

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.03.002

· 基础研究 ·

自杀基因作为一种“安全性开关”控制CAR-T细胞毒性的临床前研究

张慧慧¹, 孔群芳¹, 吕晓菲², 李想², 孙玉桃¹, 谭毅^{1,2} (1. 山东省齐鲁细胞治疗工程技术有限公司, 山东 济南 250000; 2. 山东银丰生命科学研究院, 山东 济南 250000)

[摘要] **目的:** 探讨小分子化学诱导药 AP1903 能否在体内外终止过表达 iCasp9 自杀基因的 CD19 靶向嵌合抗原受体修饰 T (CD19CAR-T) 细胞毒性功能。 **方法:** 构建过表达 iCasp9 的 CD19CAR-T (iCasp9-CD19CAR-T) 细胞并和 AP1903 共孵育, 采用流式细胞术检测细胞表型及凋亡的方法, 分别在 K562 和 T 细胞上验证 iCasp9/CID 自杀基因系统, 在体内 (观察荷 Raji 细胞移植瘤 NCG 小鼠的生存率) 和体外 (流式细胞术检测细胞的杀伤功能) 检测 AP1903 给药情况下 iCasp9-CD19CAR-T 细胞的杀伤功能。 **结果:** 和 CD19CAR-T 细胞相比, iCasp9-CD19CAR-T 细胞的增殖能力、表型及体内外杀伤功能均无显著差异 (均 $P>0.05$)。 AP1903 给药 2 h 后双表达 iCasp9 和 CD19CAR 的 K562 和 T 细胞分别有 (33.8±0.9)% 和 (27.95±0.35)% 的细胞出现凋亡, AP1903 给药 24 h 后双表达 iCasp9 和 CD19CAR 的 K562 和 T 细胞均已经全部死亡。检测 AP1903 给药和未给药两种条件下的 iCasp9-CD19CAR-T 细胞体外杀伤效率, 前者明显低于后者 ($P<0.01$); iCasp9-CD19CAR-T 细胞治疗荷 Raji 细胞移植瘤 NCG 小鼠, 其 60 d 生存率同样是 AP1903 给药的明显低于未给药的 ($P<0.01$)。 **结论:** 小分子化学诱导药物 AP1903 能在体内外有效终止 iCasp9-CD19CAR-T 细胞毒性功能。

[关键词] 嵌合抗原受体修饰 T 细胞; CD19; 安全性开关; 诱导性自杀基因 caspase9; 细胞因子释放综合征; 脱靶效应; K562 细胞
[中图分类号] R739.12; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)03-0225-07

Preclinical study of suicide gene as a safety switch to control CAR-T cell cytotoxicity

ZHANG Huihui¹, KONG Qunfang¹, LYU Xiaofei², LI Xiang², SUN Yutao¹, TAN Yi^{1,2} (1. Qilu Cell Therapy Technology Co., Ltd., Jinan 250000, Shandong, China; 2. Shandong Yinfeng Life Science Research Institute, Jinan 250000, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether AP1903, a small-molecule chemical inducer, can terminate the cytotoxicity of CD19CAR-T cells over-expressing iCasp9 suicide gene *in vivo* and *in vitro*. **Methods:** CD19CAR-T cells over-expressing iCasp9 (iCasp9-CD19CAR-T) were constructed and co-incubated with AP1903. Then, the cell phenotype and apoptosis were detected by Flow cytometry, and the iCasp9/CID suicide gene system was verified on K562 and T cells, respectively. The cytotoxicity of iCasp9-CD19CAR-T cells was detected *in vivo* (survival rate of NCG mice bearing Raji cell transplanted xenograft) and *in vitro* (cell killing function was detected by Flow cytometry) under the administration of AP1903. **Results:** Compared with CD19CAR-T cells, iCasp9-CD19CAR-T cells showed in significant difference in proliferation, phenotype and cytotoxicity both *in vitro* and *in vivo* (all $P>0.05$). At 2 h after AP1903 administration, the apoptosis rates of K562 and T cells co-expressing iCasp9 and CD19CAR were (33.8±0.9)% and (27.95±0.35)%, respectively; and at 24 h after AP1903 administration, the apoptosis rates reached 100% in both cell lines. The *in vitro* cytotoxicity of iCasp9-CD19CAR-T cells induced by AP1903 was significantly lower than that without AP1903 treatment ($P<0.01$); the 60-day survival rate of mice bearing Raji cell transplanted tumor treated with AP1903-induced iCasp9-CD19CAR-T cells was also significantly lower than those treated with iCasp9-CD19CAR-T cells alone ($P<0.01$). **Conclusion:** AP1903 can effectively terminate the cytotoxicity of CD19CAR-T cells over-expressing iCasp9 suicide gene *in vitro* and *in vivo*.

[Key words] chimeric antigen receptor modified T cell (CAR-T cell); CD19; safety switch; induced suicide gene caspase9 (iCasp9); cytokine release syndrome (CRS); off-target effect; K562 cell

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(3): 225-231. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.03.002]

[基金项目] 山东省重点研发计划资助项目 (No. 2016ZDJS07B05)。Project supported by the Key Research and Development Project of Shandong Province (No. 2016ZDJS07B05)

[作者简介] 张慧慧 (1983-), 女, 硕士, 副高级工程师, 主要从事肿瘤免疫细胞治疗和干细胞治疗研究, E-mail: zhh18653103561@126.com

[通信作者] 谭毅 (TAN Yi, corresponding author), 博士, 副高级工程师, 硕士生导师, 主要从事肿瘤免疫细胞治疗和干细胞治疗研究, E-mail: pkuty@126.com

针对CD19的嵌合抗原受体修饰的T(anti-CD19 chimeric antigen receptor modified T, CD19CAR-T)细胞在难治性B细胞恶性肿瘤的治疗中已取得巨大成功^[4],而靶向其他肿瘤靶点的CAR-T技术在其他肿瘤的治疗中也显示了良好的应用前景^[5-9]。与CD19CAR-T细胞疗法的有效性共存的是它的不良反应,其在临床应用中可能产生针对正常组织细胞误攻击的脱靶效应(off-tumor effect),或由于大量释放炎症细胞因子引起细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)等不良反应,已成为制约其应用的主要障碍^[10-13]。

由于设计时选取CD19为靶点,输入的T细胞会将体内本身存在的正常B细胞与肿瘤细胞一起杀掉,并且在肿瘤消失后,只要CAR-T细胞依然存在,机体内都不会有正常B细胞存活,患者需要间隔一定时间注射免疫球蛋白以维持基本的体液免疫^[14]。另一方面,在CAR-T细胞输入初期,由于T细胞的大量扩增以及T细胞杀伤肿瘤过程中会分泌大量细胞因子,患者会出现CRS,具体表现为发热、低血压、缺氧以及血清中多种细胞因子水平显著升高^[15-18]。如何控制CAR-T细胞的不良反应成为了一个难题。

研究者们期望通过控制回输入体内的CAR-T细胞的功能状态,在保证其靶向杀伤功能的同时给它加上一个“开关”,在严重不良反应发生时通过诱导T细胞的凋亡控制其反应程度,增加CAR-T细胞安全性。因此,本课题在CAR-T细胞治疗过程中引入自杀机制,使CAR-T细胞在表达CAR之外,共表达一个经过改造的诱导性半胱天冬酶9自杀基因(inducible caspase9 suicide gene, iCasp9)^[19-22],此基因表达后,可由外源化学药物诱导其二聚化而启动细胞的线粒体凋亡通路,从而使CAR-T细胞凋亡,提高CAR-T细胞治疗的临床安全性。

1 材料与方法

1.1 实验用细胞、动物及试剂

K562细胞、Raji细胞、293FT细胞购自ATCC。SPF级NCG小鼠购自南京大学南京生物医药研究院,实验动物质量合格证号为32002100003395。

淋巴细胞分离液购自天津灏洋公司, RPMI 1640培养基购自Invitrogen公司, CTS™ AIM V™ SFM培养基购自GIBCO公司, 抗人CD3单抗、抗人CD28单抗购自eBioscience公司, IL-2购自山东泉港药业, polybrene购自Sigma公司, 人CD19-FITC抗体购自ACROBiosystems公司, Annexin-V、7-AAD、人CD3-FITC抗体、人CD19-PE抗体购自Biolegend公司, 小分子化学诱导药AP1903购自GLP BIO公司。

1.2 iCasp9和CD19 CAR双表达的T细胞的制备

1.2.1 细胞的分离和激活 取新鲜外周血,通过淋巴细胞分离液进行密度梯度离心来分离单个核细胞。将单个核细胞重悬至CTS™ AIM V™ SFM培养基中,同时添加人CD3单抗50 ng/ml、人CD28单抗50 ng/ml来激活T淋巴细胞,37℃、5%CO₂培养48 h。T细胞在体外激活48 h后进行病毒感染。

1.2.2 iCasp9-CD19CAR载体构建 anti-CD19 scFv序列委托南京金斯瑞生物科技有限公司提供,由苏州金唯智生物科技有限公司进行CAR基因合成,然后亚克隆到慢病毒骨架质粒pHR中。iCasp9-CD19CAR载体包括iCasp9、2A、CD8穿膜信号肽、anti-CD19 scFv、CD8穿膜区、4-1BB共刺激信号区和CD3 Zeta TCR激活区。

1.2.3 iCasp9-CD19CAR重组慢病毒的构建 将携带有iCasp9-CD19CAR的慢病毒表达载体、pCMV载体和pMD.2G载体混合后转染到293FT细胞中,48 h后收集上清,得到双表达iCasp9和CD19 CAR的重组慢病毒。

1.2.4 重组慢病毒对T细胞的感染 T细胞在体外激活48 h之后按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)为5加入浓缩的慢病毒,同时加入IL-2 200 U/ml、polybrene 4 μg/ml,混匀,37℃、5%CO₂培养6~8 h,300×g离心5 min。换液为新鲜CTS™ AIM V™ SFM培养基(含IL-2),其后每2~3 d补充1次,维持细胞密度在1×10⁶个/ml左右,共扩增14 d。每隔1 d采用锥虫蓝染色后计数板计数。

1.2.5 流式细胞术对iCasp9-CD19CAR-T细胞的鉴定 取病毒感染后培养48 h以后的T细胞1×10⁶个,离心后用预冷PBS重悬,每个样品加10 μl 0.1 μg/μl的FITC标记的CD19(20-291)抗体,4℃避光染色1 h,预冷的PBS洗3遍后流式细胞仪检测iCasp9-CD19CAR-T细胞表面iCasp9-CD19CAR的表达。

1.3 iCasp9/CID自杀基因系统的验证实验

1.3.1 表达慢病毒载体的K562细胞的制备 RPMI 1640培养基重悬K562细胞,细胞密度为1×10⁶个/ml。按照MOI为5加入慢病毒,37℃、5%CO₂培养箱培养6~8 h,离心换液为新鲜K562细胞培养液,其后每2~3 d换液1次,维持细胞密度在0.5×10⁶个/ml左右。

1.3.2 AP1903诱导iCasp9-CD19CAR-K562细胞凋亡的检测 取800 μl iCasp9-CD19CAR-K562细胞铺于24孔板中,加入AP1903 20 nmol/L,37℃、5%CO₂培养箱培养,分别于2、24 h应用流式细胞仪检测CAR阳性的细胞比例(FITC标记的CD19抗体)及细胞凋亡情况(Annexin-V, 7-AAD)。设iCasp9-CD19CAR-K562细胞(不加AP1903)组、K562细胞加入AP1903(20 nmol/L)组, K562细胞(不加入

AP1903)作为对照组。

1.3.3 CAR-T 细胞中验证 iCasp9/CID 自杀基因系统 取 800 μl iCasp9-CD19CAR-T 细胞铺于 24 孔板中, 加入 AP1903 20 nmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养, 分别于 2、24 h 应用流式细胞仪检测 CAR 阳性的细胞比例 (FITC 标记的 CD19 抗体) 及细胞凋亡情况 (Annexin V, 7-AAD)。设 iCasp9-CD19CAR-T 细胞 (不加 AP1903) 组、CD19CAR-T 细胞加入 AP1903 (20 nmol/L) 组, CD19CAR-T 细胞 (不加入 AP1903) 作为对照组。

1.4 iCasp9-CD19CAR-T 细胞体外肿瘤细胞杀伤实验

将本实验室构建的 K562-CD19 和 K562 细胞 1:1 混合作为杀伤的靶细胞, 将 iCasp9-CD19CAR-T 细胞和靶细胞分别以 E:T=3:1 和 E:T=1:1 混合。效应细胞和靶细胞混合后分成 2 组, 一组添加 20 nmol/L AP1903, 另外一组不添加, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 24 h 后应用流式细胞仪检测杀伤效率 (anti-CD3 FITC、anti-CD19 PE, CD3 抗体和 CD19 抗体染色后能够将 T 细胞、K562-CD19 细胞、K562 细胞分群分析), 分析杀伤 24 h 后 K562-CD19 细胞和 K562 细胞的比值, 分别在 AP1903 存在和不存在的条件下计算 iCasp9-CD19CAR-T 细胞对 K562-CD19 细胞的特异性杀伤效率。同样的方法构建 CD19CAR-T 杀伤体系, 同样分成添加 20 nmol/L AP1903 组和不添加组, 用 T 细胞组作为阴性对照组, 计算特异性杀伤效率。

1.5 iCasp9-CD19CAR-T 细胞对移植瘤模型小鼠的治疗实验

分别在 35 只雄性 SPF 级 NCG 小鼠尾静脉注射接种人 Raji 细胞 (第 0 天) 1×10^5 个/只造模, 造模后第 4 天,

按随机数字表法将 35 只小鼠随机分为 5 组, 每组各 7 只。阴性对照组 (Mock 组) 尾静脉注射 0.9% 氯化钠注射液 0.5 ml; CD19CAR-T 细胞组尾静脉注射 CD19CAR-T 细胞 1×10^7 个/0.5 ml, 之后随机分成 2 亚组, 一组给药 AP1903 50 μg , 另外一组不给药。iCasp9-CD19CAR-T 细胞组尾静脉注射 iCasp9-CD19CAR-T 细胞 1×10^7 个/0.5 ml, 之后随机分成 2 亚组, 一组给药 AP1903 50 μg , 另外一组不给药。实验周期为 60 d, 观察实验期间各组动物变化, 绘制生存曲线。

1.6 统计学处理

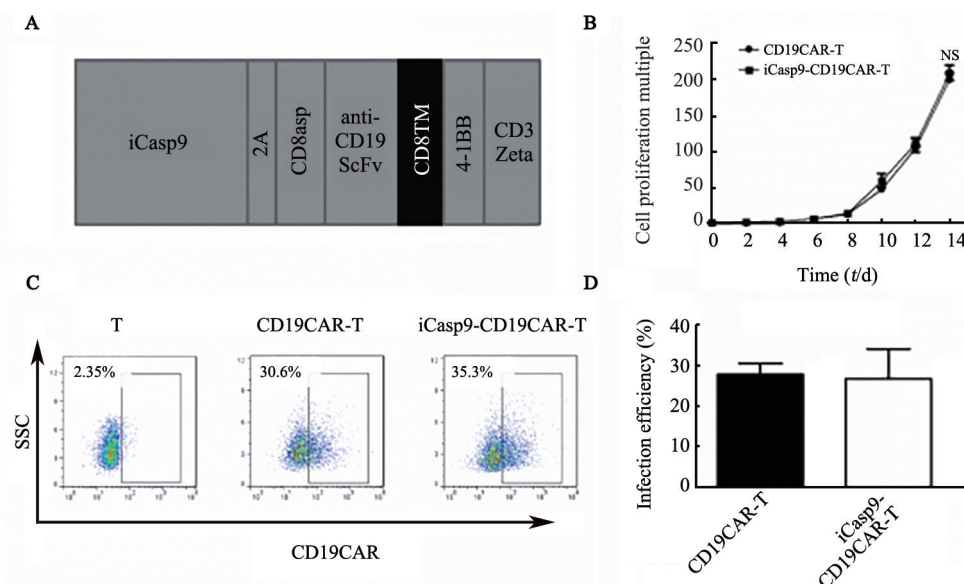
采用 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad) 软件。本研究所有独立实验均重复 3 次, 呈正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功制备 iCasp9-CD19CAR-T 细胞

将苏州金唯智生物科技有限公司合成的 iCasp9 基因序列和 CD19CAR 基因亚克隆到慢病毒骨架质粒 pHR 中, 成功构建出了 iCasp9-CD19CAR 载体, iCasp9-CD19CAR 载体结构如图 1A 所示。

重组慢病毒感染 T 细胞后, 得到的 CD19CAR-T 和 iCasp9-CD19CAR-T 细胞的增殖倍数差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1B)。重组慢病毒对 CD19CAR-T 和 iCasp9-CD19CAR-T 细胞感染效率分别为 $(27.83 \pm 1.59)\%$ 和 $(26.77 \pm 4.28)\%$, 两者感染效率差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1C、D)。



A: Construction of pHR-iCasp9-CD19CAR; B: Statistical analysis of multiplication of iCasp9-CD19CAR-T cells; C: The infection efficiency of lentivirus to transfect iCasp9-CD19CAR-T cells; D: Statistical analysis of the infection efficiency

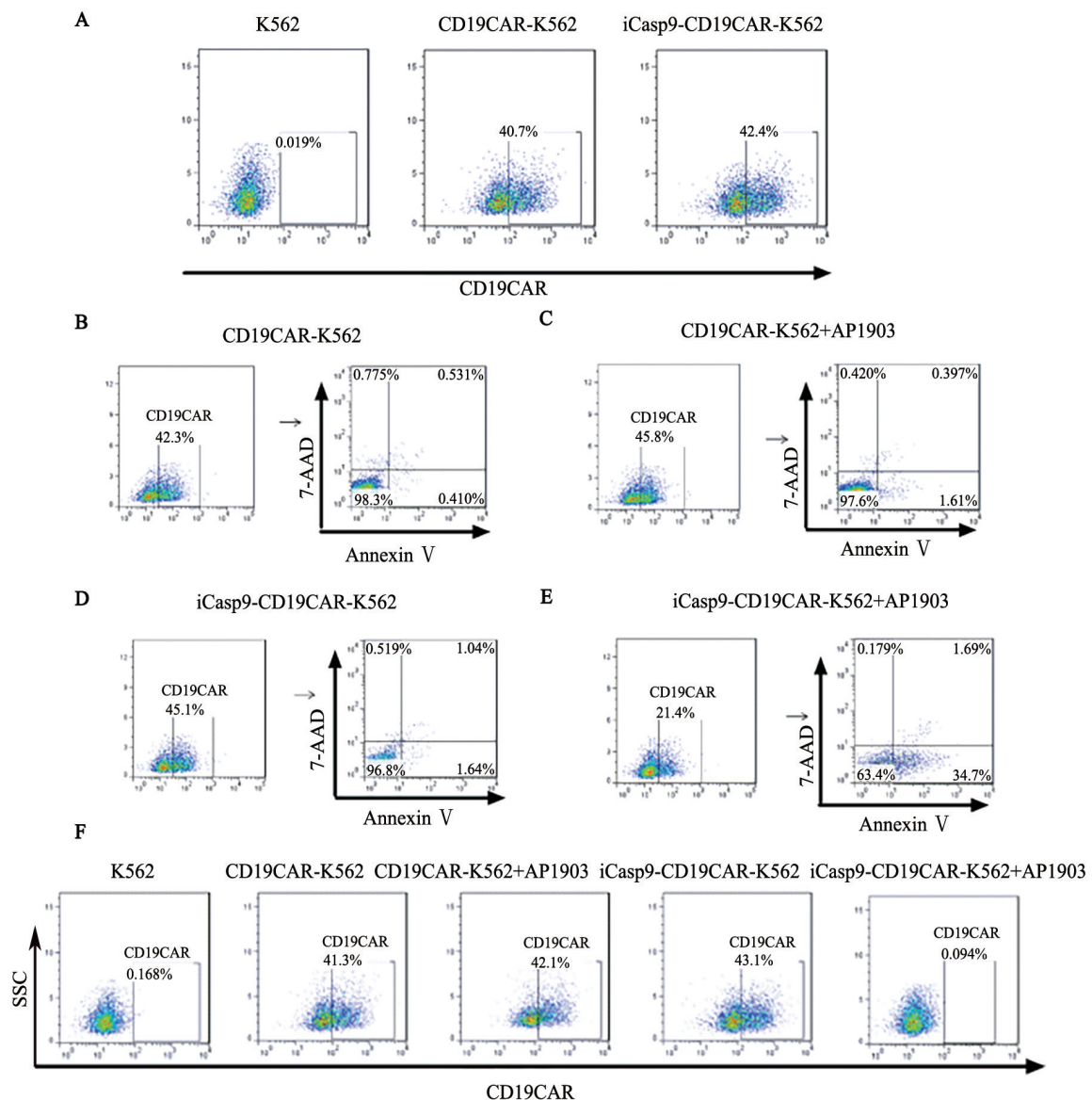
图1 pHR-iCasp9-CD19CAR 质粒载体的结构及 iCasp9-CD19CAR-T 细胞的增殖能力和感染效率

Fig.1 Structure of pHR-iCasp9-CD19CAR plasmid and the multiplication and infection efficiency of iCasp9-CD19CAR-T cells

2.2 iCasp9/CID系统可有效发挥自杀基因的功能

2.2.1 iCasp9/CID自杀基因系统可以在K562细胞中发挥作用 表达慢病毒载体的K562细胞的验证实验显示, CD19CAR-K562的感染效率为(42.85±2.15)%, iCasp9-CD19CAR-K562的感染效率为(41.2±1.2)%(图2A)。iCasp9-CD19CAR-K562细胞和AP1903混合培养2 h后, CD19CAR阳性细胞比例为21.4%,而这21.4%的CD19CAR阳性细胞中有(33.8±0.9)%的细胞出现凋亡;而iCasp9-CD19CAR-K562细胞(不加AP1903)、CD19CAR-K562细胞(不加AP1903)、CD19CAR-K562细胞加入AP1903的检

测结果显示, CD19CAR阳性细胞比例分别为(44.5±0.6)%、(41.2±1.1)%、(45.15±0.65)%,且CD19CAR阳性细胞均未出现细胞凋亡现象(图2B~E)。iCasp9-CD19CAR-K562细胞加入AP1903 24 h后检测不到CD19CAR阳性细胞,表明CD19CAR阳性的K562细胞已经全部死亡;而iCasp9-CD19CAR-K562细胞(不加AP1903)、CD19CAR-K562细胞(不加AP1903)和CD19CAR-K562细胞加入AP1903 24 h后的CD19CAR阳性细胞比例分别为(42.95±0.15)%、(40.8±0.5)%、(41.75±0.35)%(图2F)。

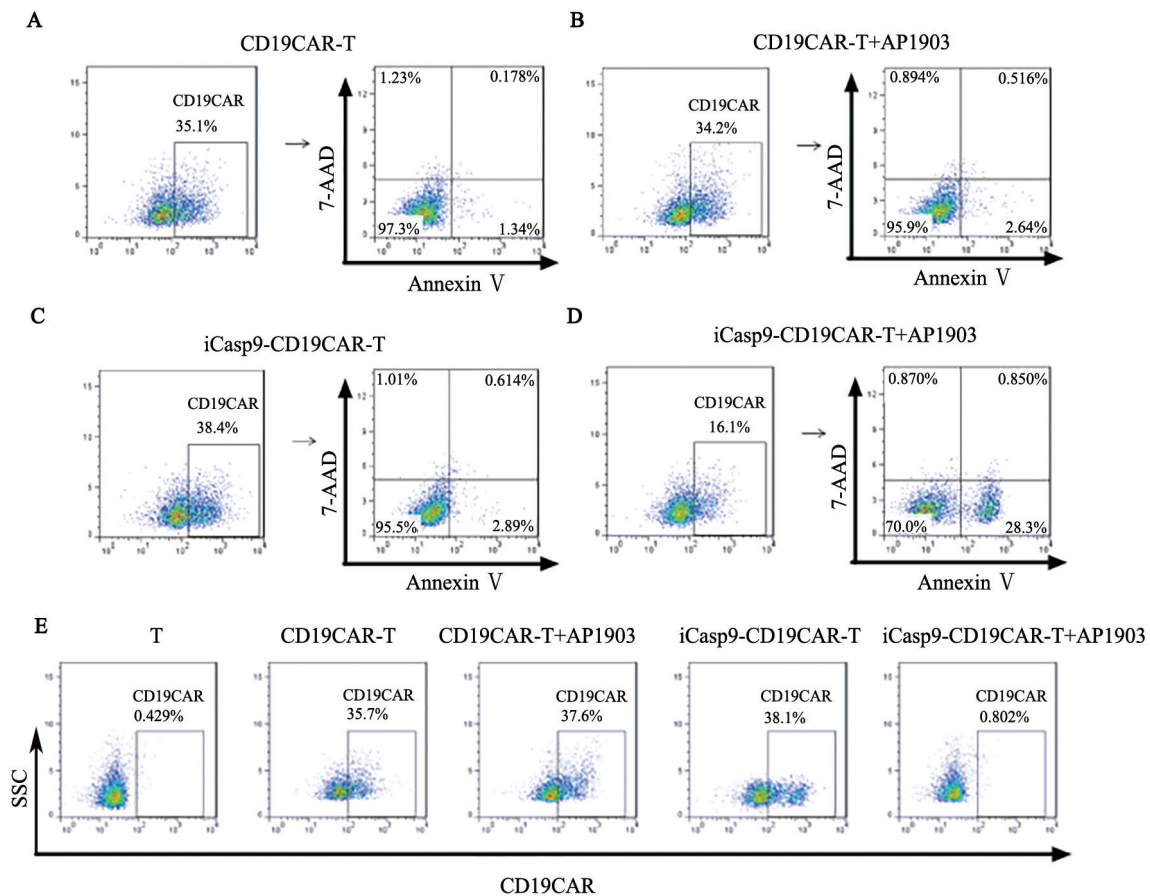


A: The infection efficiency of lentiviral vector to transfect K562 cells; B-E: The proportion of CD19CAR positive cells and the proportion of apoptotic cells in CD19CAR positive cells in cultured CD19CAR-K562 cells, AP1903 induced CD19CAR-K562 cells, iCasp9-CD19CAR-K562 cells and AP1903 induced iCasp9-CD19CAR-K562 cells (2 h); F: The proportion of CD19CAR positive cells in cultured CD19CAR-K562 cells, AP1903 induced CD19CAR-K562 cells, iCasp9-CD19CAR-K562 cells and AP1903 induced iCasp9-CD19CAR-K562 cells (24 h)

图2 iCasp9/CID自杀基因系统在K562细胞中验证的流式细胞术检测
Fig.2 Validation of iCasp9/CID suicide gene system in K562 cells by Flow cytometry

2.2.2 iCasp9/CID 自杀基因系统可以在 CAR-T 细胞中发挥作用 iCasp9-CD19CAR-T 细胞加入 AP1903 2 h 后 CD19CAR 阳性细胞比例为 16.1%，而这 16.1% 的 CD19CAR 阳性细胞中，有 $(27.95 \pm 0.35)\%$ 的细胞出现凋亡；而 iCasp9-CD19CAR-T 细胞（不加 AP1903）、CD19CAR-T 细胞（不加 AP1903）和 CD19CAR-T 细胞加入 AP1903 2 h 后的 CD19CAR 阳性细胞比例分别为 $(37.95 \pm 0.45)\%$ 、 $(34.85 \pm 0.25)\%$ 、 $(34.05 \pm 0.15)\%$ ，且

CD19CAR 阳性细胞均未出现细胞凋亡现象（图 3A~D）。iCasp9-CD19CAR-T 细胞加入 AP1903 24 h 后检测不到 CD19CAR 阳性细胞，表明 CD19CAR 阳性的 T 细胞已经全部死亡；而 iCasp9-CD19CAR-T 细胞（不加 AP1903）、CD19CAR-T 细胞（不加 AP1903）和 CD19CAR-T 细胞加入 AP1903 24 h 后，CD19CAR 阳性细胞比例分别为 $(37.85 \pm 0.25)\%$ 、 $(35.3 \pm 0.4)\%$ 、 $(37.3 \pm 0.3)\%$ （图 3E）。



A-D: The proportion of CD19CAR positive cells and the proportion of apoptotic cells in CD19CAR positive cells in cultured CD19CAR-T cells, AP1903 induced CD19CAR-T cells, iCasp9-CD19CAR-T cells and AP1903 induced iCasp9-CD19CAR-T cells (2 h); E: The proportion of CD19CAR positive cells in cultured CD19CAR-T cells, AP1903 induced CD19CAR-T cells,

iCasp9-CD19CAR-T cells and AP1903 induced iCasp9-CD19CAR-T cells (24 h)

图3 iCasp9/CID 自杀基因系统在 CAR-T 细胞中验证的流式细胞术检测

Fig.3 Validation of iCasp9/CID suicide gene system in CAR-T cells by Flow cytometry

2.3 AP1903 能有效终止 iCasp9-CD19CAR-T 细胞的体外杀伤功能

K562 为人类髓性白血病细胞，表面不表达 CD19 分子，而构建的 K562-CD19 细胞表面表达 CD19 分子，对 K562 和 K562-CD19 1:1 混合细胞的杀伤能更好地反映细胞的特异性杀伤水平。E:T=3:1 时，CD19CAR-T 细胞组、iCasp9-CD19CAR-T 细胞组、CD19CAR-T+AP1903 细胞组杀伤率均为 100%，iCasp9-CD19CAR-T+AP1903 细胞组杀伤率为 $(9 \pm 0.58)\%$ 。E:T=1:1 时，CD19CAR-

T 细胞组、iCasp9-CD19CAR-T 细胞组、CD19CAR-T+AP1903 细胞组杀伤率分别为 $(81.5 \pm 1.5)\%$ 、 $(77.5 \pm 0.5)\%$ 、 $(77.5 \pm 1.5)\%$ ，而 iCasp9-CD19CAR-T+AP1903 细胞组杀伤率为 $(6 \pm 1)\%$ （图 4）。统计学分析表明，CD19CAR-T 细胞组、iCasp9-CD19CAR-T 细胞组、CD19CAR-T+AP1903 细胞组之间的杀伤效率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，iCasp9-CD19CAR-T 细胞组和 iCasp9-CD19CAR-T+AP1903 细胞组杀伤率差异有统计学意义 ($P < 0.01$ ，图 4)。

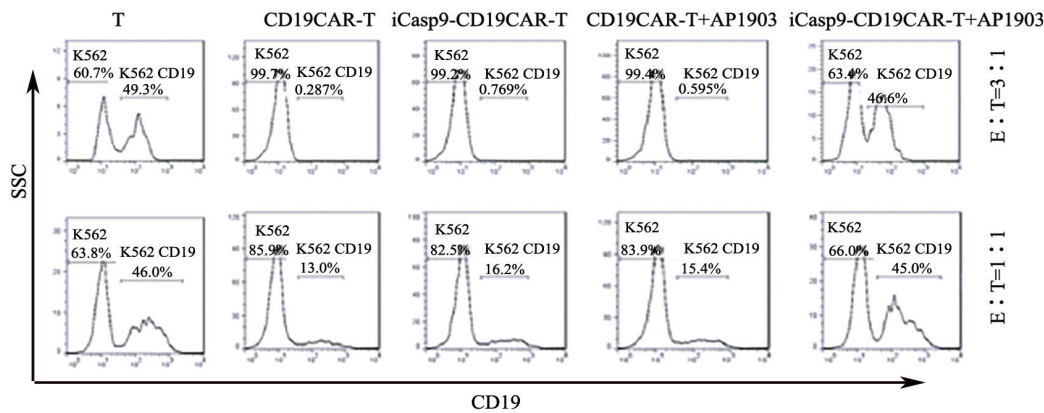


图4 AP1903有效终止iCasp9-CD19CAR-T细胞对K562-CD19细胞的特异性杀伤

Fig.4 AP1903 effectively terminated the specific cytotoxicity of iCasp9-CD19CAR-T cells on K562-CD19 cells

2.4 AP1903能有效终止iCasp9-CD19CAR-T细胞在体内对移植瘤的杀伤功能

Mock组的NCG小鼠在20~24 d陆续出现死亡,而CD19CAR-T细胞组、iCasp9-CD19CAR-T细胞组、CD19CAR-T+AP1903细胞组在23~28 d的时间里均仅有2只NCG小鼠死亡,剩下的小鼠在60 d内均未出现死亡; iCasp9-CD19CAR-T+AP1903细胞组的NCG小鼠在20~25 d陆续出现死亡。CD19CAR-T细胞组、iCasp9-CD19CAR-T细胞组、CD19CAR-T+AP1903细胞组NCG小鼠的生存率相互间差异无统计学意义(均 $P>0.05$,图5),而iCasp9-CD19CAR-T细胞组和iCasp9-CD19CAR-T+AP1903细胞组NCG小鼠60 d生存率差异具有统计学意义($P<0.01$,图5)。

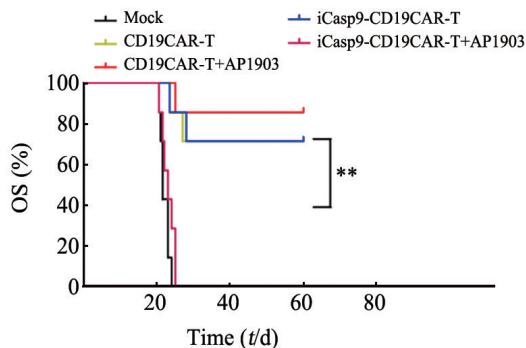


图5 荷Raji细胞移植瘤NCG小鼠60 d生存曲线图

Fig.5 The 60 d survival curve of NCG mice bearing Raji cell transplanted tumor

3 讨论

脱靶效应^[14]和CRS^[15-18]是CAR-T细胞治疗的2个最重要的不良反应。假如在CAR-T细胞中增加“自杀”或“消除”基因,可使患者在接受CAR-T细胞治疗发生严重CRS或脱靶效应时选择性消耗CAR-T细胞而减轻或消除这些不良反应。自杀基因系统中的iCasp9被激活,可导致暴露于AP1903的CAR-T细胞快速死亡^[19-22]。

2010年HOYOS等^[23]报道共表达IL-15和iCasp9的iCasp9/CD19/IL-15 T细胞有更强的生物学功能,CID给药3 d后该细胞被有效清除。BUDDE等^[20]报道,表达iCasp9的CD20-CAR-T治疗时,体内连续2 d CID给药能在24 h内消除外周血中90%的T细胞,故iCasp9/CID自杀基因系统已经成功地进入临床。对于干细胞移植术后患者输注表达iCasp9的T细胞,iCasp9能够有效消除输注的T细胞,并能缓解患者的GVHD^[24]。然而,针对CAR-T细胞治疗的不良反应,AP1903给药后CAR-T细胞的存活时间及活性则需要进一步地研究。

为了验证这一设想,本研究构建了共表达iCasp9自杀基因和CD19 CAR的质粒载体和病毒载体,并成功制备出了共表达iCasp9自杀基因的CAR-T细胞。鉴定实验结果表明,和原始CAR-T细胞相比,这种共表达iCasp9的CAR-T细胞的感染效率、增殖速率、对肿瘤的靶向性以及体内外的杀伤功能均没有受到影响,充分说明了这种共表达iCasp9的设计并没有对CAR-T细胞的功能产生影响。

本研究分别在K562细胞和T细胞中对于iCasp9/CID自杀基因系统进行了验证。对于共表达iCasp9自杀基因和CD19 CAR的K562和T细胞而言,加入AP1903 2 h后,CD19 CAR阳性的K562细胞和T细胞均出现了明显的凋亡,24 h后CD19 CAR阳性K562细胞和T细胞几乎都已经死亡。此结果说明,iCasp9/CID自杀基因系统能够在K562细胞和T细胞中发挥作用,AP1903能够有效诱导iCasp9的二聚化而启动细胞的线粒体凋亡通路,致使CAR-T细胞凋亡而降低不良反应的严重程度,提高了CAR-T细胞治疗的安全性。

本研究对于共表达iCasp9自杀基因和CD19CAR的CAR-T细胞体内外杀伤功能进行了研究:AP1903存在的情况下,iCasp9-CD19CAR-T细胞体外的杀伤功能被有效终止;动物实验结果也表明,AP1903存在的情况下,iCasp9-CD19CAR-T细胞组

小鼠的 60 d 生存率和 Mock 组无显著差异, 表明 iCasp9-CD19CAR-T 细胞已失去了应有的杀伤功能。上述结果说明, AP1903 能有效终止 iCasp9-CD19CAR-T 细胞的体内外杀伤功能, 间接说明了 AP1903 可有效控制 CAR-T 细胞治疗中的不良反应。

和原始 CD19CAR-T 细胞相比, 双表达 iCasp9 自杀基因和 CD19CAR 的 CAR-T 细胞的感染效率、增殖速率、对肿瘤的靶向性以及体内外的杀伤功能均没有受到影响; 体内外实验均表明, 无生物活性的小分子诱导药物 AP1903 能够成功诱导 iCasp9-CD19CAR-T 细胞嵌合蛋白质 iCasp9 的药物结合结构域发生交联, 使 iCasp9 发生二聚化而激活下游的 caspase3 分子, 导致 CAR-T 细胞凋亡。一旦 CAR-T 细胞治疗过程中出现严重的不良反应, 就可以启动该“安全性开关”, 为 CAR-T 细胞治疗的安全性提供有力保障。

[参 考 文 献]

- [1] JMLIO C C, CHRISTINA B, MOHAMED A K, et al. CAR T-cell therapy for B-cell lymphomas: clinical trial results of available products[J]. *Ther Adv Hematol*, 2019, 15(10): 1-20. DOI: 10.1177/2040620719841581.
- [2] KATHERINE C P, BRYNN B D, DANIEL W L, et al. CAR-T cell therapy for acute lymphoblastic leukemia: transforming the treatment of relapsed and refractory disease[J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2018, 13(5): 396-406. DOI: 10.1007/s11899-018-0470-x.
- [3] JAE H P, MARK B G, RENIER J B, et al. CD19-targeted CAR-T cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date [J]. *Blood*, 2016, 127(26): 3312-3320. DOI: 10.1182/blood-2016-02-629063.
- [4] JESSICA H, MARTINA S, ATTILIO B, et al. Clinical development of CAR-T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts[J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(9): 1183-1197. DOI: 10.15252/emmm.201607485.
- [5] NOOPUR R, JESUS B, YI L, et al. Anti-BCMA CAR-T cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(18): 1726-1737. DOI:10.1056/NEJMoa1817226.
- [6] PAN J, NIU Q, DENG B, et al. CD22 CAR-T cell therapy in refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2019, 33(12): 2854-2866. DOI: 10.1038/s41375-019-0488-7.
- [7] FRY T J, SHAH N N, ORENTAS R J, et al. CD22-targeted CAR-T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immune therapy[J]. *Nat Med*, 2018, 24(1): 20-28. DOI:10.1038/nm.4441.
- [8] NISHIDA T, KATAOKAH. Glypican 3-targeted therapy in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(9): 1339-1351. DOI: 10.3390/cancers11091339.
- [9] ZEYAN P, SHENGMENG D, BIZHI S, et al. Increased antitumor activities of glypican-3-specific chimeric antigen receptor-modified T cells by coexpression of a soluble PD1-CH3 fusion protein[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(10): 1621-1634. DOI: 10.1007/s00262-018-2221-1.
- [10] DAVID S, RENIER B. CAR T-cell therapy: full speed ahead[J]. *Hematol Oncol*, 2019, 37(1): 95-100. DOI: 10.1002/hon.2591.
- [11] SATTVA S N. Managing the toxicities of CAR T-cell therapy[J]. *Hematol Oncol*, 2019, 37(1): 48-52. DOI: 10.1002/hon.2595.
- [12] GUST J, TARASEVICIUTE A, TURTLE C J, et al. Neurotoxicity associated with CD19-targeted CAR-T cell therapies[J]. *CNS Drugs*, 2018, 32(12): 1091-1101. DOI:10.1007/s40263-018-0582-9.
- [13] ALEXANDRE V H, CAMERON J T. Toxicities of CD19 CAR-T cell immunotherapy[J]. *Am J Hematol*, 2019, 94(S1): 42-49. DOI: 10.1002/ajh.25445.
- [14] MICHAEL K, BRUCE L L, DAVID L P, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(95): 73-95. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002842.
- [15] MAUDE S L, FREY N, SHAW P A, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(16): 1507-1517. DOI:10.1056/NEJMoa1407222.
- [16] GRUPP S A, KALOS M, BARRETT D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(16): 1509-1518. DOI:10.1056/NEJMoa1215134.
- [17] MARCO L D, ISABELLE R, XIUYAN W, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR-T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224-225. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
- [18] DANIEL W L, JAMES N K, MARYALICE S S, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial [J]. *Lancet*, 2015, 385(9967): 517-528. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
- [19] MARIA S, BRIAN P, CHARLOTTE T W, et al. A Rapamycin-activated caspase 9-based suicide gene[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(5): 1266-1276. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.03.001.
- [20] BUDD L E, BERGER C, LIN Y, et al. Combining a CD20 chimeric antigen receptor and an inducible caspase 9 suicide switch to improve the efficacy and safety of T cell adoptive immunotherapy for lymphoma [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82742[2020-10-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24358223/>. DOI:10.1371/journal.pone.0082742.
- [21] YUHUI C, CHUANG S, ELISA L, et al. Eradication of neuroblastoma by T cells redirected with an optimized GD2-specific chimeric antigen receptor and interleukin-15[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(9): 2915-2924. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1811.
- [22] KENTARO M, MUSTAFA A, ANTONIO D, et al. Generation of suicide gene-modified chimeric antigen receptor-redirected T-cells for cancer immunotherapy[J/OL]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1895: 57-73[2020-10-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30539529/>. DOI: 10.1007/978-1-4939-8922-5_5.
- [23] HOYOS V, SABOLDO B, QUINTARELLI C, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety [J]. *Leukemia*, 2010, 24(6): 1160-1170. DOI: 10.1038/leu.2010.75.
- [24] ANTONIO D S, SIOK K T, GIANPIETRO D, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(18): 1673-1683. DOI: 10.1056/NEJMoa1106152.

[收稿日期] 2020-11-04

[修回日期] 2021-01-20

[本文编辑] 沈志超