

PD-1 抑制剂 Nivolumab 对 CD19 嵌合抗原受体 T 细胞体外增殖和杀伤活性的影响

朱海波 邓琦 张蕊 江嫣雨 孟娟霞 赵明峰 李玉明 崔蕊

【摘要】 目的 评估程序性细胞死亡受体1(PD-1)抑制剂Nivolumab对CD19-CAR-T细胞体外增殖和杀伤活性的影响。方法 收集5例外周血PD-1高表达恶性淋巴瘤患者的外周血T细胞制备CD19-CAR-T细胞,在培养第8天加入终浓度分别为72、36、18 μg/ml的Nivolumab,同时设患者T细胞联合72 μg/ml Nivolumab及正常人CD19-CAR-T细胞为对照,采用CCK-8法、LDH细胞毒性检测、ELISA法比较各组的增殖活性、杀伤活性及炎症因子水平。结果 ①PD-1高表达患者CD19-CAR-T细胞转染率与正常人接近[(32.80±7.22)%对(35.10±5.84)%], $t = -0.554$, $P = 0.593$]。②72 μg/ml Nivolumab联合CD19-CAR-T细胞不影响其增殖,但联合应用24、48 h对Pfeiffer细胞的杀伤率均优于单用患者CD19-CAR-T细胞及患者来源T细胞+72 μg/ml的Nivolumab(P 值均 < 0.001),其中48 h时各组的杀伤率分别为(71.61±9.50)%、(6.77±1.26)%、(15.33±4.11)%。72、36 μg/ml Nivolumab联合来源CD19-CAR-T细胞对Pfeiffer细胞的杀伤率差异无统计学意义(P 值分别为0.281、0.267),二者均高于患者来源CD19-CAR-T细胞+18 μg/ml Nivolumab组(P 值均 < 0.001)。③不同剂量Nivolumab联合患者来源CD19-CAR-T细胞,不影响炎症因子IFN- γ 、TNF- α 水平(P 值均 > 0.05)。结论 终浓度为36 μg/ml的Nivolumab与CD19-CAR-T细胞联合应用,可在减轻药物毒副作用同时增强CD19-CAR-T细胞的杀伤活性。

【关键词】 PD-1抑制剂; 嵌合抗原受体; 淋巴瘤

基金项目:天津市卫生局科技基金(15KG135);天津市卫计委重点攻关项目(16KG110);天津市应用基础与前沿技术研究计划(15JCQJNC45500)

Effect of PD-1 inhibitor Nivolumab on the proliferation and cytotoxicity of anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells Zhu Haibo, Deng Qi, Zhang Rui, Jiang Yanyu, Meng Juanxia, Zhao Mingfeng, Li Yuming, Cui Rui. Department of Hematology, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China
Corresponding author: Deng Qi, Email: kachydeng@126.com

【Abstract】 Objective To Evaluation the effect of PD-1 inhibitor Nivolumab on the proliferation and cytotoxicity of anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells (CD19-CAR-T) *in vitro*. **Methods** Five patients with high PD-1 expression in peripheral blood and five healthy volunteers were selected. These peripheral blood mononuclear cells were used as the source of T cells to prepare CD19-CAR-T cells. Different doses (72, 36, 18 μg/ml) of Nivolumab was added on day 8 to the culture medium. Patient T cells incubated with 72 μg/ml Nivolumab and CD19-CAR-T cells of healthy volunteers were used as controls. CCK-8, lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay and ELASA were used to detect the proliferation capacity, the specific cytotoxicity and the inflammatory factor secretion. **Results** ①T cells from patients with high expression of PD-1 as the source of CD19-CAR-T cells did not affect transfection rate compared with that of healthy volunteers [(32.80±7.22)% vs (35.10±5.84)%], $t = -0.554$, $P = 0.593$]. ②Incubation of CD19-CAR-T cells with 72 μg/ml Nivolumab did not affect CD19-CAR-T cell proliferation, but its cytotoxicity was significantly higher than that of CD19-CAR-T cells alone or patients' T cells +72 μg/ml Nivolumab (all $P < 0.001$), there was no significant difference in the killing activity between the 72 μg/ml and 36 μg/ml Nivolumab treated CD19-CAR-T cells on Pfeiffer cells ($P = 0.281$, 0.267 , respectively), and they were all higher than those of 18 μg/ml Nivolumab treated CD19-CAR-T cells (all $P < 0.001$). ③ Different doses of PD-1 inhibitor Nivolumab combined with CD19-CAR-T cells does not affect the

secretion of IFN- γ and IFN- α (all $P > 0.05$). **Conclusion** Combination of 36 $\mu\text{g/ml}$ PD-1 inhibitor and CD19-CAR-T cells could reduce the drug toxicity and enhance the cytotoxicity.

【Key words】 PD-1 inhibitor; Chimeric antigen receptor; Lymphoma

Fund program: Science and Technology Fund of Tianjin Municipal Health Bureau (15KG135); Key Projects of Tianjin Municipal Health Planning Commission (16KG110); and Frontier Technology Research Project(15JCQNJC45500)

嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor engineered T cell, CAR-T细胞)治疗已成为最具应用前景的肿瘤免疫治疗方法之一,但程序性死亡因子1受体(programmed cell death-1, PD-1)/程序性死亡受体-配体1(programmed cell death-Ligand 1, PD-L1)免疫抑制性途径的存在削弱了其治疗效果,通过PD-1抑制剂进行抗体封闭可增强CAR-T细胞的杀伤活性^[1]。PD-1/PD-L1信号通路在削弱抗肿瘤免疫应答方面发挥重要作用^[2-3],靶向这一途径的检查点治疗如PD-1抗体Nivolumab、Pembrolizumab及PD-L1抗体BMS-936559、MEDI4736已取得突破性进展^[4-5]。PD-1抑制剂与CAR-T细胞联合应用,可否进一步提高疗效,我们对此开展了相关的体外研究,现报道如下。

材料与方 法

1. 细胞及主要试剂:人肾上皮细胞系293T细胞、弥漫大B细胞淋巴瘤细胞株Pfeiffer细胞均购自美国模式培养物集存库(ATCC),大肠杆菌感受态细胞株DH5a细胞购自宝生物工程(大连)有限公司。无内毒素质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。Lenti-Pac慢病毒颗粒包装试剂盒购自上海伯易生物科技有限公司。磁珠分选试剂盒购自德国美天旎生物技术有限公司。CART-EST-19检测试剂盒购自上海近岸科技有限公司。LDH细胞毒性检测试剂盒、ELISA检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。CCK-8细胞增殖-毒性检测试剂盒购自日本同仁化学研究所。第三代(共刺激分子为CD28和4-1BB)抗CD19 CAR质粒购自美国Creative Biolabs公司。CD19单克隆抗体购自美国BD公司。PD-1抑制剂Nivolumab购自美国百时美施贵宝公司。

2. 质粒转化、扩增、提取:DH5a菌株置于冰上解冻,加入抗CD19 CAR质粒,冰中放置30 min,42℃放置30~60 s,再次置于冰中2~3 min。加入37℃预温的SOC培养基,振荡培养1 h。取适量菌液,三区划菌,过夜培养后挑取单个白色菌落扩增培养12~16 h。取500 μl 培养后的菌液加入SOC培养基

中,37℃振荡培养12~16 h。采用无内毒素质粒提取试剂盒提取质粒后进行定量。

3. 慢病毒包装、转染及滴度测试:转染前2 d在平板上接种 $(1.3 \sim 1.5) \times 10^6$ 293T细胞。采用Lenti-Pac慢病毒颗粒包装试剂盒包装慢病毒并转染至293T细胞,转染48 h后收集病毒颗粒,提取病毒RNA,采用real-time PCR检测病毒滴度。用无血清的DMEM培养基悬浮病毒沉淀、分装,-80℃保存。

4. T细胞制备及慢病毒感染:收集5例外周血PD-1高表达恶性淋巴瘤患者、5例健康志愿者的外周血标本,作为本实验CAR-T细胞培养的T细胞来源,采用淋巴细胞分离液提取单个核细胞。采用磁珠分选试剂盒从提取的单个核细胞中富集CD3⁺T细胞。获得的细胞沉淀用含有IL-2、谷氨酰胺的T细胞专用培养基培养,培养第4天接种慢病毒,培养第8天加入Nivolumab培养第12天收获CAR-T细胞。

5. 实验分组:(1)5例PD-1高表达患者来源CD19-CAR-T细胞;(2)5例PD-1高表达患者来源CD19-CAR-T细胞联合终浓度分别为72、36、18 $\mu\text{g/ml}$ Nivolumab;(3)5例PD-1高表达患者来源T细胞联合终浓度为72 mg/L的Nivolumab;(4)5例健康志愿者CD19-CAR-T细胞。

6. CD19-CAR-T细胞转染效率的检测:按CART-EST-19检测试剂盒说明书进行操作,上流式细胞仪检测CD19-CAR-T细胞的转染效率。

7. CD19-CAR-T细胞体外增殖能力的检测:将收获的CD19-CAR-T细胞于含10% FBS的RPMI 1640培养基,37℃、饱和湿度、5%CO₂培养箱中培养。按CCK-8细胞增殖-毒性检测试剂盒说明书进行操作,培养0、24、48 h时采用酶标仪检测450 nm处吸光度(A)值,计算其增殖能力。共5例患者,每组设3个复孔,实验重复3次。

8. 体外杀伤活性的检测:以Pfeiffer细胞为靶细胞(细胞计数为 2×10^5),各组T细胞作为效应细胞进行实验,效靶比为4:1。按LDH细胞毒性检测试剂盒说明书进行操作,共培养0、24、48 h时采用酶标仪检测490 nm处A值,计算其杀伤率。共5例患者,

每组设3个复孔,实验重复3次。

$$\text{杀伤率}(\%) = \frac{A_{\text{效应细胞自发释放}} - A_{\text{靶细胞自发释放}}}{A_{\text{效应细胞最大释放}} - A_{\text{靶细胞自发释放}}} \times 100\%$$

9. CD19-CAR-T细胞引起靶细胞炎症因子释放的检测:按ELISA检测试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪检测450 nm处A值。共5例患者,每组设3个复孔,实验重复3次。

10. 统计学处理:实验数据均采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,两组间比较采用独立样本的t检验,各时点的组间比较行单因素方差分析,两两比较采用q检验,双侧P < 0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. CD19-CAR-T细胞的转染效率:5例患者平均外周血T细胞PD-1表达率为(62.3±15.67)%,其中1例患者PD-1表达率达到82.95%。CD19-CAR-T细胞病毒滴度为3×10⁸ TU/ml,5例PD-1高表达患者外周血T来源CD19-CAR-T细胞的转染率为(32.80±7.22)%,与健康供者T细胞来源CD19-CAR-T细胞转染效率[(35.10±5.84)%]相近,差异无统计学意义(t = -0.554, P = 0.593)。

2. Nivolumab对CD19-CAR-T细胞增殖能力的影响:加入不同浓度Nivolumab的患者CD19-CAR-T细胞,与不加入Nivolumab的患者和健康志愿者CD19-CAR-T细胞组间比较,在培养0、24、48 h时细胞增殖率差异均无统计学意义(F值分别为1.506、2.143、2.576, P值分别为0.250、0.126、0.080)(图1),PD-1高表达患者CD19-CAR-T细胞中加入终浓度分别为72、36、18 μg/ml的Nivolumab培养48 h时,细胞增殖率分别为(81.20±14.01)%、(93.56±

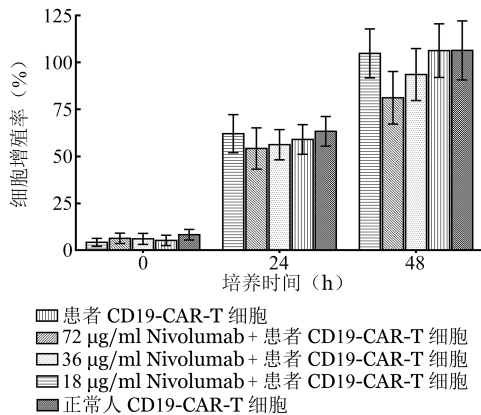


图1 不同浓度Nivolumab对PD-1高表达患者CD19嵌合抗原受体T细胞(CD19-CAR-T细胞)增殖的影响(共5份标本,每组设3个复孔,实验重复3次)

13.85)%、(106.32±14.28)%,未加入Nivolumab患者和健康供者CD19-CAR-T细胞收获后培养48 h时,细胞增殖率分别为(104.84±13.05)%、(106.43±15.72)%。

3. Nivolumab联合CD19-CAR-T细胞对Pfeiffer细胞体外杀伤活性的影响:分别比较各组效靶细胞共培养0、24、48 h时对Pfeiffer细胞的杀伤率,PD-1高表达患者CD19-CAR-T+72 μg/ml Nivolumab培养48 h时,杀伤率为(71.61±9.50)%;患者T细胞+72 μg/ml Nivolumab培养48 h时,杀伤率为(15.33±4.11)%;单用患者CD19-CAR-T细胞培养48 h时,杀伤率为(6.77±1.26)%;正常人CD19-CAR-T细胞培养48 h时,杀伤率为(79.73±11.01)%。共培养0 h时差异无统计学意义(F = 0.811, P = 0.512),共培养24、48 h时差异均有统计学意义(F值分别为51.808、28.245, P值均 < 0.001)。行两两比较,患者CD19-CAR-T细胞+72 μg/ml Nivolumab联合应用与正常人CD19-CAR-T细胞对Pfeiffer细胞的杀伤率在24、48 h时差异均无统计学意义(P值分别为0.347、0.417),联合应用在24、48 h时对Pfeiffer细胞的杀伤率均高于单用患者CD19-CAR-T细胞(P值均 < 0.001),亦均优于患者T细胞+72 μg/ml Nivolumab(P值均 < 0.001)(图2)。

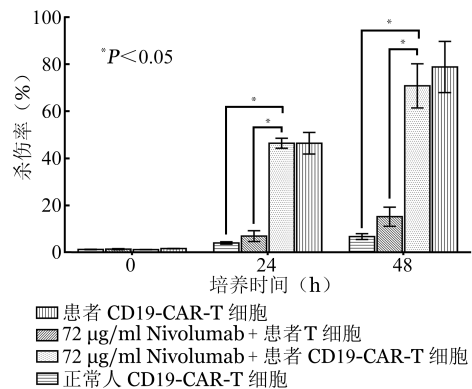


图2 72 μg/ml Nivolumab联合PD-1高表达患者CD19嵌合抗原受体T细胞(CD19-CAR-T细胞)对Pfeiffer细胞杀伤活性的影响(共5份标本,每组设3个复孔,实验重复3次)

4. 联合不同剂量的Nivolumab对Pfeiffer细胞体外杀伤活性的影响:PD-1高表达患者CD19-CAR-T细胞+终浓度分别为72、36、18 μg/ml Nivolumab三组分别比较效靶细胞共培养0、24、48 h时其对Pfeiffer细胞的杀伤率,共培养48 h时,杀伤率分别为(71.61±9.50)%、(75.28±6.41)%、(43.74±8.35)%。共培养0 h时差异无统计学意义(F =

0.211, $P=0.814$), 共培养 24、48 h 时差异均有统计学意义 (F 值分别为 43.059、53.902, P 值均 <0.001)。行两两比较, 患者 CD19-CAR-T 细胞 + 72 $\mu\text{g/ml}$ Nivolumab 与患者 CD19-CAR-T 细胞 + 36 $\mu\text{g/ml}$ Nivolumab 联合应用对 Pfeiffer 细胞的杀伤率在 24、48 h 时差异均无统计学意义 (P 值分别为 0.281、0.267), 二者均高于患者 CD19-CAR-T 细胞 + 18 $\mu\text{g/ml}$ Nivolumab (P 值均 <0.001) (图 3)。

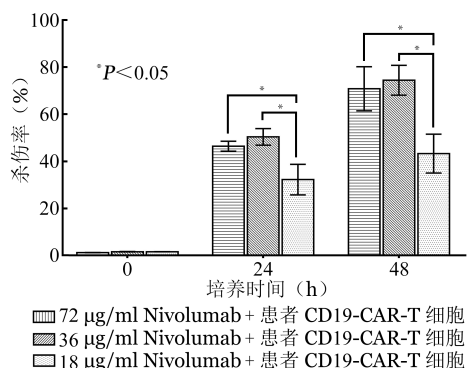


图 3 不同浓度 Nivolumab 联合 PD-1 高表达患者 CD19 嵌合抗原受体 T 细胞 (CD19-CAR-T 细胞) 对 Pfeiffer 细胞杀伤活性的影响 (共 5 份标本, 每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次)

5. Nivolumab 对 CD19-CAR-T 细胞炎症因子分泌水平的影响: PD-1 高表达 T 细胞来源 CD19-CAR-T 体外培养第 8 天加入不同浓度 Nivolumab, 与不加入 Nivolumab 的患者和正常人 CD19-CAR-T 相比, 共培养 0、24、48 h 时 IFN- γ 、TNF- α 水平差异均无统计学意义 (P 值均 >0.05)。PD-1 高表达患者 CD19-CAR-T 细胞加入终浓度分别为 72、36、18 $\mu\text{g/ml}$ 的 Nivolumab 培养 48 h 时, IFN- γ 水平分别为 (247.33 \pm 33.25)、(269 \pm 28.25)、(273 \pm 36.79) pg/ml, TNF- α 的分泌水平分别为 (656.33 \pm 35.23)、(676.67 \pm 50.27)、(664.12 \pm 82.65) pg/ml, 未加入 Nivolumab 患者和健

康供者 CD19-CAR-T 细胞收获后培养 48 h 时, IFN- γ 水平分别为 (256.33 \pm 39.24)、(281.67 \pm 28.00) pg/ml, TNF- α 水平分别为 (656.67 \pm 44.11)、(660.00 \pm 33.11) pg/ml (图 4)。

讨 论

针对于包括淋巴瘤、多发性骨髓瘤 (MM) 等恶性肿瘤患者 PD-1 高表达的 T 细胞, PD-1 抑制剂疗效显著^[6-8], 但很快肿瘤复燃, 大多数患者无法长期受益^[9]。CAR-T 细胞作为目前免疫治疗的另一个热门领域, 在 B 细胞恶性肿瘤的治疗上亦获得了令人鼓舞的临床疗效^[10-13]。在肿瘤的微环境中, 肿瘤细胞能够表达 PD-L1, 与 T 细胞表面的免疫卡控点 PD-1 结合后能通过对其的抑制性作用而促进肿瘤的免疫逃逸, 并阻止 T 细胞进入肿瘤区域或诱导进入肿瘤区域的 T 细胞凋亡, 进而削弱其治疗潜能^[14-15]。本研究我们尝试将抗 PD-1 抑制剂 Nivolumab 与 CAR-T 细胞治疗结合起来, 探索进一步提高疗效的可能性。

本研究结果显示 Nivolumab 不影响 CD19-CAR-T 细胞的增殖, 其联合患者 CD19-CAR-T 细胞对淋巴瘤细胞株 Pfeiffer 细胞的杀伤率明显高于 Nivolumab 或单用患者 CD19-CAR-T 细胞, 提示 Nivolumab 能显著增强 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性, 这与 Cherkassky 等^[16]、Suarez 等^[17]在胸膜间皮瘤、肾细胞癌方面的研究结论一致。Chong 等^[18]报道 1 例 CAR-T 细胞治疗失败的复发难治弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者, 应用 PD-1 抑制剂 Pembrolizumab 取得了较好的疗效, 提示 PD-1 通路可能在 CAR-T 细胞免疫治疗中起关键作用。我们收集 PD-1 高表达的患者 T 细胞, 作为本实验 CAR-T 细胞培养的 T 细胞来源, 与健康供者 T 细胞来源 CD19-CAR-T 细

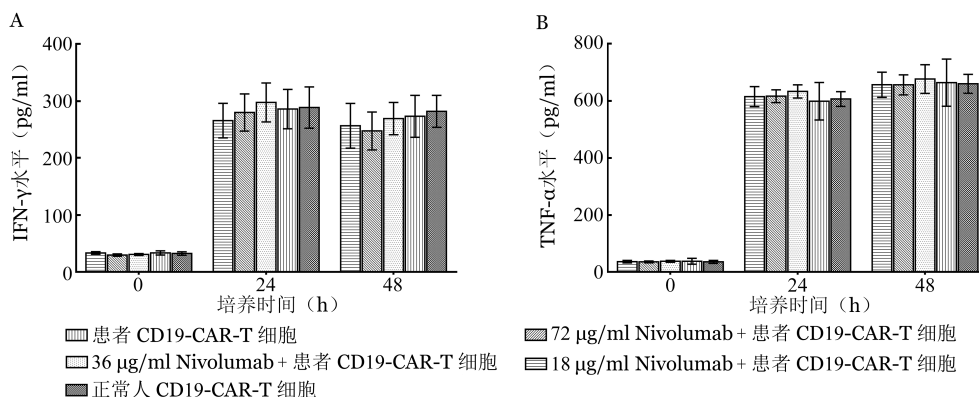


图 4 不同浓度 Nivolumab 对 PD-1 高表达患者 CD19 嵌合抗原受体 T 细胞 (CD19-CAR-T 细胞) 炎症因子 IFN- γ (A)、TNF- α (B) 分泌水平的影响 (共 5 份标本, 每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次)

胞相比, T细胞的PD-1高表达并不影响其转染率。有动物实验报道CAR-T细胞与PD-1抑制剂联合使用可提高CAR-T细胞疗效, 其方法为CAR-T细胞输注后给予一次PD-1抑制剂^[19], 本研究结果与之一致。

PD-1抑制剂虽取得了肯定的临床疗效, 但作用难以持久, 毒副作用也限制其应用, 且对于何时停药仍无定论, 我们为了减轻PD-1抑制剂联合CD19-CAR-T细胞治疗的毒副作用, 将PD-1高表达患者来源CD19-CAR-T细胞分别联合终浓度为72、36、18 μg/ml的Nivolumab, 其中CD19-CAR-T+36 μg/ml Nivolumab与CD19-CAR-T细胞+72 μg/ml Nivolumab以及健康供者来源CD19-CAR-T比较, 杀伤率差异无统计学意义。CD19-CAR-T+18 μg/ml Nivolumab组的杀伤活性低于36 μg/ml Nivolumab组, 提示36 μg/ml Nivolumab联合CD19-CAR-T细胞治疗, 可在减少Nivolumab毒副作用同时保证治疗效果, 提高了治疗安全性, 但如果进一步降低Nivolumab剂量可能无法保证治疗效果。

另外, CAR-T细胞释放的炎症因子对于CAR-T细胞在体内发挥清除肿瘤细胞的能力尤为重要^[20]。为了评估应用Nivolumab后对CAR-T细胞活化的影响, 我们检测了炎症因子IFN-γ和TNF-α水平, 结果提示不同剂量Nivolumab联合CD19-CAR-T细胞不影响CD19-CAR-T细胞的炎症因子分泌, 有良好的效果和安全性。

参考文献

- [1] John LB, Kershaw MH, Darcy PK. Blockade of PD-1 immunosuppression boosts CAR T-cell therapy [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(10): e26286.
- [2] Madorsky Rowdo FP, Baron A, Urrutia M, et al. Immunotherapy in Cancer: A Combat between Tumors and the Immune System; You Win Some, You Lose Some [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 127. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00127.
- [3] Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(127):127ra37. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003689.
- [4] Giri A, Walia SS, Gajra A. Clinical Trials Investigating Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2016, 11(4):297-305.
- [5] de Guillebon E, Roussille P, Frouin E, et al. Anti program death-1/anti program death-ligand 1 in digestive cancers [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2015, 7(8):95-101. DOI: 10.4251/wjgo.v7.i8.95.
- [6] Younes A, Santoro A, Shipp M, et al. Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(9): 1283-1294. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30167-X.
- [7] Armand P, Shipp MA, Ribrag V, et al. Programmed death-1 blockade with pembrolizumab in patients with classical Hodgkin lymphoma after brentuximab vedotin failure [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(31):3733-3739. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.3467.
- [8] Kwong YL, Chan TSY, Tan D, et al. PD1 blockade with pembrolizumab is highly effective in relapsed or refractory NK/T-cell lymphoma failing l-asparaginase [J]. *Blood*, 2017, 129(17): 2437-2442. DOI: 10.1182/blood-2016-12-756841.
- [9] Huang AC, Postow MA, Orlowski RJ, et al. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response [J]. *Nature*, 2017, 545(7652):60-65. DOI: 10.1038/nature22079.
- [10] Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias [J]. *Blood*, 2011, 118(18):4817-4828. DOI: 10.1182/blood-2011-04-348540.
- [11] Maus MV, Grupp SA, Porter DL, et al. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies [J]. *Blood*, 2014, 123(17):2625-2635. DOI: 10.1182/blood-2013-11-492231.
- [12] Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(16):1507-1517. DOI: 10.1056/NEJMoa1407222.
- [13] Garfall AL, Maus MV, Hwang WT, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(11):1040-1047. DOI: 10.1056/NEJMoa1504542.
- [14] Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224):224ra25. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
- [15] Jaspers JE, Brentjens RJ. Development of CAR T cells designed to improve antitumor efficacy and safety [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 178: 83-91. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.03.012.
- [16] Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management [J]. *Blood*, 2016, 127(26):3321-3330. DOI: 10.1182/blood-2016-04-703751.
- [17] Frey NV, Luger SM. How I treat adults with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2015, 126(5):589-596. DOI: 10.1182/blood-2014-09-551937.
- [18] Chong EA, Melenhorst JJ, Lacey SF, et al. PD-1 blockade modulates chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells: refueling the CAR [J]. *Blood*, 2017, 129(8):1039-1041. DOI: 10.1182/blood-2016-09-738245.
- [19] Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, et al. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8):3130-3144. DOI: 10.1172/JCI83092.
- [20] Cruz CR, Micklethwaite KP, Savoldo B, et al. Infusion of donor-derived CD19-redireted virus-specific T cells for B-cell malignancies relapsed after allogeneic stem cell transplant: a phase 1 study [J]. *Blood*, 2013, 122(17):2965-2973. DOI: 10.1182/blood-2013-06-506741.

(收稿日期:2017-12-24)

(本文编辑:刘爽)