

## 抗CD19嵌合抗原受体修饰的T细胞在血液系统恶性肿瘤中的应用

贾鹤晋 韩为东

**Anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells (CART-19) for hemotological malignancies therapy** Jia Hejin, Han Weidong

Corresponding author: Han Weidong, Department of Biological Treatment, The Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China. Email: hanwdrsw@sina.com

B细胞恶性肿瘤是血液系统一组恶性异质性疾病,包括多种类型的白血病和淋巴瘤,因其复发率高、预后差,是临床较难治愈的血液系统恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。除了少数患者可进行异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)外,对大多数患者而言尚无有效治疗方法,因此,寻找新的治疗方法对于B细胞恶性肿瘤患者来说极其重要。嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)疗法是近20年来发展起来极具前景的肿瘤过继免疫细胞治疗(ACT)方法之一, CAR修饰的T细胞(CAR-T细胞)通过抗原、抗体结合的原理特异性识别肿瘤细胞表面抗原,避免内源性T细胞受主要组织相容性复合体(MHC)限制即“MHC限制性”和避免肿瘤细胞因MHC下调或丢失产生的免疫逃逸,是目前有望攻克血液系统恶性肿瘤的有效治疗方法。绝大多数的B细胞恶性肿瘤细胞都表达CD19,正常组织中CD19仅在成熟B细胞、B细胞前体细胞和浆细胞中表达,而造血干细胞及非造血干细胞则不表达CD19<sup>[2-3]</sup>。因此,CD19是理想的肿瘤特异性抗原(tumor-specific antigen, TSA),而抗CD19 CAR-T细胞(CART-19细胞)是特异性针对CD19抗原的工程化免疫治疗细胞,本文我们就其在血液系统恶性肿瘤中的临床应用进行综述。

### 一、CAR-T细胞的结构

CAR-T细胞是将能识别肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)的抗体的抗原结合部和胞内信号域“免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAM,通常为CD3- $\zeta$ 或Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ )”的胞内部分在体外偶联为一个嵌合蛋白,通过基因转导的方法转染患者T细胞,使其表达CAR<sup>[4-5]</sup>,转染/转导后经过纯化和大规模扩增后的T细胞,称之为CAR-T细胞。CAR-T细胞具有识别并攻击表达相应细胞表面TAA的肿瘤细胞的能力。因此, CAR-T细胞技术本质是通过基因转染/转导手段快速获得肿

瘤杀伤性T细胞的方法。由于CAR-T细胞识别的是肿瘤细胞表面的蛋白,而非与MHC分子结合形成MHC-抗原复合物而被提呈至细胞表面的抗原,因此,不受“MHC限制”,具有对TSA的高度亲和性及对抗原负载细胞的高效杀伤特性。近年来, CAR-T细胞技术在白血病、淋巴瘤等恶性肿瘤治疗中显示出良好的抗肿瘤效应。通常,根据CAR所处T细胞位置的不同,分为胞外抗原结合区(胞外区)、胞内信号传导区(胞内区)和跨膜区三部分。

1. 胞外区: CAR的胞外区源于单克隆抗体的单链可变区(scFv), scFv由轻链、重链和铰链区共同组成,可识别特定肿瘤抗原,且识别具有“非MHC限制”和高亲和力的特点。与T细胞受体(TCR)基因修饰T细胞的较窄肿瘤抗原识别谱和低亲和力不同, CAR可识别肽类、糖类和糖脂类肿瘤抗原谱,同时与抗原结合的亲和力也较高。CAR一旦与TAA结合,可通过由CD3或高亲和性受体Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 的胞内区使T细胞活化发挥效应功能,如CAR依赖的杀伤、增殖及细胞因子释放。临床前研究表明,可变区和抗原表位结合的空间位置会影响亲和力<sup>[6]</sup>,同时,铰链区的长度、延展性以及起点在CAR的设计中也起着非常重要的作用<sup>[7-9]</sup>。

2. 胞内区: T细胞的完全活化需要双信号途径。第一信号为特异性信号,由TCR识别抗原提呈细胞表面的抗原肽-MHC复合物所启动;第二信号为共刺激信号,通过CD28/B7等重要的共刺激分子,促进IL-2合成,使T细胞充分活化并免于凋亡。因此,根据CAR-T细胞的胞内信号区的结构不同将其分为三代。第一代CAR只包括CD3 $\zeta$ 作为胞内信号转导域(不含共刺激信号);第二代CAR是在CD3 $\zeta$ 基础上包含1个共刺激信号(CD28或4-1BB);第三代CAR是在CD3 $\zeta$ 基础上包含2个或2个以上的共刺激信号(CD28-CD137)。

3. 跨膜区: 跨膜区对T细胞表达CAR的能力也至关重要。一般由同源或异源的CD3、CD8或CD28等二聚体膜蛋白,通过CAR二聚化以及与内源性TCR相互作用产生的信号有助于T细胞的激活。

### 二、CAR-T细胞的制备

CAR-T细胞的制备包括T细胞采集(自体或异体T细胞)、CAR结构构成、CAR载体系统选择(质粒、 $\gamma$ -逆转录病毒或慢病毒等)和T细胞活化方法(OKT3、CD3/CD8磁珠或滋养细胞层等)。但是,目前各个研究机构采用的CAR-T细胞制备方法不尽相同,制备出的CAR-T细胞也存在差异,所以,这也是对CAR-T细胞产品标准化的挑战。

### 三、CART-19细胞的临床疗效

目前,临床已开展的CART-19细胞临床试验见表1。

表1 已注册抗CD19嵌合抗原受体(CAR)T细胞在血液系统恶性肿瘤中的临床研究

序号	研究机构	临床情况	疾病种类	化疗方案	基因修饰途径	共刺激区域特征或病毒特征	临床注册号
1	贝勒医学院	自体移植或未移植者	淋巴瘤和CLL	环磷酰胺或未化疗	γ逆转录病毒	包含或不包含CD28结构域的CAR-T细胞均包括	NCT00586391
2	贝勒医学院	异基因移植	B细胞恶性肿瘤或高危复发者的预防性治疗	无	γ逆转录病毒	CD28共刺激结构域,多重病毒特异T细胞	NCT00840853
3	贝勒医学院	自体移植或未移植者	淋巴瘤和CLL	环磷酰胺或未化疗	γ逆转录病毒	EBV特异性CAR-T细胞和包含CD28结构域的CAR-T细胞	NCT00709033
4	费城儿童医院	异基因移植或未移植	儿童ALL或淋巴瘤	化疗方案不固定	慢病毒	4-1BB共刺激结构域	NCT01626495
5	希望之城	APBCST	中度B细胞性淋巴瘤	T细胞输注2d后行APBCST	慢病毒	4-2BB共刺激结构域	NCT01318317
6	美国福瑞德哈金森癌症中心	异基因移植后	B细胞恶性肿瘤或高危复发者的预防性治疗	无	慢病毒	CMV或EBV特异性中枢T细胞,CAR细胞中包含CD28结构域	NCT01475058
7	MD安德森癌症中心	自体移植	B细胞性淋巴瘤或CLL	APBCST后2~7d行T细胞输注	转座子	CD28共刺激结构域	NCT00968760
8	MD安德森癌症中心	异基因移植	预防性治疗或急性恶性肿瘤	无	转座子	CD28共刺激结构域	NCT01497184
9	MD安德森癌症中心	脐血移植	预防性治疗或急性恶性肿瘤	无	转座子	CD28共刺激结构域	NCT01362452
10	纪念斯隆-凯特琳癌症中心	异基因移植	儿童ALL	化疗方案不固定	γ逆转录病毒和慢病毒	包含CD28的EBV特异抗CD19 CAR-T细胞	NCT01430390
11	纪念斯隆-凯特琳癌症中心	未移植	复发/难治性CLL和惰性淋巴瘤	环磷酰胺	γ逆转录病毒	包含CD28或4-1BB的混合型CAR-T细胞	NCT01416974
12	纪念斯隆-凯特琳癌症中心	未移植	慢性CLL巩固治疗期后优先化疗	环磷酰胺	γ逆转录病毒	CD28共刺激结构域	NCT01416974
13	纪念斯隆-凯特琳癌症中心	未移植	成人ALL	ALL再诱导治疗或环磷酰胺	γ逆转录病毒	CD29共刺激结构域	NCT01044069
14	美国国家癌症研究所	未移植	成人B细胞性恶性肿瘤	氟达拉滨+环磷酰胺	γ逆转录病毒	CD30共刺激结构域	NCT00924326
15	美国国家癌症研究所	异基因移植	成人B细胞性恶性肿瘤移植后	无	γ逆转录病毒	CD31共刺激结构域	NCT01087294
16	美国国家癌症研究所	未移植或异基因移植	儿童ALL或淋巴瘤	氟达拉滨+环磷酰胺	γ逆转录病毒	CD32共刺激结构域	NCT01593696
17	伦敦大学学院	欧洲多中心的异基因移植	儿童ALL、预防给药或微小残留病	氟达拉滨化疗后再给予长春新碱和地塞米松治疗微小残留病	γ逆转录病毒	不包括共刺激结构域的EBV特异性抗原、EBV细胞疫苗	NCT01195480
18	宾夕法尼亚大学	未移植	成人B细胞性白血病或淋巴瘤	化疗方案不固定	慢病毒	4-1BB共刺激结构域	NCT01029366
19	解放军总医院	未移植/异基因移植	成人B-ALL	化疗方案不固定	慢病毒	4-2BB共刺激结构域	NCT01864889
20	军事医学科学院附属医院	未移植	成人B-ALL	无	慢病毒	CD28和4-2BB共刺激结构域	NCT02186860
21	乌普萨拉大学	无	成人B细胞恶性肿瘤	无	慢病毒	CD28和4-2BB共刺激结构域	NCT02132624
22	同济大学附属同济医院	未移植/自体移植后复发	复发难治B细胞恶性肿瘤	无	慢病毒	无	NCT02537977
23	伦敦大学学院	未移植/自体移植后复发	儿童/成人ALL、BL	氟达拉滨+环磷酰胺	无	无	NCT02443831
24	第三军医大学西南医院	未移植/自体移植后复发	成人B细胞恶性肿瘤	无	无	无	NCT02349298

数据来源:www.ClinicalTrials.gov; APBCST:自体外周血造血干细胞移植; CLL:慢性淋巴细胞白血病; ALL:急性淋巴细胞白血病; BL:伯基特淋巴瘤

2010年, Jensen等<sup>[10]</sup>首次报道以质粒为载体、信号域为包含CD3 $\zeta$ (CD3zeta链)的第一代CAR-T细胞治疗血液系统疾病, 研究入选4例患者, 弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和滤泡性淋巴瘤(FL)各2例, 回输前均进行淋巴细胞清除, 回输后以IL-2辅助治疗。4例患者共接受15次CART-19细胞回输, 细胞回输数量为: 5次 $1 \times 10^8/m^2$ 、7次 $1 \times 10^9/m^2$ 和3次 $2 \times 10^9/m^2$ 。结果显示: CART-19细胞在体内持续时间 $<1$ 周(24h~7d), 与细胞回输数量无关, 而且临床反应性和不良反应均未观察到。因该研究CART-19细胞为第一代CAR-T细胞, 仅有一个胞内信号区, 缺乏共刺激分子传导的第二信号, 因此抗肿瘤作用较弱, 而且T细胞在结合肿瘤抗原后很难进一步增殖, 因此, 临床应用效果较差。

美国国家癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)的Rosenberg研究组是CAR-T细胞研究领域的先锋, 其临床研究均以 $\gamma$ -逆转录病毒为载体, 信号域为包含CD3 $\zeta$ 和CD28的第二代CAR-T细胞。该研究组成员Kochenderfer等<sup>[11]</sup>于2010年首次报道包含CD28共刺激信号的第二代CAR-T细胞应用于1例FL患者的临床研究结果: 经PCR检测CAR-T细胞体内持续时间长达27周, 最终患者达到部分缓解(PR)。此后, Savoldo等<sup>[12]</sup>的研究也证明CD28共刺激分子可延长CAR-T细胞在体内的持续时间。

2011年有研究者以慢病毒为载体进行CAR-T细胞研究, 信号域包括CD3 $\zeta$ 和CD137(4-1BB), 这是临床首次进行共刺激信号包含CD137(4-1BB)的研究<sup>[13-14]</sup>。Kalos等<sup>[13]</sup>报道采用CAR-T细胞治疗3例进展期慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者的研究结果, 回输前的化疗方案均不相同(苯达莫司汀、苯达莫司汀联合利妥昔单抗、喷司他汀联合环磷酰胺), CAR-T细胞回输数量为 $(1.46 \sim 160.00) \times 10^5/kg$ , 最终2例获得持续性完全缓解(CR), 1例获PR, 研究显示CAR-T细胞在血液中持续时间 $>6$ 个月。不良反应为B细胞缺乏症, 其中1例回输后第22天出现肿瘤溶解综合征(tumor lysis syndrome, TLS)。同年, Porter等<sup>[14]</sup>报道采用CAR-T细胞治疗2例儿童复发难治性急性淋巴细胞白血病(ALL)的研究结果, 回输前化疗方案不同(未化疗和依托泊苷联合环磷酰胺), CAR-T细胞回输数量为 $(1.4 \sim 12.0) \times 10^6/kg$ , 2例患儿均达到分子水平CR, 其中1例CR持续时间达11个月。同时, 2例患儿均出现3~4级的发热、低血压、急性血管渗漏综合征等不良反应。

2012年, Kochenderfer等<sup>[15]</sup>报道CART-19细胞应用于8例进展期B细胞恶性肿瘤患者的研究结果, 其中3例FL、4例CLL和1例边缘带淋巴瘤。CAR-T细胞体外扩增时间缩短至24d, 回输前均进行化疗(环磷酰胺联合氟达拉滨), 回输后给予高剂量IL-2皮下注射。其中1例为文献<sup>[11]</sup>曾报道过的FL患者, 因肿瘤负荷较大而进行了两次细胞回输, 第1次细胞输注数量为 $0.3 \times 10^7/kg$ , 获得持续32周的PR, 同时B细胞缺乏时间超过36周。因在输注7个月颈部淋巴结增大, 遂行第2次细胞回输, 细胞数量为 $1.3 \times 10^7/kg$ , 该患者再次获得持续33个月的PR。其余7例患者中4例持续36周出

现重度B细胞缺乏, 治疗中患者均出现发热、低血压和疲乏等急性不良反应, 并在细胞输注后第10天达到高峰, 3周左右消失, 且不良反应严重程度与血清中TNF、IFN- $\gamma$ 等炎性因子水平高低相关。那么, 在治疗中出现的持续36周的B细胞缺乏是否也是由化疗引起的呢? 在化疗合并靶向B细胞不表达的NY-ESO或gp100的T细胞输注治疗中, B细胞恢复正常只需要8~19周<sup>[11]</sup>, 因此, B细胞缺乏的出现不是由化疗导致的, 其持续时间一定程度上也可作为CAR-T细胞具有强大的清除CD19<sup>+</sup>细胞能力的佐证。2013年Kochenderfer等<sup>[16]</sup>再次发表相关研究结果, 入选10例患者, 其中2例DLBCL、4例CLL和4例套细胞淋巴瘤(MCL), 回输前未使用化疗药物, 回输后也未用IL-2, CAR-T细胞体外培养时间为8d, 单次细胞回输数量为 $(0.4 \sim 7.8) \times 10^6/m^2$ , 最终1例CR、1例PR、6例疾病稳定(SD)、2例疾病进展(PD)。不良反应为3例B细胞缺乏, 其他症状包括细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)、疲劳、发热等。CAR-T细胞在体内存在峰值为7~14d, 持续时间 $<1$ 个月。2015年该研究组又报道了CART-19细胞治疗15例进展期B细胞恶性肿瘤患者的研究结果, 其中9例DLBCL、2例惰性淋巴瘤和4例CLL。CAR-T细胞输注方案为: 在非清髓化疗(环磷酰胺联合氟达拉滨)后单次输注CART-19细胞的数量为 $2.5 \times 10^6/kg$ , 8例CR、4例PR、1例SD、1例回输后第16天不明原因死亡。不良反应与前相同为发热、疲劳等<sup>[17]</sup>。该研究中CAR-T细胞体外培养时间为10d, 从24d缩短至10d不仅可提高制备效率, 而且在动物模型中被证实能提高CAR-T细胞清除肿瘤细胞的能力, 输注不良反应包括回输后3周内出现低热、低血压和其他神经系统反应<sup>[18-19]</sup>。

2015年, 纪念斯隆-凯特琳癌症中心的Brentjens等<sup>[20]</sup>报道以 $\gamma$ -逆转录病毒为载体包含CD3 $\zeta$ 和CD28的CART-19细胞输注治疗9例患者的结果。3例CLL患者仅接受CART-19细胞治疗, 未出现临床反应, 且均为PD, 随后进行补救化疗措施; 5例CLL和1例巩固治疗期复发的ALL患者接受环磷酰胺联合CART-19细胞治疗, 1例CLL患者在回输后4~24周出现肿大淋巴结的消退, 2例CLL患者分别出现持续16周和8周的SD, 1例CLL患者未进行临床评价, ALL患者在治疗后出现持续的骨髓和外周B细胞缺乏, 1例CLL患者因低血压、肾功能衰竭和血清炎性因子水平升高而死亡(因其在CART-19细胞回输前就出现血清炎性因子升高, 所以死亡原因可能为治疗前患者体内存在未被检测出的感染<sup>[21]</sup>)。9例患者均出现可能与抗CART-19细胞输注相关的低热、寒战、低血压等不良反应。

比较NCI和纪念斯隆-凯特琳癌症中心的研究发现, 两者CART-19细胞的设计相同, 但在细胞输注数量上存在差异: 如CD4<sup>+</sup>T细胞占回输细胞的平均比例不同, 分别为46%和83%<sup>[15,20]</sup>。由此可见不同研究机构之间CART-19细胞的特性及同一机构不同患者之间的差异也较大。

2011年, Savoldo等<sup>[12]</sup>通过体内实验观察共刺激分子胞内区对CAR-T扩增、持续性和抗瘤活性影响, 实验分为2组:

①信号域只包含CD3 $\zeta$ 组(第一代CAR);②信号域包含CD3 $\zeta$ 和CD28组(第二代CAR)。研究发现,与不包含CD28的CAR-T细胞相比,包含CD28的CAR-T细胞在血液中的浓度更高且持续时间更长。结果显示,第二代CAR-T细胞的增殖性和持续性显著强于第一代CAR-T细胞,表明在CAR结构中嵌入CD28胞内区能改善第一代CAR-T细胞在B细胞淋巴瘤患者体内的扩增能力和持续性。

#### 四、影响疗效的因素及解决途径

1. CAR结构:尤其是CAR-T细胞的共刺激区域会影响CART-19细胞在体内的活性和持续性<sup>[12,22-25]</sup>。目前已有CD28、CD137、CD134、ICOS等多种共刺激分子的胞内区应用于第二代、第三代CAR的研究,而这些共刺激分子是否具有1+1>2的效果,有待于进一步临床验证。此外,CAR中scFV与抗原靶标的亲和力、铰链区的空间灵活性也会影响CAR-T细胞活性。优化最佳的CAR结构并建立CAR结构设计原则将是今后的一个研究重点。

2. CAR-T细胞制备:包括T细胞采集、CAR载体选择和T细胞活化方法等也会影响CAR-T细胞的质量。T细胞采集时用自体还是异体,是选择外周血中混合T细胞(如外周血单个核细胞)还是某些T细胞亚群,目前尚不明确,也无相关临床报道<sup>[26]</sup>。对于影响CAR-T细胞质量也非常重要的载体来说,不同载体系统在成本、安全性和CAR表达水平方面的优缺点各不相同,目前临床应用的载体类型主要为逆转录病毒载体、慢病毒载体<sup>[13,15,20,27-28]</sup>,但二者优劣尚无定论,而这些基础问题的阐明对于CAR-T细胞载体系统的选择也更有说服力。

3. 淋巴细胞清除:有研究显示在CART-19细胞输注前需要进行“淋巴细胞清除”来提高CAR-T细胞清除肿瘤细胞的能力<sup>[29-30]</sup>,但是淋巴细胞清除到何种程度时会提高CART-19细胞的最佳疗效而不会导致机体出现过度不良反应,这也是目前临床亟需解决的问题。而目前临床上进行“淋巴细胞清除”的根据是NCI对转移性黑色素瘤的研究观察,发现其可以增加肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte)的临床疗效,原因主要是“淋巴细胞清除”同时也清除内源性淋巴细胞,避免与输注的细胞竞争消耗内环境的平衡性因子;同时也可清除肿瘤微环境中的负性调控因子Treg细胞或髓系来源的抑制性细胞<sup>[31]</sup>。

#### 五、CAR-T细胞的新进展及前景

CART-19细胞疗法对于B细胞恶性肿瘤来说是一个重大突破,并与“免疫监测点阻断抗体疗法”一起被Science评为“2013年度十大科学突破之首”。目前,已有的临床数据显示,CART-19细胞的免疫治疗较单克隆抗体的疗效更好,而不良反应比allo-HSCT治疗要小。目前,对于CAR-T细胞的研究已扩大至在实体瘤,但实体瘤因肿瘤细胞异质性、肿瘤间质等诸多问题,为CAR-T细胞治疗带来新的挑战 and 机遇。针对实体瘤的特殊性,研究者又构建了如下CAR-T细胞结构,如针对实体瘤微环境和肿瘤异质性,使用诱导表达IL-12的CAR-T细胞<sup>[32-33]</sup>,CAR-T细胞与肿瘤细胞接触并激

活抗肿瘤活性时,会在肿瘤部位同时释放IL-12来调节肿瘤间质,吸引NK细胞、巨噬细胞等先天免疫细胞到达肿瘤细胞部位发挥免疫清除作用,同时使未被识别的肿瘤细胞再次被CAR-T细胞靶向识别,在该过程中,如果没有CAR-T细胞信号也就没有IL-12的释放;针对在血液系统中出现的脱靶效应,设计了split CAR<sup>[34]</sup>,以及针对抗原阴性逃逸问题设计的双特异性串联CAR(TanCAR)等<sup>[35]</sup>。以上类型都是近期针对实体瘤的特性进行研究的CAR-T细胞的新进展,而临床疗效有待于后期进一步观察。

尽管CAR的技术是近些年才发展起来的新兴技术,但是已经显示出广阔的临床应用前景,但是否能成为治疗B细胞恶性肿瘤及实体瘤的标准治疗手段或辅助治疗手段仍需要进一步探索。

#### 参考文献

- [1] Tees MT, Sokol L. Novel Immunotherapies for B-Cell Lymphomas and Leukemias [J]. Am J Ther, 2014 [Epub ahead of print].
- [2] Otero DC, Rickert RC. CD19 function in early and late B cell development. II. CD19 facilitates the pro-B/pre-B transition [J]. J Immunol, 2003, 171(11): 5921-5930.
- [3] Kochenderfer JN, Rosenberg SA. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2013, 10(5): 267-276. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.46.
- [4] Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(8): 2048-2060. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2422.
- [5] Eshhar Z, Waks T, Bendavid A, et al. Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells [J]. J Immunol Methods, 2001, 248(1-2):67-76.
- [6] 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.
- [7] Hudecek M, Lupo-Stanghellini MT, Kosasih PL, et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(12): 3153-3164. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0330.
- [8] Hombach A, Heuser C, Gerken M, et al. T cell activation by recombinant FcepsilonRI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition [J]. Gene Ther, 2000, 7(12): 1067-1075.
- [9] Hombach A, Hombach AA, Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response [J]. Gene Ther, 2010, 17(10): 1206-1213. doi: 10.1038/gt.2010.91.
- [10] 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 [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010, 16 (9): 1245- 1256. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.03.014.
- [11] Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19 [J]. *Blood*, 2010, 116 (20): 4099- 4102. doi: 10.1182/blood-2010-04-281931.
- [12] Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor- modified T cells in lymphoma patients [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(5): 1822-1826. doi: 10.1172/JCI46110.
- [13] 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 [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(95): 95ra73. doi: 10.1126/scitranslmed.3002842.
- [14] Porter DL, Levine BL, 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.
- [15] 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 [J]. *Blood*, 2012, 119 (12): 2709-2720. doi: 10.1182/blood-2011-10-384388.
- [16] Kochenderfer JN, Dudley ME, Carpenter RO, et al. Donor-derived CD19- targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Blood*, 2013, 122 (25): 4129- 4139. doi: 10.1182/blood-2013-08-519413.
- [17] 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]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(6): 540-549. doi: 10.1200/JCO.2014.56.2025.
- [18] Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(4): 269-281. doi: 10.1038/nri3191.
- [19] Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(6): 1616-1626.
- [20] 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 [J]. *Blood*, 2011, 118(18): 4817-4828. doi: 10.1182/blood-2011-04-348540.
- [21] Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 666-668. doi: 10.1038/mt.2010.31.
- [22] Milone MC, Fish JD, Carpenito C, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo [J]. *Mol Ther*, 2009, 17(8): 1453-1464. doi: 10.1038/mt.2009.83.
- [23] Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, et al. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(1): 70-75.
- [24] Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(18 Pt 1): 5426-5435.
- [25] Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, et al. CD28 costimulation provided through a CD19- specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (22): 10995-11004.
- [26] Kalos M, June CH. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology [J]. *Immunity*, 2013, 39 (1): 49-60. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.002.
- [27] Wang X, Naranjo A, Brown CE, et al. Phenotypic and functional attributes of lentivirus- modified CD19- specific human CD8 + central memory T cells manufactured at clinical scale [J]. *J Immunother*, 2012, 35 (9): 689- 701. doi: 10.1097/CJI.0b013e318270dec7.
- [28] Kebriaei P, Huls H, Jena B, et al. Infusing CD19-directed T cells to augment disease control in patients undergoing autologous hematopoietic stem- cell transplantation for advanced B- lymphoid malignancies [J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(5): 444-450. doi: 10.1089/hum.2011.167.
- [29] Cheadle EJ, Hawkins RE, Batha H, et al. Natural expression of the CD19 antigen impacts the long- term engraftment but not antitumor activity of CD19- specific engineered T cells [J]. *J Immunol*, 2010, 184 (4): 1885- 1896. doi: 10.4049/jimmunol.0901440.
- [30] Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor- specific CD8+ T cells [J]. *J Exp Med*, 2005, 202(7): 907-912.
- [31] Tang X, Liu T, Zang X, et al. Adoptive cellular immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma: a systematic review and meta- analysis [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (5): e62847. doi: 10.1371/journal.pone.0062847.
- [32] 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 [J]. *Blood*, 2012, 119 (18): 4133-4141. doi: 10.1182/blood-2011-12-400044.
- [33] Chmielewski M, Kopecky C, Hombach AA, et al. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen- independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression [J]. *Cancer Res*, 2011, 71 (17): 5697- 5706. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0103.
- [34] Wilkie S, van Schalkwyk MC, Hobbs S, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling [J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32 (5): 1059-1070. doi: 10.1007/s10875-012-9689-9.
- [35] Grada Z, Hegde M, Byrd T, et al. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2: e105. doi: 10.1038/mtna.2013.32.

(收稿日期:2015-10-21)

(本文编辑:刘志红)