HORNETCORN

HORNETCORN
BIOTECHNOLOGY

深圳市合一康生物科技有限公司
电话：0755-21672023-617
传真：0755-21672020
E-mail: info@hornetcorn.com
网址：www.hornetcorn.com
地址：深圳市高新技术产业园清华紫光信息港B座406

2014年 第02期

HORNETCORN
BIOTECHNOLOGY

合一康生物
学术内刊

ACADEMIC JOURNAL

本期推荐

- 聚焦肿瘤免疫细胞和基因治疗 携手共摘医学皇冠上的明珠
- 中印合作焕新未来 厚德兴业绽放溢彩
- FDA质量管理专家组织合一康公司质量管理体系年度评审
- 未来医学“第三大支柱”：细胞治疗
- 聚焦sipuleucel-T（PROVEGEN®）的培养方案与疗程设计

总09期
（内部资料 仅供交流）

目录：Contents

要闻

01 聚焦肿瘤免疫细胞和基因治疗 携手共摘医学皇冠上的明珠

03 中印合作焕新未来 厚德兴业绽放溢彩

04 FDA质量管理专家组织合一康公司质量管理体系年度评审

05 Quality Management at Hornetcorn Biotechnology Limited

临床

06 HBsAg激活的D-CIK细胞治疗慢乙肝的临床研究

07 未来医学“第三大支柱”：细胞治疗

09 实体瘤免疫治疗评价指南：免疫相关评价标准（irRC）

11 聚焦sipuleucel-T（PROVEGEN®）的培养方案与疗程设计

14 过继免疫细胞（CIK细胞）治疗肝癌术后患者的疗效评价

15 CIK细胞疗法对肺癌免疫功能的调节及维持效应

16 射频消融联合序贯免疫细胞延长肝细胞癌患者无进展生存期

18 CIK细胞联合化疗治疗结直肠癌术后的安全有效性

19 细胞因子诱导的杀伤细胞（CIK细胞）治疗晚期胰腺癌

基础

20 经特异性CD123嵌合抗原受体改造过的CIK细胞对急性髓性白血病的靶向作用

23 树突状细胞系：树突状细胞及其亚群在稳态和炎性环境中的发育和功能

25 非病毒载体基因转导人单核细胞衍生的树突状细胞的高转染效率，基因表达效率和活性

典型病例

27 广州市肿瘤医院典型病例

试验

28 免疫细胞相关临床试验

HORNETCORN BIOTECHNOLOGY

编者按：

随着生物技术的发展，国内外免疫细胞治疗技术临床应用研究蓬勃兴起，已成为肿瘤生物治疗领域最活跃、最有发展前景的技术，逐步成为了继手术、放化疗后肿瘤第四种主流治疗技术。2013年中国临床肿瘤学会（CSCO）学术年会和美国癌症免疫治疗协会（SITC）年会也着重提出，免疫细胞技术是肿瘤生物治疗中最重要的治疗方式之一。

我国卫生部于2010年将免疫细胞治疗列为首批临床应用的第三类医疗技术，2012年科技部下发的《“十二五”生物技术发展规划》将免疫细胞治疗列为重点发展技术，同年12月国务院下发了《生物产业发展规划》，也重点提出免疫细胞治疗技术的产业化发展，系列管理政策的出台将进一步促进免疫细胞治疗技术的发展。2013年底，《科学》杂志公布年度十大科学突破，癌症免疫治疗荣登榜首。

本刊收集和整理了最新的会议动态、科研论文和临床试验概况等，包括肿瘤疫苗、过继性免疫细胞治疗和生物免疫治疗等资料。受编者能力及水平的限制，本刊的收集和编排中存在的不足之处，望大家提出宝贵的意见和建议。

征稿启示

作为企业文化的载体，《合一康生物学术内刊》起着传递行业信息、展示企业风采、分享技术经验的作用。为了丰富内刊内容、加强总部与各中心之间的沟通，本刊特向公司全体员工征稿。征稿内容包括公司新闻、行业动态、研发技术、典型病例、临床试验等，所有稿件要求字数800字以上，可根据内容进行配图，如推荐和引用其它刊物的文章，请注明文章出处和原著姓名。

欢迎各位同事积极参与！投稿请发送至合一康生物学术部：chenjie@hornetcorn.com。

聚焦肿瘤免疫细胞和基因治疗　携手共摘医学皇冠上的明珠

2014年中国科学院深圳先进技术研究院“肿瘤免疫细胞与基因治疗学术研讨会”专题报道

为加速推进肿瘤免疫细胞和基因治疗技术的创新研究，中国科学院深圳先进技术研究院“肿瘤免疫细胞与基因治疗技术”联合实验室邀请多位国内专家，举办了为期两天的2014年“肿瘤免疫细胞与基因治疗学术研讨会”。

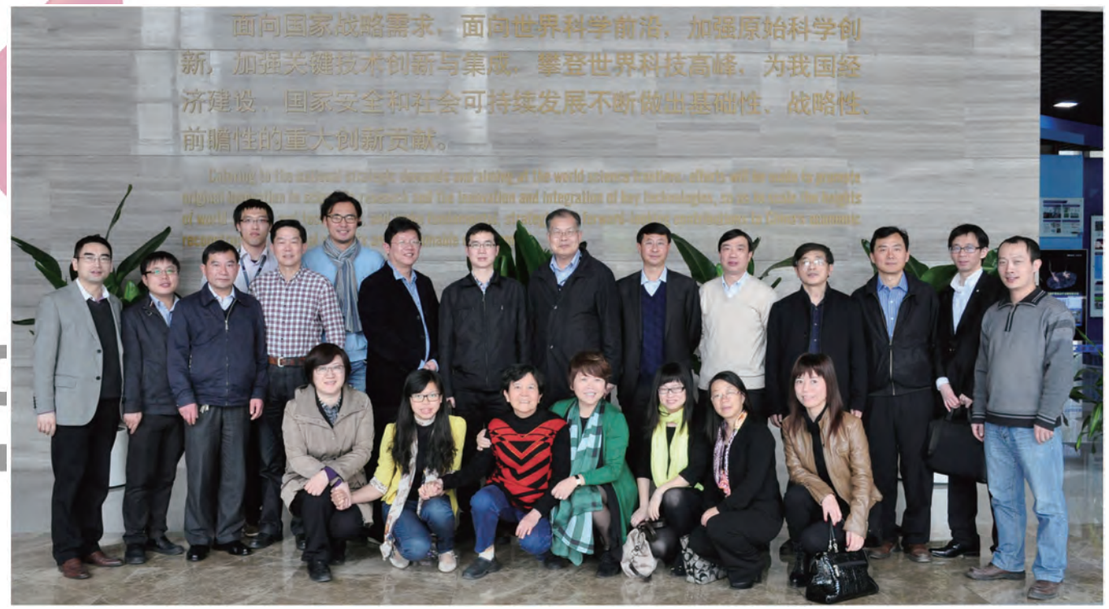
3月22日-23日，来自美国斯坦福大学、中南大学、南华大学、广州医科大学、云南省肿瘤研究所的基因工程、细胞生物学、肿瘤免疫学和临床肿瘤学专家,及多位来自免疫细胞技术研发与应用的产业界精英，齐聚中科院先进技术研究院，共商肿瘤免疫细胞和基因治疗技术产、学、研发展大计。

来自美国斯坦福大学的国际一流专家陈志英教授，是中国科学院深圳先进技术研究院与深圳市合一康生物科技有限公司合作建立的“肿瘤免疫细胞与基因治疗技术联合实验室”首席科学家。陈教授基于该联合实验室近期所取得的重大进展，做了题为“肿瘤免疫细胞与基因治疗的现状与微环DNA基因载体的应用前景”的学术报告。陈教授在回顾了联合实验室在过去一年中取得的研发成果的同时，进一步深入浅出地从学术和临床应用角度阐明了微环DNA作为新一代基因载体在肿瘤免疫细胞治疗中的广阔应用前景。与会专家一致认为微环DNA作为新一代基因载体具有安全、经济等独特优势，可为国内外普通肿瘤患者量身打造更多有效的抗肿瘤的细胞产品。

国内肿瘤免疫学和抗体工程领域顶尖专家，中南大学肿瘤研究所副所长、博士生导师李官成教授，根据目前肿瘤免疫细胞治疗发展趋势，并切合构建肿瘤抗原库和原代肿瘤细胞抗原库，做了题为“肝癌新靶点分子介绍”的报告。国内细胞生物学、免疫细胞培养领域的泰斗，中南大学细胞生物研究室主任祝和成教授做了“肿瘤细胞建系技术及其生物学特性研究”的学术报告，两位专家从学术科研和技术创新角度为免疫细胞治疗技术产业化研发提供了新的思路。

作为产业界代表，深圳市合一康生物科技有限公司总经理罗晓玲女士也应邀参会。罗晓玲女士充分肯定了在陈教授带领下联合实验室所取得的重大进展，同时从“维护人类健康，打造免疫细胞和基因治疗国际一流品牌”的战略高度，回顾了合一康在免疫细胞和基因治疗领域所取得的成就，并对产业化发展方向和战略布局做了充分介绍。公司技术总监，从CAR-T技术发明人Carl June实验室留学归国的魏征宇博士，向与会专家汇报了合一康2014年研发项目规划。专家们在充分肯定合一康在肿瘤免疫细胞治疗研发工作的同时，也分别从细胞生物学、肿瘤免疫学和临床肿瘤学各个专业领域，对企业研发工作战略布局提出了极具启发性的建议。

与会专家还就企业研发和管理创新机制以及打造抗肿瘤免疫细胞治疗产学研联盟展开了热烈讨论，南华大学医学院党委书记、肿瘤研究所所长贺修胜教授，广州医科大学附属肿瘤医院党委书记刘敏涓教授，广州医科大学肿瘤研究所所长、博士生导师贺志敏教授，云南省肿瘤医院肿瘤研究所王熙才教授等专家，基于多年的科研管理和临床工作经验，对于联合实验室的研发管理和制度创新机制探索、企业的产品临床应用布局等方面进行了深入剖析，提出了极具启发性的建议。



为期两天的会议，与会专家就国内外免疫细胞和基因治疗行业技术发展现状和趋势，抗肿瘤免疫细胞治疗技术及产品研发战略，研发和管理创新机制，及打造抗肿瘤免疫细胞和基因治疗产学研联盟等方面进行了深入探讨。为“肿瘤免疫细胞与基因治疗技术”联合实验室的后续研发提供了建设性意见，为肿瘤免疫细胞和基因治疗领域的产品研发指明了方向，并初步达成了以合一康为核心平台打造肿瘤免疫细胞技术产、学、研联盟的意向。

中印合作焕新未来 厚德兴业绽放溢彩

2013年11月7日，一直积极寻求和拓展海内外深度合作的深圳市合一康生物科技有限公司（以下简称"合一康生物"）迎来了跨国合作的崭新制高点。是日，合一康生物和印度CG有限公司(以下简称CG)共同签署了一份战略合作协议，双方将建立稳固长远的战略合作伙伴关系，形成多层次、宽领域的合作与交流格局。双方约定，合一康生物将为多达数千名印度癌症患者制定个性化的细胞技术治疗方案，并提供配套的品质服务和必要的辅助治疗。此次战略合作是肿瘤生物治疗领域首次大规模跨国契约性合作，标志着中印两国牵手关怀肿瘤患者迈入崭新起点。

珠联璧合共促祥瑞

中印两国自古就是山水相连的友好邻邦，两国人民的友谊源远流长。当今社会，中印又同时是世界上最大的两个人口大国，以突飞猛进的发展昭示着亚洲的崛起。同时，两国又面临癌症高发病率的问题。为了给印度人民寻求可靠安全的癌症治疗技术的合作方，CG着眼全球，放眼涉猎业界精英。当CG定睛合一康生物，其发言人表示："合一康生物在中国攻克癌症的成绩和进步不容忽视，企业决心诚心之高，科研步伐之快之稳，令我动容。我以这份合作为荣。这份协议的签订，不仅彰显了国际合作精神，更是对世界卫生组织准则的坚守和支持。为全世界人民提供高品质的健康医疗服务，无国界之差，无种族之异，无阶层之别。"

本着实实在在地关怀和支援生活贫苦罹患不幸的印度患者的宗旨，合一康生物和CG在协议中约定，将共同推行中印两国之间肿瘤免疫细胞治疗的慈善关爱活动。这不仅充分展现了两家高科技领域的领导者始终坚定不移的坚持着企业创建之初的理想，更将使数百名肿瘤及癌症困难患者能够真正受益。这无疑是践行世界卫生组织的宗旨——"使全世界人民获得尽可能高水平的健康"的空前创举，企业先例。企业求发展，却不忘善用自身资源优势和职责去承担社会责任。不仅仅孜孜不倦致力于革新治疗技术，提高治疗效果，造福国内患者，关怀国内民族，用实际行动支持国内慈善和公益事业的发展，还体察国际患者的困难和患病痛楚，提供实实在在的治疗惠助，以中印契约之名许下一个庄严的承诺，展现一个企业公民的跨国厚德启示录。

编织善举大道行远

对此，合一康生物CEO罗晓玲博士表示："作为企业CEO，我坚持先做社会责任家，再做企业家。我们能做的，除了尽自己最大的努力帮助患者战胜病魔，运用科技延续生命，更能让爱与生命同在，悬壶济世，德泽生命。"

FDA质量管理专家组织合一康公司质量管理体系年度评审

公司质量管理体系策划秉承全面质量管理（TQM）理念，依据ISO9001\ISO4001\OHSAS18001标准，并结合生物细胞治疗技术服务特点，将人体细胞组织优良操作规范（GTP）和良好作业规范（GMP）标准融会贯通于一体，形成了一套符合生物细胞治疗安全有效需求的质量管理体系。

质量是企业的生命，标准是生命的保证，严格执行标准是公司质量管理的核心。尽管已经通过了ISO9001\ISO4001\OHSAS18001国际质量认证，合一康生物并没有在质量管理上止步。

为进一步保证标准和规范严格落实，2013年12月中旬开始，合一康公司的细胞实验室质量管理体系年度评审正式启动。由公司质量管理总监、美国FDA质量控制专家Allen Edward Goldenthal博士主持并实施。

公司和实验室已通过ISO9001、ISO14001、OHSAS18001等认证

据了解，检查组成员均具有多年药厂和生物细胞治疗质量管理工作经验，多次主持或参与过CFDA的GMP认证，在质量管理体系的内部审核方面具有丰富的经验。

针对合一康生物细胞治疗质量管理体系，评审小组制定了全面详细的审查标准，内容涉及到各生物中心细胞实验室硬件设施和软件管理各个方面。包括合作医院开发、实验室建设、新实验室启动、环境监控、机构与人员、仪器设备管理、供应商与来料控制、生物细胞治疗流程控制、供体筛查、知情同意、细胞制备工艺技术质量控制、源文件、病例报告表、细胞治疗产品的包装及运输、细胞治疗临床观察、随访和疗效评估、检验方法确认、年度回顾及细胞治疗产品的设计研发等内容。

本次年度质量体系评审涉及到合一康生物遍布全国的多家生物细胞实验室，审核结果显示：均符合公司现行质量管理体系要求。

经过此次年度质量管理体系评审，ALLEN博士认为，合一康生物已具备向美国FDA申报GTP注册的条件。

Allen Edward Goldenthal博士简介:

美国FDA质量控制专家；纽约科学院和国际监管毒理学和药理学协会专家；20多年cGMP和cGTP实验室质量管理体系建立、申报和审核经验；将cGTP规范引入中国的外籍专家第一人。

HORNETC BIOTECHNOLOGY

Quality Management at Hornetcorn Biotechnology Limited

Dr. Allen Goldenthal
Director of Quality

It has been the overriding goal for Hornetcorn Biotechnology to establish a quality system based on the precepts established by Western regulatory authorities in regards to the use of human tissue and cells as therapies against disease. As such, this meant entering territory that was not commonplace in China and developing systems that had not been found routinely in the mainland, requiring that Hornetcorn actually became a leader in this regard in the pursuit of Good Tissue Practices as the regulations are referred to. Therefore, Hornetcorn is proud of the accomplishments it has achieved to date to serve the patient's receiving immunotherapy by strict adherence to internationally accepted regulations and guidance. From its onset, there were several goals for the Quality department to adhere to:

1. Ensure treatments are safe and efficacious.
2. Enhance patient safety.
3. Make every resource count.
4. Have an exemplary workforce.
5. Deliver exceptional service.

Having established the goals, Hornetcorn's Quality Department then made its mission to protect and improve the lives of people in China and internationally by supporting the immunotherapy care delivery system, while at the same time never losing focus on its vision that the Quality Department becomes the leader in China for GTP implementation and adherence to patient safety, prevention of cancer and therapeutic systems development.

The quality systems implemented at Hornetcorn are designed to improve the quality immunotherapy and palliative health care and service provided to patients through simplified administration of procedures and a comprehensive and ongoing system of monitoring measurable performance indicators. To do so properly, the Quality Department also assesses and monitors the risk, and problem-prone processes through data obtained from follow-up, complaints, adverse occurrences, and other relevant sources. This permits the department to identify the critical control points that must be dealt with in order to assure that the process is performed within a quality framework.

For quality to exist, it is important that the results of treatment is properly evaluated by comparing them to established goals and benchmarks that are achieved by other institutions and clinical trials. But quality does not stand still and even when those benchmarks are being met, Hornetcorn's Quality Department continues to promote and improve the technological applications within the company by having written processes for adopting and updating all of its systems. In this regard, Hornetcorn is proactive as the Quality Department constantly monitors and implements the latest regulatory requirements that are being implemented in North America and Europe, the leaders in developing an immunotherapy quality management environment. To achieve these constant updates, it is the responsibility of Hornetcorn's Quality Department to ensure that the qualifications of its technicians also are constantly upgraded through application of training programmes and having a baseline educational requirement for all its technicians. By doing all this, Hornetcorn is able to demonstrate that it is in compliance with all applicable accrediting and regulatory agencies.

But the quality system at Hornetcorn is far more than an in-house program but is far reaching in its application throughout China. In effect, by adhering to the monitoring and compliance standards established by the FDA and Eurocet regulatory bodies, Hornetcorn is required to oversee the quality performance of its service providers and vendors. These outside companies must perform to a level equal to Hornetcorn's own internal standards if they are to supply Hornetcorn and in so doing they in turn have been forced to raise the bar on their own production performance. Hence, there is a ripple effect extending from Hornetcorn throughout China.

Having its own team of experts in Quality Control, Quality Assurance and Quality Development, Hornetcorn has become a leader in regulatory standards achievement within China, and performs on par with similar research, development and clinical treatment companies based in North America and Europe. Its program of continuous education through seminars, training days and outside speakers assures Hornetcorn that it will always retain this leadership role in China for years to come.

HBsAg激活的D-CIK细胞治疗慢乙肝的临床研究

临床医学部　赵静编译

HBV感染的控制和病毒的清除有赖于机体的免疫系统，而慢乙肝（CHB）患者往往存在树突状细胞功能低下，T、B淋巴细胞对HBV呈耐受状态等情况，从而导致HBV长期持续感染。目前现有的抗病毒药物对慢乙肝患者的疗效并不理想，通过增强或恢复免疫系统功能来控制HBV感染成为一种有潜力的治疗策略，因此本文对HBsAg激活的D-CIK细胞治疗慢乙肝的临床疗效进行了研究。

该研究选择已确诊的CHB患者为研究对象，血清HBsAg、HBeAg、HBcAb均为阳性者被纳入本次试验，而肝硬化、肝癌、自身免疫性肝炎、酒精性肝炎、药物性肝炎及合并其它肝脏疾病的患者将被排除。

研究者首先进行了体外杀伤性试验，用CCK-8比色法检测HBsAg-DC-CIK细胞对HepG2.2.15细胞的杀伤作用，结果显示，HBsAg-D-CIK细胞的杀伤活性高于未激活的D-CIK细胞，并且来源于健康人体的HBsAg-D-CIK细胞较来源于CHB患者的细胞，显示出更强的体外杀伤作用。

临床试验共选择60名患者，对照组27例，只接受对症治疗；细胞治疗组33例，接受自体HBsAg-D-CIK细胞治疗，每次静脉回输细胞10^9个，共回输5次。分别于回输前及回输后4周、8周、12周和24周检测对照组和治疗组患者的血清HBV-DNA、HBsAg和ALT水平。治疗前两组患者HBV-DNA载量无明显差别，但在治疗后24周，治疗组患者的HBV-DNA明显低于对照组，而对照组并无明显变化。

另外，治疗组有21名（63.6%）患者出现了抗病毒免疫应答，其病毒载量下降超过2个对数级，而对照组只有4名（14.8%）患者有抗病毒反应，且HBV-DNA的表达无明显改变。这项研究说明，HBsAg-D-CIK细胞治疗CHB可增强患者的免疫功能，并抑制HBV病毒的复制。

（Ma YJ,et al. A clinical study of HBsAg-activated dendritic cells and cytokine-induced killer cells during the treatment for chronic hepatitis B. Scand J Immunol. 2013;78(4):387-93.）

未来医学“第三大支柱”：细胞治疗

学术部　陈杰编译

二十年前，随着以重组激素、可溶性受体和抗体为基础的生物制剂的出现，长期被作为唯一支柱的小分子药物统治下的制药工业，出现了一次重要革命。现在，随着微生物和人体细胞治疗多潜能性的发掘，生物医药也被推到了风口浪尖，引发了新的一轮革命。细胞工程学的不断进步，对开发出安全的、可预测的细胞治疗提供了一个系统性框架。微生物和人体细胞也被用作治疗的实体，有潜力解决一些重要的、目前无法满足的需求，治疗某些最致命的疾病，包括癌症、自身免疫性疾病等。

日前，美国加州大学旧金山分校的研究人员在《科学-转化医学》（Science Translational Medicine）杂志上《Perspective》栏目下发表了一篇有关细胞治疗前景概述的文章。文章称，细胞治疗未来将成为“医学第三大支柱”，会像现在用工程蛋白质、抗体或更小的化学物质制成的药品一样，普遍用于治疗患者。

研究人员比喻到，如果小分子和生物制品是工具，那么细胞就是木匠、建筑师和工程师。细胞能够完成小分子药物和靶向性药物无法实现的一些功能。举例来说，细胞的适应性强，它们能够移行至特定的部位，比当前的药物更好地感知周围的环境，然后自己做出正确的决定，改变自身的反应，更好地适应生理条件。

首先，细胞天生就承担了很多治疗的任务，如巨噬细胞吞噬病原体，招募适应性免疫细胞，造血干细胞生成髓系和淋巴谱系细胞，软骨细胞产生软骨细胞外基质等；

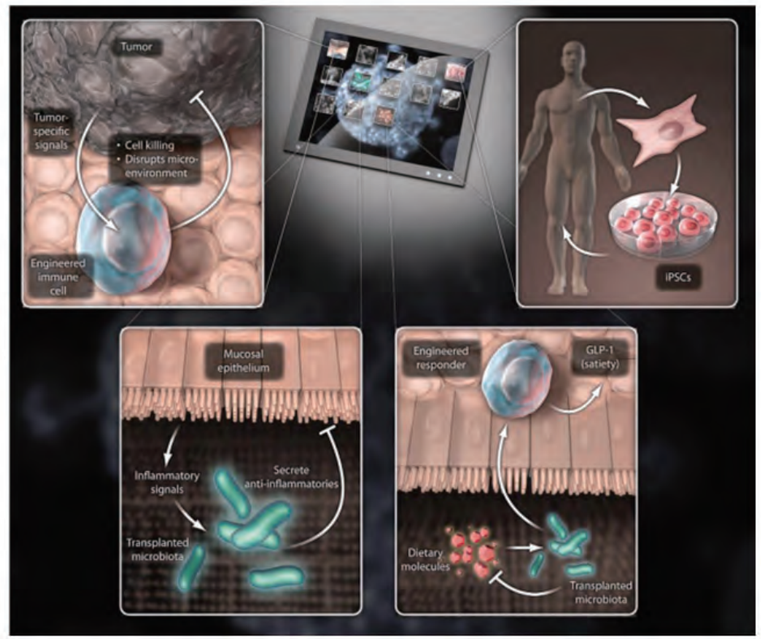
其次，细胞的行为具有选择性。对于小分子和生物制剂来说，它们没有开关，只要其与标靶结合，就发挥其生物学效应。但细胞却能感知周围环境，只有触发特定的信号分子时才发挥作用。因此，细胞治疗能更好的避免脱靶效应，也正因为如此，细胞治疗能起到更好的投递作用，是其他治疗的一个好的载体。

第三，细胞治疗能更好的适应人基因多样性。比如由于个体差异，药物在人体的代谢不同，疗效也不尽相同。但是通过改造细胞，使之能像电阻电路一样，自动调节浓度变化，适应不同宿主的代谢，从而发挥更好的疗效。

最后，可以通过改变细胞基因来调节细胞的功能。比如通过生物合成技术修饰T淋巴细胞，使之能够感应血糖并分泌胰岛素，解除1型糖尿病患者对血糖的依赖；针对癌症的免疫反应往往较弱，但是通过操纵和培育一些能靶向癌细胞上特异分子的免疫细胞群，则可提高抗肿瘤反应。这些新实验的研究，对于临床治疗都是巨大的突破。

细胞治疗与小分子或靶向药物比较

内容	小分子或靶向药	细胞治疗
选择性	分子识别	复杂的感知和反应系统
分布	根据药物动力学和药效学分布和投递	定向细胞迁移
剂量	根据时间控制	根据细胞决定 细胞的增殖/活化/死亡 闭环自动调节
治疗方式	药效的分布及持续时间不需要较多的控制	细胞的分布、水平、持续时间需要动态调整



上图介绍了以细胞为基础的四种临床治疗方式：1、重编程免疫细胞识别和杀伤肿瘤细胞，2、通过微生物移植分泌抗炎性小分子或生物因子，检测和治疗炎症性肠病，3、细菌/动物细胞混合疗法治疗代谢综合征，细菌细胞负责将饮食中的糖分转化为非吸收发酵产物，并与人体细胞一起激活饱足感激素的分泌，4、患者特异性干细胞在再生医疗中的应用，（iPSCs：诱导多能干细胞）

不过，细胞治疗仍然还存在着许多工程学和调控方面的挑战。科学家们希望能够可靠的控制细胞的多个功能，包括它们的激活、群体生长、程序性死亡、迁移至身体特定位点、与其他细胞的互动和通讯等。尽管细胞的复杂性使得许多科学家对细胞治疗抱迟疑态度，但这种复杂性更能使细胞治疗比其他药物更具有可预测性，也是未来最具发展前景的研究方向。

（Fischbach MA,et al. Cell-based therapeutics: the next pillar of medicine. Sci Transl Med. 2013;5(179):179ps7）

HORNETCOR
BIOTECHNOLOGY

实体瘤免疫治疗评价指南：免疫治疗评价标准（irRC）

学术部　陈杰编译

肿瘤免疫治疗近年来发展迅猛，已被越来越多的临床医生所认可，并广泛应用于多种恶性肿瘤的治疗。与传统的化疗不同，免疫治疗发生严重毒性反应的概率更低，患者耐受性更好，尤其对患者生活质量的改善作用更明显。但遗憾的是，目前临床上采用传统的肿瘤治疗评价体系对肿瘤免疫治疗疗效评价时往往不能令人满意，导致部分进入I\II期临床试验的免疫治疗项目最后以失败告终。

鉴于现有WHO或RECIST（response evaluation criteria in solid tumor）标准很难对肿瘤免疫治疗的临床疗效进行准确的解读和确切的评价，因此在2009年第23 期的 Clinical Cancer Research上专门刊载了由纽约Memorial Sloan-Kettering 癌症中心Wolchok教授等撰写的论文——《针对实体瘤免疫治疗疗效评价指南：免疫相关疗效评价标准》，深入探讨了肿瘤免疫治疗疗效评价新标准的意义和应用前景。

学者们针对肿瘤免疫治疗的特点，对现有WHO标准进行了相应修改并升级为免疫治疗疗效评价标准。Wolchok教授对该新标准的具体定义、指导原则和临床应用进行了详细阐述，并在一项由487例晚期黑素瘤患者参与的CTLA-4特异性单抗（ipilimumab）临床试验中，应用irRC进行了疗效评价，以全面探讨irRC的临床意义和可行性。

一、irRC的评价参数

对于 irRC 而言，可测量的新发病灶被计入总肿瘤负荷并与基线肿瘤负荷进行比较，这一点与传统的WHO标准完全不同。如对肿瘤直径的测量从原先的每个器官5个可测量病灶增加到每个内脏器官10个病灶或5个皮肤病灶，将所有测量结果相加以获得患者总肿瘤负荷并进行比较。irRC与传统WHO标准的区别详见表1。

二、irRC的效应评价

irRC中的疗效评定是根据观察点比较总肿瘤负荷与基线肿瘤负荷增加或减少的程度，并通过间隔不少于4周的两个连续观察点进行重复确认来划分。具体分为以下四类：irCR——所有病变均完全消失；irPR——在连续的检测中，与基线肿瘤负荷相比降低大于或等于50%；irSD——不符合irCR和irPR的标准，并未出现irPD；irPD——与基线肿瘤负荷相比增加大于或等于25%。

三、irRC的创新之处

irRC的创新之处在于将可测量的新发病灶计入总肿瘤负荷中，并且将其与基线肿瘤负荷进行比较。在此新规定下，即使有新病变出现，只要总肿瘤负荷并没有增加25%以上，也可不认定为疾病进展。与化疗不同，肿瘤免疫治疗后的短期肿瘤负荷增加不一定是由于肿瘤生长所导致的，也可能是因为暂时的免疫细胞浸润，而这种情况往往发生在出现明显的抗肿瘤效应之前。此外，新病变的出现也可能来源于那些原先无法用影像学检测发现的微小肿瘤灶中大量T淋巴细胞浸润所导致的局部炎症反应。

项目	WHO标准	irRC标准
新发现可测量病灶（如 ≥5mm×5mm）	永远代表疾病进展（PD）	需要纳入总肿瘤负荷再评价是否是疾病进展
新发现不可测量病灶（如 ≤5mm×5mm）	永远代表疾病进展（PD）	不定义为疾病进展
CR	在间隔不少于4周的两次连续的观察点均证实所有病灶消失	在间隔不少于4周的两次连续的观察点均证实所有病灶消失
PR	在至少间隔4周的两次连续的观察点均证实所有可测量的病灶直径较基线下降50%及以上，未见新发病灶或其他病变进展	在至少间隔4周的两次连续的观察点均证实总肿瘤负荷较基线肿瘤负荷下降50%及以上。
SD	在两次连续的观察点检测到病灶直径较基线下降不足50%，或肿瘤直径增大不足25%，未见新发病灶或其他病变进展	在两次连续的观察点证实总肿瘤负荷较基线肿瘤负荷下降不足50%，或增加不足25%
PD	在任一观察点检测到病灶直径较基线增加至少25%，和（或）出现新发病灶，和（或）出现其他病变进展	在至少间隔4周的两次连续观察点的任一时间检测到总肿瘤负荷较基线肿瘤负荷增加至少25%

根据WHO或RECIST标准，在肿瘤治疗过程中一旦发生PD应立即停止治疗。而对于肿瘤免疫治疗而言，如果肿瘤患者在初次评价时已达irPD，在病情没有急剧恶化的情况下仍需继续治疗并进行二次评价，因为肿瘤很有可能在 irPD确定4周内开始缩小，只有连续两次评价肿瘤负荷均有增加，并且大于25%才被认定为irPD。而对于那些肿瘤负荷下降缓慢，虽然超过25%但不足50%的irSD患者，irRC认为他们同样属于临床获益人群。

总之，对于像过继性免疫细胞以及ipilimumab药物这样能够诱导肿瘤消退的免疫治疗，irRC能够对临床免疫治疗的抗肿瘤效应作出更加准确和客观的评价，并且可以解释为什么经WHO标准认定为PD的患者能够长期生存。对于那些不能引起肿瘤明显缩小的肿瘤免疫治疗方案，irRC能够帮助评价其早期疗效，这与传统标准相比有一定的进步。但值得一提的是，irRC标准尚不能全面概括所有的临床疗效类型，对于irSD的定义以及其他免疫治疗有效的标志等仍需要进一步完善和开展更深入的研究。

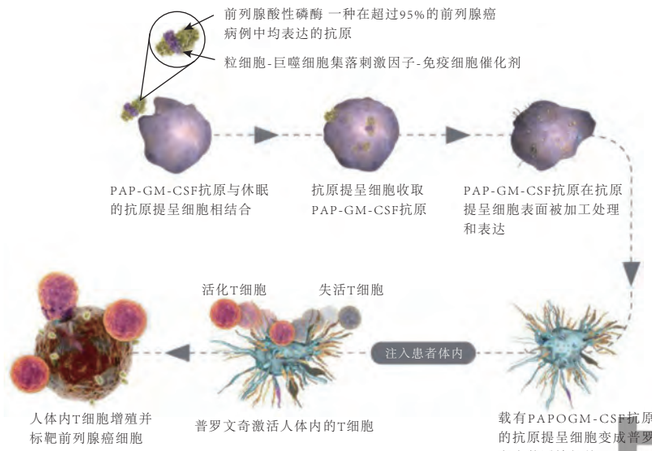
（Wolchok JD,et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors:immune-related response criteria.Clin Cancer Res.2009; 15(23):7412-20.）

HORNETCORN BIOTECHNOLOGY

聚焦sipuleucel-T（PROVEGEN®）的培养方案与疗程设计

研发部　马云骊编译

2010年4月，作为得到FDA批准的首例肿瘤疫苗，Dendreon公司的Provenge（注册商品名/品牌名：Provenge，通用名：Sipuleucel-T，下文使用商品名）正式上市，用于治疗无症状或轻微症状的转移性去势抵抗性前列腺癌。如果说在此之前人们谈到肿瘤的免疫治疗就基本等同于抗体药物治疗的话，那么Provenge的上市，使得在学术界发酵已久的肿瘤免疫细胞治疗，在普通大众和医药业界的肿瘤疗法关注排行榜上重新登顶。对于致力于成为中国免疫细胞治疗行业领军人的我公司而言，Provenge既是希望、目标，也是榜样，在各种意义、各个环节上都有许多宝贵的经验值得我们学习和借鉴。本文根据几篇重要的Provenge外文综述整理而来，将简要介绍Provenge的原理、组分、治疗方案、和临床试验数据，仅供参考，希望对各位同仁有所助益和启发。



普罗文奇(Provenge)作用机制

前列腺癌的流行病学和治疗需求

前列腺癌是男性之中最高发的癌种之一，也是全球男性因癌症死亡人数中的继肺癌之后第二大死因。仅在美国，2009年前列腺癌就有19万新增确诊，2万7千例新增死亡。前列腺癌的发病受到人种和年龄的很大影响，以65岁以上白人为最高危群体。中国是前列腺癌发病率较低的国家，但由于人口老龄化、人们生活改善、高脂饮食等社会因素，近20年来发病率骤增，正在接近欧美水平，同时我国的前列腺癌患者普遍发现得晚，前列腺死亡率与美国已相差无几。可以预见，在不久的将来我国前列腺癌的防治将会成为一个严峻课题。

对于一部分非扩散性的患者而言，手术和放化疗是可以达到治愈效果的。但是对于那些复发或转移的患者，抗雄激素治疗一般在短暂有效的初期后就会开始出现抗性。在美国，目前对于转移性去势抵抗性前列腺癌的标准疗法为多西他赛化疗，统计上此疗法能使平均生存期延长约2.4月，缺点是伴随严重副反应并且不能达到治愈效果。因此特别是在欧美国家，针对患转移性去势抵抗性前列腺癌人群的新药有着广大市场。

Provenge的基本原理

肿瘤免疫学和免疫疗法的概念从被提出到至今已经将近一个世纪，但从一个理论到一种能有效治疗某一癌种的肿瘤免疫疫苗，是一个漫长、曲折和艰难的过程。

根据目前对免疫系统和肿瘤机制的了解，领域内的专家普遍认为，通过某种方法得到对某一肿瘤抗原具有特异性的专职抗原呈递细胞（APC），并令其激活、得到肿瘤特异性的$CD8^+$细胞毒性T细胞（CTL）是一种利用自体免疫系统消除肿瘤的可行性较高的方法，国内外在此方向的研究投入也较多。

Provenge的组分、性质和治疗方案

Provenge的成分并不仅限于DC，根据Dendreon公司提供的信息，Provenge运用血细胞分离技术循环处理1.5~2倍处理病人全身血液后，得到病人自体外周血单核细胞（PBMC），并经过流式细胞术分选出$CD54^+$细胞群，其中可能包括DC以及B细胞、T细胞等其他免疫细胞。CD54是APC-T细胞接触中的一个必要粘连分子，因此被认为是APC的一个重要标志物。而Provenge的有效成分，是其中的PAP-GM-CSF重组蛋白和自体APC，两者都被认为具有激活或/和增值前列腺肿瘤细胞特异性CTL的作用。

根据FDA目前批准并公布的Provenge的处方须知/药品说明书，每一剂量（一次静脉注射回输）的Provenge含有经PAP-GM-CSF重组蛋白活化的至少5×10^7次方个自体$CD54^+$外周血单核细胞，溶于乳酸林格式注射液，体积为250毫升。而Provenge的推荐治疗方案为，三次采血三次回输为一个疗程，病人在经过血细胞分离机采集PBMC后约3天接受回输，每次采血-回输之间建议间隔为约2周，临床试验记录的实际操作间隔范围为1~15周，极限注射间隔时间限制尚不明确。但如果病人因任何原因未能接受一次计划内的注射，则原计划回输的细胞必须丢弃，需要重新采集PBMC制作Provenge疫苗。Provenge的说明书中同时建议病人在回输约30分钟前口服对乙酰氨基酚或苯海拉明等抗组织胺剂，以预防回输后可能的发热、发凉等急性过敏副反应。

树突状细胞（DC）是免疫系统中对T细胞的成熟起最重要作用的一种APC。要得到对某一肿瘤抗原具有特异性的DC，其中一种方法，是在DC成熟过程中向DC加载该抗原的抗原表位（抗原决定簇）肽段。而在寻找前列腺癌特异抗原的这一步，Dendreon公司的研究人员锁定了前列腺酸性磷酸酶（PAP）。PAP是一种典型的前列腺癌标志物，它在约95%的前列腺癌中高表达，并且很大程度上局限于前列腺组织。为了提高PAP特异性免疫反应的强度，Dendreon的研究人员用粒-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）这种免疫细胞活化因子，制造了一种PAP/（GM-CSF）重组蛋白。

Provenge的临床试验数据

目前，美国临床试验注册网站（ClinicalTrials.gov）上注册的Provenge相关的各阶段临床试验共有29项之多，其中试验完成的有5项，公布结果的有4项。而对Provenge的批准具有决定性作用的，是2个设计类似的随机双盲安慰剂对照的决定性三期临床试验。

在2个之中较早完成的实验中，127个无症状或轻微症状的转移性去势抵抗性前列腺癌的受试者以2:1的比例随机接受两周一次、一共三周的Provenge（82人）或安慰剂（45人），根据上文所述程序经行静脉输注。试验的主要终点是无疾病进展时间（The time to objective disease progression），但仍

HORNETCORN BIOTECHNOLOGY

会追踪所有受试者的生存期。最终试验在无疾病进展时间这一指标上并未观察到Provenge产生任何具有统计意义的影响。但在中位生存期上，Provenge组显示出了4.5个月的优势（Provenge组25.9个月，安慰剂组21.4个月），证明Provenge很可能在延长生存期的意义上有较大作用。

在较晚完成的试验，也就是在ClinicalTrials.gov上注册并编号为NCT00065442的试验中，实验者随机选取了512名无症状或轻微症状的转移性去势抵抗性前列腺癌受试患者，同样地是以2:1的比例接受两周一次、一共三周的Provenge（341人）或安慰剂（171人）根据上文所述程序经行静脉输注。受试者的准入标准还包括PSA血清浓度大于等于5ng/mL，血清睾丸素小于17nmol/L。试验进行了约6年，主要终点是总生存数（OS），分析手段是将血清内本底PSA和乳酸脱氢酶浓度因素计算在内经过调整的Cox回归模型。

试验结果发现Provenge组的死亡风险与安慰剂组相比下降22%（危害比0.78，可靠区间为0.61-0.98，P=0.03），同时中位生存期提高4.1个月（Provenge组25.8个月对比安慰剂组的21.7个月）。Provenge组的三年生存可能性从安慰剂组的23.0%提高到了31.7%。值得注意的一点是，该文章的作者提到，本来作者计划使用无疾病进展时间和至出现疾病相关病痛时间（The time to disease-related pain）作为试验的主要终点，但在分析了已完成的其他三期临床试验后，最终把主要终点改为了OS。该试验的结果发表于新英格兰杂志上，从一个方面说明了该试验的认可度，其设计方案值得研究和参考。

总结与展望

Provenge获批这一事件，代表着前列腺癌，乃至所有癌症的免疫治疗新时代的开启。由于Provenge的副作用与多西他赛化疗相比几乎可称之为微不足道，所以，Provenge的出现，对于轻微或无症状的转移性去势抵抗性前列腺癌患者而言，弥补了一个选择空白。

Provenge带来的革新不仅体现在治疗方法、治疗观念上，更体现在癌症治疗效果评估标准上，因为Provenge的唯一疗效体现，也就是它对生存期的延长效果，与任何其他前列腺癌病情进展指标如PSA血清浓度，或无病情进展生存期都尚未发现存在统计关系，这再一次警示了我们临床试验选对疗效标准的关键性。关于Provenge联合化疗是否能进一步提高疗效的临床试验正在进行中。

最后，不能忽视的是，关于Provenge尚有许多不明确之处。其中之一便是Provenge的具体药理。虽然“使用抗原肽体外活化APC，回输APC刺激生成抗原特异性CTL”的理论看似完美，但这一假设流程尚未经过足够多的试验确认，许多问题（如APC在体外的活化程度，抗原特异性CTL在体内是否产生、产生的数量等）还没有解答。这些问题的答案毋庸置疑对于Provenge的改进以及针对其他癌肿的同类疫苗的开发至关重要。另外，由于免疫细胞治疗的高成本，也必须将经济因素考虑进实际受益患者数或实际市场规模的计算中来。

Provenge的获批是肿瘤免疫治疗的又一历史性里程碑。并且Provenge适应于前列腺癌这一点，也打破了“免疫细胞治疗只可能对非实体瘤有效”的“迷信”。可以预见的是，Provenge获批后，研究界和医学界正进入一个“新发现大爆炸”的机遇期，如发现与免疫治疗受益率正相关的病情新指标，发现新的联合疗法，发现新的适应癌种等。作为同行，如何借鉴并超越Provenge，抓住机遇，实现突破，是我们的美好目标，也是为了生存和发展必须完成的飞跃。

(Cheever MA,et al.PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine Clin Cancer Res. 2011; 17(11):3520-6.等)

过继免疫细胞（CIK细胞）治疗肝癌术后患者的疗效评价

临床医学部　申珊珊编译

肝细胞癌（HCC）是世界最常见的癌症之一，死亡率居高不下。手术切除被认为是常规的疗法，但受到肝功能、患者自身条件、耐受状况、癌转移灶等诸多限制。各种替代疗法如经皮无水酒精注射、射频消融治疗（RFA）、经动脉化疗栓塞（TACE）等，已运用于肝癌的治疗。尽管治疗方法不断提高，但患者的5年生存率较低，预后差，常出现肝癌复发转移。据报道肝癌术后复发率超过77%，由于肝癌对放化疗不敏感，因此迫切需要找到治疗肝癌的新方法以防止其复发，提高手术的疗效。

大量临床研究表明，CIK细胞等过继性免疫细胞治疗，对多种肿瘤具有抗肿瘤效应，包括血液恶性肿瘤和实体瘤。在治疗肝癌方面，CIK细胞治疗可减少TACE、RFA治疗后肝癌患者的复发率，并延长患者的无病生存期和总生存期，治疗期间无严重不良反应。其疾病控制率（DCR）明显优于没有经过CIK细胞治疗的患者。

中山大学肿瘤医院夏建川团队一项回顾性研究，评估CIK细胞辅助治疗肝癌术后患者的疗效。研究者选取中山大学肿瘤科410例患者，其中第1组206例只接受肝癌切除（单纯手术组），第2组204例肝癌切除后，接受CIK细胞治疗（CIK组）。CIK组患者采集50ml外周血液，实验室制备培养细胞14天，回输前进行真菌、内毒素等检查无污染后，可静脉回输细胞至患者体内，每次回输量为1.5×10^{10}，4次回输为一疗程，直至患者情况稳定结束治疗。随访时进行血AFP、腹部超声、胸部影像学检查，随访5年。单纯手术组患者第1、3、5年总生存率分别为84%、61.6%和50.2%，CIK组为93.6%、76.6%、65.9%（如图1）。两组差异显著（p=0.0007），CIK组比单纯手术组生存率明显升高，具有更好的预后效果。研究者还进行亚组分析，以确定CIK细胞回输次数是否影响肝癌患者的预后。结果发现接受8次以上CIK治疗的患者比8次以下的患者，具有更长的生存期，两者有显著差异（如图2）(p=0.0272)。

综上所述，CIK免疫细胞治疗能有效改善肝癌术后患者预后，延长患者生存期，同时CIK细胞回输次数越多，预后效果越好。但本次回顾性研究也存在缺陷，如存在组间差异、组内差异，治疗频率方面CIK组较少，不可避免的出现回顾性研究的固有缺陷等，更多有效证据还需要进一步的研究。

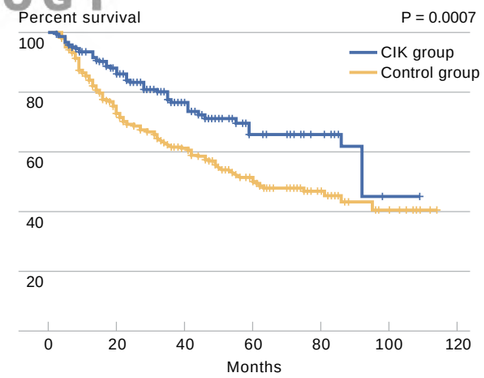


图1 CIK治疗组与对照组生存率期比较

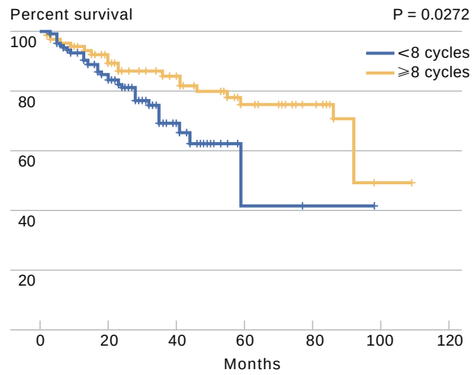


图2 CIK治疗≥8次和＜8次生存期比较

（Pan K,et al. The efficacy of cytokine-induced killer cell infusion as an adjuvant therapy for postoperative hepatocellular carcinoma patients.Ann Surg Oncol.2013; 20(13):4305-11.）

HORNETCORN BIOTECHNOLOGY

CIK细胞疗法对肺癌免疫功能的调节及维持效应

临床医学部　赵静编译

肺癌患者的细胞免疫均存在不同程度的损伤，肺癌细胞可诱导DC、T细胞和NK细胞的凋亡，同时抑制单核细胞向DC的分化，并使T细胞应答能力下降或缺失，从而阻断抗肿瘤免疫作用。为了探讨CIK细胞对肺癌患者细胞免疫功能的调节作用，云南省肿瘤医院癌症研究所的王熙才教授开展了本项研究。

该研究选择了自2002年1月至2012年1月在云南省肿瘤医院就诊的511名肺癌患者作为研究对象。采用流式细胞仪检测所有患者的细胞免疫功能，根据检测结果将患者分为ABCDE五组，与正常人群相比，除A组患者细胞免疫功能正常外，其它四组患者均有不同程度的损伤：B组患者CD3、CD4、CD8细胞数目下降，C组患者CD4细胞数目下降，CD8数目上升，CD4/CD8比值明显下降；D组患者CD8下降，CD4/CD8比值明显升高；E组患者CD3、CD8细胞数目升高，CD4/CD8比值明显下降。

将BCDE组患者分别随机分为常规化疗组和CIK细胞治疗组，前者在手术治疗后仅进行标准化疗；后者术后接受1个月标准化疗，再进行CIK细胞治疗，每次静脉回输细胞2×10^9-6×10^9个，每天一次，连续3天，共5个疗程（18个月），治疗完成后随访一年，每月进行一次细胞免疫功能检测。

经过1个疗程的治疗，B组67名患者中有31名患者的免疫细胞数目明显提升，好转率为46.3%，而细胞免疫功能较差的D组患者好转率仅8.0%；5个疗程CIK细胞治疗完成后，这四组患者细胞免疫功能的好转率分别为79.1%、70.8%、76.0% 和70.0%，均高于标准化疗组。在随访过程中发现，接受1个疗程CIK细胞治疗后，各组患者细胞免疫功能维持正常的时间分别为4.1、2.2、1.0、和1.2个月，但经过5个疗程治疗后，这一时间分别延长至10.4、8.4、9.8和7.9个月。

这一研究结果表明CIK细胞能够提高肺癌患者的免疫功能，但好转率及持续时间与治疗前的患者的免疫状态以及CIK细胞的治疗疗程有关。

（Jin CG,et al. Moderating effects and maintenance of lung cancer cellular immune functions by CIK cell therapy.Asian Pac J Cancer Prev.2013;14(6):3587-92.）

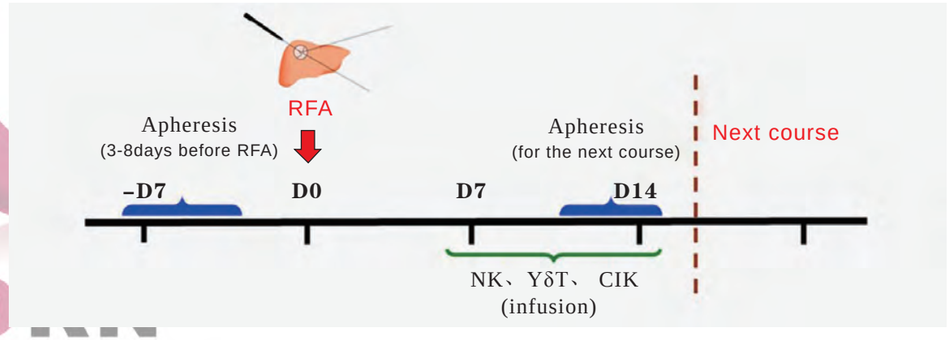
射频消融联合序贯免疫细胞延长肝细胞癌患者无进展生存期

临床医学部　周洲编译

肝细胞癌（HCC）是全球5大常见恶性肿瘤之一，致死率排名第三。由于常伴随肝硬化和较低的化疗敏感性，大部分肝细胞癌案例预后较差。射频消融（RFA）作为肝细胞癌局部治疗方法之一，已被证明安全有效，但仍存在术后复发转移的问题。吉林大学第一医院的Cui等研究者应用免疫细胞（CIT）联合RFA治疗HCC，以观察其疗效和安全性。（Int.J.Cancer，2014）

研究纳入62例肝细胞癌患者，其中32例接受RFA治疗，30例接受RFA/CIT治疗。患者肝肿瘤直径为2-8cm，数量小于5个，ECOG评分≤2分，Child-Pugh分级为A或B级，无门静脉血栓或肝外转移灶，PLT≥50.0×10^9/L。

在RFA治疗前3-8天，研究人员首先通过血细胞分离机从受试者外周血中分离出单个核细胞，经过添加不同的细胞因子，分别诱导、培养成NK、γδT和CIK细胞。然后在RFA治疗后8-11天回输细胞（约采血后14天）。患者每次回输的细胞量为1.2-2.0×10^9个，每疗程回输8次细胞，并于最后一次回输前1天抽血进行下一疗程的治疗，共计治疗3或6个疗程。患者接受RFA治疗后每3个月进行CT或MRI检查以评价肿瘤复发情况。

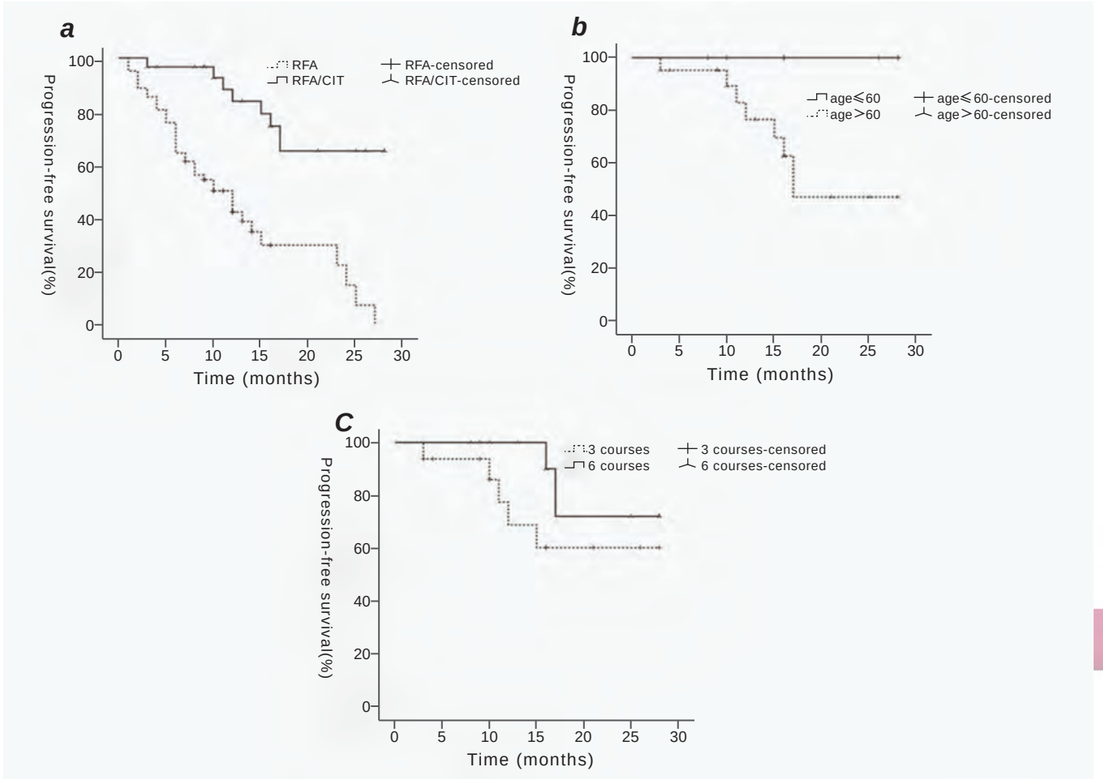


（患者CIT细胞治疗流程图）

研究结果显示：RFA/CIT组无进展生存时间（PFS）高于RFA组（p<0.0001，中位随访时间：12个月），RFA/CIT治疗能显著降低肝细胞癌复发风险（HR=0.136，95% CI 0.049-0.379）。RFA/CIT组2年生存率优于RFA组（100% vs 76.6%，p<0.05）。分层分析显示，接受6个疗程CIT治疗的患者PFS优于接受3个疗程的患者（p<0.05）。

RFA/CIT组有3例患者治疗期间未接受抗病毒治疗，其中2例患者乙肝病毒载量下降，RFA组则全部上升。不良反应两组间无显著性差异。研究者认为，RFA联合CIT治疗HCC安全有效，有预防RFA后复发的潜力。

HORNETCO
BIOTECHNOLOGY



（a图示RFA/CIT组PFS显著优于RFA组，b图示≤60岁年龄组的PFS显著优于＞60岁年龄组，c图示接受6疗程CIT治疗的患者PFS优于3个疗程的患者）

(Cui J,et al. Combination of radiofrequency ablation and sequential cellular immunotherapy improves progression-freesurvival for patients with hepatocellular carcinoma. Int J Cancer.2014; 134(2):342-51.)

CIK细胞联合化疗治疗结直肠癌术后的安全有效性

临床医学部　申珊珊编译

结直肠癌是全球最常见的第四大癌症。对于结直肠癌患者，以手术切除为主的多学科综合治疗是首选方法，但大多数患者会在术后2年复发。有报道称，手术后患者的免疫状态被抑制，术后辅助化疗甚至加重免疫抑制。而恢复患者的免疫可降低术后结直肠癌的复发率。研究表明，CIK细胞不仅能增加机体细胞免疫功能，刺激、恢复免疫识别系统，杀灭肿瘤细胞，同时通过增强免疫系统功能减轻化疗所致的副作用。因此为探讨CIK细胞治疗结直肠癌患者的安全有效性，广东省中医院对结直肠癌术后患者进行了一项回顾性临床试验研究。

该研究选择了广东省中医院就诊的96例大肠癌患者为研究对象。96例患者均接受手术切除，其中21例至少行1个疗程的CIK细胞联合化疗（为CIK组），另75例行化疗无CIK治疗（为对照组）。CIK组采集患者外周血液50ml，实验室制备培养细胞14-16天，细胞检测合格后进行回输，每次静脉回输细胞3×10^9个，3次回输为一个疗程，细胞总量达9×10^9个。一个疗程治疗结束后，进行血常规，腹部盆腔CT、及每年一次的腔镜检查，随访5年。

随访至第2年时对患者的无病生存率（DFS）、免疫细胞治疗副作用等进行评估。对照组有10例患者已死亡（占10.42%），18例患者脱落（占18.75%），而CIK组患者仅1例脱落，其他20例全部存活。CIK组与对照组患者第1年DFS分别为89.47±7.04%、64.84±5.82%。第2年DFS分别为59.65±24.80%和29.35±6.39%，可见CIK组患者第1、2年DFS明显较长(图1)，且治疗期间$CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$比值明显升高。59例病人化疗后产生骨髓抑制、呕吐等副作用，无细胞输注的不良反应发生。

本研究中，我们对结直肠癌手术的患者化疗联合CIK细胞治疗与单纯化疗进行比较，可见患者DFS有明显提高。T细胞亚群中CIK组患者的$CD4^+/CD8^+$比值升高，而化疗组患者$CD4^+/CD8^+$比值降低，发现CIK治疗可使患者$CD4^+$升高、$CD8^+$减低。另外一项研究，针对胃癌的患者CIK治疗组比对照组第5年DFS率提高到17.9%(p=0.044)。CIK组比对照组PFS明显延长，总生存率上没有明显差异。总体来看CIK免疫细胞治疗作为结直肠癌术后辅助治疗方法的安全有效性。

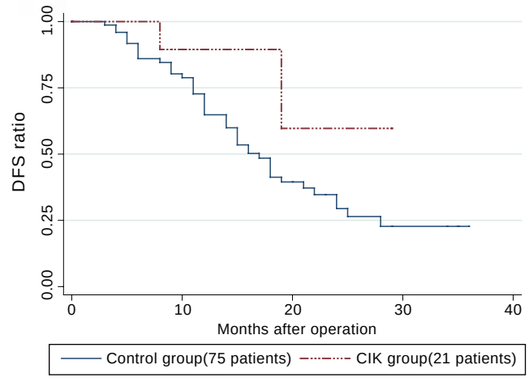


图1 CIK治疗组与对照组无病生存率（DFS）比较

(Zhu Y, et al.Efficacy of postoperative adjuvant transfusion of cytokine-induced killer cells combined with chemotherapy inpatients with colorectal cancer. Cancer Immunol Immunother.2013;62(10):1629-35.)

HORNETCORN BIOTECHNOLOGY

细胞因子诱导的杀伤细胞（CIK细胞）治疗晚期胰腺癌

临床医学部　申珊珊编译

胰腺癌因其预后不良，一直是学者们深入研究的方向，至今仍没有任何治疗方法对晚期胰腺癌有明显效果。对于中晚期胰腺癌患者，放化疗是治疗局部复发和转移性胰腺癌常用方法，但平均生存时间一般小于6个月，且大多数老年患者不能耐受其产生的不良反应。目前有研究表明，CIK可通过分泌细胞因子如干扰素γ和一些趋化因子，包括RANTES、MIP1α和MIP1β等对抗癌症，并有大量文献报道 CIK细胞治疗实体瘤有效。

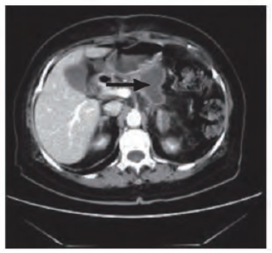
一位晚期胰腺癌患者仅接受CIK细胞治疗，其无进展生存期（PFS）现已超过19个月。基于这项个案发现，CIK细胞疗法可能是一项有效的治疗方案，能使晚期胰腺癌患者的预后得到改善。

本案为一名77岁的女性患者，间歇性腹痛1个月。经确诊为胰腺癌后，于2010年10月行胰体尾部及脾切除术。病理显示为高分化腺癌、鳞状细胞分化癌。一个月后腹部增强CT示，低密度结节已出现在切口边缘（如图1）。肿瘤标志物显示，糖类抗原CA199、CA724和癌胚抗原CEA均升高。CA199>1000U/ml（参考范围0.35 U/ml）。KPS评分50分。因患者自身不能耐受化疗、放疗的副作用，故研究者选择CIK免疫细胞治疗。

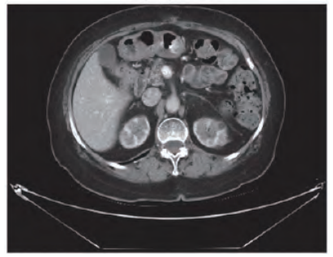
2010年11月抽取患者50ml外周血从中分离出单核细胞进行培养，随后将重组人白细胞介素2（IL-2）加入培养基中。第10天进行细胞培养分析，所有细胞均不含细菌、支原体和真菌污染，内毒素<5EU。细胞表型分析$CD3^+$、$CD3^+CD8^+$、$CD3^+CD56^+$、$CD25^+$等亚群数量明显增加。细胞检验合格后，回输患者体内，1疗程4次回输，每疗程回输总数为5×10^9。患者从2010年11月至2012年1月，共进行5个疗程的CIK细胞治疗。在细胞治疗期间，无任何不良反应。

CIK细胞治疗后，于2012年2月的CT结果显示低密度结节几乎消失（如图2），肿瘤标志物维持在正常水平（CA199，CA724和CEA）。为巩固免疫细胞治疗效果，患者随后又进行1个疗程的CIK细胞回输，在回输结束后的CT检查中，患者在同一个地方出现低密度结节影，CA199>1000U/ml，提示患者出现复发。然而在整个治疗过程中，患者无进展生存时间（PFS）已超过19个月，生存率大大提高，生活质量评分增至80分。

在报告中，患者胰腺癌术后接受CIK免疫细胞治疗并未联合其他治疗方法，其生存期明显延长，生活质量明显提升。现今免疫疗法已成为治疗肿瘤的第四大治疗方法，可能具有改善胰腺癌的预后作用，其具体的疗效机制仍需要进一步的临床研究来验证。



1．胰腺癌术后腹部CT



2．5个疗程CIK细胞治疗后

(Li W,et al.Cytokine-induced killer cell therapy for advanced pancreatic adenocarcinoma: A case report and review of the literature.Oncol Lett.2013; 5(4):1427-1429.)

经特异性CD123嵌合抗原受体改造过的CIK细胞对急性髓性白血病的靶向作用

广州市肿瘤医院细胞实验室　梁晶龙编译

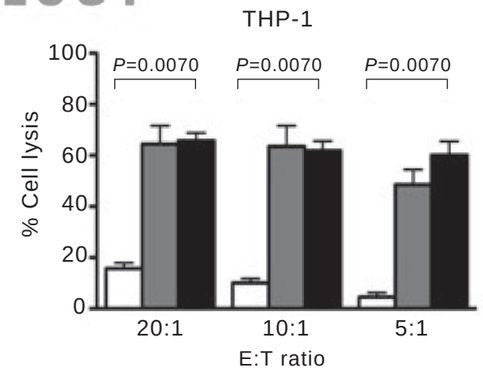
急性髓性白血病（AML)具有以不成熟髓细胞在骨髓里聚集及骨髓造血抑制的特征，是一种在形态、遗传学、临床表现、治疗和预后等方面均不同的异质性肿瘤。目前运用传统的方式治疗依然存在复发率高的特点。表达嵌合抗原受体(CAR）的CIK细胞有望成为解决这一问题的最有力工具。CARs是一类具有胞外抗原结合域与胞内信号转导区域的分子，意大利米兰大学的Ettore Biagi 教授在先前的研究中发现表达抗CD33嵌合抗原受体的CIK细胞在体外具有强烈地杀伤AML原始粒细胞的能力，但同时也检测到对造血干细胞（HSPCs）具有较强的杀伤作用，其原因是因为HSPCs表面也高表达CD33。

为了避免对HSPCs的杀伤作用，最近Ettore Biagi教授的研究小组选择了CD123作为嵌合抗原受体，主要是因为CD123在HSPCs、单核细胞、类浆状DC细胞（pDC）及内皮细胞中低表达而在AML细胞中则过表达。AML中CD123的过表达与抗细胞凋亡及预后效果较差等密切相关。

抗CD123的单克隆抗体7G3可以显著的降低NOD-SCID大鼠骨髓中AML细胞的数量。Ettore Biagi教授的研究小组在体外实验中发现经特异性嵌合抗原受体CD123改造的CIK细胞能够强烈地杀灭$CD123^+$白血病细胞，同时对正常表达CD123的细胞，比如内皮细胞及单核细胞的细胞毒性较小。因此，通过CAR转导的效应细胞来靶向攻击AML中的CD123靶点将是治疗AML的一种全新的途径。为验证其有效性、特异性及安全性，Ettore Biagi教授的研究小组以CEM细胞系、THP-1、HSPCs、AML原始粒细胞及人肾上皮细胞系293T为材料研究了抗CD123嵌合抗原受体转导的CIK细胞在这几方面的作用。

（一）抗CD123-CAR+CIK对靶细胞的细胞毒作用

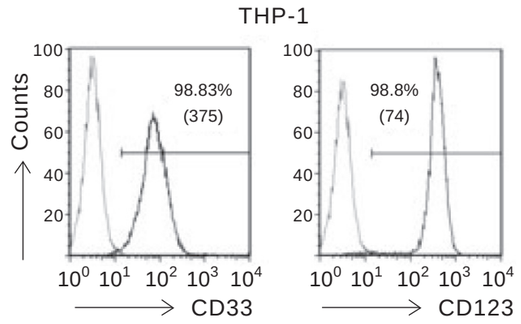
结果显示抗CD123-CAR+CIK细胞的短期效果在效靶比为5:1的条件下4小时内溶解CD123+THP-1白血病细胞的比率是60.1±5.4%，而在相同的条件下NT(non-transduced)　CIK细胞(未转化的CIK细胞）的比率是4.5±1.8%，两者之间有极显著差别，其效果与抗CD33-CAR+CIK细胞的效果相当（图A-B）。



NT CIK细胞对THP-1的细胞毒作用

抗CD33-CAR+CIK细胞对THP-1的细胞毒作用

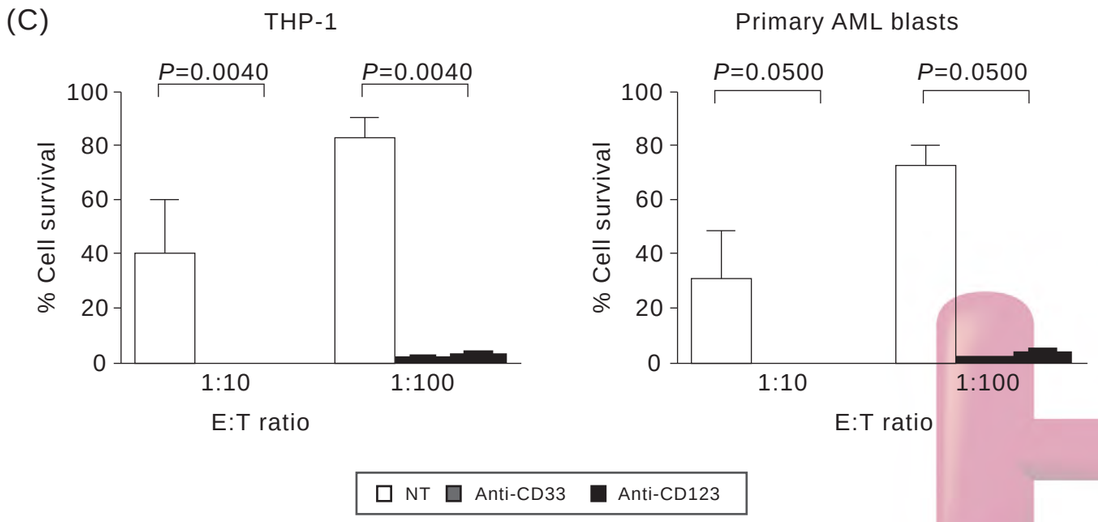
抗CD123-CAR+CIK细胞对THP-1的细胞毒作用



流式细胞术分析THP-1细胞表面CD33、CD123的表达量，括号内数值为平均荧光强度值

HORNETCORN BIOTECHNOLOGY

与此同时该研究小组还以THP-1细胞系及AML原始粒细胞作为靶细胞进一步研究了抗CD123-CAR+CIK的细胞长期细胞毒效果，结果显示抗CD123-CAR+CIK细胞在效靶比为1:100并附加外源IL-2的条件下THP-1及AML原始粒细胞的平均存活率分别为3.5±1.5%、2.4±1.4%，而NT CIK细胞在相同的条件下THP-1及AML原始粒细胞的平均存活率分别为82.7±7.4%、72.8±6.6%(图C)。

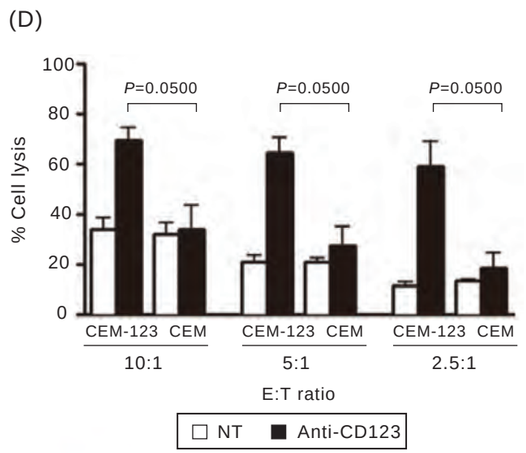


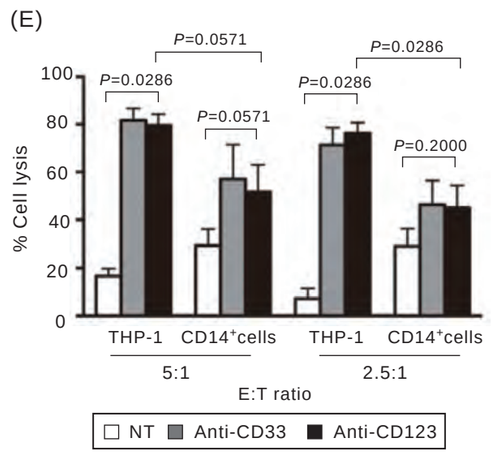
（二）抗CD123-CAR$^+$CIK的特异性

NT CIK细胞对包括CEM细胞系在内的不同肿瘤细胞具有广谱的细胞毒作用，实验结果显示NT CIK细胞对人工构建CEM-123细胞系及CEM细胞系的细胞毒杀伤作用没有显著的差异，而抗CD123-CAR$^+$CIK对CEM-123细胞系及CEM细胞系的细胞毒杀伤作用之间具有显著差异，其杀伤率分别为59.4±10.1%、18.8±5.8%，说明抗CD123-CAR$^+$CIK细胞能够识别CEM-123及CEM细胞(图D)。

（三）抗CD123-CAR$^+$CIK的安全性

在效靶比为2.5:1的条件下CD123-CAR$^+$CIK可以有效杀伤THP-1细胞，但对CD123-CEM细胞系、单核细胞及人内皮静脉细胞的细胞毒作用十分微小（图E)。





结论

抗CD123.CAR转导的CIK细胞在体外具有较强的杀伤AML细胞的作用，但相比较CD33.CAR$^+$CIK而言，其对造血干细胞、内皮细胞及单核细胞的细胞毒作用十分微小。因此可以在临床上用于治疗顽固型AML，或是对骨髓移植后的AML患者进行辅助治疗以清除残余的微小病灶并最终达到治愈AML的目的。

(Tettamanti S,et al. Targeting of acute myeloid leukaemia by cytokine-induced killer cells redirected with a novel CD123-specific chimeric antigen receptor. Br J Haematol. 2013; 161(3):389-401.)

上接P24

与其他DC细胞一样，CD11b$^+$DC细胞也能够感知病毒和外源抗原。然而，由于很难获得CD11b$^+$DC亚型缺失的小鼠模型，对CD11b$^+$DC细胞在体内的作用方式还知之甚少。与CD3$^+$和CD11$^+$DC细胞不同，CD11b$^+$DC细胞表达PRRs来感知组织损伤。CD11b$^+$DC细胞同样还能够激活CD8$^+$T细胞，CD4$^+$T细胞。

随着对DC细胞研究的不断进展，对DC细胞系不断深入的认识，必将在临床治疗上具有很大的前景。随着对DC细胞研究的不断进展，对DC细胞系不断深入的认识，必将在临床治疗上具有很大的前景。

(Merad M,et al. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and theinflamed setting. Annu Rev Immunol. 2013;31:563-604.)

HORNETCORN BIOTECHNOLOGY

树突状细胞系：树突状细胞及其亚群在稳态和炎性环境中的发育和功能

荆州市中心医院细胞实验室　付凡编译

树突状细胞（DC）通过抗原递呈作用，诱导特异性免疫应答。DC细胞起源于与其他白细胞不同的造血细胞系。早在上世纪70年代末，Ralph Steinman和Zanvil Cohn就已经分离得到了DC细胞，并且Ralph Steinman教授因其在DC细胞方面的重大贡献获得2011年的诺贝尔生理学或医学奖。经过数十年的研究与发展，DC细胞在过继性免疫反应中的作用逐渐被证明。DC细胞介导的来抗病毒、治疗肿瘤以及自身免疫性疾病等方面的应用研究也越来越广泛，具有广阔的应用前景。这篇文章主要探讨DC细胞作用的调控、差异化、多样化以及功能。

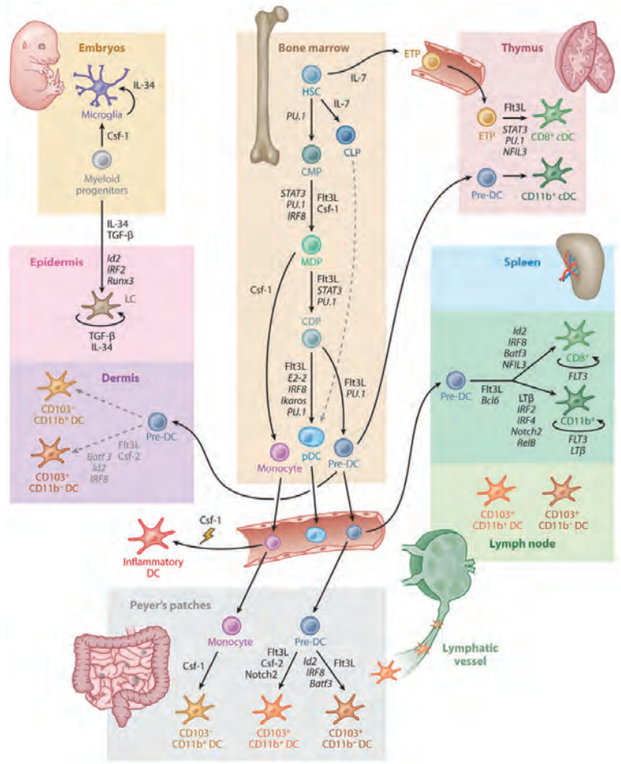
常见的DC细胞有两种，一种是浆细胞样树状突细胞（pDCs），另外一种是除pDCs之外的所有DC细胞，称为经典的树状突细胞（cDCs）。pDCs与cDCs起源相似，但在体内的循环是不同的。pDCs在血液和淋巴组织中累积并通过血液循环进入到淋巴结中，低表达主要组织相容性复合体(MHC)II类分子、共刺激分子以及低水平的CD11c，此外还小范围表达如Toll样受体（TLRs）7和9的模式识别受体(PRRs)。一旦识别外源核酸，pDCs还能产生大量Ⅰ型干扰素，并获得递呈外源性抗原的能力。而cDCs主要存在于淋巴和非淋巴组织，具有很强的感知组织伤害、捕获环境和细胞相关抗原，并将其传递给T淋巴细胞的能力。在稳态下，聚集于淋巴组织和脾边缘区的cDCs能持续捕获组织和血液中的抗原，并且高效加工处理和递呈抗原。此外，cDCs还能在稳态或炎性条件下负载抗原迁移至T细胞聚集的区域，并且激发幼稚T细胞反应。

DC细胞的分化和体内平衡受多种细胞因子的调控：

1、FMS样酪氨酸激酶3配体（Flt3L）。Flt3L是造血作用中DC细胞形成的关键调控因子，组织基质、表皮细胞以及激活的T细胞都能够表达Flt3L。Flt3受体在造血干细胞（HSCs）、共同淋巴祖系（CLPs）以及共同髓系祖细胞（CMPs）中都有表达，在巨噬细胞树突细胞祖细胞（MDPs）、常见的树突细胞前体（CDPs）以及per-cDCs等DC细胞前体中也有表达，而在非DC细胞系中，这些前体细胞是不表达Flt3的。缺失Flt3L或Flt3的小鼠模型，其体内MDPs、CDPs以及组织cDCs和pDCs都会降低。此外，Flt3L还能够调节外周DC细胞的增殖来维持DC细胞的稳定。

2、集落刺激因子1（Csf-1）。Csf-1是调节巨噬细胞存活、增殖以及分化的一种成血因子。Csf-1受体Csf-1R，在CMPs、MDPs、单核细胞和巨噬细胞中都有表达。Csf-1R在CDPs中表达，但在pre-cDCs中表达很低、在CD8+和CD103+CD细胞中不表达，而在CD11b+细胞中表达。而且Flt3和Csf-1R信号的强弱很可能调控MDP向CDPs或单核细胞的分化。

3、此外，集落刺激因子2（Csf-2）、淋巴毒素β（Lymphotoxin β）、转化生长因子β1（TGF-β1）等都对DC细胞的分化和体内平衡的维持具有重要的作用。下图为DC细胞分化过程及其调控所需的细胞因子。



研究表明，cDC前体的增殖水平很低，且不自我更新，而是依靠血液中的前体不断的生成。稳态条件下，cDC的分化是通过淋巴毒素β受体（LTβR）和Flt3调控的。Flt3对DC细胞的体内平衡具有非常重要的作用，其调控成熟$CD8^+$和$CD11b^+$的cDCs的分化，而LTβR能够抑制脾脏$CD11b^+$DC细胞的生成。

不同亚型的DC细胞，各有其独特方式来发挥其功能。淋巴组织中的$CD8^+$DC细胞和非淋巴组织中的$CD103^+$DC细胞起源相同，具有相似的表型，研究表明这两种DC细胞的功能也很相似，发挥作用的途径也比较接近。

CD8+和CD103+DC细胞具有以下的功能：

1、 感知病原体和组织损伤。最近的研究表明，$CD8^+$和$CD103^+$DC细胞表达一个相似的TLR、C型凝集素受体以及趋化因子受体，与其他DC细胞不同的是，它们还能够表达双链病毒RNA感受器TLR3和刚地弓形虫蛋白感受器TLR11。$CD8^+$和$CD103^+$DC细胞都能够诱导表达高水平的CD36，从而能够识别死去的细胞，还能够表达高水平的C型凝集素Cle9A，从而能够感知坏死组织。

2、 将相关的抗原信息传递给$CD8^+$T细胞，从而激活$CD8^+$T细胞。研究表明，$CD8^+$和$CD103^+$DC细胞与其他DC细胞相比，具有更强的将病原体和抗原递呈给$CD8^+$T细胞的能力，

3、 激活CD4+T细胞；

4、 中枢和外周的耐受性；

5、 此外，CD8+和CD103+DC细胞还在免疫反应中发挥独特的作用。 下转 P22

HORNETOORN BIOTECHNOLOGY

非病毒载体基因转导人单核细胞衍生的树突状细胞的高转染效率，基因表达效率和活性

研发部　段镇东编译

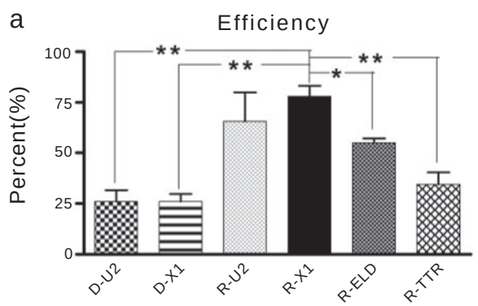
树突状细胞(dendritic cell，DC)是由骨髓起源的具有抗原捕获与呈递的细胞，可以作为疫苗载体。DC细胞的吞噬作用相比于其他细胞更为复杂，可以呈递MHC-I与MHC-II抗原肽至T细胞进行免疫杀伤。因为DC具有优良的抗原加工和呈递功能，所以人们致力于研究其作用机制。研究表明，通过转染外源肿瘤细胞DNA或者RNA，可以增强DC细胞特异性抗原识别能力，并已成为肿瘤生物治疗领域备受关注的热点之一。目前，病毒载体的转染人的DC已经取得了成功，但是病毒基因可能影响细胞的正常功能和人体的免疫系统，安全性得不到保障。而传统的非病毒类载体的转染方法转染DC细胞，转染效率差，细胞活性差，基因表达量低。为了优化转染诱导DC的方法，我们比较了转染试剂，电转和核转染非病毒载体转染质粒DNA和和体外翻译的RNA的方法。用X1 program of an Amaxa Co.公司的细胞核核转染细胞外翻译的RNA最为高效，平均达到 93%的DC转染率，出色的长期存活率.以及蛋白表达效率。而且，细胞外翻译的RNA诱导的DC细胞保持了未成熟DC细胞的所有表型和功能特性。这种方法适用于所有的用途，包括体外功能学实验，体内DC治疗和制备基于DC的疫苗。

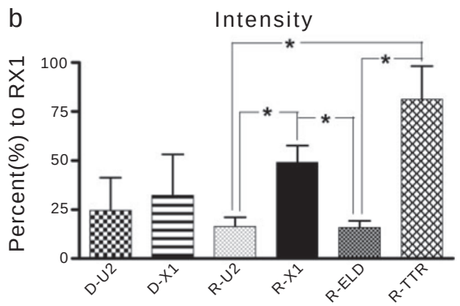
方法：采集由CD14诱导的未成熟的Immature DCs(iDCs)，iDC表现出较高的内吞作用和低抗原呈递能力。但是在成熟之后，具有与普通的DC细胞相同的能力，所以可以作为转染对象。为了优化iDC的转染，以转染率（通过绿色荧光蛋白标记载体实现），细胞活性以及蛋白表达量为参考标准，对比DNA质粒和外转录RNA

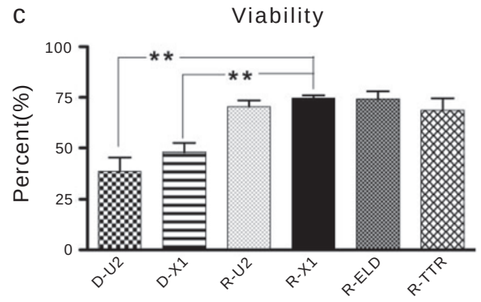
（in vitro-transcribed (IVT) RNA）以转染试剂转染，电穿孔和核转染（Amaxa Co公司核转染）三种方法的转染效果。从人体外周血分离单核细胞，应用传统方法诱导为iDC细胞后，在第三天进行转染。

转染方法流程

	转染试剂	核转染	电穿孔技术
DNA	FuGene,ExGen 500,Gene Juice 等多种试剂进行比对	Amaxa Co公司核转染仪用转染仪的K2, M2, Q2, T2, U1, U2, U8, X1,or X10程序，浓度为2*10^6个细胞用100ug核转染稀释	设置不同的参数电压250–400 V, 电容125–960 uF , 电阻100–1000
IVT RNA	TTR; Qiagen		







D-U2 ,D-X1 DNA质粒应用程序U2和X1

R-U2 R-X1 IVT RNA应用程序U2和X1

R-ELD 电穿孔 IVT RNA用200V，500uF，400Ω

结果：对比DNA质粒与IVT RNA转染

IVT RNA与质粒DNA核转染:IVT RNA核转染拥有最高的转染效率，达到93%，且很高的细胞活性以及蛋白表达。但是运用相同的转染程序，对于质粒DNA转染效率仅为20%。

IVT RNA转染试剂RRT转染：此法转染的iDC具有iDC的一切表型和功能，适应于大多数的研究，包括体外功能研究、活体DC免疫试验和以DC为基础的疫苗。达到40%的效率并且有很高的蛋白表达。CD83表达增高，细胞形态发生改变，证明TTR可能诱导DC细胞成熟

运用电穿孔技术：转染效率达到80%。

总结：TTR试剂转染的蛋白表达要高于电穿孔与核转染，而核转染的细胞活性要明显高于试剂转染和电穿孔，综合考量，X1程序的核转染技术是相对理想的方法，具有高效的转染，良好的细胞活性以及较高的蛋白表达。

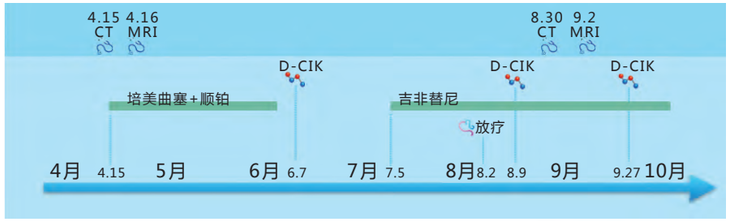
(Landi A, et al.High transfection efficiency,gene expression, and viability of monocyte-derived human dendritic cells afternonviral gene transfer. J Leukoc Biol.2007;82(4):849-60.)

HORNETCORN
BIOTECHNOLOGY

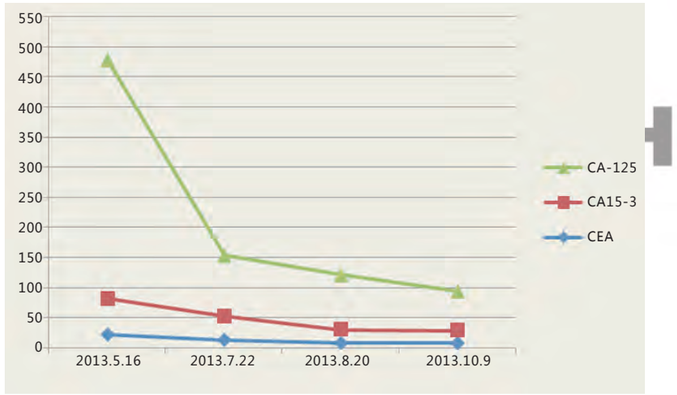
广州市肿瘤医院典型病例

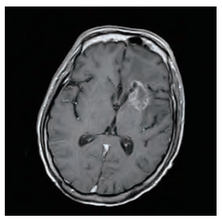
患者黄某，男，48岁，2013年4月15日CT诊断为肺癌并双肺多发转移（T4N3M1），大小65×75mm，而颈部淋巴活检为腺癌并广泛转移。4月16日脑MRI示左侧基底节区、左颞叶见异常信号，范围约32×26cm；左顶叶亦见2细小结节状影；增强后强化明显，直径最大约8cm，提示脑转移瘤。

入院后经培美曲塞联合顺铂化疗4个疗程，期间出现贫血、白细胞降低、血小板低等经对症治疗后好转，7月5日起开始行吉非替尼靶向治疗，8月2日行头部放射治疗。物治疗。8月2日行头部放射治疗。

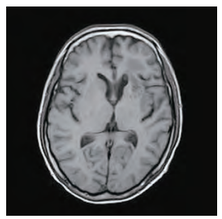


综合治疗期间，患者于2013年6月7日、8月9日、9月27日分别进行了三个疗程D-CIK免疫细胞治疗。治疗后CT示：右下肺癌治疗后右肺病灶及腹膜后淋巴结较前缩小，大小为40×16mm，双肺、肺门及纵膈多发转移灶较前减少。头颅MRI诊断：脑多发转移瘤综合治疗后，同前比较左侧基底节区、左颞叶见异常信号，范围约30×21cm，病灶较前减少，原左顶叶亦见2细小结节状影未见明显显示。肿瘤标志物：CA-125、CEA、CA15-3均有明显改善。患者自觉精神、食欲改善，休息状态下无胸闷气紧，能平卧、大小便正常。

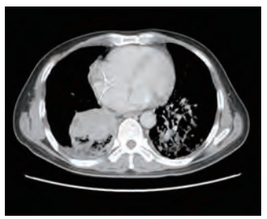




2013年4月16日MRI



2013年9月2日MRI



2013年4月15日CT

2013年8月30日CT

免疫细胞相关临床试验

Preconditioning Chemotherapy Combined With Cytokine Induced Killer Cell Immunotherapy in Advanced Non Small Cell Lung Cancer

预处理化疗联合CIK免疫细胞治疗非小细胞肺癌

状态：招募中

临床试验行政识别号：NCT01902875

预计纳入人数：100例

观察方式：病例对照研究

最近更新时间：2013.7.16

申办方：南京军区南京总医院

A Clinical Trail of Iodine[131I] Metuximab Injection With CIK Cells for Preventing Hepatocellular Carcinoma

碘美妥昔单抗联合CIK细胞治疗肝细胞癌

状态：招募中

临床试验行政识别号：NCT01758679

预计纳入人数：120例

观察方式：单组分配研究

最近更新时间：2013.6.12

申办方：天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所

Phase Ⅱ Study of Dendritic and Cytokine-induced Killer Cells (DC-CIK) Treatment in Patients With Stage Ⅲ Colorectal Cancer

DC-CIK细胞治疗Ⅲ期结直肠癌患者的Ⅱ期临床研究

状态：招募中

临床试验行政识别号：NCT01839539

预计纳入人数：60例

观察方式：随机平行分配研究

最近更新时间：2013.4.22

申办方：广西医科大学

HORNETCORN BIOTECHNOLOGY