

## 外周血来源的通用型 CAR-T 细胞产品研究进展和审评考虑

徐隆昌

(国家药品监督管理局药品审评中心,北京 100022)

**[摘要]** 自体 CAR-T(chimeric antigen receptor T cell) 细胞治疗产品在肿瘤治疗,尤其是血液系统肿瘤治疗方面取得了重大突破,但细胞来源等工艺缺陷一定程度上限制了其临床应用。相比自体 CAR-T 细胞治疗产品,通用型 CAR-T 细胞一定程度上克服了自体 CAR-T 细胞产品的工艺缺点,但也引入了新的质量控制挑战。本文结合当前研究进展,在对比自体 CAR-T 细胞产品药学研究的基础上,针对外周血来源的通用型 CAR-T 细胞产品在生产工艺和质量控制方面的特殊性进行介绍,并提出当前的审评考虑,以期能促进此类产品的研发和临床应用。

**[关键词]** 通用型 CAR-T; 生产工艺; 质量控制; 审评考虑

**[中图分类号]** R95; R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2022)21-2159-06

## Research development and review considerations of universal CAR-T cells derived from peripheral blood

XU Long-chang

(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China)

**[Abstract]** Autologous chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy products has achieved extraordinary achievements in antitumor treatment, especially against hematological malignancies. However, the limitation in the manufacturing of autologous CAR-T cells restricts its clinical application. Comparing to autologous CAR-T cells, universal CAR-T cells overcome some of limitations, but also bring some new challenges regarding quality control. Compared to autologous CAR-T cell products, this paper introduces the particularity of universal CAR-T cell products in manufacture process and quality control based on the research advancement, and puts forward the current review considerations, hoping to effectively promote the development and clinical application of such products.

**[Key words]** universal CAR-T cells; manufacture process; quality control; review considerations

嵌合抗原受体 T(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) 细胞治疗产品是指通过基因修饰得到的表达嵌合抗原受体(CAR)的 T 细胞治疗产品。通过 CAR 的抗原识别和信号激活功能, CAR-T 细胞可实现不依赖于主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)的抗原识别和肿瘤细胞的靶向杀伤活性。自细胞免疫疗法提出以来, CAR-T 细胞免疫疗法在肿瘤,尤其是血液系统肿瘤治疗方面取得了重大成就。截至 2022 年 1 月,

全球已有 7 款 CAR-T 细胞治疗产品获批上市,分别为 Novartis 公司的“Kymriah”、Kite Pharma 公司的“Yescarta”和“Tecartus”、BMS 公司的“Breyanzi”、Bluebird 公司的“Abecma”、复星凯特公司的“阿基仑赛注射液”、药明巨诺公司的“瑞基奥仑赛注射液”,以上产品均为自体 CAR-T 细胞治疗产品,主要以 CD19 或 BCMA(B-cell maturation antigen)为靶点,适应证以 B 细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤等血液系统肿瘤为主。

虽然 CAR-T 细胞产品在血液肿瘤治疗方面取得了较好的疗效,但由于目前在研和已上市的 CAR-T 细胞产品主要以自体细胞为主,以致于 CAR-T 细

**[作者简介]** 徐隆昌,男,博士,助理研究员,主要从事生物制品药审评工作。联系电话:(010) 85243067, E-mail: xulch@cde.org.cn。

胞在生产、临床应用等方面仍受到较多因素的限制:

① 患者身体状态和前期肿瘤治疗方案可能导致无法获得足够数量和相应质量的细胞用于生产。② 个体化定制产品一般需要花费约 2 周或更长的制备时间,部分患者可能由于疾病进展无法等待。③ 高额的治疗费用一定程度上影响了产品的可及性<sup>[1]</sup>。④ 残留的肿瘤细胞经 CAR 修饰,可能使肿瘤抗原靶点被掩蔽,造成免疫逃逸<sup>[2]</sup>。⑤ 由于个体化差异,部分患者可能不符合制备条件,无法参与 CAR-T 细胞治疗,另外,部分患者细胞存在制备失败的风险等。相对于自体 CAR-T 细胞,异体来源的 CAR-T 细胞无论在细胞来源、生产时间和成本、工艺可放大性或是临床应用的便利性方面均具有无可比拟的优势。因此,近年已有许多企业开始纷纷将重点转向通用型 CAR-T (universal CAR T cell,UCAR-T) 细胞的研发和生产。

相比自体 CAR-T 细胞,UCAR-T 细胞固然具有较多优势,但其研发和应用也面临新的挑战,如选择合适的 T 细胞来源、异体 T 细胞可能引发的移植物抗宿主病 (graft-vs.-host disease,GVHD) 以及患者免疫系统对异体细胞的免疫排斥反应等。因此,为克服由于细胞来源不同所带来的问题,UCAR-T 细胞的生产在原材料控制、工艺路线、质量控制等方面与自体 CAR-T 细胞产品存在一定差异<sup>[3]</sup>。本文以外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell,PBMC) 制备的 UCAR-T 细胞为例,结合当前此类产品的研发进展和审评经验,提出此类 UCAR-T 细胞治疗产品在注册临床研究 (IND) 阶段的审评考虑,以期能促进 UCAR-T 类细胞治疗产品的临床应用。

### 1 供者筛查

供者筛查是指确认供者或供者细胞是否符合生产条件的筛选和检查。对于自体 CAR-T 细胞产品来说,因细胞制备完成后仅供患者本人使用,供者筛查对患者或产品本身影响相对较小,筛查标准的设立重点在于降低生产失败的风险,同时预防生产过程中因样品可能携带的病原体而导致环境污染或不同患者细胞之间出现病原体的交叉污染。但对于 UCAR-T 细胞产品,一名供者提供的细胞经制备后可供数十甚至数百名患者使用,供者筛查标准的建立除预防生产过程中的污染外,更重要的意义在于保护患者避免因供者细胞质量差异或携带病原体而受到非预期损害。因此,针对 UCAR-T 细胞的供者有必要建立更严格、更全面的筛查标准,从起始原材料

阶段尽可能排除各种潜在的风险。

UCAR-T 细胞生产用 PBMC 通常采集自健康供者外周血,供者健康筛查标准一般包括一般信息、常规检查、病史调查、肿瘤标记物筛查、遗传病、病原体感染检查等。常规检查、肿瘤标记物筛查、病史调查和遗传病一般重点关注有可能对血细胞质量和细胞组分产生影响、具有易通过血液/淋巴系统转移的肿瘤,或易发生血液、淋巴系统肿瘤的因素或疾病,同时关注既往病原体,尤其是传染性病原体暴露风险。病原体检查常见如乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒 1/2 型、巨细胞病毒、EB 病毒、人类嗜 T 细胞病毒 1/2 型、单纯疱疹病毒、人类细小病毒 B19、人多瘤病毒、人乳头瘤病毒、腺病毒、梅毒螺旋体、疟原虫等,需重点筛查易通过血液和/或淋巴系统进行传播的细菌、病毒和寄生虫。此外,可能还需要考虑特定情况下,如疫情时期相关病原体(如新型冠状病毒等)、特定疫区病原体(如克雅病病毒等)、既往感染病原体(如伤寒杆菌、结核杆菌、狂犬病毒等)等项目的筛查。针对各个筛查项目,需同时明确筛查方法、评价标准等,筛查方法和标准应符合临床和检验科学对相应项目的标准和要求。病原体筛查一般建议优先选用经监管部门批准的试剂盒,乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、梅毒螺旋体等病原体标记检查应选择药品监管部门批准的血源筛查产品,检查方案的制定需同时考虑病原体检出窗口期的问题,针对不同病原体的窗口期,选择适当的采样和检测时间。

采集细胞的质量易受供者生理、健康状态以及个体化差异的影响,而供者细胞的组成、细胞亚型、细胞活力等可能对终产品的有效性和不良反应的发生率产生影响。作为商品化产品,有必要在起始阶段对采集细胞的质量进行监测和控制,包括细胞的类型、细胞活力等。结合前期知识和平台经验,IND 阶段初步拟定监测项目,临床期间结合临床安全性和疗效分析,逐步优化监测项目,以保证最终上市产品质量和疗效的一致性。

### 2 通用型 CAR

近些年,CAR 结构的设计经历了数代的发展:第一代 CAR 由一个胞外抗原结合结构域(通常为单链抗体可变区片段)、跨膜区和胞内信号转导结构域 CD3 $\zeta$  组成,可短暂促进细胞增殖和细胞因子的释放;第二代 CAR 结构在第一代 CAR 的基础上增加了类似 CD28 或 4-1BB 这样的共刺激结构域,可

更有效地促进 T 细胞的存活和功能活性; 第三代 CAR 则在第二代的基础上增加了共刺激结构域的数量, 但目前此类改造在临床上似乎并未展现出明显的优势<sup>[4]</sup>; 第四代 CAR 在前期 CAR 结构的基础上增加了开关元件、自杀基因或调节元件等。

随着 CAR 结构的发展, UCAR-T 细胞除了具有可用第三方供者细胞生产并供异体使用的优势外, 其 CAR 的结构设计也已逐步向模块化、通用型发展。通用型、模块化 CAR 结构通常可分割为 2 个模块: ① 在 T 细胞上表达的“信号传导模块( signaling module)”, 包括可特异性结合信号转换模块的胞外结构域和胞内信号传递激活结构域。② “信号转换模块( switching module)”, 通常包括可特异性结合肿瘤抗原的抗体部分和可被 T 细胞信号传导模块特异性结合的转换部分。通过“信号传导模块”的胞外结构域特异性结合“信号转换模块”, 将肿瘤抗原的识别信号转化为 T 细胞激活信号。目前常见的通用型 CAR 信号转化模式包括生物素-亲和素系统( biotin-avidin)、FITC-抗 FITC scFv 系统、SpyTag-SpyCatcher 系统、亮氨酸拉链( leucine zippers)、NKG2D 配体-突变 NKG2D 和 BG-SNAPtag 系统等<sup>[4]</sup>。这种分离、灵活的通用型 CAR 结构设计, 改变了传统 CAR 的结构和作用模式, 在临床应用方面可能会具有更多优势<sup>[3]</sup>, 具体体现在: ① 可通过调节转换模块的使用剂量, 调控 CAR-T 细胞的活性。② 通过设计和调节转换模块与肿瘤抗原的亲和力, 调节 CAR-T 细胞的活性。③ 通过添加转换模块的阻断剂阻断 CAR-T 细胞活性。④ 通过更换转换模块, 可在不改变 CAR-T 细胞的情况下改变靶点。⑤ 可同时使用多个转换模块, 实现多靶点 CAR-T 细胞同时治疗。以上特征可能使 CAR-T 细胞治疗在靶点选择、活性和不良反应控制方面更具有优势。

通用型 CAR 虽然具有上述诸多优势, 但其研发工作也必然更为复杂。除了需要参考一般 CAR-T 细胞的研发要求对信号传导模块进行研究和控制外, 还需要同步参考重组蛋白或抗体相关指导原则开展信号转换模块的研究, 并对信号传导模块和信号转换模块之间的相互作用模式进行研究。外源性的模块化 CAR 结构, 尤其是接头分子, 有可能在临床应用中产生中和性抗体, 有必要在接头分子的选择和设计中考虑其免疫原性。另外, 每一个新的信号转换模块可能都需要开发各自的生产工艺, 并通过非临床和临床试验来验证其安全性和有效性。虽

然通用型 CAR 的研发负担更为繁重, 但将模块化的 CAR 和通用型的 T 细胞相结合, 将有可能得到一个可转换抗原、可灵活调节的 UCAR-T 细胞, 使 CAR-T 细胞疗法的临床应用得到更大的拓展。

### 3 生产工艺方面的考虑

自体 CAR-T 细胞的生产一般包括 PBMC 细胞的分离、T 细胞的筛选、T 细胞的激活、CAR 转导、细胞扩增、细胞收获和冻存等步骤。由于异体 T 细胞的内源性 T 细胞受体( TCR) 通过识别异源性抗原可导致 GVHD, 同时异体 T 细胞表达的人类白细胞抗原( human leukocyte antigen, HLA) 也可引起宿主免疫系统的快速免疫排斥反应。因此, 相比自体 CAR-T 产品的生产工艺, UCAR-T 细胞的生产工艺往往需要设计特定的工艺单元以降低或消除 GVHD 和宿主免疫排斥反应。

#### 3.1 基因编辑技术

对于异体细胞移植来说, GVHD 可能是导致受者死亡的重要原因之一。对于来源于异体细胞的 UCAR-T 细胞, 去除或降低 GVHD 是其首先面临的挑战。早期为了避免出现 GVHD, 通常选择 MHC 配型成功的造血干细胞供者细胞用于 UCAR-T 细胞生产。研究显示, 此类细胞制品在临床完全缓解率和长期生存率方面与自体 CAR-T 细胞未见明显差异<sup>[5]</sup>。但不同研究中, 同型供者 CAR-T 细胞发生 GVHD 的概率存在较大差异<sup>[5-7]</sup>。分析认为, 这种 GVHD 发生概率的差异可能与异体 CAR-T 细胞上的 TCR 和 CAR 的双重激活相关, 但具体关系有待进一步确认<sup>[3]</sup>。近些年随着基因编辑技术的发展, ZNF( zinc-finger nucleases)、TALEN( transcription activator like effector nucleases) 和 CRISPR/Cas9 等已成为基因编辑的主要工具, 尤其是 CRISPR/Cas9 系统已在 UCAR-T 细胞的生产中广泛使用。敲除 T 细胞内源性 TCR, 如敲除 TCR $\alpha$  constant( TRAC) 和/或 TCR $\beta$  constant1( TRBC1) 或 2( TRBC2)<sup>[8]</sup>, 已成为当前 UCAR-T 细胞生产中消除 GVHD 风险的主要策略。另外有研究认为, 将 CAR 基因插入 T 细胞的 TRCA 位点, 可在敲除 TCR 的同时, 在 TCR 启动子的调控下实现 CAR 基因的增强表达, 同时又降低了 CAR 的插入致癌性风险<sup>[8]</sup>。

另一方面, 由于异体细胞自身的免疫原性, 可导致患者免疫系统对输注的 UCAR-T 细胞产生免疫排斥反应, 以至异体 CAR-T 细胞在体内存续时间缩短, 难以形成记忆细胞等, 影响治疗的持续性和疗

效。当前一般通过缓解宿主免疫排斥反应或降低输注细胞的免疫原性解决这一问题,如敲除 CAR-T 细胞的 *CD52* 基因、脱氧胞嘧啶核苷激酶( deoxycytidine kinase) 基因或 *CD7* 基因等,使异体 CAR-T 细胞获得对相应靶点药物的抗性;在治疗时注射相应靶点药物,以抑制宿主免疫排斥反应<sup>[9-10]</sup>。另外,通过敲除 UCAR-T 细胞的  $\beta$ -2 微球蛋白( $\beta$ -2 microglobulin, B2M)、*RFXANK*( regulatory factor X ankyrin repeat-containing protein) 和 *CIITA* ( class II MHC transactivator) 等基因,可不依赖于药物输注或清淋,降低由 MHC-I 和/或 MHC-II 引起的异物排斥反应<sup>[11-12]</sup>。需要关注的是,缺少 MHC-I 的 UCAR-T 细胞可能会激活宿主的 NK 细胞,导致异体 UCAR-T 细胞被清除,但这一问题有可能通过过表达 *HLA-E/G* 或 *Siglec 7/9* 等得以改善<sup>[12-13]</sup>。

### 3.2 CRISPR/Cas9 系统的质量控制

CRISPR/Cas9 系统可通过质粒、病毒载体(慢病毒载体、腺病毒载体等)、Cas9 核糖核蛋白等形式转入细胞,但不同的系统形式在转染和编辑效率方面可能存在不同的缺陷,如质粒 DNA 虽然操作简便但存在转染试剂的细胞毒性问题、病毒载体的非定点插入对基因组产生干扰以及基因编辑效率可能不够高的问题。相比质粒和病毒载体系统而言,以 Cas9 核糖核蛋白复合物电转的形式对 T 细胞进行基因编辑,Cas9 和 sgRNA 在细胞内的存续时间较短,脱靶风险相对较低,且显示了相当的基因编辑效率<sup>[14]</sup>。由于质粒和病毒载体在细胞产品中应用已较为普遍,以下重点针对 Cas9 和 sgRNA 的质量控制进行介绍。

#### 3.2.1 sgRNA 的质量控制

脱靶作为 CRISPR/Cas9 编辑技术的主要风险,需要通过多方面的优化以降低脱靶风险,而 sgRNA 序列的选择在降低脱靶风险方面起着决定作用。目前,虽然有较多通过算法预测脱靶风险以帮助设计 sgRNA 序列的平台,但不同平台的算法或预测方式可能存在一定差异。研发时,有必要对比多个平台预测的脱靶风险和基因编辑效率,结合序列的长度、末端碱基组成、GC% 含量等对脱靶的影响,选择最优的 sgRNA 序列。例如,研究显示,截短的 17nt sgRNA 可能因为降低了与靶序列的亲合力,对错配序列更敏感,有利于提高结合敏感性<sup>[15]</sup>。

sgRNA 一般通过化学合成的方式生产,其工艺设计应在确保序列正确性的同时,尽可能减少工艺

和产品相关杂质。其中,工艺相关杂质主要包括合成和纯化过程中添加的各种化学物质,产品相关杂质主要包括合成和纯化过程中可能出现的非预期序列形式,如截短序列、突变序列、双链 RNA 序列、超长序列、修饰不完全序列等。因此,除了无菌和内毒素外,sgRNA 的质量标准至少还应包括测序分析、含量、纯度等检项。对残留风险较高的工艺相关杂质进行控制,同时根据产品相关杂质的研究,对相应非预期序列的含量进行控制。sgRNA 的保存和降解产物应不影响其靶向特异性。

#### 3.2.2 Cas9 蛋白的质量控制

Cas9 蛋白在基因编辑过程中发挥基因酶切作用,通过优化 Cas9 蛋白结构,提高 Cas9 蛋白的酶切特异性也有助于降低脱靶风险。如通过选用新型的 Cas9 变体可以拓宽 PAMs 序列谱,增加 sgRNA 序列的选择范围,有助于选择出特异性更高的打靶序列;优化 Cas9 蛋白的结构得到高忠实度的 Cas9 蛋白( high fidelity Cas9, Cas9HF),也可以提高酶切特异性<sup>[14]</sup>。此外,其他改构的 Cas9 或 Cas9 类似物,如单链酶切 Cas9( Cas9 nickase)、失活 Cas9 与 FoKI 融合形式、条件表达 Cas9 或活性可调控 Cas9 等对于降低脱靶风险也可能有帮助<sup>[14]</sup>。

Cas9 蛋白一般通过重组表达体系生产,可根据工艺特点参考重组蛋白制品或抗体类产品相关指导原则对 Cas9 进行研究和质量控制。除外观、鉴别、含量、外源因子、内毒素、工艺相关杂质残留、纯度、活性等一般项目外,Cas9 的质量研究需重点关注对影响 Cas9 蛋白酶切活性和酶切特异性的产品相关杂质的控制,同时考虑 Cas9 的降解产物对酶切活性和脱靶的影响。

#### 3.2.3 基因编辑工艺的开发

基因编辑工艺作为 UCAR-T 细胞生产的关键步骤,除了可直接影响产品的编辑效率外,还有可能对脱靶风险产生影响。部分研究显示,T 细胞的编辑效率与电转时间密切相关,未经刺激的原代 T 细胞或初始 T 细胞( naïve T cells) 对外源核酸或蛋白的接受能力明显低于激活后的 T 细胞<sup>[16]</sup>。单次转染实现多基因的编辑方式相比多次转染对细胞毒性更小,但基因编辑效率也有所降低<sup>[17]</sup>。另外,Cas9 mRNA 或蛋白所介导的基因编辑,可能由于 RNA 或蛋白质的快速降解,比质粒或病毒转导方式脱靶风险更低<sup>[18]</sup>。合理控制 sgRNA, Cas9 的用量或 Cas9 的表达时间也有利于控制和降低脱靶风险<sup>[19-20]</sup>。

产品开发过程中,需要对基因编辑工艺条件,如

T 细胞的激活时间、转染时间、转染方式、编辑系统的选择、Cas9 和 sgRNA 用量等进行充分的研究,选择确定脱靶风险小且编辑效率高的工艺条件。有研究报道,经过合理优化的转染工艺,可使多基因编辑效力高达 60%<sup>[11]</sup>。虽然这一编辑效率相比早期 CRISPR/Cas9 系统已有较大提高,但这也提示了基因编辑不完全的客观事实,需要进一步结合其他工艺步骤和质量控制以降低 GVHD 风险和宿主排斥异体细胞的概率。

#### 4 产品质量研究

##### 4.1 UCAR-T 细胞质量研究

UCAR-T 细胞产品与自体 CAR-T 细胞在质量研究方面有许多相似之处,如在研发过程中均需要考虑细胞的鉴别、细胞数量和活率、细胞亚型和组成、细胞生物学活性、CAR 拷贝数、复制型病毒、杂质残留水平、非目标细胞残留、外源因子和内毒素、一般理化特性等。但由于工艺和产品设计不同,UCAR-T 细胞在质量研究与控制方面仍有其需要特殊关注的方面,如同一供者和不同供者制备细胞批次间质量的差异、产品脱靶风险研究与控制、基因编辑效率与 GVHD 风险控制等。

UCAR-T 细胞需要对产品的基因编辑效率进行研究和控制。因 TCR 基因编辑不完全导致 TCR<sup>+</sup> 细胞的残留可能会引起 GVHD 风险,需要通过工艺设计和产品放行对如 CD<sub>3</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>3</sub><sup>+</sup> 细胞组分含量进行严格控制。此外,宿主细胞免疫排斥异体 T 细胞可能对 UCAR-T 细胞在受体体内的存续时间或功能细胞的数量产生影响,需要同步控制如 CD<sub>52</sub><sup>+</sup> 或 B2M<sup>+</sup> 等细胞的含量。对于经分析确认的未编辑细胞的水平,尤其是 TCR 编辑不完全细胞的水平,可能需要结合先验知识、非临床研究批次的残留水平等综合评价产品基因编辑不完全引发 GVHD 的风险。与此同时,临床试验方案应考虑制定针对 GVHD 的应对方案。

##### 4.2 脱靶风险分析

CRISPR/Cas9 基因编辑的脱靶概率与编辑条件和细胞类型密切相关<sup>[20]</sup>。作为商品化 UCAR-T 细胞产品,需要结合不同供者样本,各类最差条件下的脱靶分析,综合分析产品的脱靶位点和脱靶风险。除正常操作外,研究条件的设定可能还需要考虑 sgRNA 和 Cas9 用量、sgRNA 和 Cas9 相关杂质和降解产物以及其他工艺步骤可能对脱靶风险的影响。

理论上,脱靶分析检测可直接通过检测与靶序

列存在 1~6 个核苷酸错配的潜在脱靶位点,但由于当前大部分脱靶位点预测算法均存在一定偏差,难以覆盖所有基因组脱靶位点,因此,精确预测所有脱靶酶切位点仍存在一定挑战。外显子测序技术目前常用于脱靶分析,但由于方法存在较高的假阴性率,检测结果的解释存在一定限制。另外,除外显子外,许多非外显子区域也可能在细胞中发挥了重要作用。相对而言,全基因组双链断裂位点检测是一个相对无偏差的检测,Cas9 介导酶切特异性的方法,常见方法如 GUIDE-Seq<sup>[21]</sup> (genome-wide unbiased identification of DSBs enabled by sequencing),LAM-PCR HTGTS<sup>[22]</sup> (linear-amplification-mediated PCR high-throughput, genome-wide translocation sequencing),BLESS<sup>[23]</sup> (in situ breaks labelling, enrichments on streptavidin, and next generation sequencing),Digenome-Seq<sup>[24]</sup> (digested genome sequencing) 等。根据不同分析方法的特点,选择多种脱靶分析方法对工艺样品或模拟样品进行分析,尽可能全面覆盖产品潜在脱靶位点。根据脱靶位点的基因功能和脱靶概率,分析脱靶风险和对产品质量、安全性和活性的影响。

#### 5 细胞来源和类型的其他考虑

相比自体 CAR-T 细胞,目前 UCAR-T 细胞制备所选用的细胞来源较多,除健康供者的外周血 T 细胞外,还可见脐带血 T 细胞、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC) 分化 T 细胞等。细胞来源不同,所制备的 UCAR-T 细胞在活性和不良反应方面也可能存在一定差异。如有研究报道,脐带血来源的 T 细胞,可能由于 NF- $\kappa$ B 通路活性较低,产生的促炎细胞因子较少,相对外周血 T 细胞来源的 UCAR-T 细胞引起 GVHD 的风险和强度也较低<sup>[25-26]</sup>,但两者在细胞组分和细胞亚型方面的差异对产品有效性和其他安全性的影响还有待进一步研究。诱导多能干细胞分化而来的 UCAR-T 细胞,虽然可通过诱导多能干细胞的扩增能力进行建库生产,避免供者重复采样操作,但多能干细胞的诱导和分化操作相对复杂,细胞分化程度和产品质量控制也更有挑战,加上 CAR 转导和基因编辑操作的影响,往往需要更多的研发投入。

虽然通过基因编辑可以有效降低 GVHD 的发生风险,但由于目前基因编辑效率无法达到 100%,未编辑细胞的残留仍有引发 GVHD 的风险。有研究认为,GVHD 的发生主要与 CAR-T 细胞的主要类型  $\alpha$  和  $\beta$  T 细胞相关,选择  $\gamma$  和  $\delta$  T 细胞、iNKT( invariant

natural killer T) 细胞等细胞亚型用于 UCAR-T 生产, 或能进一步降低 GVHD 的风险<sup>[27]</sup>。此外, 由于 GVHD 的发生风险与供者 T 细胞 TCR 库的多样性以及输注细胞的数量密切相关。选用 TCR 库多样性较低、相对较纯的 T 细胞用于生产 CAR-T 细胞也有利于降低 GVHD 的风险<sup>[28]</sup>。如有研究报道, 采用病毒特异性 T 细胞用于 CAR-T 细胞生产, 也可以降低 GVHD 发生的风险, 但这种特异性对风险的降低效果一般难以预测<sup>[29]</sup>。因此, 在开发前期, 有必要充分对比和评估供者细胞的来源和类型, 以选择适当的细胞来源用于产品开发。

## 6 结语

自体 CAR-T 细胞产品虽然在血液系统肿瘤治疗方面取得了较好的成绩, 但由于其自身的工艺特点, 在产品生产和临床应用方面仍存在较多局限。UCAR-T 细胞的设计在很大程度上弥补自体 CAR-T 细胞产品的缺陷, 但也同时带来了新的问题和挑战。与此同时, 基因编辑技术的发展为解决这些障碍提供了新的策略。虽然目前在研的 UCAR-T 细胞产品较多, 但其工艺开发和质量控制方面的认知仍较为有限。在自体 CAR-T 细胞产品的基础上, 本文结合研发进展, 对 IND 阶段 UCAR-T 细胞产品的工艺和质控特点进行总结, 并提出审评的初步考虑, 希望能有助于今后此类产品的研发。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] SIEGLER EL, ZHU YN, WANG P, *et al.* Off-the-shelf CAR-NK cells for cancer immunotherapy [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(2): 160-161.
- [2] RUELLA M, XU J, BARRETT DM, *et al.* Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell [J]. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1499-1503.
- [3] LIN HL, CHENG JL, MU W, *et al.* Advances in universal CAR-T cell therapy [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 744823.
- [4] RAMELLO MC, BENZAI D I, KUENZI BM, *et al.* An immunoproteomic approach to characterize the CAR interactome and signalosome [J]. *Sci Signal*, 2019, 12(568): eaap9777.
- [5] HU YX, WANG JS, WEI GQ, *et al.* A retrospective comparison of allogeneic and autologous chimeric antigen receptor T cell therapy targeting CD19 in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2019, 54(8): 1208-1217.
- [6] BRUDNO JN, SOMERVILLE RPT, SHI V, *et al.* Allogeneic T cells that express an anti-CD19 chimeric antigen receptor induce remissions of B-cell malignancies that progress after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation without causing graft-versus-host disease [J]. *J Clin Oncol* 2016, 34(10): 1112-1121.
- [7] KOCHENDERFER JN, DUDLEY ME, CARPENTER RO, *et al.* Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Blood*, 2013, 122(25): 4129-4139.
- [8] EYQUEM J, MANSILLA-SOTO J, GIAVRIDIS T, *et al.* Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances

- tumour rejection [J]. *Nature*, 2017, 543(7643): 113-117.
- [9] VALTON J, GUYOT V, MARECHAL A, *et al.* A multidrug-resistant engineered CAR T cell for allogeneic combination immunotherapy [J]. *Mol Ther*, 2015, 23(9): 1507-1518.
- [10] COOPER ML, DIPERSIO JF. Chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) for the treatment of T-cell malignancies [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2019, 32(4): 101097.
- [11] REN JT, LIU XJ, FANG CY, *et al.* Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9): 2255-2266.
- [12] MORGAN MA, BÜNING H, SAUER M, *et al.* Use of cell and genome modification technologies to generate improved "off-the-shelf" CAR T and CAR NK cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1965.
- [13] GORNALUSSE GG, HIRATA RK, FUNK SE, *et al.* HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and Lysis by NK cells [J]. *Nat Biotechnol* 2017, 35(8): 765-772.
- [14] MOLLANOORI H, SHAHRAKI H, RAHMATI Y, *et al.* CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment [J]. *Hum Immunol*, 2018, 79(12): 876-882.
- [15] FU YF, SANDER JD, REYON D, *et al.* Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 279-284.
- [16] HENDEL A, BAK RO, CLARK JT, *et al.* Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(9): 985-989.
- [17] LIU XJ, ZHANG YP, CHENG C, *et al.* CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells [J]. *Cell Res*, 2017, 27(1): 154-157.
- [18] KIM S, KIM D, CHO SW, *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins [J]. *Genome Res*, 2014, 24(6): 1012-1019.
- [19] FU YF, FODEN JA, KHAYTER C, *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 822-826.
- [20] CHO SW, KIM S, KIM Y, *et al.* Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases [J]. *Genome Res*, 2014, 24(1): 132-141.
- [21] MALININ NL, LEE G, LAZZAROTTO CR, *et al.* Defining genome-wide CRISPR-cas genome-editing nuclease activity with GUIDE-seq [J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(12): 5592-5615.
- [22] HU JZ, MEYERS RM, DONG JC, *et al.* Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(5): 853-871.
- [23] MIRZAZADEH R, KALLAS T, BIENKO M, *et al.* Genome-wide profiling of DNA double-strand breaks by the BLESS and BLISS methods [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1672: 167-194.
- [24] KIM D, KIM JS. Profiling genome-wide specificity of CRISPR-Cas9 using digenome-seq [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2162: 233-242.
- [25] KAMINSKI BA, KADEREIT S, MILLER RE, *et al.* Reduced expression of NFAT-associated genes in UCB versus adult CD4+ T lymphocytes during primary stimulation [J]. *Blood*, 2003, 102(13): 4608-4617.
- [26] NITSCHKE A, ZHANG MX, CLAUS T, *et al.* Cytokine profiles of cord and adult blood leukocytes: differences in expression are due to differences in expression and activation of transcription factors [J]. *BMC Immunol*, 2007, 8: 18.
- [27] ABDELHAKIM H, ABDEL-AZIM H, SAAD A. Role of  $\alpha\beta$  T cell depletion in prevention of graft versus host disease [J]. *Bio-medicines*, 2017, 5(3): 35.
- [28] DEPIL S, DUCHATEAU P, GRUPP SA, *et al.* "Off-the-shelf" allogeneic CAR T cells: development and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(3): 185-199.
- [29] D'ORSOGNA LJA, ROELEN DL, DOXIADIS IIN, *et al.* Allo-reactivity from human viral specific memory T-cells [J]. *Transpl Immunol*, 2010, 23(4): 149-155.

编辑: 杨青/接受日期: 2022-09-15

