



纳米技术在肿瘤嵌合抗原受体 T 细胞疗法中的应用*

徐霖 胡泊 郑露露 蒋邵平 阮少波** 黄渊余**

(北京理工大学生命学院, 北京理工大学前沿交叉科学研究院, 北京 100081)

摘要 嵌合抗原受体 T (chimeric antigen receptor T, CAR-T) 细胞疗法在血液系统肿瘤的治疗中取得了显著成就。然而, 由于 CAR-T 细胞的体外制备过程复杂且成本高昂, 加之在实体肿瘤治疗中面临靶向浸润困难、免疫抑制环境以及潜在的毒性副作用等科学问题, 其治疗效果并不尽如人意。幸运的是, 纳米技术的进步为这一领域带来了新的希望。特别是纳米药物递送系统, 已成为抗肿瘤药物研发中一个极为活跃的研究方向。本文聚焦于 CAR-T 疗法与实体瘤治疗的相关背景, 系统地综述了近年来纳米技术在体外与体内 CAR-T 细胞制备和实体瘤治疗中的应用, 并对未来的发展方向进行了前瞻性的展望。

关键词 CAR-T 疗法, 纳米技术, 肿瘤治疗, 纳米药物递送系统

中图分类号 R392, R730.5

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0209

过继性细胞疗法 (adoptive cell therapy, ACT) 是一种免疫治疗方法, 是指将患者自身的免疫细胞, 如 T 细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞等从体内提取出来, 然后在体外进行特定的处理, 以增强或改变它们的抗肿瘤特性^[1]。这些处理可能包括扩增细胞数量、引入特定的受体, 如嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) 或 T 细胞受体 (T-cell receptors, TCR) 以提高细胞对肿瘤的识别和杀伤能力^[2]。经过处理的细胞随后被重新输回患者体内, 期望它们能够更有效地识别并消灭癌细胞^[3-4]。ACT 的主要目标是利用患者自身的免疫系统来对抗癌症, 这种方法在某些类型的癌症治疗中显示出了显著的疗效, 特别是一些血液恶性肿瘤 (如急性淋巴细胞白血病等) 和一些淋巴瘤 (如大 B 细胞淋巴瘤和套细胞淋巴瘤等)^[5-7]。

基于 T 细胞的 ACT 包括多种形式, 如肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL) 疗法^[8]、工程化 TCR-T 细胞疗法、CAR-T 细胞疗法以及一些新型 CAR 疗法 (如 CAR- $\gamma\delta$ T^[9]、CAR-NKT^[10] 等)^[5, 11]。这些疗法在提高患者生存率、延长生存时间以及改善生活质量方面具有潜在的优势。TIL 疗法作为 ACT 的早期形式, 尽管在某些类型的癌症 (如黑色素瘤^[12] 和肺癌^[13]) 中显示出

了潜力, 但它的局限性在于其制备过程复杂、成本高昂以及对某些肿瘤类型的不适用性, 限制了其广泛应用^[14]。通过基因工程对 TCR 进行改造, 从而制备能够特异性识别肿瘤抗原的 TCR-T 细胞^[15]。TCR-T 细胞疗法在治疗某些实体瘤中显示出了希望, 但仍面临诸如肿瘤细胞识别、细胞持久性和肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 适应性等挑战^[16]。CAR-T 细胞疗法是 ACT 的一个重要里程碑, 是通过将 CAR 基因转入 T 细胞, 使 T 细胞产生能够识别肿瘤细胞表面的特定抗原的受体^[17]。尽管 CAR-T 细胞疗法在治疗血液恶性肿瘤和淋巴瘤中取得了显著的成功^[18], 然而在实体瘤中的临床疗效较差, 这主要是由于 CAR-T 细胞的肿瘤靶向性和浸润能力差^[19]、肿瘤微环境的免疫抑制^[20]、毒性副作用^[21] 等因素。为了克服实体瘤为 CAR-T 细胞疗法带来的挑战, 多种治疗策略被开发, 如局部注射 CAR-T 细胞^[22]、CAR 原件改造^[23]、基因编辑技术^[24]、纳米技术^[25] 等。

* 国家自然科学基金 (32171394, 82302387) 资助项目。

** 通讯联系人。

黄渊余 Tel: 010-68911089, E-mail: yyhuang@bit.edu.cn

阮少波 Tel: 010-68911089, E-mail: ruanshaobo@bit.edu.cn

收稿日期: 2024-05-15, 接受日期: 2024-06-03

纳米技术是指在纳米尺度上设计、制造和应用的科学与技术。它涉及在分子或原子水平上操纵物质,以创造具有独特性能和功能的新型材料和系统^[26]。纳米技术在癌症治疗中的应用是当前医学研究的一个热点领域,其独特的性质为癌症治疗提供了多种可能性^[27-28]。纳米技术以其独特的性质和多性能的机制成为CAR-T细胞疗法中的热点应用,参与优化CAR设计、开发新的转染技术、探索组合疗法等^[29-30]。具体而言,相较于常规病毒载体,纳米药物递送系统能够进一步提高基因转染效率,从而实现CAR-T细胞的高效体外和体内制备。不仅如此,通过整合生物功能分子,纳米药物递送系统还具有提高CAR-T细胞在肿瘤中的穿透力和浸润性、调节实体瘤的免疫抑制环境,以及减少毒性副作用等功能^[31]。目前已开发多种纳米药物递送系统应用于CAR-T细胞疗法,如阳离子聚合物载体和脂质体等^[32]。

本文围绕纳米技术在CAR-T细胞疗法中的多功能应用,首先介绍了CAR-T细胞疗法的基本原理,其次,从临床CAR-T疗法的不足之处出发,综述了近几年纳米技术设计的一系列解决CAR-T潜在问题的策略,这些策略为许多传统治疗无效的患者提供了新的希望,有望在未来癌症治疗中发挥更大的作用。

1 CAR-T细胞疗法的发展历程与基本原理

CAR-T细胞疗法在过继性细胞疗法领域中是一种创新且前沿的治疗方法。它代表了个性化医疗和精准医疗的一个重要里程碑。本节主要介绍CAR-T细胞疗法的发展历程以及核心组件CAR的结构与功能。

1.1 CAR-T细胞疗法的发展历程

自1986年Matis等^[33]首次提出基因工程改造T细胞技术以来,T细胞免疫治疗经历了30余年的发展历程,本小节综述了CAR-T细胞疗法不同发展阶段的主要里程碑事件。

Kuwana等^[34]于1987年报道了通过将TCR恒定区与细菌抗原识别抗体的可变区融合,第一个证明了抗体类型抗原特异性与T细胞信号转导相结合的原理。自那以后,单链可变片段(single-chain variable fragments, scFv)通过柔性接头与单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)的可变重(variable heavy, V_H)链和可变轻(variable light, V_L)链组成的结构被常用作为T细胞外抗原传感结

构域^[35]。1989年,Eshhar等^[36]首次提出CAR的概念,他们将抗体的抗原结合区scFv与CD3 ζ 的胞内部分融合形成CAR,它赋予T细胞识别半抗原的能力,这使得T细胞实现了抗原特异性的、非主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制的活化及其效应的增强^[37]。20世纪90年代,随着转基因技术的出现,人们可以通过自由编码基因并对编码的基因进行转染,从而改变T淋巴细胞具有识别抗原的特异性^[38]。由此,过继性T细胞疗法开启了新的篇章。1993年,肿瘤靶向CAR的第一份报告表明,识别抗原如人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)的scFv与CD3 ζ 信号结构域融合的CAR可以引发肿瘤特异性细胞毒性^[39],但表达这些“第一代”CAR的T细胞通常不能引发足够有效的抗肿瘤作用。尽管如此,这些嵌合抗原细胞疗法为癌症的免疫治疗带来了希望。

2000年代初,CAR-T疗法的研究开始加速,科学家们开始探索不同的CAR设计,并在动物模型中测试其抗肿瘤效果^[40-41]。在2011年,美国宾夕法尼亚大学的Carl June教授领导的团队^[42]将特异性识别CD19的CAR-T细胞用于B细胞来源的慢性淋巴细胞白血病的治疗,显示了不错的疗效。随后在难治性慢性淋巴细胞白血病展开临床实验,也取得了良好的疗效^[43]。2012年,Emily,一位患有B细胞淋巴瘤的儿童,在接受了Carl June博士团队开发的针对CD19的CAR-T细胞疗法后^[43],成为了首位通过CAR-T细胞治疗成功治愈的白血病儿童,实现了医学上的完全康复。这一历史性的突破标志着CAR-T免疫细胞治疗进入了快速发展的新纪元。

目前,CAR-T细胞免疫疗法在治疗血液系统恶性肿瘤方面取得了巨大成功^[44]。2017年,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准了首个CAR-T细胞疗法产品Kymriah上市^[45],开启了CAR-T细胞的商业化时代发展(表1)。同年,第二款CAR-T细胞治疗产品Yescarta上市^[46]。FDA已批准6种CAR-T细胞疗法治疗血液系统癌症。其中,6种CAR-T细胞疗法产品中有4种是抗CD19 CAR,两种最新的CAR-T细胞疗法产物靶向B细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA)^[5]。复星凯特公司在2017年初从美国吉利德公司引进了Yescarta技术,并在中国进行了技术转移,随后获得了在中国本地

化生产这款靶向人CD19自体CAR-T细胞治疗产品的授权。该治疗产品于2021年6月在中国正式获批上市^[47]。此后, 中国国家药品监督管理局陆续批准了瑞基奥伦塞^[48]、伊基奥仑赛^[49]、纳基奥伦塞^[50]和泽沃基奥仑赛^[51]等CAR-T细胞治疗产品, 用于治疗急性B淋巴细胞白血病、大B细胞淋巴瘤

以及多发性骨髓瘤等血液肿瘤疾病。

至今, 众多研究机构和生物技术企业正积极投身于CAR-T细胞疗法针对实体肿瘤的研究之中^[52]。鉴于CAR-T细胞疗法在治疗血液肿瘤方面取得的显著成效, 我们有理由期待其在实体肿瘤治疗领域实现更多重大进展。

Table 1 Marketed agents for CAR-T cell therapy

表1 CAR-T细胞疗法的上市药物

序号	药物名称	靶点	上市时间	公司	上市国家	适应症	客观缓解率	完全缓解率	参考文献
1	Kymriah (Tisagenlecleucel)	CD19	2017.02	诺华	美国	B-ALL	81%	60%	[53]
						LBCL	52%	40%	[54]
						FL	86%	69%	[55]
2	Yescarta (Axicabtagene Ciloleucel)	CD19	2017.10	吉利德	美国	LBCL (三线)	82%	58%	[56]
						FL	92%	74%	[57]
						LBCL (二线)	83%	65%	[58]
3	Tecartus (Brexucabagene)	CD19	2020.07	吉利德	美国	MCL	93%	67%	[59]
						B-ALL	71%	56%	[60]
4	Breyanzi (Lisocabtagene Maraleucel)	CD19	2021.02	百时鸟	美国	LBCL (三线)	73%	53%	[61]
						LBCL (二线)	86%	66%	[62]
5	Abecma (Idecabtagene Vicleucel)	BCMA	2021.03	百时鸟/蓝鸟	美国	MM	73%	33%	[63]
6	Carvykti (Ciltacabtagene Autoleucel)	BCMA	2022.02	南京传奇	美国	MM	97%	67%	[64]
7	奕凯达 (阿基伦赛)	CD19	2021.06	复星凯特	中国	LBCL	82%	58%	[65]
8	倍诺达 (瑞基奥伦塞)	CD19	2021.09	药明巨诺	中国	LBCL	78%	53%	[66]
9	CT103A (伊基奥仑赛)	BCMA	2023.06	驯鹿生物/信达生物	中国	MM	96%	74%	[49,67]
10	CNCT19 (纳基奥伦塞)	CD19	2023.11	合源生物	中国	B-ALL	82%	64%	[50]
11	CT053 (泽沃基奥仑赛)	BCMA	2024.02	科济药业	中国	MM	100%	79%	[51]

B-ALL: 急性B淋巴细胞白血病; LBCL: 大B细胞淋巴瘤; FL: 滤泡性淋巴瘤; MCL: 肥大细胞白血病; MM: 多发性骨髓瘤。

1.2 CAR的结构与功能

CAR是CAR-T细胞疗法的核心部件, 它不仅提供了T细胞识别肿瘤的能力, 还通过其胞内信号结构域激活了T细胞, 使其能够有效地攻击和消除癌细胞^[68]。CAR的基本结构包括一个肿瘤相关抗原 (tumor-associated antigen, TAA) 胞外结合域, 一个胞外铰链区, 一个跨膜区, 一个胞内共刺激结构域和一个由免疫受体酪氨酸活化基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 组成的胞质结构域 (图1)^[36, 69]。

TAA结合域是CAR的核心^[70], 通常来源于单克隆抗体抗原结合区域scFv段的V_H和V_L结构域, 这两个结构域之间的连接体通常由重复的甘氨酸和丝氨酸残基组成, 但其他新型连接体亦相继被开发, 如Whitlow等^[71-72]报道的新型连接体

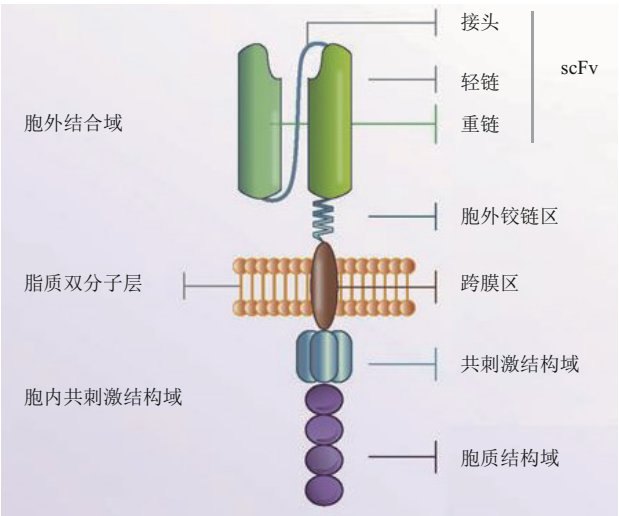


Fig. 1 The basic structure of the CAR^[36]

图1 CAR的基本结构^[36]

(GSTSGSGKPGSGEGSTKG)。TAA 通常是在肿瘤细胞上过度表达而在正常细胞上表达较少的蛋白质，TAA 结构域可用于识别并结合到肿瘤细胞表面的特定抗原^[73]。胞外铰链区将细胞外 TAA 结构域连接到跨膜区。铰链区的结构必须在保证具有稳定性的同时具有结合同源抗原的灵活性。在早期的 CAR 设计中，铰链区通常来源于天然免疫受体，如 CD28 或 CD3 ζ 链的一部分^[74-75]。随着 CAR-T 疗法的发展，研究人员开始尝试不同的铰链区设计，以优化 CAR 的性能。例如，一些研究中使用了更加柔韧的铰链区，以提高 CAR 的抗原结合能力和信号传导效率^[76]。另外，也有研究尝试具有 CD8 α 的铰链来调节 CAR 的活性和减少副作用^[77]。跨膜区通常由一串疏水氨基酸残基组成，这些残基在结构上形成跨膜螺旋，使得 CAR 能够稳定锚定在 T 细胞的表面^[76]。跨膜区的长度和序列可以影响 CAR 的稳定性和功能^[68, 78]。在 CAR 设计中，跨膜区通常来源于天然蛋白，如 CD3 ζ 链、CD28 或其他免疫受体^[19]。共刺激结构域的存在不仅可以增强 T 细胞的激活信号，而且可以提高 T 细胞的持久性和杀伤能力。共刺激结构域是来自 CD28、4-1BB、OX40 和 CD27 等共刺激分子的片段^[19, 79]。在 CAR-T 疗法中，不同的共刺激结构域会产生不同的效果，因此研究人员会根据具体的治疗目标和肿瘤类型来优化 CAR 的设计，例如，CD28 共刺激结构域通常提供强效的激活信号，而 4-1BB 则可能更适合于长期维持 T 细胞的活性^[80]。通过精心设计的共刺激结构域，CAR-T 疗法能够更有效地靶向和消除肿瘤细胞。胞质结构域是位于 CAR 最远端的细胞内部分，通常来源于 CD3 ζ 链^[81-82]。CD3 ζ 通常是一个含有 3 个 ITAM 的信号区，一旦单链抗体识别并结合 TAA，ITAM 的磷酸化就通过酪氨酸激酶相关蛋白 ZAP70 启动信号转导，然后发出信号释放 T 细胞反应，如颗粒酶和穿孔素等^[78, 83]。CD3 ζ 胞质结构域对于 CAR-T 细胞的功能至关重要，因为它们负责传递激活信号，从而引发 T 细胞的增殖、分化和杀伤肿瘤细胞的效应^[76]。

1.3 CAR 的迭代思路

自 Kuwana 等^[34]首次提出将特异性抗原修饰到 T 细胞上的概念，T 细胞抗原修饰受到了广泛的关注。然而，随着转基因技术的发展，使得这种想法具有了可操作性。Eshhar 等^[36]总结了当时 T 细胞免疫应答脱靶的原因，提出在 T 细胞装上一个能够识别肿瘤细胞特异性抗原的科学设想。他们首先

找到一个合适的 TAA，在 T 细胞修饰上对应的 scFv 与 CD3 ζ 的融合蛋白，这就是 CAR-T 细胞疗法的雏形后来也被称为第一代 CAR^[84]。然而，因为缺乏共刺激信号，T 细胞往往会未老先衰，同时由于无共刺激分子，不能转导增殖信号和诱导细胞因子产生，所以 T 细胞无法增殖而导致杀伤肿瘤效果不佳（图 2）^[85-86]。

尽管第一代 CAR-T 疗法并没有收获到想要的效果，但临床试验证明在癌症初期它确实表现出了一定的作用。直到 21 世纪初期，科学家们发现通过提供额外的共刺激信号，可以提高 T 细胞的活性和持久性，从而提高治疗效果。第二代 CAR-T 开始出现，增加了共刺激信号域，如 CD28、4-1BB 等，以增强 T 细胞的激活和增殖^[70]。本代 CAR-T 细胞的活化能力远远强于第一代，同时也在临床治疗中展现了令人惊喜的治疗效果，使得一部分常规疗法已然无效的白血病患者实现了完全康复的奇迹^[43]。第二代 CAR-T 细胞疗法在设计上实现了关键性的创新，它不仅确保了通过抗原-抗体相互作用实现对肿瘤细胞的高特异性识别，同时还具备了在识别到肿瘤细胞后能够高效激活 T 细胞的能力（图 2）^[87]。

第二代 CAR-T 细胞疗法之所以取得成功，关键在于其设计中加入了能够激活 T 细胞的共刺激分子。基于这一认识，研究者们提出了一种假设：通过组合不同的共刺激信号，可以更全面地激活 T 细胞，从而提升其对肿瘤的攻击力度。在这一理念的推动下，第三代 CAR-T 细胞疗法应运而生，它采用慢病毒作为转染载体，能够将更大型的基因片段有效整合进入 T 细胞，实现至少两种共刺激信号分子（如 CD28、4-1BB 或 OX40）的共同表达（图 2）。甚至在一项新研究中，Schneider 等^[88]用慢病毒载体构建了三特异性 duoCAR-T 细胞，通过将表达靶向 CD19 和 CD20 的串联 CAR 使用 2A 自切割肽（P2A）与靶向 CD22 抗原的 monoCAR 操作性连接在一起，从而实现三特异性的共刺激信号。实验数据表明，单独的 monoCAR-T 细胞在抑制肿瘤进展方面效果有限，而三特异性 duoCAR-T 细胞则展现出了快速且有效的抗肿瘤活性。尽管如此，关于第三代 CAR-T 细胞疗法的临床效果，当时的研究结果并不一致。一些实验显示其疗效优于第二代^[89]，而其他研究则未观察到显著差异，甚至有研究指出疗效不增反降^[90]。这表明，共刺激分子的数量并不总是与 CAR-T 细胞的激活效果成正比，

CAR-T 细胞疗法的优化和疗效提升仍需进一步的深入研究和临床验证。

第二代 CAR-T 细胞疗法在血液肿瘤治疗中取得了显著成效,但在实体瘤治疗中却面临挑战。研究发现,肿瘤微环境内的某些因素可能会抑制 CAR-T 细胞的功能。针对这一难题,第四代 CAR-T 细胞疗法应运而生,其设计不仅包含了共刺激信号域,还特别增加了能够分泌特定细胞因子或趋化因子受体的模块(图2)。这些细胞因子的释放旨在中和肿瘤微环境中的免疫抑制作用或促进 CAR-T 细胞穿透并深入肿瘤组织,从而增强 CAR-T 细胞的抗肿瘤活性^[91-92]。

关于第五代 CAR-T 细胞疗法,目前有两种普遍认可的研究方向。一方面,一些学者致力于在第二代 CAR-T 细胞疗法的基础上进行创新,通过增强细胞内结构域中的细胞因子受体(例如 IL-2R β)和转录因子(如 STAT3、STAT5),以提升 CAR-T 细胞的自我维持、增殖能力和激活效率^[17]。这种改进的设计理念在于利用细胞因子受体和转录因子的信号传导特性,以增强 T 细胞的自我维持和功能

性扩增,从而在肿瘤免疫治疗中发挥更持久和强大的作用(图2)。另一方面,第五代 CAR-T 细胞疗法的另一种研究方向是开发通用型 CAR-T 细胞,这种细胞能够识别更广泛的抗原,实现对肿瘤的广谱抗性。通用型 CAR-T 的设计允许它们克服个体间的差异,使得规模化生产和治疗成为可能。目前,研究者们正在探索使用通用型 CAR 使用生物素结合免疫受体(biotin binds to the immune receptor, BBIR) CAR 或 SUPRA (split, universal, programmable) CAR 等“第三方”系统,这些系统通过分离胞外抗原靶向结构域和 T 细胞信号单位,赋予 CAR-T 细胞识别多种抗原的能力^[93-94]。此外,通用型 CAR-T 细胞疗法还结合了基因编辑技术(如 ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas9),以敲除异体 T 细胞的 TCR、MHC 和相关信号通路基因,减少病人排斥反应的风险^[95]。尽管通用型 CAR-T 细胞疗法具有巨大的潜力,但它在技术上仍面临挑战,对安全性的要求也更高,因此,国内通用型 CAR-T 的研究尚在萌芽期。

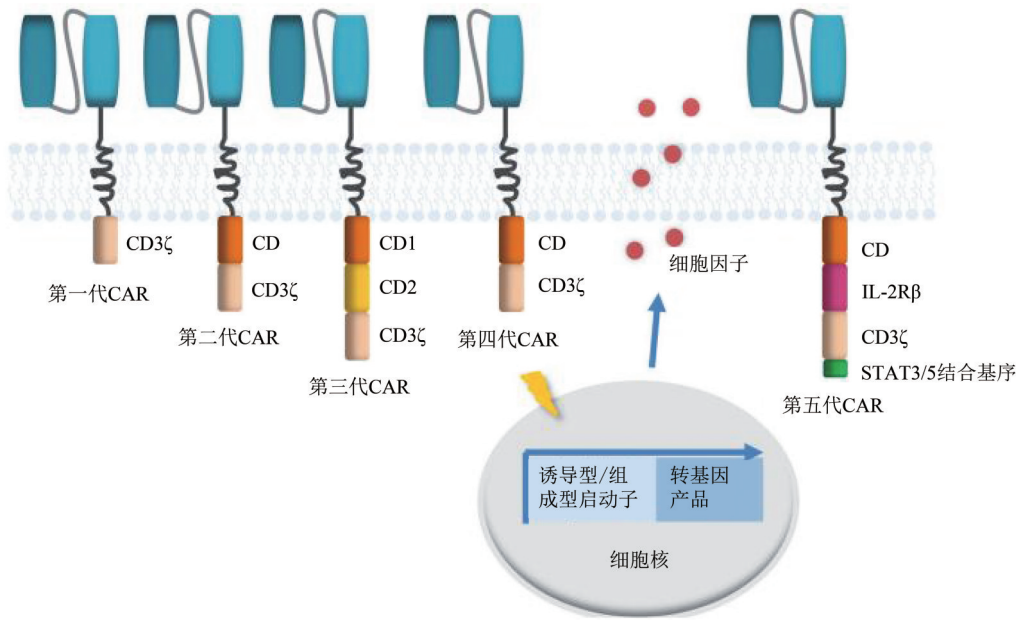


Fig. 2 The evolution of CAR^[17]
图2 CAR的迭代思路^[17]

2 纳米技术与CAR-T结合的研究进展

作为 ACT 疗法的典型代表, CAR-T 细胞疗法在临床治疗多种血液肿瘤方面已经证明了其显著的

疗效,并且在部分实体瘤的治疗中也取得了令人鼓舞的成果^[96]。本部分的目标是阐述 CAR-T 细胞疗法的治疗流程,并概述纳米技术在增强 CAR-T 细胞疗法效果方面的应用类型及前沿研究进展。

2.1 纳米技术在CAR-T治疗中的应用类型

CAR-T细胞疗法的治疗流程可概括为几个核心阶段：首先，从患者体内分离出T细胞；然后，通过基因工程技术进行改造，使其能够表达靶向癌细胞的CAR；并对这些T细胞进行体外扩增；最终，将改造后的T细胞重新回输患者体内，以便它们能够精确识别并攻击肿瘤细胞（图3）^[21]。

在这一治疗过程中，存在两个主要的挑战需要解决。第一，CAR的制备过程复杂，常用的病毒载体基因转染效率不高等问题，导致CAR-T疗法的成本高昂，有时被形象地称为“天价药”^[97]。第二，由于患者个体差异以及肿瘤类型的多样性，CAR-T细胞在体内的表现也存在差异^[98]。具体来说，CAR-T细胞通过静脉注射进入患者体内后，需要在全身循环中寻找肿瘤细胞，这涉及到克服血管和基质屏障的挑战^[99]。此外，CAR-T细胞还需

要突破实体瘤的免疫抑制微环境^[100]，同时克服可能的毒性副作用^[101]。为了提升CAR-T细胞疗法的可行性和效果，研究人员正在积极探索降低CAR制备成本的方法，并针对个体化治疗策略进行优化，以期实现更精准的肿瘤识别和更少的副作用。

纳米技术及其衍生材料在医学领域的发展，为解决上述现有的挑战带来了创新性的策略。通过药物载体的设计和生物功能分子的整合，纳米技术不仅可以应用于CAR-T细胞的制备，降低成本，而且在提高其在肿瘤中的穿透力和浸润性、调节实体瘤的免疫抑制环境，以及减少毒性副作用等方面发挥着关键作用^[31-32]。这些优势使得CAR-T细胞疗法能够克服自身的“盲点”，实现更广泛的临床应用。接下来将汇总纳米技术在CAR-T细胞疗法在制备和肿瘤治疗应用中的最近研究进展，并探讨纳米技术在CAR-T疗法中的发展前景。

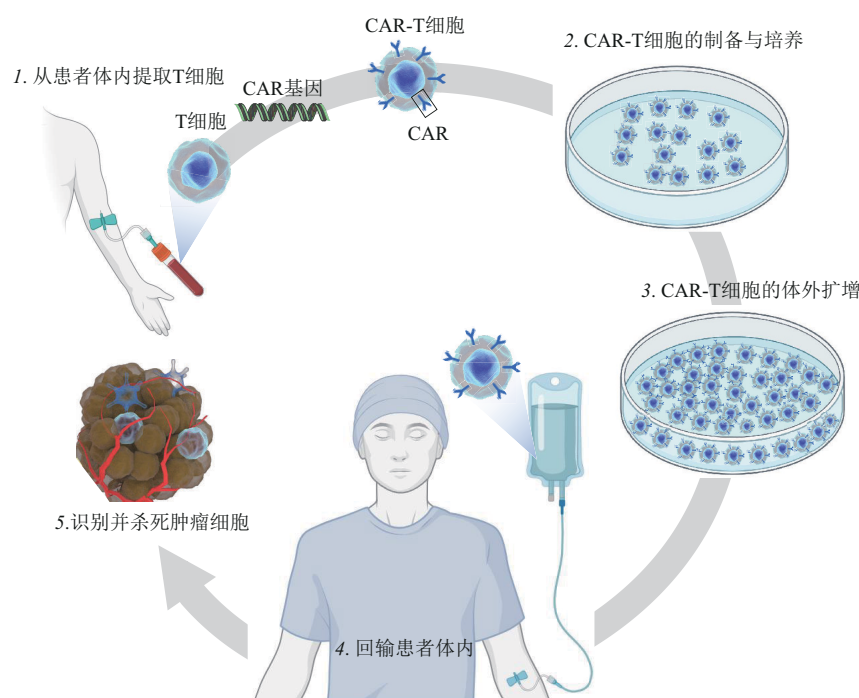


Fig. 3 Treatment steps for CAR-T cell therapy

图3 CAR-T细胞疗法的治疗流程

2.2 纳米技术在CAR-T细胞制备中的应用

CAR-T细胞的制备是CAR-T疗法成功的关键步骤之一。临床使用的CAR-T细胞是通过以上介绍到的复杂的体外方法产生的。简单来说，CAR-T细胞的制备是一个技术要求极高的过程，涉及多个步骤，每一步都需要精确的操作和严格的条件控制，以确保细胞的质量和活性^[32]。由于生产过程

中所需的高质量材料、专用设备以及高度专业化的技术人员，导致了CAR-T细胞疗法的制备成本非常高。高昂的成本导致了治疗费用的增加，这可能限制CAR-T疗法的普及和可及性。本小节综述了纳米技术在CAR-T细胞制备中的应用，旨在提出一个可能的优化方案，实现CAR-T细胞的低成本精准制备。

2.2.1 纳米技术在CAR-T细胞体外制备中的应用

CAR-T制备过程包括3个阶段: 细胞分离、转染和扩增。第一阶段和最后阶段目前具有简单的、可商购的自动化技术, 但转染阶段却相对滞后^[102]。转染阶段涉及将CAR的基因序列有效地导入到T细胞中, 使T细胞获得识别并攻击特定肿瘤细胞的能力。CAR-T细胞制备中的转染阶段是关键步骤, 因为它直接关系到CAR-T疗法成功与否。病毒载体^[103]、电穿孔(electroporation, EP)技术^[104]和转座子技术^[105]是目前最常用的CAR基因转染工具。病毒载体转染存在潜在的安全性风险, 同时, 病毒载体的生产成本高, 收率低, 且活性容易丧失。纳米技术相对于病毒载体递送技术具有一系列优势, 这些优势在提高药物递送效率、降低副作用、降低成本等方面发挥着重要作用。从这个角度来看, 用于CAR-T细胞转染的纳米技术的进展亟待开发以应对CAR-T制备日益增长的兴趣。目前依托纳米技术的纳米颗粒递送系统作为转染策略或辅助转染策略已在一些研究中正在被开发^[106]。

与病毒转染相比, 利用纳米颗粒转染可以提高基因的转染效率^[107]、减轻基因的脱靶缺陷^[108]、克服基因片段大小的限制^[109], 同时纳米颗粒载体的生产过程相对简单, 易于标准化和规模化生产, 有助于降低成本^[110-111]。纳米颗粒递送系统可以实现将特定基因靶向递送到人类T细胞以增强免疫激活已得到验证^[112]。如Olden等^[113]合成并评估了一组阳离子聚合物pHEMA-g-pDMAEMA, 用于将基因递送到培养的和原代人T细胞。研究表明, 聚合物pHEMA-g-pDMAEMA亚群可以在Jurkat(人T细胞系)中介导高达50%的转染效率, 同时保持大于90%存活率的低毒性。同时证明了用信使RNA和质粒DNA转染CD4⁺和CD8⁺原代人T细胞的效率分别高达25%和18%, 并且具有相似的高存活率。不仅如此, 他们还优化了原代人T细胞转染条件, 包括活化时间、细胞密度、DNA剂量等。有研究报道, 与目前在临床试验中使用的EP作为mRNA转导方法用于生成CAR-T细胞的方法相比, 脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNPs)递送的CAR-T细胞在体外显示出显著延长的疗效以及具有更低的细胞毒性和更慢的CAR-T细胞增殖^[114]。此外, LNPs转染的CAR-T细胞的CAR表达和体外功能与EP转导的CAR-T细胞相当, 但成本更低。这些结果表明, LNPs优于EP, 并表明了mRNA-

LNP递送作为临床研究的下一代瞬时方法用于体外CAR-T细胞修饰的巨大潜力。Stephan等^[115]的研究也同样验证了纳米颗粒高效转染人T细胞的能力。这些事实证明了利用纳米颗粒作为基因载体来代替病毒载体生成CAR的可能性。

纳米技术还可用于CAR-T细胞体外制备的扩增阶段, Cheung等^[116]描述了一个模拟天然抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APC)的系统, 由介孔二氧化硅微棒支撑的流体脂质双分子层组成, 该系统相对于广泛使用的T细胞扩增系统(例如Dynabeads和moDC)实现更有效的多克隆和抗原特异性细胞扩增。目前更有纳米级的人工抗原呈递细胞(artificial antigen presenting cells, aAPC)被开发用于体外活化T细胞^[117-118], 甚至能够导致小鼠和人类肿瘤特异性T细胞在1周内扩增超过1 000倍^[119]。随着研究的深入和技术的成熟, 纳米aAPC也有望成为CAR-T细胞治疗的一个重要辅助工具^[120]。

2.2.2 纳米技术在CAR-T细胞在体制备中的应用

CAR-T细胞体外制备成本极高且步骤繁琐, 能否在体内直接构建CAR-T细胞的科学问题受到许多学者的关注。依托纳米技术的纳米颗粒递送系统除了能在CAR-T细胞体外制备中有转染优化与降低成本等优势外, 其本意旨在安全高效的体内递送系统。事实上, 纳米颗粒递送系统已被开发应用于多种疾病治疗中, 如癌症、炎症、神经退行性疾病等^[121]。在癌症患者中的治疗效果尤为显著, 早在1995年, 美国FDA就批准了第一款脂质体产品Doxil上市, 用于晚期卵巢癌和多发性骨髓瘤的治疗^[122]。纳米颗粒作为一种多功能的递送系统, 能够递送多种类型的生物分子和治疗剂, 包括但不限于核酸药物(如mRNA、siRNA和质粒)、蛋白质药物(如抗体、多肽)和小分子药物(如抗癌药物、抗炎药物)等^[123]。同时纳米颗粒的大小和表面特性可以被合理设计, 从而做到特定细胞靶向或定点积聚等。这些优势使得纳米颗粒递送系统在CAR-T细胞在体制备中得到广泛的研究。

早在2017年, 全球CAR-T药物还未上市前, 就有具有临床前研究报道了在体生成CAR-T细胞的研究。Smith等^[124]成功地用表面修饰anti-CD3抗体的聚合物纳米颗粒代替慢病毒在体内产生CAR-T细胞, 可在体内诱导CAR表达, 实现原位在体制备CAR-T细胞(图4)。研究结果显示, 体内T细胞转变为CAR-T细胞仅需要24~48 h, 并且

另一项引起广泛热议的研究是,一篇联合刊登在《科学》(Science)杂志的文章提出了一种创新的治疗策略,即通过注射包含mRNA的LNP来重编程T细胞,使其能够识别并攻击特定的疾病相关细胞^[125]。尽管在这项研究中重编程后的T细胞用于抵抗心肌细胞纤维化,但在体生成的CAR-T细胞的优良机制决定了其有望成为多种疾病的治疗平台的前景也受到关注(图5)。就在最近,Zhao等^[126]设计了模拟病毒的融合纳米囊泡(FuNVs)

通过膜融合介导的CAR蛋白递送在体产生CAR-T细胞。研究结果显示,FuNVs可以与T细胞膜高效融合,从而将负载的 α CD19-CAR蛋白递送到T细胞上,产生 α CD19-CAR-T细胞。这些 α CD19-CAR-T细胞单独或与抗OX40抗体联合治疗B细胞淋巴瘤,而不会诱导细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)。此策略为体内工程T细胞转化为CAR-T细胞提供了一种新方法,并可进一步用于递送其他治疗性膜蛋白。

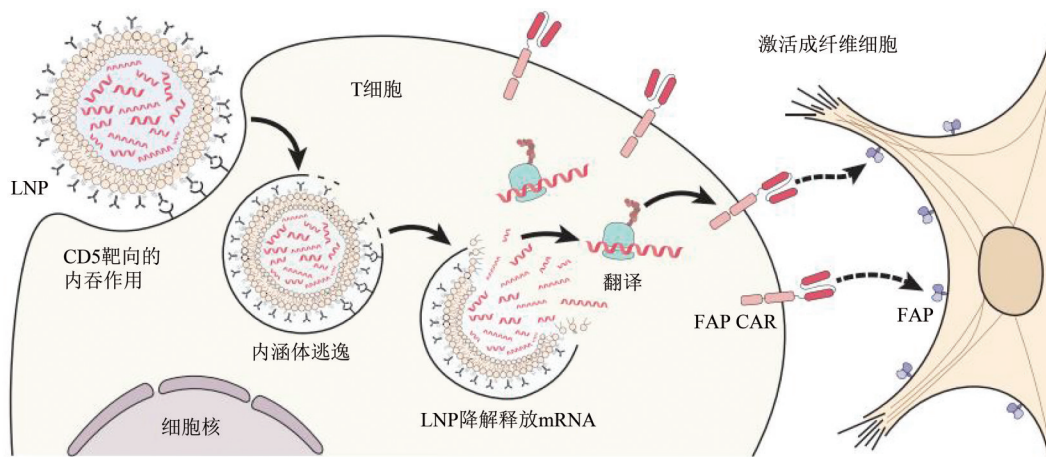


Fig. 5 Schematic outline of the molecular process to create transient FAP CAR-T cells using CD5-targeted LNPs^[125]

图5 利用CD5靶向LNPs构建瞬时FAP CAR-T细胞的分子过程示意图^[125]

综上所述,在体CAR-T制备方法有潜力降低CAR-T细胞疗法的成本并且可能减少副作用。传统的体外CAR-T细胞疗法可能导致CRS和神经毒性等副作用。而在体内直接激活和扩增CAR-T细胞的方法可能减少这些副作用的发生,因为这种方法可以避免在体外对T细胞进行长时间的激活和扩增,这些过程可能导致T细胞的功能耗竭和分化。因此在体生成CAR-T细胞的策略有望成为体外制备CAR-T细胞的替代方法。

2.3 纳米技术在CAR-T细胞治疗实体瘤中的应用

CAR-T细胞疗法在血液恶性肿瘤的治疗领域已经取得了令人瞩目的成就。然而,在治疗实体瘤方面,CAR-T细胞疗法无法获得很好的疗效,主要归因于实体瘤的复杂结构导致的CAR-T细胞的肿瘤浸润性差和免疫抑制性的肿瘤微环境。在此,我们总结了CAR-T细胞疗法面临的一系列难题与挑战(图6)^[127-128],主要可归纳为以下几个方面:

首先,肿瘤的靶向性和CAR-T细胞的浸润能力不足。实体瘤TME通常由密集的小区外基质

(extracellular matrix, ECM)构成,形成了一道物理屏障,这严重限制了CAR-T细胞对肿瘤的靶向和渗透能力。此外,肿瘤区域内的血管结构异常,常常导致组织缺氧,这种缺氧环境影响了与T细胞浸润相关的分子表达,进一步阻碍了CAR-T细胞的渗透^[129]。其次,TME中的免疫抑制因素^[130]。在TME中,存在大量的免疫抑制因子,如白介素-10(interleukin-10, IL-10)、IL-4、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、细胞程序性死亡受体配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4)等,以及包括调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)、肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)、髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)在内的抑制性细胞。这些因素不仅削弱了CAR-T细胞的持久性,还严重妨碍了其发挥有效的抗肿瘤作用^[100]。最后,CAR-T细胞疗法会产生严重的细胞

毒性。CAR-T细胞的激活可能引起CRS^[131-132]，同时攻击表达CAR-T目标抗原的正常细胞，引起“脱靶”毒性，进而引起系统性炎症反应和潜在的严重副作用^[101]。

为了克服上述障碍，科研人员正在积极寻求多种解决策略。其中，基于纳米技术的纳米颗粒递送系统展现出巨大潜力，它可以通过多种机制来应对

CAR-T细胞治疗实体瘤时所遇到的挑战^[133]。这些机制包括增强肿瘤的靶向性和CAR-T细胞的渗透能力、调节肿瘤的抑制微环境以及克服CAR-T细胞疗法的副作用等。这些策略的实施，有望显著提升CAR-T细胞疗法在实体瘤治疗中的疗效，从而为患者带来更为显著的治疗效果。

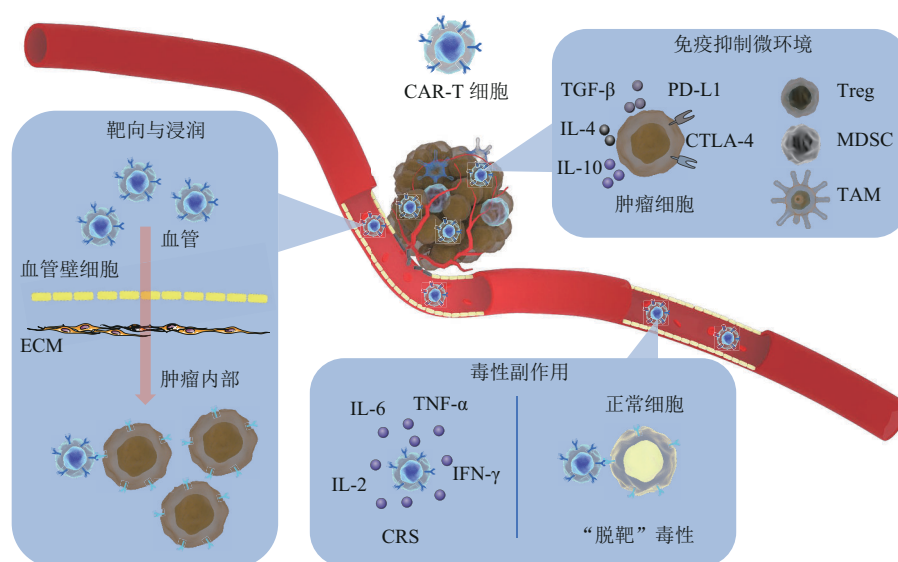


Fig. 6 The challenge of CAR-T cell therapy

图6 CAR-T细胞疗法的挑战

2.3.1 提高CAR-T细胞肿瘤靶向性和浸润能力

静脉注射作为CAR-T细胞疗法在临床试验中的主要给药途径，面临着将CAR-T细胞有效递送至实体肿瘤组织的挑战。CAR-T细胞在全身循环后需穿过血管壁和ECM，但研究表明，仅有少量细胞能成功到达并渗透实体瘤，导致治疗效果受限^[134]。为提升CAR-T细胞的肿瘤靶向性和浸润能力，研究者探索了多种策略^[135]，包括肿瘤内注射^[136]和局部脑室内递送^[137]，以增强肿瘤部位的细胞浓度和活性。尽管这些方法在特定情况下有效，但并不适用于所有类型的实体瘤。因此，如何克服CAR-T细胞肿瘤内的低浸润率和提高肿瘤靶向性是目前亟待解决的科学难题^[138]。

基于此，Nie等^[139]开发了一种pH敏感的磁性纳米簇，通过苯甲酰-亚胺键连接PD-1抗体（aP），旨在增强过继性T细胞治疗实体肿瘤的效果。实验发现，纳米簇-T细胞在肿瘤部位的富集能力显著，荧光强度在12 h提升了11.4倍，证实了其在肿瘤靶

向和浸润方面的潜力。此外，有研究表明，IL-12与CAR-T细胞的肿瘤组织浸润能力相关^[140]。Liu等^[141]用非天然叠氮糖纳米颗粒对T细胞进行代谢标记，然后采用点击化学技术，将IL-12共轭至T细胞表面，实现了T细胞在实体肿瘤中的深入浸润，并显著抑制了肿瘤生长，延长了生存期。类似地，Luo等^[142]则开发了IL-12纳米刺激物工程化CAR-T细胞（INS-CAR-T）生物杂交体，通过生物正交化学技术将负载IL-12的人血清白蛋白纳米颗粒有效偶联到CAR-T细胞上（图7）。实验结果显示，INS-CAR-T细胞在肿瘤深部的CD8⁺ CAR-T细胞数量是对照组的10倍，展现了卓越的T细胞浸润能力。

纳米技术以其独特的物理和化学性质，为CAR-T细胞疗法在克服实体瘤治疗中的多重障碍提供了创新途径。通过精确设计纳米载体，可以显著提升CAR-T细胞的靶向性和浸润能力，从而有效增强其在实体瘤微环境中的疗效。

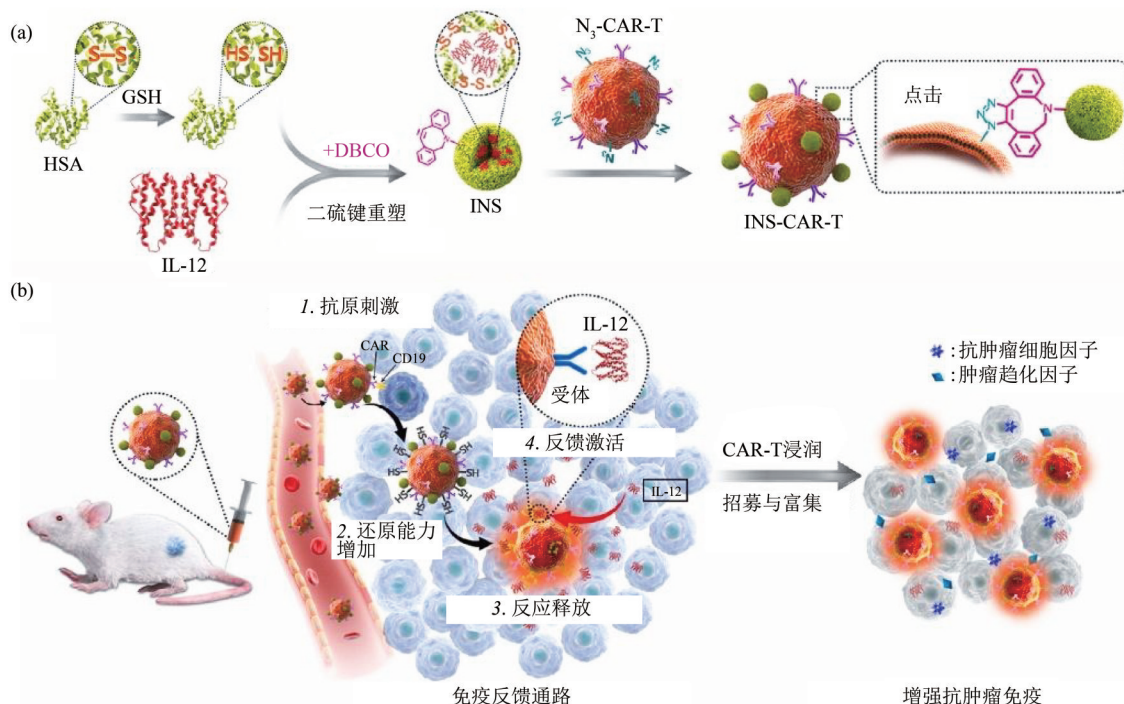


Fig. 7 Schematic illustration of IL-12 nanostimulant-engineered CAR-T cells biohybrids with immunofeedback to enhance immunotherapy in solid tumors ^[142]

图7 IL-12纳米刺激剂工程CAR-T细胞生物杂交免疫反馈增强实体瘤免疫治疗的示意图 ^[142]

(a) 负载兴奋剂IL-12 (INS) 的氧化还原反应纳米颗粒通过人血清白蛋白 (HSA) 分子间二硫键重塑和二苯并环辛基 (DBCO) 标记合成。利用糖代谢将叠氮化物标记的CAR-T细胞与INS结合, 通过DBCO和叠氮化物之间的点击化学反应制造功能化的INS-CAR-T生物杂交体。(b) 在肿瘤中靶向积累后, 肿瘤抗原刺激INS-CAR-T生物杂交体在细胞表面产生还原性巯醇 (SH)。随后, 氧化还原活性富集的CAR-T细胞加速了INS中IL-12的释放。释放IL-12有效促进外源CAR-T细胞的增殖、活化和募集, 增强实体瘤的抗肿瘤反应。

2.3.2 调节肿瘤微环境的免疫抑制作用

在实体肿瘤治疗中, 肿瘤微环境调节扮演着至关重要的角色, 并逐渐成为提升CAR-T细胞免疫疗法效果的关键突破口^[143]。然而, 当CAR-T细胞进入肿瘤的免疫抑制微环境时, 它们的激活和效能常常受到限制。目前, 研究人员已经探索了纳米技术参与的多种治疗策略用于调节免疫抑制微环境, 这些策略包括化疗^[144]、放疗^[145]、免疫检查点阻断^[145-146]、光热疗法^[147]以及超声治疗^[148]等, 它们通过改善免疫抑制性TME, 从而增强免疫治疗的效果。近年来, 纳米技术在辅助CAR-T细胞疗法中调节肿瘤微环境的潜力受到了广泛关注。以下是一些展现这一趋势的相关研究案例:

Chen等^[149]近期的研究揭示了一种创新的纳米工程策略, 该策略通过结合CAR-T细胞与纳米光敏剂吡啶菁绿纳米颗粒 (INPs) 来增强实体肿瘤的免疫治疗。通过生物正交偶联技术, INPs与CAR-T细胞结合形成CT-INPs生物杂交体。在激光

照射下, CT-INPs表明轻度光热干预破坏细胞外基质, 扩张血管, 松散致密组织, 刺激趋化因子分泌, 促进肿瘤微环境重塑, 但不抑制CAR-T细胞活性。研究表明, 在激光照射后, CT-INPs+激光组相较于单独使用CAR-T细胞、INPs或磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 的对照组, 其抗肿瘤细胞因子的表达水平 (包括TNF- α 、IFN- γ 和IL-2) 有了显著提升。这些发现证实了CT-INPs在通过轻度光热干预和TME重塑来促进CAR-T细胞抗肿瘤效果方面的潜力。因此, 这种纳米工程的CAR-T生物杂交体为实体肿瘤免疫抑制微环境的调节提供了一种新的、有效的治疗途径。

免疫检查点阻断疗法是一种前沿的肿瘤免疫治疗策略, 旨在逆转TME中的免疫抑制信号, 从而增强免疫系统对肿瘤的攻击力度。PD-1/PD-L1和CTLA-4作为关键的免疫检查点分子, 其相应的阻断剂已在临床治疗中对特定癌症展现出显著疗效,

在CAR-T细胞疗法中作为CAR同样展现出应用潜力^[150-154]，但是多结构域的CAR-T细胞制备难度限制了其发展。依托纳米技术的纳米递送系统在免疫检查点分子阻断剂的传递中扮演着日益重要的角色，纳米递送系统帮助CAR-T细胞递送免疫检查点阻断剂可能会有出人意料的效果。基于此，Nie等^[139]研究开发的磁性纳米簇，不仅用于递送阻断剂，还能在TME的酸性条件下触发苯甲酰-亚胺键的水解，从而释放aP以阻断PD-1通路。这种智能响应型的纳米递送系统，能够在肿瘤微环境中精准释放药物，有效提升T细胞对肿瘤细胞的杀伤作用，并降低免疫抑制效应。

依托纳米技术的靶向纳米载体传递免疫调节剂的组合可以去除肿瘤微环境抑制性细胞群，并激活抗肿瘤效应细胞。Zhang等^[155]通过周期性输注修饰有肿瘤靶向肽iRGD的LNPs，可以实现对实体瘤微环境的精准调控。这些LNPs搭载的PI3K抑制剂和 α -GalCer激动剂协同影响实体瘤的肿瘤微环境，使其从抑制性变为刺激性。这种协同疗法为肿瘤特异性的CAR-T细胞提供了一个约两周的治疗窗口，使得这些经过改造的免疫细胞能够更有效地归巢至肿瘤病变部位，并触发一系列免疫反应，导致肿瘤的消退。通过这种创新的纳米技术手段，不仅能够显著地改变实体瘤的免疫抑制微环境，而且为CAR-T细胞疗法在治疗实体瘤方面提供了新的策略和希望。

总之，纳米技术在调节肿瘤微环境中的免疫抑制作用方面展现出了巨大的潜力和前景。通过精准靶向肿瘤微环境，纳米技术能够改变肿瘤细胞与免疫细胞之间的相互作用，从而增强机体的抗肿瘤免疫反应。

2.3.3 克服CAR-T细胞疗法副作用

CRS是CAR-T细胞疗法中普遍且严重的副作用之一。这种副作用的发生是由于经过基因工程改造的T细胞通过CAR识别并结合肿瘤细胞表面的特定抗原后，引发了一系列免疫反应^[156-157]。在这一过程中，CAR-T细胞被激活并迅速释放大量细胞因子，包括IL-6、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 等，这些细胞因子在体内触发了炎症反应和免疫激活，可能引起包括高热、寒战、恶心、呼吸困难、低血压乃至器官功能衰竭在内的多种症状^[156, 158]。除了CRS，CAR-T细胞疗法中的“脱靶”效应也是一个重要的安全问题^[159]。在CAR-T细胞治疗实体瘤的临床应用中，已经识别了多种潜在的靶点，包括间

皮素、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3、紧密连接蛋白18.2、HER2、双唾液酸神经节苷脂和表皮生长因子受体变异体III^[160]。这些靶点均为TAA，它们在肿瘤细胞中的表达水平远高于正常组织，但正常组织中也存在一定程度的表达。这种表达模式可能导致CAR-T细胞在攻击肿瘤的同时，也损害表达相同TAA的正常组织，从而引发“脱靶”毒性，这在CAR-T细胞治疗实体瘤时构成了一个主要的治疗挑战^[161]。为了克服这些挑战，研究人员正在探索多种策略，包括使用纳米技术来控制细胞因子的释放、改进CAR-T细胞的设计以增强其特异性、以及开发新的靶点选择策略等，旨在最大限度地减少对正常组织的损害，同时提高对肿瘤的治疗效果。

细胞因子的大量释放是引发CRS的主要因素，这一综合征是CAR-T细胞疗法中常见的副作用。纳米技术的前沿应用为有效调控体内细胞因子的水平提供了一种创新的解决方案。早在2010年，Stephan及其同事^[162]开发了一种策略，将IL-15混合物和IL-21等细胞因子封装进直径为300 nm的多层脂质纳米颗粒中。通过利用马来酰亚胺与巯基的特异性偶联反应，结合聚乙二醇化处理，研究者们成功地实现了纳米颗粒与T细胞表面的稳定共轭。这种纳米颗粒的设计旨在实现对T细胞的持续伪自分泌刺激，从而在增强T细胞对癌症转移的治疗效果的同时，显著降低了细胞因子引发的全身性副作用。该研究不仅展示了一种通过将药物载荷的纳米颗粒共轭至T细胞表面来增强CAR-T细胞疗法效果的新方法，而且为CAR-T细胞疗法中CRS的克服和治疗提供了新的思路。

除此之外，依托纳米技术的纳米递送系统能够通过多种方式控制CAR-T细胞在肿瘤部位特异性释放，从而降低CAR-T细胞“脱靶”而带来的细胞毒性。Nguyen等^[25]设计并构建了一种光开关型CAR-T细胞（LiCAR-T），这种细胞能够在肿瘤抗原存在且受到光照刺激时被激活。为了实现体内应用，研究者将LiCAR-T细胞与手术可移除的上转换纳米颗粒（UCNPs）结合，利用UCNPs在近红外光照射下发出蓝光的特性，来远程激活LiCAR-T细胞，从而在活体动物中实现对T细胞介导的抗肿瘤免疫反应的时空控制。无独有偶，Wang等^[163]提出了一种新的纳米修饰开关（NanoSwitch）策略，即设计了一种基于明胶酶敏感的纳米粒子，这些粒子能够选择性地将异二聚体开关传递到肿瘤细胞，从而实现体内对CAR-T细胞的肿瘤特异性激

活。该体系有不错的T细胞激活效果、体内分布和肿瘤靶向能力,以及对肿瘤生长的抑制效果,同时有减少副作用的潜力,为提高CAR-T细胞疗法的安全性和有效性提供了新的思路。

综上所述,纳米技术为克服CAR-T细胞疗法的副作用提供了多种策略和手段。通过纳米技术的应用,可以提高CAR-T细胞疗法的安全性和有效性,使其在癌症治疗中发挥更大的作用。

3 总结与展望

本文综述了CAR-T细胞疗法的基本背景以及近几年纳米技术设计的一系列解决CAR-T实体瘤治疗中潜在问题的策略。具体来说,纳米技术的应用不仅可以显著降低CAR-T细胞疗法的制备成本,还能增强CAR-T细胞在实体瘤中的靶向性和渗透能力,同时调节免疫抑制的微环境,有效克服CAR-T疗法可能引起的副作用。纳米技术在CAR-T细胞疗法中的应用前景广阔,其在CAR-T细胞的制备和实体瘤治疗中起重要作用。此外,纳米技术在联合治疗策略中的应用也越来越受到青睐。例如,将CAR-T疗法与化疗^[164]或靶向治疗^[165]相结合,以及利用纳米技术进行CAR-T细胞的体内标记^[166],都是当前研究的热点。针对目前的CAR-T细胞疗法的研究现状和问题,我们展望了未来CAR-T细胞疗法研究和应用的几个关键方向。首先,提升CAR-T细胞制备的效率和质量是关键,这包括优化制造过程,实现生产流程的简化和标准化,旨在降低治疗成本,扩大其临床应用的普及性。其次,为了增强治疗效果,可探索将CAR-T细胞疗法与其他癌症治疗手段相结合的可能性,如化疗、放疗以及免疫检查点抑制剂等,以期达到协同增效的治疗效果。此外,个体化医疗的重要性不容忽视,研究将更加注重根据患者的个体差异和疾病特征,设计和实施定制化的治疗方案,以提高治疗的精确性和有效性。

然而,纳米技术在癌症治疗临床应用中面临的挑战也不容忽视。如何克服实体脑部肿瘤中血脑屏障的阻碍,以及如何克服纳米递药系统存在药物负载效率不足和潜在的载体毒性等问题,引起了研究者的广泛关注。我们的研究专注于将功能化纳米递药系统应用于肿瘤的精准治疗,并已成功开发了多种靶向性的纳米药物输送平台,包括针对脑部的聚合物载体以及外泌体和肺部的LNP等。这些系统在实现高效药物递送和增强治疗精确度方面展现出

巨大潜力。基于此,我们致力于开发通过脑内原位注射或可植入型系统改善CAR-T细胞疗法在脑肿瘤中的应用,有望克服血脑屏障的障碍,提高药物在脑部的浓度,从而为脑肿瘤患者提供更为有效的治疗方案。除此之外,为了克服载药效率与载体毒性等问题,我们采取了多种措施来优化纳米递药系统,特别是优化的LNP,凭借其卓越的转染能力和安全性,成为改造CAR-T细胞以增强其抗癌效果的理想工具。目前,我们正致力于利用LNP在体内特异性改造CAR-T细胞的研究,同时积极探索新靶点的开发以及多靶点联合疗法在CAR-T细胞治疗中的应用,以期提高CAR-T细胞疗法的治疗效果。通过这些策略的综合应用,CAR-T细胞疗法的发展有望实现更广泛的临床应用,并为患者带来更多的治疗希望。

参 考 文 献

- [1] Chan J D, Lai J, Slaney C Y, *et al.* Cellular networks controlling T cell persistence in adoptive cell therapy. *Nat Rev Immunol*, 2021, **21**(12): 769-784
- [2] Olson D J, Odunsi K. Adoptive cell therapy for nonhematologic solid tumors. *J Clin Oncol*, 2023, **41**(18): 3397-3407
- [3] Jafferji M S, Yang J C. Adoptive T-cell therapy for solid malignancies. *Surg Oncol Clin N Am*, 2019, **28**(3): 465-479
- [4] Maalej K M, Merhi M, Inchakalody V P, *et al.* CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances. *Mol Cancer*, 2023, **22**(1): 20
- [5] Zhang P, Zhang G, Wan X. Challenges and new technologies in adoptive cell therapy. *J Hematol Oncol*, 2023, **16**(1): 97
- [6] Xue Y, Che J, Ji X, *et al.* Recent advances in biomaterial-boosted adoptive cell therapy. *Chem Soc Rev*, 2022, **51**(5): 1766-1794
- [7] Cai Q, Warren S, Pietrobon V, *et al.* Building smart CAR T cell therapies: the path to overcome current challenges. *Cancer Cell*, 2023, **41**(10): 1689-1695
- [8] Monberg T J, Borch T H, Svane I M, *et al.* TIL therapy: facts and hopes. *Clin Cancer Res*, 2023, **29**(17): 3275-3283
- [9] Huang S W, Pan C M, Lin Y C, *et al.* BiTE-secreting CAR- $\gamma\delta$ T as a dual targeting strategy for the treatment of solid tumors. *Adv Sci*, 2023, **10**(17): e2206856
- [10] Heczey A, Courtney A N, Montalbano A, *et al.* Anti-GD2 CAR-NKT cells in patients with relapsed or refractory neuroblastoma: an interim analysis. *Nat Med*, 2020, **26**(11): 1686-1690
- [11] Roncati L, Palmieri B. Adoptive cell transfer (ACT) of autologous tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) to treat malignant melanoma: the dawn of a chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy from autologous donor. *Int J Dermatol*, 2020, **59**(7): 763-769
- [12] van den Berg J H, Heemskerk B, van Rooij N, *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) therapy in metastatic melanoma:

- boosting of neoantigen-specific T cell reactivity and long-term follow-up. *J Immunother Cancer*, 2020, **8**(2): e000848
- [13] Katiyar V, Chesney J, Kloecker G. Cellular therapy for lung cancer: focusing on chimeric antigen receptor T (CAR T) cells and tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) therapy. *Cancers*, 2023, **15**(14): 3733
- [14] Met Ö, Jensen K M, Chamberlain C A, *et al.* Principles of adoptive T cell therapy in cancer. *Semin Immunopathol*, 2019, **41**(1): 49-58
- [15] Baulu E, Gardet C, Chuvin N, *et al.* TCR-engineered T cell therapy in solid tumors: state of the art and perspectives. *Sci Adv*, 2023, **9**(7): eadf3700
- [16] Xu R, Du S, Zhu J, *et al.* Neoantigen-targeted TCR-T cell therapy for solid tumors: how far from clinical application. *Cancer Lett*, 2022, **546**: 215840
- [17] Abreu T R, Fonseca N A, Gonçalves N, *et al.* Current challenges and emerging opportunities of CAR-T cell therapies. *J Control Release*, 2020, **319**: 246-261
- [18] Ghosh S, Lalani R, Patel V, *et al.* Combinatorial nanocarriers against drug resistance in hematological cancers: opportunities and emerging strategies. *J Control Release*, 2019, **296**: 114-139
- [19] Sterner R C, Sterner R M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J*, 2021, **11**(4): 69
- [20] Liu Q, Li J, Zheng H, *et al.* Adoptive cellular immunotherapy for solid neoplasms beyond CAR-T. *Mol Cancer*, 2023, **22**(1): 28
- [21] Larson R C, Maus M V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nat Rev Cancer*, 2021, **21**(3): 145-161
- [22] Vitanza N A, Wilson A L, Huang W, *et al.* Intraventricular B7-H3 CAR T cells for diffuse intrinsic pontine glioma: preliminary first-in-human bioactivity and safety. *Cancer Discov*, 2023, **13**(1): 114-131
- [23] Xiong Y, Taleb M, Misawa K, *et al.* C-Kit signaling potentiates CAR T cell efficacy in solid tumors by CD28- and IL-2-independent co-stimulation. *Nat Cancer*, 2023, **4**(7): 1001-1015
- [24] Wang D, Prager B C, Gimple R C, *et al.* CRISPR screening of CAR T cells and cancer stem cells reveals critical dependencies for cell-based therapies. *Cancer Discov*, 2021, **11**(5): 1192-1211
- [25] Nguyen N T, Huang K, Zeng H, *et al.* Nano-optogenetic engineering of CAR T cells for precision immunotherapy with enhanced safety. *Nat Nanotechnol*, 2021, **16**(12): 1424-1434
- [26] Brassolatti P, de Almeida Rodolpho J M, Franco de Godoy K, *et al.* Functionalized titanium nanoparticles induce oxidative stress and cell death in human skin cells. *Int J Nanomedicine*, 2022, **17**: 1495-1509
- [27] Zhang Y, Li M, Gao X, *et al.* Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities. *J Hematol Oncol*, 2019, **12**(1): 137
- [28] Ding Z, Sigdel K, Yang L, *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for enhanced diagnosis and therapy of oral cancer. *J Mater Chem B*, 2020, **8**(38): 8781-8793
- [29] Nawaz W, Xu S, Li Y, *et al.* Nanotechnology and immunoengineering: how nanotechnology can boost CAR-T therapy. *Acta Biomater*, 2020, **109**: 21-36
- [30] Tang H, Zaroudi M, Zhu Y, *et al.* Toroidal-spiral particles as a CAR-T cell delivery device for solid tumor immunotherapy. *J Control Release*, 2023, **362**: 620-630
- [31] Zeng Q, Liu Z, Niu T, *et al.* Application of nanotechnology in CAR-T-cell immunotherapy. *Chin Chem Lett*, 2023, **34**(3): 107747
- [32] Abdalla A M E, Xiao L, Miao Y, *et al.* Nanotechnology promotes genetic and functional modifications of therapeutic T cells against cancer. *Adv Sci*, 2020, **7**(10): 1903164
- [33] Matis L A, Shu S, Groves E S, *et al.* Adoptive immunotherapy of a syngeneic murine leukemia with a tumor-specific cytotoxic T cell clone and recombinant human interleukin 2: correlation with clonal IL 2 receptor expression. *J Immunol*, 1986, **136**(9): 3496-3501
- [34] Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, *et al.* Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, **149**(3): 960-968
- [35] Boucher L E, Prinslow E G, Feldkamp M, *et al.* "Stapling" scFv for multispecific biotherapeutics of superior properties. *MAbs*, 2023, **15**(1): 2195517
- [36] Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(24): 10024-10028
- [37] Wang C, Wang J, Che S, *et al.* CAR-T cell therapy for hematological malignancies: history, status and promise. *Heliyon*, 2023, **9**(11): e21776
- [38] Wight D C, Wagner T E. Transgenic mice: a decade of progress in technology and research. *Mutat Res*, 1994, **307**(2): 429-440
- [39] Stancovski I, Schindler D G, Waks T, *et al.* Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. *J Immunol*, 1993, **151**(11): 6577-6582
- [40] Imai C, Mihara K, Andreansky M, *et al.* Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2004, **18**(4): 676-684
- [41] Milone M C, Fish J D, Carpenito C, *et al.* Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. *Mol Ther*, 2009, **17**(8): 1453-1464
- [42] Kalos M, Levine B L, Porter D L, *et al.* T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med*, 2011, **3**(95): 95ra73
- [43] Porter D L, Levine B L, Kalos M, *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 2011, **365**(8): 725-733
- [44] Foeng J, Comerford I, McColl S R. Harnessing the chemokine system to home CAR-T cells into solid tumors. *Cell Rep Med*, 2022, **3**(3): 100543
- [45] Behr M, Zhou J, Xu B, *et al.* *In vivo* delivery of CRISPR-Cas9 therapeutics: progress and challenges. *Acta Pharm Sin B*, 2021,

- 11(8):2150-2171
- [46] Abou-El-Enin M, Hey S P. Cell and gene therapy trials: are we facing an 'evidence crisis'? *EClinicalMedicine*, 2019, **7**: 13-14
- [47] Ghione P, Palomba M L, Patel A R, *et al.* Comparative effectiveness of ZUMA-5 (axi-cel) vs SCHOLAR-5 external control in relapsed/refractory follicular lymphoma. *Blood*, 2022, **140**(8): 851-860
- [48] Ying Z, Yang H, Guo Y, *et al.* Relmacabtagene autoleucel (relma-cel) CD19 CAR-T therapy for adults with heavily pretreated relapsed/refractory large B-cell lymphoma in China. *Cancer Med*, 2021, **10**(3): 999-1011
- [49] Wang D, Wang J, Hu G, *et al.* A phase 1 study of a novel fully human BCMA-targeting CAR (CT103A) in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood*, 2021, **137**(21): 2890-2901
- [50] Gu R, Liu F, Zou D, *et al.* Efficacy and safety of CD19 CAR T constructed with a new anti-CD19 chimeric antigen receptor in relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol*, 2020, **13**(1): 122
- [51] Shrivastava T, van Rhee F, Al Hadidi S. Targeting B cell maturation antigen in patients with multiple myeloma: current perspectives. *Onco Targets Ther*, 2023, **16**: 441-464
- [52] Sun W, Liang A B, Huang H, *et al.* Strategies to optimize chimeric antigen receptor T-cell therapy in hematologic malignancies: Chinese experience. *Haematologica*, 2023, **108**(8): 2011-2028
- [53] Maude S L, Laetsch T W, Buechner J, *et al.* Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 2018, **378**(5): 439-448
- [54] Schuster S J, Bishop M R, Tam C S, *et al.* Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 2019, **380**(1): 45-56
- [55] Fowler N H, Dickinson M, Dreyling M, *et al.* Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory follicular lymphoma: the phase 2 ELARA trial. *Nat Med*, 2022, **28**(2): 325-332
- [56] Neelapu S S, Locke F L, Bartlett N L, *et al.* Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 2017, **377**(26): 2531-2544
- [57] Jacobson C A, Chavez J C, Sehgal A R, *et al.* Axicabtagene ciloleucel in relapsed or refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (ZUMA-5): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 2022, **23**(1): 91-103
- [58] Locke F L, Miklos D B, Jacobson C A, *et al.* Axicabtagene ciloleucel as second-line therapy for large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 2022, **386**(7): 640-654
- [59] Wang M, Munoz J, Goy A, *et al.* KTE-X19 CAR T-cell therapy in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 2020, **382**(14): 1331-1342
- [60] Shah B D, Ghobadi A, Oluwole O O, *et al.* KTE-X19 for relapsed or refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study. *Lancet*, 2021, **398**(10299): 491-502
- [61] Abramson J S, Palomba M L, Gordon L I, *et al.* Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet*, 2020, **396**(10254): 839-852
- [62] Kamdar M, Solomon S R, Arnason J, *et al.* Lisocabtagene maraleucel versus standard of care with salvage chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation as second-line treatment in patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma (TRANSFORM): results from an interim analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet*, 2022, **399**(10343): 2294-2308
- [63] Munshi N C, Anderson L D, Shah N, *et al.* Idecabtagene vicleucel in relapsed and refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*, 2021, **384**(8): 705-716
- [64] Berdeja J G, Madduri D, Usmani S Z, *et al.* Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *Lancet*, 2021, **398**(10297): 314-324
- [65] Locke F L, Ghobadi A, Jacobson C A, *et al.* Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol*, 2019, **20**(1): 31-42
- [66] Ying Z, Yang H, Guo Y, *et al.* Long-term outcomes of relmacabtagene autoleucel in Chinese patients with relapsed/refractory large B-cell lymphoma: updated results of the RELIANCE study. *Cytotherapy*, 2023, **25**(5): 521-529
- [67] Bladé J, Beksac M, Caers J, *et al.* Extramedullary disease in multiple myeloma: a systematic literature review. *Blood Cancer J*, 2022, **12**(3): 45
- [68] Jayaraman J, Mellody M P, Hou A J, *et al.* CAR-T design: elements and their synergistic function. *EBioMedicine*, 2020, **58**: 102931
- [69] Huang R, Li X, He Y, *et al.* Recent advances in CAR-T cell engineering. *J Hematol Oncol*, 2020, **13**(1): 86
- [70] Yan T, Zhu L, Chen J. Current advances and challenges in CAR T-Cell therapy for solid tumors: tumor-associated antigens and the tumor microenvironment. *Exp Hematol Oncol*, 2023, **12**(1): 14
- [71] Whitlow M, Bell B A, Feng S L, *et al.* An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Eng*, 1993, **6**(8): 989-995
- [72] Zhang Q, Zhang Z, Peng M, *et al.* CAR-T cell therapy in gastrointestinal tumors and hepatic carcinoma: from bench to bedside. *Oncoimmunology*, 2016, **5**(12): e1251539
- [73] Zhang J, Fan J, Skwarczynski M, *et al.* Peptide-based nanovaccines in the treatment of cervical cancer: a review of recent advances. *Int J Nanomedicine*, 2022, **17**: 869-900
- [74] Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov*, 2013, **3**(4): 388-398
- [75] Finck A V, Blanchard T, Roselle C P, *et al.* Engineered cellular immunotherapies in cancer and beyond. *Nat Med*, 2022, **28**(4): 678-689
- [76] Rafiq S, Hackett C S, Brentjens R J. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nat Rev*

- Clin Oncol, 2020, **17**(3): 147-167
- [77] Brudno J N, Lam N, Vanasse D, *et al.* Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells with fully human binding domains in patients with B-cell lymphoma. *Nat Med*, 2020, **26**(2): 270-280
- [78] Lindner S E, Johnson S M, Brown C E, *et al.* Chimeric antigen receptor signaling: functional consequences and design implications. *Sci Adv*, 2020, **6**(21): eaaz3223
- [79] Weinkove R, George P, Dasyam N, *et al.* Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations. *Clin Transl Immunology*, 2019, **8**(5): e1049
- [80] Xie D, Jin X, Sun R, *et al.* Relapse mechanism and treatment strategy after chimeric antigen receptor T-cell therapy in treating B-cell hematological malignancies. *Technol Cancer Res Treat*, 2022, **21**: 15330338221118413
- [81] Ardouin L, Boyer C, Gillet A, *et al.* Crippling of CD3-zeta ITAMs does not impair T cell receptor signaling. *Immunity*, 1999, **10**(4): 409-420
- [82] Bettini M L, Chou P C, Guy C S, *et al.* Cutting edge: CD3 ITAM diversity is required for optimal TCR signaling and thymocyte development. *J Immunol*, 2017, **199**(5): 1555-1560
- [83] Wu L, Brzostek J, Sakthi Vale P D, *et al.* CD28-CAR-T cell activation through FYN kinase signaling rather than LCK enhances therapeutic performance. *Cell Rep Med*, 2023, **4**(2): 100917
- [84] Benmebarek M R, Karches C H, Cadilha B L, *et al.* Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(6): 1283
- [85] Kershaw M H, Westwood J A, Parker L L, *et al.* A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, **12**(20 Pt 1): 6106-6115
- [86] Park J R, Digiusto D L, Slovak M, *et al.* Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther*, 2007, **15**(4): 825-833
- [87] Brentjens R J, Rivière I, Park J H, *et al.* Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*, 2011, **118**(18): 4817-4828
- [88] Schneider D, Xiong Y, Wu D, *et al.* Trispecific CD19-CD20-CD22-targeting duoCAR-T cells eliminate antigen-heterogeneous B cell tumors in preclinical models. *Sci Transl Med*, 2021, **13**(586): eabc6401
- [89] Karlsson H, Svensson E, Gigg C, *et al.* Evaluation of intracellular signaling downstream chimeric antigen receptors. *PLoS One*, 2015, **10**(12): e0144787
- [90] Abate-Daga D, Lagisetty K H, Tran E, *et al.* A novel chimeric antigen receptor against prostate stem cell antigen mediates tumor destruction in a humanized mouse model of pancreatic cancer. *Hum Gene Ther*, 2014, **25**(12): 1003-1012
- [91] Pegram H J, Purdon T J, van Leeuwen D G, *et al.* IL-12-secreting CD19-targeted cord blood-derived T cells for the immunotherapy of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2015, **29**(2): 415-422
- [92] Ren J, Liu X, Fang C, *et al.* Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin Cancer Res*, 2017, **23**(9): 2255-2266
- [93] Zhao J, Lin Q, Song Y, *et al.* Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J Hematol Oncol*, 2018, **11**(1): 132
- [94] Zheng Z, Li S, Liu M, *et al.* Fine-tuning through generations: advances in structure and production of CAR-T therapy. *Cancers*, 2023, **15**(13): 3476
- [95] Atsavaprane E S, Billingsley M M, Mitchell M J. Delivery technologies for T cell gene editing: applications in cancer immunotherapy. *EBioMedicine*, 2021, **67**: 103354
- [96] Xie Y, Li X, Wu J, *et al.* CAR-T cells for cancer immunotherapy. *Chin Chem Lett*, 2023, **34**(9): 108202
- [97] Michels A, Ho N, Buchholz C J. Precision medicine: *in vivo* CAR therapy as a showcase for receptor-targeted vector platforms. *Mol Ther*, 2022, **30**(7): 2401-2415
- [98] Li W, Pan X, Chen L, *et al.* Cell metabolism-based optimization strategy of CAR-T cell function in cancer therapy. *Front Immunol*, 2023, **14**: 1186383
- [99] Dorff T B, Narayan V, Forman S J, *et al.* Novel redirected T-cell immunotherapies for advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2022, **28**(4): 576-584
- [100] Gumber D, Wang L D. Improving CAR-T immunotherapy: overcoming the challenges of T cell exhaustion. *EBioMedicine*, 2022, **77**: 103941
- [101] Reighard S D, Cranert S A, Rangel K M, *et al.* Therapeutic targeting of follicular T cells with chimeric antigen receptor-expressing natural killer cells. *Cell Rep Med*, 2020, **1**(1): 100003
- [102] Hu T, Kumar A R, Luo Y, *et al.* Automating CAR-T transfection with micro and nano-technologies. *Small Methods*, 2024, **8**(8): e2301300
- [103] Milone M C, O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 2018, **32**(7): 1529-1541
- [104] Lock D, Monjezi R, Brandes C, *et al.* Automated, scaled, transposon-based production of CAR T cells. *J Immunother Cancer*, 2022, **10**(9): e005189
- [105] Tipanee J, Samara-Kuko E, Gevaert T, *et al.* Universal allogeneic CAR T cells engineered with Sleeping Beauty transposons and CRISPR-CAS9 for cancer immunotherapy. *Mol Ther*, 2022, **30**(10): 3155-3175
- [106] Zhang J, Wang S, Zhang D, *et al.* Nanoparticle-based drug delivery systems to enhance cancer immunotherapy in solid tumors. *Front Immunol*, 2023, **14**: 1230893
- [107] Yadav D N, Ali M S, Thanekar A M, *et al.* Recent advancements in the design of nanodelivery systems of siRNA for cancer therapy. *Mol Pharm*, 2022, **19**(12): 4506-4526
- [108] Mahdavi Gorabi A, Sadat Ravari M, Sanaei M J, *et al.* Immune checkpoint blockade in melanoma: advantages, shortcomings and emerging roles of the nanoparticles. *Int Immunopharmacol*, 2022, **113**(Pt A): 109300
- [109] Swingle K L, Hamilton A G, Mitchell M J. Lipid nanoparticle-

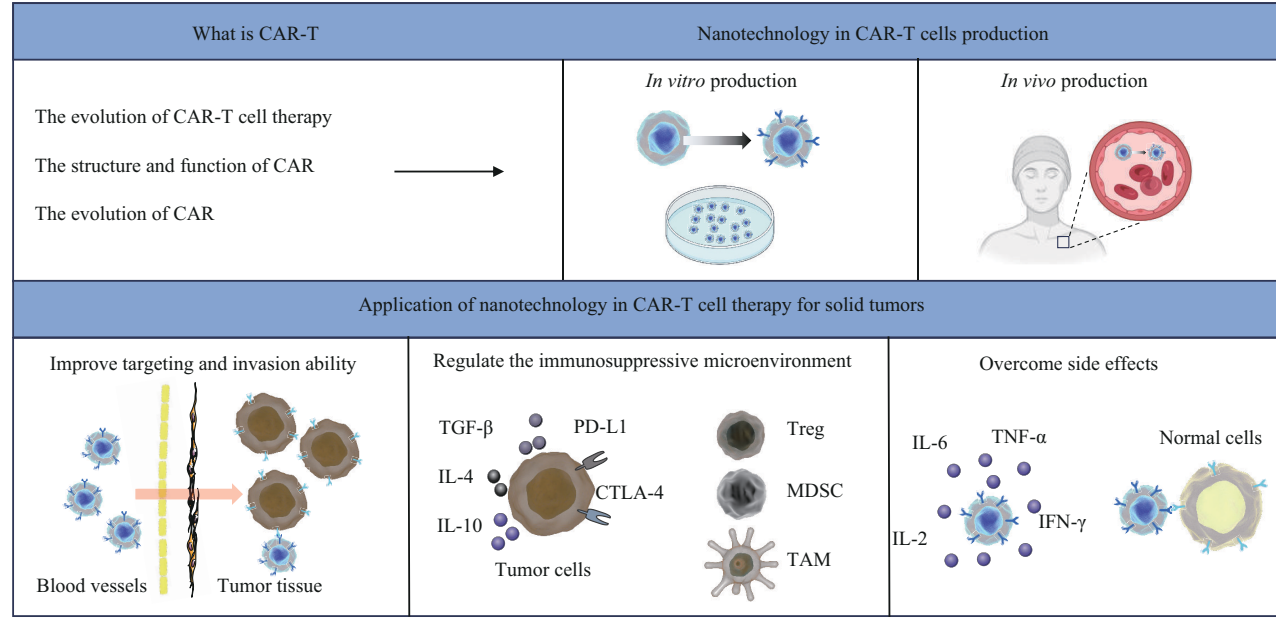
- mediated delivery of mRNA therapeutics and vaccines. *Trends Mol Med*, 2021, **27**(6): 616-617
- [110] Motsoene F, Abrahamse H, Dhillip Kumar S S. Multifunctional lipid-based nanoparticles for wound healing and antibacterial applications: a review. *Adv Colloid Interface Sci*, 2023, **321**: 103002
- [111] Han X, Alu A, Liu H, *et al*. Biomaterial-assisted biotherapy: a brief review of biomaterials used in drug delivery, vaccine development, gene therapy, and stem cell therapy. *Bioact Mater*, 2022, **17**: 29-48
- [112] Yoon H Y, Selvan S T, Yang Y, *et al*. Engineering nanoparticle strategies for effective cancer immunotherapy. *Biomaterials*, 2018, **178**: 597-607
- [113] Olden B R, Cheng Y, Yu J L, *et al*. Cationic polymers for non-viral gene delivery to human T cells. *J Control Release*, 2018, **282**: 140-147
- [114] Kitte R, Rabel M, Geczy R, *et al*. Lipid nanoparticles outperform electroporation in mRNA-based CAR T cell engineering. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2023, **31**: 101139
- [115] Moffett H F, Coon M E, Radtke S, *et al*. Hit-and-Run programming of therapeutic cytoreagents using mRNA nanocarriers. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 389
- [116] 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. *Nat Biotechnol*, 2018, **36**(2): 160-169
- [117] Wauters A C, Scheerstra J F, Vermeijlen I G, *et al*. Artificial antigen-presenting cell topology dictates T cell activation. *ACS Nano*, 2022, **16**(9): 15072-15085
- [118] 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. *Clin Cancer Res*, 2020, **26**(13): 3384-3396
- [119] Perica K, Bieler J G, Schütz C, *et al*. Enrichment and expansion with nanoscale artificial antigen presenting cells for adoptive immunotherapy. *ACS Nano*, 2015, **9**(7): 6861-6871
- [120] Rhodes K R, Green J J. Nanoscale artificial antigen presenting cells for cancer immunotherapy. *Mol Immunol*, 2018, **98**: 13-18
- [121] Shan X, Gong X, Li J, *et al*. Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation. *Acta Pharm Sin B*, 2022, **12**(7): 3028-3048
- [122] Sun M, Lee J, Chen Y, *et al*. Studies of nanoparticle delivery with *in vitro* bio-engineered microtissues. *Bioact Mater*, 2020, **5**(4): 924-937
- [123] Zhou J, Rossi J J. Cell-type-specific, aptamer-functionalized agents for targeted disease therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, **3**(6): e169
- [124] Smith T T, Stephan S B, Moffett H F, *et al*. *In situ* programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers. *Nat Nanotechnol*, 2017, **12**(8): 813-820
- [125] Rurik J G, Tombácz I, Yadegari A, *et al*. CAR T cells produced *in vivo* to treat cardiac injury. *Science*, 2022, **375**(6576): 91-96
- [126] Zhao G, Zhang Y, Xu C F, *et al*. *In vivo* production of CAR-T cells using virus-mimetic fusogenic nanovesicles. *Sci Bull*, 2024, **69**(3): 354-366
- [127] Singh A P, Zheng X, Lin-Schmidt X, *et al*. Development of a quantitative relationship between CAR-affinity, antigen abundance, tumor cell depletion and CAR-T cell expansion using a multiscale systems PK-PD model. *MAbs*, 2020, **12**(1): 1688616
- [128] Zhang T, Tai Z, Miao F, *et al*. Adoptive cell therapy for solid tumors beyond CAR-T: current challenges and emerging therapeutic advances. *J Control Release*, 2024, **368**: 372-396
- [129] Kankeu Fonkoua L A, Sirpilla O, Sakemura R, *et al*. CAR T cell therapy and the tumor microenvironment: current challenges and opportunities. *Mol Ther Oncolytics*, 2022, **25**: 69-77
- [130] Panahi Meymandi A R, Akbari B, Soltantoyeh T, *et al*. Crosstalk between autophagy and metabolic regulation of (CAR) T cells: therapeutic implications. *Front Immunol*, 2023, **14**: 1212695
- [131] Lin M Y, Nam E, Shih R M, *et al*. Self-regulating CAR-T cells modulate cytokine release syndrome in adoptive T-cell therapy. *J Exp Med*, 2024, **221**(6): e20221988
- [132] Cappuzzello E, Vigolo E, D'Accordio G, *et al*. How can cytokine-induced killer cells overcome CAR-T cell limits. *Front Immunol*, 2023, **14**: 1229540
- [133] Chen B, Gong L, Feng J, *et al*. Research advances of nanoparticles for CAR-T therapy in solid tumors. *Chin Chem Lett*, 2023: 109432
- [134] Neo S Y, Xu S, Chong J, *et al*. Harnessing novel strategies and cell types to overcome immune tolerance during adoptive cell therapy in cancer. *J Immunother Cancer*, 2023, **11**(4): e006434
- [135] Balakrishnan P B, Sweeney E E. Nanoparticles for enhanced adoptive T cell therapies and future perspectives for CNS tumors. *Front Immunol*, 2021, **12**: 600659
- [136] Stephan S B, Taber A M, Jileeva I, *et al*. Biopolymer implants enhance the efficacy of adoptive T-cell therapy. *Nat Biotechnol*, 2015, **33**(1): 97-101
- [137] Brown C E, Hibbard J C, Alizadeh D, *et al*. Locoregional delivery of IL-13R α 2-targeting CAR-T cells in recurrent high-grade glioma: a phase I trial. *Nat Med*, 2024, **30**(4): 1001-1012
- [138] Tian M, Wei J S, Shivaprasad N, *et al*. Preclinical development of a chimeric antigen receptor T cell therapy targeting FGFR4 in rhabdomyosarcoma. *Cell Rep Med*, 2024, **5**(5): 101586
- [139] 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. *ACS Nano*, 2019, **13**(2): 1469-1478
- [140] Nguyen K G, Vrabel M R, Mantooth S M, *et al*. Localized interleukin-12 for cancer immunotherapy. *Front Immunol*, 2020, **11**: 575597
- [141] Liu Y, Adu-Berchie K, Brockman J M, *et al*. Cytokine conjugation to enhance T cell therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, **120**(1): e2213222120
- [142] Luo Y, Chen Z, Sun M, *et al*. IL-12 nanochaperone-engineered CAR T cell for robust tumor-immunotherapy. *Biomaterials*, 2022, **281**: 121341
- [143] McKenzie C, El-Kholy M, Parekh F, *et al*. Novel Fas-TNFR chimeras that prevent Fas ligand-mediated kill and signal

- synergistically to enhance CAR T cell efficacy. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023, **32**: 603-621
- [144] Huang B, Abraham W D, Zheng Y, *et al.* Active targeting of chemotherapy to disseminated tumors using nanoparticle-carrying T cells. *Sci Transl Med*, 2015, **7**(291): 291ra94
- [145] Chao Y, Xu L, Liang C, *et al.* Combined local immunostimulatory radioisotope therapy and systemic immune checkpoint blockade imparts potent antitumour responses. *Nat Biomed Eng*, 2018, **2**(8): 611-621
- [146] Li Q, Qin S, Tian H, *et al.* Nano-econazole enhanced PD-L1 checkpoint blockade for synergistic antitumor immunotherapy against pancreatic ductal adenocarcinoma. *Small*, 2023, **19**(23): e2207201
- [147] Li M, Li S, Zhou H, *et al.* Chemotaxis-driven delivery of nanopathogenoids for complete eradication of tumors post-phototherapy. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 1126
- [148] Qiu Y, Wu Z, Chen Y, *et al.* Nano ultrasound contrast agent for synergistic chemo-photothermal therapy and enhanced immunotherapy against liver cancer and metastasis. *Adv Sci*, 2023, **10**(21): e2300878
- [149] Chen Z, Pan H, Luo Y, *et al.* Nanoengineered CAR-T biohybrids for solid tumor immunotherapy with microenvironment photothermal-remodeling strategy. *Small*, 2021, **17**(14): e2007494
- [150] Ma Q, He X, Zhang B, *et al.* A PD-L1-targeting chimeric switch receptor enhances efficacy of CAR-T cell for pleural and peritoneal metastasis. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, **7**(1): 380
- [151] Qin L, Cui Y, Yuan T, *et al.* Co-expression of a PD-L1-specific chimeric switch receptor augments the efficacy and persistence of CAR T cells via the CD70-CD27 axis. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 6051
- [152] Liao Q, Mao Y, He H, *et al.* PD-L1 chimeric costimulatory receptor improves the efficacy of CAR-T cells for PD-L1-positive solid tumors and reduces toxicity *in vivo*. *Biomark Res*, 2020, **8**(1): 57
- [153] Zhou X, Cao H, Fang S Y, *et al.* CTLA-4 tail fusion enhances CAR-T anti-tumor immunity. *Nat Immunol*, 2023, **24**(9): 1499-1510
- [154] Prinz L F, Riet T, Neureuther D F, *et al.* An anti-CD19/CTLA-4 switch improves efficacy and selectivity of CAR T cells targeting CD80/86-upregulated DLBCL. *Cell Rep Med*, 2024, **5**(2): 101421
- [155] 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. *Cancer Res*, 2018, **78**(13): 3718-3730
- [156] Moghanloo E, Mollanoori H, Talebi M, *et al.* Remote controlling of CAR-T cells and toxicity management: molecular switches and next generation CARs. *Transl Oncol*, 2021, **14**(6): 101070
- [157] Zhang K, Chen H, Li F, *et al.* Bright future or blind alley? CAR-T cell therapy for solid tumors. *Front Immunol*, 2023, **14**: 1045024
- [158] Stock S, Klüber A K, Fertig L, *et al.* Mechanisms and strategies for safe chimeric antigen receptor T-cell activity control. *Int J Cancer*, 2023, **153**(10): 1706-1725
- [159] Prinzing B, Krenciute G. Hypoxia-inducible CAR expression: an answer to the on-target/off-tumor dilemma?. *Cell Rep Med*, 2021, **2**(4): 100244
- [160] Yu S, Li A, Liu Q, *et al.* Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *J Hematol Oncol*, 2017, **10**(1): 78
- [161] Bergaggio E, Tai W T, Aroldi A, *et al.* ALK inhibitors increase ALK expression and sensitize neuroblastoma cells to ALK-CAR-T cells. *Cancer Cell*, 2023, **41**(12): 2100-2116.e10
- [162] Stephan M T, Moon J J, Um S H, *et al.* Therapeutic cell engineering with surface-conjugated synthetic nanoparticles. *Nat Med*, 2010, **16**(9): 1035-1041
- [163] Wang X, Meng F, Li X, *et al.* Nanomodified switch induced precise and moderate activation of CAR-T cells for solid tumors. *Adv Sci*, 2023, **10**(12): e2205044
- [164] Srivastava S, Furlan S N, Jaeger-Ruckstuhl C A, *et al.* Immunogenic chemotherapy enhances recruitment of CAR-T cells to lung tumors and improves antitumor efficacy when combined with checkpoint blockade. *Cancer Cell*, 2021, **39**(2): 193-208.e10
- [165] Liu J, Jiao X, Ma D, *et al.* CAR-T therapy and targeted treatments: emerging combination strategies in solid tumors. *Med*, 2024, **5**(6): 530-549
- [166] Kiru L, Zlitni A, Tousley A M, *et al.* *In vivo* imaging of nanoparticle-labeled CAR T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, **119**(6): e2102363119

Application of Nanotechnology in CAR-T-based Cancer Therapy*

XU Lin, HU Bo, ZHENG Lu-Lu, JIANG Shao-Ping, RUAN Shao-Bo **, HUANG Yuan-Yu**
(School of Life Science, Advanced Research Institute of Multidisciplinary Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Graphical abstract



Abstract Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy is an innovative and cutting-edge treatment in the field of adoptive cell therapy. It represents an important milestone in personalized and precision medicine. T cell immunotherapy has gone through more than 30 years of development, making CAR-T cell therapy increasingly mature. Currently, CAR-T cell therapy has achieved significant success in the treatment of hematological system tumors, and the FDA has approved 6 CAR-T cell therapies for the treatment of hematopoietic cancers. However, on one hand, the preparation of CAR-T cells is a highly technical process involving multiple steps, each requiring precise operation and strict condition control to ensure the quality and activity of the cells. The high-quality materials, specialized equipment, and highly specialized personnel required in the production process have led to very high preparation costs for CAR-T cell therapy. The high cost has led to increased treatment fees, which may limit the popularization and accessibility of CAR-T therapy. On the other hand, CAR-T cell therapy faces a series of difficulties and challenges in the treatment of solid tumors. The first is the insufficient targeting and infiltration

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32171394, 82302387).
** Corresponding author.
HUANG Yuan-Yu. Tel: 86-10-68911089, E-mail: yyhuang@bit.edu.cn
RUAN Shao-Bo. Tel: 86-10-68911089, E-mail: ruanshaobo@bit.edu.cn
Received: May 15, 2024 Accepted: June 3, 2024

ability of CAR-T cells to tumors. The tumor microenvironment (TME) of solid tumors is usually composed of dense extracellular matrix, forming a physical barrier that severely limits the targeting and penetration ability of CAR-T cells to tumors. The second is the immunosuppressive factors in the TME. In the TME, there are a large number of immunosuppressive factors, such as interleukin-10, transforming growth factor- β , and suppressive cells including regulatory T cells, tumor-associated macrophages, and myeloid-derived suppressor cells. These factors not only weaken the persistence of CAR-T cells but also severely hinder their effective anti-tumor effect. Finally, CAR-T cell therapy can cause serious cytotoxicity. The activation of CAR-T cells may cause cytokine release syndrome and attack normal cells expressing the CAR-T target antigen, causing “off-target” toxicity, and thus causing systemic inflammatory reactions and potential serious side effects. These factors lead to unsatisfactory therapeutic effects of CAR-T cell therapy. Fortunately, the advancement of nanotechnology has brought new hope to this field. In particular, nano drug delivery systems have become an extremely active research direction in the development of anti-tumor drugs. Nanoparticle delivery systems can address the challenges encountered by CAR-T cell therapy in treating solid tumors through various mechanisms. These mechanisms include enhancing tumor targeting and CAR-T cell penetration ability, regulating the tumor’s suppressive microenvironment, and overcoming the side effects of CAR-T cell therapy. The implementation of these strategies is expected to significantly improve the efficacy of CAR-T cell therapy in the treatment of solid tumors, thereby bringing more significant therapeutic effects to patients. This article focuses on the background of CAR-T therapy and solid tumor treatment, systematically reviews the application of nanotechnology in CAR-T cell preparation and solid tumor treatment *in vitro* and *in vivo* in recent years, and provides a forward-looking perspective on future development directions.

Key words CAR-T therapy, nanotechnology, cancer therapy, nanodrug delivery systems

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0209