技术与方法

## 低温电转联合Sleeping beauty转座子系统 增强CAR-T修饰效率

赵军红 郑立群 傅雅娟 蔡少丽\*

(「福建师范大学南方生物医学研究中心,福州 350117; 2福建省天然免疫生物学重点实验室,福州 350117)

摘要 嵌合抗原受体T淋巴细胞(chimeric antigen receptor T cells, CAR-T cells)在恶性B淋巴 细胞瘤治疗上取得了显著成效。CAR-T治疗通过分离病人外周血单个核细胞PBMC, 经适当的基 因编辑手段表达CAR结构,令T细胞获得靶向肿瘤细胞的能力,扩增后过继到体内完成对肿瘤的 杀伤。该文主要探索在低温状态将含有睡美人(*Sleeping beauty*)转座子/转座酶系统的质粒电转进 PBMC内表达CD19-CAR制备CAR-T细胞,并添加特定细胞因子进行增殖,并验证CAR表达、细 胞活性与杀伤能力。结果表明,转染效率高达58.8%±4.1%,增殖后的CAR-T细胞能够整合并表达 CAR基因,在与靶细胞共培养后,表现出与慢病毒制备的CD19-CAR相似的细胞活性和毒性。该文 确定了一种基于*Sleeping beauty*转座子/转座酶和电转制备CAR-T细胞的方法,为临床CAR-T治疗提 供了新的思路。

关键词 嵌合抗原受体; CD19; 电转T淋巴细胞; 睡美人转座子; 慢病毒

## Low Temperature Electroporation Combined with *Sleeping beauty* Transposon System Enhances CAR-T Modification Efficiency

ZHAO Junhong, ZHENG Liqun, FU Yajuan, CAI Shaoli\*

(<sup>1</sup>Southern Biomedical Research Center, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China; <sup>2</sup>Fujian Key Laboratory of Innate Immune Biology, Fuzhou 350117, China)

**Abstract** CAR-T cells (chimeric antigen receptor redirected T cells) have shown the beneficial effects in patients with B cell malignancies in clinical trials. The CAR-T cells were generated from patients' blood using the PBMC and introduced in CAR constructs, then the genetically modified T cells will gain the anti-tumor ability and kill tumor cells. DNA electroporation could be more convenient and cost-effective, but this approach required to co-cultured CAR-T cells with artificial antigen-presenting cells for several rounds, which reduces the yield and efficiency. Thereby, a convenient, efficient and low-cost procedure for CAR-T cells by fresh PBMC, which includes using very high voltage to introduce the *Sleeping beauty* transposon/transposase system in the low temperature

This work was supported by the Natural Science Foundation of the Fujian Province (Grant No.2017J01621)

\*Corresponding author. Tel: +86-591-22868830, E-mail: caishaoli@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2019-09-17 接受日期: 2019-11-06

福建省自然科学基金(批准号: 2017J01621)资助的课题

<sup>\*</sup>通讯作者。Tel: 0591-22868830, E-mail: caishaoli@fjnu.edu.cn

Received: September 17, 2019 Accepted: November 6, 2019

网络出版时间: 2020-01-07 13:33:30 URL: http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20200107.1333.006.html

condition to directly express a CD19-specific CAR and produce modified CAR-T cells in the presence of specific cytokines. We examined the CAR gene integration and expression in the T cells derived from PBMC after proliferation. Results showed that the cells display cyto-activity and cytotoxicity against the cancer cells in the co-culturing system, and the lentivirus transduced CAR-T cells have a comparable efficiency. In conclusion, we developed a systemic approach for producing CAR-T cells based on the *Sleeping beauty* transposon/transposase system and electroporation, which essentially provides an alternative method for CAR-T-based therapies in clinical setting.

Keywords chimeric antigen receptor; CD19; electro-transfer to T lymphocytes; *Sleeping beauty*; lentivirus

近年来,免疫细胞治疗受到广泛关注,包括淋 巴因子激活杀伤细胞(lymphokine-activated killer cell, LAK)治疗<sup>[1]</sup>、肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)治疗<sup>[2]</sup>、细胞因子诱导的杀 伤细胞(cytokine-induced killer, CIK)治疗<sup>[3]</sup>等,这些 过继细胞免疫治疗(adoptive cellular immune-therapy, ACI)曾在黑色素瘤和肾细胞癌等恶性肿瘤的治疗上 取得了一定成效。然而由于肿瘤细胞的免疫逃逸、 MHC丢失、宿主细胞的免疫耐受等问题,上述方法 仍然存在一定的局限性<sup>[2]</sup>。

为建立一种能长期缓解甚至治愈癌症的可行 方法, T细胞编辑修饰技术包括嵌合抗原受体CAR-T 技术快速发展。1989年, Eshhar实验室<sup>[4]</sup>首次提出了 嵌合抗原受体的概念,也是第一代CAR结构,指出 该结构由识别肿瘤表面抗原的单链抗体可变区片段 (single chain variable fragment, scFv)、跨膜区和胞内 区CD3 公上的免疫受体酪氨酸激酶活化基序(immune receptor tyrosine-based activation motif, ITAM)组成。 scFv可特异性识别肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA), 将活化信号传导至胞内, 启动并活化 下游级联反应,特异性杀伤肿瘤细胞<sup>[5]</sup>。但由于其修 饰的T细胞增殖能力较低、分泌细胞因子能力较弱, 所以无法在体内提供持续的抗肿瘤效应。随后Carl June等<sup>[12]</sup>在此基础上引入CD28<sup>[6]</sup>、CD134(OX40)<sup>[7-8]</sup>、 CD137(4-1BB)<sup>[9]</sup>和DAP10<sup>[10]</sup>等共刺激分子(costimulatory molecule, CM)<sup>[11]</sup>, 设计出以scFv-CM-ITAM嵌合 模式的第二代CARs(单共刺激分子)<sup>[6-8]</sup>和scFv-CM1-CM2-ITAM第三代CARs(双共刺激分子)<sup>[10]</sup>,有效刺 激T细胞持久增殖,提高T细胞肿瘤杀伤活性。这一 结构的改进在临床治疗上取得显著成效,并于2011 年发表了应用CAR修饰T细胞成功治疗慢性淋巴细 胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)的临床 研究报告,表明CD19-CAR(scFvCD19-CD137-CD3公) 修饰的T细胞在CLL治疗方面取得重大突破[12-13]。

目前, 慢病毒载体由于其在T细胞编辑修饰过 程中具有稳定性好、效率高、且能稳定遗传的特 点,适合对不同批次的T细胞进行编辑,因此成为构 建CAR-T细胞应用最广泛的载体[14-15]。但是慢病毒 包装过程耗时久、成本高、质控繁琐以及存在可能 会整合到基因组的安全性等问题[16],限制了其推广 应用,因此开发一种更加安全高效的新的T细胞编辑 方法尤为重要。因此, SINGH等[17-18]开发了基于转 座子载体睡美人(Sleeping beauty, SB)构建的CAR-T 表达系统,该系统使用电转染的方法,导入并制备了 CD19-CAR-T细胞,在实验中降低了T细胞毒性。该 转座子系统包含编码转座子酶和携带目的基因及 其两端的反向重复序列(IR/DR)的两个质粒。CD19 在B淋巴瘤表面表达最多,成为治疗B淋巴瘤的治疗 靶点[19]。然而,转座子载体由于通过电穿孔的方法 导入载体,其表达效率较差。本研究改进了睡美人 转座子表达系统,通过对电转染条件的优化,建立 了高效稳定的人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)转染体系, 制备CD19-CAR-T细胞,并通过流式分析及细胞活性检测,确立了一 种高效便捷的T细胞编辑方法,该方法成本低、操作 便捷,省去了复杂的质控,且安全性更高,有望用于 临床CAR-T治疗。

## 1 材料与方法

## 1.1 细胞和质粒

PBMC(人外周血单个核细胞)取自23~28岁健 康志愿者,获南方生物医学中心伦理审查批准以及 受试者知情同意;Jeko-1及K562细胞购自中国科学 院细胞库;293T细胞来自本实验室库存;澳洲胎牛 血清购自Gibco公司;DMEM、RPMI-1640、PBS缓 冲液、Opti-MEM购自Hyclone公司;绿色荧光蛋白 质粒pMax-GFP、X-VIVO<sup>15</sup>淋巴细胞无血清培养基 购自Lonza公司;转座系统Sleeping beauty的两个质 粒pT2/SVneo和SB100X购自Addgene公司; 慢病毒 包装质粒PLP1、PLP2、VSV-G来自本实验室库存。

## 1.2 试剂与仪器

Ficoll购自GE公司; 重组人白细胞介素2、小 鼠抗人CD3单克隆抗体购自Genecom公司; 小鼠抗 人CD28单克隆抗体购自北京同立海源公司; 电转 液、120 µL电转杯、电转仪购自Celetrix公司; CAR TEST-19检测试剂盒购自CytoCares公司;人IFN-γ ELISA试剂盒购自Neobioscience公司; CCK8检测 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; IRDye 680LT donkey anti-mouse IgG(H+L)、 IRDye 800CW donkey anti-rabbit IgG(H+L)购自Odyssey公司; Fxiable Viability Stain 620, APC Mouse Anti-Human CD3、Percp-Cy<sup>™</sup>5.5 Mouse Anti-Human、 流 式 细 胞仪均购自BD公司; CD247 Rabbit Polyclonal antibody、GAPDH Mouse mAb购自Proteintech公司; PCR 引物由福州擎科生物公司合成; 琼脂糖、酵母提取 物、蛋白胨、琼脂粉购自生工生物工程上海股份有 限公司;细胞培养箱购自Thermo公司。

#### 1.3 实验方法

1.3.1 PBMC的分离培养 抽取人25 mL外周血, 使用Ficoll密度梯度离心分离全血, 收集PBMC。用 X-VIVO<sup>15</sup>培养基重悬置于6孔板内,密度1×10<sup>6</sup>/mL, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养2 h, 让巨噬细胞和DC细胞贴壁, 取出PBMC置于新6孔板,加X-VIVO<sup>15</sup>(含500 U/mL rhIL-2、200 ng/mL human CD3/CD28)培养。

1.3.2 Sleeping beauty转座载体的构建 本文通过 同源重组的方式(LIC)进行目的载体的构建,不依赖 连接酶。根据primer premier 6设计抗CD19-CAR的 LIC扩增引物(表1),以合成的序列为模板,PCR扩增 得到目的片段,电泳后切胶回收。EcoR V、Bstb I双 酶切pT2/SVneo载体,将目的片段和酶切载体使用 LIC方法构建,反应体系50 ng载体、50 ng目的片段、

1.3.3 pMax-GFP电转染PBMC 分离培养的PBMC 锥虫蓝染色计数后,依照120 μL体系10<sup>7</sup>个PMBC细 胞, 10 µg pMax-GFP质粒配制电转混合体系, 按设定 的电转参数进行电转(表2), 电转后的细胞接种到含 X-VIVO<sup>15</sup>(含500 U/mL human-IL-2、200 ng/mL CD3/ CD28、10% FBS)培养基的24孔板内培养。

1.3.4 低温状态下pMax-GFP电转染PBMC及扩增 细胞处理及电转体系配置见1.3.3。将混合体系与电 转杯分别4°C低温处理3~5 min后,参照设置电压参 数进行电转(表3)。电转后将细胞接种于24孔板内, 加入X-VIVO<sup>15</sup>培养基(含10% FBS、500 U/mL IL-2、 200 ng/mL CD3/CD28单克隆抗体)置于 37 °C、5% CO2培养箱培养。待细胞呈大规模聚团时,每2~3天 用X-VIVO<sup>15</sup>培养基进行传代,细胞密度1×10<sup>6</sup>个/mL, 以维持细胞正常生长和聚团。

1.3.5 流式细胞检测 将电转后的细胞悬液计数, 取2×10<sup>5</sup>个PBMC细胞1 000 r/min, 离心5 min, 弃上 清。加入300 µL PBS和对应染料/抗体避光常温孵育 30 min, PBS清洗后进行流式上机操作。

1.3.6 Western blot检测CD3ζ蛋白水平 Sleeping beauty转座子系统电转制备 SB-CD19-CAR-T细 胞,14天后取细胞用预冷PBS洗涤,加入细胞裂解 液(含1% PMSF)裂解细胞提取蛋白。SDS-PAGE电 泳,转膜印迹到PVDF膜,5% BSA封闭1 h,加入一抗 CD3ζ(1:1 000) 4 °C过夜孵育。TBST洗涤3次,每次7 min。加入荧光标记的二抗(1:10 000)室温避光孵育 1h,使用Odyssey荧光显色。

1.3.7 PCR检测aCD19-CAR的表达 *Sleeping beauty* 转座子系统电转制备SB-CD19-CAR-T细胞, 14天后

Table 1 Anti-CD19 CAR primer designed for LIC			
引物	序列	产物大小	
primer	Sequence	Product length	
SVneo-aCD19-GFP-F	ggg agc ttg gat atc ATG GCC TTA CCA GTG	2 364 bp	
SVneo-aCD19-GFP-R	gtc ggt cat ttc gaa TTA GAA TTC CTT GTA	2 364 bp	
SVneo-aCD19-F	ggg agc ttg gat atc ATG GCC TTA CCA GTG	1 656 bp	
SVneo-aCD19-R	gtc ggt cat ttc gaa TTA GCG AGG GGG CAG	1 656 bp	

表1 抗CD19 CAR的LIC扩增引物

\*小写字母部分为同源臂,大写字母部分为目的序列结合部。

\*The lowercase part is the homologous arm, and the uppercase part is the binding part of the target sequence.

	Table 2	Electroporation setting	
电压/伏	时间/毫秒	脉冲/个	间隔时间/毫秒
Voltage /V	Time /ms	Impulse /number	Interval time /ms
1 000	20	1	0
820	30	1	0
710	20	2	2
1 100	20	1	0
900	30	1	0
780	20	2	2
1 200	20	1	0
980	30	1	0
850	20	2	2
1 300	20	1	0
1 060	30	1	0
920	20	2	2

表2 电转参数设置 Fable 2 Electronoration setting

表3 低温电转参数设置

Table 3	Electroporation se	etting with lov	v temperature	
时间/毫	秒	脉冲/个		间隔时间

电压/伏	时间/毫秒	脉冲/个	间隔时间/毫秒
Voltage /V	Time /ms	Impulse /number	Interval time /ms
1 120	20	1	0
1 150	20	1	0
1 180	20	1	0
1 210	20	1	0
1 240	20	1	0

取细胞用购自天根公司基因组提取试剂盒提取基因 组DNA,将模板稀释至30 ng/µL再进行PCR。反应 条件为98 °C 5 min; 98 °C 10 s, 59 °C 5 s, 72 °C 10 s, 32 个循环; 72 °C 10 min。1.5%琼脂糖电泳检测。

1.3.8 慢病毒载体pCDH-CAR-T细胞构建 首 先进行慢病毒包装,使用PLP1:PLP2:VSVG:pNL-GFP/pLvx-CAR质粒按照2:1:1:2转染293T,(pNL-GFP/b底毒荧光质粒为对照,pCDH-GFP为连接有 CD19-CAR的慢病毒质粒),转染后24 h收集培养 上清,25 000 r/min离心,2 h浓缩病毒。然后感染 PBMC,加X-VIVO<sup>15</sup>培养基置于37 °C培养箱培养。

1.3.9 细胞活性及杀伤能力检测 将CAR-T细胞 分别与靶细胞Jeko-1和对照细胞K562混合培养16 h 后,取培养上清分别用ELISA和CCK8检测试剂盒检 测IFN-γ的释放情况及CAR-T细胞的杀伤能力。

### 1.4 统计学方法

实验数据采用GraphPad Prism 8.0软件分析,进行 独立样品t检验,分析显著性差异。P<0.05具有统

计学差异。

### 2 结果

## 2.1 成功构建pSVneo-CD19和pSVneo-CD19-T2A-GFP载体

以合成的序列为模板,通过PCR分别得到转座 质粒pFMC63-4-1bb-CD3ζ和pFMC63-4-1bb-CD3ζ-T2A-eGFP, 二者都包含有表达4-1bb-CD3ζ的CAR结 构,后者还表达绿色荧光蛋白(green fluorescent proteine, GFP),可通过T2A位点切割后与CAR分离。1% 琼脂糖凝胶电泳后,可见1 656 bp和2 364 bp特异性 条带(图1A)。*Eco*R V、*Bst*b I双酶切pT2/SVneo载体, 电泳检测(图1B)。利用LIC法将目的片段分别和两 个转座质粒构建在一起,挑选克隆后测序用Bioedit 比对(图1C),片段大小和比对结果一致,证明构建成 功。

## 2.2 不同条件对pMax-GFP电转染PBMC的影响 室温条件下,通过不同参数将含有GFP的载体

2371



A: 目的片段PCR扩增后凝胶电泳结果, 左为pFMC63-4-1bb-CD3ζ序列, 右为pFMC63-4-1bb-CD3ζ-T2A-eGFP序列; B: pT2/SVneo双酶切产物凝 胶电泳结果, 1为pT2/SVneo质粒电泳结果, 2为pT2/SVneo双酶切电泳结果; C: pT2/SVneo测序结果: 连接有pFMC63-4-1bb-CD3ζ-H段的重组质 粒, 连接有pFMC63-4-1bb-CD3ζ-T2A-eGFP片段的重组质粒。

A: the result of PAGE after PCR amplification of the target fragment: pFMC63-4-1bb-CD3 Zeta sequence on the left and pFMC63-4-1bb-CD3 Zeta-T2A-eGFP sequence on the right; B: pT2/SVneo double enzyme digestion products; 1 is pT2/SVneo sequence; 2 is pT2/SVneo double enzyme digestion products; C: pT2/SVneo sequencing results: recombinant plasmid ligating pFMC63-4-1bb-CD3 $\zeta$  fragment, recombinant plasmid ligating pFMC63-4-1bb-CD3 $\zeta$ -T2A-eGFP fragment.

#### 图1 Sleeping beauty转座质粒的构建 Fig.1 Construction of Sleeping beauty transposable plasmid

pMax-GFP电转PBMC, 12 h后在荧光显微镜下观察 记录GFP表达情况(图2A),并对所有细胞进行流式分 析(图2B)。结果显示, 电流对细胞造成的损伤十分 显著。其中1 200 V 20 ms; 980 V 30 ms; 850 V 20 ms, 2 pulse, 2 ms三个条件因电流过高, 无法取得活细胞 团而无法检测。室温条件下1 100 V 20 ms电转效率 最高。在1 200 V 20 ms下,细胞几乎全部死亡,说明 在室温条件下,1200 V已超过细胞能承受的电压极 限。在低温条件下,在不同电压下进行pMax-GFP电 转PBMC, 12 h后观察并记录GFP表达情况(图3A),并 对所有细胞进行流式分析(图3B)。结果显示,低温处 理,1210 V、20 ms电转效率最高。1 240 V、20 ms其次。 但前者细胞形态更好,活细胞聚团明显(图3A),说明, 低温对细胞具有明显的保护作用,能提高细胞对高电 压的承受能力。因此确定低温处理,1210 V、20 ms 为最适电转条件。

# **2.3** *Sleeping beauty*转座子电转PBMC目的基因 表达和整合的鉴定

根据上述结果,选择最佳参数1 210 V 20 ms 低温状态进行电转。结果显示,在低温下将GFP与 SB-GFP质粒分别电转PBMC,细胞数量随着培养 天数稳定增加,活率恢复到80%以上(图4)。通过荧 光检测发现,含有转座子*Sleeping beauty*系统的SB-PBMC组,GFP表达量随着时间的增加而趋于稳定; 而仅电转GFP质粒的PBMC组,GFP表达量随时间 的增加而不断降低,第20天SB-PBMC组GFP的表 达量明显高于GFP-PBMC组(P<0.01)(图5A)。流 式分析发现,SB-PBMC组中CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T细胞中 GFP表达量随着培养天数不断增加(图5B和图5C)。 为了保证后续实验细胞的活性与状态,我们选择在 第14天对目的基因的整合和表达进行检测。结果 显示, aCD19可以通过*Sleeping beauty*系统整合至 PBMC细胞基因组内,并检测到CD3ζ蛋白的表达 (图6)。

## 2.4 低温处理SB-CAR-T细胞的构建及其活性与 毒性检测

为了进一步验证*Sleeping beauty*转座子构建的 SB-CAR-T细胞的活性和杀伤靶细胞的能力,我们 同时使用慢病毒载体构建pCDH-CAR-T细胞进行 对照,比较电转制备的SB-CAR-T与慢病毒制备的



A: 室温状态, 不同电转参数下GFP电转染PBMC后GFP表达情况; B: PBMC各电转参数流式分析。 A: expression of GFP after electro transfer of GFP with different electroporation parameters into PBMC at room temperature; B: PBMC electroporated by different conditions and analyzed by flow cytometry.



pCDH-CAR-T细胞CAR分子表达、IFN-γ释放及细胞毒性,以确定低温电转制备的CAR-T细胞是有功能的。应用流式分析对修饰后T细胞表面CAR的表达进行检测,证明SB-CAR-T细胞与pCDH-CAR-T细胞的CD4和CD8亚群的T细胞中均能在细胞表面表达所构建的CAR结构(图7)。以Jeko-1为靶细胞,K562为对照细胞,共培养24h后SB-CAR-T细胞IFN-γ释放量为2317.73±1335.57 pg/mL,与pCDH-CAR-T细胞相近,且与正常PBMC和靶细胞培养结果有明显差异(P<0.01)(图8)。将靶细胞和对照细胞

以不同的效靶比共培养,当效靶比在10:1时,可造成 50%以上的靶细胞裂解,细胞毒性为61.76%±6.68% (n=4)(图9)。

## 3 讨论

本研究运用Sleeping beauty系统在低温状态 高电压电转制备CD19-CAR-T细胞,电转效率在 58.8%±4.1%。电转后细胞可通过添加细胞因子激 活和增殖,报告基因GFP及CAR结构稳定表达至20 天,并能区分CD4和CD8细胞亚型。CD4和CD8的配



A: 荧光显微镜下观察并记录GFP表达以及对应的明场; B: PBMC低温条件下各电转参数流式分析。 A: the expression of GFP under fluorescence microscope and the corresponding bright field; B: PBMC electroporated by different conditions with low temperature and analyzed by flow cytometry.

#### 图3 低温处理下,不同电转参数GFP电转PBMC 12 h后GFP的表达情况





A: 低温处理下, GFP与SB-GFP分别电转染PBMC后14天内, 细胞增殖数量; B: PBMC在14天内, 细胞活率检测。 A: cell proliferation was detected within 14 days after GFP and SB-GFP were electro transferred into PBMC respectively after low temperature treatment.; B: cell viability was detected within 14 days after GFP and SB-GFP were electro transferred into PBMC respectively after Low temperature treatment.



比会影响T细胞杀伤能力,这在早期构建嵌合体修 你T细胞的工作中已有报道<sup>[20]</sup>。目前,CD4和CD8的 配比是CAR-T治疗在临床治疗回输阶段的一个重要 质控项目<sup>[21]</sup>。通常在回输前,CD4:CD8的比值被控 制在1:1左右<sup>[22]</sup>。实验中,在7天之后CD4:CD8的比 值在1.0:1.5左右,可以满足回输需求或者细胞杀伤 实验需求。本课题使用的是针对CD19抗原的CAR 结构,CD19在B淋巴肿瘤细胞表达时期最早、表达 量最多,因此成为基因编辑T细胞治疗最普遍的靶 点,也是在临床治疗上较为成熟的,针对急性、慢性 B淋巴白血病和B细胞非霍奇金淋巴瘤的靶标。通 过对表达CD19的靶细胞Jeko-1混合培养实验,证 明低温状态高电压电转制备的CAR-T细胞与慢病 毒制备的CAR-T具有相似的细胞活性和选择杀伤 性。由Th1细胞分泌的IFN-γ是在CAR-T相关实验 中一个重要的活性指标<sup>[23]</sup>,它对人体的免疫条件具 有诸多作用,包括增强巨噬细胞、NK细胞的功能, 增强免疫细胞表面抗原和抗体的表达,增强肿瘤浸



A: 低温处理下, GFP与SB-GFP电转PBMC后, 在第2、4、7、14、20天对PBMC中GFP表达荧光检测; B: 取电转后不同天数的PBMC流式分析, 通过CD3-APC、CD8-percp-cy5.5抗体染色标记, Q1为CD4细胞亚群, Q2为CD8亚群, 以及对应亚群中GFP表达情况; C: 流式分析Q1中CD4细胞GFP表达情况; Q2中CD8细胞GFP表达情况。

A: fluorescence detection of GFP in PBMCs on days 2, 4, 7, 14, 20 after GFP and SB-GFP electroporation in PBMC under low temperature conditions; B: flow cytometry analysis of PBMCs on different days after electroporation CD3-APC, CD8-percp-cy5.5 antibody staining marker, Q1 is CD4 cell subset, Q2 is CD8 subpopulation, and GFP expression in corresponding subpopulation; C: flow cytometry analysis of GFP expression of CD4 cells in Q1; GFP expression in CD8 cells in Q2.





A: PCR检测aCD19-CAR的表达情况; B: Western blot鉴定CD3ζ亚基表达情况。两组电转体系内均含有SVneo-aCD19-T2A-GFP质粒, NSB-GFP 为在电转时无添加SB100X质粒的对照组。SB-GFP 4组分别为不同批次的,在电转时添加SB100X质粒的实验组。

A: detection of *aCD19-CAR* expression by PCR; B: identification of CD3ζ subunit expression by Western blot. The two groups of electroporation systems contained SVneo-aCD19-T2A-GFP plasmid. NSB-GFP was the control group without SB100X plasmid during electroporation. SB-GFP 4 groups were treated with SB100X plasmid in different batches during electroporation.



润T细胞活性以及诱导刺激产生IL-2、TNF-α等与 免疫细胞增殖活化和肿瘤杀伤凋亡相关的细胞因 子<sup>[24]</sup>。SB-CD19-CAR-T与靶细胞Jeko-1共培养之 后IFN-γ释放量为2 317.73±1 335.57 pg/mL, 当效靶 比在10:1时,可造成半数以上的靶细胞裂解,细胞毒性为61.76%±6.68%,与慢病毒制备的CAR-T细胞相似。低温电转制备的CAR-T细胞IFN-γ释放量相比同类型转座子制备的抗CD19-CAR细胞略低<sup>[18]</sup>,可



SB-CAR为Sleeping beauty系统制备的抗CD19-CAR-T细胞; pCDH-CAR为慢病毒制备的抗CD19-CAR-T细胞; Q1为CD4细胞亚群; Q2为CD8细胞亚群。

Anti-CD19-CAR-T cells prepared by SB-CAR system; PCDH-CARis an anti-CD19-CAR-T cell prepared by lentivirus; Q1 is a subgroup of CD4 cells; Q2 is a subgroup of CD8 cells.

#### 图7 Sleeping beauty转座子制备CAR-T细胞流式检测表面CAR分子表达

#### Fig.7 Flow cytometry for detecting the expression of CAR molecules on the surface of CAR-T cells prepared by transposon



\*\*P<0.01, 与PBMC+Jeko-1组比较。 \*\*P<0.01 vs PBMC+Jeko-1 group.

> 图8 ELISA检测CAR-T细胞IFN-γ释放 Fig.8 CAR-T cells IFN-y release after co-culture tested by ELISA



图9 CAR-T细胞示闭作用检测 Fig.9 CAR-T cells cytotoxicity test

能的原因之一是需要将启动子更换为强启动子。在 Jurkat细胞系, PBMC细胞中,常用的CMV启动子相 较于EF1α、SV40等会呈现甲基化的趋势。在后续 的实验设计中,拟定将使用强启动子EF1α作为转座 质粒的启动子。

目前临床常用的方式是通过病毒转导将CAR 基因插入整合至宿主细胞,原理简单易行。但临床 级病毒制备设施要求苛刻,包装重组病毒成本较高、 周期较长、程序繁琐。重组病毒整合模式存在一定 的偏向性,可能整合到与细胞正常代谢和功能有关 的活跃基因上,存在潜在安全性风险。而转座子SB 系统的插入整合存在均一性,不会对活跃的基因产 生偏好,这表明在保持功能及活性上,SB系统存在 潜在优势<sup>[17]</sup>。最重要的是,电转方法制备CAR-T细 胞在很大程度上解决了重组病毒的潜在风险,降低 了病毒包装成本,过程简单,在实际应用和实验中提 供了病毒系统的有效替代。

电转是通过外加电场产生一定电脉冲,诱导 细胞产生跨膜电位差。当外加电压大于细胞膜穿 孔电压临界值,外源基因便可进入胞质内。若将细 胞视为单一质点,则细胞直径越大,在电压临界值 不变的情况下,所需外加电压越小。通常刚分离的 PBMC直径在7~8 μm,悬浮细胞系在12 μm。若要达 到较好的转染效率,通常需要较高电压。常规电转 效率低,且定向增殖需多轮刺激。本研究通过降低 温度的方式,减小了对细胞的损伤,实现了高电压对 PBMC的电转,确定的电转条件还可用于CRISPR基 因编辑,譬如PD-1敲除修饰,或者RNA、蛋白质的 电转。

### 参考文献 (References)

- Kim KH, Lee YS, Jung IS, Park SY, Chung HY, Lee IR, *et al.* Acidic polysaccharide from Panax ginseng, ginsan, induces Th1 cell and macrophage cytokines and generates LAK cells in synergy with rIL-2. Planta Med 1998; 64(2): 110-5.
- 2 Cheadle EJ, Gornall H, Baldan V, Hanson V, Hawkins RE, Gilham DEIR. CAR T cells: driving the road from the laboratory to the clinic. Immunol REV 2014; 257(1): 91-106.
- 3 Li XD, Xu B, Wu J, Ji M, Xu BH, Jiang JT, *et al.* Review of Chinese clinical trials on CIK cell treatment for malignancies. Clin Transl Oncol 2012; 14(2): 102-8.
- 4 Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-Tcell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. P Natl Acad Sci USA 1989; 86(24): 10024-8.
- 5 Ramos CA, Dotti G. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. Expert Opin Biol Th 2011; 11(7): 855-73.
- 6 Krause A, Guo H-F, Latouche J-B, Tan C, Cheung N-KV, Sadelain M. Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes. J Exp Med 1998; 188(4): 619-26.
- 7 Hombach AA, Rappl G, Abken H. Arming cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors: CD28 outperforms combined CD28–OX40 "super-stimulation". Mol Ther 2013; 21(12): 2268-77.
- 8 Hombach AA, Chmielewski M, Rappl G, Abken H. Adoptive immunotherapy with redirected T cells produces CCR7-Cells that are trapped in the periphery and benefit from combined CD28-OX40 costimulation. Hum Gene Ther 2013; 24(3): 259-69.
- 9 Guedan S, Posey Jr AD, Shaw C, Wing A, Da T, Patel PR, et al. Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation. JCI Ins 2018; 3(1). pii: 96976.
- 10 Heßmann M, Rausch A, Rückerl D, Adams PS, Simon M, Gilfillan S, *et al.* DAP10 contributes to CD8<sup>+</sup> T cell-mediated cytotoxic effector mechanisms during Mycobacterium tuberculosis infection. Immunobio 2011; 216(5): 639-47.
- 11 Finney HM, Lawson AD, Bebbington CR, Weir ANC. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. J Immunol 1998; 161(6):

2791-7

- 12 Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. New Engl J Med 2011; 365(8): 725-33.
- 13 Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. Sci Transl Med 2011; 3(95): 95ra73.
- 14 Kay MA. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. Nat Rev Genet 2011; 12(5): 316.
- 15 Wang X, Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. Mol Ther-Oncolytics 2016; 3: 16015.
- 16 Singh H, Manuri PR, Olivares S, Dara N, Dawson MJ, Huls H, et al. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. Cancer Res 2008; 68(8): 2961-71.
- 17 Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Olivares S, Zhang L, Yang G, et al. Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using Sleeping Beauty system and artificial antigen presenting cells. PLoS One 2013; 8(5): e64138.
- 18 Monjezi R, Miskey C, Gogishvili T, Schleef M, Schmeer M, Einsele H, et al. Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral *Sleeping beauty* transposition from minicircle vectors. Leukemia 2017; 31(1): 186.
- 19 Finney OC, Brakke H, Rawlings-Rhea S, Hicks R, Doolittle D,

Lopez M, *et al*. CD19 CAR T cell product and disease attributes predict leukemia remission durability. J Clin Invest 2019; 129(5): 2123-32.

- 20 Shin JH, Park HB, Oh YM, Lim DP, Lee JE, Seo HH, et al. Positive conversion of negative signaling of CTLA4 potentiates antitumor efficacy of adoptive T-cell therapy in murine tumor models. Blood 2012; 119(24): 5678-87.
- 21 Mutoh Y, Nishijima T, Inaba Y, Tanaka N, Kikuchi Y, Gatanaga H, et al. Incomplete recovery of CD4 cell count, CD4 percentage, and CD4/CD8 ratio in patients with human immunodeficiency virus infection and suppressed viremia during long-term antiretroviral therapy. Clin Infect Dis 2018; 67(6): 927-33.
- 22 Aleksandrova K, Leise J, Priesner C, Melk A, Kubaink F, Abken H, et al. Functionality and cell senescence of CD4/CD8-selected CD20 CAR T Cells manufactured using the automated Clini-MACS Prodigy<sup>®</sup> Platform. Transfus Med Hemoth 2019; 46(1): 47-54.
- 23 Li W, Guo L, Rathi P, Marinova E, Gao X, Wu M-F, et al. Redirecting T cells to glypican-3 with 4-1BB zeta chimeric antigen receptors results in Th1 polarization and potent antitumor activity. Hum Gene Ther 2017; 28(5): 437-48.
- 24 Cervera-Carrascon V, Siurala M, Santos J, Havunen R, Tähtinen S, Karell P, *et al.* TNFa and IL-2 armed adenoviruses enable complete responses by anti-PD-1 checkpoint blockade. 2018; 7: e1412902.