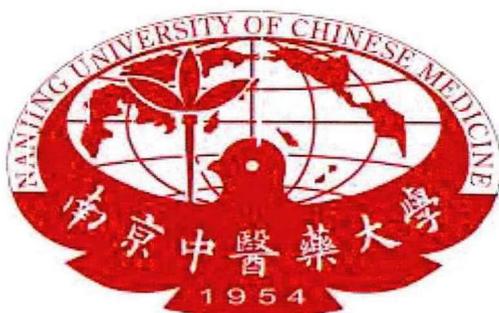


密级：公开

学号：20211587

南京中医药大学

硕士学位论文



CD19/BAFFR全人源双靶点CAR-T的开发和临床 前功能研究

研究生 吴孙桂

指导教师 陈兵 教授

学科专业 内科学

所在学院 中西医结合临床医学院

毕业时间 2024年06月

**Development and preclinical functional study of
CD19/BAFFR fully human bispecific CAR-T**

A Dissertation Submitted for the Master's Degree

Candidate: Wu Sungui

Adviser: Prof. Chen Bing

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, China

学号：20211587

硕士学位论文

CD19/BAFFR全人源双靶点CAR-T的开发和 临床前功能研究

作者姓名	吴孙桂	申请学位级别	医学科学硕士学位
指导教师姓名	陈兵	职称	主任医师
学科专业	内科学	研究方向	血液肿瘤的免疫治疗
学习时间自	2021年 09 月 01 日	起至	2024 年 06 月 30 日止
论文提交日期	2024年 03 月 12 日	论文答辩日期	2024 年 05 月 23 日
学位授予单位	南京中医药大学	学位类型	医学科学硕士学位

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 血液系统肿瘤的免疫治疗	1
1.2 CAR-T 细胞疗法的发展历程	2
1.3 CAR-T 细胞疗法的优势与限制	4
1.4 CD19 和 BAFFR 与血液系统肿瘤的关联	5
1.5 CAR-T 目前的研究进展与局限性	7
1.6 本课题研究方案.....	8
第二章 肿瘤细胞 CD19 和 BAFFR 的表达以及敲除细胞株的构建..	10
2.1 引言.....	10
2.2 材料与方法.....	10
2.2.1 实验材料.....	10
2.2.2 实验方法.....	13
2.3 实验结果.....	15
2.3.1 原代肿瘤细胞以及敲除细胞抗原表达检测	15
2.3.2 敲除细胞株生物学特征比较.....	16
2.4 总结讨论.....	17
第三章 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 的制备和鉴定.....	19
3.1 引言.....	19
3.2 材料与方法.....	19
3.2.1 实验材料.....	19
3.2.2 实验方法.....	23
3.3 实验结果.....	27
3.3.1 VH 和 VL 的顺序不影响 CD19 单 CAR 的功能.....	27
3.3.2 CAR 结构初筛	28
3.3.3 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞的制备与鉴定.....	30
3.4 总结讨论.....	31
第四章 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 体外功能研究.....	33
4.1 引言.....	33
4.2 材料与方法.....	33
4.2.1 实验材料.....	33
4.2.2 实验方法.....	35
4.3 实验结果.....	37
4.3.1 CAR-T 细胞脱颗粒和激活能力检测	37
4.3.2 细胞毒性实验.....	38

4.3.3 细胞因子检测.....	39
4.3.4 反复刺激和细胞耗竭实验.....	40
4.4 总结讨论.....	41
第五章 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 体内功能研究.....	42
5.1 引言.....	42
5.2 材料与方法.....	42
5.2.1 实验材料.....	42
5.2.2 实验方法.....	44
5.3 实验结果.....	46
5.3.1 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞在体内表现出强大的抗肿瘤活性.....	46
5.3.2 CD19/BAFFR 并联 CAR-T 细胞在体内克服肿瘤抗原逃逸.....	48
5.4 总结讨论.....	50
第六章 全文总结与讨论.....	51
6.1 研究结果总结.....	51
6.2 本研究的局限性与改进方向.....	52
6.3 研究的启示与展望.....	52
参考文献.....	54
附录.....	60
缩略词表.....	60
补充图片.....	62

摘 要

随着当代肿瘤免疫疗法的发展，靶向 CD19 的嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）疗法在晚期 B 细胞血液系统恶性肿瘤的治疗中取得了显著的成效。然而，这种疗法在实际应用中面临着一些挑战，包括抗原阴性复发导致的缓解时间缩短，以及鼠源性抗体引发的免疫反应等问题，这些都限制了 CAR-T 疗法的长期效果。为了克服这些障碍，研究者们迫切需要开发出新型的人源化抗体和多靶点联合 CAR-T 疗法。

在本研究中，我们采用了一种创新的方法，通过人源化抗体库筛选出人源化的 CD19 单链可变片段（scFv）和 BAFFR 单域重链抗体（VHH），并将这些片段改造成基于第二代 4-1BB-CD3 ζ 结构的双靶点 CAR 结构。这种结构设计旨在提高 CAR-T 细胞对肿瘤的杀伤，同时减少鼠源抗体导致免疫反应的风险。

在体外实验中，我们观察到，串联结构（Tan 5H-78HL）和并联结构（BI CAR）的 CAR-T 细胞在阳性靶细胞刺激后，其 CD107a、CD25 和 CD69 的表达水平均显著上调，这些标志物的增加表明 CAR-T 细胞可以被特异性激活。随后，在肿瘤细胞杀伤试验中我们观察到，CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞在对抗肿瘤细胞方面表现出比单靶点 CAR-T 细胞更强的杀伤能力。此外，BI CAR-T 细胞在 IL-2 和 TNF- α 的分泌能力上优于 Tan 5H-78HL CAR-T 细胞，这表明 BI CAR-T 细胞在免疫反应中可能具有更高的活性。在抗原重复刺激的实验中，与 Mock T 细胞相比，CAR-T 细胞均显示出特异性增殖的能力，这表明它们能够在持续的抗原刺激下在体外特异性扩增。值得注意的是，BI CAR-T 细胞在两轮抗原刺激后表现出比 CD19 CAR-T 细胞更少的耗竭表型，这意味着 BI CAR-T 细胞在长期治疗中可能具有更好的持久性。

在 Jeko-1 小鼠异种移植模型中，BI CAR-T 细胞显示出比 Tan 5H-78HL CAR-T 细胞更有效的抗肿瘤效果和更高的扩增倍数。这一点在模拟抗原丢失的混合肿瘤模型中得到了更好的体现，Tan 5H-78HL CAR-T 细胞很快就失去了对混合肿瘤模型的抑制效果，而 BI CAR-T 细胞通过持续的体内扩增一直保持着良好的抑瘤效果。这一发现为 CAR-T 疗法在治疗 B 细胞来源的血液系统恶性肿瘤方面提供了新的希望，通过这种新型的双靶点 CAR-T 细胞，研究者们有望克服抗原阴性复发和抗鼠源免疫反应的问题，从而提高患者的生存率和生活质量。

总结来说，本研究提出了一种基于人源化 scFv 和 VHH 组合的新型 CAR-T 疗法。通过体外和体内实验，我们验证了 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞在治疗 B 细胞血液系统恶性肿瘤方面的潜力。这种疗法不仅提高了 CAR-T 细胞的抗肿瘤能力，还减少了潜在的副

作用,为未来的临床应用奠定了坚实的基础。随着进一步的研究和临床试验,这种新型 CAR-T 疗法有望成为治疗 B 细胞血液系统恶性肿瘤的有效手段,为患者带来新的希望。

关键词: 血液系统恶性肿瘤, CD19, BAFFR, 细胞免疫治疗, 临床前研究

Abstract

The advancement of contemporary tumor immunotherapy has led to significant achievements in the treatment of advanced B-cell hematological malignancies using chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy targeting CD19. However, clinical application of this therapy faces challenges such as antigen-negative relapses leading to shortened remission periods and immune responses triggered by murine-derived antibodies, which limit the long-term efficacy of CAR-T therapy. To overcome these obstacles, there is an urgent need for the development of novel humanized antibodies and multi-target CAR-T therapies.

In this study, we employed a novel approach to combine the CD19 single-chain variable fragment (scFv) and the BAFFR single-domain heavy chain antibody (VHH) obtained from humanized antibody libraries into a bispecific CAR structure based on the second-generation 4-1BB-CD3 ζ signal domain. This structural design aims to enhance the killing capability of CAR-T cells against tumors while reducing the risk of immune responses caused by murine antibodies.

In vitro experiments revealed that both tandem (Tan 5H-78HL) and bicistronic (BI CAR) CAR-T cells exhibited significantly increased expression levels of CD107a, CD25, and CD69 upon stimulation with positive target cells, indicating that the CAR-T cells can be specifically activated. Subsequent tumor killing assays demonstrated that CD19/BAFFR bispecific CAR-T cells exhibited stronger tumoricidal capacity compared to single-target CAR-T cells. Additionally, BI CAR-T cells exhibited superior secretion capabilities of IL-2 and TNF- α over Tan 5H-78HL CAR-T cells, suggesting that BI CAR-T cells may have higher activity in immune responses. In antigen re-stimulation experiments, compared to Mock T cells, CAR-T cells displayed the ability to proliferate specifically, indicating their potential for specific expansion under sustained antigen stimulation. Notably, BI CAR-T cells showed less exhaustion phenotype after two rounds of antigen stimulation compared to CD19 CAR-T cells, implying better durability for long-term therapy.

In the Jeko-1 mouse xenograft model, BI CAR-T cells showed more effective antitumor effects and higher expansion multiples than Tan 5H-78HL CAR-T cells. This was particularly evident in a mixed tumor model simulating antigen loss, where Tan 5H-78HL CAR-T cells quickly lost their inhibitory effects on tumors, while BI CAR-T cells maintained good antitumor effects through continuous in vivo expansion. These findings offer a new hope for CAR-T therapy in treating B-cell derived hematological malignancies. With this novel bispecific CAR-T

cell therapy, researchers may overcome issues of antigen-negative relapses and anti-mouse immune responses, thereby improving patient survival rates and quality of life.

In summary, this research presents a novel CAR-T therapy based on the combination of humanized scFv and VHH. Through in vitro and in vivo experiments, we have validated the potential of CD19/BAFFR bispecific CAR-T cells in treating B-cell hematological malignancies. This therapy not only enhances the anti-tumor capability of CAR-T cells but also reduces potential side effects, laying a solid foundation for future clinical applications. With further research and clinical trials, this novel CAR-T therapy is expected to become an effective means for treating B-cell hematological malignancies, offering new hope for patients.

Key words: Hematological malignancies, CD19, BAFFR, cellular immunotherapy, preclinical studies

第一章 绪论

1.1 血液系统肿瘤的免疫治疗

近年来随着化疗、放疗和靶向治疗的不断进步，血液肿瘤患者的总体缓解率（ORR）显著提高，但这些方法往往伴随着严重的副作用，且由于血液恶性肿瘤的分子特征具有高度异质性，有不少患者因复发和耐药而面临治疗失败。因此，血液肿瘤治疗急需具有新型作用机制的治疗方法来改变现状。随着对肿瘤免疫学和免疫调节机制的深入研究，免疫疗法作为一种新兴的治疗策略，已经在血液系统肿瘤的治疗领域引起了人们的广泛关注。免疫疗法的核心思想是利用患者自身的免疫系统来识别和清除肿瘤细胞，这不仅有望提高治疗效果，还能减少对正常细胞的损害，从而降低治疗的副作用。在过去的几十年中，免疫疗法的研究已经取得了显著的进展，尤其是在血液系统肿瘤的治疗中，免疫疗法已经成为传统疗法最有希望的替代或补充^[1]。

在血液系统肿瘤治疗领域，免疫治疗主要涉及干细胞移植、靶向抗体、免疫检查点抑制剂（ICIs）和过继细胞疗法（ACT）等。其中 ACT 是难治或复发性血液系统恶性肿瘤患者最常用的免疫疗法，例如 TCR-T（T细胞受体工程化T）细胞^[2]、CAR-T（嵌合抗原受体T）细胞^[3]、CAR-NK（嵌合抗原受体自然杀伤）细胞^[4]、CAR-M（嵌合抗原受体巨噬）细胞^[5]、CAR- $\gamma\delta$ T^[6] 和 CAR-NKT（嵌合抗原受体自然杀伤T）细胞^[7]疗法。目前，过继细胞治疗仍处于第一代，主要依靠基因转导技术使某些免疫细胞表达识别肿瘤相关抗原以杀死肿瘤细胞的受体。第二代 ACT 可以结合两种类型的 CAR 工程免疫细胞，并表现出更好的抗肿瘤作用。而下一代 ACT 可以充分利用每种类型的免疫细胞的独特特性，通过逻辑组合它们以模拟健康的免疫协调系统，并人为地创建正免疫通路（图1.1）。在过继细胞疗法中，目前应用最为广泛的当为 CAR-T 细胞疗法。

Fred Hutchison 癌症研究所于2008年首次使用 CAR-T 细胞治疗 B 细胞淋巴瘤并证明其安全性。随后在2010年，两名慢性淋巴细胞白血病患者首次接受了 CAR-T 细胞治疗并达到 CR（完全缓解），且随访10年后体内仍能检测到 CAR-T 细胞^[8]。2012年，美国 B 细胞急性淋巴细胞白血病（B-ALL）患者 Emily 接受 CAR-T 治疗并痊愈。到现在为止，她已经近12年没有复发。由于这些令人鼓舞的成功案例，2017年美国食品药品监督管理局（FDA）批准了首个 CAR-T 细胞产品 Kymriah 上市，这极大地推动了 CAR-T 疗法的发展，从此开启了 CAR-T 细胞的商业化发展时代^[9]。目前，CAR-T 疗法在难治/复发性急性淋巴细胞白血病（R/R ALL）^[10]、慢性淋巴细胞白血病（CLL）^[11]、非霍奇金淋巴瘤（NHL）^[12]和多发性骨髓瘤（MM）^[13]等血液肿瘤治疗方面均取得了显著的效果。

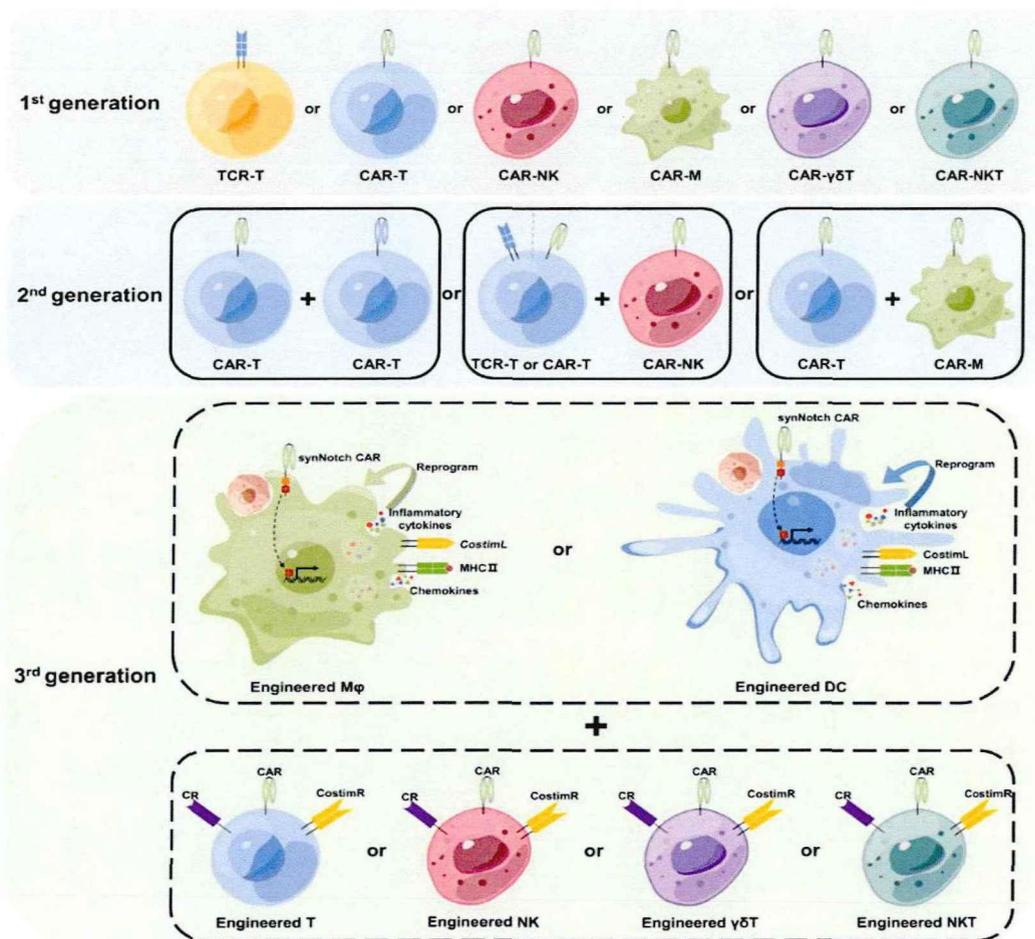


图1.1 ACT在癌症治疗中的当前和未来策略^[14]。

M, 巨噬细胞; DC, 树突状细胞; CostimL, 共刺激配体; CostimR, 共刺激受体; CR, 趋化因子受体

1.2 CAR-T 细胞疗法的发展历程

CAR-T 细胞疗法作为一种新兴的癌症免疫治疗方法, 通过改造 T 细胞的受体, 使其能够识别并攻击肿瘤细胞。CAR-T 疗法于20世纪80年代首次提出^[15], 经过多年的研究和发 展, 如今已成为引人注目的前沿生物技术。

CAR-T 由嵌合抗原受体 (CAR, 一种旨在将T细胞靶向癌细胞的工程蛋白) 和 T 细胞组成。CAR 由三个功能域组成: 细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域 (图1.2)。细胞外结构域一般由负责识别和结合抗原的单克隆抗体的单链可变片段 (scFv) 构成。跨膜结构域 (Transmembrane domain, TM) 连接胞外结构域和胞内结构域, 并锚定到细胞膜上, 它通常来源于跨膜受体蛋白, 如 CD8αTM 或 CD28TM^[16]。细胞内结构域由共刺激域和信号传导域组成。其中, 共刺激域, 如 4-1BB^[17, 18]或CD28^[19, 20], 提供额外的刺激信号,

促进 CAR-T 细胞的增殖和持久性；信号传导域，如 CD3 ζ ^[21]，则激活 T 细胞内的信号传导通路，引发细胞毒性反应。

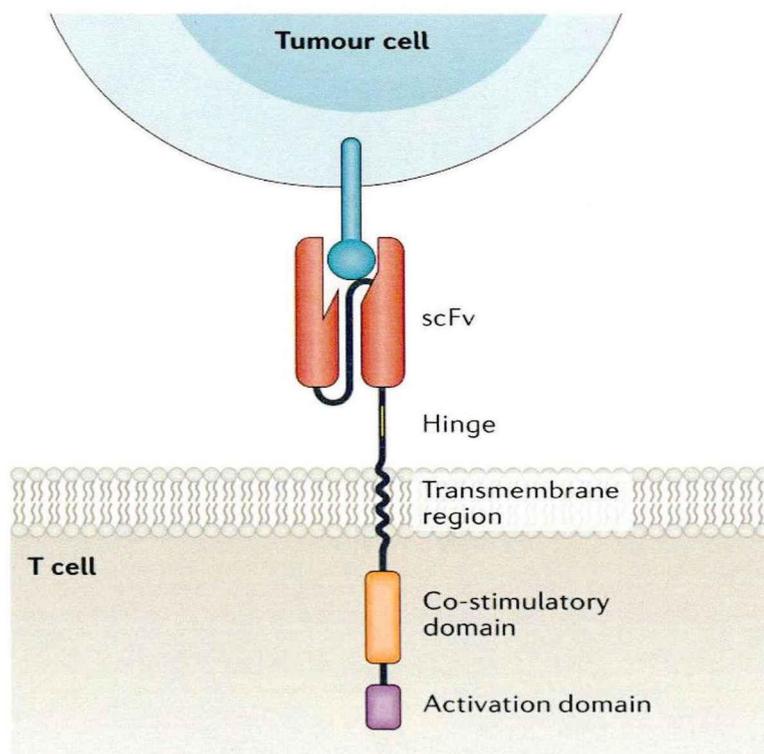


图1.2 CAR结构示意图^[22]

根据 CAR-T 发展的历程，大致可以分为五代（图1.3）。第一代 CAR-T 包含一个特异性 scFv 以及一个胞内 CD3 ζ 片段^[23, 24]。然而，由于缺乏共刺激信号，T 细胞迅速耗尽，导致第一代 CAR-T 的治疗效果并不理想^[25]。第二代 CAR-T 在先前的基础上加入了一个共刺激域。共刺激域的引入大大延长了 CAR-T 的存续时间，CAR-T 细胞在体内的持续存在促进了肿瘤细胞的长期监测和消除^[26-28]。因此，目前商业化 CAR-T 产品大都属于第二代的 CAR-T 疗法。第三代 CAR-T 同时引入了两个共刺激域，这有可能提高 CAR-T 的增殖能力同时减少耗竭，从而增强 CAR-T 的体内功能^[29, 30]，但过高的细胞因子水平也可能引起严重的细胞因子释放综合征。第四代 CAR-T 经过研究人员的改造，可以产生额外的蛋白质分子（如细胞因子）或拥有额外的受体（如共刺激配体）。这些改造增强了 CAR-T 的功能，因此这些 CAR-T 也被称为 TRUCKs（T cells Redirected for Universal Cytokine Killing）^[31]。第五代 CAR-T 为通用性 CAR-T 细胞，通过敲除从健康供体获得的 T 细胞的人类白细胞抗原和 TCR 基因^[32-34]，以避免宿主对输注的 CAR-T 细胞的免疫排斥或移植物抗宿主疾病，同时对胞内信号受体进行改造来增强 T 细胞的激活和增殖^[35]。

综上所述，CAR-T 疗法作为一种新兴的抗癌疗法，其发展历程经历了多个阶段，从第一代到第五代不断进行改良和创新。

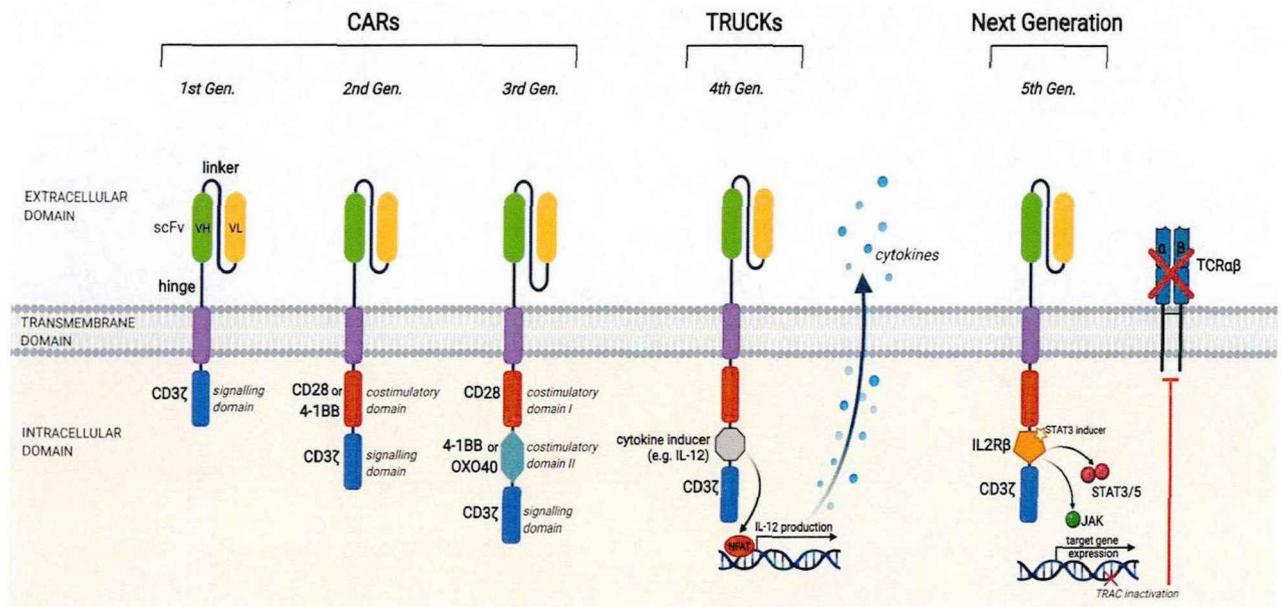


图1.3 不同代次CAR-T细胞结构设计^[36]

1.3 CAR-T 细胞疗法的优势与限制

CAR-T 细胞疗法在一些血液系统恶性肿瘤治疗中已取得了显著成果，而且相较于传统治疗方法具有许多优势。

首先，CAR-T 细胞具有高度的特异性和靶向性。CAR-T 细胞通过自身携带的特异性抗原识别结构与肿瘤细胞表面的特定抗原结合，从而实现对肿瘤细胞的非 MHC（主要组织相容性复合体）依赖性高度选择性杀伤^[37]。相比传统的化疗和放疗方法，CAR-T 疗法一定程度上减少了对正常细胞的毒性，降低了治疗的副作用。

其次，CAR-T 细胞具备良好的自我增殖潜能，这是传统药物无法做到的。经过体外扩增后的 CAR-T 细胞可以在体内持续增殖，从而持久地发挥其杀伤作用。这为 CAR-T 疗法的治疗效果提供了持久性，使其较传统抗肿瘤治疗方法具有更显著的长期疗效^[38-40]。

此外，一种 CAR-T 疗法还可以同时覆盖多种肿瘤。由于其结构的可复制性和不同肿瘤抗原的重复性，可以根据不同肿瘤对 CAR 的抗原识别结构进行微调或者使用一种 CAR 治疗多种肿瘤，比如目前的 CD19 CAR-T 细胞疗法^[41-43]。这一点增加了 CAR-T 疗法对于恶性肿瘤的覆盖范围，并减少了开发的成本。

尽管 CAR-T 疗法具有许多优点，但也存在一些不可忽视的问题。首先，CAR-T 疗法的开发和制备过程比较繁琐。CAR-T 细胞的治疗需要先采集患者的自体 T 细胞，然后

通过基因工程技术对其进行修饰，最后再重新注入患者体内。这一过程需要大量的时间和资源，并且需要具备高水平的实验技术。因此，CAR-T 疗法的应用受到了制约^[44]。

其次，CAR-T 疗法存在治疗效果的不可预测性问题。由于 CAR-T 细胞治疗的机制复杂且与肿瘤细胞的特点相关，每个患者对 CAR-T 疗法的反应可能存在较大的差异。这使得预测和评估治疗效果变得具有挑战性，有时可能导致治疗的失败或效果不理想^[45]。

最后，CAR-T 疗法在临床应用中也存在一些安全性问题。由于 CAR-T 细胞具有高度的杀伤活性，可能导致不可逆的毒副作用，如细胞因子释放综合征和神经毒性等^[46,47]。这些不良反应给患者带来了额外的风险，并且限制了 CAR-T 疗法的广泛应用。

综上所述，CAR-T 疗法作为一种新兴的免疫细胞治疗方法，具备高度的特异性、良好的增殖潜能以及覆盖种类多的优点。然而，CAR-T 疗法的开发与制备繁琐，治疗效果的不可预测性问题以及治疗安全性等方面的缺点，仍需要进一步的研究和改进。对于 CAR-T 疗法的未来发展，我们需要持续努力以提高其治疗效果和安全性，为恶性肿瘤患者带来更好的临床效果。

1.4 CD19 和 BAFFR 与血液系统肿瘤的关联

CD19 和 BAFFR 是两个与血液系统恶性肿瘤相关的关键分子，在 CAR-T 细胞疗法中起着重要的作用。CD19 是 B 细胞表面标志物，广泛表达于 B 淋巴细胞恶性肿瘤细胞上^[48]。BAFFR 是 BAFF (B 细胞活化因子) 的受体，BAFF 信号通过 BAFFR 激活 B 淋巴细胞并促进其生存与增殖^[49]。这两个分子的异常表达与多种血液系统恶性肿瘤的发生和发展密切相关。

CD19 和 BAFFR 的功能与恶性肿瘤关联的研究主要集中在两个方面：一方面是它们在肿瘤细胞增殖和生存中的重要作用，另一方面是它们在 CAR-T 细胞疗法中的应用潜力。CD19 作为 B 细胞肿瘤的特异性标志物，在恶性肿瘤细胞中高度表达，被广泛应用于 CAR-T 细胞治疗中^[50]。CD19 CAR-T 细胞通过重新编程 T 细胞，使其表达特异性抗原受体，CAR 上的抗原结合结构域可以特异性结合 CD19，激活 T 细胞并诱导其杀伤靶向细胞。大量研究已经证实，CD19 CAR-T 细胞疗法在治疗 B 细胞急性淋巴细胞白血病和复发/难治性非霍奇金淋巴瘤等恶性肿瘤中显示出显著的疗效^[51-53]。

另一方面，BAFFR 在 B 淋巴细胞的生存与增殖中的作用同样重要，其异常表达与恶性肿瘤的发生和进展密切相关^[54]。研究表明，BAFFR 在多种血液系统恶性肿瘤中高表达，包括套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤等 (表 1.1)。

表1.1淋巴增生性疾病BAFFR表达^[55]

Lymphoproliferative disorder	BAFFR-positive by immunohistochemistry	BAFFR-positive by flow cytometry	Total BAFFR-positive (%)
Pre-B lymphoblastic leukemia/lymphoma	0/6	0/2	0/8 (0)
Hairy cell leukemia	9/9	1/1	10/10 (100)
Chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma	12/12	9/9	21/21 (100)
Mantle cell lymphoma	6/6	1/1	7/7 (100)
Follicular lymphoma	11/13	2/3	13/16 (81)
Diffuse large B-cell lymphoma	13/17	1/1	14/18 (78)
Marginal zone lymphoma	9/10	1/1	10/11 (91)
Burkitt lymphoma	0/10		0/10 (0)
Lymphoplasmacytic lymphoma	2/3	0/1	2/4 (50)
Multiple myeloma	0/6		0/6 (0)
Hodgkin lymphoma, classical type	0/14		0/14 (0)
NLPHL	0/5		0/5 (0)
Pre-T lymphoblastic leukemia/lymphoma	0/7		0/7 (0)
Angioimmunoblastic lymphoma	0/7		0/7 (0)
T-cell leukemia/lymphoma, NOS	0/6	0/2	0/8 (0)
ALCL	0/7		0/7 (0)
Adult T-cell leukemia/lymphoma	0/2		0/2 (0)

已有研究人员尝试将 BAFFR 作为 CAR 的靶点，设计出 BAFFR CAR-T 细胞以对抗 B 细胞恶性肿瘤^[56]。研究表明，BAFFR CAR-T 细胞可以有效针对 BAFFR 高表达的恶性肿瘤细胞，并显示出较高的肿瘤清除能力，而且没有出现安全性相关的问题^[57]。

综上所述，CD19 和 BAFFR 作为血液系统恶性肿瘤相关的关键分子，在 CAR-T 细胞疗法中具有重要的应用前景。它们的异常表达与恶性肿瘤的发生和发展密切相关，因此，将 CD19 和 BAFFR 作为双靶点进行靶向治疗，有望提高治疗效果并减少耐药发生。

1.5 CAR-T 目前的研究进展与局限性

在近年来的研究中，CAR-T 治疗作为一种创新的免疫治疗策略，已经在临床上展现出显著的治疗潜力。尽管已有多个成功的临床案例，CAR-T 疗法在目前的应用中仍面临诸多挑战和局限性。

目前大部分 CAR-T 疗法主要针对 CD19 抗原，但 CD19 在部分患者中的表达降低或丢失可能影响治疗效果。研究表明，在接受 CD19 靶向治疗后复发的患者中，有较高比例出现了 CD19 抗原表达的降低或缺失^[58-60]。为了提高 CD19 CAR-T 疗法的疗效并降低复发率，研究者们已经开始探索将 CD19 与其他靶点结合到双靶点 CAR-T 细胞中，如 CD20^[61, 62]、CD22^[63, 64]等。然而，这些双靶点 CAR 构建体大多采用两种单链可变片段（scFv）的组合，且部分 scFv 为鼠源性，可能引发免疫反应，导致抗药抗体的产生，从而影响 CAR-T 细胞的疗效^[65, 66]。此外，串联 scFv 可能导致蛋白质折叠不正确，影响其抗原结合能力^[67]。

鉴于这些原因，已经出现了利用单域重链抗体（VHH）作为抗原识别域的新型 CAR-T^[68, 69]。VHH，也被称为纳米抗体，源自重链抗体的可变结构域，经过人源化处理后，可用于 CAR 的抗原结合域（图1.4）。与传统的鼠源性 scFv 相比，人源化的 VHH 不会导致抗药抗体的产生，从而增强了 CAR-T 细胞的体内持久性^[70]。此外，VHH 的紧凑尺寸和长互补决定区3（CDR3）有助于结合隐藏的抗原表位，这对于具有隐藏抗原表达的肿瘤具有重要意义^[71, 72]。同时，用 VHH 代替 scFv 可显著缩短 CAR 片段的长度，从而提高转导效率并简化制造工艺^[73]。这些进展有助于提高 CAR-T 疗法未来临床应用的可行性。

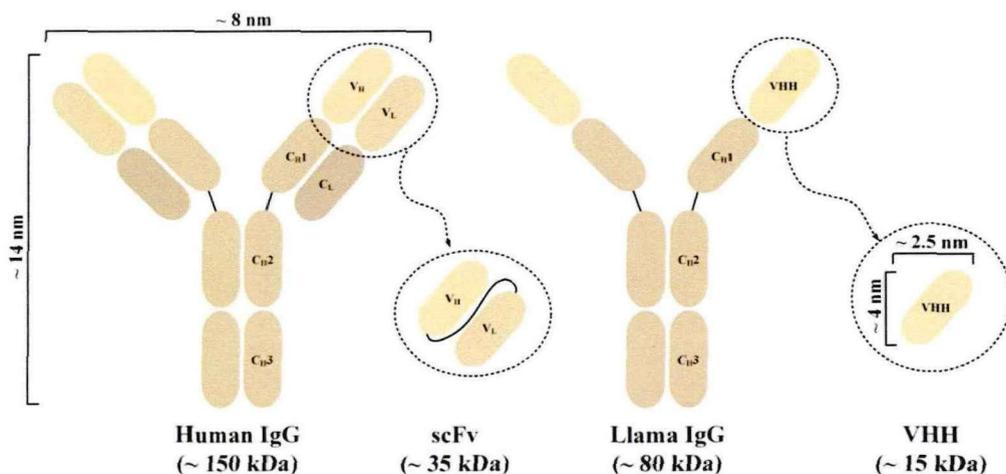


图1.4 scFv和VHH比较的图示^[74]

然而，由于技术限制，获取单域重链抗体并非易事。缺乏轻链辅助的单域重链可能在特异性和稳定性上存在不足^[75]，尤其是针对结构复杂的蛋白，例如 CD19。在之前的研究中，我们的合作伙伴南京驯鹿公司分别获得了人源化的 CD19 scFv^[76] 和 BAFFR VHH^[77]。基于这些成果，本研究决定采用人源化 scFv 和 VHH 的组合来构建 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞，以期克服现有疗法的局限性。

1.6 本课题研究方案

实验设计是科研工作中非常重要的一部分，它直接决定了实验的可行性和实验结果的可靠性。本研究旨在开发和临床前研究 CD19/BAFFR 全人源双靶点 CAR-T 细胞。为了实现这一目标，我们按照以下步骤进行实验设计。

首先，我们需要确定目标细胞，即 CD19 和 BAFFR 在血液系统恶性肿瘤中的表达情况。通过文献综述，我们可以了解到 CD19 和 BAFFR 在多种血液系统恶性肿瘤中的高表达情况，因此选择这两个抗原高表达的肿瘤细胞作为靶细胞，然后选择不表达 CD19 和 BAFFR 的细胞作为对照，同时使用基因敲除构建 CD19 或 BAFFR 单阳细胞株。

其次，我们需要设计合适的 CAR 结构。CAR 是一个重要的组成部分，它由抗原识别域、共刺激信号域和激活信号域组成。在设计 CAR 时，我们需要选择适合的结构，以确保对 CD19 和 BAFFR 的高度特异性识别。

接下来，我们需要构建相应的 CAR 质粒。CAR 质粒是用于转染 T 细胞以表达 CAR 的关键工具。在构建 CAR 质粒时，我们需要将 CAR 结构与适当的载体进行连接，接着进行扩增以及质粒抽提。

然后，我们需要制备 CAR-T 细胞。这一步包括从供体中分离 T 细胞、慢病毒包装、转染 CAR-T、扩增转染细胞，并用流式细胞仪对细胞表面 CAR 的表达进行检测与鉴定。同时，我们还需要进行细胞培养和细胞扩增，以获得足够数量的 CAR-T 细胞进行后续实验。

最后，我们需要设计合适的实验方案。根据研究目的，我们计划进行体外和体内两部分实验。体外实验主要包括抗原结合实验、细胞毒性实验以及抗原反复刺激和细胞耗竭标志物检测，体内实验则需要小鼠肿瘤模型中检验 CAR-T 的疗效和安全性。这些实验将帮助我们评估 CD19/BAFFR 全人源双靶点 CAR-T 细胞的功能和效果。

综上所述，本文设计了一系列实验步骤，包括目标细胞筛选、CAR 结构设计、CAR 质粒构建、CAR-T 细胞制备与鉴定以及功能研究（图1.5）。通过这些实验，我们期望能够深入了解 CD19/BAFFR 全人源双靶点 CAR-T 细胞的功能，并为进一步的临床研究提供有力支持。

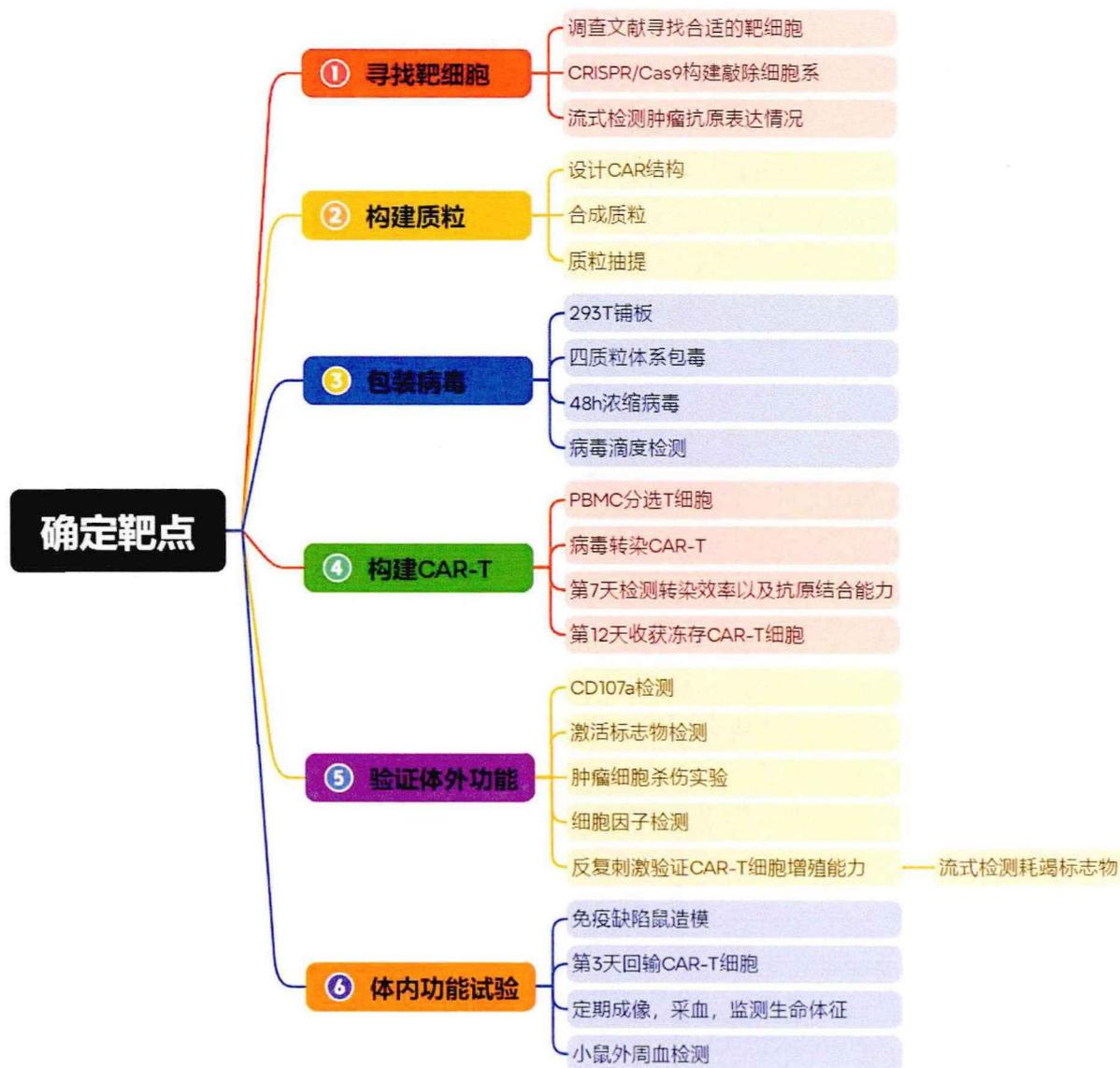


图1.5 本研究技术路线图

第二章 肿瘤细胞 CD19 和 BAFFR 的表达以及敲除细胞株的构建

2.1 引言

CD19 和 BAFFR 是两种与人体免疫系统相关的蛋白质，它们在 B 细胞的发育和功能中起着重要作用。CD19 是一种跨膜蛋白，主要表达在 B 细胞的表面，它是 B 细胞抗原受体 (BCR) 信号传导复合体的一部分，对于 B 细胞的激活、增殖和分化至关重要^[78]。CD19 通过调节 BCR 信号的强度和持续时间，帮助 B 细胞识别并响应抗原^[79]。此外，CD19 还参与调节 B 细胞的存活和自身耐受。在 B 细胞相关的疾病，如某些类型的白血病和淋巴瘤中，CD19 通常存在高表达的情况^[80]。

BAFFR (B细胞活化因子受体) 是一种属于肿瘤坏死因子受体家族的膜结合蛋白。它同样主要在 B 细胞表面表达，与 BAFF 结合，这是一种重要的 B 细胞生存因子^[81]。BAFFR 的激活对于 B 细胞的成熟、存活和免疫反应的调节至关重要。BAFFR 信号传导可以促进 B 细胞的增殖和分化，增强抗体的产生^[82]。在自身免疫性疾病中，BAFFR 的过度活化可能导致 B 细胞的异常活化和自身抗体的产生，从而加剧疾病^[83]。与 CD19 一样，BAFFR 在某些 B 细胞相关的肿瘤中也是高表达的。同时，这两种蛋白质在 B 细胞生物学中的作用是互补的，它们共同维持着 B 细胞的平衡和功能^[84]。这为研究和开发同时针对 CD19 和 BAFFR 的靶向治疗策略来治疗 B 细胞相关的肿瘤提供了理论支持。

本部分研究基于前期文献中的报道，从 B 细胞肿瘤中挑选出天然高表达 CD19 和 BAFFR 的细胞系作为本实验的双阳性靶细胞，同时选择不表达 CD19 和 BAFFR 的细胞系作为阴性对照。至于 CD19 或 BAFFR 单阳细胞株则通过 CRISPR/Cas9 技术从双阳细胞系中制备获得。我们对 CD19 或 BAFFR 敲除细胞株以及原代细胞系的生物学特性进行了多方面比较，结果表明单独敲除 CD19 或 BAFFR 的其中一个对于肿瘤细胞的体外生长和体内致瘤性影响不大，这使得后续各组之间的功能实验更加具有可比性，为后续实验做好准备。

2.2 材料与方法

2.2.1 实验材料

细胞系

Jeko-1 (套细胞淋巴瘤)、Nalm-6 (急性前B淋巴细胞白血病) 和 Mec-1 (慢性淋巴细胞白血病) 细胞系是 CD19+BAFFR+。Jeko-1-CD19 敲除细胞 (Jeko-1-CD19KO,

CD19⁻/BAFFR⁺) 和 Jeko-1-BAFFR 敲除细胞 (Jeko-1-BAFFRKO, CD19⁺/BAFFR⁻) 通过 CRISPR/Cas9 技术导致 CD19 或 BAFFR 基因缺失。NCI-H929 (多发性骨髓瘤) 细胞系为 CD19-BAFFR⁻。为便于检测, 采用慢病毒用萤火虫荧光素酶转导 Jeko-1、Jeko-1-CD19KO、Jeko-1-BAFFRKO、Nalm-6、Mec-1 和 NCI-H929 细胞系, 通过有限稀释法生成稳定表达荧光素酶的单克隆细胞株。所有细胞系均购于美国 ATCC 生物资源中心, 且在使用前均经过验证。

实验动物

6~8周、雌性、NKG小鼠购自赛业生物科技有限公司 (中国苏州), 并在南京云桥璞瑞生物科技有限公司 (中国南京) 的动物设施中饲养在无特定病原体 (SPF) 条件下。所有动物研究均获得机构动物护理和使用协议 (AP-C210507.94) 的批准。

主要仪器设备

本部分研究主要使用的仪器设备见表2.1所示

表2.1 主要仪器设备

仪器名称	厂家
二氧化碳培养箱	ESCO, 新加坡
液氮柜	Thermo, 美国
超低温冰箱	Thermo, 美国
恒温冰箱	Haier, 中国
光学倒置显微镜	Nikon, 日本
生物安全柜	Heal Force, 中国
电热恒温水浴锅	精宏, 中国
数显电子恒温水浴锅	常州国华电器, 中国
单道微量可调移液器 (2 μ l、10 μ l、20 μ l、200 μ l、1 ml)	RANIN, 美国
12道手动移液器 (300 μ l)	RANIN, 美国
电动移液器	Thermo, 美国
高速冷冻离心机	Thermo, 美国
台式离心机	Thermo, 美国
微量台式离心机	Thermo, 美国

荧光细胞计数仪	Countstar, 中国
流式细胞仪	美天旎, 德国
酶标仪	BioTek, 美国
电转仪	Celetrix, 美国
电子天平	舜宇恒平, 中国
小动物活体成像仪Lumina III	PerkinElmer, 美国

主要实验试剂

本部分研究主要使用的试剂见表2.2所示

表2.2 主要实验试剂

名称	厂家
胎牛血清	Gibco, 美国
RPMI1640培养基	Gibco, 美国
IMDM培养基	Gibco, 美国
AO/PI试剂	Countstar, 中国
病毒感染试剂	吉凯基因, 中国
磷酸盐缓冲液PBS PH7.2	源培, 中国
DPBS	索莱宝, 中国
D-虫荧光素钠	索莱宝, 中国
嘌呤霉素	Gibco, 美国
Luciferase荧光底物及溶液	Promega, 美国
Cas9蛋白	恺作生物, 中国
sgRNA	金斯瑞, 中国
Electroporation buffer	Celetrix, 美国
PE mouse anti-Human CD19	Biolegend, 美国
PE mouse anti-Human BAFFR	Biolegend, 美国

主要实验耗材

本部分研究主要使用的耗材见表2.3所示

表2.3 主要使用的实验耗材

名称	厂家
15 ml离心管	Corning, 美国
50 ml离心管	Corning, 美国
1.5 ml EP管	Thermo, 美国
细胞冻存管	Corning, 美国
T25细胞培养瓶	Corning, 美国
T75细胞培养瓶	Corning, 美国
U底96孔板	Corning, 美国
96孔板（白色）	Corning, 美国
平底96孔板	Corning, 美国
24孔板	Corning, 美国
6孔板	Corning, 美国
50 ml加样槽	BIOFIL, 中国
灭菌盒装无菌枪头	RANIN, 美国
细胞计数板	Countstar, 中国

2.2.2 实验方法

细胞培养

Jeko-1、Jeko-1-CD19KO、Jeko-1-BAFFRKO、Nalm-6 和 NCI-H929 细胞用含有10%胎牛血清（FBS）的 RPMI-1640 培养基培养。Mec-1 细胞在含有10% FBS 的 IMDM 培养基中培养。所有细胞置于37℃，5%CO₂恒温培养箱培养。

细胞计数

吸取10 μl细胞液到1个新1.5 ml离心管中，加入10 μl AO/PI,充分混匀后，从中取20 μl至细胞计数板，插入细胞计数仪，选择细胞类型，选择槽位开始计数。

荧光素酶稳定表达细胞株构建

- 1) 感染前 24h 取处于对数生长期的细胞，用 5%FBS 的培养基稀释成 1×10^6 /ml 浓度，铺入 24 孔板中，500 μl /孔。
- 2) 感染前病毒于冰上融化，加病毒 30 μl /孔，25×病毒感染试剂 20 μl /孔。

- 3) 感染 12~24h 后，离心移除病毒培养基，更换新鲜完全培养基培养 2 天。
- 4) 培养基中添加 1 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素进行加压筛选 1 周，同时取等量未转病毒的细胞一起加压作为对照。
- 5) 1 周后使用有限稀释法对细胞进行单克隆挑选。

有限稀释法筛选荧光素酶稳定表达细胞株

- 1) 取 4 个无菌 EP 管，标上 1、2、3、4，其中 2、3、4 管加 900 μl 培养基，50 ml 离心管中加好 19.8 ml 培养基。
- 2) 计数，取 1×10^6 细胞加到管 1 中，用培养基将管 1 补足到 1 ml，此时密度 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。
- 3) 从管 1 取 100 μl 加入管 2，此时密度 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。
- 4) 从管 2 取 100 μl 加入管 3，此时密度 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 。
- 5) 从管 3 取 100 μl 加入管 4，此时密度 $1 \times 10^3/\text{ml}$ 。
- 6) 从管 4 取 200 μl 加入到 19.8ml 培养基中，此时细胞密度 10 个/ml。
- 7) 将 20 ml 细胞转移到 50 ml 加样槽，用排枪加到 96 孔平底板中，100 μl /孔，此时理论上每孔 1 个细胞。
- 8) 用培养基将 96 孔板补足到 200 μl /孔，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 恒温培养箱培养 7-14 天。
- 9) 显微镜下观察细胞，单一团块细胞为单克隆。
- 10) 挑选一个孔中只有 1 个单克隆团块的进行扩增培养，从挑选出的单克隆细胞系中选取细胞状态好，发光值高的作为实验用细胞系。

CRISPR/Cas9 制备 Jeko-1-CD19KO 和 Jeko-1-BAFFRKO 细胞株

- 1) 电转前计数细胞，确认细胞状态良好并处于对数生长期。
- 2) 取 9 μg Cas9 和 6 μg sgRNA 混合（序列见表 2.4），室温放置 10 min。

表2.4 sgRNA序列

敲除蛋白	sgRNA
CD19	TTCCTCGGGCCTGACTTCCA
BAFFR	AGCAGGTCGAAGCACTCGGC

- 3) 将 10 μl 电转液 A 和 10 μl 电转液 B 混合配置成电转液
- 4) 取 Jeko-1 细胞 3×10^6 个离心 300g，5 min，用 20 μl 电转液重悬加入 20 μl 电转杯中。
- 5) 电转仪设置 540V，20 毫秒电转，之后将细胞快速转移到预热好的培养基中。
- 6) 培养一周待细胞状态恢复后，使用有限稀释法挑选单克隆，通过流式细胞术或测序检测敲除水平。

动物预实验

- 1) 取对数生长期的 Jeko-1、Jeko-1-CD19KO 或 Jeko-1-BAFFRKO 细胞计数离心。
- 2) 用预冷的 PBS 重悬细胞，调整密度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 。
- 3) 6~8 周大小的 NKG 小鼠，通过尾静脉注射 $200 \mu\text{l}$ (1×10^6 个) 肿瘤细胞。
- 4) 3 天之后，通过生物发光成像系统 (BLI) 观测肿瘤生长情况，每隔 7 天成像一次。

小动物成像

- 1) 按 $100 \mu\text{l}$ /只的量腹腔注射 D-虫荧光素钠 (10 mg/mL)。
- 2) 10 分钟后使用活体成像仪器自带气体麻醉系统进行异氟烷气体麻醉。
- 3) 数分钟后待动物麻醉，将其放置于活体成像仪下进行成像，观察荧光，保存数据。

数据分析处理

流式数据使用 MACS Quant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec) 采集，并使用 FlowJo 软件版本 10 (Tree Star, USA) 进行分析。图形和数据分析使用 GraphPad Prism 软件版本 9.0.0 进行处理。其中一些图片是从 Figdraw 获得和修改的。除非另有说明，否则所有数据均代表至少三个独立实验。除小鼠肿瘤光子数、体重和小鼠外周血数据以平均值 \pm 标准误 (SEM) 表示外，所有数据均以平均值 \pm 标准差 (SD) 表示。采用单因素方差分析、双因素方差分析、Mann-Whitney 检验或 log-rank 检验分析差异。P 值表示为无显著性差异 (ns)、* ($P < 0.05$)、** ($P < 0.01$)、*** ($P < 0.001$) 或 **** ($P < 0.0001$)。

2.3 实验结果

2.3.1 原代肿瘤细胞以及敲除细胞抗原表达检测

我们根据文献报道以及数据库调查挑选了本实验所用到的几种细胞系，但各细胞具体的抗原表达情况还不清楚。因此首先，我们使用流式细胞术评估前期挑选的肿瘤细胞系上 CD19 和 BAFFR 的表达水平。如图 2.1 所示，NCI-H929 细胞作为阴性对照，为 CD19-/BAFFR-，而 Jeko-1、Nalm-6 和 Mec-1 是天然表达 CD19 和 BAFFR 的肿瘤细胞系。其中由于 Jeko-1 细胞的 CD19 和 BAFFR 阳性率最高，因此我们选择它作为 CD19 或 BAFFR 敲除的靶细胞。敲除细胞的流式检测结果表明，Jeko-1-CD19KO 和 Jeko-1-BAFFRKO 细胞作为 BAFFR 或 CD19 单阳靶细胞，敲除效率基本达到 100%。

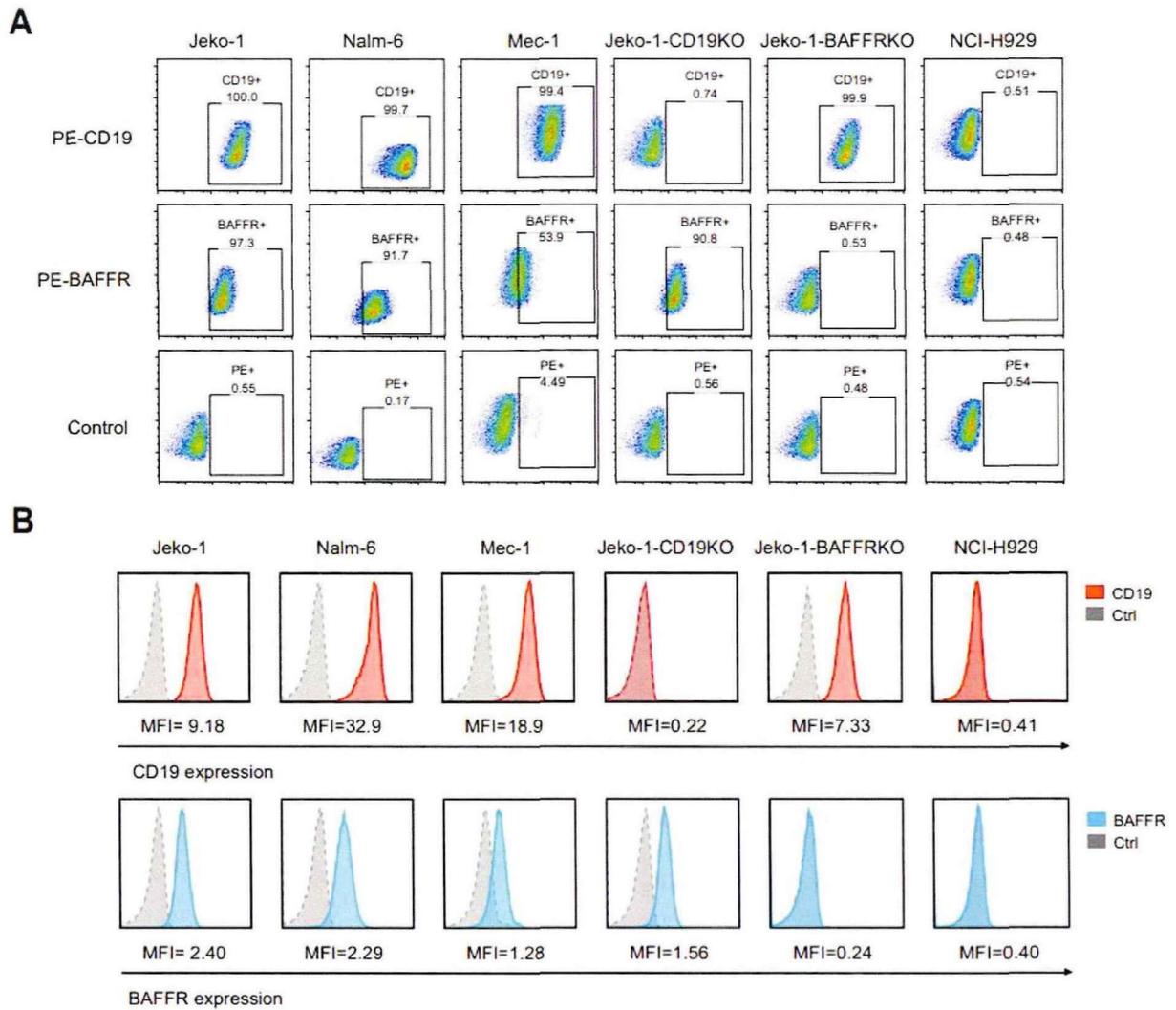


图 2.1 靶细胞抗原流式检测结果。

A. 流式细胞术散点图显示了本研究中使用的肿瘤细胞的表面抗原检测。B. 直方图表示 A 中 CD19 (红色实线直方图) 和 BAFFR (蓝色实线直方图) 与同型对照 (灰色虚线直方图) 的比较。

2.3.2 敲除细胞株生物学特征比较

鉴于 CD19 和 BAFFR 对 B 细胞的重要功能, 如果 CD19 或 BAFFR 敲除对敲除细胞系的细胞活性造成较大损害将会影响后续功能试验。因此, 我们随后对 Jeko-1、Jeko-1-CD19KO 和 Jeko-1-BAFFRKO 的体外增殖能力、细胞活力以及体内成瘤性做了比较。如图 2.2 所示, CD19 或 BAFFR 的敲除对 Jeko-1 细胞的体外增殖、活力或体内成瘤性影响不大, 不影响后续实验。

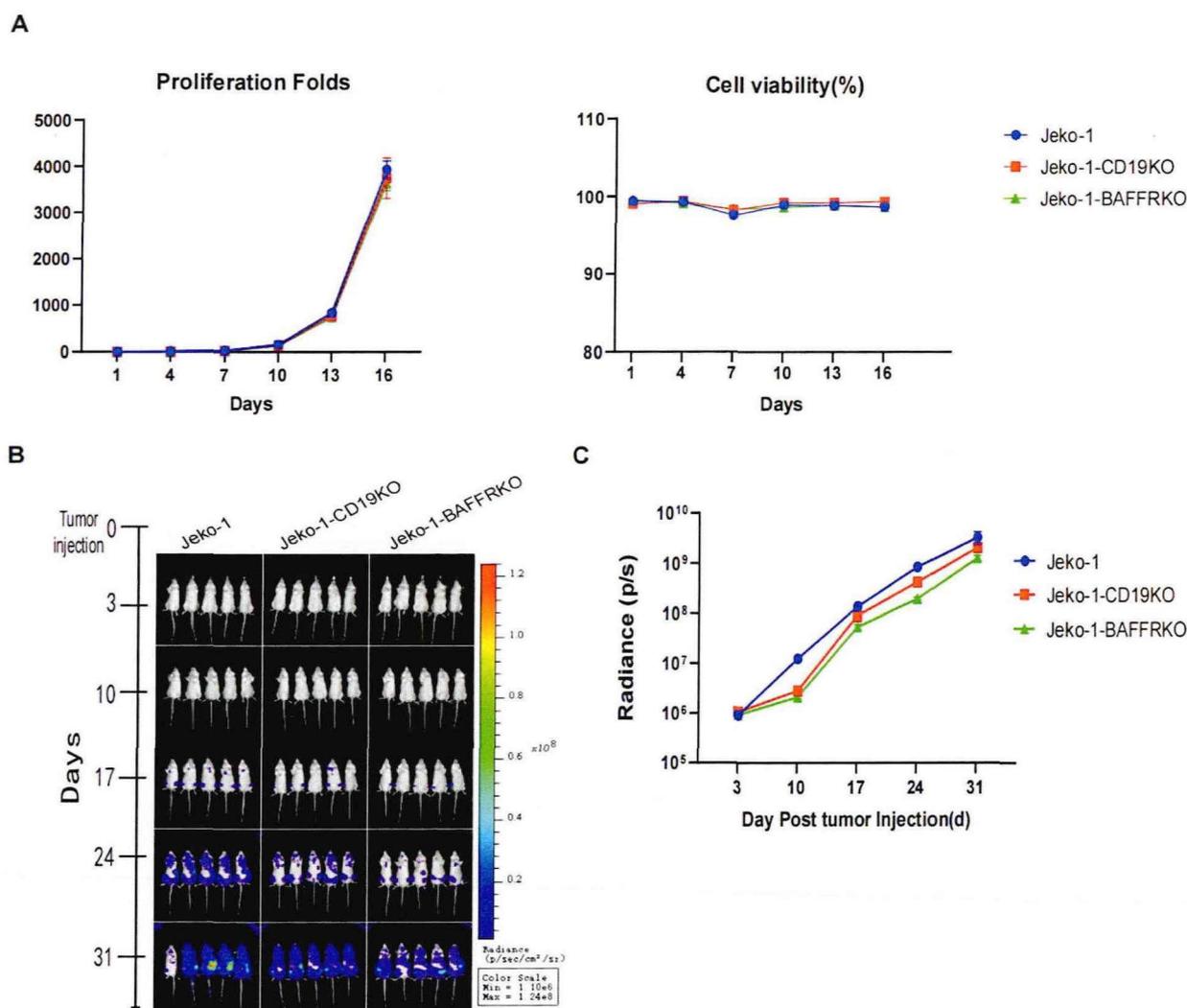


图 2.2 CD19 或 BAFFR 敲除的 Jeko-1 细胞株的生物学特征。

A. Jeko-1、Jeko-1-CD19KO 和 Jeko-1-BAFFRKO 细胞在体外的增殖和活力。B. Jeko-1、Jeko-1-CD19KO 和 Jeko-1-BAFFRKO 细胞的体内成瘤性实验。每只小鼠通过尾静脉注射 1×10^6 个肿瘤细胞。使用生物发光成像系统 (BLI) 监测肿瘤生长。C. 生物发光成像光子数的定量分析, 结果展示平均值 \pm SEM ($n=5$)。

2.4 总结讨论

肿瘤细胞表面抗原是肿瘤细胞表面的蛋白质或糖蛋白, 它们可以作为肿瘤细胞的特征标记, 帮助免疫系统识别并攻击这些异常细胞。CAR-T 疗法通过将特定的 CAR 基因转入 T 细胞, 使得这些 T 细胞能够识别并结合到肿瘤细胞表面的特定抗原, 进而对肿瘤细胞发挥杀伤作用。因此, 抗原表达水平很大程度上影响了 CAR-T 的治疗效果。

本部分研究通过流式细胞术对 Jeko-1、Nalm-6、Mec-1 和 NCI-H929 表面的 CD19 和 BAFFR 抗原进行检测，实验结果与文献调查的结果相符，Jeko-1、Nalm-6、Mec-1 均为表达 CD19 和 BAFFR 的肿瘤细胞系，NCI-H929 细胞表面不表达 CD19 或 BAFFR，其中 Jeko-1 的阳性率最高。为了模拟 CD19 或 BAFFR 抗原逃逸的情况，我们通过 CRISPR/Cas9 技术分别构建了 Jeko-1-CD19KO 和 Jeko-1-BAFFRKO 细胞株作为单阳靶细胞。对 Jeko-1 以及敲除细胞系的进一步研究证明 CD19 或 BAFFR 单一靶点的敲除无论是对细胞的体外增殖还是体内成瘤均未造成太大影响，这里的其中一种原因可能是肿瘤细胞可以通过其他信号通路补偿单一信号的缺失，从而维持其生长和存活。这也与临床上 CD19 靶向治疗后患者发生 CD19 抗原阴性复发的情况相符。总之，这部分内容为后续的体内外功能实验奠定了基础。

第三章 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 的制备和鉴定

3.1 引言

肿瘤细胞可以利用各种各样的机制来影响 CAR-T 细胞治疗的效果,比如肿瘤免疫抑制微环境或下调表面抗原的表达^[85]。其中肿瘤抗原逃逸的存在是癌症治疗中的一个重要挑战,特别是在免疫治疗领域。为了克服这一问题,研究人员正在开发新的治疗策略,比如使用双靶点 CAR-T 细胞疗法。该策略旨在同时靶向两种不同的肿瘤抗原,使得肿瘤细胞更难通过单一抗原的改变来逃避 CAR-T 细胞的识别,从而降低了肿瘤逃逸的可能性^[86]。然而,双靶点 CAR-T 疗法的研发和临床应用还面临一些挑战,包括设计和制造的复杂性、成本的增加以及可能的免疫原性问题。尽管如此,这种疗法的潜力使其成为癌症免疫治疗领域的一个研究热点。

在本研究中,我们准备将人源化 CD19 scFv 和 BAFFR VHH 构建成双靶点 CAR-T,考虑到 scFv 不同构象可能对功能有影响,因此我们首先通过不同构象的 CD19 单 CAR 的功能实验证明 VH 和 VL 的顺序不影响 CD19 CAR 的功能。接着,我们对并联结构的双靶点 CAR-T 之间进行了初步筛选,挑选出一个 CAR 来与串联 CAR 进行比较。最后,我们成功将四种串联结构与一种并联结构的 CAR-T 细胞制备出来并进行了 CAR 阳性率以及相应的抗原结合能力检测。最终,在去掉与 CD19 结合能力下降的 Tan 5H-78LH 之后,共有3个串联结构和1个并联结构将进行后续的体内外功能试验。

3.2 材料与方法

3.2.1 实验材料

实验细胞

293T (人胚胎肾)细胞用于病毒包装和滴度检测。来自健康供体的人外周血单核细胞(hPBMC)由Milestone Biotechnologies (中国)提供。在采集标本之前,已获得所有捐献者的适当知情同意。

CD19 和 BAFFR 特异性结构域

CD19 特异性78号 scFv^[76]在之前的一项研究中从全人源scFv噬菌体展示抗体库(IMARS;南京驯鹿生物,中国)中获得,BAFFR 特异性5号 VHH^[77]在先前的一项研究中从全人源重链噬菌体展示抗体库(IMARS;南京驯鹿生物,中国)中获得。

CAR 质粒

将全人源 BAFFR 特异性 5VHH 结构域和 CD19 特异性 78scFv 结构域构建为包含 CD8 α 铰链、CD8 α 跨膜区域、4-1BB 共刺激结构域和细胞内 CD3 ζ 的第二代 CAR 结构。EGFRt 通过 T2A 序列与 CAR 片段连接，以方便 CAR⁺ 细胞的检测。在串联 CAR 载体构建中，当 BAFFR-5VH（重链可变区）与 CD19-78scFv 的 VH 连接时，两个结构域通过（GGGGS） \times 2 柔性连接子连接，而当 BAFFR-5VH 与 CD19-78scFv 的 VL（轻链可变区）连接时，两个结构域通过（GGGS） \times 2 柔性连接子连接。并联 CAR 结构包含两个单独的 CAR（CD19 CAR BBz 和 BAFFR CAR BBz），这两者通过 P2A 序列连接，使 CD19 CAR 和 BAFFR CAR 能够在单个 T 细胞表面同时表达。后续质粒构建、抽提工作由南京驯鹿公司完成。

慢病毒

采用含有 transfer 质粒、GAG-POL 质粒 pMDLg/pRRE、rev 质粒 pRSV-Rev 和 VSV-G 质粒 pMD2.G 的第3代系统包装慢病毒。使用 293T 细胞检测包装慢病毒的滴度，随后储存在-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱。

主要仪器设备

本部分研究主要使用的仪器设备见表3.1所示

表3.1 主要仪器设备

仪器名称	厂家
二氧化碳培养箱	ESCO, 新加坡
液氮柜	Thermo, 美国
超低温冰箱	Thermo, 美国
恒温冰箱	Haier, 中国
光学倒置显微镜	Nikon, 日本
生物安全柜	Heal Force, 中国
电热恒温水浴锅	精宏, 中国
单道微量可调移液器 (2 μ l、10 μ l、20 μ l、200 μ l、1 ml)	RANIN, 美国
12道手动移液器 (300 μ l)	RANIN, 美国
电动移液器	Thermo, 美国

高速冷冻离心机	Thermo, 美国
台式离心机	Thermo, 美国
MACS MultiStand磁力分选架	美天旋, 德国
流式细胞仪	美天旋, 德国
酶标仪	BioTek, 美国

主要实验试剂

本部分研究主要使用的试剂见表3.2所示

表3.2 主要实验试剂

名称	厂家
胎牛血清	Gibco, 美国
DMEM培养基	Gibco, 美国
AO/PI试剂	Countstar, 中国
病毒感染试剂	吉凯基因, 中国
磷酸盐缓冲液PBS PH7.2	源培, 中国
Tryple Express	Gibco, 美国
人CD3磁珠冻干粉	美天旋, 德国
Human T-Activator CD3/CD28	Thermo, 美国
MACS Buffer	美天旋, 德国
CTS培养基	Gibco, 美国
注射用重组人白介素-2	双鹭药业, 中国
100× GlutaMAX	Gibco, 美国
Opti-MEM	Gibco, 美国
Polyethylenimine (PEI)	Polysciences, 美国
莫能菌素	Biolegend, 美国
Luciferase荧光底物及溶液	Promega, 美国
PE mouse anti-Human EGFR	Biolegend, 美国
PE/Cyanine7 mouse anti-Human CD107a	Biolegend, 美国
BV421 mouse anti-Human CD8	Biolegend, 美国

APC mouse anti-Human EGFR	Biologend, 美国
PE-labeled human CD19 protein	ACRO, 美国
PE-labeled human BAFFR protein	ACRO, 美国

主要实验耗材

本部分研究主要使用的耗材见表3.3所示

表3.3 主要使用的实验耗材

名称	厂家
15 ml离心管	Corning, 美国
50 ml离心管	Corning, 美国
1.5 ml EP管	Thermo, 美国
细胞冻存管	Corning, 美国
T25细胞培养瓶	Corning, 美国
T75细胞培养瓶	Corning, 美国
15 cm培养皿	Thermo, 美国
U底96孔板	Corning, 美国
96孔板 (白色)	Corning, 美国
平底96孔板	Corning, 美国
24孔板	Corning, 美国
6孔板	Corning, 美国
0.45 μ m过滤器	Millipore, 德国
100KD超滤管	Millipore, 德国
慢病毒滴度快速检测卡	博奥龙, 中国
50 ml加样槽	BIOFIL, 中国
灭菌盒装无菌枪头	RANIN, 美国
LS柱子	美天旋, 德国
30 ml注射器	康德莱, 中国
细胞计数板	Countstar, 中国

3.2.2 实验方法

本部分研究承接上一部分，重复的实验方法不再赘述，在此只列出不同之处。

细胞培养

293T 细胞培养在含有 10%FBS 的 DMEM 培养基中。T 细胞使用 T 细胞完全培养基培养：CTS 培养基+10%FBS+IL-2 200IU/ml+1×GlutaMAX。所有细胞放在37℃，5%CO₂的细胞培养箱中进行培养。

慢病毒包装浓缩

- 1) 转染前 24 小时，用 Tryple Express 消化对数生长期的 293T 细胞，将细胞计数（确认细胞活率大于 90%）。用 DMEM+10%FBS 培养基重悬细胞，一个 15 cm 培养皿中加入 2×10^7 个细胞，保证 24h 后细胞汇合度达到 80%-90%，以便用于转染，在 37℃，5% CO₂ 恒温培养箱中培养细胞。
- 2) 转染当天，显微镜下观察 293T 细胞达到 85%融合率。
- 3) 转染混合液准备：在 50 ml 离心管中按表 3.4 准备转染混合液

表3.4 转染混合液配比

成分	用量 (1×15cm dish)	浓度
Opti-MEM	3 ml	/
pMD2.G	2.2 μg	1 mg/ml
pRSV-Rev	7 μg	1 mg/ml
pMDLg/pRRE	1.6 μg	1 mg/ml

- 4) 将包装质粒 Opti-MEM 转染混合液分装到 15 ml 无菌离心管中，每管 3 ml。然后各加入 transfer 质粒 9.2 μg 并混匀。
- 5) 接着每 3 ml 转染混合液加入 75 μl PEI，轻轻地颠倒混匀，室温孵育 20-25min。
- 6) 每个 15 cm 皿中加入 3 ml 转染混合液，需要缓慢、均匀加入；前后左右轻轻摇匀，37℃，5%CO₂ 恒温培养箱中培养 48h。
- 7) 加入慢病毒质粒 48h 后收集病毒上清，使用慢病毒快速检测条检测结果。
- 8) 将收集到的病毒上清液倒入 50 ml 离心管，4℃，3500g 离心 20min 去除细胞碎片。
- 9) 用 30 ml 注射器通过 45 μm 滤器将上清过滤到新的 50 ml 离心管中，再转移至超滤浓缩管中，高速冷冻离心机 4℃，4000g 离心 20min。

- 10) 倒去收集管下部液体, 继续补加病毒上清, 4℃, 3500g 离心, 根据浓缩情况, 调整离心时间。
- 11) 多次离心后, 尽量使浓缩病毒液体积为 200-300 μl, 吸取浓缩病毒至冻存管中, 可暂存于 4℃, 也可保存于-80℃。

慢病毒滴度测定

- 1) 用 Tryple Express 消化对数生长期的 293T 细胞, 将细胞计数(确认细胞活率大于 90%)。用 DMEM+10%FBS 培养基重悬细胞, 调整细胞密度为 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 。
- 2) 用稀释后的细胞悬液 50 μl/孔接种到 96 孔平底板上, 使每孔细胞数为 15000 个。将 96 孔板放入温度 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 5%CO₂ 的二氧化碳培养箱培养备用。
- 3) 根据病毒上清上样量浓度为 20 μl, 10 μl, 5 μl, 2.5 μl, 1.25 μl, 0.625 μl 六个浓度梯度, 纯化样病毒浓度为 0.2 μl, 0.1 μl, 0.05 μl, 0.025 μl, 0.0125 μl, 0.00625 μl 六个梯度进行准备病毒。
- 4) 取一块无菌的 96 孔 U 底板, 取样病毒上清 200 μl, 作为原液 1, 取 100 μl 新鲜培养基, 从原液 1 中取 100 μl 与培养基进行混合做梯度稀释, 后面依次进行 2 倍倍稀, 可得到上清样品 6 个梯度; 取纯化样品 2 μl, 加入 198 μl 培养基, 将其作为原液 1, 按照上述步骤进行 2 倍倍稀, 得到纯化样品 6 个梯度。为防止液体蒸发导致细胞状态差, 边缘孔均不加样。病毒样品稀释详见表 3.5。

表3.5 病毒滴度测定稀释方法

200 μl 上清原液(1)	2 μl 纯化样品+198 μl DMEM+10%FBS 混匀(1)
100 μl(1)+100 μl DMEM+10%FBS 混匀(2)	100 μl(1)+100 μl DMEM+10%FBS 混匀(2)
100 μl(2)+100 μl DMEM+10%FBS 混匀(3)	100 μl(2)+100 μl DMEM+10%FBS 混匀(3)
100 μl(3)+100 μl DMEM+10%FBS 混匀(4)	100 μl(3)+100 μl DMEM+10%FBS 混匀(4)
100 μl(4)+100 μl DMEM+10%FBS 混匀(5)	100 μl(4)+100 μl DMEM+10%FBS 混匀(5)
100 μl(5)+100 μl DMEM+10%FBS 混匀(6)	100 μl(5)+100 μl DMEM+10%FBS 混匀(6)

- 5) 取病毒上清和纯化的各 6 个梯度的样品 20 μl 加入到铺好细胞的 96 孔板中, 培养 48h。

- 6) 显微镜下观察细胞状态，转至生物安全柜中，用 12 道排枪吸去全部培养基上清。
- 7) 各孔中加入 50 μl Tryple express, CO_2 培养箱中消化 3~5min。
- 8) 显微镜下观察细胞变圆，部分脱落后，每孔中加入 DMEM 完全培养基 100 μl 终止消化，充分重悬之后转移到新的 96 孔 U 底板中。
- 9) 400g 离心 5min 后，加 150 μl PBS 重悬，500g 离心 5min，弃去上清，用 PE-EGFR 抗体（1 μl 抗体/孔，50 μl PBS/孔）开始染色，4 度冰箱孵育 20min。
- 10) 孵育结束后，每孔加入 150 μl PBS 重悬，500g 离心 5min，弃去上清，PBS 再洗一遍，用 100 μl PBS 重悬细胞后流式上机检测。
- 11) 根据检测结果细胞阳性率计算慢病毒滴度（滴度=阳性率 \times 细胞数 15000/病毒量）。

磁珠分选 T 细胞

- 1) 将 PBMC 从液氮罐中取出，放入薄膜手套中，放入水浴锅复苏，轻轻晃动，待溶解到微小冰晶时，生物安全柜中操作。
- 2) 准备 50 ml 离心管，加入 40 ml 10% 血清的 PBS，将冻存管中 PBMC 全部吸出加入离心管混匀，取 20 μl 左右细胞 AO/PI 计数。
- 3) 将 PBMC 离心 300g，10min，弃上清，加 10 ml MACS buffer 轻柔重悬，转移到 15 ml 离心管中，300g 离心 10min。
- 4) 根据之前的计数结果计算 CD3 磁珠和 MACS buffer 用量：CD3 磁珠 20 $\mu\text{l}/10^7$ ，MACS buffer 80 $\mu\text{l}/10^7$ ，孵育总体积不超过 500 μl ，超过时可减少 MACS buffer 用量。
- 5) 依次加入磁珠和 MACS buffer 重悬，4 度冰箱孵育 15min。同时，将磁力架，磁铁，LS 柱喷酒精后放入超净台照紫外。
- 6) 向孵育后的 PBMC 中加入 10 ml MACS buffer 洗去未结合的磁珠，300g 离心 10min，用 1 ml MACS buffer 重悬。
- 7) 然后将 LS 柱子取出放在磁力架上，取 50 ml 离心管收集废液，向 LS 柱子加 2 ml MACS buffer 润洗。然后缓慢加入 1 ml PBMC，待柱子内液体滴完，加 3 ml MACS buffer 洗涤，液体滴完后，重复一次。
- 8) 待 LS 柱液体流尽后将其取下，放置在 15 ml 离心管上，向柱中加入 3 ml MACS buffer，用注射器将细胞打出，重复一次。将获得的细胞混匀后取样计数，400g 离心 7min，弃上清，按照 10 $\mu\text{l}/10^6$ 个细胞加入 CD3/CD28 人 T 细胞激活磁珠，用 T 细胞完全培养基调整 T 细胞密度至 4~6 $\times 10^6/\text{ml}$ ，置于 37 $^\circ\text{C}$ ，5% CO_2 恒温培养箱培养。

T 细胞慢病毒转染

- 1) T 细胞激活 24h 后转染，计数之后取出所需的量，400g 离心 5min，弃去上清，用新鲜 T 细胞完全培养基调整密度为 2 $\times 10^6/\text{ml}$ 。

- 2) 取 24 孔板, 将重悬好的 T 细胞按每孔 400 μl 加好, 取融化好的慢病毒浓缩液, 按照 2~5 的 MOI 添加病毒, 再加入适当的病毒感染试剂, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 恒温培养箱培养 (MOI= (病毒体积 \times 病毒滴度) / T 细胞数)。
- 3) 感染 24h 后, 离心移除病毒培养基, 更换新鲜完全培养基继续培养。

CAR 表达与抗原结合实验

- 1) 转染第 7 天 T 细胞计数, 每孔取 3×10^5 个细胞加至 96 孔 U 底板, 一式三份。
- 2) 500g 离心 5min, PBS 清洗一遍。每种 CAR-T 分别用 PE-EGFR 抗体 (1 μl 抗体/孔, 50 μl PBS/孔), PE-CD19 抗原 (2 μl 抗原/孔, 50 μl PBS/孔) 以及 PE-BAFFR 抗原 (2 μl 抗原/孔, 50 μl PBS/孔) 染色, 4 度冰箱孵育 20min。
- 3) 孵育结束后, 每孔加入 150 μl PBS 重悬, 500g 离心 5min, 弃去上清, PBS 再洗一遍, 用 100 μl PBS 重悬细胞后流式上机检测。

CD107a 脱颗粒实验

- 1) 效应细胞及靶细胞分别计数取样, 用 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基分别调整密度为 $5\times 10^5/\text{ml}$ 。
- 2) 取 96 孔 U 底板, 每孔各加 100 μl 效应细胞和靶细胞。
- 3) 配制 CD107a 抗体工作液: 50 μl 培养基/孔+PE/ Cyanine7-CD107a 抗体 (1.5 μl /孔) +monensin (0.2 μl /孔)
- 4) 每孔加 50 μl 抗体工作液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 恒温培养箱孵育 4h。
- 5) 孵育结束后, 500g 离心 5min, PBS 洗两遍, BV421-CD8 及 APC-EGFR 抗体染色 (1 μl 抗体/孔, 50 μl PBS/孔), 4 度冰箱孵育 20min。
- 6) PBS 洗涤两遍, 流式上机检测 (CD8-EGFR-CD107a)

基于荧光素酶的细胞毒性实验

- 1) 靶细胞计数, 取出所需的量, 离心弃去上清, 用 1640 完全培养基调整密度为 $4\times 10^5/\text{ml}$, 加至白色 96 孔板, 每孔 100 μl 。
- 2) CAR-T 细胞计数, 取出所需的量, 离心弃去上清, 用 1640 完全培养基调整密度稀释, 按照效靶比 (E:T) 1:1、0.5:1、0.25:1、0.125:1、添加 T 细胞, 每孔 100 μl , 其中 control 组加培养基, 每个比例三个复孔 (表 3.6)。

表3.6 细胞毒性实验排版

1:1 三个复孔	0.5:1 三个复孔	0.25:1 三个复孔	0.125:1 三个复孔
CAR 1	CAR 1	CAR 1	CAR 1
CAR 2	CAR 2	CAR 2	CAR 2
CAR 3	CAR 3	CAR 3	CAR 3
CAR 4	CAR 4	CAR 4	CAR 4
Mock T	Mock T	Mock T	Mock T
Control	Control	Control	Control

- 3) 温箱孵育 24h 后，每孔添加 10 μ l luciferase 底物激发荧光，避光孵育 3min 后酶标仪上机检测发光值。
- 4) 根据发光值计算对应 CAR-T 的杀伤度（杀伤度=（control-样本孔）/control）。

3.3 实验结果

3.3.1 VH 和 VL 的顺序不影响 CD19 单 CAR 的功能

在之前的研究中，我们成功获得了靶向 CD19 的人源化单链抗体片段（78scfv）和针对 BAFFR 的重链单域抗体（5VHH）。但是在构建双靶点 CAR 之前，我们首先需要确认 VH 和 VL 的序列顺序是否影响 CD19 CAR 的功能。如图 3.1A 所示，我们分别构建了 78HL、78LH 两种不同构象 CD19 单 CAR 与 FMC63 构建的 CD19 CAR 进行比较。这里我们主要比较了 CAR-T 的 CD107a 释放和杀伤能力，如图 3.1B,C 所示，VH 和 VL 的顺序对 CD19 CAR-T 的 CD107a 释放和杀伤几乎没有影响（CD107a 流式结果详见附录补充图 1），而且可以看出 78scFv 的功能与 FMC63 的功能非常接近。

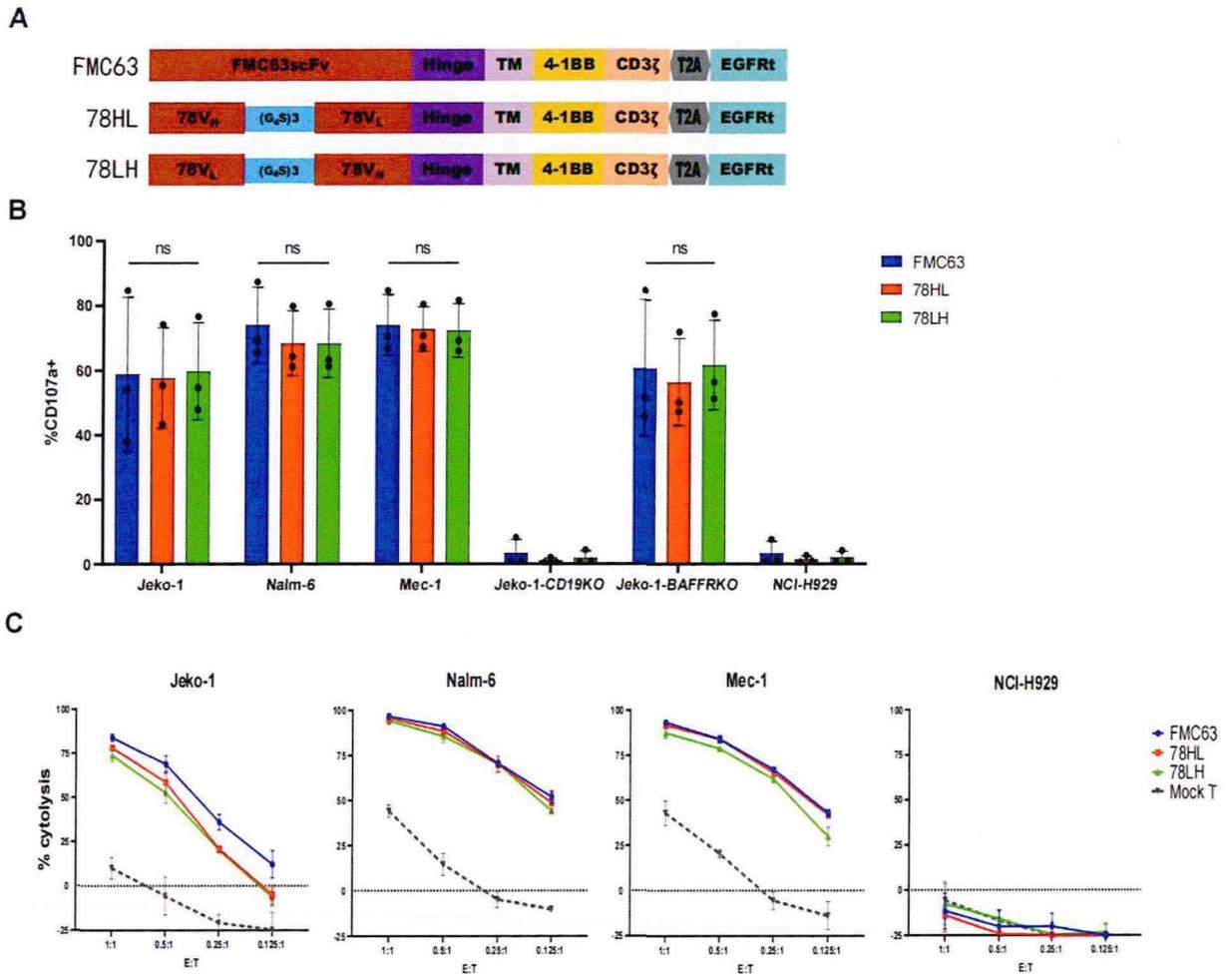


图 3.1 78HL、78LH 和 FMC63 的功能比较。

A. CD19 CAR 结构示意图。B. 比较三种 CAR 的脱颗粒功能试验。结果表示为三次实验的平均值±标准差，ns，无显著性差异，双因素方差分析。C. 基于荧光素酶的细胞毒性测定，在以指定的效靶比与靶细胞孵育 24 小时后，对肿瘤细胞进行细胞毒性测定。数据以三个独立实验的平均值±标准差表示。

3.3.2 CAR 结构初筛

在确认 CD19 的抗原结合域不会受到自身 VH 和 VL 顺序影响之后，我们就可以对 CD19 和 BAFFR 抗原结合域进行各种组合。我们设计了各种双靶点 CARs 组合，包括串联 CARs 和并联 CARs。由于并联 CARs 结构差异较小，而且转导效率不高，于是我们先对并联 CARs 之间进行了比较以简化实验内容。这里我们主要比较 CAR-T 的 CD107a 释放和杀伤能力，如图 3.2 所示，并联 CARs 的 CD107a 释放和杀伤功能差异不大，因此出于实验可行性考虑我们从中选择了转导效率最高的 78LH-P2A-5H 与串联 CARs 进行后面的比较，我们称之为 BI CAR (Bicistronic CAR)。

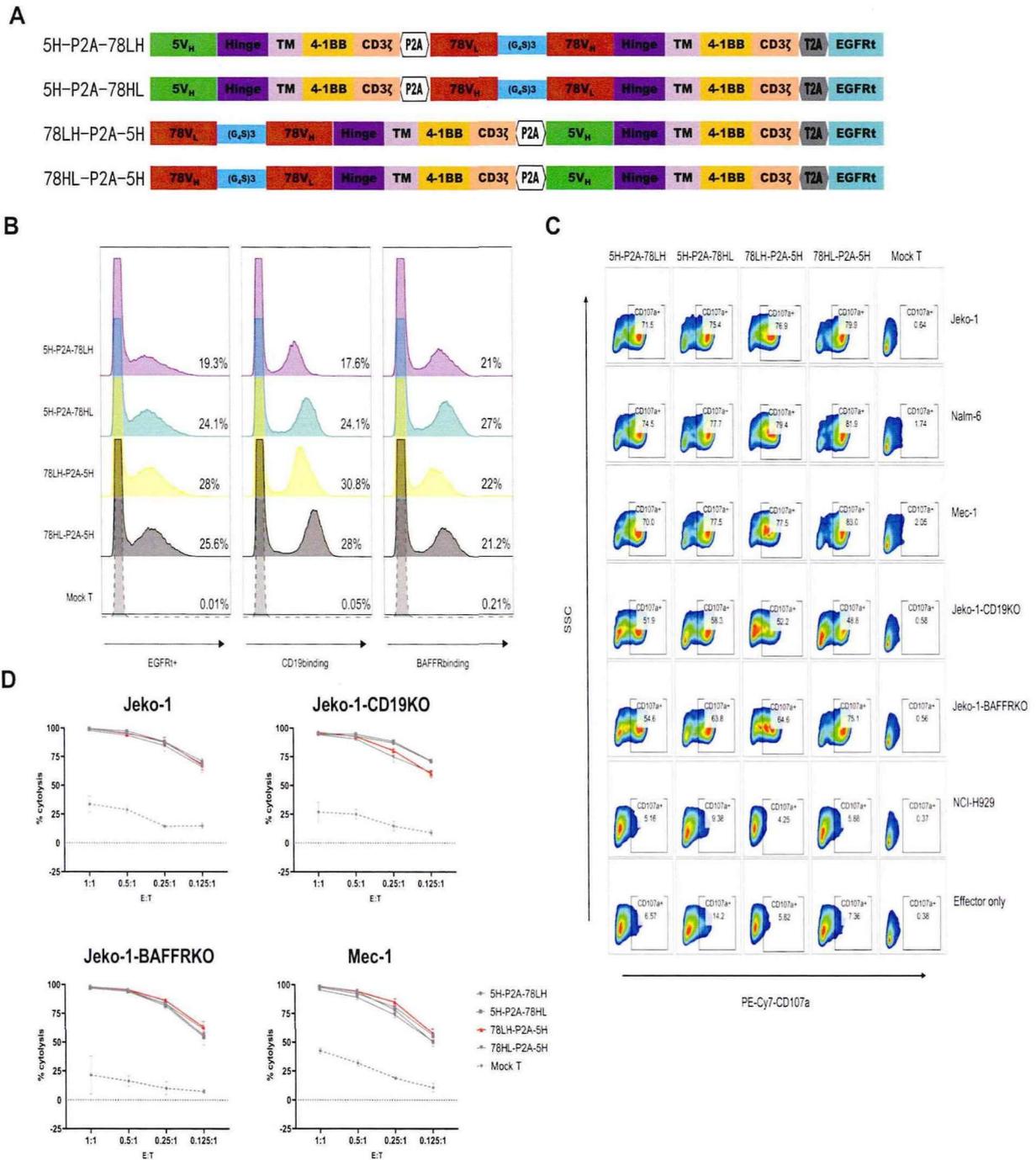


图 3.2 四种并联 CAR 的功能比较。

A. 并联 CAR 结构的示意图。B. 第 7 天并联 CAR 的转导效率和抗原结合能力。C. 显示 CD107a 染色的代表性流式细胞术图（在 CD8⁺ EGFR⁺ 细胞上设门）。D. 基于荧光素酶的 CAR-T 细胞对表达 CD19 或 BAFFR 的肿瘤细胞的细胞毒性测定，与靶细胞按指定比例孵育 24 小时，进行了三个独立的实验。

在串联 CAR 结构中，为了防止串联 CAR 中 5VHH 和 78scfv 之间的错误交联，当 5VH 接近 VL 时，我们使用了截短连接子 (GGGS) ×2，当 5VH 接近 VH 时，我们使用了截短连接子 (GGGG) ×2 连接子。我们将这些串联 CAR-T 细胞分别称为 Tan 5H-78HL、Tan 5H-78LH、Tan 78LH-5H 和 Tan 78HL-5H。这些 CAR 的结构如图 3.3 所示。

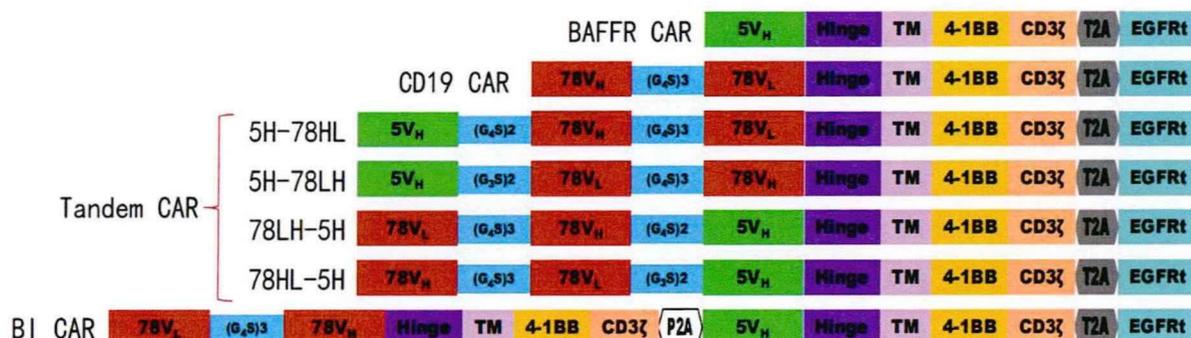


图 3.3 CAR 的结构。

BAFFR CAR、CD19 CAR、四个串联 CAR 和 BI CAR 的结构示意图。

3.3.3 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞的制备与鉴定

这些 CAR 在 T 细胞活化 24 小时后通过慢病毒载体转导到 T 细胞中，如图 3.4A 所示。病毒感染第 7 天时，使用 EGFRt 抗体和重组人 CD19 和 BAFFR 蛋白评估 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 的转导效率和相应的抗原结合能力。结果表明，不同的结构排列确实对双靶点 CARs 的抗原结合能力有显著影响。如图 3.4B, C 所示，Tan 5H-78LH 的 CD19 抗原结合能力受到显著影响，而其余结构的抗原结合能力较为稳定。因此，后续实验我们只关注其余三个串联 CAR 和 BI CAR。

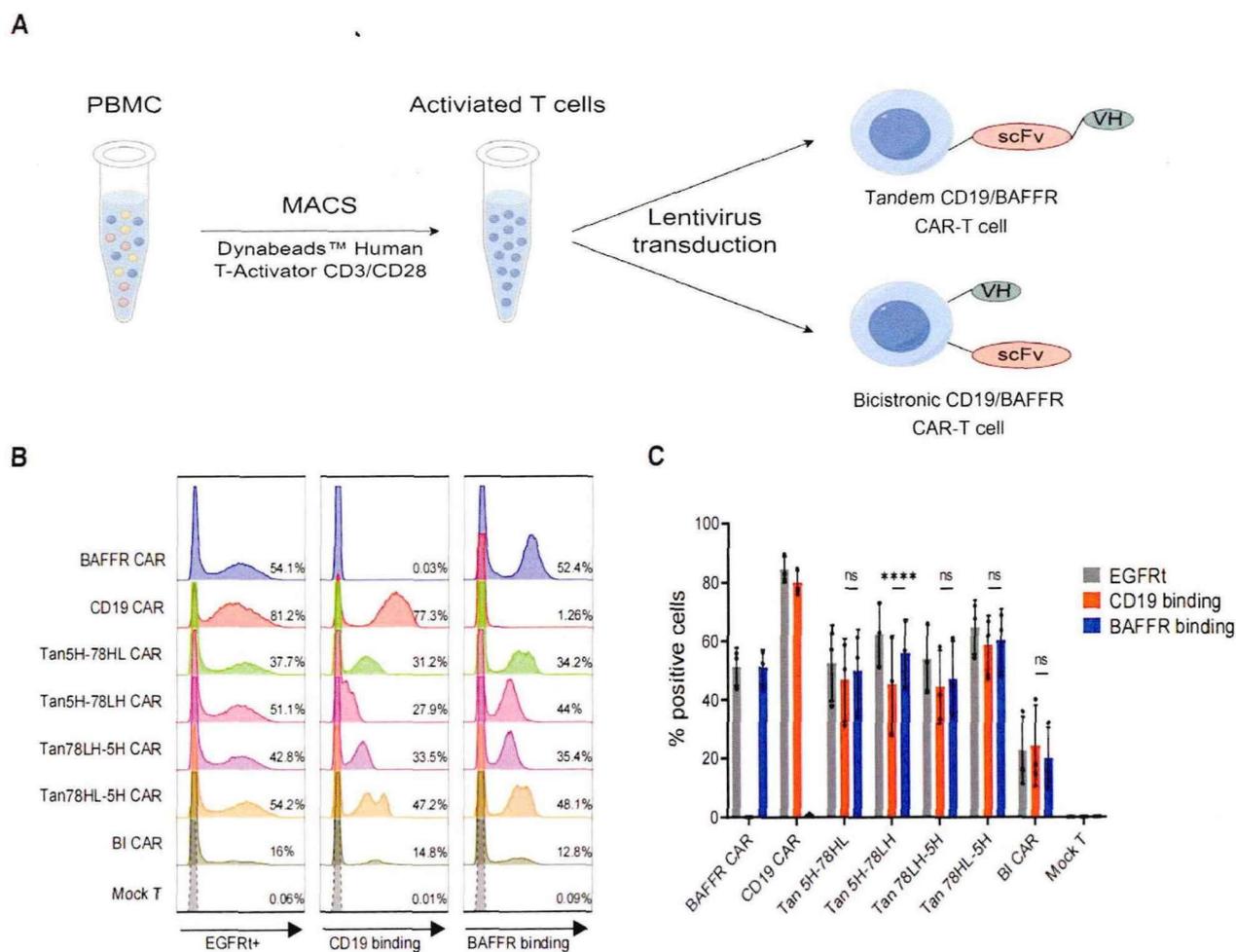


图 3.4 双靶点 CAR-T 制备的示意图和转导效率。

A. 本研究中 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 制造示意图。B. 代表性的流式细胞术结果，表示 CD19/BAFFR CAR-T 细胞在第 7 天的转导效率和抗原结合能力。C. 对 B 中得到的数据进行量化和统计分析。结果以平均值±标准差(n=3)表示，双因素方差分析。****p < 0.0001, ns, 无显著性差异。

3.4 总结讨论

本研究旨在开发一种双靶点 CAR-T，针对 CD19 和 BAFFR 这两个在 B 细胞相关肿瘤中起关键作用的抗原。在实验初期，我们对比了两种不同构象的 CD19 CAR-T 细胞，发现它们在功能上几乎没有差异，这为后续构建双靶点 CAR-T 提供了坚实的基础。接着，考虑到并联 CAR 结构的转导效率和结构相似性，我们通过一系列功能实验先对并联结构进行了初步筛选，并最终选择了转导效率最高的 BI CAR 结构与串联结构进行比较，以简化实验流程。最后，通过慢病毒转染，我们成功制备了四种串联和一种并联的 CD19/BAFFR

双靶点 CAR-T 细胞。然而，在流式细胞术检测 CAR+ 和抗原结合能力评估中，我们注意到 Tan 5H-78LH 结构的 CD19 抗原结合能力受到了显著影响。基于本部分研究的发现，我们筛选出了 Tan 5H-78HL、Tan 78LH-5H、Tan 78HL-5H 和 BI CAR 这四种双靶点 CAR-T 细胞，它们展现出了良好的抗原结合能力，为后续的实验研究奠定了基础。

第四章 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 体外功能研究

4.1 引言

在癌症治疗领域，CAR-T 疗法因其能够特异性地靶向并杀伤肿瘤细胞而备受关注。为了提高治疗效果并减少潜在的副作用，开发能够同时识别两个肿瘤相关抗原的双靶点 CAR-T 细胞成为了研究的热点^[87]。然而，构建双靶点 CAR-T 存在许多挑战。首先，双靶点 CAR-T 的两个抗原识别域是否都能有效地结合各自的肿瘤抗原是一个问题。其次，即使相应的抗原都能有效结合，也难以保证 CAR-T 细胞能发挥相应的功能。然后，双靶点 CAR-T 细胞可能会增加非特异性激活和脱靶效应的风险，这可能导致不良的副作用。最后，尽管双靶点 CAR-T 细胞可能在短期内显示出强大的抗肿瘤活性，但其长期的疗效和持久性仍需进一步研究^[88]。

在本部分研究中，我们首先探讨了 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞在体外对肿瘤细胞的特异性脱颗粒和激活能力。接着，我们使用基于荧光素酶的细胞毒性实验来评估双靶点 CAR-T 细胞的杀伤效果。同时，我们还检测了这些 CAR-T 细胞受到刺激后释放细胞因子的能力。此外，我们还研究了 CAR-T 细胞在反复刺激后的增殖能力和耗竭标志物的表达。这些研究结果为进一步开发和优化双靶点 CAR-T 疗法提供了重要的实验依据，也为接下来的动物实验奠定基础。

4.2 材料与方法

4.2.1 实验材料

主要仪器设备

本部分研究主要使用的仪器设备见表4.1所示

表4.1 主要仪器设备

仪器名称	厂家
二氧化碳培养箱	ESCO, 新加坡
超低温冰箱	Thermo, 美国
恒温冰箱	Haier, 中国
光学倒置显微镜	Nikon, 日本
生物安全柜	Heal Force, 中国

电热恒温水浴锅	精宏，中国
单道微量可调移液器 (2 μ l、10 μ l、20 μ l、200 μ l、1ml)	RANIN，美国
12道手动移液器 (300 μ l)	RANIN，美国
电动移液器	Thermo，美国
高速冷冻离心机	Thermo，美国
台式离心机	Thermo，美国
微量台式离心机	Thermo，美国
荧光细胞计数仪	Countstar，中国
流式细胞仪	美天旎，德国
酶标仪	BioTek，美国

主要实验试剂

本部分研究主要使用的试剂见表4.2所示

表4.2 主要实验试剂

名称	厂家
胎牛血清	Gibco，美国
RPMI1640培养基	Gibco，美国
IMDM培养基	Gibco，美国
AO/PI试剂	Countstar，中国
磷酸盐缓冲液PBS PH7.2	源培，中国
CTS培养基	Gibco，美国
注射用重组人白介素-2	双鹭药业，中国
100 \times GlutaMAX	Gibco，美国
莫能菌素	Biolegend，美国
丝裂霉素	MedChemExpress，美国
Luciferase荧光底物及溶液	Promega，美国
Human cytokine detection kits	Cisbio，法国
PE/Cyanine7 mouse anti-Human CD107a	Biolegend，美国
BV421 mouse anti-Human CD8	Biolegend，美国

FITC mouse anti-Human CD69	Biolegend, 美国
PE/ Cyanine7 mouse anti-Human CD25	Biolegend, 美国
FITC mouse anti-Human CD4	Biolegend, 美国
FITC mouse anti-Human CD8	Biolegend, 美国
PE/ Cyanine7 mouse anti-Human EGFR	Biolegend, 美国
BV421 mouse anti-Human TIM3	Biolegend, 美国
APC mouse anti-Human LAG3	Biolegend, 美国
APC mouse anti-Human EGFR	Biolegend, 美国

主要实验耗材

本部分研究主要使用的耗材见表4.3所示

表4.3 主要使用的实验耗材

名称	厂家
15 ml离心管	Corning, 美国
50 ml离心管	Corning, 美国
1.5 ml EP管	Thermo, 美国
细胞冻存管	Corning, 美国
T25细胞培养瓶	Corning, 美国
T75细胞培养瓶	Corning, 美国
T175细胞培养瓶	Corning, 美国
U底96孔板	Corning, 美国
96孔板 (白色)	Corning, 美国
24孔板	Corning, 美国
6孔板	Corning, 美国
50 ml加样槽	BIOFIL, 中国
灭菌盒装无菌枪头	RANIN, 美国
细胞计数板	Countstar, 中国

4.2.2 实验方法

本部分研究承接上一部分，重复的实验方法不再赘述，在此只列出不同之处。

激活标志物检测

- 1) 效应细胞及靶细胞分别计数取样，用 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基分别调整密度为 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 。
- 2) 取 96 孔板，每孔各加 100 μl 效应细胞和靶细胞，置于 37°C ，5% CO_2 恒温培养箱孵育 24h。
- 3) 孵育结束后，500g 离心 5min，PBS 洗两遍，BV421-CD8、APC-EGFR、FITC-CD69、PE/Cyanine7-CD25 抗体染色（1 μl 抗体/孔，50 μl PBS/孔），4 度冰箱孵育 20min。
- 4) PBS 洗涤两遍，流式上机检测（CD8-EGFR-CD25/CD69）

细胞因子检测

- 1) 靶细胞和 CAR-T 细胞计数，取出所需的量，离心弃去上清，用新鲜 1640 完全培养基分别调整密度为 $4 \times 10^5/\text{ml}$ ，加至 96 孔 U 底板板，每孔 100 μl 其中 T only 组只加 T 细胞和培养基，每孔三个重复。
- 2) 温箱孵育 24h 后，400g 离心 5min，留取上清待测。
- 3) 使用 Cisbio 均相时间分辨荧光(HTRF)人细胞因子检测试剂盒检测上清中 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 细胞因子水平（具体实验步骤按说明书操作）。

反复刺激与耗竭标志物检测

- 1) 在第 0 天，将 Jeko-1 细胞接种在用丝裂霉素 C 处理的 6 孔板中，丝裂霉素终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。
- 2) 在第 1 天，用 PBS 洗涤丝裂霉素 C 处理的 Jeko-1 细胞三次，然后将 4×10^5 个 Jeko-1 细胞在 24 孔板中与 8×10^5 个 CAR-T 细胞混合，使用 T 细胞完全培养基补足体积至 1 ml。
- 3) 在第 3 天，将新的 Jeko-1 细胞与第 0 天一样处理。
- 4) 在第 4 天，对第 1 天处理的 CAR-T 细胞进行计数，并将 8×10^5 个 CAR-T 细胞与前一天的 4×10^5 个丝裂霉素 C 处理的 Jeko-1 细胞重新混合到新的 24 孔板中，与第 1 天一样使用 T 细胞完全培养基补足体积至 1 ml。重复这个过程五次。
- 5) 每次刺激后的扩增倍数计算为（第 4 天 CAR-T 细胞数）/（ 8×10^5 ），并使用以下公式计算累积扩增：累积扩增倍数=（扩增倍数 1） \times （扩增倍数 2） \times ... \times （扩增倍数 n）。
- 6) 在第 2 轮刺激之后，取部分剩余的 CAR-T 细胞到 96 孔板中，用 PBS 清洗 1 遍后，染抗体 FITC-CD4/CD8，PE/Cyanine7-EGFR，BV421-TIM3，APC-LAG3（1 μl 抗体/孔，50 μl PBS/孔），4 度冰箱孵育 20min。
- 7) PBS 清洗两遍，流式上机检测（CD4/CD8-EGFR-TIM3/LAG3）

4.3 实验结果

4.3.1 CAR-T 细胞脱颗粒和激活能力检测

脱颗粒是 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞在穿孔素介导的肿瘤细胞杀伤中的关键步骤，而 CD107a 主要存在于细胞的溶酶体膜上，当细胞受到刺激时，CD107a 会从溶酶体膜转移到细胞膜上，这通常伴随着颗粒的释放，即脱颗粒。因此，我们将双靶点 CAR-T 细胞与 Jeko-1、Nalm-6、Mec-1、Jeko-1-CD19KO、Jeko-1-BAFFRKO 和 NCI-H929 细胞共培养，并通过流式细胞术检测 CD107a 表面表达水平来评估细胞的脱颗粒能力。如图 4.1A,B 所示，在 Jeko-1、Mec-1 和 Jeko-1-BAFFRKO 细胞刺激 4 小时后，与 Tan 78LH-5H 和 Tan 78HL-5H 相比，Tan 5H-78HL 和 BI CAR 的 CD107a 表达水平更高，而用 Jeko-1-CD19KO 细胞刺激时没有观察到显著差异，这表明 CD19-78scFv 在距离胞膜较远的位置会影响其脱颗粒释放能力，而 BAFFR-5VHH 的脱颗粒能力未受位置影响。因此，后续我们保留 Tan 5H-78HL 和 BI CAR 继续进行功能评估。

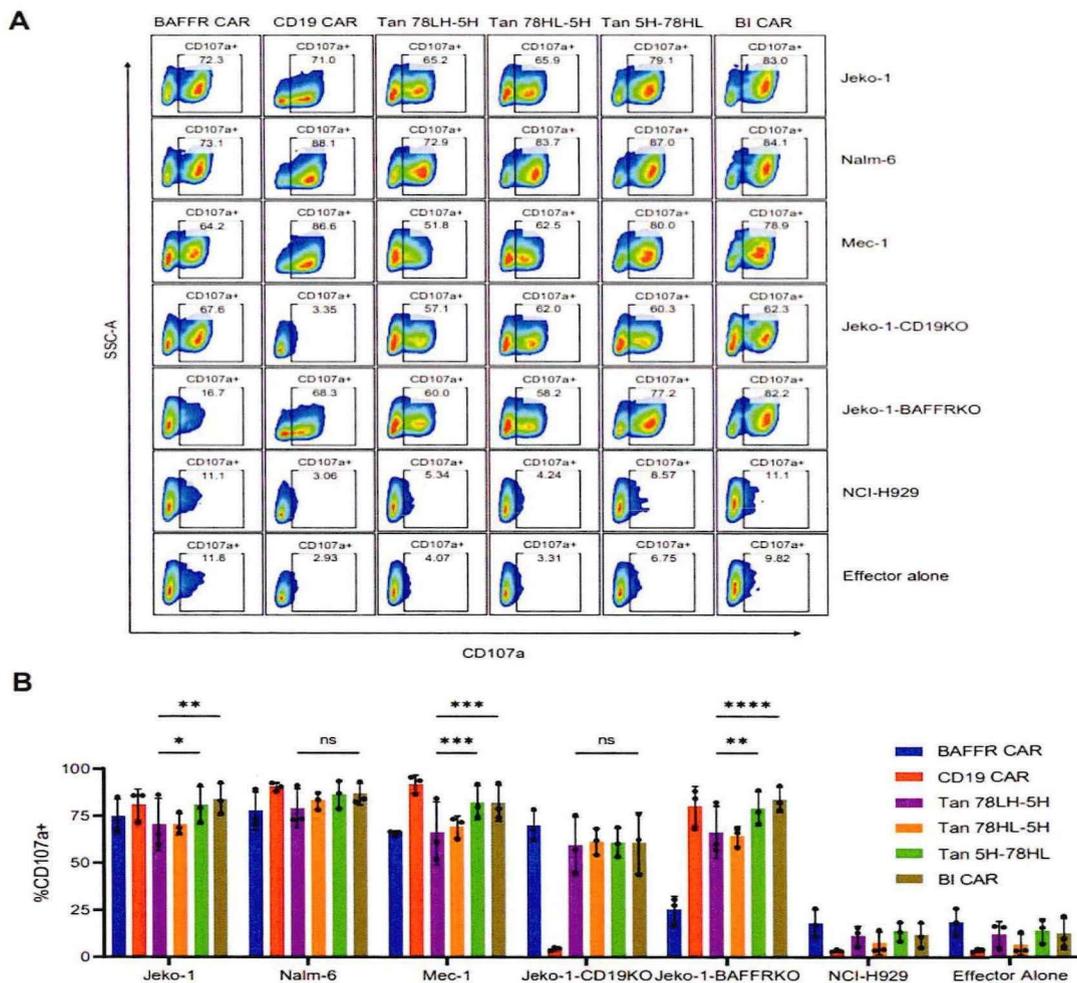


图 4.1 CAR-T 细胞脱颗粒 CD107a 释放能力检测。

A. 脱颗粒试验的代表性流式细胞术分析。B. 对脱颗粒试验的数据进行量化和统计分析。结果显示为3次实验的平均值±标准差, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns, 无显著性差异, 双因素方差分析。

接下来, 我们通过进一步实验检验 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 的激活能力。我们将 CAR-T 细胞与阳性靶细胞按 1:1 的比例在 96 孔板中刺激 24h, 随后通过流式细胞术检测 CAR-T 细胞表面激活标志物 CD25 和 CD69 的表达。如图 4.2 所示, 与未受刺激的 CAR-T 细胞相比, CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞在 Jeko-1、Jeko-1-CD19KO 或 Jeko-1-BAFFRKO 细胞刺激后均能表现出更高水平的 T 细胞活化标志物 CD25 和 CD69 表达(流式图片详见附录补充图 3)。以上这些结果表明, Tan 5H-78HL 和 BI CAR 可以被 CD19 或 BAFFR 阳性细胞特异性激活并有效导致脱颗粒。

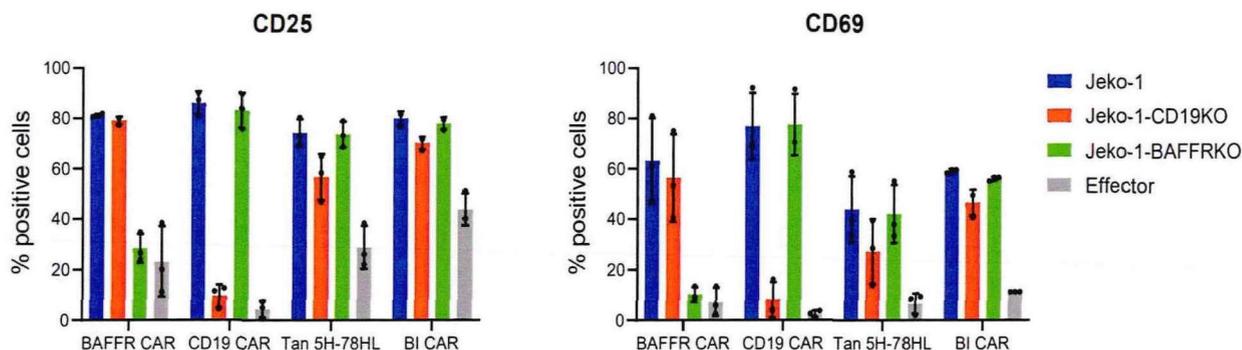


图 4.2 CAR-T 细胞特异性激活能力检测。

与 Jeko-1、Jeko-1-CD19KO 或 Jeko-1-BAFFRKO 细胞孵育 24 小时后, CAR-T 细胞上 T 细胞活化标志物 CD25 和 CD69 的表达。在 CD8⁺ EGFRt⁺ 细胞上设门。数据代表 3 次实验的平均值±标准差。

4.3.2 细胞毒性实验

接着, 为了评估 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 的细胞毒性, 我们进行了基于荧光素酶的细胞毒性测定。如图 4.3 所示, CD19/BAFFR 双靶点 CARs 对 CD19⁺ 或 BAFFR⁺ 肿瘤细胞表现出剂量依赖性细胞毒性, 但对 NCI-H929 细胞 (CD19⁻BAFFR⁻) 基本没有细胞毒性, 且双靶点 CAR-T 的细胞杀伤能力优于单靶 CAR-T。这表明 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞对抗原阳性的肿瘤细胞具有强大的杀伤能力, 而对于抗原阴性的细胞具有很好的安全性。

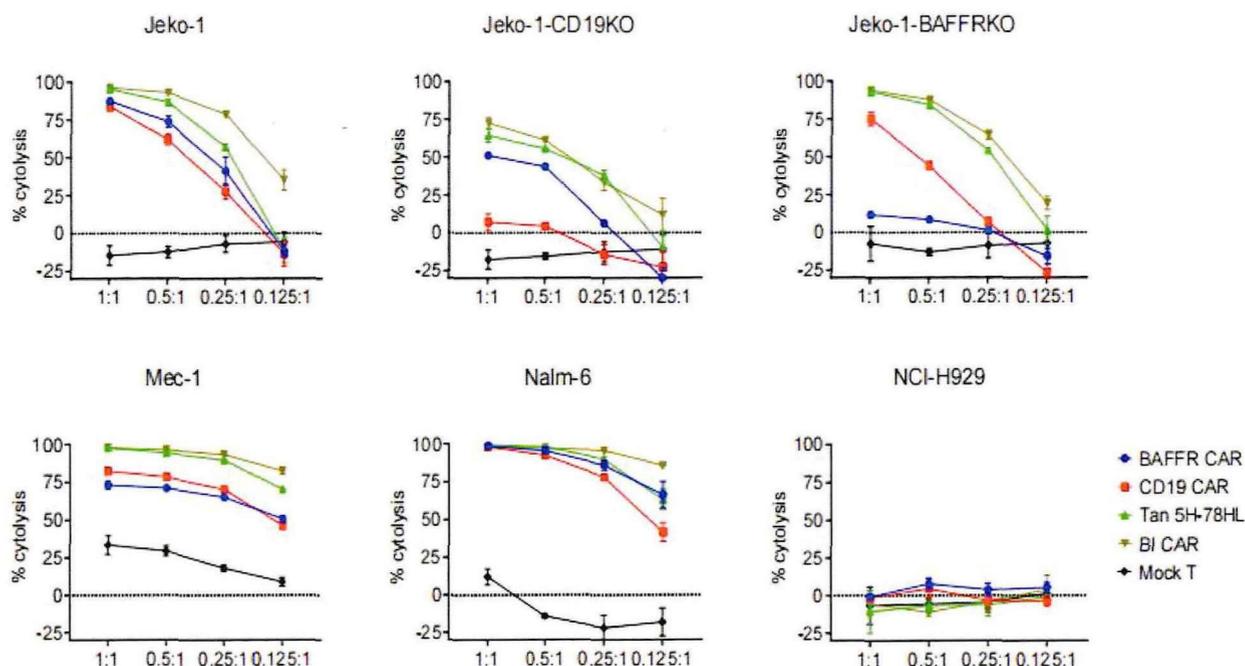


图 4.3 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞的基于荧光素酶的细胞毒性测定。

在共培养 24 小时后通过荧光素酶检测测量靶细胞的特异性裂解。数据表示平均值 \pm 标准差 (n=3)。

4.3.3 细胞因子检测

同时, 为了比较双靶点 CAR-T 细胞白细胞介素-2 (IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和干扰素- γ (IFN- γ) 的释放能力, 本研究以 1:1 的效靶比将双靶点 CARs 与阳性靶细胞共培养 24 h 后, 使用 Cisbio 细胞因子检测试剂盒测定细胞培养上清液中的细胞因子水平。结果显示, 与 Tan 5H-78HL 相比, BI CAR 的 IL-2 和 TNF- α 释放水平更高, 而 IFN- γ 的释放水平两者没有显著差异 (图 4.4)。

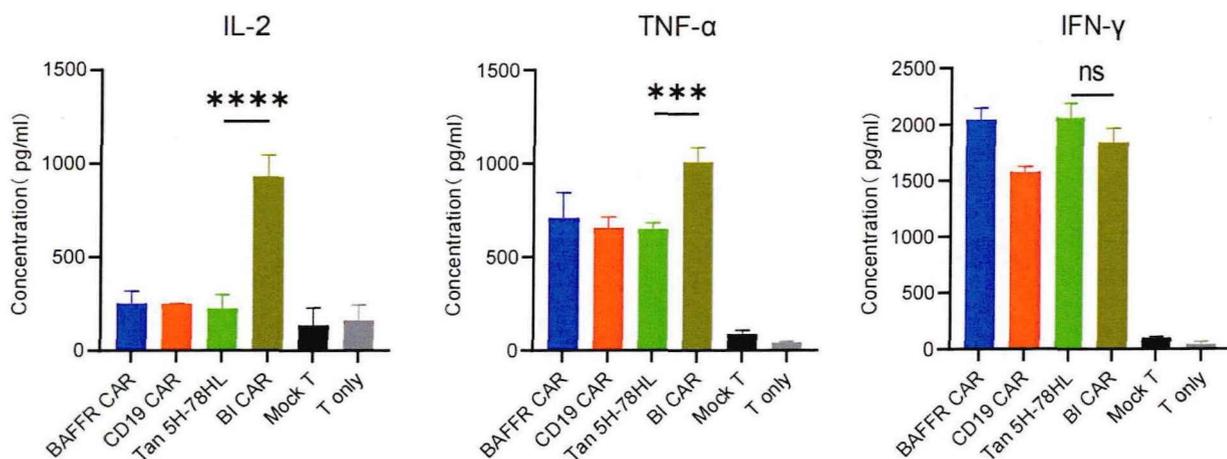


图 4.4 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞的细胞因子检测。

CAR-T 细胞与 Jeko-1 细胞 (CD19+ BAFFR+) 以 1:1 的比例孵育 24 小时, 然后使用均相时间分辨荧光 (HTRF) 技术定量上清液中的细胞因子。结果显示为平均值±标准差 (n=3), *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns, 无显著性差异, 单因素方差分析。

4.3.4 反复刺激和细胞耗竭实验

CAR-T 细胞的增殖能力是影响治疗效果的关键因素。为了评估这一点, 接下来我们模拟了体内抗原刺激的环境, 评估了 CAR-T 细胞在体外多轮抗原刺激后的增殖能力以及耗竭标志物表达。用丝裂霉素 C 处理过的 Jeko-1 细胞进行 5 轮刺激后, CAR-T 细胞的增殖明显高于 Mock T 细胞 (图 4.5A)。同时, 为了比较 CAR-T 细胞的耗竭水平, 我们检测了两轮刺激前后 CAR-T 细胞耗竭标志物 LAG-3 和 TIM-3 的表达水平。在 Jeko-1 细胞第二轮刺激后, CD4+ BI CAR-T 细胞上 LAG-3 和 TIM-3 的表达水平低于 CD19 CAR, CD8+ BI CAR-T 细胞上 LAG-3 的表达水平也低于 CD19 CAR (图 4.5B, 流式结果详见附录补充图 4)。以上这些结果表明, BI CAR 相较于 CD19 CAR 可能具有更强大、更持久的功能。

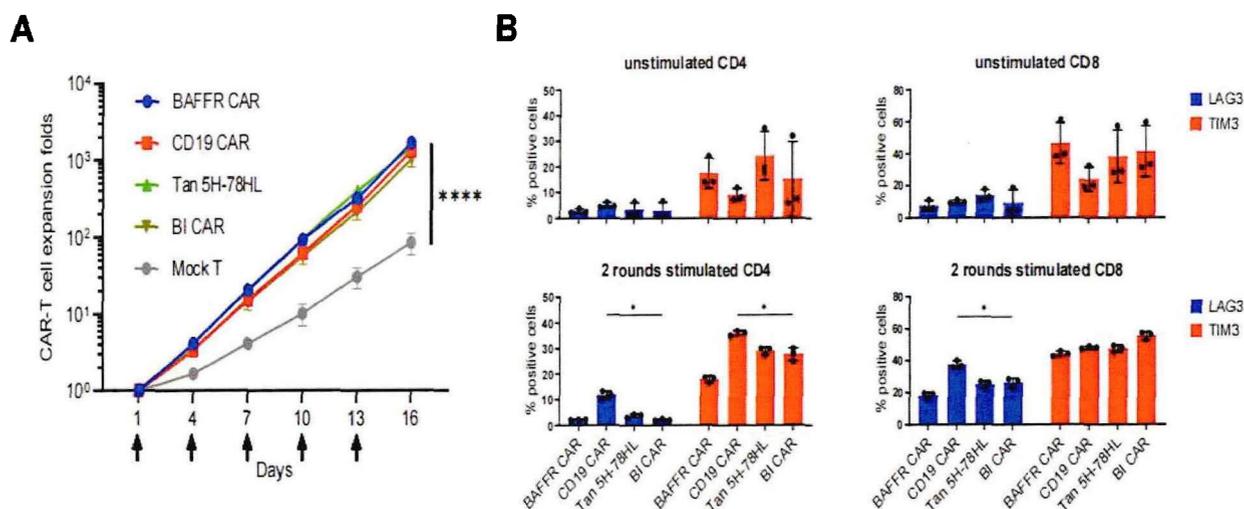


图 4.5 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞的扩增能力和耗竭标志物检测。

A. CAR-T/T 细胞在肿瘤细胞多轮刺激后的扩增倍数。横轴表示共培养的天数，箭头表示添加丝裂霉素-C 预处理的 Jeko-1 细胞。数据表示平均值±标准差 (n=3)，****p < 0.0001，单因素方差分析。B. LAG-3 和 TIM-3 在用 Jeko-1 细胞刺激两轮前后在 CAR-T 细胞上的表达水平。数据表示平均值±标准差 (n=3)，*p < 0.05，双因素方差分析。

4.4 总结讨论

本部分研究通过体外实验，成功构建并评估了 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞的体外功能。首先，我们通过流式细胞术来评估双靶点 CAR-T 细胞的特异性脱颗粒和激活能力。实验结果表明，只有 Tan 5H-78HL 和 BI CAR 的脱颗粒能力保持正常水平，而 Tan 78LH-5H 和 Tan 78HL-5H 的 CD19 特异性脱颗粒能力较为减弱。接下来，我们通过荧光素酶实验发现了双靶点 CAR-T 细胞不仅对阳性靶细胞表现出优于单靶 CAR-T 的杀伤能力，而且对于阴性靶细胞没有非特异性杀伤。于是，我们接着评估了这些 CAR-T 的细胞因子释放水平。实验结果表明，尽管它们的 IFN- γ 释放水平相似，但是 BI CAR 的 IL-2 和 TNF- α 释放水平较高，这似乎预示着 BI CAR 具有更好的扩增以及杀伤能力。最后，我们通过模拟体内抗原刺激的环境检验双靶点 CAR-T 细胞的增殖和耗竭标志物的表达。双靶点 CAR-T 细胞均表现出良好的特异性扩增，同时，BI CAR 相较于 CD19 CAR 表现出较少的耗竭标志物。然而，体外实验条件与体内环境还是存在差异，可能影响细胞行为。因此，接下来的的研究中，我们将在动物模型中验证这些 CAR-T 细胞的疗效和安全性。

第五章 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 体内功能研究

5.1 引言

在癌症治疗的不断进步中，CAR-T 细胞疗法已经显示出其在靶向治疗肿瘤细胞方面的潜力。但是，CAR-T 细胞在体内的长期稳定性和潜在的脱靶效应仍然是需要进一步研究的问题。特别是，针对两个抗原的双靶点 CAR-T 细胞，因其能够同时针对两个不同的肿瘤相关抗原，而尤为需要体内实验来验证其治疗效果和安全性。

在上一部分研究中，我们发现 Tan 5H-78HL 和 BI CAR 在体外对肿瘤细胞均具有强大的杀伤能力。因此，接下来我们想了解 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 在体内是否仍具有效果。于是，我们首先在免疫缺陷小鼠中构建了 Jeko-1 小鼠异种移植模型，来探索 CAR-T 的体内疗效和安全性。此外，我们通过构建 Jeko-1-CD19KO 和 Jeko-1-BAFFRKO 混合瘤模型模拟抗原丢失的情况，进一步探索 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 的抗肿瘤抗原逃逸能力。

5.2 材料与方法

5.2.1 实验材料

实验动物

6~8周、雌性、NKG小鼠购自赛业生物科技有限公司（中国苏州），并在南京云桥璞瑞生物科技有限公司（中国南京）的动物设施中饲养在无特定病原体（SPF）条件下。所有动物研究均获得机构动物护理和使用协议（AP-C210507.94）的批准。

主要仪器设备

本部分研究主要使用的仪器设备见表5.1所示

表5.1 主要仪器设备

仪器名称	厂家
二氧化碳培养箱	ESCO, 新加坡
液氮柜	Thermo, 美国
液氮罐	金凤, 中国
超低温冰箱	Thermo, 美国
恒温冰箱	Haier, 中国

生物安全柜	Heal Force, 中国
电热恒温水浴锅	精宏, 中国
单道微量可调移液器 (2 μ l、10 μ l、20 μ l、200 μ l、1ml)	RANIN, 美国
12道手动移液器 (300 μ l)	RANIN, 美国
电动移液器	Thermo, 美国
高速冷冻离心机	Thermo, 美国
台式离心机	Thermo, 美国
微量台式离心机	Thermo, 美国
荧光细胞计数仪	Countstar, 中国
50ml磁力架	Thermo, 美国
流式细胞仪	美天旎, 德国
电子天平	舜宇恒平, 中国
小动物活体成像仪Lumina III	PerkinElmer, 美国

主要实验试剂

本部分研究主要使用的试剂见表5.2所示

表5.2 主要实验试剂

名称	厂家
胎牛血清	Gibco, 美国
CS10细胞冻存液	Biolife, 美国
人血白蛋白	双林生物, 中国
复方电解质	四药, 中国
AO/PI试剂	Countstar, 中国
磷酸盐缓冲液PBS PH7.2	源培, 中国
CTS培养基	Gibco, 美国
注射用重组人白介素-2	双鹭药业, 中国
100 \times GlutaMAX	Gibco, 美国
红细胞裂解液	索莱宝, 中国

异氟烷	瑞沃德, 中国
DPBS	索莱宝, 中国
D-虫荧光素钠	索莱宝, 中国
BV421 mouse anti-Human CD19	Biolegend, 美国
PE mouse anti-Human BAFFR	Biolegend, 美国
Mouse BD Fc Block™	BD biosciences, 美国
BV421 mouse anti-Human CD3	Biolegend, 美国
APC mouse anti-Human EGFR	Biolegend, 美国

主要实验耗材

本部分研究主要使用的耗材见表5.3所示

表5.3 主要使用的实验耗材

名称	厂家
50 ml离心管	Corning, 美国
1.5 ml EP管	Thermo, 美国
EDTA-1.5 ml离心管	康健医疗, 中国
细胞冻存管	Corning, 美国
T175细胞培养瓶	Corning, 美国
U底96孔板	Corning, 美国
12道加样槽	BIOFIL, 中国
灭菌盒装无菌枪头	RANIN, 美国
细胞计数板	Countstar, 中国
1 ml注射器	康德莱, 中国
动物柳叶刀	Goldenrod, 美国

5.2.2 实验方法

本部分研究承接上一部分, 重复的实验方法不再赘述, 在此只列出不同之处。

CAR-T 收获与冻存

- 1) 首先配置细胞冻存液：75%CS10 细胞冻存液+23.5%复方电解质+1.5%人血白蛋白（HSA）。
- 2) CAR-T 细胞转染后扩增第 12 天，从 T175 培养瓶中取出计数。
- 3) 取 50 ml 离心管，每次加 40 ml 细胞，然后置于 50 ml 磁力架上静置 5min 去磁珠。
- 4) 用移液管悬空吸取细胞悬液，不要碰到管壁，转移到新的 50 ml 离心管中，记录总体积。
- 5) 400g 离心 5min，弃上清，再离 2min，完全吸弃上清
- 6) 用配置好的冻存液重悬，调整密度为 2×10^7 CAR-T 细胞/ml，分装到相应的冻存管中。
- 7) 冻存管放到冻存盒置于 -80°C 冰箱过夜，然后转移到液氮中冻存。

动物实验

- 1) 取对数生长期的 Jeko-1、Jeko-1-CD19KO 或 Jeko-1-BAFFRKO 细胞计数离心。
- 2) 用预冷的 PBS 重悬细胞，调整密度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 。
- 3) 6~8 周大小的 NKG 小鼠，通过尾静脉注射 $200 \mu\text{l}$ (1×10^6 个) 肿瘤细胞。
- 4) 3 天之后，通过生物发光成像系统 (BLI) 观测肿瘤生长情况，并进行随机分组 (5 只/组)。
- 5) 从液氮中取出 CAR-T 细胞，用塑料手套包裹放到水浴锅中来回晃动，待融化完成时准备回输。
- 6) 通过尾静脉注射 $200 \mu\text{l}$ (4×10^6 个) CAR-T 细胞，对照设置一个空白组和 Mock T 组。其中空白组输注等量 PBS，Mock T 组按照转效最低组输注等量 T 细胞。
- 7) 每隔 7 天成像、采血一次，每 3 天记录一次体重变化。

动物采血

- 1) 准备相应数量的 EDTA-1.5 ml EP 管，并做与动物编号对应标记。
- 2) 抓取动物，使其面部皮毛紧凑。
- 3) 使用柳叶刀在眼角 2 mm 处穿刺。
- 4) 血样从穿刺处流出，滴进与动物编号对应的 EDTA-1.5 ml EP 管。

小鼠血检测

- 1) 取小鼠全血 $200 \mu\text{l}$ 加到 EP 管中加红细胞裂解液 $700 \mu\text{l}/\text{管}$ ，上下颠倒混匀，静置 5min。
- 2) 400g 离心 7min，吸去上清，再加 $200 \mu\text{l}$ 红细胞裂解液重悬。
- 3) 400g 离心 5min，吸弃上清， $200 \mu\text{l}$ PBS 重悬转移到 96 孔 U 底板中。
- 4) 500g 离心 5min，弃上清，加 Fc block， $50 \mu\text{l}/\text{孔}$ ，封闭 10min，封闭液按 1:200 稀释。

- 5) 封闭结束后, 加抗体 BV421-CD3、APC-EGFR 染色 (1 μ l 抗体/孔, 50 μ l PBS/孔), 4 度冰箱孵育 20min。
- 6) PBS 洗涤两遍, 流式上机检测 (CD3-EGFR)

5.3 实验结果

5.3.1 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞在体内表现出强大的抗肿瘤活性

接下来, 为了进一步评估 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞的体内功能, 我们通过给 6~8 周龄 NKG 小鼠尾静脉注射 1×10^6 个 Jeko-1 荧光素酶稳转细胞来构建肿瘤异种移植模型, 并在第 3 天给予 4×10^6 CAR-T 细胞治疗 (CAR-T 转效详见附录补充图 5)。如图 5.1A, B 所示, 所有 CAR-T 治疗组的荷瘤小鼠均表现出延迟的肿瘤进展, 与 Mock T 组相比, CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞表现出强大的肿瘤抑制能力。然而, BI CAR 显示出比 Tan 5H-78HL 更好的抗肿瘤能力。此外, 如图 5.1C 所示, 与对照组相比, 用 CAR-T 细胞治疗的小鼠显示出生存时间的显著延长。更重要的是, 如图 5.1D 所示, 在用 CAR-T 细胞处理的小鼠中没有观察到体重的突然下降, 这说明所有的 CAR-T 均保持了良好的安全性。最后, 如图 5.1E 所示, 外周血的流式细胞术分析显示 (详细结果见附录补充图 6A), BI CAR 在第 31 天表现出最高的相对扩增比例。总的来说, Jeko-1 异种移植模型的结果表明, CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞均能够抑制肿瘤的体内生长, 并且表现出良好的安全性, 但是 BI CAR 表现出更好的肿瘤抑制作用和扩增能力。

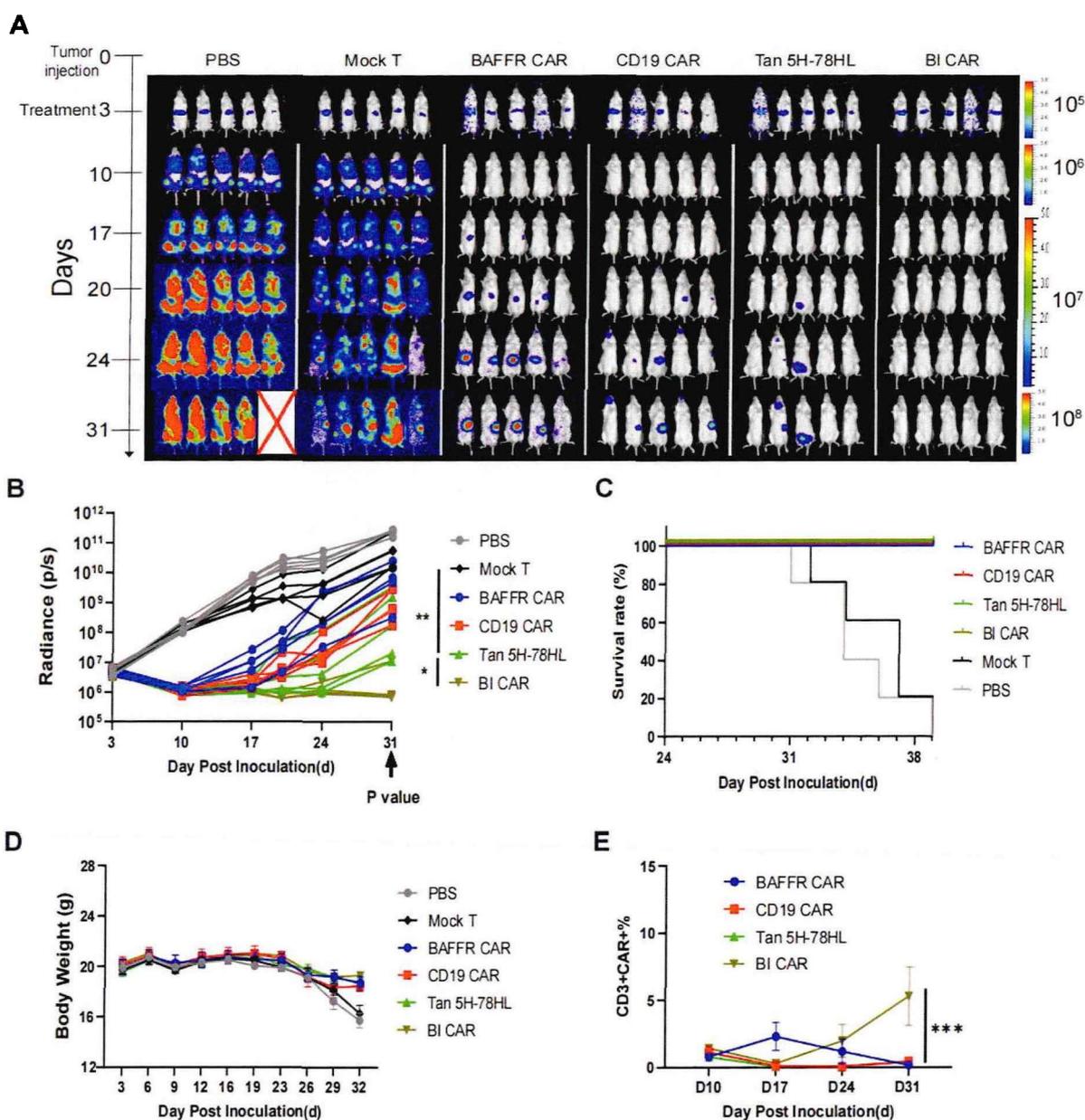


图 5.1 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞在体内的抗肿瘤活性。

A. 每隔 7 天使用生物发光成像监测肿瘤生长的照片。B. 对 A 中光子数的定量分析。数据显示为平均值 \pm SEM (n=5), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 双尾非配对 Mann-Whitney 检验。C. 小鼠总体 Kaplan-Meier 生存曲线。使用 log-rank 检验。D. 小鼠体重曲线。结果以平均值表示 \pm SEM (n=5)。E. 流式细胞术分析小鼠第 10、17、24 和 31 天外周血中 CAR+ 比例。在 CD3+ EGFRt+ 细胞上设门。数据表示平均值 \pm SEM (n=5), *** $p < 0.001$, 双因素方差分析。

5.3.2 CD19/BAFFR 并联 CAR-T 细胞在体内克服肿瘤抗原逃逸

最后,为了评估双靶点 CAR-T 细胞对抗原逃逸肿瘤细胞的体内疗效,如图 5.2A 所示,通过以 1:1 的比例混合 Jeko-1-CD19KO 和 Jeko-1-BAFFRKO 细胞,通过尾静脉输注在 NKG 小鼠中建立了混合肿瘤模型。治疗组中的每只小鼠在第 3 天通过尾静脉输注 4×10^6 个 CAR-T 细胞(CAR-T 转效详见附录补充图 5)。出乎意料的是, Tan 5H-78HL 和 BI CAR 在体内对抗抗原逃逸肿瘤细胞的能力存在显著差异。如图 5.2B, C 所示, BI CAR 在混合瘤模型中对肿瘤表现出明显的抑制作用,而 Tan 5H-78HL 则显示出十分有限的疗效。同时,我们评估了小鼠体内 CAR-T 细胞的扩增,在第 10、17、24 和 31 天对小鼠外周血进行流式细胞术分析以确定外周血中 CAR-T 细胞(CD3+EGFR+)的百分比。如图 5.2D 所示,在第 31 天,与 Tan 5H-78HL 相比,接受 BI CAR 治疗的小鼠外周血中 CAR+ 细胞的比例明显更高(详细结果见附录补充图 6B)。这些流式细胞术结果表明,与 Tan 5H-78HL 相比,BI CAR 具有更优越的体内持续扩增能力。此外,如图 5.2E 所示,与其余各组相比,BI CAR 显著延长了混合肿瘤模型中小鼠的存活时间。综上所述,这些数据表明,BI CAR 即使在体内对 CD19 或 BAFFR 缺失的肿瘤也能保持显著而持久的抑制作用。

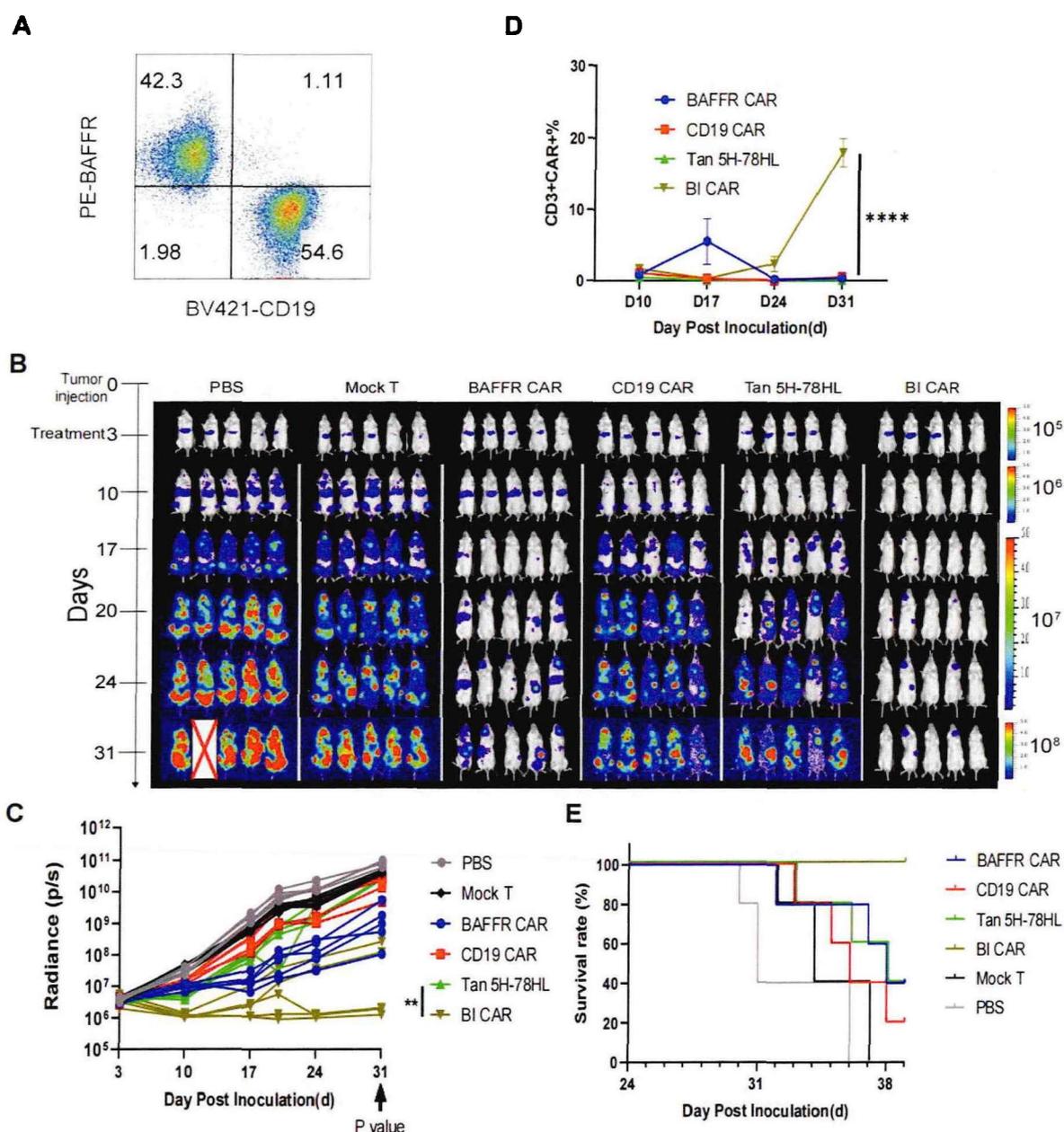


图 5.2 CD19/BAFFR 并联 CAR-T 细胞可对抗体内抗原逃逸。

A. 流式细胞术分析显示混合肿瘤模型中 Jeko-1-CD19KO 和 Jeko-1-BAFFRKO 细胞按 1:1 的比例混合输注。B. 每隔 7 天使用生物发光成像系统监测肿瘤生长的照片。C. 对 B 中光子数的定量分析。平均值 \pm SEM (n=5), **p<0.01, 双尾非配对 Mann-Whitney 检验。D. 流式细胞术分析小鼠第 10、17、24 和 31 天外周血中 CAR+比例。在 CD3+ EGFRt+细胞上设门。数据表示平均值 \pm SEM (n=5), ****p<0.0001, 双因素方差分析。E. 小鼠总体 Kaplan-Meier 生存曲线。使用 log-rank 检验。

5.4 总结讨论

本部分研究中，我们首先通过构建异种移植模型，评估了 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞在体内的抗肿瘤活性。我们的实验结果表明，与对照组相比，双靶点 CAR-T 细胞不仅能够有效抑制肿瘤生长，而且在整个动物实验中 CAR-T 细胞组均保持了良好的安全性。不过，BI CAR-T 细胞在抗肿瘤效果和扩增能力方面表现较 Tan 5H-78HL CAR-T 细胞更为出色。此外，我们还探讨了双靶点 CAR-T 细胞在应对肿瘤抗原逃逸方面的效能，发现 BI CAR-T 细胞在混合肿瘤模型中展现出显著的抑制效果，这可能为治疗那些单一抗原丢失的肿瘤细胞提供了新的策略。这些发现为 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞疗法的临床应用提供了有力的科学依据，并为未来的癌症治疗策略提供了新的视角。

第六章 全文总结与讨论

6.1 研究结果总结

尽管 CD19 嵌合抗原受体 T 细胞疗法在 B 细胞恶性肿瘤治疗中显示出显著疗效，但抗原逃逸和复发仍然是患者生存的重大挑战。此前，Gardner 等人报道了两例 B 细胞急性淋巴细胞白血病患者在 CD19 CAR-T 治疗后出现 CD19 阴性复发^[89]。类似地，Park 等人在 53 例接受 CD19 CAR-T 治疗的复发/难治性 B-ALL 成人患者中，观察到 4 例 CD19 阴性复发^[90]。这些研究凸显了 CD19 单靶点 CAR-T 疗法的局限性。因此，探索新的靶点联合治疗以提高 CAR-T 疗效成为研究的重要方向。

目前广泛的双靶点 CAR-T 细胞的研究已经探索了将 CD19 与其他靶标结合，其中也包括 BAFFR^[91]。然而，正如绪论中所述，这些双靶点 CAR 构建体中大多数采用两种 scFv 的组合，且其中不少是小鼠来源的，存在诸多问题。为了克服这些问题，本研究在 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 中应用了人源化 scFv 和 VHH 的组合。为了防止串联结构中可能的错误折叠导致抗原亲和力损失，我们缩短了 scFv 和 VHH 之间的连接子。事实证明该策略是成功的，因为除了 Tan 5H-78LH 串联结构的 CD19 亲和力受损外，其他结构均保持了相应的亲和力。在脱颗粒试验中，我们发现 5VHH 无论在 CAR 结构中的位置如何，都能保持稳定的脱颗粒水平，而当 78scFv 放置在距离胞膜较远的位置时，对应于 CD19 的脱颗粒水平显著降低。这可能是由于串联组合时 scFv 和膜之间距离的改变影响到了它们的功能^[92]。然而，VHH 受益于其高稳定性和高亲和力^[74]，受到的影响较小。

在随后的细胞毒性实验中，Tan 5H-78HL 和 BI CAR 均表现出强大的杀伤能力和良好的安全性。此外，CAR-T 的细胞因子释放检测结果显示，与 Tan 5H-78HL 相比，BI CAR 的 IL-2 和 TNF- α 分泌水平较高。IL-2 是 T 细胞的有效生长因子，可促进其扩增并增强细胞毒性活性^[93, 94]；而 TNF- α 促进 T 细胞活化、增殖和细胞毒性活性，同时调节 T 细胞存活和凋亡^[95]。因此，我们猜测 BI CAR 可能具有更好的持久性。随后我们通过动物实验证实了这一猜测，尽管双靶点 CAR-T 细胞在 Jeko-1 模型中都抑制了肿瘤细胞的进展，但是 Tan 5H-78HL 的抗肿瘤性能略逊于 BI CAR，小鼠外周血检测也显示 BI CAR 表现出更好的扩增。这在更具挑战性的混合肿瘤模型中得到了进一步强调，其中具有更好持久性的 BI CAR 始终保持有效的肿瘤抑制，而 Tan 5H-78HL 迅速失去了抗肿瘤能力。同时小鼠外周血的流式细胞术分析再次证明了 BI CAR 在体内优越的扩增能力。

总之，我们证明了基于 scFv 和 VHH 组合构建 CAR-T 细胞的可行性，而且我们的 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 为解决临床 CD19 抗原丢失复发提供了一种有效的策略，为患者提供了长期缓解的希望。

6.2 本研究的局限性与改进方向

本实验中, 尽管 BI CAR 表现出优异的治疗效果, 但与串联 CAR 相比, 其转导效率 (15-35%) 较低, 这主要是由于其基因结构尺寸较大^[73] (并联 CAR 比串联 CAR 长约 22%)。为了提高并联 CAR 的转导效率, 后续可以去除 EGFRt 片段, 这将会使长度减少 1071bp (约为原始并联 CAR DNA 长度的 28%)。另外, 尽管我们观察到与 Tan 5H-78HL 相比, BI CAR 具有更持久的体内抗肿瘤能力, 以及在体外更高水平的 IL-2 和 TNF- α 释放, 但其潜在机制仍需进一步探索。此外, 人源化的 BI CAR 不会诱导抗药免疫反应, 但由于动物模型的局限性, 这种优势无法直接体现。最后, BI CAR 对不表达相应抗原的细胞表现出良好的安全性, 而且在小鼠中没有观察到致命的毒性, 但其在人体中的疗效和安全性尚不清楚。

针对以上局限性, 我们可以着眼于以下方向进行改进。首先, 应尽可能改进工艺、优化结构以提高 BI CAR 的转导效率, 使其达到临床转化要求。其次, 应进一步完善动物实验模型, 确保其更符合临床情况, 以更准确地评估 CAR-T 细胞治疗策略的效果。同时, 应该加强对于免疫耐受性的研究, 以提高 CAR-T 细胞治疗的安全性和持久性。

6.3 研究的启示与展望

CD19/BAFFR 全人源双靶点 CAR-T 细胞的开发和临床前功能研究为我们探索细胞免疫疗法在恶性肿瘤治疗中的应用提供了重要的启示和展望。本研究的结果对于 CAR-T 细胞治疗的临床应用有着积极的意义。

首先, 本研究成功构建全人源 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞, 为 CAR-T 细胞治疗的改进和优化提供了新的方向。目前已有的 CAR-T 细胞治疗主要针对单一靶点, 而本研究的实验设计和构建的双靶点 CAR-T 细胞能够同时识别 CD19 和 BAFFR, 能够更加有效地消灭肿瘤细胞。这为进一步研究和开发具有多重靶向能力的 CAR-T 细胞提供了新的思路。其次, 本研究的功能研究结果表明 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞具有较高的抗原结合活性、显著的细胞毒性、抗原刺激下强力的扩增和较低的细胞耗竭水平。这些结果为 CAR-T 细胞治疗的临床应用提供了有力的支持。此外, 在动物实验模型中, CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞也展现出了良好的抗肿瘤效果, 对肿瘤的抑制率较高, 这进一步证实了该细胞治疗策略的潜力。尽管本研究仍存在一定局限性, 但是本研究为 CD19/BAFFR 双靶点 CAR-T 细胞治疗 B 细胞来源的血液系统恶性肿瘤的潜在临床应用提供了临床前基础。

总之, 本研究成功地构建了 CD19/BAFFR 全人源双靶点 CAR-T 细胞, 并进行了体内功能研究。结果表明, CD19/BAFFR 全人源双靶点 CAR-T 细胞具有潜在的临床应用

前景,可作为一种有效、安全的治疗手段用于血液系统恶性肿瘤的治疗。进一步研究和优化 CAR-T 细胞治疗策略,并解决其面临的挑战,将会进一步推动肿瘤治疗的进展,为患者提供更加有效和个性化的治疗方案。希望本研究能为 CD19/BAFFR 全人源双靶点 CAR-T 细胞的临床应用提供有益的参考和指导。

参考文献

- [1] Kubli S P, Berger T, Araujo D V, et al. Beyond immune checkpoint blockade: emerging immunological strategies [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(12): 899-919.
- [2] Levy P L, Gros A. Fast track to personalized TCR T cell therapies [J]. *Cancer cell*, 2022, 40(5): 447-49.
- [3] Rasche L, Hudecek M, Einsele H. CAR T-cell therapy in multiple myeloma: mission accomplished? [J]. *Blood*, 2024, 143(4): 305-10.
- [4] Liu E, Marin D, Banerjee P, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors [J]. *The New England journal of medicine*, 2020, 382(6): 545-53.
- [5] Lei A, Yu H, Lu S, et al. A second-generation M1-polarized CAR macrophage with antitumor efficacy [J]. *Nature Immunology*, 2024, 25(1): 102-16.
- [6] Huang S-W, Pan C-M, Lin Y-C, et al. BiTE-Secreting CAR- $\gamma\delta$ T as a Dual Targeting Strategy for the Treatment of Solid Tumors [J]. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 2023, 10(17): e2206856.
- [7] Heczey A, Xu X, Courtney A N, et al. Anti-GD2 CAR-NKT cells in relapsed or refractory neuroblastoma: updated phase 1 trial interim results [J]. *Nature Medicine*, 2023, 29(6): 1379-88.
- [8] Melenhorst J J, Chen G M, Wang M, et al. Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4+ CAR T cells [J]. *Nature*, 2022, 602(7897): 503-09.
- [9] Mullard A. FDA approves fourth CAR-T cell therapy [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(3): 166.
- [10] Lee D W, Kochenderfer J N, 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 (London, England)*, 2015, 385(9967): 517-28.
- [11] Siddiqi T, Soumerai J D, Dorritie K A, et al. Phase 1 TRANSCEND CLL 004 study of lisocabtagene maraleucel in patients with relapsed/refractory CLL or SLL [J]. *Blood*, 2022, 139(12): 1794-806.
- [12] Zhang J, Hu Y, Yang J, et al. Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL [J]. *Nature*, 2022, 609(7926): 369-74.
- [13] Zhao W-H, Liu J, Wang B-Y, et al. A phase 1, open-label study of LCAR-B38M, a chimeric antigen receptor T cell therapy directed against B cell maturation antigen, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma [J]. *Journal of hematology & oncology*, 2018, 11(1): 141.
- [14] Zhang P, Zhang G, Wan X. Challenges and new technologies in adoptive cell therapy [J]. *Journal of hematology & oncology*, 2023, 16(1): 97.
- [15] Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(24): 10024-28.
- [16] Muller Y D, Nguyen D P, Ferreira L M R, et al. The CD28-Transmembrane Domain Mediates Chimeric Antigen Receptor Heterodimerization With CD28 [J]. *Frontiers In Immunology*, 2021, 12: 639818.
- [17] Long A H, Haso W M, Shern J F, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors [J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(6): 581-90.

- [18] Singh N, Frey N V, Engels B, et al. Antigen-independent activation enhances the efficacy of 4-1BB-costimulated CD22 CAR T cells [J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(5): 842-50.
- [19] Savoldo B, Ramos C A, Liu E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(5): 1822-26.
- [20] Cheng Z, Wei R, Ma Q, et al. In Vivo Expansion and Antitumor Activity of Coinfused CD28- and 4-1BB-Engineered CAR-T Cells in Patients with B Cell Leukemia [J]. *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2018, 26(4): 976-85.
- [21] Feucht J, Sun J, Eyquem J, et al. Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency [J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(1): 82-88.
- [22] Mikkilineni L, Kochenderfer J N. CAR T cell therapies for patients with multiple myeloma [J]. *Nature reviews Clinical oncology*, 2021, 18(2): 71-84.
- [23] Eshhar Z, Bach N, Fitzer-Attas C J, et al. The T-body approach: potential for cancer immunotherapy [J]. *Springer Seminars In Immunopathology*, 1996, 18(2): 199-209.
- [24] Hwu P, Shafer G E, Treisman J, et al. Lysis of ovarian cancer cells by human lymphocytes redirected with a chimeric gene composed of an antibody variable region and the Fc receptor gamma chain [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1993, 178(1): 361-66.
- [25] Kershaw M H, Westwood J A, Parker L L, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer [J]. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2006, 12(20 Pt 1): 6106-15.
- [26] Porter D L, Levine B L, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. *The New England journal of medicine*, 2011, 365(8): 725-33.
- [27] Grupp S A, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia [J]. *The New England journal of medicine*, 2013, 368(16): 1509-18.
- [28] Shah B D, Ghobadi A, Oluwole O O, et al. KTE-X19 for relapsed or refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study [J]. *Lancet (London, England)*, 2021, 398(10299): 491-502.
- [29] Halim L, Das K K, Larcombe-Young D, et al. Engineering of an Avidity-Optimized CD19-Specific Parallel Chimeric Antigen Receptor That Delivers Dual CD28 and 4-1BB Co-Stimulation [J]. *Frontiers In Immunology*, 2022, 13: 836549.
- [30] Roselli E, Boucher J C, Li G, et al. 4-1BB and optimized CD28 co-stimulation enhances function of human mono-specific and bi-specific third-generation CAR T cells [J]. *Journal For Immunotherapy of Cancer*, 2021, 9(10).
- [31] Zhang C, Liu J, Zhong J F, et al. Engineering CAR-T cells [J]. *Biomarker Research*, 2017, 5: 22.
- [32] Ren J, Liu X, Fang C, et al. Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition [J]. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2017, 23(9): 2255-66.
- [33] Zhao J, Lin Q, Song Y, et al. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells [J]. *Journal of hematology & oncology*, 2018, 11(1): 132.
- [34] Benjamin R, Graham C, Yallop D, et al. Genome-edited, donor-derived allogeneic anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in paediatric and adult B-cell acute

- lymphoblastic leukaemia: results of two phase 1 studies [J]. *Lancet (London, England)*, 2020, 396(10266): 1885-94.
- [35] Tokarew N, Ogonek J, Endres S, et al. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells [J]. *British Journal of Cancer*, 2019, 120(1): 26-37.
- [36] Rallis K S, Hillyar C R T, Sideris M, et al. T-cell-based Immunotherapies for Haematological Cancers, Part B: A SWOT Analysis of Adoptive Cell Therapies [J]. *Anticancer research*, 2021, 41(3): 1143-56.
- [37] Chmielewski M, Hombach A A, Abken H. Antigen-Specific T-Cell Activation Independently of the MHC: Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells [J]. *Frontiers In Immunology*, 2013, 4: 371.
- [38] Myers R M, Li Y, Barz Leahy A, et al. Humanized CD19-Targeted Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells in CAR-Naive and CAR-Exposed Children and Young Adults With Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2021, 39(27): 3044-55.
- [39] Chong E A, Ruella M, Schuster S J. Five-Year Outcomes for Refractory B-Cell Lymphomas with CAR T-Cell Therapy [J]. *The New England journal of medicine*, 2021, 384(7): 673-74.
- [40] Raje N, Berdeja J, Lin Y, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma [J]. *The New England journal of medicine*, 2019, 380(18): 1726-37.
- [41] Scholler N, Perbost R, Locke F L, et al. Tumor immune contexture is a determinant of anti-CD19 CAR T cell efficacy in large B cell lymphoma [J]. *Nature Medicine*, 2022, 28(9): 1872-82.
- [42] Frey N V, Shaw P A, Hexner E O, et al. Optimizing Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2020, 38(5): 415-22.
- [43] Wang M, Munoz J, Goy A, et al. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma [J]. *The New England journal of medicine*, 2020, 382(14): 1331-42.
- [44] Köhl U, Arsenieva S, Holzinger A, et al. CAR T Cells in Trials: Recent Achievements and Challenges that Remain in the Production of Modified T Cells for Clinical Applications [J]. *Human Gene Therapy*, 2018, 29(5): 559-68.
- [45] Liu G, Rui W, Zhao X, et al. Enhancing CAR-T cell efficacy in solid tumors by targeting the tumor microenvironment [J]. *Cellular & molecular immunology*, 2021, 18(5): 1085-95.
- [46] Holstein S A, Lunning M A. CAR T-Cell Therapy in Hematologic Malignancies: A Voyage in Progress [J]. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2020, 107(1): 112-22.
- [47] Schubert M L, Schmitt M, Wang L, et al. Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy [J]. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 2021, 32(1): 34-48.
- [48] Uckun F M, Jaszcz W, Ambrus J L, et al. Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins [J]. *Blood*, 1988, 71(1): 13-29.
- [49] Thompson J S, Bixler S A, Qian F, et al. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF [J]. *Science (New York, NY)*, 2001, 293(5537): 2108-11.

- [50] Kochenderfer J N, Wilson W H, Janik J E, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19 [J]. *Blood*, 2010, 116(20): 4099-102.
- [51] Locke F L, Neelapu S S, Bartlett N L, et al. Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CAR T Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma [J]. *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2017, 25(1): 285-95.
- [52] Jacobson C A. CD19 Chimeric Antigen Receptor Therapy for Refractory Aggressive B-Cell Lymphoma [J]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2019, 37(4): 328-35.
- [53] Maus M V. CD19 CAR T cells for adults with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Lancet (London, England)*, 2021, 398(10299): 466-67.
- [54] Takahata H, Ohara N, Ichimura K, et al. BAFF-R is expressed on B-cell lymphomas depending on their origin, and is related to proliferation index of nodal diffuse large B-cell lymphomas [J]. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology : JCEH*, 2010, 50(2): 121-27.
- [55] Rodig S J, Shahsafaei A, Li B, et al. BAFF-R, the major B cell-activating factor receptor, is expressed on most mature B cells and B-cell lymphoproliferative disorders [J]. *Human Pathology*, 2005, 36(10): 1113-19.
- [56] Qin H, Dong Z, Wang X, et al. CAR T cells targeting BAFF-R can overcome CD19 antigen loss in B cell malignancies [J]. *Science Translational Medicine*, 2019, 11(511).
- [57] Luo Y, Qie Y, Gadd M E, et al. Translational development of a novel BAFF-R CAR-T therapy targeting B-cell lymphoid malignancies [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 2023, 72(12): 4031-47.
- [58] Majzner R G, Mackall C L. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy [J]. *Cancer Discovery*, 2018, 8(10): 1219-26.
- [59] Fousek K, Watanabe J, Joseph S K, et al. CAR T-cells that target acute B-lineage leukemia irrespective of CD19 expression [J]. *Leukemia*, 2021, 35(1): 75-89.
- [60] Roddie C, Dias J, O'Reilly M A, et al. Durable Responses and Low Toxicity After Fast Off-Rate CD19 Chimeric Antigen Receptor-T Therapy in Adults With Relapsed or Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2021, 39(30): 3352-63.
- [61] Tong C, Zhang Y, Liu Y, et al. Optimized tandem CD19/CD20 CAR-engineered T cells in refractory/relapsed B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2020, 136(14): 1632-44.
- [62] Larson S M, Walthers C M, Ji B, et al. CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptor (CAR) in Naive/Memory T Cells for the Treatment of Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma [J]. *Cancer Discovery*, 2023, 13(3): 580-97.
- [63] Cordoba S, Onuoha S, Thomas S, et al. CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in pediatric and young adult patients with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia: a phase 1 trial [J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(10): 1797-805.
- [64] Dai H, Wu Z, Jia H, 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.
- [65] Maus M V, Haas A R, Beatty G L, et al. T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans [J]. *Cancer Immunology Research*, 2013, 1(1): 26-31.

- [66] Lamers C H J, Willemsen R, van Elzakker P, et al. Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells [J]. *Blood*, 2011, 117(1): 72-82.
- [67] Hegde M, Mukherjee M, Grada Z, et al. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13R α 2 mitigate tumor antigen escape [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2016, 126(8): 3036-52.
- [68] Han L, Zhang J-S, Zhou J, et al. Single VHH-directed BCMA CAR-T cells cause remission of relapsed/refractory multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2021, 35(10): 3002-06.
- [69] Cheng J, Ge T, Zhu X, et al. Preclinical development and evaluation of nanobody-based CD70-specific CAR T cells for the treatment of acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 2023, 72(7): 2331-46.
- [70] Ackaert C, Smiejkowska N, Xavier C, et al. Immunogenicity Risk Profile of Nanobodies [J]. *Frontiers In Immunology*, 2021, 12: 632687.
- [71] Li N, Quan A, Li D, et al. The IgG4 hinge with CD28 transmembrane domain improves VHH-based CAR T cells targeting a membrane-distal epitope of GPC1 in pancreatic cancer [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 1986.
- [72] Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics [J]. *Frontiers In Immunology*, 2017, 8: 1603.
- [73] al Yacoub N, Romanowska M, Haritonova N, et al. Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts [J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2007, 9(7): 579-84.
- [74] Safarzadeh Kozani P, Naseri A, Mirarefin S M J, et al. Nanobody-based CAR-T cells for cancer immunotherapy [J]. *Biomarker Research*, 2022, 10(1): 24.
- [75] Jaffe D B, Shahi P, Adams B A, et al. Functional antibodies exhibit light chain coherence [J]. *Nature*, 2022, 611(7935): 352-57.
- [76] Dai Z, Hu X, Jia X, et al. Development and functional characterization of novel fully human anti-CD19 chimeric antigen receptors for T-cell therapy [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(8): 5832-47.
- [77] Zhang C, Luo Q, Wu S, et al. Human Single Domain Antibody-Based CAR-T Cells Targeting BAFF-R Demonstrate Promising Preclinical Activity in B Cell Malignancies [J]. *Blood*, 2023, 142(Supplement 1): 6799-99.
- [78] Fujimoto M, Poe J C, Inaoki M, et al. CD19 regulates B lymphocyte responses to transmembrane signals [J]. *Seminars In Immunology*, 1998, 10(4): 267-77.
- [79] Depoil D, Fleire S, Treanor B L, et al. CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand [J]. *Nature Immunology*, 2008, 9(1): 63-72.
- [80] Nadler L M, Anderson K C, Marti G, et al. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes [J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 1983, 131(1): 244-50.
- [81] Sakai J, Akkoyunlu M. The Role of BAFF System Molecules in Host Response to Pathogens [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017, 30(4).
- [82] Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development [J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013, 131(4): 959-71.
- [83] Melchers F. Actions of BAFF in B cell maturation and its effects on the development of autoimmune disease [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2003, 62 Suppl 2(Suppl 2): ii25-ii27.

- [84] Hobeika E, Levit-Zerdoun E, Anastasopoulou V, et al. CD19 and BAFF-R can signal to promote B-cell survival in the absence of Syk [J]. *The EMBO Journal*, 2015, 34(7): 925-39.
- [85] Ruella M, Korell F, Porazzi P, et al. Mechanisms of resistance to chimeric antigen receptor-T cells in haematological malignancies [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2023, 22(12): 976-95.
- [86] Zhao J, Song Y, Liu D. Clinical trials of dual-target CAR T cells, donor-derived CAR T cells, and universal CAR T cells for acute lymphoid leukemia [J]. *Journal of hematology & oncology*, 2019, 12(1): 17.
- [87] Zhang X, Zhang H, Lan H, et al. CAR-T cell therapy in multiple myeloma: Current limitations and potential strategies [J]. *Frontiers In Immunology*, 2023, 14: 1101495.
- [88] Xie B, Li Z, Zhou J, et al. Current Status and Perspectives of Dual-Targeting Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for the Treatment of Hematological Malignancies [J]. *Cancers*, 2022, 14(13).
- [89] Gardner R, Wu D, Cherian S, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy [J]. *Blood*, 2016, 127(20): 2406-10.
- [90] Park J H, Rivière I, Gonen M, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. *The New England journal of medicine*, 2018, 378(5): 449-59.
- [91] Wang X, Dong Z, Awuah D, et al. CD19/BAFF-R dual-targeted CAR T cells for the treatment of mixed antigen-negative variants of acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leukemia*, 2022, 36(4): 1015-24.
- [92] Guo X, Yan C, Li H, et al. Lipid-dependent conformational dynamics underlie the functional versatility of T-cell receptor [J]. *Cell Research*, 2017, 27(4): 505-25.
- [93] Malek T R. The biology of interleukin-2 [J]. *Annual Review of Immunology*, 2008, 26: 453-79.
- [94] Liao W, Lin J-X, Leonard W J. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy [J]. *Immunity*, 2013, 38(1): 13-25.
- [95] Aggarwal B B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(9): 745-56.

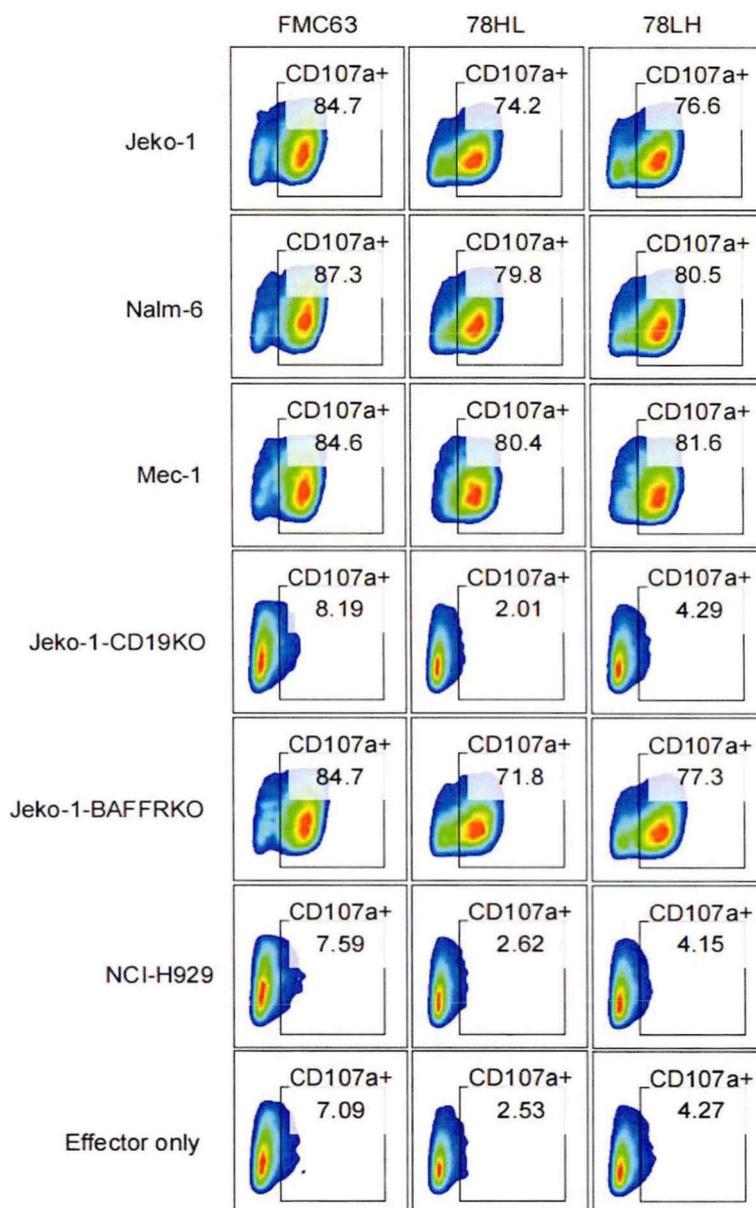
附 录

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
ACT	Adoptive cell therapy	过继细胞疗法
ALCL	Anaplastic large cell lymphoma	间变性大细胞淋巴瘤
ALL	Acute lymphoblastic leukemia	急性淋巴细胞白血病
BAFFR	B-cell activating factor receptor, TNFRSF13C	B淋巴细胞刺激因子受体
BCR	B-cell receptor	B细胞抗原受体
BLI	Bioluminescence imaging system	生物发光成像系统
CAR	Chimeric antigen receptor	嵌合抗原受体
CDR3	Complementarity-determining region3	互补决定区3
CLL	Chronic lymphoblastic leukemia	慢性淋巴细胞白血病
E:T	Effector-to-target	效靶比
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
HSA	Human Serum Albumin	人血白蛋白
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation	造血干细胞移植
HTRF	Homogeneous Time-Resolved Fluorescence	均相时间分辨荧光
ICIs	Immune checkpoint inhibitors	免疫检查点抑制剂
IFN- γ	Interferon-gamma	干扰素 γ
IL-2	Interleukin-2	白细胞介素-2

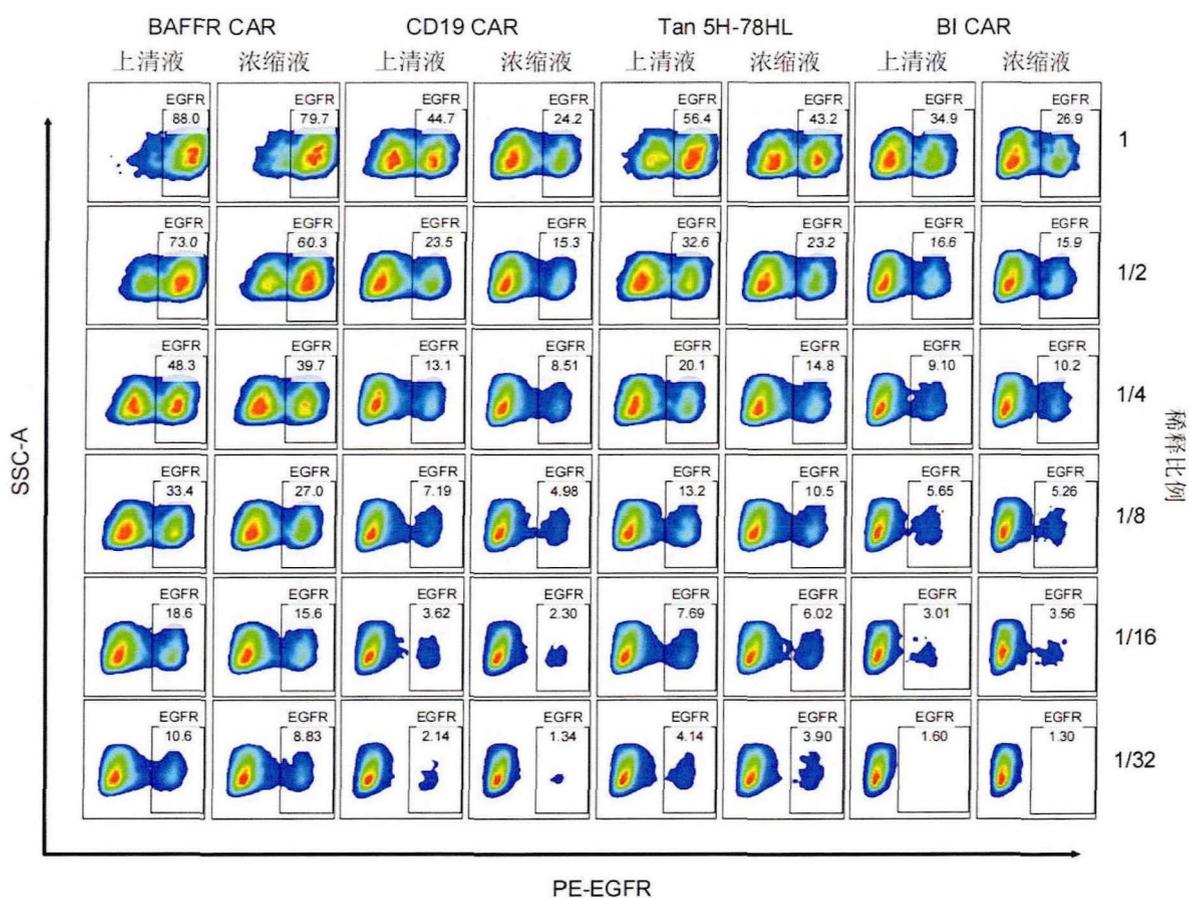
LAG3	Lymphocyte-Activation Gene 3	淋巴细胞活化基因-3
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
MM	Multiple myeloma	多发性骨髓瘤
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
NHL	Non-Hodgkin lymphoma	非霍奇金淋巴瘤
NLPHL	Nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma	结节性淋巴细胞为主型霍奇金淋巴瘤
ORR	Overall response rate	总体缓解率
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells	外周血单核细胞
PEI	Polyethyleneimine	聚乙烯亚胺
scFv	Single chain variable fragment	单链可变片段
SPF	Specific-pathogen-free	不含特定病原体
TIM3	T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3	T细胞免疫球蛋白粘蛋白-3
TM	Transmembrane domain	跨膜结构域
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha	肿瘤坏死因子 α
TRUCKs	T cells Redirected for Universal Cytokine Killing	重定向细胞因子杀伤T细胞
VH	Variable region of heavy chain	重链可变区
VHH	Single-variable domain on heavy chain, nanobody	单域可变重链片段, 纳米抗体
VL	Variable region of light chain	轻链可变区

补充图片



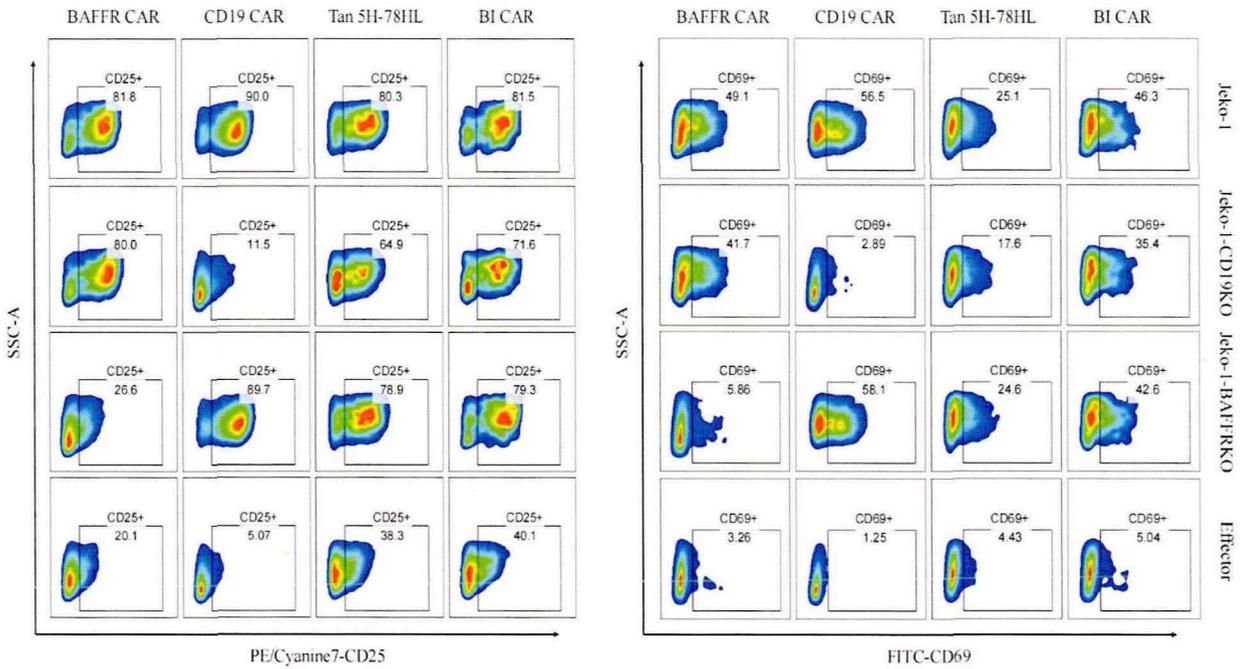
补充图 1 78HL、78LH 和 FMC63 三种 CAR-T 的 CD107a 比较的代表性流式图。

78scFv 两种不同构象的的 CAR-T 与 FMC63 构建的 CAR-T 在靶细胞刺激 4h 后相应 CD107a 的表达，图片展示三次实验中的一次实验结果作为代表（在 CD8+EGFR+CD107a+ 设门）。



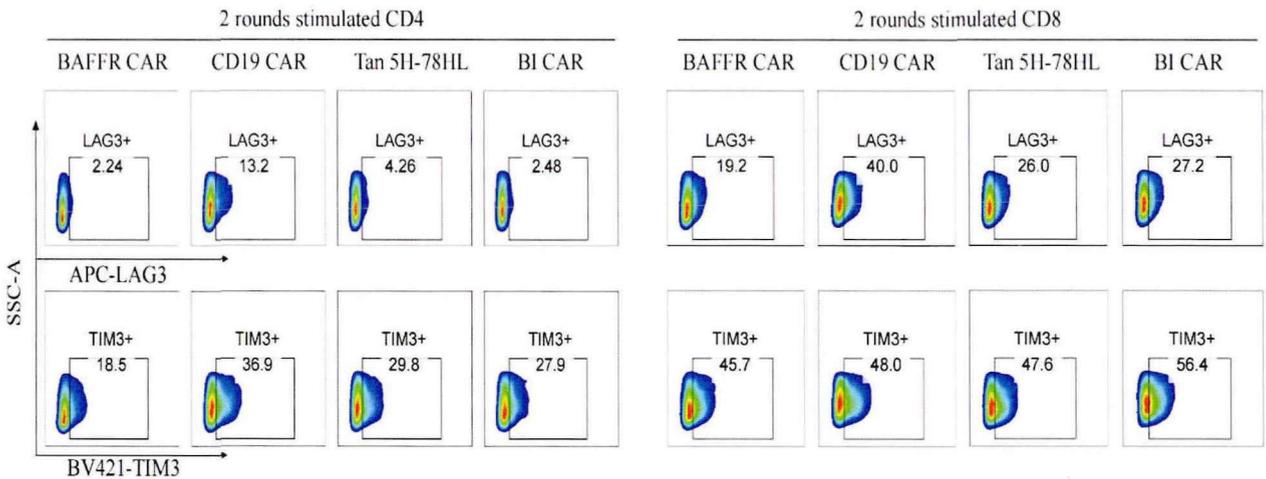
补充图 2 动物实验 CAR 慢病毒滴度测定结果。

该流式图展示了本研究中动物实验的4种CAR的慢病毒滴度测定结果，通过以稀释为不同浓度的慢病毒感染293T细胞48h后，测定293T细胞的转染效率，再通过公式来计算病毒滴度（滴度=阳性细胞数/病毒量）。



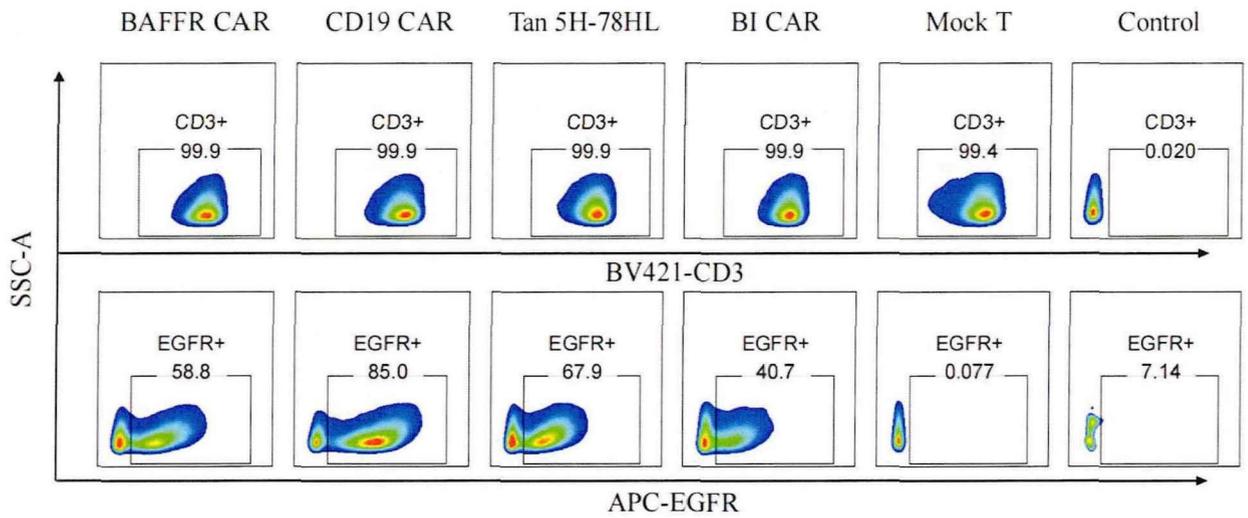
补充图 3 激活标志物 CD25 和 CD69 的代表性流式结果。

与Jeko-1、Jeko-1-CD19KO或Jeko-1-BAFFRKO细胞孵育24小时后，CAR-T细胞上T细胞活化标志物CD25和CD69表达的代表性流式图（在CD8+EGFR+CD25+/CD69+设门）。



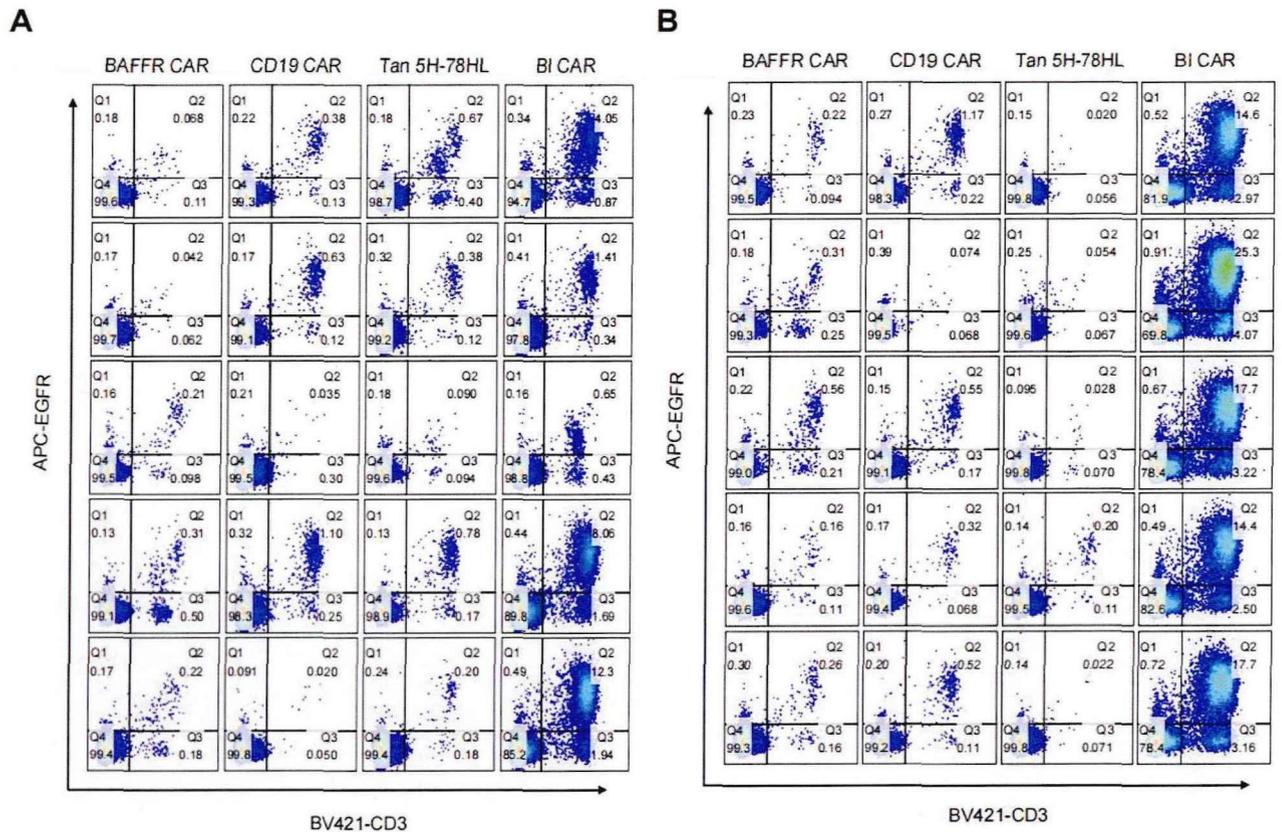
补充图 4 耗竭标志物 LAG3 和 TIM3 的代表性流式结果。

CAR-T细胞在用Jeko-1细胞反复刺激两轮后LAG-3和TIM-3表达水平的代表性的流式图（在CD4+/CD8+EGFR+LAG3+/TIM3+设门）。



补充图 5 CAR-T 细胞动物实验回输前转效测定。

转染第12天时，CAR-T细胞达到收获时机，此时对CAR-T细胞进行流式检测（在CD3+EGFR+设门）。



补充图 6 治疗组小鼠外周血 CAR+细胞的流式细胞术分析结果。

A. 第 31 天 Jeko-1 异种移植模型小鼠中外周血 CAR+细胞的流式散点图 (n=5)。在 CD3+ EGFRt+细胞上设门。B. 第 31 天 Jeko-1-CD19KO 和 Jeko-1-BAFFRKO 混合肿瘤移植模型小鼠外周血 CAR+细胞的流式散点图 (n=5)。在 CD3+ EGFRt+细胞上设门。