嵌合抗原受体基因修饰的T细胞治疗复发或难治性急性白血病的临床疗效及可行性

丁国梁, 陈虎*

军事医学科学院附属医院造血干细胞移植科, 北京 100071

* 联系人, E-mail: chenhu217@aliyun.com

收稿日期: 2017-07-06; 接受日期: 2017-07-21; 网络版发表日期: 2017-09-06

国家“十二五”“重大新药创制”科技重大专项课题(批准号: 2011ZX09102-001-29)和北京市临床应用研究项目(批准号: Z131107002213148)资助

摘要 经过几十年的医学发展, 急性白血病的治疗手段有了很大的改善, 但是复发率依然维持在一个高的水平; 而面对复发这种局面, 治疗的方案主要包括二次异基因造血干细胞移植和供者淋巴细胞输注(DLI)这两种治疗方式, 主要是调控移植物抗白血病效应, 但是治疗效果有限. DLI总的缓解率仅是15%~42%; 两年总生存期是15%~20%, 而且伴有DLI相关的毒副作用, 如移植物抗宿主病. 因此, 发展新的靶向治疗策略治疗复发或难治性白血病迫在眉睫. 嵌合抗原受体基因修饰的T细胞治疗白血病成为一种很有前景的治疗方法, 被基因修饰过的T细胞具备识别肿瘤相关抗原的能力, 而且可以突破传统治疗的限制. 本文通过对当前嵌合抗原受体基因修饰的T细胞治疗的理解, 讨论其相关的有效性及毒副作用.

关键词 嵌合抗原受体, 急性白血病, 临床疗效

异基因造血干细胞移植以及化疗已经被成功地临床应用于急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)患者的治疗, 但是对于复发的成年ALL患者, 预后依然较差, 部分可以获得长期生存率的复发的ALL患者, 更多的是通过诱导化疗, 随之进行异基因造血干细胞移植治疗^[1,2]. 不幸的是大多数患者由于挽救性的化疗失败, 不具备接受异基因造血干细胞移植治疗条件; 对于急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者, 单纯化疗治愈的可能性显著低于联合治疗, 且获得长期生存的几率较低^[3-5]. 老年患者相对青少年的预后更差^[6,7]. 为解决难治或复发性的

ALL和AML的现状, 嵌合抗体修饰的T细胞(chimeric antigen receptor expressing T cells, CAR-T cells)过继治疗已经成为很有前景的治疗手段.

1 过继性嵌合抗原受体T细胞介绍

CAR-T细胞在1989年被Gross等人首次描述. 目前, 多数嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)胞外抗原结合区由来源于单克隆抗体的轻链和重链组成^[8,9], 中间由带韧性的铰链区连接形成单链抗体(single chain fragment variable, scFv), 跨膜区域和胞内信号转导区组成. 第一代CAR包含单一信号区域, 其

引用格式: 丁国梁, 陈虎. 嵌合抗原受体基因修饰的T细胞治疗复发或难治性急性白血病的临床疗效及可行性. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1074-1078, doi: [10.1360/N052017-00116](https://doi.org/10.1360/N052017-00116)

英文版见: Ding G L, Chen H. Adoptive transfer of T cells transduced with a chimeric antigen receptor to treat relapsed or refractory acute leukemia: efficacy and feasibility of immunotherapy. Sci China Life Sci, 2016, 59: 673-677, doi: [10.1007/s11427-016-0017-3](https://doi.org/10.1007/s11427-016-0017-3)

主要是将免疫球蛋白样的TCR- ζ 和FcR- γ 链胞内结构域融合形成嵌合受体,即第一代CAR^[10,11]。相关研究表明,T细胞的活化有赖于双信号和细胞因子的作用。第一信号为特异性信号,由TCR识别抗原递呈细胞表面的抗原肽和MHC复合物所启动;第二信号为协同刺激信号,通过共刺激分子,促进IL-2合成,并使T细胞充分活化以及免于凋亡。因此第二代的CAR包含单一的共刺激分子,即4-1BB或CD28,而在第三代CAR的设计上则包含两个共刺激分子4-1BB和CD28^[12],这样设计的目的是提高T细胞的细胞毒性,增殖活性,维持T细胞的免疫应答,增加T细胞的存活时间等。将识别肿瘤相关抗原和胞内信号域如免疫受体酪氨酸活化基序的基因在体外进行基因重组,构建出重组质粒,并在体外转染T细胞,通过培养获得具有特异性识别肿瘤抗原并杀伤肿瘤细胞的CAR-T细胞。CAR-T细胞的免疫调节作用依赖其所携带的共刺激分子。研究表明,共刺激分子在打破免疫耐受、增强免疫细胞的抗肿瘤效应中发挥重要作用,共刺激信号缺失也是肿瘤诱导机体产生免疫耐受的机制之一。CAR-T细胞产生的共刺激信号对调节T细胞的活化作用,带有这些共刺激分子的CAR-T细胞可通过自分泌或旁分泌细胞因子来调节内源性抗肿瘤免疫反应。而且CAR-T细胞以抗原依赖、非MHC限制的方式结合肿瘤抗原,启动特异性抗肿瘤免疫反应克服肿瘤细胞的免疫逃逸。

1.1 CAR-T细胞在急性白血病治疗中的临床研究

通过美国临床试验网站查询,目前已经有30多项关于CAR-T细胞在急性白血病治疗中的临床试验完成注册,且部分临床试验结果已被发表,在30多项的临床试验中,更多的集中在CAR-T在急性淋巴细胞白血病治疗中的临床研究,且靶向抗原更多的以靶向CD19或CD20抗原分子为主,部分临床试验在急性髓性白血病的治疗中开展,靶向的肿瘤抗原主要以Lewis-Y和CD33为主。具体关于临床试验的开展类型,目前的研究状态见表1。

(1) CAR-T治疗急性淋巴细胞白血病的部分临床研究结果。对于复发的急性淋巴细胞白血病,即使通过多重积极的治疗手段,依然面对治疗的难题。最近关于靶向CD19/CD20肿瘤抗原的CAR-T治疗(CD19/CD20-CAR-T)成为一种有前景的治疗方法^[13]。Maude等人开展了关于自体CD19-CAR-T的回输治疗复发或难治

性的急性淋巴细胞白血病的临床研究,观察其临床疗效及毒副作用。临床结果显示,90%的患者完全缓解(27/30);67%以及78%的患者分别完成了半年无疾病生存率和总生存率。27%的患者出现细胞因子风暴(cytokine-release syndrome, CRS),而CRS与疾病的负荷具有相关性。Davila等人通过应用CD19/CAR-T在16例B细胞急性淋巴细胞白血病患者治疗开展了临床研究。其临床结果显示,有88%患者完成了完全缓解,更重要的是CAR-T细胞针对Ph阳性且经过异基因造血干细胞治疗的患者有效。之后,由Lee等人^[14]发表了21例复发或难治性的急性淋巴细胞白血病的临床研究,且患者均经过异基因干细胞的治疗,临床结果显示14%(95% CI 3.0~36.3)的患者出现CRS,而且CAR-T表现出具有强大的抗白血病的功能。

(2) CAR-T治疗急性髓性白血病的部分临床研究结果。尽管以异基因造血干细胞和化疗为基础的治疗手段有了很大的改善,但是对于大多数标危以及高风险的急性髓性白血病患者来说,依然面对复发或者死亡的风险。而相关的临床研究表明,急性髓性白血病的患者对于异基因造血干细胞治疗是敏感的,但是在调控T细胞抗肿瘤免疫反应的作用有限^[15,16]。因此,寻找新的治疗方法至关重要。虽然CD19-CAR-T在血液病恶性肿瘤治疗方面,显示了高的临床疗效^[17],但是肿瘤抗原CD19更多的限制在B细胞系^[18],相对比LeY肿瘤抗原却更广泛地被急性髓性白血病的细胞表达,而且在正常组织的表达量却很有限,因此,在抗AML的CAR-T细胞治疗中,LeY抗原被作为主要的靶抗原。在2013年,由Ritchie等人^[19]开展了靶向肿瘤抗原LeY的CAR-T治疗,临床结果显示,在安全性方面,未出现严重的毒副反应(3级或4级),其中1例患者完成细胞遗传学方面的缓解,其他患者的白血病细胞明显降低。此项临床试验结果证明了CAR-T治疗急性髓性白血病的安全性及可行性^[20],而且证明CAR-T在体内抗肿瘤的持久性。CD123作为IL-3受体的转膜链,而且在多数AML细胞表达。最近的一项临床前研究表明,CAR-T具有潜在持续的根除原始髓性细胞的能力。Mardiros等人开展了一项CD123-CAR-T在AML动物模型的临床前研究,试验数据表明CD123-CAR-T细胞呈现出在AML动物模型中抗白血病的能力。Gill等人^[21]认为,以CD123-CAR-T为基础的清髓治疗,可以被作为一种造血干细胞移植前的新的预处理治疗方案。

表1 目前正在开展的CAR-T细胞治疗急性白血病的临床试验

白血病类型	靶抗原	基因转移	信号区域	研究机构	Clinical Trial.gov ID	状态
ALL	CD20	Retrovirus	scFv-(4-1BB-CD3ζ)	Chinese PLA General Hospital	NCT01735604	Recruiting
ALL	CD19	Lentivirus	scFv-(4-1BB-CD3ζ)	Penn Medicine's Abramson Cancer Center	NCT00891215	Completed
ALL	CD19	Lentivirus	scFv-(4-1BB-CD3ζ)	University of Pennsylvania	NCT01551043	Completed
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD28-CD3ζ)	Baylor College of Medicine	NCT00608270	Recruiting
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD28-CD3ζ)	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	NCT01416974	Recruiting
ALL	CD19	Lentivirus	scFv-(4-1BB-CD3ζ)	University of Pennsylvania	NCT02030847	Recruiting
ALL	CD19	Lentivirus	scFv-(CD3ζ)	Fred Hutchinson Cancer Research Center	NCT01475058	Completed
ALL	CD19	Lentivirus	scFv-(CD3ζ)	Fred Hutchinson Cancer Research Center	NCT01865617	Recruiting
ALL	CD19	Lentivirus	scFv-(CD28-CD3ζ)	City of Hope Medical Center	NCT02146924	Recruiting
AML	CD123	Lentivirus	scFv-(CD28-CD3ζ)	City of Hope Medical Center	NCT02159495	Recruiting
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD28-CD3ζ & CD28-CD137-CD3ζ)	Baylor College of Medicine	NCT01853631	Recruiting
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD28-CD3ζ)	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	NCT01840566	Recruiting
ALL	CD19	Retrovirus/ Lentivirus	scFv-(CD28-CD3ζ & 4-1BB-CD3ζ)	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	NCT00466531	Recruiting
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD3ζ)	University College London	NCT01195480	Recruiting
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD28-CD3ζ)	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	NCT01860937	Recruiting
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD28-CD3ζ-4-1BB)	Uppsala University	NCT02132624	Recruiting
ALL	CD19	Lentivirus	scFv-(4-1BB-CD3ζ)	Seattle Children's Hospital	NCT02028455	Recruiting
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD137-CD3ζ)	Chinese PLA General Hospital	NCT01864889	Recruiting
ALL	CD19	Transposon	scFv-(CD3ζ)	MD Anderson Cancer Center	NCT01497184	Active, not recruiting
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD3ζ)	National Cancer Institute	NCT01593696	Recruiting
AML	Lewis-Y	Retrovirus	scFv-(CD28-CD3ζ)	Peter MacCallum Cancer Center	NCT01716364	Unknown
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD28-CD3ζ)	National Cancer Institute	NCT00924326	Recruiting
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD28-CD3ζ)	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	NCT01044069	Recruiting
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD3ζ)	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	NCT01430390	Recruiting
AML	CD33	Retrovirus	scFv-(CD137-CD3ζ)	Chinese PLA General Hospital	NCT01864902	Recruiting
ALL	CD19	Lentivirus	scFv-(CD28-CD3ζ)	Seattle Children's Hospital	NCT01683279	Recruiting
ALL	CD19	Lentivirus	scFv-(4-1BB-CD3ζ)	University of Pennsylvania	NCT01747486	Recruiting
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD28-CD3ζ)	Baylor College of Medicine	NCT00586391	Active, not recruiting
ALL	CD19	Lentivirus	scFv-(4-1BB-CD3ζ)	University of Pennsylvania	NCT01626495	Recruiting
ALL	CD19	Lentivirus	scFv-(4-1BB-CD3ζ)	University of Pennsylvania	NCT01029366	Completed
ALL	CD19	Retrovirus	scFv-(CD3ζ)	Baylor College of Medicine	NCT00840853	Recruiting
ALL	CD19	Transposon	scFv-(CD3ζ)	MD Anderson Cancer Center	NCT01362452	Active, not recruiting

2 存在的问题及发展前景

一系列临床前以及临床试验证明, CAR-T 的设计、肿瘤抗原基因转染的方法以及肿瘤负荷都是影响 CAR-T 治疗血液病恶性肿瘤临床疗效的因素:

(1) CAR-T 设计的影响. 临床试验的结果显示, 第二代以及第三代 CAR-T 在抗肿瘤方面的优势要优于第一代 CAR-T^[22,23]. 例如, 2014 年, Maude 等人^[24]开展了 CAR-T 治疗急性淋巴细胞白血病的临床研究, 结果表明第二代的 CAR-T 设计的抗肿瘤能力优于第一代.

(2) 基因转染方法的影响. 多数的学者认为, 不同 T 细胞基因转染方法也是影响 CAR-T 临床疗效的主要因素之一. 逆转录病毒载体已经被广泛地应用在治疗 ALL 的临床研究中, 因为其安全性以及长久性转染 T 细胞的能力^[25], 对于慢病毒载体来说, 也是种有效转染基因的方法, 但介于其成本较高, 潜在的安全性问题要优于逆转录病毒^[26], 所以依据目前注册的临床研究以及发表的临床论文, 基因转染的载体主要集中在这两种载体, 其他的转染方法如转座子和电转染已经很少被应用了^[27,28]. 但是究竟哪种转染方法更有效, 可以更好地改善 CAR-T 细胞的抗肿瘤能力, 目前没有相关的研究论文加以比较.

(3) 肿瘤负荷的影响. 相关研究表明, 肿瘤负荷与 CAR-T 在体内存在的时间具有负相关性^[29]. 针对白血病治疗的临床研究, 更多地采用异基因造血干细胞移植联合 CAR-T 的治疗方案, 因为联合治疗的优势要优于单一的 CAR-T 治疗, 直到 2014 年, Maus 做出一个假设, 认为单独 CAR-T 治疗可以取代异基因造血干细胞移植作为一种明确的治疗措施, 而且发表的临床结果也证明了这种假设, 而且接受过异基因造血干细胞移植继而进行 CAR-T 治疗的 ALL 患者, 在无疾病生存期和总生存期方面并未优于接受单一 CAR-T 治疗的 ALL 患者. CAR-T 以及如何联合异基因造血干细胞移植治疗的未来还是值得去思考, 而且也需要大的临床样本进行随机的临床研究加以证实. 在细胞因子风暴方面, 研究者发现细胞因子风暴的出现经常伴以巨噬细胞活化综合征(macrophage activation syndrome, MAS)的出现, 而且与高水平的 IL-6 有部分关系^[30]. 在以上提到的临床研究中, 有些患者会出现不同程度的 CRS, 但目前尚不清楚 CRS 或 MAS 与 CAR-T 抗肿瘤能力是否具有相关性.

总之, CAR-T 细胞治疗, 毋庸置疑已成为治疗白血病的一次突破, CAR-T 设计的改良、治疗方案的优化等大量国际性临床试验正在开展, 但仍需砥砺前行.

参考文献

- Fielding A K, Richards S M, Chopra R, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL), an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood*, 2007, 109: 944–950
- Gokbuget 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*, 2010, 116: 2032–2041
- Gibson B E S, Wheatley K, Hann I M, et al. Treatment strategy and long-term results in paediatric patients treated in consecutive UK AML trials. *Leukemia*, 2005, 19: 2130–2138
- Lange B J, Smith F O, Feusner J, et al. Outcomes in CCG-2961, a children's oncology group phase 3 trial for untreated pediatric acute myeloid leukemia: a report from the children's oncology group. *Blood*, 2008, 111: 1044–1053
- Creutzig U, Büchner T, Sauerland M C, et al. Significance of age in acute myeloid leukemia patients younger than 30 years. *Cancer*, 2008, 112: 562–571
- Kaspers G J, Creutzig U. Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. *Leukemia*, 2006, 19: 2025–2029
- Appelbaum F R, Gundacker H, Head D R. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, 2006, 107: 3481–3485
- Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, et al. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev*, 2014, 257: 107–126
- Jena B, Dotti G, Cooper L J. Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 2010, 116: 1035–1044
- Eshhar Z, Waks T, Gross G, et al. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 720–724
- Moritz D, Wels W, Mattern J, et al. Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells. *Proc Natl*

- [Acad Sci USA](#), 1994, 91: 4318–4322
- 12 Goker H, Malkan U Y, Demiroglu H, et al. Chimeric antigen receptor T cell treatment in hematologic malignancies. [Transfus Apheresis Sci](#), 2016, 54: 35–40
 - 13 Kochenderfer J N, Dudley M E, Feldman S A, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. [Blood](#), 2012, 119: 2709–2720
 - 14 Lee D W, Kochenderfer J N, 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. [Lancet](#), 2015, 385: 517–528
 - 15 Wen Y J, Min R, Tricot G., et al. Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy. [Blood](#), 2002, 99: 3280–3285
 - 16 Kershaw M H, Westwood J A, Parker L L, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. [Clin Cancer Res](#), 2006, 12: 6106–6115
 - 17 Brenner M K. CAR-T cells for acute myeloid leukemia: the LeY of the land. [Mol Ther](#), 2013, 21: 1983–1984
 - 18 Jensen M C, Popplewell L, Cooper L J, et al. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. [Biol Blood Marrow Transplant](#), 2010, 16: 1245–1256
 - 19 Ritchie D S, Neeson P J, Khot A, et al. Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia. [Mol Ther](#), 2013, 21: 2122–2129
 - 20 Mardiros A, Dos Santos C, McDonald T, et al. T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. [Blood](#), 2013, 122: 3138–3148
 - 21 Gill S, Tasian S K, Ruella M, et al. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. [Blood](#), 2014, 123: 2343–2354
 - 22 Brentjens R J, Santos E, Nikhamin Y. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. [Clin Cancer Res](#), 2007, 13: 5426–5435
 - 23 Teng M W L, Kershaw M H, Moeller M, et al. Immunotherapy of cancer using systemically delivered gene-modified human T lymphocytes. [Hum Gene Ther](#), 2004, 15: 699–708
 - 24 Maude S L, Frey N, Shaw P A, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. [N Engl J Med](#), 2014, 371: 1507–1517
 - 25 Scholler J, Brady T L, Binder-Scholl, G. Decade-long safety and function of retroviralmodified chimeric antigen receptor T cells. [Sci Transl Med](#), 2012, 4: 132–153
 - 26 Biffi A, Bartolomae C C, Cesana D. Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. [Blood](#), 2011, 117: 5332–5339
 - 27 Jin Z, Maiti S, Huls H, et al. The hyperactive sleeping beauty transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor. [Gene Ther](#), 2011, 18: 849–856
 - 28 Till B G, Jensen M C, Wang J, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. [Blood](#), 2008, 112: 2261–2271
 - 29 Brentjens R J, Rivière I, Park J H, 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: 4817–4828
 - 30 Grupp S A, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. [N Engl J Med](#), 2013, 368: 1509–1518