

靶向BCMA的第二代/三代CAR-T细胞构建及其抗肿瘤活性的体外研究

张伟光^{1,2} 王可可² 吴芳南² 刘宇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, 温州 325035)

摘要 该研究利用基因工程方法构建包含4-1BB或ICOS的第二代Anti-BCMA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-BCMA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BCMA的第二代和第三代CAR-T细胞。研究表明, 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2:1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U266-lucgfp细胞的杀伤效力更高; 在效靶比为2:1、5:1和10:1时, 第三代CAR-T细胞对U266-lucgfp细胞的杀伤效力低于第二代; 在效靶比20:1时, 第二代和第三代CAR-T细胞对U266-lucgfp细胞的杀伤效力都达到90%以上, 显著高于对照组。综上所述, 该研究成功构建了靶向BCMA的第二代和第三代CAR-T细胞, 其可高效杀伤高表达BCMA的肿瘤细胞, 且靶向BCMA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 B细胞成熟抗原; CAR-T; 基因治疗; 多发性骨髓瘤; ICOS; 4-1BB

Construction of Second-and Third-generation CAR-T Cells Targeting BCMA and Analysis of Their Antitumor Activity *in Vitro*

ZHANG Weiguang^{1,2}, WANG Keke², WU Fangnan², LIU Yu², YIN Changlin¹, GAO Jimin^{2*}

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

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

Abstract This study constructs a lentiviral expression vector of the second-generation Anti-BCMA CAR containing 4-1BB or ICOS by genetic engineering, and a lentiviral expression vector of the third-generation Anti-BCMA CAR containing both of these costimulatory signaling molecules. By transducing human CD3⁺ T cells with these lentiviral particles, the second- and third-generation Anti-BCMA CAR-T cells are obtained, respectively. Our results showed that the second-generation CAR-T cells with ICOS and 4-1BB have similar functions on antineoplastic activity. Whereas, when effector/target was 2:1, the cells with ICOS showed better killing effect to U266-Lucgfp cells comparing with 4-1BB. The third-generation Anti-BCMA CAR-T cells executed lower cytolytic capacity against U266-lucgfp cells than the second-generation CAR-T cells at the ratio of effectors/targets were 2:1, 5:1 and 10:1. But when the ratio of effectors/targets was 20:1, the specific lysis rates of the second- or third-generation CAR-T cells against U266-lucgfp cells were both above 90%, which were significantly higher than those

收稿日期: 2019-12-16 接受日期: 2020-02-24

国家自然科学基金(批准号: 81573110、91729101)、浙江省自然科学基金(批准号: LY15H160066)和温州市研究项目基金(批准号: ZS2017014、2018ZY001)资助的课题

*通讯作者。Tel: +0577-86699341, E-mail: jimingao64@163.com

Received: December 16, 2019 Accepted: February 24, 2020

This work was supported by the Natural Science Foundation of China (Grant No.81573110, 91729101), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LY15H160066) and Wenzhou Municipal Research Program (Grant No.ZS2017014, 2018ZY001)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86699341, E-mail: jimingao64@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5225>

of control T cells. In conclusion, this study successfully constructed the second- and third-generation Anti-BCMA CAR-T cells, which efficiently killed highly-expressing-BCMA tumor cells. And the second-generation CAR-T cells targeting BCMA had stronger killing effect on tumor cells than the third-generation CAR-T cells. Besides, the second-generation CAR-T cells targeting BCMA had more potent killing effect on tumor cells than the third-generation CAR-T cells.

Keywords BCMA (B cell maturation antigen); CAR-T; gene therapy; MM; ICOS; 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。近年来,我国多发性骨髓瘤的发病率逐年上升,虽然含蛋白酶体抑制剂、免疫调节药物的使用及自体干细胞移植等治疗策略改善了患者整体预后,但疾病复发、耐药以及治疗相关毒性仍是影响患者预后及生存的重要因素^[1]。在众多的免疫疗法中,嵌合抗原受体T(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^[2-4]。CAR-T细胞免疫疗法是近年来发展起来的一种新型的免疫细胞治疗技术^[5]。CAR-T技术是通过体外基因转移技术,将编码嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)的基因序列转导入T淋巴细胞基因组中,联合T淋巴细胞的效应功能和抗体作用以非主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制性方式高特异性识别预定的表面抗原从而杀伤肿瘤细胞^[6]。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。2017年,靶向CD19的CAR-T技术治疗B细胞恶性肿瘤的基础研究与临床试验取得里程碑式突破,治疗急性B淋巴细胞白血病有效率在70%以上,治疗B细胞型非霍奇金淋巴瘤有效率在50%以上。CAR-T疗法被认为是最具有前景的肿瘤治疗方法之一^[7]。

CD19靶点多表达于如B细胞淋巴瘤等血液性肿瘤细胞表面,而在其他类肿瘤如实体瘤细胞表面呈低表达^[8]。由于实体瘤缺少特异的靶点, CAR-T进展较为缓慢,大多停留在临床实验阶段^[9]。B细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA)是TNF超家族的成员,它是仅在B细胞谱系中表达的细胞表面蛋白质,并参与B细胞向浆细胞的分化和成熟。研究表明, BCMA在恶性MM浆细胞上高度表达,在其他正常人组织以及CD34⁺的造血干细胞中不表达。BCMA在MM中被用作抗凋亡和促增殖因子,

使其成为CAR-T细胞治疗多发性骨髓瘤最常用的靶标^[10-11]。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BCMA单链抗体为靶向分子,第三代慢病毒为载体来构建靶向BCMA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BCMA的骨髓瘤细胞特异且有效的细胞毒性,以此评估CAR-T细胞对BCMA阳性多发性骨髓瘤细胞免疫治疗的临床应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

pLenti-EF1 α -T2A-lucgfp质粒由本实验室保存;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;琼脂糖购自上海生工生物工程股份有限公司;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。

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;DynaMag TM-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 Anti-BCMA scFv序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 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, 在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 -BCMA scFv-4-1BB、pLenti-EF1 α -BCMA scFv-ICOS和pLenti-EF1 α -BCMA scFv-ICOS-4-1BB。以BCMA全长cDNA序列(由韩家淮实验室赠送)为模板, BCMAFOR和BCMAREV为引物扩增BCMA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, 在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 -BCMA-T2A-lucgfp质粒, 用于BCMA阳性靶细胞的制备。根据Genebank中基因序列设计PCR扩增引物, 见表1。

1.3.2 慢病毒包装与滴度检测 分别将以上三种质粒与辅助质粒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 μ m MILLEX®-HP 针式滤器。将病毒原液4 °C超速离心(32 000 r/min) 2 h, 沉淀溶解在X-VIVO培养液中。

96孔尖底板每孔铺0.2 $\times$ 10⁶个Jurkat细胞, 200 μ L/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 μ L、40 μ L和10 μ L。32 °C、

1 200 $\times$ g离心90 min。4 h后用DPBS将细胞洗1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 =滴度(TU/mL), P =流式阳性细胞比例, N =转导的细胞数, D =稀释倍数, V =转导时的体积]。

1.3.3 CAR-T细胞的制备和扩增 从健康志愿者全血中分离外周血单个核细胞, 重悬于X-VIVO-15中, 用磁珠分选出CD3⁺ T细胞后培养活化的CD3⁺ T细胞。活化后第2天加入不同载体的病毒浓缩液(MOI=40), 并加入polybrene以帮助病毒感染。第3天通过离心洗去慢病毒, 重悬于X-VIVO-15培养基中继续扩增。每2天进行计数, 使细胞密度维持在1 $\times$ 10⁶个/mL左右。扩增5天后, 取部分细胞进行阳性率检测以及功能检测。

1.3.4 靶细胞的构建 用本实验室现有的pLenti-EF1 α -BCMA-Lucgfp质粒包装慢病毒, 收取48 h病毒原液用于感染细胞。U266细胞离心计数后用含10% FBS的RPMI-1640全培稀释成1 $\times$ 10⁶/mL, 96孔平底细胞培养板每孔铺0.2 $\times$ 10⁶个细胞, 200 μ L/孔。按1:5的比例每孔加入40 μ L病毒, 1 200 $\times$ g、32 °C离心90 min, 进行离心转导。37 °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天后, 1500 r/min离心5 min后用Buffer 1(DPBS含5% FBS)重悬, 置于DynaMag TM-5磁力架上

表1 PCR扩增引物
Table 1 PCR amplification primers

引物名称 Name of primer	引物序列(5'→3') Primers sequence (5'→3')
BCMACARFOR	TCG TGA GCT AGC CCC GGG GCC ACC ATG GCC CTG CCT GTC ACC GCT
BCMACARREV	CGA TGG GCA GCC AGA AGT CGC AGG CGA AGT CGA GGC
ICOS-CD3FOR	TTC TGG CTG CCC ATC GG
ICOS-CD3REV	GCA GAC TGA CCG ACG TGA CTT TAA GGG TGA AGT TTA GC
CD3FOR	AGG GTG AAG TTT AGC AGA TCC GCC
CD3REV	CAT GCA AGC TCT CCC TCC TAG GTG AAC GCG TGT TTA AAC AA
ICOS-4-1BBREV	CTT CCT GCC CCT CTT TAA AGT CAC GTC GGT CAG TCT GC
4-1BB-CD3FOR	AAG AGG GGC AGG AAG AAG C
4-1BB-CD3REV	TTG TTT AAA CAC GCG TGC ACT CGA GTT CAC CTA G
BCMAFOR	GCC CCG GGA TGT TGC AGA TG
BCMAREV	CCG AAT TCT ATC TTC CTT AGC

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用AIM-V完全培养基重悬, 计数后取1/10流式检测其CAR-T表达率。(3) U266-lucgfp细胞离心后进行细胞计数, 每孔按照 0.1×10^6 个细胞铺板。(4) 基于CAR的表达率计算了CAR-T细胞的数量, CAR-T细胞与U266-lucgfp细胞的比例按照2:1、5:1、10:1和20:1的比例将CAR-T细胞加入到U266-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U266-lucgfp细胞孔。一种在没有T细胞或CAR-T细胞的AIM-V完全培养基中培养。另一个孔用ddH₂O将U266-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 °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AIM-V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, 酶标仪检测荧光值。(9) 计算CAR-T细胞对U266-lucgfp细胞的裂解率。裂解率 $= (\text{Max} - \text{V}) / (\text{Max} - \text{Min}) \times 100\%$ 。(Max: 不加T细胞的U266细胞孔的荧光值; Min: ddH₂O重悬的U266细胞孔的荧光值; V: 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, 数据统计分析和图表制作均采用Graphpad Prim 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, 在 $P < 0.05$ 时被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 表达载体的构建与鉴定

本研究首先构建了靶向BCMA的CAR分子, 包

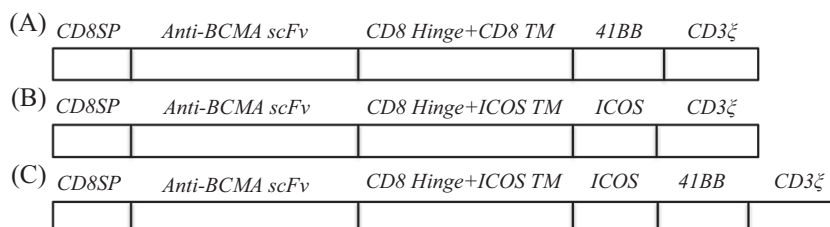
括第二代和第三代CAR分子。其中第二代CAR分子由CD8信号肽、Anti-BCMA单链可变片段、人CD8 α 的铰链和TM区、共刺激分子4-1BB或ICOS和CD3 ζ 链依次串联组成(图1A和图1B)。第三代CAR分子则在第二代的基础上增加一个共刺激分子, 即同时含有4-1BB和ICOS共刺激因子(图1C)。利用分子克隆技术, 我们成功构建了pLenti-BCMACAR-4-1BB、pLenti-BCMACAR-ICOS和pLenti-BCMA-CAR-ICOS-4-1BB重组质粒, 并通过Nco I酶进行酶切鉴定, 结果得到3条条带, 符合预期结果(图2)。

2.2 BCMA-CAR T细胞的制备

将pLenti-BCMACAR-4-1BB、pLenti-BCMA-CAR-ICOS和pLenti-BCMACAR-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天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, Anti-BCMA-4-1BB、Anti-BCMA-ICOS、Anti-BCMA-ICOS-4-1BB慢病毒载体转导效率分别为41.9%、58.0%和34.2%, 并对表达情况进行分析, 结果具有统计学意义($P < 0.0001$, 图3A)。含Anti-BCMA-4-1BB、Anti-BCMA-ICOS和Anti-BCMA-ICOS-4-1BB慢病毒感染人CD3⁺ T细胞后, 并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BCMA阳性肿瘤细胞的杀伤能力, 我们用pLenti-EF1 α -BCMA-Lucgfp质粒包装慢病毒感染人骨髓瘤细胞U266, 未感染组作为对照组, 构建高表达BCMA的U266-lucgfp靶细胞, 通过流式细胞术检测靶细胞U266-lucgfp表达BCMA抗原和GFP的情况, 结果分别为64%和85%(图4)。



A: 含4-1BB共刺激分子的第二代CAR结构示意图; B: 含ICOS共刺激分子的第二代CAR结构示意图; C: 含4-1BB及ICOS共刺激分子的第三代CAR结构示意图。

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

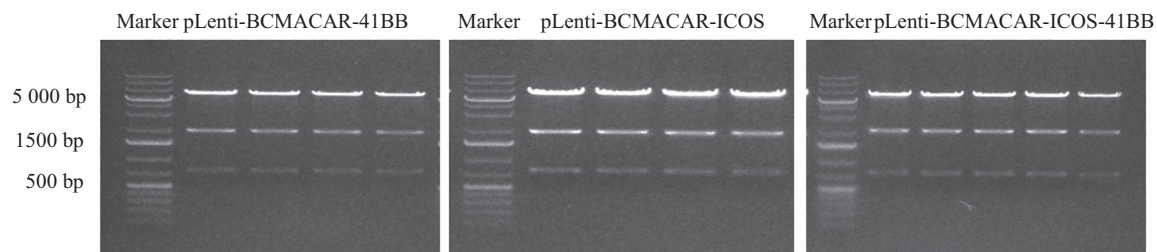
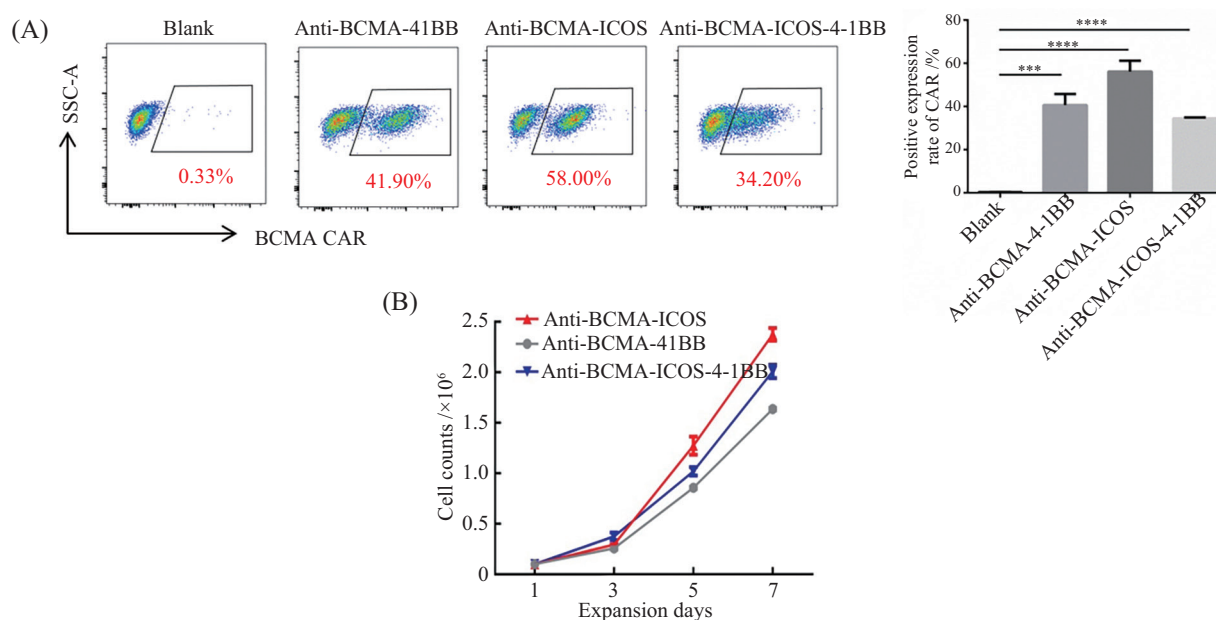


图2 pLenti-BCMACAR-41BB、pLenti-BCMACAR-ICOS和pLenti-BCMACAR-ICOS-41BB重组质粒酶切鉴定结果

Fig.2 The identification results of recombinant plasmids of pLenti-BCMACAR-41BB, pLenti-BCMACAR-ICOS and pLenti-BCMACAR-ICOS-41BB by restriction enzyme digestion



A: 人CD3⁺ T细胞感染不同CAR分子病毒后, 通过流式细胞术分析各自的表达效率; B: 人CD3⁺ T细胞感染含不同CAR分子的病毒后, 记录其扩增曲线; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

A: human CD3⁺ T cells were infected with different CAR molecules, their expression efficiency was analyzed by flow cytometry; B: human CD3⁺ T cells were infected with different CAR molecules, record its amplification curve; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图3 BCMA CAR-T细胞制备和扩增的鉴定

Fig.3 Identification of BCMA CAR-T cell preparation and amplification

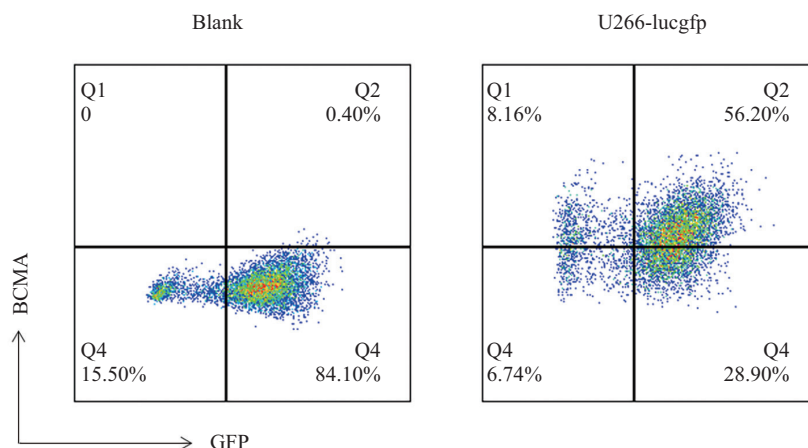
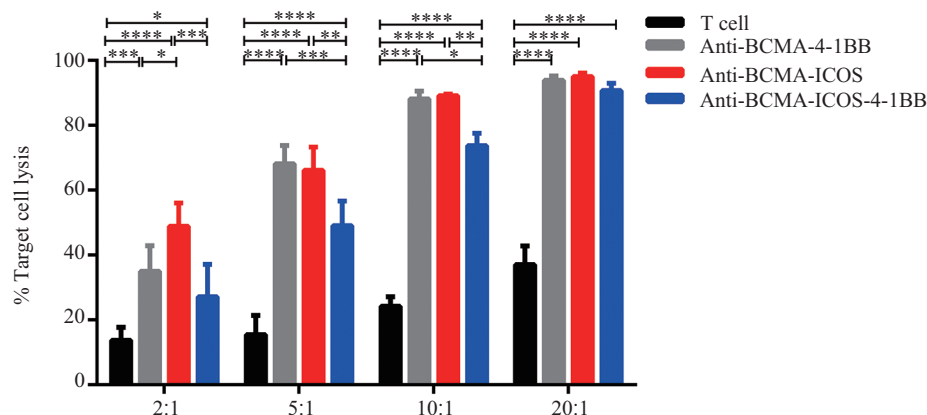


图4 流式细胞术检测靶细胞BCMA表达

Fig.4 Detection of BCMA expression in target cells by flow cytometry



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

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 target-effect ratio conditions

2.4 CAR-T细胞对阳性靶细胞的体外杀伤效果

以三种不同的CAR-T细胞(Anti-BCMA-4-1BB、Anti-BCMA-ICOS和 Anti-BCMA-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BCMA的U266-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为共刺激因子与以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2:1时, Anti-BCMA-ICOS CAR-T细胞比 Anti-BCMA-4-1BB CAR-T细胞对U266-lucgfp细胞的杀伤比例高14%, 且两者之间有显著差异($P < 0.05$), 故在特定条件下, 靶向BCMA的CAR-T细胞以ICOS作为共刺激分子可能比以4-1BB作为共刺激分子更具有杀伤潜力。在相同效靶比情况下, 靶向BCMA的第三代CAR-T细胞比第二代CAR-T细胞对U266-lucgfp细胞的杀伤比例低, 且在效靶比2:1、5:1和10:1时两者之间都有显著性差异($P < 0.05$)。三种Anti-BCMA CAR-T细胞在效靶比为20:1时能有效杀伤U266-lucgfp细胞并且杀伤比例在90%以上, 显著高于对照组($P < 0.0001$)。随着效靶比的不断提高, Anti-BCMA-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有关。以上结果表明, 靶向BCMA的第二代和第三代CAR-T细胞, 都可高效杀伤高表达BCMA的肿瘤细胞, 且在本研究中, 靶向BCMA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

过继性细胞免疫疗法治疗恶性肿瘤有着巨大

的潜力。CAR-T免疫疗法通过修饰患者自身的T细胞, 使其表达识别肿瘤细胞表面抗原的“嵌合抗原受体”(CAR), 能够以非MHC依赖的方式特异性识别并杀伤表达相应抗原的肿瘤细胞^[13-15]。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^[17]。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, 研究结果表明, 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的研究团队^[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, 选择在癌细胞中特异性表达但不在正常细胞中表达的靶抗原是极其重要的, 需谨慎选择。B细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA)在人体中仅表达于生发中心B细胞、恶性及正常浆细胞表面, 不表达于其他正常人组织以及CD34⁺的造血干细胞表面。CARPENTER等证明, anti-BCMA CAR-T细胞的杀伤作用仅限于表达BCMA的骨髓瘤细胞及患者来源的MM细胞, 因而BCMA是MM免疫治疗的理想靶点。目前针对BCMA制备的CAR-T, 治疗复发/难治性MM具有极好的应用前景^[18], 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。研究结果表明, 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2:1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。

到目前为止, 大多数临床试验使用的是同时包含CD8⁺和CD4⁺两个亚群的T细胞^[19], CD8⁺ T细胞是经典的细胞毒性T细胞(cytotoxic T cell, CTL), 我们使用CD3⁺ T细胞而不是纯化的CD8⁺ CTL来研究CAR的表现, 是因为CD4⁺ T细胞已被证明可增强CD8⁺ T细胞的功能^[20]。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, 相同效靶比下, 第三代CAR-T细胞的杀伤肿瘤细胞的能力较第二代弱。最近, 有研究团队比较了不同的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^[21]。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^[22]。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^[23]。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。

综上, 本研究成功构建了靶向BCMA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-BCMA-CAR-T在体内的杀瘤效果。

参考文献 (References)

- [1] ORMHOJ M, BEDOYA F, FRIGAULT M J, et al. CARs in the lead against multiple myeloma. *Curr Hematol Malig R*, 2017, 12(2): 119-25.
- [2] KUMAR S K, DISPENZIERI A, LACY M Q, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*, 2014, 28(5): 1122-8.
- [3] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-5.
- [4] HUDECEK M, EINSELE H. Myeloma CARs are rolling into the clinical arena. *Blood*, 2016, 128(13): 1667-8.
- [5] MAUDE S L, SHPALL E J, GRUPP S A. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for ALL. *Hematology*, 2014, (1): 559-64.
- [6] BROCKER T. Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood*, 2000, 96(5): 1999-2001.
- [7] LEYFMAN Y. Chimeric antigen receptors: unleashing a new age of anti-cancer therapy. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 182.
- [8] DAVILA M L, BRENTJENS R J. CD19-targeted CAR T cells as novel cancer immunotherapy for relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2016, 14(10): 802-8.
- [9] BAGLEY S J, O'ROURKE D M. Clinical investigation of CAR T cells for solid tumors: lessons learned and future directions. *Pharmacol Ther*, 2019, 205: 107419.
- [10] CARPENTER R O, EVBUOMWAN M O, PITTALUGA S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(8): 2048-60.
- [11] DHODAPKAR M V, BORRELLO I, COHEN A D, et al. Hematologic malignancies: plasma cell disorders. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2017, 37: 561-8.
- [12] FINNEY H M, AKBAR A N, LAWSON A D. 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 zeta chain. *J Immunol*, 2004, 172(1): 104-13.
- [13] KALOS M, LEVINE B L, PORTER D L, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med*, 2011, 3(95): 95ra73.
- [14] SASAKI T, IKEDA H, SATO M, et al. Antitumor activity of chimeric immunoreceptor gene-modified Tc1 and Th1 cells

- against autologous carcinoembryonic antigen-expressing colon cancer cells. *Cancer Sci*, 2006, 97(9): 920-7.
- [15] KLOSS C C, CONDOMINESS M, CARTELLIERI M, et al. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 71-5.
- [16] ZHONG X S, MATSUSHITA M, PLOTKIN J, et al. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8⁺ T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther*, 2010, 18(2): 413-20.
- [17] 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): 4901-9.
- [18] VO MC, LAKSHMI T J, JUNG S H, et al. Cellular immunotherapy in multiple myeloma. *Korean J Intern Med*, 2019, 34(5): 954-65.
- [19] HUANG X, GUO H, KANG J, et al. Sleeping Beauty transposon-mediated engineering of human primary T cells for therapy of CD19⁺ lymphoid malignancies. *Mol Ther*, 2008, 16(3): 580-9.
- [20] SHEN C J, YANG Y X, HAN E Q, et al. Chimeric antigen receptor containing ICOS signaling domain mediates specific and efficient antitumor effect of T cells against EGFRvIII expressing glioma. *J Hematol Oncol*, 2013, 6: 33.
- [21] RAMELLO M C, BENZAI D I, KUENZI B M, et al. An immunoproteomic approach to characterize the CAR interactome and signalosome. *Sci Signal*, 2019, doi: 10.1126/scisignal.aap9777.
- [22] ABATE-DAGA D, LAGISETTY K H, 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): 1003-12.
- [23] RAMOS C A, ROUCE R, ROBERTSON C S, 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): 2727-37.