

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.12.001

· 专家论坛 ·

## 优化CAR结构增强CAR-T细胞治疗的安全性和有效性

董杰,王征旭 [解放军总医院第七医学中心(原解放军陆军总医院)生物治疗中心,北京 100700]

**[摘要]** 嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T,CAR-T)细胞治疗近年来发展迅速,已在某些血液系统的恶性肿瘤治疗中取得了惊人的疗效,但在实体肿瘤的治疗中进展不大。目前在CAR-T细胞治疗中需要解决的问题主要有:(1)增强CAR-T细胞的杀伤活性;(2)解除肿瘤免疫抑制状态;(3)使CAR-T细胞进入实体瘤;(4)增强CAR-T细胞治疗的安全性。通过CAR结构的优化设计,可以克服CAR-T细胞治疗中的一系列缺陷,增强CAR-T细胞的疗效和减缓并发症的发生。本文对近年来在CAR结构设计上的一些优化改进措施及方法进行总结分析,探索提高CAR-T细胞治疗过程中有效性和安全性的策略和措施。

**[关键词]** 肿瘤;CAR-T细胞;细胞治疗;免疫治疗;分子结构

**[中图分类号]** R730.51;R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)12-1209-09

## Optimizing CAR structure to improve safety and efficiency of CAR-T cell therapy

DONG Jie, WANG Zhengxu (Biological Therapy Center, the Seventh Medical Center of PLA General Hospital [Former Army General Hospital of PLA], Beijing 100700, China)

**[Abstract]** CAR-T cell therapy has developed rapidly in recent years, and has achieved amazing results in the treatment of some malignant tumors of the blood system, but little progress has been made in the treatment of solid tumors. At present, the main problems to be solved in CAR-T cell therapy are: (1) enhancing the killing activity of CAR-T cells; (2) relieving the immunosuppressive state of tumors; (3) bringing CAR-T cells into solid tumors; (4) enhancing the safety of CAR-T cell therapy. By optimizing the structure of CAR, a series of defects in the CAR-T cell therapy can be overcome, and the curative effect of CAR-T can be enhanced and the complications can be alleviated. In this paper, some optimization and improvement measures and methods on the structure design of CAR in recent years are elaborated, and the effectiveness and safety of the CAR-T cell therapy are explored.

**[Key words]** tumor; chimeric antigen receptor T(CAR-T)cell; cell therapy; immunotherapy; molecular structure

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(12): 1209-1217. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.12.001]



**王征旭**,医学博士、副主任医师,解放军总医院第七医学中心(原解放军陆军总医院)生物治疗中心主任。兼任解放军第十届医学科学技术委员会生物技术专业委员会委员,中关村玖泰药物临床试验技术创新联盟细胞治疗专业委员会副主委。1998年获陆军军医大学(第三军医大学)外科学博士学位,2000年在海军军医大学(第二军医大学)博士后出站,2003-2008年在新加坡国家基因研究院(Genome Institute of Singapore)从事干细胞领域研究工作。长期从事肿瘤生物学、干细胞等领域的研究工作,建立解放军陆军总医院生物治疗中心。承担国家自然科学基金3项、首都临床特色应用研究基金课题1项。以第一作者或通信作者身份发表SCI论文16篇。以第一完成人身份获省部级科技进步二、三等奖3项。

2017年8月和10月,美国FDA先后批准了2个嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T,CAR-T)细

胞产品上市:诺华公司的Kymriah(tisagenlecleucel, CTL-019)和Kite公司的Yescarta(axicabtagene ciloleucel,KTE-C10)。这一消息具有里程碑式的意义,为恶性肿瘤等疾病的治疗带来了新的希望。然而,在看到CAR-T细胞治疗恶性肿瘤,尤其是血液系统肿瘤的显著疗效的同时,也必须充分认识到其中存在的一系列问题和挑战,如脱靶毒性、抗原逃逸、CAR-T细胞体内存活时间和增殖能力有限、肿瘤抑制微环境、细胞因子风暴等毒副作用<sup>[1]</sup>。本文将主要从改造优化CAR结

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No.31171427);首都临床特色应用研究基金(No.Z121107001012136)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31171427), and the Science and Technology Program Foundation of Beijing City (No. Z121107001012136)

**[作者简介]** 董杰(1983-),女,博士,助理研究员,主要从事肿瘤生物治疗的基础和临床研究工作,E-mail:869982010@qq.com

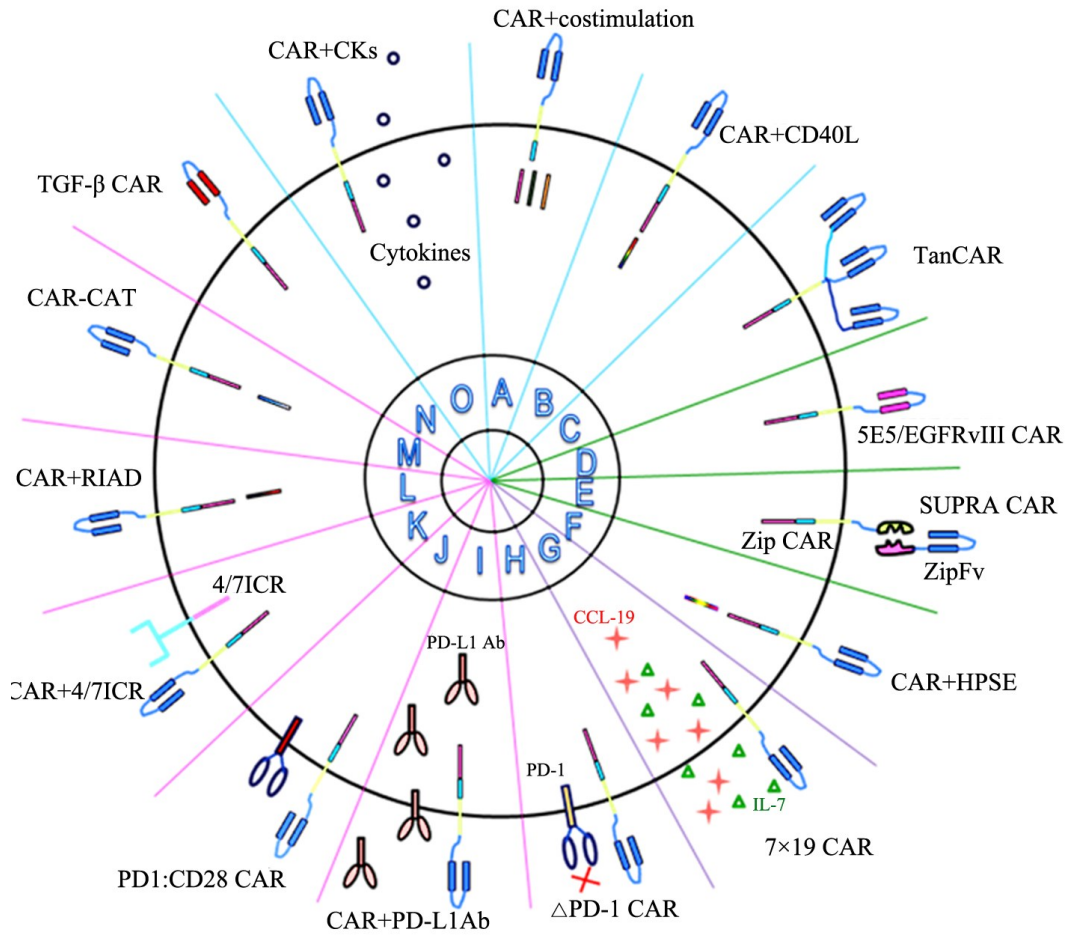
**[通信作者]** 王征旭(WANG Zhengxu, corresponding author), E-mail:zhxuwang@qq.com

构的设计方面入手,对提高CAR-T细胞肿瘤治疗的有效性和安全性问题进行讨论。

### 1 提高CAR-T细胞治疗的有效性

目前,研究者<sup>[2-39]</sup>从多个角度,如CAR胞内分子结

构的优化、解决肿瘤抗原抑制性、促进CAR-T细胞向肿瘤部位转运和浸润,以及拮抗肿瘤免疫抑制微环境等,对CAR结构进行了改进,以期可更好地促进CAR-T细胞疗效的发挥(图1)。



CAR: 嵌合抗原受体;TanCAR: 串联CAR结构;5E5:MUC1截短体特异性抗体;SUPRA CAR: Split, universal, and programmable CAR,一种通用型CAR结构;HPSE:硫酸乙酰肝素蛋白多糖;7×19 CAR:可同时分泌IL-7和CCL19的CAR-T细胞;PD-1:程序性细胞死亡蛋白1; ΔPD-1:PD-1表达被阻断;PD-L1 Ab:PD-L1抗体;PD-L1: PD-1配体1;4/7ICR:IL-4与IL-7受体融合结构;RIAD:调控亚基锚定干扰物;TGF-β: 转化生长因子-β;CKs:细胞因子

图1 通过CAR结构优化提高CAR-T细胞疗效的策略

#### 1.1 优化胞内信号分子

1.1.1 CAR胞内区协同刺激分子的优化 除了第一代CAR-T细胞之外,其他几代的CAR-T细胞在设计时都要面临不同协同刺激分子的取舍问题。有研究<sup>[2-3]</sup>表明,4-1BB和CD28分别倾向于衍生更多的中央记忆细胞和效应记忆细胞,以CD28作为协同刺激分子的CAR-T细胞较4-1BB CAR-T细胞更容易发生耗竭,由此推测4-1BB可能较CD28更有利于CAR-T细胞在体内持久存活。MILONE等<sup>[4]</sup>研究发现,在B-ALL的小鼠异种移植模型中发现,含有4-1BB的二代CAR-T细胞较一代CAR-T细胞和以CD28为协同刺激分子的二代CAR-T细胞有更强的抗白血病能力,且在体内存活更

为持久。在细胞因子分泌方面,与CD28 CAR-T细胞相比,4-1BB CAR-T细胞分泌Th1型细胞因子的速度更慢,Th2型细胞因子分泌量更低<sup>[5]</sup>。联合CD28和4-1BB(第三代CAR-T细胞),可使CAR-T细胞在模型小鼠体内存活更久,发挥更强的抗肿瘤效应<sup>[6]</sup>。此外,其他的协同刺激分子,如ICOS,更倾向于诱导T细胞向Th17方向分化,产生更多的IL-17A、IL-17F和IL-22。与CD28和4-1BB相比,ICOS CAR-T细胞可能会诱导更强的抗肿瘤应答<sup>[7]</sup>。总体而言,在CAR结构中设计不同的协同刺激分子(图1A)可能对CAR-T细胞的功能产生不同的影响,应选择哪种分子或是将哪些分子联合使用等方面的研究不多,目前尚没有

定论,有待进一步探索。

**1.1.2 引入细胞因子** T细胞激活需要3个信号:TCR、共刺激分子和细胞因子。临床上使用CAR-T细胞疗法时,往往会联合细胞因子的全身给药以增强CAR-T的疗效。然而,细胞因子的全身给药方式可能会带来一系列的不良反应。为了在增强CAR-T细胞疗效的同时,同时又避免全身使用细胞因子所带来的毒副作用,研究者们尝试在CAR-T细胞CD3 $\zeta$ 元件后连接细胞因子IL-7、IL-12、IL-18等基因。这些细胞因子能够在局部刺激CAR-T细胞的增殖,延长T细胞生存时间,招募机体免疫细胞,改善局部免疫抑制的微环境等,通过多种机制增强CAR-T细胞的抗肿瘤免疫反应。这种可以自分泌细胞因子并且刺激自身增殖的CAR-T细胞也称为武装的CAR-T细胞(armed CAR-T cell),即第四代CAR-T细胞<sup>[8]</sup>。目前研究最多的是分泌IL-12的CAR-T细胞。多项研究<sup>[9-12]</sup>表明,IL-12的加入可缓解肿瘤免疫抑制的微环境,促进CAR-T细胞分泌IFN- $\gamma$ ,增强其抗癌活性,明显延长荷瘤小鼠的生存期。此外,IL-7、IL-15和IL-18等也都可促进CAR-T细胞功能的发挥,延长荷瘤小鼠的生存期<sup>[13-15]</sup>。

**1.1.3 引入其他共刺激信号分子** 目前CAR胞内区使用较多的共刺激分子是CD28或4-1BB。其他共刺激信号分子,比如CD40L,也有望改善CAR-T细胞的功能。CD40L属于TNF超家族成员,为II型穿膜蛋白,最初在活化的CD4<sup>+</sup>T细胞中发现。其受体CD40可表达于多种免疫细胞及肿瘤细胞(B-ALL、CLL、HL、NHL、乳腺癌、卵巢癌、鼻咽癌、骨肉瘤等)中。CD40L/CD40通路参与体液免疫和细胞免疫过程,可促进肿瘤特异性T细胞应答。CURRAN研究组<sup>[16]</sup>为CAR-T细胞组成性表达CD40L后(图1B),可促进其增殖和Th1型细胞因子分泌,并可改变CD40<sup>+</sup>肿瘤细胞以及患者CLL细胞的免疫原性,促进DC成熟和分泌IL-12。与普通CAR-T细胞相比,CD40L CAR-T细胞的体外杀伤能力明显增强,并可显著延长荷瘤小鼠的生存期。

## 1.2 解决肿瘤抗原异质性及抗原表达的改变

**1.2.1 同时靶向2种或多种肿瘤相关抗原(tumor associated antigen,TAA)** 虽然靶向CD19的CAR-T细胞在B细胞恶性肿瘤治疗中疗效显著,但随着研究的增多,也不乏CD19表达阴性白血病复发案例的报道。为此,ZAH等<sup>[17]</sup>设计了靶向CD19和CD20的双特异性CAR-T细胞。通过G4S(Gly4-Ser)接头,可将CD19和CD20抗体的scFv进行连接,使之串联表达于T细胞上(图1C)。这种靶向CD19或CD20的CAR-T细胞可以对表达CD19或CD20的靶细胞产生强有力的杀伤。不论是野生型或是CD19<sup>-</sup>突变型B细胞淋巴瘤,CD19或CD20 CAR-T细胞都可以在体内发挥同等

的疗效,从而可以有效防止B细胞恶性肿瘤的复发。

无独有偶,HEGDE等<sup>[18]</sup>针对复发的胶质母细胞瘤,设计了同时靶向HER-2和IL13R $\alpha$ 2的串联CAR-T(tandem chimeric antigen T,TanCAR-T)细胞,发现TanCAR-T细胞在遇到HER-2和IL13R $\alpha$ 2中的任何一种抗原时,均可产生与普通CAR-T细胞同等的活化效果;而当同时遇到这两种抗原时,则通过产生异二聚体来增强T细胞的活化。与同时表达HER2 CAR和IL13R $\alpha$ 2 CAR的T细胞和只对单一抗原具有特异性的CAR-T细胞相比,TanCAR-T细胞的活化更为持久且不易发生耗竭。作者在小鼠的成胶质细胞瘤模型中发现,TanCAR-T细胞可以很好地防止抗原逃逸,增强CAR-T细胞的抗肿瘤效果,延长实验小鼠的生存期。然而,成胶质细胞瘤患者之间不同肿瘤抗原表达的差异使TanCAR-T细胞的临床效果并不尽如人意。为了进一步提高CAR-T细胞治疗胶质母细胞瘤的效果,BIELAMOWICZ研究组<sup>[19]</sup>发现,制备的三价CAR-T(trivalent CAR-T)细胞的研究结果。结果显示,在实验样本中,靶向HER-2、IL13R $\alpha$ 2和EphA2的三价CAR-T细胞几乎可以覆盖100%的成胶质细胞瘤。与一价和二价CAR-T细胞相比,三价CAR-T细胞表现出更强的细胞杀伤毒性和更高的细胞因子分泌能力。在成胶质细胞瘤的异种动物模型中,三价CAR-T细胞可明显抑制肿瘤的生长,延长实验动物的生存期。

**1.2.2 以肿瘤特异性突变抗原为靶点** 以经过修饰或发生突变的肿瘤特异性抗原为靶点设计CAR-T细胞,也可以增加CAR-T细胞作用的特异性,减少脱靶效应的发生。如,POSEY等<sup>[20]</sup>针对只在肿瘤中表达的MUC1的糖肽截短体设计了特异性的scFv-5E5,这种5E5 CAR-T细胞(图1D)不会结合去糖基化的MUC1和正常糖基化的MUC1,只会特异性地结合肿瘤细胞MUC1的Tn糖链,因此不会对正常细胞产生杀伤。此外,有研究者<sup>[21-23]</sup>也发现了其他的肿瘤特异性突变抗原,如EGFRvIII(6-273位氨基酸缺失),该抗原在神经胶质瘤中高表达。一项有10位成胶质细胞瘤患者参与的临床试验<sup>[23]</sup>显示,EGFRvIII CAR-T细胞疗法(图1D)安全可行,未见脱靶毒性及细胞因子释放综合征。IL13R $\alpha$ 2是另外一种只在肿瘤细胞中表达的抗原,在每个成胶质细胞瘤细胞中有多达3万个抗原结合位点,以IL13R $\alpha$ 2为靶点的CAR-T细胞研究也正在进行<sup>[24-25]</sup>。

**1.2.3 设计靶向不同肿瘤抗原的通用型CAR** CAR-T细胞结构一旦构建完成,除了重新构建以外,其CAR结构将不再发生变化。这一结构特点使CAR-T细胞通常只能与一种特定的靶抗原以特定的亲和力结合,之后以“预设”的方式激活胞内信号分子,产生

“预设”水平的应答,使CAR-T细胞的活化水平难以调控。CHO等<sup>[26]</sup>针对CAR-T细胞结构的以上缺点,设计了一种通用型SUPRA(split, universal, and programmable)CAR结构(图1E)。与传统的CAR结构不同,SUPRA CAR是将胞内信号分子与胞外区的scFv分子分开,然后通过亮氨酸拉链(leucine zippers)对两者的结合进行调控。胞内信号分子与亮氨酸拉链结合,称为ZipCAR。ZipCAR含有亮氨酸结构域、 $\alpha$ 铰链区、穿膜结构域、共刺激分子CD28、4-1BB(第三代CAR)和T细胞刺激分子 $\delta$ ,表达于T细胞表面;scFv与另一段亮氨酸拉链融合,形成ZipFv。ZipFv含有靶向肿瘤特异性抗原的scFv、35个氨基酸的甘氨酸/丝氨酸多肽、C-Myc和6xHis tag标签。通过亮氨酸拉链之间的特异性识别,可以实现ZipCAR与ZipFv的结合。与传统CAR-T细胞不同,SUPRA CAR-T细胞只需重复体外构建含不同肿瘤特异性抗体的ZipFv融合蛋白即可,不需重新设计T细胞。鉴于基因修饰T细胞的设计是CAR-T细胞治疗中最昂贵的部分,因此SUPRA CAR-T细胞会大大降低CAR-T疗法的成本。通过对亮氨酸拉链对之间的亲和力、肿瘤抗原与scFv之间的亲和力、ZipFv的浓度以及ZipCAR的表达水平进行调控,可以实现对SUPRA CAR-T细胞活化水平的调控。通过设计竞争性的ZipFv可以有效抑制CAR-T细胞的不良反应。根据不同肿瘤的抗原表达异质性设计多种ZipFv,可以有效防止肿瘤抗原多样性导致的肿瘤逃逸。通过为正常组织表达的抗原设计“安全ZipFv”,可以有效防止CAR-T细胞的脱靶效应,使之只特异性杀伤肿瘤细胞。此外,通过对同一T细胞的不同信号分子以及对不同的T细胞亚群设计不同的SUPRA CAR结构,可以实现对T细胞的不同应答以及不同T细胞的应答状态进行调控<sup>[26]</sup>。

### 1.3 促进CAR-T细胞转运和向肿瘤部位浸润

**1.3.1 破坏肿瘤细胞外基质的HPSE-CAR CAR-T细胞进入实体瘤的一个主要障碍便是肿瘤细胞的细胞外基质(ECM),而硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparin sulfate proteoglycans,HPSG)则是ECM的主要组成部分。所以,CAR-T细胞只有突破HPSG的阻碍才能到达肿瘤部位。然而,T细胞通常并不表达可降解HPSG的乙酰肝素酶HPSE,因此若CAR-T细胞可表达HPSE,便有可能实现肿瘤浸润。CARUANA等<sup>[27]</sup>构建了可表达HPSE的GD-2特异性CAR-T细胞(图1F),发现在不影响CAR-T细胞对GD-2的特异性识别的同时,HPSE-GD-2 CAR-T细胞降解ECM的能力确实得到了很大提升,并可促进CAR-T细胞的肿瘤浸润,明显延长荷瘤小鼠的生存期。**

**1.3.2 联合趋化因子-趋化因子受体信号 根据趋**

化因子与趋化因子受体之间的特异性结合原理,为CAR-T细胞设计特定的趋化因子或趋化因子受体,将有利于CAR-T细胞向肿瘤部位的迁移和浸润。目前已有多个研究组在这方面做出了尝试,如DISTASI研究组<sup>[28]</sup>发现,效应T细胞表达CCR4之后可以促进其向霍奇金淋巴瘤细胞迁移。当CD30特异性CAR-T细胞表达CCR4之后,其体外的细胞杀伤和细胞因子分泌能力不受影响;同时,在霍奇金淋巴瘤的小鼠模型中可以更好地控制肿瘤的生长。PENG等<sup>[29]</sup>在T细胞上过表达CXCR2,由此便可识别肿瘤细胞产生的CXCL1。MOON等<sup>[30]</sup>在人间皮瘤的动物模型中发现,表达了CCR2的CAR-T细胞可更好地迁移至肿瘤部位。2018年3月,KEISHI等<sup>[13]</sup>构建了表达IL-7和CCL19的CAR-T细胞( $7 \times 19$  CAR-T细胞,图1G),发现该细胞可使荷瘤小鼠获得完全缓解,小鼠生存期明显延长;组织病理学分析可见肿瘤组织中有明显的DC和T细胞浸润。

### 1.4 改善肿瘤抑制微环境

**1.4.1 免疫检查点阻断 (1)阻断PD-1:肿瘤细胞往往会表达某些抑制性分子,比如PD-L1,后者可与活化T细胞表达的PD-1结合,从而抑制T细胞应答,使之发生耗竭。联合PD-1抗体可以提高CAR-T细胞的疗效,然而由于PD-1抗体的全身给药也可能活化自身反应性T细胞,带来不良反应<sup>[31]</sup>。因此, RUPP等<sup>[32]</sup>利用CRISPR/Cas9基因编辑技术阻断CAR-T细胞的PD-1表达(图1H)之后,不论在体内或是体外,均可明显提高CD19 CAR-T细胞对CD19<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>肿瘤细胞的杀伤能力。(2)引入PD-1/PD-L1和/或CTLA-4抗体:SUAREZ等<sup>[33]</sup>则构建了可分泌PD-L1抗体的CAR-T细胞(图1I),发现在肾透明细胞癌的人源化小鼠模型中,与普通的靶向羧基脱水酶IX(carboxy anhydrase-IX,CAIX)的CAR-T细胞相比,分泌PD-L1抗体的CAIX特异性CAR-T细胞可使小鼠的肿瘤负荷下降50%~80%,明显延缓肿瘤生长,肿瘤细胞的PD-L1和Ki67表达下调。CAR-T细胞在与肿瘤细胞接触过程中局部分泌的抗PD-L1单抗能与肿瘤细胞表面的PD-L1结合,进而封闭肿瘤细胞表面PD-L1的表达,解除因T细胞PD-1分子与肿瘤细胞表面PD-L1分子结合所导致的CAR-T细胞免疫抑制状态;同时,IgG1型PD-L1抗体还可介导ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity),并募集NK细胞到达肿瘤部位,进一步增强了CAR-T细胞杀伤肾癌细胞的效率。宁波市肿瘤医院和上海细胞治疗研究院分别使用分泌PD-1抗体的CAR-T细胞以及同时分泌PD-1抗体和CTLA-4抗体的MUC1 CAR-T细胞开展了针对晚期恶性实体肿瘤的临床试验(NCT02873390和**

NCT03179007), 2项试验目前均正在招募患者。(3) 逆转PD-1的抑制信号:除了直接阻断PD-L1-PD-1通路对CAR-T细胞的抑制作用外,还可尝试将二者传递的抑制信号转变为活化信号。有研究者<sup>[34-35]</sup>对PD-1进行改造,将其穿膜区和胞内信号区域用CD28分子取代,从而使之成为协同刺激受体PD1:CD28(图1J)。这种CAR-T细胞表面同时表达抗PSAC、PD-1分子。因前列腺癌细胞高表达PD-L1分子,当表达PD-L1的肿瘤细胞与CAR-T细胞表面转染的PD-1分子相互作用,会通过PD-1胞内连接的CD28分子,使CAR-T细胞进一步活化,将会克服T细胞表面野生型PD-1和PD-L1接触后导致的免疫抑制作用,使免疫抑制信号变成活化信号,因此能增强转染双基因的CAR-T细胞对肿瘤的杀伤作用,同时也能促进CAR-T细胞IL-12、IFN- $\gamma$ 、IL-12等Th1类细胞因子的释放,进一步改善了肿瘤局部免疫抑制的微环境。动物实验<sup>[35]</sup>证明,该转染双基因的CAR-T细胞,在体内有很好的杀瘤细胞活性,经过PD1:CD28改造的CAR-T细胞还可以有效控制间皮瘤和前列腺癌小鼠模型中相应肿瘤的生长,疗效优于PD-1抗体。

**1.4.2 联合细胞因子** IL-4和IL-10等细胞因子参与了肿瘤免疫抑制微环境的形成。与上文的PD1:CD28思路类似,MOHAMMED等<sup>[36]</sup>尝试将IL-4的抑制信号转化为刺激信号,具体操作是将IL-4受体(IL-4R $\alpha$ )胞外区与IL-7受体(IL-7R $\alpha$ )胞内区进行融合,构建4/7 ICR结构(图1K),然后将该分子转入PSCA CAR-T细胞中。发现改造后的CAR-T细胞可以很好地抵制肿瘤分泌的IL-4的抑制作用,并可发生增殖,最终使其抗肿瘤能力得到很大提升。

**1.4.3 拮抗其他免疫抑制微环境中的抑制因素** (1) 抑制PGE2和腺苷: PGE2和腺苷是肿瘤微环境中重要的免疫抑制分子,两者可激活PKA,后者可与ezrin蛋白结合,最终抑制TCR活化,抑制T细胞功能。NEWICK等<sup>[37]</sup>设计了一种可表达短肽RIAD(可抑制PKA与ezrin蛋白结合)的CAR-T细胞,即CAR-RIAD T细胞(图1L)。通过促进CAR-T细胞效能的发挥以及更好地进入肿瘤组织,RIAD的引入使CAR-T细胞在体内外的初步实验中都表现良好。(2) 提高CAR-T细胞的抗氧化能力:活性氧过多构成了免疫抑制微环境的另一个重要因素。LIGTENBERG等<sup>[38]</sup>将过氧化氢酶构建至CAR结构中(CAR-CAT,图1M),以期通过促进过氧化氢的代谢而增强CAR-T细胞的抗氧化能力。与普通CAR-T细胞相比,CAR-CAT细胞不仅可抑制活性氧的聚集,增强自身的抗肿瘤能力,同时,还可增强“旁观者”NK细胞对肿瘤的杀伤能力。(3) 逆转TGF- $\beta$ 的抑制作用:CHANG等<sup>[39]</sup>对CAR-T细胞进行改造,使之可

以结合多种可溶性因子,如TGF- $\beta$ (图1N)。TGF- $\beta$ 是肿瘤免疫抑制微环境中重要的可溶性组分,改造后的CAR-T细胞在与TGF- $\beta$ 结合之后可将其免疫抑制效应逆转,成为有利于T细胞活化的激动剂。通过对CAR胞外配体结合区与其胞内信号区的机械偶合进行调节,便可调控CAR对于可溶性配体的应答。

## 2 增强CAR-T细胞治疗的安全性

在想方设法提高CAR-T细胞疗效的同时,尽量避免其可能带来的不良反应是CAR-T细胞在应用过程中需要注意的另一个关键问题,许多研究者<sup>[40-55]</sup>在这方面做出了多方面的努力(图2)。

### 2.1 设计双抗原特异性CAR

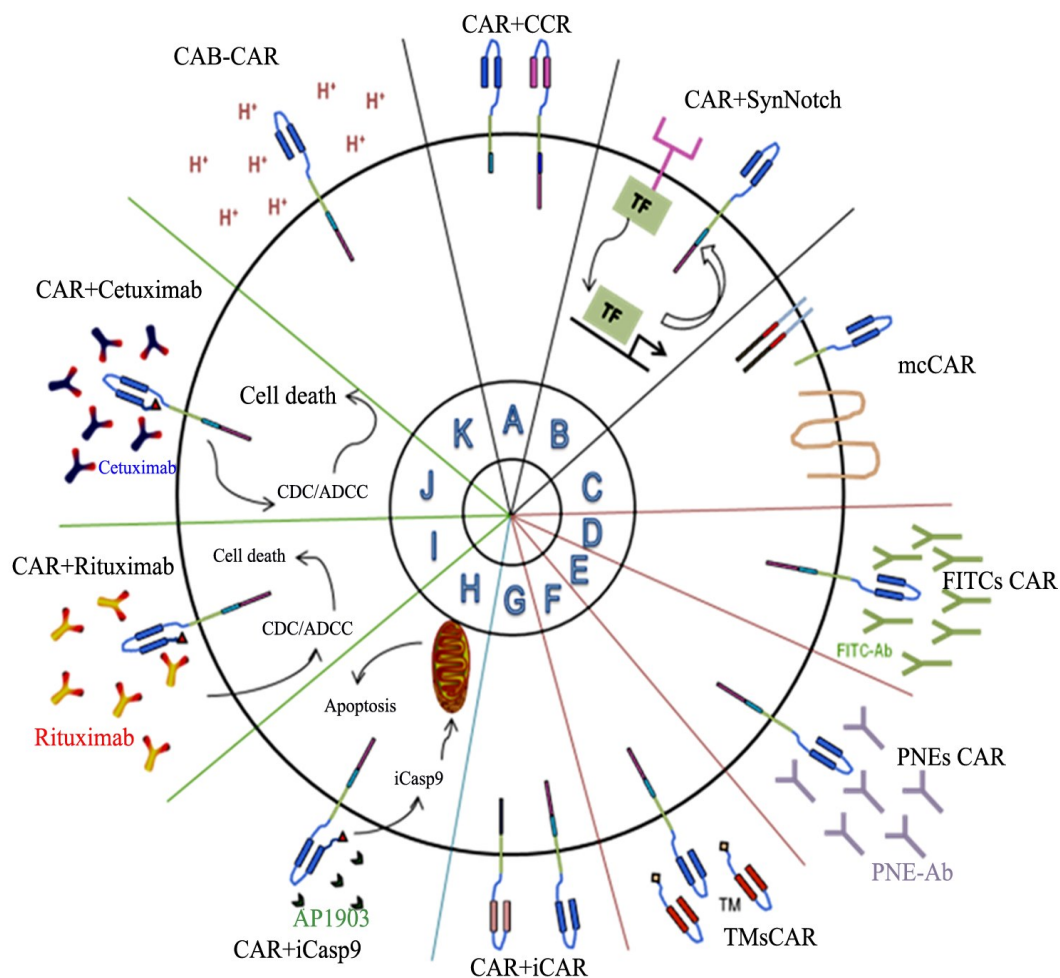
用2种不同抗原来限制CAR的靶向性,只有同时表达这2种抗原的肿瘤细胞才会被CAR-T细胞攻击,而只表达其中一种抗原的正常组织可豁免。要达到这一目的,目前有2种方法:一是KLOSS等<sup>[40]</sup>提出的为T细胞转入2种受体,嵌合抗原受体(CAR)和嵌合协同刺激受体(CCR)(图2A)。CAR可与第一种抗原(如PSCA)特异性结合,为T细胞提供次优活化信号;CCR可与第二种抗原(如PSMA)结合,为T细胞提供协同刺激信号。当CCR CAR-T细胞遇到PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>的肿瘤细胞时,可完全激活,并发挥抗肿瘤效应;而遇到PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup>的细胞时,则不会完全激活,从而使后者免于脱靶效应的影响。该方法的缺点是难以保证在2种抗原同时存在时使T细胞完全活化,同时,在只有其中一种抗原存在时保持T细胞的完全抑制状态。于是ROYBAL等<sup>[41]</sup>便提出了第二种方法,利用syn-Notch受体控制CAR的表达。即synNotch受体胞外识别结构域可与一种靶抗原A(如GFP)特异性结合,导致受体断裂,释放转录激活结构域,后者进入细胞核,启动特异性CAR,可特异性识别另外一种抗原B,如CD19 CAR的表达(图2B)。只有当抗原A和B同时存在时,该双特异性T细胞才会激活并杀伤特异性的肿瘤细胞。

### 2.2 为CAR设计开关

JUILLERAT等<sup>[42]</sup>利用雷帕霉素与FKBP-12蛋白的高亲和力来控制CAR-T细胞的活性。这个系统需要2个载体:1个载体含有scFv、共刺激分子4-1BB、FKBP序列(FK506 binding protein),另外1个载体携穿膜结构域、共刺激分子4-1BB、FRB序列(FKBP-rapamycin binding domain)、T细胞活化结构域CD3 $\zeta$ 。在Fc $\epsilon$ RI受体的基础上构建的CAR结构(mcCAR,图2C),将Fc $\epsilon$ RI受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 链分别用CD19抗体的scFv以及铰链区、4-1BB和CD3 $\zeta$ 来代替。同时,另外1个载体在CD8 $\alpha$ 铰链区和scFv之间插入

FRB和/或FKBP结构域。只有当雷帕霉素或其类似物存在时,2个分离的载体被连接起来,因此结合肿瘤抗原的CAR能刺激T细胞的增殖和活化。这个CAR-T

细胞的激活,需要通过小分子化合物来实现,FKBP/FRB-CAR T细胞才会发挥其抗肿瘤效应,因此可以调控CAR-T细胞的活化。



CCR:嵌合协同刺激受体;SynNotch:合成Notch受体;mcCAR:多链CAR结构;sCAR:开关CAR结构;FITC:异硫氰酸荧光素;PNE:短肽新表位;TM:靶分子;iCAR:抑制性CAR结构;iCasp9:诱导型半胱氨酸天冬酶-9;CDC:补体依赖的细胞毒性;ADCC:抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用;Rituximab:利妥昔单抗;Cetuximab:西妥昔单抗;CAB:条件激活生物技术

图2 通过CAR结构优化提高CAR-T细胞治疗安全性的策略

MA等<sup>[43]</sup>利用偶联FITC的抗体对特异性的肿瘤相关抗原(TAA)和FITC CAR-T(图2D)细胞的识别进行控制。与普通CAR-T细胞不同的是,这种开关CAR-T细胞(sCAR-T)的scFv识别的是FITC,而不是TAA。以CD19为例,sCAR-T细胞必须先与标记有FITC的CD19抗体进行结合,后者再与CD19结合,才能实现对CD19<sup>+</sup>肿瘤细胞的特异性杀伤。因此,CAR-T细胞与肿瘤细胞不能直接结合,需要通过特异性抗体桥接。标记有FITC的CD19抗体便可以“开关”的身份控制CAR-T细胞功能的发挥。同时,由于FITC CAR-T细胞的“通用性”,可对表达除了CD19以外的多种TAA的肿瘤进行调控,比如CD22等<sup>[44]</sup>。

除了FITC以外,还可以用短肽新表位(peptide neo-epitopes,PNE)作为开关分子(图2E),作用机制

相似<sup>[45-46]</sup>。抗体的一端是抗肿瘤特异性抗原的Fab端,另一端是PNE,Fab端能结合到肿瘤抗原,PNE端能与CAR相结合。这时CAR-T细胞的scFv靶向PNE,而不是靶向肿瘤抗原。sCAR-T细胞可取得与普通CAR-T细胞类似的疗效,当肿瘤细胞被清除以后,只要不再输注特异性的PNE抗体,CAR-T细胞就不能再和肿瘤细胞相结合,因此不能再发挥特异性杀伤作用。这种方法分泌的细胞因子相对较少,这对于预防临床应用时可能出现的细胞因子释放综合征更为有益。

第三种开关分子是TM(targeting module),用来调控UniCAR-T细胞<sup>[47-49]</sup>(图2F)。UniCAR-T细胞的胞内结构与普通二代CAR-T细胞相同,胞外的scFv结合区识别的却并不是TAA,而是由10个氨基酸组成的无免疫原性的短肽5B9标签,后者源自人类的细胞

核自身抗原La/SS-B。TM开关由可特异性识别TAA的结合区与5B9标签融合而成, TM便可在表达TAA的肿瘤细胞与UniCAR-T细胞之间架起桥梁,使两者在可控条件下进行识别。与第二种开关类似, UniCAR-T细胞可以通过不同的TM实现对多种不同肿瘤抗原的特异性识别。

### 2.3 引入抑制性CAR结构:iCAR

FEDOROV等<sup>[50]</sup>用抑制性CAR结构(iCAR, inhibitory CAR)来控制CAR-T细胞的脱靶毒性(图2J)。iCAR的胞外区是针对正常组织抗原的scFv(比如前列腺特异性膜抗原PSMA),胞内区与抑制性分子PD-1或CTLA-4信号域连接。当表达PD-1或CTLA-4 iCAR和普通CAR(如CD19 CAR)的T细胞遇到CD19<sup>+</sup>的肿瘤细胞时,由于其不表达正常组织抗原PSMA,所以iCAR不能对CD19 CAR的功能产生影响,从而使CD19<sup>+</sup>肿瘤细胞被杀伤;而当iCAR-CD19 CAR-T细胞遇到PSMA<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>的正常组织时,iCAR与正常组织抗原PSMA识别,传达抑制性信号,抑制CD19 CAR的功能,抑制CAR-T细胞增殖,减少其细胞因子的分泌,从而使正常组织免于CAR-T细胞的杀伤。

### 2.4 诱导CAR-T细胞死亡

为阻止不必要的CAR-T细胞在体内持续存在,使CAR-T细胞异性地杀伤肿瘤细胞的同时,又能在体内被系统性地控制,因此需要发展某些安全机制来控制CAR-T细胞的活性,解决方法之一是诱导体内的CAR-T细胞凋亡或者自杀。

**2.4.1 引入自杀基因** 为CAR-T细胞引入自杀基因,可以适时诱导CAR-T细胞死亡,从而防止不良反应的发生。目前研究较为广泛的自杀基因主要有两种:HSV-TK和iCasp9,尤其是后者,在CAR-T细胞治疗的研究中应用较多。在小分子药物CID AP20187<sup>[14]</sup>和AP1903<sup>[51]</sup>等存在时,iCasp9基因激活,启动线粒体凋亡级联反应,最终导致CAR-T细胞发生凋亡(图2H)。贝勒医学院已经在GD2 CAR-T细胞中引入了iCasp9基因,用于治疗晚期肉瘤(NCT01953900)和成神经细胞瘤(NCT01822652),目前这两项临床试验正在进行中。

**2.4.2 引入清除基因** 在T细胞中表达已知抗原,如CD20或EGFRt(EGFR截短体),在需要的时候可加入两者相应的单克隆抗体利妥昔单抗(图2I)或西妥昔单抗(图2J),通过补体途径或抗体介导的ADCC作用来诱导特定的CAR-T细胞死亡。此外,CD20或EGFRt抗体的存在还可以用于特定CAR-T细胞的筛选以及追踪<sup>[52-54]</sup>。

### 2.5 CAB(conditionally active biologics, CAB)条件激活生物技术平台

肿瘤细胞与正常细胞在代谢方面的一个重要区别在于,即使在有氧条件下,肿瘤细胞代谢也主要是

进行糖酵解而不是氧化磷酸化,这就促成了肿瘤酸性微环境的形成。肿瘤细胞存在Warburg效应:肿瘤细胞高酵解作用产生独特的肿瘤内部微环境如高乳酸、低pH值等。在不同的pH值情况下,CAR-T细胞和肿瘤抗原具有完全不同的亲和力,从而在不同pH值情况下被激活。美国BioAtla生物技术公司开发了一种CAB条件激活生物技术平台<sup>[55]</sup>,用于控制CAR-T细胞对正常组织可能产生的脱靶效应(图2K)。肿瘤酸性微环境激活技术便是CAB的核心。不同的微环境可作为CAB CAR-T细胞是否激活的开关,在肿瘤酸性微环境中CAB CAR-T细胞可被激活并发挥效应,但在正常组织中则不会激活,因此可避免脱靶现象。经过CAB改造的药物,可以大大提高药物在肿瘤酸性环境下与肿瘤细胞的特异性结合,因此降低药物的毒副作用、提高安全性。目前,上海Sinobioway Sunterra生物技术公司的CAR-T细胞产品——以Ax1和Ror2为靶点的CAB CAR-T细胞,已经在2018年1月获得了伦理委员会批准,用于治疗转移性肾癌(NCT03393936)。

## 3 结语

CAR-T细胞治疗领域近年来发展迅速,仅从结构上来看,已经由最初的没有胞内协同刺激分子的第一代CAR-T细胞,发展至今天的第四代CAR-T细胞,不仅增加了胞内协同刺激分子的数量,而且还引入了IL-12等其他信号分子,使CAR-T细胞的抗肿瘤能力大大增强。同时,一些适时抑制CAR-T功能的结构设计也使得CAR-T细胞的应用更为安全。除了以上提及的结构改造方法之外,CAR-T细胞与肿瘤细胞的空间距离大小以及铰链区的长短等<sup>[56-58]</sup>都可能对CAR-T细胞的疗效产生影响。总之,如何根据实际情况将CAR结构最优化,使其在最大程度发挥肿瘤杀伤功能的同时,又尽量避免或减少细胞因子风暴、神经毒性反应等不良反应的发生,是未来科研工作者们亟待解决的难点问题。

## [参考文献]

- [1] JANNEKE E, JASPERS A N, RENIER J, et al. Development of CAR-T cells designed to improve antitumor efficacy and safety[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 178(2): 83-91. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.03.012
- [2] 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. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.06.016.
- [3] LI S, TAO Z, XU Y, et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells with different co-stimulators showed potent anti-leukemia efficacy and different phenotype[J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(5): 626-639. DOI: 10.1089/hum.2017.241.

- [4] MILONE M C, FISH J D, CARPENITO C, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(8): 1453-1464. DOI: 10.1038/mt.2009.83.
- [5] SJOUKJE J C, VAN DER STEGE N, MOHAMAD H, et al. The pharmacology of second generation chimeric antigen receptors[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(7): 499-509. DOI: 10.1038/nrd4597.
- [6] CARPENITO C, MILONE M C, HASSAN R, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(11): 3360-3365. DOI: 10.1073/pnas.0813101106.
- [7] SONIA G, CHEN X, MADAR A V, et al. ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells[J]. *Blood*, 2014, 124(10): 1070-1080. DOI: 10.1182/blood-2013-10-535245.
- [8] CHMIELEWSKI M, ABKEN H. TRUCKS: the fourth generation of CARs[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(8): 1145-54. DOI: 10.1517/14712598.2015.1046430.
- [9] KONERU M, PURDON T J, SPRIGGS D, et al. IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(3): e994446[2018-06-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4404840/>. DOI: 10.4161/2162402X.2014.994446.
- [10] PEGRAM H J, PURDON T J, VAN LEEUWEN D G, et al. IL-12-secreting CD19-targeted cord blood-derived T cells for the immunotherapy of B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2015, 29(2):415-422. DOI: 10.1038/leu.2014.215.
- [11] KUEBERUWA G, KALAITSIDOU M, CHEADLE E, et al. CD19 CAR-T cells expressing IL-12 eradicate lymphoma in fully lymphoreplete mice through induction of host immunity[J]. *Mol Ther Oncol*, 2017, 12(1): 41-51. DOI: 10.1016/j.omto.2017.12.003.
- [12] YEKU O O, PURDON T J, KONERU M, et al. Armored CAR-T cells enhance antitumor efficacy and overcome the tumor microenvironment[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10541-10548. DOI: 10.1038/s41598-017-10940-8.
- [13] KEISHI A, YOSUKE K, TOMOHIKO N A, et al. IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 9(24): 2486-2491. DOI: 10.1038/nbt.4086.
- [14] HOYOS V, SAVOLDO B, QUINTARELLI C, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety [J]. *Leukemia*, 2010, 24(6): 1160-1170. DOI: 10.1038/leu.2010.75.
- [15] AVANZI M P, YEKU O, LI X, et al. Engineered tumor-targeted T cells mediate enhanced anti-tumor efficacy both directly and through activation of the endogenous immune system[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(7): 2130-2141. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.04.051.
- [16] CURRAN K J, SEINSTRAL B A, NIKHAMIN Y, et al. Enhancing antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells through constitutive CD40L expression[J]. *Mol Ther*, 2015, 23(4): 769-778. DOI: 10.1038/mt.2015.4.
- [17] ZAH E, LIN M Y, SILVA-BENEDICT A, et al. T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells[J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(6): 498-508. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0231.
- [18] HEGDE M, MUKHERJEE M, GRADA Z, et al. Tandem CAR-T cells targeting HER2 and IL13R $\alpha$ 2 mitigate tumor antigen escape[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8): 3036-3052. DOI: 10.1172/JCI83416.
- [19] BIELAMOWICZ K, FOUSEK K, BYRD T T, et al. Trivalent CAR-T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma[J]. *Neuro Oncol*, 2018, 20(4): 506-518. DOI: 10.1093/neuonc/nox182.
- [20] POSEY A D, CLAUSEN H, JUNE C H. Distinguishing truncated and normal MUC1 glycoform targeting from Tn-MUC1-specific CAR-T cells: specificity is the key to safety[J]. *Immunity*, 2016, 45(5): 947-948. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.10.015.
- [21] JOHNSON L A, SCHOLLER J, OHKURI T, et al. Rational development and characterization of humanized anti-EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(275): 275ra22. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa4963.
- [22] MORGAN R A, JOHNSON L A, DAVIS J L, et al. Recognition of glioma stem cells by genetically modified T cells targeting EGFRvIII and development of adoptive cell therapy for glioma[J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(10): 1043-1053. DOI: 10.1089/hum.2012.041.
- [23] O'ROURKE D M, NASRALLAH M P, DESAI A, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR-T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(399): 984-989. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa0984.
- [24] BROWN C E, WARDEN C D, STARR R, et al. Glioma IL-13 r1pha-2 is associated with mesenchymal signature gene expression and poor patient prognosis[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77769[2018-06-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3800130/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0077769.
- [25] THACI B, BROWN C E, BINELLO E, et al. Significance of interleukin-13 receptor alpha 2-targeted glioblastoma therapy[J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(10): 1304-1312. DOI: 10.1093/neuonc/nou045.
- [26] CHO J H, COLLINS J J, WONG W W. Universal chimeric antigen receptors for multiplexed and logical control of T cell responses[J]. *Cell*, 2018, 17(18): S0092-0093. DOI:10.1016/j.cell.2018.03.038.
- [27] CARUANA I, SAVOLDO B, HOYOS V, et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirection T lymphocytes[J]. *Nat Med*, 2015, 21(5): 524-529. DOI: 10.1038/nm.3833.
- [28] DISTASI 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(3): 6392-6402. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209650.
- [29] PENG W, YE Y, RABINOVICH B A, et al. Transduction of tumor-specific T cells with CXCR2 chemokine receptor improves migration to tumor and antitumor immune responses[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(22): 5458-5462. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0712.
- [30] 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]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(32): 4719-4730. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0351.
- [31] TOPALIAN S L, HODI F S, BRAHMER J R, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(29):2443-2454. DOI: 10.1056/NEJMoa1200690.
- [32] RUPP L J, SCHUMANN K, ROYBAL K T, et al. CRISPR/Cas9-



- mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 737-742. DOI: 10.1038/s41598-017-00462-8.
- [33] SUAREZ E R, CHANG D K, SUN J, et al. Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 34341-34355. DOI: 10.18632/oncotarget.9114.
- [34] PROSSER M E, BROWN C E, SHAMI A F, et al. Tumor PD-L1 co-stimulates primary human CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells modified to express aPD1:CD28 chimeric receptor[J]. *Mol Immunol*, 2012, 51(3): 263-272. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.03.023.
- [35] LIU X, RANGANATHAN R, JIANG S, et al. A chimeric switch-receptor targeting PD1 augments the efficacy of second-generation CAR-T cells in advanced solid tumors[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(15): 1578-1590. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2524.
- [36] MOHAMMED S, SUKUMARAN S, BAJGAIN P, et al. Improving chimeric antigen receptor-modified T cell function by reversing the immunosuppressive tumor microenvironment of pancreatic cancer[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(1): 249-258. DOI: 10.1016/j.ymthe.2016.10.016.
- [37] NEWICK K, O'BRIEN S, SUN J, et al. Augmentation of CAR T-cell trafficking and antitumor efficacy by blocking protein kinase localization[J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(6): 541-551. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0263.
- [38] LIGTENBERG M A, MOUGIAKAKOS D, MUKHOPADHYAY M, et al. Coexpressed catalase protects chimeric antigen receptor redirected T cells as well as bystander cells from oxidative stress-induced loss of antitumor activity[J]. *J Immunol*, 2016, 196(2): 759-766. DOI: 10.4049/jimmunol.1401710.
- [39] CHANG Z L, LORENZINI M H, CHEN X, et al. Rewiring T-cell responses to soluble factors with chimeric antigen receptors[J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(3): 317-324. DOI: 10.1038/nchembio.2565.
- [40] KLOSS C C, CONDOMINES M, CARTELLIERI M, et al. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 71-75. DOI: 10.1038/nbt.2459.
- [41] ROYBAL K T, RUPP L J, MORSUT L, et al. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits[J]. *Cell*, 2016, 164(7): 770-779. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.011.
- [42] JULLERAT A, MARECHAL A, FILHOL J M, et al. Design of chimeric antigen receptors with integrated controllable transient functions[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6:18950[2018-06-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26750734>. DOI: 10.1038/srep18950.
- [43] MA J S, KIM J Y, KAZANE S A, et al. Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(5):450-458. DOI: 10.1073/pnas.1524193113.
- [44] KIM M S, MA J S, YUN H, et al. Redirection of genetically engineered CAR-T cells using bifunctional small molecules[J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(8): 2832-2835. DOI: 10.1021/jacs.5b00106.
- [45] CAO Y, RODGERS D T, DU J, et al. Design of switchable chimeric antigen receptor T cells targeting breast cancer[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(19): 7520-7524. DOI: 10.1002/anie.201601902.
- [46] RODGERS D T, MAZAGOVA M, HAMPTON E N, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(5): 459-468. DOI: 10.1073/pnas.1524155113.
- [47] CARTELLIERI M, FELDMANN A, KORISTKA S, et al. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts[J]. *Blood Cancer J*, 2016, 6(5): 458-466. DOI: 10.1038/bcj.2016.61.
- [48] FELDMANN A, ARNDT C, BERGMANN R, et al. Retargeting of T lymphocytes to PSCA or PSMA positive prostate cancer cells using the novel modular chimeric antigen receptor platform technology "UniCAR" [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19): 31368-31385. DOI: 10.18632/oncotarget.15572.
- [49] ALBERT S, ARNDT C, FELDMANN A, et al. A novel nanobody-based target module for retargeting of T lymphocytes to EGFR-expressing cancer cells via the modular uni-CAR platform[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2017, 6:e1287246[2018-06-19]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28507794>. DOI:10.1080/2162402X.2017.1287246.
- [50] FEDOROV V D, THEMELI M, SADELAIN M, et al. PD-1 and CTLA-4 based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(215): 215ra172. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006597.
- [51] BUDDE L E, BERGER C, LIN Y, et al. Combining a CD20 chimeric antigen receptor and an inducible caspase 9 suicide switch to improve the efficacy and safety of T cell adoptive immunotherapy for lymphoma[J / OL]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82742[2018-06-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3866194/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0082742.
- [52] SERAFINI M, MANGANINI M, BORLERI, G, et al. Characterization of CD20-transduced T lymphocytes as an alternative suicide gene therapy approach for the treatment of graft-versus-host disease[J]. *Hum Gene Ther*, 2004, 15(1): 63-76. DOI: 10.1089/10430340460732463.
- [53] 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(13): 1277-1287. DOI: 10.1182/blood-2014-01-545020.
- [54] WANG X, CHANG W C, WONG C W, et al. A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells[J]. *Blood*, 2011, 118(17): 1255-1263. DOI: 10.1182/blood-2011-02-337360.
- [55] DIEGO SAN .Clinical trial utilizing BioAtla's conditionally active biologics in CAR-T candidates for solid tumors to be initiated in China[J]. *Oncology*, 2018, 8(2): 112-115. <https://www.bioatla.com/news/conditionally-active-car-t-enters-the-clinic-in-china/>.
- [56] HUDECEK M, SOMMERMEYER D, KOSASIH P L, et al. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(2):125-135. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0127.
- [57] QIN L, LAI Y, ZHAO R, et al. Incorporation of a hinge domain improves the expansion of chimeric antigen receptor T cells[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1):68-75. DOI: 10.1186/s13045-017-0437-8.
- [58] ALMASBAK H, WALSENG E, KRISTIAN A, et al. Inclusion of an IgG1-Fc spacer abrogates efficacy of CD19 CAR T cells in a xenograft mouse model[J]. *Gene Ther*, 2015, 22(5): 391-403. DOI: 10.1038/gt.2015.4.

[收稿日期] 2018-09-01

[修回日期] 2018-10-11

[本文编辑] 王映红