

NK 细胞的肿瘤免疫治疗研究进展

聂宇轩, 李彦欣

上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心, 转化所, 卫生部儿童血液肿瘤重点实验室 上海

【摘要】 鉴于 NK 细胞无需抗原提呈即可通过多途径杀伤肿瘤细胞, 它在抗肿瘤免疫应答中发挥重要作用。近年来, NK 细胞的肿瘤免疫治疗研究进展迅速, 包括嵌合抗原受体 NK 细胞疗法、细胞因子动员、免疫检查点阻断、双特异性或三特异性杀伤细胞接合器以及 NK 细胞胞外囊泡等多种治疗策略。本文将对基于 NK 细胞的肿瘤免疫治疗方式的研究进展进行阐述。

【关键词】 自然杀伤细胞; 诱导多能干细胞; 嵌合抗原受体; 细胞因子; 免疫检查点; 双特异性或三特异性杀伤细胞接合器; NK 细胞胞外囊泡

【基金项目】 国家自然科学基金 (32271007); 上海市自然科学基金 (23ZR1441000)

【收稿日期】 2024 年 2 月 26 日 **【出刊日期】** 2024 年 5 月 10 日 **【DOI】** 10.12208/j.jcmb.20240001

Research progress of NK cells in tumor immunotherapy

Yuxuan Nie, Yanxin Li

Pediatric Translational Medicine Institute, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Key Laboratory of Pediatric Hematology & Oncology of China Ministry of Health, Shanghai

【Abstract】 Since NK cells can kill tumor cells through multiple pathways without antigen presentation, it play an important role in anti-tumor immune response. The progress of NK cell-based tumor immunotherapy is rapid, including chimeric antigen receptor NK cell therapy, cytokine priming, immune checkpoint blockade, bi/tri-specific killer cell engagers, and NK cell extracellular vesicles. This article will summarize the progress of NK cell-based tumor immunotherapy.

【Keywords】 Natural killer cell; Induced pluripotent stem cell; Chimeric antigen receptor; Cytokine; Immune checkpoint; Bi/Tri-specific killer cell engager; NK cell extracellular vesicle

1 NK 细胞概述

1.1 NK 细胞分型

自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞属于固有免疫系统, 但它具有类似于适应性免疫系统中 CD8⁺T 细胞的细胞毒特性, 且无需抗原提呈即可直接杀伤靶细胞, 在识别和杀伤肿瘤细胞方面发挥重要作用^[1]。NK 细胞起源于淋巴祖细胞, 逐渐发育为未成熟的 CD56^{bright} NKG2A⁺CD16⁻KIR⁻NK 细胞, 然后分化为成熟的 CD56^{dim} NKG2A^{+/}-CD16⁺KIR⁺NK 细胞^[2]。根据其发育过程中 CD56 等表面蛋白的表达差异, NK 细胞主要被分为 CD56^{bright} 和 CD56^{dim} 两个亚群。CD56^{bright} NK 细胞主要分布在淋巴组织, 分泌 γ 干扰素 (interferon γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (tumor

necrosis α , TNF- α) 等细胞因子, 发挥免疫调节作用; CD56^{dim} NK 细胞主要分布在外周血中, 表达高水平的 CD16 以及细胞毒分子如颗粒酶和穿孔素来杀伤肿瘤细胞^[3, 4]。

1.2 NK 细胞受体

NK 细胞的功能是由激活和抑制信号之间的平衡控制, 这些信号由 NK 细胞表面的激活型和抑制型受体转导。NK 细胞的激活型受体包括天然细胞毒受体 (natural cytotoxicity receptor, NCR) (NKp30、NKp46 和 NKp44)、C 型凝集素家族受体 (NKG2D、CD94/NKG2C、CD94/NKG2E、CD94/NKG2F 和 CD161)、激活型杀伤免疫球蛋白受体 (activating killer immunoglobulin receptor, aKIR) (KIR2DS1、

KIR2DS4、KIR2DL4)、Fc γ RcIIIa (CD16)、共刺激受体 DNAX 辅助分子 1 (DNAX accessory molecule 1, DNAM-1) [5,6]。多数激活型受体需要与细胞因子共激活,或与第二激活受体结合,才能产生强大的功能效应,CD16 是唯一能够独立激活 NK 细胞的受体,无需通过其他受体进行额外激活[7,8]。抑制 NK 细胞激活的受体包括识别 I 类组织相容性复合体 (major histocompatibility complex-I, MHC-I) 的抑制型杀伤免疫球蛋白受体 (inhibitory killer immunoglobulin receptor, iKIR) 和识别非经典人类白细胞抗原 E/G (human leukocyte antigen-E/G, HLA-E/G) 的 NKG2A [5, 6, 9]。MHC-I 类分子表达于正常细胞表面,被 NK 细胞的抑制型受体识别后可以维持免疫耐受 [10]。但肿瘤细胞为逃避 CD8⁺T 细胞的免疫监视会下调其表面 MHC-I 类分子的表达,使得 NK 细胞缺失抑制性配体,激活 NK 细胞杀伤肿瘤细胞,这一过程被称为“missing self”,是 NK 细胞识别肿瘤细胞的机制 [10,11]。NK 细胞激活型受体 NKG2D 与其配体的相互作用比多数其它 NK 细胞受体和配体以及许多 TCR 与 MHC 蛋白的相互作用更强 [12]。Li 等研究发现,对比以 CD16、Nkp44、Nkp46 和 CD28 作为跨膜结构域的 CAR 分子,以 NKG2D 作为跨膜结构域的 CAR 分子对表达间皮素的多种肿瘤细胞表现出更强的杀伤作用 [13]。

1.3 NK 细胞抗肿瘤途径

NK 细胞可以通过多种方式发挥抗肿瘤作用:(1) 抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)。NK 细胞表达 Fc γ RIIIa (CD16), Fc γ RIIIa 与细胞膜内的 Fc ϵ RI- γ 链或 CD3- ζ 链结合, Fc ϵ RI- γ 链和 CD3- ζ 链均有免疫受体酪氨酸活化基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) [14]。IgG 结合肿瘤细胞后,其 Fc 段可与 NK 细胞上的 Fc γ RIIIa 结合, ITAM 被磷酸化,经过信号转导后, NK 细胞脱颗粒并分泌细胞因子,裂解肿瘤细胞 [14,15]。(2) 释放穿孔素和颗粒酶。NK 细胞与肿瘤细胞形成免疫突触后,分泌颗粒被运输至突触,并向突触间隙释放穿孔素和颗粒酶,导致靶细胞裂解 [16,17]。(3) 表达死亡配体。NK 细胞表面表达 Fas 配体和 TNF 相关凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL),当这些配体与肿瘤细胞表面的死亡受体结

合时,可以激活肿瘤细胞中的细胞凋亡蛋白酶,诱导肿瘤细胞凋亡 [17,18]。(4) 分泌细胞因子。NK 细胞可以分泌 IFN- γ 、TNF- α 和趋化因子 (CCL3、CCL4 和 CCL5) 等细胞因子,塑造了固有免疫和适应性免疫反应 [19,20]。IFN- γ 有助于形成淋巴结中的 T 细胞反应,并能抑制肿瘤血管生成 [20,21]。趋化因子是 NK 细胞与其他造血细胞如树突状细胞 (dendritic cell, DC) 共定位的基础 [19]。(5) 分泌 NK 细胞胞外囊泡 (NK cell extracellular vesicle, NKEV)。NK 细胞分泌的 NKEV 具有 NK 细胞的典型标志物,可以在体外和体内发挥抗肿瘤作用 [22]。

1.4 NK 细胞来源

NK 细胞来源广泛,包括外周血 (peripheral blood, PB)、脐带血 (cord blood, CB)、NK-92 细胞系和诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC) [1, 23, 24]。PB-NK 细胞可以通过单采法从供体收集并扩增,CB-NK 细胞可以从脐带血中获得并扩增 [23]。对比 PB-NK 细胞,CB-NK 细胞表型不成熟,细胞毒性弱,抑制型受体 NKG2A 高表达而激活型受体低表达,但 IL-2 或 IL-15 可以刺激 CB-NK 分化为功能更强的效应细胞 [25]。但由于 PB/CB-NK 细胞均来自供体,单位血液的 NK 细胞产量变化大,批次间差异显著 [26]。另外,同一批次 NK 细胞也存在异质性,一方面分离后的 NK 细胞不可避免的混有 T 细胞等淋巴细胞,另一方面 NK 细胞之间的增殖和效应能力也存在很大差异,这限制了其临床应用 [24]。

NK-92 细胞系是来自一位淋巴瘤患者的永生化细胞系,表达 CD16 以外的多种激活受体而不表达部分抑制受体,并且易于产生一致的基因工程 NK 细胞 [23]。因此 NK-92 细胞系解决了 PB 和 CB 来源 NK 细胞在异质性、分离和扩增方面的困难。但其自身仍存在不足:(1) 由于其淋巴瘤起源,NK-92 细胞系需要在输注前进行辐照,而照射会限制其体内扩增和持久存在,降低其抗肿瘤活性 [27]。(2) NK-92 细胞系不表达 CD16,缺乏通过 ADCC 介导细胞杀伤的能力 [28]。

iPSC-NK 细胞是体外获得 NK 细胞的全新来源,目前常用无饲养适应的 iPSC 形成拟胚体 (embryoid body, EB),培养生成造血祖细胞,然后在 NK 细胞分化条件下,诱导发育为成熟的 NK 细胞,并在 4 周内扩增大于 1000 倍 [29]。iPSC-NK 细胞无需从供体

收集, 并且具备原代 NK 细胞的关键特征, 表现出强大的抗肿瘤活性^[23]。iPSC-NK 细胞最大的优势在于清除供体异质性并为基因工程提供理想平台, 对 iPSC 的基因修饰可以一次性完成, 得到稳定的 iPSC 克隆后即可扩增生产无限数量且表型相同的 NK 细胞, 具有发展成为现成产品的巨大潜力^[23, 26]。

2 基于 NK 细胞的肿瘤免疫治疗

2.1 嵌合抗原受体 (Chimeric antigen receptor, CAR) -NK 细胞治疗技术

相比于 CAR-T 细胞治疗, CAR-NK 细胞治疗具有多种优势: 它避免了 CAR-T 细胞疗法中的 CRS 和神经毒性^[30]、MHC 限制性^[31]、抗原逃逸^[32]等问题。并且, iPSC-NK 细胞提供了更加可靠且易于操作的基因工程平台, CAR-NK 细胞可能比 CAR-T 细胞更容易制造^[24]。另外, NK 细胞体内存活时间短^[1], 有利于清除。

2.1.1 NK 细胞转基因技术进展

相较于 T 细胞, NK 细胞的转基因效率低, 为此利用狍狍包膜假型慢病毒载体优化了慢病毒转染技术, 与 G 型水疱性口炎病毒载体对比, 将转染 NK-92 细胞系的效率从 3% 提高到 97%^[33]。另外, 基于非病毒方法通过电穿孔转染 mRNA 或 DNA 具有更高的转染效率和安全性, 但受 mRNA 和 DNA 非整合性的限制, 其表达周期较短^[34]。iPSC-NK 细胞的应用规避了原代 NK 细胞和 NK 细胞系在转导和转染效率方面存在巨大差异的问题, 它为包括病毒载体、转座子和 CRISPR-Cas9 等基因修饰方法提供了便捷的平台, 可以产生表达稳定且一致的 CAR-NK 细胞^[35]。

2.1.2 CAR-NK 分子的结构进展

NK 细胞的 CAR 分子包括 3 个主要部分: 胞外域、跨膜域和胞内域^[23, 36]。胞外域由单克隆抗体的单链可变片段 (single-chain variable fragment, scFv) 和铰链区 (Hinge) 组成。scFv 由抗体的重链可变区 (variable heavy chain, VH)、轻链可变区 (variable light chain, VL) 和中间的 Linker 连接组成, 可以特异性识别并结合肿瘤抗原^[36, 37]。铰链区负责连接 scFv 和跨膜域, 可以调节 CAR 分子与靶抗原之间的距离处于最佳位置, 构建 CAR 多使用 CD8 α 或 CD28 细胞外结构域的衍生物或 IgG 的铰链^[38]。跨膜域将 CAR 的胞外域连接到细胞内信号激活域, CAR-NK

中最常用的跨膜域来自 CD3 ζ 、CD8 和 CD28^[37]。胞内域负责 CAR 识别抗原后激活 NK 细胞杀伤靶细胞。胞内激活信号的数量决定其属于第几代 CAR 分子。第一代 CAR 的胞内域通过单个 CD3 ζ 信号转导域来传导信号; 第二代和第三代 CAR 分别添加一个和两个额外的共刺激分子, 共刺激分子通常来源于 CD28 家族 (如 CD28 和 ICOS)、肿瘤坏死因子受体 (tumor necrosis factor receptor, TNFR) 基因家族 (如 4-1BB、OX40 和 CD27) 或淋巴细胞信号活化分子 (signaling lymphocytic activation molecule, SLAM) 相关受体家族 (如 2B4); 第四代 CAR 在此基础上额外共表达细胞因子, 增强 CAR-NK 细胞在体内的持久性和抗肿瘤活性^[36, 39]。

2.1.3 CAR-NK 细胞治疗在血液肿瘤中应用

(1) B 细胞恶性肿瘤

CD19 在正常和恶性 B 细胞上普遍表达, 因此已成为 CAR-NK 细胞治疗 B 细胞白血病/淋巴瘤的主要研究靶点^[1]。其它靶点如 B 细胞成熟抗原 (B-cell maturation antigen, BCMA)、FMS 样酪氨酸激酶 3 (FMS-like tyrosine kinase 3, FLT3)、NKG2D、CD20 和 CD22 配体等也正在被开发^[40-44]。在 Liu 等^[45]进行的 1 期和 2 期临床试验中, 11 名复发或难治性 NHL 或 CLL 患者接受脐带血来源的 HLA 错配抗 CD19 CAR-NK 细胞输注治疗, 客观缓解率达到 73% (8/11), 完全缓解率达到 64% (7/11)。BCMA 在骨髓瘤细胞中高表达, 健康个体仅在成熟 B 细胞和浆细胞中低水平表达^[46]。Roex 等^[40]提出一种双重靶向策略, 利用 NK-92 细胞系共同表达特异性靶向 CD19 和 BCMA 的 CAR, 并且证明这类双 CAR NK-92 细胞对 CD19⁺和 BCMA⁺肿瘤细胞系以及原代 B-ALL 和骨髓瘤细胞具有较强的特异性细胞毒性。FLT3 主要被描述为 AML 的治疗靶点, 但也在 B-ALL 中过表达^[47]。Oelsner 等^[41]利用 NK-92 细胞表达靶向 FMS 样酪氨酸激酶 3 (FMS-like tyrosine kinase 3, FLT3) 的 CAR, 这类 CAR-NK 细胞在体外对已建立的白血病细胞系和原代 B-ALL 细胞表现出高度选择性细胞毒性, 并在 NSG 小鼠的人 B-ALL 异种移植模型中显著减轻白血病负担。NKG2D 的配体在多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 细胞中高表达, Leivas 等^[42]收集来自 MM 患者的活化和扩增的 NK 细胞, 并设计其表达基于 NKG2D 的 CAR

分子。与记忆 CAR-T 细胞相比, 这类 NKG2D-CAR NK 细胞对 MM 细胞表现出更强的体外细胞毒性而对健康细胞表现出最小的活性, 并且也在体内小鼠模型中高效消除 MM 细胞。Liu 等^[43]设计可以同时识别靶细胞 CD20 抗原和 NKL 细胞 NKG2D 受体的双功能 CAR-NK 细胞, 在体外介导了 NKL 细胞对 CD20 Daudi 细胞的有效杀伤。Liu 等^[44]研究证明 CD22 iPS-CAR NK 细胞在体外对食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 细胞具有很强的抗肿瘤活性。

(2) T 细胞恶性肿瘤

关于 CAR-NK 细胞治疗 T 细胞恶性肿瘤 (包括 T 细胞淋巴细胞白血病 (T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL) 和 T 细胞淋巴瘤) 的相关报道较少, 研究受限于肿瘤抗原异质性。CD5、CD7 等抗原有望发展为 CAR-NK 治疗 T 细胞恶性肿瘤的靶点^[48, 49]。Xu 等^[48]分别使用 T 细胞相关激活受体 4-1BB (BB.z) 和 NK 细胞相关激活受体 2B4 (2B4.z) 在 NK-92 细胞系上设计靶向 CD5 的 CAR, BB.z-NK 细胞和 2B4.z-NK 细胞均在体外对 CD5⁺ 的恶性细胞表现出特异性的细胞毒性, 延长了 T-ALL 异种移植小鼠的存活时间, 并且 2B4.z-NK 细胞的抗 CD5⁺ 恶性肿瘤能力强于 BB.z-NK 细胞。但两类 CAR-NK 细胞均会对正常表达 CD5 的 T 细胞产生副作用。CD7 在 T-ALL 细胞和正常 T 细胞中表达^[50]。You 等^[49]构建了单价 CD7-CAR-NK-92MI 和二价 dCD7-CAR-NK-92MI 两个细胞系, 证明两类 CAR-NK 细胞均能在体外特异性清除 CD7⁺ T-ALL 细胞系和 CD7⁺ T-ALL 原代肿瘤细胞, 并且二价 dCD7-CAR-NK-92MI 在小鼠 T-ALL 原代肿瘤细胞异种移植模型中具有强大的肿瘤定向细胞毒性, 可以显著提高小鼠生存率。

(3) 急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML)

限制 CAR 分子靶向 AML 的主要因素是缺乏理想靶抗原, 主要是由于 CAR 可以靶向的 AML 抗原常在健康的造血干细胞上共表达, 这会导致所有髓系后代消融^[51]。目前, 包括 CD33、CD123 和 CD38 在内的多种在 AML 细胞上高表达的抗原正在被广泛研究^[52-54]。Albinger 等^[52]设计的 CD33-CAR-NK 细胞在体外表现出稳定的 CAR 表达和对 CD33⁺ AML 细胞系和原代 AML 细胞显著增强的杀伤能力, 并能

在 OCI-AML2 异种移植小鼠模型中有效清除骨髓、脾和外周血中的 AML 细胞, 且未见明显副作用。Caruso 等^[53]证明靶向 CD123 的 CAR-NK (CAR.CD123-NK) 细胞不仅在体外对 CD123⁺ AML 细胞系和 CD123⁺ 原代母细胞表现出显著的抗肿瘤能力, 而且在两种人类 AML 免疫缺陷小鼠动物模型中也表现出显著的抗白血病活性。此外, 对比 CAR.CD123-T 细胞, CAR.CD123-NK 细胞在人源化小鼠模型中不会导致正常造血功能的消融, 有更优越的安全性。Gurney^[54]等应用天然低表达 CD38 的 NK 细胞系 KHYG-1 和扩增过程中已敲除 CD38 的同种异体 NK 细胞来分别表达亲和优化的 CD38 CAR, 两类 CAR-NK 细胞克服了 CD38 表达相关的自相残杀, 能够有效靶向 AML 母细胞, 并且最大程度减少对正常髓系细胞的非肿瘤靶向毒性。

2.1.2 CAR-NK 细胞治疗实体瘤

目前 CAR-NK 细胞对实体瘤患者的治疗效果有限。一方面 NK 细胞浸润实体瘤困难, 另一方面肿瘤微环境中缺氧、腺苷等代谢因素以及免疫抑制性细胞会阻碍 NK 细胞持续处于激活状态, 影响其抗肿瘤功能^[55]。神经胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 高表达表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 或表皮生长因子受体 III 型突变体 (epidermal growth factor receptor variant III, EGFRvIII)^[56]。Ma 等^[57]使用表达 IL-15/IL-15R α 的溶瘤病毒 (OV-IL15C) 与现成的 EGFR-CAR NK 细胞联合靶向治疗胶质母细胞瘤。与对照组溶瘤病毒或空载体转导 NK 细胞相比, OV-IL15C 与 EGFR-CAR NK 细胞分别表现出更强的细胞毒活性。在体内, OV-IL15C 和 EGFR-CAR NK 细胞联合使用比单独使用任何一种治疗都更能产生协同抗肿瘤作用, 并显著延长生存期。Li 等^[13]使用 iPSC-NK 细胞表达含有 NKG2D 跨膜结构域、2B4 共刺激结构域和 CD3 ζ 信号传导结构域的 CAR (NKG2D-2B4 ζ -iPSC-NK)。在卵巢癌异种移植模型中, 对比 PB-NK 细胞、iPSC-NK 细胞和 CD28-41BB ζ -iPSC-NK 细胞, NKG2D-2B4 ζ -iPSC-NK 细胞能够有效抑制肿瘤生长并延长存活时间。胰腺癌中的前列腺干细胞抗原 (prostate stem cell antigen, PSCA) 是 CAR-NK 细胞靶向治疗的候选肿瘤抗原^[58]。Teng 等^[59]设计靶向 PSCA 且表达可溶性 IL-15 的 CAR-NK (PSCA CAR_s15 NK)

细胞, 他们证明 PSCA CAR_{s15} NK 细胞在冻融前后均对 PSCA⁺胰腺癌细胞有明显的抑制作用。在人转移性胰腺癌小鼠模型中, 冷冻的 PSCA CAR_{s15} NK 细胞在最后一次输注后体内持续存活超过 90 天, 并显著延长了移植人胰腺癌的小鼠的存活时间。GPC3 是肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的免疫治疗靶点^[60]。Yu 等^[61]利用 NK-92 细胞系成功生成特异性靶向 GPC3 的 CAR-NK 细胞, 并证明其在体外和体内均能高效特异性识别和杀伤 GPC3⁺HCC 细胞。Tseng 等^[62]发现使用 CD147-CAR 分子转导人原代 NK 细胞和 NK-92MI 细胞系可以在体外特异性杀死恶性 HCC 细胞, 并在小鼠模型中控制 HCC 的进展。间皮素 (Mesothelin, MSLN) 已被用作 CAR-T 细胞治疗胃癌的靶点^[63]。Cao 等^[64]证明靶向 MSLN 的 CAR-NK (MSLN-CAR NK) 细胞能特异性杀伤 MSLN⁺胃癌细胞, 并能在小鼠皮下和腹腔肿瘤模型中有效清除胃癌细胞, 显著延长腹膜内荷瘤小鼠的生存期。

2.2 细胞因子动员 NK 细胞

NK 细胞表达多种细胞因子受体, 常见的 γ 链细胞因子 (如 IL-2、IL-7、IL-15 和 IL-21) 通过激活相应受体促进 NK 细胞的存活、代谢、增殖、分泌细胞因子和趋化因子以及细胞毒功能, 对维持体内 NK 细胞的持续存在和效应功能发挥重要作用^[9, 65]。

细胞因子预处理: Romee 等^[66]研究结果表明, 联合使用细胞因子 IL-12、IL-15 和 IL-18 预激活 NK 细胞可以诱导产生记忆样 (memory-like, ML) NK 细胞, 与仅使用低剂量 IL-15 刺激的对照组相比, 记忆样 NK 细胞对 K562 白血病细胞和原代 AML 原始细胞的再刺激均表现出增强的细胞毒活性和分泌 IFN- γ 的能力。并且, 对复发或难治性 AML 患者输注 IL-12、IL-15 和 IL-18 预激活的供体 NK 细胞后, 在 9 例可评估患者中可以观察到 4 例患者得到完全缓解。Gang 等^[67]联合记忆样 NK 和 CAR-NK 两种策略增强 NK 细胞的抗肿瘤作用, 通过修饰细胞因子预激活的 ML NK 表达抗 CD19 CAR, 产生 19-CAR-ML NK 细胞。与常规 CAR-NK 细胞相比, 19-CAR-ML NK 细胞分泌 IFN- γ 和脱颗粒的能力增强, 对 NK 抵抗的淋巴瘤的特异性杀伤能力也显著增强。也有研究报道细胞因子诱导的记忆样 NK 在实体瘤中的应用, Marin 等^[68]证明, 对比常规 NK 细胞, IL12、IL15

和 IL18 诱导的来自健康供体和晚期黑色素瘤患者的 MLNK 细胞表现出增强的攻击黑色素瘤靶点的能力。

基因工程技术分泌细胞因子技术: 为扩增出大量 NK 细胞实现多剂量方案, 许多治疗策略使用基于超生理水平的细胞因子, 但超生理水平的细胞因子持续刺激会导致 NK 细胞状态的改变, 需要进一步的细胞因子刺激来支持生存, 被称为“细胞因子成瘾 (cytokine addiction)”^[69]。在患者体内缺乏细胞因子支持的情况下, NK 细胞会急剧减少, 从而限制了它们在体内的持久性和有效性^[70]。为实现利用细胞因子激活 NK 细胞的同时避免成瘾现象, 该领域已经转向基因工程, 通过对 NK 细胞进行修饰, 设计可自分泌可溶性细胞因子或表达膜结合形式细胞因子的 NK 细胞^[28, 70]。Imamura 等^[71]发现表达膜结合形式 IL-15 的 NK (mbIL15-NK) 细胞可以在没有外源性细胞因子的情况下维持自身在体外和体内的存活和扩增, 并且这种 mbIL15-NK 细胞在体外实验中对白血病、淋巴瘤和实体瘤细胞具有较高的细胞毒性, 在异种移植模型中对白血病和肉瘤细胞具有较高的细胞毒性。Liu 等^[72]利用逆转录病毒载体对 CB-NK 细胞进行基因修饰分泌 IL-15, 证明了 iC9/CAR.19/IL-15 CB-NK 细胞在体外对表达 CD19 的细胞系和原代白血病细胞具有高效杀伤能力, 并在异种移植的 Raji 淋巴瘤小鼠模型中观察到生存期显著延长。Woan 等^[73]通过对 iPSC 进行基因工程 (iADAPTK 细胞) 使其表达高亲和力、不可切割的 Fc 受体 CD16a 和膜结合的 IL-15/IL-15R 融合蛋白, 并且敲除水解 NAD⁺ 的外切酶 CD38。在缺乏外源细胞因子的情况下, iADAPTK 细胞在体内持续存在, 表现出强大抗肿瘤活性。并且, iADAPTK 细胞可以在体外和体内环境中与抗 CD38 的单克隆抗体 daratumumab 联合有效的杀死 MM 和 AML 细胞。

敲除细胞因子负调控因子技术: 细胞因子诱导的含 SH2 蛋白 (cytokine-inducible SH2-containing protein, CIS) 由 CISH 基因编码, 是 NK 细胞中 IL-15 信号传导的关键负调控因子^[74]。Zhu 等^[75]使用 iPSC-NK 细胞开发了人类 CISH 敲除 (CISH^{-/-}) NK 细胞, CISH^{-/-} iPSC-NK 可以在低细胞因子浓度下表现出更好的扩增能力和针对多种肿瘤细胞的细胞毒活性。

表 1 细胞因子动员 NK 细胞的相关临床试验

Intervention	Disease	Phases	Clinical trail number	Results
Fludarabine/Cyclophosphamide IL-12, IL-15 and IL-18-preactivated NK cells	AML	Phase 1	NCT01898793	MLFS=1/9(11%) CR/CRi=4/9(45%)
Fludarabine/Cytarabine/Filgrastim Donor lymphocyte infusion IL-12, IL-15 and IL-18-preactivated NK cells	AML	Phase 1	NCT03068819	ORR=6/8(75%) CR=4/8(50%)
Rescue chemotherapy IL-2+activated and expanded Natural Killer cells	Pediatric leukemia	Phase 1/2	NCT01944982 NCT02074657	ORR=13/18(72%)
Busulfan/Fludarabine/Thymoglobulin IL-2+NK cells Allogeneic stem cell transplantation	AML/MDS/CML	Phase 1 Phase 2	NCT00402558 NCT01390402	After allogeneic stem cell transplantation: Median OS=233 days Median RFS=102 days Median GVHD-free/relapse-free survival=89 days
Lymphodepleting chemotherapy Intravenous(IV) or subcutaneous(SC) recombinant human IL-15 NK cells	AML	Phase 1 Phase 2	NCT01385423 NCT02395822	Overall CR/CRi=14/40(35%) IV IL-15 group: CR/CRi=8/25(32%) SC IL-15 group: CR/CRi=6/15(40%)
Fludarabine/Cyclophosphamide IL-2+NK cells IL-2-diphtheria fusion protein (IL2DT)	AML	Phase 2 Phase 2	NCT00274846 NCT01106950	IL2DT not received group: CR=9/42(21%) IL2DT received group: CR=8/15(53%)
Fludarabine/Cyclophosphamide IL-2+NK cells	AML	Phase 1	NCT00799799	Active disease group: CR=1/5(20%) Molecular relapse group: CR=2/2(100%)
Fludarabine/Cyclophosphamide IL-2+NK cells	AML/MDS	Phase 2	NCT00526292	CR=2/8(25%)
IL-15-stimulated NK cells	Childhood Solid Tumor	Phase 1/2	NCT01337544	PR=3/6(50%) SD=1/6(17%)

AML, acute myeloid leukaemia; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; CR, complete remission; CRi, complete remission with incomplete recovery; MDS, myelodysplastic syndrome; MLFS, morphologic leukemia-free state; ORR, objective response rate; OS, overall survival; PR, partial remission; RFS, relapse free survival; SD, stable disease

2.3 免疫检查点阻断 (immune checkpoint blockade, ICB) 结合 NK 细胞的抗体治疗

ICB 彻底改变了肿瘤的治疗方法。免疫检查点包括抑制性和刺激性免疫检查点分子, 被定义为对免疫反应产生抑制或刺激作用的配体-受体对, 它们多数表达于免疫细胞上, 对于维持自身免疫耐受和调节免疫反应发挥重要作用^[76]。NK 细胞的抑制性免疫检查点包括 MHC-I 类相关的抑制性受体、细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4)、程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein-1, PD-1)、T 细胞免疫球蛋白与 ITIM 结构域 (T cell immunoglobulin and ITIM domain, TIGIT)、CD96、淋巴细胞活化基因 3 蛋白 (lymphocyte activation gene 3 protein, LAG-3) 和 T

细胞免疫球蛋白黏蛋白受体 3 (T cell immunoglobulin mucin receptor 3, TIM-3) 等^[77]。免疫检查点抑制剂通过阻断这些抑制性受体, 释放 NK 细胞的抗肿瘤能力。André 等^[78]发现人源化的抗 NKG2A 单克隆抗体 monalizumab 可以通过阻断 NK 细胞的抑制型受体 NKG2A 来增强 NK 细胞的抗肿瘤活性。他们在 II 期临床试验中联合使用 monalizumab 和表皮生长因子受体的单克隆抗体 cetuximab 治疗复发或转移性头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN), 客观缓解率为 31%。Lin 等^[79]开展了一项涉及 109 位患者的随机临床试验, 对比单独使用抗 PD-1 单克隆抗体 pembrolizumab, pembrolizumab 联合 NK 细胞治疗 PD-L1⁺晚期非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者有更高的中位总体生存率。脊髓灰质

炎病毒受体相关免疫球蛋白结构域 (Poliovirus receptor-related immunoglobulin domain containing, PVRIG) 是新发现的一种抑制性受体^[80]。Li 等^[81]在小鼠肿瘤模型中使用一种大鼠抗小鼠 PVRIG 单抗特异性阻断 PVRIG 与其配体 PVRL2 之间的相互作用, 可以显著抑制 NK 细胞的衰竭并减缓肿瘤生长。另外, 小鼠抗人 PVRIG 单抗在人 NK 细胞和外周血单核细胞 (PBMC) 重构的异种移植小鼠模型中均能减缓肿瘤生长。

尽管基于免疫检查点的抗肿瘤治疗在部分患者中显示出优越的结果, 但仍有很大比例的患者对这类治疗反应不佳。肿瘤细胞获得性遗传改变、T 细胞耗竭、肿瘤微环境中的髓系来源抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cell, MDSC) 和吲哚 2,3-双加氧酶 (indole 2,3-dioxygenase, IDO) 等抑制因素均可能导致患者 ICB 治疗耐药^[82], 如何通过多靶点联合治疗提高患者对 ICB 的反应仍然是一个挑战。

表 2 抗体联合 NK 细胞的相关临床试验

Intervention	Disease	Phases	Clinical trail number	Results
Sintilimab NK cells	NSCLC	Phase 2	NCT03958097	ORR=9/20(45%) CR=1/20(5%)
Cetuximab IL-2+NK cells	Nasopharyngeal carcinoma	Phase 1/2	NCT02507154	SD=4/7(57%)
Fludarabine/Cyclophosphamide/Methylprednisolone Rituximab IL-2+NK cells	NHL/CLL	Phase 2	NCT01181258	ORR=4/15(27%) CR=2/15(13%)
Anti-GD2 antibody Chemotherapy GM-CSF/IL2 NK cells	Neuroblastoma	Phase 1	NCT01576692	ORR=8/13(61.5%) CR=4/13(30.8%)
Trastuzumab Bevacizumab IL-2+NK cells	Breast cancer Gastric cancer	Phase 1	NCT02030561	PR=1/31(3%) SD=16/31(52%)
Monalizumab(anti-NKG2A antibody) Cetuximab	SCCHN	Phase 2	NCT02643550	ORR=8/26(31%)
Pembrolizumab NK cells	NSCLC	Phase 1/2	NCT02843204	Pembrolizumab plus NK cells group: ORR=20/55(36.4%) Pembrolizumab alone group: ORR=10/54(18.5%)

CLL, chronic lymphocytic leukaemia; CR, complete remission; NHL, non-Hodgkin lymphoma; NSCLC, non-small cell lung cancer; ORR, objective response rate; PR, partial remission; SCCHN, squamous cell carcinoma of the head and neck; SD, stable disease

2.4 BiKE/TriKE

双特异性或三特异性杀伤细胞接合器 (bi/tri-specific killer cell engager, BiKE/TriKE) 是一种工程化抗体, 它可以同时靶向肿瘤抗原和 NK 细胞的激活型受体, 在肿瘤特异性抗原和 NK 细胞之间建立免疫突触^[26, 28]。CD16a 是 BiKE 主要靶向的激活型受体, 因为它无需共刺激即可有效激活 NK 细胞^[83]。Kiyota 等^[84]设计了一种靶向 CD16a 和 BCMA 的双特异性接合器 (RO7297089), 证明 RO7297089 可以有效地诱导 ADCC 和抗体依赖的细胞吞噬 (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) 对抗 MM 细胞, 并且可以在食蟹猴中诱导药效学活

性。Kerbaux 等^[85]开发了一种同时靶向白血病/淋巴瘤细胞的 CD30 和 NK 细胞 CD16a 的四价双特异性抗体 (AFM13), 并证明 AFM13 可以在体内外增强 IL12、IL15 和 IL18 诱导的记忆样 NK 细胞和预激活扩增的 CB-NK 细胞对 CD30⁺淋巴瘤细胞的细胞毒性和细胞因子释放能力。

TriKE 通过靶向更多肿瘤抗原或将 IL-15 添加到接合器构建体中来进一步增强疗效^[83]。Chiu 等^[86]创建了一种新的抗 NKG2C/IL-15/抗 CD33 的接合器分子 (NKG2C-KE), 并将其与工程化的 NKG2C⁺iPSC 衍生 NK (iNK) 细胞结合, 该研究证明 NKG2C-KE 可以触发 iNK 细胞介导的对 CD33⁺细胞和原代 AML

细胞的细胞毒效应。由于 AML 细胞上表达的高亲和力 Fc γ R CD64 会抑制抗 CD123 抗体的 ADCC 活性, Gauthier 等^[87]设计可以同时靶向 NK 细胞上的激活型受体 NKp46、CD16a 以及 AML 细胞上 CD123 的 NK 细胞接合器 (CD123-NKCE), 并证明无论 AML 细胞上的 CD64 表达如何, CD123-NKCE 都对 AML 细胞具有高效的抗肿瘤活性, 可以在小鼠 CD123⁺肿瘤模型中的有效控制肿瘤生长。同时, 他们还证明 CD123-NKCE 在非人类灵长类动物中的安全性, 通过持续消耗 CD123⁺细胞来诱导药效学效应。BiKE/TriKE 平台具有高度灵活性, 已逐渐发展为肿瘤免疫治疗中极具前途的工具。

2.5 NKEV

细胞外囊泡 (extracellular vesicle, EV) 是一种生物纳米囊泡, 负责将蛋白质、mRNA 和 miRNA 等活性分子运送到受体细胞并影响细胞功能, 参与细胞间通讯^[88]。EV 的特点是可以复制亲本细胞的特征, 同时由于低免疫原性, 可以避免在靶向运输途中被清除^[26]。NKEV 表达 CD56、NKG2D 等表面标记和穿孔素、颗粒酶等细胞毒性效应蛋白, 对多种肿瘤细胞具有细胞毒性^[89]。NK 细胞衍生的外泌体是一组 30-200nm 的 EV, 已作为一种潜在的治疗药物被广泛研究以验证其抗肿瘤作用^[90]。Kang 等^[91]利用含有抗自然杀伤细胞抗体的氧化石墨烯微流控 (NK-GO) 芯片从活化 NK 细胞中分离 NK 外泌体, 并证明分离得到的外泌体对 NSCLC 患者循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs) 的细胞毒作用。Neviani 等^[92]发现 NK 细胞来源的外泌体携带肿瘤抑制因子 microRNA (miR) -186, 将 miR-186 异位递送至神经母细胞瘤细胞和 NK 细胞后, 可以在体外和体内有效抑制 MYCN 扩增的神经母细胞瘤的存活和迁移, 并阻止 TGF- β 1 依赖性对 NK 细胞毒性的抑制。Zhang 等^[93]利用亲水性小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 和疏水性光敏剂 Ce6 修饰 NK 细胞外泌体, 开发了一种光激活沉默 NK 细胞衍生的外泌体 (light-activatable silencing NK-derived exosome, LASNEO) 系统, 并证明了 LASNEO 系统在 HepG2 异种移植肝癌模型和 CT26 异种移植肿瘤模型中的抗肿瘤作用。Tao 等^[94]开发了一种新的仿生纳米平台 Exo_{CAR/T7}@Micelle, 由 CAR-NK 细胞衍生的外泌体 (Exo_{CAR}) 和纳米炸弹 (Micelle) 组成,

通过破坏铁死亡防御机制来增强抗肿瘤治疗。Exo_{CAR/T7}@Micelle 可以成功穿过血脑屏障, 选择性靶向 HER2⁺乳腺癌脑转移 (breast cancer brain metastasis, BCBM) 细胞, 显著延长 HER2⁺BCBM 小鼠的生存时间。

尽管 NKEV 在临床肿瘤治疗方面显示出巨大潜力, 但其发展仍处早期阶段。NK 细胞亚群和状态对 NKEV 异质性的影响、NKEV 的生产效率以及有效治疗剂量所需的 EV 颗粒数量等问题仍待探索。

3 展望

尽管基于 NK 细胞的肿瘤免疫治疗研究多数仍处于临床试验阶段, 但 NK 细胞自身无需抗原提呈且可以多途径杀伤肿瘤细胞的生物学优势, 以及 iPSC-NK 细胞为基因工程提供的便捷平台使其有望发展成为替代 T 细胞治疗的现货产品。CAR-NK 细胞疗法、细胞因子动员、免疫检查点阻断、BiKE/TriKE 以及 NKEV 等治疗策略的迅速开发与应用已经证明 NK 细胞在肿瘤免疫治疗中的巨大潜力与价值。但目前 NK 细胞免疫治疗仍存在许多问题, 包括成熟 NK 细胞的转染效率低、体外冷冻复苏问题以及体内存活时间有限, 这是其特异的技术瓶颈。另外脱靶效应、肿瘤逃逸、实体瘤渗透性差是免疫治疗的普遍问题。如何通过新的治疗策略或联合治疗方法解决 NK 细胞体内持久性、脱靶效应等问题, 并克服运输障碍、免疫抑制的肿瘤微环境等限制因素, 在未来仍需更多探索。

参考文献

- [1] LI H, SONG W, LI Z, ZHANG M. Preclinical and clinical studies of CAR-NK-cell therapies for malignancies [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 992232.
- [2] CICHOCKI F, GRZYWACZ B, MILLER J S. Human NK Cell Development: One Road or Many? [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2078.
- [3] COOPER M A, FEHNIGER T A, CALIGIURI M A. The biology of human natural killer-cell subsets [J]. *Trends Immunol*, 2001, 22(11): 633-40.
- [4] RAMIREZ-LABRADA A, PESINI C, SANTIAGO L, et al. All About (NK Cell-Mediated) Death in Two Acts and an Unexpected Encore: Initiation, Execution and Activation of Adaptive Immunity [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 896228.

- [5] KONJEVIĆ G, VULETIĆ A, MIRJAČIĆ MARTINOVIĆ K. Natural killer cell receptors: alterations and therapeutic targeting in malignancies [J]. *Immunol Res*, 2016, 64(1): 25-35.
- [6] MAROFI F, SALEH M M, RAHMAN H S, et al. CAR-engineered NK cells; a promising therapeutic option for treatment of hematological malignancies [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 374.
- [7] BRYCESON Y T, MARCH M E, LJUNGGREN H G, LONG E O. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells [J]. *Immunol Rev*, 2006, 214: 73-91.
- [8] BRYCESON Y T, MARCH M E, LJUNGGREN H G, LONG E O. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion [J]. *Blood*, 2006, 107(1): 159-66.
- [9] BERRIEN-ELLIOTT M M, JACOBS M T, FEHNIGER T A. Allogeneic natural killer cell therapy [J]. *Blood*, 2023, 141(8): 856-68.
- [10] GUILLEREY C, HUNTINGTON N D, SMYTH M J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(9): 1025-36.
- [11] KÄRRE K. Natural killer cell recognition of missing self [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(5): 477-80.
- [12] LI P, MORRIS D L, WILLCOX B E, et al. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(5): 443-51.
- [13] LI Y, HERMANSON D L, MORIARITY B S, KAUFMAN D S. Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(2): 181-92.e5.
- [14] WANG W, ERBE A K, HANK J A, et al. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 368.
- [15] CAPUANO C, PIGHI C, BATTELLA S, et al. Harnessing CD16-Mediated NK Cell Functions to Enhance Therapeutic Efficacy of Tumor-Targeting mAbs [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(10).
- [16] VOSKOBOINIK I, WHISSTOCK J C, TRAPANI J A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(6): 388-400.
- [17] MORVAN M G, LANIER L L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(1): 7-19.
- [18] WALLIN R P, SCREPANTI V, MICHAËLSSON J, et al. Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity [J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(10): 2727-35.
- [19] VIVIER E, RAULET D H, MORETTA A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells [J]. *Science*, 2011, 331(6013): 44-9.
- [20] HABIF G, CRINIER A, ANDRÉ P, et al. Targeting natural killer cells in solid tumors [J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16(5): 415-22.
- [21] HAYAKAWA Y, TAKEDA K, YAGITA H, et al. IFN-gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide [J]. *Blood*, 2002, 100(5): 1728-33.
- [22] FEDERICI C, SHAHAJ E, CECCHETTI S, et al. Natural-Killer-Derived Extracellular Vesicles: Immune Sensors and Interactors [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 262.
- [23] GOLDENSON B H, HOR P, KAUFMAN D S. iPSC-Derived Natural Killer Cell Therapies - Expansion and Targeting [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 841107.
- [24] MADDINENI S, SILBERSTEIN J L, SUNWOO J B. Emerging NK cell therapies for cancer and the promise of next generation engineering of iPSC-derived NK cells [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(5).
- [25] MEHTA R S, SHPALL E J, REZVANI K. Cord Blood as a Source of Natural Killer Cells [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2015, 2: 93.
- [26] BOYD-GIBBINS N, KARAGIANNIS P, HWANG D W, KIM S I. iPSCs in NK Cell Manufacturing and NKEV Development [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 890894.
- [27] KLINGEMANN H, BOISSEL L, TONEGUZZO F. Natural Killer Cells for Immunotherapy - Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 91.
- [28] LASKOWSKI T J, BIEDERSTÄDT A, REZVANI K. Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(10): 557-75.
- [29] ZHU H, KAUFMAN D S. An Improved Method to Produce

- Clinical-Scale Natural Killer Cells from Human Pluripotent Stem Cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2048: 107-19.
- [30] LUPO K B, MATOSEVIC S. Natural Killer Cells as Allogeneic Effectors in Adoptive Cancer Immunotherapy [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(6).
- [31] MILLER J S, SOIGNIER Y, PANOSKALTSIS-MORTARI A, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer [J]. *Blood*, 2005, 105(8): 3051-7.
- [32] XIE G, DONG H, LIANG Y, et al. CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer [J]. *EBioMedicine*, 2020, 59: 102975.
- [33] BARI R, GRANZIN M, TSANG K S, et al. A Distinct Subset of Highly Proliferative and Lentiviral Vector (LV)-Transducible NK Cells Define a Readily Engineered Subset for Adoptive Cellular Therapy [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2001.
- [34] SCHMIDT P, RAFTERY M J, PECHER G. Engineering NK Cells for CAR Therapy-Recent Advances in Gene Transfer Methodology [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 611163.
- [35] SHANKAR K, CAPITINI C M, SAHA K. Genome engineering of induced pluripotent stem cells to manufacture natural killer cell therapies [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 234.
- [36] GONG Y, KLEIN WOLTERINK R G J, WANG J, et al. Chimeric antigen receptor natural killer (CAR-NK) cell design and engineering for cancer therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 73.
- [37] PFEFFERLE A, HUNTINGTON N D. You Have Got a Fast CAR: Chimeric Antigen Receptor NK Cells in Cancer Therapy [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(3).
- [38] STOIBER S, CADILHA B L, BENMEBAREK M R, et al. Limitations in the Design of Chimeric Antigen Receptors for Cancer Therapy [J]. *Cells*, 2019, 8(5).
- [39] WANG W, JIANG J, WU C. CAR-NK for tumor immunotherapy: Clinical transformation and future prospects [J]. *Cancer Lett*, 2020, 472: 175-80.
- [40] ROEX G, CAMPILLO-DAVO D, FLUMENS D, et al. Two for one: targeting BCMA and CD19 in B-cell malignancies with off-the-shelf dual-CAR NK-92 cells [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 124.
- [41] OELSNER S, WALDMANN A, BILLMEIER A, et al. Genetically engineered CAR NK cells display selective cytotoxicity against FLT3-positive B-ALL and inhibit in vivo leukemia growth [J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(7): 1935-45.
- [42] LEIVAS A, VALERIA, CórDOBA L, et al. NKG2D-CAR-transduced natural killer cells efficiently target multiple myeloma [J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(8): 146.
- [43] LIU R, LUO Q, LUO W, et al. A Soluble NK-CAR Mediates the Specific Cytotoxicity of NK Cells toward the Target CD20(+) Lymphoma Cells [J]. *Aging Dis*, 2022, 13(5): 1576-88.
- [44] LIU T, DAI X, XU Y, et al. CD22 is a potential target of CAR-NK cell therapy for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 710.
- [45] LIU E, MARIN D, BANERJEE P, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(6): 545-53.
- [46] YAN Z, CAO J, CHENG H, et al. A combination of humanised anti-CD19 and anti-BCMA CAR T cells in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a single-arm, phase 2 trial [J]. *Lancet Haematol*, 2019, 6(10): e521-e9.
- [47] TAKETANI T, TAKI T, SUGITA K, et al. FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy [J]. *Blood*, 2004, 103(3): 1085-8.
- [48] XU Y, LIU Q, ZHONG M, et al. 2B4 costimulatory domain enhancing cytotoxic ability of anti-CD5 chimeric antigen receptor engineered natural killer cells against T cell malignancies [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 49.
- [49] YOU F, WANG Y, JIANG L, et al. A novel CD7 chimeric antigen receptor-modified NK-92MI cell line targeting T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(1): 64-78.
- [50] REINHOLD U, ABKEN H, KUKEL S, et al. CD7- T cells represent a subset of normal human blood lymphocytes [J]. *J Immunol*, 1993, 150(5): 2081-9.
- [51] CUMMINS K D, GILL S. Chimeric antigen receptor T-cell

- therapy for acute myeloid leukemia: how close to reality? [J]. *Haematologica*, 2019, 104(7): 1302-8.
- [52] 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.
- [53] CARUSO S, DE ANGELIS B, DEL BUFALO F, et al. Safe and effective off-the-shelf immunotherapy based on CAR-CD123-NK cells for the treatment of acute myeloid leukaemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 163.
- [54] GURNEY M, STIKVOORT A, NOLAN E, et al. CD38 knockout natural killer cells expressing an affinity optimized CD38 chimeric antigen receptor successfully target acute myeloid leukemia with reduced effector cell fratricide [J]. *Haematologica*, 2022, 107(2): 437-45.
- [55] MAALEJ K M, MERHI M, INCHAKALODY V P, et al. CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 20.
- [56] NEWMAN J P, WANG G Y, ARIMA K, et al. Interleukin-13 receptor alpha 2 cooperates with EGFRvIII signaling to promote glioblastoma multiforme [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1913.
- [57] 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 [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(13): 3635-48.
- [58] DESELM C J, TANO Z E, VARGHESE A M, ADUSUMILLI P S. CAR T-cell therapy for pancreatic cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2017, 116(1): 63-74.
- [59] TENG K Y, MANSOUR A G, ZHU Z, et al. Off-the-Shelf Prostate Stem Cell Antigen-Directed Chimeric Antigen Receptor Natural Killer Cell Therapy to Treat Pancreatic Cancer [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(4): 1319-33.
- [60] NISHIDA T, KATAOKA H. Glypican 3-Targeted Therapy in Hepatocellular Carcinoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(9).
- [61] YU M, LUO H, FAN M, et al. Development of GPC3-Specific Chimeric Antigen Receptor-Engineered Natural Killer Cells for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(2): 366-78.
- [62] TSENG H C, XIONG W, BADETI S, et al. Efficacy of anti-CD147 chimeric antigen receptors targeting hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4810.
- [63] LV J, ZHAO R, WU D, et al. Mesothelin is a target of chimeric antigen receptor T cells for treating gastric cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 18.
- [64] CAO B, LIU M, HUANG J, et al. Development of mesothelin-specific CAR NK-92 cells for the treatment of gastric cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(14): 3850-61.
- [65] ROMEE R, LEONG J W, FEHNIGER T A. Utilizing cytokines to function-enable human NK cells for the immunotherapy of cancer [J]. *Scientifica (Cairo)*, 2014, 2014: 205796.
- [66] ROMEE R, ROSARIO M, BERRIEN-ELLIOTT M M, et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(357): 357ra123.
- [67] GANG M, MARIN N D, WONG P, et al. CAR-modified memory-like NK cells exhibit potent responses to NK-resistant lymphomas [J]. *Blood*, 2020, 136(20): 2308-18.
- [68] MARIN N D, KRASNICK B A, BECKER-HAPAK M, et al. Memory-like Differentiation Enhances NK Cell Responses to Melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(17): 4859-69.
- [69] PFEFFERLE A, JACOBS B, HAROUN-IZQUIERDO A, et al. Deciphering Natural Killer Cell Homeostasis [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 812.
- [70] VALERI A, GARCÍA-ORTIZ A, CASTELLANO E, et al. Overcoming tumor resistance mechanisms in CAR-NK cell therapy [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 953849.
- [71] IMAMURA M, SHOOK D, KAMIYA T, et al. Autonomous growth and increased cytotoxicity of natural killer cells expressing membrane-bound interleukin-15 [J]. *Blood*, 2014, 124(7): 1081-8.
- [72] 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 [J]. *Leukemia*, 2018, 32(2): 520-31.
- [73] WOAN K V, KIM H, BJORDAHL R, et al. Harnessing features of adaptive NK cells to generate iPSC-derived NK cells for enhanced immunotherapy [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(12): 2062-75.e5.

- [74] DELCONTE R B, KOLESNIK T B, DAGLEY L F, et al. CIS is a potent checkpoint in NK cell-mediated tumor immunity [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(7): 816-24.
- [75] ZHU H, BLUM R H, BERNAREGGI D, et al. Metabolic Reprogramming via Deletion of CISH in Human iPSC-Derived NK Cells Promotes In Vivo Persistence and Enhances Anti-tumor Activity [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(2): 224-37.e6.
- [76] ZHANG Y, ZHENG J. Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1248: 201-26.
- [77] KHAN M, AROOJ S, WANG H. NK Cell-Based Immune Checkpoint Inhibition [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 167.
- [78] ANDRÉ P, DENIS C, SOULAS C, et al. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1731-43.e13.
- [79] LIN M, LUO H, LIANG S, et al. Pembrolizumab plus allogeneic NK cells in advanced non-small cell lung cancer patients [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(5): 2560-9.
- [80] ZHU Y, PANICCIA A, SCHULICK A C, et al. Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells [J]. *J Exp Med*, 2016, 213(2): 167-76.
- [81] LI Y, ZHANG Y, CAO G, et al. Blockade of checkpoint receptor PVRIG unleashes anti-tumor immunity of NK cells in murine and human solid tumors [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 100.
- [82] LI B, CHAN H L, CHEN P. Immune Checkpoint Inhibitors: Basics and Challenges [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(17): 3009-25.
- [83] HODGINS J J, KHAN S T, PARK M M, et al. Killers 2.0: NK cell therapies at the forefront of cancer control [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(9): 3499-510.
- [84] KAKIUCHI-KIYOTA S, ROSS T, WALLWEBER H A, et al. A BCMA/CD16A bispecific innate cell engager for the treatment of multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2022, 36(4): 1006-14.
- [85] KERBAUY L N, MARIN N D, KAPLAN M, et al. Combining AFM13, a Bispecific CD30/CD16 Antibody, with Cytokine-Activated Blood and Cord Blood-Derived NK Cells Facilitates CAR-like Responses Against CD30(+) Malignancies [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(13): 3744-56.
- [86] CHIU E, FELICES M, CICHOCKI F, et al. Anti-NKG2C/IL-15/anti-CD33 killer engager directs primary and iPSC-derived NKG2C(+) NK cells to target myeloid leukemia [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(12): 3410-21.
- [87] GAUTHIER L, VIRONE-ODDOS A, BENINGA J, et al. Control of acute myeloid leukemia by a trifunctional Nkp46-CD16a-NK cell engager targeting CD123 [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(9): 1296-306.
- [88] WU C H, LI J, LI L, et al. Extracellular vesicles derived from natural killer cells use multiple cytotoxic proteins and killing mechanisms to target cancer cells [J]. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8(1): 1588538.
- [89] LUGINI L, CECCHETTI S, HUBER V, et al. Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes [J]. *J Immunol*, 2012, 189(6): 2833-42.
- [90] ZHANG H, YANG L, WANG T, LI Z. NK cell-based tumor immunotherapy [J]. *Bioact Mater*, 2024, 31: 63-86.
- [91] KANG Y T, NIU Z, HADLOCK T, et al. On-Chip Biogenesis of Circulating NK Cell-Derived Exosomes in Non-Small Cell Lung Cancer Exhibits Antitumoral Activity [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(6): 2003747.
- [92] NEVIANI P, WISE P M, MURTADHA M, et al. Natural Killer-Derived Exosomal miR-186 Inhibits Neuroblastoma Growth and Immune Escape Mechanisms [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(6): 1151-64.
- [93] ZHANG M, SHAO W, YANG T, et al. Conscriptio of Immune Cells by Light-Activatable Silencing NK-Derived Exosome (LASNEO) for Synergetic Tumor Eradication [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(22): e2201135.
- [94] TAO B, DU R, ZHANG X, et al. Engineering CAR-NK cell derived exosome disguised nano-bombs for enhanced HER2 positive breast cancer brain metastasis therapy [J]. *J Control Release*, 2023, 363: 692-706.

权声明: ©2024 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS