

提高 CAR-T 细胞免疫疗法有效性和安全性的新策略

刘增萍^{1,2}, 傅晓康³, 万荣雪^{2,3}, 黄文华^{1,2,3}

(1. 广东医科大学基础医学院, 广东 东莞 523808; 2. 广东医科大学附属医院, 广东 湛江 524000; 3. 南方医科大学基础医学院人体解剖学教研室, 广东 广州 510515)

摘要:近年来,嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)免疫疗法发展迅速,尤其是在急性 B 系淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤的治疗上取得了显著疗效。虽然 CAR-T 细胞免疫疗法是一种非常具有前景的新型肿瘤免疫治疗方式,但是其应用仍然存在许多局限性:一方面, CAR-T 细胞免疫疗法治疗实体瘤的疗效不佳;另一方面, CAR-T 细胞免疫疗法在治疗过程中会出现细胞因子风暴等严重的并发症。该文主要从增强 T 细胞的定向运输和浸润、减缓或消除效应 T 细胞的衰竭以及拮抗肿瘤的免疫抑制微环境等方面概述提高 CAR-T 细胞治疗有效性的新策略,以及通过增强 CAR-T 识别并杀伤肿瘤细胞的特异性和更有效地调控 T 细胞活性的启动和关闭等新策略,提高 CAR-T 细胞治疗的安全性。

关键词:嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T);有效性;安全性;免疫疗法;肿瘤

中图分类号:R730.51 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-0242(2021)07-0552-09

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2021.07.A012

New Strategies to Improve Efficiency and Safety of Chimeric Antigen Receptor T Cell(CAR-T) Immunotherapy

LIU Zeng-ping^{1,2}, FU Xiao-kang³, WAN Rong-xue^{2,3}, HUANG Wen-hua^{1,2,3}

(1. School of Basic Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, China; 3. Department of Anatomy, School of Basic Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Chimeric antigen receptor T cell(CAR-T) immunotherapy has developed rapidly in recent years, especially in the treatment of acute B lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. However, there are some limitations for CAR-T immunotherapy: it may not produce ideal curative effect in solid tumors; and serious complications, such as cytokine release syndrome, may occur during the treatment. New strategies to improve efficacy and safety of CAR-T immunotherapy are summarized in this article, including enhancing directional transportation and infiltration of T cells, relieving or eliminating exhaustion of effector T cells, and antagonizing the immuno-suppressive microenvironment of tumors; and the strategies of improving the specificity of CAR-T cells, "turning on" and "turning off" T cells activation are also discussed.

Key words: chimeric antigen receptor T cell(CAR-T); efficiency; safety; immunotherapy; tumor

嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T) 免疫疗法是一种新开发的过继性 T 细胞疗法(adoptive T cell therapy, ACT)^[1]。CAR-T 细胞免疫疗法是指通过对患者自身 T 细胞进行基因工程改造,以表达与肿瘤表面相关抗原(tumor-associ-

ated antigen, TAA)结合的合成受体,随后将 CAR-T 细胞进一步离体扩增再回输到患者体内,达到特异性杀伤肿瘤细胞的目的^[2]。据报道,人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)表达下调或缺失是人类肿瘤细胞免疫逃逸的常见机制^[3]。然而, CAR-T 细胞在识别肿瘤的过程中,不再受到主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)的限制,而是以非 HLA 依赖性的方式识别肿瘤抗原,

收稿日期:2021-02-24;修回日期:2021-04-09

基金项目:国家自然科学基金(61427807);广东省自然科学基金面上项目(2019A1515011854)

通信作者:万荣雪, E-mail: wrx1253071629@163.com

从而能够更广泛地识别肿瘤细胞^[4]。为了提高 CAR-T 细胞治疗的成效, 研究者们对 CARs 的结构进行了优化和改造。第一代 CARs 主要由胞膜外抗原结合区、跨膜区和主要源自 CD3- ζ 信号链的胞内信号转导区构成^[5]。第一代 CAR-T 细胞虽然能够实现对肿瘤的特异性识别与杀伤, 但其在体内缺乏增殖和持久性^[6]。为了增强 CAR-T 细胞的增殖能力, 研究者们将第一代 CARs 的胞内结构域中插入 CD28 或 4-1BB 等共刺激结构域, 形成第二代 CARs^[7]。实验表明, 与具有单个信号结构域的 CAR-T 细胞相比, 共刺激信号的引入增强了 CAR-T 细胞增殖和细胞因子的分泌^[8-10]。研究表明, CD28 和 4-1BB 共刺激诱导不同的肿瘤消除动力学, 为保留基于 CD28 的 CARs 的杀伤能力以及基于 4-1BB 的 CARs 的维持能力, 研究者们设计了同时串联两个共刺激结构域的第三代 CARs^[8,11]。第四代 CARs (TRUCKs) 细胞具有额外的遗传修饰, 在第二代 CARs 的基础上引入促炎症细胞因子 (如 IL-12), 通过释放促炎症因子 IL-12 招募并活化更多的先天性免疫细胞如巨噬细胞, 识别并杀伤缺乏 T 细胞靶向抗原的肿瘤细胞, 进而引起更为广泛的抗肿瘤效应^[12-13]。

迄今为止, CAR-T 细胞免疫疗法在血液系统肿瘤中取得显著成效^[14-16]。2017 年美国食品和药品监督管理局 (FDA) 先后批准了两款靶向 CD19 的 CAR-T 细胞产品上市——诺华公司的 Kymriah 用于治疗小儿复发或难治性急性淋巴细胞白血病和 Kite 公司的 Yescarta 用于治疗成人复发或难治性大 B 细胞淋巴瘤^[17]。2020 年 7 月 24 日, FDA 正式批准 Tecartus (前称 KTE-X19) 上市, 用于治疗复发或难治性套细胞淋巴瘤^[18]。虽然 CAR-T 细胞免疫疗法在某些实体瘤中取得了较好的疗效, 但仍然不及其在血液系统中的疗效。在一项研究 GD2 特异性 CAR-T 细胞用于治疗小儿神经母细胞瘤的临床试验中, 入选的 11 例活动性疾病患者中有 3 例完全缓解^[19]。使用 HER-2 特异性 CAR 对 HER-2 阳性肉瘤患者进行 I/II 期临床研究, 结果显示, 在 17 例可评估疗效的患者中, 4 例患者在 12 周至 14 个月内病情稳定, 其中 3 例患者病情稳定且能够接受手术切除残留肿瘤, 无需进一步治疗即可完全缓解^[20]。虽然 CAR-T 细胞在实体瘤的治疗中取得了一些进展, 但是由于 CAR-T 细胞渗透性差、效应 T 细胞的衰竭以及免疫

抑制的肿瘤微环境, 使得 CAR-T 细胞免疫疗法在实体瘤中的有效性不高。在输注 CAR-T 细胞后, 患者常常会出现一些不良反应, 其中最常见的是细胞因子释放综合征 (cytokine release syndrome, CRS)、CAR-T 相关性脑病综合征和靶标外肿瘤毒性^[21]。

1 提高 CAR-T 细胞治疗的有效性

1.1 增强 T 细胞的定向运输和浸润

CAR-T 细胞在治疗实体瘤时, 需要跨越层层阻碍到达目标肿瘤部位并有效识别肿瘤细胞才能发挥其免疫杀伤作用。研究表明, 效应 T 细胞表面的特异性趋化因子受体与肿瘤或肿瘤相关细胞产生的趋化因子相匹配将有利于 CAR-T 细胞向肿瘤部位迁移和浸润^[22-23]。考虑到趋化因子在淋巴细胞迁移和归集中的重要性, Moon 等^[23]通过静脉注射改良溶瘤牛痘病毒提高趋化因子 CXCL11 在间质瘤肿瘤部位的浓度, 高水平的 CXCL11 成功招募到更多的抗原特异性 T 细胞进入肿瘤部位, 提高了抗肿瘤效应。此外, 成纤维网状细胞产生的 IL-7 和 CCL19 对淋巴器官中 T 区的产生和维持具有至关重要的作用。Adachi 等^[24]模拟淋巴器官中的 T 区环境, 构建共表达 IL-7 和 CCL19 的 CAR-T 细胞, 结果显示, 实体瘤中共表达 IL-7 和 CCL19 的 CAR-T 细胞显著增强了树突细胞及 T 细胞向实体瘤部位的浸润, 提高了 CAR-T 细胞与内源性免疫细胞的协同抗肿瘤作用。

CAR-T 细胞浸润到实体瘤的主要物理屏障是肿瘤细胞的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 如肺癌周围形成的致密纤维化瘤周包膜, 已被证实能阻止 T 细胞向肿瘤组织内浸润^[25]。硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (heparan sulfate proteoglycans, HSPG) 是 ECM 的主要成分之一, 因此攻击富含基质的实体瘤的 T 细胞需要降解 HSPG 才能进入肿瘤细胞之间发挥抗肿瘤作用^[26-27]。Caruanu 等^[26]构建表达乙酰肝素酶 (heparanase, HPSE) 的 GD2 特异性 CAR-T 细胞, 研究表明在不影响 CAR-T 细胞对 GD2 的特异性识别的同时, 表达 HPSE 的 GD2-CAR-T 细胞通过降解 HSPG 从而促进 CAR-T 细胞向肿瘤组织内浸润, 显著延长荷瘤小鼠的生存期。研究表明, 肿瘤血管上内皮素 B 受体 (endothelin B receptor, ETB) 的过度表达可作为屏障, 抑制淋巴细胞黏附于内皮并限制淋巴

细胞向肿瘤浸润^[28]。Kandalafi 等^[29]用选择性拮抗剂 BQ-788 阻断 ETB,促进 T 细胞黏附于内皮进而促进淋巴细胞的浸润。此外,结构和功能异常的肿瘤脉管系统会抑制免疫细胞向肿瘤组织内浸润,通过靶向血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗血管生成治疗可使肿瘤血管正常化,使得肿瘤特异性 T 细胞募集增加^[30-31]。

增强 CAR-T 细胞浸润的另一种方法是在肿瘤局部注射 CAR-T 细胞。这种方式既可以使 CAR-T 细胞绕过物理屏障,又可以避免 CAR-T 细胞向肿瘤组织外渗透。一项临床研究评估了在胶质母细胞瘤患者颅内注射 IL-13R α 2 特异性 CAR-T 细胞,结果显示有短暂的抗神经胶质瘤反应,且没有治疗相关的严重副作用^[32]。基于上述研究结果,Brown 等^[33-34]设计了具有 4-1BB 共刺激域的第二代 IL-13R α 2-CARs,以提高 T 细胞的持久性和抗肿瘤效应。在 1 例复发性多灶性胶质母细胞瘤患者颅内输注第二代 IL13R α 2-CAR-T 细胞后,颅内肿瘤和脊柱肿瘤均消退,脑脊液中细胞因子和免疫细胞水平相应升高。Adusumilli 等^[35]研究发现在临床前恶性胸膜间皮瘤模型中,与静脉内注射 CAR-T 细胞相比,胸膜内注射间皮素特异性 CAR-T 细胞可改善 T 细胞活化和持久性以及抗肿瘤反应。重要的是,与静脉输注相比,局部给药所需的 CAR-T 细胞数量显著降低,并且无明显的全身反应毒性^[35-36]。

1.2 减缓或消除效应 T 细胞的衰竭

CAR-T 细胞浸润到肿瘤组织内后,必须扩增到一定的数量并存活足够长的时间才能有效杀伤肿瘤细胞。临床实验证明,CAR-T 细胞的功能衰竭会导致 CAR-T 细胞治疗的整体抗肿瘤效果不佳^[37-38]。Long 等^[39]研究表明,CAR scFv 以抗原非依赖性方式聚集引起的强直 CARCD3 ζ 磷酸化会触发 CAR-T 细胞的早期衰竭,通过引入 4-1BB 共刺激结构域可改善嵌合抗原受体的强直信号诱导的 T 细胞衰竭。CAR-T 细胞的制备需要离体激活和扩增 T 细胞,如此一来会加速效应 T 细胞分化和功能衰竭。在临床前小鼠模型中,通过 T 细胞归巢纳米颗粒技术,体内重编程的 CAR-T 细胞在控制白血病进展方面与体外制造的常规 CAR-T 细胞同样有效^[40]。此外,实验数据表明内源性 TCR 对 CD8⁺ CAR-T 细胞的持久性具有负面影响,TCR 的存在使得 CD8⁺ CAR-T 细胞

上的衰竭标志物和凋亡标志物的表达增加^[41]。但 Stenger 等^[42]在 NALM6 白血病细胞的体内模型中证实了,内源性 TCR 和 CAR 共表达可使 T 细胞获得优异的持久性,并显著延长白血病的体内控制时间。关于 TCR 影响 T 细胞的存活机制有待进一步探究。最近的一项关于胶质母细胞瘤临床前研究中,比较了第二代 IL13R α 2-CAR 转导至患者来源 CD8⁺和 CD4⁺T 细胞的功效,CD8⁺CAR-T 细胞更容易被活化诱导衰竭,与 CD8⁺CAR-T 细胞相比,CD4⁺CAR-T 细胞具有更强的长期抗肿瘤功效^[43]。此外,在肿瘤小鼠模型中,通过静脉输注在人类淋巴细胞中选择性生成的 CD4⁺CAR-T 细胞的小鼠显示出了更快、更好的肿瘤杀伤力,尤其在靶抗原负荷较高的情况下^[44]。但是关于 CD4⁺CAR-T 细胞更具优越性的相关报道还较少,该结论还需进一步验证。已有多项研究表明,干细胞样记忆性 T 细胞 (stem cell memory T cells, TSCM) 和中央记忆 T 细胞 (central memory T cells, TCM) 表现出优异的持久性和抗肿瘤免疫性^[45-47]。因此,促使 CAR-T 细胞向中央记忆或干细胞样记忆表型分化,是增强治疗反应和细胞持久性的另一种独特方法。经工程改造的表达 IL-7 和 CCL19 的 CAR-T 细胞介导了针对肿瘤的记忆反应,并导致了预先建立的实体瘤完全消退并提高了小鼠的存活率^[24]。此外,在异种移植小鼠肿瘤模型中,Batra 等^[48]通过构建共表达 IL-21 和 IL-15 的 GPC3-CAR-T 细胞提高了 TSCM 和 TCM GPC3-CAR-T 细胞的比例并降低了 GPC3-CAR-T 细胞的凋亡率,进一步增强了 GPC3-CAR-T 细胞的体内扩增、持久性和抗肿瘤活性。

1.3 应对免疫抑制的肿瘤微环境

CAR-T 细胞免疫疗法在实体瘤中疗效不佳的另一原因是肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 的存在。TME 是由各种免疫细胞、内皮细胞、可溶性因子、细胞外基质等组成的复杂系统,具有缺氧、低营养、免疫抑制等特征,三者相辅相成,在局部耐药、免疫逃逸和远处转移等肿瘤发生、发展过程中起关键作用^[49-51]。

缺氧和营养不足是 TME 的主要特征。肿瘤细胞通过自身高代谢 TME 中的葡萄糖、L-谷氨酰胺和脂肪酸,产生大量乳酸、丙酮酸和酮体,导致 TME 中 pH 值较低,从而抑制 T 细胞和 NK 细胞的活性^[52-53]。以乳酸为代表的单羧酸,其动态吸收和再分配主要由

质子偶联的单羧酸转运蛋白(monocarboxylate transporters, MCTs)介导,通过抑制 MCT1 活性能够有效抑制小鼠肿瘤细胞的生长和增殖^[54-55]。人体必需氨基酸——色氨酸的缺乏可激活环境传感蛋白 2 (general control nonderepressible 2, GCN2),从而抑制 CD8⁺效应 T 细胞增殖并激活 CD4⁺Treg 细胞的综合应激反应^[56]。吲哚胺 2,3 双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)是一种细胞内酶,可催化色氨酸代谢生成犬尿氨酸等有毒代谢物。大多数人类肿瘤组成性表达 IDO,如前列腺癌、乳腺癌、脑和血液系统恶性肿瘤。在 B 淋巴细胞瘤肿瘤模型中, Kalinski 等^[57]证明了氟达拉滨和环磷酰胺通过降低 IDO 的表达提高了 CAR-T 细胞的治疗功效。因此, CAR-T 细胞和 IDO 抑制剂的联合治疗可能成为耐药恶性肿瘤的一种选择。

免疫抑制的 TME 主要由免疫抑制细胞介导,包括调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)、骨髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)和肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)^[58]。这些细胞主要通过分泌抑制性细胞因子,如 IL-4、IL-10、TGF- β 等抑制细胞毒性 CD8⁺T 细胞和自然杀伤细胞的募集和活化,从而促进肿瘤细胞的生长、浸润和转移^[59]。为了提高 T 细胞在抑制性 TME 中的效能, Leen 等^[60]对 CAR-T 细胞进行修饰改造,将 IL-4 受体(IL4R α)胞外区与 IL-7 受体(IL-7R α)胞内区进行融合形成 4/7 ICR 结构。免疫抑制性 IL-4 可结合并激活 4/7 ICR,但下游信号转换为免疫刺激的 IL-7R 信号,激活 IL-7R 信号转导通路可促进记忆 T 细胞的形成和效应 T 细胞的存活。Mohammed 等^[61]构建了 4/7 ICR,使其在 CAR-PSCA T 细胞中表达,发现改造后的 CAR-T 细胞能逆转肿瘤来源的 IL-4 的抑制作用,且促进 T 细胞增殖,从而增强了抗肿瘤活性。Chang 等^[62]设计靶向可溶性配体 TGF- β 的 CAR 结构,实验证明二聚化 TGF- β 配体通过诱导受体二聚化激活 TGF- β CAR-T 细胞的 NFAT 和 NF- κ B 信号通路而无法激活磷酸化 SMAD2(pSMAD2)信号,同时促进 TGF- β CAR-T 细胞增殖和细胞因子的分泌,逆转了 TGF- β 的免疫抑制作用。此外,可以通过调节 CAR 的配体结合结构域和信号转导域之间的机械偶联来微调 CAR 对可溶性配体的反应性。

介导肿瘤诱导的免疫抑制的关键检查点途径之一是程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein 1, PD-1)途径。PD-1 是 T 细胞表面的一种受体蛋白,通过与配体 PD-L1 或 PD-L2 的相互作用而负调节 T 细胞的免疫功能,防止细胞因慢性炎症而受损和预防组织损伤,是正常的生理反应^[63]。然而,许多人类实体瘤高表达 PD-L1,与活化 T 细胞表达的 PD-1 结合,抑制 T 细胞应答从而发生免疫逃逸,与不良预后相关^[63-64]。抗 PD-1 抗体则可以抑制负免疫调节进而增强 T 细胞介导的抗肿瘤活性。因此,联合 PD-1 抗体可以提高 CAR-T 细胞的疗效。但 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。其次,PD-1 抗体疗效短暂且依赖重复给药,而且可能会产生对检查点抑制剂的耐药性^[64]。为了规避 PD-1 抗体疗法所带来的不良反应,可使用基因编辑技术敲除 T 细胞中 PD-1 基因或构建 PD-1 抗体分泌型 CAR 等。因此, Zhao 等^[65]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除了细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL) PD-1 的表达,并评估其对多发性骨髓瘤(MM)的抗肿瘤活性的影响,结果显示,敲除 PD-1 可有效抑制体内 MM 细胞的生长,并显著提高异种移植小鼠的总体存活率。此外, Rupp 等^[66]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑结合慢病毒转导有效阻断 CAR-T 细胞的 PD-1 表达,在体内和体外均观察到 anti-CD19 CAR-T 细胞对 CD19+ PD-L1+ 肿瘤细胞的杀伤能力显著提高。Rafiq 等^[67]通过构建分泌 PD-1 阻断性 scfv 的 CAR-T 细胞,进一步增强抗肿瘤反应,这种局部递送分泌可防止其潜在的全身反应毒性。

2 提高 CAR-T 细胞治疗的安全性

2.1 增强 CAR-T 细胞的特异性

CAR-T 细胞疗法是肿瘤免疫治疗的重要手段,具有较强的抗肿瘤疗效,但由于明显的临床毒副作用而被限制使用。特别是实体瘤,由于缺乏特异性靶抗原,难以避免靶外肿瘤毒性,进一步限制了 CAR-T 细胞治疗在实体瘤中的应用。因此,为了避免 CAR-T 细胞的脱靶效应, Roybal 等^[68]设计了一种组合抗原激活的 T 细胞回路。在这一回路中,识别其

中一个抗原的 SynNotch 受体能够诱导对应第二个抗原的 CAR 表达。这种双受体 AND-gate T 细胞 (dual-receptor and-gate T cells) 只有在肿瘤细胞同时表达两种抗原的情况下才会被激活,提高了 CAR-T 细胞的靶向特异性。体内实验中,这些 T 细胞展现出了精准的识别与杀伤能力,能够区分出只拥有单个抗原的非肿瘤细胞,且有效清除携带组合抗原的肿瘤细胞。此外,CAR-T 细胞疗法显示了治疗肿瘤的可能性,然而这种治疗性 T 细胞的效能受限于内源性 T 细胞的反应:一方面,自然反应产生的细胞因子过量具有毒性效应;另一方面,T 细胞克服免疫抑制的 TME 的能力有限。Roybal 等^[69]证明 SynNotch 受体可以被用来制定自定义响应程序。他们设计了细胞表面的识别受体,发现胞内与受体相关的偶联蛋白可以激活某一段碱基序列,当这段序列出现或人工导入到目的表达基因的上游时,就可以特异性地表达相应的产物,形成一种“点单式”的 T 细胞反应。通过定制细胞因子分泌,能够调整触发所需要的特异性免疫反应。

2.2 设计耦合 TCR 的 CAR 结构

在 CAR-T 细胞治疗中 CAR 的非天然信号转导将导致不受控制的 T 细胞活化,进而出现严重/致死性的不良反应。T 细胞抗原偶联剂 (T-cell antigen coupler, TAC),是一种嵌合分子,包含多个蛋白质结构域,可将肿瘤靶向能力与 T 细胞自身的激活机制相结合。具体来说,TAC 一旦整合到患者 T 细胞中,一个结构域便会与肿瘤特异性靶点结合促进其对肿瘤细胞的识别,而第二个结构域会将 TAC 分子与内源性天然 T 细胞受体 (TCR) 连接起来。TAC 分子通过 CD4 共受体结构域锚定在膜中,这为 TAC 增加了共受体功能。基于这些功能的结合,TAC 能引导内源性 TCR 信号通路的自然激活和 T 细胞介导的肿瘤细胞杀伤。因此,TAC 工程 T 细胞有望诱导一种可控的肿瘤特异性反应,并且在体内没有毒性。Helsen 等^[70]分别以靶向 HER2 和 CD19 为研究目标,在异种移植肿瘤模型中,HER2-TAC-T 细胞和 CD19-TAC-T 细胞均显示出显著的动物体内和体外杀伤肿瘤活性。研究者们还将 TAC-T 细胞与第一代和第二代 CAR-T 细胞进行对比,发现 TAC 改造的 T 细胞具有更好的肿瘤浸润效果和更少的细胞因子 (IFN- γ 、TNF- α 、IL-2) 分泌。此外,林欣教授团队设计

并构建了一种新型嵌合受体,命名为合成 T 细胞受体抗原受体 (synthetic T cell receptor and antigen receptor, STAR)。这种新型嵌合 STAR 受体通过将抗体轻链和重链可变区与 T 细胞受体的 α 和 β 链恒定区相融合而得到双链结构,其 α 、 β 链会与 T 细胞内源性的 CD3 亚基结合形成复合体。STAR 兼具抗体特异性识别抗原的特点以及类似天然 TCR 的信号转导能力。体外功能实验结果显示,STAR-T 细胞展现出和 CD28-CAR-T 细胞相当的特异性杀伤能力,同时还保持了和 4-1BB-CAR-T 细胞相似的存活和增殖能力。在上皮细胞癌、脑胶质母细胞瘤和肝癌的动物模型中,STAR-T 细胞获得优于传统 CAR-T 细胞的抗肿瘤疗效,并且无明显的毒副作用^[71]。

2.3 为 CAR 设计开关

CAR-T 技术同样面临一个巨大的挑战——细胞因子风暴 (CRS):即 T 细胞会异常迅速地释放细胞因子到血液中,导致患者出现高热和血压急剧下降等症状。因此为了提高其可控性和安全性,开关型 CAR-T 作为新一代“智能”CAR-T 细胞治疗的研究应运而生。第一种开关分子是靶向模块 (targeting module, TM),调控 UniCAR-T 细胞的活化^[72]。效应分子 (effective molecule, EM) 是一种由两个连续排列的 scFv 组成的通用的双特异性抗体,既结合 CD3 复合物,又结合肽表位。而 TM 是双功能分子,不但识别肿瘤表面相关抗原,还包含肽表位。因此,EM 可以与任何 TM 相结合形成双特异性免疫复合物,进而活化 CAR-T 细胞。UniCAR-T 细胞是惰性的,但在 TM 存在的情况下,可以重定向到肿瘤细胞。因此,TM 充当开关分子,UniCAR-T 细胞可以简单地通过输注 TM 反复“on”,而通过停止输注和消除 TM 打开“off”。第二种开关分子是小分子药物,通过破坏异二聚体 (CDH) 调控 STOP-CAR-T 细胞的活性^[73]。STOP-CAR-T 细胞的抗原结合和 T 细胞活化分别由两条链编码,即识别 (R) 链和信号 (S) 链。将经计算设计的蛋白质分别插入两条链,通过蛋白质的相互作用,两条链可以自组装而且可以被小分子药物破坏。研究人员在体外实验中,证实这种针对前列腺癌抗原的 STOP-CAR-T 系统的效果与传统的 CAR-T 效果相同,但是只有 STOP-CAR-T 系统的作用可以通过小分子药物关闭。通过小分子药物定时给药,动态灭活 STOP-CAR-T 细胞的活性确保了 CAR-T 细

胞治疗的安全性^[73]。此外,Yang 等^[74]利用双功能分子开关 FPBM 来严格调控 sdCAR-T 细胞(switchable dual receptor CAR-T cell)的活性.FPBM 由异硫氰酸荧光素 FITC 和 PD-L1 阻断肽偶联而成。其调控机制为:sdCAR-T 遇到表达 PD-L1 的肿瘤细胞时,由于 FPBM 含有 PD-L1 阻断肽,可以形成 CD3 ζ -FPBM-PD-L1 分子桥梁,使得 sdCAR T 细胞精准识别并杀伤肿瘤细胞。当 FPBM 不存在时,CD3 ζ 无法直接识别 PD-L1,无法形成 CD3 ζ -FPBM-PD-L1 分子桥梁,也就无法实现 sdCAR-T 细胞的激活,从而实现 FPBM 对 sdCAR-T 细胞激活的精准调控。FPBM 不仅具有调控功能,它含有的 PD-L1 阻断肽也可以阻断 PD-L1/PD-1 的识别通路,减少免疫逃逸发生的可能,因而 FPBM 是激活 sdCAR-T 细胞和减少免疫逃逸的双功能分子开关。

2.4 设计基于 DAP12 CAR 新结构

特别是在实体瘤中,效应 T 细胞功能的丧失继而出现免疫抵抗,是 CAR-T 细胞免疫治疗在实体瘤应用中的重要障碍。Wang 等^[75]设计一种替代的嵌合免疫受体,将抗原识别的单链可变片段融合到杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer immunoglobulin-like receptor,KIR)跨膜和胞质结构域,与 DAP12 形成多链免疫复合物。经过工程设计以表达 KIR-CAR 和 DAP12 的过继转移 T 细胞可以有效激活 T 细胞并能诱导异种移植瘤消退,包括间皮瘤异种移植瘤。而这些异种移植瘤对含有 4-1BB 或 CD28 共刺激域的 CD3 ζ 型 CAR 的 T 细胞具有抗性。NKG2D 主要在 NK 细胞、NKT 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、CD8⁺T 细胞表面表达,作为一种激活性受体介导以上免疫细胞活化进而杀伤靶细胞。而 NKG2D 配体在各种类型的肿瘤细胞和免疫抑制细胞上均有表达,因此这些配体为癌症治疗提供了有吸引力的靶标^[76]。Ng 等^[77]开发了第二代 NKG2D-CAR,通过将活化性受体 NKG2D 胞外域融合到 4-1BB 和只含有一个免疫受体酪氨酸激活基序的 DAP12 胞浆结构域。与常用 CD3 ζ 激活域的 NKG2D-CAR 修饰的 T 细胞相比,表达 NKG2D-DAP12-CAR 的 T 细胞可刺激产生较低水平 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2,但是两种 CAR 在介导体外肿瘤细胞裂解方面并没有差异。因此,在 CAR 设计中结合 DAP12 激活结构域可能在降低 CRS 风险方面提供潜在的临床优势。

2.5 引入抑制性 CAR

CAR 能和肿瘤细胞表面抗原结合,一旦被激活,CAR-T 细胞就会释放细胞因子并杀伤肿瘤细胞。而抑制性 CAR(inhibitory CAR,iCAR)可以特异性识别正常组织中的靶标蛋白,启动抑制信号,使得 T 细胞不会杀伤正常细胞,从而提高了 CAR-T 细胞疗法的安全性。Fedorov 等^[78]设计了一款基于 PD-1 和 CTLA-4 的抑制性嵌合抗原受体(iCAR)。iCAR 的胞外区是针对正常组织抗原的 scFv,胞内区与抑制性分子 PD-1 或 CTLA-4 信号域连接。当 iCAR 识别正常组织特异性抗原时,传递抑制性信号从而抑制 T 细胞的活化,有效预防脱靶效应。这种抗原通常在肿瘤组织缺失或表达下调,所以肿瘤细胞不能对 iCAR 的功能产生影响,从而使肿瘤细胞被清除。因此,iCAR 提供了一种动态,以自我调节的方式来预防脱靶效应。

2.6 引入自杀基因

CAR-T 细胞可在体内不停增殖,甚至转化为记忆细胞,持续产生细胞因子从而引发 CRS。为解决这一问题,研究者们致力于设计短寿命 CAR-T 细胞,如引入自杀基因——单纯疱疹病毒胸苷肌酶(HSV-TK)和诱导型安全开关 caspase 9(iCasp9),以实现 CAR-T 细胞凋亡的可控性。HSV-TK 磷酸化特定的核酸类似物如更昔洛韦(GCV),形成毒性 GCV-三磷酸复合物,与底物三磷酸腺苷竞争,在 DNA 聚合酶的作用下插入 DNA 中,导致 DNA 合成受阻,继而导致细胞凋亡^[79]。iCasp9 自杀基因是由经过修饰的人 Caspase 9 融合人 FK506 结合蛋白(FKBP)组成。当条件性给予二聚体化学诱导剂 CID(AP1903),与 iCasp9 形成二聚体,激活下游 Caspase 分子,从而导致细胞凋亡^[80]。

3 总结与展望

在癌症治疗领域,CAR-T 细胞免疫疗法是一种有效的方法,在血液系统肿瘤中已经取得了良好的疗效,在实体瘤中的应用也在不断完善和发展,但 CAR-T 细胞治疗是一把双刃剑:一方面,CAR-T 细胞疗法为恶性肿瘤患者带来了更多的希望;另一方面,CAR-T 细胞在实体瘤中疗效不佳以及输注大量 CAR-T 细胞引发的各种不良反应危及患者生命健

康。因此,研究者们致力于优化 CAR-T 细胞治疗,通过构建表达特异性趋化因子受体等增强 T 细胞的定向运输和浸润,体内重编程 CAR-T 细胞以及通过表达自分泌细胞因子提高 TSCM 和 TCM 比例来减缓或消除效应 T 细胞的衰竭,以及拮抗肿瘤的免疫抑制微环境以提高 CAR-T 细胞治疗的有效性;同时,增强 CAR-T 识别并杀伤肿瘤细胞的特异性,通过内源性 TCR 信号转导通路介导可控的肿瘤细胞裂解,以及更有效地控制、调节 T 细胞活性的启动和关闭,提高 CAR-T 细胞治疗安全性。

目前,在临床前实验和临床实验中针对 CAR-T 细胞副作用已经探究了多种安全措施。通过构建双抗原特异性 CAR 增强 CAR-T 细胞治疗的特异性,但该原理高度依赖于两种靶向抗原的表达率。Syn-Notch 虽然通过自我关闭的方式实现胞内调节,但无法控制 CAR-T 细胞活性的时间和密度。外源小分子药物可以精准调控 CAR-T 细胞的活性,但要求具有良好的药代动力学。经典自杀基因可快速、有效减少毒性,但同时会不可逆清除治疗性 CAR-T 细胞,因此需要大量输注 CAR-T 细胞。尽管这些方法依旧存在不足,但我们确信新一代 CAR-T 细胞将会实现更好的疗效和安全性,为人类健康作出更大的贡献。

参考文献:

- [1] Benmeharek MR, Karches CH, Cadilha BL, et al. Killing mechanisms of chimeric antigen receptor(CAR) T cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1283.
- [2] Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(6): 370–383.
- [3] Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape[J]. *J Cell Physiol*, 2003, 195(3): 346–355.
- [4] Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, et al. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells[J]. *Immunol Rev*, 2014, 257(1): 107–126.
- [5] Jayaraman J, Mellody MP, Hou AJ, et al. CAR-T design: elements and their synergistic function [J]. *E Bio Med*, 2020, 58: 102931.
- [6] Brocker T. Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells[J]. *Blood*, 2000, 96(5): 1999–2001.
- [7] Finney HM, Akbar AN, Lawson ADG. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain[J]. *J Immunol*, 2004, 172(1): 104–113.
- [8] Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(4): 415–428.
- [9] Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(5): 1822–1826.
- [10] Li SQ, Zhang JS, Wang ML, et al. Treatment of acute lymphoblastic leukaemia with the second generation of CD19 CAR-T containing either CD28 or 4-1BB[J]. *Br J Haematol*, 2018, 181(3): 360–371.
- [11] Guedan S, Posey AD, Shaw C, et al. Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(1): e96976.
- [12] Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(8): 1145–1154.
- [13] Chmielewski M, Kopecky C, Hombach AA, et al. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(17): 5697–5706.
- [14] Cao J, Wang G, Cheng H, et al. Potent anti-leukemia activities of humanized CD19-targeted chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia[J]. *Am J Hematol*, 2018, 93(7): 851–858.
- [15] Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(16): 1507–1517.
- [16] Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, et al. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26): 2545–2554.
- [17] U.S. Food and Drug Administration. FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma (2017)[EB/OL]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-car-t-cell-therapy-treat-adults-certain-types-large-b-cell-lymphoma>.
- [18] Wang M, Munoz J, Goy A, et al. KTE-X19 CAR T-cell therapy in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(14): 1331–1342.
- [19] Louis CU, Savoldo B, Dotti G, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma [J]. *Blood*, 2011, 118(23): 6050–6056.
- [20] Ahmed N, Brawley V, Hegde M, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(15): 1688–1696.
- [21] Oved JH, Barrett DM, Teachey DT. Cellular therapy: immune-related complications [J]. *Immunol Rev*, 2019, 290

- (1):114–126.
- [22] 王泽凡,兰霞斌,温庆良,等. CAR-T 在实体瘤中的研究进展[J]. 中国肿瘤,2019,28(9):699–704.
Wang ZF,Lan XB,Wen QL,et al. Research progress on CAR-T therapy in treatment of solid tumors[J]. China Cancer,2019,28(9):699–704.
 - [23] Moon EK,Wang LCS,Bekdache K,et al. Intra-tumoral delivery of CXCL11 via a vaccinia virus, but not by modified T cells, enhances the efficacy of adoptive T cell therapy and vaccines[J]. Oncoimmunology,2018,7(3):e1395997.
 - [24] Adachi K,Kano Y,Nagai T,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,2018,36(4):346–351.
 - [25] Salmon H,Franciszewicz K,Damotte D,et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors [J]. J Clin Invest,2012,122(3):899–910.
 - [26] 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.
 - [27] Zhang BL,Qin DY,Mo ZM,et al. Hurdles of CAR-T cell-based cancer immunotherapy directed against solid tumors [J]. Sci China Life Sci,2016,59(4):340–348.
 - [28] Buckanovich RJ,Facciabene A. Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy [J]. Nat Med,2008,14(1):28–36.
 - [29] Kandalaft LE,Facciabene A,Buckanovich RJ,et al. Endothelin B receptor, a new target in cancer immune therapy[J]. Clin Cancer Res,2009,15(14):4521–4528.
 - [30] Yang J,Yan J,Liu B. Targeting VEGF/VEGFR to modulate antitumor immunity[J]. Front Immunol,2018,9:978.
 - [31] Schaaf MB,Garg AD,Agostinis P. Defining the role of the tumor vasculature in antitumor immunity and immunotherapy[J]. Cell Death Dis,2018,9(2):115.
 - [32] Brown CE,Badie B,Barish ME,et al. Bioactivity and safety of IL13R α 2-redirection chimeric antigen receptor CD8 $^{+}$ T cells in patients with recurrent glioblastoma[J]. Clin Cancer Res,2015,21(18):4062–4072.
 - [33] Brown CE,Alizadeh D,Starr R,et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy [J]. N Engl J Med,2016,375(26):2561–2569.
 - [34] Ayuk F,Fehse B,Jason D,et al. Excellent proliferation and persistence of allogeneic donor-derived 41-BB based CAR-T cells despite immunosuppression with cyclosporine A[J]. Haematologica,2020,105(6):322–324.
 - [35] Adusumilli PS,Cherkassky L,Villena-Vargas J,et al. Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity[J]. Sci Transl Med,2014,6(261):261ra151.
 - [36] Smith TT,Moffett HF,Stephan HB,et al. Biopolymers codelivering engineered T cells and STING agonists can eliminate heterogeneous tumors [J]. J Clin Invest,2017,127(6):2176–2191.
 - [37] Kershaw MH,Westwood JA,Parker LL,et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer [J]. Clin Cancer Res,2006,12(20 Pt 1):6106–6115.
 - [38] Gargett T,Yu B,Dotti G,et al. GD2-specific CAR T cells undergo potent activation and deletion following antigen encounter but can be protected from activation-induced cell death by PD-1 blockade [J]. Mol Ther,2016,24(6):1135–1149.
 - [39] Long AH,Haso WM,Shern JF,et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors[J]. Nat Med,2015,21(6):581–590.
 - [40] Smith TT,Stephan HB,Moffett HF,et al. In situ programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers[J]. Nat Nanotechnol,2017,12(8):813–820.
 - [41] Yang Y,Kohler ME,Chien CD,et al. TCR engagement negatively affects CD8 but not CD4 CAR T cell expansion and leukemic clearance[J]. Sci Transl Med,2017,9(417):eaag1209.
 - [42] Stenger D,Stief TA,Kaeuferle T,et al. Endogenous TCR promotes in vivo persistence of CD19-CAR-T cells compared to a CRISPR/Cas9-mediated TCR knockout CAR [J]. Blood,2020,136(12):1407–1418.
 - [43] Wang D,Aguilar B,Starr R,et al. Glioblastoma-targeted CD4 $^{+}$ CAR T cells mediate superior antitumor activity[J]. JCI Insight,2018,3(10):e99048.
 - [44] Agarwal S,Hanauer J,Frank AM,et al. In vivo generation of CAR T cells selectively in human CD4 $^{+}$ lymphocytes [J]. Mol Ther,2020,28(8):1783–1794.
 - [45] Hinrichs CS,Borman ZA,Cassard L,et al. Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8 $^{+}$ T cells mediate superior antitumor immunity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2009,106(41):17469–17474.
 - [46] Kondo T,Imura Y,Chikuma S,et al. Generation and application of human induced-stem cell memory T cells for adoptive immunotherapy [J]. Cancer Sci,2018,109(7):2130–2140.
 - [47] Liu Q,Sun Z,Chen L. Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy[J]. Protein Cell,2020,11(8):549–564.
 - [48] Batra SA,Rathi P,Guo L,et al. Glypican-3-specific CAR T cells coexpressing IL15 and IL21 have superior expansion and antitumor activity against hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Immunol Res,2020,8(3):309–320.
 - [49] Anderson KG,Stromnes IM,Greenberg PD. Obstacles posed by the tumor microenvironment to T cell activity: a case for synergistic therapies[J]. Cancer Cell,2017,31(3):311–325.

- [50] Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth[J]. *Oncogene*, 2008, 27(45):5904–5912.
- [51] 陈瑞, 杨丽, 张小茜, 等. 嵌合抗原受体修饰 T 细胞在畸形性胶质母细胞瘤中的应用及其研究进展 [J]. *肿瘤学杂志*, 2020, 26(2): 139–144.
Chen R, Yang L, Zhang XQ, et al. Progress on application of chimeric antigen receptor modified T cells(CAR-T) therapy in glioblastoma [J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2020, 26(2): 139–144.
- [52] Wang JX, Choi S, Niu X, et al. Lactic acid and an acidic tumor microenvironment suppress anticancer immunity[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21):8363.
- [53] Lyssiotis CA, Kimmelman AC. Metabolic interactions in the tumor microenvironment[J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(11):863–875.
- [54] Payen VL, Mina E, Van Hée VF, et al. Monocarboxylate transporters in cancer[J]. *Mol Metab*, 2020, 33:48–66.
- [55] Wang N, Jiang X, Zhang S, et al. Structural basis of human monocarboxylate transporter 1 inhibition by anti-cancer drug candidates[J]. *Cell*, 2020, 184(2):370–383.
- [56] Howie D, Waldmann H, Cobbold S. Nutrient sensing via mTOR in T cells maintains a tolerogenic microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2014, 5:409.
- [57] Ninomiya S, Narala N, Huye L, et al. Tumor indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibits CD19-CAR T cells and is downregulated by lymphodepleting drugs [J]. *Blood*, 2015, 125(25):3905–3916.
- [58] Kalinski P, Talmadge JE. Tumor immuno-environment in cancer progression and therapy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 10(36):1–18.
- [59] Laplagne C, Domagala M, Le Naour A, et al. Latest advances in targeting the tumor microenvironment for tumor suppression[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19):4719.
- [60] Leen AM, Sukumaran S, Watanabe N, et al. Reversal of tumor immune inhibition using a chimeric cytokine receptor[J]. *Mol Ther*, 2014, 22(6):1211–1220.
- [61] 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.
- [62] Chang ZL, Lorenzini MH, Chen X, et al. Rewiring T-cell responses to soluble factors with chimeric antigen receptors[J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(3):317–324.
- [63] McDermott DF, Atkins MB. PD-1 as a potential target in cancer therapy[J]. *Cancer Med*, 2013, 2(5):662–673.
- [64] McGowan E, Lin Q, Ma G, et al. PD-1 disrupted CAR-T cells in the treatments of solid tumors:promises and challenges[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121:109625.
- [65] Zhao Z, Shi L, Zhang W, et al. CRISPR knock out of programmed cell death protein 1 enhances anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes [J]. *Oncotarget*, 2018, 9 (4): 5208–5215.
- [66] Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, 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.
- [67] Rafiq S, Yeku OO, Jackson HJ, et al. Targeted delivery of a PD-1-blocking scFv by CAR-T cells enhances anti-tumor efficacy in vivo[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(9):847–856.
- [68] Roybal KT, Rupp LJ, Morsut L, et al. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits[J]. *Cell*, 2016, 164(4):770–779.
- [69] Roybal KT, Williams JZ, Morsut L, et al. Engineering T cells with customized therapeutic response programs using synthetic notch receptors[J]. *Cell*, 2016, 167(2):419–432.
- [70] Helsen CW, Hammill JA, Lau V, et al. The chimeric TAC receptor co-opts the T cell receptor yielding robust anti-tumor activity without toxicity [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1):3049.
- [71] Liu Y, Liu G, Wang J, et al. Chimeric STAR receptors using TCR machinery mediate robust responses against solid tumors[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(586):eabb5191.
- [72] Bachmann M. The UniCAR system: a modular CAR T cell approach to improve the safety of CAR T cells [J]. *Immunol Lett*, 2019, 211:13–22.
- [73] Giordano-Attianese G, Gainza P, Gray-Gaillard E, et al. A computationally designed chimeric antigen receptor provides a small-molecule safety switch for T-cell therapy[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(4):426–432.
- [74] Yang P, Wang Y, Yao Z, et al. Enhanced safety and anti-tumor efficacy of switchable dual chimeric antigen receptor-engineered T cells against solid tumors through a synthetic bifunctional PD-L1-blocking peptide[J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(44):18874–18885.
- [75] Wang E, Wang LC, Tsai CY, et al. Generation of potent T-cell immunotherapy for cancer using DAP12-based, multi-chain, chimeric immunoreceptors [J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(7):815–826.
- [76] Dhar P, Wu JD. NKG2D and its ligands in cancer[J]. *Curr Opin Immunol*, 2018, 51:55–61.
- [77] Ng YY, Tay J, Li Z, et al. T cells expressing NKG2D CAR with a DAP12 signaling domain stimulate lower cytokine production while effective in tumor eradication [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(1):75–85.
- [78] Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors(iCARs) divert off-target immunotherapy responses [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(215):215ra172.
- [79] Matthews T, Boehme R. Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir [J]. *Rev Infect Dis*, 1988, 10(Suppl 3):S490–S494.
- [80] Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells[J]. *Front Pharmacol*, 2014, 5:235.