

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.01.004

靶向人源 BCMA 的嵌合抗原受体 T 细胞构建及体外抗肿瘤活性研究 *

崔鑫铭¹ 董宇曦¹ 尚凤琴² 刘秀盈¹ 朱晶晶¹ 刘静静¹ 冯义超¹ 王建勋^{1,2Δ}

(¹ 北京中医药大学生命科学院 北京 102400; ² 深圳北京中医药大学研究院 广东 深圳 518118)

摘要 目的:通过对 CAR 结构的 ScFv 单链可变区进行改造,构建并筛选具有更强杀伤肿瘤细胞功能的新型靶向人源 B 细胞成熟抗原(BCMA)的嵌合抗原受体(CAR)-T 细胞。**方法:**构建靶向人源 BCMA 的 CAR 分子,用逆转录病毒载体包装成功后转导健康志愿者的 T 细胞,制备 Anti-BCMA-CAR-T 细胞。将 Anti-BCMA-CAR-T 细胞作为观察组,普通 T 细胞作为对照组,将其与 RPMI-8226 细胞共培养,采用 CFSE 染色的 T 细胞增殖实验观察两组体外增殖能力。采用荧光素酶化学发光实验检测两组细胞在不同效靶比(1:8、1:4、1:2、1:1、2:1、4:1)对 RPMI-8226 细胞的杀伤效率,采用流式细胞术检测两组细胞在不同效靶比(1:4、1:2、1:1、2:1、4:1)对 RPMI-8226 细胞的杀伤效率。**结果:**CFSE 检测结果显示,与对照组比较,观察组 FITC 信号明显左移,表明 T 细胞增殖能力越强。流式细胞术检测结果显示,相同效靶比时,观察组对 RPMI-8226 细胞的杀伤效率均高于对照组(P 均 <0.05);荧光素酶化学发光实验结果显示,相同效靶比时,观察组对 RPMI-8226 细胞的杀伤效率均高于对照组(P 均 <0.05)。在效靶比为 4:1 时, CAR170-T(未经改造的传统的 ScFv)细胞和 CAR174-T(经改造的 ScFv)细胞的杀伤效率分别达到了 $88.5 \pm 0.3\%$ 和 $98.5 \pm 0.7\%$ 。**结论:**通过对 CAR 结构的 ScFv 单链可变区进行改造后成功构建出的新型靶向 BCMA 的 CAR-T 细胞,它能保持较强的增殖活性且具有更强的杀伤肿瘤细胞的能力。

关键词:B 细胞成熟抗原;嵌合抗原受体;ScFv 单链可变区;T 细胞

中图分类号:R-33;R730.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)01-18-07

Construction of Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting Human BCMA and its Antitumor Activity in Vitro*

CUI Xin-ming¹, DONG Yu-xi¹, SHANG Feng-qin², LIU Xiu-ying¹, ZHU Jing-jing¹, LIU Jing-jing¹, FENG Yi-chao¹, WANG Jian-xun^{1,2Δ}

(¹ School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 102400, China;

² Research Institute of Shenzhen, Beijing University of Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong, 518118, China)

ABSTRACT Objective: To construct and screen the new type of chimeric antigen receptor CAR-T cell targeting human-derived B cell maturation antigen(BCMA), By modifying the ScFv single-chain variable region of the CAR structure, a novel chimeric antigen receptor (CAR)-T cell targeting human B-cell maturation antigen (BCMA) with a stronger ability to kill tumor cells was constructed and screened. **Methods:** We constructed a CAR molecule targeting BCMA human ScFv, and after successful packaging with retroviral vector, transducing T cells from healthy volunteers to prepare Anti-BCMA-CAR-T cells. Anti-BCMA-CAR-T cells were used as the observation group and normal T cells were used as the control group, they were co-cultured with RPMI-8226 cells, and the proliferation ability of the two groups in vitro was observed by the T cell proliferation experiment stained with CFSE. The killing efficiency of two groups of cells on RPMI-8226 cells at different effect-to-target ratios (1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1) was detected by luciferase chemiluminescence assay. Flow cytometry was used to detect the killing efficiency of the two groups of cells on RPMI-8226 cells at different effect-to-target ratios (1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1). **Results:** CFSE detection results showed that compared with the control group, the FITC signal in the observation group shifted significantly to the left, indicating that the T cell proliferation ability was stronger. The results of flow cytometry showed that at the same effect target ratio, the killing efficiency of the observation group on RPMI-8226 cells was higher than that of the control group (both $P<0.05$); the results of luciferase chemiluminescence experiment showed that the same effect target ratio, the killing efficiency of RPMI-8226 cells in the observation group was higher than that in the control group ($P<0.05$). When the effect-to-target ratio was 4:1, the killing efficiencies of CAR170-T (unmodified conventional ScFv) cells and CAR174-T (modified ScFv) cells reached $88.5 \pm 0.3\%$ and $98.5 \pm 0.7\%$, respectively. **Conclusion:** We successfully constructed a novel type of BCMA-targeting CAR-T cells by modifying the ScFv single-chain variable region of the CAR structure, which can maintain strong proliferative activity and have a stronger ability to kill tumor cells.

Key words: B cell maturation antigen; Chimeric antigen receptor; ScFv single-chain variable region; T cell

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R730.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)01-18-07

* 基金项目:王建勋高层次人才科研启动经费项目(9011451310032)

作者简介:崔鑫铭(1994-),女,硕士,研究方向:靶向 BCMA 的 CAR-T 疗法, E-mail: cuixinming0722@163.com

Δ 通讯作者:王建勋(1973-),男,博士,教授,研究方向:中医药的表观遗传学与分子生物学, E-mail: Jianxun.Wang@bucm.edu.cn

(收稿日期:2023-07-10 接受日期:2023-07-31)

前言

近年来,血液肿瘤的发病率日益增高,血液肿瘤是指以急、慢性白血病,骨髓增生异常综合征,淋巴瘤,多发性骨髓瘤等为代表的骨髓恶性增殖性疾病。多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种终末分化的浆细胞异常增殖的恶性肿瘤,是第二大最常见的血液系统恶性肿瘤^[1],是仅次于非霍奇金淋巴瘤的第二大血液系统恶性肿瘤,约占造血系统恶性肿瘤 10 %^[2]。近年来,我国 MM 的发病率迅速增加。随着新的治疗药物^[3,4,22]如蛋白酶体抑制剂和免疫调节剂的发展,患者的预后有了明显改善,但是 MM 仍然是一种难治之症,几乎所有患者最终都会面临复发和耐药的风险。因此,研究新的 MM 治疗方案是至关重要的。以嵌合抗原受体 T(chimeric antigen receptor modified T cell, CAR-T)细胞为代表的免疫疗法在血液系统恶性肿瘤中显示出了良好的疗效,有望成为 MM 的新型有效治疗方法。

目前 CAR-T 细胞治疗 MM 的靶点有很多种,包括 B 细胞成熟抗原(BCMA)、CD19、CD138、SLAMF7、免疫球蛋白 K 轻链等。BCMA 蛋白属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员^[5],表达于晚期记忆 B 细胞和浆细胞表面,在 B 细胞分化过程中表达增强,在 MM 细胞和人骨髓细胞系中表达,且表达量高于正常浆细胞^[6],在造血干细胞和幼稚 B 细胞上不表达,是治疗 MM 的理想靶点^[7]。因此本研究选取了 BCMA 为靶点。在 CAR 的结构中,靶向肿瘤抗原的特异性及亲和力是 CAR-T 疗法安全有效性的基础,单链抗体可变片段(ScFv)决定着 CAR-T 细胞的特异性识别,是至关重要的结构域^[8]。ScFv 的亲和力特征是一个重要的抗原结合结构域参数,并且决定着 CAR 分子的功能。因此本研究将 ScFv 单链可变区进行改造,将传统的 VH-VL 结构改造为亲和力更强的两个 VH 结构的串联,旨在筛选出杀伤效果更强的靶向 BCMA 的 CAR。

1 材料与方法

1.1 细胞系、主要试剂

细胞系:包装细胞系 Phoenix ECO 细胞、包装细胞系 PG13 细胞均购自于美国 ATCC 公司;肿瘤细胞系人多发性骨髓瘤外周血 B 淋巴细胞系(RPMI-8226 肿瘤细胞)、实验室前期已经使用 RPMI-8226 细胞构建出了携带(GFP)标签以及荧光素酶报告基因(LUC)标签的 RPMI-GFP-LUC 细胞系、人原髓细胞白血病细胞(HL-60)、实验室前期已经使用 HL-60 细胞构建出了携带荧光素酶报告基因(LUC)标签的 HL-60-LUC 细胞系。

主要试剂:RPMI 1640 培养基、AIM-V 培养基、胎牛血清(FBS)、Penicillin Streptomycin 及 PBS 缓冲液均购自美国 Gibco 公司,FuGene HD 转染试剂购自美国 Promega 公司,淋巴细胞分离液均购自北京友谊中联生物科技有限公司,白细胞介素 2(IL-2)、OKT-3 购自北京义翘神州科技股份有限公司,Clon Express Ulter One Step Cloning Kit 无缝克隆试剂盒、胶回收试剂盒、无内毒素质粒大提试剂盒、质粒纯化试剂盒、Bright-Lumi II 萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒、DH5 α 化学感受态细胞、Xho I /Not I 限制性内切酶、Annexin V-Alexa Flour 647/PI 凋亡检测试剂盒等购自北京兰博利德有限公司,PE anti-Myc、APC anti-human CD269(BCMA)、CD3-APC 等抗体均购自美国 BD 公司。

1.2 靶向 BCMA 的 CAR 分子构建

本实验制备的 BCMA-CAR 分子,为经典的二代 CAR 分子结构,将引导肽 SP、改造后的 BCMA ScFv、CD8 铰链区和跨膜区、4-1-BB 胞内区结构域以及 CD3 ζ 胞内区进行依次串联,并在 SP 引导肽和 BCMA ScFv 结构之间加入了 Myc 标签,以便后续实验的流式检测。

实验室前期通过噬菌体展示技术筛选出亲和力较强的靶向 BCMA 的单链可变区(ScFv)^[9],使用 16VH、19VH 代替传统的 VH-(G4S)3-VL,作为改造后的 ScFv 区,使用 VH-(G4S)3-VH 结构代替 VH-(G4S)3-VL 结构,作为改造后的 ScFv 区。由此构建靶向人源 BCMA 的 CAR 分子,其结构为经典第二代 CAR 分子结构,将 BCMA ScFv、CD8 铰链区和跨膜区、4-1-BB 胞内区和 CD3 ζ 胞内区依次串联,具体分子结构见图 1。

BCMA-CAR170	SP	MYC	16-VH	(G4S)3	16-VL	CD8	4-1-BB	CD3 ζ
BCMA-CAR174	SP	MYC	16-VH	(G4S)3	19-VH	CD8	4-1-BB	CD3 ζ

图 1 CAR 分子结构图

Fig. 1 Molecular structure of CAR

1.3 靶向 BCMA 的 CAR 质粒构建

使用 PCR 的方法获得了包含 BCMA-CAR 的目的片段,然后通过限制性内切酶酶切的方法获得载体片段,最后使用无缝克隆的方法将目的片段与载体进行连接。用 DH5 α 感受态进行转化涂板,涂布菌液的平板在细菌培养箱中培养 14 h,观察菌落的生长情况,有单克隆菌落长出,对其进行挑取。挑取单克隆加入有氨苄抗性的 LB 培养基中中进行扩大培养,6 h 后进行菌落 PCR 反应。随后进行琼脂糖凝胶实验。将琼脂糖凝胶用照胶仪进行紫外线照射后,并将发光条带大小与目的片段大小进行比对,大小正确的单克隆菌落,继续 37℃ 摇床孵育 12~16 h,用培养后的菌液进行质粒提取并送至测序公司测序。将测序正

确的质粒载体命名为 BCMA-CAR170、BCMA-CAR174。

1.4 T 细胞的制备与分离

使用肝素抗凝管抽取 2 位健康志愿者外周血各 10 mL,采用 Ficoll 密度梯度离心法分离单个核细胞(PBMC),重悬于 AIM-V 完全培养基(添加 10%FBS 和 1%青-链霉素溶液),同时加入终浓度为 100 ng/mL OKT-3 和 100 U/mL IL-2 刺激 T 细胞增殖,37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中无菌培养。收集培养后的细胞即为人原代 T 细胞。

1.5 CAR-T 细胞的制备

将培养 48 h 后的原代 T 细胞分为 BCMA-CAR170-T、BCMA-CAR174-T,共两组。将测序正确的 BCMA-CAR170、BCMA-

CAR174 质粒分别包装成逆转录病毒载体并转导人原代 T 细胞即为 BCMA-CAR170-T(对照组)、BCMA-CAR174-T(实验组)。实验操作如下:首先需要使用 OKT3 激活超过 48 h 的人原代 T 细胞。转导前一天,使用重组人纤维连接蛋白(Retronectin)进行 12 孔非组织培养板的铺板,每孔加入 RetroNectin 10 μ L,再加入 1 mL PBS,避光放置到 4℃ 冰箱过夜孵育。第二天把 12 孔板从冰箱中取出弃掉孔内原有液体,加入对应的逆转录病毒载体 1 mL。将 12 孔板配平后放入离心机离心 1 h,随后吸出逆转录病毒载体,加入经逆转录病毒载体重悬的 T 细胞(每孔 5×10^5 个),于 5% CO₂、37℃ 的条件下孵育 2 h。孵育结束后,将 12 孔板内上清移至 1.5 mL 离心管内,离心并弃上清,用 1 mL 对应的逆转录病毒载体进行细胞重悬后加入到 12 孔板内,放入离心机离心 1 h 后,放回 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h。孵育结束后,将 12 孔板内上清移至 1.5 mL 离心管内,离心 5 min。弃上清,用 1 mL AIM-V 完全培养基进行细胞重悬后加入到 12 孔板内,并加入 IL-2 放回 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养,48 h 后进行后用 PE anti-Myc 抗体通过 FCM 检测 MYC 抗原表达,计算转导效率(即 MYC 表达率)。转导效率=MYC-PE 阳性细胞数/总活细胞数 $\times$ 100%。

1.6 两组细胞对靶细胞的杀伤能力观察

1.6.1 流式检测肿瘤细胞 BCMA 抗原的阳性表达率 采用流式细胞术。本实验使用 BCMA 抗原表达阳性的 RPMI-GFP-LUC 细胞和 BCMA 抗原表达阴性的 HL-60-LUC 细胞,细胞混匀后各取 500 μ L(分 2 管:染色管与不染色阴性对照管),向不染色的细胞管中加入 400 μ L 染色缓冲液,重悬后过滤到流式管中作为阴性对照管。染色管中加入染色缓冲液 48 μ L 和 2.5 μ L 的 APC anti-human CD269(BCMA),放到避光盒后放到 4℃ 冰箱孵育 1 h,孵育结束终止染色,进行流式检测。

1.6.2 荧光素酶报告基因检测法检测靶向 BCMA 的 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤效率 采用荧光素酶报告基因法。使用携带荧光素酶报告基因的 RPMI-GFP-LUC 肿瘤细胞作为靶细胞,CAR-T 细胞作为效应细胞、未转导的 PAN-T 细胞作为对照组细胞,分别按不同效靶比(1:4、1:2、1:1、2:1、4:1)与靶细胞 RPMI-GFP-LUC 共孵育 12 h,加入荧光素酶底物后通过酶标仪读数,来判断效应细胞杀伤肿瘤的情况。杀伤效率=[1-(试验孔读数数据-空白孔读数数据)/(最大释放孔读数数据-空白孔读数数据)] $\times$ 100%。

1.6.3 荧光素酶报告基因检测法检测 CAR-T 细胞对表达 BCMA 抗原的肿瘤细胞的特异性杀伤 采用荧光素酶报告基因法。本实验使用表达 BCMA 抗原的 RPMI-GFP-LUC 肿瘤细胞和不表达 BCMA 抗原的 HL-60-LUC(携带荧光素酶报告基因)肿瘤细胞分别作为靶细胞,CAR174-T 细胞作为效应细胞、未转导的 PAN-T 细胞作为对照组细胞,分别按不同效靶比(1:4、1:2、1:1、2:1、4:1)与靶细胞 RPMI-GFP-LUC、HL-60-LUC 共孵育 12 h,使用 Annexin-V-Alexa Fluor 647 凋亡试剂进行染色后通过流式细胞术检测效应细胞杀伤肿瘤的情况。

1.6.4 流式细胞术检测靶向 BCMA 的 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤效率 采用流式细胞术。本实验使用 RPMI-GFP-LUC 肿瘤细胞作为靶细胞,CAR-T 细胞作为效应细胞、未转导的 PAN-T 细胞作为对照组细胞,分别按不同效靶比(1:4、1:2、1:1、

2:1、4:1)与靶细胞 RPMI-GFP-LUC 共孵育 12 h,使用 Annexin-V-Alexa Fluor 647 凋亡试剂进行染色后通过流式细胞术检测效应细胞杀伤肿瘤的情况。

1.7 靶向 BCMA 的 CAR-T 细胞体外增殖功能验证

采用 CFSE 染色的 T 细胞增殖实验。使用 RPMI-8226 肿瘤细胞作为靶细胞,CAR-T 细胞作为效应细胞、未转导的 PAN-T 细胞作为对照组细胞。将 RPMI-8226 细胞用 AIM-V 完全培养基(含 IL-2)稀释至 $4 \times 10^4/100 \mu$ L,取 100 μ L 接种于 96 孔板实验孔。取两组细胞,采用 CFSE(用 AIM-V 培养基稀释成 10 μ mol/mL)37℃ 水浴避光染色处理;调整细胞密度为 $1 \times 10^4/100 \mu$ L,取 100 μ L 加在铺有 RPMI-8226 细胞的孔中,即效靶比为 1:4。放入培养箱中共培养 24 h,上流式细胞仪,CD3-APC 染色标记 T 细胞,以 CFSE 现染(0 h)的 T 细胞作为阳性对照。通过流式检测 CFSE 信号强弱观察单独的 CAR-T 细胞的增殖情况以及效应细胞与肿瘤细胞共培养后的效应细胞的增殖情况,CFSE 信号越弱(左移越明显)表明其增殖能力越强。

1.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞术检测靶向 BCMA 的 CAR-T 细胞的转导效率

使用 PE anti-Myc 抗体对 PAN-T 细胞、CAR170-T 细胞、CAR174-T 细胞进行染色后 4℃ 避光孵育 1 h,以未转导的 PAN-T 细胞作为对照组进行流式检测,检测结果如图 2 所示,CAR170-T 细胞的转导效率为 62.7%、CAR174-T 细胞的转导效率为 45.1%。

2.2 检测肿瘤细胞表面 BCMA 抗原表达

以未染色的 RPMI-8226 细胞、HL-60 细胞作为阴性对照,使用 APC anti-human BCMA 抗体对 RPMI-8226 细胞、HL-60 细胞进行染色,流式细胞术检测肿瘤表面 BCMA 抗原的表达情况。结果显示:RPMI-8226 细胞表达 BCMA 抗原,HL-60 细胞不表达 BCMA 抗原,BCMA 的阳性率分别为 69.9%、0.84%。

2.3 荧光素酶报告基因检测法检测靶向 BCMA 的 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤效率

本实验使用了 RPMI-GFP-LUC 细胞作为靶细胞,PAN-T 细胞、CAR170-T 细胞和 CAR174-T 细胞作为效应细胞与靶细胞共孵育 12 h 后进行检测,实验结果如表 1 和图 4,与对照组 PAN-T 相比,在效靶比为 4:1 时,CAR170-T 细胞杀伤效率达到了 $88.5 \pm 0.3\%$,CAR-174 杀伤效率达到了 $98.5 \pm 0.7\%$ 。在设置的全部效靶比中,改造后的 CAR174-T(ScFv 结构为 16VH-(G4S)3-19VH)细胞对 RPMI-GFP-LUC 肿瘤细胞的杀伤效率要高于具有传统的单链可变区 ScFv(16VH-(G4S)3-16VL)结构的 CAR-170T 细胞的杀伤效率,且差异具有统计学意义。

2.4 荧光素酶报告基因检测法检测 CAR-T 细胞对表达 BCMA 抗原的肿瘤细胞的特异性杀伤

本实验使用了 RPMI-GFP-LUC 细胞和 HL-60-LUC 细胞作为靶细胞,PAN-T 细胞、CAR174-T 细胞作为效应细胞与靶细胞共孵育 12 h 后进行检测,如图 5 所示,当靶细胞为表达 BCMA 抗原的 RPMI-GFP-LUC 细胞时,CAR-T 细胞对其有明

显杀伤作用,杀伤强度随效靶比的升高而增强;当靶细胞为不表达 BCMA 抗原的 HL-60-LUC 细胞时,CAR-T 细胞对肿瘤细

胞不具有杀伤作用,PAN-T 细胞在效靶比 1:8 至 2:1 时,对靶细胞也没有杀伤作用。

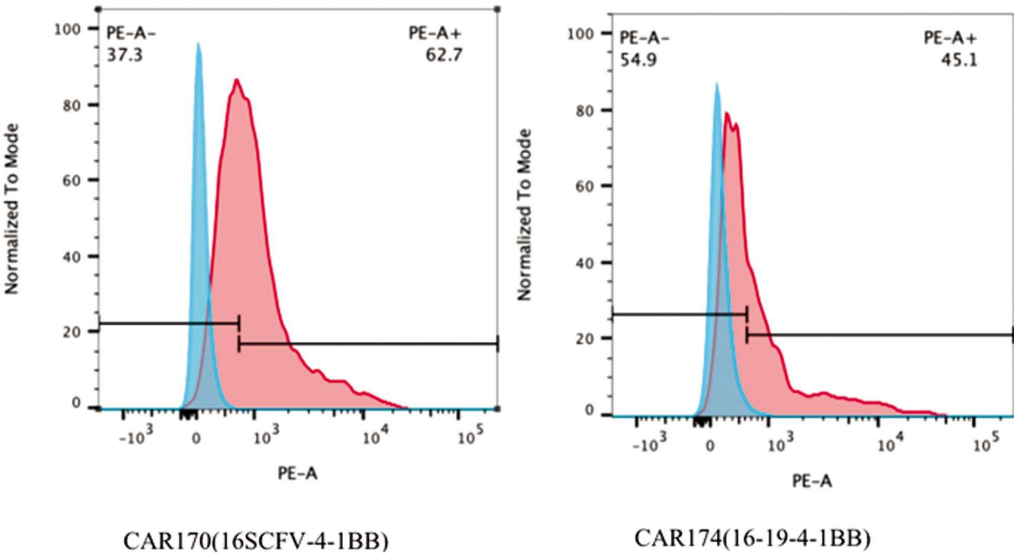


图 2 靶向 BCMA 的 CAR-T 细胞的转导效率

Fig. 2 Transduction efficiency of CAR-T cells targeting BCMA

Note: Blue represents the flow cytometry results of untransduced T cells stained with PE anti-Myc antibody, which is used as a negative control, and red represents CAR-T cells transduced with different retroviral vectors, stained with PE Flow cytometry results after anti-Myc antibody staining.

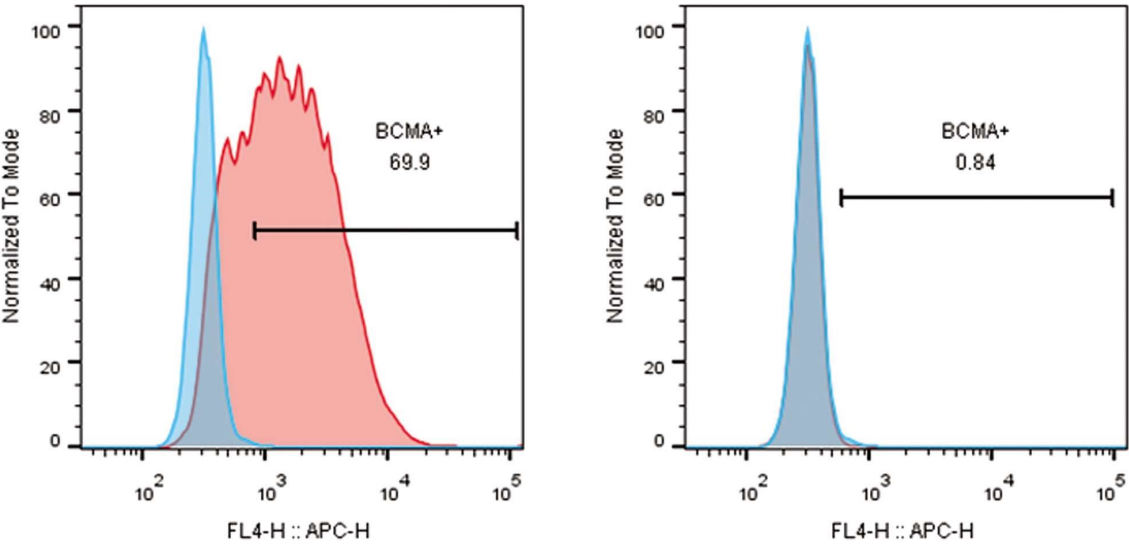


图 3 肿瘤细胞表面 BCMA 抗原检测

Fig.3 Detection of BCMA antigen on the surface of tumor cells

Note: Blue represents the results of flow cytometry of tumor cells not stained with APC anti-human BCMA antibody, which is used as a negative control, and red represents the results of flow cytometry of tumor cells stained with APC anti-human BCMA antibody.

表 1 荧光素酶报告基因检测法检测效应细胞对靶细胞的杀伤效果(%, $\bar{x}\pm s$)

Table 1 Luciferase reporter gene detection method to detect the killing effect of cells on target cells(%, $\bar{x}\pm s$)

	1:8	1:4	1:2	1:1	2:1	4:1
PAN-T	4.1± 2.8	13.2± 1.4	20.5± 0.7	30± 2.8	49.5± 4.9	70.5± 0.7
CAR170-T	9.5± 0.7	14.1± 0.1	21.2± 2.8	36.5± 5.0	66.3± 1.4	88.5± 0.3***
CAR174-T	34.0± 0.5**	38.5± 7.8*	53± 5.7*	77.1± 1.4**	90.2± 1.4**	98.5± 0.7***

Note: CAR-T cells and PAN-T cells were statistically analyzed separately, and the values were kept to the last decimal point, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, n=3.

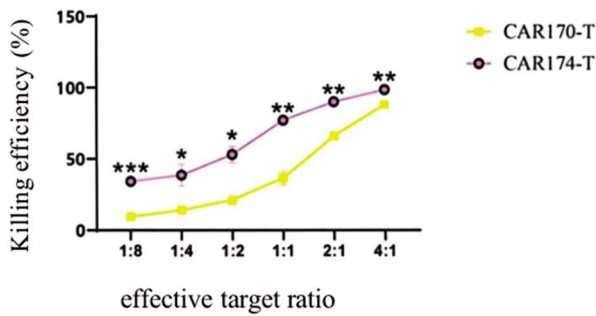


图4 荧光素酶报告基因检测 CAR170-T 细胞和 CAR174-T 细胞对 RPMI-GFP-LUC 细胞的杀伤能力
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $n=3$ 。

Fig. 4 Luciferase reporter gene detection of the killing ability of CAR170-T cells and CAR174-T cells on RPMI-GFP-LUC cells (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $n=3$)

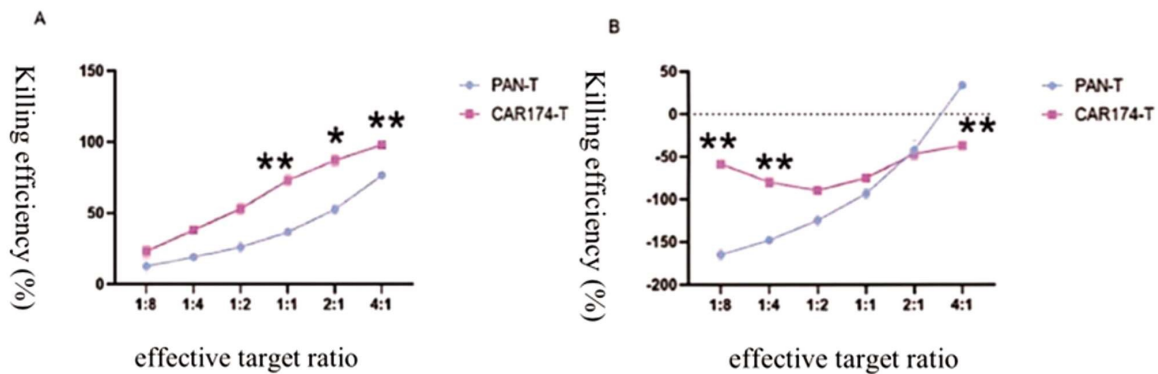


图5 荧光素酶报告基因检测法检测效应细胞对是否表达 BCMA 抗原的靶细胞的杀伤能力

A: 荧光素酶报告基因检测法检测效应细胞(PAN-T 和 CAR174-T 细胞)与 RPMI-GFP-LUC 细胞共孵育 12 h 的杀伤效率。B: 荧光素酶报告基因检测法检测效应细胞(PAN-T 和 CAR174-T 细胞)与 HL-60-LUC 细胞共孵育 12 h 的杀伤效率。(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $n=3$ 。)

Fig. 5 Luciferase reporter gene detection method to detect the killing ability of effector cells to target cells expressing BCMA antigen A: Luciferase reporter gene detection method to detect effector cells (PAN-T and CAR174-T cells) Killing efficiency of LUC cells co-incubated for 12 h. B: The killing efficiency of effector cells (PAN-T and CAR174-T cells) co-incubated with HL-60-LUC cells for 12 h was detected by luciferase reporter gene assay. (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $n=3$)

表 2 流式细胞术检测效应细胞对靶细胞的杀伤效果(%, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 The killing effect of effector cells on target cells detected by flow cytometry(%, $\bar{x}\pm s$)

	1:4	1:2	1:1	2:1	4:1
PAN-T	-0.17± 0.8	2.6± 0.4	6.2± 1.0	11.8± 1.1	16.6± 0.6
CAR170-T	0.2± 0.5	4.8± 0.3**	8.9± 0.1**	14.0± 0.8	19.9± 0.7**
CAR174-T	1.2± 0.7	7.8± 1.1***	12.7± 1.5***	20.2± 2.3**	32.8± 0.9***

Note: CAR-T cells and PAN-T cells were statistically analyzed separately, and the values were kept to the last decimal point(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $n=3$).

3 讨论

多发性骨髓瘤是一种骨髓来源的难治性癌症,会导致贫血、高钙血症、骨病变、免疫抑制伴重复感染和肾功能衰竭^[10,21]。它的特点是单克隆浆细胞大量增殖,最终可能导致肾功能衰竭、贫血、溶骨性骨病和与免疫抑制相关的反复感染^[11,19]。MM 在 65-74 岁的人群中最常见,中位年龄为 69 岁^[12],占所有癌症类型的 1%,发病率为每 10 万人 6-7 例^[13]。正在应用的治疗方式包括免疫调节剂、自体造血干细胞移植和化疗,但由于骨髓

2.5 流式细胞术检测 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤

本实验使用了 RPMI-GFP-LUC 细胞作为靶细胞,使用 PAN-T 细胞、CAR170-T 细胞、CAR174-T 细胞作为效应细胞共孵育 12 h 后进行检测,实验结果如表 2 和图 6 所示,与对照组 PAN-T 相比,CAR174-T 细胞的杀伤效果较强,CAR170-T 细胞也具有杀伤肿瘤的能力,在效靶比为 4:1 时,CAR170-T 和 CAR174-T 的杀伤效率分别达到了 $19.9\pm 0.7\%$ 、 $32.8\pm 0.9\%$ 。

2.6 流式细胞术检测肿瘤细胞对 CFSE 标记的 CAR-T 细胞的增殖影响

本实验使用了 RPMI-GFP-LUC 细胞作为靶细胞,使用 PAN-T 细胞、CAR170-T 细胞、CAR174-T 细胞作为效应细胞以效靶比为 1:1 共孵育 24 h 后进行流式检测,实验结果如图 7,可以观察到与 PAN-T 细胞相比,CAR-T 细胞的增殖能力较强。

瘤的异质性分子和细胞遗传学畸变,该疾病仍然无法治愈^[14,20]。近十年来,靶向药物治疗已成为癌症治疗的缩影。例如,多种 BCMA 靶向疗法,包括抗体-药物偶联物(ADC)^[15]、嵌合抗原受体(CAR)-T 细胞^[16]和双特异性 T 细胞接合物(BiTE)^[17],在复发和难治性多发性骨髓瘤患者中取得了显著的临床疗效。各种免疫疗法的开发研究正在进行中,但迄今为止,嵌合抗原受体 T 细胞疗法(CAR-T)在临床开发方面取得了最大进展^[18]。

目前全球上市的 CAR-T 产品共有 9 款,其中靶向 BCMA 的 CAR-T 产品已有 3 款,包括今年 6 月 30 日我国首个获批的

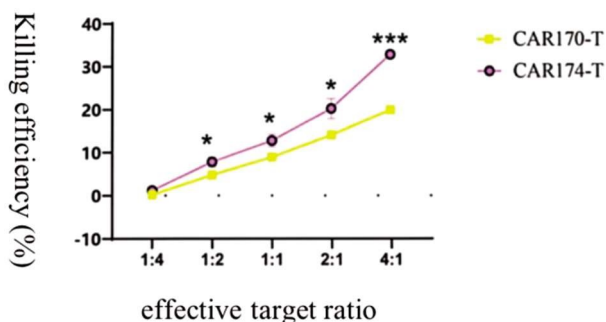


图6 流式细胞术检测 CAR170-T 细胞和 CAR174-T 细胞对

RPMI-GFP-LUC 细胞的杀伤能力 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$)。

Fig. 6 The killing ability of CAR170-T cells and CAR174-T cells on RPMI-GFP-LUC cells detected by flow cytometry (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$).

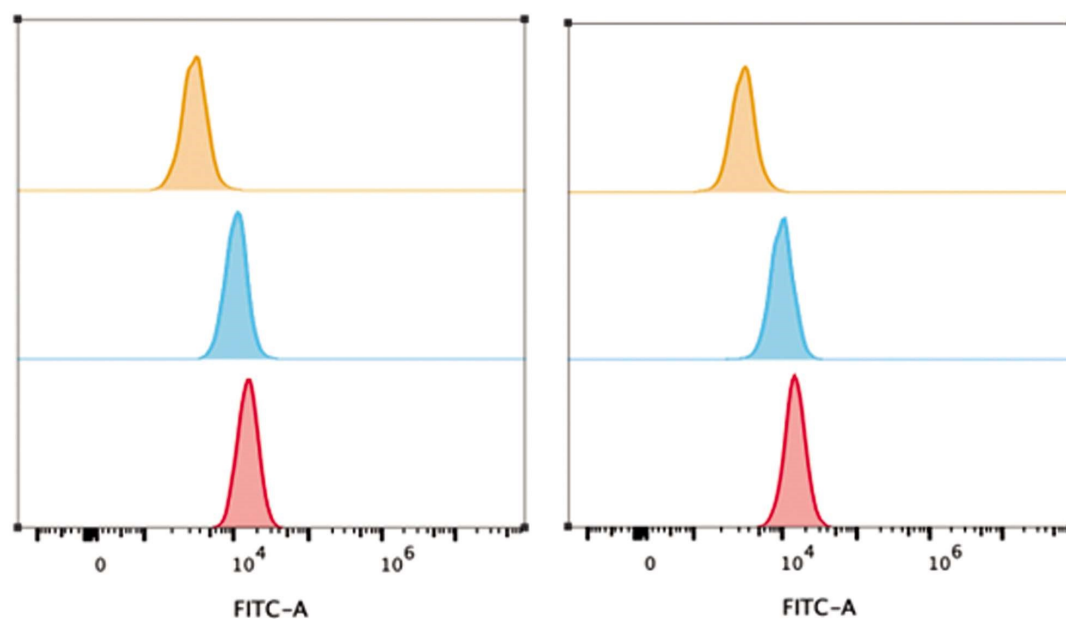


图7 CFSE 流式细胞术检测 CAR-T 细胞与 RPMI-8226 细胞共培养时的体外增殖能力从下至上依次为 PAN-T 细胞、CAR170-T 细胞、CAR174-T 细胞。左图:CAR-T 细胞与 RPMI-8226 肿瘤细胞共培养 24 h 后的流式检测结果;右图:仅 CAR-T 细胞培养 24 h 后的流式检测结果。CFSE-FITC 信号左移越明显,表明 T 细胞增殖能力越强。

Fig. 7 CFSE flow cytometry detection of the in vitro proliferation ability of CAR-T cells and RPMI-8226 cells when co-cultured. From bottom to top, the order is PAN-T cells, CAR170-T cells, and CAR174-T cells. Left panel: flow cytometry results of CAR-T cells co-cultured with RPMI-8226 tumor cells for 24 h; right panel: flow cytometry results of only CAR-T cells cultured for 24 h. The more obvious the CFSE-FITC signal shifted to the left, the stronger the proliferative ability of T cells.

基于此,我们在本课题组前期实验基础上,对噬菌体展示技术筛选出来的 CAR 质粒结构中 ScFv 的亲合力较高 VH 结构进行重组,从而代替传统的单链可变区(ScFv),并通过逆转录病毒载体转导成功构建了一种新型的二代靶向 BCMA 的 CAR-T 细胞,体外实验表明,该细胞能够有效且特异性杀伤人 BCMA 阳性肿瘤细胞,下一步拟进行动物实验验证 anti-BCMA-CAR-T 细胞在体内对肿瘤细胞的杀伤效果。

参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] Smith A, Howell D, Patmore R, et al. Incidence of haematological malignancy by subtype: a report from the Haematological Malignancy

由信达生物与驯鹿生物共同开发的全球首款全人源靶向 BCMA 的 CAR-T 产品:伊基奥仑赛注射液(商品名:福可苏)。这三款产品均以慢病毒为基因载体转染自体 T 细胞,且仅有一款产品为全人源靶向 BCMA。然而,目前关于靶向 BCMA 的 CAR-T 细胞研究中,大多都是基于鼠源的靶向 BCMA ScFv 的 CAR 分子^[23-25],且包装方式为慢病毒载体。但是从 CAR-T 产品的工业化生产角度来看,逆转录病毒载体较慢病毒载体不管是在产能及生产成本上都是具有一定优势的。比如,慢病毒载体^[26]的包装流程虽然简单,但因其包装质粒及包装细胞的需求量大,导致批次之间的异度较大,这在一定程度上限制了生产规模。逆转录病毒载体^[27]包装流程虽复杂,但其能够形成稳定产毒的细胞株,这在一定程度上是大大减少了包装质粒及包装细胞的用量。此外,逆转录病毒载体工艺的 CAR-T 产品成本低、售价低,能更大程度的造福广大的癌症患者群体。

Research Network [J]. British Journal of Cancer, 2011, 105 (11): 1684-1692.

- [3] Gandolfi S, Laubach JP, Hideshima T, et al. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma [J]. Cancer Metastasis Reviews, 2017, 36(4): 561-584.
- [4] Quach H, Ritchie D, Stewart AK, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma [J]. Leukemia, 2010, 24(1): 22-32.
- [5] Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(8): 2048-2060.
- [6] Madry C, Laabi Y, Callebaut I, et al. The characterization of murine BCMA gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor

- receptor superfamily [J]. International Immunology, 1998, 10(11): 1693-1702.
- [7] Yu B, Jiang T, Liu D. BCMA-targeted immunotherapy for multiple myeloma[J]. Journal of hematology & oncology, 2020, 13(1): 125.
- [8] Fujiwara K, Masutani M, Tachibana M, et al. Impact of scFv structure in chimeric antigen receptor on receptor expression efficiency and antigen recognition properties [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 527(2): 350-357.
- [9] 康子茜, 王加利, 和似琦, 等. 检测 B 细胞成熟抗原的噬菌体展示单链抗体实时荧光定量免疫 PCR 方法建立 [J]. 山东医药, 2022, 62(21): 43-47.
- [10] Zhang K, Desai A, Zeng D, et al. Magic year for multiple myeloma therapeutics: Key takeaways from the ASH 2015 annual meeting[J]. Oncotarget, 2017, 8(6): 10748-10759.
- [11] Batuman V. The pathogenesis of acute kidney impairment in patients with multiple myeloma [J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2012, 19(5): 282-286.
- [12] Kumar SK, Callander NS, Adekola K, et al. Multiple Myeloma, Version 3.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2020, 18(12): 1685-1717.
- [13] Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, et al. Multiple myeloma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17046.
- [14] Verdonck LF, Lokhorst HM, Dekker AW, et al. Graft-versus-myeloma effect in two cases[J]. Lancet, 1996, 347(9004): 800-801.
- [15] Lee HC, Raje NS, Landgren O, et al. Phase 1 study of the anti-BCMA antibody-drug conjugate AMG 224 in patients with relapsed/refractory multiple myeloma [J]. Leukemia, 2021, 35(1): 255-258.
- [16] Mullard A. FDA approves first BCMA-targeted CAR-T cell therapy [J]. Nature reviews Drug discovery, 2021, 20(5): 332.
- [17] Labrijn AF, Janmaat ML, Reichert JM, et al. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline[J]. Nature reviews Drug discovery, 2019, 18(8): 585-608.
- [18] Denlinger N, Bond D, Jaglowski S. CAR T-cell therapy for B-cell lymphoma[J]. Current problems in cancer, 2022, 46(1): 100826.
- [19] Silberstein J, Tuchman S, Grant SJ. What Is Multiple Myeloma?[J]. JAMA, 2022, 327(5): 497.
- [20] Cowan AJ, Green DJ, Kwok M, et al. Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review[J]. JAMA, 2022, 327(5): 464-477.
- [21] Mikhael J, Ismaila N, Cheung MC, et al. Treatment of multiple myeloma: ASCO and CCO joint clinical practice guideline[J]. Journal of clinical oncology, 2019, 37(14): 1228-1263.
- [22] Durie BGM, Hoering A, Abidi MH, et al. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial[J]. Lancet, 2017, 389(10068): 519-527.
- [23] 郝瑞栋, 田芳, 杨振莉, 等. 靶向 B 细胞成熟抗原的嵌合抗原受体 T 细胞的构建及其对肿瘤细胞的杀伤[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(02): 152-158.
- [24] Huo J, Huang Y, Zheng Z, et al. Development of a T cell-redirecting bispecific antibody targeting B-cell maturation antigen for the suppression of multiple myeloma cell growth [J]. Antibody therapeutics, 2022, 5(2): 138-149.
- [25] Xiong M, Liu R, Lei X, et al. A Novel CD3/BCMA Bispecific T-cell Redirecting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma [J]. Journal of immunotherapy, 2022, 45(2): 78-88.
- [26] Wang X, Ma C, Rodríguez Labrada R, et al. Recent advances in lentiviral vectors for gene therapy [J]. Science China Life sciences, 2021, 64(11): 1842-1857.
- [27] Kim SH, Kim S, Robbins PD. Retroviral vectors [J]. Advances in virus research, 2000, 55: 545-563.