

综述

嵌合抗原受体T细胞介绍及抗肿瘤临床应用

陈杰 王宇环 罗成林 王慧琴 罗晓玲*

(深圳市合一康生物科技有限公司, 深圳 518057)

摘要 过继性细胞免疫治疗(adoptive cellular immunotherapy, ACI)是目前较为有效的恶性肿瘤的治疗方法之一。随着技术的日趋成熟,已在多种实体瘤和血液肿瘤的临床治疗中取得较好疗效。其中,嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)T细胞技术是近年来发展非常迅速的一种细胞治疗技术。通过基因改造技术,效应T细胞的靶向性、杀伤活性和持久性均较常规应用的免疫细胞高,并可克服肿瘤局部免疫抑制微环境和打破宿主免疫耐受状态。目前, CAR的信号域已从第一代的单一信号分子发展为包含CD28、4-1BB等共刺激分子的多信号结构域(第二、三代),临床应用广泛。但是,该技术也存在脱靶效应、插入突变等临床应用风险。该文将就CAR-T细胞技术在恶性肿瘤免疫治疗中的应用及可能存在的问题作一综述。

关键词 嵌合抗原受体; 基因改造; 过继性免疫细胞治疗

Introduction of Chimeric Antigen Receptor-engineered T Cells and the Clinical Use for Anticancer

Chen Jie, Wang Yuhuan, Luo Chenglin, Wang Huiqin, Luo Xiaoling*

(Shenzhen Hornetcorn Biotechnology Co., Ltd, Shenzhen 518057, China)

Abstract Adoptive cellular immunotherapy (ACI) is one of the most effective comprehensive anticancer therapies. It has achieved expectable curative effect on different solid tumors and hematological malignancies suggested by recent data and striking clinical responses. As an ACI, chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cell therapy has been rapidly developed in recent years. By the use of genetic modification techniques, effector T cells have better properties with regard to targeting, killing activity and durability than immunocytes of conventional application. CAR-T cells can overcome the local immunosuppressive tumor microenvironment and break the immune tolerance in host. At present, the signal domain of CAR has been developed from the single to multiple structure containing costimulatory molecules such as CD28 and 4-1BB, and has been widely used in clinic. However, there are potential risks on account of the off-target effect, insertion mutation, etc. In this paper, applications and problems of CAR-T cells in cancer immunotherapy are reviewed for clinical guidance.

Key words chimeric antigen receptor; gene transformation; adoptive cellular immunotherapy

收稿日期: 2013-09-04 接受日期: 2013-10-21

深圳市战略新兴产业发展专项资金(批准号: CYZZ20130329145313934)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0755-21672023, E-mail: luoxiaoling@hornetcorn.com

Received: September 4, 2013 Accepted: October 21, 2013

This work was supported by the Strategic Emerging Industrial Development Funds of Shenzhen (Grant No.CYZZ20130329145313934)

*Corresponding author. Tel: +86-755-21672023, E-mail: luoxiaoling@hornetcorn.com

网络出版时间: 2014-01-26 10:21 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.0284.html>

随着肿瘤免疫学理论和技术的发展,免疫细胞治疗在肿瘤治疗中的作用日益受到重视。研究发现,T淋巴细胞是肿瘤细胞的天敌,在肿瘤免疫应答中起主要作用,对肿瘤细胞有极强的杀伤作用。但是,使用内源性T细胞进行肿瘤免疫治疗时,靶抗原需经过加工处理后才能和靶细胞表面的主要组织相容性复合物(main histocompatibility complex, MHC)作用,也就是存在我们常说的“MHC限制性”。然而,肿瘤免疫编辑的过程会使MHC在肿瘤细胞表面表达下降,破坏抗原加工过程,降低肽段免疫原性。这样长期形成的免疫逃逸机制,能使肿瘤细胞成功躲避T细胞攻击,肿瘤快速增殖。

此外,人体内肿瘤特异性的T细胞数量较少,并且由于大多数肿瘤细胞不断表达自体抗原,使得靶向这些抗原的T细胞通过免疫耐受机制被中和或移除,数量进一步减少。所以,包括细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK细胞)在内的T细胞过继性免疫治疗虽然在部分肿瘤的治疗中取得了一定的效果,但在大多数肿瘤中疗效尚不能令人满意。

近年来发展的利用基因改造技术表达肿瘤特异性嵌合抗原受体的T细胞治疗技术进展迅猛,在体外和临床试验中显示出良好的靶向性、杀伤活性和持久性,为过继性细胞免疫治疗提供了新的有效解决方案,展示了巨大的应用潜力和发展前景^[1]。

1 嵌合抗原受体T细胞介绍

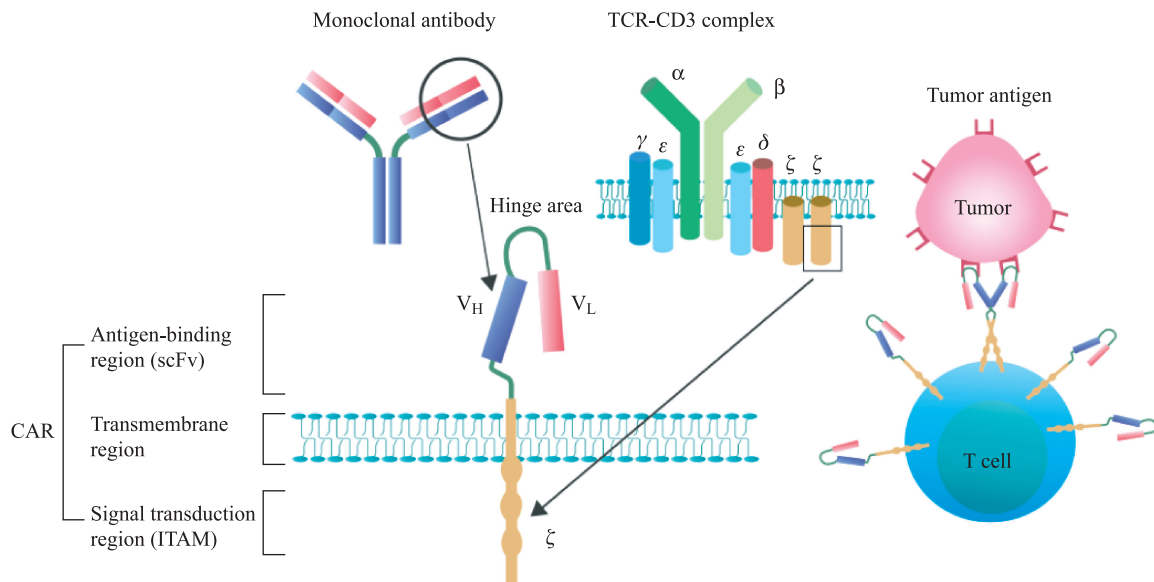
目前,大多数嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)由胞外抗原结合区[由来源于单克隆抗体的轻链(V_L)和重链(V_H)组成,中间由带韧性的铰链区连接形成单链抗体(single chain fragment variable, scFv)]、跨膜区域和胞内信号转导区组成。

通过将识别肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)的scFv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 ζ 或Fc ϵ RI γ)”在体外进行基因重组,生成重组质粒,再在体外通过转染技术转染到患者的T细胞,使患者T细胞表达肿瘤抗原受体,转染后经过纯化和大规模扩增后的T细胞,称之为嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)^[2]。CAR-T细胞在体内、外都具有对特定肿瘤抗原高度亲和性及对抗原负载细胞高效杀伤特性(图1)。近年来, CAR修饰T

细胞技术在白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、脑胶质瘤等恶性肿瘤治疗中均显示出良好的抗肿瘤效应。

1.1 第一代CAR-T细胞

早在1989年, Eshhar研究小组^[3-4]就将免疫球蛋白样scFv和Fc ϵ RI受体(γ 链)或CD3复合物(ζ 链)胞内结构域融合形成嵌合受体,即第一代CARs。表达CAR的T细胞以抗原依赖、非MHC限制的方式结合肿瘤抗原,启动并活化特异性杀伤肿瘤反应。CARs表达的稳定性依赖于所用的胞内信号域。尽管最近研究报告显示,去除CD3 ζ 链的两个ITAMs磷酸化作用,能减少T细胞转导后的凋亡,有利于转基因的长期表达^[5-6]。但是,目前含CD3 ζ 链的CAR-T细胞相对于含Fc ϵ RI γ 链的CAR-T细胞临床研究更多。原因可能是因为CD3 ζ 含有三个ITAMs,而Fc ϵ RI γ 链只有一个ITAM,虽然体内表达率较低,但是能更有效激活T细胞,对肿瘤根除能力更强。此外, CAR-T细胞的跨膜区一般由同源或异源的CD3、CD8或CD28等二聚体膜蛋白组成,通过CAR二聚化以及与内源性TCR的相互作用产生的信号有助于T细胞的激活。Bridgema等^[7]发现,抗CEA CAR-T细胞能通过自身CD3 ζ 跨膜区的二聚化作用,有效激活初始人T淋巴细胞。Kershaw等^[8]报道了逆转录病毒介导的抗 α -叶酸受体CAR修饰的T细胞治疗14例卵巢癌患者。输注2 d后, CAR-T细胞在体内可大量检测到,但1个月后迅速下降至难以检测的水平,也没有观察到对肿瘤的免疫应答反应。Julie等^[9]针对细胞黏附分子-L1,采用CE7R的单链抗体与CD3 ζ 结合,以质粒DNA作为载体构建第一代CAR,并在其中引入“自杀基因”HyTK,治疗儿童复发难治性神经母细胞瘤。在治疗的6例患者中,虽没有发现与细胞剂量相关的严重不良反应,但每次输注CAR-T细胞在体内存活时间不超过1周,并且只有一个瘤荷最小的患者有部分缓解,治疗效果不理想。Lamers等^[10]构建scFv(G250)-CD4_{TM}- γ 嵌合抗原受体,通过逆转录病毒转染患者T细胞,治疗CAIX⁺的三例肾癌患者。虽然IFN- γ 在体外分泌增高,但血浆IFN- γ 水平却与肝毒性反应成正相关,考虑可能是因为scFv(G250)⁺T细胞攻击正常胆管CAIX⁺上皮细胞所致。2008年, Pule等^[11]用针对GD2靶抗原的CAR治疗儿童成神经细胞瘤。输入6周后,仍然可以在病人血液内发现EBV特异性的CAR-T细胞,而非EBV特异性细胞仅维持1周,接受治疗的11个患者中,6例患者在治疗6



Monoclonal antibody: 单克隆抗体; TCR-CD3 complex: T细胞受体-CD3分子复合物; Antigen-binding region: 抗原结合区; Transmembrane region: 跨膜区; Signal transduction region: 信号转导区; Hinge area: 铰链区; V_H : 重链; V_L : 轻链; Tumor antigen: 肿瘤抗原; T cell: T细胞。大多数CAR包括胞外抗原结合区(由来源于单克隆抗体的轻链和重链组成,中间由带韧性的铰链区连接形成单链抗体)、跨膜区域(一般由同源或异源的CD3、CD8或CD28等二聚体膜蛋白组成)和胞内信号转导区(免疫受体酪氨酸活化基序,通常为CD3 ζ 或Fc ϵ RI γ)组成。

Most CARs are composed of surface antigen-binding region, transmembrane region and intracellular signal transduction. The antigen-binding region consists of heavy(V_H) and light(V_L) chains derived from monoantibody, which are linked by flexible hinge area. Transmembrane region involves dimer membrane proteins like CD3, CD8 and CD28. Intracellular signal transduction region is ascribed to immunor tyrosine-based activation motifs, involving CD3 ζ or Fc ϵ RI γ .

图1 嵌合抗原受体结构示意图(根据参考文献[2]修改)

Fig.1 Structural representation of CAR (modified from reference [2])

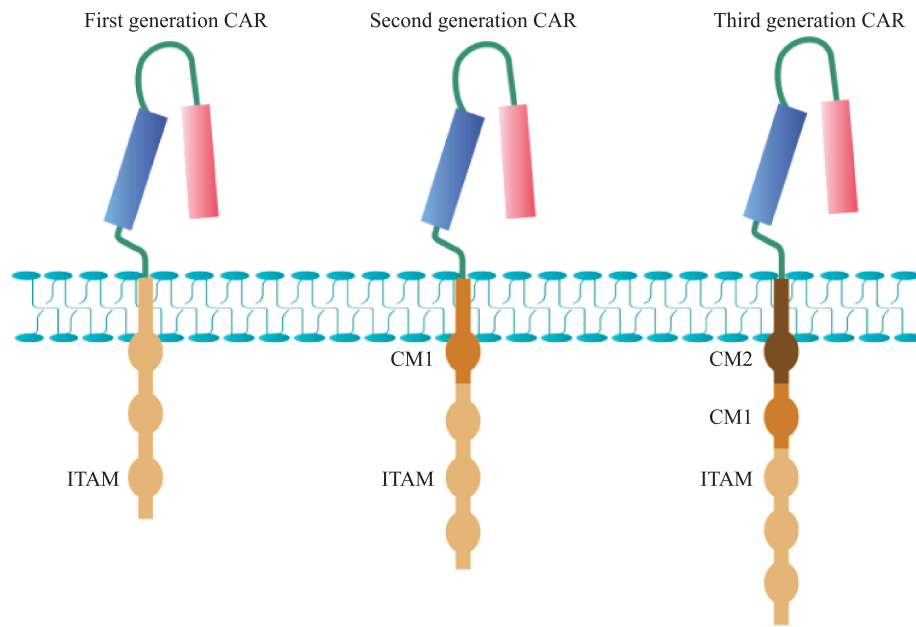
周后出现肿瘤细胞坏死或肿瘤缩小。此外,还有以CD20^[12]为靶点治疗惰性非霍奇金淋巴瘤/套细胞淋巴瘤等应用。虽然第一代CAR-T细胞研究较多,但是大多数试验在细胞扩增、体内存活时间、细胞因子分泌等方面还存在不足,没有达到预期的临床效果。

1.2 第二代CAR-T细胞

研究表明, T细胞的完全活化有赖于双信号和细胞因子的作用。其中第一信号为特异性信号,由TCR识别抗原递呈细胞表面的抗原肽-MHC复合物所启动;第二信号为协同刺激信号,通过CD28/B7等重要的共刺激分子,促进IL-2合成,并使T细胞充分活化及免于凋亡。对于初始型T细胞(未与抗原接触的T细胞),如只在信号1而没有信号2条件下无法使T细胞发挥正常作用;即使T细胞与抗原接触,如果没有协同刺激信号,细胞也不能发挥正常功能。相应的,仅含有CD3 ζ 序列的嵌合抗原受体,如没有协同刺激信号2,也无法激活CAR-T细胞。因此,依照T细胞活化的双信号学说,第二和第三代CARs在嵌合受

体上加上如CD28、CD134(OX40)和CD137(4-1BB)等共刺激分子(costimulatory molecule, CM)^[13-15],以提高T细胞的细胞毒性、增殖活性,维持T细胞应答,延长T细胞存活时间等(图2)。其中,CD28分子在调节淋巴细胞增殖和存活方面有着重要作用,也对效应细胞和记忆细胞的建立起着关键作用,其通过募集如PI3K、Grb2和Lck等分子,以调节关键转录因子如NF κ B的活性并且增加IL-2和Bcl-xL的分泌。CD134能使初始T细胞获得持久的体外增殖和较强的IL-2分泌能力。CD137则为维持T细胞应答提供信号,在T细胞生存和CD8⁺ T细胞记忆中起关键作用^[16-18]。

Porter等^[19]和Kalos等^[20]研究用第二代CAR-T细胞(scFvCD19-CD137-CD3 ζ)靶向治疗3例慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL),接受治疗的3例患者回输CAR-T细胞总数为 $1.4 \times 10^7 \sim 1.1 \times 10^9$, CAR-T细胞不仅在体内扩增1 000倍以上,而且在血液和骨髓中存活的时间也超过6个月,分泌的细胞因子如干扰素- γ 、CXCL9等较治疗前显著增高。虽然其中1例患者发生了疑似效应细胞脱靶

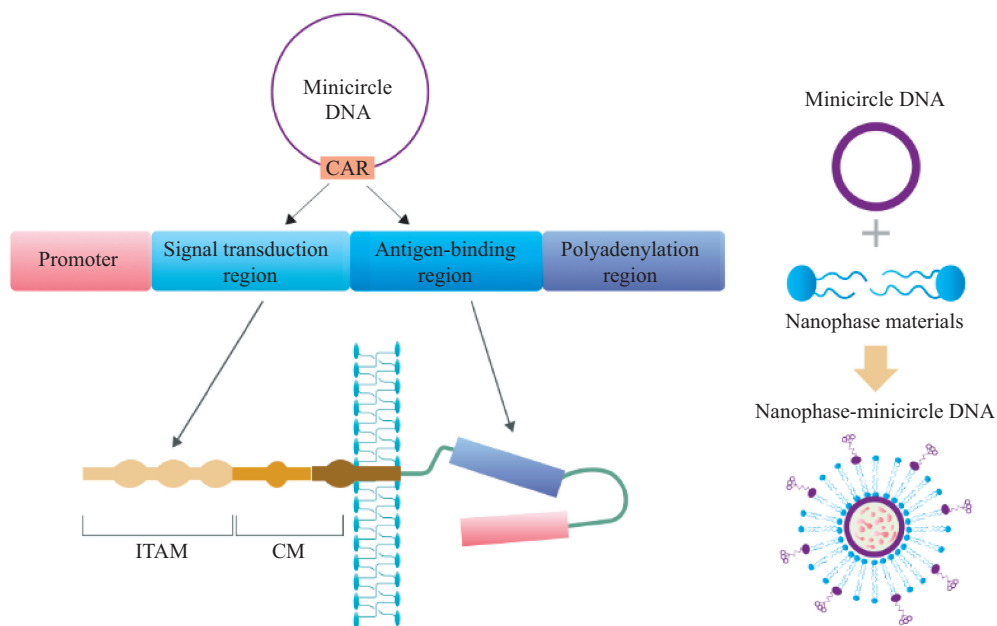


第一代CAR(左)由单链抗体通过跨膜区域与胞内信号传导区(ITAM)相连, ITAM通常为CD3 ζ 或Fc ϵ R1 γ ; 第二代CAR(中)的胞内信号传导区引入了共刺激分子CM1, 主要为CD28分子; 第三代CAR(右)引入了双共刺激分子(CM1和CM2), 主要为CD28分子加上CD134或CD137。

In the CAR of first generation, single chain antibody links the ITAM (CD3 ζ or Fc ϵ R1 γ) at transmembrane region. In the second generation, costimulatory molecule (CM1, such as CD28) has been engineered to the signal transduction region. The third generation has been engineered another costimulatory molecule (CM2) based on the second generation, combining CD134 or CD137.

图2 第一至第三代嵌合抗原受体(根据参考文献[14]修改)

Fig.2 First-generation to third-generation CARs (modified from reference [14])



Minicircle DNA: 微环DNA; Promoter: 启动子; Polyadenylation signal: 加尾信号; Nanophase materials: 纳米材料; Nanophase-minicircle DNA: 纳米-微环DNA。微环DNA-纳米系统, 是一个通用基因治疗载体, 能较好解决体内DNA投递问题。保持其基本结构不变, 仅改变DNA序列, 便可用来治疗不同疾病。通过将纳米-微环DNA体内靶向转染T淋巴细胞, 能优化现有的CAR-T技术。

Minicircle DNA-nanophase system is a general vector of gene therapy, with superiority of DNA delivery. It targets different diseases by changing the DNA sequence with preservation of the basic structure. CAR-T technique could be optimized by transfection of T cells via nanophase-minicircle DNA.

图3 微环DNA优化现有的CAR-T技术(根据参考文献[28-29]修改)

Fig.3 Minicircle DNA can optimize the existing CAR-T technology (modified from references [28-29])

有关的肿瘤溶解综合征,但经过对症处理,不良反应已经好转。接受治疗的3例患者中,2例达到完全缓解,1例部分缓解,疗效得到肯定。Kandalaft等^[21]比较一代和二代治疗卵巢癌的疗效,证实第二代的CAR-T细胞(MOv19-BB ζ)在杀瘤活性和体内存活时间均优于第一代(MOv19- ζ)。2013年,Brentjens等^[22]用CD19-CAR(scFvCD19-CD28-CD3 ζ)T细胞治疗5例形态学或微小残留病变阳性的急性B细胞白血病(acute B lymphocytic leukemia, B-ALL)患者。通过治疗,5例肿瘤迅速减小,且微小残留病灶完全缓解。其中1例患者治疗8天之后就很快得到完全缓解,3例患者缓解期已长达5月至24个月。虽然患者对该疗法能够耐受,但是也出现了细胞因子相关的毒性反应,并且与肿瘤负荷成正相关。这也是首次发表的CAR-T细胞治疗对成人ALL患者有效的研究。

1.3 第三代CAR-T细胞

Till等^[23]以逆转录病毒为载体构建第三代CAR-T细胞(scFv CD20-CD28-CD137-CD3 ζ),治疗3例非霍奇金淋巴瘤。经PCR检测,效应细胞在体内存活的时间超过12个月。临床反应持续完全缓解2例,部分缓解1例。其中1例28岁利妥昔单抗难治性滤泡性淋巴瘤患者,CAR-T细胞治疗3.5月后,颈部淋巴结在1~2周内迅速减小3 cm。

而美国国家癌症研究所Morgan等^[24]报道一例结肠癌合并肝和肺转移患者接受第三代HER2-CAR-T细胞治疗。该患者输注后4小时血液就检测出有高水平的IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α 和IL-6等细胞因子。因为细胞静脉输注后首先经过肺循环,输注大量的HER2-CAR⁺T细胞后,识别并攻击表达HER2的正常肺细胞,释放的过量细胞因子,引起“细胞因子风暴”,患者于治疗后5天死亡。这也是迄今为止公布的最为严重的1例CAR-T细胞相关的不良反应。由于目前第三代CAR-T细胞临床应用还比较少,故其安全性和有效性是否就一定优于第二代CAR-T细胞,以及选择怎样的共刺激分子组合,还需进一步观察。

2 嵌合抗原受体T细胞基因转导的方法

外源基因进入细胞中通常需要运输工具,CAR-T细胞基因转导进入细胞内也不例外。目前,基因导入的载体主要分为病毒类和非病毒类。

病毒载体的转移效率高,培养T细胞到达临

床数量的时间相对较短,且不同病毒载体具有不同表达特点,故在基础研究和临床试验中应用广泛,是目前主要的基因治疗载体。《Journal of Gene Medicine》对2008年在临床基因治疗中所用载体的类型进行了调查,约70%的治疗方案采用病毒载体。理论上所有病毒经过删除与致癌、致毒和复制相关的基因片段并在适当位置插入外源基因,均可成为基因传递的工具。目前最常用的主要是逆转录病毒载体(包括慢病毒载体)、腺病毒载体和腺相关病毒载体等。

由于病毒载体仍存在着一定的安全隐患,比如诱导机体产生免疫反应,存在着插入突变等致癌及致毒的风险,且载体容量有限,制备滴度不高^[25-26]等,而非病毒载体则具有无传染性、不限制载体容量、化学结构可控、可大量制备及具有靶向性等优点^[27],现已受到越来越多的科研人员的关注。目前,所应用的非病毒载体有裸DNA、脂质体、多聚物及分子耦联体等。

近年来,微环DNA被认为是最好的非病毒载体之一,在基因治疗中已被广为应用。微环DNA是一种新颖的小环超螺旋表达框,它是传统质粒在大肠杆菌体内通过位点特异性重组得到的。Chen等^[28]通过在体内联合表达一种限制性内切酶,将小质粒和亲本质粒酶切,使之成为线性DNA,这样就可以通过常规的质粒分离方法获得高纯度的微环DNA。

因缺少抗性标记基因、复制原点等细菌序列的特点,大大增强了这种新颖的小环超螺旋表达框在临床上的安全性。体外研究也表明,微环DNA可显著提高转基因表达效率^[29]。而微环DNA-纳米系统,就是通过保持基本结构不变,仅改变DNA序列,便可用来治疗不同疾病,在T细胞基因改造的技术构建中具有深厚的应用潜力(图3)。

3 CAR-T细胞临床应用中的问题和解决办法

虽然目前CAR-T细胞临床应用越来越多,也取得了一定的临床效果和突破,但研究者对其安全性还是十分重视和关注的。目前,CAR-T细胞就可能存在如下主要的不良反应。

3.1 CAR-T细胞的脱靶效应

CAR-T细胞临床应用的首要问题是脱靶效应,导致针对正常组织的自身免疫反应。故研究

者首先考虑的是肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen, TSA)。但目前已知的TSA较少,除了少数CAR-T试验针对前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA)和表皮生长因子受体III(epidermal growth-factor receptor variant III, EGFRvIII)等TSA外^[30-31],大多数针对重要组织不表达或相对可损耗组织表达的肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)。其中,以针对CD19、CD20和CD22为靶抗原的CAR-T细胞治疗B细胞恶性肿瘤研究得最多^[19-20,22-23],原因就是即便损伤了成熟B细胞,也只是暂时的、可恢复的;且缓解期血液肿瘤细胞数量级约为 $10^8\sim 10^9$,而1 cm实体肿瘤其肿瘤细胞数就有约 1×10^9 。实体瘤肿瘤微环境的免疫抑制作用更强,免疫细胞不易进入实体瘤内部,也是CAR-T细胞目前主要治疗血液系统疾病的又一重要原因。

对于拥有多重胞内信号区的第二和第三代CAR-T细胞,更强的亲和力和信号传导功能使其结合相关抗原后,能大量释放细胞因子,引起炎症反应^[32],故选择合适的靶抗原,是避免脱靶效应的重要挑战。上文提到的第一代CAR-T细胞治疗转移性肾细胞癌造成肝细胞毒性和第三代CAR-T细胞的不良反应就是此种情况。此外,Brentjens等^[33]报道的1例接受第二代CAR-T细胞的CLL患者,出现低血压、呼吸困难和肾衰竭,于细胞治疗后4天死亡,考虑也是CAR-T细胞相关“细胞因子风暴”所致。

最近,Kochenderfer团队^[34]也报告了1例带CD28和 ζ 链刺激结构域的抗CD19-CAR治疗B细胞淋巴瘤患者。病人虽出现CD19⁺淋巴瘤细胞清除,但是这种效果是通过持续清除外周血B细胞达39周才得以实现的,说明对健康成熟B细胞的脱靶效应仍然是CAR-T细胞应用于临床的一个潜在的主要障碍。

3.2 插入突变

CAR-T技术是在T细胞中插入一段外源DNA片段,理论上说其结构已被破坏,存在一定的致癌风险。虽然目前并没有关于基因改造T细胞致癌性的报道,但是研究者还是一直在关注此问题,也在不断通过优化载体类型和转染方式来降低插入突变的风险。

3.3 可能的解决办法

针对以上问题,如何保证发挥CAR-T细胞生物有效性的同时减少其潜在危险性,是实现基因联合细胞治疗恶性肿瘤需要解决的问题之一。

首先,很多临床试验采用了剂量爬坡的治疗方法。

在同一代次的治疗中,把细胞剂量由小到大分散到几次回输中,并不断监测细胞毒性;或是应用第一或者第二代CAR没有观察到毒性后,再开始下一代CAR-T细胞的治疗,防止可能诱发大规模不良反应。

其次,可以引入自杀基因的人工调控开关,通过自杀基因系统删除识别靶抗原的剩余CAR-T细胞。虽然自杀基因在体内需要一些时间才能被激活,不能阻止急性脱靶毒性引起的组织损伤,但对于减小长期毒性还是有积极的作用。

第三,可以把CAR中信号结构域分裂到两个不同CAR(信号一CAR和信号二CAR),只有当两个CAR与肿瘤表面的靶抗原都结合以后,才能完全激活应答。Duong等^[35]就发表了类似的方法,包括使用两种不同的CAR,以促进对表达两种肿瘤抗原的靶细胞更强的应答。

第四,除了激活受体外,还可以引入抑制性CAR。当CAR-T细胞与正常组织的靶抗原相互作用以后,抑制性CAR将拮抗效应T细胞的激活。

最后,还可以根据靶抗原表达水平,微调CAR亲和性。以较低的亲和性识别抗原高表达的肿瘤细胞,而不攻击相同抗原低表达的正常细胞。当然,这些方法是否可行,是否适用于不同的肿瘤类型,还需临床进一步验证。

4 嵌合抗原受体免疫细胞的发展方向

随着细胞免疫治疗肿瘤的进展,嵌合抗原受体修饰的T细胞在临床应用中的作用越来越受到人们的重视。通过探索完美的CAR信号组合,调节适宜的CAR亲和性,增加人工基因调控开关,产生合理的细胞因子分泌,诱导T细胞特异性归巢等,相信第四代甚至第五代CAR-T细胞也将很快应用于临床。

除此之外,嵌合抗原受体也不仅仅只是修饰T细胞,它还可以修饰CIK细胞、NK细胞以及 $\gamma\delta$ T细胞^[36-38]等等。例如,德国波恩大学的研究人员从结肠癌患者外周血中采集和培养CIK细胞,并利用CEA⁺抗体特异性的CAR对CIK细胞进行改造,使CIK细胞获得CAR的特性^[39]。将CAR-CIK细胞与CEA⁺肿瘤细胞共培养后,发现其分泌的IFN- γ ,要高于与CEA-肿瘤细胞共培养情况;而用未改造的CIK细胞与CEA⁺/CEA⁻分别共培养,却未观察到IFN- γ 分泌增加,且CAR-CIK细胞的细胞毒效应也比未改造

CIK细胞要高。

最后, 当前构建的嵌合抗原受体存在固定的抗原特异性, 这意味着它们每次只能靶向一种类型的肿瘤抗原。将来可以设计构建一种更加通用性的嵌合抗原受体框, 最终可用于同时或依次靶向多种肿瘤抗原^[40], 这样将更大程度解决肿瘤免疫逃逸引起的复发和转移等问题, 成为疗效更确切的过继性免疫细胞治疗方法, 给肿瘤治疗带来新的希望。

参考文献 (References)

- Lipowska-Bhalla G, Gilham DE, Hawkins RE, Rothwell DG, *et al.* Targeted immunotherapy of cancer with CAR-T cells: Achievements and challenges. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(7): 953-62.
- Ramos CA, Dotti G. Chimeric antigen receptor(CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11(7): 855-73.
- 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 USA* 1989; 86(24): 10024-8.
- Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(2): 720-4.
- Heuser C, Hombach A, Löscher C, Manista K, Abken H. T-cell activation by recombinant immunoreceptors: Impact of the intracellular signalling domain on the stability of receptor expression and antigen-specific activation of grafted T cells. *Gene Ther* 2003; 10(17): 1408-19.
- Zhao Y, Wang QJ, Yang S, Kochenderfer JN, Zheng Z, Zhong X, *et al.* A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity. *J Immunol* 2009; 183(9): 5563-74.
- Bridgeman JS, Hawkins RE, Bagley S, Blaylock M, Holland M, Gilham DE. The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *J Immunol* 2010; 184(12): 6938-49.
- Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, *et al.* A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(20 Pt 1): 6106-15.
- Julie RP, David LD, Marilyn S, Wright C, Naranjo A, Wagner J, *et al.* Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with Neuroblastoma. *Mol Ther* 2007; 15(4): 825-33.
- Lamers CH, Langeveld SC, Groot-van Ruijven CM, Debets R, Sleijfer S, Gratama JW, *et al.* Gene-modified T cells for adoptive immunotherapy of renal cell cancer maintain transgene-specific immune functions *in vivo*. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56(12): 1875-83.
- Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Dotti G, *et al.* Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: Persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 2008; 14(11): 1264-70.
- Till BG, Jensen MC, Wang J, Chen EY, Wood BL, Greisman HA, *et al.* Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* 2008; 112(6): 2261-71.
- Finney HM, Lawson AD, Bebbington CR, Weir AN. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol* 1998; 161(6): 2791-7.
- Dotti G, Savoldo B, Brenner M. Fifteen years of gene therapy based on chimeric antigen receptors: Are we nearly there yet? *Hum Gene Ther* 2009; 20(11): 1229-39.
- Park TS, Rosenberg SA, Morgan RA. Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends Biotechnol* 2011; 29(11): 550-7.
- Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: A quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(12): 939-51.
- Finney HM, Akbar AN, Lawson AD. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: Costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol* 2004; 172(1): 104-13.
- Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(4): 271-85.
- Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011; 365(8): 725-33.
- Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, *et al.* T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 2011; 3(95): 95ra73.
- Kandalaft LE, Powell DJ Jr, Coukos G. A phase I clinical trial of adoptive transfer of folate receptor-alpha redirected autologous T cells for recurrent ovarian cancer. *J Transl Med* 2012; 3(10): 157.
- Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, *et al.* CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 2013; 5(177): 177ra38.
- Till BG, Jensen MC, Wang J, Qian X, Gopal AK, Maloney DG, *et al.* CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: Pilot clinical trial results. *Blood* 2012; 119(17): 3940-50.
- Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 2010; 18(4): 843-51.
- Wang GP, Garrigue A, Ciuffi A, Ronen K, Leipzig J, Berry C, *et al.* DNA bar coding and pyrosequencing to analyze adverse events in therapeutic gene transfer. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(9): e49.
- Hu WS, Pathak VK. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol Rev* 2000; 52(4): 493-511.
- El-Anead A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* 2004; 94(1): 1-14.

- 28 Chen ZY, He CY, Kay MA. Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression *in vivo*. *Hum Gene Ther* 2005; 16(1): 126-31.
- 29 Kay MA, He CY, Chen ZY. A robust system for production of minicircle DNA vectors. *Nat Biotechnol* 2010; 28(12): 1287-9.
- 30 Zhong XS, Matsushita M, Plotkin J, Riviere I, Sadelain M. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther* 2010; 18(2): 413-20.
- 31 Shen CJ, Yang YX, Han EQ, Cao N, Wang YF, Wang Y, *et al*. Chimeric antigen receptor containing ICOS signaling domain mediates specific and efficient antitumor effect of T cells against EGFRvIII expressing glioma. *J Hematol Oncol* 2013; 6(1): 33.
- 32 Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, *et al*. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 2009; 114(3): 535-46.
- 33 Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, Riviere I, Sadelain M. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: Case report of an unforeseen adverse event in a phase clinical trial. *Mol Ther* 2010; 18(4): 666-8.
- 34 Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, *et al*. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 2010; 116(20): 4099-102.
- 35 Duong CP, Westwood JA, Berry LJ, Darcy PK, Kershaw MH. Enhancing the specificity of T-cell cultures for adoptive immunotherapy of cancer. *Immunotherapy* 2011; 3(1): 33-48.
- 36 Marin V, Dander E, Biagi E, Introna M, Fazio G, Biondi A, *et al*. Characterization of *in vitro* migratory properties of anti-CD19 chimeric receptor-redirection CIK cells for their potential use in B-ALL immunotherapy. *Exp Hematol* 2006; 34(9): 1219-29.
- 37 Pegram HJ, Jackson JT, Smyth MJ, Kershaw MH, Darcy PK. Adoptive transfer of gene-modified primary NK cells can specifically inhibit tumor progression *in vivo*. *J Immunol* 2008; 181(5): 3449-55.
- 38 Rischer M, Pscherer S, Duwe S, Vormoor J, Jürgens H, Rossig C. Human gammadelta T cells as mediators of chimaeric-receptor redirected anti-tumour immunity. *Br J Haematol* 2004; 126(4): 583-92.
- 39 Schlimper C, Hombach AA, Abken H, Schmidt-Wolf IG. Improved activation toward primary colorectal cancer cells by antigen-specific targeting autologous cytokine-induced killer cells. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 238924.
- 40 Urbanska K, Lanitis E, Poussin M, Lynn RC, Gavin BP, Kelderman S, *et al*. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T cell antigen receptor. *Cancer Res* 2012; 72(7): 1844-52.