

双阴性 T 细胞：通用型细胞药物研发进展与趋势

闫琼宇¹, 路丽明², 杨黎明¹

(1.上海瑞顺诺盛生物技术有限公司, 上海 201403; 2. 上海交通大学医学院, 上海 200025)

摘要:近年来以 PD-1 抗体和嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cells, CAR-T)为代表的免疫治疗使肿瘤晚期患者获得显著疗效, 肿瘤免疫治疗成为肿瘤治疗的热点。自体 CAR-T 在血液恶性肿瘤和一些自身免疫性疾病的治疗中展现出可喜疗效, 但由于其价格昂贵、制备耗时、临床使用不便等局限, 限制了 CAR-T 产品的临床应用。通用型细胞可以弥补这些缺陷。双阴性 T 细胞(double negative T cells, DNT)存在于人外周血中, 属成熟 T 细胞的一个亚型, 细胞表面表达 CD3 与 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ TCR 分子, 但不表达 CD4、CD8、CD56 分子, 也不结合恒定型自然杀伤 T 细胞特异性 α -半乳糖神经酰胺(α -galactosylceramide, α GalCer)加载的 CD1d 四聚物, 占正常人外周血 T 细胞约 1%~10%。异体来源的 DNT 无需基因编辑, 天然不引起移植物抗宿主病和宿主抗移植物反应, 具备作为通用型细胞治疗产品的特征。DNT 可在体外大量扩增, 生产工艺成熟可控, 可提前制备存储在液氮罐备用, 满足作为药物属性的通用型细胞产品要求。DNT 是制备通用型 CAR-DNT 产品的良好载体细胞, 可以发挥 DNT 天然多靶点叠加 CAR 特异靶点的多重杀瘤活性。该综述将重点介绍 DNT 的发现、杀瘤机制及其在临床研究中的进展, 为开发通用型免疫细胞治疗产品提供全新的视角。

关键词: 双阴性 T 细胞; 恶性肿瘤; 自身免疫性疾病; 通用型嵌合抗原受体 T 细胞

中图分类号: R392.12

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2024)06-0536-06

随着人类平均寿命的延长和生存环境的恶化, 全球范围内恶性肿瘤的发病率和死亡率呈上升趋势。嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cells, CAR-T)疗法作为新兴的肿瘤治疗手段取得很大成效, CAR-T 技术通过基因工程获得携带识别肿瘤抗原特异性受体的 T 细胞, 克服 MHC 限制性, 准确高效地定位到肿瘤靶点并在患者体内长期存在。目前, 全球共有 12 款 CAR-T 产品获批上市, 靶点集中在 CD19 和 BCMA。

然而目前获批上市的 CAR-T 疗法均为自体 CAR-T 产品, 存在成本高、生产时间长和制造困难等固有瓶颈, 开发通用型 CAR-T 产品是必然发展趋势。有研究尝试采用敲除内源性 TCR 和 HLA 分子技术开发供体来源的 CD4⁺、CD8⁺ 通用型 CAR-T, 然而, 该技术路线存在产品成本高、工艺复杂以及引起移植物抗宿主病(graft versus host disease, GvHD)和染色体易位等安全隐患。

双阴性 T 细胞(double negative T cells, DNT)是一种存在于人外周血的特殊 T 细胞亚群, 无需基

因编辑即可制备通用型细胞制剂, 其原料来自健康供体外周血, 制备工艺成熟可控, 体外扩增细胞量大, 提前制备后存储在液氮中, 具有很好的抗癌功能, 不引起 GvHD 和宿主抗移植物反应(host versus graft reaction, HvGR)^[1-3], 是国内首个进入注册临床试验的通用型免疫细胞治疗药物, 目前正在开展治疗血液肿瘤和自身免疫性疾病的临床研究。

1 DNT 概述

1989 年, 斯坦福大学的 Strober 教授团队在 Nature 第一次报道了从类风湿关节炎病人滑液中克隆的 TCR-DNT 对分枝杆菌抗原产生特异性应答, 该应答不受 MHC 的限制^[4]。2000 年, 加拿大多伦多大学医学院张丽教授团队在 Nature Medicine 发表论文, 报道了小鼠模型中 DNT 具有抗原特异性移植耐受功能及其机制^[5]。后续大量临床前研究表明, DNT 存在于正常人外周血, 占总 T 细胞比例约 1%~10%, 属成熟 T 细胞的一个亚型, 表达 CD3 分子, 但不表达 CD4、CD8、CD56 分子, 也不结合恒定型自然杀伤 T 细胞特异性 α -半乳糖神经酰胺(α -galactosylceramide, α GalCer)加载的 CD1d 四聚物。根据 TCR 的不同, 将 DNT 分为 $\alpha\beta$ ⁺ DNT 和 $\gamma\delta$ ⁺ DNT, $\gamma\delta$ ⁺ DNT 通过 $\gamma\delta$ TCR 和膜表面天然细胞受体(natural cell receptor, NCR)以

收稿日期: 2024-04-08

基金项目: 浙江省领军型创新创业团队项目(2021)

作者简介: 闫琼宇(1988-), 女, 博士, 主要从事肿瘤免疫相关研究

通信作者: 杨黎明(E-mail: lyang@wyzebiotech.com)

MHC 非限制性的方式发挥双重杀瘤活性, 并可发挥抗原呈递细胞的作用, 呈递肿瘤抗原以招募和激活其他免疫细胞, 发挥抗肿瘤活性, 见图 1。DNT 在胸腺中成熟分化后通过淋巴管、外周血和组织液等循环, 分布到血液充盈的器官和组织中, 在小鼠血液肿瘤模型中, 输入的 DNT 细胞主要归巢到骨髓、脾脏和肝脏等组织与器官发挥杀瘤活性, 至于正常生理条件下 DNT 细胞的最终归巢器官目前尚不清楚, 有文献报道 DNT 细胞大量存在于肠上皮组织。值得注意的是, 与 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞相比, DNT 对白血病细胞具有更强的杀伤活性^[1,6]。2023 年, Behjati 教授团队在 Nature Medicine 发表了迄今为止最大规模的 CAR-T 持久性研究, 系统分析了 10 例复发难治性儿童急性 B 淋巴细胞白血病 (relapsed or refractory B-acute lymphoblastic leukemia, r/r B-ALL) 患者接受 CD19-CAR-T 治疗 5 年后的血液和骨髓样本中 CAR-T 特征, 发现所有时间点持续存在的 CAR-T 主要是 DNT^[7], 此结论不同于之前 Carl H June 团队分析的两名缓解的慢性淋巴细胞白血病成人患者

持续存在的 CAR-T 以 CD4⁺ CAR-T 为主要占比, 这项新的更大规模研究揭示了 DNT 长久抗肿瘤的作用^[8]。

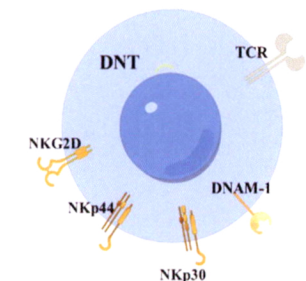


图 1 DNT 表面表达 TCR 和 NCR, γδ⁺ DNT 通过 γδ TCR 和 NCR 以 MHC 非限制性的方式发挥双重杀瘤活性。

DNT 与同种异体 PBMC 或脐带血共培养 72 h 没有杀伤反应, 表明 DNT 不引起 GvHD。TCR 和 B2M 双敲除以及单 TCR 敲除的 T 细胞对肿瘤杀伤作用随时间增加, 而 192 h 后没有观察到对 DNT 的作用, 表明 DNT 不引起 HvGR^[3]。DNT 通过 CD25-JAK-STAT 通路影响 CD4⁺ T 细胞的增殖和活化, 减轻急性 GVHD^[9]。目前各种通用细胞疗法间的比对见表 1。

表 1 天然通用细胞疗法对比

特征	DNT 细胞	γδT 细胞	NK 细胞
PBMC 占比	1%~10%	1%~10%	5%~20%
细胞表面蛋白			
αβ TCR	+	—	—
γδ TCR	Vδ1 及 Vδ2	Vδ1 或 Vδ2	—
CD4、CD8	—	±	—
细胞毒因子	PF ^① , Gr ^② , TRAIL	PF, Gr	PF, Gr
识别蛋白	TCR, NKG2D, DNAM-1, LFA1, NKP44, NKP30	TCR, NKG2D, NKG2C, NKP30	NKG2D, DNAM-1, NCR, KIR
HLA 限制性	无	有	有
持续性	长期免疫记忆	长期免疫记忆	存活时间短
体外扩增量	+++	++	++
细胞因子	IFN-γ/TNF-α/IL-2/IL-4	IFN-γ/TNF-α/IL-10	IFN-γ
GvHD 风险	低	低	低
HvG 风险	低	低	高

注: ①PF 为穿孔素(perforin); ②Gr 为颗粒酶(granzyme)。

2 DNT 的杀伤机制

2.1 识别激活机制

2.1.1 γδ TCR 识别激活机制 DNT 表面 γδ TCR 的表达在 60%~90%^[10], 通过 γδ TCR 以 MHC 非限制性方式直接识别肿瘤磷酸化抗原 PAg 并激活

DNT。

2.1.2 NCR 识别激活机制 DNT 遇到肿瘤细胞后, DNT 通过激活 NKG2D 和 DNAM-1 识别和杀伤急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 原始细胞^[1]。Xu 等^[11]发现 DNT 通过 MICA-NKG2D 途径抑制胰腺肿瘤的生长。Yao

等^[12]发现当阻断 DNT 细胞表面的 NKG2D 受体后,抑制了 DNT 对肺癌细胞的杀伤。除了 NKG2D 和 DNAM-1 受体外,当 DNT 与血液恶性肿瘤细胞系共培养时,还检测到 NKp30、KIR2DS4 的参与,同时共刺激分子 CD30、GITR、CD27 和 CD28 的表达增加,共抑制分子 ICOS、CTLA4 和 PD-1 的表达较低,表明 DNT 有良好的生存能力^[13]。

2.2 杀伤机制

2.2.1 细胞凋亡途径 DNT 通过 FasL-Fas 途径介导靶细胞凋亡。DNT 与胰腺癌细胞体外共培养,胰腺癌细胞中 Fas、Caspase-8 和 cleaved Caspase-8 的表达增加,当添加阻断剂诱骗受体-3 后,胰腺癌细胞中 Fas、Caspase-8 和 cleaved Caspase-8 表达降低,DNT 的抗肿瘤作用随之降低^[14];在裸鼠胰腺癌肿瘤模型中,DNT 治疗组和吉西他滨治疗组肿瘤体积和重量均低于空白对照,DNT 治疗组 Fas、Caspase-8 和 cleaved Caspase-8 的表达高于空白对照组,说明 DNT 通过 Fas/FasL 信号通路使胰腺癌细胞凋亡^[14]。DNT 也可通过 TRAIL 通路诱使肿瘤细胞凋亡,Yao 等^[12]研究表明,DNT 扩增后的膜 TRAIL 表达量增加了一倍,培养上清液也检测到可溶性 TRAIL。

2.2.2 释放 PF/Gr DNT 通过分泌 PF 和颗粒酶 B(granzyme B, GrB)杀伤肿瘤细胞。Merims 等^[6]证实,AML 患者的 DNT 比 CD8⁺ T 细胞表达更高水平的 PF,阻断 DNT 分泌 PF 后其对肿瘤细胞的杀伤作用降低 80%~97%,表明 DNT 的杀伤作用依赖于 PF 及 GrB 途径。Voelkl 等^[15]发现 DNT 克隆(T4H2)以 PF/GrB 依赖方式靶向人黑色素瘤细胞。Lee 等^[1]证明 DNT 对白血病细胞毒性的抑制作用主要是由 PF/GrB 诱导的。Yao 等^[12]发现 PF/GrB 参与了 DNT 杀伤非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的过程。

2.2.3 细胞因子 DNT 可以产生大量的 IFN- γ 和 TNF- α ^[6,16-17]。DNT 在识别 AML 细胞后,通过释放 IFN- γ 增加 AML 细胞上 NKG2D 和 DNAM-1 配体的表达,增强 DNT 的细胞毒作用^[1]。另外,DNT 分泌的 IFN- γ 可以显著提高肿瘤细胞对 Fas/FasL 凋亡途径的敏感性,诱导肿瘤细胞凋亡^[18]。

3 DNT 在疾病治疗中的研究进展与应用

3.1 DNT 在血液恶性肿瘤中的临床研究进展 AML 是成人最常见白血病,治疗方法以化疗为主,

但约 70% 获得缓解的患者最终复发并演变为难治性白血病,导致治疗失败而死亡。临床前研究提示,DNT 对表达 CD64 的 AML 细胞杀伤效果更好^[19]。在一项首次人体 I/IIa 期临床试验(ChiCTR1900023499)中,10 名接受异基因造血细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)治疗后复发的 AML 患者完成 3 次 DNT 回输,研究期间和随访中所有患者未观察到急性和慢性 GvHD 及与研究药物相关的严重不良事件,50% 的复发难治 AML 患者(5/10)得到完全缓解,其中 40% 患者(4/10)获得长期缓解,中位缓解持续时间(median duration of response, mDOR)为 49 个月,最长缓解持续时间已达个月^[20],表明 DNT 能够安全有效的治疗复发难治性 AML。

allo-HSCT 是复发难治 AML 的有效治疗手段,但移植后 2 年累积复发率(cumulative incidence of relapse, CIR)高达 60%,5 年生存率仅有 9%~25%^[21]。DNT 输注预防 allo-HSCT 后 AML 复发在中国已完成 1 项研究者发起的临床研究(investigator-initiated trial, IIT; ChiCTR1900023499),可评估受试者 DNT 输注后的随访时间中位数为 37.22 月(区间范围:15.31~47.08 月),mDOR 为 37.22 月(区间范围:4.34~47.08 月),3 年 CIR 为 25%,其中高剂量组为 0%(未发表数据)。由此表明 DNT 能够预防 AML 患者 allo-HSCT 治疗后疾病复发。

DNT 与其他治疗手段联合应用于血液恶性肿瘤可达到更好的治疗效果。Chen 等人^[22]临床前研究发现 DNT 能靶向柔红霉素治疗后的化疗耐药细胞,增加化疗耐药 AML 原始细胞上 NKG2D 和 DNAM-1 配体的表达,增强 DNT 的杀瘤活性,提高抗白血病作用。临床前 AML 病人来源肿瘤异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)小鼠模型中发现,PI3K δ 抑制剂 idelalisib 与 DNT 联用后,DNT 表现出早期记忆表型,具有更高的活力和增殖能力,更少的细胞衰竭,使 DNT 在体内发挥持久的抗白血病作用^[23]。维奈托克联合阿扎胞苷治疗复发难治性 AML 患者疗效不佳,体外及小鼠实验发现维奈托克和阿扎胞苷单药或两药联合能够增强 DNT 对 AML 细胞的杀伤作用,对正常造血细胞没有损伤^[24]。

3.2 DNT 在治疗实体肿瘤中的研究进展 DNT 不仅存在于外周血中,还可浸润至实体肿瘤内,如

NSCLC、肝癌、胶质瘤和胰腺肿瘤等^[14,25], 并能够治疗实体瘤。DNT 天然表达 NKp30、NKG2D、DNAM-1、膜 TRAIL 并分泌 PF/GrB、IFN- γ 、TNF- α 和可溶性 TRAIL 等, DNT 可有效杀伤 NSCLC、胰腺癌细胞、肝癌细胞、胃癌细胞等。临床前研究证明, DNT 单独或者联合淋巴细胞活化基因 3 抗体都能有效抑制三阴性乳腺癌细胞的生长^[26]。在人胰腺癌 PANC-1 细胞裸鼠移植瘤模型中, DNT 通过 Fas/FasL 途径有效抑制胰腺肿瘤的生长^[14]。在 PDX 小鼠肿瘤模型中验证 DNT 能够有效抑制 NSCLC 的生长^[25]。

DNT 疗法与其他治疗方法结合增强实体瘤治疗效果。Fang 等^[25]的研究表明 DNT 能在 PDX 小鼠肿瘤模型中显著抑制晚期肺癌移植物的生长, 联合 PD-1 抗体 Nivolumab 能够增加 DNT 的肿瘤浸润和抗肿瘤功能。IL-15 可刺激 DNT 增加效应分子的表达, 在 PDX 小鼠 NSCLC 模型中发现 DNT 与 IL-15 联合使用能够增强 DNT 的抗肿瘤活性^[12]。

3.3 DNT 在治疗自身免疫性疾病中的研究进展

1 型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)是器官特异性自身免疫性疾病, 研究发现 DNT 可以从多方面治疗 T1DM。外周 CD4⁺ T 细胞能够分化为 DNT^[27], 从而抑制免疫反应, 控制 T1DM 疾病进展; 胰岛 β 细胞抗原特异性 DNT 可以预防 T1DM 的发展, 并增加异体胰岛移植后的存活^[28]; DNT 结合抗胸腺细胞血清治愈患有 T1DM 的 NOD 小鼠^[29]。

3.4 DNT 在治疗神经退行性疾病中的应用前景

研究证实细胞衰老在阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)等神经退行性疾病(neuro degenerative diseases, NDD)中起重要作用^[30], 近期美国 NKGen Biotech 公司宣布其开发用于治疗 AD 的 NK 细胞疗法新药临床试验申请已获美国 FDA 批准。与 NK 细胞相似, DNT 兼具免疫防御、免疫监视和免疫自稳三大功能, 已有研究发现衰老会伴有 DNT 的数量和功能发生变化^[31]。DNT 在衰老及 NDD 领域的应用有待进一步研究。

3.5 基于 DNT 为平台的 CAR-DNT 的临床应用

在 DNT 上表达 CAR 抗原受体即 CAR-DNT, 对肿瘤细胞发挥更强的杀瘤活性。张丽团队使用 CD19-CAR-DNT 在 B-ALL 和 NSCLC 小鼠模型实验的

结果显示 CD19-CAR-DNT 具有与 CD19-CAR-T 相似的杀瘤活性, 但体现出更好的安全性。同时发现 CD19-CAR-DNT 表面的淋巴细胞功能相关抗原-1 (lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1)和脱颗粒作用参与肿瘤细胞杀伤, 表明 CAR-DNT 与 DNT 在杀瘤机制上略有不同^[10]。CD19-CAR-DNT 具有三重配体-受体识别机制, 见图 2。

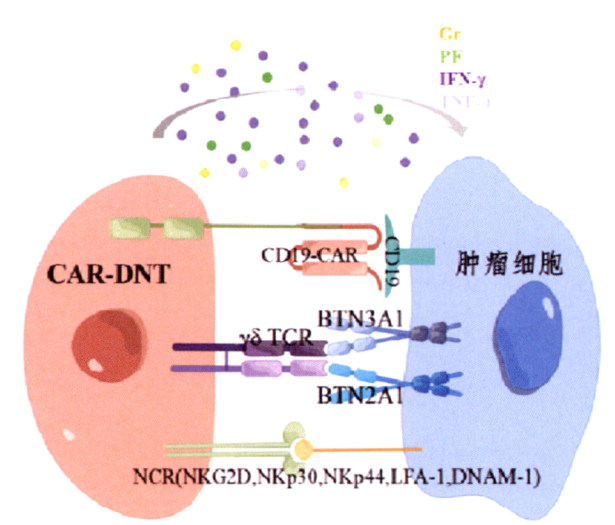


图 2 CD19-CAR-DNT 三重受体-配体识别机制, CD19-CAR-DNT 可通过 CD19-CAR、 $\gamma\delta$ TCR 和 NCR 三重受体-配体识别机制杀伤肿瘤。

CD19-CAR-DNT 用于治疗复发/难治性非霍奇金淋巴瘤 r/r NHL 的研究者发起的临床研究(NCT05453669)结果表明, 12 名患者剂量限制性毒性评估中未观察到 ≥ 2 级细胞因子释放综合征、免疫效应细胞相关的神经毒性综合征、GvHD 和其它严重不良事件, 证明 CD19-CAR-DNT 的临床安全性; 在有效性方面, 随着剂量增加, 临床疗效显著提升, 第 4 剂量组 3 例受试者在单次给药后都获得不同程度的临床缓解, 客观缓解率为 100%, 完全缓解率为 33.3%^[32-33]。

CD4-CAR-DNT 对 T 细胞恶性肿瘤包括 T 细胞急性淋巴细胞白血病(T cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL)和外周 T 细胞淋巴瘤(peripheral T cell lymphomas, PTCL)具有很强的杀瘤活性, 通过 LFA-1 和 NKG2D 分子浸润肿瘤, 延长 T-ALL 和 PTCL PDX 小鼠的生存期^[34]。

CLL1-CAR-DNT 有强大的抗肿瘤功能, 与 CAR-T 相比, CLL1-CAR-DNT 表现出对 AML 细胞系(THP1 和 HL60)更强更快的杀伤作用, 甚至消除了失去 TAA 的肿瘤细胞^[3]。

4 小结与展望

DNT 可以在多种疾病治疗领域发挥作用。临床前研究证明 DNT 通过抑制炎症细胞改善非酒精性脂肪性肝炎^[35]；DNT 可靶向自体 B 细胞和 T 细胞，显著提高小鼠供体特异性皮肤和心脏移植的存活率^[36]；DNT 在对病原体的免疫监测发挥重要作用，包括土拉杆菌、利什曼原虫^[17]和流感病毒^[37]等。

CAR-DNT 与 CAR-T 相比具有其独特的优势，未来可以借助基因编辑技术敲除/敲入相关基因，进一步提升 DNT 及 CAR-DNT 治疗疾病的功效。

参考文献

[1] Lee J, Minden MD, Chen WC, *et al.* Allogeneic human double negative T cells as a novel immunotherapy for acute myeloid leukemia and its underlying mechanisms[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(2): 370-382.

[2] Tang BL, Lee J, Cheng SQ, *et al.* Safety and efficacy of *ex vivo* expanded healthy donor-derived double negative T cells for the treatment of AML relapsed after allogeneic stem cell transplantation: a first in-human phase I/IIa clinical trial[J]. Blood, 2020, 136(Supplement 1): 1-2.

[3] Xu BL, Zhang C, Gao JX, *et al.* Developing “off-the-shelf” CLL1 CAR-DNT therapeutics for the R/R acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2023, 142(Supplement 1): 3442.

[4] Holoshtitz J, Strober S, Koning F, *et al.* Isolation of CD4-CD8-mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid[J]. Nature, 1989, 339(6221): 226-229.

[5] Zhang ZX, Yang L, Young KJ, *et al.* Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression[J]. Nat Med, 2000, 6(7): 782-789.

[6] Merims S, Li X, Joe B, *et al.* Anti-leukemia effect of *ex vivo* expanded DNT cells from AML patients: a potential novel autologous T-cell adoptive immunotherapy[J]. Leukemia, 2011, 25(9): 1415-1422.

[7] Anderson ND, Birch J, Accogli T, *et al.* Transcriptional signatures associated with persisting CD19 CAR-T cells in children with leukemia[J]. Nat Med, 2023, 29(7): 1700-1709.

[8] Melenhorst JJ, Chen GM, Wang M, *et al.* Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4⁺ CAR T cells[J]. Nature, 2022, 602: 503-509.

[9] Pan TZ, Huang AJ, Tang BL, *et al.* Double-negative T cells attenuate acute graft-versus-host disease by modulating CD4 + T cell activation post-allo-HSCT[J]. Blood, 2023, 142(Supplement 1): 4939.

[10] Vasic D, Lee JB, Leung Y, *et al.* Allogeneic double-negative CAR-T cells inhibit tumor growth without off-tumor toxicities[J]. Sci Immunol, 2022, 7(70): eabl3642.

[11] Xu H, Zhu XX, Chen J. DNT cell inhibits the growth of pancreatic carcinomavia abnormal expressions of NKG2D and

MICA *in vivo*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 469(2): 145-150.

[12] Yao JL, Ly D, Dervovic D, *et al.* Human double negative T cells target lung cancer *via* ligand-dependent mechanisms that can be enhanced by IL-15[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 17.

[13] Lee JB, Kang H, Fang LN, *et al.* Developing allogeneic double-negative T cells as a novel off-the-shelf adoptive cellular therapy for cancer[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(7): 2241-2253.

[14] Chen J, Hu PB, Wu GH, *et al.* Antipancreatic cancer effect of DNT cells and the underlying mechanism[J]. Pancreatolgy, 2019, 19(1): 105-113.

[15] Voelkl S, Moore TV, Rehli M, *et al.* Characterization of MHC class-I restricted TCRalpha⁺ CD4⁻ CD8⁻ double negative T cells recognizing the gp100 antigen from a melanoma patient after gp100 vaccination[J]. Cancer Immunol Immunother, 2009, 58(5): 709-718.

[16] Gollob KJ, Antonelli LRV, Faria DR, *et al.* Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: A balancing act between protection and pathology [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(10): 1338-1343.

[17] Mou ZR, Liu D, Okwor I, *et al.* MHC class II restricted innate-like double negative T cells contribute to optimal primary and secondary immunity to *Leishmania major*[J]. PLoS Pathog, 2014, 10(9): e1004396.

[18] Xia HL, Li CJ, Hou XF, *et al.* Interferon- γ affects leukemia cell apoptosis through regulating Fas/FasL signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(9): 2244-2248.

[19] Tang BL, Lee JB, Cheng SQ, *et al.* Allogeneic double-negative T cell therapy for relapsed acute myeloid leukemia patients post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A first-in-human phase I study[J]. Am J Hematol, 2022, 97(7): e264-e267.

[20] Soares F, Chen B, Lee JB, *et al.* CRISPR screen identifies genes that sensitize AML cells to double-negative T-cell therapy[J]. Blood, 2021, 137(16): 2171-2181.

[21] Yan CH, Wang Y, Sun YQ, *et al.* Optimized therapeutic strategy for patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia: Long-term clinical outcomes and health-related quality of life assessment [J]. Cancer Commun (Lond), 2022, 42(12): 1387-1402.

[22] Chen B, Lee JB, Kang H, *et al.* Targeting chemotherapy-resistant leukemia by combining DNT cellular therapy with conventional chemotherapy[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 88.

[23] Kang H, Lee JB, Khatri I, *et al.* Enhancing therapeutic efficacy of double negative T cells against acute myeloid leukemia using idelalisib[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(20): 5039.

[24] Lee JB, Khan DH, Hurren R, *et al.* Venetoclax enhances T cell-mediated antileukemic activity by increasing ROS production[J]. Blood, 2021, 138(3): 234-245.

[25] Fang LN, Ly D, Wang SS, *et al.* Targeting late-stage non-small cell lung cancer with a combination of DNT cellular therapy and PD-1 checkpoint blockade[J]. J Exp Clin Cancer

Res, 2019, 38(1): 123.

[26] Wang M, Wei YH, Li YR, *et al.* Targeting breast cancer with a combination of DNT and LAG3 checkpoint blockade and its mechanism[J]. Immun Inflamm Dis, 2022, 10(8): e626.

[27] Zhang D, Yang W, Degauque N, *et al.* New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses[J]. Blood, 2007, 109(9): 4071-4079.

[28] Zhang D, Zhang W, Ng TW, *et al.* Adoptive cell therapy using antigen-specific CD4(−)CD8(−) T regulatory cells to prevent autoimmune diabetes and promote islet allograft survival in NOD mice[J]. Diabetologia, 2011, 54(8): 2082-2092.

[29] Liu TH, Cong M, Sun GY, *et al.* Combination of double negative T cells and anti-thymocyte serum reverses type 1 diabetes in NOD mice[J]. J Transl Med, 2016, 14: 57.

[30] Uyar B, Palmer D, Kowald A, *et al.* Single-cell analyses of aging, inflammation and senescence[J]. Ageing Res Rev, 2020, 64: 101156.

[31] Marrero YT, Suárez VM, Abraham CMM, *et al.* Peripheral double negative T: a look at senescent Cubans[J]. Exp Gerontol, 2023, 171: 112006.

[32] Yang LM, Wang D, Xu SZ, *et al.* Abstract 5510: preclinical study of allogeneic CD19-CAR-DNT cells as an off-the-shelf immunotherapy drug for NHL[J]. Cancer Res, 2022, 82(12_Supplement): 5510.

[33] Xiao XB, Liu H, Qiu X, *et al.* CD19-CAR-DNT cells (RJM-ty19) in patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma: a phase 1, first-in-human study[J]. EclinicalMedicine, 2024, 70: 102516.

[34] Fang KKL, Lee J, Khatri I, *et al.* Targeting T-cell malignancies using allogeneic double-negative CD4-CAR-T cells[J]. J Immunother Cancer, 2023, 11(9): e007277.

[35] Sun GY, Zhao XY, Li MY, *et al.* CD4 derived double negative T cells prevent the development and progression of non-alcoholic steatohepatitis[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 650.

[36] Achita P, Dervovic D, Ly D, *et al.* Infusion of *ex-vivo* expanded human TCR- $\alpha\beta^+$ double-negative regulatory T cells delays onset of xenogeneic graft-versus-host disease[J]. Clin Exp Immunol, 2018, 193(3): 386-399.

[37] Neyt K, GeurtsvanKessel CH, Lambrecht BN. Double-negative T resident memory cells of the lung react to influenza virus infection via CD11c(hi) dendritic cells[J]. Mucosal Immunol, 2016, 9(4): 999-1014.

Research progress and trend of universal double negative T cell therapy

YAN Qiong-yu¹, LU Li-ming², YANG Li-ming¹ (1. Shanghai Ruishun Nuosheng Biotechnology Co., Shanghai 201403, China; 2. Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract: With the development of checkpoint inhibiting antibodies such as PD-1 and chimeric antigen receptor T cells (CAR-T), tumor immunotherapy has become a research hotspot. CAR-T therapy has achieved extraordinary results in antitumor treatments, especially in hematological malignancies and some autoimmune diseases, where it leads to a remarkable complete remission rate with manageable safety profile. Nevertheless, some limitations persist in autologous CAR-T therapy, including high costs, long manufacturing turn-round time, and inconvenient to use. These limitations may be overcome by utilizing allogeneic T cells obtained from healthy donors as a source of universal CAR-T production. Double negative T cells(DNT) have emerged as an allogeneic immunotherapy with no genome editing. DNT are mature T cells that comprise 1% to 10% of peripheral T cells and are defined by the expression of CD3 but not CD4, CD8, or CD56 molecules on their surface. Their TCRs are either TCR $\alpha\beta$ or TCR $\gamma\delta$ chains and do not bind to invariant natural killer T cells TCR-CD1d- α -galactosylceramide (α GalCer) tetramers. A lot of preclinical data showed that DNT possess dual abilities to kill tumor cells while simultaneously inhibiting graft-versus-host disease. DNT can be *ex vivo* expanded from healthy donors. Therefore, allogeneic DNT can be used as an “off-the-shelf” cellular product that is readily available for clinical applications. Genetically modified CAR-DNT have enhanced target-specific tumoricidal effects against several tumors. In this review, we will summarize the discovery of DNT, its tumoricidal mechanisms and updated clinical applications. DNT may provide a novel perspective immunotherapy for various diseases.

Key words: double negative T cells; malignant tumor; autoimmune disease; universal chimeric antigen receptor T cells