

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.07.003

· 基础研究 ·

CD19和CD22双靶点CAR-T细胞对肿瘤细胞的杀伤作用

李薇¹, 曾伟杰^{2Δ}, 彭浩², 刘灿¹, 刘广花¹, 肖非笛², 曾桂芳², 梁晓², 蔡车国², 胡隽源², 周明¹ [1. 湖南省人民医院(湖南师范大学附属第一医院) 血液内科, 湖南 长沙 410005; 2. 深圳市北科生物科技有限公司, 广东 深圳 518057]

[摘要] **目的:** 设计并制备一种分别靶向B细胞表面抗原CD19和CD22的CAR-T细胞, 检测其对肿瘤细胞的体内外杀伤效果。**方法:** 将含有人源化CD19 ScFv的二代CAR分子和带有CD3ε链作为共刺激结构域的CD22 ScFv CAR分子以P2A自剪切肽连接, 序列连接于慢病毒载体pLTR-CMV-MCS中, 以HEK-293T细胞包装相应的慢病毒载体, 感染健康志愿者提供的T细胞制备CAR-19-22-T细胞, 同时以相同二代结构分别构建单靶点CAR-T细胞作为参照。构建表达荧光素酶、CD19和/或CD22的前列腺癌3M细胞(靶细胞)。将各种CAR-T细胞与靶细胞共同培养, 采用荧光素酶化学发光法和ELISA法检测其对靶细胞的杀伤能力和细胞因子的分泌水平。通过尾静脉注射Raji-Luc细胞构建NOD-SCID免疫缺陷小鼠白血病模型, 分别注射各组CAR-T细胞进行治疗并评估其疗效。**结果:** 培养7 d的CAR-19-22-T细胞的CAR-19表达率为13.7%, CAR-22表达率为14.3%。CAR-19-22-T细胞在10:1效率靶比时, 对3M-CD19-Luc、3M-CD22-Luc和3M-CD19-CD22-Luc细胞的杀伤率均显著高于T细胞[(78.1±14.4)% vs (11.1±4.3)%、(46.7±10.7)% vs (12.4±2.7)%、(90.5±4.3)% vs (14.3±3.7)%], 均 $P<0.01$]; 与3M-CD19-Luc、3M-CD22-Luc、3M-CD19-CD22-Luc靶细胞共培养后, CAR-19-22-T细胞IFN- γ 、TNF- α 和IL-2水平均显著低于CAR-19-T和CAR-22-T细胞($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。CAR-19-22-T细胞对移植Raji-Luc细胞模型小鼠治疗效果明显, 其生存期显著长于T细胞组($P<0.01$), 与CAR-19-T组和CAR-22-T组荷瘤小鼠比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。**结论:** 成功设计并制备了一种双靶点CAR-19-22-T细胞, 其能够有效杀伤表达CD19和/或CD22抗原的肿瘤细胞, 对Raji-Luc细胞的白血病模型小鼠有显著的治疗效果。

[关键词] CD19; CD22; 双靶点CAR-T细胞; 淋巴细胞白血病; 靶向治疗

[中图分类号] R730.51; R733.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)07-0623-08

Tumor-killing effects of CD19 and CD22 bi-specific CAR-T cells on tumor cells

LI Wei¹, ZENG Weijie^{2Δ}, PENG Hao², LIU Can¹, LIU Guanghua¹, XIAO Feidi², ZENG Guifang², LIANG Xiao², CAI Chegao², HU Juanyuan², ZHOU Ming¹ (1. Department of Hematology, Hunan Provincial People's Hospital [the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University], Changsha 410005, Hunan, China; 2. Shenzhen Beike Biotechnology Co. Ltd, Shenzhen 518000, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To design and prepare a bi-specific chimeric antigen receptor (CAR)-T cell targeting both CD19 and CD22 antigens on the surface of B lymphocytes and to detect its tumor-killing effects *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** Second-generation CAR molecules containing CD19 ScFv (human originated) and CD22 ScFv (CD3ε chain as costimulatory domain) were connected with P2A self-cleaving peptide. The synthesized fragment was packaged into lentiviral vector pLTR-CMV-MCS. The lentiviruses were packaged with HEK-293T cells and infected with healthy human T cells to prepare CAR-19-22-T cells. Single targeted second-generation CAR-T cells were constructed with the same CD19 ScFv CAR molecules and CD22 ScFv CAR molecules respectively. Prostate cancer 3M cells expressing luciferase, CD19 and/or CD22 were constructed as target cells. Various CAR-T cells were co-cultured with target cells. Luciferase and ELISA methods were used to detect the target-cell killing ability of each group of CAR-T cells and their cytokine secretion. Mouse leukemia models were constructed by injecting Raji-Luc cells through the tail veins of the mice. Different groups of CAR-T cells were then injected respectively for treatment and the treatment efficacy was evaluated. **Results:** For CAR-19-22-T cells cultured for 7 days, the expression rates of CAR-19 and CAR-22 were 13.7% and 14.3% respectively. The killing rates of 3M-CD19-Luc, 3M-CD22-Luc and 3M-CD19-CD22-Luc cells by CAR-19-22-T cells at 10:1 efficiency target ratio were significantly higher than those of T cells [(78.1±14.4)% vs (11.1±4.3)%、(46.7±10.7)% vs (12.4±2.7)%、(90.5±4.3)% vs (14.3±3.7)%], all $P<0.01$]. CAR-19-22-T cells co-cultured with 3M-CD19-Luc, 3M-CD22-Luc or 3M-CD19-CD22-Luc target cells secreted significantly lower amounts of IFN- γ , TNF- α and IL-2 than those for CAR-19-T or CAR-22-T ($P<0.05$ or $P<0.01$). CAR-19-22-T cells had significantly better treatment efficacy on mice infected with Raji-Luc cells. The survival time

[基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目(No.2020JJ4403); 湖南省社会发展重点研发项目(No.2019SK2091)

[作者简介] 李薇(1971—), 女, 硕士, 主任医师, 主要从事血液肿瘤细胞治疗研究, E-mail: lwzgy123@163.com; 曾伟杰(1992—), 男, 硕士, 细胞制备工程师, 主要从事细胞治疗相关研究, E-mail: weijie@beike.cc。Δ为共同第一作者

[通信作者] 胡隽源, E-mail: juanyuan@beike.cc; 周明, E-mail: zhouting_0321@163.com

of these mice was significantly longer than that of the mice in the T-cell group ($P < 0.01$) and compared with those of the tumor-bearing mice in the CAR-19-T group and CAR-22-T group, was not statistically significant (all $P > 0.05$). **Conclusion:** Bi-specific CAR-19-22-T cells were successfully designed and prepared, which could effectively kill tumor cells expressing CD19 and/or CD22 antigens and have a significant treatment effect on mouse leukemia model of Raji-Luc cells.

[Key words] CD19; CD22; bi-specific CAR-T cell; lymphocyte leukemia; targeted therapy

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(7): 623-630. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.07.003]

嵌合抗原受体T(CAR-T)细胞疗法相比于传统的肿瘤治疗方法(如放疗、化疗等),其对血液瘤的疗效是使人振奋的,尤其是用于复发、难治性B细胞淋巴瘤患者的针对CD19靶点的CAR-T细胞治疗具有很好的疗效^[1-5]。但这一单靶向的细胞也并不能保证一劳永逸,对于B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-cell non-Hodgkin's lymphoma, B-NHL),其回输后无治疗效果的患者占30%~40%,即大多数患者并不能得到理想的疗效^[2,6-7]。B细胞肿瘤复发的常见因素是肿瘤细胞表面抗原CD19的下调和CD19阴性细胞的增加^[8-11]。B-NHL在使用抗CD19 CAR-T细胞治疗后约30%的患者表现为CD19阴性,这表明单一靶向治疗对CD19抗原的影响^[12-13]。那么,同时靶向多个B细胞抗原成为一种可能更优的治疗策略,以降低抗原免疫逃逸介导的复发风险^[14-16]。已有临床研究结果表明,针对表面抗原CD22的CAR-T细胞具有良好的临床疗效^[17],针对CD19和CD22设计双靶向的CAR则十分具有吸引力。如今常见的CAR结构大多采用CD3复合物中的CD3 ζ 链为T细胞激活结构域,作为CD3复合物不同亚基的CD3 ϵ 链,若将部分CD3 ϵ 链整合到第二代CAR的共刺激结构中,可以提高相应CAR-T细胞的抗肿瘤效果,同时CD3 ϵ 链相关的C末端Src激酶招募基于免疫受体酪氨酸的激活基序以减少CAR-T细胞因子的分泌水平,而CD3 ϵ 的富碱性残基序列,通过招募p85减少CAR-T细胞的耗竭^[18]。为降低治疗过程中的免疫逃逸和产生细胞因子风暴的风险,增强对两个靶点的特异性杀伤能力,本研究设计了一种包含两个独立CAR分子的双靶点CAR-19-22-T结构,其中一个CAR分子的穿膜结构域和信号转导结构域直接用部分的CD3 ϵ 链替换,然后获得足量相应的CAR-T细胞,验证其体内外对肿瘤细胞的杀伤能力。

1 材料与方法

1.1 细胞、实验动物及主要试剂

慢病毒制备用细胞HEK-293T、B-NHL细胞和人前列腺癌3M细胞均购自美国ATCC细胞库,人Burkitt's淋巴瘤细胞Raji-Luc由深圳市北科生物科技有限公司提供,人外周血单个核细胞(PBMC)从健康志愿者捐献的外周血中经Ficoll密度梯度离心获得。

SPF级6周龄、体质量为(20 \pm 3)g的雌性NOD-SCID免疫缺陷小鼠购自珠海百试通生物科技有限公

司,实验动物许可证号:SCXK(粤)2020-0051。

贴壁细胞所用DMEM高糖培养基和悬浮细胞所用RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司,培养基添加物胎牛血清(FBS)购自美国HyClone公司,T细胞培养基X-Vivo15购自美国Lonza公司,相关质粒由广州艾基生物科技有限公司合成,D-Luciferin和ATP试剂购自中国上海阿拉丁生化科技股份有限公司,IFN- γ 、TNF- α 和IL-2 ELISA试剂盒购自美国R&D公司,FITC标记人CD19和CD22蛋白购自北京百普赛斯公司,APC抗人CD19和CD22抗体购自美国Biolegend公司,Transact激活磁珠购自德国美天旌公司。

1.2 细胞培养

HEK-293T和3M细胞为贴壁细胞,以含有10%PBS的DMEM高糖培养基培养;Raji-Luc细胞为悬浮细胞,以含有10%PBS的RPMI 1640培养基培养;供者的PBMC和肿瘤细胞分开培养,使用含有10%自体血浆的X-Vivo15培养基,所有细胞的培养箱培养参数均为37 $^{\circ}$ C、5%CO₂。

1.3 质粒构建

由上海生工生物工程有限公司合成CD19、CD22和荧光素酶(luciferase)表达片段,分别将CAR-19、CAR-22和CAR-19-22目的片段,序列直接连接入慢病毒载体pLTR-CMV-MCS中,经测序检验验证。

1.4 慢病毒包装与滴度检测

将慢病毒载体质粒与包装质粒pCMV-VSVG和pCMV- Δ R 8.91共转染HEK-293T细胞,转染后24h更换新的含FBS高糖DMEM培养基,48h后收取培养上清即病毒原液,后加入新的含FBS高糖DMEM培养基,72h后最后一次收取病毒原液。病毒原液加入1/3体积的40%PEG6000溶液,24h后在4 $^{\circ}$ C、2000 \times g离心45min后,将沉淀以病毒原液的1/100体积溶解在X-Vivo15培养基中,取2.5 μ L进行病毒滴度检测。

1.5 CAR-T细胞的制备、培养和阳性率检测

用Ficoll密度梯度离心法从健康志愿者外周血中分离出PBMC,经X-Vivo15培养基重悬后,添加10%培养体积的血浆、终活性浓度为300 U/mL的IL-2。加入1/100培养体积的美天旌TransAct磁珠液激活T细胞,3d后内加入慢病毒(MOI=20),32 $^{\circ}$ C下300 \times g离心60min,进行离心感染。感染后第2天经离心去除有慢

病毒的培养基,加入含10%自体血浆和300 U/mL IL-2的新培养基继续培养,间隔1 d进行细胞计数后补液,使细胞密度维持在 $(1\sim 5)\times 10^6/\text{mL}$ 水平。加入慢病毒感染48 h后,每次换液时均取少量细胞进行阳性率检测。使用FITC标记人CD19和CD22蛋白,通过FCM检测CAR阳性率。

1.6 构建3M-CD19-Luc、3M-CD22-Luc和3M-CD19-CD22-Luc靶细胞

分别使用pLTR-CMV-CD19-Luc、pLTR-CMV-CD20-Luc与辅助质粒一起包装CD19和CD20慢病毒。以CD19和CD22阴性的3M细胞为基础,将CD19和CD20慢病毒分别转染3M细胞,分别进行流式分选,得到表达荧光素酶的3M-CD19-Luc、3M-CD22-Luc及3M-CD19-CD22-Luc细胞,作为CAR-T细胞的靶细胞。使用APC抗人CD19和CD22抗体分别检测靶细胞CD19和/或CD22表达率。

1.7 荧光素酶化学发光法检测CAR-T细胞对靶细胞的杀伤效率

靶细胞铺于96孔平底板,每孔 7×10^3 个靶细胞(悬液100 μL),在细胞培养箱中继续培养18 h。同一天取足量CAR-T细胞及对照T细胞分别转移到15 mL离心管,以500 $\times g$ 离心5 min、弃上清,用不添加IL-2只添加自体血浆的X-Vivo15培养基重悬细胞后,处理18 h。次日,以相同参数离心细胞,弃上清,加入只添加自体血浆的X-Vivo15培养基混匀后计数,同时进行靶细胞计数,然后以2.5:1、5:1、10:1梯度的效靶比,在96孔板中加效应细胞并补加T细胞培养基至100 μL ;每个效靶比设置6个复孔。共培养24 h后,取出96孔细胞培养板,每孔加入50 μL 2% Triton裂解液,反复吹匀,静置3~5 min,取50 μL 裂解液置于黑色96孔板中,加入50 μL 底物(300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ D-Luciferin水溶液与2 mg/mL ATP水溶液按照体积比为3:1混和)吹吸混匀。30 min后用酶标仪检测其化学发光值。以不加效应细胞作为杀伤靶细胞实验的空白对照,以T细胞对相应靶细胞的杀伤作用作为阴性对照,杀伤效率=[(空白对照荧光平均值-实验组荧光平均值)/空白对照荧光平均值] $\times 100\%$ 。相同效靶比的CAR-T细胞杀伤效率减去T细胞杀伤效率,即为CAR-T细胞的实际杀伤率。

1.8 ELISA法检测CAR-T细胞杀伤靶细胞时上清中IFN- γ 、TNF- α 和IL-2水平

收集体外杀伤实验的培养上清液,采用ELISA试剂盒检测CAR-T细胞分泌IFN- γ 、TNF- α 和IL-2因子的水平,严格按照说明书方法进行操作。

1.9 小鼠Raji-Luc细胞移植瘤模型的建立及CAR-T细胞体内杀伤实验

利用NOD-SCID免疫缺陷小鼠建立急性淋巴细胞白血病模型。将36只NOD-SCID小鼠,以随机表法随机分为4组,每组各9只并加上耳标。第0天(D0)尾静脉注射Raji-Luc细胞 4×10^6 /只,1周后(D7)气体麻醉并注射20 mg/mL的D-Luciferin进行活体成像,观测小鼠体内肿瘤细胞负荷情况;同天(D7)从4组小鼠尾静脉分别注射 2×10^6 个CAR-19-T、CAR-22-T、CAR-19-22-T细胞及对照T细胞各100 μL 。分别在D7、D10、D14、D17、D21、D28、D35、D42、D49使用IVIS Lumina小动物活体成像系统进行成像,观察表达荧光素酶的Raji-Luc细胞在小鼠体内的负荷以及分布情况,借以判断所用的4组细胞对于白血病治疗效果的差别。

1.10 统计学处理

荧光素化学发光实验和ELISA等实验均重复3次。实验数据均采用GraphPad Prism 8软件进行统计分析,符合正态分布的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较选用 t 检验方法,多组间比较选用单因素方差分析方法,以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功制备CD19和CD22双靶点CAR-T细胞

构建靶向CD19和CD22的双特异性CAR,前半部分为经典第二代CAR分子结构,为CD8先导区、CD19 ScFv、CD8铰链区和穿膜区、4-1BB胞内区和CD3 ζ 胞内区依次串联,后半部分为CD22 ScFv和CD3 ϵ ,中间以P2A相连(图1A)。同时分别设计针对CD19和CD22的单靶点二代CAR结构(图1B)。

FCM检测结果(图2)显示,感染T细胞3 d后,其中CAR-19-T细胞表达率为29.7%、CAR-22-T细胞表达率为31.1%,CAR-19-22-T细胞中CAR-19和CAR-22表达率分别为19.3%和17.3%(图2A);感染第7天时,细胞扩增约6~20倍,CAR-19-T细胞表达率为22.7%、CAR-22-T细胞表达率为23.6%,CAR-19-22-T细胞中CAR-19和CAR-22表达率分别为13.7%和14.3%(图2B)。

2.2 成功构建表达CD19、CD22的靶细胞

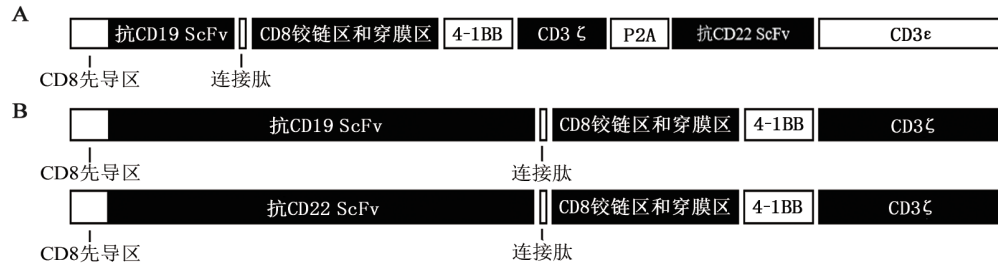
FCM检测结果(图3)显示,3M-CD19-Luc细胞CD19表达率为95.6%,3M-CD22-Luc细胞CD22表达率为95.7%,3M-CD19-CD22-Luc细胞的CD19和CD22表达率分别为97.7%和98.8%。

2.3 双靶点CAR-T细胞特异性杀伤CD19和/或CD22阳性肿瘤细胞

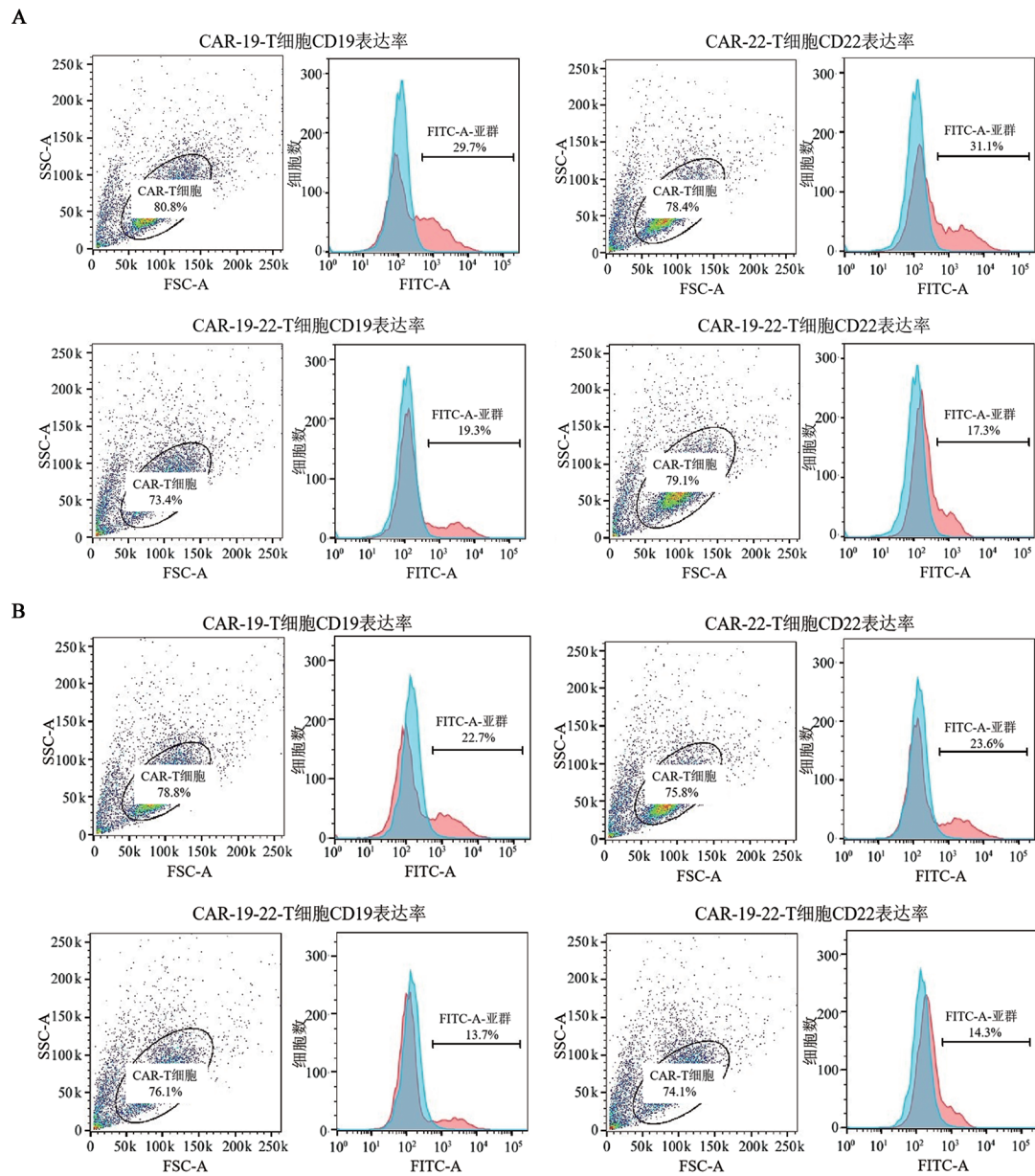
荧光素酶化学发光法检测结果(图4)显示,3例捐赠者(#1、#2、#3)的PBMC所制备的针对CD19和/或CD22 CAR-T细胞在2.5:1、5:1和10:1效靶比中均能有效杀伤3M-CD19-Luc、3M-CD22-Luc和

3M-CD19-CD22-Luc 细胞, 杀伤效果随效靶比的增加而增加, 其中, CAR-19-22-T 细胞在效靶比为 10:1 时对 3M-CD19-Luc、3M-CD22-Luc 和 3M-CD19-CD22-Luc 细胞的杀伤率均显著高于 T 细胞组 [(78.1±14.4)%

vs (11.1±4.3)%、(46.7±10.7)% vs (12.4±2.7)%、(90.5±4.3)% vs (14.3±3.7)%], 均 $P < 0.01$ 。结果表明, CAR-19-22-T 细胞能有效杀伤表达 CD19 和/或 CD22 的肿瘤细胞。



A: CAR-19-22 分子结构; B: CAR-19 和 CAR-22 分子结构
图 1 CAR 分子结构设计示意图



A: 感染后第 3 天 CAR 分子表达率; B: 感染后第 3 天 CAR 分子表达率
图 2 FCM 检测 CAR-T 细胞 CAR 分子的阳性表达率

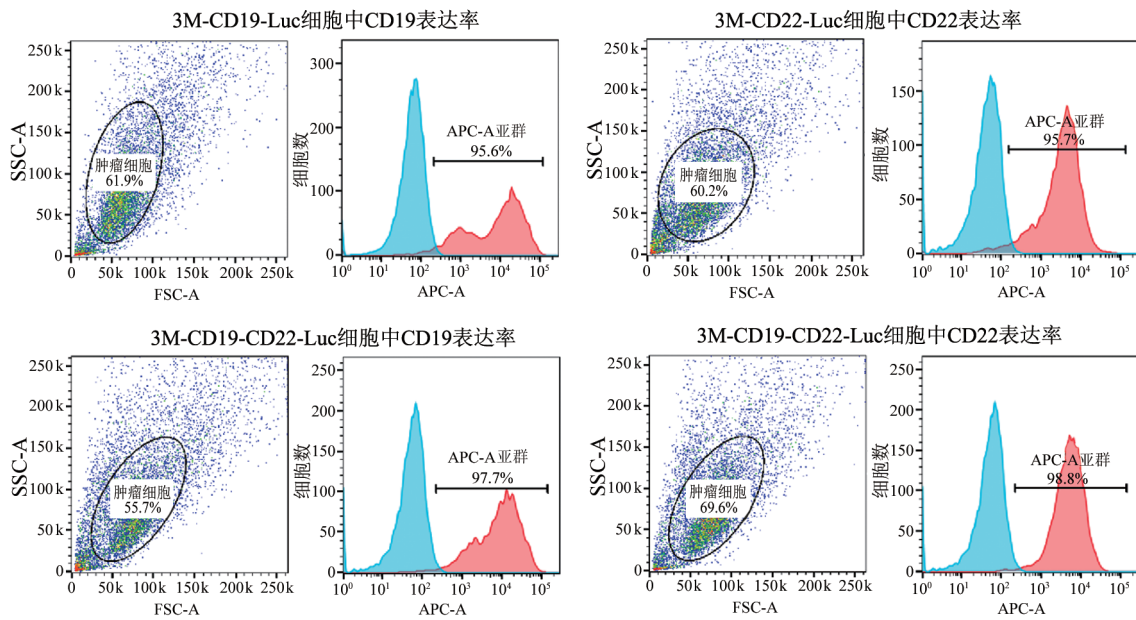


图3 成功构建分别表达CD19、CD22的靶细胞

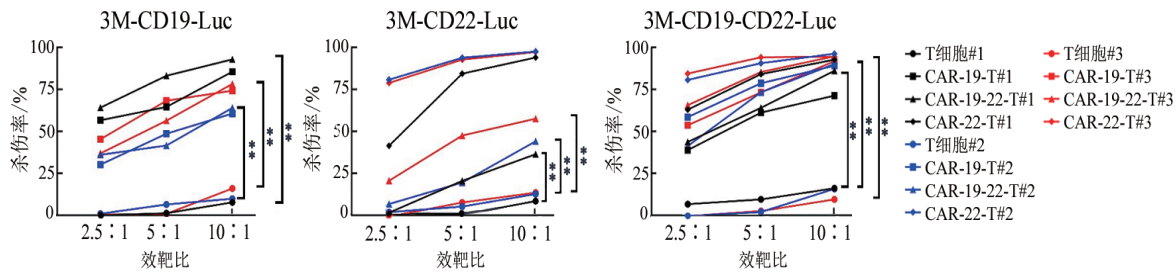


图4 CAR-19-22-T细胞对靶细胞的杀伤作用

2.4 双靶点CAR-T细胞分泌低水平的IFN- γ 、TNF- α 和IL-2

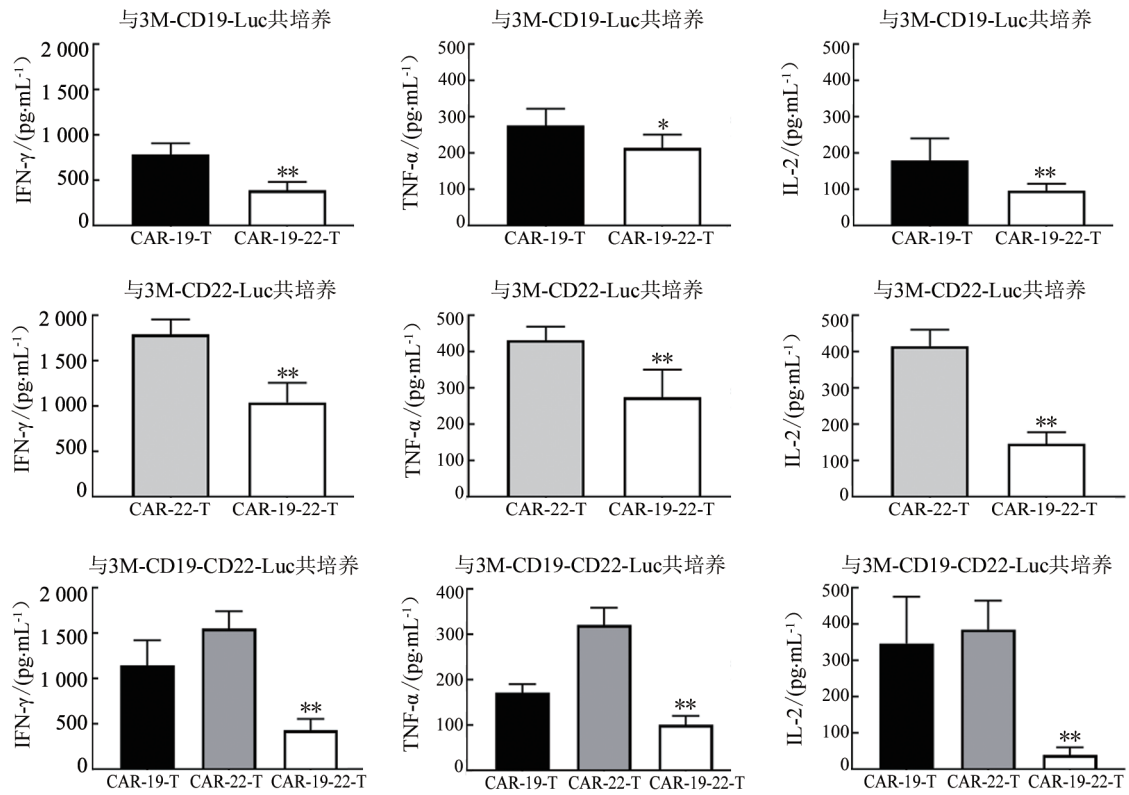
3例外周血捐赠者的PBMC所制备的针对CD19和/或CD22 CAR-T细胞与3M-CD19-CD22靶细胞共培养后,ELISA法检测结果(图5)显示,CD19和CD22双靶点CAR-T细胞可分泌一定量的IFN- γ 、TNF- α 和IL-2,它们作用于3M-CD19、3M-CD22、3M-CD19-CD22靶细胞发挥杀伤作用。

在杀伤3M-CD19-Luc靶细胞中,CAR-19-22-T细胞组细胞的IFN- γ 、TNF- α 和IL-2分泌量均显著低于单靶细胞组细胞($P<0.05$ 或 $P<0.01$);在杀伤3M-CD22-Luc靶细胞中,CAR-19-22-T细胞组细胞的IFN- γ 、TNF- α 和IL-2分泌量均显著低于单靶细胞组(均 $P<0.01$);在杀伤3M-CD19-CD22-Luc靶细胞中,CAR-19-22-T细胞组细胞的IFN- γ 、TNF- α 和IL-2分泌量均显著低于CAR-19-T组和CAR-22-T组(均 $P<0.01$)。结果表明,本研究设计的双靶点CAR-T细胞和传统的单靶点CAR-T细

胞相比,能分泌相对较少的炎症因子,仍可发挥杀伤作用,但提高了临床应用的安全性。

2.5 双靶点CAR-T细胞延长NOD-SCID急性淋巴细胞白血病模型小鼠的生存期

NOD-SCID小鼠注射稳定表达荧光素酶的Raji-Luc细胞进行白血病造模成功后,实验结果(图6)显示,在注射CAR-19-T、CAR-22-T和CAR-19-22-T细胞治疗的3组小鼠中,CAR-19-T组和CAR-22-T组较注射T细胞组具有一定的抑制肿瘤细胞体内生长的作用,CAR-19-22-T细胞组能有效抑制肿瘤细胞的体内生长,小动物成像系统中肿瘤细胞荧光值较低。同时CAR-19-22-T细胞治疗组荷瘤小鼠生存期显著长于T细胞组[(47.2 \pm 11.4) vs (27.2 \pm 3.7)d, $P<0.01$],与CAR-19-T组、CAR-22-T组荷瘤小鼠比较差异无统计学意义[(47.2 \pm 11.4) vs (34.8 \pm 11.9)、(37.8 \pm 13.6)d,均 $P>0.05$;图7)。实验结果表明,对比T细胞组,双靶点CAR-T细胞能够有效延长NOD-SCID急性淋巴细胞白血病模型小鼠的生存期。



与CAR-19-T或CAR-22-T组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图5 ELISA法检测各组效靶细胞共培养上清中IFN- γ 、TNF- α 和IL-2的含量

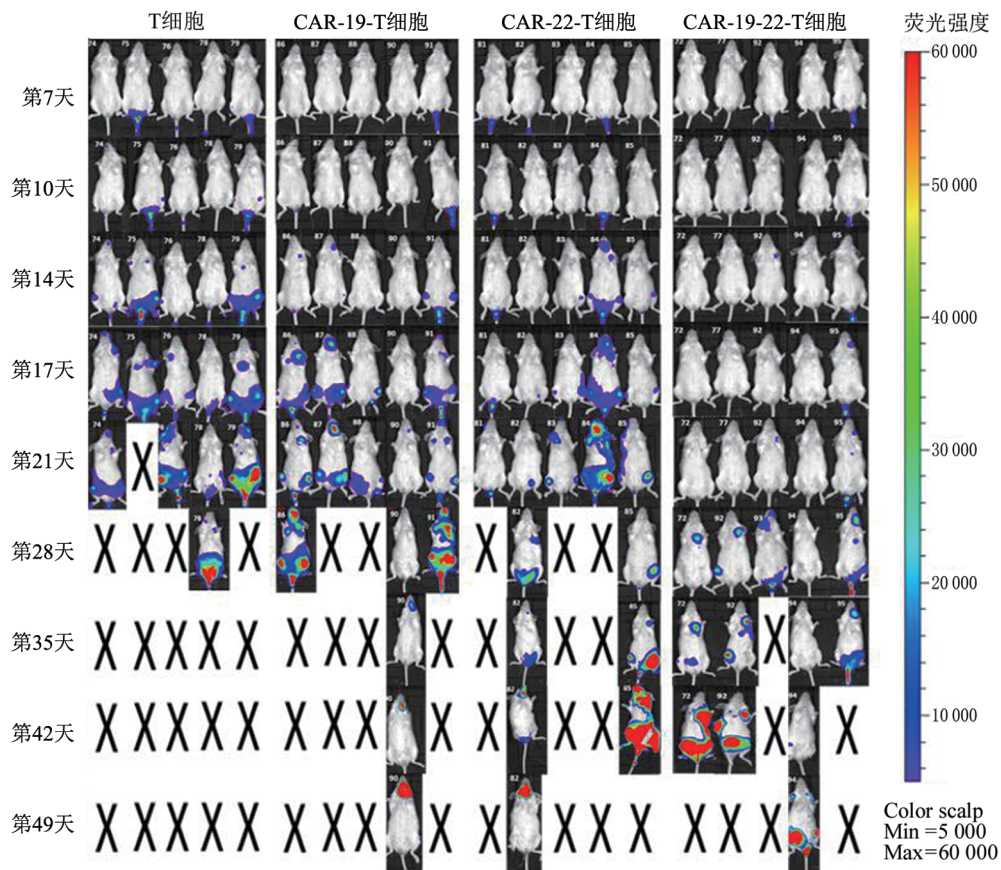


图6 各组NOD-SCID荷瘤模型小鼠在IVIS光谱活体成像系统成像图中的荧光素强度

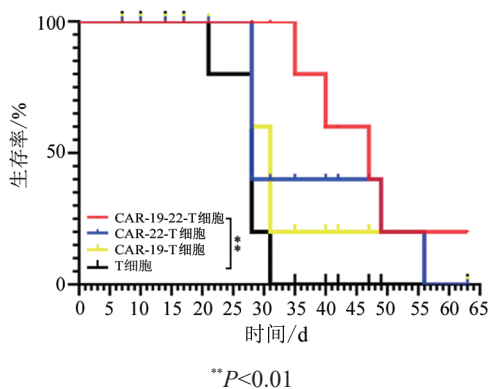


图7 各组NOD-SCID荷瘤小鼠的生存率曲线

3 讨论

近年来,针对CD19靶标的CAR-T细胞疗法在治疗B淋巴细胞肿瘤的临床试验中取得了令人瞩目的成就,但大部分患者仍会出现因CD19缺失而复发^[15]。一些研究结果^[16,19]表明,同时靶向两种或多种抗原能降低因单一靶点丢失而导致复发的可能性,因此非单一靶点的CAR-T细胞具有很大的研究意义。而CD22则是非常有潜力的新靶标之一,因为CD22仅在B细胞谱系中表达,并且在绝大多数B细胞恶性肿瘤中高表达,在临床试验中也已研究多种CD22定向疗法^[20-24]。因此,本研究探索性地设计了一种双靶CAR结构,可以分别靶向CD19和CD22两个不同表面抗原,针对CD19的部分为一个二代结构,针对CD22的部分在抗原结合结构域后以部分CD3 ϵ 链取代二代共刺激结构作为穿膜结构域和信号转导结构域。

本研究验证了CD19、CD22双靶点CAR-T细胞,即CAR-19-22-T细胞能够在体外显著地杀伤CD19阳性的3M-CD19-Luc细胞、CD22阳性的3M-CD22-Luc细胞,以及CD19和CD20双阳性的3M-CD19-CD22-Luc细胞;与单靶点CAR-T细胞相比较,双靶点CAR-T细胞具有更为显著的杀伤肿瘤细胞的能力。由于CD3 ϵ 的存在,本研究的双靶点CAR-T细胞可显著降低炎症因子如TNF- α 、IFN- γ 和IL-2的分泌水平。临床发生严重细胞因子风暴的原因,往往是伴随血液中TNF- α 、IFN- γ 和IL-2等因子水平的升高,虽然其他与细胞因子风暴相关的因子,如IL-1、IL-6、IL-10和GM-CSF等在本文并未展现,但相信本研究的CAR-19-22-T细胞具有提高临床治疗安全性的潜能。在表达荧光素酶的Raji-Luc B系淋巴瘤细胞小鼠白血病模型中,通过尾静脉回输CAR-19-22-T细胞,能够有效地抑制小鼠体内Raji-Luc细胞的增殖,较普通T细胞能显著延长荷瘤小鼠的生存期,证明该双靶点CAR-T细胞体内有效

的抗肿瘤能力。

本研究中的双靶点CAR-T细胞对比传统二代单靶点CAR-T细胞,虽然具有良好的体内外肿瘤杀伤能力及分泌低水平的炎症因子能力,且具备相对更低的脱靶风险。但由于肿瘤细胞异质性的存在,肿瘤细胞不能被完全清除,本研究的CAR-19-22-T细胞也不能避免一般CAR-T细胞的缺陷。且由于双靶点的引入,增加了慢病毒核心载体片段的长度,对蛋白的表达效率产生一定影响,导致双靶点CAR-T细胞的CAR分子表达率降低,从而增加了CAR-T细胞制作工艺的难度和生产成本的投入,这些劣势并不能忽视。

综上所述,本研究成功设计了一种靶向CD19和CD22的双特异性CAR,并成功获得了相应CAR-T细胞,通过体外肿瘤杀伤实验及小鼠体内抗肿瘤实验证明了该双靶点CAR-T细胞的安全性和有效性,证明对应的CAR-T细胞可以在有效治疗恶性肿瘤的同时防止免疫逃逸,为后期进一步的临床试验开展提供了数据支撑,具有非常重要的意义。

[参考文献]

- [1] NEELAPU S S, LOCKE F L, BARTLETT N L, *et al.* Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26): 2531-2544. DOI: 10.1056/NEJMoa1707447.
- [2] SCHUSTER S J, BISHOP M R, TAM C S, *et al.* Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(1): 45-56. DOI:10.1056/NEJMoa1804980.
- [3] SCHUSTER S J, SVOBODA J, CHONG E A, *et al.* Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26): 2545-2554. DOI:10.1056/NEJMoa1708566.
- [4] MAUDE S L, LAETSCH T W, BUECHNER J, *et al.* Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(5): 439-448. DOI:10.1056/NEJMoa1709866.
- [5] TRAN E, LONGO D L, URBA W J. A milestone for CAR T cells [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26): 2593-2596. DOI: 10.1056/NEJMe1714680.
- [6] LOCKE F L, GHOBADI A, JACOBSON C A, *et al.* Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial [J/OL]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(1): 31-42[2022-03-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6733402/>. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30864-7.
- [7] ABRAMSON J S, PALOMBA M L, GORDON L I, *et al.* Pivotal safety and efficacy results from transcend NHL 001, a multicenter phase 1 study of lisocabtagene maraleucel (liso-cel) in relapsed/refractory (R/R) large B cell lymphomas [J]. *Blood*, 2019, 134: 241. DOI:10.1182/blood-2019-127508.
- [8] SOTILLO E, BARRETT D M, BLACK K L, *et al.* Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy [J/OL]. *Cancer Discov*,

- 2015, 5(12): 1282-1295[2022-03-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4670800/>. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1020.
- [9] ORLANDO E J, HAN X, TRIBOULEY C, *et al.* Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia[J]. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1504-1506. DOI:10.1038/s41591-018-0146-z.
- [10] SHAH N N, FRY T J. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(6): 372-385. DOI: 10.1038/s41571-019-0184-6.
- [11] HAMIEH M, DOBRIN A, CABRIOLU A, *et al.* CAR T cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumour antigen escape [J/OL]. *Nature*, 2019, 568(7750): 112-116[2022-03-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6707377/>. DOI: 10.1038/s41586-019-1054-1.
- [12] SPIEGEL J Y, DAHIYA S, JAIN M D, *et al.* Outcomes in large B-cell lymphoma progressing after axicabtagene ciloleucel (Axi-cel): results from the U S Lymphoma CAR-T Consortium[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(15_suppl): 7517. DOI: 10.1200/jco.2019.37.15_suppl.7517.
- [13] NEELAPU S S, ROSSI J M, JACOBSON C A, *et al.* CD19-loss with preservation of other B cell lineage features in patients with large B cell lymphoma who relapsed post-axi-cel[J]. *Blood*, 2019, 134(Supplement_1): 203. DOI:10.1182/blood-2019-126218.
- [14] SHAH N N, MAATMAN T, HARI P, *et al.* Multi targeted CAR-T cell therapies for B-cell malignancies[J/OL]. *Front Oncol*, 2019, 9: 146 [2022-03-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6423158/>. DOI:10.3389/fonc.2019.00146.
- [15] MAJZNER R G, MACKALL C L. Tumor antigen escape from CAR T-cell therapy[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(10): 1219-1226. DOI:10.1158/2159-8290.CD-18-0442.
- [16] ZAH E, LIN M Y, SILVA-BENEDICT A, *et al.* ADDENDUM: T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells[J/OL]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(7): 639-641[2022-03-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4943870/>. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0108.
- [17] 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 immunotherapy[J/OL]. *Nat Med*, 2018, 24(1): 20-28[2022-03-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5774642/>. DOI: 10.1038/nm.4441.
- [18] WU W, ZHOU Q P, MASUBUCHI T, *et al.* Multiple signaling roles of CD3e and its application in CAR-T cell therapy[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 855-871.e23. DOI:10.1016/j.cell.2020.07.018.
- [19] QIN H Y, RAMAKRISHNA S, NGUYEN S, *et al.* Preclinical development of bivalent chimeric antigen receptors targeting both CD19 and CD22[J/OL]. *Mol Ther Oncolytics*, 2018, 11: 127-137 [2022-03-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30581986/>. DOI: 10.1016/j.omto.2018.10.006.
- [20] SINGH N, FREY N V, ENGELS B, *et al.* Antigen-independent activation enhances the efficacy of 4-1BB-costimulated CD22 CAR T cells[J/OL]. *Nat Med*, 2021, 27(5): 842-850[2022-03-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8451032/>. DOI: 10.1038/s41591-021-01326-5.
- [21] SHAH N N, HIGHFILL S L, SHALABI H, *et al.* CD4/CD8 T-cell selection affects chimeric antigen receptor (CAR) T-cell potency and toxicity: updated results from a phase I anti-CD22 CAR T-cell trial[J/OL]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(17): 1938-1950[2022-03-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7280047/>. DOI: 10.1200/JCO.19.03279.
- [22] CORDOBA S, ONUOHA S, THOMAS S, *et al.* CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in pediatric and young adult patients with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia: a phase 1 trial[J/OL]. *Nat Med*, 2021, 27(10): 1797-1805 [2022-03-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8516648/>. DOI:10.1038/s41591-021-01497-1.
- [23] TAN Y, CAI H D, LI C, *et al.* A novel full-human CD22-CAR T cell therapy with potent activity against CD22 low B-ALL[J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(4): 71. DOI:10.1038/s41408-021-00465-9.
- [24] OLEJNICZAK S H, STEWART C C, DONOHUE K, *et al.* A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry[J]. *Immunol Invest*, 2006, 35(1): 93-114. DOI:10.1080/08820130500496878.

[收稿日期] 2022-03-17

[修回日期] 2022-05-07

[本文编辑] 党瑞山