

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022年9月22日 (22.09.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/194118 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 5/10 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/080811
- (22) 国际申请日: 2022年3月15日 (15.03.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202110278284.0 2021年3月16日 (16.03.2021) CN
- (71) 申请人: 合源生物科技(天津)有限公司 (JUVENTAS CELL THERAPY LTD.) [CN/CN]; 中国天津市滨海高新区华苑产业园海泰发展三道8号5号楼, Tianjin 300384 (CN)。
- (72) 发明人: 石琳(SHI, Lin); 中国天津市滨海高新区华苑产业园海泰发展三道8号5号楼, Tianjin 300384 (CN)。 谢志明(XIE, Zhiming); 中国天津市滨海高新区华苑产业园海泰发展三道8号5号楼, Tianjin 300384 (CN)。 杨晓燕(YANG, Xiaoyan); 中国天

津市滨海高新区华苑产业园海泰发展三道8号5号楼, Tianjin 300384 (CN)。 靳霞(JIN, Xia); 中国天津市滨海高新区华苑产业园海泰发展三道8号5号楼, Tianjin 300384 (CN)。 田皞靓(TIAN, Haoliang); 中国天津市滨海高新区华苑产业园海泰发展三道8号5号楼, Tianjin 300384 (CN)。 孟欢(MENG, Huan); 中国天津市滨海高新区华苑产业园海泰发展三道8号5号楼, Tianjin 300384 (CN)。 朱慧娟(ZHU, Huijuan); 中国天津市滨海高新区华苑产业园海泰发展三道8号5号楼, Tianjin 300384 (CN)。 黄林生(HUANG, Linsheng); 中国天津市滨海高新区华苑产业园海泰发展三道8号5号楼, Tianjin 300384 (CN)。 李新灵(LI, Xinling); 中国天津市滨海高新区华苑产业园海泰发展三道8号5号楼, Tianjin 300384 (CN)。

(74) 代理人: 北京北翔知识产权代理有限公司 (PEKSUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区学院路30号科大天工大厦B座16层01室, Beijing 100083 (CN)。

(54) Title: PERFUSION CULTURE METHOD FOR CAR-T CELLS

(54) 发明名称: 一种CAR-T细胞灌流培养方法

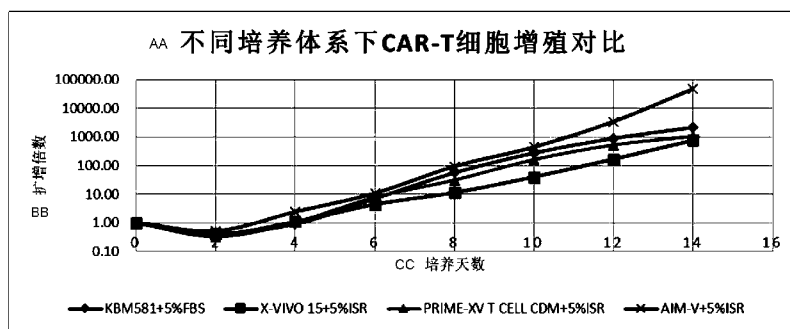


图 1

AA Comparison of CAR-T cell proliferations in different culture systems
BB Expansion fold
CC Days of culture

(57) Abstract: Provided is a perfusion culture method for CAR-T cells. The method comprises the following steps: 1) separating peripheral blood mononuclear cells from a single blood cell of a subject, and sorting the mononuclear cells to obtain T cells; 2) carrying out activation treatment on the separated T cells by using CD3/CD28 stimulation magnetic beads; 3) infecting the activated T cells by using a lentiviral vector; 4) carrying out perfusion culture on the lentivirus-infected T cells, and harvesting CAR-T cells, wherein the composition of a serum-free culture medium, which does not contain an animal-derived component, for culturing the CAR-T cells is: AIM-V+(3-9)%ISR; and the perfusion culture comprises the following stages: the first stage: when the cell density is $(0.5-1.1) \times 10^6$ cells/mL, the perfusion rate is A1, and/or the second stage: when the cell density is $(1.1-2) \times 10^6$ cells/mL, the perfusion rate is A2, and the third stage: when the cell density is $> 2 \times 10^6$ cells/mL, the perfusion rate is A3, and the ratio of A1 to A2 to A3 is 1:2:2.5.



WO 2022/194118 A1

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 提供了一种CAR-T细胞灌流培养方法, 包括以下步骤: 1)从受试者单采血细胞中分离获得外周血单个核细胞, 从单个核细胞中分选获得T细胞; 2)将分离的T细胞用CD3/CD28刺激磁珠进行激活处理; 3)采用慢病毒载体感染激活后的T细胞; 4)对慢病毒感染后的T细胞进行灌流培养, 收获CAR-T细胞; 对CAR-T细胞进行培养使用的不含动物源成分的无血清培养基的组成为: AIM-V+(3~9)% ISR; 灌流培养包括以下阶段: 第一阶段: 当细胞密度为 $(0.5 \sim 1.1) \times 10^6$ 个细胞/mL时, 灌流速率为A1; 以及/或者第二阶段: 当细胞密度为 $(1.1 \sim 2) \times 10^6$ 个细胞/mL时, 灌流速率为A2; 以及第三阶段: 当细胞密度 $>2 \times 10^6$ 个细胞/mL时, 灌流速率为A3, A1: A2: A3=1:2:2.5。

一种 CAR-T 细胞灌流培养方法

技术领域

5 本发明涉及生物工程技术领域，尤其涉及一种 CAR-T 细胞灌流培养方法。

背景技术

10 CAR-T 细胞 (Chimeric Antigen Receptor T-Cell)，全称为嵌合抗原受体 T 细胞，是指通过基因修饰技术，将带有特异性抗原识别结构域及 T 细胞激活信号的遗传物质转入 T 细胞，使 T 细胞通过直接与肿瘤细胞表面的特异性抗原相结合而激活，通过释放穿孔素、颗粒酶素 B 等直接杀伤肿瘤细胞，同时还通过释放细胞因子募集人体内源性免疫细胞杀伤肿瘤细胞，从而达到治疗肿瘤的目的。

15 使用 CAR-T 细胞治疗肿瘤的流程包括采集患者外周血、分离 T 细胞、将 CAR 导入 T 细胞、体外培养以及将细胞回输至患者。在体外培养过程中需要大量扩增 CAR-T 细胞，一般一个患者需要上亿，乃至几十亿个 CAR-T 细胞 (体型越大，需要细胞越多)，而 CAR-T 细胞扩增中所使用的培养基成本很高，对患者的经济负担过重。同时 CAR-T 细胞的存活率会直接影响 CAR-T 细胞对癌细胞的清除效率。临床研究证明，CAR-T 20 细胞回输后在患者外周血中的增殖能力与疗效具有很强的相关性。另外，文献 1 (Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornsterin E *et al.* Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med* 2007;204: 2473-2485) 和文献 2 (Harari A, Cellerai C, Enders FB, Kostler J, Codarri L, Tapia G *et al.* Skewed association of polyfunctional antigen-specific CD8 T cell polpulations with HLA-B genptype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:16233-16238) 均表明，T 细胞分泌的细胞因子 (例如 IFN- γ) 的含量与疗效密切相关。因此，如何在不显著降低培养效果的前提下，尽可能地节省培养基是亟待解决的问题。

30 文献 3 (Corey Smith et al., *Ex vivo* expansion of human T cells for

adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement, *Clinical & Translational Immunology* (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31) 公开了一种适用于基因修饰细胞（例如慢病毒介导的基因转导的 T 细胞）的无血清培养基，本发明在该文献的基础上对培养基及培养方法进行进一步的改进，以在不显著降低培养效果的前提下，尽可能地节省培养基。

发明内容

有鉴于此，本发明的目的是提出一种 CAR-T 细胞灌流培养方法，该灌流培养方法能够在不显著降低培养效果的前提下，节省培养基，经济性更高。

基于上述目的，本发明提供了一种 CAR-T 细胞灌流培养方法，其包括以下步骤：

1) 从受试者单采血细胞中分离获得外周血单个核细胞，然后从外周血单个核细胞中分选获得 T 细胞；

2) 将分离的 T 细胞用 CD3/CD28 刺激磁珠进行激活处理；

3) 采用慢病毒载体感染激活后的 T 细胞；

4) 对慢病毒感染后的 T 细胞进行灌流培养，收获 CAR-T 细胞；

其中使用不含动物源成分的无血清培养基对 CAR-T 细胞进行培养，所述不含动物源成分的无血清培养基的组成为：AIM-V+(3~9)%ISR；

所述灌流培养包括以下阶段：

第一阶段：当细胞密度为 $(0.5\sim 1.1)\times 10^6$ 个细胞/mL 时，灌流速率为 A_1 ；以及/或者

第二阶段：当细胞密度为 $(1.1\sim 2)\times 10^6$ 个细胞/mL 时，灌流速率为 A_2 ；

以及

第三阶段：当细胞密度 $> 2\times 10^6$ 个细胞/mL 时，灌流速率为 A_3 ；

其中 $A_1: A_2: A_3=1:2:2.5$ 。

在本发明的优选的实施方案中，其中，所述不含动物源成分的无血清培养基的组成为：AIM-V+(4~7)%ISR；

优选地，所述不含动物源成分的无血清培养基的组成为：AIM-V+5%ISR。

在本发明的优选的实施方案中，其中， A_1 为 0.4 个生物反应器体积/天， A_2 为 0.8 个生物反应器体积/天， A_3 为 1.0 个生物反应器体积/天。

在本发明的优选的实施方案中，其中，在步骤 4) 中，当细胞密度 \geq 预设值时，开始灌流培养；

- 5 优选地，所述预设值为 $(0.3\sim 1.2)\times 10^6$ 个细胞/mL；
更优选地，所述预设值为 $(0.4\sim 1.0)\times 10^6$ 个细胞/mL；
进一步优选地，所述预设值为 0.5×10^6 个细胞/mL。

在本发明的优选的实施方案中，其中，在步骤 4) 中，在细胞密度达到预设值之前，采用补液培养，其中补液培养过程中以 $(0.3\sim 1)\times 10^6$ 个细胞/mL 的密度为补液标准进行补液，通气量为 $(0.1\sim 1)$ L/分钟，转速为 $(4\sim 12)$ rpm，通气为压缩空气加 $(1\sim 10)\%$ CO_2 。

在本发明的优选的实施方案中，在步骤 4) 中，在补液培养之前包括：

待感染后的 T 细胞数量达到 $(5\sim 15)\times 10^7$ 个细胞，将感染后的 T 细胞转入 Xuri 生物反应器进行补液培养。

- 15 在本发明的优选的实施方案中，其中，所述灌流培养过程中的通气量为 $(0.3\sim 0.8)$ L/分钟，转速为 $(5\sim 15)$ rpm，通气为压缩空气加 $(1\sim 10)\%$ CO_2 ；
优选地，所述灌流培养过程中的通气量为 $(0.4\sim 0.6)$ L/分钟，转速为 $(8\sim 12)$ rpm，通气为压缩空气加 $(3\sim 6)\%$ CO_2 ；

更优选地，所述灌流培养过程中的通气量为 0.5L/分钟，转速为 10rpm，
20 通气为压缩空气加 5% CO_2 。

在本发明的优选的实施方案中，在步骤 2) 中，所述将分离的 T 细胞用 CD3/CD28 刺激磁珠进行激活处理具体包括：将分离的 T 细胞进行重悬，使终浓度为 $(1\sim 2)\times 10^6$ 个细胞/mL，并按照每 1×10^6 T 细胞加入 $(0.5\sim 10)\mu\text{L}$ 的 CD3/CD28 刺激磁珠混匀，然后在 $37^\circ\text{C}+5\%$ CO_2 下培养至少 24 小时。

在本发明的优选的实施方案中，将分离的 T 细胞用不含动物源成分的无血清培养基进行重悬，所述不含动物源成分的无血清培养基的组成为：
AIM-V+ $(3\sim 9)\%$ ISR；

- 30 优选地，所述不含动物源成分的无血清培养基的组成为：
AIM-V+ $(4\sim 7)\%$ ISR；

更优选地，所述不含动物源成分的无血清培养基的组成为：

AIM-V+5%ISR。

在本发明的优选的实施方案中，在步骤3)中，所述采用慢病毒载体感染激活后的T细胞具体包括：取出激活培养的T细胞，加入终浓度为(5~10) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的聚凝胺混匀，并按感染复数=(0.25~5)缓慢加入慢病毒载体，混匀后在(1000~3000)rpm下离心0.5~2.0小时，然后在37 $^{\circ}\text{C}$ +5% CO_2 下培养至少24小时。

附图说明

- 图1为不同培养体系下CAR-T细胞增殖倍数的对比图；
图2为不同培养体系下CAR-T细胞存活率的对比图；
图3为不同培养体系下CAR表达的对比图；
图4为不同灌流工艺(400mL-1000mL灌流速度与600mL-1800mL灌流速度)扩增倍数的对比图；
图5为不同灌流工艺(400mL-1000mL灌流速度与600mL-1800mL灌流速度)存活率的对比图；
图6为不同灌流工艺(800mL-1000mL灌流速度与1000mL-1500mL灌流速度)扩增倍数的对比图；
图7为不同灌流工艺(800mL-1000mL灌流速度与1000mL-1500mL灌流速度)存活率的对比图。

具体实施方式

需要说明的是，除非另外定义，本说明书一个或多个实施例使用的技术术语或者科学术语应当为本发明所属领域内具有一般技能的人士所理解的通常意义。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的药材原料、试剂材料等，如无特殊说明，均为市售购买产品。

传统CAR-T细胞培养体系采用的是含血清的培养体系，血清包括自体血清(或血浆)、AB血清、胎牛血清等。自体血清(或血浆)受个体差异的影响，质量不可控，且批量受限；AB血清采自AB血型的异体供者，虽然质量一致性较自体血清(或血浆)要好，批量也较自体血清(或血浆)高，但是由于一个批次的AB血清来源于多个供者，虽然经过病原

体筛查和灭活处理，仍然不能完全避免血源性疾病的传播；胎牛血清来源于牛，除了有病原体传播的风险，还有过敏反应的风险。因此，从 CAR-T 细胞产品开发和安全使用的角度，需要研发一种不含动物源成分的无血清培养体系用于 CAR-T 细胞培养。

5 但当前的市售无血清培养体系存在以下问题：CAR-T 细胞增殖能力在无血清培养体系下较弱；CAR-T 细胞存活率在无血清培养体系下较低；CAR-T 细胞的 CAR 表达率在无血清培养体系下较低等等。

10 本发明通过筛选不同来源的无血清培养基及添加物，获得了一种在不含动物源成分的无血清培养体系下的 CAR-T 细胞培养基，使得 CAR-T 细胞增殖、存活率和病毒感染效率均较高，与含血清的培养体系相当或更优。

另外，本发明采用灌流培养的方式对 CAR-T 细胞进行培养，并对灌流培养过程中各阶段的灌流速率进行确定，使得本发明的灌流培养方法能够在不显著降低培养效果的前提下，节省培养基，经济性更高。

15 基于上述目的，本发明提供了一种 CAR-T 细胞灌流培养方法，其包括以下步骤：

1) 从受试者单采血细胞中分离获得外周血单个核细胞，然后从外周血单个核细胞中分选获得 T 细胞；

2) 将分离的 T 细胞用 CD3/CD28 刺激磁珠进行激活处理；

20 3) 采用慢病毒载体感染激活后的 T 细胞；

4) 对慢病毒感染后的 T 细胞进行灌流培养，收获 CAR-T 细胞；

其中使用不含动物源成分的无血清培养基对 CAR-T 细胞进行培养，所述不含动物源成分的无血清培养基的组成为：AIM-V+3~9%ISR；

所述灌流培养包括以下阶段：

25 第一阶段：当细胞密度为 $(0.5\sim 1.1)\times 10^6$ 个细胞/mL 时，灌流速率为 A_1 ；以及/或者

第二阶段：当细胞密度为 $(1.1\sim 2)\times 10^6$ 个细胞/mL 时，灌流速率为 A_2 ；以及

第三阶段：当细胞密度 $> 2\times 10^6$ 个细胞/mL 时，灌流速率为 A_3 ；

30 其中 $A_1: A_2: A_3=1:2:2.5$ 。

该不含动物源成分的无血清培养基的组成为：

(1) 无血清基础培养基: AIM-V;

(2) 添加物: CTS IMMUNE CELL SR (“ISR”);

(3) 配比: AIM-V+(3~9)%ISR; 优选地, 配比: AIM-V+(4~7)%ISR;
更优选地, 配比为: AIM-V+5%ISR。

5 本发明将 AIM-V+5%ISR 培养基与含血清的培养基以及几种常见的其他无血清培养基进行 CAR-T 细胞的培养效果 (扩增倍数、存活率和 CAR 表达率) 的比较, 结果表明, AIM-V+5%ISR 培养基在扩增倍数、存活率和 CD³⁺CAR⁺表达方面均较好。综合考虑, 本发明选择了 AIM-V+5%ISR 培养基作为 CAR-T 细胞培养的培养基。

10 ISR 是一种成分明确的血清替代物, 不含牛或其他动物来源的成分, 这种血清替代物的使用, 能够减少安全方面的风险。AIM-V 培养基和 ISR 均可购自 ThermoFisher 公司。

现阶段 CAR-T 细胞的大规模培养主要使用补液培养方式, 通过扩大培养体积来提高细胞的数量。然而, 这种方式下, 当所需的细胞数量较多时, 可能无法在一个容器中完成培养, 造成批次内的差异; 另外培养过程中代谢废物无法排出, 影响细胞培养效果。灌流培养是一种补加新鲜培养基的同时排出废液的培养方式, 相比于一般的补液培养方式, 灌流培养过程中培养基成分浓度变化更小, 可提供对细胞稳定且有利的生长环境, 细胞培养效果更好, 且可以在培养体积不增加的情况下, 达到大量扩增细胞数量的效果。因此, 比较适合于 CAR-T 细胞扩增培养阶段。

25 在灌流培养过程中一个重要的参数为灌流速率, 当反应器中活细胞密度发生变化时, 每个细胞所获得的营养物质及被带走的代谢产物发生变化, 其灌流速率必然发生变化。如何根据时刻变化的细胞密度, 选择合适的灌流速率是一个非常重要的问题, 本发明比较了多个灌流模式, 综合考虑培养效果和经济性, 最终确定了以下的灌流培养过程:

第一阶段: 当细胞密度为 $(0.5\sim 1.1)\times 10^6$ 个细胞/mL 时, 灌流速率为 A_1 ; 以及/或者

第二阶段: 当细胞密度为 $(1.1\sim 2)\times 10^6$ 个细胞/mL 时, 灌流速率为 A_2 ; 以及

30 第三阶段: 当细胞密度 $> 2\times 10^6$ 个细胞/mL 时, 灌流速率为 A_3 ;
其中 $A_1: A_2: A_3=1:2:2.5$ 。

优选地，A1 为 0.4 个生物反应器体积/天，A2 为 0.8 个生物反应器体积/天，A3 为 1.0 个生物反应器体积/天。例如，当生物反应器体积为 1000mL 时，对应的灌流速率 A1 为 400mL/天，灌流速率 A2 为 800mL/天，灌流速率 A3 为 1000mL/天。

5 需要说明一点，本发明的灌流培养过程强调的是根据不断变化的细胞密度，确定所对应的灌流速率。本发明的灌流培养过程并不强调必须同时包括第一阶段和第二阶段，第一阶段和第二阶段可以择一存在，也可以同时存在，这需要根据细胞的生长情况具体而定。具体的，本发明的灌流培养过程可以包括第一阶段和第三阶段，或者包括第二阶段和第三阶段，或者同时包括第一阶段、第二阶段和第三阶段。在实际培养 CAR-T 细胞过程中，测定细胞密度为 $(0.5\sim 1.1)\times 10^6$ 个细胞/mL 时，采用灌流速率 A_1 进行培养，然后隔一段时间（例如 24 小时），测定细胞密度 $> 2\times 10^6$ 个细胞/mL 时，可直接采用灌流速率 A_3 进行培养（例如表 1 中的灌流培养过程）；或者，测定细胞密度为 $(1.1\sim 2)\times 10^6$ 个细胞/mL 时，可直接采用灌流速率 A_2 进行培养，然后隔一段时间（例如 24 小时），测定细胞密度 $> 2\times 10^6$ 个细胞/mL 时，采用灌流速率 A_3 进行培养（例如表 2 中的灌流培养过程）。

如背景技术所述，CAR-T 细胞的存活率会直接影响 CAR-T 细胞对癌细胞的清除效率。CAR-T 增殖能力（即扩增倍数）与疗效具有很强的相关性。另外，CAR-T 细胞体外扩增激活后回输到患者体内，其杀伤肿瘤细胞的机制为：CAR-T 细胞与特异性肿瘤抗原结合后，通过释放穿孔素、颗粒酶 B 等直接杀伤肿瘤细胞，同时还通过释放细胞因子募集人体内源性免疫细胞杀伤肿瘤细胞，从而达到治疗肿瘤的目的。而在 CAR-T 细胞释放的这些细胞因子中，IFN- γ （干扰素 γ ）是起主要作用的细胞因子；已有文献表明，CAR-T 细胞分泌的 IFN- γ 含量与疗效密切相关。因此，
25 本发明重点考察了这几个指标，实验结果表明，本发明在使用无血清培养基+特定灌流工艺的情况下，实现了无血清培养体系下的高效培养，且培养获得的 CAR-T 细胞扩增倍数、存活率、CAR 表达率和分泌 IFN- γ 含量均较高。

在本发明的优选的实施方案中，其中，在步骤 4) 中，当细胞密度 \geq 预设值时，开始灌流培养；优选地，所述预设值为 $(0.3\sim 1.2)\times 10^6$ 个细胞/mL；更优选地，所述预设值为 $(0.4\sim 1.0)\times 10^6$ 个细胞/mL；进一步优选地，所述

预设值为 0.5×10^6 个细胞/mL。优选地，当细胞密度为 $(0.5 \sim 1.1) \times 10^6$ 个细胞/mL 时，灌流速率为 A_1 。

本发明对从受试者单采血细胞中分离获得外周血单个核细胞(PBMC)的方法不作限制，例如可采用葡聚糖-泛影葡胺(Ficoll)密度梯度离心法，
5 用此方法分离 PMBC 纯度可达 95%。原理为：血液中各有形成分的比重存在差异，利用比重为 1.077、近于等渗的 ficoll-hypaque 混合溶液（又称淋巴细胞分层液）作密度梯度离心时，各种血液成分将按照密度梯度重新聚集。血浆和血小板由于密度较低，故悬浮于分液层的上部；红细胞与粒细胞由于密度较大，故沉于分液层的底部；PBMC 密度稍低于分层液，
10 故位于分层液界面上，这样就可获得 PMBC。本发明对从外周血中分选获得 T 细胞的方法不作限制，例如可采用免疫磁珠法，该方法是基于细胞表面抗原能与连接有磁珠的特异性单抗相结合，在外加磁场中，通过抗体与磁珠相连的细胞被吸附而滞留在磁场中，无该种表面抗原的细胞由于不能与连接着磁珠的特异性单抗结合而没有磁性，不在磁场中停留，从而
15 使细胞得以分离。

T 细胞的体外培养都需要使用 CD3/CD28 抗体，刺激 T 细胞使其获得功能活性。CD3/CD28 抗体偶联磁珠主要用于人 T 细胞的分离、活化和体外扩增。使用 $4.5 \mu\text{m}$ 的超顺磁珠，与细胞大小相匹配，同时偶联抗 CD3 和 CD28 抗体，可以提供 T 细胞激活与扩增所需的主要信号和协同
20 刺激信号。首先，利用 CD3/CD28 免疫磁珠进行磁性细胞分离， CD3^+ T 细胞便可以从所得分离产物中分离并富集。分离后， CD3^+ T 细胞在磁珠的存在下培养。通过结合免疫磁珠上的抗 CD3 和抗 CD28 抗体，磁珠可以提供 T 细胞活化和扩增所需的初级和共刺激信号。被激活的 T 细胞可产生 IL-2（白细胞介素 2）、GM-CSF（粒细胞巨噬细胞刺激因子）、IFN- γ （干扰素 γ ）和 INF- α （肿瘤坏死因子 α ）等细胞因子，发挥 T 细胞的作用和功能。
25

本发明对涉及的慢病毒载体不作限定，现有技术中包含编码 CAR 基因的核酸序列的慢病毒载体均可用于本发明。

30 下面结合具体的实施例对本发明提供的技术方案做进一步的描述。下述实施例仅用于对本发明进行说明，并不会对本发明的保护范围进行限制。

以下实施例中涉及的检测方法如下：

1) 细胞存活率

混匀检测样本，吸取 20 μ l 样本至 EP 管中。再吸取 20 μ l AOPI 染液至 EP 管中，用加样枪吸取超过 1/10 样品体积，上下混匀 10 次。从混匀的液体中吸取 20 μ l 加入细胞计数板。将细胞计数板插入细胞计数仪样本槽中，点击确定。活细胞呈绿色或黄绿色均匀荧光，死细胞呈红色荧光。记录细胞存活率和活细胞浓度等结果。

2) 细胞扩增倍数

根据细胞存活率检测试验中的细胞计数结果和培养体积，计算当天的活细胞总数，除以接种当天的活细胞总数，即可得到细胞扩增倍数。

细胞扩增倍数=活细胞浓度 \times 体积/接种的活细胞数

3) CAR 表达率

CAR-T 细胞扩增后计数，转染与未转染 CAR-T 细胞分别取 10^5 移入 FACS 管中；用 2ml FACS 缓冲液洗涤细胞，1200rpm/分离心 5 分钟，弃掉上清；100 μ l FACS 缓冲液重悬细胞沉淀，加入 2 μ l PE 标记的羊抗鼠 F(ab')² 抗体，4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 分钟；2ml FACS 缓冲液洗涤细胞，1200rpm/分离心 5 分钟，弃掉上清；200 μ l FACS 缓冲液重悬细胞沉淀，流式细胞仪分析 T 细胞表面 CAR 的表达率。

4) 分泌 IFN- γ 含量检测方法

将 CAR-T 细胞与 Nalm6 细胞按照 1:1 的比例接种在 24 孔板中，各接种 0.5×10^6 细胞/孔，作为实验孔；同时设置 CAR-T 细胞对照孔和 Nalm6 细胞对照孔。放入 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 的二氧化碳培养箱培养约 24 小时。

培养 24 小时后离心收集上清。

从已平衡至室温的密封袋中取出微孔板 (IFN- γ Microplate)，未用的板条放回铝箔袋内，重新封口，放回 2-8 $^{\circ}$ C 保存。

用稀释剂 (1X) 将样品、检测内参、阴性对照分别进行 100 倍稀释。

将准备好的标准品 (浓度由低到高)、样品、检测内参、阴性对照分别加入相应孔中，每孔 100 μ l，做三个复孔。用封板胶纸封住反应孔，室温孵育 2 小时。

将板内液体甩去，使用自动洗板机，每孔加洗涤工作液 350 μ l，低速震动 5s 洗板，重复 4 次；或手动洗板，每孔加洗涤工作液 300 μ l，浸泡

30s, 重复 4 次。

每孔加入 200ul IFN- γ 缀合物 (Conjugate), 用封板膜封住, 室温孵育 2 小时。

重复步骤 4.7.5 洗板。

5 每孔加入 200ul 显色液, 室温静置避光孵育 10-30min。

每孔加入 50ul 终止液 (Stop Solution) 1, 轻柔震荡混匀。

用酶标仪于检测波长 450nm, 参比波长 570nm 下读数。

标准曲线的绘制与计算

10 利用酶标仪软件, 绘制一个 4 参数线性标准曲线, 曲线横坐标为标准曲线点 IFN- γ 浓度值, 纵坐标为标准曲线点的 OD 平均值 ($OD=OD_{450}-OD_{570}$)。通过每个样品的 OD 平均值, 可从标准曲线上得到样品中 IFN- γ 的浓度值。

实施例 1 CAR-T 细胞培养过程中无血清培养基的筛选

15 步骤 1: T 细胞的获得

采用葡聚糖-泛影葡胺 (Ficoll) 密度梯度离心法从受试者单采血细胞中分离获得外周血单个核细胞 (PBMC), 然后采用免疫磁珠法从 PBMC 细胞中分选获得 T 细胞。采用 Ficoll 密度梯度离心法从受试者单采血细胞中分离获得 PBMC 细胞的步骤如下:

20 (1) 静脉取血 2ml, 加入含肝素溶液 (10~50 μ g/ml 血样本) 的试管中, 混匀, 使血液抗凝。用 pH 7.2 Hanks 或生理盐水将抗凝血稀释 1 倍。

(2) 吸取 2ml 淋巴细胞分层液置于刻度离心管中, 然后将离心管倾斜 45° 角, 用毛细滴管将稀释的全血沿管壁缓慢加至分离液上面, 应注意保持两者界面清晰。

25 (3) 在 18℃~20℃ 下, 用水平离心机以 2000r/min 离心 20min。

(4) 用毛细吸管轻轻插到混浊带, 沿管壁轻轻吸出此层细胞, 移入另一支离心管中。既要吸取所有单个核细胞, 又要避免吸取过多的分层液或血浆, 以免混入其他细胞成分。

30 (5) 用 Hanks 液洗涤细胞 3 次。第一次 2000r/min, 10min, 第 2~3 次 1500r/min, 10min 可去掉大部分混杂的血小板。

(6) 将沉淀细胞 (即为 PMBC 细胞) 悬于培养基中备用。

使用 CD3 免疫磁珠 (购自 Miltenyi 公司) 从 PBMC 细胞中分选获得 T 细胞的步骤如下:

取适量的 MACS 缓冲液 (成分为 PBS/EDTA+0.2% BSA) 洗涤 PMBC 细胞 ($10^7/\text{mL}$), 离心后 MACS 缓冲液重悬 PMBC, 加入 CD3 免疫磁珠 (20 $\mu\text{L}/10^7$ PBMC) 混匀, 4 $^\circ\text{C}$ 孵育 15min; MACS 缓冲液洗涤细胞 1 次后, 500 μL 重悬细胞。将 MS 分离柱放入磁场中, 加入 MACS 缓冲液预洗涤 1 次。将细胞悬液加入 MS 柱中, 先流出的细胞为 CD3 $^+$ T 细胞, MACS 缓冲液洗涤分离株 3 次, 将 MS 柱从磁场中移出, 加入 1mL MACS 缓冲液, 用推杆将 CD3 $^+$ T 细胞推出到一个无菌的离心管中。细胞计数后, 分为 4 份, 用 4 种不同的 CAR-T 细胞完全培养基, 分别为: KBM581+5% FBS+100IU/ml IL-2, X-VIVO+5% ISR+100IU/ml IL-2, PRIME-XVT CELL CDM+5% ISR+100IU/ml IL-2, AIM-V+5% ISR+100IU/ml IL-2, 重悬细胞, 1500 转、10 分钟离心去除上清。

15 步骤 2: 对 T 细胞进行激活处理

将分离的 T 细胞用 4 种 CAR-T 细胞完全培养基 (KBM581+5% FBS+100IU/ml IL-2, X-VIVO+5% ISR+100IU/ml IL-2, PRIME-XVT CELL CDM+5% ISR+100IU/ml IL-2, AIM-V+5% ISR+100IU/ml IL-2) 进行重悬, 使终浓度为 2×10^6 个细胞/ml, 并按照每 1×10^6 T 细胞加入 2.5 μL 的 CD3/CD28 抗体刺激磁珠, 混匀后置于培养箱培养, 培养条件为 37 $^\circ\text{C}$ +5% CO_2 , 培养时间至少 24 小时。

步骤 3: 慢病毒载体感染 T 细胞

25 取出激活培养的 T 细胞, 加入终浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的聚凝胺 (polybrene), 混匀, 并按 MOI=1 缓慢加入慢病毒载体, 混匀后将细胞培养板置于离心机中, 1500rpm, 离心 1.5 小时。然后将其置于培养箱培养, 培养条件为 37 $^\circ\text{C}$ +5% CO_2 , 培养时间至少 24 小时。

步骤 4: 感染后 CAR-T 细胞的扩增培养

30 培养 24 小时后, 离心细胞培养板, 弃掉培养液, 加入新鲜的细胞培养基, 扩增 CAR-T 细胞, 使用上述 4 种不同的培养基组成来扩增 CAR-T 细胞, 并在第 0 天、第 2 天、第 4 天、第 6 天、第 8 天、第 10 天、第 12 天和第 14 天取细胞培养液进行扩增倍数、存活率和 CAR 表达率的测定。

扩增倍数、存活率和 CAR 表达的结果分别参见图 1-3。由图 1-3 可知, AIM-V+5%ISR+100IU/mL IL-2 培养基中, CAR-T 细胞增殖倍数、CAR-T 细胞存活率和 CD3⁺CAR⁺表达都明显较好。比较了 4 种培养基, 综合考虑培养效果, 选择了 AIM-V+5%ISR 培养基。因此, 在后续的实验
5 中, 选择 AIM-V+5%ISR+100IU/mL IL-2 培养基作为 CAR-T 细胞扩增的培养基, 并选择 MOI=1 进行慢病毒载体转染。

实施例 2 CAR-T 细胞培养过程中灌流速率的确定

步骤 1: T 细胞的获得

10 采用葡聚糖-泛影葡胺 (Ficoll) 密度梯度离心法从受试者单采血细胞中分离获得外周血单个核细胞 (PBMC), 然后采用免疫磁珠法从 PBMC 细胞中分选获得 T 细胞。采用 Ficoll 密度梯度离心法从受试者单采血细胞中分离获得 PBMC 细胞的步骤如下:

(1) 静脉取血 2ml, 加入含肝素溶液 (10~50 μ g/ml 血样本) 的试管
15 中, 混匀, 使血液抗凝。用 pH 7.2 Hanks 或生理盐水将抗凝血稀释 1 倍。

(2) 吸取 2ml 淋巴细胞分层液置于刻度离心管中, 然后将离心管倾斜 45°角, 用毛细滴管将稀释的全血沿管壁缓慢加至分离液上面, 应注意保持两者界面清晰。

(3) 在 18℃~20℃下, 用水平离心机以 2000r/min 离心 20min。

20 (4) 用毛细吸管轻轻插到混浊带, 沿管壁轻轻吸出此层细胞, 移入另一支离心管中。既要吸取所有单个核细胞, 又要避免吸取过多的分层液或血浆, 以免混入其他细胞成分。

(5) 用 Hanks 液洗涤细胞 3 次。第一次 2000r/min, 10min, 第 2~3 次 1500r/min, 10min 可去掉大部分混杂的血小板。

25 (6) 将沉淀细胞 (即为 PMBC 细胞) 悬于培养基中备用。

使用 CD3 免疫磁珠 (购自 Miltenyi 公司) 从 PBMC 细胞中分选获得 T 细胞的步骤如下:

取适量的 MACS 缓冲液 (成分为 PBS/EDTA+0.5%人血白蛋白) 洗涤 PMBC 细胞 (10⁷/mL), 离心后 MACS 缓冲液重悬 PMBC, 加入 CD3
30 免疫磁珠 (20 μ L/10⁷PBMC) 混匀, 4℃孵育 15min; MACS 缓冲液洗涤细胞 1 次后, 500 μ L 重悬细胞。将 MS 分离柱放入磁场中, 加入 MACS

缓冲液预洗涤 1 次。将细胞悬液加入 MS 柱中，先流出的细胞为 CD3⁺T 细胞，MACS 缓冲液洗涤分离株 3 次，将 MS 柱从磁场中移出，加入 1mLMACS 缓冲液，用推杆将 CD3⁺T 细胞推出到一个无菌的离心管中。细胞计数后，用 AIM-V+5%ISR+100IU/mL IL-2 培养基重悬。

5 步骤 2：对 T 细胞进行激活处理

将分离的 T 细胞用 AIM-V+5%ISR+100IU/mL IL-2 培养基进行重悬，使终浓度为 2×10^6 个细胞/ml，并按照每 1×10^6 T 细胞加入 2.5 μ L 的 CD3/CD28 抗体刺激磁珠，混匀后置于培养箱培养，培养条件为 37 $^{\circ}$ C +5%CO₂，培养时间至少 24 小时。

10 步骤 3：慢病毒载体感染 T 细胞

取出激活培养的 T 细胞，加入终浓度为 8 μ g/ml 的聚凝胺(polybrene)，混匀，并按 MOI=1 缓慢加入慢病毒载体，混匀后将细胞培养板置于离心机中，1500rpm，离心 1.5 小时。然后将其置于培养箱培养，培养条件为 37 $^{\circ}$ C+5%CO₂，培养时间至少 24 小时。

15 步骤 4：转入 Xuri 生物反应器扩增培养

培养 24 小时后，离心细胞培养板，弃掉培养液，加入新鲜的细胞培养基 AIM-V+5%ISR+100IU/mL IL-2，扩增 CAR-T 细胞，监测细胞数量，待细胞数量达到 $(5 \sim 15) \times 10^7$ 后，将细胞转入 Xuri 生物反应器进行扩增培养。

20 扩增培养开始后，每天取样计数，并按照 $(0.3 \sim 1) \times 10^6$ 个细胞/mL 密度为补液标准进行补液，通气量设置为 $(0.1 \sim 1)$ L/分钟，转速 $(4 \sim 12)$ rpm，通气为压缩空气加 5%CO₂。一直到培养体积达到 1000mL，且细胞总数 $\geq 5 \times 10^8$ 个细胞时，转入灌流培养模式，开始灌流培养后，通气量设置为 0.5L/分钟，转速 10rpm，通气为压缩空气加 5%CO₂。

25 分别采用不同灌流速度进行 CAR-T 细胞扩增培养，比较灌流开始后的扩增倍数、存活率和分泌 IFN- γ 含量等数据。共对比了四种灌流模式，分别为：

(一) 培养体积达到 1000mL 后，当细胞密度为 $(0.5 \sim 1.1) \times 10^6$ 个细胞/mL 时，每天灌流体积设置为 400mL；当细胞密度 $\geq 2 \times 10^6$ 个细胞/mL 时，
30 每天灌流体积设置为 1000mL。以下简称“400mL-1000mL 模式”。

(二) 培养体积达到 1000mL 后，当细胞密度在 $(1.1 \sim 2) \times 10^6$ 个细胞/mL

时，每天灌流体积设置为 800mL；当细胞密度 $\geq 2 \times 10^6$ 个细胞/mL 时，每天灌流体积设置为 1000mL。以下简称“800mL-1000mL 模式”。

(三) 培养体积达到 1000mL 后，当细胞密度为 $(0.5 \sim 1.1) \times 10^6$ 个细胞/mL 时，每天灌流体积设置为 600mL；当细胞密度 $\geq 2 \times 10^6$ 个细胞/mL 时，每天灌流体积设置为 1800mL。以下简称“600mL-1800mL 模式”。

(四) 培养体积达到 1000mL 后，当细胞密度在 $(1.1 \sim 2) \times 10^6$ 个细胞/mL 时，每天灌流体积设置为 1000mL；当细胞密度 $\geq 2 \times 10^6$ 个细胞/mL 时，每天灌流体积设置为 1500mL。以下简称“1000mL-1500mL 模式”。

研究结果：

① 灌流开始后细胞密度、存活率、24 小时扩增倍数和分泌 IFN- γ 含量 (400mL-1000mL 模式与 600mL-1800mL 模式对比) 的结果见表 1 和图 4-5。

表 1：细胞密度、存活率、扩增倍数和分泌 IFN- γ 含量

灌流速度：400mL-1000mL					灌流速度：600mL-1800mL				
灌流参数	细胞密度 ($\times 10^6$ /mL)	存活率 (%)	扩增倍数	分泌 IFN- γ 含量 (pg/ml)	灌流参数	细胞密度 ($\times 10^6$ /mL)	存活率 (%)	扩增倍数	分泌 IFN- γ 含量 (pg/ml)
灌流第一天：灌流 400mL	1.05	92.3	1	-	灌流第一天：灌流 600mL	1.07	84.6	1	-
灌流第二天：灌流 1000mL	2.57	94.2	2.46	-	灌流第二天：灌流 1800mL	3.05	90.1	2.85	-
灌流第三天：收获	7.22	97.2	6.91	84927.709	灌流第三天：收获	7.83	94.8	7.31	69795.842

由以上结果可以得出，400mL-1000mL 模式与 600mL-1800mL 模式下，虽然 600mL-1800mL 模式的细胞扩增倍数略优于 400mL-1000mL 模式，但 400mL-1000mL 模式的存活率和分泌 IFN- γ 含量要显著高于 600mL-1800mL 模式，且 400mL-1000mL 模式分泌 IFN- γ 含量是 600mL-1800mL 模式的约 1.2 倍。

② 灌流开始后细胞密度、存活率、24 小时扩增倍数和分泌 IFN- γ 含量 (800mL-1000mL 模式与 1000mL-1500mL 模式对比) 的结果见表 2 和图 6-7。

表 2：细胞密度、存活率、扩增倍数和分泌 IFN- γ 含量

第一次实验：800mL-1000mL					第一次实验：1000mL-1500mL				
--------------------	--	--	--	--	---------------------	--	--	--	--

灌流参数	细胞密度 ($\times 10^6/\text{mL}$)	存活率 (%)	扩增倍 数	分泌 IFN- γ 含量 (pg/ml)	灌流参数	细胞密度 ($\times 10^6/\text{mL}$)	存活率 (%)	扩增倍 数	分泌 IFN- γ 含量 (pg/ml)
灌流第一天: 灌流 800mL	1.77	95.2	1	-	灌流第一 天: 灌流 1000mL	1.56	84.87	1	-
灌流第二天: 灌流 1000mL	4.59	95	2.59	-	灌流第二 天: 灌流 1500mL	3.24	90.8	2.08	-
灌流第三天: 收获	10.5	95.5	5.93	61690.708	灌流第三 天: 收获	8.61	91.7	5.52	34546.4

由以上结果可以得出, 800mL-1000mL 模式与 1000mL-1500mL 模式下, 两次实验细胞扩增倍数及存活率平均结果没有明显区别, 但 800mL-1000mL 模式分泌 IFN- γ 含量要显著高于 1000mL-1500mL 模式, 且 800mL-1000mL 模式分泌 IFN- γ 含量是 1000mL-1500mL 模式的约 1.8 倍。

通过上述实验, 比较了 4 种灌流模式, 综合考虑培养效果和经济性, 选择 400mL-1000mL 或 800mL-1000mL 的灌流模式作为优选的灌流模式, 即当细胞密度为 $(0.5\sim 1.1)\times 10^6$ 个细胞/mL 时, 每天灌流体积设置为 400mL; 以及/或者, 当细胞密度在 $(1.1\sim 2)\times 10^6$ 个细胞/mL 时, 每天灌流体积设置为 800mL; 以及当细胞密度 $\geq 2\times 10^6$ 个细胞/mL 时, 每天灌流体积设置为 1000mL。

综上, 在 AIM-V+5%ISR 培养基中, 通过 400mL-1000mL 或 800mL-1000mL 的灌流模式, 可以获得高细胞扩增倍数、高细胞存活率和高分泌 IFN- γ 含量, 且可保证 CAR⁺表达的 CAR-T 细胞, 用于临床治疗。

权利要求书

1. 一种 CAR-T 细胞灌流培养方法，其包括以下步骤：

1) 从受试者单采血细胞中分离获得外周血单个核细胞，然后从外周
5 血单个核细胞中分选获得 T 细胞；

2) 将分离的 T 细胞用 CD3/CD28 刺激磁珠进行激活处理；

3) 采用慢病毒载体感染激活后的 T 细胞；

4) 对慢病毒感染后的 T 细胞进行灌流培养，收获 CAR-T 细胞；

其中使用不含动物源成分的无血清培养基对 CAR-T 细胞进行培养，
10 所述不含动物源成分的无血清培养基的组成为：AIM-V+(3~9)%ISR；

所述灌流培养包括以下阶段：

第一阶段：当细胞密度为 $(0.5\sim 1.1)\times 10^6$ 个细胞/mL 时，灌流速率为 A_1 ；以及/或者

15 第二阶段：当细胞密度为 $(1.1\sim 2)\times 10^6$ 个细胞/mL 时，灌流速率为 A_2 ；
以及

第三阶段：当细胞密度 $> 2\times 10^6$ 个细胞/mL 时，灌流速率为 A_3 ；

其中 $A_1:A_2:A_3=1:2:2.5$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的 CAR-T 细胞灌流培养方法，其中，所述不
含动物源成分的无血清培养基的组成为：AIM-V+(4~7)%ISR；

20 优选地，所述不含动物源成分的无血清培养基的组成为：
AIM-V+5%ISR。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的 CAR-T 细胞灌流培养方法，其中，
 A_1 为 0.4 个生物反应器体积/天， A_2 为 0.8 个生物反应器体积/天， A_3 为 1.0
个生物反应器体积/天。

25 4. 根据权利要求 1-3 之一所述的 CAR-T 细胞灌流培养方法，其中，
在步骤 4) 中，当细胞密度 \geq 预设值时，开始灌流培养；

优选地，所述预设值为 $(0.3\sim 1.2)\times 10^6$ 个细胞/mL；

更优选地，所述预设值为 $(0.4\sim 1.0)\times 10^6$ 个细胞/mL；

进一步优选地，所述预设值为 0.5×10^6 个细胞/mL。

30 5. 根据权利要求 4 所述的 CAR-T 细胞灌流培养方法，其中，在步骤
4) 中，在细胞密度达到预设值之前，采用补液培养，其中补液培养过程

中以 $(0.3\sim 1)\times 10^6$ 个细胞/mL 的密度为补液标准进行补液，通气量为 $(0.1\sim 1)$ L/分钟，转速为 $(4\sim 12)$ rpm，通气为压缩空气加 $(1\sim 10)\%$ CO₂。

6. 根据权利要求 5 所述的 CAR-T 细胞灌流培养方法，在步骤 4) 中，在补液培养之前包括：

5 待感染后的 T 细胞数量达到 $(5\sim 15)\times 10^7$ 个细胞，将感染后的 T 细胞转入 Xuri 生物反应器进行补液培养。

7. 根据权利要求 1-6 之一所述的 CAR-T 细胞灌流培养方法，其中，所述灌流培养过程中的通气量为 $(0.3\sim 0.8)$ L/分钟，转速为 $(5\sim 15)$ rpm，通气为压缩空气加 $(1\sim 10)\%$ CO₂；

10 优选地，所述灌流培养过程中的通气量为 $(0.4\sim 0.6)$ L/分钟，转速为 $(8\sim 12)$ rpm，通气为压缩空气加 $(3\sim 6)\%$ CO₂；

更优选地，所述灌流培养过程中的通气量为 0.5L/分钟，转速为 10rpm，通气为压缩空气加 5% CO₂。

8. 根据权利要求 1-7 之一所述的 CAR-T 细胞灌流培养方法，其中，
15 在步骤 2) 中，所述将分离的 T 细胞用 CD3/CD28 刺激磁珠进行激活处理具体包括：将分离的 T 细胞进行重悬，使终浓度为 $(1\sim 2)\times 10^6$ 个细胞/mL，并按照每 1×10^6 T 细胞加入 $(0.5\sim 10)\mu\text{L}$ 的 CD3/CD28 刺激磁珠混匀，然后在 $37^\circ\text{C}+5\%$ CO₂ 下培养至少 24 小时。

9. 根据权利要求 8 所述的 CAR-T 细胞灌流培养方法，其中，将分离
20 的 T 细胞用不含动物源成分的无血清培养基进行重悬，所述不含动物源成分的无血清培养基的组成为：AIM-V+ $(3\sim 9)\%$ ISR；

优选地，所述不含动物源成分的无血清培养基的组成为：
AIM-V+ $(4\sim 7)\%$ ISR；

更优选地，所述不含动物源成分的无血清培养基的组成为：
25 AIM-V+5% ISR。

10. 根据权利要求 1-9 之一所述的 CAR-T 细胞灌流培养方法，其中，
在步骤 3) 中，所述采用慢病毒载体感染激活后的 T 细胞具体包括：取出
激活培养的 T 细胞，加入终浓度为 $(5\sim 10)\mu\text{g/mL}$ 的聚凝胺混匀，并按感染
复数= $(0.25\sim 5)$ 缓慢加入慢病毒载体，混匀后在 $(1000\sim 3000)$ rpm 下离心
30 $0.5\sim 2.0$ 小时，然后在 $37^\circ\text{C}+5\%$ CO₂ 下培养至少 24 小时。

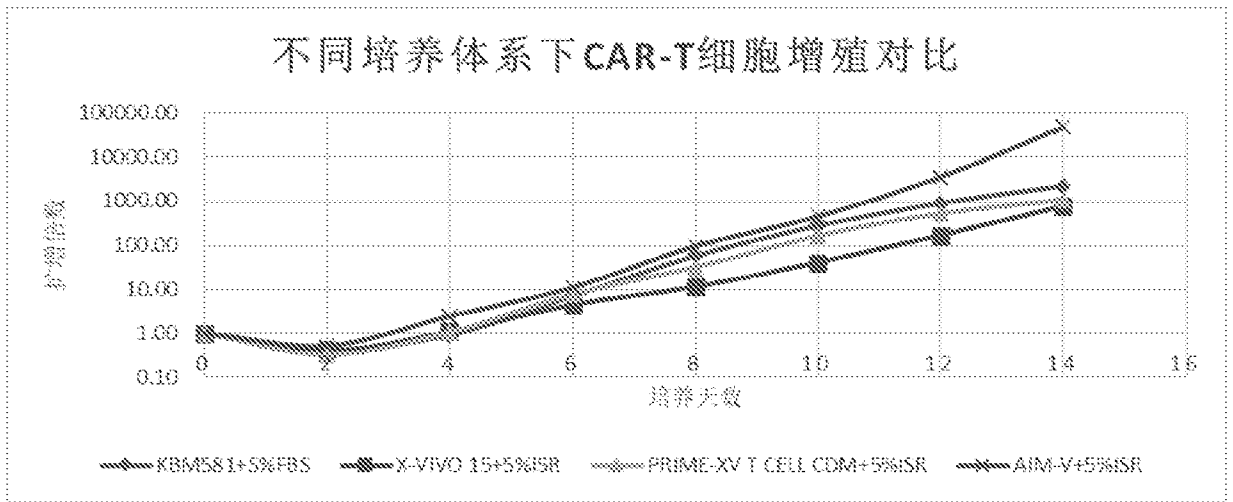


图 1

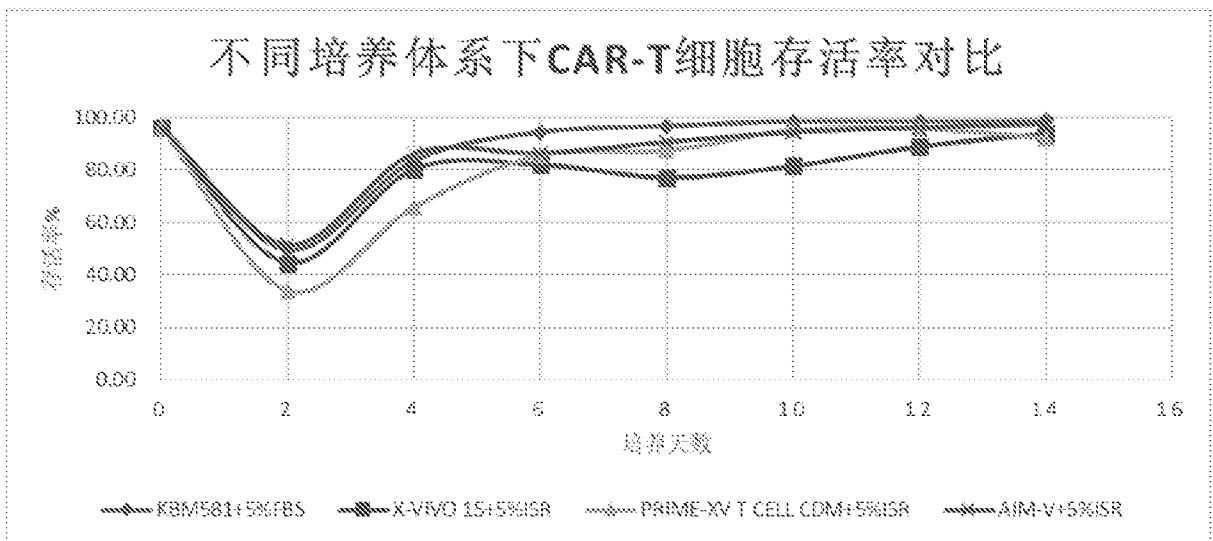


图 2

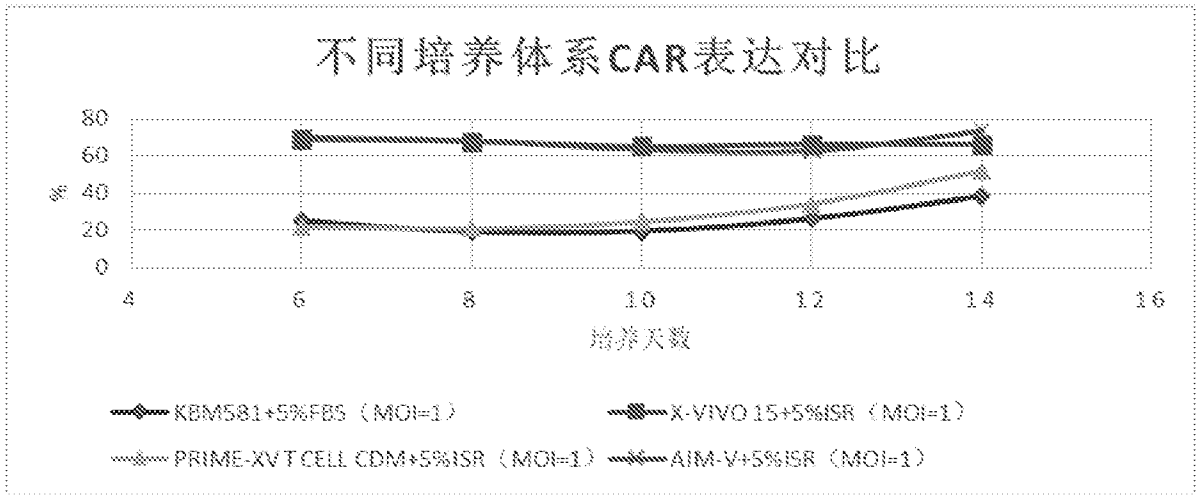


图 3

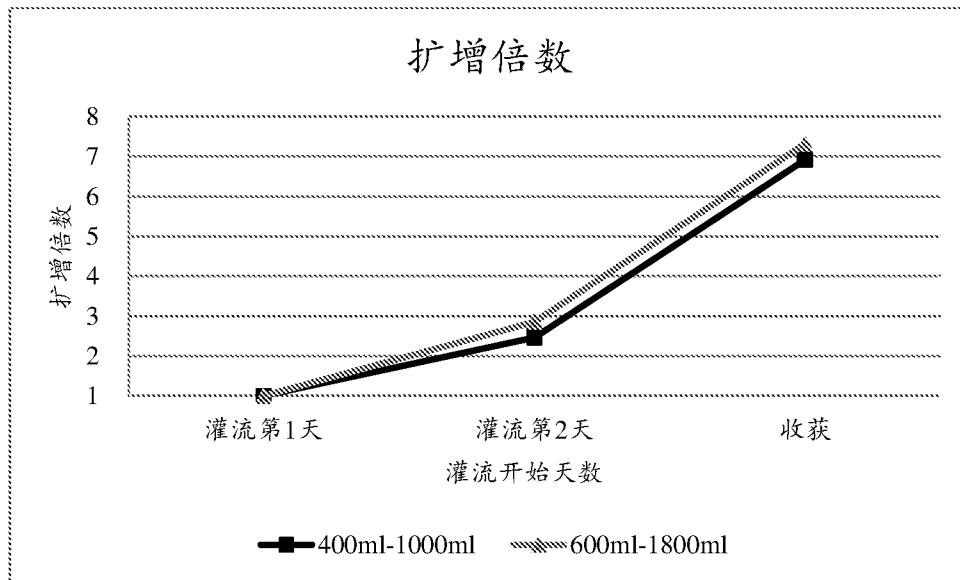


图 4

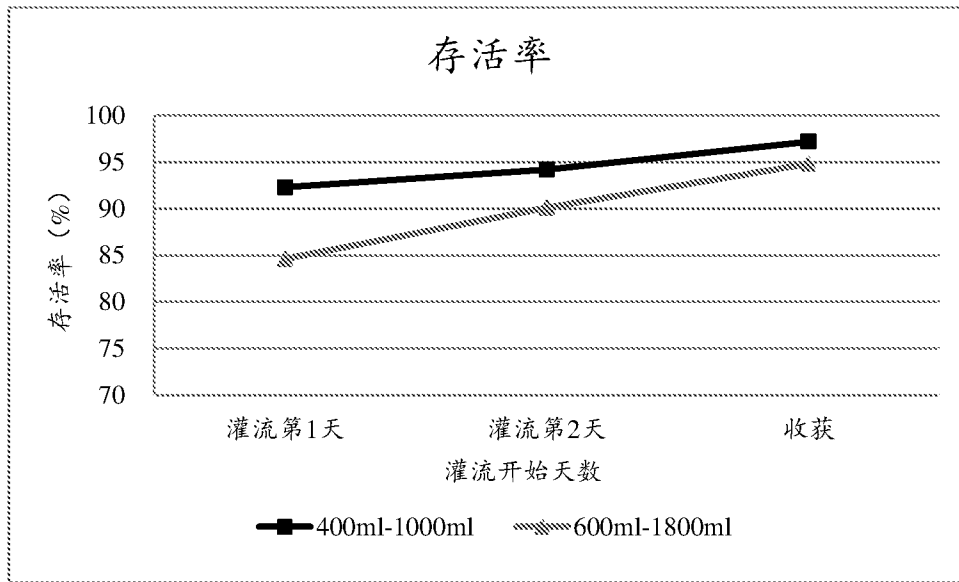


图 5

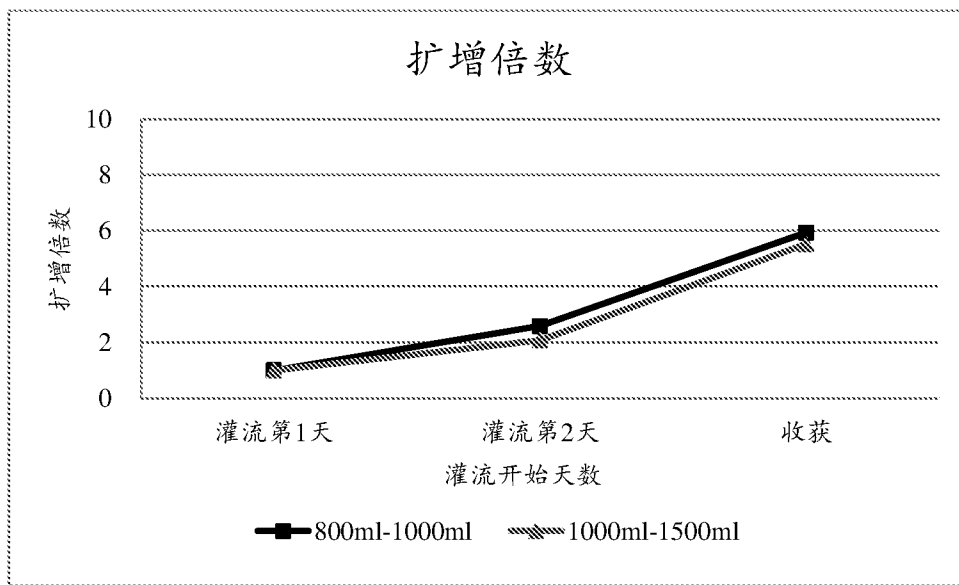


图 6

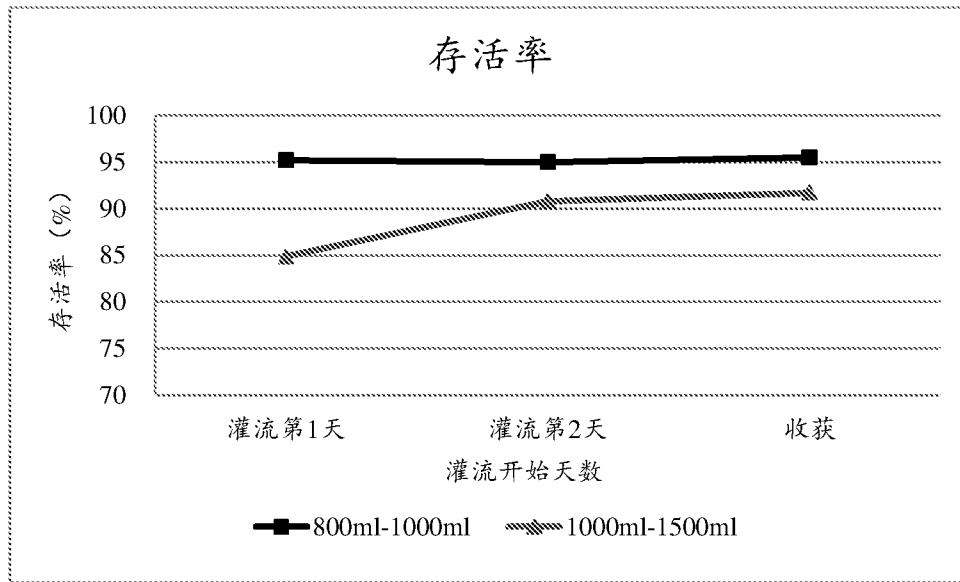


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/080811

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 5/10(2006.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, 万方数据库, WEB OF SCIENCE, PUBMED: 嵌合抗原受体, 细胞, 灌注, 培养, 速率, 无血清培养基, 免疫细胞血清替代物, Chimeric Antigen Receptor, T Cell?, CAR-T, AIM-V, ISR, CTS IMMUNE CELL SR		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 112662631 A (HEYUAN BIO TECHNOLOGY TIANJIN CO., LTD.) 16 April 2021 (2021-04-16) see claims 1-18	1-10
A	CN 110499291 A (CELLULAR BIOMEDICINE (HONGKONG) CO., LTD.) 26 November 2019 (2019-11-26) see embodiment 1	1-10
A	CN 111733186 A (TIANJIN YINGKESAI TECHNOLOGY CO., LTD.) 02 October 2020 (2020-10-02) see entire document	1-10
A	CN 107236762 A (HEBEI NONGFOYU BIOLOGY TECHNOLOGY CO., LTD.) 10 October 2017 (2017-10-10) see entire document	1-10
A	CN 101423820 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 06 May 2009 (2009-05-06) see entire document	1-10
A	US 2018179280 A1 (UNUS UNIV SINGAPORE NAT) 28 June 2018 (2018-06-28) see entire document	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 June 2022		20 June 2022
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	马冬磊 等 (MA, Donglei et al.). "Immune Cell SR对冻存PBMNC诱导培养CIK的效果研究 (Efficiency of Inducing CIK from Cryopreserved PBMNC by Using Immune Cell SR)" <i>中国实验血液学杂志 (Journal of Experimental Hematology)</i> , Vol. 26, No. 3, 20 June 2018 (2018-06-20), ISSN: 1009-2137, pages 894-899, see abstract	1-10
A	Corey Smith et al. "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" <i>Clin Transl Immunology</i> , Vol. 4, No. 1, 16 January 2015 (2015-01-16), ISSN: 2050-0068, e31, see entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/080811

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	112662631	A	16 April 2021	None	
CN	110499291	A	26 November 2019	US 2021214682 A1	15 July 2021
				WO 2019218402 A1	21 November 2019
				EP 3822344 A1	19 May 2021
				KR 20210010509 A	27 January 2021
				SG 11202011263 R A	30 December 2020
				AU 2018423493 A1	03 December 2020
CN	111733186	A	02 October 2020	None	
CN	107236762	A	10 October 2017	WO 2018233589 A1	27 December 2018
CN	101423820	A	06 May 2009	None	
US	2018179280	A1	28 June 2018	WO 2018098306 A1	31 May 2018
				JP 2019536480 A	19 December 2019
				KR 20190085528 A	18 July 2019
				SG 11201903830 T A	30 May 2019
				AU 2017363278 A1	23 May 2019
				EP 3545082 A1	02 October 2019
				CN 110268049 A	20 September 2019
				US 2018148506 A1	31 May 2018
				SG 10201912387 P A	27 February 2020
				CA 3043752 A1	31 May 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/080811

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 5/10(2006.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, 万方数据库, WEB OF SCIENCE, PUBMED: 嵌合抗原受体, 细胞, 灌注, 培养, 速率, 无血清培养基, 免疫细胞血清替代物, Chimeric Antigen Receptor, T Cell?, CAR-T, AIM-V, ISR, CTS IMMUNE CELL SR</p>																										
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 112662631 A (合源生物科技天津有限公司) 2021年4月16日 (2021 - 04 - 16) 参见权利要求1-18</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110499291 A (西比曼生物科技香港有限公司) 2019年11月26日 (2019 - 11 - 26) 参见实施例1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 111733186 A (天津英科赛奥科技有限公司) 2020年10月2日 (2020 - 10 - 02) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107236762 A (河北浓孚雨生物科技有限公司) 2017年10月10日 (2017 - 10 - 10) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101423820 A (浙江大学) 2009年5月6日 (2009 - 05 - 06) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2018179280 A1 (UNUS UNIV SINGAPORE NAT) 2018年6月28日 (2018 - 06 - 28) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>马冬磊等. "Immune Cell SR对冻存PBMNC诱导培养CIK的效果研究" 中国实验血液学杂志, 第26卷, 第3期, 2018年6月20日 (2018 - 06 - 20), ISSN: 1009-2137, 第894-899页, 参见摘要</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 112662631 A (合源生物科技天津有限公司) 2021年4月16日 (2021 - 04 - 16) 参见权利要求1-18	1-10	A	CN 110499291 A (西比曼生物科技香港有限公司) 2019年11月26日 (2019 - 11 - 26) 参见实施例1	1-10	A	CN 111733186 A (天津英科赛奥科技有限公司) 2020年10月2日 (2020 - 10 - 02) 参见全文	1-10	A	CN 107236762 A (河北浓孚雨生物科技有限公司) 2017年10月10日 (2017 - 10 - 10) 参见全文	1-10	A	CN 101423820 A (浙江大学) 2009年5月6日 (2009 - 05 - 06) 参见全文	1-10	A	US 2018179280 A1 (UNUS UNIV SINGAPORE NAT) 2018年6月28日 (2018 - 06 - 28) 参见全文	1-10	A	马冬磊等. "Immune Cell SR对冻存PBMNC诱导培养CIK的效果研究" 中国实验血液学杂志, 第26卷, 第3期, 2018年6月20日 (2018 - 06 - 20), ISSN: 1009-2137, 第894-899页, 参见摘要	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
PX	CN 112662631 A (合源生物科技天津有限公司) 2021年4月16日 (2021 - 04 - 16) 参见权利要求1-18	1-10																								
A	CN 110499291 A (西比曼生物科技香港有限公司) 2019年11月26日 (2019 - 11 - 26) 参见实施例1	1-10																								
A	CN 111733186 A (天津英科赛奥科技有限公司) 2020年10月2日 (2020 - 10 - 02) 参见全文	1-10																								
A	CN 107236762 A (河北浓孚雨生物科技有限公司) 2017年10月10日 (2017 - 10 - 10) 参见全文	1-10																								
A	CN 101423820 A (浙江大学) 2009年5月6日 (2009 - 05 - 06) 参见全文	1-10																								
A	US 2018179280 A1 (UNUS UNIV SINGAPORE NAT) 2018年6月28日 (2018 - 06 - 28) 参见全文	1-10																								
A	马冬磊等. "Immune Cell SR对冻存PBMNC诱导培养CIK的效果研究" 中国实验血液学杂志, 第26卷, 第3期, 2018年6月20日 (2018 - 06 - 20), ISSN: 1009-2137, 第894-899页, 参见摘要	1-10																								
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																										
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																										
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年6月10日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年6月20日</p>																								
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>李振鹏</p> <p>电话号码 86-(010)-62411085</p>																								

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Corey Smith等. "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" Clin Transl Immunology, 第4卷, 第1期, 2015年1月16日 (2015 - 01 - 16), ISSN: 2050-0068, e31, 参见全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/080811

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	112662631	A	2021年4月16日	无			
CN	110499291	A	2019年11月26日	US	2021214682	A1	2021年7月15日
				WO	2019218402	A1	2019年11月21日
				EP	3822344	A1	2021年5月19日
				KR	20210010509	A	2021年1月27日
				SG	11202011263R	A	2020年12月30日
				AU	2018423493	A1	2020年12月3日
CN	111733186	A	2020年10月2日	无			
CN	107236762	A	2017年10月10日	WO	2018233589	A1	2018年12月27日
CN	101423820	A	2009年5月6日	无			
US	2018179280	A1	2018年6月28日	WO	2018098306	A1	2018年5月31日
				JP	2019536480	A	2019年12月19日
				KR	20190085528	A	2019年7月18日
				SG	11201903830T	A	2019年5月30日
				AU	2017363278	A1	2019年5月23日
				EP	3545082	A1	2019年10月2日
				CN	110268049	A	2019年9月20日
				US	2018148506	A1	2018年5月31日
				SG	10201912387P	A	2020年2月27日
				CA	3043752	A1	2018年5月31日