

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.04.003

双特异性 CAR-T 细胞对 EGFRvIII⁺/CD133⁺胶质瘤干细胞的靶向杀伤

刘亚丹¹, 谢甲贝², 朱琼琼¹, 卢文杰¹, 丁辉², 韩双印² (1. 河南省第二人民医院 消化内科, 河南 郑州 451191; 2. 郑州大学人民医院 消化内科, 河南 郑州 450003)

[摘要] **目的:** 制备双特异性 CAR-T (bsCAR-T) 细胞, 观察其对表达表皮生长因子 III 型突变阳性 (EGFRvIII⁺, 简称 vIII⁺) 和 CD133⁺ 胶质瘤干细胞的靶向杀伤作用。**方法:** 基于前期研制的 vIII/CD133 双特异性微抗体和二代 CAR 构建的双特异性 CAR (bsCAR), 制备慢病毒载体转染人外周血 T 细胞, FCM 和 WB 法检测 bsCAR 转染效率和表达水平。bsCAR-T 细胞和 vIII⁺/CD133⁺ U87 胶质瘤干细胞共培养, 乳酸脱氢酶 (LDH) 释放实验、IFN- γ 分泌实验检测其特异性杀伤作用和对 IFN- γ 分泌的促进作用。制备裸鼠 vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞移植瘤模型检测 bsCAR-T 细胞对移植瘤生长的抑制作用。**结果:** vIIIscFv 和 CD133scFv 通过重叠 PCR 无缝连接入二代 CAR 表达框 (S-vIIIscFv/CD133scFv-Hinge-TM-CD137-CD3 ζ) 中, 然后克隆入 pCDH-MSCV-MCS-EF1-copGFP 载体的 *EcoR* I 和 *BamH* I 位点 (pbsCAR)。3 种质粒 (pVSV-G、pCMV-dR8.9 和 pbsCAR) 共转染 HEK293T 细胞制备慢病毒载体, 转染外周血 T 细胞, FCM 检测 bsCAR 表达率为 71.1%, WB 法结果显示 bsCAR 表达正确。bsCAR-T 细胞和 vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞共培养检测结果显示, bsCAR-T 细胞对胶质瘤干细胞具有特异性杀伤作用, 与效靶比呈正比; IFN- γ 分泌量为 (2 350.6 \pm 92) pg·mL⁻¹, 明显高于对照组 ($P<0.01$)。裸鼠移植瘤动物模型显示, bsCAR-T 细胞在体内具有明显的移植瘤抑制作用 ($P<0.01$)。**结论:** bsCAR-T 细胞能够特异性靶向杀伤 vIII⁺/CD133⁺ 胶质瘤干细胞, 实验结果为促进实体瘤的细胞免疫治疗提供了实验依据。

[关键词] 表皮生长因子 III 型突变体; CD133; 双特异性 CAR; vIII⁺/CD133⁺ U87 胶质瘤干细胞; 肿瘤干细胞

[中图分类号] R392; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)04-0296-06

Targeted killing effect of bispecific CAR-T cells on EGFRvIII⁺/CD133⁺ glioma stem cells

LIU Yadan¹, XIE Jiabei², ZHU Qionqiong¹, LU Wenjie¹, DING Hui², HAN Shuangyin² (1. Department of Gastroenterology, The Second People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou 451191, Henan, China; 2. Department of Gastroenterology, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450066, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare bsCAR-T cells and observe its targeted killing effect on epidermal growth factor variant III (EGFRvIII⁺, simplified as vIII⁺) and CD133⁺ glioma stem cells. **Methods:** Based on the previously generated vIII/CD133 minibody and second-generation CAR, bispecific CAR (bsCAR) was constructed. Lentiviral bsCAR were prepared for the transfection of human peripheral blood T cells. Flow cytometry (FCM) and Western blot test were used to detect the transfection efficiency and expression of bsCAR. After bsCAR-T cells were co-cultured with vIII⁺/CD133⁺ U87 glioma stem cells, their killing effects were detected by LDH release test and cytokine IFN- γ secretion. vIII⁺/CD133⁺ U87 stem cell transplantation tumor model of nude mouse was established to test the inhibition of bsCAR-T cells on transplanted tumors. **Results:** vIIIscFv and CD133scFv were joined seamlessly by over-lap PCR with CAR expression cassette (S-vIII/CD133scFv-Hinge-TM-CD137-CD3 ζ). The above bsCAR construct was then cloned into *EcoR* I and *BamH* I sites of pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (pbsCAR). Lentiviral bsCAR were prepared by co-transfection of three plasmid (pVSV-G, pCMV-dR8.9 and pbsCAR) into HEK293T cells and later transfected human peripheral blood T cells. The expression of bsCAR detected by flow cytometry was 71.1%. Western blot analysis showed correct expression of bsCAR. The co-culture assay of bsCAR-T cells and vIII⁺/CD133⁺ U87 stem cells showed that bsCAR-T cells had specific killing effect on glioma stem cells, which was proportional to the effector-target ratio. IFN- γ secretion was (2 350.6 \pm 92) pg·mL⁻¹, which was significantly higher than that of the control group ($P<0.01$). Nude mice transplantation tumor model demonstrated the transplantation tumor inhibition effect of bsCAR-T cells *in vivo* ($P<0.01$). **Conclusion:** bsCAR-T cells can kill specifically vIII⁺/CD133⁺ glioma stem cells, which provides experimental basis for cell immunotherapy of solid tumors.

[Key words] epidermal growth factor variant III; CD133; bispecific CAR; vIII⁺/CD133⁺ U87 glioma stem cell; cancer stem cell

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(4): 296-301. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.04.003]

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 81772670)

[作者简介] 刘亚丹(1989—), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤免疫治疗基础与临床的研究, E-mail: 1054518824@qq.com

[通信作者] 韩双印, E-mail: hansy007@zzu.edu.cn; 丁辉, E-mail: dinghui76sy@163.com

近年来,以 CAR-T 细胞为代表的肿瘤免疫治疗新方法发展迅速,其在血液肿瘤中表现出的颠覆性治疗效果,为肿瘤患者带来新的希望^[1-2]。然而, CAR-T 细胞在实体瘤中仍面临极大挑战,肿瘤异质性、免疫抑制微环境等限制了其在实体瘤中的应用^[3]。研究者一方面优化 CAR 结构,增强其杀伤性和可调控性;另一方面选择更有效的分子靶点,以实现肿瘤细胞的精准杀伤^[4]。肿瘤干细胞具有高度的自我更新、分化潜能和致瘤能力,在肿瘤发生发展、放化疗抵抗、转移和复发中的作用受到广泛关注和深入研究^[5]。CD133 是肿瘤干细胞的标志物,在脑胶质瘤、乳腺癌等许多肿瘤中得到证实^[6]。表皮生长因子 III 型突变体 (epidermal growth factor variant III, EGFRvIII, 简称 vIII) 是为数不多的肿瘤特异性抗原之一^[7],在多种实体瘤中表达,而表达 vIII/CD133 的肿瘤干细胞在脑胶质瘤中早已被发现^[8]。本研究基于课题组前期研制的 vIII/CD133 双特异性微抗体^[9]和二代 CAR^[10],设计和构建双特异性 CAR (bispecific CAR, bsCAR),转染 T 细胞,检测其靶向杀伤作用,旨在为 bsCAR-T 细胞在实体瘤中的应用提供实验依据和研究基础。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞与主要试剂

BALB/cA 裸鼠购自中国科学院上海实验动物中心 (实验动物合格证号: SCXK20160011)。vIII⁺U87、CD133⁺U87、vIII⁺/CD133⁺ U87 等细胞均由本实验室构建保存。限制性内切酶 *EcoR* I 及 *Bam*H I 购自 BioLabs 公司, pVSV-G、pCMV-dR8.9、pCDH-MSCV-MCS-EF1-copGFP 质粒均购自 Novagen 公司。人外周血淋巴细胞分离液购自 TBD 公司,重组人源化 CD3 单抗购自 Novoprotein 公司,鼠抗人 CD3 ζ 抗体、HRP 标记羊抗鼠二抗购自 Santa Cruz 公司,PE 标记的羊抗鼠二抗购自 Jackson Immunoresearch 公司。乳酸脱氢酶 (LDH) 释放检测试剂盒购自 Beyotime 公司,ELISA 试剂盒购自 Neobioscience 公司。CD3 微磁珠购自 Miltenyi Biotec 公司,CD3/CD28 免疫磁珠购自 Life Technologies 公司。

1.2 bsCAR 表达载体构建

从前期构建的 vIII 基因重组抗体^[11]、vIII/CD133 微抗体^[9]获得 vIIIscFv (726 bp)、CD133scFv (741 bp),重叠 PCR 将两者连接 (vIII/CD133scFv, 1 467 bp); 利用无缝连接入先前构建的二代 CAR 中^[10],表达框为 S-vIII/CD133scFv-Hinge-TM-CD137-CD3 ζ (2 142 bp); 将该表达框克隆入 pCDH-MSCV-MCS-EF1-copGFP 质粒的 *EcoR* I 和 *Bam*H I 位点,新载体命名为

pbsCAR (图 1A)。氨苄抗性 LB 平板筛选阳性菌落,质粒 DNA 提取后限制性内切酶片段分析 (酶切+1% 琼脂糖凝胶电泳) 及核酸测序鉴定。载体构建所用引物如表 1 所示,下划线者为限制性内切酶位点。

表 1 pbsCAR 载体构建所用引物

基因名称	引物序列 (5'~3')
vIIIscFv	F: ATGGGATGGAGCTGTATCAT R: TTTGATTTCCAGCTTGGTGCCA
CD133scFv	F: GATGTTTTGATGACCCAAACT R: CGCAGAGACAGTGACCAGAGT
bsCAR	F: <u>GCGAATTC</u> ACCATGGGATGGAGCTGTATCAT R: <u>GCGGATCCT</u> TAGCGAGGGGGCAGGGCCT

1.3 bsCAR-T 细胞的制备

首先通过磷酸钙沉淀法将 pVSV-G、pCMV-dR8.9 和 pbsCAR 质粒共转染 HEK293T 细胞,48 h 后收集上清,过滤、浓缩后检测病毒滴度,获得慢病毒 bsCAR (lentiviral bsCAR, LV-bsCAR) 载体。健康人外周血 Ficoll 密度梯度法获得单个核细胞,CD3 微磁珠分选 CD3⁺ T 细胞,CD3/CD28 免疫磁珠激活 T 细胞 (磁珠:细胞=1:1),激活后次日以感染复数为 5 的 LV-bsCAR 感染 CD3⁺ T 细胞获取 bsCAR-T 细胞,在 IL-2 (30 U/mL) 存在下扩增 14 d,用于后续实验。

1.4 FCM 和 WB 法检测感染后 CD3⁺ T 细胞中 bsCAR 的表达

收集 3×10^5 个感染后 CD3⁺ T 细胞,PBS 洗涤后加 PE 标记的山羊抗小鼠 IgG F(ab)₂ 抗体 2 μ L,室温避光处理 20 min。PBS 洗涤后重悬于 500 μ L FACS 缓冲液,上机检测。未转染 T 淋巴细胞用于设门。WB 法过程如下:LV-bsCAR 感染 CD3⁺ T 细胞 48 h 后收集细胞,裂解后加热变性、离心取上清液检测蛋白质含量,8% SDS-PAGE 分离蛋白质样本,半干转移法将蛋白质样本转移至 PVDF 膜,10% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h,加入鼠抗人 CD3 ζ 一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 下处理过夜,加入 HRP 标记羊抗鼠二抗 (1:5 000) 室温下处理 1 h,ECL 化学发光法显色,采集图像,Image J 软件分析蛋白质条带灰度值。

1.5 LDH 释放实验检测 bsCAR-T 细胞对 vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞的特异性杀伤作用

将 vIII/CD133⁺ U87 靶细胞接种于 96 孔板 (1 \times 10⁴ 个/孔) 中,按效靶比 5:1、10:1、20:1、40:1 加入效应细胞 (bsCAR-T 细胞),共培养 24 h,加入 LDH 释放试剂 (培养液体积的 1/10),1 h 后收上清液,加 LDH 工作液 60 μ L,室温避光处理 30 min 后上机检测。靶细胞的阳性对照为 vIII⁺ U87 和 CD133⁺ U87 细胞,阴

性对照组为野生型 U87 细胞 (WTU87); 效应细胞对照设为未转染 T 细胞 (NT-T)。对照组细胞毒性测定方法与上述方法相同。

1.6 ELISA 检测 bsCAR-T 细胞 IFN- γ 的分泌水平

按效靶比=5:1 将靶细胞和效应细胞在 24 孔板中共培养 24 h, ELISA 测定上清液中 IFN- γ 含量。靶细胞的阳性对照与阴性对照、效应细胞的对照同 1.5, 对照组细胞因子检测方法与上述相同。

1.7 裸鼠移植瘤实验检测 bsCAR-T 细胞对 vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞移植瘤的抑制作用

6 周龄雌性 BALB/cA 裸鼠右侧大腿皮下接种 5×10^6 个 vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞, 建立移植瘤裸鼠模型。在细胞接种后 10~14 d 肿瘤体积约 500 mm³ 时, 按随机表法将小鼠随机分为 4 组 (每组 4 只), 尾静脉注射细胞 1×10^7 个/100 μ L, 设 bsCAR-T 细胞组、vIII CAR-T 细胞为阳性对照组, 未转染 T 细胞 (NT-T) 组和 PBS 为阴性对照组。通过卡尺测量肿瘤生长, 使用公式 $[1/2 \times \text{长} \times (\text{宽})^2]$ 计算肿瘤体积。观察至第 60 天将动物进行安乐死。动物实验方案已获郑州大学人民医院伦理委员会审查批准 (批准号: No. 20190410-02)。

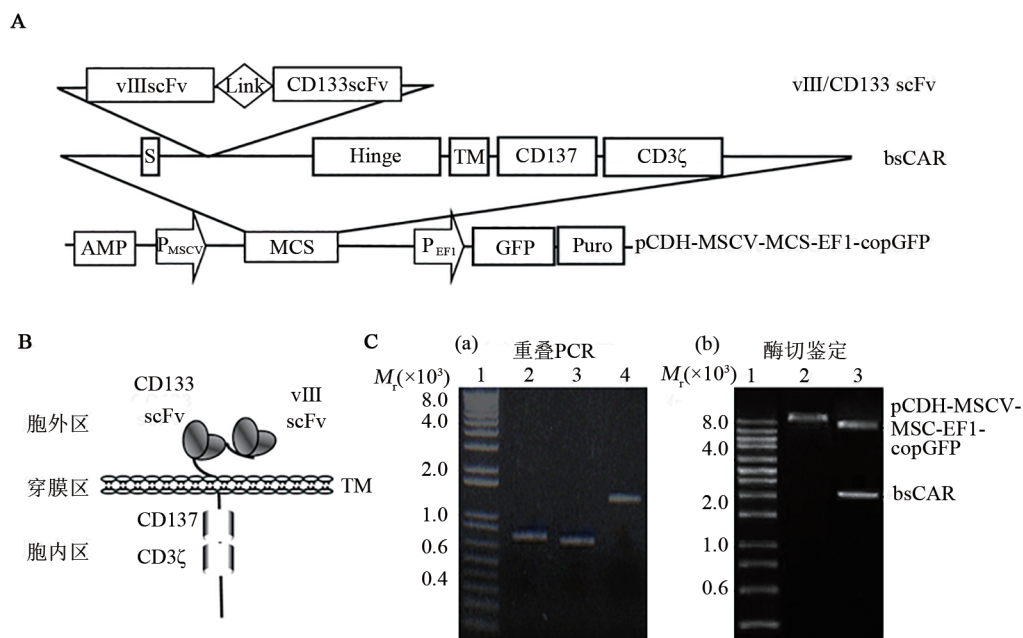
1.8 统计学处理

所有实验均独立重复 3 次。应用 SPSS17.0 统计软件分析实验数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 vIII/CD133 bsCAR 载体

pbsCAR 载体通过以下三个步骤完成构建 (图 1A): vIII/CD133scFv 和 S-vIII/CD133scFv-Hinge-TM-CD137-CD3 ζ -bsCAR 克隆入 pCDH-MSCV-MCS-EF1-copGFP 质粒的 *EcoR* I 和 *Bam*H I 位点 (pbsCAR)。bsCAR 结构如图 1B 所示: 胞外区 (信号肽、单链抗体、铰链)、穿膜区、胞内信号区 (CD137、CD3 ζ)。pbsCAR 全长 9 683 bp, bsCAR 表达框 2 142 bp, 基础载体 7 541 bp, 经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切和 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 图 1C 右第 3 泳道可见上下两条带, 上方为基础载体, 下方为 bsCAR 表达框。经 DNA 测序分析与设计序列完全一致, 表明重组载体 pbsCAR 构建成功。



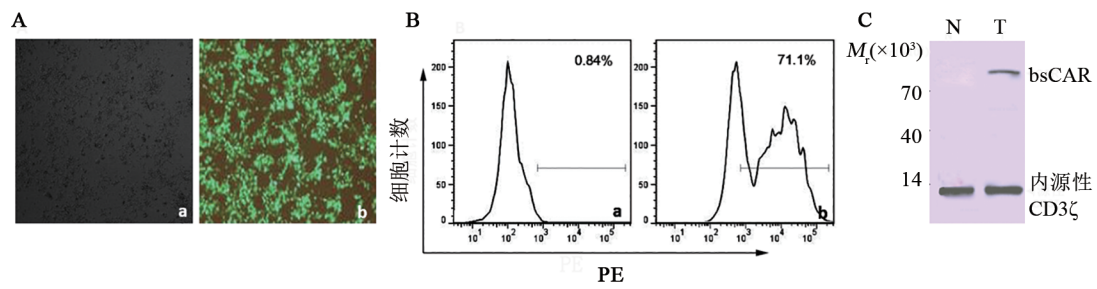
A: bsCAR 各基因片段连接步骤; B: bsCAR 结构示意图; C: pbsCAR 双酶切电泳鉴定, 其中 (a) 重叠 PCR, 1 泳道为 DNA 链长度标志、2 泳道为 CD133scFv、3 泳道为 vIIIscFv、4 泳道为 vIII/CD133scFv 连接后, (b) 酶切电泳, 1 泳道为 DNA 链长度标志、2 泳道 pbsCAR (无酶切)、3 泳道为 pbsCAR 酶切后的基础载体和 bsCAR

图 1 pbsCAR 的结构与鉴定

2.2 LV-bsCAR 包装及感染效率检测

用磷酸钙沉淀法将 3 种质粒 (pVSV-G、pCMV-dR8.9、pbsCAR) 共转染 HEK293T 细胞包装病毒, 72 h 后绿色荧光细胞达 95% 以上 (图 2A)。用 p24 ELISA 试剂盒测病毒滴度, 结果为 $(2 \sim 9) \times 10^6$ TU/ml。FCM

检测 LV-bsCAR 的转染效率可达 70% 以上 (图 2B)。WB 法检测结果 (图 2C) 显示, LV-bsCAR 转染的 T 细胞检测到表达蛋白的分子质量约为 8×10^4 (图 2C), 与计算的相对分子质量一致, 空白对照未检测到相应蛋白表达 (图 2C), 表明 bsCAR 在 T 细胞中表达成功。



A: LV-bsCAR 在 HEK293T 细胞中呈现荧光(a 白光下对照, b 荧光镜下, $\times 100$); B: LV-bsCAR 转染 T 细胞效率(a 设门, b 在 T 细胞表达率); C: WB 法检测 bsCAR 的表达, N 为未转染 T 细胞, T 为 LV-bsCAR 转染 T 细胞

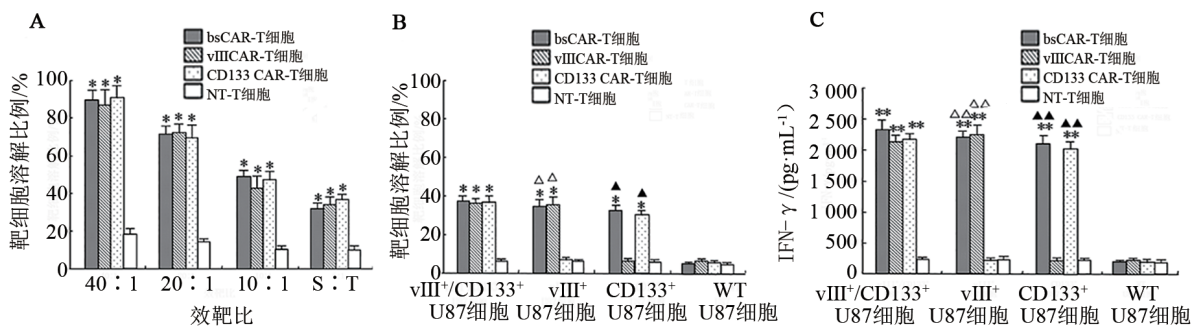
图2 LV-bsCAR 的感染效率及 bsCAR 转染 T 细胞的鉴定

2.3 bsCAR-T 细胞对 vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞的杀伤
效应细胞(bsCAR-T 细胞)与靶细胞(vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞)共培养 24 h 后, LDH 释放试验检测效靶比为 5:1、10:1、20:1、40:1 时 bsCAR-T 细胞的杀伤效果, 效应细胞和靶细胞均设阳性和阴性对照。检测结果(图 3)表明:(1)随着效靶比的升高, bsCAR-T 细胞对 vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞的杀伤能力逐渐增强, 与对照组相比, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$, 图 3A); (2)效应细胞对照组(vIII CAR-T 细胞, CD133 CAR-T 细胞)和靶细胞对照组(vIII⁺ U87、CD133⁺ U87、WTU87 细胞)的杀伤实验也均证明了 bsCAR-T 细胞的特异性杀伤作用(均 $P < 0.05$, 图 3B)。本研究

表明, bsCAR-T 细胞能特异识别并有效杀伤 vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞。

2.4 bsCAR-T 细胞的 IFN- γ 分泌量

为了进一步验证 bsCAR-T 细胞对 vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞的选择性识别和杀伤作用, 检测了细胞共培养上清液中 IFN- γ 水平。分组和对照组设定同上, 结果(图 3C)显示: bsCAR-T 细胞与阳性对照组显示一致的特异性杀伤, 效应细胞与靶细胞共培养 24 h 后, IFN- γ 分泌量为 $(2\ 350.6 \pm 92) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与阴性对照相比有显著差异($P < 0.01$), 表明 bsCAR-T 细胞可特异性识别 vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞并分泌大量的 IFN- γ 将其杀伤。



与 NT-T 细胞比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与 CD133 CAR-T 细胞比较, $^{\Delta}P < 0.01$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; 与 vIIICAR-T 细胞比较, $^{\blacktriangle}P < 0.01$, $^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$

A: bsCAR-T 细胞对 EGFRvIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞杀伤活性; B: 效应细胞和靶细胞的不同对照组显示特异性杀伤作用;

C: bsCAR-T 细胞的 IFN- γ 释放实验

图3 bsCAR-T 细胞对 EGFR vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞的特异性杀伤作用

2.5 bsCAR-T 细胞抑制 vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞裸鼠移植瘤的生长

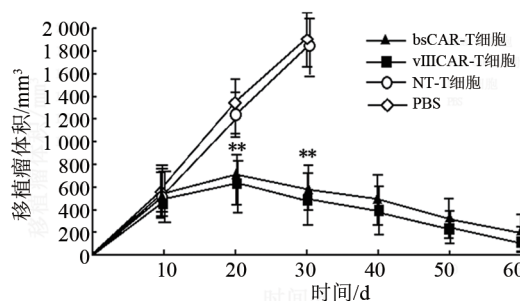
采用 BALB/cA 裸鼠皮下接种 vIII⁺/CD133⁺ U87 干细胞建立移植肿瘤模型, 各组荷瘤裸鼠分别注射 1×10^7 个 bsCAR-T、vIII CAR-T 细胞(阳性对照)、未转染 T 细胞和 PBS(阴性对照)。接受 bsCAR-T 细胞和 vIIICAR-T 细胞注射的小鼠 3 周后移植瘤的生长受到抑制, 而阴性对照组移植瘤则继续生长。基于动物伦理要求, 小鼠移植瘤大于 $1\ 500 \text{ mm}^3$ 时被安乐死。

移植瘤生长曲线结果显示, bsCAR-T 细胞组与阳性对照之间差异无统计学意义($P > 0.05$ 、与阴性对照之间的差异具有显著统计学意义($P < 0.01$, 图 4), 说明 bsCAR-T 细胞在体内能够发挥抗肿瘤作用。

3 讨论

肿瘤免疫治疗经历了三十余年的风雨历程迎来了新的跨越, CAR-T 细胞免疫治疗所表现出的杀伤性、靶向性和持久性, 提高了临床治疗效果, 在复发

及难治性白血病和淋巴瘤等血液肿瘤中取得了可喜的成功,商品化的CAR-T细胞治疗产品已得到批准^[12-13]。中国的抗肿瘤学者也在积极的探索之中,并取得了可喜的成果,出台了新的细胞治疗技术规范,众多临床试验正在进行之中^[14-17]。



与NT-T细胞组或PBS组比较,** $P < 0.01$

图4 bsCAR-T细胞抑制裸鼠移植瘤生长

肿瘤干细胞的发现使人们重新认识了肿瘤的起源和本质,也为肿瘤治疗提供了新的思路,靶向肿瘤干细胞成为肿瘤治疗的研究重点^[18]。CD133是得到广泛认可和研究较多的肿瘤干细胞标志物之一,CD133⁺肿瘤细胞在体外能形成神经球样克隆,具有很强的致瘤性、自我更新和分化能力^[19]。EGFRvIII在多种人类肿瘤中有很高的表达率(30%~89%),比如脑胶质瘤、肝癌、肺癌、结肠癌等^[20-21],其表达所导致的信号通路组成型激活与肿瘤的恶性表型密切相关,作为肿瘤治疗的分子靶点备受关注^[20]。vIII/CD133共表达的肿瘤干细胞在胶质瘤、乳腺癌中得到证实,不断积累的研究表明其在肿瘤发生发展的关键作用^[22]。

CD133⁺肿瘤干细胞特性和具有的细胞表面成分使其受到肿瘤靶向治疗的青睐^[23]。vIII是肿瘤特异性抗原,各种靶向治疗策略中的热点靶标,靶向vIII的治疗性抗体、小分子药物等已在研究中^[24-25]。本课题组前期已制备vIII基因重组抗体^[11]、vIII/CD133微抗体^[9]、靶向vIII CAR^[10]等,为制备vIII/CD133双特异性CAR打下基础。靶向vIII CAR-T细胞在胶质瘤应用已有多个临床试验正在进行中,初步的研究结果显示了良好的抗肿瘤作用^[26]。本课题组已在ClinicalTrials.gov成功注册(NCT03941626),正在筛选患者入组。双特异性抗体的设计,vIIIscFv和CD133scFv之间采用(Gly₄Ser)₄串联(Tandem)连接,该链接可以使两者互不影响。CAR以信号肽-胞外区-铰链区-穿膜区-胞内信号区,该表达框在引导人工合成受体的穿透细胞膜、穿膜锚定、T细胞激活、细胞毒性、杀伤活性等方面表现良好。pCDH-MSCV-MCS-EF1-copGFP是双启动子载体(MSCV,EF1),目

的基因和标识基因都能有效表达。本研究中FCM和荧光显微镜观察显示bsCAR和GFP的良好表达(图2A、B),T细胞中可检测到70%的bsCAR表达。WB法结果也提示bsCAR的表达正确(图2C)。

双特异性靶向策略为精准治疗提供了可能,目前有30余种双特异性抗体在临床试验中,双特异性CAR-T细胞也正在体外和体内研究中,靶点有CD19/CD20、BMCA/CD38、CD5/CD7和HER2/IL13Ra2等,通过重定向T细胞、信号通路阻断、双靶点定位等方式,提高治疗潜能^[16-17,27-29]。本课题组研制的bsCAR-T细胞旨在通过双特异性靶向肿瘤干细胞,bsCAR-T细胞与vIII⁺/CD133⁺U87干细胞共培养,通过LDH释放试验和IFN- γ 分泌,证明了bsCAR-T细胞的杀伤性,且随着效靶比的提高逐渐增强;通过对照组的设置说明其靶向性。裸鼠动物模型试验也得到相似的结果。然而,实体瘤存在分子异质性,vIII/CD133在实体瘤的表达和体外培养细胞中存在差异,靶向杀伤作用需要人源肿瘤移植、NOD/SCID小鼠模型进一步验证。

CAR-T细胞免疫治疗为肿瘤治疗带来了新的机遇,其在实体瘤中的应用仍面临诸多挑战,如分子靶点选择、CAR结构优化、基因转导效率、T细胞亚群的选择、细胞可调控性、输注方案等问题,本研究为双特异性CAR-T细胞靶向肿瘤干细胞提供了实验基础,相信随着分子肿瘤学研究的深入和细胞治疗技术的进步,肿瘤免疫治疗必将为广大患者带来福祉。

[参考文献]

- [1] FÜCHSL F, KRACKHARDT A M. Adoptive cellular therapy for multiple myeloma using CAR- and TCR-transgenic T cells: response and resistance[J/OL]. *Cells*, 2022, 11(3): 410[2022-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35159220/>. DOI: 10.3390/cells11030410.
- [2] BARROS L R C, COUTO S C F, DA SILVA SANTURIO D, *et al.* Systematic review of available CAR-T cell trials around the world [J/OL]. *Cancers*, 2022, 14(11): 2667[2022-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35681646/>. DOI: 10.3390/cancers14112667.
- [3] MAROFI F, ACHMAD H, BOKOV D, *et al.* Hurdles to breakthrough in CAR T cell therapy of solid tumors[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 140[2022-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35365241/>. DOI: 10.1186/s13287-022-02819-x.
- [4] YOUNG R M, ENGEL N W, USLU U, *et al.* Next-generation CAR T-cell therapies[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(7): 1625-1633. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1683.
- [5] MAGEE J A, PISKOUNOVA E, MORRISON S J. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 283-296. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.03.003.
- [6] BRESCIA P, ORTENSINI B, FORNASARI L, *et al.* CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance[J]. *Stem Cells*,

- 2013, 31(5): 857-869. DOI: 10.1002/stem.1317.
- [7] GAN H K, KAYE A H, LUWOR R B. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme[J]. *J Clin Neurosci*, 2009, 16(6): 748-754. DOI: 10.1016/j.jocn.2008.12.005.
- [8] LIU X J, WU W T, WU W H, *et al.* A minority subpopulation of CD133(+)/EGFRvIII(+)/EGFR (-) cells acquires stemness and contributes to gefitinib resistance[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19(7): 494-502. DOI: 10.1111/cns.12092.
- [9] EMLET D R, GUPTA P, HOLGADO-MADRUGA M, *et al.* Targeting a glioblastoma cancer stem-cell population defined by EGF receptor variant III [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(4): 1238-1249. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1407.
- [10] SHEN C J, YANG Y X, HAN E Q, *et al.* Chimeric antigen receptor containing ICOS signaling domain mediates specific and efficient antitumor effect of T cells against EGFRvIII expressing glioma [J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6: 33[2022-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23656794/>. DOI: 10.1186/1756-8722-6-33.
- [11] GUPTA P, HAN S Y, HOLGADO-MADRUGA M, *et al.* Development of an EGFRvIII specific recombinant antibody[J/OL]. *BMC Biotechnol*, 2010, 10: 72[2022-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20925961/>. DOI: 10.1186/1472-6750-10-72.
- [12] MULLARD A. FDA approves first BCMA-targeted CAR-T cell therapy[J/OL]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(5): 332[2022-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33790473/>. DOI: 10.1038/d41573-021-00063-1.
- [13] BOUCHKOUJ N, KASAMON Y L, DE CLARO R A, *et al.* FDA approval summary: axicabtagene ciloleucel for relapsed or refractory large B-cell lymphoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(6): 1702-1708. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2743.
- [14] ZHANG J Q, HU Y X, YANG J X, *et al.* Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL[J]. *Nature*, 2022, 609(7926): 369-374. DOI: 10.1038/s41586-022-05140-y.
- [15] 石璐璐, 韩双印. 成胶质细胞瘤 CAR-T 免疫治疗的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(4): 321-328. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.04.001.
- [16] MEI H, LI C G, JIANG H W, *et al.* A bispecific CAR-T cell therapy targeting BCMA and CD38 in relapsed or refractory multiple myeloma[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 161[2022-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34627333/>. DOI: 10.1186/s13045-021-01170-7.
- [17] DAI Z Y, MU W, ZHAO Y, *et al.* T cells expressing CD5/CD7 bispecific chimeric antigen receptors with fully human heavy-chain-only domains mitigate tumor antigen escape[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 85[2022-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35332132/>. DOI: 10.1038/s41392-022-00898-z.
- [18] BAI X P, NI J, BERETOV J, *et al.* Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance[J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 69: 152-163. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.07.004.
- [19] SINGH S K, HAWKINS C, CLARKE I D, *et al.* Identification of human brain tumor initiating cells[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401. DOI: 10.1038/nature03128.
- [20] DEL VECCHIO C A, JENSEN K C, NITTA R T, *et al.* Epidermal growth factor receptor variant III contributes to cancer stem cell phenotypes in invasive breast carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(10): 2657-2671. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2656.
- [21] AN Z Y, AKSOY O, ZHENG T N, *et al.* Epidermal growth factor receptor and EGFRv III in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies[J]. *Oncogene*, 2018, 37(12): 1561-1575. DOI: 10.1038/s41388-017-0045-7.
- [22] MIMEAULT M, BATRA S K. Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(2): 234-254. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0785.
- [23] CODD A S, KANASEKI T, TORIGO T, *et al.* Cancer stem cells as targets for immunotherapy[J]. *Immunology*, 2018, 153(3): 304-314. DOI: 10.1111/imm.12866.
- [24] YANG J, YAN J, LIU B R. Targeting EGFRv III for glioblastoma multiforme[J]. *Cancer Lett*, 2017, 403: 224-230. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.06.024.
- [25] IURLARO R, WALDHAEUER I, PLANAS-RIGOL E, *et al.* A novel EGFRvIII T-cell bispecific antibody for the treatment of glioblastoma [J]. *Mol Cancer Ther*, 2022, 21(10): 1499-1509. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-22-0201.
- [26] MORGAN R A, JOHNSON L A, DAVIS J L, *et al.* Recognition of glioma stem cells by genetically modified T cells targeting EGFRv III and development of adoptive cell therapy for glioma[J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(10): 1043-1053. DOI: 10.1089/hum.2012.041.
- [27] BLANCO B, DOMÍNGUEZ-ALONSO C, ALVAREZ-VALLINA L. Bispecific immunomodulatory antibodies for cancer immunotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(20): 5457-5464. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3770.
- [28] SHAH N N, JOHNSON B D, SCHNEIDER D, *et al.* Bispecific anti-CD20, anti-CD19 CAR T cells for relapsed B cell malignancies: a phase 1 dose escalation and expansion trial[J]. *Nat Med*, 2020, 26(10): 1569-1575. DOI: 10.1038/s41591-020-1081-3.
- [29] HEGDE M, MUKHERJEE M, GRADA Z, *et al.* Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13Rα2 mitigate tumor antigen escape [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8): 3036-3052. DOI: 10.1172/JCI83416.

[收稿日期] 2022-12-15

[修回日期] 2023-02-10

[本文编辑] 向正华, 沈志超