

—CAR-T 的定义、用途与目前研究情况—

月 度 专 题 报 告

目录

一、CAR-T 概况

（一）什么是 CAR-T	P2
（二）CAR-T 专利全球分布	P3
（三）CAR-T 治疗行业发展预测	P6
（四）国内相关政策	P7

二、CAR-T 的应用领域

（一）血液瘤	P9
（二）实体瘤	P10

三、CAR-T 的研究进展

（一）CAR-T 的研究历程	P11
（二）CAR-T 的关键结构	P12
（三）CAR-T 的生产工艺	P16
（四）挑战与未来研究方向	P19

一、 CAR-T 概况

（一） 什么是 CAR-T

淋巴细胞是肿瘤细胞的天敌，在肿瘤免疫应答中起主要作用，对肿瘤细胞有极强的杀伤作用，但是，使用内源性 T 细胞进行肿瘤免疫治疗时，靶抗原需经过加工处理后才能和靶细胞表面的主要组织相容性复合物（简称 MHC）作用，也即“MHC 限制性”。然而，肿瘤免疫编辑的过程会使 MC 在肿瘤细胞表面表达下降，破坏抗原加工过程，降低肽段免疫原性。这样长期形成的免疫逃逸机制，能使肿瘤细胞成功躲避细胞攻击，肿瘤快速增殖。此外，人体内肿瘤特异性细胞数量较少，并且由于大多数肿瘤细胞不断表达自体抗原，使得靶向这些抗原的 T 细胞通过免疫耐受机制被中和或移除，数量进一步减少。因此，包括细胞因子诱导的杀伤细胞在内的 T 细胞过继性免疫治疗虽然在部分肿瘤的治疗中取得了一定的效果，但在大多数肿瘤中疗效尚不能令人满意。

嵌合抗原受体 T 细胞（chimeric antigen receptor T cell, CAR-T）免疫疗法是将患者或异体供者体内分离的 T 细胞通过基因工程技术进行改造，使其表达嵌合抗原受体（chimeric antigen receptor, CAR），从而特异性识别并杀伤肿瘤细胞的一种过继细胞疗法。转染后经过纯化和大规模扩增后的 T 细胞，也即 CAR-T 细胞，可以特异性地识别肿瘤相关抗原，使效应 T 细胞的靶向性、杀伤活性和持久性较常规应用的免疫细胞大幅提高，并可克服肿瘤局部免疫抑制微环境，从而打破宿主免疫耐受状态，杀灭肿瘤细胞。

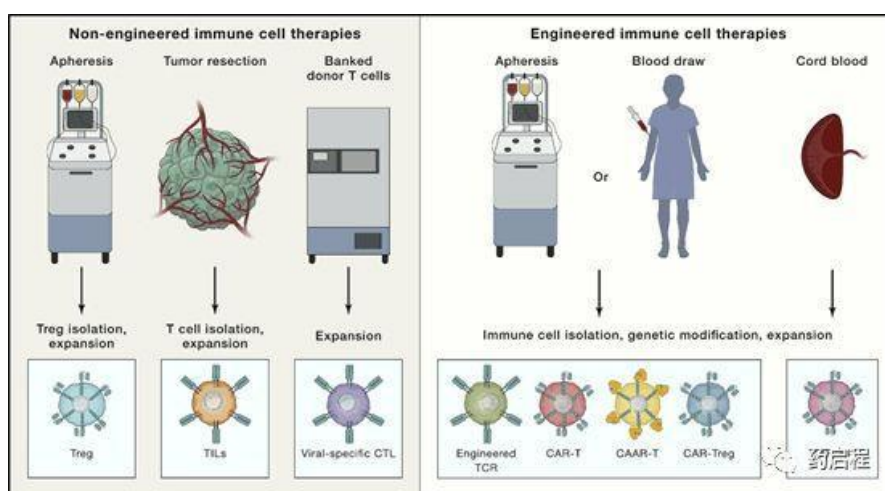


图1 免疫细胞治疗示意（图片来源：Evan W. Weber, et al. Cell, doi:10.1016/j.cell.2020.03.001）

对于传统治疗方法束手无策的癌症患者，CAR-T 提供了一种新的治疗手段，并且展现出突破性疗效，自体抗 CD19CAR-T 细胞的临床试验在成人和儿童 r/r ALL(复发/难治急性淋巴细胞白血病)患者中获得了高达 93%的缓解率,在 r/r CLL（发/难治性慢性淋巴细胞性白血病）患者中使用 CAR-T 细胞进行的临床试验表明，总有效率（ORR）高达 75%，完全缓解率（CR）高达 66%，同样 CAR-T 在一些淋巴瘤患者中也展现出前所未有的缓解率。

（二） CAR-T 专利全球分布

据 2020 年刊登在《Nature Biotechnology》的一篇文章记载，以 12431 份 CAR-T 专利为样本，分析了世界有关 CAR-T 的专利分布情况。

通常说 2017 年是 CAR-T 元年，从专利发表看，2015 年 CAR-T 已进入快速增长，主要得益于诺华吉利德的 Kite Pharma 与 BMS 的 JunoTherapeutics 分别在 2014 年和 2015 年获得了美国 FDA 突破性的称号。

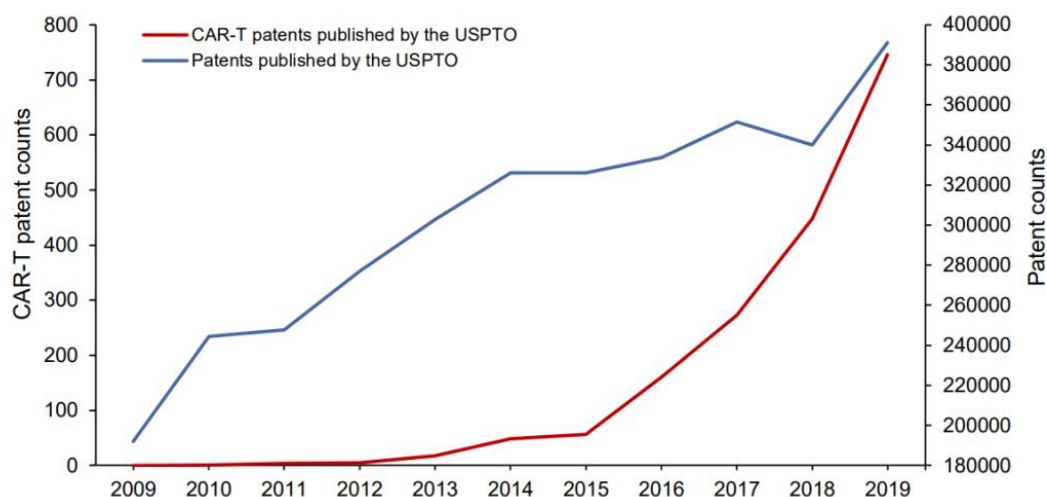


Fig. 1 Annual growth of CAR-T patents and all patents filed by the USPTO.

图 1 每年的全球 CAR-T 专利发表趋势(图片来源:Nat Biotechnol. 2020 Dec;38(12):1387-1394. doi: 10.1038/s41587-020-00749-8. PMID: 33273733.)

从专利持有人来看,美国的 Carl H. June 排第一, 562 件专利 (44 个系列), 英国的 Martin Pule (493 件 in 61 families) 和 Shaun Cordoba (279 件 in 41 families) 分别排第二第三。专利量 200 以上的发明者由美英法包揽。

表 1 专利受让人情况

数据来源: Nat Biotechnol. 2020 Dec;38(12):1387-1394. doi: 10.1038/s41587-020-00749-8. PMID: 33273733.

排名	机构	专利数	专利家族数
1	宾夕法尼亚大学 (美国)	908	108
2	百时美施贵宝公司 (美国)	507	82
3	诺瓦公司 (瑞士)	499	71
4	Collectis (法国)	495	52
5	斯隆—凯特林癌症研究所 (美国)	482	60
6	美国卫生与公共服务中心	457	67
7	伦敦大学学院 (英国)	428	40
8	福瑞德·哈金森癌症研究中心 (美国)	244	40
9	优瑞科生物技术公司 (美国)	226	24
10	贝勒医学院 (美国)	223	36

18	科济制药（中国）	150	30
----	----------	-----	----

全世界CAR-T相关专利由商业公司主导,占总数的61%,大学和医院占25%,非营利组织占13%,以及个人为1%。前20位,法国瑞士和中国各有一席,英国两个,其余均为美国。其中宾夕法尼亚大学最多,其次是百时美施贵宝公司。科济作为一家中国公司,其CAR-T专利数量排名第18位。

总体上欧美(美国)合作呈现网格化,亚洲尤其是中国缺少国家间、机构间的合作。CAR-T开发中各方的合作不同于传统模式,2000年以后,产业界与学术界合作逐渐升温,CAR-T领域的商业公司与非盈利机构(高校/科研院所)通过附属医院连接起来合作,像斯隆-凯特琳癌症中心与优瑞科,美国卫生与公共服务中心与吉利德等,这些高校科研院所通过与商业公司合作也能受益,后来合作模式也从传统的简单研究或技术成果转移开始转向资源共享/合作研发/联合专利的合作模式。从图3来看欧美的合作更偏向网格化,中国虽然关于CAR-T的专利数高居全球第二,但只有15项国际合作的共同受让专利家族——与之相对德国的总专利数很少,但其拥有的合作专利达到了10项。

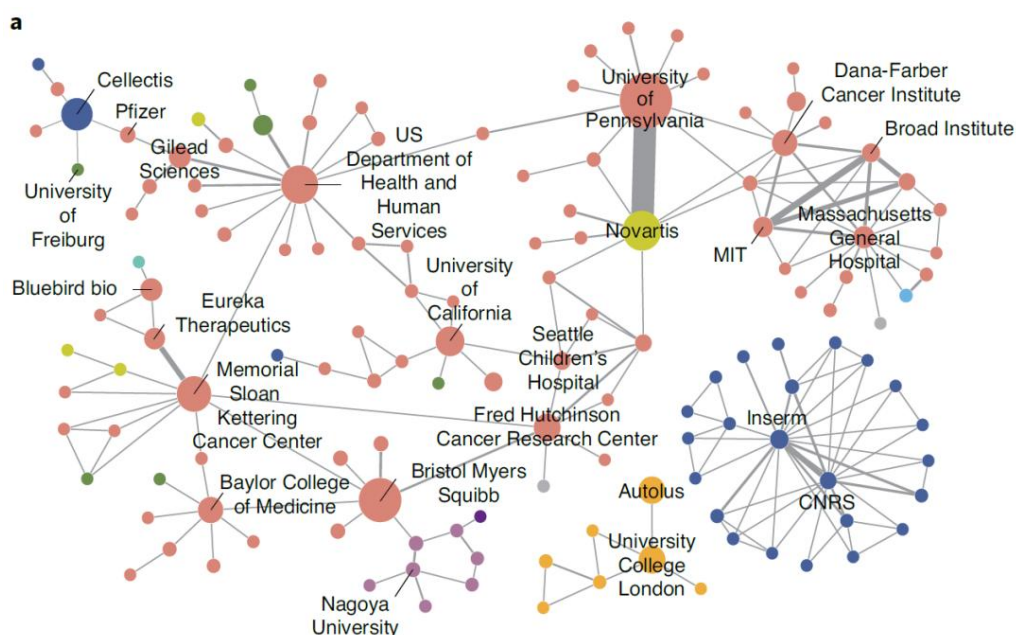


图3 美国的专利受让者协作关系(图片来源: Nat Biotechnol. 2020 Dec;38(12):1387-1394. doi: 10.1038/s41587-020-00749-8. PMID: 33273733.)

专利覆盖靶点总体与临床研究一致，细微差别可能指导未来 CAR-T 开发，比如 BCMA 靶点，以其全球专利总量第二的位置，目前临床研究远不及 CD19。

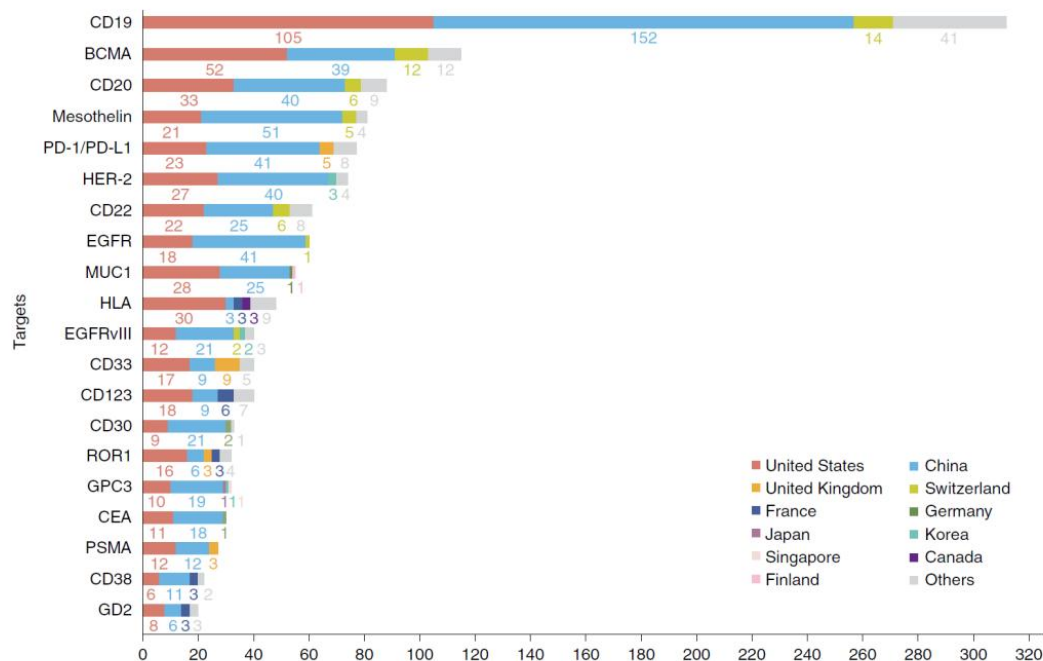
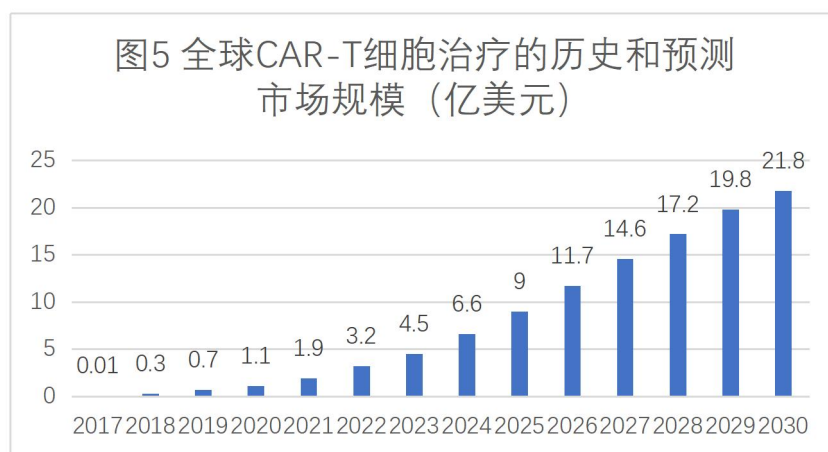


图 4 利用各靶点的相关研究专利数目(图片来源:Nat Biotechnol. 2020 Dec;38(12):1387-1394. doi: 10.1038/s41587-020-00749-8. PMID: 33273733.)

(三) CAR-T 治疗行业发展预测

海外市场对细胞治疗领域的关注热度持续走高，仅 2021 年第一季度就发生了 40 期融资事件，总融资金额超过 37 亿美元，其中 T 细胞疗法（包括了 CAR-T）相关的融资事件最多，占比达 37%。根据弗若特莎莉文（Frost & Sullivan）的数据，全球 CAR-T 的细胞治疗市场从 2017 年的 0.1 亿美元增长到 2020 年的 11 亿美元，预计未来几年将加速增长，2024 年将可扩大到 66 亿美元，2019 年至 2024 年的复合年增长率为 55%。预计 2030 年市场将进一步增长值 218 亿美元，2024 年至 2030 年复合年增长率为 22.1%。



数据来源：Frost & Sullivan

中美两国对于细胞治疗的研究数量为全球最多，对比 2020 年到 2021 年，研究数量美国从学术研究/商业研究的 126/479 起增长到 137/654 起，中国从 234/264 起增长到 275/420 起。在不同类型的细胞治疗中，CAR-T 继续占据主导地位，增加了 299 种 CART 新药物，比 2020 年同期增加了 35%。大多数 CART 疗法（80%）处于临床前和临床 I 期阶段。中国 CAR-T 市场有望在 2024 年和 2030 年规模进一步增长值 53 亿元和 289 亿元，2024 到 2030 年复合年均增长率将达到 32.6%。

（四） 国内相关政策

国内细胞免疫疗法发展历程几经波折，近年来随着政策逐步落地细胞疗法也得到了前所未有的支持，2017 年 12 月，《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试行）》的出台，标志着我国正式进入 CAR-T 发展新阶段，考虑到细胞治疗产品的物质组成及作用机制与小分子药物、大分子生物药物不同，传统、标准的非临床研究评价方法可能不完全适用于细胞治疗产品，传统的 I、II、III 期临床研究分期设计也不能完全适用于细胞治疗产品开展临床研究。

原则中指出申请人可根据拟申请产品的具体特性自行拟定临床研究分期和研究设计，一般可分为早期临床试验阶段和确证性临床试验阶段两部分，如此可大幅缩短 CART 疗法的上市时间。

- 早期临床试验阶段：原则上应包括 1) 初步安全性评价；2) 药代动力学研究；3) 初步

的药效学研究；4) 剂量探索研究。

- 确证性临床试验阶段：1) 临床有效性验证，要求能够提供可产生预期治疗效果的临床给药方案、治疗效果的持续时间以及在目标人群中的获益与风险；2) 持续的安全性监测，包括症状记录、临床检查、重要生物学过程的改变等；3) 持续的药理学活性监测。

此外，细胞治疗产品的临床试验方案中应该包括停止标准、风险评估方案，并成立独立的数据和安全监察委员会等。

当前中国细胞治疗产品监管体系逐渐清晰，自 2015 年起，实行两种制度：一是临床研究备案制，二是药品临床试验申请制。即：

A 临床研究备案制

2015 年干细胞临床研究管理办法（卫健委和国家药品监督管理局）（技术）

2019 年国家卫生健康委关于开展医疗机构临床研究调查的通知（国卫办科教函（2019）902 号）

2020 年 1 月 1 日开始，参照干细胞备案管理（技术）

B 药品临床试验申请制

2019 年中华人民共和国药品管理办法&药品注册管理办法 2020。7

2017 年细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（中国国家药监局/药品审评中心）

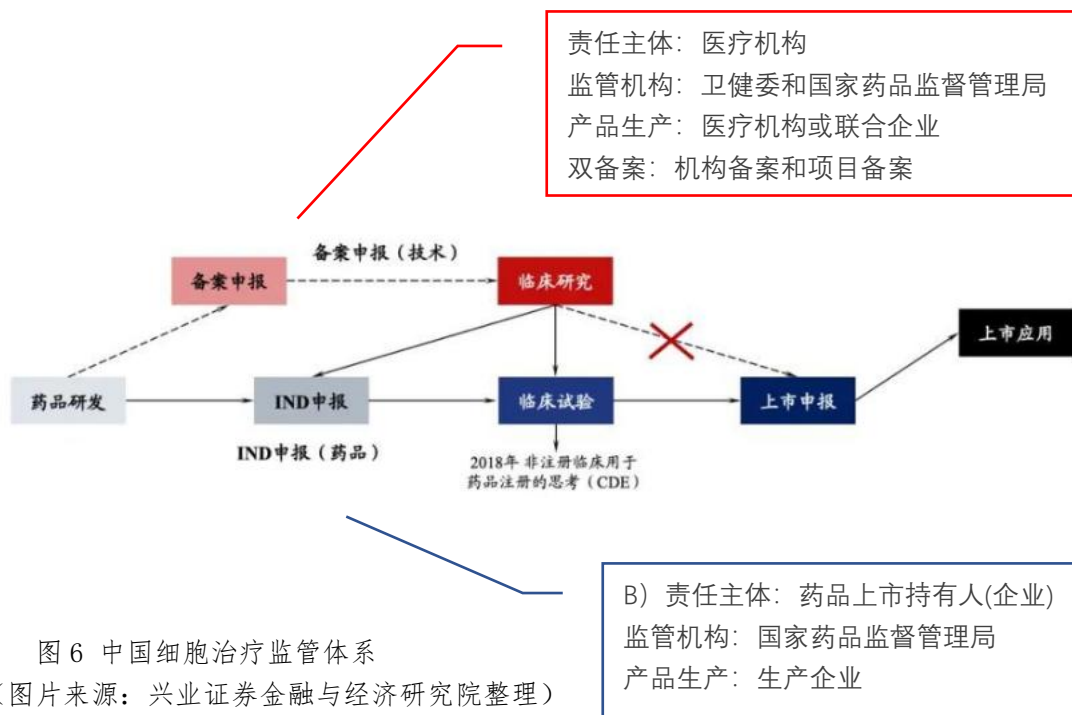


图 6 中国细胞治疗监管体系

(图片来源：兴业证券金融与经济研究院整理)

二、CAR-T 的应用领域

目前，CAR-T 疗法大部分应用于血液肿瘤，国内血液肿瘤市场预计每年将超过 200 亿人民币。

(一) 血液瘤

1、急性淋巴细胞白血病

急性淋巴细胞白血病（简称 ALL）是一种常见的恶性血液病，以骨髓和淋巴组织中不成熟淋巴细胞的异常增殖和聚集为特点，生物学特征多样同时具有较高的临床异质性。儿童和成人均可见急性淋巴细胞白血病，但其发病高峰在 2~5 岁之间，之后岁年龄增长逐渐下降，直到 50 岁后发病率由略有上升。在所有白血病中，ALL 占到 15%，约占急性白血病的 30%~40%。ALL 是儿童最常见的恶性肿瘤。

2、弥漫大 B 细胞淋巴瘤

淋巴瘤，根据瘤细胞分为霍奇金淋巴瘤（H）和非霍奇金淋巴瘤（NH），其中 MHL 占 80%~90%，根据细胞来源可分为 B 细胞类型、T 细胞类型和 NK/T 细胞类型。其中，70%~80%都是 B 细胞系，少数为 T 细胞系，NK（自然杀伤）细胞更少见。B 细胞淋巴瘤中，弥漫性大 B 细胞淋巴瘤占到 30%~40%，弥漫性大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）是 NHL 中最常见的类型。

3、多发性骨髓瘤

多发性骨髓瘤（MM）是一种克隆性浆细胞异常增殖的恶性疾病，是仅次于非霍奇金淋巴瘤的第二常见的血液系统恶性肿瘤。关于多发性骨髓瘤的药物市场，已形成了来那度胺、泊马度胺、达雷木单抗、硼替佐米、卡非佐米和埃罗妥珠单抗等六大品种竞争的市场格局。以 BCMA CAR-T 为代表的免疫疗法的出现，以及 Belantamab mafodotin、XP01 抑制剂、PD-1 等新的疗法出现，都将改变未来多发性骨髓瘤的药物格局。

4、急性髓细胞白血病

急性髓细胞性白血病（AML）是髓系造血干/祖细胞恶性疾病。以骨髓与外周血中原始和幼稚髓性细胞异常增生为主要特征，临床表现为贫血、出血、感染和

发热、脏器浸润、代谢异常等，多数病例病情急重，预后凶险，如不及时治疗常可危及生命。应用 CAR-T 治疗 AML 的研究依然难以进行到临床阶段，原因在于细胞表面抗原与正常髓系细胞表面抗原共享，因此直接靶向 AML 抗原会产生对正常髓系细胞的严重毒副作用，从而限制 CAR-T 细胞的治疗潜力。一项临床前试验利用基因编辑技术将自体 CD33 敲除的造血干细胞和祖细胞转入动物模型，建立了一个对靶向 CD33 治疗有抵抗力的造血系统，并使靶向 CD33 的 CAR-T 细胞定位到 AML。

（二） 实体瘤

目前，第二代 CAR-T 仍处于研究的主流地位，对于血液瘤而言具有较好的疗效。基于血液瘤治疗的成功，第三、四代 CAR-T 应运而生，扩增和杀伤能力都得到了明显的改善，因此研究者们将其应用于实体瘤的治疗中，并研究不同肿瘤抗原作为靶点时 CAR-T 的治疗效果。

目前最有可能突破的靶点有：

1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 (ypican-3, GPC3) GPC3 是磷脂酰肌醇蛋白聚糖家族的一员，借由糖基磷脂酰肌醇附着在细胞表面，并在细胞生长、分化和迁移过程中发挥重要的作用。多项研究表明，GPC3 可以作为肝癌的特异性靶点，在人肝细胞癌中高表达但在正常组织中表达有限，同时 GPC3 的高表达与肝细胞癌患者的预后呈一定的正相关。有研究已经构建了基于 GPC3 的第三代 CAR-T，并检测其在肝细胞癌中的疗效，体内外试验结果均证明靶向 GPC3 的 CAR-T 可以有效清除 GPC3 阳性的肝癌细胞，且杀伤效果与靶细胞中 GPC3 表达水平呈正相关。

2、人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) HER2 是受体酪氨酸激酶中表皮生长因子受体家族的一员，是胚胎发育和成人组织细胞分化增殖的必需介质之一。大量研究表明 HER2 的过度扩增和高表达与包括胃癌、胰腺癌和乳腺癌等在内的多种肿瘤的不良预后有关。有研究者进

行了针对晚期胆管癌和胰腺癌的 HER2 靶向的 CAR-T 治疗,在该 1 期临床试验中,所有患者均出现一定的临床应答,其中 1 例获得了 4.5 个月的部分缓解,5 例病情稳定,中位无进展生存期 4.8 个月,该研究数据在一定程度上证明了靶向 HER2 的 CAR-T 疗法的安全性和可行性。

3、间皮素 (mesothelin, MSLN) MSLN 是一种通过糖基磷脂酰肌醇锚定在细胞质膜上的糖蛋白,在腹膜、胸膜腔和心包的正常间皮细胞上表达,同时在多种肿瘤中高表达,促进癌细胞的增殖和局部侵袭转移,可作为诊断和预后的检测物之一。由于 MSLN 在正常组织中的分布有限而在某些肿瘤组织中高度表达,它也成为免疫治疗的研究靶点。有一例 1 期临床试验正是利用了 MSLN 特异性的 CAR-T 治疗 6 例胰腺导管腺癌患者,所有患者均未出现细胞因子释放综合征或神经毒性等,其中 2 例患者病情稳定,无进展生存时间分别为 3.8 和 5.4 个月,断层扫描监测到 3 例患者的肿瘤病灶代谢稳定,1 例证实表达 MSLN 的患者活跃体积明显下降,说明以 MSLN 为靶点的 CAR-T 治疗胰腺导管腺癌的方法是可行的。

三、 CAR-T 的研究进展

(一) CAR-T 研究历程

时至今日, CAR-T 技术已经发展到第五代。第一代 CARs 由 scFv 和 CD3 ζ 信号域组成,体外具有 T 细胞杀伤毒性,但在临床试验中没有表现出抗肿瘤效应。第二代 CARs 在第一代基础上加入了一个来源于 CD28 或 4-1BB 的共刺激域,使 CAR-T 细胞在体内存活时间延长,增殖能力和杀伤毒性也增强。第三代 CARs 在第一代 CARs 基础上加入了两个共刺激分子,其抗肿瘤效应进一步提升。第四代 CARs 又被称为“装甲”T 细胞 (T cells redirected for universal cytokine killing, TRUCKs),通过基因修饰分泌特定的细胞因子或表达额外的共刺激配体增强 CAR-T 疗效,同时引入了自杀基因系统控制 CAR-T 活性,必要时激活以降低细胞毒性。

目前全球开展的临床试验主要以 CD28 或 4-1BB 共刺激域构成的第二代 CAR-T 为主。CD28 或 4-1BB 共刺激域对促进 CAR-T 细胞体内增殖和存活具有重要意义,

能显著提高接受 CAR-T 疗法患者的完全缓解率。研究表明，CD28 共刺激域可以诱导更迅速的抗肿瘤反应，但持久性较差；而 4-1BB 的肿瘤清除速度较慢，但可诱导持续性的高水平反应，但临床研究显示表 CD28 共刺激域的 CAR-T 细胞与表达 4-1BB 的 CAR-T 细胞在治疗血液系统恶性肿瘤的临床疗效相似。除了 CD28 和 4-1BB，有关其他共刺激域来源的 CAR-T 细胞研究也正在积极展开，如 OX40（CD137）、ICOS 等。

从商用角度来看，2017 年被业内称为 CAR-T 疗法的元年，FDA 共批准了两款 CAR-T 产品，分别是 Novartis 的 Kymriah 和 Kite/Gilead 的 Yescarta，堪称是划时代的癌症治疗手段。

Kymriah: 根据一项单臂二期临床试验（ELIANA），FDA 授予 Kymriah 优先评审和突破性疗法资格，并在 6 个月内批准其用于治疗难治性、或者复发的 B 细胞前体急性淋巴细胞白血病（ALL）的儿童和青少年患者，适用年龄达到 25 岁。该二期试验中患者在接受三个月的注射治疗后，完全缓解率（CR）与不完全血细胞计数恢复率（ORi）之和达到 83%。FDA 对其的规范审查还包括治疗成人难治性、或者复发的弥漫大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）和恶性非霍奇金淋巴瘤（NH）。欧洲也有相似的疾病临床研究。除此之外，Kymriah 还接受了用于滤泡性淋巴瘤（FL）治疗、DLBCL 二线疗法、慢性淋巴细胞白血病（CLL）和多发性骨髓瘤（MM）治疗的评价。

Yescarta: Yescarta 被 FDA 批准用于治疗已接受过化疗的难治性、或者复发的 B 细胞淋巴瘤成人患者，包括 DLBCL 和其他恶性 NHL。Yescarta 在一项单臂二期临床试验（ZMA-1）中，患者的总缓解率（ORR）达到 82%，其中 CR 占比 58%。其早期数据显示治疗成人难治性、或者复发的 B 细胞 AL 效果良好，多项关键临床正在评估其对套细胞淋巴瘤（MCL），包括 FL 在内的 NHL 亚型的治疗能力。

（二） CAR-T 的关键结构

CAR-T 根据结构可分为胞外区、跨膜区和胞内区。胞外区通常为靶向识别抗原的单链可变片段（single-chain variable fragment, scFv）。跨膜区通常来源于 CD（白细胞分化抗原）28 或 CD8，可以影响 CARs 间的相互作用。胞内区为 CD3 ζ 信号域，包含三个免疫受体酪氨酸激活模体（简称 ITAMs），可通过磷酸化激活启动细胞内信号转导，活化 T 细胞，促进增殖、细胞因子分泌和细胞毒作用。这些几个结构中抗原结合域（决定靶点）和细胞内信号传导域（决定下游刺激度和杀伤效果）是影响整个治疗效果的最主要因素。

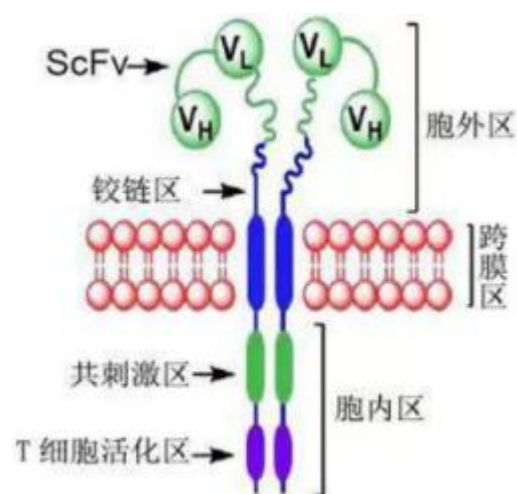


图 7 CAR-T 的结构（图片来源：粤开证券研究院整理）

1、单链可变片段（sFV）

单链可变片段是由一个重链可变区（V_H）和一个轻链可变区（L）通过肽链连接在一起组成，肿瘤特异性的 scFv 的产生以及其亲和力是 CART 安全有效性的基础，目前构建 scFv 主要有杂交瘤细系和噬菌体展示两种技术，对应抗体种类为 100% 鼠源抗体到 100% 人源抗体。单克隆抗体发展经历了鼠源单抗，人鼠嵌合单抗、人源化单抗及全人源化单抗四个阶段，人源化比例的提高使得 HAMA（人抗鼠抗体）发生概率逐步降低，安全性，疗效及时间得到改善，而在此过程中噬菌体展示文库技术、B 细胞单克隆抗体制备技术等出现也助力单抗药物持续迭代升级，快速发展。

全人源化抗体是未来发展的主要方向。在这里将进一步说明人源化抗体的制备技术。

人鼠嵌合是一种向人源抗体过渡的方案。在传统杂交瘤单抗技术上增添了嵌合过程，杂交瘤鼠源单抗会被通过基因编辑与预先准备好的人源恒定区/部分可变区拼接，成为嵌合单抗；第二代单抗去除了鼠源恒定区和部分可变区，因而极大地减少（但仍未完全消除）了用药后的排异反应，但是增加的额外修改步骤使得其相对更难生产；第三代单抗将鼠源部分减少到了只有与抗原交互的 CDR 区域，因而最小化了排异反应的可能，其工艺相比第二代本质上大同小异，这也使得它日前被广泛使用。初期的人源化抗体是在传统杂交瘤单抗技术上增添了 CDR（互补决定区）移植过程。杂交瘤鼠源单抗仅有可变区上的数个 CDR 区域会被移植到预先准备好的人源抗体上，并成为人源化单抗。而为了减少鼠源抗体的比例，又逐渐发展出下列技术：

- 噬菌体展示技术：需要通过将人源单抗可变区基因与噬菌体外壳蛋白基因随机重组，使得可变区被表达在噬菌体表面，而后通过生物淘选筛选出能够与指定抗原结合的噬菌体。这些噬菌体将随后被用于浸染大肠杆菌，并使得大肠杆菌能够表达单抗的少数组成部分，并可被随后组合成完整的单抗；此种生产方法是最早开发的，可以针对的抗原也极为广泛。但由于噬菌体无法浸染过长的序列，因而需要额外加入“组合”步骤，而组合后的单抗偶尔会出现失去亲和力或者产生自体免疫的现象。
- 转基因鼠杂交瘤技术：先需要通过转基因技术创造出缺乏原有抗体基因的小鼠胚胎；再将人源抗体基因移植入小鼠体内，迫使小鼠表达的抗体全部拥有人源序列，进而再通过传统杂交瘤创造出全人源抗体；此种生产方法能够通过选择杂交瘤从而出产亲和力极高的全人源单抗，比传统的嵌合抗体更具免疫多样性。但是由于增加的转基因步骤需要从胚胎阶段开始培育小鼠，且需要植入的基因序列极长，以被准确表达，其生产过程比传统杂交瘤复杂得多。
- B 细胞单克隆技术：需要从人体中分离出 B 细胞，从中分选出能够针对特定抗原的细胞，并在将其表达的抗体序列重建进质粒后，用其浸染大肠杆菌，使得大肠杆菌直接表达针对特定抗原的单抗；此种方法仅需要少数 B 细胞便能制造出针对特定抗原的抗体，由于单一 B 细胞只能分泌特定恒定区可变区组合的抗体，通过克隆可以得到远比噬菌体展示制备法亲和力高的单抗，但由于人类细胞难以使用成熟的杂交瘤融合技术，想要令制造出的 B 细胞长期存活仅能通过相对不稳定的 EB 病毒永生生化技术，且该技术制造的抗体在某些病人体内效率较差，原因尚不明。

2、胞内刺激域

胞内刺激域中的 CAR 共刺激是整个 CAR-T 工程的关键技术。目前围绕它不断迭代的 CAR-T 细胞已经到了第五代，代际差异主要在于胞内结构域以及引入的细胞因子和配体。

第一代 CAR 含有 SCFV、铰链区、跨膜区及胞内信号域，但没有共刺激域，所以在结合肿瘤细胞抗原后，T 细胞增殖数量不够，不能持久作用，不能分泌足够多的细胞因子，对肿瘤细胞的杀伤力不够，最终未能进入市场，

第二代 CAR 是在第一代的基础上引入了一个共刺激域（CD28 或 4-1BB），增强了 T 细胞对活化信号的响应能力，增强了 T 细胞的作用效果：上市的 Kymriah 和 Yescarta 都是第二代 CAR-T。

第三代 CAR 是在第二代的基础上引入了两个共刺激域（CD28 和 41BB），增强了 T 细胞的增殖和分泌能力，相比于二代 CAR-T 有着更强、更持久的杀伤力，

目前实验室的 CAR 细胞研究已经到了第四、第五代。第四代 CAR 是在第三代的基础上引入细胞因子受体结构域或细胞因子基因以及共刺激配体。该种细胞被设计成将在 CAR 与靶向抗原结合时能够释放改造基因的产品到肿瘤组织中，免疫调节分子如促炎症、细胞因子和酶的局部转移，使得 T 细胞将免疫抑制肿瘤微环境转化为免疫耐受肿瘤微环境。一种经常在 CAR-T 细胞中被过度表达的细胞因子是 IL-12，它是一个非常有效的分子可以增强 T 细胞分泌 IFN γ 、granzymeB 和穿孔素 perforin；并雇佣 NK 细胞去消除 CAR 不能识别的肿瘤细胞。与传统的 CAR 相比，IL-12 过表达的 CAR-T 细胞在临床前的模型中表现出增强的抗肿瘤和扩增效果，尤其是在实体瘤模型中。

第五代 CAR 即通用型 CAR-T，是指从健康志愿者获取 T 细胞并进行基因编辑敲除相关基因以及转录 CAR 基因后制成的 CAR-T 细胞，不需要从患者体内获取 T 细胞进行定制。该方法治疗价格高昂，需要复杂的前期准备，但从前景来看已然成为了 CAR-T 未来主要的发展方向。

此外，还有其他基于不同目的的新型 CAR 也被设计出来，比如针对抗原丢失的双价串联 CAR；特异性识别健康组织的抑制性 CAR；携带自杀基因以提高安全性的 CAR；具有通用潜能的 SUPRA 拉链式 CAR 等等。

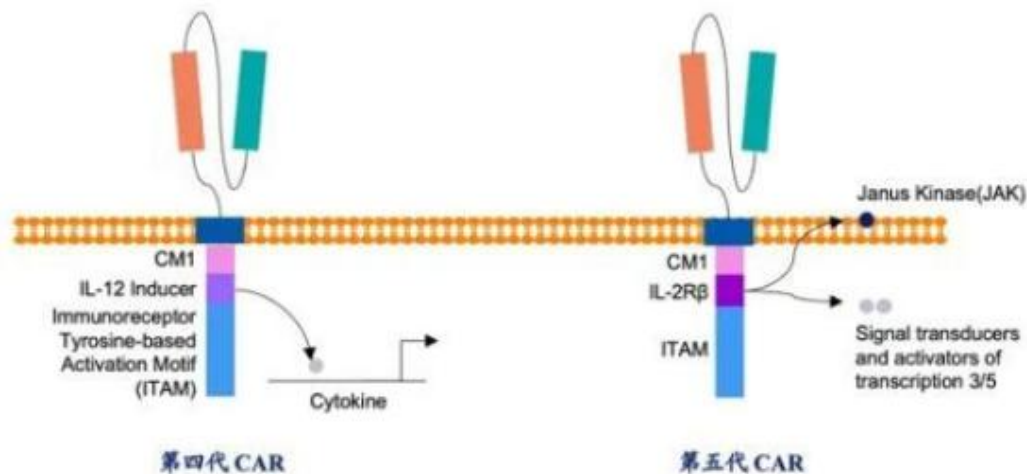


图8 第四、五代 CAR-T 细胞（图片来源：兴业证券金融与经济研究院整理）

（三） CAR-T 的生产工艺

- 单采白细胞及细胞清洗。利用密度梯度离心法从患者（已上市产品做法）或健康志愿者（发展趋势）外周血中分离白细胞，之后洗涤去除白细胞分离过程中添加的抗凝剂；
- 富集 T 细胞并激活。T 细胞通过 CD4/CD8 特异性抗体或者表面标记偶联磁珠进行分离，然后可加入 CD3/CD28 单克隆抗体磁珠或人工抗原提呈细胞等对细胞培养基中的 T 细胞进行激活；
- 基因传递/转染。使用慢病毒/逆转录病毒载体或非病毒方法（电转 DNA、转座子/转座子系统）将 CAR 转染到 T 细胞中；
- 细胞培养，通过生物反应器等细胞培养设备对 T 细胞进行扩增培养；
- 冷冻及运输，最终回输患者。根据配方调整细胞数和培养基成分，然后将产品转移到合适的容器中进行冷冻及运输，最终回输到患者。

由于 CAR 基因是 T 细胞准确识别肿瘤细胞的“眼睛”，如何高效导入也就成为了制备 CAR-T 的关键环节。载体的导入效率影响着 CAR-T 产品的成本和产量，载体的性质和批间稳定性则影响着 CAR-T 的质量。下面将重点介绍这个环节的研究情况。

现有的基因转导技术如下表所示：γ-逆转录病毒载体是第一个用于人类的基因转导系统，临床应用暂未发生与基因插入诱变相关的不良反应；慢病毒载体相对 γ 逆转录病毒转导质量更佳，因而在临床上应用最多，但由于二者为随机整合，仍然存在一定的安全性风险；病毒载体具有更高的寄送数单和 T 细胞转导质量，仍是目前的主流递送载体；转座子系统发生基因整合时具有一定的靶向性，

且成本较低，有较大的潜力发展成为临床通用的 T 细胞基因转导系统；RNA 电穿孔是将 CAR 基因导入 T 细胞最简单和最安全的方法，但其 mRNA 的不稳定性要求进行多次的 T 细胞输注。

表 2 不同 CAR 基因转导方法对比

导入方法	γ -逆转录病毒	慢病毒	转座子	mRNA 电穿孔
基因容量 (kb)	10	8	18	2
基因定位	随机整合并稳定遗传	随机整合并稳定遗传	整合并稳定遗传	不整合
可转导细胞类型	分裂细胞	分裂和静止细胞	分裂和静止细胞	分裂和静止细胞
相对转导效率	高	高	较高	中等
相对成本	高	高	低	低
表达时长	长期 (>2 月)	长期 (>2 月)	长期 (>2 月)	短期 (<1 周)
免疫原性	中等	中等	可忽略	可忽略
安全性	插入诱变	插入诱变	插入诱变	无插入诱导
临床应用	多	最多	较少	较多

目前基于病毒载体的导入方法制造过程复杂、成本昂贵且受到严格控制；还有在监管上，病毒载体在临床试验的早期阶段难以符合 cGMP（动态药品生产管理规范）的所有方面。因此基于转座子技术的非病毒载体基因传递技术被提了出来。

- 转座子：转座子是指在原核和真核生物基因组上可以进行位置转换的 DNA 片段，通过在原始位置上进行剪切或复制，经环化作用在转座酶辅助下插入到宿主基因组的其他位置。
- 载体功能：转座子基因载体由一个携带 CAR（转座子）的质粒和一个携带转座子酶的质粒组成，质粒经电穿孔进入 T 细胞，转座酶被表达后作用于 CAR 侧翼的末端倒置重复序列，导致在 T 细胞基因组的 TA 二核苷酸序列上进行切除和整合，插入 CAR 基因，转录表达后在细胞表面生成 CAR。

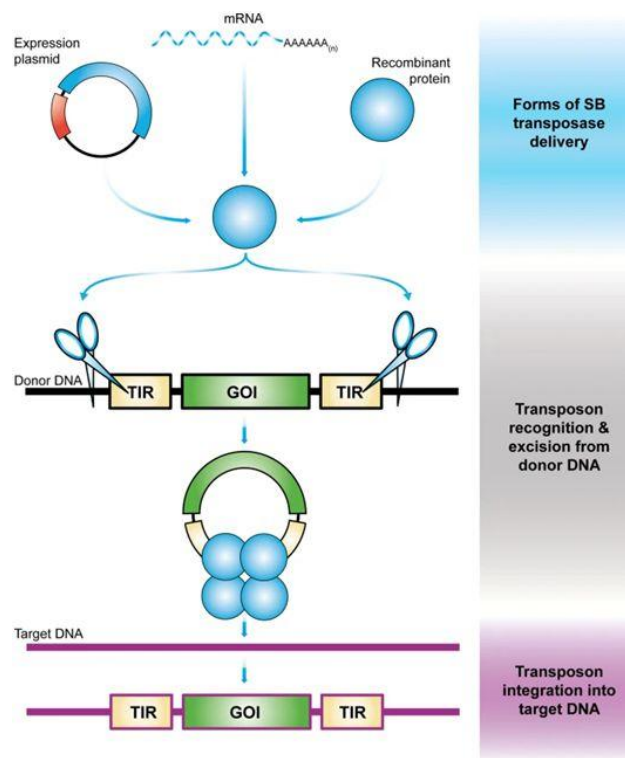


图9 利用睡美人转座子进行基因递送的示意图（图片来源：Gene Therapy, 2021, doi:10.1038/s41434-021-00254-w）

转座子导入法有两种常用技术：基于 Sleeping Beauty (SB, “睡美人”) 的转座技术, 代表产品为 Precigen 公司的 PRGN-3006, 其已获得美国 FDA 的罕见药资格认定 (ODD), 治疗复发难治性急性髓系白血病 (AML); 第二种基于 PiggyBac (PB) 的转座系统技术, 代表公司有 Poseida 和上海胞治疗集团, 其中上海细胞治疗集团的 CD-19CART 已经进入了临床阶段, 是国内首家利用非病毒载体系统制备 CAR-T 细胞治疗新药从而获得 FDA 新药临床研究审批的公司。

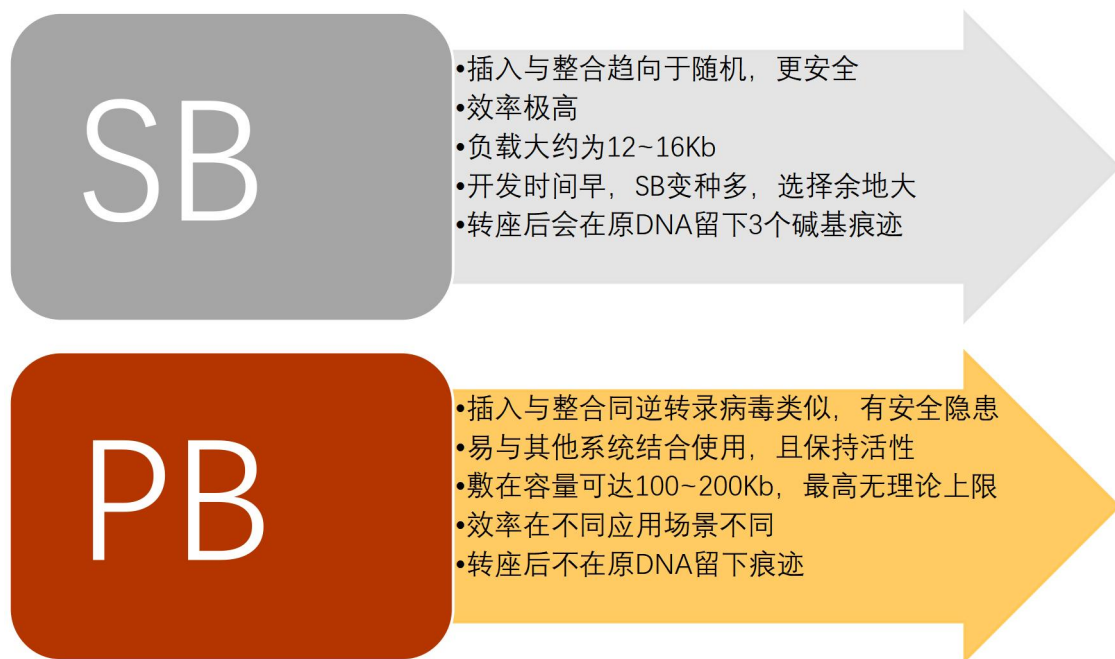


图 10 两种转座子导入技术的差异

(四) 挑战与未来研究方向

1、CAR-T 面临的挑战

(1) 实体瘤

利用 CAR-T 治疗实体瘤尚存在如下三个棘手问题。

- 靶点的选择 由于实体瘤的高度异质性，很难筛选到合适的表面抗原。目前大部分研究仍选用肿瘤相关性抗原，这些抗原往往在正常组织中少量表达，因此脱靶毒性是肿瘤相关抗原 CAR-T 难以回避的问题。此外，实体瘤的异质性表现在原发性肿瘤和继发性肿瘤以及相同肿瘤的不同部位之间，肿瘤生长过程中也会发生异变，这就使得治疗靶点难以选择。
- 实体瘤浸润 除去少数研究使用的瘤内注射方式，CAR-T 的给药方式主要还是集中在静脉输注，CAR-T 细胞需要从外周血中循环至肿瘤部位才能发挥杀伤作用。相较于血液瘤所处的均质环境，实体瘤所处的环境复杂多变，阻碍了 CAR-T 的浸润。因此，相较于抗肿瘤血管生成，研究者们越来越倾向于肿瘤血管正常化的理论，利用肿瘤血管正常化为 CAR-T 的浸润提供通道，增加 CAR-T 与肿瘤细胞接触的概率从而提高 CAR-T 的杀伤效果。
- 肿瘤微环境 肿瘤微环境是指肿瘤产生和生存的内环境，主要由肿瘤细胞、细胞外基质、周围血管、其他细胞（如免疫细胞和成纤维细胞）以及各种分泌因子等组成。越来越多的研究表明，抑制性肿瘤微环境促进了肿瘤的生长和转移，阻碍了免疫细胞的应答并抑制抗肿瘤疗法的疗效。肿瘤微环境是一种低 pH、低氧、低营养、高渗透的恶劣环境，极不利于 T 细胞的存活。

(2) 毒副反应

细胞因子释放综合征（CRS）是 CAR-T 疗法中最常见的副作用之一。CAR-T 细胞在回输给患者后，会使患者体内 T 细胞被激活并快速增殖，引发细胞因子大量释放，从而引起患者高热、疲劳、肌痛、呼吸困难等炎症反应，严重的导致多器官衰竭，常见于 CAR-T 细胞输注后的 3 周内。

神经毒性也被称为 CAR-T 细胞相关脑病综合征（CRES），是与 CAR-T 细胞治疗相关的第二常见的威胁生命的事件，在 CAR-T 治疗后的患者脑脊髓液中经常观察到 CAR-T 细胞，可能与大量细胞因子释放增加了血管机血脑屏障等的通透性有关。少数患者接受 CAR-T 细胞治疗后会出现严重的神经毒性，主要临床表现有精神错乱、失语、嗜睡等，严重者可能出现癫痫发作和脑水肿。

除了上述毒副反应外，治疗过程中还可能出现过敏反应、病毒转染过程中的潜在致癌风险、脱靶等。

（3）复发

有 10%~20% 的患者在接受了抗 CD19 的 CAR-T 治疗后不会进入缓解期，而剩余的病患即使进入缓解期，也会有 30%~50% 在 1 年内出现癌症复发。在这些复发患者中，有 10%~20% 被观测到缺乏 CD19 抗原的癌细胞。这种现象也能在 CD22 治疗中发现。

抗原阴性复发的主要机制是抗原丢失。目前认识到的抗原丢失机制包括剪接突变、表位隐蔽、靶表位丢失导致细胞谱系改变等，然而即使抗原未完全丢失，通过免疫调节使抗原表达减少或密度降低也足以使肿瘤细胞逃逸。值得注意的是，并不是所有复发患者的 CD19 都是阴性，这也说明除了抗原丢失、肿瘤细胞逃逸，还有其他因素导致了 CAR-T 的耐药性。抗原阳性复发的主要原因是 CAR-T 细胞衰竭，由于长期接触高水平抗原而导致自身功能减退。一般认为 CAR-T 细胞的抗原非依赖性信号转导与细胞衰竭关系密切，高肿瘤负荷也是导致衰竭的重要因素。

（4）生产工艺与标准

目前，CAR-T 细胞产品尚无统一的技术标准。由于每个制造商在 CAR 设计，基因导入，细胞培养和细胞纯化技术方面存在差异，因此 CAR-T 细胞的质量控制应考虑特定的生产过程和产品特性。CAR-T 细胞的生产过程应满足当前良好生产规范（cGMP）的要求。cGMP 的目的是提供一个框架，以确保由训练有素且经过定期培训的人员在受良好控制的设施和设备中进行高质量的生产，同时需要广泛的系统来记录操作的所有方面，以证明持续的合规性。CAR-T 细胞产品的质量控制在应基于相关指南并全面考虑产品作为生物产品，细胞产品和基因疗法产品的特性，包括质量、安全性和有效性的全面测试。CAR-T 细胞作为一种活泼的“药物”、其制备过程复杂，需要进行全过程质量控制。但目前工业界尚未有成熟的、广泛接受的 CAR-T 生产工艺过程，许多产品制造时仍需人工操作，耗时耗力不说失败率也很高。

从当前已面世得的产品中可以知道，影响定价的最直接因素在于耗材。Kymriah 在美国定价为 47.5 万美元，Yescarta 为 37.3 万美元。培养液、质粒、核酶、病毒载体等，占了成本的 50%左右。

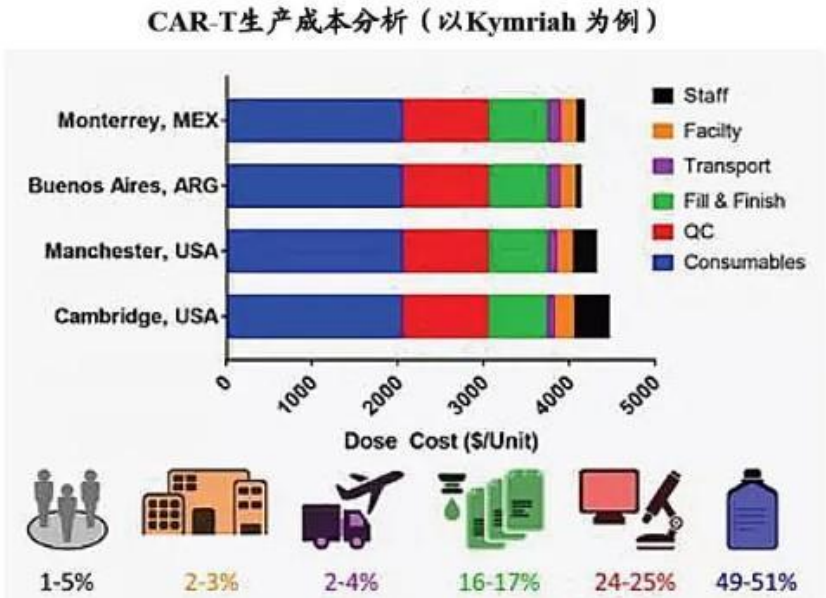


图 11 Kymriah 生产成本分析（图片来源：Cytotherapy, 2019, 224-233）

从公开资料来看，对生产成本影响最大的是产能的利用率和病毒载体的制备。其中基因导入所用的病毒载体途径主要分为慢病毒和 γ -逆转录病毒两种，稳定的生产方式为瞬时转染和稳转细胞系。Kymriah 所用的慢病毒通过瞬时转染

的方式得到，通过三个包装质粒和一个表达质粒瞬间共转染 293T 细胞（人胚胎肾细胞），经克隆筛选后获得稳定组装表达高低度慢病毒载体的细胞株，进行发酵生产后纯化得到包装有 CAR 基因的慢病毒载体。整个生产过程满足 GMP 级别要求，但转染试剂的价格和低转染效率，使得生产成本达到了 2.5 万美元/剂，占了总成本的近 30%。

在这种情况下，业界有一种共识，即在未来需要研发出一种通用型 CAR-T 产品的制备流程，以取代现在的私人订制式。通用型 CAR-T（UCAR-T）大致生产过程类似，但主要采集健康人的外周血单核细胞中的 CD3+T 细胞，通过金银载体转入 CAR 基因后，还需要通过基因编辑手段敲除 T 细胞表面的抗原受体（TCR）、人类白细胞抗原（HLA）或 CD52 分子，以消除 UCAR-T 细胞对患者的移植物抗宿主反应以及患者对于异体 UCAR-T 细胞的排斥反应。

2、相关改进研究

（1）细胞上的改进

下面提供一些最新的 CAR-T 细胞改进方向与关键词。

结构改进

多靶向：CD20、CD22与CD19的串联使用；BiTEs修饰，肿瘤特异型结构域取代scFv；双驼峰重链CAR取代scFv；人源化或全人源scFv替代鼠源

共刺激域：突变CD28中特定位点；调控细胞内信号强度；铰链和跨膜区的修饰

基因编辑

CRISPR/Cas9技术的发展

与PD1（程序性细胞死亡受体1）抗体结合

CD8+CAR-T细胞中过表达碱性亮氨酸拉链转录因子ATF样蛋白（BATF）和干扰素调节因子4（IRF4）

同种异体CAR-T细胞

外来健康供体；脐带血

基因编辑减少外来移植
物抗宿主现象发生

由于自体 CAR - T 细胞的局限性，其他效应细胞的 CAR 构建体开发已处于临床前和临床阶段，包括 NK 细胞、iNKT 细胞、 $\gamma \delta$ T 细胞、巨噬细胞和树突状细胞等。

（2）改善细胞微环境

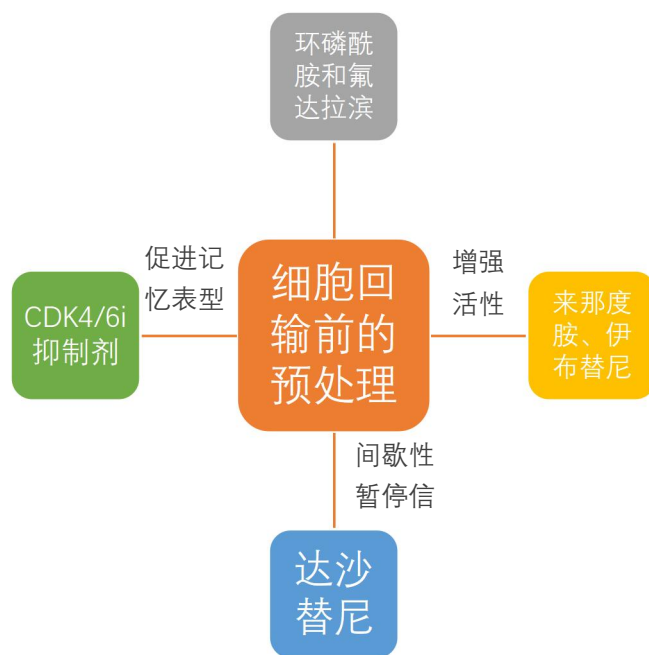


图 12 将 CAR-T 细胞回输给患者前改善患者体内微环境的方向与试验药物

(3) 治疗实体瘤

许多临床研究将 CAR-T 治疗作为多项适应症的末线疗法，为复发晚期患者带去了生的希望；CAR-T 作为一种新型的、可行的治疗方策，其靶点和适应症理论上都可以进行合适的拓展。不过由于 CAR-T 细胞治疗自身的特性所限，研究成果主要集中在血液瘤的治疗上，但未来的研究方向肯定会包括对实体瘤的攻克上。

表 3 实体瘤 CAR-T 在研靶点及适应症

靶点	适应症
CLDN18.2	胃癌
PSMA	前列腺癌
Mesothelin	恶性胸腺间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌、转移性胸腺（导管）腺癌等
FAP	间皮瘤
EGFRvIII	胶质瘤
EGFRvIII	恶性胶质瘤
CEA	肝转移
CD171	神经母细胞瘤
GD2	神经母细胞瘤、骨肉瘤、黑色素瘤等
Glypican-3	晚期肝癌
HER2	肉瘤、胶质母细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤
IL-13	胶质瘤

因此虽然 CAR-T 治疗肿瘤的研究仍充满了未知，这既是挑战也是转机，目前针对表 2 列出的靶点，已出现了多种优化方案。第一，设计双靶点 CAR-T 来减少抗原逃逸现象：Hegde 等报道了一种双特异性 CAR-T 分子，将 Her2 和 IL-13R α 2 的抗原识别区串联在一起并取名为 TanCAR，体内外试验均证明该双靶点 CAR-T 的杀伤效果强于单一靶点 CAR-T；第二，提高 CAR 的灵活性和通用性，包括利用接头系统，在不改变 CAR 结构的前提下，由接头实现不同的靶向性部分——例如连有单体链霉亲和素的 CAR-T 与生物素化肿瘤相关性抗原特异性抗体联合使用以实现多靶点同时杀伤；采用亮氨酸拉链作为接头系统开发出“分离、通用和可编程”的 CAR-T，简称 SUPER CAR 系统以提高免疫疗法的安全性及有效性。

为了治疗实体肿瘤，CAR-T 还能和其他新型治疗手段联合运用。

例如 mRNA 药物公司 BioNTech，利用 mRNA 疫苗+CAR-T 治疗实体瘤。他们鉴定了 Claudin6 (CLDN6) 为肿瘤特异性靶点，CLDN6 在人体内的表达受发育调控，主要在胎儿的器官中表达，在一般成人体内却不表达。但是 CLDN6 在卵巢癌、子宫癌和肺腺癌等肿瘤中高度表达，因此是一个高度肿瘤特异的靶点，是 CAR-T 治疗的理想靶点。他们首先使用 mRNA 疫苗实现体内扩增 CAR-T 细胞，从而保证 CAR-T 细胞的耐久性，并采用了脂质体来递送编码 CLDN6 mRNA 的疫苗，在注射到体内后，脾脏、淋巴结等处的抗原递呈细胞 (APCs) 能够将 CLDN6 抗原递呈到表面，这些 APCs 能够促进 CLDN6CAR-T 细胞的增殖。CLDN6mRNA 疫苗采用间隔重复的给药方式，每次给药后 CAR-T 细胞都会发生扩增，从而可以保持 CAR-T 细胞数目一直保持在较高水平，解决耐久性的问题。后续的动物实验证明 mRNA 疫苗+CAR-T 是很有希望进入临床试验阶段的。