

## T 细胞基因转导方法及其在肿瘤临床研究中应用的进展

### Methods of genetic transduction of T cells and its progress in clinical research of tumor

潘鹏宇 综述; 韩双印, 李修岭 审阅( 郑州大学 人民医院, 河南 郑州 450003 )

**[摘要]** T 细胞基因转导方法的快速发展为肿瘤过继免疫治疗插上了飞翔的翅膀, 近年来取得的颠覆性治疗效果让人们对它充满期待。T 细胞的基因转导具有挑战性, 以逆转录病毒、慢病毒、转座子和 mRNA 电穿孔为代表的技术进步, 释放了 T 细胞的治疗潜能, 实现了对肿瘤细胞精准、高效、持久地杀伤, 大大提升了临床级肿瘤特异性 T 细胞的临床效果; 但仍面临插入突变、转导效率、成本等方面的问题。相信随着相关基础研究的深入, T 细胞基因转导“完美载体”的出现将会助力免疫治疗成为一线主流的肿瘤治疗方法。

**[关键词]** 肿瘤免疫治疗; 基因转导; T 细胞

**[中图分类号]** R730.5; Q785

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2016)02-0287-04

肿瘤过继免疫治疗经历了 30 年的风雨历程, 基因转导方法的进展赋予 T 细胞新的生命力<sup>[1]</sup>, 尤其是特异性识别肿瘤相关抗原的 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)或嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)的转导, 使 T 细胞获得肿瘤靶向性、更强、更久的杀伤活性, 成为肿瘤治疗最有潜力的手段之一。近年来, 高效的病毒和理化基因转导策略不断的研发, 在临床试验中表现出各具特色的应用潜力, 勾勒出肿瘤免疫治疗的美好前景, 本文就最常用的 T 细胞基因转导方法的研究进展进行综述。

### 1 $\gamma$ 逆转录病毒载体(Gamma retrovirus, $\gamma$ RV)

$\gamma$ RV 是最早批准用于临床的病毒载体<sup>[2]</sup>, 现行的临床试验中约 20% 使用  $\gamma$ RV<sup>[3]</sup>。 $\gamma$ RV 的优势在于转染范围广, 能转导多种类型的细胞; 病毒基因组能整合入宿主细胞基因组, 保证目的基因长期、稳定地表达; 大多数病毒基因组可被替代, 转基因负荷量大; 生产技术成熟, 能够批量生产。

$\gamma$ RV 的广泛应用首先得益于制备技术的不断优化。传统的  $\gamma$ RV 生产受限于狭窄的收获窗口、开放的操作系统和不足的培养空间。Wang 等<sup>[4]</sup>利用固定床生物反应器和 GMP 级包装细胞系成功生产出临床级  $\gamma$ RV, 其收获窗口长达 10 d, 平均载体滴度和产量分别是对照组(多层细胞培养瓶)的 7.3 倍和 13.1 倍, 生产效率提高了 18.6 倍。目前常用的  $\gamma$ RV 呈双嗜性(amphotropic), 有产生具有复制能力载体(replication competent vectors, RCVs)的安全隐患。Koste 等<sup>[5]</sup>用单嗜性(ecotropic) $\gamma$ RV 将编码鼠阳离子氨基酸转运蛋白 1(murine cationic amino-

acid transporter 1, mCAT-1)的 mRNA 导入 T 细胞中, 避免了 RCVs 污染, 转导效率也得到提高。 $\gamma$ RV 介导的基因转导效率受培养液成分的影响, Dodo 等<sup>[6]</sup>用能够吸附 T 细胞和病毒颗粒的纤维连接蛋白结合低温震荡技术解决了此问题, 转导 5 d 后 T 细胞即扩增了 126 倍, 目的基因表达率高达 49%。这种方法的优点在于封闭环境降低了污染的风险; 震荡可以更有效地利用吸附在容器内壁上的病毒颗粒, 提高转导效率的同时降低了对  $\gamma$ RV 的消耗。

经  $\gamma$ RV 修饰制备的多种临床级抗原特异性 T 细胞已用于 I/II 期临床试验, 取得了令人满意的结果。Guest 团队<sup>[7]</sup>利用  $\gamma$ RV 生产的癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)特异性 CAR-T 细胞,  $\gamma$ RV 滴度达  $2 \times 10^6$  IU/ml, CAR 表达率达 37.3%。Davi-la 等<sup>[8]</sup>靶向 CD19 的 CAR-T 细胞联合化疗治疗 16 例急性 B 淋巴细胞白血病(B cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL), 完全缓解率(complete remission, CR)高达 88%, 远高于单独化疗方案。

$\gamma$ RV 早期临床试验中发生的插入突变事件让

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81372405), 国家卫计委计划资助项目(No. 201301010), 河南省科技厅基础与前沿项目资助(No. 132300410036)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81372405), the National Health and Family Planning Research Founding(No. 201301010), and Henan Scientific and Technical Project(No. 132300410036)

**[作者简介]** 潘鹏宇(1989-), 男, 河南省商丘市人, 硕士生, 主要从事肿瘤生物治疗基础研究, E-mail: 13673666398@163.com

**[通信作者]** 韩双印(HAN Shuangyin, corresponding author), E-mail: hansyzzu@163.com; 李修岭(LI Xiuling, co-corresponding author), E-mail: zzlixiliung@aliyun.com

研究者一直保持高度警惕<sup>[9]</sup>。 $\gamma$ RV 具有靠近启动子整合的特点, 会扰乱整合位点两侧基因的功能, 若整合发生在原癌基因可能会导致细胞恶性转化<sup>[10]</sup>。然而, 研究<sup>[11]</sup>表明成熟 T 淋巴细胞会通过凋亡和表观遗传机制抵制致瘤性转化的发生, 一项利用  $\gamma$ RV 基因转导 T 细胞的长期试验并没有发现载体诱导的细胞无限增殖或在特定位点富集的证据<sup>[12]</sup>。尽管如此, 新的安全策略, 包括自我灭活载体<sup>[13]</sup>、绝缘子序列 (insulator sequence) 阻碍病毒的亲启动子特性等<sup>[14]</sup>, 都正在临床前试验之中。

## 2 慢病毒载体

慢病毒独有的顺式作用元件中央多聚嘌呤区 (central polypurine tract, cPPT) 能不依赖有丝分裂有效转导静息 T 细胞。相比于  $\gamma$ RV, 慢病毒转导效率更高, 接近 100%; 转基因负荷量更大, 可容纳 6.5 kb 的外源基因; 基因毒性更小。这些特点让研究者们以极大的热情投入到慢病毒的研究之中, 临床试验也日益增多。

慢病毒载体是由 I 型人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus-1, HIV-1) 发展而来的。目前常用的第四代慢病毒包装系统只保留了 HIV-1 基因组中 *GAG*、*POL* 和 *REV* 基因, 用 4 个载体 (pGag/Pol、pVSV-G、pRev 及目的基因载体) 组装病毒, 产生重组慢病毒的几率极小。Lenti-X<sup>TM</sup> HTX 系统进一步将 *POL* 基因分离出来, 含有 5 种载体, 生物安全性更高; 3' LTR 端引入的早獾肝炎病毒转录后调控元件 (Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulation element, WPRE) 具有稳定转录物的功能, 与 cPPT 一起能将目的基因蛋白的表达量提高 4 倍; 该包装系统能收获滴度高达  $5 \times 10^8$  IFU/ml 的 VSV-G 泛嗜性重组慢病毒颗粒, 无需浓缩即可直接用于感染 T 细胞。假型化 (pseudotyping) 也能显著提高慢病毒的转染范围和转导效率, 糖蛋白假型化慢病毒能够更加高效地转染静息 T 细胞。Cribbs 等<sup>[15]</sup>通过优化超速离心力、T 细胞活化方式及调整培养基血清种类, 使慢病毒对 T 细胞的转导效率达到 89%。Marino 等<sup>[16]</sup>利用 Mustang Q Acrodiscs 离子交换膜柱为快速大量纯化慢病毒提供了可能, 膜柱床体积可达 900 ml, 每天能纯化 1 500 L 的培养液, 回收率 60%, 病毒滴度可达  $1.91 \times 10^8$  TU/ml。近年来, 慢病毒载体广泛应用于 CAR 修饰 T 细胞的肿瘤免疫治疗。Maude 等<sup>[17]</sup>用慢病毒转导第二代 CAR-T 细胞治疗 30 例复发/难治性急性淋巴细胞白血病患者, 90% 达完全缓解, 6 个月无事件生存率为

67%, 2 年总存活率为 78%。

随着慢病毒载体临床应用的增多, 研究者也在探索更安全的策略: 分离病毒基因和调控序列, 减少慢病毒颗粒重组和再活化的几率; 使用自身灭活型载体 (self-inactivating vector, SIN) 降低插入突变的风险<sup>[18]</sup>; 量身打造谱系特异性启动子<sup>[19]</sup>和细胞类型特异性慢病毒<sup>[20]</sup>提高特异性和有效性; 衍生自非人类慢病毒属 (猿猴、马、猫科动物、羊和牛) 的嵌合型慢病毒, 对人类无致病性, 却可有效转导人类细胞<sup>[21]</sup>。

## 3 转座子

转座子 (transposon) 是一段具有转位特性的 DNA 片段, 因其具有基因载量大、转导效率高、工业成本低等优势, 加之不断的优化和设计, 使其逐渐从实验室走向临床。睡美人 (sleeping beauty, SB) 转座子系统 and PiggyBac (PB) 转座子系统便是其中的佼佼者<sup>[22]</sup>。

SB 和 PB 转座子系统均由两种质粒组成, 一个携带转座酶基因, 另一个携带目的基因。转座效率与转座酶活性密切相关, 常用的 SB 转座酶有 SB11 转座酶和 SB100X 转座酶, PB 转座酶有 pB 转座酶和 7pB 转座酶。SB11 转座酶介导的转座效率是质粒随机整合的 100 倍, SB100X 的转座效率是 SB11 的 10 ~ 100 倍<sup>[23]</sup>; pB 转座效率与 SB100X 转座酶大致相当, 而 7pB 是 SB100X 的 2 ~ 3 倍。Jin 等<sup>[24]</sup>比较了 SB11、SB100X 的转座活性, 利用 SB100X (pKan-CMV-SB100X) 制备的 CAR-T 细胞数量是 SB11 (pKan-CMV-SB11) 的 3.6 倍。Nakazawa 等<sup>[25]</sup>利用增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescence protein, EGFP) 测试 PB 转座子在 T 细胞中的转座效率, EGFP 阳性 T 细胞比例超过 99%, 平均荧光强度为 473.5, 连续培养 6 个月, EGFP 表达水平没有明显的降低。

目前 SB11 转座酶已获准用于临床试验, Singh 等<sup>[26]</sup>用 SB11 转座体系成功生产出了临床级靶向 CD19 的 CAR-T 细胞, 28 d 中 CAR-T 细胞扩增了 1 万倍, CD19 CAR 表达率在 90% 以上, I/II 期临床试验取得了良好的抗肿瘤效果。SB100X 转座酶在进入临床之前尚需进一步的优化以提高其安全性。Kacherovsky 等<sup>[27]</sup>采用 SB100X 转座酶系统实现了人类 T 细胞的多重基因转移, 赋予 T 细胞多功能表型, 50% 的 T 细胞能表达 3 个基因的开放阅读框, 而这仅需一次电穿孔操作。使用 PB 转座子系统也生产出 CD19 和 HER-2 特异性的 CAR-T 细胞应用于临床试验<sup>[28-29]</sup>, PB 与 SB 转座子哪个更有

优越性,尤其是在安全性方面,还需进一步观察。

SB 转座子介导的基因组整合是随机的, PB 偏好靠近转录起始位点整合,因此需要额外的策略来提高安全性:通过屏蔽转录调节元件可以阻止整合位点两侧基因的活化/断裂;通过修饰转座酶将整合位点特异地导向“安全港”;通过选择性地允许转基因瞬时表达可以降低“再跳跃”的风险<sup>[30]</sup>。SB 转座子的另一局限性是转座效率似乎与目的基因大小呈负相关,当目的基因超过 5 kb 时,转座效率会明显降低,而 PB 转座子的转座效率与承载目的基因大小无关。

#### 4 mRNA 电穿孔

mRNA 电穿孔技术被认为是目前最安全的基因转导 T 细胞方式。将编码目的基因的 mRNA 配上增加稳定性和长期表达的修饰物,通过电穿孔导入细胞质中, mRNA 不需要进入细胞核便能表达,发生插入突变的几率极低。mRNA 电穿孔技术能转导静止或增殖缓慢的 T 细胞;转导效率高,多在 90% 以上;设计相对容易,性价比高。mRNA 电穿孔技术已展现出诱人的应用前景<sup>[31]</sup>。

mRNA 电穿孔技术已经成功地应用于包括 T 细胞在内的多种人类细胞。June 团队<sup>[32]</sup>将编码间皮素特异性 CAR( SS1-4-1BB-CD3 $\zeta$  )的 mRNA 通过电穿孔导入活化、扩增的 T 细胞,电穿孔后 T 细胞的生存率为 91%, mRNA 转染率达 99.5%,成功地生产出临床级的间皮素特异性 CAR-T 细胞并进行了多次注射试验,在患者体内表现出良好的治疗效果。mRNA 电穿孔技术能大大缩短临床级抗原特异性 T 细胞的制备时间,具有重要的意义。Krug 等<sup>[33]</sup>进行的临床前试验,10 d 就生产出足够数量的 GMP 标准 CEA 特异性 CAR-T 细胞, mRNA 的转染率为 96%;经低温冷藏后, CAR 表达率仍高达 28.7%。利用 mRNA 电穿孔生产出的基因修饰 T 细胞在移植瘤模型中也表现出显著的抗肿瘤作用。HER2/neu CAR mRNA 电穿孔制备的 T 细胞在乳腺癌移植模型中表现出优于 HER2/neu 抗体的抗肿瘤效果<sup>[34]</sup>。在另一项研究中, CD19 CAR mRNA 电穿孔 T 细胞在小鼠白血病移植模型中也表现出了明显的抗肿瘤效应,不弱于慢病毒转导的 CAR 细胞毒性 T 淋巴细胞<sup>[35]</sup>。

受限于 mRNA 分子本身不稳定的特点, mRNA 电穿孔基因转导技术通常引起目的基因瞬时表达。然而,在基因/细胞治疗的背景下,这可能是有利的,因为目的基因的组成型表达和正常组织会产生交叉

反应<sup>[36]</sup>,引起严重的不良事件。因此,当机体和特定蛋白之间的交叉反应度未知时,目的基因的瞬时表达能够明显提高生物安全性。这一特性同样允许对患者进行反复的基因修饰 T 细胞注射,从而产生持久的抗肿瘤效应。

#### 5 展望

近年来,基因转导 T 细胞方法备受关注,人们期待高效安全的基因转导技术,但目前尚没有一个载体能满足大部分研究者的需求。随着基因转导 T 细胞应用的增多,为满足治疗需求,升级现有载体及开发新载体迫在眉睫。在载体研发的过程中,不但要重视转导效率和安全性,产品特性和成本收益同样重要。在可以预见的未来, T 细胞基因转导方法将会进入发展的快车道,用技术的进步引领研究者穿越肿瘤免疫治疗的“地雷阵”,让攻克肿瘤的梦想早日照进现实。

#### [参考文献]

- [1] MAUS M V, GRUPP S A, PORTER D L, et al. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies [J]. *Blood*, 2014, 123(17):2625-2635. DOI: 10.1182/blood-2013-11-492231.
- [2] BAUM C, SCHAMBACH A, BOHNE J, et al. Retrovirus vectors: toward the plentivirus [J]. *Mol Ther*, 2006, 13(6):1050-1063. DOI:10.1016/j.ymthe.2006.03.007.
- [3] DEICHMANN A, SCHMIDT M. Biosafety considerations using gamma-retroviral vectors in gene therapy [J]. *Curr Gene Ther*, 2013, 13:469-477. DOI:10.2174/15665232113136660004.
- [4] WANG X, OLSZEWSKA M, QU J, et al. Large-scale clinical-grade retroviral vector production in a fixed-bed bioreactor [J]. *J Immunother*, 2015, 38(3):127-135. DOI: 10.1097/CJI.000000000000072.
- [5] KOSTE L, BEISSERT T, HOFF H, et al. T-cell receptor transfer into human T cells with ecotropic retroviral vectors [J]. *Gene Ther*, 2014, 21(5):533-538. DOI: 10.1038/gt.2014.25.
- [6] DODO K, CHONO H, SAITO N, et al. An efficient large-scale retroviral transduction method involving preloading the vector into a retronectin coated bag with low-temperature shaking [J/OL]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1):e86275 [2015-09-30]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0086275>.
- [7] GUEST R D, KIRILLOVA N, MOWBRAY S, et al. Definition and application of good manufacturing process-compliant production of CEA-specific chimeric antigen receptor expressing T-cells for phase I/II clinical trial [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63(2):133-145. DOI: 10.1007/s00262-013-1492-9.
- [8] DAVILA M L, RIVIERE I, BRENTJENS R, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR-T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224):224ra25. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
- [9] HOWE S J, MANSOUR M R, SCHWARZWAELDER K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations

- causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients [ J ]. *J Clin Invest*, 2008, 118( 9 ): 3143-3150. DOI:10.1172/JCI35798.
- [ 10 ] LEWINSKI M K, BUSHMAN F D. Retroviral DNA integration-mechanism and consequences [ J ]. *Adv Genet*, 2005, 55: 147-181. DOI:10.1016/S0065-2660(05)55005-3.
- [ 11 ] NEWRZELA S, CORNILS K, LI Z, et al. Resistance of mature T cells to oncogene transformation [ J ]. *Blood*, 2008, 112( 6 ): 2278-2286. DOI: 10.1182/blood-2007-12-128751.
- [ 12 ] SCHOLLER J, BRADY T L, BINDER-SCHOLL G, et al. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells [ J ]. *Sci Transl Med*, 2012, 4( 132 ): 132ra53. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003761.
- [ 13 ] LOEW R, MEYER Y, KUEHLCKE K, et al. A new PG13-based packaging cell line for stable production of clinical-grade self-inactivating gammaretroviral vectors using targeted integration [ J ]. *Gene Ther*, 2010, 17( 2 ): 272-280. DOI:10.1038/gt.2009.134.
- [ 14 ] ELLIS J. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16( 11 ): 1241-1246. DOI:10.1089/hum.2005.16.1241.
- [ 15 ] CRIBBS A P, KENNEDY A, GREGORY B, et al. Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells [ J/OL ]. *BMC Biotechnol*, 2013, 13: 98 [ 2015-09-30 ]. <http://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-13-98>.
- [ 16 ] MARINO M P, PANIGAJ M, OU W, et al. A scalable method to concentrate lentiviral vectors pseudotyped with measles virus glycoproteins [ J ]. *Gene Ther*, 2015, 22( 3 ): 64-69. DOI:10.1038/gt.2014.125.
- [ 17 ] MAUDE S L, FREY N, SHAW P A, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia [ J ]. *N Engl J Med*, 2014, 371( 16 ): 1507-1517. DOI: 10.1056/NEJMoa1407222.
- [ 18 ] CIUFFI A. Mechanisms governing lentivirus integration site selection [ J ]. *Curr Gene Ther*, 2008, 8( 6 ): 419-429. DOI:10.2174/156652308786848021.
- [ 19 ] SAUKKONEN K, HEMMINKI A. Tissue-specific promoters for cancer gene therapy [ J ]. *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 4( 5 ): 683-696. DOI:10.1517/14712598.4.5.683.
- [ 20 ] ZIEGLER L, YANG L, JOO K, et al. Targeting lentiviral vectors to antigen specific immunoglobulins [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2008, 19( 9 ): 861-872. DOI:10.1089/hgt.2007.149.
- [ 21 ] PISTELLO M, VANNUCCI L, RAVANI A, et al. Streamlined design of a self-inactivating feline immunodeficiency virus vector for transducing ex vivo dendritic cells and T lymphocytes [ J/OL ]. *Genet Vaccines Ther*, 2007, 5: 8 [ 2015-09-30 ]. <http://gvt-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-0556-5-8>.
- [ 22 ] 胡春晓, 冯鹏飞, 韩双印, 等. 肿瘤过继免疫治疗临床级抗原特异性 T 细胞的研究进展 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21( 1 ): 104-108. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2014.01.018.
- [ 23 ] HOU X, DU Y, DENG Y, et al. Sleeping Beauty transposon system for genetic etiological research and gene therapy of cancers [ J ]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16( 1 ): 8-16. DOI:10.4161/15384047.2014.98.6944.
- [ 24 ] JIN Z, HULS H, COOPER L J, et al. The hyperactive Sleeping Beauty transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor [ J ]. *Gene Ther*, 2011, 18( 9 ): 849-856. DOI:10.1038/gt.2011.40.
- [ 25 ] NAKAZAWA Y, SAHA S, GALVAN D L, et al. Evaluation of long-term transgene expression in piggyBac modified human T lymphocytes [ J ]. *J Immunother*, 2013, 36( 1 ): 3-10. DOI:10.1097/CJI.0b013e3182791234.
- [ 26 ] SINGH H, HULS H, COOPER L J, et al. A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify clinical-grade T cells to target CD19 [ J ]. *Immunol Rev*, 2014, 257( 1 ): 181-190. DOI: 10.1111/imr.12137.
- [ 27 ] KACHEROVSKY N, LIU G W, JENSEN M C, et al. Multiplexed gene transfer to a human T-cell line by combining Sleeping Beauty transposon system with methotrexate selection [ J ]. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112( 7 ): 1429-1436. DOI:10.1002/bit.25538.
- [ 28 ] MANURI P V, WILSON M H, MAITI S N, et al. PiggyBac transposon/transposase system to generate CD19-specific T cells for the treatment of B-lineage malignancies [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21( 4 ): 427-437. DOI:10.1089/hum.2009.114.
- [ 29 ] NAKAZAWA Y, HUYE L E, SALSMAN V S, et al. PiggyBac-mediated cancer immunotherapy using EBV-specific cytotoxic T-cells expressing HER2-specific chimeric antigen receptor [ J ]. *Mol Ther*, 2011, 19( 12 ): 2133-2143. DOI:10.1038/mt.2011.131.
- [ 30 ] IVICS Z, IZSVAK Z. Nonviral gene delivery with the sleeping beauty transposon system [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22( 9 ): 1043-1051. DOI:10.1089/hum.2011.143.
- [ 31 ] TAVERNIER G, ANDRIES O, DEMEESTER J, et al. mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression [ J ]. *J Control Release*, 2011, 150( 3 ): 238-247. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.10.020.
- [ 32 ] BEATTY G L, HAAS A R, MAUS M V, et al. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce antitumor activity in solid malignancies [ J ]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2( 2 ): 112-120. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-13-0170.
- [ 33 ] KRUG C, WIESINGER M, ABKEN H, et al. A GMP-compliant protocol to expand and transfect cancer patient T cells with mRNA encoding a tumor-specific chimeric antigen receptor [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63( 10 ): 999-1008. DOI:10.1007/s00262-014-1572-5.
- [ 34 ] YOON S H, LEE J M, CHO H I, et al. Adoptive immunotherapy using human peripheral blood lymphocytes transferred with RNA encoding Her-2/neu-specific chimeric immune receptor in ovarian cancer xenograft model [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16( 6 ): 489-497. DOI:10.1038/cgt.2008.98.
- [ 35 ] BARRETT D M, ZHAO Y, LIU X, et al. Treatment of advanced leukemia in mice with mRNA engineered T cells [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22( 12 ): 1575-1586. DOI: 10.1089/hum.2011.070.
- [ 36 ] MORGAN R A, YANG J C, KITANO M, et al. 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( 4 ): 843-851. DOI:10.1038/mt.2010.24.

[ 收稿日期 ] 2015 - 09 - 02

[ 修回日期 ] 2016 - 03 - 16

[ 本文编辑 ] 黄静怡