

针对CD4膜蛋白的CAR-T细胞 抗T细胞淋巴瘤的活性研究

陈广华 黄海雯 王易 刘慧文 徐良静 马骁 薛胜利 何雪峰 王荧
顾斌 李彩霞 仇惠英 唐晓文 金正明 苗瞄 孙爱宁 吴德沛

【摘要】 目的 探讨针对CD4膜蛋白的CAR-T细胞对CD4⁺T细胞淋巴瘤细胞的靶向特异性杀伤作用。方法 采用重组DNA技术构建含4-1BB共刺激分子的第二代针对CD4的CAR慢病毒载体,应用293T细胞包装慢病毒,采用流式细胞术检测T细胞的转染效率及T细胞亚群动态变化,采用流式细胞术微球法检测培养上清中IFN- γ 浓度。结果 ①构建的慢病毒载体转染激活的T细胞后CAR膜蛋白阳性率达到50.0%~70.0%。T细胞激活后部分CD8⁺T细胞弱表达(dim)CD4膜蛋白。T细胞转染针对CD4的CAR慢病毒后CD4⁺T细胞、CD8⁺CD4^{dim}T细胞逐渐被清除。②CAR-T细胞、对照组T细胞(空载体转染的T细胞)以8:1效靶比分别与CD4⁺人T细胞淋巴瘤细胞株KARPAS 299细胞共培养24 h,杀伤效率分别为(96.9 \pm 2.1)%和(11.2 \pm 3.1)%,前者明显高于后者($t=7.137, P=0.028$)。③CAR-T细胞单独培养,与转染慢病毒载体表达人CD4的K562细胞(K562-CD4细胞)、K562细胞共培养后上清中IFN- γ 浓度分别为(1 785 \pm 268)、(15 648 \pm 2 168)、(1 978 \pm 354)pg/ml, CAR-T细胞与K562-CD4细胞共培养上清IFN- γ 浓度明显高于其他两组,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 CD4特异性CAR-T细胞效应细胞免疫表型为CD8⁺CD4⁺T细胞,在体外具有杀伤正常CD4⁺T细胞和CD4⁺T细胞淋巴瘤细胞的活性,对于CD4^{dim}T细胞也有较好的清除活性。

【关键词】 抗原, CD4; 淋巴瘤, T细胞; 嵌合抗原受体修饰的T细胞

基金项目:江苏省科教强卫工程-临床医学中心(ZX201102);国家临床重点专科建设项目(201202017);国家高技术研究发展计划(863计划)(2012AA02A505);国家自然科学基金(81300444);江苏省自然科学基金(BK20130273)

An experimental study of CD4 targeted chimeric antigen receptor modified T cell with anti-lymphoma activity Chen Guanghua, Huang Haiwen, Wang Yi, Liu Huiwen, Xu Liangjing, Ma Xiao, Xue Shengli, He Xuefeng, Wang Ying, Gu Bin, Li Caixia, Qiu Huiying, Tang Xiaowen, Jin Zhengming, Miao Miao, Sun Aining, Wu Depei. The First Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Institute of Hematology, Collaborative Innovation Center of Hematology, Suzhou Institute of Blood and Marrow Transplantation, Suzhou 215006, China
Corresponding author: Wu Depei, Email: drwudepei@163.com

【Abstract】 Objective To study the specific killing effect of CD4 membrane protein targeted chimeric antigen receptor modified T (CAR- T) cell. **Methods** The second generation CD4 targeted chimeric antigen receptor containing 4-1BB costimulation domain was insert into lentiviral vector through recombinant DNA technology. Lentivirus was prepared and packaged by 293T cells with four plasmids. Beads activated T cells were transduced with lentivirus and the transduction efficiency was checked with Protein L and flow cytometry. T cell subsets and IFN- γ concentrations were detected with probe-tagged antibody and cytometric bead assay. **Results** ①The transduction efficiency of activated T cells with prepared lentivirus were 50.0%–70.0%. A subset of CD8⁺T cell acquired dim expression of CD4 membrane protein after activation. CD4⁺T cell and CD8⁺CD4^{dim}T cell were gradually killed by CD4 targeted CAR-T post lentivirus transduction. ②The kill efficacy of CD4 targeted CAR-T cell and control T cell toward KARPAS 299 T cell at an E:T ratio of 8:1 for 24 h was (96.9 \pm 2.1)% and (11.2 \pm 3.1)%, CAR-T cell has a

higher killing efficacy than control T cell ($t=7.137, P=0.028$). The IFN- γ concentrations in culture supernatant of CAR-T cell with K562-CD4 cell, CAR-T cell with K562 cell and CAR-T cell alone were (15 648 \pm 2 168), (1 978 \pm 354) and (1 785 \pm 268) pg/ml, CAR-T cell cocultured with K562-CD4 cell produced more IFN- γ than the other two controls ($P<0.01$). **Conclusions** CD4 targeted CAR-T has an immunophenotype of CD8⁺CD4⁻ T cell. CD4 targeted CAR-T cell has killing efficacy toward normal CD4⁺ T cell and CD4⁺T lymphoma cell. CD4 targeted CAR-T cell also has a killing efficacy toward CD4^{dim} target cell.

【Key words】 Antigen, CD4; Lymphoma, T cell; Chimeric antigen receptor modified T cell

Fund program: Jiangsu Provincial Key Medical Center and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (ZX201102); National Clinical Key Specialty Development Project and National Public Health Grand Research Foundation (201202017); National High Technology Research and Development Program of China 863 Program (2012AA02A505); National Natural Science Foundation of China (81300444); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20130273)

T细胞淋巴瘤常以结外病变居多,按照临床病理学特征主要分为成人T细胞性白血病/淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤未定型、血管免疫母T细胞淋巴瘤、皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤、皮肤 $\gamma\delta$ T细胞淋巴瘤、肝脾T细胞淋巴瘤、肠病型肠道T细胞淋巴瘤等^[1]。T细胞淋巴瘤的疗效和预后较B细胞淋巴瘤差,而其疗效的提高有赖于针对T细胞淋巴瘤发生的原癌基因的靶向治疗新型药物、针对其免疫表型的抗体治疗等^[2-4]。大部分外周T细胞淋巴瘤、间变大细胞淋巴瘤和血管免疫母T细胞淋巴瘤表达膜CD4抗原,针对CD4的治疗性单抗应用于T细胞淋巴瘤治疗,患者耐受性良好无严重不良反应^[5-6]。

针对CD19的CAR-T细胞应用于B细胞急性淋巴细胞白血病(ALL)治疗,完全缓解率可达90%^[7-9]。鉴于CAR构建元件包括单抗的单链可变区(scFv)、铰链区、跨膜区和共刺激信号区、CD3zeta胞内信号区^[10-11],我们构建了针对CD4单抗scFv片段构成的CAR,通过慢病毒载体转染T细胞并观察其对CD4⁺T细胞的杀伤活性。

材料和方法

1. 主要试剂与仪器: RPMI 1640培养基、高糖DMEM培养液、TRIzol、Lipofectamine 2000、 α CD3/CD28磁珠及PCR仪均为美国Gibco公司产品, X-Vivo 15无血清培养基为美国Lonza公司产品,重组人IL-2(rhIL-2)、rhIL-7和rhIL-15购自美国Peprotech公司。无内毒素质粒大提试剂盒购自德国QIAGEN公司, Polybrene购自美国Sigma公司, 细胞因子CBA微球试剂盒购自美国BD公司。ONE-Glo Luciferase活性检测试剂盒购自美国Promega公司。FC500流式细胞仪为美国Coulter公司产品。Varioskan Flash多功能读数仪为美国

Thermo公司产品。

2. 细胞株培养: 人CD4⁺T细胞淋巴瘤细胞株KARPAS 299细胞购自美国菌种保藏中心(american type culture collection, ATCC), 在实验室自行转染含萤火虫荧光素酶的慢病毒, 并筛选稳定表达萤火虫荧光素酶的单克隆细胞。转染慢病毒载体表达人CD4的K562细胞(K562-CD4细胞)由本实验室制备。KARPAS 299、K562-CD4、K562细胞用RPMI 1640培养基+10%胎牛血清培养。

3. 慢病毒载体构建及浓缩制备: 构建Lenti-CD4-CAR慢病毒载体。应用Lipo3000脂质体转染法分别将Lenti-CD4-CAR慢病毒载体质粒、Gag-pol质粒、VSV-G质粒共同转入293T包装细胞系, 培养24~72 h时收集病毒上清。慢病毒上清经离心沉淀后采用定量PCR法滴定慢病毒滴度。

4. 流式细胞术检测Lenti-CD4-CAR在T细胞中的表达: 调整健康志愿者外周血单个核细胞密度为 2.0×10^6 /ml, 按2:1比例加入CD3/CD28磁珠体外活化3 d, 第4天加入150 U/ml rhIL-2, 于37℃、5% CO₂、饱和湿度孵箱中扩增2 d。经流式细胞术验证CD3阳性率均>98%。感染复数(MOI)=5时, 加入慢病毒悬液至激活的T细胞悬液, 添加Polybrene 6 μ g/ml, 1 200 \times g室温条件离心2 h促进转染。收集慢病毒转染4 d后T细胞, 用含5 g/L牛血清白蛋白、0.9 g/L叠氮钠的PBS液洗涤3次。按照说明书加入生物素标记的Protein L, 洗涤去除多余游离Protein L, 随后加入链亲和霉素-PE避光孵育30 min后洗涤、重悬, 加入7-AAD孵育10 min后上流式细胞仪检测, 分析活细胞群体CAR表达。

5. 萤火虫萤光素酶化学发光法检测CAR-T细胞的体外杀伤活性: 采用V形底96孔板进行效应细胞(CAR-T细胞、空载体转染的T细胞)与靶细胞

(KARPAS 299 细胞)混合培养。每孔接种 1×10^5 个 KARPAS 299 细胞,转移至 1.6 ml EP 管离心收集细胞,按效靶比 0.5:1、1:1、2:1、4:1、8:1 进行分组,采用无血清培养基补足终体积至 200 μ l, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。培养结束后转移 100 μ l 细胞悬液至 96 孔平底板,加入 100 μ l ONE-Glo Luciferase 活性检测试剂,室温孵育 10 min 后用 Varioskan Flash 多功能读数仪 [购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司] 检测。杀伤活性计算公式为:

$$\text{杀伤活性}(\%) = \frac{\text{杀伤率}_{\text{样品孔}} - \text{杀伤率}_{\text{基线孔}}}{1 - \text{杀伤率}_{\text{基线孔}}} \times 100\%$$

6. 流式细胞术微球法检测培养上清 IFN- γ 蛋白水平:无血清培养基调整效应细胞(CAR-T 细胞、空载体转染的 T 细胞)密度为 1×10^6 /ml,靶细胞为 K562-CD4 细胞、K562 细胞,效靶比为 1:1。CAR-T 细胞实验分组:①CAR-T 细胞单独培养组;②K562-CD4 细胞+CAR-T 细胞共培养组;③K562 细胞+CAR-T 细胞共培养组。空载体转染的 T 细胞实验分组同 CAR-T 细胞。培养 24 h 后收集培养上清,按照试剂盒说明书进行操作,上流式细胞仪检测 IFN- γ 表达水平,应用 FCAP Array 软件分析数据。

7. 统计学处理:采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。数据以均值 \pm 标准误表示,进行 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Lenti-CD4-CAR-4-1BB 慢病毒表达质粒构建:成功构建针对人 CD4 的 CAR Lenti-CD4-CAR-4-1BB(由抗人 CD4 的单链抗体、CD8 α 的铰链区和跨膜区及 4-1BB 胞内区、CD3zeta 的胞内信号结构域构成),慢病毒表达转移质粒经限制性内切酶 EcoRI-BamHI 双酶切后所得长片段为 8 500 bp 左

右,短片段为 1 500 bp 左右,且采用针对 EF-1 α 的引物正向测序确认 DNA 序列无误,由此可以证明 Lenti-CD4-CAR-4-1BB 的编码基因插入位点正确(图 1)。DNA 测序结果显示 Lenti-CD4-CAR-4-1BB 的编码序列与设计序列完全一致。收集 293T 细胞制备的慢病毒上清液,超速冷冻离心机浓缩,应用定量 PCR 法测定活病毒滴度(浓缩后慢病毒滴度为 1.0×10^8 TU/ml)。

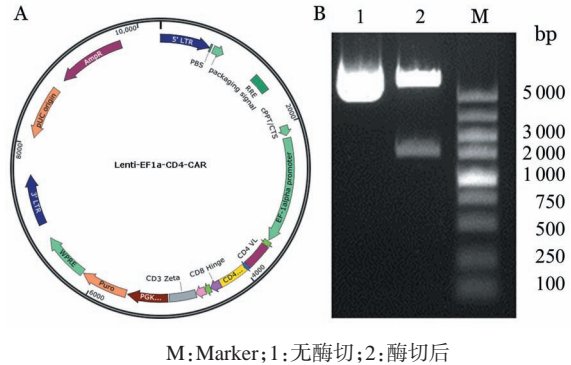


图1 针对CD4的CAR结构示意图(A)及慢病毒载体酶切后电泳图(B)

2. T 细胞 CAR 的表达:CAR 在 T 细胞中稳定表达对于 CAR-T 细胞发挥杀伤靶细胞作用是非常重要的。结果显示空载体慢病毒转染的 T 细胞中 Protein L-PE 阳性率低于 4.5%, Lenti-CD4-CAR-4-1BB 载体慢病毒转染的 T 细胞中 Protein L-PE 阳性率 50.0% ~ 70.0% (图 2)。

3. CAR 对 T 细胞亚群的影响:慢病毒转染 T 细胞 4 d 后 CD4 $^{+}$ T 细胞为 1.4% ~ 2.0%,可见少量 CD8 $^{+}$ CD4 low T 细胞,提示 T 细胞表达 CAR 能够识别 CD4 分子并激活 T 细胞杀伤功能。慢病毒转染 T 细胞 7 d 后 CD4 $^{+}$ T 细胞和 CD8 $^{+}$ CD4 low T 细胞消失,主要为 CD8 $^{+}$ T 细胞,少量为 CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$ T 细胞(图 3)。提示构建的 CAR 能够介导激活 T 细胞清除 CD4 $^{+}$ T 细

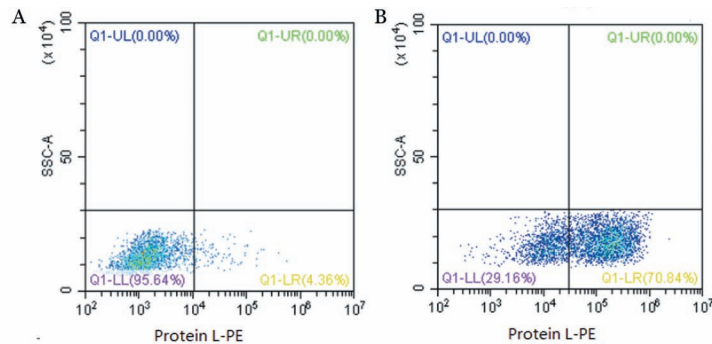


图2 流式细胞术检测针对CD4的CAR慢病毒载体转染T细胞效率

胞和CD8⁺CD4^{low}T细胞。

4. CAR-T细胞对靶细胞的杀伤活性:结果显示CAR-T细胞与KARPAS 299细胞共培养24 h后, CAR-T细胞对KARPAS 299细胞的杀伤作用明显强于对照组(空载体转染的T细胞组),不同效靶比组间差异均有统计学意义(*P*值均<0.05)(表1)。

5. CAR-T细胞对靶细胞IFN- γ 表达水平的影响:结果显示,CAR-T细胞与K562-CD4细胞共培养上清中IFN- γ 表达水平高于其他两组,差异有统计学意义(*P*<0.01)(表2)。空载体转染的T细胞共培养组各组间差异无统计学意义(*P*>0.05)。

讨 论

T细胞淋巴瘤是起源于胸腺后或成熟T细胞的一组异质性淋巴瘤,在我国所有淋巴瘤中所占比例高达30%以上^[1]。可供选择的一线治疗方案包括CHOP、HyperCVAD/MTX-AraC、EPOCH方案,对于年轻患者可考虑在疾病早期行造血干细胞移植。与传统化疗相比,自体造血干细胞移植可提高低危T细胞淋巴瘤患者的长期生存率,但对复发和难治的T细胞淋巴瘤患者的疗效较差,异基因造血干细胞移植后具有移植抗淋巴瘤效应,但移植相关死亡率较高^[12]。

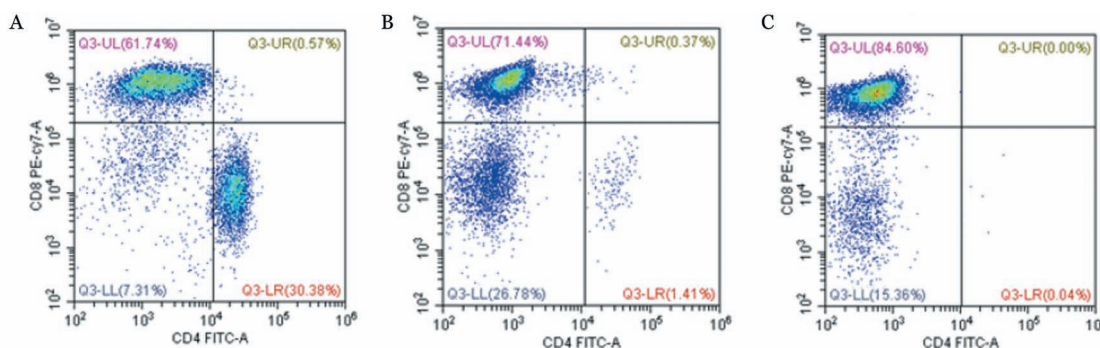
大多数T细胞淋巴瘤呈CD4⁺,部分为CD8⁺、

表2 针对CD4的CAR-T细胞对K562细胞IFN- γ 表达水平的影响(pg/ml, $\bar{x}\pm SE$)

组别	对照组	CAR-T细胞组
T细胞单独培养组	583 \pm 50	1 785 \pm 268
T细胞+K562细胞共培养组	679 \pm 66	1 978 \pm 354
T细胞+K562-CD4细胞共培养组	679 \pm 65	15 648 \pm 2 168 ^a

注:对照组:空载体转染的T细胞组;K562-CD4细胞:表达人CD4的K562细胞;^a与其他两组比较,*P*<0.01。每组设3个复孔,实验重复3次

CD4⁺CD8⁺^[13]。d'Amore等^[6]研究发现,针对CD4的单抗联合化疗药物用于间变大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤治疗后,患者外周血CD4⁺T细胞数减少,但是无抗体治疗相关严重感染发生。膜蛋白CD4高表达于辅助性T细胞表面、弱表达于单核细胞表面,造血干细胞不表达。鉴于针对CD19的CAR-T细胞治疗在B细胞ALL患者临床试验中取得良好的疗效^[7],且目前T细胞淋巴瘤患者化疗、造血干细胞移植疗效差,我们设计了针对CD4胞外区的CAR慢病毒载体,其中的单抗针对的CD4具体表位不明,不同表位可能影响CAR-T细胞识别靶细胞及免疫突触的形成^[14]。采用Protein L染色法,我们构建的慢病毒载体转染正常人T细胞后可获得高达50.0%~70.0%的阳性T细胞。有研究者报道CD8⁺T细胞被激活后弱表达CD4^[15]。我



A:转染前;B:转染后第4天;C:转染后第7天

图3 流式细胞术检测针对CD4的慢病毒转染后CAR-T细胞中CD4⁺T细胞亚群变化

表1 针对CD4的CAR-T细胞对KARPAS 299细胞的特异性杀伤活性(% , $\bar{x}\pm SE$)

组别	不同效靶比				
	0.5:1	1:1	2:1	4:1	8:1
CAR-T细胞组	25.8 \pm 4.5	56.0 \pm 5.4	92.3 \pm 6.2	94.1 \pm 4.3	96.9 \pm 2.1
对照组	1.3 \pm 0.5	2.4 \pm 1.0	6.7 \pm 1.8	9.6 \pm 2.1	11.2 \pm 3.1
<i>t</i> 值	6.723	6.980	7.340	7.523	7.137
<i>P</i> 值	0.035	0.031	0.020	0.017	0.028

注:对照组:空载体转染的T细胞组。每组设3个复孔,实验重复3次

们在研究中也发现体外 α CD3/CD28 磁珠激活部分CD8⁺T细胞弱表达CD4, 针对CD4的CAR-T细胞培养7 d后其中的CD4⁺T细胞被清除, 而且CD8⁺CD4^{low} T细胞也被清除。提示我们构建的CAR能够介导激活T细胞, 在体外与表达CD4的靶细胞形成免疫突触并杀伤靶细胞, 且具有较高的亲和力, 可以杀伤弱表达CD4的靶细胞。

人体CD4⁺T细胞具有重要的抗感染、抗肿瘤作用。针对CD19的CAR-T细胞治疗ALL后患者出现低球蛋白血症, 患者需要定期输注免疫球蛋白。在针对CD4的CAR中加入单纯疱疹病毒胸苷激酶、诱导性caspase 9、截短的表皮生长因子受体(EGFRt)等自杀基因元件有利于清除CAR-T细胞, 促进患者正常CD4⁺T细胞免疫重建。B细胞淋巴瘤患者CAR-T细胞治疗的有效率及CAR-T细胞体内扩增倍数低于B细胞ALL患者, 可能与淋巴瘤患者前期多次应用利妥昔单抗免疫清除外周血B细胞而出现低B细胞血症有一定关系。鉴于CD4⁺T细胞淋巴瘤患者的外周淋巴细胞主要为T细胞, 其中的正常CD4⁺T细胞及循环CD4⁺T细胞淋巴瘤细胞均可以作为针对CD4的CAR-T细胞的靶细胞, 理论上针对CD4的CAR-T细胞可以激活并大量增殖, 并以较高的效靶比清除CD4⁺淋巴瘤细胞, 提高CAR-T细胞治疗的安全性。

综上, 在本研究中我们成功构建了含4-1BB共刺激分子、靶向CD4抗原的第二代CAR慢病毒载体, 具有较高的转染激活T细胞效率, 体外具有杀伤CD4⁺T细胞及弱表达CD4的靶细胞活性。

参考文献

- [1] 尹光丽, 李建勇, 缪扣荣. 异基因造血干细胞移植治疗外周T细胞淋巴瘤研究进展 [J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(4): 343-347. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.04.020.
- [2] Gkotzamanidou M, Papadimitriou CA. Peripheral T-cell lymphoma: the role of hematopoietic stem cell transplantation [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2014, 89(2): 248-261. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2013.08.016.
- [3] 陈荣华, 郭树霞, 张晓娟. HyperCVAD方案和CHOP/CHOP样方案治疗初发的外周T细胞淋巴瘤的疗效 [J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(1): 80-83. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2016.01.015.
- [4] 邹德慧, 黄文阳, 刘宏, 等. 自体造血干细胞移植治疗25例侵袭性外周T细胞淋巴瘤患者临床分析 [J]. 中华血液学杂志, 2015, 36(6): 455-459. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.06.002.
- [5] Knox S, Hoppe RT, Maloney D, et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma with chimeric anti-CD4 monoclonal antibody [J]. Blood, 1996, 87(3): 893-899.
- [6] D'Amore F, Radford J, Relander T, et al. Phase II trial of zanolimumab (HuMax-CD4) in relapsed or refractory non-cutaneous peripheral T cell lymphoma [J]. Br J Haematol, 2010, 150(5): 565-573. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08298.x.
- [7] Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4⁺:CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients [J]. J Clin Invest, 2016, 126(6): 2123-2138. DOI: 10.1172/JCI85309.
- [8] Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial [J]. Lancet, 2015, 385(9967): 517-528. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
- [9] Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia [J]. N Engl J Med, 2013, 368(16): 1509-1518. DOI: 10.1056/NEJMoa1215134.
- [10] Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. N Engl J Med, 2011, 365(8): 725-733. DOI: 10.1056/NEJMoa1103849.
- [11] Milone MC, Fish JD, Carpenito C, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo [J]. Mol Ther, 2009, 17(8): 1453-1464. DOI: 10.1038/mt.2009.83.
- [12] Corradini P, Doderio A, Zallio F, et al. Graft-versus-lymphoma effect in relapsed peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphomas after reduced-intensity conditioning followed by allogeneic transplantation of hematopoietic cells [J]. J Clin Oncol, 2004, 22(11): 2172-2176. DOI: 10.1200/JCO.2004.12.050.
- [13] Pinz K, Liu H, Golightly M, et al. Preclinical targeting of human T-cell malignancies using CD4-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cells [J]. Leukemia, 2016, 30(3): 701-707. DOI: 10.1038/leu.2015.311.
- [14] 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.
- [15] Kitchen SG, Korin YD, Roth MD, et al. Costimulation of naive CD8(+) lymphocytes induces CD4 expression and allows human immunodeficiency virus type 1 infection [J]. J Virol, 1998, 72(11): 9054-9060.

(收稿日期:2017-09-26)

(本文编辑:刘志红)