

应用 CD19 修饰的嵌合抗原受体 T 细胞治疗淋巴细胞白血病

李欢欢^{1,3}, 朱平^{2*}, 伍学强¹, 刘玉峰³¹北京航天总医院血液肿瘤研究所, 北京 100076; ²北京大学第一医院血液科, 北京 100034;³郑州大学第一附属医院儿科, 河南郑州 450052

摘要 应用嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T cell, CAR T) 治疗急性和慢性淋巴细胞白血病, 在近期已取得了新进展。CAR T 细胞是通过将 T 细胞受体基因和抗 CD19 抗体基因嵌合, 转染至 T 细胞, 在体外扩增以后输注给患者来治疗白血病的新型免疫治疗。经过基因改造后的 CAR T 细胞的表面具有特异性位点, 可以识别淋巴细胞白血病中 B 细胞表面的 CD19 抗原。CD19 抗原的持续刺激可使 CAR T 细胞不断增殖与活化, CAR T 在患者体内可以增殖 1000 倍, 有效杀伤急性和慢性淋巴细胞白血病细胞。本文就 CAR T 细胞及其对急性和慢性淋巴细胞白血病的疗效进行综述。

关键词 嵌合抗原受体; T 细胞; B 淋巴细胞白血病; 免疫治疗

中图分类号 R733.7

文献标识码 A

doi: 10.7534/j.issn.1009-2137.2014.06.047

Treatment of lymphoblastic leukemia with CD19-specific Modified Chimeric Antigen Receptor T Cells —Review

LI Huan-Huan^{1,3}, ZHU Ping^{2*}, WU Xue-Qiang¹, LIU Yu-Feng³¹Hematology & Oncology Institute, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China; ²Department of Hematology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China; ³Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

* Corresponding Author: ZHU Ping, Professor. E-mail: zhupingbj@gmail.com

Abstract Bioengineered T cells, which are the genetically manipulated T cells to express chimeric antigen receptor T Cell (CAR T) against leukemia-associated specific antigens, were applied to treat acute and chronic lymphocytic leukemia with CAR T. CAR T cells combined with cell-surface binding site and anti-CD19 chimeric antigen receptor can treat diseases through T cells transfection. CAR T cells can recognize the CD19 antigen on B cells with specific cell-surface loci. CAR T cells can proliferate by 1000 times and differentiate *in vivo* by the CD19 antigen stimulation, therefore, kill the acute and chronic lymphocytic leukemia cells effectively. This article briefly reviews the CAR T cells and the effect of CAR T cells on acute and chronic lymphoblastic leukemia.

Key words chimeric antigen receptors; T cells; B lymphocytic leukemia; immunotherapy

J Exp Hematol 2014; 22(6): 1753-1756

目前急性和慢性淋巴细胞白血病的治疗仍存在许多困难^[1]。尽管化疗可使多数的急性淋巴细胞白血病达到临床缓解,但是化疗药物毒性大,特异性差,对机体损害很大。对于慢性淋巴细胞白血病来说,积极的化疗往往难以奏效。近十年来,对于淋巴系统肿瘤的治疗取得了很大进展,抗 CD20 单克隆抗体(如美罗华)可以有效地治疗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL),并且已经成为临床一线用药^[2]。但是,由于急性和慢性淋巴细胞白血病的细胞表面往往仅有 CD19 抗原,美罗华一类的抗 CD20 抗体对其无明显治疗作用,因此迫切需要一种新的治疗方法来提高急性和慢性淋巴细胞白血病的治愈率。在临床上通过输注 CD19 嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR T)来进行免疫治疗

有望解决这一问题。

转基因获得 CD19 特异性嵌合抗原受体修饰的 T 细胞

CD19 作为 B 细胞肿瘤的标志性靶点,在正常 B 细胞、滤泡状树突细胞、恶性 B 细胞及前 B 细胞中均可能表达^[3],但在造血干细胞中无表达。急性和慢性淋巴细胞白血病往往存在 CD19 的表达,而在其他淋巴系统肿瘤中表达强弱各不相同。Jena 等^[4]

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81370612)

* 通讯作者:朱平,教授,博士生导师。E-mail: zhupingbj@gmail.com
2013-12-19 收稿; 2014-01-23 接受

首次通过基因改造技术应用慢性病毒载体,将表达 B 细胞的 CD19⁺ 特异性嵌合抗原受体,转染至患者的 T 细胞中,改造后的 T 细胞称为 CD19 特异性 CAR T 细胞。这些 T 细胞在体外经过大量扩增后,重新输入到急性和慢性淋巴细胞白血患者的体内发挥作用。CD19 特异性 CAR T 细胞能够识别白血病的特异性 CD19 靶点,通过释放多种细胞因子,攻击具有 CD19 抗原的 B 细胞,促使机体清除恶性肿瘤细胞。迄今的研究结果显示,这种经逆转录病毒基因转染后的 T 细胞,在临床应用上是安全和有效的^[5]。动物实验发现,CD19 特异性 CAR T 细胞能有效地攻击 CD19⁺ 肿瘤细胞系和患者体内 B 细胞肿瘤^[6]。在免疫缺陷小鼠体内,输入 CD19⁺ 靶向 T 细胞后,机体可以有效地清除 CD19⁺ 肿瘤细胞^[7]。CAR T 细胞迄今为止已经发展了 3 代。

第 1 代 CAR T 细胞结构中仅包含单细胞信号转导区域(CD3- ζ)。CD3- ζ 连接胞内信号转导通路和抗原识别受体,激活 T 细胞,其与外源性 T 细胞受体激活方式相似。这种 CAR T 细胞不需要经过 HLA 的介导,对 MHC 丢失或抗原提呈变异的肿瘤细胞同样有效。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^[8],直接与细胞表面的 CD19 结合。结合后的抗原可作为一种细胞信号传导区域,增强 T 细胞的活性,攻击肿瘤相关抗原。

但是实验中发现,转染后的 CAR T 细胞不易在体内持续增殖并保持抗肿瘤活性,妨碍了治疗效果。因此,第 1 代的 CAR T 细胞的临床应用受到了明显的限制。后来, Milone 等^[9]对 CAR T 细胞进行改造,改造后的第 2 代 CAR T 细胞除了具有 CD3- ζ 结构域外,还增加了协同共刺激信号的区域,即 CD137 (4-1BB, TNF 受体超家族成员)或者 CD28 基因。转染这些信号转导结构可以弥补第 1 代 CAR T 细胞的不足。在急性前 B-淋巴细胞白血病(ALL)小鼠体内,有 CD137 或者 CD28 信号转导结构的 CAR T 细胞能够不断增殖并持续存活,抗肿瘤活性明显增强。第 2 代 CAR T 细胞的功能较第 1 代有明显的优越性,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。临床实验数据显示,低剂量(约 1.5×10^5 /kg)的自体 CAR T 细胞输入后,可在体内持续增殖并杀伤肿瘤细胞,且维持抗肿瘤作用达 6 个月以上,最终使 ALL 达到了完全缓解。

考虑到增加了 CD28 和 CD137 基因的 CAR T 细胞均可以在体内持续增殖并增强抗肿瘤活性,因

此研究者设想,如果将 CD28 和 CD137 两个协同共刺激结构域同时转染到 CAR T 细胞中,很可能需要更少的输入剂量就可以达到临床治疗效果,并产生更加明显的增殖能力及抗肿瘤作用。然而,这种称为第 3 代的 CAR T 细胞的功能是否更强大,还需要进一步的临床实验来证实。

CAR T 细胞治疗慢性淋巴细胞白血病

和其他类型的白血病相比,慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 是一种进展缓慢、惰性的 B 细胞型白血病,多发于成人,许多患者可以数年无症状。目前 CLL 尚无特异性的治疗方案,一般对无明显症状的 CLL 主张观察和等待,主要是对症处理,药物治疗难以达到长期缓解和临床治愈。基因修饰后的 CAR T 细胞对这种 B 细胞恶性肿瘤具有明显治疗作用。2011 年新英格兰杂志报道了 June 课题组^[10]首次应用 CAR T 细胞成功治疗 3 例 CLL 患者,其中 2 例患者在 2 年后的随访中仍处于完全缓解。他们随后的研究发现^[11],输注的 CAR T 细胞可以在患者外周血和骨髓中大量存活,在体内增殖了 1000 倍以上,有效清除 CLL 细胞的功能可维持 6 个月以上。不仅如此,部分 CAR T 细胞甚至以记忆细胞的形式存在,当再次接触 CLL 细胞时产生快速反应。CAR T 细胞在体内增殖和存活的机制还不清楚,可能是由于在内环境中正常 B 细胞和表达 CD19 的白血病细胞激活或者释放细胞因子所致。CAR T 细胞输入体内后,IFN- γ 、CXCL9、IL-6 以及可溶性 IL-2 受体等细胞因子有明显的增加,在输入后第 23 天达到高峰。骨髓中细胞因子的升高与白血病细胞的减少水平相一致,但外周血和骨髓中 TNF 的水平变化不大。应用 RT-PCR 检测体内 CAR T 细胞数量时发现,在输入后第 21 天,细胞的比值增加了 1000 倍,占外周血淋巴细胞的 20% 以上。CAR T 细胞的数量与溶瘤综合征出现时间以及细胞因子升高水平相一致。外周血中 CAR T 细胞的倍增时间约为 1.2 天,半衰期为 31 天。

值得注意的是,经 CAR T 细胞免疫治疗的患者在治疗后可出现一些细胞毒副作用,例如细胞因子释放综合征和巨噬细胞激活综合症。这些症状与儿童噬血细胞综合征、淋巴细胞增殖病所发生细胞因子风暴相似^[12]。细胞因子风暴是由于 CAR T 细胞杀伤 B 细胞后导致肿瘤细胞溶解所致,特点表现为炎症反应,长期发热、肝脾肿大、细胞减少。此时实验室检查患者出现铁蛋白、甘油三酯、转氨酶、胆红

素、可溶性 IL-2 受体 α 链均增高及纤维蛋白原降低^[13]。CAR T 细胞输入后,患者外周血和骨髓中 B 细胞缺失和低丙种球蛋白血症可达 6 个月以上,但患者并不一定出现反复感染。如果临床症状需要对症处理,患者体内 CAR T 细胞增殖数量或抗肿瘤效果不会受到明显影响。以往应用美罗华治疗的患者,在治疗间断数月后, B 细胞可以逐渐回升。这种现象是否会在 CAR T 细胞免疫治疗的患者体内发生目前仍不清楚。由于 CAR T 细胞可以在体内广泛增殖并产生细胞毒性,在临床治疗过程中需要及时对 CAR T 细胞的特异性检测^[14],及时预防不良反应发生。

CAR T 细胞治疗急性淋巴细胞白血病

急性淋巴细胞白血病(ALL)是血液系统中最常见的恶性增殖性疾病,化疗可使成人的治愈率达 1/3 以上^[15],儿童的治愈率达 85%。但是有许多难治性和复发性 ALL,经规范化治疗后仍有较高的复发率和死亡率。曾经有一些用美罗华治疗 ALL 的报道,但遗憾的是,大多数 ALL 细胞表面没有美罗华的 CD20 靶抗原,而有 CD19 抗原。CAR T 细胞能够靶向特异性的抗 CD19 抗原,在治疗有 CD19 抗原的 CLL 取得初步成功后,一些学者又开始试用于 ALL。

Davila 等^[16]通过动物实验发现,应用 CAR T 细胞治疗 B-ALL 的小鼠可诱导其长期缓解。Brentjens 等^[17]应用第 2 代 CAR T 细胞,即转染了 CD28/CD3- ζ 的 CD19 特异性 CAR T 细胞,治疗 5 例复发 B-ALL 患者。用 PCR 测序检测 CAR T 细胞数量和功能,结果显示 CAR T 细胞在体内可迅速产生抗肿瘤作用,微小残留病检测很快转阴,都达到了完全缓解。应用 CAR T 细胞免疫治疗 ALL 与 CLL 和其它非霍奇金淋巴瘤相比,治疗效果更好^[18]。最近 Grupp 等^[19]报道,应用第 2 代 CAR T 细胞治疗的 2 例难治性和复发性 B-ALL 患儿均获得完全缓解。实验中 CAR T 细胞输入剂量为 $1.4 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^7$ /kg,在 CAR T 细胞输入体内 2 周后,患者外周血淋巴细胞和中性粒细胞数量增多,且大多数的 T 淋巴细胞表达 CD19 嵌合抗原受体, CAR T 细胞数量增长至输入时的 1000 倍以上,在骨髓中也可检测到 CAR T 细胞,这与 CLL 患者治疗的报道相一致。在 ALL 患者体内, CAR T 细胞增殖活跃,可影响 B 细胞发育,具有明显的抗肿瘤作用。Brentjens 等^[20]发现,患者脑脊液中也有高水平的 CAR T 细胞,可以维持 6 个月以上,这在前期的 CLL 治疗中未见相关报

道。这些患者治疗前后,脑脊液检查均未发现中枢神经系统白血病(CNSL),而应用 CAR T 细胞治疗后第 23 天脑脊液中检测到淋巴细胞,且大部分为 CAR T 细胞,可能是外周血中 CAR T 细胞迁移至脑脊液。因此 CAR T 细胞有可能为治疗 CNSL 和原发性中枢神经系统白血病提供新的监测方法,用于避免 CNSL 复发。已经有报道证实患者经过 CAR T 细胞治疗后很快达到完全缓解,其中 1 例患者无需应用化疗药物就达到 6 个月以上的完全缓解,对于 ALL 的治疗,有可能无需联合化学药物即可达到临床缓解的治疗效果。1 例患者缓解 2 个月后再度复发。检查发现,体内出现的白血病细胞不表达 CD19,推测是由于 CAR T 细胞治疗后体内的白血病细胞发生了克隆演化,出现新的白血病细胞克隆。我们近年对造血系统恶性肿瘤的克隆演化有所报告^[21],慢性粒细胞白血病应用格列卫治疗后^[22],原发性血小板增多症的细胞演化^[23]都涉及肿瘤细胞发生克隆演化的特征。对于这些治疗后发生克隆演化而失去 CD19 抗原的 B 系白血病细胞,需要寻找其他分子靶点来治疗。

应用 CAR T 细胞靶向特异性治疗 CD19 阳性的 CLL 和 ALL 患者,已经在临床上取得显著的实验治疗效果,有望很快得到广泛的应用。CAR T 细胞治疗技术有望避免化疗所造成的高死亡率和长期住院治疗的风险,为白血病的治疗开辟新路径。

参 考 文 献

- Gökbuğut N, Stanze D, Beck J, *et al.* Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. *Blood*, 2012; 120(10): 2032-2041.
- Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs*, 2003; 63(8): 803-43.
- Morgan RA, Yang JC, Kitano M, *et al.* Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*, 2010; 18(4): 843-851.
- Jena B, Dotti G, Cooper L. Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 2010; 116(7): 1035-1044.
- Scholler J, Brady TL, Binder-scholl G, *et al.* Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci Transl Med*, 2012; 4(132): 132ra53.
- Brentjens RJ, Latouche JB, Santos E, *et al.* Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med*, 2003; 9(3): 279-

- 286.
- 7 Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, *et al.* Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin Cancer Res*, 2007; 13(18): 5426–5435.
 - 8 June CH, Blazar BR, Riley JL. Engineering lymphocyte subsets: tools, trials and tribulations. *Nat Rev Immunol*, 2009; 9(10): 704–716.
 - 9 Milone MC, Fish JD, Carpenito C, *et al.* Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased anti leukemic efficacy in vivo. *Mol Ther*, 2009; 17(8): 1453–1464.
 - 10 Porter DL, Levine BL, Kalos M, *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 2011; 365(8): 725–33.
 - 11 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. *Sci Transl Med*, 2011; 3(95): 95 ra73.
 - 12 刘倩, 朱平. EB病毒相关淋巴细胞增殖病与细胞因子风暴. *中国实验血液学杂志*, 2013; 21(2): 498–502.
 - 13 Janka G. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Annu rev Med*, 2012; 63(1): 233–246.
 - 14 Kohn DB, Dotti G, Brentjens R, *et al.* CARs on track in the clinic. *Mol Ther*, 2011; 19(3): 432–438.
 - 15 Bassan R, Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 2011; 29(5): 532–543.
 - 16 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. *PLoS One*, 2013; 8(4): e61338.
 - 17 Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, *et al.* CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*, 2013; 5(177): 177ra38.
 - 18 Davila M, Bouhassira DG, Park J, *et al.* Chimeric antigen receptors for the adoptive T cell therapy of hematologic malignancies. *Int J Hematol*, 2014; 99(4): 361–371.
 - 19 Grupp SA, Kalos M, Barrett D, *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 2013; 368(16): 1509–1518.
 - 20 Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, *et al.* Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*, 2011; 118(18): 4817–4828.
 - 21 陈雪, 王谷云, 邢海洲, 等. 骨髓增殖性疾病转化为急性髓系白血病后细胞免疫表型的变化. *中国实验血液学杂志*, 2012; 20(003): 636–641.
 - 22 朱平. 慢性髓细胞白血病 BCR/ABL 突变克隆演化和治疗策略. *中华检验医学杂志*, 2012; 35(1): 2–5.
 - 23 Liu X, Hou Y, Song L, *et al.* Single-Cell Exome Sequencing and Monoclonal Evolution of a JAK2-Negative Myeloproliferative Neoplasm. *Cell*, 2012; 148(5): 873–885.