



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117883558 B

(45) 授权公告日 2024.06.14

(21) 申请号 202410295428.7

(22) 申请日 2024.03.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117883558 A

(43) 申请公布日 2024.04.16

(73) 专利权人 山东兴瑞生物科技有限公司
地址 261500 山东省潍坊市高密市高新技术产业开发区

(72) 发明人 刘明录 李书红 张传鹏 王立新
金海锋 许淼 韩庆梅 冯建海
强邦明

(74) 专利代理机构 山东华君知识产权代理有限公司 37300
专利代理师 武欢欢

(51) Int. Cl.
A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G07K 1/00 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 116287158 A, 2023.06.23

CN 112301088 A, 2021.02.02

Arthur Esprit等.Neo-antigen mRNA vaccines.《Vaccines (Basel)》.2020,第8卷(第4期),摘要、第4-5、8-9页.

注意:

申请人在申请日后补交了实验数据,但该数据并未包含在本授权公告文档中。

审查员 何永培

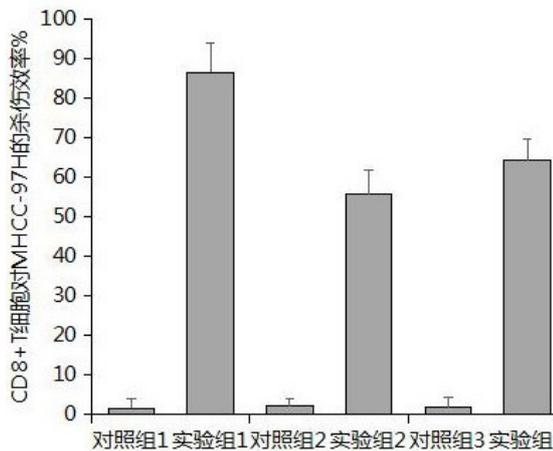
权利要求书1页 说明书7页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

靶向肝肿瘤个性化mRNA疫苗的制备方法

(57) 摘要

本发明提供靶向肝肿瘤个性化mRNA疫苗的制备方法,属于医用配制品技术领域;所述制备方法包括确定突变多肽、突变多肽的初筛、筛选高亲和性肽段、整合得到新生抗原多肽、获得免疫原性强的新生抗原多肽、合成mRNA、制得mRNA疫苗。本发明可以针对肿瘤患者测序获取突变多肽,筛选得到高亲和的新生抗原多肽,进一步筛选获得免疫原性强的新生抗原多肽,然后采取特定的连接方式,将新生抗原多肽进行连接,制备个性化肿瘤mRNA疫苗;所述mRNA疫苗能够刺激CD8+T细胞,使其IFN- γ 、TNF- α 表达上调,且刺激后的CD8+T细胞能够杀伤肿瘤细胞。



1. 靶向肝肿瘤个性化mRNA疫苗的制备方法,其特征在于:所述制备方法包括确定突变多肽、突变多肽的初筛、筛选高亲和性肽段、整合得到新生抗原多肽、获得免疫原性强的新生抗原多肽、合成mRNA、制得mRNA疫苗;

所述获得免疫原性强的新生抗原多肽的方法为将新生抗原多肽合成后,利用试剂盒测试其免疫原性,选取免疫斑点数比阳性对照多的新生抗原多肽,即为免疫原性强的新生抗原多肽;

所述合成mRNA的方法为将免疫原性强的新生抗原多肽按照免疫斑点数从多到少的顺序连接合成mRNA;

所述确定突变多肽步骤中,对于插入/缺失突变产生的移码肽,在整段移码肽的N端添加非突变氨基酸得到突变多肽;

所述筛选高亲和性肽段的方法为根据初筛后突变多肽序列和HLA分型结果,筛选出与MHC亲和性高的9-14mer的多肽序列。

2. 根据权利要求1所述的靶向肝肿瘤个性化mRNA疫苗的制备方法,其特征在于:所述确定突变多肽的方法为将肿瘤患者的肿瘤组织和健康血液进行测序比对,确定突变位点,突变类型包括单核苷酸变异、插入/缺失突变;对于单核苷酸变异导致的氨基酸突变,在突变位点前后各添加非突变氨基酸得到突变多肽。

3. 根据权利要求2所述的靶向肝肿瘤个性化mRNA疫苗的制备方法,其特征在于:所述突变多肽的初筛方法为对单核苷酸变异得到的突变多肽进行MHC I 和MHC II 亲和性分析预测,选择MHC I和MHC II 亲和性高的序列;对于插入/缺失突变获得的突变多肽,全部纳入突变序列,得到初筛后的突变多肽。

4. 根据权利要求1所述的靶向肝肿瘤个性化mRNA疫苗的制备方法,其特征在于:所述整合得到新生抗原多肽的方法为:对于同一个突变多肽中筛选出的9-14mer的高亲和性肽段,如果高亲和性肽段之间不重叠,则将每个高亲和性肽段均作为单独的新生抗原多肽;如果两个高亲和性肽段之间存在重叠部位,则将其中1个肽段的重叠部分删除,然后将两个肽段连接整合成一条肽段,形成新生抗原多肽。

5. 根据权利要求1所述的靶向肝肿瘤个性化mRNA疫苗的制备方法,其特征在于:mRNA的N端添加His标签,对合成的mRNA进行5'加帽和3'端加Poly(A)尾结构。

6. 根据权利要求5所述的靶向肝肿瘤个性化mRNA疫苗的制备方法,其特征在于:所述制得mRNA疫苗的方法为将5'加帽和3'加尾结构的mRNA进行纯化后,采用脂质体混合物进行负载,合成mRNA的LNP纳米颗粒,经透析、浓缩、过滤后得到mRNA疫苗。

靶向肝肿瘤个性化mRNA疫苗的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及靶向肝肿瘤个性化mRNA疫苗及其制备方法,属于医用配制品技术领域。

背景技术

[0002] 肿瘤疫苗作为近年来的研究热点,是根据癌症病人肿瘤细胞特有的肿瘤新生抗原定制的治疗性抗癌疫苗,利用肿瘤抗原引发机体内以细胞免疫为主的肿瘤免疫反应。癌症疫苗主要包括细胞疫苗、DNA疫苗、mRNA疫苗、多肽疫苗等。mRNA疫苗技术是最新的第三代疫苗技术,其注入机体后,在细胞质中翻译,无需进入细胞核,克服了DNA疫苗递送系统难题,也不存在整合性突变风险。该技术不仅能全面诱导体液免疫与细胞免疫应答,还可激活免疫应答佐剂,同时具有研发快、产量高、成本低和更容易实现多联多价设计优点,已成为癌症免疫治疗的重要平台。

[0003] mRNA编码新抗原引领个性化疫苗发展,个性化新抗原疫苗是以基因测序为基础,针对每位患者不同突变位点的、包含多个位点的、个体化的“高级定制”疫苗。其制备的4个基本步骤是获取肿瘤组织和正常细胞、推定新肿瘤抗原、确定新表位和制备疫苗。但是都不涉及肿瘤新抗原的筛选优化,基本都是根据软件直接推定的。

[0004] 如CN106645677A涉及肿瘤新生抗原特异性T细胞的检测,没有涉及到新生抗原的免疫原性的筛选,CN110706747A专利中涉及到肿瘤抗原免疫原性检测方法,但也是针对制备完成后的肿瘤DC疫苗或mRNA疫苗,同样不涉及新生抗原的免疫原性的筛选。针对完整的肿瘤DC疫苗、肿瘤mRNA疫苗或肿瘤新生抗原特异性T细胞进行抗原免疫原性的检测,会使成本很高。

[0005] 目前现有技术中mRNA疫苗的新生抗原确定方法多种多样,但在疫苗制备时很少关注新生抗原多肽的免疫原性筛选以及新生抗原多肽的顺序和连接方式,导致制备的mRNA疫苗的免疫效果降低。

发明内容

[0006] 针对现有技术存在的不足,本发明提供靶向肝肿瘤个性化mRNA疫苗的制备方法,实现以下发明目的:个性化mRNA疫苗刺激的CD8⁺T细胞的IFN- γ 、TNF- α 的表达量增加,个性化mRNA疫苗刺激的CD8⁺T细胞对肿瘤细胞的杀伤效率提高。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明采取以下技术方案:

[0008] 靶向肝肿瘤个性化mRNA疫苗的制备方法,所述制备方法包括确定突变多肽、突变多肽的初筛、筛选高亲和性肽段、整合得到新生抗原多肽、获得免疫原性强的新生抗原多肽、合成mRNA、制得mRNA疫苗。

[0009] 所述获得免疫原性强的新生抗原多肽的方法为将新生抗原多肽合成后,利用试剂盒测试其免疫原性,选取免疫斑点数比阳性对照多的新生抗原多肽,即为免疫原性强的新生抗原多肽。

[0010] 所述合成mRNA的方法为将免疫原性强的新生抗原多肽按照免疫斑点数从多到少的顺序连接合成mRNA;

[0011] 在mRNA的N端添加His标签,对合成的mRNA进行5'加帽和3'端加Poly(A)尾结构。

[0012] 所述确定突变多肽的方法为将肿瘤患者的肿瘤组织和健康血液进行测序比对,确定突变位点,突变类型包括单核苷酸变异、插入/缺失突变;对于单核苷酸变异导致的氨基酸突变,在突变位点前后各添加非突变氨基酸得到突变多肽;对于插入/缺失突变产生的移码肽,在整段移码肽的N端添加非突变氨基酸得到突变多肽。

[0013] 对于单核苷酸变异导致的氨基酸突变,当突变位点前后的氨基酸数量均 ≥ 12 时,则在突变位点前后各添加12个非突变氨基酸得到突变多肽;

[0014] 当突变位点前的氨基酸数量为n,且 $n < 12$ 时,突变位点后的氨基酸数量 ≥ 12 时,则在突变位点前添加n个非突变氨基酸,突变位点后添加12个非突变氨基酸得到突变多肽;

[0015] 当突变位点前的氨基酸数量 ≥ 12 ,突变位点后的氨基酸数量为m,且 $m < 12$ 时,则在突变位点前添加12个非突变氨基酸,突变位点后添加m个非突变氨基酸得到突变多肽;

[0016] 对于插入/缺失突变产生的移码肽(FSP),如果移码肽上游的氨基酸数量 ≥ 12 时,则在整段移码肽的N端添加12个非突变氨基酸得到突变多肽;如果移码肽上游的氨基酸数量为x,且 $x < 12$ 时,则在整段移码肽的N端添加x个非突变氨基酸得到突变多肽。

[0017] 所述突变多肽的初筛方法为对单核苷酸变异得到的突变多肽进行MHC I和MHC II亲和性分析预测,选择MHC I和MHC II亲和性高的序列;对于插入/缺失突变获得的突变多肽,全部纳入突变序列,得到初筛后的突变多肽。

[0018] 所述MHC I和MHC II亲和性分析预测的方法为对单核苷酸变异得到的突变多肽采用IEDB软件进行MHC I和MHC II亲和性分析预测,选择分数在0.8-1的序列。

[0019] 所述筛选高亲和性肽段的方法为根据初筛后突变多肽序列和HLA分型结果,筛选出与MHC亲和性高的9-14mer的多肽序列。

[0020] 所述整合得到新生抗原多肽的方法为:对于同一个突变多肽中筛选出的9-14mer的高亲和性肽段,如果高亲和性肽段之间不重叠,则将每个高亲和性肽段均作为单独的新生抗原多肽;如果两个高亲和性肽段之间存在重叠部位,则将其中1个肽段的重叠部分删除,然后将两个肽段连接整合成一条肽段,形成新生抗原多肽。

[0021] 所述制得mRNA疫苗的方法为将5'加帽和3'加尾结构的mRNA进行纯化后,采用脂质体混合物进行负载,合成mRNA的LNP纳米颗粒,经透析、浓缩、过滤后得到mRNA疫苗。

[0022] 所述mRNA疫苗中mRNA的浓度调整为75-85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0023] 与现有技术相比,本发明取得以下有益效果:

[0024] 本发明可以针对肿瘤患者测序获取突变多肽,筛选得到高亲和的新生抗原多肽,进一步筛选获得免疫原性强的新生抗原多肽,然后采取特定的连接方式,将新生抗原多肽进行连接,制备个性化肿瘤mRNA疫苗;所述mRNA疫苗能够刺激CD8⁺T细胞,使其IFN- γ 、TNF- α 表达上调,且刺激后的CD8⁺T细胞能够杀伤肿瘤细胞。

附图说明

[0025] 图1为肿瘤新生抗原的筛选流程图;

[0026] 图2为3种mRNA合成的排列顺序图;

- [0027] 图3为3种mRNA的跑胶验证图；
- [0028] 图4为负载mRNA1的DC细胞中His蛋白的表达率的流式图；
- [0029] 图5为肿瘤特异性CD8+T细胞的标志物表达情况柱状图；
- [0030] 其中A为肿瘤特异性CD8+T细胞表达IFN- γ 的阳性细胞占比柱状图；B为肿瘤特异性CD8+T细胞表达TNF- α 的阳性细胞占比柱状图；
- [0031] 图6为CD8+T细胞对肝癌肿瘤MHCC-97H细胞的杀伤效率柱状图。

具体实施方式

- [0032] 实施例1 肿瘤新生抗原的筛选
- [0033] 肿瘤新生抗原的筛选流程如图1所示。
- [0034] (1) 确定突变多肽
- [0035] 首先获取肿瘤患者的肿瘤组织和健康血液,进行外显子测序,两者的测序结果进行比对,不同的位点全部确定为突变位点,突变类型包括单核苷酸变异(SNV)、插入/缺失突变(也称为移码突变)。
- [0036] 对于单核苷酸变异导致的氨基酸突变,当突变位点前后的氨基酸数量均 ≥ 12 时,则在突变位点前后各添加12个非突变氨基酸得到突变多肽；
- [0037] 当突变位点前的氨基酸数量为n,且 $n < 12$ 时,突变位点后的氨基酸数量 ≥ 12 时,则在
- [0038] 突变位点前添加n个非突变氨基酸,突变位点后添加12个非突变氨基酸得到突变多肽；
- [0039] 当突变位点前的氨基酸数量 ≥ 12 ,突变位点后的氨基酸数量为m,且 $m < 12$ 时,则在
- [0040] 突变位点前添加12个非突变氨基酸,突变位点后添加m个非突变氨基酸得到突变多肽；
- [0041] 对于插入/缺失突变产生的移码肽(FSP),如果移码肽上游的氨基酸数量 ≥ 12 时,则在整段移码肽的N端添加12个非突变氨基酸得到突变多肽；如果移码肽上游的氨基酸数量为x,且 $x < 12$ 时,则在整段移码肽的N端添加x个非突变氨基酸得到突变多肽。
- [0042] (2) 突变多肽的初筛
- [0043] 对得到的突变多肽利用IEDB软件进行MHC I和MHC II亲和性分析预测,对于SNV获得的突变多肽选择分数在0.8-1的序列；对于插入/缺失突变获得的突变多肽,全部纳入突变序列,得到初筛后的突变多肽。
- [0044] (3) 筛选高亲和性肽段
- [0045] 根据初筛后突变多肽序列和HLA分型结果,利用NetMHCpan-4.0软件对突变位点筛选出与MHC亲和性高的9-14mer的多肽序列,根据匹配结果,选择%Rank值小于0.5且BindLevel为SW的肽段。
- [0046] (4) 整合得到新生抗原多肽
- [0047] 在同一个突变多肽中,筛选出的9-14mer的高亲和性肽段,如果高亲和性肽段之间不重叠,则将每个高亲和性肽段均作为单独的新生抗原多肽；如果两个高亲和性肽段之间存在重叠部位,则将其中1个肽段的重叠部分删除,然后将两个肽段连接整合成一条肽段,形成新生抗原多肽。

[0048] (5) 获得免疫原性强的新生抗原多肽

[0049] 对新生抗原多肽进行合成,加入到患者免疫细胞中,利用IFN- γ ELISPOT试剂盒验证新生抗原多肽的免疫原性,获得免疫原性强的新生抗原多肽,对筛选出的新生抗原多肽按照免疫原性从强到弱的顺序进行串联,合成mRNA。

[0050] 以某肝癌患者为例,其测得的HLA分型为A*30:01 A*02:01 B*50:01 B*13:02 C*06:02,根据步骤(1)获得的突变多肽有87条,经步骤(2)筛选获得25条,经步骤(3)分析筛选获得107条亲和性高的9-14mer的肽段,经步骤(4)综合分析及整合,获得68条新生抗原多肽,其氨基酸序列为SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:69,分别合成新生抗原多肽。

[0051] 利用达科为生物工程有限公司的Human IFN- γ Precoated ELISPOT Kit (strips)进行新生抗原多肽的筛选,其具体步骤见试剂盒说明书。

[0052] 根据ELISPOT斑点计数,最后选取斑点数比阳性对照多的新生抗原多肽,如表1所示。

[0053] 将表1中的新生抗原多肽按照斑点数从多到少的顺序连接合成mRNA1,在mRNA1的N端添加His标签,其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。按照斑点数从少到多合成mRNA2,在mRNA2的N端添加His标签,其核苷酸序列如SEQ ID NO:70所示。按照斑点数两边多,中间少的顺序合成mRNA3,在mRNA3的N端添加His标签,其核苷酸序列如SEQ ID NO:71所示。

[0054] 三种mRNA排序顺序见图2。

[0055] 表1 ELISPOT斑点计数结果

[0056]

序列号 (SEQ ID)	斑点数	序列号 (SEQ ID)	斑点数
SEQ ID NO: 2	125	SEQ ID NO: 22	168
SEQ ID NO: 3	116	SEQ ID NO: 26	172
SEQ ID NO: 6	138	SEQ ID NO: 28	120
SEQ ID NO: 9	178	SEQ ID NO: 34	151
SEQ ID NO: 12	160	SEQ ID NO: 38	162
SEQ ID NO: 14	164	SEQ ID NO: 41	145
SEQ ID NO: 15	152	SEQ ID NO: 43	124
SEQ ID NO: 19	135	SEQ ID NO: 46	162

[0057] 实施例2 mRNA的合成和鉴定

[0058] 对体外合成的mRNA,使用加帽mMESSAGE mMACHINE T7 kit (Ambion公司),体外合成5'加帽的mRNA,同时对mRNA进行3'端加Poly (A)尾结构,获得5'加帽和3'加尾结构的mRNA,利用NEB公司Monarch[®] RNACleanup Kit (T2040)系列试剂盒对mRNA进行纯化,具体步骤详见说明书。

[0059] 对纯化后的mRNA检测浓度,在琼脂糖凝胶中进行电泳,凝胶成像仪拍照,验证mRNA的大小和完整性。

[0060] 本发明中纯化后的mRNA1的浓度为2.12 μ g/ μ L,纯化后的mRNA2的浓度为2.43 μ g/ μ

L,纯化后的mRNA3的浓度为 $2.31\mu\text{g}/\mu\text{L}$;琼脂糖凝胶电泳中所得mRNA1、mRNA2、mRNA3与实际的核苷酸大小相符(见图3)。

[0061] 实施例3 mRNA-LNP疫苗的制备及其表征分析

[0062] 根据常规制备LNP的方法制备mRNA-LNP疫苗,具体方法如下:

[0063] (1) 制备mRNA水溶液

[0064] 将实施例2得到的纯化后的mRNA,溶解在柠檬酸缓冲液中,加入PBS,充分混匀,得到mRNA水溶液;

[0065] 其中纯化后的mRNA与柠檬酸缓冲液、PBS体积比为1:1250:2500;

[0066] 所述柠檬酸缓冲液的浓度为10 mM,pH为4。

[0067] (2) 制备脂质体混合物的乙醇溶液

[0068] 将脂质体混合物和乙醇混合,得到脂质体混合物的乙醇溶液;

[0069] 所述脂质体混合物的乙醇溶液中,脂质体混合物与乙醇的质量比为1:48.8;

[0070] 脂质体混合物中的DLin-MC3-DMA、DSPC、胆固醇和PEG200-DMG的摩尔比为50:10:38.5:1.5。

[0071] (3) 合成LNP纳米颗粒

[0072] 使用纳米颗粒合成系统(Ignite),将脂质体混合物的乙醇溶液与mRNA水溶液以1:3比例混合(体积比),合成mRNA的LNP纳米颗粒。

[0073] (4) 制得mRNA-LNP疫苗

[0074] 将获得的LNP纳米颗粒在PBS溶液(pH7.4)中透析24 h,透析完得到含有LNP的溶液,使用Amicon超离心过滤器浓缩,过 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜2次,调整mRNA的浓度为 $80\mu\text{g}/\text{mL}$,得到mRNA-LNP疫苗。

[0075] 实施例2的纯化后的mRNA1、mRNA2、mRNA3采用上述方法,分别制备得到mRNA-LNP疫苗,标记为mRNA1-LNP疫苗、mRNA2-LNP疫苗、mRNA3-LNP疫苗。

[0076] 对制备的mRNA-LNP疫苗进行表征分析,包括纳米颗粒的大小、分散指数、包封率测定。

[0077] 采用动态光散射法(DLS法)对mRNA-LNP疫苗的纳米颗粒的大小和分散指数(PDI)情况进行分析,采用Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kit(购自Invitrogen)测量纳米粒子的包封率。

[0078] 结果显示,mRNA1-LNP疫苗中纳米颗粒的大小为86-112nm,分散指数PDI为0.139,纳米粒子的包封率为86.7%;mRNA2-LNP疫苗中纳米颗粒大小为89-113nm,分散指数PDI为0.148,纳米粒子的包封率为85.4%;mRNA3-LNP疫苗中纳米颗粒的大小为87-116nm,分散指数为0.154,纳米粒子的包封率为84.9%。

[0079] 实施例4 DC细胞负载mRNA-LNP疫苗

[0080] 将mRNA1-LNP疫苗按照常规操作负载到成熟的DC细胞中,负载方法为:DC细胞先培养5天后,将 $25\mu\text{g}$ 的mRNA1-LNP疫苗与 1×10^6 个DC细胞共培养1天,然后诱导DC细胞成熟2天,得到负载mRNA1-LNP疫苗的DC细胞。

[0081] 取部分负载mRNA1-LNP疫苗的DC细胞,利用His标签流式抗体进行流式检测,按照常规流式检测方法进行,结果如图4所示,65.6%的DC细胞中有His蛋白的表达,说明DC细胞能够吞噬mRNA-LNP纳米颗粒,在细胞内翻译成蛋白质。

[0082] mRNA2-LNP疫苗、mRNA3-LNP疫苗按照上述方法负载到成熟的DC细胞中,得到负载mRNA2-LNP疫苗的DC细胞、负载mRNA3-LNP疫苗的DC细胞。

[0083] 实施例5负载mRNA-LNP疫苗的DC细胞刺激CD8+T细胞标记物IFN- γ 、TNF- α 的表达

[0084] (1) 收集纯化CD8+T细胞

[0085] 收集分离的淋巴细胞离心弃去上清,参照StemCell CD8 Enrichment Kit(Human CD8+ T Cell)试剂盒的说明书,每 5×10^7 个细胞加入1mL的Robosep缓冲液,重悬细胞后细胞转移至离心管,每毫升细胞悬液加入30 μ L人CD8+ T细胞富集抗体混合物,混匀后静置5min,再加入50 μ L磁珠,混匀后室温孵育1min;补加1mL的Robosep缓冲液,静置,倒出的清液里包含富集的CD8+T细胞。

[0086] (2) 共刺激培养

[0087] 对照组为CD8+T细胞单独培养;

[0088] 实验组1为负载mRNA1-LNP疫苗的DC细胞和CD8+T细胞进行共刺激培养;

[0089] 实验组2为负载mRNA2-LNP疫苗的DC细胞和CD8+T细胞进行共刺激培养;

[0090] 实验组3为负载mRNA3-LNP疫苗的DC细胞和CD8+T细胞进行共刺激培养;

[0091] 实验组负载mRNA-LNP疫苗的DC细胞在每孔的加入量为 1.53×10^6 个,CD8+T细胞在每孔的加入量为 5×10^6 个;

[0092] 对照组CD8+T细胞在每孔的加入量为 5×10^6 个;

[0093] 对照组和实验组的培养条件为在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱中孵育细胞3天。

[0094] 根据流式抗体试剂盒(购自Thermo)的说明书对各组细胞进行固定处理,然后向对照组和实验组中分别加入纯化的IFN- γ 抗体和纯化的TNF- α 抗体,室温避光孵育30min,使用Backman流式细胞仪分析细胞中IFN- γ 和TNF- α 的表达率。

[0095] 实验结果如图5和表2中所示,与对照组比较,经过负载mRNA-LNP疫苗的DC细胞刺激的特异性CD8+T细胞标记物IFN- γ 、TNF- α 均表达上调,展现出更强的杀伤肿瘤细胞的潜力。经过负载mRNA1-LNP疫苗的DC细胞刺激的特异性CD8+T细胞中IFN- γ 、TNF- α 表达量高于负载mRNA2-LNP或mRNA3-LNP疫苗的DC细胞刺激的特异性CD8+T细胞中IFN- γ 、TNF- α 表达量,说明新生抗原的排序对mRNA-LNP疫苗的免疫原性有较大的影响。

[0096] 表2 特异性CD8+T细胞标记物IFN- γ 、TNF- α 的阳性细胞占比

	对照组	实验组 1	实验组 2	实验组 3
[0097] CD8+T 细胞表达 IFN- γ 阳性细胞占比%	3.5	51.7	40.9	45.9
CD8+T 细胞表达 TNF- α 阳性细胞占比%	1.2	24.5	19.7	20.9

[0098] 实施例6肿瘤新生抗原特异性T细胞体外杀伤肿瘤细胞验证

[0099] (1) 收集纯化CD8+T细胞

[0100] 收集分离的淋巴细胞离心弃去上清,参照StemCell CD8 Enrichment Kit(Human CD8+ T Cell)试剂盒的说明书,每 5×10^7 个细胞加入1mL的Robosep缓冲液。重悬细胞后细胞转移至离心管,每毫升细胞悬液加入30 μ L人CD8+ T细胞富集抗体混合物,混匀后静置5min,再加入50 μ L磁珠,混匀后室温孵育1min;补加1mL的Robosep缓冲液,静置,倒出的清液里包

含富集的CD8+T细胞。

[0101] (2) 制备负载mRNA-LNP疫苗的DC细胞刺激的CD8+T细胞

[0102] 将负载mRNA1-LNP疫苗的DC细胞和CD8+T细胞进行共培养。其中,每孔加入CD8+T细胞 5×10^6 个、负载mRNA1-LNP疫苗的DC细胞 1.53×10^6 个,在T细胞培养基中, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下培养7天,获得负载mRNA1-LNP疫苗的DC细胞刺激的CD8+T细胞,具有肿瘤新生抗原TCR特异性。

[0103] 将负载mRNA2-LNP疫苗的DC细胞、负载mRNA3-LNP疫苗的DC细胞,按照上述方法,分别制备得到负载mRNA2-LNP疫苗的DC细胞刺激的CD8+T细胞、负载mRNA3-LNP疫苗的DC细胞刺激的CD8+T细胞。

[0104] (3) 体外杀伤实验

[0105] 选择含有荧光素酶标记的肝癌肿瘤MHCC-97H细胞作为靶细胞。

[0106] 空白组为MHCC-97H细胞;

[0107] 对照组1为含有MHCC-97H细胞和mRNA1-LNP疫苗的混合物,对照组2为含有MHCC-97H细胞和mRNA2-LNP疫苗的混合物,对照组3为含有MHCC-97H细胞和mRNA3-LNP疫苗的混合物;

[0108] 实验组1为MHCC-97H细胞和负载mRNA1-LNP疫苗的DC细胞刺激的CD8+T细胞共培养,实验组2为MHCC-97H细胞和负载mRNA2-LNP疫苗的DC细胞刺激的CD8+T细胞共培养,实验组3为MHCC-97H细胞和负载mRNA3-LNP疫苗的DC细胞刺激的CD8+T细胞共培养。

[0109] 其中空白组中MHCC-97H细胞,每孔加入量为 1.0×10^5 个;

[0110] 对照组中MHCC-97H细胞的每孔加入量为 1.0×10^5 个, mRNA-LNP疫苗在每孔的终浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$;

[0111] 实验组中MHCC-97H细胞的每孔加入量为 1.0×10^5 个,负载mRNA-LNP疫苗的DC细胞刺激的CD8+T细胞的每孔加入量为 1.0×10^5 个。

[0112] 然后将空白组、实验组和对照组在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的细胞培养箱中孵育细胞10h,通过酶标仪测量荧光素值,计算CD8+T细胞杀伤肿瘤细胞的效率,其计算公式:实验组的杀伤效率 $= (1 - \text{实验组荧光素值} / \text{空白组荧光素值}) \times 100\%$;对照组的杀伤效率 $= (1 - \text{对照组荧光素值} / \text{空白组荧光素值}) \times 100\%$ 。

[0113] 实验结果发现,对照组对肝癌肿瘤MHCC-97H细胞几乎没有杀伤力;负载mRNA-LNP的DC细胞刺激的CD8+T细胞对肝癌肿瘤MHCC-97H细胞具有明显的杀伤力。负载mRNA1-LNP疫苗的DC细胞刺激的CD8+T细胞对MHCC-97H细胞的杀伤效率(86.5%)高于负载mRNA2-LNP疫苗的DC细胞刺激的CD8+T细胞以及负载mRNA3-LNP疫苗的DC细胞刺激的CD8+T细胞对MHCC-97H细胞的杀伤效率(55.6%、64.2%),见图6,说明新生抗原的排序对mRNA疫苗的免疫原性有影响。

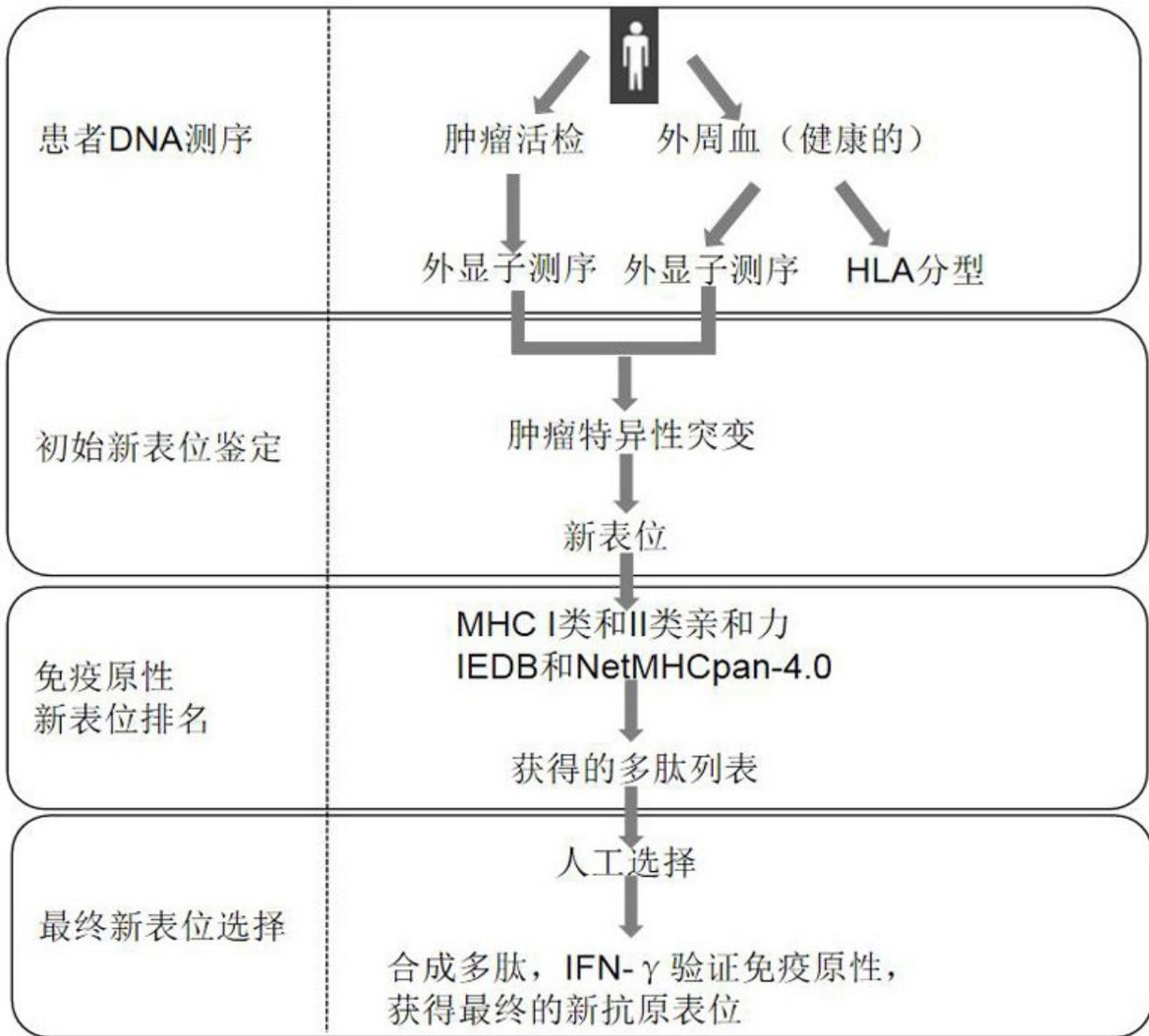


图 1

mRNA1 的 N 端到 C 端顺序为 SEQ ID NO: 9-26-22-14-38-46-12-15-34-41-6-19-2-43-28-3
mRNA2 的 N 端到 C 端顺序为 SEQ ID NO: 3-28-43-2-19-6-41-34-15-12-46-38-14-22-26-9
mRNA3 的 N 端到 C 端顺序为 SEQ ID NO: 9-22-38-12-34-6-2-28-3-43-19-41-15-46-14-26

图 2

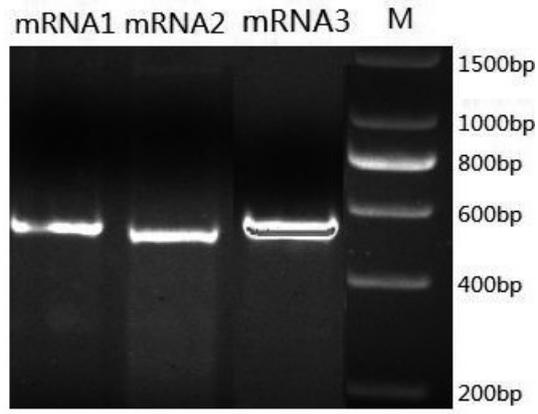


图 3

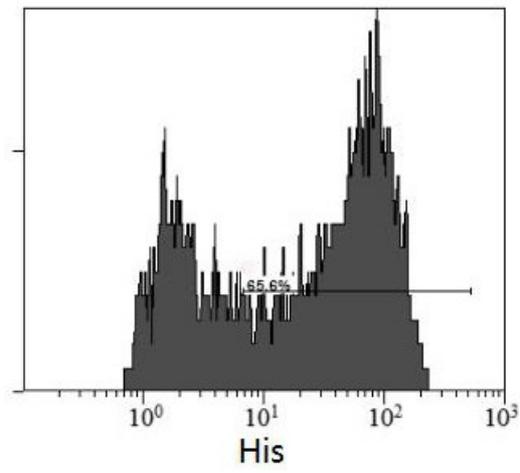


图 4

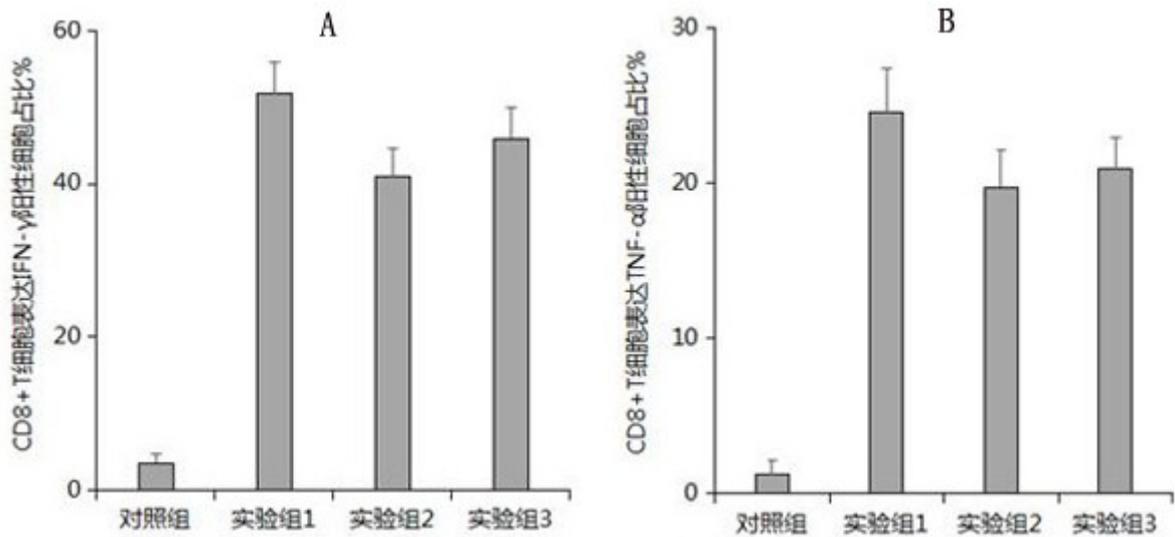


图 5

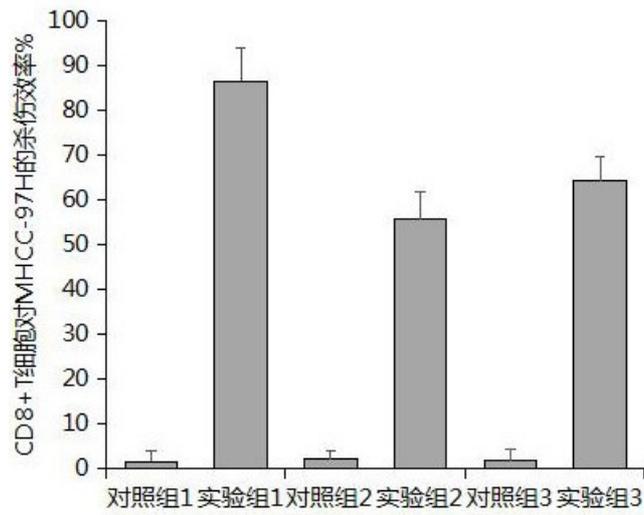


图 6