

急性B淋巴细胞白血病 自体CD19 CAR-T制备中CD19 CAR 转入体系残留白血病细胞的体外研究

刘美静 穆娟 袁婷 崔蕊 孟娟霞 江嫣雨 李玉明 邓琦

天津医科大学一中心临床学院,天津市第一中心医院血液科 300192

通信作者:邓琦,Email:kachydeng@126.com

【摘要】 目的 分析复发/难治性急性B淋巴细胞白血病(R/R B-ALL)自体CD19嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)制备过程中,培养体系中残留白血病细胞导致CD19 CAR转入白血病细胞的特征和体外杀伤研究。方法 ①收集30例接受CD19 CAR-T细胞治疗的R/R B-ALL患者及6例健康志愿者外周血单个核细胞(PBMC);②流式细胞术分析R/R B-ALL患者PBMC经CD3磁珠分选后及体外培养过程中体系白血病细胞残留情况;③患者及健康志愿者PBMC CD3⁺T细胞转染CD19 CAR及CD22 CAR慢病毒,制备CD19 CAR-T、CD22 CAR-T细胞;④复苏Nalm-6细胞株,CD19 CAR慢病毒转染Nalm-6细胞,制备CD19 CAR-Nalm-6细胞,同时转染患者原代ALL细胞;⑤流式细胞术检测转染率;⑥CCK-8法检测细胞增殖;⑦乳酸脱氢酶(LDH)法检测CD19 CAR-T、CD22 CAR-T细胞对Nalm-6细胞及CD19 CAR-Nalm-6细胞杀伤活性。结果 ①30例接受CD19 CAR-T细胞治疗的R/R B-ALL患者中,2例CD3⁺T细胞中发现3.32%、2.04%的白血病细胞残留,随体外培养时间延长,在培养第4天,白血病细胞完全消失。②体外培养中CD19 CAR-Nalm-6细胞增殖率高于Nalm-6细胞。③效靶比为1:1且共培养24、48、72 h,CD19 CAR-T细胞对Nalm-6细胞的杀伤活性高于CD19 CAR-Nalm-6细胞;与CD19 CAR-T细胞相比,CD22 CAR-T细胞对CD19 CAR-Nalm-6细胞的杀伤活性更高。④相同效靶比情况,单独应用CD22 CAR-T细胞对CD19 CAR-Nalm-6细胞的杀伤活性高于CD19 CAR-T联合CD22 CAR-T细胞。结论 CD19 CAR-T细胞制备过程中培养体系残留白血病细胞可能会导致CD19 CAR被引入白血病细胞中而导致CD19 CAR-T细胞治疗失败,在细胞制备过程中需要检测培养体系中白血病细胞的残留情况。CD22 CAR-T细胞治疗可作为上述情况的挽救治疗措施之一。

【关键词】 急性B淋巴细胞白血病; 嵌合抗原受体T细胞; 转染; 杀伤活性

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.02.009

In vitro studies on the transfer of CAR into leukemia cells due to their residue in the autologous CAR-T cell preparation system for acute B-cell acute lymphoblastic leukemia

Liu Meijing, Mu Juan, Yuan Ting, Cui Rui, Meng Juanxia, Jiang Yanyu, Li Yuming, Deng Qi

The First Central Clinical College of Tianjin Medical University, Department of Hematology, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Deng Qi, Email: kachydeng@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the characteristics and cytotoxicity in vitro of the residual leukemia cells in the culture system that caused the accidental transfer of CD19 chimeric antigen receptor (CAR) into leukemia cells during the preparation of autologous CD19 CAR-T cells of relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Methods** ① Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 30 patients with relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic anemia (R/R B-ALL) who accepted CD19 CAR-T cell therapy and six healthy volunteers were collected. ② The residual leukemia cells were analyzed by flow cytometry in the system after the PBMCs of R/R B-ALL patients were sorted by CD3 magnetic beads. ③ CD3⁺T cells from patients and healthy volunteers were transfected with CD19 CAR and CD22 CAR lentivirus to prepare CD19 CAR-T and CD22 CAR-T cells. ④ The Nalm-6 cell line was resuscitated and the Nalm-6 cells with CD19 CAR lentivirus were transfected to prepare CD19 CAR-Nalm-6 cells. The patient's primary ALL cells were transfected with CD19 CAR lentivirus at the same time. ⑤ The

transfection rates were analyzed by flow cytometer, the cell proliferation was analyzed by the CCK-8 method, and the cell-killing activities were detected by the lactate dehydrogenase method. **Results** ① Among the 30 R/R B-ALL patients who received CD19 CAR-T cell therapy, two patients had 2.04% and 3.32% residual leukemia cells in CD3⁺ T cells. After 4 days in culture, the residual leukemia cells disappeared and could not be detected by a flow cytometer with prolonged cultivation in vitro. ② The proliferation of CD19 CAR-Nalm-6 cells was higher than that of the Nalm-6 cells. ③ The killing activity of the CD19 CAR-T cells on Nalm-6 cells was higher than that of the CD19 CAR-Nalm6 cells at a target ratio of 1:1 on 24, 48, 72 h, respectively. The cytotoxicity of CD22 CAR-T cells on CD19 CAR-Nalm-6 cells was significantly higher than that of CD19 CAR-T cells. ④ The cytotoxicity of CD22 CAR-T alone on CD19 CAR-Nalm-6 cells was higher than that of CD19 CAR-T combined with CD22 CAR-T at the same target ratio. **Conclusion** The residual leukemia cells in the culture system in the preparation of CD19 CAR-T cells may lead to the introduction of CD19 CAR into leukemia cells and results in the failure of the CD19 CAR-T cell therapy. Detecting the residual leukemia cells in the culture system via flow cytometry before transfection with CD19 CAR lentivirus is needed. Thus, CD22 CAR-T cell therapy could be used as one of the salvage treatments.

【Key words】 Leukemia, B cells, acute; Chimeric antigen receptor T cell; Transfection; Cytotoxicity

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.02.009

成人急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)是最常见的成人急性白血病之一,预后较差^[1-2]。采用抗CD19嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)治疗复发/难治性(R/R)B-ALL可获得70%~90%的应答率^[3-4]。但很多患者仍面临疾病复发,B淋巴细胞表面CD19表达丢失或降低是CD19 CAR-T治疗失败或缓解后复发的重要因素,其机制尚不明确,可能受多种因素影响^[5-7]。我们前期观察到1例难治性B-ALL患者经自体CD19 CAR-T细胞治疗缓解后14 d复发,其外周血CD19 CAR-T细胞消失的同时CD19 CAR的DNA异常增高,发现其CD19 CAR误转染入白血病细胞,予自体CD22 CAR-T细胞治疗达到完全缓解^[8]。本研究我们应用流式细胞术检测R/R B-ALL患者自体CAR-T制备过程中外周血单个核细胞(PBMC)中白血病细胞的残留情况,并体外研究CD19 CAR-T、CD22 CAR-T细胞对CD19 CAR-Nalm-6细胞的杀伤活性,探讨CD22 CAR-T细胞是否可作为CD19 CAR误转染入白血病细胞的一个挽救治疗措施。

材料与方 法

1. 细胞及主要试剂:Nalm-6细胞株购自美国模式培养物集存库(ATCC),无内毒素质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;Lenti-Pac慢病毒颗粒包装试剂盒购自上海伯易生物科技有限公司;CD3磁珠分选试剂盒购自德国美天旎生物科技有限公司;CARTEST-19购自上海近岸科技有限公司;CARTEST-22检测试剂盒购自美国Acro公司;LDH细胞毒性检测试剂盒、ELISA检测试剂盒购自

上海碧云天生物技术有限公司;CCK-8细胞增殖-毒性检测试剂盒购自日本同仁化学研究所;第二代CD19质粒和CD22质粒购自美国Creative Biolabs公司。

2. 入组临床试验的患者情况:选择30例2018年11月至2020年6月期间于天津市第一中心医院血液科,入组“人源化CD19 CAR-T治疗复发/难治B细胞淋巴瘤/急性B淋巴细胞白血病”临床试验(ChiCTR1800019622)的R/R B-ALL患者,采集患者PBMC进行本研究,患者入组时骨髓白血病细胞比例均高于20%。

3. CAR-T细胞制备及慢病毒转染:淋巴细胞分离液提取30例患者及6例健康志愿者(本中心实验室人员)PBMC,CD3磁珠分选富集CD3⁺T细胞。获得的细胞用含有IL-2、谷氨酰胺的T细胞专用培养基培养。每天采用流式细胞术检测30例患者CD3⁺T细胞体系中CD19⁺白血病细胞残留至培养第4天,转染CD19 CAR慢病毒;健康志愿者组培养第4天接种转染CD19 CAR和CD22 CAR慢病毒;Nalm-6细胞培养至对数生长期,转染CD19 CAR慢病毒;上述细胞培养第12天收获。30例患者入组时液氮冻存的骨髓标本经淋巴细胞分离液获得单个核细胞,检测CD19⁺细胞比例,作为原代CD19⁺ALL细胞,转染CD19 CAR。

4. 转染效率及细胞免疫表型的检测:按CART-EST-19和CARTEST-22检测试剂盒说明书进行操作,流式细胞术检测CD19 CAR-T、CD22 CAR-T、CD19 CAR-Nalm-6及CAR19 CAR-ALL细胞的CD19 CAR转染率;流式细胞术检测培养体系中

CD19 CAR-T、CD19 CAR-Nalm-6 细胞及 CD19 CAR-ALL 细胞免疫表型变化。设 3 个复孔,实验重复 5 次,每组、每个时间点样本量等于总体样本量。

5. 共聚焦显像技术检测 CD19 CAR-T 细胞与 Nalm-6 细胞及 CD19 CAR-Nalm-6 细胞间的作用: CD3⁺T 细胞及 Nalm-6 细胞在 CD19 CAR 转染后, Nalm-6 细胞与 CD19 CAR-Nalm-6 细胞共培养, CD19 CAR-Nalm-6 细胞采用 PE 抗体标记 CD19 CAR,呈红光;Nalm-6 细胞采用 FITC 抗体标记,呈现绿光;CD19 表达位点被占据则呈现黄色光。采用共聚焦显像技术观察 CD19 CAR-T 细胞与 Nalm-6 细胞和 CD19 CAR-Nalm-6 细胞作用情况。

6. CD19 CAR-T 细胞及 CD19 CAR-Nalm-6 细胞体外增殖能力的检测:转染 CD19 CAR 后,在培养第 12 天,按 CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒说明书,于培养第 4、7、12 天采用酶标仪检测 450 nm 处吸光度(A)值,计算 CD19 CAR-T 细胞及 CD19 CAR-Nalm-6 细胞增殖能力。

7. 体外杀伤活性的检测:CD19 CAR-T 和 CD22 CAR-T 细胞培养第 12 天收获作为效应细胞,CD19 CAR-Nalm-6 细胞和 Nalm-6 细胞为靶细胞,效靶比 1:1。按 LDH 细胞毒性检测试剂盒说明书,检测 490 nm 处 A 值,计算其杀伤率。每组设 3 复孔,实验重复 3 次。

$$\text{杀伤率}(\%) = \frac{A_{\text{效应细胞自发释放}} - A_{\text{靶细胞自发释放}}}{A_{\text{效应细胞最大释放}} - A_{\text{靶细胞自发释放}}} \times 100\%$$

8. 统计学处理:实验数据均采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,数据表示为平均数±标准差,组间比较采用独立样本的 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,不同时间点的比较采用重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CD19⁺肿瘤细胞残留:30 例患者入组时外周血和骨髓白血病细胞比例及基本特征见表 1。2 例 R/R B-ALL 患者(例 2、例 4)PBMC 经 CD3 磁珠分选后 CD3⁺T 细胞中可检测到白血病细胞。体外培养第 1 天,2 例患者 CD3⁺T 细胞中检测到 3.32% 和 2.04% 的 CD19⁺白血病细胞;体外培养第 2 天,2 例患者 CD3⁺T 细胞中检测到 1.11% 和 0.65% 的 CD19⁺白血病细胞;体外培养第 3 天,仅例 2 CD3⁺T 细胞中检测到 0.40% 的 CD19⁺白血病细胞;培养第 4 天,2 例患者 CD3⁺T 细胞中均未检测到 CD19⁺白血病细胞。

2. CAR-T 的转染效率:CD19 CAR-T 细胞转染率为 $(72.3 \pm 6.0)\%$, CD22 CAR-T 细胞转染率为 $(57.2 \pm 4.2)\%$, CD19 CAR-Nalm-6 细胞转染率为 $(46.5 \pm 3.8)\%$ 。

3. 原代 B-ALL 细胞转染 CD19 CAR 的转染率及免疫表型:30 例 B-ALL 患者原代白血病细胞经 CD19 CAR 慢病毒转染后,5 例(16.67%)培养体系检测到 CD19⁺CD10⁺CD22⁺细胞,其 CD19 CAR 转染率为 $(7.50 \pm 1.67)\%$,CD19 表达阳性。

4. 共聚焦显像技术观察细胞 CD19 位点表达:共聚焦显像技术提示 CD19 CAR-Nalm-6 的 CD19 CAR 占据了 Nalm-6 细胞(蓝色箭头示)与 CD19 CAR-Nalm-6 细胞自身的 CD19 表达位点(白色箭头示),导致流式细胞术无法检出细胞 CD19 表达(图 1)。

5. Nalm-6 和 CD19 CAR-Nalm-6 细胞的体外增殖:Nalm-6 细胞培养第 0、4、7、14 天增殖率分别为 $(6.51 \pm 1.70)\%$ 、 $(15.82 \pm 2.02)\%$ 、 $(30.8 \pm 3.19)\%$ 、 $(202.5 \pm 15.13)\%$, CD19 CAR-Nalm-6 细胞培养第 0、4、7、14 天增殖率分别为 $(6.55 \pm 1.93)\%$ 、 $(15.46 \pm 2.69)\%$ 、 $(60.16 \pm 5.72)\%$ 、 $(302.51 \pm 25.90)\%$, CD19 CAR-Nalm-6 细胞较 Nalm-6 细胞增殖迅速。

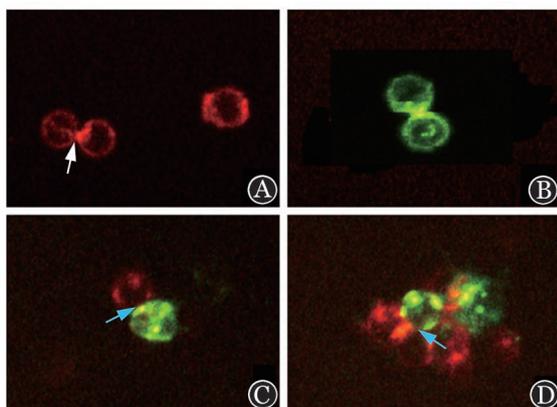
6. CAR-T 细胞对 Nalm-6、CD19 CAR-Nalm-6 细胞的体外杀伤活性比较:CD19 CAR-T 和 CD22 CAR-T 细胞单独作用的杀伤活性:在 24、48 和 72 h 时,CD19 CAR-T 细胞对 Nalm-6 细胞的杀伤活性高于 CD22 CAR-T 细胞,CD22 CAR-T 细胞对 CD19 CAR-Nalm-6 细胞的杀伤活性高于 CD19 CAR-T 细胞,CD19 CAR-T 细胞对 Nalm-6 细胞杀伤活性明显高于 CD19 CAR-Nalm-6 细胞,CD22 CAR-T 细胞对 Nalm-6 及 CD19 CAR-Nalm-6 细胞的杀伤活性差异无统计学意义(表 2)。CD19 CAR-T 和 CD22 CAR-T 细胞联合作用的杀伤活性:培养 24、48、72 h 时,CD19 CAR-T 细胞联合 CD22 CAR-T 细胞对 Nalm-6 细胞的杀伤活性不高于 CD19 CAR-T 细胞单独应用,而高于 CD22 CAR-T 细胞单独应用(表 2)。CD19 CAR-T 联合 CD22 CAR-T 细胞对 CD19 CAR-Nalm-6 细胞的杀伤活性,低于 CD22 CAR-T 单独应用,但高于 CD19 CAR-T 细胞单独应用(表 2)。

讨 论

CAR-T 治疗是近 20 年来发展起来极具前景的肿瘤过继免疫细胞治疗方法^[9-11],对 R/R B-ALL 表

表1 30例急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)患者入组临床试验时基本情况

例号	性别	年龄 (岁)	白血病细胞比例(%)		免疫分型			高危 细胞遗传学因素	中枢神经系统 白血病
			外周血	骨髓	早期前体B-ALL	前体B-ALL	普通型B-ALL		
1	男	66	6.41	26.2	无	无	有	t(9;22)(q34;q11.2)	有
2	男	12	42.03	29.8	无	无	有	无	无
3	女	54	16.05	54.2	无	有	无	t(9;22)(q34;q11.2)	无
4	女	54	56.5	87.5	无	有	无	t(9;22)(q34;q11.2)	无
5	男	29	5.07	23.4	无	有	无	无	无
6	男	30	16.07	48.6	无	有	无	无	无
7	男	46	4.44	37.3	无	无	有	无	无
8	女	63	1.93	70.5	无	无	有	无	无
9	男	42	4.39	70.7	无	无	有	t(9;22)(q34;q11.2)	无
10	女	56	36.79	25.2	无	有	无	无	有
11	男	67	24.43	60.5	无	无	有	t(9;22)(q34;q11.2)	有
12	女	31	1.15	82.6	无	有	无	t(4;11)	无
13	女	15	8.94	80.9	无	无	有	无	无
14	女	55	27.06	42.5	有	无	无	无	无
15	男	18	25.51	60.6	无	无	有	无	无
16	女	17	24.89	45.5	无	有	无	无	无
17	女	14	34.41	58.2	无	无	有	无	无
18	男	61	15.95	22.5	无	有	无	无	有
19	男	25	4.67	40.4	无	有	无	无	无
20	男	16	10.30	72.5	无	无	有	t(4;11)	无
21	男	54	33.52	42.2	有	无	无	t(9;22)(q34;q11.2)	无
22	男	13	80.32	56.2	无	有	无	无	无
23	男	66	20.11	20.6	有	无	无	无	无
24	男	52	56.35	23.8	无	无	有	无	无
25	女	14	29.72	44.5	无	无	有	无	无
26	女	17	55.92	58.3	无	有	无	无	无
27	男	36	36.73	32.4	无	有	无	t(9;22)(q34;q11.2)	无
28	男	15	66.20	30.6	无	无	有	无	无
29	男	42	32.20	44.8	无	无	有	无	无
30	女	22	29.70	92.4	有	无	无	无	无



A: 示 CD19 CAR-Nalm-6 细胞自身 CD19 表达位点被 CD19 CAR 占据(白色箭头所示); B: 示 Nalm-6 细胞强表达 CD19; C~D: 示 Nalm-6 细胞 CD19 表达位点被 CD19 CAR-Nalm-6 细胞 CD19 CAR 占据(蓝色箭头所示)

图1 Nalm-6细胞和CD19 CAR-Nalm-6细胞共聚焦显像($\times 200$)

现出令人满意的疗效^[5,12-13]。尽管 CD19 CAR-T 在 B-ALL 中取得了高响应,但复发问题仍不能忽视,其中大部分与 B 淋巴细胞表面 CD19 抗原的明显丢失相关^[7,14]。抗原丢失是一种新型的肿瘤逃逸机制,其机理仍在研究中,可能是由多因素造成的。获得性突变的融合和 CD19 的可变剪接可使白血病细胞能够抵抗 CAR-T 免疫疗法^[7]。在一些患者中,不同机制导致的 CD19 蛋白阻断引起的可识别 CD19 抗原缺乏,也可导致 CD19 阴性复发^[6,15-16]。如何预防和治疗由 CD19 抗原减少或丢失引起的复发,成为亟需解决的问题。

先前研究报告 1 例 B-ALL 患者在接受 CD19 CAR-T 治疗缓解并进行造血干细胞移植后 9 个月复发^[14]。该白血病细胞异常表达 CD19 CAR 基因,且

被证实 CD19 CAR 基因被引入了单个白血病细胞中,导致最终 CD19 阴性复发。其复发机制在于 CD19 CAR 基因的转入,与自体白血病细胞表面的 CD19 表位结合,使其 CD19 不表达,从而不能被 CD19 CAR-T 细胞所识别。我们最近报道 1 例 CD19 CAR-T 治疗缓解后 2 周 CD19⁺复发病例,在外周血 CD19 CAR-T 比例为 0 的同时 CD19 CAR 的 DNA 水平异常增高。我们发现患者第 1 次 CD19 CAR-T 细胞制备过程中磁珠分选后的 CD3⁺T 细胞存在 1.41% 的白血病细胞残留,因此本例患者存在 CD19 CAR 被意外转入白血病细胞的可能性^[8]。这提示我们在转染 CD19 CAR 时,CD3⁺T 细胞中白血病的零残留是极其重要的。我们检测了 30 例接受 CD19 CAR-T 细胞治疗的 R/R B-ALL 患者外周血单个核细胞经过 CD3 磁珠分选后的培养体系,有 2 例患者存在 3.32% 和 2.04% 的白血病细胞残留,并在随后的培养中比例逐渐减低至消失。

CD19 阴性的复发白血病患者预后非常差,迫切需要找到安全有效的治疗方法。CD22 同样在 B 淋巴细胞上表达,成为 R/R B-ALL 另外 1 个治疗靶点^[17]。针对患有 R/R B-ALL 的成人和儿童患者的 CD22 CAR-T 治疗可达到微小残留病阴性 CR,而在大多数患者只引发轻度或中度细胞因子释放综合征和神经毒性^[18-20]。Gardner 等^[14]报道中,患者尽管接受了 CD22 CAR-T 治疗,但是仍死于相关并发症。本团队报道的患者复发后接受 CD22 CAR-T 细胞治疗后再次获得 CR,CD22 CAR-T 治疗 1 周后外周血 CD19 CAR 的 DNA 拷贝数下降,提示 CD22 CAR-T 细胞治疗可以作为挽救治疗措施。因此,我们选择 Nalm-6 细胞株,将 CD19 CAR 转染入 Nalm-6 细胞,通过体外研究 CD19 CAR-T、CD22 CAR-T 细胞对 CD19 CAR-Nalm-6 细胞的杀伤活性,探索 CD22 CAR-T 细胞治疗是否可以作为上述情况的一

个挽救或联合治疗措施。

CD19 CAR Nalm-6 细胞和体系中的 Nalm-6 细胞在 CD19 表达阴性的同时,CD22 的表达并未受到影响,是 CD22 CAR-T 细胞治疗有效的理论依据^[17,20]。本实验亦证实 CD22 CAR-T 细胞对 CD19 CAR Nalm-6 细胞具有较强的杀伤活性。与文献^[14]中 CD19 CAR-T 治疗缓解后 CD19 阴性复发情况有所不同,本团队报道中患者为 CD19 阳性复发。我们前期研究发现 CD19 CAR-Nalm-6 细胞在转染率为 (46.50±3.78)% 的情况下,CD19 的表达几乎检测不到,而在培养体系中加大 Nalm-6 细胞的比例后,又检测到了 CD19 表达^[21]。我们将成功将 CD19 CAR 转入原代白血病细胞中,在转染率为 (7.50±1.67)% 的情况下,体系中 CD19⁺CD22⁺细胞占比 90% 以上。患者体内被转入 CD19 CAR 基因的白血病细胞占比较低可能是患者 CD19 阳性复发的原因。因此,我们进一步对 CD22 CAR-T 与 CD19 CAR-T 细胞的联合作用进行了研究,结果显示,对于 CD19 阴性的 CD19 CAR Nalm-6 细胞,CD22 CAR-T 对其有较明显的杀伤作用,但是相同靶比情况下 CD22 CAR-T 联合 CD19 CAR-T 的杀伤效果并不优于 CD22 CAR-T 单独应用的效果。这提示我们对于 CD19 CAR 转染入白血病细胞的问题,CD22 CAR-T 细胞治疗可作为主要的挽救治疗措施,为了降低副作用,临床上或可不联合 CD19 CAR-T 细胞治疗。

CD19 复发包括多种已知甚至未知的情况,本研究中的 CD19 CAR-Nalm-6 模型只能局限地代表 CD19 CAR 被引入肿瘤细胞的一种情况。体外实验结果提示 CD22 CAR-T 对转入 CD19 CAR 的白血病细胞有极强的杀伤作用,但实际治疗过程中存在的免疫微环境、个体差异等无疑会影响治疗结果,因此,CD22 CAR-T 细胞治疗是否能挽救 CD19 CAR-T

表 2 嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T 细胞) 对 Nalm-6、CD19 CAR-Nalm-6 细胞的体外杀伤活性比较 (%)

组别	培养时间		
	24 h	48 h	72 h
Nalm6+CD19 CAR-T	76.40±5.75	86.00±3.41	94.40±2.73
Nalm6+CD22 CAR-T	5.40±1.02	49.60±3.93	67.00±2.83
Nalm6+CD19 CAR-T+CD22 CAR-T	36.20±3.49	74.00±4.82	89.00±3.41
CAR-Nalm6+CD19 CAR-T	0.82±0.23	1.28±0.38	1.84±0.54
CAR-Nalm6+CD22 CAR-T	7.04±1.50	57.40±2.24	71.80±2.48
CAR-Nalm6+CD19 CAR-T+CD22 CAR-T	3.30±0.47	25.40±2.94	42.20±3.43

注:实验设 3 个复孔,每组实验重复 5 次

细胞治疗失败的病人需要我们进一步更深入的研究。总之,我们在CAR-T细胞的制备过程中应注意进一步提高磁珠分选CD3⁺一个方面CD22 CAR-T治疗可作为CD19CAR-T治疗复发的一个挽救治疗措施。细胞的纯度、避免混入白血病细胞;另外一个方面CD22 CAR-T治疗有望成为CD19 CAR-T治疗复发的一个挽救治疗措施。

参考文献

- [1] Haferlach T, Kern W, Schnittger S, et al. Modern diagnostics in acute leukemias [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005, 56(2):223-234. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2004.04.008.
- [2] Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354 (2):166-178. DOI: 10.1056/NEJMra052603.
- [3] 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. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
- [4] Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells 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):517-528. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
- [5] 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):1507-1517. DOI: 10.1056/NEJMoa1407222.
- [6] 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. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1020.
- [7] 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. DOI: 10.1016/j.csbj.2016.09.003.
- [8] 穆娟, 吕海容, 李静怡, 等. CD22 CAR-T挽救治疗CD19 CAR-T治疗后短期复发的TP53突变阳性难治急性B淋巴细胞白血病一例[J]. *天津医药*, 2020, 48(4):308-312. DOI: 10.11958/20192232.
- [9] Lim WA, June CH. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer [J]. *Cell*, 2017, 168(4):724-740. DOI: 10.1016/j.cell.2017.01.016.
- [10] Curran KJ, Margossian SP, Kernan NA, et al. Toxicity and response after CD19-specific CAR T-cell therapy in pediatric/young adult relapsed/refractory B-ALL. *Blood*, 2019, 134(26):2361-2368 [J]. *Blood*, 2020, 136 (11):1374. DOI: 10.1182/blood.2020008394.
- [11] Brudno JN, Lam N, Vanasse D, et al. Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells with fully human binding domains in patients with B-cell lymphoma [J]. *Nat Med*, 2020, 26(2):270-280. DOI: 10.1038/s41591-019-0737-3.
- [12] Park JH, Riviere I, Gonen M, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378 (5):449-459. DOI: 10.1056/NEJMoa1709919.
- [13] Curran KJ, Margossian SP, Kernan NA, et al. Toxicity and response after CD19-specific CAR T-cell therapy in pediatric/young adult relapsed/refractory B-ALL [J]. *Blood*, 2019, 134 (26):2361-2368. DOI: 10.1182/blood.2019001641.
- [14] Ruella M, Xu J, Barrett DM, et al. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell [J]. *Nat Med*, 2018, 24(10):1499-1503. DOI: 10.1038/s41591-018-0201-9.
- [15] 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. DOI: 10.1182/blood-2015-08-665547.
- [16] Rayes A, McMasters RL, O'Brien MM. Lineage Switch in MLL-Rearranged Infant Leukemia Following CD19-Directed Therapy [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2016, 63 (6):1113-1115. DOI: 10.1002/pbc.25953.
- [17] Shah NN, Stevenson MS, Yuan CM, et al. Characterization of CD22 expression in acute lymphoblastic leukemia [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2015, 62(6):964-969. DOI: 10.1002/pbc.25410.
- [18] Haso W, Lee DW, Shah NN, et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2013, 121 (7):1165-1174. DOI: 10.1182/blood-2012-06-438002.
- [19] Pan J, Niu Q, Deng B, et al. CD22 CAR T-cell therapy in refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leukemia*, 2019
- [20] 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. DOI: 10.1038/nm.4441.
- [21] 袁婷, 刘美静, 邓琦, 等. CD19 CAR基因转染的Nalm-6细胞免疫表型特征分析 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2019, 39 (8):613-619. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2019.08.009.

(收稿日期:2020-07-27)

(本文编辑:刘爽)