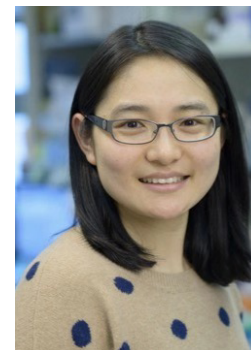


• 生物工程与大健康 •

孙洁 博士，浙江大学医学院研究员，博士生导师。目前研究方向为 CAR-T 细胞杀伤、增殖及耗竭的分子机制；开发新型生物传感器与智能分子机器；优化及探索新的细胞癌症免疫疗法。成果以第一作者或通讯作者发表在 *Nature Medicine*、*Nature Communications*、*Advanced Science* 等国际专业期刊。



细胞治疗的典范：嵌合抗原受体 T 细胞疗法

钱丽玲¹，陈蒋庆¹，吴晓燕¹，荆瑞瑞¹，孙洁^{1,2}

1 浙江大学医学院附属第一医院骨髓移植中心 浙江大学医学院细胞生物学系，浙江 杭州 310058

2 浙江大学血液学研究所 浙江省干细胞与免疫治疗工程实验室，浙江 杭州 310058

钱丽玲，陈蒋庆，吴晓燕，等. 细胞治疗的典范：嵌合抗原受体 T 细胞疗法. 生物工程学报, 2019, 35(12): 2339–2349.

Qian LL, Chen JQ, Wu XY, et al. Cell therapy's poster child: Chimeric antigen receptor T cell therapy. Chin J Biotech, 2019, 35(12): 2339–2349.

摘要：嵌合抗原受体 T (CAR-T) 细胞疗法是一种利用合成受体特异性靶向抗原的过继性细胞疗法 (ACT)，目前在血液肿瘤的治疗中有极大的临床应用价值。虽然美国食品药品监督管理局 (FDA) 已经批准两款 CAR-T 药物上市，但 CAR-T 疗法在治疗过程中仍然存在一些副作用，如细胞因子释放综合征 (CRS)、神经毒性、B 细胞功能缺失等。同时，CAR-T 疗法在实体瘤治疗中的效果甚微，主要原因是缺乏特异性靶点以及肿瘤微环境对 CAR-T 细胞功能的抑制等。文中将从 CAR 的结构设计、临床应用、合成生物学对新型 CAR 的优化来阐述应用 CAR-T 细胞疗法治疗肿瘤所面临的挑战及广阔前景。

关键词：细胞治疗，免疫治疗，嵌合抗原受体 T 细胞，合成生物学

Received: July 1, 2019; Accepted: September 4, 2019

Corresponding authors: Jie Sun. Tel: +86-571-88208509; Fax: +86-571-88208094; E-mail: sunj4@zju.edu.cn

网络出版时间：2019-10-10

网络出版地址：http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20191010.0940.003.html

Cell therapy's poster child: Chimeric antigen receptor T cell therapy

Liling Qian¹, Jiangqing Chen¹, Xiaoyan Wu¹, Ruirui Jing¹, and Jie Sun^{1,2}

¹ Bone Marrow Transplantation Center of the First Affiliated Hospital, and Department of Cell Biology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

² Institute of Hematology, Zhejiang University & Laboratory of Stem Cell and Immunotherapy Engineering, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

Abstract: Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy, which adoptively transfers engineered T cells expressing synthetic receptors to target specific antigens, has achieved great clinical success in treating hematological malignancies. Though FDA has approved two CAR-T products, CAR-T therapy can cause some side effects, such as cytokine release syndrome (CRS), neurotoxicity and B cell aplasia. Meanwhile, lacking tumor specific antigen and the suppressive tumor environment limit the efficacy of CAR-T therapy in solid tumor. This review focuses on the structural components, clinical applications and synthetic biology approaches on CAR-T cell design, and summarizes the challenges and perspectives of CAR-T therapy as a revolutionary cancer immunotherapy.

Keywords: cell therapy, immunotherapy, chimeric antigen receptor T cell, synthetic biology

20 世纪 80 年代以前, 药物的研发主要依赖于天然化合物和小分子药物的合成, 开发了许多有效的小分子药物用于疾病治疗。随着单克隆抗体技术和蛋白质工程技术的发展, 生物大分子药物如天然蛋白质或具有特定功能的重组蛋白药物应运而生, 但仍然存在新的困难和挑战, 由于疾病的复杂性和多样性, 且存在个体差异和组织特异性, 因此很难找到组织特异和个体特异的靶点。近年来, 兴起了第 3 种治疗方法——将细胞作为药物的细胞治疗, 该方法在疾病尤其是癌症的治疗方面具有划时代的意义^[1]。

1 细胞治疗的分类及发展

细胞治疗是指将自体、同源异体或异种细胞经体外工程化改造和扩大培养后, 输注患者体内治疗疾病的疗法。该治疗方法与传统的小分子药物和蛋白药物相比最大的特点是利用活细胞作为药物来治疗疾病, 具有复杂性和可调节性等特征^[1], 具体来说, 将细胞作为药物具有以下优点: 1) 选择性高, 细胞药物能感知复杂的人体内环境, 只在特定的环境中激活, 以发挥相应功能,

这意味着可以更大程度上限制药物的副作用; 2) 局部浓度高, 人体代谢、药物效应动力学 (Pharmacodynamics, PD) 和药物代谢动力学 (Pharmacokinetics, PK) 决定了分子药物靶向性较低, 它不只在病变组织或细胞内分布, 而且分布于整个机体组织, 这通常会造成严重的脱靶效应, 而细胞药物的优势在于可主动迁移到靶组织或靶细胞内发挥作用; 3) 更加个性化, 由于个体差异, 目前很难控制每个患者小分子药物的使用剂量, 但在细胞治疗中, 可应用合成生物学设计基因开关控制药物的合成或释放, 也可以根据临床需要设计不同细胞药物以治疗更多疾病^[1]。但细胞药物的开发和合成生物学的应用还需更多基础研究的支撑, 以解决细胞药物在临床上治疗疾病种类少、副作用严重、费用昂贵等问题。

1.1 细胞治疗的分类

细胞治疗根据细胞类型可分为干细胞治疗、免疫细胞治疗和其他细胞治疗。输血是最早的细胞治疗, 现在已经发展到输注特定血液成分进行治疗, 这使得在提高血液利用率的同时减少副作用, 目前研究较多的是干细胞治疗和免疫细胞治疗。

干细胞治疗是指把健康的干细胞输注到患者体内，从而修复或替换受损细胞或组织以治疗疾病的方法。目前国内外临床试验应用较广泛的是利用间充质干细胞治疗神经性疾病、糖尿病、慢性心脏疾病、肾脏病、肝脏疾病、艾滋病和癌症等疾病^[2-6]。免疫细胞治疗的过程主要包括从患者或供体血液中提取免疫细胞，在体外进行工程化改造和扩增培养后，重新输注入病人体内或者直接注射到病灶处。目前用于临床试验的免疫细胞疗法主要有 CAR-T、TCR-T 和 NK 细胞疗法等^[7-9]。文中主要介绍 CAR-T 疗法的发展、应用和前景。

1.2 CAR-T 细胞治疗的发展

早在 20 世纪 80 年代，得益于过继性 T 细胞治疗 (Adoptive T-cell therapy, ACT) 的发展，临床上已开始利用输注自体或异体供体淋巴细胞治疗一些肿瘤，如转移性黑色素瘤、复发性白血病^[10-11]等。但这种基于自然 T 细胞的 ACT 治疗存在以下不足：首先，供体 T 细胞可能攻击受体导致移植物抗宿主反应 (Graft-versus-host disease, GVHD)；同时，受体可能排斥输注的 T 细胞，限制它们的持久性和疗效；而且从体内分离的自然 T 细胞数目少，靶向特异性低，抗肿瘤效率低。这些早期 ACT 的临床结果表明，该疗法需要增强靶向肿瘤的特异性并提高体外扩增 T 细胞的数量，同时减少免疫排斥反应^[12-14]。T 细胞工程的出现改变了传统 ACT 的局限性，产生了特异性靶向肿瘤的 TCR-T、CAR-T 细胞^[15]，其中通过在 T 细胞表达嵌合抗原受体 (Chimeric antigen receptor, CAR) 而摆脱 HLA 限制性的治疗方法即 CAR-T 疗法，该方法已经在血液瘤的治疗中取得显著的效果。本文首先简述了 CAR 的结构设计以及 CAR-T 疗法在血液瘤和实体瘤中的应用现状，然后总结了合成生物学为 CAR-T 细胞设计提供的新思路，最后展望 CAR-T 疗法在肿瘤尤其是在实体瘤治疗过程中的巨大应用潜能。

2 CAR 的设计及临床应用

2.1 CAR 的设计

CAR 的发展可以被划分为三代，第一代 CAR 最初被称为“T-Bodies”，它开创性地结合了来自于抗体的可识别特异性抗原的单链可变区 (Single-chain fragment variable, scFv) 和来自于 TCR-CD3 复合物中 CD3 ζ 的信号转导区域，使得表达 T-body 的 T 细胞具有直接识别肿瘤表面抗原的能力，但因为缺乏合适的共刺激信号，这种 T 细胞无法有效扩增，其应用价值有限^[16]。此后，研究者在其基础上增加了共刺激信号结构域，为第二代 CAR (图 1)。目前应用最多的第二代 CAR 的共刺激信号结构域主要来自 CD28 或 4-1BB，第二代 CAR 比第一代 CAR 在体外的杀伤能力更强，同时具有增殖能力和分化为效应 T 细胞和记忆 T 细胞的能力，并在临床取得惊人的疗效 (图 1)。2017 年，以 CD19 作为靶点的第二代 CAR 被美国 FDA 批准上市，其中 Kymriah 以 4-1BB 作为共刺激结构域，另一款 Yescarta 以 CD28 作为共刺激结构域，用于治疗白血病和淋巴瘤^[17]。第三代 CAR 则结合了多个共刺激结构域，比如 CD28 和 4-1BB^[18-19] 或 CD28 和 OX40^[20]，以期获得更好的疗效 (图 1)。之后还出现了第四、五代 CAR 等，在这里统称为“CAR+X”策略，该方法主要是联合 CAR 与其他有利因素，通过增加一个或多个基因的共表达，如细胞因子 (IL-12、IL-7)、细胞因子受体 (IL-4R、IL-3R β)、趋化因子 (CCL19)、共刺激配体 (4-1BBL)、分泌的 PD-1 抗体等^[21]，从而增强 T 细胞的功能，比如增加 T 细胞持久性和免疫应答强度、克服肿瘤微环境介导的 T 细胞免疫抑制等功能。

2.2 CAR-T 疗法的临床应用

临床试验已证实 CAR-T 细胞疗法在治疗 B 细胞系血液肿瘤的疗效显著，其中包括非霍奇金淋巴瘤 (Non-Hodgkinlymphoma, NHL)、慢性淋巴

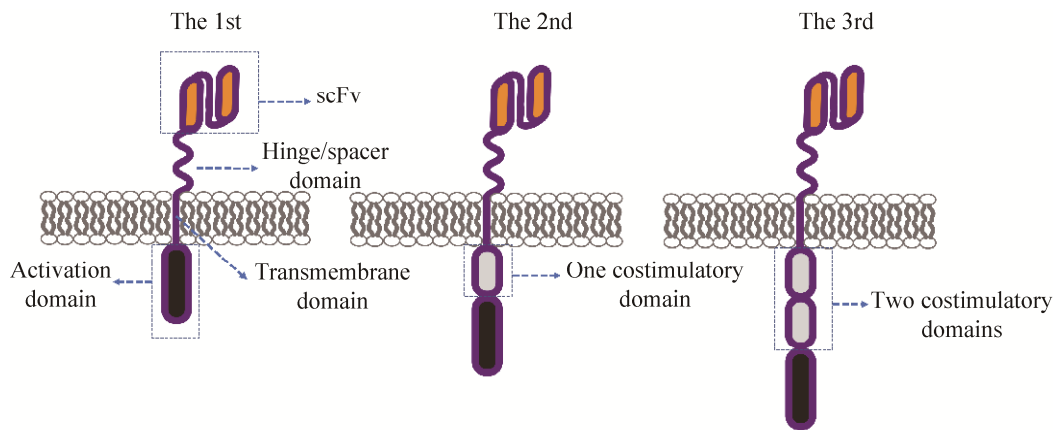


图1 第一、二和三代 CAR 的结构设计

Fig. 1 Design of the first-, second- and third- generation CARs.

细胞白血病 (Chronic lymphocytic leukemia, CLL)、急性淋巴细胞白血病 (Acute lymphoblastic leukemia, ALL), 但 CAR-T 细胞在实体瘤治疗中仍存在一定挑战。

2.2.1 CAR-T 细胞在血液肿瘤中的应用

目前, CAR-T 疗法在治疗 ALL^[22-24]中的疗效最好, 应用也最广泛, 其中靶向 CD19 的 CAR 在治疗成人和儿童 ALL 中都取得显著的疗效^[25-26], 文献报道, CD19 CAR-T 治疗复发/难治性 ALL 的完全缓解率可高达 90%^[27]。目前 FDA 批准的 CD19 CAR-T 细胞药物分别以 CD28 或 4-1BB 为共刺激结构域^[28-29]的这两种 CAR-T 细胞各有优点, 共刺激结构域为 CD28 的 CAR-T 细胞在反应初期增殖更快, 能介导更强的肿瘤杀伤能力, 但同时副作用也更强, 且在免疫反应后期的持久性较差; 而基于 4-1BB 的 CAR-T 细胞虽然在反应初期增殖能力相比 CD28 CAR 较差, 但持续性更好, 在免疫反应后期也能维持较高细胞数量^[30-32]。另外, 值得注意的是, CD19 CAR-T 细胞在治疗过程中也存在一些副作用, 比如细胞因子释放综合征 (Cytokine release syndrome, CRS), 神经毒性, B 细胞功能缺失, 同时还存在肿瘤复发等问题^[21,33-35]。已有研究表明导致 CRS 的主要原因是

单核细胞释放的 IL-1 和 IL-6^[36], 目前临床上主要采用耗竭单核细胞或使用 IL-6 拮抗剂 (托珠单抗, Tocilizumab) 来降低 CRS, 也有文献研究表明改良 CAR 的跨膜区和铰链区结构域可减少细胞因子释放^[36-40]; CAR-T 疗法造成的神经毒性可能是由于巨噬细胞攻击脑膜导致脑组织损伤, 临床上常用 IL-1 抑制剂阿那白滞素 (Anakinra, 别名 Kineret) 来控制神经毒性^[36,41]; 由于正常 B 细胞表面也表达 CD19, 故 CD19 CAR-T 细胞在杀伤肿瘤细胞的同时也会攻击自身正常的 B 细胞, 即 “on-target, off-tumor” 效应, 造成 B 细胞功能缺失, 目前可通过定期向患者体内输注免疫球蛋白以弥补 B 细胞的功能缺失^[42]。尽管针对 CD19 抗原的 CAR-T 疗法疗效突出, 但仍有部分患者易复发, 因此需要寻找新的肿瘤靶点进行辅助治疗。CD22 在大多数急性淋巴细胞白血病患者 B 细胞较高表达, 因此目前临床上会对一些 CD19 CAR-T 治疗后 CD19 阴性的患者, 开展针对 CD22 抗原的 CAR-T 治疗的临床试验, 最新的结果表明在接受 CD22 CAR-T 细胞辅助治疗后, 73% 的患者获得了完全缓解 (Complete remission, CR)^[43]。此外, 串联 CD19/CD22 CAR-T 目前也已用于临床试验^[44], 它可同时识别 CD19 和 CD22 抗原从而减少抗原逃逸引起的复发。

同时，靶向 BCMA 抗原的 CAR-T 的初步临床研究结果令人鼓舞。BCMA 全称为 B 细胞成熟抗原 (B cell maturation antigen)，呈相对特异地高表达于骨髓瘤细胞表面，因此可作为多发性骨髓瘤免疫治疗的理想靶点。临床上靶向 BCMA 的 LCAR-B38M 疗法对复发/难治性多发性骨髓瘤晚期患者的疗效较理想，总缓解率为 88%，其中 68% 患者完全缓解 (CR)，但安全性上仍存在以细胞因子释放综合征 (CRS) 为主的副作用^[45]。

2.2.2 CAR-T 疗法在治疗实体瘤中的应用

CAR-T 疗法不仅在治疗血液肿瘤方面取得了突破，在治疗实体瘤方面也有一定进展。目前，在实体瘤应用方面，CAR-T 疗法靶向的肿瘤抗原大多是高表达的分化抗原，例如癌胚抗原 (Carcinoembryonic antigen, CEA)、前列腺特异性膜抗原 (Prostate specific membrane antigen, PSMA)、双唾液酸神经节苷脂 (Disialoganglioside, GD2)、糖链抗原-125 (Carbohydrate antigen-125, CA-125)、人类表皮生长因子受体 2 (Human epidermal growth factor receptor-2, Her-2) 和间皮细胞抗原 (Mesothelin) 等。虽然过表达的抗原种类多样，但由于其表达特异性低，CAR-T 细胞对低水平表达抗原的正常细胞也高度敏感，因此治疗中存在 on-target/off-tumor 的副作用^[21]。例如，使用高剂量的 Her-2 CAR-T 细胞已导致致命的副作用，其中部分原因是由于该抗原也在健康正常肺上皮和心血管细胞低表达^[46]。因此，一个首选的实体肿瘤抗原靶点就要求其表达仅限于肿瘤细胞，或只发生在非常低水平的非重要正常组织。目前表皮生长因子受体 III 型突变体 (Epidermal growth factor receptor variant type III, EGFRv III)、糖链抗原 15-3 (Carbohydrate antigen 15-3, CA 15-3) 和硫酸软骨素蛋白聚糖 4 (Chondroitin sulfate proteoglycan-4, CSPG-4) 分别被认为是治疗恶性胶质瘤、胰腺癌、黑色素瘤较理想的 CAR

靶点^[21]。此外，实体瘤的肿瘤微环境 (Tumor microenvironment, TME) 也会对 CAR-T 细胞的功能产生抑制作用。首先，肿瘤细胞的无氧糖酵解途径使其所处的 TME 呈现出缺氧、酸性、低营养成分的特点而不利于 T 细胞存活^[47-49]。其次肿瘤细胞表面表达 PD-L1、MHC II、Gal9 等配体与 T 细胞上的 PD1、LAG-3、TIM-3 等受体结合，激活 T 细胞上的抑制性信号通路抑制 T 细胞功能^[50]。肿瘤微环境中的肿瘤细胞和肿瘤相关细胞如肿瘤相关成纤维细胞 (Cancer-associated fibroblast, CAF)、调节性 T 细胞 (Regulatory T cell, Treg) 等则会分泌抑制性的细胞因子，如血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)、转化生长因子 β (TGF- β)，或者通过产生活性氧 (ROS)、前列腺素 E2 (PGE2) 和乳酸等抑制 T 细胞的免疫应答^[51-53]。因此，CAR-T 疗法在实体瘤中的应用还需要克服 TME 的抑制信号，增强 CAR-T 细胞的肿瘤识别能力、浸润能力和持久性并避免脱靶效应^[21]。目前已有一些应对策略，可能会对 CAR-T 细胞在复杂的肿瘤微环境中发挥作用提供帮助，比如局部给药，或使用分泌 IL-12 的“武装 CAR”、NK 细胞受体 CAR 等^[54-60]。

2.3 合成生物学方法优化 CAR 的设计

为了克服免疫抑制 (包括阻断检查点、抑制调节性 T 细胞和其他髓系细胞)，降低 on-target/off-tumor 毒性，提高 CAR-T 细胞的抗肿瘤疗效，目前正在探索促进 CAR-T 细胞的浸润、增强 CAR-T 细胞的功能持久性的多种方法，其中 CAR 的设计与合成生物学技术的结合为设计安全性更高、功能更强的 CAR-T 细胞提供了更多可能性。

2.3.1 控制 CAR-T 细胞的毒性和活性

目前临床上使用的 CAR-T 疗法所带来的器官毒性、脱靶毒性等问题亟待解决，已有报道表明严重 CRS 和脑水肿可引起治疗相关死亡。合成

生物学的发展为更好地调控人体内的 CAR-T 细胞提供了新的思路。其中一种策略是通过小分子药物来控制 CAR-T 细胞自凋亡或抗原抗体结合来降低 CAR-T 细胞治疗过程中的毒性反应。其具体设计有以下几种方法：其一，在 CAR-T 细胞内加入相应的信号蛋白作为分子开关，实现对 T 细胞可逆调控^[61]或“自杀”基因如单纯疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-TK) 基因，一旦 CAR-T 细胞在患者体内发生不良反应，通过施加药物介导 T 细胞的自杀基因激活诱导 CAR-T 细胞凋亡^[62-63]。其二，利用小分子药物，如 AP1903 二聚化诱导型 Caspase 9 (iCasp9) 激活 T 细胞的自杀开关，诱导其发生凋亡终止 CAR-T 细胞发挥作用。其三，某些小分子药物能够通过介导肿瘤抗原和 CAR 之间的结合来调节 CAR-T 细胞识别肿瘤抗原的能力。最后，将 CAR 的 scFv 与信号转导结构域分隔开，两者之间依靠小分子二聚化的可逆结合得以更灵活地调控 CAR-T 细胞的功能^[64-65]。

2.3.2 增强 CAR-T 细胞肿瘤识别的特异性

利用合成生物学制备多靶点 CAR 或 Boolean logic-gated CAR，用于识别一种或两种肿瘤抗原的方式来增强工程化的 CAR-T 细胞识别肿瘤抗原的能力，比如合成 Notch (synNotch) 受体、嵌合共刺激受体 (CCR)、抑制性嵌合抗原受体 (iCAR) 等。其中 SynNotch 受体是一种精确识别肿瘤抗原的设计，该策略利用 Notch 受体独特的信号传导机制，即抗原 A 特异性的 synNotch 在结合了肿瘤抗原 A 之后，转录因子被切割激活，进而转运到细胞核引起了抗原 B 特异性的 CAR 的表达，最终与肿瘤表面的抗原 B 结合，T 细胞被激活^[66-68] (图 2A)。此外，synNotch 受体系统还具有整合多个细胞外信号的潜能^[69]。CCR 是将用于 T 细胞活化的一代 CAR 和用于共刺激的 CCR 组合到一起，只有当两种抗原同时存在于肿瘤细胞表面时，CAR-T 细胞才能激活并介导肿瘤杀伤(图 2B)。这样的设计增强了 CAR-T 细胞识别肿瘤

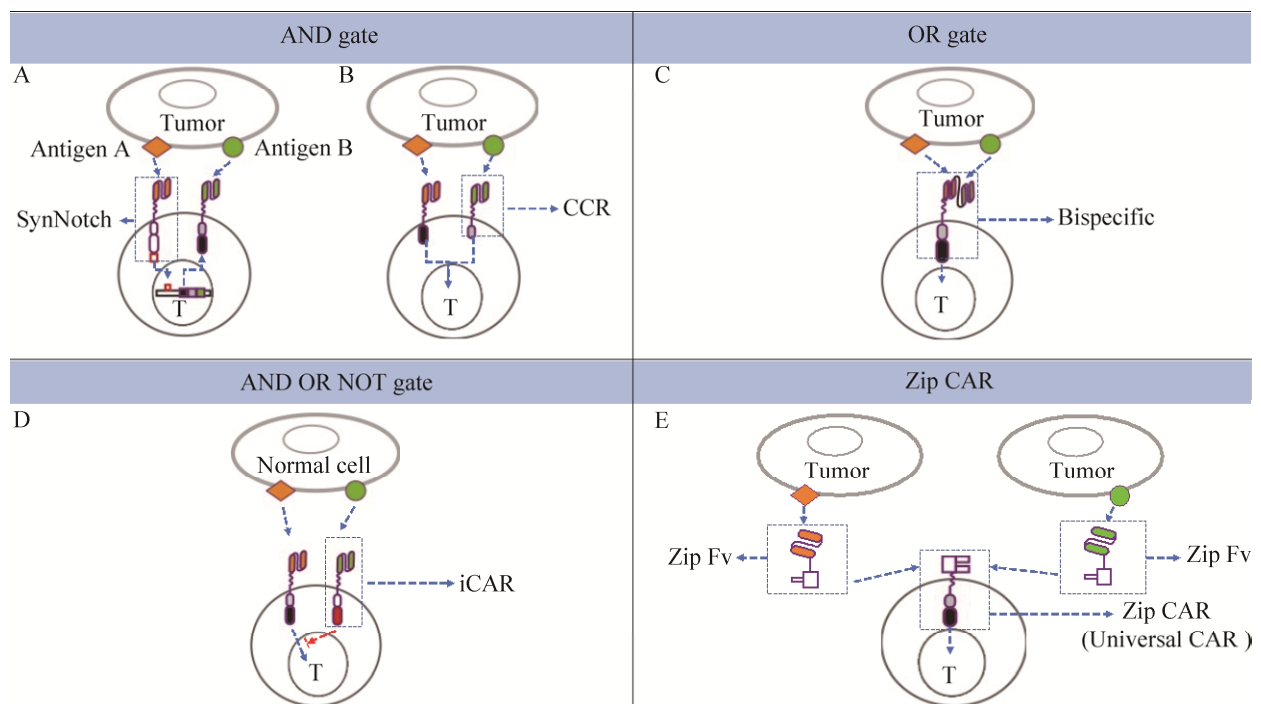


图 2 运用合成生物学设计的新型 CARs

Fig. 2 Synthetic biology approaches to design new CARs.

细胞抗原的特异性,减轻副作用^[70]。SynNotch 受体和 CCR 的识别逻辑都是“AND gate”。另一种策略则是将识别不同肿瘤抗原的 scFv 串联在一起,只要肿瘤细胞表达其中一个抗原^[71],就能活化 T 细胞介导肿瘤杀伤(图 2C),即“OR gate”。基于 CTLA-4 和 PD-1 的 iCAR 通过识别正常细胞表面的抗原来发挥作用^[72],是一种“AND OR NOT gate”,CAR-T 细胞一旦识别在正常细胞表面的抗原,就会传递抑制信号抑制 T 细胞的活化,因此可有效预防 CAR-T 细胞对正常细胞的不良反应(图 2D)。SUPRA (Split, universal and programmable) CARs 则整合了以上 3 种肿瘤识别逻辑^[71,73-75],这是一种通用型的 CAR,该策略是将 CAR 分成两个部分 Zip CAR (不含 scFv) 和 Zip Fv (不含信号转导结构域),二者能通过匹配的亮氨酸拉链结合以形成完整的 CAR,且可通过使用不同组合的抗原靶向部分控制对肿瘤抗原的识别能力^[74],SUPRA CAR 的开发表明多个高级逻辑识别抗原功能可在单个集成系统中实现(图 2E)。

目前,对这些 CAR 的研究还处在初级阶段,在向临床研究转化的过程中,还存在许多困难和挑战等待研究者去克服。

3 CAR-T 治疗的前景

肿瘤免疫治疗于 2013 年被 *Science* 杂志评为十大科技突破之首,其中 CAR-T 作为具有抗原靶向性且有一定持久性的“活细胞药物”,可重编程 T 细胞的效应和分化等功能,在接触抗原后增殖并发挥抗肿瘤作用,尤其是 CAR-T 疗法在 B 细胞血液瘤中取得了突破,给复发/难治性白血病及淋巴瘤患者带来了希望^[26-27]。但肿瘤微环境的免疫抑制^[76]、抗原表达缺失或下调以及 CAR-T 细胞持久性不足等导致仍有患者复发。此外,初步临床结果表明 CAR-T 疗法在对标准治疗有耐药性的多发性骨髓瘤治疗中取得重大进展^[45]。虽然

CAR-T 在实体瘤治疗上仍缺乏重大突破,但综合目前 CAR-T 治疗在临床以及以下各个相关领域的进展,不可否认的是 CAR-T 疗法具有广阔前景: 1) 随着基因编辑技术和合成生物学的发展, CAR 结构的设计更具灵活性和多元化。2) 已有研究表明敲除 T 细胞受体的同时将 CAR 插入 T 细胞受体位点可延迟 T 细胞耗竭从而增强抗癌作用,这为未来 CAR-T 设计提供重要思路^[44]。3) 选择最优的 T 细胞亚群,如调整 CD4/CD8 T 细胞比率和初始 T 细胞/效应 T 细胞比率用于 CAR 治疗,将进一步提高 CAR 治疗的疗效和安全性^[21]。4) 此外,初步临床结果表明 CAR-T 治疗与 PD-1/PD-L1 抑制剂联用,或两个不同靶点的 CAR-T 联用在淋巴瘤治疗上有较好成效^[21,77-78]。5) 为了使 CAR-T 细胞治疗成为更普遍的治疗手段,已经出现了“通用型”CAR-T 细胞,并在机体表现出很强免疫抑制的 B-ALL 患儿中取得了成功^[79]。开发出具有更优性能的“通用型”CAR-T 细胞,重点是避免机体和 T 细胞的相互排斥,因此通过使用基因编辑技术沉默 *TCR* 基因、*HLA* I 类基因的同种异体 T 细胞,不仅能有效消除可能造成的 GVHD^[76],经过改造后,在患者急需治疗时能提供大量可用的现成 CAR-T 细胞,这对临床治疗具有重要意义。6) 对肿瘤发病、复发机制以及对 T 细胞和 CAR-T 细胞功能机制的知识体系的扩展和更新也为 CAR-T 治疗提供深厚的理论基础。随着 CAR-T 基础研究与临床实践的不断深入, CAR-T 细胞必将在肿瘤生物细胞免疫治疗中发挥越来越重要的作用。

REFERENCES

- [1] Fischbach MA, Bluestone JA, Lim WA. Cell-based therapeutics: the next pillar of medicine. *Sci Transl Med*, 2013, 5(179): 179ps7.
- [2] Couri CEB, Voltarelli JC. Stem cell therapy for type

- 1 diabetes mellitus: a review of recent clinical trials. *Diabetol Metab Syndr*, 2009, 1: 19.
- [3] Eom YW, Shim KY, Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J Intern Med*, 2015, 30(5): 580–589.
- [4] Nguyen PK, Rhee JW, Wu JC. Adult stem cell therapy and heart failure, 2000 to 2016: a systematic review. *JAMA Cardiol*, 2016, 1(7): 831–841.
- [5] Shroff G, Dhanda Titus J, Shroff R. A review of the emerging potential therapy for neurological disorders: human embryonic stem cell therapy. *Am J Stem Cells*, 2017, 6(1): 1–12.
- [6] Zhang Z, Fu JL, Xu XS, et al. Safety and immunological responses to human mesenchymal stem cell therapy in difficult-to-treat HIV-1-infected patients. *AIDS*, 2013, 27(8): 1283–1293.
- [7] Ikeda H. T-cell adoptive immunotherapy using tumor-infiltrating T cells and genetically engineered TCR-T cells. *International Immunol*, 2016, 28(7): 349–353.
- [8] Rezvani K, Rouce R, Liu EL, et al. Engineering natural killer cells for cancer immunotherapy. *Mol Ther*, 2017, 25(8): 1769–1781.
- [9] Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(8): 585–598.
- [10] Mttchison NA, Dube OL. Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse. II. The relation between hemagglutinating antibody and graft resistance in the normal mouse and mice pretreated with tissue preparations. *J Exp Med*, 1955, 102(2): 179–197.
- [11] Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *New Engl J Med*, 1988, 319(25): 1676–1680.
- [12] Greenberg PD. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol*, 1991, 49: 281–355.
- [13] Melief CJM. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv Cancer Res*, 1992, 58: 143–175.
- [14] Old LJ. Tumor immunology: the first century. *Curr Opin Immunol*, 1992, 4(5): 603–607.
- [15] Sadelain M, Rivière I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering. *Nature*, 2017, 545(7655): 423–431.
- [16] Thistlethwaite FC, Gilham DE, Guest RD, et al. The clinical efficacy of first-generation carcinoembryonic antigen (CEACAM5)-specific CAR T cells is limited by poor persistence and transient pre-conditioning-dependent respiratory toxicity. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(11): 1425–1436.
- [17] Ghobadi A. Chimeric antigen receptor T cell therapy for non-Hodgkin lymphoma. *Curr Res Transl Med*, 2018, 66(2): 43–49.
- [18] 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.
- [19] Wang JJ, Jensen M, Lin YK, et al. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(8): 712–725.
- [20] Pulè MA, Straathof KC, Dotti G, et al. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther*, 2005, 12(5): 933–941.
- [21] Sadelain M. Chimeric antigen receptors: a paradigm shift in immunotherapy. *Annu Rev Canc Biol*, 2017, 1: 447–466.
- [22] 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): 177ra38.
- [23] Davila ML, Riviere I, Wang XY, 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): 224ra25.
- [24] Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 2015, 385(9967): 517–528.
- [25] Gardner RA, Finney O, Annesley C, et al. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood*, 2017, 129(25): 3322–3331.
- [26] Sadelain M. CAR therapy: the CD19 paradigm. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3392–3400.
- [27] Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *New Engl J Med*, 2014, 371(16): 1507–1517.
- [28] Forsberg MH, Das A, Saha K, et al. The potential of CAR T therapy for relapsed or refractory pediatric and young adult B-cell ALL. *Ther Clin Risk Manag*, 2018, 14: 1573–1584.
- [29] Hombach AA, Holzinger A, Abken H. The weal and woe of costimulation in the adoptive therapy of cancer with chimeric antigen receptor (CAR)-redirected T cells. *Curr Mol Med*, 2013, 13(7): 1079–1088.
- [30] Salter AI, Ivey RG, Kennedy JJ, et al. Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal*, 2018, 11(544): eaat6753.
- [31] Maloney DG. Anti-CD19 CAR T cell therapy for lymphoma-off to the races!. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(5): 279–280.
- [32] Kawalekar OU, Posey AD Jr, Fraietta J, et al. Distinct signaling by chimeric antigen receptors (CARs) containing CD28 signaling domain versus 4–1BB in primary human T cells. *Blood*, 2013, 122(21): 2902.
- [33] Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, et al. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther-Oncolytics*, 2016, 3: 16011.
- [34] Porter DL, Hwang WT, Frey NV, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med*, 2015, 7(303): 303ra139.
- [35] Maude SL, Barrett D, Teachey DT, et al. Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. *Cancer J*, 2014, 20(2): 119–122.
- [36] Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med*, 2018, 24(6): 739–748.
- [37] Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med*, 2018, 378(5): 439–448.
- [38] Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4⁺: CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*, 2016, 126(6): 2123–2138.
- [39] Park JH, Riviere I, Gonen M, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med*, 2018, 378(5): 449–459.
- [40] Ying ZT, Huang XF, Xiang XY, et al. A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy. *Nat Med*, 2019, 25(6): 947–953.
- [41] Fox E, Jayaprakash N, Pham TH, et al. The serum and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of anakinra after intravenous administration to non-human primates. *J Neuroimmunol*, 2010, 223(1/2): 138–140.
- [42] Tasian SK, Gardner RA. CD19-redirected chimeric antigen receptor-modified T cells: a promising immunotherapy for children and adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Ther Adv Hematol*, 2015, 6(5): 228–241.
- [43] Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med*, 2018, 24(1): 20–28.
- [44] Schneider D, Xiong Y, Wu DR, et al. A tandem CD19/CD20 CAR lentiviral vector drives on-target and off-target antigen modulation in leukemia cell lines. *J Immunother Cancer*, 2017, 5: 42.

- [45] Zhao WH, Liu J, Wang BY, et al. A phase 1, open-label study of LCAR-B38M, a chimeric antigen receptor T cell therapy directed against B cell maturation antigen, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J Hematol Oncol*, 2018, 11: 141.
- [46] Morgan RA, Yang JC, Kitano M, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 843–851.
- [47] Hirata E, Sahai E. Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017, 7(7): a026781.
- [48] Newick K, O'Brien S, Moon E, et al. CAR T cell therapy for solid tumors. *Annu Rev Med*, 2017, 68: 139–152.
- [49] Renner K, Singer K, Koehl GE, et al. Metabolic hallmarks of tumor and immune cells in the tumor microenvironment. *Front Immunol*, 2017, 8: 248.
- [50] Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(8): 486–499.
- [51] Martinez M, Moon EK. CAR T cells for solid tumors: new strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment. *Front Immunol*, 2019, 10: 128.
- [52] Morrot A, Da Fonseca LM, Salustiano EJ, et al. Metabolic symbiosis and immunomodulation: how tumor cell-derived lactate may disturb innate and adaptive immune responses. *Front Oncol*, 2018, 8: 81.
- [53] Ohta A. A metabolic immune checkpoint: adenosine in tumor microenvironment. *Front Immunol*, 2016, 7: 109.
- [54] Mardiana S, Solomon BJ, Darcy PK, et al. Supercharging adoptive T cell therapy to overcome solid tumor-induced immunosuppression. *Sci Transl Med*, 2019, 11(495): eaaw2293.
- [55] Hinrichs CS, Restifo NP. Reassessing target antigens for adoptive T-cell therapy. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(11): 999–1008.
- [56] Klebanoff CA, Rosenberg SA, Restifo NP. Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers. *Nat Med*, 2016, 22(1): 26–36.
- [57] Morello A, Sadelain M, Adusumilli PS. Mesothelin-targeted CARs: driving T cells to solid tumors. *Cancer Discov*, 2016, 6(2): 133–146.
- [58] Moon EK, Carpenito C, Sun J, et al. Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and tumor eradication by retargeted human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(14): 4719–4730.
- [59] Chmielewski M, Kopecky C, Hombach AA, et al. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res*, 2011, 71(17): 5697–5706.
- [60] Spear P, Barber A, Rynda-Appl A, et al. NKG2D CAR T-cell therapy inhibits the growth of NKG2D ligand heterogeneous tumors. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91(6): 435–440.
- [61] Wei P, Wong WW, Park JS, et al. Bacterial virulence proteins as tools to rewire kinase pathways in yeast and immune cells. *Nature*, 2012, 488(7411): 384–388.
- [62] Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science*, 1997, 276(5319): 1719–1724.
- [63] Tiberghien P, Reynolds CW, Keller J, et al. Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific *in vivo* donor T-cell depletion after bone marrow transplantation? *Blood*, 1994, 84(4): 1333–1341.
- [64] Sun J, Sadelain M. The quest for spatio-temporal control of CAR T cells. *Cell Res*, 2015, 25(12): 1281–1282.
- [65] Wu CY, Roybal KT, Puchner EM, et al. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science*, 2015,

- 350(6258): aab4077.
- [66] Gordon WR, Zimmerman B, He L, et al. Mechanical allostery: evidence for a force requirement in the proteolytic activation of notch. *Dev Cell*, 2015, 33(6): 729–736.
- [67] Morsut L, Roybal KT, Xiong X, et al. Engineering customized cell sensing and response behaviors using synthetic notch receptors. *Cell*, 2016, 164(4): 780–791.
- [68] Roybal KT, Rupp LJ, Morsut L, et al. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits. *Cell*, 2016, 164(4): 770–779.
- [69] Themeli M, Sadelain M. Combinatorial antigen targeting: ideal T-cell sensing and anti-tumor response. *Trends Mol Med*, 2016, 22(4): 271–273.
- [70] Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, et al. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 71–75.
- [71] Wu MR, Jusiak B, Lu TK. Engineering advanced cancer therapies with synthetic biology. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(4): 187–195.
- [72] Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med*, 2013, 5(215): 215ra172.
- [73] Chen YY. Increasing T cell versatility with SUPRA CARs. *Cell*, 2018, 173(6): 1316–1317.
- [74] Cho JH, Collins JJ, Wong WW. Universal chimeric antigen receptors for multiplexed and logical control of T cell responses. *Cell*, 2018, 173(6): 1426–1438.
- [75] Chopane A, Gupta S, Ajit A, et al. Design and analysis of plastic gears in rack and pinion steering system for formula supra car. *Mater Today-Proc*, 2018, 5(2): 5154–5164.
- [76] Scarfò I, Maus MV. Current approaches to increase CAR T cell potency in solid tumors: targeting the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer*, 2017, 5(1): 28.
- [77] Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 2018, 359(6382): 1350–1355.
- [78] Otahál P, Průková D, Král V, et al. Lenalidomide enhances antitumor functions of chimeric antigen receptor modified T cells. *Oncoimmunology*, 2016, 5(4): e1115940.
- [79] June CH, Sadelain M. Chimeric antigen receptor therapy. *New Engl J Med*, 2018, 379(1): 64–73.

(本文责编 陈宏宇)