

CAR-T 细胞治疗产品非临床药效学研究关注点

侯田田, 黄瑛, 霍艳* (中国食品药品检定研究院, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176)

摘要: CAR-T细胞 (Chimeric Antigen Receptor T Cells, CAR-T) 是一种表达嵌合抗原受体的基因工程T细胞, 也称“活的药物”, 可以增强基因工程T细胞的特异性, 能够以MHC (主要组织相容性复合体, Major Histocompatibility Complex, MHC) 非依赖性的方式高度靶向肿瘤抗原, 是治疗肿瘤的一种新手段。最近, 临床上使用CAR-T细胞治疗复发、难治性血液恶性肿瘤和多发性骨髓瘤取得了很好的疗效; 同时, 采用CAR-T细胞治疗实体瘤的研发也在积极开展。根据所构建的CAR-T细胞不同的适应证和作用原理, 构建不同的动物肿瘤模型, 研究CAR-T细胞在动物模型的抗肿瘤活性, 可以对CAR-T细胞进行概念验证性研究并证明其体内药效学活性, 为临床研究提供有力的数据支持。

关键词: CAR-T 细胞; 药效学研究; 抗肿瘤活性; 毒性

中图分类号: R96 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)09-1232-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.09.013

Considerations of Non-clinical Pharmacodynamic Study of CAR-T Cell Therapy Products

Hou Tiantian, Huang Ying, Huo Yan* (Beijing Key Laboratory, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China)

Abstract: Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells are genetically engineered T cells that express chimeric antigen receptors, also known as “living drugs”. CAR-T cells can enhance the specificity of genetically engineered T cell, highly target tumor antigens in a major histocompatibility complex (MHC)-independent manner and provide a new approach to the treatment of tumors. Recently, clinical use of CAR-T cells for the treatment of relapsed, refractory hematological malignancies and multiple myeloma has achieved good results; at the same time, CAR-T cells can also be used to treat solid tumors. According to the different indications and mechanism of action of CAR-T cells, different animal tumor models were constructed to study the anti-tumor activities of CAR-T cells in animal models. Proof-of-concept studies could be carried out and in vivo pharmacodynamic activity could be confirmed so as to provide supportive data for clinical study of CAR-T cells.

Keywords: CAR-T cells; pharmacodynamic study; antitumor activity; toxicity

基金项目: 十二五国家科技重大专项“生物大分子药物特殊评价关键技术研究”(编号 2015ZX09501007-004); 中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金(编号 2015X1)

作者简介: 侯田田, 硕士, 主要从事细胞治疗产品临床前安全性评价研究; Tel: (010) 67872233 转 8219; E-mail: houtiantian@nifdc.org.cn

通信作者: 霍艳, 博士, 研究员, 主要从事药物临床前安全性评价研究; Tel: (010) 67872233 转 8001; E-mail: yanhuo@nifdc.org.cn

传统的放疗、化疗、手术、造血干细胞移植等治疗手段延长了部分肿瘤患者的生存时间，但是复发性、难治性肿瘤患者的生存率依然很低，且部分患者对标准治疗方法产生了耐药，其治疗面临巨大挑战，亟需开发新的治疗手段。2006年，研究者^[1]首次发表了基因修饰T细胞自体回输临床试验结果，同年，另一项研究报道了使用自体表达嵌合抗原受体T细胞（CAR-T细胞）治疗转移性卵巢癌的I期临床试验，该疗法取得了较好的结果^[2]。之后全世界范围内开展了CAR-T细胞针对不同靶点、不同肿瘤的多项临床试验。临床试验结果显示，抗CD19 CAR-T细胞对多种B细胞淋巴瘤有很强的抗肿瘤活性，包括弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡淋巴瘤、套细胞淋巴瘤等。CAR-T细胞疗法治疗血液系统疾病的巨大成功使得免疫疗法治疗肿瘤成为近年来的研究热点。

CAR-T细胞治疗产品对肿瘤的特异性杀伤是治疗肿瘤的基础，通过体内外非临床药效学研究可以初步探讨CAR-T细胞对靶细胞的特异性杀伤活性。体外研究主要评价CAR-T细胞与靶抗原的特异性结合及亲和力、靶抗原在组织中的表达分布、特异性杀伤活性、细胞因子分泌、CAR-T细胞增殖等。体内研究主要采用荷瘤鼠模型评价CAR-T细胞在体内的抗肿瘤活性，如肿瘤负荷清除情况及动物生存情况等^[3]。动物模型的选择、实验设计、检测方法等是评价CAR-T细胞抗肿瘤活性的关键点。本文简要论述CAR-T细胞体内药效学研究的关注点。

1 动物种属的选择

CAR-T细胞作为人源化细胞产品，进入体内会被免疫系统识别，出现异种物种间排斥，导致人源细胞被清除，因此，需要使用特殊的动物模型进行CAR-T细胞的研究。近几年，应用于CAR-T细胞产品研究的动物模型包括同源小鼠模型、转基因小鼠模型、移植瘤小鼠模型、免疫系统重建人源化小鼠模型及灵长类动物模型^[4-5]。上述动物模型各有优缺点，采用不同的模型进行不同目的和不同类型的非临床研究，可以获得更多的有效性信息。

同源小鼠模型和转基因小鼠模型具备完整的免疫系统，在已建立与人源肿瘤相匹配的鼠源肿瘤模型的基础上，可在一定程度上反映宿主对CAR-T细胞的免疫反应，这两种模型适合开展概

念验证性研究，其受试物均需要是鼠源产品。

移植瘤小鼠模型研究是目前常用的研究CAR-T细胞对肿瘤抑制作用的模型。正常啮齿类小鼠免疫系统对CAR-T细胞有排斥，若使用该类小鼠（如BALB/c等），在给予CAR-T细胞前，需要配合使用免疫抑制剂或者放射线照射，抑制小鼠体内正常的免疫系统，增加CAR-T细胞在体内的存活时间。在一项使用BALB/c小鼠的研究^[6]中，给药前13天小鼠腹腔注射150~200 mg·kg⁻¹的环磷酰胺，给药前12天尾静脉注射A20luc细胞，给药前1天6 Gy低剂量照射，随后尾静脉注射鼠源CAR-T细胞。随着免疫缺陷鼠的不断被研究和应用，使用免疫缺陷鼠构建小鼠移植瘤模型，逐渐成为研究CAR-T细胞效能的重要工具鼠。研究中用到过的免疫缺陷鼠有SCID-Beige小鼠^[7]、NOD/SCID小鼠^[8]、NSG小鼠^[9]等。其中，NSG小鼠为IL2rg基因敲除的重度免疫缺陷小鼠，体内缺乏成熟的T和B细胞，也无功能性NK细胞，细胞因子信号传递功能缺失，是目前国际公认的免疫缺陷程度最高的小鼠，对人源细胞和组织几乎没有排斥反应，是适合人源细胞或者组织移植的工具鼠。

免疫系统重建人源化小鼠通常是在对免疫缺陷鼠进行CAR-T细胞治疗前移植人CD34⁺造血干细胞/祖细胞（Human CD34⁺Hematopoietic Stem/Progenitor Cells, CD34⁺HSPCs）或者人源化组织构建而成^[10]。该动物模型能在动物体内相对精确地重建人的免疫系统，通过移植人源肿瘤细胞，能够很好地模拟人免疫系统与肿瘤的相互作用，在临床前CAR-T细胞抗肿瘤评价体系中具有独特优势。Oliveira等^[11]研究者使用3~7天新生NSG小鼠用1.50 Gy的亚致死剂量全身照射，第二天每只小鼠肝内注射3×10⁵脐带血来源的人CD34⁺细胞，建立人源化小鼠模型，并在人源化小鼠模型皮下注射1×10⁶Raji细胞，随后移植CAR-T细胞，通过测量肿瘤大小来评估CAR-T细胞对肿瘤的杀伤作用。2017年，美国FDA批准上市的诺华CAR-T细胞治疗产品，就是使用人免疫系统重建小鼠进行了CAR-T细胞毒性和生物分布的研究^[12]。

2 疾病动物模型的建立

根据研究靶点和CAR-T细胞治疗产品适应证的不同，可建立不同的动物疾病模型。血液系统肿瘤和实体瘤有不同的建立方法，使用的肿瘤细胞

系、注射的肿瘤细胞剂量、评价标准等各不相同。因此,在药效学评价中,也需要根据CAR-T细胞的适应证,选择合适的动物种属以及合适的肿瘤细胞系,建立评价针对不同细胞治疗产品的动物模型。对于人源的CAR-T细胞,需要使用人源肿瘤细胞建立肿瘤模型,同时,也可使用鼠源的肿瘤细胞来评价鼠源的CAR-T细胞^[6],以此来评价细胞产品对靶细胞的特异性杀伤作用。

血液系统恶性肿瘤主要包括急、慢性白血病,多发性骨髓瘤,淋巴瘤和骨髓异常综合征等^[13]。目前,对血液系统肿瘤的研究最为深入,开发出了多种治疗靶点。以下针对近几年研究较多的靶点,论述小鼠疾病模型的构建。

2.1 抗CD19 CAR-T细胞淋巴瘤及淋巴细胞白血病动物疾病模型

CD19抗原在B细胞和B细胞祖细胞表面高度表达,并且广泛表达于源于B细胞系的肿瘤细胞表面,包括大多数的淋巴瘤和淋巴细胞白血病,因此,大多数研发者将CD19抗原作为最初的研究靶点,已上市的2种CAR-T细胞产品均是靶向CD19抗原。其中诺华公司开展了CAR-T细胞抗肿瘤活性研究,研究中使用NOD-SCID- $\gamma_c^{-/-}$ 或NOD-SCID- $\beta_2^{-/-}$ 小鼠,静脉注射人ALL(急性淋巴细胞白血病)细胞,第35天注射表达不同CARs的T细胞,以研究4种CART-19受体结构的体内效能^[14]。B细胞淋巴细胞白血病和淋巴细胞瘤有多种细胞系,文献中常用的淋巴细胞白血病细胞系为Nalm-6^[15],常用的淋巴细胞瘤为Raji^[16-17]和Daudi^[8],但是建立小鼠疾病模型使用的肿瘤细胞剂量不固定,可通过实验自行摸索,文献中Raji细胞使用过的剂量有 5×10^4 细胞/只^[16]、 5×10^5 细胞/只^[17-20]、 2×10^5 细胞/只^[21]等,最常用的剂量为 5×10^5 细胞/只;Nalm-6细胞使用过的剂量有 1×10^6 细胞/只^[7,22-23]。建立该类小鼠模型,肿瘤细胞的注射方式并不固定,可通过尾静脉注射肿瘤细胞建立系统的肿瘤模型,也可通过腹腔注射,建立小鼠的局部肿瘤模型。Syam Tammana等人^[18]使用Daudi细胞腹腔注射G射线照射过的NOD/SCID小鼠,建立局部肿瘤模型,随后腹腔注射CAR-T细胞,研究中还采用Raji细胞尾静脉注射G射线照射过的NOD/SCID小鼠,建立系统肿瘤模型,尾静脉注射CAR-T细胞。两种小鼠模型主要是为了研究含有不同刺激因子的

CAR-T细胞的抗肿瘤效果。

2.2 抗B细胞成熟抗原(B Cell Maturation Antigen, BCMA) CAR-T细胞多发性骨髓瘤(Multiple Myeloma, MM)动物疾病模型

BCMA是一种包含多发性骨髓瘤细胞在内的B系细胞选择性表达的蛋白。近几年,随着CAR-T细胞免疫疗法的兴起,BCMA逐渐成为过继性治疗MM的热门靶点之一。Robert等^[24]使用流式细胞术、免疫组化等方法检测MM细胞和正常人组织中BCMA的表达,发现正常人组织并不能检测到BCMA蛋白,在此基础上,该研究团队构建了抗BCMA-CAR-T细胞,结果显示:抗BCMA-CAR转导的T细胞能够识别并杀死原发性MM细胞。经典的MM模型是Yaccoby等学者^[25]建立起来的SCID-hu MM小鼠,能够模拟MM的病理表现和临床症状,该模型是将人胎儿骨移植到小鼠皮下,4~5周后,将BCMA⁺细胞或者MM患者细胞注射到人骨中,使MM细胞在人骨中生长,直到采用活体成像的方法观察到或者ELISA方法检测到MM细胞。另有研究者探索多发性骨髓瘤小鼠皮下移植瘤模型的可行性^[26],Robert也使用NSG小鼠皮下注射RPMI8226细胞建立人多发性骨髓瘤荷瘤小鼠。但皮肤微环境与骨髓有很大的区别,故一项研究使用静脉注射OPM-2细胞建立MM模型,该模型细胞能够渗透到骨髓,同时也能更好地反映人骨髓瘤的发病机制^[27]。

2.3 针对CAR-T细胞的实体瘤动物模型

对于实体瘤,选择在肿瘤细胞高表达、正常细胞不表达或者少量表达的抗原,构建靶向于不同抗原的CAR-T细胞,如肺癌,目前已开展了抗表皮生长因子受体(EGFR) CAR-T细胞、抗人类表皮生长因子受体2 CAR-T细胞、抗间皮素CAR-T细胞和抗癌胚抗原CAR-T细胞等的研究和临床试验^[28]。建立实体瘤小鼠模型时可根据每种疾病的特点和针对的靶点,建立相对应的小鼠肿瘤模型。一项研究将肿瘤细胞混悬在生理盐水中,在C56BL/6小鼠麻醉状态下注射到小鼠肺部,建立原位小鼠肺癌模型^[29]。大部分的恶性肿瘤患者,在初次就诊时就发现有肿瘤转移,约30%~50%肿瘤转移到肺部,形成转移性肺癌。在一项抗EGFR CAR-T细胞体内抗肿瘤活性研究中,NOD/SCID小鼠通过静脉注射人非小细胞肺癌细胞系A549细胞建立肺转移

癌模型^[30]。贝勒医学院的细胞和基因治疗中心的研究人员开发了一种新型的CAR-T细胞,用来治疗胰腺癌,可以识别在胰腺肿瘤细胞表面过表达的PSCA、TGF和IL4抗原,从而能够很好地区分正常细胞和癌细胞,减少中靶/脱靶毒性。该研究团队,使CAPAN-1(胰腺癌细胞系)细胞分别表达PSCA和PSCA/TGF β /IL4,在NSG小鼠双侧皮下分别移植CAPAN-1 PSCA细胞和CAPAN-1 PSCA/IL4/TGF β 细胞,建立双侧肿瘤动物模型,当肿瘤体积达到80 mm³时,尾静脉注射GFP-firefly 荧光素酶标记的CAR-T细胞,通过测量肿瘤体积的大小来评估CAR-T细胞的抗肿瘤效应^[31]。由于实体瘤复杂的肿瘤微环境、免疫逃逸机制等因素, CAR-T细胞难以达到肿瘤组织,需要寻找肿瘤特异性靶点,以使CAR-T细胞精准靶向抗原,降低“脱靶效应”产生的几率。

3 CAR-T细胞药效学研究中的检测方法和检测指标

CAR-T细胞药效学研究使用的检测方法主要包括生物发光成像、流式细胞术等,并伴随相关毒性指标的检测。

3.1 生物发光成像

生物发光成像(Bioluminescent Imaging, BLI)是一种无创的成像方式,广泛应用于临床前分子和细胞的检测,例如基因的表达,蛋白质的相互作用,细胞的增殖、迁移、分化以及细胞在小动物体内的分布等^[32],能够实时地检测肿瘤细胞的迁移和扩增,同时也能够评价细胞治疗的毒性反应,是目前评价CAR-T细胞产品体内药效作用的主要技术之一,大多数药效学研究使用该方法^[9,15-18]。

BLI是生物体内荧光素在荧光素酶的作用下产生的可见光,许多低等动物拥有生物发光反应的能力(包括细菌、真菌等种属,以及萤火虫等昆虫)。萤火虫是最早被研究的生物发光物种,几十年前,McElmy等^[33]首次从北美萤火虫体内提纯荧光素酶,并且确定了其晶体结构。在自然界,荧光素酶是以D-荧光素(D-Luciferin)为天然底物。D-荧光素作为天然底物有着良好的溶解性、高效的反应速度和强烈的生物发光强度,是萤火虫生物发光体系中主要的工具药。

BLI因其高灵敏度、低背景荧光和非侵入性等特点,被广泛应用于疾病的监测,而萤火虫荧光素

酶基因通常作为报告基因用于动物肿瘤模型中。肿瘤细胞移植前,体外转染荧光素酶基因,从而使肿瘤细胞稳定表达荧光素酶,给予底物后,在ATP存在下,氧化荧光素,将化学能转化为光能,产生黄绿光,使用活体成像系统可检测到该黄绿光。

3.2 流式细胞术

除了BLI方法,还可使用流式细胞术检测组织中CAR-T细胞和肿瘤细胞在体内的数量。Haso等人在实验终点采用流式细胞术检测脾脏中CAR表达和肿瘤细胞,并在另一个并行的药效学研究中第12天检测荷瘤小鼠血液、骨髓和脾脏中的CAR表达^[34],同时可检测血液中CD45⁺CD8⁺细胞^[9]、血液中CD3⁺细胞^[22]以及血液、脾脏、肝脏、肺脏中的CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺细胞^[35]来代表人源T细胞在组织中的增殖和分布情况。也有研究者使用流式方法直接检测血液、骨髓和脾脏中的CAR-T细胞^[36-38]。但是由于目前CAR结构大部分为鼠源,使用该方法检测极易出现假阳性的结果,因此,通常使用流式方法检测带有标签的CAR-T细胞,如带有EGFR标签的CAR-T细胞等。

3.3 CAR-T细胞药效学研究中伴随的毒性检测指标

CAR-T细胞在靶点存在的情况下,能够迅速被活化,释放与效应相关的细胞因子,产生相应的毒性,因此,疾病模型更适合CAR-T细胞安全性评价,故通常会在药效学评价中增加相关毒性指标的监测。如体重(体重下降>10%呈现明显的毒性)、移植物抗宿主病(Graft-versus-host Disease, GVHD)以及脱毛、腹泻、活动减少等^[39-40];免疫毒性,使用流式细胞术、ELISA、MSD等免疫学方法检测血清中细胞因子(如IL-2、IL-10、TNF- α 、INF- γ 等^[35,41])的变化,也可间接反映药效学结果;常规药理学或病理学方法检测肿瘤相关参数(如瘤体积、瘤重、肿瘤发光信号等),病理学检查可反映CAR-T细胞对小鼠组织产生的毒性,确定其毒性靶器官。

4 CAR-T细胞药效学研究的试验设计

CAR-T细胞药效学研究要包含对照组和CAR-T细胞不同的剂量组别以体现量效关系。一般需要包括非治疗组即溶媒组作为对照组^[25],对比给药组的荧光强度和/或动物的中位生存期来证明CAR-T细胞的有效性。因未转染CAR的T细胞也可能存在对肿瘤细胞的非特异性杀伤作用,故除了

溶媒对照外,需设置T细胞对照组(未转导CAR的T细胞^[42]、模拟转导的T细胞^[14]或者半抗原特异性CAR-T细胞)。药效学研究的剂量设计,可通过预试验来确定最低有效剂量和最高给药剂量。通常将临床的等效剂量作为小鼠给药的最低剂量,中、高剂量组可分别为等效剂量的2倍/2.5倍、5倍/10倍或者更高倍数,但是由于试验中以CAR-T细胞数为给药标准,因此,CAR-T细胞阳性率不同,给药总细胞数也不同,当阳性率较低时,给药总细胞数就会高,此时就要考虑动物的耐受能力,防止动物出现肺栓塞等问题。此外,建议设置不接种肿瘤的溶媒对照组以便于结果分析。研究中可增加或者设置卫星组用于细胞药代动力学(分布、迁移、归巢及其存续和消亡特性)、细胞因子的检测以及其它一些毒性指标的监测。

5 结语

经过二十多年的临床前和临床研究,CAR-T细胞治疗技术的安全性和可行性已经基本确定,其对多种血液肿瘤显示了非常好的临床效果,对实体瘤治疗也表现出了非常大的潜力。非临床动物药效学研究是开展临床试验的基础,对CAR-T细胞结构、制备工艺、靶点等的研究,都需要在荷瘤小鼠体内进行验证性的CAR-T细胞的效能研究。但是,目前所有的非临床动物模型尚不能完全精准地反映人体中CAR-T细胞与肿瘤细胞、与正常细胞、与免疫系统的相互作用。因此,在进行药效学研究时,应尽可能选择最适合的动物模型,并使用正确的检测方法,保证实验结果的准确性。随着CAR-T细胞研发工作的不断深入,CAR-T细胞非临床动物实验研究方法将逐步完善,检测手段也将不断进步,非临床研究也将会为临床试验提供更多有价值的参考数据。

参考文献:

- [1] Lamers C H J, Sleijfer S, Vulto A G, et al. Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With Autologous T-Lymphocytes Genetically Retargeted Against Carbonic Anhydrase IX: First Clinical Experience[J]. *Journal of Clinical Oncology Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2006, 24 (13): 20-22.
- [2] 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[J]. *Clinical Cancer Research*, 2006, 12 (20 Pt 1): 6106-6115.
- [3] 国家食品药品监督管理局审评中心. 当前对CAR-T类产品非临床研究与评价的一些考虑 [EB/OL]. (2018-03-15) [2018-08-15]. <http://www.cde.org.cn/dzkw.do?method=largePage&id=314391>.
- [4] Siegler E L, Wang P. Preclinical Models in Chimeric Antigen Receptor-Engineered T-Cell Therapy[J]. *Human Gene Therapy*, 2018, 29 (5): 534-546.
- [5] Wegner A. Chimeric Antigen Receptor T Cells for the Treatment of Cancer and the Future of Preclinical Models for Predicting Their Toxicities[J]. *Immunotherapy*, 2017, 9 (8): 669-680.
- [6] Cheadle E J, Hawkins R E, Batha H, et al. Natural Expression of the CD19 Antigen Impacts the Long-term Engraftment But Not Antitumor Activity of CD19-specific Engineered T Cells[J]. *Journal of Immunology*, 2010, 184 (4): 1885.
- [7] Brentjens R J, Santos E, Nikhamin Y, et al. Genetically Targeted T Cells Eradicate Systemic Acute Lymphoblastic Leukemia Xenografts[J]. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13 (1): 5426-5435.
- [8] Cooper LJ, Al-Kadhimi Z, Serrano LM, et al. Enhanced Antilymphoma Efficacy of CD19-redirected Influenza MP1-specific CTLs by Cotransfer of T Cells Modified to Present Influenza MP1. *Blood*[J]. *Blood*, 2005, 105 (4): 1622.
- [9] Daniel S, Michael H, Kosasih P L, et al. Chimeric Antigen Receptor-modified T Cells Derived from Defined CD8+and CD4+subsets Confer Superior Antitumor Reactivity in Vivo[J]. *Leukemia*, 2016, 30 (2): 492-500.
- [10] Shultz L D, Brehm M A, Garcia-Martinez J V, et al. Humanized Mice for Immune System Investigation: Progress, Promise and Challenges[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2012, 12 (11): 786-98.
- [11] Oliveira S N D, 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]. *Human Gene Therapy*, 2013, 24 (10): 824-839.
- [12] Norvatis. Primary Discipline Memo-KYMRIAH[EB/OL]. [2018-08-15]. <https://www.fda.gov/>

- BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/ucm573706.htm.
- [13] 庄蕊萌, 程坚. 嵌合抗原受体T细胞应用进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, (6): 1829-1832.
- [14] 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[J]. *Molecular Therapy*, 2009, 17 (8): 1453-1464.
- [15] Pegram H J, Purdon T J, van Leeuwen D G, et al. IL-12-secreting CD19-targeted Cord Blood-derived T Cells for the Immunotherapy of B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia[J]. *Leukemia*, 2015, 29 (2): 415-422.
- [16] Tsukahara T, Ohmine K, Yamamoto C, et al. CD19 Target-engineered T-cells Accumulate at Tumor Lesions in Human B-cell Lymphoma Xenograft Mouse Models[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2013, 438 (1): 84-89.
- [17] Budde L E, Berger C, Lin Y, et al. Combining a CD20 Chimeric Antigen Receptor and an Inducible Caspase 9 Suicide Switch to Improve the Efficacy and Safety of T Cell Adoptive Immunotherapy for Lymphoma[J]. *Plos One*, 2013, 8 (12): e82742-e82742.
- [18] Tammana S, Xin H, Wong M, et al. 4-1BB and CD28 Signaling Plays a Synergistic Role in Redirecting Umbilical Cord Blood T Cells Against B-Cell Malignancies[J]. *Human Gene Therapy*, 2010, 21 (1): 75-86.
- [19] Brentjens R J, Latouche J B, Santos E, et al. Eradication of Systemic B-cell Tumors by Genetically Targeted Human T Lymphocytes Co-stimulated by CD80 and Interleukin-15[J]. *Nature Medicine*, 2003, 9 (3): 279-286.
- [20] Sommermeyer D, Hill T, Shamah S M, et al. Fully Human CD19-specific Chimeric Antigen Receptors for T-cell Therapy[J]. *Leukemia*, 2017, 31 (10): 2191-2199.
- [21] Macleod D T, Antony J, Martin A J, et al. Integration of a CD19 CAR into the TCR Alpha Chain Locus Streamlines Production of Allogeneic Gene-Edited CAR T Cells[J]. *Molecular Therapy*, 2017, 25 (4): 949.
- [22] Fraietta J A, Beckwith K A, Patel P R, et al. Ibrutinib Enhances Chimeric Antigen Receptor T-cell Engraftment and Efficacy in Leukemia[J]. *Blood*, 2016, 127 (9): 1117-1127.
- [23] Liu X, Barrett D M, Jiang S, et al. Improved Anti-leukemia Activities of Adoptively Transferred T Cells Expressing Bispecific T-cell Engager in Mice[J]. *Blood Cancer Journal*, 2016, 6 (6): e430.
- [24] Carpenter R O, Evbuomwan M O, Pittaluga S, et al. B-cell Maturation Antigen Is a Promising Target for Adoptive T-cell Therapy of Multiple Myeloma[J]. *Clinical Cancer Research*, 2013, 19 (8): 2048-2060.
- [25] Yacoby S, Barlogie B, Epstein J. Primary Myeloma Cells Growing in SCID-hu Mice: a Model for Studying the Biology and Treatment of Myeloma and Its Manifestations[J]. *Blood*, 1998, 92 (8): 2908-2913.
- [26] 林美桂, 梁碧容, 古月瑜, 等. 人多发性骨髓瘤裸鼠皮下移植瘤模型的建立[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2012, 22 (5): 265-268.
- [27] Ramadoss N S, Schulman A D, Choi S, et al. An Anti-B Cell Maturation Antigen Bispecific Antibody for Multiple Myeloma[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137 (16): 5288-5291.
- [28] 简艳, 余妍, 刘强, 等. 嵌合抗原受体修饰T细胞在肺癌治疗中的研究进展[J]. *南昌大学学报: 医学版*, 2017, 57 (4): 92-95.
- [29] Andersson A, Srivastava M K, Harriswhite M, et al. Role of CXCR3 Ligands in IL-7/IL-7R Alpha-Fc-mediated Antitumor Activity in Lung Cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17 (11): 3660-3672.
- [30] Zhou X, Li J, Wang Z, et al. Cellular Immunotherapy for Carcinoma Using Genetically Modified EGFR-Specific T Lymphocytes[J]. *Neoplasia*, 2013, 15 (5): 544.
- [31] S. Sukumaran, N. Watanabe, Enhancing the Potency and Specificity of Engineered T Cells for Cancer Treatment[J]. *Cancer Discovery*, 2018, 8 (8): 972-987
- [32] Mezzanotte L, Van ' R M, Karatas H, et al. In Vivo Molecular Bioluminescence Imaging: New Tools and Applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2017, 35 (7): 640-652.
- [33] Bitler B, Mcelroy W D. The Preparation and Properties of Crystalline Firefly Luciferin[J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1957, 72 (2): 358-368.
- [34] Haso W, Lee D W, Shah N N, et al. Anti-CD22-chimeric Antigen Receptors Targeting B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia[J]. *Blood*, 2013, 121 (7): 1165-1174.

- [35] Rodgers D T, Mazagova M, Hampton E N, et al. Switch-mediated Activation and Retargeting of CAR-T Cells for B-cell Malignancies[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113 (4) : E459.
- [36] Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih P L, et al. The Non-signaling Extracellular Spacer Domain of Chimeric Antigen Receptors is Decisive for in Vivo Antitumor Activity[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3 (2) : 2227-2232.
- [37] Hudecek M, Lupo-Stanghellini MT, Kosasih PL, et al. Receptor Affinity and Extracellular Domain Modifications Affect Tumor Recognition by ROR1-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells[J]. *Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2013, 19 (12) : 3153-3164.
- [38] Eyquem J, Mansillasoto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC Locus with CRISPR/Cas9 Enhances Tumour Rejection[J]. *Nature*, 2017, 543 (7643) : 113.
- [39] Barrett D M, Liu X, Jiang S, et al. Regimen-Specific Effects of RNA-Modified Chimeric Antigen Receptor T Cells in Mice with Advanced Leukemia[J]. *Human Gene Therapy*, 2013, 24 (8) : 717-727.
- [40] Barrett D M, Singh N, Liu X, et al. Relation of Clinical Culture Method to T-cell Memory Status and Efficacy in Xenograft Models of Adoptive Immunotherapy[J]. *Cytotherapy*, 2014, 16 (5) : 619-630.
- [41] Almåsbak 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[J]. *Gene Therapy*, 2015, 22 (5) : 391-403.
- [42] Qian L, Li D, Ma L, et al. The Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Humanized scFv (single-chain variable fragment) Trigger Leukemia Cell Killing[J]. *Cellular Immunology*, 2016, 304-305: 49-54.

(收稿日期 2018年8月20日 编辑 王雅雯)