

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.04.003

· 基础研究(专题) ·

EGFRvIII/CAR-T对EGFRvIII⁺U87胶质瘤细胞和裸鼠移植瘤的特异性杀伤作用

郑岩, 谢甲贝[△], 曹名波, 张炳勇, 李修岭, 韩双印(郑州大学人民医院干细胞研究中心, 河南 郑州 450003)

[摘要] **目的:** 制备靶向EGFRvIII的第三代CAR-T(EGFRvIII/3CAR-T), 检测其在体外和体内对EGFRvIII⁺ U87胶质瘤细胞的特异性杀伤效应。**方法:** 用磷酸钙沉淀法将三质粒共转染HEK293T细胞包装EGFRvIII/3CAR慢病毒(LV-EGFRvIII/3CAR), 感染健康人CD3⁺T细胞, Western blotting和流式细胞术检测T细胞中EGFRvIII/3CAR的表达水平, ⁵¹Cr释放法检测EGFRvIII/3CAR-T对EGFRvIII⁺ U87细胞的体外杀伤效应, ELISA法检测EGFRvIII/3CAR⁺ T的IFN- γ 分泌水平。构建裸鼠异种胶质瘤移植模型, 检测EGFRvIII/3CAR-T对移植瘤的体内杀伤活性。**结果:** EGFRvIII/3CAR慢病毒包装成功, 滴度值为 5×10^6 TU/ml。Western blotting在相对分子质量58 000处检测到EGFRvIII/3CAR表达, 未转导组无相同分子量蛋白表达。流式细胞术检测结果显示EGFRvIII/3CAR转导效率平均为52.3%, ⁵¹Cr释放法检测EGFRvIII/3CAR-T特异性杀伤作用与E:T值(E:T为4:1、8:1、16:1、32:1)呈正比关系。ELISA法检测到细胞因子IFN- γ 分泌量为(1 836 \pm 148.2) pg/ml, 与NT T和GFP⁺ T细胞相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。EGFRvIII/3CAR⁺ T细胞的特异性杀伤活性及IFN- γ 分泌均依赖于EGFRvIII在U87细胞中的表达水平。体内肿瘤生长检测结果显示, 注射后3周EGFRvIII/3CAR⁺ T组肿瘤体积较GFP⁺ T细胞和PBS组差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论:** EGFRvIII/3CAR-T在体外和体内均能发挥靶向杀伤EGFRvIII⁺脑胶质瘤细胞的作用, 为后续临床试验提供依据。

[关键词] EGFRvIII; 嵌合抗原受体; 胶质瘤; U87细胞; 免疫治疗

[中图分类号] R739.41; Q785; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)04-0334-06

Specific cytotoxicity of EGFRvIII oriented chimeric antigen receptor-engineered T cells on EGFRvIII⁺ glioma U87 cells and the transplanted tumor in nude mice

ZHENG Yan, XIE Jiabei[△], CAO Mingbo, ZHANG Bingyong, LI Xiuling, HAN Shuangyin (Stem Cell Research Center, People's Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare the third generation CAR-T cells targeting EGFRvIII (EGFRvIII CAR-T) and to detect its specific killing effect against EGFRvIII⁺ U87 cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** Human CD3⁺ T cells were transfected with lentiviral EGFRvIII/3CAR, which was generated by calcium phosphate co-precipitation of three plasmids. The expression of EGFRvIII/3CAR in T cells was detected by Western blotting and flow cytometry. *In vitro* killing effect of EGFRvIII/3CAR-T cells on EGFRvIII⁺ U87 cells was detected by ⁵¹Cr release assay. The secretion of cytokine IFN- γ of EGFRvIII/3CAR-T cells was detected by ELISA. Nude mouse xenograft model was constructed to detect the *in vivo* cytotoxicity of EGFRvIII/3CAR-T cells on xenograft tumor. **Results:** The EGFRvIII/3CAR lentivirus was successfully packaged with an average titer of 5×10^6 TU/ml. Western blotting showed that a protein band of approximate 58 000 molecular weight was observed in EGFRvIII/3CAR-T cells but absent in untransfected T cells. Flow cytometry indicated the average transduction efficiency of EGFRvIII/3CAR was 52.3%. ⁵¹Cr release assay showed that the specific killing effect of EGFRvIII/3CAR-T cells was positively correlated with E/T ratio (E:T=4:1, 8:1, 16:1, 32:1). ELISA showed that cytokine IFN- γ secretion was (1 836 \pm 148.2) pg/ml, which was significantly different from that of NT T and GFP⁺ T cells ($P < 0.01$). The specific killing activity of EGFRvIII/3CAR-T cells and IFN- γ secretion were both dependent on the expression level of EGFRvIII in U87 cells. The tumor growth

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81372405, No.81772670)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81372405, No. 81772670)

[作者简介] 郑岩(1989-), 男, 博士生, 主要从事肿瘤免疫治疗的基础研究, E-mail: zzdxy89@163.com; 谢甲贝(1984-), 男, 主治医师, 主要从事肿瘤免疫治疗的临床研究, E-mail: jiabei924@163.com。△为共同第一作者

[通信作者] 韩双印(HAN Shuangyin, corresponding author), 博士, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫治疗的基础和临床研究, E-mail: hansyzzu@163.com

monitoring results showed that the tumor volume of EGFRvIII/3CAR-T cell group was significantly different from that of GFP⁺ T cell group and PBS group around 3 weeks after injection ($P < 0.01$). **Conclusion:** EGFRvIII/3CAR-T cells demonstrated specific antitumor effect against EGFRvIII⁺ U87 cells both *in vitro* and *in vivo*, providing basis for immunotherapy of glioma in future clinical use.

[Key words] EGFRvIII; chimeric antigen receptor; glioma; U87 cell; immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(4): 334-339. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.04.003]

嵌合抗原受体修饰T细胞(chimeric antigen receptor engineered T cells, CAR-T)是一种新兴的肿瘤免疫治疗技术,展现出良好的靶向性、杀伤性、持久性^[1]。靶向CD19的CAR-T在B细胞恶性肿瘤中表现出显著的抗肿瘤活性,取得了惊人的治疗效果^[2-3]。CAR-T治疗在血液肿瘤中的成功激励着研究者在实体瘤治疗中积极探索^[4-6]。表皮生长因子受体III型突变体(EGFRvIII)由EGFR胞外段外显子2~7缺失突变产生,是脑胶质瘤和其他恶性肿瘤中表达率很高的肿瘤特异性抗原,是肿瘤治疗的理想靶点^[7]。近期一项靶向EGFRvIII的脑成胶质细胞瘤I期研究^[8]中,CAR-T治疗展现出良好的耐受性和安全性,值得进一步探讨。本研究基于课题组前期构建的第三代嵌合抗原受体EGFRvIII scFv-CD28-CD137-CD3 ζ 表达载体^[9],利用慢病毒修饰T淋巴细胞制备EGFRvIII CAR-T,观察其对脑成胶质细胞瘤U87细胞和裸鼠移植瘤的作用,为靶向EGFRvIII的CAR-T的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

人神经胶质瘤细胞系U87、HEK293T细胞、EGFRvIII⁺U87细胞株(Neomycin抗性,由作者建立于斯坦福大学Albert Wong教授实验室^[10])均由本实验室保存。6周龄雌性BALB/cA裸鼠购自中国科学院上海实验动物中心(实验动物合格证号:SCXK20160011)。Ficoll淋巴细胞分离液购自Solarbio公司,CD3MicroBeads购自Miltenyi Biotec公司,CD3/CD28 Dynabeads购自Life Technologies公司。PVDF膜购自Millipore公司,PE标记的抗鼠IgG F(ab)₂抗体购自eBioscience公司,鼠抗人CD3 ζ 抗体、HRP标记的羊抗鼠IgG抗体均购自Santa Cruz公司。ECL发光试剂盒购自碧云天公司。p24 ELISA试剂盒购自Cell Biolabs公司,ELISA试剂盒购自R&D公司。

1.2 EGFRvIII/3CAR慢病毒包装及T淋巴细胞转导

EGFRvIII scFv从课题组前期制备的EGFRvIII特异性重组抗体中分离,该抗体对EGFRvIII肽的亲合力为 $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ^[10]。EGFRvIII scFv-CD28-CD137-CD3 ζ 表达载体(pCDH-EGFRvIII/3CAR)前期已成功构建。三质粒系统(pVSV-G, pCMV-dR8.9和pCDH-

EGFRvIII/3CAR)用磷酸钙沉淀法共转染HEK293T细胞。48 h后收集上清过滤,浓缩后用p24 ELISA试剂盒检测病毒滴度。采集健康人外周血10 ml, Ficoll分离外周血单个核细胞(PBMC), CD3MicroBeads分选CD3⁺T细胞, CD3/CD28 Dynabeads激活T细胞(磁珠:细胞=1:1)。激活后第二天以MOI为5的EGFRvIII/3CAR慢病毒感染CD3⁺T细胞。IL-2(30 units/ml)存在下扩增14 d,用于后续实验。

1.3 Western blotting、流式细胞术检测CD3⁺T细胞表达EGFRvIII/3CAR的水平

Western blotting: LV-EGFRvIII/3CAR感染CD3⁺T细胞48 h后收集并裂解细胞,加热变性、离心取上清、8%SDS-PAGE、电转移至PVDF膜,鼠抗人CD3 ζ (1:1 000)为一抗、羊抗鼠IgG/HRP(1:5 000)为二抗,ECL化学发光法显色。对照组为未转染T淋巴细胞。

流式细胞术:收集 3×10^5 个细胞,PBS洗涤后加入PE标记的抗鼠IgG F(ab)₂抗体2 μl ,室温避光孵育20 min。PBS洗涤,重悬于500 μl FACS缓冲液上机检测。每个流式直方图至少包含10 000个事件数。未转染T淋巴细胞用于设门。

1.4 ⁵¹Cr释放法检测EGFRvIII/3CAR-T对U87细胞的靶向杀伤活性

0.1 m Ci(3.7 MBq)⁵¹Cr标记 1×10^6 个靶细胞、以效应细胞:靶细胞(E:T)为4:1、8:1、16:1和32:1的比例混合。孵育4 h后,收集上清液,WIZARD2 γ 计数器(PerkinElmer)测cpm值。根据以下公式计算特异性裂解百分比:(实验组cpm-自发释放组cpm)/(最大释放组cpm-自发释放组cpm) $\times 100\%$ 。效应细胞的对照设为GFP⁺T细胞和未转导(NT)T细胞。以EGFRvIII阴性U87细胞为对照。

1.5 ELISA法检测EGFRvIII/3CAR-T的IFN- γ 分泌水平

效应细胞与靶细胞按E:T=8:1在96孔板中共培养,24 h后,使用ELISA试剂盒测定上清液的IFN- γ 分泌量。对照组与上述细胞毒性测定相同。

1.6 动物实验检测EGFRvIII/3CAR-T对EGFRvIII⁺U87细胞裸鼠移植瘤的体内杀伤作用

6周龄雌性BALB/cA裸鼠皮下接种 5×10^6 个EGFRvIII⁺U87细胞,建立异种肿瘤移植裸鼠模型。在肿瘤细胞接种后约10~14 d肿瘤负荷达到约500 mm³时,将小鼠分为3组(每组4只),尾静脉注射不同

T 细胞 1×10^7 个/100 μl (EGFRvIII/3CAR-T 或 GFP⁺ T 细胞) 和对照 PBS。随后通过卡尺测量肿瘤生长, 并使用公式: $1/2 \times \text{长} \times (\text{宽})^2$ 计算肿瘤体积。动物实验方案通过郑州大学生物医学研究伦理审查。

1.7 统计学处理

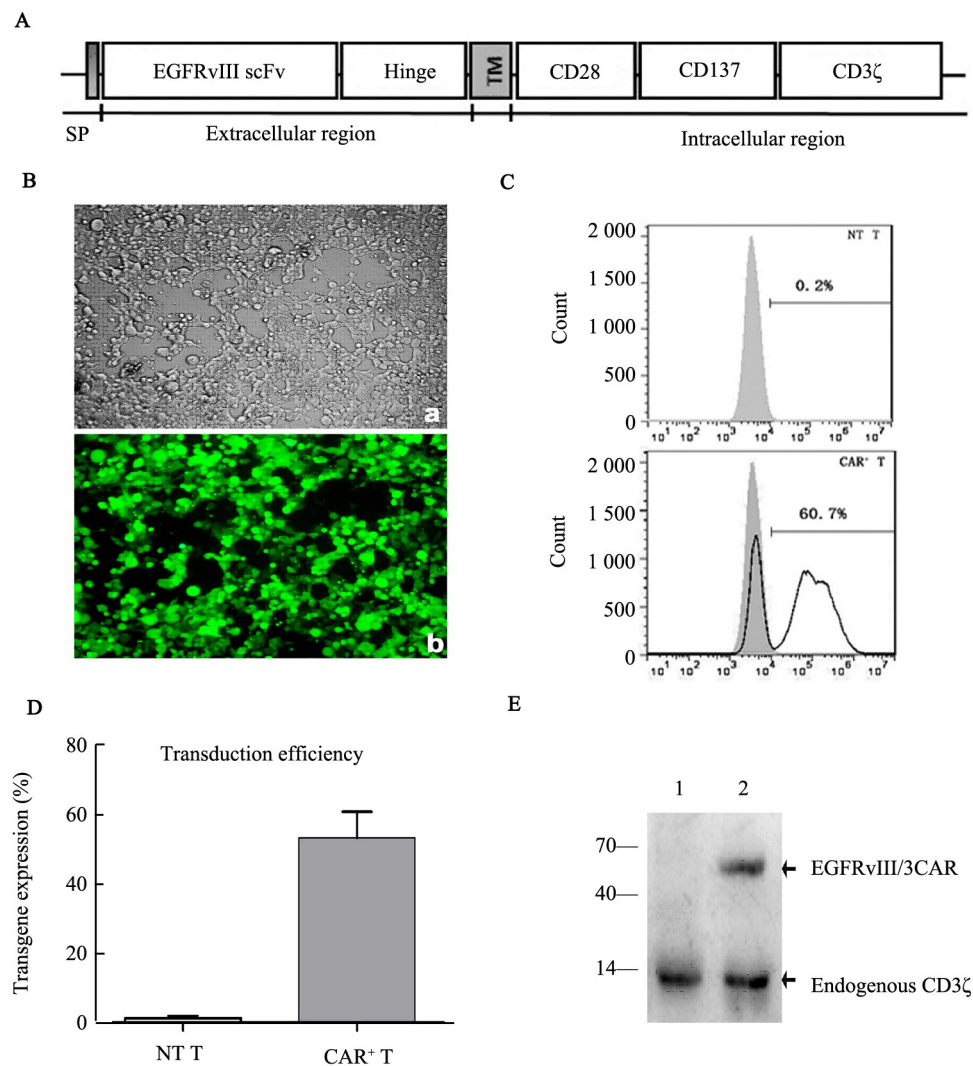
采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LV-EGFRvIII/3CAR 慢病毒包装及感染效率检测

EGFRvIII/3CAR 表达载体前期已构建, 结构如图 1A 所示: 由 EGFRvIIIscFv (726 bp)、铰链区和穿膜区

(213 bp)、CD28 (123 bp)、CD137 胞内信号区 (126 bp), CD3 ζ 链 (336 bp) 组成。三质粒 (pCDH-EGFRvIII/3CAR、pVSV-G、pDel8.9) 用磷酸钙沉淀法共转染 HEK293T 细胞包装病毒。72 h 后见大量荧光, 绿色荧光细胞达 95% 以上 (图 1B), 说明病毒包装效率较高。p24 ELISA 试剂盒测病毒滴度, 结果为 $(2 \sim 8) \times 10^6$ TU/ml。流式细胞术检测 CAR 的转染效率可达 60% 以上 (图 1C), 平均转染效率为 52.3% (图 1D)。Western blotting 检测结果 (图 1E) 显示, EGFRvIII/3CAR 转染的 T 细胞检测到相对分子质量约 58 000 的蛋白表达 (图 1E 泳道 2), 与计算的相对分子质量一致, 空白对照未检测到此蛋白表达 (图 1E 泳道 1), 表明嵌合抗原受体 EGFRvIII/3CAR 在 T 淋巴细胞表面成功表达。



A: Schematic representation of EGFRvIII/3CAR construction; B: The GFP expression in HEK293T cells. a, White light; b, Fluorescent light; C, D: Transduction efficiency of T cells was measured by flow cytometry; E: EGFRvIII/3CAR expression in T cells was detected by Western blotting. 1, Nontransduced T cells (NT T); 2, Transduced T cells

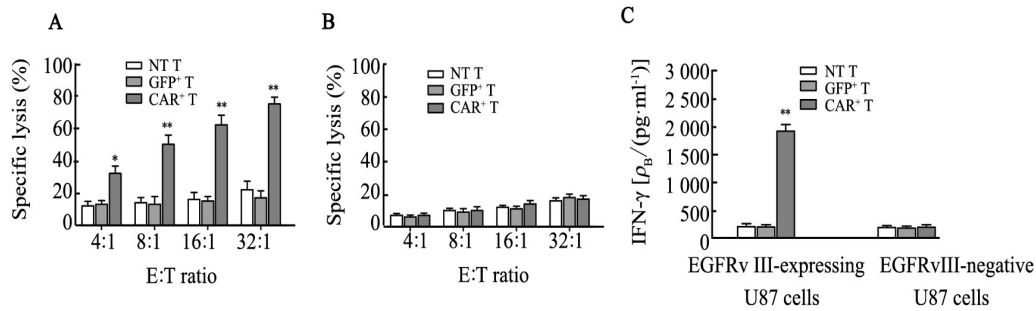
图1 成功构建表达EGFRvIII/3CAR的CD3⁺T细胞

Fig.1 CD3⁺ T cells expressing EGFRvIII/3CAR were successfully constructed

2.2 EGFRvIII/3CAR-T体外靶向杀伤EGFRvIII⁺U87细胞

效应细胞与靶细胞共培养4 h后,检测效靶比为4:1、8:1、16:1、32:1时,EGFRvIII/3CAR-T对EGFRvIII阳性或阴性U87细胞的杀伤作用。结果(图2A)显示,EGFRvIII/3CAR-T对EGFRvIII⁺U87细胞的细胞毒性随E:T比例增加而增加,在E:T比例为4:1时,EGFRvIII/3CAR-T的特异性杀伤能力与GFP⁺T或

NT T细胞对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),在E:T比例为8:1、16:1、32:1时,EGFRvIII/3CAR-T的特异性杀伤能力与GFP⁺T或NT T细胞对照组比较差异显著($P<0.01$,图2A,左),且E:T比例为8:1时,杀伤活性超过50%。相比之下,3个不同组的T细胞与EGFRvIII⁻U87细胞共培养时没有发现明显的杀伤活性(图2A,右)。证明EGFRvIII/3CAR-T对表达EGFRvIII⁺U87细胞杀伤的特异性和有效性。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs GFP⁺T or NT T group

A: Target killing activity of EGFRvIII/3CAR-T cells on EGFRvIII⁺ U87 cells; B: Target killing activity of EGFRvIII/3CAR-T cells on EGFRvIII⁻ U87 cells; C: EGFRvIII/3CAR-T cells improved IFN- γ secretion of EGFRvIII⁺ U87 cells

图2 EGFRvIII/3CAR-T靶向杀伤活性分析

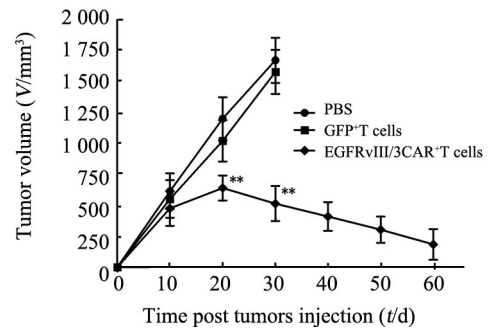
Fig.2 Target killing activity analysis of EGFRvIII/3CAR-T

2.3 EGFRvIII/3CAR-T促进EGFRvIII⁺U87细胞IFN- γ 分泌

为了检测EGFRvIII/3CAR-T能否识别EGFRvIII⁺U87细胞并获得效应细胞功能,ELISA法检测培养上清中IFN- γ 含量。结果(图2B)显示,EGFRvIII/3CAR-T与EGFRvIII⁺U87细胞共培养48 h后,IFN- γ 释放量为(1 836 \pm 148.2)pg/ml,显著高于GFP⁺T和NT T细胞组(均 $P<0.01$)。IFN- γ 释放在EGFRvIII⁻U87细胞组保持不变,表明EGFRvIII/3CAR-T以EGFRvIII依赖的方式发挥效应细胞功能。

2.4 EGFRvIII/3CAR-T抑制EGFRvIII⁺U87细胞裸鼠移植瘤的生长

采用BALB/cA裸鼠皮下接种EGFRvIII⁺U87细胞建立异种肿瘤移植模型,裸鼠分别注射 1×10^7 EGFRvIII/3CAR-T、GFP⁺T细胞和PBS。接受EGFRvIII/3CAR-T的小鼠在注射3周后肿瘤生长受到抑制,而其他两组的肿瘤继续生长,根据动物伦理要求,小鼠肿瘤体积大于1 500 mm³时处死。肿瘤生长曲线结果显示,EGFRvIII/3CAR-T组与对照组之间差异有显著统计学意义($P<0.01$,图3),证实了EGFRvIII/3CAR-T在体内能够发挥抗肿瘤作用。同时,排除了EGFRvIII/3CAR-T的抗肿瘤作用是由于其同种异体作用引起的,因为接种的GFP⁺T细胞对肿瘤生长没有显示任何明显作用。



** $P<0.01$ vs GFP⁺T or NT T group

图3 EGFRvIII/3CAR-T显著抑制裸鼠移植瘤的生长
Fig.3 EGFRvIII/3CAR-T significantly inhibited the growth of nude mice transplantation tumors in vivo

3 讨论

过继性细胞治疗(adoptive cell therapy, ACT)是肿瘤治疗研究的重点之一,近年以CAR修饰T细胞为代表的免疫治疗新策略受到了国内外的广泛关注^[11-12]。CAR将识别肿瘤相关抗原的单链抗体和T细胞的免疫活化基序相结合,通过基因转导赋予T细胞非MHC依赖的肿瘤靶向杀伤能力。目前CAR-T治疗主要应用于血液系统肿瘤,取得了令人振奋的临床疗效,在实体瘤治疗方面也不断取得进展^[13-15]。

EGFRvIII是成胶质细胞瘤中最常见的突变,与其恶性表型高度相关。作为肿瘤特异性抗原和理想的分子靶点,多种靶向EGFRvIII的免疫疗法已经在临床前和临床中展开,如多肽疫苗、树突状细胞疫苗、治疗性抗体、CAR-T等,其中EGFRvIII CAR-T细胞备受瞩目,包括本课题组在内的国内外多项研究结果表明,靶向EGFRvIII CAR-T具有特异性杀伤胶质瘤细胞的作用,是实现肿瘤长期抑制和脑成胶质细胞瘤死亡率降低最有前景的治疗方法之一^[16-19]。

CAR的功效可能受到许多因素影响,包括scFv亲和力、铰链区长度、胞内信号域等。近年来研究者通过增加引入CAR结构中刺激分子的数量及种类来增强CAR-T的抗肿瘤能力。研究^[20-23]显示,引入双共刺激分子(CD28、CD137、ICOS)的第三代CAR能进一步提高T细胞毒性,加快增殖和延长存活时间。本研究以前期构建的第三代EGFRvIII CAR为基础,制备EGFRvIII/3CAR-T,⁵¹Cr释放试验显示EGFRvIII/3CAR-T能够特异性杀伤EGFRvIII阳性脑胶质瘤细胞,随着效靶比的增加,杀伤能力增强。ELISA检测到显著的细胞因子IFN- γ 分泌。裸鼠胶质瘤移植模型显示EGFRvIII/3CAR-T具有明显的体内抗肿瘤活性,实验组裸鼠观察2个月余仍带瘤生存,对照组小鼠瘤体生长迅速予以处死。本研究表明,增加共刺激分子CD28和CD137提高了CAR-T杀伤恶性脑胶质瘤细胞的有效性。

基于CAR的免疫治疗在很大程度上取决于有效的T细胞基因转导。CAR-T治疗的大多数研究使用逆转录病毒或慢病毒将目的基因导入T细胞中。与逆转录病毒载体相比,慢病毒在转导非分裂细胞、承载目的基因能力以及降低对转导基因沉默的易感性方面具有优势^[24]。本研究采用慢病毒感染T淋巴细胞,流式细胞术检测转导效率可达60%以上,Western blotting检测显示在相对分子质量为58 000处有明显特异性条带出现,说明CAR分子已表达于T淋巴细胞表面。

综上,本研究通过慢病毒转导方法,成功制备靶向EGFRvIII的第三代CAR-T,体外和体内验证其抗胶质瘤的特异性和有效性,为后续靶向EGFRvIII CAR-T的临床应用奠定基础。

[参考文献]

- [1] FESNAK A D, JUNE C H, LEVINE B L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(9): 566-581. DOI: 10.1038/nrc.2016.97.
- [2] 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[J]. *Lancet*, 2015, 385(9967): 517-528. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
- [3] PARK J H, GEYER M B, BRENTJENS R J. CD19-targeted CAR-T cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date[J]. *Blood*, 2016, 127(26): 3312-3320. DOI: 10.1182/blood-2016-02-629063.
- [4] MARDIRO S 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[J]. *Blood*, 2013, 122(18): 3138-3148. DOI: 10.1182/blood-2012-12-474056.
- [5] AHMED N, BRAWLEY V S, HEGDE M, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(15): 1688-1696. DOI: 10.1200/JCO.2014.58.0225.
- [6] 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[J]. *Blood*, 2012, 119(17): 3940-3950. DOI: 10.1182/blood-2011-10-387969.
- [7] JOHNSON L A, SCHOLLER J, OHKURI T, et al. Rational development and characterization of humanized anti-EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(275):275ra22. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa4963.
- [8] O'ROURKE D M, NASRALLAH M L P, DESAI A, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(399): eaaa0984 [2017-11-20]. <http://stm.sciencemag.org/content/9/399/eaab0984>. short. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa0984.
- [9] 敖仕梅, 伍玥, 王春荣, 等. 靶向表皮生长因子受体 III 型突变体的第三代嵌合抗原受体的构建与表达[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(5): 603-606. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.05.009.
- [10] GUPTA P, HAN S Y, HOLGADO-MADRUGA M, et al. Development of an EGFRvIII specific recombinant antibody[J/OL]. *BMC Biotechnol*, 2010, 10: 72[2017-11-20]. <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-10-72>. DOI: 10.1186/1472-6750-10-72.
- [11] DAI H, WANG Y, LU X, et al. Chimeric antigen receptors modified T-cells for cancer therapy[J/OL]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108(7): djv439[2017-11-20]. <https://academic.oup.com/jnci/article/108/7/djv439/2412501>. DOI: 10.1093/jnci/djv439.
- [12] GILL S, MAUS M V, PORTER D L. Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25 years in the making[J]. *Blood Rev*, 2016, 30(3): 157-167. DOI: 10.1016/j.blre.2015.10.003.
- [13] BRUDNO J N, KOCHENDERFER J N. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(1): 31-46. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.128.
- [14] 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[J]. *Blood*, 2011, 118(23): 6050-6056. DOI: 10.1182/blood-2011-05-354449.
- [15] NEWICK K, MOON E, ALBELDA S M. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors[J/OL]. *Mol Ther Oncolytics*, 2016, 3:

- 16006[2017-11-21]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2372770516300456?via%3Dihub>. DOI: 10.1038/mto.2016.6.
- [16] SAMPSON J H, CHOI B D, SANCHEZ-PEREZ L, et al. EGFRvIII mCAR-modified T-cell therapy cures mice with established intracerebral glioma and generates host immunity against tumor-antigen loss[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(4): 972-984. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-13-0709.
- [17] REN P P, LI M, LI T F, et al. Anti-EGFRvIII chimeric antigen receptor-modified T cells for adoptive cell therapy of glioblastoma[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(14): 2113-2116. DOI: 10.2174/1381612823666170316125402.
- [18] SHEN C J, YANG Y X, HAN E Q, et al. Chimeric antigen receptor containing ICOS signaling domain mediates specific and efficient antitumor effect of T cells against EGFRvIII expressing glioma[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6: 33[2017-11-21]. <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-8722-6-33>. DOI: 10.1186/1756-8722-6-33.
- [19] SENGUPTA S, MAO G, GOKASLAN Z S, et al. Chimeric antigen receptors for treatment of glioblastoma: a practical review of challenges and ways to overcome them[J]. *Cancer Gene Ther*, 2017, 24(3): 121-129. DOI: 10.1038/cgt.2016.46.
- [20] VELASQUEZ M P, SZOOR A, VAIDYA A, et al. CD28 and 41BB costimulation enhances the effector function of CD19-specific engager T cells[J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(10): 860-870. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0171.
- [21] 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]. *Mol Ther*, 2009, 17(8): 1453-1464. DOI: 10.1038/mt.2009.83.
- [22] 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]. *J Clin Invest*, 2011, 121(5): 1822-1826. DOI: 10.1172/JCI46110.
- [23] KAWALEKAR O U, O'CONNOR R S, FRAIETTA J A, et al. Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells[J/OL]. *Immunity*, 2016, 44(3): 712[2017-11-21]. [http://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(16\)30062-0?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761316300620%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(16)30062-0?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761316300620%3Fshowall%3Dtrue). DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.023.
- [24] MCGARRITY G J, HOYAH G, WINEMILLER A, et al. Patient monitoring and follow-up in lentiviral clinical trials[J]. *J Gene Med*, 2013, 15(2): 78-82. DOI: 10.1002/jgm.2691.

[收稿日期] 2017-12-28

[修回日期] 2018-02-28

[本文编辑] 黄静怡