

## 引文格式:

王琪, 刘茂玄, 黄明, 等. 两种靶向间皮素的 CAR-T 细胞杀伤三阴乳腺癌效果的对比研究 [J]. 集成技术, 2022, 11(5): 12-22.

Wang Q, Liu MX, Huang M, et al. Comparative study of the efficacy of two mesothelin-targeting CAR-T cells against triple negative breast cancer [J]. Journal of Integration Technology, 2022, 11(5): 12-22.

## 两种靶向间皮素的 CAR-T 细胞杀伤三阴乳腺癌效果的对比研究

王 琪<sup>1,2#</sup> 刘茂玄<sup>1,3#</sup> 黄 明<sup>1,3</sup> 许晨光<sup>1,3\*</sup> 万晓春<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

<sup>2</sup>(中国科学院大学 北京 100049)

<sup>3</sup>(广东省免疫细胞治疗工程技术研究中心 深圳 518055)

**摘 要** 间皮素 (Mesothelin) 是一个潜力巨大的治疗三阴乳腺癌 (Triple Negative Breast Cancer, TNBC) 的 CAR-T 靶点。目前, 在临床试验中开发的 Mesothelin CAR-T 大多使用小鼠单克隆抗体 SS1 来源的 scFv 作为抗原结合结构域, 易引起体内抗 CAR 的抗体产生, 导致治疗效果不甚理想, 因此, 亟需开发新的抗原结合结构域构建 CAR-T。该研究选择了靶向 Mesothelin 的纳米抗体 VHH, 其亲和力与 SS1 scFv 相似, 基于 scFv 和 VHH 的序列, 该文分别构建了 scFv CAR-T 和 VHH CAR-T 细胞, 并比较了两种 CAR-T 对靶点阳性 TNBC 细胞系的体外杀伤效果。结果显示, 与临床试验中常用的 scFv CAR-T 相比, VHH CAR-T 对 TNBC 细胞系的体外杀伤能力更好, 且可表达更高水平的 CD107a 和 CD69。这是目前国内外报道的第一个基于 VHH 序列构建的 Mesothelin CAR-T, 为后续靶向 Mesothelin CAR-T 的开发奠定了基础。

**关键词** CAR-T; 间皮素; 三阴乳腺癌; 纳米抗体

中图分类号 Q 31 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20220225003

收稿日期: 2022-02-25 修回日期: 2022-03-25

基金项目: 科技部国家重点研发计划项目 (2019YFA0906100); 广东省重点领域研发计划项目 (2019B020201014); 广东省基础与应用基础研究项目 (2021A1515110054); 深圳市科技创新委员会基础研究项目 (JCYJ20170818164619194, JCYJ20190807160013654, JCYJ20210324101400001)

作者简介: 王琪 (共同第一作者), 硕士研究生, 研究方向为免疫细胞治疗; 刘茂玄 (共同第一作者), 博士, 研究方向为免疫细胞治疗; 黄明, 博士, 研究方向为免疫细胞治疗; 许晨光 (通讯作者), 博士, 研究方向为 CAR-T 细胞治疗技术研发和机制研究, E-mail: cg.xu@siat.ac.cn; 万晓春 (通讯作者), 博士, 研究员, 研究方向为肿瘤免疫学, E-mail: xc.wan@siat.ac.cn。

## Comparative Study of the Efficacy of Two Mesothelin-targeting CAR-T Cells Against Triple Negative Breast Cancer

WANG Qi<sup>1,2#</sup> LIU Maoxuan<sup>1,3#</sup> HUANG Ming<sup>1,3</sup> XU Chenguang<sup>1,3\*</sup> WAN Xiaochun<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>(Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

<sup>2</sup>(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

<sup>3</sup>(Guangdong Immune Cell Therapy Engineering and Technology Research Center, Shenzhen 518055, China)

\*Corresponding Authors: cg.xu@siat.ac.cn; xc.wan@siat.ac.cn

#Equal Contribution

**Abstract** Mesothelin is a potential CAR-T target for treating triple-negative breast cancer (TNBC). The majority of Mesothelin CAR-T cells currently developed in clinical trials used scFv derived from murine monoclonal antibody SS1 as antigen binding domain. The murine scFv is prone to induce the production of anti-CAR antibody in the body, which leads to unsatisfactory effect. Therefore, it is urgent to develop new antigen binding domains for constructing CAR-T. A Mesothelin-targeting nanobody VHH with a similar affinity to SS1 scFv was selected. Two CAR-T cells with different antigen recognition domains (scFv and VHH) targeting Mesothelin were constructed, and their killing ability against MDA-MB-231 cells over-expressing Mesothelin was compared. The results showed that VHH CAR-T demonstrated better killing ability against triple negative breast cancer cells than scFv CAR-T cells, which was widely used in clinical trials. In addition, VHH CAR-T expressed more CD107a and CD69 than scFv CAR-T. This is the first Mesothelin CAR-T derived from VHH sequence worldwide. The study provides basis for the further development of Mesothelin CAR-T.

**Keywords** CAR-T; mesothelin; triple negative breast cancer; nanobody

**Funding** This work is supported by National Key R&D Program of China (2019YFA0906100), Special Funds for Major Science and Technology of Guangdong Province (2019B020201014), Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2021A1515110054), the Science and Technology Innovation Fund of Shenzhen (JCYJ20170818164619194, JCYJ20190807160013654 and JCYJ20210324101400001)

## 1 引 言

2020 年, 乳腺癌成为全球发病人数最多的肿瘤<sup>[1]</sup>。乳腺癌具有高度的异质性, 在分子、组织和对治疗的反应等方面都有显著的区别。随着对其分子分型的认知加深, 三阴乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 作为其中一类独立亚型, 获得的关注度不断提升<sup>[2]</sup>。TNBC 是雌激素受体、孕激素受体、人表皮生长因子三者均为

阴性表达的乳腺癌, TNBC 患者的数量占全部乳腺癌的 15%~20%, TNBC 具有高侵袭性、易转移复发和预后差等特点, 其患者生存期的中位数为 9~13 个月, 远低于非 TNBC 患者<sup>[3]</sup>。目前, TNBC 缺少明确的治疗方案和有效药物, 临床上主要依靠化疗进行治疗。然而, 化疗药物毒副作用大, 且肿瘤细胞容易对化疗药物产生耐药, 导致化疗失败, 严重影响患者预后。因此, 亟需开发新的治疗 TNBC 的方法<sup>[4]</sup>。

CAR-T 细胞是通过基因工程改造的 T 细胞, 表达肿瘤抗原特异性 CAR, 通过将抗原抗体结合机制和 T 细胞的杀伤作用相结合, 实现肿瘤细胞的特异性杀伤, 且不受人类白细胞抗原的限制<sup>[5]</sup>。CAR-T 在血液瘤上的巨大成功, 增强了将其用于治疗实体瘤的信心<sup>[6]</sup>。应用 CAR-T 治疗 TNBC 已有初步探索, 且显示了积极的效果<sup>[7]</sup>。间皮素 (Mesothelin) 是一种肿瘤相关抗原, 在大多数恶性胸膜间皮瘤、胰腺癌等实体肿瘤中高表达, 在正常组织中几乎不表达, 是一个潜力巨大的 CAR-T 治疗靶点<sup>[8]</sup>。Mesothelin 在 TNBC 中高表达, 且该高表达和 TNBC 的进程呈正相关<sup>[9-10]</sup>, 因此, Mesothelin CAR-T 用于治疗 TNBC 具有一定的前景和潜力。目前, 两个 Mesothelin CAR-T 治疗 TNBC 的临床试验正在开展<sup>[7]</sup>。

抗原结合结构域是赋予 CAR-T 特异性识别靶抗原的部分, 直接影响 CAR-T 的功能。通常抗原结合结构域是通过一个柔性的 Linker, 将单克隆抗体的可变重链 ( $V_H$ ) 和轻链 ( $V_L$ ) 连接而形成的 scFv。从已有的公开数据来看, 在临床领域开发的 Mesothelin CAR-T, 大多使用小鼠单克隆抗体 SS1 来源的 scFv 作为抗原结合结构域<sup>[8]</sup>。在治疗实体肿瘤病人的临床试验中, Mesothelin CAR-T 虽然展现出良好的安全性, 但是治疗效果有限, 原因可能是小鼠来源的 scFv 序列引起患者体内产生抗 CAR 的抗体<sup>[11]</sup>。此外, scFv 在 CAR-T 细胞上还存在着不易正确折叠、容易聚集、稳定性差等缺点<sup>[12]</sup>。羊驼来源的单域抗体 VHH 是目前已知的最小抗原结合片段, 作为 CAR-T 的抗原结合结构域, VHH 具有分子量小、容易表达、稳定性好、免疫原性低等优点<sup>[13]</sup>。目前, 在治疗多发性骨髓瘤的临床试验中, 靶向 B 细胞成熟抗原的 VHH CAR-T 展现出优异的治疗效果, 客观缓解率高达 97%<sup>[14]</sup>, 但尚无 VHH 来源的 Mesothelin CAR-T 的相关报道, 以 VHH 作为抗原结合结构域的 Mesothelin CAR-T 是否具有靶向

杀伤功能尚不明确, 基于亲和力相似的 scFv 和 VHH 序列构建的 Mesothelin CAR-T 杀伤功能是否有差异也未知。本研究分别以两个亲和力相似的靶向 Mesothelin 的抗体 (scFv、VHH) 序列作为抗原结合结构域, 构建相应的 CAR-T 细胞, 并对比两种 CAR-T 细胞对 TNBC 细胞系的杀伤效果, 为后续治疗 TNBC 的 Mesothelin CAR-T 的开发奠定基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

本研究所用穿梭质粒和包装质粒均由中国科学院深圳先进技术研究院免疫治疗研究室保存; 人胚肾 293T 细胞系和 MDA-MB-231 细胞系来自美国菌种保藏中心 (ATCC); RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶和磷酸盐缓冲液均购于美国 Hyclone 公司; KBM 581 培养基购于康宁公司; 青霉素/链霉素双抗购于北京全式金生物技术有限公司; 胎牛血清和 Opti-MEM 培养基均购于美国 Gibco 公司; PEIpro DNA 转染试剂购于法国 Polyplus Transfection 公司; Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; IL-2 购于近岸蛋白质科技有限公司; 人 Cytometric Bead Array (CBA) Th1/Th2 细胞因子试剂盒购于美国 BD 公司; 6 孔板和 48 孔板均购于无锡耐思生物科技有限公司; 10 mL、20 mL 一次性注射器购于上海双鸽医疗器械有限公司; CD3、CD4、CD8 等流式抗体购于美国 Biolegend 公司; 超滤柱和 0.45  $\mu\text{m}$  一次性针头式过滤器购于英国颇尔公司; 实时无标记细胞分析仪购于美国安捷伦公司, 型号为 xCELLigence RTCA SP; 分析型流式细胞仪购于美国贝克曼公司, 型号为 CytoFLEX; 分选型流式细胞仪购于美国 BD 公司, 型号为 BD FACSAriaIII。

## 2.2 方法

### 2.2.1 靶向 Mesothelin 的 scFv CAR 与 VHH CAR 载体的构建

靶向 Mesothelin 的 scFv 序列来源于 SS1 抗体(US Patent: US7081518), 靶向 Mesothelin 的 VHH 序列来源于 Nb-A1 抗体(US Patent: US20180002439A1)。CAR 片段由 scFv 序列或 VHH 序列依次连接人源 CD8 $\alpha$ 、4-1BB 和 CD3 $\zeta$  链组成, CAR 基因由苏州金唯智生物技术有限公司合成, 通过 T4 连接酶将 CAR 片段插入 EcoR I 和 BamH I 限制性内切酶剪切的慢病毒载体上。

### 2.2.2 慢病毒制备

第一天, 将状态良好的 293T 细胞平铺于 6 孔板中, 每孔  $5 \times 10^5$  细胞进行培养。待细胞密度达到 70%~80% 时进行转染。转染时, 首先利用 Opti-MEM 培养基配制包装质粒 psPAX2、包膜质粒 pMD2.G 和穿梭质粒混合液, 然后将 PEIpro 加入混合液中静置 15 min, 最后将其滴加到前一天接种的细胞培养液中, 培养 6~8 h 后更换新培养液。转染 48 h 后, 收集上清液, 取 2 000 g 离心 5 min, 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤得到病毒原液。将病毒原液加入分子量截断值为 100 kDa 的超滤柱中, 在 4  $^{\circ}$ C 条件下, 3 220 g 离心 30 min, 收集浓缩 5~10 倍的病毒浓缩液。

### 2.2.3 CAR-T 细胞的制备和培养

抽取 20 mL 健康志愿者外周静脉血, 置于无菌的乙二胺四乙酸抗凝采血管中, 按照 1:1 的比例加入无菌磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Solution, PBS), 轻晃混匀, 另取一个 50 mL 无菌离心管, 加入 15 mL 外周血淋巴细胞分离液。将稀释后的血液倾倒入淋巴细胞分离液的液面上, 2 110 r/min 离心 30 min; 用无菌移液管吸取中间白膜层至另一无菌 50 mL 离心管中, 添加无菌 PBS 至 50 mL, 1 800 r/min 离心 5 min,

收集沉淀的外周血单个核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC)。PBMC 计数后, 按 1:1 的比例加入相应数量的 CD3/CD28 磁珠, 用含有 1% 胎牛血清和 200 U/mL IL-2 的 KBM 581 培养基, 将细胞置于 5% CO $_2$ 、37  $^{\circ}$ C 的培养箱中无菌培养。激活 T 细胞 24~48 h 后, 按照培养液与病毒浓缩液 1:1 的比例加入病毒浓缩液, 再补加相应的 IL-2。病毒感染 24 h 后, 300 g 离心 3 min, 更换新鲜培养基, 之后根据细胞的生长密度, 每隔 2~3 d 传代扩大培养, 共培养 7~8 d。

### 2.2.4 流式细胞术检测 scFv CAR-T 与 VHH CAR-T 细胞阳性率

收集对照组 T 细胞(UTD)及两种 CAR-T 细胞  $1 \times 10^5$  个/管, 1 500 r/min 离心 5 min 后弃上清液, 用 PBS 清洗后再用 100  $\mu$ L PBS 重悬细胞。对于 scFv CAR-T 细胞, 加入生物素标记的羊抗小鼠 IgG(Fab 段)抗体作为一抗进行染色, 对于 VHH CAR-T 细胞, 加入生物素标记的羊抗羊驼 IgG(Fab 段)抗体作为一抗进行染色, 同时以 UTD 细胞作为对照进行同样染色。在 4  $^{\circ}$ C 避光孵育一抗 30 min 后, 用 PBS 清洗两次, 然后加入 APC-Streptavidin 抗体作为二抗, 将二抗在 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后用 PBS 清洗两次, 最后利用 200  $\mu$ L PBS 重悬细胞, 以 UTD 细胞作为对照, 利用流式细胞术检测 CAR-T 的阳性率。

### 2.2.5 流式细胞术检测 CAR-T 细胞中 CD4 $^{+}$ 和 CD8 $^{+}$ 细胞亚群

采用第 2.2.4 小节的方法收集 UTD 细胞和 CAR-T 细胞, 在每种细胞中加入 CD3(FITC)、CD4(BV510)和 CD8(APC-Cy7)抗体, 于 4  $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后用 PBS 清洗两次, 接着用 200  $\mu$ L PBS 重悬细胞, 最后利用流式细胞术检测 UTD 和 CAR-T 细胞中 CD4 $^{+}$  和 CD8 $^{+}$  亚群的比例。

### 2.2.6 过表达 Mesothelin 的 MDA-MB-231 靶细胞的构建

采用第 2.2.2 小节的方法制备和浓缩慢病



毒原液, 然后感染 MDA-MB-231 细胞。感染 24 h 后更换新鲜培养基, 感染 72 h 后将细胞用 Mesothelin (PE) 的抗体染色, 于 4 °C 孵育 30 min 后用 PBS 清洗两次, 采用流式细胞术检测过表达细胞系中 Mesothelin 的表达情况, 利用分选型流式细胞仪分选出过表达 Mesothelin 的 MDA-MB-231 细胞 (MDA-MB-231-Mesothelin) 作为后续的靶细胞。

### 2.2.7 实时无标记细胞分析技术 (RTCA) 检测 CAR-T 对靶细胞的杀伤效果

第一天, 取每 100  $\mu\text{L}$  含有  $5 \times 10^4$  个 MDA-MB-231 细胞和 MDA-MB-231-Mesothelin 细胞的混合物 100  $\mu\text{L}$  平铺于 RTCA 板中; 第二天, 按 4:1、2:1 和 1:1 的效靶比, 将 UTD 细胞和两种 CAR-T 细胞依次加入第一天的 RTCA 板中, 补细胞培养基至 200  $\mu\text{L}$ , 每 15 min 监测一次细胞生长指数, 绘制细胞生长曲线。结束监测后, 取细胞上清液检测细胞因子的分泌水平, 收集杀伤后的各组 T 细胞染相应的抗体, 分析其 CD69、CD107a 和 PD-1 的表达情况。

### 2.2.8 流式细胞术检测 CAR-T 杀伤上清液中细胞因子分泌水平

取杀伤 48 h 后的细胞培养液置于干净的 EP 管内, 在 4 °C 的条件下, 300 g 离心 5 min, 取上清液进行检测。根据试剂盒说明书, 使用人 Th1/Th2 细胞因子试剂盒检测杀伤上清液中细胞因子 (IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ ) 的含量。先将试剂盒里的 3 种微球 (IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$ ) 按所需量混合, 室温下与增强液避光孵育 30 min, 然后分别加入待测样品、微球和抗体检测试剂进行混合, 室温下避光孵育 3 h, 最后用 PBS 清洗两次, 200  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞, 利用流式细胞术检测各组细胞因子的含量。

### 2.2.9 统计学分析

使用 Flowjo 7.6 进行流式结果分析, 使用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行处

理分析, 计量数据用 “ $\bar{x} \pm s$ ” 表示。两组间参数的比较用独立样本  $t$  检验, 多组间差异比较采用 ANOVA 单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 3 结 果

### 3.1 成功构建过表达 Mesothelin 的 MDA-MB-231 靶细胞

流式细胞术检测结果显示, MDA-MB-231 细胞系几乎不表达 Mesothelin (图 1), 与其他文献的结论一致<sup>[15]</sup>, 因此, MDA-MB-231 细胞系可以作为 Mesothelin 靶点阴性细胞系用于后续实验。本实验还包装了过表达 Mesothelin 的慢病毒, 并成功感染了 MDA-MB-231 细胞系, 通过流式分选成功获得了过表达 Mesothelin 的 MDA-MB-231 靶细胞 (MDA-MB-231-Mesothelin), MDA-MB-231-Mesothelin 细胞中 Mesothelin 的表达水平如图 1 所示。由图 1 可知, 该靶细胞系被成功构建, 其可作为靶向 Mesothelin CAR-T 的靶点阳性细胞, 为后续体外杀伤实验提供了基础。

### 3.2 成功构建靶向 Mesothelin 的 scFv CAR-T 和 VHH CAR-T 细胞

本实验基于经典的二代 CAR 结构, 构建了

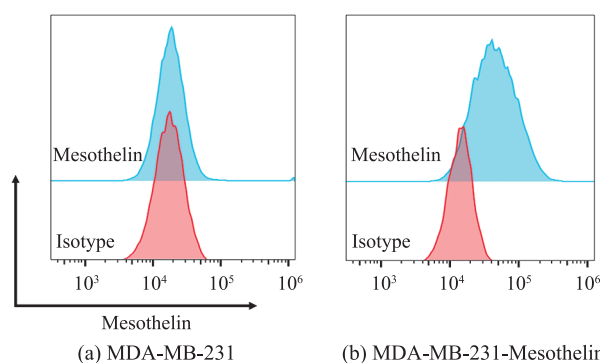


图 1 MDA-MB-231 和 MDA-MB-231-Mesothelin 细胞 Mesothelin 的表达情况

Fig. 1 The expression of Mesothelin on MDA-MB-231 and MDA-MB-231-Mesothelin cells

靶向 Mesothelin 的 scFv CAR 和 VHH CAR 慢病毒载体。其中, scFv 序列来源于 SS1 抗体 (US Patent: US7081518), 其平衡解离常数(KD)值为 11 nM<sup>[16]</sup>, VHH 序列来源于 Nb-A1 抗体 (US Patent: US20180002439A1), 其 KD 值为 15 nM。具体的 CAR 结构如图 2(a) 所示, 抗原结合结构域后, 依次连接人源的 CD8 $\alpha$  作为铰链区和跨膜段, 4-1BB 作为共刺激分子, CD3 $\zeta$  链作为 T 细胞活化基序。经过限制性内切酶鉴定和苏州金唯智有限公司测序验证, 结果符合预期, 表明成功构建慢病毒质粒。

使用上述质粒包装的慢病毒转染健康志愿者 T 细胞, 分别制备 scFv CAR-T 和 VHH CAR-T 细胞, 培养至第 6 天, 通过流式细胞术检测 CAR-T 细胞表面 CAR 的表达率, 检测结果如图 2(b) 所示。其中, scFv CAR-T 细胞阳性率约为 57%, VHH CAR-T 细胞阳性率约为 59%, 表明 CAR-T 细胞制备成功, scFv 和 VHH 来源的 CAR 均能够在 T 细胞上良好表达。对 UTD 和两种 CAR-T 细胞中 CD4 $^{+}$  和 CD8 $^{+}$  亚群的比例情况进行检测, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 与 UTD 细胞 ( $P < 0.01$ ) 相比, 两种 CAR-T 细胞中 CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$

细胞的比例较高, 而 CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$  细胞的比例较低。此外, 制备的两种 CAR-T 细胞中 CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$  和 CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$  亚群比例近似。这说明与未转病毒的 UTD 细胞相比, 制备的 CAR-T 的 CD8 $^{+}$  细胞的比例会显著提高, CAR 结构中抗原结合结构域(scFv 和 VHH)的不同, 并未影响 CAR-T 细胞中 CD4 $^{+}$  和 CD8 $^{+}$  亚群的比例情况。

### 3.3 CAR-T 细胞对靶细胞的体外杀伤效果对比

利用 RTCA 监测肿瘤细胞生长曲线的变化, 检测不同效靶比的 CAR-T 细胞和 UTD 细胞对靶点阳性的 MDA-MB-231-Mesothelin 细胞的杀伤效果。杀伤约 48 h 后, 杀伤结果如图 4(a) 和 4(b) 所示, 在不同效靶比的条件下, scFv CAR-T 和 VHH CAR-T 均能够有效杀伤靶细胞, 当效靶比为 2:1 和 1:1 时, VHH CAR-T 对靶细胞的杀伤效果显著优于 scFv CAR-T ( $P < 0.05$ )。此外, 还检测了不同效靶比的 CAR-T 细胞和 UTD 细胞对靶点阴性的 MDA-MB-231 细胞的杀伤效果。杀伤结果如图 4(c) 和 4(d) 所示, 当效靶比相同时, CAR-T 细胞和 UTD 细胞对靶点阴性的 MDA-MB-231 细胞的杀伤效果几乎没有差别。这说明 scFv CAR-T 和 VHH CAR-T 不能

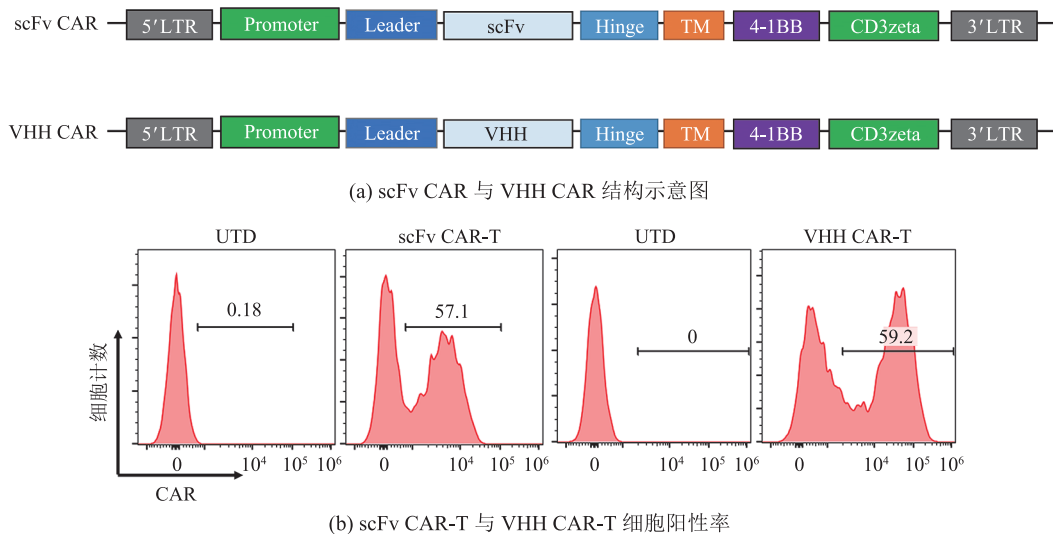


图 2 scFv CAR-T 与 VHH CAR-T 细胞的构建

Fig. 2 Construction of scFv CAR-T and VHH CAR-T cells

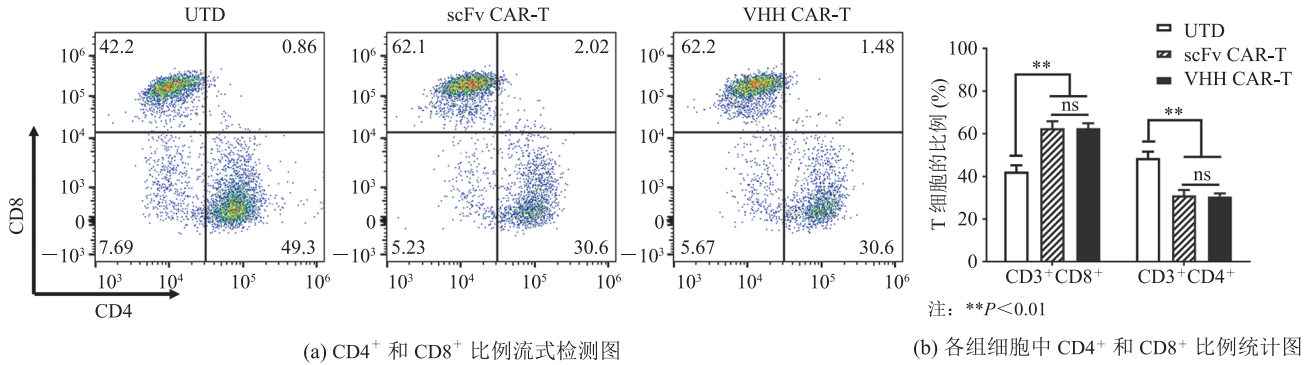
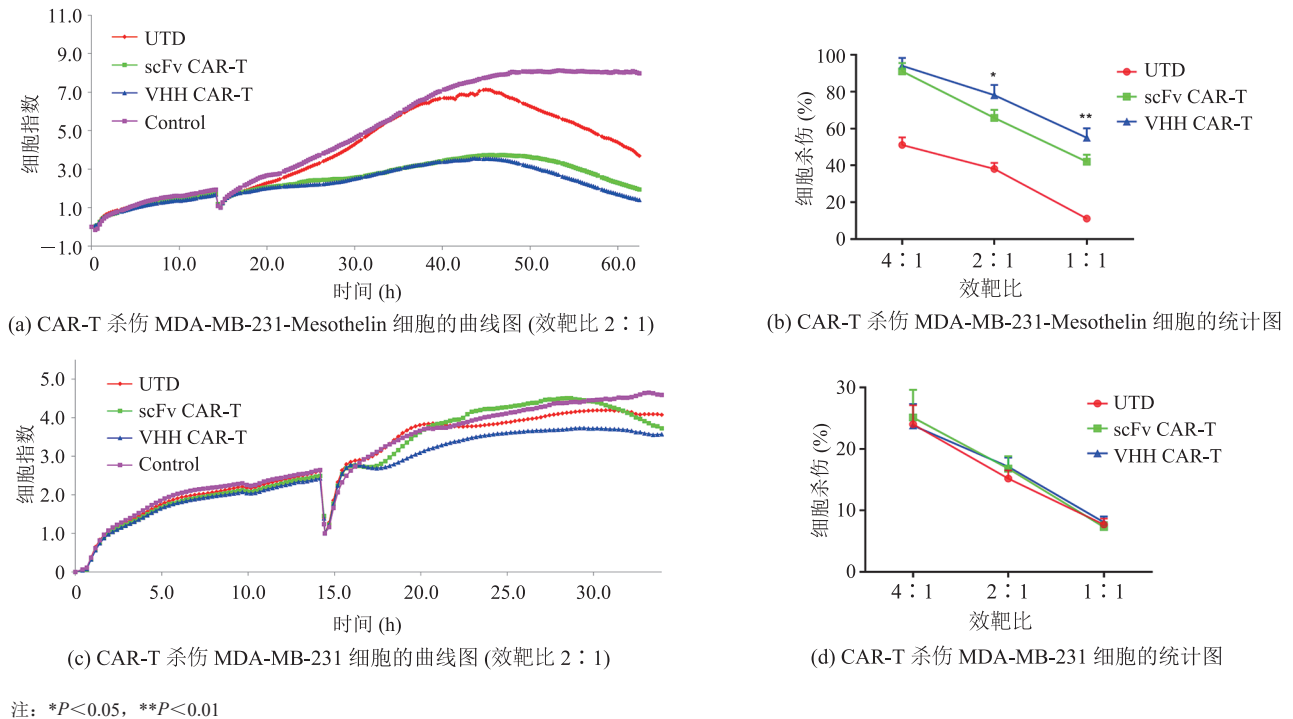
图3 CAR-T 细胞 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 亚群的比例Fig. 3 The proportion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> in CAR-T cells

图4 CAR-T 对靶点阳性和阴性细胞系的体外杀伤

Fig. 4 Cytotoxicity of CAR-T against target-negative and target-positive cells

杀伤靶点阴性的细胞系，其杀伤作用是靶点特异的。

### 3.4 CAR-T 细胞分泌细胞因子情况

将 CAR-T 细胞和靶点阳性细胞以 2 : 1 的效靶比共同孵育 48 h 后，收取培养液上清，使用 CBA 法对 CAR-T 细胞分泌细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$  进行检测。检测结果如图 5 所示，

scFv CAR-T 和 VHH CAR-T 均能分泌大量的 IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$ ，较 UTD 组具有显著差异 ( $P < 0.05$ )，这表明两种 CAR-T 均被靶点阳性细胞有效激活，进一步证实了 CAR-T 的靶向杀伤功能。虽然 VHH CAR-T 比 scFv CAR-T 对靶细胞的杀伤能力更强，但两者分泌的细胞因子的量无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

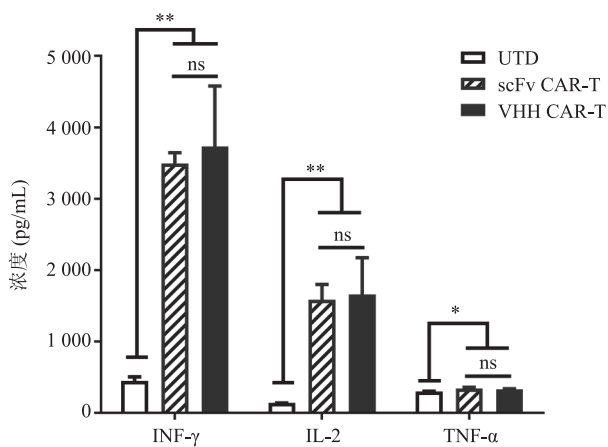
### 3.5 CAR-T 细胞表达 CD69、CD107a 和 PD-1 的情况

将 CAR-T 细胞和靶点阳性细胞以 2:1 的效靶比共同孵育 24 h 后, 收集 T 细胞, 利用流式细胞术检测各组 T 细胞的活化标记物 CD69、脱颗粒标记物 CD107a 以及免疫抑制分子 PD-1 的表达水平, 观察 CAR-T 细胞的活化情况。检测结果如图 6 所示, 两种 CAR-T 细胞中 CD69、CD107a 和 PD-1 的表达水平显著高于 UTD 组 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。VHH CAR-T 组中 CD69、CD107a 的表达水平显著高于 scFv CAR-T 组 ( $P < 0.01$ ), 这表明 VHH CAR-T 在被靶细胞激活后的活化水平更高, 同时也部分解释了 VHH CAR-T 的杀伤效果优于 scFv CAR-T。此外, VHH CAR-T 组中 PD-1 的表达水平略高于 scFv CAR-T 组, 但是二者差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 4 讨论与分析

目前, CAR-T 对于 TNBC 的临床治疗效果不佳, 患者预后较差, 迫切需要开发新型的

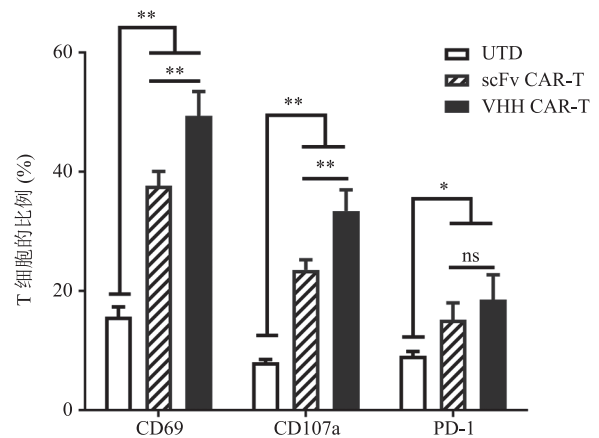
TNBC 治疗方法。而 CAR-T 免疫细胞疗法, 在血液系统肿瘤的治疗中取得了革命性的成功, 因此, 针对多个不同靶点的 CAR-T 免疫细胞疗法也被尝试用于治疗 TNBC, 并取得了一定的进展<sup>[17]</sup>。Mesothelin 靶点特异性地在 TNBC 中高表达, 不在非 TNBC 中高表达, 且该高表达和 TNBC 的进程呈正相关<sup>[9]</sup>, 因此, Mesothelin 靶点作为一个治疗 TNBC 的 CAR-T 靶点受到越来越多的关注。使用基于抗体和 CAR-T 的策略靶向 Mesothelin 过表达的肿瘤的临床试验, 已经显示出初步的安全性和潜在的效果, 说明了该靶点的安全性较好<sup>[8,18]</sup>。在临床前的研究中, 宾夕法尼亚大学医学院的 Tchou 等<sup>[9]</sup>曾证实靶向 Mesothelin CAR-T 细胞能有效杀伤 Mesothelin 高表达的原代 TNBC 细胞, 因此, Mesothelin CAR-T 在治疗 TNBC 方面具有较大的潜力。目前, 有两个 Mesothelin CAR-T 治疗 TNBC 的临床试验正在开展中, 结果未知<sup>[7]</sup>。Mesothelin CAR-T 在临床治疗 TNBC 病人方面的前景较好, 但 Mesothelin CAR-T 也可能面临其他现有靶点 CAR-T 治疗 TNBC 遇到的一些问题<sup>[17]</sup>,



注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 5 CAR-T 杀伤靶细胞后细胞因子分泌情况

Fig. 5 Cytokine secretion of CAR-T cell after killing target cells



注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 6 CAR-T 杀伤靶细胞后 CD69、CD107a 和 PD-1 的表达情况

Fig. 6 CD69, CD107a and PD-1 expression on CAR-T cell after killing target cells



如肿瘤抗原异质性导致的肿瘤逃逸、肿瘤免疫抑制微环境导致的 CAR-T 细胞耗竭等。如遇到这些问题,可根据 Mesothelin CAR-T 临床试验的结果,在 Mesothelin CAR-T 的基础上进行相应的设计和改造,如双抗原或多抗原识别的 CAR-T、“武装”细胞因子的 CAR-T 等,以进一步提高疗效。

目前,用于开展临床试验的 Mesothelin CAR-T 中的抗原结合结构域,大多数来源于小鼠单克隆抗体 SS1<sup>[16]</sup>,但就 Mesothelin CAR-T 治疗实体肿瘤的临床数据来看,SS1 来源的 Mesothelin CAR-T 疗效不佳。宾夕法尼亚大学 Haas 等<sup>[11]</sup>进行了 SS1 Mesothelin CAR-T 治疗 15 名实体肿瘤患者的临床 I 期试验,试验结果显示,患者的最佳疗效为疾病稳定(11/15),14 名患者中,8 人的血液均检测到抗 CAR 的抗体,这可能是该临床试验效果不佳的原因之一。因此,他们准备以人源化的抗体序列 Mesothelin CAR-T 进行临床试验,对于人源化的 scFv CAR-T 是否会引免疫原性,目前尚不清楚。单域抗体 VHH 因其分子量小、稳定性好、免疫原性低等特点,比 scFv 更适合做 CAR 的抗原结合结构域<sup>[12-13]</sup>,已有多个针对不同肿瘤靶点的 VHH CAR-T 在临床前或临床开发阶段,但尚未有 VHH 来源的 Mesothelin CAR-T 被报道<sup>[19-20]</sup>。

本研究寻找到一个与 SS1 抗体( $KD=11$  nM)亲和力相近的靶向 Mesothelin VHH 抗体( $KD=15$  nM),并将此 VHH 作为 CAR-T 的抗原结合结构域,与 SS1 抗体来源的 scFv 进行对比。研究发现,制备的 VHH CAR-T 能够靶向杀伤 Mesothelin 过表达的 TNBC 细胞,而对靶点 Mesothelin 不表达的阴性细胞系无杀伤效果,证明该 VHH CAR-T 具有特异性杀伤功能,这是迄今为止,国内外报道的第一个 VHH 来源的靶向 Mesothelin 的 CAR-T,证实了 VHH 可以作为

Mesothelin CAR-T 的抗原结合结构域。与临床上常用的 SS1 来源的 scFv CAR-T 相比,在体外杀伤 Mesothelin 阳性靶细胞的效果方面,VHH CAR-T 强于 scFv CAR-T,同时可表达更高水平的 CD69 和 CD107a,活化程度更高。在一定范围内,CAR 对靶点的亲和力会影响 CAR-T 的杀伤功能<sup>[21]</sup>。当 VHH 和 scFv 对靶点 Mesothelin 的亲和力相近时,VHH CAR-T 杀伤效果更好,可能是由于 VHH 和 scFv 靶向肿瘤抗原的表位不同,有研究发现,靶向 Mesothelin 膜近侧区比远侧区的 CAR-T 杀伤效果更好<sup>[15]</sup>。此外,VHH CAR-T 杀伤效果更好,可能与 VHH 在 CAR-T 细胞上的表达更稳定有关<sup>[13]</sup>。

CAR-T 疗法的局限性之一是肿瘤细胞会发生抗原逃逸,从而对单抗原靶向的 CAR-T 产生耐药。为降低 CAR-T 细胞治疗肿瘤的复发率,提高治疗效果,现有方法主要依赖于靶向多种抗原,如构建串联的双 CAR (Tandem CAR)<sup>[22]</sup>。在临床试验中,CD19/CD22 串联双 CAR 的 CAR-T 表现出较好的疗效<sup>[23]</sup>;在临床前动物模型中,靶向胶质母细胞瘤中的 HER2 和 IL13Ra2 的串联双 CAR 的效果得到验证<sup>[24]</sup>。在设计串联双 CAR 时,两个 scFv 序列在同一个 CAR 分子上表达,容易导致 V<sub>H</sub> 链和 V<sub>L</sub> 链的错配,以及蛋白聚集和错误折叠等,严重影响 CAR-T 细胞发挥功能。与传统的 scFv 相比,在构建串联双 CAR 时,单域抗体 VHH 具有非常明显的优势。VHH 只有一条重链,具有所占空间较小、更容易表达、更稳定的优势,更适用于串联双 CAR 的抗原结合结构域<sup>[13]</sup>。综上所述,本研究为后续基于 Mesothelin 靶点的双靶向或多靶向 CAR-T 的设计和研发奠定了良好的研究基础。

## 5 结 论

以靶向 Mesothelin 的 scFv 和 VHH 分别作为

抗原结合结构域, 本研究构建了 scFv CAR-T 和 VHH CAR-T 细胞, 并对两种 CAR-T 细胞在体外杀伤 TNBC 细胞系的能力进行测试。结果显示, VHH CAR-T 体外杀伤效果优于临床试验常用的 scFv CAR-T。这是目前报道的第一个基于 VHH 序列构建的 Mesothelin CAR-T, 为 Mesothelin CAR-T 的开发奠定了基础, 具有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(1): 7-33.
- [2] Newton EE, Mueller LE, Treadwell SM, et al. Molecular targets of triple-negative breast cancer: where do we stand? [J]. Cancers, 2022, 14(3): 482-497.
- [3] Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network [J]. Cancer, 2012, 118(22): 5463-5472.
- [4] Ferrari P, Scatena C, Ghilli M, et al. Molecular mechanisms, biomarkers and emerging therapies for chemotherapy resistant TNBC [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(3): 1665-1700.
- [5] June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer [J]. Science, 2018, 359(6382): 1361-1365.
- [6] Mao R, Hussein MS, He Y. Chimeric antigen receptor engineered T cells and their application in the immunotherapy of solid tumours [J]. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2022, 24: e7.
- [7] Dees S, Ganesan R, Singh S, et al. Emerging CAR-T cell therapy for the treatment of triple-negative breast cancer [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2020, 19(12): 2409-2421.
- [8] Klampatsa A, Dimou V, Albelda SM. Mesothelin-targeted CAR-T cell therapy for solid tumors [J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2021, 21(4): 473-486.
- [9] Tchou J, Wang LC, Selven B, et al. Mesothelin, a novel immunotherapy target for triple negative breast cancer [J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2012, 133(2): 799-804.
- [10] Tozbikian G, Brogi E, Kadota K, et al. Mesothelin expression in triple negative breast carcinomas correlates significantly with basal-like phenotype, distant metastases and decreased survival [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114900.
- [11] Haas AR, Tanyi JL, O'Hara MH, et al. Phase I study of lentiviral-transduced chimeric antigen receptor-modified T cells recognizing mesothelin in advanced solid cancers [J]. Molecular Therapy, 2019, 27(11): 1919-1929.
- [12] Wang GM, Zhou X, Fuca G, et al. Fully human antibody VH domains to generate mono and bispecific CAR to target solid tumors [J]. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2021, 9(4): e002173.
- [13] Bao C, Gao QL, Li LL, et al. The application of nanobody in CAR-T therapy [J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 238-255.
- [14] Berdeja JG, Madduri D, Usmani SZ, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study [J]. The Lancet, 2021, 398(10297): 314-324.
- [15] Zhang ZW, Jiang DQ, Yang H, et al. Modified CAR T cells targeting membrane-proximal epitope of mesothelin enhances the antitumor function against large solid tumor [J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(7): 476.
- [16] Chowdhury PS, Viner JL, Beers R, et al. Isolation of a high-affinity stable single-chain Fv specific for mesothelin from DNA-immunized mice by

- phage display and construction of a recombinant immunotoxin with anti-tumor activity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(2): 669-674.
- [17] Xie YT, Hu Y, Zhou NW, et al. CAR T-cell therapy for triple-negative breast cancer: where we are [J]. *Cancer Letters*, 2020, 491: 121-131.
- [18] Hassan R, Miller AC, Sharon E, et al. Major cancer regressions in mesothelioma after treatment with an anti-mesothelin immunotoxin and immune suppression [J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(208): 208ra147.
- [19] Xie YJ, Dougan M, Jaikhani N, et al. Nanobody-based CAR T cells that target the tumor microenvironment inhibit the growth of solid tumors in immunocompetent mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, 116(16): 7624-7631.
- [20] Mo FZ, Duan SL, Jiang XB, et al. Nanobody-based chimeric antigen receptor T cells designed by CRISPR/Cas9 technology for solid tumor immunotherapy [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6(1): 80.
- [21] Jayaraman J, Mellody MP, Hou AJ, et al. CAR-T design: elements and their synergistic function [J]. *EBioMedicine*, 2020, 58: 102931.
- [22] Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies [J]. *Blood Cancer Journal*, 2021, 11(4): 69.
- [23] Dai HR, Wu ZQ, Jia HJ, et al. Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 and CD22 for therapy of adults with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2020, 13(1): 30.
- [24] Hegde M, Mukherjee M, Grada Z, et al. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13R $\alpha$ 2 mitigate tumor antigen escape [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2016, 126(8): 3036-3052.