

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-075

合成免疫学与未来NK细胞免疫治疗

毕嘉成¹, 田志刚^{1, 2}

(¹ 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳合成生物学创新研究院, 广东 深圳 518055; ² 中国科学技术大学免疫学研究所, 安徽 合肥 230027)

摘要: 近年来, 免疫治疗在肿瘤等重大疾病治疗领域取得了突破性的进展, 然而当前免疫治疗在应对实体瘤等方面的有效性和安全性仍有待提高。另一方面, 合成生物学的理念和技术也取得了长足的发展, 其与免疫学基础研究及免疫治疗实践相融合, 诞生了“合成免疫学”新学科, 后者将驱动免疫治疗的进一步发展。本文概述了肿瘤免疫治疗的现状及合成免疫学诞生的背景, 对天然杀伤细胞(NK细胞)在肿瘤免疫中的作用及NK细胞疗法进行了介绍, 并详细综述了设计构建合成免疫细胞和合成免疫分子的相关进展。研究表明, NK细胞由于其独特的属性, 可能是“通用型”合成免疫细胞疗法的理想底盘细胞, 通过精准识别肿瘤的嵌合抗原受体及智能响应性基因回路等的装载, 将实现NK细胞的功能增效, 并在NK细胞大规模扩增技术及封闭式、自动化、可编程“细胞工厂”等的支撑下, 实现合成免疫细胞的“货架式”供应模式。除了合成免疫细胞疗法之外, 减毒增效的合成免疫分子则为人工操控免疫应答提供了更多的可能性。展望未来, 合成免疫学驱动的免疫细胞疗法将与新型的合成免疫分子相辅相成, 进一步提高抗肿瘤免疫疗法的有效性和安全性。

关键词: 嵌合抗原受体; 货架式供应; 细胞工厂; 基因编辑; 检查点疗法

中图分类号: R 392.12 **文献标志码:** A

Synthetic immunology and future NK cell immunotherapy

BI Jiacheng¹, TIAN Zhigang^{1, 2}

(¹Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China; ²Institute of Immunology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, Anhui, China)

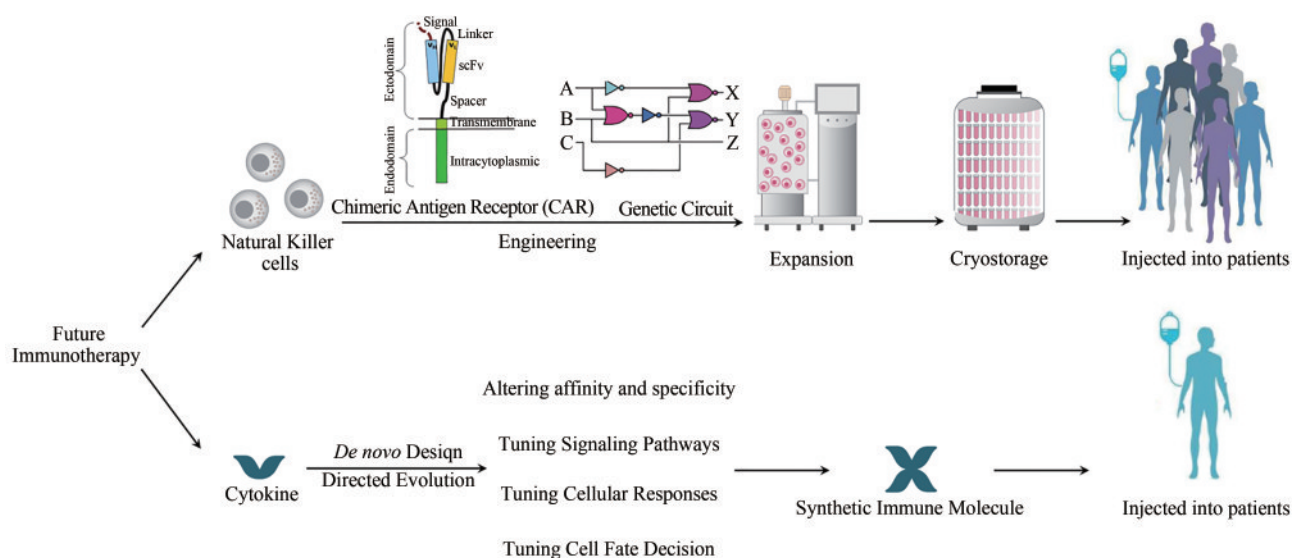
Abstract: In recent years, immunotherapy has been a breakthrough for clinical treatment of major diseases, such as cancers, whose efficacy and safety in treatment of solid tumors, however, requires further improvements. Meanwhile, the concept and technologies of synthetic biology have also gained substantial development, along with studies on basic immunology and practices in the immunotherapy, giving birth to a new discipline, ‘synthetic immunology’. Synthetic immunology aims to engineer biological devices or equipments to reshape, renormalize and rebuild the immune system for rational manipulation of immune responses in immunotherapy against major diseases. This review

收稿日期: 2021-07-19 修回日期: 2021-10-20

引用本文: 毕嘉成, 田志刚. 合成免疫学与未来NK细胞免疫治疗[J]. 合成生物学, 2022, 3(1): 22-34

Citation: BI Jiacheng, TIAN Zhigang. Synthetic immunology and future NK cell immunotherapy[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(1): 22-34

focuses on the development of immunotherapy driven by synthetic immunology. For future synthetic immune cell therapy, the chassis cell is the key element. Among effector immune cells, Natural Killer (NK) cells are cytotoxic innate lymphocytes that recognize and kill tumor cells without the need for priming. NK-based cell therapy, with proven tolerability and efficacy against tumors, is known for its low toxicity and suitable for allogenic use. These unique features of NK cells make them a potentially ideal chassis for future ‘universal’ synthetic immune cell therapy, whose anti-tumor efficacy could be further strengthened by arming of NK-adapted chimeric antigen receptors for precise recognition of tumors and of gene circuits for intelligent responses against tumors. In addition, technologies such as large-scale expansion and closed, automatic, and programmable ‘cell factory’ will lay the essential basis for ‘off-the-shelf’ supply of these synthetic immune cells. Besides synthetic immune cell therapy, synthetic immune molecules represent another arm of future synthetic immunology-driven immunotherapy. High-throughput technologies, multi-omics, and humanized mouse models will aid the rational design of these synthetic molecules towards reduced toxicity and enhanced efficacy, thus providing more possibilities for manipulation of immune responses. In the future, synthetic immune molecules will cooperate with synthetic immune cell therapy to further improve the efficacy and safety of anti-tumor immune therapy.



Keywords: chimeric antigen receptor; ‘off-the-shelf’ supply; cell factory; gene editing; checkpoint immune therapy

1 合成免疫学驱动的肿瘤免疫治疗

1.1 肿瘤免疫治疗现状概述

近年来, 免疫治疗在肿瘤等重大疾病治疗领域的应用得到蓬勃发展, 逐渐成为变革肿瘤治疗的崭新范式^[1-3]。当前免疫治疗主要包括通过单克隆抗体靶向“检查点分子”的“检查点疗法”^[4-5], 以及通过转输免疫细胞进行肿瘤治疗的免疫细胞

疗法^[6-7]。

其中“检查点疗法”主要通过单克隆抗体靶向阻断免疫细胞表面的抑制性受体, 从而解除抑制性受体介导的免疫抑制效应, 释放免疫细胞的抗肿瘤潜能。最具代表性的PD-1/PD-L1单克隆抗体, 通过阻断PD-1与PD-L1之间的相互作用, 激活抗肿瘤效应T细胞发挥抗肿瘤效应。随着基于PD-1/PD-L1抗体单药治疗肿瘤临床试验的成功, PD-1/PD-L1抗体联合CTLA-4、TIGIT等其他检查

点分子的联合疗法也相继取得成功。作为免疫治疗的重要方向之一，未来检查点疗法结合生物标志物的筛查，有望使该策略的应答水平进一步提高。

除了检查点疗法之外，免疫细胞疗法是免疫治疗中的另一个重要方向。免疫细胞疗法主要包括基于T细胞的CAR-T疗法和TCR-T疗法，以及基于NK细胞、 $\gamma\delta$ T细胞等固有免疫细胞疗法。CAR-T疗法主要通过设计构建嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)，使T细胞通过细胞外的单链抗体结构域特异性地识别肿瘤抗原，并通过细胞内的一个或多个活化性信号转导结构域触发活化性信号，二者的结合能够使得T细胞通过非MHC限制性的方式特异性地识别预先设定的肿瘤抗原，并启动T细胞的抗肿瘤效应功能^[8]。除了CAR-T外，CAR装载的NK细胞也在临床试验中体现出较好的有效性^[9]，而CAR装载的巨噬细胞目前仍在临床前开发阶段，其临床治疗肿瘤的有效性仍有待检验^[10]。此外，基于T细胞的免疫细胞疗法也包括同样在肿瘤免疫治疗领域展现出潜力的TCR-T疗法^[11]。TCR-T疗法主要通过从病人来源的T细胞进行体外的基因修饰，以使这些T细胞表达针对特定肿瘤抗原表位的TCR分子，从而获得特异性识别肿瘤的能力。与CAR-T细胞相比，TCR-T疗法的优势是能够使T细胞特异性地识别细胞内表达的肿瘤抗原，因而TCR-T疗法与CAR-T疗法具有一定程度的互补性；但TCR-T疗法具有MHC限制性，而目前所知的能特异性识别特定抗原表位的TCR数量非常有限。

尽管肿瘤免疫治疗取得了上述进展，然而针对大多数种类的肿瘤，特别是实体瘤，当前免疫疗法的疗效仍有待提高。原因主要有以下几点^[12]：免疫细胞对肿瘤的识别精准度不足；免疫细胞对肿瘤组织的浸润水平不足；免疫细胞受肿瘤微环境抑制；免疫细胞在肿瘤微环境中会进入耗竭状态。为了提高免疫治疗的有效性和安全性，亟需针对上述问题进一步发展免疫治疗的技术和手段。

1.2 合成免疫学概述

“合成生物学”是指设计与构建新的生物元

件、装置或系统，或对现有的天然生物系统进行再设计和再改造，以付诸应用^[13-16]。合成生物学以理性设计、量化、工程化和智能化等为核心理念和特征，在多个领域发展出一系列技术工具，为其广泛应用奠定了坚实的基础。合成生物学的理念与技术，结合日渐深入的免疫学基础研究及日益丰厚的免疫治疗实践积累，驱动着一个崭新学科的诞生与发展——合成免疫学^[17-18]。“合成免疫学”是指通过结合基础免疫学知识与合成生物学技术手段，工程化构建生物元件或装置，通过重塑、纠偏、再造机体的免疫系统，实现对免疫应答的理性操控、进行重大疾病的免疫治疗。合成免疫学的研究目标一方面是“致知”，即旨在进一步揭示免疫应答的调控机制；另一方面目标是“致用”，即通过理性设计、操控免疫应答的若干环节来实现重大疾病的免疫治疗。合成免疫学的诞生与发展，代表着未来免疫治疗的发展路径，即从传统以定性为主的经典免疫学理论上升为定量、可控、规模化的工程操控为主要特征的新时代；合成免疫学的重要价值在于，有望通过合成免疫学的赋能，使未来免疫疗法克服当前限制免疫治疗疗效的因素，从而实现更理想的治疗有效性和安全性。NK细胞是重要的抗肿瘤效应细胞，并在免疫治疗领域相比其他免疫细胞类型具有独特的优势，本文将对合成免疫学驱动的NK细胞肿瘤免疫治疗在未来的潜在发展路径进行展望，介绍天然杀伤细胞(natural killer cell, 即NK细胞)的特性、NK细胞在未来合成免疫细胞疗法中的重要地位、合成免疫细胞及分子的设计等内容。

2 基于NK细胞的下一代免疫治疗路径

NK细胞是一种固有免疫细胞，主要通过细胞膜表面一系列活化性、抑制性受体识别泛特异性的分子模式，从而对恶性转化或受感染的细胞进行识别和清除^[19-21]。与T细胞不同，NK细胞不需要经过预先致敏即可杀伤靶细胞。NK细胞不仅在肿瘤转移以及血液系统肿瘤等的免疫监视中发挥重要作用，而且NK细胞在实体瘤中的水平也与病人良好的预后呈正相关^[22]。更重要的是，NK细胞能在T细胞所无法识别的MHC-I低表达肿瘤中也

发挥抗肿瘤效应^[23]。由于NK细胞具备上述特征与独特优势，基于NK细胞的免疫疗法是当前免疫治疗领域的重要方向，其中主要包括NK细胞疗法^[24-26]以及NK细胞检查点疗法^[27-29]。

“底盘细胞”是指具备自我复制能力，能被人工修饰、改造以实现一定免疫学效应的免疫细胞。对底盘细胞的选择和研究是免疫治疗及合成免疫学研究的关键问题。当前的免疫治疗以基于T细胞的策略占多数，但基于T细胞的免疫治疗存在诸多不足^[30-31]：T细胞检查点疗法总体应答率偏低，肿瘤存在多种逃逸T细胞应答的机制；CAR-T和TCR-T疗法则在治疗实体瘤方面面临靶标抗原的丢失、免疫微环境抑制、免疫耗竭、较高毒性（细胞因子风暴、神经毒性、移植物抗宿主反应等）、自体T细胞质量低下、制备时间及成本较高等问题。相比之下，NK细胞疗法则具备一系列对比优势，比如毒性较低、异体来源、货架式供应模式等^[24, 32-34]，因而可能是未来免疫治疗中更为理想的工程化底盘细胞。

例如，有研究发现，造血干细胞移植后，供者NK细胞输注的患者中，HLA不完全匹配的NK细胞输注，使患者的预后更好^[35]，提示使用HLA不完全匹配的NK细胞进行输注治疗可能具有更好的抗肿瘤效果。因此，NK细胞治疗所用的NK细胞来源不受限于肿瘤患者自身，而可以来自异体健康人（包括外周血、脐带血、诱导的多能干细胞等等）；在此基础上，同一位健康人来源的NK细胞还可以用于多位不同配型的肿瘤患者的治疗。这被称为NK细胞疗法的“通用”特征^[36-37]。基于这一特征，提前将NK细胞进行体外诱导发育、分化、大量扩增及冻存，随时进行供应，能为肿瘤患者大大缩短等待治疗的时间窗口，即为NK细胞疗法的“货架式”供应模式。此外，由于NK细胞疗法毒性较小，NK细胞疗法可以施行多次反复的NK细胞输注，从而进一步提高疗效。2020年，NK细胞疗法迎来两项重大突破：其一是不同来源的NK细胞能够实现规模化的扩增生产；其二是异体CAR-NK疗法在实现同等疗效的情况下，避免了CAR-T疗法的毒副作用^[38]。这两项突破意味着NK细胞作为一种底盘细胞，从理论上具备作为免疫细胞疗法的“通用型”底盘细胞的优势，这种

策略不仅在临床上有效、安全，而且具备规模化生产工艺的可行性。

为了充分发挥NK细胞疗法的上述优势，在下一步研究中，需结合当前及未来合成免疫学的最新进展，对NK细胞进行肿瘤感受器及基因回路等的设计与构建，继续发展NK细胞的定向分化与无限量生产技术，并开发相应的自动化生产工艺。

3 合成免疫细胞的设计与生产

生物大分子药物通常被设计用于中和或触发特定靶分子的功能；而活细胞则可以执行复杂程度更高的应答程序。以免疫细胞为例。免疫细胞能够基于可精确定义的条件进行复杂环境信息的感知，随后触发执行可编程的治疗性应答。因而，免疫细胞疗法在执行智能程度较高的治疗策略方面，相比生物大分子而言更具潜力，将在基于合成免疫学的未来免疫治疗中扮演重要角色。下文将以NK细胞为例，阐述其智能设计与人工合成的关键技术。

3.1 肿瘤感受器的合成组装

免疫细胞对肿瘤细胞的精准识别是免疫细胞抗肿瘤疗法的关键。装载合成的抗原识别受体，将在NK细胞对肿瘤细胞的固有识别方式基础上，额外赋予NK细胞以肿瘤特异性识别的能力。《新英格兰医学杂志》发表的一项里程碑式的研究表明，针对11个病人，转载CAR的NK细胞疗法在8个病人中体现出应答，而其中的7个病人甚至在中位数13.8个月的时间内不再能检测出疾病的指标^[38]。该研究显示CAR-NK疗法的良好耐受性以及较好的抗肿瘤疗效，从概念上证明合成的抗原识别受体与NK细胞疗法之间的相容性。

考虑到NK细胞信号转导规律的独特性^[39-40]，为了充分调动NK细胞的效应功能，CAR的设计需要适应NK细胞特有的信号转导规律^[41-42]。比如，在CAR的细胞内信号转导模块设计上使用NK细胞活化性受体的信号转导结构域^[43]。研究表明，DAP12（活化性受体NKG2C、NKp44、KIR3DS1等的接头蛋白）^[44]、2B4.z（2B4受体的共刺激结构

域+CD3 ζ 结构域)^[45], 以及DAP10.z (活化性受体NKG2D的接头蛋白+CD3 ζ 结构域)^[46]等构造显示出较强的激活CAR-NK细胞的潜能。

3.2 NK细胞的定向分化与无限量生产技术

合成免疫细胞疗法需要制备大量免疫细胞并进行基因改造, 然而, 免疫细胞作为接近于终末分化状态的细胞, 其体外扩增能力存在瓶颈。诱导多能干细胞技术的发展则为此提供了新的解决途径。诱导多能干细胞具有类似胚胎干细胞的性质, 具备自我更新能力, 能在体外进行大规模扩增, 能通过基因编辑技术进行精确修饰和改造, 并在特定条件下被诱导分化成特定类型的免疫细胞。而通过对诱导多能干细胞及进行NK细胞定向分化的技术路线, 有潜力形成“货架式”供应的“通用型”免疫细胞疗法^[47]。

NK细胞的定向分化技术是其中的关键, 该技术主要包含两个环节。首先, 人胚胎干细胞以及人多能干细胞在基质细胞等的辅助下产生CD34⁺CD45⁺造血前体细胞; 随后, 将富集或流式分选所得的造血前体细胞在IL-3、IL-7、IL-15、SCF、FLT3L等细胞因子组合的条件下诱导分化成NK细胞^[48-50]。研究发现, 经由干细胞分化所得的NK细胞与原代分离的NK细胞及NK92细胞系等相比具有等同的效应功能, 表明该技术路线是可行的, 能用于免疫治疗用NK细胞的制备^[47]。

另一方面, 免疫细胞的大规模扩增工艺也是实现“货架式”供应“通用型”免疫细胞疗法的一种关键技术。以NK细胞为例, 其扩增技术主要分为“使用饲养细胞”或“无饲养细胞”两种方式。

“使用饲养细胞”策略通常选择在NK敏感靶细胞的表面过表达提供NK细胞存活、增殖信号的细胞因子如膜型IL-15或IL-21, 以及能激活NK细胞活化性受体的配体分子如4-1BB等。有报道在K562-mb15-4-1BBL刺激下, NK细胞能在3周内扩增数万倍, 并在8周内扩增至千万倍^[51]; 而过表达膜型IL-21的肿瘤细胞膜提取物PM21能刺激NK细胞在14天内扩增825倍^[52]; 另外, 经过TERT转染的NK细胞可以在K562-mb15-4-1BBL刺激下持

续被扩增超过1年^[53], 等等。

尽管“使用饲养细胞”策略已被用于多项肿瘤治疗的临床试验, 但“无饲养细胞”策略长远来说更具优势。“无饲养细胞”策略扩增所得的NK细胞避免了饲养细胞掺入的风险, 从而降低了质控的难度。“无饲养细胞”策略扩增NK细胞已有多项研究报道。比如通过培养瓶包被抗CD16抗体, 将PBMC在AIM V培养基、5%自体血浆、700 IU/mL IL-2的条件下进行培养, 经过前24小时OK432 (力尔凡, 即由溶血性链球菌Su株经青霉素处理、冷冻干燥制成的菌苗) 的处理, 在2~3周之后能够获得 4×10^9 、纯度95.4%的NK细胞^[54]。还有报道使用覆盖了抗CD2、抗NKp46抗体的珠子 (miltenyi biotec) 或类似的可溶性微球 (Cloudz, R&D), 在10天内获得超过100倍扩增的NK细胞^[55]。此外, 使用CD34⁺脐带血来源干细胞, 在IL-2、IL-7、IL-15存在的条件下也可以进行NK细胞的定向分化及扩增^[49]。以及在细胞因子基础上使用额外的辅助因子, 比如曾有研究者在IL-15和/或IL-2基础上结合烟酰胺或唑来膦酸及A类链球菌的使用, 进行NK细胞的扩增^[56-57]。

3.3 NK细胞的功能增效

免疫细胞疗法尽管在血液肿瘤的治疗中取得较大突破, 但目前对实体瘤的治疗仍面临有效性不足的问题。主要原因有以下几方面: ①免疫细胞对肿瘤细胞的识别精准度不足; ②免疫细胞对肿瘤组织的浸润不足; ③免疫细胞受肿瘤微环境抑制; ④免疫细胞的耗竭状态; ⑤免疫细胞在体内持续存活能力不足。为了进一步提升免疫细胞疗法的有效性, 未来可能从上述几个方面入手, 结合当前及未来合成免疫学的最新进展, 对免疫细胞进行修饰或改造, 从而实现免疫细胞的功能增效。

首先, NK细胞可以进行肿瘤感受器如CAR分子的装载, 从而增强NK细胞识别肿瘤细胞的特异性 (3.1节“肿瘤感受器的合成组装”已有讨论)。

其次, 实体肿瘤组织中存在大量的细胞外基质成分, 阻碍着免疫细胞的迁移和浸润^[58], 有报

道肝素酶^[59]在免疫细胞浸润肿瘤的过程中发挥关键作用,缺少肝素酶的NK细胞对肿瘤浸润水平降低、抗肿瘤能力大幅削弱^[60],因此,通过使NK细胞过表达肝素酶,有可能使得NK细胞对肿瘤细胞外基质降解能力提高,提高浸润肿瘤的能力。

浸润到肿瘤微环境中的NK细胞还会受到来自微环境的免疫负调控细胞和因子的抑制,其中最具有代表性的细胞因子是肿瘤坏死因子beta(tumor growth factor beta, TGF- β)^[61]。TGF- β 能通过抑制NK细胞的mTOR信号通路从而抑制NK细胞的活性^[62-63]。而通过在NK细胞上过表达突变型的TGF- β 显性阴性受体(mutant TGF- β dominant-negative receptor),能使NK细胞在TGF- β 富集的肿瘤微环境中显示出更强的肿瘤杀伤活性,并延长荷瘤小鼠的生存率^[64]。

NK细胞在肿瘤微环境中往往进入功能低下的免疫耗竭状态,这与NK细胞在肿瘤微环境中异常表达的检查点分子有关^[22]。其中,检查点分子TIGIT在肿瘤发生发展过程中在NK细胞表面逐渐上调表达,并介导NK细胞的肿瘤免疫耗竭,而通过单克隆抗体阻断TIGIT可以逆转NK细胞的免疫耗竭状态,在一定程度上恢复其抗肿瘤功能^[65]。根据这一原理,对NK细胞进行Tigit基因的敲除,有可能增强NK细胞在肿瘤微环境中抵抗免疫耗竭的能力。

在NK细胞体内存活能力方面,有报道对胞内检查点分子CIS^[66]进行基因敲除,获得的脐带血或诱导多能干细胞来源的NK细胞展现出更强大的抗肿瘤效能,伴随着更强的mTOR信号通路活性、更好的代谢状态以及更强的体内存活能力^[67-68]。

3.4 NK细胞的“定制式+通用型+货架式”供应

标准化和通用化是合成生物学的重要理念^[69-72],也是合成免疫学将赋予未来免疫治疗的重要特征。标准化和通用化能解决当下免疫细胞来源不足、价格高昂等问题,同时将利于免疫治疗符合监管的要求。在该背景下,“通用型”免疫细胞疗法的概念应运而生。

“通用型”免疫细胞疗法通过提取健康人来源的免疫细胞,经过体外基因修饰等工程化改造,

然后大规模扩增及冻存,形成可以“货架式”供应的工程化免疫细胞产品;当有患者需要进行治疗时,根据对患者生物标志物的筛查结果,在数据库中匹配最有可能产生应答的工程化免疫细胞产品,从而“定制”最合适患者的治疗方案,快速地将产品复苏并提供给患者进行临床使用。NK细胞是一种具有杀伤功能的底盘细胞,NK细胞免疫疗法的优势之一是天然具备在同种异体间使用的特点,因而更容易实现“货架式”供应^[73]。NK细胞免疫疗法与当前使用较多的自体免疫细胞疗法^[74-75](如CAR-T、TCR-T等)不同,其细胞来源不受限于患者自身,因而可以从来源广泛的健康人获取,从而进行大规模的提前制备。如此制备获得的产品对不同的患者而言是“通用”的。“通用型”免疫细胞疗法除了将大幅降低生产成本之外,还能够执行严格的质控标准,有助于推动监管法规的发展,利于免疫治疗行业的推广使用及长远发展。因此,“通用型”免疫细胞疗法是未来合成免疫细胞疗法的关键之一。

3.5 创建“无人值守”的细胞工厂

合成免疫学驱动的下一代免疫治疗,其核心在于免疫细胞底盘。包括化学药和蛋白药在内的常规药物是相对稳定、均一、化学成分明确;而免疫细胞则是活的、可自我复制、会发生改变、能对环节产生响应的^[6]。只有在生产工艺上尽可能地使细胞药物具有相对稳定的遗传成分与细胞状态,才能使免疫细胞治疗达成目标的有效性与安全性。因而,免疫细胞生产环节的标准化及严格的质控非常重要^[76-78]。为了实现标准化和严格的质控,需要改革当下集成度低、人手操作为主、产品质量参差不齐的生产模式。

针对上述难题,工业界尝试开发封闭式、自动化、可编程的细胞处理系统,即“细胞工厂”^[79-81]。细胞工厂通过对实验流程进行软硬件编程,实现全流程自动化封闭式操作,从而产出质量稳定、批次间差异小、可重复性较高的细胞产品。由于细胞工厂消除了人工处理的环节及在不同设备之间人工转移中间产物的步骤,从而系统性地降低潜在的污染风险、降低来自人工操作导致的批次

间质量差异。细胞工厂针对特定类型细胞产品进行调试及优化的结果还可以应用于后续规模放大的生产流程。

目前“细胞工厂”主要覆盖三个主要的生产工艺环节：原材料加工与储存、产品扩容与增能、成品储存与提货。具体而言，原材料加工与储存的环节包括有核细胞分离、冻存与复苏；产品扩容与增能环节包括目的细胞分选、细胞扩增与分化、细胞洗涤与分装；而成品储存与提货环节，包含细胞冻存、储存与复苏环节。此外，细胞的基因修饰与改造则根据具体细胞制备工艺的要求，可以以病毒载体等可选功能模块的形式按需整合进入生产工艺流程中。目前每个实验步骤都已有成品仪器被研制成功；而用以衔接不同仪器的机械臂技术、管路衔接技术及相关的软件设计，国内外多个单位已有一定的技术积累。可以预见，经过软件和硬件的进一步整合，“货架式”供应的免疫细胞治疗产品的全流程“细胞工厂”生产线将很快能实现。届时，以正常人的外周血作为起始原材料，经过细胞工厂的扩增，在一个月内扩增数千倍并规模冻存，一旦有患者需要用药，即可在短时间内复苏细胞、运输到医院住院部或门诊供患者进行使用。

4 合成免疫分子的设计

免疫细胞的细胞间通讯主要通过自分泌或旁分泌细胞因子或趋化因子来实现^[82]。细胞间通讯调控免疫细胞的招募、增殖、分化、死亡等环节，从而调节免疫应答。为了实现对免疫应答的人工操控，未来免疫治疗将使用比天然细胞因子功能更强大、更安全可控的新分子。“合成免疫分子”作为合成免疫学驱动的未来免疫治疗的重要组成部分，是指免疫治疗中使用的经过工程化改造的蛋白质分子，这种蛋白质分子经过理性设计（工程化）、功能模块的组合重构等，从而使亲和力和半衰期达到目的水平（量化）；另一方面，使合成免疫细胞能够表达、分泌经过上述重组/重构的免疫分子，实现目标的免疫调节效应。合成免疫分子由于具有复合的功能或条件响应性（智能化），因而能够执行天然蛋白质分子所不具备的生

物学功能。

4.1 免疫组学指导合成免疫分子的设计与使用

免疫组学是指免疫相关的组学技术，主要包括转录组^[83]及蛋白质组^[84]，蛋白质翻译后修饰如磷酸化、乙酰化、泛素化等的组学分析，以及表观遗传学方面的基因组甲基化的全局信息等。免疫组学的发展和应用对合成免疫分子的设计与开发具有重要意义。肿瘤微环境的属性取决于肿瘤类型、进展阶段和“冷/热”状态等因素，其影响因素复杂多变，全面而准确地对肿瘤微环境进行描绘已成为当今肿瘤免疫学研究的关键挑战^[12]。未来不同层次的组学技术，特别是在单细胞水平、结合组织空间定位信息的情况下，将有机构成完善的免疫组学系统分析体系。通过多学科交叉的合作，借助强大的生物信息学分析能力，整合不同层次的海量数据，从中提取具有生物学意义的信息，将为合成免疫分子的理性设计及生物标志物的发现提供重要的支撑。

首先，免疫组学可能提供免疫治疗的新靶点及相关信息。比如，单细胞转录组可以揭示出肿瘤微环境中重要的抗肿瘤效应细胞群体，并提示群体特异性的潜在检查点分子，描绘出肿瘤微环境中检查点分子及其配体分子的完整表达谱，继而推测可能涉及的细胞间相互作用关系，为新检查点疗法的开发提供重要的理论依据。

另一方面，生物标志物对包括免疫检查点疗法在内的合成免疫分子的理性设计与临床治疗使用至关重要^[85]，而免疫组学将有可能为上述免疫疗法提供新的生物标志物。比如，PD-1/PD-L1免疫检查点疗法的应答水平高度依赖于肿瘤局部高表达的PD-L1分子，因而通过PD-L1生物标志物的筛查，能够预判肿瘤患者是否适用于PD-1/PD-L1免疫检查点疗法，从而通过肿瘤标志物的筛查提高患者应答疗法的可能性^[86]。

4.2 高效减毒细胞因子的设计与合成

合成免疫分子理性设计的重要目标是同时具备高效、减毒的特性^[87-89]。比如，天然的IL-2分子在临床使用中具有较大的毒性^[90]，但研究发现IL-2分子

的毒性在 IL-2 受体的高亲和力亚基 CD25 (IL-2R α) 的基因缺失小鼠中大为减轻^[91]。因此, Garcia 等^[92] 针对性构建出的一种 IL-2 超级细胞因子 (Super-2) 能够绕过 CD25 来发挥功能。CD25 是肿瘤微环境中富集的具有免疫负调控功能的调节性 T 细胞标志^[93]。Super-2 的使用有可能在肿瘤微环境中激活 T 细胞的应答, 同时避免刺激调节性 T 细胞的扩增。而为了在绕过 CD25 的情况下同时进一步增强 IL-2 的活性及稳定性, Garcia 组与 Baker 组^[94] 合作开发了一种从头设计合成分子的计算手段, 得到的 Neo-2/15 具有与天然 IL-2 几乎完全不同的序列 (与天然 IL-2 同源性仅在 20% 左右), 它不仅可绕过 CD25 产生高效低毒的免疫学效应, 而且具有更高的亲和力和稳定性。除了亲和力、稳定性外, 基于氨基酸序列免疫原性的预测, 人工合成免疫分子还可以通过使用较低免疫原性的序列, 提高在体内长期使用时的稳定性及治疗有效性。如此类似 Super-2 和 Neo-2/15 的高效减毒的合成免疫分子, 或单独用于治疗, 或联合合成免疫细胞疗法使用, 或由合成免疫细胞分泌产生, 在未来的免疫治疗策略中, 是调控免疫应答的启动和终止的有力工具, 能够使免疫应答更有效、更安全地达成治疗目标。

4.3 双/多功能抗体

合成免疫分子的一种重要类别是双功能抗体。

单克隆抗体药物主要通过结合一个抗原表位产生生物学效应。单克隆抗体药物在临床治疗肿瘤、自身免疫性疾病等的成功^[95], 推动着抗体分子的工程化发展。与单克隆抗体相比, 双功能抗体可以同时结合两个抗原表位, 是一种代表性的合成免疫分子。双功能抗体可以将效应细胞直接靶向肿瘤细胞, 增强其细胞毒性; 或激活/中和超过一个免疫受体分子, 从而发挥特殊的生物学功能; 与两种单抗药物联合使用相比, 双功能抗体减少了药物开发和临床试验的成本^[96]。

目前获批上市的具有肿瘤免疫学效应的双功能抗体中, Catumaxomab 能够同时靶向肿瘤表面抗原 EpCAM 和 T 细胞标志 CD3^[97], 而 Blinatumomab 可以同时结合 B 细胞瘤标志 CD19 和 T 细胞标志

CD3^[98]。通过这样的方式, 这些抗体激活并招募杀伤性 T 细胞直接对肿瘤细胞进行攻击, 发挥抗肿瘤效应。

除此之外, 双功能抗体还可以同时靶向两个肿瘤抗原, 或两种细胞因子, 从而起到双重的中和效应, 比如靶向 HER2/HER3^[99]、IL-17A/IL-17F^[100] 等的双特异性抗体。

因而, 双/多功能抗体是一种前瞻性的合成免疫分子技术, 能发挥单抗药物所不能及的生物学效应, 但其产业化面临的诸多挑战, 如生产工艺上的错配问题、纯化问题和稳定性问题等等, 仍有待进一步的研究投入才能解决^[101-102]。

4.4 肿瘤新生抗原的预测指导合成免疫分子的设计

嵌合抗原受体是一类与免疫细胞疗法密切相关的合成免疫分子^[103-105]。前述章节中提到, 免疫细胞疗法的关键技术之一是通过“肿瘤感受器”即嵌合抗原受体的设计与构建, 使免疫细胞精准识别肿瘤细胞。作为一种能区分肿瘤细胞与正常细胞的合成免疫分子, 嵌合抗原受体的设计难点在于精准地获悉肿瘤特异性的抗原信息。在肿瘤发展过程中, 肿瘤细胞会逐渐积累体细胞突变^[106-107], 这些突变中的一部分会发生在蛋白质的 DNA 编码区域, 从而产生新的肿瘤相关抗原或肿瘤新生抗原^[108]。通过高外显子测序进行初步筛选, 然后对 HLA-1 亲和富集所得的抗原表位肽段进行质谱分析, 最后进行计算分析, 从而得到获取肿瘤新生抗原表位的序列信息^[109-110]。基于这些序列信息, 就能够精准地设计具有肿瘤特异性的嵌合抗原受体, 从而使免疫细胞能够精准识别肿瘤细胞。

4.5 人源化小鼠模型指导合成免疫疗法

合成免疫治疗策略的优化设计, 要求更完整地认识人类疾病的发病机制。然而, 目前仍缺少能够真实反映人类疾病发病机制的动物模型。小鼠的免疫系统和疾病模型与人体内发生的真实情形有一定差距, 导致很多在小鼠模型中观察到的现象及揭示的规律无法在人类疾病中重现。为了解决这一问题, 使用人源细胞在 NOD (non-obese diabetic)-

SCID(severe combined immunodeficient)-IL2 $\gamma^{-/-}$ (即NSG小鼠)^[111]等免疫缺陷小鼠体内重建人类免疫系统(HIS, humanized immune system)及人源组织器官^[112]的方式,可以在小鼠体内建立最大程度反映人类疾病发病机制的人源化小鼠模型,从而使免疫学基础研究的结论更加准确,以及免疫治疗策略的研发成功率更高。另一方面,肿瘤组织相比普通组织器官而言具有更复杂的区域特性^[113]。真实的肿瘤微环境的形成,是一个肿瘤细胞与基质细胞、免疫细胞等多种细胞类型相互作用下时间演进变化的结果。肿瘤患者来源的肿瘤组织可以最大程度地反映人类肿瘤微环境的属性,因此,在免疫系统人源化小鼠基础上,通过人源肿瘤组织来源移植瘤(PDX, patient-derived xenograft)^[114]建立肿瘤模型,能够建立最接近人类肿瘤组织区域特性的肿瘤模型。在此基础上,进行多组学比对研究(Exome-Seq、Methylomics、Proteomics、Metabolomic、scRNA-Seq、CyTOF等等),可获知接近于人类肿瘤微环境的全景信息,从而可以动态了解其抗肿瘤免疫应答,所获取的海量信息将有助于设计更有效的合成免疫疗法。

5 结语及展望

在前文中,我们对肿瘤免疫治疗的现状及未来可能的发展趋势进行了描绘。总体而言,当代免疫治疗已经成为继手术、放疗、化疗之后的又一重要范式,继代表性的PD-1/PD-L1检查点疗法和靶向CD19的CAR-T细胞疗法之后,随着越来越多适应证的一线治疗方案获批,免疫治疗将在肿瘤治疗等领域发挥越来越重要的作用,并将吸引越来越多研究资源的投入。此时更需要仔细分析免疫治疗手段所处的发展阶段,从而前瞻性地对关键突破方向进行布局。毋庸置疑,免疫治疗近年来在肿瘤治疗等领域取得了突破性的进展,然而有效性和安全性仍需进一步提高;尽管CAR-T疗法等在一些血液系统肿瘤的治疗中取得了较高的治愈率,但考虑到更多的肿瘤属于实体瘤范畴,而CAR-T疗法及检查点疗法等对此的应答率仍偏低,因而免疫治疗离治愈大多数肿瘤的目标仍有很大的距离。这种差距的内在原因之一是我们对

免疫细胞和分子的工程化改造仍处在早期阶段,仅仅初步展现了人工操控免疫应答的潜力。而未来只有充分掌握免疫细胞和分子工程化改造的规律,才能充分调动免疫应答的潜力;而为了更好地揭示免疫细胞和分子工程化改造的规律,更根本的手段是进一步认识免疫应答的调控原理,特别是在作为工程学基础的定量研究方面。

而此时合成生物学的发展则适逢其时地助推了这一发展趋势。合成生物学更讲究理性设计、量化、工程化,正符合免疫治疗从定性研究为主过渡到定量研究、工程化改造的发展阶段。基于SynNotch“与门”设计的双抗原识别型CAR-T^[115]、高效减毒“超级细胞因子”Super-2等^[94]的从头设计或理性设计等,正是合成生物学应用到免疫细胞或分子工程化改造的典范。除此之外,工程化改造免疫细胞及分子的“合成免疫学”领域正在揭示免疫治疗在未来更多的可能性:免疫细胞疗法将逐渐走向“通用型”的“货架式”供应模式;NK细胞作为免疫细胞治疗行业的“后起之秀”,以其独特的优势,将在“通用型”免疫细胞疗法中崭露头角;精准设计的嵌合抗原受体及基因回路将赋予免疫细胞更高的“智能”和更强的疗效;封闭式、自动化、可编程的“细胞工厂”将颠覆细胞治疗行业“小作坊”式的普遍乱象,为行业的规模化、规范化发展铺平道路;免疫组学及人源化小鼠模型将提供更贴近人类疾病状况的海量数据,为理性设计减毒增效的合成免疫分子奠定基础,而合成免疫分子的使用,将结合合成免疫细胞疗法,为人工操控免疫应答提供了更多的可能性。可以预期,合成免疫学将大大拓宽我们对免疫学基础理论的认识,在更充分揭示免疫细胞及分子的工程化改造规律基础上,将驱动未来免疫治疗走上更高的舞台。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Y Y, ZHANG Z M. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2020, 17(8): 807-821.
- [2] KRUGER S, ILMER M, KOBOLD S, et al. Advances in cancer immunotherapy 2019-latest trends[J]. Journal of Experi-

- mental & Clinical Cancer Research, 2019, 38(1): 268.
- [3] VOENA C, CHIARLE R. Advances in cancer immunology and cancer immunotherapy[J]. *Discovery Medicine*, 2016, 21(114): 125-133.
 - [4] SHARMA P, ALLISON J P. Dissecting the mechanisms of immune checkpoint therapy[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2020, 20(2): 75-76.
 - [5] SHARMA P, ALLISON J P. The future of immune checkpoint therapy[J]. *Science*, 2015, 348(6230): 56-61.
 - [6] WEBER E W, MAUS M V, MACKALL C L. The emerging landscape of immune cell therapies[J]. *Cell*, 2020, 181(1): 46-62.
 - [7] PETTITT D, ARSHAD Z, SMITH J, et al. CAR-T cells: A systematic review and mixed methods analysis of the clinical trial landscape[J]. *Molecular Therapy*, 2018, 26(2): 342-353.
 - [8] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-1365.
 - [9] ZHANG C, HU Y, XIAO W H, et al. Chimeric antigen receptor-and natural killer cell receptor-engineered innate killer cells in cancer immunotherapy[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2021, 18(9): 2083-2100.
 - [10] KLICHINSKY M, RUELLA M, SHESTOVA O, et al. Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(8): 947-953.
 - [11] ROSENBERG S A, RESTIFO N P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 2015, 348(6230): 62-68.
 - [12] HEGDE P S, CHEN D S. Top 10 challenges in cancer immunotherapy[J]. *Immunity*, 2020, 52(1): 17-35.
 - [13] PEI L, SCHMIDT M, WEI W. Synthetic biology: an emerging research field in China[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 804-814.
 - [14] KATZ L, CHEN Y Y, GONZALEZ R, et al. Synthetic biology advances and applications in the biotechnology industry: a perspective[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2018, 45(7): 449-461.
 - [15] BREITLING R, TAKANO E. Synthetic biology advances for pharmaceutical production[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 35: 46-51.
 - [16] MCDANIEL R, WEISS R. Advances in synthetic biology: on the path from prototypes to applications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16(4): 476-483.
 - [17] ROYBAL K T, LIM W A. Synthetic immunology: hacking immune cells to expand their therapeutic capabilities[J]. *Annual Review of Immunology*, 2017, 35: 229-253.
 - [18] GEERING B, FUSSENEGGER M. Synthetic immunology: modulating the human immune system[J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(2): 65-79.
 - [19] VIVIER E, TOMASELLO E, BARATIN M, et al. Functions of natural killer cells[J]. *Nature Immunology*, 2008, 9(5): 503-510.
 - [20] ABEL A M, YANG C, THAKAR M S, et al. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1869.
 - [21] GEIGER T L, SUN J C. Development and maturation of natural killer cells[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2016, 39: 82-89.
 - [22] BI J C, TIAN Z G. NK cell exhaustion[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 760.
 - [23] RAULET D H. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells[J]. *Seminars in Immunology*, 2006, 18(3): 145-150.
 - [24] CHENG M, CHEN Y Y, XIAO W H, et al. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2013, 10(3): 230-252.
 - [25] LIU S Z, GALAT V, GALAT Y, et al. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2021, 14(1): 7.
 - [26] FANG F, XIAO W H, TIAN Z G. Challenges of NK cell-based immunotherapy in the new era[J]. *Frontiers of Medicine*, 2018, 12(4): 440-450.
 - [27] BI J C, TIAN Z G. NK cell dysfunction and checkpoint immunotherapy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1999.
 - [28] KHAN M, AROOJ S, WANG H. NK cell-based immune checkpoint inhibition[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 167.
 - [29] SUN H Y, SUN C. The rise of NK cell checkpoints as promising therapeutic targets in cancer immunotherapy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2354.
 - [30] STERNER R C, STERNER R M. CAR-T cell therapy: Current limitations and potential strategies[J]. *Blood Cancer Journal*, 2021, 11: 69.
 - [31] HARGADON K M, JOHNSON C E, WILLIAMS C J. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors[J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 62: 29-39.
 - [32] HODGINS J J, KHAN S T, PARK M M, et al. Killers 2.0: NK cell therapies at the forefront of cancer control[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2019, 129(9): 3499-3510.
 - [33] BALD T, KRUMMEL M F, SMYTH M J, et al. The NK cell-cancer cycle: advances and new challenges in NK cell-based immunotherapies[J]. *Nature Immunology*, 2020, 21(8): 835-847.
 - [34] HU W L, WANG G S, HUANG D S, et al. Cancer immunotherapy based on natural killer cells: current progress and new opportunities[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1205.
 - [35] RUGGERI L, CAPANNI M, URBANI E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants[J]. *Science*, 2002, 295(5562): 2097-2100.
 - [36] SAETERSMOEN M L, HAMMER Q, VALAMEHR B, et al.

- Off-the-shelf cell therapy with induced pluripotent stem cell-derived natural killer cells[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2019, 41(1): 59-68.
- [37] WANG W X, JIANG J T, WU C P. CAR-NK for tumor immunotherapy: Clinical transformation and future prospects[J]. *Cancer Letters*, 2020, 472: 175-180.
- [38] LIU E L, MARIN D, BANERJEE P, et al. Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 382(6): 545-553.
- [39] TOMASELLO E, BLERY M, VELY E, et al. Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells[J]. *Seminars in Immunology*, 2000, 12(2): 139-147.
- [40] VIVIER E, NUNÈS J A, VÉLY F. Natural killer cell signaling pathways[J]. *Science*, 2004, 306(5701): 1517-1519.
- [41] AFOLABI L O, ADESHAKIN A O, SANI M M, et al. Genetic reprogramming for NK cell cancer immunotherapy with CRISPR/Cas9[J]. *Immunology*, 2019, 158(2): 63-69.
- [42] PFEFFERLE A, HUNTINGTON N D. You have got a fast CAR: chimeric antigen receptor NK cells in cancer therapy[J]. *Cancers*, 2020, 12(3): 706.
- [43] HU Y, TIAN Z G, ZHANG C. Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2018, 39(2): 167-176.
- [44] TÖPFER K, CARTELLIERI M, MICHEN S, et al. DAP12-based activating chimeric antigen receptor for NK cell tumor immunotherapy[J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 2015, 194(7): 3201-3212.
- [45] LI Y, HERMANSON D L, MORIARTY B S, et al. Human iPS-cell-derived natural killer cells engineered with chimeric antigen receptors enhance anti-tumor activity[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(2): 181-192.e5.
- [46] MEHTA R S, REZVANI K. Chimeric antigen receptor expressing natural killer cells for the immunotherapy of cancer[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 283.
- [47] SHANKAR K, CAPITINI C M, SAHA K. Genome engineering of induced pluripotent stem cells to manufacture natural killer cell therapies[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2020, 11(1): 234.
- [48] KNORR D A, NI Z Y, HERMANSON D, et al. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2013, 2(4): 274-283.
- [49] SPANHOLTZ J, PREIJERS F, TORDOIR M, et al. Clinical-grade generation of active NK cells from cord blood hematopoietic progenitor cells for immunotherapy using a closed-system culture process[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20740.
- [50] WOLL P S, MARTIN C H, MILLER J S, et al. Human embryonic stem cell-derived NK cells acquire functional receptors and cytolytic activity[J]. *Journal of Immunology*, 2005, 175(8): 5095-5103.
- [51] IMAI C, IWAMOTO S, CAMPANA D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells[J]. *Blood*, 2005, 106(1): 376-383.
- [52] 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]. *Cytherapy*, 2016, 18(5): 653-663.
- [53] FUJISAKI H, KAKUDA H, IMAI C, et al. Replicative potential of human natural killer cells[J]. *British Journal of Haematology*, 2009, 145(5): 606-613.
- [54] LI L Y, LI W, WANG C, et al. Adoptive transfer of natural killer cells in combination with chemotherapy improves outcomes of patients with locally advanced colon carcinoma[J]. *Cytherapy*, 2018, 20(1): 134-148.
- [55] REIM F, DOMBROWSKI Y, RITTER C, et al. Immunoselection of breast and ovarian cancer cells with trastuzumab and natural killer cells: selective escape of CD44^{high}/CD24^{low}/HER2^{low} breast cancer stem cells[J]. *Cancer Research*, 2009, 69(20): 8058-8066.
- [56] CHILDS R W, CARLSTEN M. Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: the force awakens[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, 14(7): 487-498.
- [57] MU Y X, ZHAO Y X, LI B Y, et al. A simple method for *in vitro* preparation of natural killer cells from cord blood[J]. *BMC Biotechnology*, 2019, 19(1): 80.
- [58] HENKE E, NANDIGAMA R, ERGÜN S. Extracellular matrix in the tumor microenvironment and its impact on cancer therapy[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020, 6: 160.
- [59] COOMBE D R, GANDHI N S. Heparanase: a challenging cancer drug target[J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9: 1316.
- [60] PUTZ E M, MAYFOSH A J, KOS K, et al. NK cell heparanase controls tumor invasion and immune surveillance[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2017, 127(7): 2777-2788.
- [61] GAJEWSKI T F, MENG Y, HARLIN H. Immune suppression in the tumor microenvironment[J]. *Journal of Immunotherapy*, 2006, 29(3): 233-240.
- [62] VIEL S, MARÇAIS A, GUIMARAES F S, et al. TGF- β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway[J]. *Science Signaling*, 2016, 9(415): ra19.
- [63] ZAIATZ-BITTENCOURT V, FINLAY D K, GARDINER C M. Canonical TGF- β signaling pathway represses human NK cell metabolism[J]. *The Journal of Immunology*, 2018, 200(12): 3934-3941.
- [64] BURGA R A, YVON E, CHORVINSKY E, et al. Engineering the TGF β receptor to enhance the therapeutic potential of natu-

- ral killer cells as an immunotherapy for neuroblastoma[J]. *Clinical Cancer Research*, 2019, 25(14): 4400-4412.
- [65] ZHANG Q, BI J C, ZHENG X D, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity[J]. *Nature Immunology*, 2018, 19(7): 723-732.
- [66] DELCONTE R B, KOLESNIK T B, DAGLEY L F, et al. CIS is a potent checkpoint in NK cell-mediated tumor immunity[J]. *Nature Immunology*, 2016, 17(7): 816-824.
- [67] DAHER M, BASAR R, GOKDEMIR E, et al. Targeting a cytokine checkpoint enhances the fitness of armored cord blood CAR-NK cells[J]. *Blood*, 2021, 137(5): 624-636.
- [68] 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.
- [69] CANTON B, LABNO A, ENDY D. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(7): 787-793.
- [70] ENDY D. Foundations for engineering biology[J]. *Nature*, 2005, 438(7067): 449-453.
- [71] PORTELA R M C, VOGL T, KNIELY C, et al. Synthetic core promoters as universal parts for fine-tuning expression in different yeast species[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(3): 471-484.
- [72] ADAMS B L. The next generation of synthetic biology chassis: moving synthetic biology from the laboratory to the field[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(12): 1328-1330.
- [73] SIEGLER E L, ZHU Y N, WANG P, et al. Off-the-shelf CAR-NK cells for cancer immunotherapy[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(2): 160-161.
- [74] DEPIL S, DUCHATEAU P, GRUPP S A, et al. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2020, 19(3): 185-199.
- [75] ZHAO L J, CAO Y J. Engineered T cell therapy for cancer in the clinic[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2250.
- [76] LEVINE B L, MISKIN J, WONNACOTT K, et al. Global manufacturing of CAR T cell therapy[J]. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 2017, 4: 92-101.
- [77] CHABANNON C, MFARREJ B, GUIA S, et al. Manufacturing natural killer cells as medicinal products[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7: 504.
- [78] WANG X Y, RIVIÈRE I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy[J]. *Molecular Therapy-Oncolytics*, 2016, 3: 16015.
- [79] ZHANG W, JORDAN K R, SCHULTE B, et al. Characterization of clinical grade CD19 chimeric antigen receptor T cells produced using automated CliniMACS Prodigy system[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2018, 12: 3343-3356.
- [80] JACKSON Z, ROE A, SHARMA A A, et al. Automated manufacture of autologous CD19 CAR-T cells for treatment of non-Hodgkin lymphoma[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1941.
- [81] COESHOTT C, VANG B, JONES M, et al. Large-scale expansion and characterization of CD3⁺ T-cells in the quantum[®] cell expansion system[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2019, 17(1): 258.
- [82] DANESHPOUR H, YOUK H. Modeling cell-cell communication for immune systems across space and time[J]. *Current Opinion in Systems Biology*, 2019, 18: 44-52.
- [83] REN X W, ZHANG L, ZHANG Y Y, et al. Insights gained from single-cell analysis of immune cells in the tumor microenvironment[J]. *Annual Review of Immunology*, 2021, 39: 583-609.
- [84] HANASH S, SCHLIEKELMAN M. Proteomic profiling of the tumor microenvironment: recent insights and the search for biomarkers[J]. *Genome Medicine*, 2014, 6(2): 12.
- [85] LEE J S, RUPPIN E. Multiomics prediction of response rates to therapies to inhibit programmed cell death 1 and programmed cell death 1 ligand 1[J]. *JAMA Oncology*, 2019, 5(11): 1614-1618.
- [86] PATEL S P, KURZROCK R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2015, 14(4): 847-856.
- [87] MORAGA I, SPANGLER J B, MENDOZA J L, et al. SyntheKines are surrogate cytokine and growth factor agonists that compel signaling through non-natural receptor dimers[J]. *eLife*, 2017, 6: e22882.
- [88] WU T Y H. Strategies for designing synthetic immune agonists[J]. *Immunology*, 2016, 148(4): 315-325.
- [89] SCHUKUR L, GEERING B, CHARPIN-EL HAMRI G, et al. Implantable synthetic cytokine converter cells with AND-gate logic treat experimental psoriasis[J]. *Science Translational Medicine*, 2015, 7(318): 318ra201.
- [90] SIEGEL J P, PURI R K. Interleukin-2 toxicity[J]. *ACS Chemical Biology*, 1991, 9(4): 694-704.
- [91] KRIEG C, LÉTOURNEAU S, PANTALEO G, et al. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(26): 11906-11911.
- [92] 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): 529-533.
- [93] BEYER M, SCHULTZE J L. Regulatory T cells in cancer[J]. *Blood*, 2006, 108(3): 804-811.
- [94] SILVA D A, YU S, ULGE U Y, et al. *De novo* design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15[J]. *Nature*, 2019, 565(7738): 186-191.

- [95] SINGH S, KUMAR N K, DWIWEDI P, et al. Monoclonal antibodies: a review[J]. *Current Clinical Pharmacology*, 2018, 13(2): 85-99.
- [96] LABRIJN A F, JANMAAT M L, REICHERT J M, et al. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2019, 18(8): 585-608.
- [97] LINKE R, KLEIN A, SEIMETZ D. Catumaxomab: clinical development and future directions[J]. *mAbs*, 2010, 2(2): 129-136.
- [98] ZHAO J J, SONG Y P, LIU D L. Recent advances on blinatumomab for acute lymphoblastic leukemia[J]. *Experimental Hematology & Oncology*, 2019, 8: 28.
- [99] YU S N, LIU Q, HAN X W, et al. Development and clinical application of anti-HER2 monoclonal and bispecific antibodies for cancer treatment[J]. *Experimental Hematology & Oncology*, 2017, 6: 31.
- [100] TORRES T, ROMANELLI M, CHIRICOZZI A. A revolutionary therapeutic approach for psoriasis: bispecific biological agents[J]. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2016, 25(7): 751-754.
- [101] DEMAREST S J, GLASER S M. Antibody therapeutics, antibody engineering, and the merits of protein stability[J]. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 2008, 11(5): 675-687.
- [102] PLÜCKTHUN A, PACK P. New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments[J]. *Immunotechnology*, 1997, 3(2): 83-105.
- [103] JUNE C H, SADELAIN M. Chimeric antigen receptor therapy[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2018, 379(1): 64-73.
- [104] FIGUEROA J A, REIDY A, MIRANDOLA L, et al. Chimeric antigen receptor engineering: a right step in the evolution of adoptive cellular immunotherapy[J]. *International Reviews of Immunology*, 2015, 34(2): 154-187.
- [105] SADELAIN M, BRENTJENS R, RIVIÈRE I. The basic principles of chimeric antigen receptor design[J]. *Cancer Discovery*, 2013, 3(4): 388-398.
- [106] VITALE I, SISTIGU A, MANIC G, et al. Mutational and antigenic landscape in tumor progression and cancer immunotherapy[J]. *Trends in Cell Biology*, 2019, 29(5): 396-416.
- [107] LOEB K R, LOEB L A. Significance of multiple mutations in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3): 379-385.
- [108] JIANG T, SHI T, ZHANG H, et al. Tumor neoantigens: From basic research to clinical applications[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2019, 12(1): 93.
- [109] ROUDKO V, GREENBAUM B, BHARDWAJ N. Computational prediction and validation of tumor-associated neoantigens[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 27.
- [110] WANG Z D, CAO Y J. Adoptive cell therapy targeting neoantigens: a frontier for cancer research[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 176.
- [111] ITO M, HIRAMATSU H, KOBAYASHI K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells[J]. *Blood*, 2002, 100(9): 3175-3182.
- [112] STROM S C, DAVILA J, GROMPE M. Chimeric mice with humanized liver: tools for the study of drug metabolism, excretion, and toxicity[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 640: 491-509.
- [113] WHITESIDE T L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth[J]. *Oncogene*, 2008, 27(45): 5904-5912.
- [114] HIDALGO M, AMANT F, BIANKIN A V, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research[J]. *Cancer Discovery*, 2014, 4(9): 998-1013.
- [115] MORSUT L, ROYBAL K T, XIONG X, et al. Engineering customized cell sensing and response behaviors using synthetic Notch receptors[J]. *Cell*, 2016, 164(4): 780-791.



通讯作者：田志刚(1956—)，男，博士，教授，中国工程院院士。主要从事NK细胞生物学及基于NK细胞的肿瘤免疫治疗等方面的研究。
E-mail: tzg@ustc.edu.cn



第一作者及通讯作者：毕嘉成(1985—)，男，博士，副研究员。主要从事NK细胞基础及肿瘤免疫学等方面的研究。
E-mail: jc.bi@siat.ac.cn