

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.02.009

## 基于PiggyBac转座系统的CD19-CAR载体的构建及功能鉴定

姜洪耀<sup>1</sup>, 史甲儒<sup>1</sup>, 罗志强<sup>1,2</sup>, 周雅婷<sup>1</sup>, 和似琦<sup>1</sup>, 于国华<sup>1</sup>, 王建勋<sup>1,3</sup> (1. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488; 2. 中国中医科学院 中药资源中心, 道地药材国家重点实验室, 北京 100700; 3. 深圳北京中医药大学 研究院, 广东 深圳 518118)

**[摘要]** **目的:** 开发基于PiggyBac(PB)转座系统的电转染CAR-T细胞制备方法并鉴定其体外抗肿瘤功能。**方法:** 采用健康人外周血单个核细胞(PBMC)制备T细胞, 通过分子克隆技术将CD19基因克隆到PB质粒(转座子)中后经电转染法将转座子和转座酶质粒导入激活的T细胞中, 并测定其转染效率, 最后运用流式细胞术及荧光素酶发光实验评估其对人Burkitt's淋巴瘤Raji细胞的杀伤能力。**结果:** 电转染制备的CD19 CAR-T细胞转染效率较高(>60%), 呈剂量依赖性, 且CAR-T细胞相对于Pan-T细胞对Raji细胞杀伤能力显著( $P<0.05$ )。**结论:** 开发的PB转座系统的电转染方法可行, 在体外对肿瘤细胞具有显著的杀伤能力, 具备临床运用于CD19 CAR-T细胞制备的潜力。

**[关键词]** CAR-T细胞; CD19; PB转座系统; 电转染; 淋巴瘤; Raji细胞

**[中图分类号]** Q78; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)02-0156-05

## Construction and functional identification of CD19-CAR vector based on PiggyBac transposable system

JIANG Qiyao<sup>1</sup>, SHI Jiuru<sup>1</sup>, LUO Zhiqiang<sup>1,2</sup>, ZHOU Yating<sup>1</sup>, HE Siqi<sup>1</sup>, YU Guohua<sup>1</sup>, WANG Jianxun<sup>1,3</sup> (1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. State Key Laboratory of Dao-Di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Research Institute of Shenzhen, Beijing University of Chinese Medicine, Shenzhen 518118, Guangdong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an electroporation CAR-T cell preparation method based on PiggyBac (PB) transposable system and to characterize its anti-cancer function *in vitro*. **Methods:** Healthy human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were used to obtain T cells. The CD19 gene was cloned into PB plasmid (transposon) by molecular cloning technique. Then, the transposon and transposase plasmid were introduced into activated T cells by electroporation, and the transfection efficiency was measured. Finally, the ability of prepared CAR-T cells to kill human Burkitt's lymphoma Raji cells was evaluated by flow cytometry and luciferase luminescence assay. **Results:** The transfection efficiency of CD19 CAR-T cells prepared by electroporation was high (>60%) in a dose-dependent manner, and CAR-T cells had a significantly higher cytotoxicity to Raji cells relative to the Pan-T cell group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The developed PB transposable system is feasible for electrotransfection and has the potential for clinical application in CD19 CAR-T cell preparation due to its significant *in vitro* cancer cell killing ability.

**[Key words]** CAR-T cell; CD19; PiggyBac (PB) transposable system; electrotransfection; lymphoma; Raji cell

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(2): 156-160. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.02.009]

CAR-T细胞疗法在近年来备受瞩目, 是一种精准、快速、高效的新型肿瘤免疫治疗方法<sup>[1-3]</sup>。CAR-T细胞的技术原理是通过各种转染方法对T细胞进行基因修饰, 使T细胞表达能与肿瘤细胞表面特异性抗原结合的抗原受体结构域, 同时激活细胞内共刺激域和T细胞激活域达到特异性杀伤表达靶抗原的肿瘤细胞的目的<sup>[4-5]</sup>。目前, 以靶向CD19的CAR-T细胞研究最多, 其对治疗白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤和Burkitt's淋巴瘤有着较好的疗效<sup>[6-10]</sup>。大多数CAR-T细胞制备都运用病毒载体, 然而病毒载

体介导的基因转导方法耗时久、价格昂贵、有效载荷小, 并且具有潜在的插入致癌风险<sup>[11-13]</sup>。PiggyBac (PB)转座子是一种高效的稳定表达体系, 相对于病

**[基金项目]** 北京市双一流高层次人才科研启动经费资助项目(No. 9011451310032); 北京中医药大学新教师启动基金资助项目(No.1000061223998)

**[作者简介]** 姜洪耀(1997—), 男, 硕士生, 主要从事CAR-T细胞制备方法的改良研究, E-mail: 17695597511@163.com

**[通信作者]** 王建勋, E-mail: Jianxun.Wang@bucm.edu.cn; 于国华, E-mail: ghyu@bucm.edu.cn

毒载体, PB 转座系统具有操作相对简便、安全性好、负载量大等优点, 是大片段基因或多基因稳定转染的一种较理想工具, 广泛应用于转基因及功能基因研究中<sup>[14-16]</sup>。本研究希望开发基于 PB 转座系统的电转染 CD19 CAR-T 细胞制备方法, 其无需病毒载体介入、操作方便、生产时间短和成本低, 有望提高 CAR-T 细胞疗法的安全性和普适性。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及主要试剂

人 Burkitt's 淋巴瘤 Raji 细胞购自美国 ATCC, Raji-Luc 细胞(能稳定表达萤火虫荧光素酶)购自北京维通达生物技术有限公司, DH5 $\alpha$  感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司, CAR-T 细胞由本实验室人员制备。

PB 转座子质粒(PB-EF1 $\alpha$ -EGFP)和转座酶质粒(4-PB)均由中国农业大学吴森教授馈赠。限制性内切酶、氨苄青霉素、T4 连接酶、50 $\times$ TAE 液、DNA marker 和琼脂糖均购自北京兰博利德生物技术有限公司, 胶回收试剂盒购自德国 QIAGEN 公司, 质粒小提试剂盒、质粒大提试剂盒和 DNA 纯化试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司, RPMI 1640 细胞培养基、胎牛血清、磷酸缓冲盐(PBS)溶液、青霉素-链霉素溶液均购自美国 Gibco 公司, 小鼠抗人 MYC 抗体购自美国 Invitrogen 公司。

### 1.2 构建 PB-CD19CAR001 质粒

重叠 PCR 扩增目的片段 CD19CAR001, 并增加 *Bmt* I 酶切位点( $\sim$ 1 700 bp), 将该扩增片段命名为 *Bmt* I -CAR001, 其 PCR 引物序列: PB-CAR001 上游引物为 5'-CGTGAAGCTAGCATGGAGTGGTCCTGGG-3', 下游引物为 5'-TGGCTGTTAGCGAGGGGGCAGG-3'。以凝胶电泳回收 PCR 扩增后的目的片段, 回收产物用 *Bmt* I 酶切后得到酶切产物, 经纯化后命名为 *Bmt* I -CAR001。同时, 用 *Bmt* I /*Sma* I 双酶切后载体质粒 PB-EF1 $\alpha$ -EGFP, 电泳回收纯化后命名为 PB-载体片段。将 *Bmt* I -CAR001 与 PB-载体片段混匀后, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 用 DH5 $\alpha$  感受态细胞进行转化, 挑取单克隆加入有氨苄抗性的 LB (Luria-Bertani) 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12~16 h。提取质粒 DNA, 酶切鉴定正确后进行测序, 测序正确的质粒被命名为 PB-CD19CAR001。

### 1.3 健康人外周血单个核细胞(PBMC)的分离及培养

采集健康志愿者外周血液样本[采集前签订知情同意书, 并经北京中医药大学医学伦理委员会审查批准(伦理批准编号: 2022BZYLL0102)], 采用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC, 重悬于 10% FBS 和 1%

青-链霉素溶液的 AIM-V 完全培养基, 同时加入终质量浓度为 100 ng/mL 的 OKT-3 和 100 U/mL 的 IL-2 刺激 T 细胞活化增殖, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中无菌培养。此后, 每隔 48 h 用含 100 U/mL IL-2 的 AIM-V 完全培养基传代。

### 1.4 电转染 PB-CD19 CAR001 质粒制备 CD19 CAR-T 细胞

PBMC 刺激培养 3 d 后, 计数, 取  $2.5 \times 10^7$  个细胞, 经 400 $\times$ g 离心 5 min 后, 去除上清液, 加入 2 mL 电转缓冲液清洗细胞, 再次以 400 $\times$ g 离心 5 min 后, 去除上清液, 加入适量电转缓冲液、混匀, 终体积为 250  $\mu$ L。准备 3 组 1.5 mL 离心管, 分别为电转不加质粒组(EP Control)、50  $\mu$ g/mL 组(EP 50)和 100  $\mu$ g/mL 组(EP 100)。按照分组加入相应的质粒(PB 转座子与转座酶加入量一样), 后向每管加入 50  $\mu$ L 细胞, 同时吸取 50  $\mu$ L 细胞悬液置于培养板中, 加适量的完全培养基培养作为电转阴性对照组(NC)。将细胞质粒混匀液移入 OC-100 电极杯中, 插入 Maxcyte 电转仪, 选用 Expanded T cell 3 程序电击。电击结束后, 将细胞移入 6 孔板中, 在培养箱内复苏 20 min, 加入 AIM-V 完全培养基培养。

### 1.5 流式细胞术检测电转染效率

取适量转染后的 CAR-T 细胞和未转染的 T 细胞(Pan-T 细胞), 以 400 $\times$ g 离心 5 min 后去上清, PBS 洗涤细胞后, 加入 47.5  $\mu$ L 2% FBS-PBS 染色缓冲液重悬细胞, 并向其中各加入 2.5  $\mu$ L 小鼠抗人 C-MYC 抗体(稀释比例为 1:19), 避光培养 1 h。再次 PBS 洗涤细胞, 重悬后, 上流式细胞仪检测细胞的转染效率。

### 1.6 荧光素酶化学发光法检测 CD19 CAR-T 细胞对 Raji-Luc 细胞的杀伤能力

取对数期的靶细胞 Raji-Luc 细胞, 按  $4 \times 10^4$  个/50  $\mu$ L 接种于 96 孔板中, 将细胞分为: Raji-Luc 细胞组(NC 组)、Pan-T 细胞(未电转)+Raji-Luc 细胞组(No EP 组)、CAR-T 细胞(电转未加质粒)+Raji-Luc 细胞组(EP 组)、CAR-T 细胞(50  $\mu$ g/mL)+Raji-Luc 细胞组(EP 50 组)。加入 50  $\mu$ L CAR-T 细胞或 Pan-T 细胞(效靶比 1:1), 置入 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 12 h。向各分组的每孔加入 100  $\mu$ L Bright-Lumi<sup>TM</sup> 萤火虫荧光素酶检测试剂, 反应 5 min 后, 选择化学发光模式, 检测各组各孔细胞的相对发光光度(relative light unit, RLU)。按照公式  $[(RLU_{\text{样品}}/RLU_{\text{对照}}) \times 100\%]$  计算细胞存活率。

### 1.7 Annexin V-FITC 染色流式细胞术检测 CAR-T 细胞对 Raji 细胞的杀伤能力

实验分为 3 组: Raji 细胞组(NC 组)、Pan-T 细胞(未电转)+Raji 细胞组(No EP 组)、CAR-T 细胞(50  $\mu$ g/mL)+

Raji 细胞组(EP 50组)。取对数生长期的Raji 细胞, 以每孔  $8 \times 10^4$  个/100  $\mu\text{L}$  细胞接种于96孔板中, 向各组细胞中加入100  $\mu\text{L}$  CAR-T 细胞或Pan-T 细胞(效靶比1:1)。培养12 h后, PBS 洗涤一遍, 收集细胞重悬于45  $\mu\text{L}$  结合缓冲液中, 分别加入2.5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 染色试剂和2.5  $\mu\text{L}$  抗人CD3-APC 染色试剂, 室温下避光处理30 min后, 迅速上流式细胞仪检测CAR-T 细胞的杀伤能力。

### 1.8 统计学处理

采用Prism GraphPad 8 软件进行统计学分析, 符合正态分布的计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间数据比较采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建PB-CD19CAR001 质粒

测序鉴定结果(图1)显示, PB-CD19CAR001 与预期序列一致, 其包含EF1a 启动子、MYC 标签和ScFv CD19-CD8-CD28-CD3  $\zeta$  片段, 为后续在T 细胞电转染实验奠定了基础。

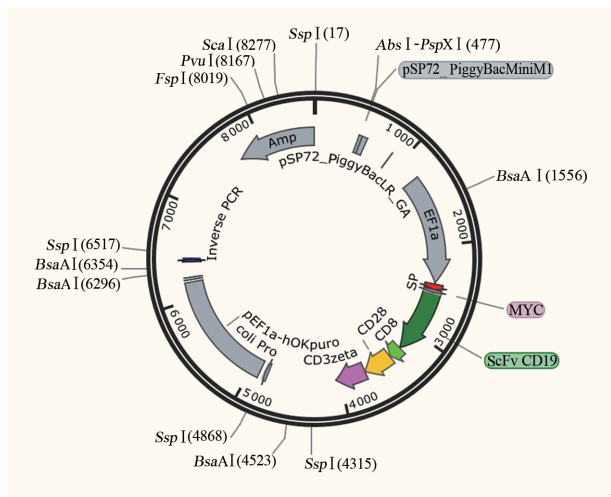


图1 PB-CD19CAR001 构造示意图

### 2.2 电转转染法可高效制备CD19 CAR-T 细胞

从第19天流式细胞术检测结果(图2)显示, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组Pan-T 细胞的转染效率为65%, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组Pan-T 细胞转染效率为92%, 具有一定的浓度依赖性。结果表明, 电转染法进行Pan-T 细胞转染效率较高, 可以用于CAR-T 细胞的制备及后续实验。

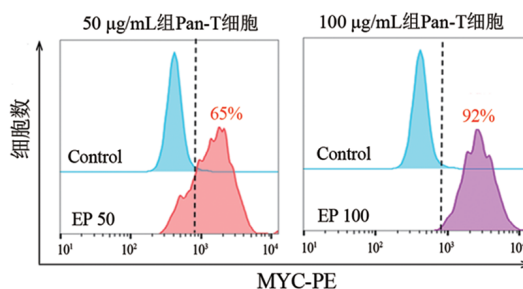


图2 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组和100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组Pan-T 细胞的电转染效率

### 2.3 电转法制备的CD19 CAR-T 细胞可显著杀伤Raji 细胞

荧光素酶杀伤实验结果(图3)显示, 靶细胞是Raji-Luc 细胞, 效靶比1:1时, EP 50 组CAR-T 细胞的杀伤能力明显强于No EP 组细胞( $P < 0.05$ )。Annexin V-FITC 染色流式细胞术检测结果(图4)显示, 靶细胞是Raji 细胞, 效靶比1:1时, EP 50 组Raji 细胞的凋亡率高于NC 组和No EP 组(20.0% vs 8.6%、11.2%)。实验结果表明, 电转CAR-T 细胞对Burkitt's 淋巴瘤Raji 细胞具有显著的杀伤能力。

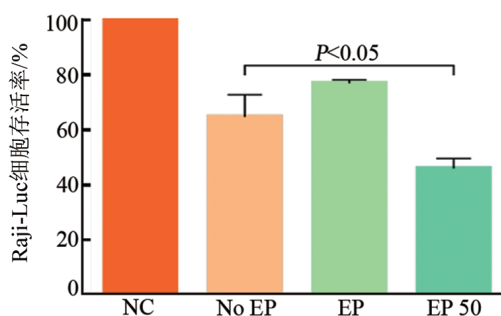


图3 EP 50 组CAR-T 细胞显著杀伤Raji-Luc 细胞

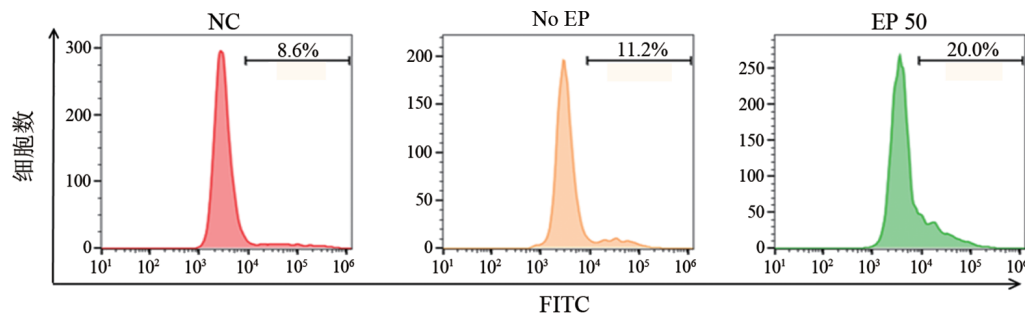


图4 Annexin V-FITC 染色流式细胞术检测电转染CD19 CAR-T 杀伤能力(Raji 细胞凋亡率)



### 3 讨论

CAR-T细胞制备的关键步骤在转导/转染,依赖于高效、稳定、安全的基因转移平台,转导/转染效率的高低决定着治疗的效果<sup>[17]</sup>。目前,最常用的CAR-T细胞制备方法为病毒转导方法,包括 $\gamma$ -逆转录病毒、慢病毒、逆转录病毒等,虽具有良好的转导效率,但存在潜在的感染风险与制备价格昂贵、生产和测试相关技术要求高的缺点<sup>[18]</sup>。

转座子系统作为一种非病毒转染的生产CAR-T细胞的方法,在过去的十年中已有团队进行了相关研究,因为这种转染方法比病毒载体的方法更简便和经济。睡美人转座子系统已经被用来生产CD19 CAR-T细胞,用于治疗异体造血干细胞移植后复发的淋巴瘤和白血病患者<sup>[19]</sup>。同样,PB转座系统是另一种常用的产生CAR-T细胞的非病毒转染的方法<sup>[20-21]</sup>。PB转座系统由蛋白质、mRNA或DNA形式的转座酶和含有所需转基因的单独质粒转座子组成,这些元素通过电穿孔法转染细胞,遵循“剪切-粘贴”机制,转座酶识别转座子两侧的反向末端重复序列,并催化其切除和随后稳定整合到基因组富含A+T的区域,特别是TTAA位点,因此,转染后目的基因可以稳定表达<sup>[22-23]</sup>。此外,由于蛋白编码区的G+C含量高于基因组其他部位,所以PB转座系统插入几率更低<sup>[24]</sup>。GALVAN等<sup>[25]</sup>发现,PB转座系统相较于 $\gamma$ -逆转录病毒和慢病毒载体,降低了原癌基因的TSS附近50 kb的整合频率,具有更好的安全性。BISHOP等<sup>[26]</sup>运用PB转座系统构建了CAR-T细胞(PBMC经电转后用细胞因子激活),并且首次进行了临床试验,发现其可以产生和病毒载体一样的抗肿瘤效果,但其安全性有待进一步研究和改进。

本实验建立了基于PB转座系统的电转染T细胞的方法(PBMC经细胞因子激活后再进行电转),其制备CD19 CAR-T细胞的转染效率高,体外杀伤能力强,为该方法临床CAR-T细胞制备运用奠定了良好的基础。后期,本课题组将进行体内实验,进一步验证该方法所制备的CAR-T细胞的肿瘤杀伤活性及其可能产生的不良反应(如细胞因子风暴和神经毒性等),为CD19 CAR-T细胞进一步临床应用提供充分的实验依据。

### 【参考文献】

- [1] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, *et al.* CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-1365. DOI:10.1126/science.aar6711.
- [2] ALNEFAIE A, ALBOGAMI S, ASIRI Y, *et al.* Chimeric antigen receptor T-cells: an overview of concepts, applications, limitations, and proposed solutions[J/OL]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 797440[2022-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9256991/>. DOI:10.3389/fbioe.2022.797440.
- [3] LIM W A, JUNE C H. The principles of engineering immune cells to treat cancer[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 724-740. DOI: 10.1016/j.cell.2017.01.016.
- [4] 刘秀盈, 冯娅茹, 周雅婷, 等. shRNA靶向抑制CD38的抗CD38 CAR-T细胞构建及其功能的初步鉴定[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(1): 11-17. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.01.002.
- [5] 王田, 张征崢, 王晓峰, 等. CD3 $\zeta$ 链引入YRHQ基序可增强靶向HER2的CAR-T细胞的抗肿瘤活性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(3): 181-188. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.03.003.
- [6] MACKAY M, AFSHINNEKOO E, RUB J, *et al.* The therapeutic landscape for cells engineered with chimeric antigen receptors[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(2): 233-244. DOI: 10.1038/s41587-019-0329-2.
- [7] SHAH N N, LEE D W, YATES B, *et al.* Long-term follow-up of CD19-CAR T-cell therapy in children and young adults with B-ALL[J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(15): 1650-1659. DOI:10.1200/JCO.20.02262.
- [8] PARK J H, RIVIÈRE I, GONEN M, *et al.* Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. *N Engl J Med*, 2018, 378(5): 449-459[2022-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6637939/>. DOI:10.1056/NEJMoa1709919.
- [9] LOCKE F L, GHOBADI A, JACOBSON C A, *et al.* Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial [J/OL]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(1): 31-42[2022-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6733402/>. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30864-7.
- [10] ZAM W, ASSAAD A. Chimeric antigen receptor T-cells (CARs) in cancer treatment[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2022, 15(3): 532-546. DOI:10.2174/1874467214666210811150255.
- [11] ZHANG C, LIU J, ZHONG J F, *et al.* Engineering CAR-T cells [J/OL]. *Biomark Res*, 2017, 5: 22[2022-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5482931/>. DOI:10.1186/s40364-017-0102-y.
- [12] NOBLES C L, SHERRILL-MIX S, EVERETT J K, *et al.* CD19-targeting CAR T cell immunotherapy outcomes correlate with genomic modification by vector integration[J/OL]. *J Clin Invest*, 2020, 130(2): 673-685[2022-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6994131/>. DOI:10.1172/JCI130144.
- [13] BUSHMAN F D. Retroviral insertional mutagenesis in humans: evidence for four genetic mechanisms promoting expansion of cell clones[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(2): 352-356. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.12.009.
- [14] 庞士慧, 钟国瑞, 谢水林, 等. PiggyBac转座子介导HepG2细胞不同亚型药物代谢酶稳定共表达方法比较[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(2): 125-134. DOI:10.3867/j.issn.1000-3002.2018.02.007.
- [15] 张文豪, 李旭, 帅领. PiggyBac转座系统的发展及应用[J]. *发育医学电子杂志*, 2018, 6(3): 149-153. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5340.2018.03.004.
- [16] 盛哲津, 王亮, 周斌, 等. 一种由PiggyBac转座子介导高效构建稳定细胞株的策略[J]. *实验技术与管理*, 2021, 38(3): 45-50. DOI: 10.16791/j.cnki.sjg.2021.03.010.

- [17] MILIOTOU A N, PAPADOPOULOU L C. CAR T-cell therapy: a new era in cancer immunotherapy[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2018, 19(1): 5-18. DOI:10.2174/1389201019666180418095526.
- [18] KATH J, DU W J, PRUENE A, *et al*. Pharmacological interventions enhance virus-free generation of TRAC-replaced CAR T cells [J/OL]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2022, 25: 311-330[2022-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9062427/>. DOI:10.1016/j.omtm.2022.03.018.
- [19] MAGNANI C F, GAIPA G, LUSSANA F, *et al*. Sleeping Beauty-engineered CAR T cells achieve antileukemic activity without severe toxicities[J/OL]. *J Clin Invest*, 2020, 130(11): 6021-6033[2022-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7598053/>. DOI: 10.1172/JCI138473.
- [20] KEBRIAIEI P, SINGH H, HULS M H, *et al*. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells[J/OL]. *J Clin Invest*, 2016, 126(9): 3363-3376[2022-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5004935/>. DOI:10.1172/JCI86721.
- [21] RAMANAYAKE S, BILMON I, BISHOP D, *et al*. Low-cost generation of Good Manufacturing Practice-grade CD19-specific chimeric antigen receptor-expressing T cells using PiggyBac gene transfer and patient-derived materials[J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(9): 1251-1267. DOI:10.1016/j.jcyt.2015.05.013.
- [22] BISHOP D C, XU N, TSE B, *et al*. PiggyBac-engineered T cells expressing CD19-specific CARs that lack IgG1 fc spacers have potent activity against B-ALL xenografts[J/OL]. *Mol Ther*, 2018, 26(8): 1883-1895[2022-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6094355/>. DOI:10.1016/j.ymthe.2018.05.007.
- [23] LI X, HARRELL R A, HANDLER A M, *et al*. PiggyBac internal sequences are necessary for efficient transformation of target genomes[J]. *Insect Mol Biol*, 2005, 14(1): 17-30. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2004.00525.x.
- [24] YUSA K. Seamless genome editing in human pluripotent stem cells using custom endonuclease-based gene targeting and the PiggyBac transposon[J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(10): 2061-2078. DOI: 10.1038/nprot.2013.126.
- [25] GALVAN D L, NAKAZAWA Y, KAJA A, *et al*. Genome-wide mapping of PiggyBac transposon integrations in primary human T cells[J/OL]. *J Immunother*, 2009, 32(8): 837-844[2022-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2796288/>. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181b2914c.
- [26] BISHOP D C, CLANCY L E, SIMMS R, *et al*. Development of CAR T-cell lymphoma in 2 of 10 patients effectively treated with PiggyBac-modified CD19 CAR T cells[J]. *Blood*, 2021, 138(16): 1504-1509. DOI:10.1182/blood.2021010813.

[收稿日期] 2022-08-12

[修回日期] 2022-11-24

[本文编辑] 党瑞山