

本文引用:左百乐,杨如,王向鹏,等.嵌合抗原受体修饰T细胞的分子设计及发展策略[J].新乡医学院学报,2019,36(2):106-110. DOI:10.7683/xyxyxb.2019.02.002.

【专题报告】

嵌合抗原受体修饰T细胞的分子设计及发展策略

左百乐¹, 杨如², 王向鹏¹, 杨安钢³

(1. 新乡医学院医学检验学院 河南省分子诊断与医学检验技术协同创新中心, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院第一附属医院神经修复重点实验室, 河南 卫辉 453100; 3. 空军军医大学基础医学院免疫学教研室, 陕西 西安 710032)

摘要: 嵌合抗原受体修饰T细胞(CAR-T)疗法因其强大的治疗潜能及临床试验的确切疗效, 已经成为肿瘤免疫治疗的重要手段之一。虽然CAR-T疗法在血液系统肿瘤的治疗中取得了突破性进展, 但在实体肿瘤中的治疗效果不太理想, 同时伴随着细胞因子风暴、脱靶效应等风险。CAR-T疗法的改良策略有通过引入自杀基因系统、CAR-T激活信号控制系统、限制剂量等来提高安全性; 增强CAR-T的归巢、增殖存活能力、突破免疫抑制微环境等来增强有效性。本文从CAR结构设计及CAR-T疗法的安全性、有效性改良策略方面展开综述。

关键词: 嵌合抗原受体修饰T细胞; 结构设计; 改良策略; 安全性; 有效性

中图分类号: R730.51 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2019)02-0106-05

恶性肿瘤因其高发病率和病死率而威胁着人类健康^[1]。近年来, 利用机体免疫系统攻击肿瘤细胞的免疫疗法成为恶性肿瘤治疗的突破点, 2013年被《Science》杂志评选为“年度十大科技突破”之首。2018年, 2位免疫学家因发现恶性肿瘤免疫检查点抑制疗法而获得诺贝尔生理学或医学奖。嵌合抗原受体修饰T细胞(chimeric antigen receptor modified T cell, CAR-T)疗法自1989年被GROSS等^[2]提出后显示出了巨大的潜力, 推动了恶性肿瘤免疫疗法的迅速发展。嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)的基本结构包括以单链可变片段(single chain variable fragment, scFv)为代表的胞外抗原识别结构域和与之连接的CD3 ζ 链的胞内信号段。近年来, CAR-T疗法在临床上尤其是在靶向CD19治疗B细胞恶性肿瘤方面取得了令人惊喜的临床应用效果。2017年有2种CAR-T疗法(Kymriah、Yescarta)被美国食品药品监督管理局批准应用于临床。尽管如此, CAR-T在实体肿瘤中的治疗效果不太理想, 同时伴随着细胞因子风暴、脱靶效应等风险。本文从CAR结构设计及CAR-T疗法的安全性、有效性改良策略方面展开综述, 为CAR-T疗法的进一步研究和临床应用提供参考。

1 CAR分子的结构设计

CAR由胞外抗原识别结合域、铰链区与跨膜结构域、胞内信号转导结构域3个部分组成。不同于生理性的T细胞抗原受体(T-cell receptor, TCR), CAR与相应抗原的识别结合不依赖于主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)的递呈, 有效避免了肿瘤细胞MHC表达下调这一免疫逃逸机制^[3]; 同时, CAR可以识别结合多种细胞表面分子, 如蛋白质、糖类、蛋白多糖、神经节苷脂、高度糖基化蛋白等^[4]。

1.1 胞外抗原识别结合域 胞外区负责识别抗原, 其中最典型的是靶向肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)的scFv, 它是由抗原特异性单克隆抗体的轻链及重链可变区通过短肽连接而成的1条多肽链, scFv的特异性及亲和力决定了CAR-T的肿瘤靶向性^[5]。为了进一步提高CAR-T的靶向性, 有研究者提出双靶CAR, 即通过设计连接2个相对独立的抗原识别序列, 以保证2个抗原同时被识别结合才能完全激活T细胞, 进而发挥特异性杀伤功能^[6]。

除scFv之外, 天然配体与受体拥有最为合适的亲和力和最小的免疫原性, 也可以用来作为CAR的胞外区。设计包含有天然配体heregulin的CAR-T能够靶向杀伤人表皮生长因子受体3/4阳性乳腺癌细胞^[7-8]。包含Fc受体CD16的CAR-T通过与抗体药物联用, 以抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用方式靶向杀伤肿瘤细胞^[9]。另外, 基于自然杀伤细胞活化性受体NKG2D的CAR-T的杀伤活性在多种

DOI:10.7683/xyxyxb.2019.02.002

收稿日期:2018-12-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81802837); 河南省高等学校重点科研计划项目(编号:18B310019); 河南省自然科学基金资助项目(编号:162300410211)。

作者简介:左百乐(1987-), 男, 河南新乡人, 博士, 讲师, 研究方向:肿瘤免疫治疗。

通信作者:杨安钢(1954-), 男, 河南安阳人, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向:肿瘤免疫; E-mail: agyang@fmmu.edu.cn。

肿瘤类型中得到验证,NKG2D-CAR-T 不仅能够靶向杀伤其配体 NKG2DL 高表达的肿瘤细胞,还能靶向肿瘤微环境中的免疫抑制细胞^[10]。

1.2 铰链区与跨膜结构域 常用的铰链区序列来源于免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) G1、IgG4、IgD 和 CD8 结构域,其中 IgG1 结构域最常用。铰链区的大小会影响 scFv 的灵活性,抗原表位的位置及铰链区的长度影响 T 细胞与肿瘤细胞之间的距离,进而影响肿瘤识别、细胞因子产生、T 细胞活化增殖。因此,针对不同 TAA 应调整铰链区长度,以便更好地发挥 CAR 靶向性识别结合肿瘤抗原的功能^[11]。

跨膜结构域连接胞外抗原识别结合域和胞内信号转导结构域,源于 T 细胞的 CD3 ζ 、CD4、CD8、CD28 的跨膜区常用来构建 CAR,跨膜区在 CAR 结构二聚化及 T 细胞活化中发挥着重要作用。研究发现,含有 CD3 跨膜区的 CAR-T 激活作用更强,含有 CD28 跨膜区的 CAR-T 能更高效地表达 CAR 基因^[12]。

1.3 胞内信号转导结构域 CAR 的胞内信号转导结构域是激活 T 细胞所必需的。第 1 代 CAR 结构通常为含有 3 个免疫受体酪氨酸活化序列的 CD3 ζ 胞内段,当胞外区识别并结合抗原,就会向胞内传导信号,激活 T 细胞^[13]。由于第 1 代 CAR 只传递第 1 信号,无共刺激分子,不能提供长时间的 T 细胞活化扩增信号,细胞因子分泌水平较低,只能引起短暂的 T 细胞增殖,因此,抗肿瘤效果甚微。第 2 代 CAR 结构增加了共刺激分子如 CD28、4-1BB (CD137)、ICOS、CD27、DAP10、OX40 (CD134) 等,以此来增强增殖信号,其中 CD28、4-1BB 最为常用。研究表明,CD28-CAR-T 的杀伤功能更强;4-1BB-CAR-T 表现出较低耗竭率,杀伤作用更持久^[14]。为了进一步提高 T 细胞的肿瘤杀伤活性,第 3 代 CAR 结构包含了 2 个共刺激分子,第 1 个分子为 CD28 或 4-1BB,第 2 个选用其他分子如 OX40、CD28 或 4-1BB,结果显示,第 3 代 CAR-T 细胞因子分泌水平更高,肿瘤杀伤作用更显著^[15]。最新研究设计的第 4 代 CAR 在结构上增加了促炎性细胞因子如白细胞介素 (interleukin, IL)-12 或者共刺激分子配体如 4-1BBL、CD40L,促炎性细胞因子可以招募免疫系统的其他组分进而放大肿瘤免疫效应,表达共刺激分子配体的 CAR-T 能够抵抗免疫抑制性肿瘤局部微环境,这对实体肿瘤的免疫治疗意义重大^[5]。

2 CAR-T 疗法的安全性对策

CAR-T 疗法在发挥显著抗肿瘤作用的同时也

存在严重的毒性反应风险,比如脱靶效应、细胞因子风暴、神经毒性等。全身应用类固醇是关闭 T 细胞功能的传统方法,其可以在数小时内减轻炎症反应和 T 细胞活化。然而,单靠类固醇不足以逆转损伤,需要新的、能够立即关闭 CAR-T 活性或者直接破坏 CAR-T 的对策。

2.1 自杀基因系统 通过引入自杀基因系统,必要时通过条件性消除 CAR-T 来避免潜在毒性风险,如:(1)单纯疱疹病毒-胸苷激酶 (herpes simplex virus-derived enzyme thymidine kinase, HSV-TK) 基因。HSV-TK 是一种高度免疫原性的病毒衍生蛋白,能将前体药物更昔洛韦 (ganciclovir, GCV) 转化为 GCV-三磷酸,通过阻断 DNA 合成导致细胞死亡。将 HSV-TK 基因插入至 CAR-T,使其对抗病毒药物 GCV 敏感,以此控制 CAR-T 的存活^[16]。(2)诱导型半胱氨酸蛋白酶 9 (inducible caspase 9, iCasp9) 系统。将缺失内源激活域的 iCasp9 序列与 FK506 结合蛋白融合,并且通过暴露于特定药物 (如 FK506) 而选择性诱导二聚化,iCasp9 二聚化后诱导细胞凋亡^[17]。DI STASI 等^[18]首先在单倍体相造血干细胞移植受者中测试了 iCasp9 系统,结果显示,发生移植物抗宿主反应 (graft-versus-host disease, GVHD) 的 4 例患者在使用单一剂量的二聚化剂 AP1903 后 30 min 内,超过 90% 的 CAR-T 被消耗。(3)截短的表皮生长因子受体 (truncated epidermal growth factor receptor, tEGFR)。tEGFR 分子只包含 EGFR 分子的胞外区,并且存在西妥昔单抗识别表位,可作为靶抗原,输注相关抗体 (西妥昔单抗) 后靶向消除 CAR-T^[19]。

2.2 CAR-T 激活信号控制 通过对 CAR 结构合理设计,可以保证 CAR 基因在特定时间和空间表达,进而选择性激活 T 细胞,发挥抗肿瘤功能。主要实施策略包括:(1)设计靶向肿瘤抗原 CAR 的同时引入抑制性 CAR (inhibitory CAR, iCAR)^[20],其包含有识别正常抗原的胞外区和抑制性受体如程序性细胞死亡受体-1 (programmed cell death-1, PD-1) 和细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) 的胞内信号区。当 iCAR-T 与正常组织接触时,iCAR 与在正常组织上特异性表达的抗原结合,激活 CTLA-4 或 PD-1 抑制信号,防止 T 细胞活化。以这种方式 CAR-T 能够被肿瘤细胞活化,并降低对正常组织的毒性。(2)为了增加 CAR-T 的特异性,设计靶向肿瘤抗原 CAR 的同时引入嵌合共刺激分子受体 (chimeric costimulatory receptor, CCR)^[20],CAR 和 CCR 二者胞内区分别为 CD3 和共刺激分子,分别传递 T 细胞活

化第1、第2信号。在肿瘤细胞上表达的2种靶抗原必须参与传递第1、第2信号才能完全激活CAR-T,仅表达一种抗原的正常细胞不足以完全激活T细胞信号。(3)近来发展的一种logic-gated CAR能够通过一种合成型Notch受体对CAR-T高度定制化^[21]。在该技术中,该合成型Notch受体的胞外识别结构域能够识别各种不同的细胞表面蛋白,包括肿瘤特异性抗原。识别结合后,胞内转录结构域将为下游基因如CAR基因提供转录信号,CAR表达于细胞表面识别另一种靶向抗原,此时T细胞完全激活发挥功能。通过此方法能够高度控制细胞的感应和应答行为,通过双靶点特异性识别来提高安全性,同时可局部选择性输送多种治疗成分,如细胞因子、抗体、小分子等,提高抗肿瘤效应。(4)CAR可以被设计为具有“开关”功能,即On-Switch CAR^[22]。其中受体的抗原结合结构域和胞内信号结构域被分成不同的模块,通过施用小分子二聚化因子诱导这些模块的异源二聚化,只有关联抗原和小分子都存在时才能诱导T细胞活化,因此可以控制CAR-T的持续时间和强度。(5)CAR可以用“masked”受体修饰,即Masked CAR。一种可被蛋白酶切割的masked短肽受体结构封闭CAR抗原结合结构域,当CAR-T进入富集蛋白酶(例如肿瘤微环境)的组织中,masked短肽被蛋白酶切割并暴露CAR的抗原结合结构域^[23]。

2.3 其他 控制治疗的持续时间也是限制CAR潜在毒性的一种方法。有研究通过RNA电穿孔法将靶向间皮素的CAR转染至T细胞,用于治疗胰腺癌、卵巢癌和间皮瘤等实体瘤患者^[24]。另外,可以通过局部注射CAR-T来减小毒性,比如在多形性胶质母细胞瘤中的应用^[25]。调整治疗剂量及输注次数也是一种应对方案,美国重组DNA咨询委员会提出CAR-T的间接剂量上升方案^[26],即CAR-T的I期试验通常以较低的细胞剂量开始,然后逐渐升高,起始剂量应根据CAR-T的类型进行调整,即第2代或第3代CAR-T应以低于第1代CAR-T的剂量开始。

3 CAR-T疗法有效性的改进策略

3.1 增强归巢能力 CAR-T归巢到达肿瘤部位是发挥有效杀伤的先决条件,也是实体瘤治疗的主要障碍。通过基因修饰技术共表达特定的趋化因子受体,能够促使CAR-T定向迁移至肿瘤部位。CCL2是许多肿瘤(包括神经母细胞瘤)产生的趋化因子细胞,而趋化因子受体CCR2b导向CCL2迁移。CRADDOCK等^[27]通过共表达趋化因子受体

CCR2b来增强靶向神经节苷脂2的CAR-T的归巢能力;结果显示,神经母细胞瘤细胞系和6例患者的原发肿瘤细胞均分泌高水平的CCL2,反转录病毒转导共表达高水平CCR2b(>60%)的CAR-T体外迁移良好,归巢能力得到改善(>10倍),杀伤肿瘤能力得到增强。DI STASI等^[28]设计CAR-T共表达CCR4,结果显示,它们能靶向迁移到CD30阳性的霍奇金淋巴瘤部位,发挥更强的抗肿瘤作用。CHINNAMY等^[29]设计了共表达IL-12及靶向肿瘤血管内皮细胞生长因子受体2的CAR-T,结果显示,CAR-T可归巢至肿瘤部位,并释放大量IL-12至肿瘤微环境。CARUANA等^[30]研究发现,CAR-T共表达类肝素酶不会影响CAR-T的存活、扩增及靶向杀伤功能,并可提高其降解细胞外基质的能力,进而增强T细胞浸润和抗肿瘤效应。

3.2 增强CAR-T的增殖存活能力 CAR-T只有持续存活、保持增殖能力,才能有效清除病灶及预防复发。研究显示,应用抗CD3/CD28免疫磁珠刺激活化能够实现自体T细胞的1000倍扩增^[31]。CHEUNG等^[32]开发了一种用生物材料制成的抗原呈递细胞模拟支架(antigen-presenting cells-mimetic scaffolds,APC-ms),与商业化磁珠相比,原代小鼠和人源T细胞的扩增效率提高了2~10倍,并且不影响CD19-CAR-T的肿瘤杀伤能力。细胞因子在T细胞体外培养制备中发挥着重要作用,其中IL-2最为常用,对T细胞增殖至关重要;然而,大剂量使用IL-2会对机体靶器官和细胞产生明显毒性。SOCKOLOSKY等^[33]利用突变IL-2以及相应的IL-2突变受体 β 导入T细胞,使其能够在体外和体内选择性靶向改造T细胞,以降低其脱靶效应和机体免疫反应,并能够有效抑制荷瘤鼠肿瘤生长,延长其生存期。

采用基因修饰技术使CAR-T同时表达细胞因子如IL-12、IL-15等,也是提高T细胞存活的一种手段。另外,可以选择存活能力更强的特殊表型的细胞,如天然和中枢记忆性T细胞、干细胞样记忆T细胞等回输治疗,还有研究者应用转录激活因子样效应核酸酶基因编辑技术永久敲除TCR α 和TCR β 表达,抑制GVHD,从而保证CAR-T的持久存活^[34]。EYQUEM等^[35]通过CRISPR/Cas9技术将CAR基因定位于TCR的 α 链的恒定区(T-cell receptor α constant,TRAC),相比传统CAR-T,TRAC-CAR-T的记忆细胞比例高,耗竭水平低,能够延缓接受抗原刺激后向效应细胞分化的过程,发挥更好的体内抗肿瘤效应。

3.3 突破肿瘤微环境的免疫抑制 实体肿瘤除了肿瘤细胞,还有成纤维细胞、内皮细胞、炎症反应细

胞、细胞外基质及免疫抑制分子等,形成了免疫抑制性肿瘤微环境。CAR-T 治疗实体肿瘤时,如何克服肿瘤微环境中多种免疫抑制分子的干扰,是必须面临和解决的问题。研究者们进行了多种尝试,如通过共表达显性失活的转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 受体克服 TGF- β 信号通路抑制作用^[36];靶向自然杀伤细胞活性受体 NKG2D 以识别免疫抑制性细胞如骨髓来源的抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) 上表达的 NKG2D 配体,以降低肿瘤微环境内骨髓来源的抑制性细胞以及调节性 T 细胞的比例,增加 T 细胞浸润^[37];共表达共刺激分子配体 CD40L 和 4-1BBL 能够降低 T 细胞耗竭水平来应对抑制性肿瘤微环境^[38];共表达促炎性因子 IL-12 能够更好地影响局部抑制性细胞如调节性 T 细胞或 MDSC 募集,或者通过招募激活固有免疫细胞如巨噬细胞的促炎反应,到达肿瘤抗原缺失部位,发挥杀伤效应^[39]。更换 IL-4 胞内区为 IL-7 胞内区,将肿瘤细胞产生的抑制性信号转换成激活性信号,由此逆转肿瘤来源的 IL-4 的作用,增强肿瘤微环境中肿瘤定向的细胞毒性 T 细胞的增殖和活化^[40];PD-1-CD28 嵌合受体通过结合肿瘤细胞表面的 PD-L1,激活 CD8⁺ T 细胞共刺激信号,增加细胞外调节蛋白激酶磷酸化水平,增强细胞因子和颗粒酶 B 分泌,进而增强其抗肿瘤活性^[41]。此外,联合使用单克隆抗体阻断免疫检查点分子 PD-1 或 CTLA-4,能进一步增强 CAR-T 疗法的功效^[42]。

4 结语

CAR-T 疗法以其强大的治疗潜能逐渐被认可接受,成为可能的肿瘤治疗方案之一,并在血液类肿瘤的临床应用中取得了令人欣喜的成绩。当然,CAR-T 疗法还有许多方面需要进一步研究,如 CAR 信号优化、最佳靶抗原选择、细胞制备方案、治疗安全性、联合治疗策略、CAR-T 的活性成分鉴定等^[3]。相信随着研究的不断深入,技术的不断改进,临床数据的完善,CAR-T 疗法将开启肿瘤治疗的新时代。

参考文献:

[1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.

[2] GROSS G, WAKS T, ESHHAR Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(24): 10024-10028.

[3] DAI H, WANG Y, LU X, *et al.* Chimeric antigen receptors modified

T-cells for cancer therapy [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108(7): 439.

[4] BEATSON R, TAJADURA-ORTEGA V, ACHKOVA D, *et al.* The mucin MUC1 modulates the tumor immunological microenvironment through engagement of the lectin Siglec-9 [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(11): 1273-1281.

[5] BATLEVI C L, MATSUKI E, BRENTJENS R J, *et al.* Novel immunotherapies in lymphoid malignancies [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(1): 25-40.

[6] KLOSS C C, CONDOMINES M, CARTELLIERI M, *et al.* Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 71-75.

[7] MUNIAPPAN A, BANAPOUR B, LEBKOWSKI J, *et al.* Ligand-mediated cytotoxicity of tumor cells; use of heregulin-zeta chimeras to redirect cytotoxic T lymphocytes [J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(1): 128-134.

[8] ZUO B L, YAN B, ZHENG G X, *et al.* Targeting and suppression of HER3-positive breast cancer by T lymphocytes expressing a heregulin chimeric antigen receptor [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(3): 393-401.

[9] KUDO K, IMAI C, LORENZINI P, *et al.* T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(1): 93-103.

[10] SENTMAN C L, MEEHAN K R. NKG2D CARs as cell therapy for cancer [J]. *Cancer J*, 2014, 20(2): 156-159.

[11] DUSTIN M L, DEPOIL D. New insights into the T cell synapse from single molecule techniques [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(10): 672-684.

[12] PULE M A, STRAATHOF K C, DOTTI G, *et al.* A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells [J]. *Mol Ther*, 2005, 12(5): 933-941.

[13] BEZBRADICA J S, MEDZHITOV R. Role of ITAM signaling module in signal integration [J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(1): 58-66.

[14] ZHAO Z, CONDOMINES M, VAN DER STEGEN S, *et al.* Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells [J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(4): 415-428.

[15] HOMBACH A A, RAPPL G, ABKEN H. Arming cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors: CD28 outperforms combined CD28-OX40 "super-stimulation" [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(12): 2268-2277.

[16] GRECO R, OLIVEIRA G, STANGHELLINI M T, *et al.* Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 95.

[17] GARGETT T, BROWN M P. The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells [J]. *Front Pharmacol*, 2014, 5: 235.

[18] DI STASI A, TEY S K, DOTTI G, *et al.* Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(18): 1673-1683.

[19] WANG X, CHANG W C, WONG C W, *et al.* A transgene-encoded

- cell surface polypeptide for selection, *in vivo* tracking, and ablation of engineered cells [J]. *Blood*, 2011, 118 (5) : 1255-1263.
- [20] FEDOROV V D, THEMELI M, SADELAIN M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5 (215) : 172-215.
- [21] ROYBAL K T, RUPP L J, MORSUT L, *et al.* Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits [J]. *Cell*, 2016, 164 (4) : 770-779.
- [22] RODGERS D T, MAZAGOVA M, HAMPTON E N, *et al.* Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113 (4) : E459-E468.
- [23] MA J S, KIM J Y, KAZANE S A, *et al.* Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113 (4) : E450-E458.
- [24] BEATTY G L, HAAS A R, MAUS M V, *et al.* Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies [J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2 (2) : 112-120.
- [25] BROWN C E, BADIE B, BARISH M E, *et al.* Bioactivity and safety of IL13 R alpha2-redredirected chimeric antigen receptor CD8⁺ T cells in patients with recurrent glioblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21 (18) : 4062-4072.
- [26] ERTL H C, ZAIA J, ROSENBERG S A, *et al.* Considerations for the clinical application of chimeric antigen receptor T cells; observations from a Recombinant DNA Advisory Committee Symposium held June 15, 2010 [J]. *Cancer Res*, 2011, 71 (9) : 3175-3181.
- [27] CRADDOCK J A, LU A, BEAR A, *et al.* Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b [J]. *J Immunother*, 2010, 33 (8) : 780-788.
- [28] DI STASI A, DE ANGELIS B, ROONEY C M, *et al.* T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model [J]. *Blood*, 2009, 113 (25) : 6392-6402.
- [29] CHINNASAMY D, YU Z, KERKAR S P, *et al.* Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18 (6) : 1672-1683.
- [30] CARUANA I, SAVOLDO B, HOYOS V, *et al.* Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redredirected T lymphocytes [J]. *Nat Med*, 2015, 21 (5) : 524-529.
- [31] WANG X, RIVIERE I. Manufacture of tumor- and virus-specific T lymphocytes for adoptive cell therapies [J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22 (2) : 85-94.
- [32] CHEUNG A S, ZHANG D, KOSHY S T, *et al.* Scaffolds that mimic antigen-presenting cells enable *ex vivo* expansion of primary T cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36 (2) : 160-169.
- [33] SOCKOLOSKY J T, TROTTEA E, PARISI G, *et al.* Selective targeting of engineered T cells using orthogonal IL-2 cytokine-receptor complexes [J]. *Science*, 2018, 359 (6379) : 1037-1042.
- [34] TORIKAI H, REIK A, LIU P Q, *et al.* A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR [J]. *Blood*, 2012, 119 (24) : 5697-5705.
- [35] EYQUEM J, MANSILLA-SOTO J, GIAVRIDIS T, *et al.* Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection [J]. *Nature*, 2017, 543 (7643) : 113-117.
- [36] FOSTER A E, DOTTI G, LU A, *et al.* Antitumor activity of EBV-specific T lymphocytes transduced with a dominant negative TGF-beta receptor [J]. *J Immunother*, 2008, 31 (5) : 500-505.
- [37] ZHANG T, SENTMAN C L. Cancer immunotherapy using a bispecific NK receptor fusion protein that engages both T cells and tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71 (6) : 2066-2076.
- [38] LONG A H, HASO W M, SHERN J F, *et al.* 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors [J]. *Nat Med*, 2015, 21 (6) : 581-590.
- [39] PEGRAM H J, LEE J C, HAYMAN E G, *et al.* Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning [J]. *Blood*, 2012, 119 (18) : 4133-4141.
- [40] LEEN A M, SUKUMARAN S, WATANABE N, *et al.* Reversal of tumor immune inhibition using a chimeric cytokine receptor [J]. *Mol Ther*, 2014, 22 (6) : 1211-1220.
- [41] PROSSER M E, BROWN C E, SHAMI A F, *et al.* Tumor PD-L1 co-stimulates primary human CD8⁺ cytotoxic T cells modified to express a PD1 : CD28 chimeric receptor [J]. *Mol Immunol*, 2012, 51 (3/4) : 263-272.
- [42] JOHN L B, KERSHAW M H, DARCY P K. Blockade of PD-1 immunosuppression boosts CAR T-cell therapy [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2 (10) : e26286.

(本文编辑:李胜利)