



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107699591 A

(43)申请公布日 2018.02.16

(21)申请号 201710322510.4

(22)申请日 2017.05.09

(71)申请人 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 冯建海 张传鹏 强邦明
金海锋 万磊 韩庆梅

(74)专利代理机构 昆明合众智信知识产权事务
所 53113

代理人 李松松

(51)Int.Cl.

C12N 15/867(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

A61P 35/00(2006.01)

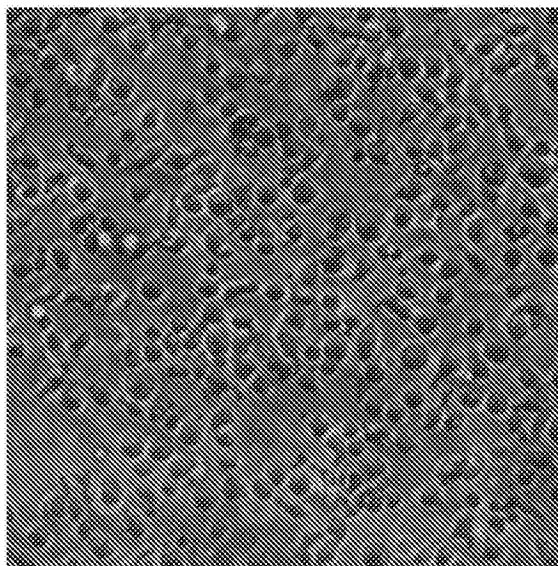
权利要求书1页 说明书5页
序列表1页 附图5页

(54)发明名称

一种敲除PD-1的T细胞制备方法及其应用

(57)摘要

本发明属于生物与新医药技术领域。公开了一种敲除PD-1的T细胞制备方法,该技术是利用Crispr/Cas9系统来敲除PD-1基因。本发明还涉及Crispr/Cas9技术修饰的T细胞,所述T细胞表面含有PD-1蛋白,可与癌细胞表面的PD-L1蛋白结合,阻碍活化T细胞攻击癌细胞。敲除T细胞中的PD-1基因,打开了免疫系统的刹车闸,增强免疫系统的功能。



1. 一种敲除PD-1的T细胞制备方法,其特征在于:在PD-1的基因序列中选取19个碱基序列作为靶点,构建pHBLV-gRNA-cas9-GFP-PD-1质粒,利用慢病毒包装体系将PD-1基因包装到慢病毒中,将所述携带PD-1基因的慢病毒感染单核细胞诱导的异质T淋巴细胞,得到敲除PD-1基因的T淋巴细胞。

2. 如权利要求1所述的一种敲除PD-1的T细胞的制备方法,其特征在于:所述19个碱基序列为序列表SEQ.ID.NO.1所示的核苷酸序列。

3. 如权利要求1所述的一种敲除PD-1的T淋巴细胞的制备方法,其特征在于,所述单核细胞诱导的异质T淋巴细胞如下制备:取患者自身的外周血,分离单个核细胞,用含有重组干扰素 γ 的Lymphocyte Serum-free Medium KBM 551培养基诱导培养24小时后,加入重组白细胞介素-2和OKT-3诱导继续培养24小时;每隔三天倍比加含有重组白细胞介素-2的培养基,同时加入5%的患者自体血浆,培养至第14天,流式细胞术检测CIK细胞的分子标记CD3⁺、CD56⁺的阳性表达率;当CD3⁺阳性率 $>80\%$,CD3⁺CD56⁺双阳性率 $>20\%$,视为CIK诱导成功,收获患者自体单核细胞诱导的异质T淋巴细胞,用于慢病毒感染。

4. 如权利要求1所述的一种敲除PD-1的T淋巴细胞的制备方法,其特征在于,将所述携带PD-1基因的慢病毒感染单核细胞诱导的异质T淋巴细胞如下操作:所述pHBLV-gRNA-cas9-GFP-PD-1质粒和慢病毒穿梭质粒及其辅助包装原件载体质粒共同转染293T细胞,所述293T细胞内PD-1基因被包装成慢病毒颗粒,释放到细胞外,收集含有慢病毒的上清,并用收集到的上清感染诱导的异质T淋巴细胞。

5. 如权利要求1所述的一种敲除PD-1的T淋巴细胞的制备方法,其特征在于,所述敲除PD-1的基因靶点片段如下制取:通过基因合成技术合成PD-1基因。

6. 一种治疗癌症的药物,其特征在于:含有权利要求1所述的敲除PD-1的T细胞。

7. 权利要求1所述的敲除PD-1的T细胞用于制备治疗恶性肿瘤的药物的用途。

8. 如权利要求7所述的制备治疗恶性肿瘤的药物的用途,其特征在于:所述恶性肿瘤为胃癌,肠癌,胰腺癌,间皮瘤,肺癌,乳腺癌和卵巢癌等肿瘤。

一种敲除PD-1的T细胞制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物与新医药技术领域,更具体的说,是一种敲除PD-1的T细胞制备方法及应用。

背景技术

[0002] PD-1(程序性死亡受体1,programmed death 1)是55KD的跨膜蛋白,属于免疫球蛋白超家族成员。其胞外区只有1个IgV样区,胞浆区有2个酪氨酸残基,尾部有1个ITIM(immunoreceptor tryosine-based inhibitory motif)。PD-1可表达于活化的T细胞、B细胞和骨髓细胞,以及CD4-CD8-胸腺细胞。PD-1有两个配体,PD-L1(B7-H1)和PD-L2(B7-DC),均为B7家族中的新成员。PD-1是免疫抑制性受体,与其配体PD-L1、PD-L2相互作用传递抑制性信号,在免疫应答中发挥负向调控作用。T细胞上的PD-1与肿瘤细胞中的PD-L1/PD-L2的结合,可抑制活化的T细胞攻击肿瘤细胞,导致免疫系统不能发挥全部作用,使肿瘤细胞逃逸。

[0003] CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats),被称为规律成簇间隔短回文重复,实际上就是一种基因编辑器。研究人员发现,它是一种精确的万能基因武器,可以用来删除、添加、激活或抑制其他生物体的目标基因,这些目标基因包括人、老鼠、斑马鱼和细菌的基因等。CRISPR簇是一个广泛存在于细菌和古生菌基因组中的特殊DNA重复序列家族,其序列由一个前导区(Leader)、多个短而高度保守的重复序列区(Repeat)和多个间隔区(Spacer)组成。

[0004] 目前发现的CRISPR/Cas系统有三种不同类型即I型、II型和III型,它们存在于大约40%已测序的真细菌和90%已测序的古细菌中。其中II型的组成较为简单,以Cas9蛋白以及向导RNA(gRNA)为核心组成,也是目前研究中最深入的类型。在II型系统中pre-crRNA的加工由Cas家族中的Cas9单独参与。研究表明,Cas9还可以剪切线性和超螺旋的质粒,其剪切效率堪比限制性内切酶。本研究中使用的就是Crispr/Cas9系统。

[0005] 由于PD-1蛋白在免疫应答中发挥负向调控作用,使得部分肿瘤细胞逃避T细胞的攻击,造成肿瘤细胞的扩散。敲除T细胞中的PD-1蛋白,可扩大T细胞的攻击范围,增强T细胞的免疫能力。本研究中利用Crispr/Cas9系统,敲除T细胞中的PD-1基因,使其不表达PD-1蛋白,打开免疫系统的刹车闸,增强免疫系统的功能。

发明内容

[0006] 本发明提供了一个利用Crispr/Cas9系统敲除PD-1基因,表达所述Crispr/Cas9系统的T淋巴细胞,以及所述T淋巴细胞用于制备治疗恶性肿瘤的药物的用途。具体包括:

[0007] (1) pHBLV-gRNA-cas9-GFP-PD-1质粒构建

[0008] 本发明中提供了一个PD-1的靶点基因,利用该靶点构建pHBLV-gRNA-cas9-GFP-PD-1载体。

[0009] (2) 重组病毒表达载体

[0010] 本发明中使用的载体是慢病毒载体pHBLV-gRNA-cas9-GFP, pHBLV-gRNA-cas9-GFP表达基因载体含有一个Cas9蛋白, 一个巨细胞病毒的启动子序列(CMV Promoter)和标签蛋白(GFP)及选择性的抗性基因(AmpR)。通过基因合成的PD-1gRNA序列, 即目标靶点, 在T4连接酶作用下, 与线性RNA敲除载体连接, 形成完整载体pHBLV-gRNA-cas9-GFP-PD-1(载体图谱见图1)。(3) 宿主细胞

[0011] 本发明所用的宿主细胞为一种异质T淋巴细胞——CIK(多种细胞因子诱导的杀伤细胞, cytokine-induced killer)。CIK细胞实际上是体外扩增出的以CD3+CD56+为主的异质性细胞群, 该细胞群是在多种细胞因子(如OKT-3、IL-2和IFN- γ 等)的刺激下, 由从外周血分离出来的单个核细胞在体外培养扩增而成, 具有极强的溶瘤活性。相对与普通的T淋巴细胞, CIK具有以下优势: ①细胞增殖能力强; ②杀伤活力强, 毒副作用小, 无严重不良反应; ③杀瘤谱广, 不受MHC限制, 具有广谱杀肿瘤和病毒的作用; ④典型的生物治疗模式, 通过基因工程方法改良的CIK细胞, 可对特定肿瘤进行杀伤。

[0012] (4) 敲除PD-1基因的T细胞的应用途径及剂量

[0013] 本发明中敲除PD-1基因的T细胞, 是自体的T细胞。所用T细胞的数量为 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ /Kg。通常所用的T细胞的剂量为 $0.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ /kg。

附图说明

[0014] 图1为pHBLV-gRNA-cas9-GFP的载体示意图。

[0015] 图2是本发明外周血单核细胞诱导的CIK倒置显微镜下视野图。

[0016] 图3是本发明外周血单核细胞诱导的CIK的表面分子标记CD3+CD56+表达的流式图(CD3表达率为81.6%, CD56表达率为49.5%, 双阳性为34.6%)。

[0017] 图4是本发明所述的293T细胞明视野图。

[0018] 图5是显微镜下观察pHBLV-gRNA-cas9-GFP-PD-1转染293T细胞图。

[0019] 图6是荧光显微镜下观察收集的病毒颗粒进行的病毒滴度检测。

[0020] 图7是本发明所述慢病毒感染CIK细胞免疫荧光显微镜下视野图。

[0021] 图8是本发明所述慢病毒感染CIK细胞后流式细胞术检测其表达率(病毒感染率为12%)。

具体实施方式

[0022] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述, 本领域技术人员将会理解, 下列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条件者, 按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均可以通过市面上购买获得的常规产品。

[0023] 实施例1: 将基因片段PD-1插入慢病毒表达载体pHBLV-gRNA-cas9-GFP

[0024] 上述PD-1的核酸人工序列, 委托汉恒生物科技有限公司合成, 插入pHBLV-gRNA-cas9-GFP载体(见图1), 转化到E. coli (TOP10), 经测序正确后, 使用OMEGA公司的质粒纯化试剂盒提取并纯化质粒, 获得重组表达载体的高品质质粒。

[0025] 实施例2: pHBLV-gRNA-cas9-GFP敲除PD-1的T细胞的制备

[0026] (一) 异质性T细胞——CIK的制备

[0027] 取75ml患者外周血,用TBD样本密度分离液(购自天津灏洋华科生物),分离出单核细胞。用含有1000IU/mL的重组干扰素 γ (购自沈阳三生制药)的CORNING培养基(购自CORNING公司)诱导培养24小时后,加入1500IU/mL的重组白细胞介素2(购自沈阳三生制药)和50ng/mL的OKT-3继续培养24小时。每隔三天倍比加液,同时加入5%的自体血浆,培养至第14天,流式细胞术检测CIK细胞中的CD3和CD56的阳性表达率(CD3-FITC、CD16/CD56-PE抗体购自BECKMAN公司),当CD3+阳性率>80%,CD3+CD56+双阳性率>20%,视为CIK诱导成功(见图2,图3),并留取该CIK待病毒感染。

[0028] (二)慢病毒包装质粒脂质体转染293T细胞

[0029] 从液氮罐中取出冻存的293T细胞,迅速丢入37℃水浴锅中并快速晃动,尽量在1~2min内使细胞溶液完全溶解。将细胞溶液转移到15mL离心管中,并在其中加上1mL新鲜的完全培养基,混匀后离心,156g,5min。去掉上清,加入1mL新鲜的完全培养基重悬细胞沉淀后(使用1mL移液枪重悬细胞,在重悬过程中力度要轻柔,防止将培养基吹出泡沫,但是需要尽可能将细胞吹散,约吹打15次),转入100mm培养皿,每个培养皿补足到10mL培养基。将培养皿平稳放入37℃、5%CO₂和95%相对湿度的培养箱中培养。第二天观察细胞存活率,并更换培养基。以后每天观察细胞生长情况(见图4)。

[0030] 将状态良好的293T细胞铺在100mm的培养皿中,置于37℃、5%CO₂和95%相对湿度的培养箱中培养2天。观察细胞密度,达到70~80%的汇合率即可进行转染。做脂转complex:Opti MEM需在37℃水浴中预热,Lipofiter™转染试剂需恢复至室温方可使用,使用前需摇匀。转染后更换含10%胎牛血清FBS的新鲜完全培养基,转染后6h进行换液(见图5)。

[0031] 转染每皿100mm的complex成分如下:

	成分	用量
	pSPAX2	10 μ g
[0032]	pMD2G	5 μ g
	pHBLV™系列载体	10 μ g
	Lipofiter™用量	75 μ L

[0033] 转染后48h和72h分别两次收集病毒上清。在48h收毒时,将100mm dish中的培养基倒入50mL离心管中,注意培养皿壁不要接触离心管口,以防出现细菌污染,随后补入10mL含10%FBS的新鲜完全培养基,平稳置于37℃,5%CO₂的恒温培养箱中继续培养。在72h收毒时,直接将100mm dish中的培养基倒入50mL离心管中,同样注意培养皿壁不要接触离心管口,以防出现细菌污染。收完72h的病毒原液后,该dish便可以舍弃。将50mL离心管中的病毒上清,4℃,2000g,10min,去除细胞碎片;然后收集病毒原液上清置于超速离心机中,4℃,82700g,离心120min,最后将慢病毒超离液分装到灭菌处理的病毒管中。按照要求分装病毒,-80℃冰箱保存。

[0034] (三)滴度检测

[0035] 将生长状态良好的293T细胞消化计数后稀释至 1×10^5 /mL,加入96孔板,100 μ L/孔,为每个病毒准备6个孔。放入37℃,5%CO₂培养箱中培养。第二天,准备6个1.5mL EP管,第

一个EP管中加入10 μ L病毒液,然后做3倍梯度稀释,共6个稀释度。第三天,有需要加puro筛选的孔,先吸弃100 μ L含病毒培养基,加入100 μ L含1.5 μ g/mL puro的10%FBS完全培养基。第五天,在荧光显微镜下观察结果,在观察结果前6h需更换新鲜培养基,从孔中吸出80 μ L培养基,然后加入80 μ L新鲜10%FBS完全培养基,放入37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养。6h后荧光显微镜下观察结果,荧光百分比在10~30%的孔计算病毒滴度(见图6)。根据公式:滴度(TU/mL)=细胞数 \times 荧光百分比 \times MOI(1) \times 病毒稀释倍数 \times 10³计算病毒滴度,本次实验中获得的病毒滴度为1 \times 10⁸TU/mL。

[0036] (四)慢病毒感染CIK细胞及感染后CIK细胞的扩增培养

[0037] 从-80 $^{\circ}$ C拿出2ml病毒液解冻后加入培养基,将聚凝胺(购自Sigma公司)加入上述培养基稀释,使其终浓度为10 μ g/ml。用该病毒液重悬1 \times 10⁶个上述诱导的CIK细胞。将细胞悬液加入到6孔板中,使病毒颗粒数与CIK细胞数比例约为2:1,400g,120min。37 $^{\circ}$ C,5%的CO₂培养箱中培养16小时后,用新鲜培养基稀释一倍,继续培养1天后收集细胞去除剩余的病毒颗粒进行正常培养。为了提高CIK细胞的感染效率,可重复此感染步骤1-2次。根据细胞生长状态及时加入新鲜的完全培养基,培养15-17天使细胞扩增至足够的用量。

[0038] (五)免疫荧光显微镜观察pHBLV-gRNA-cas9-GFP在CIK中的表达,利用流式细胞技术检测pHBLV-gRNA-cas9-GFP在CIK中的表达效率;

[0039] 以100 μ L生理盐水重悬病毒感染后的CIK细胞,取细胞悬液制作细胞涂片,用荧光显微镜观察pHBLV-gRNA-cas9-GFP在CIK中的表达效率(见图7)。

[0040] 从培养瓶中取出2mL感染的CIK细胞,利用流式细胞仪检测感染细胞FITC(异硫氰酸盐)通道中感染细胞的阳性表达率(见图8)。

[0041] 实施例3:敲除PD-1基因的T细胞抗肿瘤作用

[0042] (一)治疗前相关工作:

[0043] 病人在进行敲除PD-1基因的T细胞治疗前,一定要进行全身身体检查,尤其是心、肺、肝、肾功能及血液检测,以确保病人治疗安全,具体检查如下:

[0044] 1:心脏功能检查:

[0045] 治疗前,对病人心脏功能进行评级,如果病人心脏功能在三级或三级以上,则病人不适宜进行此治疗。

[0046] 2:肺功能检查:

[0047] 肺功能检查通常包括肺通气试验和血液中血氧饱和度检查,如果用力吹气试验(FEV1)小于50%或小于200毫升,血氧饱和度低于90%,则病人不适宜进行治疗,需要进行相应的治疗后,然后考虑进行嵌合抗原受体T细胞治疗。

[0048] 3:血液常规检查:

[0049] 在治疗前,对病人进行血液常规检查,检查结果要求病人中性白细胞要大于1500个/mm³,血小板大于100000个/mm³,血红蛋白大于8g/dl,如果病人不能满足要求,则需要进行治疗以满足上述要求。

[0050] 4:肝肾功能检查:

[0051] 血生化检查中,谷丙转氨酶、天门冬氨酸氨基转移酶不能超出正常值上限的两倍,总胆红素不能超出正常值上限的1.5倍,肌酐要小于或等于1.6mg/ml,或肌酐清除率要大于70ml/(min \cdot 1.73m²)。

[0052] 5: 传染性疾病检查:

[0053] 同时,对病人进行HIV,乙肝、丙肝等检查,以排除病人可能的医院传染。

[0054] 6: 同时要对适龄已婚妇女进行相关检查,排除病人已经怀孕可能。

[0055] 7: 与病人家属签署知情同意书。

[0056] (二) 治疗前用药:

[0057] 通过上述检查,病人符合进行敲除PD-1基因的T细胞治疗要求,安排病人进行T细胞回输。

[0058] 回输前30分钟,给予病人苯海拉明20mg, im,同时给予地塞米松5mg, iv。

[0059] (三) 回输治疗:

[0060] 本发明中,T细胞回输的总剂量为 5×10^5 个。分3次回输,连续3天,回输剂量比例按照1:3:6。

[0061] 在回输过程中,要求静脉滴注速度在5-10ml/min,如果病人因为身体原因不能耐受,可以把滴注速度适当放缓,以满足病人要求。

[0062] 同时,在回输过程中,用心电检测仪对病人生命体征进行持续监测至回输完成后3小时。

[0063] (四) 回输后跟踪随访:

[0064] 病人回输完成后,要密切观察病人的生命体征及可能出现的副作用。

[0065] 常见的副作用有:

[0066] 1: 皮肤发红、瘙痒

[0067] 2: 病人出现心慌、胸闷、呼吸困难

[0068] 3: 腹泻

[0069] 4: 皮下出血、皮疹

[0070] 5: 持续高热

[0071] 6: 谵妄,臆语等神经系统症状

[0072] 如果出现上述症状,说明病人可能出现了细胞因子综合征,或者是移植物抗宿主病反应,应给予病人激素及对应治疗,这些症状一般持续一周左右后消失。

[0073] 对于治疗效果的观察,一般表现为病人临床症状的改善。对于实体瘤来说,在回输后的一个月、三个月及半年、一年用影像跟踪观察瘤体大小的变化进行评价治疗效果。血液肿瘤要通过骨髓穿刺来确定骨髓造血细胞中肿瘤细胞的变化,一般在回输治疗后的一个月、三个月、半年及一年进行疗效的评估。

[0074] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征及本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界。

PD-1人工序列(SEQ ID NO.1)

<110> 山东兴瑞生物科技有限公司

<120>一种敲除PD-1的T细胞制备方法及应用

<130> 2017

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

aggcg cagat caaag agag 19

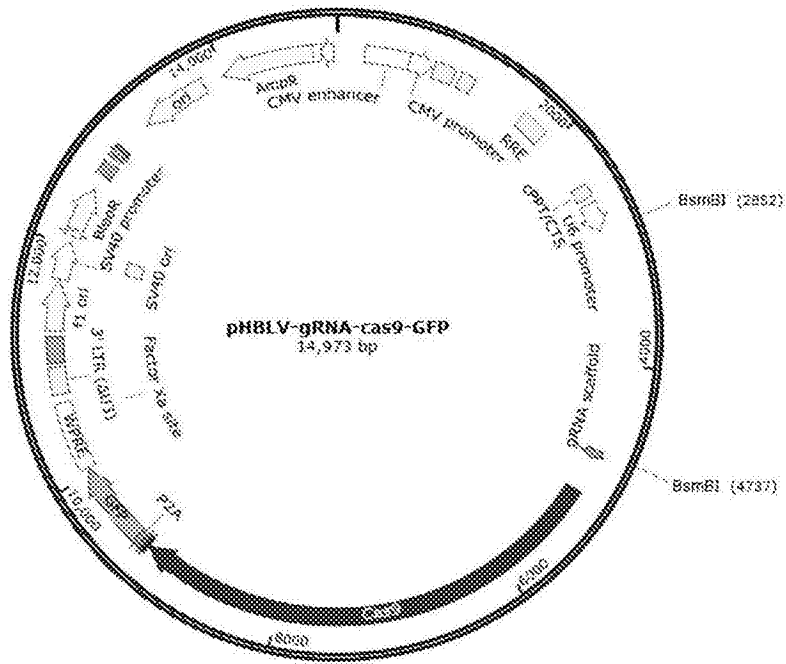


图1

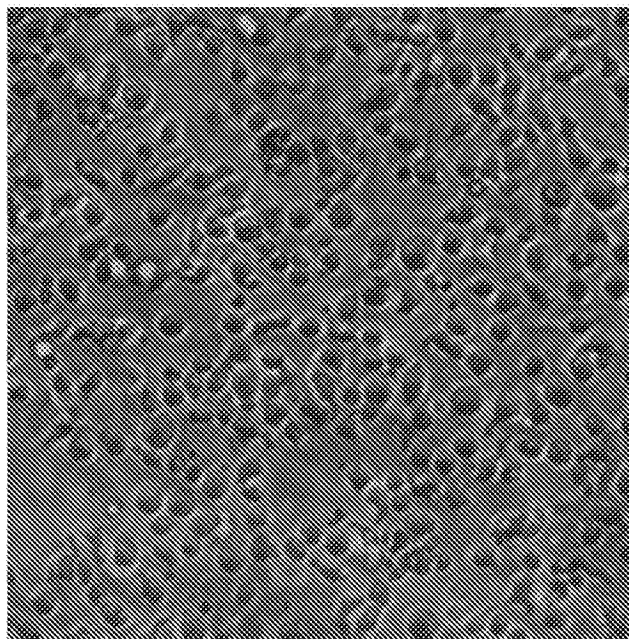


图2

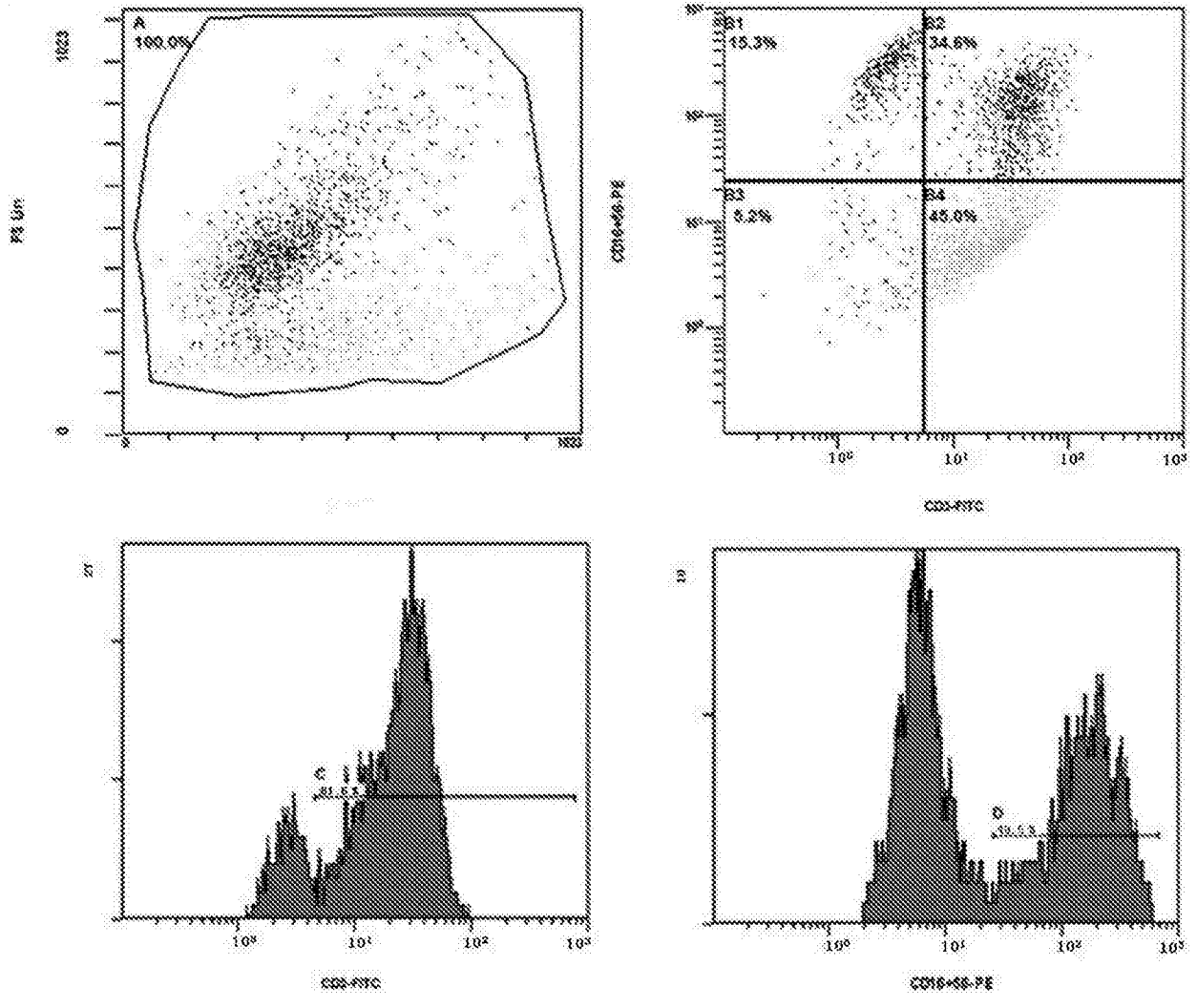


图3

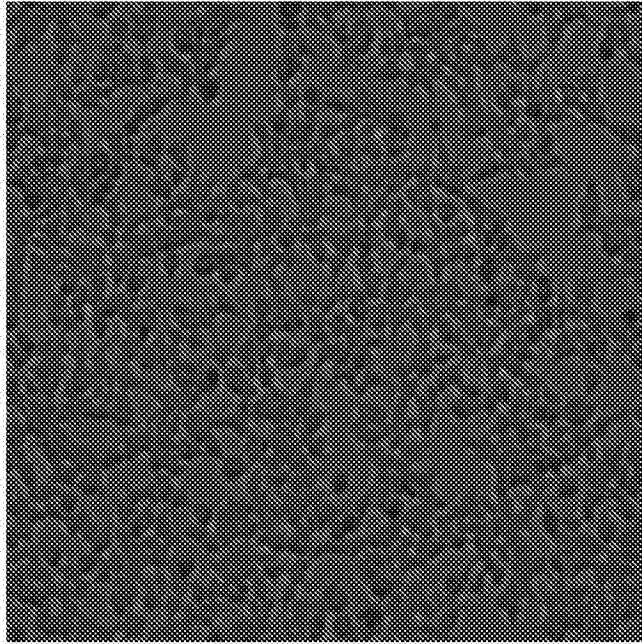


图4

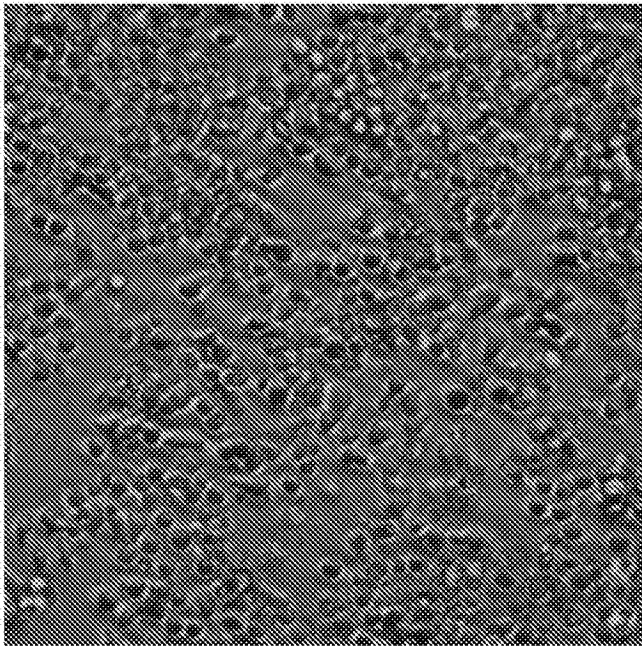


图5

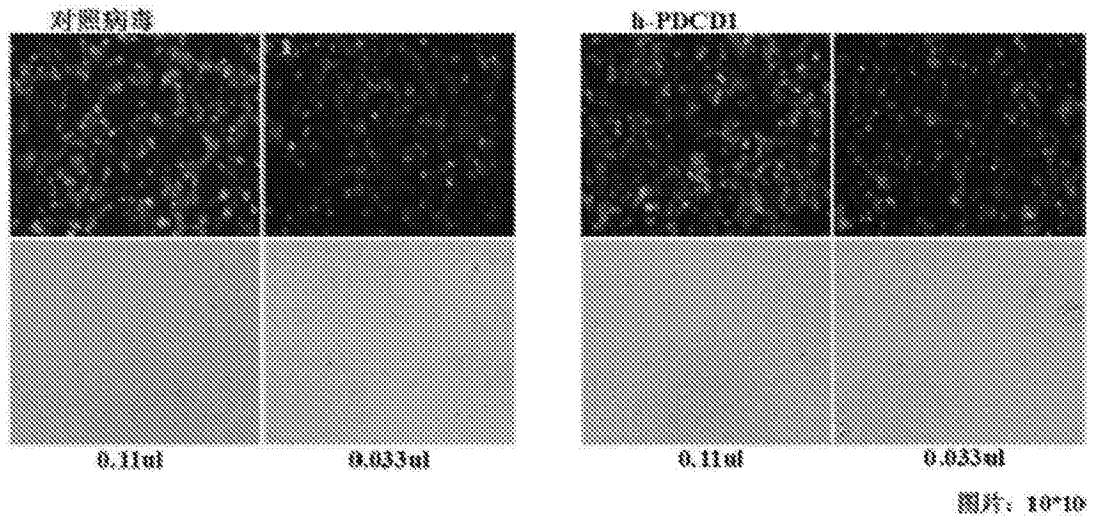


图6

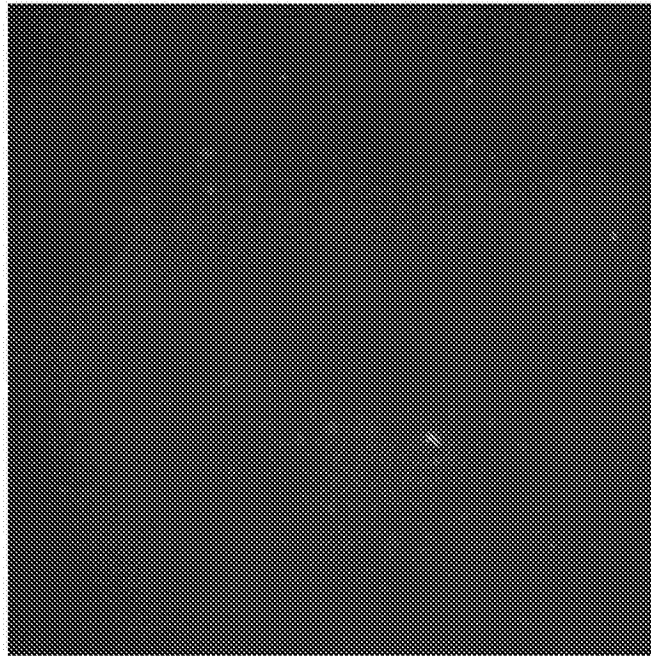


图7

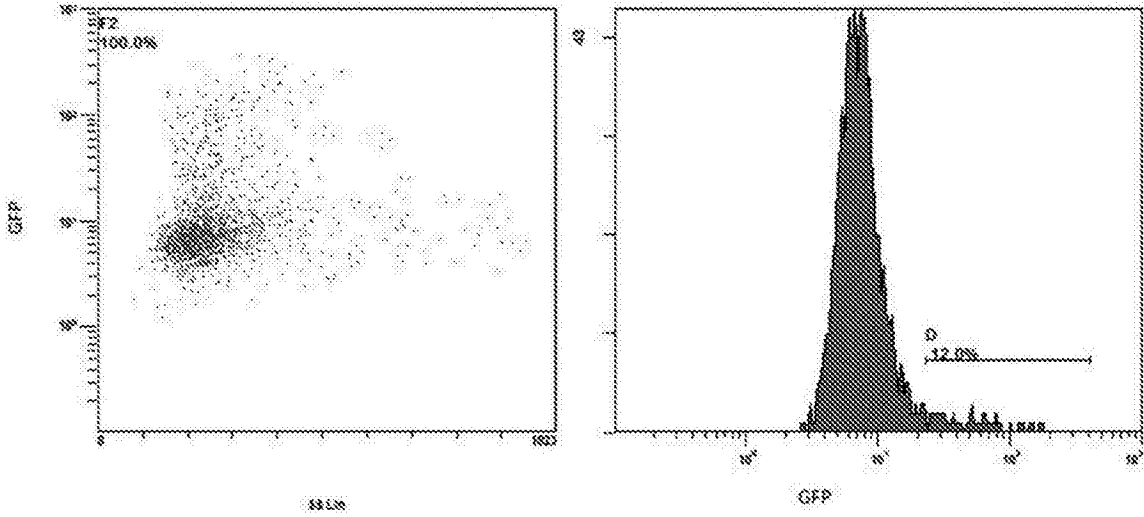


图8