

DOI: 10.13376/j.cbils/20220066

文章编号: 1004-0374(2022)06-0663-13

CD19 CAR-T细胞治疗急性B淋巴细胞白血病的研究进展

姚桦^{1,2}, 杨晓梅^{2,3}, 钟大妮^{2*}, 卢小玲^{1,2*}

(1 广西医科大学口腔医学院, 口腔应用基础教研室, 南宁 530021; 2 广西医科大学基础医学院, 广西纳米抗体国际联合研究中心, 南宁 530021; 3 广西医科大学基础医学院, 生理学教研室, 南宁 530021)

摘要: 嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) 是一种新型免疫治疗方法。多项临床研究结果显示, 靶向 CD19 的 CAR-T 细胞治疗复发难治性急性 B 淋巴细胞白血病 (B-cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL) 效果显著, 为复发难治性 B-ALL 患者带来福音。CAR-T 细胞治疗被认为是最有潜力的免疫治疗手段。该文综述了近年来 CD19 CAR-T 细胞治疗 B-ALL 的临床研究进展及改进策略。

关键词: 嵌合抗原受体 T 细胞; 急性 B 淋巴细胞白血病; 恶性肿瘤; 纳米抗体; CD19

中图分类号: R392.1 文献标志码: A

Research progress on CD19 CAR-T therapy in treating B-cell acute lymphocytic leukemia

YAO Hua^{1,2}, YANG Xiao-Mei^{2,3}, ZHONG Da-Ni^{2*}, LU Xiao-Ling^{1,2*}

(1 Department of Stomatology, Stomatology College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2 International Nanobody Research Center of Guangxi, Basic Medical College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3 Department of Physiology, Basic Medical College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) is a new type of immunotherapy. The results of a number of clinical studies have shown that CAR-T cells targeting CD19 have a significant effect on the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), bringing good news to patients with relapsed and refractory B-ALL. CAR-T cell therapy is considered to be the most potential immunotherapy. This article describes the progress in clinical research and improvement strategies of CD19 CAR-T cell therapy for B-ALL in recent years.

Key words: chimeric antigen receptor T cell; B-cells acute lymphoblastic leukemia; malignant tumor; nanobody; CD19

恶性肿瘤严重威胁着人类的健康, 已成为目前导致死亡的主要原因^[1]。长期以来, 恶性肿瘤治疗手段多以手术治疗与放化疗为主, 但这些传统的治疗方法仍有一定的局限性, 治疗后产生的副作用将严重影响患者的生活质量。随着近代肿瘤学、免疫学及分子生物学等学科迅速发展, 肿瘤免疫治疗兴起, 为恶性肿瘤的治疗带来了曙光。其中, 通过基因工程修饰表达嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) 的自体或异体 T 细胞可特异性靶向肿瘤细胞, 已逐渐成为一种有望应用于癌症的新型治疗方法^[2-3]。

目前靶向 B 细胞受体相关蛋白 CD19 的嵌合抗原受体 T 细胞 (CD19 chimeric antigen receptor T cell, CD19 CAR-T) 已被用于治疗 B 细胞恶性肿瘤, 尤其在治疗急性 B 淋巴细胞白血病 (B-cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL) 的临床前及 I、II 期临床试验中

收稿日期: 2021-06-02; 修回日期: 2022-04-23

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFE0117300); 广西科技基地和人才专项(桂科AD20238062)

*通信作者: E-mail: luxiaoling@gxmu.edu.cn (卢小玲); danizhong_gxmu@163.com (钟大妮)

均显示出了良好的抗肿瘤作用。Kantarjian 等^[4]使用 CD19 CAR-T 细胞 (Tisagenlecleucel) 治疗 271 例急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 患者, 发现中位生存期为 7.7 个月, 完全缓解率 (complete remission rate, CRR) 为 44% (临床试验号: NCT02013167)。基于此试验, 2017 年 8 月 30 日, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准了由诺华 (Novartis) 公司生产的 CAR-T 细胞产品 Kymriah (Tisagenlecleucel), 用于治疗 25 岁以下的复发或难治性 B-ALL (relapsed/refractory B-ALL, R/R B-ALL) 患者。这是世界上首个被批准用于临床治疗的 CAR-T 产品, 同时也为肿瘤治疗开启了“以基因修饰免疫细胞治疗”的新模式^[4]。随后, 利用 FDA 批准的 CD19 CAR-T 细胞 (Tisagenlecleucel) 在费城儿童医院开展了治疗小儿 ALL 的试验 (ELIANA 试验), 试验取得突破性进展: 72 例复发难治性 ALL 患者得到治疗, 在 3 个月时客观缓解率 (objective response rate, ORR) 为 81%, 所有回复者均获得微小残留病灶 (minimal residual disease, MRD) 阴性结果; 在 6 个月和 12 个月时, 无事件生存率 (event free survival, EFS) 分别为 73% 和 50%, 总生存率 (overall survival rate, OSR) 为 90% 和 76%^[5]。迄今为止, 已有 4 款 CAR-T 产品获 FDA 批准上市, 其详细对比见表 1。

本文主要就 CAR-T 细胞的发展历程、CD19 CAR-T 细胞在 ALL 中的应用、CD19 CAR-T 细胞治疗 ALL 相关并发症及提高 CD19 CAR-T 细胞抗肿瘤效力的新策略等进行综述。

1 CAR-T细胞的发展历程

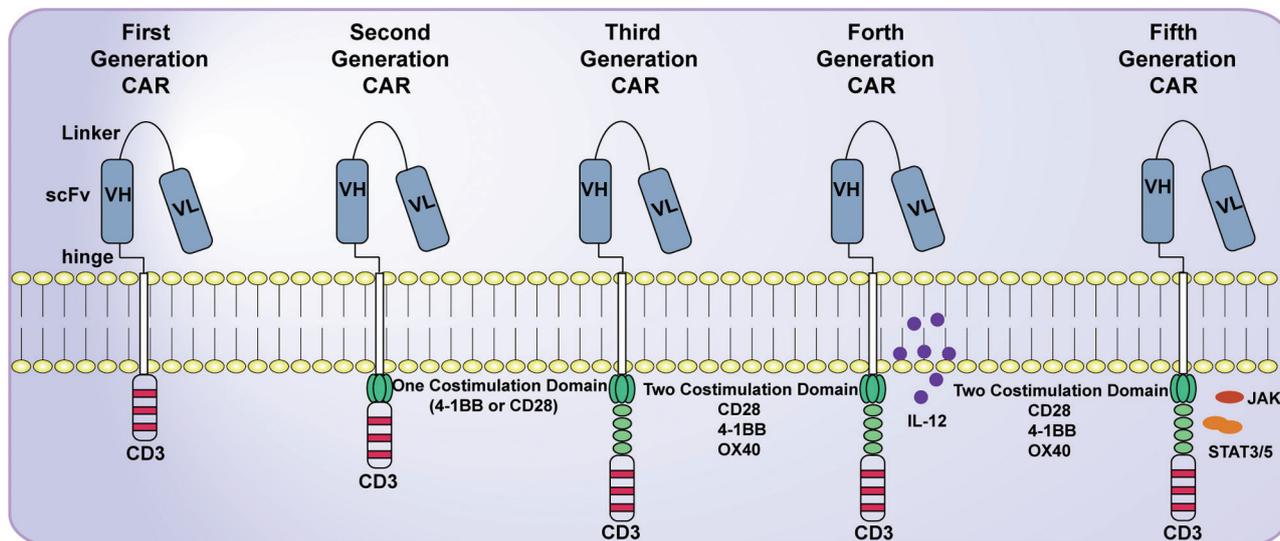
CAR 由可与肿瘤细胞表面表达的靶分子特异性结合的胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域组成, 当胞外结构域与其特异性靶标结合后, 胞内结构域向 T 细胞提供激活信号。胞外结构域通常由可识别和结合肿瘤抗原的单链可变片段 (single-chain variable fragment, scFv) 和起连接作用的铰链区 (Hinge) 组成, 当然也可使用其他分子识别抗原,

如细胞表面受体的配体。胞内结构域则包含 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 复合物中的 CD3 ζ 结构域, 其中的免疫受体酪氨酸活化基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 参与胞内信号转导。

1989 年, 以色列科学家 Eshhar 提出使用能识别抗原的抗体与 TCR 的信号分子融合, 避开主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 的限制, 使得 T 细胞被可溶性抗原诱导后特异性活化, 从而提出了 CAR 的概念^[6]。自 CAR-T 的概念被提出以来, 经过 30 余年的研究, CAR 的结构在不断改进和优化, 到目前为止, 根据 CAR 胞内信号区的不同, 已经产生了五代 CAR-T (图 1)。第一代 CAR-T 只含有一个胞内信号激活受体, 多为 CD3 ζ 或 FcR γ , 而 T 细胞的完全活化还需要共刺激信号使其持续增殖分化并分泌细胞因子。第一代 CAR-T 由于缺乏共刺激分子的支持, T 细胞被激活后很快丧失作用, 临床试验效果不佳。虽然有文献报道靶向肿瘤相关抗原 (tumor associated antigen, TAA) 的 CAR 可在人体内少量存在并保持一定时间, 但其扩增能力及抗肿瘤效力相对较低^[7]。第二代 CAR-T 细胞在第一代的基础上引入了一个共刺激分子, 如 CD28、4-1BB、OX40 或 ICOS, 使得二代 CAR-T 细胞在没有外源性共刺激分子的情况下也能增殖^[8-9]。第三代 CAR-T 细胞则在第二代的基础上又增加了一个共刺激分子, 包括两个串联的 CD28、4-1BB 或 OX40。第三代 CAR 的结构使 T 细胞能分泌更多的细胞因子, 增强了其抗肿瘤效力, 并能延长 T 细胞在体内的存活时间^[10]。到目前为止, 最新的第四代 CAR-T 也称为 TRUCK (T-cells redirected for universal cytokine killing), 增加了转基因产生的细胞因子信号放大系统, 可以在激活 T 细胞的同时引入促炎症的细胞因子 (如 IL-12), 进而使更多的免疫细胞被招募并活化以杀伤肿瘤细胞, 从而增强免疫抑制的肿瘤微环境中 CAR-T 细胞的抗肿瘤作用^[11-13]。前四代 CAR 的设计均有抗原特异性, 仅能靶向特定表位, 为提高 CAR 的灵活性, 可识别

表1 FDA批准上市的4款CD19 CAR-T产品

时间	公司	药品名	靶点	适应症
2017.08	诺华	Kymriah	CD19	复发或难治性急性B淋巴细胞白血病(ALL)、复发或难治性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)
2017.10	吉利德(Kite)	Yescarta	CD19	复发或难治性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)
2020.07	吉利德(Kite)	MSKCC	CD19	复发或难治性套细胞淋巴瘤(MCL)
2021.02	钧诺治疗	Byeanyi	CD19	复发或难治性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)



第一代CAR胞内区为CD3 ζ ; 第二代CAR的胞内区为一个共刺激分子(4-1BB或CD28)联合CD3 ζ ; 第三代CAR在第二代CAR的基础上增加一个共刺激分子; 第四代CAR的额外修饰使CAR-T细胞能够诱导性或结构性分泌如细胞因子类的转基因产物; 第五代CAR使用第三方中间系统拆分抗原靶向结合域和T细胞信号单位, 以赋予CAR-T识别更多抗原的能力。

图1 CAR的结构演变

更多抗原的第五代通用型 CAR 应运而生: 通用型 CAR 使用第三方中间系统如 BBIR CAR 或 SUPRA CAR, 拆分抗原靶向结合域和 T 细胞信号单位, 以赋予 CAR-T 识别更多抗原的能力。

2 CD19 CAR-T细胞治疗B-ALL的临床研究

B-ALL 是血液系统中常见的恶性肿瘤, 目前的治疗手段以化疗为主, 虽然化疗技术的发展显著提高了 B-ALL 的缓解率, 但缓解后复发率仍然较高, 复发者的预后并不理想。迄今为止, 已有超过 30 篇论文和大量摘要报道了 CD19 CAR-T 细胞在血液恶性肿瘤中进行的临床试验^[14]。

2011 年, 纽约纪念斯隆 - 凯特琳癌症中心 (MSKCC) 的 Brentjens 等^[15] 在 ALL 小鼠模型中观察到 CD19 CAR-T 细胞的抗肿瘤反应, 从而发起了第一个临床试验, 随后他们首次报道了使用 CD19 CAR-T 细胞治疗可以使复发难治性 ALL 达到完全缓解 (complete remission, CR), 并在输注 CD19 CAR-T 细胞 8 d 后仍保留 CAR-T 细胞的离体细胞毒性潜能。同时, 他们认为 CD19 CAR-T 治疗对低肿瘤负荷或 MRD 也可产生效力, 表明 CD19 CAR-T 有望成为 B 细胞恶性肿瘤的新疗法。2012 年, Rosenberg 课题组应用 CD19 CAR-T 细胞治疗 8 例 B-ALL: 6 例获得客观缓解 (objective response, OR), 4 例在 CD19 CAR-T 细胞治疗过程中出现炎症细胞因子干扰素- γ (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 (TNF) 水平显著升高带来

的副作用; 他们指出, 毒性与 CAR-T 细胞输注后的血清炎症细胞因子水平相关, 因此降低 CAR-T 细胞治疗后患者体内 IFN- γ 和 TNF 这些炎症细胞因子的水平可能是降低毒性反应的一种有效方法^[16]。

2013 年, Grupp 等^[17] 利用 CD19 CAR-T 细胞 (CTL019) 成功使 2 例患有 R/R B-ALL 的儿童获得 CR, 其骨髓和脑脊液中均可检测到 CD19 CAR-T 细胞, 并持续 6 个月处于较高水平; 但是, 有 2 例患者出现细胞因子释放综合征 (cytokine release syndrome, CRS) 和 B 细胞发育不全 (B cell aplasia)。2014 年, Shannon 等^[18] 报道 30 例接受 CTL019 治疗的 R/R B-ALL 患者的 CRR 达到 90%: 随访期 2~24 个月, 观察到 19 例患者持续缓解; 所有患者均出现 CRS, 其中 27% 的患者出现严重的 CRS, 通过抗白细胞介素-6 (IL-6) 受体的抗体妥西珠单抗 (Tocilizumab) 可有效治疗。2015 年, Davila 等^[19] 用 19-28z CAR-T 细胞治疗了 16 例 R/R B-ALL 患者, 14 例患者获得 CR, 总体 CRR 达到 88%, 但意想不到的是这种疗法对费城染色体阳性 (Ph⁺) 疾病高危患者与先前进行异体干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplant, allo-HSCT) 后复发的高危患者一样有效, 此次研究还确定了严重细胞因子释放综合征 (sCRS) 的诊断标准, 并提出血清 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 可以作为检测 CRS 严重程度的可靠指标。

2016 年, Frey 等^[20] 在美国临床肿瘤学会 (ASCO)

年会上报告了 51 例成人 R/R B-ALL II 期临床试验的新结果,其中包括 50 例具有高风险预后因素 (Ph⁺ B-ALL 患者、既往已行 allo-HSCT 治疗的患者和已使用 3 种及以上化疗方案治疗过的患者) 的可评估患者。输注 CD19 CAR-T 细胞治疗后, 41 例患者 (82%) 达到或持续 CR, 其中 16 例后续接受 allo-HSCT 治疗; 33 例通过多参数流式细胞术或深度测序获得 MRD 阴性, 有 15 例在随访期间复发, 其中 4 例为 CD19 阴性复发。本研究结果表明, CD19 CAR-T 细胞治疗成人 R/R B-ALL 效果明显优于其他治疗方法, 可为 R/R B-ALL 患者后续行 allo-HSCT 提供机会, 提高患者生存率, 但 CD19 CAR-T 细胞治疗后存在 CD19 阴性复发, 这可能与肿瘤细胞抗原逃逸反应有关, 需要进一步研究。同年, Brudno 等^[21]报道, 在 20 例 allo-HSCT 后复发的行 CD19 CAR-T 细胞治疗的 B-ALL 患者中有 8 例获得 CR, 其中获得缓解的患者的血 CAR-T 细胞峰值水平高于未获得缓解的患者; 研究还发现, 在 CD19 CAR-T 细胞输注后, CAR-T 细胞上程序性细胞死亡蛋白-1 (programmed cell death protein-1, PD-1) 的表达显著升高。这些研究提示, 可在 CAR-T 细胞输注后给予 PD-1 拮抗剂来提高 CD19 CAR-T 细胞的增殖水平。

2017 年 8 月 31 日, 首个 CAR-T 疗法正式上市, 诺华 Kymriah (Tisagenlecleucel, CTL019) 获 FDA 批准用于治疗 25 岁以下患有 B-ALL 的患者, 标志着血液肿瘤治疗模式的重要转变^[5]。2018 年, Maude 等^[5]用 Kymriah 治疗了 75 例 R/R B-ALL 患者, 通过流式细胞术评估发现, 3 个月内总缓解率 (overall response rate, ORR) 为 81%, 所有对治疗有反应的患者均呈 MRD 阴性。治疗后 20 个月内, 可观察到 Kymriah 在血液中持续存在。结果显示, 单次注射 Kymriah 可为患有 R/R B-ALL 的小儿和年轻成人患者提供持久的缓解。

为了减少单抗原靶向后抗原逃逸的发生率, 2018 年美国国家癌症研究所 (NCI) 研发了一种双重靶向策略, 使用单一的双特异性 CAR 而非 CD19 和 CD22 的共转导或同时修饰 CAR, 该双特异性 CAR 包含与 CD19 CAR (FMC63) 和 CD22 CAR (M971) 相同的 scFv^[22]。NCI 小儿肿瘤科和斯坦福大学对 HSCT 后的 R/R B-ALL 儿童和年轻患者进行了临床测试。斯坦福儿科数据表明, 4 例患者均出现 CR, 所有副作用均为 1 级^[22]。2019 年, He 等^[23]对 HSCT 后的 R/R B-ALL 成人患者行准备性淋巴清扫化疗后给予双特异性 CD19/CD22 CAR-T 细胞进行治疗,

患者保持 MRD 阴性的缓解时间超过 14 个月, 并且逐渐减少了移植物抗宿主疾病 (graft versus host disease, GVHD) 的预防。结果表明, 同时靶向 CD19 和 CD22 的 CAR 具有诱导 B-ALL 患者长期缓解的潜力。目前, CD19/CD22 CAR-T 已在早期临床试验中进行了评估, 结果显示该疗法是安全的, 并且在患有 R/R B-ALL 的儿童和年轻患者中显示出初步疗效^[24-26]。其他正在开发的双特异性 CAR 还有以 CD19/CD123 为靶标的 CAR。CD123 (IL-3 受体 α 链) 是造血祖细胞标记, 在儿童和成人 ALL 中也广泛表达。在临床前模型中, 双特异性 CD19/CD123 CAR 构建体能够有效介导抗白血病反应, 同时防止抗原阴性逃逸^[27]。

CD19 CAR-T 在成人和儿童 R/R B-ALL 患者中虽已取得显著成效, 但 CAR-T 疗法在 B-ALL 髓外复发患者中的应用和效果却鲜有报道。2021 年, Wan 等^[28]比较了 CD19 CAR-T 在骨髓和髓外受累患者中的疗效。8 名患者接受了 CD19 CAR-T 输注, 均达到 CR。虽然第一次输注后 3 名患者复发, 但他们依次接受 CD19/CD22 CAR-T 输注并获得第二次缓解。迄今为止, 有 5 名患者处于持续 CR 状态, 8 名患者均存活; 平均随访时间为 21.9 个月, 24 个月的估计无事件生存率 (estimated event-free survival) 为 51.4%。

由于 CD19 CAR-T 细胞治疗 ALL 可能产生相关的神经毒性, 迄今为止, 鲜有使用 CD19 CAR-T 细胞治疗伴有中枢神经系统白血病 (central nervous system leukemia, CNSL) 的 B-ALL 患者的报道。2022 年, Qi 等^[29]使用 CD19 CAR-T 细胞治疗 48 例伴有 CNSL 的 B-ALL 患者, 以评估 CD19 CAR-T 细胞疗法的疗效和安全性: 其中 11 例患者发生 3~4 级神经毒性事件 (NEs)(22.9%), 并在强化管理下得到有效控制; 结果显示, CD19 CAR-T 细胞可用于治疗伴有 CNSL 的 B-ALL, 在强化管理下具有安全性 (该临床试验在 www.clinicaltrials.gov 上注册为 #NCT02782351, 在 www.chictr.org.cn 上注册为 #ChiCTR-OPN-16008526)。以上开展的临床试验总结详见表 2。

3 CD19 CAR-T 细胞治疗 ALL 的相关并发症

CD19 CAR-T 细胞在 B-ALL 的治疗上取得了显著的临床效果, 为不少复发难治性 ALL 患者带来福音, 但在其临床应用中仍出现了多种不良反应及并发症, 其中主要有细胞因子释放综合征 (CRS)、

表2 CD19 CAR-T细胞治疗ALL的临床试验

时间	作者	机构	临床阶段	共刺激域	载体	注册人数	治疗人数	人群	CRS (≥3级)	完全缓解率
2012	Kochenderfer等 ^[16]	NCI	I	CD28	鼠干细胞病毒	8	7	成人	57.1%	86%
2013	Grupp等 ^[17]	CHOP	I	4-1BB	慢病毒	2	2	儿童	100% (50%)	100%
2013	Brentjens等 ^[30]	MSKCC	I	CD28	γ-逆转录病毒	未知	5	成人	60% (40%)	88%
2014	Davila等 ^[19]	MSKCC	I	CD28	γ-逆转录病毒	未知	16	成人	43.8%	100%
2014	Shannon等 ^[18]	CHOP	I/II	4-1BB	慢病毒	30	30	儿童/成人	100% (27%)	90%
2014	Porter等 ^[31]	UPenn	I/	4-1BB	慢病毒	未知	12	成人	91.7% (25%)	89%
2015	Lee等 ^[32]	NCI	I	CD28	γ-逆转录病毒	21	21	儿童	76% (29%)	70%
2015	Dai等 ^[33]	中国	I/II	4-1BB	慢病毒	未知	9	成人	未知	33.3%
2015	Grupp等 ^[34]	CHOP	I	4-1BB	慢病毒	未知	53	儿童	100% (32%)	94%
2015	Park等 ^[35]	MSKCC	I/II	CD28	γ-逆转录病毒	未知	46	成人	23.9%	82%
2015	Turtle等 ^[36]	FHCRC	I/II	4-1BB	慢病毒	未知	29	成人	93% (25.9%)	92%
2016	Frey等 ^[20]	CHOP	II	CD28	γ-逆转录病毒	51	50	儿童/成人	(30%)	82%
2016	Brudno等 ^[21]	NCI	I	CD28	γ-逆转录病毒	未知	20	成人	60%	40%
2017	Rossig等 ^[37]	GMUCH	I/II	CD28	EB病毒	19	11	儿童	0	46%
2017	Xiao等 ^[38]	中国	I/II	4-1BB	慢病毒	未知	30	儿童/成人	80% (27%)	87%
2017	Hu等 ^[39]	中国	I/II	4-1BB	慢病毒	22	15	成人	66.7% (40%)	80%
2017	Gardner等 ^[40]	SCRI	I/II	4-1BB	慢病毒	45	43	儿童	93% (23%)	89%
2018	Maudé等 ^[5]	Multicenter	II	4-1BB	慢病毒	92	75	儿童	77% (48%)	81%
2018	Qin等 ^[22]	NCI	I/II	CD28	γ-逆转录病毒	未知	4	儿童	100%	100%
2018	Park等 ^[41]	MSKCC	I	CD28	γ-逆转录病毒	83	53	成人	85% (26%)	83%
2018	Jacoby等 ^[42]	Israel	Ib/II	CD28	γ-逆转录病毒	21	20	儿童	80% (20%)	90%
2019	Hay等 ^[43]	FHCRC	I/II	4-1BB	慢病毒	61	53	成人	75% (19%)	85%
2019	He等 ^[23]	中国	II	4-1BB	慢病毒	1	1	成人	未知	100%
2019	Curran等 ^[44]	MSKCC	I/II	CD28	γ-逆转录病毒	38	30	成人	66% (21%)	79%
2019	Shah等 ^[45]	Multicenter	I/II	CD28	γ-逆转录病毒	45	31	成人	(31%)	69%
2019	Gardner等 ^[46]	SCH	I/II	4-1BB	慢病毒	43	40	儿童/年轻人	93% (4.7%)	93%
2020	Gu等 ^[47]	中国	I/II	4-1BB	慢病毒	20	18	儿童/年轻人	95% (45%)	90%
2020	Frey等 ^[48]	UPENN	I/II	4-1BB	慢病毒	35	24	成人	未知	69%
2020	Pasquini等 ^[49]	Multicenter	I/II	4-1BB	慢病毒	255	218	成人	(11.6%)	85.5%
2020	Wang等 ^[50-51]	中国	I/II	4-1BB	慢病毒	58	35	儿童/年轻人	未知	60%
2021	Shah等 ^[52]	Stanford University	I	CD28	γ-逆转录病毒	50	31	儿童/年轻人	70% (18%)	62%
2021	Ho等 ^[53]	中国	I/II	4-1BB	慢病毒	14	14	成人	25% (6.25%)	92.8%
2021	Cordoba等 ^[26]	NIH	I	4-1BB	慢病毒	15	13	儿童/年轻人	Unknown	86.7%
2022	Yuekun等 ^[29]	中国	I/II	CD28	慢病毒	48	41	成人	(22.9%)	85.4%

NCI, 国家癌症研究所; SCR, 西雅图儿童研究所; FHCRC, 弗雷德·哈钦森癌症研究中心; MSKCC, 纪念斯隆凯特琳癌症中心; GMUCH, 德国明斯特大学儿童医院; CHOP, 费城儿童医院; UPenn, 宾夕法尼亚大学; SCH, 西雅图儿童医院; NIH, 美国国立卫生研究院。CRS, 细胞因子释放综合征。

肿瘤溶解综合征 (tumor lysis syndrome, TLS)、神经毒性、脱靶效应 (off target effect)。

3.1 细胞因子释放综合征(CRS)

CRS 是 CAR-T 细胞临床应用中最显著的不良反应, 严重的 CRS 出现概率在 27%~53%, 常发生于接受 CAR-T 细胞治疗后 6~20 d^[54-55], 是限制其临床应用的主要原因。CRS 的作用机制是 CAR-T 细胞输注活化后, 短时间内杀伤肿瘤细胞的同时分泌炎性介质, 如 IL-2、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 等^[56], 同时招募和激活机体内其他的炎症细胞, 继而释放出大量细胞因子导致 CRS^[57]。大量细胞因子的释放可引发全身炎症反应, 除出现发热寒战、低血压、心动过速等症状外, 严重时还可出现肺水肿、心衰、呼吸窘迫等并发症。最早 CRS 用报告 AE 的 CTCAE 来分级, 但 CTCAE 系统不足以诠释 CRS

出现的时相、范围、严重程度^[58], 因此 MD Anderson 癌症中心的研究人员基于 CRS 和神经毒性发表了 Lee 分级^[59], 但有学者提出该分级并不适合所有的 CAR-T 产品。因此, 宾夕法尼亚大学研究人员开发了一种新的 CRS 分级标准 (Penn grading scale)^[60], 旨在更好地定义不同适应症间 CD19 CAR-T 相关 CRS 的严重程度和精确地指导 CRS 的控制, 三种分级方法的比较详见表 3。

CD19 CAR-T 细胞治疗后的 B-ALL 患者血清中 IL-10、IL-6、IFN- γ 、C 反应蛋白 (CRP) 等炎性因子及铁蛋白水平明显升高^[61], CRS 症状和严重程度个体差异大, 但高热常为其特征性表现, 临床中需注意与感染鉴别。Lee 等^[59]招募了 21 例 B-ALL 患者, 行 CD19 CAR-T 细胞治疗后 CRS 发生率为 76.2%, 最严重者出现 4 级 CRS。研究发现, 使用

表3 CRS分级量表

	Penn分级量表 ^[60]	CTCAE v4.0分级量表 ^[58]	Lee分级量表 ^[59]
1级	轻度反应: 用退热药、止吐药等支持治疗	轻微反应: 未指示中断输液; 未指明干预	症状不会危及生命, 只需对症治疗, 例如发烧、恶心、疲劳、头痛、肌痛、不适
2级	中度反应: 一些与 CRS 相关的器官功能障碍迹象(例如, 2级肌酐或3级LFT), 并且不能归因于任何其他情况。住院治疗 CRS 相关症状, 包括发热伴中性粒细胞减少, 需要静脉滴注治疗(不包括低血压液体复苏)	需要治疗或输液中断, 但对对症治疗反应迅速(例如, 抗组胺药、非甾体抗炎药、麻醉剂、静脉输液); 预防性药物指征 ≤ 24 小时	症状需要适度干预并对其作出反应。需氧量 $<40\%$ 或对液体或低剂量升压剂有反应的低血压或 2 级器官毒性
3级	更严重的反应: 需要住院治疗与器官功能障碍相关的症状, 包括与 CRS 相关的 4 级 LFT 或 3 级肌酐, 并且不能归因于任何其他情况; 不包括发烧或肌痛的治疗; 包括用静脉输液(定义为用于支持血压的多次液体推注)或低剂量血管加压药治疗的低血压, 需要新鲜冷冻血浆或冷沉淀或纤维蛋白原浓缩物的凝血功能障碍, 以及需要补充氧气的缺氧(鼻导管吸氧、高流量吸氧、CPAP 或 BiPAP)。因发热和(或)中性粒细胞减少而入院治疗疑似感染的患者可能患有 2 级 CRS	长期反应(例如, 对症状药物反应不迅速和(或)输液短暂中断); 初步改善后症状复发; 因临床后遗症住院(例如, 肾功能损害、肺部浸润)	症状需要积极干预并对其作出反应, 需氧量 $\geq 40\%$ 或需要大剂量或多次加压的低血压或 3 级器官毒性或 4 级转氨酶
4级	危及生命的并发症, 例如需要大剂量升压药的 低血压、需要机械通气的缺氧	危及生命的后果; 升压器或呼吸机支持	危及生命的症状, 需要呼吸机支持或 4 级氧中毒(不包括转氨酶)

BiPAP, 双水平气道正压; CPAP, 持续气道正压通气治疗; CTCAE, 不良事件的通用术语标准; IV, 静脉内; LFT, 肝功能检查; NSAID, 非甾体抗炎药。

糖皮质激素或抗 IL-6 受体抗体妥西珠单抗 (Tocilizumab) 进行免疫抑制可逆转 CRS, 并提出了一种对单个患者 CRS 的严重程度进行分级的新标准及相应级别的治疗方案^[59,62]。Davila 等^[19] 提出血清 C 反应蛋白 (CRP) 可以作为检测 CRS 严重程度的可靠指标, 从而能尽早预测及更精确地诊断 CRS。

3.2 肿瘤溶解综合征(TLS)

TLS 是 CAR-T 细胞在体内被抗原刺激后扩增和释放细胞因子, 从而导致大量肿瘤快速溶解坏死, 释放细胞内物质入血所引起的代谢紊乱综合征^[63]。在 CD19 CAR-T 细胞输注后应进行严密监测, 出现 TLS 应及时给予处理, TLS 现已通过标准支持疗法成功进行管理, 包括根据需要进行静脉水化作用、碱化尿液及纠正电解质紊乱等, 以药物处理的方式予以缓解^[64]。

3.3 脱靶效应

脱靶效应是指 CAR-T 细胞输注入体内攻击肿瘤组织以外的低表达靶标抗原的正常组织, 这种毒性取决于 CAR 的抗原特异性。CD19 CAR-T 细胞治疗 B-ALL 患者时, 常见的脱靶效应是由于 CD19 CAR-T 细胞反应在体内持续存在而引起的 B 细胞发育不良。Kalos 等^[65] 的临床研究发现, 可以通过注射两种球蛋白改善 CAR-T 治疗 B-ALL 所引起的 B 细胞发育不良导致的低丙球蛋白血症。因此, 找到特异性高表达的 TAA 是降低脱靶效应风险的关键, 当然除选择合适的肿瘤抗原外, 引入自杀基因也不失为一个好的解决措施^[66]。通过基因编辑导入自杀基因在可控的条件下诱导 CD19 CAR-T 细胞发挥抗肿瘤作用, 然后根据需要诱导其凋亡从而终止治疗。到目前为止, 诱导细胞凋亡最快的是 iCasp9 基因, iCasp9 细胞自杀系统可能会大大提高 CD19 CAR-T 细胞疗法的安全性并扩大其临床应用^[67-68]。

3.4 神经毒性

CAR-T 细胞治疗引起的神经毒性称为 CAR-T 细胞相关脑病综合征 (CAR-T cell relevant encephalopathy syndrome, CRES), 常伴随 CRS 发生, 但 CRES 的发病机制与 CRS 不同, 并且 CRES 发生机制尚未阐明。CRES 发生的一个可能机制是 IL-1 触发独立单核细胞激活, 而后 IL-6 等多种细胞因子表达, 继而激活 T 细胞和巨噬细胞, 导致全身炎症加重^[69]; 另一个可能机制是血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 的破坏。BBB 的破坏导致脑实质中的 T 细胞 (包括 CAR-T 细胞) 迁移, 并导致脑脊液中细胞因子和蛋白质水平升高, 导致中枢神经系统炎症和毒性的产

生。并且, 内皮细胞激活会加重全身炎症和 BBB 破坏^[70]。此外, CAR-T 细胞可以直接损伤中枢神经系统 (CNS): 研究者在脑脊液中检测到了 CAR-T 细胞, 表明 CAR-T 细胞可穿透 CNS, 并且发生神经毒性的患者体内 CAR-T 细胞数量明显高于未发生神经毒性的患者^[71]。

与 CRS 一样, 目前临床上采用糖皮质激素治疗 CRES。如果患者在发生 CRES 的同时伴有 CRS 的发生, 可使用托珠单抗进行治疗。Santomasso 等^[72] 研究发现, 在 B-ALL 重症患者中, CRES 和 CRS 同时存在。但是, 在临床和动物模型中的研究结果显示, 单独使用托珠单抗并不能治疗 CRES: 托珠单抗可能通过增加 CNS 中循环的 IL-6, 增加 CRES 的发生率和严重程度。因此, 托珠单抗通常不推荐用于不伴随 CRS 的 CRES 的治疗。另一种 IL-6 嵌合单克隆抗体西妥昔单抗对循环 IL-6 有直接作用^[73], 并且不会增加脑脊液中 IL-6 的水平, 在调节神经毒性方面可能发挥更重要的作用。

前面提到, IL-1 在 CRES 发生机制中起到了重要的作用, 而研究人员也发现, IL-1 的受体拮抗剂阿那白滞素能够有效控制 CRES 和 CRS, 显著延长肿瘤患者存活时间^[72]。

4 提高CD19 CAR-T细胞抗肿瘤效力的新策略

尽管 CD19 CAR-T 细胞的临床疗效显著, 但尚有许多不足之处, 因此为了提高 CD19 CAR-T 细胞的抗肿瘤效力, 学者们也在努力研究一些新策略。

4.1 “Armoured” CAR-T

“Armoured” CAR-T 是一类通过进一步修饰以额外表达免疫调节蛋白 (包括促炎性细胞因子及配体), 从而保护自身免受抑制性肿瘤微环境影响的新型 CAR-T^[74-75]。前文中提到, CAR-T 细胞输注活化后, 短时间内杀伤肿瘤细胞的同时分泌炎症性介质, 如 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 等^[55], 而 Pegram 等^[76] 指出 IL-12 是一种具有多重免疫刺激功能的多效性细胞因子。IL-12 刺激可导致 IFN- γ 分泌增加以及溶细胞蛋白颗粒酶 B 和穿孔素的表达增加, 从而导致 CAR-T 细胞毒性增加, 因此研究人员设计了能分泌促炎性细胞因子 IL-12 的 “Armoured” CAR-T: 临床前研究表明, 这种经修饰能分泌促炎性细胞因子 IL-12 的 “Armoured” CAR-T 对调节性 T 细胞 (regulatory T-cells, Treg) 介导的抑制有内在抗性, 可延长 CAR-T 存活时间, 提高 CAR-T 细胞毒性, 与传统 CAR-T 相比显示出更高的抗肿

瘤效力^[76]。

4.2 双靶点或多靶点CAR-T/Nb CAR-T

来自全球不同的临床试验结果均表明, CD19 CAR-T 细胞可使 B-ALL 患者获得 CR, 但 CD19 CAR-T 细胞临床治疗后复发仍是最大的难题。在接受 CD19 CAR-T 细胞治疗后获得缓解的患者中, 约 30%~50% 病情会复发, 且大多在接受治疗后 1 年内发生复发^[77]。其复发机制复杂且多样, Riet 和 Abken^[78] 研究发现, 在接受抗 CD19 的 CAR-T 细胞治疗后, 多达 50% 的 pre-B 细胞 ALL 患者在回输 12 个月内多以这两种模式复发: (1) 抗原阳性白血病的早期复发; (2) 与抗原丢失相关的晚期复发。此外, 还有癌细胞的胞吞作用 (troglucytosis)、CAR-癌细胞介导的免疫逃逸。其中最常见的是 CD19 阴性复发, 即肿瘤细胞不表达 CD19 使其能逃避 CAR-T 细胞的杀伤作用。为了解决单靶点治疗 B-ALL 复发或无效的问题, 一些研究中心开发了双靶点或多靶点的 CAR-T 细胞, 临床前试验结果表明, 双靶点或多靶点的 CAR-T 比单靶标 CAR-T 具有更强的抗肿瘤作用^[18]。He 等^[23] 对 HSCT 后 R/R B-ALL 成人患者给予双靶点 CD19/CD22 CAR-T 细胞进行治疗, 发现可减少 CD19 阴性复发。2020 年, Nicole^[25] 在美国癌症研究协会 (AACR) 年会上报告, 双靶点 CD19/CD22 CAR-T 细胞治疗 R/R B-ALL 年轻患者的 I 期临床试验结果显示, 该疗法是安全的, 并且在患有 R/R B-ALL 的儿童和年轻患者中显示出初步疗效, 12 例受试者中 5 例获得 CR。CD19/CD20 双特异性 CAR-T 也已在早期临床试验中进行了评估, 具有安全性和抗肿瘤效力^[79]。CD123 在儿童和成人 ALL 中也广泛表达, 因此 CD123 可能成为 R/R B-ALL 的又一特异性靶标。双靶点 CD19/CD123 CAR 构建体在临床前 CD19⁻ 荷 ALL 小鼠模型中显示出强大的抗肿瘤效力, 同时能防止抗原阴性逃逸^[27]。CD22 亦可作为克服 CD19 阴性逃逸的潜在靶点。Shah 等^[80] 使用靶向 CD22 的 CAR-T 细胞治疗 58 例 R/R B-ALL 儿童和年轻患者 (其中 62% 的患者之前接受过 CD19 CAR-T 治疗): 在可评估反应的患者 ($n = 57$) 中, CD22 CAR-T 细胞治疗 R/R B-ALL 患者 CR 达到 61%。

有研究表明, CAR 构建体的大小显著影响病毒载体的包装和转导效率, 并且与单独表达两个 CAR 的 T 细胞相比, 双特异性 CAR 具有较小的 DNA (DNA 长度减少约 40%)^[81-82]。Zah 等^[83] 将双重抗原识别功能设计到单个 CAR 分子中, 即双特

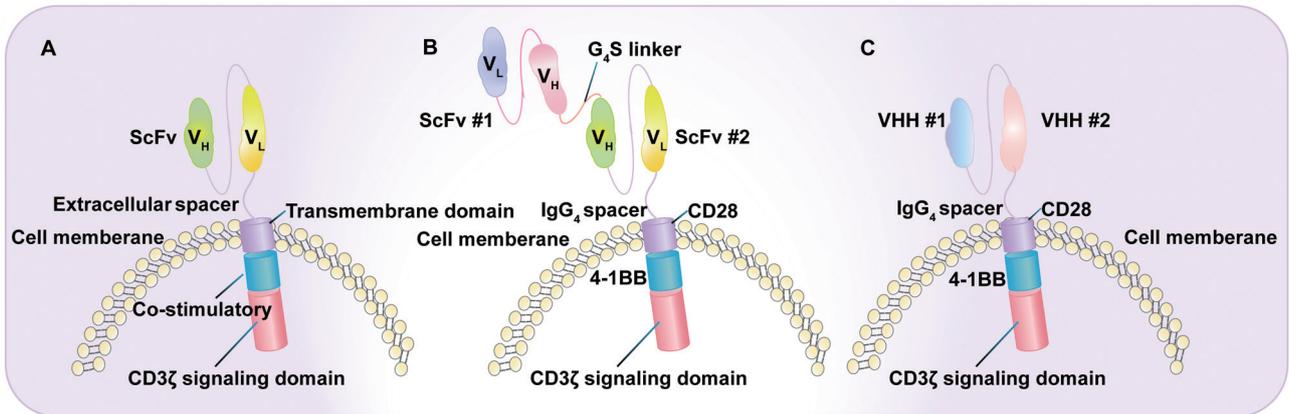
异性 CD19/CD20 CAR-T 细胞, 可更有效地靶向 CD19⁺ 肿瘤细胞, 也可对 CD19/CD20⁺ 产生杀伤效应, 避免免疫逃逸, 并且在进一步增强 CD19/CD20 CAR-T 对 CD20 的响应的同时, 不会影响受体对 CD19⁺ 靶细胞的敏感性。

目前, 用于构建 CAR 的细胞外抗原识别结构域多为识别 TAA 的 scFv, scFv 虽为一种较理想的导向抗体, 但 scFv 并不总能有效折叠, 并且容易粘黏、团聚^[83], 且 scFv 免疫原性强, 可能引起免疫排斥^[84]。源自骆驼科的纳米抗体 (nanobody, Nb or VHH) 与人类 VH 高度同源 (可降低受体免疫系统发生免疫反应的风险), 且 VHH 结构简单、体积小、稳定性高、易于改造, 是传统抗体的有益补充^[85]。传统 scFv 构建的双靶点或多靶点 CAR-T 细胞表面同时表达多个不同的 scFv, 不同 CAR 间可变区域的错配将削弱 CAR-T 细胞与抗原结合的功能。基于缺失轻链的纳米抗体构建双靶点或多靶点 CAR-T 细胞可避免 CAR 的相互干扰^[86-87] (图 2)。在 Sepideh 等^[88] 的研究中, 使用 VHH 作为抗原结合结构域构建的 CAR-T 细胞可提高特异性抗原诱导的 IL-2 细胞因子的水平, 并且促进 CAR-T 细胞的特异性扩增。

因此, 基于 VHH 的双靶点或多靶点 CAR-T 细胞具有巨大的治疗肿瘤的潜力, 必将开启新一代 CAR-T 细胞的开发之路。

4.3 联用免疫检查点阻断剂

肿瘤微环境中存在的抑制性免疫检查点信号, 如程序性细胞死亡蛋白 -1 (programmed cell death protein-1, PD-1) 及其配体 (PD-L1) 和细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 -4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) 等, 容易影响 CAR-T 细胞的活性。已有研究表明, 使用这些免疫检查点 (PD-1/PD-L1、CTLA-4 等) 的抗体可以恢复内源性肿瘤特异性 T 细胞反应。Brudno 等^[21] 曾报道复发 ALL 患者行 CD19 CAR-T 细胞治疗输注后, PD-1 在 CD19 CAR-T 细胞上的表达显著升高, 提示可在 CD19 CAR-T 细胞输注后给予 PD-1 拮抗剂来提高 CAR-T 的增殖水平。Sarwish 等^[89] 将构建的分泌 PD-1 scFv 的 CD19 CAR-T 细胞用于 PD-L1⁺ ALL 小鼠模型发现, 该方法可明显改善 CAR-T 细胞和旁观者肿瘤特异性 T 细胞的抗肿瘤活性, 也可避免与检查点抑制相关的毒性。目前, 一项临床试验 (NCT00586391) 正在评估 CD19 CAR-T 联合 Ipilimumab (CTLA-4 mAb) 治疗 B-ALL、CLL 和 B 细胞淋巴瘤患者的临床疗效。因此, 将 CAR-T 与免疫检查点抑制信号的单克隆



A: 基于ScFv的单靶点CAR; B: 基于ScFv的双特异性CAR; C: 基于VHH的双特异性CAR。

图2 单靶点CAR-T与双特异性CAR-T结构图

抗体或单链抗体联合使用,能够保护CAR-T的抗肿瘤作用,抑制肿瘤抑制微环境的影响。

5 展望

CAR-T细胞治疗作为一种新兴的免疫治疗方法,在B-ALL的治疗中更是取得了令人满意的疗效,具有非常广阔的应用前景。然而,CD19 CAR-T细胞治疗技术目前仍有诸多临床亟待解决的问题,如寻找一个或多个特异性、安全性更高的肿瘤细胞靶点,设计最佳的CAR结构,优化CD19 CAR-T细胞对抗原的识别能力等,探索最简便实用的CD19 CAR-T细胞的生产及筛选工艺,制定CD19 CAR-T细胞的各种相关并发症的诊断及预防治疗策略,都是CAR-T免疫治疗领域的研究热点。

其中,合理地选择和利用靶点是决定CAR-T细胞疗效的关键之一。获取理想的靶点非常困难,通过选择靶点和优化CAR结构可以增强靶点的性能:使用2个靶抗原构建双靶向CAR或者在一个CAR上连接2个scFv或Nb,通过靶点的识别互补扩大靶点覆盖范围;将CD3和胞内共刺激分子分开构建2个CAR,或将正常结构的CAR联合一个抑制性CAR(胞内区连接抑制性分子,如CTLA-4或PD-1)构建双靶向CAR,均可提高治疗靶点的特异性^[89]。

CD19 CAR-T细胞免疫治疗的一个重大限制因素是制造过程所需的大量时间及财力。CAR-T制造通常需要至少3~6周,涉及收集患者T细胞、CAR-T细胞制造,到最后CAR-T细胞进入患者体内。在此过程中,制造时间、潜在的制造失败或延迟以及患者疾病进展的风险都是CAR-T细胞治疗

的重大障碍。此外,每个CAR-T治疗的物流及个性化制造都显著增加了成本。因此,不少研究者提出了开发“现成”的CAR-T产品的想法,这些产品可以提前制造和储存,并可在几天内提供给需要的患者。而解决自体CAR-T细胞挑战最具前景的方法之一是开发同种异体CAR-T细胞,可以利用从健康供体收集的T细胞预先制成CAR-T细胞,冷冻储存,然后根据需要运送给治疗机构。这种方法将大大缩短CAR-T的治疗时间,降低制造延迟或失败的风险,也将显著降低成本。然而,使用同种异体CAR-T最大的问题是由T细胞介导的GVHD风险。幸运的是,随着锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应因子核酸酶(TALEN)和CRISPR/Cas9等基因编辑技术的发展,通过编辑TCR内源性的 α 或 β 亚基和HLA位点恒定区域的基因组序列,可以破坏同种异体抗原识别和T细胞活化,使其在制造工程中具有修改异体T细胞的潜力^[89-93]。由此产生的CAR-T被称为通用型CAR-T或UCART,因为它们能够普遍用于HLA不匹配的受体,具有有限的异体反应性和GVHD风险。通用型CAR-T已在临床前研究中进行了探索,其具有针对多种抗原的良好临床前活性。目前,多项临床试验正在进行中,以确定各种同种异体CAR-T产品的疗效和毒性,有可能显著改善与自体CAR-T治疗相关的制造挑战和成本问题^[93-95]。

上述问题的解决将为CD19 CAR-T细胞免疫治疗在血液恶性肿瘤中的大规模应用提供新的思路。随着研究的不断进展,结构缺陷及技术短板等方面的难题逐渐解决,无疑会产生更多安全、高效的CD19 CAR-T细胞并应用于临床,CD19 CAR-T细

胞免疫治疗在血液恶性肿瘤中的治疗潜力值得期待。

[参 考 文 献]

- [1] Thun MJ, Delancey JO, Center MM, et al. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis*, 2010, 311: 100-10
- [2] Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, 2015, 348: 62-8
- [3] June CH, Riddell SR, Schumacher TN. Adoptive cellular therapy: a race to the finish line. *Sci Transl Med*, 2015, 7: 280ps7
- [4] Kantarjian H, Stein A, Gokbuget N, et al. Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 2017, 376: 836-47
- [5] Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 2018, 378: 439-48
- [6] Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86: 10024-8
- [7] Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, 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: 1245-56
- [8] Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9: 271-85
- [9] Jensen MC, Riddell SR. Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells. *Immunol Rev*, 2014, 257: 127-44
- [10] Burns WR, Zhao Y, Frankel TL, et al. A high molecular weight melanoma-associated antigen-specific chimeric antigen receptor redirects lymphocytes to target human melanomas. *Cancer Res*, 2010, 70: 3027-33
- [11] Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*, 2012, 119: 4133-41
- [12] Wagner HJ, Bollard CM, Vigouroux S, et al. A strategy for treatment of Epstein-Barr virus positive Hodgkin's disease by targeting interleukin 12 to the tumor environment using tumor antigen-specific T cells. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11: 81-91
- [13] Zhang L, Kerkar SP, Yu Z, et al. Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Mol Ther*, 2011, 19: 751-9
- [14] DeLong L. CAR-T "the living drugs", immune checkpoint inhibitors, and precision medicine: a new era of cancer therapy. *J Hematol Oncol*, 2019, 12: 2-5
- [15] 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: 4817-28
- [16] Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, 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: 2709-20
- [17] Grupp SA, Kalos M, Baret D, et al. Chimeric antigen receptor modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 2013, 368: 1509-18
- [18] Shannon L, Maude MD, Grupp SA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, 2014, 371: 1507-17
- [19] 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. *Sci Trans Med*, 2014, 6: 224-5
- [20] Frey NV, Shaw PA, Hexner EO, et al. Optimizing chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for adult patients with relapsed or refractory (r/r) acute lymphoblastic leukemia (ALL). *J Clin Oncol*, 2016, 34: 7002
- [21] Brudno JN, Somerville RP, Shi V, et al. Allogeneic T cells that express an anti-CD19 chimeric antigen receptor induce remissions of B-cell malignancies that progress after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation without causing graft-versus-host disease. *J Clin Oncol*, 2016, 34: 1112-21
- [22] Qin H, Ramakrishna S, Nguyen S, et al. Preclinical development of bivalent chimeric antigen receptors targeting both CD19 and CD22. *Mol Ther Oncol*, 2018, 11: 127-37
- [23] He JJ, Zhen GW, Yao W, et al. Haploidentical CD19/CD22 bispecific CAR-T cells induced MRD-negative remission in a patient with relapsed and refractory adult B-ALL after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol*, 2019, 12: 2-9
- [24] Dai H, Wu Z, Jia H, et al. Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 and CD22 for therapy of adults with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol*, 2020, 13: 1-10
- [25] Nicole H. Targeting CD19-CD22 aids younger patients with ALL. *Cancer Discov*, 2020, 10: OF1
- [26] Cordoba S, Onuoha S, Thomas S, et al. CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in pediatric and young adult patients with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia: a phase 1 trial. *Nat Med*, 2021, 10: 27
- [27] Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest*, 2016, 126: 3814-26
- [28] Wan XY, Yang XM, Yang F, et al. Outcomes of anti-CD19 CAR-T treatment of pediatric B-ALL with bone marrow and extramedullary relapse. *Cancer Res Treat*, 2021, 4: 17
- [29] Qi YK, Zhao MF, Hu YX, et al. Efficacy and safety of CD19-specific CAR T-cell-based therapy in B-cell acute lymphoblastic leukemia patients with CNSL. *Blood*, 2022, 3: 25
- [30] 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: 177ra38
- [31] Porter DL, Frey NV, Melenhorst JJ, et al. Randomized, phase II dose optimization study of chimeric antigen receptor modified T cells directed against CD19 (CTL019) in patients with relapsed, refractory CLL. *Blood*, 2014, 21: 124
- [32] Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukemia in children and young adults: a phase I dose-escalation trial. *Lancet*, 2015, 385: 517-28
- [33] Dai H, Zhang W, Li X, et al. Tolerance and efficacy of autologous or donor-derived T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors in adult B-ALL with extramedullary leukemia. *Oncoimmunology*, 2015, 4: e1027469
- [34] Grupp SA, Maude SL, Shaw PA, et al. Durable remissions in children with relapsed/refractory ALL treated with T cells engineered with a CD19-targeted chimeric antigen receptor (CTL019). *Blood*, 2015, 126: 681
- [35] Park JH, Riviere I, Wang X, et al. Implications of minimal residual disease negative complete remission (MRD-CR) and allogeneic stem cell transplant on safety and clinical outcome of CD19-targeted 19-28z CAR modified T cells in adult patients with relapsed, refractory B-cell ALL. *Blood*, 2015, 126: 682
- [36] Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, et al. Addition of fludarabine to cyclophosphamide lymphodepletion improves in vivo expansion of CD19 chimeric antigen receptor-modified T cells and clinical outcome in adults with B cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2015, 126: 3773
- [37] Rossig C, Pule M, Altvater B, et al. Vaccination to improve the persistence of CD19CAR gene-modified T cells in relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2017, 31: 1087-95
- [38] Xiao L, Huang HE, Huang X, et al. Efficacy of anti-CD19 chimeric antigen receptor modified T (CAR-T) cell therapy in Chinese patients with relapsed/refractory acute lymphocytic leukemia in a multicenter trial. *J Clin Oncol*, 2017, 35: 7028-28
- [39] Hu Y, Wu Z, Luo YI, et al. Potent anti-leukemia activities of chimeric antigen receptor-modified T cells against CD19 in Chinese patients with relapsed/refractory acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 3297-306
- [40] Gardner RA, Finney O, Annesley C, et al. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood*, 2017, 129: 3322-31
- [41] Park JH, Riviere I, Gonen M, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 2018, 378: 449-59
- [42] Jacoby E, Bielorai B, Avigdor A, et al. Locally produced CD19 CAR T cells leading to clinical remissions in medullary and extramedullary relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol*, 2018, 93: 1485-92
- [43] Hay KA, Gauthier J, Hirayama AV, et al. Factors associated with durable EFS in adult B-cell ALL patients achieving MRD-negative CR after CD19 CAR-T cells. *Blood*, 2019, 133: 1652-63
- [44] 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, 12: 134: 2361-8
- [45] Shah BD, Bishop M, Oluwole OO, et al. End of phase I results of ZUMA-3, a phase 1/2 study of KTE-X19, anti-CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy, in adult patients (pts) with relapsed/refractory (R/R) acute lymphoblastic leukemia (ALL). *J Clin Oncol*, 2019, 37: 7006
- [46] Gardner RA, Ceppi F, Rivers J, et al. Preemptive mitigation of CD19 CAR T cell cytokine release syndrome without attenuation of anti-leukemic efficacy. *Blood*, 2019, 12: 134
- [47] Gu RX, Liu F, Zou DH, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol*, 2020, 122: 9-13
- [48] Frey NV, Shaw PA, Hexner EO, et al. Optimizing chimeric antigen receptor T-cell therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 2020, 38: 415-22
- [49] Pasquini MC, Hu ZH, Curran K, et al. Real-world evidence of tisagenlecleucel for pediatric acute lymphoblastic leukemia and nonHodgkin lymphoma. *Blood Adv*, 2020, 4: 5414-24
- [50] Wang M, Munoz J, Goy A, et al. KTE-X19 CAR T-cell therapy in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *New Engl J Med*, 2020, 382: 1331-42
- [51] Wang M, Jain P, Chi TL, et al. Management of a patient with mantle cell lymphoma who developed severe neurotoxicity after chimeric antigen receptor T-cell therapy in ZUMA-2. *J Immunother Cancer*, 2020, 8: e001114
- [52] Shah NN, Lee DW, Bonnie Y, et al. Long-term follow-up of CD19-CAR T-cell therapy in children and young adults with B-ALL. *J Clin Oncol*, 2021, 3: 1-11
- [53] Ho JY, Wang L, Liu Y, et al. Promoter usage regulating the surface density of CAR molecules may modulate the kinetics of CAR-T cells *in vivo*. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 21: 237-46
- [54] Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol*, 2015, 33: 540-9
- [55] Tasian SK, Gardner RA. CD19-redirected chimeric antigen receptor-modified T cells: a promising immunotherapy for children and adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Therap Adv Hematol*, 2015, 6: 228-41
- [56] Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, et al. Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov*, 2016, 6: 664-79
- [57] Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, 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: 2709-20
- [58] US Department of Health and Human Services. Common terminology criteria for Adverse Events (CTCAE). V4.03. 2010[EB/OL]. (2010-06-14) https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_8.5x11.pdf
- [59] Lee DW, Gardner R, Porter DL, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*, 2014, 124: 188-95
- [60] Porter DL, Hwang WT, Frey NV, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med*, 2015, 7: 303ra139
- [61] Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, 2014, 371: 1507-17
- [62] Schuster SJ, Maziarz RT, Rusch ES, et al. Grading and management of cytokine release syndrome in patients treated with tisagenlecleucel in the JULIET trial. *Blood Adv*, 2020, 4: 1432-39
- [63] Watanabe K, Terakura S, Martens AC, et al. Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 ζ chimeric antigen receptor modified effector CD8⁺ T cells. *J Immunol*, 2015, 194: 911-20
- [64] Baret DM, Singh N, Porter DL, et al. Chimeric antigen receptor therapy for cancer. *Annu Rev Med*, 2014, 65: 333-47
- [65] 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 Trans Med*, 2011, 3: 95ra73
- [66] Liu E, Tong Y, Dotti G, et al. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent anti-tumor activity. *Leukemia*, 2018, 2: 32
- [67] Antonio DS, Siok KT, Gianpietro D, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*, 2011, 365: 1673-83
- [68] 张慧慧,孔群芳,吕晓菲,等. 自杀基因作为一种“安全性开关”控制CAR-T细胞毒性的临床前研究. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28: 225-31
- [69] Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med*, 2018, 24: 739-48
- [70] Gust J, Hay KA, Hanafi LA, et al. Endothelial activation and blood-brain barrier disruption in neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CD19 CAR-T cells. *Cancer Discov*, 2017, 7: 1404-19
- [71] Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, 2014, 371: 1507-17
- [72] Santomasso BD, Park JH, Salloum D, et al. Clinical and biological correlates of neurotoxicity associated with CAR T-cell therapy in patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov*, 2018, 8: 958-71
- [73] Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, et al. Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer*, 2018, 6: 56
- [74] Heemskerk B. Adoptive cell therapy for patients with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2. *Hum Gene Ther*, 2008, 19: 496-510
- [75] Hoyos V. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*, 2010, 24:1160-70
- [76] Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*, 2012, 119: 4133-41
- [77] Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16: 372-85
- [78] Riet T, Abken H. Chimeric antigen receptor T cells: power tools to wipe out leukemia and lymphoma. *Expert Rev Hematol*, 2015, 8: 383-5
- [79] Han X, Wang Y, Wei J, et al. Multi-antigen-targeted chimeric antigen receptor T cells for cancer therapy. *Hematol Oncol*, 2019, 12: 1-10
- [80] Shah NN, Highfill SL, Shalabi H, et al. CD4/CD8 T-cell selection affects chimeric antigen receptor (CAR) T-cell potency and toxicity: updated results from a phase I anti-CD22 CAR T-cell trial. *J Clin Oncol*, 2020, 38: 1938-50
- [81] Bos TJ, De BE, Van LS, et al. Large double copy vectors are functional but show a size-dependent decline in transduction efficiency. *J Biotechnol*, 2010, 150: 37-40
- [82] Kumar M, Keller B, Makalou N, et al. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, 2001, 12: 1893-905
- [83] Zah E, Lin MY, Silva BA, et al. T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells. *Cancer Immunol Res*, 2016, 6: 46
- [84] Sun W, Xie J, Lin H, et al. A combined strategy improves the solubility of aggregation-prone single-chain variable fragment antibodies. *Protein Expr Purif*, 2012, 83: 21-9
- [85] Maus MV, Haas AR, Beatty GL, et al. T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans. *Cancer Immunol Res*, 2013, 1: 26-31
- [86] Song DG, Ye Q, Carpenito C, et al. *In vivo* persistence, tumor localization, and antitumor activity of car-engineered T cells is enhanced by costimulatory signaling through CD137 (4-1BB). *Cancer Res*, 2011, 71: 4617-27
- [87] Ingram JR, Schmidt FI, Ploegh HL, et al. Exploiting nanobodies' singular traits. *Annu Rev Immunol*, 2018, 4: 1-21
- [88] Sepideh K, Fatemeh R, Davoud A, et al. A caspase 8-based suicide switch induces apoptosis in nanobody-directed chimeric receptor expressing T cells. *Int J Hematol*, 2012, 95: 434-44
- [89] Sarwish R, Oladapo OY, Hollie JJ, et al. Targeted delivery of a PD-1-blocking scFv by CAR-T cells enhances anti-

- tumor efficacy *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 847-56
- [90] Poirot L, Philip B, Schiffer C, et al. Multiplex genome-edited T-cell manufacturing platform for “off-the-shelf” adoptive T-cell immunotherapies. *Cancer Res*, 2015, 75: 3853-64
- [91] Georgiadis C, Preece R, Nickolay L, et al. Long terminal repeat CRISPR-CAR-coupled “Universal” T cells mediate potent anti-leukemic effects. *Mol Ther*, 2018, 26: 1215-27
- [92] DiPersio JF, Staser K, Cooper M. Immunotherapy for T-cell ALL and T-cell NHL. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2020, 20: S56-8
- [93] Depil S, Duchateau P, Grupp SA, et al. ‘Off-the-shelf’ allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19: 185-99
- [94] Cooper ML, Choi J, Staser K, et al. An “off-the-shelf” fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leukemia*, 2018, 32: 1970-83
- [95] Perez C, Gruber I, Arber C. Off-the-shelf allogeneic T cell therapies for cancer: opportunities and challenges using naturally occurring “universal” donor T cells. *Front Immunol*, 2020, 11: 683-716