

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.01.001

· 主编述评/院士论坛 ·

NK 细胞肿瘤免疫治疗技术的挑战

方芳^{ab}, 肖卫华^{ab}, 田志刚^{ab} (中国科学技术大学 a. 生命科学院及医学中心 细胞信号转导协同创新中心 中科院天然免疫和慢病重点实验室; b. 合肥微尺度物质科学国家实验室, 安徽 合肥 230027)

[摘要] 自然杀伤(NK)细胞具有以MHC I非依赖识别机制和快速杀伤病变细胞能力、低移植物抗宿主反应(GVHD)风险、可采用异体细胞回输、体内存活周期短和无细胞因子风暴等长期和不可预期风险较低等特点和优势,使其在肿瘤免疫治疗中展现出巨大的应用潜力。虽然外周血单个核细胞(PBMC)来源NK细胞相比干细胞来源NK和NK细胞系在安全性和肿瘤杀伤能力上相对更好,但细胞制备技术的效率、稳定性和安全性仍有待完善;NK细胞被认为是较理想的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)载体,但外周血来源NK细胞转染效率较低,影响了CAR-NK的研发进程。由于NK细胞来源和培养技术的多样性,使细胞制品的活性不一,虽然NK细胞在抗血液肿瘤治疗中表现相对突出,但对实体瘤的治疗效果仍有待验证。总之,NK细胞应用开发近年已取得显著进步,但仍面临生产技术和临床疗效等诸多挑战。

[关键词] 自然杀伤细胞;肿瘤免疫治疗;过继转输;回输;NK细胞扩增

[中图分类号] R730.51; R739.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)01-0001-08



田志刚 中国科学技术大学教授,中国科学院工程院院士,博士生导师。中国科学院“百人计划”获得者、国家杰出青年科学基金获得者、国家教育部和国家基金委“天然免疫”创新研究群体学术带头人。现任中国免疫学会理事长、国际免疫学联盟执委,中国科技大学医学中心主任、免疫学研究所所长,中国科学院天然免疫与慢性疾病重点实验室主任。曾任中国科技大学生命科学院院长。中国免疫学会英文会刊 *Cell Mol Immunol* 执行主编,《中国免疫学杂志》主编,《中国肿瘤生物治疗杂志》副主编, *Cytokine* 副主编、*Hepatology* 及 *J Autoimmun* 编委。主要集中于NK细胞生物学、肝脏免疫学、NK细胞为基础的新型生物治疗技术及产品研发等方面的研究。以通信作者在 *Cell*、*Nat Immunol*、*Immunity*、*J Exp Med*、*J Clin Invest*、*Nat Commune*、*PNAS*、*Gastroenterology*、*Hepatology* 等发表SCI论文300余篇。获国家发明专利授权20余项。2008年获国家自然科学基金二等奖,2011年获国家科技进步二等奖。2015年获何梁何利科技进步奖。2004年创办中国免疫学会英文会刊 *Cell Mol Immunol*, 列中国大陆医学类SCI刊物前列。E-mail: tzg@ustc.edu.cn



肖卫华 中国科学技术大学教授、博士生导师。中科大医药生物技术系常务副主任,生物医药工程技术研究中心主任,安徽省生物工程学会理事长。1987至1995年任长春生物制品研究所助理研究员,1995至1997年任职于美国马里兰大学肿瘤研究中心,1997至2004年任职于美国国立卫生研究院肿瘤研究所,2004年起任职于中国科学技术大学生命科学院。主要研究方向为肿瘤与免疫细胞生物学、医药

生物技术研究和开发,承担了包括国家新药创制专项、国家自然科学基金、“973”和“863”等十余项科研基金项目,完成抗体药物、透皮蛋白质药物、重组细胞因子和肿瘤免疫治疗技术等生物技术药物的开发或临床前研究,开发的人外周血NK细胞体外扩增试剂盒获第四届全国创新创业大赛医药团队组三等奖,并已成功转让企业。研究成果发表在包括 *Nature Med*、*PNAS*、*Cancer Res* 等50余篇SCI论文,申请国家发明专利13项、获授权9项。E-mail: xiaow@ustc.edu.cn



方芳 中国科学技术大学副研究员。哈尔滨工业大学(威海)本科(2003-2007),中国科学技术大学博士(2007-2012)、博士后(2012-2014),中国科学技术大学副研究员(2014-现在)。主要研究方向肿瘤免疫,包括肿瘤免疫逃逸和NK细胞免疫治疗。主持国家自然科学基金面上项目、青年基金及安徽省自然科学基金,参与新药创制、传染病重大专项、国家自然科学基金创新群体、“973”、安徽省重大研究专项等科研项目。相关研究成果发表在 *Sci Rep*、*J Immunol* 等期刊。E-mail: fangfang@mail.ustc.edu.cn

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No. 2016YFC1303503);中国科学院战略性先导科技专项(B类)资助(No. XDPB0303);安徽省科技厅重大专项资助(No. 17030801024)。Project supported by the National Key Basic Research Program (973 Program) of China (No. 2016YFC1303503), the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. XDPB0303), and the Major Project from the Science and Technology Department of Anhui Province (No. 17030801024)

[通信作者] 田志刚(TIAN Zhigang, corresponding author);肖卫华(XIAO Weihua, co-corresponding author)

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20180111.1804.010.html>

Challenges on NK cell cancer immunotherapy

FANG Fang^{a,b}, XIAO Weihua^{a,b}, TIAN Zhigang^{a,b} (a. Institute of Immunology and the CAS Key Laboratory of Innate Immunity and Chronic Disease, Innovation Center for Cell Signaling Network, School of Life Sciences and Medical Center; b. Hefei National Laboratory for Physical Sciences at Microscale, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, Anhui, China)

[Abstract] Nature killer(NK) cells possess an great potential on cancer immunotherapy without long term potential adverse events and unpredictable risks due to its biological characteristics, including MHC-independent recognition and rapid killing mechanisms to the target cell, using allogenic donor cells without GVHD, short circulation life span and low CRS risks. Although NK cells from PBMC shown an great tumor killing activities and less safety concerns than from other sources including stem cell and NK cell lines, but an efficient and safer protocols for NK cell expansion from PBMC still need to be improved. NK cell is considered as a great vector for chimeric antigen receptors (CARs), however low efficiency of DNA transfection on primary NK cells is still the technically bottle neck for CAR-NK application. Clinical trails with NK cell therapy have shown encouraging efficacies on hematologic malignancy, but inconsistent on solid tumors because the NK cells that were produced from variety source cells and different protocols are differ from phenotype and function. In overall, significant progresses have made on NK cell immunotherapy in recent years, but challenges still ahead in term of manufacture and efficacy.

[Key words] nature killer cell; cancer immunotherapy; adoptive transfer; infusion; NK cell expansion

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(1): 1-8. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.01.001]

自然杀伤(NK)细胞通过杀伤性免疫球蛋白样受体(KIR)及共刺激受体依赖、主要组织相容性复合物(MHC)非依赖方式识别病变细胞,不需提前免疫致敏,可在几十分钟内杀伤恶性细胞,因而被认为是最有效的体内监视和清除病变细胞的免疫细胞亚群^[1-3]。KIR为MHC I类分子的配体,起到识别“自我”的功能,当与匹配的“自我”MHC I分子结合,传递抑制活化信号。多数恶性病变细胞上MHC I类分子的表达会下调或缺失,从而降低或丢失通过KIR分子向NK细胞传递抑制性信号的能力,驱动NK细胞活化杀伤。这种对恶性病变细胞的识别模式被称为“自我缺失”(missing-self)式识别。同时,恶性病变细胞大多表达某些损伤相关蛋白,而这些蛋白能够与NK细胞表面活化性受体结合,传递激活信号。这种识别模式被称为“压力诱导”(stress-induced)式识别。NK细胞的激活依赖于活化和抑制性受体信号的平衡结果^[4-7]。活化的NK细胞通过直接和间接的方式杀伤病变细胞:当NK细胞与靶细胞接触并形成免疫突触时,NK细胞释放穿孔素和颗粒酶,直接作用于靶细胞;同时通过表面的肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)与靶细胞TRAIL受体结合诱导细胞凋亡^[8]。另外,NK细胞通过分泌干扰素等细胞因子调节天然和获得性免疫细胞,从而间接杀伤病变细胞^[9]。基于NK细胞MHC非限制性、泛特异性识别和杀伤靶细胞及快速应答的特点,其在肿瘤免疫治疗的应用上被寄予越来越多的关注和期待。但因其仅占外周

血淋巴细胞的15%左右、体外扩增培养技术仍不成熟、DNA转染效率低等技术瓶颈,临床应用方案等研究仍远远落后于T细胞。本文综述了基于NK细胞肿瘤免疫治疗的技术路径和临床应用现状,分析并提出NK细胞免疫疗法所面临的生产技术及临床应用挑战。

1 NK细胞肿瘤免疫治疗技术路径

1.1 细胞过继转输

以往研究^[10-12]证实,肿瘤患者体内NK细胞通常数量减少、功能受损。因此NK细胞过继转输被认为可达到恢复免疫功能抵抗肿瘤的目的。从70年代的LAK细胞、到近年的CIK细胞及目前的NK细胞,一直是免疫细胞过继转输抗肿瘤理念的延续,以及不断提高NK细胞扩增效率的技术发展路程。自体 and 异体外周血单核细胞(PBMC)来源NK细胞均被用于回输,但自体来源NK细胞的临床研究结果显示其抗肿瘤效果非常有限^[13-14]。主要原因可能包括:(1)自体NK细胞KIR与肿瘤细胞HLA相匹配,“自我”识别信号抑制NK细胞活化;(2)患者自体NK细胞在免疫抑制环境下发育异常,功能受损,难以通过体外诱导达到较好的杀伤能力^[10-12]。

相对自体来源NK细胞,健康异体来源NK细胞展示出更好的抗肿瘤效果,并成为近临床研究的主流。早在2005年,Miller^[15]研究组对43名恶性肿瘤患者进行异体半相合NK细胞回输,结果表明异体NK

细胞的回输具有较好的耐受性和安全性,并未引起严重的副作用和移植物抗宿主反应(GVHD)。由于异体NK细胞的供体选择广泛,细胞来源广泛(包括外周血来源、脐带血来源、胚胎干细胞来源等),目前在NK细胞回输免疫治疗的研究中占了相当大的比例。异体NK细胞回输已被用于包括白血病、淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌在内的多种肿瘤治疗的临床研究中^[16]。但由于NK细胞的生产工艺不同,导致细胞成分和NK纯度、活性差异显著,其疗效差异也较大^[17]。因此,NK细胞的体外生产工艺也是目前NK治疗应用推广的关键因素。

1.2 免疫检验点抑制剂

免疫检验点抑制剂通过阻断免疫检验点配体与其受体的结合从而释放免疫细胞的刹车信号,达到激活细胞的目的。目前针对NK细胞抑制性受体包括KIR、NKG2A、Tim3、TIGIT等已开发相应抑制剂^[7,18-19],其中靶向NKG2A、TIGIT的抑制剂已进入临床研究阶段,但还未有研究结果报道^[20-21]。PD-1抑制剂虽然主要靶向T细胞,但也有报道发现,部分人群外周血也存在高表达PD-1的NK细胞亚群,并证实PD-1抗体可逆转其功能耗竭^[22-24],提示PD-1抑制剂在免疫治疗中对NK细胞的作用也值得关注^[25]。KIR分子特异阻断抗体IPH2101和IPH2102临床I/II期研究^[26]结果显示,接受高剂量、长时间阻断抗体治疗后,其NK细胞的功能反而降低。分析认为,长期大剂量阻断KIR,导致了单核细胞或嗜中性粒细胞介导的胞吞作用(trogocytosis),使得KIR2D分子在NK细胞表面的表达降低;而KIR分子的缺失使得NK细胞缺少了发育过程中重要的“education”过程,从而不能成为功能完全的NK细胞。该研究结果提示,干扰免疫检验点有可能激起免疫平衡中的反馈通路,从而引起相应的免疫调节。因此,临床研究方案仍需要深入的研究和优化。

1.3 细胞因子

临床前研究显示,包括IL-2、IL-15、IL-18和IL-21在内的多种细胞因子都具有促进NK细胞增殖和增强NK细胞功能的作用^[27-28]。目前IL-2伴随NK细胞回输治疗肿瘤在临床研究中应用广泛^[6],但值得注意的是,低剂量IL-2的重复使用在临床中显示具有较好的耐受性,而高剂量IL-2能够引起血管渗漏,导致严重的副作用^[2]。由于NK细胞表面高亲和力IL-2R α 表达较低,大量IL-2会被高表达IL-2R α 的调节性T细胞(Treg)竞争结合。为提高IL-2对NK细胞的亲和力,开发出了IL-2超因子(superkine),结果显示可显著提高对IL-2R β 的亲和力,促进杀伤性T细胞和NK细胞的增殖,同时具有较低的副作用^[29]。

IL-15能够促进CD8⁺T细胞和NK细胞的增殖,而不活化Treg细胞。但IL-15发挥作用通常需要顺式提呈作用,因此融合表达IL-15与IL-15R α 的异源二聚体提高了NK细胞对IL-15的利用效率^[30-31]。IL-18、IL-21等细胞因子虽还未正式进入临床实验研究,但用其体外预活化NK细胞可显著增强NK细胞在体内的存活及功能^[15]。细胞因子作为NK细胞生存、增殖、活化的辅助因子,将成为免疫治疗中必不可少的辅助治疗药物,但优化的临床组合治疗方案还需深入的探索。

1.4 免疫调节及抗肿瘤药物

免疫调节药物(immunomodulatory drugs, IMiDs)和抗肿瘤药物被证实能够直接或间接通过增强NK细胞功能或增强肿瘤细胞对杀伤的敏感性达到抑制肿瘤的目的,如已获FDA批准的来那度胺^[32]能够通过诱导周边T细胞和树突状细胞释放IL-2和IFN- γ ,从而增强NK细胞杀伤性和增殖;硼替佐米(bortezomib)可增强肿瘤细胞对NK细胞杀伤的敏感性^[33]。此外,正在临床试验研究阶段的GSK3抑制剂既对肿瘤有直接杀伤作用,也同时可增强NK细胞活性^[34]。这些药物对NK细胞调节作用的阐明,有助于后续NK细胞免疫治疗的联合应用的开展^[2,35]。

2 基于NK细胞的肿瘤精准免疫治疗策略

NK细胞对恶性病变细胞的识别具有泛特异性的特点,提高NK细胞肿瘤细胞靶向性有助于改善肿瘤免疫治疗的效果。目前,提高NK细胞靶向性有两种策略:(1)通过基因修饰,使NK细胞表达靶向肿瘤细胞的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR);(2)利用双特异或三特异抗体(Bi-/Tri-KE)靶向连接NK细胞和肿瘤细胞,从而增强抗肿瘤的效果。

2.1 CAR-NK细胞

CAR-NK所针对的靶点包括CD19、CD20、SLAMP7、EPCAM等,基本与目前CAR-T所针对靶点一致。但CAR-NK的胞内信号传递结构域沿用或在此基础上进行改造,包括4-1BB/CD3 ζ , CD28/CD3 ζ , 2B4/CD3 ζ , DAP10/CD3 ζ 以及CD28/4-1BB/CD3 ζ ^[36]。临床前的研究^[36]结果显示,4-1BB或2B4与CD3 ζ 连用的胞内信号结构域比CAR-T中最常用的CD28/CD3 ζ 具有相对更强的激活NK细胞的功能。此外,基于NK细胞胞内活化通路特点的DAP10、DAP12胞内信号结构域显示出诱导NK细胞活化的作用^[37]。同时,研究也注意到,CAR-NK细胞的激活不仅与CAR结构有关,还与包括MHC I分子、MICA/B等配体在内的抑制性配体有关,因此CAR-NK的效果在不同肿瘤类型中可能表现有差异,而针对不同肿瘤的优化CAR结构还需深

入探索和研究^[38]。NK-92是FDA批准进入临床试验的NK细胞系,以此细胞系为基础的CAR-NK-92目前已有4个临床研究正在进行,针对靶点包括CD19、CD33、MUC1和CD7;基于外周血来源原代NK细胞的CAR-NK有两个靶向CD19的I期临床研究(www.clinical-trials.gov);此外,还有一个基于脐血来源NK细胞靶向CD19的CAR-NK临床研究^[37,39-41]。目前为止,CAR-NK相关的临床研究结果均尚未公布,因此特别是CAR胞内信号域的优选,及CAR-NK抗肿瘤效果仍有待临床研究结果的验证。

虽然暂时还未有CAR-NK的临床研究效果报道,但NK细胞被认为是一种有竞争力的CAR载体。首先,NK细胞体内存活周期短,与T细胞不同,不会因在体内的持续存在而造成长期的副作用^[42];其次,NK细胞激活除CAR介导外,还与肿瘤细胞表面相关配体有关^[37],避免或降低包括On-target-off-tumor在内的对正常细胞的损伤风险;第三,包括干细胞、异体NK细胞和细胞系均可作为CAR载体,细胞种类和来源广泛^[17]。

2.2 双特异性及三特异性抗体(Bi/Tri-KE)

以单克隆抗体结构为骨架,经过工程化改造得到靶向两个或三个肿瘤抗原或效应细胞受体的工程化抗体,使其既可作为杀伤性细胞与靶细胞的连接,促进杀伤细胞聚集到肿瘤局部;同时可活化杀伤细胞,靶向肿瘤细胞。CD16是目前应用最多、也是认为结合力最强的用于识别NK细胞的双特异或三特异性抗体的靶点^[43-46]。NKG2D作为NK细胞以及杀伤性T细胞表面重要的活化性受体,是最有力的候选识别靶点。此外,缺乏Fc段而仅连接多个单链可变区结构域的工程化抗体,因可降低生产的复杂性和避免Fc段非特异性作用,也被逐渐受到重视^[44,47]。临床前大量研究^[48-49]结果表明,这些工程化的抗体能在有效激活NK细胞的同时增强其肿瘤细胞靶向性杀伤能力。其中,靶向CD30和CD16A的双特异性抗体AFM13已完成了针对霍奇金淋巴瘤的I/II期研究,并显示出较好的安全性和耐受性,总体疾病控制率达到约60%^[46,50]。目前,双特异性或三特异性抗体的开发,通过优化识别靶点、增强亲和力来达到更好的抗肿瘤效果。值得注意的是,由于双特异或三特异抗体识别靶点更多,可能产生的On-target-off-tumor的潜在副作用有待深入研究。

3 NK细胞肿瘤免疫治疗临床应用现状及前景

由于NK细胞制备技术的阶段性发展和细胞来源的多样性,所用细胞制剂在细胞成分、功能、剂量等方面显著的差异,也导致抗肿瘤临床研究疗效不一。

从细胞制备技术来看,早期LAK细胞培养技术中NK细胞所占比例仅约20%左右;CIK细胞技术中NK细胞比例占30%左右;而经纯化后饲养细胞(feeder)扩增体系NK细胞可达90%以上,细胞因子诱导扩增(feeder-free)也可达到NK细胞纯度80%以上。因CIK细胞技术制备的细胞制剂中70%以上为T细胞,如以CIK细胞代表T细胞发挥主要作用,并与现代方法制备NK细胞来比较,则临床疗效有显著的差异。在恶性血液瘤的治疗研究中,CIK细胞治疗能够达到约30%总体应答率,而其中自体来源细胞治疗的应答率要略高于异体来源的应答率^[51-53];健康异体来源NK细胞在难治型或复发的急性髓系白血病的完全缓解率平均约为40%^[54-55]。约一半以上原位黑色素瘤细胞表面呈现HLA分子表达降低或缺失^[56-57],约95%以上的卵巢癌细胞高表达NKG2D配体MICA/B和ULB-PS^[15,58]。虽然提示其容易受到来自NK细胞的杀伤,但NK细胞回输治疗效果非常有限。虽然上述临床实验所用NK细胞在扩增方法和细胞来源上存在多样性,且临床数据有限,但从初步结果来看,CIK细胞治疗在实体肿瘤中的作用优于血液肿瘤,自体来源CIK细胞效果比异体来源效果略优;NK细胞在恶性造血系肿瘤治疗中具有较好的效果,显著优于CIK方法制备的细胞,但在实体瘤中效果相对较弱。此外,异体NK细胞治疗已证实具有较好的耐受性,相对自体NK细胞有更好的疗效。

来自实体瘤局部的免疫抑制是不可忽视的影响因素,联合治疗是最可能的解决路径。已有文献报道^[59-60],放疗、化疗可显著提高肿瘤细胞表面压力相关分子的表达,这些分子能够与NK细胞表面活化性受体结合,从而向NK细胞传递更强的活化信号。此外,回输NK细胞与细胞因子或肿瘤特异性抗体联合使用,表现出增强的NK细胞体内活性和较好的抗肿瘤效果^[61-62]。尽管免疫细胞联合治疗是目前实体瘤疗效突破的可能方案,但包括治疗顺序、治疗窗口期、剂量和频率等临床治疗方案都有待更多的临床研究探讨。

4 NK细胞肿瘤免疫治疗面临的挑战

4.1 NK细胞扩增与转染

相比于T细胞,治疗用NK细胞种类多样,包括细胞系、外周血来源NK细胞和干细胞来源NK细胞。基于细胞回输的肿瘤免疫治疗需要足够数量和活化的NK细胞,因此NK细胞的体外扩增和激活是NK细胞回输治疗的首要条件。虽然不如NK-92细胞系可体外扩增和批量生产,干细胞来源NK细胞目前已有大规模临床级的生产系统建立。脐带血经过磁珠分选得

到CD34⁺细胞,在生物反应器中经过约42 d的培养,能够扩增2 000倍以上,获得90%以上纯度的NK细胞产品^[63]。此外,Kaufman研究^[64-65]组建立了临床规模的无需分选、无需使用饲养细胞从胚胎干细胞生产NK细胞的系统,可在1个月左右获得90%以上纯度的NK细胞。外周血来源NK细胞由于仅占外周血淋巴细胞的15%左右,需要先纯化再扩增,因此其生产仍是目前的技术瓶颈。早期单纯使用细胞因子扩增的方法,细胞扩增倍数和纯度都较低。随着研究的进展,饲养细胞的使用大大提高了NK细胞的生产效率。但由于培养体系中饲养细胞的添加需要增加后续纯化的步骤以及残留检测,不仅给生产带来了负担,同时也增加了临床使用的风险。因此,目前外周血来源NK细胞的体外扩增系统,向无需预纯化、无饲养细胞、无血清的培养体系发展^[66]。目前已报道的“三无”培养体系,能够在2~3周时间里得到NK细胞扩增上千倍、纯度>70%的产品^[67]。虽然目前体外扩增技术的开发已达到基本满足临床应用的要求,但扩增效率仍存在显著的个体差异,包括细胞活化状态、迁移能力、体内存活时间等方面。虽然相比干细胞、NK-92来源NK细胞,PBMC来源NK细胞无论在杀伤活性和安全性方面都更好,但在细胞纯度、数量和扩增稳定性方面还需提高。

CAR-NK细胞的生产瓶颈主要为NK细胞转染效率。目前使用的转染方法主要分两类:病毒转染系统和非病毒转染系统。逆转录病毒和慢病毒转染体系是最常用的病毒转染系统。T细胞利用逆转录病毒多次转染,CAR阳性率可达约70%^[68]。不同于T细胞,不同来源NK细胞的转染效率有差异。脐带血来源NK细胞的转染效率能够达到约73%,而静息外周血来源NK细胞的转染效率最高可达70%,平均只有约30%。体外扩增原代NK细胞的转染效率最高可达93%,显著高于静息状态NK细胞^[69-70]。通过靶向干预NK细胞内抗病毒防御机制的转染办法,被证明可有效提高外周血原代NK细胞的转染效率^[71],但大规模应用系统还未建立。此外,病毒转染存在高风险的插入突变,也成为限制其应用的一方面原因。非病毒转染系统,主要为电穿孔法,包括睡美人转座子系统和mRNA电转法,由于其具有低成本、低免疫原性的特点,受到越来越多的关注^[37]。电穿孔mRNA转染的方法目前已经建立了临床级别的生产系统,对原代NK细胞的转染能够达到约80%~90%的效率^[72-73],但由于其转染的是mRNA,所以其CAR表达是瞬时的。睡美人转座子系统目前已成功的运用于T细胞的CAR基因转染^[74]。但目前并未见其NK细胞CAR基因转染的应用报道。NK细胞转染后其细胞活率、细胞表型、迁

移能力等的检测,目前报道甚少,而这些因素都是影响其临床应用的关键因素。NK细胞不含有CD28胞内信号结构域,依据NK细胞胞内信号转导特点的DAP12在体外实验中表现出优于CD28的肿瘤杀伤效果^[75],提示NK中CAR胞内信号结构域不同于T细胞,激活信号通路有显著差异,因此,有必要对用于NK的CAR结构进行筛选和优化。总之,CAR-NK技术临床应用前仍需大量研究,面临着很大的挑战。

4.2 安全性

异体来源NK细胞在抗肿瘤治疗中表现出更好的效果,但同时由此可能产生的GVHD也成为最主要的风险问题。CIK细胞主要成分为CD3⁺细胞^[51],使用自体或异体CIK细胞进行的肿瘤免疫治疗中均未报道出现严重和非可控的GVHD、细胞因子风暴(cytokine-releasesyndrome, CRS)和肿瘤裂解相关副作用^[51,63]。虽然在临床前研究中发现外周血来源CIK细胞具有一定的免疫源性,但CIK细胞在体内的存留时间最多约为2周,因此在临床研究报告中并未见由于免疫源性而引起的副作用^[51,63]。不论自体或异体NK过继转移,均未见严重和非可控的GVHD和CRS出现^[76-77]。但由于不同的生产方法和细胞来源所得细胞特性有差异,如类似记忆型的NK细胞则会存留约2~3周时间,其免疫源性以及可能带来的相关副作用仍不清楚^[78]。另外,反复回输后的长期免疫原性也有待探讨。

5 结 语

肿瘤免疫治疗已成为继手术、放疗和化疗之后的第四类肿瘤治疗方法,是近年来应用研究和临床医学实践的最前沿研究领域。NK细胞基于其MHC非限制性和泛特异性的肿瘤识别特点,在肿瘤免疫治疗中展现出巨大的应用潜力。由于NK细胞治疗临床研究起步晚,且经历了长期的生产工艺及临床应用方案优化过程,目前关于NK细胞免疫治疗并未有明确定论。虽然前期临床研究结果显示,NK细胞治疗尤其在恶性造血系肿瘤治疗中表现相对突出,但采用现代技术制备的NK细胞在实体瘤的治疗效果仍有待验证。另外,NK细胞体外生产工艺的优化与规范、NK细胞肿瘤靶向性的增强以及与其他疗法联合应用,都是提高NK细胞肿瘤治疗效果的可行途径。

[参 考 文 献]

- [1] VIVIER E, TOMASELLO E, BARATIN M, et al. Functions of natural killer cells[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(5): 503-510. DOI: 10.1038/nri1582.
- [2] GUILLEREY C, HUNTINGTON N D, SMYTH M J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy [J]. *Nat Immunol*, 2016,

- 17(9): 1025-1036. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705503.
- [3] ROBINSON M W, HARMON C, O'FARRELLY C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis [J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(3): 267-276. DOI: 10.1038/cmi.2016.3.
- [4] BOTTINO C, DONDERO A, BELLORA F, et al. Natural killer cells and neuroblastoma: tumor recognition, escape mechanisms, and possible novel immunotherapeutic approaches[J/OL]. *Front Immunol*, 2014, 5: 56[2018-01-07]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00056/full>. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00056.
- [5] TARAZONA R, DURAN E, SOLANA R. Natural killer cell recognition of melanoma: new clues for a more effective immunotherapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2016, 6: 649[2018-01-07]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00649/full>. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00649.
- [6] BAGGIO L, LAUREANO A M, SILLA L M, et al. Natural killer cell adoptive immunotherapy: coming of age[J/OL]. *Clin Immunol*, 2016, 177: 3-11[2018-01-07]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661616300195?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.clim.2016.02.003.
- [7] CAROTTA S. Targeting NK cells for anticancer immunotherapy: clinical and preclinical approaches[J/OL]. *Front Immunol*, 2016, 7: 152[2018-01-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4838611/>. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00152.
- [8] SUNGUR C M, MURPHY W J. Positive and negative regulation by NK cells in cancer[J]. *Crit Rev Oncog*, 2014, 19(1/2): 57-66. DOI: 10.1038/bmt.2011.202.
- [9] CHESTER C, FRITSCH K, KOHRT H E. Natural killer cell immunomodulation: targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2015, 6: 601[2018-01-07]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00601/full>. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00601.
- [10] MORVAN M, DAVID G, SEBILLE V, et al. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions[J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(12): 3474-3486. DOI: 10.1002/eji.200838407.
- [11] CARREGA P, PEZZINO G, QUEIROLO P, et al. Susceptibility of human melanoma cells to autologous natural killer (NK) cell killing: HLA-related effector mechanisms and role of unlicensed NK cells[J/OL]. *PLoS One*, 2009, 4(12): e8132[2018-01-07]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0008132>. DOI: 10.1371/journal.pone.0008132.
- [12] MUNDY-BOSSE B, KATHLEEN M, MAO C, et al. Acute myeloid leukemia alters natural killer cell maturation and functional activation[J]. *Blood*, 2014, 124(21): 851-859. DOI: 10.3109/14653249.2012.694419.
- [13] ISHIKAWA E, TSUBOI K, SAIJO K, et al. Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma[J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(3B): 1861-1871. DOI: 10.3324/haematol.11132.
- [14] 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. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-11-1347.
- [15] 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): 3051-3057. DOI: 10.1182/blood-2004-07-2974.
- [16] CHENG M, CHEN Y Y, XIAO W H, et al. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases[J]. *Cell Mol Immunol*, 2013, 10(3): 230-252. DOI: 10.1007/s11523-017-0489-2.
- [17] FANG F, XIAO W H, TIAN Z G. NK cell-based immunotherapy for cancer[J/OL]. *Semin Immunol*, 2017, 31: 37-54[2018-01-07]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532317300325?via%3Dihub>. DOI: 10.3390/ijms18091868.
- [18] ANDERSON A C, JOLLER N, KUCHARO V K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation[J]. *Immunity*, 2016, 44(5): 989-1004. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.05.001.
- [19] TOPALIAN S L, DRAKE C G, PARDOLL D M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy [J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(4): 450-461. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.03.001.
- [20] RUGGERI L, URBANI E, ANDRE P, et al. Effects of anti-NKG2A antibody administration on leukemia and normal hematopoietic cells [J]. *Haematologica*, 2016, 101(5): 626-633. DOI: 10.3324/haematol.2015.135301.
- [21] NIELSEN N, GALSGAARD E D, AHERN D, et al. Blocking the inhibitory CD94/NKG2A NK cell receptor with a novel ANTI-NKG2A MAB enhances the susceptibility of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes (FLS) to NK cell-mediated cytotoxicity [J]. *Ann Rheumatic Dis*, 2012, 71: 316. DOI: 10.1002/eji.200838407.
- [22] PESCE S, GREPPI M, TABELLINI G, et al. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: a phenotypic and functional characterization[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(1): 335-346 e3. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.04.025.
- [23] ROMERO D. Immunotherapy: PD-1 says goodbye, TIM-3 says hello [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(4): 202-203. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.40.
- [24] DELLA CHIESA M, PESCE S, MUCCIO L, et al. Features of memory-like and PD-1(+) human NK cell subsets[J/OL]. *Front Immunol*, 2016, 7: 351[2018-01-07]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00351/full>. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00351.
- [25] ZITVOGEL L, KROEMER G. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy[J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(8): 1223-1225. DOI: 10.4161/onci.21335.
- [26] FELICES M, MILLER J S. Targeting KIR blockade in multiple myeloma: trouble in checkpoint paradise? [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(21): 5161-5163. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-16-1582.
- [27] FLOROS T, TARHINI A A. Anticancer cytokines: biology and clinical effects of interferon-alpha 2, interleukin(IL) -2, IL-15, IL-21, and IL-12[J]. *Semin Oncol*, 2015, 42(4): 539-548. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2015.05.015.
- [28] CHILDS R W, CARLSTEN M. Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: the force awakens[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(7): 487-498. DOI: 10.1038/nrd4506.
- [29] LEVIN A M, BATES D L, RING A M, et al. Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 'superkine'[J]. *Nature*, 2012, 484(7395): 529-U159. DOI: 10.1038/nature10975.

- [30] ROSARIO M, LIU B, KONG L, et al. The IL-15-based ALT-803 complex enhances Fc gamma RIIIa-triggered NK cell responses and in vivo clearance of B cell lymphomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(3): 596-608. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-15-1419.
- [31] HAN K P, ZHU X, LIU B, et al. IL-15:IL-15 receptor alpha super-agonist complex: high-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization[J]. *Cytokine*, 2011, 56(3): 804-810. DOI: 10.1016/j.cyto.2011.09.028.
- [32] BENSON D M JR., COHEN A D, JAGANNATH S, et al. A phase I trial of the anti-kir antibody IPH2101 and lenalidomide in patients with relapsed/refractory multiple myeloma[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(18): 4055-4061. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-15-0304.
- [33] LUNDQVIST A, YOKOYAMA H, SMITH A, et al. Bortezomib treatment and regulatory T-cell depletion enhance the antitumor effects of adoptively infused NK cells[J]. *Blood*, 2009, 113(24): 6120-6127. DOI: 10.1182/blood-2008-11-190421.
- [34] PARAMESWARAN R, RAMAKRISHNAN P, MORETON S A, et al. Repression of GSK3 restores NK cell cytotoxicity in AML patients[J/OL]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11154[2018-01-07]. <https://www.nature.com/articles/ncomms11154>. DOI: 10.1038/ncomms11154.
- [35] CHILDS R W, CARLSTEN M. Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: the force awakens[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(7): 487-498. DOI: 10.1038/nrd4506.
- [36] OBERSCHMIDT O, KLOESS S, KOEHL U. Redirected primary human chimeric antigen receptor natural killer cells as an “off-the-shelf immunotherapy” for improvement in cancer treatment[J/OL]. *Front Immunol*, 2017, 8: 654[2018-01-07]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00654/full>. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00654.
- [37] HU Y, TIAN Z-G, ZHANG C. Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy[J/OL]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2017, Epub ahead of print [2018-01-07]. <https://www.nature.com/articles/aps2017125>. DOI: 10.1038/aps.2017.125.
- [38] HERMANSON D L, KAUFMAN D S. Utilizing chimeric antigen receptors to direct natural killer cell activity[J/OL]. *Front Immunol*, 2015, 6: 195[2018-01-07]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00195/full>. DOI: 10.1038/bmt.2009.304.
- [39] LIU D, TIAN S, ZHANG K, et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-modified natural killer cell-based immunotherapy and immunological synapse formation in cancer and HIV[J]. *Protein Cell*, 2017, 8(12):861-877. DOI: 10.1007/s13238-017-0415-5.
- [40] ZHANG C, OBEROI P, OELSNER S, et al. Chimeric antigen receptor-engineered NK-92 cells: an off-the-shelf cellular therapeutic for targeted elimination of cancer cells and induction of protective antitumor immunity[J/OL]. *Front Immunol*, 2017, 8: 533[2018-01-07]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00533/full>. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00533.
- [41] WANG W N, ZHOU G Y, ZHANG W L. NK-92 cell, another ideal carrier for chimeric antigen receptor[J]. *Immunotherapy*, 2017, 9(9): 753-765. DOI: 10.2217/imt-2017-0022.
- [42] MARTIN-ANTONIO B, SUNE G, PEREZ-AMILL L, et al. Natural killer cells: angels and devils for immunotherapy[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): E1868[2018-01-07]. <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/9/1868>. DOI: 10.3390/ijms18091868.
- [43] GLEASON M K, VERNERIS M R, TODHUNTER D A, et al. Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human nk cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(12): 2674-2684. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-12-0692.
- [44] GLEASON M K, ROSS J A, WARLICK E D, et al. CD16xCD33 bispecific killer cell engager (BiKE) activates NK cells against primary MDS and MDSC CD33(+) targets[J]. *Blood*, 2014, 123(19): 3016-3026. DOI: 10.1182/blood-2013-10-533398.
- [45] MILLER J S, FELICE M, MCELMURRY R, et al. Trispecific killer engagers (TriKEs) that contain IL-15 to make NK cells antigen specific and to sustain their persistence and expansion[J/OL]. *Blood*, 2015, 126: 232[2018-01-07]. <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/232?sso-checked=true>. DOI: 10.1371/journal.pone.0008132.
- [46] ROTHE A, SASSE S, TOPP M S, et al. A phase 1 study of the bispecific anti-CD30/CD16A antibody construct AFM13 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma[J]. *Blood*, 2015, 125(26): 4024-4031. DOI: 10.1182/blood-2014-12-614636.
- [47] REUSCH U, BURKHARDT C, FUCEK I, et al. A novel tetravalent bispecific T and Ab (CD30/CD16A) efficiently recruits NK cells for the lysis of CD30+ tumor cells[J]. *mAbs*, 2014, 6(3): 728-739. DOI: 10.4161/mabs.28591.
- [48] GRANDJENETTE C, DICATO M, DIEDERICH M. Bispecific antibodies: an innovative arsenal to hunt, grab and destroy cancer cells [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2015, 16(8): 670-683. DOI: 10.1200/JCO.2009.24.4590.
- [49] TAY S S, CAROL H, BIRO M. TriKEs and BiKEs join CARs on the cancer immunotherapy highway[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2016, 12(11): 2790-2796. DOI: 10.1080/21645515.2016.1198455.
- [50] MARSCHNER J P, TREDER M, KOHRT H E, et al. AFM13, a novel bispecific (CD30xCD16A) tetravalent antibody (TandAb (R)) specifically engaging NK-cells to fight Hodgkin Lymphoma (HL) [J]. *Oncol Res Treat*, 2016, 39: 28.. DOI: 10.1182/blood-2013-10-532531.
- [51] INTRONA M. CIK as therapeutic agents against tumors[J/OL]. *J Autoimmun*, 2017, 85: 32-44[2018-01-07]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896841117304134?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.jaut.2017.06.008.
- [52] SCHMEEL L C, SCHMEEL F C, COCH C, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells in cancer immunotherapy: report of the international registry on CIK cells (IRCC)[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(5): 839-849. DOI: 10.1007/s00432-014-1864-3.
- [53] SCHMEEL F C, SCHMEEL L C, GAST S M, et al. Adoptive immunotherapy strategies with cytokine-induced killer (CIK) cells in the treatment of hematological malignancies[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(8): 14632-14648. DOI: 10.3390/ijms150814632.
- [54] SUCK G, LINN Y C, TONN T. Natural killer cells for therapy of leukemia[J]. *Transfus Med Hemoth*, 2016, 43(2): 89-95. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.005.
- [55] SINHA C, CUNNINGHAM L C. An overview of the potential strategies for NK cell-based immunotherapy for acute myeloid leukemia [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2016, 63(12): 2078-2085. DOI: 10.1002/pbc.26171.
- [56] HOLSKEN O, MILLER M, CERWENKA A. Exploiting natural killer cells for therapy of melanoma[J]. *J Dtsch Dermatol Ges*,

- 2015, 13(1): 23-29. DOI: 10.1111/ddg.12557.
- [57] SADOZAI H, GRUBER T, HUNGER R E, et al. Recent successes and future directions in immunotherapy of cutaneous melanoma[J/OL]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1617[2018-01-07]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01617/full>. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01617.
- [58] GELLER M A, COOLEY S, JUDSON P L, et al. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer[J]. *Cytotherapy*, 2011, 13(1): 98-107. DOI: 10.3109/14653249.2010.515582.
- [59] AMES E, CANTER R J, GROSSENBACHER S K, et al. Enhanced targeting of stem-like solid tumor cells with radiation and natural killer cells[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(9): e1036212[2018-01-07]. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2015.1036212>. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1036212.
- [60] ROSENAL B, APPEL M Y, YOSSEF R, et al. The effect of chemotherapy / radiotherapy on cancerous pattern recognition by NK cells[J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(12): 1780-1791. DOI: 10.2174/092986712800099730.
- [61] FEDERICO S M, MCCARVILLE M B, SHULKIN B L, et al. A pilot trial of humanized anti-GD2 monoclonal antibody (hu14.18K322A) with chemotherapy and natural killer cells in children with recurrent/refractory neuroblastoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(21): 6441-6449. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0379.
- [62] AGAUGUE S, MARCENARO E, FERRANTI B, et al. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12 IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells[J]. *Blood*, 2008, 112(5): 1776-1783. DOI: 10.1182/blood-2008-02-135871.
- [63] PITTARI G, FILIPPINI P, GENTILCORE G, et al. Revving up natural killer cells and cytokine-induced killer cells against hematological malignancies[J/OL]. *Front Immunol*, 2015, 6: 230[2018-01-07]. <http://www.eurekaselect.com/96392/article>. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00230.
- [64] KNORR D A, NI Z, HERMANSON D, et al. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2013, 2(4): 274-283. DOI: 10.5966/sctm.2012-0084.
- [65] HERMANSON D L, BENDZICK L, PRIBYL L, et al. Induced pluripotent stem cell-derived natural killer cells for treatment of ovarian cancer[J]. *Stem Cells*, 2016, 34(1): 93-101. DOI: 10.1002/stem.2230.
- [66] GRANZIN M, WAGNER J, KOHL U, et al. Shaping of natural killer cell antitumor activity by ex vivo cultivation[J/OL]. *Front Immunol*, 2017, 8: 458[2018-01-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5405078/>. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00458.
- [67] DENG X, TERUNUMA H, NIEDA M, et al. Synergistic cytotoxicity of ex vivo expanded natural killer cells in combination with monoclonal antibody drugs against cancer cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(4): 593-605. DOI: 10.1016/j.intimp.2012.09.014.
- [68] PISCOPO N J, MUELLER K P, DAS A, et al. Bioengineering solutions for manufacturing challenges in CAR T cells[J/OL]. *Biotechnol J*, 2017, Epub ahead of print[2018-01-07]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biot.201700095/abstract>. DOI:10.1002/biot.201700095.
- [69] BOISSEL L, BETANCUR M, LU W Q, et al. Comparison of mRNA and lentiviral based transfection of natural killer cells with chimeric antigen receptors recognizing lymphoid antigens[J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(5): 958-965. DOI: 10.3109/10428194.2011.634048.
- [70] CARLSTEN M, CHILDS R W. Genetic manipulation of NK cells for cancer immunotherapy: techniques and clinical implications[J/OL]. *Front Immunol*, 2015, 6: 266[2018-01-07]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00266/full>. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00266.
- [71] SUTLU T, NYSTROM S, GILLJAM M, et al. Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy[J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(10): 1090-1100. DOI: 10.1089/hum.2012.080.
- [72] CARLSTEN M, LI L, SU S, et al. Clinical-grade mRNA electroporation of NK cells: a novel and highly efficient method to genetically reprogram human NK cells for cancer immunotherapy[J]. *Blood*, 2014, 124(21): :2153. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.128.
- [73] LI L, ALLEN C, SHIVAKUMAR R, et al. Large volume flow electroporation of mRNA: clinical scale process[J/OL]. *Methods Mol Biol*, 2013, 969: 127-138[2018-01-07]. https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-62703-260-5_9. DOI: 10.1007/978-1-62703-260-5_9.
- [74] MONJEZI R, MISKEY C, GOGISHVILI T, et al. Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral sleeping beauty transposition from minicircle vectors[J]. *Leukemia*, 2017, 31(1): 186-194. DOI: 10.1038/mt.2012.227.
- [75] TOPFER K, CARTELLIERI M, MICHEN S, et al. DAP12-based activating chimeric antigen receptor for NK cell tumor immunotherapy[J]. *J Immunol*, 2015, 194(7): 3201-3212. DOI: 10.4049/jimmunol.1400330.
- [76] REZVANI K, ROUCE R H. The application of natural killer cell immunotherapy for the treatment of cancer[J/OL]. *Front Immunol*, 2015, 6: 578[2018-01-07]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00578/full>. DOI: 10.1038/mt.2013.277.
- [77] ULLRICH E, SALZMANN-MANRIQUE E, BAKHTIAR S, et al. Relation between acute GVHD and NK cell subset reconstitution following allogeneic stem cell transplantation[J/OL]. *Front Immunol*, 2016, 7: 595[2018-01-07]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00595/full>. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00595.
- [78] 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. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf2341.

[收稿日期] 2018-01-09

[修回日期] 2018-01-11

[本文编辑] 黄静怡