

自然杀伤细胞免疫疗法的创新策略及研究进展

张华^{1,2,3,4}, 杜为^{1,3,4}, 邱录贵^{5,6,7}, 张宇^{1,3,4,8*}

(1. 协和干细胞基因工程有限公司, 天津 300384; 2. 南开大学医学院, 天津 300071; 3. 天津市血液细胞治疗技术企业重点实验室, 天津 300384; 4. 国家干细胞工程产品产业化基地, 天津 300384; 5. 天津市脐带血造血干细胞库, 天津 300384; 6. 中国医学科学院北京协和医学院血液学研究所 血液病医院, 天津 300020; 7. 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020; 8. 中源协和细胞基因工程股份有限公司, 天津 300384)

[摘要] 自然杀伤 (NK) 细胞是一种天然的免疫淋巴细胞, 能够对病毒感染的和恶性转化的细胞产生有效的免疫应答。鉴于其独特的识别杀伤机制, NK 细胞在肿瘤免疫治疗领域受到了广泛关注。然而, NK 细胞单一疗法的体内持久性和有效性面临巨大挑战。为了解决这个难题, 越来越多的研究聚焦于 NK 细胞过继转移治疗策略的开发。通过对 NK 细胞基础生物学知识进行综述, 并且总结不同来源的治疗性 NK 细胞的特征以及临床级 NK 细胞的制备方法, 对不断发展的靶向 NK 细胞功能反应的基因操控和过继转移治疗策略进行概述, 为 NK 细胞免疫治疗产品的开发提供参考。

[关键词] 自然杀伤细胞; 肿瘤; 免疫疗法; 细胞产品; 治疗策略

[中国分类号] R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2023) 01-0043-13

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.2023.01.005

Innovation Strategies and Research Progress of Nature Killer Cell Immunotherapy

ZHANG Hua^{1,2,3,4}, DU Wei^{1,3,4}, QIU Lugui^{5,6,7}, ZHANG Yu^{1,3,4,8}

(1. Union Stem Cell & Gene Engineering Co., Ltd, Tianjin 300384, China; 2. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Tianjin Municipal Key Laboratory of Blood Cell Therapy Technology, Tianjin 300384, China; 4. State Industrialization Base for Stem Cell Engineering Products, Tianjin 300384, China; 5. Tianjin Municipal Bank of Cord Blood Hematopoietic Stem Cell, Tianjin 300384, China; 6. Institute of Hematology & Blood Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; 7. State Key Laboratory of Experimental Hematology, Tianjin 300020, China; 8. Vcanbio Cell & Gene Engineering Co., Ltd, Tianjin 300384, China)

[Abstract] Natural killer (NK) cells, as natural immune lymphocytes, mediate an effective immune response towards virus-infected and malignant transformed cells. Due to its specific recognition and killing mechanism, NK cell has gained wide attention in the field of cancer immunotherapy. However, the durability and effectiveness of NK cell monotherapy in vivo face great challenges. To overcome this problem, more and more studies now focus on the development of therapeutic strategies for NK cell adoptive transfer. This paper reviews the basic biology of NK cells, summarizes the characteristics of different sources of therapeutic NK cells and the methods for the generation of clinical-grade NK cells, and outlines the evolving strategies for genetic manipulation and adoptive transfer that target the functional response of NK cells, so as to provide some reference for the development of NK cell immunotherapy products.

[Key words] NK cell; tumor; immunotherapy; cell product; therapeutic strategy

近年来, 迅速发展新型肿瘤免疫疗法改变了临床肿瘤治疗的传统模式。在免疫治疗领域, 单克隆抗体和工程化免疫细胞的研发和应用取得了重

大进展。虽然用于血液恶性肿瘤自体治疗的靶向肿瘤抗原的嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T) 已取得显著效果, 但 CAR-T 细胞治疗仍然面临许多挑战, 包括高成本、长时间的制造过程, 副作用和自体应用相关的问题。因此, 人们逐渐将焦点转向基于自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞的免疫疗法。NK 细胞于 20 世纪 70 年代被发现, 是一群不需要预先致敏即可产生细胞毒性和分泌细胞因子的先天淋巴细胞亚群, 能够介导体内抗病毒和抗肿瘤反应。不同于 T 细胞和 B 细胞

接受日期: 2022-10-01

项目资助: 国家重点研发计划 (No. 2022YFA1105600); 武汉市科技计划项目 (No. 2020020602012112); 细胞生态海河实验室创新基金 (No. HH22KYZX0046); 天津自贸试验区创新发展项目 (No. ZMCY-03-2021002-01)

*** 通信作者:** 张宇, 博士;

研究方向: 细胞治疗产品的开发;

Tel: 022-83719876-8059; **E-mail:** zhangyu@vcanbio.com

通过抗原受体识别“非我”抗原产生适应性免疫, NK 细胞依赖于细胞表面的激活性和抑制性受体信号的整合, 识别和攻击丢失或下调主要组织相容性复合体 I (major histocompatibility complex class I, MHC-I) 表达的肿瘤细胞, 称为“缺失自我”识别机制^[1]。重要的是, NK 细胞可以通过多种机制杀伤靶细胞。另外, NK 细胞还可以通过人免疫球蛋白 G Fc 段受体 III A (IgG Fc region receptor III A, FcγR III A, 又称 CD16) 介导抗体依赖的细胞毒性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 效应^[2]。在安全性方面, 与 T 细胞不同, NK 细胞表面缺乏 T 细胞受体 (T cell receptors, TCRs), 不会引起移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD)^[3]。这一特点使得 NK 细胞疗法不但可以自体输注, 而且可以实现异体过继转移治疗。此外, NK 细胞治疗产品的细胞来源也丰富多样, 包括外周血 (peripheral blood, PB)、脐带血、NK-92 细胞系、胎盘和干细胞等。目前, 这些体外活化和扩增的 NK 细胞治疗的安全性和临床有效性已在多个临床研究中得到证明^[4]。NK 细胞为一个有吸引力的免疫治疗产品, 针对血液瘤或实体瘤的多个临床试验正在进行中^[5]。随着 NK 细胞一系列体外扩增和基因修饰平台的成熟, NK 细胞有望成为一种“货架型”的细胞治疗产品, 可以提前大量制备、存储并按需用于多个患者。

虽然以 NK 细胞为基础的癌症免疫疗法具有诸多优势, 但 NK 细胞的临床应用仍然面临一系列挑战。首先, 尽管 NK 细胞临床安全性已得到充分验证, 但临床治疗效果仍然有限。其次, 输注后的 NK 细胞在体内存活时间短、持久性差也进一步限制了它的疗效。因此, 目前的研究主要集中在增强 NK 细胞抗肿瘤活性的治疗策略。本文总结了 NK 细胞生物学知识、NK 细胞来源以及体外制备情况, 旨在为提高 NK 细胞疗效的过继治疗策略提供参考。

1 NK 细胞生物学

1.1 NK 细胞的定义、发育分化及体内分布

NK 细胞是 I 型先天淋巴细胞 (group 1 innate lymphoid cells, ILC1s) 的主要亚群, 与 II 型先天

淋巴细胞 (group 2 innate lymphoid cells, ILC2s) B 细胞和 III 型先天淋巴细胞 (group 3 innate lymphoid cells, ILC3s) T 细胞来自于同一淋巴祖细胞。NK 细胞是一群不需要预先致敏就可以攻击病毒感染的和恶性转化的细胞, 并分泌细胞因子干扰素 γ (interferon gamma, IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 等。

人 NK 细胞起源于骨髓中的造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs), 首先由 CD34⁺ HSC 分化为普通淋巴祖细胞 (common lymphoid progenitors, CLPs), 进一步分化为 NK 前体细胞 (NK cell precursors, NKPs)^[6]。NKPs 上 CD122 的表达决定着 NK 细胞谱系的形成。CD56 的出现标志着 NKPs 向 NK 细胞分化的完成。根据 CD56 的表达水平, NK 细胞又可以分为 CD56^{bright} 期和 CD56^{dim} 期两个时期。CD56^{bright} NK 细胞是不完全成熟的, 在获得 CD16 的表达后可以分化成 CD56^{dim} NK 细胞^[7]。虽然两个亚群都会产生细胞因子, 但 CD56^{dim} 亚群具有更强的细胞溶解活性^[8]。在 NK 细胞发育成熟过程中, 白细胞介素 (interleukin, IL)-7、干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 和 FMS 样酪氨酸激酶 3 配体 (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, FLT3L) 是 HSCs 产生 CD122⁺ NKP 的关键因子, 而 IL-5 对于 NK 细胞谱系的形成和 CD122⁺ NKPs 分化为成熟 NK 细胞至关重要^[9]。此外, NK 细胞的发育也受一系列的转录因子的调节。转录因子 E4 启动子结合蛋白 4 (E4 promoter-binding protein 4, E4BP4)、胸腺细胞选择相关 HMG 盒蛋白 (thymocyte selection-associated HMG box, TOX) 和 DNA 结合抑制剂 2 (inhibitor of DNA binding 2, ID2) 在 NK 细胞谱系中是必需的, 而 T 细胞表达的 T 盒 (T-box expressed in T cells, T-bet)、脱中胚蛋白 (eomesodermin, Eomes) 和锌指 E 盒结合同源盒 2 (zinc finger E-box-binding homeobox 2, ZEB2) 为 NK 细胞成熟所必需^[9]。

PB 中 NK 细胞占淋巴细胞的 5%~15%, 主要包含 CD56^{bright}CD16⁻ 和 CD56^{dim}CD16⁺ 两个亚群, 其中 CD56^{dim}CD16⁺ 亚群占总循环 NK 细胞的 90%~95%^[8-10]。CD56^{dim}CD16⁺ 细胞不但对易感靶细胞具

有高度的裂解作用,而且可以通过 CD16 的表达介导 ADCC 效应,同时,也可以分泌细胞因子。除此之外, NK 细胞在其他大多数器官中也都存在。在淋巴结、扁桃体和肠道中的 NK 细胞在表型和功能上与 PB 中的 NK 细胞亚群不同,主要为细胞毒性较弱的 CD56^{bright}CD16⁻ NK 细胞,但是,骨髓、脾和肺中的 NK 细胞主要是细胞毒性较强的 CD56^{dim}CD16⁺ NK 细胞^[11]。

1.2 NK 细胞的激活和抑制受体

NK 细胞的激活和抑制是由激活性和抑制性受体综合调节,这些整合的受体信号决定了相邻的细胞是否被杀伤。通常,人体中的健康细胞大多数表达 MHC-I,也被称为 I 类 HLAs。MHC-I 结合 NK 细胞表面的抑制性杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin-like receptors, KIRs)以抑制 NK 细胞功能,减少对健康自身细胞的破坏。KIR 基因具有多态性,不同基因在 NK 细胞上的随机表达形成多样化的 KIRs 库,因此,特定的 NK 细胞克隆表面至少有一种 KIR 可以与自身 I 类 HLA 相互作用形成免疫耐受,这也是 NK 细胞成熟至有功能细胞的过程,称为“许可”^[12-13]。反之,如果 NK 细胞不表达识别自身 I 类 HLA 的任何一种 KIR,则不具有功能活性^[14]。然而,这种不具有功能活性的 NK 细胞在 IL-2 或 IL-15 等因子的刺激下也可以重新获得功能^[12]。除此之外, C 型凝集素家族成员 NKG2A 与 CD94 形成二聚体后可与非典型的 MHC-I 中的 HLA-E 结合,是 NK 细胞表达的另一个主要抑制性受体^[15]。尽管这些受体代表了 NK 细胞激活的主要检查点,仍然有一些对 NK 细胞毒性稳态调节起重要作用的受体,包括 T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域(T cell immunoglobulin and ITIM domain, TIGIT)、PVR 相关的 Ig 域(PVR-related Ig domain, PVRIG)、淋巴细胞 3 激活基因(lymphocyte-3 activation gene, LAG3)、T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子(T cell immunoglobulin and mucin domain containing-3, TIM3)、程序性死亡分子-1(programmed death-1, PD-1)和 CD96。事实上,阻断以上这些抑制性受体与肿瘤上的配体的相互作用已成为 NK 细胞治疗的有效策略。

除了下调 MHC 分子,肿瘤细胞也会过表达某些配体以激活 NK 细胞受体。NK 细胞上这些激活受体主要包括自然毒性受体(nature cytotoxicity receptors, NCRs) NKp30/NKp44/NKp46、CD16 和 NKG2D 等。CD16 是 NK 细胞表面表达的最有效的激活受体。预先经过 IgG 抗体处理的靶细胞可以通过抗体的 Fc 区与 CD16 分子连接,从而激活 NK 细胞,执行杀伤功能,这一机制被称为抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用“ADCC”效应^[2]。NKp30、NKp44 和 NKp46 通过识别并直接结合到肿瘤或压力胁迫细胞的配体上,从而诱导 NK 细胞激活,启动细胞杀伤和细胞因子分泌。肿瘤和病毒感染细胞上的 MICA、MICB 和 ULBP 家族配体与 NKG2D 结合可激活 NK 细胞的活性^[16]。目前,这些激活受体作为治疗靶点被广泛研究,这对于 NK 细胞功能的提升具有重要意义。

1.3 NK 细胞的功能及作用机制

NK 细胞的功能包括脱颗粒、细胞因子释放和细胞毒性,受激活受体和抑制受体信号的整合控制。在机体中, NK 细胞可以通过“缺失自我”的机制杀伤靶细胞。通常情况下,表达 MHC-I 的正常健康细胞与 NK 细胞抑制受体形成“免疫耐受”,而低表达或不表达 MHC-I 的细胞则被 NK 细胞识别并裂解^[1]。NK 细胞不但可以通过胞吐作用释放穿孔素和颗粒酶等毒性颗粒直接裂解靶细胞,通过活化 NK 细胞表达 FASL/TRAIL,从而诱导细胞凋亡,还可以通过合成和分泌 IFN- γ 、TNF- α 和趋化因子等招募其他免疫细胞产生二次免疫反应^[17-18]。NK 细胞介导的肿瘤杀伤的另外一个关键机制是 ADCC。ADCC 可触发 NK 细胞的脱颗粒反应来杀伤抗体包被的靶细胞,对这一机制的利用临床上主要体现在 NK 细胞与肿瘤特异性治疗单克隆抗体的联用。

2 制备临床级 NK 细胞

2.1 NK 细胞的来源

NK 细胞产品开发过程中面临的首要挑战是获得足量的可用于临床治疗的细胞,而 NK 细胞起始材料的选择可以在一定程度上解决这个问题。目前用于制造临床级 NK 细胞产品的细胞来源包括

NK 细胞系、外周血 NK 细胞 (peripheral blood NK cell, PB-NK)、脐带血 NK 细胞 (umbilical cord blood NK cell, UC-NK)、干细胞来源 NK 细胞和胎盘来源 NK 细胞 (见表 1)。

表 1 NK 细胞来源的总结和比较
Table 1 Comparison of different sources of NK cells

供体来源	PB-NK	UC-NK	胎盘源 NK	NK 细胞系	干细胞源 NK
细胞制备	占淋巴细胞 5%~15%, 必须体外扩增; 细胞扩增和质量存在个体差异	NK 细胞比 PB 多, 可用冻存的 UC, 但仍需体外扩增; 细胞扩增和质量存在个体差异	pNK 占胎盘血 TNC < 2%, 血量比 PB 和 UC 丰富, 细胞需要扩增; 细胞扩增和质量存在个体差异	相对容易扩增; 细胞扩增稳定, 质量均一; 输注前需要辐照	由干细胞诱导分化 NK 方法比较复杂, 但一次获得细胞数量大且质量均一; 规避供体来源细胞污染问题
细胞编辑	转染效率低; 难以挑取单克隆; NK 细胞死亡率高	转染效率低; 难以挑取单克隆; NK 细胞死亡率高	转染效率低; 难以挑取单克隆; NK 细胞死亡率高	来自一个克隆群体, 易进行同质化基因编辑和修饰	来自一个克隆群体, 易于在干细胞阶段进行基因编辑和修饰
细胞毒性	对血液瘤有较好的细胞毒性, 体外和体内毒性均优于 UC-NK	对血液瘤疗效较好, 骨髓归巢性优于 PB-NK	表型和功能与 UC-NK 类似, 体外杀伤多种肿瘤细胞系具有优势	辐照影响细胞在体内增殖能力和持久性, 降低细胞体内疗效; 不表达 CD16 受体, 缺乏 ADCC 效应	对血液瘤和实体瘤都具有显著的细胞毒性, 易于通过基因编辑增强细胞毒性
安全性	良好的耐受性, 没有严重的不良事件; 存在 T 细胞污染风险	良好的耐受性, 没有严重的不良事件; 存在 T 细胞污染风险	良好的耐受性, 没有严重的不良事件; 存在 T 细胞污染风险	良好的耐受性, 没有严重的不良事件; 降低了群体异质性风险	一般耐受性良好; 降低了群体异质性风险; 有致突变风险

PB: 外周血; UC: 脐带血; ADCC: 抗体依赖的细胞毒性; TNC: 总单个核细胞

2.1.1 NK 细胞系 NK 细胞系具有无限增殖能力, 是被用于临床试验较早的 NK 细胞。目前, 已经建立的 NK 细胞系包括 NK-92、YT、NKL、SNK-6、KHYG-1、NK-YS、NKG 和 IMC-1 等。其中, NK-92 细胞系表现出易于扩增培养以及输注后对白血病细胞具有持续的细胞毒性的优点。NK-92 也是美国 FDA 批准用于 I 期和 II 期临床试验的唯一细胞系。NK-92 细胞系来源于快速发展的非霍奇金淋巴瘤患者, 可以通过添加 IL-2 在良好生产规范 (good manufacturing practice, GMP) 条件下大量扩增, 同时可以低温保存且解冻后细胞功能恢复良好^[19-20]。但是, NK-92 不表达 CD16 受体, 无法进行 ADCC 应答^[21]。此外, 由于此细胞系来源于肿瘤患者, 需要在输注前辐照以消除恶性转化和伴随的染色体异常风险, 这降低了 NK-92 细胞体内增殖活性和持久性。

2.1.2 外周血来源 NK 细胞 在 PB 中的 NK 细胞仅占淋巴细胞的 5%~15%, 主要为 CD3⁺CD56^{dim} NK 细胞亚群, 可以相对容易地从患者本身或健康供体中分离出来, 是 NK 细胞疗法临床前研究应用最多的细胞来源。然而, 癌症患者的自体 NK 细胞不但会被自身 MHC 所沉默, 而且 NK 细胞功能往往受到疾病或治疗的损害。因此, 异基因 PB-NK 通常是免疫治疗的首选, 但是为了防止 GVHD 的发生需要

严格控制 T 淋巴细胞的含量。此外, PB-NK 细胞功能活性较强, 也是过继 CAR-NK 细胞生产极好的种子细胞来源。但是, PB-NK 细胞在低温保存后细胞毒性降低, 虽然这种功能损失可以通过细胞因子激活和扩增得到部分恢复, 但这也使得 PB-NK 细胞不是“现货”治疗的最佳选择。

2.1.3 脐带血来源 NK 细胞 与 PB-NK 细胞不同, UC 中的 NK 细胞仅占 TNCs 的 5%, 却为过继免疫治疗提供了独特的同种异体反应优势, 提高了 NK 细胞广泛应用于临床的潜能。尽管在脐带血中幼稚性 NK 细胞比例较高, 但大多数 UC-NK 经过细胞因子刺激扩增后能够分化为功能成熟的 NK 细胞。值得关注的是, 越来越多研究已经转向采用 UC-NK 细胞来产生临床前或临床试验的 NK/CAR-NK 细胞。例如, MD 安德森癌症研究中心进行的首个人体 I / II 期临床研究证明, UC 来源的 CAR-NK 细胞治疗复发和难治性 CD19⁺B 细胞淋巴瘤有效性及安全性均较为满意^[5]。然而, 获得足够的用于临床的 NK 细胞仍然是一个挑战。尽管有一些扩增平台利用一份脐带血可制备出上百剂的 NK 细胞, 但是进行大规模 NK 细胞扩增的产量仍然受限。

2.1.4 干细胞来源 NK 细胞 目前, 研究中用于 NK 细胞生产的干细胞主要包括 CD34⁺HSC、人胚胎

干细胞(human embryo stem cells, hESCs)和人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)。早期的研究已经表明,由CD34⁺HSC可以分化为成熟的NK细胞。Glycostem公司的oNKord[®]即是脐带血CD34⁺HSC分化而来。事实上,hESCs或hiPSCs产生成熟的NK细胞过程中一个很重要的节点是产生CD34⁺细胞。近几年的大量研究已经证实,由hESCs或hiPSCs产生NK细胞具有可行性。不同于PB-NK和UC-NK细胞在数量、体外增殖、异质性及冻融敏感的限制性,干细胞来源尤其是hiPSC来源的NK细胞是从主细胞库经标准化扩增而来,可以产生大量均质化、质量可控且能够长期冷冻保存的NK/CAR-NK细胞产品。因此,干细胞衍生的NK/CAR-NK细胞是开发标准化的治疗产品的一个有吸引力的替代方案。鉴于hiPSC-NK产品的治疗潜力,FDA已经批准了Fate Therapeutics公司hiPSC-NK产品FT500的I期临床试验(NCT03841110),而FT500也是美国FDA批准的首个iPSC衍生细胞产品的临床研究,主要用于治疗晚期实体肿瘤。

2.1.5 胎盘来源NK细胞 胎盘具有的独特免疫生物学特性使其成为同种异体移植种子细胞的优质来源。胎盘来源的NK细胞主要包括胎盘NK细胞(placenta-derived natural killer cells, pNKs)和胎盘CD34⁺HSC分化的NK细胞。pNKs一般是指从供者配型和足月的胎盘组织中分离制备的一群CD56⁺CD3⁻NK细胞。胎盘CD34⁺HSC与上述干细胞来源的NK细胞类似,可以在细胞因子诱导刺激下分化为成熟NK细胞。前期研究表明,体外扩增的pNKs与增加的NKG2D、NKp44和NKp46激活受体表达一致,表现出明显增强的抗肿瘤活性^[22]。与PB-NK细胞相比,pNKs表现出独特的微RNA(microRNA, miRNA)表达谱、免疫表型和更强的体外抗肿瘤能力^[22]。CYNK-001是Celularity公司的一款胎盘造血干细胞来源的“即用型”NK细胞疗法,需冷冻保存,具有同种异体、未经基因编辑修饰的特点。CYNK-001已获得FDA授予治疗恶性神经胶质瘤的孤儿药资格,以及治疗多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)和急性

髓系淋巴瘤(acute myeloid lymphoma, AML)的快速通道资格。目前,该产品正用于治疗多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)(NCT04309084)、AML(NCT04310592)、GBM(NCT04489420)以及新型冠状病毒感染(corona virus disease 2019, COVID-19)(NCT04365101)的多种适应证临床研究中。

2.2 NK细胞扩增平台

NK细胞过继免疫疗法是一种很有前景的癌症治疗方法,但存在的挑战也限制了其可用性及临床有效性。其中,主要的困难是缺乏临床级的生产平台来支持高活性NK细胞的大规模扩增。目前NK细胞的扩增方法包括基于饲养细胞、基于质膜颗粒及无饲养细胞的扩增方法。

2.2.1 基于饲养细胞 饲养细胞分泌大量细胞因子,可以为NK细胞提供微环境并促进细胞增殖和活化。用自体细胞或灭活的饲养细胞体外共培养NK细胞是NK细胞扩增和活化的极好策略。目前,改造的K562是NK细胞扩增应用最广泛的饲养细胞。与表达膜结合IL-15(membrane bound IL-15, mb15)和4-1BB配体(4-1BB ligand, 41BBL)的K562细胞(K562-mb15-41BBL)共培养2周左右可使NK细胞扩增数百倍,但扩增出的NK细胞是端粒酶缩短且衰老的细胞^[23]。此外,ADAM17的蛋白切割活性可使IL-15激活的NK细胞失去CD16分子,削弱NK细胞的ADCC效应^[24]。相比之下,K562细胞表达膜结合IL-21(membrane bound IL-21, mb21)而不是mb15,显著促进了NK细胞的扩增,而不会引起NK细胞的衰老^[23]。K562-mb21-41BBL使NK细胞在3周内平均扩增48 000倍且细胞纯度高于85%^[23]。虽然以上2种饲养细胞扩增的NK细胞均已被应用于临床试验研究中,但K562肿瘤细胞系的使用仍然存在临床安全性风险。因此,辐照的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)、Epstein-Barr病毒淋巴瘤母细胞系(Epstein-Barr virus-transferred lymphoblastoid cell lines, EBV-LCLs)和骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)也常作为饲养细胞被用于NK细胞的扩增。

2.2.2 基于质膜颗粒 肿瘤细胞系的膜颗粒可以有效替代肿瘤细胞系用于 NK 细胞扩增。目前, 应用的质膜颗粒主要来源于 K562-mb15-41BBL 和 K562-mb21-41BBL 细胞, 是在无菌条件下经裂解液和液氮裂解, 梯度离心和蔗糖密度梯度离心纯化得到^[25]。与 K562-mb15-41BBL 质膜颗粒 (PM15 颗粒) 相比, K562-mb21-41BBL 质膜颗粒 (PM21 颗粒) 的 NK 细胞扩增效率和细胞纯度均较高^[26]。此外, PM21 颗粒刺激的 NK 细胞在 28 d 内呈指数增长, 而 PM15 颗粒刺激的 NK 细胞在培养第 22 天就因衰老而停止增长^[26]。相较于基于饲养细胞的方法, 基于质膜颗粒的方法除了具有与饲养细胞相当的增殖能力, 它们还可以提前制备和储存, 并作为“现成的试剂”使用, 大大简化了 NK 细胞的制备过程。此外, 最终的 NK 细胞产品也不存在饲养细胞残留及体内增殖的问题, 降低了饲养细胞可能导致的临床安全风险, 更适合过继 NK 细胞治疗产品的生产。

2.2.3 无饲养细胞的 NK 细胞扩增 虽然以饲养细胞为基础的扩增系统具有良好的体外 NK 细胞扩增特性, 无饲养细胞的扩增方法更符合 GMP 的流程, 并可能更容易获得治疗药品的许可。目前, 被用来激活和扩增 NK 细胞的主要细胞因子包括 IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 和 IL-21。细胞因子的组合直接影响 NK 细胞的成熟、增殖、存活, NK 细胞亚群的分布、激活, 以及细胞因子分泌和细胞毒性功能。IL-2 和 IL-15 是研究最广泛的 NK 细胞激活剂, 两者都可以增强抗肿瘤反应, 在体外联用时, 对 NK 细胞的刺激具有叠加作用; 当 IL-2 和 IL-12 联合使用时, IL-2 和 IL-12 在体外协同增强 NK 细胞的细胞毒性; IL-15/IL-18/IL-27 介导的 NK 细胞激活, 与 IL-2、IL-15 和 IL-15/IL-18 单独或者组合相比, NK 细胞增殖、细胞毒性和 IFN- γ 分泌效果更好^[27]。此外, NK 细胞与 IL-12、IL-15 和 IL-18 的联合, 可产生细胞因子诱导的记忆样 (cytokine induced memory-like, CIMK) NK 细胞^[28]。CIMK NK 细胞是一种长寿命的 NK 细胞, 当被再次激活时表现出增强的功能, 产生更多的 IFN- γ ^[29]。

2.3 NK 细胞规模化扩增系统

传统的培养瓶和培养袋培养的 NK 细胞数量已

无法满足 NK 细胞过继免疫治疗的临床应用需求。另外, 传统的 NK 细胞扩增操作过程需要频繁的补充新鲜培养基、细胞因子和生长因子等 NK 细胞生长所需营养物质, 无疑增加了细胞污染的风险。G-Rex 和生物反应器的应用实现了在封闭的系统中大规模扩增 NK 细胞的需求, 以 XuriTM W25 (GE Healthcare) 为代表的波浪式生物反应器可实现 0.3~25 L 体系高密度 NK 细胞的扩增, 其上游设备 C-Pro 全自动封闭式细胞处理设备可进行单个核细胞的分离和清洗, 而其下游设备 SefiaTM S-2000 细胞处理仪可将最终扩增的 NK 细胞进行浓缩、洗涤及分装, 最后经过程序降温设备实现“现货型”临床级 NK 细胞产品的全封闭制备流程。此外, 国内外越来越多的 NK 细胞扩增系统进入市场, 推进了 NK 细胞标准化制备和 NK 细胞免疫治疗产品上市的进程。

3 NK 细胞治疗的创新策略

随着近期 CAR-NK 和细胞因子刺激 NK 细胞疗法的成功, 基于 NK 细胞的过继转移疗法已经成熟。目前国内外大部分的 NK/CAR-NK 细胞疗法尚处于 I 期或 II 期临床研究, 早期研究结果显示出良好的抗肿瘤活性和体内安全性。基于 NK 细胞的过继转移疗法具有诸多优势, 但也面临着挑战。其中最重要的挑战之一就是 NK 细胞体内存活时间短、功能活性差。为此, 大量的研究以此为研究目标进行探索, 也开发出一系列解决策略 (见图 1)。

3.1 IL-15 信号途径

IL-15 是免疫突触中的关键细胞因子, 促进 CD8⁺T 细胞和 NK 细胞的发育和存活。在 NK 细胞体外扩增中, IL-15 也成为影响细胞增殖和细胞毒性的重要因子。因此, 研究者开发出各种各样激活 IL-15 信号通路的方法来提高 NK 细胞的功能。Imamura 等^[30]研究表明, 在人 PB-NK 细胞中只需表达一种膜结合形式的 IL-15 而不需要添加其他细胞因子就能够提高 NK 细胞在体外和体内的存活和增殖能力, 进而增强对恶性血液瘤和实体瘤的杀伤活性。一种由重组 IL-15 (recombinant IL-15, rIL-15) 或 IL-15 超级激动剂 N-803 和 IL-15R α 融合而成的复合体可以在肿瘤免疫抑制微环境中维持

NK 细胞的增殖和持久性^[31]。此外, IL-15 信号调节因子也成为增强 NK 细胞功能的靶点。因子诱导 SH2 蛋白 (cytokine-inducible SH2-containing protein, CIS) 是 NK 细胞 IL-15 信号传导的抑制剂。NK 细胞响应 IL-15 信号表达 CIS, 而编码 CIS 的基因 *CISH* 的缺失, 能够增强 NK 细胞对 IL-15 的反应, 从而增强 NK 细胞的生存、增殖和效应功能^[32-33]。用 CRISPR/Cas9 编辑技术敲除 iPSC 细胞中的 *CISH* 基因, 此 iPSC 细胞衍生的 NK 细胞的体内持久性和抗肿瘤活性得到了有效提高^[34]。类似的研究也表明, 在 PB-NK 和 UC-NK 细胞中敲除 *CISH* 也可以提高其抗肿瘤活性^[35]。

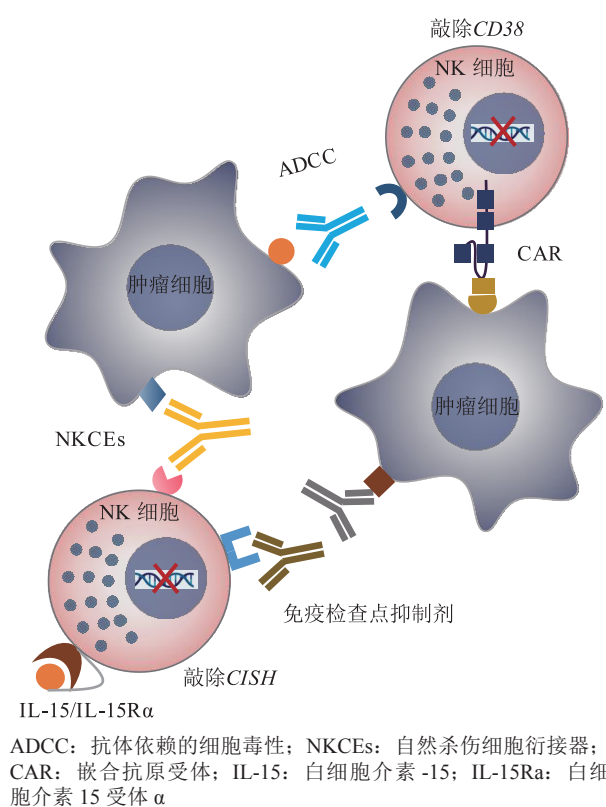


图 1 NK 细胞免疫疗法的策略

Figure 1 Different strategies for NK cell immunotherapy

体外细胞因子诱导培养的 NK 细胞输入体内后会导致其持久性下降, 因此, NK 细胞治疗临床研究常用的方案是将 NK 细胞与 IL-15 共同输注以维持 NK 细胞的体内存活和增殖, 但是这也导致了恶化的免疫反应等安全性问题。通过基因工程修饰 NK 细胞, 使 IL-15 信号途径持续激活, 能够维持

NK 细胞的体内持久性和杀伤效力。然而, 输注的 NK 细胞在体内长期存活也可能具有潜在的安全性问题, 需要长期的药物代谢临床研究来证实。

3.2 CD16A 介导的 ADCC 途径

由人 NK 细胞上的 CD16A 受体介导的 ADCC 是 NK 细胞一种重要的效应机制。激活的 NK 细胞表面 CD16A 会被 ADAM17 蛋白酶切割并从膜上脱落, 导致 NK 细胞失去 ADCC 的能力, 这也是 NK 细胞毒性丧失的一个原因^[36]。为了解决这个问题, Jing 等^[37]将突变的 CD16A 受体 (CD16A/S197P) 转入 iPSC, 阻止了定点突变的 CD16A 受体被 ADAM17 切割。为了获得更好的效果, 结合 CRISPR/Cas9 编辑技术敲除 *ADAM17* 基因的研究也在进行中。NantKwest 公司的高亲和力变体 (high affinity NK, haNK) 来源于专有的 NK-92 主细胞库, 经基因工程改造表达 CD16A 受体的 haNK 可促进癌细胞有效清除^[21]。haNK 与 ImmunityBio 公司的 IL-15 超级激动剂复合物 N-803 联合疗法在难治性 / 转移性默克尔细胞癌患者的 II 期临床试验的总体缓解率为 29%, 且具有良好的耐受性和安全性 (NCT03853317) (见表 2)。非切割和高亲和力双重修饰 CD16A (hnCD16) 的人 iPSC-NK 细胞能够更有效地靶向更多的肿瘤类型^[38]。Fate Therapeutics 公司的 FT516 hnCD16-iNK 细胞功能成熟, 对多种肿瘤靶点表现出增强的 ADCC 效应。人 B 细胞淋巴瘤体内研究表明, 使用 hnCD16-iNK 细胞联合抗 CD20 单克隆抗体治疗可以显著促进 B 细胞淋巴瘤的消退^[38] (见表 2)。已获得 FDA 批准的 FT538 在 FT516 CD16A 修饰基础上增加 IL-15 受体融合蛋白以增强体内存活和持久性, 同时敲除 CD38 以消除抗 CD38 抗体介导的 NK 细胞自相残杀^[39] (见表 2)。目前, FT538 处于多中心、多剂量的 I 期临床试验中, 用于治疗复发 / 难治性急性髓系淋巴瘤和 MM 患者 (NCT04714372) (见表 2)。

鉴于 CD16A 脱落是 NK 从靶细胞脱离并进行下一个靶细胞杀伤的调节机制, 通过对 CD16A 的改造以阻断其在 NK 细胞表面脱落的策略虽然可以极大地提高 NK 细胞的毒性, 但是却降低了 NK 细胞在有限生命内的杀伤效率^[40-41]。因此, 在临床

应用时可能需要输注更多的 NK 细胞数量。此外, NK 细胞持续作用于靶细胞也可分泌大量细胞因子, 可能会引起细胞因子释放综合征 (cytokine release

syndrome, CRS) 等副作用。增加 CD16A 受体表达或提高脱落后 CD16A 受体的再利用的策略或许可以成为增强 NK 细胞 ADCC 效应更有效的替代方法。

表 2 处于临床试验阶段的 NK 细胞产品
Table 2 NK cell products under clinical trial

公司	细胞来源	产品	特点	靶点	联合治疗	冻存产品	适应证	临床试验阶段	登记号
NKGen Biotech	PB, 自体	SNK01	超级 NK 细胞	N/A	N/A	否	难治性实体瘤 / 神经退行性疾病	I	NCT04678453
					GC, 帕博利珠单抗	否	IV 期 NSCLC	I / II	NCT04872634
					阿维单抗或帕博利珠单抗	否	难治性 PD-L1 ⁺ 和 PD-L1 ⁻ 实体瘤	I	NCT03941262
CHA Biotech	PB, 自体	CBT101	N/A	N/A	N/A	是	实体瘤	I	NCT04557306
Gamida Cell	PB, 异体	GDA-201	NAM 扩增	N/A	利妥昔单抗	是	非霍奇金淋巴瘤	I / II	NCT05296525
Nkarta	PB, 异体	NKX101	N/A	NKG2D	N/A	未披露	恶性血液瘤或实体瘤	I	NCT04623944
		NKX019	N/A	CD19	N/A	未披露	B 细胞恶性肿瘤	I	NCT05020678
Wugen	PB, 异体	WU-NK-101	记忆 NK 细胞	N/A	N/A	是	AML	I	NCT05470140
Takeda 和 MD Anderson	UC	未披露	iC9/CAR.19/IL15	CD19	N/A	未披露	B 细胞恶性肿瘤和其他肿瘤	I / II a	NCT03056339
Artiva Biotherapeutics	UC	AB-101	筛选 CD16 158V/V, B-KIR NK 细胞	N/A	利妥昔单抗	是	复发/难治性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤	I / II	NCT04673617
Glycostem Therapeutics	UC, CD34 ⁺ 干细胞	oNKord [®] GTA002	N/A	N/A	N/A	是	AML/MM	I / II	NCT04632316
Celularity	胎盘 CD34 ⁺ 干细胞	CYNK001	N/A	N/A	N/A	是	AML	I	NCT04310592
				N/A	N/A	是	GBM	I	NCT04489420
		CYNK101	高亲和、裂解抵抗 CD16	N/A	曲妥单抗和派姆单抗	是	HER2 ⁺ 胃癌	I / II	NCT05207722
NantKwest	NK-92	haNK	高亲和力 CD16 受体	N/A	N-803, 阿维单抗	是	默克尔细胞癌	II	NCT03853317
		PD-L1 t-haNK	CAR-PD-L1/CD16 变体 /IL-2 变体	PD-L1	N-803, 派姆单抗	是	胃癌和头颈癌	II	NCT04847466
Fate Therapeutics	iPSC	FT500	N/A	N/A	纳武单抗, 派姆单抗, 阿替利珠单抗	是	晚期实体瘤	I	NCT03841110
		FT516	hnCD16	CD20	CD20 单抗	是	BCL	I	NCT04023071
		FT596	hnCD16/IL15RF / CAR-19	CD19, CD20	CD20 单抗或奥比妥珠单抗	是	BCL, CLL	I	NCT04245722
		FT538	hnCD16/IL15RF/CD38-KO	N/A	N/A	是	AML	I	NCT04714372
				CD38	CD38 单抗	是	MM	I	NCT04614636
		FT576	hnCD16/IL15RF/CD38-KO/CAR-BCMA	BCMA, CD38	CD38 单抗	是	MM	I	NCT05182073
GT Biopharma	N/A	GTB-3550	TriKE	CD16/CD33/IL-15	N/A	N/A	AML/MDS	I / II	NCT03214666
Affimed Therapeutics	N/A	AFM13	四价双特异性	CD16A/CD30	N/A	N/A	CD30 ⁺ 淋巴瘤	I	NCT04101331
				NK 细胞	N/A	N/A	CD30 ⁺ 淋巴瘤	I / II	NCT04074746
		AFM24	四价双特异性	CD16A/EGFR	N/A	N/A	实体瘤	I / II	NCT04259450
国健呈诺	PB, 异体	靶向间皮素嵌合抗原受体 NK 细胞注射液	N/A	MSLN	N/A	未披露	上皮卵巢癌	I a	NCT03692637

PB: 外周血; UC: 脐带血; MM: 多发性骨髓瘤; AML: 急性髓系淋巴瘤; GBM: 多形性胶质母细胞瘤; MDS: 骨髓增生异常综合征; NSCLC: 非小细胞肺癌; BCL: 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤; CLL: 慢性淋巴细胞白血病; NAM: 烟酰胺; BCMA: B 细胞成熟抗原; HER2: 人表皮生长因子受体-2; iPSC: 诱导性多能干细胞; PD-L1: 细胞程序性死亡配体 1; EGFR: 表皮生长因子受体; MSLN: 间皮素; N/A: 无; PD-1: 程序性死亡分子-1; CAR: 嵌合抗原受体

3.3 CAR-NK 细胞

截至 2022 年 11 月, Kymriah、Yescarta、Tecartus、Breyanzi、奕凯达、倍诺达、Abecma 和 CARVYKTI 共 8 款 CAR-T 细胞治疗产品获批上市, 彻底革新了癌症免疫治疗领域。同样的, CAR 的加载也成为增强 NK 细胞功能的另一条重要途径。截至 2022 年 7 月, Clinical Trials. gov 网站显示已有超过 20 个临床试验正在进行 CAR-NK 治疗各种血液瘤和实体瘤的研究。一项应用脐带血 CAR-NK 细胞治疗复发或难治性 CD19⁺ 非霍奇金淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病的临床试验结果显示, 11 例患者中有 7 例患者获得完全缓解而没有出现 CRS 或 ICANS^[5]。Nkarta Therapeutics 最近公布的 NKX101 (靶向 NKG2D) 和 NKX019 (靶向 CD19) 治疗血液瘤的最新临床数据显示, NKX101 输注高剂量 CAR-NK 治疗 AML 呈现良好应答, 5 例受试者中 3 例完全缓解, 其中 2 例是微小残留病灶阴性 (NCT04623944; Nkarta Therapeutic 公布的临床数据) (见表 2)。NKX019 的 6 例可评估患者中的 5 例达到客观缓解, 3 例完全缓解 (NCT05020678; Nkarta Therapeutic 公布的临床数据)。两项试验中均未发现剂量限制毒性以及与 CAR-T 疗法副作用相似的不良事件 (Nkarta Therapeutic 公布的临床数据)。

2021 年 11 月 11 日, 国家药品监督管理局药品审评中心审批通过了由国健呈诺生物科技 (北京) 有限公司研发的、针对晚期上皮性卵巢癌治疗的靶向间皮素 (mesothelin, MSLN) 嵌合抗原受体 NK 细胞 (CAR-NK) 注射液的临床试验申请 (见表 2)。该产品是由国家药品监督管理局药品审评中心正式审批通过的国内首例“现货型”异体来源的 CAR-NK 产品, 标志着中国免疫细胞药物治疗实体瘤研究迈入新的里程碑。

CAR-NK 是通过基因工程手段修饰使其表达 CAR, 将识别靶细胞表面抗原的抗体与激活免疫细胞所需要的信号分子连接, 可以突破抑制性受体的限制而激活 NK 细胞, 以此增强 NK 细胞对靶细胞的特异性杀伤。然而, 基于 CAR 方法的检测能力仅限于表面蛋白质。虽然可以通过改造 NK 细胞表达 TCR 来检测细胞内抗原, 但是 NK 细胞没有配备 T

细胞中的完整信号机制, 从而潜在地降低了通过合成 TCR 来有效激活 NK 细胞的能力。此外, 传统上为 T 细胞设计的 CAR 多被用于 CAR-NK 细胞的产生。由于 T 细胞和 NK 细胞激活及作用机制方面的巨大差异, 产生的 CAR-NK 细胞可能并未达到最好的临床疗效, 因此, 针对 NK 细胞的特异性 CAR 结构尤其是激活或共激活信号分子的选择值得进一步研究。

3.4 免疫检查点抑制剂

肿瘤细胞利用 NK 细胞抑制受体进行免疫逃逸的免疫检查点抑制已被证明是一种有效的治疗方法。NK 细胞表面 KIR 类的抑制性受体可与 MHC-I 类分子结合, 抑制 NK 细胞活化。KIR 抑制性受体的这一特点使其成为 NK 细胞免疫检查点抑制剂的首选靶标。IPH2101 是针对 KIR2DL1/2/3 NK 细胞抑制受体的 IgG4 单克隆抗体, 可作为单一疗法或与其他药物联合使用。在前期研究中, IPH2101 已用于各种恶性血液瘤或实体肿瘤的临床评估^[42]。然而, IPH2101 治疗 MM 的单一疗法效果并不明显^[42]。临床前研究表明, IPH2101 与来那度胺联用可增强 NK 细胞的功能而不发生自身免疫^[43]。总的来说, 尽管 IPH2101 不能作为单一的药物用于肿瘤治疗, 但组合疗法仍值得进一步研究。

NKG2A/CD94 是 C 型凝集素家族的异二聚体抑制性受体, 它可识别非经典 MHC-I 分子 HLA-E 作为配体^[15]。HLA-E 在肺、胰腺、胃、结肠和肝等多种器官肿瘤中表达, 与 NKG2A 结合可抑制 NK 细胞的效应功能^[44]。IPH2201 是 NKG2A 的一种免疫检查点抑制抗体。IPH2201 在体外显示出增强 NK 细胞功能的良好效果, 且在一些肿瘤患者体内试验中观察到良好的耐受性^[45]。与 IPH2101 类似, IPH2201 的单一疗法效果依然有限。

除了 MHC-I 相关的抑制受体, 还有其他一些受体涉及 NK 细胞的抑制性免疫检查点, 包括经典的细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) 和 PD-1 受体以及 TIGIT、淋巴细胞活化基因 3 (lymphocyte-activation gene 3, LAG-3) 和 T 淋巴细胞免疫球蛋白黏蛋白 3 (T cell immunoglobulin domain and mucin

domain-3, TIM-3)。在 T 细胞中, 针对 PD-1 或 CTLA-4 的免疫检查点阻断克服了 T 细胞的衰竭, 重建了 T 细胞的抗肿瘤能力^[46]。尽管 PD-1 阻断对 NK 细胞的直接影响不如对 T 细胞明显, 但临床前研究表明, 它可以增强 ADCC 介导的抗肿瘤功能^[47]。目前, 虽然 CTLA-4 阻断的研究通常是在 T 细胞的背景下, 但也有一些研究表明 NK 细胞可以增强 CTLA-4 单抗治疗黑色素瘤的效果^[48]。TIGIT、LAG-3 和 TIM-3 在 NK 细胞中的研究较少。靶向 TIGIT、LAG-3 和 TIM-3 的阻断抗体已在 T 细胞中得到研究, 有待进一步在 NK 细胞中进行验证。

因为 NK 细胞的功能反应是由激活受体和抑制受体信号的整合决定, 用抑制剂阻断抑制信号能够显著增强肿瘤患者 NK 细胞的抗肿瘤反应。然而, 在使用 KIR 和 NKG2A 抗体阻断疗法时应谨慎, 因为有可能会破坏 NK 细胞的功能反应性^[42]。另外, 长期使用免疫检查点抑制剂进行治疗可能无效, 需要短期或多次注射以增强 NK 细胞的反应。此外, T 细胞也表达 CTLA-4、PD-1、TIGIT、LAG-3 和 TIM-3 等受体, 临床试验中很难区分抑制剂是否是作用于 NK 细胞产生的疗效。

3.5 NK 细胞衔接器

为了加强 NK 细胞与肿瘤细胞之间的相互作用并促进 NK 细胞持续的抗肿瘤效应, 研究者们开发出了一种被称为 NKCEs 的新型多功能抗体。NKCEs 可以将 NK 细胞引导到肿瘤部位, 通过结合肿瘤细胞上的目标抗原同时触发 NK 细胞上的激活受体来引发强烈的抗肿瘤反应。NKCEs 的开发策略包括双特异性或三特异性设计, 靶向肿瘤上的一种或多种抗原, 或通过交联细胞因子部分, 促进 NK 细胞增殖和存活, 旨在增强 NK 细胞的抗肿瘤作用。各个研究平台已针对 NK 细胞表面表达的 CD16A、NKG2D 和 NKp46 等激活受体开发出不同的 NKCEs, 以增强 NK 细胞的临床效果。

目前, 靶向 NK 细胞 CD16A 的 NKCEs 研究较多且进展最快。其中, 以 Affimed 公司开发的 AFM13 为代表, 这款 CD16A 双特异性抗体的靶点是 B 和 T 细胞淋巴瘤的表面抗原 CD30^[49]。AFM13 正处于治疗多种实体瘤和恶性血液瘤的 I 期或 II

期临床研究中 (NCT02321592、NCT03192202、NCT01221571、NCT04101331、NCT02665650 和 NCT04074746) (见表 2)。除了单一疗法, AFM13 与 MD 安德森癌症中心提供的脐带血来源的 NK 细胞联用治疗霍奇金和非霍奇金淋巴瘤患者的 I/II 期临床试验结果显示, 13 例接受 II 期推荐剂量治疗的患者达到 100% 的客观缓解率, 且接受两轮治疗后完全缓解率达到 62% (AACR 公布的结果) (见表 2)。与 AFM13 类似的 AFM24 是另一种靶向表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的双特异性药物, 目前正处于治疗转移性结直肠癌和非小细胞肺癌的 I/II 期临床试验 (NCT04259450) (见表 2)。对于三特异性平台, GT Biopharma 公司通过对 BiKE 双特异抗体平台升级改造建立的 TriKE 平台, 引入了 IL-15 融合蛋白, 赋予 NK 细胞靶向性的同时, 增强了 NK 细胞的肿瘤杀伤作用^[50]。目前, 该平台 GTB-3550 (CD16A-IL-15/CD33) 已经进入临床试验阶段 (NCT03214666) (见表 2)。

NK 细胞的另一种激活受体 NKG2D 也可以在感染和肿瘤发生时激活 NK 细胞的杀伤活性。目前已经有多个公司布局靶向 NKG2D 的 NKCEs 研究。Dragonfly Therapeutics 公司核心技术平台为 TriNKET, 其中在此平台开发的 DF1001 (NKG2D-HER2) 与其他药物联用治疗实体肿瘤已处于 I/II 期临床研究阶段 (NCT04143711)。Dragonfly 的另一个三特异性抗体 DF7001 的靶点是 5T4, 这是一种在癌细胞和基质细胞上表达的蛋白质, 支持与多种癌症预后不良相关的肿瘤生长。另外, Xencor 公司利用其 XmAb 平台同样构建了靶向 NKG2D 的双特异性抗体, 其 B7-H3-NKG2D 处于临床前研究阶段。

基于 NKp46 的双特异性抗体的开发尚处于早期研究阶段。国际上主要是 Cytovia (CYT-303 和 CYT308) 和 Innate Pharma (IPH6101 和 IPH21) 2 个公司在开发相应的抗体。IPH6101 已获得美国 FDA 批准进入临床试验。同时, Innate Pharma 在 NKCE3 的基础上融合了 IL-2v 构建的 NKCE4 平台, 能够更好地激活并维持 NK 细胞的增殖。

NKCEs 是通过靶向肿瘤上的一个或多个抗原或通过交叉连接细胞因子来增强 NK 细胞抗肿瘤效果的策略^[51]。相对于 CAR-NK 细胞的 CAR 加载, NKCEs 无需基因编辑而能够达到类似 CAR 的功能,因此制备工艺相对简单且成本较低。此外,由于 NKCEs 只有在肿瘤细胞存在时才会被激活,所以临床应用的安全性较高且非特异性细胞因子释放的风险较低。然而, NKCEs 疗法下的长期刺激可能导致 NK 细胞衰竭。通过设计间断注射 NKCEs 的临床方案避免 NK 细胞的持续激活或许可以解决这个问题。

4 结语与展望

随着人们对免疫细胞生物学基础知识体系的不断完善,细胞免疫疗法的时代已经到来。相较于 CAR-T 细胞自体疗法的种种局限性,基于 NK 细胞疗法的优势日益凸显。NK 细胞的来源丰富,无论是基于饲养细胞的 NK 细胞扩增方法,还是基于细胞因子的方法均能获得大量的高活性的 NK 细胞。hPSC-NK 细胞制备技术的成熟以及规模化扩增平台的建立也使得规模化制备质量均一的 GMP 级 NK 细胞免疫治疗产品成为可能。然而, NK 细胞扩增的过程涉及到癌症免疫疗法的剂量、安全性、有效性和成本,这些研究是过继治疗临床规模应用的基础。

日益发展的基因编辑技术提供了优化 NK 细胞

治疗的可能,通过引入 CAR、靶向激活受体和敲除抑制性分子等修饰可增强 NK 细胞治疗效果。然而, PB-NK、UC-NK 和胎盘源 NK 等天然 NK 细胞的基因工程存在基因转导困难、细胞编辑效率低、编辑后细胞存活率低等一系列问题。虽然 iPSC 衍生的 NK 细胞可能从根本上解决基因编辑的问题,但其衍生的 NK 细胞与体内发育的 NK 细胞生物学的差异、临床有效性和安全性仍然需要长期临床研究验证。随着过继细胞免疫疗法的发展,目的基因的递送技术也取得重大突破。目前,除了广泛使用的慢病毒或者 γ -逆转录病毒等病毒载体递送方式,睡美人 (PiggyBac) 转座子系统、CRISPR/Cas9、mRNA 和纳米载体等非病毒载体技术也是克服基因转导障碍的新型解决方案。虽然 NK 细胞在治疗恶性血液病方面取得良好的临床疗效,但对于实体瘤的治疗效果有限,基于编辑的策略抑制肿瘤免疫微环境、增强 NK 细胞在肿瘤微环境中的活性也是治疗实体瘤的有效策略。大量的临床前和临床研究已表明基于 NK 细胞、细胞因子拮抗剂、免疫检查点抑制剂、单克隆抗体以及双特异性或多特异性抗体的单一疗法临床效果有限。因此,结合两种或两种以上的联合疗法可能是基于 NK 细胞免疫疗法发展的必然趋势。总之,基于 NK 细胞的免疫疗法已经成为一种成熟的、不断发展的癌症免疫疗法,在治疗多种癌症方面有着巨大的潜力。

【参考文献】

- [1] Kärre K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self[J]. *Scand J Immunol*, 2002, 55(3): 221-228.
- [2] Wang W, Erbe A K, Hank J A, et al. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2015, 6: 368[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4515552/>. DOI: 310.3389/fimmu.2015.00368.
- [3] Cooley S, He F, Bachanova V, et al. First-in-human trial of rhIL-15 and haploidentical natural killer cell therapy for advanced acute myeloid leukemia[J]. *Blood Adv*, 2019, 3 (13): 1970-1980.
- [4] Shin M H, Kim J, Lim S A, et al. NK cell-based immunotherapies in cancer[J/OL]. *Immune Netw*, 2020, 20 (2): e14[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7192832/>. DOI: 10.4110/in.2020.4120.e4114.
- [5] 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): 545-553.
- [6] Di Vito C, Mikulak J, Mavilio D. On the way to become a natural killer cell[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1812[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6688484/>. DOI: 1810.3389/fimmu.2019.01812.
- [7] Crinier A, Milpied P, Escaliere B, et al. High-dimensional single-cell analysis identifies organ-specific signatures and conserved NK cell subsets in humans and mice[J]. *Immunity*, 2018, 49 (5): 971-986.
- [8] Freud A G, Mundy-Bosse B L, Yu J, et al. The broad spectrum of human natural killer cell diversity[J]. *Immunity*, 2017, 47 (5): 820-833.
- [9] Bi J, Wang X. Molecular regulation of NK cell maturation[J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1945[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7431948/>. DOI: 1910.3389/

- fimmu.2020.01945.
- [10] Fehniger T A, Cooper M A, Nuovo G J, *et al.* CD56^{bright} natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity[J]. *Blood*, 2003, 101 (8): 3052–3057.
 - [11] Dogra P, Rancan C, Ma W, *et al.* Tissue determinants of human NK cell development, function, and residence[J]. *Cell*, 2020, 180(4): 749–763.
 - [12] Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott S M, *et al.* Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules[J]. *Nature*, 2005, 436(7051): 709–713.
 - [13] Maskalenko N A, Zhigarev D, Campbell K S. Harnessing natural killer cells for cancer immunotherapy: dispatching the first responders[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(8): 559–577.
 - [14] Zamora A E, Aguilar E G, Sungur C M, *et al.* Licensing delineates helper and effector NK cell subsets during viral infection[J/OL]. *JCI Insight*, 2017, 2(10): e87032[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5436543/>. DOI: 87010.81172/jci.insight.87032.
 - [15] Liu S, Galat V, Galat Y, *et al.* NK cell-based cancer immunotherapy: From basic biology to clinical development[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 7[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7788999/>. DOI: 10.1186/s13045-13020-01014-w.
 - [16] Pazina T, Shemesh A, Brusilovsky M, *et al.* Regulation of the functions of natural cytotoxicity receptors by interactions with diverse ligands and alterations in splice variant expression[J/OL]. *Front Immunol*, 2017, 8: 369[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5371597/>. DOI: 310.3389/fimmu.2017.00369.
 - [17] Screpanti V, Wallin R P, Ljunggren H G, *et al.* A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells[J]. *J Immunol*, 2001, 167(4): 2068–2073.
 - [18] Zitti B, Bryceson Y T. Natural killer cells in inflammation and autoimmunity[J/OL]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 42: 37–46[2022-10-01]. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.08.001>.
 - [19] Gong J H, Maki G, Klingemann H G. Characterization of a human cell line(NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells[J]. *Leukemia*, 1994, 8(4): 652–658.
 - [20] 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.
 - [21] Jochems C, Hodge J W, Fantini M, *et al.* An NK cell line(haNK) expressing high levels of granzyme and engineered to express the high affinity CD16 allele[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(52): 86359–86373.
 - [22] Kang L, Voskrianian-Berse V, Law E, *et al.* Characterization and ex vivo expansion of human placenta-derived natural killer cells for cancer immunotherapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2013, 4: 101[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3640206/>. DOI: 110.3389/fimmu.2013.00101.
 - [23] Ojo E O, Sharma A A, Liu R, *et al.* Membrane bound IL-21 based NK cell feeder cells drive robust expansion and metabolic activation of NK cells[J/OL]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 14916[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6797802/>. DOI: 14910.11038/s41598-14019-51287-14916.
 - [24] Mishra H K, Dixon K J, Pore N, *et al.* Activation of ADAM17 by IL-15 limits human NK cell proliferation[J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 711621[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8339566/>. DOI: 711610.713389/fimmu.712021.711621.
 - [25] Oyer J L, Igarashi R Y, Kulikowski A R, *et al.* Generation of highly cytotoxic natural killer cells for treatment of acute myelogenous leukemia using a feeder-free, particle-based approach[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015, 21(4): 632–639.
 - [26] Oyer J L, Pandey V, Igarashi R Y, *et al.* Natural killer cells stimulated with PM21 particles expand and biodistribute *in vivo*: Clinical implications for cancer treatment[J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(5): 653–663.
 - [27] Choi Y H, Lim E J, Kim S W, *et al.* IL-27 enhances IL-15/IL-18-mediated activation of human natural killer cells[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 168[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6612093/>. DOI: 10.1186/s40425-019-0652-7.
 - [28] Romee R, Schneider S E, Leong J W, *et al.* Cytokine activation induces human memory-like NK cells[J]. *Blood*, 2012, 120(24): 4751–4760.
 - [29] 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): 4859–4869.
 - [30] 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): 1081–1088.
 - [31] Fujii R, Jochems C, Tritsch S R, *et al.* An IL-15 superagonist/IL-15R α fusion complex protects and rescues NK cell-cytotoxic function from TGF- β 1-mediated immunosuppression[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(4): 675–689.
 - [32] 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): 816–824.
 - [33] Bernard P L, Delconte R, Pastor S, *et al.* Targeting CISH enhances natural cytotoxicity receptor signaling and reduces NK cell exhaustion to improve solid tumor immunity[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(5): e004244[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9121483/>. DOI: 004210.001136/jitc-002021-004244.
 - [34] 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): 224–237.
- [35] Delconte R B, Guittard G, Goh W, *et al.* NK cell priming from endogenous homeostatic signals is modulated by CIS[J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 75[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7005222/>. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00075.
- [36] Romee R, Foley B, Lenvik T, *et al.* NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17(ADAM17)[J]. *Blood*, 2013, 121(18): 3599–3608.
- [37] Jing Y, Ni Z, Wu J, *et al.* Identification of an ADAM17 cleavage region in human CD16(FcγRIIIb) and the engineering of a non-cleavable version of the receptor in NK cells[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121788[2022-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4376770/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0121788.
- [38] Zhu H, Blum R H, Bjordahl R, *et al.* Pluripotent stem cell-derived NK cells with high-affinity noncleavable CD16a mediate improved antitumor activity[J]. *Blood*, 2020, 135(6): 399–410.
- [39] 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): 437–445.
- [40] Srpan K, Ambrose A, Karampatzakis A, *et al.* Shedding of CD16 disassembles the NK cell immune synapse and boosts serial engagement of target cells[J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(9): 3267–3283.
- [41] Vanherberghen B, Olofsson P E, Forslund E, *et al.* Classification of human natural killer cells based on migration behavior and cytotoxic response[J]. *Blood*, 2013, 121(8): 1326–1334.
- [42] Carlsten M, Korde N, Kotecha R, *et al.* Checkpoint inhibition of KIR2D with the monoclonal antibody IPH2101 induces contraction and hyporesponsiveness of NK cells in patients with myeloma[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(21): 5211–5222.
- [43] Nijhof I S, Lammerts Van Bueren J J, Van Kessel B, *et al.* Daratumumab-mediated lysis of primary multiple myeloma cells is enhanced in combination with the human anti-KIR antibody IPH2102 and lenalidomide[J]. *Haematologica*, 2015, 100(2): 263–268.
- [44] Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, *et al.* The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: Implications for tumor immune escape[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(10): 904–910.
- [45] Borst L, Van Der Burg S H, Van Hall T. The NKG2A-HLA-E axis as a novel checkpoint in the tumor microenvironment[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(21): 5549–5556.
- [46] Liu J, Zhang S, Hu Y, *et al.* Targeting PD-1 and Tim-3 pathways to reverse CD8 T-cell exhaustion and enhance ex vivo T-cell responses to autologous dendritic/tumor vaccines[J]. *J Immunother*, 2016, 39(4): 171–180.
- [47] Bezman N A, Jhatakia A, Kearney A Y, *et al.* PD-1 blockade enhances elotuzumab efficacy in mouse tumor models[J]. *Blood Adv*, 2017, 1(12): 753–765.
- [48] Sanseviero E, O'Brien E M, Karras J R, *et al.* Anti-CTLA-4 activates intratumoral NK cells and combined with IL15/IL15α complexes enhances tumor control[J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(8): 1371–1380.
- [49] Ellwanger K, Reusch U, Fucek I, *et al.* Redirected optimized cell killing(ROCK(R)): a highly versatile multispecific fit-for-purpose antibody platform for engaging innate immunity[J]. *MAbs*, 2019, 11(5): 899–918.
- [50] Schmohl J U, Felices M, Oh F, *et al.* Engineering of anti-CD133 trispecific molecule capable of inducing NK expansion and driving antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity[J]. *Cancer Res Treat*, 2017, 49(4): 1140–1152.
- [51] Vallera D A, Felices M, McElmurry R, *et al.* IL15 trispecific killer engagers(TriKE) make natural killer cells specific to CD33⁺ targets while also inducing persistence, *in vivo* expansion, and enhanced function[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(14): 3440–3450.



【本期栏目主编】张宇: 中源协和细胞基因工程股份有限公司副总经理, 首席科学官, 中源药业 CEO。北京航空航天大学空间生命科学学士、生物医学工程硕士, 德国海因里希海涅杜塞尔多夫大学(Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)干细胞与再生医学专业博士, 天津医科大学双聘教授, 国家干细胞工程产品产业化基地研究员、高级工程师。曾任颐昂生物科技有限公司总裁兼 CEO 等。在德国期间曾任德国波恩科技大学讲师、德国宇航局亥姆霍兹中心助理研究员和意大利帕勒莫大学访问学者等。主持或参加了国家重点研发计划干细胞、新型冠状病毒感染、重大慢性疾病等领域重点专项, 欧盟(EU)、德国教育科技部(BMBF)、德国研究基金会(DFG)等资助的细胞技术相关研究项目, 累计在 *Lancet* 子刊、*Nature* 子刊等杂志上发表 SCI 论文 10 余篇, 发明专利若干项。目前担任国际干细胞研究学会(ISSCR)会员、国际细胞治疗协会(ISCT)会员、中国细胞生物学学会会员、德国干细胞协会会员、中国生物医药技术协会常务理事、中国干细胞产业联盟副理事长、国家干细胞与再生医学产业技术创新战略联盟副秘书长、湖北省干细胞临床研究专家委员会委员、天津市干细胞再生医学转化重点实验室主任、天津市血液细胞治疗技术重点实验室主任、海河细胞生态实验室“揭榜挂帅”重大专项首席科学家、《药学进展》等杂志编委、*Stem Cell Res & Ther* 等杂志审稿人。入选天津“131 人才计划”, “3551 光谷人才计划”, 首批 A 类天津绿卡获得者。