

抗 PD-L1 CAR 基因的构建及 CAR-T 的功能活性研究

白 静^{a,b},张洁雯^{a,b},施炜星^a,陈健^{a,b},吕正兵^{a,b}

(浙江理工大学,a.生命科学学院;b.浙江省家蚕生物反应器和生物医药重点实验室,杭州 310018)

摘 要: 鉴于嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cells, CAR-T)疗法应用于肿瘤治疗的临床试验已取得很大突破,设计了程序性死亡配体-1(programmed death ligand-1, PD-L1)特异性 CAR-T 细胞以体外杀伤肺癌细胞。通过克隆表达 PD-L1₍₇₃₋₇₃₉₎,并纯化 PD-L1 蛋白以免疫 BALB/c 小鼠制备获得 PD-L1 单克隆抗体;克隆 PD-L1 单克隆抗体单链可变区片段,与 CD28、4-1BB、CD3- ζ 链的基因体外融合构建第三代 CAR 基因,并克隆于慢病毒载体 pCDH-CMV-EF1-copGFP 上,包装成慢病毒。该慢病毒感染 CD8⁺ T 细胞,扩增 5 d,测定 CAR 的表达,表达率可达到 22% 以上。PD-L1 靶向的肿瘤细胞杀伤作用分析显示,抗 PD-L1 CAR-T 细胞有一定的体外杀伤活性。

关键词: 肺癌;程序性死亡配体-1;嵌合抗原受体;单克隆抗体;过继细胞治疗

中图分类号: Q28

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2017)06-0901-08

0 引 言

肿瘤,尤其是恶性肿瘤,是目前威胁人类生命健康的最主要疾病之一。其中肺癌已成为比较常见的恶性肿瘤。在我国,无论是肺癌的发病率还是死亡率均高居首位^[1]。随着科学技术的发展,肿瘤治疗的手段不断创新,免疫治疗已成为继手术、放疗、化疗后的第四种行之有效的治疗手段,而它的临床试验进展更令人瞩目,因此,肿瘤免疫治疗在 2013 年被《Science》杂志评为年度十大科学突破第一位^[2]。CAR-T 细胞治疗,是嵌合抗原受体(chimeric antigen receptors, CAR)修饰的 T 细胞治疗,是免疫治疗一个重要方面,该技术是通过基因修饰的手段,将患者的 T 细胞在体外修饰,活化和扩增后,再回输到患者体内^[3]。经过不断的研究与改进, CAR 基因已由第一代发展到第三代;第一代仅 CD3 复合物(ζ 链)胞内结构域融合形成嵌合受体^[4-5],第二代引入一个共刺激因子(如 CD28)^[6],第三代 CAR 又增加一个共刺激因子引入(如 CD134(OX40)、CD137(4-1BB))^[7]。Zhao 等^[8]通过应用 CD28 和

CD137 两个共刺激因子构建第三代 CAR,第三代 CAR-T 细胞展示出较强的杀肿瘤功能,并增强 T 细胞在体内作用的持久性。

PD-L1 分子,亦称 B7-H1、CD274^[9-10],是 PD-1 的主要配体,并在很多恶性肿瘤中高表达^[11-17],在免疫应答负调控中发挥重要作用。PD-1/PD-L1 信号通路的激活,有助于形成肿瘤微环境,使肿瘤细胞逃避机体的免疫监视和杀伤,而阻断该信号通路,可以促进肿瘤抗原特异性 T 细胞的增殖,发挥杀伤肿瘤细胞的作用^[18]。PD-1 单克隆抗体与 CAR-T 技术结合,在免疫缺陷小鼠体内进行试验,验证该联合疗法消除肿瘤的可行性^[19]。PD-L1 是 PD-1 的配体,PD-L1 单克隆抗体优势也比较明显,如特异性强,副作用低,肿瘤控制时间长等,它已成为治疗非小细胞肺癌(NSCLC)有效手段,并在临床试验中取得突破性进展^[20-22]。本文设想将 PD-L1 作为 CAR-T 治疗的靶抗原,抗 PD-L1 CAR-T 既能阻断 PD-1/PD-L1 信号通路,提高 T 细胞介导的肿瘤免疫治疗,又可以直接特异性地杀死肿瘤细胞,而且构建的第三代 CAR 基因可以增加 T 细胞在体内的存活时间,

收稿日期:2017-03-03 网络出版日期:2017-10-10

基金项目:国家高技术研究发展计划项目(2012ZX09102301-009);浙江省自然科学基金项目(13H090015)

作者简介:白 静(1990-),女,河北沧州人,硕士研究生,主要从事细胞免疫疗法方面的研究。

通信作者:吕正兵,E-mail:zhengbingl@126.com

增强 T 细胞的杀伤活性和持久性。本文提出把 PD-L1 作为 CAR-T 细胞的靶点,验证抗 PD-L1 CAR-T 细胞在体外对肿瘤细胞有杀伤活性,为后续的体内试验研究和临床试验提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌种 TG1、BL21(DE3),质粒 pcDNA3.1-*PD-L1*₍₇₃₋₇₃₉₎、pETduet-*His-SUMO*、pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP、pLP1、pLP2、pLP-VSVG,细胞株 293T、A549、NCL-H1048 及小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 均由本实验室提供;小鼠采用 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠(购于上海斯莱克实验动物有限责任公司);生物分子试剂非特殊说明均购于 Takara;蛋白 Marker(Thermo);Anti-His6 抗体(Roche);BCA 蛋白定量试剂盒(Biomiga);TMB 单组份显色液(Solarbio);弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、HAT、HT、四甲基联苯胺、PEG、8-N-鸟嘌呤均购于 Sigma;CD8⁺ T 细胞分选磁珠(Miltenyi);培养基 RPMI-1640、DMEM、FBS、IL-2,均购于 Gibco;Ficoll-Paque PREMIUM sterile solution(GE healthcare)、IFN- γ 检测试剂盒(Life technologies)。

1.2 pETduet-*His-SUMO-PD-L1*₍₇₃₋₇₃₉₎ 重组质粒的构建及 PD-L1 蛋白的表达与纯化

1.2.1 pETduet-*His-SUMO-PD-L1*₍₇₃₋₇₃₉₎ 重组质粒的构建

通过限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 对含有 pcDNA3.1-*PD-L1*₍₇₃₋₇₃₉₎ 基因的质粒和 pETduet-*His-SUMO* 载体分别进行双酶切获得 *PD-L1*₍₇₃₋₇₃₉₎ 基因片段和载体片段,采用凝胶回收试剂盒(Axygen)回收目的片段,通过 T₄ DNA Ligase 将回收的酶切产物于 16~24 °C 连接,并转化至大肠杆菌 TG1 感受态;转化菌液均匀涂布于含 Amp 的 LB 固体培养基上,37 °C 培养箱,倒置培养 10 h。挑选单斑菌落,继续扩大培养 10 h,提取重组质粒,双酶切鉴定获得 pETduet-*PD-L1*₍₇₃₋₇₃₉₎,并送至上海生工生物工程有限公司测序验证。

1.2.2 PD-L1 蛋白的表达与纯化

将 pETduet-*PD-L1*₍₇₃₋₇₃₉₎ 重组质粒转化到 BL21(DE3)感受态细胞中,1 mmol/L IPTG 诱导表达,使用蛋白割胶回收试剂盒(Sangon)纯化,SDS-PAGE 凝胶电泳检测目的蛋白,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 15%,电泳时间 1.5 h,考马斯亮蓝溶液染色 2.0 h,脱色至目的条带清晰后拍照记录。

随后利用 Western blotting 验证,将 SDS-PAGE 凝胶上的 PD-L1 蛋白转移到 PVDF 膜上,经脱脂奶粉封闭后,加入 1 : 5000 倍稀释的 Anti-His6,孵育 1.0 h,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,用化学发光检测系统采集图像。

1.3 PD-L1 单克隆抗体制备

1.3.1 动物免疫

实验方法参照文献[23-24]改进,1 mg/mL 的 PD-L1 纯化蛋白与等体积弗氏完全佐剂混匀免疫 BALB/c 雌性小鼠,每隔两周进行一次免疫,进行腹部或皮下注射,共免疫 4 次,一周后收集小鼠脾细胞。

1.3.2 细胞融合

将 1×10^6 个脾脏细胞和 1×10^5 的 SP2/0 细胞充分混合,在 1 mL 的 37 °C 预热 PEG 溶液(pH 值为 8.0~8.2)作用下融合 1 min,再加入 RPMI-1640 培养基终止 PEG 作用,1000 rpm 离心 3 min,重复洗涤两次,细胞接种密度调至 2.5×10^6 /mL,50 μ L/孔并接种到 96 孔细胞培养板中;37 °C,5% CO₂ 培养箱培养,4.0~6.0 h 后每孔加入 50 μ L $2 \times$ HAT 培养基培养^[23]。

1.3.3 杂交瘤细胞的筛选

细胞融合后生长 10 d 左右,检测克隆阳性孔,对阳性克隆的杂交瘤细胞经过三轮有限稀释法进一步筛选,获得 5 株杂交瘤细胞株,分别利用 PD-L1 蛋白和经过固定处理 NCL-H1048 细胞(高表达 PD-L1 蛋白)作为包被抗原,筛选获得一株最优杂交瘤细胞株^[25]。

1.3.4 腹水单克隆抗体制备与纯化

提前一周将 400 μ L 弗氏不完全佐剂注射到小鼠体内进行诱导,扩大培养杂交瘤细胞,调整细胞浓度 8×10^5 个/mL,取 1 mL 腹腔注射小鼠体内,一周后,收取腹水,8000 rpm 离心 10 min;ELISA 法确定单克隆抗体的亚型,二抗羊抗鼠分型二抗 1 : 5000 稀释使用,确定抗体亚型,选择 Protein G 填料(索莱宝)纯化抗体,ELISA 法检测抗体效价,Western blotting 技术鉴定。

1.4 PD-L1 特异性 CAR 基因的构建

通过 RNA 提取试剂盒(Roche)提取杂交瘤细胞总 RNA,采用 SMARTer® RACE 试剂盒(Clontech)合成第一链 cDNA,PCR 扩增获得单克隆抗体可变区轻链和重链编码序列(PCR 引物设计见表 1),目的产物纯化后,通过 *EcoR* I 和 *Not* I 限制性内切酶消化,克隆到载体 pcDNA3.1 上,阳性克隆送至苏州泓讯生物技术有限公司测序验证。

表 1 PCR 引物设计

基因名称	上游引物	下游引物
Anti-PD-L1 Light	ATGTCA GAATTCAAGCAGTGGTATCA ACGCAGAGTA	ACGTCA GCGGCCGCGTTAACTGCTC ACTGGATGGTGGGAAGAT
Anti-PD-L1 Heavy	ATGTCA GAATTCAAGCAGTGGTATCA ACGCAGAGTA	ATGTCA GCGGCCGCGCTCAGACTGCT CATTTGCAGGTACAGGA

注:表中下划线部分为 *EcoR* I 和 *Not* I。

将轻链(κ 链)编码区和重链恒定区的序列由人源 IgG 编码区轻链(κ 链)和重链恒定区序列替换,将人源化单克隆抗体基因与 CD28、4-1BB、CD3- ζ 链的基因序列组合。PD-L1 特异性 CAR 基因载体结

构设计如图 1 所示,产生编码嵌合抗原受体的 CAR 基因,由苏州泓讯生物技术有限公司合成,克隆到 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 载体上。

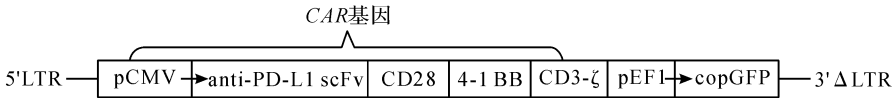


图 1 PD-L1 特异性 CAR 基因载体结构简图

注:pCMV 为 CMV 启动子;pEF1 为 EF1 启动子。

1.5 CAR-T 细胞的制备

使用脂质体 3000 将穿梭载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-CAR 与 pLP1、pLP2、pLP-VSVG 参照试剂盒(Invitrogen)共转染至 293T 细胞,流式细胞仪检测绿色荧光细胞百分比,转染后继续培养 72 h,收集上清液,PEG 法浓缩并纯化慢病毒,感染 293T 细胞进行滴度测定,滴度等于细胞数、感染率、稀释倍数的乘积,病毒浓缩液按 MOI 为 10 感染 CD8⁺ T 细胞,细胞培养基使用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基(IL-2 为 60 U/mL,IL-7 为 30 U/mL),培养 5 d 后,利用流式细胞仪检测 CAR 的表达率。

1.6 CAR-T 细胞的体外杀伤活性检测

ELISA 法检测毒性杀伤上清液中 IFN- γ 的分泌量:A549 细胞作为阴性对照细胞,NCL-H1048 细胞作为阳性靶细胞,实验组设计效靶细胞比为 1:1,每个反应孔各 100 μ L,细胞浓度 1×10^6 /mL,细胞板在 37 $^{\circ}$ C 孵育 10~20 h,1500 rpm 离心 4 min,检测毒性杀伤后上清液中 IFN- γ 的分泌量,可参照产品使用说明书。

1.7 实验数据统计分析

使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析。 $p < 0.05$ 表示具有统计学意义, $p < 0.001$ 表示存在极显著差异。

2 结果与分析

2.1 构建的 pETduet-PD-L1₍₇₃₋₇₃₉₎ 重组质粒进行双酶切鉴定

将连接产物转化 TG1,涂板,挑选 pETduet-

PD-L1₍₇₃₋₇₃₉₎ 单克隆菌落扩大培养后,提取质粒进行双酶切鉴定。将酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 2 所示。从图 2 中可以看出,目的条带大小与预期的一致,因此重组质粒 pETduet-PD-L1₍₇₃₋₇₃₉₎ 构建成功。

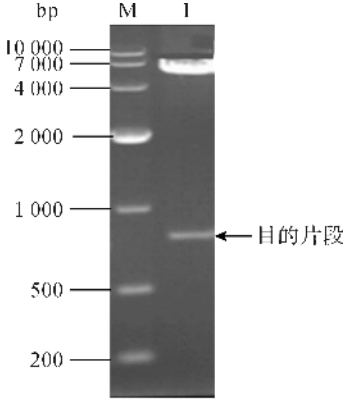


图 2 重组质粒的鉴定

注:M:DL10000,泳道 1:pETduet-PD-L1 的双酶切产物。

2.2 His-PD-L1 融合蛋白纯化产物的鉴定

收集扩大培养的 pETduet-PD-L1₍₇₃₋₇₃₉₎ 菌体,采用切胶回收的方法纯化 His-PD-L1 融合蛋白,并对回收产物进行 15% SDS-PAGE 凝胶电泳检测和 Western blotting 验证,结果如图 3 所示。从图 3 中可以看出,目的条带与预期相符。

2.3 杂交瘤细胞的筛选

免疫后小鼠,分离脾细胞,与小鼠骨髓瘤细胞经细胞融合技术获得杂交瘤细胞株,三轮有限稀释后,共得到五株稳定表达 PD-L1 单克隆抗体的细胞株,分别为 B10-8、B4-F3、B4-E1、B10-A4、A4-E6。ELISA

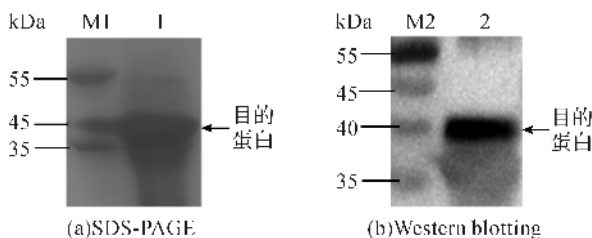


图3 PD-L1 割胶回收产物鉴定

注:图(a)中电泳凝胶检测 M1:26610 marker,泳道 1:割胶回收的蛋白纯化产物;图(b)中鉴定 M2:26616 marker,泳道 2:蛋白纯化产物。

检测,结果如图 4(a)中所示,B10-8 与 B4-F3 相对较高,其他三种也显示相对较高的水平;图 4(b)是利用高表达 PD-L1 的 NCL-H1048 细胞株进行处理作包被抗原,结果显示 B10-8 与 B10-A4 两株细胞株显示出较高的水平。综上所述,选择细胞株 B10-8 进行单克隆抗体腹水制备抗体。

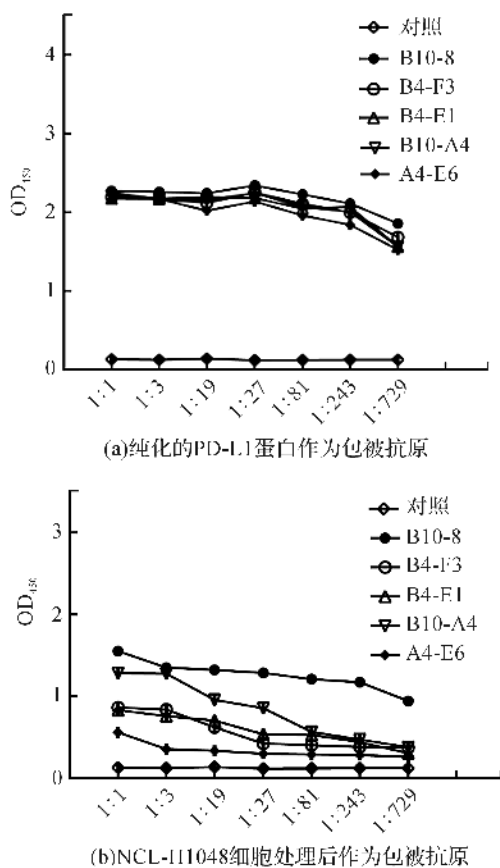


图4 杂交瘤细胞的筛选

2.4 单克隆抗体的制备与鉴定

将制备的杂交瘤细胞腹腔注射到小鼠体内,一周后获得腹水,将腹水按 1:200,1:1000,1:5000,1:10000,1:20000,1:60000,1:240000;用 PBS 等比例稀释后,测定抗体效价。结果如图 5 所示,B10-8 的效价可达到 1:240000。

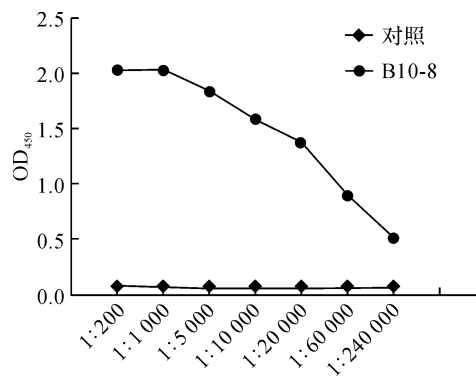


图5 PD-L1 单克隆抗体的腹水效价

利用 ELISA,检测杂交瘤细胞上清液中的抗体亚型,抗体使用羊抗鼠分型二抗,以及 1:5000 稀释的兔抗羊 HRP,酶标仪测定 $OD_{450\text{ nm}}$ 读数,结果如图 6 所示。细胞株所分泌的单克隆抗体 IgG2b 亚型,轻链为 κ 链,因此确定选用亲和层析填料 Protein G 纯化抗体。

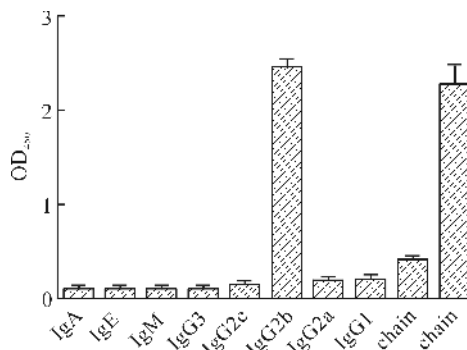
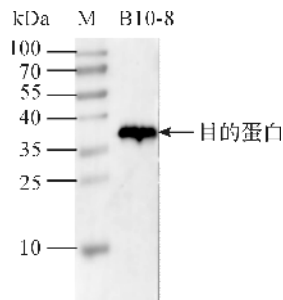


图6 B10-8 单克隆抗体的亚型分析

利用原核表达纯化的 PD-L1 蛋白与筛选得到的单克隆抗体腹水进行 Western blotting 鉴定。样品与 PBS 按 1:100 稀释,结果如图 7 所示,纯化后的单克隆抗体与 PD-L1 蛋白产生特异性反应,目的条带的显示位置与预期相符。

图7 PD-L1 单克隆抗体 Western blotting 鉴定
注:M:26616 marker;泳道 1:B10-8 单克隆抗体纯化产物。

2.5 病毒包装与滴度测定

将慢病毒质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-CAR 与 PLP1、PLP2、PLP-VSVG 四种质粒转染至

293T细胞,培养3 d后,收集细胞并通过流式细胞仪测定绿色荧光细胞百分比,293T细胞的病毒感染率如图8所示。从图8中可以看出,可达到95.66%(R₂区域所示),携带目的基因的穿梭载体对293T细胞的转染率每板均能达到90%以上,四质粒转染293T细胞,满足慢病毒包装前提。

收集含有病毒上清液100 mL,经PEG8000浓缩后得到病毒浓缩液300 μ L,取适量病毒浓缩液,梯度稀释至10倍、100倍、1000倍、2000倍用于感染293T细胞,未感染的293T细胞作为空白对照,用于感染CD8⁺T细胞。病毒浓缩液稀释10倍的感染率为88%,稀释100倍感染率为75.88%,稀释

1000倍感染率为40.53%,稀释2000倍感染率为26.45%(图9)。浓缩后病毒滴度约为 5×10^7 TU/mL。

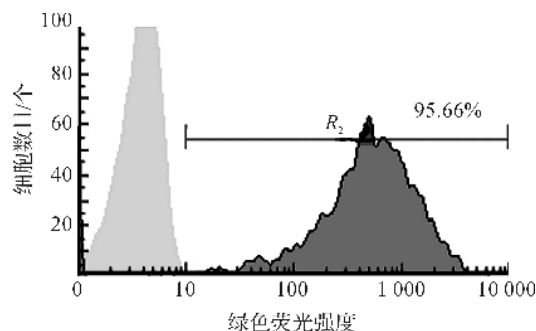
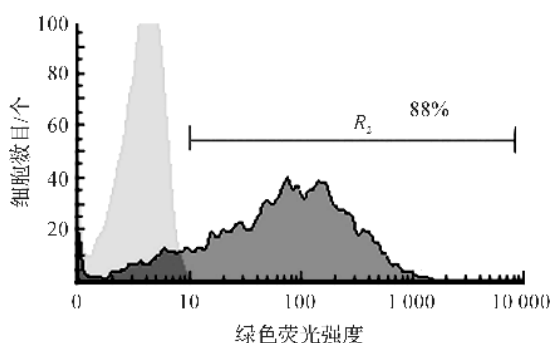
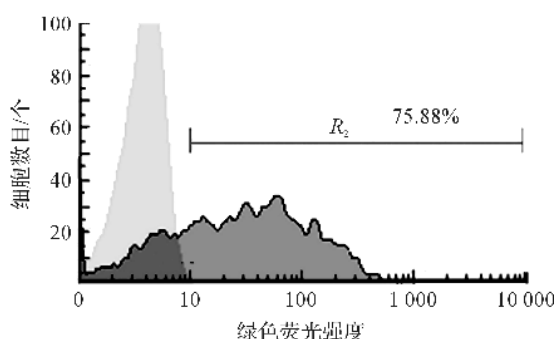


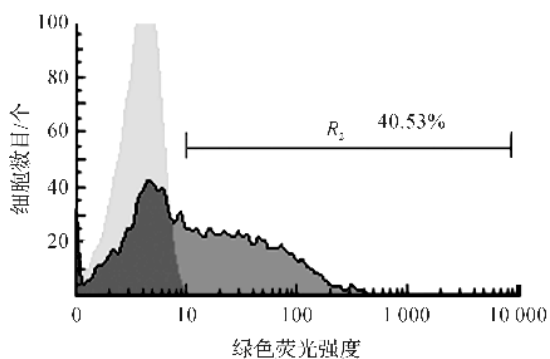
图8 293T细胞的病毒感染率



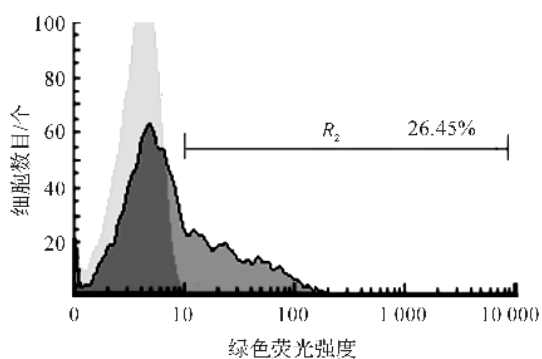
(a)病毒浓缩液稀释10倍



(b)病毒浓缩液稀释100倍



(c)病毒浓缩液稀释1000倍



(d)病毒浓缩液稀释2000倍

图9 梯度稀释病毒浓缩液对293T细胞的感染率

2.6 慢病毒感染T细胞CAR的表达率

选取数目为 0.5×10^6 个CD8⁺T细胞,作为初始细胞进行激活诱导,诱导1~2 d后,加入病毒浓缩液感染,4 d后,测定感染率结果表明:表达率达到22%,随着T细胞的不断扩增,培养20 d后,CAR的表达率仅达到不足10%,分析原因,可能为未感染病毒T细胞扩增速度较快,CAR-T细胞扩增速度相对将慢,因此表达率有所降低。感染20 d后,对照组细胞扩增近50倍,实验组细胞扩增不足40倍,原因可能是在加入病毒感染后,病毒以及病毒液中混着的蛋白杂质对T细胞的有影响,且在细胞培养过程中,尤

其在病毒感染4 d后,换液处理时观察到CAR-T实验组细胞有不同程度细胞死亡裂解存在。

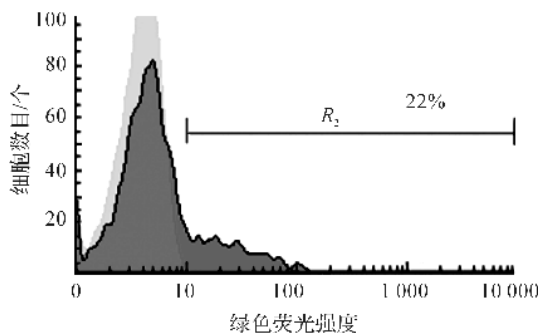


图10 CAR的表达率

2.7 CAR-T 细胞体外毒性检测

通过 ELISA 检测靶细胞上清液的 IFN- γ 的分泌量,分泌量越大,证明 CAR-T 细胞杀伤靶细胞作用越明显。IFN- γ 的分泌量如图 11 所示,从图中可以看出,在各组靶细胞的杀伤过程中释放的 IFN- γ 量有着很大的差距,其中以 CAR-T 细胞对 NCL-H1048 细胞的杀伤中分泌的 IFN- γ 量最大,证明杀伤力最强;CAR-T 对 A549 细胞显示一定杀伤活性,而 T 细胞对于两种靶细胞显示极微弱的杀伤活性,实验组与对照组相比,两者的杀伤活性差异极其显著。

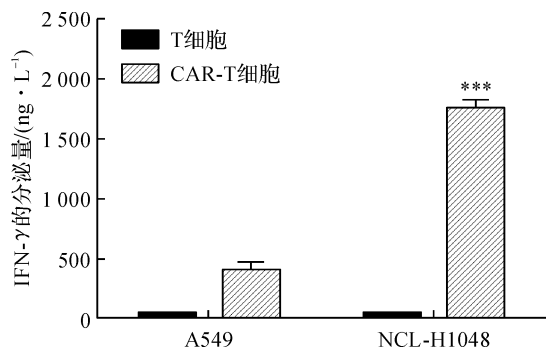


图 11 IFN- γ 的分泌量

注:***, $p < 0.001$ 。

3 讨 论

在肿瘤的免疫治疗中,解决肿瘤微环境免疫抑制的难题也越来越引起关注,目前,阻断 PD-1/PD-L1 途径的疗法已成为重要的手段,并取得一定的进展,PD-L1 单克隆抗体在临床试验中治疗效果明显,在 NSCLC 的治疗中表现出良好的耐受性,对 PD-L1 阳性病患治疗效果更显著^[21,26]。经大量研究和临床数据显示,现阶段,PD-L1 仍为 PD-1/PD-L1 通路阻断剂类药物最有前景的生物标志物之一。本文制备了 PD-L1 单克隆抗体,制备单克隆抗体的抗原选择多样,本文利用原核表达系统表达 PD-L1 蛋白作为免疫原,为提高融合蛋白的水溶性及表达量,促进靶蛋白正确折叠等,在表达载体 pETduet 上插入了 SUMO 标签^[27-28],获得质量相对高的 PD-L1 蛋白。免疫小鼠后,利用细胞融合技术,融合小鼠 B 淋巴细胞和骨髓瘤细胞,经克隆、筛选获得 1 株持续、稳定分泌特异性抗人 PD-L1 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 B10-8,腹水纯化抗体效价达 1:240000,亚型分析属 IgG2b,轻链为 κ 链,并证实单克隆抗体与高表达 PD-L1 蛋白的肺癌细胞 NCL-H1048 有较强的亲和力。然而,随着临床应用的发展,鼠源单抗用于人体治疗容易被人类免疫系统所识别,产生人抗鼠抗体反应^[29],因此,本文将单克隆抗体的基因片段在

保留对特异抗原表位高亲和力的基础上实现了人源化的改造,减少异源抗体的免疫原性,有效解决传统杂交瘤技术所存在的问题。

随着免疫治疗策略的推进,大量研究表明,联合疗法策略的开展为机体的抗肿瘤反应获得更好的疗效^[30-32]。本文将 PD-L1 单克隆抗体免疫检查点抑制剂技术与 CAR-T 疗法结合,应用于肺癌的治疗,构建了 PD-L1 特异性的 CAR 基因,以 CAR 修饰 T 细胞增强了 T 细胞的靶向性、杀伤性和持久性。该基因中包含 CD28 和 CD137 共刺激因子结构域,在肿瘤微环境中,激活 T 细胞的免疫反应,CD28 可以使 T 细胞产生耐受,CD137 可有效增强 T 细胞的增殖,进一步提高 T 细胞的增殖活性、细胞毒性和存活时间等^[7,33]。CAR-T 细胞的制备过程中,需要将抗体序列及 T 细胞受体信号途径的编码分子相关的序列导入至 T 细胞中,目前用于临床试验导入外源基因的方式大致有逆转录病毒、慢病毒、mRNA 电转入等方式。逆转录病毒感染的主要是分裂期细胞,对于非分裂细胞感染能力极弱。在此基础上发展出的慢病毒,则对分裂和非分裂细胞均具有较好的感染能力,采用传统直接转染的方式难以将外源基因导入至 T 淋巴细胞中,因此绝大部分 CAR-T 细胞制备时,采用的慢病毒系统^[34]。本文选用慢病毒质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP,转染效率达到 95.66%,转染效率很高。包装后获得慢病毒,感染 T 细胞效率达到 22%,感染效率较低,在以后的研究中,应对此改进,提高 CAR 靶点的密度。CD8⁺ T 细胞,主要分泌 IFN- γ 等细胞因子,调节免疫功能,使 T 细胞分化成细胞毒性的 T 细胞,经过 ELISA 检测靶细胞上清液的 IFN- γ 的分泌量,结果显示 CAR-T 细胞对 NCL-H1048 细胞杀伤活性最强,与对照组相比,杀伤作用明显,进而说明,PD-L1 特异性的 CAR-T 细胞对 PD-L1 高表达的肿瘤细胞具有更强的杀伤力。

CAR-T 疗法是当前过继性淋巴细胞回输治疗最新的免疫技术,该技术受到广泛的关注和研究,并从基础免疫研究发展为临床应用,有望成为彻底治愈癌症的免疫新疗法。本文选择 PD-L1 作为 CAR-T 细胞靶点可能会产生脱靶效应,因为 PD-L1 虽在肿瘤组织上高表达,但在一些正常组织上也有表达,存在 T 细胞在体内攻击正常组织的忧患。但随着 CAR-T 研究的深入和技术的改进,比如控制回输 CAR-T 细胞的数量,引进自杀基因,或在 PD-L1 CAR 基因上引进另一种肿瘤抗原基因形成特异性更强、无脱靶效应的双头 CAR-T 等^[35-36],PD-L1

CAR-T细胞可能的副作用可以被控制或减少。本文制备PD-L1特异性的CAR-T细胞,可有效识别并杀伤肺癌细胞,为CAR-T细胞疗法提供了很好的细胞模型,但尚需进一步在动物模型中得到验证,为肿瘤的治疗提供一种更有效的CAR-T细胞。

4 结 论

本文首先制备PD-L1单克隆抗体,运用基因改造技术合成PD-L1特异性的第三代CAR基因,并制备PD-L1特异性的CAR-T细胞。PD-L1靶向的肿瘤细胞杀伤作用分析显示,该CAR-T细胞能够有效地识别并杀伤表达PD-L1蛋白的NCL-H1048肺癌细胞,为下一步构建肺癌实体瘤小鼠模型进行体内杀伤实验奠定研究基础。

参考文献:

- [1] 林城,陈雄,刘静南,等. PD-1/PD-L1信号通路在非小细胞肺癌免疫逃逸及其治疗中的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2014(10):734-740.
- [2] COUZIN F J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy[J]. Science, 2013, 342(6165): 1432-1433.
- [3] KALOS M, JUNE C H. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology[J]. Immunity, 2013, 39(1):49-60.
- [4] ESHHAR Z, WAKS T, GROSS G, et al. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993, 90(2):720-724.
- [5] HEUSER C, HOMBACH A, LOSCH C, et al. T-cell activation by recombinant immunoreceptors: impact of the intracellular signalling domain on the stability of receptor expression and antigen-specific activation of grafted T cells[J]. Gene Therapy, 2003, 10(17):1408-1419.
- [6] LIPOWSKA B G, GILHAM D E, HAWKINS R E, et al. Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges [J]. Cancer Immunology, Immunotherapy: CII, 2012, 61(7):953-962.
- [7] PAK T S, ROSENBERG S A, MORGAN R A. Treating cancer with genetically engineered T cells[J]. Trends in Biotechnology, 2011, 29(11):550-557.
- [8] ZHAO Z, CONDOMINES M, STEGEN S J, et al. Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells[J]. Cancer Cell, 2015, 28(4):415-428.
- [9] DONG H, ZHU G, TAMADA K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion [J]. Nature Medicine, 1999, 5(12):1365-1369.
- [10] FREEMAN G J, LONG A J, IWAI Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2000, 192(7):1027-1034.
- [11] VELCHETI V, SCHALPER K A, CAVAJAL D E, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer [J]. Laboratory Investigation, 2014, 94(1):107-116.
- [12] BOLAND J M, KWON E D, HARRINGTON S M, et al. Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung [J]. Clinical Lung Cancer, 2013, 14(2):157-163.
- [13] SPRANGER S, SPAAPEN R M, ZHA Y, et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T (regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8 (+) T cells[J]. Science Translational Medicine, 2013, 5(200):200ra116.
- [14] THOMPSON R H, KUNTZ S M, LEIBOVICH B C, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up[J]. Cancer Research, 2006, 66(7):3381-3385.
- [15] SFANOS K S, BRUNO T C, MEEKER A K, et al. Human prostate-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are oligoclonal and PD-1⁺ [J]. The Prostate, 2009, 69(15):1694-1703.
- [16] SOLIMAN H, KHALIL F, ANTONIA S. PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells[J]. PloS One, 2014, 9(2):e88557.
- [17] LIU Y, CARLSSON R, AMBJORN M, et al. PD-L1 expression by neurons nearby tumors indicates better prognosis in glioblastoma patients[J]. The Journal of Neuroscience, 2013, 33(35):14231-14245.
- [18] ZOU W, CHEN L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment [J]. Nature Reviews Immunology, 2008, 8(6):467-477.
- [19] JONH L B, KERSHAW M H, DARCY P K. Blockade of PD-1 immunosuppression boosts CAR T-cell therapy [J]. Oncoimmunology, 2013, 2(10):e26286.
- [20] TOPALIAN S L, HODI F S, BRAHMER J R, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer[J]. The New England Journal of Medicine, 2012, 366(26):2443-2454.
- [21] BRAHMER J R, TYKODI S S, CHOW L Q, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer[J]. The New England Journal of Medicine, 2012, 366(26):2455-2465.
- [22] HAMID O, CARVAJAL R D. Anti-programmed

- death-1 and anti-programmed death-ligand 1 antibodies in cancer therapy[J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2013, 13(6): 847-861.
- [23] SAKATA R, SHOYAMA Y, MURAKAMI H. Production of monoclonal antibodies and enzyme immunoassay for typical adenylate cyclase activator, Forskolin[J]. Cytotechnology, 1994, 16(2): 101-108.
- [24] SHELVER W L, SMITH D J, BERRY E S. Production and characterization of a monoclonal antibody against the beta-adrenergic agonist ractopamine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(9): 4020-4026.
- [25] LI S, WEI Z, CHEN J, et al. Oral administration of a fusion protein between the cholera toxin B subunit and the 42-amino acid isoform of amyloid-beta peptide produced in silkworm pupae protects against Alzheimer's disease in mice[J]. PloS One, 2014, 9(12): e113585.
- [26] BOYERINAS B, JOCHEMS C, FANTINI M, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity activity of a novel anti-PD-L1 antibody avelumab (MSB0010718C) on human tumor Cells [J]. Cancer Immunology Research, 2015, 3(10): 1148-1157.
- [27] BUTT T R, EDAVETAL S C, HLL J P, et al. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 43(1): 1-9.
- [28] MALAKHOV M P, MATTERN M R, MALAKHOVA O V, et al. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins[J]. Journal of Structural and Functional Genomics, 2004, 5(1-2): 75-86.
- [29] WEINER L M. Fully human therapeutic monoclonal antibodies[J]. Journal of Immunotherapy, 2006, 29(1): 1-9.
- [30] SAGIV B I, KOHRT H E, CZERWINSKI D K, et al. Therapeutic antitumor immunity by checkpoint blockade is enhanced by ibrutinib, an inhibitor of both BTK and ITK [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(9): E966-972.
- [31] UEHA S, YOKOCHI S, ISHIWATA Y, et al. Robust antitumor effects of combined anti-CD4-depleting antibody and anti-PD-1/PD-L1 immune checkpoint antibody treatment in mice [J]. Cancer Immunology Research, 2015, 3(6): 631-640.
- [32] PARDOLL D M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy[J]. Nature Reviews Cancer, 2012, 12(4): 252-264.
- [33] JENSEN M C, RIDDELL S R. Designing chimeric antigen receptors to effectively and safely target tumors [J]. Current Opinion in Immunology, 2015, 33: 9-15.
- [34] HOYOS V, SAVOLDO B, DOTTI G. Genetic modification of human T lymphocytes for the treatment of hematologic malignancies[J]. Haematologica, 2012, 97(11): 1622-1631.
- [35] GRICO R, OLIVEIRA G, STANGHELLINI M T, et al. Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene[J]. Frontiers in Pharmacology, 2015, 6: 95.
- [36] CARTELLIERI M, FELDMANN A, KORISTKA S, et al. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts[J]. Blood Cancer Journal, 2016, 6(8): e458.

Construction of *PD-L1* CAR Gene and Research of Functional Activity of CAR T-Cells

BAI Jing^{a,b}, ZHANG Jiewen^{a,b}, SHI Weixing^a, CHEN Jian^{a,b}, LÜ Zhengbing^{a,b}

(a. College of Life Science; b. Key Laboratory of Silkworm Bioreactor and Biomedicine of Zhejiang Province, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: In view of that great breakthrough has made in clinical experiment of applying Chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) therapy, programmed death ligand-1 (PD-L1) specific CAR-T cells were designed to realize killing lung cancer cells in vitro. PD-L1 monoclonal antibody was obtained by cloning and expression of *PD-L1*₍₇₃₋₇₃₉₎ and purifying PD-L1 protein with immune BALA/c mice; the variable region fragmentation of PD-L1 monoclonal antibody was cloned, fused with genes of *CD28*, *4-1 BB* and *CD3-ζ* chains to construct the third generation of CAR gene, and cloned onto lentiviral vector pCDH-CMV-EF1-copGFP to package as lentivirus. The lentivirus was infected with CD8⁺ T cells, amplified for 5 days, and determined CAR expression (the expression rate can reach up to 22%). The analysis of the function of PD-L1 target of killing tumor cells showed that anti-PD-L1 CAR-T cells are of certain in vitro cytotoxicity.

Key words: lung cancer; PD-L1; CAR; monoclonal antibody; adoptive cell therapy

(责任编辑: 唐志荣)