

靶向CD52嵌合抗原受体T细胞的制备及其抗白血病作用研究

刘琰 刘钰 唐克晶 陈兆琪 牟峻黎 徐颖茜 邢海燕 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(中国医学科学院血液学研究所),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,细胞生态海河实验室,天津市血液病细胞治疗研究重点实验室,天津 300020

通信作者:王建祥,Email:wangjx@ihcams.ac.cn

【摘要】 目的 构建一种靶向CD52的嵌合抗原受体T细胞(CD52 CAR-T),探索其对CD52⁺白血病的治疗效果。方法 应用分子克隆技术构建以CD52为抗原结合区的CD52 scFv、4-1BB为共刺激分子的二代CAR-T细胞。慢病毒载体包装后感染T细胞,制备CD52 CAR-T细胞,通过流式细胞术检测CD52 CAR-T细胞CD4、CD8细胞亚群及其分化状态。通过体外杀伤实验、脱颗粒实验及细胞因子的释放等功能实验,观察CD52 CAR-T细胞对CD52⁺白血病细胞的特异性细胞毒作用。结果 ①成功构建了pCDH-CD52 scFv-CD8 α -4-1BB-CD3 ζ -GFP表达载体,感染人T细胞,获得靶向CD52的CAR-T细胞。②感染CD52 CAR表达载体的第6天,T细胞中表达CD52的细胞可被清除[CD52 CAR-T组CD52⁺T细胞为(4.48 \pm 4.99)%,Vector-T组为(56.58 \pm 19.8)%, $P=0.011$]。③CD52 CAR-T的自我杀伤不会影响T细胞的增殖,培养后期CD52 CAR-T组的增殖速度高于Vector-T组。④T细胞表型检测发现CD52 CAR可以促进CAR-T细胞向中心记忆T细胞及效应记忆T细胞分化,减少CAR-T细胞向终末效应细胞分化。⑤CD52 CAR-T细胞与HuT78-19t及MOLT4-19t靶细胞以效靶比1:1共培养24 h,HuT78-19t细胞可被清除,而对MOLT4-19t细胞无明显杀伤作用[(2.66 \pm 1.60)%对(56.66% \pm 5.74)%, $P<0.001$]。⑥脱颗粒实验显示,HuT78-19t细胞对CD52 CAR-T细胞的激活作用显著高于MOLT4-19t细胞[(57.34 \pm 11.25)%对(13.06 \pm 4.23)%, $P<0.001$]。⑦CD52 CAR-T与HuT78-19t细胞共培养48 h上清中细胞因子分泌水平[IFN- γ (3706 \pm 226)pg/ml、TNF- α (1732 \pm 560)pg/ml]远高于MOLT4-19t细胞组[IFN- γ (1577 \pm 846)pg/ml、TNF- α (74 \pm 12)pg/ml](P 值均 <0.01)。结论 该研究成功制备了具有抗白血病作用的CD52 CAR-T细胞,为进一步的靶向CD52的免疫治疗奠定了基础。

【关键词】 CD52; 嵌合抗原受体; 免疫治疗

基金项目:国家重点研发计划(2019YFA0110200);国家自然科学基金(81830005);中国医学科学院创新工程项目(2021-1-I2M-041)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.04.003

Preparation of CD52-targeted chimeric antigen receptor-modified T cells and their anti-leukemia effects

Liu Yan, Liu Yu, Tang Kejing, Chen Zhaoqi, Mou Junli, Xu Yingxi, Xing Haiyan, Tian Zheng, Rao Qing, Wang Min, Wang Jianxiang

State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

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

【Abstract】 Objective To construct chimeric antigen receptor (CAR) T cells targeting CD52 (CD52 CAR-T) and validate the effect of CD52 CAR-T cells on CD52-positive leukemia. **Methods** A second-generation CD52-targeting CAR bearing 4-1BB costimulatory domain was ligated into a lentiviral vector through molecular cloning. Lentivirus was prepared and packaged by 293 T cells with a four-plasmid system. Fluorescein was used to label cell surface antigens to evaluate the phenotype of

CD52 CAR-T cells after infection. Flow cytometry and ELISA were used to evaluate the specific cytotoxicity of CD52 CAR-T cells to CD52-positive cell lines in vitro. **Results** ①A pCDH-CD52scFv-CD8 α -4-1BB-CD3 ζ -GFP expressing plasmid was successfully constructed and used to transduce T cells expressing a novel CD52-targeting CAR. ②On day 6, CD52-positive T cells were almost killed by CD52-targeted CAR-T post lentivirus transduction [CD52 CAR-T (4.48 \pm 4.99)%, vs Vector-T (56.58 \pm 19.8)%, $P=0.011$]. ③T cells transduced with the CAR targeting CD52 showed low levels of apoptosis and could be expanded long-term ex vivo. ④The CD52 CAR could promote T cell differentiation into central and effector memory T cells, whereas the proportion of T cells with a CD45RA⁺ effector memory phenotype were reduced. ⑤CD52 CAR-T cells could specifically kill CD52-positive HuT78-19t cells but had no killing effect on CD52-negative MOLT4-19t cells. For CD52 CAR-T cells, the percentage of residual of HuT78-19t cells was (2.66 \pm 1.60)% at an the E:T ratio of 1:1 for 24 h, while (56.66 \pm 5.74)% of MOLT4-19t cells survived ($P<0.001$). ⑥The results of a degranulation experiment confirmed that HuT78-19t cells significantly activated CD52 CAR-T cells but not MOLT4-19t cells [(57.34 \pm 11.25)% vs (13.06 \pm 4.23)%, $P<0.001$]. ⑦CD52 CAR-T cells released more cytokines when co-cultured with HuT78-19t cells than that of vector-T cells [IFN- γ : (3706 \pm 226) pg/ml, $P<0.001$; TNF- α : (1732 \pm 560) pg/ml, $P<0.01$]. **Conclusions** We successfully prepared CD52 CAR-T cells with anti-leukemia effects, which might provide the foundation for further immunotherapy.

【Key words】 CD52; Chimeric antigen receptor T cells; Immunotherapy

Fund program: National Key R&D Program of China (2019YFA0110200); National Natural Science Foundation of China (81830005); CAMS Initiative Fund for Medical Sciences (2021-1-I2M-041)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.04.003

肿瘤过继细胞疗法(ACT)已经成为继放化疗等传统治疗方法后,治疗难治性造血系统恶性肿瘤的新一代的治疗策略^[1]。其中,嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)作为其中一种免疫疗法,在血液肿瘤中已经被广泛应用,特别是以CD19作为靶抗原的CAR-T细胞免疫治疗,完全改变了复发难治性急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)的治疗格局^[2-3]。但其他血液肿瘤,如慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性T淋巴细胞白血病(T-ALL)等患者仍面临着治疗反应率较低、疾病缓解期较短、预后较差的现状^[4-6]。探索更多适合的治疗靶点,可进一步提高CAR-T细胞适用范围,使更多患者获益。

CD52分子是一种广泛表达的糖磷脂酰肌醇连接蛋白,属于短链糖基磷脂酰肌醇锚定糖蛋白家族^[7-8]。CD52分子高表达于淋巴细胞,在造血干祖细胞上不表达^[9-11]。很多恶性血液疾病中都能检测到CD52的表达,如CLL、NHL、T-ALL及FLT3-ITD突变的急性髓系白血病(AML)。阿仑单抗(Alemtuzumab)是一种完全人源化的CD52单克隆抗体,2001年已被FDA批准用于治疗难治复发性CLL^[12]。因此,CD52是一个有开发潜能的肿瘤抗原靶点^[13-15]。

本研究中,我们成功构建以CD52 scFv为抗原结合区的二代CAR结构,并制备CD52 CAR-T细胞,通过体外功能实验初步探讨其抗白血病作用。

材料与与方法

一、主要材料及试剂

胎牛血清购自美国Biowest公司;CD3/CD28磁珠、DMEM培养基、RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司;KBM581培养基购自美国Corning公司;重组人IL-2、IFN- γ 和TNF- α ELISA试剂盒均购自美国R&D公司;pMD19-simple T载体购自北京擎科生物科技有限公司;小鼠抗体scFv基因扩增试剂盒购自江苏Public Protein/Plasmid Library公司;限制性内切酶Nhe I和Not I购自美国NEB公司;RossetteSep T细胞富集液购自美国Stem Cell公司;人淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;重组人CD52-hFc融合蛋白购自美国Sino Biological公司;本研究所用抗体均购自美国Biolegend公司。

二、细胞培养

人急性淋巴母细胞白血病细胞系HuT78和MOLT4细胞均购自美国模式培养物集存库(ATCC),培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中;293T细胞系购自ATCC,培养于含15%胎牛血清的DMEM培养基中;人T细胞培养于含5%胎牛血清和50 U/ml重组人IL-2的KBM581培养基中。

三、pCDH-CD52 scFv-CD8 α -4-1BB-CD3 ζ CAR慢病毒载体的构建

提取本所院自主研发的鼠抗人CD52单克隆抗体杂交瘤(HI186)细胞株的总RNA,逆转录合成cDNA文库。使用小鼠抗体scFv基因扩增试剂盒经PCR扩增鼠抗人CD52单克隆抗体轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)的基因片段。琼脂糖凝胶电泳分离并回收VL、VH片段。将VL、VH连接至pMD19-simple T载体并测序,根据测序结果确定CD52单克隆抗体VL、VH的核酸序列。应用重组方法构建VL-(G4S)₃-VH的CD52 scFv片段:将CD52 scFv片段连接到实验室前期已构建的pCDH-CD8 α -4-1BB-CD3 ζ -GFP质粒中^[16-17],构建pCDH-CD52 scFv-CD8 α -4-1BB-CD3 ζ CAR-GFP表达载体质粒。将构建成功的表达载体用Nhe I和Not I进行酶切鉴定。pCDH-GFP表达载体质粒(Vector)为空白对照。

四、CD52 CAR-T细胞的制备

利用慢病毒四质粒包装系统转染293T细胞,收集24和48 h培养上清,应用超速离心沉淀法浓缩与纯化慢病毒。使用RossetteSep T细胞富集液和人淋巴细胞分离液从健康人群外周血中分离富集CD3⁺ T细胞,以CD3/CD28磁珠培养刺激24 h,感染CD52 CAR或者Vector慢病毒。感染第4天,用重组人CD52-hFc融合蛋白标记CAR-T细胞或Vector-T细胞,用APC抗人IgG FC抗体分别标记CD52 CAR-T细胞和Vector-T细胞,流式细胞术检测T细胞的感染效率。

五、CD52 CAR-T细胞对T细胞表型及生物学功能的影响

1. T细胞CD52表达情况:分别在T细胞感染后的第3、6天,用APC抗人CD52抗体分别标记CD52 CAR-T细胞和Vector-T细胞,流式细胞术检测T细胞CD52表达情况。

2. T细胞增殖情况:在T细胞培养的过程中,从第3天开始,每3天计数CD52 CAR-T细胞和Vector-T细胞活细胞数目,计算T细胞增殖情况。

3. CD4/CD8比例检测:在T细胞培养的第7天,选取PE/Cy7抗人CD4抗体和PerCP抗人CD8抗体分别标记CD52 CAR-T细胞和Vector-T细胞,流式细胞术检测CD4⁺和CD8⁺ CAR-T细胞比例。

4. T细胞分化状态检测:在T细胞培养的第7天,选取APC/Cy7抗人CD45RA抗体和PE抗人CCR7抗体分别标记CD52 CAR-T细胞和Vector-T细胞,流式细胞术分析两组不同亚型T细胞的比例,分析CAR-T细胞的分化状态。

六、CD52 CAR-T细胞体外抗白血病细胞作用

1. CD52⁺靶细胞的选择:选用CD52⁺白血病细胞系HuT78细胞株为阳性靶细胞,CD52⁻白血病细胞系MOLT4细胞株为阴性靶细胞,在此基础上以慢病毒感染截短型CD19表面蛋白,得到HuT78-19t和MOLT4-19t细胞。用APC抗人CD52抗体分别标记HuT78-19t和MOLT4-19t细胞,流式细胞术检测CD52的表达水平。

2. CD52 CAR-T细胞特异性杀伤功能检测:在T细胞培养的第7天,将CD52 CAR-T细胞或Vector-T细胞与HuT78-19t或MOLT4-19t细胞以效靶比1:4、1:2、1:1、2:1共培养24 h,用APC抗人CD19抗体标记HuT78-19t和MOLT4-19t细胞,流式细胞术检测靶细胞残留比例。

3. CD52 CAR-T细胞特异性激活检测:CD52 CAR-T细胞或Vector-T细胞与HuT78-19t或MOLT4-19t以效靶比1:1共培养于含PE抗人CD107a抗体和人重组IL-2因子的培养体系中放置在37℃孵箱中孵育5 h,流式细胞术检测CAR-T细胞中CD107a⁺细胞比例。

4. 细胞因子释放检测:取CD52 CAR-T细胞或Vector-T细胞与HuT78-19t或MOLT4-19t以1:1的效靶比共培养48 h,取培养上清液,通过ELISA法检测上清液中TNF- α 和IFN- γ 的表达水平。

七、统计学处理

采用GraphPad Prism 8.0软件对本实验的所有数据进行处理及统计学分析。所有实验均重复至少3次,数据以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用双尾*t*检验。*P* < 0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. pCDH-CD52 scFv-CD8 α -4-1BB-CD3 ζ CAR表达载体的构建:从小鼠抗人CD52单克隆抗体(HI186)杂交瘤获得VL和VH序列,按照VL在前VH在后的顺序用(G4S)₃的linker连接为能特异性识别CD52的抗原识别区CD52 scFv,连接到实验室前期构建的含有pCDH-CD8 α -4-1BB-CD3 ζ -GFP片段的质粒,成功构建了靶向CD52的二代CAR的慢病毒表达载体(图1A)。使用限制性内切酶双酶切鉴定,表明阳性克隆含有目的条带(1411 bp)和载体片段(7303 bp)(图1B),测序鉴定序列正确。

2. CD52 CAR-T细胞的制备:通过慢病毒载体包装、感染T细胞获得CD52 CAR-T及Vector-T细胞,使用重组人CD52-hFc融合蛋白标记T细胞,通

过 T 细胞表面 CD52 CAR 的表达和 GFP 荧光检测 T 细胞的感染效率,由图 1C 可见,CD52 CAR-T 组感染效率在 70% 左右,Vector-T 组感染效率在 90% 以上。

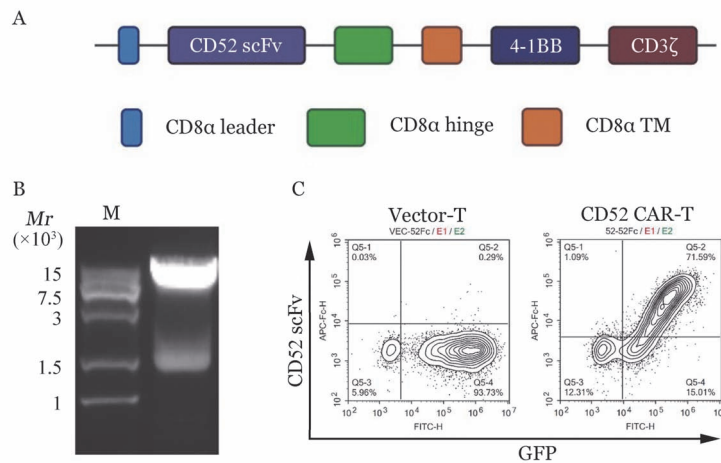
3. CD52 CAR-T 细胞 CD52 表达和 T 细胞增殖情况:慢病毒感染人 T 细胞第 3 天,CD52 CAR-T 细胞的 CD52 表达与 Vector-T 细胞无明显差异[CAR-T: (15.91±8.41)% ; Vector-T: (20.35±12.1)%]。培养至第 6 天,Vector-T 细胞 CD52 表达为 (56.58±19.8)%, CAR-T 细胞 CD52 表达仅为 (4.48±4.99)% ($P=0.011$),提示 CD52 CAR-T 细胞能识别本身 CD52 分子并激活 T 细胞清除 CD52⁺ T 细胞(图 2A)。

从慢病毒感染 T 细胞后第 3 天开始,每 3 天计数 CD52 CAR-T 细胞和 Vector-T 细胞活细胞数目,计算两组 T 细胞增殖情况。由图 2B 可看出,CD52 CAR-T 细胞的自我杀伤未影响 T 细胞增殖,CD52 CAR-T 细胞可大量扩增。培养至第 12 天时,CD52 CAR-T 细胞增殖倍数已超过 Vector-T 细胞,培养中

后期 CD52 CAR-T 细胞的增殖快于 Vector-T 细胞。

4. CAR 对 T 细胞亚群的影响:通过 PE/Cy7 抗人 CD4 抗体和 PerCP 抗人 CD8 抗体标记感染后第 7 天的 CD52 CAR-T 细胞和 Vector-T 细胞,检测 CD4、CD8 亚群的分布。由图 3A 可看出,CD52 CAR-T 细胞和 Vector-T 细胞中 CD4⁺ T 细胞比例分别为 (37.6±13.9)% 和 (31.29±10.02)% ($P=0.43$),CD52 CAR-T 细胞和 Vector-T 细胞中 CD8⁺ T 细胞比例分别为 (57.09±15.81)% 和 (62.33±12.78)% ($P=0.58$)。两组在 CD4 和 CD8 亚群比例上差异无统计学意义。

通过 APC/Cy7 抗人 CD45RA 抗体和 PE 抗人 CCR7 抗体标记感染后第 7 天的 CD52 CAR-T 细胞和 Vector-T 细胞,检测 CD52 CAR 对 CAR-T 细胞、CD8⁺ CAR-T 细胞和 CD4⁺ CAR-T 细胞分化状态的影响。与 Vector-T 细胞相比,CD52 CAR-T 细胞中心记忆 T 细胞(T_{CM})亚群、效应记忆 T 细胞(T_{EM})亚群比例均升高($P=0.005$; $P=0.056$),终末分化效应细胞(T_{EMRA})亚群比例明显降低($P<0.0001$)。T_{CM}和



A: CD52 scFv-CD8α-4-1BB-CD3ζ CAR 载体结构示意图;B:慢病毒载体进行酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳图;C:流式细胞术检测 Vector-T 和 CD52 CAR-T 细胞感染效率。CAR:嵌合抗原受体;M:Marker

图 1 pCDH-CD52 scFv-CD8α-4-1BB-CD3ζCAR 表达载体的构建

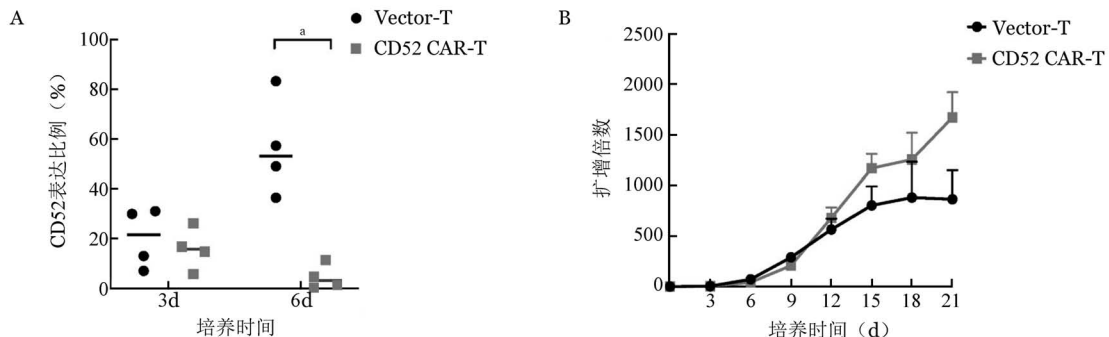


图 2 流式细胞术检测 Vector-T 和 CD52 CAR-T 细胞中 CD52 表达变化(A)及细胞增殖情况(B)(实验重复 4 次, $^*P<0.05$)

T_{EM} 比例的增加在 $CD8^+$ CAR-T 细胞和 $CD4^+$ CAR-T 细胞中都有相同的趋势,提示 CD52 CAR 可诱导 T 细胞优先向 T_{CM} 和 T_{EM} 分化,减少向 T_{EMRA} 分化(图 3B~D)。

5. CD52 CAR-T 对 $CD52^+$ 白血病细胞的特异性杀伤作用:应用流式细胞术检测靶细胞 HuT78-19t 和 MOLT4-19t 细胞系 CD52 表达阳性率,分别为 90.44% 和 0.19% (图 4A)。HuT78-19t 和 MOLT4-19t 细胞系表达 CD52 的平均荧光强度(MFI)分别为 12 823 和 2 071(图 4B)。

将效应细胞与靶细胞以 1:4、1:2、1:1、2:1 四种效靶比铺板共培养 24 h,CD52 CAR-T 组各效靶比组残留 HuT78-19t 细胞比例分别为 $(57.15 \pm$

$1.69)\%$ 、 $(19.07 \pm 7.02)\%$ 、 $(2.66 \pm 1.60)\%$ 和 $(0.26 \pm 0.18)\%$, Vector-T 组残留 HuT78-19t 细胞比例分别为 $(84.37 \pm 4.89)\%$ 、 $(73.92 \pm 5.78)\%$ 、 $(56.66 \pm 5.74)\%$ 和 $(36.64 \pm 6.43)\%$ 。上述结果显示,当效靶比为 1:1 时,CD52 CAR-T 细胞 24 h 几乎完全清除 HuT78-19t 细胞 ($P < 0.001$) (图 5A)。CD52 CAR-T 细胞和 Vector-T 细胞与阴性靶细胞 MOLT4-19t 共培养的体系中,两组 MOLT4-19t 细胞比例无明显差异(图 5B)。

脱颗粒实验证实,CD52 CAR-T 细胞可以被 $CD52^+$ 靶细胞迅速有效激活,CD52 CAR-T 细胞与 HuT78-19t 细胞共培养 5 h 后,细胞激活率为 $(57.34 \pm 11.25)\%$,显著高于与 MOLT4-19t 细胞共培养的激

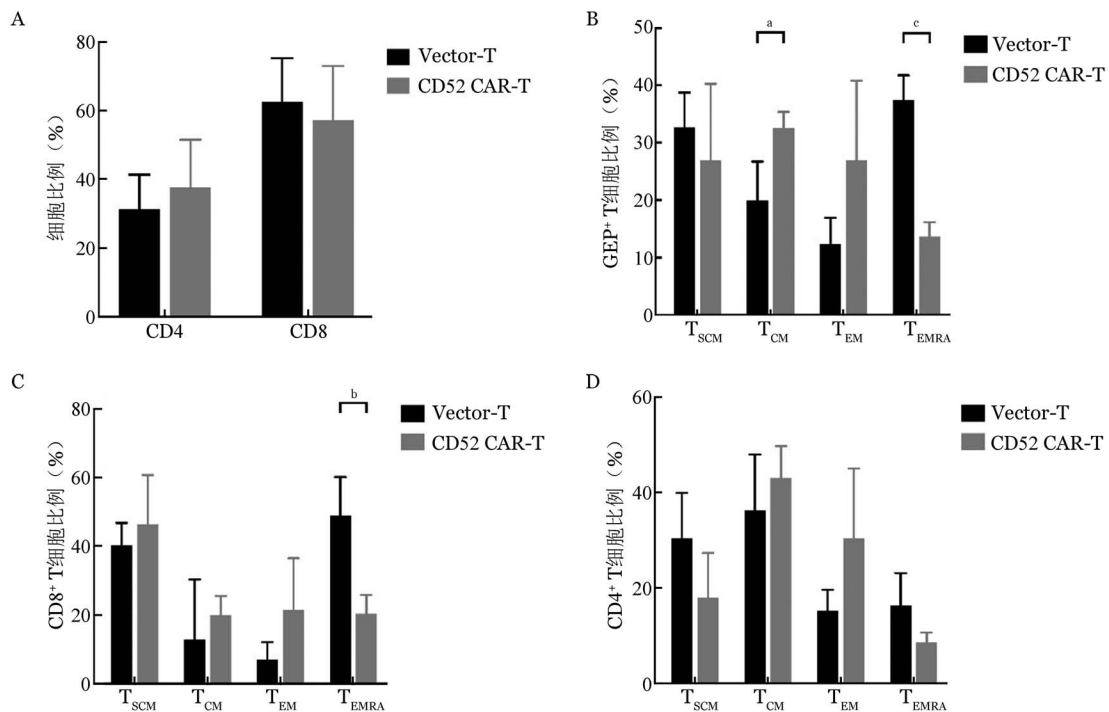


图 3 流式细胞术检测 Vector-T 和 CD52 CAR-T 细胞中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞比例(A)及细胞分化状态(B~D)(实验重复 5 次, $^aP < 0.01$ 、 $^bP < 0.001$ 、 $^cP < 0.0001$)

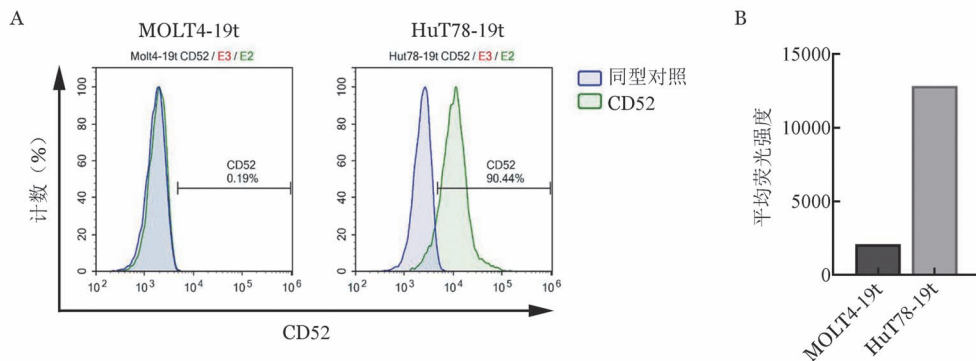


图 4 流式细胞术检测白血病细胞系 CD52 阳性细胞比例(A)及平均荧光强度(B)

活率 $[(13.06 \pm 4.23)\%, P < 0.0001]$, 而 Vector-T 与 HuT78-19t 和 MOLT4-19t 两种靶细胞共培养, 细胞激活率仅为 $(2.94 \pm 0.70)\%$ 、 $(0.67 \pm 0.23)\%$ (图 6A)。

用 ELISA 法检测 CD52 CAR-T 细胞与白血病细胞以 1:1 的效靶比共培养 48 h 后培养上清中细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 的水平。结果如图 6B、6C 所示, CD52⁺ 的 HuT78-19t 与 CAR-T 共培养上清中 IFN- γ 、TNF- α 细胞因子水平为 (3706 ± 226) pg/ml 及 (1732 ± 560) pg/ml, 均较 Vector-T 组有显著性升高 ($P < 0.001, P < 0.01$), 在与 CD52⁻ 的 MOLT4-19t 细胞的共培养上清中 CAR-T 分泌的 IFN- γ 、TNF- α 水平显著降低, 分别为 (1577 ± 846) pg/ml 及 (74 ± 12) pg/ml。

讨 论

CAR-T 细胞在血液肿瘤中已经被广泛应用, 它可以不依赖主要组织相容性复合体 (MHC) 限制性直接识别肿瘤抗原, 靶向并消除肿瘤细胞。CAR-T 细胞疗法的出现改变了复发难治性 B 细胞白血病/淋巴瘤的治疗局面, 特别是 CD19 作为靶抗原的

CAR-T 细胞免疫治疗已获得突破性进展, 将成人 B-ALL 的完全缓解率提高到了 80% 以上^[18]。随着 CAR-T 治疗临床需求的增加, 利用肿瘤抗原多样化的特点, 开发更多的抗原识别区, 提供更多有效的治疗靶点是扩大 CAR-T 适用范围的主要途径。

CD52 抗原又称 CAMPATH-1 抗原, 是一种由 12 个氨基酸多肽组成的糖磷脂酰肌醇连接蛋白, 属于短链糖基磷脂酰肌醇锚定糖蛋白家族^[8]。CD52 分子是一种分布比较广泛的抗原, 在细胞表面成簇有序地排列, 几乎所有的造血细胞都以不同的水平表达, 其中 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞中表达最高, 红细胞、血小板、精原细胞表面以及造血干祖细胞不表达 CD52^[9-11,19]。目前研究表明, CD52 是参与 T 细胞激活的抗原, 且是诱导 CD4⁺ T 细胞生成调节性 T 细胞 (Treg) 的共刺激分子^[20-21]。阿仑单抗是一种完全人源化的 CD52 单克隆抗体, 2001 年被 FDA 批准用于治疗难治复发型 CLL^[12]。除此之外, CD52 在 AML、T-ALL、NHL 中均有表达。目前研究证实阿仑单抗在消除 T-ALL 患者微小残留病方面有效, 但

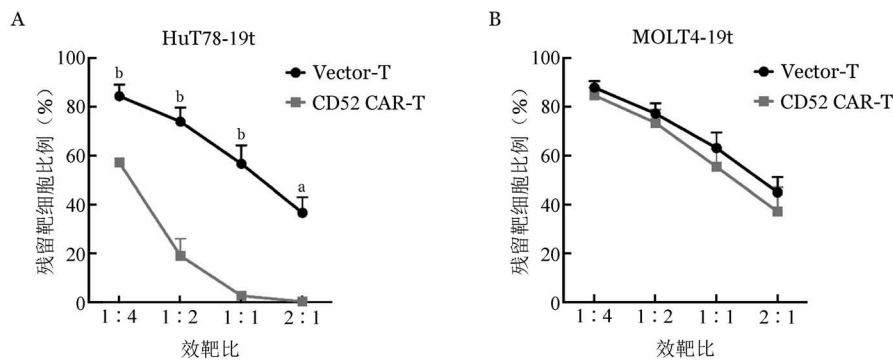


图 5 流式细胞术检测 Vector-T 及 CD52 CAR-T 细胞与靶细胞 HuT78-19t(A) Molt4-19t(B) 共培养 24 h 残留的靶细胞比例 (实验重复 5 次, $^a P < 0.001, ^b P < 0.0001$)

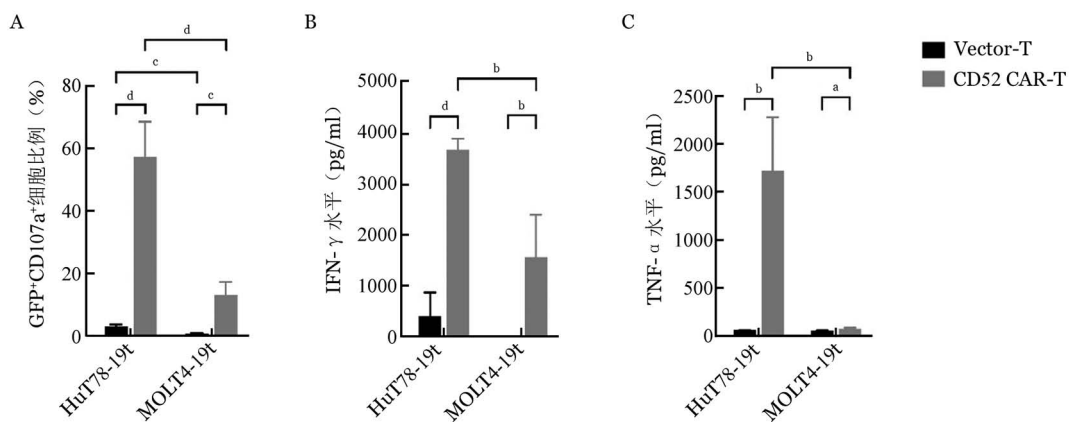


图 6 流式细胞术检测 Vector-T、CD52 CAR-T 细胞和靶细胞共培养 CD107a⁺ 表达 (A), ELISA 法检测 Vector-T、CD52 CAR-T 细胞和靶细胞共培养 48 小时培养上清细胞因子 IFN- γ (B) 和 TNF- α (C) 释放水平 ($n = 4, ^a P < 0.05, ^b P < 0.01, ^c P < 0.001, ^d P < 0.0001$)

不良反应可能会限制阿仑单抗的进一步开发^[22]。

本研究通过本所院自主研制的小鼠抗人CD52单克隆抗体杂交瘤细胞株(HI186),获得与阿仑单抗抗原识别区不同的CD52 scFv,该杂交瘤生产的单克隆抗体已成功商品化,可用于CD52表达的检测。抗原识别区是CAR-T细胞特异性识别肿瘤细胞的核心部分,相同的抗原,因其识别表位不同所表现出的亲和性不同,从而产生不同的治疗效果^[23-24]。阿仑单抗所识别的是近膜端的氨基酸残基及部分GPI锚定位点,而HI186所识别的是远膜端连接于3位天冬酰胺的糖基^[25-26]。

基于以上研究背景,我们成功构建了与阿仑单抗不同抗原识别区的嵌合抗原受体,获得CD52 CAR-T细胞,感染后第6天,CD52 CAR-T细胞本身CD52表达已通过自我杀伤被清除,且并未影响CAR-T细胞的扩增。通过对CD52 CAR-T细胞的表型检测,我们发现CD52 CAR-T可以促进CAR-T细胞向T_{CM}和T_{EM}分化,抑制CAR-T细胞向T_{EMRA}分化,有利于提高T细胞的持久性。体外实验证实CD52 CAR-T可以被CD52⁺肿瘤细胞特异性激活,启动脱颗粒过程,同时分泌IFN- γ 、TNF- α 等Th1类细胞因子特异性的杀伤肿瘤细胞,同时,对CD52⁺肿瘤细胞没有脱靶效应。在培养过程中,我们发现培养后期CD52 CAR-T细胞本身CD52表达会逐渐上升,为解决这个问题,我们采用CRISPR/Cas9技术,清除T细胞表面的CD52,构建不表达CD52的CAR-T细胞。目前,我们已证实敲除CD52后T细胞本身CD52表达不会随培养时间延长而升高,后续我们还会对敲除体系进行优化,并检测不表达CD52的CAR-T细胞的表型与功能。

综上所述,本研究成功构建的靶向CD52抗原的第二代CAR-T细胞具有特异性的抗肿瘤作用,同时没有表现出脱靶效应。研究结果提示CD52是治疗CD52⁺肿瘤的有效靶点,CAR-T可以作为化疗后衔接骨髓移植的一个桥梁,为肿瘤患者个体化治疗提供新的选择,也为精准医学的发展提供新思路。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 刘琰:实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析;王敏、王建祥:酝酿和设计实验、对文章的知识性内容作批评性审阅、指导;其他作者:实施研究、采集数据、分析/解释数据

参考文献

- [1] Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(16):1507-1517. DOI: 10.1056/NEJMoa1407222.
- [2] Mohty M, Gautier J, Malard F, et al. CD19 chimeric antigen receptor- T cells in B- cell leukemia and lymphoma: current status and perspectives [J]. *Leukemia*, 2019, 33(12):2767-2778. DOI: 10.1038/s41375-019-0615-5.
- [3] Ahmad A, Uddin S, Steinhoff M. CAR- T Cell Therapies: An Overview of Clinical Studies Supporting Their Approved Use against Acute Lymphoblastic Leukemia and Large B-Cell Lymphomas [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11):3906. DOI: 10.3390/ijms21113906.
- [4] Chihara D, Fanale MA, Miranda RN, et al. The survival outcome of patients with relapsed/refractory peripheral T-cell lymphoma-not otherwise specified and angioimmunoblastic T-cell lymphoma [J]. *Br J Haematol*, 2017, 176(5):750-758. DOI: 10.1111/bjh.14477.
- [5] Winter SS, Dunsmore KP, Devidas M, et al. Improved Survival for Children and Young Adults With T-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia: Results From the Children's Oncology Group AALL0434 Methotrexate Randomization [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(29):2926-2934. DOI: 10.1200/JCO.2018.77.7250.
- [6] Mancikova V, Smida M. Current State of CAR T-Cell Therapy in Chronic Lymphocytic Leukemia [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11):5536. DOI: 10.3390/ijms22115536.
- [7] Hale G. CD52 (CAMPATH1) [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2001, 15(4):386-391.
- [8] Xia MQ, Hale G, Lively MR, et al. Structure of the CAMPATH-1 antigen, a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein which is an exceptionally good target for complement lysis [J]. *Biochem J*, 1993, 293 (Pt 3):633-640. DOI: 10.1042/bj2930633.
- [9] Xia MQ, Tone M, Packman L, et al. Characterization of the CAMPATH-1 (CDw52) antigen: biochemical analysis and cDNA cloning reveal an unusually small peptide backbone [J]. *Eur J Immunol*, 1991, 21(7): 1677-1684. DOI: 10.1002/eji.1830210714.
- [10] Buggins AG, Mufti GJ, Salisbury J, et al. Peripheral blood but not tissue dendritic cells express CD52 and are depleted by treatment with alemtuzumab [J]. *Blood*, 2002, 100(5):1715-1720.
- [11] Hale G, Cobbold S, Novitzky N, et al. CAMPATH-1 antibodies in stem-cell transplantation [J]. *Cytotherapy*, 2001, 3(3):145-164. DOI: 10.1080/146532401753173981.
- [12] Keating MJ, Flinn I, Jain V, et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study [J]. *Blood*, 2002, 99(10): 3554-3561. DOI: 10.1182/blood.v99.10.3554.
- [13] Gökbüget N, Hoelzer D. Treatment with monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia: current knowledge and future prospects [J]. *Ann Hematol*, 2004, 83(4):201-205. DOI: 10.1007/s00277-003-0752-8.
- [14] Karnan S, Hanamura I, Ota A, et al. CD52 is a novel target for the treatment of FLT3-ITD-mutated myeloid leukemia [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1):121. DOI: 10.1038/s41420-021-00446-8.

- [15] Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, et al. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(5):1561-1570. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1254.
- [16] 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.
- [17] Li S, Tao Z, Xu Y, et al. CD33-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells with Different Co-Stimulators Showed Potent Anti-Leukemia Efficacy and Different Phenotype [J]. Hum Gene Ther, 2018, 29(5):626-639. DOI: 10.1089/hum.2017.241.
- [18] Park JH, Rivière I, Gonen M, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. N Engl J Med, 2018, 378(5):449-459. DOI: 10.1056/NEJMoa1709919.
- [19] Zhao Y, Su H, Shen X, et al. The immunological function of CD52 and its targeting in organ transplantation [J]. Inflamm Res, 2017, 66(7):571-578. DOI: 10.1007/s00011-017-1032-8.
- [20] Rowan W, Tite J, Topley P, et al. Cross-linking of the CAMPATH-1 antigen (CD52) mediates growth inhibition in human B- and T-lymphoma cell lines, and subsequent emergence of CD52-deficient cells [J]. Immunology, 1998, 95(3):427-436. DOI: 10.1046/j.1365-2567.1998.00615.x.
- [21] Watanabe T, Masuyama J, Sohma Y, et al. CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4+ regulatory T cells [J]. Clin Immunol, 2006, 120(3):247-259. DOI: 10.1016/j.clim.2006.05.006.
- [22] Stock W, Sanford B, Lozanski G, et al. Alemtuzumab can be Incorporated Into Front-Line Therapy of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): Final Phase I Results of a Cancer and Leukemia Group B Study (CALGB 10102) [J]. Blood, 2009, 114(22): 838. DOI: https://doi.org/10.1182/blood.V114.22.838.838.
- [23] Haso W, Lee DW, Shah NN, et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 2013, 121(7):1165-1174. DOI: 10.1182/blood-2012-06-438002.
- [24] Lynn RC, Feng Y, Schutsky K, et al. High-affinity FRβ-specific CAR T cells eradicate AML and normal myeloid lineage without HSC toxicity [J]. Leukemia, 2016, 30(6):1355-1364. DOI: 10.1038/leu.2016.35.
- [25] Hale G. The CD52 antigen and development of the CAMPATH antibodies [J]. Cytotherapy, 2001, 3(3):137-143. DOI: 10.1080/146532401753174098.
- [26] 屈浩. 小鼠抗人CD52单克隆抗体HI186的生物学功能研究及其单链抗体的构建[D]. 中国协和医科大学, 2006.

(收稿日期:2022-01-25)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

关于重视引用国内文献的意见

部分作者在撰写论文时,只引用国外文献(或非中文语种的文献)。诚然,在医学的许多领域,国内的研究水平确实有待提高,有引用国外文献的必要。但是,不引用国内相关文献,将存在以下问题:①作者没有阅读国内文献,这样作者阅读的文献就不全面,作者所撰写的论文、综述等的科学性、先进性就值得商榷。②不引用国内文献,就不能准确、全面地反映国内的研究水平和进展,毕竟本刊发表的文章主要的阅读对象是中国医师。③有的作者虽然阅读了国内文献,但未引用。不引用国内文献的想法可能更为复杂,如轻视或忽略国内同行,或暗示首创权。除非是专门的国外医学文摘或国外文献综述,均应有国内文献的复习、引用和注解。本刊倡导在论文的撰写中应维护参考文献的科学性,鼓励作者在引用国外文献的同时检索并引用国内相关的文献。

本刊编辑部