

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-074

合成生物学助力突破免疫治疗局限性

王子恒^{1,2}, 刘子怡², 马毓谦^{1,2}, 秦鸿雁², 赵俊龙², 张向前¹

(¹延安大学生命科学学院, 陕西 延安 716099; ²中国人民解放军空军军医大学基础医学院医学遗传与发育生物学教研室, 陕西 西安 710032)

摘要: 免疫治疗近年来在肿瘤、感染性疾病和自身免疫疾病等领域取得了突破性进展, 但其临床应用仍面临信号识别特异性不足、免疫反应调控不精准及毒副作用显著等挑战。合成生物学作为一门新兴的工程化学科, 通过模块化设计和基因回路编程, 为免疫治疗的精准化改造提供了创新解决方案。本文系统综述了合成生物学在免疫治疗中的关键技术、应用案例及未来方向, 旨在为免疫治疗的工程化设计提供理论依据和技术参考。在信号输入环节, 工程化受体 (如Syn-Notch、RASSL) 通过逻辑门控设计 (如“与”门) 增强靶向性, 减少脱靶效应; 在信号处理环节, 人工基因回路 (如CHOMP、SPOC) 将病理信号转化为治疗性输出, 实现选择性杀伤或动态调控; 在信号输出环节, 反馈系统和振荡回路 (如负反馈抑制T细胞过度活化) 优化免疫反应强度与时长, 提升安全性。此外, 合成生物技术已成功应用于CAR-T、CAR-NK等细胞疗法, 通过受体改造、回路重编程等手段, 显著提高疗效并降低毒性。未来, 随着基因编辑、动态调控等技术的进一步发展, 合成生物学驱动的免疫治疗将推动精准医学的实现, 为复杂疾病的治疗提供更高效、更安全的策略。

关键词: 免疫治疗; 合成生物学; 基因回路; 癌症免疫治疗; 工程化受体; 动态调控

中图分类号: Q816 文献标志码: A

Synthetic biology empowers breakthroughs in addressing immunotherapy limitations

WANG Ziheng^{1,2}, LIU Ziyi², MA Yuqian^{1,2}, QIN Hongyan², ZHAO Junlong², ZHANG Xiangqian¹

(¹School of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716099, Shaanxi, China; ²Department of Medical Genetics and Developmental Biology, School of Basic Medical Sciences, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

Abstract: Immunotherapy has transformed modern medicine by powerfully mobilizing the body's immune system to combat malignancies, infectious diseases, and autoimmune disorders. Despite remarkable clinical successes, current immunotherapeutic approaches face substantial limitations, including inadequate target specificity, dysregulated immune activation, and severe systemic toxicities. These challenges stem from the inherent complexity of biological

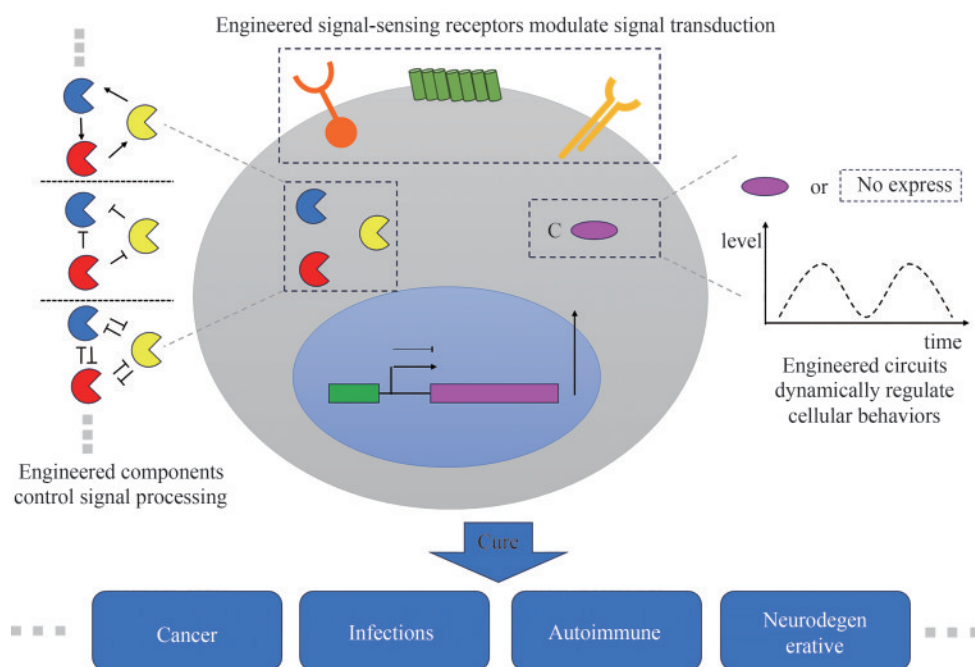
收稿日期: 2025-07-21 修回日期: 2025-10-28

基金项目: 国家自然科学基金 (82373270); 陕西省自然科学基金 (2024SF-ZDCYL-03-28)

引用本文: 王子恒, 刘子怡, 马毓谦, 秦鸿雁, 赵俊龙, 张向前. 合成生物学助力突破免疫治疗局限性[J]. 合成生物学, 2025, 6(6): 1311-1331

Citation: WANG Ziheng, LIU Ziyi, MA Yuqian, QIN Hongyan, ZHAO Junlong, ZHANG Xiangqian. Synthetic biology empowers breakthroughs in addressing immunotherapy limitations[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(6): 1311-1331

systems and the pleiotropic nature of immune responses. Synthetic biology emerges as a transformative paradigm to address these limitations through rational engineering of immune cells and circuits. This discipline applies engineering principles to biological systems, enabling the design of sophisticated genetic circuits that confer precise spatiotemporal control over immune functions. This review comprehensively examines current synthetic biology strategies in immunotherapy, highlighting their mechanistic basis, clinical applications, and future directions for advancing precision medicine. Key innovations include: (1) engineered receptor systems (*e.g.*, Syn-Notch, RASSL) that implement Boolean logic operations for enhanced target discrimination; (2) synthetic signaling cascades (*e.g.*, CHOMP, SPOC) that convert pathological signals into therapeutic outputs; and (3) feedback-regulated circuits that dynamically modulate immune effector functions. These technologies have been successfully implemented in chimeric antigen receptor (CAR)-based therapies, where they improve tumor specificity while mitigating cytokine release syndrome and other adverse effects. Notably, synthetic biology facilitates the development of “smart” immunotherapies capable of environmental sensing, decision-making, and self-regulation. For instance, conditionally activated CAR-T cells demonstrate improved safety profiles through drug-inducible control systems, while synthetic cytokine circuits enable precise immune modulation. Furthermore, the integration of computational modeling with high-throughput screening accelerates the optimization of these engineered systems. Looking forward, synthetic biology promises to bridge critical gaps in conventional immunotherapy by enabling: (1) personalized therapeutic regimens through patient-specific circuit design; (2) multi-input diagnostic capabilities for complex disease microenvironments; and (3) robust safety mechanisms to prevent off-target effects. As the field advances, the convergence of genome editing, biomaterials science, and artificial intelligence will unlock even greater therapeutic potential for engineered immune cells.



Keywords: immunotherapy; synthetic biology; genetic circuits; cancer immunotherapy; engineered receptors; dynamic regulation

免疫治疗在近些年来备受瞩目，尤其是其在抗肿瘤方面的成就，开辟了肿瘤治疗的新途径，

在2013年被《科学》杂志评选为“年度突破”^[1]。事实上，免疫治疗并非一个新的概念，早在1796

年爱德华·詹纳 (Edward Jenner) 成功研制出天花疫苗开始, 人类便开始利用免疫系统作为治疗疾病的手段^[2], 甚至其在癌症治疗方面也并非是近些年来才开创的, 1891年威廉·科利利用灭活的化脓性链球菌和黏质沙雷氏菌制成的“科利毒素”来治疗肉瘤, 其基本原理是通过灭活的细菌提取物刺激免疫系统的天然反应来对抗肉瘤, 尽管科利对其疗效无法透彻解释, 但这种超越当时时代的利用免疫系统治疗癌症的策略也让他被称为“癌症免疫疗法之父”^[3]。随着人们对免疫系统认识的不断加深, 免疫治疗也在不断进步, 诞生了非特异性免疫疗法、单克隆抗体技术、过继细胞疗法、细胞疫苗等免疫疗法^[4], 通过直接杀伤病原体或靶细胞、激活或抑制特有的免疫反应来达到治疗的目的, 在临床上已有了有目共睹的突破性成就。但是, 免疫治疗仍处在发展阶段, 其在临床上仍有着不足和缺陷, 包括引起多器官毒性 (如肝炎、肺炎、白癜风等)、神经系统毒性 (如失语症、脑水肿等)、自身免疫病、细胞因子释放综合征在内的多种毒副作用^[5-8]。疾病的发展是一个自然的过程, 虽然免疫治疗是利用免疫系统内的功能元件, 包括免疫相关分子、免疫细胞等, 来影响、改变、阻止疾病的进一步发展, 进而达到治疗的目的, 但是免疫系统涉及的分子与环路广泛且复杂, 在免疫系统发挥功能时各个功能元件的上下游元件都是多样的, 甚至所产生的效应是相反的, 在疾病进展中仅利用或影响天然的免疫功能元件所带来的结果很可能是效应不足引起治疗效果差或效应过强引起新的疾病症状。而如何最大程度地利用免疫功能元件的免疫效应, 同时最大程度地减小这些免疫功能元件发挥功能时的副作用, 则是免疫治疗的发展方向, 合成生物学恰能够满足免疫治疗发展的需求。

合成生物学是一门创造、控制和编程细胞行为的工程学科^[9], 通过将生物体内可编辑的DNA、RNA、蛋白质等生物功能性分子标准化、模块化, 自下而上地组合形成新的系统, 并能通过其各个元件、模块的特性进行功能上的预测^[10-15], 改造甚至创造新的生物系统, 小到改造细胞内的信号通路^[16-17], 大到改造优化细胞^[18]、类器官和组织的设计构建^[19], 甚至理论上对生态系统的改造都能

够进行^[20]。免疫治疗的原理是基于免疫系统工作的原理, 从工程学角度解读可将免疫治疗的过程简单地看作输入、处理和输出三个过程构成的回路^[21], 而免疫治疗过程这一回路在作用过程中展现出的不足, 便可以利用工程学手段改写回路的运行逻辑, 如通过“与”“或”“非”门的逻辑, 增加回路的可控性, 以解决免疫治疗回路中的问题, 扩展其优势, 这便是合成生物学在免疫治疗中的应用方向。本文通过查阅文献, 综合讨论如今免疫治疗方法面临的缺陷, 了解当今合成生物学的原理与现有技术手段, 结合最新合成生物学在免疫治疗领域的突破, 探讨合成生物学在免疫治疗领域甚至其他治疗领域、疾病预防领域的未来发展。

1 免疫治疗方法的局限性

现有的免疫治疗方法均有各自的局限性, 以癌症的免疫治疗为例, 无论是细胞因子治疗、免疫检查点抑制剂疗法还是近些年来火热的嵌合抗原受体T (CAR-T) 细胞疗法都有其特有的毒性。高剂量的IL-2可作用于T细胞和自然杀伤 (NK) 细胞产生多种效应, 导致毛细血管渗漏和脓毒症样综合征, 严重情况下甚至会导致多器官衰竭^[22]; 免疫检查点抑制剂, 包括针对CTLA-4、PD-1及其配体PD-L1的抗体, 会导致多器官特异性炎症副作用和免疫相关不良事件 (irAE)^[23]; CAR-T细胞疗法中最常见的毒性是细胞因子释放综合征 (CRS) 和免疫效应细胞相关神经毒性综合征 (ICANS)^[24]。免疫治疗毒性的产生机制仍处于研究阶段, 但配体与其受体识别的特异性不足产生脱靶效应是造成毒性的重要原因之一, 无论是细胞因子还是免疫检查点抑制剂, 其作用的靶分子往往不只是特异地分布在某一种细胞上的。例如IL-2可作用于T细胞引起T细胞的增殖, 同时也可以作用于中性粒细胞, 高剂量的IL-2治疗会引起中性粒细胞获得性趋化缺陷, 造成患者感染率增加, 甚至引发败血症^[25-26]; 免疫检查点被视为免疫反应的“刹车”系统, 在正常情况下介导机体的免疫抑制与免疫耐受。同时在疾病进展中也发挥作用, 例如, 癌症中癌细胞具有激活不同免

疫检查点通路的能力,引起免疫抑制,促进肿瘤生长^[27-28]。因此,免疫检查点抑制剂在阻断疾病进程中免疫抑制时,也会非特异性地作用于正常细胞,造成免疫治疗过程中的自身免疫病样症状的免疫相关不良事件^[6];在CAR-T细胞疗法中,抗原的设计是至关重要的,如果抗原设计特异性不强,加之CAR-T细胞的大多数靶标在正常组织上都有共同的表达,就会导致工程化的T细胞抗原识别的特异性不足,造成脱靶毒性,引起多器官毒性、血细胞谱系耗竭等毒副作用^[29-31]。

在免疫治疗过程中,免疫系统与其作用的微环境之间复杂的作用机制引发信号处理通路的改变,造成了耐药性,是免疫治疗仍待解决的问题之一。以癌症为例,肿瘤微环境(TME)与肿瘤的发展密切相关,其中不仅包含肿瘤细胞,还包含免疫细胞、成纤维细胞、血管系统、细胞外基质等复杂成分,对肿瘤的发展的调控是双向的,其之间平衡的打破造成了肿瘤的消退或进行^[32],而其中的一些成分、机制,便是造成免疫治疗正向消除肿瘤失效,形成肿瘤耐药性的原因。在免疫检查点抑制剂治疗的过程中,肿瘤细胞基因突变造成细胞表面抗原呈递分子MHC I缺陷^[33]、抗肿瘤细胞因子IFN- γ 生成通路缺陷^[34]等均会引起肿瘤获得性耐药;CAR-T细胞疗法中,肿瘤细胞表面抗原的丢失和调整会使设计的T细胞对肿瘤细胞无从下手,引起肿瘤的复发和耐药^[35]。

免疫治疗除了配体受体结合特异性不足造成的脱靶毒性、复杂的作用机制引起的耐药性外,还具有治疗中尤其是免疫细胞治疗前期免疫细胞体外调控改造周期长、体内持续时间过短等造成的高成本这一缺陷,增加了患者的经济负担。以CAR-T细胞疗法为例,自体CAR-T细胞经从患者体内提取T细胞并经体外调控改造后再回输患者的生产周期大约为两周,且价格昂贵^[36-37]。为减弱由于患者之间个体差异造成的个体化CAR-T细胞治疗成本高、周期长的缺陷,通用CAR-T(UCAR-T)细胞疗法的概念被提出^[38],尽管UCAR-T细胞的T细胞来源为健康的捐赠者,使得CAR-T细胞的制备得以批量化,从而降低了成本,但是由于忽视了个体差异,UCAR-T细胞的半衰期和疗效却下降了^[39]。并且,无论是CAR-T细胞还是UCAR-T细胞都没有脱离将T细胞从体内分离-改造-再输入

这一工序,导致了时间成本难以降低,对CAR细胞免疫疗法的工程逻辑仍需改进。

如上所述,仅利用免疫系统天然的免疫作用进行免疫治疗,在治疗过程中会遇到配体受体结合靶向性差、免疫系统信号处理通路复杂多变、免疫细胞难以调控等困难,促使人们开始思考如何解决免疫治疗的不足之处。合成生物学利用生命系统的组成部分来创造生物分子并建立具有新型功能生物系统,为推进免疫治疗的精准调控提供了一个有前景的途径。

2 常用合成生物学改造技术

合成生物学作为一门交叉学科,集合了生物学、物理学、化学、材料科学、信息学、计算机科学等多种学科,以重新设计或从头设计构建生物系统为技术手段,通过为“学习而构建”设计生物系统用于研究中,以及为“使用而构建”用于生物技术发展^[40]。合成生物学构建的使用系统已在农业、环境、医疗等多领域带来诸多有效产品,其利用生物学和工程学原理,通过标准化模块化生物元件,设计构建了新的生物模块、生物反应和生物系统,从而生产人们所期望的生物功能产品^[41-42]。由于合成生物学家们将生命系统以工程化思想重新审视,这些具有特定功效的产品往往是复杂且非天然的,即通过多层生物系统环路构建产生出的生物产品,且这样的系统环路通常也是非天然的。这就涉及了对一个系统“输入”“处理”“输出”三个环节的构建、改造,在免疫治疗中,人们通过引入免疫系统这一天然生物系统来干预疾病,即便取得了很大成功,但仍有免疫系统本身局限性和疾病机制复杂性造成的脱靶效应、耐药性、经济性差等缺陷,而合成生物学可合成新型免疫治疗生物产物、提供新的信号识别、传导通路以助力免疫治疗。

2.1 工程化信号识别受体调节信号传导

在天然条件下,细胞发挥一些特定的功能是靠信号调控的,比如免疫细胞的增殖分化、免疫细胞对靶细胞的细胞毒作用等,无论是通过自身

泌、旁分泌还是内分泌的途径，信号分子都是通过细胞膜上或胞内的信号受体来传递信号，再通过信号传递途径，产生各样的基因调控，以完成其相应的功能。信号受体多种多样，基于其结构的不同具有不同的特性，作为“输入”环节的一个元件，被改造后可综合其优点，通过结合天然条件下不可能结合的信号分子，启动特定的信号通路，产生目的效应。

G蛋白偶联受体（GPCR）家族是自然界中最广泛的一组7次跨膜受体蛋白^[43]，其种类繁多且可接受多种配体激活，包括激素、神经递质、离子、光子、气味剂等多种配体的刺激，并激活质膜内表面的异源三聚体（ $\alpha\beta\gamma$ ）G蛋白^[44]。G蛋白根据其 α 亚基的不同分为Gs、Gi、Gq、G12四种，激活的G蛋白的G α 亚基与G $\beta\gamma$ 分离，启动下游磷酸化级联反应，常见的Gs、Gi、Gq三种通路分别刺激cAMP的产生，抑制cAMP的产生和刺激磷脂酶C生成^[45]。GPCR表达广泛，工程化的GPCR能够转移到不同的细胞、组织和物种中并保留其功能，是合成生物学常用的工程化受体。

与Gi偶联的GPCR受体通过抑制腺苷酸环化酶来降低细胞内cAMP水平，其不同细胞中被激活会产生不同的效应，如降低心肌细胞收缩速率和调节大脑中的神经传递^[46]，调节大脑中的神经传递促进细胞增殖^[47]，促进免疫细胞趋化^[48]等，具有控制及模拟细胞功能的潜力。但天然的和Gi偶联的GPCR受体具有多种内源性受体，无法完全控制其激活，Coward等^[49]便基于人的Gi偶联的GPCR受体—— κ 阿片受体进行改造，通过利用 μ 和 δ 阿片受体的部分结构取代 κ 阿片受体细胞外环与天然配体的结合序列，同时不影响其与合成配体或小分子药物的结合位点，设计出仅由合成配体激活的受体（RASSL）系统[图1(a)]，能精确调控Gi下游通路的激活，对研究Gi相关的生理机制，构建Gi相关的疾病模型具有重大意义。

为防止GPCR与配体结合后信号通路的持续激活，G蛋白偶联受体激酶（GRK）和 β 抑制蛋白（ β -arrestin）负责GPCR与G蛋白的解偶联^[50]。当GPCR结合配体并偶联G α 后，GRK将磷酸化GPCR胞内段，磷酸化的GPCR募集 β -arrestin并由 β -arrestin降解由第二信使激活的下游信号，完成GPCR信号通路的去激活^[51-52]。Tango系统[图1

(b)] 便利用GPCR去激活的机制，通过将反式激活因子与GPCR胞内段融合，只要在配体与GPCR结合后，募集由 β -arrestin和蛋白酶组成的嵌合融合蛋白， β -arrestin与磷酸化的GPCR空间上的结合使得蛋白酶切割反式激活因子，使其从GPCR上释放到细胞核内并激活目的基因。这一系统下游的目的基因通常为报告基因，是能够针对任何GPCR与其配体研究的一个检测系统^[53-54]。

Notch受体是一种通过相邻细胞细胞膜上的配体受体结合进行信号传递的受体，在哺乳动物中，Notch受体有四种（1~4）且都是单次跨膜蛋白，对应五种典型配体，产生多种配体-受体组合，造成不同的反应^[55]。配体与Notch结合后会引发在Notch近膜调节域（NRR）中产生构象变化，使Notch近膜调节域展开从而易被ADAM金属蛋白酶和多蛋白 γ 分泌酶复合物连续切割，并从膜上释放Notch的胞内结构域（ICN），使其能够转移到细胞核中，与另外两种因子RBPJ和MAML家族的共激活因子形成Notch转录激活复合物（NTC），NTC再募集其他共激活因子和基础转录机制，开启靶基因表达^[56]。

基于Notch受体结构与构象改变，其调节核心是NRR与包含 γ 分泌酶切割位点TM结构域^[57]，胞外段和胞内段仅起到识别配体与传递信号的作用，可根据目的进行改造替换^[58-59]，基于Notch受体的可改造性，Lim等^[60]设计了Syn-Notch系统[图1(c)]，通过指定的抗体替换Notch受体的胞外段，转录因子交换胞内段，在靶细胞与携带Syn-Notch受体的细胞表面配体受体结合后实现了特定的下游效应子靶基因的激活，不仅为细胞间配体受体功能的研究、靶细胞信号的检测提供定制化的改造服务，更是能灵活运用于构建涉及细胞间接触的细胞治疗方案，如涉及癌细胞的免疫细胞治疗、调控神经元功能、诱导上皮细胞分化进行肌肉损伤修复等。

细胞因子与生长因子受体通常以同源或异源二聚化形式存在于细胞表面，结合游离型的配体，通过受体相关激酶的细胞内反式磷酸化如JAK-STAT或RTK引发信号传导，其二聚体胞外受体结构域与胞内的信号传导结构域决定了受体结合什么配体与传递何种信号^[61-62]。由于受体胞外结构域的特异性，细胞因子与生长因子受体介导的信号传导与功能反应受到限制，往往只能受到单一的

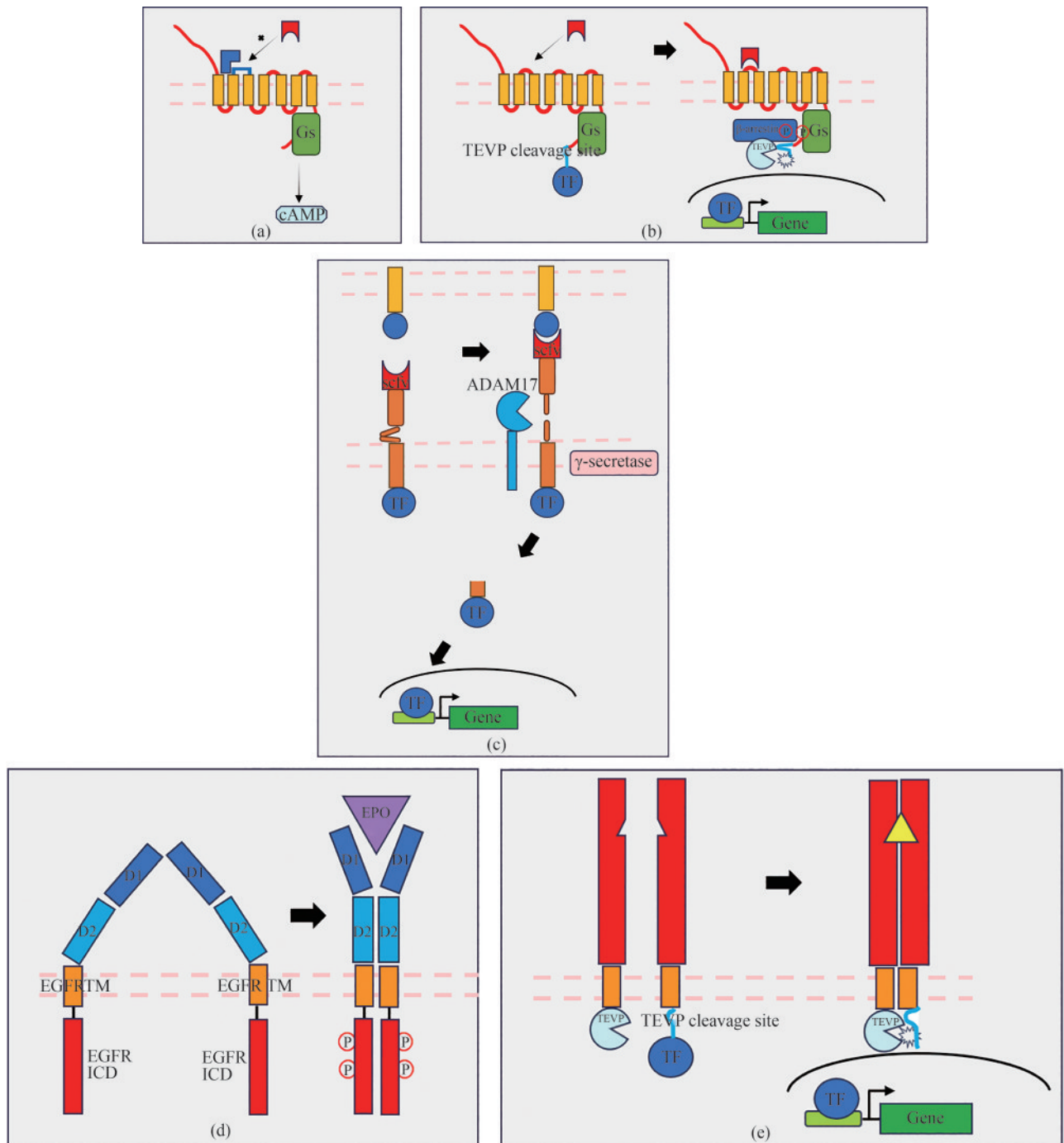


图1 工程化受体原理示意图

(a) “RASSL”系统利用GPCR突变使得仅识别特定信号(蓝色)如小分子药物;(b)“Tango”系统利用 β -arrestin与磷酸化GPCR空间位置的靠近启动蛋白酶切割释放转TF;(c)“Syn-Notch”系统利用Notch受体激活的两次切割(胞外段ADAM17切割,近膜端 γ -secretase切割)实现TF释放;(d)“GEMS”系统利用EPOR受体信号传导特点传递可编辑信号(胞外段及胞内段信号改构);(e)“MESA”系统利用受体二聚化空间位置靠近启动蛋白酶切割释放TF

Fig. 1 Schematic diagram of engineering receptor principle

(a) The RASSL system utilizes GPCR mutations to recognize specific signals (blue) only, such as small molecule drugs; (b) The “Tango” system utilizes the proximity of β -arrestin and phosphorylated GPCR spatial positions to initiate protease cleavage and release of TF; (c) the “Syn-Notch” system utilizes two cleavage processes activated by Notch receptors (extracellular ADAM17 cleavage and proximal γ -secretase cleavage) to achieve TF release; (d) The GEMS system utilizes the signaling characteristics of EPOR receptors to transmit editable signals (extracellular and intracellular signal remodeling); (e) The “MESA” system utilizes receptor dimerization spatial proximity to initiate protease cleavage and release of TF.

内源性信号启动，难以人为调控从而发挥功能。但是，其胞内磷酸化结构域却存在着多种组合形式，其激活依赖于TM结构域带来的构象改变而不是限制于胞外的受体结构，这为工程化改造细胞因子与生长因子受体提供了基础，Garcia等^[63]通过将多种细胞因子与生长因子受体杂交组合为异源二聚化受体，利用对应相应受体的合成配体依然能激活杂交受体，证实了其改造的可行性，同时为受体的基础性研究与受体靶向药物的研发提供了一种研究思路。

促红细胞生成素受体（EPOR）是一种单次跨膜蛋白的受体酪氨酸激酶，由胞外结构域、跨膜（TM）结构域和胞内段构成，其中胞外段由两个独立的结构域D1、D2构成，EPOR在未结合信号的情况下就可以通过胞外段以二聚体形式存在且胞内段不会彼此靠近而激活^[64]，在结合信号后二聚体结构改变，TM结构域将胞外段的构象改变传至胞内段，胞内段彼此靠近进而磷酸化，招募JAK2，激活下游信号通路^[65-66]。基于EPOR的胞外结构域在未激活状态下增加胞内结构域距离的特点，Martin Fussenegger等^[67]构建了广义细胞外分子传感器系统——（generalized extracellular molecule sensor, GEMS）系统 [图1(d)]，通过将多种药物或蛋白的单链抗体（雷帕霉素抗体、尼古丁抗体、SunTag 标签抗体、PSA 单体蛋白抗

体）连接至EPOR胞外结构，将多种二聚化依赖的胞内信号通路胞内段（IL-6RB、FGFR1、VEGFR2）替换EPOR胞内段进行组合，组合对信号的成功响应证实了基于细胞因子与生长因子受体的通用型工程化受体的可行性。

GEMS系统的胞内模块局限于基于反式磷酸化引发的信号传导，使其功能也局限于天然信号传导。而模块化细胞外传感器架构（modular extracellular sensor architecture, MESA）系统是另一种通用的、响应可溶性配体的工程生物传感信号识别系统，该系统利用了二聚化受体激活胞内段空间上相互靠近的特点，将其中一个受体胞内段与蛋白酶融合，另一个与蛋白酶水解其结构后释放的转录因子结构域融合，当配体结合使得两个受体二聚化后，胞内段蛋白酶切割并释放转录因子或Cas9，从而调节基因表达^[68-69] [图1(e)]。相较于GEMS系统，MESA系统中转录因子和Cas9的可选择性使其能更广泛地发挥作用。Schwarz等^[70]通过将两种结合VEGF相同表位的单克隆抗体融合在MESA受体支架胞外段，胞内段携带工程化的IL-2的转录因子，并将其在Jurakt细胞中表达，使得Jurakt细胞成功响应VEGF信号并分泌IL-2，为响应肿瘤微环境中高表达的可溶性分子（如VEGF）产生治疗效应（如T细胞生长因子IL-2）的细胞治疗提供了可塑性更强的设计方案（表1）。

表1 经典工程化受体优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of classical engineered receptors

| 工程化受体 | 优点 | 缺点 |
|------------------------------|--|--|
| RASSL ^[44,71] | 1. GPCR种类繁多且可接受多种配体激活 2. 改造GPCR结合配体特异性高 | 1. 依赖于突变 2. 受限于GPCR的配体种类 3. 局限于GPCR自身激活的通路 |
| Tango ^[53] | 1. GPCR种类繁多且可接受多种配体激活 2. 下游基因激活可编辑 | 受限于GPCR的配体种类 |
| Syn-Notch ^[60,72] | 1. 受体与配体结合特异性高 2. 配体可选择范围广 3. 可实现广泛性的目的基因表达 | 仅用于与细胞之间的配受体结合 |
| GEMS ^[54] | 1. 配体可选择范围广 2. 配体可选择为游离性配体 3. 天然信号通路，信号传导成功率高 4. 同源二聚体，工作效率与改造成功率高 5. 自激活概率低 | 信号传导局限于可选择的天然信号通路 |
| MESA ^[68-69] | 1. 配体可选择范围广 2. 配体可选择为游离性配体 3. 能够选择性表达目的产物 | 1. 异二聚体工作效率低 2. 多种质粒转染，细胞负担大 3. 有概率自激活 |

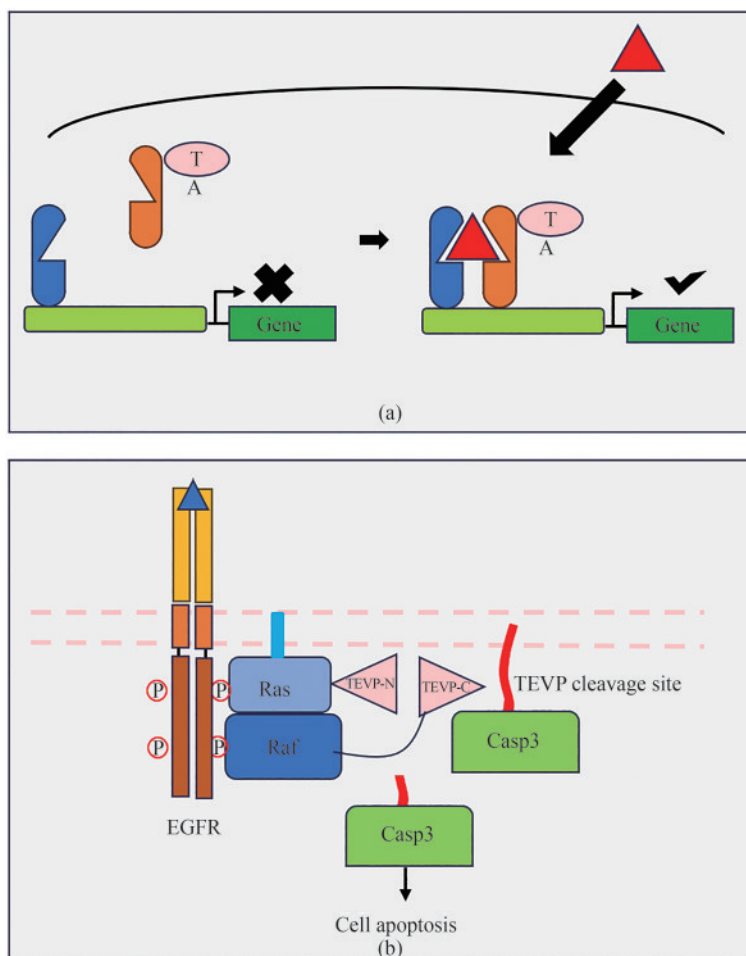
2.2 工程化元件调控信号处理

当信号分子被受体接收后，信号得以输入细胞，并随后在细胞内通过生物大分子之间相互调节，实现信号的放大、缩小、抑制、转换等不同的处理结果。胞内针对信号的处理过程其本质上是细胞内蛋白质、蛋白质与核酸、核酸水平上生物大分子间的相互作用，这样的相互作用内部依赖结合、竞争、剪切、催化等生物大分子天然功能形成环路，环路之间也可基于共有分子实现串联或并联，实现多种类的信号传达。合成生物学家们基于生物分子的结构功能，改造胞内信号传导元件，让胞内选择性地传递特定的信号处理结果。

转录因子（TF）作为DNA结合蛋白调节转录活性，是信号在蛋白质-核酸水平环路上传递的重要元件，转录因子、激活因子和阻遏因子的天然结构与调节基因表达的方向性使其能够自由组合

创建出新的转录环路^[73]，产生信号的放大、条件性的基因功能响应、目的性的基因产物的表达结果^[74-77]，对基础性研究、生物产品生产、细胞治疗等领域具有重要意义。除了利用转录因子天然的底层逻辑进行环路构建，通过其本身的改造能够添加新的运行逻辑，使得原有环路的调节更受控。例如，Bertschi等人设计的基于转录因子二聚化的调节电路[图2(a)]，利用细菌转录因子的螺旋-旋转-螺旋（HTH）结构域本身具有的DNA结合特性，构建HTH-二聚化蛋白单体、二聚化蛋白单体-TF的合成转录因子，HTH-二聚化蛋白单体结合在目的基因TF的DNA结合序列附近，只有在二聚化后TF才会结合DNA启动下游基因表达，而合成转录因子又受胞内特定浓度的内源性或外源性信号调控其二聚化结合，通过这样的分层多级调节实现了可控性的对目的基因的开关^[78]。

天然的蛋白质水平环路具有种类多、作用快、可偶联环路多等特点，相较于更为广泛的基于更



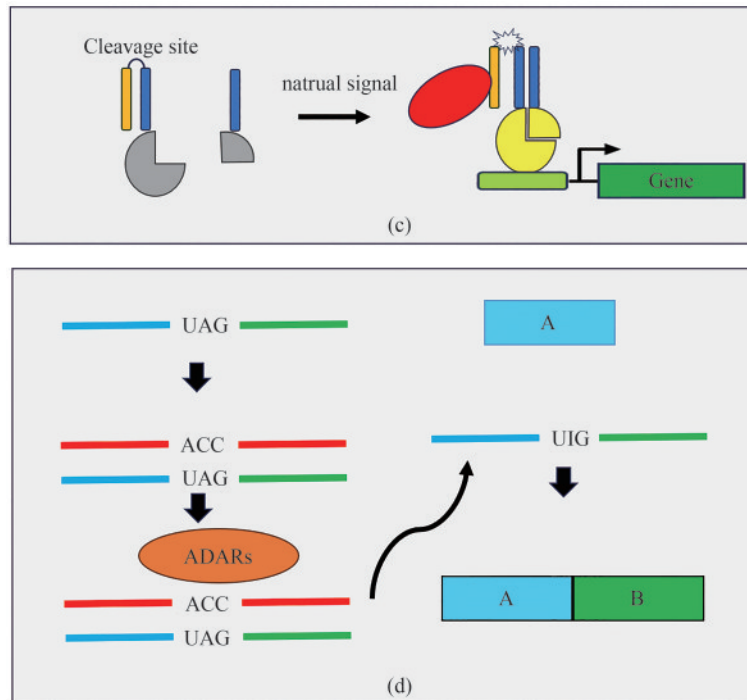


图2 工程化元件原理示意图

(a) HTH 转录因子依赖信号（红色）二聚化后，成为带有转录激活因子（TA）的完整转录因子，启动下游基因表达；(b) CHOMP 系统利用 Ras 信号通路激活后 Ras 与 Raf 的结合，实现蛋白酶 TEV 组装切割 caspase3，引起细胞凋亡；(c) SPOC 逻辑利用内源信号激活胞内蛋白酶（红色）切割无用卷曲螺旋（橙黄色）与效应卷曲螺旋（蓝色）之间的酶切位点，携带效应子卷曲螺旋（蓝色）相互结合引起效应子激活（黄色），启动下游基因转录；(d) DART VADAR 系统利用工程化 RNA 链（红色）靶向目的 RNA（蓝色，绿色），错配段引发 ADAR 修复终止密码子，转录得以继续

Fig. 2 Schematic diagram of engineering components principle

(a) After dimerization of the “HTH” transcription factor dependent signal (red), it becomes a complete transcription factor with transcription activator (TA), initiating downstream gene expression; (b) The “CHOMP” system uses the Ras signaling pathway to activate the binding of Ras and Raf, achieving the assembly and cleavage of caspase 3 by protease TEV, causing cell apoptosis; (c) The “SPOC” logic utilizes endogenous signals to activate intracellular proteases (red) to cleave enzyme cleavage sites between useless coiled coils (orange yellow) and effector coiled coils (blue), carrying effector coiled coils (blue) to bind with each other, causing effector activation (yellow) and initiating downstream gene transcription; (d) The “DART VADAR” system uses engineered RNA strands (red) to target the target RNA (blue, green), and mismatches trigger ADARs to repair stop codons, allowing transcription to continue.

易改造调配的基因调控水平的合成生物学改造，蛋白水平上的合成环路更易发挥天然环路的优势。碍于天然蛋白质环路有限的偶联组合，研究人员基于烟草蚀刻病毒蛋白酶（TEVP）对同源性短肽位点的特异性识别^[79-81]，将 TEVP 与其切割位点分别融入目的蛋白，设计了基于蛋白水解作用广泛的胞内可编程蛋白环路，命名为 CHOMP (circuits of hacked orthogonal modular proteases) 系统^[82] [图 2(b)]。基于此系统，他们将 TEVP 的 N 端与在多种癌症中活性上调的 Ras 蛋白融合^[83-84]，TEVP 的 C 端与 Raf 蛋白 Ras 结合域（RBD）融合，细胞膜内表达具有 TEVP 切割位点的连接在细胞膜内侧的工程化 Casp3，利用 Ras 信号通路激活后

Ras 与 Raf 蛋白结合的特性，条件性激活 TEVP，切割工程化 Casp3，引起 Casp3 活化，使胞内传递凋亡信号，选择性地杀伤 Ras 激活升高的细胞，为癌症的细胞治疗提供了新的改造方案。SPOC 逻辑 (split protease-cleavable orthogonal CC-based logic) 也是一种基于蛋白水解的工程化细胞处理系统 [图 2(c)]，该系统将两段通过蛋白作用互相结合的卷曲螺旋利用蛋白酶切割位点短肽相连，其中一段与未二聚化的无作用工程化效应子如工程化转录因子或可分泌分子结合，环路上游工程化蛋白酶受细胞天然信号激活后，切割酶切位点，未与效应子相连的卷曲螺旋断裂，此时连接有另一半效应子的结合性更强的卷曲螺旋竞争结合实现

效应子的二聚化，效应子活性得以恢复，进而发挥下游效应。与CHOMP系统不同，SPOC逻辑利用蛋白水解直接激活效应子而不涉及多级调节，因此反应时长更短，且工程化蛋白酶的激活信号与效应子的可选择性使得该系统通用性更强，在需要细胞快速反应的治疗领域（如可利用特异的病毒蛋白酶对效应子的激活快速感应和反应相应病原体，葡萄糖信号刺激工程化胰岛素分泌治疗糖尿病）发挥作用^[85]。

RNA作为单链核酸，既有作为模板指导蛋白合成的遗传功能，又有通过碱基互补配对原则结合其他单链核酸的结合与调节功能，可作为改造环路中的结合工具与翻译模板。Gayet等^[86]设计的DART VADAR（detection and amplification of RNA triggers via ADAR）系统基于作用于RNA的腺苷脱氨酶（ADAR），利用合成RNA靶向目的RNA后，通过合成RNA提前设计好的碱基序列，利用碱基互补配对原则和ADAR的修复功能，使得目的RNA终止密码子改变，下游编码蛋白得以过载表达[图2(d)]。

2.3 工程化环路动态调控细胞行为

细胞除了信号接受，信号传递到结果输出的单向调控外，还存在基于多种环路共同构成的复杂生物调控网络动态调控而产生的细胞行为，如细胞记忆、细胞周期性行为和细胞耐受^[87]。但是，调控网络的规模与机制的复杂性使得对其的完全复刻难度极高，而找寻调控网络运行的特征与底层逻辑进行工程化动态调控环路的构建能够更简易地实现对细胞的调控^[88]，为探寻天然细胞调控网络机制，构建针对疾病的合成环路网络提供逻辑与架构基础。

细胞记忆使细胞能够将瞬时信号转化为持续的反应，其典型特征是双稳态性，即根据外界或内部触发信号，细胞会稳定在两种截然不同的状态之一：持续激活态或抑制态。信号触发关键分子或环路的激活或抑制，使其作为开关决定后续调控网络的激活或抑制，实现细胞状态的转变。基于细胞记忆的底层逻辑，合成生物学家们利用基因编辑、蛋白质磷酸化和转录后修饰等多种分

子机制构建分子开关，在细胞内编码并维持、转变记忆状态^[89-90]。例如Padirac等^[91]通过两种相互抑制的寡核苷酸与共享模板的相互作用构建了双稳态系统：寡核苷酸（X）与模板（XX'）结合后生成两种寡核苷酸（X，X'）[图3(a)]。在该系统中，核苷酸A和B的产物A'与B'通过相互抑制对方的扩增，实现了自我正反馈调节与相互负反馈调节，从而构建出能响应外界信号并编码记忆的强大拨动开关。

周期性行为是细胞的一种基本行为，典型代表是细胞周期中细胞经历不同状态后回归初始阶段的过程。合成生物学家据此设计出模拟自然节律过程的振荡回路。遗传振荡器的概念最早由Goodwin提出^[92]，其通过基因负反馈自我调控表达，形成自持振荡循环。基于此，Zhou等^[93]构建了延缓染色质沉默与血红素缺失诱导细胞衰老的振荡系统[图3(b)]。在酵母细胞中，Sir2通过引起染色质DNA沉默延长细胞寿命，HAP则参与血红素合成延缓细胞衰老，但二者相互抑制。通过将Sir2基因插入HAP结合后的启动子区，同时使HAP基因位于Sir2沉默位点下游，构建出“HAP促进Sir2产生→Sir2抑制HAP产生”的整体负反馈循环，有效延长了酵母细胞寿命，实现了对细胞周期的精准干预，为延长真核细胞寿命（尤其是治疗性的工程化改造细胞）以应对治疗周期长的疾病提供一种改造思路。

除周期性行为外，细胞耐受性（即在环境扰动中维持稳态的能力）也是细胞动态调控能力的关键组成。这种适应性通过环路的自我调整以抵消干扰^[94]。合成生物学利用负反馈系统增强细胞对环境信号的耐受性。例如LOCKR（latching orthogonal cage/key protein）系统通过工程化蛋白质相互作用调控细胞响应[图3(c)]：其笼状蛋白Cage与带有E3泛素连接酶结构域的插销latch通过分子内相互作用结合；当关键蛋白KEY存在时，其以更强相互作用竞争性结合Cage，使插销暴露并被泛素化，导致Cage与插销降解。干扰信号刺激Cage表达时，附着于Cage的转录因子可调控下游基因表达；此时通过添加KEY或通过耐受信号调控KEY的表达，即可通过Cage降解实现细胞状态的稳定化^[95-96]。细胞耐受系统的构建为工程化细

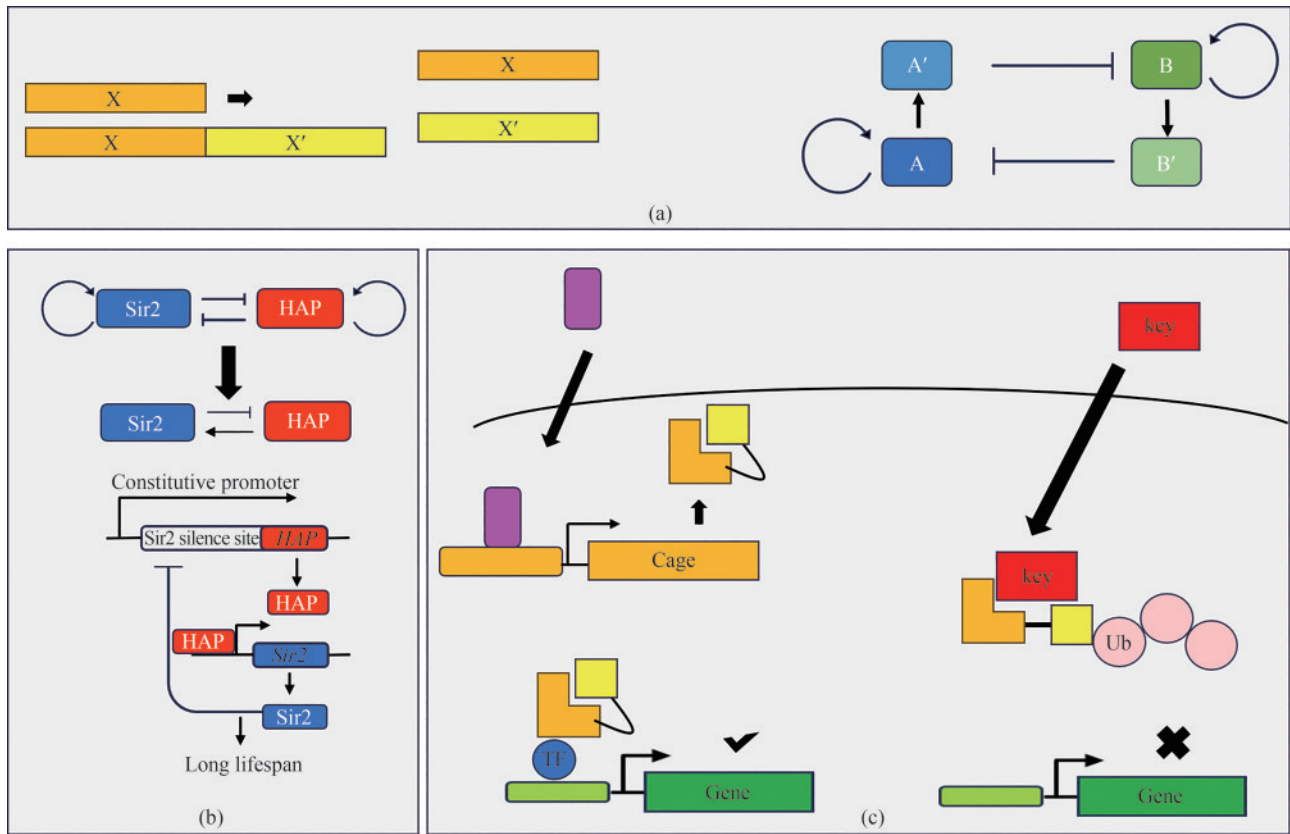


图3 工程化环路原理示意图

(a) 双稳态系统中 A、B 两种核酸产物各自自激活与互相抑制，实现 A、B 两种状态的转变；(b) 酵母中两种互相抑制的基因通过在其启动子与沉默位点下游改造实现整体负反馈调节，使得各自基因产物分开表达，实现细胞周期持续延长；(c) LOCKR 系统利用 KEY 竞争性结合 Cage，使得 Cage 降解实现对 Cage 基因产物的控制，达到对调控 Cage 的信号（紫色）的耐受

Fig. 3 Schematic diagram of engineering loop principle

(a) In a bistable system, the two nucleic acid products A and B self-activate and mutually inhibit each other, achieving the transition between the two states of A and B; (b) Two mutually inhibitory genes in yeast achieve overall negative feedback regulation by downstream modification of their promoters and silencing sites, allowing their respective gene products to be expressed separately and achieving sustained cell cycle elongation; (c) The “LOCKR” system utilizes KEY competitive binding with Cage to control the degradation of Cage gene products, achieving tolerance to the signal (purple) that regulates Cage.

胞应对复杂工作环境（如疾病环境）、维持工作能力提供了理论支持。

3 合成生物学在免疫治疗中的突破

合成生物学能够创造非自然的生物大分子，这样的生物大分子可以是合成的信号分子、合成受体，也可以是转录因子、核酸等，通过连接细胞传导通路、改变传导路径等干预细胞信号传导的方式建立新的输入、处理、输出关系；或通过逻辑回路的引入实现对细胞活动放大、缩小、开关、转换、延时、加速等多维度干预，影响系统

最终的输出结果。在以免疫系统功能为核心的免疫治疗过程中，治疗因素的引入使得免疫系统与疾病因素相互作用，免疫细胞和靶细胞通过接收外部的输入信号，产生相应的生化反应，最终输出对应的生命结果。但是，由于生命系统的复杂性，免疫治疗的引入往往也会得到非理想的输入、处理、输出关系，造成毒性升高、疗效降低等副作用，而能干预输入、处理、输出环节的合成生物学的引入带来了更精细的回路调控，增强其疗效并减弱其负面影响。

针对免疫治疗的信号传导环节，合成生物学在受体系统的配体、受体层面都有相应的工程化改造。合成信号分子是免疫治疗中使用的药物之

一, 细胞因子作为免疫细胞接收的信号之一, 是最早由美国食品和药品监督管理局 (FDA) 批准的肿瘤免疫治疗药物^[97], 其具有能迅速启动免疫反应、参与免疫反应类型广等优势, 但由于其半衰期短、单一类型的细胞因子治疗窗口窄、易发生脱靶效应等局限性, 具有天然结构的细胞因子并不是免疫治疗的理想药物, 因此针对细胞因子的工程化改造便着重于解决其局限性。通过基因突变、融合有机分子、融合抗体等手段获得的工程化细胞因子能够获得更长的半衰期、更广的治疗窗、更高的特异性等优点。Vazquez-Lombardi 等^[98] 利用人 IL2 与小鼠 IgG_{2c} 的 Fc 区连接所得的融合 IL2 使得其肾脏清除率和 FcRn 循环下降, 从而增加了血清半衰期, De Luca 及其同事^[99] 使用 IL2、靶向肿瘤对纤连蛋白的单克隆抗体 F8、TNF 构建了双功能的双细胞因子融合蛋白 IL2-F8-TNF^{mut}, 实现了 IL2、TNF 双细胞因子针对肿瘤的靶向治疗。

尽管工程化的信号分子相较于天然分子已有了显著优势, 但由于免疫系统功能的承担者是免疫细胞, 而免疫细胞所处环境的复杂性、受体的多样性、通路间的联系性使得单凭输入信号分子进行免疫系统的激活或抑制仍不能彻底摆脱脱靶效应等局限性, 相较于利用信号分子靶向并激活其受体, 利用受体接收特定信号而产生下游生化反应更能实现精准化调控的目的。工程化受体改造在免疫治疗领域已颇为常见, 其中最负盛名的便是 CAR-T 细胞治疗, 利用 T 细胞表面的受体引导 T 细胞行为, 不仅在癌症治疗中有显著疗效, 其在传染病防治方面也有突破^[100]。最早的 CAR-T 细胞疗法是利用患者的肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 中提取 T 细胞经体外培养再回输, 以达到治疗肿瘤的效果^[101]。这其实是利用肿瘤微环境培养的具有天然治疗环路的 T 细胞来靶向杀伤肿瘤。科学家们受此思路影响, 优化早期嵌合抗原受体仅依赖于肿瘤抗原特异性抗体的 Fc 段与 TCR 及 T 细胞表面相关受体所带来的靶向性低、激活强度高局限性的, 例如靶向 CD19 谱系标志物的 CAR-T 细胞可以治疗 B 细胞恶性肿瘤, 但由于正常 B 细胞也表达 CD19, 因此也具有了 B 细胞毒性^[102], 通过受体工程化改造开发了多样的更复杂的工程化 CAR 来满足细胞特异性识别、细胞迁移性等治疗需求。

Morsut 与 Roybal 等^[60] 利用 Syn-Notch 系统开发了利用“与”门逻辑实现的双信号刺激才激活的 CAR-T 细胞 [图 4(a)], 当工程化的肿瘤细胞表面表达 GFP 时, 仅识别位于细胞表面 GFP 的 α -GFP Syn-Notch 受体与其结合并激活被切割, 释放 Gal4VP64, 驱动 T 细胞表达 α -CD19 4-1BB ζ CAR, CAR 则结合肿瘤表面抗原 CD19, 进而激活 T 细胞功能, 成功构建了只响应双抗原的 CAR-T 细胞, 控制了 CAR-T 细胞的细胞毒性。相较于单独的 CAR 易靶向和肿瘤有着同样抗原的正常组织, 工程化受体作为“与”门的加入给 CAR 的表达增加了前置条件, 两种肿瘤抗原的依次识别大大增加了 CAR-T 细胞治疗的特异性。并且在肿瘤杀伤过程中, T 细胞需要与肿瘤细胞形成免疫接触, Syn-Notch 这一专门针对细胞与细胞之间的信号激活的工程化受体的效率相较于 Tango 与 MESA 这样依赖游离信号分子激活的系统更高。Park 等^[103] 利用 RASSL 的工程化 GPCR 受体 [图 4(b)], 这种受体仅由特定的合成药物激活, 内源性物质无法结合其胞外结构域, 实现了 T 细胞针对生物惰性药物样小分子氯氮平-N-氧化物 (CNO) 的靶向迁移, 通过在肿瘤病灶内注射小分子药物来为 CAR-T 细胞在实体瘤中的迁移性提供基础。通过 CAR 受体实现 T 细胞的特定时空条件的功能活化以达到免疫治疗目的的逻辑也被应用到其他免疫细胞上 [图 4(c)], 其中自然杀伤 (NK) 细胞和巨噬细胞成为人们关注的焦点^[104], 而不同免疫细胞本身的特性使得 CAR-免疫细胞疗法具有各自的独特优势 (表 2)。

NK 细胞本身具有非 MHC 限制性, 肿瘤浸润性强, 且具有细胞溶解活性, 可以杀死不表达靶抗原的癌细胞^[115], 作为一种细胞毒性免疫细胞, CAR-NK 细胞建立的目的与 CAR-T 细胞类似, Chu 等^[116] 利用多发性骨髓瘤细胞表面蛋白 CS1 的抗体构建特异性结合该蛋白的 CAR 受体, 其原理与构建针对肿瘤抗原的 CAR-T 细胞如出一辙, 能够在体外更有效地识别和杀死 NK 耐药的患者来源的原发性多发性骨髓瘤细胞, 并在荷瘤小鼠模型中显著地抑制了肿瘤生长和延长了小鼠的生存期。巨噬细胞是一种既具有吞噬性又具有抗原呈递功能的固有免疫细胞, 且可分为促炎的 M1 型和抑炎的 M2 型巨噬细胞, 在肿瘤微环境中分别起到抗癌和

表2 不同CAR免疫细胞的比较

Table 2 Comparison of different CAR immune cells

| CAR 免疫细胞 | 优点 | 缺点 |
|----------|---|---|
| CAR-T | <ol style="list-style-type: none"> 1. 肿瘤杀伤力强: T细胞具有多种肿瘤杀伤手段,能够分泌穿孔素、颗粒酶引发肿瘤细胞死亡,通过死亡受体途径(Fas/FasL)引发肿瘤细胞凋亡,通过大量细胞因子分泌增强自身,抑制及杀伤肿瘤^[105] 2. 持久性强: T细胞一旦激活,能够大规模扩增,并在体内形成长期免疫记忆,提供持续的监视和杀伤效果^[106] 3. 杀伤效率高: T细胞杀伤肿瘤后并不会发生凋亡,可立即脱离寻找下一个肿瘤细胞^[107] 4. 技术相对成熟: 是第一个成功商业化的细胞疗法,拥有大量的临床数据、生产工艺和经验^[108] | <ol style="list-style-type: none"> 1. 毒副作用强: T细胞激活后细胞因子释放能力强,易造成细胞因子释放综合征^[105] 2. 治疗实体瘤效果差: 肿瘤免疫微环境使得T细胞迁移进入肿瘤的信号不足,难以浸润实体瘤^[109] 3. 自体来源为主: 目前多为自体疗法,导致制备成本高、时间长^[109] 4. 可能脱靶: 靶抗原在正常组织上也有低水平表达,会导致T细胞攻击正常细胞^[105] |
| CAR-NK | <ol style="list-style-type: none"> 1. 毒性低: NK细胞通过不同的机制杀伤靶细胞,不会引起严重的细胞因子释放^[110] 2. 通用性高: 不同于T细胞这类适应性免疫细胞,NK细胞作为固有免疫细胞可以从健康供体的外周血、脐带血或NK细胞系扩增而来,有望成为通用型产品,成本更低^[111] 3. 对实体瘤潜力更大: 具有更好的肿瘤组织浸润能力,且在肿瘤微环境中仍能保持一定的活性^[110-111] | <ol style="list-style-type: none"> 1. 持久作用短: NK细胞在体内的存活时间较短,无法形成长期的免疫记忆^[111] 2. 增殖能力有限: 在体内的增殖能力不如T细胞^[112] 3. 技术尚不成熟: 实验数据与临床数据远少于CAR-T^[110,112] |
| CAR-M | <ol style="list-style-type: none"> 1. 实体瘤浸润能力强: 巨噬细胞天生具有浸润到实体瘤深部的能力^[113] 2. 具有重塑肿瘤微环境的能力: 活化的CAR-M不仅能直接杀伤肿瘤,还能分泌细胞因子(如IFN-γ)将抑制性的M2型巨噬细胞转化为杀伤性的“M1型”,并招募其他的免疫细胞(如T细胞)到肿瘤部位^[113] 3. 吞噬作用: 能够通过强大的吞噬作用直接吞噬肿瘤细胞^[113-114] 4. 通用性强: 作为固有免疫细胞,可在体外大量扩增改造^[114] | <ol style="list-style-type: none"> 1. 存在促瘤风险: 巨噬细胞如果功能失调,反而可能被肿瘤微环境刺激成为M2型巨噬细胞,加剧肿瘤进展^[114] 2. 肿瘤杀伤效率低: 巨噬细胞随着吞噬肿瘤细胞数量增多,自身会发生凋亡,无法做到T细胞的持续杀伤^[114] 3. 体内增殖能力差: 相较于T细胞,体内活化后的巨噬细胞增殖能力差^[114] |

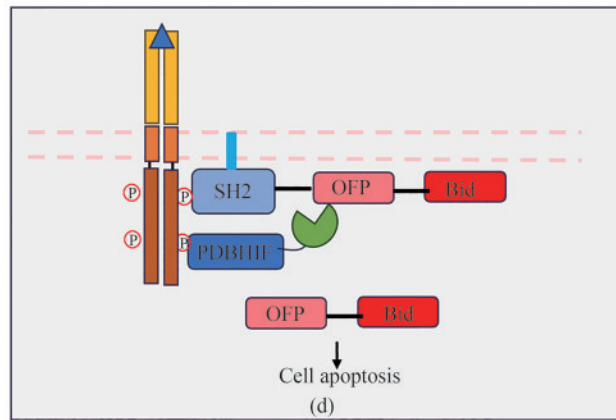
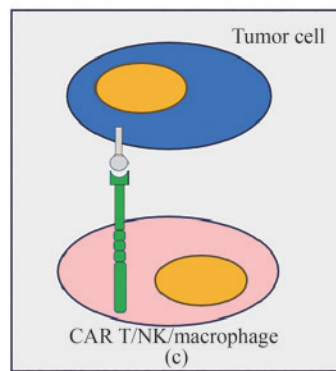
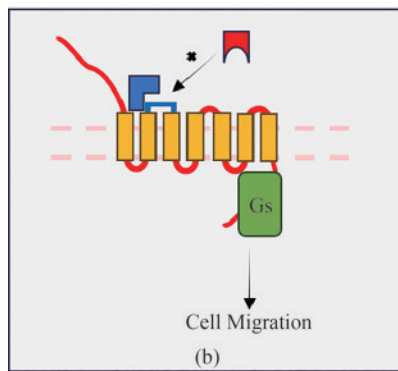
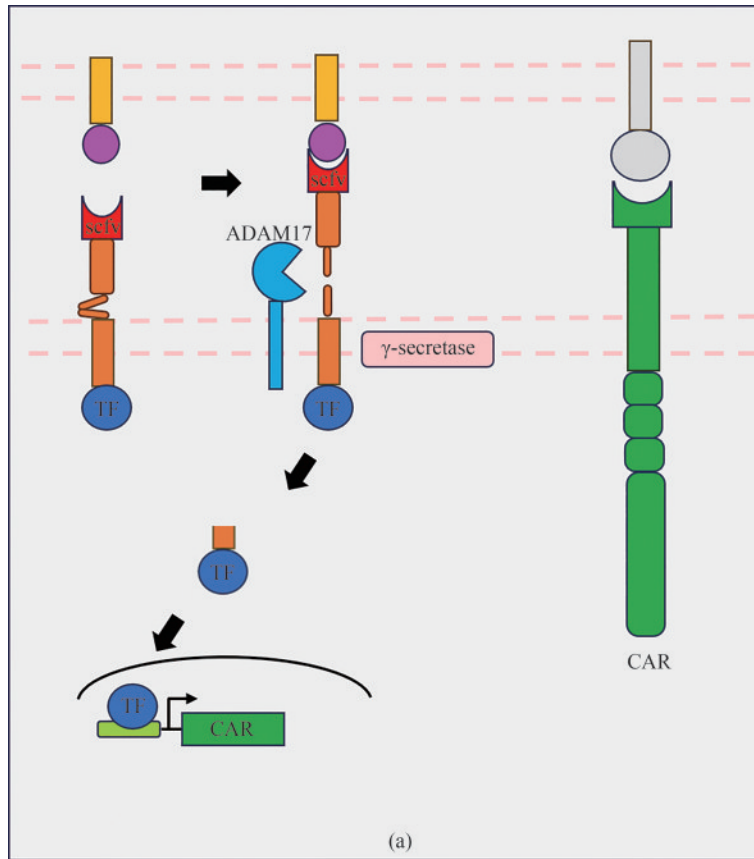
注: 不同CAR免疫细胞虽然都是通过CAR受体激活并发挥功能,但是免疫细胞自身的特点决定了不同免疫CAR细胞的治疗特点。

促癌的作用^[117], Chung等利用腺病毒载体将表达抗乳腺癌抗原HER2的CAR受体基因转入巨噬细胞,且由于巨噬细胞本身对腺病毒感染产生的促炎表型极化的特征,这样的CAR-M细胞本身是M1型极化的,并具有向T细胞呈递抗原、在肿瘤微环境中保持M1表型且促进M2表型巨噬细胞向M1表型极化的特点,使得荷瘤小鼠模型中肿瘤负荷显著降低,小鼠生存期显著延长^[118]。

与针对信号传导环节的工程化改造的逻辑不同,工程化元件调控细胞信号处理是通过天然信号激活人工的胞内信号环路来产生非天然的胞内行为。例如上文提到过的响应Ras信号启动细胞自噬的CHOMP系统^[82],通过Ras激活后转而切割激活Caspase3来启动细胞凋亡通路,是一种针对Ras信号升高的肿瘤细胞的治疗方法。同样逻辑的还有Chung等^[118]设计的RASER系统[图4(d)],通过致癌ErbB受体被激活后胞内段的两个磷酸化位点,一个通过磷酸化结合载有Bid的SH2结构域的

工程化蛋白,另一个通过磷酸化募集具有HCV NS3蛋白酶结构域的融合蛋白切割Bid,实现Bid的释放,从而启动内源性的细胞凋亡进而杀伤相应ErbB信号的肿瘤细胞。通过胞内人工的处理环路实现对信号的转化,进而输出人们想要的结果,在免疫系统内是一个较为理想化的构思,让免疫细胞在接收来自免疫环境复杂的信号后输出不一样的细胞产物,改变原有的细胞命运,譬如让肿瘤浸润的促肿瘤免疫细胞转而产生杀伤肿瘤的细胞因子、自身免疫细胞在慢性炎症疾病中产生抑炎物质等,但仍需更多的成果支持。

通过逻辑门控、反馈系统、振荡回路等设计思路,合成生物学家们实现了对细胞行为的动态调控,而这样的设计应用到免疫细胞中,可以更精确地控制免疫细胞在接收免疫信号后产生的免疫反应,使得免疫反应的程度更适中,达到更精细化的免疫治疗效果,尤其是在CAR-T细胞疗法中,通过对T细胞内部信号回路加以改造或引进新



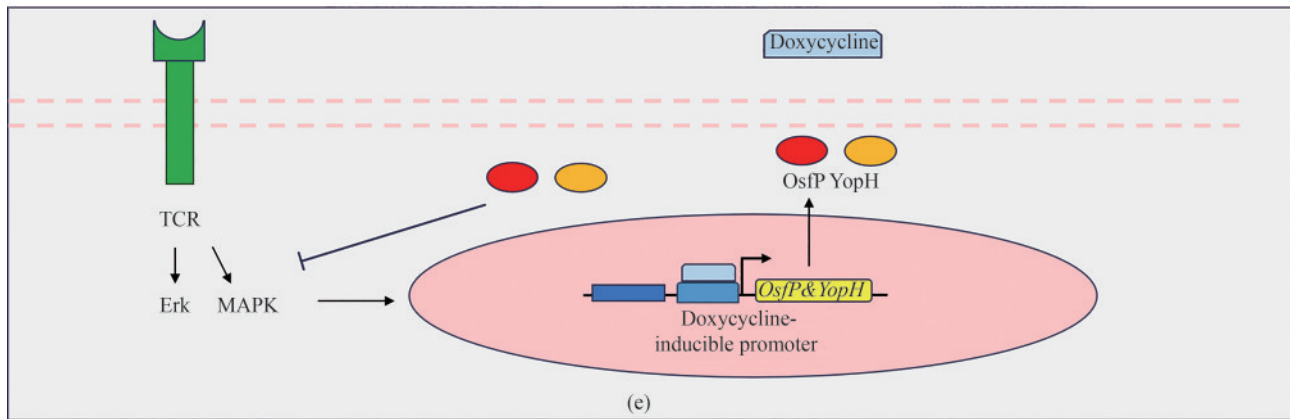


图4 合成生物学免疫治疗应用

(a) Syn-Notch系统与CAR联合运用, 肿瘤抗原一(红色)激活Syn-Notch促进CAR的表达, 结合肿瘤抗原二(灰色), 实现T细胞被肿瘤双抗原激活; (b) RASSL系统实现特定药物(蓝色)激活的细胞迁移信号; (c) CAR T/NK/macrophage示意图; (d) RASER系统示意图; (e) OspF和YopH负反馈抑制TCR激活

(a) The Syn-Notch system is used in combination with CAR. Tumor antigen one (red) activates Syn-Notch to promote CAR expression, and when combined with tumor antigen two (gray), T cells are activated by tumor dual antigens; (b) RASSL system realizes cell migration signals activated by specific drugs (blue); (c) CAR T/NK/macrophage schematic diagram; (d) RASER system schematic diagram; (e) OspF and YopH negative feedback inhibit TCR activation.

的工程化环路, 使得T细胞产生相应的免疫反应能够被选择性启动、反应程度更加合理、时长更加理想。Wei等^[119]利用福氏志贺氏菌OspF蛋白3和鼠疫耶尔森氏菌YopH蛋白靶向性抑制MAPK通路的特性, 将这两种蛋白的基因序列导入TCR响应启动子中使其表达, 通过TCR的活化反而阻断了MAPK ERK这一TCR激活重要通路来抑制TCR的激活, 实现了一种负反馈调节, 降低了T细胞的活化程度, 使得CAR-T细胞的毒性得以降低。他们还通过这两个蛋白设计了多西环素诱导的T细胞暂停开关, 通过四环素诱导型启动子启动这两种蛋白的表达, 实现对TCR激活的抑制效应, 当多西环素去除时, 其对TCR激活的抑制效应也消除, 实现暂时性和可逆性启用T细胞[图4(e)]。

4 合成生物学在免疫治疗领域的临床转化

合成生物学通过工程化受体、工程化元件及工程化环路等策略, 为免疫治疗提供了精准调控工具, 推动多种疗法从概念走向临床。工程化受体如经典的CAR-T细胞疗法通过模块化设计融合抗原识别与胞内信号域, 赋予免疫细胞靶向杀伤

能力。如Tisagenlecleucel(抗CD19 CAR-T), 其在儿童及年轻成人复发/难治B细胞白血病中实现81%的完全缓解率, 且12个月总生存率达79%, 显著超越传统化疗^[120]; NY-ESO-1特异性TCR-T细胞疗法通过筛选并优化对HLA-A*0201分子呈递的NY-ESO-1肽段(157~165)具有极高亲和力的TCR序列, 经慢病毒载体将这一环路导入T细胞, 使其能够精准识别并杀伤表达这一细胞内癌胚抗原的肿瘤细胞, 在晚期软组织肉瘤中达到50%的客观缓解率^[121]。工程化元件(如病毒基因组改造)可构建智能递送系统, 例如溶瘤病毒T-VEC(Talimogene Laherparepvec)基于1型单纯疱疹病毒(HSV-1)骨架, 通过改造DNA元件删除ICP34.5和ICP47基因以削弱病毒在正常细胞中的复制能力并解除其对宿主蛋白表达的抑制, 同时插入人GM-CSF基因, 使病毒在肿瘤细胞内选择性复制并裂解细胞的同时, 局部大量分泌GM-CSF因子, 高效募集并激活树突状细胞等抗原呈递细胞, 激发强效的全身性抗肿瘤免疫应答, 在黑色素瘤治疗中使持久缓解率提升至16.3%^[122]。然而, 这些基于工程化受体、元件及环路的免疫疗法, 在临床转化中仍面临重大挑战。工程化细胞如CAR-T/TCR-T在实体瘤的免疫抑制微环境中易发生功能性耗竭, 对实体瘤的杀伤效果远低于血液

肿瘤；基因编辑过程中 CRISPR-Cas9 等工程化元件的脱靶风险可能引发患者基因组不稳定性，造成长期影响；高度个体化的定制模式使规模化生产可行性低、流程复杂且成本高昂，严重限制了临床推广性。针对这些挑战，正如之前所讲述，合成生物学一直在探寻免疫治疗领域的突破性进展，以提供更先进的优化策略：例如设计负反馈调控回路（如 LOCKR 系统）增强工程化细胞在肿瘤微环境中的耐受性与持久工作能力；开发逻辑门控回路（如与门 CAR-T）以提升靶向精准性；利用高保真工程化元件（如 HiFi Cas9）最大程度降低脱靶风险，保障治疗安全性；推动通用型细胞疗法（基于基因编辑的通用型 CAR-T）的标准化、规模化生产^[123-125]。这些基于合成生物学理念的持续创新，将深化对免疫治疗体系的精准编程与调控，推动下一代免疫治疗技术向更高效、更安全及更通用的方向演进。

5 小结与展望

免疫治疗作为近年来生物医学领域的重大突破，已在癌症、传染病和自身免疫病等多种疾病的治疗中展现出显著潜力。免疫治疗的理念是通过激活或调节机体的免疫系统来对抗疾病，通过免疫系统的三个关键阶段：信号输入、细胞内信号处理及信号输出发挥作用。然而，由于免疫微环境的复杂性，免疫治疗的临床应用仍面临诸多挑战，包括信号识别的特异性不足、免疫反应的不可控性以及治疗引发的毒副作用等，因此，如何通过技术创新克服免疫治疗的局限性，成为该领域亟待解决的问题。合成生物学作为一门新兴的交叉学科，能够利用基因编辑和回路重构实现精确的工程化设计和改造生物系统，为免疫治疗的精准化和高效化提供了全新的解决方案，其核心贡献主要体现在以下三个方面：

一是信号输入的精准化。合成生物学通过改造受体系统，显著提升了信号识别的特异性。例如，工程化的 Syn-Notch 受体能够响应双抗原信号，实现“与”门逻辑控制，从而避免单一抗原识别导致的脱靶效应。此外，RASSL 系统通过设计仅响应合成配体的 GPCR 受体，为免疫细胞的定

向迁移提供了可控工具。这些技术不仅增强了治疗的靶向性，还降低了毒副作用的风险。

二是信号处理的可编程性。在信号处理环节，合成生物学通过工程化生物大分子元件构建人工基因环路和蛋白质相互作用网络，实现了对免疫细胞行为的精确调控。例如，CHOMP 系统利用蛋白水解作用将致癌信号转化为凋亡信号，选择性杀伤肿瘤细胞；SPOC 逻辑则通过快速响应的蛋白酶系统，实现了对细胞行为的动态控制。这些技术为免疫治疗提供了灵活且高效的工具。

三是信号输出的动态调控。合成生物学通过设计反馈系统和振荡回路，实现了对免疫反应的动态调控。例如，负反馈回路可以抑制 T 细胞的过度激活，减轻 CRS；而核酶偶联的 RNA 系统则通过药物诱导控制细胞因子的表达，延长治疗窗口。这些创新为免疫治疗的长期安全性和有效性奠定了基础。

综上所述，合成生物学为免疫治疗带来了革命性的变革，其工程化思维和模块化设计理念为解决当前免疫治疗的局限性提供了全新途径。通过精准化调控疾病环境中免疫细胞或其他细胞的信号输入、处理和输出过程，合成生物学不仅提升了治疗的有效性和安全性，还为个性化医疗和罕见复杂疾病的治疗开辟了新的可能性。现如今，合成免疫治疗的进一步发展正日益依赖于与多学科的深度交叉融合。人工智能通过分析海量蛋白质序列与结构数据，训练生成式模型（如 autoregressive models），从头设计具有高亲和力与特异性的新型抗原受体及调控蛋白，突破了传统抗体发现的局限性^[126]。系统生物学通过建立基因元件的标准化数学模型（如启动子强度、蛋白质降解速率），使得合成生物学设计能够像组装电路一样，在计算机上模拟、优化并构建复杂的合成基因回路（如逻辑门控细胞因子释放系统），大幅提高了回路设计的可预测性与成功率^[127]。纳米技术则通过设计脂质纳米颗粒（LNP）的组分与结构，优化其包载、递送和保护 CRISPR 组件或 mRNA 编码的合成回路的能力，为实现体内原位编程免疫细胞提供了安全高效的全新途径^[128]。生物材料学通过设计可植入的多孔支架材料，并对其进行功能化修饰以可控缓释细胞因子与抗原信

号, 在体内人为构建支持工程化T细胞存活、扩增并发挥功能的“人工免疫微环境”, 从而显著增强实体瘤的治疗效果^[129]。合成生物学所具备的精确可控的免疫调控能力, 与精准医学的理念高度契合。未来, 随着基因编辑、人工智能与纳米材料等跨学科技术的深度融合, 合成生物学有望驱动免疫治疗向全面可编程、高度个性化及通用普适化的方向演进, 最终成为精准医学范式下治疗肿瘤、自身免疫病及传染性疾病的支柱性策略, 是免疫治疗未来发展的重要方向。

参 考 文 献

- [1] COUZIN-FRANKEL J. Cancer immunotherapy[J]. *Science*, 2013, 342(6165): 1432-1433.
- [2] RIEDEL S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination[J]. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 2005, 18(1): 21-25.
- [3] MCCARTHY E F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas[J]. *The Iowa Orthopaedic Journal*, 2006, 26: 154-158.
- [4] MANOHAR S, JHAVERI K D, PERAZELLA M A. Immunotherapy-related acute kidney injury[J]. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 2021, 28(5): 429-437.e1.
- [5] KENNEDY L B, SALAMA A K S. A review of cancer immunotherapy toxicity[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2020, 70(2): 86-104.
- [6] YANG H X, YAO Z R, ZHOU X X, et al. Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors: insights into immunological dysregulation[J]. *Clinical Immunology*, 2020, 213: 108377.
- [7] MITRA A, BARUA A, HUANG L P, et al. From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1188049.
- [8] TURTLE C J, HAY K A, HANAFI L A, et al. Durable molecular remissions in chronic lymphocytic leukemia treated with CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells after failure of ibrutinib[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2017, 35(26): 3010-3020.
- [9] CAMERON D E, BASHOR C J, COLLINS J J. A brief history of synthetic biology[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(5): 381-390.
- [10] YANG S, SLEIGHT S C, SAURO H M. Rationally designed bidirectional promoter improves the evolutionary stability of synthetic genetic circuits[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(1): e33.
- [11] CHAPPELL J, WATTERS K E, TAKAHASHI M K, et al. A renaissance in RNA synthetic biology: new mechanisms, applications and tools for the future[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, 28: 47-56.
- [12] KHALIL A S, LU T K, BASHOR C J, et al. A synthetic biology framework for programming eukaryotic transcription functions[J]. *Cell*, 2012, 150(3): 647-658.
- [13] QUINN J Y, COX R S, ADLER A, et al. SBOL visual: a graphical language for genetic designs[J]. *PLoS Biology*, 2015, 13(12): e1002310.
- [14] MISHRA D, RIVERA P M, LIN A, et al. A load driver device for engineering modularity in biological networks[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(12): 1268-1275.
- [15] GARDNER T S, CANTOR C R, COLLINS J J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*[J]. *Nature*, 2000, 403(6767): 339-342.
- [16] LIU Y, HUANG Y X, LU R, et al. Synthetic biology applications of the yeast mating signal pathway[J]. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(5): 620-631.
- [17] RYU J, PARK S H. Simple synthetic protein scaffolds can create adjustable artificial MAPK circuits in yeast and mammalian cells[J]. *Science Signaling*, 2015, 8(383): ra66.
- [18] LI S Y, TANG H, LI C, et al. Synthetic biology technologies and genetically engineering strategies for enhanced cell therapeutics[J]. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2023, 19(2): 309-321.
- [19] TRENTESAUX C, YAMADA T, KLEIN O D, et al. Harnessing synthetic biology to engineer organoids and tissues [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(1): 10-19.
- [20] SOLÉ R V, MONTAÑEZ R, DURAN-NEBREDA S. Synthetic circuit designs for earth terraformation[J]. *Biology Direct*, 2015, 10(1): 37.
- [21] SHIH R M, CHEN Y Y. Engineering principles for synthetic biology circuits in cancer immunotherapy[J]. *Cancer Immunology Research*, 2022, 10(1): 6-11.
- [22] WEBER J S, YANG J C, ATKINS M B, et al. Toxicities of immunotherapy for the practitioner[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2015, 33(18): 2092-2099.
- [23] THOMPSON J A. New NCCN guidelines: recognition and management of immunotherapy-related toxicity[J]. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2018, 16(5S): 594-596.
- [24] NEELAPU S S, TUMMALA S, KEBRIAEI P, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2018, 15(1): 47-62.
- [25] VAN ERP E A, VAN KAMPEN M R, VAN KASTEREN P B, et al. Viral infection of human natural killer cells[J]. *Viruses*, 2019, 11(3): 243.
- [26] LE BERT N, TAN A T, KUNASEGARAN K, et al. SARS-

- CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls[J]. *Nature*, 2020, 584(7821): 457-462.
- [27] DARVIN P, TOOR S M, SASIDHARAN NAIR V, et al. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2018, 50(12): 1-11.
- [28] KEIR M E, BUTTE M J, FREEMAN G J, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity[J]. *Annual Review of Immunology*, 2008, 26: 677-704.
- [29] CURRAN K J, PEGRAM H J, BRENTJENS R J. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions[J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2012, 14(6): 405-415.
- [30] LINETTE G P, STADTMAUER E A, MAUS M V, et al. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma[J]. *Blood*, 2013, 122(6): 863-871.
- [31] WAT J, BARMETTLER S. Hypogammaglobulinemia after chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy: characteristics, management, and future directions[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: in Practice*, 2022, 10(2): 460-466.
- [32] ARNETH B. Tumor microenvironment[J]. *Medicina*, 2020, 56(1): 15.
- [33] ZARETSKY J M, GARCIA-DIAZ A, SHIN D S, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2016, 375(9): 819-829.
- [34] SHIN D S, ZARETSKY J M, ESCUIN-ORDINAS H, et al. Primary resistance to PD-1 blockade mediated by JAK1/2 mutations[J]. *Cancer Discovery*, 2017, 7(2): 188-201.
- [35] SHAH N N, FRY T J. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2019, 16(6): 372-385.
- [36] SIEGLER E L, ZHU Y N, WANG P, et al. Off-the-shelf CAR-NK cells for cancer immunotherapy[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(2): 160-161.
- [37] LIN J K, LERMAN B J, BARNES J I, et al. Cost effectiveness of chimeric antigen receptor T-cell therapy in relapsed or refractory pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2018, 36(32): 3192-3202.
- [38] DEPIL S, DUCHATEAU P, GRUPP S A, et al. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2020, 19(3): 185-199.
- [39] LIN H L, CHENG J L, MU W, et al. Advances in universal CAR-T cell therapy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 744823.
- [40] ENDY D. Foundations for engineering biology[J]. *Nature*, 2005, 438(7067): 449-453.
- [41] ANDRIANANTOANDRO E, BASU S, KARIG D K, et al. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline[J]. *Molecular Systems Biology*, 2006, 2: 2006.0028.
- [42] GROUP B F, BAKER D, CHURCH G, et al. Engineering life: building a fab for biology[J]. *Scientific American*, 2006, 294(6): 44-51.
- [43] THIEL G, KAUFMANN A, RÖSSLER O G. G-protein-coupled designer receptors - new chemical-genetic tools for signal transduction research[J]. *Biological Chemistry*, 2013, 394(12): 1615-1622.
- [44] CONKLIN B R, HSIAO E C, CLAEYSEN S, et al. Engineering GPCR signaling pathways with RASSLs[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(8): 673-678.
- [45] MCCUDDEN C R, HAINS M D, KIMPLE R J, et al. G-protein signaling: back to the future[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62(5): 551-577.
- [46] WICKMAN K, CLAPHAM D E. Ion channel regulation by G proteins[J]. *Physiological Reviews*, 1995, 75(4): 865-885.
- [47] VAN BIESEN T, LUTTRELL L M, HAWES B E, et al. Mitogenic signaling *via* G protein-coupled receptors[J]. *Endocrine Reviews*, 1996, 17(6): 698-714.
- [48] SPIEGEL A M, SHENKER A, WEINSTEIN L S. Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction[J]. *Endocrine Reviews*, 1992, 13(3): 536-565.
- [49] COWARD P, WADA H G, FALK M S, et al. Controlling signaling with a specifically designed Gi-coupled receptor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(1): 352-357.
- [50] LEFKOWITZ R J, SHENOY S K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins[J]. *Science*, 2005, 308(5721): 512-517.
- [51] SHENOY S K, LEFKOWITZ R J. β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2011, 32(9): 521-533.
- [52] REITER E, AHN S, SHUKLA A K, et al. Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2012, 52: 179-197.
- [53] BARNEA G, STRAPPS W, HERRADA G, et al. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(1): 64-69.
- [54] KIPNISS N H, DINGAL P C D P, ABBOTT T R, et al. Engineering cell sensing and responses using a GPCR-coupled CRISPR-Cas system[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 2212.
- [55] ANDERSSON E R, SANDBERG R, LENDAHL U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function[J].

- Development, 2011, 138(17): 3593-3612.
- [56] WANG H F, ZANG C Z, LIU X S, et al. The role of Notch receptors in transcriptional regulation[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2015, 230(5): 982-988.
- [57] GORDON W R, VARDAR-ULU D, HISTEN G, et al. Structural basis for autoinhibition of Notch[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2007, 14(4): 295-300.
- [58] GORDON W R, ZIMMERMAN B, HE L, et al. Mechanical allostery: evidence for a force requirement in the proteolytic activation of Notch[J]. *Developmental Cell*, 2015, 33(6): 729-736.
- [59] STRUHL G, ADACHI A. Nuclear access and action of Notch *in vivo*[J]. *Cell*, 1998, 93(4): 649-660.
- [60] MORSUT L, ROYBAL K T, XIONG X, et al. Engineering customized cell sensing and response behaviors using synthetic Notch receptors[J]. *Cell*, 2016, 164(4): 780-791.
- [61] MORAGA I, SPANGLER J, MENDOZA J L, et al. Multifarious determinants of cytokine receptor signaling specificity[J]. *Advances in Immunology*, 2014, 121: 1-39.
- [62] MORAGA I, WERNIG G, WILMES S, et al. Tuning cytokine receptor signaling by re-orienting dimer geometry with surrogate ligands[J]. *Cell*, 2015, 160(6): 1196-1208.
- [63] MORAGA I, SPANGLER J B, MENDOZA J L, et al. Synthekines are surrogate cytokine and growth factor agonists that compel signaling through non-natural receptor dimers[J]. *eLife*, 2017, 6: e22882.
- [64] REMY I, WILSON I A, MICHNICK S W. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change [J]. *Science*, 1999, 283(5404): 990-993.
- [65] CONSTANTINESCU S N, KEREN T, RUSS W P, et al. The erythropoietin receptor transmembrane domain mediates complex formation with viral anemic and polycythemic gp55 proteins[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(44): 43755-43763.
- [66] WITTHUHN B A, QUELLE F W, SILVENNOINEN O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin[J]. *Cell*, 1993, 74(2): 227-236.
- [67] SCHELLER L, STRITTMATTER T, FUCHS D, et al. Generalized extracellular molecule sensor platform for programming cellular behavior[J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(7): 723-729.
- [68] DARINGER N M, DUDEK R M, SCHWARZ K A, et al. Modular extracellular sensor architecture for engineering mammalian cell-based devices[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(12): 892-902.
- [69] HARTFIELD R M, SCHWARZ K A, MULDOON J J, et al. Multiplexing engineered receptors for multiparametric evaluation of environmental ligands[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(11): 2042-2055.
- [70] SCHWARZ K A, DARINGER N M, DOLBERG T B, et al. Rewiring human cellular input-output using modular extracellular sensors[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(2): 202-209.
- [71] URBAN D J, ROTH B L. DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): chemogenetic tools with therapeutic utility[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2015, 55: 399-417.
- [72] TODA S, BLAUCH L R, TANG S K Y, et al. Programming self-organizing multicellular structures with synthetic cell-cell signaling[J]. *Science*, 2018, 361(6398): 156-162.
- [73] BURRILL D R, SILVER P A. Making cellular memories[J]. *Cell*, 2010, 140(1): 13-18.
- [74] BROPHY J A N, MAGALLON K J, DUAN L N, et al. Synthetic genetic circuits as a means of reprogramming plant roots[J]. *Science*, 2022, 377(6607): 747-751.
- [75] WAN X Y, VOLPETTI F, PETROVA E, et al. Cascaded amplifying circuits enable ultrasensitive cellular sensors for toxic metals[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(5): 540-548.
- [76] WEINBERG B H, CHO J H, AGARWAL Y, et al. High-performance chemical- and light-inducible recombinases in mammalian cells and mice[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4845.
- [77] POTVIN-TROTTIER L, LORD N D, VINNICOMBE G, et al. Synchronous long-term oscillations in a synthetic gene circuit [J]. *Nature*, 2016, 538(7626): 514-517.
- [78] BERTSCHCHI A, WANG P L, GALVAN S, et al. Combinatorial protein dimerization enables precise multi-input synthetic computations[J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(6): 767-777.
- [79] CARRINGTON J C, DOUGHERTY W G. A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85(10): 3391-3395.
- [80] TÖZSÉR J, TROPEA J E, CHERRY S, et al. Comparison of the substrate specificity of two potyvirus proteases[J]. *The FEBS Journal*, 2005, 272(2): 514-523.
- [81] BARTENSCHLAGER R. The NS3/4A proteinase of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy[J]. *Journal of Viral Hepatitis*, 1999, 6(3): 165-181.
- [82] GAO X J, CHONG L S, KIM M S, et al. Programmable protein circuits in living cells[J]. *Science*, 2018, 361(6408): 1252-1258.
- [83] COX A D, FESIK S W, KIMMELMAN A C, et al. Drugging the undruggable RAS: mission possible? [J]. *Nature Reviews*

- Drug Discovery, 2014, 13(11): 828-851.
- [84] DOWNWARD J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy[J]. Nature Reviews Cancer, 2003, 3(1): 11-22.
- [85] FINK T, LONZARIĆ J, PRAZNIK A, et al. Design of fast proteolysis-based signaling and logic circuits in mammalian cells[J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15(2): 115-122.
- [86] GAYET R V, ILIA K, RAZAVI S, et al. Autocatalytic base editing for RNA-responsive translational control[J]. Nature Communications, 2023, 14: 1339.
- [87] SNEPPEN K, KRISHNA S, SEMSEY S. Simplified models of biological networks[J]. Annual Review of Biophysics, 2010, 39: 43-59.
- [88] LIM W A, LEE C M, TANG C. Design principles of regulatory networks: searching for the molecular algorithms of the cell[J]. Molecular Cell, 2013, 49(2): 202-212.
- [89] INNIS M C, SILVER P A. Building synthetic memory[J]. Current Biology, 2013, 23(17): R812-R816.
- [90] FERRELL J E. Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2002, 14(2): 140-148.
- [91] PADIRAC A, FUJII T, RONDELEZ Y. Bottom-up construction of *in vitro* switchable memories[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(47): E3212-E3220.
- [92] GOODWIN B B C. Temporal organization in cells: a dynamic theory of cellular control processes[M]. London: Academic Press, 1963.
- [93] ZHOU Z, LIU Y T, FENG Y S, et al. Engineering longevity-design of a synthetic gene oscillator to slow cellular aging[J]. Science, 2023, 380(6643): 376-381.
- [94] KHAMMASH M H. Perfect adaptation in biology[J]. Cell Systems, 2021, 12(6): 509-521.
- [95] LANGAN R A, BOYKEN S E, NG A H, et al. *De novo* design of bioactive protein switches[J]. Nature, 2019, 572(7768): 205-210.
- [96] QUIJANO-RUBIO A, YEH H W, PARK J, et al. *De novo* design of modular and tunable protein biosensors[J]. Nature, 2021, 591(7850): 482-487.
- [97] ZHENG X H, WU Y Q, BI J C, et al. The use of supercytokines, immunocytokines, engager cytokines, and other synthetic cytokines in immunotherapy[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2022, 19(2): 192-209.
- [98] VAZQUEZ-LOMBARDI R, LOETSCH C, ZINKL D, et al. Potent antitumour activity of interleukin-2-Fc fusion proteins requires Fc-mediated depletion of regulatory T-cells[J]. Nature Communications, 2017, 8: 15373.
- [99] DE LUCA R, SOLTERMANN A, PRETTO F, et al. Potency-matched dual cytokine-antibody fusion proteins for cancer therapy[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2017, 16(11): 2442-2451.
- [100] SEIF M, EINSELE H, LÖFFLER J. CAR T cells beyond cancer: hope for immunomodulatory therapy of infectious diseases[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 2711.
- [101] LO PRESTI E, DIELI F, MERAVIGLIA S. Tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes: pathogenic role, clinical significance, and differential programming in the tumor microenvironment[J]. Frontiers in Immunology, 2014, 5: 607.
- [102] TASIAN S K, GARDNER R A. CD19-redirected chimeric antigen receptor-modified T cells: a promising immunotherapy for children and adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL) [J]. Therapeutic Advances in Hematology, 2015, 6(5): 228-241.
- [103] PARK J S, RHAU B, HERMANN A, et al. Synthetic control of mammalian-cell motility by engineering chemotaxis to an orthogonal bioinert chemical signal[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(16): 5896-5901.
- [104] MAALEJ K M, MERHI M, INCHAKALODY V P, et al. CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances[J]. Molecular Cancer, 2023, 22(1): 20.
- [105] ALBELDA S M. CAR T cell therapy for patients with solid tumours: key lessons to learn and unlearn[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2024, 21(1): 47-66.
- [106] BAI Z L, FENG B, MCCLORY S E, et al. Single-cell CAR T atlas reveals type 2 function in 8-year leukaemia remission[J]. Nature, 2024, 634(8034): 702-711.
- [107] BUI T A, MEI H Q, SANG R, et al. Advancements and challenges in developing *in vivo* CAR T cell therapies for cancer treatment[J]. eBioMedicine, 2024, 106: 105266.
- [108] XU J, LIU L, PARONE P, et al. *In-vivo* B-cell maturation antigen CAR T-cell therapy for relapsed or refractory multiple myeloma[J]. Lancet, 2025, 406(10500): 228-231.
- [109] MOHAMMADI M, NAJAFI H, MOHAMMADI P. CAR T-cell therapy in renal cell carcinoma: opportunities, challenges, and new strategies to overcome[J]. Medical Oncology, 2025, 42(6): 179.
- [110] LIU E L, MARIN D, BANERJEE P, et al. Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors[J]. The New England Journal of Medicine, 2020, 382(6): 545-553.
- [111] MYERS J A, MILLER J S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2021, 18(2): 85-100.
- [112] XIE G Z, DONG H, LIANG Y, et al. CAR-NK cells: a promising cellular immunotherapy for cancer[J]. eBioMedicine, 2020, 59: 102975.
- [113] KLICHINSKY M, RUELLA M, SHESTOVA O, et al. Human

- chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(8): 947-953.
- [114] ZHANG W L, LIU L, SU H F, et al. Chimeric antigen receptor macrophage therapy for breast tumours mediated by targeting the tumour extracellular matrix[J]. *British Journal of Cancer*, 2019, 121(10): 837-845.
- [115] KHAWAR M B, SUN H B. CAR-NK cells: from natural basis to design for kill[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 707542.
- [116] CHU J H, DENG Y, BENSON D M, et al. CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance *in vitro* and *in vivo* antitumor activity against human multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2014, 28(4): 917-927.
- [117] BOUTILIER A J, ELSAWA S F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 6995.
- [118] CHUNG H K, ZOU X Z, BAJAR B T, et al. A compact synthetic pathway rewires cancer signaling to therapeutic effector release[J]. *Science*, 2019, 364(6439): eaat6982.
- [119] WEI P, WONG W W, PARK J S, et al. Bacterial virulence proteins as tools to rewire kinase pathways in yeast and immune cells[J]. *Nature*, 2012, 488(7411): 384-388.
- [120] MAUDE S L, LAETSCH T W, BUECHNER J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2018, 378(5): 439-448.
- [121] PAN Q Z, WENG D S, LIU J Y, et al. Phase 1 clinical trial to assess safety and efficacy of NY-ESO-1-specific TCR T cells in HLA-a 02: 01 patients with advanced soft tissue sarcoma[J]. *Cell Reports Medicine*, 2023, 4(8): 101133.
- [122] ALLA S S M, TEKURU Y, LOKESH M S, et al. Talimogene laherparepvec (T-VEC) as a treatment for melanoma: a systematic review[J]. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 2025, 31(3): 481-487.
- [123] CHO J H, OKUMA A, SOFJAN K, et al. Engineering advanced logic and distributed computing in human CAR immune cells[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 792.
- [124] VAKULSKAS C A, DEVER D P, RETTIG G R, et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(8): 1216-1224.
- [125] LU J R, JIANG G. The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies[J]. *Molecular Cancer*, 2022, 21(1): 194.
- [126] SHIN J E, RIESSELMAN A J, KOLLASCH A W, et al. Protein design and variant prediction using autoregressive generative models[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 2403.
- [127] MARCHISIO M A, STELLING J. Computational design of synthetic gene circuits with composable parts[J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(17): 1903-1910.
- [128] HALD ALBERTSEN C, KULKARNI J A, WITZIGMANN D, et al. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2022, 188: 114416.
- [129] ISSER A, LIVINGSTON N K, SCHNECK J P. Biomaterials to enhance antigen-specific T cell expansion for cancer immunotherapy[J]. *Biomaterials*, 2021, 268: 120584.



通讯作者: 张向前(1973—),男,教授,硕士生导师。研究方向为植物天然产物及 miRNA 调控机制。
E-mail: zxq@yau.edu.cn



第一作者: 王子恒(1998—),男,硕士研究生。研究方向为合成生物学和免疫细胞治疗。
E-mail: 1355985130@qq.com