

靶向CLL-1嵌合抗原受体T细胞的构建及其功能验证

柴笑 金鑫 赵明峰

天津市第一中心医院,天津 300192

通信作者:赵明峰,Email:mingfengzhao@sina.com

【摘要】 目的 探索开发一种靶向CLL-1的嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)并验证其功能。方法 通过流式细胞术检测急性髓系白血病(AML)细胞系和AML原代细胞CLL-1靶点的表达水平。构建CLL-1 CAR载体并制备出相应慢病毒,感染激活后T细胞生产出CAR-T细胞,并通过体外和体内实验验证CLL-1 CAR-T细胞的功能。结果 AML细胞系和原代AML细胞中均表达CLL-1。制备的CLL-1 CAR-T细胞转导率为77.82%,在AML细胞系以及AML原代细胞中,CLL-1 CAR-T细胞能明显特异性杀伤表达CLL-1的靶细胞系和原代肿瘤细胞。相对于未转导的T细胞,CLL-1 CAR-T细胞在杀伤靶细胞和原代肿瘤细胞时分泌IL-6、IFN- γ 等细胞因子水平更高(P 值均 <0.001)。在AML人源性异种移植小鼠模型中,相对于未转导的T细胞,CLL-1 CAR-T细胞表现出有效的抗白血病活性并延长小鼠存活时间[未达到对22(95% CI 19~24)d, $P=0.002$]。结论 靶向CLL-1的CAR-T细胞成功开发并具有较好的肿瘤杀伤作用。

【关键词】 白血病,髓样,急性; C型凝集素样分子1; 嵌合抗原受体; 细胞治疗

基金项目:天津市医学重点学科(专科)建设项目;国家自然科学基金(81970180);天津市科学技术局科技支撑重点项目(20YFZCSY00800)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.02.003

Development and functional verification of CAR-T cells targeting CLL-1

Chai Xiao, Jin Xin, Zhao Mingfeng

Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Zhao Mingfeng, Email: mingfengzhao@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the development of a CAR-T cells targeting CLL-1 and verify its function. **Methods** The expression levels of CLL-1 targets in cell lines and primary cells were detected by flow cytometry. A CLL-1 CAR vector was constructed, and the corresponding lentivirus was prepared. After infection and activation of T cells, CAR-T cells targeting CLL-1 were produced and their function was verified in vitro and in vivo. **Results** CLL-1 was expressed in acute myeloid leukemia (AML) cell lines and primary AML cells. The transduction rate of the prepared CAR T cells was 77.82%. In AML cell lines and AML primary cells, CLL-1-targeting CAR-T cells significantly and specifically killed CLL-1-expressing cells. Compared to untransduced T cells, CAR-T cells killed target cells and secreted inflammatory cytokines, such as interleukin-6 and interferon- γ , at significantly higher levels ($P < 0.001$). In an in vivo human xenograft mouse model of AML, CLL-1 CAR-T cells also exhibited potent antileukemic activity and induced prolonged mouse survival compared with untransduced T cells [not reached vs 22 days (95% CI 19–24 days), $P = 0.002$]. **Conclusion** CAR-T cells targeting CLL-1 have been successfully produced and have excellent functions.

【Key words】 Leukemia, myeloid, acute; C-type lectin-like molecule 1; Chimeric antigen receptor; Cell therapy

Fund program: Tianjin Key Medical Discipline (Specialty) Construction Project; National Natural Science Foundation of China (81970180); Key Science and Technology Support Project of Tianjin Science and Technology Bureau (20YFZCSY00800)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.02.003

急性髓系白血病(AML)是成人最常见的急性白血病类型,目前的主要治疗措施有化疗、基因靶向治疗和造血干细胞移植,复发难治是影响患者生存的重要因素^[1-2]。嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)治疗是通过基因工程的方法将一种或多种特异性嵌合抗原受体(CAR)表达于T细胞使其可靶向作用于肿瘤细胞的过继免疫疗法^[3-4]。CAR-T细胞免疫治疗是近年来肿瘤免疫治疗的里程碑,尤其在B细胞血液恶性肿瘤的治疗中取得了显著的疗效^[5]。近年来越来越多的靶点用于AML的免疫治疗,如CD33、CD123、CLL-1、CD47、CD70和TIM3^[6-16]。其中,CLL-1选择性在白血病干细胞(LSC)表面表达,而在正常造血干细胞中不表达,Morsink等^[17]研究证实CLL-1是AML的理想靶标。本研究,我们开发了一种靶向CLL-1的CAR结构并进行了功能验证,现报道如下。

材料与方法

1. 细胞系和原代细胞:HEK-293T细胞培养于含10%胎牛血清(FBS)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM),THP1、U937、MOLM13细胞培养于含10% FBS的RPMI 1640培养基。培养基购自美国Gibco公司。所有细胞系均购于美国模式培养物集存库(ATCC),在37℃、5% CO₂和95%湿度条件下培养。按照机构指南获得知情同意后,从本单位的AML患者骨髓和健康供者的外周血获取单个核细胞样本。

2. 质粒构建:靶向CLL-1的单链可变区片段(ScFv)序列来源于M26克隆。CLL-1 CAR结构由CLL-1 ScFv、CD8a铰链区和跨膜区、CD137共刺激信号、CD3 ζ 链胞内信号结构域组成,将CLL-1 CAR序列克隆到pCDH-MND-MCS-T2A-Puro骨架质粒中,从而获得慢病毒转移载体。慢病毒质粒的制备和滴度检测采用美国GeneCopoeia公司的试剂盒完成。

3. CAR-T细胞的制备:采用CD3免疫磁珠(德国Miltenyi公司)从外周血单核细胞中分离出CD3⁺T细胞,使用CD3/CD28刺激磁珠和IL-2(美国Thermo Fisher公司)扩增T细胞。24 h后通过含有抗CLL-1 CAR基因的慢病毒质粒感染激活后的T细胞,然后在转导后第3天检测转导效率。

4. CLL-1 CAR-T细胞检测:将细胞样品用藻红蛋白(PE)标记的多克隆山羊抗小鼠IgG(H+L)抗体(美国Affinity公司产品)染色来检测CAR表达,使

用Coulter Altra流式细胞仪(美国Beckman公司产品)配套的CytExpert软件进行分析。

5. 细胞的活性和增殖能力:取 5×10^5 的细胞,离心后弃上清,加入100 μ l PBS重悬细胞,加入5 μ l碘化丙啶染色,室温孵育5 min后加入PBS清洗2次。通过流式细胞术分析细胞活性,计算细胞增殖率。

6. 细胞因子评估:效应细胞与靶细胞共孵育24 h后,收集24孔板中细胞离心后的上清液,用CBA试剂盒测定其细胞因子(包括IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 、IFN- γ)表达水平。使用NovoCyte流式细胞仪(Agilent)进行检测与分析。

7. 细胞毒性测定:采用GFP标记的肿瘤细胞与CLL-1 CAR-T细胞或未转导的T细胞按一定效靶比以相同体积和相同肿瘤细胞数量进行共孵育。24 h后,取一定体积的细胞,通过流式细胞术检测肿瘤细胞的数量,通过以下公式计算肿瘤细胞杀伤作用:(空白对照孔肿瘤细胞数-实验孔肿瘤细胞数)/空白对照孔肿瘤细胞数 $\times 100\%$ 。

8. 小鼠肿瘤模型:10只6~8周龄的雄性NSG小鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,随机分为两组,每组5只,通过尾静脉注射 3×10^6 本实验室自行保存的荧光素酶表达的MOLM13细胞构建AML模型。3 d后,分别注入 5×10^6 CLL-1 CAR-T细胞和未转导的T细胞进行治疗。为检测小鼠肿瘤负荷,在指定的时间点,每只小鼠腹腔内注射3 mg D-荧光素(美国Sigma公司产品),并在10 min后使用IVIS Imager生物活体成像仪(德国PerkinElmer公司)对小鼠进行活体成像。

9. 统计学处理:使用GraphPad Prism进行统计学分析。服从正态分布的数据以均值 \pm 标准差表示,组间比较使用单因素方差分析或独立样本 t 检验。使用Kaplan-Meier法绘制生存曲线。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、AML细胞系和原代AML细胞中CLL-1表达
为了验证CLL-1是针对AML的CAR-T细胞治疗的靶抗原,我们首先评估了AML细胞系和原代AML细胞中CLL-1的表达。结果显示,慢性髓性白血病细胞株K562细胞不表达CLL-1,将其用作阴性对照。几种不同强度的AML细胞系(THP1、U937、MOLM13)均表达CLL-1(图1)。我们进一步分析了10例初发AML患者(5例M₅、3例M₂、2例M₄)的

骨髓样本中原代 AML 细胞 CLL-1 的表达,大部分患者的 AML 细胞较高表达 CLL-1(图 1B)。

二、CLL-1 CAR-T 细胞的制备

本研究设计的 CLL-1 CAR 结构由 CLL-1 ScFv、CD8a 铰链区和跨膜区、CD137 共刺激信号、CD3ζ 链胞内信号结构域组成(图 2)。将制备的 CLL-1 CAR-T 细胞采用 IgG(H+L)抗体标记,流式细胞仪检测显示 CLL-1 CAR-T 细胞转导率为 77.82%,提示 CLL-1 CAR-T 细胞成功制备。

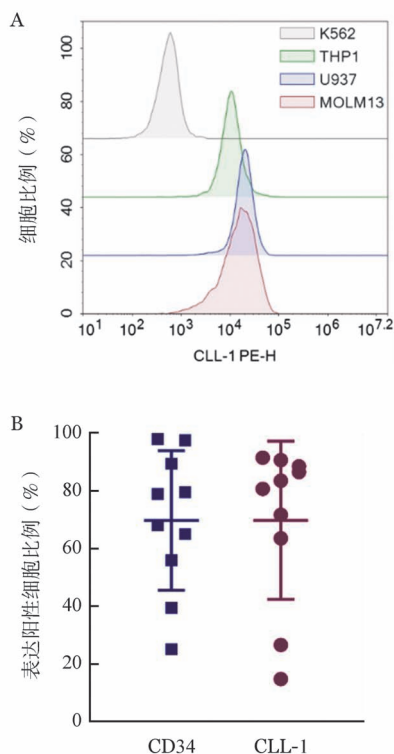
三、CLL-1 CAR-T 功能验证

1. AML 细胞系:将未转导的 T 细胞和 CLL-1 CAR-T 细胞分别与 CLL-1 阳性的 MOLM13 细胞和 CLL-1 阴性的 K562 细胞按不同效靶比共孵育。相比未转导的 T 细胞,CLL-1 CAR-T 细胞可以明显杀伤 MOLM13 细胞,而对 K562 细胞没有杀伤作用(图 3)。检测 1:1 效靶比孵育后上清的细胞因子,IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN-γ、TNF-α 仅在 CLL-1 CAR-T 细胞与 MOLM13 细胞共孵育组中有明显的上调(表 1)。

2. 原代 AML 细胞:将获得的 CLL-1 CAR-T 细胞与 3 例流式细胞术检测 CLL-1 表达超过 90% 的原代 AML 细胞按 1:1 的效靶比共孵育。相比未转导的 T 细胞,CLL-1 CAR-T 细胞可以明显杀伤原代 AML 细胞(图 4A)。检测孵育后上清中 IFN-γ 的表达水平,相比未转导的 T 细胞,CLL-1 CAR-T 细胞与原代 AML 细胞共孵育上清中的 IFN-γ 明显增加(图 4B)。

3. AML 人源性异种移植小鼠模型:为了确认 CLL-1 CAR-T 细胞的体内抗白血病活性,我们使用了 AML 人源性异种移植小鼠模型。结果见图 5,相

比接受未转导的 T 细胞组,接受 CLL-1 CAR-T 细胞的小鼠显示出白血病负荷降低,中位存活时间显著延长[未达到对 22(95% CI 19~24)d, P=0.002]。



A: 流式细胞术检测 K562、THP1、U937、MOLM13 细胞中 CLL-1 表达水平; B: 10 例初发 AML 患者原代 AML 细胞中 CD34 和 CLL-1 的阳性细胞比例

图 1 急性髓系白血病(AML)细胞系和原代 AML 细胞中 CLL-1 的表达水平

讨 论

CLL-1 在 AML 细胞和 LSC 选择性表达,在非血液组织中不表达,为 AML 免疫治疗的理想靶标^[15-17]。

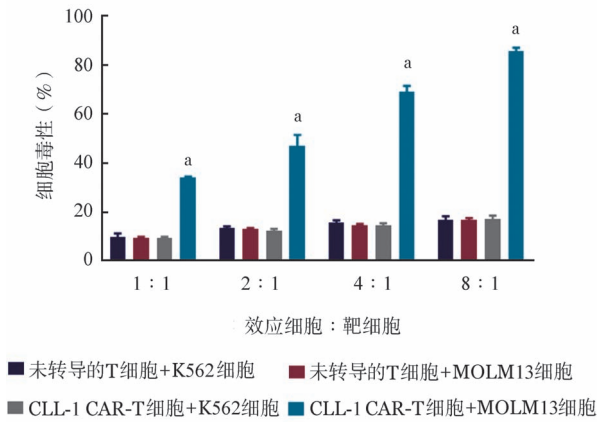


图 2 靶向 CLL-1 的嵌合抗原受体结构示意图

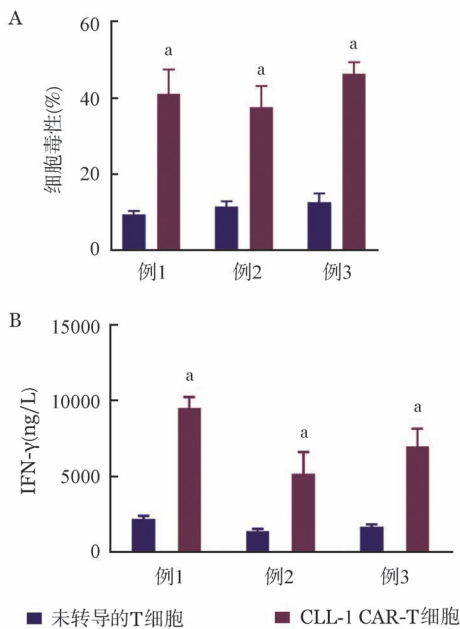
表 1 未转导的 T 细胞和 CLL-1 CAR-T 细胞分别与 MOLM13 和 K562 细胞按 1:1 效靶比共孵育 24 h 后的细胞因子表达水平 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞因子水平					
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IFN-γ	TNF-α
未转导的 T 细胞+K562	2 099.34±90.59	21.55±1.81	14.95±0.39	23.19±0.60	1 336.82±27.93	28.28±0.81
未转导的 T 细胞+MOLM13	2 146.40±41.97	22.87±0.58	14.83±0.33	23.17±0.60	1 327.21±35.20	28.60±0.75
CLL-1 CAR-T+K562	2 145.84±57.70	21.10±1.18	14.49±0.05	22.73±0.13	1 301.75±6.80	27.64±0.66
CLL-1 CAR-T+MOLM13	14 401.94±416.31 ^a	44.20±0.58 ^a	41.46±2.21 ^a	158.09±2.42 ^a	4 770.12±154.09 ^a	119.85±3.65 ^a

注:CLL-1 CAR-T:靶向 CLL-1 的嵌合抗原受体 T 细胞。实验重复 3 次。与其他各组比较,^aP<0.05

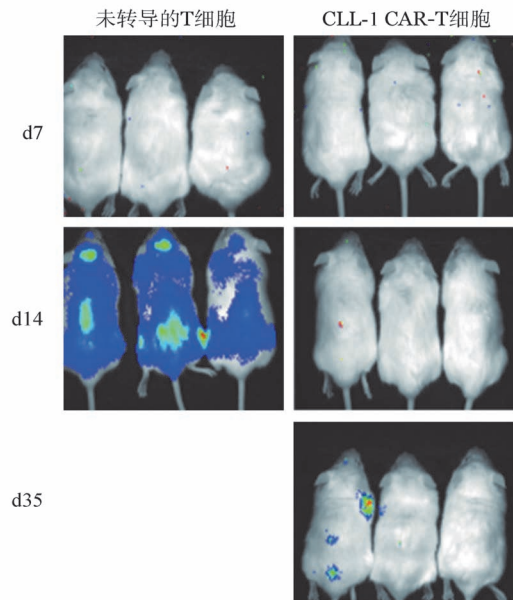


CLL-1 CAR-T细胞:靶向CLL-1的嵌合抗原受体T细胞
 图3 未转导的T细胞和CLL-1 CAR-T细胞分别与MOLM13和K562细胞按不同效靶比共孵育24 h后的细胞毒作用(实验重复3次,与其他各组比较* $P < 0.001$)



CLL-1 CAR-T:靶向CLL-1的嵌合抗原受体T细胞;AML:急性髓系白血病;A:细胞毒作用;B:IFN-γ表达水平
 图4 CLL-1 CAR-T细胞与3例CLL-1阳性的原代AML细胞按1:1的效靶比共孵育24 h的杀伤作用(实验重复3次,* $P < 0.001$)

已有研究者开发和优化了用于AML的CLL-1 CAR-T细胞,并证实CLL-1 CAR-T细胞具有特异性抗白血病活性^[10,12,18]。关于CLL-1 CAR-T的结构,Tashiro等^[18]在比较CD28、4-1BB和OX40的一种或两种组合后,发现4-1BB具有最强的刺激T细胞产生特定细胞因子并维持持久细胞毒性的能力。我们在既往研究的基础上,构建了CLL-1 CAR载体,并制备出高转导效率的CAR-T细胞,其在AML细胞系和原代AML细胞表现出明显的细胞毒作用和



CLL-1 CAR-T细胞:靶向CLL-1的嵌合抗原受体T细胞;AML:急性髓系白血病
 图5 活体成像技术检测CLL-1 CAR-T细胞在AML人源性异种移植小鼠模型中的杀伤作用

细胞因子分泌;随后体内试验显示,在AML小鼠模型中,相对于未转导的T细胞,CLL-1 CAR-T细胞在体内表现出有效的抗白血病活性并延长小鼠存活时间。

安全性是CAR-T细胞研究中的关注重点,尽管CLL-1在正常HSC不表达,但成熟粒细胞高表达CLL-1,从而引发了对CLL-1 CAR-T细胞治疗造成长期粒细胞缺乏,从而易发感染的担忧^[15]。在现有的探索性临床试验报道中,严重粒细胞缺乏是CLL-1 CAR-T细胞治疗的主要毒副作用之一^[19]。为了解决这个问题,一些研究者采用了“开关型”的结构来控制CAR-T细胞毒性^[20-21]。此外,CAR-T细胞对糖皮质激素具有高敏感性,糖皮质激素类药物对CAR-T细胞的杀伤作用可部分中和CAR-T治疗的相关毒性^[22]。

由于AML靶抗原异质性表达,CAR-T细胞疗法靶向单一抗原可能不足以完全清除AML细胞。CD19 CAR-T细胞治疗后疾病复发已经被普遍报道。这种局限性可能需要通过CAR靶向两种或多种肿瘤抗原来解决^[8,23]。靶向CLL-1和其他AML较特异抗原的类似联合可能是一种实用的方法。TIM-3、CD96、CD123等可能可以作为双靶点CAR靶向的第二靶标,从而拓宽易感肿瘤细胞群^[24]。

总之,我们成功制备出活性良好的CLL-1

CAR-T细胞,初步研究显示其具有特异性靶向杀伤AML细胞的作用。CLL-1在AML细胞中表达较为特异,其血液系统外毒性较低,可能是AML细胞治疗中较优的靶点之一;此外,该靶点目前在国内外应用较少,进一步的临床试验探索可能会为AML的细胞免疫治疗带来突破。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 柴笑: 酝酿和设计实验、起草文章、统计分析;金鑫: 实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析;赵明峰: 对文章的知识性内容作批评性审阅、指导、支持性贡献

参考文献

- [1] Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions[J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(2):41. DOI: 10.1038/s41408-021-00425-3.
- [2] Rotiroti MC, Arcangeli S, Casucci M, et al. Acute Myeloid Leukemia Targeting by Chimeric Antigen Receptor T Cells: Bridging the Gap from Preclinical Modeling to Human Studies [J]. *Hum Gene Ther*, 2017, 28 (3):231- 241. DOI: 10.1089/hum.2016.092.
- [3] Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86 (24):10024-10028. DOI: 10.1073/pnas.86.24.10024.
- [4] Wagner DL, Fritsche E, Pulsipher MA, et al. Immunogenicity of CAR T cells in cancer therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18 (6):379-393. DOI: 10.1038/s41571-021-00476-2.
- [5] Song EZ, Milone MC. Pharmacology of Chimeric Antigen Receptor- Modified T Cells [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2021, 61:805- 829. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox- 031720-102211.
- [6] Dutour A, Marin V, Pizzitola I, et al. In Vitro and In Vivo Antitumor Effect of Anti-CD33 Chimeric Receptor-Expressing EBV-CTL against CD33 Acute Myeloid Leukemia[J]. *Adv Hematol*, 2012, 2012:683065. DOI: 10.1155/2012/683065.
- [7] Mardiros A, Dos Santos C, McDonald T, et al. T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2013, 122(18):3138-3148. DOI: 10.1182/blood-2012-12-474056.
- [8] Pizzitola I, Anjos-Afonso F, Rouault-Pierre K, et al. Chimeric antigen receptors against CD33/CD123 antigens efficiently target primary acute myeloid leukemia cells in vivo [J]. *Leukemia*, 2014, 28(8):1596-1605. DOI: 10.1038/leu.2014.62.
- [9] Chen L, Mao H, Zhang J, et al. Targeting FLT3 by chimeric antigen receptor T cells for the treatment of acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2017, 31 (8): 1830- 1834. DOI: 10.1038/leu.2017.147.
- [10] Laborda E, Mazagova M, Shao S, et al. Development of A Chimeric Antigen Receptor Targeting C- Type Lectin- Like Molecule-1 for Human Acute Myeloid Leukemia[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11):2259. DOI: 10.3390/ijms18112259.
- [11] Sallman DA, Brayer J, Sagatys EM, et al. NKG2D-based chimeric antigen receptor therapy induced remission in a relapsed/refractory acute myeloid leukemia patient [J]. *Haematologica*, 2018, 103(9):e424-e426. DOI: 10.3324/haematol.2017.186742.
- [12] Wang J, Chen S, Xiao W, et al. CAR-T cells targeting CLL-1 as an approach to treat acute myeloid leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1):7. DOI: 10.1186/s13045-017-0553-5.
- [13] Gomes-Silva D, Atilla E, Atilla PA, et al. CD7 CAR T Cells for the Therapy of Acute Myeloid Leukemia[J]. *Mol Ther*, 2019, 27 (1):272-280. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.10.001.
- [14] Hofmann S, Schubert ML, Wang L, et al. Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy in Acute Myeloid Leukemia (AML) [J]. *J Clin Med*, 2019, 8 (2):200. DOI: 10.3390/jcm8020200.
- [15] Ma H, Padmanabhan IS, Parmar S, et al. Targeting CLL-1 for acute myeloid leukemia therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12 (1):41. DOI: 10.1186/s13045-019-0726-5.
- [16] Lichtman EI, Du H, Shou P, et al. Preclinical Evaluation of B7-H3-specific Chimeric Antigen Receptor T Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27 (11):3141-3153. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2540.
- [17] Morsink LM, Walter RB, Ossenkoppele GJ. Prognostic and therapeutic role of CLEC12A in acute myeloid leukemia [J]. *Blood Rev*, 2019, 34:26-33. DOI: 10.1016/j.blre.2018.10.003.
- [18] Tashiro H, Sauer T, Shum T, et al. Treatment of Acute Myeloid Leukemia with T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors Directed to C-type Lectin-like Molecule 1 [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(9):2202-2213. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.05.024.
- [19] Ataca Atila P, McKenna MK, Tashiro H, et al. Modulating TNF α activity allows transgenic IL15-Expressing CLL-1 CAR T cells to safely eliminate acute myeloid leukemia [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8 (2):e001229. DOI: 10.1136/jitc-2020-001229.
- [20] Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(3):147-167. DOI: 10.1038/s41571-019-0297-y.
- [21] Philip B, Kokalaki E, Mekkaoui L, et al. A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy [J]. *Blood*, 2014, 124(8):1277-1287. DOI: 10.1182/blood-2014-01-545020.
- [22] Strati P, Ahmed S, Furqan F, et al. Prognostic impact of corticosteroids on efficacy of chimeric antigen receptor T-cell therapy in large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2021, 137(23):3272-3276. DOI: 10.1182/blood.2020008865.
- [23] Arnone M, Konantz M, Hanns P, et al. Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: The Challenges of Phenotypic Heterogeneity [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12 (12):3742. DOI: 10.3390/cancers12123742.
- [24] Tabata R, Chi S, Yuda J, et al. Emerging Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4):1944. DOI: 10.3390/ijms22041944.

(收稿日期:2021-06-06)

(本文编辑:刘爽)