

网络出版时间:2022-08-30 11:40 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220829.1639.016.html

靶向 HER2 和 CLDN18.2 的并联嵌合抗原受体 T 细胞降低对胃癌的脱靶效应

孟涛,曾祥岳,金博

摘要 目的 探讨靶向闭合蛋白 18 亚型 2 (CLDN18.2) 和人类表皮生长因子受体 2 (HER2) 的双受体嵌合抗原受体 T (CAR-T) 细胞是否可以降低脱靶效应,并发挥抑制胃癌细胞生长的作用。方法 Western blot 和流式细胞术检测肿瘤细胞中 CLDN18.2 和 HER2 的表达情况;慢病毒感染法构建过表达 CLDN18.2 和 HER2 的肿瘤细胞系;慢病毒感染法构建 CAR-T 细胞;流式细胞术检测 CAR-T 细胞的阳性率和亚型分布;乳酸脱氢酶 (LDH) 法检测 CAR-T 细胞对靶细胞的细胞毒性;裸鼠移植瘤模型检测 CAR-T 细胞的体内抑瘤效率;免疫组化法检测肿瘤组织中 CD3⁺ T 细胞的浸润情况。结果 成功筛选得到高表达或不表达 CLDN18.2 和 HER2 的胃癌细胞系,并构建得到 CLDN18.2 和 HER2 单独表达或同时表达的胃癌细胞系;成功构建 CAR-T 细胞 Cz、Hbb 和 CHbbz;Cz 和 CHbbz 在体外对 CLDN18.2⁺ 和 CLDN18.2⁺ HER2⁺ 的肿瘤细胞系均具有特异性的剂量依赖的细胞毒性 ($P < 0.001$);在裸鼠移植瘤模型中,只有 CHbbz 可以对 CHAGS 的肿瘤细胞产生体内抑瘤活性及 T 细胞的肿瘤浸润 ($P < 0.01$),同时 CHbbz 只对 CLDN18.2⁺ HER2⁺ 的肿瘤细胞产生抑瘤活性及 T 细胞的肿瘤浸润 ($P < 0.01$)。结论 靶向 CLDN18.2 和 HER2 的双受体 CAR-T 细胞可以降低脱靶毒性发生的概率,并抑制胃癌的生长,是一种胃癌治疗的潜在方法。

关键词 胃癌;嵌合抗原受体;T 细胞;脱靶效应;免疫治疗

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1595-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.016

胃癌是世界上第五大常见癌症^[1-2]。目前,手术切除是胃癌根治的唯一方法^[3],迫切需要开发新的治疗手段以应对这一难题。基于嵌合抗原受体修饰的 T 细胞的免疫治疗已经被证明是一种很有前景的癌症治疗策略^[4-5]。由于在实体肿瘤中缺乏特

异性的肿瘤抗原,嵌合抗原受体 T (chimeric antigen-receptor T, CAR-T) 细胞有可能造成严重的脱靶效应^[6]。因此,发展限制潜在脱靶毒性的策略是必要的。研究人员利用“与”门逻辑,使得 CAR-T 细胞只有在同时识别两种肿瘤相关抗原时才可以被充分激活^[7]。该研究通过构建双嵌合抗原受体 T 细胞,分别靶向在胃癌中高表达的闭合蛋白 18 亚型 2 (claudin-18 isoform 2, CLDN18.2) 和人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2^[8-9]),探讨这种 CAR-T 细胞是否可以降低脱靶效应,并发挥抑制胃癌细胞生长的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 胃癌细胞系 AGS、MGC803 和 MKN45 购自中科院上海细胞库,细胞培养于含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养基中。

1.1.2 主要试剂 Ficoll-Paque 试剂购自北京索莱宝生物科技有限公司;CD3⁺ T 细胞分选磁珠购自德国美天旌生物科技有限公司;人 CD3/CD28 激活磁珠购自美国 Invitrogen 公司;Polybrene 购自美国 Sigma 公司;乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 细胞毒性检测试剂盒购自上海索莱宝生物科技有限公司;兔抗人 CD3 抗体、兔抗人 HER2 抗体和兔抗人 CLDN18.2 抗体购自美国 Proteintech 公司;FITC 标记的鼠抗人 HER2 抗体和 PE 标记的鼠抗人 CLDN18.2 抗体以及 FITC 标记的鼠抗人 CD4 抗体和 PE 标记的鼠抗人 CD8 抗体购自美国 ebioscience 公司;鼠抗人 GAPDH 抗体和羊抗兔、羊抗鼠二抗购自杭州联科生物科技有限公司;ECL 发光试剂盒购自上海翌圣生物科技有限公司;DAB 显色试剂和苏木精染色液购自武汉塞维尔生物科技有限公司;过表达 CLDN18.2 或 HER2 的慢病毒及过表达 Cz 或 Hbb 的慢病毒购自上海汉恒生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 流式细胞仪 (型号: FACSCanto II) 购自 Becton-Dickinson 公司;显微镜 (型号:

2022-06-10 接收

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金 (编号:2021D01C396、2017D01C385)

作者单位:新疆医科大学附属肿瘤医院胃肠外科一病区,乌鲁木齐 830011

作者简介:孟涛,男,硕士,副主任医师,责任作者, E-mail: gao1898183@163.com

BX53)购自奥林巴斯公司。

1.2 Western blot 检测 HER2 和 CLDN18.2 的表达 分别取 1×10^6 个 AGS、MGC803 和 MKN45 细胞,加入 300 μl 添加有蛋白酶抑制剂的 RIPA 试剂,冰上裂解 30 min,之后 12 000 r/min 离心取上清液,加入 5 $\times$ loading buffer 并煮沸变性,之后以每孔 30 μg 蛋白量进行上样,SDS-PAGE 电泳后,使用 200 mA 转膜条件转膜 90 min,将 PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h,加入鼠抗人 GAPDH 抗体(1:1 000)、兔抗人 HER2 抗体(1:2 000)和兔抗人 CLDN18.2 抗体(1:2 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日加入羊抗兔(1:10 000)、羊抗鼠(1:10 000)二抗,室温孵育 1 h,之后在曝光液孵育后进行曝光。

1.3 慢病毒感染法构建过表达 CLDN18.2 和 HER2 的 AGS 细胞系 在 6 孔板中接种 AGS 细胞系,每孔 3×10^5 个,次日待细胞汇合度达到 70% 时,分别加入 50 μl 过表达 CLDN18.2 或(和)HER2 的慢病毒,并加入终浓度为 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 polybrene,在培养箱中培养 12 h,更换新鲜的培养基,在感染 3 d 后加入 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 嘌呤霉素进行筛选培养,筛选 5 d 后即可得表达 CLDN18.2、过表达 HER2 以及同时过表达 CLDN18.2 和 HER2 的 AGS 细胞系,并分别命名为 C-AGS、H-AGS 及 CH-AGS。

1.4 慢病毒感染法构建 CAR-T 细胞 采集健康志愿者的 10 ml 外周血,采血流程经新疆医科大学附属肿瘤医院伦理委员会批准(审批号:20210375),且患者签署知情同意书。按照制造商的说明,使用 Ficoll-Paque 试剂利用密度梯度离心法获得外周血单核细胞,之后按照制造商的说明使用 $\text{CD}3^+$ T 细胞分选磁珠分离得到 $\text{CD}3^+$ T 细胞。取 3×10^6 个 T 细胞,加入 75 μl 人 $\text{CD}3/\text{CD}28$ 激活磁珠,培养 48 h 后,以 1×10^6 个 T 细胞为基准,分别加入 Cz 或(和)Hbb 过表达慢病毒,并加入终浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 polybrene,4 300 r/min 离心 60 min,静置培养 24 h 后更换新鲜的培养基。培养 3 d 后使用流式细胞术检测感染阳性率,CAR-T 细胞结构分别命名为 Cz、Hbb 和 CHbbz。

1.5 流式细胞术检测慢病毒感染效率和 T 细胞亚型的比例 分别取 6×10^5 个 C-AGS、H-AGS 及 CH-AGS 细胞,均分为 2 份,一份加入同型对照抗体,另一份加入 5 μl 的 FITC-HER2 和 PE-CLDN18.2 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,PBS 清洗 3 次后,使用流式细胞仪进行分析。

分别取 3×10^5 个 Cz、Hbb 和 CHbbz 细胞,PBS

清洗 3 次后,使用流式细胞仪检测细胞中 eGFP 和 mCherry 的表达情况。

分别取 3×10^5 个 Cz、Hbb 和 CHbbz 细胞,加入 5 μl 的 FITC-CD4 和 PE-CD8 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,PBS 清洗 3 次后,使用流式细胞仪进行检测。所有数据使用 Flowjo V10 进行分析。

1.6 LDH 法检测 CAR-T 细胞对靶细胞的细胞毒性 取 1×10^4 个 MGC803、MKN45、AGS、C-AGS、H-AGS 及 CH-AGS 细胞置于 96 孔板中,待细胞贴壁后,按照 1:3、1:1 及 3:1 的效靶比分别加入未感染的 T 细胞(Untransduced)、Cz、Hbb 和 CHbbz 细胞,共孵育 24 h,2 600 r/min 离心 10 min,吸取上清液,按照制造商的说明书使用 LDH 细胞毒性检测试剂盒检测上清液中 LDH 的含量。细胞毒性的计算公式为:细胞毒性(%)=(处理样品吸光度-样品对照孔吸光度)/(细胞最大酶活性的吸光度-样品对照孔吸光度) $\times 100\%$ 。

1.7 裸鼠移植瘤模型检测 CAR-T 细胞的体内抑瘤效果 6 周龄左右的裸鼠(20 g 左右)购自新疆医科大学实验动物中心,所有的动物实验均通过新疆医科大学附属肿瘤医院伦理委员会批准(审批号:20210397),动物饲养在 SPF 环境中,自由进食饮水。

取 5×10^6 个 CH-AGS 细胞重悬于 100 μl PBS 中,接种于裸鼠背部皮下,待肿瘤长至 80 mm^3 时,分别通过尾静脉回输 1×10^7 个 Untransduced、Cz、Hbb 和 CHbbz 细胞。

分别取 5×10^6 个 AGS、C-AGS、H-AGS 及 CH-AGS 细胞重悬于 100 μl PBS 中,接种于裸鼠背部皮下,待肿瘤长至 80 mm^3 时,分别通过尾静脉回输 1×10^7 个 CHbbz。回输后每 2 d 检测一次肿瘤体积,体积计算公式为:体积=瘤长(mm) $\times$ 瘤宽(mm) $^2/2$ 。待实验结束后,剖出肿瘤,进行称重。

1.8 免疫组化检测肿瘤组织中 $\text{CD}3^+$ T 细胞的含量 取 50 mg 新鲜的肿瘤组织,使用多聚甲醛固定液固定 48 h,之后经过脱水包埋,将组织切成 5 μm 的薄片,脱蜡复水后滴加 100 μl 兔抗人 CD3 抗体(1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日滴加 100 μl 羊抗兔二抗(1:1 000),室温孵育 1 h 后,使用 DAB 显色液进行显色,之后用苏木精染液复染,盖玻片封片后在显微镜下进行拍照观察。

1.9 统计学处理 所有实验数据采用 SPSS 19.0 进行统计学处理。计量数据采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间样本比较采用 One-way ANOVA 检

验,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌细胞中 CLDN18.2 和 HER2 的表达

Western blot(图 1A)以及流式细胞术(图 1B)检测结果表明,胃癌细胞系 MKN45 和 MGC803 高表达 CLDN18.2 和 HER2,然而 AGS 细胞系均不表达这两种蛋白。此外,利用流式细胞术检测慢病毒感染后的 AGS 细胞系,证明分别过表达 CLDN18.2 或 HER2 以及同时过表达 CLDN18.2 和 HER2 的 AGS 细胞系构建成功(图 1C)。

2.2 双受体 CAR-T 细胞的构建以及表型分析

两种嵌合抗原受体的结构见图 2A 所示。流式细胞术检测结果表明,Cz 的阳性率为 $(98 \pm 0.5)\%$,Hbb 的阳性率为 $(79 \pm 2.1)\%$,双受体的 CHbbz 的阳性率为 $(64 \pm 1.3)\%$ (图 2B)。同时检测了各类 CAR-T 细胞中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的比例,流式细胞术检测结果表明,各类 CAR-T 细胞中 CD8⁺ T 细胞占比超过 $(80 \pm 3.8)\%$,具备良好的肿瘤杀伤潜力(图 2C、2D)。

2.3 Cz 和 CHbbz 在体外特异性杀伤 CLDN18.2⁺ 及 CLDN18.2⁺ HER2⁺ 的肿瘤细胞 将不同的 CAR-T 细胞分别与不同种类的肿瘤细胞共孵育,细胞毒性实验结果表明,Cz 和 CHbbz 对于靶细胞为 CLDN18.2⁺ 的 C-AGS 及 CLDN18.2⁺ HER2⁺ 的 CH-AGS、MGC803 和 MKN45 均具有剂量依赖的杀伤活性,对于 CLDN18.2-HER2-的 AGS 及 CLDN18.2-HER2⁺ 的 H-AGS 则没有细胞毒性,而 Hbb 对各种靶细胞均无细胞毒性($F_{C-AGS 1:1} = 13.72$, $F_{C-AGS 3:1} = 21.83$, $F_{CH-AGS 1:1} = 10.91$, $F_{CH-AGS 3:1} = 30.37$, $F_{MGC803 1:1} = 15.57$, $F_{MGC803 3:1} = 22.71$, $F_{MKN45 1:1} = 10.22$, $F_{MKN45 3:1} = 19.52$, $P < 0.001$),见图 3。

2.4 CHbbz 可以有效抑制胃癌细胞 CH-AGS 的体内生长 在接种有 CH-AGS 的裸鼠移植瘤模型中,只有回输 CHbbz 的组别可以有效抑制胃癌细胞的生长,而回输 Cz 和 Hbb 均不能抑制肿瘤生长($F = 29.36$, $P < 0.01$; $F = 44.90$, $P < 0.01$),见图 4A、4B。免疫组化结果表明,回输 CHbbz 的肿瘤组织中 CD3⁺ T 细胞产生浸润,而回输 Cz 和 Hbb 的肿瘤组织中几乎没有 T 细胞浸润,见图 4C。

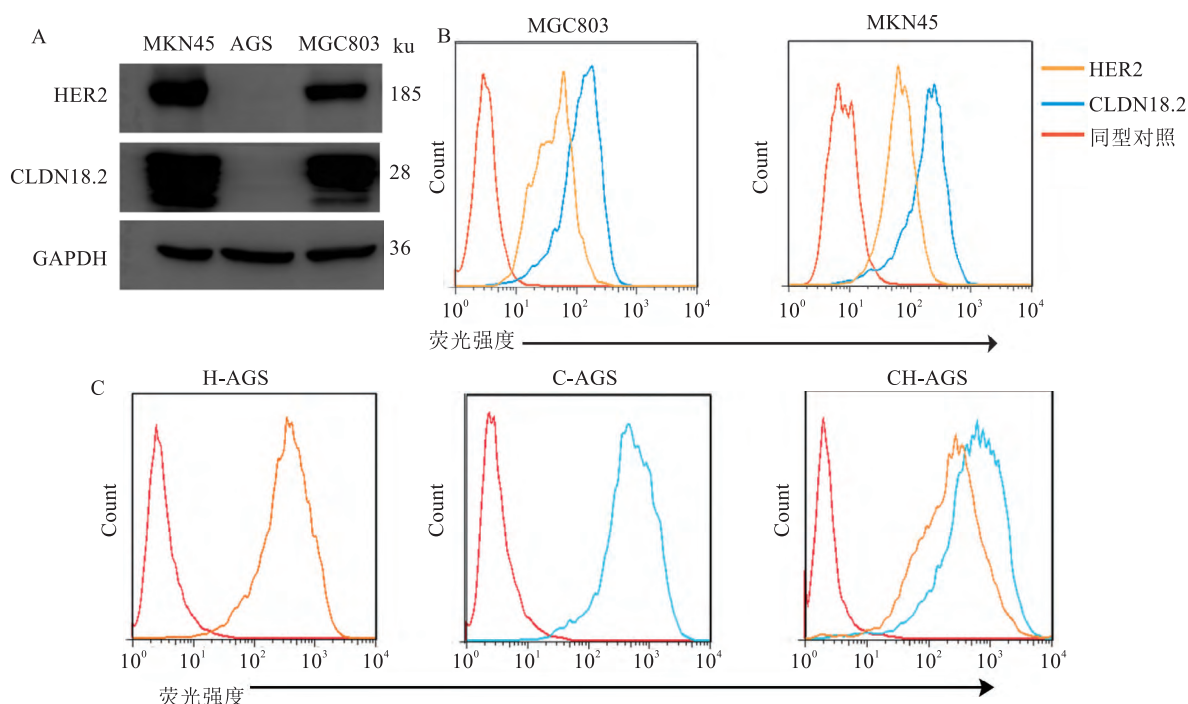


图 1 CLDN18.2 和 HER2 在胃癌细胞中的表达

A: Western blot 检测 MKN45、AGS 和 MGC803 中 CLDN18.2 和 HER2 的表达; B: 流式细胞术检测 MKN45 和 MGC803 中 CLDN18.2 和 HER2 的表达; C: 流式细胞术分析工程化的 AGS 中 CLDN18.2 和 HER2 的表达

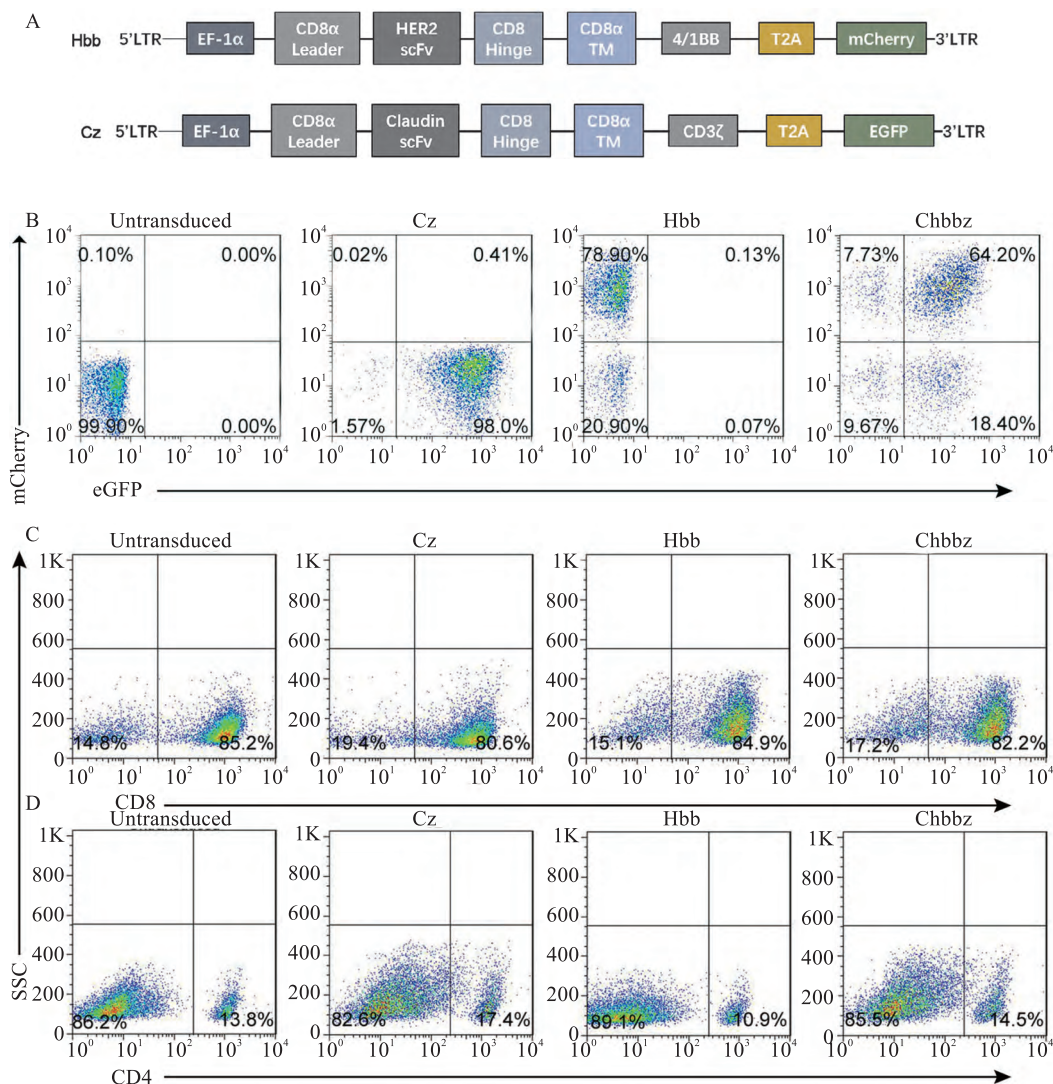


图2 不同工程化 T 细胞的性质

A: Cz 和 Hbb 的结构示意图; B: 流式细胞术检测 Cz、Hbb 和 Chbbz 的阳性率; C: 流式细胞术检测工程化 T 细胞中 CD8⁺ 的表型; D: 流式细胞术检测工程化 T 细胞中 CD4⁺ 的表型

2.5 CHbbz 仅对 CLDN18.2⁺HER2⁺ 的肿瘤生长产生抑制作用 分别建立接种 AGS、H-AGS、C-AGS 和 CH-AGS 的裸鼠移植瘤模型, 回输 CHbbz 后发现其仅对 CLDN18.2⁺HER2⁺ 的 CH-AGS 的肿瘤产生抑制活性, 而对其他三种肿瘤均不能抑制其生长 ($F = 55.09, P < 0.01; F = 19.38, P < 0.001$), 见图 5A、5B。免疫组化结果表明, 在接种 CH-AGS 的肿瘤组织中 T 细胞产生浸润, 而对于其他三种肿瘤组织中几乎没有 T 细胞浸润, 见图 5C。

3 讨论

嵌合抗原受体 T 细胞是一种很有前途的癌症治疗方法。然而, CAR-T 细胞可能会因正常组织表

达靶抗原而造成正常组织受损^[10]。有报道称, 在回输靶向 CAIX 的 CAR-T 细胞后, 由于胆管上皮表达 CAIX, 造成了严重的肝脏毒性。更严重的, 在靶向 ErbB2 的 CAR-T 细胞回输后, 已经观察到涉及患者死亡的严重不良事件^[11]。降低这种严重不良事件的一种方法是将 CAR 的胞内信号元件中的第一信号激活域和第二共刺激域物理隔离, 将它们置于两个不同的 CAR 中, 这些 CAR 针对两种不同的抗原, 因此, 这种靶向两个抗原的 CAR-T 细胞与靶向单一抗原的 CAR-T 细胞相比脱靶概率会低得多。

本研究使用了两种不同的 CAR, 分别靶向 CLDN18.2 和 HER2, 其中 CLDN18.2 负责调控 CD3ζ 信号, HER2 负责调控 4/1BB 信号。之所以选

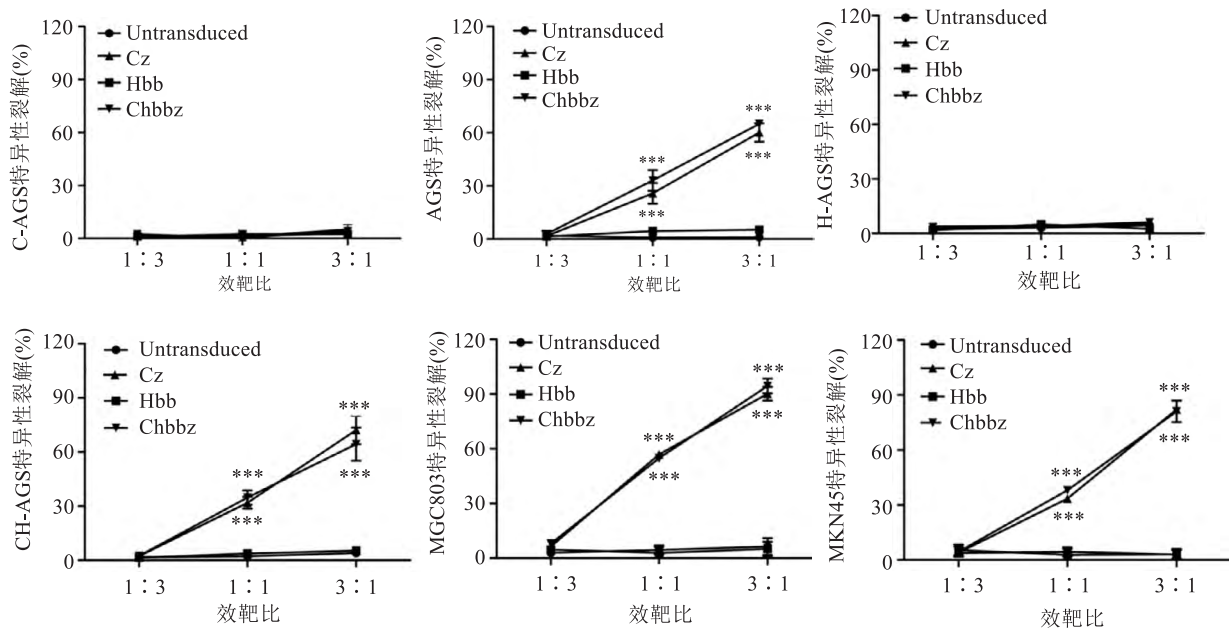


图3 CAR-T细胞在指定效靶比条件下对不同肿瘤细胞的细胞毒性
与 Untransduced 比较:*** $P < 0.001$

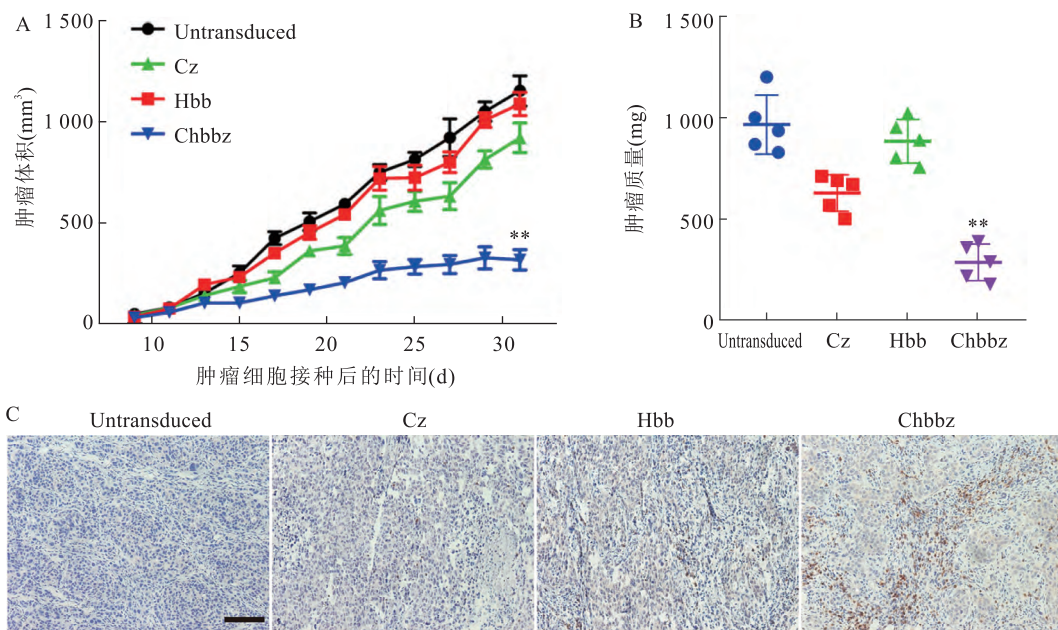


图4 CAR-T细胞对胃癌细胞的体内抗肿瘤活性

A: 治疗后 CH-AGS 肿瘤随时间的瘤体积变化; B: 治疗结束后 CH-AGS 肿瘤的肿瘤质量; C: 免疫组化法检测肿瘤组织中 CD3 的表达 SP $\times$ 100; 与 Untransduced 比较: ** $P < 0.01$

择这种组合策略,是由于 CLDN18.2 相较于 HER2,其在胃癌中的表达特异性更强^[8-9],因此作为第一信号域的控制因素,可以进一步增强肿瘤特异性。在体外实验中,当靶细胞只表达 CLDN18.2 或同时表达 CLDN18.2 和 HER2 时,Cz 和 Chbbz 都发挥剂量依赖的细胞毒作用,且二者之间并无差异。造成

这一结果的原因可能是在体外共孵育条件下,CAR-T 细胞和靶细胞直接接触,在较高的抗原密度下,CD3 ζ 信号足够强烈,已经可以发挥较强的肿瘤杀伤效应,使得在短期的刺激过程中,Cz 和 Chbbz 没能表现出差异。但在体内研究中,Chbbz 具有抗肿瘤活性,而Cz未能表现出足够的肿瘤抑制活性,这可

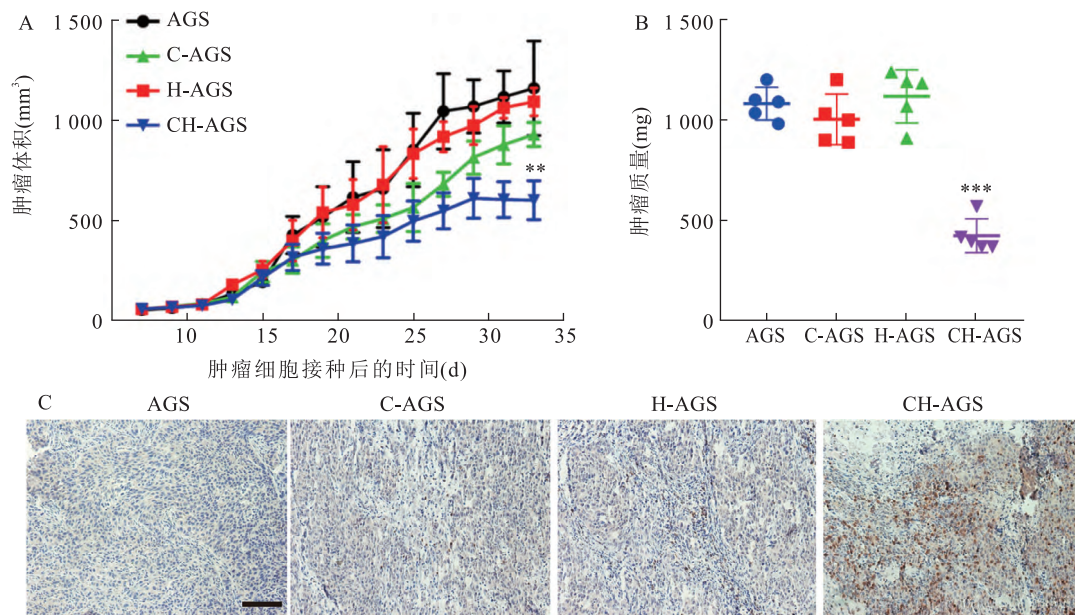


图5 CHbbz对CLDN18.2+HER2+肿瘤细胞具有肿瘤抑制活性

A: 治疗后各组肿瘤体积随时间的变化; B: 治疗结束后各组的肿瘤质量; C: 免疫组化法检测肿瘤组织中CD3的表达 SP×100; 与AGS比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

能是由于在体内研究中,没有共刺激信号的Cz不能有效扩增,因此不能有效抑制肿瘤生长。同样的,先前有研究^[12]表明,CAR-T细胞在体内的抗肿瘤效果和其在体内的扩增以及持续时间相关。除此之外,体内研究显示,CHbbz只有在肿瘤细胞同时表达CLDN18.2和HER2时才可以发挥肿瘤抑制活性,表明其发生脱靶的概率降低。

约50%的胃癌患者高表达HER2,是一个非常明确的胃癌靶标,已经有靶向HER2的ADC药物获FDA突破性药物资格,用于治疗胃癌^[13]。CLDN18.2是CLDN-18的胃特异性亚型。CLDN18.2特异性人鼠嵌合单克隆抗体IMAB362的临床数据显示,其对正常组织无毒性作用,且对胃癌患者的总体客观反应约为10%^[13]。这些数据表明,CLDN18.2是一个非常希望的治疗胃癌的靶点。因此,以CLDN18.2和HER2为靶点的双受体CAR-T细胞是一个非常理想的胃癌治疗组合。

双靶向CAR-T细胞的抗肿瘤能力较差,推测CAR-T细胞的双靶向结构不是简单地分离两个信号域。一些未知因素也可能影响最终的治疗效果。有研究^[14]表明,scFv的结构可能影响下游信号及其最终的抗肿瘤活性。因此后续仍需要继续优化双CAR的结构,如更换scFv,来提高CHbbz的肿瘤抑制能力。此外,由于目前还没有可以模拟人类CLDN18.2和HER2表达的转基因小鼠模型,CHbbz

的真实脱靶情形仍不能过早的下定论。本研究只能表明CLDN18.2和HER2特异性CAR-T细胞对单靶点组织的杀伤作用非常轻微,但真正的作用只能在未来的临床试验中得到证实。

总之,本研究表明靶向CLDN18.2和HER2的双受体CAR-T细胞可以降低脱靶毒性发生的概率,并抑制胃癌的生长,是一种胃癌治疗的潜在策略。

参考文献

- [1] Di Stadio A, D'Ascanio L, Latini G, et al. Metastatic signet ring cell gastric carcinoma bypassing Virchow's node: An unexpected etiology of a painful neck mass [J]. Clin Case Rep, 2021, 9 (2): 650-3.
- [2] 陈乐乐, 张开光, 叶超, 等. LETM1在胃癌中的表达及其与预后的相关性分析 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54 (9): 1430-4.
- [3] Mavroidis V K, Saffioti F. Parietal cell/oncocyctic/mitochondrion-rich gastric carcinoma: a need for clarity in terminology [J]. Pathology, 2021, 53 (2): 278-9.
- [4] Repellin C E, Ganesan P, Alcudia J F, et al. Engineered ovarian cancer cell lines for validation of CAR T cell function [J]. Adv Biosyst, 2020, 4 (1): e1900224.
- [5] Wang D, Prager B C, Gimple R C, et al. CRISPR screening of CAR T cells and cancer stem cells reveals critical dependencies for cell-based therapies [J]. Cancer Discov, 2021, 11 (5): 1192-211.
- [6] Qu J, Mei Q, Chen L, et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-T-cell therapy in non-small-cell lung cancer (NSCLC): Current sta-

- tus and future perspectives [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, 70 (3):619–31.
- [7] Liu M, Wang X, Li W, et al. Targeting PD-L1 in non-small cell lung cancer using CAR T cells [J]. *Oncogenesis*, 2020, 9 (8): 72.
- [8] 侯宝洲, 孙剑经, 赵秀芳, 等. 胃癌中 β -catenin, ki67 与 Her-2/Neu 的关系及临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49 (2):258–61.
- [9] Kim S R, Shin K, Park J M, et al. Clinical significance of CLDN18.2 expression in metastatic diffuse-type gastric cancer [J]. *J Gastric Cancer*, 2020, 20 (4):408–20.
- [10] Smith J B, Lanitis E, Dangaj D, et al. Tumor regression and delayed onset toxicity following B7-H4 CAR T cell therapy [J]. *Mol Ther*, 2016, 24 (11):1987–99.
- [11] Curran K J, Margossian S P, Kernan N A, et al. Toxicity and response after CD19-specific CAR T-cell therapy in pediatric/young adult relapsed/refractory B-ALL [J]. *Blood*, 2019, 134 (26): 2361–8.
- [12] Ma X, Yu X, Zhou Q. The IL1 β -HER2-CLDN18/CLDN4 axis mediates lung barrier damage in ARDS [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (4):3249–65.
- [13] Xu Y, Wang Y, Gong J, et al. Phase I study of the recombinant humanized anti-HER2 monoclonal antibody-MMAE conjugate RC48-ADC in patients with HER2-positive advanced solid tumors [J]. *Gastric Cancer*, 2021, 24 (4):913–25.
- [14] Tanaka A, Ishikawa S, Ushiku T, et al. Frequent CLDN18-ARHGAP fusion in highly metastatic diffuse-type gastric cancer with relatively early onset [J]. *Oncotarget*, 2018, 9 (50):29336–50.

Parallel CAR-T cells targeting HER2 and CLDN18.2 reduce the off target effect on gastric cancer

Meng Tao, Zeng Xiangyue, Jin Bo

(Dept of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011)

Abstract Objective To investigate whether dual-receptor chimeric antigen receptor T (CART) cells targeting claudin-18 isoform 2 (CLDN18.2) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) can reduce the off-target effect and inhibit the growth of gastric cancer cells. **Methods** Western blot and flow cytometry were used to detect the expression of CLDN18.2 and HER2 in tumor cells. Tumor cell lines overexpressing CLDN18.2 and HER2 were constructed by lentivirus infection. CART cells were constructed by lentivirus infection. Flow cytometry was used to detect the positive rate and subtype distribution of CART cells. Lactic dehydrogenase (LDH) assay was used to detect the cytotoxicity of CART cells against target tumor cells. The tumor suppressive efficiency of CART cells *in vivo* was measured using nude mouse xenograft model. Immunohistochemistry was used to detect the infiltration of CD3⁺ T cells in tumor tissues. **Results** Gastric cancer cell lines with high or no expression of CLDN18.2 and HER2 were successfully screened, and gastric cancer cell lines with single or simultaneous expression of CLDN18.2 and HER2 were constructed. CART cells Cz, Hbb and CHbbz were successfully constructed. Both Cz and CHbbz had specific dose-dependent cytotoxicity against CLDN18.2⁺ and CLDN18.2⁺HER2⁺ tumor cell lines *in vitro* ($P < 0.001$). In the nude mouse transplanted tumor model, only CHbbz could produce significant tumor suppressor activity and T cell tumor infiltration against CH-AGS tumor cells ($P < 0.001$), while only CHbbz could produce significant tumor suppressor activity and T cell tumor infiltration against CLDN18.2⁺HER2⁺ tumor cells ($P < 0.001$). **Conclusion** Dual receptor CART cells targeting CLDN18.2 and HER2 can reduce the probability of off-target toxicity and inhibit the growth of gastric cancer, which is a potential therapeutic strategy for gastric cancer. **Key words** gastric cancer; chimeric antigen receptor; T cells; off-target effect; immunotherapy