

嵌合抗原受体疗法在肿瘤免疫治疗中的研究进展

杨迪雅¹ 孔祥辉² 周秀梅^{2*}

(¹浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; ²浙江大学医学院免疫学研究所, 杭州 310058)

摘要 嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)是通过基因工程技术构建的融合蛋白, 经其修饰的免疫细胞可以特异性靶向和杀伤表达特定抗原的肿瘤细胞。到目前为止, 大多数关于CAR的研究主要集中在T细胞上。CAR-T细胞疗法在治疗恶性血液疾病方面取得了突破性进展, 目前已有7款药物获批上市, 研究者在不断深入研究CAR-T细胞疗法的同时也开始寻找新的免疫效应细胞, CAR自然杀伤细胞(CAR natural killer cell, CAR-NK)疗法、CAR自然杀伤T细胞(CAR NK T cell, CAR-NKT)疗法以及CAR巨噬细胞(CAR macrophage, CAR-MP)疗法逐渐成为免疫治疗的新策略。尽管围绕CAR的研究策略不断增加, 该领域也依然面临一些挑战, 例如有效地靶向实体瘤、减少治疗时的毒副作用。该文对以CAR为基础修饰不同效应细胞的细胞疗法的研究进展进行了综述。

关键词 细胞过继免疫治疗; 嵌合抗原受体; 肿瘤

Research Progress of Chimeric Antigen Receptor Therapy in Tumor Immunotherapy

YANG Diya¹, KONG Xianghui², ZHOU Xiumei^{2*}

(¹College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²Institute of Immunology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

Abstract CAR (chimeric antigen receptor) is a fusion protein constructed by genetic engineering technology that can be used to reprogram immune cells to specifically target and kill tumor cells expressing specific antigens. So far, most researches focus on CAR-T cell therapy. CAR-T cell therapy has made breakthroughs in hematological cancers, and seven drugs have been approved for clinical treatment. While researchers continue to study CAR-T cell therapy in depth, they also begin to look for new immune effector cells, CAR-NK (CAR natural killer cell), CAR-NKT (CAR NK T cell) and CAR-MP (CAR-macrophage) therapies are being the new strategies for tumor immunotherapy. Despite CAR-based strategies expansion, the field also faces challenges such as effective targeting of solid tumors, reducing toxic side effects during treatment. This review focuses on the research progresses in current CAR-modified cell therapies.

Keywords adoptive cellular immunotherapy; chimeric antigen receptor; neoplasms

近年来, 细胞治疗——将细胞编辑加工后作为药物来治疗疾病的新型疗法发展迅速, 而围绕嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)展开的免疫细胞疗法是最有前景的疗法之一, 在基础研究和临床治疗中都取得了巨大进展, 截至2023年1月, 全球

共有7款CAR-T细胞治疗药物上市, 这些成果建立在数十年基础研究之上, 并将不断激发基础医学研究和基因编辑科学灵感, 带来更多有效的治疗手段。

从已报道的数据来看, 围绕CAR开展的研究数量增速放缓, 可能意味着研究者们正面临着一些挑战, 研究者们态度也趋于理性。截至2022年4月15日, 全球免疫肿瘤学研究中已有2 756种细胞治疗药物, 与2020年至2021年的43%和2019年至2020年

收稿日期: 2022-09-07

接受日期: 2023-02-22

*通讯作者。Tel: 13067984291, E-mail: zhoxiumei824@163.com

Received: September 7, 2022

Accepted: February 22, 2023

*Corresponding author. Tel: +86-13067984291, E-mail: zhoxiumei824@163.com

的61%的增长速度相比,最近一年中36%的增长速度显示出了适度的减速。经基因编辑技术工程化修饰的CAR-T细胞疗法持续领跑各类细胞疗法,最近一年的增长速度为24%(同样低于2020年至2021年38%的增速)^[1]。基于自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)的CAR-NK细胞疗法势头虽然强劲,但也出现增长放缓,去年增长了55%,前年增长了65%。从ClinicalTrials.gov提取的数据显示,临床实验数量与药物研究数量变化趋势一致,都放缓了增速,截至2022年4月,有近1 800项细胞疗法进入了临床试验阶段,近一年增加了33%,上一年增幅为43%。与前几年一样,大多数细胞治疗试验的重点是攻克血液疾病,尤其是针对白血病和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)疗效显著,而针对实体瘤的临床试验占比较小,为43%,可能是因为实体瘤内部免疫抑制性肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)对CAR-T细胞有较强的抑制作用,以及CAR-T细胞的内在毒性问题等使研究试验仍然面临巨大挑战。将其他免疫细胞如NK细胞、自然杀伤T细胞(NK T cell, NKT)以及巨噬细胞(macrophage, MP)作为效应细胞,进行工程化基因编辑引入CAR的修饰,用以肿瘤免疫治疗的研究得到越来越多的关注,有望在不久的将来获批,以用于临床癌症治疗。

在国内,2021年6月,复星凯特CAR-T细胞药物——阿基仑赛注射液在我国正式获批上市,用于治疗接受二线或以上系统性治疗后复发或难治性大B细胞淋巴瘤(relapsed or refractory large B-cell lymphoma, r/r LBCL)的成人患者。同月,该药物用于治疗接受过二线或以上系统治疗后r/r NHL获国家药监局临床试验批准,并于2021年8月被纳入突破性治疗药物程序。这是国内首款获批上市的CAR-T细胞疗法药物,中国CAR-T细胞治疗元年就此开启。同年9月,药明巨诺靶向CD19的CAR-T细胞药物瑞基奥仑赛注射液正式获批,适应症与首款获批药物相同。2022年10月,该注射液在我国获批第二项适应症,用于治疗r/r性滤泡淋巴瘤(follicular lymphoma, FL),这是中国第二款获批的CAR-T细胞产品,也是我国首个获批用于治疗r/r FL的细胞治疗药物。两款获批的CAR-T细胞治疗药物均展现出较好的安全性与疗效。到目前为止这两款获批的CAR-T细胞治疗药物已累计完成超过400位患者的回输。

1 CAR的结构与功能

CAR是一种基因工程技术加工产生的受体分子,可赋予免疫效应细胞特异性靶向肿瘤细胞抗原表位的属性,能够增强免疫效应细胞识别抗原与活化自身的能力,最终消除肿瘤^[2]。典型的CAR包括了4个结构域:细胞外抗原识别域、铰链区(Hinge)、跨膜结构域(trans-membrane domain, TMD)、细胞内信号刺激域。细胞外抗原识别结构域通常是单链可变区片段(single chain variable fragment, Scfv),片段由肿瘤抗原反应性抗体的重链和轻链的可变区通过柔性接头连接形成,决定CAR对靶点的结合特异性^[3],重链和轻链中间用一段具有重复结构的氨基酸序列(G4S)3或(G4S)5连接,这段结构使蛋白质折叠获得了灵活性^[4]。修饰有ScFv的效应细胞对其靶点的亲和力,比未修饰的细胞大几个数量级,且能够不依赖主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)的抗原递呈来识别靶点。ScFv通过Hinge连接到TMD, Hinge暴露在CAR修饰后的细胞表面,是效应细胞表面与抗原识别结构域的间隔区,其长度由目标抗原的位置确定,靠近细胞膜的抗原需要较长的Hinge,而暴露在细胞表面的抗原需要较短的Hinge,铰链区的长度还会影响CAR分子的表达、抗原识别、信号转导等功能^[5]。有研究发现,距细胞膜具有较短间隔的CAR-T细胞能更有效地产生细胞因子,也具有更强的增殖能力^[6],一个广谱的癌症治疗靶点酪氨酸激酶样孤儿素受体1(receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, ROR1)拥有两个结构域表位,就Ig/Frizzled结构域表位来说,来自小鼠2A2和兔子R12 ScFv的ROR1-CAR具有较短的Hinge,能发挥最佳功能。而兔子R11 ROR1-CAR对另一Kringle结构域中的表位具有特异性,需要较长的Hinge才能识别ROR1肿瘤细胞,这再一次证明了Hinge的长度会影响CAR的肿瘤识别功能,从而影响细胞药物的杀伤功能^[7], Hinge长度对这些功能的影响取决于其所靶向的结构域。另有研究印证了相似的现象,比较使用CD28或CD8的Hinge和跨膜区构建抗CD19的CAR-T细胞,其中来自CD8的氨基酸序列较长,所构建的CAR-T细胞产生的细胞因子水平较低,磷酸化水平也较低,表现出较低水平的诱导细胞死亡效应^[6]。TMD的主要功能是将CAR锚定在免疫细胞膜上。尽管有研究表明TMD同样可以影响CAR的表达水平、稳定性,但由于TMD常常根据Hinge和细胞内

信号刺激结构域的需要而改变,在不同跨膜结构对CAR功能的影响方面没有很好的研究。

细胞内信号刺激域在CAR工程中得到了广泛研究, CAR与靶点特异性结合后, 信号转导至胞内信号刺激域激活免疫效应细胞以杀伤靶细胞。最常见的细胞内信号刺激域有T细胞受体的CD3 ζ 亚基, 胞外信号通过CD3 ζ 链中免疫受体酪氨酸的激活基序 (immune receptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 的磷酸化介导T细胞活化。共刺激结构域通常由经过选择和组合的不同蛋白序列构建而成, 可行使不同的功能, 一些共刺激结构域可以在不同效应细胞之间通用^[8-9]。修改CAR的结构尤其是细胞内结构域以求创新一直是CAR-T细胞发生革命性变化的主要驱动力, CAR的结构已经经历了1代至5代的发展历程(图1)。第一代CAR, 仅有主要信号结构域CD3 ζ , CD3 ζ 能介导效应细胞转导信号、分泌白介素并发挥T细胞效应, 但信号转导效率低下, 且缺乏促进细胞活化所需的共刺激信号, 在启动细胞活化和抗肿瘤效果方面并不理想^[10-11], 如今已经过时且很少再被使用。第二代CAR在第一代基础上增加了共刺激分子 (costimulatory, CM), CM位于跨膜区和CD3 ζ 中间, 例如使用较多的CM包括CAR-T细胞中的CD28^[12]、4-1BB^[13]、CD27^[14]、OX40^[15]和诱导型T细胞共刺激物^[16], CAR-NK细胞中的DAP10

CD3 ζ ^[17], 以及CAR-NKT细胞中的CD28、4-1BB^[18]。第二代CAR同时满足了高特异性识别肿瘤细胞以及识别后高效活化免疫细胞这两个特性。目前具有CD28和4-1BB共刺激结构域的CAR-T细胞是最常用的CAR-T细胞设计。第三代CAR串联了两个或多个CM, 临床前实验显示出第三代CAR能增强效应细胞的持久性、增殖能力和抗肿瘤活性^[19]。第三代CAR受益于结合互补的共刺激域, 但共刺激信号不是简单的相加即满足相应的功能, 多个CM可能会改变胞内结构域长度导致信号减弱甚至无法传递^[5]。与第二代CAR-T细胞相比, 在具有4-1BB和CD28内域的第三代CAR-T细胞的临床试验中, 治疗r/r B细胞恶性肿瘤受试者时, 初级响应率并未体现出第三代CAR-T细胞具有更好的抗肿瘤疗效。而对于输注B细胞恶性肿瘤负担较小的患者, 第三代CAR-T细胞表现出更好的增殖能力。因此进行额外的临床试验来评估和监测因过度激活引起的副作用风险, 可以帮助发挥第三代CAR-T细胞的最佳潜力^[20-22]。随着临床试验的扩大, 检查点抑制剂疗法被发现能够在短期内逆转复发患者CAR-T细胞的耗竭, 并通过转基因免疫调节剂的诱导释放来重塑TME, 基于这些原理而被设计的CAR细胞疗法被称为是第四代CAR^[23], 其通常含有一个激活T细胞核因子结构域 (nuclear factor of activated T cells, NFAT), 可诱导效

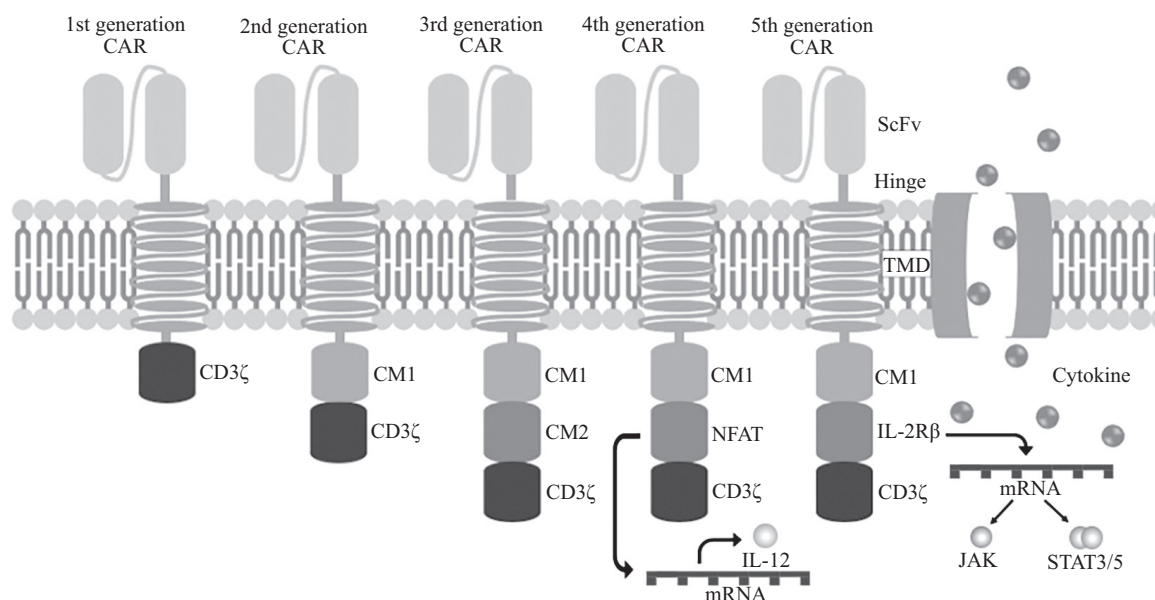


图1 1代至5代嵌合抗原受体T细胞胞内信号区发展历程

Fig.1 The development process of the intracellular signal region of chimeric antigen receptor T cells from the 1st to the 5th generation

应细胞大量分泌组成型或诱导型细胞因子(IL-12、IL-15和IL-18等),招募其他固有免疫细胞如MP和树突状细胞,识别并杀伤缺乏靶向抗原的肿瘤细胞,引发更广泛的抗肿瘤效应,有利于克服TME的抑制作用^[24]。此外,T细胞衔接子和一些膜受体也在第二代CAR基础上被设计转录,设计的这种CAR被公认为第五代CAR,增加了IL-2 β 受体片段,诱导Janus激酶和信号转导与转录激活因子3/5的产生^[25-26]。研究者们仍然在不断设计优化CAR的结构,不只局限在原始结构基础上组合不同信号分子,还优化了信号转导基序的内部序列,尤其是最常用到的CD3 ζ 结构域,有研究指出设计CAR的结构时使用CD3 ζ 链中的1个ITAM结构域而不是3个结构域全长,可以获得更强的肿瘤抑制活性与持久力^[27]。CAR针对不同的肿瘤细胞表面抗原蛋白而被设计,应具有合适的靶密度,每个细胞200~2 000拷贝的靶密度是最佳的,可以避免损伤正常细胞^[28]。

2 CAR-T细胞疗法的研究进展

经CAR改造后的T细胞的过继免疫疗法,即CAR-T细胞疗法。CAR-T细胞疗法的基本作用机制在于:ScFv识别肿瘤表面抗原后被激活,胞外信号转导至胞内刺激结构域,磷酸化CD3 ζ 链上的ITAM结构域,再通过酪氨酸激酶相关蛋白ZAP70向下游转导,信号转导过程类似于T细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)信号转导,可启动T细胞各项效应功能,例如增殖、细胞因子释放、代谢改变和

释放毒性^[19]。CAR-T细胞主要通过颗粒酶、穿孔素、死亡受体行使毒性功能^[29-31]。CAR-T细胞能够无视许多肿瘤免疫逃逸机制,这些逃逸机制包括下调MHC,诱导分泌抑制性细胞因子和募集调节性T细胞,有效地对抗原特异性的肿瘤细胞进行靶向杀伤^[32]。值得一提的是,部分T细胞亚群也可以作为CAR的效应细胞,与治疗的持久性和抗肿瘤免疫性密切相关,也显示出了巨大的临床应用潜力^[33-35]。

目前进行的热门基础研究围绕以下几大策略开展。首先,对于热门靶点CD19抗原丢失从而导致治疗中的脱靶效应^[36],有研究试图以CD20为潜在靶点,或以CD19和BCMA为双靶点解决此难题^[37];其次,有研究者聚焦于改造功能元件,例如利用CRISPR/CAS9技术,将CAR基因插入到PDI基因位点,实现敲除PDI的同时引入CAR基因,以进一步提高CAR-T细胞对肿瘤细胞的杀伤效率^[38];再次,TME对CAR-T细胞疗法有抑制作用,可能是导致治疗后实体瘤缓解率较低的原因,未来仍是CAR-T细胞疗法的一大挑战^[39];最后,通用型CAR-T细胞^[40]与诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)来源的CAR-T细胞^[41]可以解决自体细胞来源的CAR-T细胞的局限性,包括低免疫水平的细胞状态、使用次数与剂量的限制。

在各类别免疫疗法中,CAR-T细胞疗法的基础研究与临床试验一直处于领跑位置,在治疗血液恶性肿瘤方面已取得了巨大的成功。全球已批准的7款有关CAR的药物,均为CAR-T细胞药物(表1)。这些药物均以CD19和B细胞成熟抗原(B cell matura-

表1 目前已获得批准上市的CAR-T细胞疗法
Table 1 CAR-T therapies currently approved for treatment

药品名称 Drug names	获批企业 Manufacturer	靶点 Targets	代表性获批时间与国家 Typical countries and time of approval	已获批适应症 Indications
Kymria	Novartis	CD19	2017 (USA), 2018 (EU/CAN/AUS/SWIT), 2019 (JPN), 2021 (SG/HK)	r/r LBCL, r/r ALL, r/r FL
Yescarta	Kite Pharma	CD19	2017 (USA), 2018 (EU) 2019 (CAN), 2021 (CHN/JPN)	r/r LBCL, r/r FL
Tecartus	Kite Pharma	CD19	2020 (USA)	r/r MCL
Breyanzi	Bristol Myers Squibb	CD19	2021 (USA)	r/r DLBCL
Abecma	Bristol Myers Squibb	BCMA	2021 (USA)	r/r MM
Carteyva	JW (Cayman) Therapeutics	CD19	2021 (CHN)	r/r LBCL, r/r FL
Carvykti	Legend Biotech/Johnson & Johnson	BCMA	2022 (USA)	r/r MM

r/r: 复发或难治性; DLBCL: 弥漫大B细胞淋巴瘤; ALL: 急性淋巴细胞白血病; MCL: 套细胞淋巴瘤; MM: 多发性骨髓瘤; LBCL: 大B细胞淋巴瘤; FL: 滤泡性淋巴瘤。

r/r: relapsed/refractory; DLBCL: diffused large B cell lymphoma; ALL: acute lymphoblastic leukemia; MCL: mantle cell lymphoma; MM: multiple myeloma; LBCL: large B-cell lymphoma; FL: follicular lymphoma.

tion antigen, BCMA)为靶点。目前仍有临床试验围绕着血液瘤包括复发或顽固性急性B淋巴细胞白血病(r/r B-cell acute lymphoblastic leukemia, r/r B-ALL)、B细胞NHL、慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)等开展。

研究者们还在探索CAR-T细胞疗法新的适应症,例如T细胞性血液系统恶性肿瘤、髓细胞性血液系统恶性肿瘤。治疗多发性骨髓瘤的CAR-T细胞疗法主要针对靶点BCMA^[42],但存在复发可能^[43],有研究者设计了一种能够靶向BCMA和肿瘤细胞上的另一分子TACI(trans-membrane activator and CAML interactor)的CAR-T细胞,该CAR依赖一段APRIL(a proliferation-inducing ligand)结构,能够与BCMA和TACI双分子结合。研究者首先在具有CD28和OX40共刺激域的第三代CAR中使用了单个APRIL分子,但因临床试验缺乏疗效而停止。随后又在具有4-1BB共刺激域的第二代CAR中使用了3个截短APRIL分子模拟蛋白三聚体可溶分泌形式,试验结果显示改进后的CAR比使用单一APRIL结构的CAR具有更高的功效。除了治疗癌症,CAR-T细胞疗法在治疗红斑狼疮方面也取得了欣喜的突破。有研究曾于2021年报道,一名患有自身免疫疾病重度难治性耐药性红斑狼疮的20岁女性,曾接受其他治疗未能控制症状,在接受来源于自体的CD19靶向CAR-T细胞输注后,辅助以低剂量泼尼松龙,44天后,她体内攻击自身的抗体消失了,病情得到了明显缓解,且未出现明显副作用^[44]。随后该团队又进行了五名患者的治疗实验,患者们在接受一次CAR-T细胞治疗后约3个月时,诸多症状得到了缓解,包括脏器异常和疾病相关自身抗体的消失,且不需要额外激素治疗^[45]。两次试验的成功可能意味着CAR-T细胞疗法为自身免疫疾病带来了新希望。另有研究者成功构建了对HIV感染的细胞具有特异性杀伤作用的CAR-T细胞——ConvertibleCAR-bNAbs,其既具有bNAbs抗体活性能够中和HIV病毒,又可以与感染病毒的细胞表达的变异NKG2D配体结合,特异性杀死病毒感染的CD4⁺T⁺细胞。在这个基础上,研究人员开展了CAR-T细胞疗法清除HIV病毒储存库的I期临床研究^[46]。

CAR-T细胞治疗领域目前面对的一个重要挑战是大多数实体瘤对CAR-T细胞回输没有明显反应,这可能是因为缺少在实体瘤中均质高表达且在健康组

织中不表达的分子靶标,并且实体瘤内部TME的免疫抑制问题难以解决^[47-48]。但研究者们仍然找到了一些突破口,间皮素(mesothelin, MSLN)在正常组织中很少表达,在几种癌症中有高表达:已发现MSLN蛋白在85%至90%的间皮瘤,80%至85%的胰腺癌和60%至65%的肺癌、卵巢癌和胆管癌中有表达,因此其成为攻克实体瘤的重要靶点。以MSLN为靶点的CAR-T细胞疗法有几项临床试验正在进行,包括治疗胰腺癌、肺癌和卵巢癌^[49],初步观察到该CAR-T细胞具有抗肿瘤活性且是安全的,这也证明了CAR-T细胞疗法应用于实体瘤治疗的可行性^[50]。B7-H3属于B7免疫共刺激和共抑制家族,但在人恶性肿瘤如胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、透明细胞肾癌、骨肉瘤、尤文肉瘤、神经胶质瘤等实体肿瘤中异常高表达,这使之成为一个很好的潜在靶标。靶向B7-H3的CAR-T细胞药物的主要挑战之一是正常组织上的靶蛋白低表达会导致靶向毒性,MAJZNER等^[51]利用一种只能识别高水平B7-H3的抗体设计了一款ScFv,其能够限制CAR-T细胞对低水平表达B7-H3的健康组织的靶向毒性。结果表明,在B7-H3高抗原密度的环境(如髓母细胞瘤、骨肉瘤和尤文肉瘤)中,靶向B7-H3的CAR-T细胞在体外和体内都是有效的,当在抗原密度低的正常组织环境中,该CAR-T细胞的活性要低得多,这表明临床上可能存在有效、无毒的B7-H3靶向CAR-T细胞治疗方式^[51]。针对胶质母细胞瘤,有研究测试了以EGFRvIII、IL-13 R α 2和HER2为靶点的CAR-T细胞疗法^[52-54],初期试验发现抗原表达的异质性会导致该CAR-T细胞的脱靶效应,治疗效果并不明显。继而研究者设计了基于氯毒素(chlorotoxin, CLTX)的CAR-T细胞,CLTX是一段由36个氨基酸构成的多肽,与异质表达的靶点相比,CLTX与胶质瘤母细胞结合能力极强,此CAR-T细胞在没有其他胶质母细胞瘤相关抗原的情况下也具有强大的抗肿瘤活性^[55]。类似诸多实验表明,CAR-T细胞疗法在实体瘤中尽管没有像在血液恶性肿瘤中一样疗效显著,临床治疗却仍然充满希望。有研究者公布了一款名为CT041的CAR-T细胞药物治疗CLDN18.2阳性实体瘤(包括胃癌、食管胃结合部腺癌及胰腺癌)的最新临床数据,数据显示所有患者的客观缓解率达48.6%,疾病控制率达73.0%;所有胃癌患者总客观缓解率为57.1%,疾病控制率达75.0%,接受至少2线治疗失败的胃癌患者客观缓解率为61.1%,疾病控制率为83.3%^[56]。

3 CAR-NK细胞疗法的研究进展

CAR-T细胞疗法取得的成功,激发了人们使用CAR修饰其他免疫细胞来攻克肿瘤的热情。NK细胞是固有免疫系统的重要组成部分,占人类外周血白细胞的5%~15%,表达CD56,不表达CD3、TCR和抗原特异性受体,是一种非特异性肿瘤杀伤细胞,受一系列激活和抑制受体信号调控,其杀伤力取决于抑制信号和激活信号之间的平衡。在NK细胞中引入CAR的修饰甚至敲除NK细胞自身抑制基因,增强NK细胞的抗肿瘤能力,即CAR-NK细胞疗法近两年来吸引了许多研究人员的注意。CAR-NK细胞利用多种途径诱导靶细胞凋亡(如释放穿孔素、颗粒酶等细胞毒物质杀伤靶细胞, Fas/FasL、TNF- α /TNFR-I介导靶细胞凋亡等)。活化的NK细胞还分泌各种细胞因子和趋化因子,进一步募集并活化其他免疫细胞,如T细胞、树突状细胞和MP。

与CAR-T细胞相比, CAR-NK细胞具有一些显著优势。(1) 更高的安全性。较短的寿命不会引起持续的脱靶效应,不表达TCR不会产生移植物抗宿主病(graft versus host disease, GvHD),不产生或少产生IL6不会引起细胞因子风暴(cytokine storm, CRS)。(2) 较强的实体瘤浸润,可克服耐药的TME,实现有效的抗肿瘤反应^[57-59]。(3) NK细胞的来源[包括NK细胞系(NK-92^[60]、KHYG-1^[61]等)、外周血单核细胞、CD34造血祖细胞、脐带血的NK细胞]较多,最近来源于iPSC的NK细胞^[62],已成为CAR-NK细胞的重要来源,因其能更稳定地表达CAR与其他发挥功能的蛋白,同时可解决患者输注时细胞数需求紧张的问题。(4) 除了依赖于CAR的抗肿瘤机制,还可以通过抗体依赖介导的细胞毒性作用(antibody dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC)杀伤靶细胞, NK细胞膜上表达的CD16可识别与靶细胞表面结合的抗体的Fc部分,继而通过ITAM信号途径激活NK细胞。CAR-NK细胞治疗在基础研究和临床应用中也存在很多挑战,首先是包括电穿孔和病毒转导在内的几种方法尚未达到完全的转导效率^[63];再者NK细胞的扩增能力非常有限,IL-2、IL-15、IL-12、IL-21和IL-18是常用的体外原代NK细胞扩增因子,但对NK细胞扩增效率不够高。采用与刺激性细胞共培养的方法比使用细胞因子的扩增效果更好,但被这些饲养细胞激活的原代NK细胞连续增殖8~15周后会衰老。总体上目前还缺乏高效、安全的NK

细胞体外扩增方法^[64]。

围绕CAR-NK细胞逐渐兴起的话题主要有3个方面。一是不断优化和改进CAR的结构,有研究证明用于CAR-T细胞的胞内信号结构域(单独使用CD3 ζ 链或结合CD28、4-1BB、OX40)也可以激活NK细胞^[65]。最近有研究开发了以NK细胞表面的II型膜蛋白受体(natural killer group 2D, NKG2D)为胞外结构域, DNAX相关蛋白(DNAX-associated protein, DAP)10或DAP12和CD3 ζ 作为胞内信号结构域的CAR-NK细胞^[66]。NKG2D是NK细胞表面激活型受体,其配体在多种肿瘤细胞表面均有表达。而DAP10和DAP12比CD3 ζ 能更好地激活NK细胞胞内信号转导,从而使CAR-NK细胞表现出更强的细胞毒性,产生更多细胞因子^[67]。二是进一步提高CAR-NK细胞在体内的增殖能力和持久性,有研究设计了一款脐带血来源经编辑后可表达IL-15的CAR-NK细胞,该CAR-NK细胞能够自主产生IL-15,足以维持其42天的体内存活和活性^[68]。三是围绕CRISPR/Cas9基因编辑技术构建工程化NK细胞的相关研究。

目前CAR-NK细胞疗法的临床试验数量有限,许多研究仍处于早期阶段,大部分是由公司推动的。到目前为止,在ClinicalTrials.gov官网可以检索到30多个已注册的CAR-NK细胞相关临床试验,涉及的血液恶性肿瘤和靶点^[69]包括NHL(CD19/CD22)、慢性淋巴细胞白血病(CD19)、ALL(CD19/CD22/NKG2D)、急性骨髓性白血病(CD33/FLT3)和MM(CS1/BCMA),涉及的实体瘤和靶点主要包括胶质母细胞瘤(HER2/EGFR)、乳腺癌(HER2/MUC1)和卵巢癌(MSLN/EpCAM),最近针对肺癌(DLL3)、胃癌(mesothelin)、胰腺癌(PSCA/ROBO1)和前列腺癌(PSMA)也开展了一些研究。此外,美国FDA已批准的一款名为FT536的新药的临床研究备受瞩目,FT536经过多重工程修饰,来源于iPSC,表达特异性靶向I类MHC相关蛋白A和B(MICA/MICB)的 $\alpha 3$ 结构域的新型CAR, MICA和MICB在许多实体瘤中高水平表达,因而围绕此款疗法的临床试验所涉及的肿瘤类型众多,包括:晚期非小细胞肺癌、结直肠癌、头颈癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌和胰腺癌;FT536同时还修饰了可增强ADCC作用的新型高亲和力、不可被切割的CD16Fc受体,可增强NK细胞活性的IL-15/IL5R融合蛋白,此外FT536敲除了表达CD38的基因,以减小NK细胞自相残杀的可能性,这些修饰增强了NK细胞代谢适应性、持久

性和抗肿瘤功能。2023年1月, 这项看似很有希望的研究试验被宣布停止, 研究者们似乎面临着一些巨大挑战, 他们决定将未来的研究方向集中在以第二代CAR为基础同时敲除CD38的CAR-NK细胞上, 这类疗法与B细胞靶向单抗如CD20和CD38单抗联合发挥联合治疗作用, 从而对靶细胞进行多抗原攻击。他们还会继续关注BCMA靶向CAR-NK细胞项目FT576的初步临床数据, 该疗法通过与CD38单抗联合实现双抗原靶向, 高剂量、多剂量治疗多发性骨髓瘤患者。另有一名为CYTONK-203的CAR-NK细胞治疗方法, 是一种同种异体的CAR-NK细胞疗法, 其以前列腺干细胞抗原(prostate stem cell antigen, PSCA)为靶点, 能够显著抑制胰腺癌, 此外PSCA在胃癌和前列腺癌细胞中也高表达, 意味着此细胞疗法可能对治疗胃癌和前列腺癌也具有潜力^[70]。

4 CAR-NKT细胞疗法的研究进展

在寻找新的效应细胞时, NKT细胞进入了研究者的视野。NKT细胞是一种结合了NK细胞和T细胞特性的T淋巴细胞亚群, 既表达TCR以适应性免疫细胞的方式精确识别抗原, 又像固有免疫细胞一样对抗原暴露作出快速响应并产生大量细胞因子和趋化因子^[71], 属于固有免疫和适应性免疫之间的交叉环节^[72], 对癌症的免疫反应很重要^[73]。与常规T细胞一样, NKT细胞在胸腺中成熟^[74], 不同的是NKT细胞表达的TCR识别的是非多态性MHC I类分子即CD1d递呈的脂质抗原^[75]。表达CD1d的肿瘤细胞主要来源于骨髓单核细胞和B细胞谱系^[76], 部分实体瘤也呈现CD1d阳性^[77-79]。NKT细胞还表达多种细胞因子受体, 例如IL-12、IL-18、IL-25和IL-23, 即使在没有TCR信号的情况下, 这些细胞因子受体也可以通过炎症细胞因子的表达而被激活^[80]。在TME中, 当通过识别内源性脂质感知到组织完整性的破坏时, NKT细胞被激活并直接裂解肿瘤细胞, 或间接通过分泌一系列细胞因子调节其他免疫细胞恶性环境, 从而有助于增强宿主免疫反应^[81]。可根据TCR多样性和抗原特异性将CD1d限制性NKT细胞分为I型NKT细胞和II型NKT细胞两个亚群, I型NKT细胞又称iNKT, 主要对肿瘤产生有效的免疫反应^[73,82-83]。iNKT细胞可通过3种机制产生抗肿瘤免疫: (1) 激活和释放大量诱导细胞死亡的效应分子(颗粒酶、FasL、TRAIL)直接裂解肿瘤; (2) 通过启动Th1细胞因子级联反应

募集和激活其他先天性和适应性免疫细胞; (3) 调节TME中的免疫抑制细胞^[84]。II型NKT细胞通常与肿瘤免疫抑制功能相关^[85-87]。与I型NKT细胞不同, II型NKT细胞表达多种TCR, 由于这种多样性, II型NKT细胞的研究一直具有挑战性, 因此对它们的了解要少得多。多数CAR-NKT细胞的研究围绕iNKT细胞展开。

相对于传统T细胞作为CAR的效应细胞相比, CAR-NKT细胞有4个明显的优势。(1) 其关键优势在于通过TCR识别CD1d分子上的糖脂而不同于抗原蛋白, 并以固有免疫的方式快速应答^[76], 有了CD1d限制性, 可以降低治疗时的脱靶效应, 增加NKT细胞在自体 and 异体环境中的适用性^[88]。(2) NKT细胞可以合并TCR介导的刺激和炎症细胞因子的信号, 这些细胞因子可以反过来作用于TME中存在的不同免疫细胞, 例如极化巨噬细胞, 从而克服免疫抑制。(3) 因独特的细胞因子特征, 以及除CAR受体以外的广谱识别抗原受体, CAR-NKT细胞大大改善了治疗安全性, 不会诱发GvHD和CRS^[89-90]。(4) CAR-NKT细胞可以通过糖脂(如 α -GalCer)进行刺激, 浸润实体瘤, 这与CAR-T细胞不同, CAR-T细胞经常表现出向肿瘤部位的运输受损^[90]。尽管CAR-NKT细胞疗法的优势明显, 但挑战依然存在, 外周血中NKT细胞数不到T细胞数量的1%, 以及NKT细胞治疗肿瘤产生效应的多种方式似乎都是间接的, 还需要为此设计能帮助NKT细胞对抗肿瘤的额外工具, 这些挑战使得CAR-NKT细胞疗法的研究目前还处于早期阶段。

CAR-NKT细胞疗法在最近的几项研究中也显示出比较乐观的结果。GD2是一种糖鞘脂, 在黑色素瘤、神经母细胞瘤和一些其他实体瘤患者中高度表达^[91-93]。有研究结果显示, 靶向GD2和CD19的CAR-NKT细胞在神经母细胞瘤和淋巴瘤临床前研究中取得了不错的效果, 这些CAR-NKT细胞不仅对肿瘤抗原有很高的选择性, 而且还能在TME内高效增殖, 产生高水平的细胞因子。目前, 该研究已转化为临床试验, 以评估GD2靶向的CAR-NKT细胞在儿童神经母细胞瘤中的作用^[89]。而后另一项研究也表示, CD19靶向的CAR-NKT细胞比CD19靶向的CAR-T细胞能更有效地杀伤表达CD1d的淋巴瘤细胞, 意味着CAR-NKT细胞在治疗淋巴瘤和其他表达CD1d的肿瘤方面具有独特的优势^[94]。此外, 有研究

者从外周血单个核细胞中分离出了NKT细胞,并首次利用mRNA电穿孔技术构建出了特异性靶向黑色素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖4抗原的CAR-NKT细胞,体外实验结果表明该CAR-NKT细胞能够特异性杀伤人类黑色素瘤细胞,且其肿瘤细胞杀伤程度与传统CD8⁺ CAR-T细胞相似^[95]。为了解CAR-NKT细胞在荷瘤小鼠体内的持久性问题,有研究对人类原代NKT细胞进行了体外扩增和编辑,此款CAR-NKT细胞疗法被称为GD2.CAR.15, GD2.CAR.15带上了优化的抗GD2特异性ScFv和CD28或4-1BB共刺激胞内结构域,且能稳定表达IL-15,延长细胞寿命。结果显示, GD2.CAR.15体内持久性和肿瘤定位能力均有明显增强且无明显毒性。目前该研究针对人类成神经细胞瘤的临床试验初步表明, CAR-NKT细胞可以在体内扩增并定位于肿瘤,在三位患者中的一位身上诱导了骨转移病变消退的客观反应,且未产生剂量限制性毒性^[90]。

5 CAR-MP疗法的研究进展

MP细胞在固有免疫系统中是高度可塑造的效应细胞,能够吞噬降解胞内细菌、肿瘤细胞,分泌促炎因子并向T细胞提呈抗原,可响应环境刺激并改变表型^[96]。CAR-MP相较于CAR-T疗法起步较晚,其绝大多数研究还处于临床前阶段。CAR-T疗法研究主要围绕癌症免疫周期^[97]的前三个步骤,即癌抗原识别、癌抗原结合、效应细胞启动和激活,仍受制于抗癌免疫周期的后四个步骤,即效应细胞运输、浸润进入肿瘤、识别、杀死癌细胞。对于后四个步骤中免疫细胞运输和浸润到TME,与T细胞浸润能力不足相比,MP细胞有其独特的优势,可以大量存在于许多实体肿瘤中。新鲜冷冻的肿瘤切片显示,巨噬细胞在许多癌症类型中占肿瘤浸润细胞的大部分,在黑色素瘤、肾细胞癌和结直肠癌中所占比例高达50%。TME中MP细胞的浸润得益于肿瘤部位分泌的许多细胞因子,如趋化因子配体2、人趋化因子配体12、集落刺激因子1和血管内皮生长因子,缺氧环境诱导肿瘤细胞和基质产生细胞因子募集MP细胞,MP细胞一旦被招募到缺氧的TME中,这些可溶性因子的受体就会被下调,从而使巨噬细胞锁定在TME。此外,巨噬细胞可以直接感知缺氧条件(如低pH值环境)及缺氧条件下的代谢物(如脂肪酸),并迁移到TME中。它们在肿瘤中积累并穿透肿瘤周围致密的

间质组织,同时具备直接杀伤肿瘤的能力和通过抗原呈递增强内源性免疫的能力。通常将MP细胞简单划分为两类:经典激活的促炎M1 MP细胞和交替激活的抗炎M2 MP细胞^[98]。M1 MP细胞通过分泌细胞因子和趋化因子产生促炎反应,对细菌和病毒的反应至关重要^[99]。肿瘤相关M2 MP细胞,被广泛认为是TME的中枢免疫抑制细胞群之一^[100],M2巨噬细胞比M1巨噬细胞具有更高的吞噬能力^[101]。这些特点成为CAR-MP细胞攻克实体瘤的必要条件。

CAR-MP细胞疗法与CAR-T细胞疗法相比有3个显著优势:第一,对于T细胞很难进入的实体肿瘤基质形成的物理屏障,MP细胞可以更容易的突破进入TME,进而免疫抑制TME;第二,MP细胞具有促进抗原提呈和增强T细胞杀伤能力的作用;第三,CAR-MP细胞的非肿瘤靶向毒性较小。但从目前的报道来看,研究者仍然面对诸多难题。首先,MP细胞对常用的病毒载体具有天然抗性,使寻找高效的工程化改造工具成为挑战;其次,MP细胞无法在体外扩增,有限的细胞数量可能会影响病人的治疗效果;再次,输入的MP细胞在体内迁移的特点同样会严重影响治疗效果,有研究发现,MP细胞输入体内先经过肺脏后大部分滞留在肝脏^[102]。

有中国学者构建了一组CAR-147 MP细胞,其CAR区主要包括两个结构域:胞外结构域主要为一个可以识别乳腺癌标志物HER2的ScFv,胞内结构域是可以激活MP细胞表达基质金属蛋白酶的CD147分子。将CAR-147 MP细胞应用于4T1小鼠乳腺肿瘤模型后,结果显示该CAR-MP细胞促进了T细胞浸润并抑制了肿瘤生长^[103]。来自宾夕法尼亚大学的研究团队构建的HER2靶向的CAR-MP细胞,在表达HER2的卵巢癌的小鼠模型中,可以降低肿瘤负荷并延长小鼠生存期^[102]。此项试验利用一种名为Ad5f35的腺病毒系统代替了通常用于CAR转导的慢病毒和逆转录病毒载体系统,解决了人类原代MP细胞不易被转染的问题。此外,该系统不但能够靶向HER2并吞噬肿瘤细胞,诱导MP细胞形成促炎细胞因子的表型,还能进一步诱导肿瘤组织内的炎症反应,对实体瘤的抑制作用非常明显。来自中国的张进团队^[104]的第二代CAR-iMac有了新的进展,他们对iPSCs进行基因编辑使之表达CAR结构,再使iPSC分化成为巨噬细胞(human iPSC derived macrophages, iMacs),第一代CAR-iMacs实现了对血液肿瘤细胞和卵巢癌细胞

较理想的杀伤效果。第二代CAR-iMacs创新性地将介导M1极化分子的信号转导结构域引入CAR结构中并表达在iPSCs中,通过细胞分化得到成熟的M1-CAR-iMacs,体外肿瘤杀伤和荷瘤小鼠模型均表明M1-CAR-iMacs大大提升了自身的抗肿瘤效果并具有抗原依赖的M1极化能力,也进一步提高了效应细胞分泌的IL-1B、IL-6、TNF- α 等促炎因子的水平。临床前研究表明,CT-0508能够靶向HER2阳性肿瘤细胞,有效进入实体瘤并在实体瘤中生存,诱导炎症性肿瘤微环境,募集T细胞,诱导抗肿瘤T细胞免疫反应,并通过巨噬细胞的吞噬作用降低肿瘤负荷。FDA也授予了这款CAR-MP细胞疗法快速通道资格,加速其对实体瘤患者的疗效和安全性的临床试验。日前,该团队还公布了CT-0508的I期临床试验结果,结果显示CT-0508疗法是安全可行的,未从试验中观察到严重的CRS与器官毒性,也未观察到剂量限制性毒性。试验结果还显示出与临床前试验相似的结果,CT-0508能够激活并改造TME, TME内T细胞明显增加,同时伴随T细胞活化,成功诱导抗肿瘤免疫反应。

科学家们仍在不断探索寻找新兴的免疫效应细胞类型甚至亚细胞器(例如调节性T细胞、树突状细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、细胞间转运囊泡)进行工程化改造,充分利用它们所具备的不同的生理、免疫功能,使之成为人类癌症的个性化免疫疗法。

6 结语

过去几年中, CAR相关的免疫疗法使癌症治疗方式发生了革命性变化,特别是获批的CAR-T细胞药物已经为患者提供了新的治疗手段。但CAR-T细胞疗法也面临着许多挑战,例如CAR-T细胞会引发GvHD、CRS毒副作用, TME的免疫抑制性和癌症特异性抗原的缺乏导致CAR-T细胞疗法在实体瘤中的研究略显滞后。不依赖T细胞的治疗方式,包括CAR-NK、CAR-NKT和CAR-MP细胞疗法,因独特的优势、更好的安全性,它们展示出了巨大的抗肿瘤潜力,已被研究并转化为临床试验,为癌症治疗提供了更多的思路。

参考文献 (References)

- [1] SAEZ-IBANEZ A R, UPADHAYA S, PARTRIDGE T, et al. Landscape of cancer cell therapies: trends and real-world data [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(9): 631-2.
- [2] ZABEL M, TAUBER P A, PICKL W F. The making and function of CAR cells [J]. *Immunol Lett*, 2019, 212: 53-69.
- [3] SADELAIN M, RIVIERE I, BRENTJENS R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(1): 35-45.
- [4] HOSEINI S S, CHEUNG N K. Acute myeloid leukemia targets for bispecific antibodies [J]. *Blood Cancer J*, 2017, 7(2): e522.
- [5] HUGHES-PARRY H E, CROSS R S, JENKINS M R. The evolving protein engineering in the design of chimeric antigen receptor T cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 204.
- [6] ALABANZA L, PEGUES M, GELDRES C, et al. Function of novel anti-CD19 chimeric antigen receptors with human variable regions is affected by hinge and transmembrane domains [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(11): 2452-65.
- [7] 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): 125-35.
- [8] VAN DER STEGEN S J, HAMIEH M, SADELAIN M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(7): 499-509.
- [9] FERNANDEZ L, FERNANDEZ A, MIRONES I, et al. GMP-compliant manufacturing of NKG2D CAR memory T cells using CliniMACS prodigy [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2361.
- [10] PULE M A, SAVOLDO B, MYERS G D, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma [J]. *Nat Med*, 2008, 14(11): 1264-70.
- [11] TILL B G, JENSEN M C, WANG J, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells [J]. *Blood*, 2008, 112(6): 2261-71.
- [12] MAHER J, BRENTJENS R J, GUNSET G, et al. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(1): 70-5.
- [13] IMAI C, MIHARA K, ANDREANSKY M, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leukemia*, 2004, 18(4): 676-84.
- [14] SONG D G, YE Q, POUSSIN M, et al. CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells *in vivo* [J]. *Blood*, 2012, 119(3): 696-706.
- [15] PULE M A, STRAATHOF K C, DOTTI G, et al. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells [J]. *Mol Ther*, 2005, 12(5): 933-41.
- [16] GUEDAN S, CHEN X, MADAR A, et al. ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells [J]. *Blood*, 2014, 124(7): 1070-80.
- [17] CHEN K H, WADA M, PINZ K G, et al. Preclinical targeting of aggressive T-cell malignancies using anti-CD5 chimeric antigen receptor [J]. *Leukemia*, 2017, 31(10): 2151-60.
- [18] ZHONG X S, MATSUSHITA M, PLOTKIN J, et al. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8⁺ T cell-mediated tumor eradication [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(2): 413-20.
- [19] RAMELLO M C, BENZAID I, KUENZI B M, et al. An immu-

- noproteomic approach to characterize the CAR interactome and signalosome [J]. *Sci Signal*, 2019, 12(568): eaap9777.
- [20] TANG X Y, SUN Y, ZHANG A, et al. Third-generation CD28/4-1BB chimeric antigen receptor T cells for chemotherapy relapsed or refractory acute lymphoblastic leukaemia: a non-randomised, open-label phase I trial protocol [J]. *BMJ Open*, 2016, 6(12): e013904.
- [21] ENBLAD G, KARLSSON H, GAMMELGARD G, et al. A phase I/IIa trial using CD19-targeted third-generation CAR T cells for lymphoma and leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(24): 6185-94.
- [22] WENG J, LAI P, QIN L, et al. A novel generation 1928zT2 CAR T cells induce remission in extramedullary relapse of acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 25.
- [23] CHMIELEWSKI M, ABKEN H. TRUCKS: the fourth generation of CARs [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(8): 1145-54.
- [24] PORTER D L, LEVINE B L, KALOS M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 725-33.
- [25] KIM D W, CHO J Y. Recent advances in allogeneic CAR-T cells [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 263.
- [26] TOKAREW N, OGONEK J, ENDRES S, et al. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells [J]. *Br J Cancer*, 2019, 120(1): 26-37.
- [27] FEUCHT J, SUN J, EYQUEM J, et al. Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency [J]. *Nat Med*, 2019, 25(1): 82-8.
- [28] WATANABE K, TERAOKURA S, MARTENS A C, et al. Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 zeta chimeric antigen receptor-modified effector CD8⁺ T cells [J]. *J Immunol*, 2015, 194(3): 911-20.
- [29] SINGH N, LEE Y G, SHESTOVA O, et al. Impaired death receptor signaling in leukemia causes antigen-independent resistance by inducing CAR T-cell dysfunction [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(4): 552-67.
- [30] DUFVA O, KOSKI J, MALINIEMI P, et al. Integrated drug profiling and CRISPR screening identify essential pathways for CAR T-cell cytotoxicity [J]. *Blood*, 2020, 135(9): 597-609.
- [31] BENMEBAREK M R, KARCHES C H, CADILHA B L, et al. Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1283.
- [32] HAN E Q, LI X L, WANG C R, et al. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy: progress and challenges [J]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6: 47.
- [33] GOLUBOVSKAYA V, WU L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy [J]. *Cancers*, 2016, 8(3): 36.
- [34] SEBESTYEN Z, PRINZ I, DECHANET-MERVILLE J, et al. Translating gammadelta (gammadelta) T cells and their receptors into cancer cell therapies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(3): 169-84.
- [35] ZHANG Q, LU W, LIANG C L, et al. Chimeric antigen receptor (CAR) Treg: a promising approach to inducing immunological tolerance [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2359.
- [36] CHENG J, ZHAO L, ZHANG Y, et al. Understanding the mechanisms of resistance to CAR T-cell therapy in malignancies [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1237.
- [37] YAN Z, CAO J, CHENG H, et al. A combination of humanised anti-CD19 and anti-BCMA CAR T cells in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a single-arm, phase 2 trial [J]. *Lancet Haematol*, 2019, 6(10): e521-e9.
- [38] ZHANG J, HU Y, YANG J, et al. Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL [J]. *Nature*, 2022, 609(7926): 369-74.
- [39] HE H, LIAO Q, ZHAO C, et al. Conditioned CAR-T cells by hypoxia-inducible transcription amplification (HiTA) system significantly enhances systemic safety and retains antitumor efficacy [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(10): e002755.
- [40] LIN H, CHENG J, MU W, et al. Advances in universal CAR-T cell therapy [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 744823.
- [41] SADEQI NEZHAD M, ABDOLLAHPOUR-ALITAPPEH M, REZAEI B, et al. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) provide a potentially unlimited T cell source for CAR-T cell development and off-the-shelf products [J]. *Pharm Res*, 2021, 38(6): 931-45.
- [42] RAJE N, BERDEJA J, LIN Y, et al. Anti-BCMA CAR T-cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(18): 1726-37.
- [43] ALI S A, SHI V, MARIC I, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma [J]. *Blood*, 2016, 128(13): 1688-700.
- [44] MOUGIAKAKOS D, KRONKE G, VOLKL S, et al. CD19-targeted CAR T cells in refractory systemic lupus erythematosus [J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(6): 567-9.
- [45] MACKENSEN A, MULLER F, MOUGIAKAKOS D, et al. Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus [J]. *Nat Med*, 2022, 28(10): 2124-32.
- [46] QI J, DING C, JIANG X, et al. Advances in developing CAR T-cell therapy for HIV cure [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 361.
- [47] OSTRAND-ROSENBERG S, FENSELAU C. Myeloid-derived suppressor cells: immune-suppressive cells that impair antitumor immunity and are sculpted by their environment [J]. *J Immunol*, 2018, 200(2): 422-31.
- [48] DAVOODZADEH GHOLAMI M, KARDAR G A, SAEEDI Y, et al. Exhaustion of T lymphocytes in the tumor microenvironment: significance and effective mechanisms [J]. *Cell Immunol*, 2017, 322: 1-14.
- [49] MORELLO A, SADELAIN M, ADUSUMILLI P S. Mesothelin-targeted CARs: driving T cells to solid tumors [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(2): 133-46.
- [50] BEATTY G L, O'HARA M H, LACEY S F, et al. Activity of mesothelin-specific chimeric antigen receptor T cells against pancreatic carcinoma metastases in a phase I trial [J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(1): 29-32.
- [51] MAJZNER R G, THERUVATH J L, NELLAN A, et al. CAR T cells targeting B7-H3, a pan-cancer antigen, demonstrate potent preclinical activity against pediatric solid tumors and brain tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(8): 2560-74.
- [52] 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): eaaa0984.
- [53] BROWN C E, BADIE B, BARISH M E, et al. Bioactivity and safety of IL13Ralpha2-redirected chimeric antigen receptor CD8⁺

- T cells in patients with recurrent glioblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(18): 4062-72.
- [54] AHMED N, BRAWLEY V, HEGDE M, et al. HER2-specific chimeric antigen receptor-modified virus-specific T cells for progressive glioblastoma: a phase 1 dose-escalation trial [J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(8): 1094-101.
- [55] WANG D, STARR R, CHANG W C, et al. Chlorotoxin-directed CAR T cells for specific and effective targeting of glioblastoma [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(533): eaaw2672.
- [56] QI C, GONG J, LI J, et al. Claudin18.2-specific CAR T cells in gastrointestinal cancers: phase 1 trial interim results [J]. *Nat Med*, 2022, 28(6): 1189-98.
- [57] MORETTA L, LOCATELLI F, PENDE D, et al. Human NK receptors: from the molecules to the therapy of high risk leukemias [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(11): 1563-7.
- [58] DAHER M, REZVANI K. Next generation natural killer cells for cancer immunotherapy: the promise of genetic engineering [J]. *Curr Opin Immunol*, 2018, 51: 146-53.
- [59] CHIOSSONE L, VIENNE M, KERDILES Y M, et al. Natural killer cell immunotherapies against cancer: checkpoint inhibitors and more [J]. *Semin Immunol*, 2017, 31: 55-63.
- [60] ZHANG J, ZHENG H, DIAO Y. Natural killer cells and current applications of chimeric antigen receptor-modified NK-92 cells in tumor immunotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 317.
- [61] MEHTA R S, REZVANI K. Chimeric antigen receptor expressing natural killer cells for the immunotherapy of cancer [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 283.
- [62] SAETERSMOEN M L, HAMMER Q, VALAMEHR B, et al. Off-the-shelf cell therapy with induced pluripotent stem cell-derived natural killer cells [J]. *Semin Immunopathol*, 2019, 41(1): 59-68.
- [63] YILMAZ A, CUI H, CALIGIURI M A, et al. Chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells for cancer immunotherapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 168.
- [64] BECKER P S, SUCK G, NOWAKOWSKA P, et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65(4): 477-84.
- [65] JACKSON H J, RAFIQ S, BRENTJENS R J. Driving CAR T-cells forward [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(6): 370-83.
- [66] CHANG Y H, CONNOLLY J, SHIMASAKI N, et al. A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances natural killer cell activation and killing of tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(6): 1777-86.
- [67] TOPFER K, CARTELLIERI M, MICHEN S, et al. DAP12-based activating chimeric antigen receptor for NK cell tumor immunotherapy [J]. *J Immunol*, 2015, 194(7): 3201-12.
- [68] LIU E, TONG Y, DOTTI G, et al. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity [J]. *Leukemia*, 2018, 32(2): 520-31.
- [69] GONG Y, KLEIN WOLTERINK R G J, WANG J, et al. Chimeric antigen receptor natural killer (CAR-NK) cell design and engineering for cancer therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 73.
- [70] TENG K Y, MANSOUR A G, ZHU Z, et al. Off-the-shelf prostate stem cell antigen-directed chimeric antigen receptor natural killer cell therapy to treat pancreatic cancer [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(4): 1319-33.
- [71] BENDELAC A, SAVAGE P B, TEYTON L. The biology of NKT cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 297-336.
- [72] VIVIER E, ANFOSSI N. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(3): 190-8.
- [73] MCEWEN-SMITH R M, SALIO M, CERUNDOLO V. The regulatory role of invariant NKT cells in tumor immunity [J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(5): 425-35.
- [74] BERZINS S P, ULDRICH A P, PELLICCI D G, et al. Parallels and distinctions between T and NKT cell development in the thymus [J]. *Immunol Cell Biol*, 2004, 82(3): 269-75.
- [75] GODFREY D I, ULDRICH A P, MCCLUSKEY J, et al. The burgeoning family of unconventional T cells [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(11): 1114-23.
- [76] METELITSA L S. Anti-tumor potential of type-I NKT cells against CD1d-positive and CD1d-negative tumors in humans [J]. *Clin Immunol*, 2011, 140(2): 119-29.
- [77] NOWAK M, ARREDOUANI M S, TUN-KYI A, et al. Defective NKT cell activation by CD1d⁺ TRAMP prostate tumor cells is corrected by interleukin-12 with alpha-galactosylceramide [J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11311.
- [78] HIX L M, SHI Y H, BRUTKIEWICZ R R, et al. CD1d-expressing breast cancer cells modulate NKT cell-mediated antitumor immunity in a murine model of breast cancer metastasis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20702.
- [79] CHONG T W, GOH F Y, SIM M Y, et al. CD1d expression in renal cell carcinoma is associated with higher relapse rates, poorer cancer-specific and overall survival [J]. *J Clin Pathol*, 2015, 68(3): 200-5.
- [80] COHEN N R, BRENNAN P J, SHAY T, et al. Shared and distinct transcriptional programs underlie the hybrid nature of iNKT cells [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(1): 90-9.
- [81] KOHLGRUBER A C, DONADO C A, LAMARCHE N M, et al. Activation strategies for invariant natural killer T cells [J]. *Immunogenetics*, 2016, 68(8): 649-63.
- [82] ROBERTSON F C, BERZOFKY J A, TERABE M. NKT cell networks in the regulation of tumor immunity [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 543.
- [83] AMBROSINO E, TERABE M, HALDER R C, et al. Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis [J]. *J Immunol*, 2007, 179(8): 5126-36.
- [84] NAIR S, DHODAPKAR M V. Natural killer T cells in cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1178.
- [85] MOODYCLIFFE A M, NGHIEM D, CLYDESDALE G, et al. Immune suppression and skin cancer development: regulation by NKT cells [J]. *Nat Immunol*, 2000, 1(6): 521-5.
- [86] TERABE M, MATSUI S, NOBEN-TRAUTH N, et al. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway [J]. *Nat Immunol*, 2000, 1(6): 515-20.
- [87] TERABE M, MATSUI S, PARK J M, et al. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(11): 1741-52.

- [88] PATEL S, BURGA R A, POWELL A B, et al. Beyond CAR T cells: other cell-based immunotherapeutic strategies against cancer [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 196.
- [89] HECZEY A, LIU D, TIAN G, et al. Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy [J]. *Blood*, 2014, 124(18): 2824-33.
- [90] XU X, HUANG W, HECZEY A, et al. NKT cells coexpressing a GD2-specific chimeric antigen receptor and IL15 show enhanced *in vivo* persistence and antitumor activity against neuroblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(23): 7126-38.
- [91] NAZHA B, INAL C, OWONIKOKO T K. Disialoganglioside GD2 expression in solid tumors and role as a target for cancer therapy [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1000.
- [92] VANTAKU V, DONEPUDI S R, AMBATI C R, et al. Expression of ganglioside GD2, reprogram the lipid metabolism and EMT phenotype in bladder cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56): 95620-31.
- [93] ORSI G, BARBOLINI M, FICARRA G, et al. GD2 expression in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19): 31592-600.
- [94] ROTOLO A, CAPUTO V S, HOLUBOVA M, et al. Enhanced anti-lymphoma activity of CAR19-iNKT cells underpinned by dual CD19 and CD1d targeting [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(4): 596-610, e11.
- [95] SIMON B, WIESINGER M, MARZ J, et al. The generation of CAR-transfected natural killer T cells for the immunotherapy of melanoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2365.
- [96] VAROL C, MILDNER A, JUNG S. Macrophages: development and tissue specialization [J]. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33: 643-75.
- [97] CHEN D S, MELLMAN I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle [J]. *Immunity*, 2013, 39(1): 1-10.
- [98] MILLS C D, KINCAID K, ALT J M, et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm [J]. *J Immunol*, 2000, 164(12): 6166-73.
- [99] ITALIANI P, BORASCHI D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 514.
- [100] RUFFELL B, COUSSENS L M. Macrophages and therapeutic resistance in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(4): 462-72.
- [101] SCHULZ D, SEVERIN Y, ZANOTELLI V R T, et al. In-depth characterization of monocyte-derived macrophages using a mass cytometry-based phagocytosis assay [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1925.
- [102] KLICHINSKY M, RUELLA M, SHESTOVA O, et al. Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(8): 947-53.
- [103] ZHANG W, LIU L, SU H, et al. Chimeric antigen receptor macrophage therapy for breast tumours mediated by targeting the tumour extracellular matrix [J]. *Br J Cancer*, 2019, 121(10): 837-45.
- [104] ZHANG L, TIAN L, DAI X, et al. Pluripotent stem cell-derived CAR-macrophage cells with antigen-dependent anti-cancer cell functions [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 153.