

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.04.482

嵌合抗原受体修饰 T 细胞在实体肿瘤治疗中的应用

马韵涵,潘宇飞,董立巍,谈冶雄*

第二军医大学东方肝胆外科医院国际合作信号转导研究中心,上海 200438

[摘要] 嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)是一种人工修饰的 T 细胞表面受体,它可以模拟天然的 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)的功能。使用转基因技术可以在 T 细胞表面稳定表达 CAR。CAR 修饰 T 细胞(CAR-T 细胞)利用抗体的肿瘤特异性识别能力,靶向发挥 T 细胞的效应功能。目前 CAR-T 细胞在临床治疗白血病、淋巴瘤、黑色素瘤等恶性肿瘤中取得了令人鼓舞的效果。但由于实体肿瘤的某些特点,CAR-T 细胞在临床治疗实体肿瘤的实践中存在部分障碍。随着研究的深入,三代 CAR-T 细胞、双重特异性 CAR-T 细胞等的应用将为 CAR-T 细胞临床治疗实体肿瘤开拓道路。本文就近年来 CAR-T 细胞在实体肿瘤中的应用作一综述。

[关键词] 嵌合抗原受体;T 淋巴细胞;实体肿瘤;免疫疗法

[中图分类号] R 730.51 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)04-0482-06

Clinical application of chimeric antigen receptor-engineered T cells in treatment of solid tumors

MA Yun-han, PAN Yu-fei, DONG Li-wei, TAN Ye-xiong*

International Co-operation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] The chimeric antigen receptor (CAR) is an artificial T cell surface receptor that simulates the physiological functions of the native T cell receptor (TCR). With gene transfer technologies, T cells can be genetically modified to stably express CAR on their surface. The CAR-T cells have a combined advantage of antibody tumor specificity and T cells' effector function. Today the clinical trials with leukemia, lymphoma and melanoma have seen impressive results, but the clinical use of CAR-T cells for solid tumors has faced some challenges due to certain characteristics of solid tumors. In the future the third generation CAR-T cells, dual-specificity CAR-T cells and some new discoveries will pave a way for the application of CAR-T cells for solid tumors. In this paper, we reviewed the application of CAR-T cells for treatment of solid tumors in recent years.

[Key words] chimeric antigen receptor; T-lymphocytes; solid tumor; immunotherapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(4): 482-487]

肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、食管癌等实体肿瘤位于我国肿瘤发病率和病死率前 10 位,但是往往在病程的晚期才得以诊断,且缺少有效的根治手段。实体肿瘤细胞的异质性是影响治疗效应的重要因素。实体肿瘤中不仅有可以快速增殖的细胞,还有部分细胞处于相对静息状态,一般认为是肿瘤干细胞样细胞,这些细胞既可以自我更新又能分化,对于各种治疗手段有很强的抵抗性^[1]。常规的肿瘤化疗主要针对快速增殖的细胞,而肿瘤免疫治疗可以杀死恶性细胞而不用考虑其增殖状态^[2]。嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰 T 细胞(CAR-T 细胞)治疗即是特异性

的免疫治疗手段。1989 年 Cross 等最初提出 CAR-T 细胞治疗这一概念,目前其在治疗白血病临床试验上已取得突破性进展。最近一项针对复发性急性淋巴细胞白血病的治理研究中,共 30 例儿童和成年患者接受了 CD19 靶向的 CAR-T 细胞的治疗,完全缓解率达到了 90%(27/30)^[3]。如此引人瞩目的治疗效果给实体肿瘤患者带来了曙光,越来越多的研究者正尝试着将 CAR-T 细胞应用于各种实体肿瘤的治疗。

CAR-T 细胞固有的优势有潜在的体内增殖能力、长期的体内存活能力、高效的归巢能力(即 CAR-T 细胞准确的肿瘤定位能力),并且相比于传

[收稿日期] 2015-09-12 **[接受日期]** 2015-10-28

[作者简介] 马韵涵,硕士生。E-mail: invater@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81875362, E-mail: yxtan1214@163.com

统的化疗,其毒性反应较低^[4],这些都为实体肿瘤的治疗提供了可能。本文就 CAR-T 细胞在实体肿瘤中的应用、挑战及相关策略予以总结,为将来更好地应用于实体肿瘤提供参考。

1 CAR-T 细胞在实体肿瘤中的应用探索

CAR 是一种人工修饰的 T 细胞表面受体,其可以模拟天然的 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)的功能。使用转基因技术可以在 T 细胞表面稳定表达 CAR。与其他肿瘤免疫治疗方法相似,在理想条件下,CAR 应靶向在肿瘤细胞或其周围间质中特异表达的抗原,如胶质瘤细胞特有的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)可变异剪切体 EGFRv III^[5]。但大部分应用于靶向治疗的肿瘤抗原在正常细胞上存在低水平分布,或以一种谱系限定的方式分布于特定的细胞上。

1.1 第 1 代 CAR-T 细胞在治疗实体肿瘤中的应用 第1代 CAR-T 细胞在动物模型和临床试验中取得了一些成果,靶向碳酸酐酶Ⅸ(CAⅨ)、CD171、叶酸受体 α(FR-α)和双唾液酸神经节苷脂(GD2)等抗原的第 1 代 CAR-T 细胞的应用在治疗卵巢癌、肾细胞癌和成神经细胞瘤等实体肿瘤的实践中得到体现。靶向 GD2 抗原的 CAR-T 细胞在治疗成神经细胞瘤的临床试验中取得了较好的效果——接受治疗的 11 例成神经细胞瘤患者显示出良好的 CAR-T 细胞短期体内存活能力和抗肿瘤效应^[6]。另外一项纳入 11 例出现肿瘤压迫、转移症状患者的研究中,CAR-T 细胞在其中 3 例患者体内得到长期存活并使病情得以缓解^[7]。

Lamers 等^[8]尝试应用靶向 CAⅨ抗原的第 1 代

CAR-T 细胞治疗肾癌,由于 CAⅨ抗原同样表达于胆管细胞之上,最初的 3 例受试者中有 2 例出现了肝炎的症状(黄疸等)并产生了抗 CAR 免疫反应,导致 CAR-T 细胞在体内不易长期存活;随后的 4 例受试者预先用 CAⅨ单克隆抗体进行治疗,随后输注 CAR-T 细胞,有效防止了肝炎和抗 CAR 免疫反应的发生。但该措施尽管延长了 CAR-T 细胞的体内存活时间,然而并没有观察到明显的临床疗效^[9]。在 CAR-T 细胞治疗成神经细胞瘤患者的研究中,6 例受试者输注了高达 10⁹/m²(体表面积)的靶向 CD171 抗原的第 1 代 CAR-CD8⁺ T 细胞克隆。患者在输注的过程中表现出了良好的耐受,但是 CAR-T 细胞在体内仅存活了 6 周时间,仅有 1 例患者在输注后第 8 周产生了部分抗肿瘤效应^[10]。

1.2 第 2、3 代 CAR-T 细胞在治疗实体肿瘤中的应用 尽管第 1 代 CAR-T 细胞没有显示出良好的临床效应,但依据它们建立了 CAR-T 细胞过继性回输的可行性和安全性标准。这也为 CAR 信号转导功能的进一步发展铺平了道路。第 2、3 代 CAR 具有传递高强度、高质量激活信号的能力,这使得 CAR-T 细胞在增殖、细胞因子的释放、效应功能等方面有了明显提升。它们现已应用于临床,并且对它们的治疗潜力仍在不断地开发(表 1)。如以磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(glypican-3, GPC-3)为靶点的第 3 代 CAR-T 细胞,在体内和体外试验中均呈现出了良好的抗 GPC-3 阳性的肝细胞瘤的活性^[11]。此外,拥有 CD3ζ、CD28 的第 3 代 CAR-T 细胞联合白介素(IL)-7 和 IL-15 可使其获得良好的增殖能力,同时也提高了其针对 GD2 的效应功能,这也为第 3 代 CAR-T 细胞进入临床试验阶段提供了条件^[12]。

表 1 CAR-T 细胞在实体肿瘤中的代表性应用

Tab 1 The representative applications of CAR-T cells in solid tumors					
Antigen targeted	Disease	CAR generation	CAR endodomain	CAR gene transfer	Clinical trial phase
GD2	Neuroblastoma	First	CD3ζ (EBV)	RV	I
PSMA	Prostate cancer	First	CD3ζ	RV	I
CAⅨ	Metastatic renal carcinoma	First	FcRγ	PV	I
FR-α	Ovarian cancer	First	FcRγ	RV	I
L1-CAM	Metastatic neuroblastoma	First	CD3ζ	RV	I
PSMA	Prostate cancer	Second	CD3ζ/CD28	RV	I
CEA	Breast cancer	Second	CD3ζ/CD28	RV	I
CEA	Colorectal carcinoma	Second	CD3ζ/CD28	RV	I
HER2/neu	Lung malignancy	Second	CD3ζ/CD28	RV	I
HER2/neu	Advanced osteosarcoma	Second	CD3ζ/CD28	RV	I
HER2/neu	Glioblastoma	Second	CD3ζ/CD28(EBV)	RV	I / II

CAR: Chimeric antigen receptor; GD2: Diasialoganglioside; PSMA: Prostate-specific membrane antigen; CAⅨ: Carbonic anhydrase Ⅸ; FR-α: Folate receptor α; L1-CAM: L1 cell adhesion molecules; CEA: Carcinoembryonic antigen; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2; EBV: Epstein-barr virus-specific CAR-modified T(CAR-T) cells; RV: Retroviral; PV: Plasmid vector

但是,1 例不良反应事件强调了应谨慎使用具有高度活性的第 2、3 代 CAR-T 细胞。向 1 例转移性结肠癌患者体内输注了大量靶向 HER2/neu 抗原的第 3 代 CAR-T 细胞(α -HER2/neu, CD28, 4-1BB, CD3 ζ),导致该细胞对正常的肺血管内皮细胞表面低水平表达的 HER2/neu 分子产生了靶向作用,由此导致了大规模的脱靶反应(off-target)。在患者的血浆中检测到“细胞因子风暴”(cytokine storm)——即粒细胞-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-6 和 IL-10 等细胞因子的升高。在输注后的几分钟,这例患者发生了急性肺毒性反应,并于 4 d 后死亡^[13]。

1.3 CAR-T 细胞在治疗实体肿瘤中的新发现 双重特异性 CAR-T 细胞(dual-specificity CAR-T cells)是指通过 CAR 和内源性刺激手段均可使 CAR-T 细胞活化,从而增强 CAR-T 细胞在体内的存活能力和针对肿瘤细胞的细胞毒活性。TCR 可以成为内源性刺激的主要来源——特异性靶向病毒抗原的 TCR 可使 CAR-T 细胞感受到来自于潜伏感染者血清中的病毒的刺激,如 EB 病毒或病毒疫苗(病毒疫苗可以允许对 CAR-T 细胞进行周期性的重复刺激)。研究显示,来自于成神经细胞瘤(EB 病毒阳性)患者体内的 EB 病毒特异性和非特异性 T 细胞分别在体外通过细胞工程表达靶向于 GD2 的 CAR,形成 CAR-T 细胞。在过继性回输后的前几周内,EB 病毒特异性的 CAR-T 细胞相比于非特异性 CAR-T 细胞具有更高的体内存活数量;体外用含有 EB 病毒的细胞进行刺激,EB 病毒特异性的 CAR-T 细胞可以溶解 GD2 阳性靶细胞,而非特异性 CAR-T 细胞则不具备这一能力^[14]。

除了传统的 CAR 之外,配体也可作为识别肿瘤细胞的组成成分。IL-13 的受体表达于神经胶质瘤, CAR-T 细胞可以通过 IL-13 的某一结构域来识别这一受体,从而为神经胶质瘤患者提供治疗的可能。在以荷瘤小鼠为动物模型的实验中,以 IL-13 为基础的 CAR-T 细胞对人 U87 神经胶质瘤细胞产生了抗肿瘤活性^[15]。

在实体肿瘤中,肿瘤基质的破坏对 CAR-T 细胞的渗透和抗肿瘤作用的产生至关重要。在一项使用靶向 HER2 的 CAR-T 细胞治疗肿瘤的试验中发现,抗肿瘤效应的产生往往伴随着 M1 型巨噬细胞

水平的升高,并且需要肿瘤基质细胞上的干扰素(IFN)- γ 受体的表达,这都提示 CAR-T 细胞抗肿瘤效应的提升与肿瘤基质的破坏程度有一定关系^[16]。

肝脏转移病灶的免疫治疗已经进入了临床一期试验阶段,此种治疗手段是针对不可切除的癌胚抗原(CEA)阳性的结肠癌肝转移病灶,方法是将 CAR-T 细胞通过肝动脉直接输入入病灶区。治疗效果与患者接受治疗后血液中中性粒细胞/淋巴细胞比值呈负相关,与血液中 IL-6 的水平亦呈负相关^[17]。

2 CAR-T 细胞在治疗实体肿瘤临床实践中的障碍及对策

限制 CAR-T 细胞应用于实体肿瘤的主要问题包括靶抗原不特异,CAR-T 细胞在体内的存活时间有限,CAR-T 细胞的肿瘤定位作用(归巢能力)受到抑制;此外,肿瘤微环境也会对 CAR-T 细胞的活性起到抑制作用,包括免疫抑制细胞(调节性 T 细胞,骨髓来源的抑制性细胞, M2 型肿瘤相关巨噬细胞)、细胞因子[转化生长因子(TGF)- β , IL-10]和肿瘤细胞表面抑制 T 细胞功能的蛋白(B7-H 家族, Fas 配体)等共同构成了肿瘤免疫抑制微环境^[18]。这些发现可以帮助人们更好地理解 CAR-T 细胞作用受到抑制的机制,并可能产生相应的靶向药物来有效地联合 CAR-T 细胞进行治疗。

为了克服 CAR-T 细胞应用于实体肿瘤临床实践中的障碍,我们需要关注如何选择肿瘤相关抗原、如何设计 CAR、如何增强 CAR-T 细胞的体内存活和归巢能力及如何克服肿瘤微环境中的免疫抑制因子的影响等。

2.1 肿瘤相关抗原的选择和 CAR 的设计 理论上可以作为 CAR-T 细胞靶向抗原的分子有很多,但基于这些分子在正常组织中的分布情况和可能发生的脱靶反应,仅有少数的抗原分子可行。迄今为止,大多数 CAR 的设计会经过免疫缺陷小鼠模型的检测。在小鼠模型中检测 CAR-T 细胞对表达于正常组织表面的抗原的作用,可以对潜在的脱靶反应予以提示。但是,相关的抗原可能并不表达于啮齿类动物体内。在该种情况下,可以按照 Morgan 等^[13]的建议,首次输注 CAR-T 细胞进入人体内需要严格控制细胞的数量,从低剂量开始输注,以降低严重毒性反应发生的可能性。

更高性能的 CAR 可能会引起更为严重的脱靶反应,如第 2、3 代 CAR。因此,打破对单一抗原的依赖性可能会提高 CAR-T 的肿瘤特异性。拥有共刺激分子信号序列(CM,提供功能信号)的 CAR(称为 CCR)可以增强 CAR-T 细胞对特异抗原的反应。如在第 1 代 CAR-T 细胞上同时表达 CCR,使其有两种 CAR(CAR 以 CD3 ζ 为信号传递链,CCR 以 CD28 和 CD137 共刺激蛋白为信号传递链)识别不同的肿瘤抗原,在具备更好肿瘤特异性识别与杀伤能力的同时,也提供了一种对其活性的控制方法——因为只有靶细胞上同时表达 2 种相应的抗原才可能引起拥有 2 种 CAR 的 CAR-T 细胞的完全激活。这种方法的效果已得到同时靶向 HER2/neu 和 MUC-1 两种抗原的 CAR-T 细胞试验的证实^[19]。

第 1 代 CAR 也会产生严重的毒性反应,尽管可以使用固醇类激素来降低 CAR-T 细胞引发的毒性反应,但它仍会对患者的免疫系统产生不利的影响。利用“自杀基因系统”特异性诱导 CAR-T 细胞凋亡等方法将有助于控制不良反应的程度。常见的“自杀基因系统”包括可诱导的细胞凋亡蛋白酶系统^[20]和表位标签系统^[21]。如利用基因工程使 CAR-T 细胞同时表达人 EGFR 多肽(huEGFRt),后者作为表位标签可成为西妥昔单抗(cetuximab)的靶标。通过使用西妥昔单抗可诱导过继性回输入体内的 CAR-T 细胞的凋亡,减轻毒性反应。因此,合理利用这两种“自杀基因系统”将会在未来 CAR 的设计和 第 3 代 CAR-T 细胞的应用中起到重要的作用。

2.2 提高 CAR-T 细胞的体内存活能力 CAR-T 细胞的高水平外周血循环数量保证有足够数量的 CAR-T 细胞可以渗透进肿瘤位点。靶向卵巢癌^[22]和肾细胞癌^[8]的第 1 代 CAR-T 细胞的临床试验表明,CAR-T 细胞较低的体内存活能力可能与未对患者进行预处理和抗 CAR 反应有关。在一项使用 CEA 特异性 CAR-T 细胞治疗晚期 CEA 阳性恶性肿瘤患者的试验中,提高患者预先化疗的强度增加了 CAR-T 细胞短期的体内存活能力,但并没有得到长期(>14 d)体内存活能力提高的证据。目前提高 CAR-T 细胞体内存活能力的方法主要包括使用多种细胞因子、对构建 CAR-T 细胞的 T 细胞的种类和表型进行选择等。相比于成熟 T 细胞,选择表达有幼稚细胞标记分子 CD62L 的 T 细胞进行基因修

饰产生的 CAR-T 细胞具有更高的体内存活能力^[23]。采用病毒共刺激的手段(如 EB 病毒)也可提高 CAR-T 细胞的体内短期存活能力。但这些病毒特异性的 CAR-T 细胞是否能比多克隆外周血细胞来源的 CAR-T 细胞有更强的临床效应尚不可知。

2.3 提高 CAR-T 细胞的归巢能力 趋化因子在 CAR-T 细胞向肿瘤位点的渗透过程中起着重要的作用^[24]。在 CAR-T 细胞上过表达 C-X-C 趋化因子受体 4(CXCR4)可使其靶向霍奇金淋巴瘤的能力得以提升。过表达趋化因子受体 2B(CCR2B)使其靶向成神经细胞瘤的能力得到同样的提升^[25]。

虽然趋化因子系统十分复杂,但通过研究结肠癌相关趋化因子,可找出应用于引导 CAR-T 细胞靶向肿瘤的候选趋化因子。原发性和转移性结肠癌产生相当数量的嗜酸粒细胞趋化因子 eotaxin-2/CCL24,这是一种与哮喘有关的趋化因子,可以引导嗜酸粒细胞的迁移。表达有趋化因子受体 3(CCR3)的 CAR-T 细胞可以对重组 CCL24 起反应。但是,在结肠癌的样本中很少发现有嗜酸粒细胞的渗透,这可能是由于存在高水平的其他细胞因子拮抗 eotaxin-2 的作用,如人趋化因子 IP-10(interferon-inducible protein-10)^[26]。因此,为了更有效地引导 CAR-T 细胞的肿瘤定位,需要对肿瘤产生的趋化因子的综合效应予以更加深入的理解,关注重要的归巢趋化因子,规避其他趋化因子的负性调节作用。

2.4 克服肿瘤微环境中免疫抑制因子的影响 为了成功与肿瘤细胞接触,CAR-T 细胞需要克服肿瘤微环境中免疫抑制因子的影响。可采取以下措施帮助 CAR-T 细胞对抗免疫抑制因子的作用:(1)在 CAR 载体构建过程中,使其包含编码负性突变型 TGF- β 受体的基因区,从而帮助 CAR-T 细胞克服肿瘤来源的 TGF- β 的抑制作用^[27];(2)通过敲除策略使 CAR-T 细胞避免 Fas/Fas 配体介导的凋亡^[28];(3)使 CAR-T 细胞表达 *Bcl-xL* 等促存活基因^[29],等等。尽管提高了 CAR-T 细胞的治疗活性,但这些延长 T 细胞寿命的促存活基因的组成型表达却可能会存在一定的癌变风险。现今有一种改良版的 CAR-T 细胞,名为“Trucks”(T cells redirected for universal cytokine killing),即在 CAR-T 细胞原有载体上又包含了一个与 IL-12 相关的核转录因子

区^[30]。由“Trucks”产生的 IL-12 主要存在于肿瘤微环境中而不会影响机体总体 IL-12 的表达,并且其主要与 CAR 活性有关。更为重要的是,局部的 IL-12 可以下调肿瘤基质中免疫抑制细胞的表达,并且可以介导巨噬细胞的激活而引起更为广泛的抗肿瘤免疫反应(包括攻击某些靶向抗原丢失的肿瘤细胞)。此外,引起抗肿瘤效应的“Trucks”的输注总量也远远低于传统 CAR-T 细胞,使用“Trucks”进行治疗可能不需要对患者进行化疗等预处理工作。

3 小结和展望

CAR-T 细胞已经历了 3 代的发展,每一代都较前代在活化、增殖能力、抗瘤活性及体内持续时间方面有所提高。目前进入临床试验阶段的实体肿瘤靶向性 CAR-T 细胞主要使用第 1、2 代 CAR,第 3 代 CAR 因潜在的严重不良反应使其临床应用受到限制。尽管如此,随着科学技术的不断进步,相信在不久的将来,装载第 3 代 CAR 的 CAR-T 细胞也将进入肿瘤治疗的领域。CAR-T 细胞治疗在血液系统肿瘤中的应用已非常成功。对实体瘤而言,在保证安全性的前提下提高 CAR-T 细胞的归巢能力是研究的重要方向。此外,尝试双靶点甚至多靶点干预可能是个体化精准治疗理念在 CAR-T 细胞治疗策略上的体现。当然,避免脱靶效应及“细胞因子风暴”仍将是 CAR-T 细胞疗法所面临的挑战。

CAR-T 细胞的临床应用对于转化医学具有重大意义。科研人员发现通过 CAR-T 细胞这一有效的工具,可以快速地 将实体肿瘤的更多特异性靶标应用于临床诊断和治疗中,促进了基础研究向临床的转化。CAR-T 细胞疗法代表着现今最先进的肿瘤免疫细胞治疗技术,在相关临床试验中取得了巨大的成功,国内已逐渐开展对 CAR-T 细胞疗法的研究。但 CAR-T 细胞疗法需对分离的人 T 细胞进行外源基因的导入操作,对其应界定为药物还是归于第 3 类医疗技术尚未明确,这必定不利于该领域的中长期发展。与此相关的,国内缺乏基于循证医学对 CAR-T 临床应用效果数据的采集、分析和评估。我们期待政策层面的规范和支撑,使 CAR-T 细胞治疗在我国能健康有序地发展,造福肿瘤患者。

[参考文献]

[1] Tang D G. Understanding cancer stem cell

heterogeneity and plasticity[J]. Cell Res, 2012, 22: 457-472.

[2] Galluzzi L, Vacchelli E, Eggermont A, Fridman W H, Galon J, Sautès-Fridman C, et al. Trial watch: adoptive cell transfer immunotherapy [J]. Oncoimmunology, 2012, 1: 306-315.

[3] Maude S L, Frey N, Shaw P A, Aplenc R, Barrett D M, Bunin N J, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia[J]. N Engl J Med, 2014, 371: 1507-1517.

[4] Curran K J, Pegram H J, Brentjens R J. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions[J]. J Gene Med, 2012, 14: 405-415.

[5] Sampson J H, Archer G E, Mitchell D A, Heimberger A B, Bigner D D. Tumor-specific immunotherapy targeting the EGFRv III mutation in patients with malignant glioma[J]. Semin Immunol, 2008, 20: 267-275.

[6] Pule M A, Savoldo B, Myers G D, Rossig C, Russell H V, Dotti G, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma [J]. Nat Med, 2008, 14: 1264-1270.

[7] Louis C U, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers G D, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma[J]. Blood, 2011, 118: 6050-6056.

[8] Lamers C H, Sleijfer S, Vulto A G, Kruit W H, Kliffen M, Debets R, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience[J]. J Clin Oncol, 2006, 24: e20-e22.

[9] Lamers C H, Sleijfer S, van Steenbergen S, van Elzakker P, van Krimpen B, Groot C, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity[J]. Mol Ther, 2013, 21: 904-912.

[10] Park J R, Digiusto D L, Slovak M, Wright C, Naranjo A, Wagner J, et al. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma[J]. Mol Ther, 2007, 15: 825-833.

[11] Gao H, Li K, Tu H, Pan X, Jiang H, Shi B, et al. Development of T cells redirected to glypican-3 for the

- treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20: 6418-6428.
- [12] Gargett T, Brown M P. Different cytokine and stimulation conditions influence the expansion and immune phenotype of third-generation chimeric antigen receptor T cells specific for tumor antigen GD2[J]. Cytotherapy, 2015, 17: 487-495.
- [13] Morgan R A, Yang J C, Kitano M, Dudley M E, Laurencot C M, Rosenberg S A. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2[J]. Mol Ther, 2010, 18: 843-851.
- [14] Pule M A, Savoldo B, Myers G D, Rossig C, Russell H V, Dotti G, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma[J]. Nat Med, 2008, 14: 1264-1270.
- [15] Jensen M. Method and compositions for enhanced anti-tumor effector functioning of T cells; US20120148552 [P]. 2012-06-14.
- [16] Textor A, Listopad J J, Wührmann L L, Perez C, Kruschinski A, Chmielewski M, et al. Efficacy of CAR T-cell therapy in large tumors relies upon stromal targeting by IFN γ [J]. Cancer Res, 2014, 74: 6796-6805.
- [17] Saied A, Licata L, Burga R A, Thorn M, McCormack E, Stainken B F, et al. Neutrophil: lymphocyte ratios and serum cytokine changes after hepatic artery chimeric antigen receptor-modified T-cell infusions for liver metastases[J]. Cancer Gene Ther, 2014, 21: 457-462.
- [18] Whiteside T L. Immune responses to malignancies[J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(2 Suppl 2): S272-S283.
- [19] Wilkie S, van Schalkwyk M C, Hobbs S, Davies D M, van der Stegen S J, Pereira A C, 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: 1059-1070.
- [20] Straathof K C, Pulè M A, Yotnda P, Dotti G, Vanin E F, Brenner M K, et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy[J]. Blood, 2005, 105: 4247-4254.
- [21] Wang X, Chang W C, Wong C W, Colcher D, Sherman M, Ostberg J R, et al. A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, *in vivo* tracking, and ablation of engineered cells[J]. Blood, 2011, 118: 1255-1263.
- [22] Kershaw M H, Westwood J A, Parker L L, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis S A. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12 (20 Pt 1): 6105-6115.
- [23] Wang X, Naranjo A, Brown C E, Bautista C, Wong C W, Chang W C, 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: 689-701.
- [24] Bromley S K, Mempel T R, Luster A D. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic[J]. Nat Immunol, 2008, 9: 970-980.
- [25] Craddock J A, Lu A, Bear A, Pule M, Brenner M K, Rooney C M, et al. Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2B[J]. J Immunother, 2010, 33: 780-788.
- [26] Cheadle E J, Riyad K, Subar D, Rothwell D G, Ashton G, Batha H, et al. Eotaxin-2 and colorectal cancer: a potential target for immune therapy[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13: 5719-5728.
- [27] Foster A E, Dotti G, Lu A, Khalil M, Brenner M K, Heslop H E, et al. Antitumor activity of EBV-specific T lymphocytes transduced with a dominant negative TGF- β receptor[J]. J Immunother, 2008, 31: 500-505.
- [28] Dotti G, Savoldo B, Pule M, Straathof K C, Biagi E, Yvon E, et al. Human cytotoxic T lymphocytes with reduced sensitivity to Fas-induced apoptosis[J]. Blood, 2005, 105: 4677-4684.
- [29] Eaton D, Gilham D E, O'Neill A, Hawkins R E. Retroviral transduction of human peripheral blood lymphocytes with Bcl-X (L) promotes *in vitro* lymphocyte survival in pro-apoptotic conditions[J]. Gene Ther, 2002, 9: 527-535.
- [30] Cheadle E J, Sheard V, Hombach A A, Chmielewski M, Riet T, Berrevoets C, et al. Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy[J]. Methods Mol Biol, 2012, 907: 645-666.