

共表达 IL-15 和 CCL19 的 EGFRvIII CAR-T 细胞的构建和功能探究

陈婉琼¹, 咸娜², 林少梅¹, 廖婉婷¹, 陈明珠^{1*}

1 泉州医学高等专科学校药学院, 福建 泉州 362011

2 福建医科大学免疫治疗研究院, 福建 福州 350122

陈婉琼, 咸娜, 林少梅, 廖婉婷, 陈明珠. 共表达 IL-15 和 CCL19 的 EGFRvIII CAR-T 细胞的构建和功能探究[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3787-3799.

CHEN Wanqiong, XIAN Na, LIN Shaomei, LIAO Wanting, CHEN Mingzhu. Construction and functional analysis of EGFRvIII CAR-T cells co-expressing IL-15 and CCL19[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3787-3799.

摘要: 本研究分析了共表达白细胞介素-15 (interleukin-15, IL-15)和趋化因子配体 19 (C-C chemokine ligand 19, CCL19)的 EGFRvIII CAR-T 细胞的功能特性及其体外特异性杀伤效果,旨在优化 CAR-T 细胞多项功能,提高靶向 EGFRvIII 的 CAR-T 细胞对胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)的治疗效果。通过基因工程技术获得重组慢病毒质粒,转染 293T 细胞获得慢病毒并感染 T 细胞获得靶向 EGFRvIII 的第四代 CAR-T 细胞(EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T)。利用流式细胞仪、细胞计数仪、趋化小室、凋亡试剂盒等检测了第四代和第二代 CAR-T 细胞(EGFRvIII CAR-T)的 CAR 分子表达率、增殖、趋化能力、体外特异性杀伤能力及抗凋亡能力等。结果表明,与 EGFRvIII CAR-T 细胞相比,EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞能成功分泌 IL-15 和 CCL19,具有更强的体外增殖能力、趋化能力以及抗凋亡能力(P 值均 <0.05),而体外特异性杀伤能力无显著差异。因此,靶向 EGFRvIII 且同时分泌 IL-15 和 CCL19 的 CAR-T 细胞有望提高胶质母细胞瘤的治疗效果,为临床试验提供一定的参考依据。

关键词: 嵌合抗原受体修饰的 T 细胞; 表皮生长因子受体突变体 III; 胶质母细胞瘤; 白细胞介素-15; 趋化因子配体 19

资助项目: 泉州市科技计划项目(2021N130S); 泉州医学高等专科学校校级青年科技课题(XJK2015B)

This work was supported by the Science and Technology Plan Project of Quanzhou (2021N130S) and the Youth Science and Technology Project of Quanzhou Medical College (XJK2015B).

*Corresponding author. E-mail: 2008025@qzmc.edu.cn

Received: 2023-01-06; Accepted: 2023-03-03; Published online: 2023-03-09

Construction and functional analysis of EGFRvIII CAR-T cells co-expressing IL-15 and CCL19

CHEN Wanqiong¹, XIAN Na², LIN Shaomei¹, LIAO Wanting¹, CHEN Mingzhu^{1*}

¹ School of Pharmacy, Quanzhou Medical College, Quanzhou 362011, Fujian, China

² Institute of Immunotherapy, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, Fujian, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the functional characteristics and *in vitro* specific killing effect of EGFRvIII CAR-T cells co-expressing interleukin-15 and chemokine CCL19, in order to optimize the multiple functions of CAR-T cells and improve the therapeutic effect of CAR-T cells targeting EGFRvIII on glioblastoma (GBM). The recombinant lentivirus plasmid was obtained by genetic engineering, transfected into 293T cells to obtain lentivirus and infected T cells to obtain the fourth generation CAR-T cells targeting EGFRvIII (EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T). The expression rate of CAR molecules, proliferation, chemotactic ability, *in vitro* specific killing ability and anti-apoptotic ability of the fourth and second generation CAR-T cells (EGFRvIII CAR-T) were detected by flow cytometry, cell counter, chemotaxis chamber and apoptosis kit. The results showed that compared with EGFRvIII CAR-T cells, EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T cells successfully secreted IL-15 and CCL19, and had stronger proliferation, chemotactic ability and anti-apoptosis ability *in vitro* (all $P < 0.05$), while there was no significant difference in killing ability *in vitro*. Therefore, CAR-T cells targeting EGFRvIII and secreting IL-15 and CCL19 are expected to improve the therapeutic effect of glioblastoma and provide an experimental basis for clinical trials.

Keywords: chimeric antigen receptor T cell; the class III variant of the epidermal growth factor receptor; glioblastoma; interleukin-15; C-C chemokine ligand 19

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是成人最常见、最具侵袭性的恶性脑肿瘤。目前的治疗方案包括手术切除、放化疗和肿瘤电场疗法^[1]。尽管进行了最大限度的初始手术切除和多模式治疗,约70%的GBM患者在确诊后1年内会出现疾病进展^[2],患者的5年生存率不到5%^[3]。因此,基于目前GBM治疗方案易复发、治疗效果差、生存期短等缺点,有必要探索新的治疗手段。

近年来,肿瘤免疫治疗成为肿瘤研究中最热门领域。免疫治疗作为一种新的治疗方式,通过改善或重建人体免疫系统对肿瘤细胞的识

别、杀伤发挥抗癌作用,如免疫检测点抗体[细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)、程序性死亡受体1(programmed death receptor 1, PD-1)和程序性死亡配体1(programmed death ligand 1, PD-L1)等单抗]和嵌合型抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰的T细胞(CAR-T)在临床上取得了较大进展^[4]。其中CAR-T细胞疗法在血液肿瘤临床治疗中取得了显著疗效^[5-7]。

CAR分子由1个能够识别肿瘤相关抗原的单链抗体(single chain antibody fragment, scFv),

1 个或多个共刺激分子以及 1 个 TCR-derived CD3 ζ 组成。从 CAR 分子的结构可看出, CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤不依赖于主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) 识别, 而是通过 scFv 和肿瘤相关抗原的结合直接介导 T 细胞对肿瘤细胞的识别及杀伤, 有效解决了肿瘤细胞低表达 MHC 分子造成的免疫逃逸^[8]。目前临床上主流的 CAR-T 细胞属于第二代 CAR-T 细胞, 即含有 TCR-derived CD3 ζ 的同时增加了 1 个共刺激分子, 常用的有 CD28、4-1BB (CD137) 等。虽然 CAR-T 疗法在血液肿瘤中取得了进展, 但对实体瘤的治疗效果欠佳。主要原因可能有: (1) 实体瘤成分复杂, 异质性强, 缺少肿瘤特异性抗原作为靶标; (2) 通过静脉注射, CAR-T 细胞能否有效地归巢并浸润于肿瘤局部; (3) 实体瘤内的肿瘤微环境是呈现免疫抑制性的, 微环境中存在许多机制和因素抑制 CAR-T 细胞的存活和正常功能的执行^[9]。目前 CAR-T 细胞已发展到了第四代, 即在第二代 CAR-T 细胞基础上增加了细胞因子、趋化因子或自杀基因等, 以提高 CAR-T 细胞疗法在实体瘤治疗中的有效性和安全性。

据研究报告, 在 GBM 患者中大多存在表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因扩增, 且其中超过 50%为表皮生长因子受体突变体 III (the class III variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII)^[10-12]。有研究表明, EGFRvIII在 GBM 和神经胶质肉瘤中的表达率为 60%–70%^[13]。由此可见, GBM 高表达 EGFRvIII这一肿瘤相关抗原。EGFRvIII 是 EGFR 最常见的突变体, 它是 EGFR (801 bp, 267 aa)的胞外段 2–7 外显子缺失, 导致外显子 1 和 8 融合, 并于融合处产生了 1 个新的氨基酸, 且其他读码框不变, 故在细胞膜外形成了 1 个新的抗原决定簇, 这种突变体只出现在肿瘤细

胞中, 正常组织中不表达^[14], 属于肿瘤特异性抗原。

国内外已有针对 EGFRvIII靶点的二代或三代 CAR-T 细胞, 并在动物实验和临床试验中看到了一些疗效, 但依然出现了肿瘤的复发^[15-17]。虽然临床上已经证实, 通过静脉注射, 有一定比例的 CAR-T 细胞可通过血脑屏障, 进入肿瘤部位^[18], 但进入肿瘤局部中的 CAR-T 细胞比例、存活率、增殖情况、对肿瘤细胞的特异性杀伤能力、与肿瘤微环境抗衡的能力等有待更多临床试验来探究。目前仍有 2 项靶向 EGFRvIII 的 CAR-T 细胞治疗 GBM 的 I 期临床试验正在进行中^[19]。

本研究构建了同时表达 CAR 分子、细胞介素-15 (interleukin-15, IL-15)和趋化因子配体 CCL19 (C-C chemokine ligand 19, CCL19)的第四代 CAR-T 细胞。其中, IL-15 作为一种生长因子, 通过上调抗凋亡因子和下调促凋亡因子阻止细胞凋亡, 促进 T、B 和自然杀伤(natural killer, NK)细胞的存活^[20]。同时, IL-15 在 T、NK 和 NK-T 细胞的发育、稳态和功能中起着至关重要的作用^[21], 不仅参与初始 T 细胞、效应 T 细胞和记忆 T 细胞的维持, 还影响了 T 细胞的产生和重新激活^[22]。CCL19 是 T 细胞和树突状细胞(dendritic cell, DC)的趋化因子^[23-24], 可以募集 T 细胞和 DC 迁移至肿瘤组织。本研究通过对比第四代 CAR-T 细胞(EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞)和第二代 CAR-T 细胞(EGFRvIII CAR-T 细胞)的功能特性和体外特异性杀伤能力, 旨在优化 EGFRvIII CAR-T 细胞的功能, 增强其对 GBM 的治疗效果。

1 材料与方 法

1.1 细胞株和主要试剂

293T 细胞由福州拓新天成生物科技有限

公司保存, EGFRvIII⁺ U87 MG 细胞获赠于加利福尼亚大学 Ludwig 研究所, T 细胞来源于健康志愿者外周血。慢病毒表达载体、二代慢病毒包装质粒 psPAX2 质粒和 pMD2.G 质粒由福建拓新天成生物科技有限公司保存。主要试剂: TransStbl3 感受态购自北京全式金生物技术有限公司; QIA quick 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司; T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购自 New England BioLabs 公司; 去内毒素质粒抽提试剂盒购自南京诺维赞生物科技有限公司; 磷酸钙法细胞转染试剂盒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 细胞激活试剂(T Cell TransAct、Annexin V-FITC kit)购自 Miltenyi Biotec 公司; 人 IL-2 购自 PeproTech 公司; PE 标记的人 EGFRvIII 蛋白购自 Acro Biosystems 公司; 人 IL-15 细胞因子检测试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司; 人 CCL19 细胞因子检测试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司; 6.5 mm transwell (5.0 μ m) 聚碳酸酯膜小室购自 CORING 公司; 7-AAD 试剂购自 BD 公司。

1.2 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR 慢病毒表达载体构建及包装

IL-15 和 CCL19 基因序列来源于 NCBI, GenBank 序列号分别为 NM_000585.5 和 NM_006274.3。IL-15 和 CCL19 基因序列由 P2A 连接, 前后加上 *sfi* I 和 *Mlu* I 酶切位点后由生物工程(上海)股份有限公司合成。通过双酶切 (*sfi* I+*Mlu* I) 将 IL-15-CCL19 片段插入 EGFRvIII CAR 慢病毒载体中构建 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR 慢病毒表达载体。采用第二代慢病毒包装系统进行病毒包装: 将 293T 细胞培养于直径为 100 mm 的培养皿中, 待汇合度达到 80%–90% 时进行转染; 转染前 1 h 给 293T 细胞换新鲜不含抗生素的培养基; 将目的质粒和 2 个包装质粒

加入至 0.5 mL 氯化钙溶液中, 混匀; 把质粒-氯化钙溶液加入至 0.5 mL 硼酸盐缓冲溶液(borate buffer solution, BBS)溶液中, 立即轻柔混匀, 室温放置 15 min 后均匀滴加到培养皿上; 继续培养 6–8 h 后换液。换液后的 48 h 和 72 h 收取上清, 过 0.45 μ m 滤膜后, 4 $^{\circ}$ C、70 000 \times g 离心 2 h。轻柔弃去上清, 每管加入 200 μ L 1640 培养基重悬病毒。

1.3 CAR-T 细胞的制备和鉴定

利用 Ficoll 分离液进行密度梯度离心得到人外周血单核细胞, 加入 1640 培养基(含 10% 胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺和 30 IU/mL IL-2)。按照 1:100 的比例加入 T Cell TransAct 激活 T 细胞, 置于培养箱培养, 记为 day 0。24 h 后(day 1), 进行细胞计数, 按照 1×10^6 个/孔(24 孔板, 终体积 1 mL)、感染复数(multiplicity of infection, MOI) 10 加入不同病毒浓缩液进行侵染。侵染 16 h 后离心换液。每隔 48 h 补充添加 IL-2 至 30 IU/mL, T 细胞培养密度维持在 0.8×10^6 个/mL。制备的 CAR-T 细胞分别命名为 EGFRvIII CAR-T 细胞和 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞, 未做病毒侵染的 T 细胞命名为 none treated T 细胞。侵染 72 h (day 4)后, 分别取 2×10^5 个 T 细胞, 用含有 1% FBS 的 PBS 洗涤细胞 1 次; 每管加入 0.2 μ L PE 标记的人 EGFRvIII 蛋白以检测 CAR 分子的表达, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。洗涤细胞 3 次后, 上流式细胞仪检测。用 none treated T 细胞同样染 PE 标记的 EGFRvIII 蛋白作为阴性对照管。

1.4 检测 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞分泌 IL-15 和 CCL19 的能力

吸取 day 5 CAR-T 细胞和 T 细胞培养基, 4 $^{\circ}$ C、13 000 \times g 离心 5 min 后取上清。按照酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒说明书方法检测 IL-15 和 CCL19

的浓度。于 96 孔板中每孔加入 5×10^4 个效应细胞(CAR-T 细胞和 T 细胞), 此时培养基中不含有 IL-2, 每孔培养基体积为 100 μL ; 将 EGFRvIII⁺ U87 MG 细胞消化后, 计数, 加入培养基调整细胞密度为 5×10^5 个/mL。向 96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液, 即每孔 5×10^4 个肿瘤细胞, 效靶细胞共培养 24 h。第 2 天吸取培养基, 同上步骤检测效靶细胞共培养后 CAR-T 细胞 IL-15 和 CCL19 的分泌量。

1.5 CAR-T 细胞体外杀伤能力的检测

消化 EGFRvIII⁺ U87 MG 细胞, 用 PBS 洗涤 1 次后计数。用 1 mL PBS 重悬细胞, 加入羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (5,6-carboxyfluorescein diacetate, CFSE) (工作液浓度为 0.05 mmol/L) 11 μL , 室温避光孵育 5 min。用含有 10% FBS 的培养基洗涤细胞 3 次。向 96 孔板(U 型底)中加入 EGFRvIII⁺ U87 MG 细胞, 每孔 5×10^4 个细胞, 培养基体积为 100 μL 。向各孔加入效应细胞(CAR-T 细胞和 none treated T 细胞), 用培养基进行倍半稀释, 调整效应细胞和靶细胞比例(效靶比)为 8:1、4:1、2:1、1:1、0.5:1, 每孔培养基体积为 100 μL 。只有靶细胞(有 CFSE 标记)的孔为对照组。加完细胞后, 200 \times g 离心 1 min, 置于培养箱共孵育 10 h。将 96 孔板中细胞移入流式管后用流式细胞仪检测。用没有 CFSE 标记的 EGFRvIII⁺ U87 MG 细胞调节电压, 待电压调节完毕后, 每管加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 0.1 μg , 混匀后立即上机检测。用下列公式计算 CAR-T 细胞的体外杀伤能力。其中, 公式中 experimental CFSE⁺DAPI⁺ cells 表示的是效靶细胞共培养实验组死亡的 EGFRvIII⁺ U87 MG 细胞数, control CFSE⁺DAPI⁺ cells 表示的是对照组死亡的 EGFRvIII⁺ U87 MG 细胞数。

$$\text{CTL killing\%} = (\text{experimental CFSE}^+\text{DAPI}^+\text{ cells} - \text{control CFSE}^+\text{DAPI}^+\text{ cells}) / \text{total CFSE}^+\text{ cells} \times 100\%$$

1.6 趋化实验检测 CAR-T 细胞的趋化能力

取 day 5 的 CAR-T 细胞和 T 细胞上清备用。取激活 3 d 后的 T 细胞计数。细胞离心后用 1640 培养基重悬细胞, 制成 5×10^6 个/mL 的细胞悬液。将 transwell 小室放到 24 孔板中, 上室加入 100 μL T 细胞悬液, 下室分别加入 day 5 的 CAR-T 细胞和 T 细胞上清 600 μL 。置于 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中共孵育 24 h。细胞计数仪检测, 计算迁移到下室的 T 细胞数。

1.7 CAR-T 细胞体外增殖能力的比较

取 day 4 的 EGFRvIII CAR-T 细胞和 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞, 计数。将二者的 CAR⁺细胞比例调成一致后铺在 96 孔板中, 每孔 1×10^5 个细胞, 各设置 3 个复孔。培养基为 1640 培养基(含 10% 胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺和 30 IU/mL IL-2, 不含 IL-15)。于铺板后第 2、4、6、8 天进行细胞计数。比较两组 CAR-T 细胞的增殖速度。

1.8 CAR-T 细胞凋亡情况的检测

收集正常体外培养第 11 天的 CAR-T 细胞和 T 细胞(含 30 IU/mL IL-2)。细胞离心后, 弃上清液, 用结合缓冲液洗涤细胞 1 次。弃上清液后, 每组细胞用 100 μL 结合缓冲液重悬, 分别加入 5 μL Annexin-V-FITC, 2 μL 7-AAD, 室温避光孵育 15 min。结合缓冲液洗涤细胞 2 次后, 每管加入 200 μL 结合缓冲液, 上机检测。

1.9 统计学分析

数据统计使用 Graph Pad Prism 6 软件进行处理, 计量资料以均数 \pm 标准差表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验分析, 多组间差异性分析采用单因素或双因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 成功构建 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR 慢病毒表达载体及制备 CAR-T 细胞

成功构建 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR 慢病毒表达载体(图 1), 经双酶切(*sfi* I+*Mlu* I)及测序验证序列正确。将慢病毒表达载体与包装质粒用磷酸钙法转染 293T 细胞进行慢病毒包装, 经超速离心浓缩后, EGFRvIII CAR 慢病毒和 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR 慢病毒滴度分别为 8.4×10^7 TU/mL 和 6.3×10^7 TU/mL。慢病毒包装情况良好, 满足下游实验要求。T 细胞激活 24 h 后, 以相同的 MOI 加入慢病毒进行侵染。侵染 72 h 后, 用 PE 标记的 EGFRvIII 蛋白检测 T 细胞表面 CAR 分子的表达情况。结果显示, 新构建的 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR 分子在 T 细胞膜上成功表达, 可与 EGFRvIII 蛋白结合。2 种 CAR 分子的表达率分别为 56.8% 和 26.0% (图 2)。

2.2 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞成功分泌 IL-15 和 CCL19

吸取 day 5 不同 CAR-T 细胞和 T 细胞培养

基, 离心后取上清。按照 ELISA 试剂盒说明书方法检测 IL-15 和 CCL19 的浓度; 效靶细胞共培养 24 h 后, 吸取培养基, 检测效靶细胞共培养后 CAR-T 细胞 IL-15 和 CCL19 的分泌情况(图 3)。结果表明, EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞培养基中可检测到 IL-15 和 CCL19 的分泌, 而 EGFRvIII CAR-T 细胞和 none treated T 细胞培养基中未检测到 IL-15 和 CCL19 的分泌, 差异具有统计学意义($P < 0.0001$)。同样的结果在效靶细胞共培养实验中得到验证, 差异具有统计学意义($P < 0.0001$)。

2.3 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞的体外杀伤能力和 EGFRvIII CAR-T 细胞相当

按照不同效靶比, 效靶细胞共培养 10 h 后, 用流式细胞仪检测 CAR-T 细胞的体外杀伤能力。设门及数据分析见图 4A, 图中 Q2 象限表示的是效应细胞杀伤靶细胞的比例。结果显示(图 4B), EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞和 EGFRvIII CAR-T 细胞一样均能特异性杀伤 EGFRvIII⁺ U87 MG 细胞, 且体外杀伤能力没

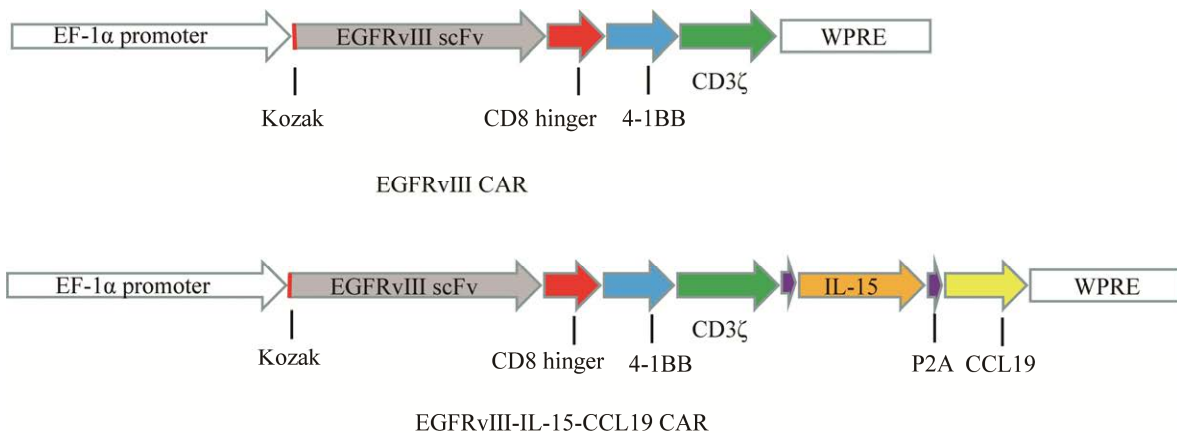


图 1 慢病毒载体 EGFRvIII CAR 和 EGFRvIII-IL15-CCL19 CAR 的质粒构建示意图

Figure 1 Design diagram of lentiviral vector EGFRvIII CAR and EGFRvIII-IL15-CCL19 CAR. EGFRvIII CAR: The human EGFRvIII-targeted second generation CAR lentiviral vector; EGFRvIII-IL15-CCL19 CAR: The human EGFRvIII-targeted fourth generation CAR lentiviral vector which can express human interleukin-15 and chemokine CCL19.

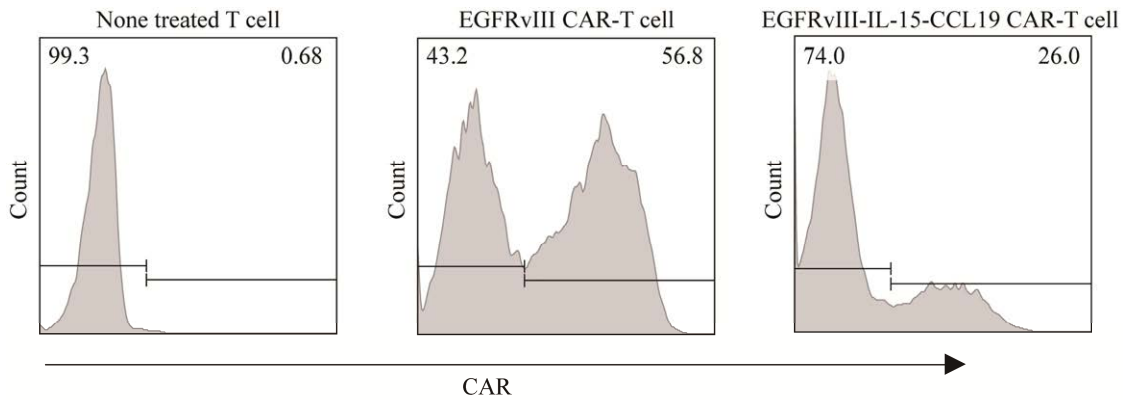


图2 流式细胞术检测 T 细胞上 CAR 分子的表达率

Figure 2 Expression rate of the CAR molecules on T cells was analyzed by flow cytometry. EGFRvIII CAR-T cell and EGFRvIII-IL15-CCL19 CAR-T cell: The human T lymphocytes were transduced with lentivirus encoding EGFRvIII CAR-T or EGFRvIII-IL15-CCL19 CAR-T; None treated T cell: The human untransduced T lymphocytes as the negative control.

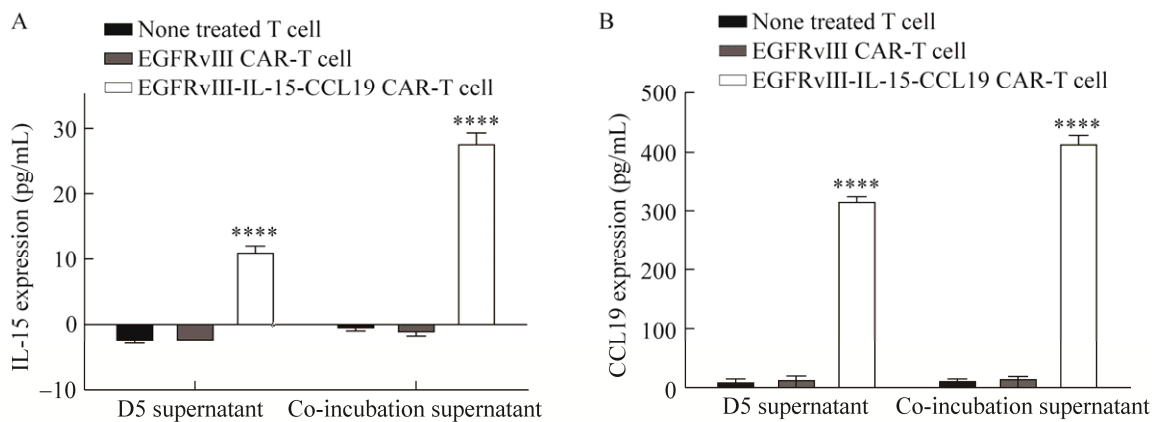


图3 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞分泌 IL-15 (A)和 CCL19 (B)能力检测

Figure 3 IL-15 (A) and CCL19 (B) secreted by EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T cells were detected by ELISA. D5 supernatant: The culture medium of different CAR-T cells and T cells of day 5; Co-incubation supernatant: The supernatant of 24 h co-culture of EGFRvIII⁺ U87 MG cells and EGFRvIII CAR-T cells or EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T cells. Data represent the $\bar{x} \pm s$ of triplicates. ****: $P < 0.0001$, $n = 3$.

有显著差异(不同效靶比 P 值均大于 0.05)。以上结果表明,EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞能成功分泌 IL-15 和 CCL19 于细胞外,且其 anti-EGFRvIII 的 scFv 与抗原特异性结合能力、体外对肿瘤细胞的特异性杀伤能力没有受到影响。

2.4 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞在体外实验中具有趋化能力

在体外趋化实验中,将激活第 3 天的 T 细

胞置于 transwell 趋化小室的上室,下室加入不同 CAR-T 细胞和 T 细胞培养上清。共孵育 24 h 后,对迁移到下室的 T 细胞进行计数。结果表明(图 5),EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞组迁移至下室的 T 细胞数量比 EGFRvIII CAR-T 细胞组更多,差异具有统计学意义($P < 0.01$),说明 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞分泌至上清液的 CCL19 对 T 细胞具有趋化作用。

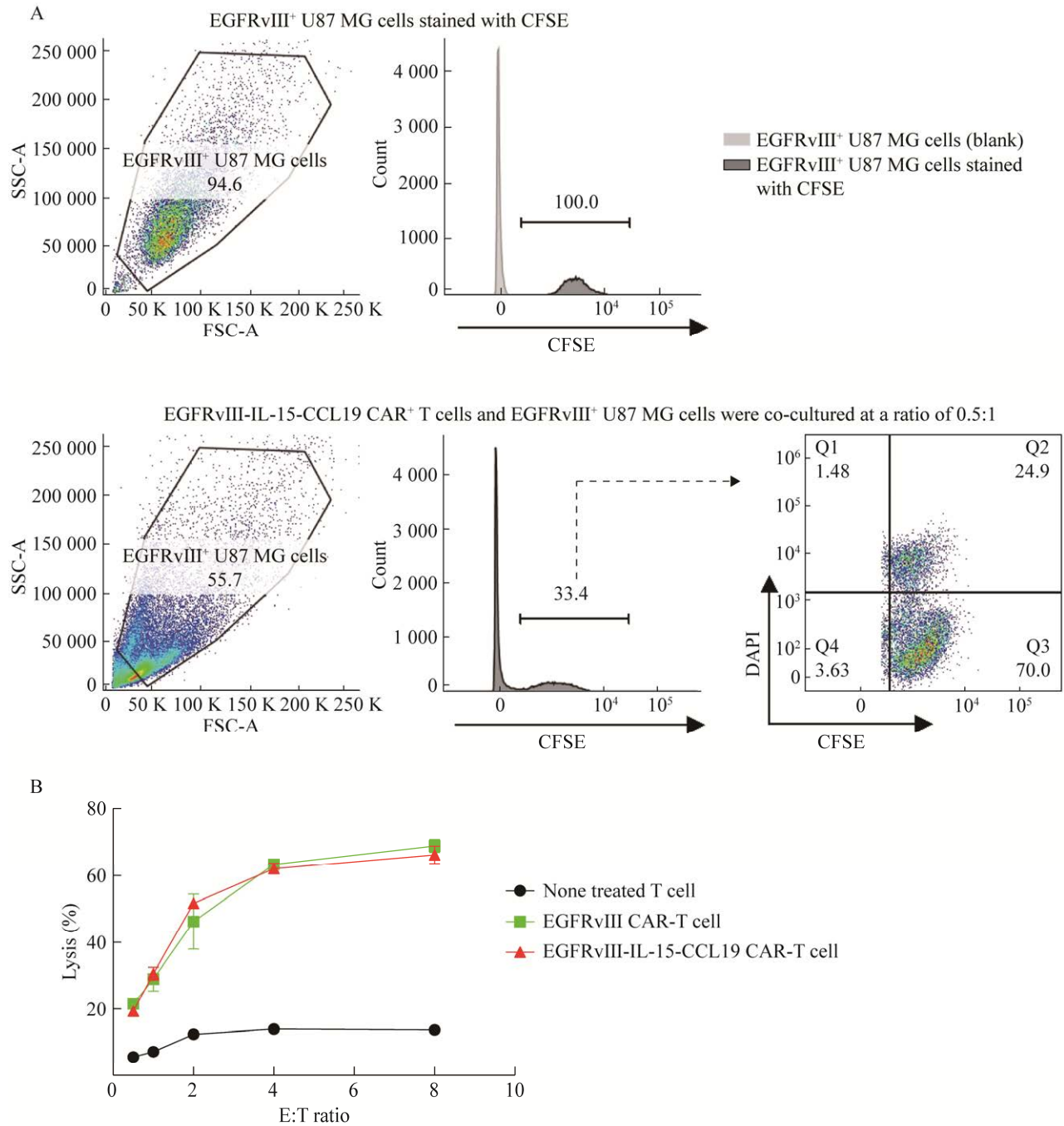


图 4 CAR-T 细胞体外杀伤实验

Figure 4 The cytolytic activities of CAR-T cells targeting EGFRvIII⁺ U87 MG cells. A: The flow result diagram of the cytolytic activities of EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T cells co-cultured with EGFRvIII⁺ U87 MG cells at a ratio of 0.5:1. B: EGFRvIII CAR-T cells, EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T cells or none treated T cells were co-cultured with EGFRvIII⁺ U87 MG cells for 10 hours respectively. Data represent the $\bar{x} \pm s$ of triplicates, $n=3$.

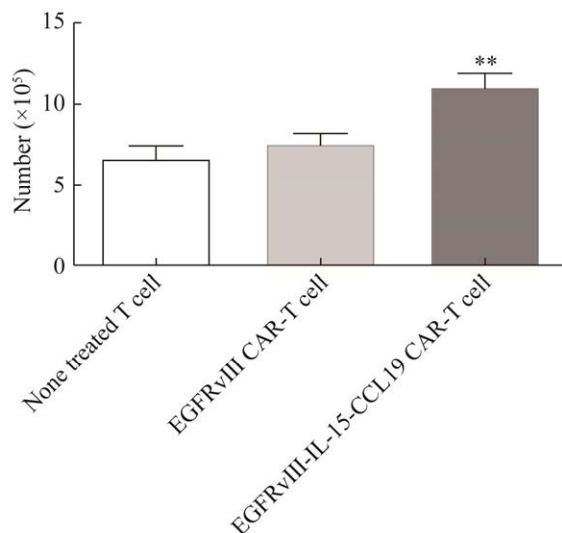


图 5 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞体外趋化能力检测

Figure 5 Detection of chemotactic ability of EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T cells *in vitro*. Chemotactic ability of CCL19 secreted by EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T cells toward none treated T cells was examined by transwell assay. Data represent the $\bar{x} \pm s$ of triplicates. **: $P < 0.01$, $n = 3$.

2.5 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞在体外具有更强的增殖能力

为了对比 2 种 CAR-T 细胞的增殖能力, 将两种 CAR-T 细胞以相同细胞数铺在 96 孔板中, 隔天用细胞计数仪计数。结果表明(图 6), 从第 10 天开始, EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞的数量多于 EGFRvIII CAR-T 细胞, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 说明分泌 IL-15 的 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞的体外增殖能力强于 EGFRvIII CAR-T 细胞。

2.6 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞在体外具有抗凋亡能力

用凋亡试剂盒检测 T 细胞和 2 种 CAR-T 细胞激活后第 11 天的凋亡情况。结果表明(图 7A), 体外培养中, T 细胞和 CAR-T 细胞会发生不同

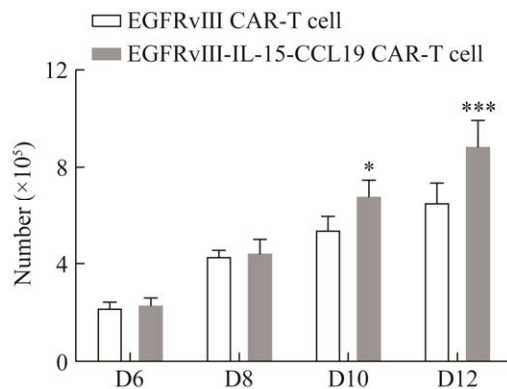


图 6 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞体外增殖能力检测

Figure 6 Proliferation ability detection of EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T cells *in vitro*. Absolute numbers of EGFRvIII CAR-T cells and EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T cells on day 6, 8, 10, 12 were counted. Data represent the $\bar{x} \pm s$ of triplicates. *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, $n = 3$.

程度的凋亡。其中, EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞发生早期凋亡的细胞数明显低于 EGFRvIII CAR-T 细胞(图 7B), 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。此结果说明 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞在体外具有抗凋亡优势。

3 讨论与结论

基于目前 GBM 治疗手段的有限性以及 CAR-T 细胞疗法在实体瘤进展的缓慢性, 本研究构建了靶向 EGFRvIII 的第四代 CAR-T 细胞 (EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞), 在表达 CAR 分子的同时成功分泌 IL-15 和 CCL19 于细胞外, 且不影响 CAR 分子和抗原的结合以及体外特异性杀伤能力。在体外培养时(不含 IL-15), EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞表现出更强的增殖和抗凋亡优势, 这或许将有利于到达肿瘤局部的 CAR-T 细胞的生存和增殖, 一定程度上克服第二代 CAR-T 细胞在肿瘤局部增殖和持久性受限的问题^[25-26]。CCL19 是 T 细胞和

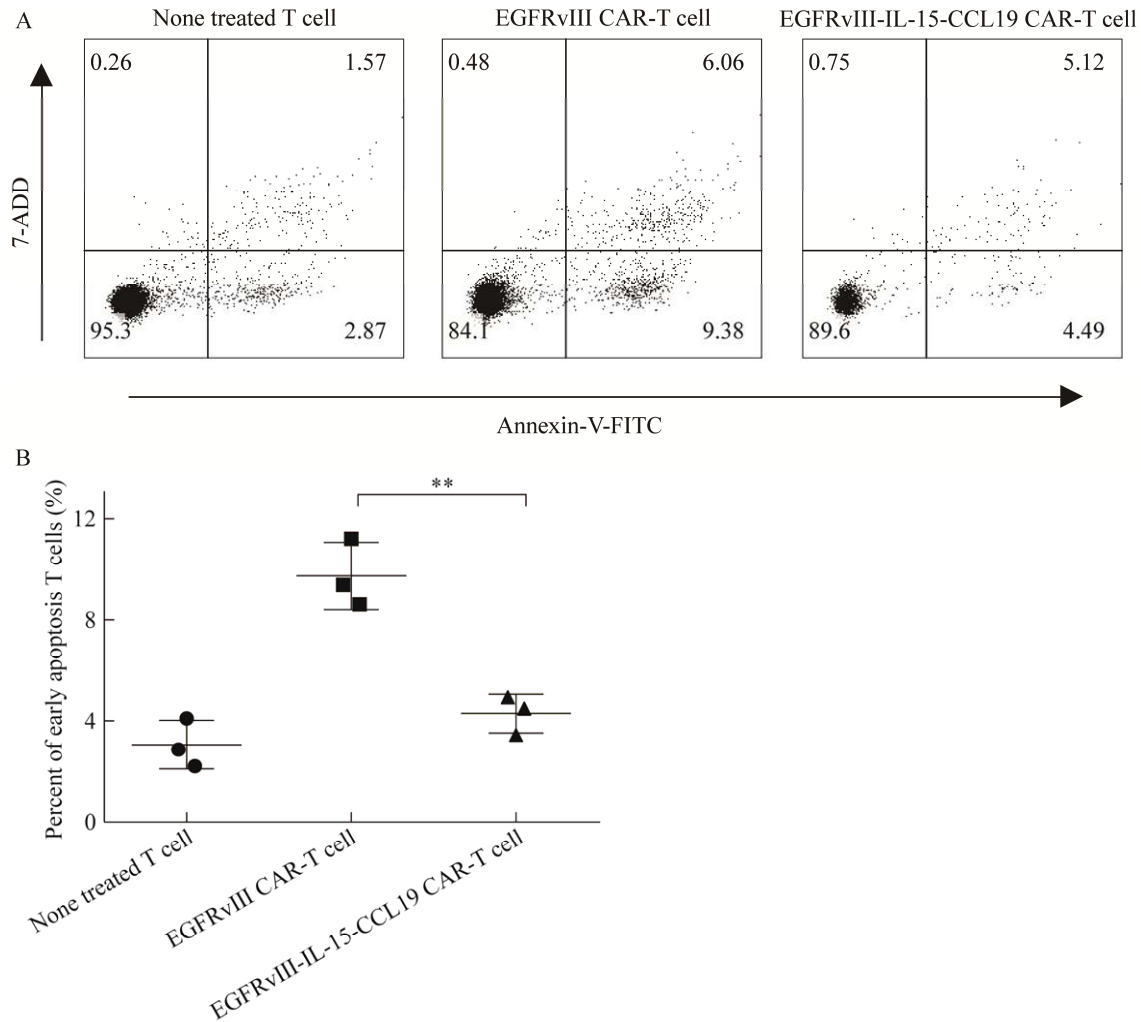


图7 EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T细胞、EGFRvIII CAR-T细胞和未经转导的T细胞在第11天的早期凋亡情况

Figure 7 Early apoptosis detection of EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T cells, EGFRvIII CAR-T cells and none treated T cells on day 11. A: The flow results diagram of the early apoptosis of CAR-T cells and T cells on day 11. The expression of annexin-V and 7-ADD were determined by flow cytometry with the apoptosis detection kit. B: The number of the early apoptotic EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T cells was significantly lower than that of EGFRvIII CAR-T cells. Data represent the $\bar{x} \pm s$ of triplicates. **: $P < 0.01$, $n = 3$.

DCs的趋化因子^[23-24]，可以募集T细胞和DCs迁移至肿瘤组织。有研究表明，CCL19可增强肿瘤局部中免疫细胞的浸润^[27]。本文在体外验证了EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T细胞分泌的CCL19对未经转导的T细胞具有促进迁移作用，这可能有利于趋化外周血液和淋巴结中的T细胞和DCs细胞至肿瘤组织，协同CAR-T细

胞发挥抗肿瘤作用。

EGFRvIII作为肿瘤特异性抗原，不仅在GBM中高表达^[13]，在乳腺癌^[28]、非小细胞肺癌^[29]等恶性肿瘤中也有较高表达率。同时，EGFRvIII已被证明可增加不同组织来源细胞的致瘤性，包括GBM^[30]、乳腺癌^[31]、肺癌^[32]和卵巢癌^[33]等。由此可见，EGFRvIII致瘤性强，且在多种实

体瘤中表达。因此,靶向 EGFRvIII 的 CAR-T 细胞具有广泛的应用性,而本研究研发的第四代 EGFRvIII CAR-T 细胞有望增强该靶点 CAR-T 细胞与实体瘤的抗衡能力,提高治疗效果。

综上所述,本研究构建的第四代 CAR-T 细胞具有以下特点:(1)改造过的第四代 CAR-T 细胞可在肿瘤局部分泌 IL-15 和 CCL19,这将克服外源性细胞因子半衰期短、作用范围广,容易引起自身免疫性疾病^[34]以及肿瘤局部浓度低等缺点。(2)IL-15 有抗凋亡和维持不同 T 细胞亚型稳态的作用,可促进 CAR-T 细胞和自身免疫细胞的存活^[20-22,35]。(3)T、DCs 和某些肿瘤细胞都表达 CCR7。因此,本研究构建的第四代 CAR-T 细胞在肿瘤局部分泌的 CCL19 可募集 T、DCs 等细胞到达肿瘤局部发挥抗肿瘤作用。但本文只进行了体外实验,同时分泌 IL-15 和 CCL19 的 CAR-T 细胞在肿瘤组织中的增殖、存活和分化情况以及在体外实验中未表现出来的对肿瘤细胞特异性杀伤的优势能否在体内实验得到体现,还需进一步开展动物实验才能验证。

总之,本研究构建了一种靶向 EGFRvIII 的第四代新型 CAR-T 细胞(EGFRvIII-IL-15-CCL19 CAR-T 细胞),在体外实验中,其增殖、趋化和抗凋亡能力均优于第二代 CAR-T 细胞,因此有望提高靶向 EGFRvIII 的 CAR-T 细胞的治疗效果,并为临床试验提供一定实验依据。

REFERENCES

- [1] CHINOT OL, WICK W, MASON W, HENRIKSSON R, SARAN F, NISHIKAWA R, CARPENTIER AF, HOANG-XUAN K, KAVAN P, CERNEA D, BRANDES AA, HILTON M, ABREY L, CLOUGHESY T. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma[J]. *New England Journal of Medicine*, 2014, 370(8): 709-722.
- [2] STUPP R, MASON WP, van den BENT MJ, WELLER M, FISHER B, TAPHOORN MJB, BELANGER K, BRANDES AA, MAROSI C, BOGDAHN U, CURSCHMANN J, JANZER RC, LUDWIN SK, GORLIA T, ALLGEIER A, LACOMBE D, CAIRNCROSS JG, EISENHAEUER E, MIRIMANOFF RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma[J]. *New England Journal of Medicine*, 2005, 352(10): 987-996.
- [3] OSTROM QT, BAUCHET L, DAVIS FG, DELTOUR I, FISHER JL, LANGER CE, PEKMEZCI M, SCHWARTZBAUM JA, TURNER MC, WALSH KM, WRENSCH MR, BARNHOLTZ-SLOAN JS. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review[J]. *Neuro-Oncology*, 2014, 16(7): 896-913.
- [4] TURTLE CJ, HUDECEK M, JENSEN MC, RIDDELL SR. Engineered T cells for anti-cancer therapy[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2012, 24(5): 633-639.
- [5] YING ZT, HUANG XF, XIANG XY, LIU YL, KANG X, SONG YQ, GUO XK, LIU HZ, DING N, ZHANG TT, DUAN PP, LIN YF, ZHENG W, WANG XP, LIN NJ, TU MF, XIE Y, ZHANG C, LIN WP, DENG LJ, et al. A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(6): 947-953.
- [6] HU YX, ZHOU YL, ZHANG MM, GE WG, LI Y, YANG L, WEI GQ, HAN L, WANG H, YU SH, CHEN Y, WANG YB, HE XH, ZHANG XW, GAO M, YANG JJ, LI XJ, REN JT, HUANG H. CRISPR/Cas9-engineered universal CD19/CD22 dual-targeted CAR-T cell therapy for relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Clinical Cancer Research*, 2021, 27(10): 2764-2772.
- [7] TURTLE CJ, HANAFI LA, BERGER C, GOOLEY TA, CHERIAN S, HUDECEK M, SOMMERMEYER D, MELVILLE K, PENDER B, BUDIARTO TM, ROBINSON E, STEEVENS NN, CHANEY C, SOMA L, CHEN XY, YEUNG C, WOOD B, LI D, CAO JH, HEIMFELD S, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4⁺: CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2016, 126(6): 2123-2138.
- [8] FESNAK AD, JUNE CH, LEVINE BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2016, 16(9): 566-581.
- [9] MOON EK, WANG LC, DOLFI DV, WILSON CB,

- RANGANATHAN R, SUN J, KAPOOR V, SCHOLLER J, PURÉ E, MILONE MC, JUNE CH, RILEY JL, WHERRY EJ, ALBELDA SM. Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible can limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors[J]. *Clinical Cancer Research*, 2014, 20(16): 4262-4273.
- [10] SCHLEGEL J, MERDES A, STUMM G, ALBERT FK, FORSTING M, HYNES N, KIESSLING M. Amplification of the epidermal-growth-factor-receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma[J]. *International Journal of Cancer*, 2007, 56(1): 72-77.
- [11] EKSTRAND AJ, JAMES CD, CAVENEE WK, SELIGER B, PETERSSON RF, COLLINS VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas *in vivo*[J]. *Cancer Research*, 1991, 51(8): 2164-2172.
- [12] HUMPHREY PA, WONG AJ, VOGELSTEIN B, ZALUTSKY MR, FULLER GN, ARCHER GE, FRIEDMAN HS, KWATRA MM, BIGNER SH, BIGNER DD. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(11): 4207-4211.
- [13] YAMAZAKI H, OHBA Y, TAMAOKI N, SHIBUYA M. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors[J]. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1990, 81(8): 773-779.
- [14] WIKSTRAND C, REIST CJ, ARCHER GE, ZALUTSKY MR, BIGNER DD. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target[J]. *Journal of Neurovirology*, 1998, 4(2): 148-158.
- [15] JOHNSON LA, SCHOLLER J, OHKURI T, KOSAKA A, PATEL PR, McGETTIGAN SE, NACE AK, DENTCHEV T, THEKKAT P, LOEW A, BOESTEANU AC, COGDILL AP, CHEN T, FRAIETTA JA, KLOSS CC, POSEY AD Jr, ENGELS B, SINGH R, EZELL T, IDAMAKANTI N, et al. Rational development and characterization of humanized anti-EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma[J]. *Science Translational Medicine*, 2015, 7(275): eaaa4963.
- [16] GOFF SL, MORGAN RA, YANG JC, SHERRY RM, ROBBINS PF, RESTIFO NP, FELDMAN SA, LU YC, LU L, ZHENG ZL, XI LQ, EPSTEIN M, McINTYRE LS, MALEKZADEH P, RAFFELD M, FINE HA, ROSENBERG SA. Pilot trial of adoptive transfer of chimeric antigen receptor-transduced T cells targeting EGFRvIII in patients with glioblastoma[J]. *Journal of Immunotherapy*, 2019, 42(4): 126-135.
- [17] ABBOTT RC, VERDON DJ, GRACEY FM, HUGHES-PARRY HE, ILIOPOULOS M, WATSON KA, MULAZZANI M, LUONG K, D'ARCY C, SULLIVAN LC, KIEFEL BR, CROSS RS, JENKINS MR. Novel high-affinity EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor T cells effectively eliminate human glioblastoma[J]. *Clinical & Translational Immunology*, 2021, 10(5): e1283.
- [18] NAGANE M, COUFAL F, LIN H, BÖGLER O, CAVENEE WK, HUANG HJ. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis[J]. *Cancer Research*, 1996, 56(21): 5079-5086.
- [19] 刘君, 谢深霞, 李海霞, 施维, 姜晓兵, 王旋, 杨晓梅, 卢小玲. 靶向 EGFRvIII 免疫疗法在胶质母细胞瘤治疗的研究进展[J]. *药学报*, 2022, 57(9): 2662-2670.
- LIU J, XIE SX, LI HX, SHI W, JIANG XB, WANG X, YANG XM, LU XL. Research progress of EGFRvIII targeted immunotherapy in the treatment of glioblastoma[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2022, 57(9): 2662-2670 (in Chinese).
- [20] FEHNIGER TA, CALIGIURI MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease[J]. *Blood*, 2001, 97(1): 14-32.
- [21] WALDMANN TA, TAGAYA Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens[J]. *Annual Review of Immunology*, 1999, 17: 19-49.
- [22] KOKAJI AI, HOCKLEY DL, KANE KP. IL-15 transpresentation augments CD8⁺ T cell activation and is required for optimal recall responses by central memory CD8⁺ T cells[J]. *The Journal of Immunology*, 2008, 180(7): 4391-4401.
- [23] YOSHIDA R, NAGIRA M, IMAI T, BABA M, TAKAGI S, TABIRA Y, AKAGI J, NOMIYAMA H, YOSHIE O. EB11-ligand chemokine (ELC) attracts a

- broad spectrum of lymphocytes: activated T cells strongly up-regulate CCR7 and efficiently migrate toward ELC[J]. *International Immunology*, 1998, 10(7): 901-910.
- [24] KELLERMANN SA, HUDAK S, OLDHAM ER, LIU YJ, McEVOY LM. The CC chemokine receptor-7 ligands 6C kine and macrophage inflammatory protein-3 β are potent chemoattractants for *in vitro*- and *in vivo*-derived dendritic cells[J]. *The Journal of Immunology*, 1999, 162(7): 3859-3864.
- [25] MARIGO I, DOLCETTI L, SERAFINI P, ZANOVELLO P, BRONTE V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells[J]. *Immunological Reviews*, 2008, 222(1): 162-179.
- [26] YU SN, LI AP, LIU Q, LI TF, YUAN X, HAN XW, WU KM. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2017, 10(1): 1-13.
- [27] ADACHI K, KANO Y, NAGAI T, OKUYAMA N, SAKODA Y, TAMADA K. IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(4): 346-351.
- [28] GE H, GONG XQ, TANG CK. Evidence of high incidence of EGFRvIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis[J]. *International Journal of Cancer*, 2002, 98(3): 357-361.
- [29] OKAMOTO I, KENYON LC, EMLET DR, MORI T, SASAKI JI, HIROSAKO S, ICHIKAWA Y, KISHI H, GODWIN AK, YOSHIOKA M, SUGA M, MATSUMOTO M, WONG AJ. Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Science*, 2003, 94(1): 50-56.
- [30] WU JL, ABE T, INOUE R, FUJIKI M, KOBAYASHI H. I κ B α M suppresses angiogenesis and tumorigenesis promoted by a constitutively active mutant EGFR in human glioma cells[J]. *Neurological Research*, 2004, 26(7): 785-791.
- [31] YU H, GONG XQ, LUO XY, HAN W, HONG G, SINGH B, TANG CK. Co-expression of EGFRvIII with ErbB-2 enhances tumorigenesis: EGFRvIII mediated constitutively activated and sustained signaling pathways, whereas EGF-induced a transient effect on EGFR-mediated signaling pathways[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2008, 7(11): 1818-1828.
- [32] JI HB, ZHAO XJ, YUZA Y, SHIMAMURA T, LI DN, PROTOPOPOV A, JUNG BL, McNAMARA K, XIA HL, GLATT KA, THOMAS RK, SASAKI H, HORNER JW, ECK M, MITCHELL A, SUN YP, AL-HASHEM R, BRONSON RT, RABINDRAN SK, DISCAFANI CM, et al. Epidermal growth factor receptor variant III mutations in lung tumorigenesis and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(20): 7817-7822.
- [33] ZEINELDIN R, ROSENBERG M, ORTEGA D, BUHR C, CHAVEZ MG, STACK MS, KUSEWITT DF, HUDSON LG. Mesenchymal transformation in epithelial ovarian tumor cells expressing epidermal growth factor receptor variant III[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2006, 45(11): 851-860.
- [34] PATIDAR M, YADAV N, DALAI SK. Interleukin 15: a key cytokine for immunotherapy[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2016, 31: 49-59.
- [35] HOYOS V, SAVOLDO B, QUINTARELLI C, MAHENDRAVADA A, ZHANG M, VERA J, HESLOP HE, ROONEY CM, BRENNER MK, DOTTI G. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety[J]. *Leukemia*, 2010, 24(6): 1160-1170.

(本文责编 陈宏宇)