

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-063

合成生物学与工程化T细胞治疗

谢君鸿¹, 何晶晶², 周鹏辉³

(¹ 广西医科大学, 广西生物靶向诊治重点实验室, 国家生物靶向诊治国际联合研究中心, 广西 南宁 530021; ² 广东医学科学院, 广东省人民医院医学研究部, 广东 广州 510055; ³ 中山大学肿瘤防治中心, 华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

摘要: 近年来, 工程化T细胞治疗在肿瘤免疫治疗领域取得了重大进展。工程化T细胞治疗主要包括T细胞受体基因工程T细胞 (T-cell receptor-engineered T cell, TCR-T) 疗法和嵌合抗原受体T细胞 (chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) 疗法, 其中, CAR-T疗法在恶性血液肿瘤中展现出了巨大的潜力和应用价值, 而TCR-T疗法则在部分实体瘤中呈现出了较好的治疗效果。然而, 针对大部分肿瘤, 特别是实体肿瘤, 当前工程化T细胞疗法还存在效率低、安全性不足等问题。通过合成生物学手段使工程化T细胞克服当前限制, 将为研制更安全、高效的工程化T细胞带来新的机遇。本文将从工程化T细胞的结构和信号激活、靶点选择、亲和力优化、安全性改造以及基因编辑改造等方面综述工程化T细胞的合成生物学改造策略, 并探讨这些优化措施在肿瘤免疫治疗应用中的最新进展。

关键词: 合成生物学; 工程化T细胞疗法; TCR-T; CAR-T; 肿瘤免疫治疗

中图分类号: R318 **文献标志码:** A

Synthetic biology and engineered T cell therapy

XIE Junhong¹, HE Jingjing², ZHOU Penghui³

(¹National Center for International Research of Bio-targeting Theranostics, Guangxi Key Laboratory of Bio-targeting Theranostics, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China; ²Medical Research Department, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510055, Guangdong, China; ³State Key Laboratory of Oncology in Southern China, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, Guangdong, China)

Abstract: In recent years, engineering T cell therapy has made great progress in tumor immunotherapy, which mainly includes T-cell receptor-engineered T cell (TCR-T) therapy and chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) therapy. Due to their structure difference, TCR-T and CAR-T cells show different characteristics in signal activation and antigen recognition. CAR has scFv derived from antibody, containing CD3 ζ and costimulatory domain(s), making engineered CAR able to recognize specific tumor associated antigens. Therefore, CAR has an ability to bind unprocessed tumor surface antigens without MHC processing, while TCR engages with both tumor intracellular and surface antigens

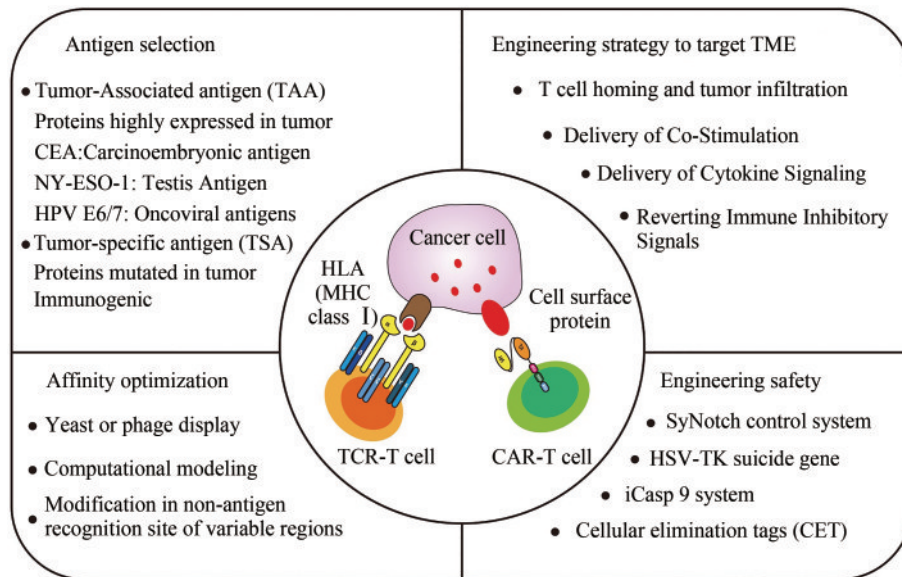
收稿日期: 2022-11-17 修回日期: 2023-02-01

基金项目: 国家自然科学基金 (82130086, 82192892, 82101860); 广东省自然科学基金 (2017A030308007); 广东省特支计划项目 (2016LJ06S464); 广东省引进创新创业团队 (2016ZT06S638)

引用本文: 谢君鸿, 何晶晶, 周鹏辉. 合成生物学与工程化T细胞治疗[J]. 合成生物学, 2023, 4(2): 373-393

Citation: XIE Junhong, HE Jingjing, ZHOU Penghui. Synthetic biology and engineered T cell therapy[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(2): 373-393

embedded in MHC. While CAR-T cell therapy has demonstrated a significant clinical effect against malignant blood tumors, TCR-T cell therapies have been tested in hematological and solid tumors. Even though clinical results are encouraging for both approaches, several major challenges have been identified, including: target antigen selection such as less tumor toxicity and antigen escape, T cell homing to the tumor, T cell infiltration into the tumor, T cell persistence, and local immunosuppression in the tumor microenvironment. Synthetic biology technologies have enabled flexible reprogramming of engineered T cells to overcome the aforementioned limitations, bringing new opportunities for improving their safety and effectiveness, but the choice of a suitable target antigen is still a key for success. Moreover, improved preclinical TCR/CAR screening is likely to enhance the safety of engineered T cell therapies, and additional T cell engineering to further enhance engineered T cells at various levels has generated promising results, including: (1) modulation of affinity, (2) safety control elements, and (3) targeting TME components. Future developments will likely harness combinatorial strategies to overcome challenges posed by the tumors. In this article, we address structure and signal activation, target selection, affinity optimization, safety modification and gene editing strategies for engineered T cells, and also review the potential synthetic biological approaches and latest progress of engineered T cell therapy in the application of tumor immunotherapy.



Keywords: synthetic biology; engineering T cell therapy; TCR-T; CAR-T; tumor immunotherapy

工程化T细胞疗法起源于过继性细胞 (adoptive cell transfer, ACT) 疗法。最早的 ACT 疗法是 20 世纪 80 年代由 Rosenberg 团队^[1] 开发, 从患者的肿瘤原发灶获取肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocyte, TIL), 培养后回输治疗转移性黑色素瘤并取得了成功。然而, TIL 疗法并未得到广泛应用, 首先是由于 TIL 中大部分为不识别肿瘤抗原的旁观者 T 细胞, 只有少部分为肿瘤抗原特异性 T 细胞, 因此 TIL 细胞只有经过上千倍的体外扩增

培养, 回输治疗才能产生较好的治疗效果。此外, 目前 TIL 疗法主要集中在黑色素瘤中, 因为黑色素瘤中的 TIL 含量较高, 而在实际操作中大部分肿瘤无法成功培养 TIL, 因此目前 TIL 治疗存在极大的技术瓶颈和应用限制。随着基因工程技术和合成生物学等学科的发展, 当前 ACT 的研究方向逐渐转向具有肿瘤抗原特异性的基因工程 T 细胞, 主要包括 T 细胞受体工程 T 细胞 (T-cell receptor-engineered T cell, TCR-T) 疗法和嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen

receptor T cell, CAR-T) 疗法。

合成生物学以工程化的策略为指导思想,以DNA合成技术为基础,有目的地设计合成标准化的生物元件,构建特定的基因回路,再组装成集成系统,最后形成具有特定功能的生命系统。工程化T细胞通过体外合成特异的能够识别肿瘤抗原的TCR或CAR基因序列,借助病毒载体系统转入原代T细胞,构建工程化T细胞,大量扩增后回输至患者体内,发挥抗肿瘤效果并达到治疗目的。TCR通常来源于经筛选能够特异性识别肿瘤抗原的天然TCR,或经基因修饰后对靶抗原亲和力增强的天然TCR;而CAR是一种合成嵌合受体,由抗体的单链可变片段(single chain variable fragment, scFv)和T细胞信号结构域组成。由于TCR和CAR结构的差异,TCR-T和CAR-T细胞在信号激活传导和抗原识别方面均表现出不同的特征^[2]:TCR-T细胞的激活依赖于MHC分子介导的抗原呈递,因此能够识别细胞内和细胞表面的抗原;而CAR-T细胞删减了MHC抗原递呈的元件,只能识别呈现在细胞表面的抗原。

目前,CAR-T疗法在恶性血液肿瘤治疗方面取得了显著的进展^[3],特别是靶向CD19的CAR-T细胞疗法对急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)均表现出较好的临床效果^[4-5]。截至2022年6月,FDA已批准6款CAR-T产品用于不同的血液恶性肿瘤,分别是诺华的Kymriah、吉利德/KitePharma的Yescarta和Tecartus、BMS的Breyanzi和Abecma、传奇生物的Carvykti;中国目前有2款CAR-T产品实现商业化,分别为复星凯特阿基仑赛注射液(吉利德/KitePharma授权Yescarta本地化生产)和药明巨诺的瑞基奥仑赛注射液^[6]。但是,一直以来,CAR-T细胞治疗实体肿瘤的临床效果不佳,主要原因包括:①肿瘤抗原的选择。现在已发现的CE2、HER2等靶点都有脱靶效应的风险,研究更具特异性的靶点是未来的研究重点。②CAR-T细胞难以归巢到肿瘤部位。CAR-T细胞要杀伤肿瘤细胞,需要穿过细胞外基质,再克服免疫抑制微环境,当CAR-T细胞到达肿瘤部位时,数量和活性已经减低。为了提高CAR-T细胞的归巢能力,可使CAR-T细胞高表达肝素酶等。③肿

瘤高度免疫抑制微环境。肿瘤细胞能够利用肿瘤抗原缺失、共刺激信号异常、肿瘤分泌的免疫抑制因子(IL-10、TGF- β 、IL-33等)以及肿瘤微环境中各种免疫抑制性细胞等多种途径抑制免疫细胞的活性。因此,过继转移的CAR-T细胞需要克服免疫抑制,以提供最佳的抗肿瘤反应^[2,7]。④肿瘤细胞的异质性。实体瘤是一群异质性的肿瘤细胞,不同突变肿瘤细胞上的靶点不一样,单一靶点的CAR-T很难杀光全部肿瘤细胞,需通过多靶向的CAR-T细胞解决^[8]。

不同于CAR-T细胞只识别表面抗原,TCR-T细胞可以识别所有能被MHC呈递的抗原,包括细胞内和细胞表面的抗原,尤其是肿瘤细胞突变产生的新抗原,这个特征使得TCR-T治疗实体肿瘤更具优势。在各种肿瘤抗原中,癌症/睾丸抗原NY-ESO-1是TCR-T细胞疗法最常见的靶点,因为它具有高度免疫原性,在多种肿瘤类型中广泛表达,包括滑膜肉瘤、乳腺癌、膀胱癌、前列腺癌、黑色素瘤、NSCLC、肝细胞癌以及卵巢癌等^[9-10]。尽管NY-ESO-1特异性TCR-T细胞治疗在包括滑膜肉瘤在内的某些病例中表现出持久的抗肿瘤反应,但大多数实体瘤患者仍然不能从TCR-T治疗中获益^[11],主要原因包括:①缺乏真正特异、稳定和同质表达模式的肿瘤细胞靶抗原,包括NY-ESO-1在内的肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)不止在肿瘤组织中表达,还在部分正常组织中表达,会导致非肿瘤靶向毒性,因此使用肿瘤组织特异的肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen, TSA)在疗效和安全性上更具优势。②由于TCR对抗原识别的MHC限制性,患者既要表达靶向抗原,还要表达相应的MHC分子,才能进行治疗。这使得适合TCR-T细胞治疗的患者数量大大减少。③TCR-T和CAR-T一样需要面对高度免疫抑制的肿瘤微环境问题。

在本综述中,基于TCR-T和CAR-T细胞疗法的结构和功能差异,以及上述提到的TCR-T和CAR-T细胞在实体瘤应用方面的反应率低和安全性差等问题,讨论了目前已开发的多种方法,包括:靶点选择,亲和力优化,以及装载免疫检查点分子、细胞因子、趋化因子等基因工程策略。这些方法可提高抗肿瘤效率并减少全身不良事件,使得基因工程T细胞可以更有效地在实体瘤中工作。

1 工程化T细胞的结构和信号激活

工程化T细胞是通过体外合成的TCR或CAR转导入原代T细胞构建而成的。TCR通常来源于经工程化改造的天然TCR，而CAR是一种合成嵌合受体，CAR-T细胞和TCR-T细胞最大的区别在于前者不受MHC限制，只要scFv与靶抗原结合即可激活T细胞功能。

1.1 TCR的基本结构和TCR-T细胞的信号激活

T细胞通过细胞膜表面的TCR识别抗原和传递免疫应答信号。TCR由TCR α 链和 β 链组成异二聚体，其胞外结构包含可变区和恒定区。可变区与靶细胞上的抗原肽-主要组织相容性复合物 (peptide-major histocompatibility complex, pMHC) 结合使T细胞识别特异性的靶抗原。TCR的跨膜区与CD3链 (γ , δ , ϵ , ζ) 结合形成功能性的TCR复合物 (图1)。初始T细胞膜表面的TCR与抗原提呈细胞 (antigen presenting cells, APC) 表面的同源pMHC结合，完成抗原识别过程，这是启动T细胞活化的第一信号，此外，必须有共刺激分子提供的协同刺激信号 (第二信号)，T细胞才能被激活。在共刺激信号的帮助下，许多基因包括编码IL-2的基因开始转录激活，促进获得抗原识别

信号的T细胞进一步进入增殖分化阶段 (第三信号)^[12-13] (图1)。第一和第二信号是T细胞活化所必需的，共刺激信号相当于“信号扩增器”，可以降低与pMHC结合的TCR必要量，使得TCR在少量抗原的刺激下实现级联激活。肿瘤细胞大多缺乏提供共刺激信号的能力，甚至大量表达共抑制分子与T细胞上的受体竞争性结合，实现免疫逃逸^[14]。当前TCR-T细胞治疗的一个关键难点就是如何克服肿瘤免疫抑制性微环境，保证TCR-T细胞在肿瘤中有效存活并发挥抗肿瘤效应。

1.2 CAR的基本结构和CAR-T细胞的信号激活

CAR是模块化合成受体，在TCR的基础上对T细胞激活信号进行了简化，不再依赖MHC的抗原递呈。CAR主要由胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域这三个功能域构成^[15]。胞外结构域主要包括scFv和铰链区，其中scFv是CAR特异性结合肿瘤抗原的基础，由单克隆抗体的轻链和重链通过多肽连接而成。目前临床上主要针对肿瘤相关抗原 (如CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、BCMA等靶点) 来开发CAR结构^[16]。铰链区连接scFv和跨膜结构域，铰链区的长度取决于靶细胞抗原表位的位置及暴露程度。跨膜结构域将CAR的胞外与胞内结构域连接，常用的跨膜结构域来

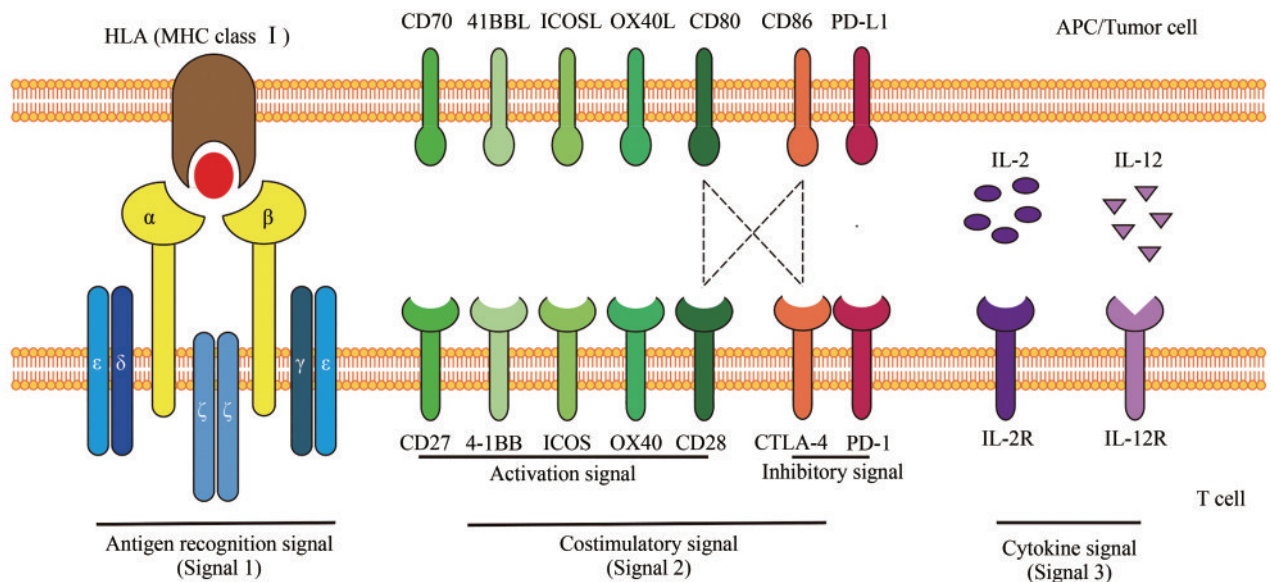


图1 TCR复合物以及T细胞激活信号

Fig. 1 TCR complex and T cell activation

源于CD4、CD8 α 、CD28和CD3 ζ 。胞内结构域由共刺激域和信号转导结构域构成，共刺激域通常来自CD28受体家族（CD28、ICOS）或肿瘤坏死因子受体家族（4-1BB、OX40、CD27），可协同共刺激分子和细胞内信号的双重活化，使T细胞持续增殖并释放细胞因子，提高T细胞的抗肿瘤能力。信号转导结构域通常为T细胞受体TCR/CD3 ζ 链或免疫球蛋白Fc受体Fc ϵ R1 γ 链，含有免疫受体酪氨酸激活基序（immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM），发挥T细胞信号转导功能^[17]。

第一代CAR分子的信号通路结构域中仅含有CD3 ζ 信号，T细胞不能充分活化，导致其应用效果不佳。在此基础上学者们对CAR分子的结构做了进一步的改进，引入一个或两个协同共刺激分子，分别形成了二代和三代CAR分子。近年来又演化出了四代CAR分子，除传统CAR分子元件之外还引入了能够诱发T细胞分泌细胞因子或者表达自杀基因的结构。另外，基因编辑敲除TCR α 链和 β 链的通用型CAR-T细胞避免了移植物抗宿主病（graft-versus-host disease, GVHD）的发生，将进一步促进CAR-T的规模化生产和治疗，目前正处于研发阶段，被称之为第五代CAR-T技术（图2）。

2 工程化T细胞靶点的选择

作为一种人工合成分子，CAR嵌合了多个特殊的结构域，已经能实现强大的信号转导功能，在识别抗原时不需要MHC的参与。但实际上，只有不到10%的抗原蛋白会在细胞表面表达，因此，

CAR-T的抗原选择范围有限。相反的，TCR-T识别pMHC复合物，不受表面抗原限制，不仅能够靶向细胞表面蛋白，还可以靶向胞内蛋白质，靶点选择范围更为广泛。

2.1 TCR-T细胞靶点的选择

高效的TCR筛选及靶点选择是这个领域共同的挑战^[18]。人类肿瘤抗原主要分为两大类：肿瘤相关抗原TAAs（癌-睾丸抗原、过表达抗原、分化抗原等），以及肿瘤特异性抗原TSAs（肿瘤新抗原、肿瘤病毒抗原等）^[18-21]。虽然TCR-T可以针对所有肿瘤抗原，但目前已证明安全有效的靶点仍然非常有限。

大部分TCR-T临床试验针对的靶点是TAAs（包括NY-ESO-1、MAGE、MART-1、gp100等）和肿瘤相关病毒抗原（包括HPV-16 E6、EBV等）^[22-25]。然而，TAAs不仅在肿瘤中高表达，在部分正常组织中也会有表达，因此无法避免靶向TAAs的TCR-T细胞对正常组织的毒副作用^[26]。靶向CEA、MAGE-A3的TCR-T临床试验均出现患者死亡的情况，最终由于严重的不良反应导致试验被迫终止^[24, 27]。而来源于肿瘤细胞随机突变的TSAs则具有更高的免疫原性和肿瘤组织特异性，因此靶向TSAs在疗效和安全性上更具优势。但是每个患者肿瘤细胞产生的突变各不相同，靶向TSAs的TCR-T只能进行个性化治疗，而传统的TCR-T细胞研制流程周期长、效率低，不适用于个性化治疗。本团队从鉴定肿瘤抗原特异性T细胞

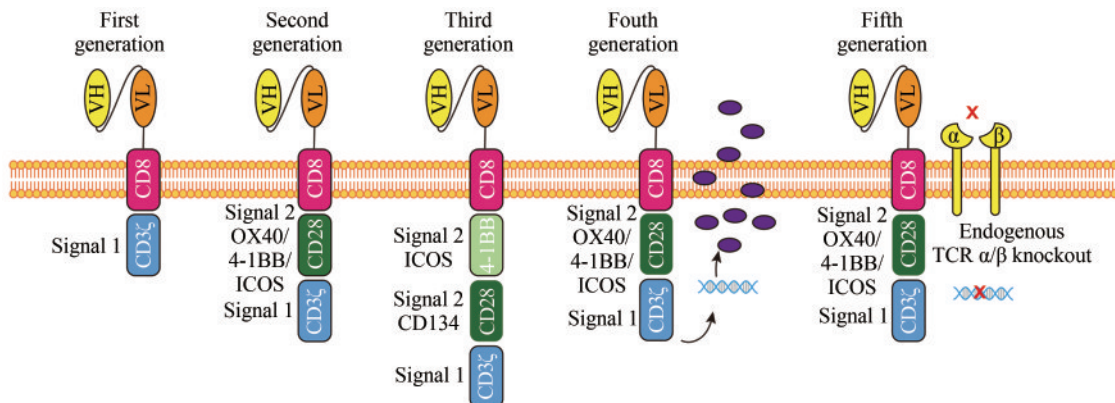


图2 CAR的结构以及发展过程

Fig. 2 CAR structure and development process

的分子标志物出发,实现了从肿瘤组织中准确分离肿瘤抗原特异性T细胞,并快速克隆其TCR,建立了不依赖于靶抗原鉴定的个性化TCR-T技术平台,并开展了IIT(investigator intitate trial)临床试验(NCT03891706),有望为大部分实体肿瘤患者提供疗效更好、安全性更高的个性化TCR-T细胞治疗^[26]。

2.2 CAR-T细胞靶点的选择

CAR-T细胞在血液肿瘤中的成功,与CD19靶点的选择密不可分。然而,CAR-T细胞疗法并不限于CD19靶点,B细胞成熟抗原(B-cell maturation antigen, BCMA)就是另一个在血液肿瘤中获得成功的靶点。基于BCMA的CAR-T细胞疗法(施贵宝和Bluebird共同研发的CAR-T细胞治疗产品Abecma[®])于2021年正式被FDA批准上市,用于治疗之前至少接受过3种治疗(免疫调节剂、蛋白酶体抑制剂和抗CD38抗体)的复发或难治性多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)成人患者^[28]。

越来越多的临床试验开始尝试将CAR-T细胞疗法用于实体瘤,靶点的选择仍然是关键。CAR-T与靶抗原的高亲和力使得其安全风险增高。传统的抗体药物针对的靶点只具备肿瘤特异性,而缺乏肿瘤专一性,因此不适用于CAR-T细胞治疗。由于肿瘤细胞来自正常细胞,很难找到只在肿瘤细胞表达而在正常细胞完全不表达的靶点。目前常见的CAR-T实体瘤靶点包括CEA^[29]、MUC-1^[30]、EGFRv III^[31]和Claudin 18.2^[32]等。EGFRv III是一种肿瘤特异性的突变蛋白,虽然正常细胞不表达,但表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)与EGFRv III的交叉活性反应不能完全避免。提高安全性的主要策略是筛选对EGFRv III高亲和力同时对EGFR低亲和力的scFv^[31]。Claudin 18.2在所有胃癌患者中的阳性率可以达到近60%,靶向它的CAR-T具有更广泛的应用前景,因此大量的临床试验正在开展中^[32]。

此外,由于CAR-T只能识别表面抗原,在实体瘤治疗过程中,极易发生耐药,主要包括以下几个方面:靶抗原丢失(指CAR分子从肿瘤细胞上移除目标抗原,并将其内化,使得肿瘤细胞上

的抗原密度降低);靶抗原的基因突变导致靶标不能被有效识别;靶抗原表位被遮蔽。为了防止发生耐药,可以设计多靶向的CAR分子来增强CAR-T细胞靶向实体肿瘤的特异性,也可以尝试提高scFv与靶抗原的亲和力,可能有助于CAR-T细胞识别低密度的靶抗原,但同时有产生更强烈的细胞因子风暴的风险^[33]。

3 工程化T细胞的亲和力优化

CAR-T和TCR-T的不同原理,使得二者对抗原的亲和力及敏感性也有所不同。CAR-T在结合抗原方面比TCR-T亲和力更高。而在抗原敏感性方面,TCR-T更胜一筹。综合考虑CAR-T和TCR-T的不同毒副作用,在对二者亲和力的优化上也遵循不同的策略。

3.1 TCR-T细胞亲和力的优化

TCR亲和力是指在细胞非依赖性条件下TCR对同源pMHC的物理结合强度^[34]。与靶向病毒或新抗原的TCR相比,经过胸腺选择的天然TCR通常对自身TAA具有较低亲和力,亲和力处于1~100 $\mu\text{mol/L}$ 的TCR会被胸腺筛选并留下来^[35-36]。靶向TAA的低亲和力TCR显示出更安全的特性,但其抗肿瘤反应较弱^[37-39]。此外,肿瘤细胞通过下调细胞表面MHC的表达进一步影响这种低亲和力TCR-T细胞的抗肿瘤效果。增强TCR对靶抗原的亲和力是提高TCR-T细胞识别TAA的方法之一^[35]。几项研究测试了TCR亲和力的最大阈值,以及相应的抗肿瘤免疫反应,显示TCR在 K_d 5~10 $\mu\text{mol/L}$ 时抗肿瘤效果最佳^[40-41]。进一步提高阈值($K_d < 1 \mu\text{mol/L}$)并不能增强T细胞功能,而超生理的TCR亲和力可能导致严重的不良反应^[24, 27],据报道,使用MAGE-A3 TCR-T细胞治疗的患者曾出现致命的心脏毒性^[24],表明开发新的TCR-T细胞需要考虑最佳亲和力,受体亲和力能够决定TCR-T细胞治疗的安全性和有效性。

TCR亲和力可以通过工程化修饰TCR与同源pMHC结合的互补决定区(complementary determining region, CDR)来调节。已开发多种方法来筛选高

亲和力 TCR，包括酵母或噬菌体展示^[42-44]、计算建模^[45-46]以及实验与算法相结合^[47]。但是，修改特定 TCR 的 pMHC 结合区可能导致对自身抗原的严重的交叉反应，并可能导致出现对患者致命的毒性^[24, 48]。因此，已经开发了新的更严格的临床前筛选算法以及更多的临床前试验验证，以规避工程 TCR 在亲和力优化过程中产生的潜在脱靶毒性^[49]。有研究表明，在 TCR 可变区域的非抗原识别位点上改变 3 个氨基酸可以更安全地改善 TCR-T 细胞的功能，经过该修饰的 TCR-T 细胞具有更强的增殖能力、细胞因子产生以及细胞毒性，同时将触发 TCR-T 细胞激活的肽浓度降低了 3000 倍。小鼠过继治疗试验表明，修饰的 TCR 比野生型 TCR 可更有效地控制肿瘤生长^[50]。此外，在 TCR-T 细胞上过表达特异性黏附分子有可能增强 T 细胞与靶细胞的相互作用。例如，在黑色素瘤荷瘤小鼠中，过表达 CD62L 的小鼠 TCR-T 细胞具有更强更持久的抗肿瘤功能^[51]。内源性 TCR 与工程化 TCR 竞争有限的 CD3 信号链会降低工程化 TCR-T 的功能，而将 4 条 CD3 链与转基因 TCR 一起转导可提高 TCR-T 细胞的亲和力^[52]。

3.2 CAR-T 细胞亲和力的优化

CAR 的抗原结合域由源自抗体的 scFv 组成，比天然 TCR 具有更高的亲和力 (K_D 值为 1 nmol/L ~ 1 μ mol/L)。在最佳条件下，CAR 识别靶抗原的能力是 TCR 的 100 倍^[53-55]。CAR 的亲和力与功能之间的关系尚未完全确定，一味地提高亲和力可能导致严重的不良反应。最近的研究发现，简单地修改 CAR-T 中 scFv 的亲和力可以有效降低 CAR-T 的非肿瘤靶向毒性，同时保持其杀伤能力^[56-58]。这为优化 CAR-T 细胞以克服非肿瘤靶向毒性提供了一种重要的思路。

作为研究最多的 TAA 之一，人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 在许多肿瘤中过表达，包括乳腺癌、卵巢癌和多发性胶质母细胞瘤^[56, 59]。赫赛汀 (曲妥珠单抗) 是一种特异性结合 HER2 的单抗，已被批准用于治疗早期 HER2 阳性乳腺癌。研究表明，对赫赛汀耐药的实体瘤如骨肉瘤和乳腺癌仍然可以通

过相同抗体结构域靶向的 CAR-T 细胞消除^[60-61]。但是，赫赛汀和 HER2 CAR-T 细胞均可诱导严重的副作用，如心脏毒性和肺损伤，这与 HER2 低表达于心肌细胞和肺上皮细胞有关^[62]。2015 年，Liu 等^[56]发现赫赛汀 ($4D5$, K_D 0.30 nmol/L) 的靶向突变可产生 3 种 scFv 亲和力降低的变体 (K_D 表示药物与受体的亲和力，其含义是引起最大效应一半时所需的药剂量。 K_D 越大，药物与受体的亲和力越小)，即 4D5-7 (K_D 0.62 nmol/L)、4D5-5 (K_D 1.1 nmol/L) 和 4D5-3 (K_D 4.4 nmol/L)。体外实验中，4D5-7 CAR-T 对高表达和低表达 HER2 的肿瘤细胞均表现出强烈的细胞毒性，而 4D5-5 或 4D5-3 CAR-T 细胞仅对高表达 HER2 的细胞系敏感。此外，体内实验表明 4D5-5 CAR-T 可有效抑制高表达 HER2 的肿瘤生长。因此，将 HER2 scFv 的亲和力从 0.30 nmol/L 降至 4.4 nmol/L 是消除非肿瘤靶向毒性的一种非常实用的解决方案^[56]。另一项研究在小鼠中构建了高表达和低表达 HER2 的肝脏模型来评估不同亲和力 HER2 CAR-T 细胞的非肿瘤靶向毒性^[57]。他们发现 4D5 HER2 CAR-T 细胞对高表达和低表达 HER2 的肝脏都表现出较高的毒性，而 4D5-5 CAR-T 细胞对 HER2 低表达肝脏的损伤减弱。

双唾液酸神经节苷脂 (disialoganglioside, GD2) 是一种表面糖脂抗原，在神经母细胞瘤、黑色素瘤、视网膜母细胞瘤和肉瘤等肿瘤中高表达，但在部分正常组织中低表达^[63-64]。已经开发了几种抗 GD2 单抗来靶向实体瘤，尤其是神经母细胞瘤，但临床试验发现反应率有限，近一半的神经母细胞瘤患者会复发^[65]。此外，抗 GD2 单抗 dinutuximab 可能会导致短暂性神经性疼痛样综合征^[66]。而靶向 GD2 的 CAR-T 细胞已被证实比单克隆抗体有更好的抗肿瘤作用^[67]。Richman 等^[68]用 14G2a 衍生的 scFv (77 nmol/L) 构建了 GD2 CAR-T 细胞，发现其只在体外具有抗肿瘤活性，推测可能是 scFv 的亲和力太低，无法在体内引发强烈的抗肿瘤反应。作者尝试将 scFv 可变结构域之间的短肽 (9 个氨基酸) 延长至 20 个氨基酸，体外实验未发现 CAR-T 细胞的细胞毒性有所改善^[68]。随后，作者将 E101K 点突变引入到 14G2a-scFv 中，以产生更高亲和力的 GD2E101K CAR-T 细胞。在神经母细胞瘤异种移植模型中，这些 GD2E101K CAR-T 细

胞抗肿瘤活性增强,但是伴有严重的中枢神经系统毒性,导致患者死亡^[68]。因此,除了改变亲和力, GD2 CAR的铰链域和共刺激域等其他组件也需要优化。

EGFR与肿瘤复发、新生血管生成和代谢密切相关,在乳腺癌和胶质母细胞瘤等肿瘤中高表达^[69]。EGFR CAR-T细胞已在多个临床试验中证明有效^[70-71],但无法避免对上皮细胞的非肿瘤靶向毒性^[72]。从两种FDA批准的抗EGFR人源化单抗中制备了两种CAR,其中西妥昔单抗(1.8 nmol/L)和尼莫妥单抗(21 nmol/L)的治疗亲和力相差10倍^[58, 73]。体外研究表明,无论EGFR表达情况如何,西妥昔单抗CAR-T细胞都能杀死胶质瘤细胞,而尼莫妥单抗CAR-T选择性地杀伤EGFR高表达的细胞。在体内,西妥昔单抗和尼莫妥单抗CAR-T细胞都可以抑制EGFR高表达胶质瘤的生长,而只有西妥昔单抗CAR-T细胞可以抑制EGFR低表达胶质瘤的生长^[58]。因此,尼莫妥单抗CAR-T细胞能够区分具有不同EGFR表达丰度的细胞,并且选择性地杀伤EGFR高表达的细胞,从而减少非肿瘤靶向毒性。另一项研究也观察到了类似的结果,该研究开发了一组具有不同亲和力的抗EGFR scFv的CAR,包括2224(0.94 nmol/L)、P2-4(15.39 nmol/L)、P3-5(88.24 nmol/L)和C10(263.67 nmol/L)。高亲和力的2224.BBZ和P2-4.BBZ CAR-T细胞对所有EGFR⁺肿瘤均表现出强大的抗肿瘤活性,无论EGFR表达水平如何。相比之下,低亲和力的P3-5.BBZ和C10.BBZ CAR-T细胞对EGFR低表达的肿瘤细胞的杀伤反应比EGFR高表达的肿瘤细胞要弱得多^[56]。

总之,对靶向HER2、GD2或EGFR的CAR-T细胞的研究表明,scFv亲和力的适当降低可能不会显著降低CAR-T的杀伤活性,但可以有效地减轻非肿瘤靶向毒性。除GD2外,上述scFv靶向抗原的最佳亲和力通常在10~5000 nmol/L的范围内。对于GD2 CAR-T细胞,仅调整亲和力是不够的,还需要更多的策略来提升安全性和有效性。

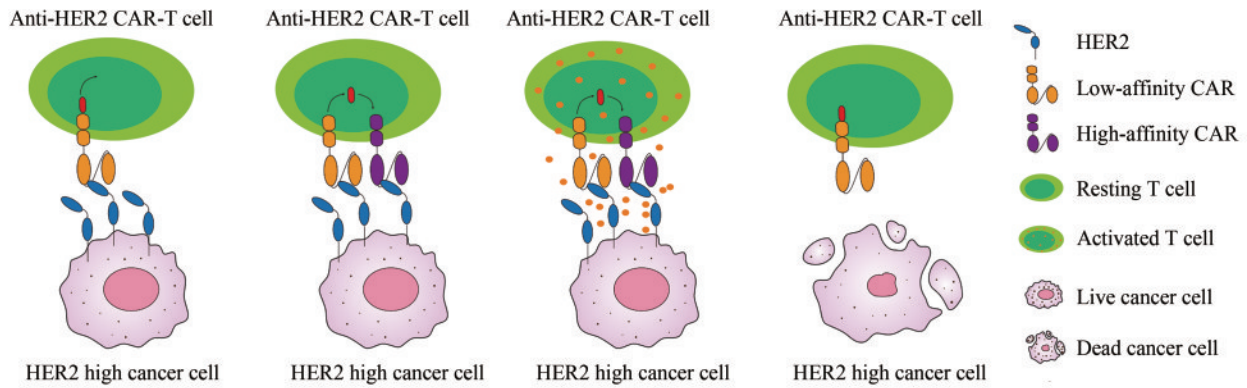
4 工程化T细胞的安全性改造

上文描述了通过调整亲和力来增强TCR-T和

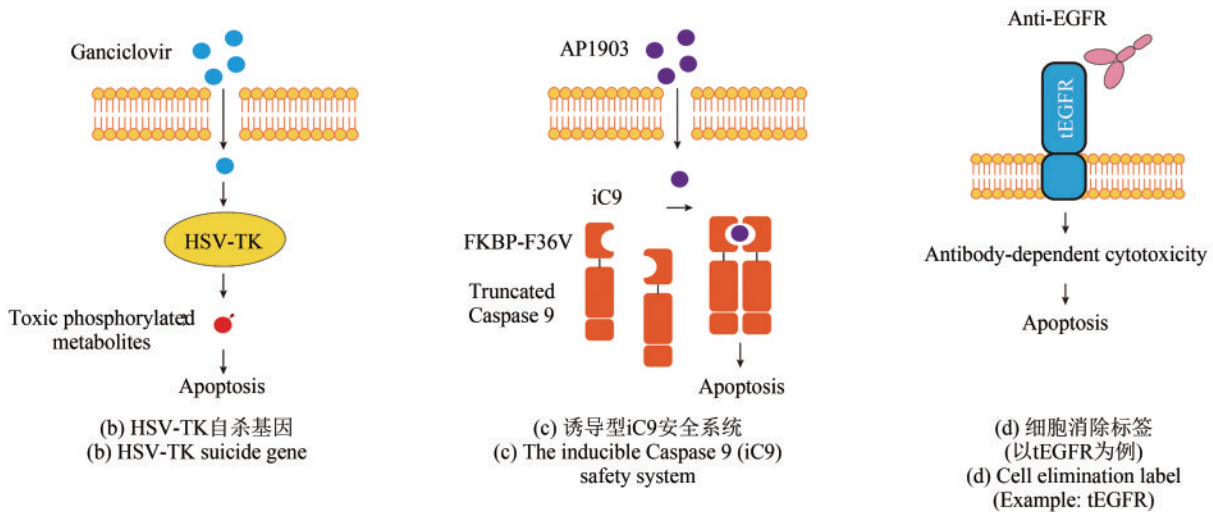
CAR-T细胞的杀伤能力,降低非肿瘤靶向毒性。工程化T细胞也可以通过基因工程的方法,将非肿瘤靶向毒性的损害降至最低,以减轻危及生命的毒性,并在实体肿瘤中取得成功。

最近,Rogelio等^[74]开发了synNotch系统,用于区分不同抗原密度的肿瘤细胞[图3(a)]。synNotch系统包含一种受体,该受体可以通过scFv识别特定的肿瘤抗原,然后激活融合转录因子以诱导转基因的表达,如CAR基因。基于这个“与”逻辑门,CAR-T细胞只能在两种肿瘤抗原都存在的情况下被触发,从而提高CAR-T细胞的特异性。Hernandez-Lopez等^[75]利用synNotch系统两步识别机制,特异性识别并杀死高表达HER-2的癌细胞。Wendell Lim教授团队同样使用synNotch调控系统两步法杀死胶质母细胞瘤。他们首先用部分肿瘤细胞高度特异性表达的EGFRv III使T细胞靶向肿瘤位置;其次,当T细胞识别到EGFRv III抗原时,即启动杀伤抗原反应。CAR-T细胞能够识别EphA2或IL13R α 2时才能激发CAR-T细胞并杀死胶质母细胞瘤细胞。

此外,也可在TCR/CAR-T中转入控制基因序列以控制其活化或凋亡,从而提高治疗的安全性,这些控制基因序列包括单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)自杀基因[图3(b)]、诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iCasp9或iC9)[图3(c)]以及细胞消除标签(cellular elimination tags, CET)[图3(d)]等。通过基因工程表达HSV-TK的T细胞在给予前药更昔洛韦(ganciclovir)后可被特异性消除。HSV-TK将更昔洛韦转化为有毒性的代谢产物,干扰了DNA合成,导致分裂期细胞凋亡。在部分临床研究中,对造血干细胞异体移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)病人输注HSV-TK改造后的淋巴细胞,可以有效控制GVHD并同时增强移植细胞抗白血病效果^[76-78]。尽管使用HSV-TK自杀基因存在作用缓慢(依赖于细胞分裂)、潜在的免疫原性以及前药更昔洛韦的毒性等缺点,HSV-TK仍是迄今为止临床研究最多的基因控制安全系统。另一种安全、可靠并且更快速的基因控制安全系统是药物诱导的iC9安全系统。iC9是一个融合蛋白,由一段修饰的FK506结合蛋白(FKBP-F36V)连接截短的Caspase 9组成^[79]。惰性小分子AP1903



(a) synNotch系统两步识别机制(以HER2 CAR-T细胞为例)
 (a) Two-step recognition mechanism of synNotch system (Example: HER2 CAR-T cells)



(b) HSV-TK自杀基因
 (b) HSV-TK suicide gene

(c) 诱导型iC9安全系统
 (c) The inducible Caspase 9 (iC9) safety system

(d) 细胞消除标签
 (以tEGFR为例)
 (d) Cell elimination label
 (Example: tEGFR)

图3 工程化T细胞的安全控制系统

Fig. 3 Safety control systems for engineered T cells

插入融合蛋白二聚体，激活 Caspase 9，继而启动 Caspase 3 凋亡途径，使工程化 T 细胞发生凋亡。iC9 的激活可以控制工程化 T 细胞的毒性，包括 HSCT 和工程化 T 细胞输注后 GVHD 的发展^[80-81]。此外，由截短标记蛋白（如 tEGFR、tCD20 或 CD34-CD20 融合 RQR8）组成的 CET 通过抗体依赖的细胞毒性实现对工程化 T 细胞安全性的控制^[82-83]。

5 靶向肿瘤微环境的工程策略

肿瘤微环境（tumor microenvironment, TME），即肿瘤细胞生活的环境，其中不仅包括了肿瘤细胞本身，还包括其周围的成纤维细胞、免疫和炎症细胞、胶质细胞等各种细胞，同时也包括附近

区域内的细胞间质、微血管以及浸润在其中的生物分子^[84]。在实体肿瘤中，输注的 T 细胞在 TME 中需要克服多层挑战，是工程化 T 细胞临床有效率低的主要原因^[85]。首先，肿瘤间质主要由肿瘤相关细胞组成，这道物理屏障可以有效阻止 T 细胞浸润^[86]。其次，TME 中缺乏 T 细胞特异性归巢因子，导致 T 细胞无法定向迁移，从而无法识别靶细胞^[87]。再次，TME 缺乏共刺激配体和促免疫细胞因子，这是 T 细胞完全激活并维持功能所必需的（图 1）。最后，在 TME 中，T 细胞抑制配体（免疫检查点）被上调并与 T 细胞上表达的共抑制受体结合，进而抑制 T 细胞的激活。具有免疫抑制功能的细胞（如调节性 T 细胞、肿瘤相关巨噬细胞、髓源性抑制细胞）浸润 TME，也能引起效应 T 细胞的功能抑制^[84]。

在CAR-T细胞治疗领域,学者们很早就意识到共刺激分子的胞内段对过继转移的CAR-T细胞的长期存活以及持久的抗肿瘤活性至关重要^[88-90]。此外,调节TME免疫抑制环境的治疗策略,如使用免疫检查点抑制剂,已成为肿瘤免疫治疗的重要手段,并正在积极研究与其他疗法的组合策略^[91]。在过去几年中,已经开发了各种协同工程策略,目的是增强TCR-T和CAR-T细胞的肿瘤浸润和免疫活性,下面将讨论对TCR-T和CAR-T细胞的功能改造策略,以应对TME带来的挑战。

5.1 改善工程化T细胞的归巢与肿瘤浸润

过继输注的TCR-T或者CAR-T细胞肿瘤浸润率低是恶性实体肿瘤ACT治疗后复发的主要机制^[11]。已有研究尝试通过基因工程手段增强T细胞对肿瘤的定位和浸润能力。例如,Harlin等^[92]研究发现,黑色素瘤TME中通常高表达CXCL8/IL-8,在工程化T细胞上过表达其匹配的趋化因子受体CXCR2可以促进浸润。在人黑色素瘤异种移植小鼠模型中,过表达CXCR2的MAGE-A3 TCR-T细胞肿瘤浸润能力更强^[93]。此外,在恶性胸膜间皮瘤、霍奇金淋巴瘤和神经母细胞瘤的小鼠模型中,CAR-T细胞中CCR2和CCR4的共表达也促进了CAR-T细胞对肿瘤部位的归巢和抗肿瘤功能^[94-96]。

实体肿瘤的另一挑战是肿瘤间质对肿瘤细胞的物理屏蔽,肿瘤间质是肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAF)和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)等组成的异质混合物。过表达ECM降解酶可增强T细胞向肿瘤组织的渗透,用乙酰肝素酶(一种降解ECM硫酸肝素蛋白多糖的酶)改造的GD2 CAR-T细胞可以促进人神经母细胞瘤异种移植小鼠中的CAR-T细胞浸润和抗肿瘤功能^[97]。另一项策略是靶向CAF上表达的成纤维细胞活化蛋白- α (fibroblast activation protein- α , FAP),以消除肿瘤基质从而使T细胞能够浸润到肿瘤部位。在多种小鼠肿瘤模型中,使用靶向FAP的CAR-T细胞显著改善了T细胞浸润,抑制了肿瘤生长^[98-99]。

5.2 工程化T细胞表达共刺激分子

CAR结构中的共刺激结构域为CAR-T细胞提供共刺激信号,是CAR-T细胞在体内产生效应的重要结构。同样,为了解决过继输注的TCR-T细胞持续性有限的问题,可以设计T细胞装载共刺激分子。转基因TCR链可以工程化结合共刺激受体CD28的跨膜区和胞内域以及相连的CD3 ϵ 胞内域^[100]。这些CD28 ϵ TCRs能有效缓解错配,介导共刺激信号并保护内源性TCR功能。尽管CD28 ϵ TCR-T细胞对同源pMHC复合物的识别降低,但在黑色素瘤小鼠模型中的体内扩增能力和持续性都有所增强^[101]。

另一种策略是将转基因TCR与共刺激CAR结合(coCAR),coCAR以类似于CAR的方式设计,但缺乏CD3 ζ 胞内结构域,对靶细胞无杀伤作用^[102-103]。只有当TCR靶向的pMHC和coCAR靶向的细胞表面抗原都同时匹配时,T细胞才能完全活化。目前正在开发的coCAR方法包括CD19-coCAR和CD38-coCAR,通过识别CD19或CD38谱系抗原时增加共刺激信号来增强工程化TCR对血液恶性肿瘤的靶向性^[104]。CD19-coCAR增强了靶向白血病的survivin特异性TCR-T细胞的扩增能力、持久性和抗肿瘤功能,CD38-coCAR增强了NY-ESO-1特异性TCR-T细胞对MM的细胞毒性^[104]。

此外,另一种简单而有效的策略是增加TCR-T细胞中共刺激受体的组成性表达。过表达4-1BB增强了TCR-T细胞的体外和体内抗肿瘤功能,增加了TCR-T细胞攻击肿瘤时细胞因子的产生,同时增强了TCR-T细胞的扩增能力和持久性^[105]。

5.3 工程化T细胞表达细胞因子信号

为了解决过继输注的工程化T细胞存活时间有限的问题,研究者们将共刺激分子和细胞因子信号串联到促血小板生成素受体(c-Mpl)上,然后转导至TCR-T细胞中。该方法利用了c-Mpl的天然特性^[106],即促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)是血液恶性肿瘤患者骨髓微环境中的可溶性因子^[107],因此c-Mpl⁺TCR-T细胞能够以微环境特异性方式被TPO激活。此外,c-Mpl⁺TCR-T细胞也可以使用临床上的c-Mpl激动剂(eltrombopag)药

理学激活。研究发现, TCR-T细胞中的c-Mpl信号具有多种效果, 包括增强T细胞增殖、细胞因子生成、免疫突触形成、体外和体内的长期杀伤活性, 以及保持低分化的表型。

增强TCR-T细胞产生细胞因子的能力也是调节局部免疫抑制性TME的一种重要策略, 有利于增强肿瘤特异性T细胞的持久性和抗肿瘤功能。已经在EBVST、TCR-T和TIL细胞中探索了过表达IL-12对T细胞功能的调节作用^[108-110]。过表达IL-12促进了TCR-T细胞的抗肿瘤功能, 但也导致了一些毒性, 利用活化T细胞核因子或四环素控制的转录激活启动子, 调控IL-12的产生, 则可以克服这些毒性^[110]。与过表达IL-12的TCR-T细胞相比, 另一项在TCR-T细胞过表达IL-18的研究显示出更好的持久性和肿瘤控制效果^[111]。此外, 已经在CAR-T细胞中探索了其他细胞因子, 包括IL-15、IL-21或组成活性IL-7受体等信号的作用^[112-113]。

5.4 逆转共抑制信号

在实体瘤的TME中, 存在许多免疫抑制性细胞因子, 抑制性检查点配体以及免疫抑制性细胞(如髓源性抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞和调节性T细胞)。共表达显性负受体(dominant negative receptors, DNR)既能抑制免疫抑制性细胞信号传导, 又能增强TME中的T细胞功能策略。DNR来源于缺乏胞内信号结构域的截短免疫抑制受体, 并在T细胞上捕获抑制分子而不启动负调节信号。在EBV相关淋巴瘤、前列腺癌或黑色素瘤模型中, 将截短的TGF- β 受体2(TGFBR2)整合到天然或转基因TCR-T细胞中, 赋予了对TGF- β 介导的免疫抑制的抗性, 并增强了TCR-T细胞的增殖、细胞因子产生和抗肿瘤功能^[114-116]。基于截短Fas受体的DNR能够减弱TME中高表达的促凋亡FasL信号。Fas DNR的表达增强了黑色素瘤荷瘤小鼠ACT后pmel-I T细胞的持久性和抗肿瘤功能^[117]。

另一种方法是针对TME细胞上表达的免疫抑制配体设计新型嵌合受体。这些受体被称为嵌合开关受体(chimeric switch receptors, CSR), 可将T细胞抑制信号转化为激活信号^[118]。目前, 已经评估了CTLA-4^[119]、PD-1^[120-121]、TIGIT^[122]、CD200R^[123]和

TGFBR2^[124]这几种CSR。所有这些CSR都利用抑制性受体的胞外结构域, 并与共刺激性受体的胞内结构域连接。基于CTLA-4(CTLA-4:CD28)的CSR促进小鼠pmel-I和OT-1/2 T细胞的IFN- γ 和IL-2分泌, 同时也增强了pmel-I和OT-1/2 T细胞的体内抗肿瘤功能, 但这一现象高度依赖于CD4⁺T细胞的存在, 并与它们的IL-2产生增加有关^[119]。基于PD-1(PD1:CD28)的CSR增强了人MART-1和p53 TCR-T细胞激活时效应细胞因子产生, 并在人黑色素瘤小鼠异种移植模型中促进了转基因TCR-T细胞的增殖和抗肿瘤功能^[120]。但是, 添加4-1BB作为第二共刺激结构域(PD-1:CD28-4-1BB), 并没有增强反而减少了MART-1 TCR-T细胞的细胞因子产生。使用PD-1:CD28 CSR的研究表明, 其过表达对CD4⁺和CD8⁺T细胞同样有益, 并且可以提高人黑色素瘤异种移植模型中靶向酪氨酸酶的TCR的亲合力^[121]。在人黑色素瘤异种移植小鼠模型中, 在人MART-1 TCR-T细胞中表达基于TIGIT(TIGIT:CD28)的CSR, 也增强了MART-1 TCR-T细胞体内抗肿瘤活性以及细胞因子产生^[122]。基于CD200R的CSR(CD200R:CD28)的联合表达改善了白血病模型中TCR-T细胞的功能^[123]。最后, 基于TGFBR2的CSR通过4-1BB(TGFBR2:4-1BB)发出信号, 增强了CAR-T细胞靶向前列腺癌的抗肿瘤功能^[122], 以及NY-ESO-1 TCR-T细胞对黑色素瘤的抗肿瘤作用^[124]。研究表明, 除TGFBR2外, 大多数抑制性受体(CTLA4、PD1、TIGIT和CD200R)单纯的信号结构域截短的诱饵受体变体并未显著改善T细胞功能。

嵌合细胞因子受体(chimeric cytokine receptors, CCR)或开关受体可将一种细胞因子信号转换为另一种细胞因子信号, 目前正在积极探索如何利用肿瘤或肿瘤相关细胞产生的免疫抑制细胞因子, 以向TCR-T或CAR-T细胞提供增殖信号。结合IL-4但激活IL-7信号通路的IL-4/IL-7开关受体可以使PSCA-CAR-T细胞在体外维持增殖能力, 并提高体内抗肿瘤活性^[125]。在原位乳腺癌模型中, IL-4/IL-7开关受体也提高了第二代MUC1-CAR-T细胞的抗肿瘤活性。并且, 这些细胞能够通过IL-4依赖性方式增殖, 从而杀伤肿瘤细胞, 并抑制远端的肿瘤再生。在EBV淋巴瘤异种移植小鼠模型

中, IL-4/IL-7 CCR 使 EBVST 对 IL-4 信号产生抗性, 并大大增强了其肿瘤杀伤能力, 使工程化 T 细胞在 TME 中局部激活^[126]。未来的研究可能会结合几种信号转换模块, 从而最大限度地增强工程化 T 细胞在 TME 中的持久性和适应性。例如, 通过组合靶向前列腺癌的第一代 CAR (信号 1) 与 TGFBR2: 4-1BB CSR (信号 2) 和 IL-4/7R CCR (信号 3), 使工程化 T 细胞以 TME 特异性方式分裂增殖, 从而实现在胰腺癌小鼠模型中抑制肿瘤生长^[127]。

6 工程化 T 细胞的基因编辑策略

目前, 许多工程化 T 细胞仍使用病毒载体来递送目的基因。逆转录病毒或慢病毒转导的缺点是目的基因插入基因组的位置和拷贝数是随机的, 导致产生的工程化 T 细胞目的基因的表达水平不可控, 而精准基因编辑技术提供了将转基因精确整合到特定基因位点的可能性^[128-129]。基因编辑在工程 T 细胞治疗领域的应用是多方面的, 包括: ①敲除内源性 TCR 和 MHC, 产生同种异体的通用供体 T 细胞^[130]; ②敲除内源性 TCR 可以增强转入的转基因 TCR 的表达和功能, 并避免交叉反应^[131-132]; ③敲除免疫抑制受体以获得对免疫抑制信号的抗性^[133-134]; ④将 CAR 或 TCR 精准插入到 TCR 基因座, 利用生理调节 CAR 或 TCR 基因的表达, 同时消除内源性 TCR 特异性^[135-136]; ⑤可编程基因线路实现对 TCR-T/CAR-T 的可控调节; ⑥发现免疫工程的新靶点^[124, 137]等。

6.1 核酸酶介导的内源性 TCR 敲除

敲除内源性 TCR 可以减少 TCR-T 的交叉反应, 增强 TCR-T 的安全性。多种核酸酶被开发作为敲除内源性 TCR 的编辑工具, 通过诱导双链 DNA 断裂或 DNA 修复来破坏内源性 TCR 位点。这些工具酶包括归巢核酸内切酶、锌指核酸酶 (zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN)、megaTAL 核酸酶以及 CRISPR/Cas9 等。

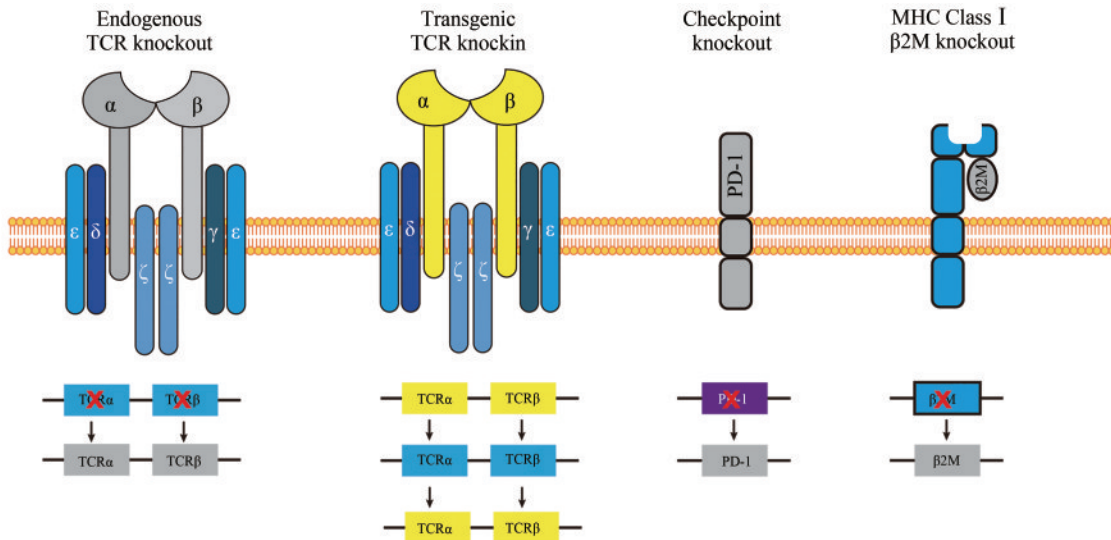
为了敲除内源性 TCR, Provasi 等^[131]在慢病

毒转导 WT-1 TCR 基因的同时, 使用 ZFN 敲除了 T 细胞内源性 TRAC、TRBC1 和 TRBC2 基因, 发现敲除内源 TRAC/TRBC 的 TCR-T 细胞亲和力提高, 抗肿瘤功能增强, 并且非特异反应显著降低。这项研究表明敲除内源性 TRAC 和 TRBC 位点可通过避免 TCR 错配, 显著提高 TCR-T 细胞安全性, 并增强 TCR-T 细胞的亲和力和抗肿瘤功能。随后, 该团队进一步研究证明, 基于 ZFN 的 TRAC 单基因敲除联合慢病毒转导外源 TCR 足以产生安全且有效的肿瘤靶向 TCR-T 细胞, 并且更适用于临床转化^[138]。TALEN、归巢核酸内切酶、megaTAL 核酸酶和 CRISPR/Cas9 系统也同样被用于敲除工程化 TCR-T 的内源性 TRAC 和/或 TRBC 基因^[139-141]。此外, 有研究表明, 使用 CRISPR/Cas9 敲除 TRBC1/2 的 $\gamma\delta$ -TCR 细胞也具有更强的抗肿瘤能力^[142]。

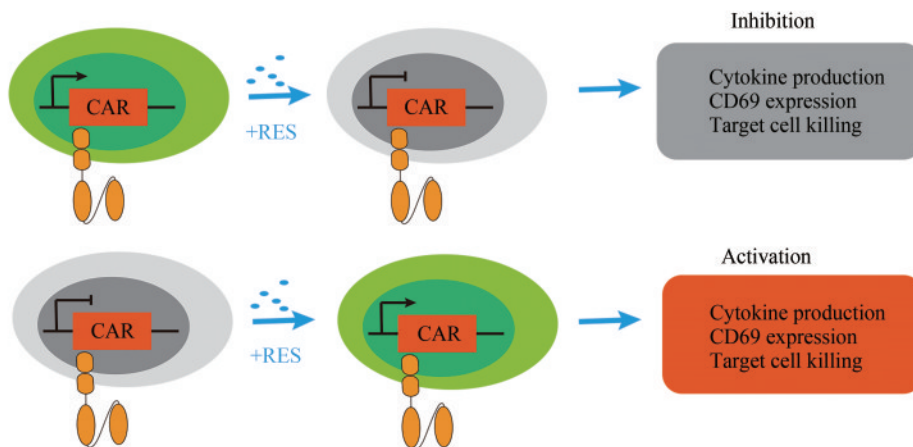
6.2 基于 CRISPR/Cas9 的多重基因编辑技术

为了增强 TCR-T 和 CAR-T 细胞对免疫微环境中 PD-1 等抑制信号的抗性, Ren 等^[143]开发了一种基于 CRISPR/Cas9 的多重编辑方法 [图 4(a)], 使用 CRISPR/Cas9 同时敲除 T 细胞的 TRAC、TRBC、 β 2-微球蛋白和 PDCD1 基因, 再慢病毒转导 CAR 基因, PD-1 的敲除进一步提高了临床前模型中 CAR-T 细胞的抗肿瘤活性^[143]。同样已有研究报道在 CAR-T 细胞中敲除其他免疫检查点, 包括单独敲除 CTLA-4 或同时敲除 PD-1 与 LAG-3, 均可以增强 CAR-T 细胞的功能^[143-144]。

另一项旨在治疗晚期难治性肉瘤和 MM 患者的 I 期临床实验使用了 CRISPR/Cas9 敲除 TRAC、TRBC 和 PDCD1 位点的 NY-ESO-1 特异性 TCR-T 细胞^[145]。该研究希望通过多基因编辑提高 NY-ESO-1 TCR-T 细胞的安全性和有效性, 并延缓 NY-ESO-1 TCR-T 细胞的耗竭。研究发现, 使用 CRISPR/Cas9 对 TCR-T 细胞进行多基因编辑是安全且可行的, 多基因编辑后的 TCR-T 细胞比只转入 NY-ESO-1 TCR 的细胞持久性增强, 且尚未观察到转入 Cas9 基因产生的脱靶相关副作用, 但是, 对其安全性的评估还需要更长时间的随访以及更多的受试者^[145]。



(a) 基于CRISPR/Cas9的多重基因编辑技术
(a) Multiple gene editing technology based on CRISPR/Cas9



(b) 可编程基因线路实现对TCR-T/CAR-T的可控调节
(b) Regulation of TCR-T/CAR-T cells based on programmable gene circuit

图4 工程化T细胞的基因编辑策略

RES—白藜芦醇; β 2M— β 2-微球蛋白

Fig. 4 Genome editing strategies for engineered T cells

RES—Resveratrol; β 2M— β 2-microglobulin

6.3 将外源CAR/TCR递送至内源TCR位点

将CAR或者外源TCR转基因靶向插入到内源性TCR位点,可以实现生理性的调节CAR/TCR表达以增强反应性并防止耗竭。利用DNA同源重组可以将外源CAR/TCR特异性插入到目标基因组位点^[146]。腺相关病毒6(AAV6)转导基于CRISPR的CD19 CAR基因靶向整合到TRAC位点,可使CAR表达更稳定,增强CAR-T细胞的体外和体内

抗肿瘤功能,同时消除内源性TCR交叉反应^[135]。与组成性启动子相比,将CAR基因置于内源TCR启动子的控制下,抗原刺激时CAR表达和转运会更符合生理状态,从而延缓CAR-T细胞的耗竭^[135]。此外, MegaTAL和AAV6介导的CAR插入TRAC或CCR5基因座也能产生相似的结果^[147-148]。

CRISPR技术还可用于设计人工T细胞信号通路,利用特定信号通路的转录调节来增强抗肿瘤T细胞功能。例如,将IL-12p70插入IL-2R α 或

PDCD1 基因位点, 产生的 T 细胞受抗原刺激后可以产生 IL-12p70, 从而增强抗肿瘤功能, 且无明显毒性^[149]。因此, 利用特定位点的转录调控系统可以严格控制转入基因的表达, 增强功能性 T 细胞的安全性和特异性。

6.4 可编程基因线路实现对 TCR-T/CAR-T 的可控调节

不可控性一直是 CAR-T 细胞治疗的一大风险。CAR-T 细胞不受控地增殖会触发细胞因子释放综合征 (cytokine release syndrome, CRS), 这种炎症因子在体内的大量释放会导致从轻度发烧到危及生命的器官衰竭等多种毒性。合成生物学的优势之一就是可编程的基因线路, 小分子化合物、生物大分子、光、热、磁等都可以作为开关, 调控 CAR-T 或者 TCR-T 细胞的激活。

近日, 华东师范大学生命科学学院叶海峰教授团队^[150]在《美国科学院院刊》(PNAS) 上刊文, 构建了一种白藜芦醇调控转基因表达的转录调控系统, 通过白藜芦醇调控 T 细胞中 CAR 的表达与抑制, 从而实现可控的 CAR-T 细胞免疫治疗 [图 4(b)]。叶海峰团队以白藜芦醇作为开关分子设计了两种 CAR-T 细胞, 分别包含可以控制 CAR-T 细胞失活和激活的基因线路, 对应两种不同的应用场景。当 CAR-T 细胞在体内过度激活, 产生 CRS 等副作用时, 白藜芦醇可启动使细胞失活的基因线路, 将其沉默; 反之, 可以先注射失活的 CAR-T 细胞, 再通过白藜芦醇进行浓度依赖性的激活^[150]。另一项研究发现, 将对紫外光敏感的小分子与肿瘤靶向抗体偶联, 可作为小分子特异性 CAR-T 细胞的开关。在暴露于紫外线下时, 小分子被打开, 激活 CAR-T 细胞介导的肿瘤细胞杀伤。这种双正交开环策略 (biorthogonal open-loop strategy) 可以实现对 CAR-T 细胞的肿瘤细胞杀伤的时间和空间控制^[151]。

6.5 新型工程靶点的筛选

维持过继转移的工程化 T 细胞在体内的持续存活和功能仍然是当前工程化 T 细胞疗法的主要目标之一。破坏 T 细胞的不同基因位点, 可以发现未来

调控工程化 T 细胞在体内持续存活和功能的新型工程靶点。

Nobles 等^[152]对输注至 CLL 患者的 CD19 CAR-T 细胞的载体整合位点进行系统分析, 发现应答者与非应答者的 CAR 整合破坏的基因位点不同, 其中一位患者症状完全缓解, 归因于 CAR 转基因的插入导致其 TET2 基因座被破坏^[153]。此外, 基于 CRISPR 的大规模基因敲除与体外杀伤试验的结合揭示了大量增强 TCR-T 细胞抗肿瘤功能的基因, 包括已知基因 (*TCEB2*、*SOCS1* 和 *CBLB*) 和新调控基因 (*RASA2*)^[154]。另一项研究基于工程化 T 细胞的体内浸润程度筛选出一个新靶点 *Dhx37*, 并发现敲除 TCR-T 细胞中 *Dhx37* 基因可以显著增强 TCR-T 细胞对三阴性乳腺癌小鼠模型的肿瘤抑制^[137]。使用 CRISPR 过表达文库可以筛选改善 TCR-T 细胞功能的基因, 结合体外和体内实验验证发现 *TGFBR2-4-1BB* 增强了人黑色素瘤异种移植小鼠模型中 NY-ESO-1 TCR-T 细胞的抗肿瘤功能^[124]。因此, 使用大规模 CRISPR 基因敲除文库或过表达文库是未来筛选工程化 T 细胞新靶点的重要研究手段。

7 结 语

近 5 年的临床数据表明, 工程化 T 细胞治疗进入了黄金发展时期。基础免疫学的进步为合成免疫学的发展提供了信息, 提供了大量增强工程化 T 细胞效能的改造策略。尽管工程化 T 细胞在实体瘤治疗领域取得了一定的成功, 但是在广泛用于实体瘤治疗时, 仍有大量问题亟待解决。

对于输注的工程化 T 细胞, 必须考虑与质量、数量等有关的基因修饰机制。增加工程化 T 细胞质量的一个有效解决方案是扩增更明确的功能性细胞亚群, 如中央和/或效应记忆亚群、病毒特异性 T 细胞, 或来自干细胞前体的工程化 T 细胞。通过输注少量工程化 T 细胞, 可以产生更有效、更持久的抗肿瘤活性^[155-156], 这表明输注的细胞产品质量而不是数量是有效抗肿瘤的关键因素。

选择合适的靶抗原和转基因 TCR/CAR 序列仍然是成功的基础和关键, 是研究的重点。用于 TCR-T 的有效且安全的肽抗原靶点非常有限。随

着下一代测序技术的发展,特别是单细胞转录组测序、TCR测序和成熟的体外验证方法,以个性化新抗原为靶点的TCR-T免疫治疗在未来将成为一种流行的癌症治疗方法。此外,新出现的TAA类别,也可能构成未来TCR-T细胞治疗的可行靶标。

此外,如何克服肿瘤微环境中存在的抑制因素(增强T细胞归巢、浸润、增殖、持久性、效应功能和调节TME成分);是否有可能提高体内肿瘤部位的TCR工程化T细胞的寿命(增强记忆细胞的产生);能否识别出有效的TCR工程T细胞混合物,包括针对不同抗原表位的不同类型的抗原特异性T细胞(本课题组开发的多靶点个性化TCR-T治疗),这些问题的解决将进一步促进工程化T细胞在实体肿瘤领域的应用。

未来的发展可能会利用多疗法组合策略来克服肿瘤带来的诸多挑战。随着基础免疫学和合成生物学的发展,新的不同的工程化改造策略将为泛实体肿瘤的工程化T细胞疗法带来重大突破。

参 考 文 献

- [1] ROSENBERG S A, PACKARD B S, AEBERSOLD P M, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1988, 319(25): 1676-1680.
- [2] WATANABE K, NISHIKAWA H. Engineering strategies for broad application of TCR-T- and CAR-T-cell therapies[J]. *International Immunology*, 2021, 33(11): 551-562.
- [3] WEBER E W, MAUS M V, MACKALL C L. The emerging landscape of immune cell therapies[J]. *Cell*, 2020, 181(1): 46-62.
- [4] GRUPP S A, KALOS M, BARRETT D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2013, 368(16): 1509-1518.
- [5] KERSTEN M J, SPANJAART A M, THIEBLEMONT C. CD19-directed CAR T-cell therapy in B-cell NHL[J]. *Current Opinion in Oncology*, 2020, 32(5): 408-417.
- [6] MULLARD A. FDA approves fourth CAR-T cell therapy[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(3): 166.
- [7] ANDERSON, A K, STROMNES I M, GREENBERG P D. Obstacles posed by the tumor microenvironment to T cell activity: a case for synergistic therapies[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(3): 311-325.
- [8] LARSON R C, MAUS M V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2021, 21(3): 145-161.
- [9] NISHIKAWA H, MAEDA Y, ISHIDA T, et al. Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma[J]. *Blood*, 2012, 119(13): 3097-3104.
- [10] JUNGBLUTH A A, ANTONESCU C R, BUSAM K J, et al. Monophasic and biphasic synovial sarcomas abundantly express cancer/testis antigen NY-ESO-1 but not MAGE-A1 or CT7[J]. *International Journal of Cancer*, 2001, 94(2): 252-256.
- [11] D'ANGELO S P, MELCHIORI L, MERCHANT M S, et al. Antitumor activity associated with prolonged persistence of adoptively transferred NY-ESO-1⁺ T cells in synovial sarcoma[J]. *Cancer Discovery*, 2018, 8(8): 944-957.
- [12] CHEN L P, FLIES D B. Molecular mechanisms of T cell costimulation and co-inhibition[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13(4): 227-242.
- [13] RAEBER M E, ZURBUCHEN Y, IMPELLIZZIERI D, et al. The role of cytokines in T-cell memory in health and disease[J]. *Immunological Reviews*, 2018, 283(1): 176-193.
- [14] DRIESSENS G, KLINE J, GAJEWSKI T F. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity[J]. *Immunological Reviews*, 2009, 229(1): 126-144.
- [15] GLOBERSON LEVIN A, RIVIÈRE I, ESHHAR Z, et al. CAR T cells: building on the CD19 paradigm[J]. *European Journal of Immunology*, 2021, 51(9): 2151-2163.
- [16] STERNER R C, STERNER R M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies[J]. *Blood Cancer Journal*, 2021, 11: 69.
- [17] JAYARAMAN J, MELLODY M P, HOU A J, et al. CAR-T design: elements and their synergistic function[J]. *EBioMedicine*, 2020, 58: 102931.
- [18] CHEEVER M A, ALLISON J P, FERRIS A S, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research[J]. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(17): 5323-5337.
- [19] COULIE P G, VAN DEN EYNDE B J, VAN DER BRUGGEN P, et al. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2014, 14(2): 135-146.
- [20] GUBIN M M, ARTYOMOV M N, MARDIS E R, et al. Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer im-

- munotherapy[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2015, 125(9): 3413-3421.
- [21] SMITH C C, SELITSKY S R, CHAI S J, et al. Alternative tumour-specific antigens[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2019, 19(8): 465-478.
- [22] RAPOPORT A P, STADTMAUER E A, BINDER-SCHOLL G K, et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma[J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(8): 914-921.
- [23] KAGEYAMA S, IKEDA H, MIYAHARA Y, et al. Adoptive transfer of MAGE-A4 T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with recurrent esophageal cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2015, 21(10): 2268-2277.
- [24] MORGAN R A, CHINNASAMY N, ABATE-DAGA D, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy[J]. *Journal of Immunotherapy*, 2013, 36(2): 133-151.
- [25] MORGAN R A, DUDLEY M E, WUNDERLICH J R, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes[J]. *Science*, 2006, 314(5796): 126-129.
- [26] HE J J, XIONG X X, YANG H, et al. Defined tumor antigen-specific T cells potentiate personalized TCR-T cell therapy and prediction of immunotherapy response[J]. *Cell Research*, 2022, 32(6): 530-542.
- [27] PARKHURST M R, YANG J C, LANGAN R C, et al. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis[J]. *Molecular Therapy*, 2011, 19(3): 620-626.
- [28] SHAH N, CHARI A, SCOTT E, et al. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches[J]. *Leukemia*, 2020, 34(4): 985-1005.
- [29] HAN Z W, LYV Z W, CUI B, et al. The old CEACAMs find their new role in tumor immunotherapy[J]. *Investigational New Drugs*, 2020, 38(6): 1888-1898.
- [30] YAMASHITA N, KUFEL D. Addiction of cancer stem cells to MUC1-C in triple-negative breast cancer progression[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(15): 8219.
- [31] KARSCHNIA P, TESKE N, THON N, et al. Chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma: current concepts, challenges, and future perspectives[J]. *Neurology*, 2021, 97(5): 218-230.
- [32] CAO W J, XING H Z, LI Y M, et al. Claudin18.2 is a novel molecular biomarker for tumor-targeted immunotherapy[J]. *Biomarker Research*, 2022, 10(1): 38.
- [33] HONG M H, CLUBB J D, CHEN Y Y. Engineering CAR-T cells for next-generation cancer therapy[J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(4): 473-488.
- [34] STONE J D, CHERVIN A S, KRANZ D M. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity[J]. *Immunology*, 2009, 126(2): 165-176.
- [35] ALEKSIC M, LIDDY N, MOLLOY P E, et al. Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors: implications for therapeutic strategies[J]. *European Journal of Immunology*, 2012, 42(12): 3174-3179.
- [36] SCHUMACHER T N, SCHREIBER R D. Neoantigens in cancer immunotherapy[J]. *Science*, 2015, 348(6230): 69-74.
- [37] STONE J D, KRANZ D M. Role of T cell receptor affinity in the efficacy and specificity of adoptive T cell therapies[J]. *Frontiers in Immunology*, 2013, 4: 244.
- [38] WILLIAMS C M, SCHONNESEN A A, ZHANG S Q, et al. Normalized synergy predicts that CD8 co-receptor contribution to T cell receptor (TCR) and pMHC binding decreases as TCR affinity increases in human viral-specific T cells[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 894.
- [39] SHARMA P, HARRIS D T, STONE J D, et al. T-cell receptors engineered *de novo* for peptide specificity can mediate optimal T-cell activity without self cross-reactivity[J]. *Cancer Immunology Research*, 2019, 7(12): 2025-2035.
- [40] TAN M P, GERRY A B, BREWER J E, et al. T cell receptor binding affinity governs the functional profile of cancer-specific CD8⁺ T cells[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2015, 180(2): 255-270.
- [41] SCHMID D A, IRVING M B, POSEVITZ V, et al. Evidence for a TCR affinity threshold delimiting maximal CD8 T cell function[J]. *Journal of Immunology*, 2010, 184(9): 4936-4946.
- [42] HOLLER P D, HOLMAN P O, SHUSTA E V, et al. *In vitro* evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(10): 5387-5392.
- [43] LI Y, MOYSEY R, MOLLOY P E, et al. Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display[J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(3): 349-354.
- [44] DUNN S M, RIZKALLAH P J, BASTON E, et al. Directed evolution of human T cell receptor CDR2 residues by phage display dramatically enhances affinity for cognate peptide-MHC without increasing apparent cross-reactivity[J]. *Protein Science*, 2006, 15(4): 710-721.
- [45] ZOETE V, IRVING M, FERBER M, et al. Structure-based, rational design of T cell receptors[J]. *Frontiers in Immunology*, 2013, 4: 268.

- [46] PIERCE B G, HELLMAN L M, HOSSAIN M, et al. Computational design of the affinity and specificity of a therapeutic T cell receptor[J]. *PLoS Computational Biology*, 2014, 10(2): e1003478.
- [47] HARRIS D T, WANG N Y, RILEY T P, et al. Deep mutational scans as a guide to engineering high affinity T cell receptor interactions with peptide-bound major histocompatibility complex[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(47): 24566-24578.
- [48] 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.
- [49] SANDERSON J P, CROWLEY D J, WIEDERMANN G E, et al. Preclinical evaluation of an affinity-enhanced MAGE-A4-specific T-cell receptor for adoptive T-cell therapy[J]. *OncoImmunology*, 2020, 9(1): 1682381.
- [50] THOMAS S, MOHAMMED F, REIJMERS R M, et al. Framework engineering to produce dominant T cell receptors with enhanced antigen-specific function[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4451.
- [51] WATSON H A, DURAIRAJ R R P, OHME J, et al. L-selectin enhanced T cells improve the efficacy of cancer immunotherapy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1321.
- [52] AHMADI M, KING J W, XUE S A, et al. CD3 limits the efficacy of TCR gene therapy *in vivo*[J]. *Blood*, 2011, 118(13): 3528-3537.
- [53] WATANABE K, TERAOKA S, MARTENS A C, et al. Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 ζ chimeric antigen receptor-modified effector CD8⁺ T cells[J]. *Journal of Immunology*, 2015, 194(3): 911-920.
- [54] IRVINE D J, PURBHOO M A, KROGSGAARD M, et al. Direct observation of ligand recognition by T cells[J]. *Nature*, 2002, 419(6909): 845-849.
- [55] HUANG J, BRAMESHUBER M, ZENG X, et al. A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4⁺ T cells[J]. *Immunity*, 2013, 39(5): 846-857.
- [56] LIU X J, JIANG S G, FANG C Y, et al. Affinity-tuned ErbB2 or EGFR chimeric antigen receptor T cells exhibit an increased therapeutic index against tumors in mice[J]. *Cancer Research*, 2015, 75(17): 3596-3607.
- [57] CASTELLARIN M, SANDS C, DA T, et al. A rational mouse model to detect on-target, off-tumor CAR T cell toxicity[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(14): e136012.
- [58] CARUSO H G, HURTON L V, NAJJAR A, et al. Tuning sensitivity of CAR to EGFR density limits recognition of normal tissue while maintaining potent antitumor activity[J]. *Cancer Research*, 2015, 75(17): 3505-3518.
- [59] AHMED N, SALSAMAN V S, KEW Y, et al. HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors[J]. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16(2): 474-485.
- [60] SZÖÖR, Á, TÓTH G, ZSEBIK B, et al. Trastuzumab derived HER2-specific CARs for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer: CAR T cells penetrate and eradicate tumors that are not accessible to antibodies[J]. *Cancer Letters*, 2020, 484: 1-8.
- [61] AHMED N, SALSAMAN V S, YVON E, et al. Immunotherapy for osteosarcoma: genetic modification of T cells overcomes low levels of tumor antigen expression[J]. *Molecular*, 2009, 17(10): 1779-1787.
- [62] HUSZNO J, LEŚ D, SARZYCZNY-SŁOTA D, et al. Cardiac side effects of trastuzumab in breast cancer patients-single center experiences[J]. *Contemporary Oncology*, 2013, 17(2): 190-195.
- [63] SUJJITJOON J, SAYOUR E, TSAO S T, et al. GD2-specific chimeric antigen receptor-modified T cells targeting retinoblastoma-assessing tumor and T cell interaction[J]. *Translational Oncology*, 2021, 14(2): 100971.
- [64] GOLINELLI G, GRISENDI G, PRAPA M, et al. Targeting GD2-positive glioblastoma by chimeric antigen receptor empowered mesenchymal progenitors[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2020, 27(7): 558-570.
- [65] YU A L, GILMAN A L, OZKAYNAK F M, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2010, 363(14): 1324-1334.
- [66] ARI P, KARS M, MEANY H, et al. Treatment of transient peripheral neuropathy during chimeric 14.18 antibody therapy in children with neuroblastoma: a case series[J]. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 2018, 40(2): e113-e116.
- [67] NAZHA B, INAL C, OWONIKOKO T K. Disialoganglioside GD2 expression in solid tumors and role as a target for cancer therapy[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 1000.
- [68] RICHMAN S A, NUNEZ-CRUZ S, MOGHIMI B, et al. High-affinity GD2-specific CAR T cells induce fatal encephalitis in a preclinical neuroblastoma model[J]. *Cancer Immunology Research*, 2018, 6(1): 36-46.
- [69] KE E E, WU Y L. EGFR as a pharmacological target in *EGFR*-

- mutant non-small-cell lung cancer: where do we stand now?[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2016, 37(11): 887-903.
- [70] LI H, HUANG Y, JIANG D Q, et al. Antitumor activity of EGFR-specific CAR T cells against non-small-cell lung cancer cells *in vitro* and in mice[J]. Cell Death & Disease, 2018, 9: 177.
- [71] GUO Y L, FENG K C, LIU Y, et al. Phase I study of chimeric antigen receptor-modified T cells in patients with EGFR-positive advanced biliary tract cancers[J]. Clinical Cancer Research, 2018, 24(6): 1277-1286.
- [72] LIU Y, GUO Y L, WU Z Q, et al. Anti-EGFR chimeric antigen receptor-modified T cells in metastatic pancreatic carcinoma: a phase I clinical trial[J]. Cytotherapy, 2020, 22(10): 573-580.
- [73] PEREZ R, MORENO E, GARRIDO G, et al. EGFR-targeting as a biological therapy: understanding nimotuzumab's clinical effects[J]. Cancers, 2011, 3(2): 2014-2031.
- [74] HERNANDEZ-LOPEZ R A, YU W, CABRAL K A, et al. T cell circuits that sense antigen density with an ultrasensitive threshold[J]. Science, 2021, 371(6534): 1166-1171.
- [75] HYRENIUS-WITTSTEN A, SU Y, PARK M, et al. SynNotch CAR circuits enhance solid tumor recognition and promote persistent antitumor activity in mouse models[J]. Science Translational Medicine, 2021, 13(591): eabd8836.
- [76] BONINI C, FERRARI G, VERZELETTI S, et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia[J]. Science, 1997, 276(5319): 1719-1724.
- [77] TRAVERSARI C, MARKTEL S, MAGNANI Z, et al. The potential immunogenicity of the TK suicide gene does not prevent full clinical benefit associated with the use of TK-transduced donor lymphocytes in HSCT for hematologic malignancies[J]. Blood, 2007, 109(11): 4708-4715.
- [78] GRECO R, OLIVEIRA G, STANGHELLINI M T L, et al. Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene[J]. Frontiers in Pharmacology, 2015, 6: 95.
- [79] STRAATHOF K C, PULÈ M A, YOTNDA P, et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy[J]. Blood, 2005, 105(11): 4247-4254.
- [80] DI STASI A, TEY S K, DOTTI G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy[J]. The New England Journal of Medicine, 2011, 365(18): 1673-1683.
- [81] ZHOU X O, DOTTI G, KRANCE R A, et al. Inducible caspase-9 suicide gene controls adverse effects from alloplete T cells after haploidentical stem cell transplantation[J]. Blood, 2015, 125(26): 4103-4113.
- [82] VOGLER I, NEWRZELA S, HARTMANN S, et al. An improved bicistronic CD20/tCD34 vector for efficient purification and *in vivo* depletion of gene-modified T cells for adoptive immunotherapy[J]. Molecular Therapy, 2010, 18(7): 1330-1338.
- [83] PHILIP B, KOKALAKI E, MEKKAOU L, et al. A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy[J]. Blood, 2014, 124(8): 1277-1287.
- [84] BINNEWIES M, ROBERTS E W, KERSTEN K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy[J]. Nature Medicine, 2018, 24(5): 541-550.
- [85] D'ALOIA M M, ZIZZARI I G, SACCHETTI B, et al. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors[J]. Cell Death & Disease, 2018, 9: 282.
- [86] LANITIS E, DANGAJ D, IRVING M, et al. Mechanisms regulating T-cell infiltration and activity in solid tumors[J]. Annals of Oncology, 2017, 28(suppl_12): xii18-xii32.
- [87] NAGARSHETH N, WICHA M S, ZOU W P. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy[J]. Nature Reviews Immunology, 2017, 17(9): 559-572.
- [88] MAHER J, BRENTJENS R J, GUNSET G, et al. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20(1): 70-75.
- [89] KAWALEKAR O U, O'CONNOR R S, FRAIETTA J A, et al. Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells[J]. Immunity, 2016, 44(2): 380-390.
- [90] WEINKOVE R, GEORGE P, DASYAM N, et al. Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations[J]. Clinical & Translational Immunology, 2019, 8(5): e1049.
- [91] GROSSER R, CHERKASSKY L, CHINTALAN, et al. Combination immunotherapy with CAR T cells and checkpoint blockade for the treatment of solid tumors[J]. Cancer Cell, 2019, 36(5): 471-482.
- [92] HARLIN H, MENG Y R, PETERSON A C, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8⁺ T-cell recruitment[J]. Cancer Research, 2009, 69(7): 3077-3085.
- [93] IDORN M, SKADBORG S K, KELLERMANN L, et al. Chemokine receptor engineering of T cells with CXCR2 improves homing towards subcutaneous human melanomas in xenograft mouse model[J]. OncoImmunology, 2018, 7(8): e1450715.
- [94] 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.
- [95] 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]. *Journal of Immunotherapy*, 2010, 33(8): 780-788.
- [96] MOON E K, CARPENITO C, SUN J, et al. Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and tumor eradication by retargeted human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor[J]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17(14): 4719-4730.
- [97] CARUANA I, SAVOLDO B, HOYOS V, et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirectioned T lymphocytes[J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(5): 524-529.
- [98] SCHUBERTH P C, HAGEDORN C, JENSEN S M, et al. Treatment of malignant pleural mesothelioma by fibroblast activation protein-specific re-directed T cells[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2013, 11: 187.
- [99] WANG L C S, LO A, SCHOLLER J, et al. Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity[J]. *Cancer Immunology Research*, 2014, 2(2): 154-166.
- [100] GOVERS C, SEBESTYÉN Z, ROSZIK J, et al. TCRs genetically linked to CD28 and CD3 ϵ do not mispair with endogenous TCR chains and mediate enhanced T cell persistence and anti-melanoma activity[J]. *Journal of Immunology*, 2014, 193(10): 5315-5326.
- [101] STONE J D, HARRIS D T, SOTO C M, et al. A novel T cell receptor single-chain signaling complex mediates antigen-specific T cell activity and tumor control[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2014, 63(11): 1163-1176.
- [102] KLOSS C C, CONDOMINES M, CARTELLIERI M, et al. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(1): 71-75.
- [103] LANITIS E, POUSSIN M, KLATTENHOFF A W, et al. Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity *in vivo*[J]. *Cancer Immunology Research*, 2013, 1(1): 43-53.
- [104] OMER B, CARDENAS M G, PFEIFFER T, et al. A costimulatory CAR improves TCR-based cancer immunotherapy[J]. *Cancer Immunology Research*, 2022, 10(4): 512-524.
- [105] DANIEL-MESHULAM I, HOROVITZ-FRIED M, COHEN C J. Enhanced antitumor activity mediated by human 4-1BB-engineered T cells[J]. *International Journal of Cancer*, 2013, 133(12): 2903-2913.
- [106] NISHIMURA C D, BRENNER D A, MUKHERJEE M, et al. c-MPL provides tumor-targeted T-cell receptor-transgenic T cells with costimulation and cytokine signals[J]. *Blood*, 2017, 130(25): 2739-2749.
- [107] MÉNDEZ-FERRER S, BONNET D, STEENSMA D P, et al. Bone marrow niches in haematological malignancies[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2020, 20(5): 285-298.
- [108] WAGNER H J, BOLLARD C M, VIGOUROUX S, et al. A strategy for treatment of Epstein-Barr virus-positive Hodgkin's disease by targeting interleukin 12 to the tumor environment using tumor antigen-specific T cells[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2004, 11(2): 81-91.
- [109] KERKAR S P, MURANSKI P, KAISER A, et al. Tumor-specific CD8⁺ T cells expressing interleukin-12 eradicate established cancers in lymphodepleted hosts[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(17): 6725-6734.
- [110] ZHANG L, MORGAN R A, BEANE J D, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma[J]. *Clinical Cancer Research*, 2015, 21(10): 2278-2288.
- [111] DRAKES D J, RAFIQ S, PURDON T J, et al. Optimization of T-cell receptor-modified T cells for cancer therapy[J]. *Cancer Immunology Research*, 2020, 8(6): 743-755.
- [112] BATRA S A, RATHI P, GUO L J, et al. Glypican-3-specific CAR T cells coexpressing IL15 and IL21 have superior expansion and antitumor activity against hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Immunology Research*, 2020, 8(3): 309-320.
- [113] SHUM T, OMER B, TASHIRO H, et al. Constitutive signaling from an engineered IL7 receptor promotes durable tumor elimination by tumor-redirectioned T cells[J]. *Cancer Discovery*, 2017, 7(11): 1238-1247.
- [114] BOLLARD C M, RÖSSIG C, CALONGE M J, et al. Adapting a transforming growth factor beta-related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity[J]. *Blood*, 2002, 99(9): 3179-3187.
- [115] BENDLE G M, LINNEMANN C, BIES L, et al. Blockade of TGF- β signaling greatly enhances the efficacy of TCR gene therapy of cancer[J]. *Journal of Immunology*, 2013, 191(6): 3232-3239.
- [116] BOLLARD C M, TRIPIC T, CRUZ C R, et al. Tumor-specific T-cells engineered to overcome tumor immune evasion induce

- clinical responses in patients with relapsed Hodgkin lymphoma[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2018, 36(11): 1128-1139.
- [117] YAMAMOTO T N, LEE P H, VODNALA S K, et al. T cells genetically engineered to overcome death signaling enhance adoptive cancer immunotherapy[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2019, 129(4): 1551-1565.
- [118] ARBER C, YOUNG M, BARTH P. Reprogramming cellular functions with engineered membrane proteins[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, 47: 92-101.
- [119] SHIN J H, PARK H B, OH Y M, et al. Positive conversion of negative signaling of CTLA4 potentiates antitumor efficacy of adoptive T-cell therapy in murine tumor models[J]. *Blood*, 2012, 119(24): 5678-5687.
- [120] ANKRI C, SHAMALOV K, HOROVITZ-FRIED M, et al. Human T cells engineered to express a programmed death 1/28 costimulatory retargeting molecule display enhanced antitumor activity[J]. *Journal of Immunology*, 2013, 191(8): 4121-4129.
- [121] SCHLENKER R, OLGUÍN-CONTRERAS L F, LEISEGANG M, et al. Chimeric PD-1: 28 receptor upgrades low-avidity T cells and restores effector function of tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy[J]. *Cancer Research*, 2017, 77(13): 3577-3590.
- [122] HOOGI S, EISENBERG V, MAYER S, et al. A TIGIT-based chimeric co-stimulatory switch receptor improves T-cell anti-tumor function[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2019, 7(1): 243.
- [123] ODA S K, DAMAN A W, GARCIA N M, et al. A CD200R-CD28 fusion protein appropriates an inhibitory signal to enhance T-cell function and therapy of murine leukemia[J]. *Blood*, 2017, 130(22): 2410-2419.
- [124] THEODORE L, ROTH, ROTH T L, LI P J, BLAESCHKE F, et al. Pooled knockin targeting for genome engineering of cellular immunotherapies[J]. *Cell*, 2020, 181(3): 728-744.e21.
- [125] WILKIE S, BURBRIDGE S E, CHIAPERO-STANKE L, et al. Selective expansion of chimeric antigen receptor-targeted T-cells with potent effector function using interleukin-4[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(33): 25538-25544.
- [126] LEEN A M, SUKUMARAN S, WATANABE N, et al. Reversal of tumor immune inhibition using a chimeric cytokine receptor[J]. *Molecular Therapy*, 2014, 22(6): 1211-1220.
- [127] SUKUMARAN S, WATANABE N, BAJGAIN P, et al. Enhancing the potency and specificity of engineered T cells for cancer treatment[J]. *Cancer Discovery*, 2018, 8(8): 972-987.
- [128] SINGH N, SHI J W, JUNE C H, et al. Genome-editing technologies in adoptive T cell immunotherapy for cancer[J]. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 2017, 12(6): 522-529.
- [129] PICKAR-OLIVER A, GERSBACH C A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(8): 490-507.
- [130] 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]. *Science Translational Medicine*, 2017, 9(374): eaaj2013.
- [131] PROVASI E, GENOVESE P, LOMBARDO A, et al. Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer[J]. *Nature Medicine*, 2012, 18(5): 807-815.
- [132] RASAIYAAH J, GEORGIADIS C, PREECE R, et al. TCR $\alpha\beta$ /CD3 disruption enables CD3-specific antileukemic T cell immunotherapy[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(13): e99442.
- [133] SU S, HU B, SHAO J, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20070.
- [134] MAROTTE L, SIMON S, VIGNARD V, et al. Increased antitumor efficacy of PD-1-deficient melanoma-specific human lymphocytes[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2020, 8(1): e000311.
- [135] 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.
- [136] ROTH T L, PUIG-SAUS C, YU R, et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting[J]. *Nature*, 2018, 559(7714): 405-409.
- [137] MATTHEW B, DONG, DONG M B, WANG G C, CHOW R D, et al. Systematic immunotherapy target discovery using genome-scale *in vivo* CRISPR screens in CD8 T cells[J]. *Cell*, 2019, 178(5): 1189-1204.e23.
- [138] MASTAGLIO S, GENOVESE P, MAGNANI Z, et al. NY-ESO-1 TCR single edited stem and central memory T cells to treat multiple myeloma without graft-versus-host disease[J]. *Blood*, 2017, 130(5): 606-618.
- [139] BERDIEN B, MOCK U, ATANACKOVIC D, et al. TALEN-mediated editing of endogenous T-cell receptors facilitates efficient reprogramming of T lymphocytes by lentiviral gene transfer[J]. *Gene Therapy*, 2014, 21(6): 539-548.
- [140] POIROT L, PHILIP B, SCHIFFER-MANNIOUI C, et al. Multiplex genome-edited T-cell manufacturing platform for "off-the-shelf" adoptive T-cell immunotherapies[J]. *Cancer Research*, 2015, 75(18): 3853-3864.
- [141] OSBORN M J, WEBBER B R, KNIPPING F, et al. Evaluation of TCR gene editing achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL nucleases[J]. *Molecular Therapy*, 2016, 24(3): 570-581.

- [142] LEGUT M, DOLTON G, MAIN A A, et al. CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells[J]. *Blood*, 2018, 131(3): 311-322.
- [143] REN J T, LIU X J, FANG C Y, et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition[J]. *Clinical Cancer Research*, 2017, 23(9): 2255-2266.
- [144] SHI L, MENG T Y, ZHANG Z L, et al. CRISPR knock out CTLA-4 enhances the anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes[J]. *Gene*, 2017, 636: 36-41.
- [145] STADTMAUER E A, FRAIETTA J A, DAVIS M M, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer[J]. *Science*, 2020, 367(6481): eaba7365.
- [146] WANG D, ZHANG F, GAO, G P. CRISPR-based therapeutic genome editing: strategies and *in vivo* delivery by AAV vectors[J]. *Cell*, 2020, 181(1): 136-150.
- [147] SATHER B D, ROMANO IBARRA G S, SOMMER K, et al. Efficient modification of CCR5 in primary human hematopoietic cells using a megaTAL nuclease and AAV donor template[J]. *Science Translational Medicine*, 2015, 7(307): 307ra156.
- [148] HALE M, LEE B, HONAKER Y, et al. Homology-directed recombination for enhanced engineering of chimeric antigen receptor T cells[J]. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 2017, 4: 192-203.
- [149] SACHDEVA M, BUSSE B W, TEMBURNI S, et al. Repurposing endogenous immune pathways to tailor and control chimeric antigen receptor T cell functionality[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 5100.
- [150] YANG L F, YIN J L, WU J L, et al. Engineering genetic devices for *in vivo* control of therapeutic T cell activity triggered by the dietary molecule resveratrol[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(34): e2106612118.
- [151] KOBAYASHI A, NOBILI A, NEIER S C, et al. Light-controllable binary switch activation of CAR T cells[J]. *ChemMedChem*, 2022, 17(12): e202100722.
- [152] NOBLES C L, SHERRILL-MIX S, EVERETT J K, et al. CD19-targeting CAR T cell immunotherapy outcomes correlate with genomic modification by vector integration[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2020, 130(2): 673-685.
- [153] 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(7709): 307-312.
- [154] SHIFRUT E, CARNEVALE J, TOBIN V, et al. Genome-wide CRISPR screens in primary human T cells reveal key regulators of immune function[J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1958-1971.e15.
- [155] GRUPP S A, PRAK E L, BOYER J, et al. Adoptive transfer of autologous T cells improves T-cell repertoire diversity and long-term B-cell function in pediatric patients with neuroblastoma[J]. *Clinical Cancer Research*, 2012, 18(24): 6732-6741.
- [156] KALOS M, LEVINE B L, PORTER D L, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia[J]. *Science Translational Medicine*, 2011, 3(95): 95ra73.



通讯作者: 周鹏辉(1974—),男,博士,教授,博士生导师。研究方向为肿瘤免疫学和肿瘤免疫治疗。

E-mail: zhoup@sysucc.org.cn



通讯作者: 何晶晶(1987—),博士,特聘副研究员。主要研究方向为肿瘤免疫学和肿瘤免疫治疗。

E-mail: hejingjing@gdph.org.cn



第一作者: 谢君鸿(1996—),男,硕士研究生,研究方向为肿瘤免疫治疗。

E-mail: jhxietw@163.com