

· 医药生物技术 ·

靶向 CS1 的 CAR-T 细胞构建及其抗肿瘤活性的体外研究

张伟光^{1,2}, 王春玲², 陶智博², 尹昌林¹, 高基民²

1 西南医院 重症医学科, 重庆 400038

2 温州医科大学 检验医学院 生命科学学院, 浙江 温州 325035

张伟光, 王春玲, 陶智博, 等. 靶向 CS1 的 CAR-T 细胞构建及其抗肿瘤活性的体外研究. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2162-2170.
Zhang WG, Wang CL, Tao ZB, et al. Construction of CAR-T cells targeting CS1 and analysis of their antitumor activity *in vitro*.
Chin J Biotech, 2020, 36(10): 2162-2170.

摘要: 文中利用基因工程方法构建包含 4-1BB 或 ICOS 的第二代 Anti-CS1 慢病毒表达载体, 以及同时包含这两个共刺激因子的第三代 Anti-CS1 慢病毒表达载体, 通过制备相应慢病毒感染人 CD3⁺T 细胞, 分别获得靶向 CS1 的第二代和第三代 CAR-T 细胞。研究结果表明: 以 ICOS 为共刺激因子及以 4-1BB 为共刺激因子的第二代 CAR-T 抗肿瘤活性相似, 且在效靶比为 1:1 时, 含 ICOS 共刺激因子比含 4-1BB 共刺激因子的第二代 CAR-T 细胞对 IM9-lucgfp 细胞的杀伤效力更高; 在效靶比为 1:1、2:1 和 5:1 时, 第三代 CAR-T 细胞对 IM9-lucgfp 细胞的杀伤效力低于第二代; 在效靶比为 10:1 时, 二代和三代 CAR-T 细胞对 IM9-lucgfp 细胞的杀伤效力都达到 85% 以上, 显著高于对照组。综上所述, 该研究成功构建了靶向 CS1 的第二代和第三代 CAR-T 细胞, 其可高效杀伤高表达 CS1 的肿瘤细胞, 且靶向 CS1 的第二代 CAR-T 细胞比第三代对肿瘤细胞的杀伤效力更强。

关键词: 人信号淋巴细胞激活分子 F7 (SLAMF7/CS1), CAR-T, 多发性骨髓瘤, 基因治疗, 诱导型共刺激分子, 4-1BB

Construction of CAR-T cells targeting CS1 and analysis of their antitumor activity *in vitro*

Weiguang Zhang^{1,2}, Chunling Wang², Zhibo Tao², Changlin Yin¹, and Jimin Gao²

1 Department of Critical Care Medicine, Southwest Hospital, Chongqing 400038, China

2 School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China

Abstract: We constructed the CS1-targeted second- and third-generation CAR-T cells with genetic engineered 4-1BB or/and

Received: June 24, 2020; **Accepted:** August 26, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81573110, 91729101), COVID-19 Emergency Science and Technology Major Projects of Chongqing (No. cstc2020jscx-fyzxX0001), Science and Technology Major Projects of Wenzhou, China (Nos. ZS2017014, 2018ZY001).

Corresponding author: Jimin Gao. Tel: +86-577-86699341; E-mail: jimingao64@yahoo.com

国家自然科学基金 (Nos. 81573110, 91729101), 重庆市新型冠状病毒感染肺炎疫情应急科技攻关专项 (No. cstc2020jscx-fyzxX0001), 温州市重大科技专项 (Nos. ZS2017014, 2018ZY001) 资助。

网络出版时间: 2020-09-02

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20200901.1640.001.html>

ICOS as a costimulatory signaling molecule by use of lentiviral platform. The CS1-targeted second-generation CAR-T cells with ICOS or 4-1BB had similar anti-neoplastic activity. When effector/target ratio was 1:1, the CAR-T cells with ICOS showed better killing effect on IM9-lucgfp cells than those with 4-1BB. However, The CS1-targeted third-generation CAR-T cells exhibited lower cytolytic capacity against IM9-lucgfp cells than the CS1-targeted second-generation CAR-T cells when the ratio of effector/target was 1:1, 2:1 or 5:1. When the ratio of effector/target was 10:1, the killing efficacy of both the second- and third-generation CAR-T cells against IM9-lucgfp cells was more than 85%, significantly higher than that of the control T cells. Taken together, both the CS1-targeted second- and third-generation CAR-T cells with ICOS or/and 4-1BB could efficiently kill CS1-positive multiple myeloma cells, but the CS1-targeted second-generation CAR-T cells had more potent killing effect on CS1-positive multiple myeloma cells than the CS1-targeted third-generation CAR-T cells.

Keywords: human signaling lymphocyte activation family 7 (SLAMF7/CS1), CAR-T, multiple myeloma, gene therapy, inducible co-stimulator, 4-1BB

多发性骨髓瘤 (Multiple myeloma, MM) 是一种恶性克隆性浆细胞大量增殖所致的血液系统恶性肿瘤, 占血液系统恶性肿瘤的 10%, 主要发病年龄为 63–70 岁^[1]。近 20 年来, MM 的传统治疗及新药疗法正在不断发展。在新药联合诱导的基础上, 进行自体干细胞移植, 使得 MM 病人的治疗疗效及存活时间得到明显改善, 但仍不能完全治愈 MM。在众多的免疫疗法中, 嵌合抗原受体 T 细胞 (Chimeric antigen receptor T cells, CAR-T) 免疫疗法已经发展成为一种潜在的抗癌疗法, 特别是在复发/难治性多发性骨髓瘤中, 表现出很高的缓解率和无进展生存期的延长^[2-6]。CAR 是一种人工合成的新型受体, 主要由识别并结合肿瘤细胞表面抗原的胞外单链抗体可变片段 (Single chain antibody fragment, scFv)、跨膜段和胞内信号转导/激活域组成。其可以特异性识别肿瘤相关抗原, 并以非主要组织相容复合物 (Major histocompatibility complex, MHC) 限制的方式消除肿瘤细胞, 克服了肿瘤细胞人类淋巴细胞抗原 (Human lymphocyte antigen, HLA) 表达下调所致的免疫逃逸, 解决了宿主免疫耐受所致的免疫治疗效果差的问题^[7]。第二代/第三代 CAR-T 细胞在第一代的基础之上加入一个/两个共刺激分子如 CD28、4-1BB 等从而增强了 CAR-T 细胞活化、增殖和生存能力。CAR-T 疗法在目前的临床试验中已显示出了巨大的治疗潜力, 成为肿

瘤免疫治疗研究的热点。CAR-T 疗法被认为是最具有前景的肿瘤治疗方法之一^[8]。

CS1 (CD2 subset 1) 也称为信号淋巴细胞活化家族成员 7 (Signalling lymphocyte activation molecule F7, SLAMF7), 是糖基化的细胞表面蛋白和信号传导淋巴细胞活化分子 (SLAM) 家族的成员, 介导多发性骨髓瘤细胞与骨髓基质细胞粘附。超过 95% 的骨髓瘤细胞以独立于细胞遗传学异常的方式表达 CS1, 而 NK 细胞、一些 T 细胞亚群和正常 B 细胞的表达仍然非常低, 在骨髓细胞和大多数健康组织中几乎检测不到^[9-10]。重要的是, 在多次化疗后或疾病复发, SLAMF7 均只在肿瘤细胞上表达, 在造血干细胞上却不表达^[11], 因此它可以作为有希望的肿瘤相关抗原。诱导型共刺激分子 (Inducible costimulatory molecule, ICOS) 是一种类似于 CD28 结构的 B7 受体家族成员, 其在活化的 T 细胞上表达, 可明显延长活化 T 细胞的凋亡周期^[12]。一些研究表明, ICOS 的共刺激可提高细胞毒性并有利于 Th1/Th2 型细胞因子的产生^[12]。

本研究以抗 CS1 单链抗体为靶向分子, 第三代慢病毒为载体来构建靶向 CS1 的第二代和第三代 CAR-T 细胞。通过 CAR-T 细胞表现出针对表达 CS1 的骨髓瘤细胞的特异且有效的细胞毒性, 以此评估其对 CS1 阳性多发性骨髓瘤细胞免疫治疗的临床应用前景。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

慢病毒载体 pLenti-EF1 α -lucgfp 质粒、包装质粒 pMD2.G 与 psPAX2 由本实验构建并保存; 质粒抽提试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; 限制性内切酶购自 New England Biolabs 公司; 胶回收试剂盒和去内毒素质粒大提试剂盒购自美国 Axygen 公司; DNA 连接酶购自日本 TaKaRa 公司; 无缝克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; PE 抗人 CD3 抗体、APC 抗人 CS1 抗体、APC-SA 流式抗体购自美国 BioLegend 公司; Bio-CS1 蛋白购自 ACRO 公司; D-(-)-荧光素购自上海甄准生物科技有限公司; 琼脂糖购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 人肾上皮细胞系 HEK293T 细胞系购自大连宝生物工程有限公司; 人 T 细胞白血病 Jurkat 细胞株和人骨髓瘤细胞 U266 系购自美国 ATCC; 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)、细胞基础培养基 DMEM-MEM、RPMI1640 及细胞培养其他成分 HEPES、D-PBS 购自美国 Gibco 公司; 聚凝胺 (Polybrene) 购自美国 Sigma 公司; 磁珠 (DynabeadsTM Human T-Activator CD3/CD28) 购自美国 Gibco 公司。

1.2 仪器与设备

FACS Aria 流式细胞仪购自美国 BD 公司; PCR 仪、电泳装置和凝胶成像系统购自美国

Bio-Rad 公司; MACS 分选架购自德国 Miltenyi 公司; DynaMagTM-5 磁力架购自北京明阳科华生物科技有限公司; 细胞培养箱购自 Thermo 公司; 超速离心机购自美国 Beckman 公司; 荧光显微镜和台式高速离心机购自德国 Eppendorf 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 质粒构建

由苏州金唯智生物科技有限公司合成 Anti-CS1 scFv 序列, 将载体 pLenti-EF1 α -T2A-lucgfp (本实验室保存) 用 *Sma* I / *Mlu* I 双酶切, 利用无缝克隆技术将片段和载体连接, 37 °C 连接 1 h 后, 转化涂于氨苄抗性 LB 平板上, 通过挑单克隆、抽提质粒、酶切验证后测序鉴定重组载体 pLenti-EF1 α -CS1 scFv-4-1BB、pLenti-EF1 α -CS1 scFv-ICOS 和 pLenti-EF1 α -CS1 scFv-ICOS-4-1BB。以 CS1 全长 cDNA 序列 (由厦门大学韩家淮实验室赠送) 为模板, CS1FOR 和 CS1REV 为引物扩增 CS1 片段, 将载体 pLenti-EF1 α -T2A-lucgfp (本实验室保存) 用 *Sma* I / *Eco*R I 双酶切, 利用无缝克隆技术将片段和载体连接, 37 °C 连接 1 h 后, 转化涂于氨苄抗性 LB 平板上, 通过挑单克隆、抽提质粒、酶切验证后测序鉴定重组载体 pLenti-EF1 α -CS1-T2A-lucgfp 质粒, 用于 CS1 阳性靶细胞的制备。根据 GenBank 中基因序列设计 PCR 扩增引物, 见表 1。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 PCR amplification primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
CS1CARFOR	TCGTGAGCTAGCCCCGGGATGGCCCTGCCCGTGACCGCT	39
CS1CARREV	CGATGGGCAGCCAGAAGTCGCAGGCGAAGTCGAGGC	36
ICOS-CD3FOR	TTCTGGCTGCCCATCGG	17
ICOS-CD3REV	GCTAAACTTCACCCTTAAAGTCACGTCGGTCAGTCTGC	38
CD3FOR	AGGGTGAAGTTTAGCAGATCCGCC	24
CD3REV	TTGTTTAAACACGCGTTCACCTAGGAGGGAGAGCTTGCATG	41
ICOS-4-1BBREV	CTTCTGCCCTCTTTAAAGTCACGTCGTCAGTCTGC	38
4-1BB-CD3FOR	AAGAGGGGCAGGAAGAAGC	19
4-1BB-CD3REV	TTGTTTAAACACGCGTGCACCTCGAGTTCACCTAG	34
CS1FOR	GCCCCGGGATGTTGCAGATG	20
CS1REV	CCGAATTCTATCTTCCTTAGC	20

1.3.2 慢病毒包装与滴度检测

分别将以上 3 种质粒与辅助质粒 pMD2.G 与 psPAX2 通过磷酸钙试剂共转染至 HEK293T 细胞, 转染后 48 h 换液, 收取培养上清, 72 h 后再次收取培养上清, 过 0.45 μm MILLEX[®]-HP 针式过滤器。将病毒原液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、32 000 r/min 超速离心 2 h, 将沉淀溶解在 X-VIVO 培养液中。

96 孔尖底板每孔铺 0.5×10^6 个 Jurkat 细胞, 200 μL /孔, 将浓缩的病毒液稀释 100 倍, 按 1:50、1:500 和 1:2 000 的比例加入各孔 400 μL 、40 μL 和 10 μL 。32 $^{\circ}\text{C}$ 、1 200 \times g 离心 90 min。4 h 后用 DPBS 将细胞洗一次后铺于 12 孔板, 转导 48 h 后用流式细胞术检测。圈出阳性细胞群后, 计算病毒滴度。

病毒滴度 $T=(P \times N)/(D \times V)$

T 为滴度 (TU/mL), P 为流式阳性细胞比例, N 为转导的细胞数, D 为稀释倍数, V 为转导时的体积。

1.3.3 CAR-T 细胞的制备和扩增

利用外周血淋巴细胞分离液 Ficoll 提取健康人外周血中单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 按照 T 细胞与磁珠数量之比为 1:1 加入 α -CD3/ α -CD28 抗体包被的磁珠分离人 T 细胞, 并置于含 10% 血清和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IL-2 的 AIM-V 培养基中培养。24 h 后, 计数活化的人 CD3⁺ T 细胞, 于每个孔加入 0.1×10^6 个 T 细胞和感染复数 (Multiplicity of infection, MOI)=40 的病毒浓缩液 (pLenti-CS1CAR-4-1BB、pLenti-CS1CAR-ICOS 和 pLenti-CS1CAR-ICOS-4-1BB), 培养基补齐至 200 μL , 并于每孔加入 polybrene (1:2 000), 32 $^{\circ}\text{C}$ 、1 200 r/min 离心 90 min, 结束后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中, 4 h 后换液。离心换液后继续培养, 每隔 2-3 d 补充培养基或者传代。取转导 5 d 后的 T 细胞, 在 DynaMagTM-5 磁力架上将磁珠脱掉, 2 500 r/min 离心 3 min 收集细胞。用 FACS (由 50 mL PBS 加 1 mL 胎牛血清配制而成) 洗涤细胞, 离心弃上清液; 用

Biotin-CS1 蛋白 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后, 用 FACS 洗 2 遍, 然后加入 APC-SA 流式抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 用 FACS 洗 2 遍, 弃掉上清, 200 μL FACS 重悬至流式管, 用流式细胞仪检测 T 细胞表面 CAR 的表达情况。

1.3.4 靶细胞的构建

用本实验室现有的 pLenti-EF1 α -T2A-lucgfp 质粒包装慢病毒, 收取 48 h 病毒原液用于感染细胞。IM9 细胞离心计数后用含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基稀释成 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 96 孔平底细胞培养板每孔铺 0.2×10^6 细胞, 200 μL /孔。按 1:5 的比例每孔加入 40 μL 病毒, 1 200 \times g、32 $^{\circ}\text{C}$ 离心 90 min 进行离心转导。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱培养 4 h 后将细胞转移至 24 孔板扩大培养。当细胞培养至足够数量时通过流式细胞仪分选出 GFP 阳性的细胞株扩大培养。

1.3.5 生物发光法检测 CAR-T 细胞对靶细胞的杀伤能力

基于生物发光的杀伤实验: ① 将转导后的 T 细胞培养 5 d 后, 1 500 r/min 离心 5 min 后用 Buffer 1 (DPBS 含 5% FBS) 重悬, 置于 DynaMagTM-5 磁力架上进行脱磁。② 2 min 后将细胞悬液慢慢吸出, 1 500 r/min 离心 5 min 后用 AIM-V 完全培养基重悬, 然后计数后取 1/10 流式检测其 CAR-T 表达率。③ IM9-lucgfp 细胞离心后进行细胞计数, 每孔按照 0.1×10^6 的细胞铺板。④ 基于 CAR 的表达率计算了 CAR-T 细胞的数量, CAR-T 细胞与 IM9-lucgfp 细胞的比例按照 1:1、2:1、5:1 和 10:1 的比例将 CAR-T 细胞加入到 IM9-lucgfp 细胞所在的孔中(对照组 T 细胞的数目与 CAR-T 细胞的数目相同)。⑤ 另设 2 个 IM9-lucgfp 细胞孔。一种在没有 T 细胞或 CAR-T 细胞的全培中培养。另一个孔用 ddH₂O 将 IM9-lucgfp 细胞重悬, 分别用作荧光强度的最大和最小背景值 (每个组设 3 个复孔)。⑥ 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱共培 4 h 后, 将 96 孔板取出, 1 500 r/min 离心 5 min。⑦ 弃去上清, 用新鲜完全培养基将细胞进行重悬。⑧ D-(-)-荧光素按照 1:200

的比例加入,轻柔混匀,转入不透光的白色 96 孔板中。避光 10 min 后用酶标仪检测荧光值。⑨ 计算 CAR-T 细胞对 IM9-lucgfp 细胞的裂解率。

$$\text{裂解率} = (\text{Max} - \text{V}) / (\text{Max} - \text{Min}) \times 100\%$$

Max 为不加 T 细胞的 IM9 细胞孔的荧光值; Min 为 ddH₂O 重悬的 IM9 细胞孔的荧光值; V 为实验孔测得的荧光值。

1.3.6 统计学处理

结果代表至少 3 次独立实验,数据统计学分析和图表制作均采用 GraphPad Prism 6.0, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据统计使用非配对 *t* 检验分析进行, $P < 0.05$ 时差异被认为具有统计学意义 (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)。

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建与鉴定

本研究首先构建了靶向 CS1 的 CAR 分子,

包括第二代和第三代 CAR 分子。其中第二代 CAR 分子由 CD8 信号肽、Anti-CS1 单链可变片段、人 CD8 α 的铰链和 TM 区、共刺激分子 4-1BB 或 ICOS 和 CD3 ζ 链依次串联组成 (图 1A-B)。第三代 CAR 分子则在第二代的基础上增加一个共刺激分子, 即同时含有 4-1BB 和 ICOS 共刺激因子 (图 1C)。通过分子克隆技术, 我们成功构建了 pLenti-CS1CAR-4-1BB、pLenti-CS1CAR-ICOS 和 pLenti-CS1CAR-ICOS-4-1BB 重组质粒, 并通过 *Nco* I 酶进行酶切鉴定, 结果得到 2 条条带, 符合预期结果 (图 2)。

2.2 CS1-CAR-T 细胞的成功制备

将 pLenti-CS1CAR-4-1BB、pLenti-CS1CAR-ICOS 和 pLenti-CS1CAR-ICOS-4-1BB 重组质粒包装成慢病毒后感染人 CD3⁺ T 细胞, 未感染组作为对照组, 5 d 后收集细胞并用流式细胞术检测各组细胞中 CAR 的阳性表达率, 所得结果显示,

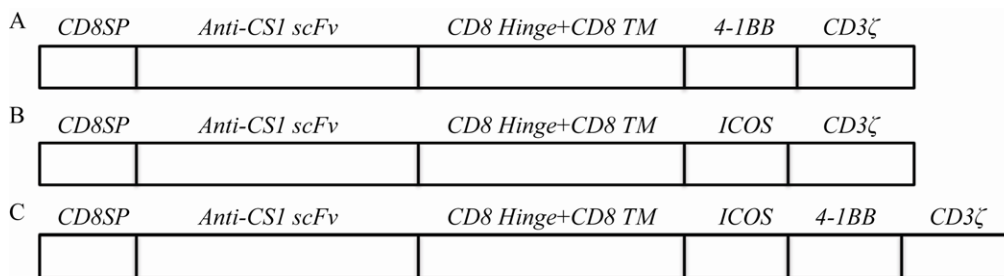


图 1 第二代和第三代 CAR 分子结构示意图

Fig. 1 The schematics of second- and third-generation CAR molecule. (A) The schematics of the second-generation CAR molecule containing 4-1BB costimulatory factor. (B) The schematics of the second-generation CAR molecule containing ICOS costimulatory factor. (C) The schematics of the third-generation CAR molecule containing both costimulatory factors with 4-1BB and ICOS.

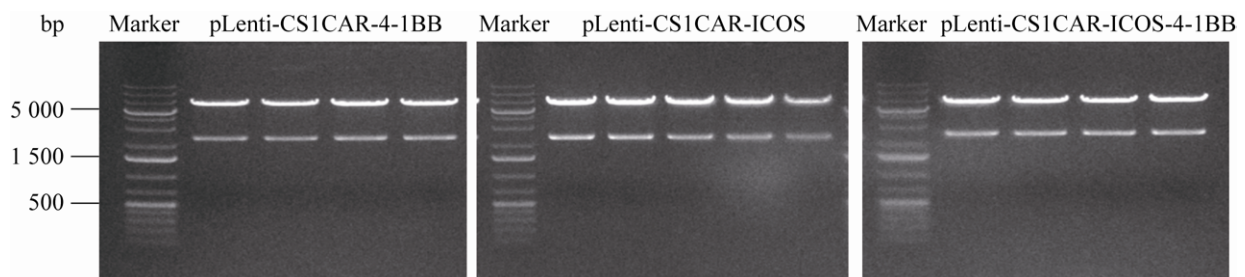


图 2 pLenti-CS1CAR-4-1BB、pLenti-CS1CAR-ICOS 和 pLenti-CS1CAR-ICOS-4-1BB 重组质粒酶切鉴定结果

Fig. 2 The identification results of recombinant plasmids of pLenti-CS1CAR-4-1BB, pLenti-CS1CAR-ICOS and pLenti-CS1CAR-ICOS-4-1BB by restriction enzyme digestion.

Anti-CS1-4-1BB、Anti-CS1-ICOS、Anti-CS1-ICOS-4-1BB 慢病毒载体转导效率分别为 82.6%、78.8% 和 41.9%，并对表达情况进行分析，结果有统计学意义 (图 3A)。含 Anti-CS1-4-1BB、Anti-CS1-ICOS、Anti-CS1-ICOS-4-1BB 慢病毒感染人 CD3⁺ T 细胞后，记录其在感染后的细胞扩增情况 (图 3B)。

2.3 靶细胞的构建

为了验证 CAR-T 细胞对于 CS1 阳性肿瘤细胞的杀伤能力，用 pLenti-EF1 α -T2A-lucgfp 质粒包装慢病毒感染人骨髓瘤细胞 IM9，未感染组作为对照组，构建高表达 CS1 的 IM9-lucgfp 靶细胞，通过流式细胞术检测靶细胞 IM9-lucgfp 表达 CS1 抗原和 GFP 的情况，结果分别为 80% 和 93% (图 4)。

2.4 CAR-T 细胞对阳性靶细胞的体外杀伤效果

以 3 种不同的 CAR-T 细胞 (Anti-CS1-4-1BB、Anti-CS1-ICOS、Anti-CS1-ICOS-4-1BB) 和对照

T 细胞作为效应细胞，通过不同效靶比 (效应细胞：肿瘤靶细胞)，利用生物发光方法检测它们对高表达 CS1 的 IM9-lucgfp 靶细胞的杀伤作用。如图 5 所示，在不同效靶比条件下，以 ICOS 为共刺激因子及以 4-1BB 为共刺激因子的第二代 CAR-T 抗肿瘤活性相似。在效靶比为 1:1 时，Anti-CS1-ICOS CAR-T 细胞比 Anti-CS1-4-1BB CAR-T 细胞对 IM9-lucgfp 细胞的杀伤比例高 11%，且两者之间有显著差异 ($P < 0.05$)，故在特定条件下，以 ICOS 作为共刺激分子的靶向 CS1 的 CAR-T 细胞可能比以 4-1BB 作为共刺激分子的更具有杀伤潜力。在相同效靶比情况下，靶向 CS1 的第三代 CAR-T 细胞比第二代 CAR-T 细胞对 IM9-lucgfp 细胞的杀伤比例低，且在效靶比 1:1、2:1 和 5:1 时两者之间都有显著性差异 ($P < 0.05$)。3 种 Anti-CS1 CAR-T 细胞在效靶比为 10:1 时能有效杀伤 IM9-lucgfp 细胞并且杀伤比例在 85% 以上，

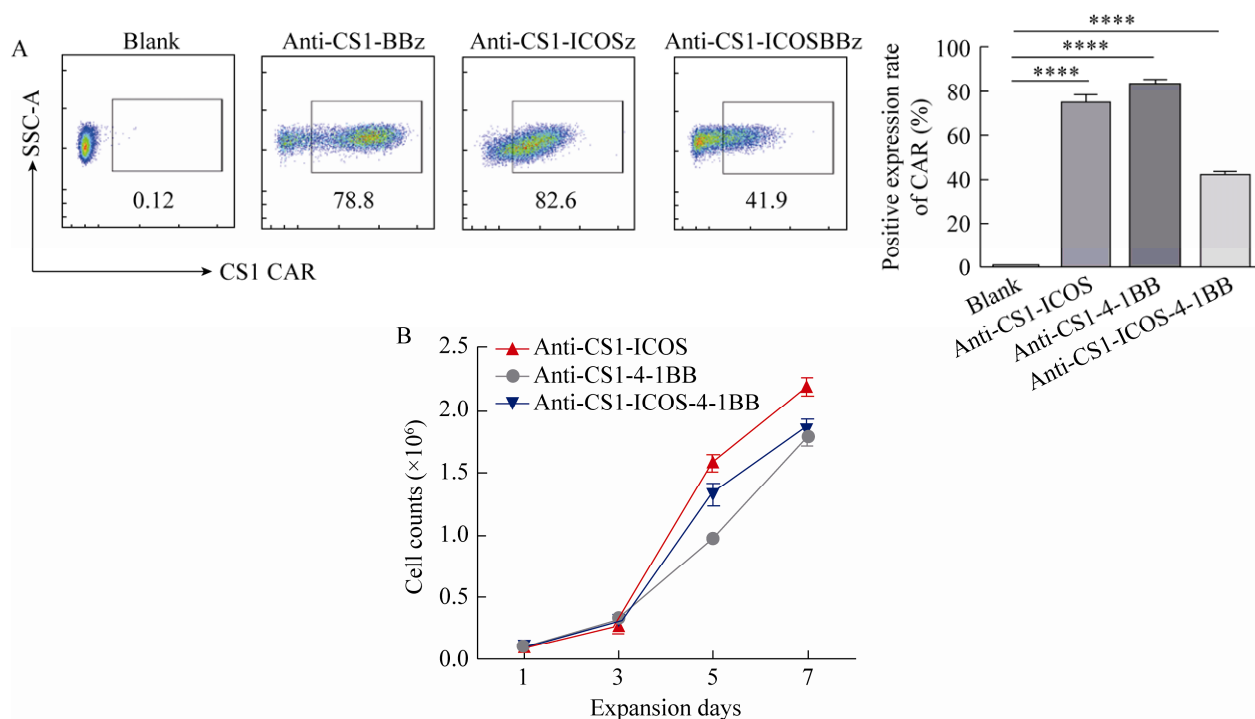


图 3 CS1 CAR-T 细胞制备和扩增的鉴定

Fig. 3 Identification of CS1 CAR-T cell preparation and amplification. (A) Human CD3⁺ T cells were infected with different CAR molecules, their expression efficiency was analyzed by flow cytometry. (B) Expansion curve of CAR-T cells with different plasmids expression were recorded after infection.

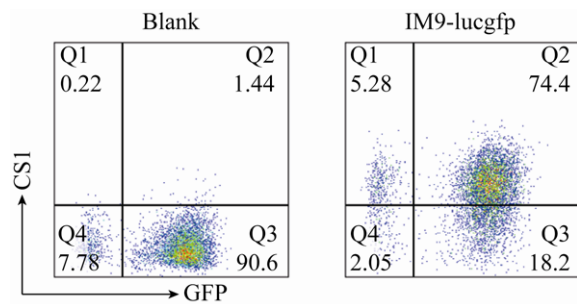


图4 流式细胞术检测靶细胞 CS1 表达

Fig. 4 Expression of CS1 in target cell line by FACS.

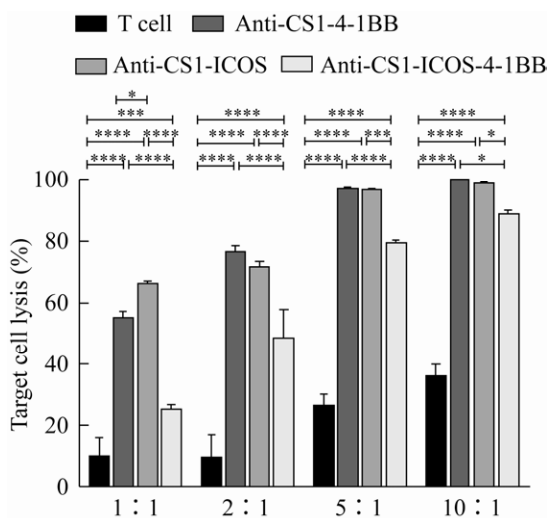


图5 不同效靶比条件下, 比较不同 CAR-T 细胞对肿瘤靶细胞的杀伤作用

Fig. 5 Comparison of killing effect of different CAR-T cells on target cells under different effect-target ratio conditions.

显著高于对照组 ($P < 0.0001$)。随着效靶比的不断提高, Anti-CS1-ICOS CAR-T 细胞杀伤优势并未再显示出来, 这可能和靶细胞的裂解率已至饱和和有关。以上结果表明靶向 CS1 的第二代和第三代 CAR-T 细胞, 都可高效杀伤高表达 CS1 的肿瘤细胞, 且在本研究中, 靶向 CS1 的第二代 CAR-T 细胞较第三代对肿瘤细胞的杀伤效力更强。

3 讨论

基于 CAR-T 细胞的免疫过继疗法治疗恶性

肿瘤有着巨大的潜力, CAR-T 细胞治疗在白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤的治疗中展现出良好的治疗效果。但这种临床的成功性较难应用到实体瘤上, 有两点原因: 第一, 缺乏特异性抗原, 找不到特异性的靶点, CAR-T 在发挥作用时就会侵害正常组织。第二, 不同于血液肿瘤, CAR-T 必须侵入实体瘤内部才能发挥作用。而且进入肿瘤后, 由于实体瘤异质性和肿瘤微环境的存在, 可能抑制免疫细胞发挥作用^[13-14]。

CAR-T 的功能受所选 scFv 的亲合力、铰链区的大小、信号传导结构域的组合方式、修饰的 T 细胞亚群等诸多因素的影响^[15]。有研究探讨了 CAR-T 胞内域嵌入的共刺激分子在协调抗肿瘤免疫中的作用, 研究表明, B7 受体家族的共刺激分子(CD28 或 ICOS)和 TNF 受体家族的共刺激分子(OX40 或 4-1BB)能够促进 IFN- γ 、TNF- γ 和 GM-CSF 的产生^[16]。Finney 等^[12]证明, 诱导型共刺激分子 ICOS 增强了 TCR 介导的抗原特异性靶细胞裂解。我们的研究结论与该发现一致, 将 ICOS 插入 CAR 中有利于 CAR-T 细胞裂解靶细胞。CAR-T 细胞的主要关注点是 CAR-T 细胞可能会识别正常细胞表达的抗原, 这种非特异的靶向免疫损伤可能会引起不良反应, 甚至是致命的。因此, 选择在肿瘤细胞中特异性表达但在正常细胞中表达的靶抗原是极其重要的。CS1 在原发性骨髓瘤细胞和大多数骨髓瘤细胞系中均呈高水平表达, 并且在正常的固体组织中缺乏表达^[17]。目前针对 CS1 制备的 CAR-T, 治疗复发/难治性 MM 具有极好的应用前景, 但将 ICOS 作为共刺激分子报道很少。本研究比较了第二代和第三代 CAR-T 细胞的杀伤功能。研究表明, 相同效靶比下, 第三代 CAR-T 细胞杀伤肿瘤细胞的能力较第二代弱。在第二代 CAR-T 细胞中, 以 ICOS 作为共刺激分子的 CAR-T 细胞与已经报道过的以 4-1BB 作为共刺激分子的 CAR-T 细胞都能有效地杀伤肿瘤细胞, 并且在效靶比为 1:1 时, 两

者间有显著性差异 ($P < 0.05$)。这说明, 以 ICOS 作为共刺激分子的 CAR-T 细胞更具杀伤潜力。

理论上, 第三代 CAR-T 细胞在第二代的基础上增添了一个共刺激分子, 会进一步加强 TCR/CD3 信号, 对其靶细胞的杀伤能力越强。我们的研究表明, 在相同效靶比情况下, 靶向 CS1 的第三代 CAR-T 细胞比第二代 CAR-T 细胞对 IM9-lucfp 细胞的杀伤比例低, 且在效靶比 1:1、2:1、5:1 和 10:1 时两者之间都有显著性差异 ($P < 0.05$)。最近, 有研究团队^[18]比较了不同的 CAR-T 细胞, 它们的靶抗原一致, 但是 CAR 的胞内结构和抗肿瘤活性不同。结果显示, 只有第二代 CAR-T 能够刺激类似于天然受体的 CD3 ζ 的表达。而且, CD3 ζ 受体的活性取决于 T 细胞胞内结构域的大小, 而不是依赖于共刺激分子的选择或者细胞外结构域的设计, 该研究表明, 第二代 CAR 与第三代 CAR 相比, 可以激活其他 CD3 信号传导源, 这可能有助于提供更强烈的信号传导和更高的抗肿瘤效果^[18]。目前关于第二代 CAR-T 和第三代 CAR-T 孰强孰弱尚无一致定论, 增加的共刺激分子可能可以联合各自的信号转导通路从而增强 CAR-T 细胞抗肿瘤效应。增加多个共刺激因子也可能因为改变 CAR-T 细胞胞内段结构域长度, 导致原有的信号减弱或不能传递, 从而减弱第三代 CAR-T 的抗肿瘤效应。相同的共刺激分子在不同靶向 CAR-T 细胞中呈现的效应也可不同, 例如有研究人员用共刺激分子 CD28 和 4-1BB 构建靶向前列腺干细胞抗原 (Prostate stem cell antigen, PSCA) 的 CAR-T, 研究显示, 第二代 CAR-T 比第三代 CAR-T 更有效^[19]。另一研究团队同样通过 CD28 和 4-1BB 构建靶向 CD19 的 CAR-T 细胞对非霍奇金淋巴瘤进行临床试验, 研究结果显示, 第三代 CAR-T 较第二代效果更好^[20]。故第二代和第三代 CAR-T 的比较, 需要根据其疗效决定取舍, 这些研究结果对 CAR-T 细胞临床治疗有较好的指导和借鉴意义。具体特定的第二代

和第三代 CAR-T 所致的抗肿瘤效应不同, 其机制仍有待进一步探究, 这对未来提高 CAR-T 的免疫治疗有着非常重要的意义。

本研究成功构建了靶向 CS1 的 CAR-T 细胞, 比较了第二代 CAR-T 和第三代 CAR-T 杀伤肿瘤细胞的能力, 证明了 CAR-T 细胞对肿瘤细胞杀伤的可行性和有效性, 下一步本研究拟进行动物实验验证 Anti-CS1-CAR-T 在体内的杀瘤效果。

REFERENCES

- [1] Brenner H, Gondas A, Pulte D. Recent major improvement in long-term survival of younger patients with multiple myeloma. *Blood*, 2008, 111(5): 2521–2526.
- [2] Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*, 2014, 28(5): 1122–1128.
- [3] June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, 2018, 359(6382): 1361–1365.
- [4] Hudecek M, Einsele H. Myeloma CARs are rolling into the clinical arena. *Blood*, 2016, 128(13): 1667–1668.
- [5] Sidana S, Shah N. CAR T-cell therapy: is it prime time in myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2019, 2019(1): 260–265.
- [6] Kansagra A, Farnia S, Majhail N. Expanding access to chimeric antigen receptor T-cell therapies: challenges and opportunities. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2020, 40: 1–8.
- [7] Tariq SM, Ali Haider S, Hasan M, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy: a beacon of hope in the fight against cancer. *Cureus*, 2018, 10(10): e3486.
- [8] Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science*, 2013, 342(6165): 1432–1433.
- [9] Janossy G, Tidman N, Papageorgiou ES, et al. Distribution of T lymphocyte subsets in the human

- bone marrow and thymus: an analysis with monoclonal antibodies. *J Immunol*, 1981, 126(4): 1608–1613.
- [10] Malaer JD, Mathew PA. CS1 (SLAMF7, CD319) is an effective immunotherapeutic target for multiple myeloma. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(8): 1637–1641.
- [11] Tai YT, Dillon M, Song WH, et al. Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu. *Blood*, 2008, 112(4): 1329–1337.
- [12] Finney HM, Akbar AN, Lawson ADG. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR ζ chain. *J Immunol*, 2004, 172(1): 104–113.
- [13] Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev*, 2008, 222(1): 162–179.
- [14] Yu SN, Li AP, Liu Q, et al. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *J Hematol Oncol*, 2017, 10: 78.
- [15] Wilkie S, Picco G, Foster J, et al. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J Immunol*, 2008, 180(7): 4901–4909.
- [16] Zhong XS, Matsushita M, Plotkin J, et al. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI₃kinase/AKT/Bcl-X_L activation and CD8⁺ T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther*, 2010, 18(2): 413–420.
- [17] Gogishvili T, Danhof S, Prommersberger S, et al. SLAMF7-CAR T cells eliminate myeloma and confer selective fratricide of SLAMF7⁺ normal lymphocytes. *Blood*, 2017, 130(26): 2838–2847.
- [18] Ramello MC, Benzaid I, Kuenzi BM, et al. An immunoproteomic approach to characterize the CAR interactome and signalosome. *Sci Signal*, 2019, 12(568): eaap9777.
- [19] Abate-Daga D, Lagisetty KH, Tran E, et al. A novel chimeric antigen receptor against prostate stem cell antigen mediates tumor destruction in a humanized mouse model of pancreatic cancer. *Hum Gene Ther*, 2014, 25(12): 1003–1012.
- [20] Ramos CA, Rouce R, Robertson CS, et al. *In vivo* fate and activity of second-versus third-generation CD19-specific CAR-T cells in B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Mol Ther*, 2018, 26(12): 2727–2737.

(本文责编 郝丽芳)