

以CD27的胞外结构域为嵌合抗原受体构建靶向CD70的CAR-T细胞

王兵 郭睿婷 赵明峰*

(天津市第一中心医院, 血液科, 天津 300192)

摘要 该研究以CD27分子的胞外段的部分肽段为嵌合抗原受体构建靶向CD70的嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T, CAR-T)细胞并在体外验证其功能。通过流式细胞术检测急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)细胞系的CD70靶抗原的表达情况, 利用基因工程方法构建包含4-1BB共刺激因子的第二代Anti-CD70慢病毒表达载体, 并制备相应慢病毒, 感染激活的人CD3⁺ T细胞, 获得靶向CD70的第二代CAR-T细胞。流式细胞术检测靶向CD70 CAR-T细胞对AML细胞系的体外杀伤功能; CBA试剂盒测定其细胞因子(包括IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ)的分泌水平。研究结果表明, AML细胞系均表达CD70, 并且在效靶比为1:1、2:1和5:1时, CD70 CAR-T细胞都能明显且特异性地杀伤表达CD70的AML细胞系。相比于对照组, CD70 CAR-T细胞在杀伤靶细胞时分泌更高水平的IL-6、IL-10、IFN- γ 等细胞因子($P<0.05$)。综上所述, 该研究成功构建了靶向CD70的CAR-T细胞, 其可高效地杀伤表达CD70的靶细胞, 为以后进一步改进和优化CD70 CAR-T提供了依据。

关键词 急性髓系白血病; CD27分子; CD70分子; CAR-T; 细胞治疗

Construction and Functional Verification of CAR-T Cells Targeting CD70 Using the Extracellular Domain of CD27 as the Chimeric Antigen Receptor

WANG Bing, GUO Ruiting, ZHAO Mingfeng*

(Tianjin First Central Hospital, Hematology Department, Tianjin 300192, China)

Abstract This study constructed CAR-T (chimeric antigen receptor T) cells targeting CD70 using partial peptides of the extracellular segment of CD27 molecule as chimeric antigen receptor and verified its function *in vitro*. The expression of CD70 targets antigen in AML (acute myeloid leukemia) cell lines was detected by flow cytometry. The second generation anti-CD70 Lentivirus expression vector containing 4-1BB costimulatory factor was constructed by genetic engineering method, and the corresponding Lentivirus was prepared to infect activated human CD3⁺ T cells to obtain the second generation CAR-T cells targeting CD70. Flow cytometry was used to detect the killing function of CD70 CAR-T cells targeting AML cell lines *in vitro*; the secretion level of cytokines was measured by CBA kit (including IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ). The research results indicated that CD70 was expressed in AML cell lines. And the CD70 CAR-T significantly and specifically killed AML cells expressing CD70 when the effector target ratio was 1:1, 2:1 and 5:1. Compared with the untransduced T cells, CD70 CAR-T

收稿日期: 2023-05-09

接受日期: 2023-06-05

天津市卫生健康科技项目(批准号: TJWJ2022XK018)和天津市自然科学基金(批准号: 22JCQNJC00820)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13752640369, E-mail: mingfengzhao@sina.com

Received: May 9, 2023

Accepted: June 5, 2023

This work was supported by the Science and Technology Project of Tianjin Municipal Health Committee (Grant No. TJWJ2022XK018) and the Tianjin Municipal Natural Science Foundation (Grant No. 22JCQNJC00820)

*Corresponding author. Tel: +86-13752640369, E-mail: mingfengzhao@sina.com

cells killed target cells and secreted higher levels of inflammatory cytokines, such as interleukin-6, interleukin-10 and interferon- γ ($P<0.05$). In summary, this study the CD70 targeting CAR-T cells have been successfully constructed and have excellent killing functions, which provided the foundation for further improvement and optimization of CD70 CAR-T in the future.

Keywords acute myeloid leukemia; CD27 molecule; CD70 molecule; CAR-T; cell therapy

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是成人急性白血病中最常见的一种类型。在上世纪中叶,AML几乎是不可治愈的疾病,但随着强化诱导细胞毒性疗法的出现,成人AML的治愈率被提高了40%^[1]。在接下来的50年时间里,针对AML的治疗方案几乎没有太大变化。从2017年开始,由美国食品和药物管理局(food and drug administration, FDA)批准了许多化疗药,包括Hedgehog、BCL-2、FLT3、CD33的抑制剂等,使AML的治愈率得到了进一步的提升^[2]。虽然这些干预措施使AML的治疗取得了实质性进展,但仍有很大部分AML老年患者死于疾病复发。

CAR-T(chimeric antigen receptor T)细胞免疫疗法被认为是最具前途的过继性细胞疗法(adoptive cell transfer therapy, ACT)之一。其原理是利用基因工程技术改造T细胞使其携带靶向某种肿瘤表面抗原的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR),再对其进行体外培养、扩增后输入患者体内,并以非主要组织相容复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制的方式特异性识别肿瘤抗原,从而杀伤肿瘤细胞。目前,CAR-T细胞疗法对B-ALL、B-NHL等B细胞来源的恶性血液病已显示出良好的疗效^[3]。现在虽然已经开发了几种针对AML的CAR-T治疗的靶点,如CD33、CD123、CLL-1等,但这些靶点都有一定的局限性,如对于靶向CD123的CAR-T,虽然临床前研究表明不错的肿瘤杀伤效果,但在临床试验中治疗效果不佳^[4]。而CLL-1虽然是一个不错的靶点,但因其正常髓细胞和干细胞中也同样表达,因此靶向CLL-1 CAR-T会造成脱靶效应,治疗的同时会造成严重的中性粒细胞缺乏症,具有较大的治疗风险^[5],因此亟需寻找新的用于治疗AML的CAR-T靶点。

CD70是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族中的一员,目前发现CD70在多种血液肿瘤和实体瘤包括血多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、AML、胰腺癌、肾细胞癌、乳腺癌、黑色素瘤和

卵巢癌等中表达上调^[6-7]。因其在正常髓系细胞中不表达,而在AML肿瘤细胞中表达上调,因此CD70被认为是针对AML的CAR-T治疗的理想靶点^[8]。由于CD70是CD27的唯一配体,因此许多靶向CD70的CAR都是基于CD27分子设计的。第一代靶向CD70的CAR是将全长型的CD27分子(full length CD27)融合到CD3 ζ 胞内信号结构域(简称flCD27-CD3 ζ)^[9];第二代靶向CD70的CAR是截去CD27分子胞内段,利用CD27分子的胞外结构域和跨膜结构域(truncated CD27)融合了共刺激结构域4-1BB或CD28及CD3 ζ 胞内信号结构域,其又称为截短的CD27-4-1BB CAR(简称trCD27-41BBz)。目前认为trCD27-41BBz CAR是靶向CD70最有效的结构,并且在表达CD70的头颈癌和胶质瘤中已经证实了其良好的杀伤效率^[10]。然而随着研究的深入,人们发现CD27分子在生理件下会被金属蛋白酶水解切割,从而导致识别CD70靶抗原的CD27分子胞外段从CAR分子上解离下来形成可溶性的CD27(soluble CD27, 简称sCD27),从而大大影响CAR-T的疗效^[11-12]。在最新的一项报道中,研究者成功地找到了CD27分子被金属蛋白酶水解的位点,且去掉此位点CD27分子可以有效地抵抗金属蛋白酶对其产生的降解作用^[13]。因此本研究以CD27为基础,去掉其金属水解酶位点,以其更加截短的胞外段结构域——第1至第123氨基酸(aa 1—123, part of extra-cellular domain, 简称pecd CD27)为天然抗原受体构建新一代靶向CD70的CAR。

此外,为了更好检测CAR的表达率且出于安全考虑,我们通过2A自剪切肽技术在CAR片段前面连接了“RQR8”分子开关。RQR8是1个人工合成的含1个CD34和2个CD20模拟表位的跨膜蛋白小分子。CD34模拟表位能够被CD34的抗体QBEnd10所识别,因此RQR8可以通过流式间接检测CAR的表达并且能够通过临床级别的CD34筛选系统对其进分选;CD20模拟表位能够被靶向CD20的临床药物利妥昔单抗(rituximab, RTX)所识别并结合,以激活抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(antibody-dependent cell-

mediated cytotoxicity, ADCC)和补体依赖的细胞毒作用(complement dependent cytotoxicity, CDC)^[14],从而导致CAR-T细胞的死亡,以便在毒副作用变得十分危险的时候能够及时启动自杀机制,杀死CAR-T细胞。最后我们评估并验证了新一代CD70 CAR-T(简称pecdCD27-41BBz)的杀伤功能,为AML的CAR-T疗法提供新的策略和方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞 HEK293T 细胞系、人急性髓系白血病细胞系(THP1、U937、MOLM13)和人急性B淋巴细胞系NALM6均购自美国模式培养物集存库(ATCC)。按照机构指南获得相关知情同意后,从本单位的AML患者骨髓和健康供者的外周血获取单个核细胞样本。本研究经天津市第一中心医院临床科研项目伦理委员会批准(批准号:2020N211KY)。

1.1.2 主要试剂 pCDH-EF1 α -copGFP-T2A-Puro质粒由本实验室保存;质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自中国天根生化科技(北京)有限公司;限制性内切酶购自New England Biolabs公司;T4 DNA连接酶购自日本TaKaRa公司;琼脂糖购自上海生物工程股份有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自以色列Biological Industries公司;细胞培养基DMEM-MEM、RPMI-1640及细胞培养其他成分购自美国Gibco公司;聚乙酰亚胺(polyetherimide, PEI)购自美国Polysciences公司;PEI转染试剂购自美国Polysciences公司;0.45 μ m MILLEX[®]-HP针式滤器购自美国Millipore公司;CD3免疫磁珠购自德国Miltenyi公司;CD3/CD28刺激磁珠购自美国ThermoFisher公司;重组人IL-2购自美国Peprotech公司;荧光素PE标记的抗RQR8抗体购自英国Abcam公司;CBA六项细胞因子测定试剂盒购自Agilent公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HEK-293细胞培养于含10%胎牛血清(FBS)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM), THP1、U937、MOLM13、NALM6细胞培养于含10% FBS的RPMI-1640培养基。所有细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂和95%湿度条件下培养。

1.2.2 质粒构建 靶向CD70的天然抗原受体CD27的胞外段(aa 1-112)序列通过NCBI查获。CD70 CAR结构由pecd CD27、CD8 α 铰链区及跨膜区、

CD137共刺激信号、CD3 ζ 链胞内信号结构域组成。CD70 CAR由上海生物工程股份有限公司通过化学合成法合成。将载体pCDH-EF1 α -copGFP-T2A-Puro(本实验室保存)用BamH I/EcoR I双酶切去copGFP-T2A-Puro片段,再利用相同酶切位点及T4连接酶将RQR8-pecdCD27-41BBz CAR片段和载体连接,从而获得慢病毒转移载体。

1.2.3 慢病毒包装与滴度检测 将含有靶向CD70 CAR的质粒、辅助质粒pMD2.G和psPAX2以4:3:2的比例通过PEI试剂共转染至HEK293T细胞,转染后24 h换液,换液后48 h收取培养上清,2 000 $\times$ g离心10 min,并用0.45 μ m MILLEX[®]-HP针式滤器进行过滤。将病毒原液-80 $^{\circ}$ C保存。通过转染293T细胞计数病毒滴度。

1.2.4 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,采用CD3免疫磁珠分离出CD3⁺ T细胞,使用CD3/CD28刺激磁珠激活T细胞。继续培养48 h后加入含有CD70 CAR的慢病毒原液,感染24 h后,1 500 $\times$ g离心5 min,洗去慢病毒,重悬于10% FBS的RPMI-1640培养基。

1.2.5 CD70 CAR-T细胞检测 扩增5天后,取部分细胞标记抗体进行流式检测感染阳性率,用PE标记的抗CD34抗体QBEnd10染色来检测RQR8的表达情况,即代表CAR的表达水平,使用Coulter Altra流式细胞仪(Beckman)及配套的CytExpert软件进行分析。

1.2.6 靶细胞的构建 用本实验室现有的pLenti-T2A-Luc-GFP质粒包装慢病毒,2 000 $\times$ g离心10 min收取48 h病毒原液用于感染人急性髓系白血病细胞系THP1、MOLM13。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱培养至足够数量细胞时,之后通过单克隆培养,筛选出荧光表达较强且均一的细胞克隆并扩大培养。

1.2.7 细胞毒性测定 将GFP标记的肿瘤细胞与CD70 CAR-T细胞或未转导的T细胞按一定的效靶比以相同体积和相同肿瘤细胞数量在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下进行共孵育。分别于12 h、24 h、48 h后,取一定体积的细胞,通过流式细胞术检测肿瘤细胞的数量,通过以下公式计算肿瘤细胞杀伤作用:肿瘤细胞杀伤率/100%=[(空白对照孔肿瘤细胞数-实验孔肿瘤细胞数)/空白对照孔肿瘤细胞数] $\times$ 100%。

1.2.8 细胞因子评估 效应细胞与靶细胞37 $^{\circ}$ C、5% CO₂共孵育24 h后,1 000 $\times$ g离心10 min收集24孔板中的上清液,用CBA试剂盒测定其细胞因子(包括

IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 、IFN- γ)的表达水平。再使用NovoCyte流式细胞仪(Agilent)进行检测与分析。

1.2.9 统计学处理 使用GraphPad Prism 9进行统计学分析。服从正态分布的数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较使用单因素方差分析或独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建靶向CD70的慢病毒表达载体

第二代CAR的慢病毒表达载体(pCDH-EF1 α -copGFP-T2A-Puro)的抗原识别片段来源于CD27分子胞外段的第1至第112个氨基酸(pecd CD27),其后依次连接人源的CD8 α 作为铰链区和跨膜段,4-1BB作为共刺激分子以及CD3 ζ 链作为T细胞的活化基序。应用2A自剪切肽技术在第二代CAR的基础上通过T2A连接RQR8分子。CAR结构和所用载体结构如图1A和图1B所示,经过双限制性内切酶鉴定并送上海生工生物科技有限公司测序,结果符合预期,表明质粒构建成功。

2.2 AML细胞系中CD70的表达

为了验证CD70是针对AML的CAR-T细胞疗法的理想靶抗原,我们首先评估了AML细胞系和急性

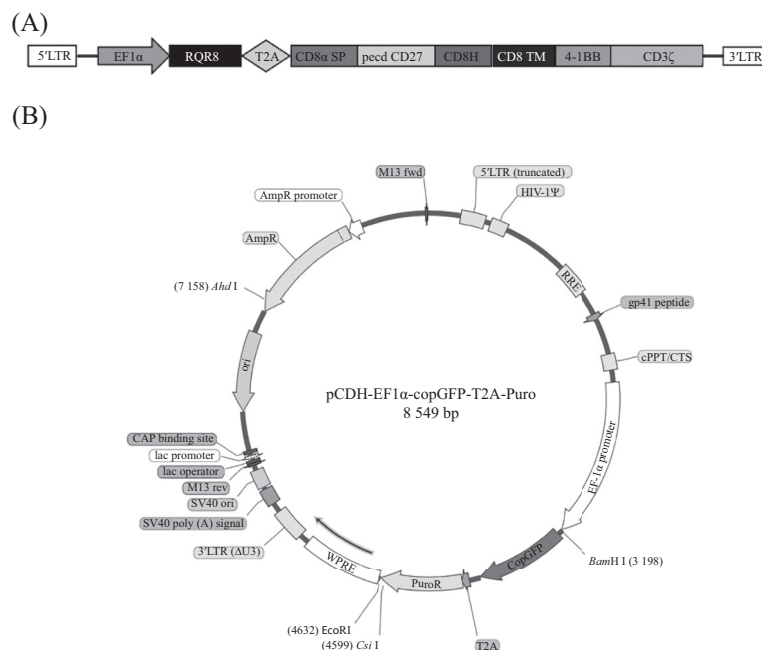
B淋巴白血病(B-cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL)细胞NALM6中CD70的表达情况。结果显示,B-ALL细胞系NALM6不表达CD70,将其用作阴性对照,而其他几种不同的AML细胞系(THP1、U937、MOLM13、KG1a、Kasumi-1)均表达CD70(图2)。

2.3 成功制备靶向CD70的CAR-T细胞

将用含CD70 CAR的慢病毒感染的CD3 $^{+}$ T细胞作为实验组,将未感染慢病毒的CD3 $^{+}$ T(untransduced T, UTD T)细胞作为对照组,4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。流式细胞仪检测显示CD70 CAR-T细胞转导率为53.32%(图3),提示CD70 CAR-T细胞成功制备。

2.4 抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)可以诱导CAR-T细胞自杀

为了更好地控制CAR-T细胞的增殖及副作用,我们给CD70 CAR-T融合表达了一个分子开关“RQR8”。将NK细胞和CD70 CAR-T分别以10:1、5:1和1:1的比例共同孵育,并且添加100 μ g/mL的利妥昔单抗,在48 h时收集细胞并用流式检测剩余的CAR-T细胞数量,计算CAR-T细胞的死亡率。结果显示,实验组随着NK细胞的增加,CAR-T细胞死亡率越来越高(图4),表明RQR8分子开关可以通过

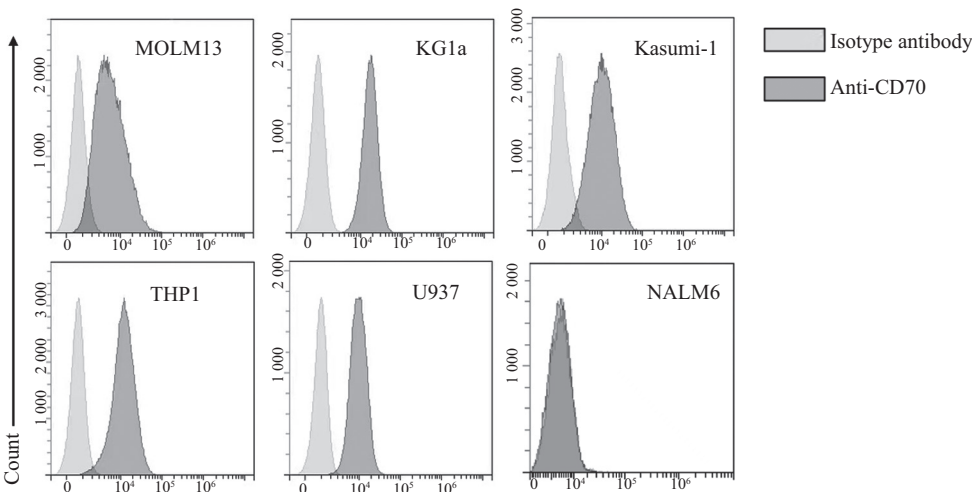


A: 靶向CD70 CAR的结构; B: 所用的慢病毒质粒载体。

A: the CD70-targeted CAR construct; B: lentivirus plasmid vector used in this study.

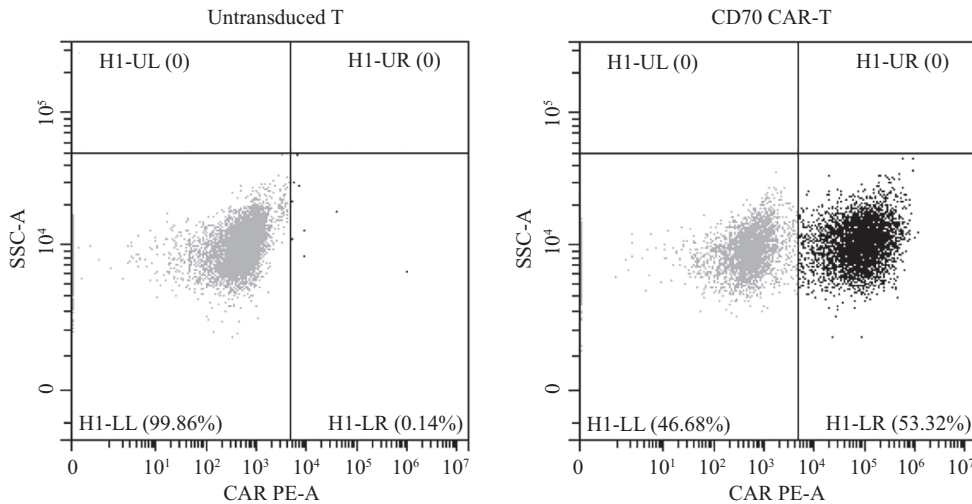
图1 成功构建靶向CD70的慢病毒载体

Fig.1 Successful construction of lentivirus vector targeting CD70



流式细胞术检测AML细胞系(MOLM13、KG1a、Kasumi-1、THP1和 U937)和B-ALL细胞系(NALM6) CD70的表达水平。直方图显示用FITC 标记的抗CD70单抗(深灰色)和同种型对照抗体(浅灰色)染色结果。
Flow cytometric analysis of CD70-expression on AML cell lines (MOLM13, KG1a, Kasumi-1, THP1, and U937) and B-ALL cell line (NALM6). His- tograms show staining with FITC labeled anti-CD70 monoclonal antibody (dark gray) and isotype control antibody (light gray).

图2 AML细胞系均表达CD70
Fig.2 AML cell lines expressed the CD70 target



流式细胞术检测CD70 CAR-T的转染成功率, 用PE标记的抗CD34抗体QBEnd10检测CAR的表达并计算转导率。
Flow cytometry detected the transduction rate of CD70 CAR-T, the expression of CAR was detected by PE labeled anti-CD34 antibody QBEnd10.

图3 成功制备靶向CD70的CAR-T细胞
Fig.3 Successfully prepared CAR-T cells targeting CD70

ADCC效应诱导CD70 CAR-T细胞的死亡。

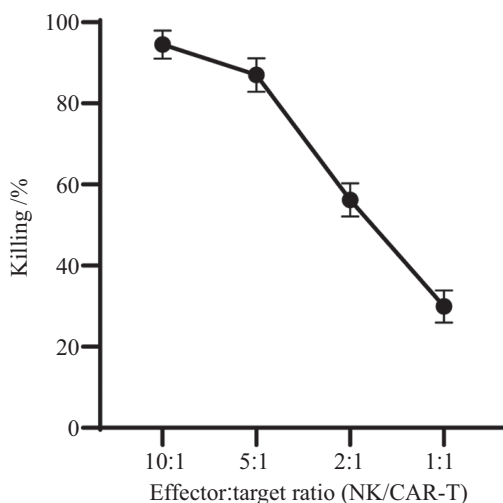
2.5 CAR-T细胞对阳性靶细胞的体外杀伤效果

将UTD T细胞和CD70 CAR-T细胞分别与CD70 阳性的MOLM13细胞和THP1细胞按不同效靶比共 孵育, 并在12 h(图5A)及24 h(图5B)通过流式细胞术 分析剩余肿瘤细胞数并计算杀伤率。结果表明, 相 比UTD T细胞, CD70 CAR-T细胞可以明显地杀伤 MOLM13细胞和THP1细胞(图5A和图5B)。检测不

同效靶比孵育24 h后培养上清的细胞因子分泌水 平结果表明, 与UTD T组相比, IL-4、IL-6、IL-10、 IFN- γ 、TNF- α 仅在CD70 CAR-T细胞与MOLM13细 胞及CD70 CAR-T细胞与THP1细胞共孵育组中明显 上调($P<0.05$)(表1和表2)。

3 讨论

过继性免疫疗法在治疗血液系统恶性肿瘤中



验证转导了RQR8-CD70 CAR-T的细胞对ADCC的敏感性。将同一供体来源的NK细胞与转导的T细胞在效靶比为10:1、5:1、2:1和1:1的条件下共孵育24 h,并添加100 $\mu\text{g/mL}$ 的利妥昔单抗。以不加NK细胞和利妥昔单抗为对照组,通过流式细胞术分析残余的活的CAR-T细胞并计算其杀伤率。Demonstration of ADCC-mediated sensitivity against T cells transduced with RQR8-CD70 CAR. Transduced T cells were incubated with NK cell effectors derived from the same donor at effector:target (E/T) ratios of 10:1, 5:1, 2:1 and 1:1 and exposed to 100 $\mu\text{g/mL}$ rituximab. Without NK cells and rituximab as the control group, the residual and live CAR-T cells were analyzed by flow cytometry and the killing rate was calculated.

图4 RQR8分子开关可以通过ADCC诱导CAR-T细胞自杀

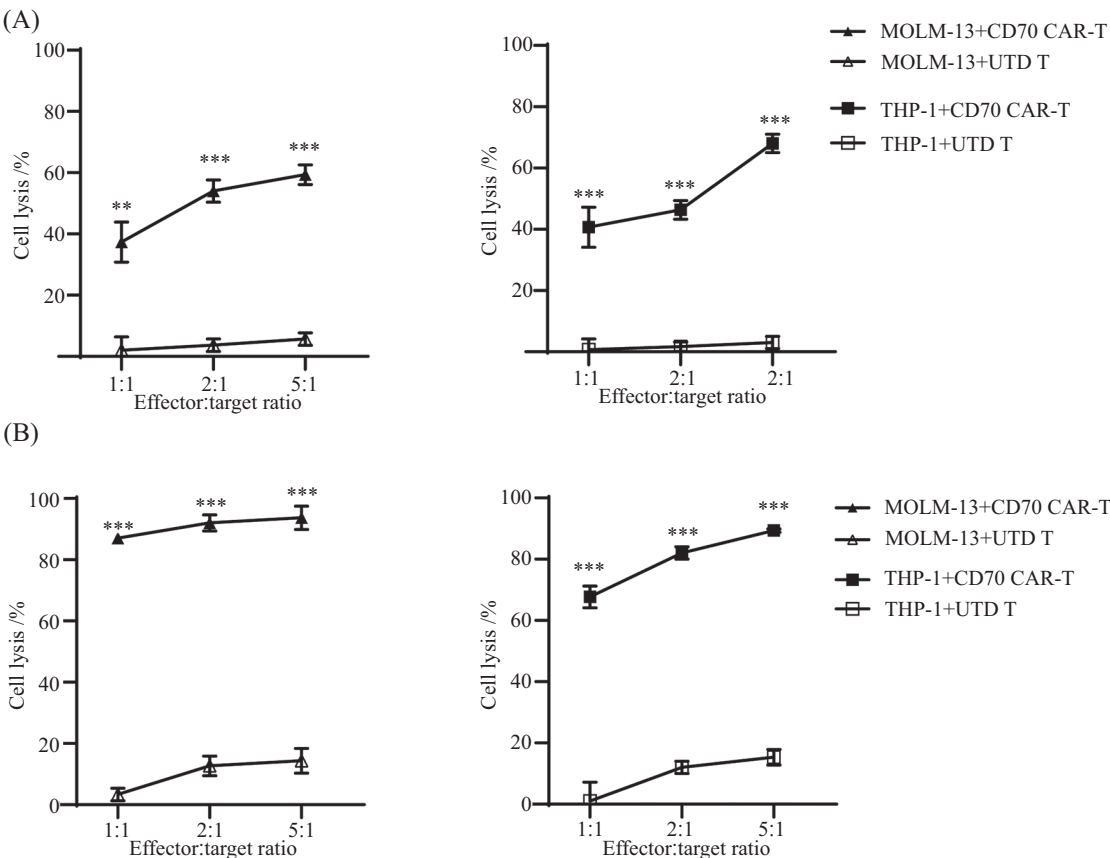
Fig.4 The RQR8 switch can induce CAR-T cell suicide through ADCC

具有巨大的潜力,其中CAR-T细胞免疫治疗被认为是最具前途的过继疗法,CAR-T细胞在治疗B细胞恶性肿瘤方面已取得了不错的临床效果,到目前为止,全球共有8款CAR-T产品获批上市,其中,FDA批准上市的有6款,中国国家药品监督管理局批准上市的有2款^[15]。然而由于在AML中缺乏特异性的靶抗原,因此针对AML的CAR-T细胞治疗并不像治疗B细胞恶性肿瘤那样成功。目前,针对AML的CAR-T治疗靶点如CD33、CD123、NKG2D等都还处于早期探索阶段^[16]。

由于CD70在AML肿瘤细胞及白血病干细胞(leukemia stem cells, LSCs)上表达,而在正常造血细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)和正常骨髓细胞中几乎不表达,因此被认为是免疫疗法的合适靶点^[17-18]。许多以CD70为靶点的抗肿瘤药物包括单克隆抗体、抗体偶联药物等已经被应运到临床当中。靶向CD70的抗体ARGX-110(cusatuzumab)在治疗初发AML患者的I期临床试验中取得了不错的效果^[6,19],这项研究也表明CD70可以作为CAR-T细胞治疗的靶点,与传统的单克隆抗体相比,CAR-T疗法具有更好的疗效。对于CD70靶抗原的CAR的设计,可以以单链抗体(single-chain variable fragment, scFv)为抗原受体靶向CD70,也可以以CD70的天然配体CD27分子为抗原受体靶向CD70的CAR用于治疗AML。但有研

究表明以CD27为天然受体设计的CAR比以单链抗体为抗原受体设计的CAR具有更好的杀伤效果^[8]。因此,目前大多数研究都是基于CD27分子设计靶向CD70的CAR结构。

最近,药物联合CAR-T细胞免疫治疗的策略,为临床治疗提供了新的需求和方向。在实体瘤CAR-T治疗过程中,由于CAR-T细胞很难进入到肿瘤内部,因此治疗反应较差,在一项CD70 CAR-T治疗肾癌研究中发现聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(polyADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂可以通过激活cGAS-STING通路调控肿瘤微环境来提高CAR-T细胞的浸润性,增强对实体瘤的杀伤作用^[20]。而另一项针对AML的研究发现CD70靶抗原的密度影响CAR-T的效率,并且去甲基化药物阿扎胞苷可以降低肿瘤中CD70启动子的甲基化水平,从而提高CD70的表达及表面密度,以增强CD70 CAR-T的杀伤效率^[13]。任何临床转化,最重要的一点都是安全性,尽管CD70会在免疫细胞活化时瞬时表达上调,但是研究发现针对CD70 CAR-T并不影响CAR-T细胞的增殖,不存在CAR-T细胞的“自杀现象”^[21]。而且在1/2期临床试验中,科研人员也验证了CD70单克隆抗体cusatuzumab治疗AML的有效性并且试验结果也展现出了其有限的毒副作用^[6,22],表明靶向CD70的免疫治疗具有较好的安全性和临床应用前景。



A: UTD T细胞和CD70 CAR-T细胞分别与MOLM13(左边)和THP1细胞(右边)按1:1、2:1和5:1的效靶比共孵育12 h后的细胞毒作用, 数值以平均值±标准差表示。 ***P*<0.01, ****P*<0.001, 与UTD T组相比。 UTD T: 未经转导的体细胞; CD70 CAR-T: 靶向CD70的嵌合抗原受体T细胞。 B: UTD T细胞和CD70 CAR-T细胞分别与MOLM13(左边)和THP1细胞(右边)按1:1、2:1和5:1的效靶比共孵育24 h后的细胞毒作用, 数值以平均值±标准差表示。 ****P*<0.001, 与UTD T组相比。

A: specific cytolytic activity of CD70 CAR and UTD T-cells against AML cell lines MOLM13 (left) and THP1 (right) in a luciferase-based killing assay at effector:target (E:T) ratios of 1:1, 2:1 and 5:1 (12 h). Values are presented as $\bar{x}\pm s$. ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs UTD T group. UTD T: untransduced T-cells; CD70 CAR-T: chimeric antigen receptor T cells targeting CD70. B: specific cytolytic activity of CD70 CAR and UTD T-cells against AML cell lines MOLM13 (left) and THP1 (right) in a luciferase-based killing assay at effector:target (E/T) ratios of 1:1, 2:1 and 5:1 (24 h). Values are presented as $\bar{x}\pm s$. ****P*<0.001 vs UTD T group.

图5 CD70 CAR-T可以有效地杀伤靶细胞
Fig.5 CD70 CAR-T can effectively kill target cells

表1 CBA试剂盒检测未转导的T细胞和CD70 CAR-T细胞与MOLM13细胞按不同效靶比共孵育24 h后的细胞因子表达水平
Table 1 CBA kit was used to detect cytokine in supernatant obtained after 24-hour co-culture of untransduced T cells or CD70 CAR-T cells with MOLM13 cells at different E/T ratios

组别 Group	IL-4 /ng·L ⁻¹	IL-6 /ng·L ⁻¹	IL-10 /ng·L ⁻¹	TNF-α /ng·L ⁻¹	IFN-γ /ng·L ⁻¹
E/T 1:1					
UTD T+MOLM13	0.50±0.27	1.01±0.02	1.51±0.38	2.62±0.17	10.61±0.32
CD70 CAR-T+MOLM13	2.26±0.01 ^c	6.78±0.96 ^c	886.79±88.21 ^c	31.53±0.48 ^d	1 608.14±30.59 ^d
E/T 2:1					
UTD T+MOLM13	1.63±0.36	1.06±0.04	2.85±0.33	6.64±1.19	12.44±0.27
CD70 CAR-T+MOLM13	3.13±0.39 ^a	11.13±1.11 ^c	1 104.54±5.39 ^d	55.00±0.33 ^d	2 062.43±11.45 ^d
E/T 5:1					
UTD T+MOLM13	2.17±0.10	1.27±0.04	9.72±1.50	9.74±0.65	84.57±10.45
CD70 CAR-T+MOLM13	7.72±1.25 ^b	15.12±1.76 ^c	1 828.90±8.41 ^d	157.63±1.91 ^d	2 349.38±254.50 ^c

UTD T: 未经转导的T细胞; CD70 CAR-T: 靶向CD70的嵌合抗原受体T细胞。 ^ans, ^b*P*<0.05, ^c*P*<0.01, ^d*P*<0.001, 与UTD T+MOLM13组比较。
UTD T: untransduced T cells; CD70 CAR-T: chimeric antigen receptor T cells targeting CD70. ^ans, ^b*P*<0.05, ^c*P*<0.01, ^d*P*<0.001 vs UTD T+MOLM13 group.

表2 CBA 试剂盒检测未转导的T 细胞和CD70 CAR-T细胞与THP1细胞按不同效靶比共孵育24 h后的细胞因子表达水平
Table 2 CBA kit was used to detect cytokine in supernatant obtained after 24-hour co-culture of untransduced T cells or CD70 CAR-T cells with THP-1 cells at different E/T ratios

组别 Group	IL-4 /ng·L ⁻¹	IL-6 /ng·L ⁻¹	IL-10 /ng·L ⁻¹	TNF-α /ng·L ⁻¹	IFN-γ /ng·L ⁻¹
E/T 1:1					
UTD T+THP1	1.08±0.01	0.73±0.06	11.07±0.14	2.76±0.22	5.56±1.22
CD70 CAR-T+THP1	10.35±0.11 ^d	1.40±0.09 ^b	18.71±5.27 ^a	13.88±3.49 ^b	2 791.97±560.47 ^d
E/T 5:1					
UTD T+THP1	1.45±0.11	1.03±0.02	17.37±0.95	6.02±0.20	14.79±3.56
CD70 CAR-T+THP1	13.85±1.92 ^d	2.5±0.23 ^c	25.46±0.64 ^b	155.10±10.48 ^b	4 137.44±23.94 ^d
E/T 5:1					
UTD T+THP1	2.10±0.01	1.29±0.05	24.88±1.67	9.39±0.49	90.84±0.49
CD70 CAR-T+THP1	17.70±0.73 ^d	5.57±0.22 ^d	74.08±4.53 ^c	549.69±43.81 ^c	11 237.12±907.97 ^d

UDT T: 未经转导的体细胞; CD70 CAR-T: 靶向CD70的嵌合抗原受体T细胞。^ans, ^bP<0.05, ^cP<0.01, ^dP<0.001, 与UTD T+THP1组比较。

UDT T: untransduced T cells; CD70 CAR-T: chimeric antigen receptor T cells targeting CD70. ^ans, ^bP<0.05, ^cP<0.01, ^dP<0.001 vs UTD T+THP1group.

在本研究中,我们成功制备了新一代更加稳定的CD70 CAR-T细胞,并通过体外细胞杀伤实验初步证实其能够有效地靶向杀伤AML细胞并且分泌相应的细胞因子。除此之外,我们还给CD70 CAR分子融合了一个分子开关“RQR8”,以便更好地控制CAR-T的增殖,增加其安全性。这项研究为以后CD70 CAR-T的优化及临床转化奠定了基础,在今后的研究中,我们计划收集临床AML患者骨髓标本,并进一步构建NCG小鼠人AML模型,在体内验证新一代CD70 CAR-T的有效性。然而,最新研究也指出,CD70在AML患者中的表达存在很大的异质性^[8],并且CD70 CAR-T的体内杀伤效果并不理想^[22]。因此如何提高CD70靶抗原的表达能力及提高CD70 CAR-T的杀伤疗效也是值得关注的重点。在今后的研究中我们打算进一步优化CD70 CAR-T,如构建分泌细胞因子的四代CAR-T,用于增强CD70 CAR-T的杀伤功能及持久性。

综上,本研究构建的新一代CD70 CAR-T细胞是一种有效的治疗AML的新方案,为其在临床中的应用提供了研究基础。此外,为了有效防止靶抗原逃逸和肿瘤复发,未来可以将CD70 CAR-T与CD33 CAR-T或CLL1 CAR-T等CAR-T进行联合使用,用于治疗AML或者构建双靶点的CAR-T用于治疗AML。

参考文献 (References)

- [1] DOHNER H, WEISDORF D J, BLOOMFIELD C D. Acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(12): 1136-52.
- [2] GUERRA V A, DINARDO C, KONOPLEVA M. Venetoclax-based therapies for acute myeloid leukemia [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2019, 32(2): 145-53.
- [3] WANG M, MUNOZ J, GOY A, et al. KTE-X19 CAR T-cell therapy in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(14): 1331-42.
- [4] ABAZA Y, FATHI A T. Monoclonal antibodies in acute myeloid leukemia-are we there yet [J]? *Cancer J*, 2022, 28(1): 37-42.
- [5] JIN X, ZHANG M, SUN R, et al. First-in-human phase I study of CLL-1 CAR-T cells in adults with relapsed/refractory acute myeloid leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 88.
- [6] RIETHER C, PABST T, HOPNER S, et al. Targeting CD70 with cusatuzumab eliminates acute myeloid leukemia stem cells in patients treated with hypomethylating agents [J]. *Nat Med*, 2020, 26(9): 1459-67.
- [7] JIN L, GE H, LONG Y, et al. CD70, a novel target of CAR T-cell therapy for gliomas [J]. *Neuro Oncol*, 2018, 20(1): 55-65.
- [8] SAUER T, PARIKH K, SHARMA S, et al. CD70-specific CAR T cells have potent activity against acute myeloid leukemia without HSC toxicity [J]. *Blood*, 2021, 138(4): 318-30.
- [9] SHAFFER D R, SAVOLDO B, YI Z, et al. T cells redirected against CD70 for the immunotherapy of CD70-positive malignancies [J]. *Blood*, 2011, 117(16): 4304-14.
- [10] WANG Q J, YU Z, HANADA K I, et al. Preclinical evaluation of chimeric antigen receptors targeting CD70-expressing cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9): 2267-76.
- [11] BURCHILL M A, TAMBURINI B A, KEDL R M. T cells compete by cleaving cell surface CD27 and blocking access to CD70-bearing APCs [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(11): 3140-9.
- [12] ZHOU Y, LIU X, XU L, et al. Matrix metalloproteinase-8 is overexpressed in Waldenstrom's macroglobulinemia cells, and specific inhibition of this metalloproteinase blocks release of soluble CD27 [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2011, 11(1): 172-5.
- [13] LEICK M B, SILVA H, SCARFO I, et al. Non-cleavable hinge enhances avidity and expansion of CAR-T cells for acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(5): 494-508.e5.
- [14] PHILIP B, KOKALAKI E, MEKKAOU L, et al. A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy [J]. *Blood*, 2014, 124(8): 1277-87.
- [15] ABRAMSON J S, PALOMBA M L, GORDON L I, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory

- large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study [J]. *Lancet*, 2020, 396(10254): 839-52.
- [16] WEI W, YANG D, CHEN X, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for T-ALL and AML [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 967754.
- [17] PERNA F, BERMAN S H, SONI R K, et al. Integrating proteomics and transcriptomics for systematic combinatorial chimeric antigen receptor therapy of AML [J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(4): 506-19, e5.
- [18] RUF M, MITTMANN C, NOWICKA A M, et al. pVHL/HIF-regulated CD70 expression is associated with infiltration of CD27⁺ lymphocytes and increased serum levels of soluble CD27 in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(4): 889-98.
- [19] SILENCE K, DREIER T, MOSHIR M, et al. ARGX-110, a highly potent antibody targeting CD70, eliminates tumors via both enhanced ADCC and immune checkpoint blockade [J]. *MAbs*, 2014, 6(2): 523-32.
- [20] JI F, ZHANG F, ZHANG M, et al. Targeting the DNA damage response enhances CD70 CAR-T cell therapy for renal carcinoma by activating the cGAS-STING pathway [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 152.
- [21] PARK Y P, JIN L, BENNETT K B, et al. CD70 as a target for chimeric antigen receptor T cells in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2018, 78: 145-50.
- [22] WU G, GUO S, LUO Q, et al. Preclinical evaluation of CD70-specific CAR T cells targeting acute myeloid leukemia [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1093750.