

雷帕霉素对CAR-T细胞功能的影响

毛娟^{1,2} 张月琴³ 刘琴³ 刘洋³ 李华^{2*}¹川北医学院, 南充 637007; ²西部战区总医院, 成都 610083; ³成都医学院, 成都 610500

摘要 为探索雷帕霉素对CAR-T细胞体外杀伤靶细胞、杀伤后的扩增及细胞因子分泌能力的影响, 该研究在体外使用靶向CD19的CAR-T细胞与CD19⁺CD22⁺ Raji靶细胞的T细胞特异性杀伤模型, 在不同效靶比、不同时相点、不同雷帕霉素浓度下, 通过流式细胞绝对计数检测细胞杀伤率, 发现雷帕霉素不影响CAR-T细胞对靶细胞的杀伤能力。通过羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)检测CAR-T细胞扩增能力, 发现雷帕霉素通过抑制CAR-T细胞增殖而非促进凋亡的方式降低其活化后的扩增数量。通过流式细胞术微球阵列法(CBA)检测细胞因子分泌情况, 发现雷帕霉素可显著性降低CAR-T细胞被靶细胞活化后的细胞因子分泌水平。综上所述, 雷帕霉素可在不影响CAR-T细胞杀伤功能的前提下, 降低其炎症因子分泌水平。

关键词 嵌合抗原受体T细胞; 雷帕霉素; 细胞因子释放综合征

Effects of Rapamycin on the Function of CAR-T cells

MAO Juan^{1,2}, ZHANG Yueqin³, LIU Qin³, LIU Yang³, LI Hua^{2*}¹North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, China; ²the General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610083, China; ³Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

Abstract To investigate the effects of rapamycin on the specific killing of CAR-T (chimeric antigen receptor T) cells, the expansion and cytokine secretion of CAR-T cells *in vitro*. This study used a T cell specific killing model in which the effect cells were the CAR-T targeting CD19 and the target cells were CD19⁺CD22⁺ Raji cells. Under different effect-target ratio with various rapamycin concentration at various drug administration time, the specific killing rates of CAR-T were detected by flow cytometry absolute count and it was found that rapamycin did not affect the killing ability of CAR-T cells. Using CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) to detect the expansion ability of CAR-T cells, it was found that rapamycin could slow down the increase rate of CAR-T cells number by inhibiting their proliferation rather than promoting apoptosis. Using flow cytometry CBA (cytometric bead array) to detect cytokine secretion, it was found that rapamycin could significantly inhibited cytokines secretion level of CAR-T cells after activation by target cells. In summary, rapamycin can reduce the secretion level of inflammatory cytokines without affecting the killing function of CAR-T cells.

Keywords CAR-T; rapamycin; cytokine release syndrome

嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T, CAR-T)细胞治疗是目前重要的肿瘤免疫治疗方法之一。研究者利用CD8⁺ T细胞活化后分化为细胞

毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的特性, 通过基因修饰技术将人工设计的嵌合抗原受体CAR跨膜蛋白“装备”到CD8⁺T细胞上。表达跨膜蛋

收稿日期: 2023-02-18

接受日期: 2023-03-27

四川省科技厅应用基础研究项目(批准号: 19YYJC0242)和国家自然科学基金(批准号: 31900643)资助的课题

*通讯作者。Tel: 17311079545, E-mail: 1749775313@qq.com

Received: February 18, 2023 Accepted: March 27, 2023

This work was supported by the Applied Basic Research Project of Science and Technology Department of Sichuan Province (Grant No.19YYJC0242) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31900643)

*Corresponding author. Tel: +86-17311079545, E-mail: 1749775313@qq.com

白CAR的T细胞被称为CAR-T细胞。CAR分子胞外区部分是单链抗体结构,可特异性与靶抗原结合,CAR分子胞内区含CD3链和共刺激分子胞内区部分,CAR分子的存在使T细胞与靶抗原特异性结合后可直接被活化,进而发挥细胞毒作用,从而达到高效清除靶细胞的目的^[1]。由于CAR-T细胞的活化无需MHC限制与第二刺激信号的参与,因此T细胞特异性杀伤肿瘤细胞变得高效便捷,在血液肿瘤治疗及实体瘤的治疗研究中取得了令人瞩目的疗效。现已有8款CAR-T细胞产品上市,主要用于治疗血液系统肿瘤^[2-4]。与传统治疗相比,CAR-T疗法有较高的缓解率^[5],2021年初上市的Breyanzi在复发/难治性弥漫大B细胞淋巴瘤(relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma, r/r DLBCL)的治疗中获得了73%的客观缓解率(objective response rate, ORR)以及53%的完全缓解率(complete remission, CR)^[6]。然而,CAR-T细胞治疗在给患者带来较高缓解率的同时,也伴随着不良反应,后者严重时甚至危及患者生命^[2,7]。因此,临床上使用CAR-T细胞进行治疗时,如何降低毒副反应是最为关注的亟待解决的重要问题。

细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)是CAR-T细胞治疗中最常见的不良反应之一^[8]。CRS发生机制主要是因为CAR-T细胞被肿瘤细胞刺激活化后分泌炎症因子,后者触发巨噬细胞等天然免疫细胞分泌大量炎症因子,引发CRS^[9-11]。因此,《嵌合抗原受体T细胞疗法的免疫相关不良事件管理:ASCO指南》推荐使用抗白细胞介素6(anti-interleukin-6, anti-IL-6)的托珠单抗、地塞米松及甲基强的松龙激素用于临床治疗CRS^[12]。但托珠单抗较为昂贵,且对中重度CRS抑制效果有限;激素对CAR-T细胞有抑制作用,虽能降低CRS反应能力但同时也影响了CAR-T细胞抗肿瘤效力,因此,探寻既能不影响CAR-T抗肿瘤作用又能降低CRS反应能力的药物是目前正在积极开展的工作^[11,13-14],其中列齐单抗^[14]和芦可替尼^[15]处于实验室研究阶段,阿那滞白素^[16](临床注册号:NCT04359784)、司妥昔单抗^[17](临床注册号:NCT04975555)正处于临床研究阶段。此外,有研究筛选了52种FDA批准的激酶抑制剂对外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)在CD3-CD22双抗存在情况下抗肿瘤细胞作用的影响,发现mTOR抑制剂雷帕霉素、替西罗莫司和依维莫司可降低PBMCs上清的细胞因子水平,

但不影响外周血T细胞的肿瘤杀伤能力^[18]。

本研究进一步以CD19-CAR-T细胞为研究对象,在CAR-T细胞杀伤CD19⁺肿瘤细胞的模型中,探究雷帕霉素对CAR-T细胞的杀伤能力和杀伤肿瘤细胞后的CAR-T细胞持续扩增能力,以及细胞因子分泌水平的影响,以期为临床CAR-T治疗时控制CRS提供更好的药物选择。

1 材料与方法

1.1 细胞

人脐带血T细胞来自成都医学院第一附属医院产妇捐赠的健康新生儿脐带静脉血(伦理批号为2018CYFYHEC-047-02);Raji(人Burkitt's淋巴瘤细胞)、293T(人肾上皮细胞系)购于中国科学院细胞库。

1.2 主要试剂

Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28购自Gibco公司;细胞因子白介素-2(interleukin-2, IL-2)、IL-7、IL-15购自北京百普赛斯生物科技有限公司;PerCP/Cy5.5 anti-human CD8、Alexa Fluor[®]700 anti-human CD4、Brilliant Violet 711 anti-human CD3、APC anti-human CD19购自Biolegend公司;PE-Labeled Human CD19购自Acro公司;PE/Cy7 anti-human IL-2、APC anti-human IFN- γ 、PE/D594 anti-human GM-CSF购自Thermo Fisher Scientific公司;CD4、CD8磁珠及Vario MACS磁珠分选系统、分离柱(LS Column)均购自Miltenyi Biotec公司;Cell-Trace[™]细胞增殖试剂盒购自Thermo Fisher Scientific公司;雷帕霉素购自美国MCE公司;PI+Annvix细胞凋亡试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;CBA试剂盒购自BD公司。

1.3 人脐带血T细胞的分离

采用Lymphoprep淋巴分离液分离脐带血中的单个核细胞(cord blood mononuclear cell, CBMC),按MACS说明书用CD4及CD8磁珠分离出脐血T细胞。

1.4 细胞培养

分离的T细胞用含200 IU/mL IL-2、5 ng/mL IL-7、5 ng/mL IL-15的RPMI-1640完全培养液培养;Raji细胞用RPMI-1640完全培养液培养;293T细胞用含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM培养液培养。

1.5 慢病毒包装

pLVX-CMV-CAR19为本课题组前期构建保存,

其构建方法参见2011年SONG等^[19]及KALOS等^[20]发表的文献。采用Lipofectamine 3000试剂盒制备转染体系, P3000与pLP1、pLP2、pLP-VSVG以及pLVX-CMV-CAR19四种质粒混合后再与Lipofectamine 3000混匀, 加入适量Opti-MEM, 室温孵育15~20 min。将混合液与293T细胞混匀, 37 °C孵箱培养, 48 h后1 000 ×g离心10 min, 收集上清液。0.45 μm过滤器过滤上清液, 去除细胞碎片, 再利用超滤管浓缩慢病毒上清液。

1.6 CAR-T细胞制备

T细胞与Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28混合, 37 °C孵箱培养24 h。按特定感染复数(multiplicity of infection, MOI)加入慢病毒感染, 96 h后流式细胞术检测T细胞的CAR阳性率。CAR分子为经典的第2代CAR分子结构: 胞外区为抗CD19的单链抗体, 铰链区和跨膜区为CD8分子跨膜区, 胞内区为CD3和4-1BB胞内区部分^[21]。所获得的CAR-T细胞冻存于液氮中备用。

1.7 流式检测CAR-T细胞杀伤实验中效应细胞与靶细胞存活数量的变化

CAR-T细胞的体外特异性杀伤实验: 效应细胞为CD19.CAR-T, 靶细胞为CD19⁺CD22⁺Raji细胞, 单独Raji细胞培养孔为空白组, CD19.CAR-T与Raji细胞共培养孔为实验组, 设不同效靶比(E:T=CD8⁺CD19.CAR-T:Raji=1:3、1:9、1:27)实验组于37 °C、5% CO₂培养箱中共培养, 分别于18 h、72 h取每孔细胞悬液, CD22-PE Cy5抗体染色, 用流式绝对计数法检测各孔中剩余的靶细胞数量, 再通过以下公式计算不同效靶比下的杀伤率: 杀伤率(%)=[(空白组靶细胞数-实验组靶细胞数)/空白组靶细胞数]×100%。CAR-T细胞与靶细胞混合时刻记为0 h。在此特异性杀伤模型基础上, 分别考察了不同因素对CAR-T杀伤能力的影响, 包括-0.5 h雷帕霉素加入的不同浓度(810 ng/mL的3倍稀释系列浓度)和雷帕霉素加入的不同时相点(CAR-T与靶细胞混合时刻记为0, 则考察了-0.5 h、-6 h、-12 h、-24 h、0 h、24 h、48 h)。

在-0.5 h雷帕霉素组1:3效靶比的杀伤模型上, 于72 h(3天)、144 h(6天)利用抗CD4、抗CD8和抗CAR19荧光抗体染色, 检测杀伤过程中CAR-T细胞数。此外, 在1:3效靶比的杀伤模型下, 10 ng/mL雷帕霉素分别于不同时刻, -0.5、0、24、48、72 h加入到CAR-T细胞与靶细胞共培养模型中, 于第3天、

第6天流式检测CAR-T细胞数。

1.8 CFSE法检测CAR-T细胞的扩增

将CFSE标记的CAR-T细胞铺板, 于-0.5 h加入10 ng/mL或100 ng/mL雷帕霉素, 以1:3效靶比共培养72 h, 流式检测带CFSE荧光的CAR-T细胞数。无雷帕霉素无Raji组CFSE荧光值为阴性对照; 无雷帕霉素有Raji组CFSE荧光值为阳性对照; 有雷帕霉素有Raji组为实验组。

1.9 PI+Annvix流式检测CAR-T细胞的凋亡情况

于-0.5 h加入10 ng/mL或100 ng/mL雷帕霉素, 以1:3效靶比共培养, 18 h取细胞悬液, PI+Annvix双染, 流式检测凋亡与死亡细胞比例。

1.10 流式检测CAR-T细胞的细胞因子胞内表达及胞外分泌水平

于-0.5 h加入不同浓度雷帕霉素, 按1:3效靶比共培养, 于18 h取培养上清液; 将10 ng/mL雷帕霉素按不同时间加入CAR-T细胞中, 而后按1:3效靶比加入Raji细胞共培养, 于18 h取培养上清液。采用流式CBA法检测上述上清液中细胞因子含量。采用流式胞内荧光抗体染色法, 检测CAR-T细胞胞内细胞因子表达水平。

1.11 数据处理及统计学分析

每组实验采用两种不同来源的脐带血制备的CAR-T细胞在相同条件下重复并采用3复孔, 所得数据采用GraphPad Prism 8统计软件进行分析, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用One-Way ANOVA和t检验进行差异分析, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

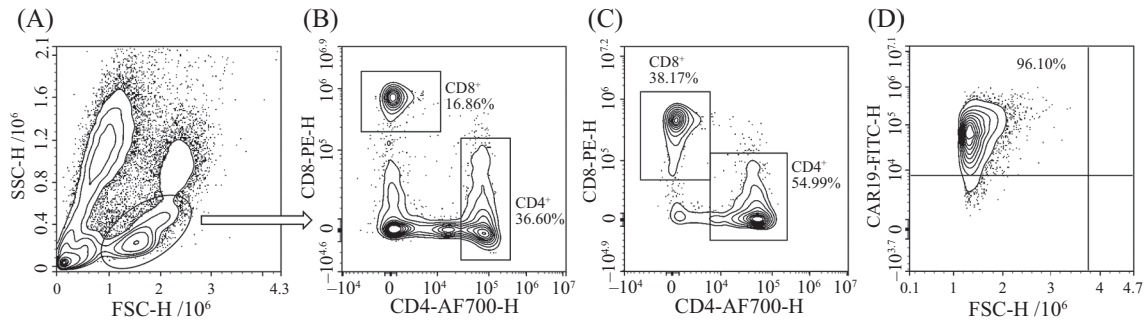
2 结果

2.1 CAR-T细胞的成功制备

通过Ficoll密度梯度离心法以及磁珠分选成功纯化获得T细胞(图1A~图1C), 将T细胞通过慢病毒转导CAR-19, 96 h后流式细胞术检测CAR-19转导效率为96.1%(图1D), 表明已成功制备较高纯度的CD19.CAR-T细胞。

2.2 雷帕霉素对CAR-T细胞肿瘤杀伤能力的影响

2.2.1 不同浓度雷帕霉素对CAR-T细胞杀伤功能的影响 于-0.5 h加入不同浓度雷帕霉素, 在1:3效靶比情况下, 共培养18 h、72 h检测CAR-T细胞杀伤率, 实验结果(图2A)显示: 18 h和72 h的杀伤率在不同浓度雷帕霉素各组之间均无显著性差异($P > 0.05$)。比较72 h各组杀伤率, 即便最高浓度810 ng/mL雷帕霉素组的杀伤率(96.47±0.78)%与无药物实验组杀伤率



A: Ficoll后的脐带血单个核细胞(CBMC)流式图; B: MACS磁珠分选前CBMC中CD45⁺CD4⁺及CD45⁺CD8⁺比例; C: MACS磁珠分选后CBMC中CD45⁺CD4⁺及CD45⁺CD8⁺比例; D: T细胞经CAR19病毒转导后培养10天左右的感染率。

A: flow chart of cord blood mononuclear cells (CBMC) after Ficoll; B: CD45⁺CD4⁺ and CD45⁺CD8⁺ ratio in CBMC before MACS magnetic bead sorting; C: CD45⁺CD4⁺ and CD45⁺CD8⁺ ratio in CBMC after MACS magnetic bead sorting; D: infection rate of T cells cultured for about 10 days after CAR19 virus transduction.

图1 CD19.CAR-T细胞制备
Fig.1 Preparation of CD19.CAR-T cells

(99.03±0.06)%之间也无显著性差异($P>0.05$)。结果表明无论雷帕霉素存在与否,甚至在其达到超临床使用剂量数倍浓度下,也并不影响CAR-T细胞的肿瘤杀伤效率。

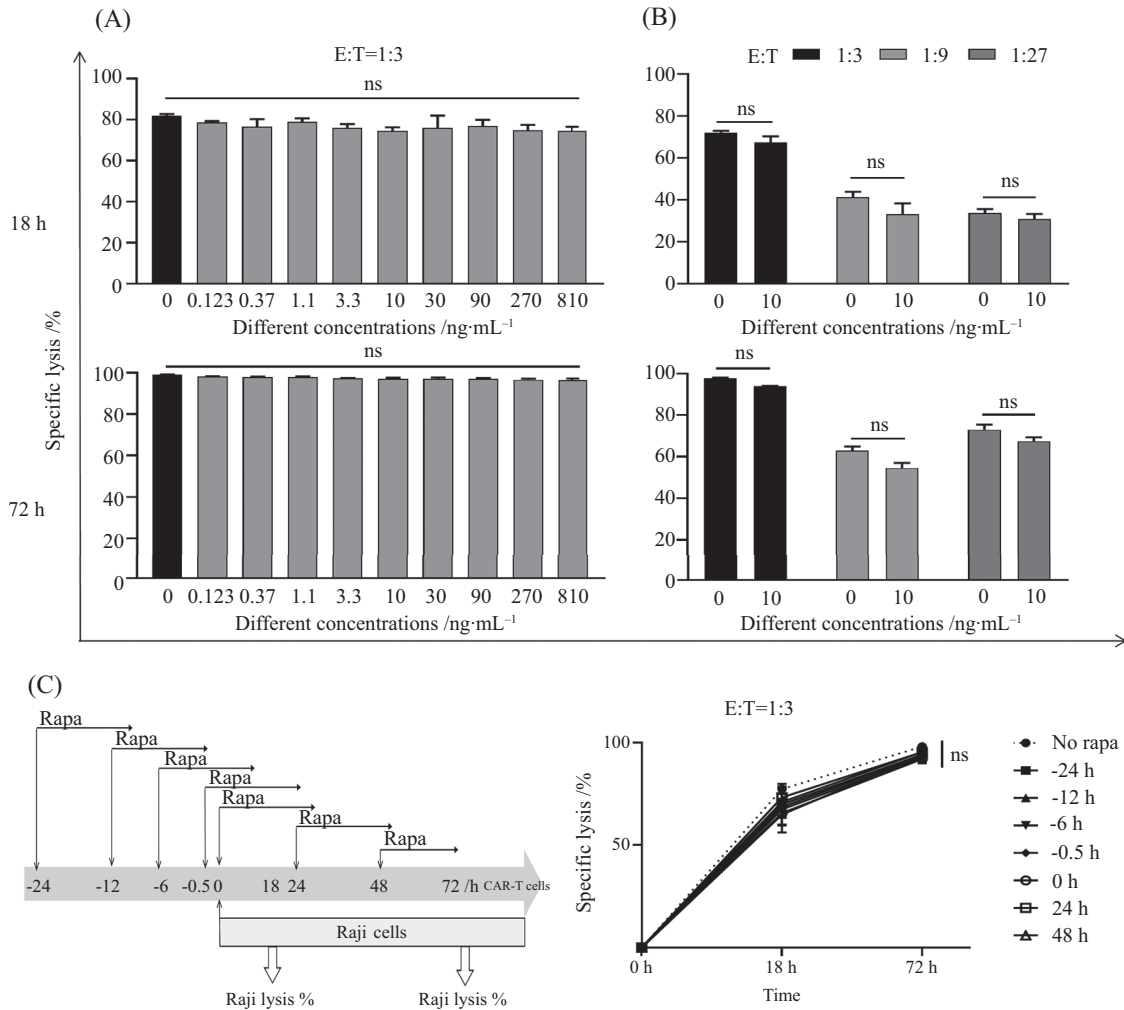
2.2.2 不同效靶比时雷帕霉素对CAR-T细胞杀伤能力的影响 根据以上实验结果,选定雷帕霉素临床有效血药浓度为10 ng/mL, -0.5 h将雷帕霉素加入到CAR-T细胞中,在不同效靶比情况下,测定共培养18 h、72 h CAR-T细胞的杀伤率(图2B)。结果显示,1:3效靶比时,雷帕霉素组与无药实验组的CAR-T细胞72 h杀伤率分别为(93.93±0.21)%和(97.73±0.31)%,两者间无显著性差异($P>0.05$);1:9效靶比时,两组72 h杀伤率分别为(54.63±2.40)%和(62.97±1.99)%,两者间无显著性差异($P>0.05$);1:27效靶比时,两组72 h杀伤率分别为(67.47±1.90)%和(73.03±2.39)%,两者间无显著性差异($P>0.05$)。结果表明,无论在高效靶比情况下还是低效靶比情况下,10 ng/mL雷帕霉素均不影响CAR-T细胞的杀伤效率。

2.2.3 雷帕霉素不同施加时机对CAR-T杀伤功能的影响 为考察雷帕霉素作用于CAR-T细胞静止态、活化态和杀伤态的不同状态时,其对CAR-T杀伤作用的影响是否存在差异,在1:3效靶比杀伤模型基础上,于刺激CAR-T细胞前不同时间、刺激同时以及杀伤中不同时间加入10 ng/mL雷帕霉素,检测了18 h、72 h的CAR-T杀伤率(图2C)。结果显示,无药实验组72 h杀伤率为(98.13±0.21)%, -24 h和-0.5 h实验组分别为(94.17±1.72)%和(92.80±1.59)%,刺激前不同

时间组之间无统计学差异($P>0.05$),表明刺激前雷帕霉素与CAR-T细胞的接触时长对于CAR-T的杀伤能力无影响。刺激前雷帕霉素组分别与无药实验组相比,均无显著性差别($P>0.05$),表明在CAR-T细胞刺激前是否使用雷帕霉素并不影响其杀伤能力。刺激时同时暴露于药物环境的CAR-T细胞,其72 h的杀伤率为(92.03±0.35)%,与无药实验组之间无显著性差异($P>0.05$),表明当同时存在药物与靶细胞时,CAR-T的活化及杀伤并未受药物影响。当CAR-T细胞与靶细胞接触,刺激活化后24 h再暴露于药物环境中时,72 h的杀伤率为(95.37±0.35)%,与无药实验组、雷帕霉素刺激前组之间均无显著性差异($P>0.05$),表明当CAR-T细胞在活化扩增和杀伤攻击靶细胞状态时,加入雷帕霉素并不影响其杀伤功能的发挥。以上结果表明,无论在CAR-T细胞活化前后哪个时机使用雷帕霉素,均不影响CAR-T细胞的杀伤作用。

2.3 雷帕霉素对CAR-T细胞杀伤中CAR-T数量变化的影响

2.3.1 不同浓度雷帕霉素对CAR-T细胞杀伤中CAR-T数量的影响 CAR-T细胞在杀伤靶细胞过程中不断损失,同时也在大量扩增,因此在杀伤不同时相点采用流式检测CAR-T细胞的总体数量,可间接反映了CAR-T细胞在杀伤靶细胞状态下的增殖能力。我们于-0.5 h加入不同浓度雷帕霉素,对随后CAR-T细胞在靶细胞杀伤中的数量变化情况进行检测,结果(图3A)显示,第6天时,无药实验组CD8⁺CAR-T细胞累计增加倍数为3.59±0.32,最低



A: 不同浓度雷帕霉素下, CAR-T细胞18 h、72 h的杀伤率(在1:3效靶比条件下, -0.5 h加入10 ng/mL雷帕霉素); B: 不同效靶比下CAR-T细胞18 h、72 h的杀伤率(-0.5 h加入10 ng/mL雷帕霉素); C: 不同活化时相点加入雷帕霉素, CAR-T细胞第18 h、72 h的杀伤率(1:3的效靶比, 10 ng/mL的雷帕霉素浓度)。n=3; ns: P>0.05。

A: fix the effect target ratio 1:3, and the time as -0.5 h to explore the effect of pretreatment with different concentrations of rapamycin on the specific lysis of CAR-T cells at 18th hour and 72th hour; B: fix the rapamycin concentration as 10 ng/mL, and the time as -0.5 h, comparison the specific lysis of CAR-T cells at 18th hour and 72th hour pretreated with rapamycin at different ratio of effect to target; C: fix the effect target ratio 1:3, and rapamycin concentration as 10 ng/mL, explore the effect of rapamycin treatment at different activation time points of CAR-T cells on the specific lysis of CAR-T cells at 18th hour and 72th hour. n=3; ns: P>0.05.

图2 雷帕霉素对CAR-T细胞体外杀伤能力的影响

Fig.2 Effect of rapamycin on the cytotoxicity of CAR-T cells *in vitro*

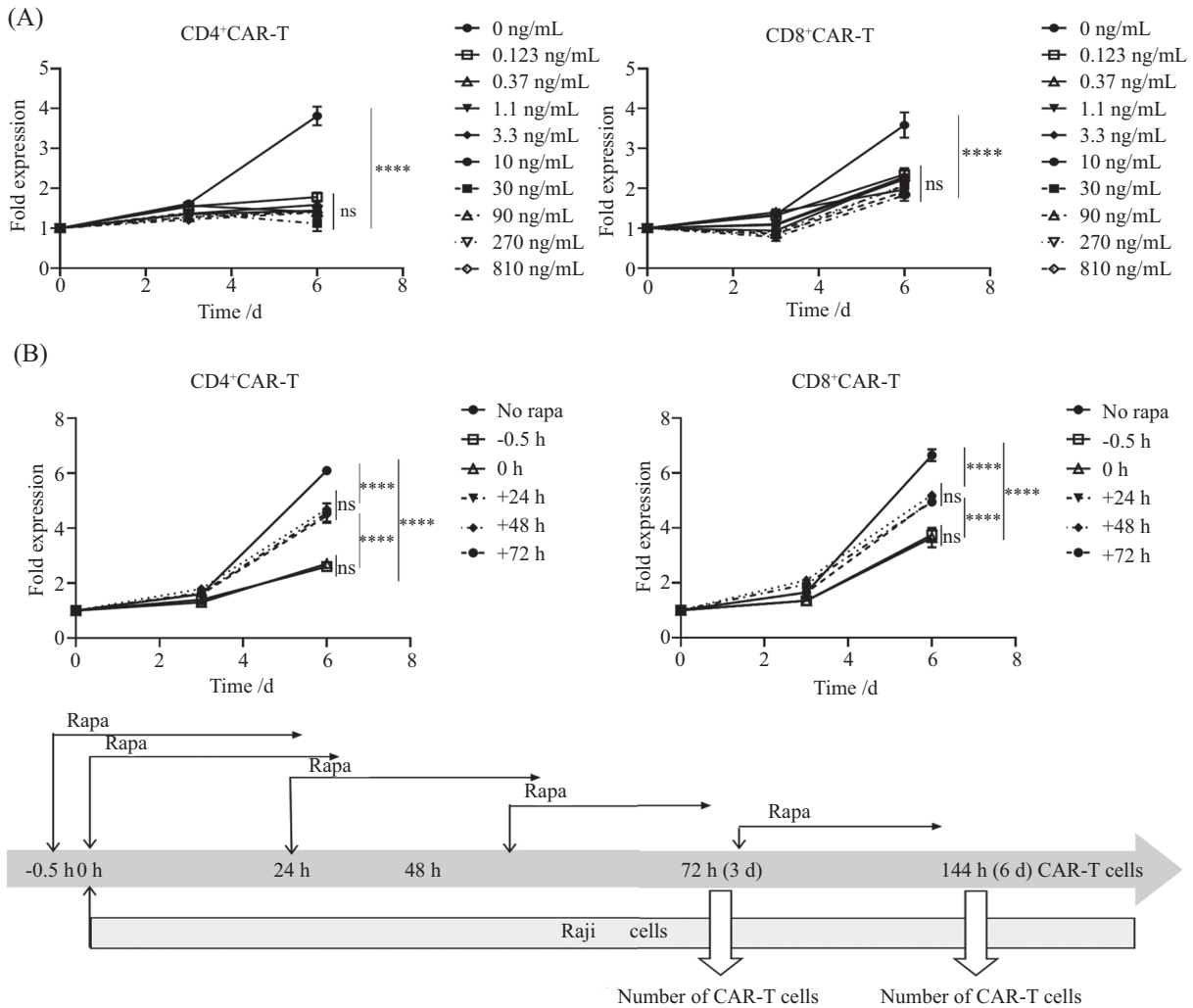
浓度为0.123 ng/mL雷帕霉素的CD8⁺CAR-T细胞的累计增加倍数为2.35±0.16, 两者间具有统计学差异 (P<0.05), 表明最低浓度雷帕霉素便可抑制CAR-T细胞杀伤中的数量增加。高浓度810 ng/mL雷帕霉素的CD8⁺CAR-T细胞累计扩增倍数为1.83±0.07, 与无药实验组相比有统计学差异 (P<0.05), 与最低浓度组间无统计学差异 (P>0.05), 表明高于0.123 ng/mL的雷帕霉素均能抑制CAR-T细胞杀伤中的总体数量增加, 但这种抑制作用不随浓度的增加而增强。CD4⁺CAR-T细胞的扩增结果趋势与CD8⁺CAR-T大

体一致。结果表明, -0.5 h加入的雷帕霉素会减弱CAR-T细胞在杀伤中的增殖能力, 这种阻碍作用的趋势在CD4⁺CAR-T细胞CD8⁺CAR-T细胞上大体一致, 均不随浓度的增加而增强, 与浓度无关。

2.3.2 雷帕霉素施加的不同时机对CAR-T细胞杀伤中CAR-T数量的影响 根据以上实验结果, 选定雷帕霉素临床有效血药浓度10 ng/mL, 进一步探索在CAR-T细胞接触Raji细胞刺激活化前、活化时以及活化后杀伤过程中不同时相点加入雷帕霉素, 6天内对各组CAR-T细胞数量变化的影响。结果(图3B)

显示, 无药实验组CD8⁺CAR-T细胞累计扩增倍数为6.65±0.21; -0.5 h雷帕霉素组CD8⁺CAR-T累计扩增倍数为3.75±0.21, 两者间具有统计学差异($P<0.05$), 表明-0.5 h加入的10 ng/mL雷帕霉素可抑制CAR-T细胞的数量增加。CAR-T细胞同时暴露于靶细胞和雷帕霉素组的累计扩增倍数为3.65±0.35, 与无药实验组间有显著性差别($P<0.05$), 表明当同时存在药物与靶细胞时, 雷帕霉素可抑制CAR-T细胞数量增加; 但与刺激前组相比, 两者间无显著性差别($P>0.05$), 表明CAR-T细胞活化前或活化时暴露于雷帕霉素均能抑制其杀伤靶细胞时的自身数量增加。当CAR-T细胞与靶细胞共培养24 h、72 h时, CAR-T细胞已处于不

断活化增殖同时不断杀伤靶细胞的状态, 此时再暴露于药物环境中, 第6天的CD8⁺CAR-T细胞累计扩增倍数分别为5.00±0.14(24 h组)、4.95±0.07(72 h组), 与空白组、刺激前组之间均具有显著性差别($P<0.05$), 结果表明, 在CAR-T细胞杀伤阶段加入雷帕霉素会抑制CAR-T细胞数量的增加, 但其抑制作用弱于CAR-T细胞刚接触靶细胞活化时加入以及刺激前加入的雷帕霉素组。第6天CAR-T细胞杀伤过程中的CD4⁺CAR-T细胞数量变化趋势与CD8⁺CAR-T大体一致。以上结果表明, 雷帕霉素能显著抑制CAR-T细胞在杀伤过程中累计数量的增加, CAR-T细胞在活化前以及活化时暴露于雷帕霉素, 其抑制作用最



A: 不同浓度雷帕霉素对CAR-T细胞活化后扩增的影响(在1:3效靶比条件下, -0.5 h加入雷帕霉素); B: 不同活化时相点加入雷帕霉素对CAR-T细胞活化后扩增的影响(在1:3效靶比条件下, 加入10 ng/mL的雷帕霉素)。n=3; **** $P<0.0001$; ns: $P>0.05$ 。

A: fix the effect target ratio 1:3, and the time as -0.5 h, explore the effect of pretreatment with different concentrations of rapamycin on the expansion of CAR-T cells after activation; B: fix the effect target ratio 1:3, and rapamycin concentration as 10 ng/mL, explore the effect of Rapamycin at different activation time points of CAR-T cells on the expansion of CAR-T cells after activation. n=3; **** $P<0.0001$; ns: $P>0.05$.

图3 雷帕霉素对CAR-T细胞杀伤后扩增能力的影响

Fig.3 Effect of rapamycin on the expansion ability of CAR-T cells after killing

强。

2.4 雷帕霉素抑制CAR-T细胞扩增机制初探

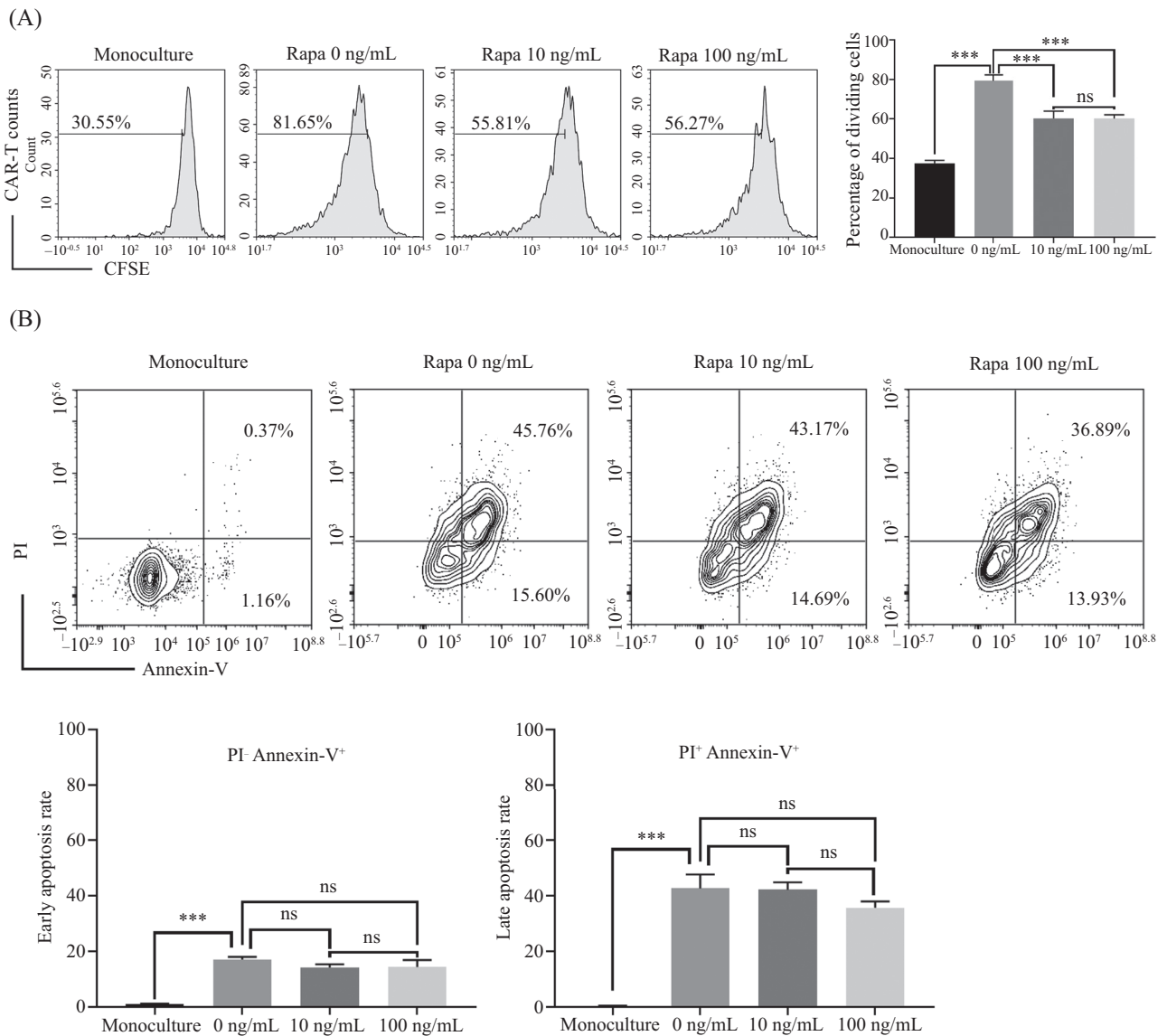
2.4.1 雷帕霉素可抑制CAR-T细胞活化后的扩增
采用CFSE法, 检测-0.5 h加入10 ng/mL或100 ng/mL雷帕霉素组CAR-T细胞的增殖情况, 结果(图4A)显示, 加入10 ng/mL以及100 ng/mL雷帕霉素的CAR-T细胞, 其CFSE荧光强度较未刺激组明显低, 较无药实验组高, 但10 ng/mL与100 ng/mL组间的荧光强度几乎一致。结果表明, 雷帕霉素能够抑制CAR-T细胞活化后的扩增能力, 但与雷帕霉素的浓度相关性不大。

2.4.2 雷帕霉素不影响CAR-T细胞的凋亡 于-0.5 h

加入10 ng/mL或100 ng/mL雷帕霉素的CAR-T细胞与靶细胞共培养18 h后, 用流式PI+Annvix双染法检测CAR-T细胞凋亡情况(图4B)。结果显示, 未刺激组的CAR-T细胞几乎不发生凋亡, 无药空白组的早期凋亡率和晚期凋亡率与10 ng/mL以及100 ng/mL雷帕霉素组的凋亡率相差不大。以上结果表明, 雷帕霉素不会促进CAR-T细胞的凋亡。

2.5 雷帕霉素对CAR-T细胞杀伤过程中细胞因子的表达及分泌的影响

2.5.1 雷帕霉素对CAR-T细胞杀伤过程中分泌细胞因子水平的影响 10 ng/mL或100 ng/mL雷帕霉



A: 雷帕霉素抑制CAR-T细胞活化后的扩增; B: 雷帕霉素不影响CAR-T细胞的凋亡。n=3; ***P<0.001; ns: P>0.05。

A: rapamycin inhibits the expansion of CAR-T cells after activation; B: rapamycin did not affect the apoptosis of CAR-T cells. n=3; ***P<0.001; ns: P>0.05.

图4 雷帕霉素阻碍CAR-T细胞杀伤后扩增的机制初探

Fig.4 Preliminary study on the mechanism of rapamycin inhibiting the expansion of CAR-T cells after killing

素于-0.5 h加入CAR-T细胞,按1:3效靶比共培养18 h,检测上清中细胞因子浓度。结果(图5A)显示,10 ng/mL以及100 ng/mL组的细胞因子IL-2、IL-4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-13、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、人可溶性CD25(soluble interleukin-2 receptor, sIL-2R/sCD25)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、趋化因子C-C基序配体4(C-C motif chemokine ligand 4, CCL4)、颗粒溶解素(granulysin)、颗粒酶A(granzyme A)、颗粒酶B(granzyme B)等浓度分别与无药组相比均显著性降低($P < 0.05$),表明不同浓度的雷帕霉素均能降低CAR-T细胞杀伤靶细胞过程中的细胞因子分泌水平。关于药物加入的不同时机,其结果显示:-24 h、-0.5 h组与活化时处理组(记为0 h)的细胞因子水平均低于无药实验组,具有显著性差异($P < 0.05$),表明雷帕霉素可显著降低细胞因子分泌水平;但不同时机加入雷帕霉素暴露组之间无显著性差异($P > 0.05$),提示雷帕霉素预处理时长以及CAR-T不同状态均不影响雷帕霉素对CAR-T细胞因子分泌的抑制作用。结果表明,CAR-T细胞活化前和活化时加入雷帕霉素,均能显著降低CAR-T细胞杀伤靶细胞过程中细胞因子分泌水平。

2.5.2 雷帕霉素可降低CAR-T细胞胞内细胞因子表达量 10 ng/mL或100 ng/mL雷帕霉素于-0.5 h加入CAR-T细胞,以1:3效靶比共培养18 h,检测CAR-T细胞胞内细胞因子表达量(图5B)。结果显示:10 ng/mL和100 ng/mL雷帕霉素组的CAR-T细胞胞内IFN- γ 、GM-CSF以及IL-2的表达量均显著低于无药实验组($P < 0.05$),说明雷帕霉素可抑制CAR-T细胞在杀伤靶细胞过程中的细胞因子表达。但不同浓度雷帕霉素组的CAR-T细胞胞内细胞因子表达量之间无显著性差异($P > 0.05$),表明10 ng/mL雷帕霉素已足以降低CAR-T细胞胞内细胞因子表达水平,高于此临床常用血药浓度的雷帕霉素与此浓度的抑制作用一样。

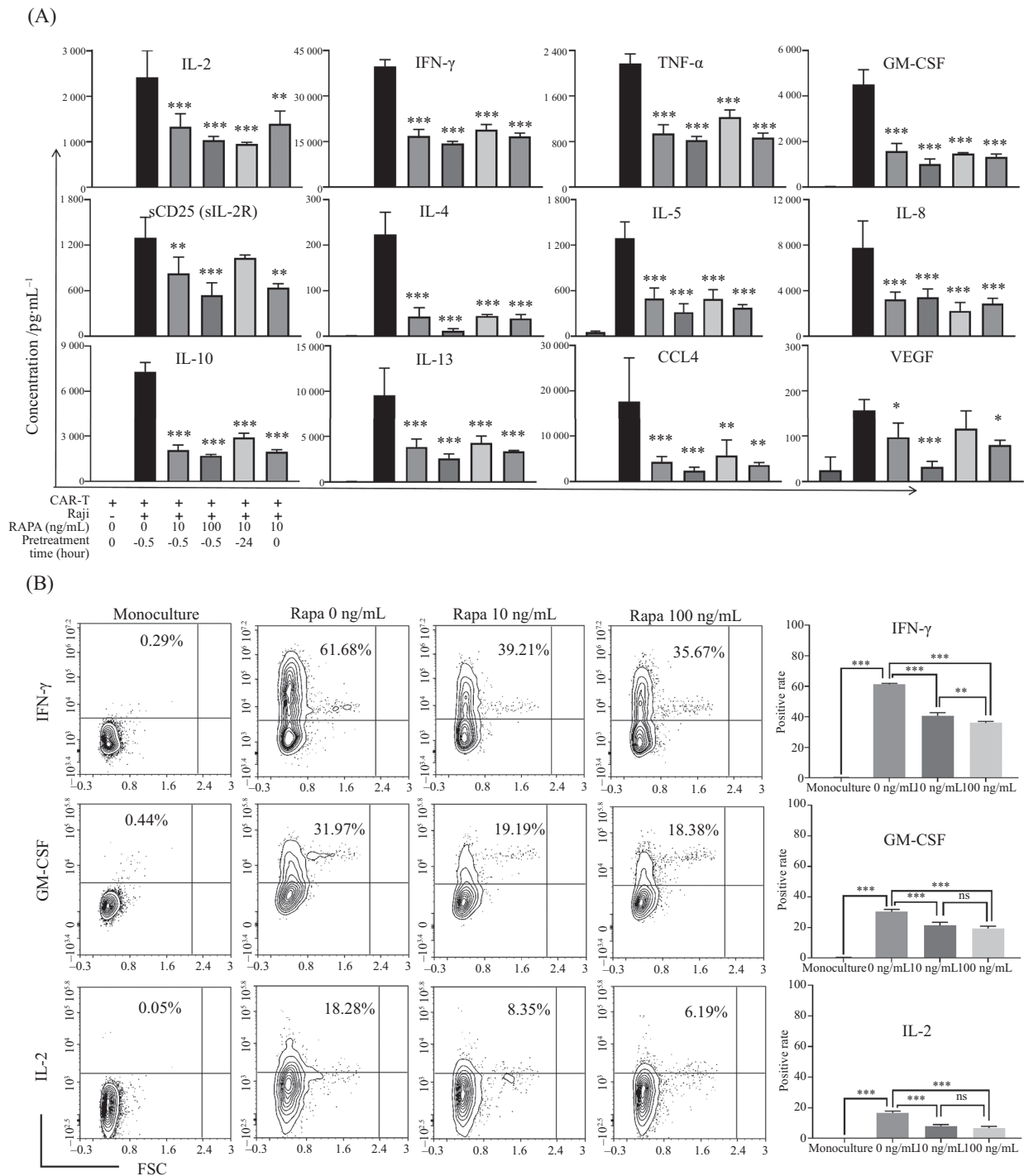
3 讨论

本研究利用CD19.CAR-T与CD19⁺CD22⁺ Raji靶细胞的特异性杀伤模型,首次探究了临床用的雷帕霉素在CAR-T细胞杀伤靶细胞过程中,对CAR-T杀伤力、扩增力及引起毒副作用CRS的细胞因子分泌的

影响。本研究发现雷帕霉素不影响CAR-T的杀伤能力,即便在1:27的超低效靶比情况下,CAR-T的杀伤能力依旧不受影响(图2B)。在杀伤过程中,CAR-T细胞数量的增加速度受到了雷帕霉素的部分抑制,造成此现象的原因并非是CAR-T凋亡而数量增加缓慢(图4B),而是部分抑制了CAR-T细胞活化后的扩增(图4A),造成了杀伤模型中药物组CAR-T数量增加缓慢(图3A和图3B)。更重要的是,我们发现雷帕霉素可显著降低CAR-T细胞杀伤靶细胞过程中分泌的细胞因子水平,降低水平在50%左右(图5A和图5B)。雷帕霉素既不影响CAR-T的杀伤,保障了临床疗效的发挥;又能显著抑制炎症细胞因子分泌水平,降低了CRS发生风险,是用于预防或治疗CAR-T并发症CRS的潜在理想药物。

雷帕霉素最初作为抗真菌抗生素从丝状放线菌中分离获得,随后研究人员发现雷帕霉素具有免疫抑制和抗肿瘤特性^[22]。由于雷帕霉素在免疫抑制剂中的毒性较环孢霉素A(cyclosporin A, CsA)和FK506低,且更能促进移植存活,因此于1999年作为免疫抑制药物被批准用于同种异体移植排斥反应的治疗^[23]。虽然临床使用雷帕霉素多年,但其免疫抑制作用机制近年来才逐渐被揭示。雷帕霉素与脯氨酰异构酶FKBP12形成复合物,后者与mTOR结合。mTOR是一个高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,与另外两个不同蛋白分别组成两个不同蛋白复合物:mTOR复合物1(mTOR complex 1, mTORC1)和mTOR复合物2(mTOR complex 2, mTORC2),mTOR作为细胞感知外界环境物质并对其作出相应反应的关键蛋白,与T细胞生长、代谢、分化密切相关^[24]。雷帕霉素不仅与mTORC1结合参与了骨髓早期T祖细胞的细胞周期阻滞^[25];也参与了胸腺中T细胞阳性选择,从而影响了 $\alpha\beta$ -T细胞的形成^[26];而且还参与了外周T细胞活化扩增中从G₁到S期的细胞周期阻滞^[27],从而也影响了T细胞活化后Th1、Th2和Th17等亚群的分化^[28]。

近年,LECLERCQ等在^[18]体外药物筛选时发现雷帕霉素可降低外周血上清中的细胞因子浓度,但不影响外周血单核细胞中T细胞的肿瘤杀伤能力。我们的研究发现,雷帕霉素不影响CAR-T细胞对靶细胞的杀伤,这与LECLERCQ等^[18]对T细胞研究结果一致。CAR-T细胞通过CAR识别靶细胞,CAR分子将结合信号传递到胞内,直接将T细胞活化为CTL

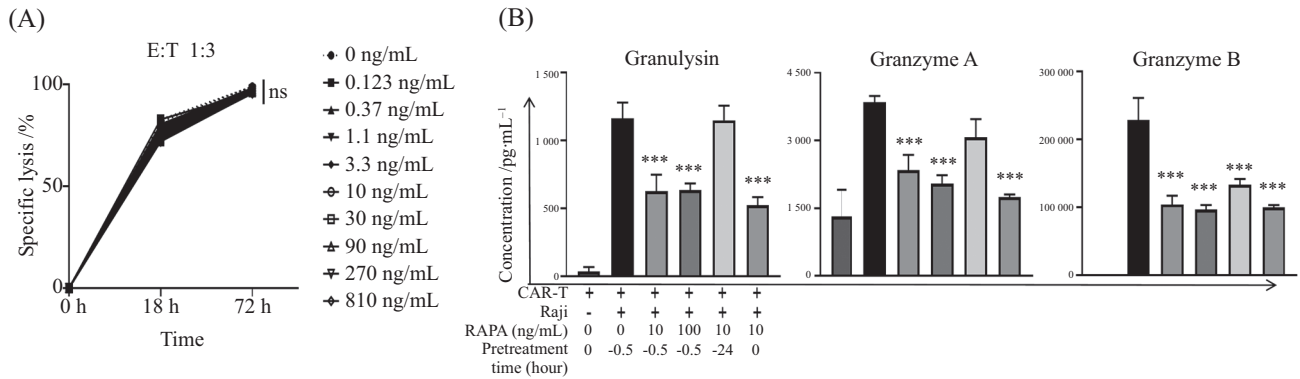


A: 共培养18 h的上清中细胞因子水平(1:3效靶比, -0.5 h加入不同浓度雷帕霉素; 以及1:3效靶比, 在-24 h、-0.5 h加入10 ng/mL雷帕霉素), CAR-T(+) Raji(+) RAPA(-) pretreatment time(-0.5 h)作为对照组; B: 共培养18 h时CAR-T细胞的胞内细胞因子表达量(1:3效靶比, -0.5 h加入不同浓度雷帕霉素)。n=3; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001, 与对照组比较; ns: P>0.05, 与对照组比较。

A: fix the effect target ratio 1:3, and the time as -0.5 h, detect the level of cytokines in the supernatant after different concentrations of rapamycin pretreatment at the 18th hour of killing. And fix the effect target ratio 1:3, and rapamycin concentration as 10 ng/mL, detect the level of cytokines in the supernatant after different activation time points of rapamycin pretreatment at the 18th hour of killing. CAR-T (+) Raji (+) RAPA (-) pretreatment time (-0.5) was used as the control group. B: fix the effect target ratio 1:3, and the time as -0.5 h, detect the expression of cytokines in CAR-T cells after pretreatment with different concentrations of rapamycin at the 18th hour of killing. n=3; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 compared with control group; ns: P>0.05 compared with control group.

图5 雷帕霉素可降低CAR-T细胞细胞因子的分泌

Fig.5 Rapamycin can reduce the secretion level of CAR-T cytokines



A: CAR-T细胞18 h、72 h杀伤率(1:3效靶比, -0.5 h加入不同浓度雷帕霉素); B: 共培养18 h上清中细胞因子水平(1:3效靶比, -0.5 h加入不同浓度雷帕霉素; 1:3效靶比, 不同时间加入10 ng/mL雷帕霉素)。CAR-T(+) Raji(+) RAPA(-) pretreatment time(-0.5 h)作为对照组, $n=3$; *** $P<0.001$, 与对照组比较; ns: $P>0.05$, 与对照组比较。

A: fix the effect target ratio 1:3, and the time as -0.5 h, detect the specific lysis at the 18th and 72th hour of killing; B: fix the effect target ratio 1:3, and the time as -0.5 h, detect the level of cytokines in the supernatant after different concentrations of rapamycin pretreatment at the 18th hour of killing. And fix the effect target ratio 1:3, and rapamycin concentration as 10 ng/mL, detect the level of cytokines in the supernatant after different activation time points of rapamycin pretreatment at the 18th hour of killing. CAR-T (+) Raji (+) RAPA (-) pretreatment time (-0.5) was used as the control group. $n=3$; *** $P<0.001$ compared with control group; ns: $P>0.05$ compared with control group.

图6 雷帕霉素降低CAR-T细胞杀伤相关的细胞因子水平

Fig.6 Rapamycin reduced the levels of cytokines related to CAR-T cell killing

细胞,活化的CTL细胞分泌穿孔素和颗粒酶,可杀伤破解靶细胞的细胞毒性淋巴细胞。CAR-T细胞杀伤肿瘤细胞主要利用了T细胞这一特性,CAR-T细胞分泌的穿孔素和颗粒酶是清除肿瘤细胞的重要因素。我们实验发现,CAR-T细胞先暴露于雷帕霉素后30 min,再接触靶细胞被活化,18 h分泌的细胞因子(图5)及颗粒酶(图6B)有显著下降。同时,我们注意到相同效靶比下,18 h各浓度药物组的杀伤率也有所差异,但72 h时各组杀伤率已均无显著差异,包括无药对照组(图6A),提示雷帕霉素影响了短时间内的细胞因子及颗粒酶的分泌,但对较长时间的总体杀伤结果无影响。此外,我们观测到雷帕霉素并不是通过凋亡来减少CAR-T的增加速率,而是通过细胞周期阻滞,导致增殖分裂减弱的,雷帕霉素减缓了CAR-T的扩增速率(图4),这与以往对T细胞的研究结果一致。可能因为CAR-T的扩增速率减缓,所以细胞因子分泌能力也随之减弱,同时减弱了短时间内的杀伤能力,但根据稍长时间观测的结果看并不影响总体杀伤情况(图6A)。本研究检测了72 h的杀伤率,但未检测72 h的颗粒酶分泌水平,未来将进一步观测不同效靶比和更长时间上颗粒酶及穿孔素分泌水平的变化情况,以进一步明确雷帕霉素对CAR-T的全面影响。总之,本研究提示:CAR-T整体应答的波峰因细胞周期受到一定程度的阻滞而有所

降低,但整体应答曲线拉长了,曲线下的阴影面积不变。这正是临床所需要的:应答不能太剧烈以致毒副作用较大,患者无法承受,同时保持彻底清除肿瘤细胞这一最终疗效。

雷帕霉素可显著降低CAR-T细胞活化后的多种炎性细胞因子的分泌水平,这对于临床上降低CAR-T治疗引起的CRS并发症发生风险有积极意义。CRS涉及多种细胞因子,肿瘤负荷越高,CAR-T细胞识别靶细胞后大量扩增,分泌的大量炎性细胞因子进一步激活巨噬细胞等固有免疫细胞分泌更多的促炎因子,形成CRS^[29-30]。本研究发现雷帕霉素可显著降低CAR-T细胞的多种促炎因子,如IL-2、IL-4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-13、IFN- γ 、TNF- α 分泌水平,趋化因子CCL4的表达水平,促进血管通透性的细胞因子VEGF和单核-巨噬细胞活化的细胞因子GM-CSF、sCD25的表达。巨噬细胞活化后分泌大量IL-6等促炎因子在CRS发展过程中具有重要作用^[9],因此雷帕霉素降低CAR-T细胞的细胞因子分泌水平,可降低巨噬细胞被活化的可能,从而降低CRS反应严重程度。有报道表明IFN- γ 、IL-8、sCD25、GM-CSF、CCL4(MIP1 β)与重度CRS高度相关^[31],而雷帕霉素可明显降低CAR-T细胞分泌这类细胞因子的水平,提示雷帕霉素可能会降低重度CRS的发生率,使临床患者受益。托珠单抗是一种针对IL-6R的

重组人源化单克隆抗体, 主要用于阻断IL-6途径来治疗CRS, 而雷帕霉素作用广泛, 能够降低多种炎症细胞因子的分泌, 并且与托珠单抗相比, 雷帕霉素具有价格低廉的优势。临床经验表明, 糖皮质激素可有效治疗CRS^[32-33], 但糖皮质激素的应用对CAR-T细胞治疗的影响尚存在争议。有文献报道长期大剂量(超过1周)的糖皮质激素虽可迅速缓解CRS症状, 但对CAR-T细胞在体内的扩增, 以及CAR-T细胞治疗的临床结果带来了不利影响^[34]。也有文献表明短期(平均4天)使用糖皮质激素甚至大剂量糖皮质激素不影响CAR-T细胞的治疗结果及其增殖和持续时间^[35]。同样的有文献表明糖皮质激素的较高累计剂量以及长期和早期应用糖皮质激素与CAR-T细胞治疗较短的中位无进展生存期(progression-free survival, PFS)和/或中位生存期(overall survival, OS)有关^[36]。虽然本课题组制备的是人源CAR-T细胞, 雷帕霉素对CRS的预防或治疗作用尚需临床试验验证, 但本课题反复的实验结果均表明雷帕霉素不影响CAR-T细胞的体外最终杀伤效果, 为今后雷帕霉素治疗CRS的相关临床试验奠定了实验室基础。

综上所述, 本研究发现雷帕霉素可在不影响CAR-T细胞抗肿瘤作用的情况下, 降低CAR-T细胞杀伤靶细胞过程中分泌的多种细胞因子水平, 是临床CAR-T治疗中控制CRS反应的潜在有效药物之一。

参考文献 (References)

- [1] LARSON R C, MAUS M V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(3): 145-61.
- [2] MAUDE S L, LAETSCH T W, BUECHNER J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(5): 439-48.
- [3] MUNSHI N C, ANDERSON L D, Jr, SHAH N, et al. Idecabtagene vicleucel in relapsed and refractory multiple myeloma [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(8): 705-16.
- [4] BERDEJA J G, MADDURI D, USMANI S Z, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study [J]. *Lancet*, 2021, 398(10297): 314-24.
- [5] MAJZNER R G, MACKALL C L. Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey [J]. *Nat Med*, 2019, 25(9): 1341-55.
- [6] ABRAMSON J S, PALOMBA M L, GORDON L I, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study [J]. *Lancet*, 2020, 396(10254): 839-52.
- [7] RAFIQ S, HACKETT C S, BRENTJENS R J. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(3): 147-67.
- [8] LEE D W, SANTOMASSO B D, LOCKE F L, et al. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019, 25(4): 625-38.
- [9] GUO H, QIAN L, CUI J. Focused evaluation of the roles of macrophages in chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy associated cytokine release syndrome [J]. *Cancer Biol Med*, 2021, 19(3): 333-42.
- [10] MIAO L, ZHANG Z, REN Z, et al. Reactions related to CAR-T cell therapy [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 663201.
- [11] SIEGLER E L, KENDERIAN S S. Neurotoxicity and cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T cell therapy: insights into mechanisms and novel therapies [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1973.
- [12] SANTOMASSO B D, NASTOUPIL L J, ADKINS S, et al. Management of immune-related adverse events in patients treated with chimeric antigen receptor T-cell therapy: ASCO guideline [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(35): 3978-92.
- [13] LECLERCQ G, STEINHOFF N, HAEGEL H, et al. Novel strategies for the mitigation of cytokine release syndrome induced by T cell engaging therapies with a focus on the use of kinase inhibitors [J]. *Oncoimmunology*, 2022, 11(1): 2083479.
- [14] STERNER R M, SAKEMURA R, COX M J, et al. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts [J]. *Blood*, 2019, 133(7): 697-709.
- [15] XU N, YANG X F, XUE S L, et al. Ruxolitinib reduces severe CRS response by suspending CAR-T cell function instead of damaging CAR-T cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 595: 54-61.
- [16] GIAVRIDIS T, VAN DER STEGEN S J C, EYQUEM J, et al. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade [J]. *Nat Med*, 2018, 24(6): 731-8.
- [17] CHEN F, TEACHEY D T, PEQUIGNOT E, et al. Measuring IL-6 and sIL-6R in serum from patients treated with tocilizumab and/or siltuximab following CAR T cell therapy [J]. *J Immunol Methods*, 2016, 434: 1-8.
- [18] LECLERCQ G, HAEGEL H, TOSO A, et al. JAK and mTOR inhibitors prevent cytokine release while retaining T cell bispecific antibody *in vivo* efficacy [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, doi: 10.1136/jitc-2021-003766.
- [19] SONG D G, YE Q, CARPENITO C, et al. *In vivo* persistence, tumor localization, and antitumor activity of CAR-engineered T cells is enhanced by costimulatory signaling through CD137 (4-1BB) [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(13): 4617-27.
- [20] KALOS M, LEVINE B L, PORTER D L, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(95): 95ra73.
- [21] MAUDE S L, FREY N, SHAW P A, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(16): 1507-17.

- [22] ENG C P, SEHGAL S N, VEZINA C. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors [J]. *J Antibiot*, 1984, 37(10): 1231-7.
- [23] YOO Y J, KIM H, PARK S R, et al. An overview of rapamycin: from discovery to future perspectives [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44(4/5): 537-53.
- [24] HUANG H, LONG L, ZHOU P, et al. mTOR signaling at the crossroads of environmental signals and T-cell fate decisions [J]. *Immunol Rev*, 2020, 295(1): 15-38.
- [25] HOSHII T, KASADA A, HATAKEYAMA T, et al. Loss of mTOR complex 1 induces developmental blockage in early T-lymphopoiesis and eradicates T-cell acute lymphoblastic leukemia cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(10): 3805-10.
- [26] WERLEN G, JAIN R, JACINTO E. MTOR signaling and metabolism in early T cell development [J]. *Genes*, 2021, 12(5): 728.
- [27] WIEDERRECHT G J, SABERS C J, BRUNN G J, et al. Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells [J]. *Prog Cell Cycle Res*, 1995, 1: 53-71.
- [28] DELGOFFE G M, KOLE T P, ZHENG Y, et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment [J]. *Immunity*, 2009, 30(6): 832-44.
- [29] BRUDNO J N, KOCHENDERFER J N. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management [J]. *Blood*, 2016, 127(26): 3321-30.
- [30] PARK J H, RIVIERE I, GONEN M, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(5): 449-59.
- [31] TEACHEY D T, LACEY S F, SHAW P A, et al. Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor t-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(6): 664-79.
- [32] LEE D W, GARDNER R, PORTER D L, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome [J]. *Blood*, 2014, 124(2): 188-95.
- [33] ALDOSS I, SONG J, STILLER T, et al. Correlates of resistance and relapse during blinatumomab therapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia [J]. *Am J Hematol*, 2017, 92(9): 858-65.
- [34] DAVILA M L, RIVIERE I, WANG X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224ra25.
- [35] LIU S, DENG B, YIN Z, et al. Corticosteroids do not influence the efficacy and kinetics of CAR-T cells for B-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood Cancer J*, 2020, 10(2): 15.
- [36] STRATI P, AHMED S, FURQAN F, et al. Prognostic impact of corticosteroids on efficacy of chimeric antigen receptor T-cell therapy in large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2021, 137(23): 3272-6.