

# 一种新的 CD123 嵌合抗原受体 T 细胞的构建及其抗白血病作用探究

王珍珍 卢杨 徐颖茜 邢海燕 唐克晶 田征 饶青 王敏 熊冬生 王建祥

中国医学科学院血液病医院(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

**【摘要】** 目的 构建一种新的靶向 CD123 的嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞),为 CD123 阳性白血病的免疫治疗提供实验参考。**方法** 通过单克隆筛选技术获得能稳定分泌 CD123 抗体的杂交瘤细胞株 6E11,将杂交瘤细胞扩增后腹腔注射至 Balb/c 小鼠腹腔内,收集腹水并处理、纯化得到单克隆抗体,测定抗体效价并对其进行特异性验证;RT-PCR 法获得轻链和重链可变区序列,并以此为基础利用分子克隆技术构建一种新的靶向 CD123 嵌合抗原受体,包装病毒后感染 T 细胞制备 CD123 CAR-T 细胞,通过功能实验初步探讨 6E11 CAR-T 细胞体外抗白血病的能力。**结果** ①获得 1 株稳定分泌抗人 CD123 抗体的杂交瘤细胞株 6E11 并获得其可变区序列。②6E11 单克隆抗体对 CD123 蛋白亲和性高,解离常数( $K_d$ 值)为 2.10 nmol/L,特异性识别 CD123 阳性细胞且与 CD123 阴性细胞无交叉反应。③成功构建了 CD123 CAR 慢病毒载体,感染 T 细胞后获得了靶向 CD123 的 CAR-T 细胞(6E11 CAR-T),感染效率大于 60%。④6E11 CAR-T 能明显杀伤 CD123 阳性靶细胞 MV4-11,效靶比 1:1 时 6E11 CAR-T 细胞对 MV4-11 细胞的杀伤比例明显高于 Vecor-T 细胞[(98.60±1.20)%对(20.28±6.74)%, $P < 0.001$ ],但对 CD123 阴性靶细胞 K562 没有明显杀伤作用。⑤MV4-11 细胞可以显著激活 6E11 CAR-T,但对 Vecor-T 细胞无明显激活作用[(26.33±3.30)%对(1.17±0.06)%, $P < 0.001$ ]。⑥6E11 CAR-T 与 MV4-11 细胞共培养上清中细胞因子水平均显著高于 Vecor-T 组[IL-2:(92.90±1.51)pg/ml对(6.05±3.41)pg/ml, $P < 0.001$ ;TNF- $\alpha$ :(1 407.20±91.95)pg/ml对(7.86±0.85)pg/ml, $P < 0.001$ ;IFN- $\gamma$ :(5 614.60±170.17)pg/ml对(8.42±2.70)pg/ml, $P < 0.001$ ],但与 K562 细胞共培养后,两组各细胞因子水平差异无统计学意义。⑦6E11 CAR-T 在与 CD123 阳性急性髓系白血病(AML)原代细胞共培养过程中被显著激活,且能有效杀伤原代 AML 细胞。**结论** 杂交瘤细胞株 6E11 能稳定分泌高效特异的抗人 CD123 单克隆抗体,可用于检测表达人 CD123 的细胞,也能应用在靶向人 CD123 蛋白的肿瘤免疫治疗中,以 6E11 Ig 可变区序列为抗原识别区的 CD123 CAR-T 细胞,具有明确的体外抗白血病活性,为进一步的临床研究奠定了基础。

**【关键词】** 白血病,髓系,急性; CD123; 嵌合抗原受体; 抗原识别区; 免疫治疗

**基金项目:**国家自然科学基金重点项目(81830005);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-12M-1-007)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.03.002

## Construction of a new anti-CD123 chimeric antigen receptor T cells and effect of anti-acute myeloid leukemia

Wang Zhenzhen, Lu Yang, Xu Yingxi, Xing Haiyan, Tang Kejing, Tian Zheng, Rao Qing, Wang Min, Xiong Dongsheng, Wang Jianxiang

State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China

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

**【Abstract】 Objective** To construct a new CD123-specific chimeric antigen receptor in order to provide a foundation for immunotherapy of CD123 positive leukemia. **Methods** A hybridoma strain (6E11) capable of stably secreting CD123 antibody was obtained by a monoclonal screening technique, and the hybridoma cells were expanded and injected intraperitoneally to the pretreated Balb/c mice. Ascites was collected and purified to obtain the monoclonal antibody (mAb). The affinity and specificity of 6E11 mAb were measured. The variable regions of the heavy and light chains of the 6E11 mAb were cloned by

RT-PCR from the 6E11 mouse hybridoma. We generated a new CD123 specific chimeric antigen receptor with a scFv fragment derived from 6E11 antibody, designated as 6E11 CAR. T cells were transduced with lentiviral supernatant from 293T cells transfected with 6E11 CAR plasmid to generate 6E11 CAR-T cells. The specific cytotoxicity of 6E11 CAR-T against CD123<sup>+</sup> acute myeloid leukemia (AML) cell lines and primary AML cells in vitro were evaluated by co-culture experiments, degranulation experiments and cytokine releasing assay. **Results** ① A hybridoma cell line 6E11 stably secreting anti-human CD123 antibody was developed and its variable region sequences were obtained. ② The 6E11 mAb has high affinity for CD123 protein (Kd value: 2.1 nmol/L). The 6E11 mAb specifically recognizes CD123<sup>+</sup> cell line THP-1 cells and does not respond to CD123<sup>-</sup> cell line Jurkat cells. ③ 6E11 CAR-T cells were successfully generated with a CAR expression rate higher than 60%. ④ 6E11 CAR-T cells could specifically kill CD123<sup>+</sup> MV4-11 cell line but had no killing effect on the CD123<sup>-</sup> K562 cell line. Compared with vector-T cells, 6E11 CAR-T cells have higher killing rate to MV4-11 cells [(98.60±1.20)% vs (20.28±6.74)%,  $P < 0.001$ ]. ⑤ MV4-11 cells activated 6E11 CAR-T cells significantly but not Vector-T cells [(26.33±3.30)% vs (1.17±0.06)%,  $P < 0.001$ ]. ⑥ 6E11 CAR-T cells released more cytokines than vector-T cells when co-cultured with MV4-11 [IL-2: (92.90±1.51) pg/ml vs (6.05±3.41) pg/ml,  $P < 0.001$ ; TNF- $\alpha$ : (1 407.20±91.95) pg/ml vs (7.86±0.85) pg/ml,  $P < 0.001$ ; IFN- $\gamma$ : (5 614.60±170.17) pg/ml vs (8.42±2.70) pg/ml,  $P < 0.001$ ]. The IFN- $\gamma$ , IL-2 and TNF- $\alpha$  in the 6E11 CAR-T group were similar to those in the Vector-T group when co-cultured with K562. ⑦ 6E11 CAR-T cells could be activated by bone marrow mononuclear cells (BMMNC) derived from CD123<sup>+</sup> AML patients and effectively kill these BMMNC cells from CD123<sup>+</sup> AML patients. **Conclusion** 6E11 hybridoma cell line can stably secrete highly specific monoclonal antibodies against human CD123, which can be used to detect the expression of human CD123. It can also be used to target human CD123 protein in tumor immunotherapy. CD123 CAR-T cells with 6E11 Ig variable region sequence have specific anti-leukemic activity in vitro, which may provide a new option for further clinical research of AML.

**【Key words】** Leukemia, myeloid, acute; CD123; Chimeric antigen receptor; Antigen recognition region; Immunotherapy

**Fund program:** State Key Program of National Natural Science Foundation of China (81830005); CAMS Initiative Fund for Medical Sciences (2016-I2M-1-007)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.03.002

嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor, CAR) T细胞治疗是一种新的免疫疗法,通过基因工程改造的方法在T细胞表面表达特异性受体,使T细胞获得精准的肿瘤识别及导向能力,同时可激活T细胞,从而增强对肿瘤细胞的杀伤能力<sup>[1]</sup>。CAR-T细胞治疗对于血液恶性肿瘤具有显著的疗效,特别是靶向CD19的CAR-T细胞在治疗B细胞淋巴瘤及白血病方面取得了积极的治疗效果<sup>[2-3]</sup>。此外,多项研究也证实CAR-T细胞治疗急性髓系白血病(AML)的可行性<sup>[4-5]</sup>,但CAR-T细胞治疗AML的持久有效性及安全性仍需进一步提高。CD123,即白细胞介素3受体 $\alpha$ 链(IL3Ra),因其高表达于白血病干细胞(LSC)表面,而在正常造血干细胞中不表达或弱表达<sup>[6]</sup>,成为理想的免疫治疗靶标。本研究中,我们制备了新的鼠源单克隆抗体并成功构建新的CD123 CAR-T,通过体外功能实验,初步探讨其抗白血病作用。

## 材料与方 法

### 一、主要材料、试剂

Balb/c小鼠购于北京华阜康生物科技有限公

司;DMEM、IMDM、RPMI 1640培养液、人T细胞激活因子CD3/CD28磁珠购于美国Gibco公司;淋巴细胞培养液购于美国Corning公司;胎牛血清购于美国Biowest公司;重组人IL-2因子及IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 ELISA检测试剂盒购于美国R&D公司;APC标记大鼠抗小鼠IgG1抗体购于美国CST公司;TRIzol试剂盒、M-MLV逆转录酶、EndoFree Plasmid Maxi质粒抽提试剂盒购自美国Invitrogen公司;pMD19-T(simple)载体、核酸内切酶、T4连接酶购于日本Takara公司;兔抗鼠IgG F(ab')<sub>2</sub>抗体购于美国Jackson Immuno Research公司,重组人CD123-hFc融合蛋白购于美国Sino Biological公司;所有流式一抗均购于美国Biolegend公司;PE标记大鼠抗小鼠IgG1抗体、FACS Calibur流式细胞仪为美国BD公司产品。CD123抗体7G3(商品号:560087)购于美国BD公司。骨髓单个核细胞(BMMNC)来源于中国医学科学院血液病医院住院的3例AML患者的骨髓标本,标本的获得经患者知情同意并签署知情同意书。健康成人外周血标本由天津市血液中心提供。

## 二、细胞培养

3T3 细胞和 293T 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中; MV4-11 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养液; THP-1 细胞、Jurkat 细胞、K562 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液; 人 T 细胞培养于含 5% 胎牛血清、100 IU/ml 重组人 IL-2 因子和与 T 细胞数等量的人 T 细胞激活因子 CD3/CD28 磁珠的淋巴细胞培养液中。

### 三、杂交瘤细胞株 6E11 的筛选及单克隆抗体的制备及鉴定

1. 参照文献[7]方法, 通过单克隆筛选技术获得能稳定分泌 CD123 抗体的杂交瘤细胞株 6E11, 将杂交瘤细胞扩增后腹腔注射至液体石蜡预处理的 Balb/c 小鼠并收集腹水, 通过 Protein G 纯化预装柱进行纯化得到 CD123 单克隆抗体纯品。

2. 抗体亲和力测定: 抗体纯品进行荧光标记, PE 直标抗体以终浓度 0.003 nmol/L 至 400 nmol/L (2 倍梯度稀释) 分别标记  $2.5 \times 10^5$  3T3 细胞 (转染 CD123) 并用流式细胞术测定荧光强度, 统计平均值并计算抗体的解离常数 ( $K_d$  值)。

3. 抗体结合特异性鉴定: 0.1 nmol/L 6E11 抗体、7G3 抗体分别与 THP-1 细胞共孵育后, 用 APC-IgG1 抗体进行标记; 100 nmol/L 6E11 抗体与 Jurkat 细胞孵育后, PE-IgG1 抗体进行标记, 上流式细胞仪检测抗体结合特异性。

### 四、CD123 scFv-CD8 $\alpha$ -4-1BB-CD3 $\zeta$ CAR 载体的构建

TRIzol 试剂盒提取杂交瘤细胞株 6E11 的总 RNA, M-MLV 逆转录酶将总 RNA 逆转录为 cDNA 文库。RT-PCR 扩增抗人 CD123 抗体重链、轻链可变区基因片段。琼脂糖凝胶电泳分离重链、轻链片段并回收, 连接 pMD19-T (simple) 载体送擎科生物公司进行一代测序得到 6E11 抗体的重链、轻链可变区序列。根据 6E11 抗体的轻链、重链可变区 DNA 序列, 利用全基因合成技术合成 6E11-CD123 scFv。将 scFv 片段克隆到实验室前期构建的 pCDH-CD8 $\alpha$ -4-1BB-CD3 $\zeta$ -GFP 质粒中<sup>[8]</sup>, 得到 pCDH-6E11 CD123 scFv-CD8 $\alpha$ -4-1BB-CD3 $\zeta$  CAR-GFP (6E11 CAR) 并送测序鉴定。

### 五、6E11 CAR 慢病毒修饰 T 细胞的制备

1. 采用质粒抽提试剂盒提取 pCDH-GFP (Vector) 或 6E11 CAR 表达载体质粒, 利用慢病毒包装系统转染 293T 细胞以制备重组慢病毒颗粒。

2. T 细胞的制备和感染: 从健康供者外周血中

分离和富集 CD3<sup>+</sup>T 细胞, 培养、刺激 24 h 后加入病毒上清进行感染。

3. 流式细胞术检测 CAR 修饰 T 细胞的阳性率: T 细胞感染后 96 h, 用兔抗鼠 IgG F(ab')<sub>2</sub> 抗体或重组人 CD123-hFc 融合蛋白标记 CAR-T 细胞或 Vector-T 细胞, 流式细胞术分析感染效率。

### 六、CAR-T 细胞对白血病细胞系及原代 AML 细胞的杀伤作用

1. 血液肿瘤细胞系及原代 AML 细胞中 CD123 的表达情况: 用 APC 标记的抗人 CD123 单抗标记 MV4-11 细胞、K562 细胞以及患者 BMMNC, 流式细胞术检测 CD123 的表达水平。

2. CAR-T 细胞与靶细胞共培养后流式检测残留的肿瘤细胞: 将 CAR-T 细胞或 Vector-T 细胞与 MV4-11 细胞按 1:8、1:4、1:2、1:1 四种不同效靶比共培养, 将 CAR-T 细胞或 Vector-T 细胞与 K562 细胞或患者 BMMNC 按 1:1 的效靶比共培养, 共培养 24 h 后流式细胞术检测残留靶细胞。

3. 脱颗粒实验分析 CAR 修饰的 T 细胞的激活: CAR-T 细胞或 Vector-T 细胞与 MV4-11 细胞、K562 细胞、患者 BMMNC 按效靶比 1:1 共培养 5 h 后, 流式细胞术检测 T 细胞表面 CD107a 的表达, 并分析 CD3<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> 细胞中 CD107a<sup>+</sup> 细胞的比例, 反映细胞激活率。

4. ELISA 法检测细胞因子释放情况: 分别将 CAR-T 细胞或 Vector-T 细胞与 MV4-11 细胞、K562 细胞按照 1:1 的效靶比共培养, 48 h 后收集上清, 采用 ELISA 检测试剂盒检测上清液中 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-2 的表达水平。

### 七、统计学处理

采用 GraphPad Prism 6.01 软件进行统计学分析。以均值  $\pm$  标准差表示, 组间比较采用 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 6E11 单克隆抗体亲和力与结合特异性鉴定: 获得的稳定分泌抗人 CD123 抗体的杂交瘤细胞株 6E11, 其产生的单克隆抗体对 CD123 蛋白解离常数  $K_d$  值为 2.10 nmol/L (图 1A)。该单克隆抗体能有效结合 THP-1 细胞, 且亲和力强于相同浓度的 7G3 抗体, 与阴性细胞系 Jurkat 细胞无交叉反应 (图 1B)。

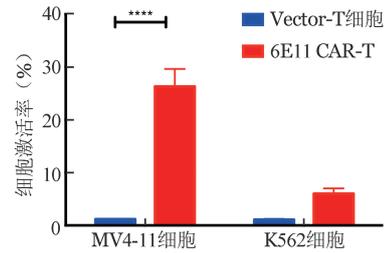
2. 6E11 CAR-T 细胞构建与感染效率检测: 在 6E11 抗体的基础上, 获得其轻链和重链可变区序列, 按照轻链在前重链在后的顺序连接成为能特异

性识别 CD123 的抗原识别区,利用本实验室此前构建的二代 CAR 表达载体成功构建了新的靶向 CD123 的二代 CAR 的慢病毒表达载体且测序鉴定正确。载体结构如图 2 所示。通过慢病毒包装、感染 T 细胞获得 CD123 CAR-T 及空载体病毒转染的 T (Vector-T) 细胞, IgG F(ab')<sub>2</sub> 抗体与重组人 CD123-hFc 融合蛋白标记分别测得对全部 T 细胞的感染效率均 > 60%。

3. 6E11 CAR-T 对 CD123 阳性肿瘤细胞的杀伤作用:以 MV4-11 细胞系为 CD123 阳性靶细胞, K562 细胞为 CD123 阴性靶细胞,流式细胞术检测残余靶细胞比例反应 CAR-T 细胞的杀伤能力,结果显示共培养 24 h,在效靶比低至 1:8 的情况下,6E11 CAR-T 细胞和 Vecor-T 细胞对 MV4-11 细胞的杀伤比例分别为(8.40±3.61)%和(0.64±0.37)%,差异有统计学意义( $P=0.019$ );效靶比 1:1 时 6E11 CAR-T 细胞几乎可将靶细胞全部杀灭,与 Vecor-T 细胞组比较差异有统计学意义[(98.60±1.20)%对(20.28±6.74)%, $P<0.001$ ](图 3A)。而与阴性靶细胞 K562 细胞按效靶比 1:1 共培养 24 h,6E11 CAR-T 细胞和与 Vecor-T 细胞对 K562 细胞均无明显杀伤(图 3B)。

脱颗粒实验证实,在与 MV4-11 细胞共培养 5 h 后,6E11 CAR-T 细胞激活率为(26.33±3.30)%,显

著高于 Vecor-T 细胞[(1.17±0.06)%]( $P<0.001$ ),而在与 K562 细胞共培养的体系中,6E11 CAR-T 细胞激活率与 Vecor-T 细胞的激活率差异无统计学意义[(4.33±0.58)%对(1.07±0.15)%, $P=0.100$ ](图 4)。



CAR-T:嵌合抗原受体 T 细胞;\*\*\*\* $P<0.0001$

图 4 脱颗粒实验检测 6E11 CAR-T 细胞对 MV4-11 细胞与 K562 细胞的激活水平(共培养 5 h,实验重复 3 次)

6E11 CAR-T 和 Vecor-T 细胞与 MV4-11 细胞及 K562 细胞按效靶比 1:1 共培养 24 h,ELISA 法检测细胞因子的释放情况。结果显示靶细胞为 MV4-11 细胞时,6E11 CAR-T 组 IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  水平明显高于 Vecor-T 细胞组[IL-2:(92.90±1.51)pg/ml 对(6.05±3.41)pg/ml, $P<0.001$ ; TNF- $\alpha$ :(1 407.20±91.95)pg/ml 对(7.86±0.85)pg/ml, $P<0.001$ ; IFN- $\gamma$ :(5 614.60±170.17)pg/ml 对(8.42±2.70)pg/ml, $P<0.001$ ]。靶细胞为 K562 细胞时,6E11 CAR-T 细胞和 Vecor-T 细胞组的 IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  水平差异均

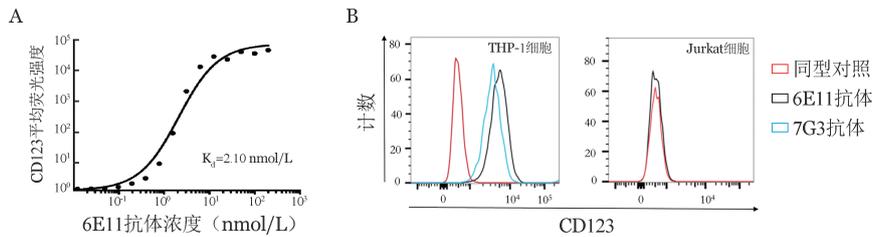
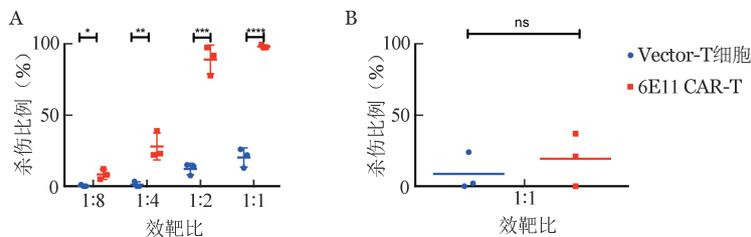


图 1 6E11 CD123 单克隆抗体的亲和力(A)和结合特异性(B)鉴定



CAR:嵌合抗原受体;CD8 $\alpha$  leader: CD8 $\alpha$ 信号肽;scFv:抗体单链可变区;CD8 $\alpha$  hinge:CD8 $\alpha$  铰链区;4-1BB:共刺激因子;CD3 $\zeta$ :CD3 $\zeta$ 胞内区

图 2 6E11 CD123 scFv-CD8 $\alpha$ -4-1BB-CD3 $\zeta$  CAR 慢病毒表达载体示意图



CAR-T:嵌合抗原受体 T 细胞;\* $P<0.05$ 、\*\* $P<0.01$ 、\*\*\* $P<0.001$ 、\*\*\*\* $P<0.0001$ 、ns 示差异无统计学意义

图 3 6E11 CAR-T 细胞对 MV4-11 细胞(A)与 K562 细胞(B)的杀伤作用(共培养 24 h,实验重复 3 次)

无统计学意义(图5)。

4. 6E11 CAR-T细胞对CD123阳性AML原代细胞的细胞毒作用:流式细胞术检测3例患者BMMNC表面CD123表达情况,3例患者的BMMNC CD123阳性率分别为68.0%、82.8%、48.0%。将6E11 CAR-T细胞或Vector-T细胞分别与3例CD123阳性AML患者来源的BMMNC按照效靶比1:1共培养24 h,6E11 CAR-T细胞对3例患者的BMMNC杀伤比例分别为98.67%、82.37%、68.42%,脱颗粒水平分别为(21.13±0.74)%、(15.50±0.50)%、(14.40±1.21)%,而Vector-T细胞对三例患者的BMMNC杀伤比例分别为22.73%、30.12%、2.63%,脱颗粒水平分别为(2.13±0.85)%、(1.63±0.40)%、(0.32±0.25)%,6E11 CAR-T细胞对CD123阳性原代肿瘤细胞的杀伤作用优于Vector-T细胞,并伴随更为强烈的脱颗粒效应(图6)。

### 讨 论

目前治疗髓系白血病的CAR-T研究主要集中在CD33<sup>[9]</sup>和CD123<sup>[4]</sup>等靶点,但由于CD33在白血病细胞及正常造血细胞中表达水平相近,缺乏特异性,在临床试验中观察到明确的毒性而致使安全性未得到一直公认<sup>[10]</sup>。而多项临床前研究通过体内外试验证实了CD123 CAR-T的抗AML效应。此外,美国“City of Hope”癌症中心的I期临床试验证实了其CD123 CAR-T细胞的安全性和有效性,在接受治疗的6例难治/复发性AML患者中,3例获得完全缓解,另有两例虽没有达到完全缓解但原始细胞

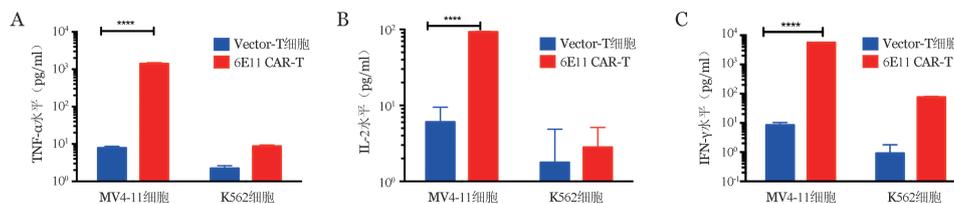
计数减少,并且所有患者均无严重的骨髓抑制<sup>[4]</sup>,提示我们以CD123作为治疗AML的靶点是安全可行的。

当前处于临床前研究及临床研究中的CD123 CAR-T的抗原识别区序列大多来源于鼠源单克隆抗体32716<sup>[11-12]</sup>。而抗原识别区作为引导CAR-T细胞特异性识别结合肿瘤细胞并产生细胞毒作用的关键部分,能通过影响CAR-T细胞与靶细胞的结合表位或者亲和力<sup>[13-14]</sup>,而产生不同的治疗效果。

基于以上研究背景,我们研发了一种新的CD123单克隆抗体,并以其为基础制备成CD123 CAR-T细胞,希望能通过不同的抗原识别区提高CD123阳性AML的治疗效果。

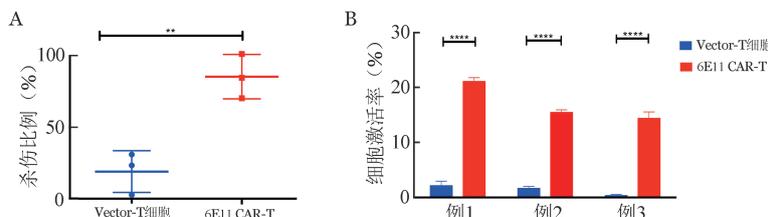
结果表明,杂交瘤细胞株6E11所产生的单克隆抗体能特异性识别CD123抗原并且亲和力高,以6E11抗体可变区序列为基础的CAR分子可以通过慢病毒感染高效的表达于T细胞表面。单链抗体序列是影响CAR蛋白在T细胞表面表达效率的因素之一,而CAR的表达效率可以通过影响细胞因子的产生等途径<sup>[15]</sup>,影响CAR-T细胞的功能,进而影响治疗效果。本研究6E11 CAR-T感染效率均在60%以上,是其能发挥良好的抗肿瘤效应的基础。

在探究6E11 CAR-T的抗AML活性方面,我们通过将CAR-T细胞与CD123阳性和CD123阴性肿瘤细胞共培养的方式证实了6E11 CAR-T可以被CD123阳性细胞特异性激活,高效分泌Th1类细胞因子杀伤肿瘤细胞,对CD123阳性靶细胞有很强的杀伤能力,而对不表达CD123的靶细胞没有表现出



CAR-T:嵌合抗原受体T细胞;\*\*\*\*P < 0.0001

图5 ELISA法检测6E11 CAR-T细胞与MV4-11细胞及K562细胞共培养48 h TNF-α(A)、IL-2(B)和IFN-γ(C)的释放水平(共培养24 h,实验重复3次)



CAR-T:嵌合抗原受体T细胞;A:共培养24 h,\*\*\*P < 0.01;B:脱颗粒实验,共培养5 h,实验重复3次,\*\*\*\*P < 0.0001

图6 6E11 CAR-T作用3例急性髓系白血病患者骨髓单个核细胞的杀伤作用(A)与激活水平(B)

脱靶效应。

此外,我们将 CD123 阳性的 AML 原代细胞与 CAR-T 细胞共培养,对 CAR-T 细胞杀伤原代细胞的能力及脱颗粒水平进行探究,CAR-T 细胞对 CD123 阳性 AML 原代细胞的杀伤能力及脱颗粒水平显著高于对照 T 细胞,说明 6E11 CAR-T 对表达 CD123 的 AML 原代 BMMNC 具有杀伤作用。

综上,我们开发的 6E11 CD123 单克隆抗体,以其可变区序列为基础的 CAR 蛋白可以高效表达于 T 细胞表面,CD123 CAR-T 细胞具有明确的体外抗白血病活性,且对 CD123 阴性细胞没有非特异性杀伤,表现出一定的安全性,有望用于人 CD123 阳性细胞的检测及为治疗 CD123 阳性白血病提供新选择。但是仍需体内试验和临床研究来进一步证实其抗 AML 作用并验证以 6E11 CD123 单克隆抗体可变区序列作为 CAR 的抗原识别区在治疗 AML 方面是否有明确的优势。

#### 参考文献

- [1] 陶中飞,王敏,王建祥.嵌合抗原受体修饰的 T 细胞抗急性髓系白血病的研究进展[J].中华血液学杂志,2016,37(2):160-163. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.02.017.
- [2] Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, 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]. J Clin Oncol, 2015, 33(6): 540-549. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.2025
- [3] Kochenderfer JN, Somerville RPT, Lu T, Shi V, et al. Lymphoma remissions caused by anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells are associated with high serum Interleukin-15 levels [J]. J Clin Oncol, 2017, 35(16):1803 - 13. DOI: 10.1200/JCO.2016.1200/JCO.2016
- [4] Budde L, Song JY, Kim Y, et al. Remissions of acute myeloid leukemia and Blastic Plasmacytoid dendritic cell neoplasm following treatment with CD123-specific CAR T cells: a first-in-human clinical trial[J]. Blood, 2017, 130(Suppl 1):811.
- [5] Wang Y, Xu Y, Li S, et al. Targeting FLT3 in acute myeloid leukemia using ligand- based chimeric antigen receptor-engineered T cells[J]. J Hematol Oncol, 2018, 11(1): 60. DOI: 10.1186/s13045-018-0603-7
- [6] Mardiros A, Forman SJ, Budde LE. T cells expressing CD123 chimeric antigen receptors for treatment of acute myeloid leukemia [J]. Curr Opin Hematol, 2015, 22 (6):484-488. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000190.
- [7] 任思楣,俞云,余鸣,等. F 消减免疫法制备抗 HL60、HL60/ADR 表面抗原差异抗体[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(2): 160-163.
- [8] 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.
- [9] Wang QS, Wang Y, Lv HY, et al. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia [J]. Mol Ther, 2015, 23(1): 184-191. DOI: 10.1038/mt.2014.164.
- [10] Larson RA, Sievers EL, Stadtmauer EA, et al. Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33- positive acute myeloid leukemia in first recurrence[J]. Cancer, 2005, 104(7): 1442-1452. DOI: 10.1002/cncr.21326
- [11] Gill S, Tasian SK, Ruella M, et al. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor- modified T cells [J]. Blood, 2014, 123 (15): 2343-2354. DOI: 10.1182/blood-2013-09-529537.
- [12] Zhou L, Liu X, Wang X, et al. CD123 redirected multiple virus-specific T cells for acute myeloid leukemia [J]. Leuk Res, 2016, 41:76-84. DOI: 10.1016/j.leukres.2015.12.003.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Arcangeli S, Rotiroli MC, Bardelli M, et al. Balance of anti-CD123 chimeric antigen receptor binding affinity and density for the targeting of acute myeloid leukemia [J]. Mol Ther, 2017, 25(8):1933-1945. DOI: 10.1016/j.yymthe.2017.04.017.

(收稿日期:2019-11-27)

(本文编辑:刘爽)