



嵌合抗原受体修饰的T细胞治疗急性白血病的 研究进展

徐颖茜, 王敏, 王建祥*

中国医学科学院&北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020

* 联系人, E-mail: wangjx@ihcams.ac.cn

收稿日期: 2017-10-05; 接受日期: 2017-11-05; 网络版发表日期: 2017-12-14

国家重点研发计划(批准号: 2017YFC0909800)、国家自然科学基金(批准号: 81700163)、中国医学科学院医学与健康科技创新工程(批准号: 2016-12M-1-007)、协和青年科研基金和中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 2017310024)资助

摘要 嵌合抗原受体修饰的T细胞(CAR-T)治疗是过继免疫治疗的一种, 通常CAR-T细胞是由患者或供者的T细胞经CAR基因转化并扩增而来, 最后再回输到患者体内. CAR-T在治疗B细胞恶性肿瘤中展现出了振奋人心的效果, 目前也被用于治疗其他血液肿瘤的研究中. 本文就CAR的基本结构、CAR结构的演变、在急性白血病治疗中的进展以及目前CAR-T设计新方案4个方面进行叙述.

关键词 急性白血病, 嵌合抗原受体修饰的T细胞, 免疫治疗

急性白血病(acute leukemia, AL)主要分为急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)和急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML). ALL可分为B细胞ALL (B-ALL)和T细胞ALL (T-ALL)以及混合系急性白血病. 其中, 儿童B-ALL的5年存活率超过80%, 而AL的平均5年存活率仅为25%~50%, 很多高危患者缺乏有效的治疗方法^[1]. 自2012年靶向CD19的CAR-T成功将患者Emily Whitehead体内白血病细胞完全清除以来, 引发了CAR-T细胞治疗的突破性进展.

CAR-T细胞治疗是将CAR表达于患者或供者T细胞, 使其特异靶向并消灭肿瘤细胞的过继免疫疗法. 目前常用的方法是从患者或供者外周血中分离出单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMCs)或CD3⁺ T细胞, 使用包被抗CD3/CD28的磁珠或抗CD3抗

体或滋养细胞以及细胞因子IL2, 诱导T细胞快速增殖; 再使用慢病毒或睡美人转座子系统(sleeping beauty transposon system)^[2]把CAR转入细胞中稳定表达, 待CAR-T细胞扩增至足量后回输到患者体内.

1 CAR的基本结构

CAR是人工合成的受体, 包括3个结构域: 胞外区、跨膜结构域及胞内信号转导结构域^[3].

1.1 胞外区

CAR的胞外区包括信号肽、抗原识别区以及铰链区^[4].

信号肽使mRNA一边翻译一边进入内质网, 进入

引用格式: 徐颖茜, 王敏, 王建祥. 嵌合抗原受体修饰的T细胞治疗急性白血病的进展. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1336-1352
Xu Y X, Wang M, Wang J X. Recent advances in immunotherapy of acute leukemia via chimeric antigen receptor-engineered T cells (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2017, 47: 1336-1352, doi: 10.1360/N052017-00266

内质网后信号肽被水解,成熟蛋白再进一步被分泌到胞外。因此,CAR结构的信号肽可引导抗原识别区及铰链区转移到胞外,从而识别靶细胞表面抗原。常用于CAR结构的信号肽有CD8a^[5]和GM-CSF^[6]信号肽。

抗原识别区通常由抗体的轻链和重链通过柔性连接肽(flexible linker)连接而成的单链抗体(single chain variable fragment, scFv)构成,也可使用抗原的配体或受体识别靶细胞,例如,Nakazawa等人^[7]使用CD116的配体GM-CSF识别CD34⁺AML细胞,Zhang等人^[8]使用NKG2D识别NKG2D配体阳性的RMA/Rae1细胞。通常,scFv与抗原的结合力要比天然TCRs结合主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)-多肽复合物高出几个数量级^[9,10]。目前,尚未能通过简单法则确定CAR的结合能力,以推测CAR-T细胞的活性^[11]。CAR-T细胞对靶细胞的应答程度与scFv或配体与抗原相互结合的亲和力^[12,13]、T细胞表面CAR的表达强度、以及靶细胞表面抗原表达程度相关^[13,14]。Chmielewski等人^[12]检测了针对同一抗原的不同亲和力的scFv对CAR-T的激活作用,结果表明当亲和力较低($K_d > 10^{-8}$ M)时,CAR-T只能对抗原表达高的靶细胞有杀伤作用,当亲和力较高($K_d < 10^{-8}$ M)时,CAR-T的激活程度与靶细胞表面抗原表达程度无关。Turatti等人^[13]研究表明,在CAR和抗原表达水平低于“最佳水平”时(under suboptimal expression levels),具有低亲和力的scFv ($K_d \sim 10^{-6}$)的CAR-T对靶细胞的杀伤作用强于高亲和力的scFv ($K_d < 10^{-8}$)。尽管scFv与抗原需要足够的相互作用才能建立免疫突触(immunological synapse)从而激活T细胞行使杀伤功能;但是,如果效应T细胞与靶细胞的结合作用太强,T细胞不能与靶细胞分开,会导致T细胞不能再与其他靶细胞相互作用,从而降低总体T细胞抗靶细胞效能(overall antitarget effect)^[15];在没有共刺激因子存在的条件下还会诱导T细胞凋亡^[16]。因此,scFvs本身亲和力低时,可以区分抗原高表达和低表达的细胞,仅识别抗原高表达靶细胞,从而降低CAR-T对抗原低表达正常细胞的脱靶效应^[17]。例如,CD123是重要的白血病干细胞相关抗原,在白血病干细胞表面高表达,在正常造血干细胞中也有少量表达,Arcangeli等人^[18]通过突变CD123 scFv,使CD123 CAR-T仅可对CD123高表达的细胞产生杀伤作用。此外,CAR-T也可对可溶性抗原产生应答作用^[19],但目前的临床应用较少。

铰链区是连接抗原识别区和跨膜区之间的区域,通常会采用IgG1^[20],IgG4^[21]或CD8a^[5]的铰链区序列或者IgG Fc序列(包括IgG铰链区以及CH2CH3区),其中最常用的IgG1铰链区可满足大部分CAR结构的需要^[4]。选择合适的铰链区可提高抗原识别区的柔韧性,降低抗原和CAR之间的空间约束,从而促进CAR-T细胞与靶细胞的突触形成^[22]。此外,铰链区还可影响CAR-T细胞的扩增及细胞抗肿瘤活性^[21]。目前发现IgG Fc可与FcγR相互作用^[23],激活CAR-T细胞,对自身单核细胞产生脱靶效应^[24]。因此,多项研究改变IgG Fc序列,以降低CAR-T的脱靶效应,如使用IgG1-CH3替代IgG1-CH2CH3,可明显降低CAR-T的非特异杀伤^[20]。

1.2 跨膜结构域

目前使用的跨膜结构通常来源于I型膜结合蛋白,如CD4, CD8, CD28, CD3ζ或Fc εRIγ^[11]。但NKG2D CAR-T是个例外,NKG2D可作为抗原识别区结合NKG2D配体阳性的靶细胞,本身是II型膜结合蛋白,带有跨膜结构域;而II型膜结合蛋白的N端在胞内区,因此CD3ζ连接在NKG2D的N端。当T细胞中共表达衔接蛋白DAP10时,NKG2D-CD3ζ重组受体可在T细胞表面表达并对NKG2D配体阳性的细胞产生杀伤作用^[8]。

1.3 胞内信号转导结构域

胞内信号转导结构域一直以来都是CAR结构的研究重点。由胞内信号转导结构域的不同将CAR大致分为三代,将在第二部分CAR的结构演变中进行叙述。

2 CAR的结构演变

天然TCR是由α链和β链构成的膜结合的异二聚体。CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞可通过内源性TCR结合靶细胞表面抗原多肽-MHC复合物来识别抗原。TCR与抗原多肽-MHC复合物结合后,通过与相关跨膜蛋白的非共价相互作用诱导TCR下游信号通路的激活,相关跨膜蛋白包括CD3ε和CD3δ组成的异二聚体、CD3ε和CD3γ组成的异二聚体以及CD3ζ形成的同二聚体。但是,TCR聚合物自身并不能有效激活T细胞,还需要T细胞表面的共刺激因子受体与靶细胞表面相应的配体相互作用,即第二活化信号。CD28是目前发现的最典型的共刺激因子受体,可与靶细胞表面的CD80或

CD86相互作用, 促进T细胞激活并避免凋亡^[25]。除此之外, 还有CD137 (4-1BB)^[26], CD134 (OX40)^[27], ICOS^[28]和CD27^[29]等。基于TCR基本结构及激活途径, Eshhar研究组构建了一代CAR。

2.1 一代CAR

1989年, Eshhar研究组^[30]第一次使用免疫球蛋白链替代了TCR的 α 链和 β 链, 并命名为“T小体”(T-bodies)。随后在1993年, 使用scFv替代了免疫球蛋白链, 并把scFv与包含3个免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)的CD3 ζ 连接, 这一基本结构可以不依赖MHC与抗原结合, 激活T细胞, 使其分泌IL2并裂解靶细胞^[31]。这一发明应用于后期的很多研究工作中, 现在称其为“一代CAR”。

除了CD3 ζ , 针对包含一个ITAM的Fc ϵ RI γ 也作为一代CAR的胞内信号转导序列进行了较多的试验^[32], 并与CD3 ζ 进行了比较。Ren-Heidenreich等人^[33]认为包含有3个ITAM的CD3 ζ 与含有1个ITAM的Fc ϵ RI γ 在CAR-T细胞的体外激活方面没有差别。Haynes等人^[34]发现, 在小鼠(*Mus musculus*)模型中, 与含有Fc ϵ RI γ 的CAR-T相比, 含有CD3 ζ 的CAR-T对肿瘤的清除能力更强。这可能是在ITAM活化起始阶段, 与CD3 ζ 相比, Fc ϵ RI γ 的表达水平较高, 但随着时间的延长, 由于CD3 ζ 活化的时间更持久, 展现出了更强的杀伤能力^[35]。

最初的一代CAR-T临床试验是针对HIV的^[36], 随后针对实体瘤的碳酸酐酶(carbonic anhydrase IX)^[37]、CD171^[38]、叶酸受体 α (folate receptor α , FR α)^[39]和GD2^[40,41], 以及针对B细胞恶性肿瘤的CD19^[42]和CD20^[43]的一代CAR-T也相继用于临床试验。在临床试验中, 一代CAR-T并没有引发实质性的抗肿瘤反应, 而且回输到患者体内后, CAR-T细胞并不能持续存在^[44]。尽管如此, 这些试验证实了CAR-T细胞在临床治疗中是安全可行的^[45]。

2.2 提高信号强度——二代和三代CAR

淋巴细胞激活的双信号模型提示, 可能是由于共刺激因子的缺失导致一代CAR-T在体内存活的时间较短, 活性欠佳。因此, 研究人员开始尝试在胞内信号转导区引入共刺激因子结构域来提高CAR-T细胞在体内的活性和扩增效率。Finney等人^[46]将CD28胞内结构域连

接于CD3 ζ 胞内结构域与跨膜结构域之间, 构建CAR-T细胞, 体外实验结果表明与一代CAR相比, 引入CD28胞内结构域后, T细胞产生IL-2的水平是一代CAR-T的20多倍。随后, 大量实验表明, 含有CD28胞内结构域的CAR-T可以维持T细胞的扩增^[47,48], 除IL-2外, 多种细胞因子分泌大量增加, 如IFN- γ ^[27,49]以及GM-CSF^[50]。体内实验进一步表明, 含有CD28胞内结构域的CAR-T具有更强的增殖能力以及抗肿瘤能力^[34,51-54]。另外, 一组针对非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)临床试验进一步证明, 与回输抗CD19-CD3 ζ 一代CAR-T相比, 抗CD19-CD28-CD3 ζ CAR-T具有更强的增殖能力^[55]。从此, CAR结构进入了胞内信号转导结构域包含一个共刺激因子的二代CAR时代。

其后, 更多的B7家族^[56]和肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)家族^[57]的共刺激因子用于二代CAR的研究。Brentjens等人^[54]对比了抗CD19的CD28, DAP10, OX40和4-1BB二代CAR的功能。与其他共刺激因子的二代CAR相比, CD28-CD3 ζ 促细胞增殖、IL-2和IFN- γ 细胞因子分泌等能力更强, 4-1BB-CD3 ζ 次之。Finney等人^[58]对比了抗CD33的CD28, ICOS, OX40和4-1BB CAR的功能, 同样, CD28表现出更强的细胞因子分泌能力, ICOS表现出最优的细胞杀伤能力, 而4-1BB的抗T细胞凋亡能力最强。尽管在以上体外实验中, CD28-CD3 ζ CAR-T在增殖及细胞因子分泌等方面表现出优势, 但在小鼠体内实验中Milone等人^[59]对比了抗CD19的CD28和4-1BB CAR, 4-1BB-CD3 ζ CAR-T在体内的持续增殖能力及抗白血病细胞能力更强。本研究组, Li等人对比了抗CD33的CD28和4-1BB CAR-T的细胞类型及T细胞的耗竭, 结果显示4-1BB-CD3 ζ CAR-T中心记忆T细胞(central memory T cell, T_{CM})的比例高于CD28-CD3 ζ CAR-T, 且T细胞耗竭标记PD-1, TIM-3和LEG-3的表达低于CD28-CD3 ζ CAR-T (研究结果尚未发表)。临床试验中, Kite和Juno公司在应用抗CD19 CD28-CD3 ζ CAR-T (KTE-19和JCAR015)时, Juno公司报道, 针对难治复发ALL患者治疗中, 2例患者因脑水肿死亡; Kite公司报道, 针对NHL患者治疗中, 1例患者因脑水肿死亡^[60,61]。这可能是由于CD28引发强劲的T细胞激活信号, 导致CAR-T细胞的快速扩增而诱发的脑水肿^[61]。

由于不同的共刺激因子在CAR-T中展现的作用不尽相同, 例如, CD28-CD3 ζ CAR可引发T细胞的快速大

量扩增, 4-1BB-CD3 ζ CAR可增强T细胞持续增殖的能力^[62], 因此, 将不同共刺激因子同时引入CAR的结构中, 可能使T细胞产生不同的性能. 将CD28, 4-1BB或CD28, OX40两个共刺激因子和CD3 ζ 串联组成胞内信号转导结构域, 再与跨膜区和胞外区连接; 或者将CAR与共刺激分子并联, 构成了“三代CAR”(图1)^[59,63,64]. 总之, 三代CAR包含两个共刺激因子的胞内信号转导结构域. 目前, 无论是体外实验还是小鼠体内实验, 均表明三代CAR的杀伤能力和产生细胞因子的水平与二代CAR相比没有太大差别^[59,65]. 美国贝勒医学院的一项针对弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)的临床试验表明, 患者体内三代CD28-4-1BB-CD3 ζ CAR-T扩增及持续扩增能力优于二代CD28-CD3 ζ 或4-1BB-CD3 ζ CAR-T^[66]. 但目前三代CAR并没有展现明显的临床优势^[67].

3 CAR-T细胞在急性白血病中的应用

3.1 针对B-ALL的CAR-T治疗

目前针对B-ALL的CAR-T治疗主要集中在CD19, CD22两个靶点上, 而CD19是临床上应用最广泛的CAR-T治疗靶点.

(1) CD19. CD19是B细胞表面膜蛋白, 与B细胞活化、增殖及信号转导相关, 几乎表达于所有正常B细胞及B细胞恶性肿瘤细胞表面, 是用于CAR-T治疗的

有效靶点. 已开展的CD19 CAR-T临床试验见表1.

目前已报道有超过350例的B-ALL患者参与临床试验^[68]. 在不同诊疗中心, 不同国家, 使用不同结构的CAR-T细胞类型、淋巴细胞清除方案、自体或异体T细胞以及不同的CAR-T回输数量治疗难治复发的B-ALL患者, 其中50%~90%的患者可达到完全缓解^[70]. 且发现, 经CD19 CAR-T治疗后, 有近30%的患者会发生CD19抗原缺失而复发^[71]. 因此, 需要寻找新的靶点弥补由CD19缺失而造成的复发.

(2) CD22. CD22是B系分化抗原, 在90% B-ALL患者中表达^[72]. 因此, 也同CD19一样, 是可用于制备CAR-T的靶点. 本课题组使用研究所前期制备的CD22 scFv序列构建特异性识别CD22的CAR-T, 可有效杀伤CD22阳性白血病细胞(研究结果尚未发表). Haso等人^[73]使用不同CD22单链抗体(HA22和m971)作为胞外抗原识别结构域, 证实m971-CAR-T的杀伤效率较高, 可有效延长小鼠生存期. 美国国家癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)报道了CD22 CAR-T相关的I期临床试验结果, 证实CD22 CAR-T不仅安全可行, 而且有效, 大部分患者可达到缓解, 并且患者对CAR-T的反应率与输注CAR-T数量呈正比^[74]. 目前, 有5个单位正在进行CD22 CAR-T相关临床试验, 分别为美国宾夕法尼亚大学(Upenn, NCT02650414)、中国西南医院(NCT02935153)、中国人民解放军总医院(NCT03185494)、中国徐州医科大学(NCT03185494)以及中国深圳基因免疫医学研究所(NCT03125577).

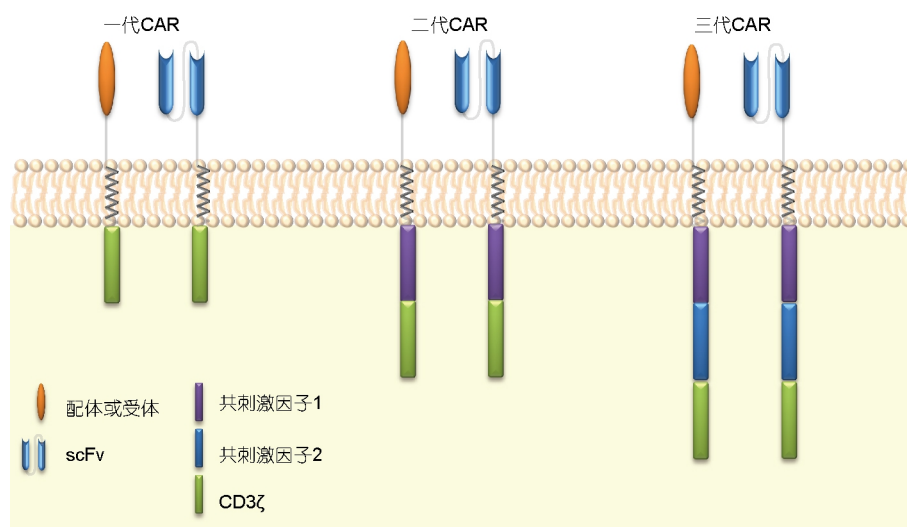


图1 CAR的基本结构

表 1 已报道的CD19 CAR-T临床试验结果^{[68]a)}

年份	学术机构(公司)	患者入组类别、数目	scFv/共刺激因子结构域	质粒类型	输注前预处理方案	CAR-T剂量	CRS/神经毒性	治疗效果
2013	美国贝勒医学院	成人B-ALL, <i>n</i> =4	FMC63/CD28	逆转录病毒	无, 输注前3-12mo allo-HSCT	3.8×10 ⁷ ~9.7×10 ⁷ /kg	无Gr≥3细胞毒性报道	ORR: 3/4; CR: 1/4 (3mo); 持续CR: 2/4 (2~8mo) CR: 56/60, MRD(-): 51/56; 12mo RFS: 60%; 24mo RFS: 53%; 12mo OS: 79%; 24mo OS: 61%
2015	美国费城儿童医院	儿童B-ALL, <i>n</i> =60	FMC63/4-1BB	慢病毒	IC	1.1×10 ⁶ ~1.7×10 ⁷ /kg	Gr CRS: 52/59; sCRS: 16/59; 无神经毒性	ORR: 4/9; CR: 2/9 (9 wks, 38+ wks), MRD(-): 2/2; PR: 2/9; 18wk OS: 5/9
2015	中国人民解放军总医院 ^[69]	成人B-ALL, <i>n</i> =9	FMC63/4-1BB	慢病毒	无处理(<i>n</i> =7/9) Cy-MOAD (<i>n</i> =2/9)	3×10 ⁶ ~1×10 ⁷ /kg	Gr CRS: 4/9; Gr≥3 CRS: 3/9	CR/CRi: 24/29, MRD(-): 24/24; 6mo OS: 89%; 6mo RFS: 60%
2016	美国费城儿童医院/全球多中心(Novartis)	儿童B-ALL, <i>n</i> =34	FMC63/4-1BB	慢病毒	IC (FluCy为主要药物)	0.2×10 ⁶ ~4×10 ⁶ /kg (中位2.9×10 ⁶)	Gr CRS: 28/34; Gr 3 CRS:7/34; Gr 4 CRS:8/34; Gr 3-4S神经毒性: 7/34	CR/CRi: 20/29, MRD(-): 18/20; 6mo RFS: 66.4%; 6mo OS: 75.7%
2016	美国费城儿童医院/美国多中心(Novartis)	儿童B-ALL, <i>n</i> =29	FMC63/4-1BB	慢病毒	FluCy	2.0×10 ⁶ ~5.0×10 ⁶ /kg (≤50 kg); 1.0×10 ⁸ ~2.5×10 ⁸ /kg (>50 kg)	Gr 3~4 CRS: 11/29; Gr 3 神经毒性: 1; Gr 4~5 神经毒性: 0	CR: 26/30 (7/11 鼠源CAR-T治疗), MRD(-): 19/19
2016	美国费城儿童医院(Novartis)	儿童B-ALL, <i>n</i> =30 (11/30使用鼠源CAR-T)	HuCART19/4-1BB (人源化)	慢病毒	FluCy	未报道	Gr 3 CRS: 3/30; Gr 4 CRS: 1/30; 脑病: 5; 癫痫: 4	CR: 28/30 (17/17 Cy+Flu, 11/13 Cy), MRD(-): 16/17 CyFlu, 10/11 Cy; CR: 12/17 CyFlu (中位f/u 300 days), 1/13 Cy (f/u 600+ days)
2016	福瑞德哈金森肿瘤研究中心 (Juno)	成人难治复发B-ALL, <i>n</i> =30	FMC63/4-1BB (EGFRt)	慢病毒	Cy (<i>n</i> =13/30) FluCy (<i>n</i> =17/30)	2×10 ⁵ ~2×10 ⁷ /kg CD4 ⁺ : CD8 ⁺ 比例=1:1	CRS: 25/30; sCRS: 7/30; 一例患者死于CRS; Gr 3~4神经毒性: 14/30; Gr 5神经毒性: 1/30 (Gr≥3神经毒性: 6/6 CAR-T剂量≥2×10 ⁶ /kg)	CR: 26/30 (7/11 鼠源CAR-T治疗), MRD(-): 19/19

续表 1

年份	学术机构(公司)	患者入组类别、数目	scFv/共刺激因子结构域	质粒类型	输注前预处理方案	CAR-T剂量	CRS/神经毒性	治疗效果
2016	中国深圳基因免疫医疗研究所	B-ALL, $n=102$ (47 成人、55 儿童)	CD19scFv/CD28-41BB-CD27 (iCasp9)	慢病毒	FluCy ($n=54$), Cy ($n=17$), 其他 ($n=29$), 无处理 ($n=2$)	平均 $1.05 \times 10^6/\text{kg}$	Gr 0~1 CRS: 73/102; Gr 3~4 CRS: 3/17 (BM 幼稚细胞 $>80\%$), 8/38 (BM 幼稚细胞 $\geq 50\%$); 神经毒性 NR	CR: 91.3% ($<50\%$ BM 幼稚细胞, $n=69$), 75.8% ($\geq 50\%$ BM 幼稚细胞, $n=33$); 中位 OS: 485 days ($<50\%$ BM 幼稚细胞), 317 days ($\geq 50\%$ BM 幼稚细胞)
2016	中国河北燕大陆道培医院	B-ALL, $n=47$ (年龄 2~68 岁)	CD19scFv/4-1BB	慢病毒	FluCy ($n=46$; Flu 30 mg/m $^2 \times 3$, Cy 250 mg/m $^2 \times 3$)	$5 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^6/\text{kg}$ (中位 $1.0 \times 10^5/\text{kg}$) 低剂量	中位 CRS Gr 2; Gr ≥ 3 CRS 以及 Gr 5 CRS NR; 神经毒性 NR.	CR/CRi: 31/35, MRD(-): 29/35 (15 持续 CR 中位 f/u 197 天)
2016	美国安德森癌症中心(Ziopharm/Intrexon)	成人 B-ALL, $n=17$	FMC63/CD28	睡美人	IC (随后进行 alloHSCT)	$1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8/\text{m}^2$	无 CRS 和神经毒性报道; 成人 GVHD: 3/17	持续 CR: 9/17 (中位随访时间 6mo); CR 死亡: 1/17
2016	纪念斯隆-凯特琳癌症研究所(Juno)	成人难治复发 B-ALL, $n=51$ (20/51 基线 MRD)	SJ25C1/CD28	逆转录病毒	Cy 或 FluCy	$1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6/\text{kg}$	sCRS: 14/51 (13/31 基线形态学阴性, 1/20 基线 MRD); Gr 3~4 神经毒性: 15/51 (11/31 基线形态学阴性, 4/20 基线 MRD)	CR: 41/50 (CR: 23/30 形态学阴性, 18/20 MRD), MRD(-): 33/39 CRs (2 例患者无 MRD); 15/33 MRD(-) CR 复发, 9/33 MRD(-) CR 持续阴性 1+ y); 6mo OS: 73% (基线 MRD), 57% (基线形态学阴性), 92% (患者达 MRD(-) CR)
2016	多中心(Kite)	B-ALL, $n=5$ (3 成人、2 儿童)	FMC63/CD28	逆转录病毒	FluCy (Flu 25 mg/m $^2 \times 3$, Cy 900 mg/m 2)	1×10^6 vs. $2 \times 10^6/\text{kg}$	CRS: 5/5; 无 Gr ≥ 3 CRS; Gr ≥ 3 神经毒性: 3/5 (3/3 成人患者)	CR: 5/5, MRD(-): 5/5
2016	美国国家癌症研究所	成人 B-ALL allo-HSCT 后复发, $n=5$	FMC63/CD28	逆转录病毒	无	$4.2 \times 10^6 \sim 7 \times 10^6/\text{kg}$	Gr 3~4 窦性心搏过速: 3/5; Gr 3~4 血压过低: 4/5; 神经毒性未见报道	CR: 4/5; 其中 MRD(-) 4/4

续表 1

年份	学术机构(公司)	患者入组类别、数目	scFv/共刺激因子结构域	质粒类型	输注前预处理方案	CAR-T剂量	CRS/神经毒性	治疗效果
2016	美国国家癌症研究所	儿童难治复发B-ALL, <i>n</i> =51	FMC63/CD28	逆转录病毒	FluCy (低剂量 <i>n</i> =36, 高剂量 <i>n</i> =8), FLAG (<i>n</i> =6), ifos/etop (<i>n</i> =2)	1×10 ⁶ ~33×10 ⁶ /kg	Gr 3-4 CRS: 7/51; Gr 1-2 癫痫: 2/51; Gr 3 神经毒性: 3/51	CR: 31/51 (18/21<25% BM幼稚细胞, 13/32>25% BM幼稚细胞), 其中28/31 MRD(-), MRD(-)中位RFS 18mo; 中位OS 13.3mo (FluCy) vs. 5.5mo (低剂量)
2016	西雅图儿童医院(Juno)	儿童B-ALL, <i>n</i> =43	FMC63/4-1BB (EFGRt)	慢病毒	Cy (<i>n</i> =27), FluCy (<i>n</i> =14), CE (<i>n</i> =1), Flu (<i>n</i> =1)	5×10 ⁵ ~4×10 ⁶ /kg CD4 ⁺ : CD8 ⁺ 比例=1:1	CRS: 40/43; sCRS: 10/43 (严重程度与CAR-T剂量相关, 无毒性死亡); 神经毒性: 21/43; 严重神经毒性: 10/43	CR: 40/43, 其中40/40 MRD(-); 12mo OS: 69.5%; 中位CAR-T持续时间: 6.4mo (>15% CD19 ⁺ BM细胞), 1.7mo (<15% CD19+BM细胞)
2016	美国宾夕法尼亚大学(Novartis)	成人难治复发B-ALL, <i>n</i> =30	FMC63/4-1BB	慢病毒	IC (Cy为基础药物)	5×10 ⁷ vs. 5×10 ⁸	Gr≥3 CRS: 22/30; Gr 5 CRS: 3/30 (输注5×10 ⁸ CAR-T一次, 使用拖珠单抗和糖皮质激素); Gr ≥3神经毒性: 1/30 (Gr 3 脑病)	CR: 15/27; PR: 1/27
2017	伦敦大学(Collectis)	儿童B-ALL, <i>n</i> =2	4g7/4-1BB	慢病毒	Cy, Flu, Alemtuzumab (抗CD52单抗)	4×10 ⁶ ~4.6×10 ⁶ /kg uniCAR-T (使用TALEN敲除TCR和CD52)	无CRS, 无神经毒性reported; Gr 2皮肤GVHD: 1/2.	CR: 2/2 (持续12+和18+ mo),全部 MRD(-)

a) allo-HSCT: 异基因造血干细胞移植; CR: 完全应答或完全缓解; Cri: 血细胞计数未完全恢复的完全缓解; Cy: 环磷酰胺; CyFlu: 环磷酰胺+氟达拉滨; etop: 依托泊苷; FLAG: 氟达拉滨+阿糖胞苷+GM-CSF; Flu: 氟达拉滨; Gr: 级别; IC, 研究人员选择; ifos: 异环磷酰胺; MRD: 微小残留病; MRD(-): 微小残留病阴性; ORR: 总缓解率; OS: 整体生存率; PR: 部分反应率; RFS: 无复发生存率; CRS: 细胞因子风暴; sCRS: 严重CRS.

(3) 酪氨酸激酶样孤儿受体-1 (tyrosine kinase-like orphan receptor-1, ROR1). ROR1主要表达于胎儿时期, 随着胎儿的发育ROR1的表达水平逐渐下降^[75], 在成人体的脂肪细胞、胰脏和肺中低表达. 此外, ROR1在B细胞恶性肿瘤中高表达, 如淋巴瘤、CLL, *t*(1;19) B-ALL^[76]. 由于ROR1在灵长类动物中高度保守, 因此Berger等人^[77]使用抗ROR1 CAR-T输入非人灵长类动物体内, 证实了ROR1 CAR-T的安全性. Deniger等人^[78]证实ROR1 CAR-T可有效杀伤ROR1阳性白血病细胞, 目前美国福瑞德哈金森肿瘤研究中心正在进行针对ROR1⁺ALL的I期临床试验(NCT02706392).

3.2 针对T-ALL的CAR-T治疗

(1) CD5. Mamonkin等人^[79]使用CD5作为靶点构建CAR-T细胞. CD5是T细胞的负调节因子, 在正常T细胞中表达, 在大约80%的T-ALL中表达. 由于CD5在正常细胞中表达, 因此他们将不包含胞外段的CD5及抗CD5 CAR共同表达于T细胞中, 既降低了CAR-T对自身的杀伤(由28%降低到10%), 又可保证对CD5阳性靶细胞的杀伤. 临床前试验显示CD5 CAR-T可有效清除T-ALL细胞.

(2) CD7. Gomes-Silva等人^[80]使用CD7作为靶点构建CAR-T细胞. 与CD5不同的是, CD5仅在部分T-ALL细胞表面表达, 而且大部分表达CD5的细胞中, 其表达水平较低; 而CD7在正常T细胞、NK细胞及其前体细胞中表达^[81,82], 且在超过95%的T-ALL中表达^[83]. 由于其在T细胞中表达, 因此他们使用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除T细胞内源性CD7, 再将CD7 CAR转入T^{CD7KO}细胞中, 临床前试验表明, CD7 CAR-T可有效杀伤T-ALL细胞, 延长小鼠生存期.

3.3 针对AML的CAR-T治疗

(1) CD33. CD33是表达在正常髓系前体细胞的SIGLEC家族跨膜蛋白, 在将近90% AML患者中表达, 且表达于AML起始细胞中^[84]. 吉妥单抗(Gemtuzumab ozogamicin, GO)是偶联免疫毒素卡里奇霉素(calicheamicin)的抗CD33单抗. 2000年获FDA快速批准上市, 其后因无法证明该药对患者有临床益处, 于2010年撤市^[85]. 但是一项meta分析证明GO可提高患者的6年生存^[86], 而且针对AML使用GO的III期临床试验的近期回顾性分析显示, 患者对GO产生耐药的原因主

要来自卡里奇霉素, 而不是CD33单抗^[85], 因此以CD33为靶点治疗AML还是切实可行的. Kenderian等人^[87]构建了靶向CD33的CAR-T (CART33)并进行了临床前试验, 体内外实验证实, CART33可有效杀伤白血病细胞并延长发病小鼠的生存期, 但是也会引发血细胞及髓系祖细胞的减少. 因此, 该研究小组构建了CD33瞬时表达的CAR-T细胞, 将表达抗CD33 CAR的mRNA电转入T细胞中, 引起抗CD33 CAR瞬时但不持久的高表达, 这样使得抗CD33 CAR有可能应用于临床. 除了临床前试验的研究, 中国人民解放军总医院对一例难治复发AML患者进行了临床试验, 使用CD33 CAR-T治疗2周后骨髓中白血病细胞明显降低, 9周后复发^[88]. 目前有两项注册的CD33 CAR-T的临床试验正在进行, 分别是中国人民解放军总医院(NCT02799680)和深圳基因免疫医学研究所(NCT03222674).

(2) CD123. CD123是IL3受体的跨膜 α 亚基(IL3R α), 与CD131 (IL3R β)结合构成IL3受体, 与IL3相互作用, 促进细胞的存活与增殖. CD123在正常造血干/祖细胞(haemopoietic stem/progenitor cells, HSPCs)中低表达, 在白血病起始细胞中高表达, 并在大多数AML细胞中表达^[89]. Mardiros等人^[90]和Gill等人^[91]构建了靶向CD123 CAR-T细胞, 证实以CD123为靶点的CAR-T细胞可有效杀伤AML细胞; 如上文提到, 为了降低CAR-T对低表达CD123的正常HSPCs的杀伤作用, Arcangeli等人^[18]将识别CD123的scFv突变, 寻找仅识别高表达抗原的scFv. 尽管CD123和上文提到的CD33 CAR-T均可在体内实验中杀伤AML细胞, 但对患者原代AML细胞在体内的杀伤没有讨论. 因此, Pizzitola等人^[92]构建CD33/CD123双靶点CAR-T, 并证实对患者原代AML细胞的有效杀伤. 目前有4项针对CD123 CAR-T的相关临床试验正在进行(NCT03114670, NCT03222674, NCT02159495, NCT03190278), 但尚未有相关结果报道.

(3) CD44v6. 透明质酸受体CD44是I类跨膜糖蛋白, 在血液及上皮肿瘤中高表达. CD44通常用作肿瘤干细胞的标记, 在CD44^{-/-}的造血干祖细胞中过表达BCR-ABL癌基因后, 第二代小鼠不能发病^[93]. 使用CD44单抗治疗人AML发病小鼠, 可有效延长小鼠生存时间^[94]. CD44存在多个亚型, 不同肿瘤中, 高表达CD44的亚型不同, 在AML中, CD44v6高表达且患者预后不良^[95]. 另外, 与CD123不同, CD44v6在正常HSPCs^[96]及

正常细胞如T细胞、单核细胞、角质细胞中不表达或低表达。Casucci等人^[97]制备的抗CD44v6二代CAR-T可有效杀伤AML细胞,且未见对HSPCs的脱靶效应。

(4) 叶酸受体 β (folate receptor β , FR β). FR家族是可结合叶酸的蛋白受体,目前已知的有4种(α , β , γ 和 δ). FR α 和FR β 是含有糖基磷脂酰肌醇(glycosyl phosphatidyl inositol, GPI)结构的膜结合蛋白^[98],有大约70%的同源性,与叶酸的结合活性相似,且摄取叶酸机制相同,但是FR α 通常表达于上皮组织,FR β 表达于髓系造血细胞中^[99],并都高表达于相应的恶性肿瘤组织中^[100]。目前针对卵巢癌的靶向FR α 的二代CAR-T正在临床试验中^[101]。Lynn等人^[102]构建了针对FR β 的二代CAR-T,并验证了对AML细胞系的有效杀伤。为了增强CAR-T对FR β^+ AML的杀伤作用,制备了结合能力更高的scFv,同时证实对HSPCs的功能没有影响^[103]。

(5) Lewis-Y. Lewis-Y是双岩藻糖苷糖类抗原,结合于包含肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)等多种蛋白上^[104],并且在包括AML等多种恶性肿瘤中有较高的表达水平^[105],但在正常组织中很少表达^[106]。Ritchie等人^[107]使用抗Lewis-Y scFv构建二代CAR-T细胞,用于治疗难治复发AML患者,结果显示CAR-T细胞可在患者体内有效扩增,在体内持续存在10个月以上,有皮肤毒性,但对AML细胞只有有限的杀伤作用。

(6) WT1 (Wilms Tumor 1). WT1是一个与细胞增殖分化、器官发育以及凋亡相关的锌指结合转录因子^[108]。在成人体的肾脏、脾脏、骨髓以及生殖器官低表达^[109],在血液肿瘤尤其是AML高表达。尽管WT1是表达在细胞内的TAA,但会通过MHC呈递到细胞表面,研究最深入的是可由HLA-A*0201识别的与MHC结合的WT1 126-134位多肽RMFPNAPYL (RMF)^[110]。Rafiq等人^[111]使用可识别MHC结合WT1多肽的scFv作为CAR的胞外识别结构域构建CAR-T细胞,体内外试验证实该CAR-T可有效杀伤AML细胞并延长小鼠生存时间。

(7) C-型凝集素样分子-1 (C-type lectin-like molecule-1, CLL-1). CLL-1是一类II型跨膜蛋白,仅在髓系细胞中表达^[112]。按FAB分型,AML可分为M0-M7,CLL1在85%~92%的M0-M6 AML患者中表达^[113],而且在CD34⁺CD38⁻ AML白血病干细胞中表达,在正常髓系前体细胞中很少表达^[112],因此可能是另一个有效的抗白血病前体细胞靶点。Tashiro等人^[114]使用CLL-1

scFv构建二代CAR-T细胞,体内外试验表明可有效杀伤CLL-1⁺AML细胞系及患者细胞。

尽管目前已发明多种抗AML和T-ALL治疗的CAR-T细胞,但至今尚未见CAR-T治疗T-ALL和AML最佳方案的报道,因此仍需进一步探索。

4 CAR-T设计的新方案

除了寻找新的靶点,尚有很多创新的方案用来降低CAR-T毒性以及提高CAR-T的抗肿瘤能力。

4.1 提高CAR-T细胞特异性

为了降低CAR-T细胞的非特异杀伤,提高CAR-T细胞分辨肿瘤细胞和正常细胞的能力,可构建识别多个抗原的CAR-T细胞以降低其脱靶效应。

Wilkie等人^[115]将两个识别不同抗原的CAR表达于细胞表面,每个CAR结构的信号转导结构域都是不完整的,只有当肿瘤细胞表面两个抗原同时存在时,CAR-T细胞才能被激活,从而增强了CAR-T细胞识别肿瘤细胞的特异性。另外,可以利用免疫抑制受体的信号转导结构域(CTLA-4或PD-1)替代CAR的胞内共刺激因子信号结构域,构建抑制性CAR (iCAR)。

Fedorov等人^[116]将识别PSMA的iCAR (off-target)和识别CD19的CAR (on-target)表达于T细胞表面,构建仅表达CD19的靶细胞3T3-CD19和同时表达CD19和PSMA的靶细胞3T3-CD19-PSMA,体内外实验表明,当仅有CD19存在时,T细胞可有效激活,并杀伤靶细胞;当CD19, PSMA同时存在时,T细胞不能有效发挥作用。因此,可将识别TAA的胞外结构域构建CAR,将识别正常细胞抗原的胞外结构域构建iCAR,以降低CAR-T的脱靶效应。

另外, Roybal等人^[117]构建了一个双抗原T细胞激活环路,将识别一个抗原(抗原1)的胞外区与Notch受体的胞内区连接,构成synNotch,将Notch调控的启动子与识别另一个抗原(抗原2)的CAR连接,构成notchCAR,将synNotch与notchCAR共同表达于T细胞,当T细胞识别抗原1时,激活Notch调控notchCAR的表达,从而诱导T细胞识别抗原2,杀伤靶细胞。

目前,尽管以上3个方法尚未应用于临床,但提高CAR-T特异性将成为应用CAR-T的先决条件,因此这些方法将为CAR-T的扩大应用提供新的思路。

4.2 提高CAR-T杀伤活性

通过制备表达促炎性因子并同时表达细胞因子受体的CAR-T细胞,使CAR-T细胞可调节肿瘤微环境中免疫抑制信号的同时,还可通过细胞因子受体的激活促进CAR-T细胞增殖,使用该策略制备的CAR-T细胞也称作“装甲车”(armoured) CAR-T. 在多个不同的临床前试验中^[118,119],均使用IL12促炎性因子调节肿瘤微环境,研究表明,引入IL12后,微环境中免疫抑制细胞调节性T细胞(Tregs)和髓系抑制细胞(myeloid derived suppressor cells, MDSCs)的比例下降, CAR-T的杀伤活性增加.

另外,当T细胞激活后,细胞表面负调节因子LEG-3等表达上调, Zhang等人^[120]使用基因编辑技术CRISPR/Cas9敲除T细胞免疫抑制因子LAG-3,增强了CAR-T细胞在小鼠体内的增殖,延长小鼠生存期.

4.3 避免抗原逃逸(escape)

与提高CAR-T特异性同样重要的是避免由靶细胞表面抗原的逃逸引起的CAR-T治疗无效. 除了已经报道的针对CD19 CAR的多个临床试验^[121,122], 本诊疗中心正在进行的临床试验也发现, CD19 CAR-T在治疗B-ALL时,由于CD19抗原发生改变,如CD19突变、表达CD19其他异构体或完全缺失导致疾病复发. 另外,有一项临床试验报道,由于白血病由淋系向髓系转变,导致CAR-T治疗失败^[123]. 目前,已有一项研究报告^[124],在CD19抗原改变导致CD19 CAR-T治疗失败后,可使用抗CD22 CAR-T治疗复发患者. 本诊疗中心临床试验中,针对一例难治复发B-ALL患者进行CD19 CAR-T治疗后,CD19阳性克隆消失,出现CD22阳性克隆复发. 继而对该患者进行针对CD22 CAR-T的试验性治疗,尽管CD22阳性克隆消失,该患者最终仍复发(结果尚未发表). 目前还没有评价CD22 CAR-T治疗的临床试验报道,但提示可设计应用双靶点或多靶点的CAR-T以避免由于抗原逃逸导致的复发^[125].

CD123高表达于白血病起始细胞及CD19阴性的B-ALL细胞中, CD20, CD22是B细胞特异性标志,也表达于CD19阴性的B-ALL细胞中. Ruella等人^[71]设计针对CD19/CD123双靶点CAR-T, Zah等人^[126]设计针对CD19/CD20双靶点CAR-T体内实验证实双靶点

CAR-T可有效避免CD19改变而导致的复发. 除此之外, 本研究组设计的针对CD19/CD22双靶点CAR-T以及CD19/CD20双靶点CAR-T的临床前试验正在进行中.

4.4 制备通用型(universal) CAR-T

如前文提到,经典的CAR-T制备及回输策略是采集患者或供者的外周血,进行PBMCs或T细胞分离,通过逆转录病毒等方式将包含CAR结构的质粒或mRNA转染到细胞内,进行扩大培养再回输到患者体内,需要7~15天的过程,且每位患者的CAR-T需要单独制备,成本较高且不确定因素较多,如分离得到的细胞不足、CAR-T制备失败、CAR-T制备中患者疾病进程较快等因素可能造成CAR-T治疗失败,因此需要使用一个或多个健康供者T细胞制备通用型CAR-T (uniCAR-T)有望解决上述困扰.

(1) 改构T细胞. 目前,应用基因编辑技术,如CRISPR-Cas9, TALENs及ZFNs等,敲除内源 $\alpha\beta$ -TCR,以排除移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)的风险. Poirot等人^[127]使用TALEN基因编辑技术,将T细胞 $\alpha\beta$ -TCR和CD52 (可以在使用CAR-T治疗的同时使用抗CD52抗体-alemtuzumab,以期提高治疗效果)敲除,并使用慢病毒将CD19 CAR转入T细胞中. 一项针对2例婴幼儿的难治复发B-ALL临床试验结果表明,该uniCAR-T在28天内可以使患者达到分子学缓解,且在异基因造血干细胞移植之前都可在患儿体内检测到uniCAR-T的存在^[128]. 目前应用该uniCAR-T的扩大样本的临床试验正在进行(NCT02746952, NCT02808442). Eyquem等人^[129]使用CRISPR/Cas9将CD19 CAR敲入到TCR α 的TRAC结构域,使用TCR α 启动子调节CD19-CAR的表达,这样不仅敲除了T细胞中TCR的表达,制备成uniCAR-T,还有效避免由于CAR结构导致的T细胞过度激活而引起的T细胞耗竭.

(2) 改变CAR-T制备策略. 除了改造T细胞, Smith等人^[130]颠覆了传统CAR-T的制备方法,他们将携带CD19 CAR结构的DNA和转座酶的纳米颗粒输入小鼠体内,纳米颗粒表面包被的CD3 scFv可特异性靶向T细胞, CD19 CAR在转座酶的作用下插入T细胞基因组,从而实现了不分离T细胞而将CD19 CAR转入患者T细胞,节约了时间成本,降低患者产生GVHD的风险.

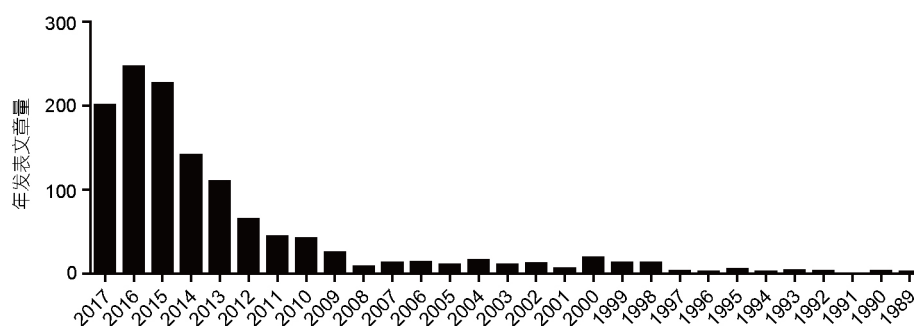


图2 Pubmed中CAR-T相关文章发表数量

5 展望

自2007年开始, CAR-T相关文章的发表在近十年时间呈现迅速增长, 截至目前, 2017年已发表文章200篇(图2)。今年3月, 国内的CAR-T在研项目共有90个, 8个月后(数据截止到2017年11月3日)数量已经达到126个, 而近两年临床试验年增长数量将近60个(图3)。

2017年7月11日美国FDA肿瘤药物专家咨询委员

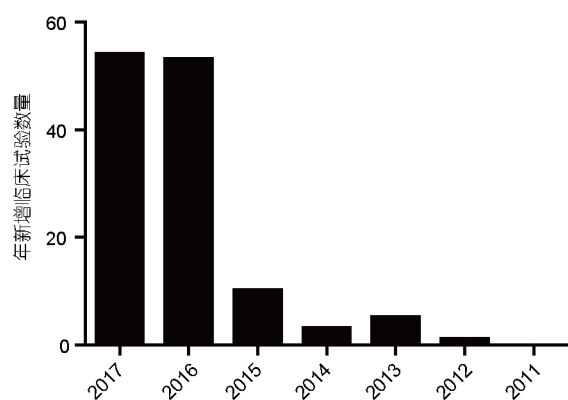


图3 Clinical trail中注册临床试验年增长数目

会以10:0的投票结果一致支持批准诺华的CAR-T疗法CTL-019上市, 用于治疗难治复发儿童和年轻人ALL。这一举措进一步证实了CAR-T在治疗急性白血病中的意义。

在CAR-T快速发展的近十年, 本研究组也自主研发了数项针对不同靶抗原的CAR-T治疗技术, 其中CD19 CAR-T在前期研究中证实可以有效地杀灭白血病细胞, 显著延长白血病小鼠的生存^[5], 目前已注册两项临床试验(NCT02975687, NCT03029338), 分别用于治疗难治/复发B-ALL及淋巴瘤。

尽管前期CAR-T治疗B-ALL展现出空前成功, 但还需找到其他血液肿瘤的最佳治疗方案, 无论是通过选择靶点, 改善CAR与靶抗原的结合效率, 还是通过改造T细胞, 提高CAR-T杀伤活性及制备uniCAR-T等都需要进一步临床试验的探索, 即是“从实验室走向临床”。

CAR-T具有强大威力, 但其中具体机制尚未解释清楚, 还需进一步研究人工构建的受体与免疫系统之间复杂的信号通路, 为进一步降低细胞毒性、提高治疗效果提供新的思路, 即是“从临床再回到实验室”。

参考文献

- 1 Pui C H, Robison L L, Look A T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 2008, 371: 1030-1043
- 2 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. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2: 112-120
- 3 陶中飞, 王敏, 王建祥. 嵌合抗原受体修饰的T细胞抗急性髓系白血病的研究进展. *中华血液学杂志*, 2016, 37: 160-162
- 4 Zhang C, Liu J, Zhong J F, et al. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res*, 2017, 5: 22
- 5 An N, Tao Z, Li S, et al. Construction of a new anti-CD19 chimeric antigen receptor and the anti-leukemia function study of the transduced T cells. *Oncotarget*, 2016, 7: 10638-10649
- 6 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 Immunother*, 2014, 37: 204-213

- 7 Nakazawa Y, Matsuda K, Kurata T, et al. Anti-proliferative effects of T cells expressing a ligand-based chimeric antigen receptor against CD116 on CD34⁺ cells of juvenile myelomonocytic leukemia. *J Hematol Oncol*, 2016, 9: 27
- 8 Zhang T, Barber A, Sentman C L. Chimeric NKG2D modified T cells inhibit systemic T-cell lymphoma growth in a manner involving multiple cytokines and cytotoxic pathways. *Cancer Res*, 2007, 67: 11029–11036
- 9 Richman S A, Kranz D M. Display, engineering, and applications of antigen-specific T cell receptors. *Biomol Eng*, 2007, 24: 361–373
- 10 Beckman R A, Weiner L M, Davis H M. Antibody constructs in cancer therapy. *Cancer*, 2007, 109: 170–179
- 11 Cartellieri M, Bachmann M, Feldmann A, et al. Chimeric antigen receptor-engineered T Cells for immunotherapy of cancer. *J Biomed Biotech*, 2010, 2010: 1–13
- 12 Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, et al. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol*, 2004, 173: 7647–7653
- 13 Turatti F, Figini M, Balladore E, et al. Redirected Activity of human antitumor chimeric immune receptors is governed by antigen and receptor expression levels and affinity of interaction. *J Immunother*, 2007, 30: 684–693
- 14 Hombach A A, Schildgen V, Heuser C, et al. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: the position of the binding epitope within the target molecule determines the efficiency of activation of redirected T cells. *J Immunol*, 2007, 178: 4650–4657
- 15 Eshhar Z. Tumor-specific T-bodies: towards clinical application. *Cancer Immunol Immunother*, 1997, 45: 131–136
- 16 Alvarez-Vallina L, Russell S J. Efficient discrimination between different densities of target antigen by tetracycline-regulatable T bodies. *Hum Gene Ther*, 1999, 10: 559–563
- 17 Westwood J A, Murray W K, Trivett M, et al. The Lewis-Y carbohydrate antigen is expressed by many human tumors and can serve as a target for genetically redirected t cells despite the presence of soluble antigen in serum. *J Immunother*, 2009, 32: 292–301
- 18 Arcangeli S, Rotiroli M C, Bardelli M, et al. Balance of anti-CD123 chimeric antigen receptor binding affinity and density for the targeting of acute myeloid leukemia. *Mol Ther*, 2017, 25: 1933–1945
- 19 Hombach A, Koch D, Sircar R, et al. A chimeric receptor that selectively targets membrane-bound carcinoembryonic antigen (mCEA) in the presence of soluble CEA. *Gene Ther*, 1999, 6: 300–304
- 20 Almsbak H, Walseng E, Kristian A, et al. Inclusion of an IgG1-Fc spacer abrogates efficacy of CD19 CAR T cells in a xenograft mouse model. *Gene Ther*, 2015, 22: 391–403
- 21 Qin L, Lai Y, Zhao R, et al. Incorporation of a hinge domain improves the expansion of chimeric antigen receptor T cells. *J Hematol Oncol*, 2017, 10: 68
- 22 Wilkie S, Picco G, Foster J, et al. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J Immunol*, 2008, 180: 4901–4909
- 23 Ying T, Ju T W, Wang Y, et al. Interactions of IgG1 CH2 and CH3 domains with FcRn. *Front Immunol*, 2014, 5: 146
- 24 Hombach A, Hombach A A, Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc ‘spacer’ domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids ‘off-target’ activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Ther*, 2010, 17: 1206–1213
- 25 Chen L, Ashe S, Brady W A, et al. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell*, 1992, 71: 1093–1102
- 26 Long A H, Haso W M, Shern J F, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med*, 2015, 21: 581–590
- 27 Hombach A A, 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. *Oncoimmunology*, 2012, 1: 458–466
- 28 Guedan S, Chen X, Madar A, et al. ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. *Blood*, 2014, 124: 1070–1080
- 29 Song D G, Ye Q, Poussin M, et al. CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells *in vivo*. *Blood*, 2012, 119: 696–706
- 30 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: 10024–10028
- 31 Eshhar Z, Waks T, Gross G, et al. 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: 720–724
- 32 Weijtens M E, Willemsen R A, Valerio D, et al. Single chain Ig/gamma gene-redirceted human T lymphocytes produce cytokines, specifically lyse tumor cells, and recycle lytic capacity. *J Immunol*, 1996, 157: 836–843

- 33 Ren-Heidenreich L, Mordini R, Hayman G T, et al. Comparison of the TCR ζ -chain with the FcR γ -chain in chimeric TCR constructs for T cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 51: 417–423
- 34 Haynes N M, Snook M B, Trapani J A, et al. Redirecting mouse CTL against colon carcinoma: superior signaling efficacy of single-chain variable domain chimeras containing TCR-zeta vs Fc epsilon RI-gamma. *J Immunol*, 2001, 166: 182–187
- 35 Heuser C, Hombach A, Lösch C, et al. 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: 1408–1419
- 36 Deeks S G, Wagner B, Anton P A, et al. A phase II randomized study of HIV-specific T-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy. *Mol Ther*, 2002, 5: 788–797
- 37 Lamers C H, Sleijfer S, van Steenbergen S, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol Ther*, 2013, 21: 904–912
- 38 Park J R, Digiusto D L, Slovak M, et al. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther*, 2007, 15: 825–833
- 39 Kershaw M H, Westwood J A, Parker L L, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 6106–6115
- 40 Pule M A, Savoldo B, Myers G D, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med*, 2008, 14: 1264–1270
- 41 Louis C U, Savoldo B, Dotti G, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood*, 2011, 118: 6050–6056
- 42 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. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010, 16: 1245–1256
- 43 Till B G, Jensen M C, Wang J, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood*, 2008, 112: 2261–2271
- 44 Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, et al. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev*, 2014, 257: 107–126
- 45 Wilkins O, Keeler A M, Flotte T R. CAR T-cell therapy: progress and prospects. *Hum Gene Ther Methods*, 2017, 28: 61–66
- 46 Finney H M, Lawson A D, Bebbington C R, et al. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol*, 1998, 161: 2791–2797
- 47 Beecham E J, Ma Q, Ripley R, et al. Coupling CD28 co-stimulation to immunoglobulin T-cell receptor molecules: the dynamics of T-cell proliferation and death. *J Immunother*, 2000, 23: 631–642
- 48 Maher J, Brentjens R J, Gunset G, et al. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 70–75
- 49 Hombach A, Sent D, Schneider C, et al. T-cell activation by recombinant receptors: CD28 costimulation is required for interleukin 2 secretion and receptor-mediated T-cell proliferation but does not affect receptor-mediated target cell lysis. *Cancer Res*, 2001, 61: 1976–1982
- 50 Haynes N M, Trapani J A, Teng M W L, et al. Rejection of syngeneic colon carcinoma by CTLs expressing single-chain antibody receptors codelivering CD28 costimulation. *J Immunol*, 2002, 169: 5780–5786
- 51 Kowolik C M, Topp M S, Gonzalez S, et al. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances *in vivo* persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res*, 2006, 66: 10995–11004
- 52 Haynes N M, Trapani J A, Teng M W L, et al. Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors. *Blood*, 2002, 100: 3155–3163
- 53 Vera J, Savoldo B, Vigouroux S, et al. T lymphocytes redirected against the light chain of human immunoglobulin efficiently kill mature B lymphocyte-derived malignant cells. *Blood*, 2006, 108: 3890–3897
- 54 Brentjens R J, Santos E, Nikhamin Y, et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 5426–5435
- 55 Savoldo B, Ramos C A, Liu E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest*, 2011, 121: 1822–1826
- 56 Greenwald R J, Freeman G J, Sharpe A H. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 515–548
- 57 Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9: 271–285
- 58 Finney H M, Akbar A N, Lawson A D G. 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 chain. *J Immunol*, 2004, 172: 104–113

- 59 Milone M C, Fish J D, Carpenito C, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. [Mol Ther](#), 2009, 17: 1453–1464
- 60 CAR-T death strikes Kite. [Nat Biotechnol](#), 2017, 35: 492
- 61 Defrancesco L. CAR-T's forge ahead, despite Juno deaths. [Nat Biotechnol](#), 2017, 35: 6–7
- 62 van der Stegen S J C, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. [Nat Rev Drug Discov](#), 2015, 14: 499–509
- 63 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. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2009, 106: 3360–3365
- 64 Tammana S, Huang X, Wong M, et al. 4-1BB and CD28 signaling plays a synergistic role in redirecting umbilical cord blood T cells against B-cell malignancies. [Hum Gene Ther](#), 2010, 21: 75–86
- 65 Zhong X S, Matsushita M, Plotkin J, et al. 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: 413–420
- 66 Da Silva G D, Mukherjee M, Srinivasan M, et al. Direct comparison of *in vivo* fate of second and third-generation CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR)-T cells in patients with B-cell lymphoma: reversal of toxicity from tonic signaling. [Blood](#), 2016, 128: 1851
- 67 Till B G, Jensen M C, 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. [Blood](#), 2012, 119: 3940–3950
- 68 Lichtman E I, Dotti G. Chimeric antigen receptor T-cells for B-cell malignancies. [Transl Res](#), 2017, 187: 59–82
- 69 Luo C, Wei J, Han W. Spotlight on chimeric antigen receptor engineered T cell research and clinical trials in China. [Sci China Life Sci](#), 2016, 59: 349–359
- 70 Khalil D N, Smith E L, Brentjens R J, et al. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. [Nat Rev Clin Oncol](#), 2016, 13: 273–290
- 71 Ruella M, Barrett D M, Kenderian S S, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. [J Clin Invest](#), 2016, 126: 3814–3826
- 72 Shah N N, Stevenson M S, Yuan C M, et al. Characterization of CD22 expression in acute lymphoblastic leukemia. [Pediatr Blood Cancer](#), 2015, 62: 964–969
- 73 Haso W, Lee D W, Shah N N, et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. [Blood](#), 2013, 121: 1165–1174
- 74 Anti-CD22 CAR therapy leads to ALL remissions. [Cancer Discov](#), 2017, 7: 120
- 75 Nomi M, Oishi I, Kani S, et al. Loss of mRor1 enhances the heart and skeletal abnormalities in mRor2-deficient mice: redundant and pleiotropic functions of mRor1 and mRor2 receptor tyrosine kinases. [Mol Cell Biol](#), 2001, 21: 8329–8335
- 76 Dave H, Anver M R, Butcher D O, et al. Restricted cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in pediatric B-lineage acute lymphoblastic leukemia suggests targetability with therapeutic monoclonal antibodies. [PLoS ONE](#), 2012, 7: e52655
- 77 Berger C, Sommermeyer D, Hudecek M, et al. Safety of targeting ROR1 in primates with chimeric antigen receptor-modified T cells. [Cancer Immunol Res](#), 2015, 3: 206–216
- 78 Deniger D C, Yu J, Huls M H, et al. Sleeping beauty transposition of chimeric antigen receptors targeting receptor tyrosine kinase-like orphan receptor-1 (ROR1) into diverse memory T-cell populations. [PLoS ONE](#), 2015, 10: e0128151
- 79 Mamonkin M, Rouce R H, Tashiro H, et al. A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. [Blood](#), 2015, 126: 983–992
- 80 Gomes-Silva D, Srinivasan M, Sharma S, et al. CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies. [Blood](#), 2017, 130: 285–296
- 81 Haynes B F, Eisenbarth G S, Fauci A S. Human lymphocyte antigens: production of a monoclonal antibody that defines functional thymus-derived lymphocyte subsets. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 1979, 76: 5829–5833
- 82 Rabinowich H, Pricop L, Herberman R B, et al. Expression and function of CD7 molecule on human natural killer cells. [J Immunol](#), 1994, 152: 517–526
- 83 Campana D, Van Dongen J J, Mehta A, et al. Stages of T-cell receptor protein expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia. [Blood](#), 1991, 77: 1546–1554
- 84 Taussig D C, Pearce D J, Simpson C, et al. Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. [Blood](#), 2005, 106: 4086–4092
- 85 Linenberger M L. CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and

- potential mechanisms of drug resistance. *Leukemia*, 2005, 19: 176–182
- 86 Hills R K, Castaigne S, Appelbaum F R, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol*, 2014, 15: 986–996
- 87 Kenderian S S, Ruella M, Shestova O, et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2015, 29: 1637–1647
- 88 Wang Q, Wang Y, Lv H, et al. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Mol Ther*, 2015, 23: 184–191
- 89 Rongvaux A, Takizawa H, Strowig T, et al. Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 635–674
- 90 Mardiros A, Dos Santos C, McDonald T, et al. T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood*, 2013, 122: 3138–3148
- 91 Gill S, Tasian S K, Ruella M, et al. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood*, 2014, 123: 2343–2354
- 92 Pizzitola I, Anjos-Afonso F, Rouault-Pierre K, et al. Chimeric antigen receptors against CD33/CD123 antigens efficiently target primary acute myeloid leukemia cells *in vivo*. *Leukemia*, 2014, 28: 1596–1605
- 93 Krause D S, Lazarides K, von Andrian U H, et al. Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. *Nat Med*, 2006, 12: 1175–1180
- 94 Jin L, Hope K J, Zhai Q, et al. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*, 2006, 12: 1167–1174
- 95 Legras S, Gunthert U, Stauder R, et al. A strong expression of CD44-6v correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 1998, 91: 3401–3413
- 96 Neu S, Geiselhart A, Sproll M, et al. Expression of CD44 isoforms by highly enriched CD34-positive cells in cord blood, bone marrow and leukaphereses. *Bone Marrow Transplant*, 1997, 20: 593–598
- 97 Casucci M, Nicolis di Robilant B, Falcone L, et al. CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Blood*, 2013, 122: 3461–3472
- 98 Ratnam M, Marquardt H, Duhring J L, et al. Homologous membrane folate binding proteins in human placenta: cloning and sequence of a cDNA. *Biochemistry*, 1989, 28: 8249–8254
- 99 Shen F, Ross J F, Wang X, et al. Identification of a novel folate receptor, a truncated receptor, and receptor type .beta. in hematopoietic cells: cDNA cloning, expression, immunoreactivity, and tissue specificity. *Biochemistry*, 1994, 33: 1209–1215
- 100 Ross J F, Wang H, Behm F G, et al. Folate receptor type beta is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia. *Cancer*, 1999, 85: 348–357
- 101 Kandalaf L E, Powell D J, 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, 10: 157
- 102 Lynn R C, Poussin M, Kalota A, et al. Targeting of folate receptor beta on acute myeloid leukemia blasts with chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Blood*, 2015, 125: 3466–3476
- 103 Lynn R C, Feng Y, Schutsky K, et al. High-affinity FRβ-specific CAR T cells eradicate AML and normal myeloid lineage without HSC toxicity. *Leukemia*, 2016, 30: 1355–1364
- 104 Yin B W T, Finstad C L, Kitamura K, et al. Serological and immunochemical analysis of Lewis Y (Ley) blood group antigen expression in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*, 1996, 65: 406–412
- 105 Zhang S, Zhang H S, Cordon-Cardo C, et al. Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: II. Blood group-related antigens. *Int J Cancer*, 1997, 73: 50–56
- 106 Kobayashi K, Sakamoto J, Kito T, et al. Lewis blood group-related antigen expression in normal gastric epithelium, intestinal metaplasia, gastric adenoma, and gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol*, 1993, 88: 919–924
- 107 Ritchie D S, Neeson P J, Khot A, et al. Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia. *Mol Ther*, 2013, 21: 2122–2129
- 108 Sugiyama H. *WT1* (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol*, 2010, 40: 377–387
- 109 Davies R, Moore A, Schedl A, et al. Multiple roles for the Wilms' tumor suppressor, WT1. *Cancer Res*, 1999, 59: 1747s–1750s; discussion 51s
- 110 Dao T, Scheinberg D A. Peptide vaccines for myeloid leukaemias. *Best Practice Res Clin Haematol*, 2008, 21: 391–404
- 111 Rafiq S, Purdon T J, Daniyan A F, et al. Optimized T-cell receptor-mimic chimeric antigen receptor T cells directed toward the intracellular Wilms Tumor 1 antigen. *Leukemia*, 2017, 31: 1788–1797

- 112 van Rhenen A, Moshaver B, Kelder A, et al. Aberrant marker expression patterns on the CD34⁺CD38⁻ stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia*, 2007, 21: 1700–1707
- 113 Bakker A B H, van den Oudenrijn S, Bakker A Q, et al. C-type lectin-like molecule-1. *Cancer Res*, 2004, 64: 8443–8450
- 114 Tashiro H, Sauer T, Shum T, et al. Treatment of acute myeloid leukemia with T cells expressing chimeric antigen receptors directed to C-type Lectin-like molecule 1. *Mol Ther*, 2017, 25: 2202–2213
- 115 Wilkie S, van Schalkwyk M C I, Hobbs S, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J Clin Immunol*, 2012, 32: 1059–1070
- 116 Fedorov V D, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 215ra172–215ra172
- 117 Roybal K T, Rupp L J, Morsut L, et al. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits. *Cell*, 2016, 164: 770–779
- 118 Chinnasamy D, Yu Z, Kerkar S P, et al. Local delivery of Interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 1672–1683
- 119 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. *Blood*, 2012, 119: 4133–4141
- 120 Zhang Y, Zhang X, Cheng C, et al. CRISPR-Cas9 mediated LAG-3 disruption in CAR-T cells. *Front Med*, 2017, in press doi: 10.1007/s11684-017-0543-6
- 121 Lee D W, Kochenderfer J N, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 2015, 385: 517–528
- 122 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 Clin Investig*, 2016, 126: 2123–2138
- 123 Gardner R, Wu D, Cherian S, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*, 2016, 127: 2406–2410
- 124 Nirali N S, Maryalice S S, Constance M Y, et al. Minimal residual disease negative complete remissions following anti-CD22 chimeric antigen receptor (CAR) in children and young adults with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*, 2016, 123: 650
- 125 Ruella M, Maus M V. Catch me if you can: leukemia escape after CD19-directed T cell immunotherapies. *Comp Struct Biotech J*, 2016, 14: 357–362
- 126 Zah E, Lin M Y, Silva-Benedict A, et al. T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4: 498–508
- 127 Poirot L, Philip B, Schiffer-Mannioui C, et al. Multiplex genome-edited T-cell manufacturing platform for “off-the-shelf” adoptive T-cell immunotherapies. *Cancer Res*, 2015, 75: 3853–3864
- 128 Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med*, 2017, 9: eaaj2013
- 129 Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, 2017, 543: 113–117
- 130 Smith T T, Stephan S B, Moffett H F, et al. *In situ* programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers. *Nat Nanotech*, 2017, 12: 813–820

Recent advances in immunotherapy of acute leukemia via chimeric antigen receptor-engineered T cells

XU YingXi, WANG Min & WANG JianXiang

State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Chimeric antigen receptor-engineered T-cell (CAR-T) therapy is a type of adoptive cellular immunotherapy, in which T cells isolated from patients' or donors' peripheral blood mononuclear cells are genetically modified, expanded, and reinfused to patients. CAR-T therapy has resulted in encouraging outcomes in patients with B-cell malignancies and is currently being investigated for the treatment of other hematological malignancies. This review discusses the basic structure of CAR, the evolution of CAR structure, the advances in acute leukemia therapy, and the innovative strategies in CAR design and CAR-T production.

acute leukemia, chimeric antigen receptor-engineered T cells (CAR-T), immunotherapy

doi: [10.1360/N052017-00266](https://doi.org/10.1360/N052017-00266)