

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.08.003

· 基础研究 ·

CD7 纳米抗体衍生的 CAR-T 细胞对 CD7 阳性急性髓系白血病细胞的杀伤活性

范双双^{1a}, 张亭亭^{1a}, 王恬^{1c}, 盛斌捷^{1a}, 游凤涛², 陈丹^{1a}, 翟晓晨^{1a}, 安钢力^{1a}, 孟会敏^{1a}, 杨林^{1a,1b,1c,2} (1. 苏州大学 a. 医学部 唐仲英血液学研究中心; b. 血液协同创新中心; c. 放射医学与辐射防护国家重点实验室, 江苏 苏州 215123; 2. 博生吉医药科技(苏州)有限公司, 江苏 苏州 215123)

[摘要] **目的:** 针对 CD7 阳性的急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 细胞开发一种新型的 CD7 嵌合抗原受体修饰的 T 细胞 (CD7-CAR-T), 观察其对 CD7 阳性 AML 细胞的杀伤作用。 **方法:** 基于 CD7 纳米抗体序列、CD28 和 4-1BB 共刺激域序列构建 CD7-CAR 慢病毒载体, 包装病毒颗粒并与 CD7 蛋白阻断剂 (protein expression blocker, PEBL) 慢病毒共感染 T 细胞, 制备 CD7-CAR-T; 应用实时无标记动态细胞分析技术 (real time cellular analysis, RTCA) 验证 CD7-CAR-T 对 CD7 过表达的 293T 细胞的特异性杀伤能力, 流式细胞术检测 CD7-CAR-T 对 CD7 高、中、低表达的 AML 细胞 (KG-1、HEL、Kasumi-1 细胞) 的增殖和细胞因子分泌的影响。 **结果:** 成功构建 CD7-CAR-T 细胞并阻断其表面 CD7 的表达, 与 T 细胞相比, CD7-CAR-T 细胞可以抑制 CD7-293T 细胞的增殖并促进其分泌 TNF、Granzyme B 和 INF- γ , 可显著促进 CD7 阳性的 KG-1 细胞和 HEL 细胞的凋亡 ($t=147.1, P<0.01$; $t=23.57, P<0.01$) 和细胞因子分泌 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而对低表达 CD7 的 Kasumi-1 细胞无显著影响 ($t=0.7058, P>0.05$)。 **结论:** CD7-CAR-T 细胞能够特异性杀伤 CD7 阳性的 AML 细胞。

[关键词] 嵌合抗原受体修饰的 T 细胞; CD7; 急性髓系白血病; 凋亡

[中图分类号] R733.71; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)08-0852-08

The killing activity of a CD7 nanobody derived CAR-T cells on CD7 positive acute myeloid leukemia cells

FAN Shuangshuang^{1a}, ZHANG Tingting^{1a}, WANG Tian^{1c}, SHENG Binjie^{1a}, YOU Fengtao², CHEN Dan^{1a}, ZHAI Xiaochen^{1a}, AN Gangli^{1a}, MENG Huimin^{1a}, YANG Lin^{1a,1b,1c,2} (1a. Cyrus Tang Hematology Center, 1b. Collaborative Innovation Center of Hematology, 1c. State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China; 2. Persongen Bio Therapeutics (Suzhou) Co., Ltd, Suzhou 215123, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a new type of CD7 chimeric antigen receptor modified T cell (CD7-CAR-T) for the treatment of CD7 positive acute myeloid leukemia (AML), and to observe its killing effect on CD7 positive AML cells. **Methods:** The CD7-CAR lentiviral vector was constructed based on the CD7 Nanobody sequence and costimulatory domain sequence of CD28 and 4-1BB. The lentiviral particles were packaged and used to co-transfect human T cells with protein expression blocker (PEBL), so as to prepare CD7-CAR-T cells. Real time cellular analysis (RTCA) was used to monitor the cytotoxicity of CD7-CAR-T cells on CD7 overexpressed 293T cells. Flow cytometry assay was used to detect the effect of CD7-CAR-T cells on proliferation and cytokine secretion of AML cells with high, medium and low CD7 expressions (KG-1, HEL and Kasumi-1 cells, respectively). **Results:** CD7-CAR-T cell was successfully constructed and its surface expression of CD7 was successfully blocked. Compared with T cells, CD7-CAR-T cells could significantly inhibit the proliferation of CD7-293T cells and promote the release of TNF, Granzyme B and INF- γ ; in addition, CD7-CAR-T cells also significantly promoted the apoptosis ($t=147.1, P<0.01$; $t=23.57, P<0.01$) and cytokine release ($P<0.05$ or $P<0.01$) in

[基金项目] 国家重点研发计划资助项目 (No. 2016YFC1303403); 国家自然科学基金资助项目 (No. 81872431; 31471283); 江苏省高等学校优势学科建设工程资助项目; 协同创新重大项目资助 (No. XYXT-2015304); 江苏省“六大人才高峰工程”资助项目 (No. SWYY-CXTD-010); 江苏省高等学校自然科学基金资助项目 (No. 19KJD320003)。 Project supported by the National Key R&D Program of China (No. 2016YFC1303403), the Natural Science Foundation of China (No. 81872431 and No. 31471283), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, the Collaborative Innovation Major Project (No. XYXT-2015304), the Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province (No. SWYY-CXTD-010), and the Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (No. 19KJD320003)

[作者简介] 范双双 (1994-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤 CAR-T 治疗相关研究, E-mail: 879071158@qq.com

[通信作者] 孟会敏 (MENG Huimin, corresponding author), 博士, 助理研究员, 主要从事肿瘤 CAR-T 治疗相关研究, E-mail: mhm@suda.edu.cn; 杨林 (YANG Lin, co-corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤 CAR-T 治疗相关研究, E-mail: yanglin@suda.edu.cn

CD7 positive KG-1 and HEL cells, but had little effect on Kasumi-1 cells that only expressed minimal CD7 antigen ($t=0.7058$, $P>0.05$).

Conclusion: CD7-CAR-T cells can specifically kill CD7-positive AML cells *in vitro*.

[Key words] chimeric antigen receptor gene modified-T lymphocytes (CAR-T); CD7; acute myeloid leukemia (AML); apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(8): 852-859. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.08.003]

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是高度异质性的克隆性造血干细胞疾病,目前尚缺乏有效的治疗手段,60岁以下的患者5年总生存率(OS)在40%左右,而对于占AML患者绝大多数的60岁以上的患者来说,5年OS仅有10%~20%^[1-2]。嵌合抗原受体基因修饰T淋巴细胞(chimeric antigen receptor gene modified-T lymphocytes, CAR-T)技术是近年来发展非常迅速的免疫治疗方法^[3],其中CAR的分子结构主要包括胞外抗原结合区和胞内共刺激区^[4-6]。目前AML的CAR-T治疗中多以CD123和CD33为靶点,但取得疗效的同时也伴随着较大的骨髓毒性,所以寻找一个相对安全性较好的靶点至关重要^[7-10]。

CD7是一种穿膜糖蛋白,其阳性患者占AML的30%左右^[11]。CD7的正常表达主要局限于T细胞和NK细胞及其前体,粒细胞和成熟B淋巴细胞不表达。另外,在CD7阳性的细胞群中均检测不到粒细胞、红细胞、巨核细胞和巨噬细胞等^[12-13]。因此,CD7是一个安全性较好的靶点。CD7阳性的AML患者的总生存率和无病生存率明显低于CD7阴性患者^[14],并且CD7阳性AML患者肝肿大和中枢神经系统受累也较为常见,对常规AML治疗方案的反应明显低于CD7阴性的AML患者^[15]。以上结果均显示CD7表达在AML诊断和治疗中的重要性,CD7阳性的AML的临床特征已逐渐成为一个独特的AML类别。因此,研究CD7-CAR-T对AML细胞的杀伤作用可为其临床转化奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系与主要试剂

AML细胞系来源:KG-1和Kasumi-1细胞系购自ATCC,HEL、AML5、HL-60及THP-1细胞系由苏州大学唐仲英血液学研究中心赵昀老师实验室馈赠;其中HEL细胞和Kasumi-1细胞应用添加10% FBS的RPMI 1640培养基培养,KG-1细胞应用添加10% FBS的IMDM培养基培养。人肾上皮293T细胞系购自ATCC,常规培养。

RPMI 1640和DMEM培养基购自Invitrogen公司, Tex-MACSTMGMMP培养基及CD3/CD28磁珠购自美天旎生物技术有限公司, Fc抗体、Cytometric Bead Array(CBA)System相关试剂盒和Human Granzyme B、Human TNF、Human IL-2、Human IFN- γ 细胞

因子试剂盒均购自BD公司,凋亡试剂盒Annexin V-APC/7-AAD Apoptosis Kit购自杭州联科生物公司,羧荧光素琥珀酸亚胺酯(carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE)购自Invitrogen公司。

1.2 T细胞的分离和培养

抽取正常人外周静脉血, Ficoll法提取PBMC,置于24孔板中培养(1×10^6 个/孔),每孔添加20 μ l的CD3/CD28磁珠激活T细胞,然后应用添加IL-7和IL-15的Tex-MACSTMGMMP培养基培养。所有细胞均在5% CO₂、37 °C饱和湿度的细胞培养箱中培养。T细胞在体外激活48 h后进行CD7-CAR病毒转染,待细胞增殖至数目足够时进行体外毒性实验。

1.3 CD7-CAR载体构建

由苏州鸿讯生物技术有限公司进行CAR基因合成,然后亚克隆到pCAR-AT-Free慢病毒载体上。CD7-CAR载体结构包括纳米抗体CD7序列、人Fc序列、共刺激分子CD28、4-1BB序列和CD3 ζ 序列。蛋白阻断剂(protein expression blocker, PEBL)载体结构包含anti-CD7纳米抗体和内质网滞留序列。

1.4 包装CD7-CAR和PEBL慢病毒并感染T细胞

按照本实验室传统的方法^[16]制备CD7-CAR和PEBL慢病毒。检测CD7-CAR慢病毒的滴度:将293T细胞以 1×10^5 个/孔接种于24孔板,设两对照孔和4个滴度检测孔,培养24 h后将病毒液分别以0.01、0.1、10 μ l的体积梯度加入到孔板中,48 h后向滴度检测孔中补加1 ml培养基,72 h后重悬各孔中的293T细胞至1.5 ml的EP管中;其中一个对照孔加适量PBS直接等待流式检测,另外一个对照孔和四孔滴度检测孔使用100 μ l/管1:1 000稀释后的Fc-APC抗体,37 °C孵育20 min,再添加适量PBS重悬离心,重复清洗两遍,使用过滤网过滤后将其转移到流式细胞管中,通过流式细胞术来检测293T中Fc的阳性率;最后根据流式细胞术检测数据计算出单位体积中病毒颗粒的个数。T细胞激活48 h后置于48孔板(5×10^5 个/孔)中,加入MOI=30的CD7-CAR慢病毒和15 μ l的PEBL慢病毒液,终体系为100 μ l,共培养15 h后补加1 000 μ l Tex-MACSTMGMMP培养基进行培养。

1.5 流式细胞术检测AML细胞表面CD7的表达和CD7-CAR的转染率

AML细胞AML5、KG-1、HEL、HL-60、THP-1和Kasumi-1分别分为两组,其中一组细胞离心弃上清,

pH 7.4的PBS清洗1次,用500 μ l的PBS重悬细胞,为Control组;另一组细胞离心弃上清,pH 7.4的PBS清洗1次,应用FITC-CD7抗体(1:100)孵育20 min,PBS清洗2次,用500 μ l的PBS重悬细胞,为实验组。应用流式细胞术检测细胞表面CD7的表达。

取CD7-CAR-T细胞及T细胞各 2×10^6 个,PBS清洗1次后应用APC-FC抗体(1:1 000)孵育30 min,PBS清洗2次,再应用FITC-CD7抗体(1:100)孵育20 min,PBS清洗1次,应用500 μ l PBS重悬细胞,应用流式细胞术检测细胞表面CD7-CAR的表达。

1.6 实时无标记动态细胞分析技术(real time cellular analysis, RTCA)检测CD7-CAR-T对CD7阳性293T细胞的特异性杀伤

第一天将浓度为 1×10^4 个/100 μ l的293T和293T-CD7细胞取100 μ l铺于RTCA板中,第二天按5:1和10:1的效靶比将T细胞和CD7-CAR-T细胞依次加入第一天所铺的RTCA板中,补液至200 μ l,每隔15 min监测一次细胞生长指数,绘制细胞生长曲线。结束观察后,取细胞上清液检测细胞因子的分泌水平。

1.7 流式细胞术检测CD7-CAR-T对AML细胞的凋亡的影响

分别取 1×10^5 个KG-1、HEL和Kasumi-1肿瘤细胞离心后,肿瘤细胞应用CFSE孵育15 min,PBS清洗2次后铺于24孔板中,按1:1的效靶比分别加入T细胞和CD7-CAR-T细胞,补液至2 ml。48 h后按凋亡检测试剂盒说明书操作,流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡比例。

1.8 流式细胞术检测CD7-CAR-T对AML细胞分泌细胞因子的影响

应用Cytometric Bead Array(CBA)系统检测效应细胞与肿瘤细胞共孵育48 h后细胞上清液中效应细胞分泌的细胞因子水平。取50 μ l细胞培养上清液,应用Human Granzyme B CBA Flex Set D7 Kit、Human TNF Flex Set D9 Kit、Human IL-2 Flex Set A4 Kit和Human IFN- γ CBA Flex Set E7 Kit细胞因子检测试剂盒处理后,流式细胞仪检测细胞因子分泌水平。

1.9 统计学处理

采用GraphPad Prism5软件分析,呈正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 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 成功筛选出CD7阳性的AML细胞株

流式细胞术检测结果(图1)显示,KG-1细胞表

面CD7表达率为97.61%(图1A),HEL细胞表面CD7表达率为69.32%(图1B),THP-1细胞表面CD7表达率为3.36%(图1C),HL-60细胞表面CD7表达率为1.19%(图1D),AML5细胞表面CD7表达率为0.50%(图1E),Kasumi-1细胞表面CD7表达率为0.17%(图1F)。因此选择KG-1、HEL和Kasumi-1细胞(CD7高、中、低表达)进行后期实验。

2.2 成功构建CD7-CAR-T细胞并阻断其表面CD7的表达

CD7-CAR与PEBL的载体结构如图2A所示。PEBL慢病毒感染T细胞后,PEBL病毒可以持续阻断T细胞表面CD7的表达(图2B)。应用不同量的CD7-CAR病毒感染293T细胞后,流式细胞术检测其表面CD7-CAR的阳性率,经计算,CD7-CAR的病毒滴度约为 5×10^9 TU/ml(图2C)。PEBL和CD7-CAR病毒以MOI=30共感染T细胞后,CD7-CAR-T细胞的阳性率检测为31.97%,且CD7-CAR T细胞表面的CD7被阻断(图2D)。

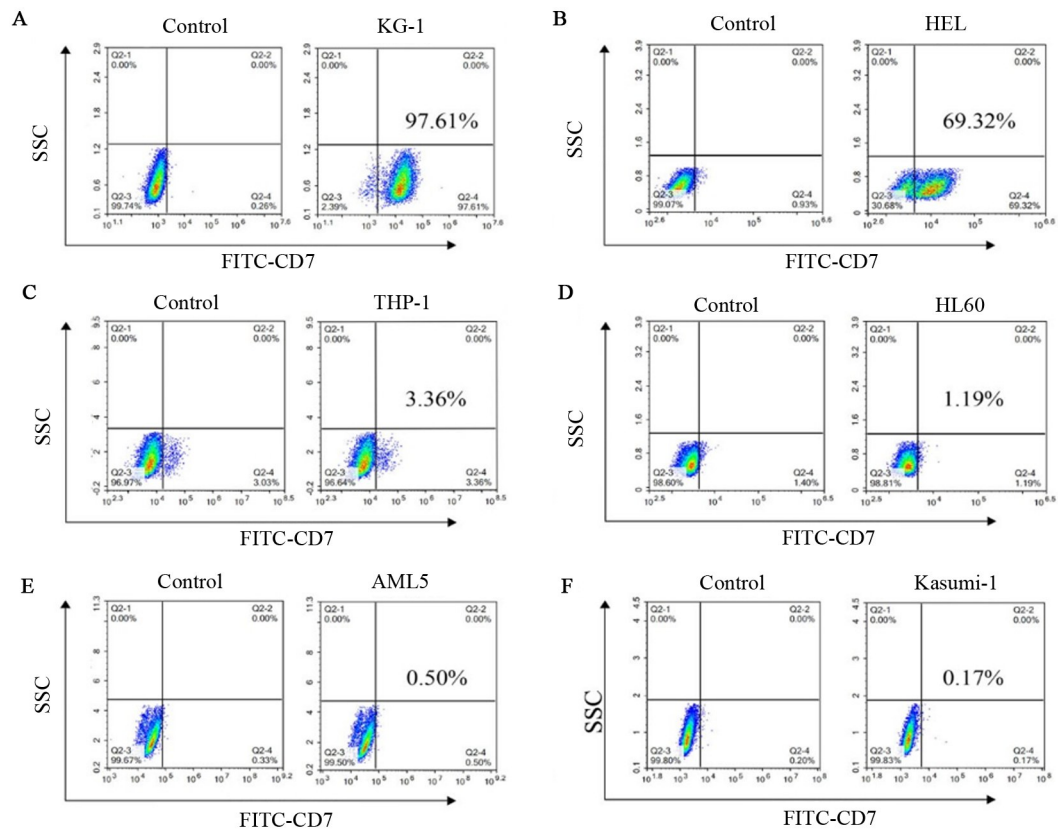
2.3 CD7-CAR-T细胞特异性杀伤CD7阳性AML细胞

应用RTCA监测肿瘤细胞生长曲线的变化96 h,结果(图3A)显示,T细胞和CD7-CAR-T细胞对293T细胞增殖的影响并没有明显的差异;而与T细胞相比,CD7-CAR-T细胞可以明显抑制CD7-293T细胞的增殖。收集各组细胞培养上清液,检测细胞因子分泌水平,结果(图3B)显示,CD7-CAR-T与293T-CD7细胞共孵育组的TNF、Granzyme B和INF- γ 明显高于其他组,IL-2略高于其他组,趋势与肿瘤细胞生长曲线图相吻合。

2.4 CD7-CAR-T细胞对CD7阳性AML细胞具有很强的特异性杀伤能力

将T细胞和CD7-CAR-T细胞分别与KG-1细胞、HEL细胞及Kasumi-1细胞按1:1的效靶比共孵育48 h,应用流式细胞术检测其凋亡,结果(图4A)显示,与T细胞相比,与CD7-CAR-T细胞共孵育的KG-1细胞和HEL细胞几乎全部凋亡,而Kasumi-1细胞的凋亡水平在T细胞组和CD7-CAR-T组中无显著差异(KG-1细胞: $t=147.1$ 、 $P < 0.01$; HEL细胞: $t=23.57$ 、 $P < 0.01$; Kasumi-1细胞: $t=0.7058$ 、 $P > 0.05$)。

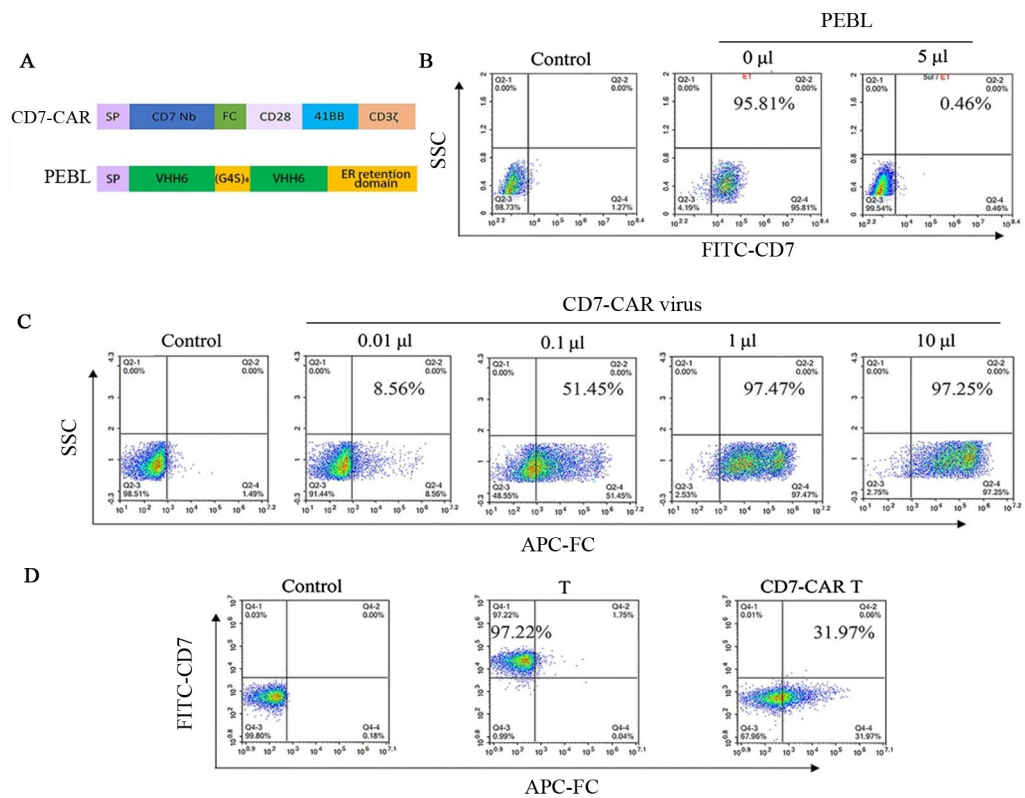
取共孵育后的细胞培养液上清,检测细胞因子分泌情况,与杀伤实验结果一致,高表达和中度表达CD7的肿瘤细胞共孵育的CD7-CAR-T细胞组的细胞因子分泌量明显高于其他组(IL-2: $t=4.042$ 、 $P < 0.05$; INF- γ : $t=52.72$ 、 $P < 0.01$; TNF: $t=18.59$ 、 $P < 0.01$; Granzyme B: $t=103.3$ 、 $P < 0.01$;图4B)。



A: KG-1 cell; B: HEL cell; C: THP-1 cell; D: HL60 cell; E: AML5 cell; F: Kasumi-1 cell

图1 六株AML细胞系表面CD7的表达

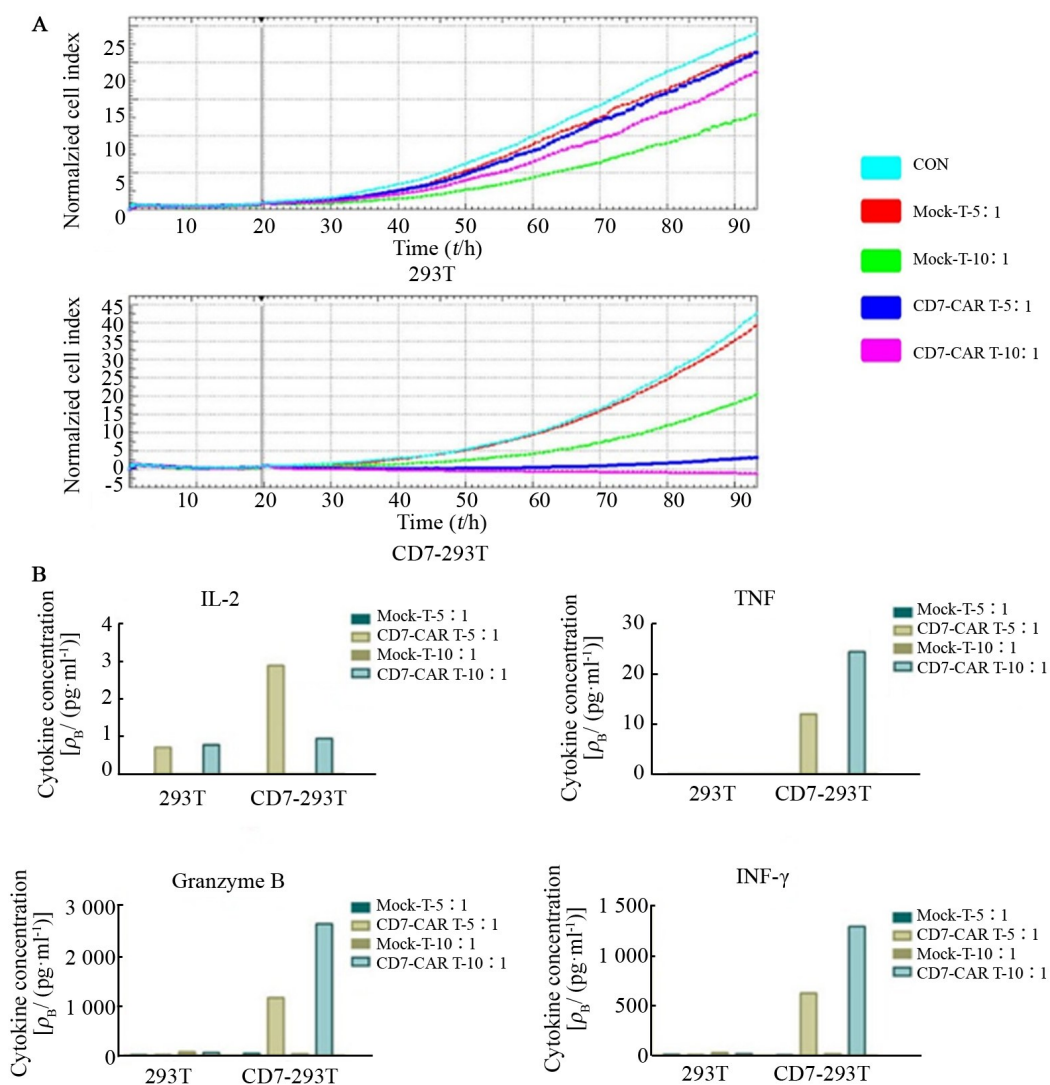
Fig.1 CD7 expression assay of AML cell lines



A: CD7-CAR and PEBL structure; B: PEBL blocking effect; C: CD7-CAR virus titer; D: Expression rate of CD7-CAR-T

图2 CD7-CAR-T细胞的构建和制备

Fig.2 Construction and preparation of CD7-CAR-T cells



A: Growth curves of 293T cells and 293T-CD7 cells after adding T cells and CD7-CAR-T cells, respectively;

B: Four cytokine secretions

图3 CD7-CAR-T 特异性杀伤 CD7 阳性 293T 细胞

Fig.3 CD7-CAR-T specifically killed CD7 positive 293T cells

3 讨论

AML 是一种非常难治的侵袭性造血干细胞恶性肿瘤^[17]。近十几年来,随着一些新的治疗方法的出现,AML 患者的预期寿命虽然有所改善,但由于耐药和难治性,AML 仍然是最致命最难治愈的癌症之一^[18-20]。因此,急需复发难治 AML 的探索新型的治疗手段。开发 AML 的新型疗法,不仅需要关注其疗效性,更重要的是其安全性及对患者本身的毒性作用。

CAR-T 作为一种新兴的免疫治疗手段,其在血液肿瘤、实体肿瘤治疗中的应用都具有较好的前景^[21-22]。该治疗手段的基本原理是向 T 细胞中载入具有特异性识别能力的嵌合抗原受体,其可以作用于人体肿瘤细胞的表面抗原实现特异性识别。在

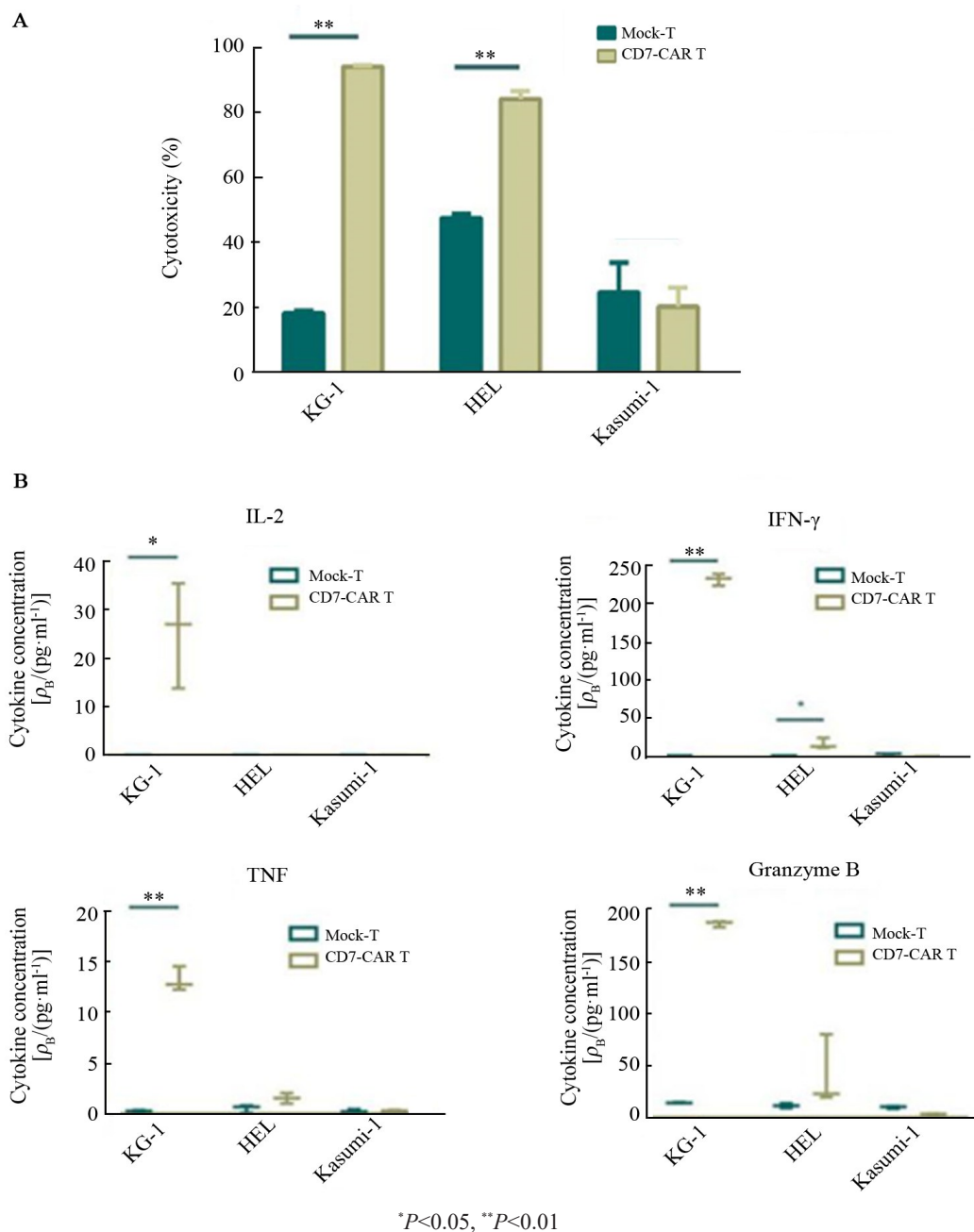
CAR-T 治疗方法的发展进步过程之中,其信号分子数量由 1 个发展到多个,初代 CAR 中只含有一个 CD3ζ 分子,而现阶段使用较多的第二、三代 CAR 则拥有多个信号分子^[23-24]。

因为 AML CAR-T 治疗的大部分靶点在人体常见的髓细胞中都具有不同程度的表达,如 CD33、CD123,虽然具有一定的临床疗效潜力,但却不能避免严重的造血系统毒副作用。因此寻找只在肿瘤细胞中选择性表达,而在正常细胞中不表达或低表达的抗原尤为重要。正常 T 细胞表面也会有 CD7 的表达,为了避免 CD7-CAR-T 细胞互相残杀并杀伤正常 T 细胞,因此需要阻断正常 T 细胞表面 CD7 的表达。目前有两种阻断的方法:一种是基因敲除,另一种是使用 PEBL。研究^[25]证明第二种抑制方法更好,不仅可以抑制细胞表面 CD7 的表达,而且与基因敲除相

比更加符合临床伦理, 因此本研究也采用 PEBL 法。本研究应用 RTCA 技术、肿瘤细胞凋亡检测和细胞因子分泌检测等结果证明了 CD7-CAR-T 细胞可以特异性杀伤 CD7 阳性的 AML 肿瘤细胞。在前期实验中, 本课题组先后应用 1:5、1:1 和 5:1 三个效靶比细胞共孵育 24 h, 1:2、1:1 和 2:1 三个效靶比共孵育 24 h 和 48 h, 发现与 CD7-CAR-T 共孵育的 KG-1 细胞和 HEL 细胞几乎全部凋亡, 与本研究结果相同, CD7-CAR-T 促 AML 细胞凋亡效果与肿瘤细胞表达 CD7 抗原的强弱有关, 对于不表达 CD7 抗原的 AML 细胞没有特异性杀伤。本研究的体外数据初步证明 CD7-

CAR-T 细胞可高效杀伤 CD7 阳性的 AML 肿瘤细胞, 后续的动物体内的药效和安全性试验正在进行之中。

虽然 CD7-CAR-T 细胞不会对造血干细胞产生毒性, 但是可能会对正常的 CD7 阳性的 T 细胞产生一定的毒性作用。前期研究^[26]显示大约有 9% 的正常 T 细胞不表达 CD7, 这些 CD7 阴性的正常 T 细胞拥有健全的 T 细胞活性功能, 因此可以在 CD7-CAR-T 细胞发挥作用后生存下来, 从而为患者提供了一个基本的免疫保护, 能够最大程度减轻由于 T 细胞缺失而引起的症状。



A: Apoptosis of AML cells after incubating effector cells and target cells at a 1:1 effect target ratio for 48 h; B: Secretion of 4 cytokines

图4 CD7-CAR-T 对 CD7 阳性的 AML 细胞具有较强的杀伤效果

Fig.4 CD7-CAR-T exhibited potent cytotoxicity against CD7 positive AML cells

在未来可以尝试通过CAR-T技术与造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplant, HSCT)联合治疗AML。目前为止,唯一能够为AML患者提供长期生存优势的治疗方式是HSTC,但要想获得较好的疗效,患者必须在完全缓解及微小残留灶(minimal residual disease, MRD)阴性的情况下进行移植。对于复发难治的AML患者,传统的放化疗方法已经很难使患者达到完全缓解,而CAR-T可以联合HSCT应用,患者预先注射CAR-T,减少患者移植前的肿瘤负荷,使患者在完全缓解的状态下接受移植,从而获得更好的疗效及更长的生存期^[27]。

目前,已有多个CAR-T产品被美国FDA批准上市,CD19-CAR-T在临床中已经取得了显著的疗效^[28-30]。CAR-T疗法无论是在血液瘤还是实体瘤的治疗中都取得了巨大的进展,被认为是最有前景的肿瘤治疗方式之一^[31-33]。本研究所构建的CD7-CAR-T在体外具有良好的特异性清除肿瘤细胞的效果,为其将来进一步应用于临床提供了强有力的实验基础,为复发难治的AML患者带来了新的希望。

[参考文献]

- [1] DÖHNER H, WEISDORF D J, BLOOMFIELD C D. Acute myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(12): 1136-1152. DOI: 10.1056/nejmra1406184.
- [2] DÖHNER H, ESTEY E H, AMADORI S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet[J]. *Blood*, 2010, 115(3): 453-474. DOI: 10.1182/blood-2009-07-235358.
- [3] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-1365. DOI:10.1126/science.aar6711.
- [4] NEELAPU S S, LOCKE F L, GO W Y. CAR T-cell therapy in large B-cell lymphoma[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(11): 1065. DOI: 10.1056/nejmc1800913.
- [5] TOWNSEND M H, SHRESTHA G, ROBISON R A, et al. The expansion of targetable biomarkers for CAR T cell therapy[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 163[2019-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6054736/>. DOI:10.1186/s13046-018-0817-0.
- [6] SIMON B, USLU U. CAR-T cell therapy in melanoma: a future success story? [J]. *Exp Dermatol*, 2018, 27(12): 1315-1321. DOI: 10.1111/exd.13792.
- [7] LICHTENEGGER F S, KRUPKA C, KÖHNKE T, et al. Immunotherapy for acute myeloid leukemia[J]. *Semin Hematol*, 2015, 52(3): 207-214. DOI:10.1053/j.seminhematol.2015.03.006.
- [8] AMADORI S, SUCIU S, SELLESLAG D, et al. Gemtuzumab ozogamicin versus best supportive care in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia unsuitable for intensive chemotherapy: results of the randomized phase III EORTC-GIMEMA AML-19 trial[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(9): 972-979. DOI:10.1200/JCO.2015.64.0060.
- [9] PETERSDORF S H, KOPECKY K J, SLOVAK M, et al. A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2013, 121(24): 4854-4860. DOI: 10.1182/blood-2013-01-466706.
- [10] APPELBAUM F R, BERNSTEIN I D. Gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2017, 130(22): 2373-2376. DOI:10.1182/blood-2017-09-797712.
- [11] BREMER E, TEN CATE B, SAMPLONIUS D F, et al. CD7-restricted activation of Fas-mediated apoptosis: a novel therapeutic approach for acute T-cell leukemia[J]. *Blood*, 2006, 107(7): 2863-2870. DOI:10.1182/blood-2005-07-2929.
- [12] HAO Q L, ZHU J, PRICE M A, et al. Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood[J]. *Blood*, 2001, 97(12): 3683-3690. DOI:10.1182/blood.v97.12.3683.
- [13] DALY A S, KAMEL-REID S, LIPTON J H, et al. Acute leukemia of donor origin arising after stem cell transplantation for acute promyelocytic leukemia[J]. *Leuk Res*, 2004, 28(10): 1107-1111. DOI: 10.1016/j.leukres.2004.02.003.
- [14] DEL POETA G, STASI R, VENDITTI A, et al. CD7 expression in acute myeloid leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 1995, 17(1/2): 111-119. DOI:10.3109/10428199509051710.
- [15] KITA K, MIWA H, NAKASE K, et al. Clinical importance of CD7 expression in acute myelocytic leukemia[J]. *Blood*, 1993, 81(9): 2399-2405.
- [16] CHEN Y, YOU F T, JIANG L C, et al. Gene-modified NK-92MI cells expressing a chimeric CD16-BB-zeta or CD64-BB-zeta receptor exhibit enhanced cancer-killing ability in combination with therapeutic antibody[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37128-37139. DOI: 10.18632/oncotarget.16201.
- [17] DIJK M V, MURPHY E, MORRELL R, et al. The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes AML with myelomonocytic differentiation to TRAIL mediated apoptosis[J]. *Cancers (Basel)*, 2011, 3(1): 1329-1350. DOI:10.3390/cancers3011329.
- [18] GUINN B A, MOHAMEDALI A, THOMAS N S B, et al. Immunotherapy of myeloid leukaemia[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(7): 943-957. DOI:10.1007/s00262-006-0267-y.
- [19] BOSE P, VACHHANI P, CORTES J E. Treatment of relapsed/refractory acute myeloid leukemia[J/OL]. *Curr Treat Options Oncol*, 2017, 18(3): 17[2019-11-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28286924/>. DOI:10.1007/s11864-017-0456-2.
- [20] NAGANNA N, OPOKU-TEMENG C, CHOI E Y, et al. Amino alkynylisoquinoline and alkynyl-naphthyridine compounds potently inhibit acute myeloid leukemia proliferation in mice[J/OL]. *EBio Medicine*, 2019, 40: 231-239[2020-01-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6413339/>. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.01.012.
- [21] BRUDNO J N, KOCHENDERFER J N. Recent advances in CAR T cell toxicity: mechanisms, manifestations and management[J/OL]. *Blood Rev*, 2019, 34: 45-55[2020-01-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6628697/>. DOI:10.1016/j.blre.2018.11.002.
- [22] RICHARDS R M, SOTILLO E, MAJZNER R G. CAR T cell therapy for neuroblastoma[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2380. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02380.

- [23] WANG J H, CHEN S Y, XIAO W, et al. CAR-T cells targeting CLL-1 as an approach to treat acute myeloid leukemia[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 7[2019-11-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5761206/>. DOI:10.1186/s13045-017-0553-5.
- [24] BRUDNO J N, KOCHENDERFER J N. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(1): 31-46. DOI:10.1038/nrclinonc.2017.128.
- [25] PNG Y T, VINANICA N, KAMIYA T, et al. Blockade of CD7 expression in T cells for effective chimeric antigen receptor targeting of T-cell malignancies[J]. *Blood Adv*, 2017, 1(25): 2348-2360. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017009928.
- [26] AANDAHL E M, SANDBERG J K, BECKERMAN K P, et al. CD7 is a differentiation marker that identifies multiple CD8 T cell effector subsets[J]. *J Immunol*, 2003, 170(5): 2349-2355. DOI:10.4049/jimmunol.170.5.2349.
- [27] WANG X L, POPPLEWELL L L, WAGNER J R, et al. Phase 1 studies of central memory-derived CD19 CAR T-cell therapy following autologous HSCT in patients with B-cell NHL[J]. *Blood*, 2016, 127(24): 2980-2990. DOI:10.1182/blood-2015-12-686725.
- [28] DAVIES J K, SINGH H, HULS H, et al. Combining CD19 redirection and alloenergization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(10): 3915-3924. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-3845.
- [29] KOCHENDERFER J N, ROSENBERG S A. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(5): 267-276. DOI:10.1038/nrclinonc.2013.46.
- [30] GARDNER R, WU D, CHERIAN S, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy[J]. *Blood*, 2016, 127(20): 2406-2410. DOI:10.1182/blood-2015-08-665547.
- [31] MAJZNER R G, MACKALL C L. Tumor antigen escape from CAR T-cell therapy[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(10): 1219-1226. DOI:10.1158/2159-8290.cd-18-0442.
- [32] NEWICK K, O'BRIEN S, MOON E, et al. CAR T cell therapy for solid tumors[J]. *Annu Rev Med*, 2017, 68(1): 139-152. DOI: 10.1146/annurev-med-062315-120245.
- [33] WANG Z G, WU Z Q, LIU Y, et al. New development in CAR-T cell therapy[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10: 53. DOI: 10.1186/s13045-017-0423-1.

[收稿日期] 2020-03-05

[修回日期] 2020-06-24

[本文编辑] 黄静怡