

# 细胞免疫治疗载体技术的现状与展望\*

刘秀盈<sup>1</sup> 刘静静<sup>1</sup> 崔鑫铭<sup>1</sup> 于梦圆<sup>1</sup> 史渊源<sup>1,2</sup> 王建勋<sup>1,2\*\*</sup>

(1 北京中医药大学生命科学院 北京 10000 2 深圳细胞谷生物医药有限公司 深圳 518000)

**摘要** 近年我国细胞免疫治疗发展迅速,从零基础直追国际前沿水平。在细胞免疫疗法蓬勃发展的背后,将基因导入靶细胞并使其进行表达的基因递送载体技术的支持不可或缺。如何更加安全高效地进行基因转递也是困扰行业发展的重要瓶颈之一。通过总结目前细胞治疗领域主要应用的载体技术发展现状,并对比已经上市产品的工业化生产流程,以期为后续载体技术的发展提供参考。

**关键词** 细胞免疫治疗 基因递送载体 工业化生产

**中图分类号** Q813

2023年6月30日,由信达生物与驯鹿生物共同开发及商业化的细胞免疫治疗产品伊基奥仑赛注射液(商品名:福可苏)通过优先审评审批程序附条件获得国家药监局审批上市许可。福可苏是国内首个获批靶向B细胞成熟抗原(BCMA)的嵌合抗原受体T细胞治疗(CAR-T),也是第一款完全意义上本土发展的产品。细胞治疗作为一种治疗手段已经在临床崭露头角,2019年美国癌症年会就将其与手术、放疗、化疗和靶向治疗并列为癌症治疗的五大支柱<sup>[1]</sup>。在其他疾病方面,细胞免疫治疗也逐渐成为发展的重要方向,也是继小分子、大分子靶向疗法之后的新一代精准疗法,其中基因编辑的过程非常重要,将外源基因导入免疫细胞中需要合适的载体技术。例如,CAR-T细胞生产过程中,将CAR基因转导进入T细胞所采用的载体被认为是制造过程中的关键原材料。理想载体应具备以下几个特点:(1)有足够的空间来递送大片段的治疗基因;(2)具有高转导效率;(3)可以长期稳定表达转基因;(4)具有较低的免疫原性或致病性,不会引起炎症;(5)具备大规模的生产能力。本文将对细胞治疗载体技术的现状进行综述并提出展望。

## 1 细胞免疫治疗

如图1所示,细胞免疫治疗是指通过采集人体的

免疫细胞,经过体外培养以富集扩增其中某种免疫细胞或增加靶向性杀伤功能,然后再回输回患者体内,从而杀灭患者体内的病灶,通常是癌组织、病变细胞或病原体等<sup>[2]</sup>。与传统医学借助外源药物来干预病原不同,细胞治疗开创了一种全新的医疗理念,即将人体自身作为治疗的基础。免疫细胞是人体的防卫军,是人体免疫系统的重要组成部分,负责杀灭对人体有害的病原体、病变细胞或癌细胞,免疫细胞包括人体的T细胞、NK细胞、B细胞、树突状细胞(DC)等。细胞免疫疗法正是利用了这种强大的功能,将其改造为具有持久功能的“活药”。1984年,Rosenberg发明了LAK细胞疗法并于11月获美国食品药品监督管理局(FDA)批准进行临床试验,其被誉为“过继性细胞疗法的开创者”<sup>[3]</sup>。世界上第一位接受CAR-T细胞治疗的白血病患者,Emily Whitehead至今已经无癌生存了11年,这在细胞免疫疗法之前是不可想象的。经过近40年的发展,细胞免疫疗法不仅效果良好已经上市的产品,还有更多在研的产品进入临床试验阶段,表1总结了细胞免疫治疗的主要发展历程。

## 2 细胞免疫治疗中的基因递送载体技术

纵观细胞免疫疗法,特异性越来越强是很明显的发展趋势,为了增强靶向性的杀伤功能,必须对提取的免疫细胞进行基因改造,这就意味着高效安全的基因递送载体技术不可或缺。2020年诺贝尔化学奖得主

收稿日期:2023-08-15 修回日期:2023-09-08

\* 高层次人才科研启动经费(9011451310032)资助项目

\*\*通讯作者,电子邮箱:jianxun.Wang@bucm.edu.cn

表 1 细胞免疫治疗的发展

Table 1 Development of cellular immunotherapy

代数	主要产品	特点
第一代	淋巴因子激活的杀伤细胞疗法 (LAK)	非特异性, 广谱杀伤能力
第二代	细胞因子诱导的杀伤细胞疗法 (CIK)、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)	非特异性, 广谱杀伤能力
第三代	细胞因子诱导的杀伤细胞-树突状细胞混合疗法 (DC-CIK)	非特异性, 混合培养能够增强 NKT 的广谱杀伤能力
第四代	嵌合抗原受体 T 细胞、NK 细胞或巨噬细胞治疗 (CAR-T、CAR-NK、CAR-M), T 细胞受体嵌合 T 细胞治疗 (TCR-T), 树突状细胞疗法 (DC-based immunotherapy)	特异性, 绕过了抗原呈递过程, 直接靶向性杀伤高表达靶抗原的细胞或组织, 能够在体内长期存活, 或能够直接诱导多种细胞进行免疫应答

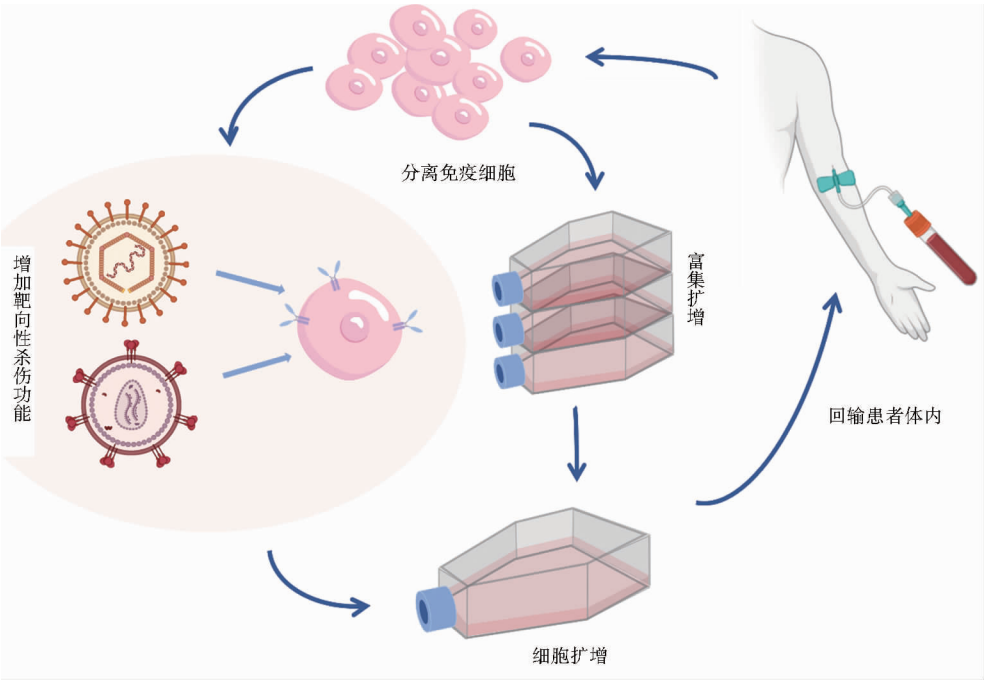


图 1 细胞免疫治疗的流程

Fig.1 Process of cellular immunotherapy

Doudna<sup>[4]</sup>认为递送仍然是基因编辑体细胞治疗的最大瓶颈。以目前细胞免疫治疗中最火爆的 CAR-T 项目为例,表 2 总结了在我国和美国已经上市的细胞产品采用的基因递送载体技术,主要集中为两类病毒载体,即逆转录病毒载体和慢病毒载体。但随着新技术的发展,在研的细胞免疫治疗技术中采用的底层载体技术远远不止上述两种,下文对目前比较常见递送载体进行简要介绍。

2.1 逆转录病毒载体

逆转录病毒 (retroviruses, RV) 又称反转录病毒,是一种 RNA 病毒,其两端为长末端重复序列 (LTR)<sup>[5]</sup>。该病毒呈球形,有包膜,表面有刺突,颗粒比较大,直径为 80 ~ 100 nm,是一种包膜蛋白壳,包含病毒基因组<sup>[6]</sup>。

表 2 上市 CAR-T 产品信息 (中国、美国)

Table 2 Information on listed CAR-T products (China, USA)

上市时间	商品名	靶点	载体
2017 年 8 月	Kymriah	CD19	慢病毒载体
2017 年 10 月	Yescarta	CD19	逆转录病毒载体
2020 年 7 月	Tecartus	CD19	逆转录病毒载体
2021 年 2 月	Breyanzi	CD19	慢病毒载体
2021 年 3 月	Abecma	BCMA	慢病毒载体
2021 年 6 月	奕凯达	CD19	逆转录病毒载体
2021 年 9 月	倍诺达	CD19	慢病毒载体
2022 年 2 月	Carvykti	BCMA	慢病毒载体
2023 年 6 月	福可苏	BCMA	慢病毒载体

衣壳周围的包膜结构实际上是起源于宿主细胞的脂质双层,含有病毒编码的表面糖蛋白和跨膜糖蛋白。逆转录病毒复制有一个必需步骤:在逆转录酶的作用下,其基因组 RNA 可被逆转录为前病毒 DNA (proviral DNA),随后借助整合酶的作用通过前病毒两端 LTR 插入到宿主细胞的基因组中<sup>[7]</sup>。一般来说,简单的逆转录病毒包含三个主要编码片段和一个小型编码域。主要片段包含三个基因——*gag*、*pol* 和 *env*,*gag* 编码病毒的核心蛋白、*pol* 编码逆转录酶、*env* 编码病毒外膜糖蛋白<sup>[8]</sup>。作为最早被开发的一类病毒载体,通过多次改进,目前逆转录病毒载体 (retroviral vector, RVV) 仅具备单次感染能力,感染的宿主细胞不能产生可以复制的病毒,病毒载体的致病性大为下降。

主要上市和在研的产品大部分采用的是  $\gamma$ -逆转录病毒载体,现有的逆转录病毒载体主要分为三型<sup>[9]</sup>。第一型是双表达 (double expression, DE) 载体,含两个外源基因,一个基因取代 *gag/pol* 片段,表达为非剪接的 RNA 形式,且不含内含子序列。第二型是具有内部启动子的载体,由于病毒载体内部有一个启动子,不同类型的启动子导致病毒的效价不同,选择合适的启动子可以提高 10 ~ 50 倍病毒效价,在较难转导的原代淋巴样细胞和骨髓祖细胞中有较广泛应用。第三型被称为是自灭活载体 (self-inactivating vector, SIN),该载体中 3'LTR 缺失增强子和启动子序列,它们的缺失并不影响病毒功能,但可以使病毒载体整合入靶细胞染色体时本身不具备活性,提高安全性。

目前逆转录病毒载体生产制备的主要流程为:目的基因获取→构建质粒测序验证→病毒瞬时包装→筛选得到稳转细胞系→扩大培养→收获病毒上清液→纯化病毒。科研级逆转录病毒载体的生产过程无须筛选稳转细胞系,过程较为简单,收获病毒产量较低,进行浓缩后可供科学研究使用。逆转录病毒载体工业化生产工艺更加完善,通过转染一种包装细胞并用这些细胞产生的病毒上清液转导另外一种包装细胞,然后筛选第二种包装细胞的稳转细胞系来收集逆转录病毒载体<sup>[10]</sup>。瞬时转染的病毒载体存在较大异质性<sup>[11]</sup>,通过筛选稳转细胞系甚至挑选单克隆细胞库,使生产病毒载体的细胞基因水平稳定、平均<sup>[12]</sup>,使产生的病毒载体产品质量稳定,工艺放大容易,单个批次生产的逆转录病毒载体可供多达 1 000 名患者进行细胞治疗,这种大规模生产大大节约了成本<sup>[13]</sup>。采用逆转录病毒载体工艺已经上市的产品均定价较低,受益人群更多,从长远

应用和效益来看,逆转录病毒载体具有很大优势。一项研究对 1997 年包装并储存的逆转录病毒载体上清液和 2008 年新鲜包装的病毒载体进行了对比,虽然 10 年的储存略降低了逆转录病毒载体的质量,但靶细胞的转导效率和增殖能力与 2008 年的对比并未显著下降,这说明逆转录病毒载体具有很强的稳定性<sup>[14]</sup>。

## 2.2 慢病毒载体

慢病毒属于逆转录病毒科,是一种 RNA 病毒,是直径为 80 ~ 120 nm 的球形颗粒。它存活和功能所需的基本基因是 *gag*、*pol* 和 *env*,*gag* 编码结构蛋白、*pol* 编码逆转录和整合到宿主细胞基因组所需的酶、*env* 编码病毒包膜糖蛋白<sup>[15]</sup>。慢病毒载体 (lentivirus vector, LVV) 是一类改造自人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的病毒载体<sup>[16]</sup>,生产病毒滴度浓缩后可高达  $10^9$  TU/mL,通常用于细胞和基因治疗<sup>[17]</sup>。它能够感染分裂期与非分裂期细胞,可利用逆转录酶将外源基因整合到宿主基因组中,并长期稳定表达,如神经元、造血干细胞和免疫系统细胞<sup>[18]</sup>。

现有的慢病毒载体主要可以分为三代:第一代慢病毒载体系统由 *env* 包装质粒、异源包膜蛋白 VSV-G 质粒及载体质粒组成,包含很大一部分 HIV 基因组,包括 *gag* 和 *pol* 基因,慢病毒辅助基因 *vif*、*vpr*、*vpu*、*nef*,以及调节基因 *tat* 和 *rev*<sup>[15]</sup>。由于 *tat* 和 *rev* 是病毒复制所必需的基因,而 *vif*、*vpr*、*vpu* 和 *nef* 基因对病毒在体外生长不是必需的。因此,第二代慢病毒载体去除了辅助基因 *vif*、*vpr*、*vpu*、*nef*,在不影响载体产量和感染效率的情况下提高了安全性。第三代慢病毒载体删除了 U3 区的 3'LTR,使载体失去 HIV-1 增强子及启动子序列,以产生自失活慢病毒载体。将 *gag* 和 *pol* 与 *rev* 基因编码在不同的质粒上,去除了 *tat* 基因,通过将病毒基因组分解成单独的质粒进一步提高了安全性<sup>[19]</sup>。

目前慢病毒载体生产制备的主要流程为:目的基因获取→构建质粒测序验证→转染 HEK 293T→扩大培养→收获病毒上清液→纯化浓缩。科研级慢病毒载体的生产过程使用普通培养瓶,收获病毒产量较低,仅供科学研究使用,纯化浓缩主要采用超滤柱浓缩法、PEG 浓缩法或超速离心法<sup>[20]</sup>。临床试验以及工业化生产需要大量慢病毒载体,因此会使用大规模制备设备,如采用多层培养系统、用悬浮培养生产慢病毒,纯化过程采用膜分离技术、离子交换色谱、亲和色谱、体积排阻色谱等技术,对洁净室环境要求也更高。

### 2.3 腺病毒载体

腺病毒属于腺病毒科,无包膜,其基因组为 26~45 kb 线状双链 DNA 分子,是直径为 90~100 nm 的二十面体病毒颗粒<sup>[21]</sup>。其基因组两端各有一个反向末端重复区,内侧为病毒包装信号。基因组上分布着 4 个承担调节功能的早期转录元 E1、E2、E3 和 E4,以及一个负责结构蛋白编码的晚期转录元<sup>[22]</sup>。1953 年,人们发现并成功分离腺病毒,经过几十年的发展,通过对其基因组的逐步修改,腺病毒成为一种有前途的基因递送载体。目前,腺病毒载体(adenovirus vector, AdV)基因插入能力从第一代约 7 kb 提高到了 36 kb,可以收获滴度高达  $10^{10} \sim 10^{11}$  pfu/mL 的病毒载体<sup>[23]</sup>。

腺病毒载体构建方法方便简单,对分裂期与非分裂期细胞均可以有效转导,转导效率高,病毒载体可长期储存,进入宿主细胞后不整合到宿主细胞基因组,仅瞬间表达,安全性高<sup>[24]</sup>。因此,腺病毒载体在基因治疗的临床试验方面蓬勃发展。2003 年,赛百诺公司自主研发的“重组人 p53 腺病毒注射液”(Gendicine)成为世界上第一个获准上市的基于腺病毒载体的基因治疗药物<sup>[25-26]</sup>。现有的腺病毒载体可分为三代:第一代腺病毒载体去除了 E1 或 E3 基因,这一类型的病毒需要经过纯化才能安全使用,否则会引发机体产生较强的炎症反应和免疫反应。第二代腺病毒载体去除了 E2A 或 E4 基因,减弱了免疫反应的发生,提高了载体容量和安全性,但病毒包装难度增加,病毒滴度有所下降。第三代腺病毒载体去除了全部或大部分病毒基因,仅可保留 ITR 和包装信号序列,使免疫反应进一步减少,载体中引入核基质附着区基因,可使外源基因保持长期表达,增加了载体的稳定性<sup>[27]</sup>。目前,Ad5 型腺病毒载体被广泛应用于基础科学、基因治疗和疫苗开发<sup>[28]</sup>。

腺病毒载体的包装系统可以分为 AdMAX 和 AdEasy 两种,主要步骤包括构建穿梭质粒→穿梭质粒与腺病毒骨架同源重组→转染 HEK293 细胞→扩大培养→收集病毒上清液→纯化病毒载体<sup>[11,29]</sup>。目前科研级腺病毒载体主要是通过小规模的培养瓶培养,培养面积为十几平方厘米到 300 m<sup>2</sup> 之间,临床级及工业化生产则需要中等甚至大规模的细胞培养环境,如细胞工厂、生物反应器贴壁培养或悬浮培养等。收获的腺病毒载体还需要进行纯化,目前采用的纯化方法多是柱层析法,可以去除大颗粒及小分子杂质,并使病毒载体进一步浓缩。

### 2.4 腺相关病毒载体

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)属于细

小病毒家族,无包膜<sup>[30]</sup>,由三种病毒衣壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3 组成二十面体对称的非包膜壳,需要依赖于其他病毒如腺病毒、单纯疱疹病毒、牛痘病毒和人乳头瘤病毒等才能进行复制<sup>[31]</sup>。基因组为长度 4~6 kb 的单链线状 DNA,包含 *rep*、*cap* 和 *aap* 三个基因,*rep* 基因编码病毒基因组复制和包装所必需的 4 种蛋白质 rep78、rep68、rep52 和 rep40, *cap* 表达产生病毒衣壳蛋白, *aap* 基因在与帽基因重叠的替代阅读框中编码组装激活蛋白<sup>[32]</sup>。AAV 最初是在 1965 年作为猴腺病毒制剂中的污染物被发现的,1984 年有研究人员认为其是潜在的基因治疗载体<sup>[33]</sup>。目前使用的 AAV 载体是重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)载体,是在非致病的野生型 AAV 基础上改造而成的基因载体,其中 *rep*、*cap* 和 *aap* 基因由转基因表达盒取代,只剩下了两端的 ITR<sup>[34]</sup>。

与其他载体系统相比,rAAV 载体的包装容量略低,可以承载 5 kb 以下的基因组,除了包括 AAV 自身的 ITR 以外,还要考虑基因表达所需的调控元件。但与其他病毒载体不同,不同血清型的 AAV 组织感染嗜亲性各不相同,具有一定器官靶向特异性<sup>[35]</sup>。并且 rAAV 载体不整合进入宿主基因组,免疫原性低,感染范围广,可以感染分裂期与非分裂期细胞,感染效率高,收获病毒滴度较高。早期的 AAV 生产系统采取两种质粒转染:一个是包含目的基因的质粒,两侧是 ITR;一个是表达 *rep* 和 *cap* 基因的质粒,以及提供辅助功能的腺病毒载体,但该方法不能避免腺病毒污染<sup>[36]</sup>。因此,通过研究,目前 AAV 生产采用最多的是经典的三质粒共转染法(Helper-free AAV 包装系统),即用编码转基因的质粒、含有 5 型腺病毒(Ad5)辅助基因(即 *E1a/b*、*E2a*、*E4* 和 *VA RNA*)或其等效基因的辅助质粒,以及编码 rAAV Rep 和 Cap 蛋白的另一个质粒共同转染 HEK293 细胞<sup>[37]</sup>。目前临床应用及大规模生产中已经培育出可以在生物反应器悬浮液中生长的 HEK293 细胞,每升产生超过  $1 \times 10^{14}$  个载体基因组,生产所得的病毒载体采用密度梯度离心或阴离子交换柱纯化,可以获得大量高纯度、高效率的病毒载体<sup>[38]</sup>。

### 2.5 非病毒载体

2.5.1 裸 DNA 裸 DNA 是最简单也是最常见的非病毒载体(nonviral vector, NVV),但其转染效率低、基因表达时间短,在临床应用上受到较大限制<sup>[39]</sup>。目前,裸 DNA 主要利用如肌肉注射、电穿孔、基因枪等物理方法,将目的基因载入细胞中并进行表达。

2.5.2 脂质体 脂质体是由脂质双分子膜形成的封闭微脂囊<sup>[40]</sup>,具有低毒性、可降解性、易操作及制备等优点。目前,阳离子型脂质体是除裸 DNA 外应用最为普遍的非病毒基因传递系统<sup>[41]</sup>。

2.5.3 高分子多聚物 多聚物载体中,阳离子多聚物目前应用较多<sup>[42]</sup>。多聚赖氨酸 (polylysine, PLL) 和聚乙烯亚胺 (polyetherimide, PEI) 是阳离子多聚物的典型代表。但二者在使用中都存在许多问题。例如,PLL 缺乏内涵体逃逸机制和内涵体裂解基因,如组氨酸<sup>[24]</sup>等,导致其在细胞内的传递使用受到限制,需要科学家对其结构加以改造<sup>[43]</sup>。

2.5.4 纳米颗粒 无机纳米颗粒基因载体具有低分散性、可重复合成性、良好的生物亲和性、较低细胞毒性、代谢产物少、无免疫排斥反应、稳定性好等优点。目前已有关于无机硅壳类纳米颗粒的一些研究报道。例如,无机纳米颗粒可用于转染,将质粒导入相应细胞系,并实现其在细胞内的高水平表达<sup>[44-45]</sup>。此外,金纳米颗粒作为无机纳米材料的一种,具有非细胞毒性、生物相容性、易于修饰改造等优点,非常适合作为核酸递送载体<sup>[46]</sup>。

2.5.5 SB 转座子 SB 转座子 (Sleeping Beauty transposon) 发现于鲑鱼基因组中,是一种合成元素,隶属于 Tc1/ mariner 超家族 DNA 转座子,该超家族在大约 1 000 万年前处于鼎盛时期<sup>[47]</sup>。它被 Ivics 等从睡眠中唤醒。1997 年<sup>[48]</sup>通过消除失活突变,构建了 8 种不同鱼类的共有序列。重建后,SB 转座子还被发现能介导包括小鼠和人类在内的多种脊椎动物的转座<sup>[49]</sup>,因此,它逐渐成为基因组工程的实用工具,其应用范围从功能基因组学<sup>[50]</sup>到基因组学和细胞疗法<sup>[51]</sup>。目前其作为一种基因转导技术,在体内外实验中均得到应用。

2.5.6 PB 转座子 PB 转座子 (PiggyBac transposon),最初是由病毒遗传学家 Fraser 等<sup>[52]</sup>发现于对甘蓝尺蠖蛾 (cabbage looper moth *Trichoplusia ni*) 的研究中,属于真核生物的第二类 DNA 转座子,是一个自主转座子,可通过“剪切和粘贴”机制在载体和染色体之间有效转座。在转座过程中,PB 转座酶可识别位于转座子载体两端的转座子特异性反向末端重复 (ITR) 序列,能够有效地将内容物从其原始位置移动,并将其有效整合到 TTAA 染色体位点中<sup>[53]</sup>。与 SB 转座子相比,PB 转座子有更高的转导转座效率<sup>[54]</sup>。除此之外,PB 转座系统操作简单,具有较高的安全性且成本低,目前 PB 转

座子系统成功应用于 T 细胞修饰<sup>[55]</sup>,是应用较广且具有临床研究前途的非病毒载体系统。

除上述载体外,非病毒基因载体还有多肽、蛋白质、壳聚糖等。随着材料化学和医学研究的快速发展,非病毒载体种类将会越来越丰富,功能越来越多样。

### 3 载体的工业化生产

细胞免疫治疗载体技术种类丰富,根据不同研究需求,科学家们可以选择不同种类的载体,但最终的目标都是能够推进临床应用,《人用基因治疗制品总论》《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》《免疫细胞治疗产品学研究与评价技术指导原则(试行)》等文件均对载体的生产和质量控制进行了通用性技术要求<sup>[56-58]</sup>。虽然病毒载体和非病毒载体在科学研究上百花齐放,但是在上市阶段,在细胞治疗领域已经上市产品主要依赖于慢病毒载体、逆转录病毒载体两种底层技术,工业化病毒包装过程基本包括以下三步:(1)将目的基因构建进入骨架质粒;(2)将包装质粒转染进入包装细胞;(3)收集上清液并纯化病毒载体。根据《中国药典》要求,从提取质粒的环节开始所有过程均需符合 GMP 的基本原则和相关要求,并且不能仅从成品进行检测,从质粒、细胞库、试剂及添加物、过程控制、中间制品、特性分析和工艺验证等全程、全方位进行质量控制<sup>[59]</sup>。

Yescarta 和 Kymriah 两款产品是最早上市的 CD19 靶向 CAR-T 产品,一个采用慢病毒载体、一个采用逆转录病毒载体,6 年建立了市场化管线,两者均具有相对成熟的工业化生产线。图 2 总结了两款产品近 5 年的全球销售额,2022 年 Yescarta (应用逆转录病毒载体) 比 Kymriah (应用慢病毒载体) 的销售额高出 2 倍。2021 年是中国细胞治疗的元年,奕凯达和倍诺达作为国内上市的第一款和第二款靶向 CD19 的 CAR-T 产品先后问世,也采用了不同的生产工艺。图 3 总结了 2022 - 2023 年这两款产品在国内的销售情况,奕凯达 (应用逆转录病毒载体) 比倍诺达 (应用慢病毒载体) 的销售额高出近 3 倍,可见逆转录病毒载体在工业化中的优势遥遥领先。无论是在国内市场还是在全球市场,应用逆转录病毒载体工艺的产品售价更低,在销售数量和销售额中都较慢病毒载体工艺的产品高,逆转录病毒载体较低工业化成本和高产量使其市场占有率较高,从而获得高收益。

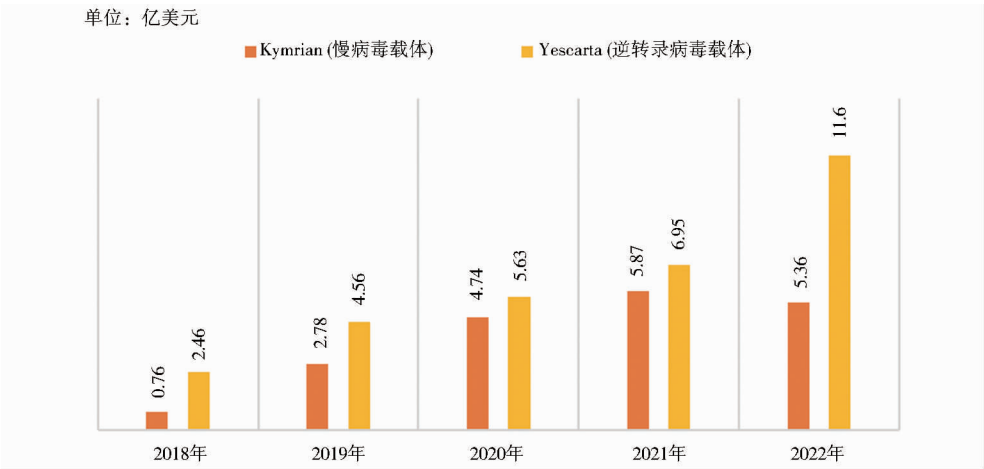


图2 Yescarta 和 Kymriah 近 5 年全球销售额

Fig.2 Yescarta and Kymriah global sales over the last five years

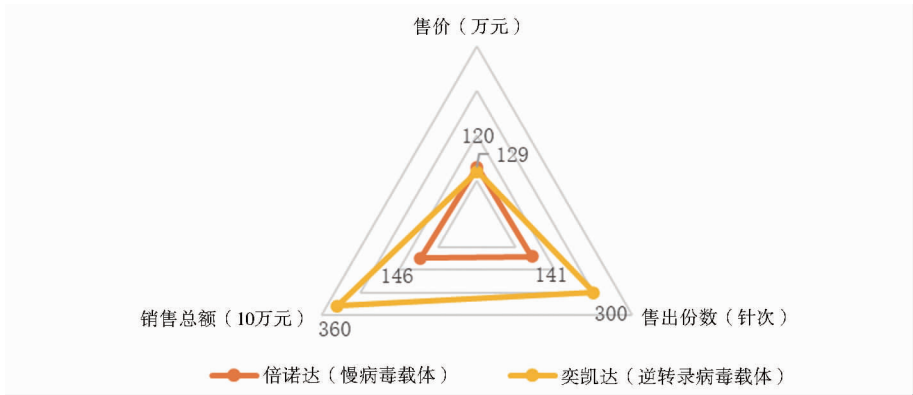


图3 2022 - 2023 年中国奕凯达和倍诺达销售情况

Fig.3 Sales of Ekedda and Benevoda in China, 2022 - 2023

慢病毒载体的包装流程较为简单,但由于慢病毒包装一般设计为 3 个质粒共同转染,且为瞬时包装方式,包装质粒需求量大。包装质粒需求量大这种方式导致批次之间的异度较大,一定程度上限制了生产规模。在工业化生产阶段,逆转录病毒载体筛选稳定转染的细胞株工艺较复杂,但其优势在于能够形成稳定产毒的细胞株,这也就意味着前期包装质粒需求量大,并且病毒载体产量稳定,批次之间异度较小,并且可以通过冻存细胞株以实现后期源源不断收获病毒载体。除去感染细胞的操作过程不一致,扩增感染细胞环节是两种病毒载体包装中一致的环节,并且由于包装细胞均为贴壁细胞,相对于悬浮细胞培养模式,贴壁细胞的空间利用度太低,目前科学家们从新工艺开发入手,开发了悬浮培养体系等解决方案<sup>[60]</sup>。图 4 总结了两个载体工业化包装流程,表 3 对两种载体进行对比。

如今,细胞产品种类的开发日益丰富,除已上市在血液瘤治疗中展示出极大优势的 CAR-T 细胞产品外,还有很多针对实体瘤治疗的 CAR-NK、CAR-M 等细胞产品,针对治疗实体瘤的细胞产品在剂量上也有大幅度提升,但要考虑其工业化成本优势。除成本外,细胞的转导效率是应用于临床的主要考核指标,慢病毒载体常见包膜 VSV-G,在造血干细胞 (HSC) 和自然杀伤 (NK) 细胞的改造中 VSV-G 假型慢病毒载体并不能获得令人满意的转导效率,而作为 VSV-G 同源细胞受体的低密度脂蛋白受体 (LDL-R),在被激活的 T 细胞表面高水平表达,因此 VSV-G 假型慢病毒载体 (VSV-G-LVs) 转导能力在 T 细胞上较强,而转导 NK 细胞其效率极低 (一般小于 5%)。相反,逆转录病毒载体的包膜在 NK 细胞的转导上更具优势<sup>[61]</sup>。



4 展 望

2010 年,第一个经 FDA 批准上市的自体细胞免疫疗法 Provenge 诞生,它通过将患者的免疫细胞与 PA2024 抗原共培养,以刺激和引导细胞在回输至患者体内后对抗前列腺癌。但在获得监管部门批准后,Provenge 面临与其制造和管理相关的挑战,高成本和短保质期阻碍了其广泛的临床应用。在经过短短几十年的研发过程,尽管细胞免疫疗法制备过程越发复杂易变,但目前在临床大放异彩,这与一代代载体技术的发

展密切相关,从可能携带致病性基因片段,到失活载体构建、提高安全性,现在已经有了可以定向在合适位点插入治疗基因的研究<sup>[62-63]</sup>,从各方面都有了长足的进步。从 Yescarta 产品 2022 年全球销售额达 11.6 亿美元的结果来看,似乎 10 年前禁锢 Provenge 产品发展的问题已经解决,但是细胞免疫疗法载体生产在工艺优化、生产规模加大和质量控制方面还有很多挑战。随着技术的不断发展和人们对疾病认识的进一步加深,基因递送载体作为可编程活体药物的途径将成为对抗疾病的有力武器。

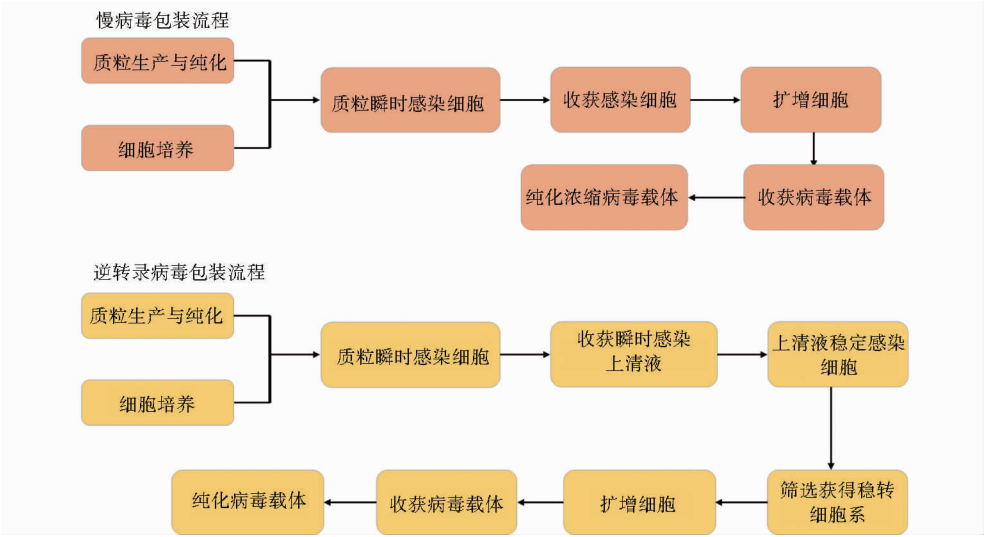


图 4 慢病毒载体和逆转录病毒载体工业化包装流程  
Fig. 4 Flow of industrial packaging of lentiviral and retroviral vectors

表 3 慢病毒载体和逆转录病毒载体的对比

Table 3 Comparison of lentiviral and retroviral vectors

病毒载体	慢病毒载体	逆转录病毒载体
病毒颗粒大小	80 ~ 120 nm	80 ~ 100 nm
基因组	RNA	RNA
包装所需质粒数量	1 个表达质粒和 2 ~ 3 个包装质粒	1 个表达质粒
包装所需质粒规模	毫克级	微克级
包装方式	表达质粒和包装质粒共转染 293T 细胞以获得含有慢病毒载体颗粒的上清液	表达质粒转染含有包装蛋白质的瞬转包装细胞以获得含有病毒的上清液,感染能够稳转的包装细胞,最终获得含有逆转录病毒载体颗粒的上清液
病毒纯化	必需(核酸、蛋白质)	可选(蛋白质)
病毒浓缩	必需	可选
病毒滴度	浓缩后可达 $10^8 \sim 10^9$ TU/mL	$10^6 \sim 10^7$ TU/mL, 浓缩后可达 $10^8 \sim 10^9$ TU/mL
免疫原性	低-中	低-中
整合方式	随机并稳定整合	随机并稳定整合
一般整合位点	基因内	基因间

(续表 3)

病毒载体	慢病毒载体	逆转录病毒载体
产量	低(30 ~ 50 人份/批)	高(可达 1 000 人份/批)
成本	较高	较低
感染细胞状态	分裂期和非分裂期	分裂期
表达维持时间	稳定表达	稳定表达
表达丰度	高水平	高水平
开始表达时间	较慢,2 ~ 4 天	较快,1 ~ 2 天

参考文献

[ 1 ] Sengupta R, Honey K. AACR cancer progress report 2019: transforming lives through innovative cancer science. *Clinical Cancer Research*, 2019, 25(18): 5431.

[ 2 ] Bashor C J, Hilton I B, Bandukwala H, et al. Engineering the next generation of cell-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2022, 21: 655-675.

[ 3 ] Finkelstein D M, Miller R G. Cell surface recognition determinants involved in triggering the lymphokine activated killer cell phenomenon; enhanced killing of modified “anti-self” targets by varying LAK culture conditions. *The Journal of Otolaryngology*, 1990, 19(5): 294-298.

[ 4 ] Doudna J A. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*, 2020, 578: 229-236.

[ 5 ] Vile R G, Tuszyński A, Castleden S. Retroviral vectors. From laboratory tools to molecular medicine. *Molecular Biotechnology*, 1996, 5(2): 139-158.

[ 6 ] Anton G. Retroviral vectors. *Revue Roumaine De Virologie*, 1994, 45(3-4): 193-202.

[ 7 ] Vargiu L, Rodriguez-Tomé P, Sperber G O, et al. Classification and characterization of human endogenous retroviruses; mosaic forms are common. *Retrovirology*, 2016, 13(1): 7.

[ 8 ] Pornillos O, Ganser-Pornillos B K. Maturation of retroviruses. *Current Opinion in Virology*, 2019, 36: 47-55.

[ 9 ] 徐铃, 贺新军. 用于基因转移的逆转录病毒及其载体. *生物技术通讯*, 1994, 5(4): 169-171.

Xu Q, He X J. Retrovirus for gene transfer and its vector. *Letters in Biotechnology*, 1994, 5(4): 169-171.

[ 10 ] Cornetta K, Pollok K E, Miller A D. Retroviral vectors for gene transfer. *CSH Protocols*, 2008, 2008: pdb.top29.

[ 11 ] Cornetta K, Pollok K E, Miller A D. Retroviral vector production by transient transfection. *CSH Protocols*, 2008, 2008: pdb.prot4881.

[ 12 ] Cornetta K, Pollok K E, Miller A D. Generation of stable vector-

producing cells for retroviral vectors. *CSH Protocols*, 2008, 2008: pdb.prot4882.

[ 13 ] Dubensky T W Jr, Sauter S L. Generation of retroviral packaging and producer cell lines for large-scale vector production with improved safety and titer. *Methods in Molecular Medicine*, 2003, 76: 309-330.

[ 14 ] Herbst F, Ball C R, Zavidij O, et al. 10-year stability of clinical-grade serum-free  $\gamma$ -retroviral vector-containing medium. *Gene Therapy*, 2011, 18(2): 210-212.

[ 15 ] Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2010, 58(2): 107-119.

[ 16 ] 赵晓煜, 徐祺玲, 赵晓东, 等. 基因治疗慢病毒载体的转导增强策略. *中国生物工程杂志*, 2021, 41(8): 52-58.

Zhao X Y, Xu Q L, Zhao X D, et al. Enhancing lentiviral vector transduction efficiency for facilitating gene therapy. *China Biotechnology*, 2021, 41(8): 52-58.

[ 17 ] Wang X Y, Ma C C, Rodríguez Labrada R, et al. Recent advances in lentiviral vectors for gene therapy. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(11): 1842-1857.

[ 18 ] Perry C, Rayat A C M E. Lentiviral vector bioprocessing. *Viruses*, 2021, 13(2): 268.

[ 19 ] Milone M C, O’ Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 2018, 32: 1529-1541.

[ 20 ] Tiscornia G, Singer O, Verma I M. Production and purification of lentiviral vectors. *Nature Protocols*, 2006, 1: 241-245.

[ 21 ] Watanabe M, Nishikawaji Y, Kawakami H, et al. Adenovirus biology, recombinant adenovirus, and adenovirus usage in gene therapy. *Viruses*, 2021, 13(12): 2502.

[ 22 ] Kulanayake S, Tikoo S K. Adenovirus core proteins: structure and function. *Viruses*, 2021, 13(3): 388.

[ 23 ] Syyam A, Nawaz A, Ijaz A, et al. Adenovirus vector system: construction, history and therapeutic applications. *BioTechniques*, 2022, 73(6): 297-305.

[ 24 ] Gebre M S, Brito L A, Tostanoski L H, et al. Novel approaches



- for vaccine development. *Cell*, 2021, 184(6): 1589-1603.
- [25] Lusky M. Good manufacturing practice production of adenoviral vectors for clinical trials. *Human Gene Therapy*, 2005, 16(3): 281-291.
- [26] Sun W M, Shi Q L, Zhang H Y, et al. Advances in the techniques and methodologies of cancer gene therapy. *Discovery Medicine*, 2019, 27(146): 45-55.
- [27] Sallard E, Zhang W L, Aydin M, et al. The adenovirus vector platform: novel insights into rational vector design and lessons learned from the COVID-19 vaccine. *Viruses*, 2023, 15(1): 204.
- [28] Guo X J, Sun Y Y, Chen J, et al. Restriction-assembly: a solution to construct novel adenovirus vector. *Viruses*, 2022, 14(3): 546.
- [29] Silva A C, Peixoto C, Lucas T, et al. Adenovirus vector production and purification. *Current Gene Therapy*, 2010, 10(6): 437-455.
- [30] 武志杰, 马文豪, 董哲岳, 等. AAV 载体介导的蓬佩病模型小鼠体内基因治疗研究. *中国生物工程杂志*, 2022, 42(7): 24-34.
- Wu Z J, Ma W H, Dong Z Y, et al. AAV vector mediated gene therapy in pompe model mice. *China Biotechnology*, 2022, 42(7): 24-34.
- [31] Meyer N L, Chapman M S. Adeno-associated virus (AAV) cell entry: structural insights. *Trends in Microbiology*, 2022, 30(5): 432-451.
- [32] Naso M F, Tomkowicz B, Perry W L, et al. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs*, 2017, 31(4): 317-334.
- [33] Zengel J, Carette J E. Structural and cellular biology of adeno-associated virus attachment and entry. *Advances in Virus Research*, 2020, 106: 39-84.
- [34] Chen Y H, Keiser M S, Davidson B L. Adeno-associated virus production, purification, and titrating. *Current Protocols in Mouse Biology*, 2018, 8(4): e56.
- [35] Li C W, Samulski R J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 2020, 21: 255-272.
- [36] Large E E, Silveria M A, Zane G M, et al. Adeno-associated virus (AAV) gene delivery: dissecting molecular interactions upon cell entry. *Viruses*, 2021, 13(7): 1336.
- [37] Aponte-Ubillus J J, Barajas D, Peltier J, et al. Molecular design for recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(3): 1045-1054.
- [38] Wang D, Tai P W L, Gao G P. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2019, 18: 358-378.
- [39] Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. Theoretical considerations involving the pharmacokinetics of plasmid DNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57(5): 675-688.
- [40] 李婉迪, 赵振民. 非病毒载体在基因治疗中的研究进展. *新乡医学院学报*, 2016, 33(8): 731-734.
- Li W D, Zhao Z M. Research progress of non-viral vectors in gene therapy. *Journal of Xinxiang Medical University*, 2016, 33(8): 731-734.
- [41] 李月, 孙景鑫, 孙丹丹, 等. 非病毒基因载体脂质-聚阳离子复合物的研究进展. *吉林医药学院学报*, 2021, 42(2): 132-134.
- Li Y, Sun J X, Sun D D, et al. Research progress of non-viral gene carrier lipid polycation complexes. *Journal of Jilin Medical University*, 2021, 42(2): 132-134.
- [42] Sunshine J C, Bishop C J, Green J J. Advances in polymeric and inorganic vectors for nonviral nucleic acid delivery. *Therapeutic Delivery*, 2011, 2(4): 493-521.
- [43] Uthaman S, Moon M J, Lee D, et al. Di-sulfide linked polyethylenimine coated gold nanoparticles as a non-viral gene delivery agent in NIH-3T3 mouse embryonic fibroblast. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2015, 15(10): 7895-7899.
- [44] 彭子艾, 李丹丹, 夏澳运, 等. 磁性纳米颗粒负载质粒 DNA 的研究. *华南农业大学学报*, 2020, 41(1): 78-82.
- Peng Z A, Li D D, Xia A Y, et al. Study on magnetic nanoparticle loading plasmid DNA. *Journal of South China Agricultural University*, 2020, 41(1): 78-82.
- [45] 吴飞龙, 孔庆磊, 蔡松旺, 等. CD147 单抗介导的基因治疗纳米颗粒的肺癌细胞靶向性研究. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(9): 1562-1567.
- Wu F L, Kong Q L, Cai S W, et al. CD147 monoclonal antibody-mediated nanoparticles for gene therapy to target lung cancer cells. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2016, 32(9): 1562-1567.
- [46] 徐建昌, 王晔. 非病毒载体作用机制及在心血管疾病基因治疗中的应用研究进展. *山东医药*, 2021, 61(30): 97-100.
- Xu J C, Wang X. Research progress on the mechanism of non-viral vector and its application in gene therapy of cardiovascular diseases. *Shandong Medical Journal*, 2021, 61(30): 97-100.
- [47] Ivics Z, Izsvak Z, Minter A, et al. Identification of functional domains and evolution of *TeI*-like transposable elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(10): 5008-5013.
- [48] Ivics Z, Hackett P B, Plasterk R H, et al. Molecular

- reconstruction of *Sleeping beauty*, a *Tc1*-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 1997, 91(4): 501-510.
- [49] Izsvák Z, Ivics Z, Plasterk R H. Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 302(1): 93-102.
- [50] Kawakami K, Largaespada D A, Ivics Z. Transposons As tools for functional genomics in vertebrate models. *Trends in Genetics*, 2017, 33(11): 784-801.
- [51] Amberger M, Ivics Z. Latest advances for the sleeping beauty transposon system: 23 years of insomnia but prettier than ever: refinement and recent innovations of the sleeping beauty transposon system enabling novel, nonviral genetic engineering applications. *BioEssays*, 2020, 42(11): e2000136.
- [52] Fraser M J, Smith G E, Summers M D. Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses; relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses. *Journal of Virology*, 1983, 47(2): 287-300.
- [53] Zhao S, Jiang E Z, Chen S S, et al. PiggyBac transposon vectors; the tools of the human gene encoding. *Translational Lung Cancer Research*, 2016, 5(1): 120-125.
- [54] 岳冉, 刘子洋, 郑岩, 等. 纳米载体介导的PiggyBac转座子制备CAR-NK细胞. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(2): 109-114.
- Yue R, Liu Z Y, Zheng Y, et al. Nanocarrier-mediated PiggyBac transposon system for preparation of CAR-NK cells. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2020, 27(2): 109-114.
- [55] Dolnikov A, Shen S, Klammer G, et al. Antileukemic potency of CD19-specific T cells against chemoresistant pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Experimental Hematology*, 2015, 43(12): 1001-1014. e5.
- [56] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-三部: 2020年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China (PRC) pharmacopoeia-part III; 2020 edition. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [57] 国家药品监督管理局. 总局关于发布细胞治疗产品研究与评价技术指导原则的通告(2017年第216号). [2023-08-01]. <https://www.nmpa.gov.cn/ylqx/ylqxggtg/ylqxzhdyz/20171222145101557.html>.
- National Medical Products Administration. Notice of the general administration of the People's Republic of China on issuing the technical guidelines for the research and evaluation of cell therapy products (2017 No. 216). [2023-08-01]. <https://www.nmpa.gov.cn/ylqx/ylqxggtg/ylqxzhdyz/20171222145101557.html>.
- [58] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》的通告(2022年第30号). [2023-08-01]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/0584963a84e01bb4d83022f559d22144>
- Center For Drug Evaluation, NMPA. Circular of the drug approval center of the State Food and Drug Administration on Issuing the guiding principles for pharmaceutical research and evaluation of immune cell therapy products (Trial) (No. 30, 2022). [2023-08-01]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/0584963a84e01bb4d83022f559d22144>
- [59] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-一部: 2020年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. People's republic of China (PRC) pharmacopoeia-part I; 2020 edition. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [60] Holohan D R, Lee J C, Bluestone J A. Shifting the evolving CAR T cell platform into higher gear. *Cancer Cell*, 2015, 28(4): 401-402.
- [61] Bari R, Granzin M, Tsang K S, et al. A distinct subset of highly proliferative and lentiviral vector (LV)-transducible NK cells define a readily engineered subset for adoptive cellular therapy. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2001.
- [62] Chavez M, Rane D A, Chen X Y, et al. Stable expression of large transgenes via the knock-in of an integrase-deficient lentivirus. *Nature Biomedical Engineering*, 2023, 7: 661-671.
- [63] Zhang J Q, Hu Y X, Yang J X, et al. Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL. *Nature*, 2022, 609: 369-374.

## Current Status and Prospects of Cellular Immunotherapy Vector Technology

LIU Xiuying<sup>1</sup> LIU Jingjing<sup>1</sup> CUI Xinming<sup>1</sup> YU Mengyuan<sup>1</sup> SHI Yuanyuan<sup>1,2</sup> WANG Jianxun<sup>1,2</sup>

(1 College of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

(2 Shenzhen Cell Valley Biopharmaceutical Co., Ltd, Shenzhen 518000, China)

**Abstract** In recent years, China's cellular immunotherapy has developed rapidly, catching up from zero to the international level of excellence. Behind the booming development of cellular immunotherapy, the support of vector technology for gene delivery is indispensable. As a medium for introducing genes into target cells and enabling their expression, vector technology is also one of the major bottlenecks in the development of the industry in terms of how to carry out gene transfer safely and efficiently. By summarizing the current status of the development of vector technology for major applications in the field of cell therapy and comparing the industrialized production process of already marketed products, we hope to provide a reference for the further development of vector technology.

**Key words** Cellular immunotherapy Gene delivery vectors Industrial production