

扩增活化的淋巴细胞在重度免疫缺陷小鼠体内生物分布研究

侯田田¹,李雪娇²,姜华¹,秦超¹,姚志伟³,霍艳¹,耿兴超¹,黄瑛¹

(1 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心,药物非临床安全评价研究北京市重点实验室,北京 100176; 2 北京永泰生物制品有限公司,北京 100176; 3 三卿(北京)生物科技有限公司,北京 10076)

[摘要] **目的:**研究扩增活化的淋巴细胞在重度免疫缺陷小鼠体内的分布情况。**方法:**使用 96 只 NPG 小鼠,随机分为溶媒对照组和给药组,溶媒对照组动物尾静脉注射给予溶媒 1 次;给药组动物尾静脉注射给予 DiR 标记的活化扩增的淋巴细胞(expanded activated lymphocytes, EAL)细胞 1 次,于给药后不同时间点采血,并使用活体成像的方法检测 EAL 细胞。在给药后 1 h, 3 h, 2 d, 7 d, 14 d, 28 d, 42 d, 56 d 共 8 个时间点小鼠实施麻醉后,解剖取血液、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、脑、睾丸、附睾、子宫、卵巢、胃、十二指肠、结肠、骨髓、脂肪、骨骼肌,冻存。采用流式细胞术、活体成像方法和 qPCR 方法,研究 EAL 细胞在外周血以及上述组织器官中的分布情况。**结果:**给药后 2 d 外周血中 CD₃⁺ T 细胞、CD₃⁺ CD₄⁺ T 细胞和 CD₃⁺ CD₈⁺ T 细胞数量较高,随后呈下降趋势,14 d 时最低,其后一直维持较低水平。由动物活体成像结果可知,细胞在小鼠体内主要分布在肺脏、肝脏脾脏部位和双侧腿骨,给药后 1 d 内主要分布在肺脏和肝脏。由 qPCR 检测结果可知,细胞主要在肺脏和血液分布最多,其次为脾脏、肝脏和骨髓,其他组织仅有较少分布。给药后 1 h,肺脏中细胞基因拷贝数较高,给药后 2 d,血液和脾脏中细胞基因拷贝数较高,后都逐渐下降,14 d 最低,至 56 d 时仅有 1 只动物的个别脏器检测到细胞。**结论:**EAL 细胞尾静脉注射给予 NPG 小鼠后,主要分布在肺脏、血液和脾脏。给药后 56 d 时,细胞在动物体内基本消除。

[关键词] 扩增活化的淋巴细胞;重度免疫缺陷小鼠;生物分布

[中图分类号] R967 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)20-2051-07

Biodistribution study of expanded activated lymphocytes in severe immunodeficient mice

HOU Tian-tian¹, LI Xue-jiao², JIANG Hua¹, QIN Chao¹, YAO Zhi-wei³, HUO Yan¹,
GENG Xing-chao¹, HUANG Ying¹

(1 National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing Key Laboratory for Safety Evaluation of Drugs, Beijing 100176, China; 2 Immunotech Applied Science Limited, Beijing 100176, China; 3 SanQ (Beijing) Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100176, China)

[Abstract] **Objective:** To study the distribution of expanded activated lymphocytes in severe immunodeficient mice. **Methods:** Ninety-six NPG mice were used and randomly divided into vehicle control group and administration group. The animals in the vehicle control group were given vehicle by tail vein injection once; the animals in the administration group were given DiR-labeled EAL cells by tail vein injection once. Blood was collected at different time points after administration, and EAL cells were detected by *in vivo* imaging system. At 1 h, 3 h, 2 d, 7 d, 14 d, 28 d, 42 d, and 56 d after administration, the mice were anesthetized, and blood, heart, liver, spleen,

[基金项目] 国家重点研发计划课题:干细胞产品非临床有效性和安全性评价新技术及规范研究(2021YFA1101602);中国科学院战略先导科技专项(XDA1604050202);中国食品药品检定研究院关键技术研究基金资助项目(GJJS-2022-6-1)

[作者简介] 侯田田,女,硕士研究生,主要从事药物临床前安全性评价。联系电话:(010)67876255,E-mail:houtiantian@nifdc.org.cn。

[通讯作者] 黄瑛,女,博士研究生,副研究员,主要从事药物临床前安全性评价。联系电话:(010)67876255,E-mail:huangying1002@nifdc.org.cn。

lung, kidney, brain, testis, epididymis, uterus, ovary, stomach, duodenum, colon, bone marrow, fat, and skeletal muscle were taken for cryopreservation. The distribution of EAL cells in peripheral blood and the above-mentioned tissues was studied by flow cytometry, *in vivo* imaging method and qPCR method. **Results:** The numbers of CD_3^+ T cells, $CD_3^+ CD_4^+$ T cells and $CD_3^+ CD_8^+$ T cells in peripheral blood were higher at 2 d after administration, and then showed a downward trend, reaching the lowest at 14 d, and maintained a low level thereafter. The results of *in vivo* imaging showed that the cells were mainly distributed in the lungs, liver, spleen and bilateral leg bones, and were mainly distributed in the lungs and liver within 1 d after administration. The results of gene copy number detection showed that the cells were mainly distributed in the lungs and blood, followed by the spleen, liver and bone marrow, and only a little in other tissues. At 1 h after administration, the gene copy number of cells in the lungs was relatively high. At 2 d, the number of gene copies in the blood and spleen was relatively high, and then gradually decreased, reaching the lowest at 14 d, and at 56 d cells were only detected in individual organs of one mice. **Conclusion:** EAL cells were administered to NPG mice, the cells were mainly distributed in lung, blood and spleen. At 56d after administration, the cells were basically eliminated from the mice.

[Key words] expanded activated lymphocytes; severe immunodeficient mice; biodistribution

过继性细胞治疗(adoptive cell therapy, ACT)是一种利用免疫细胞特别是 T 细胞杀伤肿瘤细胞的免疫治疗方法^[1]。T 淋巴细胞具有直接的活性功能,同时也能通过招募免疫反应的其他成分来发挥辅助功能,因此 T 细胞在杀伤肿瘤方面具有独特的优势^[2]。扩增活化的自体淋巴细胞(expanded activated autologous lymphocytes, EAAL)主要由 CD_4^+ T 细胞和 CD_8^+ T 细胞组成,作为同源细胞毒性淋巴细胞回输到患者体内,能通过破坏宿主和肿瘤细胞之间的病理平衡,在抗肿瘤免疫治疗中发挥重要作用^[3]。有研究发现,小细胞肝癌患者回输 EAAL 能够延长患者的生存时间,提高患者的生存率^[4-5]。

细胞经静脉注射后,可随血液分布至全身各脏器,进而存在潜在的非靶毒性。检测细胞在体内的分布迁移、存续和消除特性,对评估细胞产品的安全性和有效性具有重要意义。活化扩增的淋巴细胞(expanded activated lymphocytes, EAL)由北京永泰生物制品有限公司研发,适应证为预防肝癌术后复发,面向接受肝切除的肝癌患者。为了解 EAL 的分布特征,本研究使用 DiR 标记 EAL 细胞后,给予重度免疫缺陷鼠 NPG 小鼠,采用光学成像、流式细胞术和 qPCR 方法检测细胞在不同时间点的分布情况,为 EAL 细胞进入临床提供数据参考。

材料与方法

1 药物与试剂

20% 人血白蛋白、0.9% 氯化钠注射液和 EAL 细胞由北京永泰生物制品有限公司提供,溶媒为含

1% 人血白蛋白的生理盐水保护液,由 20% 人血白蛋白和 0.9% 氯化钠注射液配制而成,现用现配。给药组 EAL 细胞由北京永泰生物制品有限公司送至国家药物安全评价监测中心后,DiR 标记并配制为 5×10^7 个·mL⁻¹ 的浓度,在 1 h 内完成给药。

DiR(美国 Perkin Elimer 公司,货号:125964); Per-CP Mouse Anti-Human CD3(货号:8124735)、PE Mouse Anti-Human CD4(货号:9172628)和 FITC Mouse Anti-Human CD8(货号:731)均购自美国 Becton, Dickinson and Company; 7-AAD(美国 Becton, Dickinson and Company,货号:559925); 异氟烷(河北一品制药有限公司); 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒[天跟生化科技(北京)有限公司,货号:DP304-03]; Premix Ex Taq™ (Probe qPCR, 日本 Takara 公司,货号:RR390A); RNase A(德国 QIAGEN 公司,货号 19101)。

2 仪器

FACS Aria III 流式细胞仪(美国 Becton, Dickinson and Company); IVIS Lumina Series III 小动物活体成像仪(美国 Perkin Elimer 公司); XGI-8 麻醉机(美国 Perkin Elimer 公司); D3024R 高速冷冻离心机(美国 SCIOLOGEX 公司); SC-3612 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); Real-Time System 和 Hard-Shell® Low-Profile Thin-Wall 96-Well Skirted PCR Plates(美国 BIO-RAD 公司); FC-1100 NanoReady(杭州遂真生物技术有限公司)。

3 动物

实验共使用 5~6 周的 NPG 小鼠 102 只雌雄各

半(含预实验6只),购入时雌性体重16.2~20.5 g,雄性体重18.5~22.0 g,购自北京维通达生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2019-0002。动物饲养于SPF屏障IVC鼠笼内,饲养室12 h照明,温度20℃~26℃,湿度40%~70%,IVC笼具换气次数最低50次·h⁻¹。分组前各性别3~5只·笼⁻¹,分组后各性别3只·笼⁻¹,使用钴60放射灭菌鼠全价颗粒饲料喂养,自由进食和饮水。

4 实验设计

使用96只NPG小鼠,根据动物体重随机分组,分为溶媒对照组和给药组。溶媒组动物尾静脉给予含1%人血白蛋白的生理盐水保护液,400 μL·只⁻¹;给药组动物尾静脉给予DiR标记的EAL细胞,2×10⁷细胞·只⁻¹。每组动物均为48只小鼠,8个解剖点,每个解剖点6只小鼠(雌雄各半)。于给药后10 min,30 min,1 h,3 h,1 d,2 d,4 d,7 d,14 d,28 d,42 d和56 d使用活体成像仪检测EAL细胞在小鼠体内的分布情况。于给药后10 min,30 min,1 h,3 h,1 d,2 d,7 d,14 d,28 d,42 d和56 d采血,EDTA2K抗凝使用流式细胞仪检测外周血中10 000个细胞中的CD₃⁺T细胞、CD₃⁺CD₄⁺T细胞和CD₃⁺CD₈⁺T细胞数量。于给药后1 h,3 h,2 d,7 d,14 d,28 d,42 d和56 d解剖小鼠,取血液、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、脑、睾丸、附睾、子宫、卵巢、胃、十二指肠、结肠、骨髓、脂肪、骨骼肌,除血液放入EDTA2K抗凝管外,其他组织放液氮中速冻后放入-80℃冰箱冻存,后续进行qPCR检测。

在开展实验前,订购6只NPG小鼠(雌雄各半)摘取组织脏器并提取DNA,作为空白小鼠背景混合基因组DNA。

5 EAL细胞DiR染色

将北京永泰生物制品有限公司提供的EAL细胞分装至50 mL离心管中,使每管细胞为5×10⁸个,加入含0.5%人血白蛋白的生理盐水保护液,使终体积为50 mL,加入10 μL 5 mg·mL⁻¹的DiR染料混匀,37℃孵育30 min,后离心洗涤1次后,加入10 mL溶媒混悬,取5 μL细胞悬液,加入含95 μL的溶媒中,再加入5 μL的7-AAD染色,流式检测细胞活率和细胞标记率(以未标记细胞为阴性对照);另取50 μL手动细胞计数,后配制至为5×10⁷个·mL⁻¹的浓度,共配制30 mL。

6 活体成像检测

打开活体成像仪、活体成像软件和外接光源,选

择荧光检测模式,设置激发波长和发射波长分别为748和780 nm,动物放入麻醉机中,异氟烷麻醉后放入活体成像仪内自动曝光检测,完成后,拿出动物放入笼具内,约1~2 min醒来。

7 细胞表型检测

3种抗体按照每个样本3 μL加至流式管中,吸取50 μL抗凝血至含抗体的流式管中,避光孵育30 min,后加入国家药物安全评价监测中心自制的红细胞裂解液,待溶液澄清即刻200 r·min⁻¹×5 min离心,去上清加入400 μL的PBS,200 r·min⁻¹×5 min离心清洗1次,最后加入300 μL的4%多聚甲醛固定,上机检测。

8 qPCR检测

新鲜抗凝血液在取材当天按照试剂盒操作提取DNA,骨髓样本在取材时使用约1 mL PBS冲洗后,直接冻存,检测时随脏器样本一同进行DNA提取。提取后DNA混匀,吸取部分样本采用Neno-ready仪器进行浓度及纯度测定,光密度(OD)₂₆₀/OD₂₈₀介于1.6~2.0之间。其余样本储存于-60℃及以下。

检测时,从冰箱中取出质粒标准品和空白小鼠混合基因组DNA,室温融化。以含有人GAPDH基因片段的质粒作为标准品,设置6个系列浓度,范围为12.5×10⁶~1.25×10⁶ copies·μL⁻¹,每个浓度下均加入空白小鼠背景混合基因组DNA。将配制后的标准曲线溶液置于冰盒或4℃储存,备用,当天实验检测使用。将提取的各脏器DNA样本配制为25 μg·mL⁻¹的浓度,每个样本设置3个复孔。选择总体积25 μL体系进行qPCR扩增,体系各组分组成如下:Premix Ex Taq™(Probe qPCR)12.5 μL;上游引物、下游引物和探针各0.5 μL;模板8 μL;水3 μL。反应条件:预变性:95℃,30 s;PCR反应:95℃5 s,60℃30 s,循环数40。

9 数据处理

CD₃⁺T细胞、CD₃⁺CD₄⁺T细胞和CD₃⁺CD₈⁺T细胞表型测定结果为流式细胞仪每10 000个细胞中的CD₃⁺T细胞、CD₃⁺CD₄⁺T和CD₃⁺CD₈⁺T细胞数量。使用Living Image软件处理荧光图片。将不同时间点动物荧光图片设置成相同的最大值和最小值。

采用Bio-Rad CFX Manager 3.1软件进行qPCR数据分析。设置阈值相对荧光单位(RFU)=80,收集每个反应孔检测Cq(达到一定阈值信号的循环数)值等数据。采用Microsoft Office EXCEL(2007)计算

每个样本 C_q 值均值。以理论 $\text{copies} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{DNA}$ 为横坐标,以检测 C_q 值为纵坐标,进行线性拟合,绘制标准曲线。根据公式 $\text{copies} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{DNA} = 10^{\lfloor [\text{Mean}(C_q) - \text{Intercept}] / \text{Slope} \rfloor}$ 计算样本浓度,其中 Intercept 为 Y 轴纵截距, Slope 为拟合曲线斜率。

结 果

1 EAL 细胞 DiR 染色结果

DiR 染色后,流式检测 EAL 细胞标记率为 98.76%,细胞活率为 98.02%,见图 1。

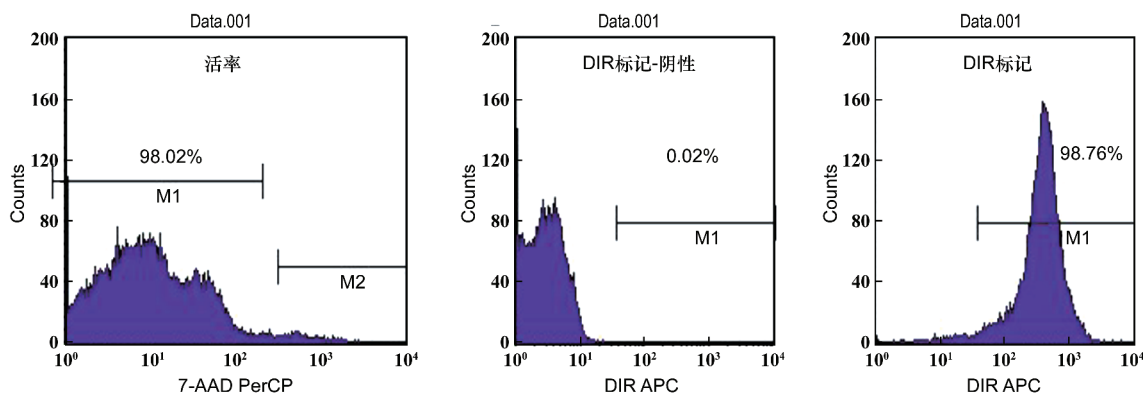
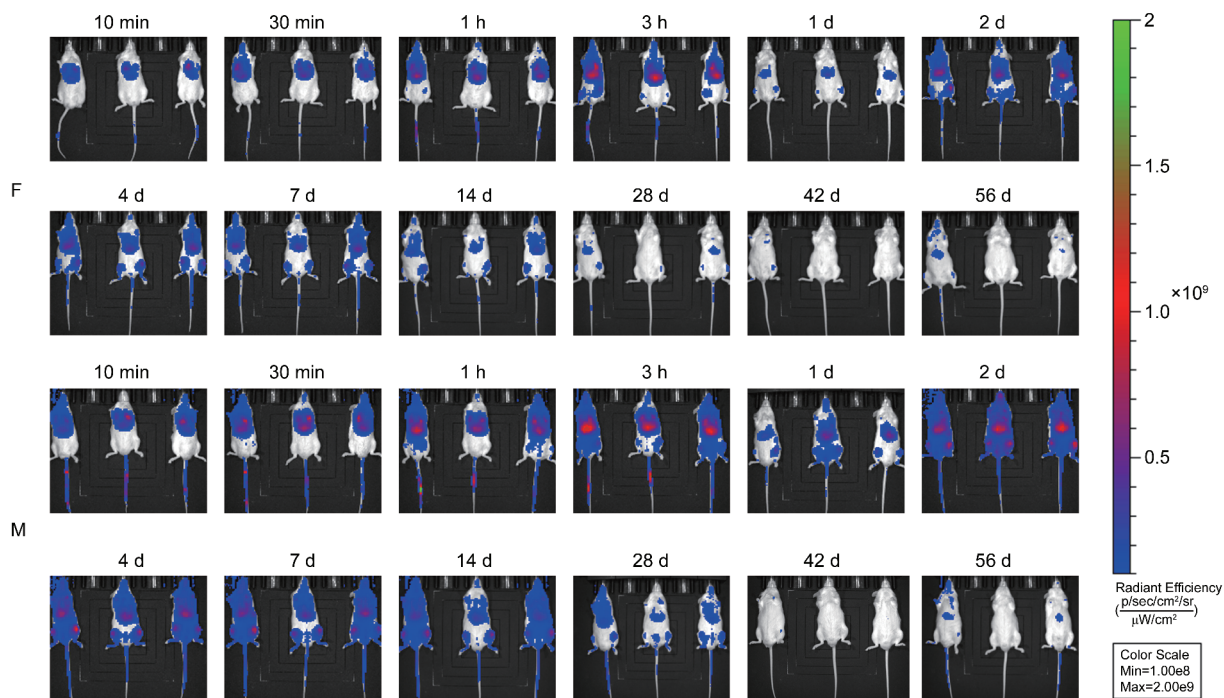


图 1 EAL 染色后细胞活率和标记率

2 活体成像检测结果

由图 2 可知,EAL 细胞在给药后 1 d 内主要分布在肺脏和肝脏,3 h 时可在小鼠双侧腿骨部位检测到细胞。给药后 2~28 d,细胞主要分布在全身、双

侧腿骨、肝脏、脾脏和肺脏部位。给药后 42 和 52 d,能检测出少量细胞。雄性和雌性动物内细胞分布整体趋势一致。



F: 雌性动物; M: 雄性动物

图 2 不同时间点动物荧光图 ($n = 3$)

3 细胞表型检测结果

给药后 10 min 在血液中即可检测到 CD_3^+ T 细

胞、 $\text{CD}_3^+ \text{CD}_4^+$ T 细胞和 $\text{CD}_3^+ \text{CD}_8^+$ T 细胞,之后细胞含量逐渐升高,至 2 d 该 3 种细胞最多,后逐渐降

低,给药后 14 d 时最低,其后一直维持较低水平,至 56 d 实验结束,此时仅能检测到少量细胞,3 种细胞分布趋势一致,见图 3。该检测结果与 qPCR 方法检测血液结果具有较好的一致性,见图 4。

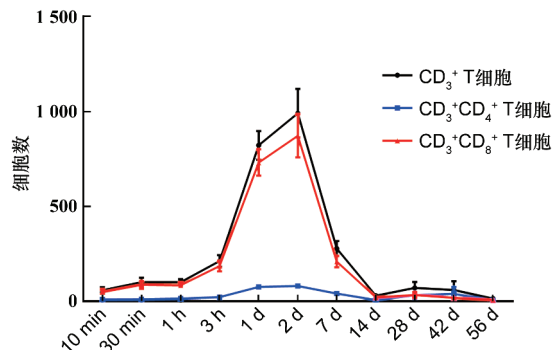


图 3 不同时间点外周血液 CD₃⁺ T, CD₃⁺CD₄⁺ T 和 CD₃⁺CD₈⁺ T 细胞数趋势图 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

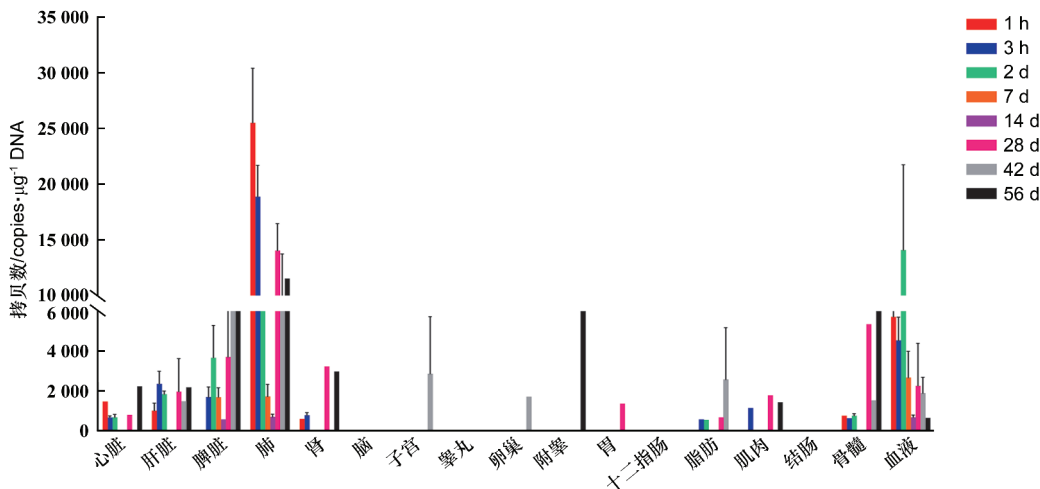


图 5 各组织不同时间点 hGAPDH 基因拷贝数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

NPG 小鼠静脉给予 EAL 细胞 1 h 后,所有动物于外周血中均可检测到 EAL 细胞基因拷贝(平均基因拷贝数为 5 723.5 copies · μg⁻¹ DNA),于给药 2 d 时达峰(平均基因拷贝数为 14 075.3 copies · μg⁻¹ DNA),随后逐渐下降。至给药 14 d,降至最低平均基因拷贝数为 665.6 copies · μg⁻¹ DNA。给药 28 d 时,EAL 细胞基因拷贝出现一定程度上升(平均基因拷贝数为 2 253.9 copies · μg⁻¹ DNA),随后整体下降,56 d 时仅 1 只动物可检测到少量 EAL 细胞基因拷贝(641.8 copies · μg⁻¹ DNA),其他动物拷贝数均低于定量下限。

给药 1 h 后,肺组织中的 EAL 细胞基因拷贝最

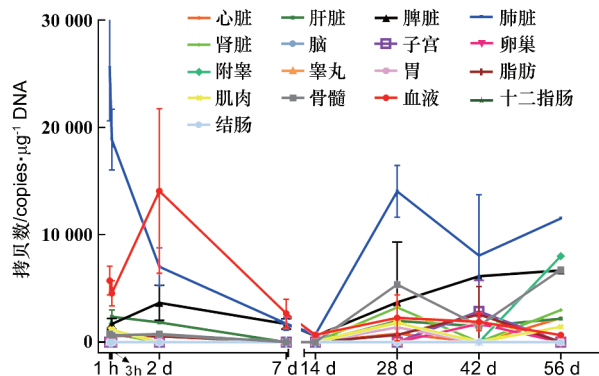


图 4 各组织的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 qPCR 检测结果

如图 5 所示,给药后 EAL 细胞主要分布于血流丰富的肺组织中,其次为血液、脾脏、骨髓和肝脏,其他组织分布较少。

高(平均基因拷贝数为 25 504.8 copies · μg⁻¹ DNA),随后逐渐下降,至给药 14 d 降至最低(平均基因拷贝数为 694.6 copies · μg⁻¹ DNA)。给药 28 d 时,EAL 细胞基因拷贝上升(平均基因拷贝数为 14 033.5 copies · μg⁻¹ DNA),随后整体下降,56 d 时仅 1 只动物可检测到少量 EAL 细胞基因拷贝(11 513.2 copies · μg⁻¹ DNA)。

给药 1 h 后,肝脏组织可检测到 EAL 细胞基因拷贝(平均基因拷贝数为 996.4 copies · μg⁻¹ DNA),随后逐渐上升,至给药 3 h 达到最高(平均基因拷贝数为 2 349.9 copies · μg⁻¹ DNA),随后下降,至给药 7,14 d 未检测到 EAL 细胞基因拷贝。28,42,56 d

仅个别个体有少量检出。

脾脏为小鼠的重要免疫器官, EAL 细胞在该组织的分布较肺、肝脏组织延后, 于给药 3 h 后检测到 EAL 细胞基因拷贝 (平均基因拷贝数 $1\ 688.0\ \text{copies} \cdot \mu\text{g}^{-1}\ \text{DNA}$), 给药 2 d 时达峰 (平均基因拷贝数 $3\ 658.5\ \text{copies} \cdot \mu\text{g}^{-1}\ \text{DNA}$), 随后逐渐下降, 于给药 14 d 时降至最低 ($562.2\ \text{copies} \cdot \mu\text{g}^{-1}\ \text{DNA}$, 仅 1 只动物基因拷贝数高于定量下限)。给药 28 d 时 EAL 细胞基因拷贝上升 ($4/6, 3\ 701.3\ \text{copies} \cdot \mu\text{g}^{-1}\ \text{DNA}$), 42, 56 d 时, 每个时间点仅 1 只动物可检测到少量 EAL 细胞基因拷贝 (分别为 $6\ 124.3$ 和 $6\ 665.3\ \text{copies} \cdot \mu\text{g}^{-1}\ \text{DNA}$)。生殖器官 (子宫、卵巢、睾丸、附睾) 仅个别时间点组织检测到 EAL 细胞基因拷贝, 大部分组织样本检测值低于定量下限。

讨 论

美国 FDA 发布的“Guidance for industry: pre-clinical assessment of investigational cellular and gene therapy products”指导原则指出, 生物分布为确定细胞命运的考虑因素之一, 细胞命运主要是指通过评估细胞的存活/移植、分布、分化/整合和致瘤性, 用于确定给药后细胞体内过程^[6]。细胞治疗产品能够在体内分化、活化或扩增, 其产品类型、作用机制和代谢特点与传统小分子或生物大分子药物有显著的区别, 技术迭代和升级迅速, 不同产品制品制备工艺的复杂程度和潜在安全性等也存在较大的差异^[7-8]。细胞治疗产品研究与评价技术指导原则指出, 细胞治疗产品的药理学研究内容应包括细胞的分布、迁移、归巢和分化。应采用一种或多种合适的细胞追踪方法评价细胞产品的分布、迁移、归巢及其存续和消亡特征^[9]。目前细胞治疗产品尚未建立完善的生物分布技术评价方法和体系, 因此, 不断开发并完善相关产品的技术评价体系, 对确保产品安全可控、推进产品临床研发进程, 满足患者的治疗需求具有重大意义。

以 T 细胞为基础的免疫治疗, 常使用免疫缺陷动物开展临床前研究, 如毒性、生物分布和药效学研究^[10-12], 以保证细胞在动物体内的存活和存续时间。因此本实验使用重度免疫缺陷鼠 (NPG 小鼠) 开展生物分布研究, 该种小鼠缺失功能性的 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞, 为人源细胞移植较好的动物模型。

光学成像是一种相对便宜且简单的成像方法,

与核医学成像相比, 没有电离辐射, 也不需要高度专业化的设备, 非常适合用于临床前研究^[13-14]。光学成像包括直接标记方法和间接标记方法。基于荧光染料的直接标记, 使用光学染料在体外标记细胞, 用限定波长的光激发荧光探针, 再使用高精度相机捕获激发的光子。直接标记常使用的有机染料是一系列明亮的亲脂性膜染料, 易嵌入生物膜内做侧向扩散运动, 从而标记细胞膜, 有发出红色荧光的 DiI、远红外的 DiD 和近红外发射的 DiR^[15-16]。DiR 可溶于乙醇, 激发和发射光谱均位于近红外区, 这使得 DiR 的荧光信号能够被灵敏地检测到^[17]。有研究使用 DiR 标记 C57BL/6J 巨噬细胞, 静脉给予 C57BL/6J 小鼠, 评估巨噬细胞在小鼠体内的分布和定植情况, 发现巨噬细胞除主要分布在肝脏和脾脏外, 对肺脏具有特定的亲和力^[18]。基于 DiR 在细胞产品分布研究中的广泛应用, 本研究使用 DiR 荧光染料标记 EAL 细胞, 检测细胞在 NPG 小鼠体内的分布情况。标记结果显示, DiR 可高效标记 EAL 细胞, 同时 EAL 细胞保持较高的细胞活率, 并在小鼠体内成功检测到 EAL 细胞。对比荧光成像结果和 qPCR 结果, 发现两者具有较好的一致性, 说明 DiR 染料可用于 EAL 细胞在体内追踪。使用 qPCR 技术检测 DNA 和 mRNA 已成为生命科学领域的普遍做法^[19-22], qPCR 也被应用于细胞治疗产品, 用来确定细胞的数量和评估体内细胞的分布, 也有研究建立了微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 检测动物组织样本内细胞动力学的方法^[23]。与细胞荧光成像、PET (positron emission computed tomography) 等技术相比, PCR 检测具有高度定量、高灵敏度等优点, 但基于 PCR 的细胞检测是侵入性的, 因为需定点进行脏器的取材。此外, PCR 也无法区分是从死细胞还是活细胞中提取的 DNA, 因此很难提供存活细胞的准确定位信息^[24]。CD₃⁺ T 细胞、CD₃⁺ CD₄⁺ T 细胞和 CD₃⁺ CD₈⁺ T 细胞作为 EAL 细胞的特定标志物, 使用流式细胞术检测小鼠外周血 3 种细胞, 可反映 EAL 细胞在小鼠外周血中的动态变化。本研究采用光学成像、流式细胞术和 qPCR 方法检测细胞在动物血液和各组织脏器内分布情况, 3 种方法相互补充和印证, 以保证检测的准确性。

由动物活体成像结果可知, 2×10^7 细胞·只⁻¹ 剂量下, 细胞在小鼠体内主要分布在肺脏、肝脏、脾脏部位和双侧腿骨。流式细胞术检测结果显示, 在给药后 2 d, EAL 细胞数量在外周血中显著升高, 后

逐渐降低。qPCR 检测结果也显示,2 d 时细胞在血液中基因拷贝数最高。给药后 1 h 大部分细胞聚集在富含小血管的肺脏中,后基因拷贝数迅速下降,细胞逐渐分布至脾脏等脏器。至给药后 56 d,6 只动物中仅有 1 只动物的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉、附睾、骨髓和血液中检测到基因拷贝数,其他动物和脏器中均未检出,考虑与动物个体差异有关。在 qPCR 的每个检测点均未在小鼠脑部检测到细胞基因拷贝数,表明 EAL 细胞未进入小鼠脑部或进入脑部细胞较少,使得检测基因拷贝数低于定量下限,从而进一步说明 EAL 细胞可能对小鼠的中枢神经系统影响较小。生殖器官(子宫、卵巢、睾丸、附睾)仅个别时间点组织检测到 EAL 细胞基因拷贝,大部分组织样本检测值低于定量下限,说明 EAL 细胞对小鼠生殖系统的影响较小。

综上所述,标记 DiR 的 EAL 细胞静脉给予 NPG 小鼠后,检测研究结果显示 EAL 细胞主要在小鼠肺脏和血液分布最多,其次为脾脏、肝脏和骨髓,其他组织仅有较少分布,同时在实验终点 56 d 时,细胞在大部分动物脏器内消除。通过本研究,了解了 EAL 细胞在重度免疫缺陷小鼠体内的分布和消除特征,为该药物临床试验提供数据参考,具有重要的意义。

[参 考 文 献]

- [1] GHAFARI S, KHALILI N, REZAEI N. CRISPR/Cas9 revitalizes adoptive T-cell therapy for cancer immunotherapy[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 269.
- [2] LEON E, RANGANATHAN R, SAVOLDO B. Adoptive T cell therapy: Boosting the immune system to fight cancer[J]. *Semin Immunol*, 2020, 49: 101437.
- [3] ZHANG, LE-PING; LU, AI-DONG; WU, *et al.* Expanded activated autologous lymphocyte infusions improve outcomes of low and intermediate-risk childhood acute myeloid leukemia with low level of minimal residual disease[J]. *Cancer Lett*, 2020, 493: 128 - 132.
- [4] 张国庆, 孙胜杰, 李瑾昱, 等. 扩增活化的自体淋巴细胞过继性细胞免疫治疗小细胞肺癌[J]. *临床药物治疗杂志*, 2016, 14(1): 21 - 27.
- [5] ZHANG GQ, LI F, SUN SJ, *et al.* Adoptive immunotherapy for small cell lung cancer by expanded activated autologous lymphocytes: a retrospective clinical analysis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(4): 1487 - 1494.
- [6] US Food and Drug Administration. Guidance for industry: pre-clinical assessment of investigational cellular and gene therapy

- products[EB/OL]. (2013 - 11) [2022 - 08 - 17]. <https://www.fda.gov/media/87564/download>.
- [7] 高建超, 韦薇, 张曼, 等. 细胞和基因治疗产品监管科学研究进展和展望[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(2): 105 - 108.
- [8] 黄瑛, 侯田田, 文海若, 等. 嵌合抗原受体 T 细胞产品临床前安全性评价策略和案例[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(8): 740 - 745.
- [9] 原国家食品药品监督管理局药品审评中心. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)[S]. 2017.
- [10] WEN HR, HUANG Y, HOU TT, *et al.* Determination of the biodistribution of chimeric antigen receptor-modified T cells against CD19 in NSG mice[J]. *Methods Cell Biol*, 2022, 167: 15 - 37.
- [11] WEN HR, QU Z, YAN YJ, *et al.* Preclinical safety evaluation of chimeric antigen receptor-modified T cells against CD19 in NSG mice[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(23): 735.
- [12] SANDERSON JP, CROWLEY DJ, WIEDERMANN GE, *et al.* Preclinical evaluation of an affinity-enhanced MAGE-A4-specific T-cell receptor for adoptive T-cell therapy[J]. *Oncoimmunology*, 2019, 9(1): 1682381.
- [13] GALLI F, VARANI M, LAURI C, *et al.* Immune cell labelling and tracking: implications for adoptive cell transfer therapies[J]. *EJNMMI Radiopharm Chem*, 2021, 6(1): 7.
- [14] 张远东, 张卓, 阚君满. 氟硼荧光染料纳米粒子在肿瘤光学成像和光疗中的应用[J]. *中国医药工业杂志*, 2023, 54(3): 330 - 338.
- [15] 王舒哲, 许波华, 王雁, 等. 细胞治疗产品非临床活体示踪方法研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(8): 624 - 631.
- [16] 徐梦欣, 李一佳, 刘志博. 细胞标记与体内追踪成像: 在动物和人类中应用的最新进展[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(19): 3108 - 3116.
- [17] 黄瑛, 高阳, 霍艳, 等. 扩增活化的淋巴细胞在小鼠体内的生物分布评价[J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(13): 1587 - 1592.
- [18] NISHIWAKI S, SAITO S, TAKESHITA K, *et al.* *In vivo* tracking of transplanted macrophages with near infrared fluorescent dye reveals temporal distribution and specific homing in the liver that can be perturbed by clodronate liposomes[J]. *PLoS One*, 2020, 15(12): e0242488.
- [19] 闫振龙, 滕伊洋, 张亚群, 等. 干细胞来源细胞治疗产品非临床安全性评价概述[J]. *中国新药杂志*, 2023, 32(6): 583 - 588.
- [20] 于雷, 史新昌, 秦玺, 等. 基因治疗产品质量控制策略及面临挑战[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(21): 2090 - 2100.
- [21] 钟小群, 张亚群, 闫振龙, 等. 细胞治疗产品的生物分布研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(19): 1888 - 1894.
- [22] 豆敏华, 朱冰美, 宗伟英, 等. 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[J]. *中国新药杂志*, 2021, 30(24): 2306 - 2314.
- [23] SUGIMOTO H, CHEN SS, MINEMBE JP, *et al.* Insights on droplet digital PCR-based cellular kinetics and biodistribution assay support for CAR-T cell therapy[J]. *Aaps J*, 2021, 23(2): 36.
- [24] KAMIYAMA Y, NARITOMI Y, MORIYA Y, *et al.* Biodistribution studies for cell therapy products: Current status and issues[J]. *Regen Ther*, 2021, 18: 202 - 216.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-02-28