

单细胞测序技术在药物开发过程中的应用

李倩, 韦薇

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

[摘要] 单细胞测序技术通过整合单细胞解离、微流控技术、微流体系统、高通量测序和生物信息等多项最新技术, 将分子生物学和细胞生物学的研究推进到单个细胞水平, 是生物技术发展史中的里程碑式技术。单细胞测序技术为研究个体发育、细胞分化、组织中细胞的异质性, 以及疾病的发生发展等生物医学的基本问题提供了新的维度并得到了广泛的应用。本文将简要介绍单细胞测序技术和分析方法的发展, 对其在疾病机理研究、靶点发现、药物发现和优化、药效机制以及临床试验设计等药物开发过程中的应用进行综述。

[关键词] 单细胞测序; 肿瘤异质性; 药物开发; 精准医疗

[中图分类号] R965.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)02-0154-05

The application of single cell sequencing technology in drug development

LI Qian, WEI Wei

(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China)

[Abstract] Single-cell sequencing advances the research of molecular biology and cell biology to the single cell level by integrating the latest technologies such as single-cell dissociation, microfluidic, microfluidics system, high-throughput sequencing, and bioinformatics. It is a milestone technology in the history of biotechnology. Single-cell sequencing technology provides a new dimension for the study of basic biomedical problems such as ontogeny, cell differentiation, cell heterogeneity in tissues, and the etiology and development of diseases, and has been widely used. In this review, we briefly introduced the development of single cell sequencing technology and associated bioinformatics methods, and reviewed its application in the process of drug development, such as study on mechanism of disease, target discovery, drug discovery and optimization, mechanism of action and clinical trial design.

[Key words] single-cell sequencing; tumor heterogeneity; drug development; precision medicine

近年来, 高通量测序技术 (high-throughput sequencing, HTS) 已广泛应用于生物和医药等各个领域。尤其是在肿瘤领域, HTS 技术和生物信息学的快速发展“破译”了肿瘤细胞的密码, 促进了靶向治疗和免疫治疗实现精准医疗 (precision medicine)。过去几十年见证了强大的测序技术进步, 但传统测序技术只能检测到混合细胞中的基因组信息, 无法获取单个细胞特有的遗传信息, 以至于产生大量虚

假信号, 也无法针对体内的不同细胞及其分子机制进行深入研究, 严重误导疾病标志物和有效药物靶点的发现。

单细胞测序技术 (single-cell sequencing) 的出现为解决这些生物医药问题带来一个全新技术维度, 将生物医学研究带入更高维的空间, 对于精准医疗的发展至关重要。单细胞测序是在单个细胞水平上对 DNA 或 RNA 进行测序的技术, 可以揭示单个细胞的基因结构和基因表达状态, 使基因表达分析能够以更高的分辨率进行, 是生物技术发展史中的里程碑式技术^[1]。最早期的单细胞测序技术虽然可以在单细胞水平检测全基因组或转录组, 但是每次

[作者简介] 李倩, 女, 审评员, 主要从事生物制品药学研究。联系电话: (010) 85242986, E-mail: liqian@cde.org.cn。

[通讯作者] 韦薇, 女, 主任药师, 主要从事生物制品药学研究。联系电话: (010) 85243075, E-mail: weiw@cde.org.cn。

只能检测 1 个细胞。随着技术的不断发展,单细胞测序技术综合了单细胞解离、微流控、分子标签、高通量测序和生物信息等多项最新技术,可以在全基因组水平同时检测数以万计的细胞^[2]。Tang 等^[3]在 2009 年第一次应用单细胞 RNA 测序技术,从小鼠单个卵裂球细胞中测序得到 1 亿个 35 碱基和 50 碱基的序列片段,首次实现了单个细胞的 mRNA 高通量测序,开启了单细胞转录组测序时代。目前,单细胞测序技术已经在肿瘤、发育生物学、微生物学、神经科学、免疫学等领域发挥重要作用,尤其在肿瘤研究领域,已经广泛应用于肿瘤细胞异质性研究、肿瘤细胞克隆演化机制、新生物标志物鉴定以及耐药性产生机制等。单细胞测序技术还可以发现稀少肿瘤细胞并进行动态监控,有助于肿瘤的个性化和精准治疗。

单细胞测序目前主要包括单细胞基因组测序、单细胞转录组测序、单细胞表观组测序和单细胞蛋白质组测序等。这些不同的测序类型从不同角度在单个细胞水平深入研究基因组、转录组、基因调控网络和细胞互作关系,将生物医药研究带入更高维空间。单细胞测序技术以其高信息内涵、高通量、高精度等特点,已被广泛应用于临床前药物靶点开发、临床试验等不同的药物开发阶段,极大地促进了药物研发进程。对于新药研发中涉及的一些关键问题,单细胞测序技术都展现出了独特的优势。在发现更有效的靶点、加快药物整体研发进度等方面为药物筛选和开发带来了革命性的改变,为现代创新药物的开发提供了强有力的技术支持。本文将简要介绍单细胞测序技术和分析方法的发展,并对其在疾病的发病机理研究、靶点发现、药物发现和优化、药效机制以及临床试验设计等药物开发过程中的应用进行综述。

1 单细胞测序技术

单细胞测序技术是从单个细胞水平上对其遗传物质进行高通量测序分析的新兴技术。随着单细胞分离技术、核酸扩增方法和高通量测序技术的不断进步与完善,单细胞测序技术也得到了快速发展。早期的单细胞分析技术如膜片钳^[4]、流式细胞^[5]、原位荧光杂交^[6]、酶联免疫斑点检测^[7]等只能检测 1~3 个指标。随后的单细胞测序技术,如多次退火环状循环扩增(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)^[8]和多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)^[9]

等,可以在单细胞水平检测全基因组或转录组,但是每次只能检测 1 个细胞。现在的单细胞测序技术可以在各组学水平同时检测数以万计的细胞。

单细胞测序的步骤主要包括单细胞分选、核酸提取和扩增、文库构建、高通量测序和数据分析等。单细胞测序的第一步是单细胞分选,制备高质量的单细胞是成功单细胞研究的关键。目前常见的单细胞分选方法包括有限稀释法、显微操作筛选法、荧光激活细胞分选法、激光捕获显微切割法和微流控分离法等^[10]。这些方法各有利弊,适用于不同的细胞/组织和研究目的。大多数单细胞测序使用新鲜的活单细胞,研究者也在开发其他方法降低对新鲜的活单细胞的需求,比如使用来自冷冻组织的核 RNA。

核酸的制备是单细胞测序实验技术的重中之重。由于每个细胞中的核酸量非常有限,因此需要前期的扩增过程来产生足够的核酸用于后续步骤,而且细胞的条形码(barcode)标记实际上也是在核酸制备过程中通过独特的 oligo/Tag 完成,因此对核酸捕获、扩增、标记、建库等相关技术的要求非常高。例如:典型的动物细胞内 mRNA 含量约为 0.5 pg,无法满足后续高通量测序所需的核酸含量^[11-12]。对于哺乳动物的 mRNA,通常通过 polyT 引物实现捕获。捕获到 mRNA 后,采用体外转录(*in vitro* transcription, IVT)技术或者模板链置换(template switch oligo, TSO)技术完成第二链合成。IVT 技术的优势在于后续扩增是线性扩增,而 TSO 后续需要通过 PCR 扩增,有可能获得非线性的扩增信号,影响后续数据分析。为了减少非线性扩增的影响,也可以利用单分子标签(unique molecular identifiers, UMI)技术^[13-14],通过计数 UMI 就可以定量 UMI 结合的 RNA 分子数,从而通过有效消除 PCR 扩增偏倚提高读取精度。核酸分子被捕获、标记和扩增后,将被混合在一起进行高通量测序和数据分析。

单细胞测序为生物医药研究打开了一个新的维度,同时也带来海量的数据和指数级的复杂度,因此单细胞测序数据分析技术已成为这个领域最大的挑战和最核心的部分。单细胞测序的原始数据是序列数据,通常是双端 150 bp (PE150),fastq 格式。与第 2 代测序相比,单细胞测序数据存在较高的噪音和信号丢失等特点,因此需要优化分析工具和算法。对分析二代测序原始数据预处理的分析工具和算法进行优化,也可以有效处理单细胞测序的原始数据。

此外,由于样本的实验数据通常是分批生成的,但批次之间的技术差异会导致不同批次数据的统计分布存在差异,并且影响下游分析,因此数据预处理中最有挑战的一步是整合不同样本的数据。目前已有研究人员开发了多种归一化方法,用来校正每个样品在批次间的整体表达分布的差异^[15-17]。由于单细胞测序数据分析步骤较多,如何将复杂的分析步骤连接起来也是单细胞测序面临的一个挑战。对于不同的测序类型和实验需求,研究者会采用不同的分析流程。纽约基因组中心的 Satija 教授实验室开发了 R 工具包 Seurat^[18],是当前比较流行的分析流程。

2 单细胞测序在药物开发中的应用

健康和病变组织的遗传、功能或组成异质性给药物发现和开发提出了很大的挑战,这些异质性阻碍了准确疾病模型的设计,并且可能混淆生物标志物水平的解释和患者对特定疗法的反应。组织细胞通常具有异质性,包括含有不同的细胞类型,而不同的细胞对靶向药物的反应不同。尤其是肿瘤组织,在时间和空间上都具有极大的异质性^[19-20],肿瘤类型之间的差异,以及肿瘤患者之间看似相似的类型和阶段,在治疗的疗效上也可能表现不同。这些可塑性和异质性是人类肿瘤的基本特征,在疾病进展和治疗失败中发挥了主要作用^[21]。基于单细胞测序技术能够快速确定成千上万个细胞的精确基因表达模式,其高分辨率在解析人类疾病和生物复杂性方面发挥了重要的作用。近年来,基于单细胞测序技术的独特优势和迅猛发展,在药物开发中的应用优势得到了广泛关注,极大地促进了药物的开发进程。

2.1 疾病机理研究 单细胞测序技术通过揭示单个细胞的基因结构、基因表达状态以及细胞间互作关系,从新的视角更清晰地理解疾病的发生发展,对疾病病理研究和治疗都有重要的意义。有研究人员通过单细胞测序技术将白癜风致病机理的研究重点集中到成纤维细胞这一细胞类型上,阐明了 IFN γ 引起成纤维细胞响应,招募自身免疫 CD 8^+ T 细胞攻击黑色素细胞,促进皮肤白斑的病理机制,并解析了白癜风部位特异性和对称性病变的分子机制^[22]。Novo Nordisk 的研究员通过单细胞转录组测序分析非酒精性脂肪性肝炎(NASH)小鼠模型的肝脏转录组,确定了参与 NASH 发展和发病机制的关键细胞类型^[23]。来自中科院的研究员通过单基因转录组测序对人类及食蟹猕猴神经节隆起的基因表达特征

进行了分析,揭示了灵长类胚胎发育早期神经节隆起的细胞多样性和发育轨迹,并确定了一类灵长类特异神经元,还建立了人类神经节隆起发育的调控网络,为大脑神经节隆起发育调节及相关疾病的分子机制研究提供了重要线索^[24]。在肿瘤研究领域,诸多研究利用单细胞测序技术在肿瘤异质性研究、肿瘤发生发展规律、肿瘤微环境表征、耐药机制等方面都有重要突破,例如北京大学研究人员在单细胞水平对结直肠癌患者的肿瘤微环境进行详细描述,揭示了靶向髓系细胞的免疫治疗策略潜在的作用机理^[25]。

2.2 靶点发现 获得高质量的新药物靶点是现代药物发现的关键,单细胞测序技术已广泛应用于药物开发中的各个阶段,在药物开发的初期,通过精准表征疾病相关细胞与病灶微环境的特征,从基因和蛋白水平上发现有效的潜在药物靶点。神经和精神药理学的药物发现滞后,最主要的原因就是药物靶点的稀缺。单基因转录组测序技术可以在单个神经元中识别出数百种不同的受体和通路,这些受体与特定的行为或疾病有关,掌握这些信息可以揭示特定神经元类型上特异性表达的几十个受体,进而作为影响这些特定神经元和神经元回路活动的有用药物靶点^[26]。近年来,肿瘤靶向治疗已成为研究热点,然而可选择的药物和靶点仍非常有限。通过单细胞测序可以评估肿瘤的整体异质性和肿瘤微环境等特征,可以更准确地发现药物靶点。例如:斯坦福大学的研究者利用单细胞转录组测序技术确定了构成基底细胞癌(basal cell carcinoma, BCC)的细胞类型、细胞间相互作用以及新的信号通路,支持了热休克蛋白通路作为 BBC 潜在的新治疗靶点。通过单细胞测序技术研究肿瘤与周围免疫细胞之间的互作,研究人员确定并验证了 CD24 作为肺癌治疗的一种新的免疫治疗靶点。慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)是一种可能致命的胰腺外分泌疾病,目前尚无特效或有效的治疗方法,研究人员通过对胰腺免疫细胞和 T 细胞受体进行单细胞测序分析,认为 CCR6-CCL20 是人类遗传性 CP 潜在靶点的信号通路^[27]。

2.3 药物发现和优化 在传染病方面,单细胞测序技术的应用促进了相关药物和疫苗的开发。特异性中和抗体由人体免疫系统产生,可以有效阻止病毒感染细胞,但抗体药物是一类大分子药物,开发周期较长。利用单细胞测序技术在康复期病人血液中

寻找特异性中和抗体,可以将寻找时间从年缩短到月。基于受体的单细胞测序技术在 COVID-19 的抗体开发中发挥了重要作用,目前进入临床的大部分 COVID-19 抗体都是利用单细胞测序技术分析单个 B 细胞受体开发的。研究人员利用单细胞测序技术,从康复期患者的抗原富集 B 细胞中快速鉴定出新冠病毒中和抗体,并在动物实验中证明了该中和抗体的治疗和预防功效。此外,研究人员采用类似寻找抗体的技术,通过对单个 T 细胞受体的测序可以快速找到高质量的抗原特异的 TCR 序列^[28],对肿瘤新抗原的开发和个性化治疗提供了新的机会。

2.4 药效机制 在药物临床前,单细胞测序技术能够在单细胞层面上阐明药物作用机制,评估药物安全性,对后续临床试验有重要的指导作用。例如研究人员利用单细胞测序技术对 AL002c(一种抗人 TREM2 的单克隆抗体)是否能够调节小胶质细胞激活以及阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)进行临床前评估,表明 AL002c 作为一种有希望的 AD 治疗候选药物。研究人员利用单细胞测序技术发现 T 细胞产生的肿瘤坏死因子在 T 细胞激活治疗后驱动单核细胞释放全身细胞因子,确定了细胞因子释放综合征的机制途径和药物靶点,以防止其临床发作^[29]。此外,在临床前动物模型方面,由于动物模型往往是高度可变的,而且人和小鼠免疫系统之间存在差异,单细胞测序技术的发展为筛选更为合适的动物模型提供了支持。研究人员利用单细胞测序可以获得不同动物模型的细胞图谱,并将之与病人图谱进行比较,找出与患者肿瘤微环境特征相似的动物模型,从而用于正在开发的特定药物临床前研究。

2.5 临床试验 在临床试验中,从单个细胞水平上深入解析人的遗传背景,可以帮助研究人员精确查找药物适用人群,指导临床精准用药,促进精准医疗的发展。此外,单细胞测序技术可以有效评估药物治疗条件下肿瘤微环境中不同细胞分子间的动态变化,提供了一个多维度的药效评价体系,包括用药前后细胞频率变化、耐药机制、关键通路和基因变化、药物联用治疗响应等。来自以色列的研究人员通过单细胞测序鉴定多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)复发患者的耐药机制,确定了高耐药 MM 患者的特征,发现肽基脯氨酰异构酶 A(PPIA)是这类肿瘤有效的治疗靶点,并提示不同的化疗药物可能会

导致不同的肿瘤微环境特征,进而影响免疫检查点抑制剂的疗效^[30]。由于肿瘤的高度异质性,大多数针对肿瘤的治疗方案和药物在不同患者中表现出不同的反应,导致低治愈率和高复发率,而且无法在体内通过实验性的测试来验证药物反应。单细胞测序结合深度学习模型可以进行药物反应预测、监测疾病进展和研究治疗反应,为研究人员提供新的治疗方案和预后信息。

3 讨论和展望

自 1977 年第一代测序技术诞生以来,测序领域已进行多次技术变革和迭代。人类基因组计划的启动,促进了 HTS 等测序技术的迅猛发展以及生物信息与大数据科学的交叉应用,推动了生物医药等研究领域的快速发展,在很多领域已经有了巨大的革命性发现。传统测序技术虽然提供了大量的基因组或转录组数据,但难以辨别群体细胞中的异质性,也不能监测细胞的动态变化及相应的基因变化。单细胞测序技术的出现弥补了该缺陷,可以发现核酸和蛋白质水平上基因表达、代谢物、细胞间通信和空间图谱的信息,使得解决健康和疾病中细胞组成和功能的问题成为可能,将精准医疗推向了全新高度,让研究人员可以基于单细胞精度研究人类疾病,从新的维度更加全面深入地理解疾病的发生发展。在过去的十几年中,单细胞测序取得了巨大的技术突破,结合计算工具的发展,在肿瘤、发育、神经、免疫等多个领域得到了广泛应用,极大地推动了生物医药行业的发展。

尽管单细胞测序技术目前已应用于生命科学几乎所有的领域,但仍存在一些问题需要解决和改善。例如:由于单个细胞中的核酸含量有限,需要应用扩增方法产生更多核酸,而扩增技术会把噪音添加到结果数据中,且每次实验同时检测数以万计的细胞,会生成海量的测序数据,给数据分析带来很大的挑战。此外,由于单细胞测序费用昂贵,且生物医学样本珍贵,因此单细胞测序数据管理需要有效的备份方案。单细胞数据信息量大且复杂,通常需要跨研究小组,跨研究单位,甚至跨国界合作分析,如何有效进行数据共享是一个巨大的挑战。这给数据的存储、索引、备份、共享、分析等带来了诸多的挑战。目前云计算平台可以提供整合的存储、备份、索引和共享能力,有潜力成为解决方案;而创新的生物信息学方法和人工智能算法是分析海量单细胞数据必不可少的技术。例如目前结合单细胞大数据和人工智能

算法,将海量数据转化为临床有效的信息,真正帮助提高临床诊断和临床治疗的精准度和效率。

随着人类细胞图谱计划(HCA)的启动和开展,单细胞测序技术的更新和完善将扩大其在临床和精准医学中的应用,以促进了解基因和细胞在健康和疾病中的功能。本文简要综述了单细胞测序技术及其在药物开发中的应用,该技术为药物开发提供了新的视角,展现出巨大的潜力。随着生物信息学和人工智能等的发展,单细胞测序技术将为药物开发带来全新的手段和方法,促进创新药的快速研制。

[参 考 文 献]

- [1] BASLAN T, HICKS J. Unravelling biology and shifting paradigms in cancer with single-cell sequencing[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(9): 557-569.
- [2] ZIEGENHAIN C, VIETH B, PAREKH S, et al. Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods[J]. *Mol Cell*, 2017, 65(4): 631-643. e4.
- [3] TANG FC, BARBACIORU C, WANG YZ, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377-382.
- [4] SAKMANN B, NEHER E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes[J]. *Annu Rev Physiol*, 1984, 46: 455-472.
- [5] HERZENBERG LA, PARKS D, SAHAF B, et al. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford[J]. *Clin Chem*, 2002, 48(10): 1819-1827.
- [6] AMANN R, FUCHS BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(5): 339-348.
- [7] CZERKINSKY CC, NILSSON LA, NYGREN H, et al. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells[J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1-2): 109-121.
- [8] ZONG CH, LU SJ, CHAPMAN AR, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell[J]. *Science*, 2012, 338(6114): 1622-1626.
- [9] SPITS C, LE CAIGNEC C, DE RYCKE M, et al. Whole-genome multiple displacement amplification from single cells[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(4): 1965-1970.
- [10] GROSS A, SCHOENDUBE J, ZIMMERMANN S, et al. Technologies for single-cell isolation[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 16897-16919.
- [11] CHIN CS, SORENSON J, HARRIS JB, et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(1): 33-42.
- [12] RASKO DA, WEBSTER DR, SAHL JW, et al. Origins of the E. coli strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 709-717.
- [13] ISLAM S, ZEISEL A, JOOST S, et al. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers[J]. *Nat Methods*, 2014, 11(2): 163-166.
- [14] KIVIOJA T, VÄHÄRAUTIO A, KARLSSON K, et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers[J]. *Nat Methods*, 2011, 9(1): 72-74.
- [15] BACHER R, CHU LF, LENG N, et al. SCnorm: robust normalization of single-cell RNA-seq data[J]. *Nat Methods*, 2017, 14(6): 584-586.
- [16] VALLEJOS CA, MARIONI JC, RICHARDSON S. BASiCS: Bayesian analysis of single-cell sequencing data[J]. *PLoS Comput Biol*, 2015, 11(6): e1004333.
- [17] LUN AT, BACH K, MARIONI JC. Pooling across cells to normalize single-cell RNA sequencing data with many zero counts[J]. *Genome Biol*, 2016, 17: 75.
- [18] BUTLER A, HOFFMAN P, SMIBERT P, et al. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(5): 411-420.
- [19] NOWELL PC. The clonal evolution of tumor cell populations[J]. *Science*, 1976, 194(4260): 23-28.
- [20] POLYAK K. Tumor heterogeneity confounds and illuminates: a case for Darwinian tumor evolution[J]. *Nat Med*, 2014, 20(4): 344-346.
- [21] MCGRANAHAN N, SWANTON C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution[J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(1): 15-26.
- [22] XU ZJ, CHEN DM, HU YC, et al. Anatomically distinct fibroblast subsets determine skin autoimmune patterns[J]. *Nature*, 2022, 601(7891): 118-124.
- [23] ÆGIDIUS HM, VEIDAL SS, FEIGH M, et al. Multi-omics characterization of a diet-induced obese model of non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 1148.
- [24] ZHAO ZQ, ZHANG D, YANG FQ, et al. Evolutionarily conservative and non-conservative regulatory networks during primate interneuron development revealed by single-cell RNA and ATAC sequencing[J]. *Cell Res*, 2022, 32(5): 425-436.
- [25] ZHANG L, LI ZY, SKRZYPCZYNSKA KM, et al. Single-cell analyses inform mechanisms of myeloid-targeted therapies in colon cancer[J]. *Cell*, 2020, 181(2): 442-459. e29.
- [26] BARTFAI T, BUCKLEY PT, EBERWINE J. Drug targets: single-cell transcriptomics hastens unbiased discovery[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2012, 33(1): 9-16.
- [27] KFOURY Y, BARYAWNO N, SEVERE N, et al. Human prostate cancer bone metastases have an actionable immunosuppressive microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(11): 1464-1478. e8.
- [28] PAI JA, SATPATHY AT. High-throughput and single-cell T cell receptor sequencing technologies[J]. *Nat Methods*, 2021, 18(8): 881-892.
- [29] LI J, PISKOL R, YBARRA R, et al. CD3 bispecific antibody-induced cytokine release is dispensable for cytotoxic T cell activity[J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(508): eaax8861.
- [30] COHEN YC, ZADA M, WANG SY, et al. Identification of resistance pathways and therapeutic targets in relapsed multiple myeloma patients through single-cell sequencing[J]. *Nat Med*, 2021, 27(3): 491-503.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-12-30