

· 综述 ·

## 纳米药物在肿瘤过继性细胞免疫治疗中的研究进展

杨艳<sup>1,2</sup>, 钱汉清<sup>3\*</sup>, 马亚军<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>南京中医药大学江宁临床医学院, 江苏 南京 211000; <sup>2</sup>南京医科大学附属江宁医院肿瘤科, 江苏 南京 211000; <sup>3</sup>江苏医药职业学院江宁临床医学院, 江苏 南京 211000

**[摘要]** 肿瘤过继性细胞免疫治疗是一种新兴的肿瘤免疫治疗模式。通过回输经体外扩增活化的工程化免疫细胞, 在患者体内激发有效的抗肿瘤免疫应答。然而, 由于复杂的肿瘤免疫抑制微环境, 免疫细胞易发生耗竭, 难以穿透肿瘤深处, 导致其在实体肿瘤中的疗效有限。近年来, 纳米材料在肿瘤免疫治疗领域受到了广泛关注。纳米材料可以促进免疫细胞扩增、回输后体内存活和在肿瘤中的穿透与浸润, 有助于免疫细胞克服实体肿瘤组织中的物理屏障和免疫抑制微环境, 提高治疗效果。本文就目前纳米药物在肿瘤过继性细胞免疫治疗中应用的研究进展进行综述。

**[关键词]** 过继性细胞免疫治疗; 纳米材料; 肿瘤; 免疫抑制微环境

**[中图分类号]** R730.51

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2023)10-1441-09

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20231018

## Research progress of nanomedicine in adoptive cell therapy for cancer

YANG Yan<sup>1,2</sup>, QIAN Hanqing<sup>3\*</sup>, MA Yajun<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Jiangning Clinical Medicine School, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 211000;

<sup>2</sup>Department of Oncology, the Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 211000;

<sup>3</sup>Jiangning Clinical Medicine School, Jiangsu Vocational College of Medicine, Nanjing 211000, China

**[Abstract]** Tumor adoptive cellular immunotherapy is a new model of tumor immunotherapy. It can induce effective anti-tumor immune response in patients by infusion the engineered immune cells which are amplified and activated *in vitro*. However, due to the complex tumor immunosuppressive microenvironment, immune cells are prone to exhaust and difficult to penetrate deep into the tumor, resulting in limited effect in solid tumors. In recent years, nanomaterials have received extensive attention in the field of tumor immunotherapy. Nanomaterials can promote the expansion of immune cells, their survival after *in vivo* infusion, and their infiltration in tumors, help immune cells to overcome the physical barriers and immunosuppressive microenvironment in solid tumor tissues, and improve the therapeutic effect. In this article, we reviewed the current research progress of the application of nanomedicine in tumor adoptive cellular immunotherapy.

**[Key words]** adoptive cellular immunotherapy; nanomaterials; tumor; immunosuppressive microenvironment

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(10): 1441-1449]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81972890, 82272690); 南京医科大学科技发展基金(NMUB2020160); 南京中医药大学自然科学基金(XZR2020086); 江苏医药职业学院临床教学基地科研发展专项课题(20219103); 南京市医学科技发展项目(YKK20193); 江宁区科技惠民计划项目(2022131S)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: mayajun@njmu.edu.cn; qianhanqing@njmu.edu.cn

以免疫检查点抑制剂、肿瘤疫苗和过继性细胞免疫治疗(adoptive cellular therapy, ACT)等为代表的免疫治疗, 是肿瘤治疗近年来最大的突破。它的应用极大地改变了临床肿瘤治疗的格局, 与手术、化疗、放疗共同构成了肿瘤治疗的四大支柱。ACT将免疫细胞在体外工程化改造、扩增后再回输患者

体内,以激发有效的免疫应答和杀伤肿瘤。与手术、放化疗等传统的治疗手段相比,ACT特异性强,对肿瘤复发和转移的控制更佳,治疗效果更具优势;同时不良反应小,在一定程度上避免了患者放化疗后免疫力差,生活质量低的问题。其中,研究最深入的是基于T细胞的ACT,如肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)、嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)、T细胞受体工程化T细胞(T cell receptor-gene engineered T cell, TCR-T)等<sup>[1]</sup>。

1988年, Rosenberg等<sup>[2]</sup>从恶性黑色素瘤患者自体肿瘤组织中分离TIL,并在体外用白细胞介素(interleukin, IL)-2培养后回输,可使60%的转移性恶性黑色素瘤患者的肿瘤客观消退,标志着TIL疗法的诞生。而通过基因工程,使T细胞表达CAR或TCR,从而获得肿瘤特异性CAR-T和TCR-T,进一步拓展了ACT的类型与范围。2017年,两种靶向CD19抗原的CAR-T——Kymriah和Yescarta分别被FDA批准用于治疗急性淋巴细胞白血病和大B细胞淋巴瘤,成为ACT治疗的又一个里程碑。截止目前,全球已有6款CAR-T细胞疗法批准上市,对肿瘤临床治疗产生了巨大影响<sup>[3]</sup>。

尽管ACT疗法在消除肿瘤和延长患者生存率方面取得了许多重要的进展,应用范围不断扩大,研发管线数量也在不断增加,但ACT在实体肿瘤中的应用仍面临一些挑战,例如:①T细胞难以通过扩增获得足够数量的效应细胞;②细胞制备过程复杂繁琐;③致密的细胞外基质构成的物理屏障,限制了免疫细胞在实体肿瘤中的穿透;④免疫抑制性微环境导致T细胞持久性差,易耗竭等。这些都影响了ACT在实体肿瘤中的应用。

纳米技术和纳米材料在医学领域的发展则为克服上述挑战提供了新的策略,通过负载药物,或者结合各种生物功能分子,纳米材料可以促进免疫细胞的扩增、体内回输后的存活,以及在肿瘤中的穿透与浸润,有助于免疫细胞克服实体肿瘤组织中的物理屏障和免疫抑制微环境,更好地发挥抗肿瘤作用(图1)。本文从以下几方面总结纳米材料增强ACT在肿瘤治疗中应用的最新研究进展,探讨纳米医学在ACT中的发展前景。

## 1 制备ACT细胞

### 1.1 促进ACT细胞扩增与活化

获得足够数量的免疫细胞是ACT治疗的第一

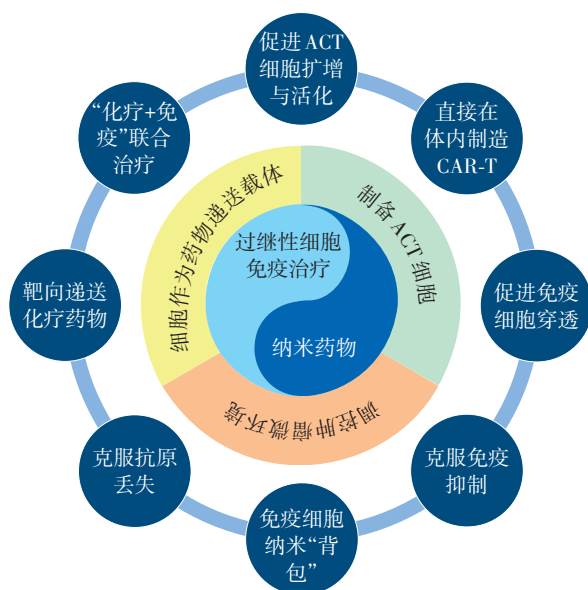


图1 纳米药物在增强肿瘤ACT治疗中的应用

Figure 1 Applications of nanomedicine in adoptive cellular therapy for cancer

步,由于从患者体内分离的自体T细胞通常数量有限,需要对T细胞进行体外扩增培养。其中,与抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)共培养,对抗原进行加工递呈是刺激T细胞增殖活化的关键步骤。该过程通常需要8~12周,耗时长,培养成本高,且难以实现标准化。将T细胞活化、增殖所需的信号分子偶联在磁珠上,构建人工抗原递呈细胞(artificial antigen presenting cell, aAPC),模拟T细胞与APC的相互作用,提供激活T细胞所需的刺激信号,是扩增T细胞,诱导抗肿瘤免疫应答的重要方法。修饰的信号分子通常包括3类:①抗原识别信号,用于抗原特异性或非特异性T细胞活化的主要组织相容性复合体-肽(peptide-major histocompatibility complex, pMHC)复合物或anti-CD3;②共刺激信号,如anti-CD28、anti-4-1BB等;③细胞因子,使T细胞存活或活化的IL,如IL-2、IL-12或IL-15等。将anti-CD3和anti-CD28抗体偶联在超顺磁性Dynabeads磁珠上,产生了商业化Dynabeads® ClinExVivo™ CD3<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> T细胞扩增试剂盒,可以非特异性扩增自体T细胞,已应用于临床ACT治疗用T细胞的制备<sup>[4-5]</sup>。

尽管T细胞的扩增技术不断进步,但体外扩增后获得足够数量且具有功能的T细胞以满足临床应用需求仍具有挑战性。由于aAPC的尺寸是影响抗原递呈效率和途径的最重要因素,纳米材料因其自身独特的生物学效应,为体外扩增与活化免疫细胞提供了新的途径。有研究表明,尽管5~10 μm的

aAPC与天然细胞大小接近,在体外扩增效率更高,但由于向淋巴引流受限,且易于被吞噬细胞清除,在体内无法充分活化T细胞<sup>[6]</sup>。与微米尺寸的aAPC相比,纳米尺度的aAPC在体内的递呈活化效率更高,可以通过淋巴引流直接迁移至淋巴结递呈抗原,活化T细胞<sup>[7]</sup>。并且纳米aAPC在体内不易形成栓塞,安全性更好。近年来,报道了许多基于脂质体、合成高分子和无机材料的纳米aAPC用于扩增与活化免疫细胞的研究。

### 1.1.1 脂质体

脂质体是由磷脂、胆固醇等构成的,与细胞膜类似的双分子层囊泡,是临床上广泛应用的纳米药物剂型。与其他材料相比,脂质体aAPC上修饰的信号分子在脂质体表面可以自由扩散,而前者表面配体只能以随机、固定的形式连接,缺乏流动性<sup>[8]</sup>。因此脂质体aAPC模拟了树突细胞(dendritic cell, DC)与T细胞表面TCR配体结合后,pMHC复合体在DC表面迁移,有利于免疫突触的形成,更好地模拟了自然状态下的抗原递呈过程<sup>[9]</sup>。Prakken等<sup>[10]</sup>最先用磷脂酰胆碱负载MHC-OVA<sub>323-339</sub>肽复合物,制备了对信号分子具有高负载能力的脂质体aAPCs。Dahotre等<sup>[11]</sup>利用pMHC的巯基与脂质体上马来酰亚胺之间的偶联,构建了一系列不同pMHC含量的脂质体aAPC,研究了aAPC表面pMHC密度对T细胞活化效率的影响。结果表明,0.5%二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-马来酰亚胺(DSPE-PEG-maleimide)和0.13% pMHC/Mal组合的脂质体aAPC扩增T细胞的效率最高。

### 1.1.2 无机纳米颗粒

无机纳米材料的形貌、尺寸易于调控,且具有丰富的光、电、磁性质,在活化和扩增T细胞方面优势独特。大多数aAPC均为球形颗粒,而利用无机纳米材料,构建不同形貌的aAPC,调控与T细胞的接触面积,优化活化扩增T细胞的能力,可以弥补纳米尺寸导致的无法与T细胞有效接触的不足。Sunshine和Meyer等<sup>[12-13]</sup>发现高长径比的椭球状aAPC与T细胞之间的接触面积和接触概率更高,较长的侧面提供了一个更类似免疫突触的接触部分,从而具有更高的T细胞扩增效率。介孔二氧化硅棒(mesoporous silica rod, MSR)是一种具有高长径比和比表面积的无机纳米材料,利用其负载IL-2,并在表面涂敷修饰了TCR共刺激配体的磷脂分子,构建的aAPC支架可以持续释放信号分子并形成有效的免疫突触<sup>[14]</sup>。与Dynabeads相比,MSR支架可促进抗

原特异性人原代T细胞和CAR-T细胞的多克隆扩增,并显著增强扩增T细胞的抗肿瘤功能。

顺磁性氧化铁纳米颗粒是研究最广泛的无机aAPC。它的一个显著优点是在刺激T细胞扩增后,可以通过磁珠分选技术将其从T细胞中直接分离出来,从而避免了与T细胞一起回输引起的不良反应和栓塞的可能。Chiang等<sup>[15]</sup>报道了一种基于岩藻多糖-葡聚糖的,包被了程序性死亡配体1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)免疫检查点抑制剂(anti-PD-L1)和T细胞激活剂(anti-CD3和anti-CD28)的磁性氧化铁纳米颗粒IO@FuDex3。研究发现IO@FuDex3可以被吸附在CD8<sup>+</sup>T细胞膜上,在阻断免疫检查点的同时促进T细胞增殖。

除尺寸和形状外,TCR在T细胞表面的预聚集是影响T细胞应答的另一个重要因素。如前所述,免疫突触的形成在T细胞识别、增殖和活化中发挥了关键作用。它增加了APC与T细胞相互接触局部的膜表面信号分子密度,有利于T细胞的活化与增殖。利用顺磁性氧化铁纳米颗粒在磁场中可以发生聚集的特点,Perica等<sup>[16]</sup>制备了基于顺磁性葡聚糖铁纳米颗粒的aAPC,研究了磁场诱导刺激分子预聚集对T细胞反应性的影响。在磁场(0.2 T, 30 min)作用下,包被MHC-Ig二聚体和anti-CD28抗体的纳米颗粒可以在T细胞的表面聚集,使生成的TCR信号簇提高2倍,从而增强抗原特异性T细胞的扩增。该方法进一步被应用于活化和扩增黑色素瘤患者中分离的MART-1(黑色素瘤抗原)肿瘤特异性CD8<sup>+</sup>T细胞,目的细胞在2周时间内可扩增1 000倍<sup>[17]</sup>。

### 1.1.3 细胞膜仿生纳米颗粒

红细胞、白细胞等天然有机体具有长循环,丰富的膜表面蛋白,穿越生物屏障和在靶器官聚集等性质。提取的细胞膜可以保留这些属性,是模拟天然APC的理想载体材料。受此启示,研究者开发了一系列基于细胞膜的仿生aAPC。例如,Zhang等<sup>[18]</sup>开发了一种包裹白细胞膜的磁小体,同时修饰的叠氮基团可通过点击反应偶联pMHC-I和anti-CD28。该aAPC可显著增强T细胞扩增,诱导的CD8<sup>+</sup>T细胞是体外可溶性抗体处理组的4倍。

综上所述,非细胞载体的纳米aAPC表面具有可控的免疫分子种类和数量,从而实现了对T细胞活化增殖过程的调控,并且活化过程中条件较均一,质量易控,在体外制造ACT免疫细胞具有良好的应用前景。

## 1.2 直接在体内制造 CAR-T 细胞

利用纳米颗粒在体内促进 T 细胞扩增的最直接应用是肿瘤纳米疫苗,它通过纳米颗粒负载肿瘤相关抗原/新抗原及佐剂,模拟抗原特异性 T 细胞致敏和活化的生理过程,诱导抗肿瘤免疫应答。除纳米疫苗外,近年来还提出了一些利用纳米颗粒在体内直接生产 CAR-T 细胞的新策略。

### 1.2.1 “二级抗原”策略诱导 CAR-T 细胞扩增

该策略通过设计一种具有额外抗原受体的 CAR-T,使其对外源性抗原(即“二级抗原”)具有特异性,在体内的扩增依赖于随后的外源性抗原疫苗接种,从而实现 CAR-T 细胞的可控扩增<sup>[19]</sup>。基于该“二级抗原”诱导策略,Reinhard 等<sup>[20]</sup>开发了负载编码紧密连接蛋白 claudin 6 (CLDN6) mRNA 的脂质体纳米疫苗 (CARVac)。回输 CLDN6 CAR-T 细胞后,静脉注射 CARVac,使抗原递呈细胞表面表达 CLDN6,并释放共刺激信号,从而有效启动 CAR-T 细胞扩增。CARVac 注射大大提高了小鼠体内 CAR-T 细胞的数量,在接种疫苗后第 3~4 天达到峰值。体内实验表明,亚治疗剂量的 CLDN6 CAR-T 细胞与单次注射 CARVac 相结合,可完全抑制肿瘤生长。

### 1.2.2 体内制造 CAR-T 细胞

针对体外制造 CAR-T 过程耗时久、成本高的问题,Smith 等<sup>[21]</sup>开发了一种表面修饰 anti-CD3 抗体的聚合物纳米颗粒,可在体内将编码 194-1BBz CAR 和 piggyBac 转座酶的质粒特异性地共递送至 T 细胞,诱导 CAR 表达,实现原位在体制造 CAR-T 细胞。表面修饰的 anti-CD3e F(ab')<sub>2</sub> 片段可对 CD3<sup>+</sup> T 细胞实现主动靶向,在注射纳米颗粒 30 h 后,就能在 T 细胞表面检测到 194-1BBz 受体,即产生 CAR-T 细胞。此外,为了提高基因转染效率,核定位和微管相关序列也与 CAR 基因一并负载,以促进质粒进入细胞核。这些设计可在体内有效递送 piggyBac 转座酶,从而在白血病小鼠模型中生产和扩增 CAR-T 细胞,使白血病小鼠的中位生存期从大约 2 周提高到 58 d。由于更具时间效益和成本效益,这种体内生产 CAR-T 细胞的策略有可能成为当前体外制备 CAR-T 的替代方法。

## 2 调控肿瘤微环境,促进肿瘤杀伤

ACT 疗法对实体肿瘤疗效有限的最重要原因是实体肿瘤的免疫抑制性微环境限制了 ACT 细胞的浸润和功能,ACT 细胞在回输后容易发生耗竭而无法持续存活并杀伤肿瘤<sup>[22-23]</sup>。虽然可以通过对

ACT 细胞进行基因修饰以表达特定的细胞因子,或联合使用白细胞介素,提高回输细胞在体内的持久性和功能,但往往伴随剂量限制性不良反应。而纳米材料不但可以递送调节肿瘤微环境的药物,还可以对免疫细胞进行工程化改造,增强 ACT 细胞的持久性和体内抗肿瘤能力。

### 2.1 促进免疫细胞穿透

免疫细胞从外周循环到达肿瘤后,在黏附分子的作用下穿透血管进入肿瘤实质仅是其发挥功能的第一步。免疫细胞还需穿透扩散到肿瘤组织深处,才能充分发挥对肿瘤细胞杀伤作用。肿瘤微环境的一个重要特征就是肿瘤组织中 T 细胞浸润程度低。研究表明,回输的 T 细胞中,仅有 1%~2% 真正浸润到肿瘤组织中,而肿瘤组织中 T 细胞的数量与过继细胞治疗的临床疗效密切相关<sup>[24]</sup>。因此,调节肿瘤组织细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 结构,增强 T 细胞在肿瘤中穿透是提高 ACT 疗法的关键之一。

一种解决思路是使用纳米颗粒递送药物改善 ECM 结构。Huang 等<sup>[25]</sup>构建了负载抗纤维化药物  $\alpha$ -mangostin 的磷酸钙杂化纳米脂质体 (纳米工兵),通过逆转异常活化的肿瘤相关成纤维细胞,减少胶原沉积,增强细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T-lymphocyte, CTL) 在免疫排斥型胰腺癌小鼠肿瘤中的浸润。此外,还可以利用光热效应直接破坏 ECM。在黑色素瘤小鼠模型中,瘤内注射负载光热剂吡啶菁绿的聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 纳米颗粒并照射近红外光后,再回输 CAR-T 细胞。与单独使用 CAR-T 细胞相比,纳米颗粒破坏 ECM,降低了间质流体压力,改善了 CAR-T 细胞在肿瘤组织中的穿透性,提高了 CAR-T 的抗肿瘤疗效<sup>[26]</sup>。

此外,Ding 等<sup>[27]</sup>发现将肿瘤穿透肽 iRGD 修饰在 T 细胞表面,可促进 T 细胞在 3D 肿瘤细胞球和多种小鼠移植瘤模型中的浸润,肿瘤组织中 T 细胞的数量增加 10 倍。同时将 iRGD 修饰与程序性死亡受体 1 (programmed death-1, PD-1) 敲除相结合显示出协同的抗肿瘤效果。机制研究表明,iRGD 与神经纤毛蛋白 1 (neuropilin1, NRP1) 结合导致血管内皮钙黏蛋白 VE-cadherin 的酪氨酸磷酸化,而该蛋白是内皮屏障调节因子,在打开内皮细胞接触和促进跨内皮淋巴细胞迁移中发挥作用。iRGD 修饰为克服过继免疫细胞在实体瘤中难以穿透的瓶颈提供了一种新的解决思路。

## 2.2 克服免疫抑制

### 2.2.1 增强免疫细胞功能

肿瘤免疫抑制微环境可诱导回输的T细胞耗竭甚至死亡。因此,阻断肿瘤微环境的免疫抑制作用可以改善T细胞治疗在实体瘤中的疗效。例如,Zhang等<sup>[28]</sup>构建了一种负载PI3K抑制剂(PI-3065)和恒定自然杀伤T细胞(invariant natural killer T cell, iNKT cell)激动剂(7DW8-5)的纳米脂质体,通过重塑肿瘤免疫抑制性微环境,增效CAR-T治疗。在小鼠4T1乳腺癌模型中,该脂质体可以使髓源性抑制细胞和肿瘤相关巨噬细胞分别减少3倍和7倍,同时使肿瘤浸润性CD8<sup>+</sup>T细胞和iNKT细胞的数量分别增加5倍和20倍。这种联合治疗为CAR-T细胞治疗提供了一个为期2周的窗口,有利于肿瘤特异性CAR-T细胞定位于肿瘤部位并充分扩增,从而有效地治疗实体瘤。

许多细胞因子,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、IL-2和IL-15等都可以诱导和维持T细胞的抗肿瘤反应。然而由于对游离细胞因子非特异性摄取会引起全身性不良反应,它们在临床治疗中仍面临诸多限制。用纳米颗粒递送细胞因子是调控免疫细胞内状态或表面信号表达的有效途径。将IL-2-Fc通过马来酰亚胺修饰在纳米脂质体上,可以在体内实现对T细胞的特异性靶向,从而持续刺激过继回输的T细胞,促进其增殖<sup>[29]</sup>。研究显示,在黑色素瘤小鼠模型中,静脉注射的脂质体可被成功递送到过继回输T细胞表面(>95%);肺转移小鼠模型中,脂质体则可以持续地促进T细胞增殖,其数量是仅回输T细胞组的6倍。

### 2.2.2 逆转免疫细胞耗竭

利用纳米药物逆转T细胞耗竭状态也可以增强ACT的疗效。例如,Zheng等<sup>[30]</sup>利用特异性表达于pmel-1 Thy1.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>供体T细胞的内吞型受体CD90,设计了一种在体内直接向过继性T细胞靶向递送转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )抑制剂SB525334的脂质体。与非内吞型受体CD45相比,尽管两者都能增加T细胞表达颗粒酶,但由于内源性T细胞,以及B细胞、DC细胞和巨噬细胞也会表达CD45,而CD90(Thy1.1)仅表达于供体T细胞,在Thy1.2<sup>+</sup>C57Bl/6黑色素瘤小鼠模型中,靶向CD90的脂质体在体内可以更有效地直接靶向过继细胞并递送TGF- $\beta$ 抑制剂,因此,抑制肿瘤生长的效果更显著。

另一项研究利用聚乳酸/羟基乙酸-聚乙二醇

(PLGA-PEG)纳米颗粒负载TGF- $\beta$ 受体抑制剂SD-208,同时修饰anti-PD-1抗体靶向体内PD-1<sup>+</sup>T细胞亚群,成功逆转了体内T细胞的耗竭状态,恢复效应T细胞功能,从而杀死肿瘤细胞,延长荷瘤小鼠的生存时间<sup>[31]</sup>。

### 2.2.3 阻断免疫检查点

免疫检查点是一类免疫抑制性的分子,是肿瘤发生、发展过程中导致免疫耐受的重要原因之一。其中,PD-1在肿瘤浸润淋巴细胞中以及PD-L1在肿瘤组织中表达的上调参与了相关的免疫抑制信号转导,从而抑制CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞增殖、活化,抑制细胞因子的表达,促进了肿瘤细胞逃避机体免疫监视和杀伤。因此,靶向PD-1/PD-L1是一种已经被广泛应用于临床的免疫治疗手段。

Kosmides等<sup>[32]</sup>构建了一种共同递送anti-4-1BB和anti-PD-L1抗体的“immunoswitch”,来克服肿瘤免疫抑制微环境。纳米颗粒在阻断肿瘤细胞PD-L1通路的同时,激活CD8<sup>+</sup>T细胞的4-1BB共刺激信号通路,并增强了T细胞和肿瘤细胞之间的相互作用。与可溶性抗体或递送单一抗体的纳米颗粒相比,“immunoswitch”显著延缓了黑色素瘤和结肠癌模型中的肿瘤生长。

含有Src同源结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶2(Src homology phosphotyrosyl phosphatase 2, SHP2)是一种参与调节细胞存活和增殖等关键细胞过程的磷酸酶。它是连接多种生长因子、细胞因子和细胞外基质受体介导的信号通路(如PI3K/AKT、RAS/Raf/MAPK和PD-1/PD-L1)的重要枢纽。PD-1在与其配体结合后形成负性共刺激微簇,通过募集SHP2直接抑制T细胞受体信号。Li等<sup>[33]</sup>通过使T细胞携带负载SHP2变构抑制剂SHP099的脂质体,抑制PD-1/PD-L1信号,增强ACT的疗效。SHP099以纳米晶形式存在于脂质体内,负载效率高,并延长SHP099纳米晶在T细胞内的保留时间。研究表明,细胞负载的SHP099能够持续抑制PD-1/PD-L1信号,增强T细胞的肿瘤杀伤活性。在小鼠肿瘤模型中,负载SHP099的T细胞能够有效抑制PD-1/PD-L1检查点信号完全根除肿瘤并维持持久的抗肿瘤免疫记忆。

## 2.3 免疫细胞纳米“背包”

除直接静脉给药外,纳米颗粒还可以通过一种“背包”策略修饰到免疫细胞表面,提高了递送的特异性而减少体内毒性。纳米颗粒释放的药物改善肿瘤微环境的同时,还通过类似自分泌的方式,促

进免疫细胞活化,帮助免疫细胞抵抗耗竭<sup>[34]</sup>。

Stephan等<sup>[35]</sup>利用马来酰亚胺功能化的脂质体与T细胞表面的游离巯基结合,将纳米颗粒修饰在T细胞的表面。结果表明,修饰过程不会损害T细胞对靶细胞的识别、杀伤以及T细胞的体内组织归巢等关键细胞功能。此外,将IL-15超级激动剂(IL-15Sa)和IL-21负载到这些纳米颗粒中,可显著增强黑色素瘤特异性pme1-1 T细胞的增殖,从而根除肿瘤并提高B16黑色素瘤荷瘤小鼠的存活率。在后续研究中,他们用含有二硫键的双N-羟基琥珀酰亚胺交联剂将IL-15Sa单体交联,构建了“无载体”蛋白纳米凝胶(nanogels, NG)<sup>[36]</sup>。同时在NG上偶联anti-CD45抗体,实现NG在CD8<sup>+</sup> T细胞表面的修饰。当NG背包式的CAR-T细胞回输到黑色素瘤小鼠体内后可识别黑色素瘤细胞,而抗原特异性的识别增加了T细胞表面的还原电位,使二硫键断裂,从而原位可控释放IL-15Sa并诱导CAR-T细胞扩增。与游离IL-15Sa相比,“背包”策略诱导的T细胞扩增提高16倍。

Hao等<sup>[37]</sup>报道了一种新的T细胞代谢工程化方法,将负载阿伐麦布的脂质体修饰到T细胞表面,而不改变其生理功能。锚定的脂质体在肿瘤组织局部缓释阿伐麦布,通过自分泌和旁分泌双重作用,同时增加肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中工程化T细胞和内源性T细胞细胞膜的胆固醇水平。胆固醇水平的升高可以促进T细胞受体的快速聚集和有效的T细胞活化,诱导抗肿瘤免疫。

该策略还可以使免疫细胞克服肿瘤微环境中的免疫抑制信号,提高ACT的疗效。通过pH响应的苯亚胺键对磁性纳米簇(nanocluster, NC)进行anti-PD-1抗体功能化,并修饰在CTL表面。在回输NC工程化CTL的同时施加磁场,可有效招募输注的细胞。此外,酸性的肿瘤微环境可使苯亚胺键水解,促进anti-PD-1抗体的局部释放,从而在小鼠肿瘤转移模型中进一步提高CTL的抗肿瘤效果<sup>[38]</sup>。在另一项研究中,CD19特异性CAR-T细胞表面偶联修饰多层脂质体囊泡,囊泡中负载了A2a腺苷受体小分子拮抗剂(SCH-58261),可抑制T细胞表面的A2a受体与腺苷之间的相互作用,从而避免T细胞失活<sup>[39]</sup>。在工程化过表达CD19的卵巢癌小鼠模型中,这种治疗策略增强了T细胞在肿瘤部位的积累,并成功逆转了免疫抑制性肿瘤微环境,从而提高了CAR-T细胞的治疗效果。

## 2.4 克服抗原丢失

T细胞介导的肿瘤细胞杀伤依赖于TCR与肿瘤细胞表面抗原之间的相互作用。肿瘤细胞可通过减少其表面的pMHC、共刺激分子或表达免疫检查点分子来逃避T细胞杀伤,甚至产生耐药<sup>[40]</sup>。Sun等<sup>[41]</sup>提出了一种靶向重定向的通用CAR-T细胞治疗策略,将外源性抗原负载到膜融合型脂质体上,脂质体与细胞膜直接融合从而将抗原肽有效修饰到肿瘤细胞膜上,为后续的CAR-T细胞治疗提供靶点,可以在肿瘤缺乏相应靶点的情况下将CAR-T细胞定向到肿瘤,发挥抗肿瘤作用。

## 3 细胞作为载体递送化疗药物

### 3.1 靶向递送化疗药物

近年来,基于人体自身的各类细胞,如红细胞、干细胞、淋巴细胞等构建的药物递送系统也受到广泛关注。与合成材料相比,细胞作为药物载体,免疫原性低,具有更好的生物相容性和体内长循环能力。特别是免疫细胞由于自身独特的生理功能,能够对病理环境中的特异性信号产生应答,经工程化改造后作为药物载体直接递送化疗药物可以跨越生物屏障,具有独特的靶向性优势。例如,通过巨噬细胞递送负载阿霉素(doxorubicin, Dox)的二氧化硅纳米胶囊(Dox-silica nanocomplexes, DSN)<sup>[42]</sup>。二氧化硅隐形外壳可增加DSN在细胞中的存续时间,并相应延长Dox的胞吐分泌。静脉注射的工程化巨噬细胞可以有效聚集在肿瘤组织中,并显著增加TME中的局部Dox浓度,抑制肿瘤生长,同时降低Dox的全身毒性。

免疫细胞由于具有向病理环境趋化,以及在受到刺激时释放细胞内生物分子的特性,可以做为递送系统实现药物的靶向递送。Xue等<sup>[43]</sup>利用中性粒细胞穿透血脑屏障的能力,构建了一种基于中性粒细胞的紫杉醇(paclitaxel, PTX)递送系统,该系统在胶质瘤部位局部释放PTX,可以抑制恶性胶质瘤术后复发。该研究用阳离子磷脂HG2C18负载PTX,制备载药脂质体并内化于中性粒细胞中。载有脂质体的中性粒细胞通过感知趋化梯度而自发地转运穿过血脑屏障,并在胶质瘤术后残余处产生中性粒细胞胞外陷阱,将PTX递送至残留的神经胶质瘤细胞并抑制肿瘤生长和复发。

通过马来酰亚胺-巯基反应,Huang等<sup>[44]</sup>将负载拓扑异构酶I抑制剂SN-38的脂质体化学偶联到表达淋巴结归巢配体的自体多克隆T细胞表面,利用

T细胞向淋巴器官转运的固有能力和精确治疗隐藏在淋巴结中的播散性淋巴瘤细胞。与游离药物相比,回输SN-38的工程化T细胞将淋巴结中的药物浓度提高了90倍。局部较高的SN-38浓度显著提高了对淋巴瘤细胞的杀伤效率,延长了播散性淋巴瘤小鼠的生存期。

### 3.2 “化疗+免疫”联合治疗

利用ACT细胞负载化疗药物,还可以实现“化疗+免疫”治疗的协同效果。Siegler等<sup>[45]</sup>将负载PTX的多层脂质体囊泡(cMLV PTX)修饰在靶向CD19的嵌合抗原受体自然杀伤细胞(CAR-NK)表面,在CAR-NK细胞杀伤SKOV3.CD19肿瘤的同时,联合靶向递送PTX。结果表明接受载药细胞治疗的小鼠肿瘤体积明显小于联合治疗组(cMLV PTX+CAR-NK),此外,由于提高了递送的靶向性,相应降低了PTX的剂量,减小了PTX相关的不良反应。Im等<sup>[46]</sup>利用马来酰亚胺-巯基偶联方法,在NK细胞表面修饰负载Dox的pH敏感型聚合物胶束,以实现肿瘤细胞的特异性药物递送。通过巧妙利用NK细胞与靶细胞结合形成免疫突触,释放酸性颗粒物杀伤靶细胞的特点,借助突触酸化触发结合在NK细胞表面的聚合物胶束解离,释放Dox从而协同杀伤肿瘤细胞。

## 4 展 望

CAR-T治疗在血液肿瘤中的成功应用为肿瘤免疫治疗开辟了新的途径,促进了针对实体瘤的过继性细胞免疫治疗的研究。然而由于实体瘤的生理屏障和免疫抑制微环境,ACT仅在少数实体肿瘤中取得进展,同时伴随了细胞因子释放综合征和神经毒性等严重的不良反应,因此仍面临诸多挑战。随着纳米技术和纳米医学的发展,纳米材料成为促进ACT细胞增殖、活化和肿瘤浸润,逆转耗竭,克服免疫抑制的重要方法,在临床前研究方面取得了令人鼓舞的进展,但仍存在一定不足。

首先,需要进一步优化纳米颗粒靶向递送的效率。可以通过构建具有精确定位和可控释放能力的多功能纳米药物,对过继细胞进行智能的工程化设计。还可以通过高通量筛选、基于结构-活性分析数据集的机器学习算法,以预测纳米药物的最佳物理化学结构<sup>[47]</sup>。其次,纳米材料需要进一步合理设计。作为递送系统时,纳米药物复杂的组成以及尺寸、表面电荷、形状、配体密度、刚性等物理性质,影响了纳米材料与免疫细胞间的生物化学或机械相

互作用,从而可能改变ACT细胞的状态与功能,无法实现ACT疗效的最优化。再次,目前纳米材料增强肿瘤ACT治疗的研究侧重于CAR-T细胞治疗,可以更广泛地应用于其他的过继细胞治疗,如TCR-T、TIL、巨噬细胞和自然杀伤细胞,进一步拓宽纳米药物的应用范围。最后,纳米材料的设计应以临床应用为导向。利用纳米材料对ACT细胞工程化改造可能带来的不良反应以及纳米材料自身毒性的长期、全面监测在临床评估中非常必要。更重要的是,随着对纳米材料多功能、智能化设计的深入,整个体系的复杂性不断增强,导致在最终应用时的生产成本、安全性和有效性的质量控制要求也相应增加。因此,未来研究应兼顾原始创新和临床应用,充分考虑商业化生产与临床转化应用阶段的实际需求。

综上所述,对纳米材料的持续优化将进一步拓展ACT疗法的应用,并加速其临床转化。对纳米材料与免疫细胞相互作用生物学过程的深入理解,也将在免疫学研究和肿瘤临床免疫治疗中取得新的突破。纳米药物在促进免疫细胞扩增、改变免疫细胞活性和克服实体瘤障碍方面取得了重要进展,在增强肿瘤ACT治疗中具有良好的应用前景。

### [参考文献]

- [1] MOROTTI M, ALBUKHARI A, ALSAADI A, et al. Promises and challenges of adoptive T-cell therapies for solid tumours[J]. Br J Cancer, 2021, 124(11): 1759-1776
- [2] ROSENBERG S A, PACKARD B S, AEBERSOLD P M, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report[J]. N Engl J Med, 1988, 319(25): 1676-1680
- [3] LARSON R C, MAUS M V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(3): 145-161
- [4] KALAMASZ D, LONG S A, TANIGUCHI R, et al. Optimization of human T-cell expansion ex vivo using magnetic beads conjugated with anti-CD3 and Anti-CD28 antibodies[J]. J Immunother, 2004, 27(5): 405-418
- [5] NEURAUER A A, BONYHADI M, LIEN E, et al. Cell separation[M]. Berlin: Springer Nature, 2007: 41-73
- [6] STEENBLOCK E R, FAHMY T M. A comprehensive platform for ex vivo T-cell expansion based on biodegradable polymeric artificial antigen-presenting cells [J]. Mol Ther, 2008, 16(4): 765-772
- [7] EGGERMONT L J, PAULIS L E, TEL J, et al. Towards ef-

- ficient cancer immunotherapy: advances in developing artificial antigen-presenting cells [J]. *Trends Biotechnol*, 2014, 32(9):456-465
- [8] FANG R H, HU C M, LUK B T, et al. Cancer cell membrane-coated nanoparticles for anticancer vaccination and drug delivery [J]. *Nano Lett*, 2014, 14(4):2181-2188
- [9] GOTO T, NISHIDA T, TAKAGI E, et al. Programmed death-ligand 1 on antigen-presenting cells facilitates the induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes: application to adoptive T-cell immunotherapy [J]. *J Immunother*, 2016, 39(8):306-315
- [10] PRAKKEN B, WAUBEN M, GENINI D, et al. Artificial antigen-presenting cells as a tool to exploit the immune 'synapse' [J]. *Nat Med*, 2000, 6(12):1406-1410
- [11] DAHOTRE S N, ROMANOV A M, SU F Y, et al. Synthetic antigen-presenting cells for adoptive T cell therapy [J]. *Adv Ther (Weinh)*, 2021, 4(8):2100034
- [12] SUNSHINE J C, PERICA K, SCHNECK J P, et al. Particle shape dependence of CD8<sup>+</sup> T cell activation by artificial antigen presenting cells [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(1):269-277
- [13] MEYER R A, SUNSHINE J C, PERICA K, et al. Biodegradable nanoellipsoidal artificial antigen presenting cells for antigen specific T-cell activation [J]. *Small*, 2015, 11(13):1519-1525
- [14] CHEUNG A S, ZHANG D K Y, KOSHY S T, et al. Scaffolds that mimic antigen-presenting cells enable ex vivo expansion of primary T cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(2):160-169
- [15] CHIANG C S, LIN Y J, LEE R, et al. Combination of fucoidan-based magnetic nanoparticles and immunomodulators enhances tumour-localized immunotherapy [J]. *Nat Nanotechnol*, 2018, 13(8):746-754
- [16] PERICA K, TU A, RICHTER A, et al. Magnetic field-induced T cell receptor clustering by nanoparticles enhances T cell activation and stimulates antitumor activity [J]. *ACS Nano*, 2014, 8(3):2252-2260
- [17] ICHIKAWA J, YOSHIDA T, ISSER A, et al. Rapid expansion of highly functional antigen-specific T cells from patients with melanoma by nanoscale artificial antigen-presenting cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(13):3384-3396
- [18] ZHANG Q, WEI W, WANG P, et al. Biomimetic magnetosomes as versatile artificial antigen-presenting cells to potentiate T-cell-based anticancer therapy [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(11):10724-10732
- [19] SLANEY C Y, VON SCHEIDT B, DAVENPORT A J, et al. Dual-specific chimeric antigen receptor T cells and an indirect vaccine eradicate a variety of large solid tumors in an immunocompetent, self-antigen setting [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(10):2478-2490
- [20] REINHARD K, RENGSTL B, OEHM P, et al. An RNA vaccine drives expansion and efficacy of claudin-CAR-T cells against solid tumors [J]. *Science*, 2020, 367(6476):446-453
- [21] SMITH T T, STEPHAN S B, MOFFETT H F, et al. *In situ* programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers [J]. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12(8):813-820
- [22] SOCKOLOSKY J T, TROTTEA E, PARISI G, et al. Selective targeting of engineered T cells using orthogonal IL-2 cytokine-receptor complexes [J]. *Science*, 2018, 359(6379):1037-1042
- [23] D'ALOIA M M, ZIZZARI I G, SACCHETTI B, et al. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3):282
- [24] PARKHURST M R, RILEY J P, DUDLEY M E, et al. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(19):6287-6297
- [25] HUANG Y, CHEN Y, ZHOU S, et al. Dual-mechanism based CTLs infiltration enhancement initiated by nanosapper potentiates immunotherapy against immune-excluded tumors [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):622
- [26] CHEN Q, HU Q, DUKHOVLINOVA E, et al. Photothermal therapy promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR T cells [J]. *Adv Mater*, 2019, 31(23):e1900192
- [27] DING N, ZOU Z, SHA H, et al. iRGD synergizes with PD-1 knockout immunotherapy by enhancing lymphocyte infiltration in gastric cancer [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1336
- [28] ZHANG F, STEPHAN S B, ENE C I, et al. Nanoparticles that reshape the tumor milieu create a therapeutic window for effective T-cell therapy in solid malignancies [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(13):3718-3730
- [29] ZHENG Y, STEPHAN M T, GAI S A, et al. *In vivo* targeting of adoptively transferred T-cells with antibody- and cytokine-conjugated liposomes [J]. *J Control Release*, 2013, 172(2):426-435
- [30] ZHENG Y, TANG L, MABARDI L, et al. Enhancing adoptive cell therapy of cancer through targeted delivery of small-molecule immunomodulators to internalizing or noninternalizing receptors [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(3):3089-3100



- [31] SCHMID D, PARK C G, HARTL C A, et al. T cell-targeting nanoparticles focus delivery of immunotherapy to improve antitumor immunity [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1747
- [32] KOSMIDES A K, SIDHOM J W, FRASER A, et al. Dual targeting nanoparticle stimulates the immune system to inhibit tumor growth [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(6): 5417-5429
- [33] LI X, HALLDORSDDOTTIR H R, WELLER S, et al. Enhancing adoptive cell therapy by T cell loading of SHP2 inhibitor nanocrystals before infusion [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(7): 10918-10930
- [34] BERGER C, BERGER M, HACKMAN R C, et al. Safety and immunologic effects of IL-15 administration in nonhuman primates [J]. *Blood*, 2009, 114(12): 2417-2426
- [35] STEPHAN M T, MOON J J, UM S H, et al. Therapeutic cell engineering with surface - conjugated synthetic nanoparticles [J]. *Nat Med*, 2010, 16(9): 1035-1041
- [36] TANG L, ZHENG Y, MELO M B, et al. Enhancing T cell therapy through TCR - signaling - responsive nanoparticle drug delivery [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(8): 707-716
- [37] HAO M, HOU S, LI W, et al. Combination of metabolic intervention and T cell therapy enhances solid tumor immunotherapy [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(571):
- [38] NIE W, WEI W, ZUO L, et al. Magnetic nanoclusters armed with responsive PD - 1 antibody synergistically improved adoptive T - cell therapy for solid tumors [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(2): 1469-1478
- [39] SIRIWON N, KIM Y J, SIEGLER E, et al. CAR-T cells surface-engineered with drug-encapsulated nanoparticles can ameliorate intratumoral T - cell hypofunction [J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6(7): 812-824
- [40] SHARMA P, HU - LIESKOVAN S, WARGO J A, et al. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy [J]. *Cell*, 2017, 168(4): 707-723
- [41] SUN Z, LI R, SHEN Y, et al. In situ antigen modification-based target-redireceted universal chimeric antigen receptor T (TRUE CAR-T) cell therapy in solid tumors [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 29
- [42] ZHANG W, WANG M, TANG W, et al. Nanoparticle-laden macrophages for tumor - tropic drug delivery [J]. *Adv Mater*, 2018, 30(50): e1805557
- [43] XUE J, ZHAO Z, ZHANG L, et al. Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence [J]. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12(7): 692-700
- [44] HUANG B, ABRAHAM W D, ZHENG Y, et al. Active targeting of chemotherapy to disseminated tumors using nanoparticle-carrying T cells [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(291): 291ra294
- [45] SIEGLER E L, KIM Y J, CHEN X, et al. Combination cancer therapy using chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells as drug carriers [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(12): 2607-2619
- [46] IM S, JANG D, SARAVANAKUMAR G, et al. Harnessing the formation of natural killer-tumor cell immunological synapses for enhanced therapeutic effect in solid tumors [J]. *Adv Mater*, 2020, 32(22): e2000020
- [47] TAO H, WU T, ALDEGHI M, et al. Nanoparticle synthesis assisted by machine learning [J]. *Nature Reviews Materials*, 2021, 6(8): 701-716

[收稿日期] 2023-01-05

(责任编辑:蒋 莉)