

嵌合抗原受体T细胞治疗儿童急性B淋巴细胞白血病异基因造血干细胞移植后复发一例报告并文献复习

左英熹 王静波 陆爱东 贾月萍 吴珺 董陆佳 张隆基 张乐萍

【摘要】 目的 探讨嵌合抗原受体(CAR)T细胞技术治疗儿童急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)的临床疗效和不良反应。方法 报道1例CAR-T细胞治疗儿童B-ALL异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后复发患者,并复习相关文献。结果 1例伴TEL-AML1融合基因阳性11岁B-ALL患儿,规律化疗后早期复发,于第2次完全缓解(CR)期给予allo-HSCT。治疗后骨髓微小残留病(MRD)反复阳性,化疗以及供者淋巴细胞输注(DLI)治疗无明显疗效,故给予供者来源的抗CD19的CAR-T细胞输注。该患儿经输注CAR-T细胞 $1 \times 10^6/\text{kg}$ 后骨髓MRD转阴,后又反复输注3次CAR-T细胞 $[(0.83 \sim 1.65) \times 10^6/\text{kg}]$,患儿持续无病生存达10个月,随后输注CAR-T细胞2次,监测外周血TEL-AML1融合基因拷贝持续升高,最终骨髓复发,因脑出血死亡。输注CAR-T细胞的主要不良反应为细胞因子释放综合征。结论 抗CD19的CAR-T细胞技术治疗复发B-ALL安全有效,为复发及难治性B-ALL患儿提供了新的治疗手段。

【关键词】 嵌合抗原受体; 白血病,淋巴样; 复发; 儿童

Chimeric antigen receptors T cells in treatment of a relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia, relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: case report and review of literature review Zuo Yingxi*, Wang Jingbo, Lu Aidong, Jia Yueping, Wu Jun, Dong Lujia, Chang Lungji, Zhang Leping*. Pediatrics Department, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China
Corresponding author: Zhang Leping, Email:zhangleping@pkuph.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the safety and efficacy of chimeric antigen receptors T cells (CAR-T) in childhood acute B lymphoblastic leukemia (B-ALL). **Methods** A relapsed B-ALL child after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) was treated with CAR-T, and the related literatures were reviewed. **Result** An 11-year-old girl with TEL-AML1 fusion gene positive B-ALL who suffered a bone marrow relapse 28 months after remission from conventional chemotherapy. During the second remission, the patient received haploidentical allo-HSCT. She relapsed with detectable TEL-AML1 fusion gene even after chemotherapy and donor leukocyte infusions. She received an experimental donor-derived fourth generation CD19 CAR-T therapy. After infusion of $1 \times 10^6/\text{kg}$ CAR-T cells, she experienced only mild or moderate cytokine-release syndrome and the minimal residual disease turned negative. Then three maintenance of CAR-T cell infusions $[(0.83 \sim 1.65) \times 10^6/\text{kg}]$ was administered, and the disease-free survival had lasted for 10 months. However, the TEL-AML1 copies in her blood still increased and she died with leukemia relapse after additional CAR-T cell infusion. **Conclusion** Treatment of relapsed B-ALL with the fourth generation CAR-T cells directed against CD19 was effective and safe. CAR-T therapy is a novel therapeutic approach that could be useful for patients with relapsed and refractory B-ALL who have failed all other treatment options.

【Key words】 Chimeric antigen receptors; Leukemia, lymphoid; Relapse; Pediatric

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.02.006

作者单位:100044 北京大学人民医院儿科(左英熹、陆爱东、贾月萍、吴珺、张乐萍);航天中心医院血液科(王静波);北京美康优娃免疫医学实验室(董陆佳);美国佛罗里达大学医学院分子生物学和微生物学实验室(张隆基)

通信作者:张乐萍,Email:zhangleping@pkuph.edu.cn

急性淋巴细胞白血病(ALL)是儿童时期最常见的恶性血液系统疾病。随着化疗药物及方案的改进,儿童ALL的长期无病生存率已超过85%,但仍有10%~15%的ALL患儿表现为难治或复发,并成为儿童ALL死亡的主要原因之一^[1]。针对复发及难治性白血病的免疫治疗是近年来研究的热点。嵌合抗原受体(chimeric antigen receptors, CAR)T细胞因为具有不依赖于主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)的特异性杀伤肿瘤细胞的特点受到了广泛关注,并初步应用于临床,取得了较好的疗效。

病例资料

患儿,女,11岁。2010年12月15日以“间断发热10余天,骶尾部及颈部疼痛10d”起病,于当地医院就诊,当时查体:肝肋缘下3cm,脾肋缘下4cm;血常规:WBC $8.89 \times 10^9/L$, HGB 109 g/L, PLT $69 \times 10^9/L$;骨髓象:原幼淋巴细胞0.895,符合ALL-L₂;免疫分型:B淋系表达;染色体核型:46,XX;融合基因TEL-AML1阳性。确诊为B-ALL。按CCLG-ALL2008方案^[2]进行化疗,泼尼松反应敏感,但第15天骨髓象显示原幼淋巴细胞占0.315,故调整至中危组规律化疗27个月,期间骨髓持续完全缓解(CR),但监测TEL-AML1融合基因持续阳性。维持化疗结束后1个月患儿出现骨痛伴发热,血常规示轻度贫血,骨髓象:幼稚淋巴细胞占0.580,提示复发;免疫分型:符合普通型B-ALL表型,表达CD10、CD19、TdT、cCD79a、HLA-DR、CD58、CD22、CD13、CD123;TEL-AML1融合基因阳性,染色体核型:46,XX, del(9)(q32), add(11)(q23), add(15)(q26)[1]/47,XX,+1[1]/50,XX,+4mar[1]/46,XX[7]。给予环磷酰胺、去甲氧柔红霉素、培门冬酶、大剂量甲氨蝶呤、长春新碱等联合化疗,并应用实时定量聚合酶链反应(RQ-PCR)监测微小残留病(MRD)。化疗2个月时骨髓达CR,TEL-AML1融合基因水平降至0.014%,行亲缘半相异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)(父供女,HLA3/6相合)治疗。移植后5个月时TEL-AML1融合基因水平升高至0.340%,先后给予大剂量阿糖胞苷及培门冬酶、大剂量甲氨蝶呤化疗及供者淋巴细胞(DLI)回输治疗后TEL-AML1融合基因转阴性,但患儿出现丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、转肽酶持续明显升高,伴双肺真菌感染及中-重度营养不良。移植后13个月患儿TEL-

AML1融合基因再次阳性,且基因水平由0.0095%升高至0.170%,骨髓嵌合状态仍为完全供者型。故采集供者外周血T淋巴细胞,通过慢病毒载体将CAR结构片段(anti-CD19 scFv/CD28/CD137/CD27/ ζ -iCasp9)转染进入T细胞,并进行体外扩增。患儿经去甲氧柔红霉素及环磷酰胺预处理后,输注抗CD19的CAR-T细胞 $1 \times 10^6/kg$ 。输注后第5~9天出现间断发热、轻度低血压、散在充血性皮疹等表现,予多巴胺、多乙酰氨基酚及抗过敏治疗后好转。输注后第14天及第37天复查骨髓TEL-AML1均阴性,流式细胞术检测提示骨髓中未见CD19阳性B淋巴细胞。输注后第63天骨髓流式细胞术检测发现0.002%细胞表型异常,TEL-AML1融合基因再次阳性,水平达0.110%。于第84、132、203天又予输注供者来源抗CD19 CAR-T细胞3次,每次输注细胞 $(0.83 \sim 1.65) \times 10^6/kg$,患儿骨髓持续CR,TEL-AML1持续阴性。移植后20个月患儿骨髓TEL-AML1融合基因再次升高至0.180%,骨髓流式细胞术检测提示微量细胞($< 0.004\%$)表型异常,且仍为CD19阳性表达。于第1次输注后第265天及第321天再次分别输注供者来源抗CD19 CAR-T细胞 $3.39 \times 10^6/kg$ 和 $3.47 \times 10^6/kg$,但患儿外周血TEL-AML1基因仍进行性增高。至移植后26个月患儿骨髓复发死亡。

讨论及文献复习

一般情况下,机体的免疫系统对肿瘤细胞有着重要的免疫监视和杀伤作用,其中主要的效应细胞是CD8阳性的细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic t-lymphocytes, CTL)。CTL的活化要求CD8分子特异性识别自身HLA-I分子,而肿瘤细胞的HLA-I分子表达通常是下调的,这是肿瘤免疫逃逸的重要机制之一。allo-HSCT主要是通过供受者之间MHC和次要组织相容性抗原系统(minor histocompatibility antigen, mH)的不相合介导供者细胞识别杀伤受者细胞,即移植抗白血病(graft versus leukemia, GVL)作用。本例B-ALL患儿经allo-HSCT后仍然出现复发,而且allo-HSCT后化疗以及DLI未能达到理想效果,提示通过MHC/mH机制的GVL作用已经耐受。而CAR-T细胞能够以非MHC限制的模式直接识别肿瘤相关抗原或者肿瘤特异性抗原,介导细胞表型特异性杀伤作用。

CAR的结构一般是由胞外单链可变区(single chain variable fragment, scFv)、铰链、跨膜区以及胞

内信号传导域四部分组成^[3]。scFv将针对肿瘤抗原特异性抗体的抗原识别区的重链和轻链通过一个多肽序列连接起来,能够以非MHC限制的模式直接识别肿瘤相关抗原或者肿瘤特异性抗原,并通过胞内信号域传导信号、活化效应T细胞。铰链区通常来源于CD8或IgG分子,起到连接scFv与跨膜区的作用,可影响scFv的灵活性,从而影响其与肿瘤相关抗原之间的相互作用。跨膜区可来源于同一分子或为1型跨膜蛋白,如CD4、CD8或CD28。胞内信号域通常来自T细胞受体的信号CD3的 ζ 链或免疫球蛋白Fc受体的 γ 链。通过基因工程技术将这四部分拼接后,可通过逆转录病毒或慢病毒载体、转座子或转座酶系统或电穿孔方法转染到T细胞,从而使T细胞成为具有特异性识别抗原特异性的CAR-T细胞,在细胞因子刺激下经体外扩增后再过继输注给患者。

为了扩大 ζ 链的信号转导作用,促进CAR-T细胞在体内的持续扩增,研究者们又在胞内信号域加入了CD27、CD28、CD134、4-1BB、ICOS等共刺激分子。根据胞内信号域中是否包含共刺激分子以及共刺激分子的数量,CAR被人为分为第一代、第二代及第三代^[3-4]。第一代CAR-T细胞由于缺乏扩增活性,输注后几乎未显示出抗肿瘤的活性。目前广泛应用于临床试验的大多为第二代及第三代CAR。

CAR-T细胞的特异性主要依赖于scFv所针对的肿瘤抗原。CAR的设计中应尽可能选择在肿瘤细胞表面广泛表达而在正常细胞表面不表达或少表达的抗原,同时考虑其靶向杀伤正常细胞后可能出现的不良反应在可接受的程度^[5]。科学家们针对B细胞肿瘤设计出了以CD19、CD20、CD22等为标靶的多种CAR,并开展临床试验。其中针对CD19的CAR应用最为广泛,病例数最多,疗效也最为可靠。近年来,对于急性髓系白血病的CAR-T细胞治疗也开始起步,如CD33、CD123等抗原也开始了临床及临床前试验^[6-8]。

CD19广泛表达于正常B细胞及大多数B细胞肿瘤,包括慢性淋巴细胞白血病、B细胞非霍奇金淋巴瘤及B-ALL。在这类B细胞恶性肿瘤的治疗中,CD19 CAR-T细胞显示了明显的抗肿瘤活性。

2013年Brentjens等^[9]首次报道了应用CD19 CAR-T细胞治疗5例复发成人B-ALL患者,均获得了CR,MRD转阴性。同年,Grupp等^[10]首次报道应用CD19 CAR-T细胞(CTL019细胞)治疗2例经allo-HSCT治疗后复发及难治性前B-ALL患儿,初

步证实了CAR-T细胞治疗儿童B-ALL的安全性及有效性。2例患儿分别输注 $1.2 \times 10^7/\text{kg}$ 及 $1.4 \times 10^6/\text{kg}$ 的CTL019细胞,输注后CTL019细胞均在患儿体内扩增超过1000倍,并可在骨髓及脑脊液中检测到。输注后1个月内外周血及骨髓CD19阳性细胞均被清除,均获得骨髓形态学CR,MRD低于0.01%,其中1例持续基因水平缓解达9个月。2014年Maude等^[11]将病例数扩大至30例,其中儿童25例,包括18例allo-HSCT后复发的B-ALL患者,进一步证实了CAR-T细胞治疗的良好疗效。该临床试验结果显示,应用CD19 CAR-T细胞治疗复发及难治性B-ALL的CR率高达90%,在外周血、骨髓及脑脊液中均可发现CTL019细胞的扩增。从长期疗效看,6个月的无事件生存(EFS)率达67%,总生存(OS)率达78%。

上述研究中,在脑脊液中发现了CAR-T细胞显著扩增的事实引导着研究人员探索CAR-T细胞治疗中枢神经系统白血病(CNSL)的可能。Grupp等^[10]报道2例CNSL患儿经CAR-T治疗后持续6个月无CNSL复发,但因病例数较少,确切的结论仍需进一步的临床研究证实。

尽管诸多临床试验已经证实了CAR-T细胞治疗的安全性及有效性,但经CAR-T细胞治疗后仍可能出现复发。其原因可能包括CAR-T细胞在部分患者体内的持续时间较短,以及肿瘤抗原表达逃逸变异等^[11]。为了解决CAR-T细胞治疗后复发的的问题,研究者们尝试增加共刺激分子的数量以延长CAR-T细胞在体内的持续时间,即第三代CAR-T细胞^[10];另一方面,为解决抗原变异的问题,科学家们也提出一些设想,如同时输注针对 ≥ 2 种特异性抗原的CAR-T细胞,设计同时表达 ≥ 2 种CAR结构的引物,或在单个CAR结构上同时包含 ≥ 2 个抗原结合区域等^[4,12]。

本例患儿经CAR-T细胞治疗后骨髓MRD得到有效清除,但其效应持续时间仅2个月左右,故每隔2个月反复输注CAR-T细胞,使该患儿的无病生存期达到10个月。但是最后两次输注CAR-T细胞却未达到清除MRD的效应,复发时流式细胞术检测患儿体内肿瘤细胞仍表达CD19。推测该例患儿复发的原因,一方面与个别患者CAR-T细胞的效应持续时间短有关,或是患者已产生排斥CAR的反应,另一方面,复发时肿瘤仍然表达CD19抗原,也可能是该例ALL患儿具有非CD19阳性的ALL干细胞存在而无法完全清除恶性细胞,或者CD19分子可

能发生了结构变异,不易被CD19单抗所识别,从而逃避了CAR-T细胞的免疫攻击。其具体原因仍需进一步研究。

从已开展的临床试验结果中,CAR-T细胞技术展现了很好的疗效,具有广阔的应用前景。但仍需扩大临床试验数据以进一步验证其长期的安全性及有效性,并探索针对其他肿瘤相关抗原的CAR-T细胞治疗手段。在临床实践中,可将CAR-T细胞治疗应用于复发后患儿清除MRD,为行HSCT治疗赢得时机。但是目前CAR-T细胞治疗的效应难以持久的问题仍待克服,可能受患儿疾病状态、基因类型等多种因素的影响。CAR-T技术目前明确可以作为移植前的缓解工具,提供了化疗以外的另一治疗手段,但是否能够使B-ALL患者获得长期无病生存尚需更多的病例追踪以及对CAR技术进行优化。

参考文献

- [1] Park KD. How do we prepare ourselves for a new paradigm of medicine to advance the treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia? [J]. Blood Res, 2014, 49(1):3-4. doi: 10.5045/br.2014.49.1.3.
- [2] 陈波, 宪莹, 苏庸春, 等. CCLG-ALL 08 方案治疗儿童急性淋巴细胞白血病病毒副作用的临床研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(9):737-742. doi:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.09.007.
- [3] Gill S, June CH. Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies [J]. Immunol Rev, 2015, 263(1):68-89. doi: 10.1111/imr.12243.
- [4] Jensen MC, Riddell SR. Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells [J]. Immunol Rev, 2014, 257(1):127-144. doi: 10.1111/imr.12139.
- [5] Lee DW, Barrett DM, Mackall C, et al. The future is now: chimeric antigen receptors as new targeted therapies for childhood cancer [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(10):2780-2790. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1920.
- [6] Kenderian SS, Ruella M, Shestova O, et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia [J]. Leukemia, 2015, 29(8):1637-1647. doi: 10.1038/leu.2015.52.
- [7] Wang QS, Wang Y, Lv HY, et al. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia [J]. Mol Ther, 2015, 23(1):184-191. doi: 10.1038/mt.2014.164.
- [8] Tettamanti S, Biondi A, Biagi E, et al. CD123 AML targeting by chimeric antigen receptors: A novel magic bullet for AML therapeutics? [J]. Oncoimmunology, 2014, 3:e28835.
- [9] Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia [J]. Sci Transl Med, 2013, 5(177):177ra38. doi: 10.1126/scitranslmed.3005930.
- [10] Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia [J]. New Engl J Med, 2013, 368(16):1509-1518. doi: 10.1056/NEJMoa1215134.
- [11] Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia [J]. New Engl J Med, 2014, 371(16):1507-1517. doi: 10.1056/NEJMoa1407222.
- [12] Grada Z, Hegde M, Byrd T, et al. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2013, 2:e105. doi: 10.1038/mtna.2013.32.

(收稿日期:2015-06-29)

(本文编辑:王叶青)

·消息·

第五届全国血液肿瘤学术大会暨2016年金陵淋巴瘤论坛征文及会议通知

由中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会主办,中国医学科学院血液学研究所血液病医院、江苏省抗癌协会和江苏省人民医院共同协办的“第五届全国血液肿瘤学术大会暨2016年金陵淋巴瘤论坛”定于2016年5月20日至22日在江苏省南京市召开。会议由江苏省抗癌协会和江苏省人民医院承办。本次论坛采取特邀报告、大会发言和讨论的形式进行,将就血液肿瘤基础研究和临床诊治的进展、热点问题和发展趋势进行广泛交流。

——征文内容及要求:有关淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓系肿瘤和淋巴细胞白血病的诊治及其血液肿瘤的基础研究与综合血液病理诊断等。凡未在全国性公开刊物上发表的论文均可投稿。征文要求600字左右摘要1份,按标题、姓名、作者单位、联系方式(通信地址、电话、电子邮箱)、目的、方法、结果、结论撰写,请不要附图表,不接受综述性文章投稿。投稿请采用Word文档格式、中文撰写,Email:zgkxhxyzl@126.com。截稿日期为2016年4月10日。

会议将组织专家对投稿论文进行评审,推选优秀论文进行会议演讲;会议期间将组织专家从演讲者中评选出一等奖1名、二等奖3名、三等奖5名,获奖者将予以奖励。与会者可获得国家级医学继续教育I类学分10分。欢迎踊跃投稿并莅临参会。

会议注册费:1500元/人;学生1000元/人。

联系人及联系方式:徐卫、范磊,电话:025-68302182

中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会