

本手册为吉凯基因版权所有，未经许可禁止全部及部分复制

CAR-T 技术手册

CAR-T Technical Manual

致力转化医学 共创健康明天

☎ 021-51320189 (总机)

www.genechem.com.cn



上海吉凯基因化学技术有限公司

SHANGHAI GENECHM CO.,LTD.

目录

CONTENTS

CAR-T技术概述

03

CAR-T技术是什么

03

CAR-T技术的发展历史

03

CAR-T技术的抗肿瘤机制

04

CAR-T技术最新研究进展

05

新型CAR载体的研究进展

05

CAR-T靶点的研究进展

08

改善CAR-T细胞的方法

10

CAR-T技术面临的挑战

11

CAR-T领域基础研究思路及临床应用标准

11

CAR-T研究经典思路

12

scFv的获取

13

CAR的设计及构建包装

13

体外实验验证CAR的效果

13

体内实验验证CAR的效果

14

临床研究或试验的CAR病毒制备及质控要点

15

科研能力

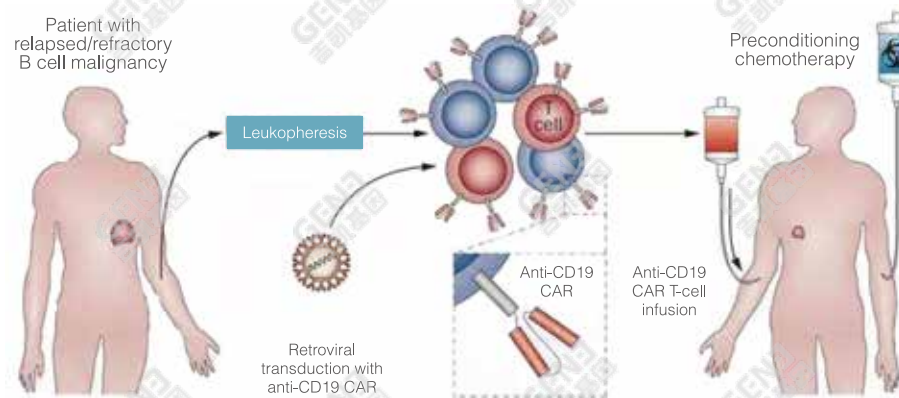
17



CAR-T技术概述

CAR-T技术是什么

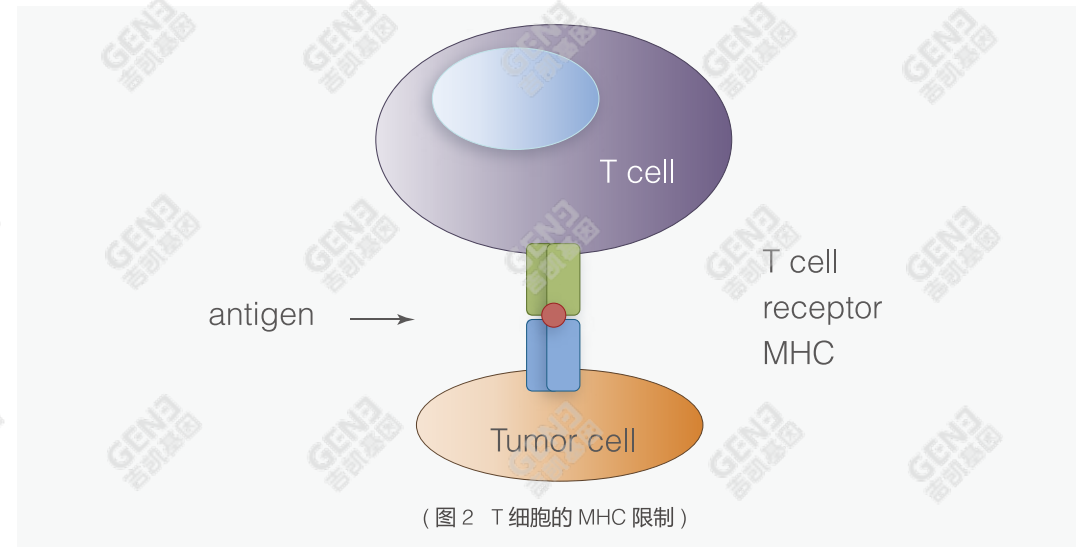
CAR-T，全称是 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy 指的是嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法。是一种将抗体对抗原的高度特异性和 T 细胞对靶细胞的细胞毒活性相结合的一种方法：通过基因重组获得表达嵌合抗原受体的 T 细胞，经过纯化、体外扩增和活化，输注回患者体内形式杀灭肿瘤细胞的功能。CAR-T 细胞通过其表达的 CAR 能特异性的识别杀伤肿瘤细胞，属于精准肿瘤免疫细胞治疗。CAR 的设计是通过胞外肿瘤相关抗原（Tumor-associated antigen, TAA）结合区。共包含一个跨膜去和一个胞内信号区，将其有序的结合在一起，并组装在 T 细胞上。当 CAR 收到特异性抗原识别后可为 T 细胞提供活化信号并通过胞内结构域转到该信号，引起 T 细胞的活化，从而发挥 T 细胞杀伤作用，并释放大量细胞因子对肿瘤细胞进行攻击。



(图 1 CAR-T 治疗技术示意图)

CAR-T技术的发展历史

CAR-T 技术先驱人物，以色列魏茨曼科学研究院（Weizmann Institute of Science）科学家 Zelig Eshhar 教授为了绕开 T 细胞杀伤肿瘤中的 MHC 限制性问题，提出了一个解决办法，找到一个合适的 TAA（Tumor Associated Antigen，即肿瘤相关抗原），为 T 细胞装上一个与这个抗原相对应的 scFv（single chain Variable fragment，即单链抗体），严格的说只是抗体的一个片段，可以绕开 MHC 分子，将 T 细胞改造成精确制导的抗肿瘤武器。一开始 Eshhar 教授将这种经过基因修饰的 T 细胞叫做 T-bodies，这就是 CAR-T 的雏形。



(图 2 T 细胞的 MHC 限制)

第一代 CAR 改造的 T 细胞的有效性已经有多家单位开展临床实验进行检验。总体说来，早期利用第一代 CAR-T 开展的临床试验没有表现出显著的有效性。不仅如此，这些实验间在许多方面都有明显差别，包括目标基因选择，基因转导方式，体外扩增方式，细胞数量，IL-2 的用量以及调理治疗选择。吸取一代 CAR-T 细胞疗法的经验教训后，科学家不断试错却也不断翻车，随即出现的第二代、第三代 CAR-T 技术。目前最新的第四代的 CAR-T 细胞，它能够表达对于调节抗肿瘤微环境的细胞因子，尤其是 IL-12，或许不久的将来，一些其他的细胞因子如 IL-15 及 GM-CSF 也能同时表达，共同完成对抗 tumor 的艰巨使命。

在之后的数十年间，全球的科学家针对 CAR-T 技术开展了各类的改进和临床前研究，其中包含了非实体瘤和实体瘤。Lamers 用抗 AIX 的 CAR-T 联合或不联合 IL-2 注射的方案治疗转移性肾透明细胞癌。Kershaw 用放射性标记的抗叶酸受体的 CAR-T 细胞治疗卵巢癌的试验。Park 用改造的 L1-CAM-CD8 CAR-T 细胞治疗神经母细胞瘤。Till 与其同事用靶向 CD20 的 CAR-T 细胞过继治疗难治或复发性 NHL。Louis 和 Pule 分别用病毒和非病毒方式靶向 GD2 的 CAR-T 细胞治疗 19 位神经母细胞瘤患者。Jsen 等人用 CAR 改造的 T 细胞治疗 4 位反复发作的 NHL（非霍奇金淋巴瘤）患者。

CAR-T技术的抗肿瘤机制

理解 CAR-T 的抗肿瘤机制，首先需了解 T 细胞是如何活化并杀伤肿瘤细胞的。T 细胞的活化需要双信号途径。第一信号为 T 细胞表面受体（T cell receptor, TCRs）与抗原递呈细胞上的主要组织相容性复合物（MHC）结合，第二信号为抗原递呈细胞上的共刺激分子 B7 家族分子与 T 细胞上的配体 CD28 分子结合，产生协同刺激信号。在双信号共同刺激下，T 细胞活化增殖为细胞毒 T 细胞（cytotoxic T cell, CTL）。当 CTL 再次遇到携带相同 MHC 抗原肽复合体的肿瘤细胞时，就会与之结合，并分泌穿孔素、颗粒酶，直接介导肿瘤细胞溶解，也可诱导巨噬细胞分泌促炎因子 IL-12 等，间接影响肿瘤细胞的生长。CAR-T 细胞免疫治疗是利用基因工程的方法，将识别目标抗原的单链抗体与间隔区、跨膜基序和 T 细胞活化基序等结合为一体，利用融合基因修饰的 T 细胞特异性杀伤肿瘤细胞。

CAR-T技术最新研究进展

新型CAR载体的研究进展

经过不断试错(初期一代 CAR-T 的无法有效激活及维持)和从教训(早期临床试验中几例病人的致死)中吸取经验, CAR-T 的结构随着 T 细胞免疫激活双信号机制的基础研究发现等的逐渐进步, 从只携带有 CD3ζ胞内激活结构域的一代 CAR, 逐渐演化到携带 CD28/4-1BB/OX40/ICOS 等胞内共刺激结构域和 CD3ζ胞内激活结构域的二代 CAR (携带一个共刺激结构域), 三代 CAR (携带两个共刺激结构域)。

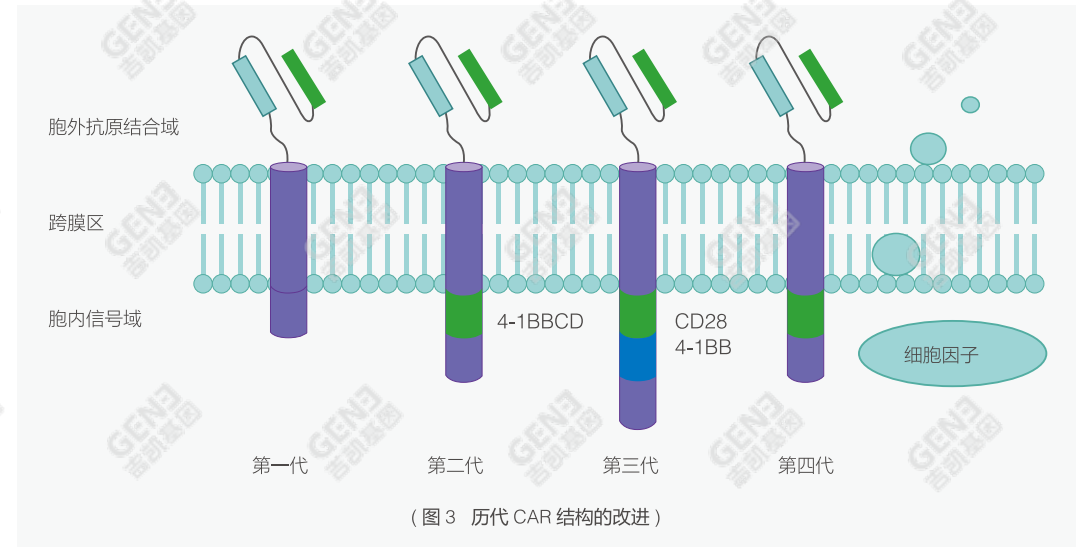
并且, 基于对安全性的进一步研究和突破, 如应对细胞因子风暴时, 诺华的 CAR-T 团队采用 IL-6 抑制剂即可有效降低和解除该副作用, 这一结构现在已经开始成功应用到临床试验, 并且在针对 CD19 抗原或 CD20 抗原等的 B 淋巴细胞白血病等的临床试验中取得了惊人疗效, 而应用二 / 三代 CAR 结构的针对其他靶点的 CAR-T 细胞, 也在黑色素瘤、前列腺癌、头颈部癌症、肺癌等中进行临床试验。

面对实体瘤高异质性、肿瘤相关抗原 (TAA) 特异性不高导致脱靶效应 (on target/off tumour) 等方面问题, 实验室研究中的一些报道, 采用了双信号 CAR 结构, 该结构采用两个独立的 CAR 结构, 将提供 T 细胞激活的第一信号 CD3ζ胞内结构域, 和提供第二信号的共刺激受体 CD28/4-1BB/OX40 等的胞内信号结构域分开, 分别连接至两个独立的 CAR 结构胞内, 胞外采用两个靶向不同 TAA 的单链抗体 (ScFv), 取得了一定的针对实体瘤动物模型治疗效果, 并有效防止了脱靶效应。

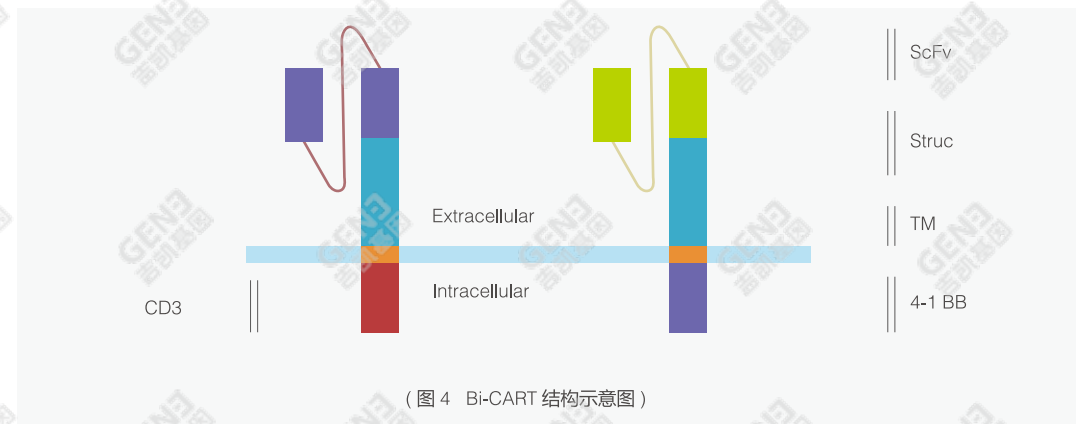
在此结构基础上, 一些团队还进行了对胞外单链抗体的优化, 分别使两个单链抗体拥有不同的针对 TAA 的亲合力, 如提供第一信号的 CAR 使用低亲和力, 而对提供共刺激作用的 CAR 采用较高亲和力, 这样能够在一定程度上提高防脱靶作用。另外, 也有团队尝试进行了称为 iCAR 的设计, 将提供免疫抑制信号的 PD-1 受体的胞内段信号结构域, 连接到携带针对正常细胞抗原 ScFv 的 CAR 上, 与靶向 TAA 的二代或三代 CAR 组成双信号受体结构, 在动物模型中能够有效避免对正常组织的副作用。

在面对实体瘤由于 PD-L1 高表达而导致的免疫抑制方面, 最近也有团队在上述双信号独立 CAR 结构基础上, 将 PD-1 受体的胞内抑制性结构基序替换成 CD28 分子的胞内激活结构域, 与靶向 TAA 的二代 CAR 组成双信号受体共同表达, 使这一新嵌合受体与 T 细胞原本的 PD-1 受体竞争性结合 PD-L1 从而扭转免疫抑制, 从而能够提高 CAR-T 对实体瘤的杀伤作用。

此外, 尚在临床前实验阶段的 CAR 结构, 有在二 / 三代 CAR 基础上, 在 CAR 的基因表达框内同时携带独立组成型表达或诱导型表达的免疫调控因子基因, 如 IL-12/IL15/anti-PD-1 等, 将其称之为第四代 CAR, 这样的结构能够在针对实体瘤时, 面对其微环境的免疫抑制和实体瘤高异质性方面发挥一定的促进杀伤作用。

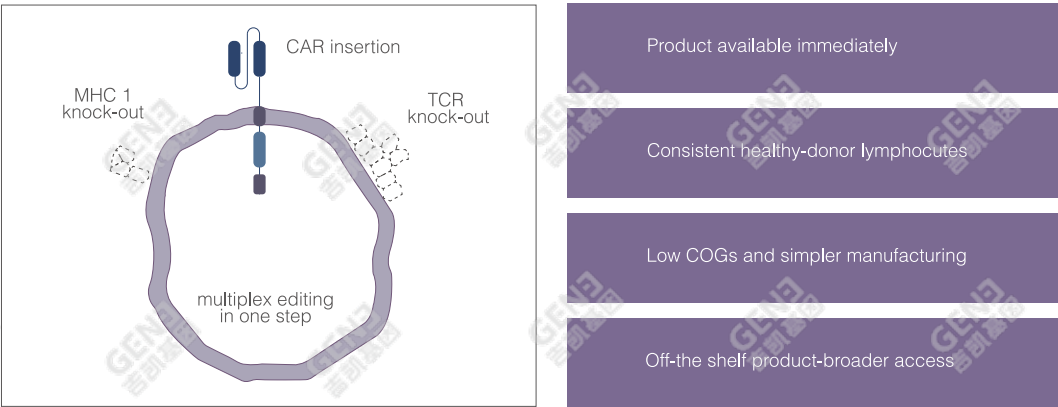


Bi- CAR-T 设计, 临床上指并联式 CAR。其要求靶细胞上两种抗原同时表达, Bi-CAR-T 才可产生杀伤效果。靶细胞范围较单靶点 CAR-T 与串联式 CAR-T 缩小, 临床试验中对肿瘤细胞具有更加精确的靶向效果, 避免由于正常组织细胞上靶标 A 或靶标 B 的单独微量表达而引起 CAR-T 细胞对正常组织细胞的杀伤而带来的器官损伤等毒副作用。另外, 还存在串联式双 CAR 结构, 靶细胞上只要有一种抗原表达, Bi-CAR-T 即可识别并产生杀伤效果。具有扩大杀伤效果的作用。



而面对有些由于身体原因以及经过多次放化疗导致免疫细胞活性很差, 从而不适宜进自体 CAR-T 治疗的患者, 通用型 CAR-T (universal-CAR-T, uCAR-T) 无疑是最佳选择, 业内将其称之为第五代 CAR-T 这方面已见报道的有 Cellectis 公司 2013 年的科研论文及其近期对一例幼儿白血病患者治愈的报道。近期, 我们也可以看到 Baxalta 公司与基因编辑公司 Precision BioSciences 宣布达成合作, 开发基于健康供体 T 细胞的新型嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法 (CAR-T), 以用于多种癌症的治疗。

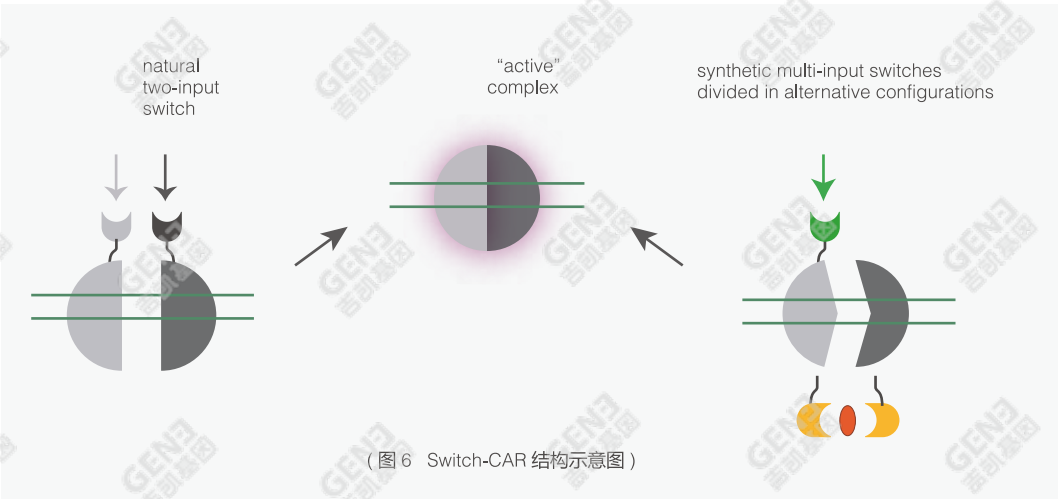
CRISPR enables an allogeneic approach that remedies issues with autologous CAR-T



(图5 基于 CRISPR 开发的同种异体 CAR-T)

Tamada 教授所开发的全新一代 CAR-T 其实就是在常规 CAR-T 基础上进行改造，使常规 CAR-T 可以表达 IL7 和 CCL19 两种趋化因子。因此，新一代 CAR-T 也被命名为 7×19CAR-T。在体外实验中，表达 IL7 和 CCR19 的新一代 CAR-T，增殖能力是普通 CAR-T 的两倍，而在体内迁移试验中募集免疫细胞的能力是普通 CAR-T 的至少 5 倍。同时，IL7 受体抑制剂可以完全消除新一代 CAR-T 被增强的增殖能力，而 CCL19 受体抑制剂同样也可以完全消除新一代 CAR-T 的募集免疫细胞的能力。

Switch-CAR 结构，将 CAR 结构分为两个部分，再通过小分子作为开关控制，能够一定程度上人为控制 CAR 结构的有效与否，被认为是目前体内实验中能够对 CAR 结构进行人为干预且抑制细胞因子风暴副作用的最有效的手段之一，能够有效控制目前 CART 治疗过程中细胞因子风暴而带来的对患者机体的损伤。



(图6 Switch-CAR 结构示意图)

CAR-T靶点的研究进展

CAR-T 结构的演化，逐渐在解决其面对的问题中前进，至今已经演进至五代 CAR 结构，而临床试验应用中多以二 / 三代 CAR 结构为主，其他 CAR 结构还需要进行更多的优化和提高以应对临床实际应用中疗效和安全性的要求。

在血液肿瘤方向，CD19 无疑是竞争最为激烈的靶点，随着诺华和 Kite 产品获得 FDA 批准上市，CD19 的有效性被进一步肯定。此外，CD22、CD20、CD30 等位点同样也是研究热点。除了目前研究较为深入的血液肿瘤领域，已有不少研究团队将 CAR-T 瞄准具有更大市场空间的实体瘤领域，实体瘤的研究热门靶点包括 Mesothelin、GD2、HER2 等。

CD20	CD20 阳性的恶性肿瘤
ROR1	慢性淋巴细胞白血病，小淋巴细胞性淋巴瘤
Igk	慢性淋巴细胞白血病，低级别 B 细胞恶性肿瘤
CD30	霍奇金淋巴瘤，非霍奇金淋巴瘤
CD123	急性骨髓性白血病
CD33	急性骨髓性白血病
LeY	急性骨髓性白血病
BCMA	多发性骨髓瘤
CD138	多发性骨髓瘤

实体瘤

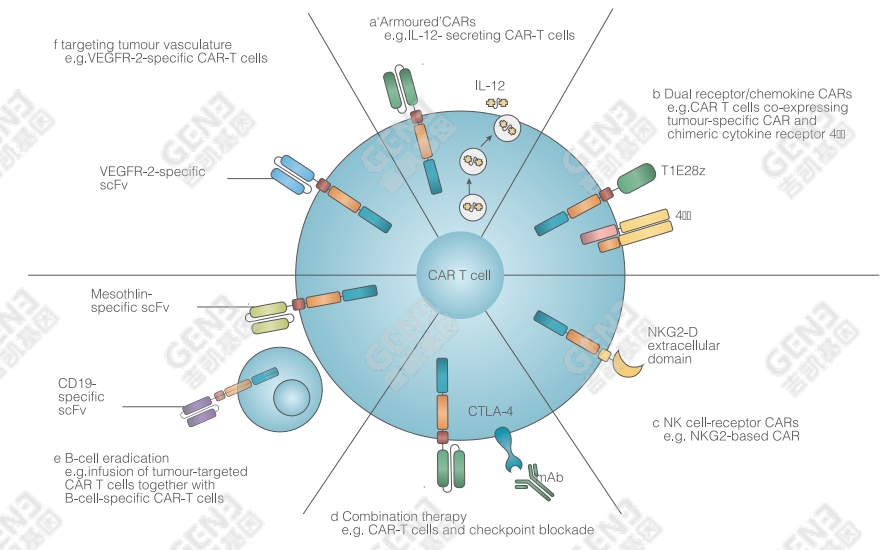
PSMA	前列腺癌
Mesothelin	恶性胸膜间皮瘤，胰腺癌，转移性胰腺（导管）腺癌，上皮性卵巢癌和恶性，上皮性胸膜间皮瘤，卵巢癌
FAP	间皮瘤

Table 3 | **CAR targets for the treatment of solid malignancies**

Target	CAR structure	Malignancy	Institution	Reference
PSMA	CD3 α and CD28	Prostate cancer	MSKCC	NCT01140373(REF.76)
			Roger Williams	NCT00664196(REF.78)
Mesothelin	CD3 and 4-1BB	Malignant pleural mesothelioma	Upenn	NCT01355965(REF.81)
		Pancreatic cancer	Upenn	NCT02465983(REF.156)
		Metastatic pancreatic(ductal) adenocarcinoma epithelial ovarian cancer and malignant epithelial pleural mesothelioma	Upenn	NCT02159716(REF.84)
	CD3 α and CD28	Mesothelioma and malignant pleural disease	MSKCC	NCT02414269(REF.85)
	CD3 α CD28 and 4-1BB	Mesothelioma pancreatic and ovarian cancer	NCI	NCT01583686(REF.86)
FAP	CD3 α and CD28	Mesothelioma	University of Zurich (Switzerland)	NCT01722149(REF.90)
EGFRvIII	CD3 α and 4-1BB	Glioma	Upenn	NCT02209376(REF.95)
	CD3 α CD28 and 4-1BB	Glioma	NCI	NCT01454596(REF.97)
EGFR	Unknown	Malignant glioma	Renji Hospital (China)	NCT02331693(REF.98)
CEA	CD3 α and CD28	Liver metastases	Roger Williams	NCT02146466(REF.100)
	Unknown	Lung colorectal gastric breast and pancreatic cancer	Southwest Hospital (China)	NCT02349724(REF.103)
CD171	CD3 α and 4-1BB or CD3 α CD28 and 4-1BB	Neuroblastoma	Seattle Children's	NCT02311621(REF.106)
GD2	CD3 α OX40 CD28	Neuroblastoma osteosarcoma and melanoma	NCI Baylor	NCT02107963(REF.112)
		Neuroblastoma	Baylor	NCT01822652(REF.114)
	CD3 α Ox40 CD28 virus specific	Sarcoma	Baylor	NCT01953900(REF.115)
Glypican-3	CD3 α CD28 and 4-1BB	Advanced-stage hepatocellular carcinoma	Renji hospital (China)	NCT02395250(REF.117)
HER2	CD3 α and CD28 virus specific	Sarcoma	Baylor	NCT00902044(REF.122)
	CD3 α and CD28	Glioblastoma	Baylor	NCT02442297(REF.126)
		Glioblastoma multiforme	Baylor	NCT01109095(REF.127)

改善CAR-T细胞的方法

目前，科学家们开发了多种改善 CAR-T 疗法抗肿瘤效力的途径。



(图7 改善 CAR-T 细胞的方法)

(1) 改装 CARs, 即将 CAR-T 细胞进一步修饰, 使其能够分泌促炎细胞因子, 从而在抑制性的肿瘤微环境中保护 CAR-T 细胞; 其中分泌 IL-12 的改装 CARs 在临床上取得了令人鼓舞的成果。

(2) 双重受体 CARs: 为了改善 CAR-T 的持久性, 伦敦国王学院的科学家们使工程 T 细胞表达了两个人工受体, 一个用于 TAA 识别, 另一个为 T 细胞提供细胞因子介导的生长刺激。

(3) 自然杀伤细胞受体 CARs：自然杀伤细胞表达的受体与肿瘤细胞和非恶性细胞的不同，这些受体（如 NKG2-D）也可用作 CARs 上的抗原识别域，从而改善 T 细胞的肿瘤识别能力。

(4) 联合检查点阻断: CAR-T 细胞受制于肿瘤微环境中抑制性的免疫检查点信号, 如 PD-1 配体或 CTLA-4 配体。这些抑制性受体 - 配体的相互作用可以通过单克隆抗体阻断, 从而解除对 T 细胞的抑制。

(5) 改善 CAR-T 细胞持久性：失败的 CAR-T 细胞疗法一个潜在的原因是持久性的降低。这是由于机体对 CAR 衍生的外源多肽的免疫识别，以及随后产生的对工程 T 细胞的破坏。事实上，这种影响已经在多个临床试验中被注意到。对抗这种免疫介导的破坏的一种途径是耗尽 B 细胞。

(6) 靶向肿瘤血管的 CAR-T 细胞: CAR-T 细胞靶向肿瘤血管的这一方法正被研究用于治疗黑色素瘤和肾癌。肿瘤微环境中血管生成生长因子(如 VEGF)的存在以及肿瘤细胞中它们受体的过表达与不良的预后和转移相关。

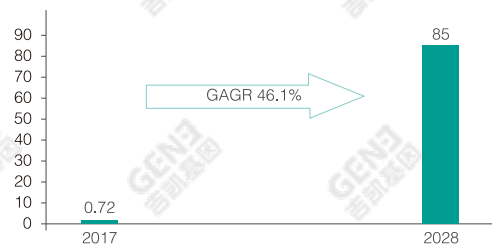
CAR-T技术面临的挑战

从目前 CAR-T 的临床前实验研究结果和临床应用方面来看，遇到的问题主要分为以下几个方面。

- 1 靶标抗原的选择及其靶向问题
- 2 胞外单链抗体的人源化问题
- 3 T 细胞基因修饰问题
- 4 T 细胞修饰前细胞亚群的选择问题
- 5 CAR-T 细胞的培养和分选问题
- 6 实体瘤免疫抑制问题
- 7 复发问题
- 8 安全性问题
- 9 产业化制备及政策

CAR-T领域基础研究思路及临床应用标准

根据 COHERENT MARKET INSIGHTS 的预计，2017 年全球 CAR-T 细胞治疗市场估值为 7200 万美元，2028 年将达到 85 亿美元，2019 年至 2028 年间市场规模预计呈指数增长，复合年增长率高达 46.1%。

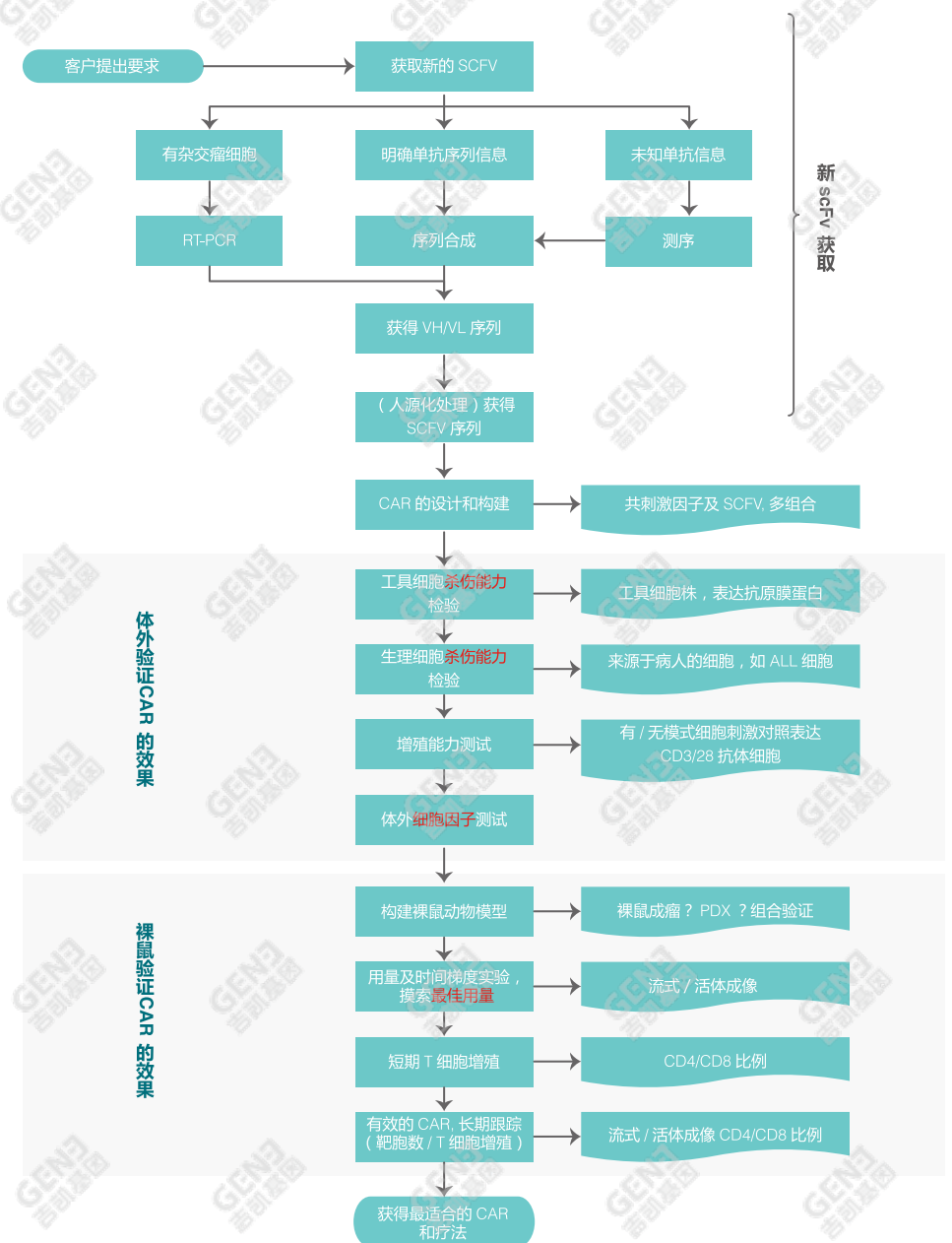


(图 8 2028 年全球 CAR-T 市场规模或达 85 亿美元)

目前主要应用的两类适应症为儿童和年轻成人急性淋巴细胞白血病 (ALL) 和非霍奇金淋巴瘤 (NHL，成人复发或难治性大 B 细胞淋巴瘤)，根据《2017 年中国癌症统计》，并参考国内肿瘤靶向治疗药物，预计 CAR-T 疗法市场价格约为 40-50 万元人民币 / 疗程，我们预测中国存量市场空间约为 228-285 亿元。

CAR-T研究经典思路

针对 CAR-T 的研究目前已经形成了比较经典的研究思路



scFv的获取

1. 肿瘤抗原识别序列 (scFv)。可以是新的 scFv 抗已有 CAR 结构的肿瘤抗原 (CD19)，也可以是 scFv 抗尚未经过 CAR-T 治疗实验但比较公认的肿瘤抗原 (肿瘤细胞明显表达增加，且在正常组织中表达较低)。
2. 新的 scFv 可由客户直接提供，也可由吉凯通过定制抗体获取。已知抗体杂交瘤细胞使用通用引物扩增获取 scFv 序列；未知抗体杂交瘤细胞先使用 sigma 生产的 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents 进行分型，再使用引物扩增获取 scFv 序列；无细胞抗体可根据抗体氨基酸序列进行 scFv 序列设计；未知单抗需先测序确定氨基酸序列，再设计 scFv 序列。

CAR的设计及构建包装

CAR-T设计

01

共刺激因子的选择，CD28/CD147 等的组合

02

Promotor 的选择，例如可调控表达

03

设计可自杀的 CAR-T 相关质粒，赋予感染成功的 CAR-T 细胞可诱导凋亡的能力，进而控制慢病毒随机插入引起的 T 淋巴瘤风险

(以上因素分拆或组合，可得到不同种 CAR，每种 CAR 均为一个大综合合同)

体外实验验证CAR的效果

体外实验验证以下指标



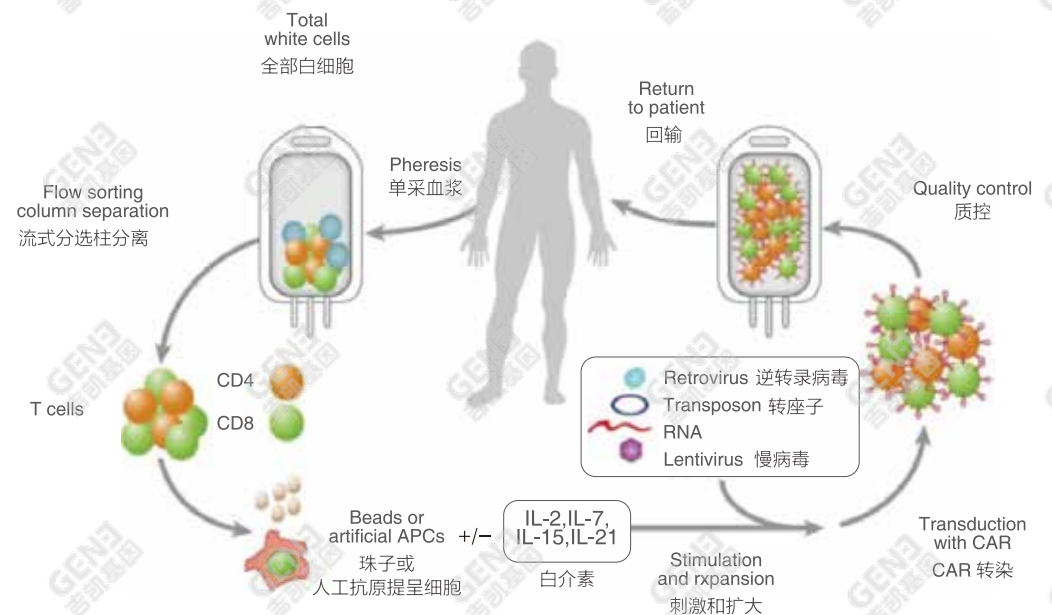
(若有多种 CAR 结构，可在此步进行初步筛选)

体内实验验证CAR的效果

- 1 在短期内验证待选 CAR 结构的细胞毒性杀伤、细胞类
- 2 在长期内观察选中 CAR 结构的对肿瘤的

CAR-T技术的治疗流程

完整的治疗过程包括从病人体内单采血浆，流式分选细胞，CAR 病毒制备，CAR 病毒感染 T 细胞，CAR-T 细胞扩大培养，质检后输回病人体内等几个大步骤，每个大步骤又包含多个小步骤，对实验室条件和操作等要求也非常高。



(图 9 CAR-T 的治疗流程)

参考文献

1. Rosenberg S A, Restifo N P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer[J]. Science, 2015, 348(6230): 62-68.

2. Link A, Vogt T K, Favre S, et al. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells[J]. Nature immunology, 2007, 8(11): 1255.

3. Wu CY1, Roybal KT1, Puchner EM2, Onuffer J3, Lim WA4.Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor.Science. 2015 Oct 16;350(6258):aab4077.

4. Byrne JD1, Jajja MR2, O'Neill AT2, Bickford LR2, Keeler AW3 etc.Local iontophoretic administration of cytotoxic therapies to solid tumors. Sci Transl Med. 2015 Feb 4;7(273):273ra14.

5. Kloss CC1, Condomines M, Cartellieri M, Bachmann M, Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. Nat Biotechnol. 2013 Jan;31(1):71-5.

6. Pegram HJ, Park JH, Brentjens RJ. CD28z CARs and armored CARs. Cancer J. 2014 Mar-Apr;20(2):127-33.

7. Poirot L, Philip B, Schiffer-Mannioui C, Le Clerre D, Chion-Sotinel I etc. Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies.Cancer Res. 2015 Sep 15;75(18):3853-64.

8. Laura A Johnson1 and Carl H June1. Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer.Cell Research (2017) 27:38–58.

临床研究或试验的CAR病毒制备及质控要点

2017 年 CFDA 将细胞治疗纳入治疗性生物用品进行申报管理，并在同年 12 月正式出台注册受理文件，明确了细胞治疗将作为药品管理的方向。

同时，鉴于 CFDA 对于细胞治疗是非常鼓励和支持的，非 IND 申报的研究者发起的临床研究（Investigator Initiated Trials, IIT）亦可作为 CAR-T 治疗质量评估的参考数据。从这个角度来说，研究者需保证慢病毒的质量及安全性，在临床研究前充分评估，虽然 GMP 生产环境及文件体系并非必须，但是生产工艺的稳定性、工艺参数和质量控制是很重要的。

作为 CAR-T 细胞治疗中的重要原材料，慢病毒和质粒的质量控制非常关键。对于质粒来说，常规的质量控制有质粒鉴别、含量、纯度、无菌、内毒素、以及质粒的细胞转染效率。临床研究中所用的病毒包装质粒需要考虑工业化的质粒生产方式，包括连续发酵工艺、柱纯化工艺等，并开展质粒生产工艺验证。

直接用于 T 细胞转染的质粒还需要考虑制剂配方工艺。为了提高生产的一致性，单批次质粒应准备足够多批次慢病毒包装及感染的量。最后，质粒保存的稳定性研究也是质粒质量控制的一个重要参数，通过分析不同保存条件下质粒的变化和对 T 细胞转染效率的影响，确定质粒使用的有效期和安全性。

相比质粒来说，慢病毒的工艺及质量控制要复杂很多。

对于药品级别 CAR-T 研究中的慢病毒的包装来说，通常采用 3 或 4 质粒系统。这个体系中的穿梭载体，包装辅助质粒以及包装细胞均是原材料。由于质粒由菌种生产，所以制备质粒的菌种也应定义为原材料。

对于能够建库的起始原材料，均应采用二级或三级种子库（种子、主库、工作库），从而最大程度控制交叉污染。在的平时的科研中，慢病毒通常使用培养皿培养，但是在临床研究中，这样的培养方法较难防止污染和交叉污染。因此，临床研究所用慢病毒也需要为类似 GMP 的车间所生产，才能保障受试者安全。在申报 IND 时，只有在这样的工艺和质量要求下生产的病毒和细胞制品说产生的临床研究数据才能为 CFDA 所采用。

基本的质检项目包括但不限于

质检项目						
支原体	无菌	衣原体	外源性总 DNA 残留	总蛋白	BSA 残留	PH
病毒纯度	感染滴度	RCL	病毒基因组检测	渗透压	颜色	目的基因过表达

同时，滴度、CAR 鉴别、物理及细胞转导滴度的检测中，还需要建立相应的病毒载体参比品。

CAR-T 所用慢病毒产品不具有复制能力，所以不能用常规的细胞病变法（PFU/CCID50）测量滴度，而应该使用检测细胞 CAR 表达阳性率，计算其转导滴度（TU/ml）。一般来说，CAR-T 慢病毒产品的滴度在 1E+8 TU/ml 以上，为了获得高滴度的病毒，需要开展病毒培养工艺的研究，包括不用阶段细胞培养用液、辅助质粒与穿梭质粒的比例、质粒转染方法及所用试剂、转染时间及效率、病毒收获时间及批数，病毒悬浮液保存条件等参数，并验证。

外源因子污染也是影响其安全性的一个关键因素，在这中间，采用《中国药典》规定的无菌检查法、支原体检查法以及外源病毒因子污染检查法的通则。由于病毒产品的活性，不能采用终端灭菌工艺及除菌过滤工艺。由此，为了降低病毒载体的安全风险，对病毒载体收获液应进行纯化，浓缩并制成无菌病毒载体。制成的病毒载体浓缩液，应避免冻融，以保证其稳定性，安全性以及一致性。

工艺杂质残留量的限定标准可以参考体内病毒基因治疗的要求，但是由于病毒载体不是直接进入人体，而是经过多次处理洗涤的过程，所以对于工艺残留杂质的要求也要结合下游工艺验证的数据综合评估。但对于牛血清蛋白之中明显过敏原，仍需要建立严格的标准。

在临床实验过程中，除了评估 CAR-T 细胞产品的同时也要评估病毒载体工艺及其稳定性，所以需要用到不止一个批次的病毒载体。而另一方面，由于 T 细胞供体的来源差异很大，使用多批次病毒产品会造成产品一致性不足。在兼顾这两方面的需求情况下，病毒载体规模的设计需要满足单次感染 T 细胞所需、质量检测所需、留样量、稳定性测试所需以及预期每个有效期内病毒用量。

在政策逐渐清晰的趋势下，对于 CAR-T 细胞及慢病毒产品的要求愈发严格。在临床研究过程中，安全性、有效性、可控性、一致性是每一个研究者都需要面临的问题。

科研能力

国内最大的慢病毒文库，
包含 **15 万个** 独立克隆肿瘤候选靶标基因库。
肿瘤模式细胞库，
所有细胞均经过 **STR 分型** 鉴定。
吉凯关键基因数据库。



ISO9001 实验全流程数据管理系统

累积承担国家科技部、上海市科委、上海市经委支持的疾病诊疗基因靶标研究相关课题30余项

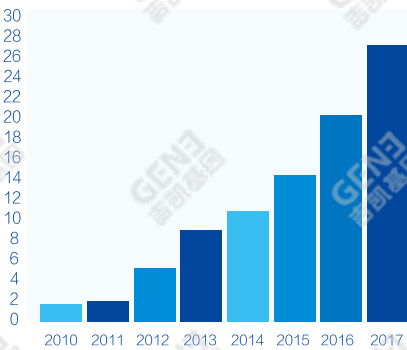
2007	2011	2013	2014
国家 863 目标导向研究项目 - 脑胶质瘤增殖侵袭病理机制研究	上海市生物医药产业化项目 - 治疗性抗体有效性筛选评价技术服务	上海市智能制造及先进材料领域项目 - 转化医学研发智能分析与管理系统及服务应用	上海市中小企业发展专项资金项目 - 用于肿瘤诊疗靶标发现的慢病毒产品的产业化技术改造
2010	2012	2015	2016
上海市生物医药产业化项目 - 肿瘤治疗药物基因靶标筛选和有效性评价技术服务	国家 “863 计划” 项目 - 小核酸技术的前沿研究	上海市产学研医合作项目 - 髓系白血病 CD123-CART 细胞治疗成药性研究及 cGMP 生产技术标准的研究	国家重点研发计划重大慢性非传染性疾病防控研究等重点专项 - 消化道肿瘤诊疗生物标志物验证及应用研究

销售网络覆盖



Corporate clients in 2017

历年合作申请基金



Funding for the project

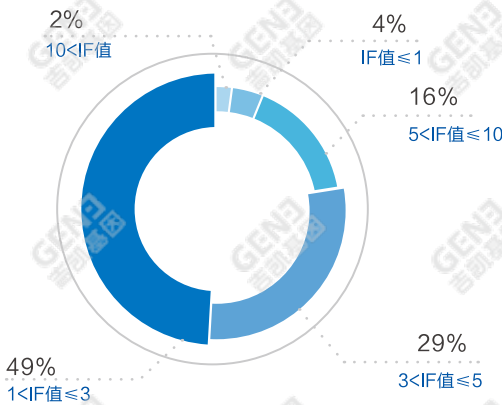
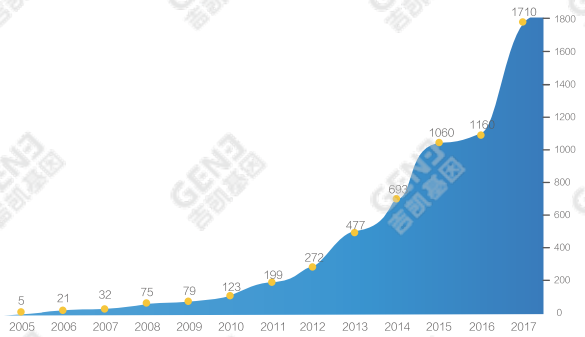
授权的发明专利

累计申请 **100** 余项
获得授权专利 **30** 余项
PCT 专利 **4** 项 (美国已授权 **2** 项)
60% 为基因靶标专利
40% 为技术专利



历年客户使用吉凯基因产品和服务发表文章统计

使用吉凯的产品和服务发表的 SCI 文章统计



使用吉凯的产品和服务发表的 SCI 文章 IF 值分布统计

吉凯产品和服务陪伴国内科学家的杰出研究成果发表的 SCI 文章累计 5000 多篇