

Research Progress of CAR-T Cell Therapy Products

Yi Chen

National Key Laboratory of Neurological and Oncology Drug Research and Development, Jiangsu Simcere Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing, Jiangsu, 210000, China

Abstract

Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) therapy is one of the hot technologies in tumor immunotherapy, which is mainly used in Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) treatment of hematologic tumors represented by Acute Lymphoblastic Leukemia and some solid tumors. This revolutionary therapeutic approach features high targeting, low recurrence rate and remarkable therapeutic effect, but the rejection phenomenon is still present and serious cytokine release syndrome (sCRS) is triggered. This paper mainly analyzes CAR-T cell therapy technology from the aspects of technical principle, technical classification, process flow and clinical application, so as to provide help for the development of CAR-T immunotherapy technology in the direction of safer, more efficient and more controllable.

Keywords

CAR-T; ALL; CRS

CAR-T 细胞治疗产品研究进展

陈怡

江苏先声药业有限公司 - 神经与肿瘤药物研发全国重点实验室, 中国·江苏·南京 210000

摘要

嵌合抗原受体T细胞 (Chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) 治疗是当前肿瘤免疫治疗的热门技术之一, 主要用于急性淋巴细胞白血病 (Acute Lymphoblastic Leukemia, ALL) 为代表的血液肿瘤以及部分实体瘤的治疗。这一革命性治疗方法, 靶向性高, 复发率低, 治疗效果显著, 但是仍然存在排异现象, 并引发细胞因子释放综合症 (serious cytokine release syndrome, sCRS)。论文主要从技术原理、技术分类、工艺流程和临床应用等方面对CAR-T细胞治疗技术进行分析, 为CAR-T免疫治疗技术向着更安全、更高效、更可控的方向发展提供帮助。

关键词

CAR-T; ALL; CRS

1 引言

进入 21 世纪以来, 肿瘤的发病率快速增加, 尤其是恶性肿瘤的数量与日俱增。手术、化疗和放疗是肿瘤治疗的三种常用方法。近年来, 免疫细胞治疗技术作为一种新型肿瘤治疗技术, 展现出良好的治疗效果。CAR-T 细胞疗法的发明者是美国宾夕法尼亚大学的教授 Carl H. June, 2012 年他利用此项技术成功治愈了一位患有急性淋巴细胞白血病 (Acute Lymphoblastic Leukemia, ALL) 的儿童。2017 年 8 月, Novartis 研发的 Kymriah (CTL019) 成为全球首个批准上市的 CAR-T 细胞治疗产品, Kymriah (CTL019) 主要用于治疗 3~25 岁复发或难治性急性淋巴细胞白血病。这一革命性的治疗技术为人类与肿瘤的博弈提供了更有利的武器。

2 原理

嵌合抗原受体 T 细胞 (Chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) 是指通过基因修饰技术, 将带有特异性抗原识别结构域及 T 细胞激活信号的遗传物质转入 T 细胞, 使 T 细胞通过直接与肿瘤细胞表面的特异性抗原相结合而激活, 释放穿孔素、颗粒酶 B 等直接杀伤肿瘤细胞, 同时还通过释放细胞因子募集人体内源性免疫细胞杀伤肿瘤细胞, 从而达到治疗肿瘤的目的, 而且还可形成免疫记忆 T 细胞, 从而获得特异性的抗肿瘤长效机制^[1]。

CAR 的结构包含四个区域, 即识别肿瘤特异性抗原结合区 (Target-binding domain)、胞外铰链区 (Hinge domain)、跨膜区 (Transmembrane domain)、胞内信号区 (Signal transduction domain)。单链抗体片段 (Single chain antibody fragment, scFv) 是一种能识别肿瘤特异性抗原的特异片段, 将其进行基因编辑之后, 与一系列参与 T 细胞激活的因子通过铰链区和跨膜区融合, 接着通过慢病毒或逆

【作者简介】陈怡 (1985-), 女, 中国江苏连云港人, 硕士, 工程师、执业药师, 从事药物分析研究。

转录病毒载体将其转入从外周血中提取的 T 细胞中,即成为 CAR-T 细胞,将 CAR-T 细胞增殖后再输入患者体内,就可以达到治疗癌症的效果。

3 分类

CAR-T 细胞产品生产的一个重要环节是供体细胞的采集,这既是 CAR-T 细胞产品工艺的重要特征,也是其终产品之间一致性较差的原因。Kymriah 的供体细胞来自患者自身,体外基因编辑之后再回输入同一个患者体内,这是一种个体化 CAR-T 治疗方法,能够最大程度避免体内排异反应,增强治疗效果,这种方法称为自体型 CAR-T (Autologous CAR-T)。但是这种治疗产品费用昂贵,每一个患者条件差异大,不利于技术推广。2015 年伦敦学院大学教授 Waseem Qasim 运用 TALEN 基因编辑平台,“关闭”了可引起排异反应的基因,创造出了一种理论上可以输入到更多患者体内的通用型 CAR-T (UCAR-T, Universal Chimeric Antigen Receptor T-cells)。通用型 CAR-T 产品的费用更低,并且可以建立标准化流程,易于技术的使用和推广。自体型 CAR-T 和通用型 CAR-T 各有其独特的特点,仍然需要不断探索与研究。

CAR 与肿瘤相关抗原 (Tumor-associated antigen, TAA) 结合,活化 CAR-T 细胞,引发释放细胞因子、穿孔素等效应,因此将 CAR 进行基因编辑可以制作出新的 CAR,如含有重复修饰的嵌合活性区。1 代 CAR-T 含有 1 个胞内信号区,2 代增加了 1 个串联的共刺激胞内信号区,3 代增加了 2 个串联的共刺激胞内信号区。4 代 CAR-T 是在 3 代的基础上增加了释放细胞因子 (如 IL-2) 的基因,强化机体自身免疫系统,抗击肿瘤,这种技术又称为 TRUCK-T 细胞,目前 4 代 CAR-T 主要应用在实体瘤的临床治疗,同时还可以用于治疗病毒感染、自身免疫疾病等。

4 工艺流程

CAR-T 细胞产品的生产流程包括,首先采用白细胞分离术从供体血液中分离得到外周血单核细胞 (PBMC),然后分选出 T 细胞,用包备着磁珠的单克隆抗体活化 T 细胞,接着用病毒载体或非病毒载体将 T 细胞转入目的 CAR 中。基因编辑的 T 细胞在含有抗 CD3/CD28 单克隆抗体和细胞因子的培养基中增殖,经过规定时间的细胞培养,将培养的终产物 CAR-T 细胞分离,灌装入输液袋中。经过质量检验,并在验证过的保存条件下低温保存。最终,将 CAR-T 细胞输入患者体内,定期监测临床反应。自体型 CAR-T 的血液供体为患者,终产品回输入患者体内;通用型 CAR-T 的血液供体为健康人体,终产品输入其他患者体内。

5 临床应用

CAR-T 细胞产品针对血液疾病的治疗已经获得了广泛应用,CD19、CD22、CD33 是研究最多的靶点。郑佳

佳用 meta 法分析近二十年来 CD19 CAR-T 细胞治疗难治/复发性 B-ALL 的安全性,结果表明临床总反应率为 81%,严重细胞因子释放综合征 (serious cytokine release syndrome, sCRS) 发生率为 26%,复发率为 33%,数据证明 CD19 CAR-T 细胞治疗技术对 r/rB-ALL 有较好的临床效果,同时 CAR-T 细胞的供体来源不同、患者输入前治疗情况不同等因素差异,对于临床治疗有一定影响^[2]。Yang Fei 等采用序贯输入人源 CD19 修饰 CAR-T 细胞和 CD22 修饰 CAR-T 细胞的方法治疗曾经接受过鼠源抗 CD19CAR-T 细胞治疗后复发性 ALL 患者,经过 6 周的治疗与监测,骨髓切片和流式细胞分析结果表明均未检测出淋巴细胞^[3]。CAR-T 细胞在血液瘤中的应用已经得到广泛的临床数据支持。

CAR-T 细胞产品在实体瘤中的应用也正在得到关注,但是和血液肿瘤相比,实体瘤缺乏特异性靶点,容易受到肿瘤微环境 (Tumor microenvironment, TME) 影响,这是实体瘤治疗过程中最大的难题。徐亚如等制备了靶向人滋养层细胞表面抗原 2 (human trophoblast cell surface antigen 2, Trop-2) 的 CAR-T 细胞,在体外可以有效抑制表达 Trop-2 的卵巢癌细胞增殖^[4]。邓新娜利用非病毒载体制备了 NKG2D (natural killer group 2 member D) CAR-T 细胞,考察对人结肠癌细胞杀伤效果,体外实验证明 NKG2D CAR-T 对人结肠癌细胞的杀伤效率与效靶比呈正相关,体内实验证明 NKG2D CAR-T 能抑制肿瘤生长,并对重要脏器具有安全性^[5]。

根据已有的临床数据, CAR-T 细胞技术治疗后会出现各种不良反应,如 CRS、神经毒性、靶向和脱靶 (On-target, Off-tumor) 毒性效应等。其中 CRS 是最常见的一种不良反应,目前其发病机制仍在研究中,但是严重者会引发多个器官衰竭甚至死亡^[6]。依据不同临床症状,不同的机构对 CRS 的判断标准不同,因此产生了不同的分级标准,如 Penn 标准^[7]、Lee 标准、CTCAE4.0 标准等。为了建立 CRS 的标准化判断标准,美国血液与骨髓移植学会 (ASBMT, American Society for Blood and Marrow Transplantation) 建立了一个目前应用的共识标准,即 ASTCT CRS 分级标准^[8]。该标准以三个主要临床特征为参数:发热、低血压、缺氧,将 CRS 分为 4 个级别,见表 1。

* 发热定义为体温 $\geq 38^{\circ}\text{C}$,与其他因素不相关。对于产生 CRS 反应之后接受了抗发热或抗细胞因子治疗 (如托珠单抗或类固醇类) 的患者,在后续的 CRS 严重性分级中,不再将发热作为评价参数。在这种情况下, CRS 分级根据低血压和/或缺氧来评价。

** CRS 分级由更高级别的严重性事件决定,即低血压或缺氧,与其他因素无关。例如,一个患者体温 39.5°C ,低血压情况需要 1 种血管升压药,缺氧情况需要低流速鼻腔插管,此种情况为 3 级 CRS。

表 1 ASTCT CRS 分级 (ASTCT CRS Consensus Grading)

| CRS 参数 | 1 级 | 2 级 | 3 级 | 4 级 |
|--------|-----------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 发热* | 体温 ≥ 38°C | 体温 ≥ 38°C | 体温 ≥ 38°C | 体温 ≥ 38°C |
| | | 包含 | | |
| 低血压 | 无 | 不需要血管加压药 | 需要一种血管加压药 (含有或不含有催产素) | 需要多种血管加压药 (包含血管加压素) |
| | | 和 / 或** | | |
| 缺氧 | 无 | 需要低流速的鼻腔插管***或鼻塞 | 需要高流速的鼻腔插管、面罩、非循环呼吸面罩、文丘里面罩 | 需要正压 (如 CPAP、BiPAP、插管和机械通风) |

注：器官毒性不影响 CRS 分级。

*** 低流速鼻腔插管定义为供氧速度 ≤ 6L/min。低流速还包括鼻塞供氧，主要用于儿科。高流速鼻腔插管定义为供氧速度 > 6L/min。

张亦琳等使用托珠单抗针对 21 例接受 CAR-T 细胞治疗病人的 CRS 进行治疗，结果证明 2/3 的 2 级以上患者恢复正常，并且无毒副作用^[9]。因此，密切监测与及时干预是降低 CRS 的有效方法。

6 展望

CAR-T 细胞技术是目前最热门的免疫治疗方法之一，中国的 CAR-T 研究也在蓬勃发展，已经有众多国内研究机构和制药公司提交了 CAR-T 细胞治疗产品的临床试验申请，如药明巨诺的 JWCAR029 (CD19 靶向嵌合抗原受体 T 细胞)、复兴凯特的 FKC876 (益基利仑赛)、恒润达生的 BCMA CAR-T 细胞注射液、南京传奇的 LXAR-B38M CAR-T 细胞自体回输制剂等。同时，在 CAR-T 研究的热潮背后，还有许多仍需解决的问题，CAR-T 细胞产品具有产量小、批次少、原材料差异大、制备工艺仍未成熟、临床安全性复杂等特点，因此更安全、更有效、更可控是 CAR-T 细胞治疗产品未来的发展方向和探索目标。

参考文献

[1] 孟淑芳,王佑春,吴雪伶,等.CAR-T细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点[J].中国药事,2018,32(6):829-852.
 [2] 郑佳佳,陶浩.抗CD19嵌合抗原受体-T细胞疗法在难治/复发性B细胞急性淋巴细胞白血病中应用效果的Meta分析[J].广西医学,2019,41(13):6.

[3] Yang Fei, Zhang Jian, Zhang Xinyou, et al. Delayed remission following sequential infusion of humanized CD19- and CD22-modified CAR-T cells in a patient with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia and prior exposure to murine-derived CD19-directed CAR-T cells[J].OncoTargets and therapy,2019(7):2187-2191.
 [4] 徐亚如,周炎,唐奇,等.靶向Trop-2 CAR-T细胞的制备及其体外对卵巢癌细胞杀伤作用的研究[J].南京医科大学学报(自然科学版),2017(4):653-658.
 [5] 邓新娜.NKG2D嵌合抗原受体T细胞对人结肠癌细胞杀伤作用的体内外研究[D].2019.
 [6] Li Jie, Wu Zhenyu, Zhao Naiqing.Individual Patient Data Meta-Analysis from 16 Trials for Safety Factors in Cytokine Release Syndrome After CAR-T Therapy in Patients with Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) and Acute Lymphoblastic Leukemia[J].Advances in therapy,2019(7):2881-2894.
 [7] Porter D, Frey N, Wood PA, et al.Grading of cytokine release syndrome associated with the CAR-T cell therapy tisagenlecleucel[J].J Hematol Oncol,2018,11(1):35.
 [8] Lee D W, Santomasso B D, Locke F L, et al.ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells[J].Biol Blood Marrow Transplant,2019,25(4):625-638.
 [9] 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(6):990-994.