

靶向BCMA的嵌合抗原受体T细胞 抗多发性骨髓瘤作用研究

钟梦君 徐颖茜 邢海燕 唐克晶 田征 饶青 王敏 王建祥

中国医学科学院、北京协和医学院血液病医院(血液学研究所),实验血液学国家重点实验室,国家血液系统疾病临床医学研究中心,天津 300020

通信作者:王建祥,Email:wangjx@ihcams.ac.cn;王敏,Email:wangjxm@ihcams.ac.cn

【摘要】 目的 构建以B细胞成熟抗原(BCMA)的特异性配体APRIL为抗原结合区的BCMA-CAR,并验证该BCMA-CAR修饰的T细胞(BCMA-CAR-T)对多发性骨髓瘤的作用。方法 以BCMA的特异性配体APRIL为抗原结合区、4-1BB为共刺激分子而构建BCMA-CAR,体外实验验证BCMA-CAR-T细胞对BCMA⁺骨髓瘤细胞系和原代骨髓瘤细胞的特异性细胞毒作用。此外,构建BCMA⁺骨髓瘤小鼠模型并评价BCMA-CAR-T细胞的体内抗肿瘤效应。结果 BCMA-CAR-T细胞能特异性杀伤BCMA⁺骨髓瘤细胞系(当效靶比为1:4时,BCMA-CAR-T细胞组中BCMA⁺细胞几乎检测不到)和骨髓瘤患者的骨髓单个核细胞(BCMA-CAR-T和空载组T细胞的残余细胞比例分别为16.00%和66.85%, $P=0.003$),并伴随显著的脱颗粒效应(CAR-T和空载组T细胞与MM1.S、H929、U266共培养的脱颗粒水平分别为33.30%对5.62%、16.97%对2.95%、25.87%对2.97%, P 值均 <0.001)和细胞因子释放(P 值均 <0.01)。在治疗人BCMA⁺骨髓瘤小鼠移植模型中,BCMA-CAR-T细胞可显著延长小鼠的生存期(BCMA-CAR-T和空载组T细胞治疗小鼠的中位生存期分别为87.5 d、67.5 d, $P<0.001$)。结论 以APRIL为抗原识别区的BCMA-CAR-T细胞有望成为治疗BCMA⁺多发性骨髓瘤的理想策略。

【关键词】 多发性骨髓瘤; 嵌合抗原受体; B细胞成熟抗原; 免疫治疗

基金项目: 国家自然科学基金(81830005、81770181); 国家精准医疗重点研发项目(2017YFC0909800); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-1-007)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.10.002

Targeting BCMA in multiple myeloma using chimeric antigen receptor-engineered T cells

Zhong Mengjun, Xu Yingxi, Xing Haiyan, Tang Kejing, Tian Zheng, Rao Qing, Wang Min, Wang Jianxiang
Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College; State Key Laboratory of Experimental Hematology; National Clinical Research Center for Blood Diseases, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Wang Jianxiang, Email: wangjx@ihcams.ac.cn, Wang Min, Email: wangjxm@ihcams.ac.cn

【Abstract】 **Objective** To construct the BCMA-CAR using the B-cell maturation antigen (BCMA) specific ligand APRIL as antigen binding region and to validate the effect of BCMA-CAR modified T cells (BCMA-CAR-T) on myeloma cells. **Methods** The BCMA-CAR was constructed using the BCMA specific ligand APRIL as antigen binding domain and 4-1BB as the costimulatory domain. The specific cytotoxicity against BCMA⁺ myeloma cell lines and primary multiple myeloma (MM) cells in vitro were evaluated. In addition, BCMA⁺ myeloma xenograft mouse model was established to assess the anti-tumor effect of BCMA-CAR-T cell therapy in vivo. **Results** BCMA-CAR-T cells could specifically kill BCMA⁺ myeloma cell lines (For BCMA-CAR-T cells, BCMA⁺ cells are almost undetectable in the E:T ratio of 1:4) and MM patients' bone marrow mononuclear cells (the proportion of residual cells in BCMA-CAR-T and vector-T groups was 16.0% vs 66.85%, $P=0.003$) with significant degranulation (CAR-T and vector-T cells cocultured with MM1.S, H929 and U266 had degranulation levels of 33.30% vs 5.62%, 16.97% vs 2.95% and 25.87% vs 2.97%, respectively, $P<0.001$) and cytokines release ($P<0.01$) in vitro. In a human BCMA⁺ myeloma xenograft mouse model, BCMA-CAR-T cells could significantly prolong the survival of mice (The median survival time of mice treated with BCMA-CAR-T and vector-T

cells was 87.5 days and 67.5 days, respectively, $P < 0.001$). **Conclusion** The ligand-based BCMA-CAR-T cells could be a promising strategy for BCMA⁺ multiple myeloma treatment.

【Key words】 Multiple myeloma; Chimeric antigen receptor; B- cell maturation antigen; Immunotherapy

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81830005, 81770181); The National Key Research and Development Program for Precision Medicine (2017YFC0909800); CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (2016-I2M-1-007)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.10.002

多发性骨髓瘤(MM)是以骨髓中异常浆细胞大量积聚并伴不同程度骨质破坏为特征的血液系统恶性肿瘤^[1]。虽然蛋白酶体抑制剂和免疫调节剂已显著改善患者的生存期^[2],但大多数患者仍会出现耐药、复发、难治等情况^[1,3]。因此,探索治疗MM的新方法十分必要。

B 细胞成熟抗原(BCMA)高度特异地表达于骨髓瘤细胞系和 MM 患者的肿瘤细胞表面,调节 B 细胞成熟及分化^[4]。BCMA 并不表达于 CD34⁺造血干细胞或大多数正常组织细胞表面^[5],因此,BCMA 已成为 MM 免疫治疗策略的理想靶点^[6-7]。BCMA 存在两个特异性配体,其中增殖诱导配体(APRIL)是较 B 细胞活化因子(BAFF)更特异、与 BCMA 亲和力更强的配体^[8]。

嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)由胞外的特异性抗原结合区、铰链区、跨膜区和胞内信号转导区构成^[9-10]。近年来的研究报道了以 BCMA 的特异性单链抗体可变区片段(scFv)^[11]或二聚体形式的 APRIL^[12]为抗原结合区而构建的 BCMA-CAR-T 治疗 MM 的作用。

本研究中我们以 APRIL 的单体形式为抗原结合区构建了一种新的 BCMA-CAR 结构并制备 BCMA-CAR-T 细胞。功能实验证明此 BCMA-CAR-T 细胞能特异性杀伤 BCMA⁺骨髓瘤细胞,且能明显延长骨髓瘤小鼠的生存期。

材料与方法

一、患者骨髓标本

实验涉及的骨髓单个核细胞(BMMNC)来源于 4 例 MM 患者的骨髓标本(表 1),通过 Ficoll-Paque 密度离心法分离而得。所有患者均为中国医学科学院血液病医院住院患者并签署知情同意书。

二、BCMA-CAR 慢病毒载体的构建

在健康供者外周血单个核细胞中以 PCR 方式扩增 APRIL 的胞外区片段,PCR 过程中使用的前向

表 1 4 例多发性骨髓瘤患者基本情况

例号	年龄(岁)	性别	样本	CD138 ⁺ (%)	BCMA ⁺ (%)	BCMA ⁺ (SFI)
1	61	女	骨髓	18.90	69.30	5.05
2	62	女	骨髓	9.63	44.00	4.80
3	52	女	骨髓	4.70	23.40	4.06
4	60	男	骨髓	5.15	5.89	1.31

注:BCMA:B 细胞成熟抗原;SFI: 特定荧光强度

引物和后向引物序列分别为:5'-CTAGCTAGCG CAGTGCTCACCCAAAACA-3' 和 5'- CCGGAA TTCCAGTTTCACAAACCCCAGGA-3'。将成功扩增的 APRIL 胞外区序列通过酶切和连接反应克隆到实验室前期已构建的 pCDH-CD8 α -4-1BB-CD3 ζ -绿色荧光蛋白(GFP)质粒中^[13],以构建 pCDH-BCMA-CAR-GFP 表达载体质粒,同时以 pCDH-GFP 载体质粒为空白对照。将 pCDH-GFP 或 pCDH-BCMA-CAR-GFP 表达载体质粒与包装质粒(美国 Invitrogen 公司产品)及聚乙烯亚胺(美国 Polysciences 公司产品)共同转染 293T 细胞以制备重组慢病毒颗粒。含有慢病毒的上清液于更换培养液后 24 和 48 h 收集,于 4 °C 中 50 000 \times g 超速离心 90 min,以 KBM581 淋巴细胞培养液(美国 Corning 公司产品)重悬慢病毒颗粒,分装后于 -80 °C 储存备用。

三、细胞培养

293T 细胞培养于含 10% 胎牛血清(美国 Biowest 公司产品)的 DMEM 培养液(美国 Gibco 公司产品)中;骨髓瘤细胞系 MM1.S、NCI-H929 细胞和白白血病细胞系 K562 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司产品)中;骨髓瘤细胞系 U266 细胞培养于含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中。

四、人 T 细胞的富集和转染

利用 RossetteSep T 细胞富集液(加拿大 STEM-CELL Technologies 公司产品)和 Ficoll 淋巴细胞分

离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司产品)从健康供者外周血中分离和富集CD3⁺T细胞,并通过APC/Cy7标记的小鼠抗人CD3抗体(美国Biolegend公司产品)于流式细胞分析仪(美国BD公司产品)中检测T细胞纯度。T细胞以 1×10^6 /ml的密度于含5%胎牛血清、100 IU/ml人重组IL-2因子(美国R&D公司产品)和人T细胞激活因子CD3/CD28磁珠(美国Gibco公司产品)的淋巴细胞培养液中培养和刺激24 h后,直接转染BCMA-CAR或者空载体慢病毒和8 μ g/ml聚凝胺(美国Sigma公司产品),并于37 $^{\circ}$ C中1 800 r/min离心90 min。每两天更换一次T细胞培养液并维持细胞密度 3×10^5 /ml。

五、BCMA-CAR蛋白的检测及CAR-T细胞表型分析

通过流式细胞术检测和分析CAR-T细胞表面CAR蛋白的表达及细胞表型。T细胞于慢病毒颗粒感染后的96 h收集,并于流式细胞分析仪中检测GFP的表达率以分析CAR-T细胞的阳性率。通过PE/Cy7标记的小鼠抗人CD4抗体、PerCP-Cy5.5标记的小鼠抗人CD8抗体、PE标记的小鼠抗人CCR7抗体和Pacific Blue标记的小鼠抗人CD45RA抗体(均购自美国Biolegend公司)标记T细胞,于流式细胞分析仪中检测不同亚型T细胞的比例^[14]。

六、BCMA-CAR-T细胞的体外功能实验

本实验选用BCMA⁺骨髓瘤细胞系NCI-H929、MM1.S和U266细胞作为阳性靶细胞,BCMA⁻的K562细胞作为阴性靶细胞;选用BCMA-CAR-T细胞和空载体T细胞(vector-T)为效应细胞。

1. BCMA-CAR-T细胞与骨髓瘤细胞系共培养: T细胞与靶细胞按照一定的效靶比(1:4、1:8、1:16和1:32)共培养于含5%胎牛血清的淋巴细胞培养液中,24 h和48 h后分别收集共培养体系中的细胞并通过APC标记的小鼠抗人BCMA抗体(美国Biolegend公司产品)和APC/Cy7标记的小鼠抗人CD3抗体检测共培养体系中T细胞和靶细胞的比例。BCMA阳性细胞的比例代表靶细胞的残余比例,从而反映BCMA-CAR-T细胞对骨髓瘤细胞系的杀伤作用。

2. BCMA-CAR-T细胞与原代骨髓瘤细胞共培养: T细胞与MM患者来源的原代细胞以1:4的效靶比共培养48 h,流式细胞术检测共培养体系中BCMA⁺细胞的残余比例。

3. 脱颗粒实验: T细胞与靶细胞以1:1的效靶

比,共培养于含50 IU/ml人重组IL-2因子和PE标记的小鼠抗人CD107a抗体(美国Biolegend公司产品)的培养液中(总体积为200 μ l),1 h和4 h后分别加入莫能霉素(美国Sigma公司产品)和APC/Cy7标记的小鼠抗人CD3抗体并进行流式细胞术检测,分析CD3⁺GFP⁺T细胞中CD107a阳性T细胞的比例。

4. ELISA法检测细胞因子释放情况: 收集T细胞与靶细胞以1:4的效靶比共培养48 h后的上清液,通过ELISA法检测上清液中干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素2(IL-2)的分泌情况。

七、小鼠骨髓瘤模型的构建及BCMA-CAR-T细胞治疗

从中国医学科学院实验动物所购得12只6~8周龄雌性NOD/SCID小鼠,200 cGy照射后经尾静脉接种MM1.S细胞(1×10^7 /只)。接种MM1.S细胞后的第14天,按照小鼠体重将其随机分为两组,于第14、21和28天分别经尾静脉注射BCMA-CAR-T细胞或vector-T细胞(5×10^6 /只)进行治疗。每周测量小鼠体重,观察小鼠发病情况并记录小鼠总生存期。小鼠发病症状包括腹泻、后肢瘫痪和体重减轻。对死亡小鼠进行解剖并取心、脾、肺、肾和骨髓进行流式细胞术分析和组织病理学检查。本实验中所有动物实验均经北京协和医学院动物保护和委员会批准。

八、统计学处理

所有统计学处理均采用GraphPad Prism 6.01软件完成。结果以均值 \pm 标准差表示,组间比较采用*t*检验,生存曲线采用Kaplan-Meier分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. BCMA-CAR慢病毒载体构建: 本实验成功构建了以单体形式的APRIL胞外区片段为抗原结合区、4-1BB为共刺激分子、GFP为标记基因的BCMA-CAR慢病毒表达载体,通过GFP测得BCMA-CAR慢病毒感染人T细胞的效率为50%~60%。采用锥虫蓝染色和细胞计数方式,测得BCMA-CAR-T和vector-T细胞在慢病毒感染后2周内可增殖1 000倍以上(图1A)。BCMA-CAR-T细胞组和vector-T细胞组中CD4⁺和CD8⁺T细胞比例差异无统计学意义(CD4⁺T细胞比例: 39%对35%, $P = 0.15$; CD8⁺T细胞比例: 54%对59%, $P = 0.10$) (图1B)。以CCR7和CD45RA为表面标记,检测和

分析 BCMA-CAR-T 和 vector-T 细胞中记忆性 T 细胞亚群 (Tcm、Tem、Temra 和 naive T 细胞) 的比例。结果显示,与 vector-T 细胞相比,BCMA-CAR-T 细胞组的效应性记忆 T 细胞 (Tem, CCR7⁻CD45RA⁻) 比例较 vector-T 细胞组高 ($P=0.04$) (53.9% 对 34.7%,图 1C)。

2. BCMA-CAR-T 细胞对 BCMA⁺骨髓瘤细胞系具有特异性杀伤作用:选用 BCMA⁺骨髓瘤细胞系 NCI-H929、MM1.S 和 U266 细胞作为阳性靶细胞,BCMA⁻的 K562 细胞系作为阴性靶细胞,并通过流式细胞术检测细胞表面 BCMA 的表达情况 (图 2A)。BCMA-CAR-T 细胞和 vector-T 细胞分别与骨髓瘤细胞系共培养 48 h。对于 BCMA-CAR-T 细胞组,当效靶比为 1:4 和 1:8 时,BCMA⁺细胞几乎检测不到;当效靶比低至 1:16 时,仅有 30% 的 BCMA⁺靶细胞存活;而与 K562 细胞共培养的体系中,BCMA-CAR-T 细胞组和 vector-T 细胞组中靶细胞比例随时间变化不大 (图 2B)。

采用 ELISA 法检测共培养上清液中细胞因子的释放情况。与 BCMA⁺骨髓瘤细胞系共培养的上清液中,BCMA-CAR-T 细胞组释放的 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 水平较 vector-T 细胞组显著升高,而这些因子在 T 细胞与 K562 细胞共培养的上清液中几乎检测不到 (图 2C)。

检测共培养体系中 T 细胞表面 CD107a 分子的表达情况^[15]。与 BCMA⁺骨髓瘤细胞系以 1:1 的效靶比共培养 5 h 后,BCMA-CAR-T 细胞表面 CD107a 的表达较 vector-T 细胞组显著升高 (两组细胞与 MM1.S、H929 和 U266 细胞共培养的脱颗粒水平分别为 33.30% 对 5.62%、16.97% 对 2.95%、25.87% 对 2.94%, P 值均 <0.001) (图 2D)。

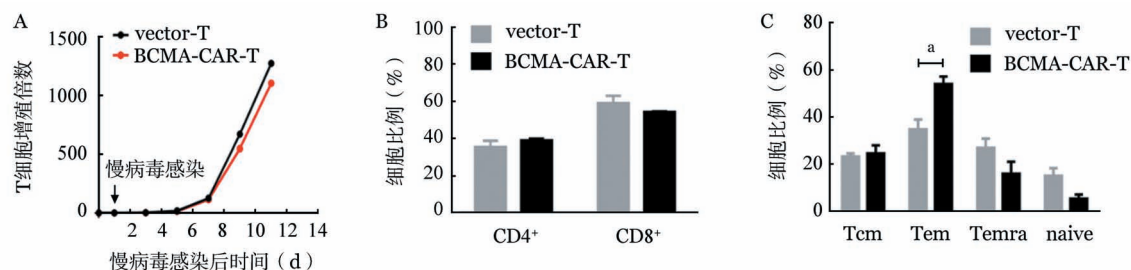
3. BCMA-CAR-T 细胞能延长骨髓瘤小鼠的生

存期:将 MM1.S 细胞通过尾静脉接种至 NOD/SCID 小鼠 (1×10^7 /只),成功构建骨髓瘤小鼠模型。在移植后第 14、21、28 天,BCMA-CAR-T 和 vector-T 组小鼠分别给予 T 细胞 (5×10^6 /只) 治疗。在 T 细胞治疗后的第 14 天,BCMA-CAR-T 和 vector-T 细胞治疗组小鼠体重均无明显变化 (图 3A),提示 CAR-T 细胞治疗的安全性。随着疾病的进展,MM1.S 细胞接种后第 42 天, vector-T 治疗组小鼠体重显著降低 (BCMA-CAR-T 和 vector-T 细胞治疗组小鼠平均体重分别为 21.63 g 和 18.68 g) (图 3A)。流式细胞术和组织病理学检查显示,所有移植小鼠在疾病发展末期均出现浸润性骨髓瘤,骨髓、脾脏、肾脏甚至心脏均可见 BCMA⁺细胞广泛浸润 (图 3B、3C)。BCMA-CAR-T 细胞治疗组小鼠的中位生存期 (87.5 d) 较 vector-T 细胞治疗组 (67.5 d) 显著延长 ($P < 0.001$) (图 3D)。

4. BCMA-CAR-T 细胞对 BCMA⁺原代骨髓瘤细胞具有显著细胞毒作用:将 BCMA-CAR-T 细胞和 vector-T 细胞分别与 4 例 MM 患者来源的 BMMNC 共培养。流式细胞术检测 4 例患者 BMMNC 表面 CD138 和 BCMA 的表达情况 (表 1、图 4A)。BCMA-CAR-T 细胞对 BCMA⁺原代肿瘤细胞的杀伤作用优于 vector-T 细胞 (肿瘤细胞残余比例 16.00% 对 66.85%, $P=0.003$) (图 4B),并伴随更为强烈的脱颗粒效应 (图 4C) 和细胞因子释放 (图 4D)。

讨 论

MM 是一种起源于骨髓中恶性浆细胞的血液系统肿瘤,常伴有多发性溶骨性病理改变、贫血、高钙血症、肾脏损伤等症状。由于恶性肿瘤是一种克隆性疾病,随着时间的推移,肿瘤细胞内部会形成多种亚克隆,所以肿瘤细胞的遗传和表型异质性常常



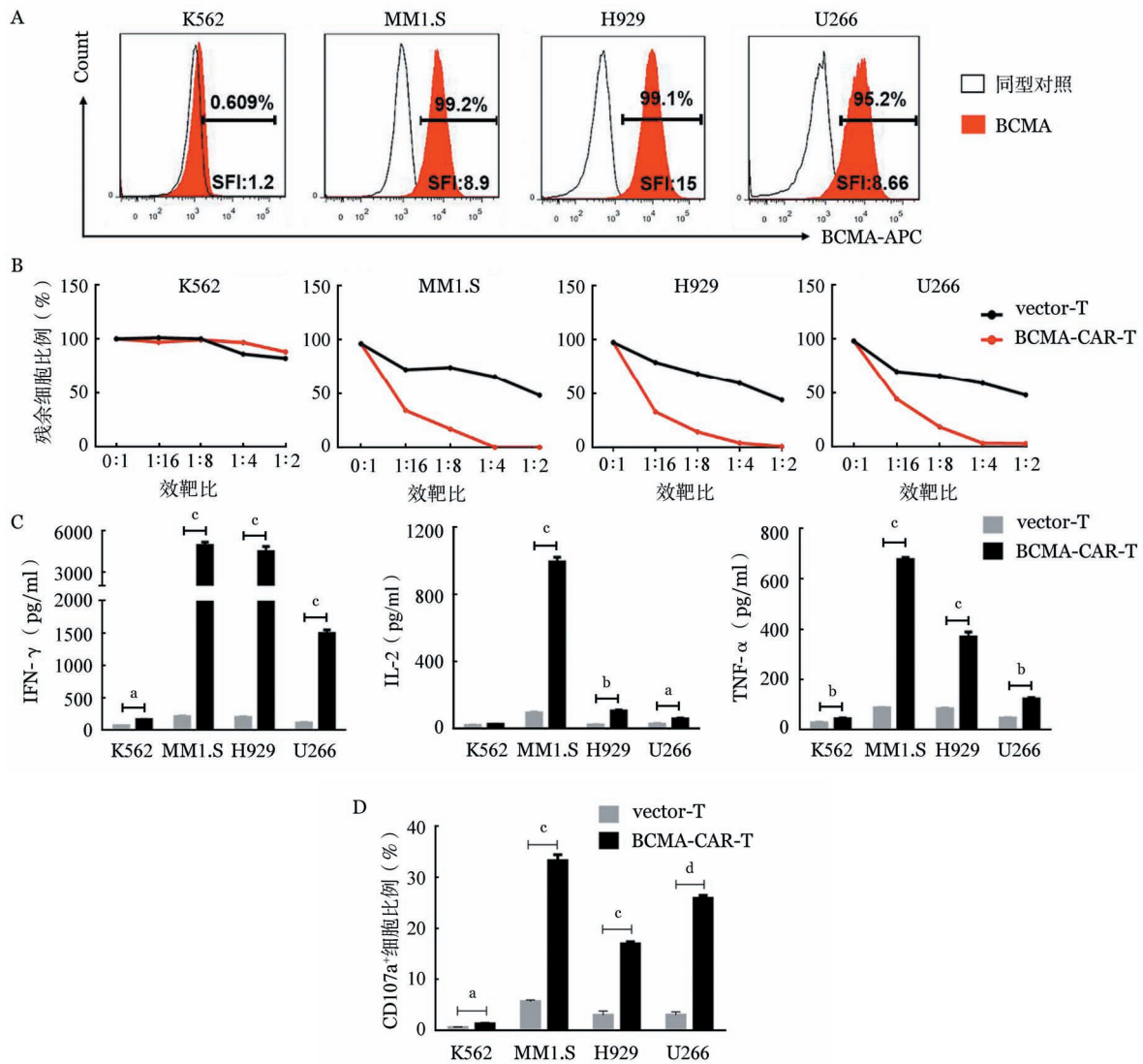
A: 锥虫蓝染色和细胞计数检测 CAR-T 和 vector-T 细胞增殖倍数。B: BCMA-CAR-T 和 vector-T 细胞中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞比例。C: BCMA-CAR-T 和 vector-T 细胞中记忆性 T 细胞亚群比例。Tcm: 中央记忆型 T 细胞, CCR7⁺CD45RA⁻; Tem: 效应记忆型 T 细胞, CCR7⁻CD45RA⁻; Temra: 终末分化效应记忆型 T 细胞, CCR7⁺CD45RA⁺; naive T: 初始 T 细胞, CCR7⁻CD45RA⁺。* $P < 0.05$

图 1 BCMA-CAR-T 细胞的构建及亚型分析

出现在同一患者体内^[16]。因此近几年来,T细胞治疗等方法已被应用于血液系统恶性肿瘤患者,以获得更好的疗效和降低治疗相关死亡率。

在本研究中,我们以BCMA的天然特异性高亲和力配体分子APRIL为抗原识别区、4-1BB为共刺激分子构建了一种新的靶向BCMA的第二代CAR。尽管APRIL以同源三聚体的形式与BCMA结合^[17],本实验以APRIL的单体分子形式构建抗原识别区,制备CAR-T细胞,研究其对MM细胞的特异性杀伤作用。体外共培养实验中,BCMA-CAR-T细胞对BCMA阳性的骨髓瘤细胞系NCI-H929、

MM1.S和U266均有显著而特异的杀伤效果,并伴随强烈的脱颗粒效应及IFN- γ 、TNF- α 和IL-2等细胞因子释放,而对BCMA表达阴性的K562细胞系无明显的杀伤作用。同时,BCMA-CAR-T细胞对MM患者来源的BCMA⁺肿瘤细胞也具有杀伤作用。小鼠体内移植实验显示,BCMA-CAR-T细胞治疗接种MM1.S细胞的NOD/SCID小鼠可以显著延长小鼠的生存期,且在治疗过程中无明显的不良反应,提示BCMA-CAR-T细胞治疗是安全的。Lee等^[12]构建了一种以APRIL的同源二聚体为抗原结合区的靶向BCMA和TACI的第三代CAR结构,并研究其



A:流式细胞术检测骨髓瘤细胞系MM1.S、NCI-H929、U266和白白血病细胞系K562表面BCMA的表达,对应的同型异构体为阴性对照。B:BCMA-CAR-T细胞对BCMA⁺骨髓瘤细胞系和BCMA⁻K562细胞的杀伤作用。共培养48 h,效靶比为1:4、1:8、1:16和1:32。C:T细胞与靶细胞以1:4的效靶比共培养48 h后,ELISA法检测细胞因子IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的释放水平。D:流式细胞术检测脱颗粒过程中CD3⁺GFP⁺CD107a⁺T细胞的比例。^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.005$,^d $P < 0.001$

图2 BCMA-CAR-T细胞对BCMA⁺骨髓瘤细胞系的特异性细胞毒作用

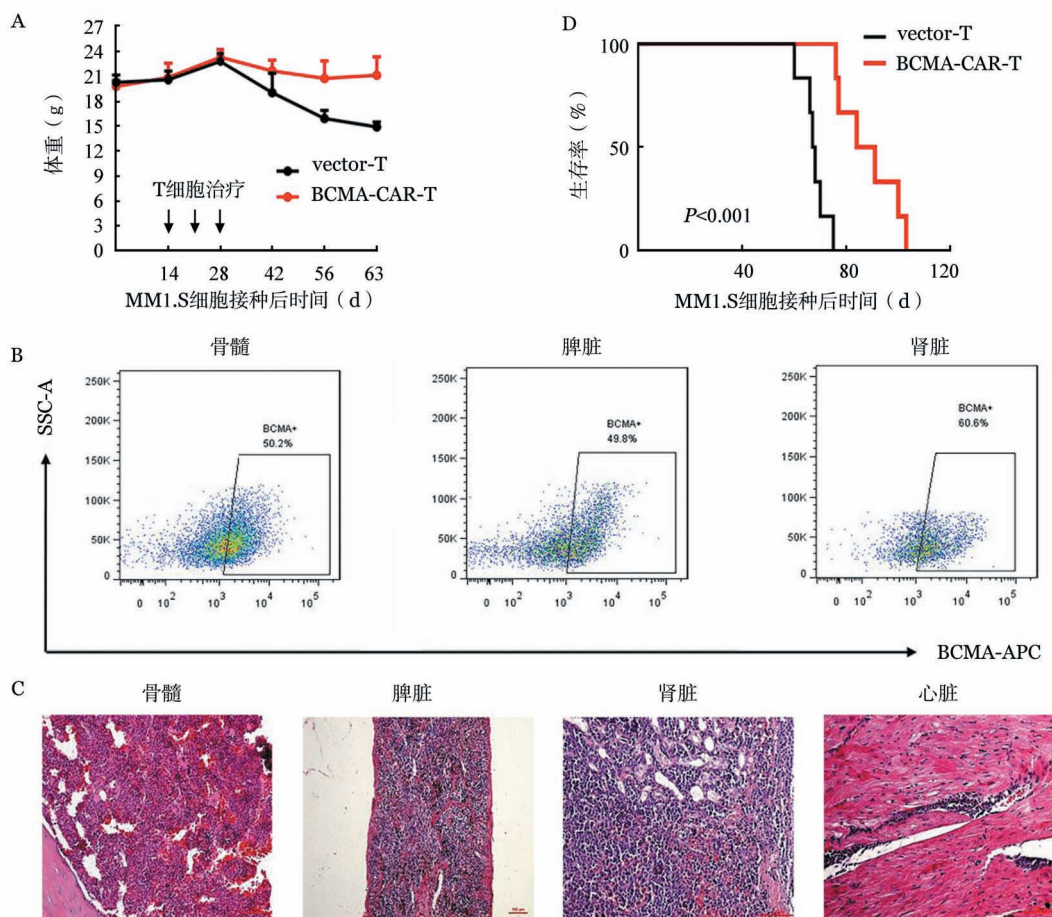


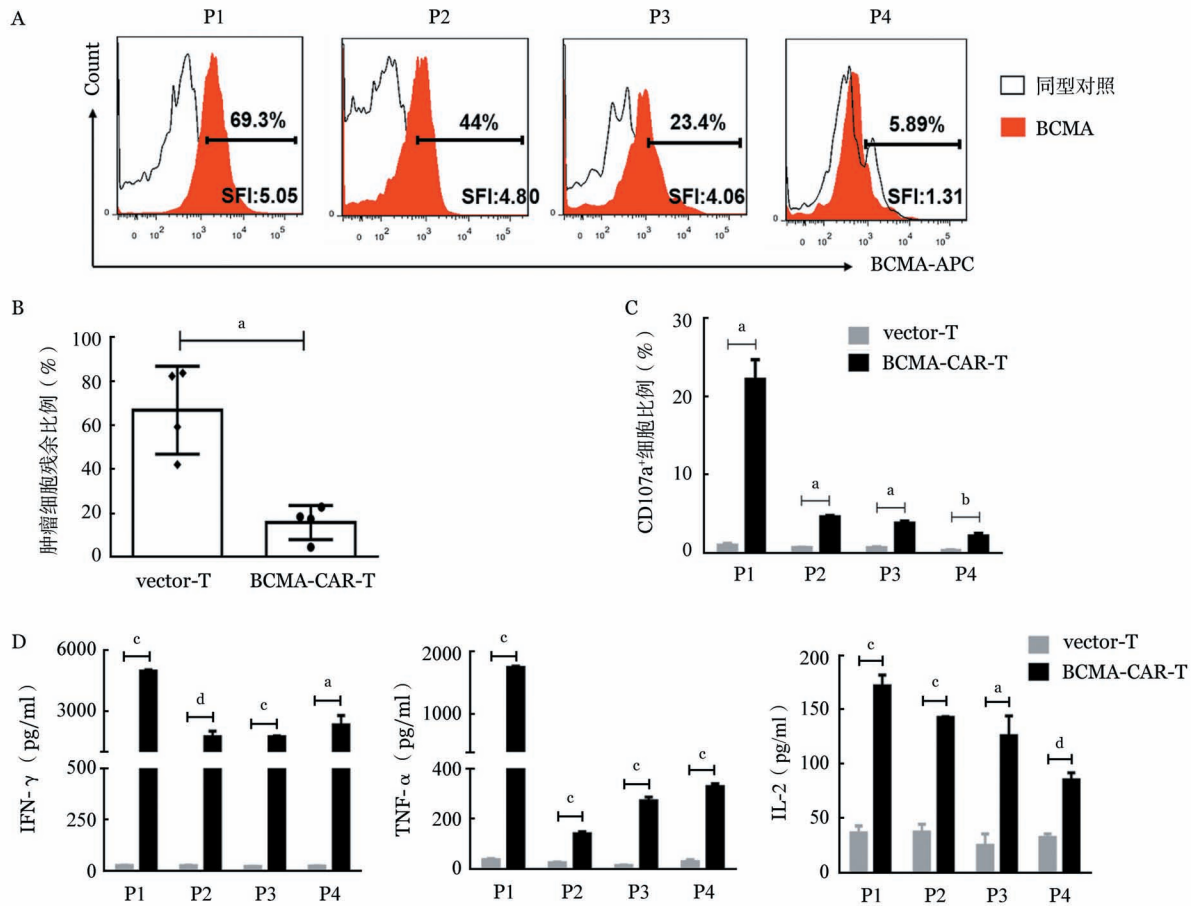
图3 BCMA-CAR-T细胞对骨髓瘤小鼠体重、BCMA⁺细胞、生存期的影响及主要脏器病理改变

治疗MM的作用。本实验中设计的BCMA-CAR较Lee等构建的CAR结构简单,感染效率高,且在低效靶比的情况下仍能发挥强大的抗肿瘤作用,这意味着本实验中以单体形式的APRIL胞外区为抗原识别区的BCMA-CAR能在低剂量的条件下有效地靶向结合并杀伤BCMA阳性的MM细胞,从而减少治疗相关不良反应。

BCMA作为近几年来治疗MM的靶点备受关注,许多以scFv为抗原结合区的BCMA-CAR-T细胞治疗正在进行临床前和临床研究,并显示出有效的抗MM作用^[11,18]。Friedman等^[18]以scFv为抗原识别区构建BCMA-CAR-T细胞,与靶细胞共培养时效率比高达10:1;而Bu等^[19]设计的以scFv为抗原结合区的BCMA-CAR-T细胞,以较低的效率比1:4进行共培养时也能有效杀伤BCMA⁺细胞。由于以特异性抗体为抗原结合区的CAR-T细胞识别的抗

原表位及与抗原的亲合力不同,CAR-T细胞对靶细胞的杀伤效果存在较大的差异。然而,APRIL是BCMA的天然特异性高亲和力配体,以APRIL为抗原结合区构建的CAR-T细胞在低效率比情况下仍能展现出强大的杀伤效应,且能显著延长BCMA阳性骨髓瘤小鼠的生存期。

本实验构建的以单体形式的APRIL为抗原结合区的BCMA-CAR-T细胞对BCMA阳性的肿瘤细胞具有显著而强大的杀伤作用。然而该CAR-T细胞用于治疗MM患者的效果可能会受以下因素影响:患者骨髓微环境中的APRIL会与BCMA-CAR-T细胞表面的APRIL竞争性结合肿瘤细胞表面的BCMA从而阻断CAR-T细胞与肿瘤细胞的结合,并最终降低CAR-T细胞的治疗效果;MM患者体内APRIL水平较健康人显著升高^[20],而BCMA-CAR-T细胞表面的抗原结合区APRIL与BCMA的亲合力



A: 流式细胞术检测4例多发性骨髓瘤患者(P1~P4)骨髓单个核细胞中CD138⁺细胞表面BCMA的表达,对应的同型异构体为阴性对照。SFI:特定荧光强度,SFI达到或超过1.30为BCMA阳性。B:BCMA-CAR-T细胞对原代骨髓瘤细胞的杀伤作用。T细胞与靶细胞以1:4的效靶比共培养48h。C:流式细胞术检测T细胞与原代骨髓瘤细胞1:1共培养5h后CD3⁺GFP⁺CD107a⁺T细胞比例。D:BCMA-CAR-T和vector-T细胞与原代骨髓瘤细胞1:4共培养48h后ELISA法检测共培养上清液中IFN- γ 、TNF- α 和IL-2的分泌情况。^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.001$,^d $P < 0.005$

图4 BCMA-CAR-T细胞对BCMA⁺原代骨髓瘤细胞的细胞毒作用

与血液循环中的APRIL相近,故BCMA-CAR-T细胞不具有与MM细胞优先结合和发挥杀伤作用的优势。为改善BCMA-CAR-T细胞临床应用的效果,将其与APRIL拮抗剂联合使用或使用亲和力更强的结构作为抗原结合区而优化CAR设计可能是一种有效的方法。

此外,本研究中BCMA-CAR-T细胞与BCMA⁺细胞共培养时伴随显著的细胞因子释放,可能会导致一些严重的治疗相关不良反应,尤其是细胞因子释放综合征(CRS)——CAR-T细胞治疗中最严重的短期不良反应,为CAR-T细胞治疗带来很大的风险^[21]。最近,Staedtke等^[22]发现,可通过降低血液循环中儿茶酚胺的水平控制CRS的程度。然而到目前为止,仍无具体的临床指南指导CRS的管理,在

临床实践中应用CAR-T细胞治疗时应从小剂量开始输注,并逐渐增加剂量,同时运用预防手段、支持治疗和IL-6受体拮抗剂以控制CRS^[23]。

综上,以APRIL为抗原识别区构建的BCMA-CAR-T细胞能有效而特异性地靶向和杀伤BCMA阳性的MM细胞,显著延长BCMA阳性的MM小鼠的生存期,提示BCMA是治疗MM的有效靶点,以APRIL为抗原结合区构建的CAR-T细胞能发挥强大的抗MM作用。

参考文献

[1] Tai YT, Acharya C, An G, et al. APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment [J]. Blood, 2016, 127 (25): 3225-3236. DOI: 10.1182/blood-2016-01-691162.

- [2] Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies [J]. *Blood*, 2008, 111 (5):2516-2520. DOI: 10.1182/blood-2007-10-116129.
- [3] Mikkilineni L, Kochenderfer JN. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma [J]. *Blood*, 2017, 130(24): 2594-2602. DOI: 10.1182/blood-2017-06-793869.
- [4] Tai YT, Anderson KC. Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma [J]. *Immunotherapy*, 2015, 7(11):1187-1199. DOI: 10.2217/imt.15.77.
- [5] O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells [J]. *J Exp Med*, 2004, 199(1):91-98. DOI: 10.1084/jem.20031330.
- [6] Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(8): 2048-2060. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2422.
- [7] Hipp S, Tai YT, Blanset D, et al. A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis in vitro and in vivo [J]. *Leukemia*, 2017, 31(10): 2278. DOI: 10.1038/leu.2017.219.
- [8] Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL, et al. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells [J]. *Blood*, 2008, 111 (5):2755-2764. DOI: 10.1182/blood-2007-09-110858.
- [9] June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer [J]. *Science*, 2018, 359 (6382):1361-1365. DOI: 10.1126/science.aar6711.
- [10] 李津杞, 顾海慧, 杨建民, 等. 嵌合抗原受体修饰的T细胞治疗肿瘤的不良反应及相关治疗方案的研究进展 [J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37 (2): 169-173. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.02.019.
- [11] Ali SA, Shi V, Maric I, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma [J]. *Blood*, 2016, 128 (13):1688-1700. DOI: 10.1182/blood-2016-04-711903.
- [12] Lee L, Draper B, Chaplin N, et al. An APRIL-based chimeric antigen receptor for dual targeting of BCMA and TACI in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2018, 131 (7):746-758. DOI: 10.1182/blood-2017-05-781351.
- [13] An N, Tao Z, Li S, et al. Construction of a new anti-CD19 chimeric antigen receptor and the anti-leukemia function study of the transduced T cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (9):10638-10649. DOI: 10.18632/oncotarget.7079.
- [14] Gupta S, Su H, Bi R, et al. Life and death of lymphocytes: a role in immunosenescence [J]. *Immun Ageing*, 2005, 2:12. DOI: 10.1186/1742-4933-2-12.
- [15] Betts MR, Brenchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation [J]. *J Immunol Methods*, 2003, 281 (1-2):65-78. DOI: 10.1016/s0022-1759(03)00265-5.
- [16] Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma [J]. *Nat Commun*, 2014, 5:2997. DOI: 10.1038/ncomms3997.
- [17] Wallweber HJ, Compaan DM, Starovasnik MA, et al. The crystal structure of a proliferation-inducing ligand, APRIL [J]. *J Mol Biol*, 2004, 343 (2): 283-290. DOI: 10.1016/j.jmb. 2004. 08.040.
- [18] Friedman KM, Garrett TE, Evans JW, et al. Effective Targeting of Multiple B-Cell Maturation Antigen-Expressing Hematological Malignancies by Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor T Cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(5):585-601. DOI: 10.1089/hum.2018.001.
- [19] Bu DX, Singh R, Choi EE, et al. Pre-clinical validation of B cell maturation antigen (BCMA) as a target for T cell immunotherapy of multiple myeloma [J]. *Oncotarget*, 2018, 9 (40):25764-25780. DOI: 10.18632/oncotarget.25359.
- [20] Bolkun L, Lemancewicz D, Jablonska E, et al. BAFF and APRIL as TNF superfamily molecules and angiogenesis parallel progression of human multiple myeloma [J]. *Ann Hematol*, 2014, 93(4):635-644. DOI: 10.1007/s00277-013-1924-9.
- [21] Frey N. Cytokine release syndrome: Who is at risk and how to treat [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2017, 30(4):336-340. DOI: 10.1016/j.beha.2017.09.002.
- [22] Staedtke V, Bai RY, Kim K, et al. Disruption of a self-amplifying catecholamine loop reduces cytokine release syndrome [J]. *Nature*, 2018, 564 (7735):273-277. DOI: 10.1038/s41586-018-0774-y.
- [23] Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management [J]. *Blood Rev*, 2019, 34:45-55. DOI: 10.1016/j.blre.2018.11.002.

(收稿日期:2019-07-20)

(本文编辑:董文革)