

# 免疫疗法的突破



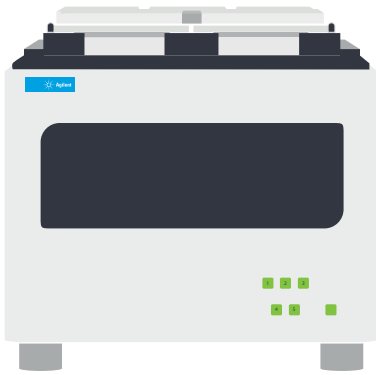
**Agilent**

赞助出版机构

**GEN** Genetic Engineering  
& Biotechnology News

## xCELLigence RTCA eSight

细胞杀伤的实时动态分析和活细胞成像



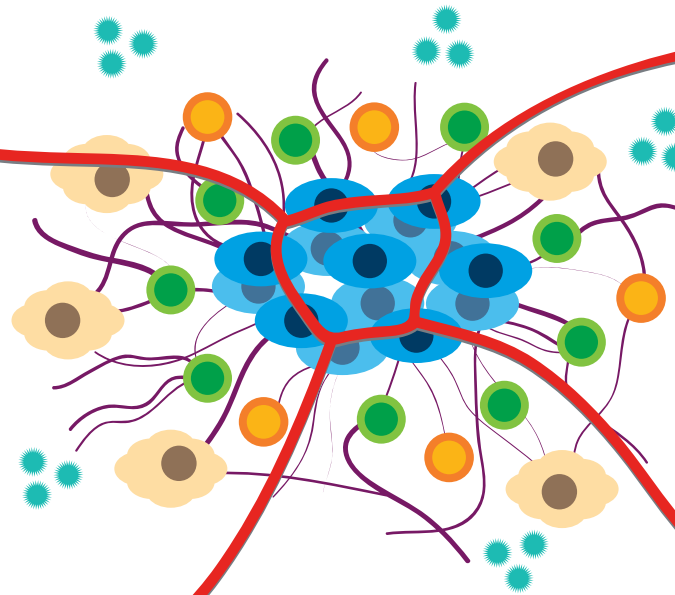
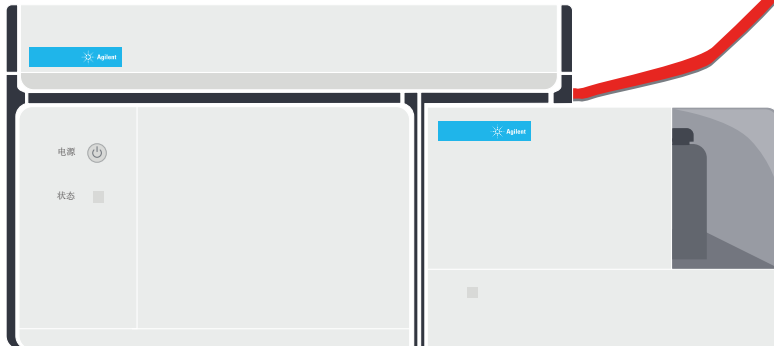
## Seahorse XF 分析仪

免疫细胞命运和适应性的  
动态分析



## NovoCyte Quanteon 流式细胞仪

采用流式细胞仪进行多参数免疫表型分析



SureGuide  
CRISPR  
sgRNA

稳定的靶标  
基因编辑

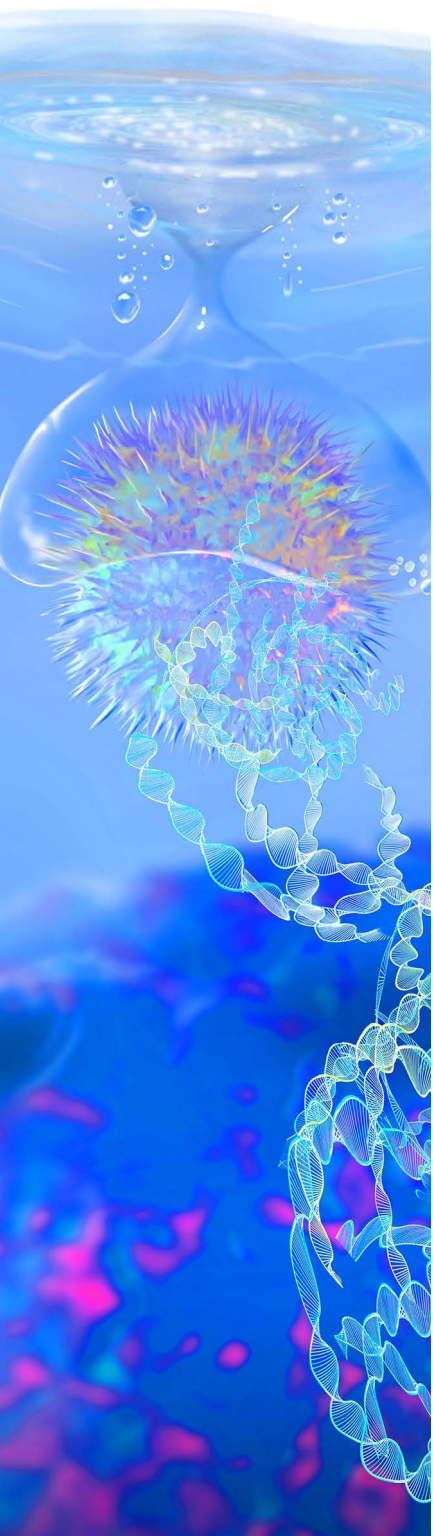


## 加快免疫细胞疗法的开发

了解安捷伦免疫细胞疗法分析工具组合如何帮助您在开发的各个阶段检测免疫细胞的表型、效价和持久性。

了解更多信息





# 欢迎

**免**疫疗法正在改变癌症治疗的格局，但大多数可用分析工具都是通过改造各种现成工具得到的，并非专为这种以细胞为中心的工作流程而设计。一款安全、强效且持久的免疫细胞产品依赖于开发人员对各种免疫细胞功能的综合利用：激活、增殖、细胞命运、细胞毒性杀伤、免疫调节和记忆。所有这些都必须在不断变化的抑制性和毒性肿瘤微环境中完成。

安捷伦致力于为这些新一代细胞疗法提供支持，为实现高效基因编辑以及实时细胞功能、表型、适应性和命运的评估提供关键技术。全套的分析工具组合可用于检测和控制免疫细胞功能，使转化研究人员和开发人员能够获得所需的治疗效价和安全性。

本电子书提供了多位免疫疗法研究领导者的最新建议以及他们对激动人心的新进展的深入见解。他们潜心指导并帮助我们撰写了这些文章，其中展示的新分析工具能够帮助科学家开发基于细胞的创新解决方案。



David Ferrick 博士  
细胞分析事业部高级战略总监，安捷伦科技有限公司

赞助出版机构



## 目录

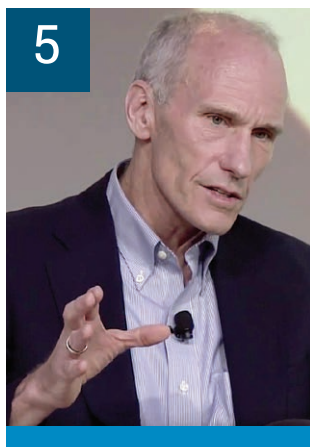
美国著名免疫学家  
和肿瘤学家 Carl  
June 博士访谈

将高性能 CRISPR  
技术与高灵敏度时  
间分辨细胞分析相  
结合

效价分析在细胞  
治疗产品生产中的  
作用

免疫表型分析，  
不断超越

癌症免疫疗法的多  
功能性效价分析



25 综述：定量分析免疫细胞介导的杀伤作用

访谈

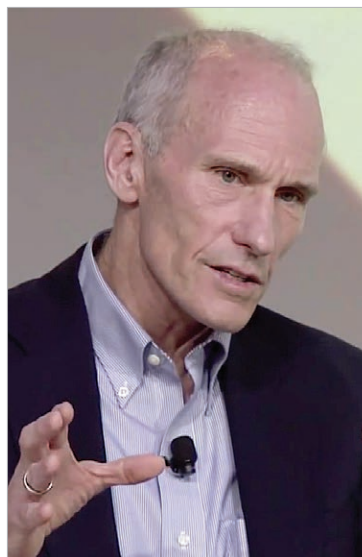
# 免疫疗法的突破

美国著名免疫学家和肿瘤学家 Carl June 博士访谈

**安**捷伦一直致力于开发基于细胞分析的创新解决方案，旨在帮助研究人员和开发人员克服各种挑战，在快速发展的免疫治疗领域抓住机遇。最近，安捷伦细胞分析部门高层 David Ferrick 约见了宾夕法尼亚大学和艾布拉姆森癌症中心的 Carl June 教授，探讨了他们对这些独特挑战和机遇的看法。June 博士未担任安捷伦的顾问，也未收取安捷伦的报酬。

**David Ferrick:** Carl，您知道过去几年我们与您的合作为我们某些创新解决方案的推进提供了莫大的帮助，其中包括专门针对免疫疗法开发的工具。您在这一快速发展领域的需求方面提供了非常宝贵的指导。我想集中讨论三个方面：人类细胞工程、细胞分析工具如何助力细胞疗法发挥其潜力，以及用于细胞疗法的细胞生产 QA/QC 的前景。作为人类细胞工程领域的先驱，您如何看待该领域的发展，您认为目前面临的最大挑战是什么？

**Carl June:** 我们目前还处于早期阶段，当前已经进行了合成工程化 T 细胞的概念验证，并且现已被接受。与天然免疫系统相比，它们在很多方面性能更强。在很长一段时间内都存在这样一个问题——



Carl June 博士



更多信息

观看网络研讨会：“肿瘤微环境中免疫细胞持久性的生物能量代谢”



能成功吗？你能改进基于达尔文学说的自然进化的 T 细胞吗？如果可以，你能安全地做到吗？

我们已经有 1000 多名患者接受了基因工程 T 细胞治疗，主要为癌症患者，并且没有任何细胞发生转化或存在遗传毒性的现象。这是一个重要的转折点，我们采用这种正交方法将整个人类基因组和表观基因组的知识结合起来。我们正在利用它来研究肿瘤微环境中的易感性，并制备经过设计的“专用”T 细胞，用于克服毒性肿瘤微环境中的屏障。

**David Ferrick:** 您如何看待其他免疫细胞工程设计的潜力，如自然杀伤细胞 (NK)、 $\gamma\delta$  细胞或巨噬细胞？

**Carl June:** 这就是这个领域现在令人倍感兴奋的原因之一。我们意识到免疫系统不仅仅只是一种乐器，打个比方，它就像一个管弦乐队。在整个免疫系统中它们的作用各不相同。例如，NK 细胞以不同于 T 细胞的方式识别并杀死靶标。同样地，也存

在 T 细胞亚群， $\gamma\delta$  细胞更像先天免疫细胞，但它们也可以杀死肿瘤。它们具有不同的代谢方式，并且能够在不同环境中以相对于  $\alpha\beta$  T 细胞更好的方式存活。由于  $\gamma\delta$  细胞不具有  $\alpha\beta$  T 细胞受体，因此它们不会引起移植物抗宿主病。

近来，巨噬细胞成为了关注的焦点，它们通过吞噬作用杀死并消灭细胞，而不是像 NK 细胞和 T 细胞那样采用细胞溶解机制。此外，我们将看到工程干细胞及其后代，在移植到病人体内后可以产生我们刚才讨论的所有类型的工程细胞。

**David Ferrick:** 您刚提到一个重要的观点，就是免疫系统就像一个管弦乐队，具有自我平衡原则，许多类型的细胞在时间和空间上相互配合来实现这一目标。我们关注的重点之一是细胞分析工具的改进，这些工具可以生成高质量[时间分辨]信息，有助于我们沿着细胞行为在体内发生的时间线对其进行理解。您能评论一下实时动态分析方法的價值嗎？我們可以将这种方法称为基于细胞的“新型”解决方案。

**Carl June:** 这是一个关键问题。基础免疫学的最新数据表明，细胞包含重要的代谢重编程步骤。一般情况下，急性效应 T 细胞的代谢由糖酵解主导，而记忆细胞增殖较慢，但存活时间更长，主要利用基于脂肪酸氧化、三羧酸循环和线粒体生物合成的代谢。从我们在小鼠慢性感染和肿瘤模型中观察到的情况来看，我们希望同时拥有这两种细胞群。一些细胞将是强效的效应细胞，但存活时间较短，另一组细胞能够建立长期的细胞记忆和功能，用于长期免疫监视。

如 Seahorse 这样的代谢分析方法可以很好地识别具有这些特性的细胞。我认为，未来可能会有基于细胞的效价释放测定法，以及预测性测定法，作为细胞产品响应的生物标志物。

**David Ferrick:** 这一切的发展速度之快，令人十分惊讶。正如您所指出的，线粒体呼吸和糖酵解之间存在着这种定性二分法，非常适合免疫功能，这是我从不敢想象的，但确实是这样。我们了解到有关这

种基于细胞的“新型”分析方法的一个问题是功能性效价测试，主要在于新产品可以做什么以及能够起效多长时间这两方面。对此，您的看法是？

**Carl June:** 这些新型细胞分析方法 [安捷伦 ACEA xCELLigence, 安捷伦 Seahorse XF] 的一个潜在用途可能是，能够知道哪些细胞利用现有技术能制造出治疗产品，而对于其他细胞可能一切都是徒劳。如果确定了某种细胞并非良好的候选者，那么这意味着你将使用例如第三方细胞继续开展研究，这将对未来造成重大改变。此外，即使在你确定了可以制造成功产品的候选细胞中，这一新“工具包”的另一个应用是，为你找到起重要作用的细胞。一些分析表明，当你进行过继转移时，消除大部分肿瘤的 T 细胞只是少数细胞的后代。如果我们能预先识别出这些 T 细胞，那么我们就有可能只需制造更少的细胞，这意味着制造成本会下降，从而为治疗带来更多好处。

**David Ferrick:** 我们继续讨论一下这一点，您如何看待一些像 CRISPR 这样的新技术被用于提高保真度并最大限度减少细胞工程的影响，使我们能够通过更自然的方法获得保护性免疫，这可能是耐久性和产生最小副作用的关键？

**Carl June:** 一些全基因组研究方法可以识别 T 细胞中的“机遇靶标”，在临床前模型中，这些方法可以提高其性能。这是一个很好的时机，正因为基因组编辑中可以使用 CRISPR、meganucleases 等新技术，才使这成为可能。

实体瘤和血液恶性肿瘤之间的问题有些不同。在血液恶性肿瘤中，T 细胞在注入后通常会直接进入骨髓，这对它们来说是一件很自然的事情。但在实体肿瘤中，许多情况下 T 细胞进入实体肿瘤的速度可能会受到限制。因此，编辑 T 细胞以增强其在实体肿瘤微环境中的归巢性、穿透性和持久性的策略引起了极大的关注。

另一个机会是肿瘤和 T 细胞在代谢物之间的“对决”，CRISPR 工程可以帮助增加肿瘤微环境中营养物质的获取。CRISPR 方法有助于开发对这种“对决”状态有抵抗力的细胞，这些细胞可以存活更长时间，从而可以在实体肿瘤微环境中更好地增殖。

**David Ferrick:** 作为一种治疗方式，这让我想到了细胞的生产 and QA/QC 部分。我们所谈到的基于细胞的分析，也就是正在开发的“新型”分析，是否发挥作用？

**Carl June:** 正是这样。对于自体细胞疗法，至少存在一个问题，那就是它总是比可以批量生产的第三方细胞要昂贵。如果你打算花费大价钱去做某事，就需要确保其有效。因此，任何[基于细胞的]分析方法，只要能提高获得有效细胞产品的可能性，都将是包括患者、医生和第三方付款人在内每一个人所期望和需要的。

了解候选细胞中哪些细胞可以制造出有效细胞产品的基本原理是重要的第一步。现在，通过安捷伦提供的工具，我们可以在流式细胞术、活细胞代谢的动态测量以及量化 T 细胞在一段时间内杀死靶标的能力等方面开展研究，寻找我们需要答案。

**David Ferrick:** 最后，对于安捷伦和其他正致力于构建各种工具，尝试为这一领域提供帮助的其他人，您对他们如何贡献出自己的一份力有什么建议吗？

**Carl June:** 功能分析。很长一段时间，我们只有流式细胞术。我相信，我们可以从制药行业的薄弱环节中学到很多东西。在制药行业，很多试验都没有着重研究某些试验失败的原因。

但使用工程细胞时，你可以从患者身上取回它们，并更彻底地研究细胞的免疫表型和代谢状况，并了解这种细胞是否衰竭？是否衰老？或者可能从未被成功移植？我非常乐观，我们可以在失败的地方展开分

析，从而找到解决方案。有了这些知识，我相信我们能够制造出更好的“新一代” T 细胞来克服这些缺陷。

**David Ferrick:** Carl，结尾的评论非常精彩。非常感谢您的帮助，与您合作非常愉快。

**Carl June:** 非常感谢 David，与安捷伦合作也非常愉快。■

这篇采访经过编辑以确保适当的篇幅和逻辑清楚。



# 将高性能 CRISPR 技术与高灵敏度时间分辨细胞分析相结合

体外分析不仅需要分析细胞毒性，还必须评估持续性和持久性

如何设计出安全且性能比天然免疫细胞更强的基因工程细胞，是免疫细胞疗法面临的巨大挑战。虽然我们尚处于全面实现这一目标的早期阶段，但概念验证已经取得了良好的效果，如率先获批的 CAR T 细胞疗法 Kymriah 和 Yescarta<sup>[1,2]</sup>。

CRISPR 基因编辑系统已成为一种非常有效的工具，能够非常轻松地修改活细胞的基因组。然而，要充分发挥其潜力，以达到更高的活性、稳定性和特异性，就需要以最小的细胞核足迹进行高保真编辑来实现。此外，需要使用活细胞分析工具找到最有效的编辑方案，活细胞分析工具可以提供功能相关性分析，以及效价和持久性评估。能够实现定量分析并报告实时动力学的活细胞分析可以满足这些要求。根据免疫疗法的大量早期研究，人们充分认识到只分析细胞毒性远远不够。在肿瘤消除和监视的整个过程中，基因工程细胞必须能够在免疫抑制且不断变化的不良肿瘤微环境中持续存活，以实现持久的效果<sup>[3]</sup>。

更多信息

下载 CRISPR 技术  
指南了解更多信息:



Agilent

为了解决这些问题，安捷伦推出了一整套可以提高 CRISPR 编辑效率和准确性的创新解决方案。这些解决方案还可与评估和验证编辑结果的活细胞分析平台相结合，后者能够提供相关的时间分辨功能数据。

尽管 CRISPR 基因编辑技术的前景一片光明，但目前仍然存在许多挑战，因此无法广泛应用于治疗领域，它还需要具备更好的效率、特异性和可调性来适应不同的情况。可以使用酶将 DNA 模板转录为 RNA，从而制造出能够靶向特定基因组位点的向导 RNA。然而，Agilent SureGuide gRNA (安捷伦科技公司) 采用的直接化学合成向导 RNA 技术具有更明显的优势<sup>[4]</sup>。化学合成为高纯度 sgRNA 的可扩展性生产提供了一种稳定可靠的方法，为 sgRNA 设计和精确修改分子功能提供了独特的机会，以提高 CRISPR-Cas 的性能，推进其在研究、工业和治疗领域的应用。如图 1 所示，

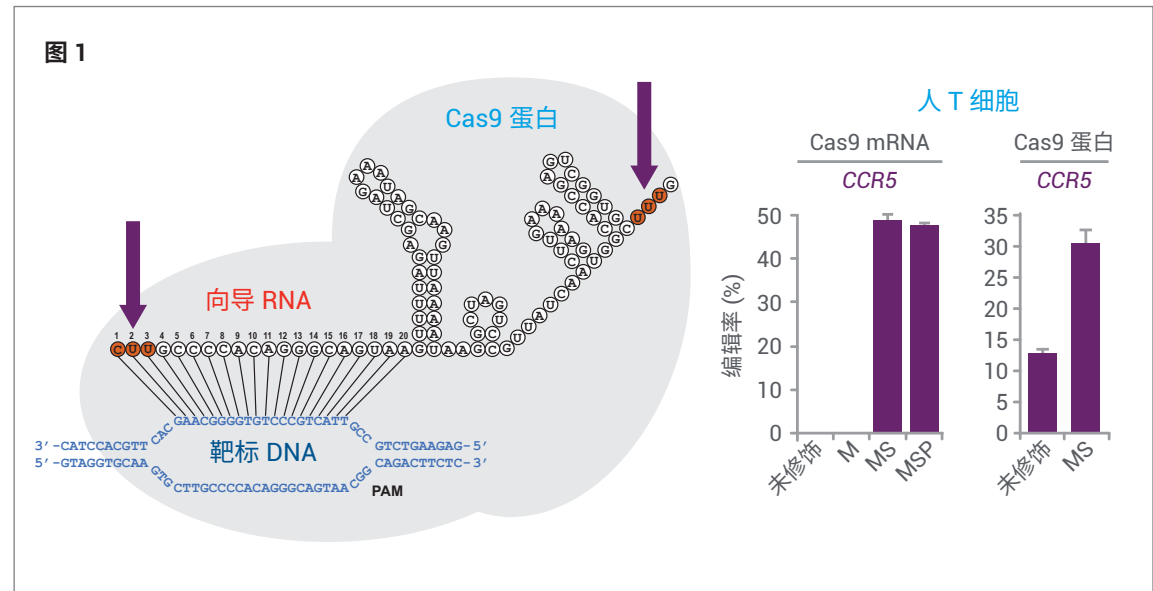


图 1. 化学合成向导 RNA 可以在特定位置引入天然核苷酸、修饰过的天然核苷酸或人工核苷酸的组合，从而改善 CRISPR 的性能。对靶向 CCR5 基因的单向导 RNA 进行改造，对其 5' 端和 3' 端的 3 个核苷酸添加化学修饰，即 2'-O-甲基 (M)、2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯 (MS) 或 2'-O-甲基 3' 硫代 PACE (MSP)，使用 Cas9 (mRNA 或纯化蛋白) 评估改造后的向导 RNA 在 T 细胞中的活性。MS 和 MSP 修饰的向导 RNA 的活性明显高于未修饰的向导 RNA。图片摘自 A. Hendel et al., Nat. Biotechnol.33(9):985-989 (2015)

在向导 RNA 末端附近添加化学修饰可以提高向导 RNA 的稳定性和活性<sup>[5]</sup>。在最近开展的一项研究中，在向导 RNA 的 DNA 识别序列的特定位点添加化学修饰，然后系统地评估其靶向和脱靶活性，结果显示 CRISPR 的特异性得到提高<sup>[6]</sup>。这种新方法在保持高靶向性能的同时，显著减少了脱靶裂解活性（图 2）。

一旦您完成了对细胞的编辑，您将如何评估和验证期望的和期望的功能性变化？随着定量、时间分辨细胞分析平台的出现，研究人员可以更灵敏地测量活细胞功能，并同步扫描不断发展的免疫反应在有效性和持久性方面的时间相关变化。例如，我们现在可以在一次实验中，同时检测极低的效靶比下基因编辑的杀伤效率和连续杀伤活性。然后可将这些结果与抑制作用联系起来，例如由于与不断变化的肿瘤及其微环境相互作用而出现的衰竭、无效及其他逃逸机制。

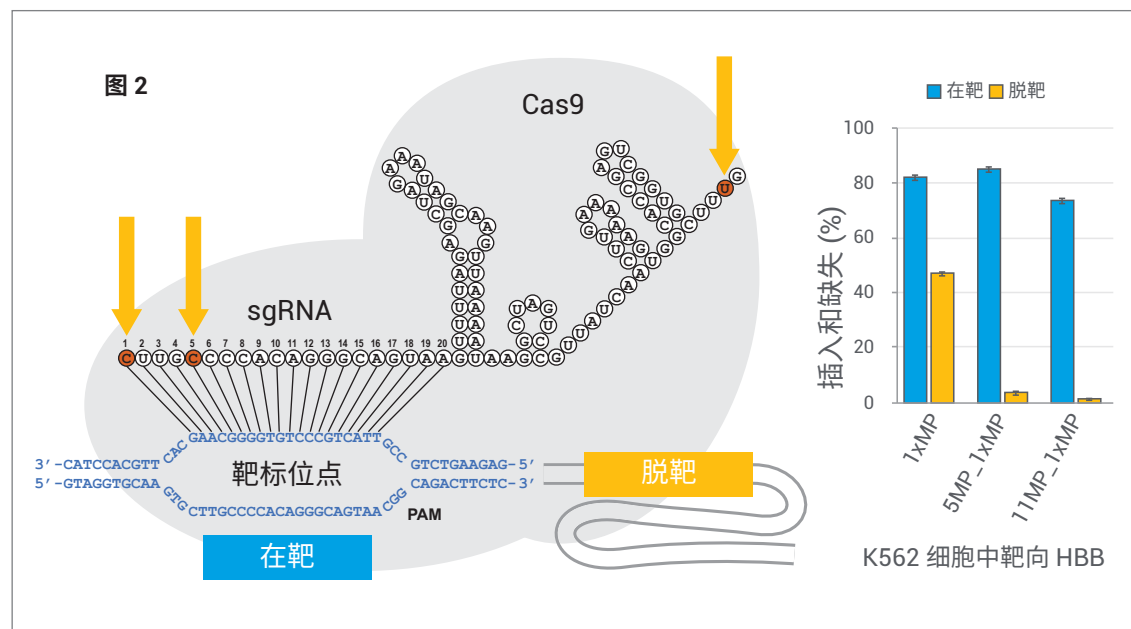


图 2. HBB 基因包含导致镰状细胞病的突变，作为一项非常重要但具有挑战性的测试，以提高 CRISPR 的特异性。结果表明，最常用于编辑 HBB 基因中导致镰状细胞病的突变基因的向导 RNA 在另一个基因组位点产生了高水平的脱靶活性。在 HBB 向导 RNA 序列的第 5 位或第 11 位添加一个修饰，可显著降低脱靶活性（如金色柱状图所示），同时保持高水平的靶标位点活性。图片摘自 Ryan et al., *Nucleic Acids Res.* 46(2):792-803 (2018)



最近使用 xCELLigence 系统（艾森生物现已加入安捷伦）发表的一篇研究，充分展示了将高灵敏度功能分析和时间分辨相结合的价值。这项研究开发了一种 CAR T 细胞策略来解决癌细胞群中抗原表达的异质性问题<sup>[7]</sup>。过继性细胞疗法 (adoptive cell therapy, ACT) 中一个常见现象是，表达了目标抗原的癌细胞被杀死，而未表达抗原的细胞将继续不受阻碍地增殖。为了最大程度减少这种现象，作者同时靶向两种肿瘤细胞抗原，并使用 xCELLigence 来评估其功能和持久性。图 3a 所示的结果使作者能够选择最优的基因工程构造子，依据在非常低的效靶比下，对多种共刺激结构域和一个恒定抗原结合域的组合的杀伤效果进行的高灵敏度定量分析 (N. Ahmed, 结果未发表)。同时，他们还得以采用时间分辨分析识别潜在的逃逸表型。图 3b 展示了不同情况下获得的主要结果，其中靶向 HER2 和 IL13Ra2 抗

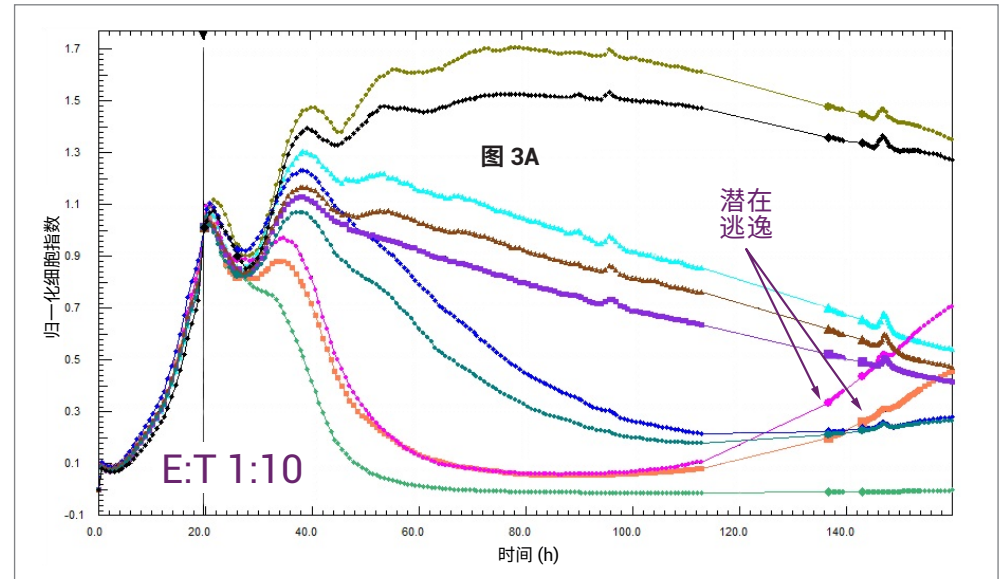


图 3a. 在低效靶比 (1:10) 下，对多种专用共刺激结构域与一个恒定抗原结合域的组的杀伤效果进行定量分析，同时根据时间分辨分析数据确定潜在的逃逸表型（粉色线和橙色线） (N. Ahmed, 结果未发表, 2019 年 4 月 2 日)

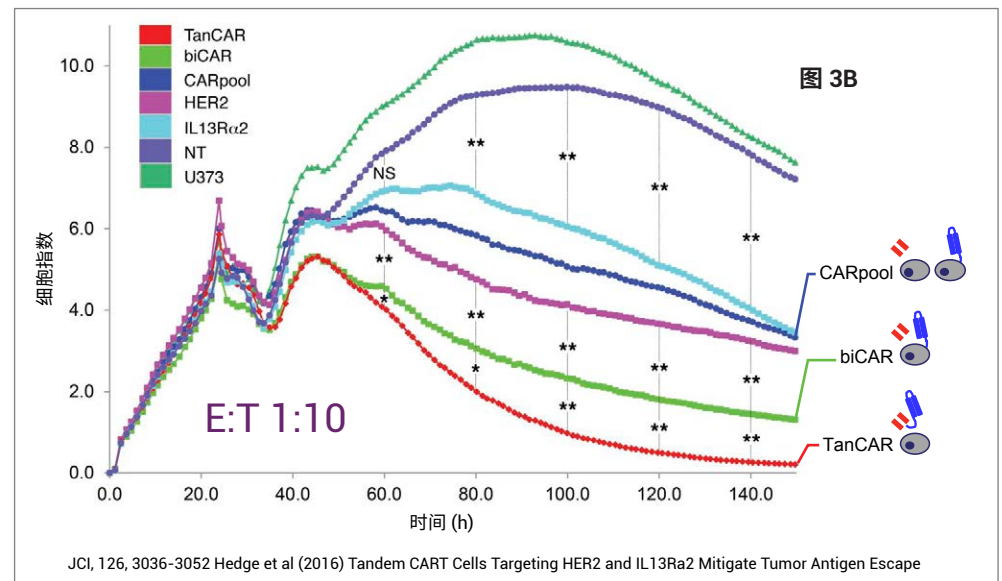
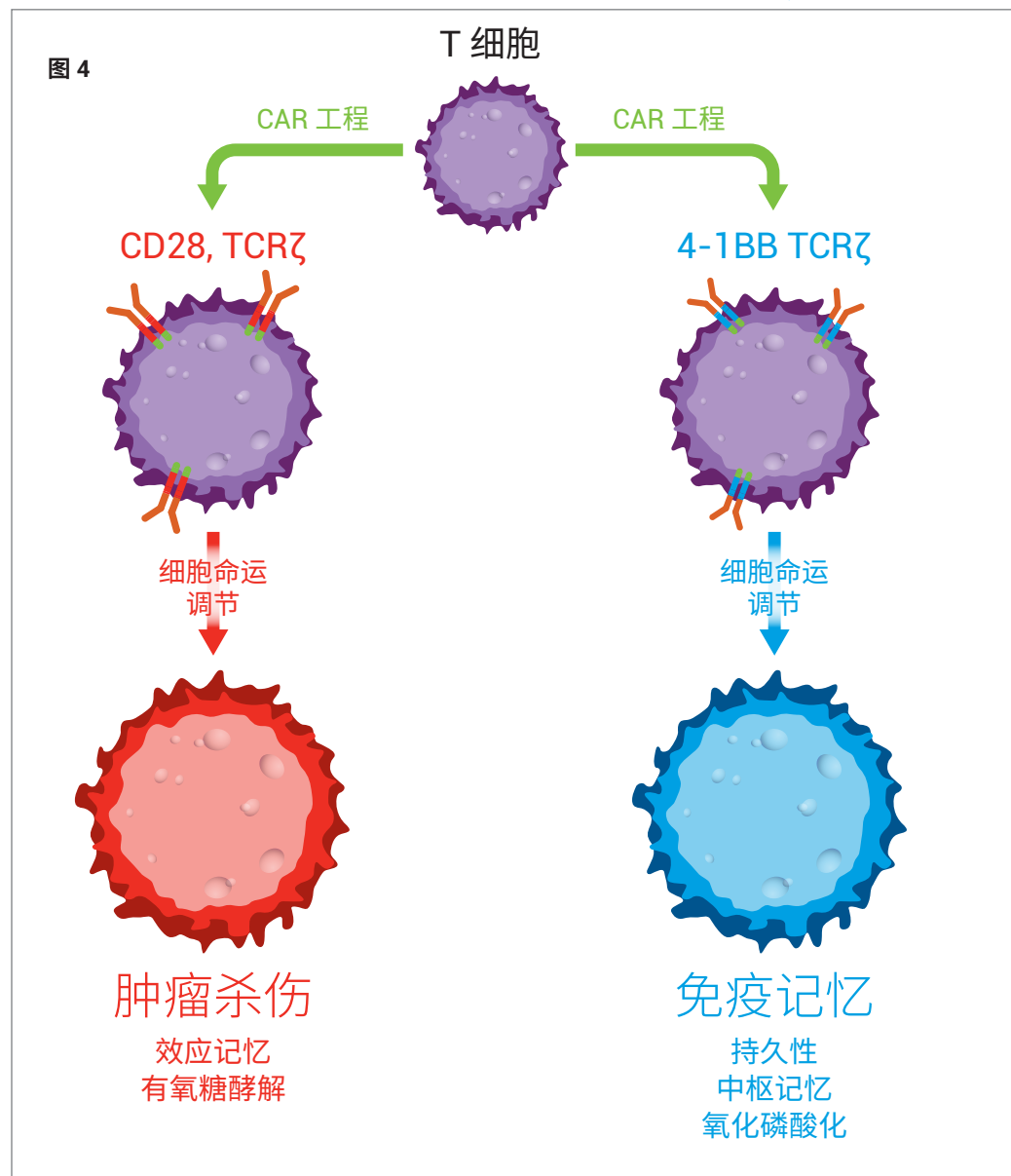


图 3b. 使用 xCelligence 监控 CAR-T 细胞靶向一个或同时靶向两个抗原 (HER2 和 IL13Ra2) 时对胶质母细胞瘤细胞系 U373 的杀伤能力。在图例中: U373 = 只有靶细胞系; NT = 用未转染的 T 细胞 (即不表达 CAR) 处理的靶细胞; IL13Ra2 = 用 T 细胞处理的靶细胞, 其中 T 细胞表达靶向 IL13Ra2 的单一 CAR; Her2 = 用 T 细胞处理的靶细胞, 其中 T 细胞表达靶向 Her2 的单一 CAR; 有关 CARpool、biCAR 和 TanCAR 的说明, 请参阅正文。E:T 比为 1:10。图片摘自 Hegde et al., J Clin Invest.2016 Aug 1;126(8):3036-52

原的 CAR 在不同的 T 细胞中得到表达 (CARpool); 在同一 T 细胞中表达为不同的蛋白 (biCAR); 或在 T 细胞中表达为单个融合蛋白 (TanCAR)。当与胶质母细胞瘤靶细胞孵育时, 这些 CAR T 方法均表现出不同的杀伤力和动力学。通过连续监测阻抗, 很容易监测到在连续杀伤过程中出现的这些细微差别, 但使用传统的终点分析方法时无法检测到这些变化。

安捷伦 Seahorse XF 分析仪 (安捷伦科技公司) 同样是一个能够提供丰富的功能数据的高灵敏度时间分辨分析平台。Carl June 团队发表的一项关键研究展示了不同的 CAR T 基因工程构造子是如何通过驱动不同的代谢程序, 对细胞命运和功能产生显著不同的影响<sup>[8]</sup>。它揭示了如何优化基因工程构造子的肿瘤消除活性, 以及提高其在微环境中的持续性和持久性。图 4 简要总结了他们的研究结果, 揭示了含有共受体信号转导结构域 4-1BB 的 CAR T 细胞是如何诱导与形成中枢记忆以及增强持久性相一致的有氧呼吸。相反, 对 CD28 共受体信号转导结构域进行修改可将代谢重编程为有氧糖酵解, 从而增强效应记忆细胞这一细胞命运。这

图 4. 选择不同的 T 细胞信号转导结构域将不同程度地影响代谢编程, 从而为细胞疗法的微调提供了可能。含有 4-1BB 的 CAR T 细胞线粒体增加, 需氧更多, 从而增强了体外持久性和中枢记忆的细胞命运。相比之下, CD28 可加强糖酵解过程, 从而增加效应记忆的细胞命运。图片摘自 Kawalekar et al., *Immunity* 44, 380–390 (2016)  
仅限研究使用。不可用于诊断目的。



项研究有力地证明了改造代谢特征的可行性，即建立效应细胞和记忆细胞的适当平衡，以解决在不良肿瘤微环境中免疫细胞的衰竭和持久性问题，从而为实现持久记忆和免疫监视奠定坚实基础。■

### 参考文献

1. FDA (2017) *FDA approval brings first gene therapy to the United States*, [News Release], 30 August 30
2. FDA (2017) *FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma*, [News Release], 18 October
3. M.A. Morgan *et al.* Engineering CAR-T Cells for Improved Function Against Solid Tumors. *Frontiers in Immunology*, 9: article 2493 (2018)
4. D.J. Dellinger *et al.* Streamlined Process for the Chemical Synthesis of RNA Using 2'-O-Thionocarbamate-Protected Nucleoside Phosphoramidites in the Solid Phase. *Journal of the American Chemical Society*, 133(30):11540–11556 (2011)
5. A. Hendel *et al.* Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nature Biotechnology*, 33(9):985–989 (2015)
6. D.E. Ryan *et al.* Improving CRISPR–Cas specificity with chemical modifications in single-guide RNAs. *Nucleic Acids Research*, 46(2):792–803 (2018)
7. M. Hegde *et al.* Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13R $\alpha$ 2 mitigate tumor antigen escape. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(8):3036–52 (2016)
8. O.U. Kawalekar *et al.* Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity* 44:380–390 (2016)



# 效价分析在细胞治疗产品生产中的作用

尽管细胞疗法在临床研究中显示出了巨大的潜力，但在大规模生产这类治疗产品之前还有一系列挑战需要解决。在使用这些产品对患者进行治疗之前，应对产品质量进行严格控制，以确保其疗效。通常，效价分析用于检测一定剂量的药物在相关生物系统中引起特定反应的能力。尽管测定效价的首选方法是单一的定量生物分析法，但由于细胞疗法的复杂性和个性化特征，这种方法可能并不总是适用。

美国 FDA 没有规定细胞和基因治疗产品的效价测定方法，因为需要根据特定产品开发专门的效价测定方法。他们没有对特定的分析类型提出建议，也没有提出用于产品放行的合格标准。

过去，强制要求对细胞疗法执行用于内毒素和无菌性的标准放行分析方法，而这些方法已有几十年的历史。效价分析被视为必要的确认性分析。“许多团队选择了最便宜且技术上最简单的检测方法，只是为了能在放行报告证书上勾选那一个框，”宾夕法尼亚大学佩雷尔曼医学院和艾布拉姆森癌症中心教授、医学博士 Carl June 说道。

但是现在，第三方付款人、患者和医生都希望能获得更有说服力的数据来更好地预测昂贵疗法的临床治疗效果。在评估细胞疗法在移植、增殖和杀死肿瘤细胞的能力方面，功能性效价分析将发挥更大的作用。



更多信息

阅读 xCELLigence  
RTCA 应用简报，了解  
关于效价评估的更多  
信息：

在开发细胞治疗产品的效价分析方法时，第一步是在特定疗法背景下定义效价。

“保持简单。通常，有关效价分析的新奇想法几乎无法确保其重现性和可靠性，”伦敦大学学院细胞与组织疗法教授、皇家自由医院细胞、基因与组织疗法中心主任 Mark Lowdell 博士说道。

佐治亚理工学院免疫工程中心主任 Krishnendu Roy 博士也表示：“在生产背景下，在模拟人类疾病、复杂性和成本之间保持平衡至关重要。”

目前，CAR-T 细胞的效价分析可以简单地测定所需的 CAR 在细胞表面的表达情况。但是，应该注意的是，这并不是直接检测功能；没有证据表明表达 CAR 相关抗原的肿瘤细胞会被杀死。如果不考虑体内的预期活性，这种类型的效价可能不具备足够的预测性。

Lowdell 博士参与了一项英国临床试验，其中对一组异体间充质基质细胞 (mesenchymal stromal cell, MSC) 进行转导以表达肿瘤坏死因子 (TNF) 相关的凋亡诱导配体 (TRAIL)。由于 MSC 的非免疫原性和浸润肿瘤微环境的能力，表达 TRAIL 的基因工程 MSC 可能成为一种有效的细胞治疗方式。为了满足质量控制标准，通过表达 TRAIL 的细胞比例以及阳性细胞的 TRAIL 表达量来对产品进行测试。



“在生产背景下，在模拟人类疾病、复杂性和成本之间保持平衡至关重要。”

Krishnendu Roy 博士，  
佐治亚理工学院免疫工程中心主任。

通常，在设计功能性效价分析方法时，没有考虑肿瘤微环境中的其他细胞或疾病组织。在建立分析方法时考虑这些因素有助于更好地预测效价或对患者的疗效。

“个性化医疗是我们的最终目标，” Roy 博士说，“我们的目标是最终能设计出一种比仅仅考虑患者的一般平均情况更好的方法。对于癌症来说，使用患者的活组织切片进行效价分析将考虑到患者的具体情况，即使不是整个微环境。在其他疾病中，这是不可能的。”

此外，在分析方法开发期间对大量患者开展研究有助于科学家更好地了解患者的差异性。

### 验证注意事项

重复性、可靠性和简便性对于确保多个机构和实验室获得一致的样本分析结果至关

重要。分析读数应具有较低的变异系数 (CV) 和较高的信噪比。应尽可能减少细胞、试剂、仪器、平台设备（如微芯片）和操作人员的差异。

“例如，在目前的方法中，取肿瘤细胞系与 CAR-T 细胞共培养，以确定 CAR-T 细胞识别肿瘤，表达相同的分子并杀死肿瘤细胞。虽然这可能被认为是一种良好的功能分析方法，但它并不能反映患者的情况或肿瘤微环境，而这些这在实体瘤中尤其重要，” Roy 博士说。

可以通过与来自肿瘤微环境的其他细胞共培养或通过创建 3D 培养，将这些条件整合到效价分析中。更多变量可能有利于更准确地预测体内行为，但也导致转化到生产时情况更为复杂。虽然目前的方法较为简单，但其分析结果与功能并不完全相关。

根据 Lowdell 博士介绍，对一种称为 INKmune™ 的同种异体细胞产品进行效价分析可以检测 NK 细胞的激活情况。由于它是一种现成产品，生产过程未考虑患者的个体差异；因此，使用预先筛选的正常 NK 细胞供体池来显示激活情况。对于自体产品，减少或控制变异性的唯一方法是使用标准的靶标或分子。

建立阳性和阴性对照也应该成为分析验证的一部分。在自体情况下，同一产品内的变异性可能与供体有关。例如，流式细胞术筛选分析中可以使用结合抗体的内部微球标准品。抗体既能与微球结合，也能与细胞结合。微球落在规定的区域，表明添加了正确的抗体且添加量适当，并且操作人员进行了正确的检测。使用内部对照，样本之间的任何异常都可以归因于生物变异，而不是技术分析失败。



## 基于实时细胞检测的体外分析作用

细胞治疗产品的生产过程可能耗时较长，从几天到几周不等。“在这个过程中，细胞行为和表型可能会发生变化，” Roy 博士说，“在生产过程中进行实时分析对于获得持续的反馈非常有利，这将帮助我们验证产品批次的质量，并降低生产成本。”

在研发阶段，实时反馈是了解细胞特性，预测功能性效价的关键。对这些质量属性进行实时检测将确保生产出高性能的细胞。

研究人员仍在努力确定需要测量哪些质量属性来预测效价。“将一些基因工程细胞与野生型细胞进行比较，以确保产生了所需的变化。对于 CAR-T 细胞，通过检测细胞活力、表面标志物和细胞杀伤活性来评估最终产品。但这组测量数据并不能真正说明这些细胞对特定患者有效，” Roy 博士继续说道。

安捷伦科技有限公司的 xCELLigence 实时细胞分析 (RTCA) 仪器可以进行长时间的实时分析。实时分析可以更准确地评估产品的生物学特性、疗效或效价，特别是可以在几个小时或几天内通过多项参数监测细胞活性。虽然终点分析法可以提供有价值的信息，但如果细胞的杀伤时间晚于测量时间，则可能无法预测体内活性。

此外，如果杀伤作用分析方法的背景噪音较高，可能无法识别用于细胞疗法的可靠候选细胞。采用高灵敏度的 xCELLigence RTCA 分析法，可以在较低的效靶比下，监测靶细胞的增殖和效应细胞对其的杀伤作用。这种低



“保持简单。通常，有关效价分析的新奇想法几乎无法确保其重现性和可靠性。”

Mark Lowdell 博士，英国皇家自由医院细胞、基因与组织疗法中心主任，伦敦大学学院细胞与组织疗法教授。

效靶比更接近生理条件，能更好地预测患者的响应。研究人员还可以降低分析中所用的珍贵细胞的浓度，从而同时测试更多的条件。

“高通量 xCELLigence RTCA 分析法可以连续测定细胞的杀伤情况，是一种非常出色的功能性效价分析方法。对于 INKmune，在 xCELLigence E-plate 检测板中培养抗 NK 杀伤的靶细胞，然后加入供体 NK 细胞显示无反应。24 小时后，加入 INKmune，如果它起作用，NK 细胞就会被激活，在接下来的 5 天内，靶细胞就会发生细胞毒性变化，” Lowdell 博士解释道。

### 基于细胞的分析方法与动物研究的比较

动物研究通常是一个复杂、漫长和昂贵的过程。它们可能不能反映或预测人类患者的疾病过程，而且可能根本就没有良好的动物模型。“在细胞治疗产品的生产过程

中，动物研究不能用作效价分析，” Roy 博士指出，“基于细胞的体外分析法是确定细胞功能的替代方法。对人类疾病的模仿程度越高，体内预测就越准确。随着开发出更好的体外分析方法，它们将在生产过程中发挥重要作用。”

动物研究的一个关键性基本问题是，人类和其他哺乳动物细胞存在同源性差异。当人效应细胞被注射到患者血液中时，它们与肿瘤微环境中的特定分子结合，从而激活免疫应答，杀死靶标肿瘤细胞。当这些人效应细胞被注射到用于动物研究的啮齿动物体内时，人效应细胞与啮齿动物配体之间的结合可能不能预测其在人类肿瘤微环境中的杀伤活性。

动物研究面临的另一个挑战是，在动物模型中人工建立肿瘤时观察到免疫应答增强。通常，将快速分裂的肿瘤细胞系注射到动物体内，形成一个肿块。随后，该肿

瘤产生急性炎症反应。在患者体内，由于肿瘤的局部微环境及其免疫抑制特性，肿瘤属于慢性免疫应答的一部分。急性和慢性炎症反应会导致不同的免疫结果，因此在动物模型中观察到的免疫应答可能不能代表产品在患者体内的效价和疗效。

据 Lowdell 博士介绍，“使用 xCELLigence RTCA 仪器可以在没有局部炎症反应的情况下观察肿瘤生长的动态模型，英国监管委员会对此感到非常高兴。我相信，实时分析方法将作为一种效价分析或放行分析方法，越来越多地应用于药物开发和生产过程。”

### 安全性筛查

检查污染和无菌性属于常规工作，但其他安全性筛查仍面临挑战；有关细胞疗法如何对患者产生不利影响仍在进一步研究中。

产品的风险状况决定了需要评估哪些安全性要求。同种异体产品具有移植物抗宿主病 (GvHD) 的风险。还可能产生另一种风险 — 细胞因子释放综合征 (CRS)，这是一种全身性炎症反应综合征，是感染的并发症，在使用过继性 T 细胞疗法时也可能发生。由于患者免疫应答的内在差异，这些情况很难预测。

由于细胞疗法被用于治疗癌症等威胁生命的疾病，其改善患者生存期的潜力往往胜过了它的毒性风险。对患者无益处的毒性和治疗性毒性（可能表明细胞确实正在杀死肿瘤细胞）之间存在差异。“我们真正想控制的是意外的副作用，” Lowdell 博士说，“实际上，你最终可能会筛选出有效的药物，因为部分副作用可能是治疗反应。”

Roy 博士说：“当我们在更接近患者的体外模型中观察效价时，我们是在寻找能够与临床试验观察结果相关联的预测信号。就 CAR-T 细胞而言，我们开始了解为什么会发生某些神经毒性和 CRS，但还没有详细了解如何预测这些治疗结果。”

“CAR-T 疗法对百分之二十到三十的患者没有疗效。我们中心和其他机构正在着手研究这些未解决的问题。这要追溯到质量属性，” Roy 博士继续说道，“最有效、强大且安全的细胞疗法有哪些特性？我们从生物制剂时代学到了很多。针对细胞治疗这个领域，我们需要尽早考虑效价分析的相关预测参数。” ■

# 免疫表型分析，不断超越

靶向免疫系统极大地增加了追踪多个细胞系的固有表型和新的基因工程表型的需要

**流**式细胞术已经从使用荧光标记的单克隆抗体对细胞混合物进行鉴定和分类的定量工具，发展成为细胞分析研究和开发的主要工具。在过去十年中，随着抗体和荧光染料的指数级增长，仪器和软件也取得了一系列进展。这极大地扩展了其应用范围，可以非常快速且精确地检测细胞表型<sup>[1]</sup>。它不再只是一种表征工具，而是一个具有惊人分析速度的全面表型分析系统，越来越丰富的荧光基团最大限度地增加了每个细胞可以测量的参数数量。

在人体试验中，现在通常采用细胞免疫表型分析来进行血液肿瘤以及越来越多与年龄相关的疾病的诊断、分类、分期和监测治疗<sup>[2]</sup>。它可以用来确定白血病和淋巴瘤的起源和分化阶段<sup>[3]</sup>。采样方式为侵入性，这使它成为监测治疗和检测复发的理想方法，特别是在基于细胞的免疫疗法中<sup>[4]</sup>。

更多信息

阅读本篇 Novocyte  
Quanteon 应用简报  
了解更多信息：



**Agilent**



免疫疗法在癌症治疗中的深厚根基和近期的成功案例正在迅速改变如何进行疾病干预的研究和开发。然而，能够充分表征各种免疫网络的抗肿瘤反应的免疫参数还有待进一步开发。将最近免疫疗法取得的成功转化为广泛适用的临床研究策略，提高应答率，这就需要我们提高我们在研究、开发、诊断和治疗的所有阶段监测免疫的能力。

流式细胞仪对弥合这一差距具有巨大的潜力，因为相比以往它更加小巧、适应性更高、易用性更强。流式细胞仪可定制并且兼容自动进样和高通量技术，对不断丰富的荧光基团越来越灵敏，能够并行处理多个起始样本，从而使我们能够轻松地获得和处理样本，收集大量信息。“我们设计了新一代的流式细胞仪，以确保每一次的性能提升都能在台式仪器上得以体现，并且软件也易于使用。最终，研究人员将能够更好地跟上发现和实施新型免疫疗法的需求”，王小波解释说（图 1）。王博士曾担任 ACEA Biosciences（艾森生物）的总裁兼首席技术官，在安捷伦收购艾森生物后，担任安捷伦流式细胞仪和实时细胞分析业务部总经理。“我们的目标是把最好的性能和经验融入到台式仪器中。不论操作人员是谁，都能在一次次的分析中获得一致的答案时，我们就知道我们成功了。”

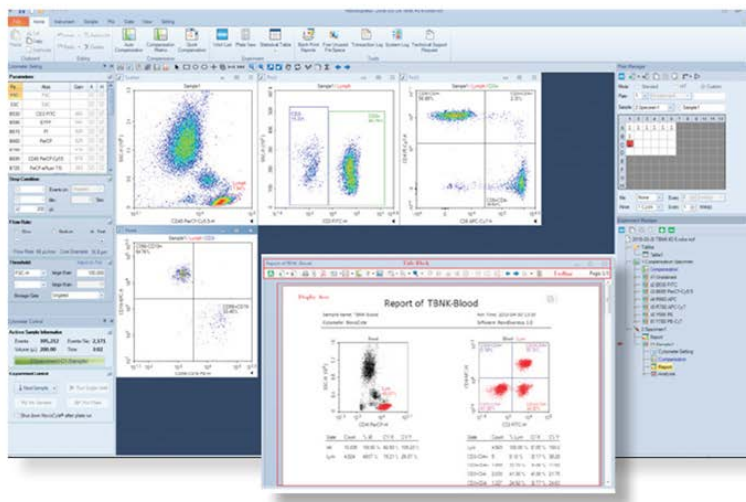
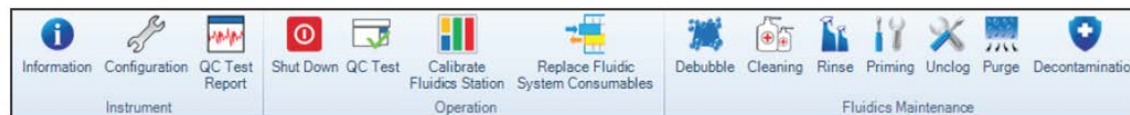
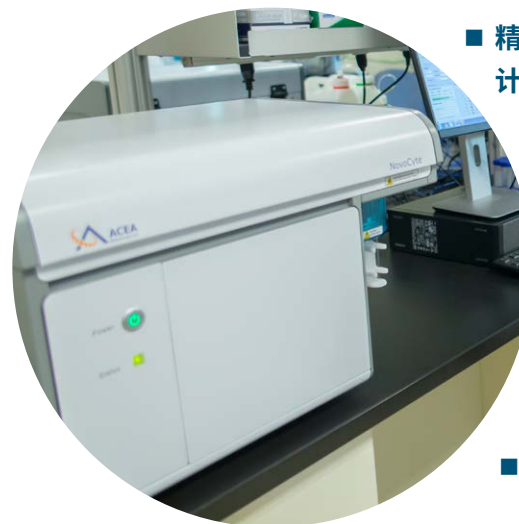


图 1. NovoExpress 采用用户友好型界面，可轻松地进行设置、分析、报告和设置孔板/样品布局

根据王博士推断，流式细胞仪的分辨率之争已接近尾声。大多数仪器的荧光分辨率相差无几，而且足够高。因此，竞争正转向仪器的易用性，即极大地提高可用性、效率和决策能力。该领域的许多专家预测，软件使用体验和自动化将成为未来流式细胞仪的主要区别因素，特别是对于台式仪器，这也是每个人所希望的。

作为一种细胞工程工具，从筛选到验证靶向的准确性再到全面的表型表征都可以采用流式细胞仪。一个很好的例子是 Precision BioSciences 公司。该公司正在使用其 ARCUS 基因组编辑技术开发基于同种异体细胞的免疫疗法。他们的免疫疗法来自于筛选的健康受试者，而不是癌症患者，目的是克服自体细胞的一致性和可扩展性生产等固有问题。“流式细胞仪是我们工作中的关键工具。这是我们在生产之前、生产过程中和生产之后分析细胞的方式，包括我们如何在患者体内追踪我们的细胞，以及在治疗期间分析免疫系统的细胞成分，” Precision BioSciences 公司生物分析开发部主任 Vladimir Senyukov 解释说。他接着解释道：“我喜欢 NovoCyte Quanteon 的原因是它体积小、分析快速，并且可以基于体积进行精确的细胞计数。这是一款耐用稳定的仪器。”

## NovoCyte 的优势



- 更宽动态范围能够大大缩短检测时间并减少错误
- 精确且基于体积的直接细胞计数系统
- NovoExpress 的拖放功能可以实现快速高效的数据分析
- NovoExpress 可以一键生成 PDF 报告
- 创新的液路系统提供更好的重现性和超低的 CV
- 全自动清洗和关闭功能；为下一个用户使用做好准备
- 通过 NovoSampler Q™，可以实现无人值守自动化功能

总而言之，安捷伦的 NovoCyte 系列流式细胞仪突破了可用性和性能的界限，在这一对于新进入者来说过于拥挤的行业中开辟了一片新天地。大众化是其吸引力和被青睐的根源，特别是在免疫肿瘤学和免疫疗法领域。随着流式细胞仪不断应用于更多新应用，特别是在细胞工程和生产等非传统工作流程中，它必须更加简单化。此解决方案能够根据客户的需求和偏好进行配置，从而使平台更加智能化。这就是 Agilent NovoCyte 的优势所在。■

### 参考文献

1. Picot J, *et al*: Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. 64 (2): 109–30, 2012
2. Finak G, *et al*: Standardizing flow cytoanalysis from the human immunophenotyping consortium. *Sci Rep* 6: 20686, 2016
3. FloresMontero J, *et al*: Next generation flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 31: 20942103, 2017
4. Danova M, *et al*: The role of automated cytometry in the new era of cancer immunotherapy. *Mol Clin Oncol*. 9(4): 355–361, 2018
5. A Quantum Leap In Benchtop Flow Cytometry. (2018) <https://go.aceabio.com/l/492941/2018-12-03/nb13>

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

### 表 1.

以下是用户谈及 NovoCyte 系列流式细胞仪时通常会提到的特征：

1. 更宽的检测信号动态范围，无需调整 PMT 电压。这一特性使数据采集更加简单，尤其对于新用户。因此，能够大大缩短检测时间，并减少错误的产生
2. NovoCyte 拥有一个精确的基于体积的细胞计数系统，可以在数据采集过程中直接对细胞进行绝对计数，无需标准计数微球或其他步骤
3. NovoExpress 软件简单易用，可用于样品采集和分析。通过简单的拖放功能，可以在相同的设置下对样本进行分析，从而使数据分析流程更快速高效
4. NovoExpress 软件上的报告功能可以一键生成 PDF 报告，使数据共享变得简单
5. 开创性的液路系统能够实现无脉冲样品输送，从而获得更高的重现性和超低的 CV
6. 全自动流动室清洗和关闭功能减少流动室堵塞。系统始终保持就绪状态，以便下一位用户使用
7. 通过 NovoSampler Q 能够实现无人值守自动化功能。即使对于非常小的样品体积也能实现出色的振荡，此外还兼容最常用的孔板形式、条形码和实验室自动化系统的内置 API<sup>[5]</sup>

## 综述

# 定量分析免疫细胞介导的杀伤作用



前，大多数商业化癌症免疫疗法使用单克隆抗体或癌症疫苗，但另一种癌症免疫疗法——过继性细胞转移 (ACT) 正在迅速发展。ACT 通常使用从患者自身收集的免疫细胞，扩增这些细胞（或对它们进行基因工程改造后再扩增），然后将它们重新导入患者体内。

以 ACT 为基础的治疗方法带来了严峻的开发挑战，尤其是需要评估免疫细胞对癌细胞的杀伤能力。理想的体外分析方法除了稳定、简单外，还需要能很好地模拟体内活性。理想的体外分析方法还必须预测细胞在动物模型中的长期行为，并且最终能预测在人类患者体内的长期行为。为了推进免疫细胞介导的杀伤作用研究，艾森生物（现已加入安捷伦）开发了 xCELLigence® 实时细胞分析 (RTCA) 平台。

下面将介绍 RTCA 平台，主要介绍 RTCA 平台如何帮助推进实际项目。在本文中，几位关键意见领袖向 GEN 介绍了他们如何使用 RTCA 平台。

**GEN:** 为什么当前的癌症免疫疗法在患者之间或患者亚群之间存在如此大的效价差异？

**Anderson 博士:** 遗传学和肿瘤微环境这两个因素是研究的重点。此外，我们还不是很了解适应性耐药的机制，但它将是许多免疫疗法会遇到的一个问题。在过去，癌症已经能够适应性地逃避治疗策略，我们现在看到，免疫疗法也面临这一境况。我们尝试预测肿瘤如何逃避我们的疗法，这样我们就可以制定应对策略。



更多信息

如有需要，请观看  
本次网络研讨会：  
“新一代 CAR-T  
细胞”



Agilent



**Bamdad 博士：**我认为，根本问题在于，在把细胞输送回患者体内之前，它们在体外是如何被处理的。看起来它们在体外培养的时间越长，对患者来说就越糟糕，因为当这些细胞成熟时，T 细胞不同亚群的分布就会发生变化。这将影响其持久性（即，它们在患者体内的有效期），还可能导致细胞因子风暴或神经毒性。我们对这一主题的理解正呈指数级增长。

**MacLeod 博士：**在 CAR T 细胞和其他 T 细胞介导的治疗中，变异性的主要原因之一是使用了患者的自体细胞。在 Precision Biosciences，我们不是采用自体方法，而是对健康的供体细胞进行基因工程处理然后输入到不相关的患者体内，这种同种异体方法使我们能够得出更明确、更一致的结论。在我们使用分析方法来评估这些产品的功能时，例如使用艾森生物为细胞毒性分析方法开发的 xCELLigence 仪器时，这一点显而易见。

**Golubovskaya 博士：**患者的免疫系统存在差异，肿瘤的生物标志物也不同。我们无法预测这些差异，我们需要分析每个患者的这些生物标志物来帮助我们预测他们对免疫疗法的反应。



Kristin Anderson 博士

博士后研究员

弗雷德·哈奇森癌症研究中心，华盛顿大学

“我们还不是很了解适应性耐药的机制，但它将是许多免疫疗法会遇到的一个问题。”

**GEN:** 对于靶向肿瘤的细胞免疫疗法，在评估和监测它们的效价和有效性时面临的主要挑战有哪些？

**Anderson 博士:** 不同的肿瘤类型所面临的挑战也不同。大多数人体样本的实验必须在培养皿中进行，这无法复制肿瘤微环境的复杂性。此外，我们在使用一些“金标准”分析方法（如铬释放和流式细胞术杀伤作用分析）研究卵巢癌细胞时遇到了一些问题。我们使用的癌细胞往往不能很好地吸收或保留铬标记，导致背景读数高。

对于基于流式细胞术的分析（也需要标记），如果你引入太多不同类型的细胞（通常需要它们作为对照），可能会发生过度拥挤，并导致非特异性肿瘤细胞死亡。在这些情况下，背景性细胞死亡使得很难评估真正的 T 细胞介导的杀伤作用。

**Overstreet 博士:** 最大的挑战之一是提高我们模拟和预测哪些产品对人类有效的能力。许多这些通路在老鼠身上已经得到了充分研究，其中一些通路可以很好地转化到人类身上，而另一些通路却不能。我们已经能够在 xCELLigence 平台上建立体外系统，在这个平台上，我们可以研究人 T 细胞和人肿瘤细胞之间的同源相互作用，并且能更好地反映出在患者肿瘤中的情况。

**Bamdad 博士:** 仪器的测定时间、准确性和灵活性至关重要。你可以使用荧光激活细胞分选 (FACS) 来观察 CAR T 细胞的杀伤作用，但它是一种间接检测，你只能看到一个实时快照。你无法看到你的 CAR T 细胞或癌细胞是如何随着时间演化的。



Cynthia C. Bamdad 博士  
创始人兼首席执行官  
Minerva Biotechnologies

“仪器的测定时间、准确性和灵活性至关重要。”

你需要一种技术来观察癌细胞和 CAR T 细胞随时间的共培养情况，以便能够准确识别初始 T 细胞或中枢记忆 T 细胞与效应记忆 T 细胞的分布。你需要确定这些细胞需要多长时间才能成熟，这样你就能看到细胞杀伤作用什么时候开始，在谱图的另一端，当 CAR T 细胞耗尽时，癌细胞群又开始再次增长。能够实时观察到发生的情况对 CAR 设计以及如何体外培养 CAR T 细胞以获得正确的亚型分布至关重要。

**MacLeod 博士：**主要的挑战之一是，如何将体外实验结果转化为在动物模型或患者体内的实际治疗效果。传统的细胞毒性分析方法通常用时较短，有时为 3 个小时或 4 小时，为了观察到反应，通常会使用非常高的效靶比。这能体现出活性，但它没有反映整个作用机制。

这些都是活的细胞 — 它们不仅能杀死细胞，而且还会增殖，这是该机制的重要组成部分。当你能够在较低的效靶比条件下，在较长的时间内观察对靶细胞的杀伤作用时，效应细胞能够在这段时间内增殖并杀死多个靶细胞（称为连续杀伤），这种更长时间的评估是一种更严格的评估 T 细胞活性的方式。



**Dan MacLeod 博士**

细胞疗法研发部副主任

Precision BioSciences

“这些都是活的细胞 — 它们不仅能杀死细胞，而且还会增殖，这是该机制的重要组成部分。”

**GEN:** 为什么直接测量对靶细胞的杀伤作用比定量分析相关因子（如分泌的化合物的水平或效应细胞的激活）更重要？

**Anderson 博士:** 两者都很重要，但测量靶细胞死亡尤其重要，因为每种肿瘤都存在差异。一些肿瘤细胞可能对一种杀伤机制有反应，而对另一种杀伤机制没有反应，因为它们也很容易适应以逃避 T 细胞介导的杀伤作用，我们需要能够看到 T 细胞确实能杀死靶细胞。

需要注意的是，xCELLigence 分析法并不是直接读出细胞的杀伤情况，它是通过检测阻抗，而阻抗反映了靶细胞粘附于孔板底部的能力。由于死亡细胞不会阻碍信号，因此可以间接测定细胞杀伤情况。就我们的实验而言，它提供了具有极高重现性的结果，允许我们在生理效靶比条件下开展研究，而使用其他方法时无法进行此类评估。

**Overstreet 博士:** 如果你最终想看到 T 细胞如何与肿瘤细胞相互作用并消灭它们，那么这就是你应该去测量的。T 细胞有一系列重叠/半冗余的方法来杀死靶细胞，通过检测单一的分析物，你可能会错过特定相互作用中的关键限制因素。但是如果你实时观察一个肿瘤细胞是如何死亡的，那么你可以看到动态的相互作用，这是所有效应作用的最终结果，并且你可以观察你采取的治疗策略是如何改变这种相互作用的。



Michael Overstreet 博士

科学家，MedImmune  
(阿斯利康旗下公司)

“与传统的 T 细胞毒性评估方法相比，xCELLigence 分析法的一个优点是特异性更高。”



**GEN:** 在 CAR T 细胞和其他 T 细胞介导的治疗方法的设计和优化中，用于分析免疫细胞介导的杀伤动力学的分析方法的最关键特征是什么？

**Anderson 博士:** 灵敏度、准确性和重复性至关重要。高通量技术的一个优点是能够包含多种对照，我们需要这些对照来确保我们观察到的确实是 T 细胞介导的杀伤作用。我们还可以通过 xCELLigence 仪器监测靶细胞活力，并且可以使用软件校正非特异性背景杀伤。

**Overstreet 博士:** 与传统的 T 细胞毒性评估方法相比，xCELLigence 分析法的一个优点是特异性更高。考虑到我们可以使用这些分析方法进行 3-4 天的实时监测，而不是在 4-6 小时内捕捉单一时间点数据，因此我们可以将效靶比降低到 0.5-2:1，接近于 T 细胞与肿瘤细胞之间 1:1 比例下的相互作用。你看到的是更缓慢、更稳定的杀伤作用，这使肿瘤细胞和 T 细胞之间能够进行反复的相互作用，更能反映出在肿瘤中的情况。在较低的效靶比下，杀伤的特异性也得到了改善 — 显著增加了动态范围。

**Bamdad 博士:** 能够同时测试多种不同的条件非常重要。使用连续方法 FACS，我们需要 6-9 个月的时间来评估我们的 60 种不同的 CAR 在不同条件下对不同类型的癌细胞的抵抗能力。使用我们的 6 x 96 孔板 xCELLigence 平台，我们能够并行分析 576 种条件，因此我们能够在不到一个月的时间内完成这项工作。我们还可以在实验过程中添加试剂，并实时评估其对癌细胞杀伤的效果。

“[xCELLigence] 平台的无损分析使你能够进行任何类型的正交读数，以评估 T 细胞的抗肿瘤反应性，如流式细胞术或细胞因子分析。”

Michael Overstreet 博士

**Golubovskaya 博士：**无标记、实时、剂量依赖性和时间依赖性免疫细胞介导的杀伤作用分析最重要的特征。xCELLigence 技术是一种非常好的技术，它可以实时检测 T 细胞的细胞毒性和靶标癌细胞的死亡情况。

**GEN：**xCELLigence 仪器的具体优点以及无标记分析方法的优点是什么？您如何看待它在早期研究和商业产品开发中的作用？

**Overstreet 博士：**我们整个机构的科学家都向我表明希望能够使用这款仪器，因为它可以获得丰富的实时分析数据。xCELLigence 平台的无标记分析能够简化你的工作流程。此外，该平台的无损分析使你能够进行任何类型的正交读数，以评估 T 细胞的抗肿瘤反应性，如流式细胞术或细胞因子分析。

将该仪器与我们这里完成的一些科学基础设施和人类免疫学模型开发工作相结合后，很多人对我们的方法以及我们在相关的基于人细胞的系统中检测分子的能力感到非常兴奋。我们希望这将最终改善我们的临床前建模，并加强我们将分子引入临床的理论基础。



Vita Golubovskaya 博士

研发总监

ProMab Biotechnologies

“xCELLigence 技术是一种非常好的技术，它可以实时检测 T 细胞的细胞毒性和靶标癌细胞的死亡情况。”

**Bamdad 博士：**我们正在与弗雷德·哈奇森癌症中心 (Fred Hutchinson Cancer Center) 合作，预计今年早些时候开始人体试验。当你即将进行临床试验时，你必须消除实验室分析和动物实验与治疗患者之间的差异。我们将放入动物体内的每一种 CAR T 细胞和肿瘤细胞在 xCELLigence 仪器上进行对比观察。到目前为止，结果完美地反映了我们在动物身上得到的结果。这给了我们更多的信心，因为我们正在努力推动人体试验。

**Golubovskaya 博士：**使用无标记分析方法的优点和好处包括：步骤更少，变量更少，分析更直接。我们使用 6 × 96 孔板和 xCELLigence 系统，实时测量 CAR T 细胞对癌细胞的细胞毒性。在第一天我们接种不同类型的癌细胞，第二天我们以不同的效靶比加入效应 CAR T 细胞，我们可以在不同时间点，在不同剂量条件下分析细胞的杀伤作用。你可以使用该系统的软件在任意时间点进行定量分析，这样你就可以获得杀伤动力学数据。这是一种非常直观、方便的分析。

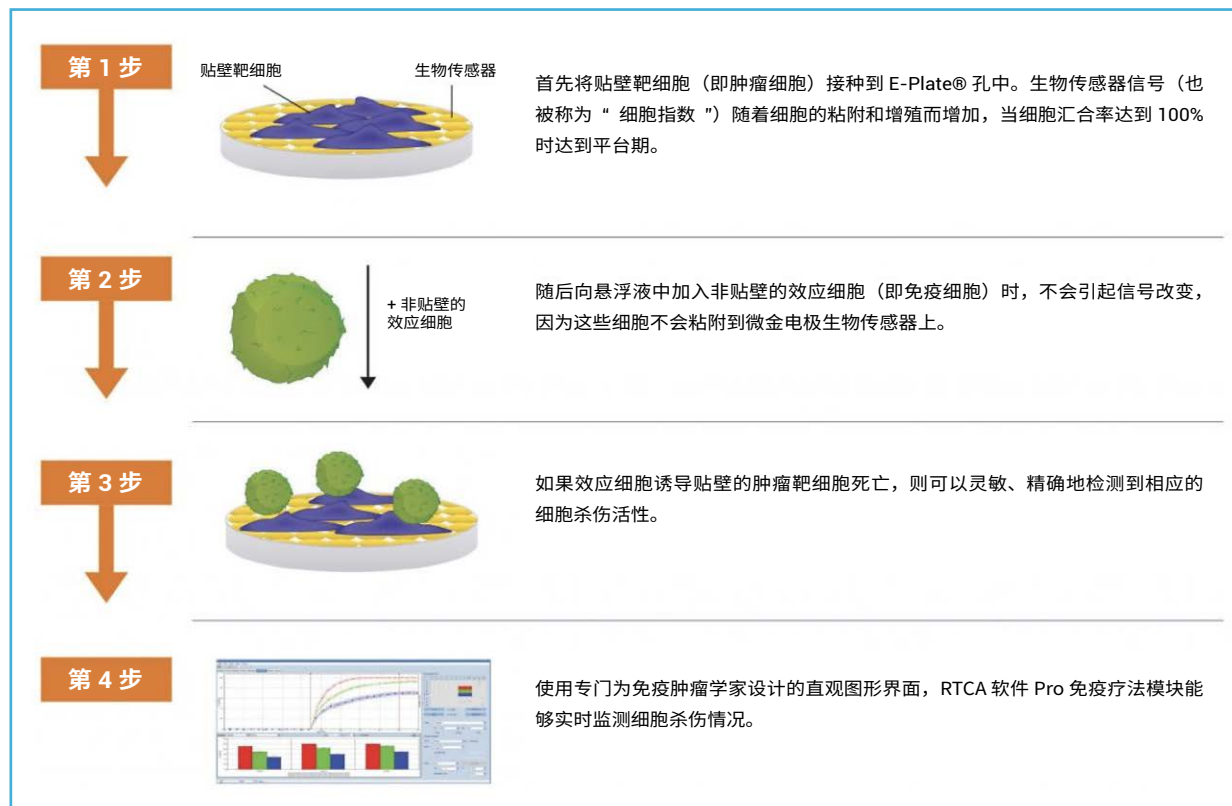
**MacLeod 博士：**最大的优点就是简单，这让分析更加容易，获得的结果也更一致，并且新用户也更容易上手。我们主要是在非常早期的阶段使用此仪器，当时我们只是测试了大量不同的 CAR T。该分析非常灵敏，因此我们可以使用非常少量的细胞，并且由于我们可以检测到低效靶比下的杀伤作用，我们能够进行更多的筛选。■

## 革命性平台加速发现和开发速度

设计和开发嵌合抗原受体 (CAR) T 细胞、检查点抑制剂和溶瘤病毒等有效的免疫疗法时，关键是要能够在体外监测这些疗法对抗目标肿瘤细胞的效价。理想的体外分析不仅需要简单、可靠，还应能高度预测该疗法在动物模型中的表现，并且最终能够预测在人类患者体内的表现。

为了能更加高度模拟体内活性，艾森生物（现已加入安捷伦）开发了 xCELLigence® 实时细胞分析 (RTCA) 平台，能够在较长时间内定量监测癌细胞的杀伤情况。这种无标记且无损的技术通过嵌有专利微金电极生物传感器的定制微孔板来捕获粘附的肿瘤细胞对不同治疗的反应。

工作流程非常简单：将目标肿瘤细胞加入微孔板中孵育，加入待测试的效应细胞，然后使用 xCELLigence 平台监测肿瘤细胞的杀伤情况，无需进一步的人工干预。虽然血液瘤（即白血病）不是自然粘附的，但通过将艾森生物公司的抗体介导的粘附试剂盒与这些定制微孔板一起使用，也可以通过 xCELLigence 平台对它们进行监测。



简单的工作流程使同时分析多个参数变得更加容易，例如不同剂量的检查点抑制剂或不同的 CAR 构造子。这种分析方法的高灵敏度使得可以在生理相关的低效靶比下检测杀伤作用，持

续的数据监测能够获得更全面且详细的癌细胞杀伤情况，而使用终点分析方法时无法做到这一点。■



# 癌症免疫疗法的多功能性效价分析

### 艾森生物公司介绍了用于定量分析双特异性 T 细胞增强肿瘤细胞杀伤的新分析工具

Lauren Jachimowicz 博士, Aimee Chiavario, Peifang Ye, Ming Lei, Nan Li 博士, Xiaobo Wang 博士, Wei Tang, Garret Guenther 博士, Kenneth Chan 博士, Jeff Shurong Xue 博士

# 癌

症免疫疗法越来越多地被认为是一种利用免疫系统攻击癌细胞的治疗方法。免疫系统的适应性免疫和先天免疫在宿主防御肿瘤的过程中都起着关键的作用。

CD8+ 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 是适应性免疫应答的主要组成部分,除了能产生多种细胞因子外,还能释放颗粒酶、穿孔素和颗粒溶解素等细胞溶解蛋白直接消灭肿瘤细胞。将 T 细胞生物标志物的表达/分泌与靶细胞杀伤联系起来对于肿瘤免疫学研究至关重要。

将这项研究从实验阶段转化到临床应用至关重要,但需要可靠的工具来设计可以高度模拟体内活性的体外分析。在本研究中,我们使用基于阻抗的技术结合基于微球的多重流式细胞分析来评估靶细胞和效应细胞,以评估 T 细胞介导的 B 细胞杀伤作用(图 1)。我们可以通过艾森生物 xCELLigence® 系统的实时细胞分析 (Real-time cell analysis, RTCA) 技术连续监测靶细胞活力,同时,通过流式细胞术测量细胞因子和细胞溶解蛋白的分泌可以研究 T 细胞的激活和功能。

更多信息

下载 xCELLigence  
RTCA 癌症免疫疗法  
手册:



双特异性 T 细胞 (bispecific T-cell engager, BiTE) 是一类非常有应用前景的新型疗法，它通过增强 CTL 特异性识别和消除肿瘤的能力来利用适应性免疫应答的力量。CD19-BiTE 可以结合 CTL 上的 CD3 和 B 细胞系细胞上的 CD19，同时激活 T 细胞，使其接近 B 细胞，从而增强 CTL 对各种 B 细胞来源的肿瘤的效应作用。

在本研究中，我们使用两种不同的分析方法来评估 CD19-BiTE 增强 T 淋巴细胞对 B 细胞淋巴瘤细胞系 (Daudi 细胞) 的细胞毒性作用的能力。使用实时细胞分析阻抗检测来监测靶细胞死亡情况，同时使用基于微球的多重流式细胞术定性分析分泌的细胞因子和细胞溶解蛋白，以评估多功能性 T 细胞反应的效价。

### 增强 T 细胞介导的靶细胞杀伤作用

为了在 xCELLigence 平台上证明 T 细胞介导的靶细胞毒性作用，我们评估了人 T 细胞对 B 细胞淋巴瘤细胞系 (Daudi 细胞) 的杀伤作用。B 细胞癌

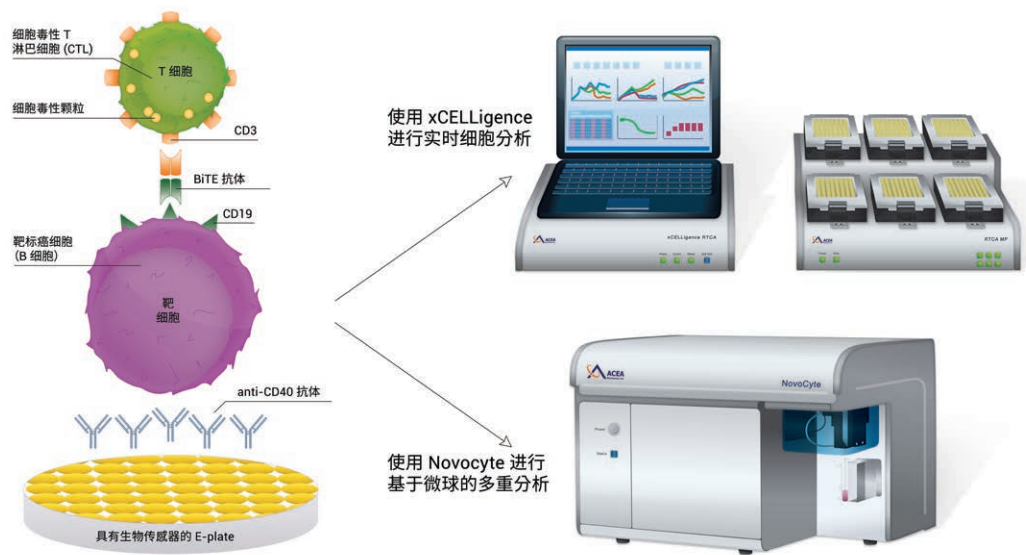
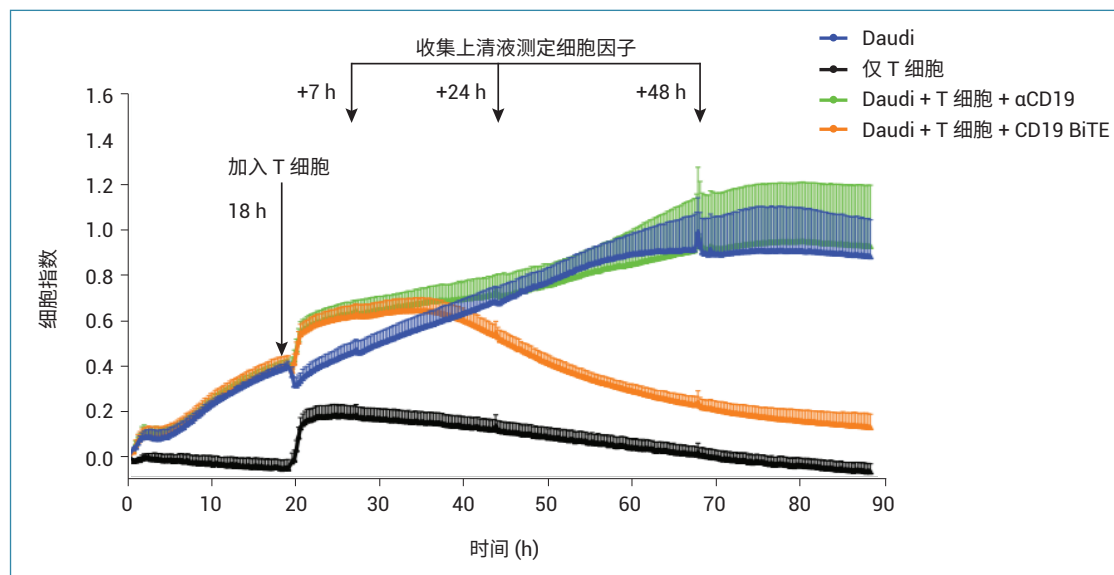


图 1. 使用 xCELLigence RTCA 阻抗分析法监测靶细胞死亡情况，同时在 Novocyte 流式细胞仪上使用基于微球的多重分析检测分泌的细胞因子和细胞溶解蛋白，以评估 T 细胞反应

是重要的免疫治疗靶点，因为它们容易从血液中获得，不受微环境复杂性或与实体肿瘤相关的混合组织类型的影响。为了加速这一领域的研究，艾森生物开发了一种 xCELLigence 免疫疗法试剂盒，用于研究血液瘤的细胞杀伤作用。

在本研究中，Daudi 细胞被固定在包被有 anti-CD40 粘附抗体的 xCELLigence E-Plate<sup>®</sup> 上。接种 Daudi 细胞后，加入从原代外周血单个核细胞 (PBMC) 富集的 T 细胞，效靶比为 10:1。为了检测 BiTE 是否能增强 T 细胞的杀伤作用，还加入了 CD19-BiTE 或 anti-CD19 抗体对照。

xCELLigence 技术采用嵌有微金电极生物传感器的专利 E-plate 检测板，能够通过阻抗监测细胞行为。每 15 分钟记录一次 Daudi 单层细胞的阻抗信号，并使用称为细胞指数 (Cell Index) 的无单位参数进行报告。在只有 Daudi 细胞的孔中，可以看到 Daudi 细胞不间断地生长和粘附 (图 2, 蓝色线)，而仅存在 T 细胞时不能产生持续的阻抗信号，可以将其作为背景 (图 2, 黑色线)。加入 T 细胞和 anti-CD19 抗体作为对照不影响 Daudi 细胞的生长 (图 2, 绿色线)。然而，在 T 细胞存



**图 2. 通过 xCELLigence RTCA 阻抗分析法检测到 CD19 BiTE 增强了 T 细胞介导的 B 细胞杀伤。Daudi 靶细胞以 50000 个/孔的数量接种到包被有 anti-CD40 抗体的 96 孔 E-Plate<sup>®</sup> 中。接种 Daudi 细胞后 18 小时，以 10:1 (T:Daudi 细胞) 的比例加入从原代 PBMC 中富集的人效应 T 细胞。同时，加入 CD19-BiTE (0.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 或 anti-CD19 抗体 (0.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。在加入 T 细胞后第 7 小时、第 24 小时和第 48 小时分别收集上清液以测定相关蛋白。通过细胞阻抗测量细胞与微金电极生物传感器的相互作用。阻抗值被绘制成无单位参数 (称为细胞指数)，并与细胞数量、大小和细胞-基质粘附强度相关。细胞指数的增加代表靶细胞增殖，而下降则代表靶细胞死亡。阻抗信号每 15 分钟记录一次**

在的情况下，加入 CD19 BiTE 使细胞指数迅速下降，表明 Daudi 靶细胞被杀死（图 2，橙色线）。这一数据表明 CD19 BiTE 能够增强 T 细胞介导的 B 细胞淋巴瘤细胞的细胞毒性。

### 促进细胞因子和细胞溶解蛋白的分泌

为了进一步研究 CD19-BiTE 对 T 细胞激活和功能的影响，我们检测了细胞因子和细胞溶解蛋白的分泌情况。细胞按图 2 所示进行培养，在加入 T 细胞后的第 7 小时、第 24 小时和第 48 小时分别取上清液，在 NovoCyte 流式细胞仪上采用基于微球的多重分析法测定 13 种已知会影响 T 细胞功能的人蛋白（图 3）。与我们通过 RTCA 得到的结果一致，我们观察到 CTL 相关蛋白的分泌增加。这些数据表明，CD19-BiTE 的存在显著增加了介导和维持靶细胞破坏的细胞因子和效应分子的产生。在加入效应 T 细胞后 7 小时，与 CTL 反应相关的细胞因子，如 IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$  和 IL-2 分别增加了 300 倍、9 倍和 10 倍。

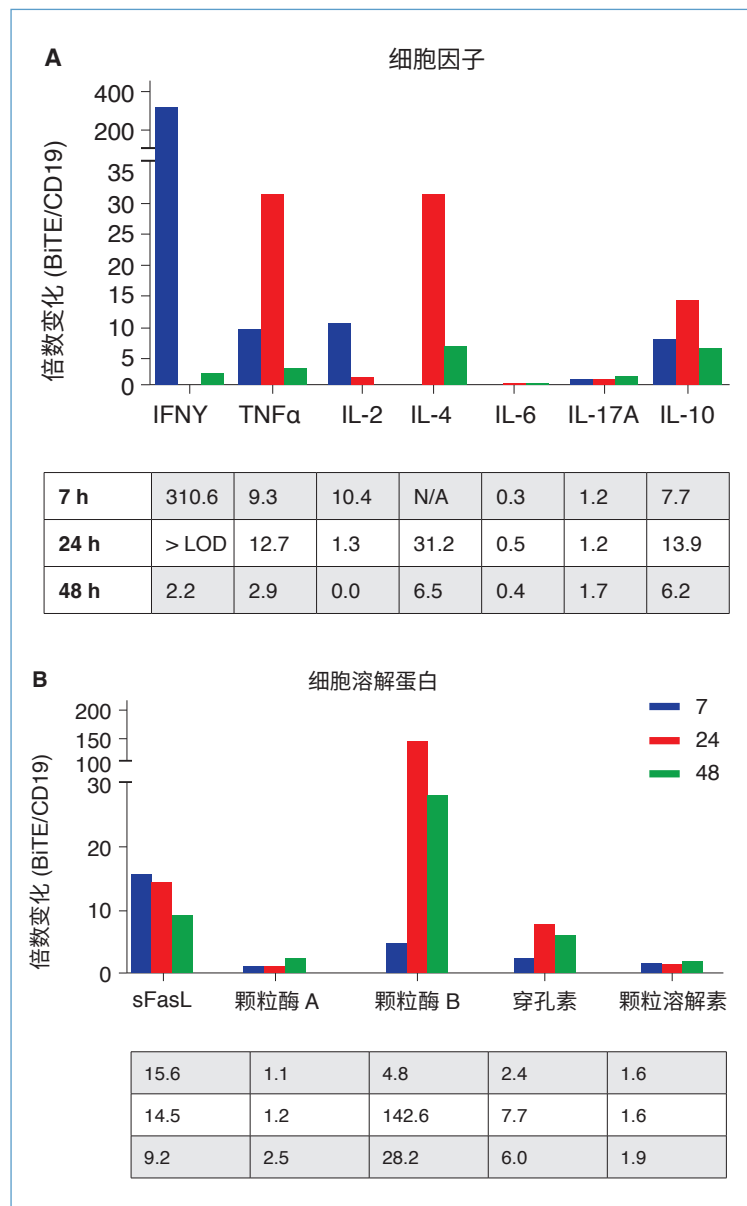


图 3. 在基于微球的多重免疫分析中，CD19-BiTE 增强了 T 细胞的细胞毒性活性。Daudi 靶细胞以 50000 个/孔的数量接种到包被有 anti-CD40 抗体的 96 孔 E-Plate 中。接种 Daudi 细胞后 18 小时，以 10:1 (T:Daudi 细胞) 的比例加入从原代 PBMC 中富集的人效应 T 细胞。同时，加入 CD19-BiTE (0.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 或 anti-CD19 抗体 (0.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。在加入 T 细胞后第 7 小时、第 24 小时和第 48 小时收集上清液，用于基于微球的多重免疫分析。确定 Daudi + T + CD19-BiTE 相对于 Daudi + T +  $\alpha\text{CD19}$  的蛋白表达倍数变化：细胞因子 (A) 和细胞溶解蛋白 (B)



在加入效应 T 细胞后 24 小时，细胞溶解蛋白如 sFasL、颗粒酶 B 和穿孔素的分泌也显著增加，与观察到的 CTL 杀伤反应一致。这些数据表明，CD19-BiTE 通过增加细胞因子和细胞溶解蛋白的分泌（对于产生强大的 CTL 反应非常重要）来增强 T 细胞介导的 B 细胞杀伤作用。

### 总结

本研究中，我们将定量分析细胞杀伤作用与定量分析生物标志物相结合，从而通过单一工作流程深入了解了 CD19-BiTE 如何影响 T 细胞介导的 B 细胞淋巴瘤细胞杀伤。使用 RTCA 连续监测细胞数量、大小和粘附质量，能够对杀伤过程进行定量和动态评估。将这些细胞毒性数据与细胞因子和效应蛋白的定量分析联系起来，可以同时分析 T 细胞激活和功能。此工作流程整合了细胞和蛋白质分析，推进了当前的癌症免疫治疗研究方法。■

---

Lauren Jachimowicz 博士是应用开发科学家，Aimee Chiavario 是免疫肿瘤学的高级营销经理，Peifang Ye 是团队负责人，Garret Guenther 博士和 Kenneth Chan 博士是产品经理，Jeff Shurong Xue 博士是市场总监，均就职于艾森生物（现已加入安捷伦）。

# 专为免疫细胞疗法应用而设计的解决方案



效价测试

免疫细胞适应性

细胞工程

免疫表型分析

肿瘤生长和细胞毒性

细胞命运决定

了解新一代  
免疫细胞疗法  
分析工具

- xCELLigence RTCA
- Seahorse XF 分析仪
- NovoCyte Quanteon 流式细胞仪
- SureGuide CRISPR sgRNA

了解更多信息