

Research
Immunology—Article

供体来源的 CD19 靶向 T 细胞输注消除异基因造血干细胞移植后对供者淋巴细胞无反应的急性 B 淋巴细胞白血病微小残留病

程翼飞^{a,b,#}, 陈育红^{a,b,#}, 闫晨华^{a,b}, 王昱^{a,b}, 赵翔宇^{a,b}, 陈瑶^{a,b}, 韩伟^{a,b}, 许兰平^{a,b}, 张晓辉^{a,b}, 刘开彦^{a,b}, 王莎莎^{a,b}, 张隆基^c, 肖磊^d, 黄晓军^{a,b,*}^a Beijing Key Laboratory of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Peking University Institute of Hematology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China^b Collaborative Innovation Center of Hematology, Peking University, Beijing 100084, China^c Shenzhen Geno-Immune Medical Institute, Shenzhen 518057, China^d Innovative Cellular Therapeutics Co., Ltd., Shanghai 201499, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2018

Revised 23 December 2018

Accepted 26 December 2018

Available online 11 January 2019

关键词

供体来源的 CD19 靶向 T 细胞输注
造血干细胞移植
急性 B 淋巴细胞白血病
微小残留病

摘要

白血病复发仍是异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT) 后急性 B 淋巴细胞白血病 (B cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL) 治疗失败的主要原因。allo-HSCT 后 B-ALL 复发患者的中位生存期很短。微小残留病 (minimal residual disease, MRD) 预示着造血干细胞移植 (HSCT) 后白血病将复发; 消除 MRD 将有效防止复发。HSCT 后治疗伴有 MRD 的 B-ALL 的主要方法是供者淋巴细胞输注 (donor lymphoblastic infusion, DLI)。然而, 在出现 MRD 的患者中, 约三分之一的患者对 DLI 并无反应, 且预后恶劣。虽然供体来源的 CD19 导向嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor-modified, CAR) 修饰 T 细胞 (CART19) 可能治愈白血病, 但输注此类细胞的效率与安全性尚未在经过 HSCT 后出现 MRD 的 B-ALL 患者当中进行过考察。在 2014 年 9 月至 2018 年 2 月期间, 6 名患者均一次或多次输注了 HSCT 供者提供的 CD19 导向 CAR 修饰 T 细胞。其中有 5 名患者 (83.33%) 的 MRD 阴性得到缓解, 而另 1 名患者对 CAR T 细胞并无反应。6 名患者中有 3 名至今存活, 白血病也并未复发。无患者出现急性移植物抗宿主病 (acute graft-versus-host disease, aGVHD), 也无患者死于细胞因子释放综合征。对于在 allo-HSCT 后出现 MRD 的 B-ALL 患者且对 DLI 并无反应的患者而言, 供体来源的 CAR T 细胞输注似乎是一种有效而安全的干预手段。

© 2019 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

急性 B 淋巴细胞白血病 (B cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL) 可通过异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)

治愈[1,2]。血液病复发是allo-HSCT后B-ALL患者治疗失败的常见原因, 且这些患者的临床结果也不甚理想。allo-HSCT后, B-ALL复发的成年患者的中位生存期为5.5月, 而对于allo-HSCT后B-ALL复发的儿童患者而言, 其无事件生存率 (event-free survival, EFS) 为15%, 总

* Corresponding author.

E-mail address: xjhrm@medmail.com.cn (X. Huang).

These authors contributed equally to this work.

生存率 (overall survival, OS) 为20%[3,4]。

HSCT后, 一旦出现微小残留病 (minimal residual disease, MRD), 血液病必然会复发, 因此可作为抢先治疗的标记[5-7]。通常, allo-HSCT后防止B-ALL患者复发和出现阳性MRD的主要方法是减少/停用免疫抑制药、使用干扰素以及供者淋巴细胞输注 (donor lymphoblastic infusion, DLI) [8-10]。多项研究已探讨了干扰素和供体淋巴细胞输注对治疗allo-HSCT后B-ALL MRD的有效性。对于allo-HSCT后B-ALL复发, DLI是一项非常重要的方案。然而, DLI的响应率却很低。Yan等[11]发现, 在半相合造血干细胞移植 (haploidentical hematopoietic stem cell transplantation, haplo-HSCT) 后急性白血病复发的患者中, 约64%的患者在接受DLI后可以达到完全缓解 (complete remission, CR), 且其一年无疾病存活率 (disease-free survival, DFS) 为36%。Yan等[12]还发现, 相较于对照组, 以MRD和移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 为导向的多种巩固化疗与供体淋巴细胞输注降低了累计复发率 (cumulative incidence of relapse, CIR), 增加了无白血病存活率 (leukemia-free survival, LFS), 并增加了急性白血病haplo-HSCT后复发患者的存活率。但是, 约三分之一对供者淋巴细胞无反应的患者预后恶化, 亟需创新方法来提高这些患者的总体存活率。

通过分化簇 (cluster of differentiation, CD) 19导向嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) 修饰T细胞 (CART19) 可以有效地消除化疗后复发患者的白血病细胞, 而且对于进行HSCT的患者而言, CART19s也起着重要的作用。一般来说, CART19s可来自患者或供者。尽管自体CART19s在未出现GVHD的HSCT前患者中可能显示出有效的抗白血病活性, 但是却难以从已经进行过HSCT的患者、当前接受化疗的患者以及出现疾病复发的患者身上获取足够的高质量T细胞。供体来源的CART19s表现出有效的移植物抗白血病 (graft-versus-leukemia, GVL) 活性, 且不影响来自CART19s的细胞毒活性[13]; 供体来源的CART19s的安全性和有效性是本研究的关注焦点。Brudno等[14]从形态学角度评估了CART19s对于复发患者的效果, 这些患者接受了人类白细胞抗原相合同胞供者及无关供者的异基因血液或骨髓移植, 且并未出现GVHD。随后, 在haplo-HSCT后对DLI无反应的B-ALL复发患者中, 在接受供体来源的CD19靶向T细胞输注后, 多数患者MRD阴性缓解[15]。

这些临床研究表明, 供体来源的CART19s可消除HSCT后复发患者的白血病细胞, 甚至对DLI无反应的患者也是如此。初步结果也表明, 供体来源的抗CD19 CAR T细胞输注对于HSCT后B细胞恶性肿瘤复发患者也是安全的。目前尚未确定供体来源的CAR T细胞输注是否是治疗HSCT后B细胞恶性肿瘤MRD的有效干预手段。在本研究中, 我们评估了供体来源的抗CD19CAR T细胞输注对DLI无效的B细胞恶性肿瘤MRD阳性患者的临床干预结果。

2. 方法

2.1. 患者

本研究纳入了2014年9月至2018年2月在北京大学血液病研究所接受CAR T细胞输注且符合下列标准的患者: ①诊断患有B-ALL; ②allo-HSCT后出现被定义为形态学上缓解的MRD, 并且对任何MRD检测[包括流式细胞术、*WT1*表达、可检测融合基因患者所做的实时定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 的融合基因检测]均呈阳性结果; ③对一次或多次DLI无反应 (无反应定义为DLI后25~30天骨髓穿刺液检测显示MRD阳性); ④白血病细胞的CD19表达经流式细胞测量予以确定。

该方案经北京大学人民医院审查委员会评估, 并得到批准。所有参与本研究的患者均根据《赫尔辛基宣言》在知情的情况下给予同意。

2.2. haplo-HSCT 程序

之前的报道[16]中描述了haplo-HSCT程序, 包括预处理、GVHD预防、干细胞收集和支持性疗法。预处理期间使用了以下药物: 阿糖胞苷 (2天, 每天 $4 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$)、白消安 (busulfan, Bu) (3天, 每天 $3.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、环磷酰胺 (cyclophosphamide, Cy) (2天, 每天 $1.8 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$)、司莫司汀 (1天, $250 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$)、抗人胸腺细胞免疫球蛋白 (4天, 每天 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 美国马萨诸塞州波士顿健赞公司的兔抗胸腺细胞免疫球蛋白)。所有患者均接受了粒细胞集落刺激因子动员骨髓干细胞及外周血干细胞治疗。所有移植受者均接受了使用环孢素A (cyclosporine A, CsA)、霉酚酸酯和短期甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 来预防移植后急性移植物抗宿主病 (acute graft-versus-host disease, aGVHD)。

2.3. 同胞全合的 HSCT 程序

所有患者均采用改良BuCy2方案治疗, 包括: 羟基脲(在输注前第10天口服两剂 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、阿糖胞苷(在输注前第9天每天静脉注射 $2 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$)、白消安(在输注前第8天至第6天每天静脉给药 $3.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、环磷酰胺(在输注前第5天至第4天每天 $1.8 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$)和司莫司汀(在输注前第3天给予 $250 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$)。至于aGVHD预防, 则同上所述使用了CsA; 骨髓恢复之日停用霉酚酸酯, 在第1、3、6天给予甲氨蝶呤[17]。

2.4. DLI 程序

本研究中, DLI包括在化疗后输注粒细胞集落刺激因子动员外周血干细胞一次, 并在输注后为了预防GVHD给予免疫抑制药[18]。单核细胞的中位剂量为 $1 \times 10^8 \text{ kg}^{-1}$ 。DLI后, 所有患者均按照主治医师的建议接受了4~6周的CsA等免疫抑制药治疗(通常取决于DLI后患者的GVHD情况), 以预防GVHD。CsA的初始剂量为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 对剂量进行了调整, 使血浆浓度保持在 $150 \sim 250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对DLI无反应定义为DLI一个月后检测出MRD。

2.5. 细胞生产

我们通过外周血分离从每个患者的异基因移植供体的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中生产抗CD19 CAR T细胞。CAR T细胞的产生时间为5~15天。激活与修饰T细胞, 以表达获取外周血单核细胞后的4SCAR19基因。在输注前5~7天, 4SCAR19慢病毒转导后, 激活外周血单核细胞并使其富集于T细胞中。输注CART19s前, 每个患者的CART19s均进行了转导效率的荧光活化细胞分选(fluorescence-activated cell-sorting, FACS)分析以及体外细胞毒性检测。此外, CART19s培养期间, 还评估了可能存在的真菌、细菌、支原体、衣原体和内毒素污染。有关CART19s的其他详情请见附录A。

2.6. CAR T 细胞输注方案

患者接受了目的在于清除淋巴细胞的淋巴细胞消减治疗。大多数患者根据肿瘤负荷与主治医师的建议接受了基于氟达拉滨或环磷酰胺的化疗(详情请见第3.2节)。在未进行术前用药的情况下, CART19s直接被输入患者体内; 第3.4节给出了输入的细胞剂量与特征。当满足下列其中一个标准时, 患者接受第二剂CAR T细胞输

注: ①第一次输注后患者MRD检测结果呈阳性; 或②患者出现了形态学复发情况。

2.7. CAR T 细胞输注和 GVHD 的毒性

采用细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)的通用标准对CAR T细胞输注后的毒性进行了分级[19,20]。在获得合适的培养物并开始经验性抗生素治疗后, 对所有表现出CRS的患者的感染可能性均进行了考虑。

根据受感染器官的临床特征确诊GVHD为急性或慢性, 且根据先前发布的标准对aGVHD进行了分级[21]。当无法排除GVHD时, 采用了包括甲泼尼龙或地塞米松的初始疗法。静脉注射1剂 $1 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的甲泼尼龙。对GVHD不受控制的患者给予CsA, 随后进行了剂量调整, 使血浆浓度保持为不低于 $150 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.8. 反应评价

在CAR T细胞输注后的第15和(或)第30天进行了骨髓检查, 以评估临床效果, 或者如果有临床指征, 则会尽早进行。其后, 每1~3个月均进行了骨髓检查。对所有患者均采用流式细胞测量进行了骨髓涂片和微小残留疾病检测, 采用qPCR进行融合基因检测, 并测量了WTI表达水平。

MRD阴性完全缓解定义为所有MRD检测有形态学缓解, 并呈阴性结果, 这些检测包括WTI表达、流式细胞测量以及可检测融合基因患者的qPCR融合基因检测。

2.9. 统计分析

采用描述性统计评估了患者特点。使用Fisher精确检验比较了微小残留病率, 使用Student *t* 检验评估了定性变量。所有分析均使用SPSS软件(版本19, SPSS公司, 芝加哥, 伊利诺伊州, 美国)进行。

3. 结果

3.1. 患者特点

本研究包括6名allo-HSCT后出现MRD的B-ALL患者(3名女性, 3名男性, 年龄范围: 12~46岁), 其中, 4例接受haplo-HSCT, 另两例接受人类白细胞抗原相合同胞供者HSCT。所有患者均出现了MRD, 且对至少1疗程供体淋巴细胞输注无反应(表1)。其中, 5名患者接受一次以上输注(总输注次数: 15), 且中位

CAR T细胞输注剂量为 1.51×10^8 个细胞 $\cdot\text{kg}^{-1}$ （范围： $2 \times 10^7 \sim 3.66 \times 10^8$ 个细胞 $\cdot\text{kg}^{-1}$ ）。对所有患者的观察持续到2018年2月。

3.2. 完全缓解率与临床结果

6名患者中，有5名（83.33%）在首次输注后达到了MRD阴性完全缓解，其中5名患者在CAR T细胞输注后平均健康生活了3个月（2~17个月不等）。患者1~4出现了MRD复发。患者1接受了第二次输注，但未得到缓解。患者2接受了第二次输注且得到缓解，但两个月之后出现MRD复发。随后，患者2接受了四次CART19s输注，但未得到缓解。患者3和4接受了第二次输注，摆脱了白血病继续生存。患者5对第一、第二次CAR T细胞输注无反应，出现形态学复发，并于其后死于白血病。患者6情况出现缓解，继续无病生存。所有详情总结在表2和表3中。

3.3. GVHD

后续CAR T细胞输注期间，无患者出现aGVHD。

3.4. 细胞因子释放综合征

CAR T细胞输注之后观察到的毒性包括发烧、低血压、低血氧、谷丙转氨酶（alanine transaminase, ALT）升高，在排除其他原因后，被归为CRS。根据修订后的分级制度对CRS进行评分[21]。每名患者出现的毒性列

于表4中。6名患者出现5次CRS事件（83.33%），且这5次事件均发生在第一次输注之后（1级：2次；2级：1次；3级：2次）。

一名患者需要药物干预（妥珠单抗）：患者6在输注后第8天出现皮疹、发烧和低血压症状，并于输注后第8天和第9天接受了两次托珠单抗治疗。

3.5. 外周血 CART19s

在4个输注疗程期间，通过qPCR于输注后第7天、第14天、第21天分别测量外周血中的CART19s。外周血中的CART19s于输注后第7天达到峰值，并于第21天减少（表4）。

4. 讨论

MRD是HSCT后预测血液病复发的方法[22,23]，消除MRD可以预防复发。采用了多种方法治疗MRD。DLI后给予干扰素疗法和化疗是HSCT后对复发急性淋巴细胞白血病的重要干预手段。Mo等[24]表示，对HSCT后出现MRD的急性淋巴细胞白血病患者的DLI结果和 α 型干扰素（IFN- α ）治疗结果对比，抢先的IFN- α 疗法是HSCT后无法接受DLI的MRD阳性患者的一种替代疗法。本次对比表明，实施干预后，IFN- α 组和DLI组患者的一年无疾病存活率分别为68.2%和60.0%。Yan等[12]表示，与对照组相比，以MRD和GVHD为导向的多

表1 患者特点

Patient	Age (years old)	Sex	Donor/type of transplant	Malignancy	Detection of MRD	Status before CAR T cell infusion	DLI before CAR T cell infusion	Frequency of CAR T cell infusion
1	16	M	Father/haplo-HSCT (4/6)	B-ALL ph+ (T315I) CNSL TL	FCM (0.02%), <i>WT1</i> , <i>BCR/ABL</i> = 1.4%	MRD+, CNSL	6	1 + 1
2	12	F	Father/haplo-HSCT (3/6)	B-ALL, <i>TEL/AML1</i> +	FCM, <i>WT1</i>	MRD+	1	1 + 5
3	40	M	Brother/haplo-HSCT (4/6)	B-ALL ph+ CNSL	FCM, <i>WT1</i> , <i>BCR/ABL</i>	MRD+, CNSL	2	1 + 1
4	28	F	Father/haplo-HSCT (3/6) The second HSCT, CP3	CML lymphoblastic crisis	FCM, <i>WT1</i> , <i>BCR/ABL</i>	MRD+	2	1 + 1
5	18	M	Sibling (6/6)	B-ALL	FCM, <i>WT1</i>	MRD+	2	1 + 1
6	46	F	Sibling (6/6)	B-ALL ph+	FCM, <i>WT1</i> , <i>BCR/ABL</i>	MRD+	1	1

CML: chronic myelogenous leukemia; CNSL: central nervous system leukemia; F: female; FCM: flow cytometry; M: male; ph+: philadelphia chromosome-positive; sibling: HLA-matched sibling donor; TL: testicular leukemia.

表2 CAR T细胞首次输注与患者结果

Patient	Chemotherapy before infusion	Chimeric	CAR T cells infused (kg)	CRS	Evaluation of MRD	GVHD	Glu	Virus	Bas	MR time (month)	Clinical outcome	Survival time after infusion (month)
1	CODP	—	1.10×10^8	2	CR	—	—	Herpes simplex (12th month)	—	5	Relapse (death)	12
2	Cy	Full chimera	2.00×10^7	3	CR	—	—	—	—	2	Relapse (death)	12
3	COMP	Full chimera	2.24×10^8	1	CR	—	—	—	—	3	MR (CNSL-CR)	15 (alive)
4	None	Full chimera	9.00×10^7	1	CR	—	—	—	—	4	MR	16 (alive)
5	CHOP	—	1.30×10^8	—	NR 0.07% (3%)	—	—	—	—	—	Relapse (death)	5
6	Flu + Cy	Full chimera	3.66×10^8	3 ^a	CR	—	—	—	—	17	MR	17 (alive)

Bas: basiliximab; CHOP: cyclophosphamide ($750 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on day 1) + vincristine ($1.4 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on days 1, 8, 15, 21) + adriamycin ($50 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on day 1) + prednisone ($60 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on days 1–21); CODP: cyclophosphamide ($750 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on day 1) + vincristine ($1.8 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on days 1, 8, 15, 21) + daunorubicin ($40\text{--}60 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on days 1–3) + prednisone ($60 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on days 1–21); COMP: cyclophosphamide ($400 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on days 1, 8) + vincristine ($1.4 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on days 1, 8) + mitoxantrone ($5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on days 1–4) + prednisone ($60 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on days 1–21); Cy: cyclophosphamide ($500 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on days 1–3); Flu: fludarabine ($30 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ on days 1–3); Glu: glucocorticoid; MR: molecular remission. NR: no response

^a Patient 6 required medication intervention (tocilizumab $\times 2$ on days 8 and 9).

表3 CAR T细胞第二次输注与患者结果

Patient	Chemotherapy	Evaluation before CAR T cell fusion	CAR T cells infused (kg)	CRS	Evaluation	Clinical outcomes
1	CODP	MRD+	2.60×10^8	0	MRD+	Relapse (death), 7 months
2	Ara-C	MRD+	—	0	MRD+	Relapse (death), 12 months
3	Flu	MRD+, CNSL	8.00×10^7	0	CR	Alive
4	None	Relapse	6.20×10^7	0	CR	Alive
5	Flu + Cy	MRD+	1.70×10^8	0	Relapse	Relapse (death), 3 months

种巩固化疗加DLI可以减少累计复发率，增加无白血病存活率以及allo-HSCT后急性白血病复发患者的存活率。三年累计复发率、无白血病患者与移植后存活率分别为32.4%、50.3%和51.4%。Ma等[25]报道，采用DLI治疗了allo-HSCT后复发的19名高危疾病患者，并监测是否出现MRD。其中，6名患者（31.58%）在DLI后未出现白血病进展。由此可知，DLI方案对于治疗急性淋巴细胞白血病的疗效有限，且可能导致危及生命的GVHD。此外，约三分之一的MRD患者可能对DLI无反应，且预后可能恶化。这些患者应采用创新方案予以治疗。

CAR T细胞代表一种新型的、有发展前景的免疫疗法[26]。我们探讨了人类白细胞抗原相合同胞供者/无关供者移植后供体来源CART19s输注；在患B-ALL的5名患者中，其中，4名（80%）出现了缓解，且未复发aGVHD[14]。我们还开展了供体来源的CD19靶向T细胞输注临床研究，发现此种治疗使在haplo-HSCT后对供

体淋巴细胞输注无反应的B-ALL复发患者出现了MRD阴性缓解。6名患者中，有5名（83.33%）出现了MRD阴性缓解；此外，CRS和GVHD也均得到了控制[15]。总之，供体来源的CD19靶向T细胞输注似乎是治疗allo-HSCT后B-ALL复发患者的有效方法。然而，目前尚不清楚CAR T细胞输注对造血高细胞移植后对供体淋巴细胞输注无反应的MRD患者来说是否有效。本研究结果表明，供体来源的CART19s也是HSCT后治疗MRD患者的有效方法。就我们所知，本研究包括allo-HSCT后B-ALL复发患者接受供体来源的CART19s输注的最大研究。本研究结果提供了供体来源的CART19s输注可有效消除MRD的初步证据。

一直以来，人们都很关心供体来源的CAR T细胞输注的安全性。在体外实验中，供者CART19s可在不破坏GVHD活性的情况下增加移植抗白血病活性，同时不影响细胞毒活性[27]。本研究中还从aGVHD与细胞因

表4 输入的细胞特性和相关毒性

Patient	Stage	CAR T cells infused (kg)	Cell percentage (%)				CD8/CD4 in infused CAR T cells		Content of CART19s detected in peripheral blood (detection time)			CRS symptoms
			CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD56 ⁺	CAR T cells		1st detection	2nd detection	3rd detection	
1	1st infusion	1.10 × 10 ⁸	88	40	48	11	1.2	0.01 (1st DAI)	0.88 (38th DAI)	0 (100th DAI)	Fever, hypotension, dysfunction-al blood coagulation	
	2nd infusion	2.60 × 10 ⁸	—	—	—	—	—	0 (1st DAI)	0 (7th DAI)	0 (21st DAI)	—	
2	1st infusion	2.00 × 10 ⁷	—	—	—	—	—	0.21 (7th DAI)	1.31 (12th DAI)	4.28 (20th DAI)	Fever, hypotension, hypoxemia	
3	1st infusion	2.24 × 10 ⁸	—	—	—	—	—	0 (4th DAI)	1 × 10 ⁵ copies:(μg·g) ⁻¹ DNA (7th DAI)	0 (20th DAI)	Fever	
	2nd infusion	8.00 × 10 ⁷	—	—	—	—	—	—	2 × 10 ⁵ copies:(μg·g) ⁻¹ DNA (7th DAI)	0 (21st DAI)	—	
4	1st infusion	9.00 × 10 ⁷	—	—	—	—	—	0 (4th DAI)	6 × 10 ⁵ copies:(μg·g) ⁻¹ DNA (7th DAI)	0 (21st DAI)	Fever	
	2nd infusion	6.2 × 10 ⁷	—	—	—	—	—	0 (1st DAI)	4.6 × 10 ⁵ copies:(μg·g) ⁻¹ DNA (7th DAI)	0 (28th DAI)	—	
5	1st infusion	1.30 × 10 ⁸	—	—	—	—	—	0 (1st DAI)	0.12 (7th DAI)	0.05 (21st DAI)	Fever	
	2nd infusion	1.70 × 10 ⁸	—	—	—	—	—	0 (1st DAI)	0 (7th DAI)	0 (14th DAI)	—	
6	1st infusion	3.66 × 10 ⁸	—	—	—	—	—	0.32 (2nd DAI)	13.86 (7th DAI)	10.87 (30th DAI)	Fever, hypotension, dysfunction-al blood coagulation	

DAI: day after infusion.

子综合征两个方面评估了供者来源的CAR T细胞输注对HSCT受体的安全性。无患者出现主要令人担心的并发症——aGVHD。本研究中的GVHD的发病率与程度低于因先前用于治疗复发患者的CAR T细胞输注而导致的GVHD的发病率与强度[15]。这种临床现象与Jacoby等[28]报道的结果一致。在体外，鼠类转基因CD19 T细胞表现出有效的抗白血病活性，但也表现出潜在的致命性GVHD。然而，CAR引起的GVHD仅在白血病细胞的情况下才会发生。另一种主要担忧是CRS。在本研究中，无患者直接死于CRS。此外，本研究尽管有中枢神经系统白血病（CNSL）患者参与，但并未出现与CRS相关的脑水肿病例。因此，供体来源的CAR T细胞输注对于HSCT后B-ALL的MRD是安全的。

本研究中，在接受CAR T细胞输注之前，6名MRD患者中，有5名患者（83.33%）在第一次输注后达到了分子完全缓解，有3名患者至今仍在人世。我们先前的研究中，有反应的5名患者中，有4名患者在2~7个月后复发血液病[15]。尽管本研究纳入的病例较少，但确定MRD治疗对复发患者是否有足够的效果值得评估。

5. 总结

根据临床观察，我们提出供体来源的CAR T细胞输注是HSCT后可消除B细胞恶性肿瘤患者MRD的一种有效与安全的干预手段。而让人印象更深刻的是，本研究观察期间无患者出现GVHD。但是，尚不清楚这种情况出现的机制。需要进一步的实验和更大规模的临床试验来确认CAR T细胞输注是否可以用作消灭对DLI无反应的患者和MRD患者的MRD的一线干预措施。

致谢

本工作得到了首都医学发展科研基金（2018-2-4084）的支持。

Author contributions

Yifei Cheng and Yuhong Chen analyzed the material and wrote the paper. Shasha Wang collected the data. Xiangyu Zhao, Chenhua Yan, Yu Wang, Yao Chen, Wei

Han, Lanping Xu, and Xiaohui Zhang performed the research. Lungji Chang and Lei Xiao contributed to cell production. Kaiyan Liu designed the research. Xiaojun Huang designed the research and edited the manuscript.

Compliance with ethics guidelines

The present protocol was evaluated and allowed by the Peking University People's Hospital review board. All enrolled patients gave informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Yifei Cheng, Yuhong Chen, Chenhua Yan, Yu Wang, Xiangyu Zhao, Yao Chen, Wei Han, Lanping Xu, Xiaohui Zhang, Kaiyan Liu, Shasha Wang, Lungji Chang, Lei Xiao, and Xiaojun Huang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Nomenclature

aGVHD	acute graft-versus-host disease
allo-HSCT	allogeneic hematopoietic stem cell transplantation
ALT	elevated alanine transaminase
B-ALL	B cell acute lymphoblastic leukemia
Bu	busulfan
CAR	chimeric antigen receptor
CART19	CD19-directed chimeric antigen receptor-modified T cell
CD	cluster of differentiation
CIR	cumulative incidence of relapse
CR	complete remission
CRS	cytokine release syndrome
CsA	cyclosporine A
Cy	cyclophosphamide
DLI	donor lymphoblastic infusion
EFS	event-free survival
FACS	fluorescence-activated cell-sorting
GVHD	graft-versus-host disease
GVL	graft-versus-leukemia
haplo-HSCT	haploidentical hematopoietic stem cell transplantation
HLA	human leukocyte antigen

HSCT	hematopoietic stem cell transplantation
LFS	leukemia-free survival
MRD	minimal residual disease
MTX	methotrexate
OS	overall survival
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.12.006>.

References

- [1] Numata A, Fujisawa S, Itabashi M, Ishii Y, Yamamoto W, Motohashi K, et al. Favorable prognosis in Philadelphia chromosome-positive B-cell acute lymphoblastic leukemia patients following hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant* 2016;30(5):485–6.
- [2] Yan CH, Jiang Q, Wang J, Xu LP, Liu DH, Jiang H, et al. Superior survival of unmanipulated haploidentical hematopoietic stem cell transplantation compared with chemotherapy alone used as post-remission therapy in adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia in first complete remission. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(9):1314–21.
- [3] Kuhlen M, Willasch AM, Dalle JH, Wachowiak J, Yaniv I, Ifversen M, et al. Outcome of relapse after allogeneic HSCT in children with ALL enrolled in the ALL-SCT 2003/2007 trial. *Br J Haematol* 2018;180(1):82–9.
- [4] Spyridonidis A, Labopin M, Schmid C, Volin L, Yakoub-Agha I, Stadler M, et al. Outcomes and prognostic factors of adults with acute lymphoblastic leukemia who relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation. An analysis on behalf of the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Leukemia* 2012;26(6):1211–7.
- [5] Bader P, Kreyenberg H, von Stackelberg A, Eckert C, Salzmann-Manrique E, Meisel R, et al. Monitoring of minimal residual disease after allogeneic stem cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia allows for the identification of impending relapse: results of the ALL-BFM-SCT 2003 trial. *J Clin Oncol* 2015;33(11):1275–84.
- [6] Terwey TH, Hemmati PG, Nagy M, Pfeifer H, Gökbuget N, Brüggemann M, et al. Comparison of chimerism and minimal residual disease monitoring for relapse prediction after allogeneic stem cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(10):1522–9.
- [7] Sutton R, Shaw PJ, Venn NC, Law T, Dissanayake A, Kilo T, et al. Persistent MRD before and after allogeneic BMT predicts relapse in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2015;168(3):395–404.
- [8] Mo XD, Zhang XH, Xu LP, Wang Y, Yan CH, Chen H, et al. Interferon- α : a potentially effective treatment for minimal residual disease in acute leukemia/myelodysplastic syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(11):1939–47.
- [9] Yan CH, Liu DH, Xu LP, Liu KY, Zhao T, Wang Y, et al. Modified donor lymphocyte infusion-associated acute graft-versus-host disease after haploidentical T-cell-replete hematopoietic stem cell transplantation: incidence and risk factors. *Clin Transplant* 2012;26(6):868–76.
- [10] Pochon C, Oger E, Michel G, Dalle JH, Salmon A, Nelken B, et al. Follow-up of post-transplant minimal residual disease and chimerism in childhood lymphoblastic leukaemia: 90 d to react. *Br J Haematol* 2015;169(2):249–61.
- [11] Yan CH, Wang JZ, Liu DH, Xu LP, Chen H, Liu KY, et al. Chemotherapy followed by modified donor lymphocyte infusion as a treatment for relapsed acute leukemia after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion: superior outcomes compared with chemotherapy alone and an analysis of prognostic factors. *Eur J Haematol* 2013;91(4):304–14.
- [12] Yan CH, Wang Y, Wang JZ, Chen YH, Chen Y, Wang FR, et al. Minimal residual disease- and graft-vs.-host disease-guided multiple consolidation chemotherapy and donor lymphocyte infusion prevent second acute leukemia relapse after allotransplant. *J Hematol Oncol* 2016;9(1):87.
- [13] Davies JK, Singh H, Huls H, Yuk DA, Lee DA, Kebriaei P, et al. Combining CD19

- redirection and alloenergization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies. *Cancer Res* 2010;70(10):3915–24.
- [14] Brudno JN, Somerville RPT, Shi V, Rose JJ, Halverson DC, Fowler DH, et al. Allogeneic T cells that express an anti-CD19 chimeric antigen receptor induce remission of B-cell malignancies that progress after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation without causing graft-versus-host disease. *J Clin Oncol* 2016;34(10):1112–21.
- [15] Chen Y, Cheng Y, Suo P, Yan C, Wang Y, Chen Y, et al. Donor-derived CD19-targeted T cell infusion induces minimal residual disease-negative remission in relapsed B-cell acute lymphoblastic leukaemia with no response to donor lymphocyte infusions after haploidentical haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2017;179(4):598–605.
- [16] Huang XJ, Liu DH, Liu KY, Xu LP, Chen H, Han W, et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion for the treatment of hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2006;38(4):291–7.
- [17] Liu DH, Xu LP, Liu KY, Wang Y, Chen H, Han W, et al. Long-term outcomes of unmanipulated haploidentical HSCT for paediatric patients with acute leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(12):1519–24.
- [18] Yan CH, Xiu LP, Liu DH, Chen H, Wang Y, Liu KY, et al. Immunosuppression for 6–8 weeks after modified donor lymphocyte infusion reduced acute graft-versus-host disease without influencing graft-versus-leukemia effect in haploidentical transplant. *Chin Med J* 2014;127:3602–9.
- [19] Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 2014;124(2):188–95.
- [20] Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood* 2016;127(26):3321–30.
- [21] Huff CA, Fuchs EJ, Smith BD, Blackford A, Garrett-Mayer E, Brodsky RA, et al. Graft-versus-host reactions and the effectiveness of donor lymphocyte infusions. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(4):414–21.
- [22] Lovisa F, Zecca M, Rossi B, Campeggio M, Magrin E, Giarin E, et al. Pre- and post-transplant minimal residual disease predicts relapse occurrence in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2018;180(5):680–93.
- [23] Zhao XS, Liu YR, Zhu HH, Xu LP, Liu DH, Liu KY, et al. Monitoring MRD with flow cytometry: an effective method to predict relapse for ALL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2012;91(2):183–92.
- [24] Mo XD, Zhang XH, Xu LP, Wang Y, Yan CH, Chen H, et al. IFN- α is effective for treatment of minimal residual disease in patients with acute leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: results of a registry study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23(8):1303–10.
- [25] Ma X, Wu DP, Sun AN, Qiu HY, Fu ZZ, Wu XJ, et al. The value of monitoring minimal residual disease in the patients with donor lymphocyte infusion as intervention of relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol* 2010;85(2):141–2.
- [26] Reis M, Ogonek J, Qesari M, Borges NM, Nicholson L, Preußner L, et al. Recent developments in cellular immunotherapy for HSCT-associated complications. *Front Immunol* 2016;7:500.
- [27] Ghosh A, Smith M, James SE, Davila ML, Velardi E, Argyropoulos KV, et al. Donor CD19 CAR T cells exert potent graft-versus-lymphoma activity with diminished graft-versus-host activity. *Nat Med* 2017;23(2):242–9.
- [28] Jacoby E, Yang Y, Qin H, Chien CD, Kochenderfer JN, Fry TJ. Murine allogeneic CD19 CAR T cells harbor potent antileukemic activity but have the potential to mediate lethal GVHD. *Blood* 2016;127(10):1361–70.