

嵌合抗原受体修饰 T 细胞在复发、难治性慢性淋巴细胞白血病中的治疗进展

黄涛^{1,2} 综述,李静²,殷献录² 审校

[关键词] 慢性淋巴细胞白血病;抗原嵌合受体 T 细胞;CD19;综述

[中图分类号] R 733.7;R 457.2

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.01.043

尽管在经过多年的临床研究后,许多传统的治疗方案已经在急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)的治疗上取得突破性的进展,化疗可使多数的 ALL 得到临床缓解,但对于 CLL 而言,积极的化疗往往难以达到预期疗效,并且化疗药物的毒性大,特异性差,对机体损伤严重。免疫治疗因其肿瘤抗原识别靶向性、杀伤活性和持久性强的优点而受到了越来越多的临床关注,将为血液肿瘤的治疗开启免疫疗法新时代。2014 年 12 月 6 日至 9 日在美国旧金山举行的第 56 届美国血液学会(American Society of Hematology,ASH)年会上,肿瘤免疫疗法以全新的姿态进入世界各地专家的视野,其中嵌合抗原受体修饰 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell,CAR-T 细胞)的免疫疗法更是备受关注。本文就 CAR-T 细胞在复发、难治性 CLL 中的治疗进展作一综述。

1 CAR-T 细胞的概述

CAR-T 细胞是以能编码单链抗体-共刺激分子-免疫受体酪氨酸活化基序的嵌合分子的融合基因修饰 T 细胞而产生的一种特殊的基因修饰 T 细胞。CAR 的基本结构包含胞外区、跨膜区和胞内区。胞外区源于单克隆抗体的单链可变区(scFv),scFv 又由重链和轻链共同组成。scFv 通过识别肿瘤特异性抗原,直接将信号向细胞内转导,使 T 细胞活化,分泌细胞因子,并杀伤肿瘤细胞^[1]。CAR 识别的是细胞表面完整的蛋白或糖脂分子,无需抗原处理和递呈,故为主要组织相容性复合体(MHC)非限制性。跨膜区一般由同源或异源二聚体膜蛋白如 CD4、CD8、CD28 组成,主要起着连接胞外区与胞内区,进行信号转导的作用。胞内区为信号转导区,主要由免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif,ITAM)的 CD3 ζ 链、免疫球蛋白 Fc 受体的 γ 链或 CD3 ϵ 链构成。

CAR-T 技术的发展共经历四代。第一代 CARs,也是基本的 CARs,由识别肿瘤表面抗原的 scFv 和 ITAM(通常为 CD3 ζ 和 Fc ϵ RI γ)组成。这种 CAR-T 细胞不需要经过 HLA

的介导,对 MHC 丢失或抗原递呈变异的肿瘤细胞同样有效。早期的实验证明了其介导对肿瘤细胞杀伤作用的可行性,然而第一代 CARs 不能转导增殖信号和诱导细胞因子产生,只能引起短暂的 T 细胞增殖和较低的细胞因子分泌,不能提供体内长时间持续的抗肿瘤效应。第二代 CARs 通过增加协同共刺激分子(costimulatory molecule,CM)(例如 CD28、CD123)的胞内结构域,以延长其体内存活时间,促进其迅速扩增能力。相比第一代,第二代 CARs 细胞的功能有明显的优势,甚至可以转化为记忆细胞,当记忆细胞再次接触白血病细胞时,可迅速产生杀伤效应。到了第三代 CARs,通过引入 2 种或者 2 种以上的 CM 结构域,更好地增强了 T 细胞的活化、扩增、抗肿瘤能力及促进转基因的表达能力^[2]。第四代 CARs 是在第二/第三代 CARs 的基础上,加入共表达一些关键的细胞因子^[3],例如白细胞介素(IL)-12,注射 IL-12 会引起患者严重的炎症不良反应,但是通过 CAR-T 细胞来实现局部表达后,可以在肿瘤病灶处招募自然杀伤细胞,或者直接逆转被耗竭的肿瘤浸润性 T 淋巴细胞,从而有效克服肿瘤免疫抑制微环境,为 CAR-T 细胞治疗提高了安全性及拓宽了临床应用范围。在 ASCO2015 会议上 Bellicum 公司的发言称考虑到 CAR 的共刺激分子 CD28 和 4-1BB 在体内实验中对 T 细胞增殖、体内存活时间及治疗效果的不稳定性,最新设计并导入了全新的 CAR 共刺激组合 MyD88 和 CD40,同时为降低不良反应,保证 CAR 的安全性,该 CAR 上还装配有 iCaspase-9 安全开关。

2 针对 CLL 的抗 CD19 CAR-T 细胞

CLL 相对于其他类型的白血病而言是一种进展缓慢、惰性的 B 淋巴细胞白血病(B-CLL),患者可以持续多年无临床症状,生存期数十年,但仍有部分患者表现为侵袭性的临床经过,生存时间短,且在治疗过程中常表现为对传统化疗药物耐药。CAR-T 细胞免疫疗法在 B-CLL 的治疗中表现出了显著的疗效。CD19 作为 B 细胞肿瘤的标志性靶点,除表达于恶性 B 细胞外,也可见于成熟 B 细胞、前体 B 细胞、浆细胞以及树突状细胞,而其他实质细胞几乎不表达,更重要的是造血干细胞不表达,因此作为 B 细胞肿瘤抗原的特异性高^[4]。在 CLL 中往往存在 CD19 的表达。CAR-T 细胞通过组织学特点识别白血病细胞的 CD19 特异性靶点^[5],直接与细胞表面的 CD19 结合,结合后的抗原作为一种细胞信号转导区域,增强 T 细胞的活性,攻击肿瘤相关抗原,从而达到杀

[收稿日期] 2015-12-22

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 研究生院,安徽 蚌埠 233030;2. 安徽省蚌埠市第三人民医院 血液科,233000

[作者简介] 黄涛(1991-),男,硕士研究生。

[通信作者] 李静,硕士研究生导师,主任医师。E-mail:bbsyxyk@163.com

伤肿瘤细胞的目的。早在 2011 年, PORTER 等^[6]在《新英格兰医学杂志》上发表了首次应用第二代抗 CD19 CAR-T 细胞成功治疗 CLL 的个案报道。随后该课题组再次报道了 3 例传统化疗耐药的 CLL 患者接受 CAR-T 细胞治疗的临床研究结果^[7]。其中 1 号患者接受了苯达莫司汀 1 个疗程的单药化疗; 2 号患者最初经过利妥昔单抗联合苯达莫司汀化疗 2 个疗程后又行 1 个疗程的苯达莫司单药化疗; 3 号患者使用的是喷司他丁联合环磷酰胺的化疗方案; 输注细胞数分别为 $1.6 \times 10^7/\text{kg}$ 、 $1.0 \times 10^7/\text{kg}$ 、 $1.46 \times 10^5/\text{kg}$, 其中 1 号和 3 号患者达到完全缓解 (CR) 时间超过 10 个月, 并且这 2 例患者在 2 年的随访中仍处于 CR, 另 1 例病情稳定 (stable disease, SD)。随后的分析指出虽然给予低剂量的 CAR-T 细胞回输, 但输注的 CAR-T 细胞可以在患者外周血和骨髓中大量存活, 在体内能够扩增 1 000 倍以上, 有效杀伤 CLL 细胞的活性至少维持达 6 个月以上。随后, 在第 55 届 ASH 会议时该课题组再次报道了 14 例复发难治 CLL 患者接受 CAR-T 细胞治疗结果, 8 例患者有效, 其中 3 例患者达到 CR, 且均未复发; 5 例患者达到部分缓解 (PR), 其中 2 例在输注细胞后 4 个月出现复发^[8]。不仅如此, 部分 CAR-T 细胞甚至以记忆细胞形式存在, 再次接触 CLL 细胞时能快速产生反应^[8]。PORTER 等^[9]报道了 14 例复发难治 CLL 接受抗 CD19 CAR-T 细胞治疗后的疗效。这些患者既往至少接受过 1 种化疗 (1~11 次, 中位次数为 5 次), 并且 8 例患者为 del(17)(p53), 其中 1 例患者接受过 2 次的自体干细胞移植。14 例中有 4 例患者达到了 CR, 并且在平均随访了 40 个月后发现没有复发现象。4 例患者在输注抗 CD19 CAR-T 细胞后的第 1 个月达到了 PR, 中位持续 PR 时间是 7 个月。其中 1 例患者在输注 CAR-T 细胞后的第 6 个月死于大面积的肺栓塞, 值得一提的是在该患者的骨髓及外周血中并未检测到白血病细胞。其余 6 例患者在使用抗 CD19 CAR-T 治疗 1~9 个月 (中位时间为 4 个月) 后没有明显临床疗效。这 6 例患者回输 CAR-T 细胞在体内的扩增受到明显的限制, 其中 2 例患者死亡, 1 例在接受抗 CD19 CAR-T 疗法的第 8 个月死于 CLL 的并发症, 另 1 例在第 9 个月死于同种异体干细胞移植的并发症。其余 4 例在输注 CAR-T 细胞后的第 9~15 个月仍存活, 但均接受了其他代替治疗。另外, KOCHENDERFER 等^[10]2013 年报道了 10 例在完成同种异基因 HSCT (allogeneic HSCT, allo-HSCT) 后复发的 B 细胞系血液肿瘤患者最后接受供体来源的抗 CD19 CAR-T 细胞治疗效果的研究, 其中 2 例为 allo-HSCT 后复发的 CLL。该研究结果显示, 这 2 例复发 CLL 患者输注供者 CD19-CAR-T 细胞后疗效明显, 其中 1 例 CLL 患者在接受同种异体抗 CD19 CAR-T 细胞输注后获得持续的 CR, 而另 1 例 CLL 患者则在接受 CAR-T 细胞输注 2 周后发生肿瘤溶解综合征, 1 例套细胞淋巴瘤患者则得到持续的 PR, 其余患者均获得 SD。值得一提的是, 这 10 例患者在接受供者来源的抗 CD19 CAR-T 细胞治疗期间均未发生移植物抗宿主病 (GVHD)。对于血液肿瘤患者而言, 在接受 HSCT 治疗后疾病复发往往是导致该患者死亡的主要原因, 该研究的结果很好地为接受同种 allo-HSCT 治

疗后复发的患者提供一种非常有应用前景的治疗选择。

3 CARs 所伴随的不良反应

虽然以 CD19 为靶向的 CAR 修饰 T 细胞在抗肿瘤效果上得到了众多研究结果的支持, 有很高的缓解率, 为部分复发、难治、传统化疗耐药的血液肿瘤患者带来了新的治愈希望, 但在临床实验中仍出现一定的不良反应, 虽然大部分都可以自行缓解, 但仍有部分不良反应有可能是致命的, 随着对 CAR-T 细胞研究的深入, 这类安全性问题越来越多地引起人们的关注。

首先是脱靶效应, 即免疫反应介导的表达靶抗原的正常组织排斥反应。这是由于已经被视为靶点的一些肿瘤相关抗原, 也会在正常细胞低水平表达, 导致 CAR-T 治疗可能会产生脱靶毒性, 引发严重的不良反应。在使用抗 CD19 CAR-T 细胞治疗过程中出现的 B 细胞缺乏即为最直接的脱靶效应。原因是在 CAR-T 细胞回输到患者体内后会大量扩增并清除白血病细胞, 但与此同时也对正常的 B 细胞产生杀伤作用, 从而导致 B 细胞缺乏。在 KALOS 等^[7]的研究中发现, 持久的 CAR-T 细胞存在意味着持续的缓解及长期的 B 细胞发育不全, 该课题组对 3 例接受 CAR-T 细胞治疗的 CLL 患者输注 CAR-T 细胞前后外周血中浆细胞含量进行对比, 发现 3 例患者均出现浆细胞不同程度的减少, 但是 3 例患者中只有 1 号患者出现长期的 B 细胞发育不全。他们认为长期的 B 细胞发育不全暗示着 CAR-T 细胞的持续活动, 并且需要更多的临床实验数据来证实长期的 B 细胞发育不全是否与长期的复发率及死亡率有关。B 细胞缺乏可引起长期的低 γ 球蛋白血症, 但是可通过静脉输注丙种球蛋白来纠正^[11]。但是如果这类特性靶点表达在其他重要的脏器中, 则会发生其他不可预见的不良反应, 甚至危及患者生命。所以如果能寻找到高度特异表达于肿瘤细胞的靶抗原, 而在正常组织或者器官不表达, 那么将会为 CAR 技术带来革命性的突破。

其次是细胞因子释放综合征 (cytokine release syndrome, CRS), 这是 CAR-T 细胞治疗中另外一个巨大的临床风险, 有致死性, 典型的临床症状是高热、低血压、过敏、呼吸窘迫综合征, 甚至引发器官衰竭^[12]。其机制可能是肿瘤细胞在短时间内被 CAR-T 细胞清除溶解而释放出大量的炎症反应因子, 如 IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等。很糟糕的情况是在各大 CAR-T 研究中心的临床实验中, CRS 导致的发热、低血压和神经系统的变化 (包括精神状态改变、癫痫、反应迟缓) 有着非常高的发生率^[13-15], 主要的干预措施包括气管插管保护呼吸道、静脉滴注升压支持、积极的液体支持和抗癫痫药物应用。虽然这些不良反应已经很严重, 但经过积极的对症支持患者均已缓解, 并且患者恢复后没有出现持续性神经功能障碍, 通过各种神经影像学研究没有发现任何解剖原因的神经系统异常, 但是随后在这些 CRS 患者的脑脊液 (CSF) 中均发现了 CAR-T 细胞的存在^[13-15], 因此, 这是否表明 CAR-T 细胞可能是中介, 直接或间接地导致了神经毒性, CAR-T 细胞是否为针对靶抗原而进入中枢神经系统, 并且这些靶抗原是以微小残留的白血病细胞形式存在或者是 CD19

抗原表达在了正常的中枢神经细胞上^[16],这些都需要进一步临床实验去证实。并且,与传统的药物不良反应不同,CRS并不能简单的通过减少药物的剂量来控制,因为只要有肿瘤细胞,CAR-T细胞就会持续地扩增,杀伤溶解肿瘤细胞,释放炎症介质,但是有报道称CRS严重程度与肿瘤负荷大小相关^[17]。JONES等^[18]首次在治疗CRS中尝试使用甾体类固醇药物和IL-6阻断剂托珠单抗(tocilizumab),类固醇药物在改善CRS患者的临床毒性上是非常有效的,但是会严重影响CAR-T细胞的抗肿瘤效应,并且可能会导致白血病的复发^[7,13]。相比之下,使用托珠单抗治疗CRS则能保证改善临床症状的同时并不影响CAR-T细胞的疗效,使患者获得更长久的持续缓解^[13],虽然该课题组仍然在持续跟进使用托珠单抗后是否会导致复发,但他们仍建议使用托珠单抗作为治疗CRS的第一线用药。

4 未来展望

尽管anti-CD19 CAR-T细胞在治疗B淋巴细胞系白血病中取得了令人激动的疗效,但是在进一步改进CAR技术及提高其安全性方面仍然有很多优化的空间。CAR-T细胞治疗技术实质上是一种靶点依赖型的治疗,但不少肿瘤类型都缺少理想的靶点,导致CAR-T治疗可能会产生脱靶毒性,引发严重的不良反应。一些患者即使有特异的靶点,但由于本身T细胞功能低下甚至无法体外扩增,给CAR-T治疗带来困难。CRS是可能致死的潜在风险。另外基于病毒表达体系的CAR-T技术的生物安全性也需要更多的临床实验去证实。因此,如何解决这些问题,将会影响CAR-T技术的发展及临床推广,也决定了治疗效果的好坏。靶点的寻找工作随着新一代基因测序技术的快速发展有望取得重大的进展,脱靶反应的解决也有望随着新靶点的不断涌现而得到控制,CRS也有望由于单链抗体制备上的进展而得到改善。另外自杀基因的导入及双靶点识别CAR-T细胞的研究也有望进一步减少CAR技术的临床不良反应;用健康人群的T细胞来制备CAR-T细胞的技术也在突飞猛进,有望实现异体CAR-T细胞治疗技术的临床应用,从而解决患者T细胞功能低下的障碍。目前采用RAN电转染及转座子介导细胞核转染仪转染等非病毒CAR-T方法均可以提高CAR技术的安全性。相信随着CAR技术原理和临床研究的深入,CAR-T细胞免疫疗法必将为血液肿瘤的治疗带来一种安全高效的临床手段。

[参 考 文 献]

[1] FITZER-ATTAS CJ, SCHINDLER DG, WAKS T, *et al.* Direct T cell activation by chimeric single chain Fv-Syk promotes Syk-Cbl association and Cbl phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(13):8551.

[2] SONG DG, YE Q, POUSSIN M, *et al.* CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells *in vivo*[J]. *Blood*, 2002, 119(3):696.

[3] PEGRAM HJ, LEE JC, HAYMAN EG, *et al.* Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning[J]. *Blood*, 2012, 119(18):4133.

[4] KOCHENDERFER JN, ROSENBERG SA. Treating B-cell cancer with T-cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(5):267.

[5] JUNE CH, BLAZAR BR, RILEY JL. Engineering lymphocyte subsets: tools, trials and tribulations[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(10):704.

[6] PORTER DL, LEVINE BL, KALOS M, *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8):725.

[7] KALOS M, LEVINE BL, PORTER DL, *et al.* T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(95):95ra73.

[8] PORTER DL, FREY NV, MELENHORST JJ, *et al.* Randomized, Phase II Dose Optimization Study of Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells Directed Against CD19 (CTL019) in Patients with Relapsed, Refractory CLL[J]. *Blood*, 2014, 124(21):1982.

[9] PORTER DL, HWANG WT, FREY NV, *et al.* Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(303):303ra139.

[10] KOCHENDERFER JN, DUDLEY ME, CARPENTER RO, *et al.* Donor-derived anti-CD19 chimeric antigen receptor expressing T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Blood*, 2013, 122(25):4129.

[11] DAVILA ML, KLOSS CC, GUNSET G, *et al.* CD19 CAR-targeted T cells induce long-term remission and B Cell Aplasia in an immunocompetent mouse model of B cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e61338.

[12] MAUS MV, GRUPP SA, PORTER D, *et al.* Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies[J]. *Blood*, 2014, 123(17):2625.

[13] DAVILA ML, RIVIERE I, WANG X, *et al.* Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224):224ra25.

[14] MAUDE SL, FREY N, SHAW PA, *et al.* Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(16):1507.

[15] LEE DW, KOCHENDERFER JN, STETLER-STEVENSON M, *et al.* T cell expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial[J]. *Lancet*, 2015, 385(9967):517.

[16] KRANICK S, PHAN G, KOCHENDERFER J, *et al.* Aphasia as a complication of CD19-targeted chimeric antigen receptor immunotherapy[J]. *Neurology*, 2014, 82(10 Suppl):S52.

[17] GMPSSA, KALOS M, BARRETT D, *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(16):1509.

[18] JONSE SA, SCHELLER J, ROSE-JOHN S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling[J]. *Clin Invest*, 2011, 121(9):3375.