

# CAR-T 与阻断 PD-1 联合治疗在实体瘤中的研究进展

郑梦<sup>1,2</sup>, 王燕<sup>1</sup>, 缪丽燕<sup>1,2\*</sup> (1. 苏州大学附属第一医院临床药理实验室, 江苏 苏州 215006; 2. 苏州大学药物研究与转化交叉研究所, 江苏 苏州 215123)

**摘要:**近年来,嵌合抗原受体修饰 T 细胞(chimeric antigen receptor-modified T cells, CAR-T)在血液系统肿瘤中的临床疗效显著,但在实体瘤的治疗中面临诸多挑战。在实体肿瘤微环境中, CAR-T 细胞表面高表达的程序性细胞死亡蛋白-1(programmed cell death-1, PD-1)是限制发挥疗效的主要因素。故而,阻断 PD-1 可以提高 CAR-T 细胞的效应功能,并显著降低肿瘤负荷。本文总结了 CAR-T 与 PD-1 阻断联合治疗在实体瘤中临床前及临床中的研究现状。

**关键词:**嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法;程序性细胞死亡蛋白-1;实体瘤;免疫疗法

doi:10.11669/cpj.2024.11.002 中图分类号:R730.51 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)11-0961-09

## Progress in CAR-T Cell therapy Combined with PD-1 Blockade Therapy for Solid Tumors

ZHENG Meng<sup>1,2</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, MIAO Liyan<sup>1,2\*</sup> (1. Department of Clinical Pharmacology Research Laboratory, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China; 2. Institute for Interdisciplinary Drug Research and Translational Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**ABSTRACT:** Recently, chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy has made remarkable success in hematological malignancies but faces a series of challenges in solid tumors. One of the major problems is that CAR-T cells overexpress programmed death-1 (PD-1) in tumor microenvironment. Therefore, blocking PD-1 can rescue the effector functions of CAR-T cells and reduce tumor burden significantly. Herein, it is aimed to summarize the progress in preclinical and clinical research on immunotherapy of combining CAR-T cells with PD-1 blockade for solid tumors.

**KEY WORDS:** CAR-T; PD-1; solid tumor; immunotherapy

嵌合抗原受体修饰 T 细胞(chimeric antigen receptor-modified T cells, CAR-T)细胞疗法是利用基因工程手段将特异性靶向肿瘤抗原的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CARs)引入到人的 T 细胞,经体外扩增后,回输患者体内,从而发挥肿瘤细胞杀伤作用。与传统过继免疫疗法相比, CAR-T 细胞疗法不需要抗原呈递,以非 MHC 限制性的方式识别并精准靶向肿瘤抗原而发挥作用<sup>[1]</sup>。因此, CAR-T 细胞疗法在血液恶性肿瘤中发展迅速。截止到 2023 年 12 月,美国食品药品监督管理局已先后批准 4 种 CD19 CAR-T 活细胞药物(tisagenlecleucel, axicabtagene ciloleucel, brexucabtagene autoleucel, lisocabtagene maraleucel)用于复发或难治弥漫大 B 细胞瘤治疗, 2 种 BCMA-CAR-T(idecabtagene vicleucel, ciltacabtagene autoleucel)用于复发或难治性多发性骨髓瘤<sup>[2-4]</sup>。国内上市 2 种 CD19-CAR-T 活细胞药物(阿基伦塞注射液和瑞基奥仑塞注射液)<sup>[5]</sup>用于成人复发难治性大 B 细胞淋巴瘤;还有一些其他的 CAR-T 细胞正在进行临床试验测试,如 CD22-CAR-T 细胞用于治疗 B 细胞淋巴瘤(NCT02315612)<sup>[6]</sup>, BCMA CAR-T 细胞用于治疗多发性骨髓瘤(NCT02658929)<sup>[7]</sup>。

然而, CAR-T 治疗实体瘤的疗效却面临诸多挑战,比如,实体肿瘤异质性、免疫抑制肿瘤微环境等。在肿瘤免疫抑制性微环境中, CAR-T 细胞表面过表达 PD-1, 从而引起细胞毒性和功能持久性下降<sup>[8,9]</sup>。因此,通过阻断 PD-1 来挽救 CAR-T 的效应功能是一个很有前途的策略<sup>[8]</sup>。为了提升 CAR-T 细胞功能,增强抗肿瘤疗效,目前已开展了多种方法来抵抗 CAR-T 细胞疗法中 PD-1 的抑制性作用,如抗 PD-1 抗体与 CAR-T 联合应用、CAR-T 细胞中表达 PD-1 显性阴性受体、PD-1/CD28 嵌合开关受体,或分泌 PD-1 阻断单链可变片段(single-chain variable fragment, scFv),以及在 CAR-T 细胞上 PD-1 基因敲除等。本文主要就 CAR-T 与 PD-1 阻断在实体瘤中临床前及临床中的研究现状进行综述。

### 1 CAR-T 细胞结构与特点

CAR-T 细胞最早构建方案由 Gross 等<sup>[10]</sup>提出,他们发现 VHC $\alpha$  或 VHC $\beta$  嵌合链可以与受体 T 细胞的  $\beta$  或  $\alpha$  链形成异源二聚体,从而以非 MHC 限制性的方式激活 T 细胞。随着技术的发展和成熟, CAR-T 的结构和功能不断优化,已经发展到第五代,但其主要结构依旧由胞外 scFv, 跨膜结构域

**基金项目:**国家自然科学基金项目资助(82104318);江苏省重点研发计划(社会发展)专项资助(BE2021644)

**作者简介:**郑梦,女,博士研究生 研究方向:分子影像与临床药学 \* 通讯作者:缪丽燕,女,博士,主任药师,教授,博士生导师  
研究方向:分子影像与临床药理 Tel: (0512) 67972988

和胞内信号域 (CD3 $\zeta$ , CD28 或 TNFRSF9) 3 部分组成<sup>[11]</sup> (图 1)。

第 1 代 CAR-T 细胞只有单一的 CD3 $\zeta$  ITAM (基于免疫受体酪氨酸的激活基序) 活性结构域; 第 2 代 CAR-T 细胞包含一个共刺激域, 来自 CD28 或 4-1BB; 第 3 代 CAR-T 细胞在第二代的基础上, 增加了一个共刺激结构域, 具有更强的增殖

能力和更长的持久性; 第 4 代 CAR-T 细胞可以产生 IL-2, IL-12, IL-15, 能够激活固有免疫, 对病毒感染、自身免疫性疾病和代谢紊乱均有效。第 5 代 CAR-T 细胞, 在 CD28 和 CD247 之间添加 IL-2RB 的 JAK-STAT 激活域。该结构域可刺激 CAR-T 细胞增殖, 防止 CAR-T 终端分化, 具有更好的持久性, 使 CAR-T 具有更好的安全性和疗效。

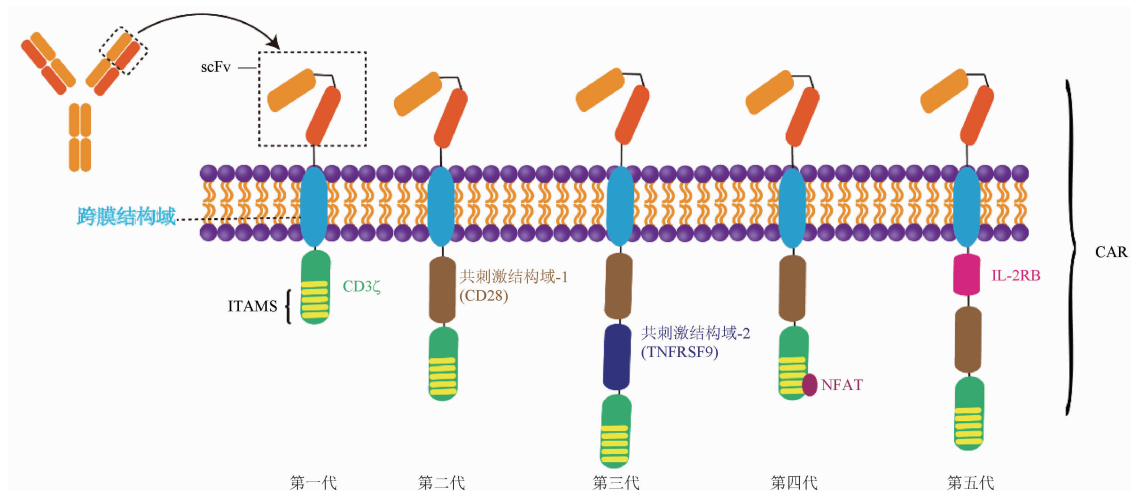


图 1 嵌合抗原受体修饰 T 细胞 (CAR-T) 的结构<sup>[11-13]</sup>

## 2 CAR-T 细胞疗法在实体瘤研究中面临的挑战及现状

CAR-T 细胞结构的优化促进了其在实体肿瘤治疗中的应用。现在越来越多的 CAR-T 细胞疗法在靶向实体肿瘤的临床试验中进行评估, 如胶质母细胞瘤<sup>[14]</sup>、肺癌<sup>[15]</sup>、肝癌<sup>[16]</sup>、胃癌<sup>[17]</sup>、肾癌<sup>[18]</sup>、前列腺癌<sup>[19]</sup>等。然而, 治疗结果却不尽如人意。一项基于对 CAR-T 治疗实体肿瘤疗效的 Meta 分析, 其产生的综合有效率也仅有 9%<sup>[20]</sup>。

CAR-T 细胞疗法在实体瘤中疗效受多种因素的影响。第一, 实体肿瘤中肿瘤特异性抗原 (tumor-specific antigens, TSAs) 的缺乏。在目前大多数实体肿瘤中, 大多治疗靶点是肿瘤相关抗原 (tumor-associated antigens, TAAs), 例如, GD2<sup>[21]</sup>, HER2<sup>[22]</sup>, EGFRvIII<sup>[23]</sup>, CEA<sup>[24]</sup>, PSMA<sup>[25]</sup>, mesothelin<sup>[26]</sup>, B7-H3<sup>[27]</sup>。然而, 肿瘤相关抗原的特异性不高, 容易引发 CAR-T 细胞在实体肿瘤治疗中的脱靶效应<sup>[28]</sup>。Lamers 等<sup>[29]</sup>开展的一项临床试验发现, 12 例晚期肾细胞癌的患者中有 4 例因严重的肝损伤而终止实验。这归因于 CAIX-CAR-T 也靶向表达 CAIX 的胆管上皮细胞, 引起细胞损伤。第二, 恶性肿瘤抗原具有高度异质性。对于同一患者, 即使在同一部位的肿瘤, 甚至在同一肿瘤上的肿瘤细胞也可能表达不相同的肿瘤抗原。此外, 肿瘤治疗前后肿瘤抗原的数量或类型也可能不同<sup>[30]</sup>。传统的 CAR-T 细胞只针对一种肿瘤表面抗原, 从而导致不表达或过表达其他抗原的肿瘤细胞逃逸, 最终导致肿瘤复发。因此, 肿瘤抗原的异质性增加了实体肿瘤治疗的难度和肿瘤复发的可能性。O' Rourke 等<sup>[23]</sup>在一项靶向 EGFRvIII-CAR-T 首次人体研究中, 外周单次输入 CAR-T 细胞治疗后, 71% 胶质母细胞瘤患者 EGFRvIII 抗原表达水平较治疗前降低, 且发生适应

性耐药。第三, 与血液恶性肿瘤情况不同的是, CAR-T 细胞与实体肿瘤细胞之间存在 2 个主要的屏障 (包括实体肿瘤组织中的血管屏障和间质屏障)。在临床上, CAR-T 细胞经常通过静脉注射注射到体内。然而, 由于输入的 CAR-T 细胞与实体肿瘤细胞之间存在屏障, 只有少量的 CAR-T 细胞进入实体肿瘤内部, 大部分留在外周循环中。Moon 等<sup>[31]</sup>发现抗 mesothelin-CAR-T 细胞过表达 CCR2b 后, 小鼠中 CAR-T 细胞向恶性胸膜间皮瘤转移数量增加了 12.5 倍以上, 抗肿瘤作用明显得到改善。第四, 肿瘤微环境破坏并抑制了实体肿瘤治疗中 CAR-T 细胞的活性, 导致 CAR-T 细胞无法有效识别和杀死肿瘤细胞<sup>[32]</sup>。与天然 T 细胞相似, 浸润在肿瘤组织中的 CAR-T 细胞被 PD-1/PD-L1 信号强烈抑制, 直接抑制 CAR-T 细胞效应功能<sup>[33]</sup>。研究报道显示, 抗 PD1 ( $\alpha$ -PD-1) 治疗确实可用于增强 CAR-T 细胞的抗肿瘤活性<sup>[34]</sup>, 提示 CAR-T 联合 PD-1 阻断可能是一种很有前景的肿瘤免疫治疗策略, 可以增强抗肿瘤疗效, 扩大治疗范围。

## 3 CAR-T 细胞治疗与阻断 PD-1 联合应用的原理

T 细胞的表面由许多具有不同类型和功能的分子组成, 包括提供激活信号的共刺激分子 (CD28, 4-1BB) 和抑制信号的免疫检查点分子 (CTLA-4/PD-1)。与内源性 T 细胞一样, CAR-T 细胞的功能很容易受到实体肿瘤中免疫抑制微环境的影响, 如肿瘤细胞上抑制性配体 PD-L1/PD-L2 的表达<sup>[33]</sup>。PD-1 是 T 细胞激活后显著表达的一个免疫检查点受体。CAR-T 细胞的分化和耗竭表型与其 PD-1 表达上调相关<sup>[35-36]</sup>。PD-1; PD-L1/L2 通路在抑制 T 细胞反应和增加 T

细胞对凋亡的敏感性方面发挥重要作用。因此,肿瘤诱导的 T 细胞功能下调使用通过免疫检查点抑制剂来逆转,该抑制剂可以阻断 PD-1 介导的信号级联,并在肿瘤微环境中维持 T 细胞的激活和功能持久性。Cherkassky 等<sup>[33]</sup>发现,在小鼠胸膜间皮瘤原位模型中,CD28/4-1BB mesothelin 特异性靶向的 CAR-T 细胞上调 PD-1 和 LAG-3 后,抗肿瘤效应下降。通过抗 PD-1 抗体、细胞内在 PD-1 shRNA,或 PD-1 显性阴性受体阻断 PD-1 的方法,恢复 CD28-CAR-T 细胞的效应功能。另外,在一项 I 期临床试验中,Gargett 等<sup>[37]</sup>发现在转移性黑色素瘤患者体内,特异性靶向 GD2 的 CAR-T 细胞在经抗原反复刺激后,同时上调 PD-1 和 PD-L1,且引发因激活诱发的细胞死亡(activation-induced cell death, AICD),阻断 PD-1 后,可降低经抗原反复刺激后, CAR-T 细胞 AICD 的发生。这些发现证实了 CAR-T 细胞的衰竭,更类似于慢性病毒感染模型<sup>[38]</sup>,即 CAR-T 细胞衰竭是由于长期暴露于充满抑制性肿瘤微环境中,反复经抗原刺激的结果。因此,阻断 PD-1 后,可以有效改善实体瘤中免疫微环境对 CAR-T 细胞活力的抑制作用。这些发现为人类 CAR-T 细胞在实体肿瘤中的衰竭提供了机制上的见解,并提示 PD-1 阻断可能是提高 CAR-T 细胞治疗效力的有效策略。

#### 4 CAR-T 细胞治疗与阻断 PD-1 在实体瘤中联合应用研究现状

虽然 CAR-T 细胞疗法在血液恶性肿瘤中取得了显著的疗效,然而, T 细胞扩增受限和持续时间短,仍然是 CAR-T 细胞治疗后疗效不佳和复发的主要原因之一。Joseph 等<sup>[39]</sup>对患者来源的 CAR-T 细胞进行全面评估以确定治疗成功和失败的机制。通过基因组、表型和功能评估发现,完全缓解的慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)患者的 CAR-T 细胞有记忆相关基因富集,包括 IL-6/STAT3;持续缓解患者体内 CD27<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T 细胞增加,且这些淋巴细胞具有记忆样特征。而无应答患者, CAR-T 细胞上调了与效应细胞分化、糖酵解、耗竭和凋亡相关的通路。PD-L1/PD-1 通路能够直接抑制 CAR-T 细胞中共刺激结构域 CD28 信号,从而抑制 CAR-T 细胞的功能<sup>[40]</sup>。故而,阻断 PD-1 可能是提高 CAR-T 细胞在血液恶性肿瘤中治疗疗效的方法之一。一项在宾夕法尼亚儿童医院(Children's Hospital of Pennsylvania, CHOP)开展的小型、单中心研究中,在 CD19 CAR-T 疗法基础上加用 PD-1 阻断治疗 14 例既往接受过多次治疗的 B-ALL 患儿(13 例使用派姆单抗,1 例使用纳武利尤单抗),结果发现 14 例患者中有 7 例维持了部分缓解(partial response, PR)或完全缓解(complete response, CR)。6 例接受 PD-1 抑制剂治疗的患者中有 3 例出现修复 B 细胞再生障碍,提示 CAR-T 功能仍在继续。1 例患者中,在开始使用派姆单抗的几天内, CAR-T 细胞显著增殖。该队列显示的初步证据表明,检查点抑制剂可以有效和安全地与 CAR-T 细胞联合治疗复发的 B-ALL 儿童,该策略可能增强 CAR-T 细胞的效果和持久性<sup>[41]</sup>。因此,阻断 PD-1 和 CAR-T 联用在血

液恶性肿瘤中取得良好疗效,推动了这种联用方式在实体瘤的研究。目前这种联用方式在已报道的临床前研究主要集中在肺癌、脑胶质瘤及肝癌中(表 1);正在进行临床试验的研究主要集中在结直肠癌、脑胶质瘤及卵巢癌(表 2)。这种组合方法在实体瘤临床前或临床试验的研究主要是通过外源性(单克隆抗体)和内源性(基因工程)方法阻断 PD-1,改善 CAR-T 细胞的活性(图 2)。

#### 4.1 CAR-T 细胞治疗与阻断 PD-1 联合应用方法的临床前研究

**4.1.1 外源性方法一与抗 PD-1 抗体联用** 临床前实验结果表明, CAR-T 细胞治疗结合抗 PD-1 单抗可以提高 CAR-T 细胞活性,促进肿瘤细胞死亡。John 等<sup>[43]</sup>首次发现抗 PD-1 抗体可以提高 CAR-T 细胞对 HER-2<sup>+</sup> 肿瘤的治疗活性。实验证明,经抗原特异性刺激后,特异性靶向 HER-2 的 CD8<sup>+</sup> CAR-T 细胞上的 PD-1 表达水平显著升高。当加入抗 PD-1 单抗后,不仅能增强 CAR-T 细胞的体外增殖能力和功能,引起体内已形成的肿瘤消退,并且在小鼠体内不会引起自身免疫,同时,骨髓源性抑制细胞(MDSCs)在肿瘤微环境中的比例降低。Moon 等<sup>[44]</sup>发现抗 NY-ESO-1 T 细胞受体工程的 T 细胞出现严重的功能减退,同时伴有 PD-1、TIM-3 和 LAG-3 的表达上调。注射抗 PD-1 抗体后,可控制肿瘤生长的速率,发挥抗肿瘤效应。

**4.1.2 内源性方法一利用基因工程干扰 CAR-T 细胞中 PD-1 的表达** 抗 PD-1 抗体的原位分泌: CAR-T 细胞可产生 PD-1/PD-L1 阻断 scFvs, 阻断与配体结合的区域。Ping 等<sup>[45]</sup>设计了一种能够分泌具有生物活性的  $\alpha$ -PD-1 scFv 的 CAR-T 细胞。在皮下和原位异种移植模型中,自分泌  $\alpha$ -PD-1 scFv 增加 CAR-T 细胞功能和抑瘤率。Li 等<sup>[46]</sup>研究设计了一种 CAR-T 细胞分泌靶向 PD-1 的检查点抑制剂,并评估了它们在肺癌异种移植小鼠模型中的疗效。与未经处理的 CAR-T 相比,抗 PD-1 的 CAR-T 细胞具有更强的可扩展性和更有效的肿瘤消退作用。

PD-1 显性阴性受体(dominant negative receptor, DNR) PD-1 显性阴性受体(PD-1 DNR)缺乏细胞内信号转导域,作为一个诱骗受体与机体 PD-1 受体竞争,当遇到 PD-L1 配体时,可将抑制信号转换为激活信号,消除 PD-L1 信号对 T 细胞的抑制。Cherkassky 等<sup>[33]</sup>证实了 CAR-T 细胞在体内经抗原反复刺激后,其分泌细胞因子的功能受到抑制。为了直接对抗 PD-1 对 CAR-T 介导的抑制作用,他们使用逆转录病毒载体将 CAR-T 介导的共刺激与 PD-1 DNR 结合,以竞争 PD-1 配体。在间皮瘤和肺癌小鼠模型中,CD28 CD19 特异性 CAR-T 细胞与 PD-1 DNR 共转导后,显著增强了 CAR-T 细胞活性,抗肿瘤能力增加,肿瘤负荷降低,小鼠生存时间延长。Qin 等<sup>[47]</sup>设计了一种 PD-1 DNR(dPD1z)和一种针对 PD-L1 的 CAR 载体(CAR-PD-L1z)的 CAR-T 细胞。dPD1z CAR-T 和 PD-L1z CAR-T 细胞能有效地裂解 PD-L1<sup>+</sup> 肿瘤细胞,增强细胞因子的分泌,并显著抑制非小细胞肺癌、胃癌和肝癌患者来源的异种移植瘤(PDX)的生长。

表 1 CAR-T 细胞和阻断程序性细胞死亡蛋白-1 (PD-1) 联用在临床前研究现状

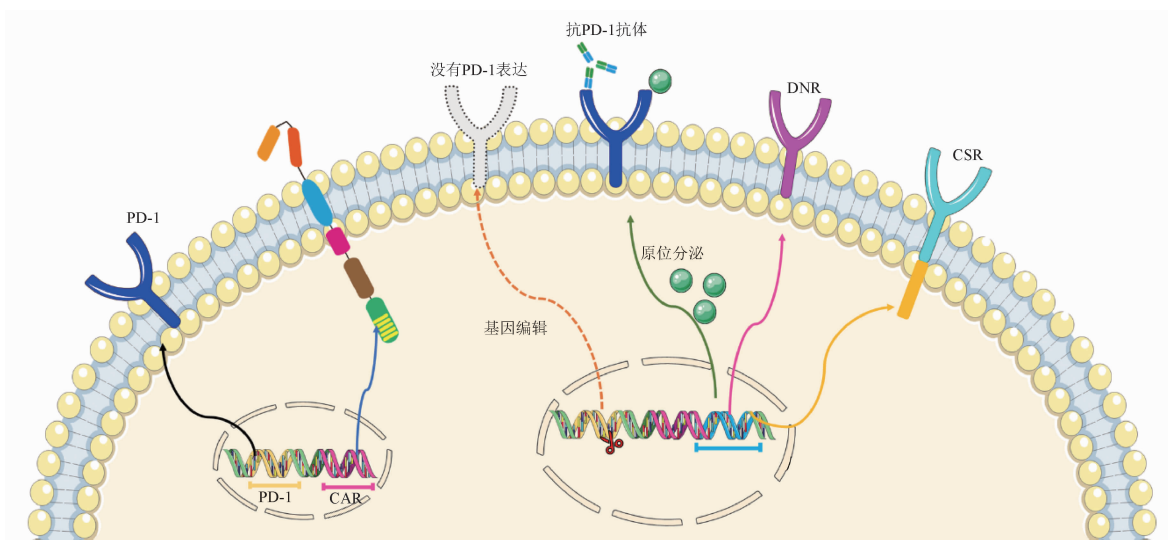
序号	PD-1 干扰方法	CAR-T 靶点	肿瘤模型	CAR-T 给药方案	动物模型	参考文献
1	PD-1 单抗 (EH122H7)	PLAP	结直肠癌	每只小鼠在第 1,7 和 13 天尾静脉注射 $1 \times 10^7$ CAR-T 细胞	每只小鼠皮下注射 $2 \times 10^6$ 个结肠癌细胞	[64]
2	PD-1/CD28 嵌合开关	c-Met	胃癌	小鼠于第 0,7 天分别瘤内注射 $5 \times 10^6$ CAR-T 细胞	将 $1 \times 10^6$ 个 MKN5-Luc 细胞用 100 $\mu$ L PBS 混悬后,皮下注射	[54]
3	分泌与 TGF- $\beta$ 融合的抗 PD-1 双特异性蛋白	CD19	前列腺癌	通过尾静脉注射给药的方式,CAR-T 细胞分别按 $2 \times 10^6$ (短期研究)或 $4 \times 10^6$ (长期研究)方式给药	NSG 小鼠皮下接种 $3 \times 10^6$ 个 PC3-CD19 细胞	[65]
4	CRISPR/Cas9 干扰 PD-1	EGFRvIII	脑胶质瘤	经尾静脉注射总容积为 100 $\mu$ L 的效应细胞或经脑室内输入总容积为 30 $\mu$ L 的效应细胞。脑室内注射位置在脑膜左侧 2 mm,前 0.3 mm,距颅骨表面 3 mm 处。对所有实验的效应细胞群进行标准化,使其每次输入包含 $1 \times 10^6$ 个细胞	将肿瘤细胞植入脑后膜右侧 2 mm 处,距颅骨表面 4 mm 处,共 5 $\mu$ L	[66]
5	干扰 PD-1	GPC3	肝癌	分别静脉注射 $5 \times 10^6$ 野生型 CAR-T 细胞与 $5 \times 10^6$ PD-1 缺陷型 CAR-T 细胞	将 $3 \times 10^6$ PLC/PRF/5 细胞用 PBS 混悬后,并建立皮下移植瘤模型	[67]
6	原位分泌抗 PD-1 scFv	ROR1	三阴性乳腺癌	小鼠接受单次静脉注射 $4 \times 10^6$ CAR-T 细胞或相同未经处理的 T 细胞	NSG 小鼠皮下移植 $2 \times 10^6$ MDA-MB-231 细胞	[68]
7	CRISPR/Cas9 干扰 PD-1	CD133	脑胶质瘤	在肿瘤细胞注射后的第 7,11 和 15 天,通过原始颅内注射通道注射 $2 \times 10^6$ PD-1-缺陷或正常 CD133-CAR-T 细胞或未转染的 T 细胞	NPG 小鼠颅内注射 $2 \times 10^5$ 荧光素酶表达的 U251 CD133 OE luc 细胞	[69]
8	CRISPR/Cas9 干扰 PD-1	Mesothelin	三阴性乳腺癌	第 25 天时,每只小鼠尾静脉给予 $1 \times 10^5$ 个 Meso CAR-T 细胞	将 $2 \times 10^6$ 个表达荧光素酶的 BT549 细胞注射到 NSG 小鼠的第 4 乳腺	[51]
9	PD-1 诱骗受体	B7-H3	肺巨细胞癌	当肿瘤平均直径达到约 4 mm 时,每组小鼠分别在第 5,10 和 15 天静脉注射 PBS 或 $5 \times 10^6$ 个 CAR-T 细胞 (Control CAR-T, H3 CAR-T, H3/DS CAR-T, H3/PD28 CAR-T 或 H3/PDmut7R CAR-T)	NSG 小鼠腰背部皮下注射 $0.5 \times 10^6$ 个肺巨细胞癌 (PG) 细胞	[70]
10	PD-1 显性阴性受体 (PD-1 DNR)	MSLN	胸膜间皮瘤	$4 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 转导 T 细胞 (200 $\mu$ L 无血清培养液) 通过直接胸膜内注射转入荷瘤小鼠胸腔	经右胸切口直接胸腔内注射含 200 $\mu$ L 无血清培养基的 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个肿瘤细胞建立原位 MPM 肿瘤模型	[33]
11	PD-1-CSR	NKG2D	结直肠癌和卵巢癌腹膜转移	为了研究 CAR-T 细胞在体内的抗肿瘤作用,将表达 $1 \times 10^7$ 的 CAR-T 细胞腹腔注射到荷瘤小鼠体内	在 NSG 小鼠腹腔注射 HCT116-Luc 细胞 ( $2 \times 10^6$ ) 或 SKOV3-Luc 细胞 ( $5 \times 10^6$ ) 建立肿瘤模型	[71]
12	PD-1 单抗	GPC1	人食管鳞癌和人肺鳞状癌	第 2~3 天,小鼠接受 5 Gy 全身照射 (TBI) 后,通过静脉输注培养的 mCAR-T 细胞或小鼠对照 T 细胞 (mCont-T) (每支 $2 \times 10^6$ 个)	将 $3 \times 10^6$ 个 TE14 细胞接种于小鼠背部皮下,建立异种小鼠模型。对于同基因小鼠模型,将 $5 \times 10^5$ 个 MC38-mGPC1 或 MCA205-mGPC1 细胞皮下接种 C57BL/6 小鼠的腹部	[72]
13	PD-1 显性阴性受体 (PD-1 DNR)	PD-L1	肺癌,胃癌和肝癌	肿瘤细胞移植后 10 d,经小鼠尾静脉注射 $5 \times 10^6$ 个 CAR-T 细胞	在 NSI 小鼠右侧皮下注射 $5 \times 10^5$ H460GL 细胞 (含 200 $\mu$ L PBS) 建立肺癌细胞系异种移植模型。为了开发第一代 PDXs,将包括肺癌,胃癌和肝癌在内的外科肿瘤样本移植到 3~6 只 NSI 小鼠的皮下	[47]
14	分泌 PD-1	CD19	肺癌	小鼠进行 $1 \times 10^6$ 或 $3 \times 10^6$ CAR-T 细胞进行过继转移	小鼠皮下接种 $3 \times 10^6$ 个 H292-CD19 细胞	[62]
15	原位分泌抗 PD-1 scFv	CD20	肺癌	小鼠在第 6 天接受亚致死剂量的照射 (3 Gy),然后在第 7 天静脉注射 $1 \times 10^6$ 个 conv CAR-T 细胞,scFv CAR-T 细胞,或无基因转导的活化 T 细胞,其中总细胞数量调整为与 CAR-T 细胞组相当	C57BL/6 小鼠在第 0 天注射 $2.5 \times 10^6$ 个 3LL-hCD20	[73]
16	分泌可溶性 PD-1-CH3 融合蛋白	Glypican-3 (GPC3)	肝癌	经环磷酰胺 (200 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ) 清除淋巴细胞后,在 SK-HEP-1-GPC3 模型中,每只小鼠尾静脉注射 $8 \times 10^6$ CAR-T 细胞,而在 Huh7 模型中,每只小鼠注射 $7 \times 10^6$ CAR-T 细胞	建立 Huh7 和 SK-HEP-1-GPC3 模型,将 $2 \times 10^6$ 个肿瘤细胞接种于小鼠右侧皮下	[74]
17	原位分泌抗 PD-1 scFv	Meso	肺癌	尾静脉输注 $5 \times 10^6$ CAR-meso 细胞和 CAR-meso- $\alpha$ -PD-1 细胞。	皮下移植模型:每只 SCID-Beige 小鼠皮下接种 $1 \times 10^6$ 个 H322 细胞;原位瘤模型:每只 SCID-Beige 小鼠尾静脉注射 $5 \times 10^5$ 个 H322 细胞	[34]
18	抗 hPD-1 单抗	PSMA	前列腺癌	CAR-T 细胞的数量从每只老鼠 $20 \times 10^6$ 个减少到 $10 \times 10^6$ 个	在 NSG 小鼠右侧皮下注射 $1 \times 10^6$ 个 Myc-CaP: hPSMA (+) 或 Myc-CaP: hPSMA (-)。将 $1 \times 10^6$ 个 Myc-CaP 野生型细胞注射到 FVB/N 小鼠体内	[75]
19	抗 PD1 单抗	EGFR	脑胶质瘤	将 $1 \times 10^7$ EGFRvIII CAR + T 细胞或等量地模拟 T 细胞 (与总 T 细胞剂量相匹配) 或 $1 \times 10^7$ 带有 PD1 阻断的 EGFRvIII CAR + T 细胞在接种肿瘤 2~3 周后尾静脉注射	皮下模型: $1 \times 10^6$ U87-ELUC 肿瘤细胞植入 NPI 小皮下	[76]
20	抗 PD-1 单抗	PD-L1	胰腺癌	每只小鼠尾静脉注射 $1 \times 10^7$ 个 PD-L1 CAR-T 细胞	皮下模型: $1 \times 10^7$ 或 $1.5 \times 10^7$ CFPAC1 细胞植入 NPI 小皮下左侧;原位瘤模型: $7.5 \times 10^6$ CFPAC1 细胞于第 0 天注射入小鼠胰腺	[77]
21	原位分泌抗 PD-1 scFv	c-Met and PD-1	肝癌	每只小鼠瘤内注射 $1 \times 10^6$ CAR-T 细胞	小鼠右侧皮下注射 $5 \times 10^6$ 个 MKN45 或 A549 细胞建立异种移植瘤	[78]
22	敲除 PD-1	EGFRvIII	脑胶质瘤	在模型建立第 10 天,尾静脉注射 PD-1 WT EGFRvIII-CAR-T 细胞和 PD-1 KD EGFRvIII-CAR-T 细胞	原位脑胶质瘤模型:将培养的 EGFRvIII + U373 细胞立体定向注入 ball/c 裸鼠大脑	[79]

表 2 CAR-T 细胞和阻断 PD-1 联用正在实体瘤中进行的临床研究

序号	试验号	项目名称	靶点	癌症类型及条件	阶段
1	NCT03179007	CTLA-4 and PD-1 antibodies expressing MUC1-CAR-T cells for MUC1 positive advanced solid tumor	MUC1	Advanced solid tumor	Phase I Phase II
2	NCT03182816	CTLA-4 and PD-1 antibodies expressing EGFR-CAR-T cells for EGFR positive advanced solid tumor	EGFR	Advanced solid tumor	Phase I Phase II
3	NCT03030001	PD-1 antibody expressing CAR T cells for mesothelin positive advanced malignancies	Mesothelin	Solid tumor, adult advanced cancer	Phase I Phase II
4	NCT03182803	CTLA-4 and PD-1 antibodies expressing mesothelin-CAR-T cells for mesothelin positive advanced solid tumor	Mesothelin	Advanced solid tumor	Phase I Phase II
5	NCT03706326	CAR T and PD-1 knockout engineered T cells for esophageal cancer	MUC1	Advanced esophageal cancer	Phase I Phase II
6	NCT03525782	Anti-MUC1 CAR T cells and PD-1 knockout engineered T cells for NSCLC	MUC1	Lung neoplasm malignant; non-small cell lung cancer	Phase I Phase II
7	NCT02873390	PD-1 antibody expressing CAR-T cells for EGFR family member positive advanced solid tumor	EGFR	Advanced malignancies	Phase I Phase II
8	NCT03545815	Study of CRISPR-Cas9 mediated PD-1 and TCR gene-knocked out mesothelin-directed CAR-T cells in patients with mesothelin positive multiple solid tumors	Mesothelin	Solid tumor, adult	Phase I
9	NCT03747965	Study of PD-1 gene-knocked out mesothelin-directed CAR-T cells with the conditioning of PC in mesothelin positive multiple solid tumors	Mesothelin	Solid tumor, adult	Phase I
10	NCT04489862	$\alpha$ PD1-MSLN-CAR T cells for the treatment of MSLN-positive advanced solid tumors	Mesothelin	Non-small-cell lung cancer mesothelioma	Early Phase I
11	NCT04503980	$\alpha$ PD1-MSLN-CAR T cells for the treatment of MSLN-positive advanced solid tumors	Mesothelin	Colorectal cancer ovarian cancer	Early Phase I
12	NCT03615313	PD-1 antibody expressing mesoCAR-T cells for mesothelin positive advanced solid tumor (PAEMCMPAST)	Mesothelin	Advanced solid tumor	Phase I Phase II
13	NCT04768608	PD1 integrated anti-PSMA CART in treating patients with castrate-resistant prostate cancer	PSMA	Castrate-Resistant Prostate Cancer	Phase I
14	NCT04995003	HER2 chimeric antigen receptor (CAR) T cells in combination with checkpoint blockade in patients with advanced sarcoma	HER2	Sarcoma HER-2 protein overexpression	Phase I
15	NCT03874897	Chimeric antigen receptor T cells targeting claudin 18.2 in solid tumors	Claudin18.2	Advanced solid tumor	Phase I
16	NCT05089266	Study of $\alpha$ PD1-MSLN-CAR T cells to evaluate the safety, tolerability, and effectiveness for patients with MSLN-positive advanced solid tumors	Mesothelin	Colorectal cancer	Phase I
17	NCT03726515	CART-EGFRvIII + pembrolizumab in GBM	EGFRvIII	Glioblastoma	Phase I
18	NCT03198546	GPC3-CAR-T cells for immunotherapy of cancer with GPC3 expression	GPC3/TGF $\beta$	Hepatocellular carcinoma squamous cell lung cancer	Phase I
19	NCT04577326	Mesothelin-targeted CAR T-cell therapy in patients with mesothelioma	Mesothelin	Malignant pleural mesothelioma (MPM)	Phase I
20	NCT03980288	4 th generation chimeric antigen receptor T cells targeting glypican-3	GPC3	Advanced hepatocellular carcinoma	Phase I
21	NCT01822652	3 rd generation GD-2 chimeric antigen receptor and iCaspase suicide safety switch, neuroblastoma, GRAIN	GD2	Neuroblastoma	Phase I
22	NCT04162119	Safety and efficiency study of BCMA-PD1-CART cells in relapsed/refractory multiple myeloma	BCMA	Multiple myeloma	Phase II
23	NCT03916679	MESO-CAR T Cells Therapy for Relapsed and Refractory Epithelial Ovarian Cancer	MESO	Ovarian Cancer	Phase I Phase II
24	NCT03799913	MESO-CAR T cells therapy for relapsed and refractory ovarian cancer	MESO	Ovarian cancer	Early Phase I
25	NCT03356782	Safety and efficacy evaluation of 4th generation safety-engineered CAR T cells targeting sarcomas		Sarcoma;osteoid sarcoma ewing sarcoma	Phase I Phase II
26	NCT02862028	PD-1 antibody expressing CAR-T cells for EGFR family member positive advanced solid tumor (lung, liver and stomach)	EGFR	Advanced solid tumor	Phase I Phase II

PD-1 基因编辑:PD-1 基因敲除也是抑制 PD-1 表达一种有效策略,主要采用 CRISPR/Cas9<sup>[48]</sup> 或 TALEN<sup>[49]</sup> 等基因编辑技术编辑 PDCD1 基因组来沉默 PD-1 的表达。Guo 等<sup>[50]</sup> 发现 GPC3-CAR-T 细胞中 PD-1 的破坏增强了特异性 CAR 依赖的细胞毒性功能和细胞因子的分泌,而不影响 GPC3-CAR-T 细胞的 CD4 和 CD8 亚群构成和激活状态。并且增加了 GPC3-CAR-T 细胞中 Akt 的活化水平和抗凋亡蛋白 Bcl-xL 的表达水平。这表明在 PD-L1<sup>+</sup> GPC3<sup>+</sup> HCC 下,干扰 PD-1 表达可以保护 GPC3-CAR T 细胞免于衰竭。体内试验也证明,干扰 PD-1 表达增强了 GPC3-CAR-T 细胞的体内抗肿瘤疗效、存活率、细胞因子的产生和肿瘤组织中 GPC3-CAR-T 细胞的浸润。因此,PD-1 缺失的 CAR-T 细胞比野生型 CAR-T 细胞表现出更强的 CAR 依赖性抗肿瘤作用。为了克服 PD-1 对

CAR-T 细胞的抑制作用,Hu 等<sup>[51]</sup> 同样用 CRISPR/Cas9 核糖核酸蛋白介导的编辑来破坏人原代 T 细胞的 PD-1 基因位点,显著减少表达 PD-1<sup>hi</sup> 细胞群体占比。这种减少对 CAR-T 细胞的增殖影响不大,但在体外极大增强了 CAR-T 细胞细胞因子的产生和对表达 PD-L1 癌细胞的细胞毒性。并与有无  $\alpha$ PD-1 抗体阻断的 CAR-T 细胞相比,PD-1 缺失的 CAR-T 细胞在体内显示出更强的肿瘤杀伤作用和复发预防作用。Ren 等<sup>[52]</sup> 也发现 CRISPR/Cas9 在 CAR-T 细胞中破坏 PD-1 后,体外和动物模型中显示出抗肿瘤活性增强,且与非基因编辑的 CAR-T 细胞相比,其活性并没有发生显著性变化。这些研究说明通过 CRISPR/Cas9 编辑的 PD1-CAR-T 细胞治疗效果有显著提高,也说明基因组工程可增强下一代细胞治疗的潜力。



DNR - 显性阴性受体; CAR - 嵌合抗原受体; CSR - 嵌合开关受体。

图2 CAR-T 细胞治疗与阻断 PD-1 联合应用方法示意图<sup>[8,42]</sup>

**PD-1/CD28 嵌合开关:** PD-1/CD28 嵌合开关受体 (chimeric-switch receptor, CSR) 通过融合 PD-1 的胞外结构域和 CD28 的跨膜结构域和胞内结构域来改善免疫抑制。因此, 将 PD-1 通路的抑制信号转化为 CD28 的激活信号, 发挥抗肿瘤效果。Liu 等<sup>[53]</sup> 引入了一种基因工程的“开关”受体结构, 将 PD-1 的细胞外结构域与 CD28 的跨膜结构域融合引入 CAR-T 细胞, 构建靶向间皮素 MSLN 和前列腺干细胞抗原 PSCA-CAR-T。他们发现, 这些 PD-1/CD28 CAR-T 的抗肿瘤效果优于 CAR-T 和派姆单抗联用, 肿瘤体积显著减小, 增强了 CAR-T 细胞的效应功能和体内持久性。Chen 等<sup>[54]</sup> 人将 c-Met 作为 CAR-T 的靶点, 并在体内外检测了 c-Met CAR-T 的有效性和安全性。在 cMet-PD-1/CD28 CAR-T 中优化 PD-1/CD28 CSR 的结构, 发现 PD-1/CD28 CSR 逆转 PD-1 免疫抑制, 提高 cMet CAR-T 的疗效, 增强了 cMet CAR-T 在胃癌中的抗肿瘤能力, 降低 IL-6 的释放水平, 降低细胞因子释放综合征 (CRS) 的发生率。

#### 4.2 CAR-T 细胞治疗与阻断 PD-1 联合应用方法的临床试验研究

临床前研究结果推动了 CAR-T 细胞治疗与阻断 PD-1 联合应用方法的临床试验研究。在一项 CAR-T 细胞联合派姆单抗治疗神经母细胞瘤 (NB) 患者的 I 期临床研究中, 总共纳入 11 例复发或难治性 NB 患者。队列 1 是单独接受 CAR-T 细胞治疗, 队列 2 是接受 CAR-T 加环磷酰胺和氟达拉滨 (Cy/Flu) 治疗, 队列 3 是接受 CAR-T、Cy/Flu 和 PD-1 抑制剂 (派姆单抗) 治疗。Heczey 等<sup>[55]</sup> 发现这 11 例接受了 CAR-T 细胞治疗的患者, 没有发生剂量限制毒性。在队列 1 中检测到 CAR-T, 但是 Cy/Flu 引起的淋巴细胞消耗增加了循环中白细胞介素-15 (IL-15) ( $P=0.003$ ), 并使 CAR-T 体内扩增增加了 3 个 log ( $P=0.03$ )。但派姆单抗的加入并没有进一步增强这种积累或持久性。虽然在派姆单抗治疗队列中观察到 1 例患者完全缓解, 但还不能从这一小群患者中得出结

论。Prasad 等<sup>[26]</sup> 开发了一种 mesothelin 靶向的 CAR-T 细胞疗法治疗恶性胸膜疾病 (malignant pleural disease, MPM)。在 27 例患者中, 25 例 MPM 胸膜内注射  $0.3 \sim 60 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CAR-T 细胞/kg 是安全的, 并且耐受性良好。并且在 39% 的患者外周血中检测到 CAR-T 细胞持续 100 d。在这项研究中, MPM 患者也接受了派姆单抗联用的治疗方案。结果发现在这些患者中, CAR-T 细胞输入后, 患者的中位总生存期为 23.9 个月 (1 年总生存期, 83%)。8 例患者病情稳定持续  $\geq 6$  个月; 2 例 PET 显像显示代谢完全缓解。综上, CAR-T 细胞和 PD-1 抑制联合疗法应在实体瘤患者中进一步评估。同时, 使用内源性方法干扰 PD-1 表达的安全性和有效性正在研究中, 如 CAR-T 细胞表达 PD-1 抗体治疗 EGFR 家族阳性晚期实体瘤 [肺、肝、胃癌 (NCT02862028)], 敲除 CAR-T 中 PD-1 基因临床试验也正在研究中 (NCT03525782, NCT03706326, NCT03545815 和 NCT03747965)。虽然目前正在进行的 CAR-T 细胞治疗与阻断 PD-1 联合应用的临床试验总共有 26 项 (表 2), 但 CAR-T 联合 PD-1 阻断是否为临床试验的合理策略及其治疗疗效还有待进一步阐明。

#### 5 讨论与展望

CAR-T 在实体肿瘤中的疗效不如在血液恶性肿瘤中的显著, 这与实体肿瘤中抑制性免疫微环境有关。免疫抑制通路的存在, 特别是 PD-1:PD-L1/L2 通路的存在, 限制了 CAR-T 细胞的功能和持久性。干扰 PD-1 是增强 CAR-T 细胞功能的有效途径。目前干扰 PD-1 的研究主要有外源性和内源性这两种方法, 都可以显著提高 CAR-T 细胞的功能, 但每种方法仍旧存在一些挑战。

在生理条件下, PD-1:PD-L1/L2 通路可防止 T 细胞过度活化, 并促进对自身抗原的耐受, 以避免自身免疫的发展。内源性方法—阻断 PD-1 的单克隆抗体, 如派姆单抗和尼鲁单抗<sup>[56-57]</sup>, 可以恢复耗竭的 T 细胞功能, 并在各种癌症患者

中产生强大的抗肿瘤免疫反应,但全身给予免疫检查点通路阻断抗体仍然有破坏免疫稳态的风险,产生独特的免疫相关不良反应,甚至威胁生命。而且,抗 PD-1 抗体在发挥作用之前,抗体的 Fc 端结构域被肿瘤相关巨噬细胞捕获;再者,抗体半衰期较短,需要定期和重复给药,增加了患者的经济负担,依从性也较差<sup>[55]</sup>。

因此,相比于外源性方法,通过基因工程的方法干扰 CAR-T 细胞中 PD-1 的表达,不仅可以消除抗 PD-1 抗体持续给药的需要,而且也是一种相对安全的用药方法。目前内源性方法主要是: CAR-T 细胞中表达 PD-1 显性阴性受体、PD-1 或 PD-1/CD28 嵌合开关受体,或分泌 PD-1 阻断单链可变片段,以及在 CAR-T 细胞上敲除 PD-1 基因等。

CAR-T 细胞过表达 PD-1 显性阴性受体 (PD-1 DNR),该受体缺乏 PD-1 跨膜和细胞内信号域,可持续阻断 PD-1 信号。但是,PD-1 DNR 和 PD-L1/2 结合亲和力会受到限制。而且,Heczey 等<sup>[58]</sup>报道使用单剂量 M28z、PD-1、DNR、CAR-T 细胞治疗后<sup>[55]</sup>,肿瘤复发。说明除 PD-1 外,多种共抑制受体(如 CTLA-4、TIM-3、LAG3 和 TIGIT)也在耗竭的 T 细胞上表达,同时靶向多种抑制途径(如 CTLA-4/PD-1 阻断剂)可能进一步增强 CAR-T 细胞的效力。

另外,利用 CRISPR/Cas9<sup>[59]</sup>、TALEN<sup>[60]</sup> 等技术敲除 CAR-T 细胞上 PD-1 的表达,消除 PD-1/PD-L1 引起的免疫抑制,提高 CAR-T 的疗效。然而,适当表达 PD-1 可以保护 CD8<sup>+</sup> T 细胞不受过度刺激、过度增殖和终末分化。PD-1 的完全缺失可能导致 CD8<sup>+</sup> T 细胞的衰竭。因此,完全敲除 PD-1 可能会对 CAR-T 的活性产生不利影响<sup>[61]</sup>。

因此,在 CAR 结构中可分泌 PD-1 抗体的基因序列, CAR-T 与肿瘤细胞结合时可通过旁分泌或自分泌方式分泌 PD-1 抗体。CAR-T 存活时间不仅更长,而且由于分泌的 PD-1 可定位在肿瘤附近,可以避免全身应用免疫检查点抑制剂所引起的相关毒性<sup>[62-63]</sup>。然而,在 CAR 质粒中加入 PD-1 抗体基因序列的设计不仅大大增加 CAR 质粒的长度,也提高 CAR-T 细胞感染的难度。而且单链抗体分泌的差异最终可能导致不同的临床结果。因此需要更详细的研究来确定 CAR-T 细胞中自传递  $\alpha$ -PD-1 单链抗体的最佳形式。

与以上几种方法相比,使用 CD28/PD-1 CSR 修饰传统 CAR-T 细胞<sup>[63]</sup>,可将 PD-L1 抑制信号转化为 CD28 共刺激信号,保护 CAR-T 细胞免受 PD-L1 介导的抑制。然而,由于 PD-1 转换受体中缺乏 CD3 结构域,这些 CAR-T 细胞必须依赖传统 CAR 对 TSA 的识别,从而限制了它们对异质性肿瘤的疗效。故而,进一步识别 T 细胞的特征及优化 CAR-T 的功能对于修改 CAR 结构来增加 CAR-T 细胞疗效至关重要。

综上,CAR-T 细胞疗法和阻断 PD-1 联合治疗确实具有协同作用,可能为癌症患者提供新的希望。然而,通过外源性方法和内源性方法阻断 PD-1 均存在各自的优劣势,同时这种组合方式可能导致 T 细胞的过度活化,最终导致毒性增强,如细胞因子释放综合征或神经损伤。因此,CAR-T 和阻断 PD-1 联合治疗必须要综合多种因素,如低应答率,毒性,

以及特异性肿瘤相关靶点等,同时需要通过反复的临床前和临床试验来优化,对治疗方案的可行性、安全性和有效性进行详细评估,以期达到最小化毒性和最大化恶性肿瘤患者的治疗效果,也为未来的临床实践提供更合理的免疫治疗药物联用原则。

## REFERENCES

- [1] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, *et al.* CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 2018, 359(6382):1361-1365.
- [2] KOCHENDERFER J N, FELDMAN S A, ZHAO Y, *et al.* Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor[J]. *J Immunother*, 2009, 32(7):689-702.
- [3] CHEN Y J, ABILA B, MOSTAFA KAMEL Y. CAR-T: what is next? [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(3): 663. DOI: 10.3390/cancers15030663.
- [4] WANG J Y, WANG L. CAR-T cell therapy: where are we now, and where are we heading? [J]. *Blood Sci*, 2023, 5(4): 237-248. DOI:10.1097/BS9.000000000000173.
- [5] YING Z, YANG H, GUO Y, *et al.* Relmacabtagene autoleucl (relma-cel) CD19 CAR-T therapy for adults with heavily pretreated relapsed/refractory large B-cell lymphoma in China [J]. *Cancer Med*, 2021, 10(3):999-1011.
- [6] FRY T J, SHAH N N, ORENTAS R J, *et al.* CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy[J]. *Nat Med*, 2018, 24(1):20-28.
- [7] WANG C, SHI F, LIU Y, *et al.* Anti-PD-1 antibodies as a salvage therapy for patients with diffuse large B cell lymphoma who progressed/relapsed after CART19/20 therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1):106. DOI: 10.1186/s13045-021-01120-3.
- [8] YOON D H, OSBORN M J, TOLAR J, *et al.* Incorporation of immune checkpoint blockade into chimeric antigen receptor T cells (CAR-Ts): combination or built-in CAR-T [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2). DOI: 10.3390/ijms19020340.
- [9] BRUDNO J N, KOCHENDERFER J N. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(1):31-46.
- [10] GROSS G, WAKS T, ESHHAR Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(24):10024-10028.
- [11] RAZEGHIAN E, NASUTION M K M, RAHMAN H S, *et al.* A deep insight into CRISPR/Cas9 application in CAR-T cell-based tumor immunotherapies [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 428. DOI: 10.1186/s13287-021-02510-7.
- [12] HUANG X, YANG Y. Driving an improved CAR for cancer immunotherapy [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8):2795-2798.
- [13] USLU U. Driving CAR T cells towards dermatologic oncology [J]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2021, 19(3):359-362.
- [14] AHMED N, BRAWLEY V, HEGDE M, *et al.* HER2-specific chimeric antigen receptor-modified virus-specific T cells for progressive glioblastoma: a phase I dose-escalation trial [J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(8):1094-1101.
- [15] HU Z, ZHENG X, JIAO D, *et al.* LunX-CAR T cells as a targeted therapy for non-small cell lung cancer [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 17: 361-370. DOI: 10.1016/j.omto.2020.04.008.
- [16] BATRA S A, 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.
- [17] JIANG H, SHI Z, WANG P, *et al.* Claudin18.2-specific chimeric antigen receptor engineered T cells for the treatment of gastric cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2019, 111(4):409-418.
- [18] LI H, DING J, LU M, *et al.* CAIX-specific CAR-T cells and sunitinib show synergistic effects against metastatic renal cancer models[J]. *J Immunother*, 2020, 43(1):16-28.
- [19] GORCHAKOV A A, KULEMZIN S V, KOCHNEVA G V, *et al.* Challenges and prospects of chimeric antigen receptor T-cell therapy for metastatic prostate cancer[J]. *Eur Urol*, 2020, 77(3):299-308.
- [20] HOU B, TANG Y, LI W, *et al.* Efficiency of CAR-T therapy for treatment of solid tumor in clinical trials: a meta-analysis[J]. *Dis Markers*, 2019, 2019:3425291. DOI: 10.1155/2019/3425291.
- [21] MAJZNER R G, RAMAKRISHNA S, YEOM K W, *et al.* GD2-CAR T cell therapy for H3K27M-mutated diffuse midline gliomas[J]. *Nature*, 2022, 603(7903):934-941.
- [22] VITANZA N A, JOHNSON A J, WILSON A L, *et al.* Locoregional infusion of HER2-specific CAR T cells in children and young adults with recurrent or refractory CNS tumors: an interim analysis[J]. *Nat Med*, 2021, 27(9):1544-1552.
- [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). DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa0984.
- [24] ZHANG C, WANG Z, YANG Z, *et al.* Phase I escalating-dose trial of CAR-T therapy targeting CEA(+) metastatic colorectal cancers[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(5):1248-1258.
- [25] NARAYAN V, BARBER-ROTENBERG J S, JUNG I Y, *et al.* PSMA-targeting TGF $\beta$ -insensitive armored CAR T cells in metastatic castration-resistant prostate cancer: a phase 1 trial[J]. *Nat Med*, 2022, 28(4):724-734.
- [26] ADUSUMILLI P S, ZAUDERER M G, RIVIÈRE I, *et al.* A phase I trial of regional mesothelin-targeted CAR T-cell therapy in patients with malignant pleural disease, in combination with the anti-PD-1 agent pembrolizumab[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(11):2748-2763.
- [27] 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):2560-2574.
- [28] MIAO L, ZHANG Z, REN Z, *et al.* Obstacles and coping strategies of CAR-T cell immunotherapy in solid tumors[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:687822. DOI: 10.3389/fimmu.2021.687822.
- [29] LAMERS C H, SLEIJFER S, VAN STEENBERGEN S, *et al.* Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(4):904-912.
- [30] NEWICK K, O'BRIEN S, MOON E, *et al.* CAR T cell therapy for solid tumors[J]. *Annu Rev Med*, 2017, 68:139-152. DOI: 10.1146/annurev-med-062315-120245.
- [31] 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(14):4719-4730.
- [32] ZHANG E, GU J, XU H. Prospects for chimeric antigen receptor-modified T cell therapy for solid tumors[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1):7. DOI: 10.1186/s12943-018-0759-3.
- [33] CHERKASSKY L, MORELLO A, VILLENA-VARGAS J, *et al.* Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8):3130-3144.
- [34] PING Y, LI F, NAN S, *et al.* Augmenting the Effectiveness of CAR-T cells by enhanced self-delivery of PD-1-neutralizing scFv[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:803. DOI: 10.3389/fcell.2020.00803.
- [35] EYQUEM J, MANSILLA-SOTO J, GIAVRIDIS T, *et al.* Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection[J]. *Nature*, 2017, 543(7643):113-117.
- [36] KEIR M E, BUTTE M J, FREEMAN G J, *et al.* PD-1 and its ligands in tolerance and immunity[J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26:677-704. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
- [37] GARGETT T, YU W, 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.
- [38] BARBER D L, WHERRY E J, MASOPUST D, *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection[J]. *Nature*, 2006, 439(7077):682-687.
- [39] FRAIETTA J A, LACEY S F, ORLANDO E J, *et al.* Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia[J]. *Nat Med*, 2018, 24(5):563-571.
- [40] HUI E, CHEUNG J, ZHU J, *et al.* T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition[J]. *Science*, 2017, 355(6332):1428-1433.
- [41] LI A M, HUCKS G E, DINOPIA A M, *et al.* Checkpoint inhibitors augment CD19-directed chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy in relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2018, 132(Suppl. 1):556. DOI: 10.1182/blood-2018-99-112572.
- [42] GROSSER R, CHERKASSKY L, CHINTALA N, *et al.* Combination immunotherapy with CAR T cells and checkpoint blockade for the treatment of solid tumors[J]. *Cancer Cell*, 2019, 36(5):471-482.
- [43] JOHN L B, DEVAUD C, DUONG C P, *et al.* Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(20):5636-5646.
- [44] MOON E K, RANGANATHAN R, ERUSLANOV E, *et al.* Blockade of programmed death 1 augments the ability of human T cells engineered to target NY-ESO-1 to control tumor growth after adoptive transfer[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(2):436-447.
- [45] PING Y, LI F, NAN S, *et al.* Augmenting the effectiveness of CAR-T cells by enhanced self-delivery of pd-1-neutralizing scFv[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8. DOI: 10.3389/fcell.2020.00803.
- [46] LI S, SIRIWON N, ZHANG X, *et al.* Enhanced cancer immunotherapy by chimeric antigen receptor-modified T cells engineered to secrete checkpoint inhibitors[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(22):6982-6992.
- [47] QIN L, ZHAO R, CHEN D, *et al.* Chimeric antigen receptor T cells targeting PD-L1 suppress tumor growth[J]. *Biomark Res*, 2020, 8:19. DOI:10.1186/s40364-020-00198-0.
- [48] 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. DOI:10.1038/s41598-017-00462-8.
- [49] GAUTRON A S, JUILLELAT A, GUYOT V, *et al.* Fine and predictable tuning of TALEN gene editing targeting for improved T cell adoptive immunotherapy[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 9:312-321. DOI:10.1016/j.omtn.2017.10.005.

- [50] GUO X, JIANG H, SHI B, *et al.* Disruption of PD-1 Enhanced the anti-tumor activity of chimeric antigen receptor T cells against hepatocellular carcinoma [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9. DOI:10.3389/fphar.2018.01118
- [51] HU W, ZI Z, JIN Y, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances human mesothelin-targeted CAR T cell effector functions [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(3):365-377.
- [52] REN J, LIU X, FANG C, *et al.* Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9):2255-2266.
- [53] 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(6):1578-1590.
- [54] CHEN C, GU Y M, ZHANG F, *et al.* Construction of PD1/CD28 chimeric-switch receptor enhances anti-tumor ability of c-Met CAR-T in gastric cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2021, 10(1):1901434. DOI:10.1080/2162402x.2021.1901434.
- [55] HECZEY A, LOUIS C U, SAVOLDO B, *et al.* CAR T cells administered in combination with lymphodepletion and PD-1 inhibition to patients with neuroblastoma [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(9):2214-2224.
- [56] ROBERT C, SCHACHTER J, LONG G V, *et al.* Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(26):2521-2532.
- [57] PARAKH S, RANDHAWA M, NGUYEN B, *et al.* Real-world efficacy and toxicity of combined nivolumab and ipilimumab in patients with metastatic melanoma [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2019, 15(1):26-30.
- [58] SMYTH M J, NGIOW S F, RIBAS A, *et al.* Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(3):143-158.
- [59] 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. DOI:10.1038/s41598-017-00462-8.
- [60] GAUTRON A S, JUILLERAT A, GUYOT V, *et al.* Fine and predictable tuning of TALEN gene editing targeting for improved T cell adoptive immunotherapy [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 9:312-321. DOI:10.1016/j.omtn.2017.10.005.
- [61] ODORIZZI P M, PAUKEN K E, PALEY M A, *et al.* Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8 + T cells [J]. *J Exp Med*, 2015, 212(7):1125-1137.
- [62] LI S, SIRIWON N, ZHANG X, *et al.* Enhanced cancer immunotherapy by chimeric antigen receptor-modified T cells engineered to secrete checkpoint inhibitors [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(22):6982-6992.
- [63] RAFIQ S, YEKU O O, JACKSON H J, *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.
- [64] LI X, BERAHOVICH R, ZHOU H, *et al.* PLAP-CAR T cells mediate high specific cytotoxicity against colon cancer cells [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2020, 25(9):1765-1786.
- [65] CHEN X, YANG S, LI S, *et al.* Secretion of bispecific protein of anti-PD-1 fused with TGF- $\beta$  trap enhances antitumor efficacy of CAR-T cell therapy [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2021, 21:144-157. DOI:10.1016/j.omto.2021.03.014.
- [66] CHOI B D, YU X, CASTANO A P, *et al.* CRISPR-Cas9 disruption of PD-1 enhances activity of universal EGFRvIII CAR T cells in a preclinical model of human glioblastoma [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1):304. DOI:10.1186/s40425-019-0806-7.
- [67] GUO X, JIANG H, SHI B, *et al.* Disruption of PD-1 enhanced the anti-tumor activity of chimeric antigen receptor T cells against hepatocellular carcinoma [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1118. DOI:10.3389/fphar.2018.01118.
- [68] HARRASSER M, GOHIL S H, LAU H, *et al.* Inducible localized delivery of an anti-PD-1 scFv enhances anti-tumor activity of ROR1 CAR-T cells in TNBC [J]. *Breast Cancer Res*, 2022, 24(1):39. DOI:10.1186/s13058-022-01531-1.
- [69] HU B, ZOU Y, ZHANG L, *et al.* Nucleofection with plasmid DNA for CRISPR/Cas9-mediated inactivation of programmed cell death protein 1 in CD133-specific CAR T cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2019, 30(4):446-458.
- [70] HUANG B, LUO L, WANG J, *et al.* B7-H3 specific T cells with chimeric antigen receptor and decoy PD-1 receptors eradicate established solid human tumors in mouse models [J]. *Oncoimmunol*, 2020, 9(1):1684127. DOI:10.1080/2162402x.2019.1684127.
- [71] JIANG G, NG Y Y, TAY J C K, *et al.* Dual CAR-T cells to treat cancers co-expressing NKG2D and PD1 ligands in xenograft models of peritoneal metastasis [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2022. DOI:10.1007/s00262-022-03247-9.
- [72] KATO D, YAGUCHI T, IWATA T, *et al.* GPC1 specific CAR-T cells eradicate established solid tumor without adverse effects and synergize with anti-PD-1 Ab [J]. *eLife*, 2020, 9. DOI: 10.7554/eLife.49392.
- [73] NAKAJIMA M, SAKODA Y, ADACHI K, *et al.* Improved survival of chimeric antigen receptor-engineered T (CAR-T) and tumor-specific T cells caused by anti-programmed cell death protein 1 single-chain variable fragment-producing CAR-T cells [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(10):3079-3088.
- [74] PAN Z, DI S, SHI B, *et al.* Increased antitumor activities of glypican-3-specific chimeric antigen receptor-modified T cells by coexpression of a soluble PD1-CH3 fusion protein [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(10):1621-1634.
- [75] SERGANOVA I, MOROZ E, COHEN I, *et al.* Enhancement of PSMA-directed CAR adoptive immunotherapy by PD-1/PD-L1 blockade [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2017, 4:41-54. DOI:10.1016/j.omto.2016.11.005.
- [76] SONG Y, LIU Q, ZUO T, *et al.* Combined antitumor effects of anti-EGFR variant III CAR-T cell therapy and PD-1 checkpoint blockade on glioblastoma in mouse model [J]. *Cell Immunol*, 2020, 352:104112. DOI:10.1016/j.cellimm.2020.104112.
- [77] YANG C Y, FAN M H, MIAO C H, *et al.* Engineering chimeric antigen receptor T cells against immune checkpoint inhibitors PD-1/PD-L1 for treating pancreatic cancer [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 17:571-585. DOI:10.1016/j.omto.2020.05.009.
- [78] YUAN X, SUN Z, YUAN Q, *et al.* Dual-function chimeric antigen receptor T cells targeting c-Met and PD-1 exhibit potent anti-tumor efficacy in solid tumors [J]. *Invest New Drugs*, 2021, 39(1):34-51.
- [79] ZHU H, YOU Y, SHEN Z, *et al.* EGFRvIII-CAR-T cells with PD-1 knockout have improved anti-glioma activity [J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(4):2135-2141.

(收稿日期:2022-03-15)