

一种新的高亲和力的人源化抗 CD19 CAR-T 细胞的构建及体外功能验证

张常晓 程海 韩笑 齐昆明 陈伟 吴庆运 曹江 徐开林

【摘要】 目的 构建人源化抗 CD19 嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T),通过体外实验验证其杀伤白血病细胞的能力。**方法** 将人 CD19 的鼠源抗体(FMC63)进行了人源化改造,获得高亲和力的人源化 CD19 抗体;构建携带人源化 CD19 CAR 慢病毒载体,感染 T 细胞获得人源化 CD19 CAR-T 细胞(hCART19);按不同效靶比将效应细胞[hCART19、未转染的 T 细胞(阴性组)及对照病毒转染的 T 细胞(对照组)]及靶细胞(CHO-K1-CD19 及 Raji 细胞)混合培养,LDH 释放实验及 ELISA 法检测 hCART19 杀伤白血病细胞的能力及细胞因子释放水平;白血病小鼠模型检测 hCART19 的杀瘤效果。**结果** LDH 释放实验证实随着效靶比的不断增加,对靶细胞的杀伤率逐渐增加,当效靶比为 10:1 时 hCART19 组的杀伤率最大,在 Raji 细胞中为(87.56±1.99)%,明显高于阴性组[(19.31±1.16)%]及对照组[(21.35±1.19)%](P 值均 <0.001)。ELISA 法检测显示 Raji 细胞作为靶细胞时,hCART19 组 IL-2 水平[(10.56±0.88)pg/ml]及 IFN- γ [(199.02±12.66)pg/ml]较阴性组[IL-2:(3.55±0.26)pg/ml;IFN- γ :(37.63±0.85)pg/ml]及对照组[IL-2:(2.92±0.32)pg/ml;IFN- γ :(52.07±3.33)pg/ml]明显升高(P 值均 <0.001)。以上实验在 CHO-K1-CD19 细胞作为靶细胞时也出现了相似的结果。给予白血病小鼠模型尾静脉分别注射 hCART19、对照病毒转染的 T 细胞及未转染的 T 细胞,结果显示 hCART19 组小鼠存活时间 >40 d,另外两组小鼠在 20~30 d 全部死亡,差异有统计学意义($\chi^2=11.73, P=0.008$)。**结论** 成功构建了具有抗白血病活性的人源化 CD19 CAR-T 细胞,为下一步的临床研究奠定了基础。

【关键词】 嵌合抗原受体 T 细胞; CD19; 人源化抗体; 白血病

基金项目:国家自然科学基金(81470303);江苏省社会发展重点项目(BE2017639);中国博士后基金(2016M591928);徐州市社会发展计划(KC16SY148)

Construction and in vitro verification of a new humanized anti-CD19 CAR-T cells with high affinity Zhang Changxiao, Cheng Hai, Han Xiao, Qi Kunming, Chen Wei, Wu Qingyun, Cao Jiang, Xu Kailin. Department of Hematology, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, China

Corresponding author: Cao Jiang, Email: zimu05067@163.com

【Abstract】 Objective To construct humanized anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells and investigate its ability to kill leukemia cells in vitro and in vivo. **Methods** Humanized anti-human CD19 antibody with a high affinity was obtained based on mouse anti-human CD19 antibody (FMC63). Humanized CD19 CAR-T cells (hCART19) were constructed through transfection of lentivirus carrying a CAR sequence of humanized anti-CD19 scFv into human peripheral CD3⁺ T cells. The ability of hCART19 to kill leukemia cells and secrete cytokines was detected by LDH release assay and ELISA. The in vivo tumor-killing effect of hCART19 was evaluated in a leukemia mouse model. **Results** Several different humanized CD19 single-chain antibodies which were constructed by IMGT database were expressed in the eukaryotic expression vector and purified followed by acquiring humanized CD19 antibody (Clone H3L2) with similar binding ability to FMC63. Humanized CD19 CAR lentivirus vector was constructed and transfected into T cells to obtain hCART19 cells. The LDH release experiment confirmed that the killing rate of target cells was increased gradually along with the increased E/T ratio. When the ratio of E/T was

10:1, the killing rate of target cells by hCART19 reached a maximum. When Raji cells were used as target cells, the hCART19 cells group had a significantly higher kill rate [(87.56±1.99)%] than the untransduced T cells group [(19.31±1.16)%] and the control virus transduced T cells group [(21.35±1.19)%] ($P < 0.001$). ELISA analysis showed that the secretion of IL-2 [(10.56±0.88)pg/ml] and IFN- γ [(199.02±12.66)pg/ml] in the hCART19 cells group were significantly higher than those in the untransduced T cells group [IL-2: (3.55±0.26) pg/ml; IFN- γ : (37.63±0.85) pg/ml] and the control virus transduced T cells group [IL-2: (2.92±0.32) pg/ml; IFN- γ : (52.07±3.33) pg/ml] ($P < 0.001$). The above experiments also showed similar results when CHO-K1-CD19 cells were used as target cells. Moreover, in a human leukemia xenograft animal model, the results showed that mice in the untransduced T cells group and the control virus transduced T cells group all died within 20 to 30 days, and the hCART19 cell group survived > 40 days, which was more than the survival time of the other two groups of mice. The difference was statistically significant ($\chi^2 = 11.73, P = 0.008$). **Conclusion** Humanized CD19 CAR-T cells with anti-leukemic activity have been successfully constructed, which will lay a foundation for clinical studies in the future.

【Key words】 Chimeric antigen receptor T cell; CD19; Humanized antibody; Leukemia

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81470303); Jiangsu Province Social Development Key Projects (BE2017639); China Postdoctoral Science Foundation funded project (2016M591928); Xuzhou Science and Technology Plan Projects (KC16SY148)

CAR-T疗法是目前最有前景的肿瘤免疫治疗技术之一^[1-2]。尽管全球已有多项针对实体肿瘤细胞表面分子CAR-T的研究报道,但其临床试验的结果仍不尽人意^[3-5]。而在血液肿瘤领域,多项临床试验均证实CAR-T疗法可有效治疗多种难治复发的B细胞恶性血液病,如急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)、慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤等^[6-9]。现有数据显示抗CD19 CAR-T治疗难治复发B-ALL患者完全缓解(CR)率为70%~90%^[10]。白血病细胞的消退与CAR-T细胞的增殖水平及其在血液中的存活时间存在密切相关。而ALL患者体内的CAR-T细胞消失常伴随着正常B细胞的恢复,并且部分患者出现了CD19⁺白血病的复发。多种机制可能造成体内CAR-T细胞的失活,其中之一就是针对CAR结构中来源于鼠源单链抗体(scFv)的,与抗原特异性结合的表位机体产生HLA限制性T细胞介导的免疫应答。利用人源化的scFv有望减低CAR的免疫原性从而改善CAR-T细胞的存活时间并且增强CAR-T的治疗效果。我们针对靶向人CD19的鼠源抗体(FMC63)进行了人源化改造,进而构建了高亲和力的人源化抗CD19 CAR-T细胞,通过体外杀伤实验及动物模型验证其杀伤白血病细胞的作用,现报道如下。

材料与amp;方法

一、材料和试剂

SPF级NOD/SCID小鼠,6~8周龄,由南京生物医药研究院提供;FACS Calibur流式细胞仪为美国BD公司产品;淋巴细胞分离液、EasySep磁极购自

美国Stem Cell公司;Dynabeads Human T-Expander CD3/CD28、CHO-S细胞购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;X-Vivo 15无血清培养基购自瑞士Lonza公司;Polybrene购自美国Santa Cruz公司;PE标记的抗人IgG抗体、PerCP标记的抗人CD3抗体、APC标记的抗人CD19抗体均购自美国BD公司;IL-2、IL-7、IL-15购自上海普欣生物技术有限公司;人IL-2及IFN- γ ELISA检测试剂盒购自美国R&D公司;乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Burkitt淋巴瘤细胞系Raji细胞购自美国菌株保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC);Lenti-EF1a质粒、pFUSE-hIgG1-FC2质粒、表达外源人CD19蛋白的CHO-K1细胞(CHO-K1-CD19)及293T细胞为本实验室保存。

二、实验方法

1. 人源化CD19抗体的构建:对FMC63鼠源抗体重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)序列进行分析,获取其中的互补决定区(CDR)序列信息。通过国际免疫遗传学数据库(IMG T)比对分析,选择与鼠抗序列相似度最高的人源化抗体框架区,将鼠抗CDR区直接放入人源化抗体框架区。合成人源化的抗体VH和VL序列,并亚克隆至scFv表达载体pFUSE-hIgG1-FC2中,瞬时转染CHO-S细胞,并使用Protein A柱子纯化scFv。

2. 流式细胞术(FCM)检测人源化CD19 scFv与靶蛋白的结合能力:1×10⁶ CHO-K1-CD19与10 μ g人源化scFv室温孵育30 min,加入2 μ g/ml的PE标记的抗人IgG抗体,FCM检测抗体与CD19蛋白的

结合能力。

3. 携带人源化CD19 CAR慢病毒的制备:选择经FCM鉴定的人源化CD19 scFv的VH和VL序列,与人CD8跨膜区、CD8铰链区、4-1BB、CD3 ζ 、T2A-EGFRt等序列顺序合成,形成人源化CD19 CAR结构,亚克隆至Lenti-EF1a质粒,按三质粒包装系统操作流程包装携带人源化CD19 CAR的重组慢病毒载体^[11],高速离心后-80℃保存。以Lenti-EF1a空质粒包装的慢病毒载体作为对照病毒。

4. 人源化CD19 CAR-T细胞(hCART19)的产生:抽取健康志愿者外周血10 ml,经淋巴细胞分离液密度梯度离心获取单个核细胞(PBMC),利用磁珠分选CD3⁺T细胞,经CD3/CD28磁珠刺激24 h,按感染复数(MOI)=5加入携带人源化CD19 CAR的重组慢病毒及对照病毒,定期换液培养,7~10 d后获得hCART19及对照病毒转染的T细胞,FCM检测病毒转染效率。

5. 体外实验评价hCART19杀伤能力及细胞因子释放能力:以表达CD19抗原的CHO-K1-CD19及Raji细胞作为靶细胞(细胞计数为 2×10^5),未转染的T细胞(阴性组)、对照病毒转染的T细胞(对照组)及hCART19作为效应细胞,按不同效靶比(0.5:1、1:1、2:1、5:1、10:1)将效应细胞及靶细胞混合培养,按LDH细胞毒性检测试剂盒说明书进行操作,用酶标仪检测490 nm处吸光度(A)值,计算细胞杀伤率。同时取上清利用ELISA法检测各组细胞的IL-2及IFN- γ 分泌能力。

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

6. 白血病小鼠模型评价hCART19杀伤能力:取15只6~8周龄的NOD/SCID小鼠,每只小鼠尾静脉注射 1×10^6 Nalm6细胞。将15只小鼠随机分为3组,每组5只,分别为阴性组、对照组及hCART19组。在输注Nalm6细胞1周后各组小鼠分别给予尾静脉注射 1×10^6 个未转染的T细胞、对照病毒转染的T细胞或hCART19。每日观察小鼠的生存情况,每周通过内眦静脉采血0.2 ml,利用FCM检测外周血CD19⁺细胞比例及CAR⁺细胞比例。

7. 统计学处理:每组实验至少重复3次,采用SPSS 16.0软件进行统计学分析。数据符合正态分布,多组数据间比较采用单因素方差分析,组内两组间比较采用LSD-*t*法,采取Kaplan-Meier法绘制生存曲线,应用Log-rank检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 高亲和力人源化CD19 scFv的筛选:将IMGT数据库分析构建的不同人源化抗体重链和轻链序列通过(GGGGS)₃链随机连接,构成10条人源化CD19 scFv,经真核表达载体表达后纯化出10个人源化scFv(Clone H3L1-H3L10)。FCM检测显示鼠源CD19抗体FMC63其结合CD19抗原的效率为99.5%,而10个人源化CD19 scFv中有两个抗体其结合CD19抗原的效率>90%,分别为Clone H3L1 96.2%,Clone H3L2 98.0%(图1)。选择Clone H3L2抗体序列进行CAR序列的合成。

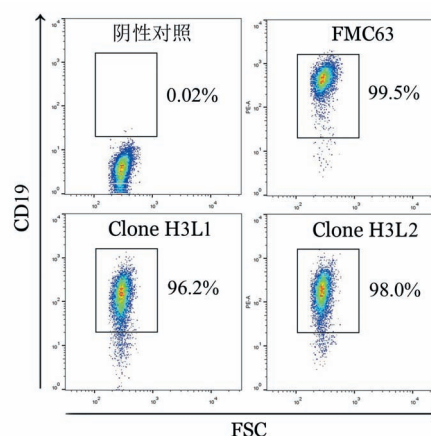
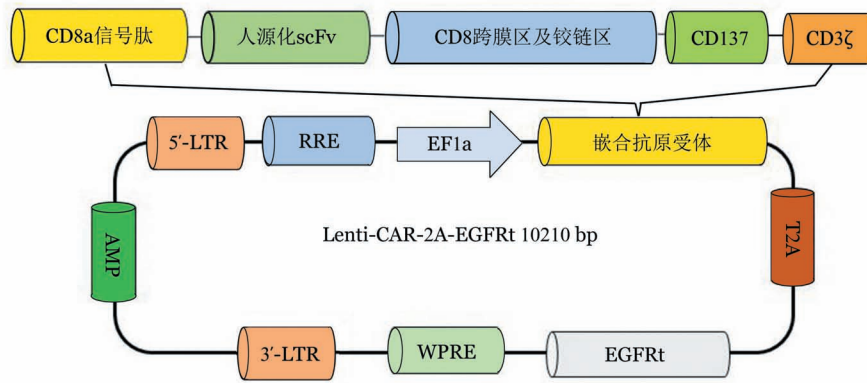


图1 流式细胞术检测人源化CD19单链抗体与靶蛋白的结合能力

2. 携带人源化CD19 CAR慢病毒的制备:选择Clone H3L2抗体的VH和VL序列,与人CD8跨膜区、CD8铰链区、4-1BB(CD137)、CD3 ζ 、T2A-EGFRt等序列顺序合成,形成人源化CD19 CAR结构。构建携带人源化CD19 CAR的慢病毒载体Lenti-CAR-2A-EGFRt(图2),经三质粒系统包装重组病毒及对照病毒,高速离心浓缩后冻存备用。

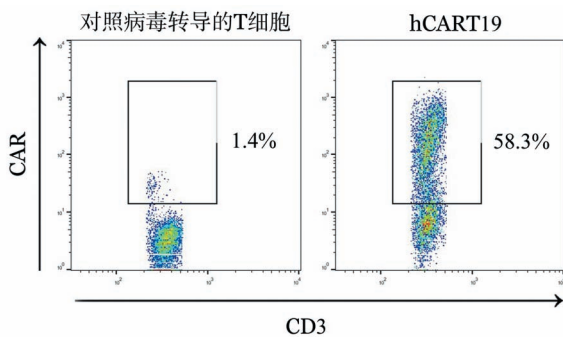
3. hCART19的产生:健康志愿者外周血分选的CD3⁺T细胞,经感染携带人源化CD19 CAR的慢病毒及对照病毒后,分别获得hCART19及对照病毒转染的T细胞,FCM检测病毒转染效率为58.3%及1.4%(图3)。

4. hCART19的体外杀伤能力:按不同效靶比将效应细胞及靶细胞混合培养,结果显示随着效靶比的不断增加,靶细胞的杀伤率逐渐增加,当效靶比为10:1时hCART19杀伤靶细胞效率达到最大。其中三组对Raji细胞杀伤率比较差异有统计学意义($F = 2\ 023.81, P < 0.001$),进一步两两比较显示hCART19组[(87.56±1.99)%]明显高于阴性组



scFv:单链抗体;RRE:rev 应答元件;AMP:氨苄青霉素;WPRE:翻译后调节元件;EGFRt:截短型表皮生长因子受体

图2 携带人源化CD19 CAR的慢病毒载体结构示意图



hCART19:人源化CD19 CAR-T细胞

图3 流式细胞术检测携带人源化CD19 CAR的慢病毒转染效率

[(19.31±1.16)%]及对照组[(21.35±1.19)%](P 值均 <0.001);三组对CHO-K1-CD19细胞杀伤率比较差异有统计学意义($F=4\ 867.01, P<0.001$),两两比较显示hCART19组[(90.60±0.74)%]明显高于阴性组[(24.48±1.01)%]及对照组[(24.95±1.05)%](P 值均 <0.001)(图4)。取效靶比10:1时各组细胞培养上清行ELISA检测,结果显示靶细胞为Raji细胞时三组IL-2水平比较差异有统计学意义($F=171.67, P<0.001$),hCART19组[(10.56±0.88)pg/ml]明显高于阴性组[(3.55±0.26)pg/ml]及对照组[(2.92±0.32)pg/ml](P 值均 <0.001);三组IFN- γ 水平比较差异有统计学意义($F=417.45, P<0.001$),hCART19组[(199.02±12.66)pg/ml]明显高于阴性组[(37.63±0.85)pg/ml]及对照组[(52.07±3.33)pg/ml](P 值均 <0.001)。靶细胞为CHO-K1-CD19时三组IL-2水平比较差异有统计学意义($F=1\ 319.97, P<0.001$),hCART19组[(15.03±0.81)pg/ml]明显高于阴性组[(4.72±0.25)pg/ml]及对照

组[(5.61±0.39)pg/ml](P 值均 <0.001);三组IFN- γ 水平比较差异有统计学意义($F=666.02, P<0.001$),hCART19组[(290.66±10.10)pg/ml]明显高于阴性组[(51.43±12.06)pg/ml]及对照组[(55.86±2.38)pg/ml](P 值均 <0.001)(图5)。

5. hCART19对白血病小鼠生存的影响:阴性组及对照组小鼠在接种Nalm6细胞后20~30 d全部死亡,hCART19组小鼠存活时间 >40 d,较另外两组小鼠生存时间差异有统计学意义($\chi^2=11.73, P=0.008$)(图6A)。FCM检测结果显示三组小鼠在注射白血病细胞后14 d($F=154.74, P<0.001$)及21 d($F=291.28, P<0.001$)外周血中CD19 $^+$ 白血病细胞比例差异有统计学意义,其中阴性组小鼠在注射白血病细胞后14 d为(12.24±1.30)%,21 d为(17.15±0.96)%;对照组小鼠在注射白血病细胞后14 d为(10.10±1.05)%,21 d为(20.84±2.22)%;而hCART19组小鼠在注射白血病细胞后14 d为(1.78±0.40)%,21 d为(0.16±0.09)%,明显低于阴性组及对照组(P 值均 <0.001)(图6B),28 d后已检测不到hCART19组小鼠外周血CD19 $^+$ 白血病细胞表达。我们还采用FCM检测了三组小鼠在注射白血病细胞后外周血中CAR-T细胞的比例变化,结果显示未转染的T细胞组小鼠在注射白血病细胞后未检测出CAR-T细胞的存在,而hCART19组小鼠在注射白血病细胞后14 d及21 d分别检测到CAR-T细胞比例为(9.66±1.28)%及(4.38±0.70)%,明显高于对照组小鼠14 d及21 d的CAR-T细胞比例[分别为(0.74±0.38)%及(0.14±0.11)%](P 值均 <0.001)(图6C),35 d已检测不到hCART19组小鼠的CAR-T细胞。

讨 论

CAR-T技术是生物学近期最重要的创新之一。该疗法在体外通过生物技术改造免疫性T细胞,令其识别癌细胞表面的抗原,达到定向杀死癌细胞的功效。目前大多数CAR由scFv、跨膜区域和胞内信号转染区组成。scFv由来源于单克隆抗体的VH和VL组成,中间由带韧性的铰链区连接形成。scFv可特异性识别肿瘤相关抗原并与其结合,进而将信号传递给胞内信号域激活CAR-T细胞产生杀伤作用,因此是CAR-T疗法成功与否的关键结构。在实体肿瘤方面,2006年Kershaw等^[12]首次报道了利用针对FR α 抗原的鼠源scFv制备的CAR-T

细胞治疗卵巢癌的临床试验结果,该类CAR-T细胞有较好的体外杀伤作用,但输入患者体内却很快耗竭,其持久性很差。2011年Lamers等^[5]利用针对CAIX抗原的鼠源scFv制备的CAR-T细胞治疗肾细胞癌患者,结果显示大部分患者治疗后出现了针对CAR-T细胞的体液及细胞免疫应答,其中鼠源scFv结构中的CDR及骨架区(FR)序列是引起细胞免疫应答的主要区域,并且该研究证实针对CAR的免疫应答导致了CAR-T细胞在外周血液中的短暂存活,影响了治疗效果。在血液肿瘤方面,目前全球最成功的临床试验结果主要来源于针对CD19的CAR-T治疗。现有的已发表的靶向CD19的临床试验其CAR结构中的scFv主要来源于鼠FMC63或SJ25C1

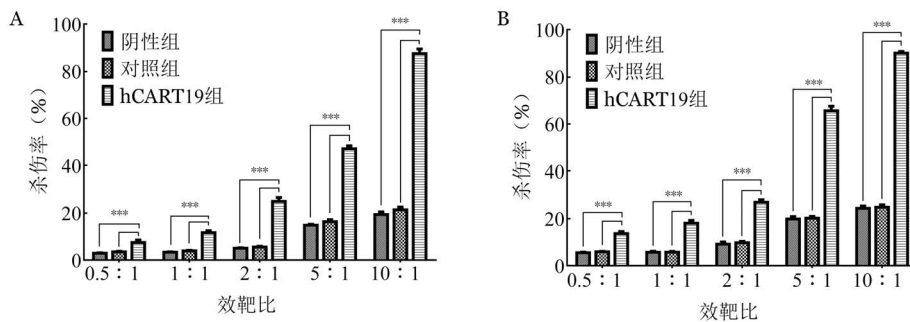


图4 不同效靶比人源化CD19 CAR-T细胞(hCART19)对Raji细胞(A)及CHO-K1-CD19细胞(B)杀伤能力测定(*** $P < 0.001$)

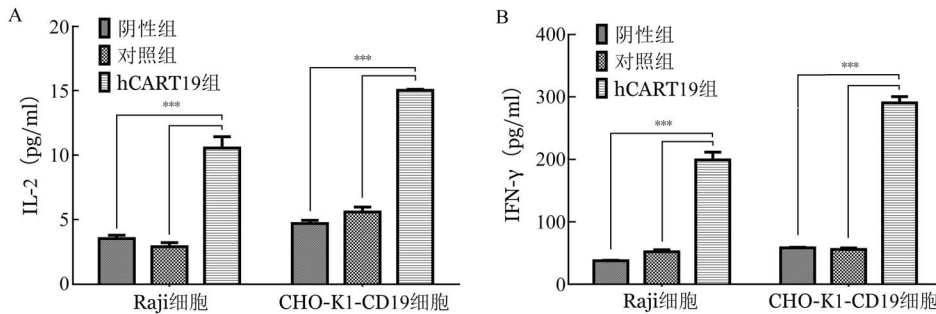
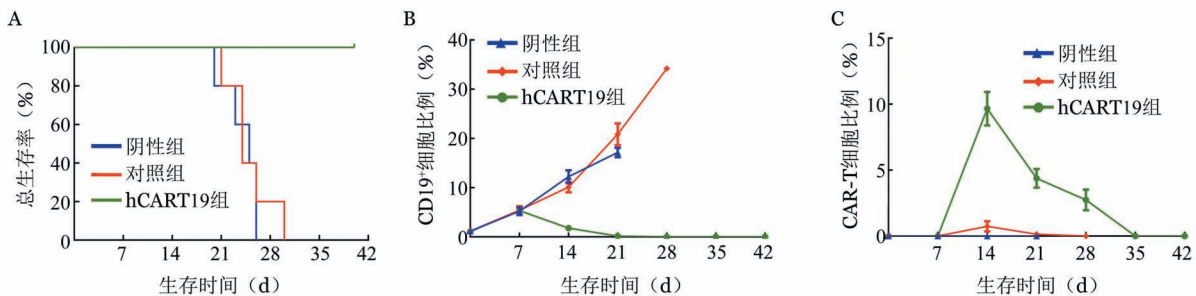


图5 ELISA法检测效靶比为10:1时人源化CD19 CAR-T细胞(hCART19)对Raji及CHO-K1-CD19细胞IL-2(A)及IFN- γ (B)水平的影响(*** $P < 0.001$)



A:白血病小鼠的生存时间;B:小鼠外周血中CD19⁺细胞比例变化;C:小鼠外周血中CAR-T细胞比例变化

图6 人源化CD19 CAR-T细胞(hCART19)的体内杀瘤效果(*** $P < 0.001$)

单抗。Turtle 等^[13]对 B-ALL 患者输注了利用 FMC63 来源的 scFv 制备的等比例 CD4⁺ CAR-T 及 CD8⁺ CAR-T 细胞,结果显示 93% 的患者获得了骨髓缓解,而其中 5 例白血病细胞持续存在或缓解后复发的患者,再次输注 CAR-T 细胞均未能产生疗效,经检测证实由于鼠源 CAR 序列的免疫原性导致了 CAR-T 细胞无法活化及持续存在。以上研究提示转基因的免疫原性是影响 CAR-T 体内存活的关键因素之一。

人源化 scFv 是将鼠源 scFv 结构中的 CDR 区保留,而 FR 区改为人源序列,这一变化将进一步减少人体对 CAR 序列产生的免疫应答,有望改善并延长 CAR-T 在体内的存活时间。由于鼠源 CAR 产生的免疫原性影响了 CAR-T 细胞在患者体内的存活时间,因此全球多个中心正在进行人源化 CAR-T 的研制工作,但相关的研究报告极少,且未见人源化 CAR-T 相关临床试验研究性论文的发表。我们通过将鼠抗人 CD19 抗体(FMC63)的人源化而获得了与 FMC63 亲和力相似的人源化的抗 CD19 抗体。利用人源化抗 CD19 scFv 与其他序列连接,构建出人源化 CAR 结构,经慢病毒包装、感染,从而获得了 hCART19 细胞。体外实验证实 hCART19 细胞可有效杀伤 CD19⁺ 白血病细胞并分泌大量的 IL-2 及 IFN- γ 。在白血病小鼠模型中证实 hCART19 可有效清除白血病细胞,延长小鼠的生存期。

我们成功构建了具有抗白血病活性的人源化抗 CD19 CAR-T 细胞,这为下一步的临床试验奠定基础。在今后的临床研究中需要进一步观察该类细胞治疗复发、难治性 B 细胞肿瘤的安全性、有效性及免疫原性等问题。

参考文献

- [1] Wang Z, Guo Y, Han W. Current status and perspectives of chimeric antigen receptor modified T cells for cancer treatment [J]. *Protein Cell*, 2017, 8(12): 896-925. DOI: 10.1007/s13238-017-0400-z.
- [2] Mo Z, Du P, Wang G, et al. The multi-purpose tool of tumor immunotherapy: gene-engineered T cells [J]. *J Cancer*, 2017, 8(9): 1690-1703. DOI: 10.7150/jca.18681
- [3] Feng K, Liu Y, Guo Y, et al. Phase I study of chimeric antigen receptor modified T cells in treating HER2-positive advanced biliary tract cancers and pancreatic cancers [J]. *Protein Cell*, 2017. DOI: 10.1007/s13238-017-0440-4.
- [4] O'Hara M, Stashwick C, Haas AR, et al. Mesothelin as a target for chimeric antigen receptor-modified T cells as anticancer therapy [J]. *Immunotherapy*, 2016, 8(4): 449-460. DOI: 10.2217/imt.16.4.
- [5] Lamers CH, Willemsen R, van Elzakker P, et al. Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells [J]. *Blood*, 2011, 117(1): 72-82.
- [6] 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.
- [7] 贾鹤晋, 韩为东. 抗 CD19 嵌合抗原受体修饰的 T 细胞在血液系统恶性肿瘤中的应用 [J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(2): 164-168. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.02.018.
- [8] Porter DL, Hwang WT, Frey NV, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(303): 303ra139. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac5415.
- [9] Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(6): 540-549. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.2025.
- [10] Luskin MR, DeAngelo DJ. Chimeric antigen receptor therapy in acute lymphoblastic leukemia clinical practice [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2017, 12(4): 370-379. DOI: 10.1007/s11899-017-0394-x.
- [11] Cao J, Chen C, Zeng L, et al. Engineered regulatory T cells prevent graft-versus-host disease while sparing the graft-versus-leukemia effect after bone marrow transplantation [J]. *Leuk Res*, 2010, 34(10): 1374-1382. DOI: 10.1016/j.leukres.2009.11.024.
- [12] Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(20 Pt 1): 6106-6115. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1183.
- [13] 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.

(收稿日期:2018-01-14)

(本文编辑:刘爽)