

雷西莫特抗肿瘤纳米给药系统研究进展

李朋鑫^{1,2}, 王小欢², 官婷婷², 王向涛^{1,2*}

(1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 雷西莫特 (resiquimod, R848) 属于咪唑喹啉类小分子化合物, 是 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 7/8 的高效激动剂。R848 有很强的免疫激动活性, 可以激发多种免疫细胞, 调节天然免疫和适应性免疫, 是一种极具潜力的免疫佐剂。近年来, 研究发现 R848 自身对多种肿瘤具有直接的抗肿瘤疗效, 同时还可与化疗、光热治疗等联用表现出良好的协同作用, 因此备受广大研究者关注。然而 R848 没有肿瘤靶向性, 大剂量重复给药可产生全身炎症和自身免疫反应, 限制了其临床应用。而纳米给药系统可能是解决这些问题的有效途径, 包括脂质体、聚合物纳米粒、生物载体、包合物、有机金属骨架和无机纳米材料, 以及基于 R848 前药或 R848 衍生物的纳米给药系统。本文对 R848 的理化性质、免疫调控机制、纳米给药系统进行综述, 以期对 R848 的抗肿瘤研究发展及新药开发提供参考和支持。

关键词: 雷西莫特; 抗肿瘤; 纳米给药系统; Toll 样受体激动剂; 免疫疗法

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)03-0700-11

Research progress on nanoscale drug delivery system of resiquimod for tumor treatment

LI Peng-xin^{1,2}, WANG Xiao-huan², GONG Ting-ting², WANG Xiang-tao^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: Resiquimod (R848) belongs to the class of weak base organic compounds that are derivatives of imidazole quinoline and is a potent agonist of Toll-like receptor (TLR) 7/8. R848 can be considered an effective immune adjuvant as it has the ability to activate different immune cells and regulate innate and adaptive immunity. A number of researches done recently have reported R848 potent anti-tumor capacity, especially when combined with other cytotoxic therapies. Nonetheless, some hurdles remain with the clinical use of R848 such as its limited ability to reach the tumor and likelihood of inflammation and autoimmune responses which might result from repeated delivery of high dosages of the drug. Nanoscale drug delivery systems may overcome some of these challenges. Various nanoformulations, including liposomes, polymeric nanoparticles, biocarriers, inclusion compound, metal-organic frameworks and inorganic nanoparticles, as well as several R848 prodrugs or derivatives-based nanoparticles, have been incorporated into present R848 delivery platforms. This article reviews the physicochemical properties, immune regulatory mechanisms and nano drug delivery systems of R848, in order to provide reference and support for anti-tumor research and new drug development.

Key words: resiquimod; antitumor; nano drug delivery system; Toll-like receptor agonist; immunotherapy

收稿日期: 2024-07-24; 修回日期: 2024-12-06.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康创新工程 (2021-I2M-1-071).

*通讯作者 Tel: 86-10-5783326686, Fax: 86-10-57833020,

E-mail: xtaowang@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0706

据国际癌症研究机构发布的全球癌症统计^[1], 2022 年有近 2 000 万癌症新发病例, 970 万人死于癌症, 预计 2050 年癌症新发病例数达到 3 500 万。传统的肿瘤治疗方法手术切除、化疗、放疗等, 虽然能够缓解病情, 但存在肿瘤复发、化疗耐药、毒副作用等问题。免疫

治疗^[2,3]依靠免疫系统识别和清除癌细胞, 主要包括免疫检查点阻断 (immune checkpoint blockade, ICB)^[4-6]、细胞因子疗法^[7]、嵌合抗原受体 T 细胞疗法 (chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CAR-T)^[8,9]、免疫佐剂等疗法, 均取得不错的结果, 但是在临床应用上仍受到免疫应答效率低下、全身毒副作用等挑战的阻碍。肿瘤并非仅由癌细胞组成, 癌细胞与多种免疫细胞、肿瘤相关成纤维细胞、内层细胞和细胞外基质等相互作用, 共同组成一个支持肿瘤生长的环境, 即肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME)^[10]。TME 在很多时候表现为适应性免疫抵抗 (adaptive immune resistance, AIR)^[11], 即“冷肿瘤”^[12], 冷肿瘤患者对免疫治疗不响应, 无法从免疫治疗中获益。通过免疫治疗刺激自身免疫系统, 恢复 TME 中免疫细胞对癌细胞的免疫抑制作用, 可将“冷肿瘤”转化为“热肿瘤”, 促进免疫细胞的浸润, 抑制肿瘤的生长, 并且产生特异免疫记忆。

R848 作为一种免疫佐剂, 具有很强的刺激树突细胞 (dendritic cells, DCs) 活化、肿瘤相关巨噬细胞^[13] (tumor-associated macrophages, TAMs) 重极化的能力^[14], 通过活化免疫细胞, 逆转 TME, 从而表现出抗肿瘤作用。目前已有 26 项关于 R848 的研究进入或完成了临床试验, 大部分为外用凝胶剂治疗黑色素瘤、光化性角化病、疣、乙肝、T 细胞淋巴瘤等病毒性皮肤病变和癌症, 通过静脉注射^[15]、口服^[16]、局部外用凝胶^[17]等给药方式, 在显示疗效的同时, 也表现出不同程度的不良反应, 如发热、头痛、淋巴细胞减少、短期局部免疫缺陷等, 这些与 R848 作为 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 7/8 激动剂能够诱导促炎细胞因子、干扰素、趋化因子的分泌等作用吻合^[18-20]。

纳米给药系统有望改善 R848 的药代动力学差的现状, 延长其血液循环时间, 提高对肿瘤的靶向性, 控制其有效释放, 从而实现增效减毒。此外借助纳米给药系统, 还可以将 R848 与其他 TLR 受体激动剂、免疫检查点阻断剂联用, 或与化疗^[21-23]、放疗^[24]、光热^[25-27]、光动^[28, 29]、声动^[30-32]等疗法协同发挥抗癌作用。

1 理化性质

R848 的分子式为 $C_{17}H_{22}N_4O_2$, 相对分子质量为 314.38, 中文名称有雷西莫特、瑞喹莫德、雷西喹莫特, 化学结构如图 1 所示。R848 是一种白色或淡黄色粉末状固体化合物, 不易挥发, 没有明显气味, 熔点为 190~193 °C, 在水中溶解度为 0.312 mg·mL⁻¹^[33]。使用 5% DMSO + 40% PEG₄₀₀ + 5% Tween 80 + 50% 生理盐水, 可以将 R848 配置成溶解度大于 2.5 mg·mL⁻¹ 的澄清溶液。R848 易溶于有机溶剂, 在甲醇、DMF、DMSO 中的溶解度分别为 25、50 和 30 mg·mL⁻¹。R848 也表现出一

定的亲脂性, 油水分配系数 $\text{Log}P = 1.55$ 。R848 是弱碱性化合物, $\text{p}K_a = 14.63 \pm 0.29$ 。在体外 14.1 nmol·L⁻¹ (约 4.43×10^{-6} mg·mL⁻¹) 的 R848 可以将半数的 M2 型巨噬细胞重极化为 M1 型^[14]。R848 上可供化学修饰的基团有限, 其中吡啶环上的氨基是 R848 的活性中心, 对其修饰可能导致抗肿瘤活性降低或损失, 同时 R848 上叔醇羟基反应活性较低^[25, 28-30, 34-37], 所以对 R848 结构修饰的研究不多。

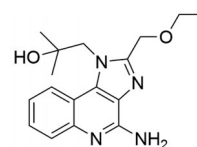


Figure 1 Chemical structure of resiquimod (R848)

2 抗肿瘤免疫反应机制

TLR 是一种模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRR), 是一类在哺乳动物免疫系统中广泛表达的跨膜蛋白, 多存在于免疫细胞中, 如巨噬细胞、DCs 等, 能够识别多种微生物分子, 如细菌、病毒、真菌等, 并激活宿主免疫系统对其进行攻击。在众多 TLR 中, TLR3/4/7/8/9 是常见的抗肿瘤免疫激动剂受体。TLR3/7/8/9 定位于内质网和溶酶体, 主要识别病原体核糖; TLR4 定位于细胞表面, 用于识别细胞外病原体成分。常见的激动剂有 TLR3 激动剂聚肌酸 (poly I:C)、TLR4 激动剂细菌脂多糖、TLR7/8 激动剂 R848 和 imiquimod 及 TLR9 激动剂 CpG 寡核苷酸等。

R848 属于一种 TLR7/8 激动剂。可通过多种途径激活机体免疫反应, 改善 TME。R848 被先天免疫细胞的 TLR 识别后通过 TLR/MyD 88 依赖性信号通路^[38] 激活 DCs, 上调 DCs 中的 TLR7/8 表达, 促进 M2 型巨噬细胞重极化为抑制肿瘤生长的 M1 型, 并诱导促炎细胞因子 (如 IL-6、IL-12 和 IFN α 、IFN- γ)^[39] 和趋化因子的分泌。R848 通过激活肿瘤坏死因子- α 、转录因子 NF- κ B 和 STAT 4 将髓源性抑制细胞转化为肿瘤杀伤性的抗原呈递细胞^[40]。IL-6、IL-12 和 IFN α 、IFN- γ 等多种促炎细胞因子的释放, 增加自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 和细胞毒性 T 细胞^[41] 的比例, 降低调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs)^[42] 的比例。也有研究发现 R848 的治疗效果独立于 CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞和 NK 细胞, 因为这些免疫细胞的选择性耗竭并没有消除治疗效果^[43], 关于 R848 免疫治疗的反应机制有待于进一步研究。

在 R848 与化疗等联用常表现出协同抗肿瘤作用。化疗、放疗或者光热等可使肿瘤细胞产生免疫原性细胞死亡 (immunogenic cell death, ICD), 垂死的肿瘤细

胞会释放各种可溶性危险信号,如钙网蛋白、CXC趋化因子配体10、高迁移率族蛋白B1等,这些危险信号可以招募并引发免疫细胞的成熟,继而吞噬并呈递肿瘤抗原以激活T细胞应答,激活T细胞被募集至肿瘤区域对肿瘤细胞进行杀伤并再次引发ICD。但是化疗、放疗或者光热产生的ICD效应并不强,与R848联用,借助R848的免疫激活效应,经常表现出高效持久的抗肿瘤反应。

3 纳米给药系统

纳米粒泛指至少在一个维度上小于100 nm的微小颗粒,包括纳米粒、纳米棒、纳米花等。纳米给药系统包括胶束、脂质体、聚合物纳米粒、生物来源纳米载体(如外泌体)和仿生纳米载体(如红细胞包被纳米粒)、有机金属骨架纳米粒、无机纳米材料(如介孔硅)等,借助其在粒径、表面电荷、外形、材料性质等方面的特性,及特定的表面修饰,用于向体内有效递送各种小分子药物、核酸等大分子治疗性物质输送。纳米技术的药物递送系统通过增强的渗透性和滞留(enhanced permeability and retention, EPR)效应和靶向配体的修饰,增强药物肿瘤分布和肿瘤深层渗透的能力,提高治疗效果。R848纳米给药系统表现出比游离R848更优的免疫抗肿瘤效果,并能与其他药物协同发挥抗肿瘤疗效。

3.1 R848脂质体纳米给药系统 脂质体包裹递送R848可改善其体内代谢特征,通过EPR效应、甘露糖修饰提高TAMs的摄取^[44]等提高脂质体在肿瘤中的聚集,表现出良好的治疗效果和不错的安全性,见表1^[45-49]。由于R848具有一定的水溶性,被动载药时,如薄膜分散法,包封率较低;利用R848是弱碱性化合物的性质,通过pH梯度法如硫酸铵梯度法主动装载,包封率较高。此外,通过细胞内吞作用制备膜仿生脂质体也可以增加脂质体的肿瘤靶向能力。

甘露糖受体CD206是一种主要分布于DCs和巨噬细胞表面的PRR,尤其是在M2型TAMs上呈高表达。甘露糖是CD206的天然配体。Lu等^[45]用二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-甘露糖(DSPE-PEG-Mannose)为靶向脂材,采用硫酸铵梯度法包封R848,制备了甘露糖修饰的R848脂质体,包封率达85.59%,48 h积累

释药46.73%,与普通的脂质体相比,RAW264.7对甘露糖修饰的脂质体摄取效率提高了3.8倍,肿瘤靶向性提高了3.3倍,在小鼠结肠癌细胞MC38移植瘤模型上以 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量静脉注射5次(隔1天给药1次),瘤重抑瘤率达95.83%,有两只小鼠肿瘤完全消失,产生了免疫记忆效应。

R848与CD47拮抗剂联用可以协同增强巨噬细胞对癌细胞的吞噬作用。癌细胞倾向于高表达CD47,一种“不要吃我”的信号,通过CD47/SIRP α 信号通路阻碍巨噬细胞的吞噬。Jia等^[46]通过硫酸铵梯度法制备了表面修饰甘露糖的R848脂质体,表面吸附对CD47具有高度拮抗作用的CV1蛋白,制得对TME和肿瘤细胞双重靶向作用的脂质体,R848包封率达90%,16 h体外释放<30%;与未修饰的脂质体相比,被M2型TAMs、小鼠结肠癌细胞MC38的摄取显著增加;在MC38模型治疗中瘤内注射2次(R848,每只11.25 μg ; CV1,每只25 μg ;隔2天给药1次)后,6只小鼠中有4只肿瘤完全治愈;静脉注射给药3次(R848,每只22.5 μg ; CV1,每只50 μg ;隔1天给药1次),肿瘤靶向能力比空白脂质体高2倍,抑瘤率为88.3%,而且未产生血液和器官毒性。

Zhang等^[47]通过硫酸铵梯度法制备了温度敏感型R848脂质体(R848-TSLs),包封率为50%,药载比(w/w)为0.09,在37 $^{\circ}\text{C}$ 的PBS中,药物30 min释放率为12%,在50%血清中,37 $^{\circ}\text{C}$ 时,5 min内释放率为60%,42 $^{\circ}\text{C}$ 时,5 min释放率为80%。与 $\alpha\text{PD-1}$ 联用,在乳腺癌Neu缺失(Neu deletion, NDL)小鼠模型治疗中(R848,每只10 μg ,瘤内注射,每周2次,共4次; $\alpha\text{PD-1}$,每只200 μg ,腹腔注射,每周1次,共3次),通过超声热疗使小鼠肿瘤部位局部升温控制药物释放,小鼠体重没有明显变化,肿瘤完全根除,超过50%的小鼠肿瘤没有复发,小鼠中位生存期大于100天,并产生了特异性免疫记忆。

肿瘤通过对巨噬细胞等免疫细胞的招募构建免疫抑制的TME,通过巨噬细胞构建仿生给药系统,可以提高药物肿瘤靶向性。Xu等^[48]通过薄膜分散法、巨噬细胞内吞作用制备了一种含有M1巨噬细胞膜的仿生脂质体递送R848和DM4(抑制细胞分裂的微管蛋白剂)。R848包封率为93.21%,载药量为0.084%。在小

Table 1 Nano-drug delivery systems of R848 liposome. EE: Encapsulation efficiency; MC38: Mouse colon cancer cell; NDL: Neu deletion; 4T1: Mouse breast cancer cell; IV: Intravenous injection; IT: Intratumoral injection

Method	EE%	Mouse model	Route of administration	Dosage	Antitumor efficacy	Ref.
Ammonium sulfate gradient method	85.59	MC38	IV	$2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	95.83%	[45]
	90	MC38	IT	11.25 μg per mouse	88.3%	[46]
	50	NDL	IT	10 μg per mouse	100%	[47]
A thin-film and rehydration method	93.21	4T1	IV	$52\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	90.99%	[48]
	72	4T1	IT	10 μg per mouse	-	[49]

鼠乳腺癌细胞 4T1 肺转移模型中, 药物表现出良好的肺部靶向, 抑瘤率为 90.99%。静脉注射 2 或 3 次 (R848, $52 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; DM4, $135 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 使 4T1、EMT-6、Renca 3 种肺转移肿瘤模型小鼠中位生存期分别延长 148.94%、248.28%、178.85%。此外也有研究使用通过薄膜分散法制备支原体膜仿生脂质体包载 R848 和鬼臼毒素, 表现出良好的肿瘤靶向和显著的肿瘤抑制^[50]。

3.2 R848 聚合物纳米给药系统 常见的聚合物包括两性亲性聚合物、天然多糖等, 通过溶剂法、乳化法等方法, 利用静电作用、 π - π 堆叠等将 R848 包裹于其中, 具有一定的缓释、靶向作用。进一步通过对聚合物进行特异修饰得到响应型聚合物 (如 pH 响应型) 或靶向性聚合物 (如甘露糖受体靶向^[51,52]), 来增加 R848 肿瘤靶向性, 提高其抗肿瘤活性, 见表 2^[51-56]。但是由于 R848 本身具有一定的水溶性, 通过沉淀法等自下而上 (bottom-up) 法制备的纳米粒常表现出包封率低的问题。

TAMs 中表达的 SIRP α 与巨噬细胞活化和吞噬作用负相关, 导致免疫监视逃逸。Li 等^[53]通过溶剂交换法制备了共载 R848 和 2', 3'-cyclic GMP-AMP (cGAMP) 的甘露糖修饰的 pH 响应性纳米平台, R848 包封率、载药量分别为 71.8% 和 7.39%。cGAMP 介导的干扰素基因刺激因子的激活能够显著下调 TAMs 中 SIRP α 的表达, 通过与 CD 47 抗体、PD-L1 抗体联合治疗, 三重阻断信号通路。在 B16F10 肿瘤模型中静脉注射 3 次 (R848, 每只 $10 \mu\text{g}$; cGAMP, 每只 $10 \mu\text{g}$; 每隔 2 天给药 1 次; aCD47, 每只 $120 \mu\text{g}$; aPD-L1, 每只 $100 \mu\text{g}$; 给药第 2 天静脉注射抗体), 显著抑制肿瘤生长, 50 天生存率为 71.4%, 并具有有效的抗肿瘤免疫应答。

Duwa 等^[54]通过溶剂蒸发法制备了载有 R848 的 PLGA NPs, 表面修饰靶向 T 细胞的抗 CD3 抗体和靶向癌细胞 PD-L1 的 anti-PD-L1 抗体。R848 包封率为 46.33%, 载药量为 4.85%, 提高了人卵巢癌细胞 SK-OV3、黑色素瘤细胞 B16F10 的摄取, 瘤内注射后 72 h 仍表现出良好的滞留能力。以 $2 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ R848 的剂量对 B16F10 肿瘤模型上瘤内注射 5 次 (隔 1 天给药 1 次)

显著抑制了肿瘤的生长, 抑瘤率约为 51.28%。卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 是一种鸡源性蛋白, 对小鼠是一种外来抗原, 而表达 OVA 的肿瘤细胞, 更容易被判断为非自身细胞, 刺激免疫系统。为了增加药物对 M2 型 TAMs 的靶向性, Zhang 等^[55]用水包油纳米乳化法制备了包载 R848 的 PLGA 纳米粒, 外层包裹 B16-OVA 癌细胞膜, 用 M2 靶向肽 M2pep 修饰, 以 $0.5 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量给 B16-OVA 黑色素瘤小鼠静脉注射 5 次 (隔 2 天给药 1 次), 抑瘤率为 82%, 体重呈略微上升趋势, 并显著延长中位生存期。

Jin 等^[56]分别通过纳米沉淀法和单乳液法制备了聚合物 mPEG-b-PHEP [poly (ethylene glycol)-block-polyphosphoester] 包载铁磁纳米立方体和 R848 的纳米粒 Tu-NP_{FN} 和 Ln-NP_{R848}。Tu-NP_{FN} 载药量为 4.11%, 在交变磁场下表现出良好的磁热疗能力, 产生大量抗原; Ln-NP_{R848} 包封率为 60.2%, 载药量为 5.68%, 可以捕获一部分产生的抗原, 刺激免疫反应激活并向淋巴结靶向递送, 显著促进了 DCs 的摄取和成熟。在对 4T1 乳腺癌肺转移小鼠瘤内注射 1 次 (Tu-NP_{FN} = $116.55 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, Ln-NP_{R848} = $33.22 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 联合静脉注射抗 CTLA4 抗体 3 次 (aCTLA-4, $5.0 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 隔 3 天给药 1 次) 治疗, 7 只小鼠中有 3 只小鼠转移病灶消失。

声动力治疗 (sonodynamic treatment, SDT) 指通过将超声与声敏剂联合使用, 可以使肿瘤组织产生活性氧 (ROS), 与 R848 联用可以诱导更强的免疫抗肿瘤反应。Chen 等^[57]利用薄膜水化超声技术制备了利用 DSPE、DSPE-PEG₂₀₀₀ 包载声敏剂 ICG、R848 和八氟丙烷 (C₃F₈) 的纳米气泡 (nanobubbles, NBs), 即 ICG@C3F8-R848 NBs, 用于纳米超声成像。C₃F₈ 作为一种高相对分子质量和低溶解度的气体, 在 NBs 中充当气体核心成分, 保持微泡的稳定性, 延长血液循环时间。NBs 中的 ICG 在超声波的刺激下能有效地产生单线态氧, 以杀死肿瘤细胞。静脉给药后, NBs 与 SDT 结合后表现出极强的肿瘤靶向性和良好的抗肿瘤疗效, 小鼠体重没有明显降低。

3.3 R848 生物载体纳米给药系统 常用的生物载体

Table 2 Nano-drug delivery systems of R848 polymeric nanoparticles. CMT167: Murine lung cancer cell; B16F10: Mouse skin melanoma cells; B16-OVA: B16 cells engineered to express the exogenous protein ovalbumin; IP: Intraperitoneal injection

Method	EE%	Mouse model	Route of administration	Dosage	Antitumor efficacy	Ref.
Solvent displacement	10-20	CMT167	IV	$25 \mu\text{g}$ per mouse	-	[51]
Solvent-exchange	-	4T1	IP	$0.125 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	-	[52]
		B16F10	IV	$0.5 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	-	[53]
Emulsion-solvent evaporation technique	46.33	B16F10	IT	$2 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	51.28%	[54]
O/W single-emulsion	-	B16-OVA	IV	$0.5 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	82%	[55]
Single emulsion	60.2	4T1	IT	Ln-NP _{R848} = $33.22 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	100%	[56]

可以分为全细胞和细胞衍生物(即基于细胞膜和各种细胞分泌的外泌体、微泡、凋亡小体等细胞外囊泡)。它们作为天然载体为药物靶向治疗带来了新的方向。生物载体保留了本体细胞的生理功能和特性,而不诱发机体免疫排斥,在R848递送中表现出一定的潜力。但是为了保持细胞载体的活性,R848载药的剂量受到一定限制。同时生物载体在提取、纯化、载药方面具有一定难度,并且成本较高。总体上生物载体纳米给药系统通过细胞固有的摄取能力或药物的被动扩散将药物装载到细胞内部,或通过吸附或缀合将药物包载到细胞表面,普遍取得了良好的肿瘤靶向和喜人的抗肿瘤效果,见表3^[32,57-60],但是临床研究时安全性方面应慎重考虑。

Zhang等^[57]通过基因修饰获得肝癌抗原甲胎蛋白过表达的巨噬细胞,经紫外照射1 h后,与R848孵育12 h,弃去细胞和细胞碎片,收集负载R848的工程微粒(engineered microparticles, MPs),进一步与DSPE-PEG-M2pep孵育进行表面修饰,R848载药量约3.5%。在Hepa1-6肝癌细胞小鼠模型中静脉注射给药6次(0.5 mg·kg⁻¹ R848,隔2天给药1次),抑瘤率92.3%,中位生存期延长至126.5天,体重没有明显变化。与PDL-1联用(5 mg·kg⁻¹ PDL-1,腹腔注射4次,隔4天给药1次),抑瘤率提高至95.9%,50%的小鼠肿瘤完全消失,并产生了抗原特异性免疫记忆。

在癌症手术后的伤口愈合过程中,血小板、中性粒细胞和巨噬细胞在伤口部位积聚,并诱导重要的病理生理过程。Bahmani等^[58]将血小板膜包被在R848的PLA纳米粒上,载药量为3.4%,肿瘤内给药明显增强了局部免疫激活,在MC38小鼠结肠癌模型上以15 μg/只的剂量瘤内给药3次(隔1天给药1次),100%的肿瘤完全根除,并产生了特异免疫记忆。在4T1乳腺癌小鼠模型上给药5次显著延缓了肿瘤生长并抑制肺转移,延长无进展生存期至23天,而阴性组为9天。Sheng等^[61]制备了血小板-中性粒细胞混合膜,包裹R848 NPs后表面修饰IR820形成光热免疫联合纳米递送系

统。4T1-Luc小鼠双侧乳腺腺癌肿瘤模型上,与CD47阻断剂联用静脉注射4次(每只40 μg R848和75 μg aCD47,每周2次),术后小鼠复发率降为25%,没有发现肺转移,存活率提高至75%。

Wang等^[32]通过外泌体包载声敏剂二氢卟吩(chlorin e6, Ce6)和R848,构建了STD与免疫治疗联合治疗的纳米给药系统。R848、Ce6载药量分别为58.56%和70.08%。借助于外泌体的稳定性、生物相容性等特性,与静脉给药相比,药物通过瘤内注射后,表现出更强的肿瘤靶向性。在小鼠前列腺癌细胞RM-1肿瘤模型治疗中,将每公斤2×10⁹个颗粒的外泌体通过瘤内注射给药0.2 mL共3次(R848, 2.5 μg·μL⁻¹; Ce6, 5 μg·μL⁻¹,隔1天给药1次),给药后麻醉小鼠进行STD治疗,肿瘤生长受到明显抑制,小鼠体重没有明显变化。

细菌治疗是一种新颖的抗肿瘤治疗方法,由于肿瘤的缺氧微环境,细菌可以靶向肿瘤组织,此外细菌还可以抑制肿瘤血管生成、抑制肿瘤转移、诱发巨噬细胞极化刺激自身免疫等。Wei等^[59]首先通过溶剂蒸发法制备了R848@PLGA NPs,然后通过静电相互作用将R848@PLGA NPs吸附于非致病性的大肠杆菌MG1655表面,制备了大肠杆菌负载R848的纳米递送系统(Ec-R848)。在4T1乳腺癌小鼠模型上,联合化疗[R848, 2 mg·kg⁻¹,静脉注射,隔2天给药1次,共3次;多柔比星(doxorubicin, DOX), 5 mg·kg⁻¹,瘤内注射1次],抑瘤率为78.37%,药物表现出良好的肿瘤积累,肿瘤菌落数是肝脏的17倍以上,小鼠体重没有明显降低。

面对手术治疗后肿瘤复发和转移的问题, Ma等^[60]通过处理酵母细胞得到酵母细胞胶囊,内部填充介孔二氧化硅纳米颗粒来构建仿生酵母载体(bionic yeast carriers, BYCs),负载抗原和R848。BYCs可以模拟酵母感染途径,促进DC大量识别细胞抗原/R848@BYC,刺激DC生长并成熟。在4T1-Luc乳腺癌小鼠肿瘤模型上,通过手术与给药联合治疗(R848, 1 mg·mL⁻¹, 60 μL,背部皮下注射,隔3天给药1次,共3次),57%的小鼠完全治愈,体重没有明显下降,并产

Table 3 Nano-drug delivery systems of R848 biocarriers. DLC: Drug loading content; MPs: Engineered microparticles; GM1655: Nonpathogenic bacterium *Escherichia coli*; YCs: Yeast carriers; Hepa1-6: Mouse Hepa cancer cell; RM-1: Mouse prostate cancer cell; 4T1-Luc: Luciferin-marked 4T1; SC: Subcutaneous injection

Biocarrier	DLC/%	EE/%	Mouse model	Route of administration	Dosage	Antitumor efficacy	Ref.
MPs	3.5	-	Hepa1-6	IV	0.5 mg·kg ⁻¹	92.3%	[57]
Platelet membrane	3.4	-	MC38	IT	15 μg per mouse	100%	[58]
Exosomes	58.56	-	RM-1	IT	2.5 μg·μL ⁻¹ 0.2 mL	-	[32]
MG1655	5.91 ± 0.32	62.92 ± 3.72	4T1	IV	2 mg·kg ⁻¹	78.37%	[59]
YCs	-	-	4T1-Luc	SC	1 mg·mL ⁻¹ 60 μL	57% recover	[60]

生了特异免疫记忆。

3.4 R848 包合物纳米给药系统 包合物 (inclusion compound) 是指一种分子部分或全部被包藏于另一种分子的空穴结构内形成的络合物。包合物包括主分子与客分子组成, 主分子是包合材料具有较大的空穴结构, 客分子被包合在主分子的空穴中, 两者通过范德华力, 形成稳定的包合物。具有增加难溶药物稳定性和溶解度, 较少药物的不良反应等功能。常见的包合材料有环糊精 (cyclodextrin, CD) 及其衍生物, 如 β -环糊精具有生物相容性好, 表面易于修饰等优点。研究发现, β -环糊精具有良好的巨噬细胞亲和力^[14], 通过其制备的纳米制剂表现出靶向富含巨噬细胞组织的能力。

为改善 R848 对 TAMs 的靶向作用, Rodell 等^[14]将琥珀酰- β -环糊精与赖氨酸 (*L*-lysine) 在水中通过酰胺缩合反应形成环糊精纳米粒 (CDNPs), 通过主客体相互作用包载 R848, 载药量为 10.39%。在 MC38 小鼠结肠癌模型上静脉给药 4 次 ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 隔 2 天给药 1 次), 由于巨噬细胞对 CDNPs 的主动摄取, 药物在肿瘤和淋巴结中高度累积, 肿瘤生长受到明显抑制, 生存期显著延长, 并产生了特异免疫记忆。Turco 等^[62]使用同样的方法制备了 β -环糊精包载 R848 的纳米粒 CDNPs。静脉注射于 GI261 胶质瘤小鼠模型后, 药物主要分布于髓细胞来源的单核细胞 ($25.7 \pm 2.9\%$)、脾巨噬细胞 ($13.2 \pm 0.7\%$), 给药 3 次 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 隔 2 天给药 1 次) 后, 43% 的小鼠肿瘤消退, 延长中位生存期至 65 天。Lugani 等^[63]通过相似的方法用 β -环糊精包载 R848 和 LCL-161 (细胞凋亡抑制蛋白抑制剂), 制备了纳米粒。给药后药物可以进入 TME, 在肿瘤部位分布是正常脑组织的 68 倍, 在淋巴中也高浓度积累, 通过 NF- κ B 通路诱导 IL-12 的分泌, 激活髓细胞。在 CT2A 胶质母细胞瘤小鼠模型上静脉注射 3 次 (R848, 每只 $200 \mu\text{g}$; LCL-161, 每只 $500 \mu\text{g}$; 隔 2 天给药 1 次), 抑瘤率为 92.96%, 治疗的小鼠体重没有明显下降, 中位生存期显著延长。

表没食子儿茶素没食子酸酯 (green tea catechin, EGCG) 可以减少癌细胞 PDL-1 的表达, 有助于恢复巨噬细胞、细胞毒性 T 细胞等对癌细胞的杀伤作用, 从而表现出与 R848 的协同作用。Song 等^[64]基于修饰后的羟丙基- β -环糊精通过主客体相互作用分别包载 R848 与 EGCG 后进一步通过化学交联作用制备了 TME 响应型纳米凝胶。EGCG 与 R848 包封率分别为 74.07% 和 90.56%, 具有 pH 响应性释药特性。在 B16F10 黑色素瘤小鼠模型中静脉给药 4 次 ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ R848, $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ EGCG, 隔 2 天给药 1 次), 表现出一定的肿瘤靶向性, 抑瘤率为 79.01%, 与 OX40 激动剂 alphaOX40 联用

($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 腹腔注射, 给药 4 次, 隔 2 天给药 1 次) 表现出 91.56% 的肿瘤抑制, 中位生存期延长至 42 天。

3.5 R848 金属有机骨架纳米给药系统 金属有机骨架 (metal-organic frameworks, MOF) 是一类由金属离子或离子簇作为节点和有机分子作为配体构成的多孔有机-无机配位材料。与传统材料相比, MOF 具有易合成、形态可控、可定制粒径、成分多样化、孔隙率高且可调控、高比表面积、易功能化修饰和良好的生物相容性等诸多优势。

细胞焦亡 (pyroptosis) 是 ICD 的一种炎症形式, 由 gasdermin 蛋白家族调节以响应各种刺激。研究表明, 过渡金属离子 (如 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cu^{2+}) 可以通过 Fenton 或 Fenton 样反应与酸性 TME 中的 H_2O_2 反应, 产生 ROS 触发细胞焦亡。通过纳米给药系统可以实现 MOF 与 R848 协同抗肿瘤。Feng 等^[65]设计了一种负载金属离子和 R848 的酸响应性 Fe/Mn 双金属有机骨架纳米系统 (TheFeMn@R@H) 用于将细胞焦亡和免疫疗法相结合。R848 被封装在 MOF 内部, 外层包裹透明质酸 (hyaluronic acid, HA), R848 载药量为 15.7%。在酸性 TME 中 TheFeMn@R@H 将被触发分解并迅速释放 Fe^{3+} 和 Mn^{2+} 离子。在 4T1 单侧乳腺癌小鼠模型中静脉注射 3 次 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Fe, $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ R848, 隔 1 天给药 1 次), 抑瘤率为 82.2%, 体重没有明显变化。通过纳米给药系统可以实现 MOF + R848 + 化疗协同抗肿瘤。Guo 等^[66]通过人血清白蛋白、单宁酸 (tannic acid, TA) 用于蜂毒肽 (melittin, Mel) 和 R848 的体内递送和可控释放, TA 与 Fe^{3+} 相互作用增加 NPs 的稳定性。在双侧小鼠乳腺癌细胞 4T1 模型上瘤内注射 3 次 (Mel, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; R848, $1.25 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$; 隔 2 天给药 1 次), 显著抑制了原发性肿瘤和继发性肿瘤生长。

3.6 R848 无机纳米给药系统 无机纳米给药系统具有尺寸小、比表面积大等优点, 与其他纳米给药系统相比, 表现出更好的化学稳定性及独特的物理性质。如广泛运用的介孔二氧化硅纳米颗粒 (mesoporous silica nanoparticles, MSNs) 具有良好的生物相容性、孔隙率可调节、高负载能力、低成本和可调节表面特性等优点。

传统 MSNs 因孔径小和生物降解缓慢, 而在递送多肽和蛋白质方面受限制。Huang 等^[67]基于活性氧反应性 MSNs, 将 HMGN1 (TLR4 激动剂) 和 R848 共载到 MSNs 的大孔中, α PD-L1 通过二硫键共轭到 MSN 的表面, 制备了纳米递送系统, 其可被 TME 中高水平的 ROS 快速裂解。1 mg MSNs 中 R848、HMGN1、 α PD-L1 的同时负载量分别为 0.43 ± 0.06 、 0.28 ± 0.07 和 $0.16 \pm 0.04 \text{ mg}$ 。在小鼠结肠癌细胞 CT26 肿瘤模型

治疗中静脉注射 5 次后 ($6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ MSNs, 隔 2 天给药 1 次), 抑瘤率为 100%, 并产生了特异性免疫记忆, 小鼠体重没有明显降低。

树枝状大孔介孔二氧化硅纳米颗粒 (dendritic large-pore mesoporous silica nanoparticles, DLMSNs) 在体内的降解速度更快, 且孔径比 MSNs 大, Cheng 等^[26] 基于 4T1 癌细胞膜包裹的 DLMSNs 共载 CuS NPs、AUNP-12 (PD-1/PDL-1 通路拮抗剂) 和 R848, 构建了智能仿生纳米递送系统。R848 包封率、载药量分别为 10.0% 和 10.2%。通过光热消融破坏原发性肿瘤, 并通过免疫重塑防止肿瘤复发和远处转移, 在酸性的 TME 中, 释放出 AUNP-12, 有助于恢复 T 细胞对肿瘤细胞的识别杀伤作用。在双侧小鼠乳腺癌 4T1 原位肿瘤模型中静脉注射 2 次 (R848, $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; AUNP-12, $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; DLMSN, $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 隔 2 天给药一次, 给药 24 h 后进行激光照射), 小鼠原发性肿瘤完全消失, 没有复发, 中位生存期延长至 47.0 天, 表明具有极佳的治疗效果和安全性。

为改善缺氧性 TME 中免疫治疗的有效性, Wen 等^[68] 基于巨噬细胞膜包被的 MSNs 负载过氧化氢酶 (catalase)、DOX 和 R848, 构建了多功能纳米平台。R848 载药量、包封率分别为 (1.6 ± 0.14)%、(56.9 ± 4.27)%。Catalase 可以特异性地将肿瘤部位高浓度的 H_2O_2 分解为原位氧, 阻断 Treg 细胞的 A2AR 受体与腺苷的结合, 下调 Treg 细胞的免疫抑制功能, 改善免疫抑制性 TME。DOX 和 R848 可以分别诱导 ICD 和增强 DCs 的活化。在小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 肿瘤模型和小鼠结肠癌细胞 CT26.WT 模型中静脉给药 3 次 (DOX, $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; R848, $3.67 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; catalase, $4.76 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 隔 1 天给药 1 次), 抑瘤率为 73.58%, 体重几乎没有变化, 极大地延长了小鼠的生存期。

可生物降解的半导体空心硫化铜 (hollow copper sulfide, HCuS) 是一种独特的光热材料, 与金相比, 具有更好的光稳定性, 毒性更小且成本较低。Gowsalya 等^[69] 基于 HCuS 的多孔、空心的结构, 加载 ICG, 然后通过化学偶联将 HA 包裹 HCuS, 最后加载 R848, 形成纳米复合材料 NC。HA 的存在增强了 CD44 介导的细胞摄取, HCuS 和 ICG 表现出极大的光热转换效率, 在 NIR 照射下有效地诱导肿瘤细胞 ICD。R848 载药量、包封率分别为 18.4%、74.2%。在小鼠乳腺癌 4T1 模型治疗中静脉注射 3 次 ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ NC; 隔 2 天给药 1 次), 表现出 100% 的肿瘤抑制, 且小鼠体重没有明显降低。

3.7 R848 前药/R848 衍生物纳米给药系统 为了改善 R848 的肿瘤靶向性, 减小其对组织的毒副作用, 研

究人员尝试了通过对 R848 的氨基或羟基进行化学修饰, 主要分为两类: 一类为与 R848 氨基反应的前药, 通过对其氨基进行修饰使 R848 的活性消失, 于 TME 特定的环境中 (如缺氧、酶、微酸性 pH) 响应, 恢复其免疫活性, 如 R848-BPDs^[70]、R848- N_3 ^[71]; 另一类为与 R848 羟基反应的衍生物, 通过修饰增加 R848 的脂溶性, 或将 R848 偶联到聚合物^[72,73]上, 延长其血液循环时间, 并保留其免疫活性, 如 R848-Toco^[35]、R848- C_{16} ^[74]等。

精确控制 R848 的释放是增加其疗效, 减小其毒副作用的重要因素。为研究 R848 系统给药后的药物动力学行为, Bhagchandani 等^[70] 通过将 R848 的氨基与 PEG 链共价连接形成 R848-BPDs 聚合物“前药库”, 以避免 R848 暴露于表面。不同的 R848-BPDs 表现出 4~40 天不同的 R848 体外释放半衰期。通过不同缓释程度, 提高了 R848 的最大耐受剂量。在小鼠结肠癌 MC38、CT26 模型治疗中, 静脉注射给药 3 次 (R848, $7.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 隔 2 天给药 1 次), 相比于游离的 R848, R848-BPDs 表现出更显著的肿瘤抑制和良好的安全性。

为降低 R848 的系统毒性, 增强其对肿瘤组织的靶向性, Sun 等^[71] 开发了 R848 的叠氮化物掩蔽的前药 R848- N_3 , 其在缺氧肿瘤中被选择性激活为 R848。与相同剂量的 R848 相比, R848- N_3 显著降低了治疗小鼠的促炎细胞因子。与康普瑞汀 A4 纳米粒 (combretastatin A4 nanoparticles, CA4 NPs) 联用, 可提高肿瘤缺氧水平来增强 R848- N_3 的肿瘤靶向性, 静脉注射给药后 1 h 比瘤内注射 R848 表现出更高的肿瘤蓄积。并且发现, 相比于 R848, 通过静脉注射 $10\sim 80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 R848- N_3 溶液, 小鼠耐受性很好, 没有体重下降或死亡, 血清中细胞因子水平明显降低。为了增加疗效, 使用马来酰亚胺 (maleimide, MAL) 基团修饰两性亲性聚合物 mPEG_{5k}-PDLLA_{5k} 来增加纳米制剂的捕获抗原和载药能力, 通过薄膜水化法包载 R848- N_3 制备了 MAL-NPs。由 MAL NPs + 放疗 + aPD1 (R848- N_3 , $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 静脉注射; aPD1, 每只 100 μg , 腹腔注射; 隔 2 天给药 1 次, 共 3 次) 可诱导的全身免疫应答和长期免疫记忆, 显著抑制了小鼠结肠癌细胞 CT26 双侧肿瘤模型原发性肿瘤生长 (抑瘤率为 96.01%) 和继发性肿瘤生长 (抑瘤率为 78.84%), 体重没有明显下降^[75]。

Wang 等^[30] 通过将 R848 与超小尺寸的晶状纳米结构 PAMAM (G5) 偶联, 制备了缺氧敏感型前药, 同时将 G5 与声敏剂 CHC (chenghai chlorin) 偶联, 制备了 G5-CHC-R NPs。缺氧敏感接头可被在肿瘤微环境中高表达的硝基还原酶酶解断开, 释放 R848。通过全身超声治疗刺激 CHC 杀死癌细胞, 表现出良好的重现

性、高穿透性和微弱的组织损伤。通过静脉注射 G5-CHC-R NPs 联合低强度超声治疗小鼠胰腺癌细胞 Pan02 原位肿瘤模型和 4T1 肿瘤模型后, 肿瘤生长发生显著抑制和明显的颜色变化, 表现出较好的肿瘤靶向, 并且没有观察到小鼠体重减轻和明显的组织损伤。

为提高 R848 的包封率, 控制其释放但不影响其活性, Lu 等^[35]通过酯化反应将 R848 的羟基与 α -tocopherol 偶联制备了前药 R848-Toco, 增加了其亲脂性, 然后与 α -tocopherol 修饰的 HA 制备聚合物纳米混悬剂, 包封率为 $(94.2 \pm 8.9)\%$, 延长了 R848 释放动力学, 显著抑制了肿瘤生长。Wang 等^[36]将棕榈酸通过酯化反应与 R848 的羟基偶联合成了 C_{16} -R848。Islam 等^[76]通过自组装制备了一种由 Lipid-PEG 包载编码 OVA 的 mRNA 和 C_{16} -R848 的脂质纳米颗粒, 使用 mRNA 疗法与 R848 联合刺激先天免疫。 C_{16} -R848 的包封率约 20%, 同时表现出较高的 mRNA 转染效率 ($> 95\%$)。体内预防性接种后 (每只鼠 30 μg OVA mRNA 和 5.6 μg R848), 在小鼠 T 细胞淋巴瘤上肿瘤生长较对照减少 84%, 前列腺癌模型上肿瘤生长较对照减少 60%。Yan 等^[74]通过酯化反应将 R848 的羟基与带羧基的阳离子脂质偶联合成 RAL, 制备了脂质纳米颗粒 (RAL-LNPs), 用于递送 CD40 mRNA (CD40 激动剂), 在 B16-F10 肿瘤模型治疗中瘤内注射 6 次 (隔天给药), 与 anti-CD40 Abs 联合治疗后, 70% 的小鼠得以痊愈, 并产生了免疫记忆。

光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 与 R848 联用也表现出良好的治疗效果。Wang 等^[28]通过自组装将 R848 修饰的酸响应型聚合物和光敏剂 PPa (pyropheophorbide a) 修饰的聚合物制备了前药纳米给药系统。在 671 nm 照射下, PPa 产生 ROS, 引发肿瘤细胞 ICD 的同时, 促进 R848 的释放。在小鼠结肠癌 CT26 模型中静脉注射治疗 3 次 (R848, 2.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; PPa, 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 隔 1 天给药 1 次), 与腹腔注射 $\alpha\text{PD-L1}$ 联合治疗 (2.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 在激光照射 24 h 后), 显著抑制肿瘤生长, 极大延长生存期, 并且产生了特异性免疫记忆。Qu 等^[29]通过酯化反应将光敏剂 PPa 与 R848 偶联合成前药 PA-R848, 通过自组装制备脂酶响应型纳米给药系统。在小鼠鳞状癌细胞 SCC-7 肿瘤模型中静脉注射前药纳米粒 2 次 (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 每周 1 次), 与激光照射、抗 PD-1 联合治疗 (腹腔注射, 每只 200 μg), 完全抑制原发性肿瘤, 显著抑制远端肿瘤的生长, 小鼠体重没有明显降低。

4 展望与挑战

综上所述, 近年来 R848 抗肿瘤纳米给药系统主要集中于脂质体、聚合物和生物载体, 其他的剂型研究较少。通过纳米给药系统可以延长 R848 血液循环时间、

提高肿瘤部位靶向作用, 减小全身毒副作用。此外, R848 的单药治疗研究较少, 多与其他药物或其他疗法联合使用, 通过协同作用表现出良好的抗肿瘤效果甚至痊愈, 并产生了特异性免疫记忆。关于 R848 的纳米制剂近年发展迅猛, 总体上具有良好抗肿瘤效果, 为 R848 进一步抗肿瘤纳米制剂的研究奠定了基础。

但是, R848 抗肿瘤纳米给药系统仍面临一些问题。首先, 一些纳米制剂具体的制备方法较复杂, 如为了增加肿瘤靶向性而进行的特异性修饰; 一些生物载体成本较高等, 难以进行大规模工业化生产; 由于 R848 具有一定的水溶性, 导致部分纳米制剂包封率较低; 多数纳米制剂制备时为提高包封率大量使用载体, 这可能存在载体的相关毒性; 最后, 目前关于 R848 的抗肿瘤纳米给药系统研究仍处于实验室阶段, 距离临床应用仍有一段距离。

未来 R848 抗肿瘤纳米给药系统, 应该多关注通过简单的方法, 利用 R848 自身的性质 (如亲脂性、弱碱性、一定的自组装能力等) 制备得到高载药量的 R848 纳米粒; 利用肿瘤微环境中微酸性、缺氧等特异条件诱导纳米制剂降解和药物释放; 利用超声、近红外、磁场等外源条件, 从时间或空间上主动控制纳米制剂的分布和释放, 此外可以设计将 R848 运输到免疫细胞内细胞器 TLR 受体上, 如通过甘露糖修饰增加纳米制剂对 M2 型 TAMs 的靶向, 持续高效刺激免疫细胞, 有助于实现高效运输 R848, 提高其抗肿瘤疗效。在 R848 纳米给药系统免疫治疗实体肿瘤的研究中, 未来可能会有更多的研究方向, 以提供更加有效的治疗方案, 从而改善患者的临床疗效。

作者贡献: 李朋鑫负责查阅文献和论文撰写; 王小欢和宫婷婷负责文献收集和语言润色; 王向涛负责论文整体设计及修改指导。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74: 229-263.
- [2] McNutt M. Cancer immunotherapy [J]. *Science*, 2013, 342: 1417.
- [3] Gravitz L. Cancer immunotherapy [J]. *Nature*, 2013, 504: S1.
- [4] Melero I, Castanon E, Alvarez M, et al. Intratumoural administration and tumour tissue targeting of cancer immunotherapies [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18: 558-576.
- [5] Chen Q, Chen GJ, Chen JW, et al. Bioresponsive protein complex of aPD1 and aCD47 antibodies for enhanced immunotherapy [J].

- Nano Lett, 2019, 19: 4879-4889.
- [6] Jiang P, Gu SQ, Pan D, et al. Signatures of T cell dysfunction and exclusion predict cancer immunotherapy response [J]. Nat Med, 2018, 24: 1550-1558.
- [7] Derynck R, Turley SJ, Akhurst RJ. TGFbeta biology in cancer progression and immunotherapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2021, 18: 9-34.
- [8] Ma S, Li XC, Wang XY, et al. Current progress in CAR-T cell therapy for solid tumors [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15: 2548-2560.
- [9] Daei Sorkhabi A, Mohamed Khosroshahi L, Sarkesh A, et al. The current landscape of CAR T-cell therapy for solid tumors: mechanisms, research progress, challenges, and counterstrategies [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1113882.
- [10] De Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth [J]. Cancer Cell, 2023, 41: 374-403.
- [11] Kim TK, Vandsemb EN, Herbst RS, et al. Adaptive immune resistance at the tumour site: mechanisms and therapeutic opportunities [J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21: 529-540.
- [12] Balta E, Wabnitz GH, Samstag Y. Hijacked immune cells in the tumor microenvironment: molecular mechanisms of immunosuppression and cues to improve T cell-based immunotherapy of solid tumors [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 5736.
- [13] Gao J, Liang YZ, Wang L. Shaping polarization of tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy [J]. Front Immunol, 2022, 13: 888713.
- [14] Rodell CB, Arlauckas SP, Cuccarese MF, et al. TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy [J]. Nat Biomed Eng, 2018, 2: 578-588.
- [15] Perkins H, Khodai T, Mechiche H, et al. Therapy with TLR7 agonists induces lymphopenia: correlating pharmacology to mechanism in a mouse model [J]. J Clin Immunol, 2012, 32: 1082-1092.
- [16] Meyer T, Surber C, French LE, et al. Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2013, 22: 149-159.
- [17] Frega G, Wu Q, Le Naour J, et al. Trial watch: experimental TLR7/TLR8 agonists for oncological indications [J]. Oncoimmunology, 2020, 9: 1796002.
- [18] Jurk M, Heil F, Vollmer J, et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848 [J]. Nat Immunol, 2002, 3: 499.
- [19] Smits EL, Ponsaerts P, Berneman ZN, et al. The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy [J]. Oncologist, 2008, 13: 859-875.
- [20] Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity [J]. Immunol Rev, 2007, 220: 251-269.
- [21] Si XH, Ji GF, Ma S, et al. Comprehensive evaluation of biopolymer immune implants for peritoneal metastasis carcinoma therapy [J]. J Control Release, 2023, 353: 289-302.
- [22] Yan P, Luo Y, Li XY, et al. A redox-responsive nanovaccine combined with A2A receptor antagonist for cancer immunotherapy [J]. Adv Healthc Mater, 2021, 10: e2101222.
- [23] Ji GF, Zhang Y, Si XH, et al. Biopolymer immune implants' sequential activation of innate and adaptive immunity for colorectal cancer postoperative immunotherapy [J]. Adv Mater, 2021, 33: e2004559.
- [24] Wu YX, Qin JZ, Gu Y, et al. Radioresponsive delivery of toll-like receptor 7/8 agonist for tumor radioimmunotherapy enabled by core-cross-linked diselenide nanoparticles [J]. ACS Nano, 2024, 18: 2800-2814.
- [25] Zhong WB, Yuan W, Chen Y, et al. Activable nano-immunomodulator assembled from pi-extended naphthalenediimide for precision photothermal immunotherapy [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2024, 63: e202401250.
- [26] Cheng YY, Chen Q, Guo ZY, et al. An intelligent biomimetic nanoplatform for holistic treatment of metastatic triple-negative breast cancer *via* photothermal ablation and immune remodeling [J]. ACS Nano, 2020, 14: 15161-15181.
- [27] Li T, Chen GJ, Xiao ZC, et al. Surgical tumor-derived photothermal nanovaccine for personalized cancer therapy and prevention [J]. Nano Lett, 2022, 22: 3095-3103.
- [28] Wang W, Zhu Q, Jin Y, et al. Self-immolated nanoadjuvant for *in situ* vaccination immunotherapy of colorectal cancer [J]. Adv Healthc Mater, 2023, 12: e2300524.
- [29] Qu HJ, Li LM, Chen H, et al. Drug-drug conjugates self-assembled nanomedicines triggered photo-/immuno-therapy for synergistic cancer treatments [J]. J Control Release, 2023, 363: 361-375.
- [30] Wang Y, Li GZ, Su JL, et al. Spatiotemporal controllable sononanovaccines driven by free-field based whole-body ultrasound for personalized cancer therapy [J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11: e2307920.
- [31] Chen YC, Wu BL, Shang HT, et al. Sono-immunotherapy mediated controllable composite nano fluorescent probes reprogram the immune microenvironment of hepatocellular carcinoma [J]. Int J Nanomedicine, 2023, 18: 6059-6073.
- [32] Wang DY, Wan Z, Yang Q, et al. Sonodynamical reversion of immunosuppressive microenvironment in prostate cancer *via* engineered exosomes [J]. Drug Deliv, 2022, 29: 702-713.
- [33] Tambunlertchai S, Geary SM, Salem AK. Topically applied resiquimod *versus* imiquimod as a potential adjuvant in melanoma treatment [J]. Pharmaceutics, 2022, 14: 2076.
- [34] Rodell CB, Ahmed MS, Garris CS, et al. Development of adamantane-conjugated TLR7/8 agonists for supramolecular delivery and cancer immunotherapy [J]. Theranostics, 2019, 9: 8426-8436.
- [35] Lu RL, Groer C, Kleindl PA, et al. Formulation and preclinical

- evaluation of a toll-like receptor 7/8 agonist as an anti-tumoral immunomodulator [J]. *J Control Release*, 2019, 306: 165-176.
- [36] Wang JQ, Zope H, Islam MA, et al. Lipidation approaches potentiate adjuvant-pulsed immune surveillance: a design rationale for cancer nanovaccine [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 787.
- [37] Bisbal Lopez L, Ravazza D, Bocci M, et al. *Ex vivo* mass spectrometry-based biodistribution analysis of an antibody-resiquimod conjugate bearing a protease-cleavable and acid-labile linker [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1320524.
- [38] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells *via* the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3: 196-200.
- [39] Gibson SJ, Lindh JM, Riter TR, et al. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod [J]. *Cell Immunol*, 2002, 218: 74-86.
- [40] Lee M, Park CS, Lee YR, et al. Resiquimod, a TLR7/8 agonist, promotes differentiation of myeloid-derived suppressor cells into macrophages and dendritic cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37: 1234-1240.
- [41] Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive [J]. *J Exp Med*, 1999, 189: 521-530.
- [42] Peng GY, Guo Z, Kuniwa Y, et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4⁺ regulatory T cell function [J]. *Science*, 2005, 309: 1380-1384.
- [43] Andrianov AK, Marin A, Wang RX, et al. Supramolecular assembly of Toll-like receptor 7/8 agonist into multimeric water-soluble constructs enables superior immune stimulation *in vitro* and *in vivo* [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2020, 3: 3187-3195.
- [44] Ye J, Yang YF, Jin J, et al. Targeted delivery of chlorogenic acid by mannoseylated liposomes to effectively promote the polarization of TAMs for the treatment of glioblastoma [J]. *Bioact Mater*, 2020, 5: 694-708.
- [45] Lu Y, Yuan F, Zheng S, et al. Mannose modification enhances tumor targeting and immunotherapeutic effects of resiquimod liposomes [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2022, 57: 1917-1925.
- [46] Jia DL, Lu Y, Lv MJ, et al. Targeted co-delivery of resiquimod and a SIRPalpha variant by liposomes to activate macrophage immune responses for tumor immunotherapy [J]. *J Control Release*, 2023, 360: 858-871.
- [47] Zhang H, Tang WL, Kheirrolomoom A, et al. Development of thermosensitive resiquimod-loaded liposomes for enhanced cancer immunotherapy [J]. *J Control Release*, 2021, 330: 1080-1094.
- [48] Xu XX, Wang Q, Qian XD, et al. Spatial-drug-laden protease-activatable M1 macrophage system targets lung metastasis and potentiates antitumor immunity [J]. *ACS Nano*, 2023, 17: 5354-5372.
- [49] Huang SC, Wen T, Wang JC, et al. Nanoparticle-integrated dissolving microneedles for the co-delivery of R848/aPD-1 to synergistically reverse the immunosuppressive microenvironment of triple-negative breast cancer [J]. *Acta Biomater*, 2024, 176: 344-355.
- [50] Cheng XB, Yu P, Zhou X, et al. Enhanced tumor homing of pathogen-mimicking liposomes driven by R848 stimulation: a new platform for synergistic oncology therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 924-938.
- [51] Anfray C, Varela CF, Ummarino A, et al. Polymeric nanocapsules loaded with poly(I:C) and resiquimod to reprogram tumor-associated macrophages for the treatment of solid tumors [J]. *Front Immunol*, 2024, 14: 1334800.
- [52] Figueiredo P, Leland A, Scodeller P, et al. Peptide-guided resiquimod-loaded lignin nanoparticles convert tumor-associated macrophages from M2 to M1 phenotype for enhanced chemotherapy [J]. *Acta Biomater*, 2021, 133: 231-243.
- [53] Li YJ, Yi JM, Ma R, et al. A polymeric nanopatform enhances the cGAS-STING pathway in macrophages to potentiate phagocytosis for cancer immunotherapy [J]. *J Control Release*, 2024, 373: 447-462.
- [54] Duwa R, Pokhrel RH, Banstola A, et al. T-cell engaging poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as a modular platform to induce a potent cytotoxic immunogenic response against PD-L1 overexpressing cancer [J]. *Biomaterials*, 2022, 291: 121911.
- [55] Zhang Y, Chen YL, Li JH, et al. Development of toll-like receptor agonist-loaded nanoparticles as precision immunotherapy for reprogramming tumor-associated macrophages [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13: 24442-24452.
- [56] Jin LJ, Yang DM, Song YH, et al. *In situ* programming of nanovaccines for lymph node-targeted delivery and cancer immunotherapy [J]. *ACS Nano*, 2022, 16: 15226-15236.
- [57] Zhang X, Wei ZH, Yong TY, et al. Cell microparticles loaded with tumor antigen and resiquimod reprogram tumor-associated macrophages and promote stem-like CD8⁺ T cells to boost anti-PD-1 therapy [J]. *Nat Commun*, 2023, 14: 5653.
- [58] Bahmani B, Gong H, Luk BT, et al. Intratumoral immunotherapy using platelet-cloaked nanoparticles enhances antitumor immunity in solid tumors [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 1999.
- [59] Wei BC, Pan JM, Yuan RT, et al. Polarization of tumor-associated macrophages by nanoparticle-loaded escherichia coli combined with immunogenic cell death for cancer immunotherapy [J]. *Nano Lett*, 2021, 21: 4231-4240.
- [60] Ma GL, Li F, Wang X, et al. A bionic yeast tumor vaccine using the co-loading strategy to prevent post-operative tumor recurrence [J]. *ACS Nano*, 2023, 17: 21394-21410.
- [61] Sheng SP, Jin LM, Zhang Y, et al. A twindrive precise delivery system of platelet-neutrophil hybrid membrane pegulates macrophage combined with CD47 blocking for postoperative immunotherapy [J]. *ACS Nano*, 2024, 18: 4981-4992.
- [62] Turco V, Pfliegerer K, Hunger J, et al. T cell-independent eradication of experimental glioma by intravenous TLR7/8-agonist

- loaded nanoparticles [J]. Nat Commun, 2023, 14: 771.
- [63] Lugani S, Halabi EA, Oh J, et al. Dual immunostimulatory pathway agonism through a synthetic nanocarrier triggers robust anti-tumor immunity in murine glioblastoma [J]. Adv Mater, 2023, 35: e2208782.
- [64] Song QL, Zhang GF, Wang B, et al. Reinforcing the combinational immuno-oncotherapy of switching "cold" tumor to "hot" by responsive penetrating nanogels [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13: 36824-36838.
- [65] Feng ZZ, Chen G, Zhong M, et al. An acid-responsive MOF nanomedicine for augmented anti-tumor immunotherapy *via* a metal ion interference-mediated pyroptotic pathway [J]. Biomaterials, 2023, 302: 122333.
- [66] Guo YX, Zhang XP, Wang SZ, et al. Metal-phenolic network-facilitated "foe-to-friend" conversion of melittin for cancer immunotherapy with boosted abscopal effect [J]. Research (Wash D C), 2023, 6: 0052.
- [67] Huang Y, Nahar S, Alam MM, et al. Reactive oxygen species-sensitive biodegradable mesoporous silica nanoparticles harboring theravac elicit tumor-specific immunity for colon tumor treatment [J]. ACS Nano, 2023, 17: 19740-19752.
- [68] Wen XD, Xiong X, Yang G, et al. A macrophage membrane-coated mesoporous silica nanoplatform inhibiting adenosine A2AR *via in situ* oxygen supply for immunotherapy [J]. J Control Release, 2023, 353: 535-548.
- [69] Gowsalya K, Rithisa B, Haldorai Y, et al. Engineered photonic near-infrared light activated photothermal theranostic nanovaccine induced targeted remodeling of tumor microenvironment [J]. Nanomedicine, 2024, 57: 102738.
- [70] Bhagchandani SH, Vohidov F, Milling LE, et al. Engineering kinetics of TLR7/8 agonist release from bottlebrush prodrugs enables tumor-focused immune stimulation [J]. Sci Adv, 2023, 9: eadg2239.
- [71] Sun JL, Liu ZL, Yao HC, et al. Azide-masked resiquimod activated by hypoxia for selective tumor therapy [J]. Adv Mater, 2023, 35: e2207733.
- [72] Kakwere H, Zhang H, Ingham ES, et al. Systemic immunotherapy with micellar resiquimod-polymer conjugates triggers a robust antitumor response in a breast cancer model [J]. Adv Healthc Mater, 2021, 10: e2100008.
- [73] Chen JM, Liu XX, Zhao SJ, et al. Carboxymethylated alginate-resiquimod micelles reverse the immunosuppressive tumor microenvironment and synergistically enhance the chemotherapy and immunotherapy for gastric cancer [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2023, 15: 35999-36012.
- [74] Yan JY, Zhang YB, Du S, et al. Nanomaterials-mediated costimulation of toll-like receptors and CD40 for antitumor immunity [J]. Adv Mater, 2022, 34: e2207486.
- [75] Sun JL, Yao HC, Ren XT, et al. Radiation-activated resiquimod prodrug nanomaterials for enhancing immune checkpoint inhibitor therapy [J]. Nano Lett, 2024, 24: 2921-2930.
- [76] Islam MA, Rice J, Reesor E, et al. Adjuvant-pulsed mRNA vaccine nanoparticle for immunoprophylactic and therapeutic tumor suppression in mice [J]. Biomaterials, 2021, 266: 120431.