

基于多链结构的 CD30 CAR-T 细胞的抗肿瘤作用研究

宋羽佳¹,汪晨²,王恩秀²,汪波¹

摘要 目的 基于衔接蛋白 DAP12 的多链嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 开发靶向 CD30 的 CAR-T 细胞药物,研究 CD30 CAR-T 对霍奇金淋巴瘤肿瘤细胞的体外和体内临床前药效。**方法** 通过基因合成和分子克隆技术,设计构建靶向 CD30 的 CAR 质粒,进行慢病毒包装,将得到的慢病毒转染 T 细胞,其中靶向 CD30 的多链 CAR-T 为 CD30-KIRS2/Dap12-BB 组,单链二代 CAR-T 为 CD30-41BB ζ 组,未做病毒感染的 T 细胞为 NTD 组,利用流式细胞术检测 CAR 阳性率情况,通过乳酸脱氢酶 (LDH) 释放检测细胞的杀伤活性,采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测细胞因子干扰素 γ (IFN- γ) 的分泌水平,进一步通过小鼠异种移植瘤模型检测 CD30 CAR-T 在小鼠体内抗肿瘤活性。**结果** 靶向 CD30 的多链 CAR-T 和单链二代 CAR-T 进行对比,研究发现多链 CAR-T 与单链 CAR-T 的杀瘤作用相似。但值得注意的是,多链 CAR-T 的 IFN- γ 分泌水平更高 ($P < 0.001$)。更重要的是,在小鼠的肿瘤模型实验中,多链 CAR-T 实现了肿瘤的完全消退。**结论** 靶向 CD30 的多链 CAR-T 在抗肿瘤活性方面优于传统单链 CAR-T。

关键词 嵌合抗原受体修饰的 T 细胞;CD30;霍奇金淋巴瘤;DAP12;过继性细胞疗法

中图分类号 R 733.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0666-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.017

霍奇金淋巴瘤主要来源于 B 细胞谱系,包括两种亚型,经典型霍奇金淋巴瘤和结节性淋巴细胞为主的霍奇金淋巴瘤。霍奇金淋巴瘤是一种罕见的淋巴瘤,经典型霍奇金淋巴瘤占有霍奇金淋巴瘤病例的近 95%^[1]。霍奇金淋巴瘤具有双峰年龄分布,峰值分别在 20~30 岁和 50~70 岁,偶尔会发生在 ≥ 75 岁的患者中^[2]。靶向 CD30 的抗体偶联药物本妥昔单抗治疗霍奇金淋巴瘤的客观缓解率能达到 75%,完全缓解率为 34%^[3]。然而,抗体疗法受限于体内分布,临床获益是短暂的,因此必须探索其他

方法。过继性细胞疗法是治疗癌症的一种策略,近年来展示出极大的应用前景^[4-5]。对于霍奇金淋巴瘤,CD30 是作为 CAR-T 细胞治疗靶点的极好候选者,因为其在霍奇金淋巴瘤肿瘤细胞上的丰富和特异性表达,但在正常组织上的表达有限^[6-8]。因此,该研究基于 DAP12 的多链嵌合抗原受体开发靶向 CD30 CAR-T,研究 CD30 CAR-T 对霍奇金淋巴瘤肿瘤细胞的体外和体内临床前药效。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞及质粒 HEK-293T 细胞购自美国细胞培养物收藏中心,由南京卡提医学科技有限公司保存。L428 人霍奇金淋巴瘤细胞保存于南京卡提医学科技有限公司。T 细胞来源于健康志愿者外周血。慢病毒表达载体包装质粒 pMDLg/PRRE、pRSV-Rev、pMD2.G 购自湖南丰晖生物科技有限公司。JM109 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂 T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购自 NEB(北京)有限公司,中提质粒抽提试剂盒购自南京诺维赞生物科技有限公司,PEI 转染试剂购自上海碧云天生物技术有限公司,Ficoll 分离液购自 GE 公司;T 细胞分选试剂盒 (EasySepTM Human T Cell Isolation Kit) 购自 STEMCELL Technologies;T 细胞激活试剂 (CD3/CD28 Dynabeads)、Optmizer 培养基、DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自 Gibco 公司,X-VIVO 15 培养基购自 LONZA 公司;人白介素-2 (interleukin-2, IL-2) 和干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 细胞因子检测试剂盒购自 R&D Systems 公司,无血清细胞冻存液 CS10 购自 BioLife 公司。抗人 CD3 抗体 (FITC)、抗人 CD3 抗体 (APC-Cy7)、链霉亲和素 (PE)、链霉亲和素 (APC) 和抗人 CD30 antibody (APC) 均购自 BD 公司;Biotinylated Human CD30 蛋白购自 Acro Biosystems 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肿瘤细胞培养 L428 细胞为人经典型霍奇

2024-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81970177)

作者单位:¹中山大学附属第七医院肿瘤科,深圳 518107

²南京卡提医学科技有限公司,南京 210000

作者简介:宋羽佳,女,硕士研究生;

汪波,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:

wangb68377@sina.com

金淋巴瘤细胞,用含有灭活的 10% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养,每隔 2~3 d 待细胞长满后分瓶传代,将处于对数生长期的肿瘤细胞用于体内肿瘤的接种。

1.2.2 CAR 慢病毒表达载体构建及包装 CD30 scFv 委托上海生工生物工程有限公司合成含有 CD30 scFv 的 DNA 片段。CD30 scFv 基因序列通过双酶切将 CD30 scFv 片段插入 CAR 慢病毒骨架载体(KIRS2/DAP12-BB 和 BB ζ)中构建 CD30-KIRS2/Dap12-BB 和 CD30-41BB ζ 慢病毒表达载体,选取筛选得到的阳性克隆细菌进行摇菌并且抽提质粒小提。质粒送上海生工进行测序。选择测序结果正确的克隆进行摇菌,用去内毒素的质粒大提试剂盒提取质粒。采用第三代慢病毒包装系统进行病毒包装:将 293T 细胞培养于 T150 培养瓶中,5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,每 48 h 进行换液传代及规模放大,最终放大至 8 个 T150 方瓶。待汇合度达到 80%~90% 时进行转染;将 CAR 质粒和 3 个包装质粒,通过 PEI 转染,每个 T150 瓶需要添加 10.9 μg pMDLg/PRRE、5.5 μg pRSV-Rev、5.5 μg pMD2. G、21.8 μg CAR 质粒。PEI 转染 6 h 换液,24 h 第一次收集慢病毒悬液保存至 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,48 h 第 2 次收集慢病毒悬液,与第 1 次收集到的慢病毒悬液合并,用 0.45 μm 的滤膜过滤去除细胞碎片,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000~24 000 r/min 离心过夜,离心后,倾倒全部上清液,每管加入 200 μl X-vivo15 培养基重悬,进行病毒分装,迅速存放于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.3 CAR-T 细胞的制备和鉴定 通过淋巴细胞分离液提取外周血单个核细胞,磁珠分选 $\text{CD}3^+$ T 细胞。加入完全培养基(optimizer 培养基 + 10% 人 AB 血清 + 100 IU/ml IL-2 + 2 mmol/L Glutamax + Supplement)重悬,按数量比 3:1 加入 $\text{CD}3/\text{CD}28$ 刺激磁珠。24 h 后,取所需量的 T 细胞,以感染复数 $\text{MOI} = 3$ 将 T 细胞与慢病毒混合铺入合适的培养容器中,未转导(not transduced,NTD)组不加入慢病毒,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱进行培养。每隔 1~2 d 传代补液一次,培养至细胞处于静息状态,去除 $\text{CD}3/\text{CD}28$ 磁珠后,将细胞冻存于液氮中,用于后续细胞功能分析。制备的 CAR-T 细胞分别命名 CD30-KIRS2/Dap12-BB 组和 CD30-41BB ζ 组,未做病毒侵染的 T 细胞命名为 NTD 组。

1.2.4 CAR-T 细胞体外杀伤能力的检测 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基常规培养 L428,收集细

胞, 1×10^4 细胞/孔接种于 96 孔板中,按照效靶比(E:T)为 0:1、1:1、5:1、10:1 将 CAR-T 细胞加入到靶细胞中,以 NTD 作为阴性对照,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 18 h,根据乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)检测 CAR-T 细胞对靶细胞杀伤作用。

1.2.5 CAR-T 细胞因子分泌试验 靶细胞培养:L428 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基进行培养,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 进行培养。细胞因子释放试验在 96 孔板上通过共培养靶细胞与 CAR-T 共培养进行,E:T 为 2:1,靶细胞接种 1×10^4 细胞/孔,共培养培养基为 200 μl 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基。共培养 24 h 后,参考 IFN- γ 的 ELISA 试剂盒说明书,检测上清液中 IFN- γ 含量。

1.2.6 实验动物及伦理 实验所用动物的种属为 Mus Musculus,品系为 NCG,6~8 周龄,性别为雌性。动物级别为 SPF 级,体质量 18~22 g,由江苏集萃药康生物科技有限公司提供。动物试验设计和实施符合赫尔辛基宣言、医学伦理道德标准及我国的法律法规,并得到中山大学附属第七医院实验动物伦理委员会的批准。许可证号:SCXK(苏)2023-0009。

1.2.7 肿瘤细胞的接种、分组及给药方案 将 PBS 重悬的 L428 肿瘤细胞接种于小鼠右侧肋部皮下, 5×10^5 细胞/只,在肿瘤细胞注射接种 20 d 后,根据荷瘤小鼠肿瘤体积将其随机分为 3 组(NTD 组、CD30-KIRS2/Dap12-BB 组和 CD30-41BB ζ 组)进行治疗(当天记为分组后 0 d, D0),给药途径采用尾静脉给药,每组 5 只。

1.3 统计学处理 使用 Graphpad Prism 9.0 软件进行统计学分析和作图。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CAR 表达质粒构建及验证 通过上海生工生物工程有限公司全基因合成 CD30 scFv,在实验室现有载体 pWC032 和 pKT004 的基础上,通过酶切连接的方法,分别构建 CD30-KIRS2/Dap12-BB CAR 质粒和 CD30-BB ζ CAR 质粒,对 CAR 质粒进行双酶切鉴定,CD30-KIRS2/Dap12-BB CAR 质粒条带约为 756 bp 和 8 583 bp,CD30-41BB ζ CAR 质粒条带约为 756 bp 和 8 449 bp。载体示意图及酶切鉴定结果如图 1 所示,两个 CAR 质粒条带大小均正确。

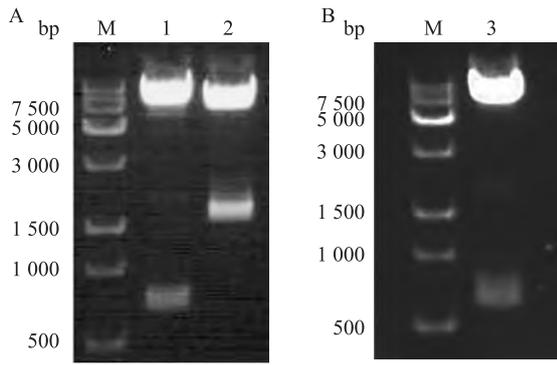


图1 CAR质粒酶切电泳图

A: CD30-KIRS2/Dap12-BB质粒 BamHI/NheI 双酶切电泳图; M: 15 000 bp DNA Marker; 泳道 1: CAR质粒 BamHI/NheI 双酶切; B: CD30-41BBζ质粒 XbaI/XhoI 双酶切电泳图; 泳道 3: CAR质粒 XbaI/XhoI 双酶切

2.2 CAR慢病毒及CAR-T细胞制备 将CAR表达质粒与包装质粒用PEI转染293T细胞进行慢病毒包装,经超速离心浓缩后,CD30-KIRS2/Dap12-BB CAR慢病毒和CD30-41BBζ CAR慢病毒滴度分别为 2.7×10^7 TU/ml 和 4.6×10^7 TU/ml。T细胞激活24 h后,以 MOI = 3 加入慢病毒进行感染,在细

胞收获冻存时检测CAR阳性率,两种CD30 CAR结构示意图见图2A,结果表明两种CD30 CAR-T细胞均能较好表达CAR分子,CAR表达都在50%以上(图2B)。

2.3 基于多链结构的CD30 CAR-T细胞体外功能测试 为了检测CD30 CAR-T细胞的杀伤活性,本研究采用L428作为抗原阳性的靶细胞,流式细胞术检测结果表明L428高表达CD30抗原(图3A)。

细胞杀伤实验结果表明两种CD30 CAR-T细胞对靶细胞均有显著的杀伤作用,其中CD30-KIRS2/Dap12-BB组杀伤作用优于CD30-41BBζ组(图3B)。NTD组没有展现出特异性杀伤作用,表明两种CD30 CAR-T是依赖CD30抗原的特异性杀伤作用,CD30-KIRS2/Dap12-BB组抗肿瘤效果更好。

CAR-T与靶细胞共培养时细胞因子分泌实验结果表明,CD30-KIRS2/Dap12-BB组分泌IFN-γ能力最强,CD30-41BBζ组分泌IFN-γ能力稍弱于CD30-KIRS2/Dap12-BB组,两种CD30 CAR-T与抗原阳性肿瘤细胞共培养均能产生显著的响应作用(图3C)。

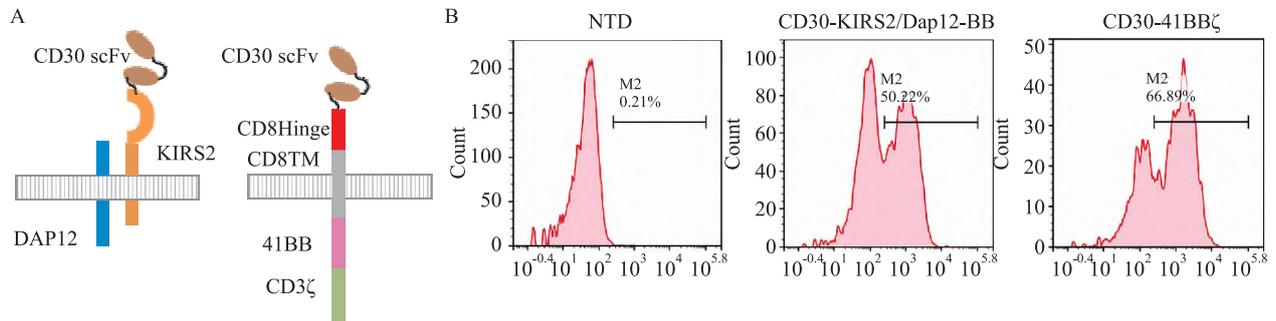


图2 CAR结构设计及表达

A: CD30 CAR-T结构示意图; B: CD30 CAR表达流式图

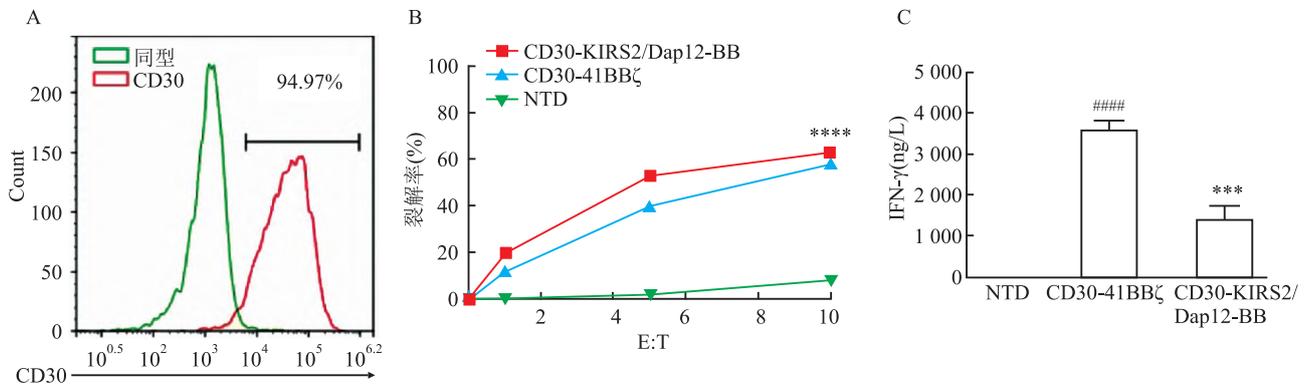


图3 肿瘤细胞抗原表达及靶向CD30 CAR-T体外功能分析

A: L428的CD30表达情况; B: 两种CD30 CAR-T杀伤情况($n = 3$); 与NTD组比较: **** $P < 0.0001$; C: 两种CD30 CAR-T细胞因子分泌情况($n = 3$); 与CD30-KIRS2/Dap12-BB组比较: *** $P < 0.001$; 与NTD组比较: **** $P < 0.0001$

2.4 基于多链结构的 CD30 CAR-T 细胞体内抗肿瘤作用 为了研究 CD30-KIRS2/Dap12-BB CAR-T 的体内抗肿瘤活性,本研究用 L428 细胞建立了 NCG 小鼠皮下移植瘤模型。20 d 后,待肿瘤体积大小达到 50 mm^3 时,将荷瘤小鼠随机分为 3 组,并且尾静脉注射细胞进行治疗。结果表明,CD30-KIRS2/Dap12-BB 组和 CD30-41BB ζ 组可以迅速实现肿瘤消退,而 NTD 组没有产生肿瘤抑制作用。结果表明 CD30-KIRS2/Dap12-BB 抗肿瘤效果更持久,具备强大的靶向 CD30 的抗肿瘤活性(图 4)。

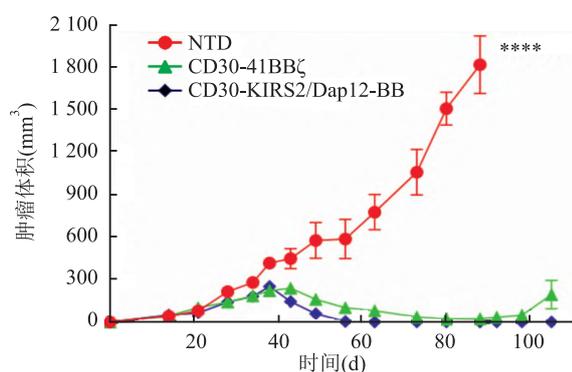


图 4 小鼠肿瘤体积变化情况 (n=5)
与 CD30-KIRS2/Dap12-BB 组比较: **** $P < 0.0001$

3 讨论

霍奇金淋巴瘤是一种影响跨越儿童和成人人群的恶性淋巴瘤。虽然大多数霍奇金淋巴瘤患者通过一线治疗治愈,但约 15% 的患者要么是原发难治性疾病,要么是在最初治疗有反应后复发^[9]。CAR-T 细胞是治疗复发或难治性血液系统恶性肿瘤(包括淋巴瘤)的一种具有前景的新疗法^[10-12]。CD30 是一个高特异性的靶点,因为它在几乎所有的经典霍奇金淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤以及其他部分淋巴瘤类型(包括皮肤 T 细胞淋巴瘤和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤)中普遍表达^[13]。传统的 CAR 结构体系普遍采用的是单链嵌合分子结构的设计,主要结构包括抗原结合区、铰链区、跨膜区和细胞内信号区^[14],然而在生理状态下细胞的免疫受体通常是以多链复合物的结构存在,例如包括配体结合链和免疫酪氨酸活化序列^[15]。

本项目组根据免疫受体的这一生理特性设计了独特的多链 CAR 结构体系,以杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)和 DAP12 为基础的多链体系。该 CAR 结构优点在于允许所有相关信号结构域位于

细胞膜附近^[16]。从研究结果可以看出,CD30-KIRS2/Dap12-BB CAR-T 细胞与 CD30-41BB ζ 组对 L428 细胞体外杀瘤效应相当。ELISA 法检测 IFN- γ 分泌水平结果显示,在 L428 肿瘤细胞刺激下 CD30-KIRS2/Dap12-BB 组较 CD30-41BB ζ 组 IFN- γ 分泌水平显著提高。分别将两种 CD30 CAR-T 治疗 NCG 小鼠皮下移植瘤模型,结果显示 CD30-KIRS2/Dap12-BB 组能够实现肿瘤完全消退且 100 d 内肿瘤没有复发。结果表明 CD30-KIRS2/Dap12-BB 组抗肿瘤效果更持久,具备强大的靶向 CD30 的抗肿瘤活性。

本研究从体外杀伤、细胞因子分泌以及体内药效等多个方面证明了多链 CAR-T 在抗肿瘤药效活性方面优于传统二代 CAR-T。尽管如此,CAR-T 的临床治疗在开发高效抗肿瘤候选药物的同时需要考虑到临床的安全性,高抗肿瘤活性可能带来更大的临床毒副作用(如细胞因子释放综合征等),多链 CAR-T 虽然在临床前药效评估中具有一定的优势,但细胞因子分泌水平更高可能会给临床的副作用处理带来更大的挑战。

参考文献

- [1] Flora D R, Parsons S K, Liu N, et al. Classical Hodgkin lymphoma; real-world observations from physicians, patients, and caregivers on the disease and its treatment (CONNECT)-a cross-sectional survey of patients with stage III or IV classical Hodgkin lymphoma compared by age [J]. *Blood*, 2021, 138:1966-6.
- [2] Brice P, de Kerviler E, Friedberg J W. Classical Hodgkin lymphoma [J]. *Lancet*, 2021, 398(10310):1518-27.
- [3] Bartlett N L, Chen R, Fanale M A, et al. Retreatment with brentuximab vedotin in patients with CD30-positive hematologic malignancies [J]. *Hematol Oncol*, 2014, 7(1):24.
- [4] San-Miguel J, Dhakal B, Yong K, et al. Cilta-cel or standard care in lenalidomide-refractory multiple myeloma [J]. *N Engl J Med*, 2023, 389(4):335-47.
- [5] Rodriguez-Otero P, Ailawadhi S, Arnulf B, et al. Ide-cel or standard regimens in relapsed and refractory multiple myeloma [J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(11):1002-14.
- [6] Nakashima M, Uchimar K. CD30 expression and its functions during the disease progression of adult T-cell leukemia/lymphoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10):8731.
- [7] Dumitru A V, Tăpoi D A, Halcu G, et al. The polyvalent role of CD30 for cancer diagnosis and treatment [J]. *Cells*, 2023, 12(13):1783.
- [8] Prince H M, Hutchings M, Domingo-Domenech E, et al. Anti-CD30 antibody-drug conjugate therapy in lymphoma: current knowledge, remaining controversies, and future perspectives [J]. *Ann Hematol*, 2023, 102(1):13-29.

- [9] Glimelius I, Ekberg S, Jerkeman M, et al. Long-term survival in young and middle-aged Hodgkin lymphoma patients in Sweden 1992–2009—trends in cure proportions by clinical characteristics [J]. *Am J Hematol*, 2015, 90(12): 1128–34.
- [10] 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.
- [11] Schuster S J, Bishop M R, Tam C S, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(1):45–56.
- [12] Roschewski M, Longo D L, Wilson W H. CART-cell therapy for large β -cell lymphoma—who, when, and how? [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(7):692–6.
- [13] Grover N S, Savoldo B. Challenges of driving CD30-directed CAR-T cells to the clinic [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):203.
- [14] Rafiq S, Hackett C S, Brentjens R J. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(3):147–67.
- [15] Sigalov A B. Evolution of immunity: no development without risk [J]. *Immunol Res*, 2012, 52(3):176–81.
- [16] Paul W. Multichain immune recognition receptor signaling from spatiotemporal organization to human disease [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 640:vii–viii.

Study on the anti-tumor effect of CD30 CAR-T cells based on multi-chain structure

Song Yujia¹, Wang Chen², Wang Enxiu², Wang Bo¹

(¹Dept of Oncology, The Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107;

²Nanjing KATI Medical Technology Co. Ltd., Nanjing 210000)

Abstract Objective To develop a CD30-targeted CAR-T cell drug based on the multi-chain chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) of the bridging protein DAP12, and to study the *in vitro* and *in vivo* preclinical efficacy of CD30 CAR-T on Hodgkin lymphoma tumor cells. **Methods** Through gene synthesis and molecular cloning techniques, a CAR plasmid targeting CD30 was designed and constructed, and the obtained lentivirus was packaged. The T cells were transfected with the lentivirus, where the multi-chain CAR-T targeting CD30 was the CD30-KIRS2/Dap12-BB group, the single-chain second-generation CAR-T was the CD30-41BB ζ group, and the T cells without virus infection were the NTD group. The positive rate of CAR was detected by flow cytometry, the cytotoxicity of the cells was detected by lactate dehydrogenase (LDH) release assay, the secretion level of the cytokine interferon γ (IFN- γ) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the antitumor activity of CD30 CAR-T in mice was further detected by a mouse xenograft tumor model. **Results** A comparison was made between the multi-chain CAR-T targeting CD30 and the single-chain second-generation CAR-T. It was found that the antitumor effect of the multi-chain CAR-T was similar to that of the single-chain CAR-T. However, it was worth noting that the IFN- γ secretion level of the multi-chain CAR-T was higher ($P < 0.001$). More importantly, in the mouse tumor model experiment, the multi-chain CAR-T achieved complete tumor regression. **Conclusion** The multi-chain CAR-T targeting CD30 is superior to the traditional single-chain CAR-T in terms of antitumor activity. **Key words** chimeric antigen receptor modified T cells; CD30; Hodgkin lymphoma; DAP12; adoptive cell therapy