



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104434973 A

(43) 申请公布日 2015.03.25

(21) 申请号 201410511726.1

A61P 37/04(2006.01)

(22) 申请日 2014.09.29

A61P 35/00(2006.01)

(71) 申请人 深圳市金佳禾生物医药湖北有限公司

C12N 5/10(2006.01)

C12N 5/0783(2010.01)

地址 441000 湖北省襄樊市高新区邓城大道
49号国际创新产业基地11号楼

(72) 发明人 郑义 都会 李智龙 肖艳归

(74) 专利代理机构 深圳国鑫联合知识产权代理
事务所(普通合伙) 44324

代理人 王志强

(51) Int. Cl.

A61K 35/12(2015.01)

A61K 35/14(2015.01)

A61K 35/26(2015.01)

A61K 39/00(2006.01)

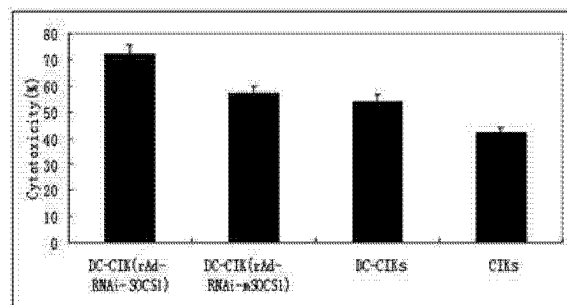
权利要求书1页 说明书14页 附图5页

(54) 发明名称

一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法。所述方法通过生物信息学分析方法分析并获得抗原表位,并将抗原表位与Ii-Kye融合成抗原表位多肽,然后将抗原表位多肽锚定在树突状细胞表面的MHC-II分子,再用重组腺病毒rAd-RNAi-SOCS1感染树突状细胞,进一步将树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞共同培养,然后用共同培养的细胞对荷瘤小鼠进行治疗,这样处理后的树突状细胞能够激活细胞因子诱导的杀伤细胞,增强细胞因子诱导的杀伤细胞对相关肿瘤的特异性杀伤功能。该发明提供了一种激活细胞治疗肿瘤的方法,其核心技术对其它病毒性疾病的治疗具有借鉴意义。



1. 一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法,其特征在于:
步骤一,通过生物信息学方法分析获得肿瘤抗原表位;
步骤二,将步骤一中获得的抗原表位与 Ii-Key 融合;
步骤三,在树突状细胞培养过程中,将步骤二中融合形成的 Ii-Key- 抗原表位肽添加到树突状细胞培养液的体系中;
步骤四,用重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染步骤三中培养的树突状细胞;
步骤五,将步骤四中经过重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染的树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞共同培养;
步骤六,将步骤五中共同培养的树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞注射到患者体内进行治疗。
2. 如权利要求 1 所述的一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法,其特征在于:所述抗原表位来源于肿瘤细胞的抗原表位。
3. 如权利要求 1 所述的一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法,其特征在于:所述 Ii-Key 与抗原表位融合成为 Ii-Key- 抗原表位多肽。
4. 如权利要求 1 所述的一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法,其特征在于:步骤三中树突状细胞原材料取自患者外周血或者健康小鼠骨髓,经过粒细胞-巨噬细胞(简称 GM-CSF)和白细胞介素 4(简称 IL-4)诱导制备。
5. 如权利要求 1 所述的一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法,其特征在于:所述细胞因子诱导的杀伤细胞原材料取自患者外周血或者健康小鼠脾,用 IL-1 α 、IFN- γ 和抗 CD3 单抗,以及 IL-2 诱导制备。
6. 如权利要求 1 所述的一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法,其特征在于:所述 Ii-Key- 抗原表位多肽在树突状细胞培养液的体系中与树突状细胞共同培养时,Ii-Key- 抗原表位多肽锚定在树突状细胞表面的 MHC- II 分子上。
7. 如权利要求 1 所述的一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法,其特征在于:所述树突状细胞培养时,加入 GCP 级别的 Ii-Key- 抗原表位多肽,且 Ii-Key- 抗原表位多肽的浓度为 1~5 μ g/mL。
8. 如权利要求 1 所述的一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法,其特征在于:所述 Ii-Key- 抗原表位多肽与树突状细胞共同培养 1 天时,用重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染,感染 1 天,感染复数为 50。
9. 如权利要求 1 所述的一种抗原表位锚定在树突状细胞表面的 MHC- II 分子上强化细胞因子诱导的杀伤细胞的制备方法,其特征在于:步骤五中树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞共同培养的比例为树突状细胞:细胞因子诱导的杀伤细胞=1:50,共同培养时间或少于 5 天。
10. 如权利要求 1 所述的一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法,其特征在于:所述树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞培养或少于 5 天后用于治疗肿瘤或病毒性疾病。
11. 如权利要求 1 和 10 所述任一项的一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法,其特征在于:所述共同培养后的树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞用于治疗肿瘤或病毒性疾病时,每隔一天注射一次,每次注射细胞量为 10⁷,共计注射三次。

一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫细胞制备的方法,尤其涉及强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法。

背景技术

[0002] 癌症问题日趋严峻,癌症的预防与控制面临巨大挑战。世界卫生组织国际癌症研究中心认为,未来癌症发病人数年均将会以 3%~5% 的速度递增,预计 2020 年全球将有 2000 万癌症新发病例,死亡病例将达 1400 万。据《2012 年中国肿瘤登记年报》报告,我国肿瘤发病率和死亡率的概况为:每 10 万人有 286 人患癌,肿瘤发病率随人群年龄逐渐上升,特别是 50 岁以上随年龄增加而大幅上升,50 岁以上占全部发病的 80% 以上,每年肿瘤死亡人数为 140~150 万。

[0003] 常规的肿瘤治疗手段,即手术、放疗和化疗,对于进展性的或晚期肿瘤仍然束手无策。许多肿瘤患者最终死于肿瘤的转移和耐药。由于肿瘤变异的特性,肿瘤对常规放射和化学治疗有明显的反弹效应。例如,当细胞毒性化疗药物将大部分肿瘤细胞摧毁后,少量对这种药物有抗性的细胞仍有能力成为新的肿瘤灶。更糟的是,这种肿瘤对先前有效的治疗不再产生反应,因为肿瘤细胞在细胞毒性药物的选择压力下会产生抗性。即在正常条件下存活而被选择出来的那部分肿瘤细胞导致了肿瘤的复发、发展和转移。因为肿瘤细胞具有一种重要的遗传可塑性,所以对任何致死性压力的抗性,都可以在肿瘤细胞群体中被进化选择出来。要成功地治疗肿瘤,可能需要多种针对肿瘤细胞不同存活机制的靶向制剂。

[0004] 通常有两种解决方法:攻击肿瘤细胞本身改变成攻击维持肿瘤生长和存活的环境,或者使免疫系统像对付感染那样去杀伤肿瘤细胞。前一种策略,就其本质而言是被动的,因为肿瘤细胞是被间接的途径所杀伤。例如,抗血管生长治疗阻断肿瘤的血供应,从而间接地杀伤肿瘤。这种治疗不容易诱导产生抗性,因为肿瘤环境中的基质细胞在基因上相对稳定。然而,由于其被动型,这种治疗仍然因肿瘤细胞的演化而容易复发,例如抗血管生长治疗中,血管又会再现,可能因为营养和低氧环境导致肿瘤干细胞的产生。与此相反,一种主动的、更具吸引力的策略是,在肿瘤患者中“唤醒”主动免疫反应,使其参与抗肿瘤治疗。这种策略的主要作用是规避肿瘤的异质性,而这种异质性是肿瘤细胞对选择压力反应的结果。在这点上,免疫系统特别适合于清除少量残存的肿瘤细胞,尤其是那种放疗和化疗很难杀灭的静止期细胞或肿瘤干细胞,这有助于延长患者无瘤生存期。

[0005] 目前国内外非常关注免疫细胞治疗肿瘤。从上个世纪的 80 年代的 LAK 细胞,到 1989 年的细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killers, CIKs),肿瘤浸润淋巴细胞(TILs),这些免疫细胞治疗肿瘤无疑为患者的治疗带来了福音。2010 年 FDA 批准 DC 细胞疫苗治疗前列腺癌具有里程碑意义,世界各国已有 200 多项治疗各种不同肿瘤的 DC 疫苗进入临床 I、II 期。近年来除了 DC 细胞疫苗外,其他免疫细胞和 DCs 联合使用用于肿瘤的治疗,如 DC-CIK, DC-CTL 和 DC-NK,其中 CIK 应用较为广泛,DC-CIKs 或 CTL 较单纯的效应细胞对肿瘤的治疗效果好,主要由于 DC 和效应细胞 CIKs 和 CD8+T 之间的相互作用,增加

了效应细胞对肿瘤的特异杀伤和效应细胞的活化。但 DC 细胞和效应细胞的相互作用非常复杂,不仅存在 MHC-I- 表位多肽复合物和 T 细胞受体(TCR)作用的第一信号(signal-1)和共刺激分子和其受体之间的作用的第二信号(signal-2),以及细胞因子刺激的第三信号(signal-3),如附图 1。

[0006] 第一信号的产生是病原体感染 DC 细胞或 DC 细胞摄取突变或转化细胞后,对抗原进行加工处理,并把抗原表位和主要组织相关性复合物(MHC)结合成 MHC/ 抗原表位复合物,然后成熟的 DCs 迁徙到类淋巴组织,把抗原信息呈递给辅助性 T 细胞或交叉递呈给 CD8+T 细胞,诱导机体对病原体或转化细胞或肿瘤细胞的免疫反应。显然,抗原表位和 MHC 分子的结合是启动特异免疫反应的关键步骤之一。

[0007] 多肽免疫治疗的吸引力在于是有效 T 细胞反应的最小必需原件:MHC-I 和 / 或 II 表位肽,制备简单方便。但是,当用多肽疫苗观察免疫反应时,有临床疗效的少,表明其免疫原性弱。MHC 相关不变链(Ii)的一部分能加强 MHC-II 表位电荷,导致抗原特异的 CD4+Th 激活。这一策略的有效性在各种不同的体外体系、动物模型和临床实验中得到了证明。Ii-key 杂交技术代表一个安全有效的多肽免疫治疗策略,在临床实验中显示有疗效。

[0008] MHC-II 在抗原呈递细胞合成后不久,MHC-II 异二聚体形成与在内质网的不变链(Ii 蛋白)组装,从高尔基复合体转运到内吞作用途径,大部分 Ii 被低 pH 液泡中的蛋白酶从 MHC-II 分子上除去,只剩下称为 II 类相关不变链多肽(CLIP)的 Ii 蛋白水解片断 [Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Ann Rev Immunol* 1994; 12:259 - 93]。CLIP 作为在 MHC-II 表位 - 结合沟中的看护者,抑制构象改变 [Natarajan SK, Assadi M, Sadegh-Nasser S. Stable peptide binding to MHC class II molecule is rapid and is determined by a receptive conformation shaped by prior association with low affinity peptides. *J Immunol* 1999;162(7):4030 - 6.]。当外源多肽结合新生的 MHCII 复合体后,以一个协同的方式除去 CLIP。人类的 HLA-DM 或小鼠的 H2-M 在 CLIP 的替代中起关键作用 [Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 1995;82(1):155 - 65.]。除了替代 CLIP 外,DM 在极短时间内和没有结合表位肽的 MHC-II 相互作用产生一个接受多肽的构象,在抗原呈递中选择特异多肽 /MHC-II 复合体 [Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 1995;82(1):155 - 65.]。最近的研究表明 Ii 片断在抗原加工、表位和 MHC-II 分子结合能模拟 HLA-DM 功能。Ii-key 的特性和用它修饰多肽疫苗使其成为加强多肽疫苗的抗原性的候选分子 [Chou CL, Mirshahidi S, Su KW, Kim A, Narayan K, Khoruzhenko S, et al. Short peptide sequences mimic HLA-DM functions. *Mol Immunol* 2008;45(7):1935 - 43.]。早期研究表明 Ii (小鼠 Ii :77-92 :LRMKLPKSAKPVQMR) 的一个 17 氨基酸多肽序列能够大大加强 I-E 限制的抗原多肽呈递给反应的 T 细胞杂交瘤 [Adams S, Humphreys RE. Invariant chain peptides enhancing or inhibiting the presentation of antigenic peptides by major histocompatibility complex class II molecules. *Eur J Immunol* 1995;25(6):1693 - 702.]。序列的 C 末端删去后,剩余(后来称为 Ii-Key)N 末端的 LRMKLPK 多肽,仍保留了大部分活性 [Adams S, Albericio F,

Alsina J, Smith ER, Humphreys RE. Biological activity and therapeutic potential of homologs of an Ii peptide which regulates antigenic peptide binding to cell surface MHC class II molecules. *Arzneimittelforschung* 1997;47(9):1069-77.]. Ii 蛋白的这个片断能够与 MHC-II 分子的别构位点结合,方便以前结合的多肽释放,加强了新的多肽与 MHC-II 的结合 [Xu M, Jackson R, Adams S, Humphreys RE. Studies on activities of invariant chain peptides on releasing or exchanging of antigenic peptides at human Leukocyte antigen-DR1. *Arzneimittelforschung* 1999;49(9):791-9.].

[0009] 为了强化 MHC-II 表位肽疫苗的能力, Ii-Key/ 表位杂交体通过 Ii-Key 核心基序 LRMK 通过一个简单的多聚亚甲基桥和 MHC-II 表位的 N 末端连接而成 [Humphreys RE, Adams S, Koldzic G, Nedelescu B, von Hofe E, Xu M. Increasing the potency of MHC class II-presented epitopes by linkage to Ii-Key peptide. *Vaccine* 2000;18(24):2693-7.]. 最初 Ii-Key/PGCC (aa 95-104) 的杂交体的体外 T 细胞杂交瘤的增殖研究显示 Ii-Key/PGCC (aa 95-104) 杂交体刺激 PGCC(aa 95-104) T 细胞杂交瘤较 PGCC(aa 95-104) 表位肽强 200-250 倍 [11]。接下来的研究显示来源不同相关疾病的 Th 细胞体内外 Ii-Key 杂交体疫苗的作用 [Kallinteris NL, Lu X, Wu S, Hu H, Li Y, Gulfo JV, et al. Ii-Key/MHC class II epitope hybrid peptide vaccines for HIV. *Vaccine* 2003;21(27-30):4128-32;Kallinteris NL, Wu S, Lu X, von Hofe E, Humphreys RE, Xu M. Linkage of Ii-Key segment to gp100(46-58) epitope enhances the production of epitope-specific antibodies. *Vaccine* 2005;23(17-18):2336-8;Kallinteris NL, Wu S, Lu X, Humphreys RE, von Hofe E, Xu M. Enhanced CD4+T-cell response in DR4-transgenic mice to a hybrid peptide linking the Ii-Key segment of the invariant chain to the melanoma gp100(48-58) MHC class II epitope. *J Immunother* 2005;28(4):352-8;Xu M, Lu X, Sposato M, Zinckgraf JW, Wu S, von Hofe E. Ii-Key/HPV16 E7 hybrid peptide immunotherapy for HPV16+ cancers. *Vaccine* 2009;27(34):4641-7;Gillogly ME, Kallinteris NL, Xu M, Gulfo JV, Humphreys RE, Murray GL. Ii-Key/HER-2/neu MHC class-II antigenic epitope vaccine peptide for breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53(6):490-6;Voutsas IF, Gritzapis AD, Mahaira LG, Salagianni M, von Hofe E, Kallinteris NL, et al. Induction of potent CD4+ T-cell-mediated antitumor responses by a helper HER-2/neu peptide linked to the Ii-Key moiety of the invariant chain. *Int J Cancer* 2007; 121(9):2031-41.]. AE37, 是一个 HER2 表位肽和 Ii-key 的杂交体,即使没有 GM-CSF 佐剂下免疫肿瘤患者,能诱导产生 CD4+T 细胞和抗-HER2 免疫反应 [Holmes JP, Benavides LC, Gates JD, Carmichael MG, Hueman MT, Mittendorf EA, et al. Results of the first phase I clinical trial of the novel II-key hybrid preventive HER-2/neu peptide (AE37) vaccine. *J Clin Oncol* 2008;26(20):3426-33;Gates JD, Clifton GT, Benavides LC, Sears AK, Carmichael MG, Hueman MT, et al. Circulating regulatory T-cells (CD4+CD25+FOXP3+) decrease in breast cancer patients after vaccination with a modified MHC

class II HER2/neu (AE37) peptide. Vaccine 2010;28(47):7476 - 82 ;Perez SA, Kallinteris NL, Bisias S, Tzonis PK, Georgakopoulou K, Varla-Leftherioti M, et al. Results from a phase I clinical study of the novel Ii-Key/HER-2/neu((aa776-790)) hybrid peptide vaccine in patients with prostate cancer. Clin Cancer Res 2010;16(13):3495 - 506.]。图 2 描述了 Ii-Key/ 表位肽和 MHC-II 结合。表明 Ii-Key/ 抗原表位肽能够“劫持”以前的表位肽, 让与 Ii-Key 融合的抗原表位肽与 MHC-II 分子结合, 无需通过 DC 细胞对抗原加工处理。

[0010] 附图 2 显示效应细胞激活后产生共抑制性信号, 以减弱因效应细胞过度激活对机体产生的伤害, 这种抑制性受体被称为“免疫检查点(immune checkpoint)”。主要有 PD-1 和共抑制性受体, 如 CTLA-4, B 和 T 淋巴细胞减弱因子(B and T Lymphocyte Attenuator, BTLA 或 CD272), Tim-3(T cell Immunoglobulin and Mucin domain-3), LAG-3(Lymphocyte Activation Gene-3) 等。其中 PD-1/PD-L1 信号途径是最重要的途径之一, 大量证据表明 PD-1 是一个共抑制受体, 在活化的 T 细胞表达, 负调节 T 细胞功能【Drew M. Pardoll. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. NATURE REVIEWS | CANCER. 2012, 12(253): 252-264.】。例如, PD-1 在抗原 - 激活的 CD8+T 细胞高水平表达和 CD8+T 细胞耗损(T cell exhaustion) 相关。被耗损的 CD8+T 细胞渐渐失去效应功能, 包括增殖能力、表达如 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 等细胞因子的能力, 最终导致细胞凋亡。耗损的 PD-1+CD8+T 细胞在肿瘤的肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) 和慢性病毒性感染得到证明【Badoua C, Hans S, Merillon N, et al. PD-1 -Expressing Tumor-Infiltrating T Cells Are a Favorable Prognostic Biomarker in HPV-Associated Head and Neck Cancer. Cancer Res. 2013;73(1):128-138. Pai S. Adaptive immune resistance in HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. OncoImmunology. 2013;2:5, e24065. Sznol M and Chen L. Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer. Clin Cancer Res. 2013; 19(5): 1021 - 1034. Bauzon M and Hermiston T. Armed therapeutic viruses - a disruptive therapy on the horizon of cancer immunotherapy. Frontiers in Immunology. 2014; 5:1-10. Lyford-Pike S, Peng S, Young G, et al. Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res. 2013; 73(6): 1733 - 1741.】。但是, PD-1 的表达抑制 CD8+T 细胞功能的确切机制未完全理解。除了 PD-1、CTLA-4 免疫检查点外, 免疫细胞内在一些细胞因子的作用下存在抑制因子, 以免免疫反应对机体造成损害。

[0011] 无论是 DC 疫苗还是 DC-CIK 在体外的培养需要一组细胞因子。细胞因子是一类调节细胞生长、分化、增殖的多肽小分子, 其不能直接进入细胞内发挥作用, 需通过细胞因子受体介导, 经相应信号传导途径发挥其生物学效应。细胞因子信号抑制因子 (Suppressor of cytokine signaling, SOCS) 是信号传导通路 JAK/STAT 的一个负调控分子家族, 为 SOCS1 ~ 7 和 CIS(cytokine-inducible SH2 domain-containing protein) 等 8 种起免疫调节作用胞质分子组成的超家族, 含有 WD-40 重复序列及 SOCS 盒的蛋白 (WSB), 锚蛋白重复序列及 SOCS 盒的蛋白 (ASB), SPRY 结构域及 SOCS 盒的蛋白 (SSB) 等成员【Gilboa E

. DC-Bsaed cancer vaccines[J]. J Clin Invest,2007,117(5):1195】。SOCS1 定位在 16p12-p13.1, 人类 SOCS1 基因编码 211 个氨基酸, 鼠和人的 SOCS1 蛋白有 95%~99% 氨基酸同源【Julie P, Delphine L, Frank P, et al. The many faces of the SOCS box[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2008, 19: 371-381】。其中, SOCS1 通过 SH2 结构域与细胞因子受体胞内段 Janus 激酶 (Janus kinases, JAK) 结合, 使其泛素化后降解, 从而阻滞 IFN- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-6、IL-7、IL-12 和 IL-15 等多种因子信号, 抑制 DCs 和其他细胞内 JAK-STAT 信号通路。SOCS1 被认为是防止自身免疫的重要调节分子, 近年发现, SOCS1 在 DCs 中发挥了相当的作用, 是抗原提呈负性调控的一种重要机制【Yandava CN, Pillari A, Drazen JM. Radiation hybrid and cyto-genetic mapping of SOCS1 and SOCS2 to chromosomes 16p13 and 12q, respectively[J]. Genomics, 1999, 61:108-111; Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signaling and immune regulation[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(6):454-465】。SOCS 结构见图附图 3 (a), 3 (b) 和 3 (c), SOCS 蛋白功能见附图 4。

【0012】 SOCS1 参与 DCs 的发生、成熟和活化, SOCS1 缺陷的 DCs 释放细胞因子如 IL-4 和 IFN- γ , 可抑制 GM-CSF 介导人 CD14⁺ 单核细胞来源的 DCs 发生, 并负调控 LPS 和 IL-4 诱导的 DCs 成熟【于鸿, 刘玉侠, 贾艳华, 等. SOCS1 调节树突状细胞抗肿瘤免疫的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2009, 25 (6):571-575】。SOCS1 是一个独特的抑癌基因, SOCS1 异位表达抑制某些造血特异性癌基因的转化活动。研究发现【Involvement of suppressors of cytokine signaling in toll-like receptor mediated block of dendritic cell differentiation[J]. Blood, 2006, 108(13):4102-4108】发现 SOCS1 缺陷转基因小鼠支持在炎症相关的肿瘤的发展中 SOCS1 的负性作用, 这种小鼠除 T、B 细胞外, 其它所有类型细胞 SOCS1 表达都被敲除, 发展成慢性结肠炎和结肠癌, 显示缺乏 SOCS1 时 IFN- γ -STAT1 通路持续激活诱发结肠癌。大多数人肝细胞癌中 SOCS1 表达常常通过 SOCS1 启动子 CpG 岛的过度甲基化而被沉默, 当敲除 SOCS1 后能增强 IL-6 介导的细胞增殖【Yoshida T, Ogata H, Kanmo M, et al. SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis -induced carcinogenesis[J]. J Exp Med, 2004, 199(12):1701-1707】。研究表明【Evel-Kabler K, Song XT, Aldrich M, et al. SOCS1 restricts dendritic cells' ability to break self tolerance and induce antitumor immune by regulating IL-12 production and signaling [J]. J Clin Invest, 2006, 116(1):90-100】。SOCS1 沉默导致抗原呈递 DCs 的 IL-12 信号和下游细胞因子网络不受约束, 从而导致宿主水平自身耐受的打破和自身免疫性病理反应。在抗原呈递 DCs 中 siRNA 技术沉默 SOCS1 基因强烈加强抗原特异性抗肿瘤免疫。与对照的 siRNA 转染的 DCs 相比, SOCS1 siRNA 转染的 DCs 对 LPS 或 IFN- γ 的应答更强。抗原 (OVA) 肽脉冲的 SOCS1-siRNA 转染的 DCs 比对照组 DCs 更强烈地激发 OVA- 特异性 CTL【Shen L, Evel-Kabler K, Strube R, et al. Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(12):1546-1553】。利用各种 SOCS 蛋白的小分子类似物结合药物传递系统可有效治疗炎症性疾病及癌症。宋海峰等【宋海峰, 周军, 潘科, 等. 抑制 SOCS1 联合 OK-432 刺激的 DC 疫苗抗肿瘤效应的初步研究 [J]. 癌症, 2008, 27(7):685-691】通过设计 siRNA 片段能有效下调 iDC 中 SOCS1 的表达, OK-432 刺激 DC 成熟, CD80、CD83、CD86、

HLA-DR 等 DC 表面抗原明显表达上调,而负载肝癌抗原对 DC 表型无明显影响。SOCS1 的下调可以促进 DC 成熟,负载肝癌抗原的 DC 能有效刺激自体淋巴细胞增殖, T 细胞增殖率为 $(110.7 \pm 22.2)\%$,同时产生针对 HepG2 细胞的特异性杀伤作用,特异性细胞毒 T 淋巴细胞活性为 $(54.0 \pm 13.2)\%$ 。而针对 K562 细胞和 EC109 细胞杀伤率仅为 $(14.5 \pm 15.5)\%$ 和 $(10.0 \pm 30.7)\%$ 。结果显示 RNAi 下调 SOCS1 表达,OK-432 刺激负载肝癌全细胞抗原的 DC,可以产生高效而特异性的抗肝癌的免疫应答。SOCS1 在 DCs 介导的系统性自身免疫反应中起着不可忽视的抑制作用。SOCS1 缺陷 DCs 免疫诱导了一种超 Th1 型免疫应答和抗肿瘤活性。江敏等【姜敏,秦霞,胡青海,等. SOCS 1 基因沉默增强 DO 疫苗对肺癌动物模型的治疗效果 [J]. 现代免疫学,2007,27(4):294-299】研究发现,荷瘤小鼠接受疫苗治疗后,虽然未沉默 SOCS1 的 DC 也有一定疗效,但沉默 SOCS1 可使疗效显著增强,肺肿瘤生长明显趋缓,CD8⁺ CTL 在体外对肿瘤的特异性杀伤大幅提高,分泌 Th1 型细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 亦进一步增加。可见,SOCS1 是 DC 功能负性调节的重要分子,沉默 SOCS1 可以显著增强 DC 提呈抗原、启动 T 细胞免疫的能力。于鸿等【于鸿,张健,刘玉侠. RNA 干扰抑制 SOCS1 表达增强树突状细胞抗肿瘤作用 [J]. 中国实验诊断学,2009,13(5):598-601】针对 SOCS1 基因,采用化学合成法合成 3 对 SOCS1 siRNA,并转染树突状细胞。Western blot 检测树突状细胞 SOCS1 的表达情况,结果与空白对照组相比,SOCS1 沉默的树突状细胞抗肿瘤活性显著提高,可以用于临床的肿瘤治疗。此外,SOCS1 的沉默导致 DCs 细胞表达 PD-L1 降低,进一步刺激与 DC 共培养的效应细胞 CIKs 的活性。

发明内容

[0013] 本发明通过生物信息学方法分析肿瘤的抗原表位,然后将抗原表位和 Ii-Key 融合成 Ii-Key-抗原表位多肽,直接将 Ii-Key-抗原表位多肽添加到培养的 DCs, Ii-Key-抗原表位多肽通过 Ii-Key 锚定在 DCs 表面的 MHC-II 分子后,去感染重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1,成功感染后与 CIKs 共同培养,可以大大增强 CIKs 对肿瘤细胞(以乳腺癌细胞系 MCF-7 为例)的特异性杀伤作用。在实验中,以乳腺癌为模型,将乳腺癌细胞系 MCF-7 (高表达 HER2) 接种裸鼠,用本发明的方法对荷瘤小鼠进行治疗,重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染的 Ii-Key-抗原表位多肽锚定的 DCs 强化的 CIKs 对肿瘤具有显著的抑制作用,大大延长了荷瘤小鼠的总体存活时间。

[0014] 本发明的技术方案如下:

步骤一,通过生物信息学方法分析获得肿瘤相关抗原表位;

步骤二,将步骤一中获得的抗原表位与 Ii-Key 融合;

步骤三,在树突状细胞培养过程中,将步骤二中融合形成的 Ii-Key-抗原表位多肽添加到树突状细胞培养液的体系中;

步骤四,用重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染步骤三中培养的树突状细胞;

步骤五,将步骤四中经过重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染的树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞共同培养;

步骤六,将步骤五中经过共同培养的树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞注射到患者体内进行治疗。

[0015] 所述生物信息学方法分析肿瘤相关抗原表位的方法为,以 MCF-7 高表达大

HER2 为抗原,生物信息学分析表明其表位为 GVGSPYVSRLLGICL, 然后与 Ii-Key 融合为 Ac-LRMK-GVGSPYVSRLLGICL-NH₂, 命名为肿瘤高表达抗原表位肽 1, 即 Ii-Key- 抗原表位多肽, 标号为 GH03;

所述 DCs 采用患者外周血细胞经过离心分离, 洗涤, 获得单核细胞(英文简称为 PBMCs), 再通过 IL-4 和 GM-CSF 培养获得;

所述 CIKs 采用患者外周血或健康小鼠脾经过分离成单核细胞后经过 IL-1 α 、IFN- γ 和抗 CD3 单抗, 以及 IL-2 诱导制备;

所述的 Ii-Key- 抗原表位肽与 DCs 培养的第 3 天, 加入 GCP 级别的浓度为 1 \sim 5 μ g/mL 的 GH03;

所述 Ii-Key- 抗原表位肽在树突状细胞培养液的体系中与树突状细胞共同培养时, Ii-Key- 抗原表位多肽锚定在树突状细胞表面的 MHC- II 分子上;

所述重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染树突状细胞的时间是, 当树突状细胞培养过程中将 GCP 级别的浓度为 1 \sim 5 μ g/mL 的 GH03 加入到树突状细胞培养液中并与树突状细胞共同培养 1 天时, 才用重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染, 且感染数为 50;

所述的 DCs 与 CIKs 共同培养, 是指将 CIKs 加入 DCs 在重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染 1 天时间后的培养液中, 并与 DCs 共同培养, 而且加入 CIKs 时, DCs 数量和 CIKs 数量的比例为, DCs :CIKs=1:50。

[0016] 所述一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞的功能后, 用于治疗肿瘤时, DCs 与 CIKs 共同培养的时间或少于 5 天, 才可用于治疗肿瘤。治疗肿瘤的流程为第一次向患者输入细胞总数为 10⁷ 的经过共同培养的细胞, 隔一天后再向患者输入细胞总数为 10⁷ 的经过共同培养的细胞, 隔一天再向患者输入细胞总数为 10⁷ 的经过共同培养的细胞。

[0017] 本发明的有益效果:

1. DCs 先后经历 Ii-Key、GH03 和重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 处理后, 与 CIKs 共同培养时, 强化 CIKs 的扩增数量和功能;
2. 经过处理的 CIKs, 增强了对肿瘤细胞的特异性杀伤作用;
3. 对实验组中荷瘤小鼠肿瘤细胞具有明显的抑制作用, 显著延长实验组荷瘤小鼠的总体存活时间;
4. 本发明的肿瘤抗原表位肽没有 MHC 人群限制性, 不需要对抗原进行加工处理。

[0018]

附图说明

[0019] 图 1. 为说明 DCs 细胞核效应细胞相互作用的示意图;

图 2. 用抗原特异的表位肽和 Ii-Key 融合后结合 DC 细胞的示意图;

图 3. 显示了 SOCS 结构特征, 其中 (a) Schematic representation of the general domain architecture of CIS and SOCS1-7, color coordinated with panels (b) and (c). (b) Structure of SOCS2 in complex with Elongin b(green) and Elongin c (orange). (c) Structure of SOCS4 in complex with Elongin b and c.;

图 4. 显示了 SOCS 蛋白功能;

图 5. 为本发明流式细胞仪放大 40 倍镜和 100 倍镜分析培养三天的 DCs 状态示意图;

图 6. 为本发明荧光显微镜检测 GH03 能够和 DCs 结合的示意图；

图 7. 为本发明重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染 DCs 后用 Real-time RT-PCR 分析 PD-L1 mRNA 水平；

图 8. 为本发明显微镜观察 CIKs 增殖成熟的情况示意图；

图 9. 为本发明流式细胞仪分析 CIK 的表面分子 CD3、CD4、CD8 和 CD56 的情况；

图 10. 为本发明 CIKs 及共培养的 DCs-CIKs 表型分析示意图；

图 11. 为本发明用 LDH 释放实验分析 DC-CIKs 对靶细胞 (TC-1) 的杀伤活性示意图。

具体实施方式

[0020] 为了更好地说明本发明, 现结合实施例与附图作进一步说明。

[0021] 本发明为一种强化细胞因子诱导的杀伤细胞功能的方法。

[0022] 步骤一: 生物信息学分析肿瘤抗原表位

本发明一个较优实施方式中, 通过生物信息学分析方法分析肿瘤的抗原表位, 而具体用的肿瘤模型为乳腺癌模型, 但不局限于乳腺癌模型。生物信息学分析方法分析的乳腺癌模型中, 该乳腺癌模型的细胞系为 MCH-7, MCF-7 的细胞中含有高表达的 HER2。经过生物信息学分析, 获得 HER2 的抗原表位为 GVGSPYVSRLGICL, 将所获得的 HER2 的抗原表位命名为肿瘤高表达抗原表位 1。

[0023] 步骤二: 肿瘤抗原表位与 Ii-Key 融合成 Ii-Key- 抗原表位多肽

本发明一个较优实施方式中, 肿瘤抗原表位肽与 Ii-Key 融合成 Ii-Key- 抗原表位多肽的方法是, 通过生物信息学分析方法获得的肿瘤高表达抗原表位 1 与 Ii-Key 融合, 融合物的系列号为 Ac-LRMK-GVGSPYVSRLGICL, 命名为肿瘤高表达抗原表位肽 1, 即 Ii-Key- 抗原表位多肽, 标号为 GH03。

[0024] 步骤三: 树突状细胞 (英文为: dendritic cell, 简称 DCs) 的培养

1. DCs 的培养

本发明一种较优的实施方式中, DCs 的培养是采用患者体外周血的 DCs 来培养, 具体如下:

(1). 从患者中采取外周血 80 毫升;

(2). 用淋巴细胞分离液将 (1) 中采取来的患者人体的外周血进行离心分离, 通过分离, 获得外周血单核细胞 (英文全称为: peripheral blood mononuclear cells, 英文简称为: PBMCs);

(3). 将 (2) 中获得的 PBMCs 进行细胞计数;

(4). 将 (3) 中已经进行细胞计数的 PBMCs, 按照 10^6 细胞 /mL 铺在细胞培养瓶中进行培养;

(5). 把 (4) 中置于细胞培养瓶中的细胞进行 4 个小时的培养, 培养经过 4 个小时时开始除去细胞培养瓶内的悬浮细胞;

(6). 将 (5) 中去除掉细胞瓶内的悬浮细胞后残留在细胞培养瓶内的细胞, 用含 rhuGM-CSF (20ng/ml, PeproTech) 和 rhuIL-4 (20 ng/ml, PeproTech) 的完全培养液进行培养;

(7). 待 (6) 中培养的细胞经过 2 天 (48 小时) 的培养后, 弃掉培养液的上清液, 并用新

鲜的含 rhuGM-CSF 和 rhuIL-4 的培养基代替；

(8). 待(7)中用新鲜的含 rhuGM-CSF 和 rhuIL-4 的培养基培养的细胞,当培养经历 24 小时,将没有粘附的粒细胞去掉；

(9). 将经过(8)残留下的细胞,也即培养了 3 天的 DCs,用流式细胞仪分析其表型。如图 5 所示,从图中可观察到,DCs 培养的第三天,DCs 贴壁成团,部分呈半悬浮状态,其效果与 TNF- α 处理后的呈半悬浮状态相同。

[0025] 2. DCs 表型检测

本发明一种较优实施方式中,需要对培养的 DCs 表型进行检测,具体的 DCs 表型检测有两种,一是经过腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染和在含 LPS 的新鲜培养液进行刺激 24 小时后进行流式检测,二是经过腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染和在不含 LPS 的新鲜培养液进行刺激 24 小时后进行流式检测。检测时,先将细胞浓度调为 2×10^5 /mL,每个样品中先后加入 $1 \mu\text{L}$ 的 FITC 标记的小鼠 CD80、CD83、CD86 单抗,并设立空白(同型抗体)对照,在 4°C 中避光反应 30 分钟,经洗涤后上流式细胞仪检测。流式细胞仪具体操作如下所述：

- (1). DCs 培养 7 天后,以 800r/min 离心速度离心 7 分钟,弃掉上清液；
- (2). 用含 2% 牛血清的 PBS 洗液 1mL 洗涤已经弃掉上清液的 DCs,洗涤 2 次；
- (3). 先后加入标记抗体(CD80、CD83、CD86)各 $1 \mu\text{L}$,至 DCs 终浓度为 5mg/L;阴性对照组中加入 FITC 标记羊抗鼠 IgG,终浓度为 5mg/L；
- (4). 在 4°C 避光环境中,轻度震荡 30 min,用 1 mL PBS 洗涤 2 次,弃掉上清液；
- (5). 加入 $400 \mu\text{L}$ 1% 多聚甲醛进行固定洗涤好的 DCs；
- (6). 将固定好 DCs 的 4°C 暗处保存,上机分析。

[0026] 3. GH03 锚定 DCs 及其鉴定

在本发明的一个优选实施方式中, GH03 锚定 DCs 及其锚定结果鉴定如下描述：

(1). 取步骤三中培养的 DCs,在其培养至用新鲜的含 rhuGM-CSF 和 rhuIL-4 的培养基代替培养时,加入浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 GH03,孵育 1 天时间。

[0027] (2). GH03 锚定 DCs 的鉴定。在用新鲜的含 rhuGM-CSF 和 rhuIL-4 的培养基代替培养时,加入浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 GH03 的步骤中,将“浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 GH03”换成“用荧光标记的浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 GH03”,并且用没有标记的 GH03 和有荧光标记的 HbsAg 的表位肽 R837 作为对照,对这三个样品进行 1 天时间的孵育,然后在荧光显微镜下观察,实验结果显示,荧光标记的 GH03 与 DCs 培养后,出现荧光,说明 GH03 能够锚定在 DCs 的表面,如图 6 所示,而如果用 MHC-II 抗体先对 DCs 封闭,再加入荧光标记的 GH03,在显微镜下没有观察到 DCs 带有荧光,表明 GH03 确实结合在 DCs 表面的 MHC-II 分子上。

[0028] 步骤四:重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 和重组腺病毒 rAd-RNAi-mSOCS1 的制备、鉴定和感染 DCs

1. 重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 和其变体重组腺病毒 rAd-RNAi-mSOCS1 的制备
本发明一个较优的实施方式中,

将重组表达载体 RNAi-SOCS1-pShuttle 和 RNAi-mSOCS1-pShuttle 分别用 PI-Sce I 和 I-Ceu I (购自 BD Clontech 公司) 进行双酶切,回收酶切产物,用 Takara ligation Mixture 分别连入 Adeno-X 表达系统(购自 BD Clontech 公司) 中的 Adeno-X 病毒 DNA 中,置 PCR 仪中 16°C 连接过夜。将连接产物用 Sma I 酶切消化(Sma I 酶切位点位于

PI-Sce I 与 I-Ceu I 之间),以去除未能与 Adeno-X 病毒 DNA 连接的基因片段。再次回收酶切产物,将 shRNA-SOCS1 与 Adeno-X 病毒 DNA 正确连接的重组腺病毒载体命名为 pAdeno-X-RNAi-SOCS1,将 pshRNA-mSOCS1 与 Adeno-X 病毒 DNA 正确连接的重组腺病毒载体命名为 Adeno-X-RNAi-mSOCS1。

[0029] 用重组腺病毒载体 pAdeno-X-RNAi-SOCS1 和 pAdeno-X-RNAi-mSOCS1 分别转化大肠杆菌 DH5 α , Amp 抗性平板挑选阳性克隆。分别提取重组腺病毒载体 pAdeno-X-RNAi-SOCS1 和 pAdeno-X-RNAi-mSOCS1 的 DNA,将所得的重组质粒分别命名为 pAdeno-X-RNAi-SOCS1 和 pAdeno-X-RNAi-mSOCS1。对重组质粒 pAdeno-X-RNAi-SOCS1 和 pAdeno-X-RNAi-mSOCS1 进行 PCR 扩增、酶切鉴定,将酶切鉴定正确的重组质粒送上海博亚生物技术有限公司测序。Pac I 酶切 pAdeno-X-RNAi-SOCS1 和 pAdeno-X-RNAi-mSOCS1 使之线性化。

[0030] 用线性化后的重组质粒 pAdeno-X-RNAi-SOCS1 和 pAdeno-X-RNAi-mSOCS1 分别转染 HEK293 细胞,培养转染后的细胞至细胞出现明显的病态效应 (cytopathic effect, CPE)。从 293T 细胞得到了重组腺病毒 Ad-EGFP。随着培养的时间的延长,分泌到培养液中的腺病毒再感染新的 293T 细胞,但后期会出现特有的细胞病变反应 (CPE)。

[0031] 重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 和 rAd-RNAi-mSOCS1 的制备,具体过程如下:

(1) 用 PBS 洗涤上述出现明显病态效应的 HEK293 细胞 2 次,直接将 HEK293 细胞吹打下来 (不用胰酶),1500rpm 室温下离心 5min;500 μ l PBS 重悬细胞;

(2) -20 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 水浴反复冻融细胞 3 次,每次融化后短时间混匀细胞悬液;

(3) 12000rpm 室温离心 10min,收集含病毒的上清,加入 10% 甘油,过滤除菌后作为重组病毒原液置 -70 $^{\circ}$ C 冻存备用;

(4) 培养 HEK293 细胞,待细胞铺满瓶底 50~70% 时,加入步骤 (3) 制备的病毒原液 250 μ l,继续培养;

(5) 观察细胞的病态效应,待 50% 以上的细胞从培养板底浮起时,重复上述 (1)-(3) 步骤制备重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 和 rAd-RNAi-mSOCS1,-20 $^{\circ}$ C 存放,以备测定病毒滴度或进一步制备高滴度病毒用。

[0032] 2. 重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 和重组腺病毒 rAd-RNAi-mSOCS1 的鉴定

本发明的一个较优实施方式中,重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 和 rAd-RNAi-mSOCS1 的鉴定为,用超高速离心机回收上述制备的重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 和重组腺病毒 rAd-RNAi-mSOCS1,然后用腺病毒滴定试剂盒测定重组腺病毒的滴度。结果表明,重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 的滴度为 2.8×10^7 pfu/ml,重组腺病毒 rAd-RNAi-mSOCS1 的滴度为 2.5×10^7 pfu/ml。

[0033] 3. 重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染 GH03 锚定的 DCs

(1). 本发明一个较优实施方式中,用步骤四制备的且经过鉴定的重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 去感染 DCs,当感染复数 (MOI) 为 50 时,用 SOCS1 的突变体重组腺病毒 rAd-siD-mSOCS1 收集 DCs。

[0034] (2). 本发明一个较优实施方式中,用步骤四制备的且经过鉴定的重组腺病毒 rAd-siD-mSOCS1 收集 DCs 后,用 Real-time RT-PCR 分析收集来的 DCs 表达的 PD-L1。结果表明重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染 DCs 后,PD-L1 的表达降低,具体如图 7 所示。从图中

可知,DCs 和 CIKs 共同培养体系中,DCs 和 CIKs 相互作用诱导的 PD-1 和 PD-L1 互作减弱,有利于 DCs 强化 CIKs 的功能。

[0035] 步骤五:经过重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染的树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞(英文名为 cytokine-induced killers,英文简称为 CIKs)共同培养

本发明的一个较优实施方式中,用经过重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染的树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞共同培养时,需要先制备和培养细胞因子诱导的杀伤细胞,而细胞因子诱导的杀伤细胞的培养选用健康人的外周血作为 CIKS 的培养基础,具体培养如下:

1. 外周血单核细胞(PBMCs)的分离与培养

(1). 采健康人体外周血 50mL,柠檬酸钠抗凝;

(2). 从健康人中采取静脉血 50mL;

(3). 从(1)中取经过加入柠檬酸钠抗凝的外周血 50mL,置于离心管中,并缓慢加入 Ficoll 淋巴细胞分离液,从(2)中取静脉血,在距离分层液界面上 1 厘米处沿离心管内壁缓慢添加到 Ficoll 淋巴细胞分离液上,切勿晃动混匀,注意加入的用于稀释的静脉血液柱与 Ficoll 淋巴细胞分离液液柱高之比为 1.5:1,且两者液柱总高不能超过试管的 2/3,待离心;

(4). 将经过(3)处理后离心管置于水平离心机内,在室温中以 2000r/min 的离心速度离心 20 分钟;

(5). 经过 20 分钟离心后,缓慢取出离心管,置于水平放置的离心管架上,此时可以观察到离心管分为 4 层:① 上层为血浆、大部分血小板和血液稀释液;② 下层为粒细胞和红细胞;③ 中层为 Ficoll 淋巴细胞分离液;④ Ficoll 淋巴细胞分离液与血浆交界部位的灰白色层为单个核细胞层。此时,用毛细吸管轻轻插入灰白色层中,沿离心管内壁轻轻吸出灰白色单核细胞,转移入另一只洁净无菌的离心管中;

(6). 将(5)所得的灰白色单核细胞悬液用 1 倍体积的 PBS 洗涤 1 次。具体操作为:往盛装灰白色单核细胞的离心管中加入 1 倍体积的 PBS,置于离心机中,以 1000r/min 的离心速度,离心 5 分钟,离心结束后去掉上层清液;

(7). 继续洗涤。往去掉上层清液的(6)中离心管中加入 2 倍体积的 PBS,观察离心管中的悬浮细胞,用手工计数板计数,计数结束,开始以 1000r/min 的离心速度,离心 5 分钟,取出离心管,去掉上层清液,获取离心管底层的淋巴细胞;

(8). 用无血清(FCS)培养液培养上步(7)中获得的淋巴细胞,获得终浓度为 5×10^6 / mL 的悬浮细胞。

[0036] (9). 对(8)中获得的悬浮细胞用台盼蓝染液进行细胞活性检查。具体操作方式为:取 2 滴细胞悬液加 1 滴 2% 台盼蓝染液,5 分钟后用高倍显微镜镜检,死细胞会染成蓝色,活细胞不着色,计数 200 个细胞,计算活细胞百分率,一般细胞活性应在 95% 以上。

[0037] 2. CIKs 的培养

本发明一个较优实施方式中,CIKs 的培养为,取上述经过细胞活性检验合格的单核细胞悬浮液,以 5×10^6 / mL 加到 75cm^3 的洁净的细胞培养瓶中,并同时加入 IL-1 α 、IFN- γ 和抗鼠 CD3 抗体各 10 μ L/瓶,经过 24 小时的培养,补加 IL-2 10 μ L/瓶,继续培养,每 2 天添加与以前体积等量的培养基,第 10 天用 CD3-PE, CD56-FITC, CD4-FITC, CD8-FITC 抗体流

式细胞仪检测其表面标记。

[0038] 3. CIKs 分离后增殖与观察

本发明一个较优实施方式中,通过显微镜观察 CIKs 增殖成熟的情况,观察结果如图 8 所示,从图示结果可知,CIKs 加入刺激因子培养 24~48 小时,开始出现小的克隆团,72 小时达到高峰。在观察中,如果出现大量悬浮细胞克隆团,需要用滴管吹散,并补充适量的培养液。每天观察 2 次细胞生长情况,根据细胞克隆团生长情况和培养液颜色补充培养液,出现大量悬浮细胞克隆团时,滴管吹散,添加培养液或者培养液颜色变淡时也要添加适量的培养液。整个过程只加培养液,不进行培养液的更换,随着细胞数量的扩增,传代分瓶培养。

[0039] 4. DC-CIKs 共同培养

本发明一个优选实施方式中,DC-CIKs 共同培养系为,按照步骤三和步骤四的 DCs 培养步骤,培养至用重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 (MOI :50) 在 37℃ 感染 DCs,感染时间为 24 小时,随后与同期按照步骤五培养的 CIKs 按照 DCs :CIKs 为 1:50 的比例,将 CIKs 加入到 DCs 培养液中,组成 DC-CIKs 共同培养体系,在培养瓶中继续共同培养 5 天。

[0040] 5. 流式细胞学检测 DCs 和 CIKs 的表型

本发明的一个较优实施方式中,DCs 和 CIKs 培养过程中,需要进行表型检测,采用流式细胞学检测 DCs 和 CIKs 的表型。在 DCs、CIKs 培养第 3 天到第 8 天这个时间段内,收集相应细胞,进行处理后,使用流式细胞仪技术检测不成熟和成熟的 DCs、CIKs 的表型。

[0041] (1). DCs 检测

(a). 在培养了 3 天至 8 天时间段内的 DCs 中,收集各个时间段内的 DCs,每次收集到的 DCs 立即置于事先已作好相应收集时间标记的离心管中,加入适量的 PBS 进行洗涤。洗涤时按照 1000r/min 的离心速度,离心 10 分钟;

(b). 然后将洗涤后的 DCs 收集,按照每管 10^5 个细胞分装在 5 测定管,每个管中按照先后顺序加入抗小鼠的单抗 CD80 (FITC)、CD83 (FITC)、CD86 (PE)。同型对照组为鼠 IgG,在室温中孵育 30 分钟;

(c). 用 PBS 洗涤 1 次,按照 1000r/min 的离心速度,离心 10 分钟,加入加入 500 μ L PBS 上流式细胞仪检测分析。利用软件分析数据,如图 9 所示。

[0042] (2). CIKs 检测

(a). 在培养了 3 天至 8 天时间段内的 CIKs 中,收集各个时间段内的 CIKs,每次收集到的 CIKs 立即置于事先已作好相应收集时间标记的离心管中,加入适量的 PBS 进行洗涤。洗涤时按照 1000r/min 的离心速度,离心 10 分钟;

(b). 然后将洗涤后的 CIKs 收集,按照每管 10^5 个细胞分装在 5 测定管,每个管中按照先后顺序加入抗小鼠的单抗 CD3 (FITC)/CD4 (PE)、CD3 (FITC)/CD8 (PE)、CD3 (FITC)/CD56 (PE)。同型对照组为鼠 IgG,在室温中孵育 30 分钟;

(c). 用 PBS 洗涤 1 次,按照 1000r/min 的离心速度,离心 10 分钟,加入 500 μ L PBS 上流式细胞仪检测分析。利用软件分析数据,如图 10 所示。

[0043] 结果表明,用一组细胞因子可以在体外培养 DCs。DCs 成熟后其表面标记分子 CD83 和 CD80 显著增加,而 CD14 则显著减少,但 CD40 和 CD86 变化不明显。

[0044] 验证 .DC-CIKs 在体内和体外强化对靶细胞的杀伤作用

本发明一个较优实施方式中,为证明重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染 GH03 锚定的 DCs

能够强化 CIKs 对靶细胞的杀伤,实施中优选乳腺癌细胞系 MCF-7 为研究对象。

[0045] 按照步骤三培养 DCs 到第 3 天时,加入浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ 的 GH03,以 HbsAg 的 R187 (aa183-191) (FLLTRILTI) 作为对照,加入 R187 多肽的浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$,24 小时后,用重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 (MOI=50),刺激 DCs 成熟,然后与单独培养 5 天的 CIKs 混合,混合比例为 DCs:CIKs=1:50,继续培养 5 天,然后以不同比例的 DC-CIKs 和靶细胞 MCF-7 细胞混合培养,混合比例为 30:1 ;50:1 ;和 100:1 ;培养 24 小时后,用试剂盒检测乳酸脱氢酶(英文简称为 LDH)的活性。

[0046] 在检测过程中,需要设置培养孔中只有靶细胞没有效应细胞作为空白对照,以验证自发的 LDH 的活性。培养孔中加 Triton X-100 (1% 质量百分含量) 表示最大释放活性。乳酸脱氢酶活性的计算公式为: $[(\text{LDH}_{\text{test}} - \text{LDH}_{\text{spont}}) / (\text{LDH}_{\text{total}} - \text{LDH}_{\text{spont}})] \times 100$ (Shan, B.E., J. S. Hao, Q. X. Li, and M. Tagawa. Antitumor Activity and Immune Enhancement of Murine Interleukin-23 Expressed in Murine Colon Carcinoma Cells Cellular & Molecular Immunology. 2006 ;3(1), 49-57)。公式中 LDH_{test}、LDH_{spont} 和 LDH_{total} 分别代表试验孔、自发释放孔和最大释放孔。实验中设置三个复孔,具体结果如表 1 所示。从表 1 中可看出,重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染 GH03 锚定的 DCs 激活的 CIKs 对靶细胞 MCF-7 的杀伤活性最强,图 11 也显示同样的结果。

[0047] 具体实施例 1

(1). 实验鼠情况 :BALB/C (null)裸鼠,周龄为 3-4 周,购自广东省实验动物中心,在无特殊病原体的笼子里喂养 ;

(2). 将培养的 MCF-7 细胞(ATCC)用 PBS 洗 3 次后,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$,每只小鼠皮下接种 $200 \mu\text{L}$ 上述 MCF-7 细胞,接种 8 天后,用肉眼观察到已形成肿瘤。

[0048] (3). 将已成瘤的小鼠随机分成 PBS、DC-CIKs (NO GH03)、DC-CIKs (GH03) 细胞组,每组 10 只小鼠,静脉注射细胞总数为 2×10^6 ,隔天注射,连续 2 次用同样的方法再注射细胞总数为 2×10^6 ,观察小鼠的肿瘤生长情况。

[0049] (4). 每两天用游标卡尺测量肿瘤的长和宽,计算肿瘤的体积大小(肿瘤体积的大小按照宽 $2 \times$ 长 /2 计算)。当肿瘤大小达到 2500mm^3 时,断颈处死小鼠。小鼠的存活率结果见表 1 所示。

[0050] 结果表明 :PBS 组小鼠在注射后第 14 天内肿瘤大小达到 2500mm^3 ;当用免疫细胞治疗后,肿瘤的生长明显减慢,表明免疫细胞能够抑制肿瘤的生长。与 DC-CIKs (NO GH03) 组比较,DC-CIKs (GH03) 组小鼠肿瘤明显被抑制,其中有 30% 完全消退,这也证实了我们的猜想,与体外的 DC-CIKs (GH03) 对肿瘤细胞的杀伤的结果符合。这表明重组腺病毒 rAd-RNAi-SOCS1 感染 GH03 锚定的 DCs,与 CIKs 共培养过程中的相互作用能够强化 CIKs 对肿瘤的杀伤功能。

[0051] 表 1 用小鼠实验后小鼠存活时间小鼠后的存活时间情况

存活时间	DC-CIKs (GH03)	DC-CIKs (NOGH03)	PBS
Day28	100%	100%	0%
Day30	100%	100%	0%
Day32	100%	100%	0%
Day34	100%	100%	0%
Day36	100%	90%	0%
Day40	100%	90%	0%

Day42	100%	90%	0%
Day44	100%	80%	0%
Day46	100%	80%	0%
Day48	100%	80%	0%
Day50	100%	70%	0%
Day52	100%	70%	0%
Day54	100%	60%	0%
Day56	100%	60%	0%
Day58	100%	60%	0%
Day60	100%	50%	0%
Day62	100%	50%	0%

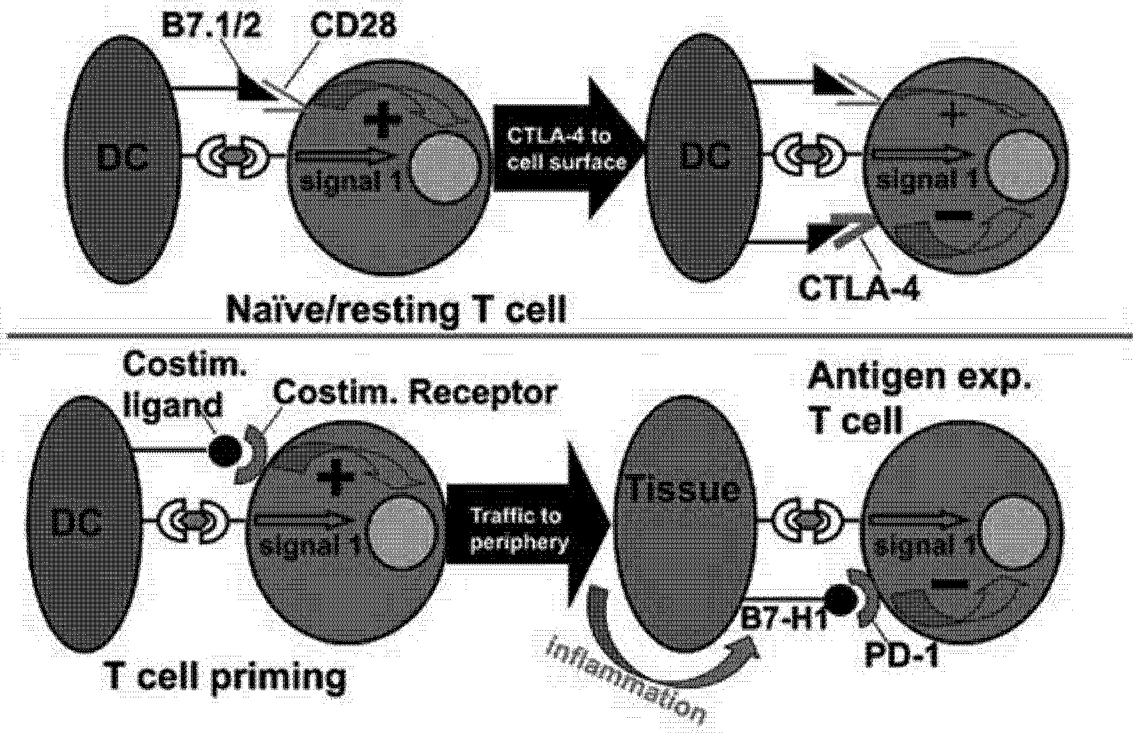


图 1

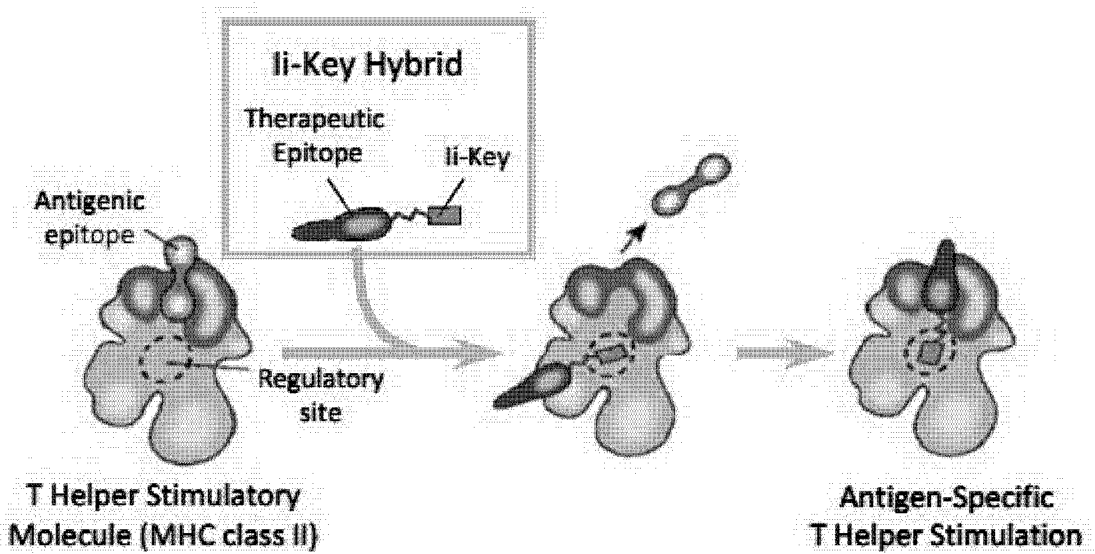


图 2

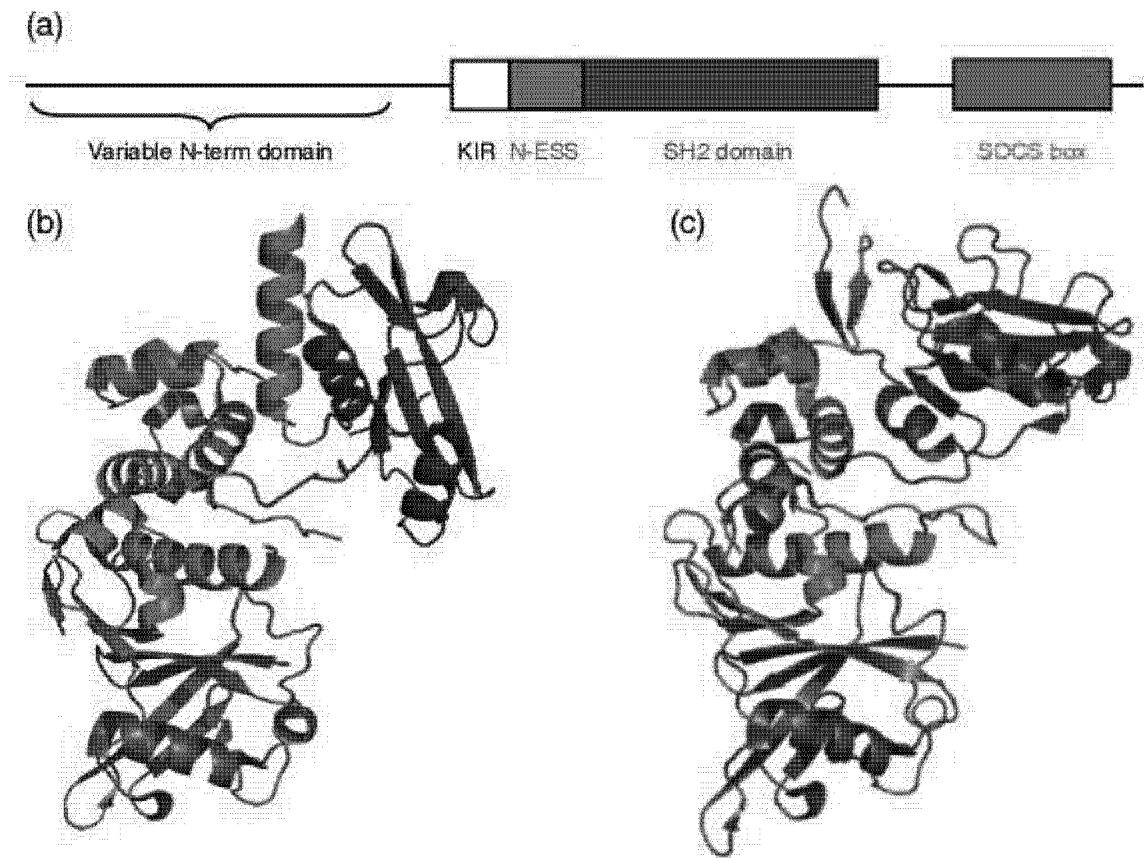


图 3

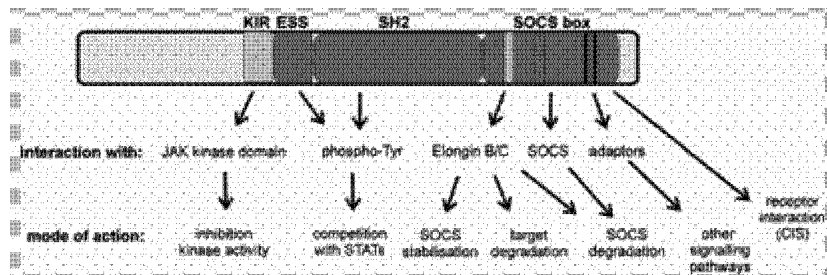


图 4

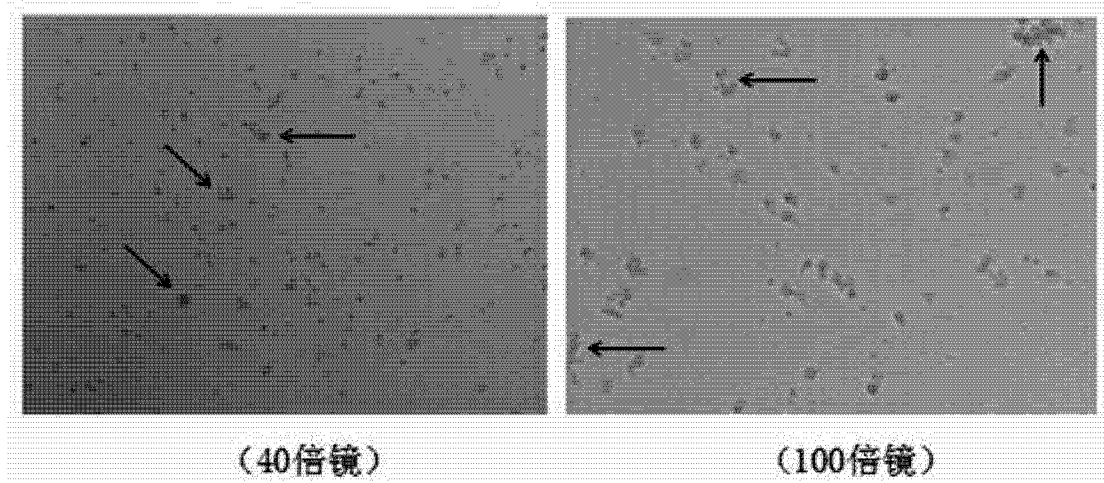


图 5

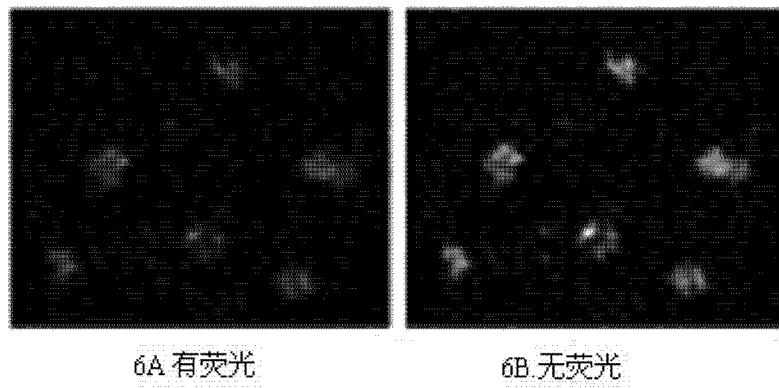


图 6

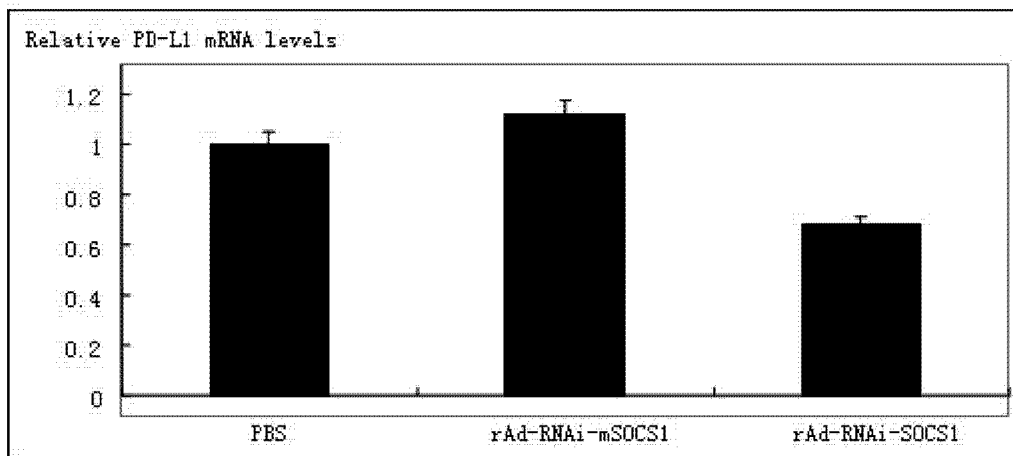


图 7

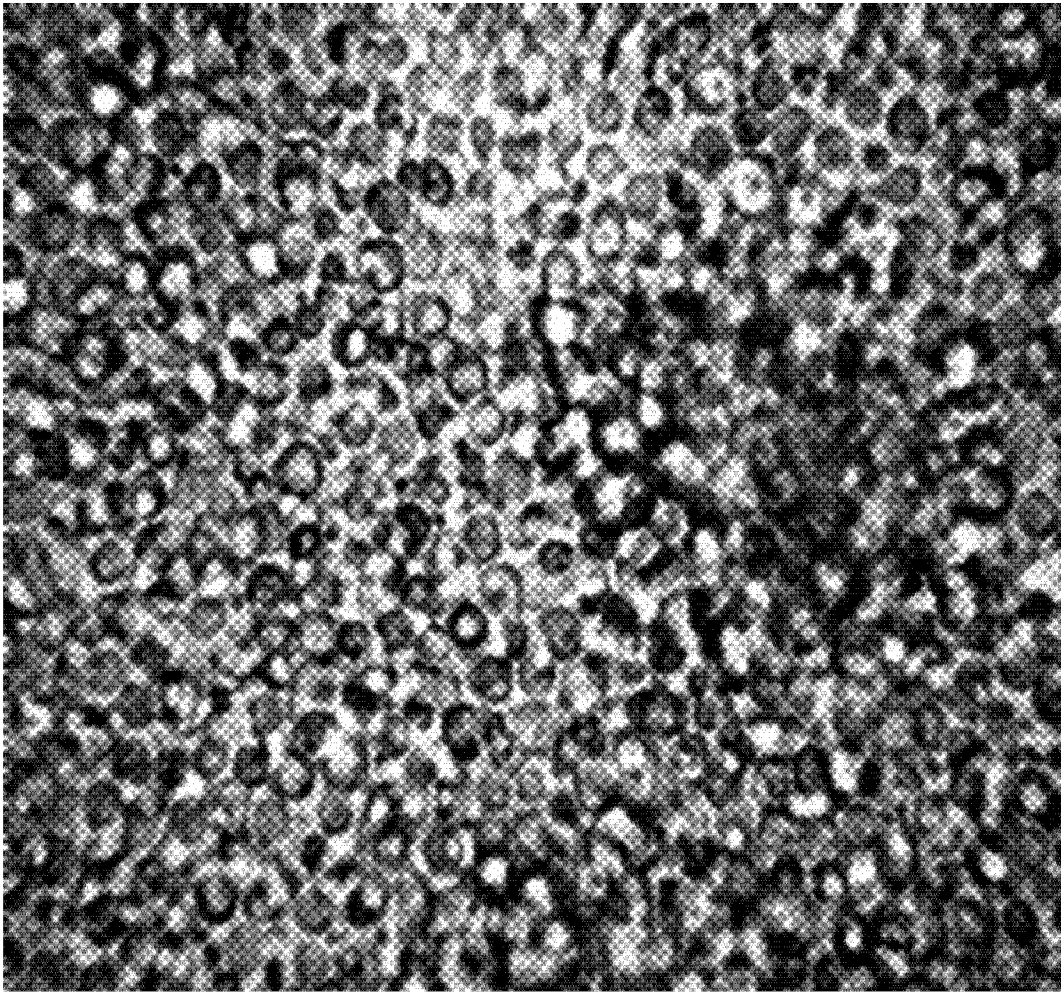


图 8

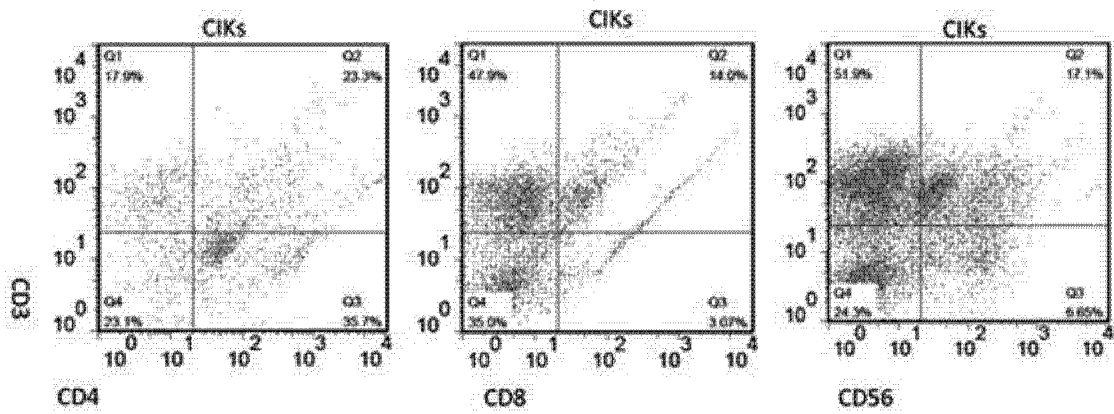


图 9

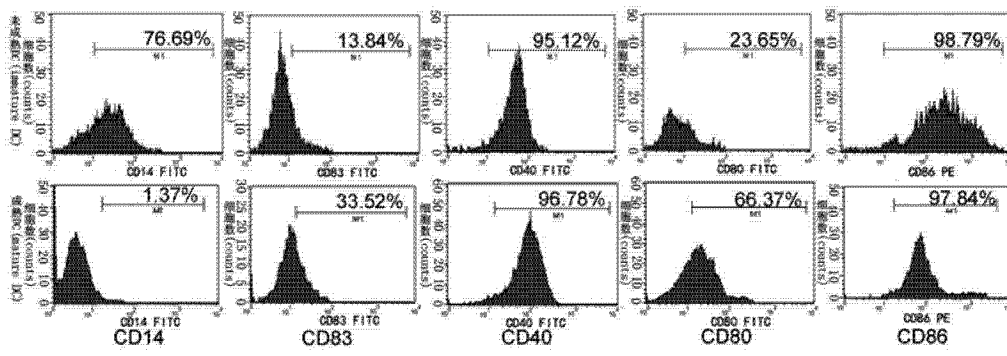


图 10

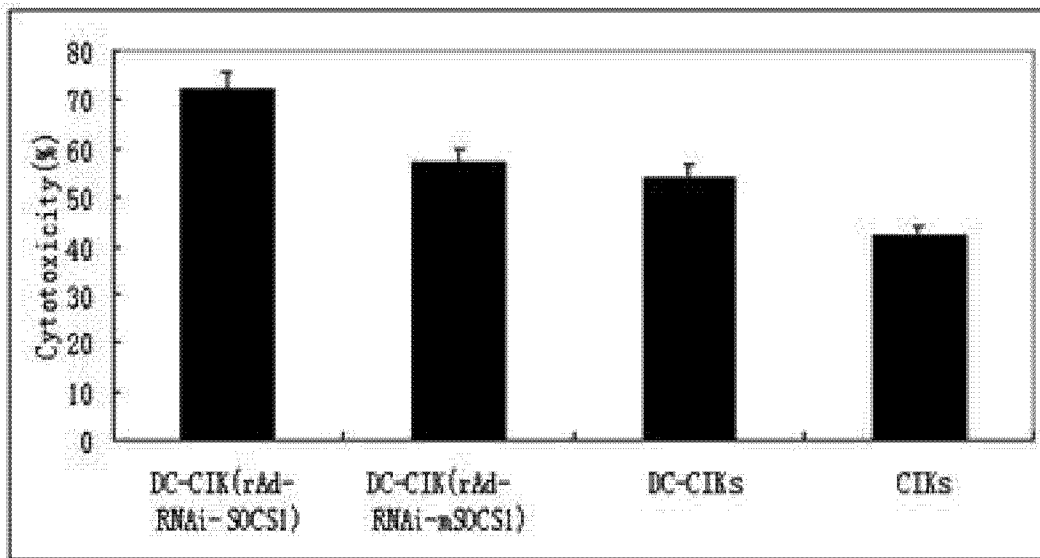


图 11