

## · 综 述 ·

## 嵌合抗原受体 T 细胞功能设计与运用的研究进展

支黎明,姚 祎,李文娟综述,王 晶审校

**[摘要]** 嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor engineered T cell, CAR-T)治疗在 B 细胞恶性肿瘤治疗的临床试验中取得了巨大成功,引起了业界极大的关注。文章就 CAR 功能区域, CAR 功能设计和 CAR-T 运用等方面研究进展进行综述。

**[关键词]** 嵌合抗原受体 T 细胞; CAR 功能设计; CAR-T 运用

**[中图分类号]** R392 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2017)01-0070-06

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1672-271X.2017.01.019

过继细胞免疫疗法(adoptive cellular immunotherapy, ACT)是将对抗原特异性识别的细胞经体外培养扩增输入患者体内,使其被动获得特异性识别抗原能力的一种免疫疗法。以淋巴因子激活的杀伤细胞和细胞因子诱导的杀伤性细胞为代表的非特异性细胞因肿瘤逃逸机制、肿瘤微环境和免疫耐受等原因,回输后难于有效识别杀伤肿瘤。为解决特异性识别问题,抗原特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxicity T lymphocyte, CTL)、肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TIL)、TCR 基因修饰 T 细胞(gene modified T cell, TCR-T)和 CAR-T 疗法孕育而生。CTL 疗法通过抗原提呈载体与 T 细胞共培养,而使 T 细胞获得特异性。TIL 疗法筛选对肿瘤有抗性的 TIL 中抗原特异性 T 细胞。TCR-T 疗法通过基因转导系统,表达外源性抗原特异 TCR $\alpha$ 、 $\beta$  链获得特异性识别。CAR-T 疗法通过基因转导系统,表达外源性抗原特异性 CAR,经抗原抗体结合获得特异性。CAR-T 疗法与前三者基于 TCR 与肽段/主要组织相容性复合物(peptide/major histocompatibility complex, pMHC)结合获得特异性相比,无主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)限制。CAR-T 相较于前三者具有 2 个优势:① CAR 识别肿瘤是非 MHC 限制性的,可克服 MHC 分子表达下调

的肿瘤细胞免疫逃逸机制。② 可针对任何类型的细胞表面抗原,除蛋白外还包括糖和糖脂,提高了识别范围。

## 1 CAR 功能区域

CAR 的设计是基于 TCR 结构的 T 细胞活化的第一和第二信号模型,胞外抗原结合区域,通常用单链可变区域 scFv( $V_H+V_L$ )片段,通过胞外空间区域与 I 型穿膜蛋白连接,与包括 CD3 $\zeta$  的胞内信号分子区域连接起来,再通过与肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)相互作用有效激活 T 细胞。胞内信号分子模块从第一代 CAR 的单个 Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ /CD3 $\zeta$  信号结构域到第二代的共刺激信号分子,研究较多的是 CD28/4-1BB(CD137)/OX40(CD134)/ICOS 和 CD3 $\zeta$  的 2 种信号结构域,到第三代的双共刺激信号分子组合(如 CD28-OX40, CD28-4-1BB 等)和 CD3 $\zeta$  的 3 种信号结构域组成。

一个完整的 CAR 的分子结构包括胞外抗原结合区、胞外空间区、穿膜区和胞内信号区 4 个区域。每个区域都发挥不同的功能而又相互影响,因此对于每个区域的研究是有必要的。

**1.1 胞外抗原结合区域** 目前使用最多的是 scFv 片段,从现有杂交瘤单克隆抗体中选取靶向 TAA 的鼠源单抗  $V_H$  和  $V_L$  片段,连接而成。除了可选择的单克隆抗体具有一定的局限性外,scFv 片段与 TCR 之间也存在 3 个限制其应用的不同之处:① scFv 片段对抗原的亲和力较 TCR 高,影响相关的信号传递。② scFv 片段的特异性仅局限于肿瘤细胞表面抗原,对肿瘤细胞胞内抗原无作用。③ 理论上,

**作者单位:** 210002 南京,解放军第 454 医院转化医学中心

**通讯作者:** 王 晶, E-mail: wj6373@hotmail.com

**引用格式:** 支黎明,姚 祎,李文娟,等.嵌合抗原受体 T 细胞功能设计与运用的研究进展[J].东南国防医药,2017,19(1):70-75.

鼠源 scFv 会被免疫系统排斥,易造成疾病复发。为避免异源 scFv 的问题,临床应用中一般通过化疗除去 B 淋巴细胞,以免人体产生识别外源性 CAR 的人抗鼠抗体而被免疫系统清除。但是这一方案的不良反应较为明显,因此 CAR 的人源化或对其免疫原性的限制对其疗效至关重要。基于以上 3 点,开发与 TCR 相似的 CAR 抗原结合区域对 CAR-T 细胞功能的提升是一个重要的方向。可通过噬菌体展示和杂交瘤技术,以 HLA 限制性方式结合肿瘤来源的多肽,分离“TCR 类似”抗体。此类抗体同 TCR,识别以 MHC 结合的胞内肿瘤抗原,但其动力学和高亲和力的抗体特性相较于 TCR 并无改变<sup>[1]</sup>。从正常锚蛋白改造而来的锚蛋白重复蛋白(DARPs),可广泛用于蛋白之间的亲和力、结合/解离速率和多重特异性的精密调控,因为锚蛋白本身的作用就是调控高亲和力蛋白之间相互作用<sup>[2]</sup>。还可通过计算机分析的方法,设计能结合各种限制性抗原的人工抗体<sup>[3]</sup>。

**1.2 胞外空间区域** 也称胞外连接区,或绞链区。作用是给 CAR 和抗原结合提供合适的空间结构,其长短取决于靶点抗原表位的位置。

**1.3 穿膜区域** 大多 CAR 运用 I 型穿膜蛋白,如 CD3 $\zeta$ , CD4, CD8, CD28 等。此区域虽然研究较少,但却是一个重要的功能区域,尤其是对于单聚体的 CAR<sup>[4]</sup>。研究显示含 CD3 $\zeta$  的穿膜区域在 T 细胞表达后,形成同源二聚体,并与内源性 TCR 复合物结合。进一步研究显示,CD3 $\zeta$  二聚体与同源性 TCR 复合物结合有利于 T 细胞活化 TCR<sup>[4]</sup>。

**1.4 胞内信号区** 第一代 CAR 由于只有 T 细胞活化第一信号,CAR-T 显示出有限的增殖和较短的存活期<sup>[5]</sup>。相较于第一代 CAR-T,第二代 CAR-T 有很好的增殖能力、较长的存活期和更好的定位肿瘤能力<sup>[6]</sup>。过去 5 年,在治疗急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)中,靶向 CD19 的第二代 CAR-T(CD28/4-1BB)均表现较好的临床效果,但 CD28 和 4-1BB 组件比较,何种较好尚难以确定<sup>[7]</sup>。相较于第二代 CAR-T,尽管临床前试验表明第三代 CAR-T 具有更优的抗癌效应<sup>[8]</sup>,但是这一结论缺少临床试验结果的认证。

## 2 CAR 功能设计

**2.1 基于 TCR 结构** 尽管 CAR-T 技术特异性

识别无 MHC 限制,但是其基于 TCR 信号传导而设计,因此,CAR 与 TCR 信号传导的类比研究是必要的。CAR-T 细胞,除 CD3 $\zeta$  和 CD28 磷酸化引起的信号传导外,TCR 信号其他方面对 T 细胞的分化和功能也非常重要。T 细胞功能和命运受 TCR 与所遇到细胞表面的 pMHC 亲和力的影响,而该亲和力由 T 细胞与抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)之间的空间结构、结合/解离系数、免疫突触形成、TCR 成簇聚集以及 MHC 分子与 CD4 或 CD8 的复合受体相互作用等因素决定<sup>[9]</sup>。

普通 T 细胞通过自身 TCR 能有效区分外源 pMHC 复合物和自身 pMHC 复合物。在成千上万的自身 pMHC 复合物中,仅个位数的 pMHC 激动分子也能引起相应的 T 细胞激活<sup>[10]</sup>。单个特定的 TCR 对外源 pMHC 具有最优亲和力,对自身 pMHC 具有微弱亲和力。这种特异性的获得,除经胸腺选择之外,活性 APC 细胞提供的 TCR-CD3 复合物第一信号和共刺激分子受体第二信号的共同作用也是不可或缺的。

在免疫突触形成过程中,由于 TCR 和 pMHC 复合物结构的缘故,T 细胞和 APC 细胞之间的距离约 15 nm<sup>[11]</sup>。磷酸化酶 CD45 和 CD148 由于具有远长于 15 nm 的外功能区而被排挤在突触外,从而使无负调控因子情况下的 TCR 诱导的酪氨酸磷酸化过程顺利进行。有研究表明具有更短的外功能区的突变型 CD45 蛋白削弱了 T 细胞相关信号,这也验证了上述的分子排挤作用在 T 细胞信号中的重要性<sup>[12]</sup>。

CAR 与靶点抗原之间的空间距离对于相应的 T 细胞信号也同样重要。这一空间距离取决于靶点抗原表位的位置以及 scFv 和 T 细胞膜之间的连接区域。当靶向肿瘤细胞膜远端抗原表位,应缩短 scFv 片段与 T 细胞膜间的空间距离拉近靶点抗原表位与 T 细胞膜之间的距离<sup>[13]</sup>。相反,当靶向近端抗原表位时,较长的胞外片段反而对 T 细胞功能有利<sup>[14]</sup>。这说明 CAR 的胞外片段的最佳长度受靶点抗原表位位置的影响。CAR 胞外片段长度的增减有可能使得 T 细胞和靶细胞之间保持在一个恒定的距离,从而有效的将大型抑制性分子(如磷酸化酶 CD45 和 CD148)排挤在突触外,使 TCR 诱导的酪氨酸磷酸化过程顺利进行。

传统 TCR 对低密度抗原极其灵敏的研究对靶向低密度表达抗原的 CAR 的设计具有重要的指导作用。TCR 的敏感性机制可能的原因:一是通过激活共刺激分子受体(如 CD28、NKG2D),从而降低 TCR 激活的临界值实现的;另一种解释是“连环诱导”理论,即多个 TCR 成簇聚集共同传递 pMHC 分子给 T 细胞激活<sup>[11]</sup>。在“连环诱导”过程中,TCR 与 pMHC 分子的低亲和力和快速解离很重要<sup>[15]</sup>。在一项靶向 pMHC 的 CAR 研究中发现,与  $\alpha$ 、 $\beta$ TCR 一样,低多肽浓度下,随着 CAR 表面表达越高,CAR-T 灵敏度和裂解活性反而降低<sup>[16]</sup>。研究表明,CAR 的功能具有最佳的亲和力范围,目前有多种可精确检测结合/解离系数的工具,如实时显微技术分析活性 T 细胞 TCRs 的解离系数,扫描 CAR 抗体法<sup>[17]</sup>。

CD4/CD8 的复合受体因能招募 Lck 分子而在 TCR 信号起始过程中扮演中重要的角色。Lck 分子能与附近的 TCR-CD3 $\zeta$  复合物的胞内尾部结合,并磷酸化 CD3 $\zeta$  链的酪氨酸活化基序(tyrosine-based activation motif, ITAM),从而促进 Zap70 分子的结合和磷酸化并提高 T 细胞的裂解活性。CAR 设计中无 CD4/CD8 复合受体与 pMHC 复合物之间的相互作用,CAR 是否以 TCR-CD3 复合物和 CD4/CD8 复合受体相互作用依然未知。CAR 设计中能增强其与 CD4/CD8 复合受体相互作用的策略可能使单个 CAR 的激活被加强<sup>[11]</sup>。

**2.2 基于功能应用** 为了进一步提高 CAR-T 的杀瘤效应,对 CAR-T 细胞进行再改造或者联合其他治疗是必要的。基于应用的基础,可通过以下策略实现 CAR-T 的新功能。

**2.2.1 基于 T 细胞活化第三信号模型的改造** 已接收第一和第二信号的初始 T 细胞上调表达相关受体(特别是 IL-2R),这些受体使 T 细胞能接收细胞因子、趋化因子和生长因子等形式的第三信号。这些因子的参与,进一步促进 T 细胞和其他免疫细胞活化和聚集,打破抑制性的肿瘤微环境。在第三代 CAR 基础上,基于 T 细胞活化第三信号进行的改造一般被称为第四代 CAR-T 技术。如改造 CAR-T 细胞使其能分泌 IL-12,在临床前试验表现了很好的杀瘤效应<sup>[18]</sup>。改造 CAR-T 细胞,使其共表达一个嵌合因子受体  $4\alpha\beta$ ,由胞外结构域 IL-4R 和胞内结

构域 IL-2R 和 IL-15R 构成<sup>[19]</sup>。通过胞外 IL-4R 和 IL-4 的结合,使 IL-2R 和 IL-15R 胞内信号传导激活。由于 IL-4 广泛存在于各种肿瘤的免疫微环境中<sup>[19]</sup>,故可产生有 IL-4 介导的 IL-2 和 IL-15 对 T 细胞的第三信号激活。

**2.2.2 CAR 基因表达调控系统** 由于 CAR-T 杀瘤的强大能力以及不良反应,对 CAR 基因表达调控非常迫切。**①** CAR-T 细胞条件性表达自杀基因,CAR-T 细胞转染并表达可诱导形式的 caspase-9 (iCasp9) 蛋白,药物 AP1903 的使用能激活 iCasp9 蛋白形成二聚体,从而介导 T 细胞凋亡。iCasp9 基因表达载体系统已在临床前和 I 期临床试验中展现出有效的诱导 T 细胞自杀效果<sup>[20]</sup>。**②** CAR-T “沉默”技术,利用将整个 CAR 载体置于能操控的开关系统下,用相应的小分子药物对其进行调控,如四环素或雷帕霉素类似小分子的诱导系统,能有效对整个 CAR 系统进行开启或关闭<sup>[21]</sup>。

**2.2.3 双特异 CAR 的运用** 为避免 CAR-T 脱靶发生以及对正常细胞的攻击,双靶向 CAR 技术被运用。**①** 双特异 CAR 分别靶向目标肿瘤 2 个 TAA,即 scFv1 特异识别次要抗原和 scFv2 特异识别主要抗原,通过慢病毒共转染 CAR(scFv1-CD3 $\zeta$ )和嵌合共刺激分子受体(scFv2-CD28/4-1BB)到 T 细胞。只有 2 个抗原结合后,CAR-T 细胞才能通过共刺激第二信号最优活化,发挥最大杀瘤活性<sup>[22]</sup>。这种策略的关键是传递第一信号的 CAR 需要减弱,可通过对 ITAM 进行突变或下调 scFv1 的亲和力<sup>[22]</sup>。**②** 双特异 CAR 分别靶向正常细胞和肿瘤细胞,靶向肿瘤 CAR 表达第一和第二信号,靶向正常细胞的类 CAR 表达负调控因子,例如程序性死亡受体 1(programmed cell death-1, PD-1)和细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxicity T lymphocyte antigen 4, CTLA-4),通过共转染 CAR(scFv1-CD28-CD3 $\zeta$ )和抑制性类 CAR(scFv2-PD-1/CTLA-4)到 T 细胞。CAR-T 细胞只有在特异性结合肿瘤细胞时,才能有效活化并杀伤肿瘤<sup>[23]</sup>。这种方法难点在于合适的正常细胞抗原的选择,而且抑制性受体影响 TCR 的信号传导机制不明确<sup>[11]</sup>。由于 CTLA-4 主要与 CD28 竞争性结合 CD80 和 CD86,故其在第二和第三代 CAR 中提供负调控信号的能力不如 PD-1<sup>[23]</sup>。**2.2.4 联合免疫检查点阻断剂** 由于 T 细胞活化

后, T 细胞会上调免疫抑制受体 PD-1 和 CTLA-4, 与其相应配体结合后会引引起 T 细胞耗竭或死亡。在有效的抗病毒免疫应答和自身免疫耐受所需的刺激和抑制信号之间, PD-1/程序性死亡配体 1 (programmed cell death-ligand 1, PD-L1) 信号通路至关重要<sup>[24]</sup>。近年来, 作用于 PD-1 及其 PD-L1 的药物, 已被用于治疗恶性黑色素瘤和肺癌等恶性肿瘤<sup>[25]</sup>。免疫检查点阻断剂 (PD-1 抗体或 PD-L1 抗体) 在恶性肿瘤治疗中取得了较好疗效, 其成功依赖于内源性的肿瘤特异 T 细胞的应答<sup>[26]</sup>。同样, CAR-T 联合免疫检查点阻断剂在治疗肿瘤中具有很大的潜力。

**2.2.5 开发新抗原受体 CAR** 近年来, 靶向 CD19 的 CAR-T 临床试验的成功推动了业界对实体瘤 TAA 的密集探索。其中包括粘蛋白 1 (MUC-1), 是粘蛋白家族的一种肿瘤相关糖蛋白, 也被用作免疫治疗的靶标<sup>[27]</sup>。最近有研究团队鉴定出的癌细胞标志物是一种蛋白糖基化的特异变化, 一种细胞表面糖修饰蛋白质的独特模式。随后开发了新型 CAR-T 细胞, 能特异性识别肿瘤细胞表面 Tn-MUC-1, 即 MUC-1 蛋白上的 Tn 多糖<sup>[28]</sup>。由于 NK 细胞表达的一些受体可区分肿瘤细胞和正常细胞, 这些受体也被用于 CAR 的设计。如 NKG2-D, 其配体经常高表达于许多肿瘤细胞。一个联合 NKG2-D 胞外抗原结合区域的 CAR-T 临床前试验被证实具有很好的杀瘤效应<sup>[29]</sup>。

### 3 CAR-T 运用

CAR 设计的首要难点就是杀伤肿瘤细胞的同时, 不伤害正常组织和降低不良反应。因此选择特异性的 TAA 是治疗的关键。

**3.1 恶性造血系肿瘤治疗中的应用** CAR-T 细胞疗法的临床试验目前大部分用于恶性造血系肿瘤。其中以治疗 CD19 阳性 B 细胞肿瘤, 如急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、弥漫型大 B 细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤和霍奇金氏淋巴瘤等为主。由于 CD19 阴性肿瘤或 CD19 阳性肿瘤逃逸突变的存在, 除 CD19 外, 在临床试验中的 B 细胞肿瘤靶点还有 CD22、CD20、CD30、ROR1 和 Igκ 等<sup>[30]</sup>。目前, 临床试验正在进行的治疗造血系肿瘤的其他靶点包括用于治疗多发性骨髓瘤的 B 细胞成熟抗原和 CD138, 用于治疗急性髓系白血病

的 CD33、CD123 和 LeY<sup>[30]</sup>。

**3.2 实体肿瘤治疗中的应用** 目前, 即将进行的治疗实体肿瘤的 CAR-T 临床试验, 涉及的靶点包括前列腺特异性膜抗原、间皮素、Fas 相关磷酸酯酶、表皮生长因子受体 8、表皮生长因子受体、癌胚抗原、CD171、二唾液酸神经节苷脂、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3、人表皮生长因子受体 2、IL-13 和 IL-13 受体 α2。涉及的实体瘤包括前列腺癌、间皮瘤、黑色素瘤、胰腺癌、肝癌、肺癌、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤和肉瘤等<sup>[30-31]</sup>。

### 3.3 CAR-T 技术的其他运用

**3.3.1 CAR-T 技术在自身免疫性疾病中的运用** 传统治疗自身免疫性疾病的方法主要是大范围的免疫抑制, 这会使患者更容易受到感染和癌症的攻击。利用调节性 T 细胞 (regulatory t cell, Treg) 抑制有害的免疫应答正引发越来越大的兴趣。通过在小鼠体内过继回输 Treg 细胞能防止致命性移植物抗宿主病和自身免疫性糖尿病。这一方法的有效性已经在自身免疫性疾病和同种异体移植排斥反应的临床前模型中得到验证<sup>[32]</sup>。经历同种异体造血干细胞移植的患者, 接受扩增的脐带血 Treg 细胞已被证明是安全和可行的<sup>[33]</sup>。通过 CAR-Treg 细胞聚集于易受攻击的组织以抑制那里的自身免疫成为一种治疗策略。利用 CAR 修饰小鼠 Treg 细胞, 使其靶向髓鞘, 可防止自身免疫性脑膜炎。同样, 分别寻找结肠和胰岛的靶向抗原可防止结肠炎和糖尿病<sup>[34]</sup>。

另外, 新型嵌合自身抗原受体 (chimeric automatic antigen receptor engineered T cell, CAAR-T) 技术在治疗 B 细胞相关抗体介导的自身免疫性疾病方面具有潜力<sup>[35]</sup>。寻常性天疱疹引起的自身免疫性疾病, 是由患者的 B 细胞产生的抗桥粒芯糖蛋白 3 (desmoglein 3, Dsg3) 的抗体, 持续攻击皮肤和粘膜, 产生大面积的水泡的自身免疫性疾病。以 Dsg3 作为胞外识别区的 CAAR-T (Dsg3-CD137-CD3ζ), 展示了特异性杀伤表达抗 Dsg3 的 B 细胞。这一概念也可运用于相似的疾病, 病因与一种抗体明确相关, 如基于乙酰胆碱抗原的重症肌无力<sup>[35]</sup>。

**3.3.2 CAR-T 技术在人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 等内源性慢性感染中**

的运用 目前 HIV 治疗领域的挑战是开发细胞治疗的潜力,用来清除寄宿的耐受抗病毒治疗的 HIV-1。Hutter 等<sup>[36]</sup>进行的一项特别的试验使得该领域充满活力,感染 HIV-1 的髓系白血病患者,在接受 HIV 阴性,缺失 32 个碱基对的 CCR5 基因纯合子捐赠者造血干细胞移植后,随后 20 个月艾滋病无进展。有许多方法诱导细胞产生对 HIV-1 感染的内在抗性,以及通过基因修饰的 ACT 疗法来靶向寄宿的 HIV-1<sup>[37]</sup>。Deng 等<sup>[38]</sup>试验表明,靶向特异性潜伏抗原表位的 CTL 治疗可清除人源化小鼠体内潜在的 HIV-1 病毒,为利用基因修饰的 T 细胞治疗 HIV-1 感染和其他内源性免疫系统不能控制的慢性感染提供了参考。在一项新的研究中,研究人员采用了 7 种广谱中和性抗体可变结合区,做成单链抗体 CAR。试验表明,这种广泛中和抗体 CAR 能结合多种入侵的 HIV-1 毒株,能不同程度地指导杀伤性 T 细胞增殖,杀死被 HIV 感染的细胞和抑制被感染的细胞中病毒的复制<sup>[39]</sup>。

#### 4 结 语

CAR-T 细胞治疗在 B 细胞恶性肿瘤治疗的临床试验中取得了巨大成功。为延续这种成功,在其他血液学肿瘤和实体瘤治疗中多项临床试验正在进行。CAR-T 技术广泛运用至少面临 3 个挑战:肿瘤特异抗原的筛选、CAR 设计的优化和临床安全性。肿瘤特异抗原筛选的重要性毋庸置疑。对 CAR 的设计优化,可改善治疗效果以及实现新功能,是 CAR-T 细胞治疗的技术基础。临床安全性是 CAR-T 细胞治疗的临床应用基础,是目前亟待解决的问题。临床安全性主要表现在免疫相关不良反应,主要潜在机制包括 CAR-T 细胞攻击共表达肿瘤抗原的正常组织或器官;在某些不可预知的情况下,CAR-T 细胞可通过识别交叉抗原(结构或系列相似或部分相似)损伤正常组织或器官;CAR-T 细胞输注或化疗预处理造成急性过敏反应和肿瘤细胞大量死亡后引起肿瘤溶解综合症;淋巴细胞在治疗后大量活化、溶解并释放大量细胞因子造成细胞因子释放综合症(cytokine-release syndrome, CRS);由 CRS 及其他不明原因造成神经毒性;基因转导载体(慢病毒等)通过插入突变机制,可能引起人体内自发复制并导致二次肿瘤的发生。CAR-T 细胞治

疗所产生不良反应的个体差异较大,不良反应有时表现较为剧烈,因此需要对整个临床试验阶段密切监测,及时发现,合理用药。在充分了解不良反应机制基础上,需要进一步制定临床试验参考路径及诊疗指南。相信随着研究的深入和临床试验的开展,CAR-T 技术会越来越完善,为以后安全有效的临床治疗的开展提供可能。

#### 【参考文献】

- [1] Oren R, Hod-Marco M, Haus-Cohen M, *et al.* Functional comparison of engineered T cells carrying a native TCR versus TCR-like antibody-based chimeric antigen receptors indicates affinity/avidity thresholds [J]. *J Immunol*, 2014, 193: 5733-5743.
- [2] Tamaskovic R, Simon M, Stefan N, *et al.* Designed ankyrin repeat proteins (DARPs) from research to therapy [J]. *Meth Enzymol*, 2012, 503: 101-134.
- [3] Procko E, Berguig GY, Shen BW, *et al.* A computationally designed inhibitor of an Epstein-Barr viral Bcl-2 protein induces apoptosis in infected cells [J]. *Cell*, 2014, 157: 1644-1656.
- [4] Bridgeman JS, Hawkins RE, Bagley S, *et al.* The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex [J]. *J Immunol*, 2010, 184: 6938-6949.
- [5] Shirasu N, Shibaguci H, Kuroki M, *et al.* Construction and molecular characterization of human chimeric T-cell antigen receptors specific for carcinoembryonic antigen [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30: 2731-2738.
- [6] Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, *et al.* B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells [J]. *Blood*, 2012, 119: 2709-2720.
- [7] Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, *et al.* T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial [J]. *Lancet*, 2014, 385: 517-528.
- [8] Zhong XS, Matsushita M, Plotkin J, *et al.* Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8<sup>+</sup> T cell-mediated tumor eradication [J]. *Mol Ther*, 2010, 18: 413-420.
- [9] Hogquist KA, Jameson SC. The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate "decisions" and effector function [J]. *Nat Immunol*, 2014, 15: 815-823.
- [10] Huang J, Brameshuber M, Zeng X, *et al.* A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4<sup>+</sup> T cells [J]. *Immunity*, 2013, 39: 846-857.
- [11] Srivastava S, Stanley R. Engineering CAR-T Cells; Design Concepts [J]. *Trends Immunol*, 2015, 36: 494-502.
- [12] Cordoba SP, choudhuri K, Zhang H, *et al.* The large ectodomains of CD45 and CD148 regulate their segregation from and inhibition of ligated T-cell receptor [J]. *Blood*, 2013, 121: 4295-4302.
- [13] Haso W, Lee DW, Shah NN, *et al.* Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2013, 121: 1165-1174.

- [14] Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, *et al.* The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity [J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3: 125-135.
- [15] Stone JD, Chervin AS, Kranz DM. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity [J]. *Immunology*, 2009, 126: 165-176.
- [16] Oren R, Hod-Marco M, Haus-cohen M, *et al.* Functional comparison of engineered T cells carrying a native TCR versus TCR-like antibody-based chimeric antigen receptors indicates affinity/avidity thresholds [J]. *J Immunol*, 2014, 193: 5733-5743.
- [17] Nauerth M, Weißbrich B, Knall R, *et al.* TCR-ligand koff rate correlates with the protective capacity of antigen-specific CD8+ T cells for adoptive transfer [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 192ra87.
- [18] Chinnasamy D, Yu Z, Kerkar SP, *et al.* Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 1672-1683.
- [19] Wilkie S, Burbridge SE, Chiapero-Stanke L, *et al.* Selective expansion of chimeric antigen receptor-targeted T-cells with potent effector function using interleukin-4 [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 25538-25544.
- [20] 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.
- [21] Chia-Yung Wu, Roybal KT, Puchner EM, *et al.* Remote control of therapeutic T cells through a small molecule gated chimeric receptor [J]. *Science*, 2015, 350: aab4077.
- [22] Kloss CC, 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: 71-75.
- [23] 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: 215ra172.
- [24] 徐成润. PD-1/PD-L1 负性协同刺激通路在乙型病毒性肝炎慢性化中的地位及进展 [J]. *东南国防医药*, 2015, 17(5): 514-516.
- [25] 伍筱玫, 雷月. 程序性死亡受体-1/配体-1 在卵巢癌中的研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(1): 108-112.
- [26] Robert C, Schachter J, Long GV, *et al.* Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372: 2521-2532.
- [27] Blidner AG, Mariño KV, Rabinovich GA. Driving CARs into Sweet Roads; Targeting Glycosylated Antigens in Cancer [J]. *Immunity*, 2016, 44: 1248-1250.
- [28] posey AD Jr, Schwab RD, Boesteanu AC, *et al.* Engineered CAR T Cells Targeting the cancer-associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma [J]. *Immunity*, 2016, 44: 1444-1454.
- [29] Spear P, Barber A, Rynda-Apple A, *et al.* NKG2D CAR T-cell therapy inhibits the growth of NKG2D ligand heterogeneous tumors [J]. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91: 435-440.
- [30] Hollie J, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13: 370-383.
- [31] Brown CE, Alizadeh D, Starr R, *et al.* Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy [J]. *New Engl J Med*, 2016, 375: 2561-2569.
- [32] Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, *et al.* In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes [J]. *J Exp Med*, 2004, 199: 1455-1465.
- [33] Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, *et al.* Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood; safety profile and detection kinetics [J]. *Blood*, 2011, 117: 1061-1070.
- [34] Jethwa H, Adami AA, Maher J. Use of gene-modified regulatory T-cells to control autoimmune and alloimmune pathology: Is now the right time? [J]. *Clin Immunol*, 2013, 150: 51-63.
- [35] Eleebrecht CT, Bhoj VG, Nace A, *et al.* Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease [J]. *Science*, 2016, 353: 179-84.
- [36] Hutter G, Nowak D, Mossner M, *et al.* Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation [J]. *New Engl J Med*, 2009, 360: 692-696.
- [37] Rossi JJ, June CH, Kohn DB. Genetic Therapies for HIV/AIDS [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1444-1454.
- [38] Deng K, Perteu M, Rongvaux A, *et al.* Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations [J]. *Nature*, 2015, 517: 381-385.
- [39] Ali A, Kitchen SG, Chen IS, *et al.* HIV-1-Specific Chimeric Antigen Receptors Based on Broadly Neutralizing Antibodies [J]. *J Virol*, 2016, 90: 6999-7006.

(收稿日期:2016-08-29; 修回日期:2016-11-07)

(本文编辑:刘玉巧)