

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.004

CD19-CAR-T 细胞治疗难治复发急性淋巴细胞白血病的研究进展

丁利娟, 黄河(浙江大学医学院附属第一医院 骨髓移植中心, 浙江 杭州 321000)

[摘要] 难治复发急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia, ALL)预后差,生存期短,其治疗已成为国际难题。嵌合抗原受体基因修饰 T(chimeric antigen receptor gene-modified T, CAR-T)细胞是目前最具应用前景的靶向免疫治疗,靶向 CD19 的 CAR-T 细胞(CD19-CAR-T)治疗儿童及成人难治复发性 ALL 的完全缓解率(complete remission, CR)可达 90% 以上,疗效远高于化疗。然而,细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)、严重神经毒性(serious neurotoxicity, SNT)、脱靶效应以及疾病复发等严重限制了 CAR-T 细胞的进一步临床应用。本文主要阐述 CAR-T 细胞的制备技术、预处理方案、细胞输注剂量及各种并发症防治策略等最新研究进展。

[关键词] 急性淋巴细胞白血病;CD19;嵌合抗原受体基因修饰 T 细胞;预处理方案;细胞因子释放综合征

[中图分类号] R730.51; R733.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)01-0012-06

Progresses of research on CD19-CAR-T cell therapy for refractory/relapsed acute lymphocytic leukemia

DING Lijuan, HUANG He (Bone Marrow Transplantation Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 321000, Zhejiang, China)

[Abstract] Patients with refractory/relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL) have poor prognosis and short survival time, which has become an international conundrum. Chimeric antigen receptor gene-modified T cell (CAR-T) therapy has been the most promising application targeted immunotherapy so far. CD19-targeted CAR-T (CD19-CAR-T) therapy could reach more than 90% of complete remission rate (CR) for the children and adults with refractory/relapsed ALL, of which efficacy was much higher than that of chemotherapy. However, complications, such as cytokine release syndrome (CRS), serious neurotoxicity (SNT), off-target effect and relapse, seriously impeded its further clinical application. This article mainly reviewed the latest progresses of researches on the manufacture technologies, the conditioning regimens, the cell infusion doses and the prevention and treatment strategies of complications for the CAR-T therapy.

[Key words] acute lymphoblastic leukemia(ALL); CD19; chimeric antigen receptor gene-modified T(CAR-T)cell; conditioning regimen; cytokine release syndrome(CRS)

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(1): 12-17. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.004]



黄河 博士,主任医师,博士生导师,浙江大学求是特聘教授,973 首席科学家。现任浙江大学医学院附属第一医院骨髓移植中心主任、血液病研究所所长,中华医学会血液学分会造血干细胞应用学组副组长,中华骨髓库专家委员会副主任委员,亚太国际骨髓移植组织国际学术委员会常务委员(中国唯一),浙江省医学会血液专业委员会主任委员,浙江省抗癌协会血液淋巴瘤专业委员会主任委员等学术职务,任国际造血干细胞移植领域权威杂志 *Bone Marrow Transpl* 和 *Biol Blood Marrow Transplant* 编委。作为负责人承担 973、863、国家自然科学基金重点项目及国家自然科学基金国际合作与交流项目等 25 项。近 10 年在国内外学术期刊发表

论文 200 余篇,其中在 *Blood*、*Leukemia* 等 SCI 杂志发表论文 107 篇(其中通信作者论文 77 篇)。先后于 2003 年及 2015 年 2 次荣获国家科技进步奖二等奖,获省部级以上奖项 14 项,发明专利 16 项。近 5 年在国际大型会议担任主席、特邀报告和口头报告 51 次。

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)基金项目(No. 2015CB964900)。Project supported by the National Key Basic Research Development Program (973 Program) (No. 2015CB964900)

[作者简介] 丁利娟(1992-),女,博士,主要从事恶性血液病细胞免疫相关研究, E-mail: dinglij. zju@163. com

[通信作者] 黄河(HUANG He, corresponding author), E-mail: huanghe@zju. edu. cn

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170110.1527.018.html>

难治复发急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia, ALL)预后差,生存期短。儿童难治复发 ALL 的 5 年生存率为 $(21.0 \pm 1.8)\%$ ^[1],而成人难治复发 ALL 的 5 年生存率低于 7% ^[2]。虽然近年来新型化疗药物、靶向药物及造血干细胞移植技术取得了很大的进展,但并未从根本上改善难治复发 ALL 的预后,其治疗仍然是国际难题。嵌合抗原受体基因修饰 T(chimeric antigen receptor gene-modified T, CAR-T)细胞疗法是目前最具应用前景的过继免疫治疗,它通过整合 CAR-T 细胞特异性识别并结合肿瘤相关抗原靶点,将信号传递至细胞内,引起 T 细胞增殖活化,从而靶向杀伤肿瘤细胞。目前以靶向 CD19 的 CAR-T 细胞(CD19-CAR-T)治疗 ALL 疗效最为显著,但同时也发现存在细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)、严重神经毒性(serious neurotoxicity, SNT)、脱靶效应及复发等多种问题。本文主要阐述 CD19-CAR-T 细胞治疗难治复发 ALL 的最新研究进展。

1 CD19-CAR-T 细胞的设计和制备

CAR 分子的主要结构区包括胞外抗原结合区、穿膜区和胞内信号区。其中胞外抗原结合区为鼠源或人源化结合 CD19 特异性抗原的单链可变区(single chain fragment variable, scFv),穿膜区由 CD3、CD4、CD8 或 CD28 等分子构成。胞内信号区以 T 细胞受体(TCR)的 CD3 ζ 链或 Fc ϵ R1 γ 链等共刺激分子^[3]为主。目前,对 CAR 的改造主要集中在共刺激信号分子上。

1.1 共刺激分子

第 1 代 CAR 由 scFv、穿膜区、CD3 ζ 链或 Fc ϵ R1 γ 链组成,但存在增殖能力弱、抗肿瘤效应不强、体内存活时间短等缺陷^[4]。第 2、3 代 CAR 则在第 1 代的基础上分别引入 1 或 2 个共刺激信号域,从而显著提高了 CAR-T 细胞的增殖能力和抗肿瘤作用,延长了体内 CAR-T 细胞的持续存在时间。共刺激信号分子包括 CD28、4-1BB、CD22、CD27、OX40 及 ICOS 等,目前以 CD28 和 4-1BB 应用最为广泛。研究者们比较了 CD28 和 4-1BB 作为共刺激分子的功能差异,发现 CD28 赋予 CART 细胞更强的杀伤能力,而 4-1BB 使 CAR-T 细胞在体内的持续时间更长。Wang 等^[5]尝试将 CD28 和 4-1BB 整合在同一个 CAR 分子上,发现该类第 3 代 CAR-T 细胞表现出更强的增殖活性和促细胞因子释放的能力。Till 等^[6]将这种 CD28-4-1BB-CART 细胞用于 3 例复发的惰性 B 细胞淋巴瘤患者,2 例获得完全缓解(CR),并

维持 12、24 个月的无进展生存期(PFS),1 例获得部分缓解(PR);1 年后这些患者外周血中仍能检测到 CD28-4-1BB-CART 细胞,说明该种 CAR-T 细胞可在体内持续发挥作用。不同共刺激分子之间的功能互补可赋予 CAR-T 细胞更强的杀伤作用,提示第 3 代 CAR-T 具有临床开发和应用的潜在价值。Hombach 等^[7]在 CAR-CIK 细胞的研究中发现,嵌合 CD28 和 OX40 两种共刺激分子的第 3 代 CAR-T 细胞更容易产生激活诱导性细胞凋亡,降低效应细胞的存活时间和杀瘤效果。第 3 代 CAR-CIK 细胞的有效性和安全性有待于进一步验证。目前应用编码 CAR 和/或 CAR 反应性启动子载体构建的第 4 代 CAR-T 细胞是在 CAR 编码生成的细胞因子作用下产生活化信号,从而增强抗肿瘤作用^[8]。随着 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术的快速发展,CAR-T 细胞制备技术正在日益完善。

1.2 转染方案

病毒为最常见的转染方式,包括 γ 逆转录病毒和慢病毒^[9]。 γ 逆转录病毒的生产工艺简单、转染效率较高^[10],但只能转染分裂期细胞,并且曾有插入性突变的个案报道^[11]。而来源于人类免疫缺陷病毒-1 的慢病毒载体可以转染非分裂期细胞,并且容纳目的基因片段大、免疫反应小^[12],因此目前 CAR-T 细胞的转染以慢病毒为主。也有电转染的报道^[13],但在达到足够 CAR 表达水平的前提下耗时过长(数周甚至数月),因此临床应用大大受限。Ivics 等^[14]利用生物信息学方法重建了“睡美人”转座子系统,这是第一个人工合成的 DNA 转座子,在脊椎动物中活性比其他转座子高,可随机插入基因组中,使目标基因长期稳定地表达^[15]。Huang 等^[16]首次报道了应用“睡美人”转座子技术制备的 CD19-CAR-T 细胞,并证实对 CD19⁺ 的白血病和淋巴瘤细胞具有特异性杀伤能力。

1.3 筛选效应细胞

CAR 技术的理想效应细胞一般需具备以下特点:(1)在体内或体外可以实现扩增而满足过继回输的要求;(2)具备足够强度的肿瘤杀伤能力;(3)能够到达肿瘤局部;(4)没有或者具有易控的毒副作用^[17]。T 淋巴细胞作为细胞免疫的主体,满足了上述特点。目前大多数用于 CAR 技术的效应细胞均为 T 细胞^[18]。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并被激活,不受主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制,可以避免因肿瘤细胞 MHC 下调或缺失导致的免疫逃逸。Turtle 等^[19]发现,应用

中心记忆 T 细胞或初始 T 细胞制备的 CAR-T 细胞比效应记忆细胞来源者具有更强的肿瘤杀伤能力。因此制备不同 T 淋巴细胞亚群来源的 CAR-T 细胞将是今后研究的热点。

2 CD19-CAR-T 细胞的临床应用

CD19-CAR-T 细胞的临床报道^[20]最早来自于 MSKCC 的 I 期临床试验,接着相继在 NCI 和 UPenn 开展^[21-22]。三大中心报道了难治复发 ALL 的 CR 分别为 88%、67% 和 90%,其他中心也取得了类似结果,疗效明显优于化疗。但目前全球还未形成统一的临床应用方案,各中心的预处理方案和 CAR-T 细胞输注剂量均存在差异,并发症发生情况也不一致。

2.1 预处理方案

目前全球各治疗中心预处理方案尚无统一标准,包括不预处理、单用环磷酰胺、联用氟达拉滨和环磷酰胺(FC 方案)等^[23],且氟达拉滨和环磷酰胺的剂量和使用天数均不一致。由于病例数有限,通过现有的数据分析并不能确定何种方案为最佳预处理方案,但相关研究表明预处理能显著提高疗效。Zhang 等^[24]的 Meta 分析发现,CD19-CAR-T 细胞输注前经过预处理的患者 6 个月 PFS 为 94.6%,而未行预处理的患者仅为 54.5%。Turtle 等^[19]使用 FC 方案明显提高了 CAR-T 细胞在体内的持续时间和患者的无病生存期(DFS)。总之,CD19-CAR-T 输注前预处理方案可减轻肿瘤负荷,减少 CRS 等并发症,同时可使 CAR-T 细胞充分植入和扩增,从而增强 CAR-T 细胞的疗效和持续作用时间,为此,制定合适的预处理方案有助于提高 CAR-T 细胞治疗的安全性和有效性。

2.2 CD19-CAR-T 细胞输注剂量

Zhao 等^[25]在 NALM6 细胞株构建的白血病小鼠模型中发现,输注少于 4×10^5 个含 CD28 共刺激分子的 CD19-CAR-T 细胞不能使小鼠获得 CR,提示 CAR-T 细胞输注数量过低可能达不到肿瘤杀伤效果。Zhang 等^[24]Meta 分析发现 CD19-CAR-T 细胞输注剂量在 1×10^8 数量级以上患者 6 个月 PFS 为 94.4%,显著高于细胞输注剂量低于该数量级的患者。而 Turtle 等^[26]临床研究中设置了 $2 \times 10^5/\text{kg}$ 、 $2 \times 10^6/\text{kg}$ 和 $2 \times 10^7/\text{kg}$ 三种剂量,其中输注剂量为 $2 \times 10^7/\text{kg}$ 的 1 例 ALL 患者死于严重的 CRS 并发症,而其他剂量组的患者均发生可逆的 CRS 和 SNT。Morgan 等^[27]也报道了 1 例死亡病例,患者在输注 1×10^{10} 个 CAR-T 细胞后数分钟内即发生严重的 CRS,提示 CAR-T 细胞输注剂量过大与重度 CRS

的发生相关。另有研究^[28]发现,体内 CAR-T 细胞含量和肿瘤负荷大小均是 CRS 发生的重要危险因素。如何综合利用体外 CAR-T 细胞增殖能力、杀伤功能等制定最优化和个体化的 CD19-CAR-T 细胞输注剂量值得深入研究。

2.3 CD19-CAR-T 细胞治疗相关并发症

CD19-CAR-T 细胞治疗的常见反应包括寒战、发热、低血压、白细胞减少等,可通过相应的对症支持治疗缓解。但临床上更为严重的并发症包括 CRS、SNT、脱靶效应,以及复发等是阻碍其临床广泛应用的主要原因。

2.3.1 CRS Chatenoud 等^[29]在器官移植后患者中应用抗 CD3 单克隆抗体诱发 CRS,是生物制品引起 CRS 的首次报道。CRS 在临床上并不罕见,严重的感染、嗜血细胞综合征、移植物抗宿主病等均可出现 CRS^[30-32],又称为细胞因子风暴(cytokine storm)。CAR-T 细胞输入体内后,单链可变区的特异性抗体识别并结合肿瘤抗原,激活 T 细胞,导致大量炎症因子的释放,同时招募和激活机体内其他的炎症细胞^[33]。发生 CRS 时上调的细胞因子主要有 IFN- γ 、IL-6、IL-10、TNF- α 、IL-2 等^[34]。大量细胞因子的释放可引发全身炎症反应,导致脏器和血管内皮损伤,出现心衰、肺水肿、呼吸窘迫、微血管渗漏等严重并发症。

CD19-CAR-T 细胞治疗后 CRS 症状和严重程度差异性很大,高热往往是特征性的表现,但要注意与感染鉴别。Lee 等^[22]在 CD19-CAR-T 细胞临床治疗的研究中,CRS 的发生率为 76.2%,其中 1~4 级 CRS 各占 38.1%、9.5%、14.3%、14.3%,5 级 CRS(即死亡病例)未见报道。Lee 等^[28]根据临床经验提出了 CRS 分级系统和相应级别的治疗方案,认为 3~4 级 CRS 是使用糖皮质激素和/或 tocilizumab(抗 IL-6 单克隆抗体)的指征。已有研究^[35]表明,用糖皮质激素或 tocilizumab 对 3~4 级 CRS 显示出良好的疗效。但是糖皮质激素在严重的 CRS 中疗效有限,可抑制 CAR-T 细胞增殖和功能,与 CAR-T 治疗后的早期复发有关^[36]。

为早期预测及更精确地诊断 CRS,Teachey 等^[34]开展了寻找新型 CRS 诊断标志物的研究,发现 IFN- γ 、IL-6、IL-8、sIL-2R α 、sgp130、sIL-6R、MCP1、MIP1- α 、MIP1- β 和 GM-CSF 等细胞因子可作为严重 CRS 的预测标志物,IFN- γ 和 sgp130 的升高与 4~5 级 CRS 的发生具有明显的相关性,其他细胞因子如 CRP 和铁蛋白的预测作用需要进一步验证。目前该方面的研究并不多见,尤其是感染与 CRS 相鉴别

的指标。寻找敏感性强和特异性高的新型 CRS 诊断标志物可进一步减少 CRS 的发生,降低 CRS 相关病死率。

2.3.2 SNT SNT 可表现为头痛、呕吐、视力改变、震颤、失语、嗜睡、偏瘫、癫痫和肌阵挛等中枢和周围神经系统症状。Lee 等^[22]在 CD19-CAR-T 细胞临床研究中 SNT 的发生率为 28.6%。CRS 经常和 SNT 伴随发生,CRS 改善后 SNT 随之好转。目前观点认为,CRS 释放的细胞因子是引起神经毒性的主要原因,但尚无客观依据证实。本课题组^[37]首次报道了 1 例中枢性 CRS,发现患者血浆中 IFN- γ 、IL-6 和 IL-10 达到 2 级 CRS 水平,而脑脊液的 INF- γ 、IL-6 水平是血浆中的数十倍,同时脑脊液中 CD19-CAR-T 细胞的 DNA 拷贝数明显高于外周血,提示 CAR-T 细胞可从外周血迁移至中枢神经系统并被活化而释放一系列细胞因子;经降颅压和糖皮质激素治疗,该患者中枢 CRS 和原发病均获得了 CR。因 tocilizumab 分子量较大,不易透过血脑屏障,对于伴有中枢神经系统症状的 CRS 通常不推荐使用。SNT 通常呈自限性,轻度的 SNT 只需支持治疗,症状严重时可使用小剂量糖皮质激素。

2.3.3 脱靶效应 脱靶效应指 CAR-T 细胞在体内对肿瘤以外的正常组织发动免疫攻击,主要与正常细胞同时表达靶抗原有关。CD19 是 B 细胞系特异性抗原,在 B 系肿瘤细胞和正常 B 淋巴细胞表面均有表达,因此 B 细胞缺乏是 CD19-CAR-T 细胞治疗的并发症之一。在 Porter 等^[38]的试验中,所有患者都发生了 B 细胞缺乏,部分患者可持续 4 年之久。由于 B 细胞的主要功能是产生免疫球蛋白,B 细胞缺乏时可用人丙种球蛋白替代治疗。为降低脱靶效应的风险,必须选择合适的肿瘤特异性抗原,也可考虑剂量递增、引入自杀基因、多抗原嵌合受体等方法。

2.3.4 原有疾病复发 来自全球不同的临床试验均表明,CD19-CAR-T 细胞可使 ALL 患者获得很好的 CR,但复发仍然是 CD19-CAR-T 细胞治疗后面临的一大难题。临床上最常见的是 CD19 阴性复发,Ruella 等^[39]报道 ALL 成人的复发率为 30% 左右,而 Sotillo 等^[40]报道儿童 ALL 的复发率为 10% ~ 20%。目前认为 CD19 抗原表达缺失的主要机制包括:(1)CD19 基因突变或缺失致合成障碍;(2)参与 CD19 合成的相关转录因子缺陷;(3)白血病细胞发生类型的转变,如从淋系转为髓系;(4)治疗之前存在不同水平的 CD19 阴性白血病克隆,在 CD19-CAR-T 细胞治疗中因不表达 CD19 抗原而逃避杀伤

作用。Grupp 等^[21]报告了 6 例 CD19 阳性 ALL 复发的患者,发现复发之前外周血中均检测不到 CAR-T 细胞,从而推测早期复发与 CAR-T 细胞持续时间短有关。另外由微环境或其他原因致体内 CAR-T 细胞功能异常也是 CD19 阳性复发的机制之一。

研究者们正尝试着各种方案用于 CD19-CAR-T 细胞治疗 ALL 后复发的防治,包括 CAR-T 细胞治疗后桥接异基因造血干细胞移植,CD22 和 CD19 的双抗原嵌合 CAR-T 细胞减少 CD19 阴性复发,CAR-T 细胞二次回输等,但上述方案的疗效均有待于进一步验证。

3 展望

经过二十多年的发展,CAR-T 细胞的设计已经越来越完善,治疗疾病谱越来越广。针对单个靶标治疗 ALL 复发或无效问题,一些中心开发出双靶点或多靶点的 CAR-T 细胞,临床前试验显示出更强的抗肿瘤效应。CD123 可能是难治复发 ALL 的又一重要靶标,在临床前试验中对 CD19 阴性 ALL 小鼠显示出强大的抗肿瘤作用^[40],联合 CD19-CAR-T 细胞及 CD123-CAR-T 细胞治疗 ALL 可能会有更好的效果。“自杀基因”为不良反应的控制带来了福音,在不良反应发生时可被激活并诱导 CAR-T 细胞凋亡,从而自动终止治疗。在目前研究中,诱导细胞凋亡最快仅 1 h 的自杀基因是 *iCasp9* 基因^[41],或可用于控制 CRS。此外,全球多个中心正尝试开发新型的 CAR-T 细胞,包括通用型 CAR-T(正常第三方细胞来源的 T 细胞)和造血干细胞来源的 CAR-T 细胞等。de Oliveira 等^[42]已证实造血干细胞基因修饰成 CAR-T 细胞的可行性,这种 CAR-T 细胞持续存在于体内并可分化成多系列靶标特异性的免疫细胞,从而有效减少 ALL 复发。

CAR-T 细胞还可联合万珂、来那度胺、靶向药物、免疫检查点抗体和细胞因子等其他治疗。免疫检查点抗体在 CAR-T 治疗中的应用已有令人振奋的成果,CTLA-4、PD-1 和 PD-L1 的抗体已被 FDA 获准用于临床治疗。也有研究发现来那度胺在 CD19-CAR-T 细胞和 CD20-CAR-T 细胞治疗 B-NHL 过程中有协同抗肿瘤作用^[43]。

通过优化 CAR-T 细胞的设计和培育条件、建立合理的预处理和细胞输注临床方案、制定各种并发症的诊断及防治策略以及与其他治疗方案联合应用等有望进一步提高 CD19-CAR-T 细胞治疗的安全性和有效性,为难治复发 ALL 治疗提供新方案。

[参 考 文 献]

- [1] NGUYEN K, DEVIDAS M, CHENG S C, et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study[J]. *Leukemia*, 2008, 22(12): 2142-2150. DOI: 10.1038/leu.2008.251.
- [2] DINNERS S, LEE D, LIEDTKE M. Current therapy and novel agents for relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 2013, 55(8): 1715-1724. DOI: 10.3109/10428194.2013.856428.
- [3] DAVILA M L, SADELAIN M. Biology and clinical application of CAR T cells for B cell malignancies[J]. *Int J Hematol*, 2016, 104(1):6-17. DOI: 10.1007/s12185-016-2039-6.
- [4] CARPENITO C, MILONE M C, HASSAN R, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(9): 3360-3365. DOI: 10.1073/pnas.0813101106.
- [5] WANG J, JENSEN M, LIN Y, et al. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains[J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(8): 712-725. DOI: 10.1089/hum.2007.028.
- [6] BRIAN G, TIL L, MICHAEL C, 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. DOI: 10.1182/blood-2011-10-387969.
- [7] HOMBACH A A, RAPPL G, ABKEN H. Arming cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors: CD28 outperforms combined CD28-OX40 "super-stimulation"[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(12): 2268-2277. DOI: 10.1038/mt.2013.192.
- [8] PEGRAM H J, LEE J C, HAYMAN E G, 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.
- [9] WANG X, RIVIÈRE I. Manufacture of tumor- and virus-specific T lymphocytes for adoptive cell therapies[J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22(2): 85-94. DOI: 10.1038/cgt.2014.81.
- [10] 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.0000000000000072.
- [11] JIN C, FOTAKI G, RAMACHANDRAN M, et al. Safe engineering of CAR-T cells for adoptive cell therapy of cancer using long-term episomal gene transfer[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(7): 702-711. DOI: 10.15252/emmm.201505869.
- [12] NALDINI L, BLÖMER U, GALLAY P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector[J]. *Science*, 1996, 272(5259): 263-267.
- [13] JENSEN M C, POPPLEWELL L, COOPER L J, 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.
- [14] IVICS Z, HACKETT P B, PLASTERK R H, et al. Molecular reconstruction of sleeping beauty, a *Te1*-like transposon from fish, and its transposition in human cells[J]. *Cell*, 1997, 91(4): 501-510.
- [15] NARAYANAVARI S A, CHILKUNDA S S, IVICS Z, et al. Sleeping beauty transposition: from biology to applications[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2016, 27(4): 1-27. DOI: 10.1080/10409238.2016.1237935.
- [16] HUANG X, GUO H, KANG J, et al. Sleeping beauty transposon-mediated engineering of human primary T cells for therapy of CD19⁺ lymphoid malignancies [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(3): 580-589. DOI: 10.1038/sj.mt.6300404.
- [17] 殷书磊, 于益芝, 曹雪涛. CAR-NK 抗肿瘤研究的现状与发展趋势[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(1): 1-10. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.001.
- [18] JUNE C H, BLAZAR B R, RILEY J L. Engineering lymphocyte subsets: tools, trials and tribulations [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(10): 704-716. DOI: 10.1038/nri2635.
- [19] TURTLE C J, HANAFI L A, BERGER C, et al. CD19- CAR-T cells of defined CD4⁺: CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(6): 2123-2138. DOI: 10.1172/JCI85309.
- [20] BRENTJENS R J, DAVILA M L, 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): 638-643. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005930.
- [21] GRUPP S A, 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. DOI: 10.1056/NEJMoa1215134.
- [22] LEE L, DANIEL W, KOCHENDERFER R, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial [J]. *Lancet*, 2015, 385(9967): 517-528. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
- [23] KENDERIAN S S, PORTER D L, GILL S. Chimeric antigen receptor T cells and hematopoietic cell transplantation: how not to put the CAR-T before the horse [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2016, 13(9): 328-337. DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.09.002.
- [24] ZHANG T, CAO L, XIE J, et al. Efficiency of CD19 chimeric antigen receptor-modified T cells for treatment of B cell malignancies in phase I clinical trials: a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32): 33961-33971. DOI: 10.18632/oncotarget.5582.
- [25] ZHAO Z, CONDOMINES M, van der STEGEN S J, et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells [J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(4): 415-428. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.09.004.
- [26] TURTLE C J, SOMMERMEYER D, BERGER C, et al. Therapy of

- B cell malignancies with CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells of defined subset composition[J]. *Cancer J*, 2014, 20(2):141-154. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000036.
- [27] 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.
- [28] LEE D W, GARDNER R, PORTER D L, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome[J]. *Blood*, 2014, 124(2):188-195. DOI: 10.1182/blood-2014-05-552729.
- [29] CHATENOUD L, FERRAN C, LEGENDRE C, et al. In vivo cell activation following OKT3 administration. systemic cytokine release and modulation by corticosteroids[J]. *Transplantation*, 1990, 49(4):697-702.
- [30] XU X J, TANG Y M, LIAO C, et al. Inflammatory cytokine measurement quickly discriminates gram-negative from gram-positive bacteremia in pediatric hematology/oncology patients with septic shock[J]. *Intensive Care Med*, 2013, 39(2):319-326. DOI: 10.1007/s00134-012-2752-4.
- [31] BRISSE E, WOUTERS C H, MATTHYS P. Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): a heterogeneous spectrum of cytokine-driven immune disorders[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015, 26(3):263-280. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2014.10.001.
- [32] FERRARA J L, ABHYANKAR S, GILLILAND D G. Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1[J]. *Transplant Proc*, 1993, 25(1 Pt 2):1216-1217.
- [33] KOCHENDERFER J N, DUDLEY M E, FELDMAN S A, 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.
- [34] TEACHEY D T, LACEY S F, SHAW P A, et al. Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T cell therapy for acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(6):664-679. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0040.
- [35] 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.
- [36] DAVILA M L, RIVIERE I, WANG X, 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):268-276. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
- [37] HU Y, JIE S, ZHAO W, et al. Predominant cerebral cytokine release syndrome in CD19-directed chimeric antigen receptor-modified T cell therapy[J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1):70-75. DOI: 10.1186/s13045-016-0299-5.
- [38] PORTER D L, HWANG W T, FREY N V, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(303):303ra139. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac5415.
- [39] RUELLA M, BARRETT D M, KENDERIAN S S, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(10):3814-3826. DOI: 10.1172/JCI87366.
- [40] SOTILLO E, BARRETT D M, Black K L, et al. Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CAR-T-19 immunotherapy[J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(12):1282-1295. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1020.
- [41] DI S A, TEY S K, DOTTE G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(18):1673-1683. DOI: 10.1056/NEJMoa1106152.
- [42] de OLIVEIRA S N, RYAN C, GIANNONI F, et al. Modification of hematopoietic stem/progenitor cells with CD19-specific chimeric antigen receptors as a novel approach for cancer immunotherapy[J]. *Hum Gene Ther*, 2014, 25(20):2243-2253. DOI: 10.1089/hum.2012.202.
- [43] OTÁHAL P, PRŮKOVÁ D, KRÁL V, et al. Lenalidomide enhances antitumor functions of chimeric antigen receptor modified T cells[J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(4):e1115940. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4839314>. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1115940.
- [收稿日期] 2016-11-28 [修回日期] 2016-12-13
[本文编辑] 王映红

本期广告目录

沈阳三生制药有限责任公司	封二
上海厦泰生物科技有限公司	封三
索尼(中国)有限公司生命科学业务部	封四
上海细胞治疗工程技术研究中心集团	后插页