

利用嵌合抗原受体的 T 细胞 (CAR-T) 治疗复发和难治 B 细胞淋巴瘤/白血病的转化医学研究

袁顺宗, 苏航*

军事医学科学院附属医院淋巴头颈肿瘤内科, 北京 100071

摘要 B 细胞淋巴瘤/白血病是恶性淋巴瘤中最常见的亚型,其复发和难治常常是导致治疗失败的主要原因。长期以来,手术、放疗、化疗和姑息治疗等作为传统的抗肿瘤治疗模式,挽救了许多患者的生命,但每年仍然有大量患者因肿瘤不治而死亡。B 细胞淋巴瘤/白血病,尤其是表达 CD20 的成熟 B 细胞淋巴瘤/白血病,在利妥昔单抗问世之后,其治愈率有了大幅度的上升,然而仍然有近 20% - 40% 患者因复发和难治而去世。近 5 年来,随着可特异性识别 B 细胞表面 CD19 的嵌合抗原受体的 T 细胞 (CAR-T) 的发展,尤其是 CD19 CAR-T 细胞免疫治疗在针对复发和难治 B 细胞淋巴瘤的临床试验中取得了非常显著的疗效, CAR-T 细胞免疫治疗便逐渐受到广大研究者和临床学家的重视,包括我国在内的全球多家医疗机构纷纷注册和开展了针对 B 细胞淋巴瘤/白血病的临床试验。本文就 CD19 CAR-T 细胞在治疗 B 细胞淋巴瘤/白血病过程中的发展历史,在前进行中的主要的临床试验和已经证实的主要潜在不良反应作一综述。

关键词 B 细胞淋巴瘤; 白血病; 嵌合抗原受体 T 细胞

中图分类号 R733.1; R733.7

文献标识码 A

doi:10.7534/j.issn.1009-2137.2014.04.048

Clinical Translational Research of Chimeric Antigen Receptor-T (CAR-T) Cells for the Treatment of Relapsed and Refractory B-cell Lymphoma/Leukemia—Review

YUAN Shun-Zong, SU Hang*

Department of Lymphoma, Head and Neck Cancer, Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

* Corresponding Author: SU Hang, Senior Physician, Associate Professor. E-mail: suhang307@126.com

Abstract B-cell lymphoma and leukemia are the most common subtypes of malignant lymphomas. Relapse and refractory to multiple therapy are the main reasons of treatment failure. As the classical anti-tumor methods, surgery, radiation, chemotherapy and palliative therapy have cured lots of cancer patients. However, each year many patients still died of different kinds of hard-to-treat cancers. Although the ratio of complete remission of B-cell lymphoma/leukemia patients particularly with CD20 positive mature B cell malignancies has been largely increased after the application of Rituximab in clinic, nearly 20% - 40% patients still died due to relapse and refractory to the treatment. During last five years, the development of chimeric antigen receptor-T (CAR-T) cells, especially CD19 CAR-T cells, which can recognize CD19 specifically expressed on B cells and have been demonstrated to be significantly effective to relapsed and refractory B cell lymphoma/leukemia in clinical trials, has gradually attracted extensively concerning from researchers and clinicians. Many medical institutions all over the world (besides in China) have registered the clinical trials for B-cell lymphoma/leukemia patients by use of CAR-T cells. In this review, we summarize the developmental history, the main ongoing clinical trials and proved potential adverse affects of CD19 CAR-T cells for the treatment of patients with B-cell lymphoma/leukemia.

Key words B-cell lymphoma; leukemia; chimeric antigen receptor-T cell

J Exp Hematol 2014; (4):1137-1141

淋巴瘤是由 B、T 和 NK 等淋巴细胞发生的恶性肿瘤,根据世界卫生组织 (WHO) 的最新分类,淋巴瘤主要分为霍奇金和非霍奇金淋巴瘤两大类,其中非霍奇金淋巴瘤比例约为 90%^[1]。在非霍奇金淋巴瘤中,源自 B 细胞的淋巴瘤/白血病为最常见的

亚型,所占比例大致为 85%^[1]。随着诊断和治疗模

基金项目:国家自然科学基金 (81370631)

* 通讯作者:苏航,副主任医师,副教授. E-mail: suhang307@126.com

2014-06-25 收稿;2014-07-17 接受

式的不断改进,尤其是自针对 CD20 阳性 B 细胞淋巴瘤/白血病的利妥昔单抗的上市以来,源自成熟 B 细胞的淋巴瘤/白血病患者接受经含利妥昔单抗免疫化疗为主的综合治疗后,完全缓解率可达 76%^[1-2]。虽然, B 细胞淋巴瘤/白血病经当前普遍采用的规范化治疗后有着较高的缓解率,但是仍有 20% - 30% 患者死于肿瘤耐药所致的复发和难治^[1-2]。因此,复发和难治 B 细胞淋巴瘤/白血病也就成为了当前淋巴瘤基础和转化研究领域的重点和焦点问题之一。

手术、放疗、化疗和姑息治疗等作为恶性肿瘤的传统治疗方法,在抗肿瘤治疗中一直占据着主导地位。近十年来,随着对肿瘤发生发展的内在机制及其外在微环境研究的不断深入,免疫治疗尤其是细胞免疫治疗在肿瘤治疗中的应用逐渐从幕后走到了前台^[3]。免疫治疗具有突破肿瘤耐药的遗传学和细胞系机制、靶向肿瘤细胞的同时极少损伤正常组织的特点。近五年来,可以激活机体 T 细胞杀伤功能的单克隆抗体和经基因修饰后可直接识别肿瘤细胞的效应细胞,在临床抗肿瘤试验中体现出明显强于既往研究的显著疗效,在肿瘤治疗领域中引发了转化研究的新高潮。尤其在 2011 年之后,Carl June 小组利用表达嵌合抗原受体的 T 细胞 (CAR-T) 治疗复发的 B 细胞急性淋巴细胞白血病患者两篇论文同时发表后不久^[18,19],针对复发和难治 B 细胞淋巴瘤/白血病的 CAR-T 细胞免疫治疗便迅速受到全球淋巴瘤相关专家和制药公司的关注和跟进。CAR-T 细胞相关的文献至今发表近 300 篇,限于篇幅,本文就针对 B 细胞淋巴瘤/白血病的 CAR-T 细胞的发展历史、临床试验和临床试验中已经出现以及潜在的副作用做一简要综述。

针对 B 细胞恶性肿瘤的 CAR-T 细胞研究的历史回顾

CAR-T 最初于 1989 年由 Gross 等^[4]人将编码 TNP 单克隆抗体的轻链和重链基因克隆出来之后,分别和 T 细胞受体 (TCR) 的 α 和 β 链编码基因进行连接,再共转至 T 细胞株,结果发现经过改造后的 T 细胞可以特异杀伤表达 TNP 的 B 细胞淋巴瘤细胞株。1993 年,该研究小组进一步将编码 TNP 抗体的轻链、重链的单链可变区 (scFv) 和 CD3 ζ /Fc γ RIIIA γ 链三者首尾相连并构建至逆转录病毒载体中,包装病毒后感染细胞毒性 T 细胞 (CTL) 后得到的 TNP CAR-T 细胞不仅可以靶向杀伤表达 TNP 的 B 细胞

淋巴瘤细胞株,而且存在于 CAR 中的 CD3 ζ /Fc γ RIIIA γ 链,使 CAR-T 产生了自激活的效应^[5]。随后,Hwu^[6-7]和 Stancovski 等^[7]人还发现,将编码 TNP 的 scFv 换成 MOv18 和 Her2 的 scFv 后生产出来的 CAR-T 细胞,同样分别对表达 MOv18 配体的卵巢癌细胞株和表达 Her2 的细胞株具有很好的杀伤效应。但是,Zelig Eshhar 小组的 CAR-T 细胞相关研究结果在发表后的最初十年里并未引起广大研究者的重视。1998 年,Jensen 等^[8]人发现利用人 CD20 单抗 scFv 做成的 CAR-T 细胞可以特异性杀伤表达 CD20 的淋巴瘤细胞株;2003 年,Cooper 等^[9]人发现由 CD19 抗体 scFv 构建的 CD8⁺ CAR-T 细胞具有高度亲和力和裂解原代 B 细胞急性淋巴细胞白血病 (B-ALL) 瘤细胞的作用,并随后启动 I 期临床试验。2006 年,Kowolik 等^[10]人在原来第 1 代抗 CD19 CAR-T 基础上,将编码共刺激分子 CD28 的全长基因序列插入至 scFv 和 CD3 ζ 之间,并将其命名为第 2 代 CAR-T 细胞,与第 1 代相比,其增殖和抗肿瘤效果均有所增强。随后,2009 年 Carpenito 等^[11]的研究结果显示,在 CAR 中间加入共刺激分子 CD137 后得到的 CAR-T 细胞具有分泌更多的细胞因子和更强的增殖活性。该研究结果也随后得到了 Zhong 等^[12]人的证实。研究者们将这种加入 2 个或 2 个以上共刺激分子的 CAR-T 称之为第 3 代 CAR-T 细胞^[13]。不过,其他团队如 Kochenderfer 等^[14]人的研究显示,第 2 代 CAR-T 在分泌 IL-2 和 IFN- γ 方面却要优于第 3 代 CAR-T。尽管在技术手段上存在着一定的区别,由 Carl June、Michel Sadelain、Steven A. Rosenberg 和 Cooper 等研究小组领衔的临床试验还是逐步将 CAR-T 细胞从第 1 代推向了第 3 代^[9-11,14]。

针对 B 细胞恶性肿瘤的 CAR-T 细胞临床试验

2008 年 Till 等^[15]研究者发表了第 1 篇采用 CD20 单抗 scFv 的第 1 代 CAR-T 细胞治疗惰性淋巴瘤和套细胞淋巴瘤的临床试验结果,并说明 CAR-T 细胞治疗 B 细胞淋巴瘤是安全可行的,但是 5 例未达到完全缓解的患者在使用抗 CD20 CAR-T 后,淋巴瘤仍然保持稳定状态。随后,2012 年,Till 等^[16]研究者又报道了 3 例采用第 3 代抗 CD20 CAR-T 细胞治疗淋巴瘤的效果,其中两例套细胞淋巴瘤分别维持 12 月和 24 月完全缓解,第 3 例滤泡性淋巴瘤反应则呈现异质性,部分有反应,部分则没有任何反应,

总体上呈部分缓解效果。相比之下,更多的临床研究则集中于采用抗 CD19 CAR-T 细胞治疗 B 细胞淋巴瘤/白血病。2010 年, Kochenderfer 等^[17]人首次报道 1 例进展期滤泡性淋巴瘤患者,经第 2 代抗 CD19 CAR-T 细胞输入后,维持完全缓解达 32 周。2011 年 8 月, Kalos^[18]和 Porter 等^[19]人(均为 Carl June 小组)同时发表两篇论文,证实采用第 3 代抗 CD19 CAR-T 细胞治疗 3 例进展期 B 细胞慢性淋巴细胞白血(B-CLL)病患者后,其中 2 例患者维持完全缓解 10 个月以上,1 例部分缓解超 8 个月。不过, Brentjens 等^[20]人(Michel Sadelain 小组)同年发表的采用第 2 代抗 CD19 CAR-T 细胞治疗 8 例 B-CLL 和 1 例 B 细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)患者,仅 1 例获得了维持 6 个月的部分缓解。与此同时, Savoldo 等^[21]人(Gianpietro Dotti 小组)采用第 2 代抗 CD19 CAR-T 细胞治疗 5 例弥漫大 B 细胞淋巴瘤和 1 例小淋巴细胞淋巴瘤,6 例患者也均未见有临床缓解。尽管如此,抗 CD19 CAR-T 细胞治疗 B 细胞淋巴瘤/白血病的临床研究仍在不断进行中。2012 年, Kochenderfer 等^[22]人又报道第 2 代抗 CD19 CAR-T 细胞治疗 8 例惰性淋巴瘤/白血病患者,除 1 例因流感死亡无法评价疗效之外,剩余下 7 例患者中 6 例均有明显缓解,包括 1 例 B-CLL 患者完全缓解 15 个月以上。2013 年, Brentjens 等^[2]人(Michel Sadelain 小组)的数据结果显示,5 例 B-ALL 患者使用第 2 代抗 CD19 CAR-T 细胞治疗后,均达到了分子水平上的完全缓解。Grupp 等^[23]人(Carl June 小组)紧随其后也报道经第 3 代抗 CD19 CAR-T 细胞治疗后,2 例 B-ALL 患者在 1 个月左右均达到分子水平完全缓解; Kochenderfer 等^[24](Steven A. Rosenberg 小组)还尝试采用异基因第 2 代抗 CD19 CAR-T 细胞治疗 10 例 B 细胞淋巴瘤/白血病患者,3 例患者肿瘤明显缓解,其中 1 例 B-CLL 维持完全缓解 9 个月以上。2014 年, Davila 等^[25]人(Michel Sadelain 小组)最新的结果显示,16 例复发/难治的 B-ALL 患者经第 2 代抗 CD19 CAR-T 细胞治疗,15 例达到完全缓解,完全缓解率高达 88%。这些由不同研究小组已经发表的临床试验数据均一致证实抗 CD19 CAR-T 细胞治疗疗效是明确的,尤其是进入临床试验的大部分患者属于复发/难治性淋巴瘤/白血病,既往经多次多种的治疗方案未能取得明确疗效,在此基础上经 CAR-T 细胞治疗后迅速达到完全缓解,从而将细胞免疫治疗推向了一个新的研究狂潮。尽管 anti-CD19 CAR-T 细胞在临床针对 B 细胞恶性肿瘤尤其是对复发、难治性 B-ALL 的治疗取得

了非常令人瞩目的成绩,但是 CD19 抗原的变异,以及具有干细胞样特征的 B-ALL 白血病起始细胞不表达 CD19 也同样会影响治疗的效果^[23, 26]。因此,对于 anti-CD19 CAR-T 细胞在临床的应用中,对于 CD19 抗原在肿瘤细胞的表达情况,需要进行准确的检测与判断,以便使其发挥最大的抗肿瘤效应。

针对 B 细胞恶性肿瘤的 CAR-T 细胞临床使用中的不良反应与潜在风险

针对 B 细胞恶性肿瘤的 CAR-T 细胞临床使用中的不良反应

与大多数细胞过继输入治疗相类似, CAR-T 细胞应用过程中需要配合使用细胞因子及其他相关处理方式, 寒战、发热、白细胞减少、肿瘤溶解综合征、细胞因子风暴、B 细胞缺乏引起的低免疫球蛋白血症等为常见的不良反应^[20]。需要警惕的是,在抗 CD19 CAR-T 细胞治疗临床试验中,有 2 例患者死亡, Brentjens 等^[27]人报道 1 例出现在输入细胞后 24 h,患者出现发热、呼吸窘迫、随后继发肾功能衰竭而于细胞输入 44 h 后死亡,研究者们认为此例主要死因为感染;另 1 例由 Kochenderfer 等^[22]报道患者在输入细胞 18 d 后因流感病毒肺部感染而死亡。此外, Brentjens 等^[2]人还报道有一例患者经细胞输入达到完全缓解,完成异基因干细胞移植两月后死于肺栓塞。至于其他的副反应,如针对肿瘤溶解综合征,可采用水化、碱化、药物处理等方式^[28]予以缓解;针对细胞因子风暴,采用细胞因子阻断剂后可迅速得到缓解^[23], Davila 等^[25]人(Michel Sadelain 小组)最近提出可以采用检测 C-反应蛋白的浓度来进行细胞因子风暴的监测;对于 B 细胞缺乏,针对性的治疗措施是补充免疫球蛋白预防感染^[17],也有研究者提出采用诱导性凋亡的措施促使 CAR-T 在完成杀灭肿瘤细胞的任务后自发凋亡^[29-30];发热、寒战等则采用激素等药物对症处理^[28]。因为死亡患者与抗 CD19 CAR-T 细胞暂无直接相关性,因而其他副反应及时采取措施后大多数可以得到控制。因此,虽然抗 CD19 CAR-T 细胞治疗存在着一定的潜在风险,但是对于复发、难治或者原发耐药的 B 细胞恶性肿瘤,在难以找到有效治疗方式的时候,该细胞免疫治疗方案仍然不失为一个利远远大于弊的选择。

基因修饰后 CAR-T 细胞可能存在的潜在风险

前面提及 CAR-T 细胞的制备过程中,需要将抗体序列及 T 细胞受体信号途径的编码分子相关的序列

导入至 T 细胞中,外源基因导入进行治疗大多数研究结果显示这是一种比较安全的方式。目前美国用于临床试验导入外源基因的方式大致有逆转录病毒、慢病毒、转座子、mRNA 电转入等方式。早在 1990 年,Rosenberg^[31] 小组提出利用逆转录病毒将外源基因导入 T 细胞进行肿瘤是安全可行的,同年美国 FDA 批准了基因治疗。逆转录病毒感染的主要是分裂期细胞,对于非分裂细胞感染能力极弱。在此基础上发展出的慢病毒,则对分裂和非分裂细胞均具有较好的感染能力。采用传统直接转染的方式难以将外源基因导入至 T 淋巴细胞中,因此绝大部分 CAR-T 细胞制备时,采用的慢病毒系统^[32]。因为病毒类载体涉及较多专利上的争议,因此研究者们又尝试采用转座子结合电转导入外源基因来制备 CAR-T 细胞,临床前研究也证实该方法是可行的^[33]。尽管逆转录病毒和慢病毒导入外源基因进行治疗被认为是安全的,但是由于外源基因却是随机整合至宿主基因组并在细胞内长期存在且稳定表达,存在不合适的插入位点突变可能会引起细胞发生转化的潜在风险,转座子电转的方式也存在着类似的风险^[32]。因此,有研究探索将编码质粒直接通过电转导入细胞内,但是因为质粒导入的方式大多数为瞬时表达,能否达到治疗效果还有待进一步实验验证^[32]。Maxcyte 公司针对不断升温的 CAR-T 细胞免疫治疗开发出一套专门的电转仪和电转试剂,该方法首先需要制备 mRNA,然后将 mRNA 直接导入细胞,转染效率可以达到 90%,转染体系可达 50 ml,理论上仅需一次转染就可以满足治疗所需,但其高昂的售价和授权费用却让不少研究者望而却步^[34-35]。虽然质粒转染或者 mRNA 转染这些方式主要用于瞬时表达外源基因,但其是否会有外源基因整合至宿主基因组并稳定表达,目前并不清楚,因此其安全性有待更多的研究来明确。

针对 B 细胞恶性肿瘤的 CAR-T 细胞,目前在全球范围内引起极大关注,不少国家和地区包括我国在内的一些医学机构也已经注册了临床试验。虽然在临床使用过程中,因为其应用时间较短,更多的不良反应和并发症等尚有待时日方可知晓,但是由于其在治疗 B 细胞恶性肿瘤尤其是复发、难治等经其他多种处理方式无效的情况后还可作为补救治疗并显示出非常显著的治疗效果,因此 CAR-T 细胞免疫治疗在临床中的应用和推广非常值得期待。

参 考 文 献

1 Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell

- non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 2008; 359(6): 613 - 626.
- 2 Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*, 2013; 5(177): 177ra138.
- 3 Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ. Cancer immunotherapy—revisited. *Nat Rev Drug Discov*, 2011; 10(8): 591 - 600.
- 4 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(24): 10024 - 10028.
- 5 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(2): 720 - 724.
- 6 Hwu P, Shafer GE, Treisman J, et al. Lysis of ovarian cancer cells by human lymphocytes redirected with a chimeric gene composed of an antibody variable region and the Fc receptor gamma chain. *J Exp Med*, 1993; 178(1): 361 - 366.
- 7 Stancovski I, Schindler DG, Waks T, et al. Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. *J Immunol*, 1993; 151(11): 6577 - 6582.
- 8 Jensen M, Tan G, Forman S, et al. CD20 is a molecular target for scFvFc: zeta receptor redirected T cells: implications for cellular immunotherapy of CD20 + malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant*, 1998; 4(2): 75 - 83.
- 9 Cooper LJ, Topp MS, Serrano LM, et al. T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood*, 2003; 101(4): 1637 - 1644.
- 10 Kowolik CM, Topp MS, 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(22): 10995 - 11004.
- 11 Carpenito C, Milone MC, 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(9): 3360 - 3365.
- 12 Zhong XS, 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(2): 413 - 420.
- 13 Kershaw MH, Westwood JA, Darcy PK. Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2013; 13(8): 525 - 541.
- 14 Kochenderfer JN, Feldman SA, Zhao Y, et al. Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother*, 2009; 32(7): 689 - 702.
- 15 Till BG, Jensen MC, 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(6): 2261 - 2271.
- 16 Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. CD20-specific adoptive immu-

- notherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood*, 2012;119(17): 3940-3950.
- 17 Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, *et al.* Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*, 2010; 116(20): 4099-4102.
- 18 Kalos M, Levine BL, Porter DL, *et al.* T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med*, 2011; 3(95): 95ra73.
- 19 Porter DL, Levine BL, Kalos M, *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 2011; 365(8): 725-733.
- 20 Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, *et al.* Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*, 2011;118(18): 4817-4828.
- 21 Savoldo B, Ramos CA, 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(5):1822-1826.
- 22 Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, *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. *Blood*, 2012;119(12): 2709-2720.
- 23 Grupp SA, Kalos M, Barrett D, *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 2013; 368(16): 1509-1518.
- 24 Kochenderfer JN, Dudley ME, Carpenter RO, *et al.* Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2013;122(25): 4129-4139.
- 25 Davila ML, Riviere I, Wang X, *et al.* Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med*, 2014; 6(224): 224ra225.
- 26 Le Viseur C, Hotfilder M, Bomken S, *et al.* In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. *Cancer Cell*, 2008; 14(1): 47-58.
- 27 Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, *et al.* Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Mol Ther*, 2010;18(4): 666-668.
- 28 Barrett DM, Singh N, Porter DL, *et al.* Chimeric antigen receptor therapy for cancer. *Annu Rev Med*, 2014; 65333-347.
- 29 Budde LE, 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. *PLoS One*, 2013;8(12): e82742.
- 30 Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, *et al.* Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*, 2010; 24(6):1160-1170.
- 31 Rosenberg SA, Aebbersold P, Cornetta K, *et al.* Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*, 1990;323(9): 570-578.
- 32 Hoyos V, Savoldo B, Dotti G. Genetic modification of human T lymphocytes for the treatment of hematologic malignancies. *Haematologica*, 2012;97(11): 1622-1631.
- 33 Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, *et al.* Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using Sleeping Beauty system and artificial antigen presenting cells. *PLoS One*, 2013; 8(5): e64138.
- 34 Li LH, Shivakumar R, Feller S, *et al.* Highly efficient, large volume flow electroporation. *Technol Cancer Res Treat*, 2002; 1(5): 341-350.
- 35 Li L, Liu LN, Feller S, *et al.* Expression of chimeric antigen receptors in natural killer cells with a regulatory-compliant non-viral method. *Cancer Gene Ther*, 2010; 17(3): 147-154.