·生物医药前沿·

抗 GPC3/NKG2D 双特异性融合蛋白的制备及其功能研究

刘蕴慧[1,2],葛　晨[1],徐勤枝[2],钱尼良[2],杨　慧[3],万令飞[1],阎新龙[1],高　新[2]
(1 北京工业大学环境与生命学部,北京 100124;2 北京免疫方舟医药科技有限公司,北京 100071;
3 军事科学院军事医学研究院卫生勤务与血液研究所军事再生医学研究室,北京 100850)

[**摘要**] **目的**:构建靶向磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(glypican-3,GPC3)和 NKG2D 的双特异性融合蛋白,并初步评价其在体外对肝癌细胞的杀伤功能。**方法**:通过基因工程技术,将 NKG2D 的配体人主要组织相容性复合物Ⅰ类相关蛋白 A(MHC class Ⅰ chain-related A,MICA)胞外区融合到 Fab 形式的抗人 GPC3 抗体 GC33 的重链末端,构建双特异性融合蛋白(Fab GC33-MICA,FabGM)表达载体;转染 FreeStyle™ 293-F 细胞,收集细胞培养上清,经亲和纯化获得 FabGM 蛋白;利用分子相互作用技术(Fortebio)和流式细胞术检测 FabGM 的靶向亲和力;细胞实时动态成像分析系统测定 FabGM 介导的外周血单个核细胞(PBMCs)对高表达 GPC3 的人肝癌细胞 HepG2 的杀伤效应,ELISA 法检测杀伤过程中 PBMCs 分泌人干扰素-γ(hIFN-γ)情况。**结果**:本研究成功地表达并纯化了 FabGM,明确 FabGM 可特异性结合 GPC3 和 NKG2D。经检测 FabGM 能有效介导 PBMCs 靶向杀伤 HepG2 肝癌细胞,诱导 PBMCs 分泌 IFN-γ。**结论**:双特异性融合蛋白 FabGM 能够在体外有效介导效应细胞 PBMCs 杀伤肝癌细胞 HepG2,为 FabGM 成为肝细胞肝癌的潜在靶向治疗药物提供了实验依据。

[**关键词**] 双特异性融合蛋白;双特异性抗体;肝细胞肝癌;磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3;NKG2D
[**中图分类号**] R979.1　　[**文献标志码**] A　　[**文章编号**] 1003－3734(2021)21－1975－07

Preparation and preliminary characterization of anti-GPC3/NKG2D bispecific fusion protein

LIU Yun-hui[1,2], GE Chen[1], XU Qin-zhi[2], QIAN Ni-liang[2], YANG Hui[3], WAN Ling-fei[1], YAN Xin-long[1], GAO Xin[2]
(1 *Faculty of Enviromental and Life Sciences, Beijing University of Technology, Beijing* 100124, *China*; 2 *Beijing Immunoah Pharma Tech Co., Ltd., Beijing* 100071, *China*; 3 *Stem Cell and Regenerative Medicine Lab, Institute of Health Service and Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing* 100850, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To construct bispecific fusion protein from Glypican-3 and NKG2D, and to primarily evaluate the cytolytic properties against human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 *in vitro*. **Methods**: Using genetic engineering technology, bispecific fusion protein FabGC33-MICA (human MHC class Ⅰ chain-related A, FabGM) expression vector was obtained by fusion the extracellular domain of MICA to heavy chain's C-terminal of the Fab form of GC33, and was used to transfect FreeStyle™ 293-F cells. FabGM fusion protein was purified from the cell supernatant by affinity chromatography. Octet QKe system (ForteBio) was applied to detect FabGM's affinity for its targets. Flow cytometry analysis was used to assess the avidity of FabGM fusion protein in HepG2 cells. The cytotoxicity of FabGM against HepG2 was monitored by IncuCyte Live Cell Imaging System. The secretion of

[**基金项目**] 国家自然科学基金资助项目(81772617);北京市长城学者项目(CIT & TCD 20190311)
[**作者简介**] 刘蕴慧,女,硕士研究生,主要从事肿瘤生物学研究。E-mail:liuyunhui66@163.com。
[**通讯作者**] 高新,女,副研究员,主要从事抗体药物研发。E-mail:gaoxin@immunoah.cn。阎新龙,男,教授,博士生导师,主要从事肿瘤生物学研究。E-mail:yxlong2000@126.com。

interferon-γ (IFN-γ) by PBMCs was detected by ELISA assay. **Results**: FabGM was successfully purified and confirmed selectively combined with GPC3 and NKG2D. The SDS-PAGE assay confirmed the predicted molecular. The K_d values of FabGM to target molecular GPC3 and NKG2D was 1.14 and 561 nmol·L^{-1} respectively. FabGM effectively mediated the targeted killing effect of PBMCs against HepG2. ELISA assay showed that IFN-γ level was significantly increased during the killing process compared with negative control. **Conclusion**: Bispecific fusion protein FabGM effectively mediated PBMCs to kill HepG2 cells *in vitro*, providing experimental evidence for FabGM to become a candidate drug for hepatocellular carcinoma treatment.

[**Key words**] bispecific fusion protein; bispecific antibody; hepatocellular carcinoma; glypican-3; NKG2D

原发性肝癌(简称肝癌)是世界范围内常见的恶性肿瘤,致死率位列肿瘤死亡病因第4,肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是肝癌中最常见的一种,约占75% ~95%[1-2]。HCC的发病原因有慢性乙型或丙型肝炎病毒感染、脂肪肝、糖尿病、酗酒和食品污染等[3]。中国是HCC高发地区,HCC患者的确诊年龄均值为52岁,由于发病隐匿,大部分患者确诊时已处于中晚期,患者的中位总生存期仅为23个月[4]。肝癌治疗方式主要有肝切除术、肝移植术、局部消融治疗、经动脉化疗栓塞术、放射治疗和系统治疗[5]。对于初诊已处于中晚期的患者,治疗方法非常有限,主要是系统治疗,如激酶抑制剂和PD-1检查点抑制性抗体[3,5]。然而,现有的治疗药物在提高存活率方面仍不尽如人意,故仍需开发更有效的治疗药物,减轻肿瘤负荷、提高生存质量、延长生存时间。

磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(glypican-3,GPC3)是硫酸乙酰肝素蛋白多糖家族的成员,通过糖基磷脂酰肌醇锚点定位于细胞表面[6]。GPC3在胚胎发育过程中表达,在大多数成人组织中不表达或者低表达,而大量研究证明其在HCC中高表达,故可作为肝细胞肝癌特异性诊断和治疗靶点。GC33是靶向GPC3的单克隆抗体,虽然耐受性良好,作为二线治疗药物在治疗晚期肝癌患者中未能体现优势,但提示GC33抗体安全性可靠[7-10]。将GPC3与免疫活化受体组合,开发成双特异性抗体是一种有潜力的免疫治疗手段。双特异性抗体可通过其双靶向作用,一端靶向肿瘤特异性靶点,另一端靶向免疫细胞表面受体,引导免疫细胞在肿瘤微环境发挥杀伤作用。

NKG2D是一种活化受体,表达于自然杀伤(NK)细胞和T细胞亚群,NKG2D配体包括MHC Ⅰ类相关分子家族(MICA/B)和人巨细胞病毒蛋白UL16的结合蛋白(ULBP1-6)家族等,在压力如病毒/细菌感染、恶性转化诱导下在细胞上表达[11]。当NKG2D与配体结合后,下游的PI3K(phosphoinositide 3-kinase,PI3K)和/或GRB2(growth factor receptor-bound protein 2,GRB2)信号通路活化,NK细胞活化、增殖、分泌细胞因子,激活免疫系统,进而引起对异常细胞的杀伤,因此NKG2D分子成为肿瘤免疫治疗新靶点之一[11]。有研究将NKG2D的配体ULBP2或MICA与多发性骨髓瘤相关抗原CD138或CS1单链抗体融合,构建的双特异性融合蛋白能有效介导NK2GD$^+$的NK细胞或T细胞对肿瘤细胞的杀伤[12-13]。基于上述研究背景,我们尝试将MICA与GC33抗体进行组合,构建成靶向GPC3和NKG2D的双特异性融合蛋白FabGM,以期通过靶向GPC3分子,在肿瘤微环境富集表达NK2GD的NK细胞或T细胞并使之活化,达到特异性杀伤肿瘤的目的。利用双特异性抗体XFab技术平台,可以设计并制备同时靶向2个不同抗原的双特异性抗体[14]。基于此平台,借鉴双特异抗体的双靶点结合方式,我们构建了GC33的Fab抗体,并将NKG2D的配体MICA胞外区融合在重链的羧基端,制备了靶向GPC3和NKG2D双特异性融合蛋白,并初步验证其在体外对肝癌细胞的杀伤作用。

材料与方法

1 材料

1.1 载体和细胞 哺乳动物细胞表达载体pQKX系列载体(北京免疫方舟医药科技有限公司),FreeStyle™ 293-F细胞(购自Thermo Fisher公司),人肝癌细胞系HepG2(购自PerkinElmer公司),人肝癌细胞系LM3(复旦大学肝癌研究所),NKG2D过表达细胞株HEK293-NKG2D(北京免疫方舟医药科技有限公司),健康人外周血单个核细胞(PBMCs,购自上海赛笠生物科技有限公司)。

1.2 主要试剂 BM无缝克隆试剂盒、大肠杆菌感

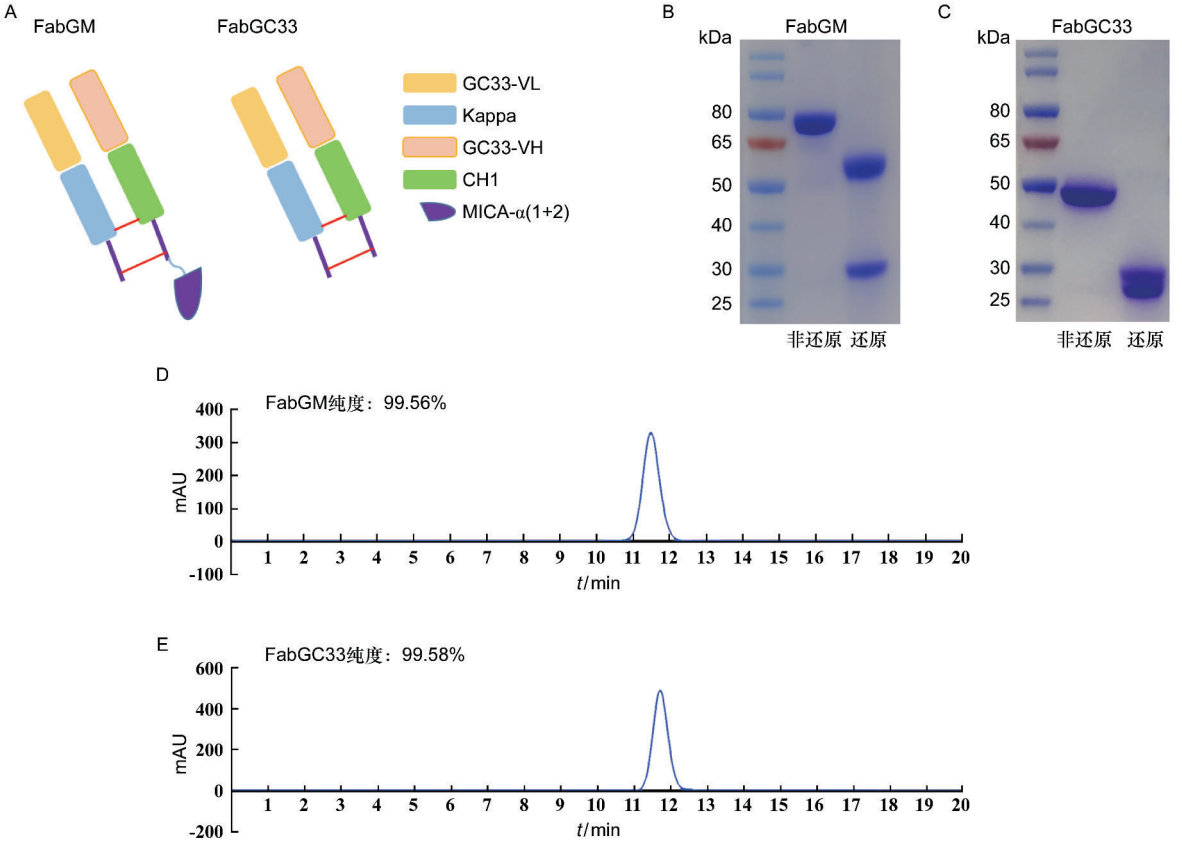
受态细胞 DH5α(北京博迈德基因技术有限公司),无血清培养基 OPM-293 CD05(上海奥浦迈生物科技有限公司),RPMI－1640 培养基、DMEM 培养基、青霉素、链霉素(Gibco 公司),胎牛血清(GEMINI 公司),蛋白质电泳预制胶(南京金斯瑞生物科技有限公司),重组人 GPC3 蛋白(近岸蛋白科技有限公司),重组人 NKG2D 蛋白(北京义翘神州科技有限公司),重组人 MICA-α1/2-Fc 融合蛋白(北京免疫方舟医药科技有限公司),APC 标记鼠抗人 Kappa 轻链抗体(Biolegend 公司),APC 标记抗人 NKG2D 抗体(Biolegend 公司),抗人 GPC3 抗体(R&D),Human IFN-gamma ELISA Kit(杭州联科生物技术股份有限公司)。

1.3 主要仪器 洁净工作台(苏净安泰公司),显微镜(日本 Olympus 公司),细胞培养摇床(Kuhner 公司),二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),蛋白纯化仪(美国 GE Healthcare 公司),分光光度计(比利时 Trinean 公司),高效液相色谱(美国 Agilent 公司),Fortebio 分子相互作用技术平台(美国 Fortebio 公司),流式细胞分析仪(美国 ACEA 公司),Incucyte 细胞实时动态成像分析系统(美国 Essen Bioscience 公司),多功能酶标仪(德国 BMG 公司)。

2 方法

2.1 双特异性融合蛋白的设计与表达载体构建

合成抗 GPC3 的单克隆抗体 GC33 的重链可变区和轻链可变区的基因序列[15],利用 XFab 双特异性抗体平台,将其构建成 FabGC33 形式。根据 NCBI 网站序列 MICA(GenBank: AAH16929.1),采购 *MICA* 基因克隆载体(北京义翘神州科技股份有限公司),将其 α1/2 区的基因序列[16],以柔性多肽 G4S(Gly4-Ser)连接到 FabGC33 的重链羧基端,构建成双特异性融合蛋白 FabGC33-MICA(FabGM),结构如图 1A。利用同源重组 PCR 技术将编码上述分子的基因序列分别连入真核表达载体 pQKX。



A: FabGM 和 FabGC33 的结构示意图;B,C:纯化 FabGM 和 FabGC33 的 SDS-PAGE 电泳图;D,E: HPLC 检测样品 FabGM 和 Fab GC33 的纯度

图 1 双特异性融合蛋白的表达及鉴定

2.2　双特异性融合蛋白的表达、纯化和检测　FreeStyle™ 293-F 细胞用无血清培养基 OPM-293 CD05 培养，利用阳离子 PEI 将构建成功的质粒转染至 FreeStyle™ 293-F 细胞中，将细胞置于摇床中，37 ℃、150 r·min^{-1}培养 7 d 后收集细胞上清。利用 CH1 亲和层析柱从上清中纯化蛋白，分光光度计测得抗体浓度，SDS-PAGE 联合 HPLC 法检测重组蛋白的分子量和纯度。

2.3　双特异性融合蛋白的亲和力检测　使用分子相互作用仪（Fortebio）检测 FabGM 与重组人 GPC3 蛋白和 NKG2D 蛋白的亲和力。将 FabGM 以及对照样品 FabGC33 和 MICA-α1/2-Fc 与 FAB2G 传感器偶联，分别检测其与不同浓度的 GPC3 和 NKG2D 的结合情况，通过软件 Octet Data Analysis HT Software（Version 10）计算亲和力。

2.4　流式细胞术分析　将 LM3，HepG2 和 NKG2D 过表达细胞株 HEK293-NKG2D 细胞用胰酶消化后，分别与 10 μg·mL^{-1}的 FabGM 或 FabGC33 共孵育 30 min，用 PBS 清洗细胞 2 次后，加入 APC 标记的鼠抗人 Kappa 轻链二抗，设置商业化抗人 GPC3 抗体（R&D）和抗 NKG2D 抗体（Biolegend）做为阳性对照，4 ℃避光孵育 30 min，用 PBS 清洗细胞 2 次，150 μL PBS 重悬细胞，流式细胞分析仪进行检测。

2.5　体外杀伤实验　将人肝癌细胞 HepG2 或 LM3 按 5 000/100 μL 铺至 96 孔板中，24 h 后加入 5 × 10^5·50 μL^{-1} PBMCs（效靶比为 100∶1）和 50 μL FabGM，终浓度为 500 nmol·L^{-1}，设置对照抗体 FabGC33（500 nmol·L^{-1}）组及不同浓度的 FabGM（工作浓度分别为 500，250 和 125 nmol·L^{-1}）对肿瘤细胞的杀伤作用。96 孔板置于 Incucyte 细胞实时动态成像分析系统，每 4 h 拍摄 1 次，拍摄 5 d 后分析数据，利用 HepG2 或 LM3 携带的红色荧光蛋白面积计算活细胞数。取 100 μL 细胞培养上清，ELISA 检测试剂盒检测 IFN-γ 分泌情况。

3　统计学分析

实验数据使用 GraphPad Prism 7.0 软件分析。数据以均数 ± 标准差表示，数据采用 t 检验分析，$P>0.05$ 认为无显著性差异，$P<0.05$ 和 $P<0.01$ 认为有统计学显著性差异。

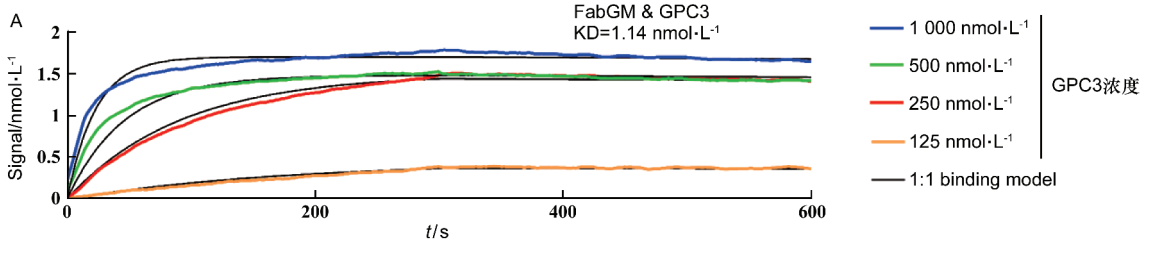
结　果

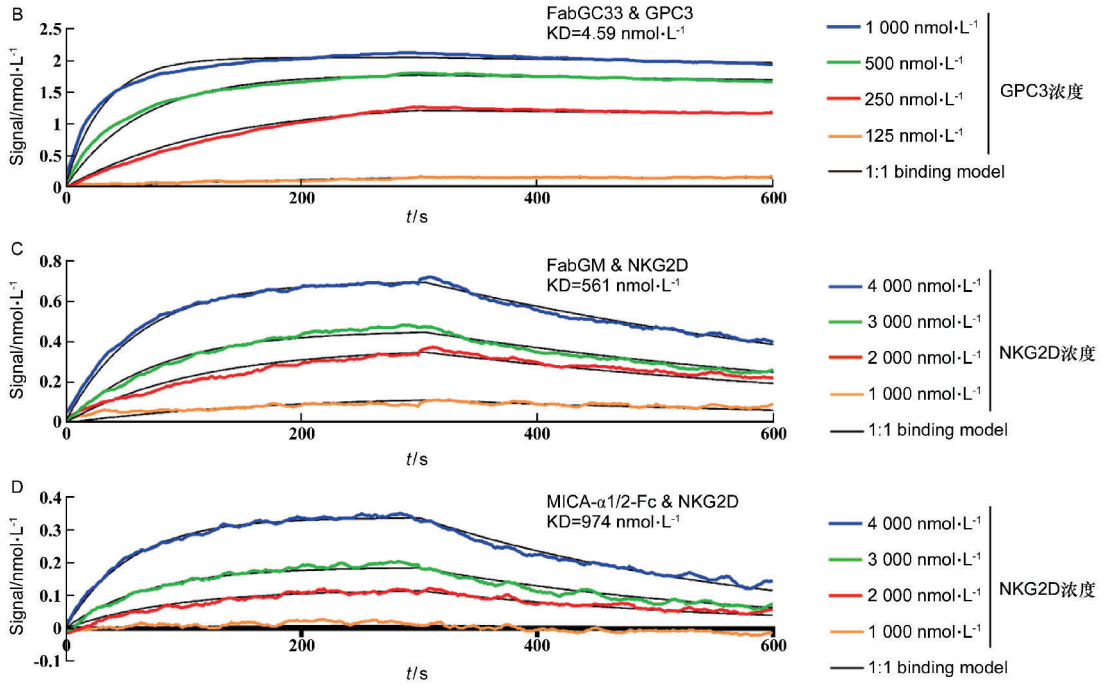
1　双特异性融合蛋白 FabGM 的表达载体构建和表达

双特异性融合蛋白 FabGM 和对照抗体 FabGC33 结构示意图如 1A 所示。构建载体 DNA 测序证实序列无误后，瞬转 FreeStyle™ 293-F 细胞。7 d 后收集细胞培养上清，CH1 柱亲和纯化上清中抗体。纯化 FabGM，FabGC33 蛋白进行 SDS-PAGE 检测，二者的分子量 FabGM（72.2 kDa），FabGC33（50.7 kDa）与预期一致；蛋白变性后的分子量也符合理论预期，提示蛋白表达纯化成功（见图 1B，1C）。HPLC 进一步检测二者的纯度，结果显示双特异抗体 FabGM 的纯度为 99.56%，FabGC33 的纯度为 99.58%（见图 1D，1E）。

2　双特异性融合蛋白 FabGM 的亲和力检测

利用分子相互作仪（Fortebio）检测 FabGM 与靶分子 GPC3 和 NKG2D 的亲和力，结果如图 2 所示，FabGM 与靶分子 GPC3，NKG2D 亲和力常数 KD 分别为 1.14 和 561 nmol·L^{-1}，二者之间约有 2 个数量级的差别，符合最初的设计理念，在肿瘤微环境富集 NK 细胞，从而产生靶向性杀伤。对照 FabGC33 分子与 GPC3 亲和力常数 KD 为 4.59 nmol·L^{-1}，表明课题设计的 FabGM 双功能融合蛋白，保留了抗体的亲和活性。而 NKG2D 蛋白与 MICA-α1/2-Fc 融合蛋白的亲和力常数为 974 nmol·L^{-1}，与 FabGM 数值接近，表明 FabGM 模拟了生理状态下 NKG2D 与配体的亲和状态。



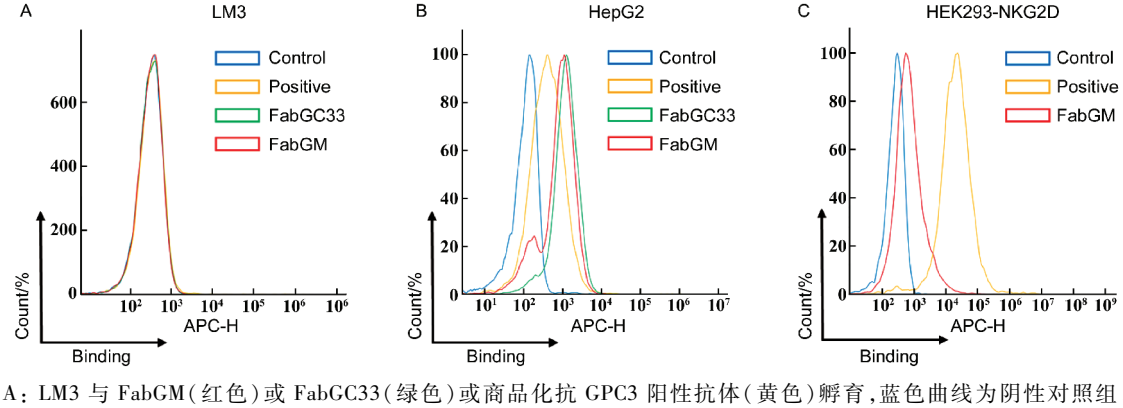


A：FabGM 与人重组蛋白 GPC3 亲和力检测；B：FabGC33 与人重组蛋白 GPC3 亲和力检测；C：FabGM 与人重组蛋白 NKG2D 亲和力检测；D：MICA-α1/2-Fc 与人重组蛋白 NKG2D 亲和力检测

图 2　FabGM 与靶标蛋白的亲和力测定

3　流式检测双特异性融合蛋白 FabGM 与细胞结合能力

利用流式细胞术，分析 FabGM 与人肝癌细胞 LM3 和 HepG2 及过表达 NKG2D 的 HEK293-NKG2D 细胞的结合活性。如图 3A 所示，FabGM，FabGC33 和商业化抗体与人肝癌细胞 LM3 均无结合，提示 LM3 细胞为 GPC3 阴性表达；上述分子与 HepG2 细胞有结合，峰图右移，提示 HepG2 为 GPC3 阳性细胞（图 3B）。FabGM 和商业化抗 NKG2D 抗体与 HEK293-NKG2D 产生特异性结合（图 3C），表明本实验制备的 FabGM 分子具有特异性结合 GPC3 阳性细胞和 NKG2D 阳性细胞的能力。



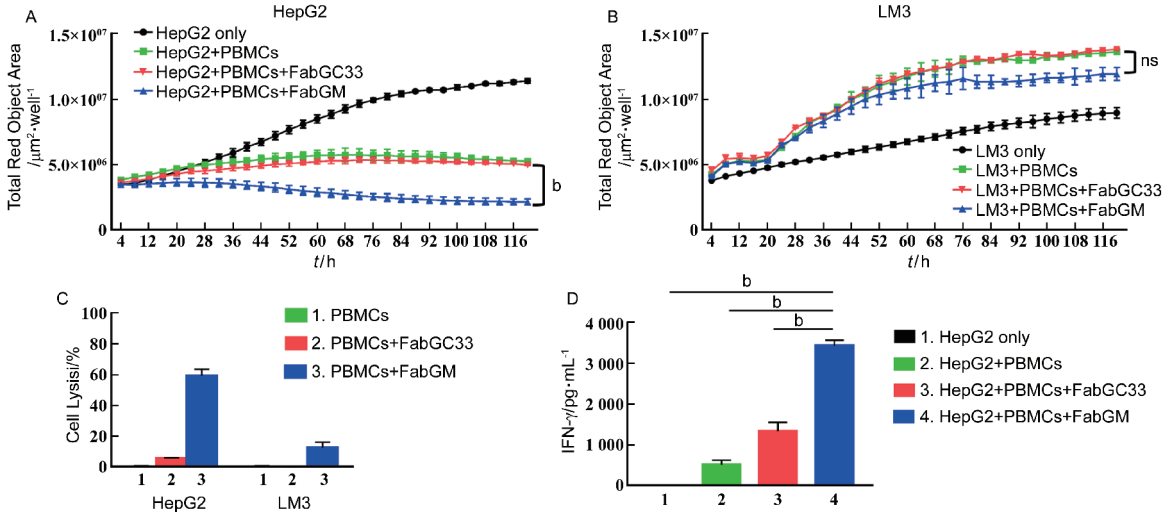
A：LM3 与 FabGM（红色）或 FabGC33（绿色）或商品化抗 GPC3 阳性抗体（黄色）孵育，蓝色曲线为阴性对照组；
B：HepG2 与 FabGM（红色）或 FabGC33（绿色）或商品化抗 GPC3 阳性抗体（黄色）孵育，蓝色曲线为阴性对照组；
C：HEK293-NKG2D 与 FabGM（红色）或商品化抗 NKG2D 阳性抗体（黄色）孵育，蓝色曲线为阴性对照组

图 3　流式细胞术检测 FabGM 与靶标细胞的结合能力

4　双特异性融合蛋白 FabGM 体外介导 PBMCs 杀伤肝癌细胞

为了检测 FabGM 介导 PBMCs 靶向杀伤肝癌细胞的能力，我们采用人 PBMCs 作为效应细胞，人肝癌细胞 LM3 和 HepG2 作为靶细胞。在 500 nmol·L^{-1}药物作用下，由图 4A 和图 4C 可见，与 HepG2 + PBMCs 对照组相比，FabGC33 对照组介导的对肿瘤细胞的杀伤效率 5.6%，而 FabGM 实验组为 59.4%。FabGM

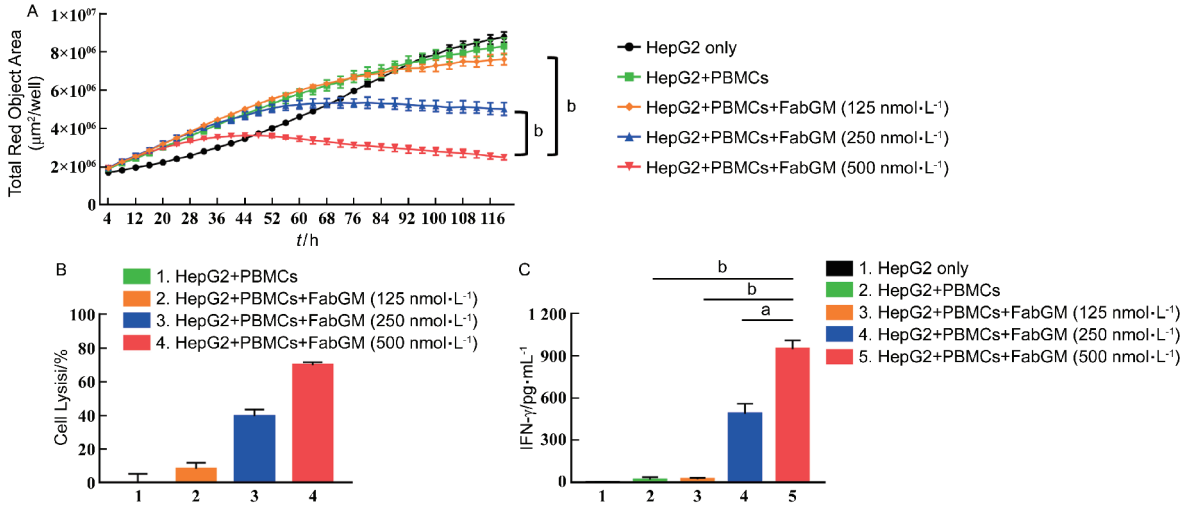
组显著抑制 HepG2 增殖($P<0.01$);FabGC33 对照组因为缺乏靶向 PMBCs 分子,不能介导 PBMCs 在肿瘤细胞富集,所以其生长曲线与 HepG2 + PBMCs 相似。LM3 细胞 GPC3 表达阴性,FabGM 未能诱导 PBMCs对 LM3 的杀伤,表明双特异性融合蛋白 FabGM 诱导的杀伤具有 GPC3 靶点依赖性(图 4B,4C)。ELISA 检测图 4A 各组上清中 IFN-γ,结果显示 FabGM 实验组的 IFN-γ 水平显著高于对照组($P<0.01$,图 4D),提示双特异性融合蛋白 FabGM 可以介导 PBMCs 活化分泌 IFN-γ,达到杀伤肿瘤细胞的作用。



A,B:将效应细胞 PBMCs 与靶细胞 HepG2 细胞或 LM3 细胞在效靶比为 100∶1的条件下与浓度为 500 nmol·L^{-1}的 FabGM 或 FabGC33 共孵育 5 d,设置单靶细胞对照组和靶细胞与 PBMCs 共孵育对照组,组横坐标为共孵育时间,纵坐标为靶细胞的红色荧光信号,代表活细胞数量;C:将靶细胞和 PBMCs 单独孵育组设置为杀伤效率归零组,统计各组在实验结束时靶细胞 HepG2 或 LM3 相对于该归零组的杀伤效率;D:ELISA 检测 A 图中各组细胞上清中 IFN-γ 的含量;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

图 4 FabGM 介导 PBMCs 体外杀伤 HepG2 肝癌细胞和 LM3 肝癌细胞的实验

我们进一步研究了 FabGM 的剂量效应关系。随着 FabGM 浓度增大,介导 PBMCs 对靶细胞的杀伤作用逐渐增强(图 5A 和 5B),FabGM 浓度为 125,250 和 500 nmol·L^{-1}时诱导 PBMCs 对 HepG2 的杀伤效率依次为 8.2%,39.6% 和 70%,杀伤效率逐渐增强,证明 FabGM 诱导 PBMCs 对肿瘤细胞的杀伤具有剂量依赖关系。ELISA 检测上清中 IFN-γ 浓度,也与药物浓度成正相关(图 5C)。



A:将效应细胞 PBMCs 与靶细胞 HepG2 细胞在效靶比为 100∶1的条件下与浓度依次为 125,250 和 500 nmol·L^{-1}的 FabGM 共孵育 5 d,设置单靶细胞对照组和靶细胞与 PBMCs 共孵育对照组,横坐标为共孵育时间,纵坐标为靶细胞的红色荧光信号,代表活细胞数量; B:将靶细胞 HepG2 和 PBMCs 单独孵育组设置为杀伤效率归零组,统计各组在实验结束时靶细胞 HepG2 相对于该归零组的杀伤效率;C:ELISA 检测 A 图中各组细胞上清中 IFN-γ 的含量;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

图 5 不同浓度的 FabGM 介导 PBMCs 体外杀伤 HepG2 肝癌细胞的实验

讨　论

伴随肿瘤免疫疗法的兴起、抗体制备工艺的不断完善,新型抗体如双特异性抗体的设计和研发不断进步,目前已有 2 种双特异性抗体获批上市:catumaxoma 靶向 EpCAM 和 CD3,适应证是恶性腹水;blinatumomab 靶向 CD19 和 CD3,适应证是费氏染色体阴性的前体 B 细胞急性淋巴细胞白血病[17-18]。目前尚没有针对 HCC 的双特异性抗体药物上市,在 HCC 中高表达的 GPC3 是一个优选的肿瘤相关抗原,针对该靶点开发双特异性抗体是一项有潜力的研究。

GC33 是靶向 GPC3 的单克隆抗体,其借助 ADCC 作用达到杀伤肿瘤细胞的作用,在Ⅰ期临床试验中,相对于 GPC3 阴性的 HCC 患者,GC33 有效延长了 GPC3 阳性 HCC 患者的中位疾病进展时间,但在Ⅱ期临床试验中,仅高剂量的治疗组具有潜在的益处,低剂量组中并不明显,且各组中无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)的中位持续时间没有差别[7-10]。虽然 GC33 作为二线治疗晚期 HCC 患者的药物不能显示出益处,但 GC33 耐受性良好,故将其开发成双特异性抗体是一种新的研究方向。

本实验成功表达了高纯度的靶向 GPC3 和 NKG2D 的双特异性融合蛋白 FabGM,该分子与靶点 GPC3 和 NKG2D 均有特异性结合。体外杀伤实验验证了 FabGM 介导的 PBMCs 杀伤 GPC3 阳性肝癌细胞 HepG2 的功能,且有剂量依赖关系,对 GPC3 阴性的 LM3 无显著杀伤作用,证明 FabGM 介导的 PBMCs 对肿瘤细胞的杀伤具有 GPC3 靶点依赖性,验证了我们的双特异性融合蛋白的概念,为双特异性抗体在 HCC 的系统治疗中的临床应用奠定了实验基础。

[参 考 文 献]

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.

[2] 郭银锋,郑绚,杜玲然. 栓塞微球在肝癌治疗中的新进展[J]. 今日药学,2021,31(4):251-254.

[3] YANG JD, HAINAUT P, GORES GJ, *et al*. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10): 589-604.

[4] PARK JW, CHEN M, COLOMBO M, *et al*. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study[J]. *Liver Int*, 2015, 35(9): 2155-2166.

[5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2019 年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(2): 277-292.

[6] FILMUS J, SELLECK SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(4): 497-501.

[7] KHAN S, BLACKBURN M, MAO DL, *et al*. Glypican-3 (GPC3) expression in human placenta: localization to the differentiated syncytiotrophoblast[J]. *Histol Histopathol*, 2001, 16(1): 71-78.

[8] IGLESIAS BV, CENTENO G, PASCUCCELLI H, *et al*. Expression pattern of glypican-3 (GPC3) during human embryonic and fetal development[J]. *Histol Histopathol*,2008,23(11): 1333-1340.

[9] ZHU AX, GOLD PJ, EL-KHOUEIRY AB, *et al*. First-in-man phase I study of GC33, a novel recombinant humanized antibody against glypican-3, in patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(4): 920-928.

[10] ABOU-ALFA GK, PUIG O, DANIELE B, *et al*. Randomized phase II placebo controlled study of codrituzumab in previously treated patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2016, 65(2): 289-295.

[11] LANIER LL. NKG2D receptor and its ligands in host defense[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(6): 575-582.

[12] VON STRANDMANN EP, HANSEN HP, REINERS KS, *et al*. A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma *in vitro* and *in vivo*[J]. *Blood*, 2006, 107(5): 1955-1962.

[13] CHAN WK, KANG S, YOUSSEF Y, *et al*. A CS1-NKG2D bispecific antibody collectively activates cytolytic immune cells against multiple myeloma[J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6(7): 776-787.

[14] 高新. 一种多特异性抗体及其制备方法和用途:中国, 201911015236.1[P]. 2021-07-16.

[15] NAKANO K, ISHIGURO T, KONISHI H, *et al*. Generation of a humanized anti-glypican 3 antibody by CDR grafting and stability optimization[J]. *Anticancer Drugs*, 2010, 21(10): 907-916.

[16] FERRARI DE ANDRADE L, TAY RE, PAN D, *et al*. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity[J]. *Science*, 2018, 359(6383): 1537-1542.

[17] LINKE R, KLEIN A, SEIMETZ D. Catumaxomab: clinical development and future directions[J]. *MAbs*, 2010, 2(2): 129-136.

[18] PORTELL CA, WENZELL CM, ADVANI AS. Clinical and pharmacologic aspects of blinatumomab in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Clin Pharmacol*, 2013, 5(Suppl 1): 5-11.

编辑:杨青/接受日期:2021-05-06