



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**

Institutionen för biomedicin och veterinär  
folkhälsovetenskap

# **Framtida möjligheter för adoptiv T-cellsbehandling av tumörer hos hund**

*Nina Pyykkönen*

*Uppsala  
2016*

*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

*Delnummer i serien: 2016:71*



# Framtida möjligheter för adoptiv T-cellsbehandling av tumörer hos hund

*Nina Pyykkönen*

**Handledare:** *Caroline Fossum & Magnus Åbrink, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, sektionen för immunologi*

**Examinator:** *Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** grundnivå, G2E

**Kurstitel:** *Självständigt arbete i veterinärmedicin*

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2016

**Serienamn:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

**Delnummer i serie:** 2016:71

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** *Adoptiv immunterapi, T-cell, CAR, TCR,*

**Key words:** *Adoptive immunotherapy, T cell, CAR, TCR*

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap



## **INNEHÅLL**

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning.....	3
Material och metoder .....	3
Litteraturoversikt.....	3
Diskussion .....	10
Referenslista .....	11



## SAMMANFATTNING

Immunförsvaret spelar en viktig roll i eliminering av tumörceller. Studier har visat att individer med nedsatt immunförsvaret har större benägenhet att utveckla tumörer och sedan slutet av 1800-talet har man studerat kopplingen mellan immunförsvaret och cancer. Många intressanta behandlingsmetoder där man utnyttjar kroppens egna försvar för att eliminera tumörer har utvecklats sedan dess. Adoptiv immunterapi mot cancer är en behandlingsform som de senaste åren rönt stort intresse och studier har visat lovande resultat hos patienter med olika cancerformer. Genom att isolera T-celler från patienter, expandera dem *ex vivo* och sedan återföra T-cellerna till samma patient, kan immunförsvaret mot tumörceller förstärkas. 2013 utnämndes adoptiv immunterapi till ”Breakthrough of the Year” av tidningen *Science*.

Kliniska studier med naturligt förekommande tumörreaktiva T-celler, även kallade tumörinfiltrerande lymfocyter (TIL) har gett lovande resultat särskilt på patienter med malignt melanom. Det har dock visats vara svårt att använda adoptiv T-cellsbehandling med TIL mot andra cancerformer än melanom, då antalet tumörinfiltrerade T-celler som har kunnat isoleras har varit alldeles för lågt. För att komma runt problemet har möjligheten att expandera icke specifika T-celler undersökts. Genom att genetiskt modifiera T-cellerna med receptorer som känner igen tumörassocierade antigen (TAA) kan cellerna ges tumörspecificiteten de annars saknar. De två receptortyperna som framförallt har modifierats är T-cellsreceptorn (TCR) och chimära antigenreceptorer (CAR).

T-celler med genetiskt modifierade TCR har visat bra effekt framförallt i individer med melanom. De är dock inte alltid effektiva då TCR-modifierade T-celler är beroende av major histocompatibility complex-molekyler (MHC) för att de ska känna igen antigen och aktiveras. Eftersom tumörer kan skapa en immunsupprimerande miljö och nedreglera uttrycket av MHC, är detta ett problem. För att överkomma problemet har chimära antigenreceptorer (CAR) utvecklats. Chimära antigenreceptorer är en syntetisk receptor som kombinerar antikroppens förmåga att känna igen antigen med T-cellsreceptorns förmåga att aktivera T-cells tumördödande egenskaper. CAR är inte beroende av MHC-molekyler för att känna igen antigen, utan känner istället igen antigen på målcellens yta. Kliniska studier med CAR T-celler har visat lovande resultat på patienter med bland annat kronisk lymfatisk leukemi.

Trots lovande resultat från kliniska studier finns det flera hinder som måste överkommas innan adoptiv T-cellsbehandling kan användas som standard på kliniker både på djur- och humansidan. Behandlingen är i dagsläget väldigt dyr och kostnaderna måste fås ned genom att förenkla och effektivisera framställningen av de modifierade T-cellerna. Specificiteten hos de modifierade T-cellerna måste förbättras för att undvika allvarliga biverkningar. Antigen som är gemensamma för tumörceller och kroppens normala celler kan leda till on-target off-tumor-toxicitet, en biverkning då T-cellerna attackerar kroppens friska vävnad, vilket kan leda till svåra påföljder för patienterna.

## SUMMARY

The immune system plays an important role in the elimination of tumour cells. Research shows that an individual with an impaired immune system runs a higher risk of developing tumours. Since the late 1800s researchers have looked into the connection between the immune defence and cancer. Adoptive immunotherapy as a treatment against cancer is a subject of heightened interest. The procedure of isolating T cells from patients, expanding them *ex vivo* and reintroduce them to the patient, has been shown to enhance the immune response against tumour cells.

Tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) have been used in clinical studies with promising results in patients with malignant melanoma. Though adoptive immunotherapy with TIL has been successful it has yet to be improved for use in other forms of cancer with a low number of TILs. Genetically modified T cells have in the last few years given researchers the tools to overcome that obstacle. The two main receptor types getting most attention are T cell receptors (TCRs) and chimeric antigen receptors (CAR).

Genetically modified TCRs have shown promising results in individuals with melanoma. Because TCRs are dependent on major histocompatibility complex molecules (MHC) to recognise antigen, they are not always applicable in this form of treatment because many tumours have the ability to down regulate MHC. Chimeric antigen receptors are synthetic receptors that are not dependent on MHC to be able to recognize antigens. Instead they recognize antigens displayed on the cells surface. So far CAR T cells have shown the most promising results on patients with haematological tumours.

Future challenges for adoptive T cell treatment are to enhance the specificity of the modified T cells. Target antigens that are expressed by both the tumour cells and normal healthy cells can result in on-target off-tumour toxicity. This is when T cells target healthy tissue, which can lead to severe side effects. Adoptive T cell treatment is an expensive treatment and for clinics to be able to use it the costs have to decrease significantly. The way to do that is to make the production of modified T cells more effective and simple.



## INLEDNING

Cancer är en svår sjukdom hos både människa och hund. Cancer är en av de ledande dödsorsakerna hos hundar i Sverige (Dobson *et al.*, 2002) och djurägarna ställer allt högre önskemål och krav på djursjukhusen vad gäller behandling av deras djur (Prof. Rönnberg, H., Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, SLU, pers. medd., 2016-02-29), varför detta är ett angeläget område för forskning och utveckling av nya behandlingsmetoder både inom veterinär- och humanmedicin. Under de senaste två årtiondena har forskningen kring området adoptiv immunterapi intensifierats (Regan *et al.*, 2016) och prekliniska och kliniska studier har visat intressanta resultat. Därför valde tidskriften *Science* att 2013 utnämna immunterapin till ”Breakthrough of the Year” (Couzin-Frankel, 2013).

Syftet med denna litteraturstudie är att sammanfatta användningen av adoptiv immunterapi på människa och hund. Fokus kommer att ligga på användningen av kroppsegna T-celler för att behandla olika sorters tumörer. Det har visat sig vara möjligt att stoppa tillväxten och i vissa fall helt utplåna tumörer med hjälp av adoptiv T-cellsbehandling. Prekliniska och kliniska studier med autologa tumörinfiltrerande lymfocyter (TIL) och genetiskt modifierade T-celler har visat väldigt lovande resultat på individer med olika sorters tumörer. Det medföljer dock fortfarande allvarliga biverkningar med dessa behandlingsformer.

Frågan är hur långt forskningen kommit vad gäller adoptiv T-cellsbehandling mot cancer? Vilka möjligheter finns det i dagsläget att behandla cancerpatienter med genetiskt modifierade T-celler? Vad återstår att göra innan man kan använda sig av adoptiv T-cellsbehandling inom både veterinär- och humanmedicin?

## MATERIAL OCH METODER

Litteratur till den här studien erhöles via databaserna PubMed, Web of science och Google scholar. Sökord som använts är bland annat (immunotherapy OR immunology) AND (cancer OR tumour OR neoplasia) AND (canine OR dog) (T cells) AND (CAR OR TCR). Flera olika kombinationer av dessa sökord har använts för att få fram relevant litteratur. Referenslistor från vetenskapliga artiklar har också använts för att hitta mer litteratur kring ämnet.

## LITTERATURÖVERSIKT

Det har länge diskuterats kring immunförsvarets funktion i att motverka utvecklingen av tumörer. Redan i slutet av 1800-talet märkte William Coley kopplingen (Parish, 2003) då han gjorde försök med att injicera cancerpatienter med *S. pyogenes* and *Serratia marcescens*. Behandlingen med bakterier visade sig minska tumörernas storlek (Hoption Cann *et al.*, 2003) och immunförsvarets roll i kampen mot cancer fick sin början. Sedan Coley’s första studier har många intressanta immunologiska behandlingsmetoder där man utnyttjar kroppens egna försvar för att eliminera tumörer utvecklats. Både det medfödda och det adaptiva immunförsvaret har

studerats ur den här aspekten. För att amplifiera ett immunsvår från det medfödda ospecifika immunförsvaret används så kallade biologiska responsmodifierare (BRM). BRM kan vara bakterier, virus, cytokiner som IL-2, IL-12 och TNF- $\alpha$ . (Regan *et al.*, 2016). Försök med Bacillus Calmette-Guéri (BCG), som är en försvagad stam av *Mycobacterium bovis*, har visat sig ha en tumördödande effekt på flera olika cancerformer, framför allt cancer i urinblåsan (Killick *et al.*, 2015). Problemet med immunterapi med hjälp av det medfödda immunförsvaret är att försvaret inte utvecklar ett minne. Det kan inte komma ihåg antigen som det utsatts för tidigare, vilket betyder att upprepade behandlingar måste ges för att stimulera immunförsvaret och hålla tumörerna borta (Regan *et al.*, 2016).

Det adaptiva försvaret är långsammare, men däremot är immunsvaret specifikt. Försvaret består av B- och T-celler. Det adaptiva försvaret har förmåga att känna igen främmande antigener, komma ihåg dem och sedan förstöra dem när de stöter på dem igen. Sedan länge har monoklonala antikroppar använts inom immunterapi (Biller, 2007) och försök att få fram cancervaccin pågår kontinuerligt (Gilboa, 2004; Bergman, 2007; Andersen *et al.*, 2013). T-cellernas roll inom immunterapi är varierad. CD4<sup>+</sup> T-cellerna är så kallade T-hjälparceller. De har flera funktioner, bland annat producerar de IL-2 som förstärker proliferationen av CD8<sup>+</sup> T-celler. Regulatoriska T-celler (T<sub>reg</sub>) är en undergrupp av CD4<sup>+</sup> T-celler och studier har visat att regulatoriska T-celler kan dämpa anti-tumör immunsvår genom att utsöndra immundämpande cytokiner som TGF- $\beta$  och IL-10 (Bergman, 2014). I de följande avsnitten kommer fokus ligga på cytotoxiska CD8<sup>+</sup> T-celler, då de visat sig ha stor betydelse för prognosen för individer med cancer.

## **T-cellers roll inom immunterapi**

Under de senaste årtiondena har kunskaperna kring T-cellers roll i behandlingen av cancer ökat. Studier har kunnat visa ett tydligt samband mellan antal tumörinfiltrerande cytotoxiska CD8<sup>+</sup> T-celler och överlevnad hos människor med bland annat colorektal cancer, lungcancer och livmoderhalscancer (Sytse J Piersma, 2007; O'Connor & Wilson-Robles, 2014). Ju högre andel CD8<sup>+</sup> T-celler i tumörvävnaden och perifert, desto mindre risk för metastaser och därmed bättre prognos. Liknande observationer har även gjorts på hundar med juvertumörer, där ökade nivåer av CD8<sup>+</sup> T-celler i tumörerna korrelerade med minskad metastasrisk (Estrela-Lima *et al.*, 2010). I en studie observerade forskare att hundar med osteosarkom som uppvisade minskande antal CD8<sup>+</sup> T-celler hade en kortare överlevnadstid (O'Connor & Wilson-Robles, 2014). Cellerna verkar dock inte alltid ha tillräckligt med kraft att döda tumörcellerna trots att de till en hög grad kan infiltrera tumören. Anledningen till detta kan vara att tumörerna ofta uttrycker flera olika proteiner vilka skapar en immunsupprimerande miljö som gör att T-cellerna inte kan proliferera. Att T-cellerna inte kan utföra sin uppgift har fått forskarna att fundera på hur man ska komma runt problemet (Marincola *et al.*, 1999).

En T-cellsbaserad immunterapi som rönt stort intresse inom immunologin de senaste åren är s.k. adoptiv T-cellsbehandling. Forskarna har här gjort försök med att isolera och aktivera T-celler

från patienten. Metoden bygger på att när T-cellerna tas ur den immunsupprimerande miljön kan de expanderas kraftigt *ex vivo* för att sedan återföras till samma individ och ge ett ökat immunsvär. Denna form av behandling har visat sig ge bra resultat (Parish, 2003).

### **T-cellreceptorns struktur och funktion**

Inom adoptiv T-cellsbehandling är det vanligast att det används CD8<sup>+</sup> T-celler som har kapacitet att döda tumörcellen direkt (Sytse J Piersma, 2007; Wu *et al.*, 2012; Duong *et al.*, 2015). T-celler har på sin cellyta en T-cells receptor (TCR) som är en heterodimer och består av en  $\alpha$ - och en  $\beta$ -kedja.  $\alpha$ - och  $\beta$ -kedjan består i sin tur av en variabel och en konstant region. På receptorns variabla regioner finns CDR-loopar. Det är denna del av receptorn som känner igen och fäster till antigen på målcellen. Vid T-cellsreceptorn sitter även CD3-komplexet som hjälper T-cellsreceptorn att skicka vidare signaler som aktiverar T-cellen (Harris & Kranz, 2016). Peptidfragment av antigenet presenteras för T-cellen på målcellens yta med hjälp av major histocompatibility complex-molekyler (MHC). TCR har förmågan att känna igen och aktivera T-cellen med hjälp av så lite som ett enda MHC/peptid-komplex (Sykulev *et al.*, 1996). Det är denna enorma känslighet, som gör att TCR kan känna igen tumörassocierade antigen (TAA) även om de endast skulle uttryckas i väldigt låga nivåer (Harris & Kranz, 2016). När T-cellerna stöter på celler som uppvisar antigen de känner igen, kan de inducera celldöd genom att släppa ifrån sig perforiner som skapar porer i målcellens membran, vilket möjliggör för granzymmer att ta sig in i cellerna och inducerar apoptos. Apoptos induceras även när Fas-ligand (FasL) binder till en Fas-receptor på tumörcellen och inducerar en kaspaskaskad som leder till apoptos (Essand & Loskog, 2013).

Efter behandling med cytostatika kan tumörer uppvisa neoantigen – nya antigen som tidigare inte uppfattats av immunsystemet. Dessa neoantigen är ypperliga för T-cellerna att uppfatta som främmande och därmed kunna känna igen och döda tumörcellerna. Eftersom antalet T-celler dock minskar efter cytostatikabehandling, kan det vara en orsak till att de inte har kraft nog att döda tumörerna (O'Connor & Wilson-Robles, 2014). En studie med lovande resultat har gjorts på hundar med B-cells non-Hodgkins lymfom. Flertalet studier har visat att ju snabbare T-cellerna återhämtar sig efter cytostatikabehandling, desto bättre prognos har patienterna. I denna studie behandlades 8 hundar först med cytostatika och därefter fick de tre infusioner av autologa icke specifika T-celler som expanderats *ex vivo* med hjälp av artificiella antigenpresenterande celler. Resultaten visade att T-cellerna överlevde minst 49 dagar, tog sig till vävnaderna där tumörcellerna befann sig vilket ledde till förlängd överlevnad hos de behandlade hundarna jämfört med kontrollhundar som enbart fått cytostatikabehandling. Medianöverlevnaden ökade från 167 dagar till 392 dagar och den tumörfria tiden från 71 dagar till 338 dagar. Denna studie anses vara en bra grund för att vidareutveckla behandlingar med genmodifierade T-celler (O'Connor *et al.*, 2012).

### **TIL – tumörinfiltrerande lymfocyter**

För att öka aktiviteten hos T-celler med tumörspecificitet utnyttjas naturligt förekommande tumörreaktiva T-celler, även kallade tumörinfiltrerande lymfocyter (TIL). Dessa isolerades och extraherades direkt från cancerpatienters tumörer. Metoden testades mer specifikt på patienter med malignt melanom (Marincola *et al.*, 1999; Restifo *et al.*, 2012). Kliniska studier med TIL på malignt melanom-patienter har visat på goda resultat. Av 93 personer som var med i studien svarade 56 % på behandlingen och av dem var det 20 stycken som visade en fullständig regression av tumörerna. Efter 3 år visade fortfarande 19 personer en pågående regression (Rosenberg *et al.*, 2011).

Även om försök har gjorts på andra typer av tumörer, har behandling med TIL huvudsakligen kunnat användas mot melanom och inga kliniska studier har gjorts på hundar med hjälp av TIL. Det har visat sig svårt att isolera och extrahera tillräckligt stora antal av TIL från andra sorters tumörer än melanom (Duong *et al.*, 2015). Att på genetisk väg modifiera T-celler öppnar dock möjligheten att på kort tid producera en stor mängd TAA-specifika T-celler och därmed öka effektiviteten av adoptiv T-cellsbehandling.

### **Genetisk modifierade TCR T-celler**

Forskning kring genmodifiering av T-celler har rönt stort intresse (Hinrichs & Rosenberg, 2014). Möjligheten att genetiskt modifiera T-celler genom att överföra receptorer med tumörspecificitet, har varit mål för intensiv forskning de senaste åren (Regan *et al.*, 2016). De två receptortyperna som huvudsakligen studerats och modifierats är T-cellsreceptorer (TCR) och chimära antigenreceptorer (CAR). De är uppbyggda på olika sätt och har olika sätt att känna igen tumörassocierade antigen (TAA).

Principen bygger på att icke specifika perifera T-celler isoleras och expanderas *ex vivo*. TCR-generna från TAA-specifika TCR:er klonas och överförs med virala vektorer som t.ex. retrovirus eller lentivirus. Retrovirus och lentivirus är de genöverföringsvektorer som använts mest i försök. Fördelarna med att använda virus är att de resulterar i en långvarig modifiering av genomet. Generna inkorporeras i cellens DNA och resultatet blir att den modifierade T-cellen får en ny specificitet (Shi *et al.*, 2013; Srivastava & Riddell, 2015).

För att hitta de receptorer som ska klonas har försök gjorts där det tagits tumörinfiltrerande lymfocyter från personer med melanom. Dessa T-celler visade affinitet för antigenet MART-1. MART-1 är ett protein som är vanligt förekommande hos malignt melanom och uttrycks även av vanliga melanocyter (Fetsch *et al.*, 1999). Cellerna klonades, generna för TCR:en isolerades och fördes över till samma patient, men till T-celler som inte visat specificitet för MART-1. Försöket visade att cellernas specificitet kunde ändras på det här sättet (Johnson *et al.*, 2006). Tekniken kräver dock att T-celler från människor kan lokaliserats och extraheras, vilket har visat sig inte alltid vara så lätt. På grund av detta har transgena möss blivit väldigt viktiga för denna typ av forskning. Genom att använda transgena möss har forskare lyckats producera TCR T-celler mot

humana TAA som p53 och Carcinoembryonic antigen (CEA). TCR isoleras från mössen, generna klonas och rekombinanta vektorer överförs sedan till patientens kroppsegna celler som då kommer uttrycka TCR från de transgena mössen (Cohen *et al.*, 2005; Parkhurst *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011).

### *Kliniska studier*

TCR med affinitet för antigenerna MART-1 och gp100 från transgena möss expanderades *ex vivo* och gavs till 36 patienter med metastatiskt melanom. Av de patienter som fick TCR från transgena möss visade 19 % på tumörregression. Svåra biverkningar uppkom dock då T-cellerna även riktade in sig på melanocyter på hud, ögon och öron vilket i några fall resulterade i uveit och hörselbortfall (Johnson *et al.*, 2006).

Försök har även gjorts på personer med metastaserande synovialt sarkom och melanom. I försöket användes modifierade TCR T-celler mot antigenet NY-ESO-1. Detta antigen har visat sig vara bra att använda sig av, eftersom det uttrycks enbart av tumörer och inte av normal vävnad. Ingen on-target off-tumor-toxicitet uppvisades i studien. Fyra av sex patienter med synovialt sarkom och fem av elva patienter med melanom, uppnådde objektiv klinisk respons. Två av patienterna med melanom uppvisade en komplett regression av tumörerna som höll i sig över ett år. En av patienterna med synovialt sarkom visade på partiell respons vilken var kvarstående fortfarande efter 18 månader (Robbins *et al.*, 2011).

### *Biverkningar*

Även om behandling med modifierade TCR T-celler har visat på positiva resultat i, uppstår det en del allvarliga biverkningar som måste minimeras innan metoden kan användas säkert. En av de allvarligaste biverkningarna är s.k. on-target off-tumor-toxicitet. Eftersom vissa av TCR T-cellerna riktar sig mot antigen som även uttrycks av normal vävnad, kan de ibland attackera friska organ. Om dessa organ är livsviktiga kan biverkningarna bli mycket allvarliga (Baas, 2013).

I en genomförd studie i ämnet behandlades 9 cancerpatienter med TCR T-celler riktade mot antigenet MAGE-A3. Visserligen uppstod det hos 5 av patienterna en klinisk regression, men två av patienterna avled på grund av neurologisk toxicitet. Nervcellsdöden tros bero på en inflammation orsakad av de modifierade TCR T-cellerna som reagerat på ett liknande antigen, MAGE-12, som forskare tidigare inte visste fanns i hjärnan (Morgan *et al.*, 2013).

Ett annat problem med TCR T-celler är att de är beroende av MHC-molekyler för att kunna känna igen antigen. Tumörceller har möjlighet att nedreglera MHC-molekyler, vilket gör att T-cellerna då inte kan känna igen antigen (Drake *et al.*, 2006). Lösningen på det kan vara en syntetisk form av receptor; chimär antigenreceptor (CAR). CAR är inte beroende av MHC-

molekyler för att upptäcka antigen. Det är numera CAR T-celler som används mest i kliniska studier (Harris & Kranz, 2016).

### **CAR T-celler**

En chimär antigenreceptor är helt syntetiskt konstruerad. CAR är en rekombinant receptor som kombinerar antikroppens förmåga att känna igen och binda till ett antigen med T-cellerreceptors förmåga att aktivera T-cellens tumördödande egenskaper. Receptorn utgörs av flera delar. Den extracellulära delen består av de variabla regionerna av de tunga (TK) och lätta kedjorna (LK) på en monoklonal antikropp. De variabla regionerna kopplas ihop med en länk av peptider och bildar en "single chain variable domain" (scFv). Detta är den antigenbindande delen av CAR. Den extracellulära delen kopplas till en transmembranös del. Kopplingen ska vara flexibel så att den antigenbindande delen har möjlighet att röra på sig och binda till antigenet. Kopplingen kan t.ex. bestå av IgG, men diskussioner pågår angående vilken typ av koppling som fungerar bäst (Srivastava & Riddell, 2015). Den transmembranösa delen förankrar receptorn i cellmembranet och består av antingen CD28 eller CD3 $\zeta$ . Den intracellulära delen är den signalöverförande domänen som aktiverar de tumördödande effekterna hos T-cellen. I den första generationen av CAR bestod den intracellulära delen endast av signaldomänen CD3 $\zeta$  från en TCR. Försök visade dock att signalen inte var så stark eller långvarig. I tredje generationens CAR inkorporerades därmed kostimulatoriska signalförstärkande domäner som CD28, OX40 och 4-1BB. För att T-cellen ska aktiveras måste fosforylering av ITAM:s ske. Vid CD3 $\zeta$  finns tre stycken ITAM:s fästa (Jena *et al.*, 2013; Dotti *et al.*, 2014).

CAR T-celler möjliggör behandling med T-celler oberoende av MHC-molekyler. Flertalet monoklonala antikroppar mot tumör associerade antigen (TAA) har redan identifierats både på human- och djursidan. Dessa kan användas för att konstruera CAR vilket innebär att det omständliga jobbet med att isolera passande TCR kan uteslutas (DeRenzo & Gottschalk, 2014). Nackdelen är dock att CAR T-celler endast kan känna igen antigen på cellytan, varför intracellulära antigen förblir oupptäckta (Duong *et al.*, 2015).

### **Kliniska studier**

CD19 är ett antigen som uttrycks av både normala och maligna B-celler (Essand & Loskog, 2013). CD19 är ett bra antigen att konstruera CAR T-celler mot, då även om T-cellerna förstör de normala B-cellerna, är konsekvenserna av det hanterbara och behandlingsbara. I ett försök testades CD19 TCR T-celler på tre patienter som led av kronisk lymfatisk leukemi och hade utvecklat resistens mot cellgiftsbehandling. Studien visade att en CAR T-cell i snitt kunde döda 1000 leukemiceller *in vivo*. Effekten av T-cellerna kvarstod minst 6 månader i blod och benmärg. Av de tre patienterna som behandlades uppvisade två stycken komplett respons och en partiell respons som hade hållit i sig i 8 månader (Kalos *et al.*, 2011).

CAR T-celler riktade mot antigenet ERBB2 testades 2010 på en patient. ERBB2 tillhör familjen

epidermal tillväxtfaktor som uttrycks i flera cancerformer, framförallt bröstcancer. I tidigare kliniska studier på bröstcancerpatienter hade man sett bra kliniska effekt av monoklonala antikroppar riktade mot ERBB2. I studien av Morgan *et al.* utvecklades CAR T-celler som skulle rikta sig mot detta antigen. Patienten som injicerades med CAR T-cellerna fick en stark reaktion. Redan efter 15 minuter efter att hon injicerades med CAR T-cellerna fick hon svårigheter att andas och efter några dagar avled hon. Anledningen till detta tros vara att CAR T-cellerna förutom att inrikta sig på tumörcellerna även kände igen ERBB2 som uttrycktes i normala lungceller, varpå inflammatoriska cytokiner utsöndrades vilket till slut ledde till en s.k. cytokinstorm (hypercytokinemi). Detta ledde till lungödem och till slut en total organsvikt varpå patienten avled (Morgan *et al.*, 2010). Tidigare prekliniska studier hade gjorts på möss med humana bröstcancer-tumörer och resultatet från den studien var lovande och visade inte på de biverkningarna som sedan uppstod i den humana studien (Zhao *et al.*, 2009).

Hittills verkar det som att de bästa resultaten har kommit från försök som riktar in sig på CD19-antigenet. År 2014 rapporterades det om en studie där 30 patienter, både barn och vuxna, med akut lymfatisk leukemi behandlades med CAR T-celler riktade mot CD19. Vuxna med återkommande lymfatisk leukemi har en dålig prognos och det är den ledande dödsorsaken inom barncancer. En månad efter behandlingen uppvisade 27 av de 30 patienterna fullständig remission. Uppföljning gjordes mellan 2-24 månader och av dessa 27 patienter visade 19 patienter pågående remission (Maude *et al.*, 2014).

Än så länge har försök med CAR T-celler på hundar inte kommit lika långt som på humansidan. Framsteg görs dock hela tiden. Man har lyckats producera CAR T-celler riktade mot HER2-positiva osteosarkom hos hund. I studien testades både CAR med en human transmembranös- och signalöverförande del och CAR där alla delarna var från hund. Båda varianterna visade sig vara i princip lika effektiva på att döda tumörcellerna. Detta innebär att det är möjligt att skapa CAR T-celler riktade mot tumörceller hos hund (Mata *et al.*, 2014). En pilotstudie är sedan maj 2015 igång på University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine, ledd av Nicola Mason. I studien behandlas hundar med B-cells lymfom med CAR T-celler riktade mot antigenet CD20. Inga resultat från studien har dock publicerats än (*Penn Vet | Canine Lymphoma - RNA-transfected CD40-B Cell Vaccines for Dogs With Newly Diagnosed Lymphoma - Re-directed Autologous T cell Therapy for drug resistant or refractory CD20+ B cell lymphoma*).

### **Biverkningar**

Trots att lovande resultat har kommit från flera studier går det inte att komma ifrån att allvarliga biverkningar fortfarande uppkommer med behandling av CAR T-celler. En av dessa är ”cytokine release syndrome” (CRS) som har beskrivits här ovan. Frisättningen av cytokiner är ofrånkomligt vid behandling med CAR T-celler, men i de flesta fallen är de hanterbara och kan behandlas med bland annat glukokortikoider. (Xu & Tang, 2014). Det är när nivåerna av cytokiner ökar dramatiskt som det kan drabba vissa patienter väldigt svårt. Fall har rapporterats där personer har avlidit på grund av detta (Morgan *et al.*, 2006; Brentjens *et al.*, 2010).

Tumor lysis syndrome (TLS) uppstår när tumörerna dör och deras innehåll frigörs till blodbanan (Howard *et al.*, 2011). Detta kan leda till hyperkalemi, hyperfosfatemi och hypocalcemi, som i sin tur kan leda till bland annat arytmier och njurskador (Porter *et al.*, 2011). B-cellsaplasi är en annan biverkning som ofta uppstår hos patienter behandlade med anti-CD19 CAR T-celler. Detta är dock behandlingsbart med intravenösa injektioner av IgG och är inte livshotande (Essand & Loskog, 2013; Duong *et al.*, 2015).

## DISKUSSION

Cellgiftsbehandling, strålning och kirurgi har etablerat sig som standardbehandlingarna för både djur och människor med cancer. De senaste årtiondena har dock adoptiv immunterapi med T-celler väckt forskares uppmärksamhet och möjligheterna att immunterapin ska bli en etablerad behandlingsform mot cancer börjar närma sig. Det återstår dock flera hinder innan behandlingsmetoden kommer vara en självklar del på klinikerna.

Forskningen inom adoptiv T-cellsbehandling har än så länge inte kommit lika långt inom veterinärmedicinen som den har på humansidan. Dock görs det framsteg hela tiden och möjligheterna att immunterapin ska kunna användas frekvent för behandling mot cancer hos hund närmar sig med stormsteg (Anderson & Modiano, 2015). Cancer hos hundar är även en utmärkt möjlighet att fungera som en komparativ modell för cancer hos människor. Hundar, till skillnad mot transgena möss, är immunokompetenta, är genetiskt väldigt lika människor, lever i samma miljöer som vi och tumörer uppstår hos alla raser (Paoloni & Khanna, 2008). Kliniska försök på hundar skulle därmed inte bara förlänga livet på hundar utan även förmedla viktig information till humana studier.

Adoptiv immunterapi har kommit långt sedan de första kliniska studierna. Att kunna extrahera T-celler från patienters melanom, expandera dem *ex vivo*, för att sedan återföra till patienter, har visat på resultat som tidigare inte setts hos patienter med malignt melanom. I flera fall har långvarig total remission kunnat påvisas. Det har dock varit komplicerat att applicera behandling med TIL på andra sorters tumörer då det har visat sig vara svårt att extrahera och expandera ett tillräckligt stort antal T-celler från andra tumörtyper (Duong *et al.*, 2015). För att överkomma den problematiken har det gjorts försök med genetisk modifierade T-celler. I dagsläget görs den mesta forskningen på TCR T-celler och CAR T-celler (Hinrichs & Rosenberg, 2014).

Modifierade TCR T-celler har testats på flera olika tumörtyper, bland annat melanom och synovialt sarkom, med varierande resultat (Johnson *et al.*, 2006; Robbins *et al.*, 2011). Det som ska tas i hänsyn är de svåra biverkningarna som kan uppstå med denna behandling. Den vanligaste, och farligaste, är on-target off-tumor-toxicitet då TCR T-cellerna även attackerar normal frisk vävnad (Baas, 2013). Detta gör att behovet att identifiera och använda sig av antigener som endast uttrycks av tumörceller är avgörande. Alternativt kan självantigen som



uttrycks av tumörceller och organ av mindre betydelse vara en lösning. På detta sätt skulle biverkningarna kunna reduceras och bli mindre allvarliga.

Modifierade TCR T-celler kan visa sig vara ineffektiva i vissa fall då de är beroende av MHC-molekyler att uppvisa antigen för dem. Tumörer har en immunsupprimerande kapacitet och kan bland annat nedreglera uttrycket av MHC-molekyler, vilket gör att TCR T-cellen inte aktiveras (Drake *et al.*, 2006). En annan form av genetiskt modifierad T-cell är CAR T-cellen som inte är beroende av MHC-molekyler för att aktiveras, utan känner igen antigen på tumörcellens yta. CAR T-cellen kombinerar de bästa av två världar, monoklona antikroppens kapacitet att känna igen och fästa till antigen, samt T-cellreceptorns förmåga att aktivera T-cellen (Jena *et al.*, 2013) (Srivastava & Riddell, 2015).

Mycket positiva resultat har visats i humana kliniska studier gjorda på patienter med akut lymfatisk leukemi (Maude *et al.*, 2014) och flera kliniska studier pågår där patienter med tumörer av hematologiskt ursprung behandlas. Bland annat genomförs en studie på Uppsala Universitet som har visat lovande resultat hittills (Essand & Loskog, 2013).

Det som också är tydligt i studierna är att behandlingarna för med sig allvarliga biverkningar. Cytokine release syndrome (CRS) och tumor lysis syndrome (TLS) (Howard *et al.*, 2011) är de allvarligaste som stötts på hittills. I två fall har CRS varit så pass allvarlig att patienter har avlidit (Brentjens *et al.*, 2010; Morgan *et al.*, 2010).

Eftersom de modifierade T-cellerna är konstruerade att motstå de immunsupprimerande mekanismerna från tumörceller, kan det uppstå allvarliga situationer om T-cellerna bara fortsätter att expandera och inte dör *in vivo*. Därför har forskare föreslagit att en s.k. ”suicide gene” som inkorporerades i T-cellen. Om svår toxicitet uppstår (O’Connor & Wilson-Robles, 2014) finns då möjligheten att kontrollera T-cellens aktivitet.

Sammanfattningsvis har det uppvisats mycket bra resultat av användningen av modifierade T-celler, men det finns mycket kvar att göra innan det kan användas i större utsträckning på kliniker. Kostanden är fortfarande höga, runt 50 000 amerikanska dollar per patient (Anderson & Modiano, 2015; Duong *et al.*, 2015) och arbetet bakom krävande, vilket i dagsläget förhindrar att den här sortens behandlingar skulle kunna användas dagligen på kliniken. I framtiden kommer förmodligen modifierade T-celler inte kunna användas som enda behandlingsmetod, men det kan utgöra ett bra komplement till de mer traditionella behandlingarna som kirurgi, cellgiftsbehandling och strålning.

## REFERENSLISTA

Andersen, B. M., Pluhar, G. E., Seiler, C. E., Goulart, M. R., SantaCruz, K. S., Schutten, M. M., Meints, J. P., O’Sullivan, M. G., Bentley, R. T., Packer, R. A., Thomovsky, S. A., Chen, A. V., Faissler, D.,

- Chen, W., Hunt, M. A., Olin, M. R. & Ohlfest, J. R. (2013). Vaccination for Invasive Canine Meningioma Induces In Situ Production of Antibodies Capable of Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *Cancer Research*, 73: 2987–2997.
- Anderson, K. L. & Modiano, J. F. (2015). Progress in Adaptive Immunotherapy for Cancer in Companion Animals: Success on the Path to a Cure. *Veterinary Sciences*, 2: 363–387.
- Baas, T. (2013). Sleuthing for toxicity. *SciBX: Science-Business eXchange* [online], 6(33). Available from: <http://www.nature.com/scibx/journal/v6/n33/full/scibx.2013.879.html>. [Accessed 2016-03-21].
- Bergman, P. J. (2007). Anticancer vaccines. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 37: 1111–1119; vi–ii.
- Bergman, P. J. (2014). Immunotherapy in Veterinary Oncology. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 44: 925–939.
- Billir, B. J. (2007). Cancer Immunotherapy for the Veterinary Patient. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37: 1137–1149 (State of the Art Veterinary Oncology).
- Brentjens, R., Yeh, R., Bernal, Y., Riviere, I. & Sadelain, M. (2010). Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia With Genetically Targeted Autologous T Cells: Case Report of an Unforeseen Adverse Event in a Phase I Clinical Trial. *Molecular Therapy*, 18: 666–668.
- Cohen, C. J., Zheng, Z., Bray, R., Zhao, Y., Sherman, L. A., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. (2005). Recognition of fresh human tumor by human peripheral blood lymphocytes transduced with a bicistronic retroviral vector encoding a murine anti-p53 TCR. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175: 5799–5808.
- Couzin-Frankel, J. (2013). Cancer Immunotherapy. *Science*, 342: 1432–1433.
- DeRenzo, C. & Gottschalk, S. (2014). Genetically Modified T-Cell Therapy for Osteosarcoma. *Advances in experimental medicine and biology*, 804: 323–340.
- Dobson, J. M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K. & Wood, J. L. N. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 43: 240–246.
- Dotti, G., Gottschalk, S., Savoldo, B. & Brenner, M. K. (2014). Design and Development of Therapies using Chimeric Antigen Receptor-Expressing T cells. *Immunological reviews* [online], 257(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3874724/>. [Accessed 2016-03-23].
- Drake, C. G., Jaffee, E. & Pardoll, D. M. (2006). Mechanisms of Immune Evasion by Tumors. *Advances in Immunology*: 51–81. Elsevier. ISBN 978-0-12-022489-0.
- Duong, C. P. M., Yong, C. S. M., Kershaw, M. H., Slaney, C. Y. & Darcy, P. K. (2015). Cancer immunotherapy utilizing gene-modified T cells: From the bench to the clinic. *Molecular Immunology*, 67: 46–57
- Essand, M. & Loskog, A. S. I. (2013). Genetically engineered T cells for the treatment of cancer. *Journal of Internal Medicine*, 273: 166–181.
- Estrela-Lima, A., Araújo, M. S. S., Costa-Neto, J. M., Teixeira-Carvalho, A., Barrouin-Melo, S. M., Cardoso, S. V., Martins-Filho, O. A., Serakides, R. & Cassali, G. D. (2010). Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC cancer*, 10: 256.

- Fetsch, P. A., Marincola, F. M., Filie, A., Hijazi, Y. M., Kleiner, D. E. & Abati, A. (1999). Melanoma-associated antigen recognized by T cells (MART-1): the advent of a preferred immunocytochemical antibody for the diagnosis of metastatic malignant melanoma with fine-needle aspiration. *Cancer*, 87: 37–42.
- Gilboa, E. (2004). The promise of cancer vaccines. *Nature Reviews Cancer*, 4: 401–411.
- Harris, D. T. & Kranz, D. M. (2016). Adoptive T Cell Therapies: A Comparison of T Cell Receptors and Chimeric Antigen Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37: 220–230.
- Hinrichs, C. S. & Rosenberg, S. A. (2014). Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunological reviews*, 257: 56–71.
- Hoption Cann, S. A., van Netten, J. P. & van Netten, C. (2003). Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgraduate Medical Journal*, 79: 672–680.
- Howard, S. C., Jones, D. P. & Pui, C.-H. (2011). The Tumor Lysis Syndrome. *The New England journal of medicine*, 364: 1844–1854.
- Jena, B., Maiti, S., Huls, H., Singh, H., Lee, D. A., Champlin, R. E. & Cooper, L. J. N. (2013). Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T Cells in Clinical Trials. (Ho, M., Ed) *PLoS ONE*, 8: e57838.
- Johnson, L. A., Heemskerk, B., Powell, D. J., Cohen, C. J., Morgan, R. A., Dudley, M. E., Robbins, P. F. & Rosenberg, S. A. (2006). Gene transfer of tumor-reactive TCR confers both high avidity and tumor reactivity to nonreactive peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177: 6548–6559.
- Killick, D. R., Stell, A. J. & Catchpole, B. (2015). Immunotherapy for canine cancer – Is it time to go back to the future? *Journal of Small Animal Practice*, 56: 229–241.
- Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J. & Ferrone, S. (1999). Escape of Human Solid Tumors from T-Cell Recognition: Molecular Mechanisms and Functional Significance. In: Dixon, F. J. (Ed) *Advances in Immunology*: 181–273. Academic Press.
- Mata, M., Vera, J., Gerken, C., Rooney, C. M., Miller, T., Pfent, C., Wang, L. L., Wilson-Robles, H. M. & Gottschalk, S. (2014). Towards immunotherapy with redirected T cells in a large animal model: Ex vivo activation, expansion, and genetic modification of canine T cells. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 37: 407–415.
- Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L. & Grupp, S. A. (2014). Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 371: 1507–1517.
- Morgan, R. A., Chinnasamy, N., Abate-Daga, D., Gros, A., Robbins, P. F., Zheng, Z., Dudley, M. E., Feldman, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Miller, A. D., Hessman, C. J., Stewart, A. A., Restifo, N. P., Quezado, M. M., Alimchandani, M., Rosenberg, A. Z., Nath, A., Wang, T., Bielekova, B., Wuest, S. C., Akula, N., McMahon, F. J., Wilde, S., Mosetter, B., Schendel, D. J., Laurencot, C. M. & Rosenberg, S. A. (2013). Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 36: 133–151.
- Morgan, R. A., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Yang, J. C., Sherry, R. M., Royal, R. E., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Restifo, N. P., Zheng, Z., Nahvi, A., de Vries, C. R., Rogers-Freezer, L. J., Mavroukakis, S. A. & Rosenberg, S. A. (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 314: 126–129.

- Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M. & Rosenberg, S. A. (2010). Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18: 843–851.
- O'Connor, C. M., Sheppard, S., Hartline, C. A., Huls, H., Johnson, M., Palla, S. L., Maiti, S., Ma, W., Davis, R. E., Craig, S., Lee, D. A., Champlin, R., Wilson, H. & Cooper, L. J. N. (2012). Adoptive T-cell therapy improves treatment of canine non-Hodgkin lymphoma post chemotherapy. *Scientific Reports* [online], 2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3278154/>. [Accessed 2016-02-24].
- O'Connor, C. M. & Wilson-Robles, H. (2014). Developing T Cell Cancer Immunotherapy in the Dog with Lymphoma. *ILAR Journal*, 55: 169–181.
- Paoloni, M. & Khanna, C. (2008). Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature Reviews Cancer*, 8(2), pp 147–156.
- Parish, C. R. (2003). Cancer immunotherapy: The past, the present and the future\*. *Immunology and Cell Biology*, 81: 106–113.
- Parkhurst, M. R., Joo, J., Riley, J. P., Yu, Z., Li, Y., Robbins, P. F. & Rosenberg, S. A. (2009). Characterization of Genetically Modified T-Cell Receptors that Recognize the CEA:691-699 Peptide in the Context of HLA-A2.1 on Human Colorectal Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 15: 169–180.
- Park, T. S., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. (2011). Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends in Biotechnology*, 29: 550–557.
- Penn Vet | Canine Lymphoma - RNA-transfected CD40-B Cell Vaccines for Dogs With Newly Diagnosed Lymphoma - Re-directed Autologous T cell Therapy for drug resistant or refractory CD20+ B cell lymphoma.* [online]. Available from: <https://www.vet.upenn.edu/research/centers-initiatives/mason-cancer-immunotherapy/canine-lymphoma>. [Accessed 2016-03-25].
- Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A. & June, C. H. (2011). Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 365: 725–733.
- Regan, D., Guth, A., Coy, J. & Dow, S. (2016). Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments. *The Veterinary Journal*, 207: 20–28.
- Restifo, N. P., Dudley, M. E. & Rosenberg, S. A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews Immunology*, 12: 269–281.
- Robbins, P. F., Morgan, R. A., Feldman, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Nahvi, A. V., Helman, L. J., Mackall, C. L., Kammula, U. S., Hughes, M. S., Restifo, N. P., Raffeld, M., Lee, C.-C. R., Levy, C. L., Li, Y. F., El-Gamil, M., Schwarz, S. L., Laurencot, C. & Rosenberg, S. A. (2011). Tumor Regression in Patients With Metastatic Synovial Cell Sarcoma and Melanoma Using Genetically Engineered Lymphocytes Reactive With NY-ESO-1. *Journal of Clinical Oncology*, 29: 917–924.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Kammula, U. S., Hughes, M. S., Phan, G. Q., Citrin, D. E., Restifo, N. P., Robbins, P. F., Wunderlich, J. R., Morton, K. E., Laurencot, C. M., Steinberg, S. M., White, D. E. & Dudley, M. E. (2011). Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 17: 4550–4557.
- Shi, H., Liu, L. & Wang, Z. (2013). Improving the efficacy and safety of engineered T cell therapy for cancer. *Cancer Letters*, 328: 191–197.

- Srivastava, S. & Riddell, S. R. (2015). Engineering CAR-T cells: Design concepts. *Trends in Immunology*, 36: 494–502.
- Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T. J. & Eisen, H. N. (1996). Evidence that a Single Peptide–MHC Complex on a Target Cell Can Elicit a Cytolytic T Cell Response. *Immunity*, 4: 565–571.
- Sytse J Piersma, E. S. J. (2007). High Number of Intraepithelial CD8 Tumor-Infiltrating Lymphocytes Is Associated with the Absence of Lymph Node Metastases in Patients with Large Early-Stage Cervical Cancer. *Cancer research*, 67: 354–61.
- Wu, R., Forget, M.-A., Chacon, J., Bernatchez, C., Haymaker, C., Chen, J. Q., Hwu, P. & Radvanyi, L. (2012). Adoptive T-cell Therapy Using Autologous Tumor-infiltrating Lymphocytes for Metastatic Melanoma: Current Status and Future Outlook. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 18: 160–175.
- Xu, X.-J. & Tang, Y.-M. (2014). Cytokine release syndrome in cancer immunotherapy with chimeric antigen receptor engineered T cells. *Cancer Letters*, 343: 172–178.
- Zhao, Y., Wang, Q. J., Yang, S., Kochenderfer, J. N., Zheng, Z., Zhong, X., Sadelain, M., Eshhar, Z., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. (2009). A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183: 5563–5574.