

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.005

· 专家论坛(专题) ·

## 第二代 CD19-CAR-T 细胞治疗难治复发急性 B 淋巴细胞白血病的经验及问题

童春容 (河北燕达陆道培医院 免疫治疗科, 河北 廊坊 065201)

**[摘要]** 为了探索抗 CD19 嵌合抗原受体基因修饰 T (CD19-CAR-T) 细胞治疗难治、复发的 B 急性淋巴白血病 (B-acute lymphoblastic leukemia, B-ALL) 安全有效的细胞剂量、毒副作用及其处理方法, 2015 年 7 月 12 日至 2016 年 11 月 20 日, 笔者团队采用 CD19-CAR-T 细胞治疗了 64 例难治复发 B-ALL 患者。其中 55 例为原发耐药或难治性血液学复发患者, 9 例为 FCM 确认的难治性微小残留白血病 (minimal residual disease, MRD) 阳性 B-ALL 患者。在治疗工作早期, 2 例死于治疗后相关并发症 (treatment related mortality, TRM), 疗效不可评估, 4 例未获得完全缓解 (NR)。以后通过调整入组标准及回输细胞数, 近期连续 33 例患者均获得完全缓解 (CR), 或达到 CR 但血液细胞计数未正常 (CR incomplete, CRi), 无 1 例死亡。CD19-CAR-T 细胞治疗达 CR 后, 接受异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT) 者 80% 以上持续 FCM-MRD 阴性至观察结束, 该疗效与第 1 次 CR 期 (CR1) 接受移植者相同; 未移植者绝大多数在 CR 后 1 年内再次复发。治疗过程中, 及时稳妥地处理好细胞因子释放综合征 (cytokine releasing syndrome, CRS) 及各种引起复发的因素是保证治疗成功的关键。

**[关键词]** CD19; 嵌合抗原受体基因修饰 T 细胞; 急性 B 淋巴细胞白血病; 细胞因子释放综合征

**[中图分类号]** R730.51; R733.7

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2017)01-0018-04

## Experience and problems of the second generation CD19-CAR-T cell in the treatment of refractory relapsed acute B lymphocytic leukemia

TONG Chunrong (Department of Immunotherapy, Hebei Yanda Lu Daopei Hospital, Langfang 065201, Hebei, China)

**[Abstract]** To explore the safety and effective doses of CD19 chimeric antigen receptor gene-modified T cells (CD19-CAR-T) for treating the refractory relapsed acute B lymphoblastic leukemia (R/R B-ALL), as well as side effects and its optimal treatment methods, during July 12, 2015 to November 20, 2016 the 64 patients with R/R B-ALL were treated with the CD19-CAR-T. Among them 55 cases were recurrent primary drug-resistant or refractory patients with B-ALL, 9 cases were refractory positive minimal residual disease (MRD) patients with R/R-ALL confirmed by flow cytometry (FCM). In the early period, the 2 patients dies from treatment-related complications and their efficacy could not evaluated, and the 4 patients did not achieve complete remission (CR). After adjusting inclusion criteria and retransfusion cell numbers of CD19-CAR-T, recently the 33 patients continuously achieved RC, or achieved RC but numbers of their blood cells were not normal without any dead cases. More than 80% patients, who received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) after treatment with CD19-CAR-T, continued negative MRD confirmed by FCM until end of the observation, of which efficacy was the same as that of the patients received allo-HSCT at first CR time, and most of the patients who did not receive allo-HSCT had a relapse again within 1 year after CR. In course of the treatment, keys to ensure success of the treatment should be timely and safely handling of cytokines releasing syndromes and various factors of inducing recurrent.

**[Key words]** CD19; chimeric antigen receptor gene-modified T (CAR-T) cell; B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL); cytokine release syndrome (CRS)

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(1): 18-21. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.005]



**童春容** 河北燕达陆道培医院副院长、血液科及免疫治疗科主任, 主任医师, 全国形态学诊断学术交流群专家组成员, 中国医药生物技术协会医药生物技术临床专业委员会常委, 中国抗癌协会生物治疗专业委员会常委和血液肿瘤专业委员会委员, 中国医师协会检验医师分会血液肿瘤专业委员会副主任委员, 中华

骨髓库专家委员会委员, 卫生部“临床人体成体细胞研究、体外制备技术管理专家委员会委员”、《中国肿瘤生物治疗杂志》编委, 中华医学会血液学分会实验血液学组成员。曾任第八届国家药典委员会委员、国家药品监督管理局药品评审专家、《中华血液学杂志》编委。E-mail: tongcr.21@163.com

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170110.1504.008.html>

2011年,美国宾夕法尼亚大学 June 教授的团队<sup>[1]</sup>首先报告采用 CD19-CAR-T 细胞治疗 1 例晚期慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL),使其持续 CR 达 1 年以上。CLL 是一种药物不能治愈的慢性白血病,病程长,多见于老年。June 教授的团队仅用 1 个疗程的 CD19-CAR-T 细胞治疗就可达到这样的疗效,轰动了全世界。笔者作为长期从事白血病免疫治疗的医生,深知 CD19-CAR-T 细胞治疗成功是癌症免疫治疗的一个突破性进展。其后多个临床试验<sup>[2,4]</sup>显示,CD19-CAR-T 细胞治疗难治复发性 B-ALL 的 CR 可达到 90% 以上,治疗其他 B 细胞淋巴瘤的有效率可达到 70% 以上,2017 年美国 FDA 将批准其正式上市。CD19-CAR-T 细胞治疗的成功引起了全世界的研究热潮,包括对其他靶点 CAR-T 也在积极开发试验中,以美国为首,中国紧随其后。迄今为止,临床效果最好、毒副作用最小的仍是 CD19-CAR-T 细胞。

## 1 笔者团队开展 CD19-CAR-T 细胞临床研究的过程

2 年前,笔者团队与有基因载体制备试验的上海雅科生物技术公司合作,开发第二代编码抗 CD19-CD3-41BB 的慢病毒载体,用难治复发 B-ALL 的原代白血病细胞及其正常细胞在体外实验证明了该载体转染患者正常 T 细胞的安全性及有效性。2015 年 7 月 12 日开始至 2016 年 11 月 20 日,笔者团队共采用 CD19-CAR-T 细胞治疗了 64 例难治复发 B-ALL(回输 CAR-T 细胞后观察  $\geq 30$  d)。其中 55 例为原发耐药[诊断后 2 个疗程标准化疗未获得完全缓解者(no remission, NR)]或难治性血液学复发患者(化疗中发生血液学复发,或者停全部化疗后复发再次化疗  $\geq 1$  个疗程 NR),这类患者的白血病负荷高,如果仅用化疗不能治愈,直接行异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)治愈率也很低或根本不可能治愈;另 9 例为难治性 FCM-MRD 阳性 B-ALL(化疗 3 个疗程 FCM 仍检测出有意义的 MRD)患者。

## 2 治疗原发耐药或难治复发性 B-ALL

55 例患者 CAR-T 治疗前的中位病程为 17 个月(2~81 个月),骨髓中位原幼淋巴细胞(FCM 证实为白血病细胞)为 50%(6.5%~98.5%),其中同时合并髓外白血病者 15 例。近期连续治疗 33 例患者仅选择血液白血病细胞  $< 30\%$ 、头颅核磁共振(MRI)检查颅内无肿块及其他严重病灶的患者;治

疗前血液白血病细胞比例更高者,先用化疗降低其比例后再采用 CD19-CAR-T 细胞治疗。患者几乎均有 1 项以上预后差的因素:(1)复杂染色体异常[25/49(51%)];(2)对 2~3 代酪氨酸酶抑制剂(TKI)耐药的 *BCR-ABL1* 基因阳性 3 例;(3)有以下 1 种或多种预后差的基因突变:*TP53*、*IKZF1*、*CXCR4*、*NOTCH*、*PTPN11*、*ABL*、*PHF6*、*ERG*、*ETV6*、*JAK*、*CREBBP*[23/45 例(51%)];(4)伴有遗传噬血综合征基因缺陷 ± 范可尼基因缺陷 & 角化不良基因缺陷 Wiskott-Aldrich 综合征基因缺陷者[15/23 例(65%)]

治疗过程:先采集患者 PBL 培养 CD19-CAR-T 细胞,采集后当日或次日给患者氟达拉滨(fludarabine, Flu)  $30 \text{ mg/m}^2 \times 3 \text{ d}$  及环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)  $0.25 \text{ mg/m}^2 \times 3 \text{ d}$  为主的预处理方案;采集 PBL 后 6~8 d 回输 CD19-CAR-T 细胞,回输细胞数为  $(0.05 \sim 14) \times 10^5/\text{kg}$ 。最近连续 33 例患者回输细胞数均为  $1 \times 10^5/\text{kg}$ ;如果回输前血液白血病细胞绝对值成倍增长,先冻存 CD19-CAR-T 细胞,用化疗降低血液白血病细胞至  $< 1 \times 10^9/\text{L}$  后再回输细胞。回输 1 个月后评估疗效。

本组中可评估疗效的患者共 53 例,49 例(92%)获得 CR/CRi,87% 的患者 FCM-MRD 阴性(complete remission of molecular, CRm)。治疗工作的早期,2 例患者死于相关并发症:1 例为脑出血,另 1 例为白细胞持续严重低下后的感染,所以疗效不可评估;有 4 例死于白血病进展。CD19-CAR-T 细胞治疗后全部患者的髓外白血病细胞几乎检查不出。最近连续 33 例患者均获得 CR/CRi(100%),无 1 例死亡。

CD19-CAR-T 细胞治疗后 CRS 中位分级为 2 级(1~5 级)。CR 后未移植者 11 例均发生血液复发,中位复发时间 79 d(45~290 d);其中 10 例检查了免疫标志,8 例白血病细胞为 CD19 阴性或弱阳性,2 例为 CD19 阳性。27 例 CR 后行 allo-HSCT 并观察  $\geq 70$  d 者,24 例 CRm 至今,中位 CRm 220 d(100~476 d);1 例死于肺结核,2 例死于复发。

## 3 治疗难治性 FCM-MRD 阳性 B-ALL

本组患者中 9 例为难治性 FCM-MRD 阳性患者,如果仅用化疗最后全部复发,如果采用 allo-HSCT 治疗,复发率高于 FCM-MRD 阴性者。此组患者中位年龄 9 岁(3~68 岁),输注 CD19-CAR-T 细胞后,中位观察时间为 230 d(30~476 d)。治疗后全部患者获得 CRm,CRS 均  $< 1$  级,TRM 为 0。CRm

后4例患者未接受 allo-HSCT 治疗,3例血液学复发,仅1例 CRm 至今 250 d;5例接受 allo-HSCT 治疗,4例 CRm 至今。

#### 4 经验与问题

本团队的治疗结果在国内外引起较大反响,欧洲血液学年会上被选为报告,今年底美国血液学年会上有2篇相关文章被选为报告,在国内多个大会上进行交流。在多次大会上大家问的最多的问题是:(1)为什么你们输注的 CD19-CAR-T 细胞数比文献报告低很多?(2)你们对不同患者回输的 CD19-CAR-T 细胞数变动范围那么大?(3)最近治疗的33例患者连续获得 CR/CRi 且无死亡的原因是什么?下面对以上问题谈谈笔者的看法。

##### 4.1 细胞输注剂量及患者适应过程的确

开始时,选择的 CAR-T 细胞数首先是为了安全性起见,采用比国内外文献报告更低的细胞数,以后确定安全及有效的细胞数量,这是一个探索过程。

第1例为7岁男孩,在外院反复化疗24个月复发,再用大剂量化疗2个疗程, NR 且合并肺炎来我院,其骨髓白血病细胞为 89%,血液白血病细胞为 36%、肝肋下 2 cm、颈部淋巴结肿大。考虑在白血病负荷较高,转我院时染色体呈复杂且多克隆异常,再次化疗难以缓解,在与其监护人讨论并同意后决定选择 CD19-CAR-T 细胞治疗。用磁珠纯化血正常 T 细胞来制备 CD19-CAR-T 细胞,给患者共输注细胞  $1.6 \times 10^5/\text{kg}$ 。国内外文献<sup>[24]</sup>报道,一般 CD19-CAR-T 细胞输注剂量为  $(1 \times 10^6) \sim (1 \times 10^8)/\text{kg}$ 。为预防 CRS,在回输后第1天,给予 IL-6 单抗;回输后第8天该患者出现高热,第9天达 40℃,血转氨酶、胆红素升高,纤维蛋白原下降,血 CD19-CAR-T 细胞占 CD3<sup>+</sup> 细胞 3.8%;第11天出现抽搐、短暂意识丧失、血氧饱和度下降、血压下降,血和脑脊液中 CD19-CAR-T 细胞占血 CD3<sup>+</sup> 细胞 43.0% 和 2.1%。予以静脉注射安定、地塞米松、IL-6 单抗,吸氧、输液治疗,抽搐缓解后鞘注地塞米松 5 mg;治疗后上述症状表现缓解。综合评定患者 CRS 为 2 级。回输后第30天,评估白血病达到 CRm,3个月后患者接受 allo-HSCT 治疗, CRm 至今已经超过 16 个月。

此后本团队连续成功治疗了3例难治复发性 B-ALL 患者。第2例尤其严重,除了骨髓白血病负荷高外, PET-CT 示纵隔、双肾、腹膜后、盆腔、子宫颈、子宫体、鼻咽部等部位多发髓外白血病肿块。 CD19-CAR-T 细胞回输后1个月复查 PET-CT 全部

髓外肿块均未显示肿块,达到 CRm,其后接受 allo-HSCT 治疗, CRm 至今已经超过 1 年。

上述4例的成功,证明低于文献<sup>[24]</sup>报告剂量的 CD19-CAR-T 细胞也可以达到非常好的疗效,且毒副作用可控制, CD19-CAR-T 细胞可进入髓外清除瘤性白血病,也可克服预后差的染色体、基因异常及遗传易感的障碍。

此后,笔者团队过于自信,对 B-ALL 患者严重性也不加选择。第5例因白血病控制不理想,近1年化疗强度都很大,在 CAR-T 治疗前接受了含克拉曲滨的强烈化疗,合并严重感染及严重口腔溃疡,近1个月未进食,一般状况很差来我院。入院后白血病细胞处于迅猛增长阶段,血液中白血病细胞高达 90%;除了复杂染色体异常外还有多种高危险性基因突变包括 TP53、PTPN11、BCL2、TET2,估计化疗难以见效,故予以 CD19-CAR-T 细胞治疗。回输细胞后第5天开始出现 CRS,此后逐渐加重,除高热外还有转氨酶及胆红素重度升高、凝血功能严重异常、胃肠道大出血,抽搐、昏迷、呼吸困难、全身严重水肿,腰穿抽出血性脑脊液。经过超大剂量糖皮质激素、IL-6 单抗、TNF 单抗,输注凝血因子,对症支持等处理后,以上 CRS 改善,患者神智清楚,肠道出血控制。但是回输后第18天,突然昏迷,一侧瞳孔对光反射消失,迅速死亡,初步判断为脑出血死亡。笔者考虑患者严重 CRS 与血液中白血病细胞比例过高,与此前化疗剂量太大、一般状况太差相关,但由于 CAR-T 前未检测颅内病灶,故难以判断脑出血的具体原因。另一例患者死于白血细胞持续低下导致的严重感染。在 CD19-CAR-T 细胞治疗前也用了含克拉曲滨的强烈化疗,克拉曲滨与 Flu 相似,免疫抑制强,可能与并发症有关。

此后又有6例患者发生  $\geq 3$  级的 CRS。为了减轻 CRS,笔者进一步减少 CD19-CAR-T 细胞数至  $< 1 \times 10^5/\text{kg}$ 。但随后观察发现,回输细胞数  $< 0.5 \times 10^5/\text{kg}$  的患者均 NR,均死于白血病进展,其中1例回输细胞前血液白血病细胞绝对值倍增很快,回输后第8天血液白细胞数为  $34.9 \times 10^9/\text{L}$ ,白血病细胞占 88%;突然呼吸困难、咳血死亡。

总结上述教训,笔者调整 CD19-CAR-T 细胞回输量为  $1 \times 10^5/\text{kg}$ ,并要求入组患者血液白血病细胞比例  $< 30\%$ , MRI 检查头颅无肿块及其他严重疾病。如果一次转染细胞未达到前述细胞数量标准,将转染细胞冻存,再次转染;两次转染的 CD19-CAR-T 细胞达到  $1 \times 10^5/\text{kg}$  后再回输;如果回输 CD19-CAR-T 细胞前患者血液白血病细胞绝对值成

倍增长,先冻存 CD19-CAR-T 细胞,用化疗将血液白血病细胞降至  $<1 \times 10^9/L$  后再回输。此后连续治疗 33 例患者均达到 CR/CRi,且无死亡,该疗效达到国际先进水平;同时,回输的 CD19-CAR-T 细胞数明显低于文献<sup>[24]</sup>。

#### 4.2 CD19-CAR-T 细胞的毒副作用及其防治措施

CD19-CAR-T 细胞治疗后的主要毒副作用是 CRS 及中枢神经系统并发症,主要处理方法是糖皮质激素(包括鞘注激素)、IL-6 抗体、TNF- $\alpha$  抗体、血浆交换、对症支持等。在处理过程中要注意平衡并发症处理和疗效的问题,因为过度防治并发症可能降低 CD19-CAR-T 细胞疗效。笔者认为,如果患者仅仅发热,主要予以解热止痛药。重点关注 CRS 的发生,首先予以心电监护,并监测凝血功能、血铁蛋白、血生化、肝脾大小的变化,了解 CRS 的严重程度;如果白细胞低于  $1 \times 10^9/L$ ,应该居住在无菌病房或无菌床内,注意房间隔离消毒;如果出现 CRS  $\geq 2$  级,予以糖皮质激素干预;如果患者出现呼吸困难,以甲泼尼龙治疗为主;如果出现中枢神经并发症,以地塞米松治疗为主;对抽搐、昏睡甚至昏迷患者,除了静脉注射地塞米松外,最好鞘注地塞米松。如果普通剂量激素不能控制,采用超大剂量糖皮质激素[等量泼尼松  $10 \sim 15 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ],加 IL-6 和/或 TNF- $\alpha$  抗体,必要时血浆交换;出现肾功衰竭时加用血液透析或血液过滤治疗等。

CD19-CAR-T 细胞治疗难治复发 B-ALL 虽然是艰难、痛苦的过程,对于这些几乎完全无希望的患者,冒这个风险是值得的。分析发现,上述患者的毒副反应,主要与血液中白血病细胞负荷密切相关,因此回输 CD19-CAR-T 细胞前,对白血病负荷大者,除了予以 Flu + CTX 外,还应该适当加入其他化疗药物。

笔者团队治疗的绝大多数是晚期难治复发 B-ALL 患者,已经经过大剂量的化疗,大部分合并有感染。在 CD19-CAR-T 细胞治疗中,由于化疗、CRS 及预处理,CD19-CAR-T 细胞治疗导致免疫球蛋白下降,因此要注意用抗生素防治感染,监测并及时输注

丙种球蛋白。经过以上处理后,仅在早期 1 例患者(曾用克拉曲滨)因持续严重白细胞下降死于感染,其他患者均未因 CD19-CAR-T 细胞治疗加重感染,患者均愿意且顺利桥接到细胞移植。

目前,对笔者研究团队来说,CD19-CAR-T 细胞的毒副作用不再是治疗难治复发 B-ALL 患者的主要问题。

## 5 CD19-CAR-T 细胞治疗存在的主要问题

目前 CD19-CAR-T 细胞治疗难治复发 B-ALL 患者最大的问题还是复发,其中绝大多数是 CD19 阴性或弱阳性患者会复发,这是 CAR-T 细胞膜表面靶点治疗难以克服的短板。因此,在肯定 CD19-CAR-T 细胞治疗为免疫治疗突破性进展的同时,不能将之过度神化,癌症的攻克还需要多种方法的联合,在免疫治疗上还需要开发更多的方法。

### [参考文献]

- [1] PORTER D L, LEVINE B L, KALOS M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia[J]. N Engl J Med, 2011, 365(8): 725-733. DOI: 10.1056/NEJMoa1103849.
- [2] RENIER B, MARCO L D, ISABELLE R, 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.
- [3] MARCO L, DAVILA I R, WANG X Y, 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] NEELAPU S S, LOCKE F L, BARTLETT N L, et al. On going complete remissions (CR) in the phase 1 of ZUMA-1: a phase 1-2 multicenter study evaluating the safety and efficacy of KTE-C19 (anti-CD19 CAR T cells) in subjects with refractory aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL)[J/OL]. J Clin Oncol, 2016,34:( Suppl; abstr 7559)[2016-12-05]. [http://jco.asco-pubs.org/cgi/content/abstract/34/15\\_suppl/7559](http://jco.asco-pubs.org/cgi/content/abstract/34/15_suppl/7559).

[收稿日期] 2016-12-06

[修回日期] 2016-12-10

[本文编辑] 王映红

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅