

融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 对 B 细胞淋巴瘤 BJAB 细胞杀伤作用及其机制研究

范冬梅¹, 杨圆圆¹, 姜琳琳¹, 熊冬生¹, 杨 铭¹, 陶欣勇², 周 珊², 刘红芹², 屈 浩², 韩博文², 石 钊²

(1. 中国医学科学院北京协和医学院血液病医院血液学研究所 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020; 2. 天津同生时代生物技术有限公司, 天津 300020)

摘 要: [目的] 探讨融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 对 B 细胞淋巴瘤细胞株 BJAB 细胞的杀伤作用及其机制研究。[方法] 利用流式细胞分析技术(FACS)和激光共聚焦显微镜技术, 检测融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 与 BJAB 细胞的结合活性。MTT 法检测融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 对 BJAB 细胞的体外杀伤活性。彗星电泳实验检测融合蛋白 anti-CD19 (Fab)-LDM 对 BJAB 细胞 DNA 的损伤。FACS 检测不同浓度融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 处理 BJAB 细胞后细胞周期的变化。[结果] FACS 和激光共聚焦显微镜技术实验结果表明, 融合蛋白 anti-CD19 (Fab)-LDM 能与 BJAB 细胞结合。MTT 法实验结果表明, 融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 对 BJAB 细胞杀伤活性较单用力达霉素或阿霉素强, IC₅₀ 值分别为(0.15±0.02)nmol/L、(0.38±0.03)nmol/L 和(57.15±2.30)nmol/L。彗星电泳实验结果表明, 用 5pmol/L 的融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 及力达霉素处理 BJAB 细胞后, 可引起细胞不同程度的 DNA 损伤, 由于融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 具有靶向性和细胞内化的特性, 对 DNA 造成的损伤较力达霉素组明显。FACS 结果显示, 随着融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 浓度的增加, S 期的比例从 53.78% 升高至 77.29%, 呈剂量依赖性。[结论] 融合蛋白 anti-CD19 (Fab)-LDM 可以靶向杀伤 B 细胞淋巴瘤细胞株 BJAB, 引起细胞周期阻滞, 在 B 细胞淋巴瘤生物治疗中具有潜在的应用价值。

关键词: 基因工程抗体; 融合蛋白; 力达霉素; B 细胞淋巴瘤; 细胞周期

中图分类号: R733.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2019)03-0220-07

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2019.03.A011

Cytotoxicity of Engineered Fusion Protein Anti-CD19 (Fab)-LDM on B-cell Lymphoma BJAB Cells and Its Mechanism

FAN Dong-mei¹, YANG Yuan-yuan¹, JIANG Lin-lin¹, XIONG Dong-sheng¹, YANG Ming¹, TAO Xin-yong², ZHOU Shan², LIU Hong-qin², QU Hao², HAN Bo-wen², SHI Chuan²

(1.State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Hospital of Blood Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; 2.Tianjin Tongsheng Shidai Biotechnology Co.Ltd., Tianjin 300020, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the cytotoxicity of the engineered fusion protein anti-CD19 (Fab)-LDM to B-cell lymphoma BJAB cells and its mechanism. [Methods] The antigen binding activity of anti-CD19(Fab)-LDM on BJAB cells was observed by FACS and confocal microscopy. The cytotoxicity of the engineered fusion protein anti-CD19 (Fab)-LDM to BJAB cells was tested by MTT assay. Comet assay was used to determine the DNA damage in BJAB cells induced by anti-CD19(Fab)-LDM. Changes of cell cycle of BJAB cells treated with anti-CD19(Fab)-LDM were detected by FACS. [Results] FACS and confocal microscopy showed that the antibody bound specifically to BJAB cells. MTT assay demonstrated that the engineered fusion protein anti-CD19(Fab)-LDM strongly enhanced the cytotoxicity to BJAB cells compared with adriamycin or lidamycin (LDM). The comet assay showed that cells treated with anti-CD19 (Fab)-LDM induced more DNA damage than cells treated with LDM. BJAB cells treated with anti-CD19(Fab)-LDM resulted in cell cycle arrest in a concentration dependence manner. [Conclusion] The fusion protein anti-CD19 (Fab)-LDM can target to kill CD19-positive B lymphoma cells and induce cell cycle arrest. These findings may be useful in clinical practice for B-cell lymphoma treatment.

Key words: genetic engineered antibody; fusion protein; lidamycin; B-cell lymphoma; cell cycle

收稿日期: 2018-09-05; 修回日期: 2018-10-16

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX09102301)

通信作者: 杨铭, E-mail: my1970@163.com

1975 年 Kohler 和 Milstein 报道用 B 淋巴细胞杂交瘤技术制备单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb) 至今 30 多年, 由于其特异性高、性质均一及毒副作用低的特点, 单克隆抗体在疾病治疗及诊断方面得到广泛应用^[1]。B 细胞淋巴瘤表面表达多种抗原, 也为单克隆抗体治疗提供了多种靶点。虽然单克隆抗体靶向治疗 B 细胞淋巴瘤取得一定的成效, 但是, 抗体作为单一手段用于治疗也有一定的限制。单克隆抗体能特异性结合到相关的肿瘤靶细胞, 但通常难以杀伤靶细胞。而单克隆抗体药物偶联物则主要依靠“弹头”药物杀伤肿瘤靶细胞, 这就克服了单克隆抗体与化学疗法联合使用的缺点。抗体药物偶联物 (antibody drug conjugates, ADCs) 既保持抗体的特异性、靶向性又具有药物的高效性, 可以将抗肿瘤药物靶向结合在肿瘤部位^[2]。ADCs 一般由靶向肿瘤的抗体、细胞毒性药物和合适的连接分子 (linker) 构成^[3,4]。目前, 靶向治疗 B 细胞淋巴瘤并进入临床研究的 ADCs 主要有 5 种: inotuzumab ozogamicin (CD22)^[5-7]、DCDT2980S (CD22)^[8]、SAR3419 (CD19)^[9,10]、MDX-1203 (CD70)^[11] 和 SGN-75 (CD70)^[12]。CD19 是一个非常具有前景的治疗靶点^[13]。CD19 不仅起源早, 表达范围广泛, 最主要的是 CD19 可以介导细胞的快速内化, 提高药物利用度^[14]。力达霉素 (lidamycin, LDM) 是由一个烯二炔发色团 (AE) 和一个酸性辅基蛋白 (LDP) 以非共价键结合而成, 属于烯二炔类抗肿瘤抗生素。LDM 具有较强的杀伤肿瘤细胞的作用, 效果均强于丝裂霉素和阿霉素。同时, LDM 在体内也能抑制肿瘤生长, 对小鼠移植瘤包括实体瘤和白血病均有显著抑制作用^[15]。并且前期试验已经证明 LDM 可以引起细胞周期的阻滞^[16]。虽然 LDM 对肿瘤细胞具有较强的杀伤活性, 但是缺乏肿瘤特异性。因此, 我们通过基因工程的方法, 将 anti-CD19 (Fab) 片段与 LDM 进行基因重组, 形成融合蛋白 anti-CD19 (Fab)-LDM, 探讨其对 B 细胞淋巴瘤细胞株 BJAB 的杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

B 细胞淋巴瘤细胞系 BJAB 培养于含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中, 阿霉素 (adriamycin, ADR)

购自 Pharmacia 公司, Propidium Iodide (PI) 购自 Sigma 公司, 融合蛋白 anti-CD19 (Fab)-LDM 的构建、表达、纯化以及 Cy5 标记的融合蛋白 anti-CD19 (Fab)-LDM 均由本实验室完成并保存^[17]。LSR II 型流式细胞分析仪购自美国 BD 公司, Synergy H4 酶标仪购自美国 BioTek 公司, 共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 FACS 检测融合蛋白与 BJAB 细胞的结合活性

收集 1×10^6 对数生长期的 BJAB 细胞, PBS 洗 3 次, 将细胞重悬于 100 μ l 含有 20 μ g/ml Cy5 标记的融合蛋白和 anti-CD19 (Fab), 4 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 1000r/min, 离心 10min, 弃上清, PBS 洗 3 次, FACS 测定融合蛋白与 BJAB 细胞的结合活性。以 Cy5 标记的鼠抗人抗体为同型对照。

1.2.2 激光共聚焦显微镜观察融合蛋白靶向结合 BJAB 细胞表面受体 CD19

取 5×10^4 个对数生长期的 BJAB 细胞, 冷的 PBS 洗两次, 加入 10 μ g/ml Cy5 标记的融合蛋白, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min, 用预冷的 PBS 洗 2 次, 加入 20 μ g 含有 1 μ g/ml DAPI 溶液, 避光染色 10min, 用预冷的 PBS 洗 2 次。用无血清培养基重悬细胞, 将细胞接种于 35mm 培养皿中, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养, 此时为 0h, 继续培养 2h、16h 后, 于共聚焦显微镜下观察, Cy5 激发光波长为 645nm, 发射光波长为 680nm, 呈红色荧光, DAPI 为紫外激发, 镜下呈蓝色荧光。

1.2.3 融合蛋白对 BJAB 细胞的细胞毒作用

取对数生长期的 BJAB 细胞, 用含 10% 血清的 RPMI1640 培养液配成一定浓度的细胞悬液, 每孔 180 μ l, 含细胞 2×10^4 , 接种于 96 孔细胞培养板中。将融合蛋白 anti-CD19 (Fab)-LDM、ADR 和 LDM 按照一定的浓度, 分别加入 96 孔板中, 20 μ l/孔, 每个浓度设置 3 个复孔, 同时设对照孔, 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱中培养。72h 后, 每孔加入 20 μ l 的 MTT (5mg/ml), 继续培养 4h。离心, 弃上清, 加入 150 μ l DMSO, 于酶标仪检测 570nm 处 OD 值。按下述公式计算半数抑制浓度 IC₅₀ 值: 抑制度 = (1 - 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值) $\times$ 100%。

1.2.4 彗星电泳实验检测融合蛋白对 BJAB 细胞 DNA 的损伤

收集经 5 μ mol/L 融合蛋白及 LDM 处理过的 5×10^5

个 BJAB 细胞, PBS 洗 2 遍。加入 100 μ l 低熔点凝胶, 在 37 $^{\circ}$ C 下混匀, 迅速滴在铺有 1% 正常熔点胶的载玻片上, 加盖玻片, 放入 4 $^{\circ}$ C, 10min, 使其硬化, 小心取下盖玻片。在低熔点凝胶上加入 37 $^{\circ}$ C 100 μ l 的正常熔点胶。将载玻片浸入预冷的裂解液, 4 $^{\circ}$ C, 避光 1h。取出玻片, 吸取液体, 置于水平电泳槽中, 加入 TBE 电泳缓冲液, 静置 20min。20V, 300mA, 电泳 20min。电泳完毕后, 载玻片放于 PBS 中冲洗。加入 20 μ l 浓度为 1 μ g/ml 的 DAPI 溶液, 染色 5~10min, 荧光显微镜下观察。

1.2.5 融合蛋白对 BJAB 细胞周期的影响

取对数生长期的 BJAB 细胞, 1×10^6 个细胞/孔, 接种于 6 孔细胞培养板中。分别加入 2.5、5、10 μ mol/L 的融合蛋白或 LDM 处理 8h。收集处理后的细胞, 以未处理的细胞作对照, 用预冷的 PBS 洗 2 次, 加入 1ml 预冷的 70% 乙醇, 混匀, 于 4 $^{\circ}$ C 固定, 离心收集细胞, 以预冷的 PBS 洗细胞 2 次, 加入 100 μ l 工作液浓度为 100 μ g/ml 的 RNase 溶液, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 加入 200 μ l 浓度为 50 μ g/ml 的 PI 溶液, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 1h, 用预冷 PBS 洗 2 次, 加入 400 μ l PBS 重悬细胞, 200 目尼龙网过滤后, FACS 上机检测。

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS13.0 软件进行分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为具有统计学差异, 采用 GraphPad Prism 5 软件进行作图分析。

2 结果

2.1 融合蛋白与 BJAB 细胞的结合活性

FACS 结果 (Figure 1) 显示, Cy5 标记的融合蛋白与 CD19 表达阳性的 BJAB 细胞具有较强的结合

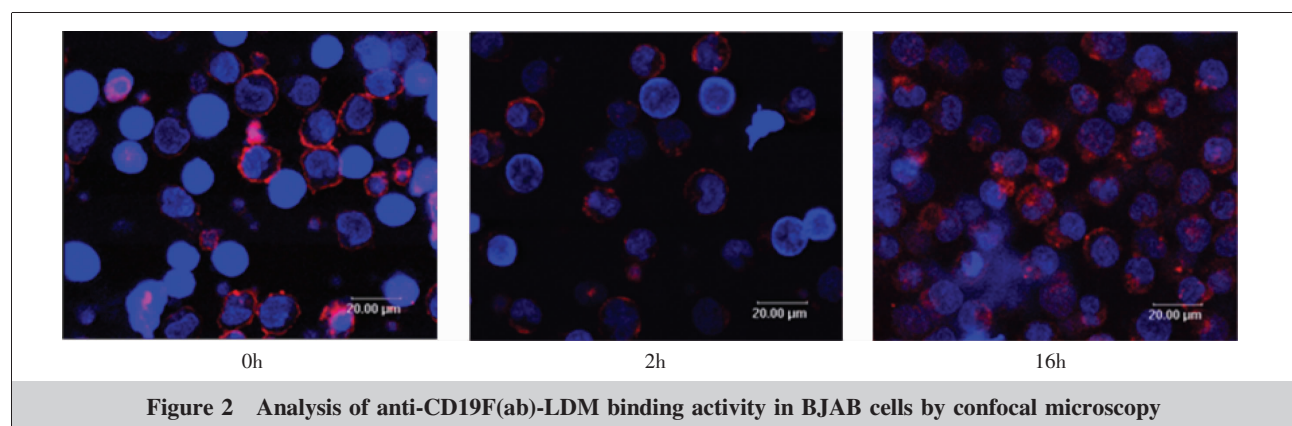
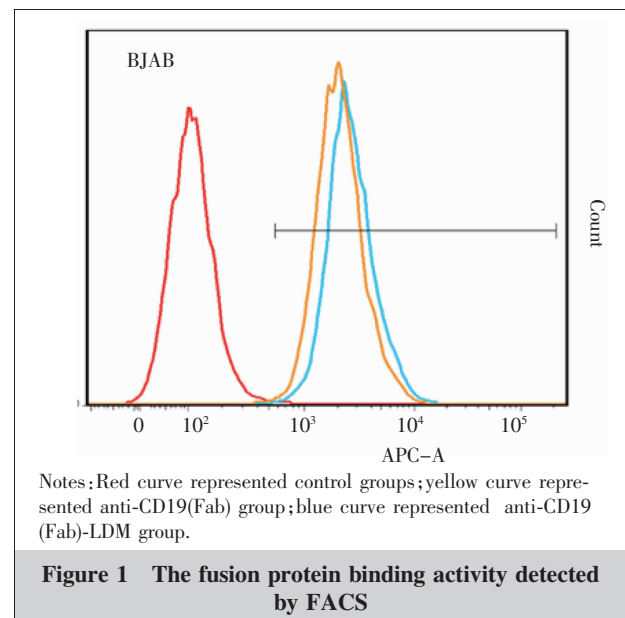
活性, 阳性率 > 90%, 并且与 anti-CD19(Fab) 抗体的结合活性相一致。由此说明了融合蛋白对于 CD19 阳性的 BJAB 细胞有较强的靶向性。

2.2 激光共聚焦显微镜观察融合蛋白靶向结合 BJAB 细胞

激光共聚焦显微镜观察结果表明 (Figure 2), 融合蛋白可以靶向结合到 BJAB 细胞膜表面, 并且随着时间的延长, 融合蛋白逐渐进入到细胞的内部。说明融合蛋白可以与 BJAB 细胞表面受体 CD19 相结合, 可以引起受体介导的细胞内化, 从而使更多的抗肿瘤药物在细胞内释放, 增加肿瘤部位的有效药物浓度, 最终可以使抗肿瘤药物发挥更强的作用。

2.3 融合蛋白对 BJAB 细胞的细胞毒作用

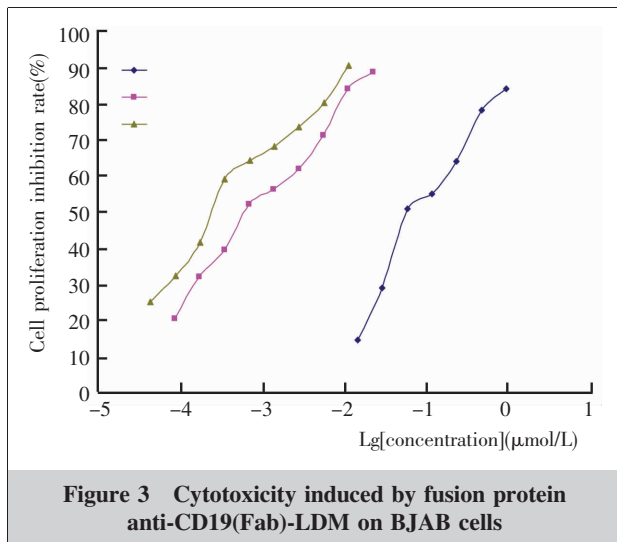
MTT 实验结果表明, 使用不同浓度梯度的融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM、ADR 和 LDM 处理 BJAB 细胞 72h 后, 细胞增殖受到不同程度的抑制 (Figure 3)。



IC₅₀ 值分别为 (0.15±0.02)nmol/L、(57.15±2.30)nmol/L 和 (0.38±0.03)nmol/L。由于融合蛋白具有靶向性,故杀伤效果较 LDM 组明显 ($P=0.028$),并且抑制作用呈剂量依赖性。

2.4 融合蛋白对 BJAB 细胞 DNA 的损伤

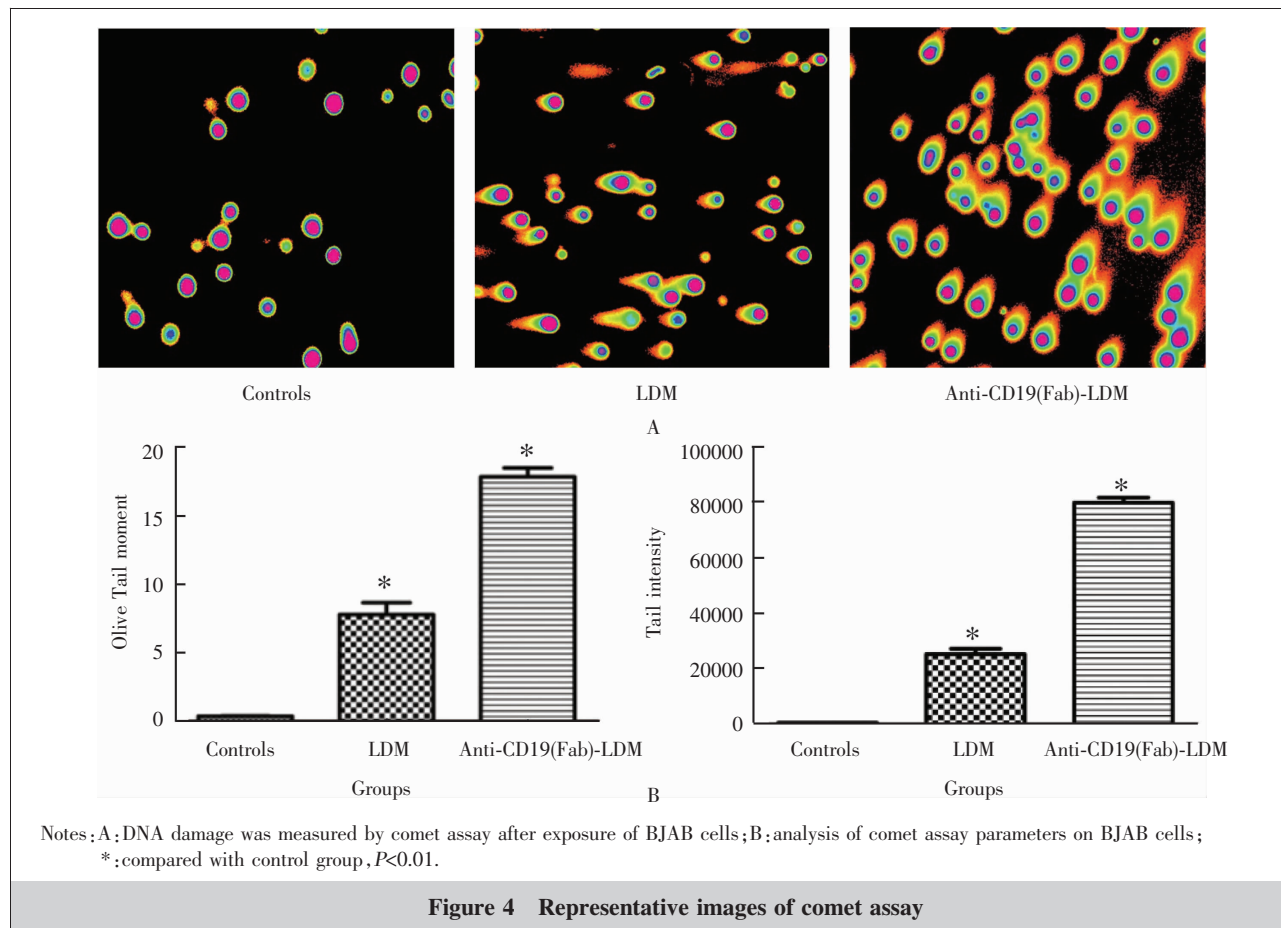
彗星电泳结果表明,使用相同摩尔剂量的融合



蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 和 LDM 处理细胞,与对照组比,可见明显的 DNA 损伤。此外,由于融合蛋白具有特异靶向性和细胞内化的特性,对 DNA 造成的损伤较 LDM 组明显 (Figure 4A)。应用 Comet Score 软件分析实验结果中的尾矩 (OTM) 和慧尾中 DNA 的密度 (TI),可直接反应出 DNA 损伤的程度。数据分析结果表明,融合蛋白的 OTM 为 (18.30±0.34),TI 为 (71607.29±1555.49);LDM 的 OTM 为 (8.45±0.38),TI 为 (22459.79±907.14),与对照 OTM (0.43±0.01) 和 TI (496.3±18.31) 相比,具有显著性差异 ($P=0.0067$) (Figure 4B)。

2.5 融合蛋白对 BJAB 细胞周期的影响

流式细胞仪分析细胞周期的变化,结果显示 (Figure 5A),当融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 浓度为 2.5、5 和 10pmol/L 时,S 期的细胞占比分别为 (53.78%±2.06%)、(57.80%±4.39%) 和 (77.29%±1.37%),说明融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 可以明显地引起细胞 S 期的阻滞,并且随着融合蛋白浓度的升高,S 期的比例显著增高,并呈剂量依赖性。在



相同摩尔浓度下,LDM 组 S 期的细胞比例分别为 (52.21%±1.53%)、(58.35%±3.29%)和(58.56%±3.78%),并且融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 组与 LDM 组 S 期的变化较对照组 (41.79%±1.87%)明显 ($P=0.041$) (Figure 5B)。

3 讨论

近二十多年来,单克隆抗体药物不断上市,引发了药物新一轮的技术革命,这也在治疗 B 细胞淋巴瘤患者中发挥着重要的作用^[18,19]。B 淋巴细胞表面有多种抗原的表达,包括 CD19、CD22、CD37 和 CD40 等^[20],这为抗体治疗 B 细胞淋巴瘤提供了潜在的靶点。靶向抗原首先要具备的条件就是,必须在

靶细胞表面大量表达并且抗体容易与之接近,仅在靶细胞表面特异、稳定的表达,而在其它组织中没有表达^[21]。另外,抗体在体内循环的时候,应避免被其它细胞吞噬、消化或者溶解,这样才能有效地到达肿瘤部位。除此之外,如果受体可以介导细胞的内化,可以增强在肿瘤部位药物的释放,提高治疗效果。

CD19 作为治疗 B 细胞淋巴瘤的靶点,除了因其具有与抗体结合的特异性和高亲和性,还由于可以介导细胞的内化^[22,23]。具体来说,CD19 可以通过介导抗体的内化,增加肿瘤部位药物的浓度,从而更有利于杀伤肿瘤细胞。这一特性较其他靶点如 CD20 来说,体现了选取 CD19 作为靶点的优越性^[24]。此外,CD19 在 B 细胞的各分化阶段上,较其他表面抗原如 CD20,有更加持续稳定的表达,且具

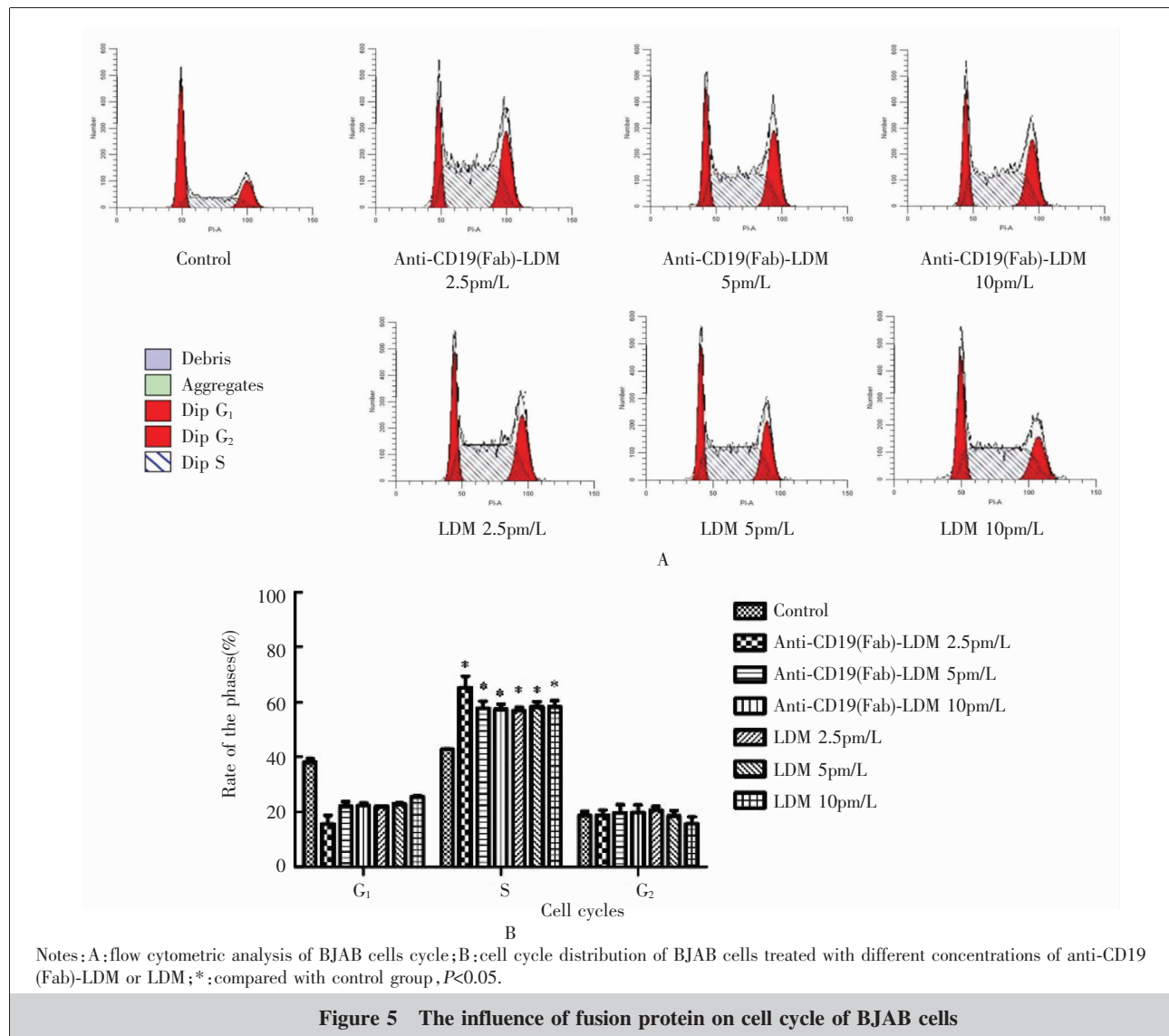


Figure 5 The influence of fusion protein on cell cycle of BJAB cells

有更宽更均一的反应谱^[25]。这些特性均为 CD19 成为靶向治疗的优良靶点提供了有力的依据。

融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 对 CD19 阳性细胞系 BJAB 有较强的结合活性。此外,融合蛋白对 BJAB 细胞具有细胞毒作用,且较单用 LDM 组效果更强。其主要机制是对 DNA 的损伤。对此,彗星电泳实验很好地验证了这一点。进一步来说,融合蛋白 anti-CD19 (Fab)-LDM 和 LDM 组都能引起细胞 S 期的阻滞,但由于融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 具有特异靶向性和细胞内化的特性,避免了单用 LDM 时在体内的损伤,还提高了肿瘤部位的药物浓度和生物利用度,使得较低浓度的融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM 就可以达到较强的抗肿瘤效果。综上,融合蛋白 anti-CD19 (Fab)-LDM 体内的治疗效果比 LDM 更强^[26]。

通过基因工程方法获得融合蛋白 anti-CD19 (Fab)-LDM,在体内外实验中均证明了对 CD19 阳性的 B 淋巴瘤细胞具有较强的抗肿瘤活性。实验表明,融合蛋白 anti-CD19 (Fab)-LDM 不仅保留了抗 CD19 抗体的靶向性和 LDM 的肿瘤杀伤活性,还具有较强的肿瘤抑制效果,并且可减少对其它组织的损伤。由于单抗靶向药物的小型化、高效化以及具有特异性肿瘤靶标,所以其一直是解决当前单抗治疗存在问题的主要途径^[27]。应用基因工程技术获得的融合蛋白 anti-CD19(Fab)-LDM,具有分子量小、活性强的特点,且是人鼠嵌合抗体,免疫原性低,具有较好的临床价值,在肿瘤治疗中可以改善患者预后。因此,其具有很好的应用前景,该研究为临床应用奠定了坚实的基础。

参考文献:

- [1] Rodgers KR,Chou RC. Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives;historical perspectives and future directions[J]. Biotechnol Adv,2016,34(6):1149-1158.
- [2] Hayat SMG,Sahebkar A. Antibody drug conjugates for cancer therapy[J]. J Babol Univ Med Sci,2017,19(7):20-27.
- [3] Gébleux R,Casi G. Antibody-drug conjugates;current status and future perspectives[J]. Pharmacol Ther,2016,167:48-59.
- [4] Wagh A,Song H,Zeng M,et al. Challenges and new frontiers in analytical characterization of antibody-drug conjugates[J]. Mabs,2018,10(2):222-243.

- [5] Kantarjian H,Thomas D,Jorgensen J,et al. Inotuzumab ozogamicin,an anti-CD22-calecheamicin conjugate,for refractory and relapsed acute lymphocytic leukaemia:a phase 2 study.[J]. Lancet Oncol,2012,13(4):403-411.
- [6] Deangelo DJ,Stock W,Stein AS,et al. Inotuzumab ozogamicin in adults with relapsed or refractory CD22-positive acute lymphoblastic leukemia;a phase 1/2 study.[J]. Blood Adv,2017,1(15):1167-1180.
- [7] Uy N,Nadeau M,Stahl M,et al. Inotuzumab ozogamicin in the treatment of relapsed/refractory acute B cell lymphoblastic leukemia[J]. J Blood Med,2018,9:67-74.
- [8] Li D,Poon KA,Yu SF,et al. DCDT2980S,an anti-CD22-monomethyl auristatin E antibody-drug conjugate,is a potential treatment for non-Hodgkin lymphoma[J]. Mol Cancer Ther,2013,12(7):1255-1265.
- [9] Donaghy H. Effects of antibody,drug and linker on the preclinical and clinical toxicities of antibody-drug conjugates[J]. Mabs,2016,8(4):659-671.
- [10] Trněný M,Verhoef G,Dyer M J,et al. A phase 2 multicenter study of the anti-CD19 antibody drug conjugate coltuximab ravtansine (SAR3419) in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma previously treated with rituximab-based immunotherapy[J]. Haematologica,2018,103(8):1351-1358.
- [11] Owonikoko TK,Hussain A,Stadler WM,et al. First-in-human multicenter phase I study of BMS-936561 (MDX-1203),an antibody-drug conjugate targeting CD70 [J]. Cancer Chemother Pharmacol,2015,77(1):155-162.
- [12] Tannir NM,Forerotorres A,Ramchandren R,et al. Phase I dose-escalation study of SGN-75 in patients with CD70-positive relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma or metastatic renal cell carcinoma[J]. Invest New Drugs,2014,32(6):1246-1257.
- [13] Wang K,Wei G,Liu D. CD19:a biomarker for B cell development,lymphoma diagnosis and therapy [J]. Exp Hematol Oncol,2012,1(1):36-42.
- [14] Gerber HP,Kung-Sutherland M,Stone I,et al. Potent anti-tumor activity of the anti-CD19 auristatin antibody drug conjugate hBU12-vcMMAE against rituximab-sensitive and -resistant lymphomas[J]. Blood,2009,113(18):4352-4361.
- [15] Zhen Y,Shang B,Liu X,et al. Antitumor efficacy of lidamycin against human multiple myeloma RPMI 8226 cells and the xenograft in nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice [J]. J Cancer Res Ther,2016,12(1):182-187.
- [16] Li KJ,Wei JB,Luo GL,et al. Lidamycin induces cell apop-

- toxis and cell cycle arrest of human multiple myeloma RPMI 8226 cells [J]. Basic & Clinical Medicine, 2015, 35 (3):377-382. [李开济, 魏静波, 骆广玲, 等. 力达霉素诱导人多发性骨髓瘤 RPMI8226 细胞凋亡和周期阻滞[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(3):377-382.]
- [17] Jiang LL, Zhang XY, Ma L, et al. Preparation of genetic engineering antibody anti-CD19(Fab)-LDM and its biological activity[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2013, 29 (10):1363-1368. [姜琳琳, 张孝云, 马莉, 等. 基因工程抗体抗 CD19(Fab)-LDM 的制备及生物学活性研究[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(10):1363-1368.]
- [18] Zhao CX, Hu ZW, Cui B. Recent advances in monoclonal antibody-based therapeutics [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2016, 52(6):837-847. [赵晨曦, 胡卓伟, 崔冰. 单克隆抗体药物研究进展[J]. 药学报, 2017(6):837-847.]
- [19] Weiner G J. Building better monoclonal antibody-based therapeutics.[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(6):361-370.
- [20] Oksvold MP, Kullmann A, Forfang L, et al. Expression of B-cell surface antigens in subpopulations of exosomes released from b-cell lymphoma cells [J]. Clin Ther, 2014, 36 (6):847-862.
- [21] Cao R, Shao RG, Li L, et al. Advances in antibody drug for cancer targeted therapy [J]. Chinese Journal of Biochemical and Pharmacetics, 2016, 36(6):15-18. [曹睿, 邵荣光, 李亮. 肿瘤靶向治疗抗体药物的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(6):15-18.]
- [22] Horton H M, Bennett M J, Pong E, et al. Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia[J]. Cancer Res, 2008, 68(19):8049-8057.
- [23] Pesando JM, Bouchard LS, McMaster BE. CD19 is functionally and physically associated with surface immunoglobulin.[J]. J Exp Med, 1989, 170(6):2159-2164.
- [24] Zhang YJ, Li SJ, Jiang LL, et al. Targeting cytotoxicity effect of IL-3-lidamycin fusion protein on CD123+ leukemia cells [J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2013, 20 (4):391-397. [张砚君, 李双静, 姜琳琳, 等. IL-3-LDM 融合蛋白对 CD123+ 白血病细胞的靶向杀伤作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(4):391-397.]
- [25] Ning BT, Tang YM, Chen YH, et al. Comparison between CD19 and CD20 expression patterns on acute leukemic cells[J]. Journal of Experimental Hematology, 2005, 13(6):943-947. [宁铂涛, 汤永民, 陈英虎, 等. 急性白血病细胞 CD19 和 CD20 表达比较 [J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(6):943-947.]
- [26] Zhang XL, Yang YY, Yang YQ, et al. Inhibition of fusion protein anti-CD19(Fab)-LDM on B-cell lymphoma[J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2016, 22 (2):89-93. [张晓龙, 杨圆圆, 杨雨琪, 等. 融合蛋白 anti-CD19 (Fab)-LDM 对 B 细胞淋巴瘤的抑制作用[J]. 中华生物医学工程杂志, 2016, 22(2):89-93.]
- [27] Zhang M, Li J, Yu DC. The development trend of therapeutic monoclonal antibodies for cancer therapy [J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2017, 24 (9):929-937. [张敏, 李佳, 俞德超. 靶向抗肿瘤单克隆抗体药物应用的现状和展望 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(9):929-937.]