

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.004

· 基础研究 ·

## CD20和CD19双靶点CAR-T细胞对B淋巴细胞肿瘤的杀伤作用

赵欣<sup>1</sup>, 陈喜林<sup>2△</sup>, 张铁<sup>3</sup>, 陈兴<sup>1</sup>, 王孔鑫<sup>1</sup>[1. 圭特(北京)医药科技有限公司, 北京 100176; 2. 中国人民解放军总医院第五医学中心 淋巴瘤科, 北京 100171; 3. 中日友好医院 检验科, 北京 100029]

**[摘要]** **目的:** 设计同时靶向B淋巴细胞表面CD20和CD19两个抗原蛋白的双特异嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)并制备BiCAR-T细胞, 检测其对B淋巴细胞肿瘤细胞的杀伤作用以及对免疫缺陷B-NSG小鼠白血病模型的治疗效果。**方法:** 构建基于鼠源CD19和人源化CD20 scFv的双靶点CAR分子, 将CAR基因装载于慢病毒载体中, 在293T细胞中包装慢病毒, 感染健康人T细胞制备BiCAR-T细胞。构建表达CD19和CD20的K562-CD19-GFP、K562-CD20-GFP以及表达Luciferase的Nalm6-Luc-GFP细胞作为靶细胞, 将BiCAR-T细胞与靶细胞共同孵育, 检测其对靶细胞杀伤能力及释放IFN- $\gamma$ 水平。使用Nalm6-Luc-GFP细胞构建白血病小鼠模型, 尾静脉注射BiCAR-T细胞, 通过小动物成像方法观察BiCAR-T细胞对荷瘤小鼠的治疗作用。**结果:** 健康人来源的BiCAR-T细胞经7 d培养后扩增良好, 扩增倍数为20~50倍, 阳性率为10%~92%, 显示成功制备BiCAR-T细胞。在效靶比为10:1时, BiCAR-T细胞对Nalm-6、K562-CD19-GFP和K562-CD20-GFP的杀伤率显著高于对照组细胞[(76.7 $\pm$ 7.4)% vs (8.7 $\pm$ 2.4)%、(93.3 $\pm$ 5.2)% vs (46.7 $\pm$ 6.2)%、(51.0 $\pm$ 0.8) vs (30.7 $\pm$ 0.5)%], 均 $P<0.01$ ]; 与对照组相比, 与Nalm-6细胞共孵育后BiCAR-T细胞分泌IFN- $\gamma$ 量显著增加[(872.7 $\pm$ 7.7) vs (101.0 $\pm$ 5.3) pg/ml,  $P<0.01$ ]。动物实验表明, BiCAR-T细胞对B-NSG小鼠白血病模型治疗效果明显, 注射BiCAR-T细胞后白血病细胞逐渐减少, 第50天时基本消失, 小鼠全部存活至第70天被安乐死; PBS和对照T细胞组小鼠分别在(19 $\pm$ 3)和(20 $\pm$ 1)d全部死亡。**结论:** 成功设计了表达CD19和CD20的双靶点CAR分子后成功制备了BiCAR-T细胞, 该细胞能够有效杀伤表达CD19和/或CD20的B淋巴细胞肿瘤细胞, 与靶细胞共同孵育后能够分泌大量IFN- $\gamma$ , 对B-NSG免疫缺陷小鼠白血病模型具有明显的治疗效果。

**[关键词]** B淋巴细胞肿瘤; CD20; CD19; 双靶点嵌合抗原受体; T淋巴细胞

**[中图分类号]** R730.51; R733 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)03-0235-07

## Effect of CD20/CD19 bi-specific chimeric antigen receptor (CAR)-T cell on B lymphocyte tumor

ZHAO Xin<sup>1</sup>, CHEN Xilin<sup>2△</sup>, ZHANG Tie<sup>3</sup>, CHEN Xing<sup>1</sup>, WANG Kongxin<sup>1</sup> (1. Quick Medical Co.Ltd, Beijing 100176, China; 2. Department of Lymphoma, the Fifth Medical Center of General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100171, China; 3. Department of Laboratory Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To design and prepare a novel bi-specific chimeric antigen receptor (CAR)-T cell targeting both CD20 and CD19 antigen on B lymphocyte surface, and to detect its killing effect on B lymphocyte tumors as well as its treatment efficacy on immunodeficiency B-NSG mouse with leukemia. **Methods:** Bi-specific CAR molecule of CD20 (human originated)/CD19 (murine originated) scFv was constructed and packaged into lentiviral vector in 293 cells, and then transfected into T lymphocytes from healthy donors to prepare BiCAR-T cells. K562-CD19-GFP cells (with positive CD19 expression), K562-CD20-GFP cells (with positive CD20 expression) and Nalm6-Luc-GFP cells expressing luciferase were constructed as target cells. After being co-incubated with above mentioned targets cells, the cytotoxic effects of BiCAR-T cells on target cells were evaluated *via* LDH release assay, and the secretion of IFN- $\gamma$  by BiCAR-T cells was evaluated by ELISA. Nalm6-Luc-GFP cells were used to construct the mouse model of leukemia and BiCAR-T cells were transfused *via* tail veins; the treatment efficacy of BiCAR-T cells on tumor bearing mice was evaluated with small animal imaging method. **Results:** After 7 days' incubation, the BiCAR-T cells originated from healthy donors amplified about

**[基金项目]** 首都临床特色应用研究与成果推广课题资助项目(No.Z171100001017189); 北京市朝阳区科技计划资助项目(No.CYSF1835)。Project supported by the Program of Capital Clinical Characteristic Application Research and Achievement Promotion(No.Z171100001017189), and the Chaoyang District Science and Technology Plan of Beijing Municipality(No.CYSF1835)

**[作者简介]** 赵欣(1976-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事肿瘤免疫治疗以及疫苗研究; 陈喜林(1973-), 男, 博士, 副主任医师, 主要从事恶性淋巴瘤的基础和临床研究, E-mail: chenx1307@163.com。△为共同第一作者

**[通信作者]** 赵欣(ZHAO Xin, corresponding author), E-mail: 1363215115@qq.com

20-50 times with a positive rate of 10%~92%, indicating successful preparation of BiCAR-T cells. Under an effector:target ratio of 10:1, the killing rates of BiCAR-T cells against Nalm-6, K562-CD19-GFP and K562-CD20-GFP cells were significantly higher than that of control cells [(76.7±7.4)% vs (8.7±2.4)%, (93.3±5.2)% vs (46.7±6.2)%, (51.0±0.8) vs (30.7±0.5)%, all  $P<0.01$ ]. Compared with control group, BiCAR-T cells co-incubated with Nalm-6 cells also secreted significantly more IFN- $\gamma$  [(872.7±7.7) vs (101.0±5.3) pg/ml,  $P<0.01$ ]. Animal experiment showed that BiCAR-T cells had significant efficacy on B-NSG mice with leukemia; NSG leukemia mice treated with BiCAR-T cells all lived up to 70 days (till they were mercy killed) and leukemia cells disappeared at about 50 days, while the mice in PBS and T lymphocytes group all died at (19±3) d and (20±1) d, respectively. **Conclusion:** Bi-specific CAR molecules expressing CD19 and CD20 were successfully designed and BiCAR-T cells were successfully prepared. The BiCAR-T cells can effectively kill CD19 and/or CD20 tumor cells and secrete large amounts of IFN- $\gamma$  after co-incubation with target cells, exerting significant treatment efficacy on B-NSG immunodeficiency mouse with leukemia.

**[Key words]** B lymphocyte tumor; CD20; CD19; bi-specific chimeric antigen receptor (BiCAR); T lymphocyte

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(3): 235-241. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.03.004]

近年来CAR-T细胞治疗技术,主要是以CD19为靶点的CAR-T在白血病领域取得突破性进展,在B细胞急性白血病的临床研究中取得了高达90%的完全缓解率,弥漫性大B细胞淋巴瘤等B细胞淋巴瘤的治疗也取得了约50%的完全缓解<sup>[1-3]</sup>。但是,随着CD19 CAR-T细胞应用时间延长,单独靶向CD19的CAR-T治疗B细胞肿瘤尤其是白血病中的复发问题也日益凸显。不同机构统计的复发率略有不同,疾病复发也与疾病性质以及CAR-T细胞治疗之后是否接受骨髓移植密切相关,其中有相当一部分患者为CD19阴性肿瘤复发<sup>[4-7]</sup>。为了提高CAR-T细胞对肿瘤的覆盖率,增强治疗效果和减少肿瘤复发,本研究设计了针对B细胞上CD20和CD19两种抗原的双靶点嵌合抗原受体,且针对已知的CD20、CD19双靶点CAR-T杀伤效果不理想的问题,在CAR的设计上进行了改进,以课题组先前改造的慢病毒载体装载CAR后制备CAR-T细胞,检测了双靶点CAR-T (BiCAR-T)细胞对肿瘤细胞的体内外的杀伤能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株、实验动物及主要试剂

慢病毒包装细胞株293T购自上海中国科学院细胞库,人慢性髓系白血病细胞K562细胞系和人白血病细胞系Nalm-6购自北纳创联生物技术有限公司, PBMC为健康志愿者提供。

5~8周雌性B-NSG小鼠26只(SPF级),动物许可证号为SCXK(苏)2016-0004,体质量为17~20 g,购自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司。经过北京亦庄生物医药园试验动物中心动物伦理委员会批准(2018S021),由动物中心饲养人员在万级屏障设施内按照SPF级动物饲养。以数字随机表法随机分为3组,其中2组各9只小鼠,另1组8只小鼠,每组两笼。

DMEM高糖培养基、RPMI 1640培养基以及胎牛血清购自美国Gibco公司,X-vivo培养基购自美国Lonza公司,含有CD19和CD20全长cDNA序列的质

粒购自山东维真生物科技有限公司,CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay试剂盒购自美国Promega公司,IFN- $\gamma$  ELISA试剂盒购自Invitrogen公司,CD19和CD20蛋白购自北京ACRO Biosystem公司。

### 1.2 细胞培养

293T细胞在含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中培养,K562细胞、Nalm-6细胞在含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养,PBMC细胞在添加自体血浆的X-Vivo培养基中培养,所有细胞的培养条件均为37 °C、5%CO<sub>2</sub>。

### 1.3 质粒构建

由上海生工生物工程有限公司合成CAR-CD19/CD20序列,将序列用EcoRI和BamHI双酶切,连接进入载体pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP中构建成pCDH-BiCAR-GFP质粒,并对该质粒进行了改造,去除了GFP基因。将CD19和CD20 cDNA序列通过酶切连接到pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP质粒中,构建成pCDH-CD19-GFP和pCDH-CD20-GFP。Luciferase基因序列通过PCR方法以pmirGLO质粒为模板扩增得到后通过酶切连接到pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP质粒中,并经测序验证,成功构建pCDH-Luciferase-GFP质粒。

### 1.4 慢病毒包装与滴度检测

将pCDH-BiCAR-GFP、pCDH-CD19-GFP、pCDH-CD20-GFP或pCDH-Luciferase-GFP质粒与包装质粒PMD2.G和psPAX2共转染293 T细胞,转染后8 h换液,于24、48 h收取培养上清即为病毒原液。将病毒原液在4 °C、10 675×g超速离心2 h后,将沉淀溶解在PBS溶液中,进行滴度检测。

### 1.5 CD19/CD20 CAR-T (BiCAR-T)细胞的制备、扩增和表型鉴定

从健康志愿者单采外周血中分离PBMC,重悬于X-Vivo-15培养基中,添加10%血浆,同时加入T细胞Transact磁珠进行换液活化,活化后24~72 h内加入

慢病毒(MOI=5~30)。次日离心换液去除慢病毒,加入 10% 血浆和 1 000 U/ml IL-2 继续扩增,每隔 1 d 计数补液,使细胞密度维持在 $(1\sim 2)\times 10^6/\text{ml}$ 。在加入慢病毒后 48 h 及收获细胞进行体内外实验之前(扩增 7~14 d),取部分细胞进行阳性率检测。使用生物素标记的 Protein L 以及 SA-PE 二抗(1:1 000)检测 CAR 阳性率;分别用 Protein L、CD20 和 CD19 蛋白检测 BiCAR-T 细胞上 CD20 scFv 和 CD19 scFv 的表达,计算阳性率。

### 1.6 构建 K562-CD19-GFP、K562-CD20-GFP 和 Nalm6-Luc-GFP 的靶细胞系

分别使用 pCDH-CD19-GFP 和 pCDH-CD20-GFP 以及 pCDH-Luciferase-GFP 与辅助质粒一起包装出 CD19、CD20 及 luciferase 慢病毒。将前 2 种病毒转染 K562 细胞,后一种病毒转染 Nalm-6 细胞,然后进行单克隆筛选,得到表达 GFP 的 K562-CD19-GFP、K562-CD20-GFP 及 Nalm6-Luc-GFP 细胞系,作为双靶点 BiCAR-T 细胞的靶细胞。

### 1.7 LDH 释放实验检测 BiCAR-T 细胞对靶细胞的杀伤能力

使用 Promega 公司的 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒进行体外细胞毒性检测。取培养 7~10 d 的 BiCAR-T 细胞,PBS 清洗 1 次后,用无血清淋巴细胞培养基调整细胞密度为 $2\times 10^6$ 个/ml、 $6\times 10^5$ 个/ml、 $2\times 10^5$ 个/ml。取 Nalm-6、K562-CD19-GFP、K562-CD20-GFP 和 K562 细胞作为靶细胞,其中 K562 细胞因为其表面不表达 CD19 和 CD20 抗原,故作为阴性对照。用含 5% 胎牛血清的无酚红 RPMI 1640 培养基调整靶细胞密度为 $2\times 10^5$ 个/ml。按照效靶比 10:1、3:1 和 1:1 分别将 BiCAR-T 细胞与靶细胞混合,然后按试剂盒指示取培养后的上清使用酶标仪进行检测。计算校正后的光密度( $D_{490}$ )值。用下列公式计算每个效靶比的细胞毒性:细胞毒性=(实验组  $D$  - 效应细胞自发释放  $D$  - 靶细胞自发释放  $D$ )/(靶细胞最大释放  $D$  - 靶细胞自发释放  $D$ ) $\times 100\%$ 。

### 1.8 采用 ELISA 法检测 CAR-T 细胞分泌 IFN- $\gamma$ 的水平

将 Nalm-6 细胞分别与 BiCAR-T 细胞以效靶比 10:1、3:1 和 1:1 共孵育,在孵育 4、8、24 h 培养上清中使用 IFN- $\gamma$  ELISA 试剂盒,按照说明书操作步骤检测 IFN- $\gamma$  水平。

### 1.9 建立 B-NSG 小鼠白血病肿瘤模型并进行 BiCAR-T 细胞治疗实验

取 5~8 周雌性 B-NSG 小鼠,以数字随机表法随机分为 3 组,其中两组各 9 只,另一组 8 只。通过尾静脉注射 Nalm6-Luc-GFP 细胞,时间记为 D0。在第 3 天(D3)作小动物成像,记录小鼠体内肿瘤细胞生长及

分布情况。然后在第 4 天向 3 组小鼠尾静脉分别注射 $1\times 10^6$ 个 BiCAR-T 细胞、未转导病毒的对照组 T 细胞或 PBS 溶液,每只小鼠注射 300  $\mu\text{l}$ 。在 D0、D3、D10、D17、D26、D34、D50,使用 IVIS Spectrum 小动物活体成像系统进行成像操作,观察表达 luciferase 的 Nalm6-Luc-GFP 肿瘤细胞在小鼠体内的数量以及分布情况,分析 BiCAR-T 细胞的治疗效果。

### 1.10 统计学处理

LDH 释放和 ELISA 等实验均重复 3 次。采用 SPSS 20.0 软件进行统计数据分析,用 GraphPad Prism 7 软件绘制图片。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析。以  $P<0.05$  或  $P<0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功制备 CD20 和 CD19 双靶点的 BiCAR-T 细胞

本研究首先构建了靶向 CD20/CD19 的 CAR 分子,其结构为经典第二代 CAR 分子结构,将 CD8 引导区、CD20scFv+CD19scFv、CD8 铰链区和穿膜区、4-1BB 胞内区和 CD3 $\zeta$  胞内区依次串联(图 1)。

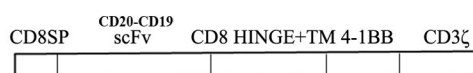


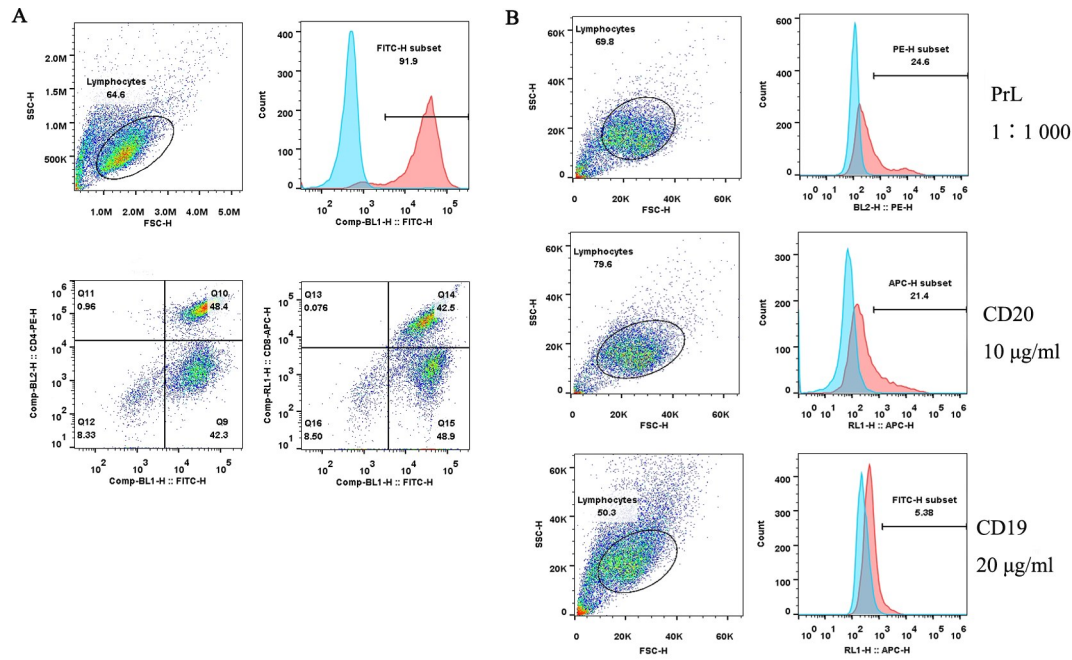
图 1 CD20/CD19 CAR 分子设计示意图

Fig.1 The schematics of CD20/CD19 CAR molecule

将上述分子包装成为慢病毒,使用慢病毒转染 T 细胞,3 d 后通过 Protein L 检测病毒转染效率为 91.9%,其中 CD4<sup>+</sup>T 细胞占 48.4%,CD8<sup>+</sup>T 细胞占 42.5%(图 2A)。扩增 7 d 时细胞增殖至 20~50 倍。为了验证 BiCAR-T 细胞能够识别 CD19 和 CD20 两种抗原,分别用 Protein L、CD20 蛋白和 CD19 蛋白检测了另一批次 BiCAR-T 细胞上 CAR 的表达,结果显示,其表达阳性率分别为 24.6%、21.4% 和 5.38%(图 2B)。

### 2.2 成功构建 CD19、CD20 阳性及表达 luciferase 的靶细胞系

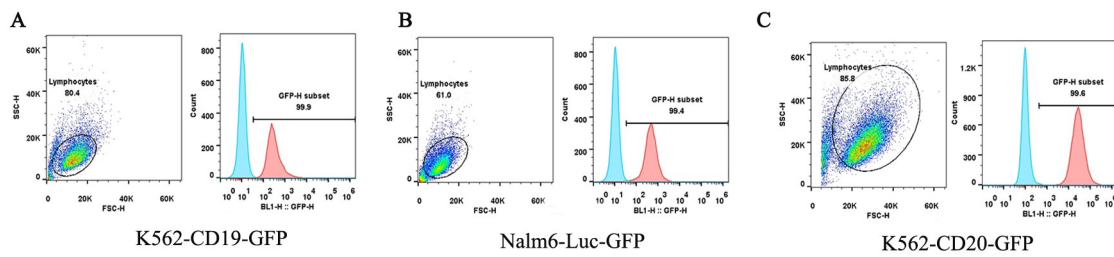
为了进一步验证双靶点 BiCAR-T 细胞对于 CD19 和/或 CD20 阳性肿瘤细胞的杀伤能力,基于 CD19 和 CD20 阴性肿瘤细胞 K562 构建了靶细胞 K562-CD19-GFP 和 K562-CD20-GFP。另外还构建了同时表达 luciferase 和 GFP 的 CD19 和 CD20 双阳性的 Nalm6-Luc-GFP 细胞。流式细胞术检测结果(图 3)显示,3 种靶细胞的 luciferase 表达阳性率分别为 99.9%、99.3% 和 99.9%。通过单克隆筛选,本实验获得 GFP 阳性细胞系。



A: CAR molecules expression were measured with FACS using Protein L for 3 d after transfection, phenotypes of BiCAR-T cells were determined using CD3, CD4 and CD8 antibodies by FACS; B: CAR expression were measured with FACS using Protein L, CD20 and CD19 protein for 3 d after transfection

图2 转染3 d后检测BiCAR-T细胞上CAR分子的表达率

Fig.2 The expression rates of CAR molecules on BiCAR-T cells were detected 3 d after transfection



A: K562-CD19-GFP cell line expressing CD19 was constructed successfully; B: K562-CD20-GFP cell line expressing CD20 was constructed successfully; C: Nalm6-Luc-GFP cell line expressing luciferase and GFP was constructed successfully

图3 成功构建分别表达CD19、CD20或luciferase及GFP的靶细胞系

Fig.3 Target cell lines expressing CD19, CD20 or luciferase separately and GFP were constructed successfully

2.3 BiCAR-T细胞可特异性杀伤CD19和/或CD20阳性肿瘤细胞

LDH释放实验结果(图4)显示,BiCAR-T细胞在10:1和3:1效靶比能有效杀伤靶细胞Nalm-6、K562-CD19-GFP和K562-CD20-GFP(均 $P < 0.01$ ),但不杀伤CD19和CD20阴性的K562细胞。在10:1效靶比下,BiCAR-T细胞对Nalm-6、K562-CD19-GFP和K562-CD20-GFP的杀伤率显著高于对照组细胞[(76.7±7.4)% vs (8.7±2.4)%、(93.3±5.2)% vs (46.7±6.2)%、(51.0±0.8) vs (30.7±0.5)%],均 $P < 0.01$ ]。以上结果说明,由健康志愿者PBMC制备的BiCAR-T细胞能够有效杀伤CD19和/或CD20阳性肿瘤细胞,其杀伤效果与BiCAR-T细胞和靶细胞的比例有关。

2.5 BiCAR-T细胞被激活后可大量表达IFN- $\gamma$

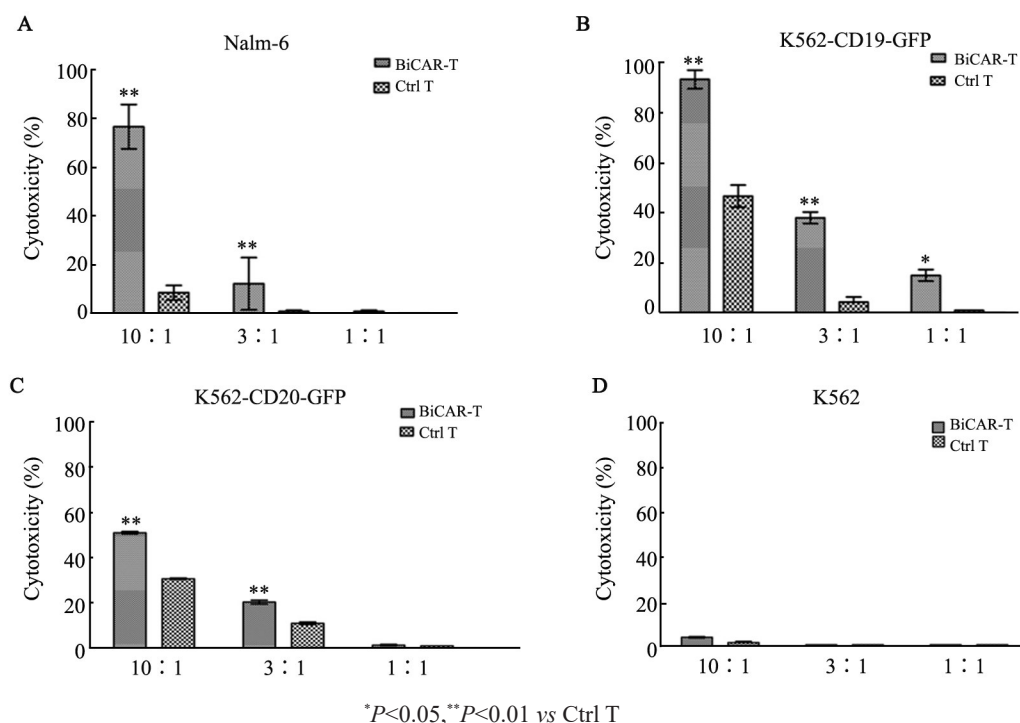
ELISA实验检测结果(图5)显示,在不与靶细胞共孵育时,BiCAR-T细胞表达IFN- $\gamma$ 的水平无明显变化;在靶细胞Nalm-6刺激下,当效靶比1:1时,BiCAR-T细胞IFN- $\gamma$ 表达量[(872.7±7.7)pg/ml]较未被激活的BiCAR-T细胞[(101.0±5.3)pg/ml]增加了8.6倍( $P < 0.01$ ),表明BiCAR-T细胞可以被表达CD19和CD20抗原的肿瘤细胞激活。上述结果表明,CD19/CD20双靶点的BiCAR-T细胞能大量分泌杀伤相关的细胞因子IFN- $\gamma$ 。

2.6 BiCAR-T细胞能有效治疗B-NSG B系急性淋巴细胞白血病模型小鼠

在3组B-NSG小鼠中,注射未转染病毒T细胞和PBS溶液的小鼠体内肿瘤细胞均迅速生长,小动物成像系统中出现较高的荧光值,PBS组小鼠在(19±3)d

全部死亡, T 细胞组在(20±1)d 全部死亡; 而双靶点 BiCAR-T 细胞组小鼠肿瘤细胞信号逐渐减弱, 生存良好, 至 50 d 时, 小鼠体内肿瘤细胞信号几乎消失,

接近注射肿瘤细胞前的小鼠信号水平(图 6、7)。70 d 时, BiCAR-T 细胞组所有小鼠均存活(图 8,  $P < 0.01$ )。



A: Cytotoxicity of BiCAR-T on Nalm-6 cells with CD19 and CD20 expression; B: Cytotoxicity of BiCAR-T on K562-CD19-GFP cells with CD19 expression; C: Cytotoxicity of BiCAR-T on K562-CD20-GFP cells with CD20 expression; D: Cytotoxicity of BiCAR-T on K562 cells without CD19 and CD20 expression

图4 BiCAR-T 细胞对靶细胞的杀伤作用

Fig.4 Cytotoxicity of BiCAR-T on target cells

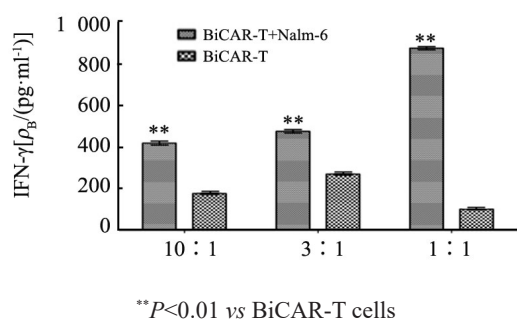


图5 BiCAR-T 细胞与 Nalm-6 细胞共孵育后 IFN- $\gamma$  的水平  
Fig.5 IFN- $\gamma$  level of BiCAR-T cells after co-incubation with Nalm-6 cells

### 3 讨论

以 CD19 为靶点的 CAR-T 细胞治疗急性 B 细胞白血病和淋巴瘤的临床试验取得了很好的结果, 也促成了诺华公司的 kymriah 和吉利德公司的 yescarta 两款 CAR-T 细胞产品的获批上市。单靶点 CAR-T 细胞治疗在短期内有很高的治愈率, 但疾病缓解之后的复发问题也越来越被研究者关注。有研究<sup>[5,8]</sup>显示, 经过 CD19 CAR-T 治疗的白血病患者会有一部分

出现疾病复发。复发原因包括免疫治疗压力下, 肿瘤抗原逃逸或变异<sup>[9-10]</sup>、肿瘤的异质性导致的髓系复发或表达其他肿瘤抗原(如 CD20 和 CD22)但不表达 CD19 的肿瘤复发, 以及肿瘤负荷大或 HAMA 效应导致的 CAR-T 细胞在体内存活时间短, 无法产生足够的肿瘤杀伤效果等<sup>[11-13]</sup>。

目前有多种策略来增强 CAR-T 治疗效果, 提高治愈率和减少复发率。其中之一就是在单一的抗原靶点基础上, 增加另外一个肿瘤细胞上普遍表达的特异抗原<sup>[14]</sup>。对于 B 淋巴细胞肿瘤, 尤其是淋巴瘤而言, CD20 是除了 CD19 之外一个不错的选择<sup>[15]</sup>。CD20 表达于除浆细胞(分泌免疫球蛋白的 B 细胞)外的发育分化各阶段 B 细胞的表面, 在 B 细胞增殖和分化中起重要的调节作用; 在 B 细胞肿瘤尤其是非霍奇金淋巴瘤细胞上也广泛表达。针对 CD20 的单克隆抗体利妥昔单抗已被广泛应用于淋巴瘤的治疗<sup>[16]</sup>, 也有研究者构建了以 CD20 为靶点的 CAR-T 细胞用于治疗 B 细胞肿瘤, 体外、动物试验<sup>[17-20]</sup>及初步临床试验<sup>[21]</sup>(NCT00621452)结果提示 CD20 可以作为 CAR-T 细胞治疗 B 细胞肿瘤的靶点。

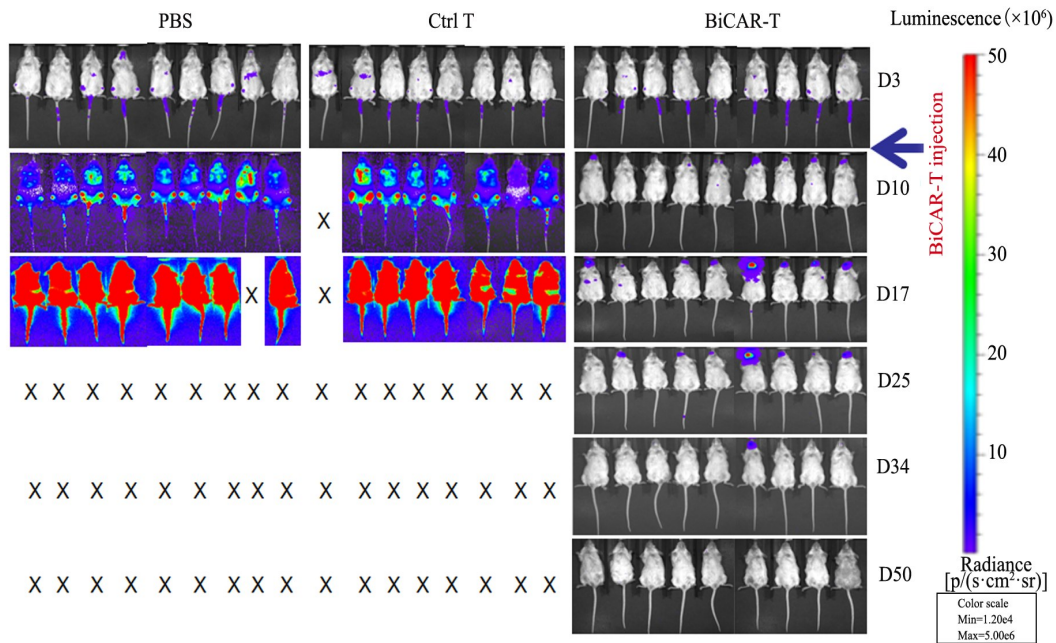


图6 IVIS 光谱活体成像系统下 NSG 小鼠的成像效果  
Fig.6 Imaging effect of NSG mice under IVIS system

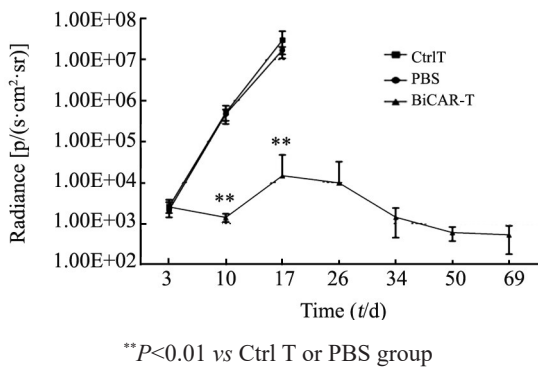


图7 BiCAR-T 细胞处理后各组 NSG 小鼠在小鼠成像系统下的辐射亮度

Fig.7 Radiance in each group of NSG mice after treatment with BiCAR-T cells under the mice imaging system

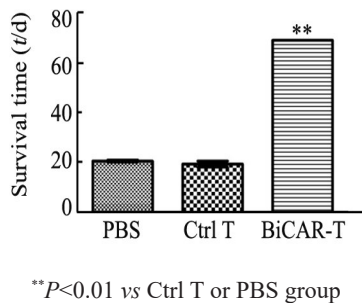


图8 BiCAR-T 细胞处理后各组 NSG 小鼠的存活时间

Fig.8 Survival time of NSG mice in each group after treatment with BiCAR-T cells

本研究提供了一种新型的靶向 B 细胞上 CD19 和 CD20 双靶抗原的 CAR 分子的构建方法, 验证了双靶点 CAR-T 细胞能够有效、特异性地杀伤 CD19 单阳

性的 K562-CD19-GFP 细胞、CD20 单阳性的 K562-CD20-GFP 细胞以及 CD19 和 CD20 双阳性的 Nalm-6 肿瘤细胞, Nalm-6 肿瘤细胞与 CAR-T 细胞共孵育, 能够使 CAR-T 细胞活化并分泌大量 IFN- $\gamma$ 。

多项研究<sup>[22-25]</sup>表明, 4-1BB 为信号域的 CAR 分子相较于 CD28 为信号域的 CAR 分子具有更好的体内增殖能力和清除肿瘤能力。本研究采用的 CAR 分子结构为第二代结构, 共刺激分子为 4-1BB。为了证明 CD19/CD20 双靶点的 BiCAR-T 细胞杀伤 CD19 和/或 CD20 阳性靶细胞的能力和特异性, 构建了多种细胞模型, 包括 K562-CD19-GFP、K562-CD20-GFP 和 Nalm6-Luc-GFP。LDH 释放实验验证了 BiCAR-T 细胞杀伤上述 3 种靶细胞的能力, 表明 BiCAR-T 细胞杀伤靶细胞的特异性和广泛性。本研究中的 BiCAR-T 细胞在效靶比为 10:1 时杀伤靶细胞能力达到 90% 以上。

为了进一步证明 BiCAR-T 细胞的有效性, 使用 B-NSG 免疫缺陷小鼠, 尾静脉注射带有 luciferase 标记的 Nalm6-Luc-GFP 肿瘤细胞构建小鼠白血病模型。造模后第 4 天通过尾静脉注射 BiCAR-T 细胞, 在输注 BiCAR-T 细胞后不同时间点通过小动物活体成像方法观察肿瘤细胞在小鼠体内的存活和分布情况。结果显示, CAR-T 细胞能够有效清除小鼠体内的 Nalm6-Luc-GFP 肿瘤细胞, 对小鼠白血病具有良好的治疗效果。

综上所述, 本研究报道了一种 CD19 和 CD20 双靶点 BiCAR-T 细胞的设计和制备方法, 并且在体外试验及小鼠体内试验均证明了其可行性和有效性。本实验结果为进一步开展临床研究验证双靶点

CAR-T 在白血病和淋巴瘤患者的治疗效果提供了实验依据。

### [参考文献]

- [1] SADELAIN M, RIVIÈRE I, RIDDELL S. Therapeutic T cell engineering[J]. *Nature*, 2017, 545(7655): 423-431. DOI: 10.1038/nature22395.
- [2] JUNE C H, SADELAIN M. Chimeric antigen receptor therapy[J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(1): 64-73. DOI: 10.1056/NEJMra1706169.
- [3] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 59(6382): 1361-1365. DOI: 10.1126/science.aar6711.
- [4] WANG J, HU Y, HUANG H. Acute lymphoblastic leukemia relapse after CD19-targeted chimeric antigen receptor T cell therapy[J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 102(6): 1347-1356. DOI: 10.1189/jlb.5RU0817-315R.
- [5] NELLAN A, LEE D W. Paving the road ahead for CD19 CAR T-cell therapy[J]. *Curr Opin Hematol*, 2015, 22(6): 516-520. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000182.
- [6] SOTILLO E, BARRETT D M, BLACK KL, et al. Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy[J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(12): 1282-1295. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1020.
- [7] PAN J, YANG J F, DENG B P, et al. High efficacy and safety of low-dose CD19-directed CAR-T cell therapy in 51 refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia patients[J]. *Leukemia*, 2017, 31(12): 2587-2593. DOI: 10.1038/leu.2017.145.
- [8] MAUDE S L, FREY N, SHAW P A, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia[J]. *N Engl J*, 2014, 371(16): 1507-1517. DOI: 10.1056/NEJMoa1407222.
- [9] SOTILLO E, BARRETT D M, BLACK K L, et al. Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy[J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(12): 1282-1295. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1020.
- [10] ASNANI M, HAYER K E, NAQVI A S, et al. Retention of CD19 intron 2 contributes to CART-19 resistance in leukemias with subclonal frameshift mutations in CD19[J]. *Leukemia*, 2019, [Epub ahead of print] [2019-11-16]. <https://www.nature.com/articles/s41375-019-0580-z>. DOI: 10.1038/s41375-019-0580-z.
- [11] GARDNER R, WU D, CHERIAN S, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy[J]. *Blood*, 2016, 127(20): 2406-10. DOI: 10.1182/blood-2015-08-665547.
- [12] WANG J, HU Y, HUANG H. Acute lymphoblastic leukemia relapse after CD19-targeted chimeric antigen receptor T cell therapy[J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 102(6): 1347-1356. DOI: 10.1189/jlb.5RU0817-315R.
- [13] SHAH N N, FRY T J. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(6): 372-385. DOI: 10.1038/s41571-019-0184-6.
- [14] GRADA Z, HEGDE M, BYRD T, et al. TanCAR: a novel bispecific chimeric antigen receptor for cancer immunotherapy[J/OR]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2(7): e105[2019-11-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3731887/>. DOI: 10.1038/mtna.2013.32.
- [15] EINFELD D A, BROWN J P, VALENTINE M A, et al. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains[J/OL]. *EMBO J*, 1988, 7(3): 711-717[2019-11-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC454379/>.
- [16] BORNSTEIN G G, QUÉVA C, TABRIZI M, et al. Development of a new fully human anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of B-cell malignancies[J]. *Invest New Drugs*, 2010, 28(5): 561-574. DOI: 10.1007/s10637-009-9291-z.
- [17] JENSEN M, TAN G, FORMAN S, et al. CD20 is a molecular target for scFvFc: zeta receptor redirected T cells: implications for cellular immunotherapy of CD20<sup>+</sup> malignancy[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 1998, 4(2): 75-83. DOI: 10.1053/bbmt.1998.v4.pm9763110.
- [18] JENSEN M C, COOPER L J, WU A M, et al. Engineered CD20-specific primary human cytotoxic T lymphocytes for targeting B cell malignancy[J]. *Cytotherapy*, 2003, 5: 131-138. DOI: 10.1080/14653240310001028.
- [19] TILL B G, JENSEN M C, WANG J J, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells[J/OL]. *Blood*, 2008, 112(6): 2261-2271[2019-11-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2532803/>. DOI: 10.1182/blood-2007-12-128843.
- [20] WANG J, PRESS O W, LINDGREN C G, et al. Cellular immunotherapy for follicular lymphoma using genetically modified CD20-specific CD8 $\beta$  cytotoxic T lymphocytes[J]. *Mol Ther*, 2004, 9: 577-586.
- [21] TILL B G, JENSEN M C, WANG J J, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results[J/OL]. *Blood*, 2012, 119(17): 3940-3950[2019-11-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3350361/>.
- [22] WANG J, JENSEN M, LIN Y, et al. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains[J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(8): 712-725. DOI: 10.1089/hum.2007.028.
- [23] GOMEZ-EERLAND R, NUIJEN B, HEEMSKERK B, et al. Manufacture of gene-modified human T-cells with a memory stem/central memory phenotype[J/OL]. *Hum Gene Ther Methods*, 2014, 25(5): 277-287[2019-11-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4208561/>. DOI: 10.1089/hgtb.2014.004.
- [24] ZHAO Z G, CONDOMINES M, VAN DER STEGEN S J C, et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells[J/OL]. *Cancer Cell*, 2015, 28(4): 415-428 [2019-11-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5003056/>. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.09.004.
- [25] ZHONG Q, ZHU Y M, ZHENG L L, et al. Chimeric antigen receptor-T cells with 4-1BB co-stimulatory domain present a superior treatment outcome than those with CD28 domain based on bioinformatics[J]. *Acta Haematol*, 2018, 140(3): 131-140. DOI: 10.1159/000492146.

[收稿日期] 2019-12-20

[修回日期] 2020-02-18

[本文编辑] 阮芳铭