



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Immunology—Review

嵌合抗原受体和调节性T细胞——移植中人类白细胞抗原特异性免疫抑制的潜力

Sabrina Wright[#], Conor Hennessy[#], Joanna Hester, Fadi Issa^{*}

Nuffield Department of Surgical Sciences, University of Oxford, Oxford OX3 9DU, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 June 2021

Revised 22 September 2021

Accepted 25 October 2021

Available online 20 December 2021

关键词

嵌合抗原受体

T细胞

调节性T细胞

同种异体免疫

生物工程

移植

生物工程

摘要

嵌合抗原受体(CAR)是基因工程领域的一项突破,它彻底改变了过继细胞疗法(ACT)领域。表达这些受体的细胞通过在合成的CAR构建体中包含抗原特异性结合区域而被重新定向到预定的靶点。程序化特异性细胞在肿瘤学领域的优势已被临床证明,与同类未修饰的细胞相比,这种细胞具有更高的准确性、效力与更少的脱靶效应。与常规T细胞(Tconvs)不同,调节性T细胞(Treg)在抑制免疫激活和调节宿主免疫反应方面发挥着重要作用。Treg中CAR的表达被认为是治疗自身免疫和炎症性疾病、移植物抗宿主病(GVHD)和器官移植排斥反应的一种方法。在后者中,它们作为同种异体移植受者免疫耐受的介质具有巨大的潜力。然而,目前对CAR-Treg工程的研究非常有限,并且关于治疗用途的最佳设计存在不确定性。本文综述了CAR-Treg发展的理论基础、其对人类移植的意义、潜在的设计、安全性考虑因素,以及迄今为止CAR-Treg在移植模型中的对比。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

嵌合抗原受体(CAR)是过继细胞疗法(ACT)细胞设计和生产的一项突破。表达这种受体的CAR-T细胞通过在合成构建体中包含抗原特异性结合区而被重新定向到预定的靶点。程序化特异性细胞的优势已在许多异种移植模型中得到证实,显然,与未修饰的细胞相比,抗原特异性细胞具有更高的准确性、效力与更少的脱靶效应。在调节性T细胞(Treg)内诱导CAR表达已被提出作为自身免疫性和炎症性疾病、移植物抗宿主病(GVHD)和器官移植排斥反应的一种假定治疗方法(表1)[1–5]。CAR-Treg作为同种异体移植受者的耐受性介质具有巨大的潜力,因此

应该得到更多的关注。现阶段有必要进行回顾,以突出这一领域的需求并鼓励更多的研究工作,同时确定在实验研究进展到临床应用之前必须解决的信息缺失领域问题。

在本文中,Treg被定义为CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺(CD:分化簇;FOXP3:叉头盒p3)T细胞;相反,具有促炎症特性的CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻T细胞亚群在此被称为常规T细胞(Tconvs)。当描述已被修饰以表达CAR的T细胞时,修饰的Tregs被称为CAR-Tregs,而修饰的Tconvs被称为CAR-Tconvs。

1.1. Treg抑制的机制

1995年,Treg被Sakaguchi等[6]正式确认为T细胞的

^{*} Corresponding author.

E-mail address: fadi.issa@nds.ox.ac.uk (F. Issa).

[#] These authors contributed equally to this work.

表1 目前研究 CAR-Treg 是否能调节异体免疫反应的五项研究的总结

References	ScFv	Hinge domain	Transmembrane domain	Costimulatory domain	CD3 ζ signaling chain	Outcome
MacDonald et al. [1]	HLA-A2	CD8 α	CD28	CD28	CD3 ζ	Suppression of alloreactive T Cells
Boardman et al. [2]	HLA-A2	CD28	CD28	CD28	CD3 ζ	Prevention of skin graft rejection
Noyan et al. [3]	HLA-A2	CD8 α	CD8	CD28	CD3 ζ	Prevention of skin graft rejection
Imura et al. [4]	CD19	CD28	CD28	CD28/4-1BB	CD3 ζ	Suppression of alloantibody production
Sicard et al. [5]	HLA-A2	CD8 α	CD28	CD28	CD3 ζ	Prevention of skin graft rejection

HLA: human leukocyte antigen; ScFv: single-chain variable fragment.

一个独特亚群，他们通过标记物 CD4⁺CD25⁺来识别 T 细胞。这篇具有里程碑意义的论文阐明了 Treg 抑制同种异体反应的能力，并揭示 Treg 的耗尽导致了免疫反应的增强和自身免疫性疾病的自发发展。后来的工作发现转录因子 FOXP3 是 Treg 表型的一个决定性调节因子[7]。Treg 是适应性免疫系统中自然产生的淋巴细胞亚群，负责维持免疫动态平衡。除了介导对自身抗原的耐受外，它们还在炎症条件下发挥作用，限制效应器的免疫反应，以防止对个体组织的过度损害。Treg 通过各种接触依赖和可溶的机制来操纵免疫环境。它们能够直接抑制其他免疫细胞亚群，包括 B 细胞和 CD4⁺CD25⁺Tconvs，并作用于树突状细胞 (DC) 以阻止其成熟和抗原表达[8–9]。以下是 Treg 用来调节免疫系统以应对抗原刺激的主要策略。

1.1.1. 细胞溶解

细胞溶解分子，如颗粒酶 B 被释放出来，以激发对靶前炎症细胞的直接杀伤。胸腺来源的天然 Treg (nTreg) 产生的颗粒酶 B 可诱导 T 细胞和 B 细胞凋亡[10–11]。穿孔素/颗粒酶途径介导直接细胞毒性，但穿孔素和颗粒酶 B 之间的关系一直存在争议。两项体外研究描述了 FOXP3⁺ 细胞表达颗粒酶 B 的颗粒酶 B 依赖性、穿孔素依赖性抑制系统[12–13]，而 Gondek 等[10]报道了这两个系统之间的独立性。Cao 等[14]利用颗粒酶 B 缺陷的小鼠模型，报道了穿孔蛋白和颗粒酶 B 对 Treg 介导的自然杀伤 (NK) 和 CD8⁺ T 细胞的凋亡都很重要，因为缺乏这些分子的基因的 Treg 过继转移未能抑制肿瘤清除。同样，在穿孔素敲除模型中，穿孔素被发现是 Treg 介导的 DC 移除所必需的[15]。

1.1.2. 细胞因子的释放

白细胞介素 (IL) -10 和 IL-35 是负责抑制促炎症反应的关键调节细胞因子[16]。IL-10 通过 Tconvs 阻止促炎细胞因子和趋化因子的释放，同时抑制 DC 和其他专业抗原呈递细胞 (APC) 上共刺激分子及 I 类和 II 类主要组织相容性复合体 (MHC) 的表达[17–19]。IL-35 是已知的 Treg 工具系列中的一个相对较新的补充，并且自此已被证明直

接抑制小鼠 Tconvs 的增殖[20]。虽然 IL-35 在人类 Treg 中没有结构性表达，但人类 Treg 的长期激活会导致 IL-35 的上调，从而增强了抑制能力[21–22]。

有趣的是，体外诱导的 Treg (iTreg) 的功能似乎依赖于细胞因子信号而不是细胞毒性；几项研究报道了 iTreg 的转化生长因子 (TGF) - β 信号负责抑制 B 细胞、T 细胞和 DC [11,23]。然而，到目前为止，胸腺 Treg 在临床前模型中比 iTreg 更受青睐（可能是因为它们体内更稳定），所以对 iTreg 行为的深入分析不在本文的范围之内。

1.1.3. 操控树突状细胞

Treg 能够减弱或消除来自专业 APC 的激活信号，以防止 naïve T 细胞的激活[24]。Treg 分子细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (CTLA) 与 APC 细胞表面的共刺激分子 CD80 和 CD86 结合，触发吡啶胺 2,3-二氧酶 (IDO) 的释放，IDO 是一种耐受性酶，起到限制 T 细胞色氨酸分解代谢的作用，并导致周围环境中色氨酸代谢浓度增加，对 Tconv 细胞周期进程具有抑制作用[24–25]。此外，T 细胞受体 (TCR) 结合以 CTLA-4 依赖的方式刺激 DC 上 CD80 和 CD86 的下调[24]。

1.1.4. 代谢紊乱和竞争

通过竞争基本的细胞因子而造成的代谢紊乱是另一种有效的抑制机制。特别是，Treg 可以通过消耗外部供应直接剥夺周围细胞的 IL-2，从而限制非 Treg 的生长和生存[26]。当聚集在单个区域时，Treg 表面高表达的 CD25 [IL-2 受体 α (IL-2R α)] 可能会结合足够的 IL-2 来诱导周围细胞的凋亡[26]。

1.1.5. 感染性耐受

最后，Treg 可以通过一种被称为感染性耐受的现象在炎性细胞中诱导耐受性表型[27–28]。这需要 Treg 表面存在膜结合型 TGF- β ，这种膜结合型- β 以接触依赖的方式诱导 naïve 前体细胞从头产生 FOXP3⁺ T 细胞[29]。IL-35 具有将靶 T 细胞转化为 T 细胞的能力；因此，它可以被认为是

一种感染耐受剂[22]。

1.2. 作为一种新兴疗法的 Treg

过继细胞疗法 (ACT) 的治疗策略利用了免疫细胞的内在功能；对于 Treg 而言，这是一种促进耐受状态的治疗。Treg 的进一步特征包括它们的增殖能力，与其他类型细胞的相互作用，以及发挥多种抑制机制，支持 Treg 疗法比非细胞疗法更有优势。

在发现 Treg 后不久，人们就意识到它们的抑制功能可以用来抑制自身免疫性疾病和移植的免疫反应[30–31]。随后根据这一概念对关于 Treg 转移疗法对各种自身免疫性疾病（包括 1 型糖尿病、实验性自身免疫性脑脊髓炎和系统性红斑狼疮）、GvHD 和同种异体移植的有效性进行了体内研究[32–36]。研究表明，体外扩增的 Treg 可以通过减少 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的浸润来延长人源化小鼠模型的皮肤和胰岛异体移植物的存活率，从而使人们乐观地认为这些结果可以在人类患者身上得到复制[37–38]。

在移植中使用 Treg 的概念主要是由于非细胞免疫抑制药物的毒副作用，希望基于细胞的治疗能减轻毒性风险[39–40]。在移植受者中观察到心血管疾病和糖尿病的疾病率较高；虽然这些情况在很大程度上受到移植前患者的合并症的影响，但它们也直接受到药物免疫抑制剂的影响[39,41]。高血压在肾移植患者中很常见，主要是由于使用钙调磷酸酶抑制剂治疗所致成人患者的患病率可高达 82% [39,42]。这些因素反过来会增加心血管疾病的风险，如心肌梗死、心肌病、心力衰竭和中风[40]。总体而言，器官毒性严重影响患者的生活质量，并且仍然是移植受者的移植物损失和患者死亡的主要原因[40]。

细胞疗法对于那些原本需要每天坚持服药的患者来说，也可能具有更大的实用性。未修饰的多克隆 Treg 在人体中可检测到的时间从两周到一年不等，允许两次用药之间的时间跨度大得多；这将减轻患者的负担，并减少因不坚持用药而产生异体移植排斥的机会[1,43–44]。一个尚待回答的问题是重复 Treg 用药是否必要，或者是否有可能通过有限的输液建立一个自我维持的供体特异性 Treg 群体。

Treg 过继转移的首次人体临床验证提供了支持使用扩增的多克隆 Treg 预防或治疗 GvHD 和自身免疫性疾病的证据[45–47]。根据在小鼠中进行的类似研究[48]，在没有任何并发免疫抑制的情况下，人类患者的早期 Treg 输注被证明可以预防慢性 GvHD；然而，Treg 治疗与更大的细胞免疫力有关，可以对抗机会性病原体，同时保持移植抗白血病的效果[49]。但是，死亡率凸显了安全性方面需要改进：患者仍然容易受到腺病毒感染、弓形虫病、细菌感染

以及免疫系统受到抑制的真菌感染。

最近，实体器官移植成为一项 I 期剂量递增试验的主题，以评估肾脏移植患者输注 Treg 的安全性。在 Mathew 等[50]进行的这项试验中，9 名活体供体肾移植受者在移植后两个月接受离体扩增的自体 Treg，在淋巴细胞耗竭后，联合霉酚酸酯 (MMF) 和西罗莫司维持治疗。值得关注的是，没有严重不良事件的报道，也没有发现机会性感染或其他免疫抑制相关疾病的证据。研究人员报道了移植后两年移植物存活率为 100% [50]。进一步的研究正在进行中，以确定 Treg 治疗的潜力，同时进行最小的免疫抑制。ONE 研究是一个国际联盟，旨在评估活体肾移植中不同的调节细胞类型，其中包括 Treg [51]。患者最初接受三联疗法（泼尼松龙、MMF 和他克莫司），随后在移植后 5 天注入自体多克隆 Treg [52]。在完成观察期的 38 名接受调节性细胞的患者中，有 15 名成功转换为他克莫司单药治疗，与接受标准免疫抑制治疗的患者相比，他们的病毒感染率更低[51]。随后宣布了一项名为“TWO 研究”的后续 II 期试验，旨在评估 Treg 联合西罗莫司单药治疗预防肾移植排斥反应的疗效[53]。尽管现阶段还不清楚 Treg 是否能完全取代传统药物，但即使将免疫抑制减少到单一疗法，也会对同种异体移植物和患者的预后产生显著的积极影响。

1.3. 抗原特异性 Treg

免疫激活途径的非特异性抑制剂，如代谢抑制剂，会产生全身性抑制作用，从而影响整个身体，而不仅仅是供体器官受到影响。除了心脏毒性和肾脏毒性外，已知大量全身免疫抑制方案会增加患者患癌症的风险，特别是鳞状细胞癌和卡波西肉瘤[54]。降低患者对病原体的检测和应对能力也使他们特别容易受到细菌、真菌、病毒和霉菌感染[55]。虽然细胞疗法规避了许多与药物有关的毒性，但具有多克隆特异性的 Treg 仍会增加移植患者感染和恶性肿瘤发展的易感性。为了解决这个问题，目前正在设计新的疗法来靶向供体组织的特异性抗原，这样其他表达自身抗原的器官就不会受到影响。

虽然癌症特异性 CAR-Tconvs 的设计者面临着选择合适靶点的困难（真正的癌症特异性抗原很少），但在移植的情况下，供体和受体的人类白细胞抗原 (HLA) 的表达等位基因复合物之间会存在差异。这使得靶向供体器官特有且受体中不存在的抗原成为可能，从而实现同种异体移植的高度特异性。

Treg 在循环的 CD4⁺ T 细胞群中占比不到 10%，其中只有一小部分会携带目标抗原的正确 T 细胞受体 (TCR) [56–58]。通常通过将大量 CD4⁺CD25⁺ 细胞与异体 DC 或之

前被异肽脉冲过的自体DC共同培养，在体外选择性地扩大抗原特异性Treg是很常见的[57–58]。另外，也可以用基因操作来直接赋予多克隆细胞样本以特异性；这已被广泛用于创造抗原特异性Treg。许多临床前研究已将已知特异性的重组TCR克隆到CD4⁺宿主细胞中，以创造一种靶向细胞疗法；这已在Treg和Tconv中完成[59–61]，并从多发性硬化症和1型糖尿病的实验模型中获得了有希望的结果[60–61]。但是，尽管TCR对MHC的处理允许识别细胞内（IC）肽，但也有一种观点认为，TCR的一个主要缺点，无论是内源性的还是修饰的，都是仅限于与MHC相关的肽，限制了目标抗原的储备。此外，钙调神经磷酸酶抑制剂对DC中MHC表达的下调作用的证据表明，如果患者正在接受某些药物免疫抑制，这一过程可能会受到影响[62–63]。

为了解决这些问题，Gross等[64]在1989年报道了第一个CAR的开发。这种受体将抗2,4,6-三硝基苯抗体的恒定域和可变域与 α 或 β TCR链的一段结合起来；然后将整个构建体转染到一个细胞毒性T细胞杂交瘤中。由此产生的转基因细胞被证明具有抗原特异性、非MHC限制的效应功能，以及诱导其靶细胞产生细胞因子的能力。通过使用抗体的可变片段，而不是TCR的MHC限制性结合区，合成受体可以与细胞外（EC）肽接触而不需要处理。对于异

体移植来说，这意味着MHC分子本身也可以成为目标。

1.4. CAR设计的发展

继Gross等的革命性的“第一代”CAR之后，其他许多研究人员已经扩大了CAR的设计和和应用，以提高寿命和功能。CAR已经被设计成各种细胞类型，包括NK细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁺ Tconv和Treg [65–69]。

CAR是对TCR设计的一种改进，因为CAR是模块化设计，CAR构建体的各个部分可以被添加或替换（图1）。例如，共刺激域可以由TCR的不同域形成——最常用的是CD28和4-1BB（CD137）——并且每个域都对CAR的功能具有自己的优势或劣势。也可以加入其他成分，如细胞因子序列，以增强它们的功能。

CAR疗法在治疗先前治疗失败的复发或难治性癌症方面已显示出显著的疗效。它们在临床前模型和后来的临床试验中取得巨大成功，为2017年美国食品和药物管理局（FDA）批准两种独立的CAR-T细胞疗法铺平了道路，随后其获得了欧洲药品管理局（EMA）的批准[70]。其中一种疗法tisagenlecleucel（作为Kymriah销售）在涉及75名患者的早期I/IIa期试验中实现了93%的完全缓解率[71]。在实验性小鼠模型中，CAR-Treg在治疗自身免疫和炎症性疾病，以及在同种异体干细胞移植模型中预防移植物抗宿主疾病方面也有类似的疗效，并且与多克隆Treg

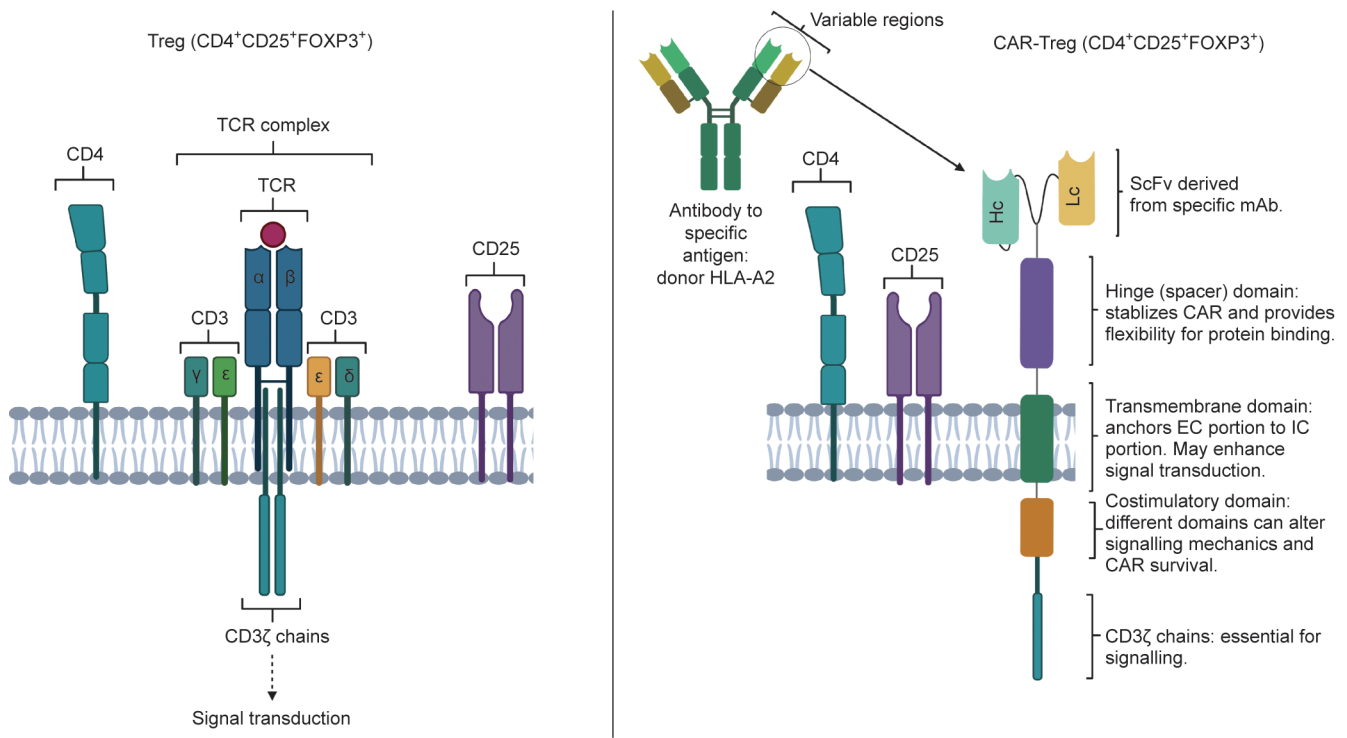


图1. 传统的Treg与CAR-Treg设计。CAR-Treg保留了Treg的关键成分：CD25和CD4复合物。TCR复合物被模块化的CAR-Treg设计所取代，它提供的抗原特异性取决于单克隆抗体（mAb），而单链片段变量（ScFv）片段则来自单链片段。这允许生产具有靶向抗炎作用的Treg，其可能会应用于降低异体反应和防止异体移植中的移植排斥反应。Hc：重链；Lc：轻链。

相比，在同种异体实体器官移植模型中表现出更好的疗效[1–2,72–76]（图2）。

CAR-Treg的产生是基因工程T细胞发展中最新的一个里程碑。MacDonald等[1]于2016年发表了第一个研究其在同种异体移植中相关性的体内CAR-Treg研究。他们说明了CAR-Tregs赋予抗原特异性抑制HLA的能力；然而，它们作为移植排斥的预防和治疗潜力仍未得到充分研究。目前还没有进行CAR-Treg的人体试验，因此，也没有批准的CAR-Treg疗法。但是，最近FDA和EMA批准了抗CD19的CAR-Tconvs Kymriah®和Yescarta®，这让人受到鼓舞，CAR-Treg在不久的将来也可能获得临床应用的许可[70]。

2. 为治疗性Treg设计有效的CAR

第一个采用具有抗原特异性结合区的基本嵌合分子

的设计后来被称为“第一代”CAR，其在体内的持久性非常有限[77]。随后的设计在原型的扩展和持久性方面有所改进（图3）。第二代CAR在跨膜结构域和CD3 ζ 信号传导结构域之间加入了一个共刺激结构域，以允许细胞完全激活；这明显改善了扩增，从而提高了携带受体的常规细胞和Treg的疗效[77–80]。第三代和第四代CAR也被开发出来，加入了其他的元素。所有的CAR，不管是哪一代，都在IC尾部含有一个CD3 ζ 链来传播激活信号，模拟通过TCR激活。虽然已经发表了关于CAR设计的优秀评论，但这里将具体讨论每个组件与CAR-Treg相关的重要性。

2.1. 选择一个HLA目标

在CAR中，抗原特异性通常是通过包含单克隆抗体（mAb）衍生的单链片段变量（scFv）片段的轻链和可变链来确定。迄今为止，所有CAR-Treg同种异体移植模型都使用MHC I类HLA-A2抗原作为治疗靶点，因为它在人

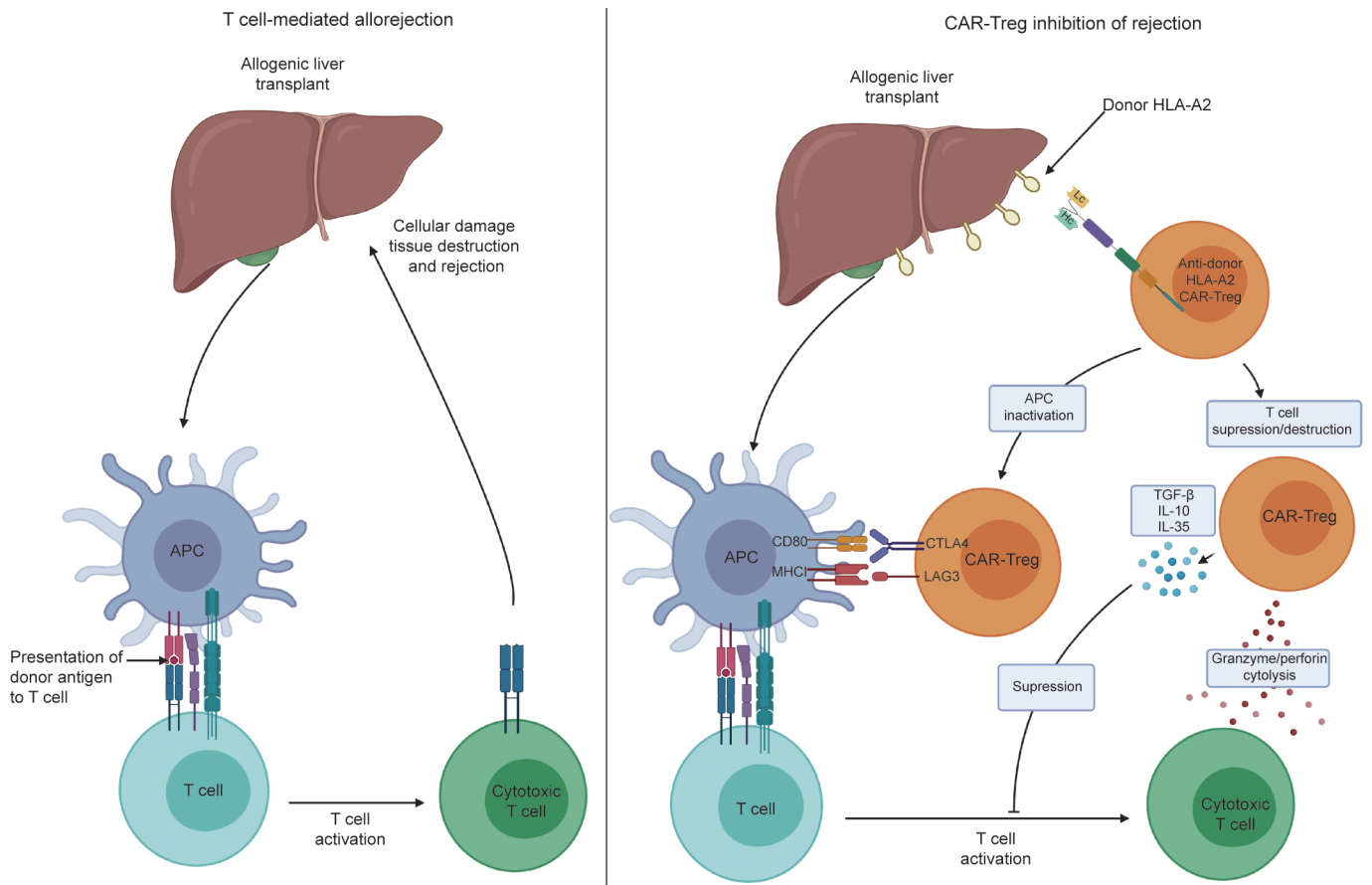


图2. CAR-Treg介导的抑制异体免疫的拟议机制。传统上认为，异体移植后的器官排斥是由T细胞介导的异体免疫引起的。APC（如DC）将捐赠组织的抗原呈现给宿主T细胞，然后T细胞因识别“非自我”而被激活。这最终导致了细胞毒性T细胞的产生，它传播了组织破坏，从而导致器官排斥。CAR-Treg的拟议功能将有可能防止这种情况。构建一个识别捐赠器官上的抗原（如HLA-D2）的CAR，将导致Treg的激活和增殖。然后，这些CAR-Treg可以直接灭活APC，通过细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4（CTLA4）-CD80和主要组织相容性复合体I类（MHCI）-淋巴细胞激活基因3产物（LAG3）的相互作用发挥作用，从而防止捐赠者的抗原呈现给T细胞。此外，CAR-Treg可以通过产生抑制性细胞因子（TGF- β 、IL-10和IL-35）直接抑制T细胞的激活。最后，激活的CAR-Treg可以通过释放颗粒酶和穿孔蛋白破坏细胞毒性T细胞来抑制排斥反应。

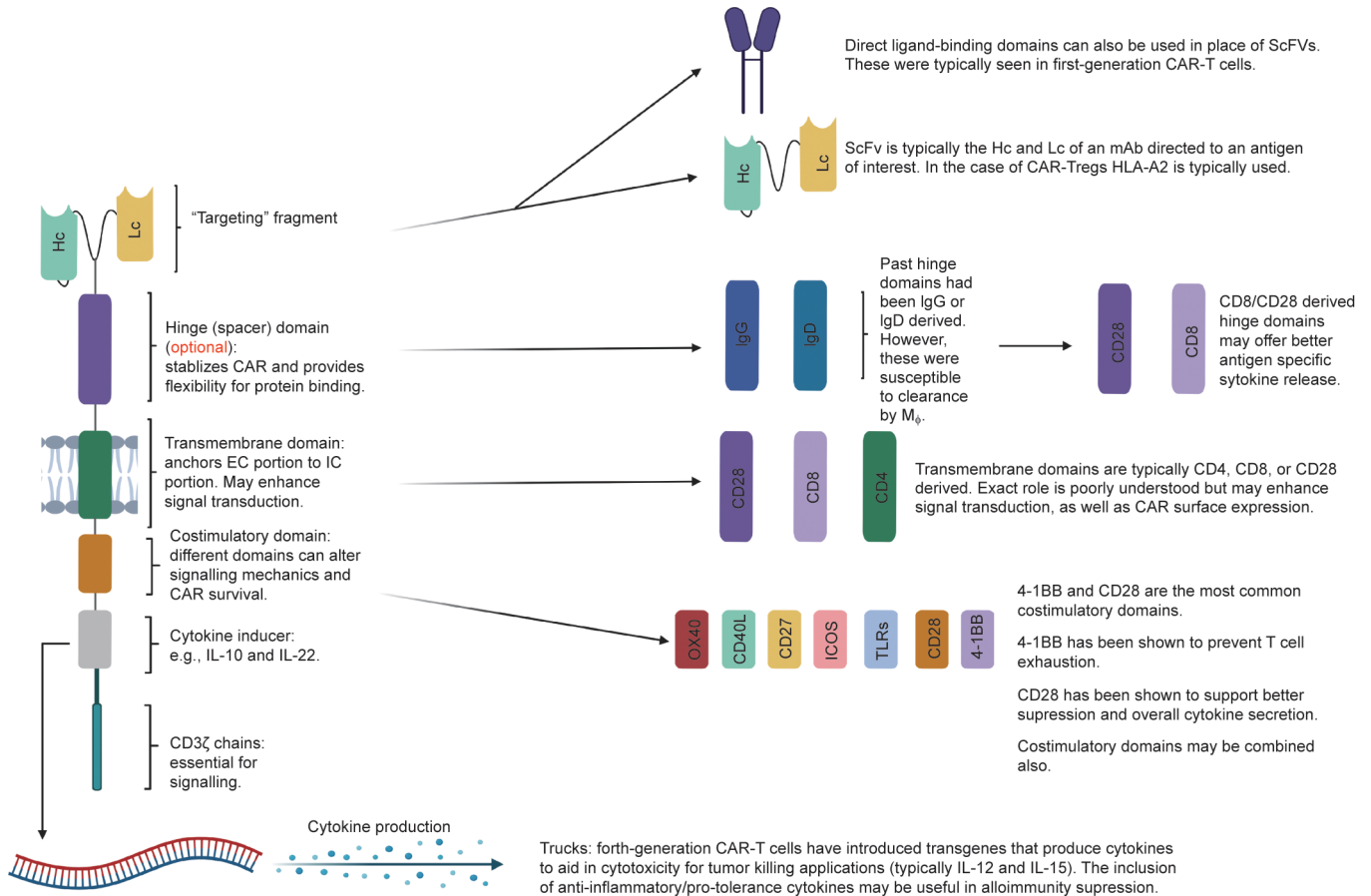


图3. CAR 的模块结构。 CAR 的结构可以根据感兴趣的目标和功能来修改。ScFv 片段具有抗原特异性，通常来源于针对目标抗原的 mAbs。铰链结构是一个可选的组成部分，可以增加细胞因子的产生，增强增殖，或促进跨膜迁移。跨膜结构域将 EC 组分固定在 IC 组分上，也可能在信号转导中发挥作用。成本刺激结构域可以影响信号转导，增加细胞扩张率，并防止 T 细胞衰竭。它们可以单独使用或组合使用，这取决于所需的效果。第四代 CAR-T 细胞引入了产生细胞因子的转基因，有助于细胞的抑制或毒作用，这取决于其目的。IgG：免疫球蛋白 G；IgD：免疫球蛋白 D；OX40：肿瘤坏死因子受体超家族成员 4；ICOS：CD278；CD40L：CD40 配体； M_{ϕ} ：巨噬细胞；TLR：Toll 样受体。

类群体中普遍存在，因此大量的患者可以通过单一的 CAR 设计进行治疗[1–3,5,81–90]。为了减少生产和扩展每个克隆所需的劳动力、成本和时间，这种做法是可取的；从临床角度来看，可以根据需要将“现成”的 CAR-Treg 送入患者体内。然而，应该探索其他常见的 HLA 抗原作为 CAR-Treg 疗法的潜在目标，以涵盖整个人群中存在的各种单倍型。事实上，如果 CAR-Treg 真正被设想为一种未来的治疗剂，那么跨地域和种族群体的单倍型频率的变化需要扩大抗原靶点的范围[83–90]。

在目前已知的 800 多种 HLA-A2 亚型中，CAR-Treg 的临床前模型没有明确指出 scFv 可以与哪些 HLA-A2 亚型结合[81–82,91]。生产可以靶向多个等位基因的 CAR 以减少覆盖所有患者 HLA 单倍型所需的 CAR 设计数量会很方便，尽管这种情况需要仔细控制，以确定供体和受体之间不会发生不需要的交叉反应（下文将进一步讨论安全问题）。有证据表明，HLA 结合肽可以与多种不同的亚型发生反应[92]。

2.2. 成本刺激结构域

CD28 和 4-1BB 是最常被用作 CAR 结构的共刺激元素[1–3,5,80,93]。它们各自对 CAR 的信号动力学和持久性，甚至对宿主细胞的抑制功能表现出不同的影响[94]。CD28 的 IC 信号强度高于 4-1BB；因此，有更大的细胞扩张率，这使得宿主细胞更容易衰竭，并与较差的持久性有关[95–96]。相反，4-1BB CAR 已被证明在单次输液后可在人体中存活 600 天以上[71]。

第一项直接比较 CD28 与 4-1BB 对 CAR-Treg 表型和功能影响的研究称，CD28 在促进细胞因子分泌和整体抑制能力方面优于 4-1BB [94]。携带 CD28 结构域的 CAR-Treg 产生的 IL-10 明显多于 4-1BB 的对应物；这与 4-1BB CAR-Treg 在体外与 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ Tconv 共培养时的抑制能力下降有关。此外，该研究报告，与缺乏任何共刺激结构的第一代 CAR 相比，4-1BB 甚至降低了 CAR-Treg 的抑制功能。

其他在 CAR 中测试较少的共刺激结构域包括诱导型

T细胞共刺激物ICOS (CD278)、肿瘤坏死因子受体超家族成员4 (OX40)、CD27和CD40配体 (CD40L) [97–98]。获得更多关于这些域的功效及其对Treg亚群具体的功能影响的数据将很有用。CD27是增强持久性的特别有希望的候选者；Song等[99]证明，与携带CD28的CAR相比，携带有CD27结构域的CAR在体内具有更长的寿命。

在第三代CAR中，人们试图通过加入第二个适配域来改进以前的设计。Ramos等[100]的研究（使用Tconvs）发现，CD28和4-1BB的组合克服了每个单独结构域的限制性，与单独使用CD28的第二代CAR相比，具有更强的持久性和扩展性。再一次，这个主题在CAR-Treg领域还没有被测试过，值得对其潜力进行调查。

2.3. 细胞因子结构域

对CAR结构的进一步改进导致第四代CAR加入了细胞因子结构域，最常见的是IL-12或IL-15，以增强为抗肿瘤免疫治疗而设计的CAR的细胞毒作用[101–103]。从这种设计中得到启发并应用于CAR-Treg，在CAR中加入调节性细胞因子，如IL-10或TGF- β ，有可能调节异体移植的免疫环境。发现它们的加入在多大程度上提高了CAR-Treg疗法的成功率，即在药理学制剂的支持下创造一个耐受性环境，这将具有临床意义。

3. 基因传递系统

不同的基因组编辑技术与不同的CAR表达细胞的效率、特异性、表达稳定性和安全性有关，这会影响最终CAR-Treg产品的成功。在这一节中，将对已有的CAR基因传递方法进行评估，以确定其在CAR-Treg治疗中的适用性。

3.1. 病毒载体

病毒转导是对T细胞基因操作的最常用的方法。这可以归因于它们的高编辑效率和最终将其DNA搭载掺入宿主细胞的基因组，导致稳定的蛋白质表达[104]。

逆转录病毒转导的Treg上CAR的平均表达率在20%~95%之间[3,76]。虽然通过逆转录病毒传递制造的几种CAR产品已经进入临床试验（特别是FDA批准的Yescarta®）[105–106]，但有证据表明，这种细胞可以表达免疫原性载体编码的表位，这就提出了病毒载体可能增加治疗细胞的免疫原性的安全问题[107]。通过偏向转录起始位点的半随机整合模式增加了遗传毒性的风险[108–109]。慢病毒是逆转录病毒的一个复杂的亚家族，作为病毒载体

已得到普及，用这种方法设计的CAR也已进入临床试验及其他阶段，包括FDA批准的Kymriah® [110–112]。CAR-Treg研究报道了不同范围的慢病毒转导效率，从10%~15% (Fransson等[72])到30%~80% (Boardman等[2])。慢病毒系统由于倾向于活性基因位点而不是转录起始位点，似乎基因毒性较低，被认为构成较低的插入性诱变风险；因此，在临床应用中似乎更有利[108–109,113]。

尽管CAR-Treg尚未进入临床试验，但CAR-Tconvs可能使人们了解其在病毒转导后在人类中的持久性。来自axicabtagene ciloleucel (Yescarta)的ZUMA-1临床试验的数据表明，CAR在外周血中可保持180天，在某些患者中甚至长达24个月；在这种情况下，使用了CD28结构域[114]。更令人印象深刻的是，tisagenlecleucel (Kymriah)——一种结合了4-1BB结构域的CAR疗法——被报道在血液中最多可维持617天，中位持续时间为168天[71]。这一证据表明，病毒递送有可能在广泛和临床上适当的时间段内支持CAR表达。

矛盾的是，来自小鼠模型的CAR-Treg数据还没有证明使用病毒载体的CAR表达有如此长的持续时间。小鼠研究数据显示，CAR-Treg在慢病毒转导后仅存活两周 (MacDonald等[1])，在同种异体移植模型中进行逆转录病毒转导超过40天 (Noyan等[3]的异体移植模型)，Tenspolde等[75]在1型糖尿病模型中进行逆转录病毒转导17周。MacDonald等[1]假设，IL-2不足、抗原不足或两者的结合可能会阻碍持久性；前者当然可能是一个潜在因素，因为Treg不产生内源性IL-2，而是依靠其他细胞分泌。另一方面，Noyan等[3]的评论提出，在MacDonald等[1]的研究中，小鼠是用HLA-A2外周血单核细胞(PBMC)重组的，这意味着HLA-A2 CAR-Treg的广泛激活已经发生了。在这种情况下，Treg将经历更大的衰竭，导致其迅速衰退。在这些研究中，CAR-Treg是否由于供体抗原的持续存在而变得枯竭，或者病毒载体赋予的免疫原性是否是CAR-Treg群体下降的原因，还有待解答；这些因素及其对CAR-Treg治疗成功的影响将在下文讨论。

上述病毒载体可以运输高达8 kb的DNA搭载，远远高于平均CAR序列的大小[115]。但是，基因整合是以半随机的方式发生的；这可能导致CAR表达的异质性，并有可能导致DNA序列整合到原致癌位点，这促使一些研究人员探索替代方案。

3.2. 转座子

转座子是一种非病毒性的遗传修饰手段，可以提供长期的表达和更高的DNA搭载上限，尽管在原致癌位点附

近整合的风险与病毒载体相似[116]。转座子元件通常与转座酶一起通过两个独立的表达质粒（转座酶也可以以 mRNA 形式传递）被送入细胞[117–118]。转座酶切下搭载的 DNA 并以半随机的方式将其“粘贴”到宿主基因组中[116]。

这种方法最重要的优势是载货量，这是其他方法效率的限制因素；例如，表达系统 PiggyBac 可以携带长达 14.3 kb 的盒式病毒而不影响效率[117,119]。转座子系统对人类外周血细胞的表达效率约为 50% [120]。转座子介导的 CAR 表达之前已经在临床上得到了利用：作为 Kebriaci 等[121]进行的一期试验的一部分，抗 CD19 的 CAR-Tconv5 是利用超活性的“睡美人”（SB）系统 SB11 从患者来源的 T 细胞中体外产生，随后被输注到 19 名异体干细胞移植的受者体内。CAR 转基因在外周血中平均可检测 51 天，最长可达 180 天。这个例子是追求长期 CAR 表达的一个令人鼓舞的起点，总的来说，与基于转座子的递送相关的 DNA 承载量、表达效率和体内持久性对于 CAR-Treg 的制造都是有利的。

3.3. CRISPR-Cas9

簇状规则间隔短回文重复（CRISPR）-CRISPR 相关蛋白 9（CRISPR-Cas9）系统提供了一种高度精确的基因组编辑方法。由于基因插入的靶点可以由引导 RNA 的序列来定义，因此与非特异性载体相比，异常基因的插入大大减少。CRISPR 编辑的效率相对较低，这对于像 CAR 这样的大序列来说可能是个问题，尽管其极高的特异性使其仍然是一种有吸引力的方法。

将 CAR 序列靶向基因组的特定区域可以修饰特定的细胞类型；因此，在 CAR-Treg 的生产过程中，将其定位于 Treg 常见或特有的基因是合乎逻辑的。据报道，靶向 T 细胞受体 α 常数（*TRAC*）基因可以在转染的细胞中产生均匀的 CAR 表达，减少强直信号传导，并导致 CAR 在抗原暴露后内化和重新表达，以延迟衰竭和延长细胞存活[122]；但是，出现的问题是，除非在基因编辑之前将 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ 群体从大量 T 细胞群体中分离出来，否则很可能发生促炎性 T 细胞亚群的污染。应该探索其他更专属于 Treg 亚群的敲入目标，如 *FOXP3*。

有人担心同源定向修复（HDR）介导的基因插入对内源性目标基因有破坏性。但是，这个问题已经通过利用内含子靶向和同源独立整合来保留内源序列的研究得到了解决[123–124]。通过使用 CRISPR-Cas9 技术在供体质粒和靶基因中产生双链断裂，它们共享相同的单向导 RNA（sgRNA）靶点，可以在不破坏内源表达的情况下以非同

源方式有效整合供体模板靶基因[124]。这为 CAR 插入提供了一种优越的方法，并使真正 Treg 特异性基因（如 *FOXP3*）的靶向成为一种可行的选择[122–123]。

4. 细胞来源

4.1. 自体

自体 Treg 表达患者的 MHC 库，因此本身不具有免疫原性，使其成为更安全和更可行的治疗选择。必须在输液前几周将细胞分离出来，以便有时间进行基因改造和扩增，而自体 CAR-T 细胞的产生需要 14~51 天[105]。必须记住，移植 Treg 疗法的目的是规避长期药物免疫抑制带来的累积风险，在 Treg 扩增期间，移植后立即短期使用标准三联疗法，不应损害 Treg 疗法的目的。非转基因 Treg 的临床试验在手术后进行了延迟输注，此前患者一直接受全量免疫抑制药物并在自体细胞输注后逐渐减量[52,125]。

4.2. 同种异体

使用第三方 Tregs 进行 CAR 治疗具有明显的优势和劣势。一方面，已经设想使用来自第三方供体的细胞将允许扩大和储存细胞培养物，以便在需要时以方便的“现成”方案提供给多位患者。此外，这些细胞在使用前可以进行广泛的质量筛选[126]。小鼠模型表明，将同种异体 Treg 过继转移到完全 MHC 不匹配的受体中，可以防止与 Treg 供体具有相同 MHC 特征的同种异体移植被排斥[127]。另一方面，同种异体细胞的免疫原性可能会对其长期持续存在产生不利影响。Kebriaci 等[121]报道，与具有相同特异性的自体 CAR-T 细胞相比，人类造血干细胞移植（HSCT）受者输注的异体 CAR-T 细胞的检测期明显缩短（分别为最长 180 天与 360 天）；这一结果强调了此类细胞的免疫原性引起的并发症（研究人员将存活率下降归因于他们同时使用免疫抑制来控制 GvHD，以及他们的方案中缺乏淋巴排泄）。为了减少免疫原性，可以采用进一步的细胞修饰来取消 MHC 的表达，从而避免免疫清除[128]。虽然这种潜在的解决方案可以使许多移植患者迅速得到单一供体来源的 CAR-Treg 的治疗，但必须产生许多不同的特异性，以覆盖整个人群的大量 MHC 单倍型。考虑到这一点，自体细胞很可能是 ACT 近期内 Treg 的首选来源。

5. 不良反应和安全问题

尽管 CAR 疗法具有明显的治疗效果，并被批准用于某些恶性肿瘤的临床治疗，但该技术仍处于刚刚起步的阶

段。文献中存在许多未解答的问题、理论风险和副作用，必须加以解决。许多的安全问题给 CAR-Treg 疗法在人类移植患者中的应用带来了障碍，特别是在重要器官是免疫抑制目标的情况下。在现阶段，关于 CAR-Treg 在体内的行为、疗效和安全性的公开文献仍然非常有限。

以下部分列出了目前相关文献中强调的重要安全问题，并提供了可能的解决方案。

5.1. 靶向细胞毒性

颗粒酶 B 的产生长期以来被认为是 Treg 介导的一种抑制机制。这在移植的情况下是有问题的，因为供体器官在输送耐受性细胞时容易受到细胞毒性的损害[10,94]。Boroughs 等[94]的研究结果表明，CAR-Treg 能够通过颗粒酶 B/穿孔素途径诱导表达靶抗原的细胞凋亡。尽管通过上皮破坏和细胞凋亡测量的细胞毒性在他们的研究中是最小的，但他们的结果证明了如何减轻 CAR-Treg 抑制的破坏性机制。研究人员报道，当 CAR-Treg 用雷帕霉素的磷脂酰肌醇 3-激酶哺乳动物靶标 (PI3K-mTOR) 通路抑制剂雷帕霉素 (西罗莫司) 处理时，颗粒酶 B 的产生受到抑制，这反映了之前关于 PI3K-mTOR 通路抑制剂对颗粒酶 B 的影响的研究结果[129]。研究人员也建议敲除 *GZMB* 基因。这种基因改造策略的效果将在体内持续存在，而无需重复使用 mTOR 抑制剂[94]。

另一种降低细胞毒性的直接方法是减少每次输注的细胞数量；然而，这需要对介导对同种异体移植物的耐受性所需的最小细胞数有充分的了解。目前尚不清楚实体器官移植中抗原特异性 CAR-Treg 的最佳剂量是多少。

在细胞过继转移之后，目标上、器官外结合是另一个问题。靶抗原在治疗无关细胞上的表达是在 CAR-T 细胞治疗恶性肿瘤领域的一大障碍[130]。然而，与癌症免疫疗法不同，癌症免疫疗法通常依赖于健康组织中较少存在的肿瘤相关抗原的过度表达，移植环境中的 CAR 可以靶向受体不表达的供体 HLA 等位基因，从而减少 CAR 错误结合导致的毒性风险。

5.2. 与其他肽的交叉反应性

脱靶毒性是 CAR-Treg 的一个理论风险，主要是由于 HLA 特异性肽倾向于其他 HLA 亚型发生交叉反应[92]。Noyan 等[3]对他们的 HLA-A2 特异性 CAR-Tregs 进行了交叉反应测试，将其暴露在 20 种不同 HLA 单倍型的 PBMC 中；虽然 CAR 优先与 HLA-A2 结合，但有一个与 HLA-A1 型的 PBMC 交叉反应的记录实例。此外，CAR 成功地与 HLA-A2 的所有亚型结合（没有说明 CAR 本身的亚型特

异性），这表明对供体和受体单倍型之间的这种精细区分可能无法实现。同样，MacDonald 等[1]证明他们的 HLA-A2 特异性 CAR-Treg 与 HLA-A2 四聚体结合，但不与 HLA-A2 四聚体结合；但是，他们并没有针对 HLA-A2 的各个亚型进行测试。在另一项 CAR-Treg 研究中，Boardman 等[2]承认，已知他们选择的抗 HLA-A2 的单链抗体会与 HLA-A2 和 HLA-68 发生交叉反应。

Tanigaki 等[92]的一篇文章显示，A2 结合肽有可能与 HLA-A 家族的其他亚型 A24、A26、A28 和 A29 发生交叉反应。他们的结果来自体内结合试验，并没有证明 CAR-Treg 在结合后必然会激活和发挥抑制功能。尽管如此，为了回答这个问题并提高 CAR 疗法的安全性，最好在一个 HLA 分子小组中进行抗原特异性的控制测试。

但是，在移植过程中，交叉反应也有积极作用。正如 Boardman 等[2]所阐明的，交叉反应性允许 CAR 特异性和供体器官的单倍型有许多不同的组合；因此，这种现象可以增加从接受特定 CAR 中受益的患者数量。但是，为了利用这种可能性，有必要了解每种 CAR 的全部结合目标，以避免与受体健康组织发生有害的结合。

5.3. 内源性 TCR 特异性的存在

除非 *TRAC* 基因被抑制或敲除，否则 CAR-Treg 将保留其具有独立特异性的内源性 TCR。如果它与 TCR 的靶抗原频繁接触，这会导致早期衰竭[122]，如果发生异常结合，可能会触发细胞对非靶组织起作用。这种担忧促使人们努力借助 CRISPR 等基因组编辑技术来取代内源性 TCR [131–132]。Eyquem 等[122]试验了一种将 CAR 靶向 *TRAC* 基因座本身的二合一方法，以破坏 *Tconvs* 中的 TCR 表达，并报道，与 TCR 完整的对照 CAR 相比，细胞增殖和效应器功能有所改善。但是，其他研究表明，T 细胞亚群之间对 TCR 的功能依赖是不同的，Eyquem 等的研究结果可能无法在 CAR-Treg 上重现。Treg 依赖 TCR 的刺激以维持其抑制功能，并且发现 25% 的激活 Treg 转录特征的表达依赖于 TCR 信号传导[133]。这就提出了一个问题，即由 CAR 激活诱导的信号级联是否能充分模仿 TCR 介导的激活，以维持 CAR-Treg 的抑制能力。总的来说，目前没有足够的证据建议纳入或去除内源性 TCR。

5.4. 免疫原性

尽管来自患者的自体 Treg 本身不存在免疫原性问题，但转基因 CAR 的存在提高了检测非自身蛋白的可能性；这种现象先前已在自体 Treg 的传统对应物（即 *Tconvs*）的研究中有记录[134]。症状包括从特定抗体的形成到急

性副作用，如细胞因子释放综合征（CRS）。因此，降低治疗细胞的免疫原性对降低患者的风险至关重要，此外，还要确保体内的最佳存活和增殖。

单克隆抗体是 scFv 区域的来源，主要来自于鼠类动物；这意味着 CAR 的可变链有可能引发抗鼠抗体反应。其他非人类来源的蛋白质也是风险因素。Sommermeyer 等 [135] 已经证明，可以从人类抗体链库中获得 scFv 区域以避免这种风险，并且可以修改 CAR 内的融合位点以产生完全人类的构建体。

5.5. CRS 和神经毒性

虽然 Treg 主要是抗炎细胞因子，与 CRS 和神经毒性的发病机制相矛盾，但这些不良事件在 CAR-T 细胞试验中的频率，使得我们有必要讨论这个问题。当注入细胞的激活与随后宿主免疫反应的激活相结合，导致细胞因子产生激增时，就会发生 CRS。CRS 有潜在的生命危险，会导致发烧、血管渗漏、多器官衰竭，甚至死亡 [101]。值得注意的是，CRS 中的一些关键参与者，尤其是 IL-6，是由内源性单核细胞和巨噬细胞分泌的，而不是由表达 CAR 的细胞本身分泌的 [136]。因此，尽管 CAR-Treg 具有抗炎表型，但 CRS 仍然是一种可能性。考虑到这一点，针对内源性细胞的细胞因子产生途径可能是一种必要的治疗策略。这种策略的例子包括提供粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）抑制剂 lenzilumab 与 CAR 输送相结合，抗 IL-6R α mAb 托珠单抗的给药，或对儿茶酚胺进行药物阻断——尽管这些不幸地增加了患者的用药负担 [137–141]。

5.6. 表型的不稳定性

Treg 表型的任何不稳定性都会加剧不良事件的风险，但 Treg 在体内的稳定性仍然是一个有争议的问题。FOXP3 表达缺失和转化为促炎状态是一种已知现象。据报道，在某些炎症条件下，特别是在微环境中缺乏 TGF- β 时，Treg 会转换为 T 辅助细胞 17（Th17）表型 [28,142]。另一方面，许多专家认为，完全分化的 FOXP3^{high} 的胸腺 Treg 在表型上是稳健的，将报道的 FOXP3 下调事件归因于非承诺的发育“中间物”的存在和显示 FOXP3 短暂、杂乱表达的 CD4⁺D25⁻ 细胞的污染 [143–146]。虽然真正的 Treg（和 CAR-Treg）是否在体内表型稳定的问题在不久的将来不太可能得到解决，但人们普遍认为 FOXP3^{high}CD25^{high}CD45RA⁻ 细胞系在世代稳定性方面代表最可靠的群体 [143]。

Treg 的表观遗传状态是维持稳定系谱的一个关键因素

[143]。FOXP3 基因座内的保守非编码序列 2（CNS2）必须去甲基化，以使 FOXP3 的表达在细胞分裂后得以维持，胸腺 Treg 是这样，但 iTreg 不是。尽管有可能通过体外修饰来提高 iTreg 的功能稳定性 [147–148]，但通过磁分离或从细胞样本中富集的过程来选择胸腺 Treg 群体，是迄今为止 CAR-Treg 工程在体内移植研究中的一致方法，也是人体内多克隆 Treg 治疗的一致做法 [1–3,5,23,49–50]。

值得注意的是，Nowak 等 [149] 发现 CD137⁺CD154⁻ 是体外培养后稳定 Treg 表型的可靠标志，并报道选择这一标志，然后进一步扩展纯化的表型，可能会增加 Treg 群体的稳定性。

5.7. 强化信号传导

强直性信号传导（定义为通过受体的慢性信号传导）可导致功能表现不佳、细胞衰竭和体内持久性降低 [150]。它可以以配体依赖性或非依赖性方式发生，并且可以通过激活 CAR 或天然 TCR 来引发。CD28 CAR 在其静止状态下表现出 CD3 ζ 链的基础磷酸化水平，这使它们容易衰竭 [95]。令人欣慰的是，Noyan 等 [3] 在他们的同种异体移植模型中明确报道了 HLA-A2 特异性 CD28 CAR-Treg 内没有强直信号传导，这可以通过细胞增殖和通过活化 T 细胞核因子（NFAT）信号来检测，而无需抗原刺激。尽管如此，还需要进一步研究来支持这一结果。之前有报道称，加入 4-1BB 适配域可以减弱强直信号，从而减少 CAR-T 细胞的衰竭 [151]。然而，其他人通过证明用 4-1BB CAR 对 T 细胞进行逆转录病毒转导可导致强直信号传导、扩增减少和功能受损来抵消这一点 [152]。通过将 CAR 序列靶向 TRAC 位点而不是 CD4 已经减少了强直信号传导，从而导致体内持久性更强（这可能是由于细胞激活事件的减少） [122,153]。但是，正如本文前面所强调的，TCR 的中断或下调对 Treg 亚群的功能有影响，所以对 CAR 在模拟 TCR 激活方面的潜在作用（并可能挽救功能的丧失）需要进一步研究。

5.8. 药物相互作用

仅使用 CARTreg 实现耐受性环境是细胞治疗的理想方案。然而，目前尚不清楚在不使用低剂量免疫抑制剂的情况下是否可以完全预防同种异体反应。因此，确定任何药物对 CAR-Treg 活性的影响非常重要。几类免疫抑制剂通过靶向 IL-2 信号通路发挥作用；这些包括巴利昔单抗和钙调神经磷酸酶抑制剂 [154–156]。Treg 的生存和扩张依赖于 EC 来源的 IL-2，因为与 Tconv 不同，它们本身不能产生 IL-2，并且对某些药物可能会干扰移植受者的 Treg 群

体的担忧是可以理解的。有趣的是，多项研究报道，根据其作为诱导治疗的作用，短期使用巴利昔单抗并不能阻止CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg的长期持续性或功能[155,157]。

6. 商业CAR-Treg生产的考虑因素

6.1. 安全开关

治疗细胞的自主性会导致患者体内难以控制的严重副作用。鉴于CAR-Treg在体内的动态很大程度上尚未确定，重要的是包括一种安全机制，在临床试验期间及以后发生不良事件时，这些细胞可以被选择性地失活或破坏。已发表的CAR-Treg研究侧重于免疫抑制潜力，尚未探索安全策略；然而，在过渡到人类使用之前，这些都需要仔细考虑。为了允许对注入的CAR-Treg进行外部操作，安全开关或自杀基因可以作为CAR的一部分或作为共同表达的分子被包括在内。最广泛开发的系统是基于基因定向酶前药治疗（GDEPT）、诱导型二聚化和mAb耗竭[158]。虽然上述方法在严重不良事件的情况下非常有价值，但它们的有效性导致治疗细胞不可挽回的损失。这不仅意味着对患者的治疗益处的损失，而且意味着与产生这些细胞相关的时间和成本的损失。或者，可逆的安全开关可以提供一种在不破坏CAR-Treg的情况下停用它们的方法。研究工作越来越关注不会导致细胞瞬间死亡的安全系统，从而产生了UniCAR技术和类似系统等创新[159–161]。在不希望破坏CAR细胞的情况下，这是一个更好的选择。通过停止给药激活药物，CAR的表达将暂时失活，直到再次给药。

从移植的角度来看，对这些“开关”系统的一个批评是，它们依赖于重复给予小分子药物以维持CAR的激活。虽然这对于只考虑短期治疗的应用来说是可以接受的（如抗癌治疗），但对于需要终身干预免疫系统的移植受体来说就不太适合了。这也是药理学药物正在失去青睐的一个原因；不依从的风险变得更有可能是，而终身用药的相关费用构成了沉重的经济负担。这个问题的答案可能在于四环素反应性转录系统（Tet-Off），其中感兴趣的基因在四环素控制的反式激活因子和tet操纵子序列的控制下组成型表达[162–163]。反式激活因子不能与操纵基因序列结合，基因转录以可逆方式受到抑制[163]。将CAR序列置于Tet-Off系统的控制之下，可以满足对安全系统的需求，同时使细胞免受不可逆的破坏，并将减少移植患者的负担。

6.2. 财务成本

在目前的价格范围内，CAR疗法的广泛应用可能会

给医疗保健系统带来财务压力，在没有全民医疗的国家，可能会阻止医疗保险提供商支付输液费用[164]。目前，获批的CAR疗法只提供给患有复发或难治性疾病、对其他治疗没有反应且符合年龄标准的高度特定的患者[70]。在移植方面，如果CAR-tregs被批准作为一种免疫抑制疗法，很难想象如何管理成本。抗肿瘤的CAR-Tconv的“最后手段”地位并不适用于移植，人们希望Treg介导的抑制能替代或部分取代药物治疗。虽然HLA特异性、基于细胞的疗法的好处是显而易见的，可以预见有朝一日它们会发挥这一作用，但终身免疫抑制的财务可持续性是一个重要的考虑因素。目前还不能确定CAR-Treg需要多久进行一次给药。CAR产品的大规模生产可能会降低每次输液的成本。

6.3. 优化剂量

关于CAR-Treg治疗应用的剩余问题之一是实现耐受所需的细胞数量。不同研究之间的剂量差异很大，目前，每次输液的最佳细胞数量仍有争议。根据小鼠模型估计，Treg与Tconv的比率至少为1:2（Tregs占CD4⁺T细胞总数的33%），才能防止实体器官移植的急性排斥反应[165]。异体移植中的Treg比例不能无限期维持，但在移植时拥有如此高的比例可以通过旁观者抑制和感染性耐受的机制在较长时间内建立一个耐受性环境[165]。假设一个人的外周血中有 5×10^9 个CD4⁺T细胞，其中平均有5%（ 2.5×10^8 ）是Treg，那么在不进行Tconv的淋巴耗竭的情况下，需要输注 4.9×10^{10} 个Treg才能达到这个比例[165]。即使在体外扩增的情况下，这也是一个很难达到的数字，所以可以说，淋巴耗竭和Treg输注相结合是有利的策略。通过胸腺球蛋白淋巴耗竭治疗，Treg的剂量可以降低到 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 个细胞[165]。

但是，具有预定特异性的Treg的效力提升可能会减少输液所需的细胞数量。CAR-Treg由于其scFv衍生的结合位点，能够优先定位到异体移植上；因此，浸润到移植上的耐受性细胞的数量会增加。需要进一步研究这种可能性，以及研究CAR-Treg剂量的最佳频率。

7. 总结和未来展望

由于CAR作为一种潜在的免疫调节工具的价值得到认可，它正在迅速占领免疫治疗领域。CAR-Treg在早期的小鼠研究中的功效与多克隆对应物相比，更能防止实体器官的排斥症状，这有力地证明了这项技术值得大力研究。现有描述以移植耐受为目的的CAR-Treg生成的研究

已经确定了 CAR-Treg 的耐受性活性和 scFv 的抗原偏好，并提供了一些关于体内持久性的信息；尽管如此，对于长期的 CAR-Treg 治疗，仍然存在其他问题。

拓展 CAR-Treg 在体内的寿命是一个基本需求。数据表明，携带常用 CD28 共刺激结构域的 CAR 具有足够的抑制能力来防止体内同种异体移植排斥反应，但表现出持久性的降低，这可能归因于导致早期衰竭的基础激活水平，如前所述。有必要探索其他共刺激域的结合，并确定它们对 Treg 的激活、增殖和强直信号传导的影响。更长的持久性意味着两次输注之间的时间跨度更大，从而减少了患者的药物负担和生产新批次 CAR-Treg 相关的制造成本。

仍有待克服的主要障碍是 HLA 特异性 CAR-Treg 在体内的未知安全状况。尽管美国食品和药物管理局（FDA）和欧洲药品管理局（EMA）已经批准了两种基于 CAR 的疗法用于癌症治疗，但临床试验的结果表明了有关 CAR 疗法的安全性的几个问题。尽管到目前为止还没有临床试验可以提供关于 CAR-Treg 对人类的不良影响的报道，但通过常规 CAR-T 细胞疗法进行的观察可用于创建预期的潜在副作用的全部内容。但是，Treg 亚群的独特功能可能会在移植方面带来一系列尚未确定的新问题；例如，旁观者抑制和耐受环境的创造可能会促进病原体和恶性细胞的存活，造成与传统免疫抑制剂下的长期影响。因此，在这一领域能够超越临床前研究之前，对潜在的不良反应、最佳剂量和过继转移的时机进行彻底检查是至关重要的。如果可以缓解安全问题，并且如果完成进一步的研究以提高我们对体内 CAR-Treg 行为和动力学的理解，那么 HLA 特异性 CAR 的治疗益处是其在移植中的应用非常乐观的一个原因。

Acknowledgements

Fadi Issa is a Wellcome Trust CRCD Fellow. Work relevant to this review is supported by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program (RESHAPE, 825392) to Joanna Hester and Fadi Issa. Sabrina Wright is supported by the Restore Research Trust.

Compliance with ethics guidelines

Sabrina Wright, Conor Hennessy, Joanna Hester, and Fadi Issa declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] MacDonald KG, Hoeppli RE, Huang Q, Gillies J, Luciani DS, Orban PC, et al. Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. *J Clin Invest* 2016;126(4):1413–24.
- [2] Boardman DA, Philippeos C, Fruhwirth GO, Ibrahim MAA, Hannen RF, Cooper D, et al. Expression of a chimeric antigen receptor specific for donor HLA class I enhances the potency of human regulatory T cells in preventing human skin transplant rejection. *Am J Transplant* 2017;17(4):931–43.
- [3] Noyan F, Zimmermann K, Hardtke-Wolenski M, Knoefel A, Schulde E, Geffers R, et al. Prevention of allograft rejection by use of regulatory T cells with an MHC-specific chimeric antigen receptor. *Am J Transplant* 2017;17(4):917–30.
- [4] Imura Y, Ando M, Kondo T, Ito M, Yoshimura A. CD19-targeted CAR regulatory T cells suppress B cell pathology without GvHD. *JCI Insight* 2020;5(14):e136185.
- [5] Sicard A, Lamarche C, Speck M, Wong M, Rosado-Sánchez I, Blois M, et al. Donor-specific chimeric antigen receptor Tregs limit rejection in naive but not sensitized allograft recipients. *Am J Transplant* 2020;20(6):1562–73.
- [6] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alphachains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155(3):1151–64.
- [7] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *J Immunol* 2003;299(5609):1057–61.
- [8] Palomares O, Yaman G, Azkur AK, Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol* 2010;40(5):1232–40.
- [9] Wing K, Onishi Y, Prieto-martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322(5899):271–5.
- [10] Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005;174(4):1783–6.
- [11] Xu A, Liu Y, Chen WQ, Wang JL, Xue YQ, Huang F, et al. TGF- β -induced regulatory T cells directly suppress B cell responses through a noncytotoxic mechanism. *J Immunol* 2016;196(9):3631–41.
- [12] Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 2006;107(10):3925–32.
- [13] Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004;21(4):589–601.
- [14] Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnicka-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007;27(4):635–46.
- [15] Boissonnas A, Scholer-Dahirel A, Simon-Blancal V, Pace L, Valet F, Kissenpfennig A, et al. Foxp3⁺ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 2010;32(2):266–78.
- [16] Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol* 2012;3:51.
- [17] De Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174(5):1209–20.
- [18] Palomares O, Martín-Fontecha M, Lauener R, Traidl-Hoffmann C, Cavkaytar O, Akdis M, et al. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . *Genes Immun* 2014;15:511–20.
- [19] Akkaya B, Oya Y, Akkaya M, Souza JA, Holstein AH, Kamenyeva O, et al. Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide–MHC class II from dendritic cells. *Nat Immunol* 2019;20(2):218–31.
- [20] Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450(7169):566–9.
- [21] Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb-L'Herminé A, Devergne O. Human CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL35. *J Immunol* 2008;181(10):6898–905.
- [22] Chaturvedi V, Collison LW, Guy CS, Workman CJ, Vignali DAA. Cutting edge: human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *J Immunol* 2011;186(12):6661–6.
- [23] Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA. Generation *ex vivo* of TGF- β -producing regulatory T cells from CD4⁺CD25 precursors. *J Immunol* 2002;169(8):4183–9.
- [24] Bourque J, Hawiger D. Immunomodulatory bonds of the partnership between

- dendritic cells and T cells. *Crit Rev Immunol* 2018;38(5):379–401.
- [25] Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* 2007;117(5):1147–54.
- [26] Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2007;8(12):1353–62.
- [27] Gravano DM, Vignali DA. The battle against immunopathology: infectious tolerance mediated by regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* 2011;62 (12):1997–2008.
- [28] Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- β . *J Immunol* 2007;178(11):6725–9.
- [29] Andersson J, Tran DQ, Pesu M, Davidson TS, Ramsey H, O'Shea JJ, et al. CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- β -dependent manner. *J Exp Med* 2008;205(9):1975–81.
- [30] Han HS, Jun HS, Utsugi T, Yoon JW. A new type of CD4⁺ suppressor T cell completely prevents spontaneous autoimmune diabetes and recurrent diabetes in syngeneic islet-transplanted NOD mice. *J Autoimmun* 1996;9 (3):331–9.
- [31] Cobbold SP, Graca L, Lin CY, Adams E, Waldmann H. Regulatory T cells in the induction and maintenance of peripheral transplantation tolerance. *Transpl Int* 2003;16(2):66–75.
- [32] Piccirillo CA, Tritt M, Sgouroudis E, Albanese A, Pyzik M, Hay V. Control of type 1 autoimmune diabetes by naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in neonatal NOD mice. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051(1):72–87.
- [33] Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002;169(9):4712–6.
- [34] Horwitz DA, Gray JD, Zheng SG. The potential of human regulatory T cells generated *ex vivo* as a treatment for lupus and other chronic inflammatory diseases. *Arthritis Res* 2002;4(4):241–6.
- [35] Jones SC, Murphy GF, Korngold R. Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD4⁺25⁺ T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9 (4):243–56.
- [36] Field EH, Matesic D, Rigby S, Fehr T, Rouse T, Gao Q. CD4⁺CD25⁺ regulatory cells in acquired MHC tolerance. *Immunol Rev* 2001;182(1):99–112.
- [37] Issa F, Hester J, Goto R, Nadig S, Goodacre TE, Wood K. *Ex vivo*-expanded human regulatory T cells prevent the rejection of skin allografts in a humanized mouse model. *Transplantation* 2010;90(12):1321–7.
- [38] Wu DC, Hester J, Nadig SN, Zhang W, Trzonkowski P, Gray D, et al. *Ex vivo* expanded human regulatory T cells can prolong survival of a human islet allograft in a humanized mouse model. *Transplantation* 2013;96 (8):707–16.
- [39] Miller LW. Cardiovascular toxicities of immunosuppressive agents. *Am J Transplant* 2002;2(9):807–18.
- [40] Fellström B. Risk factors for and management of post-transplantation cardiovascular disease. *BioDrugs* 2001;15(4):261–78.
- [41] Agarwal A, Prasad GVR. Post-transplant dyslipidemia: mechanisms, diagnosis and management. *World J Transplant* 2016;6(1):125–34.
- [42] Weir MR, Burgess ED, Cooper JE, Fenves AZ, Goldsmith D, McKay D, et al. Assessment and management of hypertension in transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2015;26(6):1248–60.
- [43] Chandran S, Tang Q, Sarwal M, Laszik ZG, Putnam AL, Lee K, et al. Polyclonal regulatory T cell therapy for control of inflammation in kidney transplants. *Am J Transplant* 2017;17(11):2945–54.
- [44] Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 2015;7(315):315ra189.
- [45] Trzonkowski P, Szaryńska M, Myśliwska J, Myśliwski A. *Ex vivo* expansion of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells for immunosuppressive therapy. *Cytometry A* 2009;75A(3):175–88.
- [46] Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszuk A, Grabowska M, Techmańska I, Juścińska J, et al. Administration of CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ regulatory T cells preserves β -cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care* 2012;35(9):1817–20.
- [47] Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszuk A, Grabowska M, Techmańska I, Juścińska J, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets—results of one year follow-up. *Clin Immunol* 2014;153(1):23–30.
- [48] Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9(9):1144–50.
- [49] Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011;117(14):3921–8.
- [50] Mathew JM, Voss JH, LeFever A, Konieczna I, Stratton C, He J, et al. A phase I clinical trial with *ex vivo* expanded recipient regulatory T cells in living donor kidney transplants. *Sci Rep* 2018;8(1):7428.
- [51] Sawitzki B, Harden PN, Reinke P, Moreau A, Hutchinson JA, Game DS, et al. Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *Lancet* 2020;395(10237):1627–39.
- [52] clinicaltrials.gov [Internet]. Washington, DC: US National Library of Medicine; 2014 [cited 2021 Oct 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02129881>.
- [53] gtr.ukri.org [Internet]. London: Innovate UK; 2021 [cited 2021 Oct 30]. Available from: <https://gtr.ukri.org/projects?ref=MR%2FN027930%2F1>.
- [54] Mittal A, Colegio OR. Skin cancers in organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2017;17(10):2509–30.
- [55] Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 2007; 357:2601–14.
- [56] Lisowska KA, Dębska-Ślizień A, Jasiulewicz A, Bryl E, Witkowski JM. Influence of hemodialysis on circulating CD4^{low}CD25^{high} regulatory T cells in end-stage renal disease patients. *Inflamm Res* 2014;63(2):99–103.
- [57] Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2002;196(3):401–6.
- [58] Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, Mottet C, Lechler RI. *In vitro*-expanded donor alloantigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood* 2007;109(2):827–35.
- [59] Mercier-Letondal P, Marton C, Deschamps M, Ferrand C, Vauchy C, Chenut C, et al. Isolation and characterization of an HLA-DRB1*04-restricted HPV16-E7 T cell receptor for cancer immunotherapy. *Hum Gene Ther* 2018;29(10):1202–12.
- [60] Kim YC, Zhang AH, Yoon J, Culp WE, Lees JR, Wucherpfennig KW, et al. Engineered MBP-specific human Tregs ameliorate MOG-induced EAE through IL-2-triggered inhibition of effector T cells. *J Autoimmun* 2018;92:77–86.
- [61] Hull CM, Nickolay LE, Estorninho M, Richardson MW, Riley JL, Peakman M, et al. Generation of human islet-specific regulatory T cells by TCR gene transfer. *J Autoimmun* 2017;79:63–73.
- [62] Lee YR, Yang IH, Lee YH, Im SA, Song S, Li H, et al. Cyclosporin A and tacrolimus, but not rapamycin, inhibit MHC-restricted antigen presentation pathways in dendritic cells. *Blood* 2005;105(10):3951–5.
- [63] Imai A, Sahara H, Tamura Y, Jimbow K, Saito T, Ezoe K, et al. Inhibition of endogenous MHC class II-restricted antigen presentation by tacrolimus (FK506) via FKBP51. *Eur J Immunol* 2007;37(7):1730–8.
- [64] Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(24):10024–8.
- [65] Müller T, Uherek C, Maki G, Chow KU, Schimpf A, Klingemann HG, et al. Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57(3):411–23.
- [66] Beecham EJ, Ortiz-Pujols S, Junghans RP. Dynamics of tumor cell killing by human T lymphocytes armed with an anti-carcinoembryonic antigen chimeric immunoglobulin T-cell receptor. *J Immunother* 2000;23(3):332–43.
- [67] McGuinness RP, Ge Y, Patel SD, Kashmiri SVS, Lee HS, Hand PH, et al. Antitumor activity of human T cells expressing the CC49- ζ chimeric immune receptor. *Hum Gene Ther* 1999;10(2):165–73.
- [68] Bitton N, Verrier F, Debré P, Gorochov G. Characterization of T cell-expressed chimeric receptors with antibody-type specificity for the CD4 binding site of HIV-1 gp120. *Eur J Immunol* 1998;28(12):4177–87.
- [69] Elinav E, Waks T, Eshhar Z. Redirection of regulatory T cells with predetermined specificity for the treatment of experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 2008;134(7):2014–24.
- [70] Hayden PJ, Sirait T, Koster L, Snowden JA, Yakoub-Agha I. An international survey on the management of patients receiving CAR T-cell therapy for haematological malignancies on behalf of the Chronic Malignancies Working Party of EBMT. *Curr Res Transl Med* 2019;67(3):79–88.
- [71] Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018;378(5):439–48.
- [72] Fransson M, Piras E, Burman J, Nilsson B, Essand M, Lu B, et al. CAR/Foxp3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery. *J Neuroinflammation* 2012;9:112.
- [73] Wright GP, Notley CA, Xue SA, Bendle GM, Holler A, Schumacher TN, et al.

- Adoptive therapy with redirected primary regulatory T cells results in antigen-specific suppression of arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(45):19078–83.
- [74] Skuljec J, Chmielewski M, Happle C, Habener A, Busse M, Abken H, et al. Chimeric antigen receptor-redirected regulatory T cells suppress experimental allergic airway inflammation, a model of asthma. *Front Immunol* 2017;8:1125.
- [75] Tenspolde M, Zimmermann K, Weber LC, Hapke M, Lieber M, Dywicky J, et al. Regulatory T cells engineered with a novel insulin-specific chimeric antigen receptor as a candidate immunotherapy for type 1 diabetes. *J Autoimmun* 2019;103:102289.
- [76] Elinav E, Adam N, Waks T, Eshhar Z. Amelioration of colitis by genetically engineered murine regulatory T cells redirected by antigen-specific chimeric receptor. *Gastroenterology* 2009;136(5):1721–31.
- [77] Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, Pfeiffer T, Olivares S, Gonzalez N, et al. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances *in vivo* persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res* 2006;66(22):10995–1004.
- [78] Finney HM, Lawson ADG, Bebbington CR, Weir ANC. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol* 1998;161(6):2791–7.
- [79] Savoldo B, Ramos CA, Liu E, Mims MP, Keating MJ, Carrum G, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest* 2011;121(5):1822–6.
- [80] Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. *Mol Ther* 2009;17(8):1453–64.
- [81] Chen J, Lu S, Weng X, Liang Z, Wu X. Heterogeneity of antigen specificity between HLA-A*02:01 and other frequent Chinese HLA-A2 subtypes detected by a modified autologous lymphocyte–monocyte coculture. *Mol Immunol* 2019;114:389–94.
- [82] Chen KY, Liu J, Ren EC. Structural and functional distinctiveness of HLA-A2 allelic variants. *Immunol Res* 2012;53(1–3):182–90.
- [83] Saito PK, Yamakawa RH, Noguti EN, Bedendo GB, da Silva Junior WV, Yamada SS, et al. HLA-A, HLA-B, and HLA-DRB1 allele and haplotype frequencies in renal transplant candidates in a population in southern Brazil. *J Clin Lab Anal* 2016;30(3):258–65.
- [84] Joshi C, Patel MM, Koringa PG, Shah TM, Patel AK, Tripathi AK, et al. Human leukocyte antigen alleles, genotypes and haplotypes frequencies in renal transplant donors and recipients from West Central India. *Indian J Hum Genet* 2013;19(2):219–32.
- [85] Zhou XY, Zhu FM, Li JP, Mao W, Zhang DM, Liu ML, et al. High-resolution analyses of human leukocyte antigens allele and haplotype frequencies based on 169, 995 volunteers from the China bone marrow donor registry program. *PLoS ONE* 2015;10(9):e0139485.
- [86] Ikhtiar AM, Jazairi B, Khansa I, Othman A. HLA class I alleles frequencies in the Syrian population. *BMC Res Notes* 2018;11(1):324.
- [87] Jawdat D, Al-Zahrani M, Al-Askar A, Fakhoury H, Uyar FA, Hajeer A, et al. HLAA, B, C, DRB1 and DQB1 allele and haplotype frequencies in volunteer bone marrow donors from Eastern Region of Saudi Arabia. *HLA* 2019;94(1):49–56.
- [88] Tshabalala M, Ingram C, Schlaphoff T, Borrill V, Christoffels A, Pepper MS. Human leukocyte antigen-A, B, C, DRB1, and DQB1 allele and haplotype frequencies in a subset of 237 donors in the South African bone marrow registry. *J Immunol Res* 2018;2018:2031571.
- [89] Luo M, Embree J, Ramdahn S, Ndinya-Achola J, Njenga S, Bwayo JB, et al. HLAA and HLA-B in Kenya, Africa: allele frequencies and identification of HLAB*1567 and HLA-B*4426. *Tissue Antigens* 2002;59(5):370–80.
- [90] Sanchez-Mazas A, Nunes JM, Middleton D, Sauter J, Buhler S, McCabe A, et al. Common and well-documented HLA alleles over all of Europe and within European sub-regions: a catalogue from the European Federation for Immunogenetics. *HLA* 2017;89(2):104–13.
- [91] Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE. IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res* 2020;48(D1):D948–55.
- [92] Tanigaki N, Fruci D, Chersi A, Falasca G, Tosi R, Butler RH. HLA-A2-binding peptides cross-react not only within the A2 subgroup but also with other HLA-A-locus allelic products. *Hum Immunol* 1994;39(3):155–62.
- [93] Choi BK, Bae JS, Choi EM, Kang WJ, Sakaguchi S, Vinay DS, et al. 4–1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4⁺CD25⁺T cells. *J Leukoc Biol* 2004;75(5):785–91.
- [94] Boroughs AC, Larson RC, Choi BD, Bouffard AA, Riley LS, Schiferle E, et al. Chimeric antigen receptor costimulation domains modulate human regulatory T cell function. *JCI Insight* 2019;4(8):e126194.
- [95] Salter AI, Ivey RG, Kennedy JJ, Voillet V, Rajan A, Alderman EJ, et al. Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal* 2018;11(544):eaat6753.
- [96] Guedan S, Posey AD, Shaw C, Wing A, Da T, Patel PR, et al. Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4–1BB costimulation. *JCI Insight* 2018;3(1):e96976.
- [97] Weinkove R, George P, Dasyam N, McLellan AD. Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations. *Clin Transl Immunol* 2019;8(5):e1049.
- [98] Guedan S, Chen X, Madar A, Carpenito C, McGettigan SE, Frigault MJ, et al. ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar T_H17/T_H1 cells. *Blood* 2014;124(7):1070–80.
- [99] Song DG, Ye Q, Poussin M, Harms GM, Figini M, Powell DJ. CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells *in vivo*. *Blood* 2012;119(3):696–706.
- [100] Ramos CA, Rouce R, Robertson CS, Reyna A, Narala N, Vyas G, et al. *In vivo* fate and activity of second- versus third-generation CD19-specific CAR-T cells in B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Mol Ther* 2018;26(12):2727–37.
- [101] Elahi R, Khosh E, Tahmasebi S, Esmailzadeh A. Immune cell hacking: challenges and clinical approaches to create smarter generations of chimeric antigen receptor T cells. *Front Immunol* 2018;9:1717.
- [102] Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood* 2012;119(18):4133–41.
- [103] Kerker SP, Muranski P, Kaiser A, Boni A, Sanchez-Perez L, Yu Z, et al. Tumorspecific CD8⁺T cells expressing interleukin-12 eradicate established cancers in lymphodepleted hosts. *Cancer Res* 2010;70(17):6725–34.
- [104] Dufait I, Liechtenstein T, Lanna A, Bricogne C, Laranga R, Padella A, et al. Retroviral and lentiviral vectors for the induction of immunological tolerance. *Scientifica* 2012;2012:694137.
- [105] Papadouli I, Mueller-Berghaus J, Beuneu C, Ali S, Hofner B, Petavy F, et al. EMA review of axicabtagene ciloleucel (Yescarta) for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Oncologist* 2020;25(10):894–902.
- [106] Petrusch U, Schuberth PC, Hagedorn C, Soltermann A, Tomaszek S, Stahel R, et al. Re-directed T cells for the treatment of fibroblast activation protein (FAP) positive malignant pleural mesothelioma (FAPME-1). *BMC Cancer* 2012;12:615.
- [107] Lamers CHJ, Willemsen R, van Elzakker P, van Steenbergen-Langeveld S, Broertjes M, Oosterwijk-Wakka J, et al. Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with *ex vivo*-engineered T cells. *Blood* 2011;117(1):72–82.
- [108] Persons DA. Lentiviral vector gene therapy: effective and safe? *Mol Ther* 2010;18(5):861–2.
- [109] Dismuke D, Samulski RJ. Hepatic gene therapy using lentiviral vectors: has safety been established? *Hepatology* 2013;58(1):13–4.
- [110] Budde LE, Berger C, Lin Y, Wang J, Lin X, Frayo SE, et al. Combining a CD20 chimeric antigen receptor and an inducible caspase 9 suicide switch to improve the efficacy and safety of T cell adoptive immunotherapy for lymphoma. *PLoS ONE* 2013;8(12):e82742.
- [111] Haas AR, Tanyi JL, O'Hara MH, Gladney WL, Lacey SF, Torigian DA, et al. Phase I study of lentiviral-transduced chimeric antigen receptor-modified T cells recognizing mesothelin in advanced solid cancers. *Mol Ther* 2019;27(11):1919–29.
- [112] Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014;371(16):1507–17.
- [113] Cavazzana M, Bushman FD, Miccio A, André-Schmutz I, Six E. Gene therapy targeting haematopoietic stem cells for inherited diseases: progress and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2019;18:447–62.
- [114] Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2017;377(26):2531–44.
- [115] Lundstrom K. Viral vectors in gene therapy. *Diseases* 2018;6(2):42.
- [116] Hamada M, Nishio N, Okuno Y, Suzuki S, Kawashima N, Muramatsu H, et al. Integration mapping of *piggyBac*-mediated CD19 chimeric antigen receptor T cells analyzed by novel tagmentation-assisted PCR. *EBioMedicine* 2018;34:18–26.
- [117] Tipanee J, Chai YC, VandenDriessche T, Chuah MK. Preclinical and clinical advances in transposon-based gene therapy. *Biosci Rep* 2017;37(6):BSR20160614.
- [118] Grabundzija I, Irgang M, Mátés L, Belay E, Matrai J, Gogol-Döring A, et al. Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells.

- Mol Ther 2010;18(6):1200–9.
- [119] Li R, Zhuang Y, Han M, Xu T, Wu X. *PiggyBac* as a high-capacity transgenesis and gene-therapy vector in human cells and mice. *Dis Model Mech* 2013;6(3): 828–33.
- [120] Peng PD, Cohen CJ, Yang S, Hsu C, Jones S, Zhao Y, et al. Efficient nonviral *Sleeping Beauty* transposon-based TCR gene transfer to peripheral blood lymphocytes confers antigen-specific antitumor reactivity. *Gene Ther* 2009;16 (8):1042–9.
- [121] Kebriaei P, Singh H, Huls MH, Figliola MJ, Bassett R, Olivares S, et al. Phase I trials using *Sleeping Beauty* to generate CD19-specific CAR T cells. *J Clin Invest* 2016;126(9):3363–76.
- [122] Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJC, Hamieh M, Cunanan KM, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* 2017;543(7643):113–7.
- [123] Auer TO, Duroure K, Cian AD, Concordet JP, Bene FD. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res* 2014;24(1):142–53.
- [124] Li J, Zhang BB, Ren YG, Gu SY, Xiang YH, Huang C, et al. Intron targeting-mediated and endogenous gene integrity-maintaining knockin in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Res* 2015;25:634–7.
- [125] Todo S, Yamashita K, Goto R, Zaitus M, Nagatsu A, Oura T, et al. A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. *Hepatology* 2016;64(2):632–43.
- [126] American Association for Cancer Research. The quest for off-the-shelf CAR T cells. *Cancer Discov* 2018;8(7):787–8.
- [127] Adeegbe D, Bayer AL, Levy RB, Malek TR. Cutting edge: allogeneic CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells suppress autoimmunity while establishing transplantation tolerance. *J Immunol* 2006;176(12):7149–53.
- [128] Deuse T, Hu X, Gravina A, Wang D, Tediashvili G, De C, et al. Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat Biotechnol* 2019; 37(3):252–8.
- [129] Efimova OV, Kelley TW. Induction of granzyme B expression in T-cell receptor/CD28-stimulated human regulatory T cells is suppressed by inhibitors of the PI3K-mTOR pathway. *BMC Immunol* 2009;10:59.
- [130] Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 2011;3(95):95ra73.
- [131] Legut M, Dolton G, Mian AA, Ottmann OG, Sewell AK. CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells. *Blood* 2018; 131(3):311–22.
- [132] Stadtmayer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* 2020; 367(6481):1001.
- [133] Levine AG, Arvey A, Jin W, Rudensky AY. Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nat Immunol* 2014;15(11):1070–8.
- [134] Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, DiGiusto D, Kalos M, Ostberg JR, et al. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(9):1245–56.
- [135] Sommermeyer D, Hill T, Shamah SM, Salter AI, Chen Y, Mohler KM, et al. Fully human CD19-specific chimeric antigen receptors for T-cell therapy. *Leukemia* 2017;31(10):2191–9.
- [136] Singh N, Hofmann TJ, Gershenson Z, Levine BL, Grupp SA, Teachey DT, et al. Monocyte lineage-derived IL-6 does not affect chimeric antigen receptor T cell function. *Cytotherapy* 2017;19(7):867–80.
- [137] Sterner RM, Sakemura R, Cox MJ, Yang N, Khadka RH, Forsman CL, et al. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts. *Blood* 2019;133(7):697–709.
- [138] Dholaria BR, Bachmeier CA, Locke F. Mechanisms and management of chimeric antigen receptor T-cell therapy-related toxicities. *BioDrugs* 2019;33: 45–60.
- [139] Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak Ö, et al. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2017;377(26):2545–54.
- [140] Staedtke V, Bai RY, Kim K, Darvas M, Davila ML, Riggins GJ, et al. Disruption of a self-amplifying catecholamine loop reduces cytokine release syndrome. *Nature* 2018;564(7735):273–7.
- [141] Sachdeva M, Duchateau P, Depil S, Poirot L, Valton J. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor inactivation in CAR T-cells prevents monocytedependent release of key cytokine release syndrome mediators. *J Biol Chem* 2019;294(14):5430–7.
- [142] Goldstein JD, Burlion A, Zaragoza B, Sendeyo K, Polansky JK, Huehn J, et al. Inhibition of the JAK/STAT signaling pathway in regulatory T cells reveals a very dynamic regulation of Foxp3 expression. *PLoS ONE* 2016; 11(6): e0157629.
- [143] Sakaguchi S, Vignali DAA, Rudensky AY, Niec RE, Waldmann H. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(6): 461–7.
- [144] Hori S. Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev* 2014;259(1):159–72.
- [145] Rubtsov YP, Niec RE, Josefowicz S, Li L, Darce J, Mathis D, et al. Stability of the regulatory T cell lineage *in vivo*. *Science* 2010;329(5999):1667–71.
- [146] Barbi J, Pardoll DM, Pan F. Treg functional stability and its responsiveness to the microenvironment. *Immunol Rev* 2014;259(1):115–39.
- [147] Chen S, Zhang L, Ying Y, Wang Y, Arnold PR, Wang G, et al. Epigenetically modifying the Foxp3 locus for generation of stable antigen-specific Tregs as cellular therapeutics. *Am J Transplant* 2020;20(9):2066–79.
- [148] Iizuka-Koga M, Nakatsukasa H, Ito M, Akanuma T, Lu Q, Yoshimura A. Induction and maintenance of regulatory T cells by transcription factors and epigenetic modifications. *J Autoimmun* 2017;83:113–21.
- [149] Nowak A, Lock D, Bacher P, Hohnstein T, Vogt K, Gottfreund J, et al. CD137⁺CD154⁺ expression as a regulatory T cell (Treg)-specific activation signature for identification and sorting of stable human Tregs from *in vitro* expansion cultures. *Front Immunol* 2018;9:199.
- [150] Ajina A, Maher J. Strategies to address chimeric antigen receptor tonic signaling. *Mol Cancer Ther* 2018;17(9):1795–815.
- [151] Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, et al. 4–1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med* 2015;21(6):581–90.
- [152] Gomes-Silva D, Mukherjee M, Srinivasan M, Krenciute G, Dakhova O, Zheng Y, et al. Tonic 4–1BB costimulation in chimeric antigen receptors impedes T cell survival and is vector-dependent. *Cell Rep* 2017;21(1):17–26.
- [153] MacLeod DT, Antony J, Martin AJ, Moser RJ, Hekele A, Wetzel KJ, et al. Integration of a CD19 CAR into the TCR alpha chain locus streamlines production of allogeneic gene-edited CAR T cells. *Mol Ther* 2017;25(4):949–61.
- [154] Scott C, Fanelli G, Hoong SJ, Romano M, Lamperti EN, Sukthankar M, et al. Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of *ex vivo* expanded human regulatory T cells. *Haematologica* 2016;101(1):91–100.
- [155] Bluestone JA, Liu W, Yabu JM, Laszik ZG, Putnam A, Belingheri M, et al. The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am J Transplant* 2008;8(10):2086–96.
- [156] Fourtounas C, Dousdampanis P, Sakellaraki P, Rodi M, Georgakopoulos T, Vlachojannis JG, et al. Different immunosuppressive combinations on T-cell regulation in renal transplant recipients. *Am J Nephrol* 2010;32(1):1–9.
- [157] Wang Z, Shi BY, Qian YY, Cai M, Wang Q. Short-term anti-CD25 monoclonal antibody administration down-regulated CD25 expression without eliminating the neogenetic functional regulatory T cells in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol* 2009;155(3):496–503.
- [158] Jones BS, Lamb LS, Goldman F, Stasi AD. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front Pharmacol* 2014;5:254.
- [159] Zheng Y, Gao N, Fu YL, Zhang BY, Li XL, Gupta P, et al. Generation of regulable EGFRvIII targeted chimeric antigen receptor T cells for adoptive cell therapy of glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;507(1–4):59–66.
- [160] Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Arndt C, Loff S, Ehninger A, et al. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood Cancer J* 2016;6(8):e458.
- [161] Raj D, Yang MH, Rodgers D, Hampton EN, Begum J, Mustafa A, et al. Switchable CAR-T cells mediate remission in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* 2019;68(6):1052–64.
- [162] Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89 (12):5547–51.
- [163] Peng Y, Zhang H, Xu M, Tan MW. A Tet-Off gene expression system for validation of antifungal drug targets in a murine invasive pulmonary aspergillosis model. *Sci Rep* 2018;8(1):443.
- [164] Kansagra A, Farnia S, Majhail N. Expanding access to chimeric antigen receptor T-cell therapies: challenges and opportunities. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2020;40:e27–34.
- [165] Tang Q, Lee K. Regulatory T-cell therapy for transplantation: how many cells do we need? *Curr Opin Organ Transplant* 2012;17(4):349–54.