·实验研究·

建立 CAR-T 细胞治疗产品质量控制检测方法及其定量参考品的数字 PCR 方法研究

豆敏华[1],朱冰美[2],宗伟英[2],吴晓双[2],杨志行[1]

(1 中国科学院上海生命科学研究院湖州营养与健康产业创新中心,湖州 313000;
2 湖州申科生物技术有限公司,湖州 313000)

[摘要] **目的**:本研究建立嵌合抗原受体 T(CAR-T)细胞治疗产品质量控制中猿猴病毒 40 大 T 抗原(SV40LTA),腺病毒早期区域 1A 蛋白(E1A)和质粒残留水平的荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测方法,同时采用微流控芯片式数字 PCR 技术对质粒定量参考品进行赋值。**方法**:通过建立多重荧光定量 PCR 的方法,在一个反应中同时检测 SV40LTA 和 E1A 的残留水平。针对目前慢病毒等包装技术存在多种质粒组合系统(如四质粒和五质粒),对质粒的残留检测标准难以统一,本研究从同源性很高的复制子区域入手,设计和筛选引物探针,能同时检测多种不同质粒的总体残留水平。建立数字 PCR 技术分别对 SV40LTA 和 E1A 的质粒定量参考品拷贝数浓度标定方法进行方法学验证和赋值。**结果**:SV40LTA 和 E1A 双重定量 PCR 方法的特异性好,最低定量限分别达到 2.80×10 和 2.98×10 copies·μL^{-1}。质粒残留检测法的最低定量限可达到 2.80×10 copies·μL^{-1}。通过采用目前快速发展的数字 PCR 技术进行赋值,经典吸光度法计算质粒定量参考品 SV40LTA 和 E1A 的拷贝数浓度为 2.80×10^8 和 2.98×10^8 copies·μL^{-1};经数字 PCR 标定分别为 1.06×10^8 和 1.21×10^8 copies·μL^{-1}。**结论**:本研究建立的 SV40LTA,E1A 和质粒检测方法灵敏度较高、特异性强,能满足 CAR-T 细胞治疗产品的质量控制要求。经典的吸光度法定值的结果大于数字 PCR 方法,大约有 2 倍左右的差别。

[关键词] 嵌合抗原受体 T;细胞治疗;猿猴病毒 40 大 T 抗原;腺病毒早期区域 1A 蛋白;质粒残留;数字聚合酶链式反应

[中图分类号] R917;R979.5 [文献标志码] A [文章编号] 1003-3734(2021)24-2306-09

Research on the development of methods in CAR-T cell therapy and its quantitative reference using digital PCR

DOU Min-hua[1], ZHU Bing-mei[2], ZONG Wei-ying[2], WU Xiao-shuang[2], YANG Zhi-xing[1]

(1 *Huzhou R&D Center for Nutrition and Health Shanghai Institutes for Biological Sciences Chinese Academy of Sciences, Huzhou* 313000, *China*; 2 *Huzhou Shenke Biotechnology Co., Ltd., Huzhou* 313000, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish real-time PCR methods for the detection of residual SV40LTA&E1A and plasmids in the quality control of CAR-T cell therapy products, as well as the assay of reference plasmid calibration by microfluidic digital PCR technology. **Methods**: SV40LTA&E1A were detected in one tube at the same time by multiplex TaqMan probe PCR. In view of the fact that it was hard to unify the standard of residue detection because multiple plasmid systems (four or five plasmids) existed in the current lentiviral packaging technologies, primers were designed from the significant sequence homology of replicon of those plasmids. Meanwhile,

[基金项目] 湖州市科技局公益性技术应用研究资助项目(2018GZ29)

[作者简介] 豆敏华,男,硕士,研究方向:生物技术药物质量安全控制技术和产品研究。E-mail:minhuad@nhc.ac.cn。

[通讯作者] 杨志行,男,高级工程师,研究方向:生物技术药物质量安全控制技术和产品研究。E-mail:zhixingy@nhc.ac.cn。

digital PCR method was validated. **Results**: Good specificity and quantitative limits of 2.80×10 copies·μL^{-1} (SV40LTA) and 2.98×10 copies·μL^{-1} (E1A) were achieved in the SV40LTA&E1A PCR method. The quantitative limit was 2.80×10 copies·μL^{-1} for plasmids detection method. The quantitative calculation results of plasmid copy number concentration of SV40LTA and E1A were 2.80×10^8 copies·μL^{-1} and 2.98×10^8 copies·μL^{-1}, corresponding to 1.06×10^8 copies·μL^{-1} (SV40LTA) and 1.21×10^8 copies·μL^{-1} (E1A) by digital PCR method. **Conclusion**: The SV40LTA&E1A and residual plasmid PCR detection methods have good specificity, sensitivity and accuracy. The calibration results of classical absorption method are about twice times larger than those by digital PCR method.

[**Key words**] chimeric antigen receptor T-cell; cell therapy; SV40 large T antigen; E1A; residual plasmid; digital PCR

嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法(chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy,CAR-T)已在急性白血病和非霍奇金淋巴瘤的治疗上表现出了显著的疗效,被认为是最有前景的肿瘤治疗方式之一[1-3]。2017 年 8 月 30 日,美国 FDA 批准诺华(Novartis)公司的 CAR-T 疗法 Kymriah(CTL-019)上市,用于治疗复发性或难治性儿童、青少年 B 细胞急性淋巴性白血病。2017 年 10 月 18 日,FDA 批准凯特(Kite)公司的 CAR-T 疗法 Yescarta(KTE-C10)上市,用于治疗复发性或难治性的特定类型成人大 B 细胞淋巴瘤[4]。因此,2017 年被称为免疫细胞治疗元年。此后有更多生物医药制造巨头企业开始进入该领域,企业融资规模扩大,更多靶点类型的 CAR-T 产品陆续研发和申报临床试验。CAR-T 细胞研究非常迅猛,到目前 CAR 功能结构元件已经发展到第 4 代,在前几代的基础上进一步引入功能性因子来增强 T 细胞的杀伤能力[5-7]。由于目前已上市的 CAR-T 细胞是通过自体的 T 细胞改造而来,是一种私人定制化的产品,造价十分昂贵。这种方式由于需要从患者抽血分离 T 细胞开始,总体的生产时间较长,无法直接给患者使用。患者的异质性导致产品的质量和稳定性难以保证,给工业化的生产带来诸多风险。这些缺点极大地限制了 CAR-T 细胞治疗技术的大规模临床运用。目前科学界正在研究采用同种异型的通用型 CAR-T 细胞(universal chimeric antingen receptor T-cells,UCARTs)技术,该技术有望解决上述难题[8-11]。

目前,CAR-T 细胞产品作为一种“活的”特殊生物技术药物,是用《药品生产质量管理规范》(GMP)来监管药物生产[12-13],对生产过程的质量控制提出了更高的要求,急需形成行业标准。2018 年 6 月,由中国食品药品检定研究院生物制品检定所牵头起草的《CAR-T 细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点》,在《中国药事》上发表,为相关企事业单位进行 CAR-T 细胞产品的质量控制和临床前研究的关键点指明了方向[14]。CAR-T 细胞的生产工艺复杂,涉及质粒制备、慢病毒制备[15-18]、T 细胞感染及扩增培养、细胞冻存、冷链运输等多道工艺流程,其中产品生产中工艺相关杂质的限量控制是重要方面之一。综合目前 CAR-T 细胞治疗技术主要依赖于慢病毒或逆转录病毒感染的方法,在整个制备工艺中有可能引入来自宿主细胞的残留 DNA[19]、残留蛋白[20]、工艺残留物[21-22](如培养基来源的牛血清白蛋白)以及外来病源微生物污染物(如支原体[23])等多种杂质存在。这些污染物不但影响其在体内发挥作用,而且具有潜在的致癌和传染风险,是国内外药品监管部门重点关注的细胞治疗质量与安全问题。

根据目前 CAR-T 制备主流工艺技术的特点,普遍涉及包括 293T 宿主细胞的残留 DNA 和宿主蛋白;宿主细胞来源的高风险因子,如猿猴病毒 40 大 T 抗原(SV40LTA),腺病毒早期区域 1A 蛋白(E1A),腺病毒早期区域 1B 蛋白(E1B)等;慢病毒包装用的质粒残留;CAR 基因的拷贝数水平检测等诸多方面的质量控制要求[24-25]。因此,灵敏且可靠的检测成为确保细胞治疗产品安全的重要一环。目前,定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)技术已成为国外药典[如《美国药典》(USP)、欧洲药典(EP)]中最常用的方法之一。USP 43 版中唯一推荐定量 PCR 法作为生物制品中宿主残留 DNA 的标准方法。在 EP 10.6 版中也列入了核酸检测法,主要为定量 PCR 方法,与传统方法并列。综上所述,本研究基于定量 PCR 方法,研究内容分为 3 个部分:① 通过比对常见慢病毒包装质粒系统间的共性区域设计特异性引物,一次检测反应得到所有质粒的残留拷贝数水平。② 运用多重定量

PCR 检测体系同时检测 CAR-T 细胞中 *SV40LTA* 基因和 *E1A* 基因这 2 个高风险因子的残留拷贝数水平。为 CAR-T 细胞治疗产品的质量控制提供技术参考。③ 为了进一步准确和标准化质粒定量参考品的赋值,本文同时尝试运用数字 PCR 技术[26-27],比较 2 种方法的区别,期望为核酸类标准品的标定方法提供参考数据。

材料与方法

1 试剂

MiniBEST Universal Genomic DNA EXtraction Kit 和Vector pMD™19 (Simple)购自 TaKaRa 公司;QIAGEN Plasmid Maxi Kit 试剂盒(凯杰生物公司);HEK293T 细胞和 HEK293 细胞购自中国科学院细胞库;构建的克隆质粒均由上海生工生物有限公司测序;引物和探针由上海捷瑞生物有限公司合成。

2 仪器

PRISM® 7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);CFX96™荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);BioPhotometer plus 核酸蛋白定量仪(德国 Eppendorf 公司);Naica 微流控芯片式数字 PCR 仪(法国 Stilla 公司)。

3 定量参考品的制备

采用基因组 DNA 提取试剂盒提取 293T 细胞基因组 DNA,将其作为 SV40LTA 和 E1A 定量参考品建立克隆模板,提取方法参照试剂盒操作说明书。通过琼脂糖凝胶电泳对提取的基因组 DNA 样本进行纯度鉴定,需满足条带单一,同时光密度(OD)260/OD280 比值均在 1.80 ~ 1.90 之间。

通过美国国家生物信息中心(NCBI)数据库查询获取 SV40LTA 和 E1A 的基因序列信息,克隆引物见表 1,产物利用 TA 克隆法克隆到 pMD19-T 载体中,转化并筛选单克隆菌株,测序鉴定。

表 1 克隆引物

克隆靶序列	引物方向	引物序列(5'-3')	扩展长度/bp
SV40LTA	上游	AACCTATGGAACTGATGAATGG	1 217
	下游	CCTGACCTGAAGGCAAATCT	
E1A	上游	ATGAGACATATTATCTGCCACGGAG	986
	下游	TTATGGCCTGGGGCGTTTACAG	

保存相应的菌株,通过质粒提取试剂盒提取制备定量参考品 SV40LTA 和 E1A,参考品质粒的纯度需满足条带 1 ~ 2 条,无其他降解带出现。同时 OD260/OD280 比值均在 1.80 ~ 1.90 之间。将获得的定量参考品测量值按如下公式计算转换为拷贝数[28]。

质粒拷贝数/copies·μL^{-1} = 6.02 × 10^{14} × 质粒浓度(ng·μL^{-1})/(质粒碱基数 ×660)

SV40LTA 和 E1A 双重荧光定量 PCR 的定量参考品是通过两者等比例混合而成,而 SV40LTA 质粒单独作为质粒残留检测的定量参考品。

4 引物探针的设计与合成

利用 Primer Express 3.0 软件针对 SV40LTA 和 E1A 的克隆区域设计筛选多重定量 PCR 引物和探针,保证检测体系的特异性和灵敏度要求[29]。针对慢病毒包装系统所用质粒间的共同区域复制子设计引物和探针,如 ColE1/pMB1/pBR322/pUC 来源的复制子,定量检测样本中质粒 DNA 的残留[10],详见表 2。

表 2 引物探针序列

靶序列	引物方向	引物序列(5'-3')
SV40LTA	上游	GTGCCTTGACTAGAGATCCATTT
	下游	AGCTTCCAGGACACTTGTTTAG
	探针	**FAM**-TTGCCAGGTGGGTTAAAGGAGCAT-**TAMRA**
E1A	上游	GTCCTTCTAACACACCTCCTGAGATAC
	下游	TCACGGCAACTGGTTTAATGG
	探针	**HEX**-CCCGGTGGTCCCGCTGTGC-**TAMRA**
ORI	上游	ATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTG
	下游	TCACGCTGTAGGTATCTCAGT
	探针	**FAM**-CCCAGCTTGGAGCGAACGACC-**BHQ1**

粗体字:TaqMan 探针两端标记的荧光基团

5 Taqman 探针法 PCR 检测体系及反应条件

将 SV40LTA 和 E1A 定量参考品与 DNA 稀释液置于冰上融化,待完全融化后,轻微振荡混匀,快速离心 10 s,按 10 倍梯度稀释获得标准曲线,分别为 2.80 × 10^{6} ~ 2.80 × 10 copies·μL^{-1} 和 2.98 × 10^{6} ~ 2.98 × 10 copies·μL^{-1}。选择 SV40LTA 质粒为质粒残留检测的定量参考品。

SV40LTA 和 E1A 多重 PCR 检测的总反应体系为 30 μL,模板量为 10 μL,上下游引物及探针混合物 4.1 μL,定量 PCR 反应液 15.9 μL。具体 PCR 反应程序如下:95 ℃,5 min;95 ℃,30 s;60 ℃,60 s(40 个循环)。质粒残留检测定量 PCR 体系总反应体系为 30 μL,模板量为 10 μL,上下游引物及探针混合

物 3 μL,定量 PCR 反应液 17 μL。具体 PCR 反应程序如下:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s;60 ℃ 60 s(40 个循环)。

6 数字 PCR 对质粒定量参考品赋值的方法学验证内容

6.1 样本稀释线性 将 SV40LTA 和 E1A 的 DNA 定量参考品进行梯度稀释,见表 3。选择 ST4-ST8 进行范围浓度检测,2 名实验员分别进行 1 次检测,各浓度检测 1 孔,分别计算各梯度稀释管回算浓度,计算当前稀释孔的回算浓度与相邻上一个回算浓度的比率,在 80% ~120% 以内即为合适的范围。

表 3 线性范围实验样本制备

编号	稀释管	配制	稀释倍数
1	ST0	10 μL DNA 定量参考品 +90 μL DNA 稀释液	1×10
2	ST1	10 μL ST0 +90 μL DNA 稀释液	1×10^2
3	ST2	10 μL ST1 +90 μL DNA 稀释液	1×10^3
4	ST3	10 μL ST2 +90 μL DNA 稀释液	1×10^4
5	ST4	10 μL ST3 +90 μL DNA 稀释液	1×10^5
6	ST5	10 μL ST4 +30 μL DNA 稀释液	4×10^5
7	ST6	10 μL ST4 +90 μL DNA 稀释液	1×10^6
8	ST7	10 μL ST6 +30 μL DNA 稀释液	4×10^6
9	ST8	10 μL ST6 +90 μL DNA 稀释液	1×10^7
10	NTC	DNA 稀释液	—

6.2 定量限 检测浓度变异系数(CV)≤20% 时所对应的最低浓度即为仪器检测的定量限。根据稀释线性范围结果选择合适的定量限浓度,将 DNA 参考品稀释成预期定量限浓度,重复检测 10 次,计算 CV。

6.3 重复性 同一实验内,取 ST6 浓度进行 6 次重复检测,见表 3。计算 CV,测定结果:CV≤15%。

6.4 专属性 专属性是指检测方法仅仅测定某种被测物而不受其他物质干扰的能力。检测值无阳性拷贝数判定为无干扰,检测值有阳性拷贝数判定为干扰。研究分别在不同干扰物质的情况下检测目标 DNA 的能力,见表 4。

表 4 专属性验证

干扰物质	目标 DNA 检测试剂
E1A DNA(ST6)	SV40LTA Primer & Probe MIX
SV40LTA DNA(ST6)	E1A Primer & Probe MIX
0.3 pg·μL^{-1} *E. coli* DNA	SV40LTA Primer & Probe MIX
0.3 pg·μL^{-1} *E. coli* DNA	E1A Primer & Probe MIX

Primer & Probe MIX:PCR 引物和探针的混合物

结 果

1 定量参考品的制备及吸光度方法赋值结果

SV40LTA 和 E1A 片段克隆质粒构建完成,经测序鉴定与 NCBI 数据库目标序列相同。使用 QIAGEN Plasmid Maxi Kit 试剂盒提取质粒,然后使用分光光度计测定 OD260/OD280 比值均在 1.8 ~1.9 之间。琼脂糖电泳结果(见图 1)显示超螺旋主带明显,符合质量要求,可以作为制备定量标准品的原液。将 SV40LTA 和 E1A 质粒 DNA 等比例混合稀释,使各自的终浓度均为 1.2 ng·mL^{-1},经计算 2 种质粒的各自拷贝数终浓度分别为 2.8×10^8 和 2.98×10^8 copies·μL^{-1},作为 SV40LTA 和 E1A 的定量参考品。其中将 SV40LTA 质粒单独作为质粒残留检测的定量参考品。

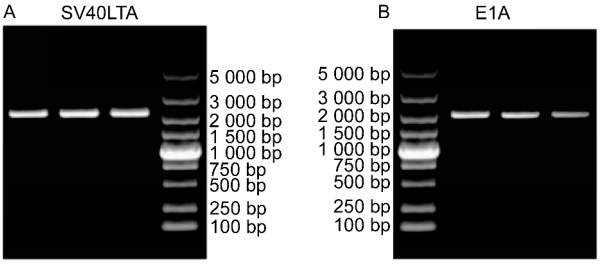


图 1 SV40LTA(A)和 E1A(B)质粒的琼脂糖核酸电泳纯度

2 SV40LTA 和 E1A 多重定量 PCR 检测体系优化及标准曲线性能

经过多次调整引物及探针的浓度,如图 2 所示荧光定量 PCR 得到的扩增曲线,每个梯度均具有典型的扩增曲线形状,可以根据不同拷贝数标准品的循环阈值(cycle threshold,CT)为纵坐标,拷贝数的自然对数(log)为横坐标绘制标准曲线。因此,根据 2.80×10^6 ~2.80×10 copies·μL^{-1}标准品浓度区间和 2.98×10^6 ~2.98×10 copies·μL^{-1}及其各点所得的荧光信号到达设定的域值时所得循环数(Ct)值绘制标准曲线方程,其呈直线相关,图 A 为 SV40LTA 标准曲线计算得到相关系数 R^2 为 1.000,扩增效率(E/%)为 105.2%;图 B 为 E1A 标准曲线计算得到相关系数 R^2 为 0.999,E = 102.9%;图 C 是 2 个曲线组合在一起的情况,说明双重 PCR 体系中 SV40LTA 与 E1A 两组扩增体系间不存在相互干扰现象。

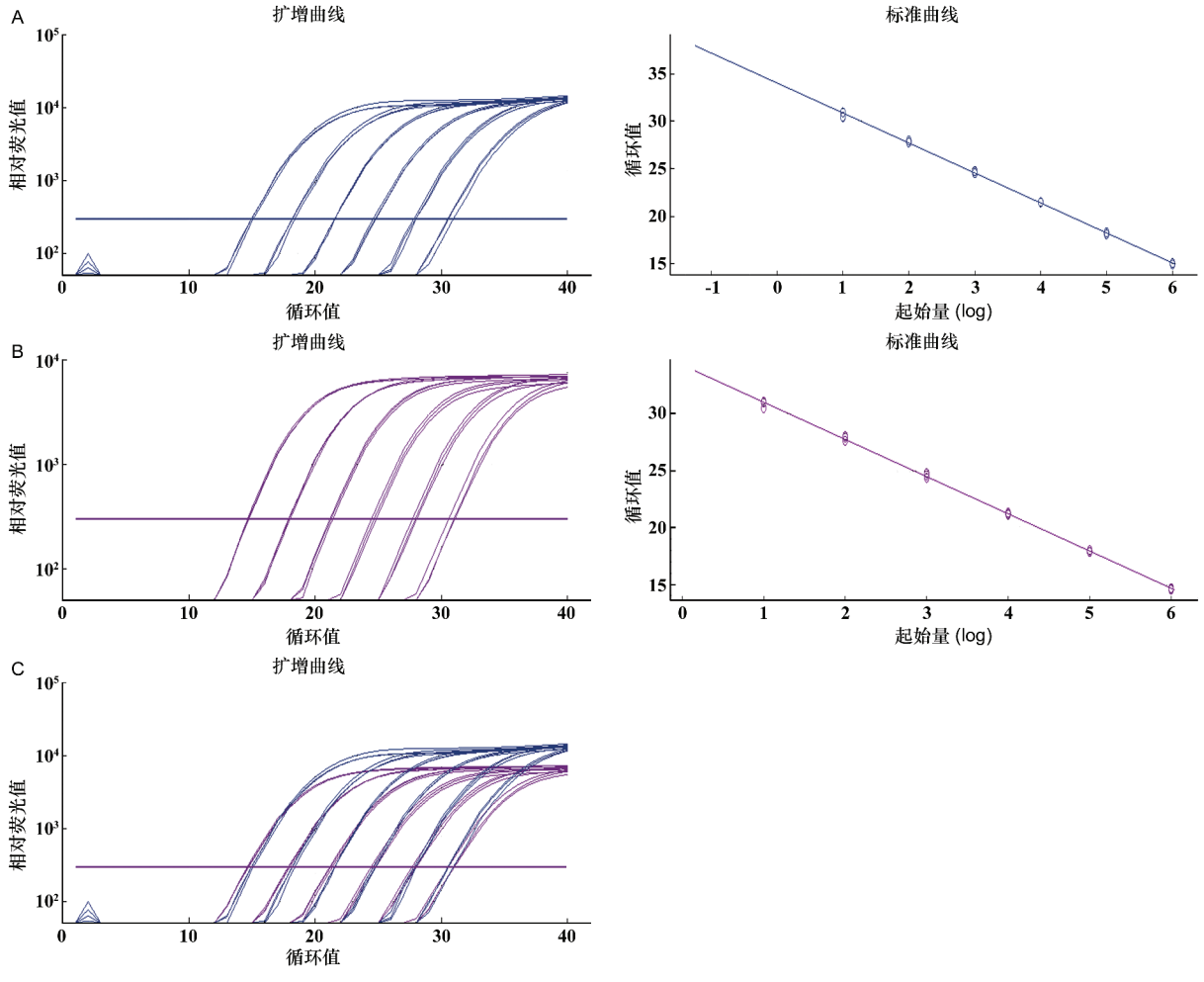


图 2　SV40LTA(A)和 E1A(B)双重荧光定量 PCR 的扩增曲线和标准曲线及 SV40LTA 和 E1A 扩增曲线合并图(C)

3　质粒残留定量 PCR 检测体系标准曲线

按表 3 所示方法单独稀释 SV40LTA 定量参考品,PCR 扩增结果见图 3,根据 $2.8\times10^{6}\sim2.8\times10$ copies·μL^{-1}标准品各点所得的荧光信号到达设定的域值时所得循环数(Ct)值绘制标准曲线,由仪器软件直接计算得到相关系数 R^2 为 0.996,E(%)为 100.9%。

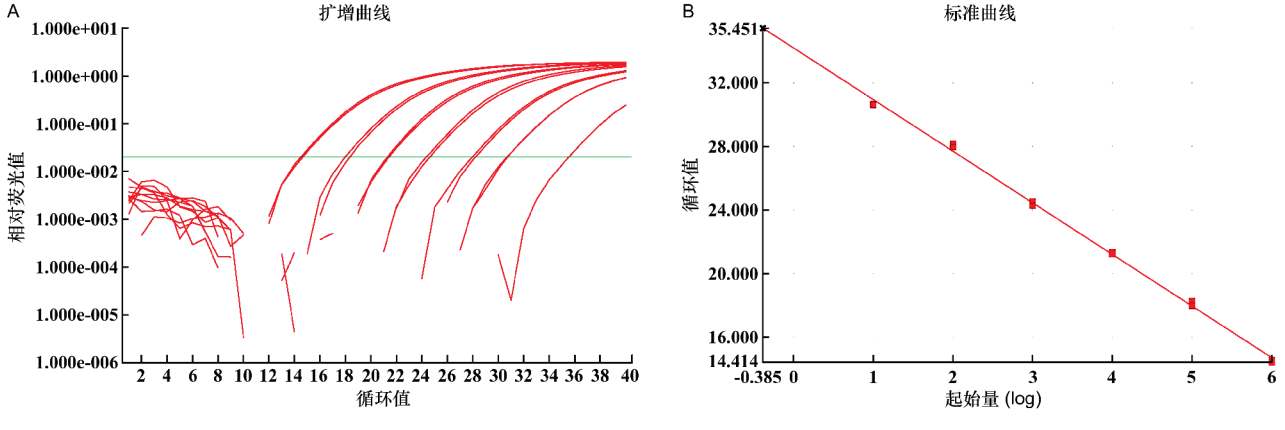


图 3　质粒检测荧光定量 PCR 的扩增曲线(A)和标准曲线(B)

4 在 293 和 293T 细胞中检测 SV40LTA 和 E1A 的拷贝数

通过已经建立的 PCR 检测体系，在 293 和 293T 细胞基因组 DNA 样本中检测 SV40LTA 和 E1A 的拷贝数，结果见表 5。在 293 细胞中由于不存在 *SV40LTA* 基因而无法检测到扩增信号，证明该检测体系的特异性比较好。按照 1 个人类单倍体基因组约为 3.3 pg 来粗略计算细胞中每个基因组中 SV40LTA 和 E1A 的拷贝数水平。

表 5 293 和 293T 细胞中 SV40LTA 和 E1A 的拷贝数

样品	上样浓度/pg·μL^{-1}	拷贝数/copies·μL^{-1}		拷贝数/copies·genome	
		SV40LTA	E1A	SV40LTA	E1A
293 细胞	300	—	467.5	—	5.1
293T 细胞	300	116.6	315.8	1.3	3.5

5 数字 PCR 技术对 SV40LTA 和 E1A 定量参考品赋值的方法学验证结果

5.1 样本稀释线性 数字 PCR 的结果分区质量较好，见图 4。由表 6 结果计算可知相邻回算浓度的比值能够控制在 20% 以内，表明目前建立的数字 PCR 方法在 2.5×10^7 倍的稀释度下仍能保持较好的检测性能，符合稀释线性的要求。

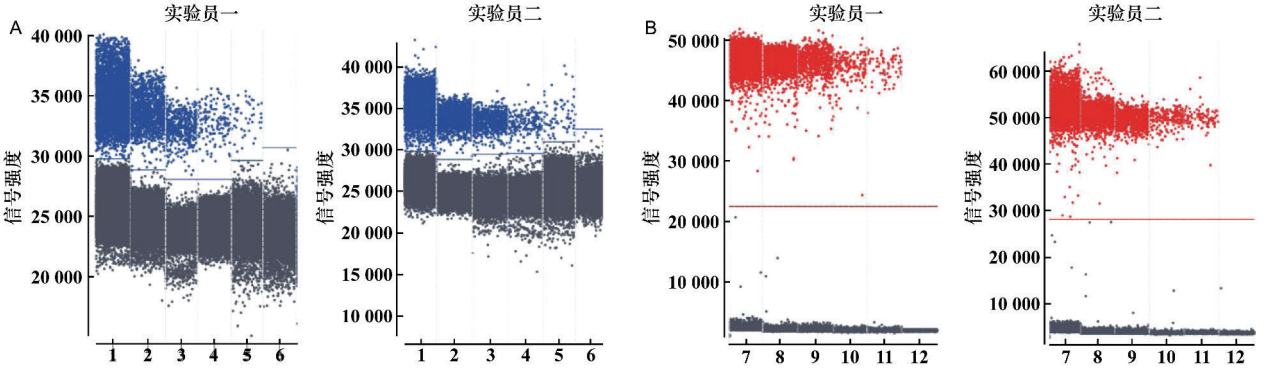


图 4 SV40LTA(A)和 E1A(B)的数字 PCR 检测微滴分布图

表 6 SV40LTA 和 E1A 质粒定量参考品样本线性稀释检测结果

实验员	样本	SV40LTA			E1A		
		检测值/copies·μL^{-1}	回算总拷贝数/copies·μL^{-1}	与上一个浓度的比值/%	检测值/copies·μL^{-1}	回算总拷贝数/copies·μL^{-1}	与上一个浓度的比值/%
一	ST4	393.1	9.83×10^7	—	396	9.90×10^7	—
	ST5	94	9.40×10^7	95.6	101.6	1.02×10^8	103.0
	ST6	39.9	9.99×10^7	106.3	40.8	1.02×10^8	100.0
	ST7	10.2	1.02×10^8	102.1	10.3	1.03×10^8	101.0
	ST8	3.58	8.96×10^7	87.8	4.36	1.09×10^8	105.8
	NTC	0	0	—	0	0	—
二	ST4	514.2	1.29×10^8	—	624.1	1.56×10^8	—
	ST5	127.3	1.27×10^8	98.4	142.6	1.43×10^8	91.7
	ST6	51.3	1.28×10^8	100.7	56.9	1.42×10^8	99.3
	ST7	12.4	1.24×10^8	96.9	14	1.40×10^8	98.6
	ST8	4.93	1.23×10^8	99.2	6.29	1.57×10^8	112.1
	NTC	0	0	—	0	0	—

NTC：无模板对照

5.2 定量限 数字 PCR 结果的分区质量较好，见图 5。以 ST4 样本为对照品，通过 10 次重复测定，结果显示针对 SV40LTA 和 E1A 定量参考品在 6.46 copies·μL^{-1}和 E1A 定量参考品在 7.6 copies·μL^{-1}时目标总拷贝数的 CV 和偏差均 <20%，因此定量限分别暂定为 6.46 和 7.6 copies·μL^{-1}，结果见表 7。

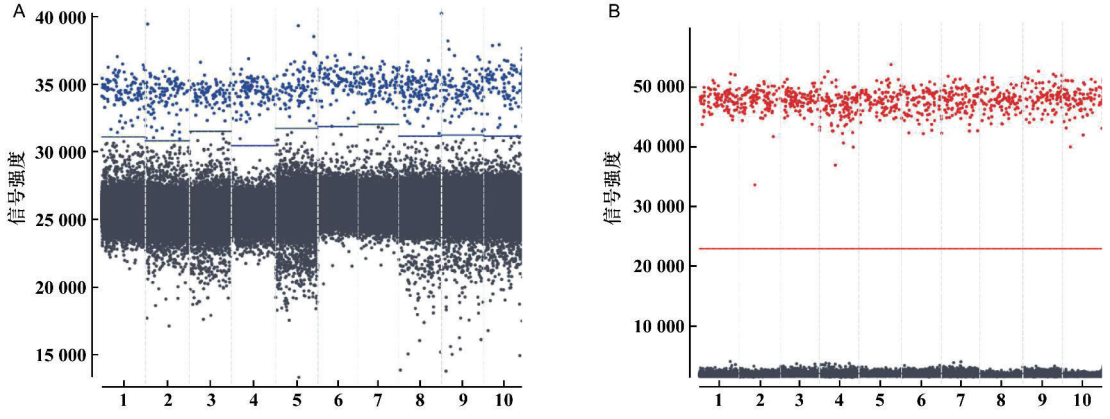


图 5 SV40LTA(A)和 E1A(B)的定量限检测样本数字 PCR 微滴分布图

表 7 SV40LTA 和 E1A 定量限验证结果

样本	SV40LTA		E1A	
	检测值 /copies·μL^{-1}	目标总拷贝数 /copies·μL^{-1}	检测值 /copies·μL^{-1}	目标总拷贝数 /copies·μL^{-1}
ST4(对照)	646.8	1.62×10^{8}	760.4	1.90×10^{8}
测定一	7.18	1.79×10^{8}	6.82	1.70×10^{8}
测定二	6.85	1.71×10^{8}	6.53	1.63×10^{8}
测定三	5.67	1.42×10^{8}	7.39	1.85×10^{8}
测定四	6.31	1.58×10^{8}	8.26	2.07×10^{8}
测定五	6.05	1.51×10^{8}	6.41	1.60×10^{8}
测定六	6.3	1.57×10^{8}	6.24	1.56×10^{8}
测定七	6.54	1.63×10^{8}	6.88	1.72×10^{8}
测定八	7.69	1.92×10^{8}	5.97	1.49×10^{8}
测定九	6.69	1.67×10^{8}	6.17	1.54×10^{8}
测定十	6.16	1.54×10^{8}	6.54	1.64×10^{8}
均值	6.54	1.64×10^{8}	6.42	1.68×10^{8}
SD	5.87×10^{-1}	1.47×10^{7}	1.14	1.69×10^{7}
CV/%	9.0	9.0	17.7	10.15
与对照偏差/%	1.2		13.1	

5.3 重复性 样本检测结果显示目标总拷贝数的 CV 均 <15%，见表 8，表明该方法精密度良好。

表 8 SV40LTA 和 E1A 的重复性实验结果

样本	SV40LTA 检测值 /copies·μL^{-1}	E1A 检测值 /copies·μL^{-1}
测定一	20.9	50.6
测定二	27.2	54.6
测定三	25.5	52.3
测定四	19.7	50.4
测定五	20.6	48.5
测定六	27.2	54.7
均值	23.5	51.8
NTC	0	0.08
SD	3.49	2.48
CV/%	14.9	4.8

5.4 专属性 验证结果显示 SV40LTA 的数字 PCR 检测方法对 E1A DNA 和 *E. coli* DNA 均无非特异性扩增，见表 9，表明专属性良好。E1A 的数字 PCR 检测方法对 SV40LTA DNA 和 *E. coli* DNA 有小于 3 个阳性液滴信号，但是仍在可接受的范围，因此无非特异性扩增。

表 9 专属性验证结果

样本	检测目标基因	总微滴数/个	阳性微滴数/个	检测值/copies·μL^{-1}
E1A DNA	SV40LTA Primer & Probe MIX	27 625	0	0
SV40LTA DNA	E1A Primer & Probe MIX	26 731	3	0.19
E. coli DNA	SV40LTA Primer & Probe MIX	24 485	0	0
E. coli DNA	E1A Primer & Probe MIX	25 267	2	0.14

6 两种方法赋值结果比较

数字 PCR 的赋值结果是取稀释线性实验部分数据的均值计算得到，如表 10 所示，经典的吸光度法定值的结果大于数字 PCR 方法。

表 10 赋值方法的结果对比

定量参考品	吸光度法 /copies·μL^{-1}	数字 PCR /copies·μL^{-1}	比值
SV40LTA	2.80×10^{8}	1.06×10^{8}	2.64
E1A	2.98×10^{8}	1.21×10^{8}	2.46

讨　论

CAR-T 细胞治疗产品作为一种新型的细胞治疗药物，虽然目前在抗肿瘤治疗方面有很大的进展，但是仍然没有足够的数据来评估其潜在风险。另外，细胞治疗产品具有与其他传统药物和重组蛋白类药物完全不同的特点，体现在患者的个体化导致起始原料的差异大、产量比较小、批次有限、制备工艺不成熟、生物学效力以及安全性评价等评价技术不健全、不标准等复杂问题。因此，如何提升 CAR-T 细胞治疗产品质量可控性以及产品工艺一致性是首要问题。本研究从 CAR-T 细胞目前主流生产工艺出发，识别其潜在的安全性风险点，如本文涉及的宿主细胞来源的高风险因子 SV40LTA 和 E1A[24,30]；慢病毒生产过程中引入的外源质粒残留[31-32]等。本研究通过构建 SV40LTA 和 E1A 的定量参考品，采用双重定量 PCR 的方法进行检测，保证检测结果的特异性和准确性，同时提升检测的效率。通过选取慢病毒包装质粒共同区域复制子的方法可以一次检测所有的质粒残留水平，避免针对不同质粒去设计引物探针检测，具有简便高效的特点。另外为了进一步简化检测流程，后续可以将 SV40LTA 和 E1A 这 2 个片段克隆到一个质粒载体中，避免本文中需要两者混合操作带来的潜在误差。

由于数字 PCR 方法无需定量参考品，是真正意义上的绝对定量。目前，采用数字 PCR 方法进行核酸标准品标定已经越来越普遍。本文研究结果表明采用紫外吸光度法测定质粒定量参考品的赋值结果与数字 PCR 法的结果有较大的差异。传统的紫外吸光度定量方法是通过特定种类核酸的转换系数计算得到，如 1OD 的吸光值分别相当于 50 μg·mL^{-1}的 dsDNA、37 μg·mL^{-1}的 ssDNA、40 μg·mL^{-1}的 RNA、30 μg·mL^{-1}的寡核苷酸，但若样本中含有蛋白、盐或其他形式的核酸等杂质均会使 260 nm 数值升高，导致测得的结果过高。因此对被测物的纯度和分子形态提出了很高的要求，需要提升纯化工艺。同时，最终的拷贝数值需再通过分子量和摩尔浓度进行近似换算，也会导致测量得到的拷贝数值与真实值存在明显的差异。因此，综合来看这种差异主要是由 2 种方法学本身检测原理的差别造成的结果差异。从本文研究结果表明，数字 PCR 方法更加适合进行核酸类标准品的标定[33]，如新型冠状病毒 RNA 假病毒标准品[34]、质粒定量标准品[35]等。本研究希望将目前普及的荧光定量 PCR 方法运用到 CAR-T 细胞产品的质量控制中，也是各国药典普遍推荐的方法之一，为国内外相关企业在产品开发中质量控制体系的建立提供实验基础。同时，建议将经过验证的数字 PCR 方法作为核酸类标准品的赋值方法。

[参 考 文 献]

[1] JACKSON HJ, RAFIQ S, BRENTJENS RJ. Driving CAR T-cells forward[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(6): 370-383.

[2] NEELAPU SS, TUMMALA S, KEBRIAEI P, *et al*. Chimeric antigen receptor T-cell therapy-assessment and management of toxicities[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(1): 47-62.

[3] HOLZINGER A, ABKEN H. Advances and challenges of CAR T cells in clinical trials[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2020, 214: 93-128.

[4] VORMITTAG P, GUNN R, GHORASHIAN S, *et al*. A guide to manufacturing CAR T cell therapies[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 53: 164-181.

[5] ZHANG QY, PING JM, HUANG ZR, *et al*. CAR-T cell therapy in cancer: tribulations and road ahead[J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 1924379.

[6] HUANG RH, LI XP, HE YD, *et al*. Recent advances in CAR-T cell engineering[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 86.

[7] TOKAREW N, OGONEK J, ENDRES S, *et al*. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells[J]. *Br J Cancer*, 2019, 120(1): 26-37.

[8] PELLEGRINO C, FAVALLI N, SANDHOLZER M, *et al*. Impact of ligand size and conjugation chemistry on the performance of universal chimeric antigen receptor T-cells for tumor killing[J]. *Bioconjugate Chem*, 2020, 31(7): 1775-1783.

[9] LI S, WANG X, YUAN Z, *et al*. Eradication of T-ALL cells by CD7-targeted universal CAR-T cells and initial test of ruxolitinib-based CRS management[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(5): 1242-1246.

[10] HU YX, ZHOU YL, ZHANG MM, *et al*. CRISPR/Cas9-engineered universal CD19/CD22 dual-targeted CAR-T cell therapy for relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(10): 2764-2772.

[11] SUTHERLAND AR, OWENS MN, GEYER CR. Modular chimeric antigen receptor systems for universal CAR T cell retargeting[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7222.

[12] GEE AP. GMP CAR-T cell production[J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2018, 31(2): 126-134.

[13] FERNÁNDEZ L, FERNÁNDEZ A, MIRONES I, *et al*. GMP-compliant manufacturing of NKG2D CAR memory T cells using

CliniMACS prodigy[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2361.
[14] 孟淑芳, 王佑春, 吴雪伶, 等. CAR-T 细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点[J]. 中国药事, 2018, 32(6): 831 - 852.
[15] MOREIRA AS, CAVACO DG, FARIA TQ, *et al*. Advances in Lentivirus purification[J]. *Biotechnol J*,2021,16(1):e2000019.
[16] MARTÍNEZ-MOLINA E, CHOCARRO-WRONA C, MARTÍNEZ-MORENO D, *et al*. Large-scale production of lentiviral vectors: current perspectives and challenges[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(11): 1051.
[17] DASGUPTA A,TINCH S,SZCZUR K,*et al*. Phase Ⅰ/Ⅱ manufacture of lentiviral vectors under GMP in an academic setting [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2086: 27 - 60.
[18] LANA MG, STRAUSS BE. Production of Lentivirus for the establishment of CAR-T cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2086: 61 - 67.
[19] YAN L, MATELING M, NORMAN K. A rapid and reliable qPCR based system to quantitate HEK 293 residual DNA for GMP lot release in gene therapy manufacturing [J]. *Cytotherapy*, 2020, 22(5): S186.
[20] MEKKAOUI L, PAREKH F, KOTSOPOULOU E, *et al*. Lentiviral vector purification using genetically encoded biotin mimic in packaging cell[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*,2018,11: 155 - 165.
[21] SASTRY L, XU Y, COOPER R, *et al*. Evaluation of plasmid DNA removal from lentiviral vectors by benzonase treatment[J]. *Hum Gene Ther*, 2004, 15(2): 221 - 226.
[22] SHAW A, BISCHOF D, JASTI A, *et al*. Using Pulmozyme DNase treatment in lentiviral vector production[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2012, 23(1): 65 - 71.
[23] DREOLINI L, CULLEN M, YUNG E, *et al*. A rapid and sensitive nucleic acid amplification technique for Mycoplasma screening of cell therapy products[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, 17: 393 - 399.
[24] MERTEN OW, CHARRIER S, LAROUDIE N, *et al*. Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application[J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(3): 343 - 356.
[25] None. 365. Characterization of residual plasmid DNA impurities in recombinant AAV; correlation with size of transgene expression cassette[J]. *Mol Ther*, 2012, 20:S143.
[26] DMIQE GROUP, HUGGETT JF. The digital MIQE guidelines update: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments for 2020[J]. *Clin Chem*, 2020, 66(8): 1012 - 1029.
[27] ALCAIDE M, CHEUNG M, HILLMAN J, *et al*. Evaluating the quantity, quality and size distribution of cell-free DNA by multiplex droplet digital PCR[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 12564.
[28] 孙懿, 曾思聪, 胡亮, 等. 荧光定量 PCR 精确检测人胚胎干细胞线粒体 DNA 拷贝数方法的建立[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(7): 685 - 689.
[29] BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, *et al*. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. *Clin Chem*, 2009, 55(4): 611 - 622.
[30] MÁTRAI J, CHUAH MK, VANDENDRIESSCHE T. Recent advances in lentiviral vector development and applications[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(3): 477 - 490.
[31] YANG S, KARNE NK, GOFF SL, *et al*. A simple and effective method to generate lentiviral vectors for ex vivo gene delivery to mature human peripheral blood lymphocytes[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2012, 23(2): 73 - 83.
[32] MÁTRAI J,CHUAH MK,VANDENDRIESSCHE T. Recent advances in lentiviral vector development and applications[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(3): 477 - 490.
[33] 李婷,谭奇凤,杨丽菲,等.结核 DNA 疫苗中卡那霉素残留的半定量检测法的建立及验证[J].今日药学,2021,31(9): 678 - 681.
[34] AKYUREK S, DEMIRCI SNS, BAYRAK Z, *et al*. The production and characterization of SARS-CoV-2 RNA reference material [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(13): 3411 - 3419.
[35] DONG L, MENG Y, WANG J, *et al*. Evaluation of droplet digital PCR for characterizing plasmid reference material used for quantifying ammonia oxidizers and denitrifiers[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(6): 1701 - 1712.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 07 - 06