

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.04.004

· 基础研究 ·

PD-S15融合蛋白体外特异性靶向PD-1分子并快速扩增NK/T细胞

王阿香, 李铁鹏, 张放, 王瑶, 杜雪相, 高全立(郑州大学附属肿瘤医院暨河南省肿瘤医院 生物免疫治疗中心, 河南 郑州 450008)

[摘要] **目的:** 探讨 anti-PD-1(scFv)/IL-15/IL-15R α -sushi(简称 PD-S15)融合蛋白体外特异性结合 PD-1 的能力及其对 NK/T 细胞增殖能力的影响。**方法:** 化学合成人 anti-PD-1(scFv)基因和人 IL-15/IL-15R α -sushi 融合基因, 经过酶切连接构建重组表达质粒 pUC57-PD-S15, 用 Lipofectamine™ 2000 瞬时转染 HEK293T 细胞, 收获细胞培养液上清, 用 Wb 法检测细胞培养液上清中 PD-S15 融合蛋白的表达; 用不同配比的 PD-S15/X-VIVO™15 培养液对 PBMC 和 TIL 分别诱导培养后, 用流式细胞术检测 PD-S15 融合蛋白体外特异性结合 PD-1 的能力和对 PBMC 增殖及 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD56⁺ 各细胞亚群比例的影响; 用细胞计数法检测 PD-S15 融合蛋白对 TIL 增殖能力的影响。**结果:** pUC57-PD-S15 表达质粒经双酶切和测序验证构建成功并成功转染 HEK293T 细胞, 目标蛋白相对分子质量大约为 55 000, 符合预期。PD-S15 融合蛋白体外具有 PD-1 特异性结合能力($P<0.05$)及 NK/T 细胞活化增殖能力($P<0.05$); 与经典 TIL 培养方案相比, PD-S15 培养方案体外活化扩增 T 细胞的能力更强($P<0.01$)。**结论:** PD-S15 融合蛋白体外能够特异性靶向 PD-1 分子并快速扩增 NK/T 细胞, 为后续从肿瘤组织内或外周血中选择性扩增 CD8⁺ PD-1⁺ 抗原特异性 T 细胞奠定了基础。

[关键词] 程序性死亡受体 1; 白细胞介素-15/白细胞介素-15 受体; PD-S15 融合蛋白; 过继细胞治疗; 抗原特异性 T 细胞
[中图分类号] R392.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)04-0389-07

PD-S15 fusion protein specifically target PD-1 and rapidly expands NK/T cells

WANG Axiang, LI Tiejeng, ZHANG Fang, WANG Yao, DU Xuexiang, GAO Quanli (Cancer Biotherapy Center, Cancer Hospital of Henan Province, Cancer Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the function of anti-PD-1 (scFv)/IL-15/IL-15R α -sushi fusion protein (PD-S15) to specifically bind to PD-1 *in vitro* and to explore its effect on NK/T cell proliferation. **Methods:** The human anti-PD-1 (scFv) gene sequence and human IL-15/IL-15R α -sushi fusion gene sequence were synthesized chemically. The recombinant expression plasmid pUC57-PD-S15 was constructed by enzyme digestion and ligation of the two target genes, and then transiently transfected into HEK293T cells by lipofectamine™ 2000. The supernatants of cell culture medium were acquired, and the expression of PD-S15 fusion protein in cell culture supernatants was detected by Wb assay. PBMCs and TILs were cultured in mediums with different proportion of PD-S15/X-VIVO™15, respectively. Then, the capacity of PD-S15 fusion protein to bind to PD-1 *in vitro* and its effect on the proliferation of PBMCs and the proportion of CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD56⁺ subsets were detected by flow cytometry. The effect of PD-S15 fusion protein on the proliferation of TILs was detected by cytometry. **Results:** The successful construction of pUC57-PD-S15 eukaryotic expression plasmid was confirmed by double enzyme digestion and sequencing, and then successfully transfected into HEK293T cells. The relative molecular weight of the target protein was approximately 55 000, and was in line with expectations. PD-S15 fusion protein could specifically combine with PD-1 *in vitro* ($P<0.05$) and stimulate NK/T cell proliferation ($P<0.05$). Compared with classical TILs culture method, the efficiency of activation and amplification of T cells *in vitro* by PD-S15 culture method was better ($P<0.01$). **Conclusion:** PD-S15 fusion protein can specifically target PD-1 and rapidly expand NK/T cells *in vitro*, which lays a foundation for the selective expansion

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81502468); 河南省医学科技攻关计划项目(No.201701030); 河南省自然科学基金项目(No.182300410344); 河南省科技攻关计划项目(No.162300410095)。Subject supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81502468), the Medical Science and Technique Research Foundation of Henan Province (No.201701030), the Natural Science Foundation of Henan Province (No.182300410344), and the Science and Technique Research Foundation of Henan Province (No.162300410095)

[作者简介] 王阿香(1992-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤生物免疫治疗研究, E-mail:1909960826@qq.com

[通信作者] 高全立(GAO Quanli, corresponding author), 博士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事恶性肿瘤生物免疫治疗的基础及临床研究, E-mail:gaoquanli@aliyun.com

of CD8⁺PD-1⁺ antigen-specific T lymphocytes from tumor tissues and even peripheral blood.

[Key words] programmed death receptor-1 (PD-1); IL-15/IL-15R α ; PD-S15 fusion protein; adoptive cell therapy; antigen-specific T cell

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(4): 389-395. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.04.004]

过继免疫细胞治疗逐渐成为晚期恶性肿瘤治疗的一种重要选择^[1]。然而,在癌症患者体内,抗原特异性 CD8⁺T 淋巴细胞诱导表达多种免疫抑制分子,如 PD-1、CTLA-4 等,处于耗竭状态^[2-3],决定了其难以利用常规方案进行体外扩增培养。多项研究^[4-7]显示,PD-1 可以作为肿瘤抗原特异性 T 淋巴细胞的标志物。因此,体外恢复 CD8⁺PD-1⁺ 效应性 T 淋巴细胞的功能并实现该亚群的大量扩增成为优化肿瘤免疫细胞治疗的关键。IL-15 作为 T 细胞生长因子,与 IL-2 在结构和功能上存在许多相似之处^[8-9],但 IL-15 拥有不同于 IL-2 的独特生物学功能,如刺激和维持记忆性 CD8⁺T 淋巴细胞、NK/NKT 细胞的增殖和存活,无活化诱导的细胞死亡(activation-induced cell death, AICD)和刺激 Treg 增殖的作用^[10]。IL-15 受体由 IL-15R α 、IL-15R β 、 γ c3 个亚基组成。IL-15R α 内含一个“sushi”结构域,为 IL-15 与其结合并发挥生物学功能所必需^[11]。前期的研究^[12-13]已证实,IL-15 与其受体 IL-15R α 形成的复合物可显著增强 IL-15 生物学活性,可用于抗原特异性中央型记忆性 T 细胞的体外扩张。本研究旨在构建 PD-S15 融合蛋白[包含 PD-1 特异性单链抗体(scFv)、IL-15 及 IL-15R α 的 sushi 结构域的融合蛋白,简称 PD-S15]的真核表达载体并分泌性表达,进一步探讨其体外特异性结合 PD-1 的能力及其对 NK/T 细胞增殖能力的影响,为后续从肿瘤组织内甚至外周血中选择性扩增 CD8⁺PD-1⁺ 效应性 T 淋巴细胞奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、基因、细胞系及主要试剂

人 anti-PD-1 (scFv) 基因和人 IL-15/IL-15R α -sushi 融合基因由苏州金唯智生物科技有限公司合成,感受态细胞 TOP10 购自北京康为世纪生物科技有限公司,HEK293T 细胞由本室冻存。

HG-DMEM 培养基(美国 HyClone 公司),胎牛血清(美国 HyClone 公司),X-VIVOTM 15 培养基(美国 Lonza 公司),限制性内切酶 *Bgl* II、*Sal* I、*Bam* HI、*Eco* RI 及 T4 DNA 连接酶(大连宝生物工程有限公司),DNA 凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量抽提试剂盒(上海生工生物工程有限公司),LipofectamineTM 2000 转染试剂盒(美国 Invitrogen 公司),兔 HA 多克隆抗体(成都正能生物有限公司),HRP 标记的山羊抗

兔 IgG(H+L)抗体(上海碧云天生物技术有限公司),PVDF 膜(美国 GE 公司),淋巴细胞分离液(天津美德太平洋生物科技有限公司),CellTraceTM CFSE 细胞增殖试剂盒(美国 Invitrogen 公司),rhIL-2(北京四环生物制药有限公司),FACS CantoTM II 流式细胞仪(美国 BD 公司),流式抗体 anti-PD-1-APC、CD3-PE-Cy7、CD4-Percp-Cy5.5、CD8-APC-Cy7 和 CD56-APC(美国 Biolegend 公司)。

1.2 pUC57-PD-S15 真核表达质粒的构建及鉴定

anti-PD-1 (scFv) 基因由 Nivolumab 序列组装而成,并在其序列前端依次添加 CMV 启动子、KOZAK 片段、Igk 信号肽和 HA 标签,其后序列依次添加限制性酶切位点 *Xho* I、*Bam* HI 和 *Sal* I,克隆至 pUC57 载体,并通过测序验证,命名为 pUC57-PD,其序列见图 1。根据文献[11]中 RL1 序列化学合成 IL-15/IL-15R α -sushi 融合基因序列,克隆至 pUC57 载体,并通过测序验证,命名为 pUC57-S15。pUC57-PD 和 pUC57-S15 均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。利用 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切质粒 pUC57-S15,凝胶回收试剂盒回收目的片段 IL-15/IL-15R α -sushi,将该片段连接至经 *Bam* HI 和 *Sal* I 双酶切的 pUC57-PD 载体,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 TOP10,接种于含有氨苄西林的 LB 固体培养基中,37 °C 倒置培养 12~16 h,挑取单克隆菌落,接种于含氨苄西林的 TB 培养基中 37 °C 培养 12~16 h,质粒小量抽提试剂盒抽提 pUC57-PD-S15 质粒,*Eco* RI 和 *Sal* I 双酶切后,酶切产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,将验证正确的 pUC57-PD-S15 质粒送苏州金唯智生物科技有限公司测序。

1.3 细胞转染

HEK293T 细胞在含 10%FBS 的 HG-DMEM 培养基中培养至细胞铺满 6 孔板底面积 70% 时,按照 LipofectamineTM 2000 试剂盒操作说明,将鉴定正确的 pUC57-PD-S15 质粒转染至 HEK293T 细胞中。于转染后 6 h 更换 37 °C 预热的含 10%FBS 的新鲜 DMEM 培养基。分别于转染后 48、72、96 和 120 h 收集细胞培养液上清并均匀混合。同等条件下转染 pUC57 空载体作为对照。

1.4 Wb 检测细胞培养液上清中 PD-S15 融合蛋白的表达

转染 pUC57-PD-S15 细胞培养液上清经 SDS-

PAGE 后转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 加入一抗兔 HA 多克隆抗体 (1:3 000), 室温孵育 2 h, PBST 洗涤后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(H+L) 抗体 (1:5 000), 室温孵育 2 h, 再次洗涤后, ECL 超敏发光液显影后观察结果。同等条件下以转染空载体 pUC57 的细胞培养液上清作为对照。

1.5 流式细胞术检测 PD-S15 融合蛋白体外特异性结合 PD-1 的能力

在患者知情同意的情况下, 抽取 3 例晚期肿瘤患者外周血每人 3 ml, 用淋巴细胞分离液提取单个核细胞 (PBMC), 细胞计数后, 取 5×10^5 细胞采用 1:1 配比的 PD-S15/X-VIVOTM15 培养液 1 ml, 于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中孵育 24 h, 同等条件下对照组采用 1:1 配比的空载体 pUC57/X-VIVOTM15 培养液进行孵育, PBS 洗涤后分别加入 anti-PD-1-APC 抗体 (说明书推荐用量) 4 °C 避光孵育 30 min, 同型对照加入 APC 标记的抗鼠的 IgG 抗体 (说明书推荐用量), PBS 洗 2 次, 加入 300 μ l PBS 重悬细胞, 上流式细胞仪检测两组细胞表面 PD-1 的表达, 用 FlowJo-V10 软件进行数据分析。

1.6 流式细胞术检测 PD-S15 融合蛋白对外周血 NK/T 细胞增殖能力的影响

在患者知情同意的情况下, 抽取 3 例晚期肿瘤患者外周血每人 15 ml, 用淋巴细胞分离液提取 PBMC, 细胞计数后, 加入 CFSE 工作液 (调整细胞密度为 5×10^6 /ml, CFSE 终浓度为 5 μ mol/L), 混匀, 37 °C 孵育 10 min, 加入 5 倍体积的含 10%FBS 的 DMEM 培养液终止反应, 600 \times g 离心 3 min, 弃上清, PBS 洗 1 次, 细胞均分成 5 份, 采用 1:1 配比的空载体 pUC57/X-VIVOTM15 培养液重悬其中一份作为对照, 余 4 份采用不同配比的 PD-S15/X-VIVOTM15 培养液 (1:19、1:9、1:4、1:1) 进行重悬, 以 5×10^5 细胞/1 ml/孔接种于 48 孔板持续诱导培养, 每个配比浓度设 3 个复孔。每天显微镜下观察细胞生长状态, 培养至第 4 天收获细胞, 流式细胞仪检测 CFSE 荧光强度递减情况, 分析增殖细胞百分比。此外, 分别在培养前 (第 0 天) 和培养后第 5 天增殖现象最佳孔取适量细胞 4 °C 避光孵育 CD3-PE-Cy7、CD4-Percp-Cy5.5、CD8-APC-Cy7 和 CD56-APC 抗体 (说明书推荐用量), 流式细胞仪检测 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD56⁺ 各细胞亚群的比例, 用 FlowJo-V10 软件进行数据分析。

1.7 细胞计数法检测 PD-S15 融合蛋白对 TIL 细胞增殖能力的影响

在患者知情同意的情况下, 取 3 例手术切除的新鲜肝癌组织标本, TIL 细胞的分离方法参见文献 [14]。每份 TIL 均分成 2 份, 以 5×10^5 /孔接种于 48 孔板, 设置 3 个复孔。一组采用经典 TIL 培养方案 (X-VI-

VOTM15 培养液 + rhIL-2 7 000 U/ml), 另一组采用 1:1 配比的 PD-S15/X-VIVOTM15 培养液持续诱导培养。每天显微镜下观察细胞生长状态。培养至第 5 天, 0.4% 锥虫蓝染色后, 在光学显微镜下观察并进行细胞计数。

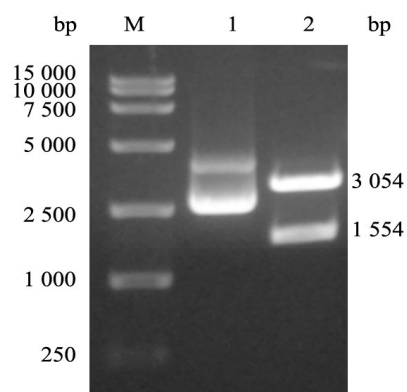
1.8 统计学处理

1.4~1.7 实验均重复 3 次。采用 SPSS21.0 统计学软件对数据进行分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用配对的 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 pUC57-PD-S15 重组质粒

pUC57-PD-S15 重组质粒双酶切产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析结果 (图 1) 显示, 可见大小分别为 1 554 bp 的目的基因片段和 3 054 bp 的载体片段。测序结果与预期完全一致, 说明 pUC57-PD-S15 重组质粒构建成功。



M: DL15 000 DNA marker; 1: Plasmid pUC57-PD-S15;
2: Double enzyme digestion products (*Eco* R I and *Sal* I) of pUC57-PD-S15 plasmid

图 1 pUC57-PD-S15 重组质粒的酶切鉴定

Fig.1 Identification map of recombinant plasmid pUC57-PD-S15

2.2 转染 pUC57-PD-S15 细胞培养上清液中表达 PD-S15 融合蛋白

Wb 检测结果 (图 2) 显示, 转染 pUC57-PD-S15 的细胞培养上清液中可见相对分子质量大约为 55 000 蛋白特异性条带, 符合预期 (理论值为 55 200); 转染空载体 pUC57 的细胞培养液上清中未检测出相应的蛋白条带。

2.3 PD-S15 融合蛋白具有体外特异性结合 PD-1 的能力

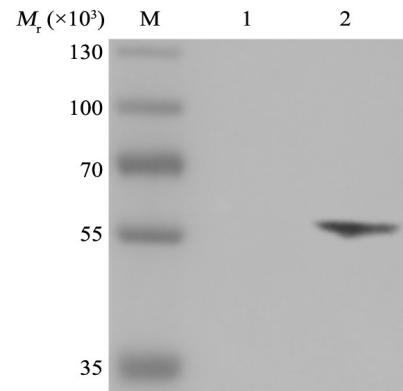
流式细胞术检测结果 (图 3) 显示, 用 1:1 配比的

空载体 pUC57/X-VIVO™15 培养液孵育 PBMC, 不能封闭细胞表面的 PD-1 位点, 相反用 1:1 配比的 PD-S15/X-VIVO™15 培养液孵育几乎封闭了所有细胞表面的 PD-1 的位点 ($t=9.41, P<0.05$), 该结果在 3 例不同患者来源的 PBMC 中具有良好的重复性。

2.4 PD-S15 融合蛋白体外具有 NK/T 细胞活化增殖能力

第 4 天倒置显微镜观察 (图 4A) 及流式细胞术检测结果 (图 4B) 显示, PD-S15 融合蛋白体外能够刺激 PBMC 活化增殖 ($t=-15.22, P<0.01$), 并表现出浓度依赖性, PD-S15 浓度越高, PBMC 增殖能力越强, 其中以 1:1 配比的 PD-S15/X-VIVO™15 培养液刺激 PBMC 增殖能力最强 (1:19 vs 1:9, $t=-6.29, P<0.05$; 1:9 vs 1:4, $t=-16.81, P<0.01$; 1:4 vs 1:1, $t=-3.11, P>0.05$)。第 0 天 (D0) 与第 5 天 (D5) 流式细胞术检测结果 (图 5) 显示, $CD3^+CD8^+$ T 细胞和 $CD3^-CD56^+$ (NK) 细胞比例较培养前有升高趋势 ($CD3^+CD8^+$ T: D0 vs D5, $t=-6.17, P<0.05$; $CD3^-CD56^+$: D0 vs D5, $t=-2.44, P>0.05$), $CD3^+CD4^+$ T 淋巴细胞比例较培养前有下降趋势 ($CD3^+CD4^+$ T: D0 vs D5, $t=2.61,$

$P>0.05$)。上述结果在 3 例不同患者来源的 PBMC 中均具有良好的重复性。



M: Protein marker; 1: Supernatant of cell culture medium transfected with empty vector pUC57; 2: Supernatant of cell culture medium transfected with plasmid pUC57-PD-S15

图 2 转染 pUC57-PD-S15 细胞培养液上清中 PD-S15 融合蛋白的表达

Fig.2 Expression of PD-S15 fusion protein in cell supernatants of pUC57-PD-S15 transfected cells

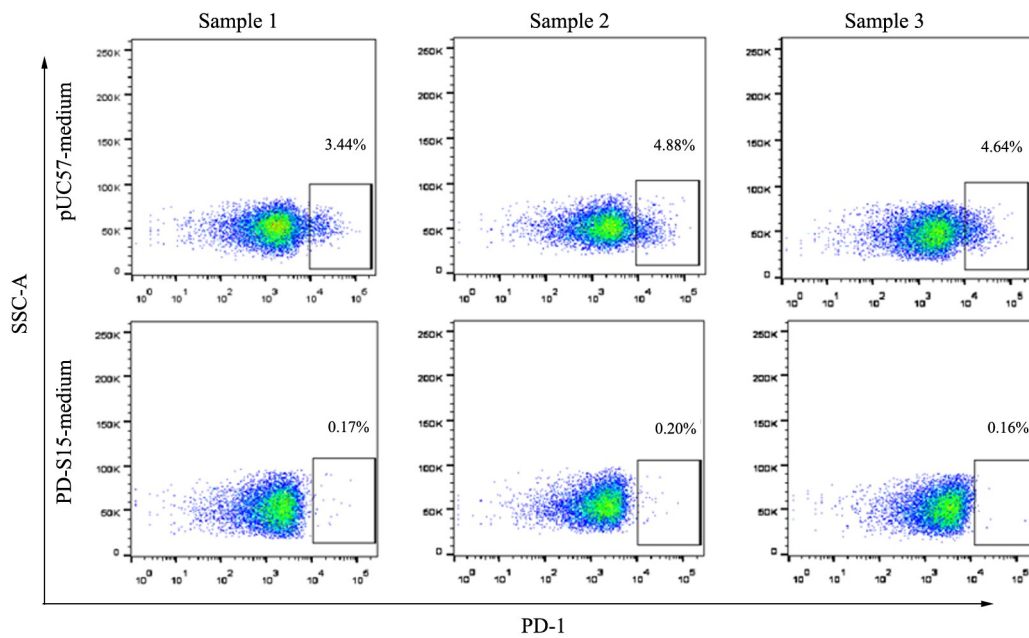


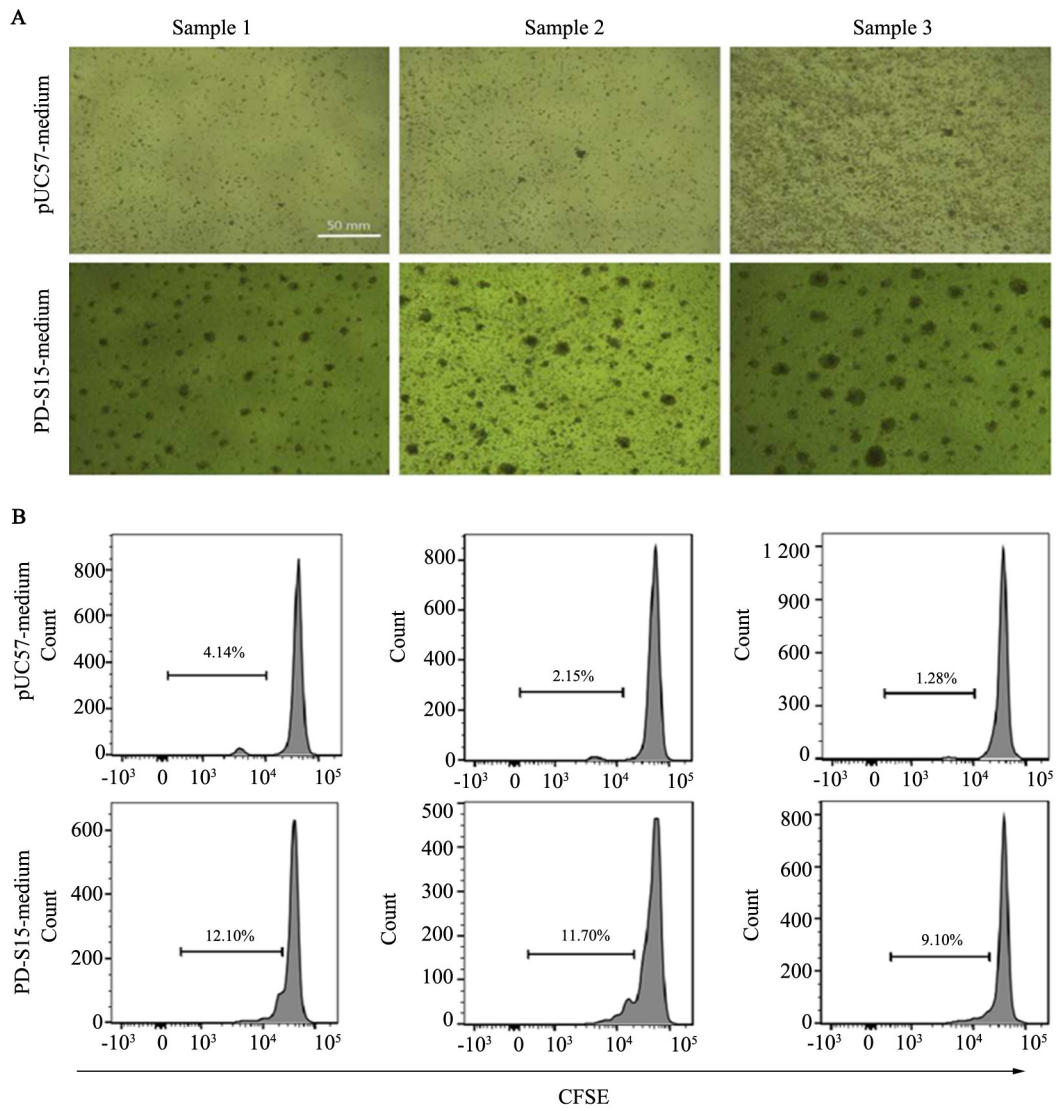
图 3 PD-S15 融合蛋白体外特异性结合 PD-1

Fig.3 Fusion protein PD-S15 specifically binds to PD-1 in vitro

2.5 PD-S15 培养方案体外活化扩增 T 细胞的效能优于经典 TIL 培养方案

诱导至第 5 天, 倒置显微镜观察结果 (图 6) 显示, PD-S15 培养方案组镜下细胞增殖克隆团大且多, 而经典 TIL 组细胞增殖克隆团小且少, 且该结果在 3 例

不同患者之间具有良好的重复性。细胞计数结果显示 PD-S15 培养方案组细胞数量明显高于经典 TIL 组 [$(3.58\pm 0.49)\times 10^6$ vs $(1.37\pm 0.17)\times 10^6, t=11.47, P<0.01$]。上述结果表明, PD-S15 培养方案体外活化扩增 T 细胞的效能优于经典的 TIL 培养方案。



A: View under an inverted microscope ($\times 50$); B: Proliferation of PBMC by flow cytometry

图4 诱导第4天时 PD-S15 融合蛋白对 PBMC 增殖的影响

Fig.4 Effect of PD-S15 fusion protein on the proliferation of PBMCs on the 4th day after induction

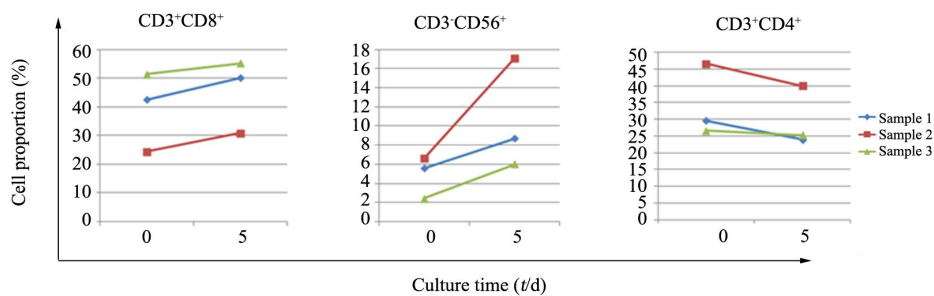


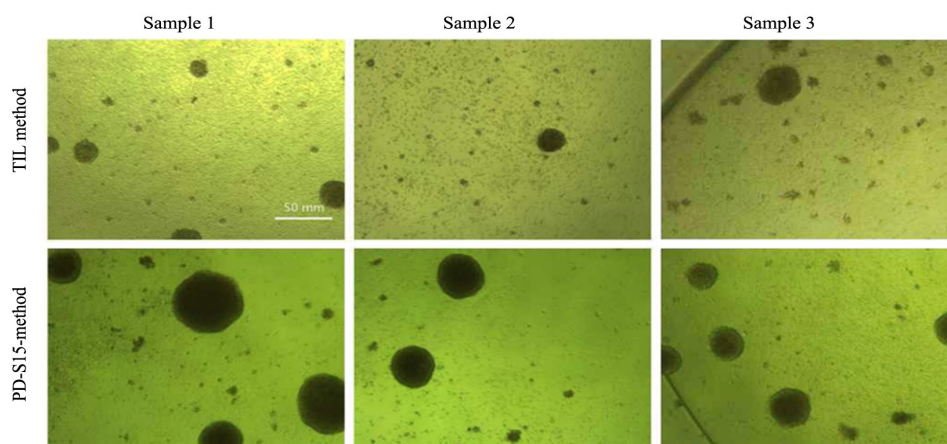
图5 PD-S15 融合蛋白对 NK/T 细胞亚群比例的影响(1:1 配比的 PD-S15/X-VIVO™15 培养液)

Fig.5 Effect of PD-S15 fusion protein on the proportion of NK/T cells subset (PD-S15 /X-VIVO™15 medium mixed at 1:1 volume)

3 讨论

近年来,基于基因修饰的抗原特异性 T 细胞的过继转移治疗已取得突破性进展^[15-16]。但是基因工程 T 细胞

并不完美,存在制备工艺复杂、脱靶毒性以及大部分肿瘤缺乏特异性靶标等问题^[17-18]。因此,有必要开发一种简单高效的方法来快速扩增抗原特异性 T 细胞。

图6 诱导第5天时PD-S15对TIL增殖的影响($\times 50$)Fig.6 Effect of PD-S15 fusion protein on the proliferation of TIL on the 5th day after induction ($\times 50$)

目前,多项研究证实肿瘤组织或外周血中 $CD8^+$ PD-1 $^+$ T细胞亚群包含了主要的肿瘤抗原特异性T淋巴细胞^[4-7]。因此,本课题组认为体外扩增肿瘤抗原特异性T淋巴细胞即体外扩增PD-1 $^+$ T淋巴细胞。然而,PD-1 $^+$ T细胞处于耗竭状态,增殖能力弱,常规培养会使该亚群细胞处于增殖劣势^[19]。本研究构建了一种新型的双功能融合蛋白PD-S15,并在HEK293T细胞中成功分泌性表达。流式细胞术检测结果显示,PD-S15融合蛋白体外具有较强的PD-1特异性结合能力。因此,该证据间接证明了PD-S15融合蛋白能够在T细胞培养过程中通过PD-1特异性单链抗体与PD-1结合,逆转PD-1 $^+$ T淋巴细胞所处的耗竭状态,恢复PD-1 $^+$ T细胞的活化增殖能力。

IL-15是结构和功能与IL-2高度相关的细胞因子,其能够刺激记忆性 $CD8^+$ T淋巴细胞、NK/NKT细胞活化增殖,减少或去除培养体系的负相调节作用^[10]。近年发现,IL-15/IL-15R α -sushi复合物作为T细胞培养体系的生长因子,可显著增强IL-15生物学活性,可用于抗原特异性中央型记忆性T细胞的体外扩张^[12-13]。本研究构建了一种新型的双功能融合蛋白PD-S15并成功分泌性表达,流式细胞术检测结果显示PD-S15融合蛋白具备IL-15/IL-15R α -sushi复合物的功能一体外具有很强的NK/T细胞活化增殖能力;且通过与经典TIL培养方案(即IL-2作为T细胞培养体系的生长因子)相比,观察到PD-S15培养方案体外活化扩增T淋巴细胞的效能优于经典TIL培养方案。因此,该证据也间接证明了PD-S15融合蛋白体外活化扩增T淋巴细胞的效能可能优于IL-2。

尽管前期研究^[5,7]通过流式分选 $CD8^+$ PD-1 $^+$ T淋巴细胞亚群,利用IL-2体外诱导培养,实现了该细胞亚群的有效扩增。但是,该方案技术要求极高,且

过程复杂,很难在临床中推广应用;且长期IL-2的活化能够诱导Treg比例的升高以及AICD现象的发生^[20],因而该方案尚不能成为 $CD8^+$ PD-1 $^+$ T细胞体外扩增的最优选择。PD-S15融合蛋白很有可能借助抗原抗体之间的相互作用将IL-15/IL-15R α -sushi复合物定位于PD-1 $^+$ T淋巴细胞表面,将其具有的极强的T淋巴细胞活化增殖能力靶向于PD-1 $^+$ T淋巴细胞,从而实现该亚群细胞的选择性扩增。然而,在本研究中,不能排除PD-S15融合蛋白与PD-1结合后,反向活化PD-1 $^+$ T细胞的可能性,从而造成非特异性扩增。为了进一步优化PD-S15融合蛋白体外选择性扩增的 $CD8^+$ PD-1 $^+$ 效应性T细胞的能力,这些问题本课题组正在进一步的深入探索中。

综上所述,本研究构建了一种新型的双功能融合蛋白PD-S15,证实了其体外能够特异性靶向PD-1分子并快速扩增NK/T细胞,为后续从肿瘤组织内甚至外周血中选择性扩增 $CD8^+$ PD-1 $^+$ 抗原特异性T淋巴细胞奠定了基础。

[参考文献]

- [1] ROSENBERG S A, RESTIFO N P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer[J/OL]. *Science*, 2015, 348(6230): 62-68[2018-10-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6295668/>. DOI:10.1126/science.aaa4967.
- [2] WANG C, SINGER M, ANDERSON A C. Molecular dissection of $CD8^+$ T-cell dysfunction[J/OL]. *Trends Immunol*, 2017, 38(8): 567-576[2018-10-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5759349/>. DOI:10.1016/j.it.2017.05.008.
- [3] WHERRY E J, KURACHI M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion[J/OL]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(8): 486-499[2018-10-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4889009/>. DOI: 10.1038/nri3862.
- [4] INOZUME T, HANADA K, WANG Q J, et al. Selection of $CD8^+$

- PD-1⁺ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells[J/OL]. *J Immunother*, 2010, 33(9): 956-964[2018-10-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2980947/>. DOI:10.1097/CJI.0b013e3181fad2b0.
- [5] GROS A, ROBBINS P F, YAO X, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8⁺ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors[J/OL]. *J Clin Invest*, 2014, 124(5): 2246-2259[2018-10-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4001555/>. DOI:10.1172/JCI73639.
- [6] MCGRANAHAN N, FURNESS A J, ROSENTHAL R, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade[J/OL]. *Science*, 2016, 351(6280): 1463-1469[2018-10-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4984254/>. DOI:10.1126/science.aaf1490.
- [7] GROS A, PARKHURST M R, TRAN E, et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients[J]. *Nat Med*, 2016, 22(4): 433-438. DOI:10.1038/nm.4051.
- [8] GRABSTEIN K H, EISENMAN J, SHANEBECK K, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor[J]. *Science*, 1994, 264(5161): 965-968.
- [9] BAMFORD R N, GRANT A J, BURTON J D, et al. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(11): 4940-4944.
- [10] IKEMIZU S, CHIRIFU M, DAVIS S J. IL-2 and IL-15 signaling complexes: different but the same[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(12): 1141-1142. DOI:10.1038/ni.2472.
- [11] MORTIER E, QUÉMÉNER A, VUSIO P, et al. Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(3): 1612-1619. DOI:10.1074/jbc.M508624200.
- [12] RUBINSTEIN M P, KOVAR M, PURTON J F, et al. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15Rα[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(24): 9166-9171[2018-10-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1482584/>. DOI:10.1073/pnas.0600240103.
- [13] HASAN A N, SELVAKUMAR A, SHABROVA E, et al. Soluble and membrane-bound interleukin (IL)-15 Rα/IL-15 complexes mediate proliferation of high-avidity central memory CD8⁺ T cells for adoptive immunotherapy of cancer and infections[J/OL]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 186(2): 249-265[2018-10-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5054569/>. DOI:10.1111/cei.12816.
- [14] LI W, XU L, WANG Y, et al. Efficacy of tumor-infiltrating lymphocytes combined with IFN-alpha in Chinese resected stage III malignant melanoma[J/OL]. *J Immunol Res*, 2017, 2017: 1092507[2018-10-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5585573/>. DOI:10.1155/2017/1092507.
- [15] MAUDE S L, FREY N, SHAW P A, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia[J/OL]. *N Engl J Med*, 2014, 371(16): 1507-1517[2018-10-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4267531/>. DOI:10.1056/NEJMoa1407222.
- [16] ROBBINS P F, KASSIM S H, TRAN T L, et al. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(5): 1019-1027[2018-10-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4361810/>. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-14-2708.
- [17] 赵玲娣, 韩露, 高全立. CAR-T 细胞肿瘤治疗中若干问题的思考[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(9): 859-864. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.09.003.
- [18] 陈晓彤, 刘宝瑞. T 细胞受体工程化 T 细胞抗肿瘤治疗的现状与挑战[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(8): 755-760. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.08.001.
- [19] FERNANDEZ-POMA S M, SALAS-BENITO D, LOZANO T, et al. Expansion of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells expressing PD-1 improves the efficacy of adoptive T-cell therapy[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13): 3672-3684. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-17-0236.
- [20] WALDMANN T A, DUBOIS S, TAGAYA Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy[J]. *Immunity*, 2001, 14(2): 105-110. DOI:10.1016/s1074-7613(09)00091-0.

[收稿日期] 2018-11-17

[修回日期] 2019-02-20

[本文编辑] 党瑞山