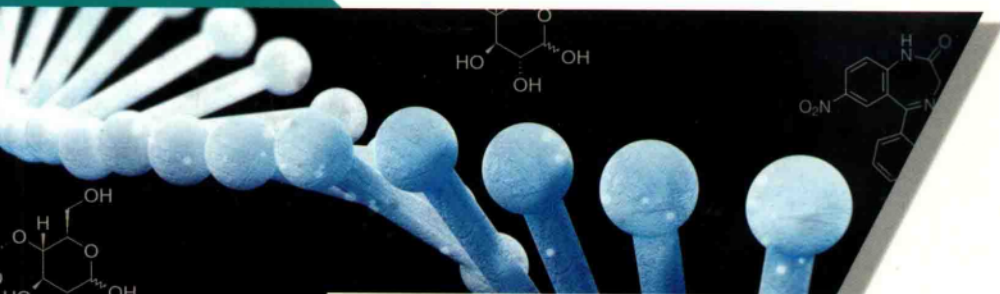


JIYIN ZHENDUAN YU  
XIBAO ZHILIAO



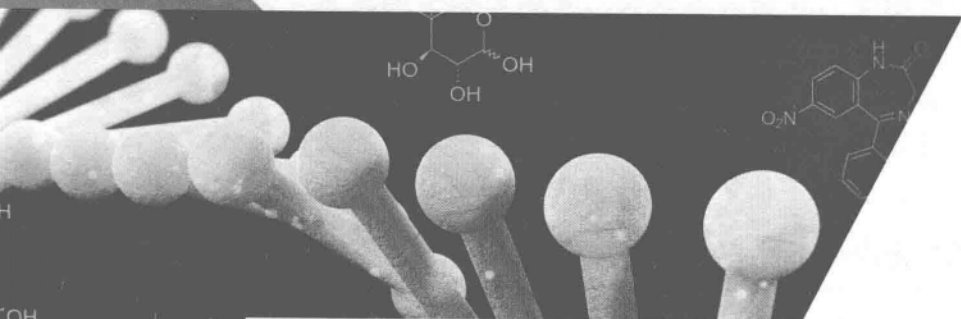
# 基因诊断与细胞治疗

主 编 杨 涛 隋 昶 余 波

科学出版社

 科学技术文献出版社  
SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

JIYIN ZHENDUAN YU  
XIBAO ZHILIAO



# 基因诊断与细胞治疗

主 编 杨 涛 隋 昞 余 波



科学技术文献出版社  
SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

· 北 京 ·

## 图书在版编目 (CIP)数据

基因诊断与细胞治疗 / 杨涛等主编. — 北京 : 科学技术文献出版社, 2018.5  
ISBN 978-7-5189-4399-9

I. ①基… II. ①杨… III. ①基因诊断②造血干细胞—移植术(医学) IV. ①R446.7  
②R457.7

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第099709号

## 基因诊断与细胞治疗

策划编辑: 曹沧晔      责任编辑: 曹沧晔      责任校对: 赵 瑗      责任出版: 张志平

出版者 科学技术文献出版社  
地 址 北京市复兴路15号 邮编 100038  
编 务 部 (010) 58882938, 58882087 (传真)  
发 行 部 (010) 58882868, 58882874 (传真)  
邮 购 部 (010) 58882873  
官方网址 [www.stdp.com.cn](http://www.stdp.com.cn)  
发 行 者 科学技术文献出版社发行 全国各地新华书店经销  
印 刷 者 济南大地图文快印有限公司  
版 次 2018年8月第1版 2018年8月第1次印刷  
开 本 787 × 1092 1/16  
字 数 296千  
印 张 12  
书 号 ISBN 978-7-5189-4399-9  
定 价 148.00元



版权所有 违法必究

购买本社图书, 凡字迹不清、缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责调换

# 前 言

近年来，我国基础研究方面取得了很大的进步，每年国家自然科学基金资助的项目数量及力度呈逐年递增趋势，针对基因治疗、干细胞分化、移植以及对分子机制及其治疗的研究也越来越丰富和深入。在人类许多基本的健康问题还有待解决的今天，作为转化医学科研工作者，不但要重视临床诊疗问题，更有责任和义务将大量的基础研究成果应用于日常临床及健康保健工作中。转化医学的核心，就是在从事基础科学发现的研究者与了解患者实际需求的医生之间建立起有效联系，特别集中在基础分子生物医学研究向最有效和最适合的疾病诊断、治疗和预防模式的转化。

本书首先讲解了生物治疗技术及其临床转化应用及干细胞治疗相关基础理论，然后着重介绍了神经系统疾病、血液系统疾病、心血管疾病的生物治疗，针对干细胞在相关方面治疗也做了详细介绍，最后讲述了内分泌、风湿免疫、软骨损伤的生物治疗及肿瘤相关基因与基因治疗，资料新颖，科学实用。我们希望通过典型生物治疗转化医学案例的介绍，给广大临床医生、科研工作者和相关领域的研究人员提供有益的参考和借鉴。

由于编著时间较短和篇幅有限，随着基础研究的不断发展，书中的理论和观点难免有不足和需要更新之处，恳请广大读者提出宝贵意见和建议，以利我们在今后的工作中加以改进和提高。

编 者  
2018年5月

# 目 录

第一章 生物治疗技术及其临床转化应用概论	1
第一节 概述	1
第二节 生物治疗临床转化的意义	2
第三节 国内外生物治疗临床转化的现状及存在的问题	4
第四节 目前生物治疗临床转化中存在的主要问题	7
第五节 对生物治疗技术临床转化发展的建议	8
第六节 细胞治疗与基因治疗——载体纯化	10
第二章 干细胞治疗	14
第一节 造血干细胞	14
第二节 间充质干细胞	20
第三节 干细胞与代谢病	37
第四节 干细胞标准化制备、质量控制与冷冻保存	41
第五节 骨髓来源的干细胞——组织修复的新希望	45
第三章 神经系统疾病的生物治疗	53
第一节 神经系统疾病的干细胞治疗	53
第二节 干细胞移植临床应用的未来趋势和发展前景	64
第四章 血液系统疾病的生物治疗	66
第一节 细胞因子	66
第二节 单克隆抗体	67
第三节 过继免疫细胞治疗	70
第四节 嵌合抗原受体修饰 T 细胞	71
第五节 肿瘤疫苗	74
第五章 心血管疾病的生物治疗	77
第一节 基因治疗	77
第二节 细胞治疗	84
第三节 免疫治疗	88
第六章 自体干细胞移植在血管疾病中的应用	93
第一节 自体干细胞技术的临床应用	93
第二节 细胞因子在血管新生中的应用	98
第七章 干细胞治疗糖尿病的基础与临床研究	100
第一节 干细胞治疗糖尿病的理论基础	100
第二节 具有治疗糖尿病潜能的干细胞种类	101

第三节	干细胞治疗糖尿病的动物实验	105
第四节	干细胞治疗糖尿病的临床研究	107
第五节	干细胞治疗糖尿病的前景展望	107
第八章	干细胞与皮肤组织损伤修复与再生	109
第一节	概述	109
第二节	干细胞与皮肤损伤修复与再生	110
第三节	干细胞的组织工程皮肤与皮肤损伤修复和再生	113
第九章	内分泌代谢性疾病的生物治疗	118
第十章	风湿免疫系统疾病的生物治疗	136
第十一章	软骨损伤的生物治疗	161
第十二章	肿瘤相关基因与基因治疗	177
第一节	癌基因和原癌基因的沉默治疗	177
第二节	肿瘤抑制基因表达的重建	178
第三节	肿瘤的免疫基因治疗	179
第四节	自杀基因疗法	180
第五节	抗肿瘤血管生成基因治疗	180
第六节	肿瘤多药耐药基因治疗	181
第七节	抗端粒酶疗法	181
第八节	多基因联合治疗	182
第十三章	临床牙源性干细胞储存和应用研究进展	183
参考文献		190

# 第一章 生物治疗技术及其临床转化应用概论

## 第一节 概述

生物治疗的内涵非常广泛,从广义的角度来讲可以理解为凡是在疾病的预防和治疗过程中用到生物材料和相关方法,即用生物材料进行疾病的预防和治疗,均可称为生物治疗。目前,生物材料大体包括以下几种:①多肽、蛋白和细胞(生长)因子类。这类材料在临床上应用非常广泛,如多肽类激素,包括胰岛素、催产素、胸腺素、生长激素(HGH)、促卵泡生成素(FSH)等;细胞(生长)因子类,包括表皮生长因子(EGF),造血干细胞动员剂(G-CSF),免疫调节因子IL-2,干扰素 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ,促黏膜修复因子(KGF1),神经生长因子(NGF)等;抗体类药物,如治疗乳腺癌的赫赛汀、治疗淋巴瘤的美罗华、治疗肺癌等的爱必妥、治疗结直肠癌等的阿瓦斯汀。②核酸类药物。包括基因治疗产品Ad-p53、H101、ADV-TK和用于宫颈癌预防的HPV核酸疫苗等。③免疫细胞类。包括用于肿瘤和病毒感染性疾病治疗的多种类型免疫细胞,如树突状细胞(DC)、细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞、NKT、 $\gamma\delta$ T细胞等。④干细胞类。包括用于造血系统恶性肿瘤等治疗的造血干细胞、用于治疗移植物抗宿主反应GVHD和骨关节修复的间充质干细胞等。⑤组织工程类产品。如工程化皮肤、软骨等。⑥其他材料。如减毒的活菌疫苗,用于肠道功能调理的益生菌,包括整肠生、乳酸杆菌、双歧杆菌等。

相对于蛋白质药物而言,免疫细胞治疗、干细胞治疗和组织工程材料治疗的发展较晚,但其功能更强大、更复杂、更多样,发展的潜力也更大。三者可以被认为是狭义的生物治疗的主要内容。细胞疗法和组织工程材料的替代疗法对疾病的治疗具有革命性的意义。首先是对肿瘤的治疗。以免疫细胞为代表的生物治疗开创了肿瘤治疗的新时代。2000年美国肿瘤生物治疗年会总结报告指出:“21世纪将是肿瘤生物治疗时代,生物治疗是唯一有望从根本上清除肿瘤细胞的方法,以常规治疗加生物治疗的综合治疗将是人类征服肿瘤的主要工具。”其次是对自身免疫性疾病的治疗。这类疾病包括哮喘、系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿关节炎、强直性脊椎炎、1型糖尿病等。目前对这类疾病的治疗还没有很好的办法。间充质干细胞为这类疾病的治疗带来了新的希望。间充质干细胞可以从多种组织中分离获得,在体外进行大规模扩增培养。除了具有成脂、成骨、成软骨等多向分化能力外,间充质干细胞可以分泌上百种细胞因子,对免疫系统具有重要的调控作用。临床试验证实,间充质干细胞对自身免疫性疾病的治疗具有明显的效果。第三是对难治性组织器官损伤性疾病的治疗。这类疾病包括神经损伤、骨软骨缺损、大面积溃疡和心肌梗死等。由于自身组织修复能力有限,或缺乏再生能力,在自然情况下,或现有的医疗条件下,对这类疾病还没有很好的治疗办法。在临床上,常常因为不能有效修复或修复不完全,导致机体丧失某些功能,留下终身

残疾，或因为创伤严重危及患者的生命。干细胞和组织工程材料不仅提供组织修复的种子和材料，而且可改善损伤组织局部的微环境和整个机体的大环境，进而快速高效地修复损伤组织的结构与功能，从而使损伤组织的修复在传统“3R”（Resection，切除；Repair，修复；Replacement，替代）基础上又发展了“2R”（再生，Regeneration；康复，Rehabilitation），进入“5R”阶段。《科学-转化医学》（Sci Transl Med）杂志在2013年作出前瞻性的预测：“细胞疗法会像工程蛋白质、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，成为医学第三大支柱。”

（杨 涛）

## 第二节 生物治疗临床转化的意义

生物治疗的临床转化是我国人口健康领域的重大需求。

（一）组织器官缺损、功能障碍以及肿瘤的发生率极高，导致对生物治疗技术的需求巨大

我国是世界第一人口大国，因创伤、疾病、遗传和衰老造成的组织/器官缺损或功能障碍人数位居世界各国之首。我国每年因心脑血管疾病死亡的患者有250万~300万，心脑血管疾病占总死因的43%，是导致我国国民死亡的第一病因，每年用于心脑血管疾病的医疗费用高达3 098亿元（图1-1）；我国现有糖尿病患者9 200万人，发病率为11.6%，增长率居全球首位；我国每年骨损伤患者近300万例；每年因在事故中烧伤的患者，需住院治疗的人数约为120万例，等等。以上情况表明，组织器官缺损或功能障碍的发生率极高，不但给人类健康造成重大威胁，而且每年的医疗花费需要数万亿元，对我国国民经济发展与社会稳定带来极大负担。针对较大创伤与病损组织器官的修复时段重建，现有的主要手段包括移植（自体移植、同种异体移植、异种移植）和人工替代物，时段虽然可以在一定程度上提高患者的生存质量和健康水平，但存在诸如组织器官来源困难、人工替代物功能单一等问题和缺陷。因此，人们在尽可能完善现有疗法的同时，寻找更具有主动意义的创新医疗方式，即用正常的组织器官修复或取代病变受损的脏器、原位再生修复组织器官则成为现代生物医学发展的重要方向。

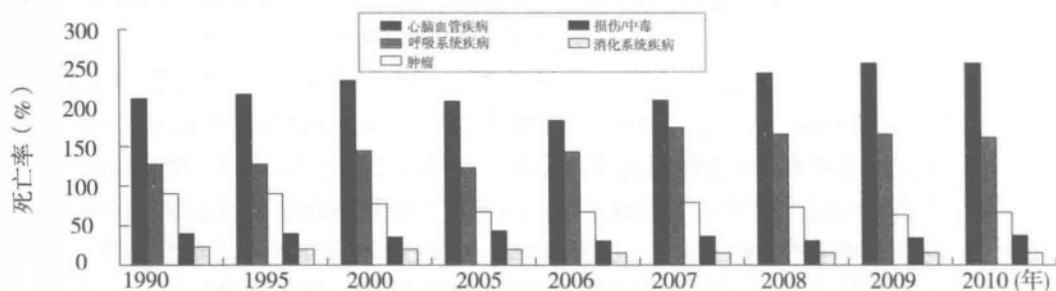


图 1-1 1990—2010 年我国城市居民主要疾病死亡率的变化

根据 WHO/IARC 2008 年全球癌症流行病学最新统计结果，2008 年全球新发癌症病例 1 270 万人，癌症相关死亡病例 760 万人，5 年癌症患病例数为 2 880 万人。进一步分析表

明,癌症发病率和死亡率在全球范围内均呈显著上升趋势,癌症同心脑血管疾病已并列成为影响人类健康的最常见慢性病,如肺癌、食管癌、胃癌、乳腺癌等。同样在2008年我国进行了第三次全国死因回顾调查,结果表明,中国人癌症死亡率在过去30年增长八成以上,每四到五人就有一人死于癌症。这些残酷的数字警示我们,在今后相当长的一段时间内,人类在抗肿瘤研究的道路上还将面临巨大挑战。而已往的研究表明,除手术、放疗与化疗等传统治疗手段以外,以免疫治疗为主的生物治疗是缓解患者症状、调节免疫机能以及直接对肿瘤细胞的最有效方式之一。

## (二) 生物治疗技术的发展为组织器官缺损、功能障碍以及肿瘤患者带来新的希望

随着对干细胞可塑性认识的深入,其在多种组织器官损伤性疾病治疗与修复中的应用潜能进一步加大。这方面的进展突出表现在基础与临床前、临床试验研究的国际论文发表呈直线上升的趋势(图1-2),显现强劲的研究势头。目前已完成的成体干细胞基础研究、临床前研究及临床试验表明,成体干细胞移植在安全性、有效性、稳定性等各方面均非常适合临床治疗的要求,将是未来相当一段时期内有希望首先从实验室研究真正走向临床应用的治疗性干细胞。随着我国人口结构逐渐向老龄化方向发展,临床上多组织器官损伤性疾病数量逐年递增,加之人们对医疗服务的要求越来越高,传统医学的被动治疗已不再能满足日益增长的需求,而治疗性干细胞技术为临床提供了一个全新的再生医学治疗手段。

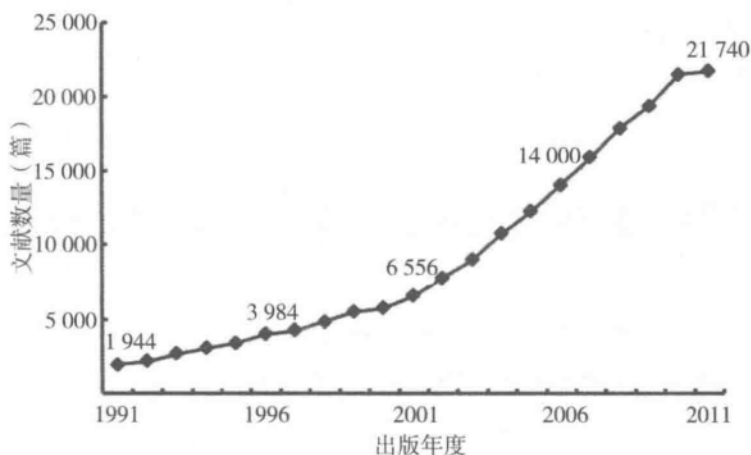


图1-2 SCI数据库1991—2011收录干细胞研究文献数量的变化趋势

利用细胞培养技术以及生物材料,在体外人工调控细胞增殖、分化并生长成需要的组织工程技术的发展,使得工程化批量产出用来修补或修复由于意外损伤等引起的功能丧失的体内组织,满足临床和康复的需要成为可能,并有可能对一些尚没有根治办法的疾病如恶性肿瘤、糖尿病、心脏病、阿尔茨海默病、帕金森病、中风和其他疾病提供治疗办法。同时,干细胞研究的深入为组织工程医疗带来了新的契机,组织工程是生命科学发展史上的新的里程碑。目前组织工程技术国内外总体发展格局相近,一些结构相对简单的组织如皮肤、软骨等已有少量产品应用于临床,同时还有骨、软骨、神经、角膜、肌腱、皮肤等多种类型系列产品也都已进入申报和审批程序,有望在近几年内形成一大批新的产品。此外,国内外组织工

程器官（如心肌、肝脏、肾脏、胰腺等）构建的相关研究也都已起步。

毋庸置疑，在过去的半个多世纪，尽管肿瘤的发生率呈逐年上升趋势，但人类在抗肿瘤药物研发和临床实践上同样也取得质的飞跃。也正是由于化疗药物的出现，在联合传统手术治疗和放疗后，使得一部分肿瘤得以治愈，绝大多数肿瘤患者生存期得以不同程度延长。近30年来，人类对抗肿瘤方法的研究涉及了多个方面，包括细胞因子治疗、过继免疫细胞治疗、抗体药物、小分子靶向药物、抗血管生成药物、肿瘤疫苗、微波、热疗及介入治疗等，目前，这些方法均已在临床上得到应用，极大地丰富了肿瘤治疗的手段，进一步提高了肿瘤治愈率和生存期。而生物治疗被视为继手术、放疗、化疗之后的第四种治疗方法。国际抗癌联盟（UICC）在最新出版的《临床肿瘤学手册》中指出：当前肿瘤治疗应该采取综合治疗策略，在分别以治愈和以延长生存期、提高生活质量为目标的两种不同情况下，均强调标准化和个体化治疗相结合，以患者最大获益为评估标准，开展系统治疗和长期随访，鼓励应用生物治疗。未来随着越来越多的肿瘤患者生存期延长，一段时间内肿瘤患病人数将会显著增加，且多数为带瘤生存。就像心脑血管疾病一样，肿瘤已成为一种典型的慢性病，需要长期干预和治疗，已成为长期影响人类健康，大量消耗医疗资源，以及极大增加国家和个人医疗费用开支的重要慢性疾病。对于这些预期长生存期的肿瘤患者来讲，在最大限度地接受手术及放、化疗后，如何进一步提高疗效，有效预防肿瘤复发，降低放化疗不良反应，改善生活质量和延长生存期是一项值得深入探索的重大课题。而细胞免疫治疗将是有价值的选择之一。细胞免疫治疗在中国被列为三类医疗技术，目前在临床上应用最多且技术最成熟的是DC治疗和CIK细胞治疗，而去除调节性T细胞治疗是最近几年来细胞免疫治疗的热点之一。

（杨涛）

### 第三节 国内外生物治疗临床转化的现状及存在的问题

#### （一）治疗性干细胞临床转化现状调查及分析

近几年，世界各国科学家和临床工作者在一系列动物实验的基础上，在严格符合美国食品和药品管理局（FDA）标准的前提下，开展了临床试验，并取得了明显的成效。2005年12月20日，美国FDA以“孤儿药”核准一种人类干细胞产品 Prochymal（由 Osiris 药厂制造），用于治疗移植物抗宿主病的急性排斥反应（GVHD）。Osiris Therapeutics 公司的第二个产品 Provacel™ 用于修复心脏组织，处于临床 I 期研究阶段。

TM 用于修复膝关节其第三个产品 Chondrogen 已经获得美国 FDA 批准开始临床 I/II 期研究，用于修复组织损伤及预防关节炎。韩国食品药品监督管理局（KFDA）在 2011 年 7 月批准该国 FCB - Pharmicell 公司开发的治疗心肌梗死的干细胞新药 Hearticellgram - AMI 投放市场销售，这也将是全球第一个获得政府部门批准上市的治疗性干细胞药物，表明治疗性干细胞不仅仅停留在概念和实验室阶段，而是已经正式作为一种药物应用到日常的医疗工作中，开启干细胞再生医学发展的新阶段。目前，全球研制和生产供临床治疗与科研所需的治疗性干细胞技术产品的公司纷纷成立，在美国、加拿大、日本和欧盟国家迅速发展，治疗性干细胞技术产品的出现不但将提高治疗水平和患者的生存质量，同时也降低了医疗成本。随

着越来越多的干细胞研究成果的完善和转化并形成新的高新技术产业链，发达国家的政府和产、学、研机构均加大了对该领域的投入，以促进治疗性干细胞技术产品开发进一步发展。截至 2013 年 1 月，8 个干细胞药物或产品已批准用于临床。在国际临床试验机构注册 (www.clinicaltrials.gov.) 的成体干细胞临床试验项目则达 326 项。

中国干细胞的治疗实践总体来讲处于世界前沿。相对宽松的环境和政策的支持，使我国不仅在干细胞基础研究方面取得了长足进展，而且在干细胞临床应用方面，也是世界上接受干细胞治疗患者最多的国家。针对成体干细胞的研究，自 2002 年开始，我国通过“863”、“973”等项目重点支持了该领域相关的基础和应用研究工作，这些项目从启动到现在，已经在基础研究领域和干细胞临床试验方面取得了一定成绩。我国正在开展将干细胞治疗技术应用于治疗冠心病、糖尿病、肝功能衰竭等重大疾病的临床前研究以及将干细胞应用于组织工程产品的研究，部分产品已完成了临床前研究工作，为下一步干细胞产品的临床应用和产业化奠定了坚实的基础。然而也正是由于我国相对宽松的监管环境，以及到目前为止对治疗性干细胞是作为治疗技术监管还是作为药物监管仍在犹豫不定，致使干细胞治疗性研究非常普遍，已有不少单位尝试使用治疗性干细胞治疗的病例，虽有部分病例取得良好的效果，但总体来讲，治疗性干细胞技术与市场均未成熟，也未得到国家的正式审批，同时缺少产业化产品，因此大规模的市场化转化暂时还较困难。尽管原卫生部于 2012 年初叫停了所有的干细胞治疗研究，但由于监管的滞后，致使未获任何审批监管的治疗性干细胞市场在不断扩大，由此带来一定的不良影响。治疗性干细胞快速发展的原因主要有：①市场需要，中国人口众多，相关疾病患者的绝对数量大；②大众对干细胞技术的了解不全面，但期望值很高；③政府对治疗性干细胞尚缺乏严格的管理，虽然有用来规范前沿生物技术进入临床的法规《医疗技术临床应用管理办法》，但对治疗性干细胞的监管一直存在争议，作为有活性的个性化细胞治疗，是作为药品管理还是作为医疗技术管理在目前国内的争议很大。此外，还存在临床研究方法以及疗效评判标准尚存在不规范和不够严谨的问题。最近国家卫生健康委员会发布了《有关细胞临床试验基地管理》等三个文件，期望能有效承担其相关的管理职责。

## (二) 组织工程技术临床转化的发展

组织工程技术经过近 30 年的研究与探索，特别是近 10 年来的迅猛发展，已成为生物技术领域最具生命力和发展前景的新兴技术，也是当前再生医学和转化医学中最重要的推动力和关键技术手段之一。目前组织工程技术国内外总体发展格局相近，一些结构相对简单的组织如皮肤、软骨等已有少量产品应用于临床，同时还有骨、软骨、神经、角膜、肌腱、皮肤等多种类型系列产品已进入申报和审批程序，有望在近几年内形成一大批新的产品。此外，大器官组织工程（如心肌、肝脏、肾脏、胰腺等）构建的相关研究国内外也都已起步。

中国组织工程研究在我国各级政府的高度重视与扶持引导下，在国家“863”、“973”和国家自然科学基金的重点资助下，已从无到有逐步发展壮大，整体已处于国际先进水平，某些方面已处于领先地位，尤以组织工程骨、软骨、肌腱、皮肤等领域的研究最具有特色和优势。

在组织工程皮肤方面，组织工程皮肤产品（安体肤）已于 2007 年 11 月获得中国 SFDA 批准，是我国第一个成功转化的组织工程产品。在组织工程软骨方面，在亚洲率先开展了关键技术完全自主的组织工程软骨临床移植，是我国卫生部门批准临床准入的第一个组织工程

技术。在组织工程骨方面,国内数家单位已将组织工程骨成功应用于临床,研究水平已步入世界前列。在组织工程肌腱方面,已将组织工程肌腱成功应用于临床修复韧带损伤及肌腱缺损,正在进行系列产品的产业化转化。在组织工程产品标准制订方面,我国于2007年开始发布了10个组织工程产品行业标准,卫生部公布了组织工程新技术临床应用管理规范。

尽管我国的组织工程研究已与国际同步,但国际上已成批出现20多种皮肤、软骨、骨等组织工程产品,且国际上组织工程产业化结构具备从成体组织细胞(已有20余个产品)到成体干细胞(临床验证Ⅱ期Ⅲ期),再到全能干细胞(临床前研究)三个层次的完整体系,循序组合前进。相对而言,我国组织工程领域产业化转化尚有提升空间。事实上,现阶段我国组织工程产品的开发仍面临着两大瓶颈:①资金严重不足。组织工程产品研发周期长,资金需求量大,短期内又无法实现盈利,因此很多企业不愿意投资这一产业。②产业化转化迟缓。国家管理部门对于组织工程相关的技术标准和管理规范尚不健全,这进一步延缓了组织工程产品的产业化转化进程。基于这两点现状,中国要继续保持这些已建立的领先优势并抢占国际制高点就迫切需要各级政府的大力支持,特别是在资金配备和政策导向等方面的扶持,不然很容易丧失已有的优势。

据不完全统计,我国每年约有200万人需要组织工程骨、300万人需要人工关节、400万人需要人工晶体、100万人需要人工血管,组织工程产品的潜在市场每年高达千亿元人民币。据预测,全球组织工程相关产品在今后20年的潜在年市场额为5000亿美元。

### (三) 细胞免疫治疗临床转化的发展

细胞免疫治疗是一种新兴的、具有显著疗效的全新抗肿瘤治疗方法,是传统的手术、放疗和化疗的补充治疗方法,被认为是21世纪肿瘤综合治疗模式中最活跃、最有发展前途的一种治疗手段,也是世界目前唯一有希望完全消灭肿瘤细胞的治疗手段。目前,已有的细胞免疫治疗方法有:细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞疗法、树突状细胞(DC)疗法、DC-CIK细胞疗法、自然杀伤(NK)细胞疗法和DC-T细胞疗法等。CIK细胞疗法已逐渐发展成为新一代抗肿瘤过继细胞免疫治疗的首选方案。自1991年美国学者Schmidt-Wolf IG首次报道CIK细胞以来,国内外学者对CIK细胞展开了深入的研究,初步阐明了CIK细胞抗肿瘤作用机制。CIK细胞是将人体外周血单个核细胞在体外经过多种细胞因子的特定时间刺激培养后获得的一群异质性免疫效应细胞,以 $CD3^+CD56^+$ 细胞(称为NK样T淋巴细胞)为主要效应细胞,这群细胞兼具NK细胞的非IVIHC(IV期对碘杂环)限制性杀伤活性和T细胞受体介导的特异性杀伤活性。与以往的LAK细胞(淋巴因子激活的杀伤细胞)相比,CIK细胞具有取材方便、扩增效率高、杀瘤活性强、抗瘤谱广和毒性小的优点,且已在体外实验、荷瘤动物模型及临床试验三个水平得到验证。

NK细胞是机体重要的免疫细胞,是人体免疫系统的组成部分。它能迅速溶解某些肿瘤细胞,因此开发它的抗癌功能是近年来癌症研究的重点。NK细胞不表达特异性抗原识别受体,是不同于T、B淋巴细胞的一类淋巴样细胞,可表达多种表面标志,其中多数也可表达于其他免疫细胞表面。临床将 $TCR^-$ 、 $mIg^-$ 、 $CD56^+$ 、 $CD16^+$ 淋巴样细胞鉴定为NK细胞。此外,NK细胞表面还具有多种与其杀伤活化或杀伤抑制有关的受体。NK细胞能够识别和杀伤突变的肿瘤细胞和病毒感染细胞,而对正常自身组织细胞无细胞毒作用。NK细胞通过自然杀伤作用、ADCC效应(抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用),释放穿孔素、颗粒酶及细胞因子发挥生物学功能,其具有的主要生物学功能为抗感染、抗肿瘤的作用,同时NK

细胞具有免疫调节作用。

细胞免疫治疗已比较成熟,已作为国家的三类医疗技术来管理,涉及的相关技术如NK细胞疗法、CIK细胞疗法、DC疗法等在许多医院已经开展10年以上,并且国内已有几家大的公司涉及这个领域,试图走产业化的道路。但是,此类技术主要还是以自体的体细胞为主,更注重个体化医疗,走产业化的道路还需要技术的突破。目前国际上缺乏有关细胞免疫治疗的大样本临床试验,大多以病例报道等形式出现。临床使用的细胞标准还不统一,也缺乏疗效评估的标准,这些均属需要进一步重视和改进的地方。

(杨 涛)

## 第四节 目前生物治疗临床转化中存在的主要问题

### (一) 国家行政管理与政策的滞后制约着生物治疗临床转化的发展

1. 我国至今还没有制定出治疗性干细胞技术临床转化的战略部署和监管条例 国家对于某些新兴科学技术尚没有建立起针对性的政策反馈机制,科技政策常常滞后于科技发展本身,致使相关技术和产品规范标准缺乏统一性,对治疗性干细胞技术产品的研发和产业规划统筹缺乏有效的指导和管理手段,致使产品成果转化效率过低。治疗性干细胞技术产品的开发,特别是具有自主知识产权的产品开发步伐比较缓慢。作为全新的医药技术,治疗性干细胞产品实际上是以活细胞为形式的生物制品,其生产、质量管理、运输保存和发放使用与传统的化学药品甚至生物制品都有明显区别。因此,如何审批和临床试验对于国家食品和药品监督管理局和卫生行政管理部门来说都是新课题。

当前治疗性干细胞技术产业发展的浮夸与虚幻泡沫已逐渐显现,且有的已经引发多种问题。在当前研究和开发热潮中其面临比其他科学研究更大的阻力和更多的挑战,包括干细胞科学研究本身的难度、治疗性干细胞技术成果转化为应用的艰辛、涉及医学伦理和社会问题的困扰以及公众不切实际的期待等。因而,进一步获得国家政府相关部门的支持和强化规范化管理,对于治疗性干细胞技术临床转化顺利发展尤为重要。

2. 对于组织工程相关的技术标准和管理规范尚不健全 对于组织工程产品,尽管国家出台了相应的管理规范以及效应的技术标准,2009年又将“组织工程化组织移植治疗技术”列为三类医疗技术。但是,基于组织工程产品的复杂性与特殊性,配套的政策明显阻碍了产业化发展。基于进一步体外模拟体内环境而构建的组织器官,除了需要材料与细胞外,还需要细胞因子等参与,而细胞因子归口药品管理,涉及药品管理与医疗器械管理相统一的标准与管理规范仍属于空白。干细胞因具备修复再生的潜能,其与组织工程材料的结合为组织工程技术赋予新的活力,却也陷于归口管理缺乏的尴尬局面。

### (二) 生物治疗技术标准缺失制约着临床转化的发展

1. 治疗性干细胞临床转化缺乏标准化体外制备与临床应用技术规范 近年来我国在治疗性干细胞技术应用方面所做的工作包括神经干细胞、造血干细胞、间充质干细胞等,涉及疾病多达几十种。但是,临床应用所涉及的治疗性干细胞缺乏相关基础研究资料和标准化技术规范作为质量保障,存在很大的安全隐患。目前国内所报道的治疗性干细胞技术在临床上

的应用都获得了一定疗效,表现为相关症状的改善,但多缺乏严格对照,缺乏多中心的研究,许多为个案报道,因此尚不能完全得出科学有效的结论。此外,这些治疗性干细胞技术及其临床应用多缺乏必需的临床前研究,没有统一干细胞体外操作制备工艺标准和严格的质量检定程序,以及大样本的长期安全性和有效性的观察,并且没有获得国家相关部门的批准,目前有向滥用化发展的趋势。

2. 组织工程新产品规范化的应用技术标准缺乏 组织工程技术研究最终目标是构建出功能、外形与自体组织器官相同或相似的永久性替代物。尽管目前已有许多组织工程化组织器官具有与正常组织器官相似的结构、功能,应用于临床也取得了一定疗效,并具有广阔的应用前景,但组织工程产品由于针对的患者数量不多或者产品比现有的治疗产品没有足够的优势、产品的规范化途径尚需探索、对复杂产品的市场接受度尚待提高等原因,使得新产品的开发与应用技术标准化存在一定难度。

3. 缺乏细胞体外操作制备工艺标准 自细胞免疫治疗理论建立以来,细胞免疫治疗的基础研究和临床应用取得了极大进步。虽然从它出现的那一天开始,在基础研究与临床应用领域,对其质疑和支持的声音就一直伴随着走到今天。这一方面是由于在动物实验中的良好疗效不能在临床的肿瘤患者当中完全复制。另一方面,同样一种免疫治疗方法,不同单位之间的临床疗效差异较大。其原因可能有二,其一,不同单位之间采用不同方法制备的免疫细胞质量和数量差异较大;其二,不同单位和中心之间免疫治疗小组的标准与临床疗效评估的标准并不相同。这两点可能是对细胞免疫治疗存在不同声音的原因。细胞免疫治疗是基于个体化的治疗,目前国内所报道的在临床上的应用都获得了一定疗效,但多缺乏严格对照、大样本研究,因此不能完全得出科学的有效性结论。此外,没有统一的细胞体外操作制备工艺标准和严格的质量检定程序,也制约其发展。

### (三) 临床实践创新能力不够,若干重要问题有待深入探讨和完善

中国是个人口大国,丰富的病例资源,相对宽松的医疗管理市场,为生物治疗技术在临床的应用提供了良好的机会,但也造成了忽视基础研究深度的问题。虽然我国在基础与临床研究方面申请了一批专利,但是原始创新性成果较少,基础研究相对比较薄弱,研究技术方法滞后。临床实践能力虽强却少创新,主要是跟风,由此制约了其持续发展。

### (四) 医学伦理问题限制了生物治疗技术的转化与产业化发展

生物治疗技术的转化与产业化必然经历临床前研究和临床试验研究,是临床科学试验的两个重要阶段,只有经过这两个阶段的科学实验,取得了安全性和有效性的充分证据,才能进一步应用。科学评估和伦理评估所面临的问题包括:安全性、知情同意、胚胎来源的细胞、异基因来源的材料及细胞、二次创伤、公正性、公益性、科学性等。

(杨 涛)

## 第五节 对生物治疗技术临床转化发展的建议

以最大满足我国人口健康领域人口众多、老龄化加剧而带来的对生物治疗技术的需求,提升我国医疗卫生领域可持续发展能力与创新能力为指导思想。实现在早期主要解决以个体

化医疗为主的医疗技术,在临床试验及其临床实践结果的基础上,加强规划引导,加大政策监管,加速科技成果规模化、产业化,推动生物治疗技术最终走向产业化快速健康发展。

### (一) 促进生物治疗临床转化发展的保障措施

1. 国家行政管理及评审部门的政策监管 生物治疗技术作为一种新生科学事物,进入公众视野的时间很短,并且由于技术更新快、医疗观念等诸多原因,社会各界对生物治疗技术在科学上、客观实际的认识上表现不对称,甚至存在各种误解。正是在这样一种充满不一致的社会审视角度下,唯一稳妥的方式便是国家行政层面通过严格的政策和法规来达到对其的监控与管理。为了更加科学、有效地对生物治疗技术的临床研究和应用工作进行规范监督和管理,应制订区别于传统药物的技术规范和药监管理措施。生物治疗技术作为临床应用的创新技术和产品,具有独特的生物学功能,区别于传统化学分子和一般生物制品,其细胞生物学活性及治疗机制决定了其需要比现有医疗技术产品更加扎实的基础研究成果、特有质控技术和 SOP 标准,以及规范安全有效的临床评价标准,以保证临床应用达到预期效果。

2. 加大对创新性的医学技术基础研究的投入 由于存在着巨大的需求,以及由此产生的巨大的经济与社会效应,国际上对这一领域的竞争已呈现白热化的状态。为促进生物治疗技术的长足发展,使我国在这一领域赶上世界发展的脚步,在国际上占据一席之地,国家行政管理部门一定要合理规划,并建立一系列保障措施,加大经费支持力度,以利于该领域的可持续性快速发展。具体措施:①大幅度增加科技投入,合理有效利用有限资金。②重视基础研究工作,合理决策重要的基础研究方向,从国家战略层面合理布局重要的研究项目、联合攻关项目。③加强人才队伍建设,保障学科发展。④加强组织领导和统筹协调,促进学科间、区域间及不同优势单位间的交流和合作;加强对外交流,构建学科发展的良好内外环境。⑤深入实施知识产权和技术标准战略。⑥合理制订近期及远期目标。

### (二) 生物治疗临床转化的行政管理策略的建议

针对上述在生物治疗的临床转化过程中出现的问题,加上生物治疗作为临床应用的一种创新技术和产品,还有就是具有的个性化医疗的特点等,其远期效果尚无法预知。这正需要相关管理部门加强监管职能,制订出区别于传统药物的技术规范和药监管理措施,使生物治疗技术的管理主体更加明确,促使相关主管部门加强对创新前沿技术的政策支持,以加快新技术及时向临床转化,以满足临床应用的需要。应在充分的基础研究与应用研究的基础上,建立生物治疗技术临床转化的标准体系,国家行政部门应设立专门机构,聘请相关专家甚至国际同行以及第三方评审机构,设立专家委员会,建立监管准入制度。

### (三) 立足产品技术标准,明确监管范围

在现有的技术与药物质量监管体系基础上,根据生物治疗临床转化所具有的独特生物学功能,参照目前国际生物治疗发展水平,结合我国经济发展的实际,建立一套完整的具备可操作性的生物治疗临床转化的路径,包括产品生产、质量控制的标准文件及 SOP 工作规范,充分体现生物治疗技术与传统化学药物、一般生物制品在安全性、有效性、稳定性等指标方面质量控制要求的区别。建议依据生物治疗临床转化的特性,尽早明确其监管范围,在早期软、硬件都达标的国家认可的研究基地内实施临床试验与临床研究,对达到规模化、产业化标准的技术产品明确按照药品管理。

#### (四) 建立国家级生物治疗临床转化试验基地，建立疗效评估标准与体系

针对生物治疗临床研究与应用技术的特殊性，在上述规范化的产品技术标准与分类管理条件下，建立国家政策与资金支持下的有较大规模的生物治疗临床转化试验基地，在国家专项基金或企业项目资助下，开展对单病种临床试验研究，与国际合作开展多中心论证，形成指南，摸索建立生物治疗技术临床研究与应用各节点的相应标准及单病种整体解决方案，为政府相关部门制定决策提供科学依据。

(杨涛)

## 第六节 细胞治疗与基因治疗——载体纯化

细胞治疗是将细胞转移到一个病人身上，其目的是改善或治疗疾病。细胞治疗策略包括分离和转移特定的干细胞群，执行效应细胞，诱导成熟细胞成为多能性细胞，以及成熟细胞的重新编程。

基因治疗是一种新的治疗手段，是指将外源正常基因导入靶细胞，以纠正或补偿因基因缺陷和异常引起的疾病，以达到治疗目的。即将外源基因通过基因转移技术将其插入病人的适当的受体细胞中，使用外源基因制造的产物来治疗疾病。从广义说，基因治疗还可包括从DNA水平采取的治疗某些疾病的措施和新技术。第一个基因疗法获准正式上市。这种CAR-T细胞疗法被批准授予诺华制药以商品名Kymiah用于临床，治疗25岁以下青少年儿童复发性或难治性B细胞急性淋巴细胞白血病(ALL)。FDA在官网称，这次批准是一次历史性行动，将为癌症和其他致命性严重疾病开创全新疗法。

2013年欧洲Glybera是用于治疗脂蛋白脂酶缺乏遗传病(LPLD)的基因药物。

通过一种腺相关病毒(AAV)，将产生功能性脂蛋白脂肪酶的基因递送到患者骨骼肌，患者接受治疗后胰腺炎发病率大大降低，并可以放松饮食限制，提高生活质量。2003年，中国赛百诺公司生产的重组腺病毒P-53(Gendicine)成功获得了国家食品药品监督管理局SFDA的生产批文，用于治疗头颈部肿瘤的基因疗法药物。

### 一、细胞及基因治疗用基因载体的分离纯化策略

(1) 细胞及基因治疗的载体，一般使用病毒或者超螺旋质粒为载体。载体颗粒较大，几十至上百纳米。在细胞和基因治疗中使用的较多的载体有：腺病毒(AdV)，逆转录病毒(Rv)，腺相关病毒(AAV)，质粒，慢病毒(LV)等。

(2) 基因载体颗粒一般加大，所以纯化时载量偏低。

(3) 一般基因载体颗粒带有负电荷。

(4) 病毒颗粒一般为蛋白衣壳和核酸组成，所以对于剪切力比价敏感。

细胞治疗与基因治疗常用载体特性。

### 二、基因载体分离纯化工艺

病毒类载体具有类似的结构表达和扩增系统所以病毒类载体可以使用通用的平台工艺。

### 【腺病毒载体】

腺病毒 (adenovirus) 是一种没有包膜的直径为 70 ~ 90nm 的颗粒, 由 252 个壳粒呈廿面体排列构成。

用于治疗腺病毒在纯度、活性以及病毒制品中热源、支原体、杂蛋白、牛血清、Benzonase 的残留都有严格的指标。这就要求在设计生产工艺时, 需要选用特异性好, 高效的方法分离纯化腺病毒载体。层析方法纯化腺病毒已成为规模生产的首选方法。以往层析纯化腺病毒的方法有很多, 如: 利用金属螯和 (IMAC Bestarose FF) + 凝胶过滤 (S - 500 HR、4FF)、离子交换层析 (Q Bestarose XL) 以及反相层析的方法等纯化方法。中试或生产规模的腺病毒纯化使用 QXL 阴离子交换, 和 Bestarose 4 FF 分子筛组份分离。病毒类载体的通用平台工艺。

## 三、病毒类载体的通用平台工艺

### (一) 腺病毒纯化工艺

第一步: 细胞分离: 腺病毒培养过程中部分腺病毒分泌到培养基中, 部分在细胞中。使用离心或中空纤维将培养基上清和细胞分离, 细胞采用冻融的方法裂解或去污剂 Triton X - 100 (浓度通常 1%)。加入 Benzonase 酶切断染色体 DNA, 降低样品粘度。

第二步: 澄清, 使用中空纤维或离心去除细胞碎片。

第三步: 浓缩更换缓冲液, 将培养上清 (如果上清中的病毒颗粒较多, 舍弃影响收率) 与澄清后的样品混合, 使用中空纤维浓缩, 更换为离子交换的缓冲液。使用 Q Bestarose XL 其缓冲液为 50mM TrisHcl, 5% glycerol, pH 8.0。

第三步: 阴离子交换纯化, 使用 Q Bestarose XL, 采用 Nacl 洗脱, 通常腺病毒在 0.4 ~ 0.6 M Nacl 浓度时被洗脱。洗脱后腺病毒在高盐缓冲液中。

第四步: 分子筛组份分离, 使用 Bestarose 4/6 FF, 上样一般在 5 ~ 10%, 更换缓冲液。

### (二) 腺相关病毒纯化

腺相关病毒 (adeno - associated virus, AAV) 是微小病毒科, 无包膜的 20 面体结构的病毒。病毒颗粒 20 ~ 26nm。目前还没有发现 AAV 对人体致病性, 重组的 AAV 去除了 96% 的 AAV 基因组, 进一步确保安全性, 2012 年 10 月欧洲批准了第一个基因治疗药物 Glybera, 就是利用重组的 AAV 药物。

腺相关病毒的纯化近年来有许多报道; 多是采用传统的氯化铯密度梯度超速离心的方法, 由于 AAV 耐受氯仿, 所以可以使用氯仿抽提的方法纯化 AAV - 2 载体。氯化铯、氯仿为有毒试剂, 在制药生产中使用有潜在的危害; 亲和层析 (AVB sepharose, Heparin 等) 的方法是可以使用于生产, 但其产品中的残留量必须是痕量的及有经过认证的严格检测, 这就增加了质检的项目和成本, 对工艺的稳定性提出了更高的要求。Nicole Brument 等 2002 年提出了使用 2 步离子交换 (SP Sepharose HP; Source15Q) 方法纯化 AAV 病毒。阴离子交换是一个纯化病毒颗粒的最佳的方法, 其中 Q XL 可以分离 AAV 在表达过程中的空病毒颗粒。

AAV 可以按照病毒载体的通用工艺, 设计生产工艺。

QXL: Q Bestarose XL 捕获病毒颗粒, 同时去除空的病毒颗粒。

Q Bestarose XL 捕获腺病毒颗粒。