

定点突变优化信号肽对嵌合抗原受体 T 细胞功能的影响

刘玉¹, 李帆², 戴蕙芸¹, 周润龙¹, 王梦怡¹, 甘世豪², 徐瑶^{1*}

1 武汉科技大学生命科学与健康学院 生物医学研究院, 湖北 武汉 430081

2 武汉波睿达生物科技有限公司, 湖北 武汉 430075

刘玉, 李帆, 戴蕙芸, 周润龙, 王梦怡, 甘世豪, 徐瑶. 定点突变优化信号肽对嵌合抗原受体 T 细胞功能的影响[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 573-584.

LIU Yu, LI Fan, DAI Huiyun, ZHOU Runlong, WANG Mengyi, GAN Shihao, XU Yao. Effect of signal peptide optimized by site-directed mutagenesis on the function of chimeric antigen receptor T cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 573-584.

摘要: 信号肽(signal peptide, SP)参与调节嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)结构的分泌水平及跨膜易位过程, 对嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)行使功能至关重要, 本研究通过定点突变技术优化 SP 序列, 并研究其对 CD19-CAR-T 杀伤功能的影响。首先, 利用基因合成和分子克隆技术, 构建含野生型 SP (SP-wtY)、2 种突变型 SP (SP-muK 或 SP-muR) 的靶向 CD19 的 CAR 载体; 对构建成功的载体进行慢病毒包装, 并使用慢病毒感染 T 细胞, 利用流式细胞术检测细胞的转染效率, 钙黄绿素释放法检测对靶细胞的体外杀瘤能力, 酶联免疫吸附 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 技术检测 2 种细胞因子 [干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 和干扰素- α (interferon- α , TNF- α)] 的分泌水平。结果显示, 构建了野生型和信号肽突变的重组慢病毒质粒, 慢病毒转导 T 细胞后, 携带 3 种信号肽 (SP-wtY、SP-muK 或 SP-muR) 的 CD19-CAR 转染效率分别为 33.9%、35.5%、36.8%。进一步杀伤实验显示, 与 SP-muK 和 SP-wtY 细胞相比, SP-muR 细胞的肿瘤杀伤效果显著提高, 当效靶比为 10:1 时共培养 24 h 后, SP-muR 组 CAR-T 细胞的细胞因子 IFN- γ 和 TNF- α 分泌水平显著高于 SP-muK 和 SP-wtY 组。本研究揭示信号肽 N 端正电荷数的增加可以提高 CAR 的表达效率和对 CD19⁺ 靶细胞的杀伤作用, 为 CAR 结构的优化改造和临床高效应用提供了科学依据。

关键词: 定点突变; 信号肽; 嵌合抗原受体; CD19-CAR-T 细胞; 体外杀瘤; 细胞因子

资助项目: 湖北省科技厅支持企业创新发展项目(2021BAB126); 武汉东湖高新区“揭榜挂帅”项目(2022KJB113)

This work was supported by the Foundation of Department of Science and Technology of Hubei Province Supporting Enterprise Technology Innovation Development (2021BAB126) and the Wuhan East Lake High-Tech Zone “JieBangGuaShuai” Project (2022KJB113).

*Corresponding author. E-mail: xuyao0307@wust.edu.cn

Received: 2023-07-13; Accepted: 2023-11-20

Effect of signal peptide optimized by site-directed mutagenesis on the function of chimeric antigen receptor T cells

LIU Yu¹, LI Fan², DAI Huiyun¹, ZHOU Runlong¹, WANG Mengyi¹, GAN Shihao², XU Yao^{1*}

¹ Institute of Biology and Medicine, College of Life Science and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, Hubei, China

² Wuhan Bio-Raid Biotechnology Co., Ltd., Wuhan 430075, Hubei, China

Abstract: Signal peptides (SP) are involved in regulating the secretion level and transmembrane translocation of chimeric antigen receptors (CAR), which is crucial for CAR-T cells. This study aimed to optimize the SP sequence by site-directed mutagenesis and investigate its impact on the killing function of CD19-CAR-T. Firstly, CAR vectors targeting CD19 containing wild-type SP (SP-wtY) or two mutant SP (SP-muK or SP-muR) were constructed using gene synthesis and molecular cloning techniques. The successfully constructed vector was packaged with lentivirus, and T cells were infected. The transfection efficiency of T cells was detected by flow cytometry, while the killing effect on target cells was assessed using the calcein release method. The secretion levels of cytokines interferon- γ (IFN- γ) and interferon- α (TNF- α) were measured using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that successful construction of recombinant lentivirus plasmids with wild type and signal peptide mutation. After the transferring the lentivirus into T cells, the transfection efficiency of CD19-CAR carrying three signal peptides (SP-wtY, SP-muK, or SP-muR) were 33.9%, 35.5%, and 36.8%, respectively. Further killing assay showed that the tumor-killing effect of SP-muR cells was significantly higher than that of SP-muK and SP-wtY cells. When the ratio of effector to target was 10:1, the secretion levels of cytokines IFN- γ and TNF- α of CAR-T cells of the SP-muR group were significantly higher than those in SP-muK and SP-wtY groups. In summary, this study revealed that increasing the N-terminal positive charge of the signal peptide can improve the expression efficiency of CAR and promote the killing of CD19⁺ target cells. These findings provide a scientific basis the optimization and clinical application of CAR structure.

Keywords: point mutation; signal peptide; chimeric antigen receptor; CD19-CAR-T cells; killing tumor *in vitro*; cytokines

嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)免疫治疗技术是一种新型的肿瘤精准靶向疗法,近年来,国内外陆续上市的 CAR-T 细胞产品在血液肿瘤领域取得了显著疗效。CAR-T 技术是指利用基因工程技术,在 T 细胞内导入一个可以将嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)表达于其表面的融合基因,使 T 细胞具备肿瘤靶向能力,通

过不断增殖并释放细胞因子、颗粒酶、穿孔素等,杀伤肿瘤细胞^[1-2]。抗原(靶点)的选择一直是 CAR-T 领域的研究重点,如果仅仅有合适的抗原,缺乏共刺激信号, T 细胞往往会未老先衰,起不到抗肿瘤的作用。在 CAR-T 的结构中,任何一个元件都起着关键作用。按照每个元件所处的位置, CAR 主要分为 3 个功能区域,分别是胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域^[3-4]。其

中,负责识别并结合抗原的单克隆抗体的单链可变片段(single-chain variable fragment, scFv)是 CAR 胞外结构域的重要组成部分,scFv 的 N 端包含一段长度约 25-30 个氨基酸的信号肽序列(signal peptide, SP),其对 CAR 基因的表达、分泌和膜定位至关重要^[5]。因此,SP 序列的优化是提高 CAR-T 细胞功能的重要手段。

科学家们通过对 SP 的结构研究发现,位于 SP 氮端(N)的正电荷氨基酸或疏水区域长度增加有利于新生肽段的跨膜转运,进而显著促进蛋白质的分泌水平^[6]。Huang 等研究表明,通过信号肽的氨基酸突变增加其疏水性,能够显著提高目标蛋白对转运通道的亲和力,可以取代双精氨酸基序(正电荷),靶向下游通路发挥调节作用^[7]。基于此,可以通过增加信号肽 N 端的正电荷数或疏水核心长度,提高信号肽介导的 CAR 在 T 细胞膜上的表达效率,进一步增强 CAR-T 的肿瘤杀伤活性。

靶向 B 细胞标志物 CD19 的 CAR-T 细胞的临床试验已显示出对多种血液系统恶性肿瘤的明显疗效,包括急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)^[8-10]、慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)^[11-12]和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)^[13-14],但 CAR-T 治疗后复发依然是亟待解决的现实问题。本研究围绕 CAR 结构优化改造为切入点,利用定点突变技术,在野生型重组质粒 SP-wtY-CD19-CAR 的基础上,构建 2 种信号肽 N 端正电荷数增加的突变型质粒,研究 SP 结构优化对 CAR 在 T 细胞表面表达的影响,进一步揭示其对 CAR-T 细胞杀伤功能的调控作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株

本研究使用的细胞系包括 HEK293T、K562、NALM-6,均购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),稳定过表达 CD19

抗原的 K562 细胞系(K562-CD19)由武汉波睿达生物科技有限公司赠予所得,大肠杆菌感受态细胞(DH5 α)购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂

慢病毒表达载体 pTK-Kan 由武汉波睿达生物科技有限公司惠赠,3 个慢病毒包装质粒 pMDLg/pRRE、pRSV-Rev、pMD2.G 均购自 Addgene 公司,质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒均购自 Axygen 公司,细胞培养相关试剂包括 DMEM 培养基、RPMI1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和胰酶(trypsin-EDTA, 0.25%)均购自 Gibco 公司,7-氨基放线菌素 D (7-aminoactinomycin D, 7-AAD)试剂购自 BD Bioscience 公司,CD19 蛋白抗原(PE-Labeled Human CD19 Protein)购自北京百普赛斯生物科技有限公司,钙黄绿素购自上海阿拉丁生化科技有限公司,人干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和干扰素- α (interferon- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(96-test)购于达科为生物科技有限公司。本研究涉及的引物合成及测序均由武汉擎科生物科技有限公司完成。

1.2 信号肽序列定点突变位点的选择

本研究选择的 SP 序列来自白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) (human),其野生型 SP 序列为:5'-ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACCTTGTACAAACAGT-3',对应的编码氨基酸序列为:MYRMQLLSICALSLALVTNS^[15]。为了增加信号肽 N 端的正电荷数,可在信号肽的 N 端引入带正电荷的保守序列。因此,本研究选择在信号肽 N 端的酪氨酸(Y)处进行突变,并选择带正电荷的极性氨基酸赖氨酸(K)或精氨酸(R)作为突变氨基酸。精氨酸(R)的核苷酸序列可以用 AGG、AGA、CGU、CGC、CGA 和 CCG 表示,而赖氨酸(K)对应的核苷酸序列为 AAA 和 AAG。本研究最终选择了 AAA 和 AGA 作为突变序列,以完成赖氨酸(K)和精氨酸(R)的定点突变(表 1)。

表 1 野生型和定点突变型 SP 序列信息

Table 1 The SP information of wild-type and site-directed mutated sequences

Type of signal peptide	SP amino acid sequence
SP-wtY	<u>M</u> <u>Y</u> RMQLLSCIALSLALVTNS
SP mutation 1 (SP-muK)	<u>M</u> <u>K</u> RMQLLSCIALSLALVTNS
SP mutation 2 (SP-muR)	<u>M</u> <u>R</u> RMQLLSCIALSLALVTNS

The bold and underlined letters showed the wild-type and mutated amino acids.

1.3 分子重组技术构建野生型和突变型信号肽的 pTK-CD19-CAR 载体

设计引物 F-muK、F-muR 分别为引入点突变的上游引物，CAR-R 为共同下游引物。本实验室前期已成功构建含野生型 SP 的 SP-wtY-CD19-CAR 载体，本研究在此基础上，分别使用上游引物 F-muK、F-muR 和下游引物 CAR-R (表 2) 配对进行 PCR 扩增，获得了含有 SP 突变 1 (SP-muK) 和 SP 突变 2 (SP-muR) 的 CD19-CAR 片段，其带有相同的同源臂。选择 *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性酶切识别位点作为克隆位点，利用同源重组技术将其克隆至慢病毒表达载体 pTK-Kan 上，转化后挑选单菌落进行菌落 PCR、双酶切鉴定，同时进行测序，将测序正确的菌液保存，并通过质粒提取最终获得含有 SP-muK 和 SP-muR 的 CD19-CAR 片段的载体，即 SP-muK-CD19-CAR 和 SP-muR-CD19-CAR，用于后续的慢病毒包装。

1.4 细胞培养

K562 细胞系、K562-CD19 细胞系以及 NALM-6 细胞系均培养于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中，HEK293T 细胞使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基进行持续培养；关于

原代 T 细胞的培养，本研究使用新鲜配制的 TexMACS™ GMP 培养基(包含 1 000 U/mL IL2、1:1 000 的比例稀释 1 mol/L 的 HEPES 和 1:1 000 稀释的谷氨酰胺)，在培养过程中，通过观察细胞状态及生长密度确定是否补充或替换新鲜培养基，使细胞密度维持在 $(2-3) \times 10^6$ cells/mL 之间，期间定时显微观察并拍照记录生长状态。以上所有细胞均置于细胞培养箱中持续培养，培养条件为 37 °C 和 5% CO₂。

1.5 慢病毒包装、浓缩及活滴测定

在充分考虑慢病毒包装效率及使用安全性的基础上，选择四质粒系统(第三代慢病毒包装系统)获取慢病毒原液。首先，将 4 个质粒 pMDLg/pRRE、pRSV-Rev、pMD2.G 和 pTK-CD19-CAR 以 12:10:6:5 的转染比例，通过聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)共转染至 HEK293T 细胞中，将转染后的细胞置于 CO₂ 细胞培养箱中继续培养 72 h 后，离心收集培养基上清，然后，采用超速离心法得到病毒浓缩液。慢病毒活滴测定采用梯度感染 HEK293T 细胞进行，首先按照 5×10^5 cells/well 的密度在 6 孔板中培养 HEK293T 细胞，待细胞生长至 70% 左右时，向孔板中分别加入 0.5、1、2、5、10 μL 的病毒浓缩液，同时加入终浓度为 5 μg/mL 的聚凝胺(polybrene)，病毒感染 72 h 后，利用 CD19 抗原试剂(PE-Labeled Human CD19 Protein)与感染后细胞共孵育，通过流式细胞术检测每组转染效率，从而计算病毒活滴数。本研究中每个病毒添加梯度设置 2 个平行重复，该实验重复 3 次。

表 2 SP 信号肽基因定点突变的 PCR 引物

Table 2 PCR primers for site-directed mutagenesis of SP signal peptide gene

Name of primer	Sequence (5'→3')
F-muK	GGATCTATTTCGGTGAATTCGCCACCATGAAAAGGATGCAACTCCTGTCTTGC
F-muR	GGATCTATTTCGGTGAATTCGCCACCATGAGAAGGATGCAACTCCTGTCTTGC
CAR-R	GGGAGGGAGAGGGGCGGATCCTTAGCGAGGGGGCAGGGCC

1.6 通过慢病毒转导构建 CD19-CAR-T 细胞

体外培养原代 T 细胞约 16–24 h 后,取少量细胞溶液检测细胞密度,根据实验研究所需细胞数量,使用移液器量取相应悬液铺于六孔板中,在病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 5 的条件下,将带有 CD19-CAR 结构的病毒浓缩液缓慢加入细胞悬液中,同时加入 polybrene 使其最终浓度达到 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,随后将六孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中,孵育 4 h 后,补充 T 细胞培养基,使 CAR-T 细胞密度处于 1×10^6 – 3×10^6 cells/mL 之间持续培养。

1.7 流式细胞术检测 CD19-CAR-T 细胞的转导效率

采用流式细胞术检测 CD19-CAR 在 T 细胞表面的表达情况,慢病毒转导 T 细胞 6 d 后,取 5×10^5 个 CAR-T 细胞于流式管中。首先,向每管中加入 1–2 mL 的流式缓冲液(含 PBS 和 FBS),充分混匀后,300 \times g 离心 5 min,该步骤重复 2 次,去除上清液。然后,使用配置好的流式抗体(流式缓冲液溶解)溶液重悬细胞,并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,加入 1–2 mL 缓冲液终止反应,300 \times g 离心 5 min,去除上清,重复洗涤 2 次后,再加入 2 μL 的 7-AAD 抗体(1:100)以检测细胞活率,将细胞沉淀重悬于 0.2 mL 的流式缓冲液中,在 3 h 以内上机进行流式检测。

1.8 钙黄绿素释放法检测 CD19-CAR-T 细胞的体外杀伤功能

钙黄绿素释放法是用来评估 CAR-T 细胞对肿瘤杀伤作用的重要研究方法。通过使用一种胞浆荧光标记物钙黄绿素 AM (calcein-AM),实现对肿瘤靶细胞的标记,然后通过与效应细胞共孵育进而检测荧光强度。本研究的效应细胞分别为 3 种 CAR-T 细胞(SP-wtY-CD19、SP-muR-CD19、SP-muK-CD19),同时,选择 CD19 抗原高表达的 NALM-6 和 K562-CD19 (CD19 稳定过表

达细胞系)为阳性靶细胞,而不表达 CD19 的 K562 细胞为阴性对照组。首先,将各组的靶细胞进行 calcein-AM 标记后,每孔加入密度为 1×10^5 cells/mL 的细胞 100 μL 于 96 孔细胞培养板中,然后,将 CAR-T 效应细胞以 25:1、5:1 和 1:1 的效靶比分别加入靶细胞中进行共孵育,其中,阳性对照组中直接加入细胞裂解液,阴性对照组中加入 PBS,各组均设置 4 个复孔,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育 3 h 后,将共孵育细胞置于荧光显微镜下观察钙黄绿素的释放情况,并拍照记录;随后将 96 孔板在常温下 700 \times g 离心 10 min,仅收集每孔的上清液至新的 96 孔板中,在激发光波长 485/20 nm、发射波长 530/25 nm 的参数条件下,采用酶标仪读取每组的荧光值。最终, CAR-T 细胞的体外杀伤能力采用靶细胞损伤百分比表示,计算公式如下:肿瘤细胞杀伤比率(%)=(实验组荧光值–阴性对照组荧光值)/(最大释放组荧光值–阴性对照组荧光值) $\times 100\%$,在本研究中每个分组设 4 个平行复孔,该实验重复 3 次。

1.9 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测 CD19-CAR-T 的细胞因子分泌水平

IFN- γ 和 TNF- α 是 2 个常用来评估 CAR-T 细胞潜在功能的重要指标。在本实验中,分别取 5×10^3 个阳性靶细胞 NALM-6 和阴性靶细胞 K562 接种于 96 孔板中,另设不加入靶细胞的孔为空白对照组,每孔添加体积均为 100 μL 。然后,按照效靶比为 10:1 的条件,在上述实验组及对照组中加入 5×10^4 个 T 细胞或 3 种不同信号肽的 CD19-CAR-T 细胞,每个样本做 3 个复孔,将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中孵育 24 h。然后,将 96 孔板在常温下 700 g/min 离心 10 min,收集 100 μL 上清液,按 ELISA 试剂盒说明书操作检测上清液中干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和

干扰素- α (interferon- α , TNF- α)的分泌水平,将实验操作后的孔板放入酶标仪中在 450 nm 波长处测量光密度值(optical density, *OD*)。此外,根据试剂盒的说明制作标准曲线,进而定量计算细胞因子的分泌水平。

1.10 数据分析

本研究的数据统计及组间差异分析均采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件完成,研究数据使用平均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,组间的显著性分析采用 Student's *t* 检验。*: $P < 0.05$ 或 **: $P < 0.01$ 分别表示显著性或极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 成功构建 SP-muK-CD19-CAR 和 SP-muR-CD19-CAR 重组质粒

首先利用基因合成技术,成功获得含野生型 SP 片段的 CAR 序列,将其命名为 SP-wtY-CD19-CAR,然后,利用设计的定点突变上游引物 F-muK 或 F-muR,分别与下游引物 CAR-R 配对

(表 2),PCR 扩增得到包含 SP-muK 或 SP-muR 的 CD19-CAR 片段(图 1A),凝胶电泳结果显示扩增条带为 1 593 bp,符合预期。根据过表达载体序列特征,利用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切技术,将慢病毒表达载体 pTK-Kan 切割为线性载体,结果如图 1B 所示,双酶切显示线性载体片段大小为 10 205 bp,与预期结果一致,对该片段进行胶回收备用。

将回收得到的 SP-muK-CD19-CAR 和 SP-muR-CD19-CAR 片段分别和线性载体进行同源重组、转化、菌落 PCR 及双酶切鉴定,同时进行测序验证,将正确的重组质粒中提后保存待用。双酶切鉴定结果如图 1C 所示,由于 CD19-CAR 分子的重链 VH 序列中含有 *Bam*H I 酶切位点,因此,酶切后可见两条大小分别为 1 052bp 和 541 bp 的片段,与序列分析结果一致。此外,为了进一步确定重组载体的序列信息,本研究将 2 个重组载体 SP-muK-CD19-CAR 和 SP-muR-CD19-CAR 进行测序,结果如图 2A、

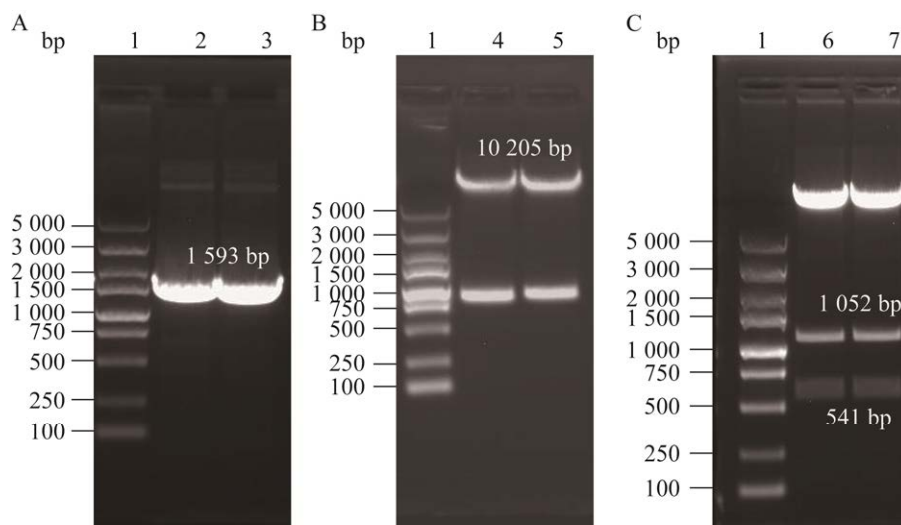


图 1 PCR 及 pTK-Kan 载体双酶切结果和双酶切产物鉴定电泳结果

Figure 1 Double digestion of the PCR products and pTK-Kan vector and the associated electrophoresis diagram. 1: Marker; 2-3: CD19-CAR PCR amplification fragments containing SP-muK and SP-muR, respectively; 4-5: pTK-Kan vector double enzyme fragment; 6-7: SP-muK-CD19-CAR and SP-muR-CD19-CAR recombinant lentiviral expression vectors were double digested to verify the bands.

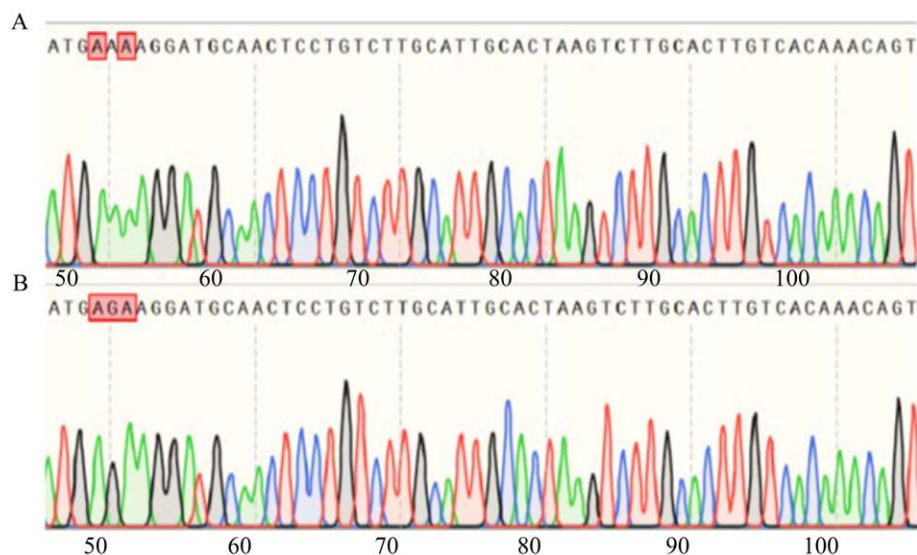


图 2 突变位点测序分析图

Figure 2 The sequencing diagram analyzing the mutation site. A: SP-muK sequencing analysis diagram. B: SP-muR sequencing analysis diagram.

2B 所示, 测序图谱无杂峰, 插入序列完全符合设计, 表明 SP-muK-CD19-CAR 和 SP-muR-CD19-CAR 重组质粒构建成功。

2.2 成功制备 SP-wtY、SP-muK 和 SP-muR 慢病毒

采用四质粒系统成功包装慢病毒, 然后通过设置不同的慢病毒体积梯度(0.2、0.5、1 μL) 感染 293T 细胞, 以确定病毒活性滴度。根据流式细胞术检测结果判断, 选择病毒添加量为

0.5 μL 时计算 SP-wtY、SP-muK 和 SP-muR 的慢病毒滴度。如图 3A 所示, 3 种慢病毒(SP-wtY、SP-muK、SP-muR)的转染效率分别为 33.9%、35.5%、36.8%, 定点突变组 SP-muK $[(3.6 \pm 0.10) \times 10^8 \text{ TU/mL}]$ 和 SP-muR $[(3.8 \pm 0.13) \times 10^8 \text{ TU/mL}]$ 慢病毒的滴度显著高于野生型 SP-wtY 组 $[(3.2 \pm 0.14) \times 10^8 \text{ TU/mL}]$ (图 3B, $P < 0.05$)。由此可见, 3 个慢病毒已成功包装, 且 2 个信号肽突变组的活滴均显著高于未突变组。

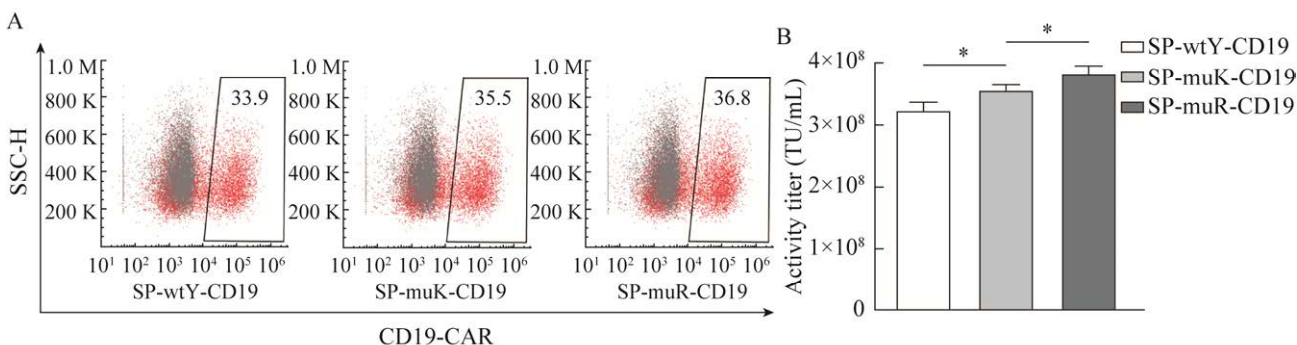


图 3 慢病毒制备及活滴检测

Figure 3 Lentivirus production and titer detection. A: The CD19-CAR expression on HEK-293T cells transfected by three different lentivirus. B: Activity titers of three lentiviruses. *: $P < 0.05$.

2.3 含不同信号肽类型的 CD19-CAR 在 T 细胞中的转导效率

分别使用含野生型和 2 种突变型信号肽序列的慢病毒感染 T 细胞后, 通过流式细胞术检测 CD19-CAR 在 T 细胞表面的表达, 即转导效率。结果显示, 3 组慢病毒(SP-wtY、SP-muK、SP-muR)感染的 T 细胞成功表达 CD19-CAR 的比例分别为 $(21.43 \pm 0.87)\%$ 、 $(26.03 \pm 1.00)\%$ 、 $(30.33 \pm 1.25)\%$ (图 4A、4B), 且突变组极显著高于 SP-wtY 组($P < 0.01$)。此外, 还进一步分析了含 3 种信号肽的 CD19-CAR 在 T 细胞膜表面表达的平均荧光强度(图 4C), 结果显示, SP-muK-CD19 和 SP-muR-CD19 在细胞表面的表达量极显著高于 SP-wtY-CD19 细胞组($P < 0.01$), 说明信号肽经突变优化后能显著提高 T 细胞的转染效率, 增强 CD19-CAR 基因表达。

2.4 不同类型的 CD19-CAR-T 细胞对靶细胞杀伤效率的影响

为了体外评价 CAR-T 细胞的杀伤功能, 通过流式细胞术检测候选靶细胞的 CD19 表达水平, 结果如图 5A 所示, K562-CD19 细胞表面 CD19 的表达率为 99.5%, 且 NALM-6 细胞为 99.3%, 可作为杀伤实验的阳性靶细胞; 然而, K562 细胞的 CD19 阳性表达率仅为 0.3%, 可作为阴性靶细胞。

在效应细胞与靶细胞的比例分别为 25:1、5:1、1:1 的条件下进行钙黄绿素释放实验, 结果显示, 效靶比为 25:1 的 3 组细胞共孵育前后荧光成像结果显示, 杀伤前细胞光滑圆润, 杀伤后细胞破碎缩小, 钙黄绿素从细胞中释放出来, 且 SP-muR-CD19 组杀伤作用更强(图 5B)。

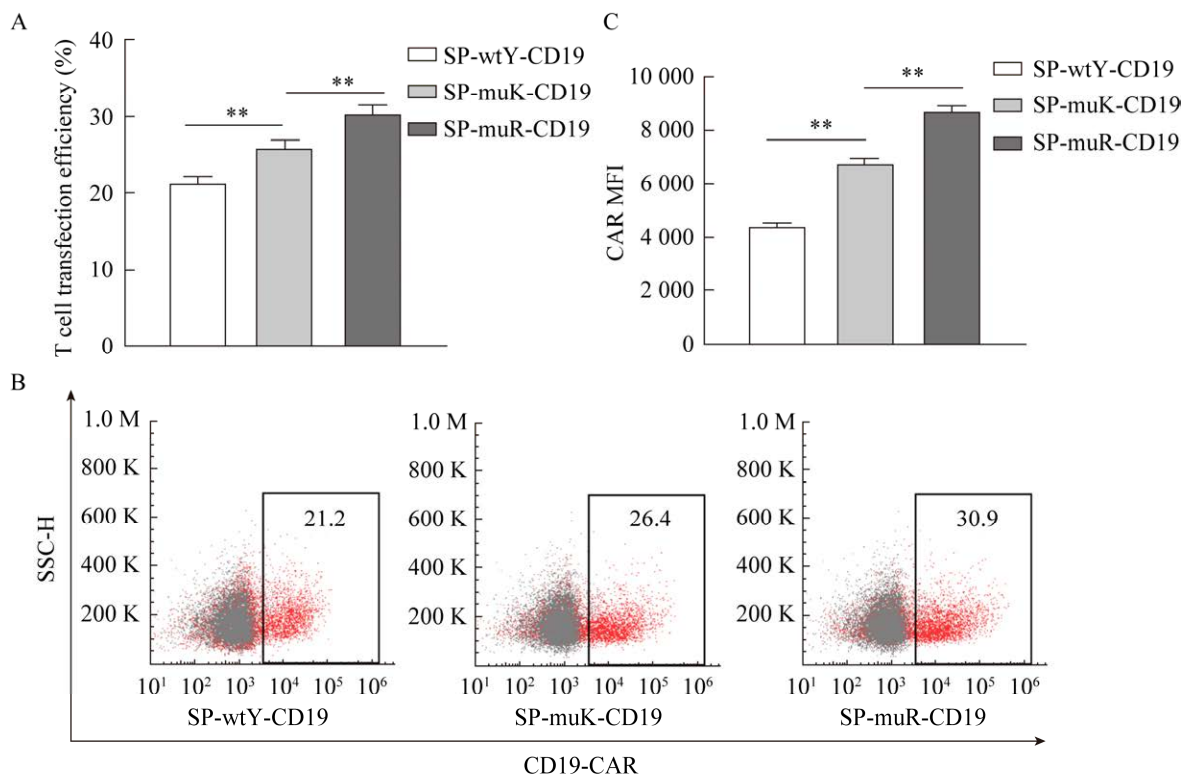


图 4 三种 CD19-CAR 分子在 T 细胞中的转染效率

Figure 4 Transfection efficiency of three CD19-CAR molecules in T cells. A: Expression efficiency of CD19-CAR molecules in T cells of three different groups. B: The expression efficiency of CD19-CAR in T cells was detected by flow cytometry. C: Average fluorescence intensity of CD19-CAR expression with three different signal peptides on T cell membrane surface. **: $P < 0.01$.

此外, 酶标仪量化结果显示(图 5C), 效靶比为 25:1 的 CAR-T 细胞杀伤效果最好, 其中 SP-muR-CD19 组对 K562-CD19 肿瘤细胞的杀伤作用 $[(43.33 \pm 2.49)\%]$ 显著高于 SP-muK-CD19 $[(37.33 \pm 2.05)\%]$ 和 SP-wtY-CD19 $[(31.57 \pm 2.48)\%]$ 细胞 ($P < 0.05$)。同样地, 在 NALM-6 肿瘤细胞组, SP-muR-CD19 细胞的杀伤作用 $[(29.29 \pm 1.11)\%]$ 依然显著高于 SP-muK-CD19 $[(25.06 \pm 1.00)\%]$ 和 SP-wtY-CD19 $[(20.53 \pm 1.71)\%]$ 细胞 ($P < 0.05$)。且三者对 CD19 阴性肿瘤细胞 K562 无杀伤作用, 且组间无显著差异[效靶比 25:1 时, $(3.79 \pm 0.55)\%$ vs. $(2.24 \pm 0.37)\%$, $(2.98 \pm 0.81)\%$; $P > 0.05$]。总之, 细胞毒性实验表明, 信号肽突变后的 2 组 CAR-T 细胞均优于未突变组, 且 SP-muR-CD19 细胞杀伤提升效果更为显著。

2.5 不同类型的 CD19-CAR-T 细胞对细胞因子 IFN- γ 和 TNF- α 释放的影响

为了进一步探究 3 种 CAR 结构对细胞因子释放的影响, 采用 ELISA 技术检测不同的 CAR-T 细胞类型与肿瘤细胞共孵育后细胞因子 IFN- γ 和 TNF- α 的分泌水平^[16], 当靶细胞共孵育 24 h 后, 实验结果如图 6 所示, 与阴性靶细胞组相比, IFN- γ 和 TNF- α 的分泌水平在 3 种 CD19-CAR-T 细胞分别与阳性靶细胞共孵育组显著升高。与 SP-wtY-CD19 组相比, SP-muK-CD19 和 SP-muR-CD19 细胞中 IFN- γ $[(4\ 812 \pm 365.60)$ pg/mL vs. $(6\ 424 \pm 207.9)$ pg/mL、 $(7\ 620 \pm 236.60)$ pg/mL; $P < 0.05$] 和 TNF- α $[(6\ 377 \pm 137.20)$ pg/mL vs. $(7\ 797 \pm 64.98)$ pg/mL、 $(8\ 634 \pm 151.60)$ pg/mL; $P < 0.05$] 的分泌水平均显著升高。综上所述, 与

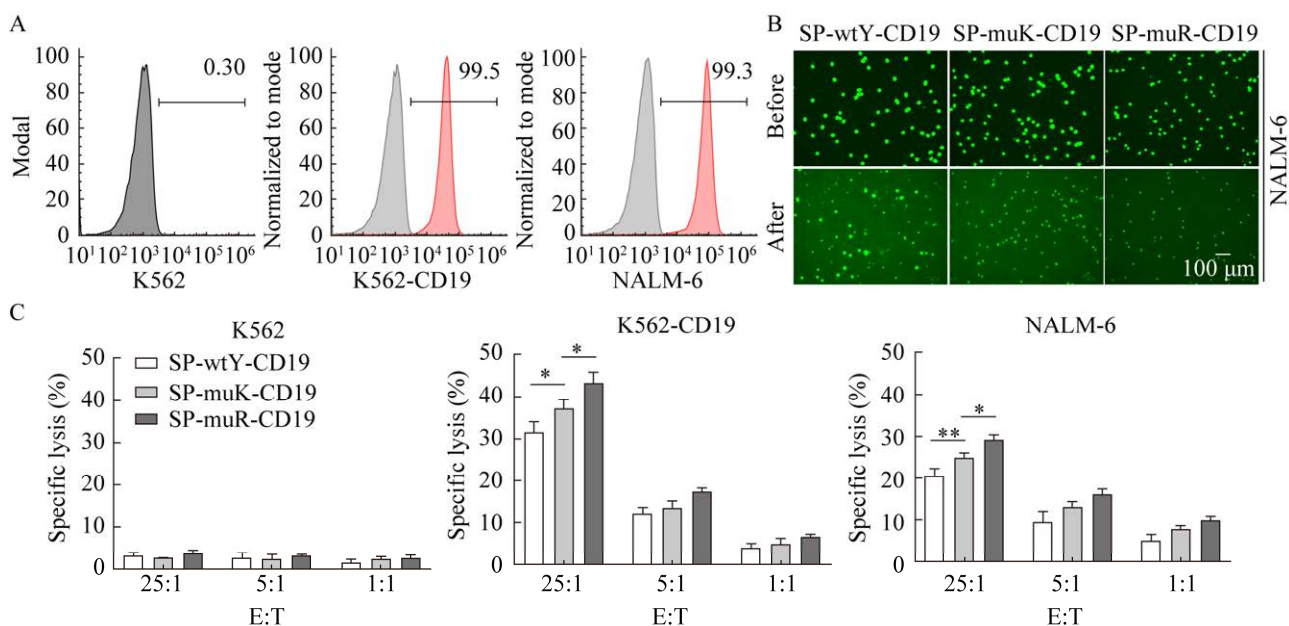


图 5 三种 CD19-CAR-T 细胞对 CD19 阳性靶细胞的杀伤效应

Figure 5 Killing effects of three kinds of CD19-CAR-T cells on CD19 positive target cells. A: The surface expression of CD19 in K562, K562-CD19, and NALM-6 cells was detected by flow cytometry. B: Fluorescence detection of three CD19-CAR-T cells on NALM-6 cell cytotoxicity. Scale bar: 100 μ m. C: Detection of cytotoxicity of three CD19-CAR-T cells on K562, K562-CD19, and NALM-6 cells by calcein-AM release assay. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

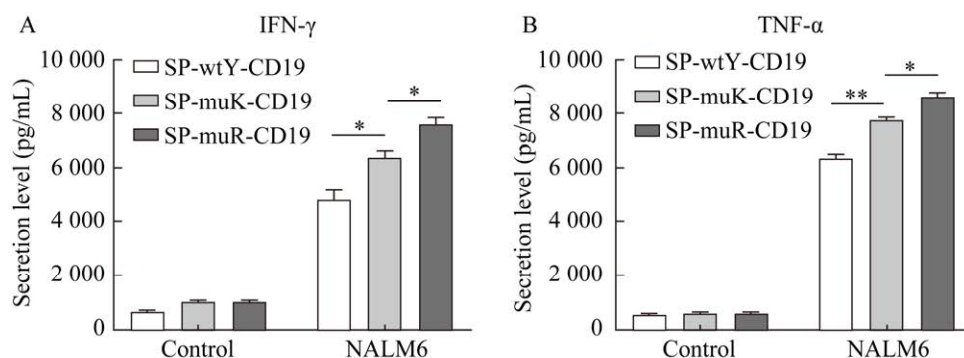


图6 三种 CD19-CAR-T 细胞与靶细胞共孵育体系中 IFN- γ 和 TNF- α 的分泌水平

Figure 6 The secretion levels of IFN- γ and TNF- α from three co-incubation system of CD19-CAR T cells and target cells. A: IFN- γ secretion levels from three groups were detected by ELISA. B: The secretion level of TNF- α from three groups was detected by ELISA. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

SP-wtY-CD19 和 SP-muK-CD19 相比, SP-muR-CD19 细胞 IFN- γ 和 TNF- α 的分泌水平显著升高, 与杀瘤结果一致。

3 讨论与结论

急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是淋巴细胞在分化早期恶性增殖所致, 可侵犯骨髓、血液和其他组织。该疾病发病率高, 预后不佳^[17]。CAR-T 免疫治疗对 ALL 细胞具有靶向作用, 而不损害正常细胞, 有望作为 ALL 治疗的新方案。有研究报道, T 细胞表面 CAR 结构的表达升高有助于促进 CAR-T 技术的肿瘤治疗效果, 这为 CAR-T 在 ALL 中的优化治疗提供了新的思路^[18]。近年来, 靶向 CD19 的 CAR-T 细胞在白血病治疗中取得了突破性进展^[19], 然而, 针对 CD19-CAR-T 的复发及疗效持久性方面也开展了大量优化研究, 其中, 关于 CAR 结构的跨膜区及胞内共刺激分子的研究层出不穷, 但围绕 scFv 的 N 端 SP 优化研究相对较少。基于此, 本研究采用第三代 CAR 结构为基础开展信号肽的优化研究, 该结构由单链抗体 scFv (含 SP)、CD28 跨膜区、CD28 胞内结构域、

胞内共刺激域 4-1BB 和 CD3 ζ 链组成^[20]。前期报道显示, 不同的 SP 序列直接决定其与信号识别颗粒(signal recognition particle, SRP)的亲合力, 尤其是 N 端正电荷增加能够影响 SRP 的定位与捕获, 最终决定新生多肽链向分泌途径进入的效率^[21]。因此, 本研究通过定点突变提高 SP 的 N 端正电荷数, 通过一系列实验证实, 与野生型相比, 突变信号肽后的 CAR-T 细胞展示出更强的杀伤效应和细胞因子释放水平, 且突变为精氨酸组效力更为显著, 这可能与 SP-muR 与 SRP 的结合效率有关^[22], 其具体的分子机制和作用方式还需进一步实验验证。综上所述, 研究表明增加信号肽 N 端的正电荷数, 可以提升 CAR 的表达效率和对 CD19 阳性靶细胞的杀伤效果。

CAR-T 免疫细胞治疗领域发展迅速, 新的技术手段迭代创新, 如何通过分子生物学前沿创新型方式改造 CAR 结构, 以增强 CAR-T 细胞持久性、降低细胞耗竭是影响 CAR-T 技术临床疗效的瓶颈问题。此外, 下一代 CARs 的开发可能会整合多个共刺激结构域, 或者使转导 T 细胞能够分泌特定的细胞因子, 可能会增强抗恶性肿瘤的效果, 但也可能改变预期的毒性特征^[23]。

CAR-T 细胞疗法越来越多地被评估可用于实体恶性肿瘤,实体恶性肿瘤相关抗原在某些情况下可能在正常组织中同样广泛表达,这可能增加 CAR 介导的细胞毒性,引起副作用^[24]。据报道, CAR-T 细胞已应用于霍奇金淋巴瘤^[25-26]和一些实体肿瘤的临床试验^[27-28]中。随着 CAR-T 细胞生产工艺的不断优化升级,未来必将会有更多靶点的 CAR-T 细胞产品应用于恶性肿瘤治疗。

REFERENCES

- [1] JOHNSON LA, JUNE CH. Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer[J]. *Cell Research*, 2017, 27(1): 38-58.
- [2] JUNE CH, SADELAIN M. Chimeric antigen receptor therapy[J]. *New England Journal of Medicine*, 2018, 379(1): 64-73.
- [3] BRUDNO JN, KOCHENDERFER JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: mechanisms, manifestations and management[J]. *Blood Reviews*, 2019, 34: 45-55.
- [4] DEPIL S, DUCHATEAU P, GRUPP SA, MUFTI G, POIROT L. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2020, 19(3): 185-199.
- [5] GUMBER D, WANG LD. Improving CAR-T immunotherapy: overcoming the challenges of T cell exhaustion[J]. *eBioMedicine*, 2022, 77: 103941.
- [6] ARMENTEROS JJA, TSIRIGOS KD, SØNDERBY CK, PETERSEN TN, WINTHER O, BRUNAK S, von HEIJNE G, NIELSEN H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(4): 420-423.
- [7] HUANG Q, PALMER T. Signal peptide hydrophobicity modulates interaction with the twin-arginine translocase[J]. *mBio*, 2017, 8(4): e00909-00917.
- [8] DANIEL W, LEE, MD. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial[J]. *The Lancet*, 2015, 385(9967): 517-528.
- [9] MAUDE SL, LAETSCH TW, BUECHNER J, RIVES S, BOYER M, BITTENCOURT H, BADER P, VERNERIS MR, STEFANSKI HE, MYERS GD, QAYED M, de MOERLOOSE B, HIRAMATSU H, SCHLIS K, DAVIS KL, MARTIN PL, NEMECEK ER, YANIK GA, PETERS C, BARUCHEL A, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia[J]. *New England Journal of Medicine*, 2018, 378(5): 439-448.
- [10] PARK JH, RIVIÈRE I, GONEN M, WANG XY, SÉNÉCHAL B, CURRAN KJ, SAUTER C, WANG YZ, SANTOMASSO B, MEAD E, ROSHAL M, MASLAK P, DAVILA M, BRENTJENS RJ, SADELAIN M. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2018, 378(5): 449-459.
- [11] TURTLE CJ, HAY KA, HANAFI LA, LI D, CHERIAN S, CHEN XY, WOOD B, LOZANSKI A, BYRD JC, HEIMFELD S, RIDDELL SR, MALONEY DG. Durable molecular remissions in chronic lymphocytic leukemia treated with CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells after failure of ibrutinib[J]. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2017, 35(26): 3010-3020.
- [12] PORTER DL, LEVINE BL, KALOS M, BAGG A, JUNE CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2011, 365(8): 725-733.
- [13] KOCHENDERFER JN, DUDLEY ME, FELDMAN SA, WILSON WH, SPANER DE, MARIC I, STETLER-STEVENSON M, PHAN GQ, HUGHES MS, SHERRY RM, YANG JC, KAMMULA US, DEVILLIER L, CARPENTER R, NATHAN DA N, MORGAN RA, LAURENCOT C, ROSENBERG SA. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells[J]. *Blood*, 2012, 119(12): 2709-2720.
- [14] KOCHENDERFER JN, DUDLEY ME, KASSIM SH, SOMERVILLE RPT, CARPENTER RO, STETLER-STEVENSON M, YANG JC, PHAN GQ, HUGHES MS, SHERRY RM, RAFFELD M, FELDMAN S, LU L, LI YF, NGO LT, GOY A, FELDMAN T, SPANER DE, WANG ML, CHEN CC, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor[J]. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2015, 33(6): 540-549.

- [15] 李帆, 张琴星, 童祥文, 田高辉, 顾力行, 徐瑶. 不同信号肽对嵌合抗原受体 T 细胞杀伤作用的影响研究[J]. 中国癌症杂志, 2022, 32(2): 142-151.
LI F, ZHANG QX, TONG XW, TIAN GH, GU LX, XU Y. A study on influence of different signal peptides on anti-tumor effect of chimeric antigen receptor (CAR) T cells[J]. *China Oncology*, 2022, 32(2): 142-151 (in Chinese).
- [16] GOLUBOVSKAYA V. CAR-T cells targeting immune checkpoint pathway players[J]. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2022, 27(4): 121.
- [17] ROGOSIC S, GHORASHIAN S. CAR-T cell therapy in paediatric acute lymphoblastic leukaemia-past, present and future[J]. *British Journal of Haematology*, 2020, 191(4): 617-626.
- [18] LIN WY, WANG HH, CHEN YW, LIN CF, FAN HC, LEE YY. Gene modified CAR-T cellular therapy for hematologic malignancies[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(22): 8655.
- [19] HONG MH, CLUBB JD, CHEN YY. Engineering CAR-T cells for next-generation cancer therapy[J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(4): 473-488.
- [20] STERNER RC, STERNER RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies[J]. *Blood Cancer Journal*, 2021, 11(4): 69.
- [21] JANDA CY, LI J, OUBRIDGE C, HERNÁNDEZ H, ROBINSON CV, NAGAI K. Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle[J]. *Nature*, 2010, 465(7297): 507-510.
- [22] SARAOGI I, SHAN SO. Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle[J]. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2011, 12(5): 535-542.
- [23] SADELAIN M, BRENTJENS R, RIVIÈRE I. The basic principles of chimeric antigen receptor design[J]. *Cancer Discovery*, 2013, 3(4): 388-398.
- [24] MAUS MV, JUNE CH. Making better chimeric antigen receptors for adoptive T-cell therapy[J]. *Clinical Cancer Research*, 2016, 22(8): 1875-1884.
- [25] WANG CM, WU ZQ, WANG Y, GUO YL, DAI HR, WANG XH, LI X, ZHANG YJ, ZHANG WY, CHEN MX, ZHANG Y, FENG KC, LIU Y, LI SX, YANG QM, HAN WD. Autologous T cells expressing CD30 chimeric antigen receptors for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: an open-label phase I trial[J]. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2017, 23(5): 1156-1166.
- [26] RAMOS CA, BALLARD B, ZHANG HM, DAKHOVA O, GEE AP, MEI ZY, BILGI M, WU MF, LIU H, GRILLEY B, BOLLARD CM, CHANG BH, ROONEY CM, BRENNER MK, HESLOP HE, DOTTI G, SAVOLDO B. Clinical and immunological responses after CD30-specific chimeric antigen receptor-redirected lymphocytes[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2017, 127(9): 3462-3471.
- [27] BROWN CE, ALIZADEH D, STARR R, WENG LH, WAGNER JR, NARANJO A, OSTBERG JR, KILPATRICK J, SIMPSON J, KURIEN A, PRICEMAN SJ, WANG XL, HARSHBARGER TL, D'APUZZO M, RESSLER JA, JENSEN MC, BARISH ME, CHEN MK, PORTNOW J, FORMAN SJ, et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2016, 375(26): 2561-2569.
- [28] AHMED N, BRAWLEY VS, HEGDE M, ROBERTSON C, GHAZI A, GERKEN C, LIU EL, DAKHOVA O, ASHOORI A, CORDER A, GRAY T, WU MF, LIU H, HICKS J, RAINUSSO N, DOTTI G, MEI ZY, GRILLEY B, GEE A, ROONEY CM, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma[J]. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2015, 33(15): 1688-1696.

(本文责编 郝丽芳)