

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.12.002

· 专家论坛 ·

CAR-T细胞产品中病毒载体生产的研发进展和审评考虑

徐隆昌, 韦薇, 罗建辉(国家药品监督管理局 药品审评中心, 北京 100022)

[摘要] 嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T, CAR-T)细胞疗法因在血液肿瘤中的突出疗效已成为肿瘤细胞免疫治疗领域中新研发热点。作为CAR-T细胞生产关键原材料的病毒载体,在CAR基因结构设计、生产工艺的精细化、质量控制和标准的设定等方面与CAR-T细胞产品的安全性、有效性和质量的可控性密切相关。本文根据慢病毒和 γ -逆转录病毒载体的研发进展,结合审评体会,对病毒载体研发和生产过程中需要重点关注的几个常见问题进行讨论,希望能为未来国内相关产品的研发、上市提供参考。

[关键词] CAR-T细胞;病毒载体;慢病毒;逆转录病毒;研发;审评

[中图分类号] R730.51;R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)12-1218-05

Development and evaluation considerations of viral vector production for CAR-T cell products

XU Longchang, WEI Wei, LUO Jianhui(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China)

[Abstract] Due to the spectacular therapy results in hematologic tumors, chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy has been the research hot-spot in the field of cell-immunotherapy. Viral vectors, as the critical raw material in CAR-T cell manufacturing, are closely related to the safety, efficacy and quality control of CAR-T cell products, in the aspects of the structure design of CAR gene, refinement of production process, quality control and setting of characterization and specification etc. Based on the research progress in lentiviral and γ -retroviral vectors development and the evaluation experiences, this paper discusses some common problems that need to be focused on in the preparation of viral vectors, expecting to provide references for the development and the authorization applications of domestic related products in the future.

[Key words] chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell; viral vector; lentivirus; retrovirus; research and development; review

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(12): 1218-1222. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.12.002]

嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor T, CAR-T)细胞疗法是指在体外通过基因工程技术,将特异性抗原嵌合受体CAR的编码基因转入T细胞,通过T细胞表达的CAR识别肿瘤细胞表面的靶向抗原,激活T细胞杀伤活性,进而释放穿孔素、颗粒酶、细胞因子等发挥肿瘤杀伤作用的治疗方法^[1-3]。2017年和2018年,美国和欧盟委员会相继批准了Kymriah(tisagenlecleucel, Novartis公司)和Yescarta(axicabtagene ciloleucel, Kite Pharma公司)两款CAR-T细胞治疗产品,使CAR-T细胞治疗产品成为各大生物制药企业竞相研发的热点。检索美国临床试验网站(ClinicalTrials.gov),截至2018年8月5日,全球CAR-T细胞治疗临床试验登记数已达444项,中国以183项位列第二,仅次于美国。2017年12月,原国家食品药品监督管理总局发布《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》,建立了细胞治疗产品按药品途径申报的指导原则。截至2018年6

月,国内已有23个CAR-T细胞治疗品种按药品规范申请临床试验,其中3个已获得了临床批件。CAR-T细胞的生产流程主要包括患者的外周血分离、T细胞的活化和富集、将CAR转入T细胞、CAR-T细胞的体外扩增,以及最终形成制剂。由于转导效率高、目的基因表达稳定、持续时间长,慢病毒和 γ -逆转录病毒成为目前将CAR编码基因转入T细胞过程中应用最普遍的表达载体。作为CAR-T细胞生产的关键性原材料,病毒载体的CAR的结构设计、生产工艺精细化的、质量的控制,与CAR-T细胞产品的安全、有效、质量可控密切相关。以下笔者就上述几方面,结合审

[作者简介] 徐隆昌(1986-),男,博士生,助理研究员,主要从事生物制品药理学评价的研究, E-mail: xulch@cde.org.cn

[通信作者] 韦薇(WEI Wei, corresponding author),博士,高级审评员,主要生物制品药理学评价的研究, E-mail: weiw@cde.org.cn; 罗建辉(LUO Jianhui, co-corresponding author),生物制品药学部部长,主要从事生物制品药理学评价的研究, E-mail: luojh@cde.org.cn

评体会,对CAR-T细胞治疗产品相关的病毒载体的研发和生产需要重点关注的几个常见问题进行讨论,希望能为未来国内相关产品的研发、上市提供参考思路。

1 CAR结构和功能设计的考虑

自1989年Eshhar首次提出“嵌合抗原受体”的概念以来,CAR的设计已发展至第四代^[4]。参照T细胞受体(T cell receptor)的作用模式,第一代CAR的胞内区主要由CD3 δ 组成;第二代CAR在第一代基础上增加了一个共刺激结构域;第三代CAR在第二代的基础上又增加了一个或多个共刺激机构域;第四代CAR则引入了T细胞诱导的通用型细胞因子杀伤机制。第一、第二代CAR的改良效果已在前期试验中得到证明,但第三、第四代CAR的优势仍需进一步验证。目前各类CAR-T细胞产品CAR的结构组成基本一致,但在各结构域的设计上往往存在一定的差异,当前国内外多数临床试验主要采用了第二代CAR结构。现以第二代CAR的结构为例,对各结构域的设计进行必要的对比分析。

第二代CAR主要由胞外特异性抗原识别区、铰链区、穿膜区和胞内信号转导区组成。CAR的胞外抗原识别区通常采用特异性抗体抗原结合区构成的scFv(single chain variable fragment)结构,如anti-CD19 scFv常见改造自小鼠杂交瘤细胞系FMC63来源的单克隆抗体^[5]。因此,抗体可变区的选择和单链改造过程对scFv的特异性和结合力较为重要,有必要对构建的scFv进行空间结构和功能活性的鉴定,同时与已批准上市的同靶点或同可变区品种进行对比分析,证明scFv结构设计的合理性。除了亲和力、特异性与CAR的治疗效果有关外,scFv所识别的抗原表位的空间位置也十分关键。研究^[6]显示,抗原表位与靶细胞膜的相对空间位置对T细胞杀伤活性存在影响,识别表位靠近B细胞膜表面的anti-CD22 CAR的抗肿瘤活性要优于抗原识别表位远离膜表面的anti-CD22 CAR。另外,非人源scFv的免疫原性诱发的抗CAR免疫反应对细胞疗法的存续性有一定的影响。

铰链区和穿膜区是连接胞外抗原识别区和胞内信号区的重要片段,通常选用CD4、CD28、CD8a或Fc片段等,其长度、柔韧性以及序列来源对CAR的功能活性十分重要^[6-7]。研究^[8]显示,Fc片段来源的铰链区易与Fc受体结合,激活天然免疫细胞从而产生脱靶反应;较长的铰链区有利于结合靶细胞膜附近的表位,但却不利于结合表面蛋白N端附近的表位。因此,抗原表位不同,铰链区的长度也应做适当调整,以利于抗原和受体的有效结合以及下游的信号转导^[9-10]。

共刺激结构域是T细胞活化和功能调节的关键区域,常由CD28、CD27、ICOS、4-1BB、OX40等构成^[11],

其中,CD28和4-1BB最为常见。研究^[12-16]显示,4-1BB可能有助于CD8⁺中央记忆细胞的形成和CAR-T细胞的存续性,而CD28结构域则在早期显示出较好的肿瘤杀伤活性,有利于形成效应记忆细胞,同时细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)的严重程度相对较低。但以上部分研究结果仅在小鼠模型中得到验证,并且在不同CAR中的表现也不尽相同。目前各类临床研究中,CAR的结构设计各有差异,如靶点、表位、铰链和穿膜区的选择、共刺激域的组合等,此外还可能含有为预防副作用所进行的点突变、共表达自杀基因、细胞因子敲降等改造。研发中所有设计均需要以充分的机制研究和深入的功能理解为基础,证明设计的科学性和合理性,才能达到预期的功能目的。

CAR-T细胞治疗的理想靶点应具有肿瘤特异性,但这样的靶点相对较少,大部分靶点往往在正常组织呈低表达或散在表达的状态。因此,CAR-T细胞治疗“on-target/off-tumor”毒性所引发的自身免疫反应成为CAR-T细胞疗法在除CD19靶点以外的其他肿瘤,如实体瘤中应用的重要限制因素。为了减少或避免“on-target/off-tumor”毒性,部分研究者^[8]提出了dual-signaling CAR、synthetic Notch receptor、inhibitory receptor(iCAR)、masked CAR、self-driving CAR等多种设计理念,但以上策略通常需要以单一刺激无法成功激活T细胞为前提条件。同时,还有研究^[17-19]提出,通过调节抗原识别结构域与肿瘤抗原的亲和力,以降低高亲和力CAR与正常组织低表达抗原结合的概率,但这种亲和力的调整需要进行精细的调控。因为除抗原识别序列外,表位的空间位置、抗原密度、铰链区长度、CAR的表达、信号结构域的组合等均与亲和力的调节紧密相关。此外,值得注意的是,dual-signaling CAR和tandem CAR的设计理念也可能有助于预防肿瘤抗原逃逸所引起的肿瘤复发,但这种设计一定程度上也增加了CRS和“off-tumor”发生的风险概率。

因此,当前尚无理想的最优的CAR结构组合适用于多种肿瘤。部分研究项目显示,对各种结构域进行的简单组合,往往缺少前期的设计和筛选,资料完整性存在一定的缺陷。CAR结构的设计应根据肿瘤的特点、靶点的选择、表位空间位置、功能需求,结合疾病进程和治疗的副作用,通过前期筛选和体内、外的验证,选择最佳的结构组合,才能使CAR的功能得到有效发挥。即便在前期同类研究的基础上进行改进,也应按照药品研发的规律和品种的特点,提供科学的改造依据,进行必要的验证,在确保CAR结构的改造不会对产品的安全性产生不利影响的前提下,

方能考虑进一步的临床探索和确证。

2 病毒载体生产的全程质控

T细胞的转染目前主要选用 γ -逆转录病毒或慢病毒载体,两者均改造自逆转录病毒科病毒。其中, γ -逆转录病毒的生产常选用质粒转染细胞基质、构建和筛选稳定产毒细胞株的方式,而慢病毒生产则通过质粒瞬转细胞基质产生有限次数的包装病毒。病毒载体的生产应在符合GMP规范条件下进行。参照CFDA《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》的要求,病毒载体作为CAR-T细胞生产的关键原材料直接关系到细胞产品的质量。病毒载体的生产应建立全过程的控制体系,包括原材料、生产工艺、关键点的质控、病毒载体的质量控制等,通过验证确保工艺的稳健性和批间一致性。除应满足生物制品生产的一般性技术要求外,病毒载体的生产在原材料和生产工艺的策略方面具有一定的特殊性,其在工艺开发过程中应该引起重视。

2.1 关键原材料

目前,慢病毒载体的生产主要采用第三代质粒包装系统。第二代包装系统虽然目前尚未见产生可复制性病毒的报道,但无论从重组概率和元件设计上,第三代包装系统均更为安全。 γ -逆转录病毒稳定产毒细胞株的构建常采用三质粒系统。包装质粒作为病毒载体生产的原材料,其质量和批间一致性对病毒的产量和质量影响较为直接。质粒生产应符合GMP规范,按照《中国药典》的要求建立二级或三级工程菌库,并完成相应的菌库检定。除了应符合一般重组生物制品对质粒的要求外,根据包装质粒的用途,还应关注包装系统质粒元件设计的重组安全性,质粒同质性对病毒包装效率的影响,杂质残留水平对病毒和CAR-T细胞质量的影响,以及生产中使用的内酰胺类抗生素残留水平对过敏性个体的安全风险。

慢病毒包装常选用的细胞系如HEK 293T等,可参考《中国药典》对重组生物技术产品或疫苗生产用细胞基质的要求完成细胞库的制备和检定。除一般检项外,细胞库的检定还应包括种属特异性内、外源因子的检测,对病毒生产过程中的重组安全性进行评估。 γ -逆转录病毒的生产涉及病毒瞬时包装细胞(如HEK 293T)和最终筛选得到的稳定产毒细胞株(如PG13)。由于生产体系的差异,除对包装细胞和产毒细胞基质的要求外, γ -逆转录病毒的生产还应关注稳定生产细胞系构建过程中的控制和最终稳定产毒株的检定,如生物来源的原材料的应用、基因序列的鉴定、外源因子的风险、细胞单克隆的筛选、过程中的重组风险等。另外,还应关注PG13细胞培养

和生产过程中产生GaLV类似病毒的风险。

2.2 病毒生产工艺的精细化

γ -逆转录病毒常由稳定产毒细胞株的复苏和培养得到,而由于protease、gag-pol、VSV-G等病毒蛋白的细胞毒性,慢病毒的生产通常采用瞬转的包装方式^[20]。但这种生产方式的批间变异度较大、质粒需求量大,一定程度上限制了生产规模的放大。另外,HEK 293T、PG13等细胞贴壁培养的方式也对规模放大提出了一定挑战,虽然目前已开发出转瓶、多层摇瓶、细胞工厂、中空纤维反应器、固定床生物反应器、微珠载体等多种增加表面积的培养策略,但这些培养方式的细胞密度和空间利用度仍然较低^[15]。同时,培养过程中经常添加的胎牛血清等生物原材料中易引入外源因子险,也进一步增加了纯化工艺的挑战。因此,开发化学成分限定的培养基进行悬浮培养仍属于相对理想的培养方式,既有利于规模扩大,也避免了血清等高风险生物原材料的使用,减轻了下游的纯化负担。病毒包装过程应通过工艺研究对细胞的培养条件、培养时间、转染方法、质粒用量、收获时间和次数等工艺进行优化和验证,以保证病毒产量和质量的批间一致性。

目前,病毒载体生产常用的纯化方法包括超速离心、离子交换层析、分子排阻层析、亲和层析、渗滤等。由于工作原理的差异,不同纯化方式各有利弊,如阴离子交换层析纯化效果较好,便于规模放大,但高盐洗脱液易使病毒的感染活性下降;分子排阻层析得到的病毒纯度和回收率均较高,但其通量较低、耗时较长,洗脱过程存在一定的稀释性,较适宜作为最后的精纯以去除微粒杂质;亲和层析的纯化效果相对较好,但操作复杂,经验要求高,尚不能排除杂质蛋白竞争性吸附的影响,且下游往往需要增加其他纯化单元;切向流过滤可用于病毒收获液和原液的过滤与换液,回收率较高^[15]。另外,纯化过程中添加核酸酶对残留的质粒和宿主核酸进行酶切,有助于降低致癌基因随病毒进入细胞产品的风险,也减少溶液的黏性,便于下游的纯化^[16];但同时也增加了核酸酶残留的风险,需要利弊权衡,必要时合理优化酶的用量、酶切时间和条件等,对残留的生物安全性进行评估。最后,纯化过程还应包括无菌过滤步骤提供无菌保障。因此,为了得到较高的病毒纯度和浓度,需要根据病毒的结构特点、宿主细胞的种类、培养基的成分、纯化方式的性质等,合理设计纯化路线,将一种或多种纯化单元进行优化组合,提高病毒产品的纯度,降低杂质残留的安全性风险。

由于纯化策略不同,病毒产品的杂质种类和纯度也各有差别。在去除工艺和产品相关杂质的同

时,病毒纯化应尽可能保持病毒的结构完整性、感染活性,以及目的基因的表达功能。基于QbD(quality by design)的理念和风险控制意识,应合理设计病毒的生产工艺,通过全过程的质量控制,保证病毒批间的一致性,减少杂质残留,降低CAR-T细胞生产的变异性。由于 γ -逆转录病毒的包膜蛋白对剪切力等作用较为敏感,通常不适用于常规纯化方法,一般采用滤膜过滤纯化^[21]。但由于产毒细胞株构建采用的细胞系如PG13、HEK 293等均有一定的成瘤性,因此,残留的成瘤风险细胞、细胞碎片等杂质均应通过纯化过程去除,同时还应通过减少或无血清化培养工艺降低胎牛血清等生物原材料在病毒产品中的残留量^[21]。

3 病毒载体的质量研究与质量控制

除了一般理化性质外,病毒载体的质量研究应关注感染活性、纯度、无菌、支原体、外源因子、基因序列、复制型病毒等,具体可参见《细胞治疗产品申请临床试验药学研究和申报资料的考虑要点》以及欧美先进疗法的相关指导原则。通过原材料、生产工艺、过程中的质控、工艺验证和放行检测等全过程的控制保证病毒质量的稳定性和批间一致性。

病毒的活性包括转导活性、基因组整合活性、目的基因的表达和功能,其方法学的建立涉及病毒滴度、检测细胞系的选择、细胞培养条件、检测时间、细胞数量、病毒参考品等多方面的优化。纯度方面,除了对功能性和非功能性病毒滴度及其比值进行控制以保证转导效率的一致性外,还应关注工艺相关杂质的残留水平,如宿主细胞的核酸和蛋白质、质粒DNA、培养和纯化过程相关的成分等。病毒来源基因E1A、致癌基因SV40等的残留限度也应进行严格控制。各种杂质的标准上限应根据病毒的使用目的合理设定。鉴于病毒*ex vivo*和*in vivo*应用方式的差异,其分析方法和目标质量也应区别考虑。通常,*in vivo*直接使用的方式对纯度和活力具有更高的要求。由于CAR-T细胞制品的特殊性,生产阶段通常无法进行常规纯化和过滤操作,因此,通过对病毒载体严格的质量控制,减少最终细胞制剂中杂质的残留水平尤为重要。病毒产品各种杂质的残留限度应确保能通过CAR-T细胞生产拟定的换液和洗涤工艺稳定去除或降低至人体安全剂量水平。此外,为降低基因毒性和致瘤风险,可参考FDA关于残余DNA片段大小应小于200 bp的建议^[17]。

可复制型病毒的产生是慢病毒和 γ -逆转录病毒载体生产和应用过程中最严重的风险因素,应通

过主细胞库的细胞和上清、生产终末细胞、收获液上清和病毒终产品,以及后期细胞制品等多个环节进行监测和控制,确保不存在可复制型病毒。此外, γ -逆转录病毒生产还应关注产毒细胞株构建过程产生可复制病毒的风险。病毒阶段,可复制型病毒的检测应采用基于细胞的方法,RCR/RCL标准限度的设定应综合考虑后续工艺病毒的用量和方法学的检测限度。除了改进方法学的灵敏度和检测限度以外,可考虑采用多种检测互补的方式进行检测,如P24的免疫学方法和PCR方法、VSV-G的免疫学方法和PCR方法,以及逆转录酶活性的定量分析等^[20]。此外,应选择适宜的代表性对照或参考标准品对方法学进行验证。具体可参考美国FDA最新的RCR检测方法和基因治疗指导原则^[23]。

通过整合酶和宿主细胞因子的相互作用,病毒对基因组的整合位点有一定的倾向性,如 γ -逆转录病毒倾向于整合至基因转录起始区、启动子/增强子区,而慢病毒则更倾向于整合至基因的体外显子和内含子^[20]。病毒基因组的整合可通过原癌基因的激活、抑癌基因的失活、RNA剪接、基因融合等机制引起转导细胞的插入突变^[25]。因此,除了在病毒设计阶段对病毒基因组的启动子/增强子元件、潜在的剪接位点等进行评估外,针对宿主细胞的差异,可通过对一定数量的目标转染细胞采用高通量测序等方法对病毒插入位点的倾向性进行监测,初步评估病毒插入位点的安全性,同时还应对使用CAR-T细胞产品的代表性患者进行动态跟踪监测和定期、长时间的随访,排除病毒插入引起的不良反应,具体可参考FDA患者随访相关指导原则^[24]。

4 细胞产品稳定性及其包装材料的要求

病毒载体生产过程中涉及到生产管线和包装容器的接触,应关注直接接触材料的质量标准和相容性,评估材料吸附和渗出的影响。同时,由于病毒产品保存的稳定性直接关系到转染效率和降解风险,应该对病毒保存的影响因素进行全面的评估,尤其是冻融条件对病毒滴度的影响。具体可参考生物制品稳定性研究相关指导原则,结合产品质量研究结果和放行检测项目,选择敏感性指标进行观测,总结重要影响因素和质量变化趋势,根据病毒稳定性研究结果合理确定病毒保存有效期。

5 结语

作为肿瘤的个体化精准治疗方法,CAR-T细胞的生产涉及到一系列与病毒载体构建、转导/转染密切相关的控制过程,存在不同于其他生物制品的“复杂

性和特殊性”。由于个体条件、疾病阶段、前期治疗方案的差异, T细胞作为重要起始原材料往往存在重大的个体差异性, 对CAR-T细胞生产工艺的稳定性和产品批次间一致性提出了严峻的挑战。但慢病毒和 γ -逆转录病毒作为细胞治疗关键的载体工具, 通过上游设计、原材料、生产工艺和放行检测等全过程的控制, 为最终病毒产品生产的稳定性和批次间一致性提供了基本保证, 有助于减少CAR-T细胞生产过程中转染/转导关键环节的影响因素和风险因素。

由于细胞治疗产品制备过程复杂、易变, 目前监管和研发机构对其认知仍处在不断积累的过程中。病毒载体生产在上游CAR的设计、生产规模的放大、工艺的优化和质量控制方面仍然面临许多挑战, 需要后续进一步通过机制研究、工艺优化和认识提升, 逐步提高国内CAR-T细胞生产过程中对病毒载体原材料的研发水平和风险意识, 以促进细胞治疗产品的临床转化应用。

[参考文献]

- [1] 赵玲娣, 韩露, 高全立. CAR-T细胞肿瘤治疗中若干问题的思考[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(9): 859-864. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.09.003.
- [2] 何海霞, 石华山, 陈念永. CAR-T在实体瘤治疗中的抗原选择及其相关临床研究现状[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(4): 414-420. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.04.016.
- [3] 张昂, 张斌, 陈虎. 改进CAR-T细胞有效性和安全性的设计策略[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(5): 461-466. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.001.
- [4] SMITH A J, OERTLE J, WARREN D, et al. Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for malignant cancers: summary and perspective[J]. *J Cellular Immunother*, 2016, 8(2): 59-68. DOI: 10.1016/j.jocit.2016.08.001
- [5] LEVINE B L. Performance-enhancing drugs: design and production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22(2): 79-84. DOI: 10.1038/cgt.2015.5.
- [6] DOTTI G, GOTTSCHALK S, SAVOLDO B, et al. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells[J]. *Immunol Rev*, 2014, 257(2): 107-126. DOI: 10.1111/imr.12131.
- [7] MAUS M V, GRUPP S A, PORTER D L, et al. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies[J]. *Blood*, 2014, 123(11): 2625-2635. DOI: 10.1182/blood-2013-11-492231.
- [8] HUDECEK M, LUPO-STANGHELLINI M T, KOSASIH P L, et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(13): 3153-3164. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0330.
- [9] SRIVASTAVA S, RIDDELL S R. Engineering CAR-T cells: design concepts[J]. *Trends Immunol*, 2015, 36(6): 494-502. DOI: 10.1016/j.it.2015.06.004.
- [10] ABATE-DAGA D, DAVILA M L. CAR models: next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2016, 14(3): 16014-16019. DOI: 10.1038/mto.2016.14.
- [11] FESNAK A D, JUNE C H, LEVINE B L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(8): 566-581. DOI: 10.1038/nrc.2016.97.
- [12] LI S, TAO Z, XU Y, et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells with different co-stimulators showed potent anti-leukemia efficacy and different phenotype[J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(8): 626-639. DOI: 10.1089/hum.2017.241.
- [13] KAWALEKAR O U, O' CR, FRAIETTA J A, et al. Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells[J]. *Immunity*, 2016, 44(9): 712-717. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.023.
- [14] 丁利娟, 黄河. CD19-CAR-T细胞治疗难治复发急性淋巴细胞白血病的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(1): 12-17. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.004.
- [15] HOLOHAN D R, LEE J C, BLUESTONE J A. Shifting the evolving CAR-T cell platform into higher gear[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(8): 401-402. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.09.014.
- [16] 张亦琳, 赵万红, 张王刚, 等. 托珠单抗治疗CAR-T细胞治疗难治复发多发性骨髓瘤后细胞因子释放综合征的疗效[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(9): 990-994. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.09.011.
- [17] CARUSO H G, HURTON L V, NAJJAR A, et al. Tuning sensitivity of CAR to EGFR density limits recognition of normal tissue while maintaining potent antitumor activity[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(15): 3505-3518. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0139.
- [18] HARRIS D T, KRANZ D M. Adoptive T cell therapies: a comparison of T cell receptors and chimeric antigen receptors[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2016, 37(11): 220-230. DOI: 10.1016/j.tips.2015.11.004.
- [19] LIU X, JIANG S, FANG C, et al. Affinity-tuned ErbB2 or EGFR chimeric antigen receptor T cells exhibit an increased therapeutic index against tumors in mice[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(89): 3596-3607. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0159.
- [20] MCCARRON A, DONNELLEY M, MCINTYRE C, et al. Challenges of up-scaling lentivirus production and processing[J]. *J Biotechnol*, 2016, 240(1): 23-30. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.10.016.
- [21] MERTEN O, SCHWEIZER M, CHAHAL P, et al. Manufacturing of viral vectors: downstream processing and safety aspects pharm[J]. *Bioprocess*, 2014, 2(3): 237-251. DOI: 10.4155/BPB.14.15.
- [22] FDA. FDA briefing document: vaccines and related biological products advisory committee meeting: cell lines derived from human tumors for vaccine manufacture[S]. 2012. <https://www.nvic.org/cms-templates/nvic/pdf/fda/fda-briefing-09192012.pdf>.
- [23] FDA. Testing of retroviral vector-based human gene therapy products for replication competent retrovirus during product manufacture and patient follow-up[S]. 2018. https://www.fda.gov/downloads/biologics_blood_vaccines_guidance_compliance_regulatory_information/guidances/cellularand_gene_therapy/UCM610800.pdf.
- [24] FDA. Long term follow-up after administration of human gene therapy products[S]. 2018. https://www.fda.gov/downloads/Biologics_blood_vaccines_guidance_compliance_regulatory_information/guidances/cellularand_gene_therapy/UCM610797.pdf.

[收稿日期] 2018-11-02

[修回日期] 2018-11-30

[本文编辑] 王映红