



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116240173 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 27

(21) 申请号 202310052269.3

A61K 35/17 (2015.01)

(22) 申请日 2023.02.02

A61P 35/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 116240173 A

(56) 对比文件

US 2023183340 A1, 2023.06.15

WO 2023169092 A1, 2023.09.14

CN 115772232 A, 2023.03.10

CN 115960256 A, 2023.04.14

TW 202325320 A, 2023.07.01

US 2024066126 A1, 2024.02.29

CN 116023507 A, 2023.04.28

CN 118126199 A, 2024.06.04

CN 118206664 A, 2024.06.18

US 2023227554 A1, 2023.07.20

WO 2023142635 A1, 2023.08.03

(43) 申请公布日 2023.06.09

(73) 专利权人 西安电子科技大学

地址 710071 陕西省西安市雁塔区太白南路2号

(72) 发明人 宁蓬勃

审查员 杨兴艳

(74) 专利代理机构 北京市诚辉律师事务所

11430

专利代理师 范盈

(51) Int. Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

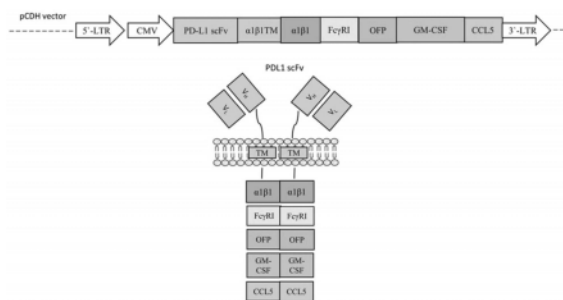
序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

一种冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明一种冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞及其制备方法和应用,属于免疫学及肿瘤治疗技术领域。本发明冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞为嵌合抗原受体与单核/巨噬细胞的复合结构,嵌合抗原受体包含胞外域、跨膜域和胞内域。胞外域包含抗原结合域;跨膜域包含α1β1TM;胞内域包含α1β1与FcγRI共刺激域、可分泌型细胞因子GM-CSF、招募免疫细胞的细胞因子。抗原结合域为PD-L1scFv分子或PD1scFv分子。本发明CAR-单核/巨噬细胞发挥自身深度浸润、特异吞噬杀伤实体肿瘤,招募T细胞等免疫细胞、调控实体肿瘤冷热转换,实现CAR-单核/巨噬细胞与T细胞免疫的协同抗肿瘤效应。



1. 一种冷热肿瘤调控型CAR-巨噬细胞,其特征在于,所述冷热肿瘤调控型CAR-巨噬细胞为嵌合抗原受体巨噬细胞的复合结构,其中嵌合抗原受体包含胞外域、跨膜域和胞内域;所述胞外域包含抗PD-L1 scFv分子或抗PD1 scFv分子;所述跨膜域包含 $\alpha 1\beta 1$ TM;所述胞内域包含 $\alpha 1\beta 1$ 与Fc γ RI共刺激域、可分泌型细胞因子GM-CSF和招募免疫细胞的细胞因子;

所述招募免疫细胞为T细胞;

所述招募T细胞的细胞因子为CCL5。

2. 如权利要求1所述的一种冷热肿瘤调控型CAR-巨噬细胞,其特征在于,由包含有抗PD-L1 scFv分子的胞外域、 $\alpha 1\beta 1$ TM、 $\alpha 1\beta 1$ 与Fc γ RI共刺激域、可分泌型细胞因子GM-CSF和CCL5作为招募T细胞的细胞因子组成的嵌合抗原受体的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

3. 一种嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体包含胞外域、跨膜域和胞内域;胞外域包含抗PD-L1 scFv分子或抗PD1 scFv分子;跨膜域包含 $\alpha 1\beta 1$ TM;胞内域包含 $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 1\beta 1$ 与Fc γ RI共刺激域、可分泌型细胞因子GM-CSF和招募免疫细胞的细胞因子;

所述招募免疫细胞为T细胞;

所述招募T细胞的细胞因子为CCL5。

4. 一种含有如权利要求3所述的嵌合抗原受体的重组表达载体。

5. 如权利要求1或2所述的冷热肿瘤调控型CAR-巨噬细胞的制备方法,其特征在于,构建如权利要求4所述的重组表达载体,将重组表达载体转染巨噬细胞。

6. 如权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述重组表达载体的构建方法包括以下步骤:

(1) 将PD-L1 scFv或PD1 scFv、 $\alpha 1\beta 1$ TM、 $\alpha 1\beta 1$ 与Fc γ RI共刺激域和OFP使用linker进行连接,再使用P2A连接GM-CSF基序,再使用P2A连接招募T细胞的细胞因子CCL5基序,合成嵌合抗原受体PD-L1 scFv- $\alpha 1\beta 1$ TM- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5或PD1 scFv- $\alpha 1\beta 1$ TM- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5;

(2) 将嵌合抗原受体PD-L1 scFv- $\alpha 1\beta 1$ TM- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5或PD1 scFv- $\alpha 1\beta 1$ TM- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5与慢病毒载体重组,构成重组表达载体。

7. 如权利要求1或2所述的冷热肿瘤调控型CAR-巨噬细胞、如权利要求3所述的嵌合抗原受体或如权利要求4所述的重组表达载体在制备治疗实体瘤的药物中的应用。

8. 一种治疗实体瘤的药物组合物,其特征在于,包含如权利要求1或2所述的冷热肿瘤调控型CAR-巨噬细胞,及药物学上可接受的辅料或载体。

一种冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学及肿瘤治疗技术领域,具体涉及一种冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 随着肿瘤生物学和免疫学的发展,肿瘤免疫治疗已成为近年来肿瘤治疗领域的新途径。与传统化放疗相比,免疫治疗颠覆了人们以往对于肿瘤治疗的理念,从传统的依靠外界方式杀死肿瘤,到免疫治疗依靠自身免疫系统杀死肿瘤。其中免疫检查点抑制剂治疗、过继性免疫细胞治疗备受瞩目。

[0003] 基于免疫检查点理论的单抗阻断治疗技术,以及基于细胞治疗技术平台的嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)技术受到广泛关注。免疫检查点阻断的肿瘤免疫治疗方法是通过阻断肿瘤对T细胞的抑制途径来激活抗肿瘤免疫。目前抗PD1抗体药物已被用于治疗多种癌症,但仍然存在一些问题:(1) 较低的客观应答率,PD1抑制剂在未经选择的实体瘤患者中,有效率只有10%-30%,多由于肿瘤局部存在的多种免疫逃逸机制导致,包括肿瘤相关抗原的缺乏,免疫抑制细胞的渗透,免疫抑制肿瘤微环境的限制等,免疫治疗作用十分有限;(2) 被动给药的药代动力学不理想,实体瘤内部药物富集率很低,药物的长期使用也可能产生耐药,往往第一剂之后,治疗不响应;(3) 缺少主动靶向,导致毒副作用大。CAR-T疗法虽然在血液瘤中已经取得良好的治疗效果,但对于实体肿瘤治疗仍存在一定局限,其无法高效浸润实体肿瘤内部,且T细胞在肿瘤微环境中遭遇免疫衰竭等因素,使得当前免疫治疗在临床恶性肿瘤治疗中收效不甚理想。

[0004] 基于T细胞的浸润情况,肿瘤免疫微环境分为3种不同的表型,分别是免疫沙漠(immune-desert)型、免疫排斥(immune-excluded)型和免疫炎症(immune-inflamed)型,前两种也称为“冷肿瘤”,也就是对免疫检查点抑制剂(CPI)治疗不敏感的非炎症性肿瘤。而最后一种称为“热肿瘤”,免疫炎症表型被T细胞深度浸润,显著响应CPI。“冷肿瘤”的特点包括T细胞浸润程度低、突变负荷低、PD-L1表达低,而TAMs和Tregs等免疫抑制细胞群被表达,这使得“冷肿瘤”对ICI单抗疗法几乎不反应。

[0005] 免疫排斥型对CPI应答率较低,表现出T细胞浸润不良或滞留在肿瘤外。免疫沙漠表型对CPI几乎没有应答,主要是由于肿瘤微环境(Tumor microenvironment, TME)中缺乏CD8⁺T细胞,反映出缺乏T细胞的启动和生成。这两种肿瘤微环境由于缺乏T细胞或者T细胞无法浸润到实体肿瘤内部,最终导致肿瘤免疫逃逸,CPI治疗效果不佳且个体差异性较大。可见,若要基于免疫检查点理论实现肿瘤免疫治疗的突破进展,首先要解决的就是实体肿瘤的冷热调控。

[0006] 当前即便是采用CAR-T、CAR-NK等细胞疗法,在临床治疗实体冷肿瘤中仍存在诸多瓶颈。实体瘤通常被隔离于密集的纤维化肿块和缺氧的免疫抑制环境中,这阻碍了CAR-T、CAR-NK的细胞浸润;肿瘤微环境中含有许多免疫抑制性细胞和其它免疫抑制因子都会降低

CAR-T的抗肿瘤效力,同时CAR-T存在的细胞因子风暴问题,临床应用挑战诸多。

[0007] 当前研究对冷热肿瘤的免疫机制逐渐清晰,为针对性地设计治疗策略提供了创新可能。研究表明肿瘤相关巨噬细胞(Tumor associated macrophages,TAM)是形成“T细胞排斥肿瘤表型”的重要决定因素,在小鼠肿瘤研究模型及患者肿瘤中均已发现由于TAM对TME的免疫负调控影响、及其与T细胞等的长期相互作用,CD8⁺T细胞很难迁移和侵袭肿瘤巢,无法有效形成T细胞对肿瘤的杀伤作用,这也是“冷肿瘤”临床治疗不响应的根本机制之一。并且更多证据表明,T细胞向肿瘤内的迁移缺陷构成了对癌症免疫治疗的耐药机制。T细胞无法高效侵入实体瘤内部并有效工作,免疫治疗则很难发挥显著作用,最终导致患者生存率低。所以,如何避免肿瘤微环境的T细胞抵抗、实现T细胞高效富集肿瘤并活化激活,从而协同发挥抗肿瘤效应,这是当下免疫治疗亟待解决的问题。

[0008] 因此,针对上述免疫治疗的困境,本发明设计的针对免疫检查点的冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞(CAR-M),包括PD-L1 scFv、 $\alpha 1\beta 1$ 整合素的跨膜区域、 $\alpha 1\beta 1$ 整合素胞内以及Fc γ R1跨膜信号传导域胞内、GM-CSF、CCL5细胞招募因子。获得的过继细胞免疫治疗CAR-M技术,(1)不但可以基于CAR-M的底盘细胞优势深度递送免疫检查点单链抗体结构域,靶向肿瘤组织并深度浸润实体肿瘤内部特异吞噬肿瘤细胞;(2)GM-CSF调节TAM介导的肿瘤微环境,同时CCL5招募T细胞等免疫细胞在肿瘤处的有效富集,系统逆转冷肿瘤形成的肿瘤免疫抑制微环境,将“冷肿瘤”转化为“热肿瘤”;(3)胞外抗PD-L1/PD1结构域解除T细胞的免疫抑制,给予招募来的T细胞充分的杀伤活性。从而使得CAR-单核/巨噬细胞的特异吞噬及单抗杀伤效应、与肿瘤微环境的逆转及冷热肿瘤的调节效应、T细胞免疫的协同抗肿瘤效应相互结合,发挥“立体化”的肿瘤免疫杀伤机制,预期获得显著临床治疗效果。

发明内容

[0009] 针对上述现有技术中存在的问题,本发明的目的在于设计提供一种冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞及其制备方法和应用,对以往免疫治疗对冷肿瘤不响应的问题给予根本解决。本发明冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞可分泌表达CCL5及GM-CSF,可逆转肿瘤微环境;同时招募T细胞等免疫细胞到达肿瘤部位实现“冷热”转换;同时,抗原结合域包含抗PD-L1scFv分子或抗PD1 scFv分子,进而增敏T细胞的肿瘤协同杀伤效应。

[0010] 本发明冷热肿瘤调控型CAR单核/巨噬细胞的作用机制及原理为:

[0011] (1) 本发明冷热肿瘤调控型CAR单核/巨噬细胞可特定分泌粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),维持自身保持M1表型的同时,可将TAM中M2型抗炎巨噬细胞逆转为M1型促炎巨噬细胞,逆转肿瘤微环境。

[0012] (2) 进而重塑肿瘤微环境,并且减少对CD8⁺T侵袭的抑制,营造适宜T细胞的迁移和发挥功能的肿瘤微环境,促进抗肿瘤免疫应答。

[0013] (3) 同时本发明冷热肿瘤调控型CAR单核/巨噬细胞可通过分泌CCL5等细胞招募因子,招募T细胞等免疫细胞到达肿瘤部位,增加肿瘤浸润性CD8⁺T细胞的数量,促进它们在肿瘤部位的富集,以及增强它们攻击肿瘤细胞的能力,从而根本调节“冷热肿瘤”转换。

[0014] (4) 最终使得发明技术方案中胞外PD-L1 scFv在实体瘤内部发挥最大化的抗肿瘤效应。PD-L1 scFv一方面通过阻断PD1/PD-L1免疫检查点通路恢复T细胞杀伤作用,另一方面PD-L1 scFv可与巨噬细胞表面PD-L1结合,促进巨噬细胞增殖与激活,促进巨噬细胞杀伤

作用。

[0015] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0016] 一方面,本发明提供了一种冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞,所述冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞为嵌合抗原受体与单核/巨噬细胞的复合结构,其中嵌合抗原受体包含胞外域、跨膜域和胞内域;

[0017] 所述胞外域包含抗PD-L1 scFv分子或抗PD1 scFv分子;所述跨膜域包含 $\alpha 1\beta 1$ TM;所述胞内域包含 $\alpha 1\beta 1$ 与Fc γ RI共刺激域、可分泌型细胞因子GM-CSF、招募免疫细胞的细胞因子。抗PD-L1 scFv分子或抗PD1 scFv分子,能够增敏T细胞的肿瘤协同杀伤效应。

[0018] 所述的一种冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞,所述招募免疫细胞包括T细胞、NK细胞。

[0019] 所述的一种冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞,所述招募T细胞或NK细胞细胞的细胞因子包括CCL5。胞内域可分泌表达CCL5及GM-CSF,促进CAR-单核/巨噬细胞逆转冷肿瘤微环境的同时,招募T细胞等免疫细胞富集至肿瘤处实现“冷热”转换。

[0020] 所述的一种冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞,由包含有抗PD-L1 scFv分子的胞外域、 $\alpha 1\beta 1$ TM、 $\alpha 1\beta 1$ 与Fc γ RI共刺激域、可分泌型细胞因子GM-CSF、CCL5作为招募T细胞的细胞因子,组成的嵌合抗原受体的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0021] 第二方面,本发明提供了一种嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包含胞外域、跨膜域和胞内域;

[0022] 胞外域包含抗PD-L1 scFv分子或抗PD1 scFv分子;跨膜域包含 $\alpha 1\beta 1$ TM;胞内域包含 $\alpha 1\beta 1$ 与Fc γ RI共刺激域、可分泌型细胞因子GM-CSF、招募免疫细胞的细胞因子;

[0023] 优选,免疫细胞包括T细胞、NK细胞;

[0024] 更优选,T细胞等免疫细胞的细胞招募因子包括CCL5、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL14、CCL2、CCL3、CCL4、CCL20、CCL22、IL-8、IL12、IL-15、IL-18等机体具有免疫细胞招募活化能力的细胞因子。

[0025] 第三方面,本发明提供了一种含有所述的嵌合抗原受体的重组表达载体。

[0026] 第四方面,本发明提供了任一项所述的冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞的制备方法,构建所述的重组表达载体,将重组表达载体转染单核/巨噬细胞。

[0027] 所述的制备方法,所述重组表达载体的构建方法包括以下步骤:

[0028] (1) 将PD-L1 scFv或PD1 scFv、 $\alpha 1\beta 1$ TM、 $\alpha 1\beta 1$ 与Fc γ RI共刺激域和OFP使用linker进行连接,再使用P2A连接GM-CSF基序,再使用P2A连接招募T细胞的细胞因子基序,合成嵌合抗原受体PD-L1 scFv- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5或PD1scFv- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5;

[0029] (2) 将嵌合抗原受体PD-L1 scFv- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5或PD1 scFv- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5与慢病毒载体重组,构成重组表达载体。

[0030] 第五方面,本发明提供了任一项所述的冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞,所述的嵌合抗原受体,所述的重组表达载体在制备治疗实体瘤的药物中的应用。

[0031] 第六方面,本发明提供了一种治疗实体瘤的药物组合物,包含任一项所述的冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞,或所述的嵌合抗原受体,或所述的重组表达载体,及药物学上可接受的辅料或载体。

[0032] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0033] 本发明基于CCL5招募因子构建了免疫细胞招募、冷热肿瘤调控型CAR-单核/巨噬细胞,不但能够靶向肿瘤组织并深度浸润实体肿瘤内部特异吞噬肿瘤细胞,同时还能将肿瘤抗原提呈给T细胞,激活T细胞对肿瘤的免疫反应。本发明利用巨噬细胞的天然优势,增强肿瘤内部的深度浸润。并依靠细胞因子GM-CSF和CCL5,逆转肿瘤微环境,募集CD8+T细胞,恢复T细胞对肿瘤的杀伤作用,将免疫抑制型微环境恢复成免疫炎症型,将“冷肿瘤”逆转成“热肿瘤”,提高抗肿瘤效果。

附图说明

[0034] 图1为实施例1中靶向PD-L1的Immune cell recruiting CAR-M(ICR CAR-M)的分子结构图;

[0035] 图2为实施例3中抗PD-L1型ICR CAR-M与细胞膜的共聚焦共定位图;

[0036] 图3为实施例4中ICR CAR-M的活力检测结果图;

[0037] 图4为实施例5中UTD-M、Empty、CAR-like、ICR CAR-M组对PDL1+肿瘤细胞的效靶比杀伤结果图;

[0038] 图5为实施例6中ICR CAR-M吞噬B16F10肿瘤能力检测结果图;

[0039] 图6为实施例7中ICR CAR-M体外自身M1表型极化检测结果图,其中,*表示不同组之间的显著性差异,***为 $P<0.001$,**为 $P<0.01$,*为 $P<0.05$;

[0040] 图7为实施例8中ICR CAR-M体外抗M2复极化检测结果图,其中,*表示不同组之间的显著性差异,***为 $P<0.001$,**为 $P<0.01$,*为 $P<0.05$;

[0041] 图8为实施例9中ICR CAR-M体外调控M0型巨噬细胞极化为M1型的结果图,其中,*表示不同组之间的显著性差异,***为 $P<0.001$,**为 $P<0.01$,*为 $P<0.05$;

[0042] 图9为实施例10中ICR CAR-M体外调控M2型巨噬细胞逆转情况分析结果图,其中,*表示不同组之间的显著性差异,***为 $P<0.001$,**为 $P<0.01$,*为 $P<0.05$;

[0043] 图10为实施例11中Transwell趋化实验验证ICR CAR-M招募T细胞能力检测结果图;

[0044] 图11为实施例12中ICR CAR-M体内靶向小鼠肿瘤模型IVIS成像及定量结果图;

[0045] 图12为实施例13中ICR CAR-M体内治疗结果图。

具体实施方式

[0046] 以下将结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

[0047] 以下实施例采用慢病毒载体构建巨噬细胞的特异性CAR成为肿瘤微环境修复和治疗型CAR-M,以PD-L1为模式分子成功建立肿瘤微环境修复和招募免疫细胞的治疗型CAR-M,于细胞膜表面表达跨膜PD-L1 scFv胞外段。

[0048] 实施例1:ICR CAR-M慢病毒的构建和包装

[0049] 基于慢病毒载体,通过将PD-L1 scFv、 $\alpha 1\beta 1$ TM、 $\alpha 1\beta 1$ 与Fc γ RI共刺激域和OFP使用linker进行连接,再使用P2A连接GM-CSF基序,再使用P2A连接CCL5基序,构建的靶向PD-L1 ICR CAR-M的分子结构如图1所示,靶向PD-L1 ICR CAR-M的分子结构由胞外域、跨膜域和胞内域三部分构成。胞外域中的抗原结合域是抗PD-L1 scFv分子。跨膜域 $\alpha 1\beta 1$ TM的主要功能

在于将CAR分子锚定在细胞膜上,其对CAR分子表达的稳定性及活化胞内刺激域具有重要作用。胞内域主要由 $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI共刺激域、可分泌型细胞因子GM-CSF、CCL5组成,其转染单核/巨噬细胞,构建为ICR CAR-M。再将其转染巨噬细胞,构建巨噬细胞特异性CAR,通过将合成的PD-L1 scFv- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5的CAR慢病毒质粒与Rev、Gag、VSV三种辅助质粒进行共转染,使其包装成为完整的PD-L1 scFv- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5 CAR慢病毒。用于转染单核/巨噬细胞,构建单核/巨噬细胞特异性CAR-M(即ICR CAR-M)。

[0050] 具体步骤如下:

[0051] (1) 将处于对数生长期的HEK293T细胞均匀接种于6孔板中,在37°C、5%CO₂细胞培养箱中静置培养至细胞汇合度达到60%-70%,按3:1:1:1比例分别取质粒pCDH-PD-L1scFv- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5、Rev、Gag和VSV加入到装有Opti-MEM的离心管中混匀室温孵育,再加入TurboFect Transfection Reagent转染试剂,枪头轻柔吹打混匀,室温孵育;

[0052] (2) 将上述孵育好的混合液缓慢滴加接种到293T细胞中,混合均匀,置于37°C、5%CO₂培养16-24h后,弃掉培养板各孔中的转染混合液,添加2-3mL包含10%FBS、1×CD、0.01mM胆固醇、4.0mM L-Glu、0.01mM蛋黄卵磷脂的Advanced DMEM完全培养基,将细胞培养板重置于37°C、5%CO₂培养48h,待合成为PD-L1 scFv- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5CAR慢病毒;

[0053] (3) 慢病毒的收集:将上述步骤中获得的细胞培养基于离心管中3000rpm离心5min,吸取上清液至新的无菌离心管中进行下一步的浓缩纯化;

[0054] (4) 慢病毒的纯化浓缩:为去除细胞碎片,将含有慢病毒的培养基于4°C、4000g下离心10min。用0.22 μ m的过滤器过滤上清液并收集,离心机4°C、15000g离心2h。弃上清,利用病毒保存液重悬病毒颗粒,再10000g离心5min后取上清于-80°C中保存备用;

[0055] (5) 随后,检测包装出来的慢病毒滴度,设置不加入病毒稀释液的293T细胞作为阴性对照;倒置荧光显微镜下观察各孔荧光情况,计算慢病毒滴度为后期使用提供用量依据。

[0056] 上述PD-L1 ICR CAR-M分子(即PDL1 scFv-linker- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-linker-OFP-P2A-GM-CSF-P2A-CCL5)的核苷酸序列如下SEQ ID NO.1所示:

[0057] tctagaatgaatttacaaccaattttctggattggactgatcagttcagtttgctgtgtgtttgctgaggtgcagctggtggagagcggcggcggcctggtgcagcccggcggcagcctgaggctgagctgcgcccagcggc
ttcaccttcagcgcagcagctggatccactgggtgagggcagggccccggcaaggcctggagtggtggcctggatca
gcccctacggcggcagcacctactacggcagcgtgaaggcaggttcaccatcagcggcagaccagcaagaa
caccgcctacctgcagatgaacagcctgagggccgaggacaccgccgtgtactactgcgccaggaggcactggccc
ggcggccttcgactactggggccagggcaccctggtgaccgtgagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcga
gcggcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcgcacatccagatgaccagagccccagcagcctgagcggcagcgt
gggcgacaggggtgaccatcacctgcagggccagccaggacgtgagcaccgccgtggcctggtaccagcagaagccc
ggcaaggcccccaagctgctgatctacagcggcagcttctgtacagcggcgtgccagcaggttcagcggcagcg
gcagcggcaccgacttcacctgaccatcagcagcctgcagcccaggacttcgccacctactactgccagcagta
cttcataccccaccaccttcggccagggcaccaaggtggagatcaagagggggcgtggttcggcgggtggatct
ggtggaggaactggaggaggttcaggaggtggtttatgggtcatcctgctgagtgcttttgccgattgttgctgt
taatgctgctcatttttagcactgtggaagatcggattcttcaagagacctctgaagaagaagatggagaagaagat

ccatagactgcagagagagaagaagtacaacctggaggtgcctctggtgagcagcagggaagaaggccaacagc
ttccagcaggtgaggagcgacggcgtgtacgaggaggtgaccgccaccgccagccagaccaccctaaaggaggccc
ctgacggccctaggagcagcgtggcgactgtggcctgagcagcctgagcctctgcctcctagcgacagcaccgg
cgcccagaccagccagagcggcggtggttccggcggtggatctggtggaggaactggaggaggttcaggaggtggt
gatagcactgagaacgtcatcaagcccttcatgccttcaaggtgcacatggagggtccgtgaacggccacgagt
tcgagatcgagggcgtggcgagggcccccctacgagggctttcagaccgctaagctgaaggtgaccaagggtgg
ccccctgcccttcgctgggacatcctgtcccctcatttcacctacggctccaaggcctacgtgaagcaccgcc
gacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgaggagcgcgtgatgaactacgaggacggcg
gcgtggtgaccgtgaccagactcctccctacaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaa
cttccccctccgacggccccgtgatgcagaagaagaccatgggctgggagggcctcctccgagcggatgtacccccgag
gacggtgccctgaagggaagatcaagatgaggctgaagctgaaggacggcgccactacacctccgaggtcaaga
ccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgccctacatcgctcgacatcaagttggacatcacctccca
caacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgcggagggccgccaccacctgttccaggggaagcggagct
actaacttcagcctgctgaagcaggctggagacgtggaggagaaccctggacctatgtggctgcagaacctgctgt
tcttgggcatcgtggtgtacagcctgagcgcccccacaaggtctccaatcacagtgaccagacctggaagcagct
ggaggccatcaaggaggccctgaatctgctggacgacatgcccgtgacctgaacgaagaggtggaggtggtgtcc
aacgagttcagcctcaagaagctgacctgtgtgcagaccaggctgaagatcttcgagcagggcctgaggggcaact
tcaccaagctgaaggagccctgaatatgaccgccagctactaccagacctactgccccccaccctgagacaga
ttgagagaccaggtgaccacctacgccgacttcatcgatagcctcaagaccttctgacagacatccccctcgag
tgtaagaagccaggccagaagggaagcggagctactaacttcagcctgctgaagcaggctggagacgtggaggaga
accctggacctatgaagatctctgctgccgcccctgacaatcatcctgacagctgccgcccctgtgtacacctgccc
tgcttctccatattggaagcgatacaacaccttgttgttttgccttatctgtctctggctctgcctagagcccacgtg
aaggagtacttttacacatcttctaagtgtagcaacctggctgtggtgttcgtgacaagaagaatagacaggtgt
gtgccaacctgagaagaagtgggtgcaggagtacatcaactacctggagatgtcttaagaattc。

[0058] 实施例2:制备ICR CAR-M细胞系

[0059] 在包装为完整的慢病毒并检测了其滴度后,使用PD-L1 scFv- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5 CAR慢病毒感染巨噬细胞,获得PD-L1 scFv ICR CAR-M稳转细胞系,取单核/巨噬细胞接种于细胞培养板内,待其生长到细胞汇合度至60-70%时,向巨噬细胞的培养基中加入PD-L1 scFv- $\alpha 1\beta 1$ -Fc γ RI-GM-CSF-CCL5 CAR慢病毒病毒颗粒,24h前后更换新鲜DMEM完全培养基,48h后即完成巨噬细胞的慢病毒感染;观察细胞生长情况及形态变化,传代至新的培养瓶或培养皿中进行扩增或者冻存。

[0060] 实施例3:ICR CAR-M细胞系的共聚焦表征

[0061] 将PD-L1 scFv ICR CAR-M细胞系由含10%FBS的DMEM高糖培养基(hyclone)于37°C、5%CO₂的细胞培养箱中静置培养。

[0062] (1) 将培养的巨噬细胞利用PBS清洗1-2次,再用胰酶消化2min,并利用完全培养基重悬,重悬细胞浓度为10⁵个细胞/mL,将1mL细胞重悬液加入共聚焦小皿中,平铺均匀,于37°C、5%CO₂的细胞培养箱中静置培养12h,待细胞贴壁;

[0063] (2) 取出共聚焦小皿,利用PBS清洗细胞,每次清洗5min,清洗3次,再向共聚焦小皿中加入1mL的4%多聚甲醛固定20-30min,吸尽固定液,同样PBS清洗3次,每次5min;

[0064] (3) DiO处理:通过DiO(DiOC₁₈(3)) 细胞膜绿色荧光探针对ICR CAR-M细胞膜进行染色,首先利用DMSO将DiO粉末颗粒稀释成浓度为1-5mM的储存液,再利用PBS稀释浓度至1-5 μ M形成工作液,将100 μ L的工作液从共聚焦小皿的小室边缘加入,轻轻晃动覆盖所有细胞,15-20min后吸尽染色液,PBS清洗3次,每次5min;

[0065] (4) DAPI染色处理:利用DAPI蓝色荧光染料对ICR CAR-M细胞核进行染色,首先将浓度为5mg/mL的DAPI储存液利用PBS稀释至0.5-10 μ g/mL形成工作液再将100 μ L的工作液,加入共聚焦皿并覆盖所有细胞,10-15min后吸尽染色液,PBS清洗3次,每次5min;

[0066] (5) 封片及成像处理:样品用抗荧光衰减封片剂进行封片处理,使之完全覆盖样本细胞并且不能产生气泡,最终样品置于共聚焦扫描显微镜的载物台台上进行荧光监测。如图2所示,共聚焦显微镜结果显示PD-L1 scFvICR CAR-M融合蛋白成功跨膜表达。其中,DAPI代表DAPI蓝色荧光染料对ICR CAR-M细胞核染色成功,DiO代表DiO细胞膜绿色荧光探针对细胞膜进行染色成功,OFP红色荧光代表ICR CAR-M跨膜构建表达成功,Merge为DAPI、DiO、ICR CAR-M的叠加图片,体现了PD-L1 scFv-OFP跨膜表达与DiO细胞膜染色的共定位。(由于专利说明书附图不能带有色彩的限制,图2不能够完整用色彩清楚显示,Merge结果实为DAPI、DiO、PD-L1 scFv-OFP的叠加图片,验证了CAR结构的跨膜正确表达。)

[0067] 实施例4:ICR CAR-M细胞系的活力检测

[0068] 采用CCK细胞增殖试验验证ICR CAR-M细胞系的活力,具体操作如下:

[0069] (1) 于96孔板中每孔加入100 μ L的不同组的巨噬细胞悬液,分别为J774A.1 (UTD-M)、Empty-pCDH J774A.1 (Empty)、PD-L1 scFv J774A.1 (CAR-like)、PD-L1 scFv CAR J774A.1 (ICR CAR-M) 密度为 1×10^4 个细胞/mL,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中静置培养;

[0070] (2) 细胞培养24-48h之后,吸去96孔板中的培养基,用PBS清洗细胞2-3次,再向96孔板中加入10 μ L的CCK-8检测溶液,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养3-4h;

[0071] (3) 用酶标仪测定各孔在450nm处的吸光度,靶细胞细胞活性大小=(效靶比作用组吸光度-效应细胞对照组吸光度)/(靶细胞阳性对照组吸光度-空白孔吸光度)。

[0072] 结果如图3所示,ICR CAR-M组细胞增殖显著增强于CAR-Like组和UTD-M、Empty组。研究结果提示,ICR CAR-M的基础活力显著增强,其中GM-CSF的表达增强了CAR-M的活力。

[0073] 实施例5:ICR CAR-M效靶比肿瘤细胞杀伤效果验证

[0074] (1) 于96孔板中每孔加入100 μ L的PD-L1阳性肿瘤靶细胞B16F10悬液,密度为 1×10^5 个细胞/mL,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中静置培养;

[0075] (2) 待PD-L1阳性肿瘤靶细胞贴壁后,吸去孔板中的培养基,用PBS清洗细胞2-3次,分别向96孔板中分别加入100 μ L 1:1,0.75:1,0.5:1,0.25:1效靶比的UTD-M、Empty、CAR-like、ICR CAR-M,剂量效应组依次设置不同效靶比,同时在没有靶细胞的96孔板中加入等量的UTD-M、Empty、CAR-like、ICR CAR-M细胞作为效应细胞对照,设置全部裂解的未加效应细胞的等量PD-L1阳性肿瘤靶细胞孔作为靶细胞阳性对照组,每组实验设置3个平行孔;

[0076] (3) 细胞共培养24-48h之后,吸去96孔板中的培养基,用PBS清洗细胞2-3次,再向96孔板中加入10 μ L的CCK8检测溶液,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养3-4h;

[0077] (4) 用酶标仪测定各孔在450nm处的吸光度,靶细胞细胞活性大小=(效靶比作用组吸光度-效应细胞对照组吸光度)/(靶细胞阳性对照组吸光度-空白孔吸光度)。

[0078] 结果如图4所示,相比于UTD-M、Empty、CAR-like组,ICR CAR-M组对PD-L1阳性肿瘤

细胞有显著杀伤作用。

[0079] 实施例6:ICR CAR-M吞噬肿瘤细胞能力验证

[0080] 将实施例2中构建的ICR CAR-M,分别基于1:1的效靶比,以PD-L1+-B16F10肿瘤细胞为模型,使用ICR CAR-M吞噬肿瘤细胞,具体操作为:于6孔板中分别接种 4×10^5 个UTD-M、Empty、CAR-like、ICR CAR-M、PD-L1阳性肿瘤靶细胞,以10%FBS的DMEM高糖培养基于37°C、5%CO₂条件培养,待细胞长至汇合度为70-80%时,向巨噬细胞组中加入工作浓度4 μ M的DiO染料,向PD-L1阳性肿瘤靶细胞组中加入工作浓度4 μ M DiI染料,孵育4-6h。效靶细胞分别染色互做后于荧光显微镜下拍照。

[0081] 结果如图5所示,相对于UTD-M、Empty、CAR-like组,ICR CAR-M组的吞噬肿瘤细胞能力得到了显著提升,这意味着本专利设计的CAR-M吞噬能力得到了显著增强。(因专利说明书附图不能带有色彩限制,图5的荧光结果显示不全,第二列红色代表各类型巨噬细胞与肿瘤细胞相互作用后被吞噬的肿瘤细胞,在1小时后ICR CAR-M的图案中红色荧光分布最多。)

[0082] 实施例7:ICR CAR-M的体外M1表型极化检测

[0083] 将实施例2中构建的ICR CAR-M,基于 2×10^5 个细胞/mL的密度,于6孔板中进行培养并检测,具体操作为:于6孔板中分别接种 4×10^5 个UTD-M、Empty、CAR-like、ICR CAR-M以10%FBS的DMEM高糖培养基于37°C、5%CO₂培养箱中静置培养48h,随后分别提取各组细胞总RNA,采用qPCR检测CAR-M自身极化。利用SuperReal PreMix Plus试剂盒检测上述细胞中极化相关细胞因子的表达情况,按照试剂盒说明书进行实验,qPCR实验步骤如下:

[0084] (1) 正常溶解2 \times SuperReal Premix Plus、50 \times ROX Reference Dye、模板、引物和RNase-free ddH₂O,并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀;

[0085] (2) 在冰上将反转得到的cDNA模板以一定体系与正向引物、反向引物、Mix、ROX、ddH₂O混合,利用移液枪将混合液添加入八连管中,20 μ L体系包括:10 μ L 2 \times SuperReal Premix Plus、0.6 μ L正向引物(10 μ M)、0.6 μ L反向引物(10 μ M)、0.1-2 μ L cDNA模板、0.4 μ L 50 \times ROX Reference Dye,使用RNase-free ddH₂O补充至总体积20 μ L;

[0086] (3) 盖上管盖,吹打混匀,用微量离心机离心5-10s,确保所有组分均在管底;

[0087] (4) 将反应体系放置于RT-qPCR仪ABI 7300中,设置仪器参数,95°C预变性15min、95°C变性10s、60°C \pm 1°C退火20s,72°C延伸31s,40个循环,运行程序,待程序结束后导出Ct值,并利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak)法计算最终结果。

[0088] 结果如图6所示,与CAR-like组和UTD-M、Empty组相比,ICR CAR-M组M1型因子CD80基因表达水平均显著上升,但其M2型因子CD206表达水平均显著下降,说明ICR CAR-M组相对于CAR-like组和UTD-M、Empty组均呈现显著性的M1型抗肿瘤巨噬细胞特性,提示GM-CSF在CAR-M的极化方面发挥了作用,说明本发明ICR CAR-M能够维持自身M1表型不被极化改变。

[0089] 实施例8:ICR CAR-M体外抗M2复极化验证

[0090] 采用肿瘤细胞培养上清液体外模拟肿瘤抑制性微环境体系,分别作用ICR CAR-M、CAR-Like及UTD-M、Empty组,将实施例2构建成功的ICR CAR-M细胞与CAR-Like和UTD-M、Empty组进行对照分析,肿瘤培养上清对ICR CAR-M诱导5d,提取细胞总RNA,qPCR检测进一步验证CAR-M抗极化能力。具体步骤包括:

[0091] (1) 于6孔板中每孔加入 2×10^5 个的ICR CAR-M、CAR-like、UTD-M、Empty组,置于37°C、5%CO₂的培养箱中静置培养;

[0092] (2) 待ICR CAR-M、CAR-like、UTD-M、Empty组细胞贴壁后,吸去孔板中的培养基,PBS清洗细胞2-3次,分别向孔板中每组加入肿瘤细胞培养上清,每组实验设置3个平行孔。

[0093] (3) 细胞诱导5d后,吸去孔板中的培养基,PBS清洗细胞2-3次,再向孔板中每孔加入1mL的Trizol,提取RNA,利用SuperReal Premix Plus试剂盒,并按照其说明书进行实验。

[0094] (4) 正常溶解 $2 \times$ SuperReal Premix Plus、 $50 \times$ ROX Reference Dye、模板、引物和RNase-free ddH₂O,并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀;

[0095] (5) 在冰上将反转得到的cDNA模板以一定体系与正向引物、反向引物、Mix、ROX、ddH₂O混合,利用移液枪将混合液添加入八连管中,20 μ L体系包括:10 μ L $2 \times$ SuperReal Premix Plus、0.6 μ L正向引物(10 μ M)、0.6 μ L反向引物(10 μ M)、0.1-2 μ L cDNA模板、0.4 μ L $50 \times$ ROX Reference Dye,使用RNase-free ddH₂O补充至总体积20 μ L;

[0096] (6) 盖上管盖,吹打混匀,用微量离心机离心5-10s,确保所有组分均在管底;

[0097] (7) 将反应体系放置于RT-qPCR仪中,设置仪器参数,95°C预变性15min、95°C变性10s、60 \pm 1°C退火20s、72°C延伸31s,40个循环,运行程序,待程序结束后导出Ct值,并利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak)法计算最终结果。

[0098] 结果如图7所示,在肿瘤上清液的作用下,与ICR CAR-M组相比,CAR-like组、UTD-M、Empty组M2型因子CD206基因表达水平均显著上升,提示CAR-like组、和UTD-M、Empty组在肿瘤微环境诱导性出现M2型极化,而ICR CAR-M组仍然保持显著性的M1型巨噬细胞特征,说明ICR CAR-M能够在肿瘤微环境中抗M2复极化。

[0099] 实施例9:ICR CAR-M体外调控M0型巨噬细胞逆转为M1型

[0100] 采用培养上清液体外诱导普通巨噬细胞,提取其细胞总RNA,qPCR检测进一步验证ICR CAR-M极化能力。具体步骤包括:

[0101] (1) 于6孔板中每孔加入 2×10^5 个普通巨噬细胞,使用UTD-M、Empty、CAR-like、ICR CAR-M细胞培养液上清进行诱导;

[0102] (2) 细胞诱导5d后,吸去6孔板中的培养基,用PBS清洗细胞2-3次,再向6孔板中每孔加入1mL的Trizol,提取RNA,检测方法同上述的qPCR的检测方法。

[0103] 结果如图8所示,UTD-M、Empty、CAR-like组M2型标志物CD206基因表达水平均显著上升,提示UTD-M、Empty、CAR-like组不能诱导M0型巨噬细胞重编程为M1表型,而ICR CAR-M组上清诱导的巨噬细胞显示出显著性的M1型巨噬细胞特征,说明ICR CAR-M上清能够调控M0型巨噬细胞极化为M1型,初步评价其体外调控能力。

[0104] 实施例10:ICR CAR-M体外调控M2型巨噬细胞逆转为M1型

[0105] 采用肿瘤细胞培养上清液体外模拟肿瘤抑制性微环境体系,分别作用ICR CAR-M、CAR-like、UTD-M、Empty组,将构建成功的ICR CAR-M细胞与CAR-Like和UTD-M、Empty组进行对照分析,肿瘤培养上清对普通巨噬细胞诱导,随后使用CAR-M上清进行诱导,提取其提取细胞总RNA,qPCR检测进一步验证ICR CAR-M抗极化能力。具体步骤包括:

[0106] (1) 于6孔板中每孔加入 2×10^5 个普通巨噬细胞,使用肿瘤细胞培养上清诱导5d,置于37°C、5%CO₂的培养箱中静置培养,每组实验设置3个平行孔;

[0107] (2) 细胞诱导5d后,吸去6孔板中的培养基,用PBS清洗细胞2-3次,使用ICR CAR-M、

CAR-like组、UTD-M、Empty组细胞培养液上清进行诱导；

[0108] (3) 细胞诱导5d后,吸去6孔板中的培养基,用PBS清洗细胞2-3次,再向6孔板中每孔加入1mL的Trizol,提取RNA,检测方法同上述的qPCR的检测方法。

[0109] 结果如图9所示,与CAR-like组、UTD-M、Empty组相比,在ICR CAR-M组上清液的作用下,CAR-like组、UTD-M、Empty组M2型因子CD206表达水平均显著上升,提示CAR-like组、UTD-M、Empty组在肿瘤微环境中不能诱导M2型巨噬细胞重编程为M1表型,而ICR CAR-M组上清诱导的巨噬细胞显示出显著性的M1型巨噬细胞特征,说明ICR CAR-M上清能够调控M2型巨噬细胞逆转为M1型,初步评价其体外肿瘤微环境调控能力。

[0110] 实施例11:Transwell趋化实验验证ICR CAR-M招募T细胞

[0111] 采用5.0 μ m孔径的聚碳酸酯膜Transwell 24孔板用来验证ICR CAR-M特异性招募T细胞体外趋向性,其具体实验操作如下:

[0112] (1) 下层细胞的接种:向Transwell 24孔板中分别接种 2.5×10^5 、 3.75×10^5 、 5×10^5 个CAR-like组和ICR CAR-M组细胞,并分别标定为I (2.5×10^5) 组、II (3.75×10^5) 组、III (5×10^5) 组,用含10%FBS的DMEM高糖培养基于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养24h;

[0113] (2) 上层T细胞的接种:将聚碳酸酯膜Transwell嵌套嵌入24孔板中,将 5×10^5 个T细胞接种至Transwell嵌套上层,并将T细胞用CD3+抗体进行激活,T细胞来源自小鼠脾脏;

[0114] (3) 5%CO₂,37 $^{\circ}$ C培养箱共培养2h,检测上室未迁移的T细胞和下室迁移的T细胞,流式进行计数。

[0115] 结果如图10显示,与CAR-like组相比,ICR CAR-M组能够显著使T细胞迁移至下室,说明ICR CAR-M通过胞内表达CCL5的设计,使其具备招募T细胞的能力。

[0116] 实施例12:ICR CAR-M体内靶向肿瘤效果验证

[0117] 本发明使用小鼠B16F10肿瘤模型验证ICR CAR-M在体内对肿瘤的靶向效果,B16F10肿瘤模型的建立及体内靶向验证包括如下步骤:

[0118] (1) 小鼠黑色素瘤细胞系B16F10利用1640培养基于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱中培养;

[0119] (2) 4-6周龄的雌性C57小鼠购买后需于恒温无菌通风小鼠饲养间饲养一周以上后进行小鼠实验;

[0120] (3) 将B16F10细胞扩大培养,待小鼠饲养约一周后,消化B16F10细胞,用PBS清洗2-3次,并利用PBS重悬,稀释密度为 10^7 个细胞/mL,将100 μ L细胞重悬液以皮下注射的方式注射到小鼠右肢上方皮下;

[0121] (4) 将UTD-M、ICR CAR-M细胞均利用DMEM高糖培养基于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱中培养;

[0122] (5) 待B16F10细胞成瘤后,每组设置1只小鼠,分别将100 μ L UTD-M或ICR CAR-M细胞悬液通过尾静脉方式进行注射,注射前先利用IR780对UTD-M和ICR CAR-M进行染色,每6mL培养基加入15 μ L染料,悬浮染色半小时。UTD-M、ICR CAR-M组分别注射 3×10^6 个细胞,随后利用IVIS进行成像拍摄,分为0h,2h,4h,6h,8h,10h,12h,24h,48h,随后进行离体拍摄心,肝,脾,肺,肾,肿瘤。

[0123] 结果如图11所示,CAR-M能够很好的富集到肿瘤细胞处,在器官中分布较UTD-M少。

[0124] 实施例13:ICR CAR-M体内治疗肿瘤效果验证

[0125] 本发明使用小鼠B16F10肿瘤模型验证ICR CAR-M的抗肿瘤效果,B16F10肿瘤模型的建立及肿瘤治疗过程包括如下步骤:

[0126] (1) 小鼠黑色素瘤细胞系B16F10利用1640培养基于37°C、5%CO₂细胞培养箱中培养;

[0127] (2) 4-6周龄的雌性C57小鼠购买后需于恒温无菌通风小鼠饲养间饲养一周以上后进行小鼠实验;

[0128] (3) 将B16F10细胞扩大培养,待小鼠饲养约一周后,消化B16F10细胞,用PBS清洗2-3次,并利用PBS重悬,稀释密度为10⁷个细胞/mL,将100μL细胞重悬液以皮下注射的方式注射到小鼠右肢上方皮下;

[0129] (4) 将UTD-M、Empty、CAR-like、ICR CAR-M细胞均利用DMEM高糖培养基于37°C、5%CO₂细胞培养箱中培养;

[0130] (5) 待B16F10细胞成瘤后,每组设置6只小鼠的平行实验,分别将100μL PBS或细胞重悬液通过尾静脉方式进行注射,UTD-M、Empty、CAR-like、ICR CAR-M组每组每次分别注射3×10⁶个细胞,在注射第一次后的第5d,进行第二次注射,共注射两次。

[0131] (6) 用电子游标卡尺对小鼠肿瘤的长和宽分别进行测量,利用电子天平对小鼠体重进行测量,小鼠肿瘤体积=(长*宽²)/2,每两天测量一次,最后计算小鼠生存曲线。

[0132] 结果如图12,相对于CAR-like组和UTD-M、Empty组,ICR CAR-M组肿瘤得到了明显抑制(图12-B),UTD-M、Empty组与PBS组无法对小鼠肿瘤生长形成显著性抑制,CAR-like组虽然相对于普通巨噬细胞治疗有一定抑制效果,但是无法有效治疗,而ICR CAR-M组对小鼠肿瘤取得了显著性抑制效果;图12-C显示相对于CAR-like组和UTD-M、Empty、PBS组荷瘤小鼠陆续出现死亡,ICR CAR-M组小鼠生存期显著延长,部分小鼠完全治愈,ICR CAR-M组取得了显著的治疗效果。另外,相对于CAR-like组和UTD-M、Empty组,ICR CAR-M组体重无明显变化,提示其具有较好安全性。

[0133] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

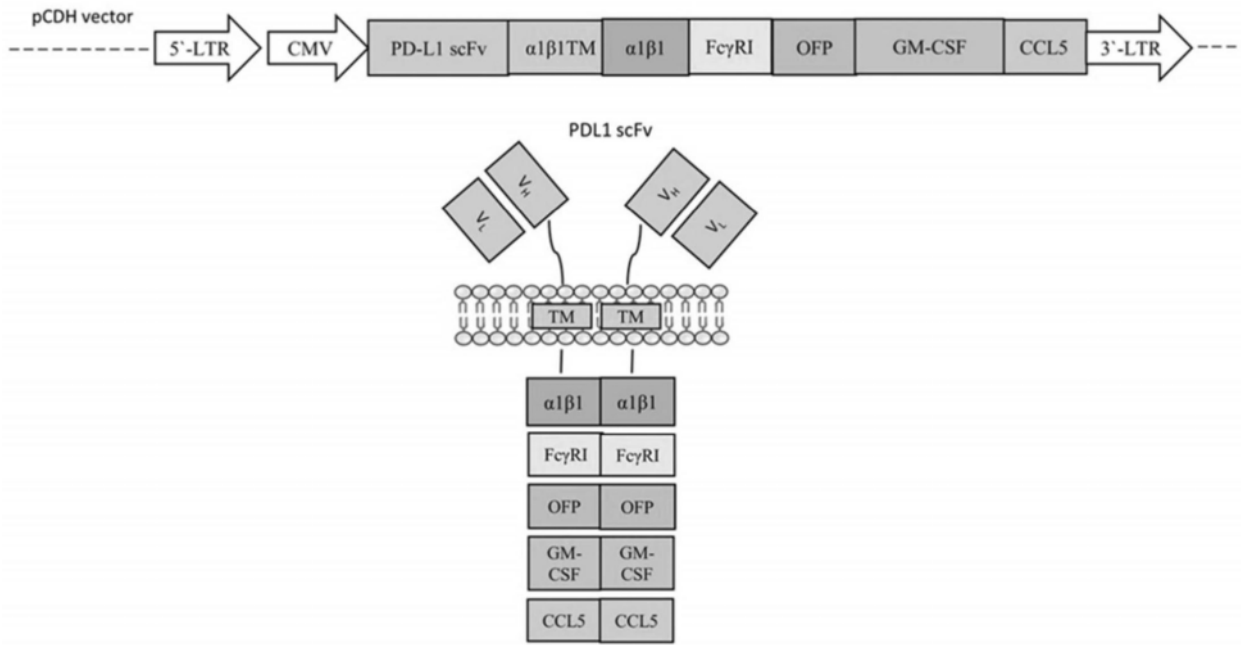


图1

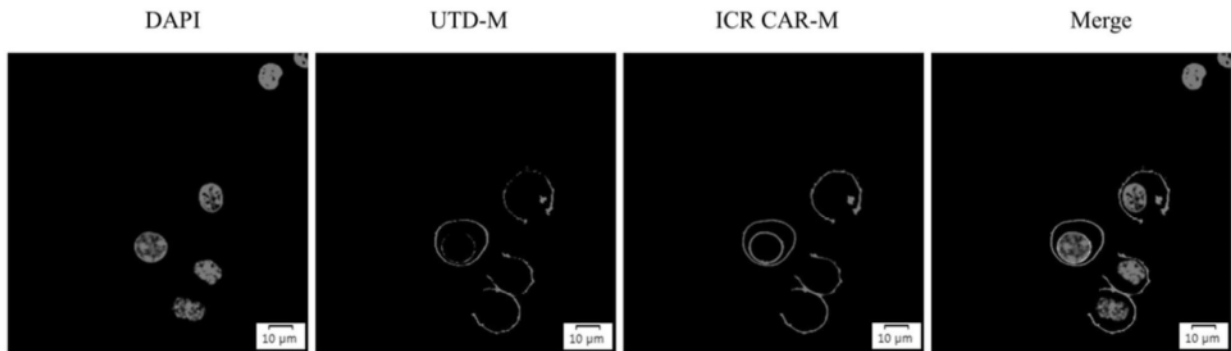


图2

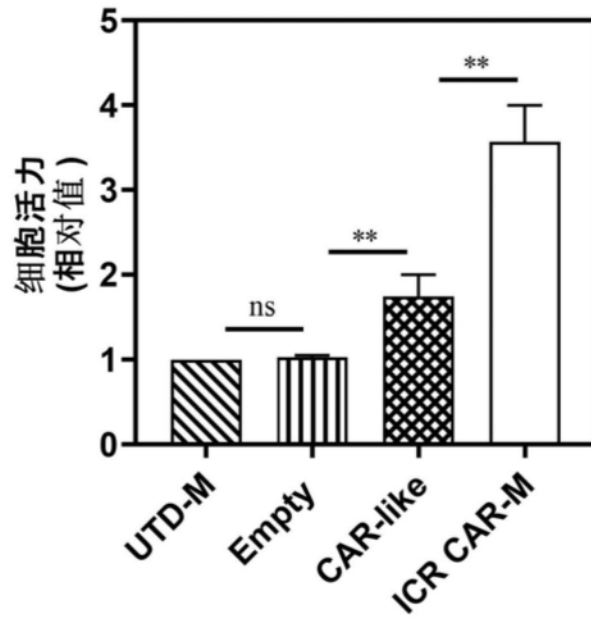


图3

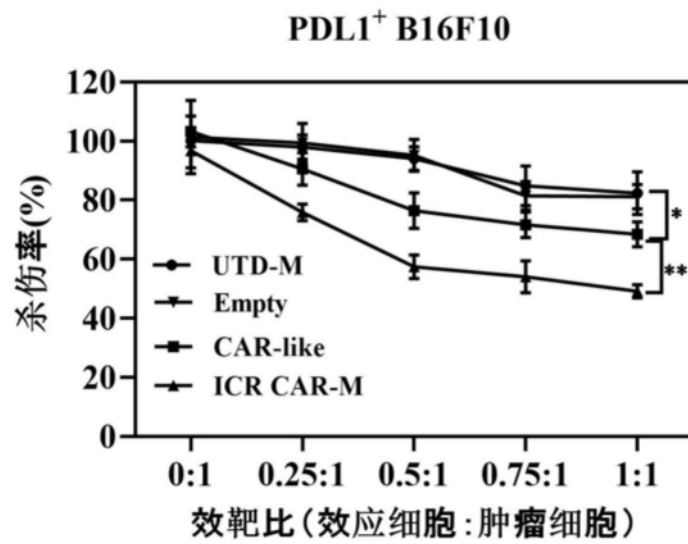


图4

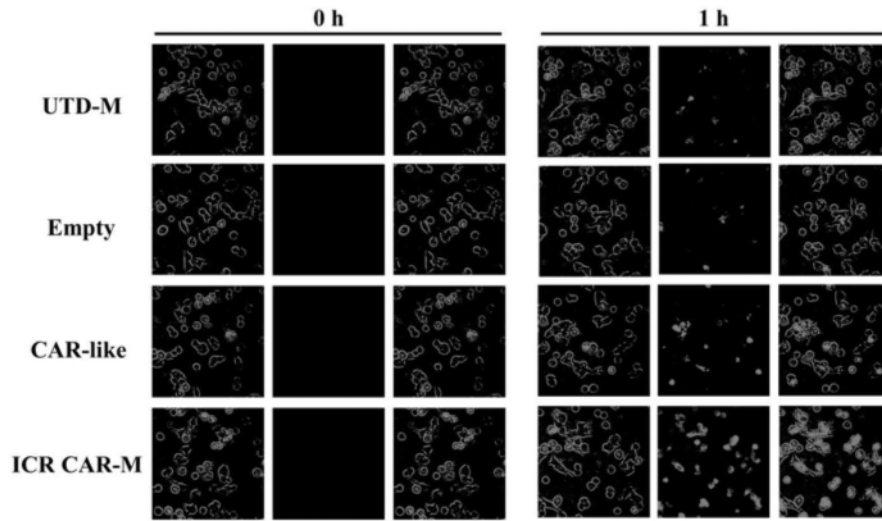


图5

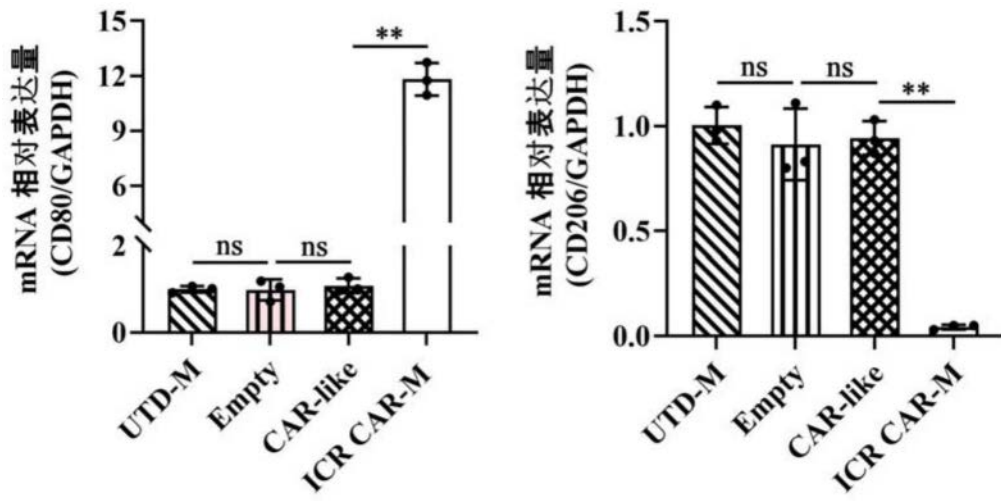


图6

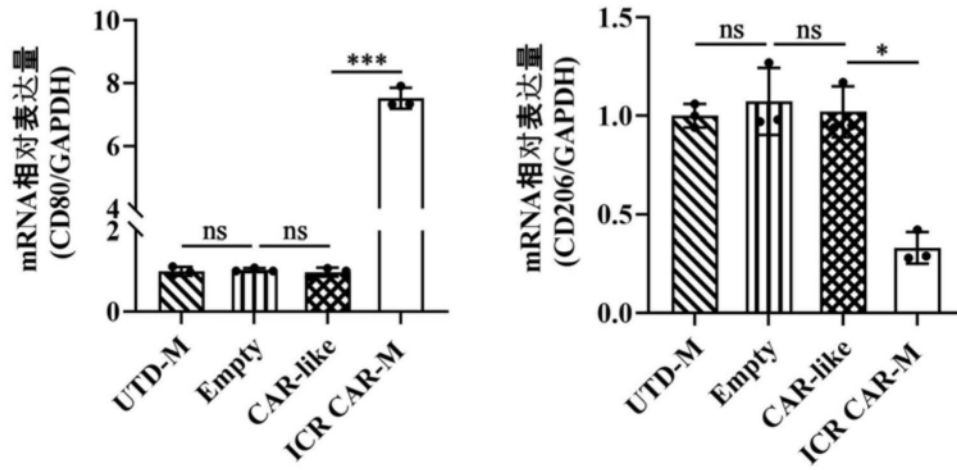


图7

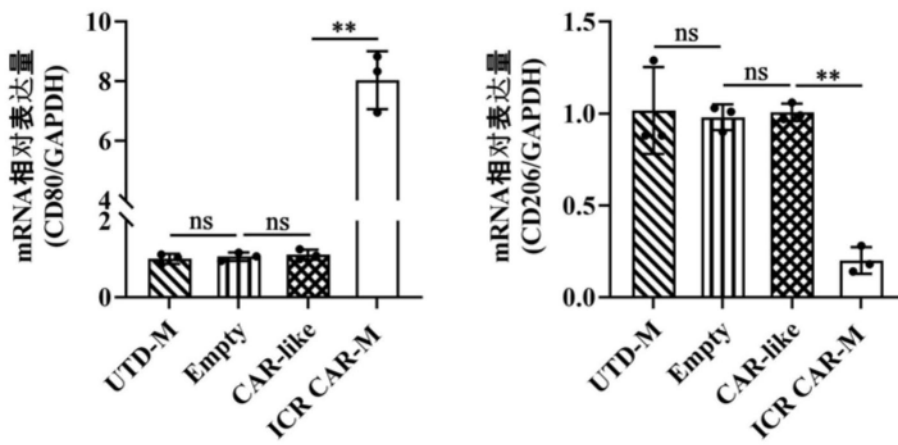


图8

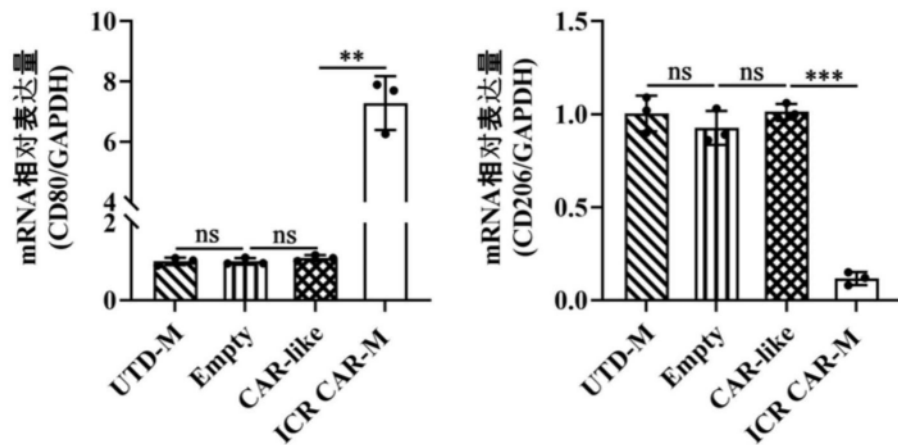


图9

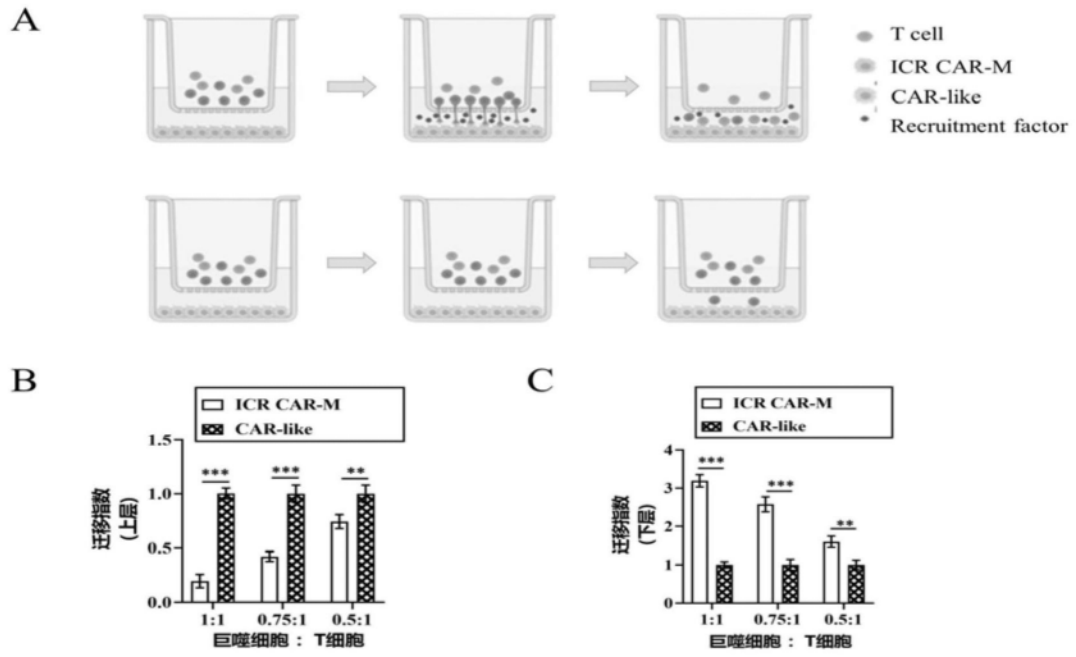


图10

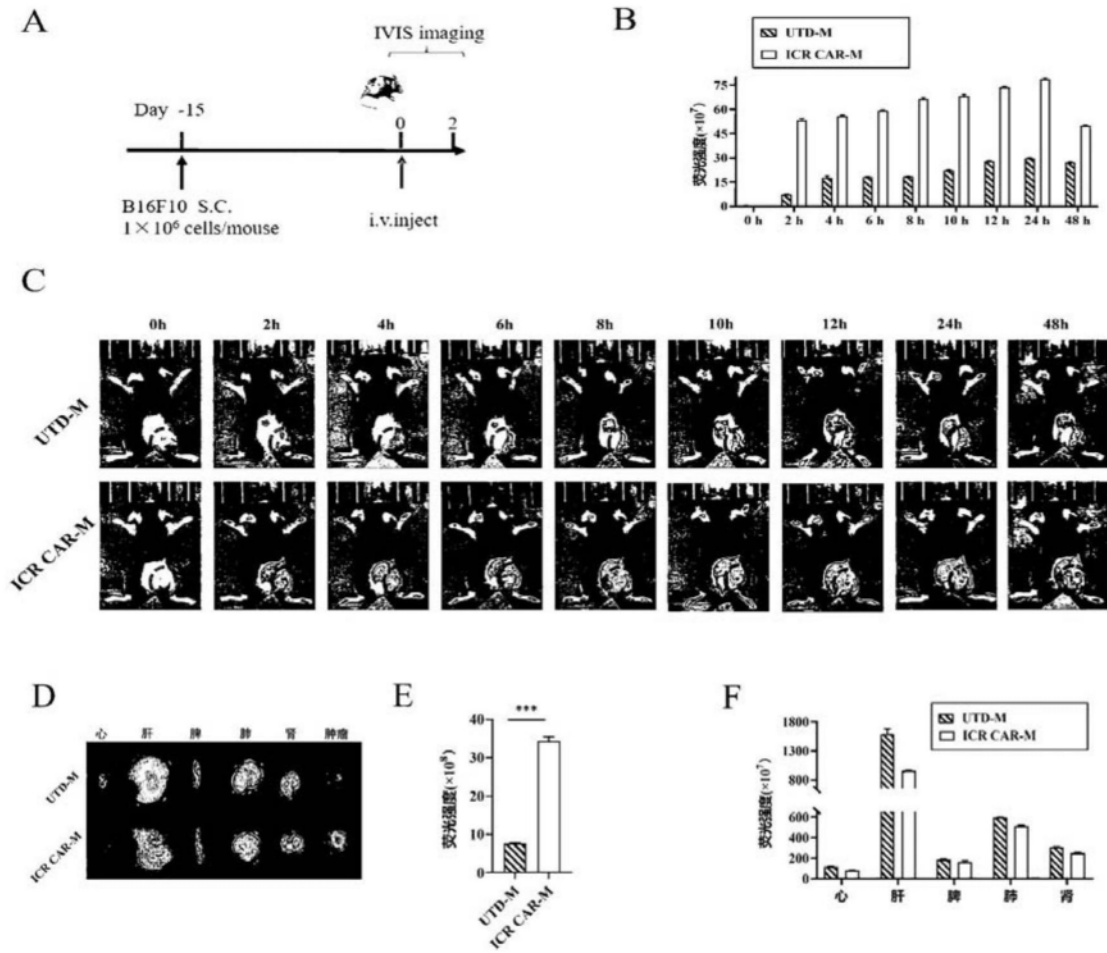


图11

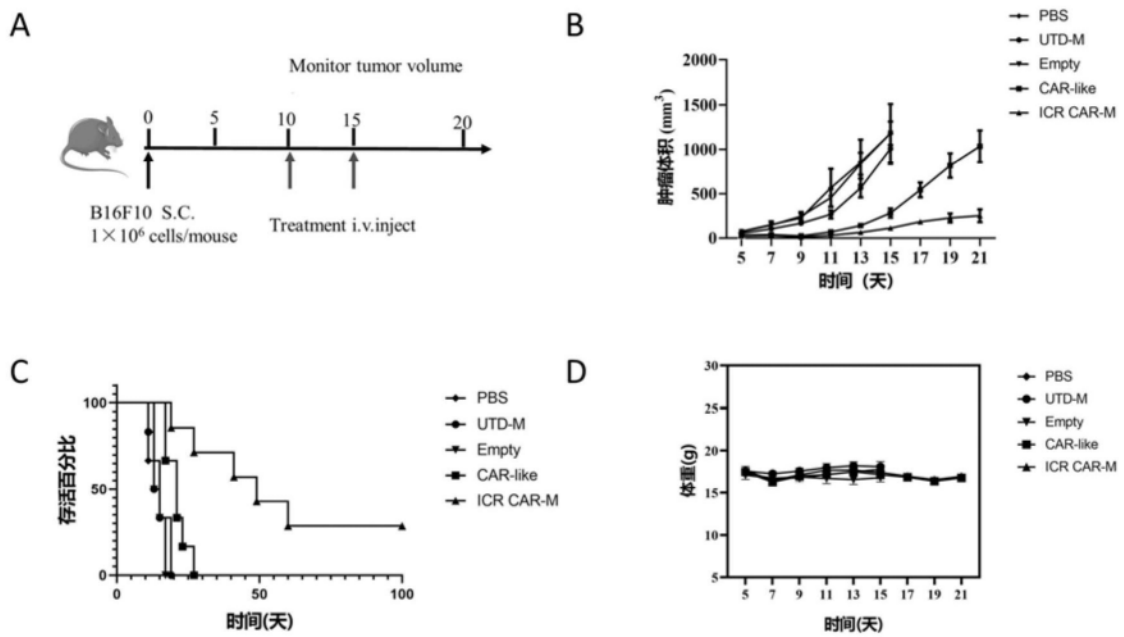


图12