

【药效学评价】

NSG 小鼠多发性骨髓瘤模型评价 BCMA-CAR-T 的药效和毒性及 RNAscope 在检测 CAR-T 分布中的应用

荣 斌^{1,2}, 吴纯启², 原 野², 尹纪业², 瞿文生², 李晓旭², 范 丹¹, 贺小琼^{1*}, 王全军^{2*}

1. 昆明医科大学 公共卫生学院, 云南 昆明 650504

2. 军事科学院军事医学研究院, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 国家北京药物安全评价研究中心, 北京 100850

摘要: 目的 选择合适的小鼠模型, 评价以B细胞成熟抗原为靶点的嵌合抗原受体T细胞(BCMA-CAR-T)治疗产品的抗多发性骨髓瘤作用及毒性, 探讨RNAscope在CAR-T治疗中的应用。方法 在免疫缺陷严重的NSG小鼠中建立MM. 1s-luc多发性骨髓瘤模型, 随机分为细胞外液组(每只小鼠100 μ L PBS缓冲液)、MOCK-T组(未转染的T细胞, 剂量为100 μ L)和CAR-T低、中、高剂量组(分别每只计数 1×10^6 、 5×10^6 、 10×10^6 个CAR-T, 每只一次性尾iv 100 μ L细胞悬液)。采用活体成像技术检测CAR-T治疗肿瘤的消退效果; 酶联免疫吸附实验检测血浆中 γ -干扰素(IFN- γ)水平; 观察小鼠一般状态、体温、体质量; 治疗后14 d对小鼠进行解剖和采样, 利用RNAscope技术检测CAR-T在小鼠组织的特异性分布。结果 成功建立了多发性骨髓瘤NSG小鼠移植肿瘤模型; 在输注BCMA-CAR-T后3、7、12 d, 生物发光成像显示, CAR-T组小鼠平均光子强度显著低于细胞外液、MOCK-T组($P < 0.05$), 中、高剂量组的治疗效果明显高于低剂量组($P < 0.05$); CAR-T组的IFN- γ 分泌水平显著高于细胞外液、MOCK-T组($P < 0.05$); 记录CAR-T治疗组小鼠的一般情况, 未见明显不良反应; RNAscope检测到CAR-T在输注14 d后少量特异性分布于骨髓和脾脏。结论 本研究验证了BCMA-CAR-T抗多发性骨髓瘤药效明显, 安全可靠, RNAscope技术可应用于CAR-T分布检测。

关键词: BCMA-CAR-T; 多发性骨髓瘤; 生物发光成像; 药效; 毒性; RNAscope; γ -干扰素

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2019)05-0822-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.05.003

NSG mouse multiple myeloma model was used to evaluate *in vivo* efficacy and toxicity of BCMA-CAR-T cells and application of RNAscope in the detection of CAR-T distribution

RONG Bin^{1,2}, WU Chunqi², YUAN Ye², YIN Jiye², QU Wensheng², LI Xiaoxu², FAN Dan¹, HE Xiaoqiong¹, WANG Quanjun²

1. School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650504, China

2. National Beijing Center for Drug Safety Evaluation and Research, State Key Laboratory of Medical Countermeasures and Toxicology, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: **Objective** Choose the appropriate mouse model, evaluate BCMA-CAR-T anti-tumor effects, and explore the application of RNAscope in CAR-T cell therapy. **Methods** MM. 1s-luc multiple myeloma mouse model was established in NSG mice with severe immunodeficiency, they were randomly divided into extracellular fluid group (100 μ L PBS buffer per mouse), MOCK-T group (100 μ L untransfected T cells), low, medium and high dose groups of CAR-T (1×10^6 , 5×10^6 , 10×10^6 CAR-T per mouse, and

收稿日期: 2018-12-20

基金项目: 重大新药创制科技重大专项(2018ZX09711003-007); 重大新药创制科技重大专项(2017ZX09201008-001-002); 重大新药创制科技重大专项(2018ZX09201017-003); 重点仪器研发计划(ZDYZZ2015-2); 转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08011007)

第一作者: 荣 斌, 女, 硕士研究生, 主要从事药效与毒理学研究。Tel: 17710731527 E-mail: rongbinbeijing@163.com

***通信作者:** 王全军, 研究员, 博士生导师, 研究方向为药物毒理学与药物临床前安全评价。Tel: 101-66931631

E-mail: wangquanjunbeijing@163.com

贺小琼, 硕士, 教授, 研究方向为化学致癌与癌症的化学防治。E-mail: hexqcn@aliyun.com

100 μ L cell suspension of one-off tail iv). *In vivo* imaging was performed to detect the tumor regression effect of CAR-T treatment. The level of interferon-gamma (IFN-gamma) in plasma was detected by ELISA. General clinical observation, body temperature, body weight monitoring were performed after CAR-T was given once. Mice were dissected and sampled 14 days after infusion. CAR-T distribution in the spleen and bone marrow of mice was detected by RNAscope technology, and the specific distribution of CAR-T in various tissues was detected. **Results** Successfully established many found myeloma NOD/SCID mice transplanted tumor model, At 3, 7 and 12 days after BCMA-CAR-T infusion, bioluminescence imaging showed that the average photon intensity of mice in CAR-T group was significantly lower than that in extracellular fluid and MOCK-T group ($P < 0.05$), and the therapeutic effect in medium and high dose groups was significantly higher than that in low dose groups ($P < 0.05$); the level of IFN-gamma secretion in CAR-T group was significantly higher than that in extracellular fluid and MOCK-T group ($P < 0.05$); the general situation of mice in CAR-T group was recorded, but no significant difference was observed. Adverse reactions: RNA scope detected that CAR-T was localized in bone marrow and spleen 14 days after infusion. **Conclusion** The BCMA-CAR-T has been proven to be safe and reliable by some non-clinical evaluation methods. RNAscope technology can be applied to CAR-T cell distribution detection.

Key words: BCMA-CAR-T; nonclinical study; bioluminescent imaging; efficacy; toxicity; RNAscope

近年来,越来越多的国内外科学专注于嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)细胞免疫疗法治疗肿瘤的研究^[1],目前,全球已有多个,如靶向CD19等靶点的CAR-T,获FDA批准上市,以B细胞成熟抗原(BCMA)为靶点的CAR-T技术在治疗多发性骨髓瘤领域也被越来越多的科学家关注^[2]。BCMA仅在生发中心B细胞、恶性和正常浆细胞表面表达,不表达于其他的正常人体组织中,相对特异性的高表达于骨髓细胞的表面,是免疫治疗多发性骨髓瘤理想的靶标,BCMA-CAR-T可以靶向识别BCMA并同时激活T细胞进行大规模扩增,在短时间内释放炎症介质,从而杀伤肿瘤细胞^[3]。新一代原位RNA检测技术-RNAscope技术,由于其独特的探针设计和信号放大系统使其比传统原位杂交检测技术具有更高的灵敏度和特异性^[4]。本研究采用严重免疫缺陷NSG小鼠建立人多发性骨髓移植模型,验证BCMA-CAR-T的体内药效,初步观察CAR-T对移植瘤小鼠的毒性,以及探索RNAscope技术在CAR-T治疗中的应用。

1 材料

1.1 细胞株和实验动物

人多发性骨髓瘤MM.1S细胞株,购自美国ATCC公司;过表达荧光素酶报告基因(luciferase)的MM.1S细胞(MM.1S-Luc),由深圳普瑞金药业实验室构建并检测BCMA表达率为90%,在含有10%的胎牛血清(FBS)的1640培养液中培养MM.1S-Luc;BCMA-CAR-T由张继帅博士赠予。

无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)级、6~8周龄的B-NSG小鼠,购自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(苏)2016-0004。饲养于军事科学院军事医

学研究院国家北京药物安全评价研究中心(NBCDSER)GLP实验室,12 h/12 h明暗交替,温度20~24 $^{\circ}$ C,湿度40%~70%,自由饮食、饮水。NBCDSER已通过国际实验动物评估和认可委员会(AAALAC)认证。所有动物适应性饲养3 d后供试。本研究中动物实验严格按照国家北京药物安全评价研究中心动物管理委员会制定的动物伦理条例进行相关操作。

1.2 主要试剂和仪器

实验室所用的细胞培养液、血清(美国Gibco公司);底物荧光素D-luciferin(PerkinElmer公司);人 γ -干扰素(IFN- γ) ELISA Kit(购自英国abcam公司);RNAscope二代荧光检测试剂盒[红色,美国Advanced Cell Diagnostics(ACD)公司]。

小鼠活体成像仪IVIS Spectrum CT(Perkin Elmer公司);Immedge疏水性屏障笔、Hybez杂交炉,均购于美国Advanced Cell Diagnostics(ACD)公司;载玻片和盖玻片,购于美国Thermo Fisher公司。

2 方法

2.1 利用人MM.1S-luc细胞建立NOD/SCID小鼠多发性骨髓瘤模型

将MM1.S-Luc细胞在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中缓慢洗涤2次以除去胎牛血清,并使用台盼蓝染色法鉴定细胞存活率高于95%,调整细胞浓度为 $10 \times 10^7/\text{mL}$,根据预实验结果,52只小鼠(雌雄各半)尾iv 1.5×10^6 个MM.1S-luc细胞(200 μ L瘤细胞悬液),注意防止拔针时后孔溢出。

注射肿瘤细胞后14 d,随机挑选4只进行活体成像,根据成像结果判断何时给予CAR-T,输注CAR-T前1天对所有小鼠成像,根据成像结果评估模型是否建立成功(图像可监测到小鼠活体内肿瘤细胞发光)。

2.2 动物分组与给药

依据成像结果选出荷瘤成功且肿瘤细胞发光强度均一的40只小鼠(雌雄各半)进入实验,随机分为细胞外液组(每只小鼠100 μ L PBS缓冲液)、MOCK-T组(未转染的T细胞,剂量为100 μ L)及低、中、高剂量CAR-T组(分别每只计数 1×10^6 、 5×10^6 、 10×10^6 个CAR-T,每只一次性尾iv 100 μ L细胞悬液),每组8只(雌雄各半)。

2.3 检测指标

2.3.1 活体成像检测肿瘤细胞 给药当天记为1 d, 输注CAR-T后3、7、12 d分别对小鼠活体成像检测CAR-T对肿瘤的治疗作用:每只小鼠ip底物荧光素D-luciferin(15 mg/kg),2 min后用1%~3%异氟烷麻醉小鼠至停止活动,随后放入活体成像仪,打开麻醉气体开关,并保持1%~2%的异氟烷持续麻醉。该成像仪为自动活体成像模式,1~5 min不等,成像结束后,将实验动物放回动物饲养箱中。全部成像结束后读取图像,活体图像软件(Perkin Elmer)将肿瘤测量值计算为整个动物的光子/秒生物发光强度(photons/s)。实验期间监测小鼠一般状态,测量体质量变化和体温变化。

2.3.2 IFN- γ 水平检测 在CAR-T输注后3、7、12 d,眼眶静脉丛采集小鼠血液0.1 mL并收于EDTA-K2抗凝管中,立即放入碎冰,1 h内所有血样4 $^{\circ}$ C、1 500 \times g离心5 min后,将样品的血浆分离约50 μ L并储存在-80 $^{\circ}$ C保存,采用酶联免疫吸附实验对血浆中IFN- γ 水平进行测定,所有操作均按照试剂盒要求进行。

2.3.3 RNAscope检测 输注CAR-T后第14天剖杀小鼠(每组雌雄各半),取材脾脏、骨髓、心脏、肝脏、肺脏等组织制作石蜡切片,用于RNAscope检测。具体过程如下:①标本准备:石蜡切片(厚度5 μ m),60 $^{\circ}$ C烤片1 h,二甲苯透明、无水乙醇脱蜡,室温风干5 min;②H₂O₂靶标修复处理:在每张切片上滴加5~6滴H₂O₂,室温孵育10 min,蒸馏水清洗切片3次,再浸入99 $^{\circ}$ C靶标修复液中孵育15 min。后将切片立即转移至蒸馏水中,清洗切片3次,无水乙醇中静置5 min,室温下风干切片;③画阻水圈:使用阻水笔在每张切片样本周围画阻水圈4~5次,室温下放置2 min至完全干燥或过夜干燥;④蛋白酶Plus处理:在上述每张切片上加约5滴蛋白酶Plus,放入预热至40 $^{\circ}$ C的HybEZ湿度控制盘,盖上盖密封,放入杂交炉,在40 $^{\circ}$ C孵育30 min,蒸馏水洗3次;⑤Amp杂交反应:依次分别加入6次杂交反应液,反应

温度为40 $^{\circ}$ C,每次反应结束均用缓冲液清洗玻片;⑥检测信号:去除上述切片的过量液体,每张切片滴加约120 μ L DAB溶液,把切片置于湿度控制盘,孵育10 min;去除DAB溶液,蒸馏水清洗3次;⑦苏木精复染、封片:苏木精染色2 min,蒸馏水洗3次,0.02%氨水洗1次,蒸馏水再洗3次,风干后中性树胶封固;⑧结果判读:因只需观察CAR mRNA在各组织中有无表达,所以将片子放在显微镜下放大40 \times 观察并拍照,判定有无CAR mRNA表达(显示为红色标点)。

2.4 统计学分析

应用SPSS 21.0统计软件进行分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较,若方差齐采用单因素方差分析,若方差不齐采用Kruskal-Wallis检验。

3 结果

3.1 成功构建人多发性骨髓瘤NOD/SCID尾静脉移植瘤小鼠模型

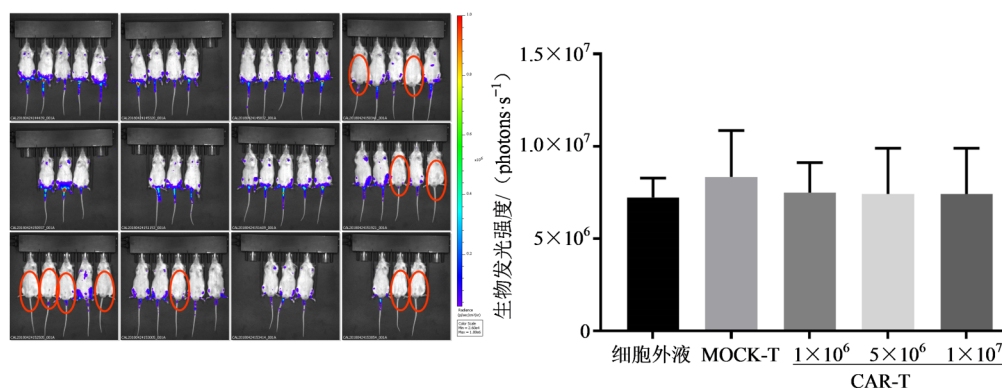
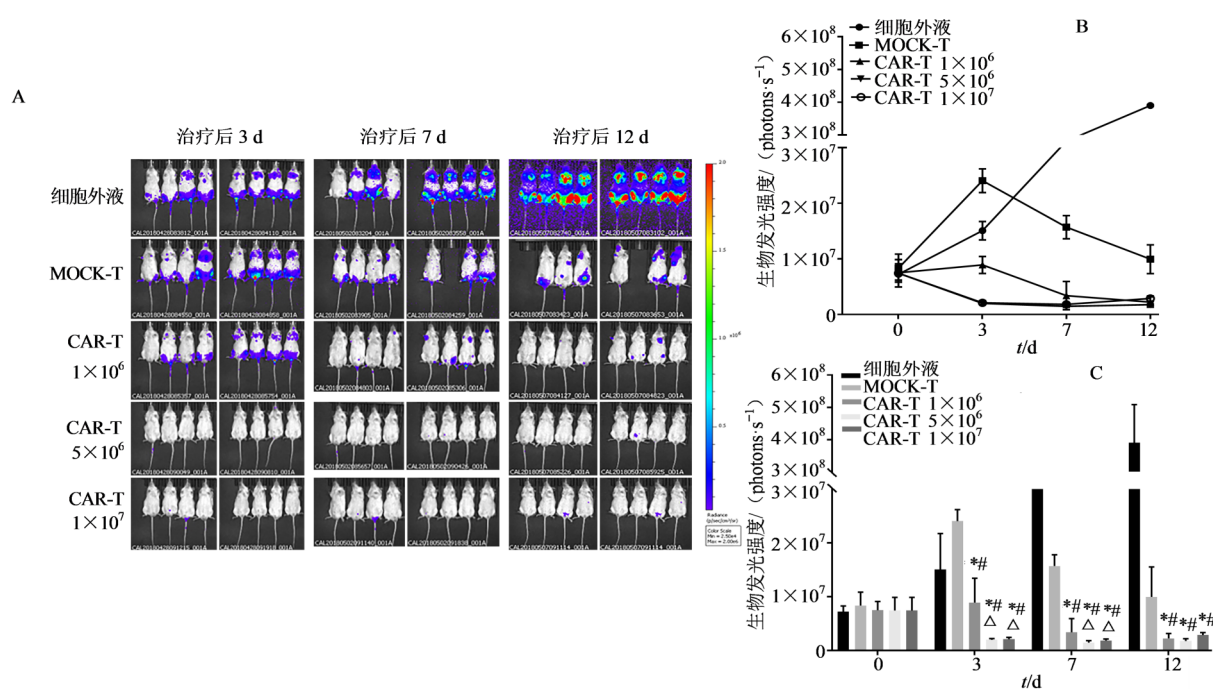
NSG鼠尾iv MM.1S-Luc细胞后第18天,CAR-T输注前1天,成功构建人多发性骨髓瘤NSG鼠模型(图1A),根据成像结果和图像剔除未见发光小鼠(已圈出),挑选40只信号均一小鼠进入实验,将40只肿瘤细胞信号发光强度均一的小鼠随机分组,并进行统计学验证,结果显示,各组小鼠肿瘤细胞生物发光强度无统计学差异。结果见图1。

3.2 BCMA-CAR-T可快速消除荷瘤鼠多发性骨髓瘤

如图2A、B所示,细胞外液组小鼠,BCMA-CAR-T输注后0~12 d,MM.1S-Luc细胞发光强度持续增强,且在3~7 d增强趋势最快;MOCK-T组小鼠,0~3 d MM.1S-Luc细胞发光强度明显增强,且增强趋势大于细胞外液组,3~12 d发光强度持续降低。低剂量CAR-T组,0~3 d,MM.1S-Luc细胞发光强度增强,增强趋势小于细胞外液组和MOCK-T组,3~12 d发光强度持续下降,但7~12 d下降趋势小于3~7 d。中、高剂量CAR-T组变化趋势基本一致,0~3 d,MM.1S-Luc细胞发光强度持续降低,降低趋势显著强于其他各组,3~7 d MM.1S-Luc细胞发光强度略有下降,但7~12 d发光强度增强,有肿瘤复发趋势。如图2C所示,在输注CAR-T后3~12 d,CAR-T3个剂量组与两对照组比较肿瘤细胞发光强度显著降低($P < 0.05$);中、高剂量之间组无显著差异,3、7 d低剂量组发光强度显著高于中、高剂量组($P < 0.05$)。

3.3 小鼠外周血细胞因子变化趋势

如图3所示,细胞外液组未检出人源IFN- γ 分

图1 NSG小鼠多发性骨髓瘤模型的建立 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)Fig. 1 Establishment of a multiple myeloma model in NSG mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)与细胞外液组比较: * $P < 0.05$; 与 MOCK-T 组比较: # $P < 0.05$; 与 CAR-T 1×10^6 组比较: $\Delta P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs extracellular fluid group; # $P < 0.05$ vs MOCK-T cell group; $\Delta P < 0.05$ vs CAR-T cell 1×10^6 group图2 活体成像检测 CAR-T 对 NSG 鼠多发性骨髓瘤模型的治疗作用 ($\bar{x} \pm s$)Fig. 2 BIL monitoring therapeutic effect of CAR-T cells on multiple myeloma model in NSG mice ($\bar{x} \pm s$)

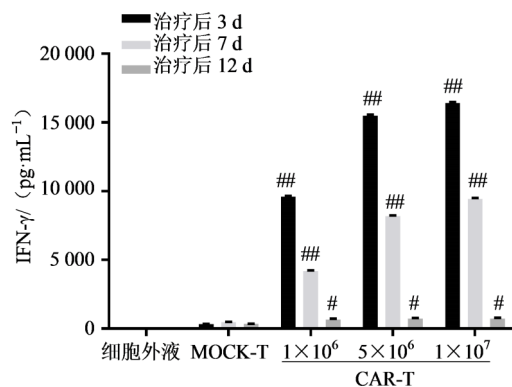
泌; MOCK-T 组小鼠, 输注 CAR-T 后 3、7、12 d 检测到 IFN- γ 的分泌, 水平无显著差异; CAR-T 治疗组, 各组小鼠在治疗 3 d 检测到 IFN- γ 释放量大量增加, 随后降低, 低、中、高剂量组在 CAR-T 输注后 3、7、12 d IFN- γ 水平均显著高于 MOCK-T 组 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见图 3。

3.4 动物一般状态

给药 1 周后, 细胞外液组和 MOCK-T 组小鼠开始出现活动明显减少、饮食饮水减少、安静、毛色不华、四肢瘫痪等症状, MOCK-T 组分别出现 2 只小鼠死亡, 雌性 1 只(死亡原因: 眼眶采血操作不当, 窒息

死亡), 雄性 1 只, 总体死亡率 25%。CAR-T 各剂量组小鼠在给药后 14 d 内, 活动及饮食饮水均正常, 毛发整齐。

小鼠体重、温度变化见图 4。在细胞治疗初始阶段雄鼠体重均高于雌鼠, 输注 CAR-T 后 1~14 d, 雄鼠细胞外液组体重持续下降, MOCK-T 组体重变化不明显; CAR-T 低剂量组小鼠体重变化与细胞外液、MOCK-T 组比较无统计学差异; 中剂量组小鼠体重持续增长, 在输注 CAR-T 后 11 d, 体重显著高于细胞外液和 MOCK-T 组 ($P < 0.05$); 高剂量组小鼠体重在 CAR-T 输注后 1~7 d

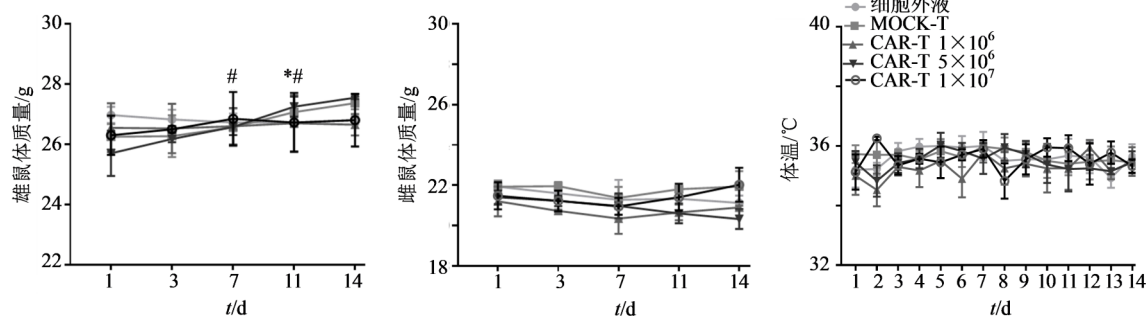


与MOCK-T组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs MOCK-T cell group

图3 输注CAR-T后小鼠外周血IFN- γ 变化($\bar{x} \pm s$)

Fig 3 Changes of IFN- γ in peripheral blood of mice after CAR-T infusion ($\bar{x} \pm s$)



与细胞外液组比较: * $P < 0.05$; 与MOCK-T组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs extracellular fluid group; # $P < 0.05$ vs MOCK-T cell group

图4 实验期间小鼠体质量、体温变化($\bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Changes in body weight and body temperature of mice during experiment ($\bar{x} \pm s$)

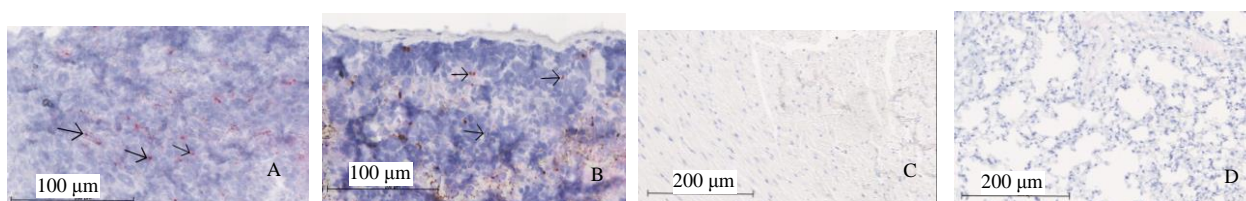


图5 骨髓(A)、脾脏(B)、心脏(C)、肺脏(D)中RNAscope检测

Fig. 5 RNAscope detection of bone marrow (A), spleen (B), heart (C) and lungs (D)

4 讨论

新药的非临床评价是药物从药学进入临床试验的重要环节, CAR-T免疫疗法作为新兴且最有前途的治疗方法, 本课题组对其进行非临床研究评价, 研究CAR-T在动物体内的抗肿瘤活性, 对其进行概念性研究并证明其体内药效学活性, 同时观察一些毒性指标, 如体质量下降程度、移植物抗宿主病(Graft-versus-host Disease, GVHD)以及行动迟缓、脱毛等, 为临床研究尽可能提供有力的数据支

持续增长, 7 d显著高于MOCK-T组($P < 0.05$), 7~11 d有下降的趋势, 但与对照组比较不明显; 11~14 d自然增长。雌鼠细胞外液组小鼠体质量持续降低, MOCK-T组小鼠体质量自然增长, 3~7 d有下降的趋势; 低、中剂量组小鼠整体有下降的趋势, 但与细胞外液和MOCK-T组比较差异不明显; 高剂量组小鼠体质量在输注CAR-T后1~7 d略有降低, 在7~14 d体质量自然增长。输注CAR-T后14 d内各组小鼠体温变化不明显, 均维持在正常范围内。

3.5 RNAscope检测CAR-T分布

在CAR-T输注后14 d剖杀小鼠, 取重要组织检测CAR mRNA分布, 在40×或20×显微镜下观察, 检测结果为CAR-T各组小鼠骨髓和脾脏中还有少量CAR mRNA(红色标点), 其他组织(如心脏、肺脏)中未检测到。结果见图5。

持。针对BCMA-CAR-T动物模型的选择和构建、实验方案的设计、检测方法和相关指标等是评价CAR-T抗肿瘤活性的关键点^[5]。

在本研究中, 选择重度免疫缺陷鼠NSG小鼠建立异种移植瘤小鼠模型, NSG小鼠体内缺乏成熟的T和B细胞, 也无功能性NK细胞, 细胞因子信号传递功能缺失, 是目前免疫缺陷程度最高的小鼠, 对人源细胞和组织几乎没有排斥反应, 是适合人源多发性骨髓瘤移植的工具鼠^[6]。相比于同源小鼠模

型,该模型可以移植、研究人源CAR-T的体内活性。在免疫缺陷鼠中进行尾iv或皮下移植人源肿瘤细胞或组织,可以作为疾病动物模型对药效进行验证并对毒性指标进行观察,但由于没有免疫系统,不能完全模拟人体中出现的细胞因子风暴现象,也无法直接检测脱靶作用^[7]。

生物发光成像(Bioluminescent Imaging, BLI)是一种无创的成像方法,可实时地检测肿瘤细胞的迁移和扩增,同时也能够评价细胞治疗的毒性反应,是目前评价CAR-T产品体内药效作用的主要技术之一^[8]。在评估CAR-T的体内代谢和毒性方面存在诸多技术上的困难,例如需要的动物数量大,单一捐赠者来源的人源CAR-T不能满足代谢研究的需求,制备的成本太高。同时,目前没有较理想的模型检测CAR-T的一般毒性指标、免疫毒性和神经毒性。RNAscope技术是美国ACD公司开发的一项新型原位mRNA检测技术,其独特之处在于设计了双Z型的探针以及特有的信号放大系统,具备优异灵敏度、特异性,可以极大降低反应背景,并适用于冷冻切片、石蜡切片、悬浮细胞等样本^[9]。

针对BCMA-CAR-T,使用NSG小鼠构建多发性骨髓瘤小鼠模型,采用BLI法鉴定模型是否构建成功,并监测BCMA CAR-T对多发性骨髓瘤细胞的清除作用^[10],同时观察其一般状态、检测体质量变化等初步判断CAR-T对肿瘤模型小鼠是否造成毒性。在多发性骨髓瘤中,外周血细胞因子IFN- γ 的分泌是间接反应CAR-T抗肿瘤的效应的重要细胞因子^[11-12]。针对BCMA-CAR-T的CAR特异性序列设计了双Z探针,在输注CAR-T后第14天检测几个重要组织中CAR-T的特异性分布,同时可以初步预测CAR-T在组织中存活的时间。本研究结果显示,MM.1S-Luc输注后18 d成功构建多发性骨髓瘤模型,BLI和IFN- γ 分泌水平显示,荷瘤鼠注射人源CAR-T后3 d就已经显示出对肿瘤的消除效果,同时CAR-T输注组未表现出毒性反应,RNAscope结果显示CAR-T在输注后第14天在小鼠骨髓、脾脏中有低水平的分布,其他组织未检测到CAR-T分布。通过CAR-T输注组小鼠结果,初步证明该BCMA-CAR-T治疗产品药效明显,临床前动物试验毒性小,安全性可被监测,无严重安全性事件。

本研究证明了NSG小鼠构建人多发性骨髓瘤细胞可以较好的验证BCMA-CAR-T体内药效,同

时可检测相关毒性指标,下一步实验需探索临床更合适的剂量进行体内药效研究,同时设置卫星组,增加更多的毒理学指标的检测。

参考文献

- [1] Brudno J N, Kochenderfer J N. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(1): 31-46.
- [2] 吴晓菲,王雅丹,胡 豫,等.多发性骨髓瘤的CAR-T细胞治疗现状 [J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(10): 921-925.
- [3] Friedman K M, Garrett T E, Evans J W, et al. Effective targeting of multiple B-cell maturation Antigen - Expressing hematological malignancies by anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor t cells [J]. Human Gene Therapy, 2018, 29(5): 585-601.
- [4] Wang H W, Su N, Wang L C, et al. Quantitative ultrasensitive bright-field RNA in situ hybridization with RNAscope [J]. Methods Mol Biol, 2014, 1211: 201-212.
- [5] 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.
- [6] Kalatsidou M, Kueberuwa G, Schütt A, et al. CAR T-cell therapy: toxicity and the relevance of preclinical models [J]. Immunotherapy, 2015, 7(5): 487-497.
- [7] 黄 瑛,侯田田,霍 艳,等. CAR-T细胞治疗产品非临床研究动物模型的发展和应用概述 [J]. 中国药事, 2018, 32(7): 886-892.
- [8] 倪庆纯. 利用小动物活体成像技术快速评价药物的抗肿瘤作用研究 [J]. 今日药学, 2012, 22(6): 321-323.
- [9] Grabinski T M, Kneynsberg A, Manfredsson F P, et al. A method for combining RNAscope in situ hybridization with immunohistochemistry in thick free-floating brain sections and primary neuronal cultures [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120120.
- [10] Bonifant C L, Jackson H J, Brentjens R J, et al. Toxicity and management in CAR T-cell therapy [J]. Molecular Therapy Oncolytics, 2016, 3: 16011.
- [11] Xia A L, Wang X C, Lu Y J, et al. Chimeric-antigen receptor T (CAR-T) cell therapy for solid tumors: challenges and opportunities [J]. Oncotarget, 2017, 8(52): 90521-90531.
- [12] Hermanson D, Barnett B E, Rengarajan S, et al. Abstract 3759: PiggyBac-manufactured anti-BCMA Centyrin-based CAR-T therapeutic exhibits improved potency and durability [J]. Cancer Res, 2017, 77(13 Supplement): 3759.