

双亲和性适配体靶向脂质体介导的T细胞免疫治疗

任欢欢¹, 贾国萍¹, 黄 婧¹, 王梦迪¹, 孙定亚¹, 褚超男^{2*}, 王 珊^{1*}

(1. 中南大学化学化工学院制药工程系, 湖南 长沙 410083; 2. 湖南省肿瘤医院中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院妇科, 湖南 长沙 410013)

摘要: 将免疫细胞重定向至肿瘤部位并增强抗肿瘤免疫反应是一种有前景的癌症治疗策略。AS1411 适配体对高表达核仁素的恶性肿瘤有高亲和结合力, 细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) 适配体可特异性结合 T 细胞表达的免疫检查点 CTLA-4。本研究基于 AS1411 适配体和 CTLA-4 适配体构建了一种可同时靶向肿瘤细胞和 T 细胞的双亲和性适配体靶向脂质体 (dual-affinity aptamer targeted liposome, Dat. Lipo), 并在细胞水平研究其促 T 细胞免疫治疗效果。将适配体修饰上胆固醇后, 用滴入法制备 Dat. Lipo; 用成像系统检测其 T 细胞重定向作用, CCK8 (cell counting kit-8) 评价其促 T 细胞免疫治疗作用, 用肿瘤球评价其促 T 细胞渗透作用。结果表明, 与只负载一种适配体的脂质体相比, Dat. Lipo 可有效促进 T 细胞重定向至肿瘤细胞; 对 MCF-7 和 HepG2 细胞具有良好的促免疫治疗作用, 且呈浓度依赖性, 具有良好的生物安全性; Dat. Lipo 还能促进 T 细胞渗透到肿瘤球内部, 在不同维度增强 T 细胞免疫治疗作用。综上, Dat. Lipo 可利用适配体对靶标的高亲和性将 T 细胞重定向至肿瘤细胞, 增强免疫疗法效果, 在肿瘤治疗方面具有一定的应用前景。本研究获得了湖南省肿瘤医院中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院审查委员会的伦理批准。

关键词: 适配体; 双亲和性; T 细胞重定向; 免疫疗法; 免疫检查点

中图分类号: R945 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1338-09

T cell immunotherapy mediated by dual-affinity aptamer targeted liposome

REN Huan-huan¹, JIA Guo-ping¹, HUANG Jing¹, WANG Meng-di¹, SUN Ding-ya¹,
ZHU Chao-nan^{2*}, WANG Shan^{1*}

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China; 2. Department of Gynecology Tumor, Cancer Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Hunan Cancer Hospital, Changsha 410013, China)

Abstract: Redirecting immune cells to the tumor cells and enhancing its anti-tumor immune response is a very promising cancer treatment strategy. AS1411 aptamers have high affinity for malignant tumors with high nucleolin expression, and cytotoxic T lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4) aptamers can specifically bind to CTLA-4, which is expressed by T cells. In this study, a dual-affinity aptamer targeted liposome (Dat. Lipo) was constructed based on AS1411 aptamer and CTLA-4 aptamer, and its immunotherapeutic effect on T cells was studied. After the aptamer was modified with cholesterol, Dat. Lipo was prepared by instillation method; its effect of redirecting T cells was determined by confocal micrographs; its T cell immunotherapy effect was evaluated by cell counting kit-8 (CCK8) and T cell penetration was evaluated by tumor spheroids. The results showed that

收稿日期: 2022-11-24; 修回日期: 2023-01-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872919); 中南大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (1053320212602).

*通讯作者 Tel: 18008425007, E-mail: wangshansu0717@163.com;

Tel: 18684983256, E-mail: zhuchaonan@hnca.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1266

compared with liposomes loaded with one type aptamer, Dat. Lipo could effectively promote the redirection of T cells to tumor cells; Dat. Lipo had good biosafety and immunotherapeutic effect on MCF-7 and HepG2 cells in a concentration-dependent manner; Dat. Lipo could also promote T cells to infiltrate into the tumor spheroids and enhance the immunotherapy effect of T cells in different dimensions. In summary, Dat. Lipo can use the high affinity of aptamers to redirect T cells to tumor cells, enhance the effect of immunotherapy, and has a promising application prospect in tumor therapy. This study was approved by the Examination Committee of Cancer Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Hunan Cancer Hospital.

Key words: aptamer; dual-affinity; T-cell redirection; immunotherapy; immune checkpoint

利用人类免疫系统攻击肿瘤细胞的免疫疗法是治疗多种癌症的最新突破之一。其中,嵌合抗原受体-T细胞疗法^[1]对非实体瘤有良好的治疗效果,已成功应用于临床;近年来基因工程改造的T细胞受体-T细胞疗法^[2]和肿瘤浸润淋巴细胞疗法^[3]对实体肿瘤展现出很好的缓解消除效果。这些免疫细胞疗法通过促进免疫细胞重定向至肿瘤周围并增强免疫疗效,为癌症患者带来了良好的生存获益,但由于需要为患者量身定制,涉及复杂耗时的细胞工程和基因工程过程,并且可能引起严重的细胞因子释放综合征和神经毒性,阻碍其广泛应用^[4]。具有两个不同抗原结合位点的双特异性抗体可通过将免疫细胞重定向至肿瘤促进免疫治疗,从而缓解癌症,可制成一种“现成的”产品,与免疫细胞疗法相比,其应用方法更简单^[5]。但双特异性抗体的制备和纯化过程繁琐,产率较低和免疫原性较高,严重影响患者健康和疗效^[6],寻找更好的免疫治疗剂尤其重要。

适配体是在复杂的相互作用中被筛选出来的单链寡核苷酸,显示出类似或优于单抗的特异性和亲和力,因可化学合成而具有低免疫原性、低生产成本和便于化学修饰的优点^[7]。近年来,有研究利用碱基互补配对形成的环状双特异性适配体^[8-10]或依赖连接体简单组合形成的二价双特异性适配体^[11]将免疫细胞重定向至肿瘤,并在体内体外实验中取得较好的治疗效果。但这些双特异性适配体策略往往只能连接少数几个适配体,导致其细胞结合能力不够强,使用浓度偏大。目前急需一种可促进免疫治疗、低免疫原性、低毒副作用、高效和通用的肿瘤治疗药物。

核仁素是一种多功能蛋白,参与核糖体的生物形成、rRNA的加工和mRNA的稳定等多种过程,过表达于多种增殖活跃的癌细胞膜及细胞质中,但在正常细胞表面不表达^[12]。AS1411是一个富含鸟嘌呤核苷(G)的核仁素核酸适配体,具有亲和力高、特异性强和相对分子量小等显著优势,可与细胞表面的核仁素结合并在一定程度上阻断肿瘤细胞的增殖且下调致癌基因^[13]。细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(cytotoxic

T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4)是CD28的竞争性结合蛋白,当CD28与B7家族分子结合时,可促进细胞因子白细胞介素-2(IL-2)的mRNA表达和T细胞存活分化;而当CTLA-4与B7家族分子结合时,CTLA-4介导的细胞外区域信号具有抑制和关闭T细胞依赖性免疫反应的作用^[14,15]。CTLA-4核酸适配体能以高亲和力与CTLA-4蛋白结合,阻断CTLA-4信号通路,释放B7与共刺激分子CD28相互作用,可增加免疫细胞对肿瘤细胞的敏感度并诱导对继发性肿瘤攻击的免疫^[16]。脂质体^[17]是目前研究最为广泛的递送系统之一,具有生物安全性好、免疫原性低和递送效率高等优势,许多基于脂质体的药物系统已被美国食品和药物管理局批准用于临床疾病治疗,具有良好的临床应用前景^[18]。

本研究构建了一种负载AS1411适配体和CTLA-4适配体的双亲和性适配体靶向脂质体(dual-affinity aptamer targeted liposome, Dat. Lipo),可同时特异性结合核仁素和CTLA-4蛋白,促进T细胞重定向至肿瘤细胞(图1)。一方面,CTLA-4在活化T细胞和调节性T细胞表面高表达,故Dat. Lipo可特异性靶向活化T细胞和调节性T细胞,并通过CTLA-4免疫检查点阻断促进T细胞激活、唤醒沉睡的T细胞,促进免疫治疗效果;另一方面,核仁素在多种恶性肿瘤细胞表面的高表达使得Dat. Lipo可靶向多种肿瘤细胞,具有通用性。此外,纳米级脂质体是目前药物输送系统中应用极为广泛的药物载体,具有被动靶向实体肿瘤的能力^[19]。本研究在细胞水平探讨Dat. Lipo的促T细胞免疫治疗能力,为其临床应用提供初步依据。

材料与方法

药品与试剂 胆固醇-聚乙二醇-N-羟基琥珀酰亚胺(CLS-PEG-NHS,批号A2219353,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);Cy3(cyanine 3)标记的5'-NH₂-AS1411(5'-NH₂-TTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3')、5'-NH₂-CTLA-4(5'-NH₂-TCCCTACGG-CGCTAACGATGGTGAATAATGGGCCTAGGGTGGTGA-

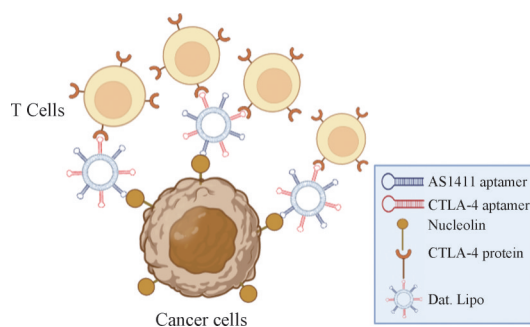


Figure 1 Scheme of dual-affinity aptamer targeted liposome (Dat. Lipo) retargeting cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4)-positive immunocytes to nucleolin-positive tumor cells

CGGTGCCACCGTGCTACAAC-3') (苏州贝信生物技术有限公司); 氢化大豆卵磷脂 (hydrogenated soybean phosphatidylcholine, HSPC, 批号 C00257, 上海艾伟拓医药科技有限公司); 胆固醇 (批号 P1880718, 中国 Adamas-beta 公司); 甲基-PEG2000-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, DSPE, 批号 91RUR51R, 上海萨恩化学技术有限公司); 无水乙醇 (批号 20180930, 上海沪试实验室器材股份有限公司); Ficoll 淋巴细胞分离液 (批号 10316369, 瑞典 Cytiva Sweden AB 公司); 人白细胞介素-2 (HIL-2, 批号 021812-3, 美国 Peprotech 公司); 抗人 CD3 抗体 (批号 B284044, 美国 BiosLegend 公司); 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK8, 批号 22153558, 北京兰杰柯科技有限公司); HBSS (Hank's balanced salt solution, 批号 14170112)、细胞培养基 (批号 C11875500BT)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 C0235)、MitoSpy Red (批号 424801) (赛默飞世尔科技公司); 双抗 (批号 PB180120, 武汉普诺赛生命科技有限公司); CFSE (5,6-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, 批号 GC14056, 上海宏叶生物科技有限公司)。

仪器 电泳仪、凝胶成像仪 (新加坡 Bio-Rad 公司); 磁力搅拌加热器 (德国 IKA 公司); CO₂ 培养箱 (德国 Binder 公司); 马尔文激光粒度仪 (英国 Malvern Instruments 公司); 高内涵成像系统 (美国 PerkinElmer 公司); 酶联免疫检测仪 [赛默飞世尔 (上海) 仪器有限公司]; 倒置显微镜 (厦门麦克迪奥有限公司); 流式细胞仪 (美国碧迪医疗器械有限公司)。

适配体-脂质体的制备 将 5' 端修饰-NH₂ 的 AS1411 和 CTLA-4 适配体于 95 °C 加热 5 min, 0 °C 冷却 10 min 变复性, 以适配体:CLS-PEG-NHS 按 1:5 摩尔比混合, 室温反应 10 h, 制得胆固醇-适配体, 即 CLS-PEG-AS1411 和 CLS-PEG-CTLA-4。用滴入法制

备 3 种适配体-脂质体: AS1411 适配体修饰的脂质体 (AS1411. Lipo)、CTLA-4 适配体修饰的脂质体 (CTLA-4. Lipo) 和双亲和性适配体脂质体 (Dat. Lipo)。按处方量 (表 1) 准确称取各种成分, 加入 6 mL 无水乙醇, 并将其置于 50 °C 充分溶解, 得脂质体储液。将 6 mL 无酶 PBS (phosphate buffer saline) 加热至 65 °C, 然后将脂质体储液滴加入无酶 PBS 中, 65 °C、120~200 r·min⁻¹ 搅拌反应体系, 反应 1~2 h 后停止。将最终所得溶液超声 3 min, 透析 48 h 纯化产物, 得到适配体-脂质体。

Table 1 Formulation of aptamer-liposome. HSPC: Hydrogenated soybean phosphatidylcholine; CLS: Cholesterol; PEG: Polyethylene glycol; DSPE: 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

Composition	AS1411. Lipo	CTLA-4. Lipo	Dat. Lipo
HSPC/mg	5.4	1.8	7.2
Cholesterol/mg	2.7	0.9	3.6
CH ₃ -PEG2000-DSPE/mg	0.9	0.3	1.2
CLS-PEG-AS1411/nmol	2.81	/	2.81
CLS-PEG-CTLA-4/nmol	/	0.93	0.93

细胞培养 肺癌人类肺泡基底上皮细胞 (A549)、人乳腺癌细胞 (MCF-7)、人肝癌细胞 (HepG2) 用含 1% 双抗 (100 u·mL⁻¹ 青霉素和 100 μg·mL⁻¹ 链霉素) 和 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基培养。人正常卵巢上皮细胞 (IOSE-80)、人 T 淋巴细胞瘤细胞 (Jurkat) 用含 1% 双抗和 10% FBS 的 RPMI1640 培养基培养。所有细胞购自汉恒生物技术 (上海) 有限公司。A549、MCF-7、HepG2 和 Jurkat 细胞每 2 天传代, IOSE-80 细胞每 3 天传代。将细胞置于 5% CO₂、恒温 37 °C 培养箱中培养。

PBMC (peripheral blood mononuclear cell) 的提取及激活 离心管分装 5 mL 外周血, 2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 去除血浆, 加 2.5 mL HBSS 到血细胞中。将 5 mL Ficoll 分离液加至离心管中, 缓缓加入血细胞混悬液。2 000 r·min⁻¹ 离心 20 min。用移液枪吸取白膜层细胞至新离心管中, 加 10 mL HBSS 充分吹打混匀, 1 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 沉淀为 PBMC。加入 RPMI1640 完全培养基充分吹打混匀, 加入 100 ng·mL⁻¹ CD3 抗体和 200 ng·mL⁻¹ HIL-2 刺激 PBMC 活化为 T 细胞。本研究获得了湖南省肿瘤医院中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院审查委员会的伦理批准。

流式分析 用 Cy3 分别标记 AS1411 适配体和 CTLA-4 适配体, 然后合成含 Cy3 荧光的 Con. Lipo (CTLA-4 对照核酸制备的脂质体)、CTLA-4. Lipo 和 Dat. Lipo。分别将 2×10⁵ 个 Jurkat 细胞与 Con. Lipo 和 Dat. Lipo 在 4 °C 孵育 0.5 h; 作为阴性对照, 将 2×10⁵ 个

Jurkat细胞悬浮在缓冲溶液中,于4 °C孵育0.5 h。分别将细胞数为 2×10^5 个的A549、MCF-7和HepG2细胞各自与CTLA-4. Lipo和Dat. Lipo在4 °C孵育0.5 h;作为阴性对照,将 2×10^5 个A549、MCF-7和HepG2细胞各自悬浮在缓冲溶液中,于4 °C孵育0.5 h。孵育结束后,用流式细胞仪检测各分组中材料与细胞的结合情况。

高内涵成像 分别用MitoSpy Red和CFSE对A549细胞和Jurkat细胞进行染色,用冷的缓冲溶液洗细胞2次。将Jurkat细胞与Dat. Lipo、AS1411. Lipo和CTLA-4. Lipo混合物,或阴性对照PBS组,在缓冲液中于4 °C孵育30 min。离心去除未结合材料,分别与等量A549细胞在RPMI1640完全培养基中混合,加入96孔板,于4 °C孵育5 h。将细胞用PBS洗2次,1% (w/v)低聚甲醛固定细胞,用高内涵成像系统对细胞进行成像。

Dat. Lipo促进T细胞对肿瘤细胞的免疫杀伤作用 分别将 1.5×10^4 个活化的T细胞与 $300 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的AS1411. Lipo、CTLA-4. Lipo和Dat. Lipo及PBS在4 °C孵育30 min,然后将 5×10^3 个HepG2细胞与上述T细胞混合,并将细胞混合液接种在96孔板中,置于5% CO_2 、37 °C培养箱中共培养40 h。培养结束后,用PBS洗细胞2次,去除悬浮T细胞,加入10% CCK8溶液检测。在5% CO_2 、37 °C培养箱中孵育1~2 h后,用酶联免疫检测仪在450 nm处测量吸光度(A_{450})值。按照公式(1)计算细胞存活率(survival rate, SR)。

$$\text{SR} = (A_s - A_b) / (A_c - A_b) \times 100\% \quad (1)$$

其中, A_s 为实验组吸光度, A_c 为对照组吸光度, A_b 为空白组吸光度。

为了验证Dat. Lipo促进T细胞对肿瘤细胞的免疫杀伤作用呈浓度依赖性,分别将 1.5×10^4 个活化的T细胞与不同浓度的Dat. Lipo在4 °C孵育30 min,然后将 5×10^3 个A549、MCF-7或HepG2细胞分别与上述T细胞混合,并将细胞混合液接种于96孔板。置于5% CO_2 、37 °C培养箱中共培养40 h。培养结束后,用PBS洗细胞2次,去除悬浮T细胞,加入10% CCK8溶液检测。在5% CO_2 、37 °C培养箱中孵育1~2 h后,测量 A_{450} 值。按公式(1)计算细胞SR。

Dat. Lipo的体外生物安全性 将 $8 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 个A549、MCF-7、HepG2及IOSE-80分别种于96孔板。待贴壁后,各细胞组分别加入PBS(对照)和 $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Dat. Lipo。置于5% CO_2 、37 °C培养箱中共培养45 h。用PBS洗细胞2次,加入10% CCK8溶液检测。在5% CO_2 、37 °C培养箱中孵育1 h后,测量 A_{450} 值。按公式(1)计算细胞SR。

肿瘤球渗透能力 将2%琼脂糖溶液平铺于96孔板底部,每孔80 μL 。待琼脂糖胶凝固后,每孔加 $2 \times 10^3 \sim 3 \times 10^3$ 个A549或MCF-7细胞,细胞悬液每孔体积为200 μL ,5天左右即可观察到明显的细胞圆球。第6天时,轻轻吸走孔内培养基,各组分别加入PBS、荧光标记的Con. Lipo和Dat. Lipo,4 °C孵育3 h后,用高内涵成像系统对肿瘤球进行成像。

Dat. Lipo对肿瘤球的促免疫杀伤能力 按前述方法构建A549和MCF-7肿瘤球模型。第5天,分别将 6×10^3 个活化的T细胞与PBS、AS1411. Lipo和Dat. Lipo($500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在4 °C孵育30 min,孵育结束后,将T细胞加入肿瘤球中。在5% CO_2 、37 °C培养箱中孵育48 h,在0、24、48 h对肿瘤球用高内涵成像系统对肿瘤球进行成像。最后用PI(propidium iodide)染料对肿瘤球染色,用高内涵成像系统分析肿瘤球中的细胞死亡情况。

统计学分析 用GraphPad Prism 8.0.2软件分析,结果用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数用one-way ANOVA方法进行方差齐性分析。 $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

结果

1 Dat. Lipo制备和表征

为了促进T细胞重定向至肿瘤细胞,从而增强T细胞发挥抗肿瘤免疫杀伤能力,本研究构建了一种双亲和性适配体靶向脂质体(Dat. Lipo)。5'端修饰-NH₂的AS1411和CTLA-4适配体与修饰NHS酯基的胆固醇通过氨基和NHS酯基的取代反应,形成胆固醇修饰的适配体,使其能负载到脂质体表面^[18]。通过乙醇注入法获得Dat. Lipo,用琼脂糖凝胶电泳对合成的Dat. Lipo进行表征(图2A),条带“1”为混合的AS1411和CTLA-4适配体,条带“2”为Dat. Lipo,两者中的各种适配体量保持一致。条带“2”比条带“1”亮度明显减小,说明多数适配体已被负载到Dat. Lipo中。

用透射电子显微镜(TEM)观察到Dat. Lipo的表面形貌呈球形(图2B)。使用马尔文激光粒度仪检测空脂质体Lipo和Dat. Lipo的水合粒径(图2C),平均粒径约为100 nm,粒径范围集中,分散性较好。为了测验Dat. Lipo纳米粒的稳定性,将Lipo和Dat. Lipo置于10% FBS中,并连续5天测量其粒径变化。由图2D可知,Lipo和Dat. Lipo纳米粒尺寸随时间变化较小,结构稳定性较好。

2 Dat. Lipo介导的T细胞重定向作用

2.1 Dat. Lipo细胞亲和性的流式分析 AS1411适配体对含核仁素蛋白的细胞有特异性亲和力^[20],CTLA-4

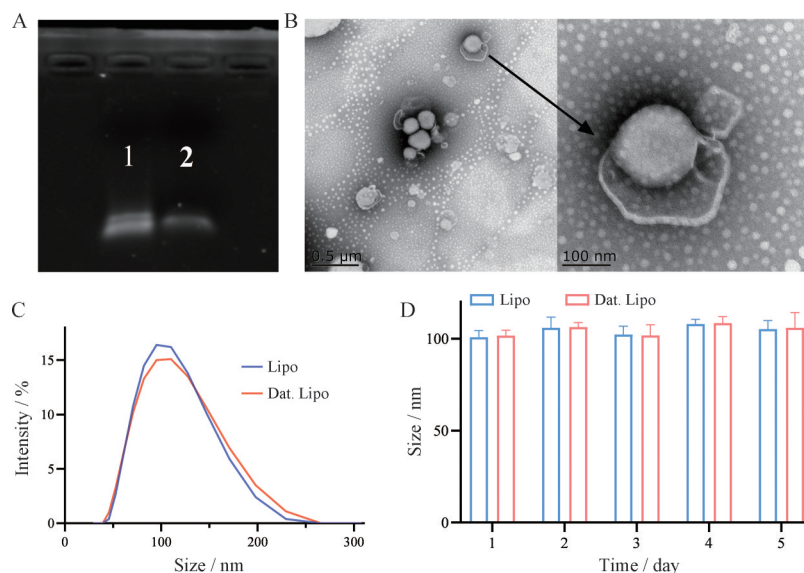


Figure 2 Characterization of the Dat. Lipo. A: Agarose gel electrophoresis to identify the conjugation of AS1411 and CTLA-4 aptamer to liposome surface. Lane 1: The mixture of AS1411 and CTLA-4 aptamer; Lane 2: Dat. Lipo; B: Transmission electron microscope (TEM) images of Dat. Lipo. Scale bar: 0.5 μm (left); 100 nm (right); C: The size distribution of liposome (Lipo) and Dat. Lipo; D: Size stability of Lipo and Dat. Lipo in 10% fetal bovine serum (FBS). $n = 3, \bar{x} \pm s$

适配体对含 CTLA-4 蛋白的细胞有特异性亲和力^[16], 同时负载 AS1411 和 CTLA-4 适配体的 Dat. Lipo 对相应细胞也具有特异性亲和作用。Jurkat 细胞是人 T 淋巴细胞白血病细胞, 其细胞膜高表达 CTLA-4 蛋白^[21]。作为对照, 合成了由不具备识别能力的随机对照序列组成的对照脂质体 (Con. Lipo)。通过流式细胞仪检测单独 CTLA-4 适配体或 AS1411 适配体、CTLA-4. Lipo 或 AS1411. Lipo、Con. Lipo 及 Dat. Lipo 对 Jurkat、A549、MCF-7 和 HepG2 细胞的亲和性 (图 3A), 结果表明, 将适配体进行胆固醇修饰并负载到脂质体上并不会影响其对细胞的靶向能力, Dat. Lipo 对 CTLA-4 蛋白阳性的 T 细胞和核仁素阳性的肿瘤细胞皆具有特异性亲和力, 为其促进 T 细胞重定向至肿瘤细胞提供了理论依据。

2.2 Dat. Lipo 介导的 T 细胞重定向成像 Dat. Lipo 能通过靶向两种靶点, 同时对两种细胞显示出特异性亲和力, 本研究用高内涵成像系统分析了 Dat. Lipo 促进 T 细胞重定向至肿瘤细胞的能力。高内涵成像结果显示 (图 3B), Dat. Lipo 孵育过的 Jurkat 细胞 (CFSE 染色) 被更多保留在 A549 细胞 (MitoSpy Red 染色) 周围, 且与 A549 细胞紧密相接; 而 Mix. Lipo (CTLA-4. Lipo 和 AS1411. Lipo 的混合物) 孵育过的 Jurkat 细胞绝大多数都被洗掉, 即使未被洗掉也不与 A549 细胞相接。分析 3 个分组中 Jurkat 细胞占总细胞的比例可知 (图 3C), Dat. Lipo 可有效促进含 CTLA-4 膜蛋白的 T 细胞重定向至含核仁素膜蛋白的肿瘤细胞周围。

Dat. Lipo 的双亲和性使 Jurkat 细胞与 A549 细胞紧密结合在一起, 这一结果为 Dat. Lipo 对 T 细胞的促免疫治疗作用进一步提供了依据。

3 Dat. Lipo 对肿瘤细胞的促免疫杀伤作用

3.1 Dat. Lipo 促进 T 细胞对肿瘤细胞的免疫杀伤作用 T 细胞重定向至肿瘤细胞可能会导致 T 细胞对肿瘤细胞的免疫杀伤作用增强。为了验证这点, 本研究将分别与 AS1411. Lipo、CTLA-4. Lipo 或 Dat. Lipo 孵育过的 T 细胞和 HepG2 细胞共培养。毒性检测结果如图 4A 所示, Dat. Lipo 介导的促 T 细胞免疫杀伤作用显著, 只有 68.24% HepG2 细胞依然存活, 即促免疫杀伤效果达 31.76%; CTLA-4. Lipo 介导的杀伤作用几乎为零; 而 AS1411. Lipo 组也对 HepG2 细胞表现出一定杀伤作用, 这可能是 AS1411 适配体对 HepG2 细胞造成的毒性作用。这表明 Dat. Lipo 通过促进 T 细胞重定向至肿瘤细胞, 增强 T 细胞对肿瘤细胞的免疫杀伤作用。

为了探究 Dat. Lipo 促进 T 细胞对癌细胞的免疫杀伤作用与其浓度的关系, 本研究使用与不同浓度 Dat. Lipo 孵育之后的 T 细胞和不同肿瘤细胞共培养, 结果如图 4B 所示。随着 Dat. Lipo 浓度的升高, T 细胞的免疫杀伤作用也逐渐增强, 当其浓度达 $1\ 000\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, MCF-7 细胞的存活率为 72.42%, HepG2 细胞的存活率为 58.1%。该结果也表明 Dat. Lipo 的促免疫杀伤作用对不同类型的肿瘤细胞会产生不同的疗效。

3.2 Dat. Lipo 的体外生物安全性 作为一种治疗剂,

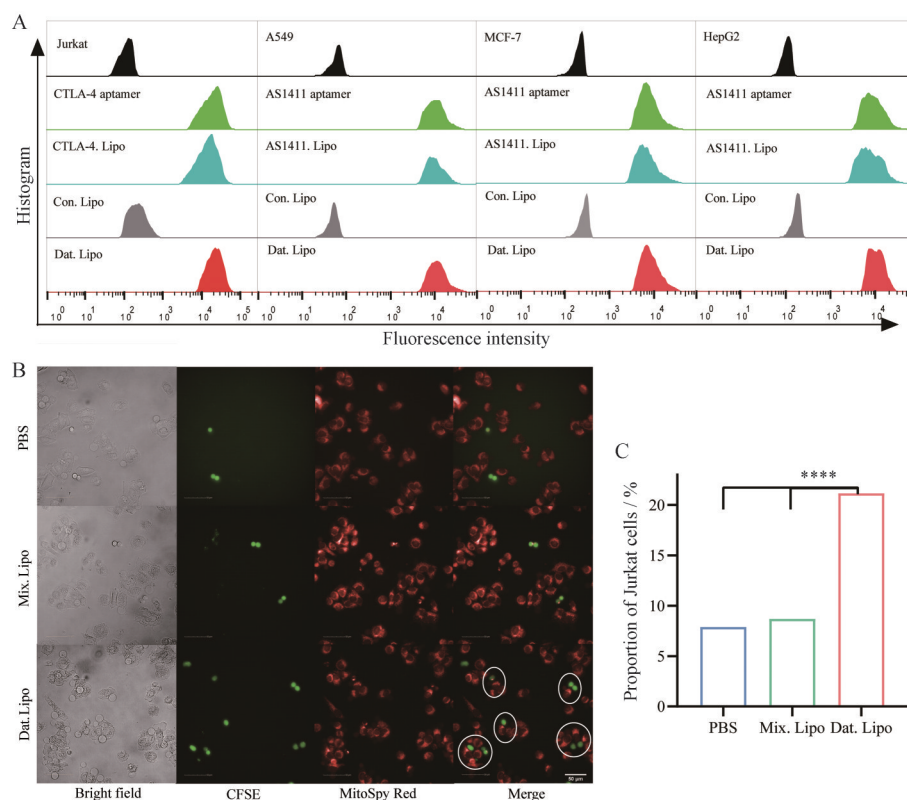


Figure 3 Dat. Lipo-mediated T cell redirection. A: Binding ability analysis of Dat. Lipo to Jurkat, A549, MCF-7 and HepG2 cells, determined by flow cytometry; B, C: Representative confocal micrographs (B) of T cells redirection after treatment with Dat. Lipo, and the proportion analysis of Jurkat cells (C). A549 cells were stained with MitoSpy Red, and Jurkat cells were stained with 5,6-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE) fluorescence dyes, a mixture of AS1411. Lipo and CTLA-4. Lipo was used as a control. Scale bar: 50 μm . **** $P < 0.0001$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

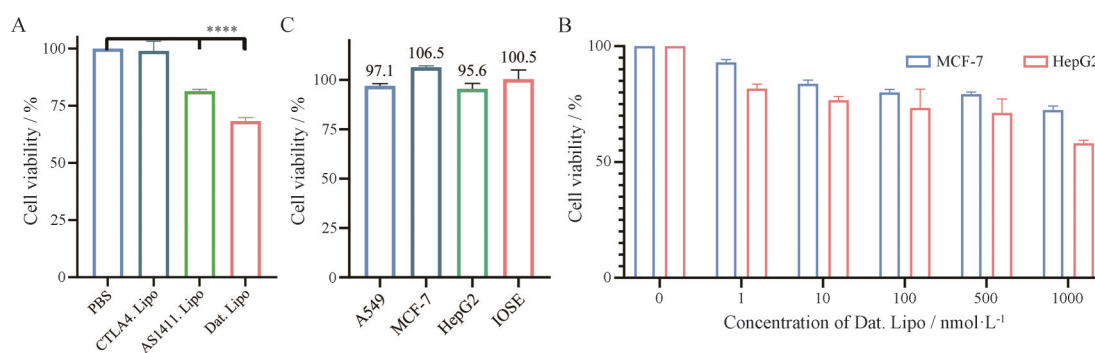


Figure 4 *In vitro* immunotherapeutic effect of Dat. Lipo. A: *In vitro* immunotherapeutic efficacy of HepG2 cells with treatment of T cells incubated by Dat. Lipo, AS1411. Lipo and CTLA-4. Lipo. Effector cells (E): target cells (T) = 3:1, effector cells represented T cells and target cells represented MCF-7 or HepG2 cells; B: Dose-dependent immunotherapeutic efficacy of Dat. Lipo for MCF-7 and HepG2 cells. E:T = 3:1; C: Cytotoxicity of Dat. Lipo against different cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. **** $P < 0.0001$

生物安全性尤其重要。为此,本研究用 Dat. Lipo 处理细胞膜表面表达或不表达核仁素的细胞,以检测 Dat. Lipo 的细胞毒性。IOSE-80 为人正常卵巢上皮细胞,细胞表面不表达核仁素; A549、MCF-7、HepG2 为肿瘤细胞,细胞表面高表达核仁素。CCK8 结果显示(图 4C), Dat. Lipo 对胞膜高表达或不表达核仁素蛋白的细胞都无细胞毒性(对 4 种细胞活力的抑制作用均不超

过 5%),表明 Dat. Lipo 并不产生直接细胞毒性,而是通过促进 T 细胞重定向至肿瘤细胞,从而增强 T 细胞对肿瘤细胞的免疫杀伤能力,生物安全性良好。

4 Dat. Lipo 对肿瘤球的促免疫杀伤能力

4.1 肿瘤球渗透能力 在用于实际治疗时,治疗剂需穿过肿瘤间质才能有效治疗实体肿瘤,本研究构造了 A549 肿瘤球和 MCF-7 肿瘤球模型来测验 Dat. Lipo 的

肿瘤深层渗透能力(图 5A、B)。在经历 3 h 的孵育后, Dat. Lipo 孵育的肿瘤球具有很强的荧光强度, 而 Con. Lipo 组的肿瘤球荧光极弱, 表明 Dat. Lipo 能很好地富集并渗透进入 A549 肿瘤球和 MCF-7 肿瘤球内部, Con. Lipo 由于缺乏对肿瘤细胞的特异亲和性而无法富集到肿瘤球。这为 Dat. Lipo 治疗实体肿瘤提供了初步依据。

4.2 Dat. Lipo 促进 T 细胞对 A549、MCF-7 细胞肿瘤球的生长抑制作用 为了进一步探究 Dat. Lipo 在 3D 维度促进 T 细胞治疗肿瘤的效力, 在 A549 和 MCF-7 肿瘤球生长到第 5 天时, 加入 3 倍量经过不同材料孵育后的活化 T 细胞与肿瘤球共培养。随着共培养时长不断增加, 可观察到施加 Dat. Lipo 的 A549 肿瘤球(图 5C)和 MCF-7 肿瘤球(图 5D)形态逐渐变得松散, 且肿瘤球周围存在较多细胞碎片; 而 PBS 组和 Con. Lipo 组中的肿瘤球依然保持明显的球形, 表明即使是致密的肿瘤球, Dat. Lipo 也能促进 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。利用 PI 染料对活死细胞的特殊性(不能穿过完整的活细胞膜, 只能在细胞坏死的情况下穿过其破损的细胞膜), 对 MCF-7 肿瘤球中的死细胞进行染色分析(图 5E), 可观察到 Dat. Lipo 组中有较强的 PI 信号, 而对照组中 PI 信号却较弱, 进一步确定了 Dat. Lipo 可有效促进 T 细胞在不同维度对肿瘤细胞的杀伤作用。

肿瘤球实验结果表明, Dat. Lipo 对肿瘤细胞有较强特异性亲和作用, 且可渗透进肿瘤球内部。T 细胞在 Dat. Lipo 的协助下不仅能聚集在肿瘤球周围, 还可侵入肿瘤球内部, 促使 T 细胞在不同肿瘤球深度对肿瘤产生杀伤作用。

讨论

利用细胞免疫疗法^[22]和双特异性抗体^[23]实现 T 细胞重定向至肿瘤细胞, 对癌症展现出良好的治疗效果, 但这两种治疗方式均需涉及复杂繁琐的细胞工程、基因工程和纯化程序, 且可能引起致命的细胞因子释放综合征^[5]。适配体由于其独特的三维结构和分子相互作用, 具有高稳定性、高结合亲和力、高特异性和低免疫原性, 能以高亲和力和特异性与其靶标结合, 被视为抗体的理想替代物^[17]。AS1411 适配体对高表达于多种肿瘤细胞的核仁素蛋白有高亲和力靶向作用, 并可在一定程度上抑制多种肿瘤细胞的生长, 而对正常细胞基本无影响^[20]。免疫检查点 CTLA-4 蛋白表达于 T 细胞表面, 通过竞争结合 B7 来减弱 CD28 的共刺激和抑制信号传导, 阻断 CTLA-4 蛋白和 B7 的结合可重塑宿主免疫反应^[24]。CTLA-4 适配体可特异性结合 CTLA-4 蛋白, 释放 B7 与 CD28 相互作用, 从而促进 T

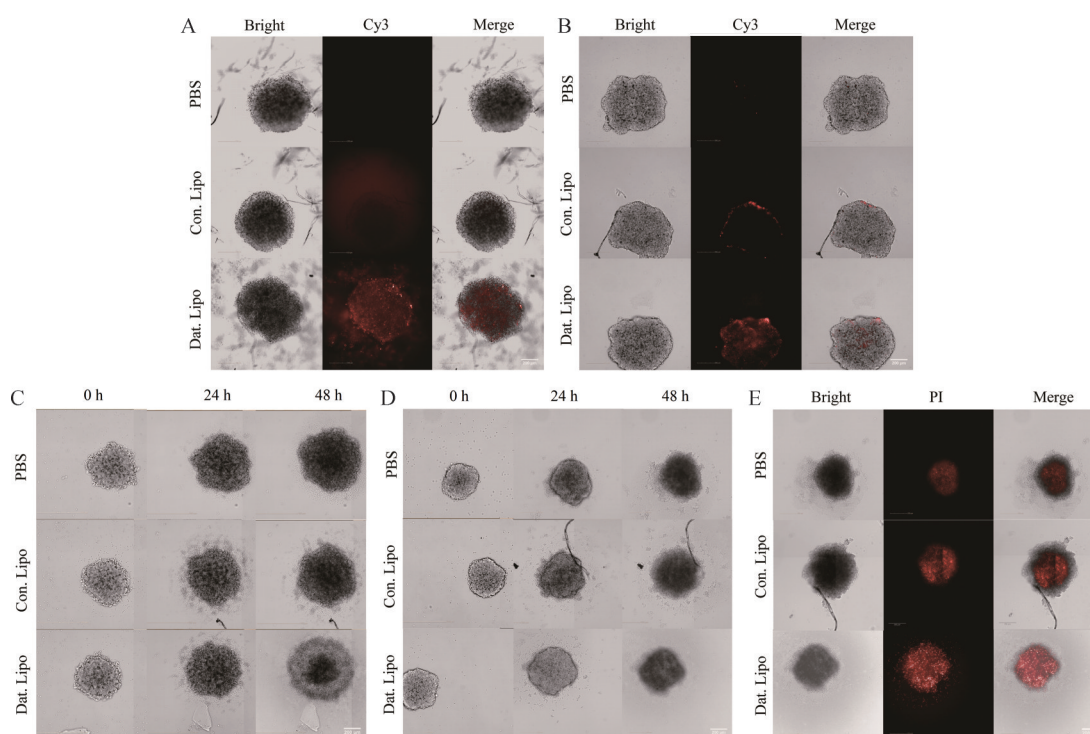


Figure 5 Immunotherapeutic effect of Dat. Lipo on tumor spheroids. A, B: The specific affinity and permeability of Dat. Lipo to A549 (A) and MCF-7 (B) tumor spheroids. A kind of liposome synthesized by disordered aptamer was used as control; C, D: T cells incubated with Dat. Lipo or Con. Lipo were co-cultured with A549 (C) and MCF-7 (D) tumor spheroids for 48 h to detect their immunotherapeutic effect in 3D dimension; E: PI staining was used to detect the cell death of MCF-7 tumor spheroids after co-culture for 48 h. Scale bar: 200 μm

细胞的活化增殖。

本研究所构建的 Dat. Lipo 利用 AS1411 适配体和 CTLA-4 适配体, 可通过将 T 细胞重定向至肿瘤细胞增强免疫治疗效果, 是一个适用于多种肿瘤的 T 细胞免疫疗法。Dat. Lipo 粒径约 100 nm, 有利于其蓄积在肿瘤部位, 且纳米级脂质体可装载治疗药物提高疗效。流式和成像结果显示, Dat. Lipo 对多种高表达核仁素蛋白的肿瘤细胞具有良好靶向作用, 且可特异性靶向含 CTLA-4 蛋白的 T 细胞, 这提示 Dat. Lipo 可能通过抑制免疫检查点改善肿瘤免疫抑制微环境, 提高 T 细胞免疫应答, 促进 T 细胞活化。Dat. Lipo 可进一步将 T 细胞重定向至肿瘤细胞, 促进免疫突触的形成, 增强 T 细胞的激活。Dat. Lipo 孵育过的 T 细胞对 HepG2 和 MCF-7 细胞的免疫杀伤率分别达到 41.9% 和 27.58%, 这揭示 Dat. Lipo 可通过 T 细胞重定向和抑制免疫检查点促进 T 细胞对不同肿瘤细胞的杀伤作用, 但可能由于不同肿瘤细胞核仁素膜蛋白表达量的不同而导致不同的免疫疗效^[25]。令人惊喜的是, Dat. Lipo 并不会对细胞产生毒性, 具有良好的生物安全性。Dat. Lipo 还可在 3D 维度促进 T 细胞对 A549 和 MCF-7 肿瘤球的深层渗透和免疫杀伤作用, 为其治疗实体肿瘤提供了初步依据。

综上, 本研究基于 AS1411 适配体和 CTLA-4 适配体构建了一种可用于治疗多种肿瘤的 Dat. Lipo, 可通过简单的使用方法增强 T 细胞对肿瘤细胞的免疫治疗, 而无需复杂耗时的制备过程。结果提示, Dat. Lipo 可通过 CTLA-4 阻断改善肿瘤免疫应答, 可招募 CTLA-4 阳性 T 细胞渗透到肿瘤中, 从而增强其抗肿瘤效果, 安全性良好, 为进一步探索其在体内的肿瘤靶向性、促免疫治疗作用和体内生物安全性提供了实验基础。

作者贡献: 任欢欢负责材料合成和实验设计; 贾国萍负责对实验过程出现的问题及时解答; 黄婧、王梦迪和孙定亚负责细胞实验; 王珊和褚超男负责文章整理和稿件修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Zhang X, Zhu L, Zhang H, et al. CAR-T cell therapy in hematological malignancies: current opportunities and challenges [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 927153.
- [2] Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, et al. Toxicity and management in CAR T-cell therapy [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2016, 3: 16011.
- [3] Zhao Y, Deng J, Rao S, et al. Tumor infiltrating lymphocyte (TIL) therapy for solid tumor treatment: progressions and challenges [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14: 4160.
- [4] Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, 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: 664-679.
- [5] Wang Q, Chen Y, Park J, et al. Design and production of bispecific antibodies [J]. *Antibodies (Basel)*, 2019, 8: 43.
- [6] Fournier P, Schirmacher V. Bispecific antibodies and trispecific immunocytokines for targeting the immune system against cancer: preparing for the future [J]. *BioDrugs*, 2013, 27: 35-53.
- [7] Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 537-550.
- [8] Du Y, Zhang D, Wang Y, et al. A highly stable multifunctional aptamer for enhancing antitumor immunity against hepatocellular carcinoma by blocking dual immune checkpoints [J]. *Biomater Sci*, 2021, 9: 4159-4168.
- [9] Soldevilla MM, Villanueva H, Casares N, et al. MRP1-CD28 bi-specific oligonucleotide aptamers: target costimulation to drug-resistant melanoma cancer stem cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 23182-23196.
- [10] Yang Y, Sun X, Xu J, et al. Circular bispecific aptamer-mediated artificial intercellular recognition for targeted T cell immunotherapy [J]. *ACS Nano*, 2020, 14: 9562-9571.
- [11] Li Z, Hu Y, An Y, et al. Novel bispecific aptamer enhances immune cytotoxicity against MUC1-positive tumor cells by MUC1-CD16 dual targeting [J]. *Molecules*, 2019, 24: 478.
- [12] Xing H, Tang L, Yang X, et al. Selective delivery of an anticancer drug with aptamer-functionalized liposomes to breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Mater Chem B*, 2013, 1: 5288-5297.
- [13] Iturriaga-Goyon E, Vivanco-Rojas O, Magana-Guerrero FS, et al. AS1411 nucleolin-specific binding aptamers reduce pathological angiogenesis through inhibition of nucleolin phosphorylation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 13150.
- [14] Lo B, Abdel-Motal UM. Lessons from CTLA-4 deficiency and checkpoint inhibition [J]. *Curr Opin Immunol*, 2017, 49: 14-19.
- [15] Zhang H, Dai Z, Wu W, et al. Regulatory mechanisms of immune checkpoints PD-L1 and CTLA-4 in cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40: 184.
- [16] Huang BT, Lai WY, Chang YC, et al. A CTLA-4 antagonizing DNA aptamer with antitumor effect [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 8: 520-528.
- [17] Zhang YY, Chen JM. Existing problems and strategies in liposome-mediated nucleic acid delivery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 261-268.
- [18] Yue X, Dai Z. Liposomal nanotechnology for cancer theranostics [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25: 1397-1408.
- [19] Yazdian-Robati R, Bayat P, Oroojalian F, et al. Therapeutic applications of AS1411 aptamer, an update review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 155: 1420-1431.
- [20] Llinas L, Lazaro A, de Salort J, et al. Expression profiles of

- novel cell surface molecules on B-cell subsets and plasma cells as analyzed by flow cytometry [J]. *Immunol Lett*, 2011, 134: 113-121.
- [21] O'donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16: 151-167.
- [22] Suurs FV, Lub-de Hooge MN, de Vries EGE, et al. A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 201: 103-119.
- [23] Morita Y, Leslie M, Kameyama H, et al. Aptamer therapeutics in cancer: current and future [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10: 80.
- [24] Wolchok JD, Neyns B, Linette G, et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11: 155-164.
- [25] Koutsoumpa M, Papadimitriou E. Cell surface nucleolin as a target for anti-cancer therapies [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2014, 9: 137-152.