

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.04.002

· 基础研究 ·

局部分泌 IL-2 的 CD19 CAR-T 细胞构建与功能

王文娟¹, 陈静², 胡周¹, 刘秀盈¹, 王建勋^{1,3} (1. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102400; 2. 三峡大学健康医学院 中医系, 湖北 宜昌 443002; 3. 深圳北京中医药大学研究院, 广东 深圳 518118)

[摘要] **目的:** 探讨基于新型单载体 SynNotch 系统构建的局部分泌 IL-2 的 CAR-T 细胞 (Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞) 对传统 CD19 CAR-T 细胞功能的影响。**方法:** 基于本课题组前期构建的单载体 SynNotch 系统, 将 CD19 特异性 FMC63 抗体与 IL-2 表达模块整合, 通过自失活逆转录病毒载体转导 T 细胞制备 Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞。诱导验证实验分为 Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞组和未转导 T 细胞组, 通过 ELISA 检测抗原刺激后 IL-2 分泌水平。采用 CFSE 染色法检测在 Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞存在时, CD19 CAR-T 细胞与肿瘤 Raji-Luc 或 SW620-CD19-Luc 细胞共培养时, IL-2 的分泌对 CD19 CAR-T 细胞增殖的影响。流式细胞术检测 CD69 表达, 观察在 Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞分泌 IL-2 的情况下, CD19 CAR-T 细胞与 Raji-Luc 细胞共培养时的激活情况。**结果:** 成功构建自失活逆转录病毒载体 Syn.CD19.IL-2 CAR, 制备出 Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞, 病毒滴度 $> 1 \times 10^7$ 拷贝/mL, 转导效率达 37.1%。抗原刺激后, SynNotch CAR-T 细胞 IL-2 分泌量显著高于未转导 T 细胞 ($P < 0.001$)。在 Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞分泌 IL-2 时, CD19 CAR-T 细胞具有更强的增殖能力和更高的活化水平 (均 $P < 0.001$)。**结论:** 成功构建的 Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞能显著增强 CD19 CAR-T 细胞的增殖和活化能力。

[关键词] SynNotch 系统; CAR-T 细胞; IL-2; CD19

[中图分类号] R730.5; R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)04-0356-08

Construction and functional study of CD19 CAR-T cells that secrete IL-2 locally

WANG Wenjuan¹, CHEN Jing², HU Zhou¹, LIU Xiuying¹, WANG Jianxun^{1,3} (1. School of Life Sciences, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102400, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, School of Health Medicine, Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China; 3. Shenzhen Institute of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518118, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the impact of locally IL-2-secreting CAR-T cells (Syn.CD19.IL-2 CAR-T cells) constructed using a novel single-vector SynNotch system on the function of conventional CD19 CAR-T cells. **Methods:** Building upon our previously established single-vector SynNotch system, the CD19-specific FMC63 antibody was integrated with an IL-2 expression module to prepare Syn.CD19.IL-2 CAR-T cells through T cell transduction using a self-inactivating retroviral vector. For validation experiments, cells were divided into the Syn.CD19.IL-2 CAR-T cell group and the untransduced T cells group. ELISA was used to detect IL-2 secretion levels after antigen stimulation. The CFSE staining assay was implemented to evaluate the effects of IL-2 secretion on the proliferation of CD19 CAR-T cells when CD19 CAR-T cells were co-cultured with Raji-Luc or SW620-CD19-Luc cells in the presence of Syn.CD19.IL-2 CAR-T cells. Flow cytometry was employed to detect CD69 expression and monitor the activation status of CD19 CAR-T cells when co-cultured with Raji-Luc cells in the condition of Syn.CD19.IL-2 CAR-T cells secreting IL-2. **Results:** The self-inactivating retroviral vector Syn.CD19.IL-2 CAR were successfully constructed and Syn.CD19.IL-2 CAR-T cells with a viral titer $> 1 \times 10^7$ copies/mL and transduction efficiency of 37.1% were generated. After antigen stimulation, SynNotch CAR-T cells demonstrated significantly elevated IL-2 secretion compared with the untransduced T cell group ($P < 0.001$). When Syn.CD19.IL-2 CAR-T cells secreted IL-2, the CD19 CAR-T cells exhibited enhanced proliferative capacity and elevated activation level (all $P < 0.001$). **Conclusion:** Successfully constructed Syn.CD19.IL-2 CAR-T cells can significantly enhance the proliferative capacity and activation ability of conventional CD19 CAR-T cells.

[Key words] SynNotch system; CAR-T cell; IL-2; CD19

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(4): 356-363. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.04.002]

[基金项目] 王建勋高层次人才科研启动经费 (No. 90011451310032)

[作者简介] 王文娟 (2000—), 女, 硕士生, 主要从事 CAR-T 细胞的研究

[通信作者] 王建勋 (扫码获取作者联系方式)



通过基因工程表达嵌合抗原受体基因修饰 T 淋巴细胞 (CAR-T 细胞) 疗法, 是目前被批准用于治疗血液系统恶性肿瘤的前沿过继性细胞免疫疗法之一^[1]。IL-2 是一种由抗原刺激诱导的 T 细胞生长因子, 在 T 细胞活化与扩增中起关键作用。然而, 全身给予 IL-2 已被证明毒性过高^[2-3]。研究^[4-5]表明, 局部使用高浓度炎性细胞因子, 能够有效改善肿瘤免疫抑制微环境, 从而显著提升 CAR-T 细胞疗法的疗效。合成 Notch (synthetic Notch, SynNotch) 受体由可变的胞外识别结构域、基于 Notch 的可切割穿膜结构域, 以及胞内转录结构域组成。胞外识别结构域识别肿瘤抗原, 诱导穿膜切割, 从而实现特异性抗原输入和输出的编程控制^[6-9]。然而, SynNotch 系统由双载体系统组成, 需两种病毒转导靶细胞, 制备困难, 极大地限制了 SynNotch 系统在临床应用中的推广。因此, 本课题组将 SynNotch 系统的诱导元件和效应元件设计合并到一个自失活逆转录病毒载体中, 解决了 SynNotch 系统应用的局限性。通过构建靶向 CD19 的 SynNotch 受体诱导局部分泌 IL-2 的 CAR-T 细胞 (Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞), 旨在探索单载体 SynNotch 系统在肿瘤部位选择性分泌 IL-2 并增强 CD19 CAR-T 细胞抗肿瘤活性的可能性。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

包装细胞 Pheonix-Ampho (Ampho 细胞) 购自美国 ATCC 细胞库; Raji-Luc 细胞 (表达抗原 CD19 和萤光素酶) 来源于人伯基特淋巴瘤 (Burkitt lymphoma) 细胞, 由北京维通达生物技术有限公司提供; SW620-CD19-Luc 细胞 (表达抗原 CD19 和萤光素酶) 来源于人结肠直肠癌细胞, 由本实验室基于 SW620 细胞构建; RPMI-Luc 细胞 (表达萤光素酶) 来源于人多发性骨髓瘤细胞, 购自美国 ATCC 细胞库。

PB 转座子质粒和 PB 转座酶质粒由中国农业大学吴森教授课题组相赠, AIM-V 培养基、RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、青链霉素和磷酸缓冲液 (PBS) 购自美国 Gibco 公司, FuGene HD 转染试剂购自美国 Promega 公司, 淋巴细胞分离液、DNA Assembly Mix Plus 无缝克隆盒、盐酸嘌呤霉素试剂购自北京兰博利德生物技术有限公司, IL-2、CD3 单克隆抗体 (OKT-3) 购自北京义翘神州科技股份有限公司, DH5 α 感受态、质粒提取试剂盒、细胞总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, SYBR Green qPCR 试剂盒、胶回收试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 逆转录试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司, Human IL-2 ELISA

Kit 试剂盒购自 Proteintech, APC-anti-Myc、CD3-PE、APC-Cy7-CD69、APC-CD19 等抗体均购自美国 Biolegend 公司。

1.2 基于 SynNotch 系统的 CD19 靶向分泌 IL-2 的 CAR 分子及载体构建

本实验所制备的 Syn.CD19.IL-2 质粒, 以本课题组前期构建的单载体 SynNotch 系统为基础, 在启动子 SFFV 后面插入 CD19-GAL4VP64 和 UAS-IL-2 目的基因。以实验室前期构建的 Syn-CAR187 作为模板, 基因合成质粒 pUC-IL-2-GW-Amp (human)。设计同源臂引物, 通过 PCR 扩增获得目的片段和载体片段, 采用无缝克隆法将目的片段与载体片段相连接。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞后立即涂板, 挑取单克隆菌液, 菌液经 PCR 鉴定正确后送至测序公司测序。将测序正确的质粒载体命名为 Syn.CD19.IL-2。

1.3 Syn.CD19.IL-2 稳定产毒细胞的构建

将 Amphi 细胞接种于 6 孔板, 培养过夜。转染前配制转染复合物, 6 孔板每孔转染 3.3 μ g 质粒, 质粒 Syn.CD19.IL-2 与转座酶质粒 PB 的转染比例为 1:1, 加入转染质粒 3 倍体积的转染试剂 FuGene HD, 将转染复合物均匀地加入已换液的细胞中。24 h 换液, 48 h 后取一部分细胞进行流式细胞术检测确定转染效率, 剩余细胞继续培养, 加入嘌呤霉素药筛 10 d 左右至细胞稳定且高表达科普绿荧光蛋白 (Cop-GFP) 时。采用极限稀释法将细胞铺于 96 孔板中, 借助荧光显微镜挑出高表达 Cop-GFP 的单个细胞并扩大培养。

1.4 qPCR 法检测单克隆细胞中 CD19-scFv mRNA 的表达水平

挑选一株 CD19-scFv 表达较高的细胞作为产毒细胞。每株单克隆细胞分别取 5×10^5 个活细胞, 使用 RNA 提取试剂盒按说明书进行操作以提取 RNA, 再逆转录为 cDNA, 使用 SYBR Green 试剂盒采用两步法进行 qPCR 实验。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共循环 40 次。CD19-scFv 上游引物序列为 ACCTATTTCTGCCAGCAGGG, 下游引物序列为 CCACTTCCTCCTCCTCCAGA; GAPDH 上游引物序列为 CATGTTCCCTCATGGGTGTGAACCA, 下游引物序列为 ATGGCATGGACTCTGGTCATG。以 GAPDH 为内参基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 CD19-scFv mRNA 的相对表达量。

1.5 qPCR 法检测自失活逆转录病毒拷贝数

收集经筛选得到的单克隆产毒细胞的病毒载体, 按照病毒 RNA 提取试剂盒说明书操作, 提取病毒载体上清液中 RNA。使用逆转录试剂盒将提取到的

RNA逆转录为cDNA。随后,采用SYBR Green试剂盒采用两步法进行qPCR实验。反应条件:95 °C预变性2 min;95 °C变性5 s,60 °C退火和延伸30 s,共循环40次。引物序列:上游引物为ACCTATTTCTGCCAGCAGGG,下游引物为CCACTTCCTCCTCCTCCAGA。利用 $10^3\sim 10^8$ 拷贝数Syn.CD19.IL-2质粒作出标准曲线,将样品Ct值代入标准曲线得出自失活逆转录病毒载体拷贝数。

1.6 CAR-T细胞的制备及鉴定

T细胞在含有IL-2(100 U/mL)和OKT-3(100 ng/mL)的培养基中激活扩增48 h。提前一天使用浓度为10 μg/mL RetroNectin 稀释液包被24孔未组织处理细胞培养板,4 °C避光培养24 h,回收RetroNectin后,每孔使用PBS室温避光清洗2遍,吸弃上清液,每孔加入1 mL逆转录病毒,32 °C、 $1\ 335\times g$ 离心1 h。将培养48 h后的T细胞(10% FBS、100 U/mL IL-2的AIMV培养基)按 5×10^5 个/孔重悬于1 mL的逆转录病毒中,接种到上步离心结束后的24孔板中,32 °C、 $1\ 335\times g$ 离心1 h,培养2 h后更换新鲜T细胞培养基培养。转导48 h后,使用CD3-PE抗体(稀释比例1:25)、APC anti-Myc抗体(稀释比例1:25)染色,以未转导的T细胞作为对照,通过流式细胞术检测其达情况,其PE、APC双阳性率即为CAR-T细胞转导效率。

1.7 流式细胞术检测肿瘤细胞CD19抗原的表达水平

分别取 1×10^6 个Raji-Luc、SW620-CD19-Luc和RPMI-Luc细胞,室温下 $300\times g$ 离心5 min,弃上清液。用含2%胎牛血清的48 μL PBS重悬细胞,加入2 μL APC-CD19抗体(稀释比例1:25),室温避光染色30 min。PBS洗涤2次,200 μL PBS重悬后,采用流式细胞仪检测肿瘤细胞CD19抗原的表达水平。

1.8 ELISA检测Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞与肿瘤细胞共培养上清液中IL-2水平

将Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞或未转导T细胞与密度为 4×10^4 个/100 μL的CD19阳性Raji-Luc和SW620-CD19-Luc细胞或CD19阴性RPMI Luc细胞按照1:1的效靶比在96孔板中共培养,分为未转导T细胞组和Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞组。培养24 h后,收集共培养细胞上清液, $300\times g$ 离心5 min后取上清液,使用ELISA试剂盒检测CAR-T细胞分泌的IL-2。用Raji-Luc细胞刺激Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞,在不同时间点收集培养细胞上清液, $300\times g$ 离心5 min后取上清液,用ELISA试剂盒检测不同时间点IL-2分泌水平。

1.9 CFSE染色法检测Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞对CD19 CAR-T细胞增殖的影响

实验分为未转导T细胞组、CD19 CAR-T细胞

组、Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞上清液处理CD19 CAR-T细胞(CD19.IL-2 CAR-T细胞+Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞)组。准备密度为 1×10^6 个/mL CD19阳性Raji-Luc和SW620-CD19-Luc细胞,将Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞与之按照1:1的效靶比共培养24 h后,收集细胞上清液。针对上述3个实验组,分别以收集所得细胞上清液或者AIMV培养基,按照实验分组要求,对Raji-Luc和SW620-CD19-Luc这两种靶细胞进行稀释操作,使其密度达到 4×10^5 个/mL,各取100 μL接种于96孔板内。同时,采用CFSE(用无血清AIM-V培养基稀释成5 μmol/mL),37 °C避光染色CD19 CAR-T和T细胞30 min,用相应的细胞上清液调整细胞密度为 4×10^5 个/mL,取100 μL加入靶细胞中,即效靶比为1:1。共培养24 h后,以CD3-PE染色标记T细胞,以单独培养的T细胞为对照(AIM-V完全培养基稀释)。通过CFSE信号[平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)]强弱比较Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞上清液对CD19 CAR-T细胞增殖的影响,增殖能力越强CFSE信号越弱(左移越明显)。

1.10 CD69检测Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞对CD19 CAR-T细胞早期活化的影响

铺板方法与1.9相同。实验分为3组,分别为未转导T细胞组、CD19 CAR-T细胞组、CD19 CAR-T细胞+Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞组,分别与肿瘤Raji-Luc细胞共培养12 h或不加肿瘤细胞单独培养12 h,收集细胞用PE anti-human CD3抗体、APC CD69抗体进行染色30 min。流式细胞仪检测细胞表面CD69的表达水平。

1.11 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。采用GraphPad Prism 8软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,两组间数据比较采用t检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建Syn.CD19.IL-2质粒

基于单载体SynNotch系统,通过CD19抗原诱导表达IL-2,成功构建Syn.CD19.IL-2质粒(图1)。采用无缝克隆技术构建Syn.CD19.IL-2质粒,经PCR法鉴定及序列测定,构建所得的质粒Syn.CD19.IL-2序列与预期的序列完全一致,表明质粒构建成功。

2.2 成功构建稳定产毒的包装细胞

Syn.CD19.IL-2质粒通过包装细胞Ampho包装以生产自失活逆转录病毒载体,在转染48 h后,进行

10 d的嘌呤霉素药筛, 从而获得稳定转染细胞。采用有限稀释法在荧光显微镜下筛选出多株高表达绿色荧光的包装细胞并扩大培养。流式细胞术验证单克隆包装细胞 Cop-GFP 标签的表达情况, qPCR 法检测单克隆包装细胞 CD19-scFv mRNA 的相对表达量, 最终选择 17 号单克隆细胞作为产毒细胞, 其 Cop-

GFP 表达率为 98.8% (图 2A、B、C)。qPCR 法检测病毒物理滴度, 结果 (图 2D) 显示, 生产的 Syn.CD19.IL-2 逆转录病毒载体大于 1×10^7 拷贝数/mL, 符合转导 T 细胞的逆转录病毒载体拷贝数要求, 可以进行后续实验。

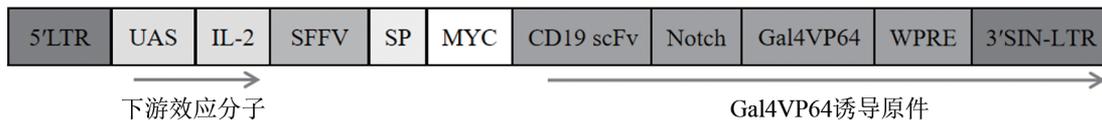
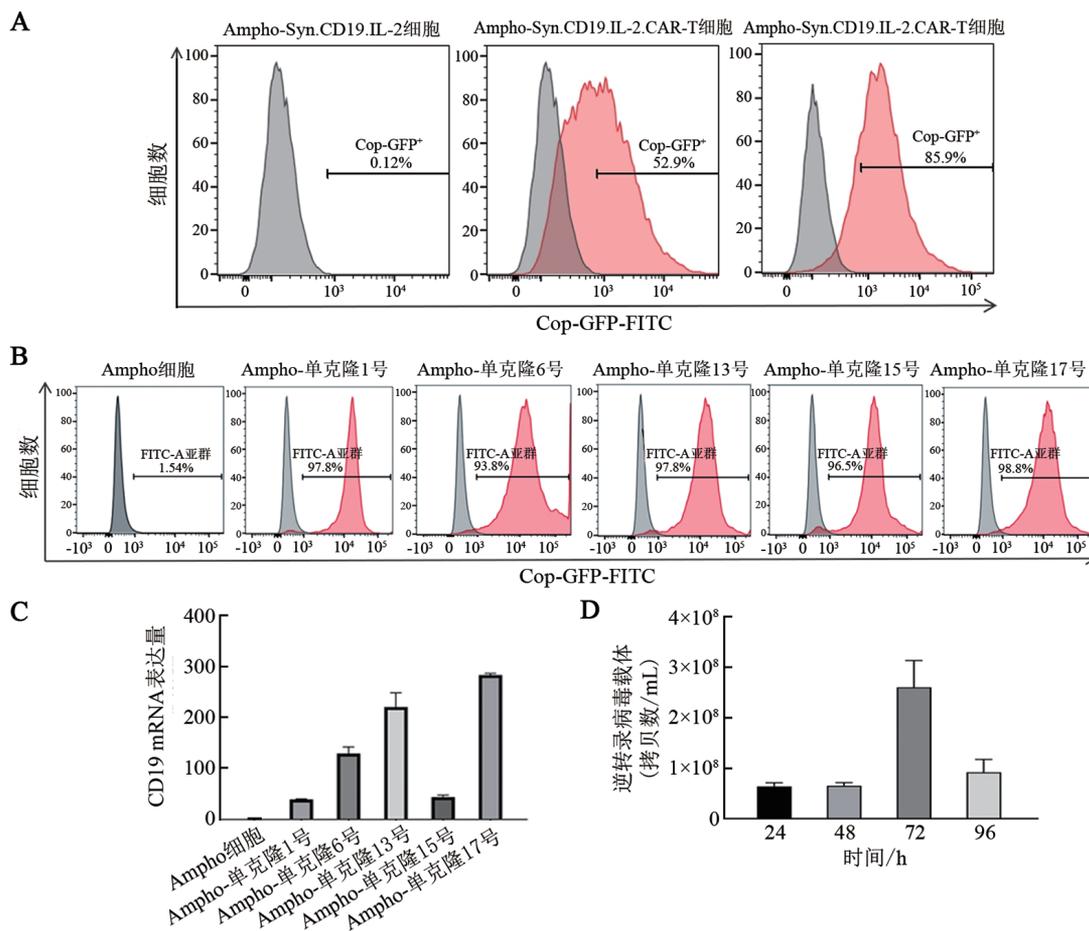


图1 Syn.CD19.IL-2 质粒分子的结构示意图



A、B: 流式细胞术检测转染第 2、10 天 Cop-GFP 表达率 (A) 和单克隆细胞 Cop-GFP 表达率 (B); C、D: qPCR 法检测单克隆细胞 CD19-scFv mRNA 表达水平 (C) 及病毒滴度拷贝数 (D)。

图2 构建稳定产毒的单克隆细胞

2.3 成功制备 Syn.CD19.IL-2 CAR-T 与 CD19 CAR-T 细胞

将收获的 Syn.CD19.IL-2 自失活逆转录病毒转导人原代 T 细胞。流式细胞术检测结果 (图 3) 显示, Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞转导效率为 37.1%。CD19 CAR-T 细胞是采用课题组前期制备的逆转录病毒 anti CD19-CAR 转导人原代 T 细胞获得, 其转导

效率为 76.9% (图 3)。结果表明, 已成功构建 Syn.CD19.IL-2 CAR-T 和 CD19 CAR-T 细胞, 可以进行后续实验。

2.4 Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞定向诱导 IL-2 表达

流式细胞术检测结果 (图 4A) 显示, Raji-Luc 及 SW620-CD19-Luc 细胞均可以作为 Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞的靶细胞。ELISA 检测结果 (图 4B) 显

示,在未与肿瘤细胞共培养时,与未转导T细胞相比, Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞上清液中检测出低含量的IL-2,表明Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞会低量自表达IL-2。当Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞与CD19阳性的Raji-Luc和SW620-CD19-Luc细胞共培养时,选择性地高表达IL-2,以响应CD19阳性的肿瘤细胞,IL-2表达量显著高于RPMI-Luc细胞组(均 $P < 0.001$)。在

Raji-Luc细胞的持续刺激下,随着共培养时间的延长, Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞分泌的IL-2量不断增加,IL-2在24 h达到稳态表达(图4C, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。结果表明,本实验成功构建了局部分泌IL-2的CD19 CAR-T细胞,该细胞能够在肿瘤部位局部表达IL-2。

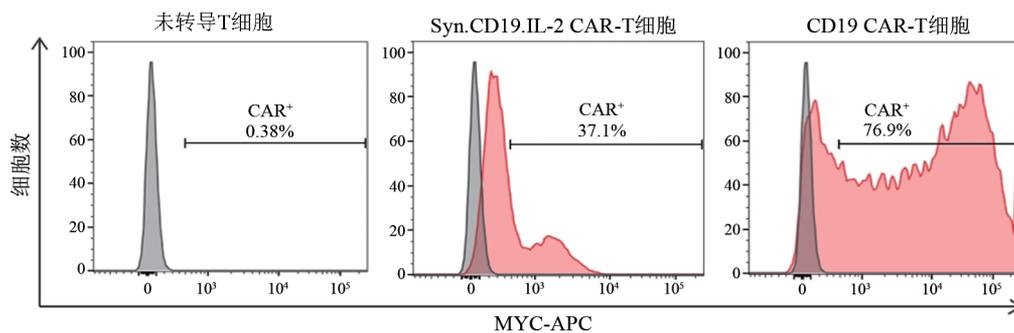
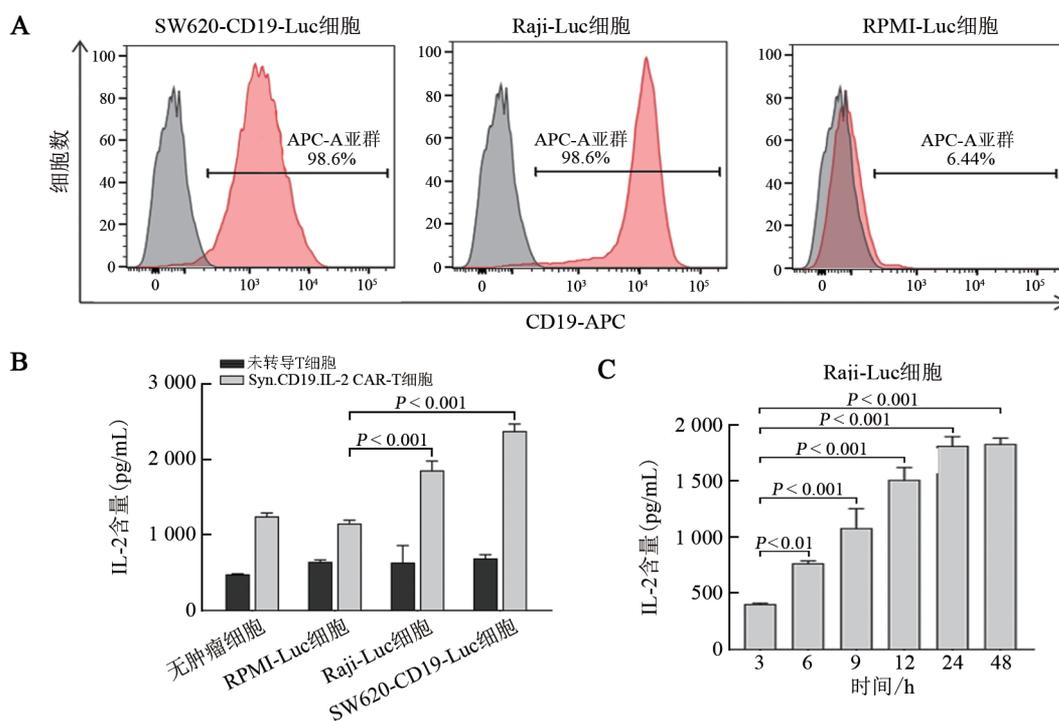


图3 流式细胞术检测Syn.CD19.IL-2 CAR-T和CD19 CAR-T细胞转导效率



A:流式细胞术检测靶细胞表面CD19抗原的表达水平;B:ELISA检测效应细胞IL-2分泌水平;
C:Raji-Luc细胞刺激Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞在不同时间点产生的IL-2水平。

图4 ELISA法检测Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞诱导表达IL-2的情况

2.5 Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞显著增强CD19 CAR-T细胞的增殖能力

CFSE染色法结果(图5)显示,在Raji-Luc和SW620-CD19-Luc细胞刺激下,CD19 CAR-T细胞 + Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞组与CD19 CAR-T细胞组相比,其FITC信号明显左移, MFI值明显降低

($P < 0.001$),细胞增殖更快。结果表明, Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞分泌的IL-2能够高效促进CD19 CAR-T细胞增殖。

2.6 Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞能有效活化CD19 CAR-T细胞

流式细胞术检测结果(图6)显示,在无肿瘤细胞

刺激时,与未转导 T 细胞相比,CD19 CAR-T 细胞表面 CD69 表达无统计学差异;在 CD19 CAR-T 细胞 + Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞组中,细胞表面 CD69 表达显著上升($P < 0.001$),表明 Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞分泌 IL-2 能维持 T 细胞活力。在 Raji-luc 细胞的刺激下,CD19 CAR-T 细胞比未转导 T 细胞表面

CD69 表达升高,在 CD19 CAR-T 细胞 + Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞组中,细胞表面 CD69 表达显著上升,差异具有统计学意义(均 $P < 0.001$)。结果表明, Syn.CD19.IL-2 CAR-T 细胞分泌的 IL-2 能够有效激活 CD19 CAR-T 细胞。

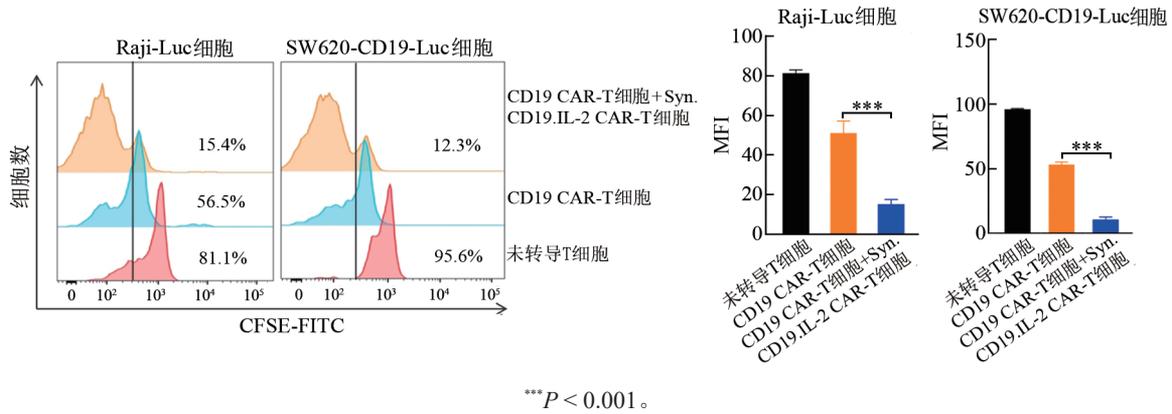


图5 CFSE 染色法检测 CD19 CAR-T 细胞的增殖水平

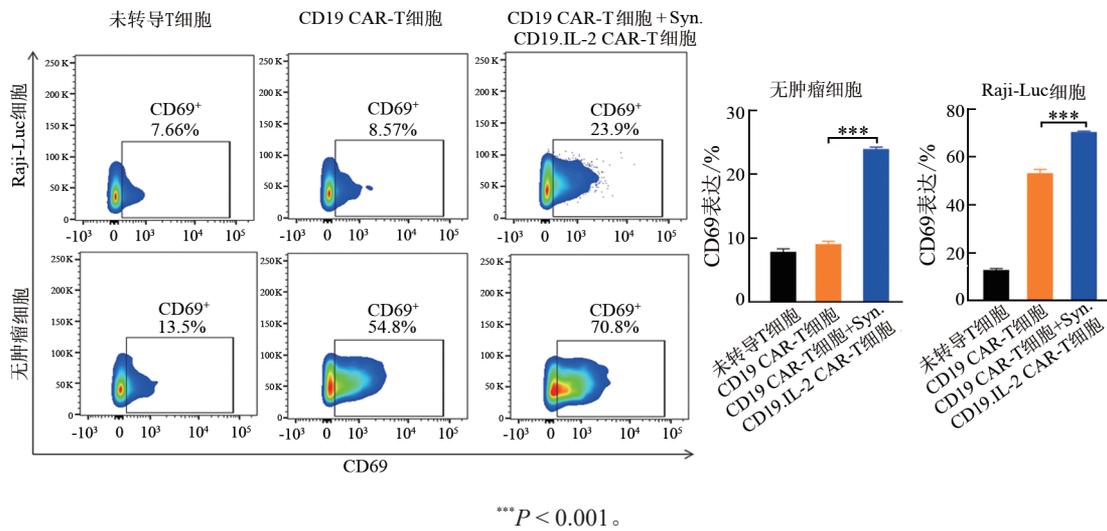


图6 流式细胞术检测 CD19 CAR-T 细胞表面 CD69 表达

3 讨论

CAR-T 细胞免疫疗法在治疗 B 细胞恶性肿瘤方面取得了极为显著的成果^[10]。然而, CAR-T 细胞疗法目前仍存在一定局限性,例如,回输至患者体内的 CAR-T 细胞在增殖能力和持久性方面存在局限性,这使得其在治疗实体瘤时面临诸多挑战,许多实体瘤具有免疫抑制性微环境,在很大程度上限制了 T 细胞的浸润、激活和扩增^[11-12]。长期以来, IL-2 等细胞因子在抗肿瘤免疫中一直起着重要作用。但是,全身性 IL-2 递送具有剧毒,会引发包括毛细血管渗漏综

合征在内的一系列不良反应,从而极大地限制了其在临床中的应用^[13]。T 细胞可通过组成型表达 IL-2 会导致终末分化,不利于驱动自主增殖^[14]。1991 年,美国 FDA 批准了首个 IL-2 药物阿地白介素 (aldesleukin) 上市,用于治疗转移性肾癌和转移性黑色素瘤。但是,由于 IL-2 较短的半衰期和免疫系统激活带来的毒副作用等导致其临床应用受限^[15]。近年来,偏向型 IL-2 开发已成为 IL-2 研究领域最主流且备受关注的技术路线,但由于其半衰期短和治疗剂量窗口窄而需要每日注射,目前还停留在临床 II、III 期^[16-17]。研究^[18-19]表明,在肿瘤部位局部递送 IL-2

能够增强CAR-T细胞的抗肿瘤活性、延缓半衰期且在体内没有明显的毒性。因此,设计一种由肿瘤抗原触发的信号转导通路,在肿瘤局部释放IL-2可有效解决系统递送的毒性及半衰期短等问题。SynNotch系统可由肿瘤特异性抗原诱导T细胞驱动IL-2的分泌,为实现局部递送细胞因子这一目标提供了一种简单的模块化方法^[20]。SynNotch系统可精确调控细胞因子的产生和递送,达到更好地控制肿瘤的目的,延长细胞因子的血清半衰期,同时减少脱靶效应^[21-22]。因此,本课题设计受靶抗原调控分泌IL-2的CAR-T细胞,并通过实验验证了其功能的有效性。

本研究使用的CD19 scFv是美国FDA批准上市的抗体FMC63。美国FDA批准上市的6款CD19 CAR-T细胞产品都是FMC63-CD19 scFv,多项临床试验^[23-24]均证明其具有良好的临床疗效及安全性。本课题设计并构建了靶向CD19分泌IL-2的Syn.CD19.IL-2分子,通过自失活逆转录病毒载体进行包装后,将其转导人原代T细胞,成功构建Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞。实验结果表明,当与CD19阳性的肿瘤细胞Raji-Luc或SW620-CD19-Luc共培养时,Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞分泌IL-2的量明显高于CD19阴性的肿瘤细胞。这一结果表明,本研究成功构建了由肿瘤抗原触发在肿瘤局部分泌细胞因子的CAR-T细胞。在体外培养的条件下,当Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞存在时,CD19 CAR-T细胞的增殖能力明显增强。CD69是T细胞活化的最早标记,当Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞存在时,CD19 CAR-T细胞能够更好地被肿瘤细胞活化。

综上所述,本研究以单载体SynNotch系统为基础,设计并成功构建了靶向CD19分泌IL-2的Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞。实现了在肿瘤局部递送IL-2,显著改善了细胞因子全身应用的毒性问题,增强了CAR-T细胞的扩增与激活,为CAR-T细胞与细胞因子联合应用提供了选择。然而,由于细胞因子的抗肿瘤功能机制复杂,体内和体外环境差异大,本研究初步在体外验证了Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞的功能。后续可开展体内实验,进一步验证Syn.CD19.IL-2 CAR-T细胞在增强传统CD19 CAR-T细胞疗效方面的潜在优势。

[参考文献]

- [1] DAVILA M L, BOUHASSIRA D C G, PARK J H, *et al.* Chimeric antigen receptors for the adoptive T cell therapy of hematologic malignancies[J]. *Int J Hematol*, 2014, 99(4): 361-371. DOI:10.1007/s12185-013-1479-5.
- [2] SUN Z C, REN Z H, YANG K T, *et al.* A next-generation tumor-targeting IL-2 preferentially promotes tumor-infiltrating CD8⁺ T-cell response and effective tumor control [J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3874[2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31462678/>. DOI:10.1038/s41467-019-11782-w.
- [3] SCHROEDER T, MARTENS T, FRANSECKY L, *et al.* Management of chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell-associated toxicities[J]. *Intensive Care Med*, 2024, 50(9): 1459-1469. DOI:10.1007/s00134-024-07576-4.
- [4] DHUPKAR P, GORDON N. Interleukin-2: old and new approaches to enhance immune-therapeutic efficacy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 995: 33-51. DOI:10.1007/978-3-319-53156-4_2.
- [5] MARABONDO S, KAUFMAN H L. High-dose interleukin-2 (IL-2) for the treatment of melanoma: safety considerations and future directions[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2017, 16(12): 1347-1357. DOI:10.1080/14740338.2017.1382472.
- [6] DARINGER N M, DUDEK R M, SCHWARZ K A, *et al.* Modular extracellular sensor architecture for engineering mammalian cell-based devices[J]. *ACS Synth Biol*, 2014, 3(12): 892-902. DOI:10.1021/sb400128g.
- [7] GARIBYAN M, HOFFMAN T, MAKASKE T, *et al.* Engineering programmable material-to-cell pathways via synthetic Notch receptors to spatially control differentiation in multicellular constructs[J/OL]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 5891[2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39003263/>. DOI:10.1038/s41467-024-50126-1.
- [8] ALLEN G M, FRANKEL N W, REDDY N R, *et al.* Synthetic cytokine circuits that drive T cells into immune-excluded tumors[J/OL]. *Science*, 2022, 378(6625): eaba1624[2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36520915/>. DOI:10.1126/science.aba1624.
- [9] REDDY N R, MAACHI H, XIAO Y N, *et al.* Engineering synthetic suppressor T cells that execute locally targeted immunoprotective programs[J/OL]. *Science*, 2024, 386(6726): ead14793[2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39636990/>. DOI:10.1126/science.ad14793.
- [10] LOCKE F L, NEELAPU S S, BARTLETT N L, *et al.* Phase 1 results of ZUMA-1: a multicenter study of KTE-C19 anti-CD19 CAR T cell therapy in refractory aggressive lymphoma[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(1): 285-295. DOI:10.1016/j.ymthe.2016.10.020.
- [11] 潘心怡,任政乾,王欣玥,等. CAR-T细胞体内外扩增方法的优化策略[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(7): 647-654. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.07.001.
- [12] KIRTANE K, ELMARIAH H, CHUNG C H, *et al.* Adoptive cellular therapy in solid tumor malignancies: review of the literature and challenges ahead[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(7): e002723[2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34301811/>. DOI:10.1136/jitc-2021-002723.

- [13] BRUDNO J N, KOCHENDERFER J N. Recent advances in CAR T-cell toxicity: mechanisms, manifestations and management[J]. *Blood Rev*, 2019, 34: 45-55. DOI:10.1016/j.blre.2018.11.002.
- [14] MCLELLAN A D, ALI HOSSEINI RAD S M. Chimeric antigen receptor T cell persistence and memory cell formation[J]. *Immunol Cell Biol*, 2019, 97(7): 664-674. DOI:10.1111/imcb.12254.
- [15] FYFE G, FISHER R I, ROSENBERG S A, *et al.* Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy[J]. *J Clin Oncol*, 1995, 13(3): 688-696. DOI: 10.1200/jco.1995.13.3.688.
- [16] ZHANG B, SUN J Q, WANG Y, *et al.* Site-specific PEGylation of interleukin-2 enhances immunosuppression *via* the sustained activation of regulatory T cells[J]. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5(11): 1288-1305. DOI:10.1038/s41551-021-00797-8.
- [17] CHARYCH D H, HOCH U, LANGOWSKI J L, *et al.* NKTR-214, an engineered cytokine with biased IL2 receptor binding, increased tumor exposure, and marked efficacy in mouse tumor models[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(3): 680-690. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-15-1631.
- [18] LI S J, XIA Y F, HOU R, *et al.* Armed with IL-2 based fusion protein improves CAR-T cell fitness and efficacy against solid tumors[J/OL]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(5): 167159[2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38583815/>. DOI: 10.1016/j.bbadis.2024.167159.
- [19] DAVILA M L, BRENTJENS R. Synthetic gene circuits drive disease-fighting T cells[J]. *Science*, 2024, 386(6726): 1094-1095. DOI:10.1126/science.adt9921.
- [20] LUO H, WU X Q, SUN R X, *et al.* Target-dependent expression of IL12 by synNotch receptor-engineered NK92 cells increases the antitumor activities of CAR-T cells[J/OL]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1448[2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31921693/>. DOI:10.3389/fonc.2019.01448.
- [21] AHMADNIA A, MOHAMMADI S, YAMCHI A, *et al.* Augmenting the antitumor efficacy of natural killer cells *via* SynNotch receptor engineering for targeted IL-12 secretion[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2024, 46(4): 2931-2945. DOI:10.3390/cimb46040183.
- [22] BRUDNO J N, LAM N, VANASSE D, *et al.* Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells with fully human binding domains in patients with B-cell lymphoma[J]. *Nat Med*, 2020, 26(2): 270-280. DOI: 10.1038/s41591-019-0737-3.
- [23] GHORASHIAN S, KRAMER A M, ONUOHA S, *et al.* Enhanced CAR T cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with ALL treated with a low-affinity CD19 CAR[J]. *Nat Med*, 2019, 25(9): 1408-1414. DOI: 10.1038/s41591-019-0549-5.

[收稿日期] 2024-10-23

[修回日期] 2025-03-18

[本文编辑] 党瑞山