

一种新的靶向CD19抗原的三特异性T细胞衔接器的制备及其抗白血病作用研究

陈曼玲 彭楠 刘晓雨 张婷 徐颖茜 田征 邢海燕 唐克晶
饶青 王建祥 王敏

中国医学科学院、北京协和医学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所),实验血液学国家重点实验室,国家血液系统疾病临床医学研究中心,天津 300020

通信作者:王敏,Email:wangjxm@ihcams.ac.cn

【摘要】 目的 制备一种新的靶向CD19的三特异性T细胞衔接器融合蛋白(19TriTE),研究其对CD19阳性血液肿瘤的免疫治疗作用。方法 通过分子克隆技术构建19TriTE表达质粒,并通过真核蛋白表达系统成功表达该融合蛋白。体外实验验证19TriTE对T细胞的活化与增殖作用及介导T细胞发挥对CD19阳性肿瘤细胞的特异性细胞毒作用。结果 ①成功构建19TriTE融合蛋白表达质粒,并通过真核蛋白表达系统成功表达。②19TriTE可以特异性结合T细胞和Nalm6细胞,与T细胞的平衡解离常数为19.21 nmol/L,与Nalm6细胞的平衡解离常数为11.67 nmol/L。③2 nmol/L浓度的19TriTE与T细胞及Nalm6细胞共培养时,T细胞中CD69阳性表达率为35.4%,CD25阳性表达率为49.8%,较对照组显著升高。④19TriTE在浓度为1 nmol/L时即可显著促进T细胞增殖,第12天时,T细胞绝对计数由初始 1×10^6 扩增至 7.4×10^7 ,增殖74倍。⑤19TriTE融合蛋白能明显介导T细胞杀伤CD19阳性靶细胞且与剂量呈正相关,浓度为10 nmol/L时,靶细胞裂解率达50%。⑥脱颗粒实验验证,CD19阳性靶细胞存在时,19TriTE可以显著激活T细胞且与剂量呈正相关。⑦将19TriTE融合蛋白分别与过表达RFP及Luciferase基因的靶细胞及T细胞共培养,19TriTE能够介导T细胞杀伤CD19阳性的靶细胞。结论 本研究成功构建及表达19TriTE融合蛋白,体外实验验证其可以有效活化T细胞,并促进T细胞增殖。同时,能够结合CD19阳性靶细胞和T细胞,促进T细胞发挥体外抗白血病作用,为进一步临床研究奠定基础。

【关键词】 急性淋巴细胞白血病; CD19; 三特异性T细胞衔接器; 融合蛋白; 免疫治疗

基金项目:国家自然科学基金重点项目(81830005);国家重点研发计划(2019YFA0110204)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.03.007

Preparation of a novel tri-specific T cell engager targeting CD19 antigen and its anti-leukemia effect exploration

Chen Manling, Peng Nan, Liu Xiaoyu, Zhang Ting, Xu Yingxi, Tian Zheng, Xing Haiyan, Tang Kejing, Rao Qing, Wang Jianxiang, Wang Min

State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Peking Union Medical University, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Wang Min, Email: wangjxm@ihcams.ac.cn

【Abstract】 Objective To prepare a novel tri-specific T cell engager (19TriTE) targeting CD19 antigen, and to investigate its immunotherapeutic effect on CD19-positive hematological malignancies. **Methods** 19TriTE was constructed by molecular cloning technology and successfully expressed through the eukaryotic expressing system. The effects of 19TriTE on the proliferation and activation of T cells, as well as the specific cytotoxicity against CD19 positive tumor cell lines were verified. **Results** ①19TriTE expressing plasmid was constructed and successfully expressed through the eukaryotic expressing system. ②19TriTE can specifically bind to T cells and Nalm6 cells, with equilibrium dissociation constants of 19.21 nmol/L and 11.67 nmol/L, respectively. ③The expression rates of CD69 positive T cells and CD25 positive T cells were 35.4% and 49.8% respectively, when 2 nmol/L 19TriTE were added in the co-culture system, which were significantly higher than those in the control group. ④19TriTE can significantly

promote the proliferation of T cells. The absolute count of T cells expanded from the initial one million to 74 million with an 74 fold increase at the concentration of 1 nmol/L on day 12. ⑤19TriTE can significantly mediate T cells killing of CD19 positive target cells in a dose-dependent manner. At the concentration of 10 nmol/L, the target cells lysis reached 50%. ⑥Degranulation experiment verified that 19TriTE can activate T cells in the presence of CD19 positive target cells, and the activation of T cells positively correlated with the dose of 19TriTE. ⑦ When 19TriTE fusion protein co-cultured with T cells and target cells overexpression RFP and luciferase genes respectively, 19TriTE can notably mediate T cells killing of CD19 positive target cells through fluorescent microscope or bioluminescence imaging technology. **Conclusion** In this study, we successfully constructed and expressed 19TriTE fusion protein and verified that it can effectively activate T cells and promote their proliferation in vitro. At the same time, it can bind to CD19 positive target cells and T cells, as well as enhance T cells anti-leukemia effect in vitro, providing the foundation for further clinical research.

【Key words】 Leukemia, lymphoblastic, acute; CD19; T cell engager, tri-specific; Fusion protein; Immunotherapy

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81830005); National Key R&D Program of China (2019YFA0110204)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.03.007

急性淋巴细胞白血病(ALL)是一种淋巴细胞系在骨髓中异常分化、增殖和聚集的恶性血液系统肿瘤^[1]。目前常规化疗在儿童ALL中取得非常好的疗效^[2],但成人ALL治疗效果欠佳^[3]。近年来,除了临床常规化疗外,一些新的免疫疗法发展迅速,如嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)治疗、单克隆抗体、双特异性T细胞衔接器抗体等^[4-5]。其中,双特异性衔接器博纳吐单抗(Blinicyto)较常规化疗有更好的治疗效果^[6],该抗体通过结合B细胞表面CD19抗原及T细胞表面CD3受体复合物,发挥杀伤CD19阳性肿瘤细胞的作用^[7]。而T细胞活化需要两个信号,第一信号通过“MHC-抗原肽-TCR三分子复合物”提供,第二活化信号可以由抗原提呈细胞上的CD80与T细胞上的CD28结合提供,缺乏第二信号,T细胞呈无能状态^[8]。通常肿瘤细胞表面缺乏或低表达CD80分子,有研究通过药物作用上调肿瘤细胞CD80分子的表达,来促进抗体介导的T细胞杀伤作用^[9]。此外,本实验室前期研究发现,CD19scFv-CD80融合蛋白可以有效活化T细胞并促进其杀伤肿瘤细胞的作用^[10]。近年来,越来越多研究者进行多功能融合蛋白的研究^[11-13],推动了多功能融合蛋白的发展,为临床提供了新的治疗策略。本研究中,我们构建了一种新的多功能融合蛋白19TriTE,既通过CD19scFv与肿瘤细胞结合,又通过CD3scFv与T细胞结合,提供T细胞第一活化信号,同时以CD80分子提供T细胞活化的第二信号,从而促进T细胞的活化、增殖及杀伤靶细胞作用。通过体外实验,我们已经初步证实了该19TriTE融合蛋白的抗白血病作用,现报道如下。

材料与方法

一、主要材料及试剂

ExpiCHO-S细胞、ExpiCHO瞬时转染试剂、CFSE染料购于美国Thermo Fisher公司;Strep tag XT蛋白纯化柱购于美国GE公司;D-Biotin购于上海生工生物股份有限公司;蛋白脱盐及浓缩柱购于美国Millipore公司;蛋白定量检测ELISA试剂盒购于南京金斯瑞生物科技股份有限公司;RPMI 1640培养基购于美国Gibco公司;人淋巴细胞培养液KBM581购于美国Corning公司;胎牛血清购于法国Biowest公司;重组人IL-2因子购于美国R&D公司;CD69、CD25、CD107a等流式抗体购于美国Biolegend公司;兔抗鼠IgG抗体购于美国CST公司;Anti-His抗体购于日本MBL公司;RossetteSep T细胞富集试剂购于美国Stem Cell公司;健康成人外周血标本由天津市血液中心提供。

二、细胞培养

人ALL细胞系Nalm6细胞、过表达RFP及Luciferase基因的Nalm6细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中;人T细胞用Ficoll淋巴细胞分离液及RossetteSep T细胞富集试剂富集后,培养于含10%胎牛血清和50 U IL-2的KBM581培养基中。

三、融合蛋白的表达

构建pcDNA3.4表达质粒,参照ExpiCHO瞬时表达系统手册,转染ExpiCHO细胞,转染14 d后收取细胞培养上清,3000×g离心30 min后,用0.45 μm滤膜过滤。Western blot验证蛋白表达后,将过滤后

的培养上清纯化,纯化标签为 Strep tag II,用D-生物素将蛋白从 Strep tag XT 纯化柱洗脱下来。用 Millipore 超滤浓缩柱将纯化后的蛋白洗脱液用 PBS 反复脱盐3次,将蛋白分装置 -80°C 冰箱保存。用 10% SDS Page 电泳验证所得蛋白的纯度。采用 Genescript His tag ELISA 试剂盒,对融合蛋白进行定量,用于后续功能实验。

四、融合蛋白活性鉴定

1. 融合蛋白结合特异性鉴定:取扩增后的人T细胞,阴性对照组加 PBS,阳性对照组加抗 CD3 单克隆抗体 APC/Cy7 anti-CD3,实验组加 19TriTE 融合蛋白及抗 CD3 单克隆抗体 APC/Cy7 anti-CD3; 4°C 孵育 1 h; PBS 清洗 2 次后重悬于 PBS 中,流式细胞术检测抗 CD3 单克隆抗体 APC/Cy7 anti-CD3 与人 T 细胞结合的荧光强度。同样方法检测 19TriTE 融合蛋白与 Nalm6 细胞表面 CD19 抗原结合的特异性。

2. 融合蛋白结合常数测定:将 19TriTE 融合蛋白以终浓度 0.05 nmol/L 至 100 nmol/L (倍比稀释)与 1×10^5 人 T 细胞 4°C 孵育 30 min; PBS 洗 1 次,加入 anti-His 抗体, 4°C 孵育 30 min; PBS 洗 1 次,加入 APC anti-mouse IgG 抗体, 4°C 孵育 30 min; 用 PBS 洗 2 次, 200 ml PBS 重悬细胞,流式细胞术检测 T 细胞的平均荧光强度。GraphPad Prism 8 软件计算融合蛋白与 T 细胞的平衡解离常数 K_D 值。同样方法检测 19TriTE 融合蛋白与 Nalm6 细胞的平衡解离常数 K_D 值。

五、蛋白对人 T 细胞的活化作用

1. T 细胞的活化检测:2 nmol/L 浓度的 19TriTE 融合蛋白与 T 细胞及 Nalm6 靶细胞共孵育 6 h,通过流式细胞术检测 T 细胞活化标志 CD69 的表达; 2 nmol/L 浓度的 19TriTE 融合蛋白与人 T 细胞及 Nalm6 靶细胞共孵育 3.5 d,通过流式细胞术检测 T 细胞活化标志 CD25 的表达。

2. T 细胞增殖的绝对计数:用 1 nmol/L 的 19TriTE 融合蛋白与人 T 细胞共孵育,加入 50 U 人 IL-2 因子。同时设置 PBS 对照组。 37°C 、5% CO_2 的孵箱中培养,每隔 2 d 用 counting beads 计数,计算 T 细胞增殖情况。

3. CFSE 方法检测 T 细胞增殖情况:根据 CFSE 染料操作手册对人 T 细胞进行标记,将 CFSE 染料标记的 T 细胞加入 96 孔板中,每孔 $2 \times 10^5/200$ ml; 分别在对照组加入 PBS、实验组加入 19TriTE 融合蛋白;共培养 4 d,根据流式细胞术检测 T 细胞荧光强

度变化,评估 T 细胞增殖情况。

六、蛋白介导 T 细胞对白血病细胞的杀伤作用

1. Nalm6 细胞 CD19 表达检测:用 APC anti-CD19 单抗标记 Nalm6 细胞,流式细胞术检测 CD19 的表达水平。

2. 19TriTE 融合蛋白介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞:应用实验室建立的 RFP 及 Luciferase 过表达的 Nalm6 细胞系为靶细胞, T 细胞与靶细胞以效靶比为 10:1 混合,加入不同浓度的 19TriTE 融合蛋白,共培养 24、48 h,流式细胞术检测靶细胞裂解率,倒置荧光显微镜观察残留靶细胞红色荧光强度,生物发光仪检测残余靶细胞生物发光强度。

3. 脱颗粒实验分析靶细胞存在下 19TriTE 融合蛋白介导 T 细胞的激活:将人 T 细胞与靶细胞按照效靶比 10:1 共培养 4 h 后,流式细胞术检测 T 细胞表面 CD107a 的表达,并分析 T 细胞群中 CD107a⁺ 细胞的比例,反映细胞激活率。

七、统计学处理

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析。结果均以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。

结 果

一、19TriTE 融合蛋白的表达和纯化

1. 19TriTE 融合蛋白表达质粒的构建:应用实验室已有的 CD19scFv 序列、CD3sFv 序列及 NCBI 公共数据库中查询的 CD80 胞外区序列,将三个基因序列依次串联连接——CD19scFv- CD80-CD3sFv,转入 pcDNA3.4 载体,成功构建 pcDNA3.4-19TriTE 真核表达质粒,载体结构如图 1A。

2. 19TriTE 融合蛋白的表达和纯化:用 pcDNA3.4-19TriTE 转染 ExpiCHO 细胞,Western blot 示在 110×10^3 处有 1 条蛋白条带,且无其他蛋白条带(图 1B),提示该培养转染方案成功表达目的蛋白。将收获上清进行纯化、脱盐浓缩后得到相对较纯的高浓度融合蛋白,10% SDS-PAGE 电泳验证其纯度。结果显示,在 110×10^3 左右有 1 条主条带(图 1C),ImageJ 软件验证融合蛋白的纯度大于 90%。

二、19TriTE 融合蛋白与 Nalm6 细胞和 T 细胞的结合特异性及亲和常数的测定

19TriTE 融合蛋白与商品化抗体 PE-anti-CD3 (HIT3a)及 PE-anti-CD19(HIB19)的竞争结合实验,结果显示,加入的 19TriTE 融合蛋白能够竞争结合

至人T细胞上的CD3抗原(图2A)及Nalm6细胞上的CD19抗原(图2B),该结果表明,19TriTE融合蛋白保留了与CD3抗原及CD19靶抗原的特异性结合能力。

通过活细胞间接免疫荧光实验,检测19TriTE融合蛋白与人T细胞及Nalm6细胞的结合活性。19TriTE融合蛋白与T细胞的 K_D 值为19.21 nmol/L(图2C),与Nalm6细胞的 K_D 值为11.67 nmol/L(图2D)。

三、19TriTE融合蛋白能够有效促进人T细胞的活化、增殖

1. 19TriTE融合蛋白对人T细胞的活化作用:

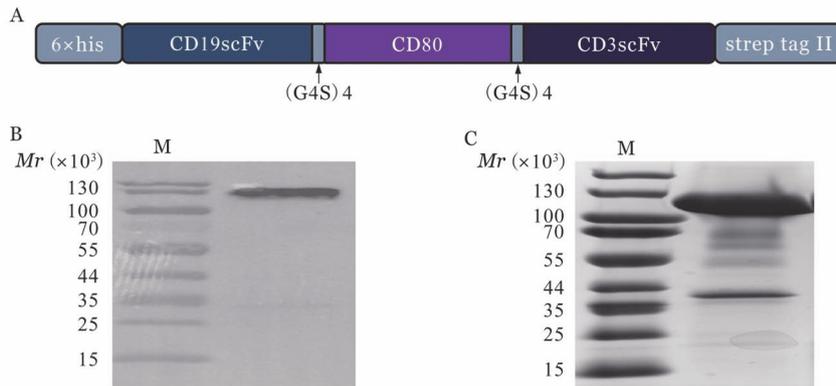
2 nmol/L浓度的19TriTE融合蛋白与人T细胞及

Nalm6靶细胞共孵育6 h,流式细胞术结果显示T细胞CD69阳性表达率为35.4%,显著高于PBS处理的对照组(图3A)。19TriTE融合蛋白与人T细胞及Nalm6靶细胞共孵育3.5 d,流式细胞术结果显示T细胞CD25阳性表达率为49.8%,显著高于PBS处理的对照组(图3B)。

2. 19TriTE融合蛋白促进人T细胞增殖作用:

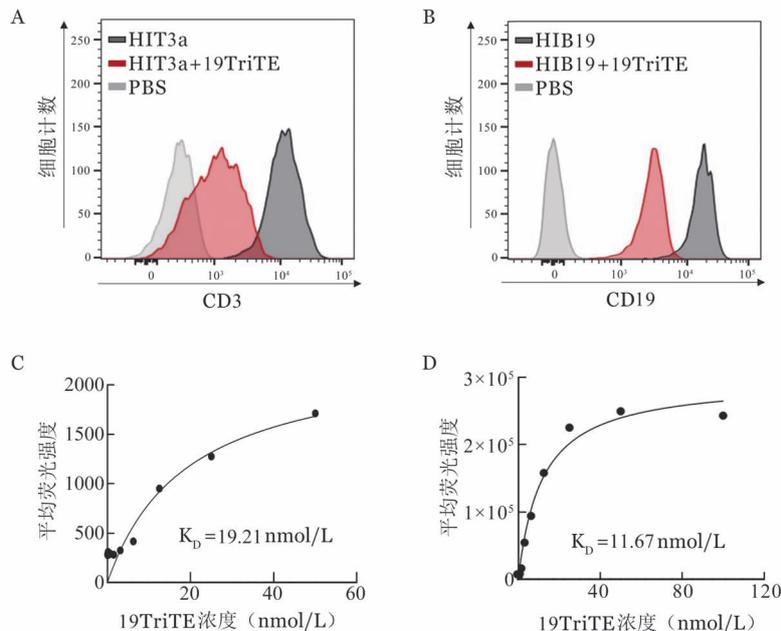
19TriTE融合蛋白与人T细胞共孵育,以PBS为对照组,置孵箱中培养,每隔2 d用counting beads计数,结果显示,19TriTE可以有效刺激T细胞增殖,培养至第12天时,T细胞绝对计数由初始 1×10^6 扩增至 7.4×10^7 ,增殖74倍(图3C)。

19TriTE融合蛋白(1 nmol/L)与CFSE标记的人



A: 19TriTE载体构建示意图; B: Western blot验证19TriTE的表达; C: SDS-PAGE电泳分析19TriTE纯度。M: Marker

图1 19TriTE的载体构建示意图及表达



A: 19TriTE与HIT3a竞争结合T细胞上的CD3抗原; B: 19TriTE与HIB19竞争结合Nalm6细胞上的CD19抗原; C: 19TriTE与CD3抗原亲和性分析(19TriTE-T细胞); D: 19TriTE与CD19抗原亲和性分析(19TriTE-Nalm6细胞)

图2 19TriTE结合特异性及亲和性分析

T细胞共孵育,4 d后,用流式细胞仪检测CFSE标记的T细胞的荧光变化。结果显示,与19TriTE融合蛋白共孵育的CFSE标记T细胞荧光强度随着增殖峰出现而下降(图3D),提示T细胞在19TriTE刺激下增殖、分裂,致CFSE荧光减弱。

四、19TriTE融合蛋白能够介导人T细胞对Nalm6细胞发挥特异性杀伤作用

以CD19⁺ Nalm6为靶细胞(图4A),人T细胞与Nalm6细胞按照效靶比10:1混合,加入不同浓度的19TriTE融合蛋白,共培养24 h,流式细胞仪及SnapGene软件分析靶细胞裂解率。结果显示,19TriTE融合蛋白能够介导T细胞杀伤CD19⁺的Nalm6细胞,且与19TriTE融合蛋白浓度呈正相关,浓度为10 nmol/L时,靶细胞裂解率达50%(图4B)

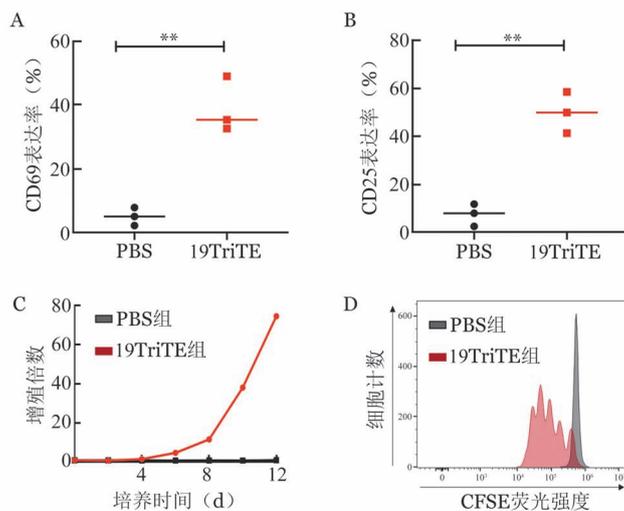
脱颗粒实验证实,在与CD19⁺ Nalm6细胞共培养4 h,19TriTE介导T细胞的激活效率与融合蛋白浓度呈正相关,浓度为10 nmol/L时,T细胞激活率

约25%(图4C)。

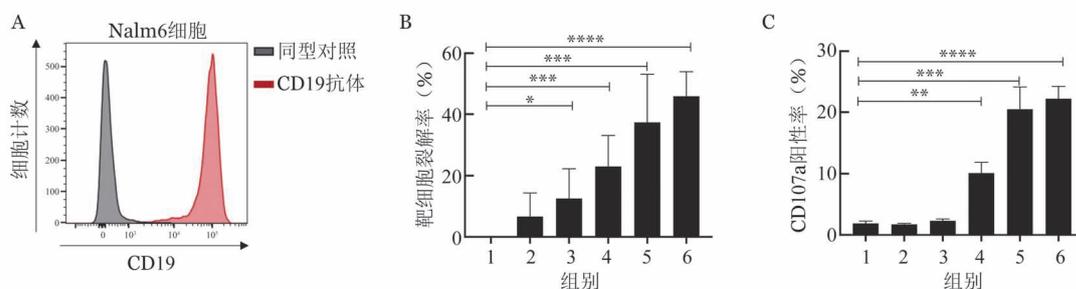
T细胞与过表达RFP的Nalm6细胞以效靶比10:1混合,加入10 nmol/L的19TriTE融合蛋白,共培养48 h,倒置荧光显微镜观察靶细胞红色荧光强度并拍照记录。结果显示,与PBS对照组相比,19TriTE能够介导T细胞对Nalm6-RFP细胞的特异性杀伤作用(图5A)。T细胞与Nalm6-Luciferase细胞以效靶比10:1混合,加入不同浓度的19TriTE融合蛋白,共培养48 h,用生物发光仪观察靶细胞生物发光并拍照记录,结果显示,19TriTE介导T细胞对Nalm6-Luciferase靶细胞有特异性杀伤作用且与剂量呈正相关(图5B)。

讨 论

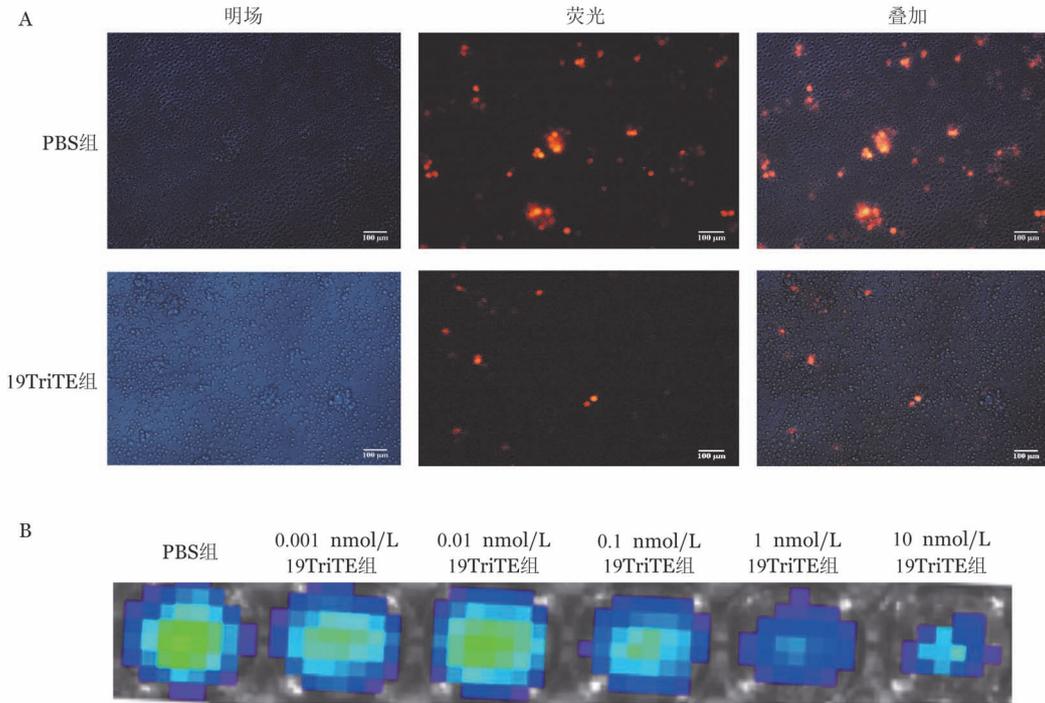
目前ALL的免疫治疗主要包括CAR-T疗法及抗体疗法,其中CD19 CAR-T细胞在B-ALL治疗中取得了突破性进展。然而,CAR-T细胞需要针对每



A: 19TriTE促进T细胞CD69表达;B: 19TriTE促进T细胞CD25表达;C: 19TriTE促进T细胞增殖;D: 19TriTE促进T细胞分裂
图3 19TriTE对T细胞的活化及增殖作用(* $P < 0.01$)



A: Nalm6细胞CD19抗原表达;B: 19TriTE促进T细胞对Nalm6细胞的裂解作用,实验重复5次;C: 19TriTE促进T细胞激活水平,实验重复3次
图4 19TriTE促进T细胞对CD19阳性Nalm6细胞的裂解作用及T细胞激活水平(组1为PBS组,组2~组6分别为0.001、0.01、0.1、1、10 nmol/L 19TriTE组; * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$)



A: 在 10 nmol/L 浓度, 共培养 48 h 时, 19TriTE 可以显著介导 T 细胞杀伤 Nalm6-RFP 细胞; B: 共培养 48 h, 19TriTE 可以显著介导 T 细胞杀伤 Nalm6-Luciferase 细胞, 且与剂量呈正相关

图 5 荧光显微镜(A)及生物发光实验(B)观察靶细胞残留

例患者单独制备,且制备周期长、成本高,而抗体则可以做成一种可工业化生产的即用型产品,从而节省治疗的时间和成本。本研究我们制备的 19TriTE 融合蛋白或可作为一种血液肿瘤即用型治疗选择。

CD19 抗原是一种表达于正常和绝大多数 B 细胞恶性肿瘤表面的膜蛋白,和 B 细胞肿瘤的发展紧密相关^[14]。目前很多研究将 CD19 做为主要靶点,如 CD19 CAR-T、靶向 CD19 的融合蛋白或双特异性 T 细胞衔接器^[7,10,15]。本实验室前期制备的 CD19 CAR-T 在临床试验中疗效较好^[16]。以 CD19 抗原为靶点,我们构建了新型 19TriTE 融合蛋白,通过特异性竞争结合实验及亲和常数测定实验,验证了该 19TriTE 融合蛋白可以特异性结合肿瘤细胞 CD19 抗原,为其发挥抗肿瘤作用奠定了基础。

T 细胞活化是其发挥免疫应答的核心,初始 T 细胞的激活需要双重信号。通常, T 细胞借助 TCR 识别 MHC 分子结合的抗原肽(pMHC)之后,通过 TCR-CD3 复合体传递抗原识别信号(第一信号);以 CD28 为主的 T 细胞表面受体分子,识别相应配体 B7-1(CD80)和 B7-2,传递共刺激信号(第二信号)^[8]。本实验室前期构建的融合蛋白 CD19scFv/

CD80 抗白血病作用研究结果证实, CD80 融合蛋白可以促进 T 细胞杀伤肿瘤细胞的作用^[10]。在此基础上我们构建了新型 19TriTE 融合蛋白,结果显示该融合蛋白为 T 细胞提供了两个活化信号,确保 T 细胞活化并促进 T 细胞杀伤肿瘤细胞的作用。

我们构建的新型融合蛋白体外实验已经证实可以发挥对肿瘤细胞的杀伤作用,联合使用 19TriTE 和本实验室研发的同靶点的 CD19 CAR-T,是否可以增进疗效,有待进一步研究。此外,已有研究证实 CAR-T 和抗体药物,在治疗时会出现因为 T 细胞过度激活而引发细胞因子释放综合征,从而引起机体发热甚至多器官功能衰竭^[17-20]。本研究制备的 19TriTE 新型融合蛋白,在未来的应用中也可能要面对此问题。为此,我们将探索更多的结构、抗体使用的方式及剂量条件,寻求更安全的方式。

综上,我们研发了一种新的 19TriTE 融合蛋白,通过真核表达系统成功表达了有活性的该融合蛋白。该融合蛋白可以活化 T 细胞,并促进 T 细胞的体外增殖。能够同时与 CD19 阳性靶细胞及 T 细胞结合,促使 T 细胞发挥杀伤肿瘤细胞的作用。体外实验已验证其对 CD19 阳性肿瘤细胞的杀伤作用,

为治疗B细胞血液肿瘤提供新策略,也为针对其他肿瘤细胞靶点的多功能融合蛋白的研究提供参考。

参考文献

- [1] Paul S, Kantarjian H, Jabbour EJ. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia[J]. Mayo Clin Proc, 2016, 91(11):1645-1666. DOI: 10.1016/j.mayocp.2016.09.010.
- [2] Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children[J]. N Engl J Med, 2015, 373(16):1541-1552. DOI: 10.1056/NEJMra1400972.
- [3] Goldstone AH, Richards SM, Lazarus HM, et al. In adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective than conventional consolidation/maintenance chemotherapy in all patients: final results of the International ALL Trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993)[J]. Blood, 2008, 111(4):1827-1833. DOI: 10.1182/blood-2007-10-116582.
- [4] Phelan KW, Advani AS. Novel Therapies in Acute Lymphoblastic Leukemia[J]. Curr Hematol Malig Rep, 2018, 13(4):289-299. DOI: 10.1007/s11899-018-0457-7.
- [5] Hodby KA, Marks DI. Recent Advances in the Management of Acute Lymphoblastic Leukemia[J]. Curr Treat Options Oncol, 2020, 21(3):23. DOI: 10.1007/s11864-020-0712-8.
- [6] Kantarjian H, Stein A, Gökbuğut N, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia[J]. N Engl J Med, 2017, 376(9):836-847. DOI: 10.1056/NEJMoa1609783.
- [7] Goebeler ME, Bargou R. Blinatumomab: a CD19/CD3 bispecific T cell engager (BiTE) with unique anti-tumor efficacy[J]. Leuk Lymphoma, 2016, 57(5):1021-1032. DOI: 10.3109/10428194.2016.1161185.
- [8] 周光炎. 免疫学原理(第四版)[M]. 北京科学出版社: 2018.
- [9] Li W, Fan D, Yang M, et al. Cytosine arabinoside promotes cytotoxic effect of T cells on leukemia cells mediated by bispecific antibody[J]. Hum Gene Ther, 2013, 24(8):751-760. DOI: 10.1089/hum.2013.051.
- [10] 陈礼平, 饶青, 陈森, 等. 新融合蛋白CD19scFv/CD80抗白血病作用研究[J]. 中国科学(生命科学), 2017, 47(12):1397-1403. DOI: 10.1360/N052017-00265.
- [11] Vallera DA, Felices M, McElmurry R, et al. IL15 Trispecific Killer Engagers (TriKE) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing Persistence, In Vivo Expansion, and Enhanced Function[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(14):3440-3450. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2710.
- [12] Wu L, Seung E, Xu L, et al. Trispecific antibodies enhance the therapeutic efficacy of tumor-directed T cells through T cell receptor co-stimulation[J]. Nature Cancer, 2019, 1(1): 86-98. DOI: 10.1038/s43018-019-0004-z. (<https://www.nature.com/articles/s43018-019-0004-z>).
- [13] Gauthier L, Morel A, Anceriz N, et al. Multifunctional Natural Killer Cell Engagers Targeting Nkp46 Trigger Protective Tumor Immunity[J]. Cell, 2019, 177(7):1701-1713.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2019.04.041.
- [14] Ajina R, Aldeghaither D, Jablonski S, et al. 6.02 - Cancer Immunotherapy // Chackalamannil S, Rotella D, Ward SE, et al. Comprehensive Medicinal Chemistry III[M]. Oxford: Elsevier, 2017: 32-65.
- [15] Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients[J]. J Clin Invest, 2016, 126(6):2123-2138. DOI: 10.1172/JCI85309.
- [16] 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]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1):122. DOI: 10.1186/s13045-020-00953-8.
- [17] Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, et al. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2019, 25(4):625-638. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.12.758.
- [18] Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia[J]. N Engl J Med, 2013, 368(16):1509-1518. DOI: 10.1056/NEJMoa1215134.
- [19] Rosenbaum L. Tragedy, Perseverance, and Chance - The Story of CAR-T Therapy[J]. N Engl J Med, 2017, 377(14):1313-1315. DOI: 10.1056/NEJMp1711886.
- [20] Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412[J]. N Engl J Med, 2006, 355(10):1018-1028. DOI: 10.1056/NEJMoa063842.

(收稿日期:2020-12-17)

(本文编辑:刘爽)