

## Linfocitos T con receptor de antígeno quimérico

### Chimeric Antigen Receptor T cells (CAR T-cells)

Diego Molina-Leiva<sup>(1)</sup>, Marianela Amador-Araya<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratorio Clínico Hospital San Juan de Dios

Artículo recibido el 16/10/2018

Aceptado para su publicación el 7/11/2018

Correspondencia: [dmolinaleiva@gmail.com](mailto:dmolinaleiva@gmail.com)

#### Resumen

A los linfocitos T con receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) se les incorpora el fragmento variable de un anticuerpo monoclonal, cambiando la especificidad del receptor T. Al darse el reconocimiento específico, se activa la célula T colaboradora o citotóxica desarrollando una respuesta T clásica; esta propiedad puede utilizarse para combatir blancos específicos en células alteradas, entre ellas las tumorales. Han pasado casi 30 años desde su descubrimiento y en la actualidad su uso clínico como inmunoterapia comienza a extenderse ampliamente, razón por la cual es importante comprender su concepto, fabricación, acción citotóxica y toxicidad.

**Palabras clave:** Linfocitos T con receptor de antígeno quimérico, toxicidad, primera generación, segunda generación.

#### Abstract

T lymphocytes with a Chimeric Antigen Receptor (CAR) express the variable region of a monoclonal antibody of known specificity permanently, changing the specificity of the T cell that expresses it becoming reactive to the desired antigenic structure. Upon specific recognition, the recombinant T cell becomes fully activated, proliferates, and then differentiates into specific CD4+ helper or CD8+ cytotoxic T cells programs which ultimately execute their immune capabilities against cells that express such specific antigen. This methodology can be used today in patients to target the patient's own T cells towards specific relevant molecular clues express by altered cells, e.g. tumor specific antigens expressed by particular tumor cells. It has been almost 30 years since its initial development and its current clinical application as a successful immunotherapy begins to spread widely, which is why its concept, manufacture, cytotoxic action, and toxicities must be understood.

**Key words:** T lymphocytes with chimeric antigen receptor, toxicity, first generation, second generation.

## **Introducción**

La habilidad del sistema inmune para reconocer y erradicar células cancerígenas ha sido ampliamente estudiada y demostrada. En el campo hematológico, la inmunidad celular se utiliza en los trasplantes alogénicos, beneficiándose del efecto injerto versus leucemia, y la terapia celular ha tenido un gran auge en el manejo, demostrando resultados prometedores y excelentes respuestas contra el cáncer tanto en niños como en adultos <sup>(1,2,3)</sup>.

En 1989, Gros, Woks y Echar lograron incorporar una especificidad “tipo anticuerpo” dentro del receptor de célula T, creando así los primeros linfocitos T CAR. Dicha especificidad proviene del fragmento variable de un anticuerpo monoclonal, ampliando el repertorio antigénico tumoral que puede reconocer el linfocito T <sup>(4)</sup>.

La estructura de un linfocito T CAR se compone de un dominio extracelular que reconoce y se une específicamente a un antígeno tumoral y un dominio intracitoplasmático que activa la respuesta de la célula T. El sitio de unión al antígeno del linfocito T CAR está compuesto por una cadena simple variable ligera (que le da la especificidad) y otra cadena variable pesada separadas entre sí por una secuencia estable de más de 12 aminoácidos que simulan la estructura de la región Fc de un anticuerpo <sup>(3)</sup>.

Sin embargo, el dominio intracelular es quien tiene el papel primordial de transmitir la señal de reconocimiento y activar a los linfocitos T para que inicie el ataque a la célula blanco. Debido a la importancia de esta activación y la facilidad actual de obtener anticuerpos monoclonales de diversas especificidades, la investigación e innovación de la estructura de los linfocitos T CAR se centra en el diseño del dominio intracelular. Desde el descubrimiento de Gros y colaboradores, se han desarrollado tres generaciones de linfocitos T CAR que se distinguen entre sí por la estructura del dominio intracelular con el fin de potenciar su proliferación, citotoxicidad y persistencia *in vivo* <sup>(5,6,7)</sup>.

### **Linfocitos T CAR de primera generación**

Su activación se da a través del inmunorreceptor con motivo activador basado en la tirosina del CD3 $\zeta$  o del Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ . El reconocimiento por parte del sector variable activa esta única vía de señalización para resultar en la activación del linfocito T, la producción de pequeñas cantidades de IL-2 y la lisis de la célula blanco <sup>(8,9)</sup>.

### **Linfocitos T CAR de segunda generación**

En 1999, Gong *et al.*; investigaron la citotoxicidad de estos linfocitos contra células tumorales del cáncer de próstata *in vitro*. Utilizaron el endodominio del CD3 dirigidos contra el antígeno de membrana prostático específico humano e incorporaron una señal

coestimuladora por medio del CD28, debido a que las células tumorales utilizadas en ese ensayo poseían el ligando B7.1/CD80 que fue reconocido por los linfocitos T a través del CD28 produciendo un aumento en la supervivencia de los linfocitos T. Sin embargo, la mayoría de las células tumorales no presentan el CD80 que active el CD28 y potencie la respuesta; por esta razón se diseñaron linfocitos T CAR que incorporan una señal de activación dual CD3 $\zeta$ -CD28 como endodominio u otros motivos como los del 4-1BB (CD137) y el CD134 (6, 10, 11, 12, 13).

La presencia de una señal dual de activación incrementa los niveles de IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF; además, los linfocitos T expresan Bcl-2 como proteína antiapoptótica y desarrollan mayor proliferación cuando se comparan con los linfocitos T CAR de primera generación (6,14).

### **Linfocitos T CAR de tercera generación**

Por último, se han diseñado linfocitos que incorporan el CD3 $\zeta$  junto a dos señales estimuladoras, usualmente CD28/CD137, para favorecer la proliferación, citotoxicidad, eficacia antitumor y persistencia *in vivo* (6, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

### **Especificidad de fragmento variable de cadena simple de los linfocitos T CAR**

En el diseño del receptor de antígeno quimérico, la especificidad y escogencia del blanco celular constituye el determinante crítico para la efectividad y seguridad de la terapia. El blanco ideal contra el cual se diseña un linfocito T CAR debería expresarse solamente en células tumorales y estar ausente en células normales; además, debe tener poca variación antigénica y expresarse fuertemente sobre la célula blanco; sin embargo, la mayoría de los antígenos asociados a tumores no se encuentran de forma exclusiva en las células malignas, lo que abre la posibilidad de presentar efectos indeseados sobre células normales (21, 22).

Desde el desarrollo de los linfocitos T CAR se buscó aumentar su afinidad hacia el antígeno de la célula tumoral y para así poder elegir ligandos con baja expresión en la célula tumoral y amplificar la activación de esta población de células T, pero investigaciones posteriores han demostrado que no existe relación entre la afinidad y tasa de activación, por lo tanto, se pueden seleccionar linfocitos T CAR con baja afinidad, permitiendo que este pueda discriminar entre células tumorales con baja y alta expresión de antígeno y así reducir el indeseado ataque a células normales, pues se activarían con mayor preferencia sobre células tumorales con sobreexpresión antigénica (21, 23).

Debido a que el fragmento variable de cadena ligera del linfocito T CAR se obtiene de la secuencia de un anticuerpo monoclonal, prácticamente, se podría inducir contra cualquier proteína, carbohidrato o glicopéptido tumoral. Claramente se requieren investigaciones independientes, posterior al diseño de cada clon del receptor tipo CAR de los linfocitos T,

para demostrar su efectividad y seguridad antes de utilizarlo a nivel clínico. Lo anterior incrementa los costos en la producción, desarrollo e implementación de esta inmunoterapia en la rutina clínica; por tal motivo, diversos investigadores han buscado el desarrollo de un linfocito T CAR universal. Se ha propuesto que este sea un linfocito T CAR antiisocianato de fluoresceína (anti-FITC). Este funcionaría en conjunto con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos tumorales, muchos de los cuales con especificidad y afinidad determinada, que ya se utilizan como tratamiento de rutina para diversas malignidades, a los cuales se le conjuga el FITC. En la primera parte de la terapia, el anticuerpo monoclonal conjugado con FITC reconoce el antígeno tumoral y marca la célula tumoral con muchas moléculas FITC alrededor, posteriormente el linfocito T CAR reconoce el FITC y se activa, iniciando la respuesta. Siguiendo esta tendencia, también se han diseñado linfocitos T con dominio avidina en la región variable que puede unirse a anticuerpos biotinilados <sup>(24, 25, 26)</sup>.

### **Uso clínico de los linfocitos T CAR**

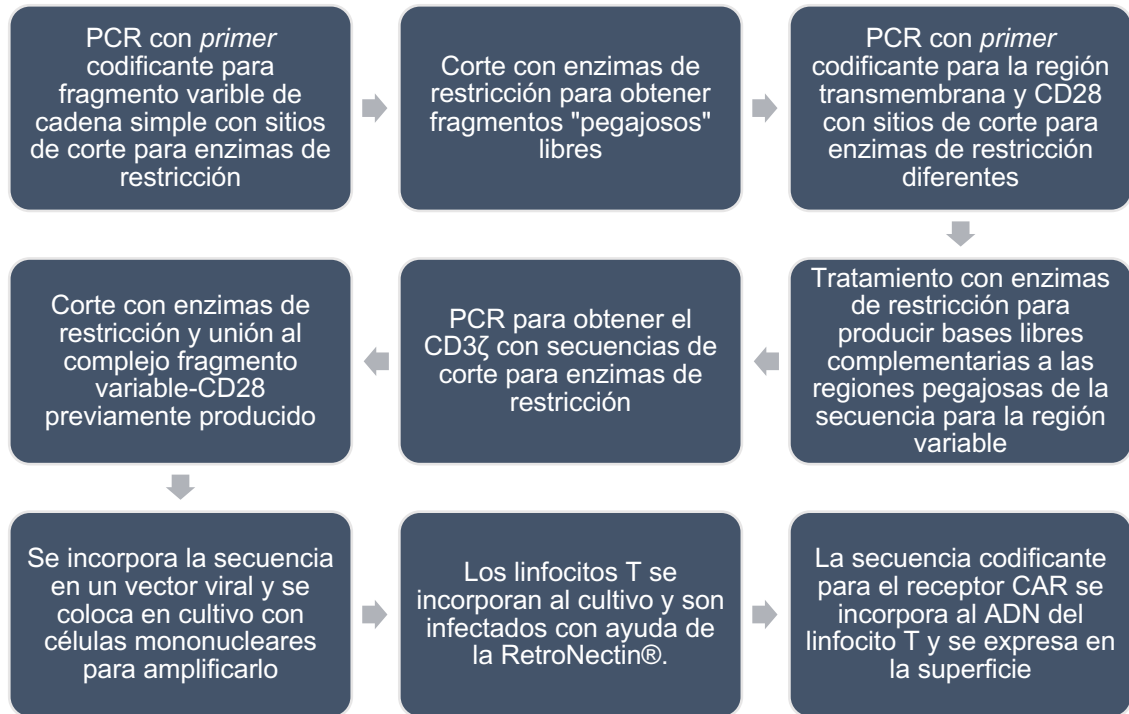
La principal ventaja de la utilización de los linfocitos T CAR lo constituye su aplicación a un amplio rango de antígenos de superficie celulares como proteínas; además, el cambiar la especificidad del receptor de la célula T por uno CAR permite reconocer antígenos sin depender de la presentación por medio del antígeno leucocitario humano (HLA) evitando que la célula tumoral escape de la inmunodetección al disminuir la expresión del HLA en la superficie <sup>(27, 28, 29)</sup>.

Además, al no depender del procesamiento y presentación del antígeno por parte del HLA, se pueden utilizar en un amplio rango de pacientes sin importar la compatibilidad HLA y la cantidad de moléculas blanco (carga antigénica) en la célula tumoral aumenta; por ejemplo, en un linfoma no-Hodgkin B se expresan más de  $10^4$  moléculas de CD19 mientras que solo se expresan  $10^3$  moléculas del HLA <sup>(30, 31, 32)</sup>.

### **Desarrollo, producción y proliferación de los linfocitos T CAR**

La producción de estas células toma aproximadamente 14 días; se inicia con la extracción de los linfocitos del paciente o donador. Posteriormente, se selecciona por citometría de flujo las células T de memoria central (Tcm) CD45RO+/CD62L+/CD28+/CD95+ o las células madre T de memoria (Tscm) que expresan CD45RA+/CD62L+/CD28+/CD95+/CD122+. La razón por la cual se seleccionan las Tcm y Tscm radica en que estas conservan la capacidad de proliferar, pero a su vez ya poseen actividad efectora, sumado a su potencial de expansión y proliferación. Los linfocitos Tcm se multiplican y activan *ex vivo* en cultivo celular con muy altas concentraciones de Il-2, además, es necesario utilizar anticuerpos activadores (dirigidos contra el receptor de células T o contra el CD28), células presentadoras de antígeno artificiales o perlas plásticas que activan las vías del CD28 y 4-1BB, lo cual, su vez, generan señales antiapoptóticas <sup>(20, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41)</sup>.

Paralelo a la expansión y activación de los linfocitos, se debe fabricar la secuencia genética para el receptor de células T químerico donde se selecciona un anticuerpo monoclonal contra el antígeno tumoral al que se va dirigir la terapia. Para ese anticuerpo monoclonal seleccionado se le determina la secuencia de aminoácidos y posteriormente el transcrito y ADN copia (ya determinadas y disponibles para la gran mayoría de anticuerpos monoclonales). Una vez conocida la secuencia se le incorpora una región codificante que funcione como marcador como el *c-myc* que permitirá, posteriormente, seleccionar las células que logran expresar el receptor de células T químerico. Posteriormente, se incorpora la secuencia del CD28 y CD3  $\zeta$  como se muestra en la figura 1 <sup>(42)</sup>.



**Figura 1.** Producción de la secuencia del receptor T CAR y su introducción al linfocito <sup>(42)</sup>

Como alternativa al uso de vectores virales para la inserción de la secuencia en los linfocitos T CAR, algunos grupos de investigadores han utilizado la transferencia de ARN por electroporulación con la cual el ARNm se inserta en el linfocito y este empieza a sintetizar el receptor y a expresarlo. Esta metodología requiere menos tiempo y un costo menor, sin embargo, presenta como desventaja que la secuencia codificante para el receptor no se incorpora al ADN por lo que el linfocito T CAR no puede sufrir expansión y proliferación *in vivo* y las respuestas generadas son de corta duración <sup>(43, 44)</sup>.

Por último, se seleccionan los linfocitos T que hayan incorporado y expresen el receptor de célula T quimérico mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos contra el c-myc (que se había incorporado previamente como marcador) y se expande su número en cultivo con IL-2<sup>(42, 45)</sup>.

### **Preparación del huésped preinfusión de los linfocitos T CAR y su proliferación *in vivo***

Un reto importante en la posible aplicación clínica de los linfocitos T CAR es prolongar la supervivencia de estos postinfusión hasta lograr la remisión del cáncer. Diversos estudios han demostrado que si se utilizan solo linfocitos T CD8+ estos desaparecen rápidamente cuando empieza a descender el número de antígenos malignos; sin embargo, cuando se utiliza la combinación con células T CAR CD4+ en conjunto a IL-2 logran prolongar su supervivencia *in vivo*<sup>(46, 47, 48, 49)</sup>.

Para potenciar la sobrevivencia de los linfocitos T CAR se requiere depletar los linfocitos del huésped con irradiación o quimioterapia mieloablativa que desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias y estimuladores de proliferación linfocitaria como el factor de necrosis tumoral alfa (NTF- $\alpha$ ), IL-1 e IL-4; además, se genera una sobreexpresión de CD80 y CD86 en las células dendríticas que estimula la producción de IL-12. La linfopenia produce cambios en el balance de citoquinas con aumento de IL-7 e IL-15 que potencian la proliferación y supervivencia de los linfocitos T; además, se reducen los linfocitos T reguladores del huésped que podrían disminuir la respuesta de los linfocitos T CAR e inducir su destrucción<sup>(34, 50, 51, 52, 53)</sup>.

Para estimular la respuesta y proliferación de los linfocitos T CAR se puede administrar IL-2, IL-7, IL-15 e IL 21. En 2011, Savoldo *et al.* compararon la persistencia de células T CAR anti-CD19 de primera y segunda generación (CD28) en seis pacientes con linfoma no-Hodgkin refractario o en recaída. Ellos demostraron que los niveles de las células de segunda generación aumentaron más de siete veces con respecto a la dosis infundida en una semana, y eran detectables dos meses después, mientras que los de primera generación mantenían los niveles y no fueron detectados a las seis semanas<sup>(52, 54)</sup>.

### **Desventajas y reacciones adversas de la terapia con linfocitos T CAR**

Hasta el momento, no se han descrito casos de enfermedad injerto versus huésped en pacientes tratados con linfocitos T CAR alogénicos, lo que sugiere que estos linfocitos quiméricos presentan anergia a los antígenos HLA del huésped. Una vez infundidos, se ha demostrado que primero sufren una migración al pulmón, por lo cual es necesario que el antígeno blanco se encuentre pobremente expresado en el tejido pulmonar para favorecer la distribución hacia el nicho tumoral y evitar la toxicidad pulmonar<sup>(56)</sup>. Precisamente en el 2010, Morgan *et al.* reportaron un caso grave de distress respiratorio 15 minutos después de la infusión de linfocitos T CAR con gran infiltrado pulmonar y muerte a los 5 días. En dicho

estudio se trataron pacientes con cáncer que sobreexpresaban ERBB2 y utilizaron linfocitos T CAR de tercera generación. El paciente que presentó la reacción adversa tenía un cáncer de colon con metástasis en pulmón e hígado. Se demostró mediante análisis genéticos que el paciente presentaba polimorfismos genéticos que expresaban una hipersecreción de IL-6 e IL-10, por lo que se determinó que la causa de muerte fue una alta expresión de los antígenos tumorales en pulmón sumado a la hipersecreción de citoquinas dada por el genotipo del paciente <sup>(55, 56, 57)</sup>.

Se han descrito que son comunes síntomas similares a un resfriado como fiebre, malestar general y mialgia posterior a la infusión de los linfocitos T CAR debido a la liberación de citoquinas por parte de la respuesta T antitumoral, especialmente, el IFN- $\gamma$ . En una recopilación de los datos reportados por varios ensayos clínicos se determinó que de 50 individuos tratados con linfocitos T CAR, el 54% presentó fiebre, 26% hipotensión, 14% fatiga, 14% bacteremia, 12% dolor de cabeza y 10% daño renal; otras reacciones menos frecuentes fueron la neutropenia severa, diarrea, afasia, confusión y fallo hepático <sup>(58, 59)</sup>.

Las mayores implicaciones de esta terapia es la aplasia de células B (cuando se trata malignidades linaje B) que usualmente es tratado con infusiones de gammaglobulinas. Kochender, *et al.* (2012), en un ensayo clínico para linfoma folicular y leucemia linfocítica crónica, reportaron cuatro reacciones adversas con hipogammaglobulinemia, hipotensión, fiebre, y daño renal que resolvió a los 8 días de la infusión de inmunoglobulina intravenosa. También se ha demostrado la presencia de linfocitos T CAR en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con manifestaciones neurológicas, lo cual puede llegar a ser beneficioso al combatir y proteger de la invasión de células leucémicas a sistema nervioso central <sup>(21, 60, 61, 62)</sup>.

Otra reacción importante que se puede presentar es el síndrome de activación macrofágica que se caracteriza por niveles elevados de ferritina (mayor a 5 000  $\mu\text{g/dl}$ ), elevación de la proteína C reactiva, dímero D, IFN- $\gamma$  e IL-6, y el síndrome de liberación de citoquinas que cursa con fiebre, náuseas y malestar general con una muy alta secreción de IL-2, IL6 e interferón gamma. Los efectos de ambos síndromes pueden ser bloqueados por tocilizumab (anticuerpo monoclonal antirreceptor de IL-6) o etanercept (anti-TNF- $\alpha$ ) <sup>(63, 64, 65, 66)</sup>.

### **Mejoras en la seguridad de las terapias con T CAR**

Se ha propuesto la introducción de genes “suicidas” dentro de los linfocitos T CAR para poder eliminarlos en caso de que provoquen reacciones adversas. Inicialmente se ha utilizado el gen de la timidina quinasa del virus herpes I que podría eliminarse con ganciclovir o la utilización de genes inducibles de la vía de apoptosis endógena como la vía Fas <sup>(67, 68, 69, 70)</sup>.

Otro enfoque para mejorar la especificidad y seguridad del uso estas células es la implementación de blancos múltiples que permitan diferenciar mejor entre células normales y tumorales. En la actualidad, se plantea el uso de linfocitos T CAR con dos receptores quiméricos de diferente especificidad, uno que incorpore la activación del CD3 $\zeta$  sin señal

coestimuladora y otro que incorpora las señales coestimuladoras de forma tal que su respuesta total se dé solamente cuando se reconocen ambos antígenos en las células tumorales. Alternativamente, se plantea la posibilidad de utilizar un receptor quimérico con las señales coestimuladoras que active una respuesta completa y otro receptor acoplado a un inhibidor o represor de la respuesta que reconozca un antígeno presente solo en células normales, con lo cual, si se da el doble reconocimiento, la respuesta es inhibida <sup>(36, 71)</sup>.

## **Conclusiones**

La principal ventaja de la utilización de los linfocitos T CAR la constituye el amplio rango de antígenos de superficie celulares. Lo anterior sumado al aumento en la habilidad de proliferación, persistencia y capacidad citotóxica en las células tumorales; estos potencian la extensión de su uso clínico.

La linfodepleción del huésped ha demostrado potenciar la supervivencia de los linfocitos T CAR al liberarse citoquinas proinflamatorias y estimuladores de proliferación aumentando su sobrevida y eficacia; sin embargo, estas citoquinas son responsables de las manifestaciones clínicas que incluyen fiebre, hipotensión, malestar general, dolor de cabeza, problemas neurológicos, por lo cual es necesario investigar más sobre su seguridad y la mejora en su especificidad para aumentar la seguridad de estas células.

## **Referencias**

1. Kochenderfer J, Wilson W, Janik J, Dudley M, Stetler-Stevenson M, Feldman S 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.
2. Kolb H. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 2008; 112: 4371-4383.
3. Pule M, Finney H, and Lawson A. Artificial T-cell receptors. *Cytotherapy* 2003; 5(3), 211-226.
4. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86, 10024-10028.



5. Lee D, Kochenderfer J, Stetler-Stevenson M, Cui Y, Delbrook C, Feldman, S et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet* 2015; 385: 517-528.
6. Finney H, Akbar A, Lawson A. 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 zeta chain. *Journal of Immunology* 2004; 172: 104-113.
7. Milone M, Fish J, Carpenito C, Riley J, Grupp S, June C. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells an increased antileukemic efficacy in vivo. *Molecular Therapy* 2009; 17: 1453-1464.
8. Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler D. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chain consisting of antibody domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulins and T-cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90: 720-724.
9. Heuser C, Hombach A, Löscher C, Manista K, Abken H. T-cell activation by recombinant immunoreceptors: impact of the intracellular signaling domain on the stability of receptor expression and antigen-specific activation of grafted T cells. *Gene Therapy* 2003; 10: 1408-1419.
10. Gong M, Latouche J, Krause A, Heston, W, Bander, N Sadelain M. Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate specific membrane antigen. *Neoplasia* 1999; 1(2): 123-127.
11. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Current Opinion in Immunology* 2009; 21: 215-223.
12. Haynes N, Trapani J, Teng M, Jackson J, Cerruti L, Jane S, et al. Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors. *Blood* 2002; 100: 3155-3163.
13. Maher J, Brentjens R, Gunset G, Rivière I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta/CD28 receptor. *Nature Biotechnology* 2002; 20: 70-75.

14. Harada Y, Ohgai D, Watanabe F, Okano k, Koiwai O, Tanabe k, et al. A single amino acid alteration in cytoplasmic domain determines IL-2 promoter activation by ligation of CD28 but no inducible costimulator (ICOS). *Journal of Experimental Medicine* 2003; 197: 257-262.
15. Imai C, Mihara K, Andreansky M, Nicholson I, Pui C, Geiger T, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18(4): 676-684.
16. Carpenito C, Milone M, Hassan R, Simonet J, Lakhali M, Suhoski m, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106: 3360-3365.
17. Chang L, Chang W, McNamara G, Aguilar B, Ostberg J, Jensen M. Transgene-enforced co-stimulation of CD4+ T cells leads to enhanced and sustained anti-tumor effector functioning. *Cytherapy* 2007; 9(8): 771-784.
18. Zhao Y, Wang Q, Yang S, Kochenderfer J, Zheng Z, Zhong X, et al. A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling receptor with modified signaling of transduced T lymphocytes and antitumor activity. *Journal of Immunology* 2009; 183: 5563-5574.
19. Wang J, Jensen M, Lin Y, Sui X, Chen E, Lindgren C, et al. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Human Gene Therapy* 2007; 18(8): 712-725.
20. Lee D, Barrett D, Mackall C, Orentass R, Grupp S. The future is now: Chimeric antigen receptors as new targeted therapies for childhood cancer. *Clinical Cancer Research* 2012; 18(10): 2780-2790.
21. Curran K, Pegram H, Brentjens R. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *Journal of Gene Medicine* 2012; 14: 405-415.
22. Goldberger O, Volovitz I, Machlenkin A, Vadai E, tzevoval E, Eisenbach L. Exuberated numbers of tumors-specific T cells a result in tumor escape. *Cancer Research* 2008; 68: 3450-3457.
23. Chmielewski M, Hombach A, Heurser C, Finfern R, Gilham D, Abken H. 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 decrease selectivity. *Journal of Immunology* 2004; 173: 7647-7653.

24. Ang S, Hartline C, Mi T, Maiti S, Jackson G, Hul H, et al. Generating a chimeric antigen receptor to redirect T-cell specify after infusion. *Molecular Therapy* 2011; 19: S137.

25. Tamada K, Gend D, Sakoda Y, Basal N, Srivastava R, Li Z, et al. Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clinical Cancer Research* 2012; 18: 6436-6445.

26. Urbanska K, Lanitis E, Pussin M, Lynn R, Gavin B, Kelderman S, et al. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer Research* 2012; 72: 1844-1852.

27. Selider B. Different regulation of MCH class I antigen processing components in human tumors. *Journal of Immunotoxicology* 2008; 5: 361-367.

28. Sadelain M, Riviere I, Brentjens R. Targeting tumors with genetically enhanced T lymphocytes. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3: 35-45.

29. Schreiber R, Old L, Smyth M. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331: 1565-1570.

30. Du X, Beers R, FitzGerald D, Pastan I. Differential cellular internalization of anti-CD19 and CD22 immunotoxins results in different cytotoxic activity. *Cancer Research* 2008; 68: 6300-6305.

31. Baskar S, Kwong K, Hofer T, Levy J, Kennedy M, Lee E, et al. Unique cell surface expression of receptor tyrosine ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research* 2008; 14: 396-404.

32. Kerkar S, Muranski P, Kaiser A, Boni A, Sanchez-Perez L, Yu Z, et al. Tumor-specific CD8+ T cells expressing interleukin-12 eradicate established cancer in lymphodepleted hosts. *Cancer Research* 2010; 70: 6725-6734.

33. Becker C, Pohla H, Frankenberger B, Schüler T, Assenmacher M, Schendel D et al. Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-gamma capture assay. *Nature Medicine* 2001; 7: 1159-1162.

34. Ho W, Blattman J, Dossett M, Yee C, Greenberg P. Adoptive immunotherapy: engineering T cell responses as biologic weapons for tumor mass destruction. *Cancer Cell* 2003; 3: 431-437.
35. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine* 2011; 17: 1290-1297.
36. Jensen M, Ridell S. Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells. *Immunology Reviews* 2014; 257: 127-144.
37. Hinrichs C, Borman Z, Cassar L, Gattinoni L, Spolski R, Yu Z, et al. Adoptive transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8<sup>+</sup> T cells mediate superior antitumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106: 17469-17474.
38. Dudley M, Wunderlich J, Yang J, Hwu P, Schwartzentruber D, Topalian S, et al. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *Journal of Immunotherapy* 2002; 25: 243-251.
39. Garlie N, LeFever A, Siebenlist R, Levine B, June C, Lum L. T cells coactivated with immobilized anti-Cd3 and anti-Cd28 as potential immunotherapy for cancer. *Journal of Immunotherapy* 1999; 22: 336-345.
40. Maus M, Thomas A, Leonard D, Allman D, Addya K, Schlienger K, et al.. Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor. *Clinical Cancer* 2002; 20: 143-148.
41. Suhoski M, Golovina T, Aqui N, Tai V, Varela-Rochena A, Milone M, et al. Engineering artificial antigen-presenting cells to express a diverse array of co-stimulatory molecules. *Molecular Therapy* 2007; 15: 981-988.
42. Howland L, Haynes N, Darcy P. Generation of chimeric T-cell receptor transgenes and their efficient transfer in primary mouse T lymphocytes. In P. Yotnda (Ed.), *Immunotherapy of cancer* 2010; 291-306.
43. Cleadle E, Gornall H, Baldan V, Hanson V, Hawkins R, Gilham D. CAR T cells: driving the road from the laboratory to the clinic. *Immunological Reviews* 2014; 257: 91-106.

44. Zhao Y, Moon E, Carpenito C, Paulos C, Liu X, Brennan A, et al. Multiple injection of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Research* 2010; 70: 9053-9061.
45. Lee J, Sadelain M, Brentjens R. Retroviral transduction of murine primary T lymphocytes. In C. Baum (Ed.), *Genetic modification of hematopoietic stem cells* 2009: 83-96.
46. Walter E, Greenberg P, Gilbert M, Finch R, Watanabe K, Thomas E, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *The New England Journal of Medicine* 1995; 333: 1038-1044.
47. Yee C, Thompson J, Byrd D, Ridell S, Roche P, Celis E, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration and antitumor effect of transferred T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 16168-16173.
48. Blattman J, Grayson J, Wherry E, Kaech S, Smith K, Ahmed R. Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nature Medicine*; 9: 540-547.
49. Till B, Jensen M, Wang J, Chen E, Wood B, Greisman H, 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.
50. Torihata H, Ishikawa F, Okada Y, Tanaka Y, Uchida T, Suguro T, et al. Irradiation up-regulates CD80 expression through two different mechanisms in spleen B cells, B lymphoma cells, and dendritic cells. *Immunology* 2004; 112: 219-227.
51. Fry T, Connick E, Falloon J, Lederman M, Liewehr D, Spritzler J, et al. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood* 2001; 97: 2983-2990.
52. Klebanoff C, Khong H, Antony P, Palmer D, Restifo N. Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy. *Trends in Immunology* 2005; 26(2): 111-117.
53. Zhang H, Chua K, Guimond M, Kapoor V, Brown M, Fleisher T, et al. Lymphopenia and interleukin-2 therapy after homeostasis of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Medicine* 2005; 11: 1238-1243.

54. Savoldo B, Almeida C, Liu E, Mims M. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *Journal of Clinical Investigation* 2011; 121(5): 1822-1826.
55. Gill S, June C. Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies. *Immunological Reviews* 2015; 263: 68-89.
56. Parente-Pereira A. Trafficking of CAR-engineered human T cells following regional or systemic adoptive transfer in SCID beige mice. *Journal of Clinical Immunology* 2011; 31: 710-718.
57. Morgan R, Yang J, Kitano M, Dudley M, Laurencot C, Rosenberg S. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy* 2010; 18: 843-851.
58. Kalos M, Levine B, Porter D, Katz S, Grupp S, Bagg A, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science Translational Medicine* 2011; 3: 73.
59. Zhu Y, Tan Y, Ou R, Zhong Q, Du Y, Zhang Q, et al. Anti-CD19 chimeric antigen receptor-modified T cells for B-cell malignancies: a systematic review of efficacy and safety in clinical trial. *European Journal of Haematology* 2016; 96:389-396.
60. Kochenderfer J, Dudley M, Feldman S, Wilson W, Spaner D, Maric I, 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.
61. Kochenderfer J, Dudley M, Kassim S, Somerville R, Carpenter Rm Stetler-Stevenson M, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *Journal of Clinical Oncology* 2015; 33(6): 540-549.
62. Davila M, Rievere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Science Translational Medicine* 2014; 6(224): 1-9.
63. Riet T, Abken H. Chimeric antigen receptor T cells: power tools to wipe out leukemia and lymphoma. *Expert Review of Hematology* 2015; 8(4): 383-385.

64. Gill S, Porter D. CAR-modified anti-CD19 T cells for the treatment of B-cell malignancies: rules of the road. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2014; 14(1): 37-49.
65. Wilkins O, Keeler A, Flotte T. CAR T-Cell Therapy: Progress and prospects. *Human Gene Therapy* 2017; 28: 62-66.
66. Nelapu S, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, Gutierrez C, Locke F, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy: assessment and management of toxicities. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2018; 15: 47-62.
67. Thomis D, Markt S, Bonini C, Traversari C, Gilman M, Bordignon C, et al. A Fas-based suicide switch in human T cells for the treatment of graft-versus-host disease. *Blood* 2001; 97: 1249-1257.
68. Springer C, Niculescu-Duvaz I. Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *Journal of Clinical Investigation* 200; 105: 1161-1167.
69. Hoyos V, Savoldo B, Quintareli C, Mahendravada A, Zhang M; Vera J, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia* 201; 24: 1160-1170.
70. Di Satasi A, Tey S, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible apoptosis as safety switch for adoptative cell therapy. *The New England Journal of Medicine* 2011; 365: 1673-1683.
71. Kloss C, Condomines M, Cartelliere M, Bachmann M, Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nature Biotechnology* 2012; 31: 71-75.