



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104830790 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 12

(21) 申请号 201510225533. 4

A61K 35/17(2015. 01)

(22) 申请日 2015. 05. 05

A61P 35/00(2006. 01)

(71) 申请人 杨光华

地址 200120 上海市浦东新区南六公路 399
弄 63 号楼 1501 室

(72) 发明人 杨光华 李财新

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201

代理人 李志东

(51) Int. Cl.

C12N 5/10(2006. 01)

C12N 15/87(2006. 01)

C12N 5/0783(2010. 01)

A61K 39/00(2006. 01)

权利要求书3页 说明书10页
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

基于 HM1. 24 抗原的 DC 细胞、靶向性免疫细胞群及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了 DC 细胞、靶向性免疫细胞群及其制备方法和用途,其中制备 DC 细胞的方法包括:将单核细胞进行第一诱导分化培养,以便获得未成熟的 DC 细胞;利用 HM1. 24 抗原 mRNA 转染所述未成熟的 DC 细胞,以便获得经过转染的未成熟 DC 细胞;以及将所述经过转染的未成熟 DC 细胞进行第二诱导分化培养,以便获得成熟的 DC 细胞,其中,所述单核细胞是从样本的外周血单个核细胞中分离获得的。利用该发明能够安全高效地制备 DC 细胞,且本发明的方法成本低、效率高、且能够有效地解决细胞毒性问题,能够有效用于免疫细胞治疗或用于刺激同样患者来源的淋巴细胞产生富含大量 CTL 细胞的靶向性免疫细胞群,进而用于肿瘤免疫治疗后效果更好。

1. 一种制备 DC 细胞的方法,其特征在于,包括以下步骤:
将单核细胞进行第一诱导分化培养,以便获得未成熟的 DC 细胞;
利用 HM1.24 抗原 mRNA 转染所述未成熟的 DC 细胞,以便获得经过转染的未成熟 DC 细胞;以及
将所述经过转染的未成熟 DC 细胞进行第二诱导分化培养,以便获得成熟的 DC 细胞,
其中,所述单核细胞是从样本的外周血单个核细胞中分离获得的。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述 HM1.24 抗原 mRNA 是通过以下步骤获得的:
制备 HM1.24 抗原 cDNA 质粒,所述 HM1.24 抗原 cDNA 的核酸序列如 SEQ ID NO:1 所示;
将所述 HM1.24 抗原 cDNA 质粒进行线性化处理,以便获得经过线性化处理的 HM1.24 抗原 cDNA 质粒;以及
将所述经过线性化处理的 HM1.24 抗原 cDNA 质粒进行体外转录,以便获得 HM1.24 抗原 mRNA。
3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,以 pcDNA3.1 载体为骨架载体,制备所述 HM1.24 抗原 cDNA 质粒,
任选地,所述 pcDNA3.1 载体具有 BamHI、XbaI 和 Bst1107I 酶切位点,
任选地,基于酶切位点 Bst1107I 进行所述线性化处理,
任选地,利用 T7Message Machine 试剂盒进行所述体外转录,
任选地,在进行所述体外转录后,进一步包括除杂纯化的步骤。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,利用电转或 PEI 法进行所述转染,
任选地,利用 PEI 法进行所述转染,其中,PEI 与所述 HM1.24 抗原 mRNA 的混合质量比为 3:1,
任选地,利用 DC 培养基进行所述第一诱导分化培养和所述第二诱导分化培养,
任选地,所述 DC 培养基包含:
无血清细胞培养基;
100 ~ 1000U/ml 的 CTL4 因子;以及
2 体积% ~ 10 体积%的自体血清,
其中,所述血清来源于所述样本,
任选地,所述无血清培养基为 Takara 的无血清培养基,
任选地,所述无血清培养基中添加有 0.5 体积% ~ 5 体积%的抗生素,优选庆大霉素,
任选地,进行所述第一诱导分化培养 4-5 天,每 2-3 天半换液一次,
任选地,进行所述第二诱导分化培养 4-5 天,每 2-3 天半换液一次。
5. 一种制备靶向性免疫细胞群的方法,其特征在于,包括以下步骤:
提供样本的外周血单个核细胞;
将所述样本的外周血单个核细胞分离为淋巴细胞和单核细胞;
将所述淋巴细胞进行活化培养,以便获得经过活化培养的淋巴细胞;
将单核细胞进行第一诱导分化培养,以便获得未成熟的 DC 细胞;
利用 HM1.24 抗原 mRNA 转染所述未成熟的 DC 细胞,以便获得经过转染的未成熟 DC 细胞;

将所述经过转染的未成熟 DC 细胞进行第二诱导分化培养,以便获得成熟的 DC 细胞;以及

将所述成熟的 DC 细胞与所述经过活化培养的淋巴细胞进行混合培养,以便获得靶向性免疫细胞群。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,所述 HM1.24 抗原 mRNA 是通过以下步骤获得的:

制备 HM1.24 抗原 cDNA 质粒,所述 HM1.24 抗原 cDNA 的核酸序列如 SEQ ID NO:1 所示;将所述 HM1.24 抗原 cDNA 质粒进行线性化处理,以便获得经过线性化处理的 HM1.24 抗原 cDNA 质粒;以及

将所述经过线性化处理的 HM1.24 抗原 cDNA 质粒进行体外转录,以便获得 HM1.24 抗原 mRNA,

任选地,以 pcDNA3.1 载体为骨架载体,制备所述 HM1.24 抗原 cDNA 质粒,

任选地,所述 pcDNA3.1 载体具有 BamHI、XbaI 和 Bst1107I 酶切位点,

任选地,基于酶切位点 Bst1107I 进行所述线性化处理,

任选地,利用 T7Message Machine 试剂盒进行所述体外转录,

任选地,在进行所述体外转录后,进一步包括除杂纯化的步骤。

7. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,利用电转或 PEI 法进行所述转染,

任选地,利用 PEI 法进行所述转染,其中,PEI 与所述 HM1.24 抗原 mRNA 的混合质量比为 3:1,

任选地,所述活化培养包括:

利用 CTL1 细胞培养基对所述淋巴细胞进行第一活化培养 24 小时;

利用 CTL2 细胞培养基对经过第一活化培养的淋巴细胞进行第二活化培养 2-3 天;以及利用 CTL3 细胞培养基对经过第二活化培养的淋巴细胞进行第三活化培养 4-5 天,每隔 2-3 天等量补液一次,

任选地,所述 CTL1 细胞培养基包含:

无血清细胞培养基;

100 ~ 1000U/ml 的 CTL1 因子;以及

2 体积% ~ 10 体积%的自体血清,

所述 CTL2 细胞培养基包含:

无血清细胞培养基;

100 ~ 1000U/ml 的 CTL2 因子;以及

2 体积% ~ 10 体积%的自体血清,

所述 CTL3 细胞培养基包含:

无血清细胞培养基;

100 ~ 1000U/ml 的 CTL3 因子;以及

2 体积% ~ 10 体积%的自体血清,

其中,所述血清来源于所述样本,

任选地,所述无血清培养基为 Takara 的无血清培养基,

任选地,所述无血清培养基中添加有 0.5 体积% ~ 5 体积%的抗生素,优选庆大霉素。

8. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,利用 DC 培养基进行所述第一诱导分化培养和所述第二诱导分化培养,

任选地,所述 DC 培养基包含:

无血清细胞培养基;

100 ~ 1000U/ml 的 CTL4 因子;以及

2 体积%~ 10 体积%的自体血清,其中,所述血清来源于所述样本,

任选地,所述无血清培养基为 Takara 的无血清培养基,

任选地,所述无血清培养基中添加有 0.5 体积%~ 5 体积%的抗生素,优选庆大霉素,

任选地,进行所述第一诱导分化培养 4-5 天,每 2-3 天半换液一次,

任选地,进行所述第二诱导分化培养 4-5 天,每 2-3 天半换液一次,

任选地,利用 CTL3 细胞培养基进行所述混合培养 6-8 天,优选 7 天,

任选地,所述 CTL3 细胞培养基包含:

无血清细胞培养基;

100 ~ 1000U/ml 的 CTL3 因子;以及

2 体积%~ 10 体积%的自体血清,

其中,所述血清来源于所述样本,

任选地,所述无血清培养基为 Takara 的无血清培养基,

任选地,所述无血清培养基中添加有 0.5 体积%~ 5 体积%的抗生素,优选庆大霉素,

任选地,按照所述成熟的 DC 细胞与所述经过活化培养的淋巴细胞的体积比为 1:20 进行所述混合培养。

9. 一种靶向性免疫细胞群,其是通过权利要求 5-8 任一项所述的方法制备获得的。

10. 权利要求 9 所述的靶向性免疫细胞群,以及利用权利要求 1-4 任一项所述的制备 DC 细胞的方法制备获得的 DC 细胞在制备药物中的用途,所述药物用于抑制肿瘤转移、扩散、复发,

任选地,所述肿瘤为 HM1.24 抗原阳性肿瘤,优选多发性骨髓瘤。

基于 HM1.24 抗原的 DC 细胞、靶向性免疫细胞群及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地,本发明涉及 DC 细胞、靶向性免疫细胞群及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤是人类主要的致死性疾病类型,死亡率居高不下。卫生部最新统计数据表明恶性肿瘤居我国居民前十位死因首位。2010 年中国恶性肿瘤发病患者 268 万人,死亡 197 万人;目前全国共有恶性肿瘤患者 600 余万人。每年用于恶性肿瘤病人的医疗费用约占卫生总费用的 20%,是全社会最大的医疗负担。目前的治疗手段对于达到治愈、延长恶性肿瘤患者生存期以及改善生活质量等目标的作用仍然十分有限,尤其对于某些类型的恶性肿瘤即使是早期诊断也难以获得满意的疗效,至于转移性、全身性或进展期的恶性肿瘤则更难以治愈。

[0003] 目前的肿瘤治疗策略中,手术和放疗等局部治疗对局限性肿瘤有较好的疗效,而对于全身性、转移性或局部治疗后的微小残留病灶则主要依靠化疗或免疫疗法进行系统性治疗。肿瘤发病是多步骤、多基因作用的结果,肿瘤细胞表现出生长、分化与凋亡的失控。临床上病人症状的多样性和个体遗传异质性,以及肿瘤远处转移病灶的出现,使肿瘤治疗必须以全身性疾病的观点,采用个体化的综合治疗方案。即根据每个肿瘤病人的特点,采用局部治疗结合全身治疗;不仅要消除局部病灶的肿瘤,还要控制肿瘤的复发、转移生长及肿瘤对重要脏器的侵袭,才能真正有效地提高肿瘤病人的治愈率和生存期。通常肿瘤局部病灶的治疗可采取手术和物理治疗(包括射频消融、热疗、放疗、冷冻、超声波及激光治疗等)方法消除,然而对于影像学不能发现的肿瘤微小病灶(如转移复发灶、局部治疗后的残留病灶、血液中的癌细胞),以上局部治疗手段则无能为力,必须通过全身性治疗手段加以解决。由于肿瘤的转移、复发、扩散更为致命,因此全身性治疗显得尤为重要和紧迫。目前全身性治疗有传统化学治疗、分子靶向药物治疗、生物治疗(包括干细胞移植治疗和免疫细胞治疗)以及基因治疗等。传统化疗虽然在某些肿瘤治疗方面取得了一些进展,但对延长肿瘤病人生存期方面仍然贡献不大。而且肿瘤细胞对化疗药的天然耐药和获得性多药耐药以及化疗毒性,使化学治疗的发展受到了严重的妨碍。多年来的临床实践证明它并非是全身治疗的优势项目。

[0004] 免疫细胞治疗是近二十年发展起来的,免疫细胞治疗主要包括 CIK 和 DC 细胞。由于它治疗范围广(可用于实体肿瘤及白血病),特别对肿瘤微小病灶(包括转移、复发灶、血液中的癌细胞)更为有效,无毒副作用,而且适用于肿瘤各阶段(如晚期放、化疗不能使用);因此它是全身治疗的一个优势项目。免疫细胞治疗对提高生命质量、延长生存期有显著的效果,倍受国内外推崇,是目前全身治疗的最佳手段之一,临床潜力巨大。

[0005] 然而,目前用于进行免疫细胞治疗的免疫细胞的制备方法仍有待改进。

发明内容

[0006] 本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明的一个目的在于提出一种安全、高效的制备 DC 细胞和靶向性免疫细胞群的方法。

[0007] 需要说明的是,本发明是基于发明人的下列发现而完成的:

[0008] 随着生物治疗技术的发展,对恶性肿瘤进行免疫治疗已成为研究热点,免疫治疗是肿瘤治疗的一种崭新模式,尤其是细胞介导的过继免疫治疗已较为成熟已经进入临床应用阶段,并取得了明显的治疗效果。细胞介导的过继免疫治疗已成为肿瘤患者放、化疗后辅助治疗的重要手段之一,其对于促进患者免疫系统的重建、消除残留病灶及骨髓净化都具有良好效果。人们通过研究淋巴因子一激活的杀伤(LAK)细胞、肿瘤浸润淋巴(TIL)细胞、细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞等,表明 CIK 细胞是一种新型、高效、具有广谱杀瘤活性的非主要组织相容性复合体(MHC)限制性免疫效应细胞,在肿瘤免疫治疗中显露出巨大的应用价值。树突状细胞(DC)是人体内功能强大的主要的抗原递呈细胞,能诱导出抗原特异性细胞毒淋巴细胞(CTL)反应并可通过直接或间接方式影响 β 细胞(胰腺的胰岛中能产生胰岛素的细胞)的增殖,活化体液免疫应答。将 CIK 细胞和 DC 联合治疗恶性肿瘤,有助于解除肿瘤患者的 T 细胞免疫无能,有协同抗肿瘤的作用。越来越多的试验和临床实践表明,细胞因子诱导的杀伤细胞联合树突状细胞对恶性肿瘤的治疗(CIK/DC 细胞治疗)显示出良好的治疗效果,有着巨大的发展潜力和应用前景。

[0009] 其中,CTL 细胞是 CD8⁺ 的 T 细胞亚群,为一种特异 T 细胞,对某些病毒、肿瘤细胞等具有直接杀伤作用,与自然杀伤细胞构成机体抗病毒、抗肿瘤的重要防线。CTL 杀伤机制有:①释放穿孔素,颗粒酶,裂解靶细胞。②通过 FasL 介导靶细胞的凋亡。

[0010] 基于 DC 的抗原负载技术主要类型有:肿瘤抗原肽冲击 DC;肿瘤细胞性抗原冲击 DC;肿瘤细胞 RNA 冲击 DC;基因修饰 DC 的免疫治疗。发明人发现,肿瘤抗原多肽负载 DC 是应用肿瘤抗原多肽在体外冲击致敏 DC,然后回输或免疫接种至荷瘤宿主,能明显诱导机体产生抗原特异性 CTL,产生保护性免疫反应,目前所有的 dc 负载抗原作为疫苗来开发的,在机体内产生抗体及 CTL,没有在体外制备 CTL 细胞。由于抗原在体内激起的免疫反应有可能产生系统性免疫的可能,发明人利用该技术在体外制备 CTL 细胞及综合免疫细胞群,可以解决目前的问题。另外,目前有用各种载体作为抗原,rAAV 等病毒类载体负载抗原制备 CTL 技术的,ACTL 技术就是其中之一,但是由于病毒的整合特性,导致 DC 细胞的基因组毒性问题一直解决不了,所以发明人利用 mRNA 抗原技术替代病毒类或 DNA 类的载体,从安全性上超过了病毒类载体,同时从产业化角度上来看,mRNA 体外转录更能实现产业化,操作简单,质控及质检可以标准化。

[0011] 换言之,本发明利用 mRNA-DC-CTL 技术制备靶向性免疫细胞群,具体地:将肿瘤相关抗原决定簇的 mRNA 转染患者的外周血单核细胞(Monocytes),经细胞因子诱导,单核细胞转化为具有强大抗原提呈功能的 DC 细胞。将经此技术获得的 DC 细胞,在体外刺激患者的 T 淋巴细胞,产生有效杀伤肿瘤细胞的细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocytes, CTL)。所产生的 CTL 具有肿瘤抗原特异性,即靶向性,仅针对某种或数种特定肿瘤相关抗原阳性的肿瘤细胞具有杀伤作用,对抗原阴性的细胞无任何作用。

[0012] 进而,根据本发明的一个方面,本发明提供了一种制备 DC 细胞的方法。根据本发明的实施例,该方法包括以下步骤:将单核细胞进行第一诱导分化培养,以便获得未成熟的

DC 细胞 ; 利用 HM1. 24 抗原 mRNA 转染所述未成熟的 DC 细胞, 以便获得经过转染的未成熟 DC 细胞 ; 以及将所述经过转染的未成熟 DC 细胞进行第二诱导分化培养, 以便获得成熟的 DC 细胞, 其中, 所述单核细胞是从样本的外周血单个核细胞中分离获得的。

[0013] 发明人惊奇地发现, 利用本发明的方法能够安全高效地制备 DC 细胞 (即树突状细胞), 且本发明的方法成本低、效率高、且能够有效地解决细胞毒性问题, 获得的 DC 细胞回输患者后安全无毒, 能够有效用于免疫细胞治疗, 且该 DC 细胞还能够有效用于刺激同样患者来源的淋巴细胞产生富含大量 CTL 细胞的靶向性免疫细胞群, 进而用于肿瘤免疫治疗后效果更好。

[0014] 另外, 根据本发明上述实施例的制备 DC 细胞的方法还可以具有如下附加的技术特征 :

[0015] 根据本发明的实施例, 所述 HM1. 24 抗原 mRNA 是通过以下步骤获得的 : 制备 HM1. 24 抗原 cDNA 质粒, 所述 HM1. 24 抗原 cDNA 的核酸序列如 SEQ ID NO : 1 所示 ; 将所述 HM1. 24 抗原 cDNA 质粒进行线性化处理, 以便获得经过线性化处理的 HM1. 24 抗原 cDNA 质粒 ; 以及将所述经过线性化处理的 HM1. 24 抗原 cDNA 质粒进行体外转录, 以便获得 HM1. 24 抗原 mRNA。由此, 能够有效制备获得 HM1. 24 抗原 mRNA。

[0016] 根据本发明的实施例, 以 pcDNA3. 1 载体为骨架载体, 制备所述 HM1. 24 抗原 cDNA 质粒。由此, 制备效率高, 效果好。

[0017] 根据本发明的实施例, 所述 pcDNA3. 1 载体具有 BamHI、XbaI 和 Bst1107I 酶切位点。由此, 能够有效进行质粒克隆和后续的线性化处理。

[0018] 根据本发明的实施例, 基于酶切位点 Bst1107I 进行所述线性化处理。

[0019] 根据本发明的实施例, 利用 T7Message Machine 试剂盒进行所述体外转录。由此, 转录效率高、效果好。

[0020] 根据本发明的实施例, 在进行所述体外转录后, 进一步包括除杂纯化的步骤。由此, 有利于后续 HM1. 24 抗原 mRNA 转染的进行。

[0021] 根据本发明的实施例, 利用电转或 PEI 法进行所述转染。由此, 转染效率高、效果好。

[0022] 根据本发明的实施例, 利用 PEI 法进行所述转染, 其中, PEI 与所述 HM1. 24 抗原 mRNA 的混合质量比为 3:1。由此, 转染效果突出。

[0023] 根据本发明的实施例, 利用 DC 培养基进行所述第一诱导分化培养和所述第二诱导分化培养。由此, 能够有效诱导获得 DC 细胞。

[0024] 根据本发明的实施例, 所述 DC 培养基包含 : 无血清细胞培养基 ; 100 ~ 1000U/ml 的 CTL4 因子 ; 以及 2 体积% ~ 10 体积% 的自体血清, 其中, 所述血清来源于所述样本。由此, 培养效果好。根据本发明的实施例, 所述无血清培养基为 Takara 的无血清培养基。根据本发明的另一些实施例, 所述无血清培养基中添加有 0. 5 体积% ~ 5 体积% 的抗生素, 优选庆大霉素。由此, 培养效果突出。

[0025] 根据本发明的实施例, 进行所述第一诱导分化培养 4-5 天, 每 2-3 天半换液一次。根据本发明的实施例, 进行所述第二诱导分化培养 4-5 天, 每 2-3 天半换液一次。由此, 培养效果好。

[0026] 根据本发明的另一方面, 本发明还提供了一种制备靶向性免疫细胞群的方法。根

据本发明的实施例,该方法包括以下步骤:提供样本的外周血单个核细胞;将所述样本的外周血单个核细胞分离为淋巴细胞和单核细胞;将所述淋巴细胞进行活化培养,以便获得经过活化培养的淋巴细胞;将单核细胞进行第一诱导分化培养,以便获得未成熟的 DC 细胞;利用 HM1.24 抗原 mRNA 转染所述未成熟的 DC 细胞,以便获得经过转染的未成熟 DC 细胞;将所述经过转染的未成熟 DC 细胞进行第二诱导分化培养,以便获得成熟的 DC 细胞;以及将所述成熟的 DC 细胞与所述经过活化培养的淋巴细胞进行混合培养,以便获得靶向性免疫细胞群。

[0027] 发明人惊奇地发现,利用本发明的方法能够有效制备获得靶向性免疫细胞群,该靶向性免疫细胞群不仅具有强大杀伤特定肿瘤细胞的 CTL 细胞,还有 CIK、NK 等免疫细胞,能够有效用于免疫细胞治疗。此外,本发明的方法成本低、效率高,且能够有效地解决细胞毒性问题,获得的靶向性免疫细胞群回输患者后安全无毒。

[0028] 根据本发明的实施例,所述 HM1.24 抗原 mRNA 是通过以下步骤获得的:制备 HM1.24 抗原 cDNA 质粒,所述 HM1.24 抗原 cDNA 的核酸序列如 SEQ ID NO:1 所示;将所述 HM1.24 抗原 cDNA 质粒进行线性化处理,以便获得经过线性化处理的 HM1.24 抗原 cDNA 质粒;以及将所述经过线性化处理的 HM1.24 抗原 cDNA 质粒进行体外转录,以便获得 HM1.24 抗原 mRNA。由此,能够有效制备获得 HM1.24 抗原 mRNA。

[0029] 根据本发明的实施例,以 pcDNA3.1 载体为骨架载体,制备所述 HM1.24 抗原 cDNA 质粒。由此,制备效率高,效果好。

[0030] 根据本发明的实施例,所述 pcDNA3.1 载体具有 BamHI、XbaI 和 Bst1107I 酶切位点。由此,能够有效进行质粒克隆和后续的线性化处理。

[0031] 根据本发明的实施例,基于酶切位点 Bst1107I 进行所述线性化处理。

[0032] 根据本发明的实施例,利用 T7Message Machine 试剂盒进行所述体外转录。由此,能够有效进行质粒克隆和后续的线性化处理。

[0033] 根据本发明的实施例,在进行所述体外转录后,进一步包括除杂纯化的步骤。由此,有利于后续 HM1.24 抗原 mRNA 转染的进行。

[0034] 根据本发明的实施例,利用电转或 PEI 法进行所述转染。由此,转染效率高、效果好。

[0035] 根据本发明的实施例,利用 PEI 法进行所述转染,其中,PEI 与所述 HM1.24 抗原 mRNA 的混合质量比为 3:1。由此,转染效果突出。

[0036] 根据本发明的实施例,所述活化培养包括:利用 CTL1 细胞培养基对所述淋巴细胞进行第一活化培养 24 小时;利用 CTL2 细胞培养基对经过第一活化培养的淋巴细胞进行第二活化培养 2-3 天;以及利用 CTL3 细胞培养基对经过第二活化培养的淋巴细胞进行第三活化培养 4-5 天,每隔 2-3 天等量补液一次。由此,能够有效使淋巴细胞活化,有利于后续靶向性免疫细胞群的获得。

[0037] 根据本发明的实施例,所述 CTL1 细胞培养基包含:无血清细胞培养基;

[0038] 100 ~ 1000U/ml 的 CTL1 因子;以及 2 体积% ~ 10 体积%的自体血清,所述 CTL2 细胞培养基包含:无血清细胞培养基;100 ~ 1000U/ml 的 CTL2 因子;以及 2 体积% ~ 10 体积%的自体血清,所述 CTL3 细胞培养基包含:无血清细胞培养基;100 ~ 1000U/ml 的 CTL3 因子;以及 2 体积% ~ 10 体积%的自体血清,其中,所述血清来源于所述样本。由此,活化

培养效果好。根据本发明的实施例,所述无血清培养基为 Takara 的无血清培养基。根据本发明的另一些实施例,所述无血清培养基中添加有 0.5 体积%~5 体积%的抗生素,优选庆大霉素。由此,活化培养效果突出,淋巴细胞活化效果好,有利于后续靶向性免疫细胞群的获得。

[0039] 根据本发明的实施例,利用 DC 培养基进行所述第一诱导分化培养和所述第二诱导分化培养。由此,能够有效诱导获得 DC 细胞。

[0040] 根据本发明的实施例,所述 DC 培养基包含:无血清细胞培养基;100~1000U/ml 的 CTL4 因子;以及 2 体积%~10 体积%的自体血清,其中,所述血清来源于所述样本。由此,培养效果好。根据本发明的实施例,所述无血清培养基为 Takara 的无血清培养基。根据本发明的另一些实施例,所述无血清培养基中添加有 0.5 体积%~5 体积%的抗生素,优选庆大霉素。由此,培养效果突出。

[0041] 根据本发明的实施例,进行所述第一诱导分化培养 4-5 天,每 2-3 天半换液一次。根据本发明的实施例,进行所述第二诱导分化培养 4-5 天,每 2-3 天半换液一次。由此,培养效果好。

[0042] 根据本发明的实施例,利用 CTL3 细胞培养基进行所述混合培养 6-8 天,优选 7 天。由此,能够有效获得靶向性免疫细胞群。

[0043] 根据本发明的实施例,所述 CTL3 细胞培养基包含:无血清细胞培养基;100~1000U/ml 的 CTL3 因子;以及 2 体积%~10 体积%的自体血清,其中,所述血清来源于所述样本。由此,培养效果好。根据本发明的实施例,所述无血清培养基为 Takara 的无血清培养基。根据本发明的另一些实施例,所述无血清培养基中添加有 0.5 体积%~5 体积%的抗生素,优选庆大霉素。由此,能够高效地制备获得靶向性免疫细胞群。

[0044] 根据本发明的实施例,按照所述成熟的 DC 细胞与所述经过活化培养的淋巴细胞的体积比为 1:20 进行所述混合培养。由此,混合培养效果好,能够高效地制备获得靶向性免疫细胞群。

[0045] 此外,根据本发明的另一些实施例,本发明的制备靶向性免疫细胞群的方法还可以包括以下步骤:

[0046] 第一步:抽取肿瘤患者静脉外周血(50-100 毫升)或采用血细胞分离机直接分离出外周血单个核细胞(PBMC)。

[0047] 第二步:经培养,PBMC 被分离为淋巴细胞和单核细胞,淋巴细胞继续培养,备用;利用 HM1.24 抗原 mRNA 转染单核细胞,并利用细胞因子诱导成熟的树突状细胞(DC)产生。

[0048] 第三步:将成熟的 DC 细胞与淋巴细胞混合培养,将淋巴细胞诱导成为具有抗原特异性的、杀伤抗原阳性肿瘤细胞的细胞毒性 T 淋巴细胞,获得靶向性免疫细胞群。

[0049] 根据本发明的又一方面,本发明还提供了一种靶向性免疫细胞群。根据本发明的实施例,其是通过前面所述的制备靶向性免疫细胞群的方法制备获得的。发明人发现,本发明的靶向性免疫细胞群不仅具有强大杀伤特定肿瘤细胞的 CTL 细胞,还有 CIK、NK 等免疫细胞,且成本低、安全无毒,能够有效用于免疫细胞治疗。

[0050] 根据本发明的再一方面,本发明还提供了靶向性免疫细胞群、以及利用前面所述的制备 DC 细胞的方法制备获得的 DC 细胞在制备药物中的用途,所述药物用于抑制肿瘤转移、扩散、复发。

[0051] 根据本发明的实施例,所述肿瘤为 HM1.24 抗原阳性肿瘤,优选多发性骨髓瘤。

[0052] 需要说明的是,发明人发现,由于 mRNA 无需启动子,不能无限制的扩增,不会进入细胞核插入宿主细胞染色体上,无遗传基因毒性,具很高的安全性等特点,因而本发明拟用 mRNA-DC-CTL 方法制备 DC 细胞以及靶向性免疫细胞群(针对 HM1.24 的靶向性免疫细胞集群),以便用于肿瘤的免疫治疗。本发明的方法突破了以往的刺激 DC 的药物不能常规制备的局限性。并且,在体外利用 mRNA 转染 DC 而产生特异性多靶点 CTL 细胞的属于第一次。

[0053] 具体地,本发明的方法具有以下优点的至少之一:

[0054] 1、国际上首次构建出 HM1.24mRNA 抗原。

[0055] 2、国际上首次利用 HM1.24 抗原 mRNA 转染 DC 细胞来体外诱导获得 HM1.24 特异性的靶向免疫细胞群(富含 CTL 细胞)。

[0056] 3、本发明的靶向免疫细胞群包含:CTL 细胞(CD8+, CD3+CD8+CD28+),CIK 细胞(CD3+CD56+),NK 细胞(CD3-CD56+),使其不仅具有强大杀伤特定肿瘤细胞的 CTL 细胞,还有 CIK、NK 等免疫细胞,可以提升患者的整体免疫力,明显改善患者的症状,能帮助免疫反应更加完整、效能更高。

[0057] 4、靶向免疫细胞群制备的整个过程仅需要 12-14 天。

[0058] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0059] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0060] 图 1 显示了根据本发明一个实施例, HM1.24 抗原 cDNA 质粒构建过程中质粒酶切鉴定的结果;

[0061] 图 2 显示了根据本发明一个实施例, GFP 检测 mRNA 转染后效果的结果图;

[0062] 图 3 显示了根据本发明一个实施例,基于靶向性免疫细胞群的流式细胞仪检测结果获得的统计分析结果。

具体实施方式

[0063] 需要说明的是,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地,在本发明的描述中,除非另有说明,“多个”的含义是两个或两个以上。

[0064] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考 J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品,例如可以采购自 Illumina 公司。

[0065] 实施例 1:

[0066] 一、材料与设备

[0067] 1、实验室级别 :GLP

[0068] 2、仪器设备 :

[0069] 负 80 度超低温冰箱 (中科美菱, DW-HL388); 普通冰箱 (海尔, 双开门, -20℃ 和 4℃); 霉菌培养箱 (上海博迅, MJX-160B-Z); 恒温水浴箱 (SSW-420-2S); CO₂ 培养箱 (HF240); 低速离心机 (上海安亭, TDL-40C); 倒置生物显微镜 (科信, 型号 :BLD-1); 生物安全柜 (苏州净化, 双人); 电动移液器 (德国普兰德) 1-10ml ; 微量移液枪 (大龙) 1 套, 4 把 ; 程序降温盒 (Thermo); 液氮罐 (金凤, YDS-120-216); PCR 仪 ; 凝胶电泳成像系统 ; 电泳仪 ; 恒温仪 ;

[0070] 3、细胞培养耗材 :

[0071] 细胞培养袋 (Takara 公司) ; 75cm² 培养瓶、175cm² 培养瓶、1.8ml 冻存管、1.5ml EP 管、50ml 离心管、15ml 离心管, 均来自美国 Coning 公司 ; 0.22um 针头滤器 (美国 BD 公司); 100um 细胞筛网 (美国 BD 公司); 30ml 注射器 (上海医疗器械)。

[0072] 4、细胞培养试剂 :

[0073] 无血清细胞培养基 (Takara, 货号 :GT-T561) ; 澳大利亚胎牛血清 (FBS QUALIFIED AUSTRALIA ORIGIN), Gibco, 货号 :10099-141 ;

[0074] 淋巴细胞分离液 Ficoll 液 (GE, 货号 :17-1440-02) ;

[0075] 青霉素 / 链霉素双抗溶液 (PENICILLIN STREPTOMYCIN SOL, PS), Gibco, 货号 :15140-122。

[0076] 5、培养基的配制 :

[0077] 5.1 试剂 :

[0078] CTL1 因子 (包括 γ 干扰素, 1000U/ml) : 1ml, -20℃ 长期保存, 4℃ 保存 2 周 ;

[0079] CTL2 因子 (包括 IL-1, 1000U/ml ; IL-2, 1000U/ml ; CD3 抗体, 100ng/ml ; CD28 抗体, 100ng/ml) : 1ml, -20℃ 长期保存, 4℃ 保存 2 周 ;

[0080] CTL3 因子 (包括 IL-2, 1000U/ml ; IL-7, 20ng/ml ; IL-15, 20ng/ml) : 1ml, -20℃ 长期保存, 4℃ 保存 2 周 ;

[0081] CTL4 因子 (包括 GM-CSF, 1000U/ml ; IL-4, 500U/ml ; TNF- α , 500U/ml ; IL-1, 500U/ml ; IL-6, 500U/ml) : 1ml, -20℃ 长期保存, 4℃ 保存 2 周 ;

[0082] 肿瘤抗原 mRNA 转染混合物试剂 A : 100u1, -80℃ 长期保存, 溶解后一次用掉。

[0083] 5.2 配制方法 :

[0084] 基础培养基 : 向无血清细胞培养基中添加 2% 的庆大霉素, 其中将 0.22um 针头滤器过滤后使用。

[0085] CTL1 培养基 : 将 1 管 CTL1 因子从 -20 度取出, 常温融化, 加到 20ml 基础培养基中, 并添加 10% 的客户的血清, 其中将 0.22um 针头滤器过滤后使用。

[0086] CTL2 培养基 : 将 1 管 CTL2 因子从 -20 度取出, 常温融化, 加到 20ml 基础培养基中, 其中将 0.22um 针头滤器过滤后使用。

[0087] CTL3 培养基 : 将 1 管 CTL3 因子从 -20 度取出, 常温融化, 加到 500ml 基础培养基中, 其中将 0.22um 针头滤器过滤后使用, 整个培养过程用 3 管。

[0088] DC 培养基 : 将 1 管 CTL4 因子从 -20 度取出, 常温融化, 加到 50ml 基础培养基中,

并添加 10% 的客户的血清, 其中将 0.22um 针头滤器过滤后使用。

[0089] 二、方法

[0090] 1 构建 HM1.24 抗原 cDNA 质粒

[0091] 首先, 将 HM1.24 抗原基因进行人工合成, 并获得基因的 cDNA。

[0092] HM1.24 抗原基因的 cDNA 序列如下:

[0093] ATGGCATCTACTTCGTATGACTATTGCAGAGTGCCCATGGAAGACGGGGATAAGCGCTGTAAGCTTCTGCTGGGGATAGGAATTCTGGTGCTCCTGATCATCGTGATTCTGGGGGTGCCCTTGATTATCTTCACCATCAAGGCCAA CAGCGAGGCCTGCCGGGACGGCCTTCGGGCAGTGATGGAGTGTGCGCAATGTCACCCATCTCCTGCAACAAGAGCTGACCGAGGCCAGAAAGGGCTTTCAGGATGTGGAGGCCAGGCCACCTGCAACCACACTGTGATGGCCCTAATGGCT TCCCTGGATGCAGAGAAGGCCCAAGGACAAAAGAAAGTGGAGGAGCTTGAGGGAGAGATCACTACATTAACCATAA GCTTCAGGACGCGTCTGCAGAGGTGGAGCGACTGAGAAGAGAAAACCAGGTCTTAAGCGTGAGAATCGCGGACAAGA AGTACTACCCCAGCTCCCAGGACTCCAGCTCCGCTGCGGCGCCCCAGCTGCTGATTGTGCTGCTGGGCCTCAGCGCT CTGCTGCAG (SEQ ID NO :1)

[0094] 然后, 以 pcDNA3.1 载体 (具有 BamHI/SaI 酶切位点) 为骨架载体, 通过酶切方法, 将上述人工合成的 SEQ ID NO :1 所示的 HM1.24 抗原基因 cDNA 序列克隆至载体上, 制备获得 HM1.24 抗原 cDNA 质粒。

[0095] 其中, 质粒酶切图片见图 1。如图 1 所示, 左侧泳道为 :DNA marker, 由上至下, 条带顺序 :250bp, 500bp, 750bp, 1000bp, 1500bp, 2000bp, 3000bp, 5000bp, 10000bp ; 右侧泳道为 :4139-1 质粒, 是通过 pcDNA3.1 载体的 BamHI/SaI 酶切位点进行酶切消化获得的。

[0096] 经过测序及酶切鉴定, 人工合成的 HM1.24 基因序列正确, 发明人成功构建获得了 HM1.24 抗原 cDNA 质粒。

[0097] 2 体外转录

[0098] 2.1 线性化处理

[0099] 取构建好的 HM1.24 抗原 cDNA 质粒, 基于 pcDNA3.1 载体建议的线性化酶切位点 Bst1107I (距离终止密码子比较远, 2KB 左右) 进行线性化处理。

[0100] 2.2 体外转录

[0101] 利用 T7 Message Machine 试剂盒 (Ambion 公司), 将经过线性化处理的 HM1.24 抗原 cDNA 质粒 (即作为体外转录的 DNA 模板) 进行体外转录, 具体如下:

[0102] 首先, 在一个 RNase-free 的塑料离心管中, 在室温下按次序加入下列成分, 制备反应体系 (20 微升):

[0103]

成份	加入量 (微升)	备注
RNase-free 水	(13-x)	先根据模板 DNA 浓度确定模板量
转录反应缓冲液 (10X)	2	
DNA 模板	1	1ug/1uL 质粒浓度
dNTP(Mix)	4	

[0104] 接着,用封口膜包好管口,60℃水浴 30min,使反应体系中的 RNase 抑制物充分发挥作用,以去除模板中的 RNase。

[0105] 待反应体系冷却后加入 1 微升 T7RNA 聚合酶(注:此为 20 微升反应体系的用量,对其他反应体系,各成分的用量可以按比例增减),37℃保温 2 小时(注意:延长保温时间不能明显提高产量)。

[0106] 接着,70℃加热 10 分钟灭活 T7RNA 聚合酶。

[0107] 2.3 去除 DNA 模板

[0108] 在上述的体外转录体系中加入 1 微升 RNase-free DNase (3-5U/uL),并于 37℃下保温 15-30 分钟,然后补水至 100uL;

[0109] 接着,用等体积的 Tris 饱和酚-氯仿抽提一次;

[0110] 接下来,加入 0.1 倍体积的 3M NaAc 和 2 倍体积的乙醇,混匀后最高转速离心 15-30 分钟,弃上清后加入 1mL 70%的乙醇,振荡后最高转速离心 2 分钟,弃上清,晾干,所得沉淀即体外转录所得的 RNA。

[0111] 取 1-3 微升产物电泳检测转录效果,检测合格后将得到的 RNA 置于 -80℃保存。

[0112] 3 靶向性免疫细胞群制备

[0113] 3.1. 外周血单个核细胞的分离

[0114] 将从 1 例 HM1.24 阳性的多发性骨髓瘤患者采集的 100ml 外周血中分离获得的细胞,转移到 50ml 离心管中离心 (1800rpm, 10min),吸去上清,取上清后的液体缓慢加在淋巴细胞分离液 Ficoll 液 (GE) 上,体积比为 1:1,离心 (2000rpm, 20min);

[0115] 接着,收集界面的白色絮状细胞加入 PBS,轻轻吹打混匀,离心 (1500rpm, 10min);

[0116] 接下来,重复离心洗涤共 3 遍;

[0117] 然后,收取细胞轻轻吹打混匀,加入基础培养基 20ml 吹打均匀,转移至 75cm²培养瓶中,于 37℃,5% CO₂培养箱培养 2h。

[0118] 3.2 淋巴细胞和单核细胞的分离

[0119] 取出 75cm²培养瓶,轻轻将 75cm²培养瓶放直立,吸取 18ml 培养液于新的 175cm²瓶中,以便用于淋巴细胞的活化培养;

[0120] 针对原瓶 (75cm²培养瓶) 中剩余的 2ml 残液,将用于将单核细胞诱导分化为 DC 细胞。

[0121] 3.3 淋巴细胞的培养

[0122] 在用于培养淋巴细胞的 175cm²瓶中,加入 20ml CTL1 细胞培养基,24h 后再加入 20ml CTL2 培养基培养,然后每隔 2~3d 用 CTL3 培养基等量补液,进行活性活率检测验证是否合格。

[0123] 3.4. 单核细胞的处理

[0124] a、在剩有 2ml 残液的原瓶 (75cm²培养瓶) 中加入 15ml DC 培养基继续培养 4 天,每 2~3 天半换液一次,以便将单核细胞诱导分化为未成熟的 DC 细胞。

[0125] b、PEI 转染法进行抗原基因 mRNA 转染:第 5 天,用 50ml 离心管收集未成熟的 DC 细胞 (离心 1500rpm, 10min),弃掉上清后,将下层细胞转移到 1.5ml 离心管,然后直接加入 100uL 的试剂 A (即 HM1.24mRNA 与 PEI 按照质量比 1:3 混合后获得的混合物) 充分混匀底部细胞,盖好离心管,置于细胞培养箱中孵育 30 分钟,每隔 10 分钟取出上下倒置几次。

[0126] 其中, PEI(1ug/ul)Polysciences(CAT#23966-2 配制成储液)是按照以下步骤配制获得的:首先,将无内毒素的无菌水加热至 80℃左右溶解 PEI,冷却到室温;然后,调整 pH 值至 7.0,用 0.22um 的滤器过滤消毒,分装后储存在 -20℃,工作液可于 4℃下保存备用。

[0127] GFP 检测 mRNA 转染后的效果,结果如图 2 所示,其中,左图为 DC 转染前图片,右图为 DC 转染后图片,由图 2 可知转染效率高达 80%。

[0128] c、之后取出离心管,用移液枪将细胞悬液取出加到培养瓶(75cm²)中,并加入 DC 培养基,继续培养 3 天,以便获得成熟的 DC 细胞。

[0129] 3.5. 共培养

[0130] 第 8 天后,将成熟的 DC 细胞与前述经过活化培养的淋巴细胞按照体积比 1:20 混合,用 CTL3 培养基共培养七天,诱导 CTL 细胞及其他杀伤性细胞的产生。

[0131] 共培养七天后,对细胞进行流式检测,然后对流式检测结果进行统计分析。其中,图 3 显示了基于靶向性免疫细胞群的流式细胞仪检测结果获得的统计分析结果,即靶向性免疫细胞群中各种免疫细胞所占的百分比。由图 3 可知,本实施例制备获得的免疫细胞群中不仅含有大量的 CTL 细胞,而且还有 NK 及 CIK 细胞等多种免疫细胞:CTL 细胞(CD8+, CD3+CD8+CD28+)、CIK 细胞(CD3+CD56+)、NK 细胞(CD3-CD56+),即该免疫细胞群不仅具有强大杀伤特定肿瘤细胞的 CTL 细胞,还有 CIK、NK 等免疫细胞。

[0132] 由此,发明人发现,被转染的树突状细胞在体外能够有效地激活 T 淋巴细胞,产生 CTL,而且数量巨大,达 10⁹个以上。保证临床疗效好。而传统的 DC 细胞试图在体内激活 T 淋巴细胞,产生 CTL,但患者的薄弱的免疫系统微环境使 DC 细胞很难在体内激活 T 细胞产生 CTL,数量少,致使疗效不佳,且无特异性,靶向性。

[0133] 实施例 2:临床治疗

[0134] 将实施例 1 制备获得的 CTL 细胞回输患者,并观察回输效果,具体如下:

[0135] 将 HM1.24 阳性的多发性骨髓瘤患者 20 名分为 2 组(A 组 10 名和 B 组 10 名),其中,针对 A 组,按照实施例 1 中的方法在第 14 天和第 15 天获得足量 CTL 细胞后,给患者回输,每次回输细胞量为 1~2*10⁹;B 组不回输细胞(作为对照)。采血一次连续回输 2 次为一个疗程。3 个疗程结束后,进行观察。

[0136] 结果发现:A 组和 B 组有明显的区别,A 组所有患者在回输后均感觉身体疲惫感减轻,食欲增加,疼痛减轻,体重增加,其中有 6 名患者肿瘤指标都有所下降;而 B 组各项症状均未改善。可以明显看出,经过回输 CTL 细胞后,患者症状得到明显缓解。

[0137] 由此,可知本发明制备获得的 CTL 细胞可以提升患者的整体免疫力,明显改善患者的症状,能帮助免疫反应更加完整、效能更高。

[0138] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

[0139] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,本领域的普通技术人员可以理解:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 杨光华

<120> 基于HM1.24抗原的DC细胞、靶向性免疫细胞群及其制备方法和用途

<130> PIDC3152264

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 540

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> HM1.24抗原基因

<400> 1

```

atggcateta cttcgtatga ctattgcaga gtgccatgg aagacgggga taagecgtgt      60
aagettctgc tgggatagg aattetggtg ctectgatca tegtattct gggggtgccc      120
ttgattatct tcaccatcaa ggccaacagc gaggcctgcc gggacggcct tcgggcagtg      180
atggagtgtc gcaatgtcac ccatctcctg caacaagage tgaccgagge ccagaagggc      240
tttcaggatg tggaggccca ggccgccacc tgcaaccaca ctgtgatggc cctaattggt      300
tcctggatg cagagaaggc ccaaggacaa aagaaagtgg aggagcttga gggagagatc      360
actacattaa accataagct tcaggacgcg tctgcagagg tggagcgact gagaagagaa      420
aaccaggtct taagcgtgag aatcgcgac aagaagtact accccagctc ccaggactcc      480
agctccgctg cggcgcccca gctgctgatt gtgctgctgg gcctcagcgc tctgctgcag      540

```

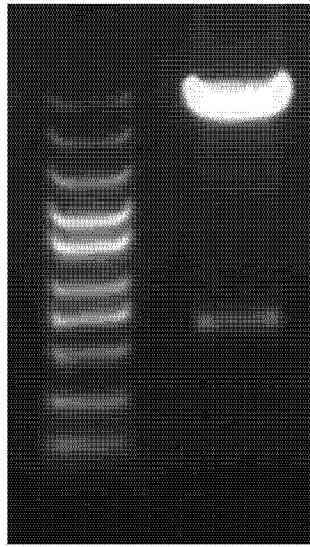


图 1

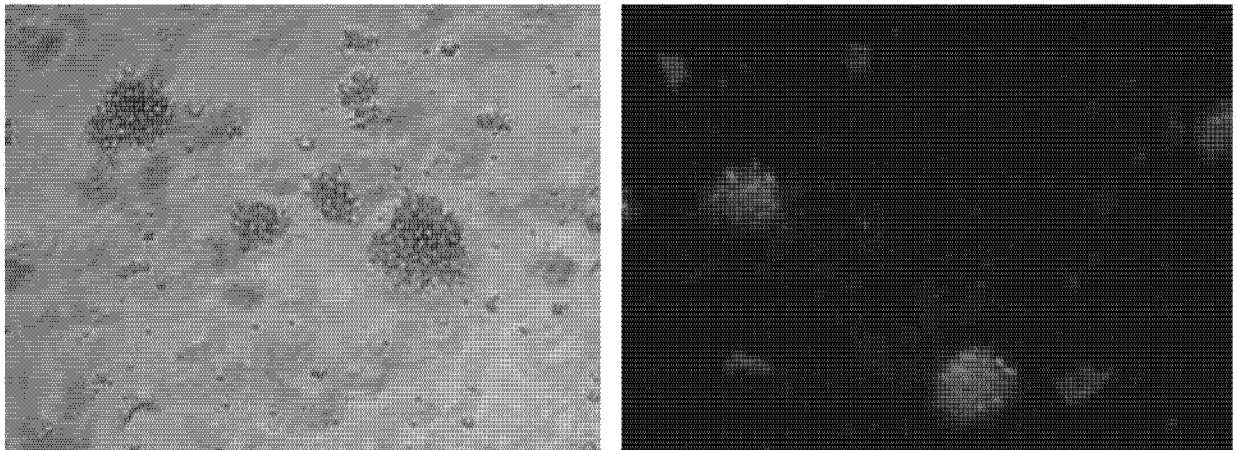


图 2

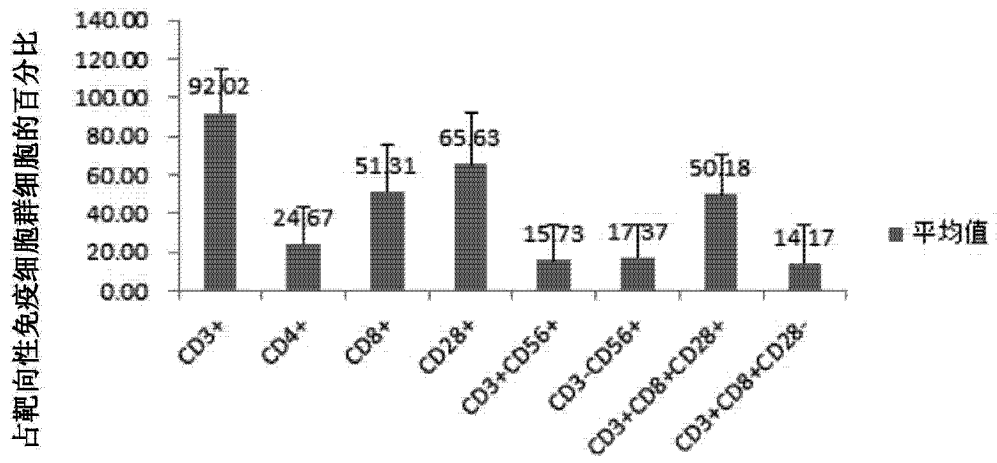


图 3