

嵌合型抗原受体 T 细胞疗法的研究进展

刘立梅, 高清平, 王琼玉
(武汉大学人民医院, 湖北 武汉 430060)

摘要:嵌合型抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T cell)是通过基因修饰而表达肿瘤特异性的嵌合型抗原受体的 T 细胞, 能重新识别特异的肿瘤相关性抗原(tumor-associated antigen, TAA), 并对肿瘤细胞产生细胞毒性作用, 发挥抗肿瘤效应。许多临床研究已经证明该疗法的可行性及安全性, 并已取得令人振奋的疗效。

关键词:嵌合型抗原受体; 过继性细胞免疫治疗; 肿瘤相关性抗原; 协同刺激

中图分类号: R730.54 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2016)06-0453-06

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.06.A011

Research Progression in Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy

LIU Li-mei, GAO Qing-ping, WANG Qiong-yu
(Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T cell) can express tumor-associated chimeric antigen receptor by genetic modification. Those cells can recognize tumor-associated antigens (TAAs) in the targeted cells, then exert antigen-specific cytotoxicity against tumor cells. Many clinical trials have demonstrated the feasibility and safety, as well as impressive effectiveness of CAR-T cell therapy.

Key words: chimeric antigen receptor; adoptive immunotherapy; tumor-associated antigen; co-stimulation

嵌合型抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T cell)疗法属于过继性细胞免疫治疗(adoptive immunotherapy)^[1]。最早用 T 细胞治疗实体肿瘤是在 1988 年, Rosenberg 等从切除的黑色素瘤组织中提取肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs), 并将获取的 TILs 在体外扩增后, 输回患者体内获得了一定的治疗效果^[2]。但是肿瘤浸润性淋巴细胞只能从切除的肿块或者活检组织中分离出来, 它的获取限制了这种治疗的应用。相比而言, 从外周血中获取 T 细胞容易得多。但是大部分肿瘤免疫原性很弱或者没有, 同时机体存在调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)和细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4) 等参与的肿瘤免疫抑制,

使得肿瘤细胞能逃避机体的免疫监视^[3]。如果将 T 细胞进行基因修饰, 表达嵌合型抗原受体, 就可以重新识别肿瘤细胞, 对肿瘤细胞产生特异性的细胞毒作用, 从而达到抗肿瘤效果, 这就是 CAR-T 细胞疗法的作用机制。目前这种新的治疗手段正处于临床研究阶段, 备受瞩目, 全文将介绍 CAR-T 细胞疗法及其发展。

1 CAR-T 细胞疗法

1.1 CAR-T 细胞的作用机制

T 细胞的活化一般需要三大信号。第一信号是 T 细胞上的 TCR 识别 APC 上的 MHC 肽复合物摄取的抗原, 产生 T 细胞活化信号; 在 TCR 活化信号的基础上, T 细胞产生的 CD134 能结合 APC 表面的 CD40 进一步活化 APC。在和 TLRs 相互作用后, APC 表达

收稿日期: 2015-10-26; 修回日期: 2016-01-24
通讯作者: 高清平, E-mail: gao.qingping@163.com

CD80 和 CD86, 与 T 细胞的 CD28 结合, 产生协同刺激 (co-stimulation), 也就是第二信号; 活化的 APC 细胞分泌各种细胞因子, 促进 T 细胞向不同的亚型进行分化, 这就是第三信号^[4]。若缺乏第一信号则 T 细胞不会被活化, 若只有第一信号而没有第二信号, 则会导致 T 细胞的无能化。

第一代 CAR-T 细胞是将抗体的单链可变片段 (single chain variable fragment, scFv) 融合到免疫球蛋白 Fc 受体的 γ 链或者 CD3 复合体的 ζ 链形成嵌合型 T 细胞受体 (chimeric T-cell receptor, c-TCR)^[5]。c-TCR 是第一代嵌合型抗原受体, 拥有了抗体的特异性。研究表明抗原表位与靶细胞膜的距离能影响 CAR-T 细胞的抗癌效应, 随着距离增加其效应减少; 故可选择距离不同的靶抗原来调节 c-TCR 信号传导强度以及抗原敏感性^[6]。在与 TAA 结合时, c-TCR 会传导信号刺激 T 细胞活化。c-TCR 与靶细胞的表面抗原结合, 不需要抗原的加工处理以及 HLA 的表达; 表明了受体介导的 T 细胞活化不仅不受 MHC 的限制, 而且与肿瘤细胞表达 MHC 无关。T 细胞的活化程度可从细胞因子的释放和细胞的扩增来判断^[7]。持续的 T 细胞激活除了需要抗原相关的 TCR-CD3 复合体的初始信号传递, 还需要 T 细胞表面的大量协同刺激受体的参与及 T 细胞与抗原提呈细胞的配体相互作用。由于 c-TCR 细胞是通过非 MHC 限制的方式活化, 缺乏与抗原提呈细胞之间的相互作用, 故而信号 2 和信号 3 被削弱了。所以第一代嵌合型抗原受体的缺陷在于不能充分的激活 T 细胞^[8]。

第二代 CAR-T 细胞通过对信号 2 起始信号分子的处理, 整合了协同刺激受体 (如 CD28、4-1BB、DAP10、OX40、ICOS) 的胞浆区^[9]。研究表明将 CD28 或者 4-1BB (CD137) 的胞浆域合并到包含 CD3 ζ 链的重组 T 细胞受体上, 能提高过继性 T 细胞对靶细胞反应时细胞因子的分泌, 增强 T 细胞介导的抗肿瘤效应^[10]。协同刺激能提高第二代 CAR-T 细胞的扩增和持久性, 其重要性在临床试验中已经被证实了^[11]。第二代的 CD19CAR-T 的研究数据表明融合 CD28 共刺激域与融合 4-1BB 的相比, 细胞毒性是一样的, 但是后者能诱导更高的效应细胞扩增^[12]。有研究用表达 CAR 受体或者 CD19 的 APCs 刺激 CAR-T 细胞增殖, 并取得肯定的结果^[13]。也有研究认为 CD28- ζ CAR 与抗原结合后可诱导 T 细胞释放

IL-10, 但是融合 OX40 可以消除对 IL-10 的诱导, 从而增强 CAR-T 细胞的抗肿瘤效应^[14]。但是总的来说, 目前第二代 CAR 的构造很多, 相互之间缺乏详细的对比, 尚不清楚哪种协同刺激受体更具有优势。

第三代的 CAR-T 细胞, 即是在 CAR 上整合多个共刺激域。有试验在研究整合 CD28 与同时整合 4-1BB 和 CD28 的 CARs 时, 发现前者的细胞毒性强于后者^[10]。虽然早期的研究还没有明确证明第三代 CAR 的潜在优势, 但我们仍需要更多研究去探究理想的 CAR 的信号传导, 以提高 CAR-T 细胞的功能、存活, 避免过早的凋亡、消耗和过度的增生。

1.2 CAR 的构造

CAR 虽然在不断的改造, 其组成大致包含 4 个部分^[8]: (1) 抗原识别区: 一般是抗体的单链可变片段, 是 CAR-T 细胞特异性识别肿瘤细胞的关键。(2) 胞外间隔区 (铰链区): 这些区域通常来源于 IgG, CD8a, 或者 CD28; 使得抗原识别区突出细胞膜表面, 并允许适当的灵活性。其长度的设计非常重要, 太长会削弱效应器的效果^[15]。(3) 跨膜连接区。(4) 细胞内的信号传递域, 通常是 TCR ζ 链, 或者 TCR ζ 链上整合了协同刺激受体。

1.3 如何进行 CAR-T 细胞的基因修饰

在以病毒为载体的方式中, 使用的病毒大多为 γ -逆转录病毒和慢病毒。人们担心随机插入转基因甚至基因组会导致肿瘤的形成, 因为曾经在用逆转录病毒纠正过的造血干细胞治疗 X 染色体相关的严重免疫缺陷的病人时有发生^[16]。但是现在也有大量证据表明逆转录病毒的这种基因整合不是随机的^[17]。而且至目前为止, 用逆转录病毒完成 CAR-T 细胞治疗患者中还未出现插入性变异的报道。在体外转染 T 细胞的实验中, 这些载体在多种细胞因子如 CD3、CD8 的作用下, 具有很高的效率。理论上, 慢病毒更安全, 因为它在逆转录起始位点的整合倾向小些; 而且有自我钝化, 长末端重复序列 (Long terminal repeats, LTR) 在插入后会被截短。慢病毒可以转导静止细胞, 然而 γ -逆转录病毒则只能转导处于有丝分裂的病毒; 但是在实际操作中, 使用强效的促进有丝分裂的物质使静止细胞处于有丝分裂阶段, 可以消除逆转录病毒在这方面的限制。

还可通过电穿孔的方法转导包含转位子的质粒 DNA; 邻近特殊的末端重复序列的 CAR 基因盒可以

被转座酶识别,并插入 T 细胞基因组。该方法已经被用于临床研究。但是这种方法会导致大量细胞的死亡,且需要更长时间的培养使得细胞恢复。此外还有用电穿孔的方法将合成的 mRNA 导入细胞内,而不是将其整合到细胞的基因组中;但 CAR 的表达是瞬时的,意味着 T 细胞的细胞毒性作用短暂的,其抗肿瘤效应会受限。

1.4 治疗前预处理

在治疗前除了为病人量身定制 CAR-T 细胞外,还需要对患者进行预处理。在肿瘤浸润性淋巴细胞治疗黑色素瘤的研究中,以及后来 CD19CAR-T 细胞疗法的试验均表明消除淋巴细胞的预处理可提高输注的 T 细胞的成活率、扩增及抗肿瘤效应。可能是通过消除了调节 T 细胞,或者是减少了其他淋巴细胞对能促进 CAR-T 细胞移植和扩增的细胞因子的竞争,如白介素-2、白介素-7,来提高 CAR-T 细胞扩增。预处理几乎均采用化疗来完成,且普遍使用弗达拉宾和环磷酰胺。

1.5 CAR-T 细胞疗法的不良反应

CAR-T 疗法的不良反应主要包括 B 细胞发育不全(B cell aplasia)、细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)、神经毒性等。

B 细胞发育不全的原因,一方面是因为在治疗前对病人进行了预处理,清除了患者体内的淋巴细胞;另一方面是因为 CAR-T 细胞对淋巴细胞的特异性清除,B 细胞发育不全持续时间的长短与 CAR 的构造相关。长期的 B 细胞发育不全可能会增加感染的风险,可以通过补充免疫球蛋白来治疗。外周血中缺乏 B 细胞被认为是 CD19CAR-T 细胞持续存在的间接表现。但是针对其他抗原如 ROR1 等的 CAR-T 细胞治疗,发生 B 淋巴细胞减少和低免疫球蛋白血症的风险就相对低些^[18]。理想的 CAR-T 细胞是既能够在体内存在足够久以发挥充分的抗肿瘤效应,也能允许正常 B 细胞的恢复。

接受 CAR-T 细胞治疗的患者均会发生不同程度的 CRS,其严重程度可从轻微类似流感症状到严重的包括呼吸、循环衰竭的多器官衰竭不等。CRS 通常发生在 CAR-T 细胞输注后的第 5~21 天,目前有研究数据表明其严重性与肿瘤负荷呈正相关。但是 CRS 严重性与抗肿瘤效应的之间的关系尚没有定论,因为一些 CRS 症状轻微的患者也表现出有效

的抗肿瘤效应。CRS 与升高的血浆细胞因子相关,但临床严重程度与细胞因子升高水平可能是没有关系的。升高最显著的细胞因子有 IL-6、IL-10 和 γ -干扰素。但是目前尚不清楚主要是哪些类型的细胞分泌了这些细胞因子,尤其是白介素-6。在严重的 CRS 患者中,白介素-6 的峰值似乎与输注的 T 细胞的最大扩增同步。虽然类固醇激素能够有效缓解 CRS 的症状,但是同样也会抑制 CAR-T 细胞的功能和扩增,可能会影响到抗肿瘤的效果。还可以通过对促炎因子如白介素-6、 γ -干扰素的干预来治疗 CRS。市场上销售的白介素-6 的受体阻断抗体,托珠单抗,对严重 CRS 具有很高的疗效。且与激素治疗相比,托珠单抗可能不会阻止 CAR-T 细胞在体内的增殖。由于尚不清楚细胞因子级联反应的中断是否会消除抗肿瘤效应,因此托珠单抗的最佳使用时机并还不确定,目前普遍将它保留在器官衰竭时使用,以防大量细胞因子是 T 细胞达最大扩增的关键。

在 CD19 CAR 研究过程中,有许多病人出现了短暂的神毒性,表现为失语、迟钝、错乱、癫痫等。这种神经毒性作用大多局限在 ALL 患者。有神经毒性反应的患者脑成像检查显示正常,脑脊液显示淋巴细胞增多,提示在一定程度上是由 CAR-T 细胞导致的改变。但是有趣的是,在没有明显中枢神经系统改变的患者脑脊液也能看到这种改变。神经毒性的发生,是因为细胞因子跨过血脑屏障还是 CAR-T 细胞与中枢神经系统内的靶目标发生交叉反应尚未有定论。神经毒性的症状是可逆的,可以自行缓解,不需要特殊的治疗。

此外还有文献报道了一些少见的不良反应,如 Marcela 等报道第 1 例 CAR 致过敏的病例,该患者在第 3 次输注 CAR-T 细胞后出现手部刺痛、呼吸困难等症状,随后发展为心脏骤停^[19]。研究者们认为这是由针对 CAR 的 IgE 引起,改变输注方案可避免。

1.6 如何提高治疗安全性

由于潜在的插入突变以及 TAA 也可能会表达在正常组织上等原因,过继细胞如果在体内持续存在时间过长,可能会对机体造成一些无法接受的损伤;因此,通过自杀基因诱导 CAR-细胞在适当时间的凋亡似乎是有必要的。目前,单纯疱疹胸腺激酶(herpes-simplex-thymidine-kinase, HVS-TK)和诱导型半胱天冬酶-9(iCasp9)是被研究的最多的^[20,21]。但

是单纯疱疹胸腺激酶自杀基因被更昔洛韦活化的速度比较慢,且病毒产品本质上具有免疫原性,可导致转染的细胞被机体的免疫系统排斥;而且更昔洛韦常用于造血干细胞移植患者的巨细胞病毒感染治疗,也会诱发一些不必要的移植细胞的凋亡。故现在研究主要是集中在诱导型半胱天冬酶-9上。有实验已经证明抗 CD20 合并了 CD28、CD137 共刺激域及 iCasp9 的 CAR-T(iC9-CD20CAR- Δ CD19 T cells)在体外及动物模型中既能发挥有效抗肿瘤作用,也能及时被 AP1903 诱导死亡;这个方法被证明是安全可行的, I 期临床试验正在进行中。此外,还有研究者报道了关于 sCAR-T 细胞 (switch chimeric antigen receptor T cell) 的研究,该研究认为来自酵母转录因子 GCN4 的 14-aa PNE 序列可以作为开关设计引入 CAR 的特定位置,从而调控 CAR-T 细胞的活性、细胞因子释放等,以提高治疗的安全性^[22]。

2 CAR-T 细胞疗法的临床研究

CAR-T 细胞疗法作为新的肿瘤治疗模式备受关注。目前研究的有 CD19、CD20、表皮生长因子 III 型突变体 (variant III epidermal growth factor, EGFRv III)^[23]、睾丸肿瘤抗原 NY-ESO-1^[24]、前列腺特异膜抗原 (prostate-specific membrane antigen, PSMA)^[25]、卵巢肿瘤抗原 MUC-16ecto^[26]等。但是研究的最多还是造血组织恶性肿瘤表达的 CD19。CD19 在正常 B 细胞和大多数 B 细胞恶性肿瘤中都有表达,但在其他类型的细胞上没有表达,是理想的靶点。在临床前研究中,体外实验表明 CD19CAR-T 细胞可以破坏裂解 CLL 和 ALL 的白血病细胞,在小鼠的活体研究中则证明了该效应细胞对非造血组织没有细胞毒性^[27]。也有体外实验表明当 CAR-T 细胞和 raji 细胞的比例达 10:1 时, CAR-T 细胞能显示出很有效的杀灭 raji 细胞的效应;同时他们的小鼠实验也显示 CAR-T 细胞能抑制移植淋巴瘤组织的生长^[28]。下面着重介绍 CAR-T 细胞在淋巴瘤、白血病方面的临床研究。

在 2010 年, Jensen 等^[6]报道了用第一代 CAR 治疗难治性滤泡性淋巴瘤和弥漫性大 B 细胞性淋巴瘤患者。该试验以质粒为载体,用电穿孔的方式转染 T 细胞。总共有 4 例患者参与试验,分别用抗 CD20 CAR-T 细胞和抗 CD19 CAR-T 细胞治疗。在循环血

中检测到 CAR-T 的时间很短, 24h~7 天不等, 没有观察到明显的细胞毒性作用, 但是有 2 例出现了细胞抗转基因免疫排斥反应。这项研究认为影响疗效的主要障碍是 CTL 存在时间的太短; 并且认为调节被治疗者的免疫状态来防止或延迟抗转基因排斥反应的是非常有必要的。

美国国家癌症研究所 (NCI) 的团队在 2010 年报道了 1 例用整合了 CD28 共刺激域的第二代 CD19 CAR-T 细胞治疗滤泡性淋巴瘤^[27]。以逆转录病毒为载体转染 T 细胞。该患者在完成环磷酰胺 (2d, 60mg/kg) 联合弗达拉滨 (5d, 25mg/m²) 的预处理后; 接受了两次过继性细胞治疗 (第一天为 1×10^8 CAR-T 细胞, 第二天为 3×10^8 CAR-T 细胞); 随后接受了每 8h 一次的 72000IU/kg IL-2 治疗, 共 8 次。治疗后患者淋巴结有了明显缩小, 通过 CT 扫描检查显示的淋巴瘤部分缓解至少维持了 32 周; 在过继性治疗后, B 细胞的前体细胞从骨髓中消失了, 血中 B 细胞持续缺乏至少达 39 周, 但是其他类型的血细胞计数则迅速恢复了, 表明这种较长时间的选择性的 B 细胞缺乏可能不是由于化疗造成的, 而是抗原特异性 B 淋巴细胞的清除。在 2014 年该团队的另一个临床试验取得了更为鼓舞人心的结果^[28], 此次研究评估并入组的有 15 例患者 (9 例弥漫性大 B 细胞性淋巴瘤, 2 例惰性淋巴瘤, 4 例慢性淋巴细胞白血病), 并采取与之前相似的预处理, 但是未给予白介素-2 治疗; 由于毒性作用, 在治疗过程中输注的细胞剂量由 5×10^6 /kg 降到 1×10^6 /kg。DLBCL 在治疗后获得了完全缓解, 白血病和惰性淋巴瘤的治疗与之前相比也取得巨大进步。观察到的最长的完全缓解至少持续了 23 个月。治疗淋巴瘤的关键在于是 CAR-T 细胞能否渗入淋巴结组织, 且渗入的细胞数量可以作为衡量治疗效果的指标。在 CLL 患者缩小的淋巴结内也发现大量 CAR-T 细胞。在血中检测到 CAR-T 细胞的峰值在输注后的第 7~17 天, 随后迅速下降。这段时间内, 抗 CD19 CAR-T 细胞获得了更多的分化表型, 其扩增能力下降, 似乎也解释病人血中 CAR-T 细胞迅速下降的原因。

Brentjens 等^[29]2013 年报道了 5 例急性 B 淋巴细胞白血病患者 (2 例复发难治, 2 例存留微小病灶, 2 例微小病灶阴性) 的临床研究, 该研究以 γ -逆转录病毒为载体转染 T 细胞。患者均在进行了 $1.5 \sim 3.0$ gm/m²

环磷酸胺的预处理后,接受了 $1.5\sim 3\times 10^6/\text{kg}$ 剂量的19-28z T细胞的治疗。5例患者在治疗前均未计划行异体干细胞移植,但在治疗后的1~4个月,有4例患者重新获得了异体造血干细胞移植的机会,并接受了移植治疗。这也使得该研究随后的观察受到了限制,观察到的最长时间的微小病灶阴性状态是122天。没有接受异体造血干细胞移植的患者在治疗后90天复发,复发前正使用大剂量的类固醇激素控制细胞因子介导的毒性症状。

宾夕法尼亚大学2013年报道的2例急性淋巴细胞白血病(第1例7岁,第2例10岁)的临床研究,该研究以慢病毒为载体转染T细胞^[30]。使用的是合并了CD137共刺激域的抗CD19 CAR-T细胞(CTL019 cells)。第1例患者没有进行预处理,治疗的总剂量为 $1.2\times 10^7/\text{kg}$,分3d输注。第2例是异体脐带血移植后复发的患者,在治疗前一周采用了依托泊苷联合环磷酸胺的预处理,输注细胞的总剂量为 $1.4\times 10^6/\text{kg}$,1次输完。CTL019细胞在体内表现出明显的扩增;在骨髓及脑脊液中均能检测到。2例患者都达到完全缓解,其中第1例在发生了严重的细胞因子释放综合征后用依那西普和托珠单抗治疗后好转,且没有阻碍CAR-T细胞的扩增,在治疗后11个月仍完全缓解。另一例患者大约在治疗后2个月复发,在外周血中检测到了没有表达CD19的白血病细胞。此外,Shannon等在2014年10月份也发表用CTL019细胞治疗30例ALL的研究^[8],在这个试验中有3例患者复发时仍能检测到CTL019细胞,而且复发的白血病细胞没有表达CD19。

在第三代的CAR的临床研究中,Brian等^[31]使用同时整合CD28和41-BB协同刺激域的抗CD20 CAR-T细胞;有4例患者(病人1-3为MCL,病人4为复发的FL)纳入研究。在制备CAR-T细胞过程中使用OKT3和IL-2刺激T细胞,并以DNA质粒为载体用电穿孔的方法转染T细胞。筛选的细胞在体外培养了至少69d后输入患者体内。其中患者1因未能制备出足够剂量的细胞而退出了研究。被研究者在输注细胞前进行了 $1\text{g}/\text{m}^2$ 的环磷酸胺预处理后分3次输注细胞,分别以 $1\times 10^8/\text{m}^2$, $1\times 10^9/\text{m}^2$, $3.3\times 10^9/\text{m}^2$ 的递增剂量间隔2~5天输注。在输注后给予了14d $250\ 000\text{U}/\text{m}^2$ IL-2每日2次的皮下注射治疗。患者2在输注T细胞后出现发热、体位性低血

压、低氧血症,但随后都自行恢复了;并且在治疗后1年内疾病都没有进展。病人3则在治疗后至完成研究时的2年都没有出现进展,病人4则表现为部分淋巴结消退,在治疗1年后疾病出现了进展。在该研究中研究者们发现延长CAR-T细胞的体外培养时间会损害其功能,但也验证了该治疗的安全性和有效性。

3 小 结

CAR-T细胞在治疗一些复发难治的血液系统恶性肿瘤时取得了令人振奋的效果;目前许多研究机构对它的研究也进入了临床试验I/II期,并且试验得到的数据也证明了该疗法的可行性和安全性。许多患者通过CAR-T细胞治疗重新获得完全缓解或者造血干细胞移植的机会,因此将该疗法作为造血干细胞移植治疗的过渡治疗也是不错的选择。但是在这个新的治疗领域中,仍有面临许多问题;如何筛选合适的治疗靶点,如何抑制对肿瘤的免疫耐受,克服肿瘤微环境,进一步提高治疗效果;如何延长CAR-T细胞在体内存在和扩增时间确保治疗效果的同时,提高治疗的安全性;对于不表达靶抗原的复发,如何选用多重CARs来治疗等;这些都需更深入的研究。

参考文献:

- [1] Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro JM, et al. Classification of current anticancer immunotherapies [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(24): 12472.
- [2] Rosenberg SA, Packard BS, Aebbersold PM, et al. Use of Tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma—a preliminary report [J]. *New Engl J Med*, 1988, 319(25): 1676–1680.
- [3] Walker LS. Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance [J]. *J Autoimmun*, 2013, 45: 49–57. [Epub 2013 Jul 10].
- [4] Jin B, Sun T, Yu XH, et al. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation [J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 836485. [Epub 2012 Jun 7].
- [5] 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]. *Biology of*

- Blood and Marrow Transplantation, 2010, 16(9): 1245–1256.
- [6] James SE, Greenberg PD, Jensen MC, et al. Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric TCR is modulated by target epitope distance from the cell membrane[J]. The Journal of Immunology, 2008, 180(10): 7028–7038.
- [7] Kershaw MH, Westwood JA, Darcy PK. Gene-engineered T cells for cancer therapy [J]. Nature Reviews Cancer, 2013, 13(8): 525–541.
- [8] Ghorashian S, Pule M, Amrolia P. CD19 chimeric antigen receptor T cell therapy for haematological malignancies[J]. British Journal of Haematology, 2015, 169(4): 463–478.
- [9] Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design [J]. Cancer Discovery, 2013, 3(4): 388–398.
- [10] Kochenderfer JN, Feldman SA, Zhao Y, et al. Construction and pre-clinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor[J]. J Immunother, 2009, 32(7): 689–702.
- [11] 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.
- [12] 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]. Molecular Therapy, 2009, 17(8): 1453–1464.
- [13] Rushworth D, Jena B, Olivares S, et al. Universal artificial antigen presenting cells to selectively propagate t cells expressing chimeric antigen receptor independent of specificity[J]. J Immunother, 2014, 37(4): 204–213.
- [14] Hombach AA, Heiders J, Foppe M, et al. OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4 T cells[J]. Oncoimmunology, 2012, 1(4): 458–466.
- [15] 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]. Clinical Cancer Research, 2013, 19(12): 3153–3164.
- [16] Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1 [J]. J Clin Invest, 2008, 118(9): 3132–3142.
- [17] Niederer HA, Bangham CRM. Integration site and clonal expansion in human chronic retroviral infection and gene therapy[J]. Viruses, 2014, 6(11): 4140–4164.
- [18] Deniger DC, Yu J, Huls MH, et al. Sleeping beauty transposition of chimeric antigen receptors targeting receptor tyrosine kinase-like orphan receptor-1 (ROR1) into diverse memory T-cell populations[J]. PloS One, 2015, 10(6): e0128151.
- [19] Maus MV, Haas AR, Beatty GL, et al. T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans.[J]. Cancer Immunology Research, 2013, 1(1): 26–31.
- [20] Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells[J]. Front Pharmacol, 2014, 5: 235.
- [21] Budde LE, Berger C, Lin Y, et al. Combining a CD20 chimeric antigen receptor and an inducible caspase 9 suicide switch to improve the efficacy and safety of T cell adoptive immunotherapy for lymphoma [J]. PloS One, 2013, 8(12): e82742.
- [22] Rodgers DT, Mazagova M, Hampton EN, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(4): E459–E468.
- [23] Ohno M, Ohkuri T, Kosaka A, et al. Expression of miR-17-92 enhances anti-tumor activity of T-cells transduced with the anti-EGFRv III chimeric antigen receptor in mice bearing human GBM xenografts[J]. J Immunother Cancer, 2013, 1: 21.
- [24] Klippel ZK, Chou J, Towler AM, et al. Immune escape from NY-ESO-1-specific T-cell therapy via loss of heterozygosity in the MHC [J]. Gene Therapy, 2014, 21(3): 337–342.
- [25] Hillerdal V, Essand M. Chimeric antigen receptor-engineered t cells for the treatment of metastatic prostate cancer[J]. Bio Drugs, 2015, 29(2): 75–89.
- [26] Koneru M, O’Cearbhaill R, Pendharkar S, et al. A phase I clinical trial of adoptive T cell therapy using IL-12 secreting MUC-16ecto directed chimeric antigen receptors for recurrent ovarian cancer[J]. J Transl Med, 2015, 13: 102.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, 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.
- [30] Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia[J]. N Engl J Med, 2013, 368(16): 1509–1518.
- [31] Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results[J]. Blood, 2012, 119(17): 3940–3950.