

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.006

· 专家论坛(专题) ·

CD19-CAR-T 细胞治疗技术的产业化前景

张波桢¹, 杨林² (1. 苏州肿瘤免疫诊疗及纳米医药工程技术研究中心, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州大学 唐仲英血液学研究中心 血液学协同创新中心, 江苏 苏州 215123)

[摘要] 嵌合抗原受体基因修饰 T (chimeric antigen receptor gene-modified T, CAR-T) 细胞治疗技术自从 2010 年以来在临床上不断取得突破, 特别是靶向 CD19 分子在针对难治、复发的 B 细胞来源的血液肿瘤(急、慢性淋巴细胞白血病, 非霍奇金淋巴瘤)的治疗上, 获得了传统疗法无法达到的临床疗效, 成为当下肿瘤免疫治疗中最为引人关注的领域。不过 CAR-T 细胞技术治疗中不断出现的高复发率、毒副作用及 CAR-T 细胞高昂的制备成本都为这一技术的产业化前景带来了不确定性。本文总结了目前国际上 CAR-T 细胞治疗技术领军企业的发展现状, 就该技术产业化发展面临的挑战进行了深入分析, 并展望该产业的发展趋势和产业化前景。

[关键词] 肿瘤; CD19; 嵌合抗原受体基因修饰 T 细胞; 细胞治疗; 产业化

[中图分类号] R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)01-0022-08

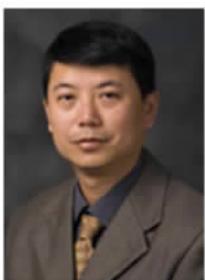
Industrialization prospect of CD19-CAR-T cell therapy technology

ZHANG Bozhen¹, YANG Lin² (1. Suzhou Research Center of Immunologic Diagnosis and Treatment of Tumor and Nano Pharmaceutic Engineering Technology, Suzhou 215123, Jiangsu, China; 2. Collaborative Innovation Center for Hematology, Cyrus Tang Hematology Center, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China)

[Abstract] The chimeric antigen receptor gene-modified T cells (CAR-T) technique has constantly made breakthroughs in clinical practice since 2010, especially in the treatment of refractory, relapsed B cell-derived hematologic malignancies (such as acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, non-Hodgkin's lymphoma), targeting CD19 molecule of the CAR-T has obtained clinical efficacy which has never been achieved by traditional tumor therapy strategies, and become the most attractive area of the moment in cancer immunotherapy. However, high recurrence rate, toxic side effects and expensive preparation costs of CAR-T, which appeared constantly in the CAR-T cell therapy, have also brought uncertainties to the industrialization of this technique. The article summarized the current development situation of CAR-T cell therapy technique in leading enterprises of the world and thoroughly analyzed challenges to the development of this technique industrialization, as well as evaluated development trend and industrialization prospect of this technique.

[Key words] tumour; CD19; chimeric antigen receptor gene-modified T (CAR-T) cell; cell therapy; industrialization

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(1): 22-29. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.006]



杨林 杨林, 苏州大学唐仲英血液学研究中心兼职教授、博士生导师, 美国 MD 安德森癌症研究中心访问教授, 博士吉医药科技(苏州)有限公司和博士吉安科细胞技术有限公司董事长兼首席科学官。主要从事肿瘤生物学和免疫治疗领域的研究, 拥有 20 余年全球癌症研究中心研发经验, 因在癌症发

生机制研究上的重大成就, 荣获 MD 安德森癌症研究中心优秀博士后奖; 获得苏州工业园区科技领军人才、姑苏创新创业领军人才, 江苏省高层次创新创业领军人才、“六大人才高峰”创新团队等荣誉。在 *Cancer Cell*、*Cancer Res*、*Oncogene*、*EMBO J*、*JBC* 等期刊发表论文 60 余篇。

[基金项目] 血液学协同创新中心资助项目(No. XYXT2015304); 山东省重点研发计划资助项目(No. 2015GSF118108)。Project supported by the Collaborative Innovation Major Project (No. XYXT2015304), and the Major R & D Project of Shandong Province (No. 2015GSF118108)

[作者简介] 张波桢(1975 -), 男, MBA, 苏州肿瘤免疫诊疗及纳米医药工程技术研究中心副主任、博士吉医药科技(苏州)有限公司常务副总裁, 主要从事 CAR-T 技术产业化的研究, E-mail: Shirley.zhang@persongen.com

[通信作者] 杨林(YANG Lin, corresponding author), E-mail: yanglin@suda.edu.cn

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170110.1501.006.html>

2010 年以来,利用患者免疫系统来控制肿瘤细胞发展,甚至彻底清除肿瘤细胞的新一代肿瘤免疫治疗技术在临床上得到了快速发展,其中 CAR-T (chimeric antigen receptor gene-modified T) 细胞治疗技术最受关注。尤其是靶向 CD19 分子的 CAR-T 细胞治疗技术,在针对难治、复发的 B 急性淋巴细胞白血病(B-acute lymphoblastic leukemia, B-ALL)的治疗上,CR 普遍达到了 80% 以上,有些临床试验甚至高达 100%,CAR-T 技术因此被迅速推广到其他适应证和不同的靶点上。然而,作为一项高度个性化的特异性过继细胞免疫治疗技术,其产业化道路就一直没有平坦过^[1]。与传统药物不同,CAR-T 细胞作为“活的药物”,制备流程复杂、时效性要求极高、冷链运输困难、质控环节众多,更重要的是由于每份细胞的制备来源于患者本人,因此其个性化色彩浓厚,并且回输到体内的 CAR-T 细胞会以无法精确判断的速率进行增殖,这些特质使得在 2010 年以前几乎看不到大型药企对 CAR-T 领域的正式介入。此种局面直到 2011 年美国宾夕法尼亚大学 June 教授团队^[2]发表了 CD19-CAR-T 细胞技术成功缓解了难治、复发的慢性淋巴白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)患者的报道后才得以改变。2012 年 8 月,诺华公司(Novartis)正式与宾夕法尼亚大学合作,开启了国际药企巨头涉足过继细胞治疗的先河,并从此促进了大批药企和创业公司在 CAR-T 领域的合作。然而,由于除了 CD19-CAR-T 细胞临床试验取得了公认的临床疗效外,大部分针对其他靶点和适应证的 CAR-T 临床试验由于面临归巢障碍、肿瘤微环境抑制等因素,鲜有大家预期的临床应答。即使是取得了显著临床效果的 CD19-CAR-T 细胞临床试验,也面临着易复发、细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)、严重神经毒性(seri-

ous neurotoxicity, SNT)、制备成本高昂等困难^[3]。本文将 CAR-T 领域产业化前景最为明朗的 CD19-CAR-T 细胞技术为主要内容,介绍国际上最领先的代表性企业的最新临床试验进展及其产业化的进程,以及 CD19-CAR-T 细胞技术需要克服的障碍,为这一革命性新兴技术的市场化提供参考依据。

1 国际药企三巨头的 CD19-CAR-T 细胞产业化进展以及临床疗效分析

1.1 CD19-CAR-T 细胞产品临床上市进度分析

国际上在 CD19-CAR-T 细胞技术产业化方面名列前茅的是总部位于西雅图的 Juno Therapeutics (Juno)公司、总部位于洛杉矶的 Kite Pharma(Kite)公司及国际药企巨头 Novartis 公司。其中,Novartis 公司于 2012 年通过与宾夕法尼亚大学合作正式介入 CAR-T 领域。Kite 公司与美国国立癌症研究所(NCI)合作,正式开启了 CAR-T 领域的临床研究。Juno 公司成立于 2013 年。这 3 家公司都致力于成为首家 CAR-T 细胞疗法的临床上市企业,但是当 Juno 公司的 CD19-CAR-T 细胞疗法相继出现 SNT 死亡事件后,Kite 公司成为了有望在产品获得 FDA 批准上面拔得头筹的企业。Novartis 公司也在力争成为首家 CD19-CAR-T 细胞产品临床上市的企业,但由于该公司在 2016 年 9 月解散了其 CAR-T 部门,行业分析认为其 CAR-T 产业化节奏将明显放慢。但刚刚从美国结束的 2016 年美国血液学协会(American Society of Hematology, ASH)年会上传来的新闻显示,Novartis 公司仍将按计划于 2017 年向 FDA 递交生物制品批件申请,有望与 Kite 公司一道,成为首批 CD19-CAR-T 疗法上市的企业之一,详见表 1。

表 1 国际三大药企 CD19-CAR-T 细胞新药申报进度

项目名称	产品	公司	适应证	进度	临床试验 ID
ZUMA-1	KTE-C19	Kite	非霍奇金淋巴瘤	2016 年向 FDA 申报,有望 2017 年获批	NCT02348216
ELIANA	CTL019	Novartis	儿童 ALL	2017 年向 FDA 申报新药批件	NCT02435849
ROCKET	JCAR015	Juno	成人 ALL	2017 年底向 FDA 申报,有望 2018 年获批	NCT02535364
	JCAR017	Juno	非霍奇金淋巴瘤	2018 年向 FDA 申报新药批件	NCT02631044
JULIET	CTL019	Novartis	弥漫大 B 淋巴瘤	—	NCT02445248
ZUMA-3	KYE-C19	Kite	成人 ALL	—	NCT02614066

1.2 三巨头药企 CD19-CAR-T 细胞的临床疗效分析

Kite、Juno、Novartis 3 家公司的 CD19-CAR-T 细

胞技术在产业化方面各有其领先的产品。在针对弥漫大 B 淋巴瘤的治疗上,Kite 公司的 KTE-C19 目前

处于领先地位,而且 Kite 公司近日已经正式命名了这个面向非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)适应证的产品名称为 axicabtagene ciloleucel,也是全球首个正式被命名的 CAR-T 产品。在针对儿童 B-ALL 的治疗上处于领先地位的是 Novartis 公司的 CTL019。Juno 公司在 SNT 致死事件发生之前,其 JCAR015 产品一直被认为是治疗成人 B-ALL 的领先产品。

1.2.1 成人难治、复发 B-ALL 美国每年有大约 6 000 例患者被诊断为成人 ALL,其中大约 80% 的病例是 B 细胞来源的 ALL。大约 80% 的 B-ALL 患者可以被一线化疗所缓解,但仍然有 60% 的 B-ALL 会复发。复发患者即使经过二线化疗和造血干细胞移植,生存率依然很低,大部分患者会于复发后 3~6 个月死亡。第 2 次挽救化疗后,难治、复发 B-ALL 患者的 CR 仅为 5%~8%。美国市场上近期推出的临床新药 blinatumomab(CD3/CD19 BiTE, Blincyto)可以实现较高的 CR(43%),但临床响应的中位时间不超过 6 个月,大部分患者仍然会出现复发^[3]。因此,成人 B-ALL 仍然是临床上一个重要的挑战。

Juno 公司在针对成人 B-ALL 上的首期产品是 JCAR015,其技术来源于美国 Memorial Sloan Kettering Cancer Center(MSKCC),CAR 的 CD19 单链抗体(CD19 scFv)是鼠源的,采用 CD28 共刺激信号分子和逆转录病毒系统。JCAR015 的临床 I 期试验没有对患者进行预处理,入组的 45 例患者 CR 为 82%,超过 50% 患者存活超过 1 年。在临床 II 期的多中心试验中(Rocket trial),入组目标为 90 例难治、复发成人 ALL。截止 2016 年 5 月,51 例接受试验的患者 CR 为 82%,T 细胞剂量为 $2 \times 10^7/\text{kg}$ 。2016 年第 2 季度开始有 1/3 患者进行氟达拉滨(fludarabine, Flu)和环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)预处理。结果显示,与历史对照(OS 为 3 个月)相比,临床 II 期的中位数 OS 达到 13 个月;严重 CRS 为 27%,SNT 为 29%^[4]。

Juno 公司还有另外一款产品 JCAR014 也用于成人 ALL 的临床试验。JCAR014 同样是鼠源 CD19 scFv,但改用慢病毒转染体系和 4-1BB 共刺激信号分子。截止到 2016 年 5 月,入组的 36 例患者中,经过 Flu/CTX 预处理后,CR 高达 94%,但与此同时,CRS 和 SNT 均高达 39%。由于 JCAR014 采用了 4-1BB 分子,一般会被认为即使在不做预处理的前提下,疗效有可能会优于 JCAR015。但是 2014 年有 2 例患者死于 JCAR014 的 I 期临床试验,其原因来自于 CRS。其中第 1 例患者接受了高剂量($2 \times 10^7/\text{kg}$)

kg)CAR-T 细胞的回输。自从死亡事件发生后,Juno 公司已调整 JCAR014 的剂量为 $2 \times 10^6/\text{kg}$,并排除了有严重心脏衰竭、回输前 4 周内中枢系统白细胞大量浸润的患者。

Kite 公司也正在开展成人 B-ALL 的临床试验,其产品 KTE-C19 也是鼠源 CD19 scFv,采用 CD28 共刺激信号分子以及逆转录病毒体系。正在进行的 ZUMA-3 临床试验在 2016 ASH 年会上报道了 5 例患者(3 例成人、2 例儿童)的治疗结果,初步结果显示 CR 为 80%^[5]。

1.2.2 儿童难治、复发 B-ALL 在美国 ALL 患者中,大约 45% 是儿童和年轻人,其中 80% 为 B-ALL,首次治疗后 60% 的患者会复发,但生存率优于成人 ALL。

Juno 公司针对儿童 B-ALL 的主要产品是 JCAR017。JCAR017 被列为该公司的旗舰产品,也是采用鼠源 CD19 scFv 序列、慢病毒转染体系和 4-1BB 共刺激信号分子,但是回输的细胞是 50%:50% 的 CD4⁺ 和 CD8⁺ CAR-T 细胞。在 2016 ASH 年会上,JCAR017 临床试验项目的负责人 Gardner 等^[6]报告,患者经历了微小疾病残留(minimal residual disease, MRD)的 CR 为 93%(40/43);在接受 Flu/CTX 预处理的 14 例患者的 CR 高达 100%,而严重 CRS 的发生率为 23%(10/43)。

Kite 公司的 KTE-C19 也在进行儿童 B-ALL 的临床试验(1/2 ZUMA-4),但由于进入这个领域较晚,所以临床数据还不多。如前所述,从 2016 ASH 年会的报道看,有 5 例患者(3 例成人、2 例儿童)接受了临床试验,CR 为 80%(4/5)^[5]。

Norartis 公司的 CTL019 一直是这个领域的领头产品,它采用鼠源 CD19 scFv、4-1BB 共刺激信号分子和慢病毒体系。2016 年 ASH 会议上发布的 CR 高达 93%,但是 36.4% 的患者于 CR 后的 3~6 个月复发^[7]。在 2016 ASH 会议上,Novartis 公司报告了 29 例可评估患者的多中心临床试验结果,CR 达到了 83%(24/29)^[8]。考虑到多中心试验通常会出现疗效下降的现象,这一结果值得鼓励。目前,Novartis 公司似乎将研发重心转向了全人源化 CD19 scFv 的 CTL119 产品,从 2016 ASH 年会现场发回的报道看,CR 高达 87%(26/30),其中 11 例患者是之前接受过鼠源 CD19-CAR-T 细胞的治疗而复发的患者,接受 CTL119 治疗后,7 例患者在回输 1 个月后 CR 达到 100%,另外 4 例没有应答^[9]。

1.2.3 难治、复发 NHL 在美国每年大约有 7 万 NHL 新增患者,其中 85% 是 B 细胞来源的 B-NHL,

包括 40% 弥漫大 B 淋巴瘤 (DLBCL), 在现有治疗条件下 DLBCL 的中位数 OS 仅为 6 个月 (没有进行自体造血干细胞移植) 或者 12 个月 (进行了自体造血干细胞移植)。因此, NHL, 特别是 DLBCL 是临床上一个亟待解决的挑战。

Kite 公司的 KTE-C19 在 B-NHL 临床试验 (ZUMA-1) 方面一直处于领先地位, 并已正式宣布将寻求 2017 年获得 FDA 批准上市。安德森癌症研究中心 ZUMA-1 临床 I 期试验显示, 低剂量 Flu/CTX 预处理后, CR 为 57% (4/7), 其中 3 例患者 CR 持续 9 个月, ORR 为 71%。在晚期 DLBCL 治疗上面, CR 达到 42%^[10]。在最新的由 Locke 博士^[11] 主持的临床 II 期多中心试验中, 原发性纵隔 B 细胞淋巴瘤 (primary mediastinal B-cell lymphoma, PM-BCL) 和转化滤泡淋巴瘤 (transformed follicular lymphoma, TFL) 的 6 例患者 ORR 为 100%, 并处于持续改善中。

Juno 公司的 JCAR014 已经获得了令人鼓舞的临床数据。有研究^[4] 显示, 经过 Flu/CTX 预处理后, 患者 CR 达到 50%、ORR 达 72%。值得注意的是, 只进行 Cy 预处理的患者中, CR 为 8%、ORR 为 50%。进一步的分析显示, 接受最大剂量 Flu/CTX 预处理和中位数剂量 JCAR014 的患者中, CR 和 ORR 分别提高到 64% 和 82%, SCRS 为 13%、SNT 为 28%, 其数据实际上是优于 Kite 公司的 KTE-C19。另外, JCAR014 联合 Medimmune 的抗 PD-L1 (durvalumab) 的临床 I b 期试验也正在用于成人难治、复发 B-NHL。Juno 公司的 JCAR017 预计也将与免疫检验点抑制剂进行联合治疗试验。另外, 单独 JCAR017 针对 NHL 的多中心临床 I 期试验正在进行之中, 预计 2018 年提交 FDA 审批。

Novartis 公司的 CTL019 也进行了针对 NHL 的临床试验。患者经过 Flu/CTX 预处理, 所有晚期 B-NHL 的 CR 为 52%, 晚期 DLBCL 的 CR 为 40%。CR 14 个月后仍未见复发, 数据优于 KTE-C19^[12]。

1.2.4 难治、复发 CLL 与中国有所不同, 美国 CLL 是最常见的白血病类型, 每年新增 2.1 万病例, 常见于老年患者。大约 15% ~ 20% 的患者属于高危型 (CD38⁺、ZAP70 或者其他细胞遗传学异常), 在目前标准治疗下, 复发、难治 CLL 患者的中位生存期低于 12 个月。

Juno 公司将 JCAR014 作为 CLL 的三线治疗方案来开发的, 截止到 2016 年 5 月, Flu/Cy 预处理患者的 CR 为 45%、ORR 为 91%。所有患者回输前均接受了依鲁替尼 (ibrutinib) 治疗, 其中 77% 的患者

有 del(17p) 染色体异常, SCRS 和 SNT 发生率均为 27%, 18 个月后仍然处于完全缓解状态。而作为一线治疗的依鲁替尼, CR 只有 4.4%, 疗效明显比 JCAR014 差, 预后比 JCAR017 会更差^[5]。Kite 公司也计划将 KTE-C19 用于 CLL, 但目前仍处于 pre-IND 阶段。Novartis 公司的 CTL019 在完成的临床试验中 CR 为 29%, 完全缓解持续时间 21 ~ 53 个月, ORR 为 57%^[13]。

2 CD19-CAR-T 面临的技术困难与解决方案

虽然 CD19-CAR-T 在临床上获得了良好的疗效, 但也暴露出在 CAR-T 细胞持久性较差、抗原逃逸导致肿瘤复发及安全性隐患等。

2.1 CAR-T 细胞的体内持久性问题

几乎所有的 CAR-T 项目都面临一个严峻的考验, 那就是如何确保回输后的 CAR-T 细胞在患者体内有足够的持续存活时间, 而存活时间的长短已被证明与疗效密切相关。有临床试验^[12] 显示, 即使是 CR 高达 90% 以上的 B-ALL 患者, 多数在治疗后的 1 年内仍会复发。对于 NHL 患者, CAR-T 细胞治疗后的复发也是一个常见现象。Novartis 公司的 CTL019 临床试验^[8] 发现有 PR 患者在 6 ~ 12 个月内又出现进展。Kite 公司于 2015 年 ASH 会议上报道^[14] 了 7 例 NHL 患者的 KTE-C19 Zuma-1 临床试验, 其中 1 例患者完全缓解 3 个月后复发。持久性问题的解决在技术上主要依靠 CAR 结构的改良、单链抗体序列的人源化以及回输的 CAR-T 细胞组成的优化等。

2.1.1 CAR 结构的改良 改善 CAR-T 细胞体内存活时间, 选择合适的共刺激信号分子是通常首选的改良措施, 但共刺激信号分子对改善 CAR-T 细胞体内存活的作用仍然有待确证。目前在 CAR 结构中常用的共刺激信号分子是 CD28 和 4-1BB, 其中 CD28 被认为对活化 T 细胞更有影响力, 而 4-1BB 则与体内存活时间延长有相关性。但由于大部分商业化公司已经在最初启动项目的时候确定了用哪一种共刺激信号分子, 所以要想改变 CAR 的结构对于很多已经在开展临床试验的项目来讲是不易进行的, 也导致无法得到临床试验层面上的验证。有研究者^[8] 正在测试其他共刺激信号分子, 如 ICOS^[15]、CD40^[16]、MyD88^[16] 等, 但这些共刺激信号分子对改善 CAR-T 细胞体内存活时间的效果还不清楚, 且在临床上验证较困难。

在转染方法上也存在一些改进的可能性。例如: 目前流行的转染方法包括逆转录病毒、慢病毒、

电转法3种。有研究^[17]显示,逆转录病毒可能存在导致基因表达沉默的风险,而慢病毒与良好的体内生存性更相关。不过专家们更倾向于以4-1BB替换CD28分子,比慢病毒替换逆转录病毒可能更具临床意义。电转方法也有一些研究团队在尝试,例如安德森癌症研究中心的睡美人系统、宾夕法尼亚大学开发的mRNACAR电转技术等。但有一些观点认为电转可能导致T细胞耗竭。

2.1.2 scFv人源化改造 有研究^[18]认为,鼠源的CD19单链抗体是导致不良体内生存的因素之一,因此不少研究者都在努力进行人源化甚至全人化ScFv的尝试。Kite公司最近与NCI签署了新的合作协议,将引进其已启动了临床试验(NCT02659943)的全人化CD19-CAR-T^[19]。Juno公司也在积极布局,其全人化CD19-CAR-T产品(JCAR021)的临床前研究已经接近尾声^[17]。在CAR-T领域投入很大的Novartis公司,人源化的CD19-CAR-T产品(CTL119)已经获得了初步的、可喜的临床数据^[9]。

2.1.3 用特定表型CAR-T细胞进行回输 作为CAR-T疗效改善的措施之一,Juno公司的JCAR017产品正在尝试用特定比例CD4⁺和CD8⁺CAR-T细胞进行回输。其理论依据是B-ALL患者中,CD4⁺和CD8⁺T细胞数量偏低,而且CD4⁺/CD8⁺T细胞比例高度可变(0.27~8.89),这就导致制备好并最后回输的CAR-T细胞组成因患者不同而有显著差异,其中会有部分患者出现体内存活能力不高,并且不同患者之间疗效评估标准没法制定^[4]。当JCAR017按照CD4⁺/CD8⁺为1:1的比例进行回输后,在使用Flu和CTX预处理的前提下,对晚期DLBCL的患者获得了CR高达73%,包括1例继发性中枢神经系统淋巴瘤患者,且毒性可控^[22]。

2.2 抗原丢失导致的复发问题

与CAR-T细胞体内存活时间不够长相呼应的是抗原丢失产生免疫逃逸,从而导致复发。以CTL019治疗儿童B-ALL为例,Novartis公司在2015年的ASH会议上报道^[21]了CR达93%,但20例CR患者1个月后陆续出现了复发,复发率为36.4%,其中6例(30%)是由于CAR-T细胞体内存活时间不够长(3~6个月)造成的,其余患者(70%)是由于CD19抗原表位的丢失导致。

对于CD19抗原丢失导致的复发问题,目前主流的解决方案是用CD22靶点进行替代。例如:Juno公司的JCAR018(NCI02315612)、Novartis公司的CART22(NCT02588456、NCT02650414)。但是,

CD22作为替换靶点并不能从根本上解决逃逸,因为CD22也会面临CD19类似的抗原丢失问题^[22]。所以,现在临床上有一种趋势就是将CAR-T细胞作为骨髓移植前的桥接治疗手段,或者骨髓移植后复发患者的挽救性治疗方案。

2.3 安全性问题

自CD19-CAR-T细胞应用于临床试验以来,不断传出严重不良事件,甚至有治疗相关死亡的报道。其中最为受到关注的不良事件是CRS,也称作淋巴瘤因子风暴(cytokine storm);另一个越来越受到重视的不良事件是SNT。这两种不良事件均有导致受试患者死亡的报道。

2.3.1 CRS诱因及预防 CRS的安全性一直CAR-T技术中备受诟病的话题。在临床试验中,CD19-CAR-T治疗导致的不良事件已成为常态,其中特别严重的是CRS。虽然CRS是获得疗效所必须的前提,但是如何管控CRS,减少因CRS的致死率是十分紧迫的任务。从报道^[23]的CD19-CAR-T临床试验看,发生3级以上严重CRS的比例在27%~43%是最为常见的。针对CRS的不同发生级别,临床上逐渐形成了相应的缓解措施,不过最佳的方案应该是进行预处理,包括CAR-T细胞给药剂量采取爬坡的方式,以及对医护人员如何预防或者治疗CRS进行培训。NCI提出了CRS的干预目的是避免4级CRS的产生,并制定了具体的干预方案^[24]。

2.3.2 SNT诱因及预防 另一类引起广泛关注的不良事件是CD19-CAR-T治疗中出现的严重SNT。2016年上半年,Juno公司的JCAR015的ROCKET Trial临床试验中,有4例患者死于脑水肿,因此被FDA紧急叫停。Juno公司分析后认为,致死原因在于患者在回输细胞前的预处理方案中加入了高剂量的Flu。这个高剂量的Flu/CTX预处理方案为30~60 mg/kg的CTX、25~30 mg/m³的Flu处理3 d。有报道^[25-26]显示,不同来源的Flu的确会引起严重SNT,其发生率为14%~40%,与Flu联合使用后其他的导致SNT的危险因素还包括:CTX、中枢神经系统疾病、高血压、肾功能衰竭、高剂量CAR-T细胞。另一种观点^[27]认为,采用CD28共刺激信号分子的CAR会具有更强的促进T细胞增殖和更快的导致T细胞耗竭的能力,而且与Flu/CTX会起到协同增强作用,促进脑水肿的发生。

虽然Flu/CTX预处理有导致不良事件的可能性,但在Juno公司的临床试验^[4]中已经被证实该联合预处理可以增加CR。例如JACR014治疗难治、复发NHL的CR从8%提高到64%,尽管SCRS也

从 0(没有 Flu/CTX 预处理)提高到了 9%、SNT 从 17% 提高到 33%,不过在降低 CAR-T 剂量后,SNT 也下降到 18%。之所以预处理会增加缓解率,其原因在于 Flu 清除患者的 CD8⁺T 细胞后,可以减少患者对 CAR-T 细胞的免疫反应。同时,Flu 还能清除患者 CD4⁺T 细胞,从而帮助 CAR-T 细胞在患者体内的生存。在 NHL 患者体内,Flu 还有助于 CAR-T 细胞归巢到淋巴结。有临床研究^[28]显示,核苷转运抑制剂(NBMPR-P、NBTGR-P)可以保护 Flu 引起的 SNT,因此预处理前进行核苷转运抑制剂的使用应该是一个可行的预防措施。

不过就在 FDA 接受了 Juno 公司将神经毒性发生的罪魁祸首解释为使用 Flu 之后 4 个月,2016 年 11 月 22 日被迫再次叫停 JCAR015 的 ROCKET II 期临床试验,因为 2 例入组不久的 B-ALL 患者因为治疗后出现脑水肿导致死亡,新的死亡事件对其“Flu 解释说”是一个否定,因为这次的临床试验显然没有采用 Flu 预处理。Kite 公司在 2016 年 ASH 会议也报道了 2 例类似 Juno 公司的死亡事件。CD19-CAR-T 的严重不良事件,是产业化道路上不能绕开的障碍。因此,三大药企公司在质控、制备、临床入组标准和治疗过程中的监管措施都需要不断的优化和完善。

3 CD19-CAR-T 细胞工业化生产面临的挑战

除克服技术上存在的问题,CD19-CAR-T 较为复杂的制备流程与高昂的制备成本成为了产业化方面最大的障碍。不过在随着制备流程的日趋成熟,原本被认为制作流程上的复杂性和高昂成本正处在不断改善之中。

首家采用过继性细胞治疗的 Dendreon 公司开发的针对前列腺癌的 DC 产品 Provenge,于 2010 年被 FDA 正式批准上市,成为了过继性细胞治疗技术的里程碑事件。但遗憾的是,短短 5 年时间,Dendreon 公司就走向了破产的结局,于 2015 年 2 月 23 日被加拿大拉瓦尔的 Valeant 公司将产品 Provenge 买断。公司创始人 Engleman 在谈及公司的失败时,认为最初的一些决策可能是错的,比如没有开发可冷冻的免疫细胞,这使得产品工序更复杂、成本更高;另一方面,其最初动物实验的适应证是淋巴瘤,前期实验数据也很有说服力,但临床试验阶段,由于考虑到前列腺癌的市场需求更大,而且如果输入的免疫细胞即使攻击了正常的前列腺组织,人不会发生死亡,因此就选择了前列腺癌作为产品的首个适应证。纵观 Dendreon 公司的发展历程,可以发现其

失败的最根本原因在于:(1)疗效有限:虽然 Provenge 确实能延长晚期前列腺癌患者的寿命,但平均值仅仅 4 个月;(2)Provenge 是一款个性化产品,需要在不同的医院采集患者血样,然后运送至公司 GMP 车间制作成 DC 疫苗,制作流程复杂,而且不是以冷冻产品方式来进行产品的冷链运输,导致 QA/QC 要求十分严格和繁琐,最终产品售价高昂,与其他较低价格的产品形成不了竞争优势,再加上疗效的局限性,最终逐渐失利。

CAR-T 产品是技术上比 Provenge 更为复杂的新产品,因此 CAR-T 的产业化面临很大的质疑和挑战。曾有强烈的反对声音认为连技术更为简单的 Provenge 都失败了,有什么理由可以乐观的认为 CAR-T 产品就一定能够产业化成功呢。但实际上,随着技术工艺的改进,CAR-T 生产过程比 Provenge 的更简化、成本更低。而且 CAR-T 细胞可以冷冻方式储存,因此产品质量的 QA/QC、冷链物流也变得没有那么复杂了。

不过 CD19-CAR-T 产品的定价是一个潜在的风险因素。根据现在多家 CAR-T 研究公司试探市场反应而提出的价格,预计首个上市的产品价格将会高达 50 万美元左右,这也是多家公司(如 Kite 公司和 Juno 公司都在争夺第一个产品上市的原因,这样可以有很大的定价优势)。Juno 公司的旗舰产品 JCAR017 将是一款特定表型比例 T 细胞的 CAR-T 产品(CD4⁺:CD8⁺ = 50%:50%),因此产品制备涉及更多的流程和复杂性。例如:大多数产品只需要 Clinimacs 分选 1 次,JCAR017 将需要分选 3 次,且每次分选通常耗费 4 000~7 000 美元。不过很多公司和学术机构都在努力减化制备的复杂程序和分选成本,最近 Juno 公司就收购了德国的 Stage Cell Therapeutics 公司,利用其自动化细胞选择技术来降低分选的成本。

另外一种与病毒转染技术完全不一样的技术体系,如 mRNA 电转技术也受到了极大关注。绝大多数 CAR-T 技术都是使用病毒转染如慢病毒或 γ -逆转录病毒。mRNA 电穿孔技术则是基于瞬态 CAR 表达的概念,即电场用于制造细胞膜暂时呈现可渗透性,允许 mRNA 编码的 CAR 进入细胞质。Maxcyte 公司所开发的 mRNA 电转技术的一个优点是电穿孔效率比病毒转染更高,可获得大约 80% 的 T 细胞转染效率,而病毒转染的效率大多在 50% 以下。由于转染效率高,理论上不需要再在体外进行扩增就能够获得足够的可供回输的 CAR-T 细胞,因此 Maxcyte 公司将使制备时间短至 1 d,从而取得巨大

的成本优势。不管怎么说, 如果以高昂的 50 万美元作为 CD19-CAR-T 产品的销售价格, 那么当复发率居高不下的问题得不到真正解决的时候, CD19-CAR-T 产品将有可能沦为骨髓移植前的桥接治疗手段, 那么如此昂贵的收费就有可能失去政府以及临床单位的支持。所以, 降低制备成本是 CAR-T 技术产业化中必须解决的问题。

在 2016 年 ASH 会议上, Grupp 团队^[8]提交了 CTL019 Eliana 临床试验的中期数据显示, CTL019 是真正的第一个全球化 CAR-T 产品, 它运送至北美、欧洲和亚太地区的 25 家医院。CTL019 是 Novartis 公司位于新泽西州 Morris Plains 制造工厂生产的, 并运往各个国际地点, 在物流和患者管理方面 Novartis 公司都进行了所在地的特定培训。不过在多中心临床试验中, 无论是 Novartis 公司的 Eliana, 还是 Kite 公司的 ZUMA-1, 都出现与单中心相比 CR 下降的问题, 而 Grupp 团队在这个最新的多中心临床数据中获得了 CR 为 82%^[8], 结果令人鼓舞。

4 结 语

虽然 CAR-T 技术的临床应用还依然处在较早的阶段, 但是在这一领域的基础和转化研究均在蓬勃发展。从 20 世纪 80 年代开始的 CAR-T 研发, 已经将 CAR 从第一代技术发展了当今的第四代技术^[29-30], 临床上也首次实现了将难治-复发 B-ALL 的 CR 提高到 90% 以上^[23], 其中包括我国学者童春容团队^[31]的国际最低剂量 ($1 \times 10^5/\text{kg}$) CD19-CAR-T 细胞治疗 B-ALL 所展现的优越疗效、安全性及低成本。值得一提的里程碑事件是 2012 年 Novartis 公司与宾夕法尼亚大学的合作, 促成了产业巨头的卷入和新兴 CAR-T 公司的涌现; 另一个里程碑事件是宾夕法尼亚大学 June 教授治愈了 CAR-T 世界的小天使 Whitehead^[32]。在这些事件的推动下, CAR-T 迎来了较好的发展前景。当然, CAR-T 后面的路还很长, 包括毒性的解决、制备的简化、成本的降低及技术的改良等, 特别是工业化生产流程和质量管理体系的建立。与此同时, CAR-T 在实体肿瘤以及其他类型的血液肿瘤(急性髓系白血病、多发性骨髓瘤等)上还有许多困难要克服, 例如靶点的筛选、肿瘤微环境的打破、归巢障碍等。但即使存在上述诸多困难, CAR-T 前进的步伐已经不可能停下, 在肿瘤患者这一巨大刚性需求面前, 代表着新一代肿瘤免疫治疗方向的 CAR-T 技术只会越来越成熟并最终走向成功。特别是 2017 年将很可能面世首款 CAR-T 细胞产品, 无疑将成为 CAR-T 技术的发展中

最重大的里程碑事件。

[参 考 文 献]

- [1] KUWANA Y, ASAKURA Y, UTSUNOMIYA N, et al. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 149(3): 960-968. DOI:10.1016/0006-291x(87)90502-x.
- [2] PORTER D L, LEVINE B L, KALOS M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 725-733. DOI:10.1056/NEJMoa1103849.
- [3] DIAS A, KENDERIAN S J, WESTIN G F, et al. Novel therapeutic strategies in acute lymphoblastic leukemia [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2016, 11(4): 253-264. DOI:10.1007/s11899-016-0326-1.
- [4] TURTLE C J, HANAFI L A, BERGER C, et al. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8⁺ and CD4⁺ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(355): 355ra116. DOI:10.1126/scitranslmed.aaf8621.
- [5] SHAH B, HUYNH V, SENDER L S, et al. High rates of minimal residual disease-negative complete responses in adult and pediatric patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (R/R ALL) treated with KTE-C19 preliminary results of the ZUMA-3 and ZUMA-4 trials [J/OL]. *Blood*, 2016, 128: 2803 [2016-12-05]. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/2803>.
- [6] GARDNER R, FINNEY O, SMITHERS H, et al. CD19-CAR-T cell products of defined CD4:CD8 composition and transgene expression show prolonged persistence and durable MRD-negative remission in pediatric and Young Adult B-Cell ALL [J/OL]. *Blood*, 2016, 128: 219 [2016-12-05]. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/219>.
- [7] MAUDE S L, TEACHEY D T, RET S, et al. Sustained remissions with CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells in children with relapsed/refractory ALL [J/OL]. *J Clin Oncol*, 2016, 34:(Suppl; abstr 3011) [2016-12-05]. http://jco.ascopubs.org/cgi/content/abstract/34/15_suppl/3011.
- [8] GRUPP S A, LAETSCH T W, BUECHNER J, et al. Analysis of a global registration trial of the efficacy and safety of CTL019 in pediatric and young adults with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL) [J/OL]. *Blood*, 2016, 128: 221 [2016-12-05]. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/221>.
- [9] MAUDE S L, BARRETT D M, RHEINGOLD S R, et al. Efficacy of humanized CD19-targeted chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells in children and young adults with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia [J/OL]. *Blood*, 2016, 128: 217 [2016-12-05]. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/217>.
- [10] NEELAPU S S, LOCKE F L, BARTLETT N L, et al. Ongoing complete remissions (CR) in the phase I of ZUMA-1: a phase 1-2 multicenter study evaluating the safety and efficacy of KTE-C19 (anti-CD19 CAR T cells) in subjects with refractory aggressive B-

- cell Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) [J/OL]. J Clin Oncol, 2016,34(Suppl; abstr 7559) [2016-12-05]. http://jco.ascopubs.org/cgi/content/abstract/34/15_suppl/7559.
- [11] NEELAPU S S, LOCKE F L, BARTLETT N L, et al. A phase 2 multicenter trial of KTE-C19 (anti-CD19 CAR T Cells) in patients with chemorefractory primary mediastinal B-cell lymphoma (PM-BCL) and transformed follicular lymphoma (TFL): interim results from ZUMA-1 [J/OL]. Blood, 2016, 128: 998 [2016-12-05]. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/998>.
- [12] SCHUSTER S J, SVOBODA J, NASTAET S D, et al. Treatment with chimeric antigen receptor modified T cells directed against CD19 (CTL019) results in durable remissions in patients with relapsed or refractory diffuse large B cell lymphomas of germinal center and non-germinal center origin, “double hit” diffuse large B cell lymphomas, and transformed follicular to diffuse large B cell lymphomas [J/OL]. Blood, 2016, 128: 3026 [2016-12-05]. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/3026>.
- [13] PORTER D L, FREY N V, MELENHORST J J, et al. Randomized, phase II dose optimization study of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells directed against CD19 in patients (pts) with relapsed, refractory (R/R) CLL [J/OL]. J Clin Oncol, 2016,34(Suppl; abstr 3009) [2016-12-05]. http://www.bloodjournal.org/content/122/21/873.meeting_abstract.
- [14] LOCKE F L, NEELAPU S S, BARTLETT N L, et al. Phase 1 clinical results of the ZUMA-1 (KTE-C19-101) study: a phase 1-2 multi-center study evaluating the safety and efficacy of anti-CD19 CAR T cells (KTE-C19) in subjects with refractory aggressive non-hodgkin lymphoma (NHL) [J/OL]. Blood, 2015, 126: 3991 [2016-12-05]. <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/3991>.
- [15] GUEDAN S, CHEN X, MADAR A, et al. ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells [J]. Blood, 2014,124(7):1070-1080. DOI:10.1182/blood-2013-10-535245.
- [16] FOSTER A E, CRISOSTOMO J, CHANGET P, et al. Efficacy and safety of Her2-targeted chimeric antigen receptor (CAR) T cells using MyD88/CD40 costimulation and iCaspase-9 suicide switch [J/OL]. J Clin Oncol, 2016, 34: 3050 [2016-12-05]. http://jco.ascopubs.org/cgi/content/abstract/34/15_suppl/3050.
- [17] SINN P L, SAUTER S L, MCCRAY P B J R. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors-design, biosafety, and production [J]. Gene Therapy, 2005,12(14):1089-1098. DOI: 10.1038/sj.gt.3302570.
- [18] JOHNSON L A, SCHOLLER J, OHKURI T, et al. Rational development and characterization of humanized anti-EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma [J]. Sci Transl Med, 2015, 7(275): 275ra22. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa4963.
- [19] BRUDNO J N, SHI V, STRONCEK D, et al. T cells expressing a novel fully-human anti-CD19 chimeric antigen receptor induce remissions of advanced lymphoma in a first-in-humans clinical trial [J/OL]. Blood, 2016, 128: 999 [2016-12-05]. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/999?sso-checked=true>.
- [20] ABRAMSON J S, PALOMBA L, GORDON L I, et al. Transcend NHL 001: immunotherapy with the CD19-directed CAR T-cell product JCAR017 results in high complete response rates in relapsed or refractory B-cell non-hodgkin lymphoma [J/OL]. Blood, 2016, 128: 4192 [2016-12-05]. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/4192?sso-checked=true>.
- [21] GRUPP S A, MAUDE S L, SHAW P A, et al. Durable remissions in children with relapsed/refractory ALL treated with T cells engineered with a CD19-targeted chimeric antigen receptor (CTL019) [J/OL]. Blood, 2015, 126: 681 [2016-12-05]. <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/681>.
- [22] SHAH N N, STETLER-STEVENSON M, YUAN C M, et al. Minimal residual disease negative complete remissions following anti-CD22 chimeric antigen receptor (CAR) in children and young adults with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL) [J/OL]. Blood, 2016, 128: 650 [2016-12-05]. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/650?sso-checked=true>.
- [23] PARK J H, GEYER M B, BRENTJENSEN R J. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date [J]. Blood, 2016,127(26): 3312-20. DOI: 10.1182/blood-2016-02-629063.
- [24] LEE D W, GARDNER R, PORTER D L, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome [J]. Blood, 2014, 124(2):188-195. DOI: 10.1182/blood-2014-05-552729.
- [25] HELTON K J, PATAY Z, TRIPLETT B M, et al. Fludarabine-induced severe necrotizing leukoencephalopathy in pediatric hematopoietic cell transplantation [J]. Bone Marrow Transpl, 2013, 48(5):729-731. DOI: 10.1038/bmt.2012.196.
- [26] LEE M S, MCKINNEY A M, BRACE J R, et al. Clinical and imaging features of fludarabine neurotoxicity [J]. J Neuroophthalmol, 2010, 30(1): 37-41. DOI: 10.1097/WNO.0b013e3181ce8087.
- [27] de FRANCESCO L. Juno’s wild ride [J]. Nat Biotechnol, 2016, 34(8):793-801. DOI: 10.1038/nbt0816-793.
- [28] ADJEI A A, DAGNINO L, WONG M M, et al. , Protection against fludarabine neurotoxicity in leukemic mice by the nucleoside transport inhibitor nitrobenzylthioinosine [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1992, 311(1): 71-75.
- [29] HOLZINGER A, BARDEN M, ABKEN H. The growing world of CAR T cell trials: a systematic review [J]. Cancer Immunol, 2016, 65(12): 1433-1450. DOI: 10.1007/s00262-016-1895-5.
- [30] RUELLA M, JUNE C H. Chimeric antigen receptor T cells for B cell neoplasms: choose the right CAR for you [J]. Curr Hematol Malig Rep, 2016, 11(5): 368-384. DOI: 10.1007/s11899-016-0336-z.
- [31] DENG B, CHANG A H, YANG J, et al. Safety and efficacy of low dose CD19 targeted chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell immunotherapy in 47 cases with relapsed refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) [J/OL]. Blood, 2016, 128: 649 [2016-12-05]. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/649?sso-checked=true>.
- [32] GRUPP S A, KALOS M, BARRETT D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia [J]. N Engl J Med, 2013, 368(16): 1509-1518. DOI: 10.1056/NEJMoa1215134.
- [收稿日期] 2016 - 11 - 20 [修回日期] 2016 - 12 - 11
[本文编辑] 王映红