

CD22 - CD19 - CAR - T 细胞治疗儿童难治性复发性 B 淋巴细胞白血病的研究进展

孙柏青 张莹 张静 张丽坤 曹峰林

摘要 儿童 B 淋巴细胞白血病(B - acute lymphoblastic leukemia, B - ALL)的治愈率接近 95%,但儿童难治性复发性白血病经规范治疗后仍存在较高的复发率和病死率。嵌合抗原受体 T 细胞免疫治疗(chimeric antigen receptor, CAR - T)近年来在白血病治疗方面取得了突破性进展,患者中的大多数对 CD19 - CAR - T 细胞免疫疗法有反应,但 CD19 阳性和阴性复发仍然是一个重要的问题,这促进了对 CAR - T 细胞持久性生物学的研究和靶向多种抗原的 CAR - T 的发展。本文简要介绍 CD22 - CD19 - CAR - T 细胞治疗儿童难治性复发性 B 淋巴细胞白血病的研究进展。

关键词 B - ALL CAR - T CD22 CD19 免疫治疗

中图分类号 R551

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.11.005

B - ALL 患儿化疗后缓解率达到 95% 以上,虽然化疗是儿童难治性复发性 B 淋巴细胞白血病首选治疗方法,但尚有部分患者对化疗无效或化疗后复发,所以难治性和复发性患者的治疗效果仍然是个挑战^[1]。迫切需要用于改善难治性复发性结果的新型方法,嵌合抗原受体 T 细胞(CAR - T)被用于患有难治性复发性的儿童急性淋巴细胞白血病患者,其中 CD19 靶向的嵌合抗原受体(CAR)修饰的 T(CAR - T)细胞免疫疗法已经在儿童难治性复发性白血病中显示出令人印象深刻的结果,缓解率为 70% ~ 90%,但仍会引起一部分患者在 CD19 - CAR - T 细胞治疗后复发^[2]。同时细胞因子释放综合征(cytokine - release - syndrome, CRS)和神经毒性在一部分患者中可能危及生命。为降低复发率并治疗那些 CAR - T 细胞治疗后患有抗原丢失的复发患者,顺序输注 CD22 - CD19 - CAR - T 细胞运用于临床治疗,即使产生了适度的 CRS,但尚未观察到神经毒性的证据及复发。白细胞介素 - 6(interleukin - 6, IL - 6)受体拮抗剂和类固醇类激素已被用于控制这些毒性,使得 CD22 - CD19 - CAR - T 细胞能够在没有明显功效损害的情况下使用。

一、CAR - T 细胞结构与特点

1. CAR - T 细胞制备及优势: CAR - T 细胞是

CAR 杂合受体, CAR 是一种合成蛋白,经基因工程改造后可在 T 细胞表面表达。它包含细胞外结合结构域、铰链区、跨膜结构域和一个或多个细胞内信号转导结构域^[3]。由于嵌合性质,使用基因转移技术(例如慢病毒或反转录病毒载体)重新编程患者的 T 细胞以表达 CAR, CAR 具有以独立于主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)的方式将 T 细胞通过非 MHC 限制性识别特定抗原能力,从而增强识别与杀伤肿瘤细胞的能力^[4]。CAR - T 是患者自身的 T 细胞,其在体外重新设计以表达嵌合抗原受体(CAR),使其能够识别在白血病细胞表面上表达的一种抗原。在临床环境中, CAR - T 被激活,进行基因改造,扩增,然后再输注回到患者身上,以便重建永久性的抗肿瘤免疫系统。作为一种“活的药物”,不仅不会被代谢掉,还会在患者体内复制、迁移、增殖和杀死表达同源抗原的靶细胞,通过强大的体外扩增能力形成记忆细胞,一次输注体内存续时间久,针对低表达量的靶分子仍然有效等^[5]。

2. CAR - T 细胞结构: CAR - T 细胞结合了靶标识别中的抗体和效应物的强烈特征,并且 T 细胞和效应细胞的长期功能直接被带入肿瘤细胞。CAR - T 细胞是由 3 个结构域组成的人工受体:①来自抗体单链可变片段(scFv)的细胞外抗原特异性结合结构域;②通常来源于 CD8 α 的铰链和跨膜区段或 IgG 结构域;③细胞内 T 细胞信号转导结构域。CAR - T 细胞经基因工程改造以通过病毒(反转录病毒、慢病毒、腺病毒)或非病毒技术(例如电穿孔、基于转座子或

基金项目:国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2014AA020901)

作者单位:150000 哈尔滨医科大学附属第一医院血液内科

通讯作者:曹峰林,电子邮箱:CFL023@163.com

基因编辑系统)表达 CAR。

3. CAR-T 细胞结构演变及特点:通过对胞内信号区设计的改造,CAR 经历了从第 1 代到第 4 代的变迁。第 1 代 CAR 仅含有来自 TCR/CD3 受体复合物的基于酪氨酸的 zeta 信号转导亚基,与该 zeta 结构域相邻,但增殖效应小、释放细胞因子少,导致抗肿瘤细胞效应不足。在第 2 代和第 3 代 CAR 中向细胞内结构域添加共刺激信号,旨在改善工程化 T 细胞的存活。第 2 代 CAR 含有一个额外的共刺激分子,在治疗血液肿瘤方面应用广泛。第 3 代 CAR 含有两个额外的共刺激分子,或诱导型 T 细胞共刺激分子,使得持续性更强。第 4 代 CAR 增加了编码 CAR 与其反应性的启动子载体,可以在激活时表达调节抗肿瘤微环境的细胞因子进而招募并活化更多的免疫细胞攻击肿瘤细胞,并通过调节肿瘤微环境从而增强免疫反应。

二、CAR-T 毒性不良反应与治疗

1. 脱靶效应:由于 CAR-T 细胞所针对的肿瘤细胞相关抗原在正常组织中存在不同程度的表达,所以在对靶细胞有抗原亲和力和杀伤力的 CAR-T 细胞同时也会攻击正常组织细胞,从而造成正常组织与器官的损伤。通过导入自杀基因、构建抑制性 CAR-T 细胞及双靶抗原 CAR-T 细胞可改善脱靶效应。

2. CRS:通常发生于 CAR-T 细胞输注后 2~3 周内,与 CAR-T 细胞回输剂量无关,患者体内常存在高水平的 IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-2、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、单核细胞趋化蛋白 1 (human monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、可溶性 gp120 等细胞因子及肿瘤负荷,同时粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 是一种关键的 CRS 促进蛋白,与 CRS 水平呈正相关^[6]。临床可通过血清 GM-CSF、血清 C 反应蛋白和铁蛋白水平监测。常见的表现形式包括发热、寒战、低血压、呼吸困难及脏器功能异常,通常可通过解热、升血压、吸氧、水化、碱化等对症处理,因类固醇类激素影响 CAR-T 细胞增殖,而常常将 IL-6 受体拮抗剂作为一线治疗方案。必要时可通过敲除 CAR-T 细胞中 GM-CSF 基因或通过导入自杀基因等途径清除体内过多的活化 CAR-T 细胞控制 CRS。

3. 神经系统损伤:研究表明,血-脑脊液屏障和星形胶质细胞功能障碍的破坏与神经系统损伤的发展有关,常由于预处理方案药物、CAR-T 细胞穿透

血-脑脊液屏障、较高的 CAR-T 细胞峰值等引起,常伴随早期或者严重 CRS 反应,临床症状表现为意识不清、抽搐、共济失调等中枢系统症状^[7,8]。CAR-T 细胞输注前的炎性反应、内皮功能障碍/激活、峰值 CAR-T 细胞、细胞因子水平、内皮激活的生物学标志及 CSF 蛋白水平增加了严重的神经系统损伤的风险。治疗神经系统损伤需针对细胞因子、单核细胞、内皮细胞及血-脑脊液屏障进行干预^[6]。虽然 IL-6 受体拮抗剂和高剂量类固醇类激素通常可有效控制 CRS,但 IL-6 在逆转神经毒性方面效果较差,需通过利用类固醇类激素穿透血-脑脊液屏障的作用而应用于治疗神经系统损伤^[9,10]。达沙替尼通过可逆地抑制 CAR-T 细胞的细胞毒性、细胞因子分泌和增殖,且通过穿透血-脑脊液屏障作用,可用于减轻神经系统损伤。

4. 移植物抗宿主病:除 CAR-T 细胞来源于患者本人,而其他非来源于患者本人的非同源 CAR-T 细胞易引移植物抗宿主病,虽然通过敲除技术可降低移植物抗宿主病风险,但同时存在 CAR-T 细胞活性降低的风险。虽然脐带血为非同源制备 CAR-T 细胞来源,但脐带血中自然杀伤细胞通过直接杀死肿瘤细胞,可减少移植物抗宿主病风险。

5. 噬血性淋巴组织细胞增多症 (fulminant haemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH):其特征是巨噬细胞和淋巴细胞过度活化,促炎细胞因子产生,淋巴组织细胞组织浸润,作为 CRS 严重时表现,患者通常有基因易感性,临床表现为骨髓可见噬血细胞、外周血细胞计数降低、凝血功能障碍及高热等。应用托珠单抗或类固醇激素可控制良好。如果患者在 48h 内没有临床或血清学改善,应考虑使用依托普利的额外治疗。在不久的将来,在 HLH 中发挥核心作用的特异性细胞因子将会发生重要作用^[6]。

6. B 细胞缺如:因 CD22-CD19-CAR-T 细胞靶向于 B 细胞表面表达的靶点,可引起 B 细胞发育不良,导致 B 细胞缺如。由于 CAR-T 细胞不会像药物被代谢掉,还会在体内形成记忆细胞,持续长时间存在,所以 B 细胞缺如的情况就难以改善。因此,B 细胞缺如可作为功能性 CAR-T 细胞持久性的药效学标志物^[11]。

7. 低丙种球蛋白血症:B 细胞缺如会造成严重的低丙种球蛋白血症,需要静脉注射免疫球蛋白。CD22-CD19-CAR-T 细胞引起的长期 B 细胞缺如,需输注免疫球蛋白纠正,且仅能补充 IgG。

8. 感染综合征: CAR-T 治疗后的大多数感染发生在中性粒细胞减少症和(或)严重 CRS 之后, 对抗菌治疗反应差, 反映了感染相关细胞因子的扩增和抗细胞因子治疗对免疫的影响及更高程度的免疫功能障碍。也可能与先前的自体或同种异体造血细胞移植、预处理方案有关, 其机制与持续的细胞免疫缺陷有关。先前存在的血细胞减少和低丙种球蛋白血症及 CRS 可能导致感染异常严重。80% 的首次感染是在 CAR-T 输注后的前 10 天内, 42% 在输注后的前 30 天内发生细菌、真菌或病毒感染。超过 30 天, 病毒感染占主导地位, 晚期感染可能反映长期免疫球蛋白缺乏以及淋巴细胞减少症。预防感染综合征应在调节和输注 CAR-T 产品之前控制活动性感染, 特别是在 CRS 引起的炎性过程恶化的情况下^[12]。

9. 恶性肿瘤: 反转录病毒和慢病毒基因转移系统是 CAR-T 细胞疗法的遗传修饰中最常用的载体。衍生自这些病毒家族的载体具有两种潜在风险: 产生复制型病毒和插入诱变, 特别是致癌活化。使用 γ -反转录病毒和慢病毒修饰 CAR-T 细胞进行的许多临床试验尚未证实 CAR-T 细胞中的插入突变^[13]。虽然风险似乎非常低, 但是继发性恶性肿瘤的临床监测和 CAR-T 治疗后的长期随访应继续成为临床试验方案的一部分, 需进行前瞻性、多中心、观察性研究, 以评估长期安全性以及治疗后发生继发性恶性肿瘤的风险^[14]。

三、CD22-CD19-CAR-T 细胞特点

1. CD19-CAR-T 细胞治疗后复发特点及对策: (1) CD19 特异性表达于正常 B 细胞、B 细胞前体细胞, 不表达于造血干细胞及非造血细胞, 作为一个理想的治疗靶点, CD19-CAR-T 细胞的治疗使得 ALL 患者获得了较好的完全缓解率 (complete response, CR), 但复发仍然存在, 其中 CD19 阴性复发最常见^[15]。CD19 抗原的表达缺失导致的 CD19 免疫逃逸是 CD19-CAR 治疗 B-ALL 后最常见的复发原因, 其主要机制是: ① CD19 基因突变或缺失导致合成障碍; ② 参与 CD19 合成的相关转录因子缺陷; ③ 白血病细胞发生类型的转变, CD19-阴性白血病亚群引起明显的骨髓复发; ④ 治疗之前存在不同水平的 CD19 阴性白血病克隆, 而在 CD19-CAR-T 细胞治疗中因不表达 CD19 抗原而逃避杀伤作用。另一个导致 CD19 阴性复发原因可能是: 在 CAR-T 细胞治疗后, 由于 CD19 阳性细胞被杀灭, 导致 CD19 阴性细胞大量增殖而导致白血病复发^[16]。所以 CAR-T 治

疗后微小残留白血病 (minimal residual disease, MRD) 的监测不应该局限于 CD19 阳性细胞, 监测 CD19 阴性细胞细胞的免疫表型变化也尤为重要。对于 CD19 阴性复发, 重新输注将没有用, 因为 B-ALL 不再表达目标^[15]。(2) CD19 阳性复发中, 多因 T 细胞功能较差或早期输注 CAR-T 细胞后 CAR-T 细胞消失导致, 其中较为罕见的原因是谱系转化, 另一个原因可能与 CAR-T 细胞内的共刺激结构域有关^[17]。这些患者中, 重新输注 CAR-T 细胞可能会有所帮助。

2. CD19-CAR-T 细胞治疗后复发对策: (1) 对于 CD19 阳性复发患者, CD19-CAR-T 细胞经过共刺激信号分子改造后, 可实现 CAR-T 细胞扩增。(2) 而对于 CD19 阴性患者采用多种标志物的共靶向 CAR-T 治疗, CD19 不是 CAR-T 细胞的独特有效靶标, CD22 表达于大多数 B 细胞性急性淋巴细胞白血病患者, 包括在 CD19 定向免疫疗法后发展 CD19 免疫逃逸的大多数患者保留 CD22 表面表达, 并且白血病仍然对免疫治疗敏感。(3) 同种异体移植治疗, 造血干细胞移植是目前唯一可以治愈 B-ALL 的方法, 在患者获得完全缓解后桥接造血干细胞移植。

3. CD22-CAR-T 细胞治疗特点: (1) CD22 也在大多数 B-ALL 病例中表达, 并且通常在 CD19 丧失后保留。Fry 等^[15] 的临床试验表明, 在接受 CD22-CD19-CAR-T 细胞治疗的患者中, 有 73% (11/15) 获得完全缓解, 包括 CD19 阴性复发的 5 例患者。(2) CD22-CAR-T 细胞具有与 CD19-CAR-T 细胞相似的安全性, 且双抗原的免疫治疗, 可以减少肿瘤通过抗原丢失逃逸的可能性。ChiCTR (Chinese Clinical Trial Registry, number ChiCTR-OPN-16008526) 临床试验表明 50 例患者接受 CD22-CD19-CAR-T 细胞治疗后, 有 48 例 (96%) 在第 30 天评估时达到 CR, 其中 94% MRD 阴性, 所有 B-ALL 患者的无进展生存期 (progression-free survival, PFS) 为 12.0 个月^[18]。(3) 数据证明了 CD22-CD19-CAR-T 细胞产生了有效的抗白血病活性, 即使产生了适度的 CRS, 但在 CD22-CD19-CAR-T 细胞治疗后没有显示脱靶毒性的证据。(4) CD22-CART 细胞也有效迁移至脑脊液, 但尚未观察到严重神经毒性或癫痫发作的证据^[19,20]。(5) 同时靶向 B-ALL 表面上的两种抗原可降低抗原丢失变体的可能性。

4. CD22-CD19-CAR-T 细胞治疗后复发及复发后对策: (1) Fry 等的临床试验表明, 在 CD22-

CAR-T 细胞治疗缓解后复发的 8 例患者中发现有 7 例患者存在 CD22 位点密度降低,这与潜在的细胞遗传学亚型有关,可能使 CD22⁺ 细胞逃脱 CD22-CART 细胞的杀伤。(2)在达到 CR 的 12 例患者中,有 8 例患者在输注 CD22-CAR-T 细胞后 1.5~12.0 个月(中位数 6 个月)复发,并且有 7 例患者发现 CD22 表面表达减少,而不是表面表达的完全丧失,足以使 CD22 定向的 CAR 治疗中的白血病逃逸^[15]。(3)实际上,B-ALL 上 CD19 和 CD22 的表达水平在患者与患者之间可能是异质的,复发时可能发生免疫表型改变,特别是在靶向治疗时代。因此,CAR-T 细胞的双重靶向可以是更广泛的活性疗法,其可以解释抗原表达的基线变异性和随时间发生的变化。采用多种抗原免疫治疗及同种异体移植可减少抗原丢失逃逸带来的复发。(4)在先前 CD19 和 CD22 定向治疗失败的患者中,应尽早考虑造血干细胞移植而不是等到复发^[15,18]。

四、展 望

因造血干细胞移植依赖于寻找 MHC 匹配供体的能力以及避免可能危及生命的感染和移植物抗宿主病等并发症等特点,且 CAR-T 细胞治疗 B-ALL 可获得分子学缓解,有完善的治疗方案应对 CAR-T 细胞治疗后所产生的不良反应,CD19 和 CD22 双靶抗原治疗解决了 CD19 治疗后复发的部分问题^[21]。因此,CAR-T 细胞的双重靶向可以是更广泛的活性疗法,其可以解释抗原表达的基线变异性和随时间发生的变化。最后,双靶向 B-ALL 表面上的两种抗原可降低抗原丢失变体的可能性,已经进入临床实践,取得了满意的疗效,有望成为 B-ALL 复发的新方案。

参考文献

- 杨琼梅,史明霞. CD19 CAR-T 细胞治疗成人复发难治性急性淋巴细胞白血病进展[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(12): 1907-1909
- 罗晓庆,曾韞璟,张诚,等. CAR-T 细胞治疗复发/难治性急性淋巴细胞白血病的临床观察——附 3 例报告[J]. 中国输血杂志 2016, 29(10): 1096-1098
- Ghorashian S, Pule M, Amrolia P. CD19 chimeric antigen receptor T cell therapy for haematological malignancies[J]. Br J Haematol, 2015, 169(4): 463-478
- June CH, Sadelain M. Chimeric antigen receptor therapy[J]. N Engl J Med, 2018, 379(1): 64-73
- Roddie C, O'reilly M, Dias Alves Pinto J, et al. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges[J]. Cytotherapy, 2019, 21(3): 327-340
- Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(1): 47-62
- Sachdeva M, Duchateau P, Depil S, et al. Granulocyte - macrophage colony - stimulating factor inactivation in CAR T - cells prevents monocyte - dependent release of key cytokine release syndrome mediators[J]. J Biol Chem, 2019, 294(14): 5430-5437
- Hunter BD, Jacobson CA. CAR T - cell associated neurotoxicity: mechanisms, clinicopathologic correlates, and future directions[J]. J Natl Cancer Inst, 2019, doi:10.1093/jnci/djz017
- Lee DW, Gardner R, Porter DL, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome[J]. Blood, 2014, 124(2): 188-195
- Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management[J]. Blood, 2016, 127(26): 3321-3330
- Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B - cell lymphoblastic leukemia[J]. N Engl J Med, 2018, 378(5): 439-448
- Fishman JA, Hogan JI, Maus MV. Inflammatory and infectious syndromes associated with cancer immunotherapies[J]. Clin Infect Dis, 2018, 69(6): 909-920
- Milone MC, O'doherty U. Clinical use of lentiviral vectors[J]. Leukemia, 2018, 32(7): 1529-1541
- Kansagra AJ, Frey NV, Bar M, et al. Clinical utilization of chimeric antigen receptor T cells in B cell acute lymphoblastic leukemia: an expert opinion from the european society for blood and marrow transplantation and the American society for blood and marrow transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2018, 25(3): e76-e85
- Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, et al. CD22 - targeted CAR T cells induce remission in B - ALL that is naive or resistant to CD19 - targeted CAR immunotherapy[J]. Nat Med, 2018, 24(1): 20-28
- Ruella M, Maus MV. Catch me if you can: leukemia escape after CD19 - directed T cell immunotherapies[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2016, 14: 357-362
- Long AH, Haso WM, Shern JF, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors[J]. Nat Med, 2015, 21(6): 581-590
- Zhao J, Song Y, Liu D. Clinical trials of dual - target CAR T cells, donor - derived CAR T cells, and universal CAR T cells for acute lymphoid leukemia[J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1): 17
- Sotillo E, Barrett DM, Black KL, et al. Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART - 19 immunotherapy[J]. Cancer Discov, 2015, 5(12): 1282-1295
- Gardner R, Wu D, Cherian S, et al. Acquisition of a CD19 - negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL - rearranged B - ALL from CD19 CAR - T - cell therapy[J]. Blood, 2016, 127(20): 2406-2410
- Capitini CM. CAR - T immunotherapy: how will it change treatment for acute lymphoblastic leukemia and beyond? [J]. Expert Opin Orphan Drugs, 2018, 6(10): 563-566

(收稿日期:2019-03-06)

(修回日期:2019-03-22)