

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.03.003

一种新的人源化抗 CD19 嵌合抗原受体 NK 细胞的制备 和对体外肿瘤细胞杀伤作用 *

张 灿 庄清慧 白 玥 王 芳 钟晓松[△]

(首都医科大学附属北京世纪坛医院 临床基因与细胞工程中心 北京 100038)

摘要 目的:构建人源化抗 CD19 嵌合抗原受体 NK 细胞(hCAR19-NK),并且在体外证明其对 CD19 阳性血液病肿瘤细胞杀伤作用。**方法:**构建人源化的第二代 CD19 CAR 的逆转录病毒载体,使用辐照的 K562-4-1BBL-mIL21 细胞刺激外周血来源的 NK 细胞,通过逆转录病毒转导 NK 细胞获得 hCAR19-NK 细胞;采用流式细胞术和 Western blot 检测转导效率;采用 4 h 荧光杀伤实验和 ELISA 法检测 hCAR19-NK 细胞对淋巴瘤细胞的杀伤能力和 IFN- γ 释放水平;采用 CD107a 脱颗粒实验评估淋巴瘤细胞对 hCAR19-NK 细胞的特异性激活;比较对照组(Mock)和 hCAR19-NK 组细胞扩增倍数。**结果:**流式细胞术和 Western blot 证明构建的 CAR 可以成功转导外周血来源的 NK 细胞;4 h 荧光杀伤实验证明随着效靶比例升高,hCAR19-NK 对 Raji-GL 杀伤率增加,明显高于 Mock 组;ELISA 法检测显示 Raji 和 K562-CD19 作为靶细胞时,hCAR19-NK 细胞的 IFN- γ 释放明显高于 Mock 组($P<0.01$);CD19⁺ 细胞 (Raji 和 K562-CD19) 可以特异性刺激 hCAR19-NK 细胞表达 CD107a, 具有统计学意义 ($P<0.05$);Mock 组和 hCAR19-NK 组细胞扩增倍数无显著差异。**结论:**成功构建了可以杀伤 CD19⁺ 肿瘤的人源化 scFv 的第二代 hCAR19-NK 细胞。

关键词:嵌合抗原受体 NK 细胞;CD19;人源化 scFv;淋巴瘤

中图分类号:R-33;R730.51 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)03-412-05

Construction and Antitumor Activity of a New Humanized anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor NK Cells *in vitro**

ZHANG Can, ZHUANG Qing-hui, BAI Yue, WANG Fang, ZHONG Xiao-song[△]

(The Clinical Center of Gene and Cell Engineering, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100038, China)

ABSTRACT Objective: Humanized anti-CD19 chimeric antigen receptor NK cells (hCAR19-NK) were constructed successfully and proved to kill CD19 positive hematological tumor cells *in vitro*. **Methods:** The retroviral vector of humanized second-generation CD19 chimeric antigen receptor was constructed. Irradiated K562-4-1BBL-mIL21 as feeder cells were used to stimulate peripheral blood derived NK cells, and hCAR19-NK cells were obtained by retroviral transduction of NK cells; The transduction efficiency was detected by flow cytometry and Western blot; The killing ability and IFN- γ release level of hCAR19-NK cells on lymphoma cells were detected by 4 h fluorescence killing test and ELISA; CD107a degranulation test was used to evaluate the specific activation of lymphoma cells to hCAR19-NK cells; The cell expansion times of control group (Mock) and hCAR19-NK group were compared. **Results:** Flow cytometry and Western blot showed that the constructed CAR could successfully transduce NK cells from peripheral blood; The hCAR19-NK cells exhibited good anti-tumor activity *in vitro* via killing Raji-GL cells after 4 hours co-culture; After co-culture of hCAR19-NK and different CD19 positive cell lines, the IFN- γ release was significantly higher than those in the Mock group ($P<0.01$); CD19⁺ cells (Raji and K562-CD19) could specifically stimulate the expression of CD107a in hCAR19-NK cells and CD107a degranulation was significantly higher than those in the Mock group ($P<0.05$); And the fold expansion of hCAR19-NK cells *in vitro* was similar to Mock cells. **Conclusion:** The second-generation hCAR19-NK cells using humanized scFv have been successfully constructed for the effectively treatment of CD19 positive cell lines.

Key words: Chimeric antigen receptor NK cells; CD19; Humanized scFv; Lymphoma

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R730.51 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)03-412-05

前言

近年来,嵌合抗原受体 T 细胞(Chimeric antigen receptor,

CAR-T)在治疗血液系统恶性肿瘤中具有显著疗效,但由于其引起的一些毒副作用而使用受限,其中最为常见的是细胞因子释放综合征(Cytokine release syndrome, CRS)^[1,2],表现为发热、

* 基金项目:北京市科技计划脑科学专项基金项目(Z161100000216136)

作者简介:张灿(1990-),女,硕士,研究实习生,主要研究方向:肿瘤的基因与免疫治疗的研究,E-mail: zhangcan3375@bjsjth.cn

[△] 通讯作者:钟晓松,E-mail: m15313000323@163.com

(收稿日期:2022-07-26 接受日期:2022-08-21)

低血压和凝血功能障碍,严重者可导致血管不稳定、巨噬细胞活化综合征和终末器官毒性。自然杀伤细胞(natural killer, NK)作为天然免疫的效应细胞,具有很强的抗肿瘤能力,不会引起较强的 CRS,也不会造成移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)^[3,4],因此,制备 CAR-NK 细胞可以取自与患者无关健康供体,还可以通过其天然的杀伤机制克服由于抗原逃逸引起的复发^[5]。有文献报道采用人源化单链抗体(single chain antibody fragment, scFv)可以延长 CAR-T 细胞在体内的存活进而提高疗效^[6]。因此,本研究初步构建了一种人源化 scFv 的第二代 CD19CAR 的逆转录病毒载体,在体外制备 CAR-NK 细胞,经验证其具备体外扩增和杀伤 CD19⁺ 血液肿瘤细胞能力。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

K562、Raji 和 PG-13 细胞系购自 ATCC。K562-GL、Raji-GL、K562-CD19 和 K562-4-1BBL-mIL21 细胞由实验室构建,方法参考^[7]。所有细胞系支原体检测均为阴性。RPMI 1640 培养基和 DMEM 培养基购自 Lonza 公司。淋巴细胞分离液购自美国 MP 公司。胎牛血清购自 Thermo 公司。重组人白细胞介素-2 购自双鹭药业。人 NK 细胞分离试剂盒购自 Miltenyi 公司。逆转录病毒质粒及包装体系均为本实验室保存。所有流式抗体均购自美国 BD 公司。IFN- γ ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D 公司。D-虫荧光素钾盐购自桥生物。

1.2 实验方法

1.2.1 靶向 CD19 人源化 scFv 的第二代 CAR 的逆转录病毒的构建和包装 本实验室前期构建了 MSGV-FMC63-28Z 质粒^[7],设计人源化 scFv 对 CAR 结构进行改造,采用 PG-13 病毒包装体系^[8]制备逆转录病毒,高速离心后 -80℃ 保存。以空质粒包装的逆转录病毒载体作为 Mock 组。

1.2.2 hCAR19-NK 细胞的制备 采集多位健康志愿者外周血,使用人 NK 细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)纯化 CD56⁺ NK 细胞,采用 100 cGy 辐照的 K562-4-1BBL-mIL21 细胞作为饲养层细胞(feeder),在第 0 天以 feeder: NK=1:1 的比例进行共培养,于第 6 天转导逆转录病毒^[3],次日换含有 IL-2 (400 IU/mL)的完全培养基进行 hCAR19-NK 细胞扩增,在转导后第 8 天采用流式细胞仪检测病毒转导效率,并用 Western blot 验证是否表达外源性 CD3 ζ 。

1.2.3 肿瘤细胞对 hCAR19-NK 细胞的特异性激活 CD107a 脱颗粒实验:按照效靶比 5:1 将效应细胞(Mock 和 hCAR19-NK)与肿瘤细胞(K562、Raji 和 K562-CD19)共培养,期间加入 1 μ L CD107a 抗体和 1 μ L 的 Golgi Stop,6 h 后收集细胞,再染色 CD56 进行流式检测。

1.2.4 评估 hCAR19-NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤能力和细胞因子释放能力 4 h 共培养荧光杀伤实验:按照效靶比 10:1、5:1、2.5:1、1:1 将效应细胞(Mock 和 hCAR19-NK)与肿瘤细胞(Raji-GL 和 K562-GL)共培养 4 h,加入 D-虫荧光素钾稀释至 150 μ g/mL,采用 Xenogen IVIS 成像系统进行荧光拍照,杀伤率基于孔中的肿瘤细胞的荧光值,计算公式:杀伤率=100-(效应细胞和靶细胞共培养荧光值/靶细胞荧光值) $\times$ 100。ELISA 法检测 IFN- γ 释放:按照效靶比 5:1 将效应细胞(Mock 和

hCAR19-NK)与肿瘤细胞(K562、Raji 和 K562-CD19)共培养 24 h,收集上清离心后,用 ELISA 标准方法检测 IFN- γ 的分泌量。

1.2.5 比较 Mock 组和 hCAR19-NK 组的细胞扩增倍数 在第 0 天从外周血分离纯化 NK 细胞,然后以 feeder: NK=1:1 的比例进行共培养,计数 Mock 组和 hCAR19-NK 组细胞在刺激(第 0 天)、转导(第 6 天)和扩增(第 14 和 21 天)的细胞数量,比较细胞扩增倍数。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据统计,数据以均值 $\pm$ 标准误形式表示,每组实验至少独立重复三次。比较两组之间的差异,使用 t 检验分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建了靶向 CD19 的人源化 scFv 嵌合抗原受体的逆转录病毒载体,并证明其可在外周血来源的 NK 细胞稳定表达

采用人源化 CD19 scFv、CD8a 铰链区、CD28 跨膜域和胞内活化信号 CD28 以及 CD3 ζ 构建了逆转录病毒载体质粒,如图 1A。采用制备的 hCAR19-NK 逆转录病毒及对照组病毒转染活化的 NK 细胞,流式细胞仪检测转染效率分别为 1.04% 和 23.8%,如图 1B。然后再次用 Western blot 检测转染细胞的人源 CD3 ζ 的表达,结果显示与 Mock 组相比,hCAR19-NK 组有明显的外源性 CD3 ζ 的表达,如图 1C。

2.2 CD19⁺ 肿瘤细胞可以特异地刺激 hCAR19-NK 细胞脱颗粒

按照效靶比 5:1 将 Mock 组和 hCAR19-NK 组分别同 3 种靶细胞(CD19⁺ 细胞系是 K562,CD19⁺ 细胞系是 Raji 和 K562-CD19)共培养 6 h,流式细胞仪检测 Mock 组和 hCAR19-NK 组的 CD107a 的表达,结果显示与 Mock 组共培养相比,CD19⁺ 细胞系可以刺激 hCAR19-NK 组表达 CD107a,如图 2,具有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.3 hCAR19-NK 细胞在体外可以特异性杀伤 CD19⁺ 肿瘤细胞并释放 IFN- γ

按照不同效靶比(E:T)将 Mock 组和 hCAR19-NK 组分别同 CD19⁺ 肿瘤细胞(K562-GL)或 CD19⁺ 肿瘤细胞(Raji-GL)共培养 4 h,结果显示相比于 Mock 组,hCAR19-NK 组对 Raji-GL 的杀伤更强($P<0.01$),而 Mock 组和 hCAR19-NK 组对 K562-GL 的杀伤基本无差异,如图 3A。在此选取效靶比 5:1 进行 24 h 的共培养,收取培养上清进行 IFN- γ 的 ELISA 检测,结果显示在靶细胞为 K562 的共培养中,hCAR19-NK 组(1078 ± 10.7)的 IFN- γ 的释放与 Mock 组(1036 ± 132.7)无差异;在靶细胞为 Raji 的共培养中,hCAR19-NK 组(1252 ± 77)的 IFN- γ 的释放明显高于 Mock 组(586.1 ± 51.8),在靶细胞为 K562-CD19 的共培养中,hCAR19-NK 组(790.2 ± 53.3)的 IFN- γ 的释放也明显高于 Mock 组(4145 ± 94.7),并且具有统计学意义($P<0.01$),如图 3B。

2.4 体外 hCAR19-NK 组与 Mock 组扩增细胞数量无明显差异

在第 0 天从外周血分离纯化 NK 细胞,然后以 feeder: NK=1:1 的比例进行共培养,于第 6 天转导人源化 CAR 和 Mock 组病毒,分别在第 0 天、第 6 天、第 14 天和第 21 天计算扩增倍数,结果显示与 Mock 组相比,hCAR19-NK 组的细胞扩增倍数无显著差异,如图 4。

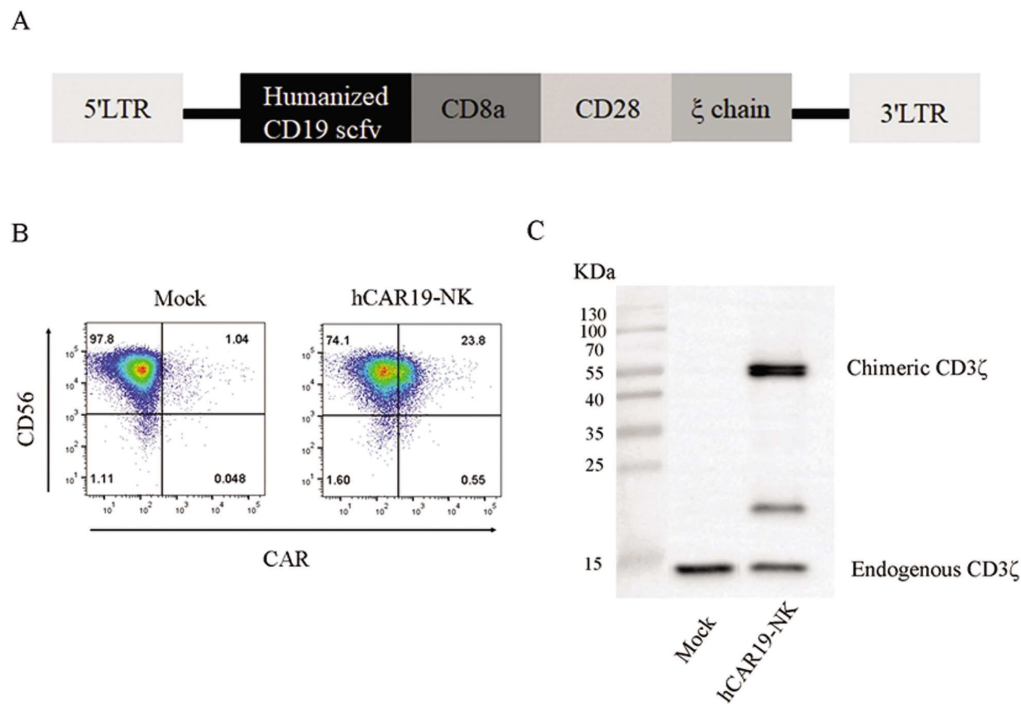


图1 hCAR19-NK 的结构设计(A),然后分别采用流式细胞术(B)和蛋白质印记法(C)检测 hCAR19-NK 细胞的 CAR 表达

Fig.1 Schematic of anti-CD19 CAR. Single-chain (sc) Fv region that recognizes CD19 was derived from Humanized monoclonal antibody. CAR contained a modified CD8a hinge, CD28 costimulatory domain and T-cell activation domain (A). CAR expression on hCAR19-NK cells surface was detected with anti-Fab antibody by flow cytometry, control staining of Mock cells is also shown (B). Detection of NK cells retrovirally transduced with CAR genes with an anti-CD3 ζ mAb by Western Immunoblot. Lane 1, Mock cells; Line 2, hCAR19-NK cells (C).

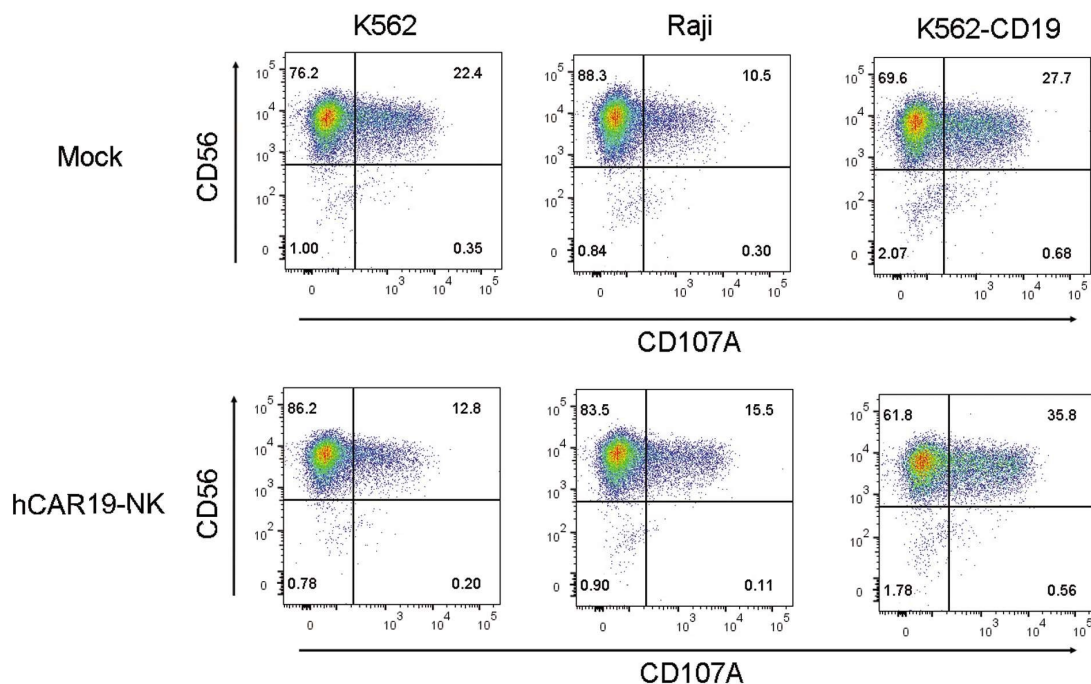


图2 流式细胞术检测 CD19 特异性刺激 hCAR19-NK 细胞表达CD107a

Fig.2 CD107a degranulation by flow cytometry in the Mock cells and hCAR19-NK cells co-cultured with K562, Raji, or K562-CD19 cells for 6 h .

3 讨论

近年来,CAR-T 细胞疗法已经成为一种强大的靶向免疫疗法,在治疗复发性或难治性 B 细胞恶性肿瘤方面具有良好的疗效^[8],其中靶向 CD19 的 CAR-T 细胞治疗淋巴瘤的总体有效

率在 50%-82%之间^[9],但 CAR-T 细胞疗法在实体瘤的治疗中效果不佳^[10]。由于存在 HLA 限制,异体 CAR-T 细胞还可能导致 GVDH^[11],为了安全考虑会采用自体细胞制备 CAR-T 细胞^[12],但这些患者通常在接受 CAR-T 细胞治疗前接受了大量的其他治疗,其中许多患者的外周血 T 细胞计数较低,导致无

表 1 CD19⁺ 细胞系刺激 hCAR19-NK 组表达 CD107a 情况(%, $\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of CD107a⁺CD56⁺ between the Mock cells and hCAR19-NK cells co-cultured with K562, Raji, or K562-CD19 cells for 6 h ($\bar{x} \pm s$)

Variables	Mock group (n=3)	hCAR19-NK group (n=3)	P value
K562	19.43 $\pm$ 1.667	14.33 $\pm$ 1.262	*
Raji	9.36 $\pm$ 0.9108	17.13 $\pm$ 3.277	*
K562-CD19	18.77 $\pm$ 1.736	27.8 $\pm$ 3.844	*

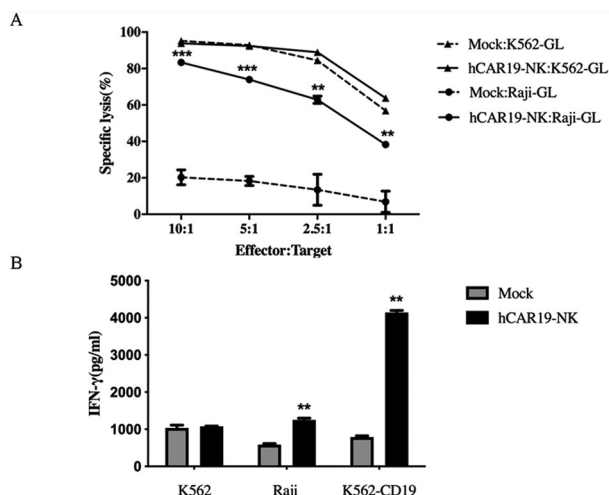
Note: The values are expressed as mean $\pm$ SE. $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance. NS, not significant.图 3 hCAR19-NK 细胞特异性杀伤 CD19⁺ 细胞(A)并释放细胞因子 IFN- γ (B)

Fig.3 Cytotoxicity of Mock cells and hCAR19-NK cells after co-culture with CD19⁺ cell line (Raji-GL) and CD19⁻ cell line (K562-GL) at the indicated E:T ratio for 4 h (A). IFN- γ production of Mock cells and hCAR19-NK cells after co-culture with CD19⁺ cell line (Raji and K562-CD19) and CD19⁻ cell line (K562) at E:T ratio 5:1 for 24 h (B). Results are shown as mean $\pm$ SE from three independent experiments. Statistical significance was set at $P < 0.05$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

法生产出足量的 CAR-T 细胞^[13]。另外在靶向 CD19 的 CAR-T 细胞治疗的 I 期和 II 期临床试验中,有 58-92% 的患者发生了不同级别的 CRS^[14]。NK 细胞作为天然杀伤细胞可以利用其自身优势克服上述 T 细胞的缺点,首先转基因 NK 细胞输注既不会产生 GVDH,也不会产生明显的毒副作用,相较于 CAR-T 细胞会更安全,也不会受限于自体细胞,在一项使用脐带血开发的 HLA 不匹配的 CAR-NK 细胞疗法的试验中,11 名患者中没有一人出现 GVHD^[3]。其次,除了通过 CAR 依赖途径抑制肿瘤细胞之外,CAR-NK 细胞还可以通过 NK 细胞受体依赖途径更有效的杀伤残留的肿瘤细胞^[15,16],减少复发率。最后,NK 细胞来源多样化,可以从外周血(PB)、脐带血(UCB)、人胚胎干细胞细胞(HESC)以及诱导多能干细胞(IPSC),甚至 NK-92 细胞系中产生^[17],因此,CAR-NK 细胞疗法可以通过大规模生产制造"现成"即用的 CAR-NK 细胞,并随时给患者输注。

CAR-NK 细胞免疫治疗的主要局限性之一是在没有细胞因子的支持下,输注的细胞缺乏体内持久性,可能需要反复给药才能实现持久的反应,这将会影响 CAR-NK 细胞治疗的疗效^[18],有研究表明鼠源 scFv 的免疫原性可能会造成 CAR-T 细

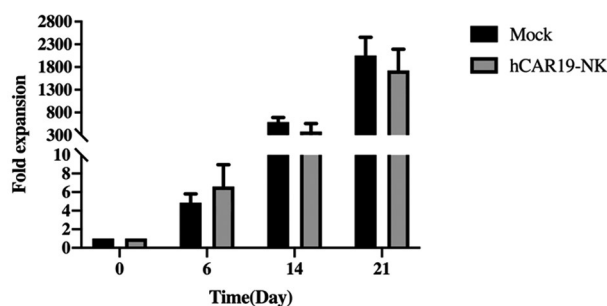


图 4 体外 hCAR19-NK 和 Mock 细胞扩增倍数的比较

Fig.4 The fold expansion of hCAR19-NK and Mock were not significantly different from day 21 of culture. Results are shown as mean $\pm$ SE from three independent experiments.

胞在体内产生排斥或引起过敏反应,导致细胞无法持续存活^[19],影响治疗效果,而人源化的 scFv 可以降低人体对 CAR 产生的免疫应答,有望延长 CAR-T 细胞在体内的存活时间,因此我们构建了 hCAR19-NK 细胞,试图提高 CAR-NK 细胞在体内的持久性,从而提高疗效。

我们成功从外周血分离纯化出 NK 细胞,并且在 100 cGy 辐照后的 K562-4-1BBL-mIL21 细胞刺激下扩增,同时构建了靶向 CD19 的人源化的 CAR,经过逆转录病毒包装、转导和扩增,获得了足够数量的 hCAR19-NK 细胞,体外实验证明了这种 hCAR19-NK 细胞可以有效杀伤 CD19⁺ 肿瘤细胞并分泌大量 IFN- γ ,并且 CD19⁺ 肿瘤细胞可以特异性刺激 hCAR19-NK 细胞表达 CD107a,CD107a 作为 NK 细胞功能活性的标志物,代表活化 NK 细胞的脱颗粒能力,与 NK 细胞介导的靶细胞密切相关^[20],以上为接下来在体内的功能验证奠定了基础。

关于提高体内 NK 细胞持久性的方法,研究较多的是在 CAR 结构上添加 IL-15 基因,不仅增强了 NK 细胞的持久性,提高了抗肿瘤活性,而且不会增加 IL-15 的全身水平或高危淋巴瘤恶性肿瘤患者的毒性^[3,21]。另外策略是采用细胞因子(IL-12、IL-15 和 IL-18)短暂地预激活 NK 细胞,诱导它们分化为细胞因子诱导的记忆样 NK 细胞^[22,23],再转导 CD19CAR,增强了对 NK 细胞耐受型的 B 细胞淋巴瘤的杀伤作用^[25],因此我们可以继续改进 CAR 的结构,比如增加 4-1BB 结构域^[26],联合 IL-15 和 IL-21 增强体内持久性^[27],或通过多靶点激活如 CD19、CD20、CD22、CD276、CD138、CD5、CS1、HER-2、NKG2D 和 GD2 等,增强 CAR-NK 细胞对表面抗原的反应^[22,28-31],提高疗效,从而降低疾病复发。

总之,我们采用外周血分离的 NK 细胞构建了靶向 CD19 的人源化 CAR-NK 细胞,并在体外验证了其可以特异性杀伤

淋巴瘤细胞,为进一步研究 CAR-NK 细胞奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] K-A Hay. Cytokine release syndrome and neurotoxicity after CD19 chimeric antigen receptor-modified (CAR-) T cell therapy [J]. *Br J Haematol*, 2018, 183(3): 364-374
- [2] K-A Hay, Hanafi L-A, Li D, et al. Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy[J]. *Blood*, 2017, 130(21): 2295-2306
- [3] E Liu, Marin D, Banerjee P, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(6): 545-553
- [4] J-A Olson, Leveson-Gower D-B, Gill S, et al. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects[J]. *Blood*, 2010, 115(21): 4293-4301
- [5] E-L Siegler, Zhu Y, Wang P, et al. Off-the-Shelf CAR-NK Cells for Cancer Immunotherapy[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(2): 160-161
- [6] G Heng, Jia J, Li S, et al. Sustained Therapeutic Efficacy of Humanized Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells in Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(7): 1606-1615
- [7] J-N Kochenderfer, Feldman S-A, Zhao Y, et al. Construction and pre-clinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor [J]. *J Immunother*, 2009, 32(7): 689-702
- [8] R-C Larson, Maus M-V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(3): 145-161
- [9] O Castaneda-Puglianini, Chavez J-C. Assessing and Management of Neurotoxicity After CAR-T Therapy in Diffuse Large B-Cell Lymphoma[J]. *J Blood Med*, 2021, 12775-783
- [10] David-E Gilham, Debets Reno, Pule Martin, et al. CAR-T cells and solid tumors: tuning T cells to challenge an inveterate foe [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2012, 18(7): 377-384
- [11] M Kalaitidou, Kueberuwa G, Schutt A, et al. CAR T-cell therapy: toxicity and the relevance of preclinical models [J]. *Immunotherapy*, 2015, 7(5): 487-497
- [12] V Ortiz-Maldonado, Rives S, Castella M, et al. CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19(+) Relapsed/Refractory Malignancies [J]. *Mol Ther*, 2021, 29 (2): 636-644
- [13] E-S Allen, Stroncek D-F, Ren J, et al. Autologous lymphapheresis for the production of chimeric antigen receptor T cells [J]. *Transfusion*, 2017, 57(5): 1133-1141
- [14] M Daher, Melo Garcia-L, Li Y, et al. CAR-NK cells: the next wave of cellular therapy for cancer [J]. *Clin Transl Immunology*, 2021, 10(4): e1274
- [15] M Daher, Rezvani K. Next generation natural killer cells for cancer immunotherapy: the promise of genetic engineering[J]. *Curr Opin Immunol*, 2018, 51146-153
- [16] D Pende, Falco M, Vitale M, et al. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation[J]. *Front Immunol*, 2019, 101179
- [17] F Marofi, Saleh M-M, Rahman H-S, et al. CAR-engineered NK cells; a promising therapeutic option for treatment of hematological malignancies[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 374
- [18] H Fujisaki, Kakuda H, Shimasaki N, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(9): 4010-4017
- [19] C-J Turtle, Hanafi L-A, 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
- [20] G Alter, Malenfant J-M, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity [J]. *J Immunol Methods*, 2004, 294(1-2): 15-22
- [21] E Liu, Tong Y, Dotti G, et al. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity[J]. *Leukemia*, 2018, 32(2): 520-531
- [22] L Zhang, Liu M, Yang S, et al. Natural killer cells: of-the-shelf cytotoxicity for cancer immunosurveillance[J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(4): 1770-1791
- [23] J Ni, Miller M, Stojanovic A, et al. Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors [J]. *J Exp Med*, 2012, 209(13): 2351-2365
- [24] R Romee, Rosario M, Berrien-Elliott M-M, et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(357): 123r-357r
- [25] M Gang, Marin N-D, Wong P, et al. CAR-modified memory-like NK cells exhibit potent responses to NK-resistant lymphomas [J]. *Blood*, 2020, 136(20): 2308-2318
- [26] X-S Zhong, Matsushita M, Plotkin J, et al. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(2): 413-420
- [27] L Vidard, Dureuil C, Baudhuin J, et al. CD137 (4-1BB) Engagement Fine-Tunes Synergistic IL-15- and IL-21-Driven NK Cell Proliferation[J]. *J Immunol*, 2019, 203(3): 676-685
- [28] A Romanski, Uhrek C, Bug G, et al. CD19-CAR engineered NK-92 cells are sufficient to overcome NK cell resistance in B-cell malignancies[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(7): 1287-1294
- [29] Y Xu, Liu Q, Zhong M, et al. 2B4 costimulatory domain enhancing cytotoxic ability of anti-CD5 chimeric antigen receptor engineered natural killer cells against T cell malignancies [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 49
- [30] S Genssler, Burger M-C, Zhang C, et al. Dual targeting of glioblastoma with chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells overcomes heterogeneity of target antigen expression and enhances antitumor activity and survival[J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(4): e1119354
- [31] E Voynova, Hawk N, Flomerfelt F-A, et al. Increased Activity of a NK-Specific CAR-NK Framework Targeting CD3 and CD5 for T-Cell Leukemias[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(3): 524