

综述

CAR-NK在实体瘤治疗中的研究进展

史佳欣¹, 袁青宏¹, 尉丁², 蒋建利², 边惠洁², 南刚^{2*}

(¹空军军医大学基础医学院学员五大队, 西安 710032; ²空军军医大学国家分子医学转化中心, 基础医学院细胞生物学教研室, 西安 710032)

摘要: 目前嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T, CAR-T)在肿瘤尤其是血液肿瘤的治疗方面已经取得了重大的成果,但是在实体瘤治疗领域仍存在较大的困难,如靶向实体瘤困难、无法有效浸润肿瘤组织、实体肿瘤微环境的免疫抑制性等。而嵌合抗原受体NK细胞可能作为CAR-T疗法治疗实体瘤的替代方案,目前已有多项基于CAR-NK的优化研究进入临床试验阶段。本文通过简述CAR-NK细胞疗法的原理、应用、局限和发展,总结了CAR-NK细胞近几年来在实体瘤治疗中的研究进展,为未来的研究和临床应用提供参考。

关键词: CAR-NK细胞; 免疫治疗; 恶性肿瘤; 实体瘤; NK细胞

Research progress of CAR-NK in the treatment of solid tumors

SHI Jiaxin¹, YUAN Qinghong¹, WEI Ding², JIANG Jianli², BIAN Huijie², NAN Gang^{2*}

(¹No.5 Cadet Regiment, School of Basic Medical Sciences, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China;

²National Translational Science Center for Molecular Medicine, Department of Cell Biology, School of Basic Medicine, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: At present, chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy has made great achievements in the treatment of tumors, especially blood tumors, but there are still great difficulties in the field of solid tumors, such as targeting solid tumors, the inability to effectively infiltrate tumor tissue, and the immune inhibition of the solid tumor microenvironment. Chimeric antigen receptor NK cells may be an alternative to CAR-T therapy for solid tumors, and a number of optimization studies based on CAR-NK have entered the clinical trial stage. By briefly describing the principle, application, limitation and development of CAR-NK cell therapy, this paper summarized the research progress of CAR-NK cells in the treatment of solid tumors in recent years, and provided a reference for future research and clinical application.

Key Words: CAR-NK cell; immunotherapy; malignant tumor; solid tumor; NK cell

近年来的肿瘤治疗方面,免疫疗法发挥了极大的作用,并且成为继手术、放疗和化疗之后治疗癌症的第四块基石。应用免疫疗法在已发生远处转移的肿瘤晚期患者的身上可以实现更长的总生存期(overall survival, OS)和无进展生存期

(progression-free survival, PFS),在部分患者身上甚至实现了完全缓解。目前,临床上实体瘤的免疫治疗包括过继性免疫细胞治疗,PD-1抗体、PD-L1抗体、CTLA-4抗体的免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors, ICIs)以及肿瘤疫苗,

收稿日期: 2024-05-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82372787); 陕西省自然科学基金重点研发计划项目(2023-YBSF-174)

第一作者: E-mail: jiaxin.shi729@foxmail.com

*通信作者: E-mail: nanren3033@163.com

其中的过继性免疫细胞治疗包括嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T, CAR-T)、T细胞受体嵌合型T细胞、树突状细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、多种细胞因子诱导的杀伤细胞、淋巴因子活化杀伤细胞和自然杀伤(natural killer, NK)细胞治疗, 目前来看, CAR-T细胞疗法越来越受到临床医生的重视^[1,2]。而CAR-T细胞疗法虽然在血液肿瘤的治疗方面取得了巨大成就, 但它仍然有诸多局限性, 如靶向实体瘤困难、无法有效浸润肿瘤组织、实体肿瘤微环境的免疫抑制性等^[3]。NK细胞也属于免疫细胞, 在抗肿瘤免疫中发挥着至关重要的作用, 由于NK细胞本身独特的生物学特性, 如来源广泛、靶向相对较广、可以活性调控等特点, CAR-NK疗法应运而生。考虑到CAR-T细胞固有的局限性和非基因编辑NK细胞识别肿瘤的能力与抗肿瘤能力较弱、在体内存活与扩增困难等缺陷, CAR-NK细胞有潜力被认为是降低肿瘤复发并达到症状缓解的新型治疗选择^[4]。本文从CAR-NK细胞疗法的原理、在实体瘤中的治疗应用、CAR-NK疗法面临的挑战、CAR-NK疗法的改进方案四个方面展开综述, 并着重探讨了过继性CAR-NK细胞免疫疗法的机遇和挑战。

1 CAR-NK细胞疗法的原理

CAR是合成的嵌合抗原受体, 其通常包括胞外域、跨膜域和胞内域三个主要部分。其中胞外

域中的抗原结合域通常是一个单链片段scFv分子, 主要由抗体的可变轻链和可变重链及中间的连接肽(Linker)连接组成, 再通过铰链区(Hinge)连接到跨膜结构域, 负责识别抗原^[5]。跨膜域的主要功能在于将CAR分子锚定到细胞膜上, 它对CAR分子表达的稳定性意义重大。胞内域则包括共刺激结构域和信号转导结构域, 其中的信号转导结构域来源于免疫受体酪氨酸激酶的激活基序^[6]。由于第一代CAR只含有CD3 β 构成的信号转导结构域, 没有共刺激域, CAR-T细胞增殖能力较弱, 不能在体内有效清除肿瘤细胞, 因此第二代CAR包含了共刺激分子——CD28、CD137和CD3 ζ ^[7]。之后, 第三代CAR的开发和设计包括3个信号转导结构域和2个共刺激结构域, 第四代CAR的设计引入了一个细胞内结构域, 它们可以共表达一些小分子物质, 如IL-12, 能够触发由细胞因子介导的信号通路或者阻断影响CAR-T细胞功能的一些信号通路, 以获取更强的疗效^[8]。第五代CAR-T是通用型CAR-T细胞, 可以获取健康者的T细胞并且使用基因编辑的方法对其相关基因进行敲除, 然后转入CAR的基因以获得CAR-T细胞, 可以极大地降低治疗的成本。CAR结构也在第二代的基础上新增了激活其他信号通路的共刺激结构域, 包括IL-2R β 和STAT3/5结合基序结构域, 提供了抗原依赖的细胞因子信号(图1)。

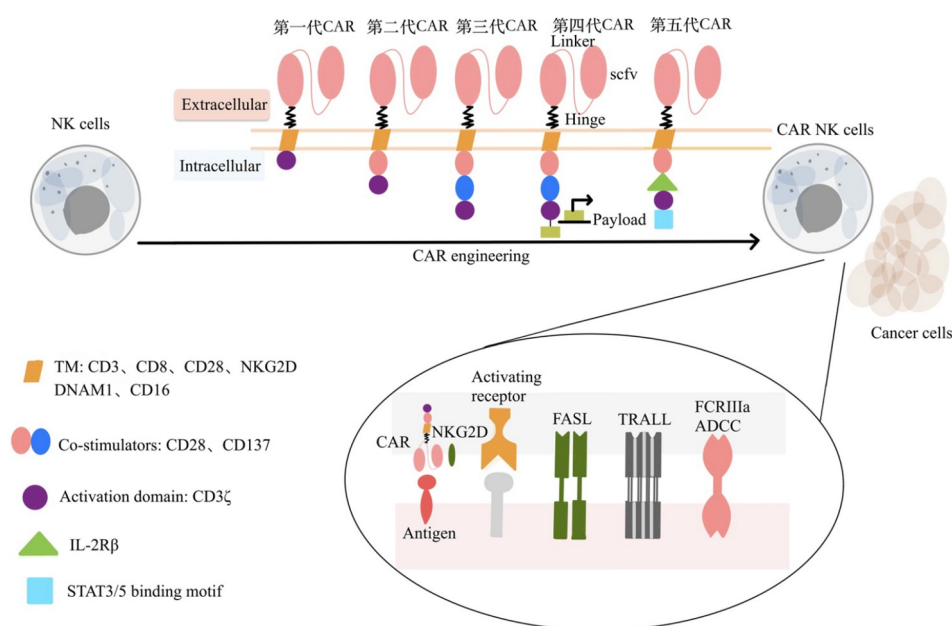


图1 CAR-NK细胞的构建体和靶点

NK细胞是源自造血干细胞CD34⁺前体的先天性细胞毒性淋巴样细胞^[9], 可以对非自身细胞产生快速反应, 具有直接杀死肿瘤细胞和调节免疫反应的双重功能。它们可以在不需要特异性抗原呈递的情况下, 识别并消灭体内异常细胞, 如癌细胞和病毒感染细胞。NK细胞是否攻击目标细胞, 依赖细胞表面的激活与抑制受体来识别决定: 当NK细胞的抑制受体与MHC I类分子结合时, 它们会接收到一个“不要攻击我”的信号, 从而避免对健康细胞的错误攻击。这些特性使NK细胞成为免疫治疗的“潜力股”。

CAR-NK细胞中CAR的构建, 通常是插入基于逆转录病毒或慢病毒载体转染T细胞制备而成的, 随后用于转导原代NK细胞或NK细胞系, 最常见的是NK-92细胞系^[10]。目前CAR-NK细胞免疫疗法的实验需要较高的NK细胞剂量, 并且还需要多次给药, 因此实现NK细胞扩增的优化方案至关重要。目前已经建立了几种复杂的NK细胞扩增方法: 利用IL-12或IL-15或两种细胞因子共同使用, 在长达3个月的持续培养中, NK细胞可扩增1 000倍^[11]。另外, 还有一种经过遗传修饰的K562细胞作为饲养细胞的方法, 使NK细胞在8周时扩增约500倍, 也为后期治疗提供了大量的NK细胞^[11]。

与CAR-T细胞的接合和活化不同, CAR-NK细胞具有不同的细胞因子谱, 只分泌少量的IFN- γ 和GM-CSF^[12], 因此可以有效避免细胞因子释放综合征发生和神经毒性等局限。此外, CAR-NK细胞相

对于CAR-T细胞的一个主要优势是免疫细胞的来源。由于有同种异体反应性和移植物抗宿主病发生的可能性, CAR-T治疗需要使用自体T细胞。而肿瘤患者通常在CAR-T治疗之前都接受放化疗和靶向药物治疗, 可能会导致外周血中T淋巴细胞计数和活性偏低, 使得T淋巴细胞采集数量以及体外活化增殖效率降低, 无法获得足够且活性良好的CAR-T细胞, 从而影响治疗结果^[13]。在杀伤机制方面(图2), 除了CAR介导的肿瘤杀伤途径之外, NK细胞本身还具有多种靶向肿瘤细胞和消除其的机制。例如, NK细胞作为抗体依赖性细胞介导细胞毒性的关键介质, 可以通过其表达的CD16识别并结合肿瘤细胞上IgG抗体的Fc段, 杀死癌细胞。此外, NK细胞表面的杀伤性细胞免疫球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin-like receptors, KIR)是一个重要的免疫检查点, 是位于NK细胞表面的受体, 它可以与细胞表面的人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)分子结合。激活性KIR能够识别并结合肿瘤相关分子, 这些分子通常会表达在受体细胞上, 如病毒感染或转化的癌细胞。这种结合会激活NK细胞, 使其释放杀伤性物质, 如穿孔素和干扰素, 来杀伤肿瘤细胞。抑制性KIR则与宿主细胞表面的HLA分子结合。HLA分子在正常细胞上表达, 并通过与抑制性KIR结合来抑制NK细胞的杀伤作用。这种机制有助于防止NK细胞攻击正常组织细胞。因此, NK细胞还可以通过其表面激活性或抑制性的KIR的结合和/或脱离而被

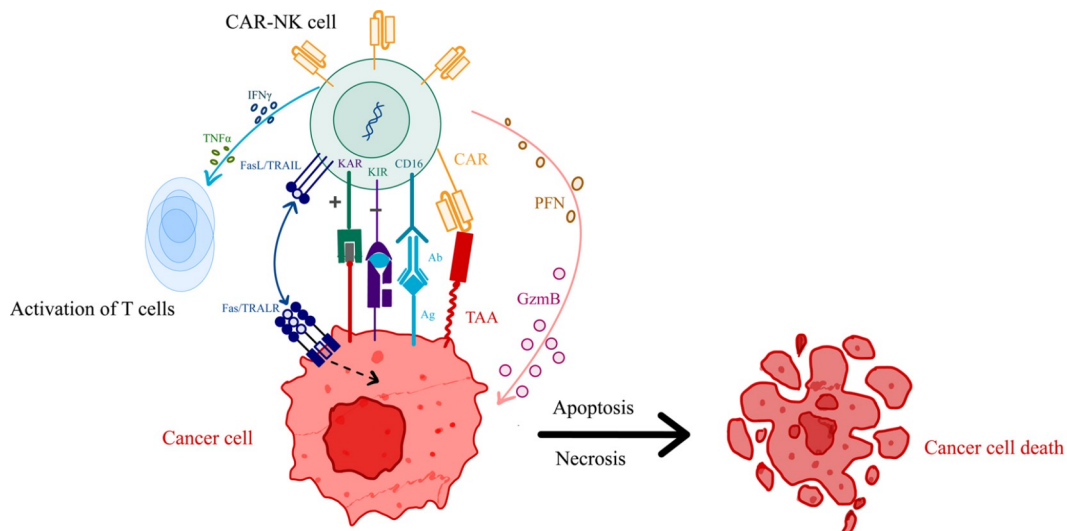


图2 CAR-NK细胞的杀伤机制

激活,从而杀死癌细胞^[14]。综上所述,CAR-NK相对于CAR-T最主要的不同在于其来源的多样性与直接杀伤肿瘤细胞、多种受体识别肿瘤细胞、克服免疫逃逸等多重杀伤机制的应用性,同时也具有比CAR-T更高的安全性,这使其在治疗实体瘤方面具有较大的优势。

2 CAR-NK细胞在实体瘤治疗中的应用

在实体瘤临床试验中,CAR-NK可以通过多种机制识别癌细胞,除了通过CAR识别肿瘤表面抗原以外,CAR-NK细胞还可以通过多种天然毒性受体识别癌细胞,如受体NKp 44、NKp 46、NKp 30、NKG2D和DNAM-1(CD226)等。与CAR-T相比,CAR-NK有更高的靶向作用效果。有研究指出,CAR-NK细胞在治疗实体肿瘤方面较CAR-T细胞更具优势^[15]。首先,CAR-NK细胞在利用NK细胞固有抗肿瘤能力的同时,实现了更具靶向性的杀伤。这使得CAR-NK细胞能够杀死目标癌细胞(通过CAR介导的杀伤),也可以杀死不表达目标的癌细胞。此外,CAR-NK细胞还具有更加广泛的抗肿瘤效应,包括对免疫逃逸机制的克服和对免疫抑制肿瘤微环境的调节。因此,CAR-NK细胞有望成为治疗实体肿瘤的有效免疫疗法。多项临床试验表明,CAR-NK细胞可以杀死长期治疗后表型改变的残留肿瘤细胞,但是,在肿瘤中有时会存在一些孤立的、单一类型的癌细胞,这些细胞与周围其他肿瘤细胞的性质或表达特征有所不同,因此称为“孤独异质性癌细胞”,而CAR-T细胞不能消除孤独异质性癌细胞^[16]。事实上,由于CAR定向抗原的缺乏,癌症干细胞样细胞隐藏在癌细胞中,最终会发生肿瘤免疫逃逸而导致CAR-T治疗无效^[17]。然而,在CAR-NK治疗中,肿瘤免疫逃逸的发生是有限的,因为CAR-NK细胞具有CAR依赖性和CAR非依赖性靶向能力,并且NK细胞表面低表达PD-1,它们受肿瘤表达的PD-L1的影响相对较小^[18]。鉴于以上优势,CAR-NK细胞疗法在临床前和临床试验阶段杀死血液和实体瘤细胞的可能性已被证明,如三阴性乳腺癌、膀胱和肺肿瘤中的细胞^[19]。

一项在动物模型中测试针对表达肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)的CAR-NK细胞的研究表明,基于NK-92细胞系的CAR-NK细胞在体

内和体外可有效杀伤肿瘤细胞。表达CAR-NK-92的NKG2D-DAP10-CD3 ζ 的细胞毒活性和细胞因子分泌均有增强;同时,其在骨肉瘤治疗中也表现出良好的抗肿瘤活性。靶向野生型和EGFR突变的CAR-NK-92细胞也显示出针对胶质母细胞瘤细胞的细胞溶解活性,同时也观察到了IFN- γ 产生。靶向HER2的CAR-NK-92细胞在鼠模型中的胶质母细胞瘤中也同样显示有效^[20]。

目前,CAR-NK疗法在全球范围内已经开展了多项NK细胞肿瘤免疫治疗的临床试验,除了在血液中的有效性外,NK细胞还被认为是在治疗实体瘤的可能重要策略,填补了CAR-T在实体瘤治疗中效果不理想的缺陷。此外,CAR-NK细胞疗法在规避了一些风险的同时,还保留了CAR-T细胞疗法的抗肿瘤活性^[21]。CAR-NK细胞的临床研究已经揭示了其体外和体内的抗肿瘤活性,如在异种移植鼠模型中释放了更少的细胞因子并且移植鼠拥有更高的总存活率^[22]。

目前,已有多项CAR-NK临床试验注册并正在进行中^[14-21]。大多数临床试验是CAR-NK靶向CD19、CD22、BCMA、CD33或CD37,治疗血液中的恶性肿瘤;只有少数临床试验关注CAR-NK细胞靶向表达TAA(包括HER2、ROBO1、PSMA、间皮素和MUC1)的实体转移性肿瘤,但目前尚无报道治疗实体瘤的大规模临床试验^[20]。在靶向CD19阳性B淋巴瘤的I期临床试验中,CAR-NK细胞从具有部分匹配的HLA或无HLA匹配的脐带血中产生,并且用表达编码抗CD19的CAR、IL-15和诱导型半胱天冬酶9基因的逆转录病毒载体转导NK细胞,接受治疗的11例患者中有8例达到客观缓解,其中7例患者得到完全缓解,并且无严重不良反应^[23]。此外,由于NKG2D受体识别肿瘤细胞中的应激分子通常在实体转移性肿瘤中出现上调现象^[24],基于以上现象,针对实体瘤的NKG2DL靶点的CAR-NK临床试验(NCT03415100)正在进行中(表1)。

3 CAR-NK疗法面临的挑战

尽管CAR-NK细胞疗法取得了一些有突破的进展,但其治疗过程中存在的不良反应与目前无适应症获批产品的现状,限制了这些疗法进一步的

表 1 在Clinicaltrial.org注册的CAR-NK治疗实体瘤的临床试验

注册时间(年)	注册编号	靶点	肿瘤类型	CAR-NK构建/来源
2018	NCT03692663	PSMA	前列腺肿瘤	抗PSMA CAR NK细胞(人原代NK细胞)
2019	NCT03940820	ROBO1	实体瘤	靶向ROBO1特异性CAR-NK细胞
2022	NCT05507593	DLL3	复发/难治性广泛期非小细胞肺癌	靶向DLL3特异性CAR-NK细胞
2022	NCT05410717	Claudin6	IV期卵巢癌/睾丸癌/难治性子宫内膜癌	靶向Claudin6的CAR-NK细胞(人原代NK细胞)
2022	NCT05528341	NKG2D-ligand	难治性转移性结直肠癌	NKG2D-CAR-NK92嵌合抗原受体修饰NK92细胞(NK-92细胞系)
2022	NCT05194709	Oncofetal、Trophoblast、Glycoprotein(5T4)	晚期实体瘤	抗5T4癌胎滋养层糖蛋白偶联抗体重定向CAR-NK细胞
2022	NCT05395052	MICA/B	多种实体瘤	FT536作为单一疗法和与单克隆抗体联合(iPS细胞)
2017	NCT03383978	HER2	复发/难治性HER2阳性胶质母细胞瘤	颅内注射NK-92/5.28.z细胞(NK-92细胞系)

应用^[25]。对于目前并没有适应症获批这一现状来看，CAR-NK疗法还存在诸多局限，最主要的问题在于临床证据不足，没有足够的临床数据支持其安全性与有效性，使得监管机构无法对此方法进行批准。此外，与CAR-T免疫治疗相比，CAR-NK细胞治疗的临床数据，如不同宿主体内时空代谢和微环境中影响CAR-NK的因素，也尚未进行广泛研究^[26]。通常，与CAR-T细胞相比，CAR-NK细胞的过继性免疫治疗在大规模实际应用之前也受到限制，如体内增殖问题、活化能力不足以及无法保证治疗的持久性；还有CAR-NK细胞在制备上的障碍，如基因转染效率低、血液中NK细胞比例低、扩增效率有限等^[27,28]。并且，CAR-NK的增殖率低与其老化以及半衰期短等特点，也缩短了治疗窗口期和输注后产生的治疗效果所维持的时间^[29-31]。最后是技术上的局限，CAR-NK疗法仍处于发展阶段，其技术可能还不够成熟。生产CAR-NK细胞的工艺和质量控制仍是一个挑战，而监管机构要求确保制备的CAR-NK细胞符合一定的标准，这也使得CAR-NK细胞不能进行广泛的应用。

随着研究的深入，CAR-NK细胞在肿瘤治疗中也被证实存在一定的局限性，首先是细胞来源的局限性。当前，CAR-NK细胞的制备主要依赖于NK细胞系细胞株，如NK-92细胞系^[32]。这些细胞系虽具备出色的增殖潜能与细胞毒性，但作为异基因细胞，其临床应用中可能引发的免疫排斥反

应成为一大挑战。因此，探索更为理想、低免疫原性的细胞来源，以优化CAR-NK细胞的效能，成为当前研究的重点。

其次是靶向抗原选择的困境，CAR-NK细胞的疗效直接受其所靶向的肿瘤细胞表面抗原的影响。然而，某些抗原在正常组织中的表达，使得CAR-NK细胞在攻击肿瘤细胞时，可能误伤正常细胞，导致不良反应增加^[33]。此外，肿瘤细胞还可能通过减少或丧失特定抗原的表达，实现对CAR-NK细胞攻击的逃避^[34]。因此，精准选择具有高特异性和低脱靶效应的抗原，对于提高CAR-NK细胞的治疗安全性与有效性至关重要。

同时，CAR-NK也同样面临着免疫逃逸的难题。肿瘤细胞具有复杂的免疫逃逸机制，如降低表面配体表达、释放抑制性细胞因子等，这些机制可显著降低CAR-NK细胞的杀伤效果^[35]。如何避免肿瘤细胞的免疫逃逸，并且提高CAR-NK细胞的抗肿瘤能力，是当前CAR-NK细胞治疗领域亟待解决的问题。

除设计外，包括CAR-NK在内的多种CAR疗法在规模化生产上也存在一定的局限性^[36]。生产的复杂性、品质的难控性，以及对专业设备的需求等多方压力使得CAR-NK作为高成本疗法，可能会极大地限制患者的可及性^[37]。简化生产流程从而降低成本，同时满足监管要求将是克服这些挑战和使CAR-NK细胞疗法能够更广泛地提供给有需要

的患者关键。

最后是治疗耐受性的挑战,部分患者在接受CAR-NK细胞治疗后,可能会出现治疗耐受现象,即治疗效果随时间推移而逐渐减弱。这可能与肿瘤细胞对CAR-NK细胞攻击的适应性抵抗机制有关^[38]。因此,深入研究肿瘤细胞的耐受机制,开发有效的应对策略,对于提高CAR-NK细胞治疗的长期疗效具有重要意义。

总的来说,虽然CAR-NK细胞疗法相较于CAR-T细胞疗法的优势明显,但是与CAR-T疗法类似的限制性也出现在CAR-NK细胞疗法中。从靶向抗原的选择、抗原异质性、CAR设计、制造到输注后的困难等,都限制了CAR-NK细胞疗法的临床应用。改善CAR-NK的制造和储存、优化CAR-NK结构、增加CAR-NK细胞向肿瘤中的浸润并维持免疫抑制性肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)的细胞毒性等将是未来的研究重点。此外,NK细胞半衰期较短,也是临床治疗的双刃剑,可在发生严重毒性的情况下具有优势,但也产生了可能需要重复给药以实现持久治疗反应的成本。最后,与T细胞类似,NK细胞在细胞表面上具有活化和抑制性KIR,并且有核细胞上普遍表达的MHC分子可以抑制NK细胞的功能。

4 CAR-NK疗法的改进方案

NK细胞通常不是TME中存在的主要免疫细胞群体,适当修饰CAR-NK细胞可以解决一些障碍。例如,用IL-15修饰的CAR-NK细胞可以显著增强CAR-NK在体内扩增和治疗的持久性^[39],改善小鼠模型中的抗肿瘤活性和总体存活率^[40]。由于到目前为止只有一项I期临床试验报道了此类结果^[21],尚不清楚用细胞因子修饰的CAR-NK细胞是否可以推广到其他恶性肿瘤。一旦NK细胞进入肿瘤部位,免疫抑制性TME可以抑制NK细胞功能^[41]。TME由免疫活性细胞组成,这些免疫活性细胞呈现免疫应答的负调节,如MDSC(髓源性抑制细胞)和TEM(表达Tie2的单核细胞)。免疫调节剂(易普利姆玛)、酪氨酸激酶抑制剂(舒尼替尼)和细胞毒性药物(5-FU、环磷酰胺、多柔比星)可降低TME中MDSC和TEM的发生率^[42-45]。除药物外,目前也可以通过代谢途径来优化CAR-NK疗法以避免TME的免疫抑制

性。如基因工程改造NK细胞以克服代谢物的免疫抑制作用,可以通过过氧化物来氧化相关功能蛋白,改善NK细胞功能^[46]。

此外,还可以通过合理的联合治疗来增强CAR-NK细胞的疗效。现在已经在临床前测试了许多治疗剂与CAR-NK细胞的组合,目的是增加细胞毒性和肿瘤内浸润。研究发现,多靶点抗肿瘤药物-卡博替尼和EGFR导向的CAR-NK-92的组合显示出对体外肾细胞癌的协同作用^[47]。另外,瑞格菲尼(一种多靶点受体酪氨酸激酶抑制剂)和EpCAM导向的CAR-NK-92细胞的联合治疗对结直肠癌的抗肿瘤作用优于任何一种单个药物的治疗^[48]。CAR-NK细胞和PD-L1单抗联合治疗也可以改善抵抗性前列腺癌的抗肿瘤疗效^[49]。抗NKG2A单抗能通过增强T细胞和NK细胞的活性来促进肿瘤免疫^[50]。基于以上临床试验结果,也有研究证明,来源于诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)的CAR-NK细胞CAR-iNK也可以与药物进行联合治疗,这为NK细胞增加了新的来源^[51]。

iPSC衍生的NK细胞具有成熟的表型和强大的细胞溶解活性,可以提供扩展到临床规模的均质CAR-NK细胞群。因此,iPSC衍生的CAR-iNK细胞可以用作癌症免疫治疗的标准化和“现成”产品,其主要操作流程如下。(1) iPSC的获取。iPSC可以从多种来源获得,包括成人体细胞(如皮肤细胞或血细胞)。通过转录因子或其他方法,这些成人细胞可以重新编程成具有多能性的iPSC,定向分化为NK细胞前体细胞。(2)将CAR基因采用基因编辑的方法导入NK前体细胞内获得CAR-iNK细胞,之后在体外进行CAR-iNK的扩增和纯化。(3)进行质量控制和验证后,获得具体产品。通过这些步骤,诱导性多能干细胞可以被成功分化成CAR-NK细胞,为癌症免疫治疗提供了一种潜在的个性化治疗策略^[51]。

最后,为了促进CAR-T与CAR-NK细胞得到更广泛的应用,研究人员也在探究CAR-M(CAR巨噬细胞)作为一种替代疗法的可能性。CAR-M细胞在实体瘤治疗中的主要优势在于可以克服免疫细胞运输和浸润到TME中及TME的免疫抑制性^[14]。目前为止,CAR-M疗法主要还在临床试验阶段,但

临床前研究已经显示出了抗肿瘤活性, 其中一项使用CAR-M靶向HER2的实体瘤临床试验正在进行中^[52]。未来的CAR-M疗法有望与CAR-T细胞或CAR-NK细胞联用来共同提高治疗实体瘤的效果。

5 结语

CAR-NK细胞作为一种新型的抗癌细胞免疫治疗平台, 具有巨大的前景, 并有可能产生“现成的”产品, 这些产品可以随时获得并安全地用于临床。基因操作技术的最新进展使得其能够创造出具有强效抗肿瘤活性的新型CAR-NK细胞产品, 在输注到患者体内后对大多正常组织无毒。基于CRISPR的基因修饰和在CAR构建体中加入新基因以调节TME等多种策略, 是有助于推进该领域的一些关键创新。随着临床前研究和临床试验结果显示的安全性与活性的增加, 预计CAR-NK细胞疗法将继续发展, 并有效改善肿瘤患者的长期生存, 否则患者在治疗方法上的选择将非常有限。

总的来讲, CAR-NK细胞疗法仍是具有重大应用前景的一种治疗方法。NK细胞的非MHC限制性识别、浸润肿瘤组织的能力、细胞溶解能力与不良反应较小等特性成为了CAR-NK区别于CAR-T的主要特征, 一些临床试验的成功也为其成为CAR-T的补充替代疗法提供了可能。然而, 在CAR-NK细胞中也观察到了与CAR-T细胞相关的一些其他挑战, 包括进入肿瘤组织和抵抗其免疫抑制微环境等。在此局限的基础上, CAR-M细胞疗法应运而生, CAR-M细胞介导的疗法通过结合先天性和适应性免疫系统, 从而对肿瘤发起多管齐下的攻击, 解决了当前CAR-T细胞疗法面临的关键挑战。最近的研究结果强调了修饰或未修饰的巨噬细胞与T细胞或NK细胞在肿瘤消退中相互作用的重要性^[53,54]。考虑到这些优势, 是否可以将CAR-M与CAR-NK细胞或CAR-T细胞组合以增强其抗肿瘤功效, 也是一个值得深入探究的方案。最后, iPSC作为CAR-NK细胞的重要来源, 是最有可能使CAR-NK产品化的一项技术, 但其繁琐的操作与较低的成功率使CAR-iNK尚未得到较大范围的应用, 日后可以通过基因编辑技术的发展, 如对CRISPR Cas9技术中sgRNA与Cas9蛋白定向改造, 来简化重编程的步骤, 更加高效地获取iPSC, 同时利用

该技术将一些具有肿瘤杀伤性的细胞因子一并导入NK细胞中, 增强其对实体瘤的治疗效果。期待未来CAR-NK细胞疗法能够成为癌症患者的新希望。

参考文献

- [1] Li H, Song W, Li Z, et al. Preclinical and clinical studies of CAR-NK-cell therapies for malignancies. *Front Immunol*, 2022, 13: 992232
- [2] 刘莹莹, 文金生, 邢景军, 等. 原发性恶性骨肿瘤免疫疗法研究现状及展望. *生命的化学*, 2022, 42(2): 283-290
- [3] Maalej KM, Merhi M, Inchakalody VP, et al. CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 20
- [4] Gang M, Marin ND, Wong P, et al. CAR-modified memory-like NK cells exhibit potent responses to NK-resistant lymphomas. *Blood*, 2020, 136(20): 2308-2318
- [5] He C, Mansilla-Soto J, Khanra N, et al. CD19 CAR antigen engagement mechanisms and affinity tuning. *Sci Immunol*, 2023, 8(81): eadf1426
- [6] Fujiwara K, Masutani M, Tachibana M, et al. Impact of scFv structure in chimeric antigen receptor on receptor expression efficiency and antigen recognition properties. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527(2): 350-357
- [7] 金文煜, 廖新化. 抗击癌症的新纪元——CAR-T的前世、今生与未来. *生命的化学*, 2021, 41(4): 656-663
- [8] Ingegnere T, Mariotti FR, Pelosi A, et al. Human CAR NK cells: a new non-viral method allowing high efficient transfection and strong tumor cell killing. *Front Immunol*, 2019, 10: 957
- [9] Gunesch JT, Angelo LS, Mahapatra S, et al. Genome-wide analyses and functional profiling of human NK cell lines. *Mol Immunol*, 2019, 115: 64-75
- [10] Althaus J, Nilius-Eliliwi V, Maghnouj A, et al. Cytotoxicity of CD19-CAR-NK92 cells is primarily mediated via perforin/granzyme pathway. *Cancer Immunol Immunother*, 2023, 72(8): 2573-2583
- [11] Ishikawa T, Okayama T, Sakamoto N, et al. Phase I clinical trial of adoptive transfer of expanded natural killer cells in combination with IgG1 antibody in patients with gastric or colorectal cancer. *Int J Cancer*, 2018, 142(12): 2599-2609
- [12] Liu Y, Zhou Y, Huang KH, et al. Targeting epidermal growth factor-overexpressing triple-negative breast cancer by natural killer cells expressing a specific chimeric antigen receptor. *Cell Prolif*, 2020, 53(8): e12858
- [13] Allen ES, Stroncek DF, Ren J, et al. Autologous

- lymphapheresis for the production of chimeric antigen receptor T cells. *Transfusion*, 2017, 57(5): 1133-1141
- [14] Graham LV, Fisher JG, Khakoo SI, et al. Targeting KIR as a novel approach to improve CAR-NK cell function. *J Transl Genet Genom*, 2023, 7(4): 230-235
- [15] Peng L, Renauer PA, Sferruzza G, et al. *In vivo* AAV-SB-CRISPR screens of tumor-infiltrating primary NK cells identify genetic checkpoints of CAR-NK therapy. *Nat Biotechnol*, 2024. doi: 10.1038/s41587-024-02282-4
- [16] Xia J, Minamino S, Kuwabara K. CAR-expressing NK cells for cancer therapy: a new hope. *Biosci Trends*, 2020, 14(5): 354-359
- [17] Wrona E, Borowiec M, Potemski P. CAR-NK cells in the treatment of solid tumors. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5899
- [18] Lu C, Guo C, Chen H, et al. A novel chimeric PD1-NKG2D-41BB receptor enhances antitumor activity of NK92 cells against human lung cancer H1299 cells by triggering pyroptosis. *Mol Immunol*, 2020, 122: 200-206
- [19] Bachiller M, Perez-Amill L, Battram AM, et al. NK cells enhance CAR-T cell antitumor efficacy by enhancing immune/tumor cells cluster formation and improving CAR-T cell fitness. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(8): e002866
- [20] Kiefer A, Prüfer M, Röder J, et al. Dual targeting of glioblastoma cells with bispecific killer cell engagers directed to EGFR and ErbB2 (HER2) facilitates effective elimination by NKG2D-CAR-Engineered NK cells. *Cells*, 2024, 13(3): 246
- [21] Ghaedrahmati F, Akbari V, Seyedhosseini-Ghaheh H, et al. Strong capacity of differentiated PD-L1 CAR-modified UCB-CD34⁺ cells and PD-L1 CAR-modified UCB-CD34⁺-derived NK cells in killing target cells and restoration of the anti-tumor function of PD-1-high exhausted T Cells. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 257
- [22] Li Y, Hermanson DL, Moriarity BS, et al. Human iPSC-Derived natural killer cells engineered with chimeric antigen receptors enhance anti-tumor activity. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(2): 181-192.e5
- [23] Liu E, Marin D, Banerjee P, et al. Use of CAR-Transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors. *N Engl J Med*, 2020, 382(6): 545-553
- [24] Tarannum M, Romee R, Shapiro RM. Innovative strategies to improve the clinical application of NK cell-based immunotherapy. *Front Immunol*, 2022, 13: 859177
- [25] Sanmamed MF, Chen L. A paradigm shift in cancer immunotherapy: from enhancement to normalization. *Cell*, 2018, 175(2): 313-326
- [26] Berrien-Elliott MM, Cashen AF, Cubitt CC, et al. Multidimensional analyses of donor memory-like NK cells reveal new associations with response after adoptive immunotherapy for leukemia. *Cancer Discov*, 2020, 10(12): 1854-1871
- [27] Daher M, Melo Garcia L, Li Y, et al. CAR-NK cells: the next wave of cellular therapy for cancer. *Clin Transl Immunology*, 2021, 10(4): e1274
- [28] Karadimitris A. Cord blood CAR-NK cells: favorable initial efficacy and toxicity but durability of clinical responses not yet clear. *Cancer Cell*, 2020, 37(4): 426-427
- [29] Björklund AT, Carlsten M, Sohlberg E, et al. Complete remission with reduction of high-risk clones following haploidentical NK-cell therapy against MDS and AML. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(8): 1834-1844
- [30] Shang J, Hu S, Wang X. Targeting natural killer cells: from basic biology to clinical application in hematologic malignancies. *Exp Hematol Oncol*, 2024, 13(1): 21
- [31] He Y, Yang D, Lin X, et al. Neoadjuvant immunotherapy improves clinical outcomes of patients with esophageal cancer by mediating anti-tumor immunity of CD8⁺ T (Tc1) and CD16⁺ NK cells. *Front Immunol*, 2024, 15: 1412693
- [32] Peng Y, Zhang W, Chen Y, et al. Engineering c-Met-CAR NK-92 cells as a promising therapeutic candidate for lung adenocarcinoma. *Pharmacol Res*, 2023, 188: 106656
- [33] Franzén AS, Boulifa A, Radecke C, et al. Next-generation CEA-CAR-NK-92 cells against solid tumors: overcoming tumor microenvironment challenges in colorectal cancer. *Cancers*, 2024, 16(2): 388
- [34] Vyas M, Requesens M, Nguyen TH, et al. Natural killer cells suppress cancer metastasis by eliminating circulating cancer cells. *Front Immunol*, 2023, 13: 1098445
- [35] Fei F, Rong L, Jiang N, et al. Targeting HLA-DR loss in hematologic malignancies with an inhibitory chimeric antigen receptor. *Mol Ther*, 2022, 30(3): 1215-1226
- [36] Zhou J, Zhang C, Mao W, et al. Development of TSHR-CAR NK-92 cells for differentiated thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 2024, 589: 112251
- [37] Kulemzin S, Evsyukov I, Belovezhets T, et al. Horses for courses in the era of CARs: advancing CAR T and CAR NK cell therapies. *J Pers Med*, 2021, 11(11): 1182
- [38] Fabian KP, Padgett MR, Donahue RN, et al. PD-L1 targeting high-affinity NK (t-haNK) cells induce direct antitumor effects and target suppressive MDSC populations. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000450
- [39] Ma R, Lu T, Li Z, et al. An oncolytic virus expressing IL15/IL15R α combined with off-the-shelf EGFR-CAR NK cells targets glioblastoma. *Cancer Res*, 2021, 81(13): 3635-3648
- [40] Liu E, Tong Y, Dotti G, et al. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity.

- [Leukemia](#), 2018, 32(2): 520-531
- [41] Bagaev A, Kotlov N, Nomie K, et al. Conserved pancreatic microenvironment subtypes predict response to immunotherapy. [Cancer Cell](#), 2021, 39(6): 845-865.e7
- [42] Kobayashi Y, Yamada D, Kawai T, et al. Different immunological effects of the molecular targeted agents sunitinib, everolimus and temsirolimus in patients with renal cell carcinoma. [Int J Oncol](#), 2020, 56(4): 999-1013
- [43] Pilot T, Fratti A, Thinselin C, et al. Heat shock and HSP70 regulate 5-FU-mediated caspase-1 activation in myeloid-derived suppressor cells and tumor growth in mice. [J Immunother Cancer](#), 2020, 8(1): e000478
- [44] Santry LA, van Vloten JP, AuYeung AWK, et al. Recombinant Newcastle disease viruses expressing immunological checkpoint inhibitors induce a pro-inflammatory state and enhance tumor-specific immune responses in two murine models of cancer. [Front Microbiol](#), 2024, 15: 1325558
- [45] Xu WL, Shi BJ, Li SL, et al. Targeted inhibition of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment by low-dose doxorubicin to improve immune efficacy in murine neuroblastoma. [Chin Med J](#), 2020, 134(3): 334-343
- [46] Klopotoska M, Bajor M, Graczyk-Jarzynka A, et al. PRDX-1 supports the survival and antitumor activity of primary and CAR-modified NK cells under oxidative stress. [Cancer Immunol Res](#), 2022, 10(2): 228-244
- [47] Zhang Q, Tian K, Xu J, et al. Synergistic effects of cabozantinib and EGFR-specific CAR-NK-92 cells in renal cell carcinoma. [J Immunol Res](#), 2017, 2017: 1-14
- [48] Lee YE, Ju A, Choi HW, et al. Rationally designed redirection of natural killer cells anchoring a cytotoxic ligand for pancreatic cancer treatment. [J Control Release](#), 2020, 326: 310-323
- [49] Wang F, Wu L, Yin L, et al. Combined treatment with anti-PSMA CAR NK-92 cell and anti-PD-L1 monoclonal antibody enhances the antitumor efficacy against castration-resistant prostate cancer. [Clin Transl Med](#), 2022, 12(6): e901
- [50] Spinosa P, Musial-Siwiek M, Presler M, et al. Quantitative modeling predicts competitive advantages of a next generation anti-NKG2A monoclonal antibody over monalizumab for the treatment of cancer. [CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol](#), 2021, 10(3): 220-229
- [51] Kong D, Kwon D, Moon B, et al. CD19 CAR-expressing iPSC-derived NK cells effectively enhance migration and cytotoxicity into glioblastoma by targeting to the pericytes in tumor microenvironment. [Biomed Pharmacother](#), 2024, 174: 116436
- [52] Klichinsky M, Ruella M, Shestova O, et al. Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. [Nat Biotechnol](#), 2020, 38(8): 947-953
- [53] Su P, Yu T, Zhang Y, et al. Upregulation of MELK promotes chemoresistance and induces macrophage M2 polarization via CSF-1/JAK2/STAT3 pathway in gastric cancer. [Cancer Cell Int](#), 2024, 24(1): 287
- [54] Chupradit K, Muneekaew S, Wattapanitch M. Engineered CD147-CAR macrophages for enhanced phagocytosis of cancers. [Cancer Immunol Immunother](#), 2024, 73(9): 170