

靶向 GPC3 的第四代嵌合抗原受体 T 细胞 (分泌 IL-7 和 CCL19) 的构建以及功能

黄婉莉, 刘宇, 胡耀狄, 高基民

温州医科大学 检验医学院 生命科学学院, 浙江 温州 325035

黄婉莉, 刘宇, 胡耀狄, 等. 靶向 GPC3 的第四代嵌合抗原受体 T 细胞 (分泌 IL-7 和 CCL19) 的构建以及功能. 生物工程学报, 2020, 36(5): 979-991.

Huang WL, Liu Y, Hu YD, et al. Construction and function of Glypican-3-targeted fourth-generation chimeric antigen receptor T cells (secreting IL-7 and CCL19). Chin J Biotech, 2020, 36(5): 979-991.

摘要: 基于嵌合抗原受体修饰的 T 细胞 (CAR-T) 的过继免疫疗法已被证明是治疗恶性肿瘤最有希望策略之一, 但是目前其在实体瘤中的应用依然有限。研究表明磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 (GPC3) 对肝细胞癌来说是一种有意义的诊断、治疗和预后生物标志物, 且已有利用第二代/第三代 GPC3 靶向的 CAR-T 细胞治疗肝细胞癌的研究报道。为了进一步提高治疗效果, 构建同时表达 GPC3 CAR、人源 IL-7 和 CCL19 细胞因子的第四代慢病毒载体, 转染 293T 细胞包装慢病毒并感染人 T 淋巴细胞制备靶向 GPC3 的第四代 CAR-T 细胞 (GPC3-BBZ-7×19)。利用细胞计数、趋化小室、荧光素酶生物发光法以及流式细胞术等比较其与第二代 GPC3 CAR-T 细胞 (GPC3-BBZ) 在增殖、迁移、杀伤以及亚型分布方面的区别, 评估 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞对免疫缺陷小鼠体内 GPC3 阳性的肝细胞癌腹腔移植瘤生长的作用。结果表明与 GPC3-BBZ CAR-T 细胞相比, GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞具备更强的增殖能力、趋化能力以及记忆干细胞 (Stem memory T cell, Tscm) 组成比 (P 值均 < 0.05), 而在体外特异性杀伤 GPC3 阳性的肝细胞癌细胞以及细胞因子分泌水平方面无显著差异。此外, GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞能够明显抑制免疫缺陷小鼠体内的 GPC3 阳性肝细胞癌移植瘤模型。因此靶向 GPC3 的第四代 CAR-T 细胞 (分泌 IL-7 和 CCL19) 有望比第二代 GPC3 靶向的 CAR-T 细胞更持久有效地对抗肿瘤, 并产生针对肿瘤的记忆功能, 为以后的临床试验提供了临床前研究基础。

关键词: 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3, 肝细胞癌, 嵌合抗原受体修饰的 T 细胞, 增殖, 迁移, 记忆干细胞

Received: March 7, 2020; **Accepted:** April 9, 2020

Supported by: Science Foundation of National Health Commission of the People's Republic of China (No. WKJ-ZJ-1928), Science and Technology Major Projects of Wenzhou (No. ZS2017014).

Corresponding author: Jimin Gao. Tel: +86-577-86699341; E-mail: jimingao64@yahoo.com

国家卫生健康委员会科研基金 (No. WKJ-ZJ-1928), 温州市重大科技专项 (No. ZS2017014) 资助。

网络出版时间: 2020-05-12

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200511.1827.001.html>

Construction and function of Glypican-3-targeted fourth-generation chimeric antigen receptor T cells (secreting IL-7 and CCL19)

Wanli Huang, Yu Liu, Yaodi Hu, and Jimin Gao

School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China

Abstract: Adoptive immunotherapy based on chimeric antigen receptor-modified T cells (CAR-T) is one of the most promising strategies to treat malignant tumors, but its application in solid tumors is still limited. Glypican-3 (GPC3) is a meaningful diagnostic, therapeutic, and prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma (HCC). The second/third generation GPC3-targeted CAR-T cells are generated to treat HCC. In order to improve the therapeutic effect, we constructed a fourth-generation lentiviral vector to express GPC3 CAR, human interleukin-7 (IL-7) and CCL19. Then the lentiviral vector and packaging plasmids were co-transfected into HEK293T cells to generate CAR lentiviral particles. Human T lymphocyte cells were transduced with CAR lentiviral to develop the fourth-generation GPC3-targeted CAR-T cells (GPC3-BBZ-7×19). *In vitro*, we used cell counting, transwell assay, luciferase bioluminescence assay and flow cytometry to compare the proliferation, chemotaxis, cytotoxicity and subtype distribution between GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells and the second generation GPC3-targeted CAR-T cells (GPC3-BBZ). *In vivo*, we established GPC3-positive HCC xenograft model in immunodeficient mice, then untransduced T cells (non-CAR-T) or GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells were injected. Tumor growth in mice was observed by bioluminescence imaging. Results showed that compared with GPC3-BBZ CAR-T, GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells had stronger proliferation, chemotactic ability, and higher composition of memory stem T cells (Tscm) (P values < 0.05). However, there were no significant difference in cytotoxicity and cytokine secretion between them. In addition, GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells could significantly eliminate GPC3-positive HCC xenografts established in immunodeficient mice. Therefore, the fourth-generation GPC3-targeted CAR-T cells (secreting IL-7 and CCL19) are expected to be more durable and effective against HCC and produce tumor-specific memory, to provide a preclinical research basis for future clinical trials.

Keywords: glypican-3, hepatocellular carcinoma, chimeric antigen receptor T cells, proliferation, chemotaxis, memory stem T cells

肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种侵略性癌症,也是全球范围内最常见的恶性肿瘤,占原发性肝癌约 90%^[1]。目前手术切除、肝移植和肝动脉化疗栓塞术 (Transarterial chemoembolization, TACE) 是治疗早期 HCC 患者的主要策略^[2-3],但是大多数肝细胞癌患者确诊时已是晚期,这些治疗并没有产生显著的效果。索拉替尼、雷戈非尼、乐伐替尼等是美国食品药品监督管理局 (Food and drug administration, FDA) 批准的治疗晚期 HCC 的一线或二线药物,其临床疗效存在一定的局限性^[4-7]。因此迫切需要开发新的策略治疗晚期 HCC 患者。

嵌合抗原受体 (Chimeric antigen receptor,

CAR) 修饰的 T 细胞免疫疗法已被证实是一种非常有希望的肿瘤治疗策略^[8],其可以特异性识别肿瘤相关抗原,并以非主要组织相容复合物 (Major histocompatibility complex, MHC) 限制的方式消除肿瘤细胞^[9-10]。CAR 主要由识别并结合肿瘤细胞表面抗原的胞外单链抗体可变片段 (Single chain antibody fragment, scFv)、跨膜段和胞内信号转导/激活域组成。第二代/第三代 CAR-T 细胞在第一代的基础之上加入一个/两个共刺激分子如 CD28、4-1BB 等从而增强了 CAR-T 细胞活化、增殖和生存能力。第四代 CAR-T (又被称为“TRUCK”)则在传统的 CAR 载体上增加了编码细胞因子的基因,其可以分泌 IL-12、IL-15 等细

胞因子, 从而改善 CAR-T 细胞的扩增和持久性, 提升其对于免疫抑制肿瘤微环境的抵抗力^[11]。

磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 (Glypican-3, GPC3) 是硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 Glypican 家族成员的一种, 其通过糖基磷脂酰肌醇 (Glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚定在细胞表面。GPC3 核心蛋白由 580 个氨基酸组成, 大小为 70 kDa。其已被证明在 HCC 中高表达, 而在大多数健康的成年器官中无法检测到^[12-15], GPC3 对于 HCC 来说是一种有意义的诊断、治疗和预后评估的生物标志物。因此它可以作为有希望的肿瘤相关抗原, 用于构建靶向 HCC 的 CAR-T 细胞。事实上, 已有研究者构建了靶向 GPC3 的第二/三代 CAR-T 细胞, 并在动物体内验证了其对于细胞株或患者来源的 GPC3 阳性肝细胞癌移植瘤的治疗效果^[16-17]。

虽然 CAR-T 疗法在治疗血液系统恶性肿瘤中取得了重大突破, 比如 2017 年靶向 CD19 的两种 CAR-T 细胞产品 Kymriah 和 Yescarta 被 FDA 分别批准为治疗复发/难治性急性 B 淋巴细胞白血病和难治性大 B 细胞淋巴瘤的首选治疗方式^[18-19], 但是目前 CAR-T 细胞对实体瘤的疗效依然有限。原因是多方面的: 实体瘤表面往往表达多种不同的抗原, 因此缺乏肿瘤特异性靶标; 肿瘤免疫微环境的存在可以抑制 CAR-T 细胞活性; CAR-T 细胞体内的存活时间短等。

本研究中我们构建了一种靶向 GPC3 的第四代 CAR-T 细胞 (分泌 IL-7 和 CCL19)。其中 IL-7 是 T 细胞稳态的主要调节因子, 可以促进 T 细胞扩增, 对维持体内 T 细胞存活及持久性具有重要作用^[20-21]。CCL19 属于 CC 类趋化因子, 可以募集 T 细胞和树突状细胞 (Dendritic cell, DC) 浸润到肿瘤发生部位^[22-23]。本研究通过体外比较第四代 GPC3 CAR-T 细胞 (GPC3-BBZ-7×19) 与第二代 GPC3 CAR-T 细胞 (GPC3-BBZ) 在增殖、迁移、亚型和杀伤等功能方面的差异, 以及体内观察 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞对免疫缺陷小鼠体

内 HCC 移植瘤的作用效果, 期望为 GPC3 阳性的肝细胞癌提供新的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

慢病毒载体 pLenti-T2A-Luc-GFP、包装质粒 pLP1、pLP2 和 pMD2G 由本实验构建并保存。靶向 GPC3 的单克隆抗体可变区 (4A11) 从专利^[24]获取。IL-7 和 CCL19 基因片段由苏州金唯智科技有限公司合成。人肾上皮细胞系 HEK293T 和人急性 T 细胞白血病细胞系 Jurkat 购于美国菌种保藏中心 (American type culture collection, ATCC)。人肝癌细胞系 Huh7、Hep3B 和 HepG2 由中国科学院细胞库提供。无特定病原体 (Specific pathogen-free, SPF) 级雄性、4-6 周龄的 NCG (NOD/ShiLtJGpt-Prkdc^{em26Cd52} Il2rg^{em26Cd22}/Gpt) 小鼠购自南京集萃药康生物科技有限公司, 动物生产许可证号为 SCXK (苏) 2019-0009。小鼠饲养于温州医科大学实验动物中心的 SPF 级实验室, 动物饲养许可证号为 SYXK (浙) 2015-0009。本研究中动物实验严格按照温州医科大学医学实验动物管理委员会制定的动物伦理条例进行相关操作。

1.1.2 实验试剂

TransStbl3 感受态购于上海桑尼生物技术公司; DNA 胶回收试剂盒购于美国 Axygen 公司; 限制性内切酶购于美国 New England BioLabs 公司; 无缝克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技公司; 质粒抽提试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; PE 抗人 CD3 抗体、APC 抗人 CD45RA 抗体、FITC 抗人 CD45RO 抗体、PB 抗人 CD62L 抗体、APC 抗人 IFN- γ 抗体均购自美国 BioLegend 公司; 鼠抗人 GPC3 单克隆抗体和 FITC 标记的驴抗鼠 IgG (H+L) 抗体、PE 标记的链亲和素 (PE-SA) 购自美国 Thermo Fisher 公司; 生物素标记的 F(ab')₂ 片段化羊抗人 IgG 购于美国 eBioscience 公司;

FITC 标记的人 GPC3 蛋白购自美国 AcroBiosystems 公司; IL-7 和 GM-CSF 细胞因子检测试剂盒购自杭州联科生物技术有限公司; CCL19 细胞因子检测试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司; 重组人 IL-2 购于美国 Prprotech 公司。D-(-)-荧光素购自上海甄准生物科技有限公司; 聚凝胺 (polybrene) 购自美国 Sigma 公司; 聚乙酰亚胺 (Polyetherimide, PEI) 购于美国 Sigma 公司。细胞培养基以及添加剂均购于美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒表达载体的构建及其包装

GPC3 CAR 由靶向 GPC3 的 4A11 单克隆抗体的单链可变区与人 CD8 α 、4-1BB 和 CD3 ζ 组成。设计引物 (表 1) 对 GPC3 CAR 片段和人源 IL-7-CCL19 片段进行 PCR, 再通过重叠延伸 PCR 将 IL-7-CCL19 片段与 GPC3 CAR 片段连接 (3 个片段中间以 2A 自剪切肽隔开), 以 *Mlu* I 和 *Eco*R I 限制性酶切位点酶切慢病毒表达载体 pLenti-T₂A-Luc-GFP, 通过无缝克隆将 GPC3 CAR 片段和 GPC3 CAR-IL-7-CCL19 片段分别插入载体中构建第二代 CAR 慢病毒载体 GPC3-BBZ 和第四代 CAR 慢病毒载体 GPC3-BBZ-7 \times 19。

质粒通过第三代慢病毒包装系统进行病毒包装: 准备 EP 管, 并加入适量的 PBS, 在第 1 管 PBS 中分别加入一定量的目的质粒 GPC3-BBZ/GPC3-BBZ-7 \times 19 与包装质粒 pLP1、pLP2、pMD2G; 在第 2 管 PBS 中加入 PEI, 室温孵育 5 min; 将第 2 管混合物加入第 1 管中, 轻柔混匀并室温孵育 20 min, 形成质粒-PEI 复合物; 将该复合物加入细胞密度为 70%–80% 的 293T 细胞培养基中,

37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后收集上清, 用 0.45 μ m 滤膜过滤病毒原液并超速离心获得病毒浓缩液。

1.2.2 健康人外周血 CAR-T 细胞的制备及鉴定

利用外周血淋巴细胞分离液 Ficoll 提取健康人外周血中单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 按照 T 细胞与磁珠数量之比为 1:1 加入 α -CD3/ α -CD28 抗体包被的磁珠分离人 T 细胞, 并置于含 10% 血清和 100 μ g/mL IL-2 的 AIM-V 培养基中培养。24 h 后, 计数活化的人 CD3⁺T 细胞, 于每个孔加入 0.1 \times 10⁶ 个 T 细胞和感染复数 (Multiplicity of infection, MOI)=10 的病毒浓缩液 (GPC3-BBZ 或 GPC3-BBZ-7 \times 19), 培养基补齐至 200 μ L, 并于每孔加入聚凝胺 (1:2 000), 1 200 r/min 离心 90 min, 然后置于细胞培养箱中, 4 h 后换液。离心换液后继续培养, 每隔 2–3 d 补充培养基或者传代。制备的 CAR-T 细胞分别命名为 GPC3-BBZ CAR-T 细胞和 GPC3-BBZ-7 \times 19 CAR-T 细胞, 将未经病毒感染的人 T 细胞 (non-CAR-T) 作为阴性对照。

取转导 5 d 后的 T 细胞, 用 FACS (由 50 mL PBS 加 1 mL 胎牛血清配制而成) 洗涤细胞, 离心弃上清液; 加入 100 μ L FITC 标记的人 GPC3 蛋白 (工作浓度为 3 μ g/mL) 重悬细胞, 4 °C 孵育 60 min, 然后用 FACS 洗涤 3 次, 用流式细胞仪检测 T 细胞表面 CAR 的表达情况。

1.2.3 荧光素酶生物发光法检测 CAR-T 细胞的体外杀伤活性

使用鼠抗人 GPC3 单克隆抗体和 FITC 标记的驴抗鼠 IgG (H+L) 抗体 (二抗) 对实验室中 4 种

表 1 质粒构建所需引物

Table 1 Primer sequence for plasmid construction

| Primer name | Primer sequence (5'-3') | Size (bp) |
|-------------|--|-----------|
| GPC3-F | TAGCCCCGGGGAATTCACCGCCATGGCTTTACCCGT | 36 |
| GPC3-R | CCTGGGAGGCAGGGCTTGCATGTG | 24 |
| IL-7-F | CACATGCAAGCCCTGCCTCCCAGGGGCGAGCGGCCACCAACT | 43 |
| CCL19-R | TTGTTTAAACACGCGTTCAGGAG | 23 |

肝癌细胞株 Sk-hep1、HepG2、Huh7 和 Hep3B 进行染色。用流式细胞术检测其 GPC3 表达水平。将 pLenti-T2A-Luc-GFP 慢病毒质粒转导上述 GPC3 表达阳性的细胞, 然后通过流式分选 GFP 阳性细胞, 构建长久、稳定表达 GFP 和荧光素酶 (Luciferase), 且表达率在 90% 以上的细胞株来用于后续的杀伤实验。在 96 孔细胞培养板中加入 0.01×10^6 个靶细胞使其贴壁, 并按效靶比 2:1、5:1、10:1 和 20:1 加入效应 T 细胞, 每组设置 3 个复孔。另外再设置只加靶细胞与培养基的阴性对照孔和用 ddH₂O 重悬靶细胞的阳性对照孔, 每组 3 个复孔。靶细胞为人肝癌细胞 HepG2、Huh7 和 Hep3B, 效应细胞为 non-CAR-T、GPC3-BBZ CAR-T 细胞和 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞, 杀伤所用培养基为 AIM-V T 细胞完全培养基。铺板结束后, 将 96 孔板置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h, 然后在上清中加入荧光素酶的底物 D-(-)-荧光素, 避光孵育 10 min, 使用酶标仪检测荧光值, 计算各组 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的体外裂解率。裂解率=(Max-V)/(Max-Min)×100%。(Max: 只加靶细胞与培养基孔的荧光值; Min: ddH₂O 重悬靶细胞孔的荧光值; V: 效靶细胞共孵育孔测得的荧光值)

1.2.4 ELISA 法检测 CAR-T 细胞分泌的 IL-7 和 CCL19 细胞因子水平

取培养至 5 d 和 10 d 的 CAR-T 细胞培养上清, 300 r/min 离心 10 min 后去除沉淀物, 根据细胞因子检测试剂盒要求, 采用双抗体夹心法检测 CAR-T 细胞分泌的人 IL-7 (Human IL-7) 和 CCL19 (Human CCL19) 细胞因子水平, 底物显色后, 使用酶标仪在 450 nm 读取 OD 值, 根据标准曲线计算各样品中相应的细胞因子浓度。

1.2.5 CAR-T 细胞活化水平检测

将靶细胞与肿瘤细胞按 1:1 的效靶比共孵育 24 h, 取上清 300 r/min 离心 10 min 后去除沉淀物, 采用双抗体夹心法检测 CAR-T 细胞分泌人

GM-CSF 的水平。底物显色后, 使用酶标仪在 450 nm 读取 OD 值, 根据标准曲线计算各样品中相应的细胞因子浓度。

采用同样的方法将靶细胞与肿瘤细胞进行共孵育, 并在上清中加入高尔基体阻断剂 (美国 BD 公司), 6 h 以后取 T 细胞进行染色: 先洗涤 T 细胞, 再用 PE 标记的抗人 CD3 抗体染色, 方法同上, 之后按照胞内染色试剂盒的操作流程先固定和裂解 T 细胞, 再加入配制的 APC 抗人 IFN- γ 抗体重悬 T 细胞, 室温孵育 40 min, 染色完成后用 FACS 洗涤细胞并用流式细胞仪检测 T 细胞的 IFN- γ 分泌水平。

1.2.6 计数检测 CAR-T 细胞增殖水平

将按相同 MOI 转导病毒的 GPC3-BBZ CAR-T 细胞和 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞铺在 96 孔板中, 0.1×10^6 个/孔, 每组设置 3 个复孔, 并于 3、5、7、9 d 计数细胞的绝对数量, 绘制生长曲线比较 GPC3-BBZ CAR-T 细胞和 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞生长速度。

1.2.7 Transwell 实验检测 CAR-T 细胞趋化功能

取培养至第 5 天的 T 细胞上清备用, 取 non-CAR-T 细胞置于 DynaMag™-5 磁力架上脱磁, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 将细胞用 Buffer I (50 mL PBS 中加入 250 μ L 血清配制而成) 洗涤后重悬, 并计数, 用 5 μ mol/L CFSE 重悬 (1×10^6 个细胞加 100 μ L CFSE), 避光孵育 10 min, 然后用 T 细胞完全培养基洗涤 3 次。将 transwell 小室放到 24 孔板中, 于下室中加入 400 μ L 不同的 CAR-T 细胞培养上清, 上室中加入 CFSE 标记的 T 细胞, 0.2×10^6 个/100 μ L, 然后将 24 孔板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 2 h 后取出 24 孔板, 荧光显微镜下拍照, 并计数迁移到下室的 T 细胞数量。

1.2.8 流式细胞术检测 CAR-T 细胞亚型分布

取培养第 5 天的 CAR-T 细胞, 用流式细胞仪检测其亚型分布情况, 操作方法同上, 使用抗体为

APC 抗人 CD45RA 抗体、FITC 抗人 CD45RO 抗体、PB 抗人 CD62L 抗体、生物素标记的 F(ab')₂ 片段化羊抗人 IgG 和 PE 标记的链亲和素(PE-SA)。

1.2.9 小鼠肝细胞癌腹腔移植瘤实验检测 CAR-T 细胞治疗效果

收集处于生长对数期的 Huh7-Luc-GFP 细胞, 接种于雄性 NCG 小鼠的腹腔, 每只小鼠接种 1×10^6 个 Huh7-Luc-GFP 细胞。当肿瘤生长至第 5 天时, 荷瘤小鼠被随机分成 2 组, 3 只/组。各组小鼠通过尾静脉分别注射相应数量的病毒感染 9 d 的 CAR-T 细胞: 8×10^6 个 non-CAR-T 细胞/只小鼠 (对照组); 8×10^6 个 GPC3-BBZ-7 \times 19 CAR-T 细胞/只小鼠 (实验组)。每隔 5-7 d 通过生物发光活体成像仪检测小鼠体内肿瘤生长情况和小鼠体重; CAR-T 细胞注射后第 28 天采集小鼠外周血, 通过流式细胞术检测小鼠外周血 CD3⁺T 细胞和 CAR-T 细胞的生存情况。

1.2.10 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计学分析。所有实验均独立重复 3 次, 结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验; 多组间比较采用双因素或单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 成功构建慢病毒载体 GPC3-BBZ 和 GPC3-BBZ-7 \times 19

如图 1 所示, GPC3-BBZ 载体的抗原识别片段来自针对 GPC3 的抗体 4A11 的单链可变区, 其后连接人源的 CD8 α (铰链区和跨膜段)、4-1BB (共刺激分子) 以及 CD3 ζ (T 细胞活化基序)。GPC3-BBZ-7 \times 19 在 GPC3-BBZ 的基础上加上人源 IL-7 和 CCL19 分子, 中间用 2A 自剪切肽隔开。以上 2 个慢病毒载体构建完成后, 经过 *Afl* II 限制性内切酶鉴定以及上海桑尼生物科技有限公司测序, 并与图谱比对, 结果与预期一致, 说明构建成功。

2.2 成功制备 GPC3-BBZ CAR-T 细胞和 GPC3-BBZ-7 \times 19 CAR-T 细胞

成功构建慢病毒载体质粒后, 将其与包装质粒共转染 293T 细胞进行慢病毒包装, 获得编码 GPC3-BBZ 和 GPC3-BBZ-7 \times 19 的慢病毒; 然后以相同的感染复数转导健康人外周血提取的 CD3⁺T 细胞, 制备 GPC3-BBZ CAR-T 细胞和 GPC3-BBZ-7 \times 19 CAR-T 细胞。培养第 5 天用 FITC 直接标记的商品化 GPC3 蛋白来检测 T 细胞表面 CAR 的表达情况, 结果显示 CAR 成功表达于 GPC3-BBZ CAR-T 细胞和 GPC3-BBZ-7 \times 19 CAR-T 细胞表面, 且两者之间无明显差异 ($P > 0.05$, 图 2A-B), 说明两种 CAR 病毒对 T 细胞的感染能力相当。

2.3 GPC3-BBZ-7 \times 19 CAR-T 细胞成功分泌 IL-7 和 CCL19 并在体外表现出增殖、趋化、亚型优势

使用不添加 IL-7 的 AIM-V 培养基对 T 细胞进行培养, 并分别取第 5 天和第 10 天的 T 细胞培养上清, 用 ELISA 法检测上清中 IL-7 和 CCL19 的浓度 (图 3A)。结果表明, non-CAR-T 和 GPC3-BBZ CAR-T 细胞的培养上清中没有检测到这两种细胞因子, 而 GPC3-BBZ-7 \times 19 CAR-T 细胞的培养上清均检测到 IL-7 和 CCL19 的分泌, 并且随着培养天数增加, 其浓度也有所上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.000 1$)。因此可以进行下一步相关的功能验证。

为比较两种 CAR-T 细胞的增殖能力, 我们将转导 GPC3-BBZ CAR 或 GPC3-BBZ-7 \times 19 CAR 病毒的 T 细胞以相同的数量铺在 96 孔板中, 然后隔天对 T 细胞进行计数。结果 (图 3B) 表明, 从第 7 天开始, GPC3-BBZ-7 \times 19 CAR-T 细胞的数量明显多于 GPC3-BBZ CAR-T 细胞, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。培养第 7 天镜下可见 GPC3-BBZ-7 \times 19 CAR-T 细胞成团生长, 说明细胞状态佳, 且密度大于 GPC3-BBZ CAR-T 和 Non-CAR-T 细胞, 说明分泌 IL-7 的第四代 GPC3-BBZ-7 \times 19 CAR-T 细胞其增殖能力优于第二代。

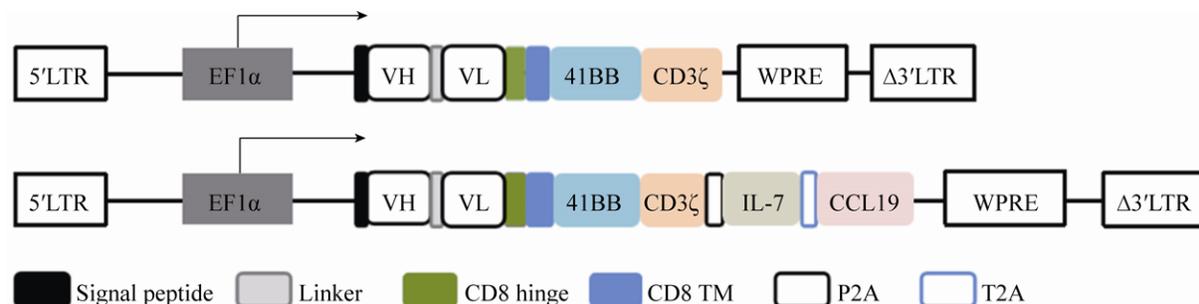


图 1 慢病毒载体 GPC3-BBZ 和 GPC3-BBZ-7×19 的质粒构建示意图

Fig. 1 Design diagram of lentiviral vector GPC3-BBZ and GPC3-BBZ-7×19. GPC3-BBZ: the human GPC3-targeted second generation CAR lentiviral vector; GPC3-BBZ-7×19: the human GPC3-targeted fourth generation CAR lentiviral vector which can express human interleukin-7 and chemokine CCL19.

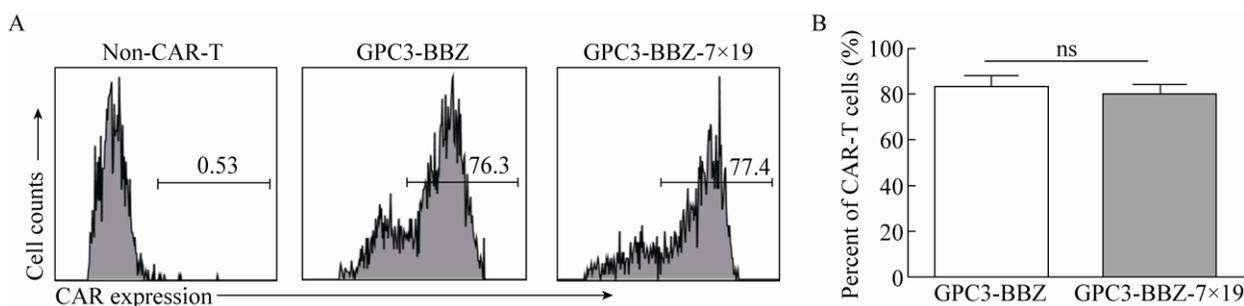


图 2 流式细胞术检测 CAR-T 细胞表面 CAR 的表达情况

Fig. 2 Chimeric antigen receptor (CAR) expression in GPC3-BBZ CAR-T cells and GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells. (A) CAR expression was detected by FCM assay. Representative data from five independent experiments are shown. (B) Comparison of CAR expression between GPC3-BBZ CAR-T cells and GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells. Data represent the $\bar{x} \pm s$ of five independent experiments. GPC3-BBZ CAR-T and GPC3-BBZ-7×19 CAR-T: the human T lymphocytes were transduced with lentivirus encoding GPC3-BBZ or GPC3-BBZ-7×19; Non-CAR-T: the human untransduced T lymphocytes as the negative control.

在趋化实验中,我们将 non-CAR-T 细胞标记上 CFSE 染料,并通过荧光显微镜观察 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞分泌至上清的 CCL19 对 non-CAR-T 细胞的趋化作用。结果 (图 3C) 表明,加入 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞培养上清的孔中,其迁移到下室的 non-CAR-T 数量比另两个组更多,差异有统计学意义 ($P < 0.0001$)。

由于 T 细胞亚型对于 CAR-T 免疫治疗效果具有重要作用,因此我们通过流式细胞术比较 CAR-T 细胞的亚型分布。结果 (图 3D) 表明,在 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞中,其初始 T 细胞 (Native) ($\text{CAR}^+\text{CD62L}^+\text{CD45RA}^+\text{CD45RO}^-$) 和 T 记

忆干细胞 (Tscm) ($\text{CAR}^+\text{CD62L}^+\text{CD45RA}^+\text{CD45RO}^+$) 的比例高于 GPC3-BBZ CAR-T,记忆干细胞的差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.4 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞和 GPC3-BBZ CAR-T 细胞有相当的细胞因子分泌能力以及体外杀伤毒性

用流式细胞术检测实验室的肝细胞癌细胞系 SK-Hep1、Huh7、HepG2 和 Hep3B 细胞表面 GPC3 的表达水平,结果如图 4A 所示,Huh7 表面的 GPC3 抗原为高表达,HepG2 和 Hep3B 为中等表达,而 SK-Hep1 则不表达。

将 non-CAR-T 细胞、GPC3-BBZ CAR-T 细胞

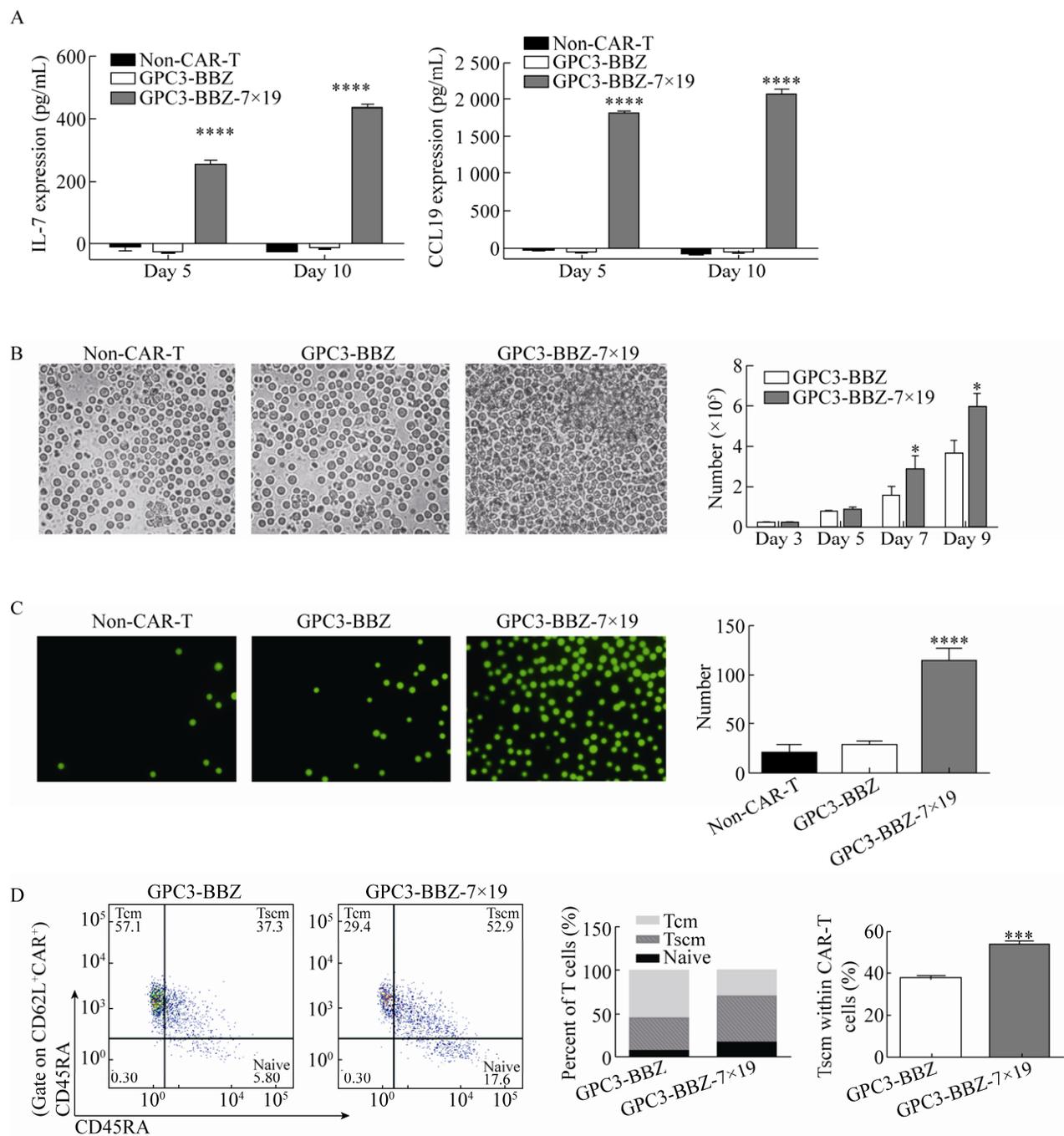


图 3 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞和 GPC3-BBZ CAR-T 细胞体外功能比较

Fig. 3 Functional comparison of GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells and GPC3-BBZ CAR-T cells *in vitro*. (A) IL-7 and CCL19 secreted by GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells was detected on day 5 and 10 by ELISA. (B) Absolute numbers of GPC3-BBZ CAR-T and GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells on day 3, 5, 7, 9 counted. (C) Chemotactic capacity of CCL19 secreted by GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells toward non-CAR-T was examined by transwell assay. (D) To analysis the phenotype of CAR-T cells, the expression of CD62L, CD45RO, and CD45RA were determined by FCM assay with the indicated antibodies. Data represent the $\bar{x} \pm s$ of triplicates. *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$, $n = 3$.

和 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞与 Huh7 细胞按效靶比 1 : 1 共孵育 24 h, ELISA 法检测共孵育上清液中 GM-CSF 的浓度, 流式胞内染色法检测共孵育 T 细胞 IFN- γ 的分泌情况。结果 (图 4B) 显示, GPC3-BBZ CAR-T 细胞和 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞分泌 GM-CSF 和 IFN- γ 水平无显著性差异 ($P>0.05$)。

在体外杀伤实验中, 我们采用荧光素酶生物

发光法检测 CAR-T 细胞与肝细胞癌细胞系 (Huh7、HepG2 和 Hep3B) 在不同效靶比 (2 : 1、5 : 1、10 : 1、20 : 1) 下共孵育 24 h 后的体外杀伤情况。结果显示, GPC3-BBZ CAR-T 细胞和 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞均能够特异性杀伤 GPC3 阳性肿瘤细胞, 且杀伤效果无明显差异 (P 值均 >0.05 , 图 4C), 其对于靶细胞的最大裂解率与靶细胞表面 GPC3 表达阳性率相关。以上结

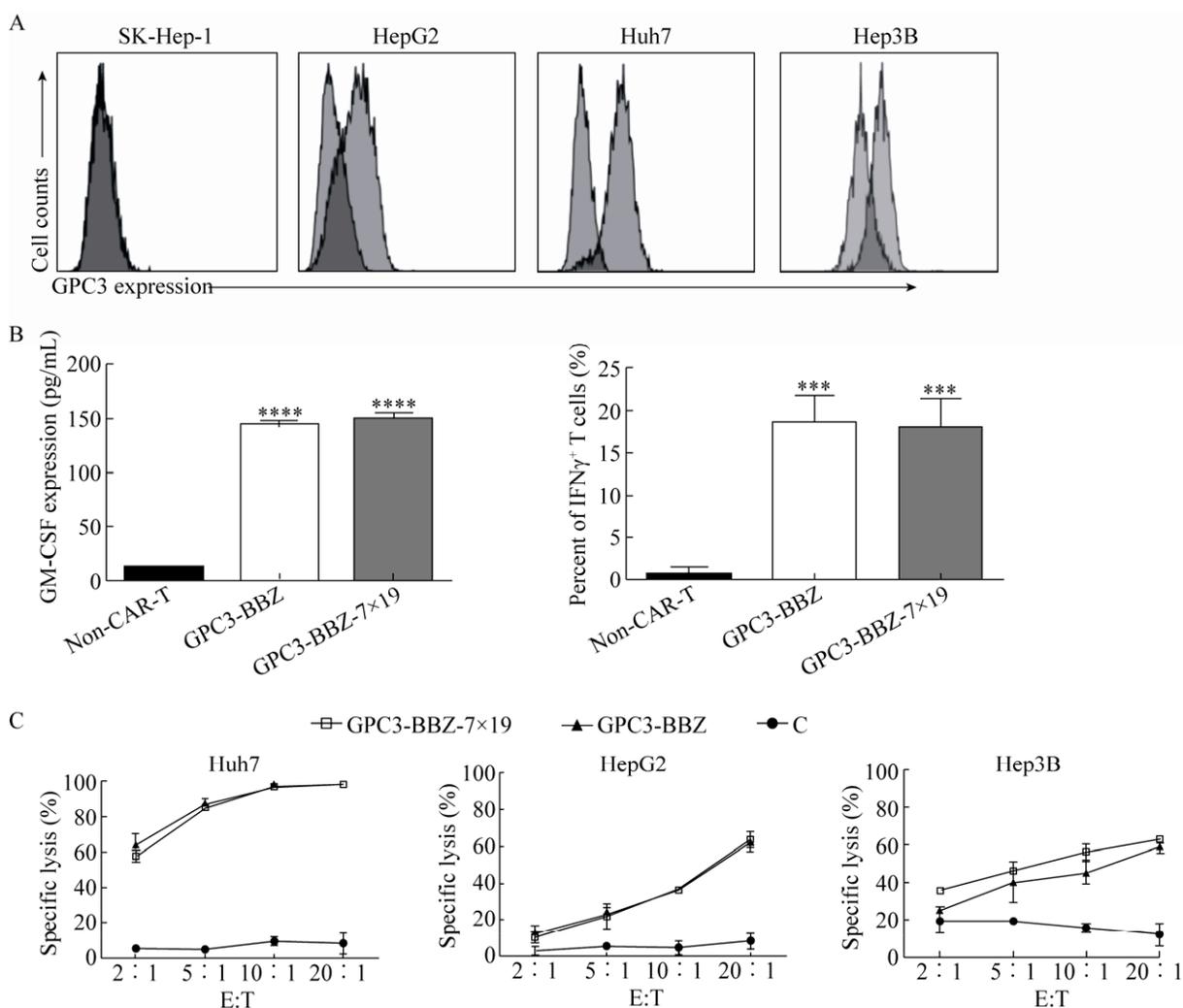


图 4 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞体外杀伤活性以及细胞因子分泌能力检测

Fig. 4 Cytotoxicity and cytokine secretion detection of GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells *in vitro*. (A) The glypican-3 (GPC3) expression on human hepatocellular carcinoma cell lines was detected by FCM assay. (B) GM-CSF and IFN- γ secretion of GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells co-cultured with GPC3 positive hepatocellular carcinoma cells were detected by ELISA and FCM assay. (C) Cytotoxicity of GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells *in vitro* was detected by luciferase bio-luminescence assay. GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor; IFN- γ : interferon- γ . Data represent the $\bar{x} \pm s$ of triplicates. ***: $P<0.001$, ****: $P<0.0001$, $n=3$.

果表明,分泌 IL-7 和 CCL19 并没有对 CAR-T 细胞活化后的细胞因子分泌能力以及杀伤的特异性和有效性造成不利影响。

2.5 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞使小鼠体内 GPC3 阳性的肝细胞癌腹腔移植瘤消退

首先建立 Huh7-Luc-GFP 细胞的腹腔移植瘤模型,然后利用 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞进行体内治疗。由生物发光成像结果(图 5A)来看,与 non-CAR-T 组相比, GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞有效使小鼠体内的肿瘤消退。此外,我们将小鼠体重作为衡量 CAR-T 治疗的毒性指标之一,定期对小鼠体质量进行称量。结果显示,各组小鼠的体重无明显差异 ($P>0.05$,图 5B),提示靶向 GPC3 的第四代 CAR-T 细胞(分泌 IL-7 和 CCL19)治疗小鼠体内的肝细胞癌腹腔移植瘤时未出现明显的不良反应。

为了解 CAR-T 细胞在外周血中的存活情况,于 28 d 取小鼠外周血进行染色,通过流式检测外周血中 T 细胞所占比率,结果表明 CAR-T 组小鼠 CD3⁺T 细胞占 25%(图 5C-D),这其中 GPC3 CAR 表达阳性的 T 细胞占 50%,而对照组小鼠的外周血 CD3⁺T 细胞只占 1%,这可能是由于实验组小鼠体内的肿瘤细胞被 CAR-T 特异性识别并刺激其增殖,而对照组中的 non-CAR-T 细胞不能特异性识别肿瘤细胞而自然衰竭死亡。

3 讨论

基于 CAR-T 细胞的免疫过继疗法已被证明是治疗 B 淋巴细胞恶性肿瘤的一项有效策略,目前这种临床的成功性较难体现到实体瘤身上,由于实体瘤异质性以及免疫微环境的存在,包括髓样来源的抑制细胞(Myeloid derived suppressor cell, MDSC)、调节性 T 细胞(Regulatory cell, Treg)、免疫抑制细胞因子(例如 IL-10)等^[25-26],这些因素限制了 CAR-T 细胞在体内的增殖能力和持久性,从而影响其抗肿瘤能力。

先前的研究表明, T 区成纤维网状细胞产生的 IL-7 和 CCL19 对于淋巴器官中 T 细胞区的形

成和维持至关重要^[27-28]。为了提高靶向 GPC3 的 CAR-T 细胞对肝细胞癌的治疗效果,我们构建并制备了靶向 GPC3 的第四代 CAR-T 细胞(分泌 IL-7 和 CCL19),与第二代 GPC3 CAR-T 相比,IL-7 和 CCL19 的分泌不影响 T 细胞表面 CAR 表达以及 CAR-T 杀伤肝癌细胞的特异性和有效性。然而,在无外源性添加 IL-7 的培养过程中, GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞展现出了更为出色的增殖能力,这将有利于其在体内的生存,提高其临床活性。此外, CAR-T 表型已被证明是临床疗效的一个关键因素^[29-31],相较于中央记忆型 T 细胞而言, T 记忆干细胞分化程度低,具有更强的自我更新以及分化生成所有记忆和效应 T 细胞子集的能力,从而被认为具有更强的抗肿瘤活性和持久力^[32]。已有研究表明 IL-7 趋向于诱导 CAR-T 细胞分化生成 Naive、Tscm 等分化程度更低的细胞^[33]。经亚型分析发现, GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 中 Tscm 的比率确实高于二代 GPC3-BBZ CAR-T,这有利于其在体内形成针对肿瘤的长效记忆功能,从而更有效预防肿瘤复发。CCL19 是 T 细胞和树突状细胞的趋化因子,我们于体外验证 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞分泌的 CCL19 对 non-CAR-T 细胞具有促迁移作用,这有助于其在体内募集外周血 T 细胞和树突状细胞协同对抗肿瘤。此外针对 HCC 移植瘤模型的体内研究表明, GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 能有效清除免疫缺陷小鼠体内的 HCC 移植瘤模型,并且在观察期间小鼠体重稳定,未发现不良反应,一个月之后在外周血中仍然能够检测到部分存活的 CAR-T 细胞。

传统的 CAR-T 细胞由于在体内生存时间不够长,而且受到肿瘤微环境中各种免疫抑制因子的影响,对肿瘤的浸润能力较差,本研究构建了一种靶向 GPC3 的第四代 CAR-T 细胞(分泌 IL-7 和 CCL19),其生存能力、趋化能力和亚型分布均优于第二代 GPC3 CAR-T 细胞,因此有望在体内取得更好的抗肿瘤效果,并为之后的临床试验提供临床前研究基础。

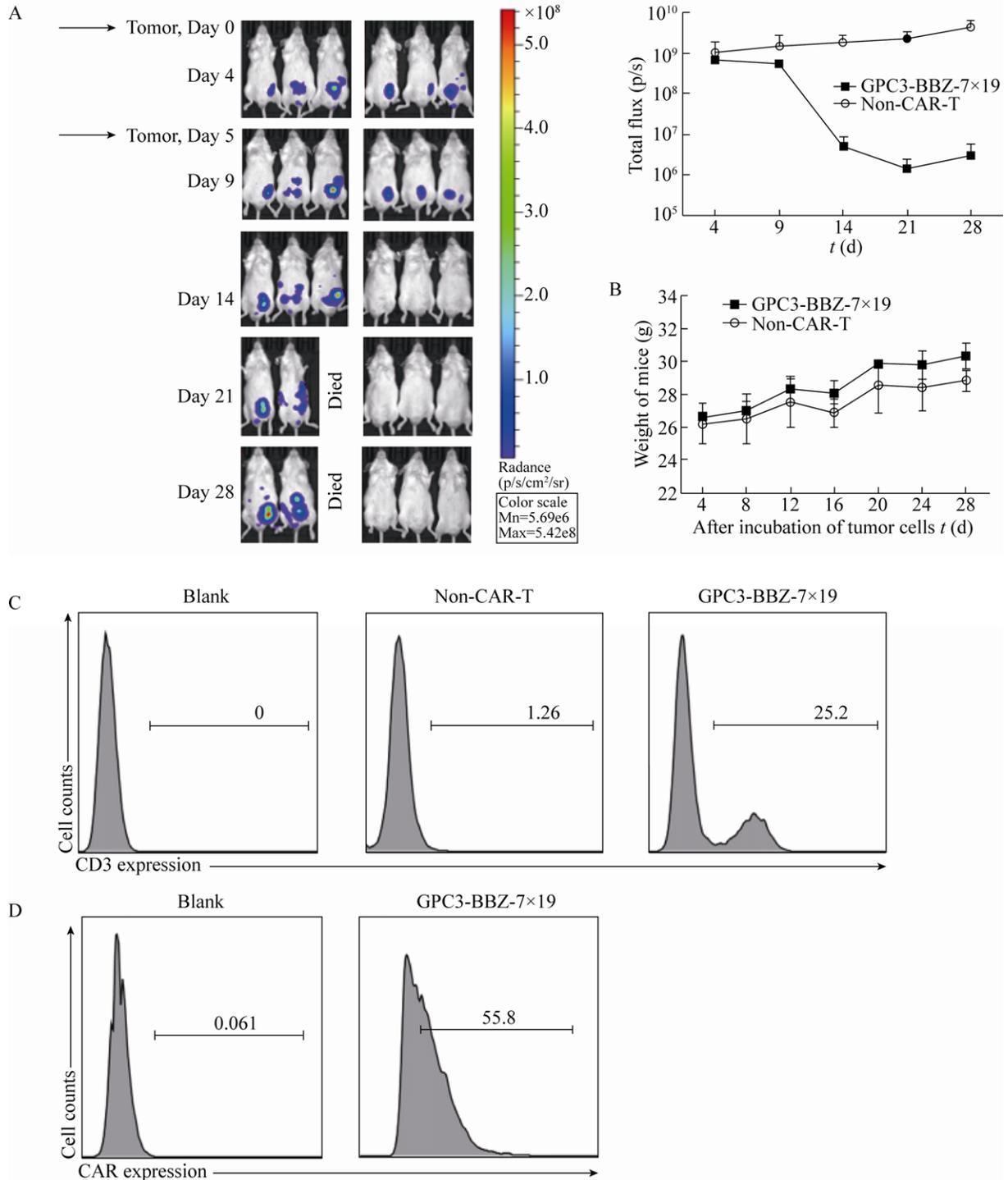


图 5 GPC3-BBZ-7×19 CAR-T 细胞对 NCG 小鼠体内肝细胞癌腹腔移植瘤的作用效果

Fig. 5 Effect of GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells on the growth of GPC3-positive hepatocellular carcinoma xenograft in NCG mice. (A) NCG mice bearing Huh-7-Luc-GFP xenografts were intravenous injected with 8×10^6 non-CAR-T or GPC3-BBZ-7×19 CAR-T cells on day 5. Mice were imaged weekly. Tumor growth was assessed by total bioluminescence signals. (B) The weight curve of NCG mice after incubation with different CAR-T cells. (C) CD3⁺ human T cells in mice peripheral blood were detected by FCM assay. (D) CAR⁺ T cells in mice peripheral blood were detected by FCM assay.

REFERENCES

- [1] Anwanwan D, Singh SK, Singh S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1): 188314.
- [2] Knudsen ES, Gopal P, Singal AG. The changing landscape of hepatocellular carcinoma: etiology, genetics, and therapy. *Am J Pathol*, 2014, 184(3): 574–583.
- [3] Fitzmorris P, Shoreibah M, Anand BS, et al. Management of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(5): 861–876.
- [4] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 2008, 359(23): 378–390.
- [5] Bruix J, Qin SK, Merle P, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 2017, 389(10064): 56–66.
- [6] Kudo M, Finn RS, Qin SK, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*, 2018, 391(10126): 1163–1173.
- [7] Pinter M, Peck-Radosavljevic M. Review article: systemic treatment of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 48(6): 598–609.
- [8] Couzin-Frankel J. Cancer immunotherapy. *Science*, 2013, 342(6165): 1432–1433.
- [9] Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med*, 2011, 3(95): 95ra73.
- [10] Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 725–733.
- [11] Maus MV, Grupp SA, Porter DL, et al. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*, 2014, 123(17): 2625–2635.
- [12] Montalbano M, Georgiadis J, Masterson AL, et al. Biology and function of glypican-3 as a candidate for early cancerous transformation of hepatocytes in hepatocellular carcinoma (Review). *Oncol Rep*, 2017, 37(3): 1291–1300.
- [13] Zhu ZW, Friess H, Wang L, et al. Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. *Gut*, 2001, 48(4): 558–564.
- [14] Nakatsura T, Nishimura Y. Usefulness of the novel oncofetal antigen glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs*, 2005, 19(2): 71–77.
- [15] Ortiz MV, Roberts SS, Bender JG, et al. Immunotherapeutic targeting of GPC3 in pediatric solid embryonal tumors. *Front Oncol*, 2019, 9: 108.
- [16] Jiang ZW, Jiang XF, Chen SM, et al. Anti-GPC3-CAR T cells suppress the growth of tumor cells in patient-derived xenografts of hepatocellular carcinoma. *Front Immunol*, 2017, 7: 690.
- [17] Gao HP, Li KS, Tu H, et al. Development of T cells redirected to glypican-3 for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(24): 6418–6428.
- [18] Liu Y, Chen X, Han W, et al. Tisagenlecleucel, an approved anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for the treatment of leukemia. *Drugs Today*, 2017, 53(11): 597–608.
- [19] Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, et al. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 53: 164–181.
- [20] Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol*, 2001, 22(10): 564–571.
- [21] Bradley LM, Haynes L, Swain SL. IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. *Trends Immunol*, 2005, 26(3): 172–176.
- [22] Kellermann SA, Hudak S, Oldham ER, et al. The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for *in vitro*- and *in vivo*-derived dendritic cells. *J Immunol*, 1999, 162(7): 3859–3864.
- [23] Yoshida R, Nagira M, Imai T, et al. EBI1-ligand chemokine (ELC) attracts a broad spectrum of

- lymphocytes: activated T cells strongly up-regulate CCR7 and efficiently migrate toward ELC. *Int Immunol*, 1998, 10(7): 901–910.
- [24] Polakis P, Chen Y. Anti-GPC3 antibodies and immunoconjugates: US, 9926377 B2. 2018-3-27.
- [25] Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev*, 2008, 222(1): 162–179.
- [26] Yu SN, Li AP, Liu Q, et al. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 78.
- [27] Link Alexander, Vogt Tobias K, Favre Stéphanie, et al. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol*, 2007, 8(11): s1255–1265.
- [28] Luther Sanjiv A, Bidgol Afshin, Hargreaves Diana C, et al. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol*, 2002, 169(1): 424–433.
- [29] Singh N, Perazzelli J, Grupp SA, et al. Early memory phenotypes drive T cell proliferation in patients with pediatric malignancies. *Sci Transl Med*, 2016, 8(320): 320ra3.
- [30] Sabatino M, Hu JH, Sommariva M, et al. Generation of clinical-grade CD19-specific CAR-modified CD8⁺ memory stem cells for the treatment of human B-cell malignancies. *Blood*, 2016, 128(4): 519–528.
- [31] Blaeschke F, Stenger D, Kaeuferle T, et al. Induction of a central memory and stem cell memory phenotype in functionally active CD4⁺ and CD8⁺ CAR T cells produced in an automated good manufacturing practice system for the treatment of CD19⁺ acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(7): 1053–1066.
- [32] Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: Building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(10): 671–684.
- [33] Hoffmann JM, Schubert ML, Wang L, et al. Differences in expansion potential of naive chimeric antigen receptor T cells from healthy donors and untreated chronic lymphocytic leukemia patients. *Front Immunol*, 2018, 8: 1956.

(本文责编 郝丽芳)