

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.005

· 研究快报 ·

靶向 CD19 的 CAR 修饰的 NK 细胞对 B 细胞淋巴瘤的杀伤

袁园¹, 秦扬², 游凤涛³, 陈丹³, 邹建炫¹, 朱学军⁴, 李炳宗⁵, 袁磊⁶, 孟会敏¹, 张波桢³, 安钢力¹, 杨林¹(1. 苏州大学唐仲英血液学研究中心, 江苏 苏州 215123; 2. 云南省肿瘤医院 泌尿科, 云南 昆明 650118; 3. 博生吉医药科技(苏州)有限公司, 江苏 苏州 215123; 4. 江苏省中医院 血液科, 江苏 南京 210029; 5. 苏州大学附属第二医院 血液科, 江苏 苏州 215004; 6. 中国人民解放军总医院 血液科, 北京 100853)

[摘要] **目的:** 利用鼠杂交瘤技术筛选和制备治疗性 CD19 单克隆抗体, 探讨以 CD19 scFv 序列构建 CD19-CAR (pCD19-CAR) 修饰的 NK 细胞对 CD19⁺ B 细胞淋巴瘤细胞的杀伤作用。**方法:** 用偶联多肽免疫小鼠制备 CD19 单克隆抗体, 然后用基因测序法获得抗体的序列。分析抗体序列, 并通过基因合成和分子克隆技术构建 pCD19-CAR 片段, 然后将其克隆到慢病毒载体上, 病毒包装制备后, 转染 NK-92MI 细胞。最后, 用流式细胞术检测不同的 pCD19-CAR-NK-92MI 细胞对 CD19⁺ 细胞的杀伤率。**结果:** (1) 成功筛出特异性强的 CD19 单克隆抗体-pCD19; (2) 抗体检测结果显示 CD19⁺ 的 Ramos 细胞的阳性率为 84.3%, Raji 为 85.6%, 与商业化抗体结果相似; (3) 被 pCD19-CAR 修饰的 CD19-CAR 阳性率为 28.72% 的 NK-92MI 细胞对 CD19⁺ 的 Ramos 和 Raji 细胞的杀伤效率明显高于未被修饰的 NK-92MI 细胞株对 Ramos 和 Raji 细胞的杀伤率[(47.1 ± 1.7)% vs (24.7 ± 6.2)% 和 (51.8 ± 7.9)% vs (27.6 ± 9.6)%], 均 $P < 0.05$; 对 CD19⁻ 细胞 Jurkat, 不论是未被 pCD19-CAR 修饰的 NK-92MI 或是被修饰的 NK-92MI 细胞, 几乎都不存在特异性杀伤作用[(16.1 ± 0.7)% vs (17.7 ± 2.9)%], $P > 0.05$ 。**结论:** 成功构建 pCD19-CAR, 被 pCD19-CAR 修饰的 NK-92MI 细胞能特异性的识别 CD19 抗原并杀伤 CD19⁺ B 细胞淋巴瘤细胞。

[关键词] 单克隆抗体; 嵌合抗原受体; NK-92MI 细胞; CD19; B 细胞淋巴瘤

[中图分类号] R739.5; R730.51; R967

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)05-0613-07

Killing effect of NK cells modified with pCD19-CAR on B-cell lymphoma

YUAN Yuan¹, QIN Yang², YOU Fengtao³, CHEN Dan³, ZOU Jianxuan¹, ZHU Xuejun⁴, LI Bingzong⁵, YUAN Lei⁶, MENG Huimin¹, ZHANG Bozhen³, AN Gangli¹, YANG Lin¹(1. The Cyrus Tang Hematology Center, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China; 2. Department of Urology, Yunnan Cancer Hospital, Kunming 650118, Yunnan, China; 3. PersonGen Biomedicine (Suzhou) Co., Ltd, Suzhou 215123, Jiangsu, China; 4. Department of Hematology, Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 5. Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu, China; 6. Department of Hematology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[Abstract] **Objective:** To screen and prepare therapeutic monoclonal antibody CD19 using hybridoma technique in mice, and to explore killing effect of NK cells modified with pCD19-CAR which made by CD19 scFv sequence on B-cell lymphoma cells. **Methods:** CD19 monoclonal antibody was prepared in mice immunized with conjugated polypeptide, then sequence of the obtained antibody was obtained by gene sequencing method. The antibody sequence was analyzed and pCD19-CAR fragments were constructed via gene synthesis and molecular cloning PCR-based gene synthesis techniques. Then the pCD19-CAR fragments were cloned into lentiviral vectors, and transfected into NK-92MI cells after packaging preparation. and cloned into lenti-virus using molecular cloning method; and then the positive hybridoma cells were analyzed for scFv se-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 31471283)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 31471283)

[作者简介] 袁园(1989-),女,江苏苏州人,硕士生,主要从事肿瘤免疫治疗研究,E-mail:390000843@qq.com

[通信作者] 杨林(YANG Lin, corresponding author),E-mail:yanglin@suda.edu.cn;安钢力(AN Gangli, co-corresponding author),E-mail:gangli_an@suda.edu.cn

[优先发表]

quences. One of the scFv sequence was used to construct CAR (pCD19-CAR). Finally, the killing rates of various pCD19-CAR-NK-92MI cells on B-cell lymphoma cells were examined using Flow cytometry assay. **Results:** (1) CD19 monoclonal antibody pCD19 with high specificity was successfully screened out. (2) The measurement of the antibody showed that the positive rates of Ramos and Raji cells were 84.3% and 85.6% respectively, which were similar to commercial CD19 antibody. (3) The killing efficacy of pCD19-CAR-NK-92MI cells, of which modification rate was 28.72%, on CD⁺Ramos cells and CD⁺Raji cells was apparently higher than those of non-modified NK-92MI cells ($[47 \pm 1.7]\%$ vs $[24.7 \pm 6.2]\%$ and $[51.8 \pm 7.9]\%$ vs $[27.6 \pm 9.3]\%$, all $P < 0.05$). Specific killing effects of unmodified and modified NK-92 cells on CD19⁻ Jurkat cells were not almost found ($[16.1 \pm 0.7]\%$ vs $[17.7 \pm 2.9]\%$, $P > 0.05$). **Conclusion:** pCD19-CAR was successfully constructed; pCD19-CAR-NK-92MI cells could specifically recognize CD19 antigen and kill CD19⁺ B-cell lymphoma cells.

[**Key words**] monoclonal antibody; chimeric antigen receptor(CAR); NK-92MI cell; CD19; B-cell lymphoma

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(5): 613-619. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.005]

CD19 是 95 kD 的穿膜糖蛋白,它属于免疫球蛋白超家族并且在 B 细胞调节应答中起核心作用^[1]。CD19 作为治疗 B 细胞淋巴瘤的一个标志性的靶点,在大部分恶性 B 细胞、前 B 细胞、正常 B 细胞及滤泡状 DC 中都有可能表达^[2-3],但在造血干细胞表面不表达^[4]。因此,CD19 是针对 B 细胞恶性肿瘤免疫治疗的理想靶标^[5-6]。研究^[7-8]认为,CD19-CAR 相关技术在治疗急、慢性淋巴细胞性白血病(acute and chronic lymphocytic leukemia, ALL, CLL)的临床试验中取得了成功。2014 年第 56 届 ASH 年会上,诺华公布了 CTL019(CD19-CAR-T)治疗 39 例难治、复发性 ALL 儿科患者的临床数据,结果显示有 36 例患者经历了 CR,比例高达 92%(36/39)。2015 年第 57 届美国血液学年会上,CTL019 在难治、复发性 ALL 儿童及年轻患者中的 CR 达到了与上一年度惊人相似的 93%(55/59)。关于 CD19-CAR-NK 的临床应用目前鲜有报道。如今,国际上获得认可的应用于 CD19-CAR 治疗中的 CD19 单克隆抗体 scFv 克隆主要来自 FMC63 和 SJ25C1。目前国内仍未见有独立研发 CD19 scFv 应用于 CAR-T/NK 治疗的报道。为了开展并推进具有自主知识产权的 CD19-CAR 的研发,本课题成功开发出了一株可应用与 CD19-CAR 治疗的 CD19 scFv 序列,并选用 NK-92MI 作为效应细胞,验证其是否适用于 CD19-CAR-NK 疗法来治疗 B 细胞淋巴瘤。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

研究中用 B 细胞淋巴瘤细胞系 Ramos 和 Raji 由美国 MD Anderson Cancer Center 淋巴瘤/骨髓瘤系 Robert Z. Orlowski 实验室惠赠;骨髓瘤细胞系 GI-8226、U266,人胚肾细胞 293T 及效应细胞 NK-92MI 均购于美国 ATCC 公司。

1.2 CD19 多肽抗原的设计和偶联

在 ELM 网站搜索 CD19 序列,对序列进行避免信号肽、穿膜区及选择亲水性好的区域等一系列的优化。将得到的多肽抗原偶联到载体蛋白 KLH 上。偶联好的多肽(KLH-peptide)置于 -20 °C 保存。

1.3 治疗性 CD19 单克隆抗体的制备

1.3.1 用 KLH 偶联肽免疫小鼠 免疫 BALB/c 小鼠前先制备好阴性血清作为对照。然后免疫小鼠,每只小鼠用 120 μg 抗原免疫,抗原需与等体积弗氏完全佐剂乳化,分多个部位将其注入皮下。2 周后,第 2 次免疫小鼠,用 60 μg 抗原/只的剂量,抗原与等体积弗氏不完全佐剂乳化,同样分多个部位皮下注射。4 周后按第 2 次免疫同样的方法进行第 3 次免疫。5 周后,小鼠眼眶采血制备阳性血清并用 ELISA 和 Western blotting 检测。

1.3.2 细胞融合 准备好骨髓瘤细胞并从小鼠脾脏中分离出脾细胞。在已敲散的细胞中加入 1 ml 预热好的 PEG 1 500,反复吹打细胞 2 min,然后加入 15 ml 预热好的培养液将其混匀,将其置于 37 °C 水浴 10 min。后 1 500 × g 离心 10 min 弃上清。加入 10 ml HAT 培养液重悬细胞,将其都转移到加样槽中,再加入 90 ml HAT 培养液并混匀,用排枪将其分别加入已经铺好饲养层细胞的 96 孔板中,100 μl/孔,再放置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。培养 5 d 后观察各个克隆的生长情况,挑选克隆进行 ELISA、Western blotting 等检测,根据检测结果将阳性克隆转移至新的 24 孔板进行扩大培养。

1.3.3 亚克隆 挑选多个克隆并计数,在新的 24 孔板中加入 900 μl 培养液/孔,将原孔中需要稀释的克隆混匀,吸取 100 μl 到 24 孔板中,对原孔中的细胞进行计数后根据比例稀释到实验所需的细胞个数,将计算好的细胞铺到 96 孔板中并做好标记。7 ~ 14 d 后

取样进行 ELISA 和 Western blotting 检测。

1.3.4 生产腹水 准备 5 只 10 周龄以上小鼠,腹腔注射 0.5 ml 矿物油。7~10 d 后,取对数生长期杂交瘤细胞,计数,调整到 6×10^6 个细胞/ml,注入小鼠腹腔,0.5 ml/只。7~10 d 后小鼠腹水产生充足,收集腹水。将同一个克隆产生的腹水收集到 50 ml 离心管中, $3\ 000 \times g$ 离心 10 min,将上清转移到新的 50 ml 离心管中,加入 0.09% 的 NaN_3 ,留 1 ml 待用,注明信息,保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中。

1.4 小鼠杂交瘤抗体基因测序

当上清抗体检测呈阳性后,提取细胞总 RNA 并以其为模板逆转录成 cDNA。将 PCR 所得的重链可变区和轻链可变区核苷酸片段跑胶回收,对其分别进行酶切并连接到 pMD18-T 载体上,转化连接产物,菌落 PCR 鉴定后挑选阳性克隆,提取质粒后进行酶切鉴定及质粒 PCR 鉴定,若结果为阳性,则进行测序并对测序,结果进行 CDR 区和 FR 区分析。

1.5 pCD19-CAR-pCDH 载体的构建

根据序列分析结果合成 pCD19 基因,利用分子克隆技术将 pCD19 基因与 CAR 片段连接并克隆到 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP 载体上(pCD19 基因序列已申报国际专利)。

1.6 慢病毒的包装、浓缩及滴度测定

用于包装病毒的细胞为 293T 细胞,将其置于 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 进行培养。用于包装病毒的是第二代慢病毒包装系统,由 Rev、VSV-G 和 $\Delta\text{R}3$ 种包装质粒组成。所得的病毒用超速离心法进行浓缩并保存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$,避免反复冻融。本研究测定滴度所用细胞为 293T 细胞,在 24 孔板中隔夜接种 6×10^4 个细胞/孔,浓缩后的病毒以 0.01、0.1、1.0、10 μl 的梯度加入各个孔中,2~3 d 后用于绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)检测。

1.7 流式细胞术检测慢病毒感染 NK-92MI 细胞 GFP 蛋白的表达

收集 NK-92MI 细胞并对其进行计数,每 100 μl 浓缩过的病毒感染 1×10^6 个 NK-92MI 细胞,将其放入 15 ml 离心管中,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养 4~6 h,而后 $3\ 000 \times g$ 离心 3 min,吸出病毒,将细胞重悬加入新的 6 孔板中。2~3 d 后用流式细胞仪检测 NK-92MI 细胞的 GFP 阳性表达率即为蛋白表达率。

1.8 流式细胞术检测 pCD19-CAR 修饰的 NK-92MI 细胞对 B 细胞淋巴瘤的杀伤

选用 2 组细胞,一组为 $\text{CD}19^+$ B 细胞淋巴瘤 Ramos 和 Raji 细胞,另一组为 $\text{CD}19^-$ 白血病 Jurkat

细胞。效应细胞分别是被 pCD19-CAR 修饰的 NK-92MI 细胞、未被修饰过的 NK-92MI 细胞。在效靶比为 5:1 的条件下杀伤 4 h。先用 CFSE 标记靶细胞, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 15 min,洗涤,分别加入不同 NK-92MI 细胞,培养 4 h 后,加入 7-AAD 以流式细胞仪检测靶细胞的死亡率。

1.9 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件对数据进行处理,两样本均数比较采用独立样本 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 成功设计 CD19 抗原多肽

在 ELM 网站上设计多肽可得到 CD19 抗原肽序列分析(图 1),从而设计出一条抗原肽序列用于小鼠免疫。此抗原肽序列为 AKDRPEIWEGEPPC,其避开了信号肽、穿膜区、球状区,排除了磷酸化、甲基化等蛋白修饰位点,且具有良好的亲水性。

2.2 成功筛选出 CD19 单克隆抗体

Western blotting 检测结果(图 2A)显示, $\text{CD}19^+$ 细胞 Ramos 和 Raji 在 95 kD 处各有一条带;阴性细胞 Jurkat 并没有任何条带。结果表明,纯化的 CD19 小鼠抗人单克隆抗体能很好地与细胞中的 CD19 蛋白结合,特异地识别 CD19 分子,说明纯化的抗体对 $\text{CD}19^+$ 细胞系的结合力和特异性高。对所得抗体进行 FCM 分析结果(图 2B)显示, $\text{CD}19^+$ 细胞 Ramos 和 Raji 抗体阳性率分别为 84.3% 和 85.6%,接近商业化 CD19 流式抗体(美国 BD 公司)检测 Ramos 和 Raji 细胞的阳性率(90.8% 和 89.8%)(图 2C)。 $\text{CD}19^-$ Jurkat 细胞几乎没有阳性。

2.3 成功构建 pCD19-CAR-pCDH 重组载体

利用基因合成及分子克隆技术构建 pCD19-CAR 片段(图 3A),并将其克隆到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP(图 3B),所用酶切位点为 *Xba* I 和 *Eco*R I。构建好的重组载体称为 pCD19-CAR-pCDH,用于后续的慢病毒包装。

2.4 成功包装 pCD19-CAR-pCDH 慢病毒

包装病毒后得到 pCD19-CAR-pCDH 的绿色荧光图(图 4A)。病毒滴度测定的结果(图 4B)显示,加入了 0.01、0.1、1 和 10 μl pCD19-CAR-pCDH 浓缩过的病毒 72 h 后,293T 细胞的 GFP 阳性率分别为 17.0%、81.2%、95.2% 和 96.0%。检测经病毒感染后的 NK-92MI 细胞的 GFP 阳性率为 28.7%(图 5),其中未感染 pCD19-CAR-pCDH 的 NK-92MI 细胞为阴性对照细胞。

2.5 pCD19-CAR 修饰的 NK-92MI 细胞对 B 细胞淋巴瘤的杀伤效率

流式细胞术检测结果显示,被 pCD19-CAR 修饰过的 NK-92MI 细胞对 Ramos 和 Raji 的平均杀伤效率显著高于未被修饰的 NK-92MI 细胞对 CD19⁺ B 细胞淋巴瘤细胞系 Ramos 和 Raji[(47. 1 ± 1. 7)% vs (24. 7 ± 6. 2)% 和 (51. 8 ± 7. 9)% vs (27. 6 ± 9. 6)% ,均 $P < 0.05$],图 6 显示的是一次具有代表性的杀伤实验结果(48. 6% vs 27. 6% 和 44. 1% vs

21. 8% , $P < 0.05$);对于 CD19⁻ 细胞株 Jurkat,不论是未被基因修饰的 NK-92MI 或者是被 pCD19-CAR 修饰的 NK-92MI,几乎不存在特异性杀伤[(16. 1 ± 0. 7)% vs (17. 7 ± 2. 9)% , $P > 0.05$],图 6 实验中杀伤率分别为 15. 5% 和 17. 8%。结果表明,CD19 单克隆抗体的 SCFV 构建的 CAR-NK-92MI 细胞能有效地靶向 CD19⁺ 细胞,并对其进行有效杀伤,CD19 scFv 能够用于细胞肿瘤免疫治疗。

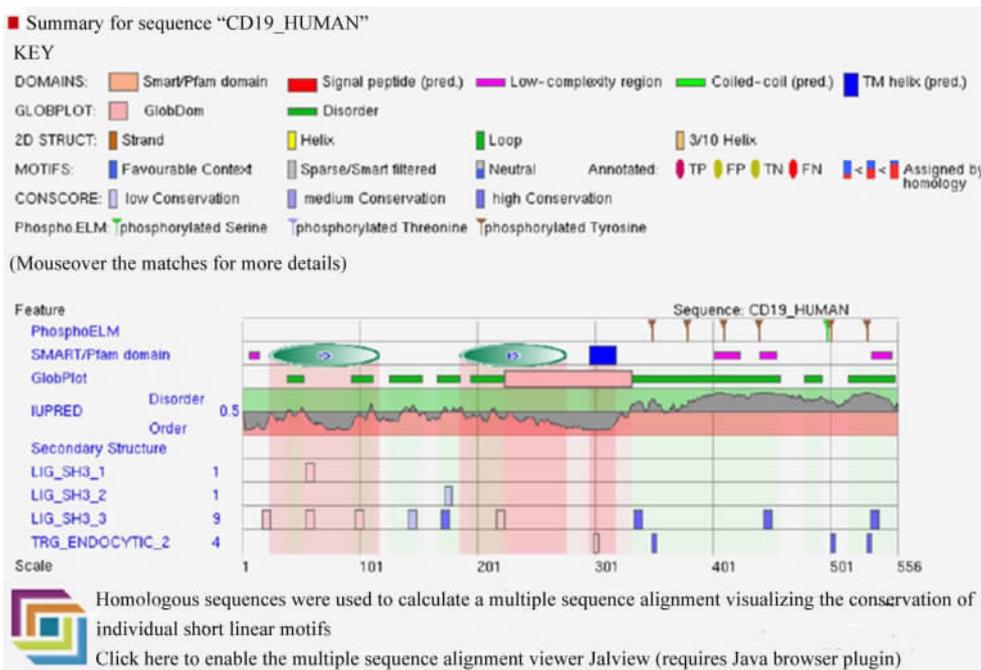


图 1 抗原多肽的设计

Fig. 1 Design of CD19 antigenic peptide

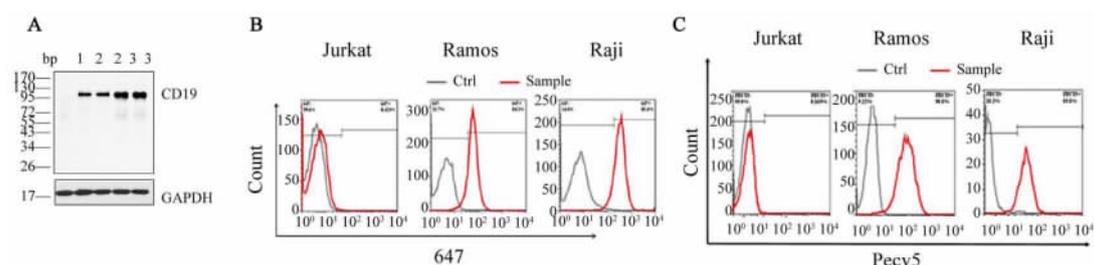


图 2 CD19 单克隆抗体的测定

Fig. 2 Measurement of CD19 monoclonal antibody

- A: CD19 monoclonal antibody by Western blotting assay; 1: Jurkat; 2: Ramos; 3: Raji;
- B: CD19 monoclonal antibody by flow cytometry assay; C: CD19 expression in Jurkat, Ramos and Raji cells using CD19 commercial antibody by flow cytometry assay

3 讨论

B 细胞淋巴瘤是恶性淋巴瘤中最常见的亚型,由于其复发性和难以治愈性,每年都有大量患者不

治而亡。近年来,治疗 B 淋巴瘤的 CD19-CAR-T 技术飞速发展并在临床中取得显著疗效^[9-12],因此受到研究者极大的重视。为了研究 CD19-CAR 相关技术,本研究利用鼠杂交瘤技术筛选出了具有自

主知识产权的 CD19 单克隆抗体,并基于该抗体的 scFv 构建了 CD19-CAR(即 pCD19-CAR)。

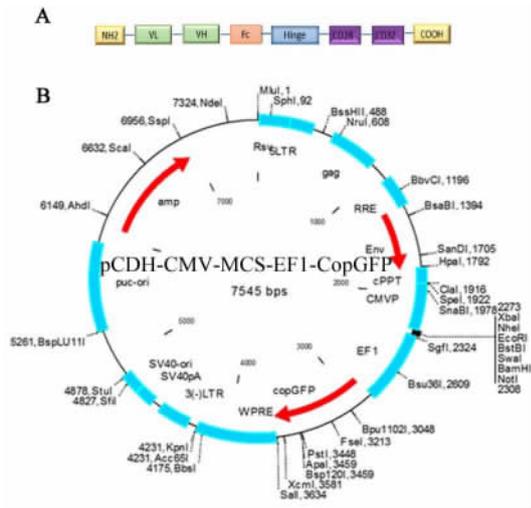


图 3 pCD19-CAR-pCDH 的构建
Fig. 3 Construction of pCD19-CAR-pCDH
 A: Structure of pCD19-CAR; B: Structure of pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP

CAR 是利用抗体对肿瘤抗原的高亲和性与 T 细胞或者 NK 细胞的杀伤机制结合来识别相关肿瘤抗原,进而杀伤肿瘤细胞。目前,把由单克隆抗体的 scFv 直接与信号肽相连接的称为第一代 CAR。Milone 等^[13]对第一代 CAR 进行改造,在 scFv 和信号肽之间插入了 CD28^[14]或者 CD137^[15]等协同共刺激分子,称为第二代 CAR。而把在 scFv 和信号肽之间插入两种或者两种以上的协同共刺激分子的称为第三代 CAR^[16]。目前,第三代 CAR 也被用于套式淋巴瘤等治疗,但是临床疗效并没有比第二代 CAR 更好^[17]。因此,本研究中采用第二代 CAR 的结构,主要由单链抗体 scFv、协同共刺激分子 CD28 和向胞内传递信号的 CD3 ζ 组成。从对抗体的流式细胞术和 Western blotting 分析数据可知本研究筛出的抗体对 CD19⁺ 肿瘤细胞 Ramos 和 Raji 的结合力很强,因此为 CAR 的构建提供了一个良好的 scFv 片段。

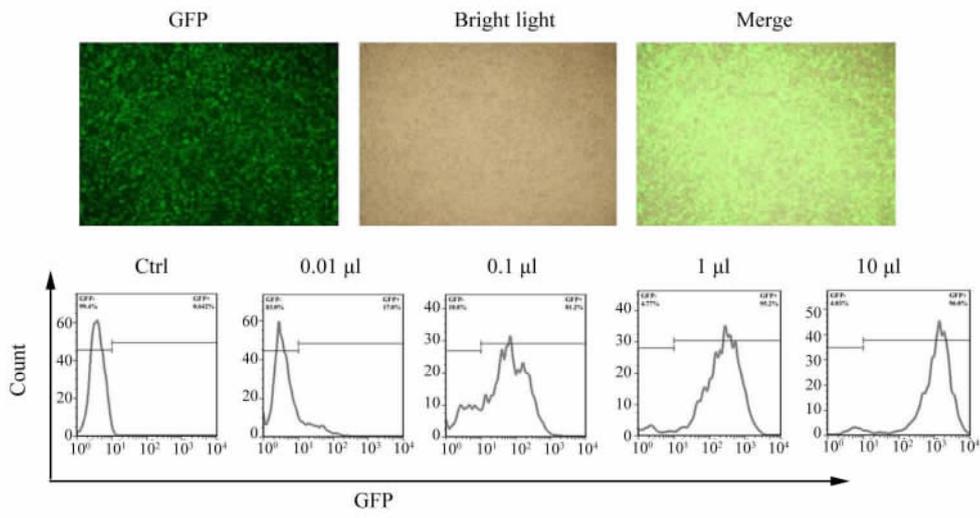


图 4 慢病毒包装、浓缩及滴度测定
Fig. 4 Lentivirus packaging and viral titer results
 A: Protein expression in 293T cell transfected with anti-virus by GFP fluorescence assay;
 B: The GFP positive result of 293T cell by viral titer measurement

在本研究中研发的 pCD19 scFv 被用于 CAR 修饰 NK 细胞实验的主要原因是:(1)可以快速确定 pCD19 scFv 序列是否适合进行细胞治疗;(2)NK92 细胞是从非霍奇金淋巴瘤患者的外周血淋巴细胞中分离出来的一种 NK 细胞系,可在体外长期扩大培养,与人的 NK 细胞具有相似的细胞表面分子及各种功能特点,能杀伤多种肿瘤细胞,因此已被用于过继性免疫治疗^[18]。NK-92MI 细胞株是经转染了 IL-2 cDNA 后非 IL-2 依赖型的 NK-92 细胞,研究^[19]

表明其对肿瘤细胞的杀伤在体内外均高于 NK-92 细胞。因此,本研究选用 NK-92MI 作为效应细胞;(3)虽然 CD19-CAR-T 细胞治疗在难治、复发性 ALL 患者中取得了重大突破,但是其对于高肿瘤负荷的患者而言,严重的细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)仍然是需要面对的一个主要不良反应。对于此类患者,CAR-NK 细胞治疗就显示出了一定的优势:(1)不产生 IL-6,不会造成因为高水平 IL-6 而导致的致死性 CRS;(2)NK 细胞在患

者体内存留时间短,不必担心长期滞留患者体内带来的隐患,也无需安装自杀开关;(3)许多B细胞恶性肿瘤患者体内的T细胞是缺乏功能的,对于这些有缺陷的T细胞患者或是T细胞在体外难以扩增及扩增数目不足的患者,CAR-NK不失为一种良好的缓解方法;(4)不同于CAR-T,CAR-NK可以进行同种异体移植治疗;(5)在目前T细胞的转染效率问题没有得到很好解决的情况下,利用NK-92MI细胞系构建的CAR-NK可以在体外筛选得到阳性率很高的细胞株,并可以无限扩增;(6)CAR-NK也可以作为CAR-T治疗的辅助治疗手段。

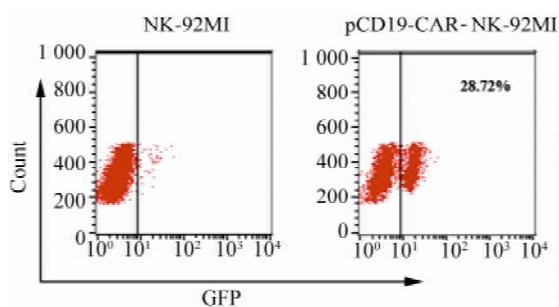


图5 病毒感染NK-92MI细胞的效率

Fig. 5 Transfection rate of lenti-virusin NK-92MI cells

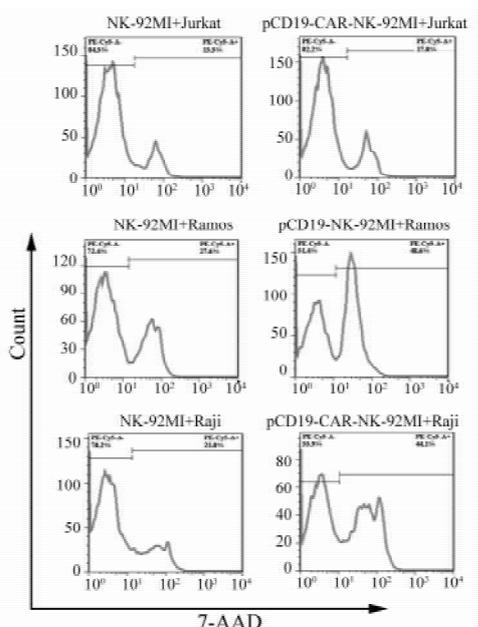


图6 pCD19-CAR修饰的NK-92MI细胞对B细胞淋巴瘤的杀伤效率

Fig. 6 Killing efficacy of pCD19-CAR modified NK-92MI cells on B-cell lymphoma

本研究的杀伤结果中未看到对肿瘤细胞全部杀

伤,这主要是与NK-92MI细胞的转染阳性率及效靶比和作用时间等密切相关。本课题在转染了25%~30%的NK-92MI阳性细胞的条件下进行效靶比为5:1的杀伤实验,4h就可以看到明显的杀伤效果,说明构建的pCD19-CAR能特异识别CD19分子,其转染的NK-92MI细胞能特异杀伤CD19⁺肿瘤细胞,此为进一步的实验研究提供了重要依据。但是,由于本研究中NK-92MI的病毒转染效率不高,即表达pCD19-CAR的NK-92MI细胞的比例不高,因此对杀伤的最终结果造成了影响。后续的实验,将使用嘌呤霉素作为筛选标记筛出pCD19-CAR-NK-92MI稳定表达的高阳性率的细胞株,并进一步优化效靶比和杀伤时间。同时将构建小鼠模型,把pCD19-CAR-NK回输入小鼠体内进行免疫治疗,观察小鼠体内的肿瘤变化及小鼠生存期,并采取样本进行一系列的病理毒理学分析。另外,还将构建FMC63和SJ25C1 scFvs的CAR,与pCD19-CAR进行一系列的实验比较,最终确定pCD19 scFv序列是否具有类似或者更好的性能。

随着对生物免疫疗法的认识,越来越多的研究者关注人NK细胞系对肿瘤细胞的杀伤,尽管目前许多研究都围绕着CAR-T进行,在肿瘤免疫治疗中CAR-NK还是占据着不可或缺的重要位置^[20-21]。如今,NK-92MI已经成为许多研究者青睐的对象^[22-23]。但是CAR-NK也还存在着需要完善的地方,例如将NK-92MI应用到临床,宿主可能会产生异体排斥反应,故其安全性还需要进行深入的研究。已有研究^[24]表明,将CAR转入NK-92细胞会使细胞识别特异性肿瘤细胞并产生特异性杀伤,更有越来越多的研究已经进入临床I、II期试验并取得了一定的成果。进一步的临床试验需要一系列的安全管理及根据不同患者个体化制定患者能承受的最大剂量等问题,从而使得NK-92MI能在安全的前提下最大化治疗效果,CAR-NK的抗肿瘤应用也将会变得更加广泛、高效。

[参考文献]

[1] WANGK, WEI G, LIU D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2012, 1(1): 36. DOI: 10.1186/2162-3619-1-36.

[2] SCHEUERMANN R H, RACILA E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy [J]. *Leuk Lymphoma*, 1995, 18(5/6): 385-397. DOI: 10.3109/10428199509059636.

[3] MORGAN R A, YANG J C, KITANO M, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells trans-

- duced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2 [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 843-851. DOI: 10.1038/mt.2010.24.
- [4] PONTVERT-DELUCQ S, BRETON-GORIUS J, SCHMITT C, et al. Characterization and functional analysis of adult human bone marrow cell subsets in relation to B-lymphoid development [J]. *Blood*, 1993, 82(2): 417-429.
- [5] LE GALL F, KIPRIYANOV S M, MOLDENHARUER G, et al. Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on cell binding [J]. *FEBS Lett*, 1999, 453(1/2): 164-178. DOI: 10.1016/S0014-5793(99) 00713-9.
- [6] STANCIU-HERRERA C, MORGAN C, HERRERA L. Anti-CD19 and anti-CD22 monoclonal antibodies increase the effectiveness of chemotherapy in pre-B acute lymphoblastic leukemia cell lines [J]. *Leuk Res*, 2008, 32(4): 625-632. DOI: 10.1016/j.leukres.2007.07.002.
- [7] PORTER D L, LEVINE B L, KALOS M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 725-733. DOI: 10.1056/NEJMoa1103849.
- [8] BRENTJENS R J, DAVILA M L, RIVIERE I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(177): 177ra38. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005930.
- [9] CRUS C R, MICKLETHWAITE K P, SAVOLDO B, et al. Infusion of donor-derived CD19-redirected virus-specific T cells for B-cell malignancies relapsed after allogeneic stem cell transplant: a phase I study [J]. *Blood*, 2013, 122(17): 2965-2973. DOI: 10.1182/blood-2013-06-506741.
- [10] GRUPP S A. Advances in T-cell therapy for ALL [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2014, 27(3/4): 222-228. DOI: 10.1016/j.beha.2014.10.014.
- [11] NINOMIYA S, NARALA N, HUYE L, et al. Tumor indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibits CD19-CAR T cells and is down-regulated by lymphodepleting drugs [J]. *Blood*, 2015, 125(25): 3905-3916. DOI: 10.1182/blood-2015-01-621474.
- [12] SADELAIN M, BRENTJENS R, RIVIÈRE I, et al. CD19 CAR therapy for acute lymphoblastic leukemia [J/OL]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2015: e360-363 [2016-07-12]. <http://meetinglibrary.asco.org/content/11500360-156>. DOI: 10.14694/EdBook_AM.2015.35.e360.
- [13] MILONE M C, FISH J D, CARPENITO C, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo [J]. *Mol Ther*, 2009, 17(8): 1453-1464. DOI: 10.1038/mt.2009.83.
- [14] BRENTJENS R, YEH R, BERNAL Y, et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 666-668. DOI: 10.1038/mt.2010.31.
- [15] BRENTJENS R J, SANTOS E, NIKHAMIN Y, et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(18 Pt 1): 5426-5435. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0674.
- [16] KERSHAW M H, WESTWOOD J A, DARCY P K. Gene-engineered T cells for cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(8): 525-541. DOI: 10.1038/nrc3565.
- [17] MAHER J. Clinical immunotherapy of B-cell malignancy using CD19-targeted CAR T-cells [J]. *Curr Gene Ther*, 2014, 14(1): 35-43. DOI: 10.2174/1566523213666131223130554. ? <http://search.crossref.org/?q=Clinical+immunotherapy+of+B-cell+malignancy+using+CD19-targeted+CAR+T-cells>.
- [18] WALLACE M E, SMYTH M J. The role of natural killer cells in tumor control-effectors and regulators of adaptive immunity [J]. *Springer Semin Immunopathol*, 2005, 27(1): 49-64. DOI: 10.1007/s00281-004-0195-x.
- [19] NAGASHIMA S, MAILLIARD R, KASHII Y, et al. Stable transduction of the interleukin-2 gene into human natural killer cell lines and their phenotypic and functional characterization in vitro and in vivo [J]. *Blood*, 1998, 91(10): 3850-3861.
- [20] CHEN X, HAN J, CHU J, et al. A combinational therapy of EGFR-CAR NK cells and oncolytic herpes simplex virus 1 for breast cancer brain metastases [J]. *Oncotarget*, 2016, DOI: 10.18632/oncotarget.8526.
- [21] ROMANSHI A, UHEREK C, BUG G, et al. CD19-CAR engineered NK-92 cells are sufficient to overcome NK cell resistance in B-cell malignancies [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(7): 1287-1294. DOI: 10.1111/jcmm.12810.
- [22] GALLARDO-VERA F, DIAZ D, TAPIA-RODRIGUEZ M, et al. Vanadium pentoxide prevents NK-92MI cell proliferation and IFN-gamma secretion through sustained JAK3 phosphorylation [J]. *J Immunotoxicol*, 2016, 13(1): 27-37. DOI: 10.3109/1547691X.2014.996681.
- [23] PHILLIPS M, ROMEO F, BITSAKTSIS C, et al. B7H6 derived peptides trigger TNF-alpha dependent immunostimulatory activity of lymphocytic NK92-MI cells [J]. *Biopolymers*, 2016, 13(1): 27-37. DOI: 10.1002/bip.22879.
- [24] CARTRON G, DACHEUX L, SALLES G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma R IIIa gene [J]. *Blood*, 2002, 99(3): 754-758. DOI: 10.1182/blood.V99.3.754.

[收稿日期] 2016 - 04 - 15 [修回日期] 2016 - 08 - 30

[本文编辑] 党瑞山