

[文章编号] 1007-7669(2024)11-0801-08

[DOI号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2024.11.01

CAR-NK 细胞的构建策略及其在肿瘤免疫治疗中的研究进展

胡佳琪, 高洁

(海军军医大学第一附属医院 风湿免疫科, 上海 200433)

[关键词] 嵌合抗原受体; 自然杀伤细胞; 血液肿瘤; 实体瘤; 免疫治疗

[摘要] 嵌合抗原受体 (CAR)-T 细胞疗法改变了传统血液系统恶性肿瘤的治疗方法, 显示出显著疗效。然而, CAR-T 细胞因制作周期长、价格高昂和细胞因子释放综合征等副作用的限制, 无法在临床广泛应用。自然杀伤 (NK) 细胞是机体固有免疫反应的重要组成部分, 与 CAR-T 细胞相比, CAR-NK 细胞的神经毒性、细胞因子释放综合征及引起移植物抗宿主病的概率均显著降低。临床前研究和临床试验证明了 CAR-NK 细胞疗法治疗恶性肿瘤的安全性和可行性, 正逐渐成为肿瘤免疫治疗的研究热点, 但也存在一些亟需解决的问题, 仍需进一步优化构建策略以实现临床转化。本文综合国内外最新的研究成果, 对 CAR-NK 细胞构建策略及其在肿瘤免疫治疗领域的研究进展作一综述, 以期为 NK 细胞在恶性肿瘤治疗中的应用提供有价值的参考。

[中图分类号] R457; R979.1

[文献标志码] A

Construction strategy of CAR-NK cells and its research progress in tumor immunotherapy

HU Jia-qi, GAO Jie

(Rheumatology and Immunology Department, the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, SHANGHAI 200433, China)

[KEY WORDS] chimeric antigen receptor; natural killer cell; hematologic neoplasms; solid tumor; immunotherapy

[ABSTRACT] Chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy has changed the traditional treatment of hematological malignancies and has shown significant efficacy. However, the clinical application of CAR-T cells is limited by long production cycle, high price, and side effects such as cytokine storm, so it can not be widely used in clinical practice. Natural killer (NK) cells are an important part of the body's innate immune response. Compared with CAR-T cells, CAR-NK cells can significantly reduce the probability of neurotoxicity, cytokine storm, and graft versus host diseases. CAR-NK cell therapy is gradually becoming a research hotspot, but there are still some urgent problems to be solved, and further optimization of the construction strategy is needed to achieve its clinical translation. This paper will review the construction strategy and the research progress in tumor immunotherapy based on the latest literatures at home and abroad, in order to provide valuable reference for application of NK cells in the treatment of malignant tumors.

[收稿日期] 2023-09-24 [接受日期] 2024-07-15

[基金项目] 上海市卫生健康委员会临床科研项目 (202340061); 海军军医大学第一附属医院基础研究面上培育项目 (2023PY40)

[作者简介] 胡佳琪, 女, 硕士在读, 主要从事风湿免疫疾病的研究, E-mail: jiaqihu1998@163.com。高洁, 女, 副主任医师, 博士, 主要从事风湿免疫疾病的治疗工作, E-mail: gaojie@tom.com

[责任作者] 高洁

肿瘤免疫疗法是指通过调控机体自身的免疫系统, 增强对肿瘤细胞的识别和杀伤能力, 从而达到控制甚至特异性清除肿瘤细胞的目的, 主要包括免疫检查点抑制剂治疗、过继性细胞免疫治疗、癌症疫苗等。目前, 在肿瘤免疫疗法中研究最广泛的是嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) -T 细胞疗法。美国食品和药物管理局 (FDA) 已经批准了多项 CAR-T 产品用于血液系统恶性肿瘤和实体瘤的治疗^[1], 但 CAR-T 细胞疗法因为制备周期长、价格高昂而无法得到广泛应用, 同时抗原逃逸、细胞因子释放综合征 (cytokine release syndrome, CRS)、神经毒性等副作用也是不容忽视的问题^[2]。与 T 细胞不同, 自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞来源广泛, 寿命相对较短, 且在同种异体环境下引起移植物抗宿主病 (graft versus host disease, GVHD) 的风险较低^[3], 临床前研究和临床试验均已证明了 CAR-NK 细胞疗法治疗恶性肿瘤的安全性和可行性^[4]。CAR-NK 细胞疗法具有广阔的前景和研究价值, 正逐渐成为肿瘤免疫疗法的研究新热点。

CAR-NK 细胞的构建

1 CAR 的结构 CAR 通常由胞外抗原结合域、铰链区、跨膜结构域和胞内信号结构域组成^[5]。抗原结合域是由抗体重链可变区和轻链可变区通过连接子连接形成的单链抗体, 决定 CAR-NK 细胞结构的特异性; 铰链区通常来源于 CD8、CD28 和免疫球蛋白 G (IgG), 与靶抗原的间隔区相结合, 铰链区的长度由目标抗原的位置决定, 靠近细胞膜的抗原需要较长的铰链, 暴露于细胞表面的抗原则需要较短的铰链; 跨膜结构域介导 CAR 与免疫细胞膜相结合, 影响 CAR 的表达、稳定性及信号转导; 胞内信号结构域转导信号激活免疫细胞。第一代 CAR-NK 细胞和 CAR-T 细胞一样, 仅含有 CD3 ζ 信号结构域; 为了提高抗肿瘤活性, 第二代 CAR-T 细胞增加了 CD28 和 4-1BB (CD137) 共刺激域^[6] (图 1)。FDA 批准的 axicabtagene ciloleucel (axi-cel) 和 brexucabtagene autoleucel (brexu-cel) 两种 CAR-T 细胞疗法, 均靶向 CD19 阳性的肿瘤细胞, 且均包含 CD28 共刺激域, 可增强 T 细胞的激活能力和持久性。临床前研究证实, 其他胞内共刺激域如 OX40、CD27 和诱导型 T 细胞共刺激分子对 CAR 抗肿瘤作用的增效与 CD28 和 4-1BB 结构域相当。研究表明, CD27 共刺激域比 CD28 共刺激域更能增强 CAR-T 细胞在体内的维持时间^[7]。共刺激域通常来自 CD28 家族 (CD28、诱导型 T 细胞共刺激分子)、肿瘤坏死因子受体家族 (4-1BB、OX40、CD27) 和淋巴

细胞激活分子相关受体家族 (2B4)^[8]。CD3 ζ 含有 3 个免疫受体酪氨酸激活基序, 可以与 Nkp46、Nkp30 结合, 参与 NK 细胞受体信号转导的激活过程。衔接蛋白 DNAX 激活蛋白 12 (DAP12) 只含有 1 个免疫受体酪氨酸激活基序, 能够结合脾酪氨酸激酶和 Zeta 链相关蛋白激酶 70 (ZAP70), 为 NK 细胞抗肿瘤活性提供可替代信号通路。相较于含有 CD3 ζ 的 NKG2DCAR-NK 细胞, 含 DAP12 的 NKG2D CAR-NK 细胞含有更多的干扰素- γ (IFN- γ) 和更强的细胞毒性^[9]。因此, 含有 DAP12 信号域的 CAR 提高了 NK 细胞的抗肿瘤活性和特异性。此外, 2B4、NKG2D 也能调节 NK 细胞的细胞毒性, 并促进细胞因子分泌过程。

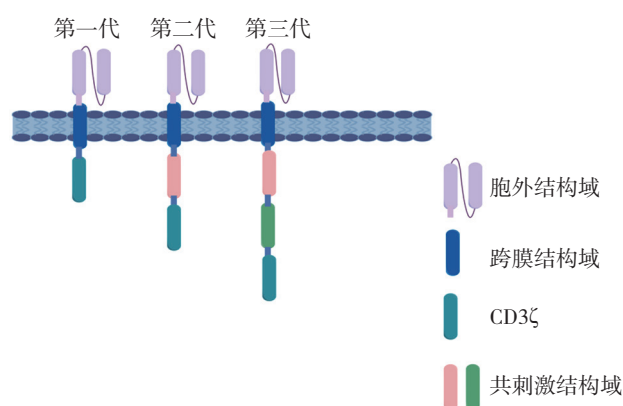


图 1 三代嵌合抗原受体 -T 细胞的结构

2 NK 细胞的来源 NK 细胞主要存在于骨髓、外周血、肝脏、脾脏、肺和淋巴结中。NK 细胞是先天性免疫细胞, 能够迅速识别和杀死异常细胞、肿瘤细胞和病毒感染细胞。与 T 细胞不同, NK 细胞不会诱发 GVHD。随着基因改造技术的发展, NK 细胞可以被进一步引入 CAR 和敲除抑制基因技术。目前, 用于 CAR 基因工程的 NK 细胞主要来源于外周血单个核细胞 (peripheral blood monocytes, PBMC)、脐带血 (umbilical cord blood, UCB) 单个核细胞、诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC) 和 NK 细胞系。

2.1 PBMC PBMC 是 NK 细胞的主要来源之一, 具有易于体外扩增、无毒副作用等优点。由于 NK 细胞可以相对容易地从自体或同种异体 PBMC 中分离得到, 因此大多数临床前研究使用的 CAR-NK 细胞都来自于外周血。PBMC 来源的 NK (PBMC-NK) 细胞占循环淋巴细胞的 10%~15%, 由于 NK 细胞的分离、筛选过程较昂贵, 因此需要通过体外扩增以增加 NK 细胞的表达水平。传统使用细胞因子白细胞介素 (IL) -2、IL-12 或 IL-18 与 PBMC-NK 细胞联合培养, 可以实现 PBMC-NK 细胞的体外扩增并同时降低细胞毒

性^[10], 但扩增后表达的 NK 细胞与内皮细胞接触时, 倾向于诱导细胞凋亡。研究发现^[11], 使用 IL-15 扩增的 NK 细胞不仅避免了诱导细胞凋亡的倾向, 而且可以促进 NK 细胞的生存及进一步扩增。KAMIYA 等^[12]使用人工抗原提呈细胞 (artificial antigen-presenting cells, aAPCs) 体外激活和扩增 NK 细胞, 可在不到 2 周的时间内将 PBMC-NK 细胞扩增 500~1 000 倍。NK 细胞的主要亚群根据细胞表面密度表达量被确定为 CD56 和 CD16。在生理条件下, 90% 的 PBMC-NK 细胞表达 CD56^{dim}CD16⁺, CD56^{dim} NK 细胞是细胞毒性群体, 除了具有溶解细胞的能力外, 还可在受体介导下快速释放细胞因子。10% 的 PBMC-NK 细胞表达 CD56^{bright}CD16^{-/dim}, 表达高亲和力的 CD25、NKp44 和 CD117/C-kit^[13]。与 CD56^{bright} 相比, CD56^{dim} NK 细胞主要靶向于肿瘤细胞、病毒感染细胞和寄生虫, 杀伤性更高, 这些细胞启动、参与适应性免疫反应, 并且对类风湿关节炎也表现出良好的治疗作用^[14, 15]。研究发现, 将 IL-2 刺激的高浓缩半相合 NK 细胞输入急性髓系白血病 (AML) 和急性淋巴细胞白血病患者体内, 结果显示无 GVHD 且对 NK 细胞治疗耐受性良好, 所有患者 1 个月内达到完全缓解。这项试验初步表明, 根据药品生产质量管理规范 (good manufacturing practices, GMP) 标准从外周血中分离并扩增的 NK 细胞在临床应用中具有可行性^[16]。主要缺点是冷冻成熟的 PBMC-NK 细胞会显著降低其生存能力和细胞毒性, 这不仅增加了运输难度, 也限制了其成为“现货型”治疗的应用^[17, 18]。

2.2 UCB 来源的 NK (UCB-NK) 细胞 UCB-NK 细胞约占脐带血淋巴细胞的 15%~30%, 显著高于外周血中 NK 细胞占比, 第一个 CAR-NK 细胞临床试验使用的 NK 细胞即来源于脐带血。与 PBMC-NK 细胞相比, UCB-NK 细胞被认为是具有更年轻且更具增殖性的表型, 但杀伤活性较低。UCB-NK 细胞中的 T 细胞大部分是未成熟的 T 细胞, 这就降低了 GVHD 的发生率。除此之外, UCB-NK 细胞中调控细胞周期和增殖的基因水平更高, 在维持细胞的增殖能力和持久性方面具有更高的潜能^[19]。但是, UCB-NK 细胞用于免疫治疗的主要局限性在于单个 UCB 单位的 NK 细胞数量相对较少, 同时 UCB 的体积有限, 因此建立高效的扩增方法以获得足够数量的 NK 细胞用于 UCB-NK 细胞免疫治疗至关重要^[20]。NK 细胞不受主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 限制, 因此可以改造开发异体来源的 NK 细胞进行“现货型” CAR-NK 细胞治疗。尽管目前只有少数 CAR-

NK 细胞临床前研究使用 UCB-NK 细胞, 但其抗肿瘤活性已在临床试验中得到证实^[21, 22]。

2.3 iPSC 来源的 NK (iPSC-NK) 细胞 iPSC-NK 细胞具有自我更新和无限增殖的潜能, 同时也更易于规模生产, 因此越来越引起研究者的关注, 成为 CAR-NK 细胞产品的理想来源。利用 iPSC 技术“特制”的 NK 细胞可用于多个患者, 仅单一攻击特定肿瘤细胞, 对除肿瘤细胞以外的其他细胞风险较低, 在体内的存活时间更短, 所以副作用相对较小。考虑到 iPSC-NK 细胞上述属性, 2018 年美国 FDA 批准了第一个 iPSC-NK 细胞免疫疗法 FT500 用于临床研究。2022 年, 我国批准了首个 iPSC 来源细胞治疗产品的临床试验申请。在生物制药行业, iPSC-NK 细胞被用于治疗肿瘤和自身免疫疾病的多项临床研究正在进行中。与 PBMC-NK 细胞相比, iPSC-NK 细胞的生产为基因修饰提供了更有效的手段。

2.4 NK 细胞系 NK 细胞系主要包括 NK-92、NKG、NKL、KHYG1、YT 等。迄今为止, 大多数 CAR-NK 细胞的研究都是基于 NK-92 细胞系开展的。NK-92 是一种成熟的 NK 细胞系, 来源于 1 例 50 岁男性非霍奇金淋巴瘤患者的外周血, 可以在体外无限增殖, 并且对冻融敏感性较低, 因此被广泛用于 CAR-NK 细胞的生产^[23]。由于 NK-92 细胞系来源于恶性淋巴瘤患者, 有引起继发性肿瘤的风险, 因此在植入患者体内之前必须接受辐照以防止其永久植入。NK-92 细胞系还有一个主要优势是无需病毒介导即可进行基因改造^[24]。此外, NK-92 细胞系的细胞毒性依赖于外源性 IL-2, 并且不表达抗体依赖细胞介导的细胞毒性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 所需的 CD16 受体, 因此, NK-92 细胞系无法通过 ADCC 实现细胞杀伤^[25]。值得关注的是, IL-2 依赖于 NK-92 细胞系和人恶性非霍奇金淋巴瘤患者 NK 细胞 (NK-92MI) 衍生物在淋巴细胞倍增的条件下表现出易于扩增、培养和激活的显著优势, 同时输注后对 AML 细胞显示出持续、可靠的细胞毒性^[26]。

CAR-NK 细胞研究现状 近年来, CAR-T 细胞在血液肿瘤和实体瘤的临床治疗中取得了卓有成效的进展, 但同时也出现了 CRS、神经毒性和 GVHD 等副作用。与 CAR-T 细胞免疫治疗相比, CD19-CAR-NK 细胞在对抗造血淋巴系统的恶性肿瘤方面有其独特的优势, 主要归功于临床批准的第二代 CAR-NK 细胞通常包含 CD3 ζ 结构域, 与 4-1BB 和 CD28 共刺激结构域结合, 从而显示出治疗非霍奇金淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病的突出有效性^[27, 28]。与活化 T 细胞释放

的细胞因子 (IL-1、IL-2、IL-6、IL-15) 相比, 激活的 NK 细胞产生 IFN- γ 和 IFN- α , 从而诱导 CRS 和严重神经毒性的倾向性要低得多, 无需基因编辑即可实现异体回输, 且不会产生 GVHD。同时, NK 细胞不受 MHC 的限制, 可以将异体来源的 NK 细胞用于“现货型”CAR-NK 细胞治疗, 具有广阔的治疗前景和研究价值^[29]。

1 治疗 AML AML 是一种源自肿瘤髓系祖细胞的血液系统恶性疾病, 主要特征是外周血或骨髓细胞中未分化的髓母细胞克隆性增殖。过去几十年, AML 的治疗进展有限, 标准的前期治疗仍是阿糖胞苷和蒽环类药物为基础的强化治疗。除此之外, 同种异体造血干细胞移植是目前 AML 最有效的治疗方法, 但对于器官衰竭、感染和老年患者, 同种异体造血干细胞移植往往不能彻底清除肿瘤细胞, 且存在诱发 GVHD 的风险^[30]。CD33 在 80% 以上 AML 患者的髓系细胞和原始粒细胞中表达。2017 年, 美国 FDA 批准吉妥珠单抗 (gemtuzumab ozogamicin, GO) 用于 AML 的治疗。GO 是由靶向 CD33 的单克隆抗体与卡奇霉素衍生物连接而成的抗体偶联药物。研究发现, 靶向 CD33 并载有卡奇霉素的 GO 进入细胞核, 与 DNA 结合并诱导 DNA 双链的断裂, 导致细胞周期阻滞和细胞凋亡^[31]。靶向 CD33 的 CAR-T 细胞和 CAR-NK 细胞治疗也显示出了治疗 AML 的潜力。与 CD33-CAR-T 细胞相比, CD33-CAR-NK-92 细胞具有更短的生命周期, 更低的细胞毒性, 同时对 AML 细胞也更具杀伤力。临床研究证明, CD33-CAR-NK-92 细胞在治疗复发性或难治性 AML 中具有安全性和可行性。2018 年, TANG 等^[32]通过在 CD33 单链可变片段 (ScFv) 和 CD28 之间插入 Fc 片段, 构建包含 CD28 和 4-1BB 共刺激分子的第三代 CAR 结构 CD33-CD28-4-1BB-CAR。与亲代 NK-92 细胞相比, CAR-NK-92 细胞对人急性早幼粒白血病细胞 (HL-60) 的细胞毒性更强。在临床试验 (NCT02944162) 中, 3 例难治性 / 复发性 AML 患者被输注钴-60 辐照 (10Gy) CAR-NK-92 细胞, 这也是首次利用 CAR-NK-92 细胞治疗难治性 / 复发性 AML 的临床研究。值得关注的是, 当每位患者输入高达 5×10^9 个细胞时, 未观察到任何明显的不良反应。除此之外, KOH 等^[20]通过狒狒包膜伪型慢病毒载体 (BaEV-LV) 慢病毒感染 PB-UK, 构建靶向 CD33 的 CAR-NK, 在人 AML 细胞系 OCI-AML2 异种移植小鼠模型中, CD33-CAR-NK 细胞清除了所有移植的骨髓和脾脏细胞, 以及大部分 AML 细胞, 却并未检测到任何副作用。除了 CD33 以外, CD123 也可作为治疗

AML 的可行性靶点之一, 并且 CD123 更易获得也更具抗肿瘤活性。

2 治疗多发性骨髓瘤 多发性骨髓瘤是以骨髓中浆细胞恶性增殖为特点的血液系统恶性肿瘤, 伴有单克隆抗体免疫球蛋白和轻链蛋白的过度表达。1980 年, REINHERZ 等^[33]首次在人类淋巴细胞表面发现了 CD38, 它是一种跨膜糖蛋白, 广泛表达于多发性骨髓瘤细胞中以及一些调节性 T 细胞和 NK 细胞中。研究者针对多发性骨髓瘤细胞表面高表达的 CD38 开发了抗 CD38 抗体。2015 年, 美国 FDA 首次批准达雷妥尤单抗用于多发性骨髓瘤的治疗, CD38 通过促进二磷酸腺苷核糖基化的产生和细胞内 Ca^{2+} 的动员, 在 NK 细胞中发挥重要作用^[34]。除了 CD38 以外, CD138 和 CD319 也是治疗多发性骨髓瘤的潜在靶点, CD138 是诊断多发性骨髓瘤的主要标志物, CD319 是治疗多发性骨髓瘤的安全性靶点。LEIVAS 等^[35]通过自体携带的 NK 细胞构建 NKG2D-CAR-NKAE, 证实了其治疗多发性骨髓瘤的安全性和可行性, 并在 150 d 内未观察到任何 GVHD 或治疗相关毒性, 同时 NKG2D-CAR 转导还增强了体外和体内抗肿瘤活性。FT-576 细胞是一种来自 iPSC 的 CAR-NK 细胞类型, 其表面均表达 CD16、B 细胞成熟抗原和 IL-15 受体 α 融合蛋白。临床试验表明, 在治疗多发性骨髓瘤中, FT-576 细胞增强了细胞毒性并且防止了 B 细胞成熟抗原丢失^[36,37]。

3 治疗实体瘤 近年来, CAR-T 细胞免疫疗法在血液系统恶性肿瘤中已经表现出令人惊喜的疗效, 但在治疗转移性实体瘤中仍存在相当大的局限性, 包括有限的肿瘤浸润能力、免疫抑制肿瘤微环境的存在以及明显的不良反应^[38-40]。由于 CAR-NK 细胞治疗血液系统恶性肿瘤的可行性被广泛证实, 因此越来越多的临床前研究建立了不同的 CAR-NK 细胞结构, 并在胶质母细胞瘤、乳腺癌和卵巢癌等癌种中进行了研究, 证实了其安全性和有效性。

3.1 治疗胶质母细胞瘤 CAR-NK 细胞在胶质母细胞瘤治疗中获得了广泛的临床前数据。临床前研究表明, 胶质母细胞瘤的肿瘤微环境异质性较大, 每个已知的胶质母细胞瘤亚型均显示出与细胞可塑性相关的分子、遗传和表观遗传特征, 因此胶质母细胞瘤的肿瘤微环境异质性是其治疗中亟需克服的障碍。WANG 等^[41]通过将靶向双唾液酸神经节苷酯 (GD)2 的双功能 CAR 与 NKG2D 配体和局部触发释放的 CD73 阻断抗体片段结合到一个单基因改造的 NK 细胞中, 同时解决了与胶质母细胞瘤免疫耐药性相关的 3 个关键问

题, 即免疫逃逸、代谢重编程和免疫细胞浸润不良。在此基础上, 研究者根据 CAR-T 细胞疗法治疗胶质母细胞瘤的弊端, 发现可利用同时靶向突变型和野生型表皮生长因子受体 (EGFR) 的双特异性 CAR 构建转导的 CAR-NK 细胞疗法来避免 CAR-T 细胞疗法的不足。同时, 临床前研究也证实改造后的 CAR-NK 细胞疗法可有效延长胶质母细胞瘤异体种植小鼠模型的存活时间。

3.2 治疗乳腺癌 尽管手术、化疗、放疗、内分泌治疗和分子靶向治疗在乳腺癌治疗中已经取得了重大进展, 但乳腺癌仍然是女性癌症死亡的主要原因之一。在体内和体外模型中证明了针对几种不同抗原的 CAR-NK 细胞对乳腺癌均有效, 组织因子在 50%~85% 的三阴性乳腺癌患者中存在, 所以被选为 CAR-NK 的适当靶点之一, 组织因子靶向的 CD28-4-1BB-CD3 ζ -CAR 结构被转导到 NK-92MI 细胞内, 在肿瘤衍生的异种移植模型中, 改造后的 CAR-NK 细胞对表达组织因子的乳腺癌表现出显著的抗肿瘤活性^[42]。在表达上皮细胞黏附分子 (EPCAM) 的乳腺癌中, 靶向 EPCAM 的 CAR 和 IL-15 的 NK-92 细胞比未修饰的 NK-92 细胞表现了优越的选择性和细胞毒性^[43]。同样, 人表皮生长因子受体 2 (HER2) 也是乳腺癌的理想靶点之一, 由 NK-92 细胞表达的 HER2 导向的 CD28-CD3 ζ -CAR 在体内、体外均表现出抗肿瘤活性^[44]。

3.3 治疗卵巢癌 多项研究分析了 CAR-NK 细胞疗法在卵巢癌模型中的有效性。间皮素介导的 CAR-NK-92 细胞在构建的卵巢癌小鼠模型中能够选择性清除间皮素表达阳性的卵巢癌细胞 (OVCAR-3 和 SK-OV-3), 而不是间皮素表达阴性的细胞 (SK-HEP-1), 并同时延长了小鼠的生存期。靶向叶酸受体 α (FR α) 的 CAR-NK-92 细胞系在卵巢癌中也显示出显著的抗肿瘤活性, 在异体移植小鼠模型中, FR α -CD28-4-1BB-CD3 ζ -CAR-NK 细胞显著延长了存活时间^[45,46]。

CAR-NK 细胞免疫治疗针对不同实体瘤及不同靶抗原构建了不同的基本框架, 临床前数据也表明 CAR-NK 细胞疗法在未来有巨大的潜力, 但同时, NK 细胞用于实体瘤的治疗仍然受到多方面限制, 优化 CAR-NK 的基因编辑技术、实现 NK 细胞的有效扩增以及提高肿瘤微环境的持久性是亟待解决的问题。

CAR-NK 细胞疗法在临床应用中的挑战 尽管 CAR-NK 细胞疗法在治疗血液系统恶性肿瘤和实体瘤中具有显著优势, 但目前仍处于临床研究阶段^[47], 在临床应用仍存在一些局限性。首先, CAR-NK 细胞在体内存活的时间相对较短。其次, NK 细胞对冻融过程

很敏感, 其存活率和细胞毒性在冻融之后都显著降低, 进一步研究发现在冻存复苏后外源性添加 IL-2 等细胞因子可以再次激活 NK 细胞功能^[48,49]。再次, 目前 CAR-NK 细胞的转染方式主要是病毒转染和非病毒转染, 病毒转染效率很高, 但有诱发随机插入突变的风险, 慢病毒转染可以避免诱发突变的风险, 但转染效率较低, 因此 CAR-NK 细胞的转染方式仍有待改进^[50]。最后, 异体 NK 细胞可能被 T 细胞污染而导致 GVHD 和淋巴细胞增殖性疾病的发生, 异体 NK 细胞也可能影响调节性 T 细胞和骨髓源性抑制细胞的正常功能, 不利于 CAR-NK 细胞治疗发挥作用^[51-53]。

NK 细胞可替代类型 NK 细胞已经成为 CAR 疗法的研究热点, 其他细胞群体同样具有其特殊优势, 多项研究正在进行, 以探索新免疫细胞的可行性, 这将增加 CAR 细胞免疫疗法的细胞谱系。

1 iNKT 细胞 iNKT 细胞是具有先天性免疫和适应性免疫特征的特异性 T 细胞, 可以与暴露出的抗原迅速反应, 也可以适应性细胞的方式精准识别抗原。与传统 T 细胞不同的是, iNKT 细胞的 T 细胞抗原受体 (T cell receptor, TCR) 由 CD1d 呈递脂质抗原识别。除此之外, iNKT 细胞还可被多种与先天性免疫细胞类似的细胞因子受体激活^[54]。因此, iNKT 细胞在肿瘤免疫微环境中, 通过识别内源性脂质感知组织完整性被破坏, 通过直接分泌细胞因子, 间接介导抗肿瘤活性, 调节恶劣环境中其他免疫细胞, 辅助机体免疫反应^[55]。iNKT 细胞的另一个优势是不会产生 GVHD, 使其成为异体细胞治疗的一个良好的选择。HECZEY 等^[56]研究发现, 用抗 GD2-CAR 改造自体 iNKT 细胞转导含 CD28-4-1BB ζ 的第三代膜内区, 在转移性神经母细胞瘤小鼠模型中表现出很强的抗肿瘤活性, 且没有发生 GVHD。

2 $\gamma\delta$ T 细胞 $\gamma\delta$ T 细胞占循环 T 细胞的 1%~5%, 是连接先天性免疫和适应性免疫应答的主要淋巴细胞。 $\gamma\delta$ TCR 以不依赖 MHC 的方式识别靶抗原, 唑来膦酸由于可以干扰胆固醇合成, 导致异戊基焦磷酸积累, 从而促进 PBMC 中 $\gamma\delta$ T 细胞的扩增^[57,58]。这一独特功能使 $\gamma\delta$ T 细胞成为 CAR 工程的潜在治疗细胞。研究人员利用唑来膦酸从外周血扩增 $\gamma\delta$ T 细胞, 以抗 GD2 和抗 CD19 第一代 CAR 的逆转录病毒载体转导 $\gamma\delta$ T 细胞, 转导的 $\gamma\delta$ T 细胞在体外对尤文肉瘤细胞和 CD19⁺B 细胞肿瘤细胞系表现出显著的抗肿瘤活性^[59]。

3 巨噬细胞 与 T 细胞及其他免疫效应细胞不同的是, 巨噬细胞能够迅速穿透实体肿瘤以应对肿瘤来

源的趋化因子, 如集落刺激因子、血管内皮生长因子、CC 趋化因子配体 2、巨噬细胞炎性蛋白 1- α 等。巨噬细胞可以用包含 CD3 ζ 胞内结构域的 CAR 来激活其特异性抗肿瘤活性^[60, 61]。研究者用腺病毒载体 Ad5f35 转导巨噬细胞的 CAR, 结果表明可以使巨噬细胞极化为 M1 型免疫促炎表型, 而非极化为 M2 型免疫抗炎表型^[62]。在卵巢癌小鼠模型中, 与注射空载的巨噬细胞小鼠相比, 用靶向 HER2 的嵌合抗原受体巨噬细胞 (CAR-iMac) 治疗异体移植小鼠, 具有更好的抗肿瘤活性和更高的生存率^[63]。

小结与展望 CAR 基因工程的出现是癌症免疫治疗的突破, 尤其针对 B 细胞恶性肿瘤。CAR-T 细胞疗法在治疗血液系统恶性肿瘤和实体瘤中取得了一定成效, 但由于神经毒性、GVHD 等严重不良反应, 目前肿瘤细胞免疫治疗的研究重点已经从 CAR-T 细胞治疗转移到 CAR-NK 细胞治疗。临床前研究及临床试验结果表明, CAR-NK 细胞疗法在安全性、可行性及疗效方面均较 CAR-T 细胞疗法更具优势。目前对 CAR-NK 细胞疗法的研究仍处于起步阶段, 要将其成功运用到临床, 还需要进一步优化 CAR-NK 细胞的构建策略, 深入研究其疗效及可能的不良反应。期望在不久的将来, 随着理论知识进一步完善, CAR-NK 细胞疗法能成为对抗恶性肿瘤强有力的武器, 使更多肿瘤患者从治疗中获益。

[参考文献]

- [1] AMINI L, SILBERT SK, MAUDE SL, *et al.* Preparing for CAR T cell therapy: patient selection, bridging therapies and lymphodepletion [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19 (5) : 342–355.
- [2] STERNER RC, STERNER RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies [J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11 (4) : 69.
- [3] LIM O, JUNG MY, HWANG YK, *et al.* Present and future of allogeneic natural killer cell therapy [J]. *Front Immunol*, 2015, 6 : 286.
- [4] WANG L, DOU M, MA Q, *et al.* Chimeric antigen receptor (CAR) - modified NK cells against cancer: opportunities and challenges [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74 : 105695.
- [5] YILMAZ A, CUI H, CALIGIURI MA, *et al.* Chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells for cancer immunotherapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13 : 1–22.
- [6] IMAI C, IWAMOTO S, CAMPANA D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells [J]. *Blood*, 2005, 106 (1) : 376–383.
- [7] SONG DG, YE Q, POUSSIN M, *et al.* CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells *in vivo* [J]. *Blood*, 2012, 119 (3) : 696–706.
- [8] MACKAY M, AFSHINNEKOO E, RUB J, *et al.* The therapeutic landscape for cells engineered with chimeric antigen receptors [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38 (2) : 233–244.
- [9] XIAO L, CEN D, GAN H, *et al.* Adoptive transfer of NKG2D CAR mRNA-engineered natural killer cells in colorectal cancer patients [J]. *Mol Ther*, 2019, 27 (6) : 1114–1125.
- [10] GRANZIN M, WAGNER J, KOHL U, *et al.* Shaping of natural killer cell antitumor activity by *ex vivo* cultivation [J]. *Front Immunol*, 2017, 8 : 458.
- [11] WALDMANN TA, DUBOIS S, TAGAYA Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy [J]. *Immunity*, 2001, 14 (2) : 105–110.
- [12] KAMIYA T, CHANG YH, CAMPANA D. Expanded and activated natural killer cells for immunotherapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4 (7) : 574–581.
- [13] FAURIAT C, LONG EO, LJUNGGREN HG, *et al.* Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition [J]. *Blood*, 2010, 115 (11) : 2167–2176.
- [14] KUCUKSEZER UC, AKTAS CETIN E, ESEN F, *et al.* The role of natural killer cells in autoimmune diseases [J]. *Front Immunol*, 2021, 12 : 622306.
- [15] FATHOLLAHI A, SAMIMI LN, AKHLAGHI M, *et al.* The role of NK cells in rheumatoid arthritis [J]. *Inflamm Res*, 2021, 70 (10–12) : 1063–1073.
- [16] KOEHL U, SORENSEN J, ESSER R, *et al.* IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation [J]. *Blood Cell Mol Dis*, 2004, 33 (3) : 261–266.
- [17] VOSHOL H, DULLENS HFJ, DEN OTTER W, *et al.* Human natural killer cells: a convenient purification procedure and the influence of cryopreservation on cytotoxic activity [J]. *J Immunol Methods*, 1993, 165 (1) : 21–30.
- [18] SAEKO F, MITOSHI A, MICHIO Y, *et al.* Cryopreservation of human lymphocytes for assessment of lymphocyte subsets and natural killer cytotoxicity [J]. *J Immunol Methods*, 1986, 90 (2) : 265–273.
- [19] LI L, CHEN H, MARIN D, *et al.* A novel immature natural killer cell subpopulation predicts relapse after cord blood transplantation [J]. *Blood Adv*, 2019, 3 (23) : 4117–4130.
- [20] KOH SK, PARK J, KIM SE, *et al.* Natural killer cell expansion and cytotoxicity differ depending on the culture medium used [J]. *Ann Lab Med*, 2022, 42 (6) : 638.
- [21] KARADIMITRIS A. Cord blood CAR-NK cells: favorable initial efficacy and toxicity but durability of clinical responses not yet clear [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37 (4) : 426–427.
- [22] XU C, LIU D, CHEN Z, *et al.* Umbilical cord blood-derived natural

- killer cells combined with bevacizumab for colorectal cancer treatment [J]. *Human Gene Ther*, 2019, 30 (4): 459–470.
- [23] ZHANG J, ZHENG H, DIAO Y. Natural killer cells and current applications of chimeric antigen receptor-modified NK-92 cells in tumor immunotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (2): 317.
- [24] SUCK G, ODENDAHL M, NOWAKOWSKA P, *et al.* NK-92: an ‘off-the-shelf therapeutic’ for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65 (4): 485–492.
- [25] ZHAO H, ZHOU Z, LI G, *et al.* An NK cell line (NK92-41BB) expressing high levels of granzyme is engineered to express the high affinity chimeric genes CD16/CAR [J]. *Cytotechnology*, 2021, 73 (4): 539–553.
- [26] XU J, NIU T. Natural killer cell-based immunotherapy for acute myeloid leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13 (1): 167.
- [27] YANG K, ZHAO Y, SUN G, *et al.* Clinical application and prospect of immune checkpoint inhibitors for CAR-NK cell in tumor immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2023, 13: 1081546.
- [28] KESHAVARZ A, SALEHI A, KHOSRAVI S, *et al.* Recent findings on chimeric antigen receptor (CAR)-engineered immune cell therapy in solid tumors and hematological malignancies [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13 (1): 482.
- [29] PAN K, FARRUKH H, CHITTEPU VCSR, *et al.* CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41 (1): 119.
- [30] ALBINGER N, PFEIFER R, NITSCHKE M, *et al.* Primary CD33-targeting CAR-NK cells for the treatment of acute myeloid leukemia [J]. *Blood Cancer J*, 2022, 12 (4): 61.
- [31] BARON J, WANG ES. Gemtuzumab ozogamicin for the treatment of acute myeloid leukemia [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2018, 11 (6): 549–559.
- [32] TANG X, YANG L, LI Z, *et al.* First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8 (6): 1083–1089.
- [33] REINHERZ EL, KUNG PC, GOLDSTEIN G, *et al.* Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1980, 77 (3): 1588–1592.
- [34] ABRAMSON HN. Monoclonal antibodies for the treatment of multiple myeloma: an update [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (12): 3924.
- [35] LEIVAS A, VALERI A, CORDOBA L, *et al.* NKG2D-CAR-transduced natural killer cells efficiently target multiple myeloma [J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11 (8): 146.
- [36] GOODRIDGE JP, BJORDAHL R, MAHMOOD S, *et al.* FT576: multi-specific off-the-shelf CAR-NK cell therapy engineered for enhanced persistence, avoidance of self-fratricide and optimized mab combination therapy to prevent antigenic escape and elicit a deep and durable response in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2020, 136 (1): 4–5.
- [37] BJORDAHL R, GAIDAROVA S, GOODRIDGE JP, *et al.* FT576: a novel multiplexed engineered off-the-shelf natural killer cell immunotherapy for the dual-targeting of CD38 and BCMA for the treatment of multiple myeloma [J]. *Blood*, 2019, 134 (1): 3214.
- [38] MAROFI F, RAHMAN HS, THANGAVELU L, *et al.* Renaissance of armored immune effector cells, CAR-NK cells, brings the higher hope for successful cancer therapy [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12 (1): 200.
- [39] GELLER MA, COOLEY S, JUDSON P L, *et al.* A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer [J]. *Cytotherapy*, 2011, 13 (1): 98–107.
- [40] MORGAN MA, BUNING H, SAUER M, *et al.* Use of cell and genome modification technologies to generate improved “off-the-shelf” CAR T and CAR NK cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1965.
- [41] WANG J, TOREGROSA-ALLEN S, ELZEY BD, *et al.* Multispecific targeting of glioblastoma with tumor microenvironment-responsive multifunctional engineered NK cells [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2021, 118 (45): e2107507118.
- [42] HU Z. Tissue factor as a new target for CAR-NK cell immunotherapy of triple-negative breast cancer [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 2815.
- [43] SAHM C, SCHONFELD K, WELS WS. Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61 (9): 1451–1461.
- [44] SCHONFELD K, SAHM C, ZHANG C, *et al.* Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor [J]. *Mol Ther*, 2015, 23 (2): 330–338.
- [45] CAO B, LIU M, WANG L, *et al.* Use of chimeric antigen receptor NK-92 cells to target mesothelin in ovarian cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524 (1): 96–102.
- [46] KLAPDOR R, WANG S, MORGAN M, *et al.* Characterization of a novel third-generation anti-CD24-CAR against ovarian cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (3): 660.
- [47] ZHANG L, LIU M, YANG S, *et al.* Natural killer cells: off-the-shelf cytototherapy for cancer immunosurveillance [J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11 (4): 1770.
- [48] van OSTAIJEN-TEN DAM MM, PRINS HJ, BOERMAN GH, *et al.* Preparation of cytokine-activated NK cells for use in adoptive cell therapy in cancer patients: protocol optimization and therapeutic potential [J]. *J Immunother*, 2016, 39 (2): 90–100.
- [49] DOMOGALA A, MADRIGAL JA, SAUDEMONT A. Cryopreservation has no effect on function of natural killer cells differentiated *in vitro* from umbilical cord blood CD34⁺ cells [J].

- Cytotherapy, 2016, 18 (6) : 754–759.
- [50] HU Y, TIAN Z, ZHANG C. Chimeric antigen receptor (CAR) - transduced natural killer cells in tumor immunotherapy [J] . Acta Pharmacol Sin, 2018, 39 (2) : 167–176.
- [51] SHAH NN, BAIRD K, DELBROOK CP, *et al.* Acute GVHD in patients receiving IL-15/4-1BBL activated NK cells following T-cell-depleted stem cell transplantation [J] . Blood, 2015, 125 (5) : 784–792.
- [52] KLINGEMANN H. Challenges of cancer therapy with natural killer cells [J] . Cytotherapy, 2015, 17 (3) : 245–249.
- [53] CARLSTEN M, CHILDS RW. Genetic manipulation of NK cells for cancer immunotherapy: techniques and clinical implications [J] . Front Immunol, 2015, 6 : 266.
- [54] CROSBY CM, KRONENBERG M. Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells [J] . Nat Rev Immunol, 2018, 18 (9) : 559–574.
- [55] MALLEVAEY T, SELVANANTHAM T. Strategy of lipid recognition by invariant natural killer T cells: ‘one for all and all for one’ [J] . Immunology, 2012, 136 (3) : 273–282.
- [56] HECZEY A, LIU D, TIAN G, *et al.* Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy [J] . Blood, 2014, 124 (18) : 2824–2833.
- [57] NIELSEN MM, WITHERDEN DA, HAVRAN WL. $\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues [J] . Nat Rev Immunol, 2017, 17 (12) : 733–745.
- [58] NUSSBAUMER O, GRUENBACHER G, GANDER H, *et al.* Essential requirements of zoledronate-induced cytokine and $\gamma\delta$ T cell proliferative responses [J] . J Immunol, 2013, 191 (3) : 1346–1355.
- [59] RISCHER M, PSCHERER S, DUWE S, *et al.* Human $\gamma\delta$ T cells as mediators of chimaeric-receptor redirected anti-tumour immunity [J] . Br J Haematol, 2004, 126 (4) : 583–592.
- [60] LONG KB, BEATTY GL. Harnessing the antitumor potential of macrophages for cancer immunotherapy [J] . Oncoimmunology, 2013, 2 (12) : e26860.
- [61] LEWIS CE, POLLARD JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments [J] . Cancer Res, 2006, 66 (2) : 605–612.
- [62] DAHER M, REZVANI K. Outlook for new CAR-based therapies with a focus on CAR NK cells: what lies beyond CAR-engineered T cells in the race against cancer [J] . Cancer Discov, 2021, 11 (1) : 45–58.
- [63] KLICHINSKY M, RUELLA M, SHESTOVA O, *et al.* Chimeric antigen receptor macrophages (CARMA) for adoptive cellular immunotherapy of solid tumors [J] . Cancer Res, 2017, 77 (13 Suppl) : 4575.