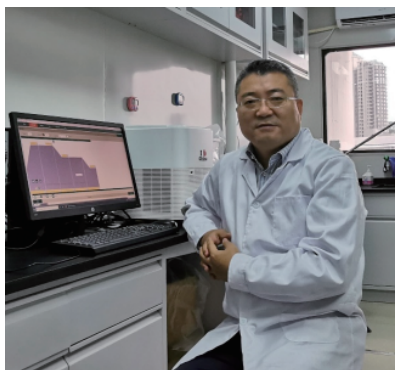


CAR-T细胞免疫疗法在肿瘤治疗中的研究进展

徐广贤 (广东医科大学医学技术学院/广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808)



专家简介:徐广贤, 博士, 复旦大学博士后, 二级教授, 硕士/博士生导师, 教育部“新世纪优秀人才”, 享受国务院特殊津贴。教育部高等学校教学指导委员会医学技术委员会委员; 中华医学会病原微生物与免疫学分会第八、九届委员会委员; 中国兽医学会病理学分会常务理事; 中国医检联盟理事会常务理事; 第二届中国中西医结合学会检验医学专业委员会感染疾病实验诊断专家委员会副主任委员。主持完成国家自然科学基金项目5项、教育部新世纪优秀人才项目等省部级项目20余项。获省科技进步三等奖4项, 省级医学科学技术奖二等奖2项; 授权专利5项, 申请专利4项, 在国内外学术杂志上发表论文100余篇, 其中作为第一或通信作者身份发表SCI收录论文25篇。徐广贤团队主要研究方向: (1) 非编码RNA在消化道肿瘤的发病机制及病原微生物与宿主相互作用中的分子调控机制; (2) 纳米抗体药物与CAR-T细胞治疗等细胞免疫治疗技术; (3) 分子诊断技术与POCT快速诊断试剂的研究与应用。E-mail: xuguangxian@gdmu.edu.cn。

摘要:嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(chimeric antigen receptor therapy, CAR-T)作为一种肿瘤免疫治疗方法, 具有良好的治疗前景。该文总结了CAR-T细胞治疗的发展历程与临床研究进展, 阐述了CAR-T细胞治疗耐药机制, 并提出了优化CAR-T细胞治疗的策略。

关键词: CAR-T; T细胞耗竭; 肿瘤; 免疫治疗

中图分类号: R 730.51

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2022)02-0121-11

Advances of chimeric antigen receptor T cell immunotherapy in tumor therapy

XU Guang-xian (School of Medical Technology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: Chimeric antigen receptor therapy (CAR-T) is a promising method for tumor immunotherapy. This review summarizes the development and clinical progress of CAR-T cell therapy, describes the strategies for CAR-T cell drug resistance and proposes strategies to optimize CAR-T cell therapy.

Key words: CAR-T; T cell exhaustion; tumor; immunotherapy

CAR-T细胞治疗概念最初于1989年提出, 是一种过继性细胞治疗方法。CAR-T细胞疗法是在体外利用基因工程的方法修饰患者外周血T细胞, 赋予T细胞靶向识别肿瘤细胞表面抗原的特性, 经体外扩增培养后回输到患者体内进行治疗肿瘤的方法。CAR-T细胞疗法已广泛应用于临床恶性血液肿瘤领域, 但是仍旧存在诸多不足且面临极大挑战。本文总结了CAR-T细胞治疗在肿瘤免疫治疗中的最新研究

进展, 同时归纳了可能的解决方案, 以期能为CAR-T细胞治疗适用性提供理论基础。

1 CAR结构演变

CAR结构自提出至今, 经历了四代CAR结构的演变与优化, 具有不同的优缺点。第一代CAR是以TCR结构和抗体结构为基础进行模拟改造, 仅包含负责识别肿瘤细胞的胞外抗原识别区、跨膜区和CD3 ζ 信号传递区。第一代CAR设计是将三硝基苯基(Tri-nitrophenyl, TNP)抗体的可变区同TCR恒定区相融合表达, 转导T细胞后此种结构可稳定表达于T细胞表面, 以MHC非限制性识别杀伤靶细胞并分泌

收稿日期: 2022-03-28

基金项目: 广东医科大学高层次人才科研启动经费(4SG21240G), 2021年广东医科大学“冲补强”建设二级项目(4SG21278P)

IL-2^[1-2]。尽管第一代CAR-T细胞在体外具有肿瘤杀伤优势,但在临床实验中CAR-T细胞扩增能力及体内持续时间有限,无法完全清除肿瘤细胞,导致肿瘤复发^[3]。第二代CAR借鉴了T细胞活化经典信号,在第一代CAR结构的基础上增加1个共刺激分子,如4-1BB(又称CD137)或CD28,可使CAR-T细胞活化水平,增殖能力得到显著提升,临床数据表明接受第二代CAR-T细胞治疗的患者肿瘤负荷得到长期有效控制^[4-5]。目前,新发现的共刺激分子包括可诱导共刺激分子(Inducible Costimulatory Molecule, ICOS)、OX40(又称CD134)和CD40等,第二代CAR结构也是临床上应用最为成熟的结构^[6-9]。第三代CAR是在第二代CAR结构的基础上增加1个共刺激分子,即同一CAR结构中共表达2个共刺激分子。第三代CAR-T细胞与第二代CAR-T细胞相比,其细胞毒性进一步提升,Cappell等^[10]的研究结果表明4-1BB与CD28共表达的CAR-T细胞增殖及细胞因子释放水平,均优于仅含单个共刺激分子的CAR-T细胞;同时,Guedan等^[6,11]构建的ICOS-BBz CAR-T细胞表现出更长效的体内持续时间。第四代CAR又称通用细胞因子介导杀伤的T细胞(T cells redirected for universal cytokine killing, TRUCK T),是在第二代或第三代CAR基础上共表达一些其他分子,这些分子包括促进T细胞增殖的IL-7、IL-15和IL-21^[12-15],或提升T细胞效应能力的IL-12和IL-18等^[16-18],或趋化其他免疫细胞或CAR-T细胞至肿瘤细胞周围的C-C基序趋化因子19(C-C motif chemokine 19, CCL-19)和CCL-21等^[19]。

2 CAR-T细胞治疗临床研究进展

自2017年FDA批准诺华与吉利德的CAR-T细胞疗法产品上市起,目前全球已有Kymirah、Yescarta、Tecartus、Breyanzi、Abecma、Relma-cel和Carvykti共7款产品获批,应用于恶性血液肿瘤的治疗,如B细胞急性淋巴细胞白血病(B cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL)、复发或难治性大B细胞淋巴瘤(Relapsed or refractory large B-cell lymphoma, LBCL)、复发或难治性滤泡性淋巴瘤成人患者(Relapsed or refractory follicular lymphoma in adults, FL)、复发或难治性套细胞淋巴瘤成人患者(Relapsed or refractory mantle cell lymphoma in adults, MCL)和复发或难治性多发性骨髓瘤(Recurrent or refractory multiple myeloma, MM)^[20-25]。Kymirah是一种靶向CD19的

单链抗体(Single chain antibody fragment, ScFv)、4-1BB和CD3 ζ 的细胞内信号结构域,其治疗滤泡性淋巴瘤完全缓解率为69.1%(95%CI58.8%~78.3%),总缓解率为86.2%(95%CI77.5%~92.4%)^[26]。Yescarta也是一款靶向CD19的CAR-T细胞免疫疗法产品,在治疗大B细胞淋巴瘤时,83%的患者出现缓解,而标准治疗组(接受2~3轮化学免疫治疗,然后对化学免疫治疗有反应的患者进行大剂量化疗和自体干细胞移植)仅50%缓解;Yescarta组和标准治疗组的完全缓解率分别为65%和32%;2年总生存率分别为61%和52%;Yescarta组3级及以上细胞因子释放综合征发生率为6%,3级及以上神经事件发生率为21%^[27]。Carvykti,即西达基奥仑赛注射液,是我国首款获FDA批准上市的CAR-T细胞产品,是一款靶向B细胞成熟抗原(B-cell maturation antigen, BCMA)的CAR-T细胞免疫疗法,主要用于多发性骨髓瘤治疗,临床总缓解率高达98%(95%CI92.7%~99.7%),完全缓解为78%(95%CI68.8%~86.1%);在18个月的中位随访时间中,中位缓解持续时间为21.8个月(95%CI21.8%~无法预估)^[28]。此外,有研究团队对全球首批接受CAR-T细胞治疗的患者进行追踪调查发现,CAR-T细胞在这些患者体内可存留长达10年之久,其中,CD8⁺CAR-T细胞初始在效应阶段占主导群体,当肿瘤负荷缓解后则由CD4⁺CAR-T细胞维持机体持久的肿瘤清除^[29]。

目前,CAR-T细胞治疗研发管线主要分布于美国与中国,约占全球75%以上。临床治疗靶点以CD19、CD22、CD20、BCMA为主,一些诸如CD38、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素(Sialic acid binding Ig-like lectin 6, Siglec-6)、白细胞免疫球蛋白样受体B4(Leukocyte immunoglobulin-like receptor B4, LILRB4)、CD133^[30]等新靶点也逐渐备受关注,旨在降低B细胞发育不全的不良反应并规避脱靶毒性^[31-34]。CAR-T细胞治疗主要集中于血液肿瘤,如急性白血病、多发性骨髓瘤、淋巴瘤等,但针对实体瘤领域,虽然存在如癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen, CEA)、人类表皮生长因子受体2(Human epithelial factor receptor 2, HER2)、神经节苷脂2(Gangliosides 2, GD2)、前列腺特异性膜抗原(Prostate specific membrane antigen, PSMA)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(Glypican3, GPC3)、粘蛋白1(Mucoprotein1, MUC1)等在研靶点,目前尚无CAR-T产品获批,其原因较为复杂^[35]。

3 CAR-T细胞治疗面临的挑战

CAR-T细胞治疗虽然取得很瞩目的成就,但是依然存在一定程度的不足,主要包括CAR-T细胞生产批次差异大、慢病毒载体递送CAR基因的安全性、CAR-T细胞脱靶效应、CAR-T细胞输注后的免疫排斥及毒副作用、CAR-T细胞体内持续时间不足而导致肿瘤复发^[36]。这些因素都会导致CAR-T细胞治疗效果不佳,对CAR-T细胞治疗存在极大挑战,亟待解决。此外,实体瘤治疗中由于肿瘤微环境存在,特异性肿瘤相关抗原缺失等诸多因素导致CAR-T细胞无法有效浸润至肿瘤周围或内部,从而无法杀伤肿瘤细胞^[19, 37],CAR-T细胞在治疗实体瘤领域面临着诸多的挑战。

3.1 CAR-T细胞体外生产工艺复杂

CAR-T细胞体外生产流程包括外周血获取、单个核细胞分离、T细胞激活、病毒转染、CAR-T细胞扩增和质检等,生产全过程需无菌控制,同时防止不同产品之间的交叉污染,整个流程需2~4周,其制备过程复杂,耗时且成本较高,这在一定程度上延迟了患者接受治疗的最佳时间。首先,对T细胞来源而言,有研究者直接采用患者外周血单个核细胞制备CAR-T细胞,也有研究者采用纯化的T细胞进行CAR-T生产,二者之间的差异尚需深入研究。其次,CAR-T细胞扩增过程中需借助细胞因子刺激,补充血清或其他营养物质等,对CAR-T细胞生产所需原材料有严格要求,且补加时必须保证无菌环境。最后,CAR-T细胞在输注前,需对内毒素、支原体、化学试剂残余等一系列潜在风险因素进行质检。

3.2 病毒递送安全性

目前,已上市的几款CAR-T细胞产品均采用病毒载体向T细胞递送CAR基因,例如Kymriah, Yescarta均采用慢病毒作为其载体^[38]。以来源于HIV的慢病毒载体为例,其主要包含Gag、Pol、Env、Tat、Rev、Vif、Vpr、Vpu和Nef等关键基因,每个基因各司其职,在包装质粒的帮助下将外源基因整合至靶细胞基因组,实现外源基因的持续稳定表达。然而,病毒载体依旧存在潜在致癌性,且病毒载体携带基因片段有一定局限性,无法容纳较大基因,同时病毒载体在整合时可能会导致插入突变。FDA推荐残余DNA片段应低于200 bp,且受CAR-T细胞治疗的患者需进行长期随访,以监测病毒载体的副作用^[38],同时,对病毒载体的获取,浓缩纯化等工艺均需优化。

基于此,目前非病毒载体如转座子系统,包括

piggyBac转座子(PB)系统(P-BCMA-101)和睡美人(Sleeping Beauty, SB)转座子系统备受研究者青睐。其中在以SB作为载体的CD19 CAR-T治疗复发难治性B细胞淋巴瘤的长期随访中证实该方法高效安全,毒副作用低^[39]。同样的,在抗白血病治疗中也取得相似效果^[40-41]。此外,采用该系统可精准将外源基因递送至目标区域并且扩增的CAR-T细胞以TCM表型为主^[42-43]。

3.3 毒副作用

CD19是目前研究最为成熟的肿瘤抗原靶点,主要是其仅在B系细胞表面表达,其他细胞几乎不表达,且即使CAR-T细胞杀伤正常B细胞后也可通过补充免疫球蛋白弥补B细胞暂时性的发育不全。但并不是所有肿瘤同B细胞恶性血液肿瘤一般,它们表达异质性的肿瘤相关抗原,且这些抗原在正常组织表面也大量表达,因此,CAR-T细胞将正常细胞视为杀伤对象,从而导致脱靶毒性^[44-45]。

此外,临床上常见的CAR-T细胞回输后出现细胞因子释放综合征(Cytokine release syndrome, CRS)与神经毒性综合征等不良反应,主要原因是CAR-T细胞及机体的其他免疫细胞一同释放IL-1、IL-6、IL-10等细胞因子导致CRS。根据患者临床表征,CRS分为不同等级,如轻度患者表现为全身发热、恶心、头痛等;中度患者表现为呼吸困难、低血压、2级器官毒性;重度患者则出现3级器官毒性并伴有转氨酶升高乏力出现;极重度则表现为4级器官毒性需机械通气,已严重危及生命^[46]。而IFN- γ 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、粒细胞集落刺激因子(Granulocyte Colony-Stimulating Factor, G-CSF)、粒细胞巨噬细胞刺激因子(Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating factor, GM-CSF)、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemoattractant protein, MCP-1)、干扰素诱导蛋白10(Interferon induced protein 10, IP-10)等细胞炎性因子导致嗜睡、疲劳、震颤、视听幻觉、语言表达困难、书写障碍、轻度嗜睡、注意力不集中等为主要表现的神经毒性综合征,更甚之,严重时进展为全面失语、大小便失禁、严重意识及运动障碍、癫痫发作和昏迷性脑水肿。根据患者临床表现不同可分为不同等级^[47]。

CAR-T细胞回输治疗后的另一不良反应作用为宿主抗移植反应,一方面可能由于CAR结构中负责识别肿瘤抗原的胞外识别区单链抗体(ScFv)为鼠源;另一方面由于目前CAR-T细胞治疗“自体性”属性,制备流程复杂,耗时长,若使用异源CAR-T细胞

则不可避免的导致移植物抗宿主病(Graft versus host disease, GVDH)发生^[48-51]。

3.4 CAR-T细胞耗竭

相关研究表明,在肿瘤抗原的持续刺激下,机体的T细胞正常效应水平被削减,且自身增殖及存活时间均下调,即T细胞处于耗竭状态(PD-1⁺TCF-1⁻TIM-3⁺)^[52-53]。当然,CAR-T细胞也存在相似表征,传统体外扩增的CAR-T细胞群体中以效应表型(CCR7⁺CD45RA⁻)为主,与Naïve CAR-T细胞(CD45RA⁺CCR7L⁺)相比,虽然细胞因子分泌能力较强但该群体细胞增殖、自我更新能力极度下降(依赖于IL-7、IL-15)。同时,抑制性受体程序性死亡因子1(Programmed death1, PD-1)、细胞毒性T细胞淋巴细胞抗原4(Cytotoxic T cell lymphocyte antigen 4, CTLA-4)、T细胞免疫球蛋白粘蛋白-3(T cell immunoglobulin mucin-3, TIM-3)、淋巴细胞活化基因3(Lymphocyte-activation gene 3, LAG-3)、T细胞免疫球蛋白和ITIM结构域(T cell Ig and ITIM domain, TIGIT)、CD244(2B4)和CD160等在该表型群体细胞中的表达持续增加或同时共同表达多个抑制性受体;效应功能渐进性降低,即IFN- γ 、IL-2、颗粒酶B和穿孔素分泌减少;代谢水平发生改变,CAR-T细胞线粒体活性降低,由氧化磷酸化、脂肪酸氧化转换为糖酵解、谷氨酰胺、支链氨基酸代谢,PI3K-AKT-mTOR通路活化,储备能力降低^[54-58]。

也有文献报道,患者临床反应与CAR-T细胞体内扩增高度相关,持续的CAR-T细胞存在可控制肿瘤进展^[59]。然而回输处于耗竭状态的CAR-T细胞后,由于线粒体活性削弱,其在患者体内持续存活时间有限,无法有效维持一定数量效应细胞;临床分离的肿瘤患者T细胞活化状态受到影响,进而体内抗肿瘤反应受到抑制。当接受CAR-T细胞治疗的患者肿瘤负荷较低时,其临床反应较佳,例如在治疗中,初发性肿瘤患者临床治疗效果由于复发难治性,可能原因在于初发患者T细胞线粒体活性好,制备的CAR-T细胞质量良好^[60]。此外,CAR基因融合位点从表观遗传学角度调节T细胞耗竭状态而产生不同临床反应结果^[61]。

3.5 实体瘤适用性不佳

CAR-T细胞治疗目前主要应用于恶性血液肿瘤,实体瘤治疗适用性并不理想,临床尚无获批产品。限制CAR-T细胞对实体瘤领域应用的原因可能因素如下:首先,缺乏肿瘤特异性抗原,不同于CD19,实体瘤肿瘤细胞一般异常表达多个靶点,且这些异常表达

的抗原在正常组织中也有表达,例如目前针对神经胶质瘤的研究靶标包括PSMA、CEA、Her2、GD2、上皮细胞黏附分子(Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)和间皮素(Mesothelin)等^[62-63];其次,最主要的因素当属肿瘤微环境,肿瘤相关成纤维细胞(Cancer-associated fibroblasts, CAFs)是肿瘤微环境中最主要的成分之一,构成肿瘤基质层并释放一些抑制性细胞因子;Treg细胞、骨髓来源抑制性细胞、M₂型巨噬细胞等免疫抑制性细胞通过分泌TGF- β 、IL-10或其他细胞因子来负向调节CAR-T细胞免疫反应;此外,实体瘤细胞丢失细胞因子受体,逃避免疫细胞监视,CAR-T细胞无法有效趋化至肿瘤细胞附近,归巢能力受到抑制,而同样的实体瘤治疗中的免疫抑制性受体高表达抑制了CAR-T细胞的有效活化,降低其效应能力^[35, 64-65]。

4 CAR-T细胞耐药应对策略

4.1 CAR-T细胞通用性及安全性

首先,利用基因编辑技术优势,敲除引起GVDH的相关基因,实现“现货通用”的CAR-T细胞疗法^[66-67]。例如,基于TALEN基因编辑技术将CAR基因导入TCR α 位点(TRAC_{CAR}T),将IL-12P70导入IL2R α 或PDCD1制备的通用细胞有效清除NSG小鼠体内肿瘤细胞,且临床首批接受基于此技术制备的CAR-T细胞白血病患者已得到缓解,仅出现低程度GVDH表现^[68-69];基于CRISPR-Cas9编辑技术将CD19 CAR定向递送到T细胞受体 α 恒定区(T-cell receptor α constant, TRAC)基因座,该设计不仅获得了通用CAR-T细胞,而且增强了CAR-T在急性淋巴细胞白血病小鼠模型中的扩增能力以及改善因抗原刺激导致的CAR-T细胞耗竭^[70]。但也有研究报道,相比于TCR敲除组CAR-T细胞,内源性TCR促进CAR-T细胞持续^[71]。因此,对于TCR基因敲除后对CAR-T细胞的影响尚需深入探究。同时,研究者利用CRISPR-Cas9技术筛选出Fas-FasL、p38等多个新型肿瘤治疗靶点,这一发现将进一步提升过继性细胞治疗适用性^[72-73]。

其次,脐带血及造血干细胞因其天然优势用于血液肿瘤移植性治疗,采用脐带血来源T细胞/NK细胞制备的CAR-T/CAR-NK均可有效缓解GVDH及CRS等毒副作用。在一项临床研究中(NCT03056339),11位复发难治性CD19阳性肿瘤患者接受脐带血来源CAR-NK治疗后,8例患者对CAR-NK反应(73%),其中4例淋巴瘤和3例CLL患者完全缓解,1例患者

部分缓解^[74]。

控制 CAR-T 回输后的 CRS、神经毒性等不良反应可通过调节 CAR-T 细胞体内活性达到缓解^[75-76],例如 Amatya 等^[77]设计了一种携带自杀基因 IC9 的 SLAMF7 CAR-T 细胞,主要考虑到 SLAMF7 除在 MM 细胞中表达外,在诸如 NK 细胞、淋巴细胞中也保持表达。添加自杀基因相当于给 CAR-T 细胞配置“刹车”系统,使 CAR-T 细胞清除 MM 细胞后,通过添加 AP1903 诱导其死亡。此外,有研究者设计了一对人正交 IL-2 (orthogonal IL-2, ortho-hIL-2)/IL-2R β (ortho-hIL-2R β) 系统, ortho-hIL-2 对表达 ortho-hIL-2R β 的细胞具有选择性,可诱导表达 ortho-hIL-2R β 的 CAR-T 细胞增殖,而对野生型 T 细胞没有明显的信号传导作用,通过体外给予或不给予 ortho-hIL-2,可控制 CAR-T 细胞的增殖水平^[15]。FDA 指出采用类固醇可改善接受 Yescarta 治疗后的 CRS (<https://investors.gilead.com/news-releases/news-release-details/us-fda-approves-new-label-update-car-t-cell-therapy-yescarta>);同时,抑制 IFN γ 似乎可以阻止巨噬细胞和其他有助于驱动细胞因子释放综合征的免疫细胞的激活且对 CAR-T 细胞的抗肿瘤作用没有明显的负面影响^[78]。

B 细胞发育不全是 CD19 CAR-T 细胞治疗后的另一主要不良反应,尽管临床上采用免疫球蛋白补给治疗,但仍存在一定的风险。研究者发现给 CAR-T 细胞装载一种 B 细胞激活因子 (B cell activating factor, BAFF) 配体,可实现仅杀伤肿瘤细胞而对早期 B 细胞无毒性,早期 B 细胞则可以补充已被消耗的成熟 B 细胞。主要原理为 BAFF 可同 B 系恶性肿瘤细胞表面表达的 B 细胞活化因子受体 (B cell-activating factor receptor, BAFF-R)、BCMA 和跨膜激活剂和 CAML 相互作用剂 (Transmembrane Activator and CAML Interactor, TACI) 任一受体特异性结合,而早期 B 细胞却几乎不表达 BAFF 受体^[45]。Hebbar 等^[44]构建了一种靶向 AMLGRP78 新型抗原的 CAR-T 细胞,因为 GRP78 在 AML 癌细胞表面上过表达,但在骨髓造血祖细胞 (Hematopoietic progenitor cells, HPCs) 中不表达,从而避免对 B 细胞的杀伤;同时他们采用 BCR-ABL 激酶抑制剂达沙替尼 (Dasatinib) 处理该 CAR-T 细胞,阻滞了 GRP78 CAR-T 细胞对自身的识别,提高了其适应性,持续时间延长从而有效清除肿瘤细胞。

4.2 改善 CAR-T 细胞耗竭状态

CAR-T 细胞耗竭调节主要包括但不限于如下

策略:首先,基因编辑技术敲除或过表达耗竭相关基因,例如敲除细胞因子信号抑制因子 1 (Suppressor of Cytokine Signaling 1, SOCS1) 可促进 CD4⁺T 细胞增殖与存活潜能,且体内结果表明抑制 SOCS1 表达可明显改善 CD4⁺CAR-T 细胞的持久性和 CD8⁺CAR-T 细胞的功效^[79]。在一代或二代 CAR-T 细胞中敲除 DNA 甲基转移酶 3A (DNA Methyltransferase 3A, DNMT3A) 后,其增殖能力显著提升,在接受长期肿瘤抗原刺激也依旧表现出较强毒性,其可能通过抑制 TCF7, CD62L, CD45RA 等记忆干性基因参与 T 细胞耗竭调控^[80]。同样的,敲除或抑制胸腺细胞选择相关的高迁移率族盒 (Thymocyte selection associated high mobility group box, TOX)、核受体亚家族 4 A (Nuclear receptor subfamily 4 group A, NR4A)、正性调控域锌指蛋白 1 (Positive regulatory domain zinc finger protein 1, PRDM1) 和 CLB 等表达也可有效改善 CAR-T 细胞耗竭状态^[80-87]。其次,优化改善 CAR-T 细胞培养基,包括细胞因子优化与 T 细胞分化的抑制剂两种措施。例如 CAR-T 细胞在 IL-15、IL-21 培养下以记忆性表型为主体,而 IL-2 培养下则以末端效应为主^[15, 88-89];补加 DNA 甲基转移酶抑制剂地西他滨 (Decitabine), 2-脱氧-D-葡萄糖 (2-Deoxy-D-glucose, 2-DG) 等均促进低分化 CAR-T 细胞群体形成,有利于 CAR-T 细胞在体内维持自我更新及长期存活特征,从而增加其对肿瘤细胞的清除能力。添加此类物质可能通过对 CAR-T 细胞表观遗传学及代谢水平产生潜在影响^[90-91]。同样的,研究者也发现以 4-1BB 为共刺激分子的 CAR-T 细胞表现为更强增殖能力与记忆样表型,但 CD28 CAR-T 却以丢失增殖潜能为代价表现出更强的细胞毒性^[10]。最后,联合新技术筛选与驱动 T 细胞耗竭相关的基因,有研究者发现 CD19-CAR-T 细胞经历了与 T 细胞耗竭相关的 DNA 甲基化编程,因此阻止这一过程可能是提高 CAR-T 细胞疗效的一种有效的措施^[92]。此外,有研究者利用 CRISPR 全基因组激活筛选平台 dgRNA-CRISPR,基于小鼠原代 CD8 T 细胞筛选出能够增强细胞功能的特定基因脯氨酸脱氢酶 2 (Proline dehydrogenase 2, PRODH2), 并构建了 PRODH2 过表达的 CD22-CAR、BCMA-CAR 和 HER2-CAR 等 T 细胞,体内、外实验表明 PRODH2 基因能够增强 CAR-T 细胞的持久性,提高抗多种肿瘤的治疗效果;进一步对 PRODH2 工程化的 CAR-T 进行转录、代谢等研究发现,PRODH2 可重编程脯氨酸代谢途径,促进线粒体的增生,提高 T 细胞的氧化磷酸化水平,降低其糖酵解水平,为 CAR-T 细胞提供了

更多的能量,增强 CAR-T 细胞的抗肿瘤能力;同时,针对实体瘤构建共表达趋化因子受体或靶向肿瘤微环境中基质细胞标志物的 CAR-T 细胞,如共表达 CCR7 增加了 CAR-T 细胞向肿瘤细胞周围的迁移与浸润。靶向纤维细胞活化蛋白(Fibroblast activation protein, FAP)的 CAR-T 细胞降低了肿瘤血管密度和结缔组织增生,并以免疫非依赖性方式抑制了人肺癌异种移植物和同基因鼠胰腺癌的生长,为开发用于治疗实体瘤的 FAP(+) 基质细胞靶向疗法提供支持^[93]。共表达 4-1BBL 和 CD40 等一些新的受体,增加 CAR-T 细胞增殖,活化能力,抑制细胞凋亡水平^[94-95]。研究发现源自神经母细胞瘤配对同源异型盒蛋白 2B (Paired-like homeobox 2B, PHOX2B) 的未突变肽 (QYNPIRTTF) 在神经母细胞瘤中大量表达,构建靶向 PHOX2B 未突变肽的 PC CAR-T 细胞可特异识别杀伤不同 HLA 类型的神经母细胞瘤细胞,治疗 1 周后小鼠体内神经母细胞瘤细胞完全消退^[96]。

4.3 提升 CAR-T 细胞敏感性

在 CAR-T 细胞研究过程中发现肿瘤复发的另一重要原因是肿瘤细胞下调靶抗原的表达, CAR 分子表达水平降低或 CAR-T 细胞与肿瘤细胞间免疫突触亲和力不佳。基于此,研究者通过 TCR 工作原理设计出一种新型高抗原敏感性 CAR, 他们发现通过在 4-1BB/CD3 ζ 序列中嵌入 CD3 ϵ 或生长因子受体结合蛋白 2 (Growth factor receptor binding protein 2, GRB2) 结构域可以使 CAR-T 细胞在较低抗原阈值下激活,且与传统 4-1BB/CD3 ζ 相比,该新型 CAR-T 细胞在构建的白血病、淋巴瘤及乳腺癌小鼠肿瘤模型中均展现出优势^[97]。有文献发现 CAR-T 细胞中的溴结构域和超末端结构域(bromodomain and extra terminal domain, BET)蛋白会降低 CAR 的表达,采用 BET 溴结构域 JQ1 抑制剂抑制 BET 蛋白的表达,可以减少 T 细胞耗竭,提高 CAR 的表达量并延长 CAR-T 细胞在体内的扩增能力^[98]。Halim 等^[99]通过优化亲和力方式,筛选出可与 CAR-T 细胞高效结合的靶抗原 ScFv,从而增加 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的亲和性并对其进行杀伤。

4.4 CAR-T 细胞代谢水平

CAR-T 细胞代谢途径与其增殖和分化状态息息相关,通过调节 CAR-T 细胞新陈代谢可以提高其肿瘤免疫活性。T 细胞在未接触抗原前,代谢主要依靠氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation, OXPHOS) 和脂肪酸氧化 (Fatty acid oxidation, FAO) 代谢途径提供能量,此时 T 细胞处于幼稚低分化阶段,自我更新能

力较强,抗肿瘤能力不佳。当遇到抗原刺激时, TCR 和 CD28 协同激活 T 细胞 PI3K-AKT-mTOR 通路,代谢方式转换为糖酵解、谷氨酰胺和支链氨基酸的分解代谢,导致葡萄糖和氨基酸的摄取增加,满足快速增殖和细胞因子产生的新陈代谢需求,此时 T 细胞具备一定裂解靶细胞能力^[100]。相关研究表明低分化 CAR-T 细胞回输后效果优于末端分化状态 CAR-T 细胞,基于此,有文献报道 CAR-T 细胞与 mTOR 上游调节因子 PI3K 抑制剂孵育,可增加幼稚和中枢记忆 T 细胞亚群,且体内持续时间和抗肿瘤活性均得到提升^[58, 101]。也有文献报道采用人工合成的 2DG 抑制糖酵解过程,可促进记忆性 T 细胞的形成^[102]。此外,在 CLL 中, T 细胞线粒体受损,降低葡萄糖转运蛋白 1 (Glucose Transporters 1, GLUT1) 的储备也可提高 CAR-T 治疗效果^[60]。也有研究者发现在 CAR-T 细胞培养基中提升钾离子浓度可以诱导 T 细胞自噬,减少效应和耗竭相关基因的组蛋白乙酰化,所获得的 CAR-T 细胞具有更好持久性与多能性^[103]。提升培养基中精氨酸水平也可诱导 CAR-T 细胞代谢水平变化,促进 OXPHOS 代谢并抑制糖酵解,维持效应记忆型 T 细胞 (Effective Memory T Cell, Tem) 的生存^[104]。

肿瘤细胞的糖酵解活性可能会限制 CAR-T 细胞对葡萄糖的摄取,对肿瘤微环境的代谢调节可改善 CAR-T 细胞功能。阻断 PD-L1/PD1 轴可直接抑制肿瘤细胞的糖酵解,恢复 TME 中的葡萄糖,从而促进 CAR-T 细胞的糖酵解和 IFN- γ 的产生^[105]。GLUT1 抑制剂或生酮饮食在不损伤 CAR-T 细胞功能的前提下抑制肿瘤细胞葡萄糖代谢^[106]。缺氧和营养不足是肿瘤微环境的主要特征。营养缺乏,尤其是氨基酸,如色氨酸,能够激活调节 T 细胞活性的综合应激反应。吡啶胺 2,3 双加氧酶 (Indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO) 是一种细胞内酶,可以催化色氨酸降解为犬尿氨酸。肿瘤微环境内的肿瘤细胞和骨髓细胞过表达 IDO,会导致 T 细胞增殖和存活受阻,使用 miR-153 抑制结肠癌细胞中 IDO1 的表达后, CAR-T 细胞毒性增加^[107]。TGF- β 参与 T 细胞糖酵解和 OXPHOS,采用 CRISPR/CAS9 技术敲除 CAR-T 细胞内源性转化生长因子- β 受体 II (Transforming growth factor- β receptor II, TGF- β R2) 后, Treg 转化降低, CAR-T 细胞的耗竭缓解^[108]。

5 展望

近年来,肿瘤免疫疗法在临床的应用极大程度地提升了肿瘤患者的生活质量, CAR-T 细胞疗法为血

液肿瘤患者的治愈带来了曙光,借鉴并联合新兴技术有望进一步拓展CAR-T细胞疗法的适用性。(1)TCR-T与CAR-T技术联合应用。有研究者将抗原的ScFv偶联在TCR上制备的TRuC-T,该设计保持了原有的TCR序列,识别肿瘤时不受HLA限制。TRuC-T细胞毒性与CAR-T细胞相近甚至超越CD28/4-1BB CAR-T细胞,并且在小鼠淋巴瘤及白血病血液肿瘤模型中均展现潜在的抗肿瘤活性^[109]。目前采用该疗法的产品(TC-201)已进入I/II期临床试验,用于治疗间皮素阳性的非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、恶性胸膜/腹膜间皮瘤和胆管癌患者^[110]。(2)新兴技术和制备工艺联合应用。Novartis公司采用T-Charge™工艺制备的新型抗BCMA CAR-T细胞(PHE885),与传统技术相比,需要不到2 d的时间就可以生成功能性的CAR-T细胞,并且保留了原始/干细胞记忆T细胞(Tscm)(CD45RO⁺/CCR7⁺),极大程度改变了CAR-T细胞耗竭水平。Pulsipher等^[111]的研究结果表明,采用新一代NGS测序技术监测微小残留病灶可更好预测tisagenlecleucel治疗儿童和青年急性淋巴细胞白血病后的复发情况,帮助医护人员在第一时间采取预防措施。预先筛选与肿瘤抗原间可形成高效免疫突触的ScFv等技术^[99]。(3)免疫检查点抑制剂与CAR-T疗法联合应用。有研究者采用shRNA技术同时下调两种检查点分子(包括PD-1/TIM-3、PD-1/LAG-3、PD-1/CTLA-4、PD-1/TIGIT),结果显示在PD-1/TIGIT同时敲除后起到协同促进CD19 CAR-T细胞对白血病肿瘤细胞的清除^[112]。机制上,下调PD-1增强了CAR-T细胞效应分子分泌能力,而TIGIT的下调则主要负责维持CAR-T细胞低分化/耗竭状态,对其安全性评估后开展一项复发或难治性大B细胞淋巴瘤成人患者的临床实验以验证该设计的临床疗效(NCT04836507)^[112]。最新发现PTP1B(Protein Tyrosine Phosphatase 1B, 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B)是一种新的免疫检查点分子,其在T细胞中高表达抑制T细胞扩增与细胞毒性从而促进肿瘤发展,当敲除PTP1B后STAT5信号增加,从而增强了CD8⁺T细胞的抗原依赖性增殖与毒性并抑制肿瘤细胞生存活性。采用PTP1B抑制剂同样再现了T细胞介导的肿瘤生长抑制,同时影响PD-1阻断治疗。CAR-T细胞敲除该基因后对抗实体瘤(肝癌,乳腺癌)的疗效均得到提升^[113]。(4)小分子抗癌药物与CAR-T疗法联合应用。将CAR-T细胞作为药物递送载体。采用CAR-T细胞递送无活性的前体抗癌药物AMS于肿瘤细胞周围,经改造后的CAR-T细胞称之为合成酶武装杀伤细胞(Synthetic Enzyme-Armed

Kill ER cells, SEAKER),兼备CAR-T细胞的靶向能力与小分子抗癌药物双重效果,SEAKER中的CAR-T细胞扮演着“即时药物生产”角色^[114]。采用CAR-T细胞递送一种RN7SL1的内源性RNA和外来抗原。RN7SL1模拟了病毒RNA,当CAR-T细胞到达肿瘤细胞周围时释放RN7SL1,可被先天免疫细胞NK和DC等细胞识别,活化刺激机体自身T细胞参与肿瘤免疫反应,同时CAR-T细胞递送的外来抗原被锚定于肿瘤细胞,进一步增加机体T细胞寻找逃避CAR-T细胞监视的肿瘤细胞,CAR-T细胞与机体自身T细胞可协同清除肿瘤细胞,尤其实体瘤细胞^[115]。(5)CAR-T细胞治疗领域的拓展。采用CAR-T细胞疗法治疗心肌纤维化相关疾病,在治疗过程中虽然心肌纤维化得到了改善,但由于该CAR-T细胞可在体内存活数月甚至数年,持续攻击全身范围的成纤维细胞,从而导致伤口难以愈合,因此导致CAR-T细胞治疗弊大于利。借鉴mRNA疫苗治疗理念,研究者设计了一款更可控、程序更简单的CAR-T细胞治疗技术,即mRNA递送。该mRNA编码靶向成纤维细胞表面的FAP,同时将mRNA与附着靶向T细胞表面CD5分子的脂质纳米颗粒融合。注射该mRNA后,其成功在体内编码CAR-T细胞,但是不同于慢病毒递送CAR基因,该“CAR-T细胞”中mRNA未整合到T细胞基因组,因此这些CAR-T细胞攻击心肌纤维细胞后仅仅数天便消失,在改善心衰的同时也规避了对其他纤维阻滞的攻击^[116-117]。

总之,CAR-T细胞治疗及基于CAR-T细胞治疗的新型技术均具有非常大的应用前景,通过不断地优化调整设计方案,最终将适用于广泛的疾病治疗,为更多患者带来希望,提升人类生活质量。

参考文献:

- [1] 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 U S A*, 1989, 86(24):10024-10028.
- [2] KUWANA Y, ASAKURA Y, UTSUNOMIYA N, et al. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 149(3):960-968.
- [3] KERSHAW M, WESTWOOD J, PARKER L, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(20 Pt1): 6106-6115.
- [4] BRENTJENS R, RIVIÈRE I, PARK J, et al. Safety and

- persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias[J]. *Blood*, 2011, 118(8):4817-4828.
- [5] KALOS M, LEVINE B L, PORTER D, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(95):73-95.
- [6] GUEDAN S, POSEY A, SHAW C, et al. Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation[J]. *JCI insight*, 2018, 3(1):e96976.
- [7] GUEDAN S, MADAR A, CASADO-MEDRANO V, et al. Single residue in CD28-costimulated CAR-T cells limits long-term persistence and antitumor durability[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(6):3087-3097.
- [8] SADELAİN M, BRENTJENS R, RIVIÈRE I. The basic principles of chimeric antigen receptor design[J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(4):388-398.
- [9] ROSELLI E, BOUCHER J, LI G, et al. 4-1BB and optimized CD28 co-stimulation enhances function of human mono-specific and bi-specific third-generation CAR T cells[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(10):e003354.
- [10] CAPPELL K, KOCHENDERFER J. A comparison of chimeric antigen receptors containing CD28 versus 4-1BB costimulatory domains[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2021, 18:715-727.
- [11] WANG Y, ZHONG K, KE J, et al. Combined 4-1BB and ICOS co-stimulation improves anti-tumor efficacy and persistence of dual anti-CD19/CD20 chimeric antigen receptor T cells [J]. *Cytotherapy*, 2021, 23:715-723.
- [12] ALIZADEH D, WONG R, YANG X, et al. IL15 enhances CAR-T Cell antitumor activity by reducing mTORC1 activity and preserving their stem cell memory phenotype[J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(5):759-772.
- [13] ALVAREZ-FERNÁNDEZ C, ESCRIBÀ-GARCIA L, CABALLERO A, et al. Memory stem T cells modified with a redesigned CD30-chimeric antigen receptor show an enhanced antitumor effect in Hodgkin lymphoma[J]. *Clin Transl Immun*, 2021, 10:e1268.
- [14] HURTON L, SINGH H, NAJJAR A, et al. Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(48):E7788-E7797.
- [15] ASPURIA P, VIVONA S, BAUER M, et al. An orthogonal IL-2 and IL-2R β system drives persistence and activation of CAR T cells and clearance of bulky lymphoma[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13:eabg7565.
- [16] AGLIARDI G, LIUZZI A, HOTBLACK A, et al. Intratumoral IL-12 delivery empowers CAR-T cell immunotherapy in a pre-clinical model of glioblastoma[J]. *Nat Commun*, 2021, 12:444.
- [17] KOSAKA H, YOSHIMOTO T, YOSHIMOTO T, et al. Interferon-gamma is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation[J]. *Nat Med*, 2008, 14:437-441.
- [18] RAUÉ H, BEADLING C, HAUN J, et al. Cytokine-mediated programmed proliferation of virus-specific CD8(+) memory T cells[J]. *Immunity*, 2013, 38:131-139.
- [19] PANG N, SHI J, QIN L, et al. IL-7 and CCL19-secreting CAR-T cell therapy for tumors with positive glypican-3 or mesothelin[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1):118.
- [20] NO AUTHORS LISTED. FDA approves second CAR t-cell therapy[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(1):5-6.
- [21] MUNSHI N, ANDERSON L, SHAH N, et al. Idecabtagene vicleucel in relapsed and refractory multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(8):705-716.
- [22] NEELAPU S, LOCKE F, BARTLETT N, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26):2531-2544.
- [23] QIN J, JOHNSTONE T, BATUREVYCH A, et al. Antitumor potency of an anti-CD19 chimeric antigen receptor T-Cell therapy, lisocabtagene maraleucel in combination with ibrutinib or acalabrutinib[J]. *J Immunother*, 2020, 43(4):107-120.
- [24] SHERIDAN C. First approval in sight for Novartis' CAR-T therapy after panel vote[J]. *Nat Biotechnol* 2017, 35:691-693.
- [25] WANG M, MUNOZ J, GOY A, et al. KTE-X19 CAR T-cell therapy in relapsed or refractory Mantle-cell lymphoma[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382:1331-1342.
- [26] FOWLER N, DICKINSON M, DREYLING M, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory follicular lymphoma: the phase 2 ELARA trial[J]. *Nat Med*, 2022, 28:325-332.
- [27] LOCKE F, MIKLOS D, JACOBSON C, et al. Axicabtagene ciloleucel as second-line therapy for large B-cell lymphoma [J]. *New Engl J Med*, 2022, 386(7):640-654.
- [28] BERDEJA J, MADDURI D, USMANI S, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study[J]. *Lancet*, 2021, 398:314-324.
- [29] MELENHORST J, CHEN G, WANG M, et al. Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4 CAR T cells [J]. *Nature*, 2022, 602:503-509.
- [30] VORA P, VENUGOPAL C, SALIM S, et al. The rational development of CD133-targeting immunotherapies for glioblastoma[J]. *Cell stem cell*, 2020, 26(6):832-844.
- [31] CHEN H, YANG Y, DENG Y, et al. Delivery of CD47 blocker SIRP α -Fc by CAR-T cells enhances antitumor efficacy[J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(2):e003737.
- [32] CUI Q, QIAN C, XU N, et al. CD38-directed CAR-T cell

- therapy: a novel immunotherapy strategy for relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1):82.
- [33] JETANI H, NAVARRO-BAILÓN A, MAUCHER M, et al. Siglec-6 is a novel target for CAR T-cell therapy in acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2021, 138(19):1830-1842.
- [34] JOHN S, CHEN H, DENG M, et al. A novel Anti-LILRB4 CAR-T cell for the treatment of monocytic AML[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(10):2487-2495.
- [35] HOU A, CHEN L, CHEN Y. Navigating CAR-T cells through the solid-tumour microenvironment[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(7):531-550.
- [36] HO L, ROBBINS H, LEVINE A. Assessing workforce needs for the emerging CAR-T cell therapy industry[J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(2):275-278.
- [37] LUO H, SU J, SUN R, et al. Coexpression of IL7 and CCL21 increases efficacy of CAR-T cells in solid tumors without requiring preconditioned lymphodepletion[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(20):5494-5505.
- [38] CARUSO H, HURTON L, NAJJAR A, et al. Tuning sensitivity of CAR to EGFR density limits recognition of normal tissue while maintaining potent antitumor activity[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(17):3505-3518.
- [39] SROUR S, SINGH H, MCCARTY J, et al. Long-term outcomes of Sleeping Beauty-generated CD19-specific CAR T-cell therapy for relapsed-refractory B-cell lymphomas[J]. *Blood*, 2020, 135(11):862-865.
- [40] MAGNANI C, GAIPA G, LUSSANA F, et al. Sleeping beauty-engineered CAR T cells achieve antileukemic activity without severe toxicities[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(11):6021-6033.
- [41] ROTIROTI M, BURACCHI C, ARCANGELI S, et al. Targeting CD33 in chemoresistant AML patient-derived xenografts by CAR-CIK cells modified with an improved SB transposon system[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(9):1974-1986.
- [42] QUERQUES I, MADES A, ZULIANI C, et al. A highly soluble Sleeping Beauty transposase improves control of gene insertion[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(12):1502-1512.
- [43] IVICS Z. Potent CAR-T cells engineered with Sleeping Beauty transposon vectors display a central memory phenotype[J]. *Gene Ther*, 2021, 28(1-2):3-5.
- [44] HEBBAR N, EPPERLY R, VAIDYA A, et al. CAR T cells redirected to cell surface GRP78 display robust anti-acute myeloid leukemia activity and do not target hematopoietic progenitor cells[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):587.
- [45] WONG D, ROY N, ZHANG K, et al. A BAFF ligand-based CAR-T cell targeting three receptors and multiple B cell cancers[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):217.
- [46] HEGDE M, MUKHERJEE M, GRADA Z, et al. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13R α 2 mitigate tumor antigen escape[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126:3036-3052.
- [47] KARSCHNIA P, JORDAN J, FORST D, et al. Clinical presentation, management, and biomarkers of neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CAR T cells[J]. *Blood*, 2019, 133(20):2212-2221.
- [48] CARTER P. Potent antibody therapeutics by design[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(5):343-357.
- [49] GORO VITS B, KOREN E. Immunogenicity of Chimeric antigen receptor T-Cell therapeutics[J]. *BioDrugs*, 2019, 33:275-284.
- [50] GUEDAN S, CALDERON H, POSEY A, et al. Engineering and design of chimeric antigen receptors[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 12:145-156.
- [51] SUN W, XIE J, LIN H, et al. A combined strategy improves the solubility of aggregation-prone single-chain variable fragment antibodies[J]. *Protein Expr Purif*, 2012, 83(1):21-29.
- [52] WU T, JI Y, MOSEMAN E, et al. The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness[J]. *Sci Immunol*, 2016, 1(6):eaai8593.
- [53] DELGOFFE G, XU C, MACKALL C, et al. The role of exhaustion in CAR T cell therapy[J]. *Cancer cell*, 2021, 39(7):885-888.
- [54] PALEY M, KROY D, ODORIZZI P, et al. Progenitor and terminal subsets of CD8⁺ T cells cooperate to contain chronic viral infection[J]. *Science*, 2012, 338(6111):1220-1225.
- [55] PHILIP M, SCHIETINGER A. Heterogeneity and fate choice: T cell exhaustion in cancer and chronic infections[J]. *Curr Opin Immunol*, 2019, 58:98-103.
- [56] VERDON D, MULAZZANI M, JENKINS M. Cellular and molecular mechanisms of CD8 T cell differentiation, dysfunction and exhaustion[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19):7357.
- [57] YATES K, TONNERRE P, MARTIN G, et al. Epigenetic scars of CD8 T cell exhaustion persist after cure of chronic infection in humans[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(8):1020-1029.
- [58] URAK R, WALTER M, LIM L, et al. Ex vivo Akt inhibition promotes the generation of potent CD19CAR T cells for adoptive immunotherapy[J]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5:26.
- [59] FRAIETTA J, LACEY S, ORLANDO E, et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia [J]. *Nat Med*, 2018, 24:563-571.
- [60] VAN BRUGGEN J, MARTENS A, FRAIETTA J, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells impair mitochondrial fitness in CD8 T cells and impede CAR T-cell efficacy[J]. *Blood*, 2019, 134:44-58.
- [61] NOBLES C, SHERRILL-MIX S, EVERETT J, et al. CD19-

- targeting CAR T cell immunotherapy outcomes correlate with genomic modification by vector integration[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130:673-685.
- [62] HEITZENEDER S, BOSSE K, ZHU Z, et al. GPC2-CAR T cells tuned for low antigen density mediate potent activity against neuroblastoma without toxicity[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(1):53-69.
- [63] NARAYAN V, BARBER-ROTENBERG J, JUNG I, et al. PSMA-targeting TGF β -insensitive armored CAR T cells in metastatic castration-resistant prostate cancer: a phase 1 trial [J/OL]. [2022-03-25]. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01726-1>.
- [64] THE LANCET ONCOLOGY. CAR T-cell therapy for solid tumours[J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22:893.
- [65] HONG M, CLUBB J, CHEN Y. Engineering CAR-T cells for next-generation cancer therapy[J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(4):473-488.
- [66] ZHAO J, LIN Q, SONG Y, et al. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells[J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1):132.
- [67] NO AUTHERS LISTED. CRISPR Meets CAR T-cell Therapy [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(5):OF6.
- [68] PANOWSKI S H, SRINIVASAN S, TAN N, et al. Preclinical development and evaluation of allogeneic CAR T Cells targeting CD70 for the treatment of renal cell carcinoma [J/OL]. [2022-03-25]. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-2931>.
- [69] QASIM W, ZHAN H, SAMARASINGHE S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(374):eaaj2013.
- [70] 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, 543:113-117.
- [71] STENGER D, STIEF T, KAEUFERLE T, et al. Endogenous TCR promotes in vivo persistence of CD19-CAR-T cells compared to a CRISPR/Cas9-mediated TCR knockout CAR [J]. *Blood*, 2020, 136(12):1407-1418.
- [72] UPADHYAY R, BOIARSKY J, PANTSULAIA G, et al. A critical role for Fas-mediated off-target tumor killing in T-cell immunotherapy[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11:599-613.
- [73] GURUSAMY D, HENNING A, YAMAMOTO T, et al. Multi-phenotype CRISPR-Cas9 screen identifies p38 kinase as a target for adoptive immunotherapies[J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(6):818-833.
- [74] LIU E, MARIN D, BANERJEE P, et al. Use of CAR-Transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382:545-553.
- [75] YU S, YI M, QIN S, et al. Next generation chimeric antigen receptor T cells: safety strategies to overcome toxicity[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):125.
- [76] BRANDT L, BARNKOB M, MICHAELS Y, et al. Emerging approaches for regulation and control of CAR T Cells: a mini review[J]. *Front Immun*, 2020, 11:326.
- [77] AMATYA C, PEGUES M, LAM N, et al. Development of CAR T Cells expressing a suicide gene plus a chimeric antigen receptor targeting signaling lymphocytic-activation molecule F7[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(2):702-717.
- [78] BAILEY S, VATSA S, LARSON R, et al. Blockade or deletion of IFN γ reduces macrophage activation without compromising CAR T-cell function in hematologic malignancies [J]. *Blood Cancer Discov*, 2022, 3:136-153.
- [79] GALY A S D, MENEGATTI S, FUENTEALBA J, et al. In vivo genome-wide CRISPR screens identify SOCS1 as intrinsic checkpoint of CD4 T1 cell response[J]. *Sci Immunol*, 2021, 6:eabe8219.
- [80] PRINZING B, ZEBLEY C, PETERSEN C, et al. Deleting DNMT3A in CAR T cells prevents exhaustion and enhances antitumor activity[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13:eabh0272.
- [81] CHEN J, LOPEZ-MOYADO IF, SEO H, et al. NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours [J]. *Nature*, 2019, 567(7749):530-534.
- [82] FRAIETTA J A, NOBLES C L, SAMMONS M A, et al. Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells[J]. *Nature*, 2018, 558:307-312.
- [83] GOOD C R, AZNAR M A, KURAMITSU S, et al. An NK-like CAR T cell transition in CAR T cell dysfunction[J]. *Cell*, 2021, 184:6081-6100.
- [84] KUMAR J, KUMAR R, KUMAR SINGH A, et al. Deletion of Cbl-b inhibits CD8(+) T-cell exhaustion and promotes CAR T-cell function[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(1):e001688.
- [85] LYNN R C, WEBER E W, SOTILLO E, et al. c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance[J]. *Nature*, 2019, 576:293-300.
- [86] SEO H, CHEN J, GONZÁLEZ-AVALOS E, et al. TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8 T cell exhaustion[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(25):12410-12415.
- [87] SEO H, GONZALEZ-AVALOS E, ZHANG W, et al. BATF and IRF4 cooperate to counter exhaustion in tumor-infiltrating CAR T cells[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22:983-995.
- [88] LIU Y, ZHOU N, ZHOU L, et al. IL-2 regulates tumor-reactive CD8 T cell exhaustion by activating the aryl hydrocarbon receptor[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22:358-369.
- [89] XU Y, ZHANG M, RAMOS C, et al. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR. CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15[J].

- Blood, 2014, 123:3750-3759.
- [90] ADUSUMILLI P, ZAUDERER M, RIVIÈRE I, et al. A phase I trial of regional mesothelin-targeted CAR T-cell therapy in patients with malignant pleural disease, in combination with the anti-PD-1 agent pembrolizumab[J]. Cancer Discov, 2021, 11:2748-2763.
- [91] GRECO B, MALACARNE V, DE GIRARDI F, et al. Disrupting N-glycan expression on tumor cells boosts chimeric antigen receptor T cell efficacy against solid malignancies[J]. Sci Transl Med, 2022, 14:eabg3072.
- [92] ZEBLEY C, BROWN C, MI T, et al. CD19-CAR T cells undergo exhaustion DNA methylation programming in patients with acute lymphoblastic leukemia[J]. Cell Rep, 2021, 37:110079.
- [93] LO A, WANG L, SCHOLLER J, et al. Tumor-promoting desmoplasia is disrupted by depleting FAP-expressing stromal cells[J]. Cancer Res, 2015, 75:2800-2810.
- [94] KUHN N, PURDON T, VAN LEEUWEN D, et al. CD40 ligand-modified chimeric antigen receptor T cells enhance antitumor function by eliciting an endogenous antitumor response[J]. Cancer Cell, 2019, 35:473-488.
- [95] HOLOHAN D, LEE J, BLUESTONE J. Shifting the evolving CAR T Cell platform into higher gear[J]. Cancer Cell, 2015, 28:401-402.
- [96] YARMARKOVICH M, MARSHALL Q, WARRINGTON J, et al. Cross-HLA targeting of intracellular oncoproteins with peptide-centric CARs[J]. Nature, 2021, 599:477-484.
- [97] SALTER A I, RAJAN A, KENNEDY J, et al. Comparative analysis of TCR and CAR signaling informs CAR designs with superior antigen sensitivity and in vivo function[J]. Sci Signal, 2021, 14:eabe2606.
- [98] KONG W, DIMITRI A, WANG W, et al. BET bromodomain protein inhibition reverses chimeric antigen receptor extinction and reinvigorates exhausted T cells in chronic lymphocytic leukemia[J]. J Clin Invest, 2021, 131(16):e145459.
- [99] HALIM L, DAS K, LARCOMBE-YOUNG D, et al. Engineering of an avidity-optimized CD19-Specific parallel chimeric antigen receptor that delivers dual CD28 and 4-1BB co-stimulation[J]. Front Immunol, 2022, 13:836549.
- [100] ZHAO L, WU Q, WANG X, et al. Reversal of abnormal CD4+ T cell metabolism alleviates thyroiditis by deactivating the mTOR/HIF1 α /Glycolysis pathway[J]. Front Endocrinol, 2021, 12:659738.
- [101] ZHENG W, O'HEAR C, ALLI R, et al. PI3K orchestration of the in vivo persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells[J]. Leukemia, 2018, 32:1157-1167.
- [102] SUKUMAR M, LIU J, JI Y, et al. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function[J]. J Clin Invest, 2013, 123(10):4479-4488.
- [103] VODNALA S, EIL R, KISHTON R, et al. T cell stemness and dysfunction in tumors are triggered by a common mechanism[J]. Science, 2019, 363(6434):eaau0135.
- [104] GEIGER R, RIECKMANN J, WOLF T, et al. L-arginine modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity[J]. Cell, 2016, 167(3):829-842.
- [105] SUAREZ E, CHANG DK, SUN J, et al. Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model[J]. Oncotarget, 2016, 7:34341-34355.
- [106] MARCHESI F, VIGNALI D, MANINI B, et al. Manipulation of glucose availability to boost cancer immunotherapies[J]. Cancers, 2020, 12(10):2940.
- [107] HUANG Q, XIA J, WANG L, et al. miR-153 suppresses IDO1 expression and enhances CAR T cell immunotherapy[J]. J Hematol Oncol, 2018, 11:58.
- [108] TANG N, CHENG C, ZHANG X, et al. TGF- β inhibition via CRISPR promotes the long-term efficacy of CAR T cells against solid tumors[J]. JCI Insight, 2020, 5(4):e133977.
- [109] BAEUERLE P, DING J, PATEL E, et al. Synthetic TRuC receptors engaging the complete T cell receptor for potent anti-tumor response[J]. Nat Commun, 2019, 10(1):2087.
- [110] HARRIS D, KRANZ D. Adoptive T cell therapies: a Comparison of T cell receptors and chimeric antigen receptors [J]. Trends Pharmacol Sci, 2016, 37(3):220-230.
- [111] PULSIPHER M, HAN X, MAUDE S, et al. Next-generation sequencing of minimal residual disease for predicting relapse after tisagenlecleucel in children and young adults with acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood Cancer Discov, 2022, 3:66-81.
- [112] LEE Y, LEE H, KIM H, et al. PD-1 and TIGIT downregulation distinctly affect the effector and early memory phenotypes of CD19-targeting CAR T cells[J]. Mol Ther, 2022, 30:579-592.
- [113] WIEDE F, LU K, DU X, et al. PTP1B is an intracellular checkpoint that limits T-cell and CAR T-cell antitumor immunity[J]. Cancer discovery, 2022, 12:752-773.
- [114] GARDNER T, LEE J, BOURNE C, et al. Engineering CAR-T cells to activate small-molecule drugs in situ[J]. Nat Chem Biol, 2022, 18:216-225.
- [115] JOHNSON L, LEE D, EACRET J, et al. The immunostimulatory RNA RN7SL1 enables CAR-T cells to enhance autonomous and endogenous immune function[J]. Cell, 2021, 184(19):4981-4995.
- [116] RURIK J, TOMBÁČZ I, YADEGARI A, et al. CAR T cells produced in vivo to treat cardiac injury[J]. Science, 2022, 375(6576):91-96.
- [117] VILLANUEVA M. Repairing cardiac injury with transient CAR-T cells[J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21(3):179.