



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106754723 B

(45)授权公告日 2020.03.17

(21)申请号 201611095758.3

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2016.12.02

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 102335427 A,2012.02.01,全文.

申请公布号 CN 106754723 A

孟冰等.慢病毒载体表达外源PON1对小鼠巨噬细胞的影响.《武汉大学学报(医学版)》.2015,第36卷(第1期),第1-5,35页.

(43)申请公布日 2017.05.31

(73)专利权人 南京大学

Divya Vats et al..Oxidative metabolism and PGC-1 $\beta$  attenuate macrophagemediated inflammation.《CELL METABOLISM》.2006,第13-24页.

地址 210093 江苏省南京市鼓楼区汉口路22号

(72)发明人 沈萍萍 牛志远

审查员 夏文静

(74)专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 胡锡瑜

(51)Int.Cl.

C12N 5/10(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

A61K 35/15(2015.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

一种具有抗肿瘤功能的免疫细胞及其应用

(57)摘要

本发明属于医药生物技术领域,具体涉及一种基因改造过的对恶性实体瘤具有治疗作用的免疫细胞及其应用,本发明提供的免疫细胞是特定的通过基因改造使之过表达脂代谢相关基因的免疫细胞;所述免疫细胞抑制肿瘤生长的能力是通过在肿瘤微环境中降低免疫细胞本身脂滴的积累,降低促肿瘤基因/蛋白表达,增强免疫细胞的吞噬能力、抗原呈递能力及肿瘤杀伤能力来实现的;所述免疫细胞为离体NKT细胞、DC细胞、巨噬细胞、单核细胞、粒细胞或T细胞。相关代谢调控基因的过表达使免疫细胞抗肿瘤能力显著增强,相较目前受到强烈关注的嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(CAR-T),毒副作用低且不会引起细胞因子风暴,满足临床需求。

1. 一种具有抗肿瘤功能的免疫细胞,其特征是宿主细胞表达外源的MCAD蛋白,细胞为巨噬细胞。

2. 根据权利要求1所述具有抗肿瘤功能的免疫细胞,其特征是宿主细胞表达外源的蛋白是由于宿主细胞内含有相应的表达载体或染色体中整合有外源的编码相应蛋白的核酸分子。

3. 根据权利要求2所述具有抗肿瘤功能的免疫细胞,其特征是载体在哺乳动物细胞内表达MCAD蛋白。

4. 根据权利要求2所述具有抗肿瘤功能的免疫细胞,其特征是载体为慢病毒载体。

5. 权利要求1所述具有抗肿瘤功能的免疫细胞在制备治疗恶性实体瘤的药物或制剂中的应用。

## 一种具有抗肿瘤功能的免疫细胞及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药生物技术领域,具体涉及一种基因改造过的具有抗肿瘤功能的免疫细胞及其应用。

### 背景技术

[0002] 肿瘤一直以来都是困扰全世界的重大疾病,严重危害人类健康。因此,寻找有效的肿瘤治疗方法,彻底攻克肿瘤是世界医学界的重要研究课题。目前,传统的三大主要治疗手段即手术治疗、化疗、放疗,这三大主要治疗手段虽然是全球肿瘤治疗的基本手段,但是其治疗效果非常有限。

[0003] 最近肿瘤的细胞过继免疫疗法正在全世界兴起,为肿瘤患者带来了曙光。目前肿瘤过继免疫疗法所用的细胞主要是单核细胞、T细胞或树突状细胞,如淋巴因子IL-2激活的T细胞或单核细胞;用肿瘤抗原(蛋白或多肽)处理激活的树突状细胞以及目前受到强烈关注的嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy, CAR-T),即使T细胞表达可识别并结合肿瘤抗原的受体,扩增后回输给肿瘤患者来达到治疗的目的。但是这些方法存在的问题也正在被研究者发现,例如CAR-T治疗引起的细胞因子释放综合征等。

[0004] 而通过调节肿瘤微环境中免疫细胞的代谢激活其抗肿瘤功能的研究是抗肿瘤免疫研究的一个全新领域,相关的研究报道非常少并集中在肿瘤微环境中的树突状细胞和T细胞。如2010年,Herber DL等在Nature Medicine杂志上报道肿瘤相关树突状细胞(TADCs)通过上调清道夫受体A从胞外摄取脂类,胞内脂质堆积直接导致树突状细胞抗原呈递及激活T细胞的能力缺失,运用乙酰-CoA羧化酶的小分子抑制剂干预脂质堆积可以恢复TADCs的抗肿瘤功能;2015年,Cubillos-Ruiz JR,Silberman PC等人在Cell杂志上报道肿瘤微环境中树突状细胞内出现了内质网应激现象,导致XBP1的激活以及树突状细胞内脂质的积累,从而使树突状细胞抗原呈递能力下降,运用可以沉默XBP1的纳米颗粒药物可以减少树突状细胞内脂滴的积累并增强其抗肿瘤能力;2015年,Ho PC,Bihuniak JD等人在Cell杂志上报道通过过表达磷酸烯醇丙酮酸羧基激酶1(PCK1)来增加T细胞内的磷酸烯醇丙酮酸(PEP),可以改善T细胞耗竭,通过过继T细胞疗法,即向小鼠体内回输过表达PCK1的T细胞,可以达到很好的抗肿瘤效果;2016年Kumar V和Cheng PY等人在Immunity杂志上报道,在缺氧环境诱导下,浸润到肿瘤组织中的MDSC会上调唾液酸转运蛋白(sialin)从而增加MDSC中唾液酸(sialic acid)的浓度并促使唾液酸与细胞表面CD45蛋白酪氨酸磷酸酶(CD45PTP)的结合并激活CD45PTP,进而抑制了STAT3的活性,STAT3活性的抑制会促进MDSC向TAMs的分化,从而形成促肿瘤的微环境。而使用唾液酸酶来水解掉MDSC中的唾液酸可以抑制MDSC向TAMs的分化;2016年Yang W,Bai YB等在Nature杂志上报道“代谢检查点”可以调控T细胞的抗肿瘤活性,鉴定了肿瘤免疫治疗的新靶点—胆固醇酯化酶ACAT1并开发了相应的小分子药物前体。报道称通过调控T细胞的“代谢检查点”可改变其代谢状态,使其获得更强的抗肿瘤功能。科研人员发现T细胞代谢通路中的胆固醇酯化酶ACAT1是一个很好的调控靶点,抑制

ACAT1的活性可以大大提高CD8+T细胞(又名杀伤性T细胞)的抗肿瘤功能。因为ACAT1被抑制后,CD8+T细胞膜上的游离胆固醇水平提高,从而让T细胞肿瘤抗原免疫应答变得更加高效。同时,科研人员还利用ACAT1的小分子抑制剂avasimibe在小鼠模型中治疗肿瘤,发现该抑制剂具有很好的抗肿瘤效应;并且avasimibe与现有的肿瘤免疫治疗临床药物anti-PD-1联用后效果更佳。该项研究开辟肿瘤免疫治疗研究的一个全新领域,证明细胞代谢对肿瘤免疫应答起到了关键作用,同时发现ACAT1这一新的药物靶点,揭示ACAT1小分子抑制剂的应用前景,为肿瘤免疫治疗提供了新思路与新方法。

[0005] 这些报道表明通过调节肿瘤微环境中免疫细胞的代谢可以充分激活其抗肿瘤功能,寻找肿瘤微环境中免疫细胞新的代谢特征,并进行靶向调节对肿瘤治疗具有重要意义。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的是为了克服传统方法治疗恶性肿瘤的低效以及最近兴起的嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(CAR-T)不安全,容易引起细胞因子风暴的缺陷,提供一种具有治疗恶性实体瘤功能的免疫细胞及其应用。

[0007] 本发明的技术方案:

[0008] 本发明所述具有抗肿瘤功能的免疫细胞,其特征在于,所述的宿主细胞可表达外源的SCAD或MCAD或LCAD或VLCAD或CPT1或CPT2或CACT或CD36或FABP4蛋白或以上所述蛋白的任意的组合,所述细胞为NKT细胞或DC细胞或巨噬细胞或单核细胞或粒细胞或T细胞。所述的宿主细胞可表达外源的所述蛋白是由于宿主细胞内含有相应的表达载体或染色体中整合有外源的编码相应蛋白的核酸分子。所述的载体可在哺乳动物细胞内表达SCAD或MCAD或LCAD或VLCAD或CPT1或CPT2或CACT或CD36或FABP4蛋白,优选地载体为慢病毒载体。

[0009] 本发明的第一方面,提供了一种载体,所述的载体可在哺乳动物细胞内表达短链酰基辅酶A脱氢酶(SCAD)。优选地所述载体为慢病毒载体。

[0010] 在另一优选例中,所述的载体可在哺乳动物细胞内表达中链脂酰辅酶A脱氢酶(MCAD)。

[0011] 在另一优选例中,所述的载体可在哺乳动物细胞内表达长链酰基辅酶A脱氢酶(LCAD)。

[0012] 在另一优选例中,所述的载体可在哺乳动物细胞内表达极长链酰基辅酶A脱氢酶(VLCAD)。

[0013] 在另一优选例中,所述的载体可在哺乳动物细胞内表达肉毒碱棕榈酰转移酶-1(CPT1)。

[0014] 在另一优选例中,所述的载体可在哺乳动物细胞内表达肉毒碱棕榈酰转移酶-1(CPT2)。

[0015] 在另一优选例中,所述的载体可在哺乳动物细胞内表达肉碱酰基肉碱移位酶(CACT)。

[0016] 在另一优选例中,所述的载体可在哺乳动物细胞内表达清道夫受体CD36。

[0017] 在另一优选例中,所述的载体可在哺乳动物细胞内表达脂肪酸结合蛋白4(FABP4)。

[0018] 本发明的第二方面,提供了一种宿主细胞,所述的宿主细胞中含有本发明第一方

面所述的载体或染色体中整合有外源的编码第一方面所述的蛋白分子的核酸分子。

[0019] 在另一优选例中,所述细胞为分离的细胞,和/或所述细胞为基因工程化的细胞。

[0020] 在另一优选例中,所述细胞为哺乳动物细胞。

[0021] 在另一优选例中,所述细胞为NKT细胞或T细胞。

[0022] 在另一优选例中,所述细胞为DC细胞。

[0023] 在另一优选例中,所述细胞为单核细胞。

[0024] 在另一优选例中,所述细胞为巨噬细胞或粒细胞。本发明所述的巨噬细胞或粒细胞的分离及诱导方法为:取肿瘤患者的外周血,用含2mM EDTA的PBS (pH 7.2) 将外周血稀释4倍;在离心管底部加入1体积的Lymphoprep™ (AXIS-SHIELD, Norway) 试剂,然后在分离液上面小心地加入3体积稀释后的外周血样本;室温800×g离心30min (此步离心时须关闭离心机刹车),离心结束后,可以看到离心管中部有一层白膜即单个核细胞;用巴斯德管小心地吸取白膜层细胞,转移至另一新的离心管中;用PBS洗两次,250×g离心10min (4℃);细胞计数,用适量的完全培养基 (PRMI 1640+10%FBS) 重悬,细胞密度控制为 $5 \times 10^6$  cells/mL;置于细胞培养箱内培养;2h后换液并用预热的PBS充分洗涤5次,以去除悬浮细胞;剩余的贴壁牢固的细胞即为单核细胞。将分离得到的单核细胞按照 $1 \times 10^6$  cells/mL铺板,然后加入100ng/mL的M-CSF (Peprotech, Minneapolis, MN) 或G-CSF (Peprotech, Minneapolis, MN) 诱导分化;第4天时换液一次,7天后收集得到巨噬细胞或粒细胞。

[0025] 本发明的第三方面,提供了一种药物组合物,所述组合物含有本发明第一方面所述的载体、本发明第二方面所述的细胞或本发明第一方面、第二方面所述的载体或细胞的任意组合物。

[0026] 在另一优选例中,所述载体为纳米颗粒包裹的载体,并可用于治疗恶性肿瘤。

[0027] 在另一优选例中,所述载体被包裹于具有生物活性的病毒颗粒中。

[0028] 本发明的第四方面,提供了一种治疗疾病的方法,包括给需要治疗的对象施用适量的本发明第三方面所述的药物组合物。

[0029] 在另一优选例中,所述疾病为恶性肿瘤。

[0030] 在另一优选例中,所述疾病为人的Her2<sup>+</sup>乳腺癌,在此乳腺癌组织浸润的TAMs中我们观察到了脂滴积累。

[0031] 在另一优选例中,本发明所述的用于治疗乳腺癌的巨噬细胞进行外周静脉输注的有效剂量为 $1 \times 10^7$ /kg。

[0032] 本发明的有益效果是:

[0033] 1) 本发明中,使用过表达MCAD的巨噬细胞可以有效抑制肿瘤的生长。

[0034] 2) 本发明中,使用过表达MCAD的巨噬细胞进行肿瘤治疗毒副作用低,相对于传统的化疗,避免了化疗药物对正常组织的损伤;相对于目前研究广泛的细胞疗法,如嵌合抗原受体T细胞免疫疗法 (Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy, CAR-T),不会在患者体内引起细胞因子风暴,从而造成严重的后果。

[0035] 上述说明仅是本发明技术方案的概述,为了能够更清楚了解本发明的技术手段,并可依照说明书的内容予以实施,以下将以本发明的较佳实施案例并配合附图进行详细说明。本发明的具体实施方式由以下实施例及其附图详细给出。

## 附图说明

- [0036] 图1为pLenti6/V5-D-TOPO-MCAD载体的结构图。
- [0037] 图2为过表达MCAD的骨髓来源巨噬细胞 (BMDM) 的构建。
- [0038] 图3为腹腔注射过表达MCAD的BMDMs对4T1种植瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用。
- [0039] 图4表明腹腔注射的BMDMs可以有效地向肿瘤组织中迁移。
- [0040] 图5表明注射了过表达MCAD蛋白的BMDMs的小鼠肿瘤组织中TAMs的脂质明显减少, 吞噬能力上升, 促肿瘤基因表达下调。
- [0041] 图6表明注射过表达MCAD蛋白的BMDMs对荷瘤小鼠的TAMs以及腹腔巨噬细胞中脂质均有下调作用。
- [0042] 图7表明注射过表达MCAD蛋白的BMDMs并不会导致细胞因子释放综合征。

## 具体实施方式

[0043] 以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是, 此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明, 并不用于限制本发明。

[0044] 在本发明的一个较佳的实施方式中, 本发明提供了含有小鼠MCAD基因的重组表达载体。优选情况下, 重组表达载体为慢病毒表达载体。对于慢病毒表达载体没有特别的限定, 只要能够与辅助载体共转染包装细胞如293T包装细胞, 获得病毒浓缩液及过表达相关蛋白的细胞即可, 优选情况下, 慢病毒表达载体为pLenti6/V5-D-TOPO-MCAD。

[0045] 对于慢病毒表达载体pLenti6/V5-D-TOPO-MCAD的制备方法没有特别的限定, 可以为本领域技术人员能够想到的各种方法, 优选情况下, 慢病毒表达载体pLenti6/V5-D-TOPO-MCAD的制备方法包括以下步骤:

[0046] 1. 从哺乳动物细胞中扩增MCAD的cDNA, 可以用本领域常用的各种方法, 例如可以为

[0047] RT-PCR法或全基因合成技术。以RT-PCR法为例:

[0048] 实验材料:

[0049] Trizol购于Invitrogen; PrimeScript™1st strand cDNA Synthesis试剂盒和Premix Ex Taq™Version 2.0试剂盒购于TaKaRa; SYBR Green Master Mix (Vazyme biotech); 定量PCR仪型号为CFX96Real-Time System (BIO-RAD) 或者Step one plus Real-Time PCR-system (AB Applied biosystem)。

[0050] 实验步骤:

[0051] 1. 1RNA抽提

[0052] 1) 对于6孔板, 每孔加入1mL Trizol, 室温5min, 吹打细胞使之充分裂解; 如果是悬浮细胞, 则先离心收细胞, 再加入Trizol。

[0053] 2) 将Trizol转移至除酶的EP管中, 然后加入CHCl<sub>3</sub> (按0.2mL CHCl<sub>3</sub>/1mL Trizol的比例加入), 剧烈震荡, 室温放置10min。

[0054] 3) 12,000g离心15min, 4℃。

[0055] 4) 液体分层, 取上层水相 (约500μL) 转移至另一新的EP管中。

[0056] 5) 加入0.5mL异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温静置5-10min。

[0057] 6) 12,000g离心10min, 4℃。

[0058] 7) 弃上清,75%乙醇重悬RNA沉淀。

[0059] 8) 7800g离心5min,4℃。

[0060] 9) 弃上清,管壁上的液滴用枪头吸出,然后室温放置10min左右以使残留的液体挥发干净(可看到RNA由白色变为半透明)。

[0061] 10) 加入10-20μL DEPC水溶解RNA,立即使用或-80℃保存。

[0062] 过程中的所用枪头和离心管都必须经过除酶处理。

[0063] 1.2逆转录

[0064] 1) 按如下体系配制第一反应液:

| 试剂                           | 体积          |
|------------------------------|-------------|
| oligo(dT) <sub>18</sub>      | 1.0 μL      |
| total RNA                    | 3.0 μg      |
| dNTP Mixture (10 mM)         | 1.0 μL      |
| Rnase free dH <sub>2</sub> O | Up to 10 μL |

[0066] 2) PCR仪上65℃反应5min,然后立即冰上冷却。

[0067] 3) 在第一反应液基础上配制如下第二反应液:

| 试剂                           | 体积          |
|------------------------------|-------------|
| 第一反应液                        | 10 μL       |
| 5×PrimeScript Buffer         | 4.0 μL      |
| RNase Inhibitor              | 0.5 μL      |
| PrimeScript RTase            | 1.0 μL      |
| Rnase free dH <sub>2</sub> O | Up to 20 μL |

[0069] 4) 轻轻混匀,然后42℃反应1h。

[0070] 5) 接着95℃反应5min使逆转录酶灭活。

[0071] 6) 冰上冷却,用于后续PCR实验或-20℃保存。

[0072] \*逆转录过程中的枪头和离心管都必须经过除酶处理。

[0073] 1.3PCR扩增MCAD的cDNA

[0074] PCR扩增体系:

| 试剂                          | 体积    |
|-----------------------------|-------|
| PrimeSTAR HS DNA Polymerase | 1 μL  |
| 5×PrimeSTAR Buffer          | 10 μL |

[0075]

|        |                    |                  |
|--------|--------------------|------------------|
|        | dNTP Mixture       | 4 $\mu$ L        |
|        | DNA模板              | 1 $\mu$ L        |
| [0076] | Primer 1           | 1 $\mu$ L        |
|        | Primer 2           | 1 $\mu$ L        |
|        | ddH <sub>2</sub> O | Up to 50 $\mu$ L |

[0077] PCR扩增程序:

|        |      |        |
|--------|------|--------|
|        | 98°C | 10 sec |
|        | 55°C | 5 sec  |
| [0078] | 72°C | 30 sec |

For 30 Cycles

[0079] 引物序列为:

[0080] Forward: 5' -CTGCGGATCCATGGCAGCGGCGTTCCGCAG-3'。

[0081] Reverse: 5' -ATATCTCGAGTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAATTTTTATACTT TCAATGTGC-3'。

[0082] 2. 将MCAD的cDNA扩增产物和pLenti6/V5-D-TOPO载体 (Invitrogen, Catalog nos. K4955-00) 分别经过内切酶BamHI (TaKaRa) 和XhoI (TaKaRa) 酶切之后用T4连接酶 (TaKaRa) 连接过夜。

[0083] 3. 经测序验证后得到序列正确的pLenti6/V5-D-TOPO-MCAD载体, pLenti6/V5-D-TOPO-MCAD载体的结构如图1所示。

[0084] 在本发明的一个较佳的实施方式中, 本发明提供了经过基因工程改造以过表达小鼠MCAD的鼠源巨噬细胞, 其显示显著的抗肿瘤特性。本发明的细胞还可以包括NKT细胞、DC细胞、单核细胞、粒细胞或T细胞。对于工程化过表达MCAD的巨噬细胞的制备方法没有特别的限定, 可以为本领域技术人员能够想到的任何方法, 优选情况下, 该方法包括: 包装携带pLenti6/V5-D-TOPO-MCAD编码基因的慢病毒; 利用分离或诱导的手段获得足够的巨噬细胞; 利用得到的慢病毒感染巨噬细胞, 使巨噬细胞过表达MCAD。具体地, 对于包装携带pLenti6/V5-D-TOPO-MCAD编码基因的慢病毒的方法没有特别的限定, 可以为本领域技术人员常用的各种方法, 优选情况下, 用Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将慢病毒表达载体pLenti6/V5-D-TOPO-MCAD与辅助质粒 (如PL3, PL4, PL5) 共转染293T包装细胞, 转染48-72h时收集病毒上清, 离心、过滤, 在滤液中添加5 $\times$ PEG-it<sup>TM</sup> (CAT.#LV810A-1, SBI, USA) 并混匀, 4°C静置24h, 离心后弃上清, 沉淀用0-4°C预冷的无菌PBS溶解, 获得病毒浓缩液。

[0085] 优选情况下, 改良的制备小鼠巨噬细胞的方法如下: 选取刚刚处死的小鼠的后肢, 先剔除一部分皮肉使腿骨大致显露出来, 尽量在关节外端 (靠近脊椎) 剪下大腿; 尽量剔除干净残余的肌肉和结缔组织, 将股骨和胫骨间的连接剪开; 将股骨和胫骨间的两端的关节剪开 (切口尽量整齐); 用注射器 (5mL针筒+1mL针头) 吸取PRMI 1640, 并将骨髓细胞吹到培养皿里面 (可看到红色的团块, 骨头变白); 用40 $\mu$ M滤网过滤, 转移至15mL离心管; 离心后弃上清 (300g, 10min); 加入1mL红细胞裂解液混匀, 裂解2min; 用PBS补齐至10mL 300g离心



10min,弃上清;收集细胞按照 $1 \times 10^5$ 个/mL重悬与PRMI 1640完全培养基;加入鼠源的M-CSF (20ng/mL) 诱导7天。

[0086] 对于慢病毒感染巨噬细胞的方法没有特别限定,可以为本领域常用的各种方法,优选情况下,该方法包括:取 $1 \times 10^7$ 个巨噬细胞,弃掉旧的培养液,加入10mL新鲜BMDM培养液,再加入300 $\mu$ L病毒浓缩液、10 $\mu$ L Polybrene (Santa Cruz),置于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中感染48h后,更换新的BMDM完全培养液并加入10 $\mu$ g/mL blasticidin (Invitrogen, Cat.No.R210-01),再过3天之后收集得到过表达MCAD的巨噬细胞。

[0087] 图2A为过表达MCAD的小鼠巨噬细胞(右图),左图为未处理的小鼠骨髓细胞对照。图2B为M-CSF刺激小鼠骨髓细胞分化7天后流式分析A图中两种细胞表面巨噬细胞标志分子CD11b的表达情况。

[0088] 在本发明的一个较佳的实施方式中,本发明提供了过表达MCAD的巨噬细胞在治疗小鼠乳腺癌中的应用。优选情况下,小鼠乳腺癌是原位种植的4T1小鼠乳腺癌模型。具体地操作如下:

[0089] 1. 首先我们分离了小鼠后腿骨中的骨髓细胞,并用20ng/mL的巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF) 诱导巨噬细胞分化7天,我们也检测到诱导7天之后巨噬细胞的表面标志CD11b表达量明显升高。然后用慢病毒转入过表达MCAD的质粒并使用blasticidin筛选出阳性的BMDM,并用类似的方法构建表达LacZ蛋白的对照BMDM。

[0090] 2. 原位种植乳腺癌模型构建及细胞治疗

[0091] 实验材料:

[0092] 8-10周龄的BALB/c雌性小鼠购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,所有动物均饲养于SPF级的动物房中;4T1细胞培养在含10%胎牛血清的DMEM中。

[0093] 实验步骤:

[0094] 1) 收集对数生长期的4T1细胞,用适量PBS重悬,使其密度为 $1 \times 10^7$  cells/mL。

[0095] 2) 取20 $\mu$ L细胞悬液接种于BALB/c小鼠左侧乳腺脂肪垫内。

[0096] 3) 在接种4T1细胞之后第5天,我们给荷瘤小鼠腹腔注射 $1 \times 10^7$ 个过表达MCAD的BMDM以及对照BMDM,并在第13天重复注射1次,为了实验的严谨我们同时也设置了一组注射RPMI1640培养基的阴性对照组。

[0097] 4) 接种过4T1的第27天处死小鼠,进行后续实验分析。

[0098] 3. 细胞治疗效果检测

[0099] 首先,我们统计了肿瘤的大小,我们发现与对照BMDM(过表达LacZ) 相比注射过表达MCAD的BMDM可以显著抑制肿瘤的生长( $P < 0.01$ ) (图3A和3D),同样的小鼠体重(图3B)和脾重并没有明显的变化(图3C)。由于我们过表达的MCAD蛋白上带有HA标签,我们制作了肿瘤组织的冰冻切片并用抗HA的抗体进行免疫荧光实验,检测了肿瘤组织中是否浸润了我们注射的BMDM,图片显示我们注入的BMDM成功浸润到了肿瘤组织中(图4A)。免疫荧光实验步骤:将冰冻切片用4%多聚甲醛(BOSTER, Lot No.10/10A68) 固定30min;用预冷过的0.2% Triton X-100穿孔10min;用2%BSA包被1h;在4 $^{\circ}$ C用anti-HA (Bioworld) 一抗孵育过夜;用PBS洗3次,每次3min;用FITC标记的二抗孵育1h;用Hoechst 33342 (LifeTechnology) 染核,室温孵育1h;用PBS洗3次,每次3min;在荧光显微镜下观察。

[0100] 并且我们还分选出了肿瘤组织中的巨噬细胞(方法如下)并用抗HA的抗体以及抗

MCAD的抗体进行了免疫印迹实验,结果同样证实了高效的浸润(图4B)。

[0101] 肿瘤相关巨噬细胞的分离:

[0102] 实验材料:

[0103] 100 $\mu$ M滤网,40 $\mu$ M滤网,50mL离心管;PEB溶液(PBS 500mL+EDTA2mM+5%FBS),可以过滤除菌后再于超净台中加FBS;胶原酶消化液:100mL Hanks+50mg collagase I(sigma)+7.5mg DNA酶I+双抗;使用前预热至37 $^{\circ}$ C。红细胞裂解液(碧云天C3702)。Hanks溶液配方:NaCl 8.175g;KCL 0.403g;Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.114g;HEPES 5.958g;CaCL<sub>2</sub> 0.444g;MgSO<sub>4</sub> 0.197g定容至1000mL。

[0104] 实验步骤:

[0105] 1) 取出肿瘤后,放在大号培养皿里面,PEB洗涤一次,用剪刀剪成小块。

[0106] 2) 加入适量的胶原酶消化液,放在37 $^{\circ}$ C细胞培养箱进行消化。

[0107] 3) 30min后,用注射器的末端充分研磨小的肿瘤块儿,如果有很难研磨的块状物可以先移去消化液再用剃须刀片切成糊状。

[0108] 4) 继续孵育,消化大约30min(可适当延长),每隔十分钟摇晃一下。

[0109] 5) 将消化成的液体用100 $\mu$ m的滤网过滤至50mL的离心管中,再用40 $\mu$ m滤网过滤一次;(此过程时间较长,可以将一毫升的枪尖头部剪掉一截再吸粘稠的液体,加到滤网中后可以在滤网中反复吹吸加速过滤)。

[0110] 6) 将过滤后的细胞悬液低速离心一次(500rpm,2min)。

[0111] 7) 弃沉淀,收集上清再低速离心一次(500rpm,2min)。

[0112] 8) 弃沉淀,收集上清高速离心一次(1000rpm,5min)。

[0113] 9) 收集沉淀,如果细胞颜色太红加入2-4mL红细胞裂解液裂解5min(选做)。

[0114] 10) 用20mL PEB洗一次。

[0115] 11) 根据细胞量的多少用完全培养基(含10%FBS和双抗的DMEM)重悬,预贴壁1-2h。

[0116] 12) 弃上清,PEB重悬贴壁细胞,计数,离心收集细胞,使用分选巨噬细胞的抗F4/80磁珠在PEB中孵育30min。

[0117] 13) PEB洗涤三次,用PEB重悬细胞,然后进行磁珠分选(Miltenyi Biotec)。未与磁柱结合的细胞标记为Passthrough(主要是肿瘤细胞)。

[0118] \*分选出的细胞如果要后续的培养,所有的试剂耗材都要无菌。

[0119] 我们还从4T1接种瘤小鼠的肿瘤组织分选TAMs-LacZ(腹腔注射过表达LacZ蛋白的BMDMs),和TAMs-MCAD(腹腔注射过表达MCAD蛋白的BMDMs),使用尼罗红对脂滴进行染色,运用FSC-H和FL-2两个通道,流式分析各组TAMs中脂质的含量,分离4T1接种瘤小鼠的未染尼罗红的腹腔巨噬细胞(腹腔注射过表达LacZ蛋白的BMDMs)为阴性对照。结果也证实与注射过表达LacZ的BMDM对照组相比注射了过表达MCAD的BMDM的荷瘤小鼠肿瘤组织中分选出来的TAMs中低脂滴的巨噬细胞要多~20%左右(图5A)。此外,我们也检测了这两组TAMs的吞噬能力,从4T1接种瘤小鼠的肿瘤组织分选TAMs-LacZ,和TAMs-MCAD,使用Latex beads分析吞噬能力,TAMs-LacZ和未加Latex beads的培养基孵育相同的时间作为阴性对照,与体外实验相一致,过表达MCAD增强了TAMs的吞噬能力(图5B),我们的结果表明TAMs中脂滴的积累可以导致巨噬细胞吞噬能力的受损,但具体的机制还需要深入的研究。同时我们也用RT-

qPCR观察了TAMs促肿瘤基因的表达状况,分离4T1接种瘤小鼠的腹腔巨噬细胞(腹腔注射过表达LacZ蛋白的BMDMs),从4T1接种瘤小鼠的肿瘤组织分选TAMs-LacZ,和TAMs-MCAD,提取RNA,RT-qPCR分析TAMs促肿瘤基因的表达状况,结果表明类似于体外实验MCAD过表达抑制了Vegfa,Stat3,Il-6,Fr $\beta$ ,Cox2,B7h1,Arg1和Ido1等TAMs标志基因的表达(图5C)。

[0120] 我们也用油红染色并定量的方法同样证实了过表达MCAD对TAMs中脂滴的下调作用。我们取注射了过表达MCAD蛋白的BMDMs的小鼠肿瘤组织,胶原酶消化分离肿瘤组织单细胞,油红O染色观察整个肿瘤组织细胞群中脂质过载的细胞群(图6A),以及分选出TAMs,油红染色显微镜下观察脂质含量变化(图6B)及定量分析结果(图6C)也证实了从注射了过表达MCAD的BMDM的荷瘤小鼠肿瘤组织中分离得到的TAMs中有很多透明的没有积累脂滴的巨噬细胞并且总体脂滴含量下调。同时我们也发现,注射过表达MCAD的BMDM对小鼠腹腔巨噬细胞中的脂滴同样具有明显的下调作用(图6D-F)。

[0121] 更值得注意的是在我们的细胞治疗过程中我们并没有观测到细胞因子释放综合征/细胞因子风暴,我们知道肿瘤的生物疗法如T细胞治疗或单抗类药物治疗通常会伴随严重的细胞因子释放综合征,对机体造成严重的损伤或导致个体死亡,因此寻找更为安全的生物疗法是相关研究者所共同追求的。我们在输入BMDM后的第2天及第7天检测了小鼠血清中IL-1 $\beta$ ,TNF $\alpha$ ,IL-6和IL-12的含量,发现与未处理的4T1荷瘤小鼠血清中的细胞因子相比并没有出现大幅度的含量变化(图7),因此,我们所提出的改造巨噬细胞进行肿瘤免疫治疗的方法是安全有效的。

[0122] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0123] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0124] 此外,本发明的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其不违背本发明的思想,其同样应当视为本发明所公开的内容。

# pLenti6/V5-D-TOPO-MCAD

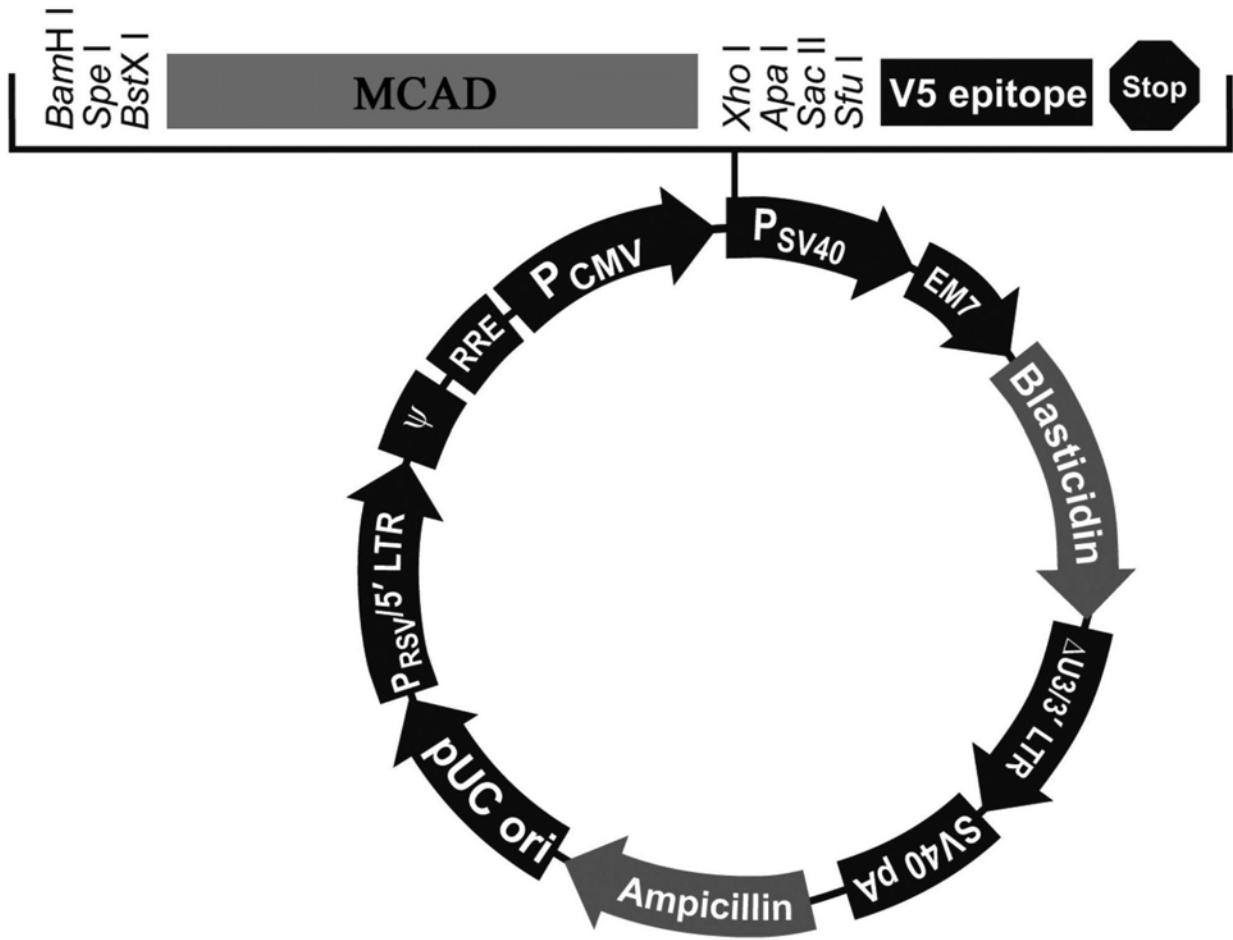


图1

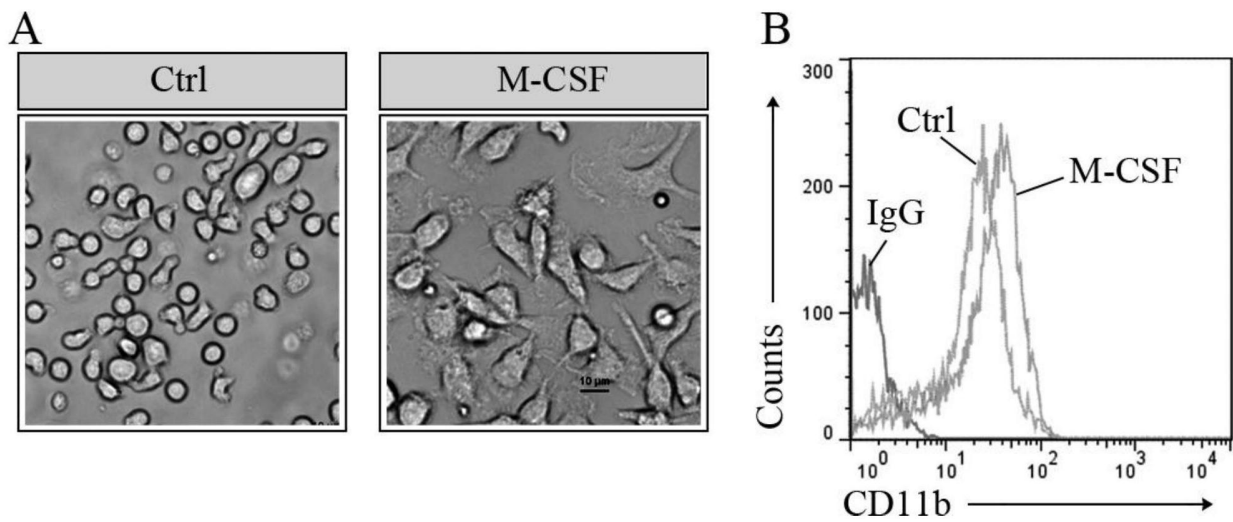


图2

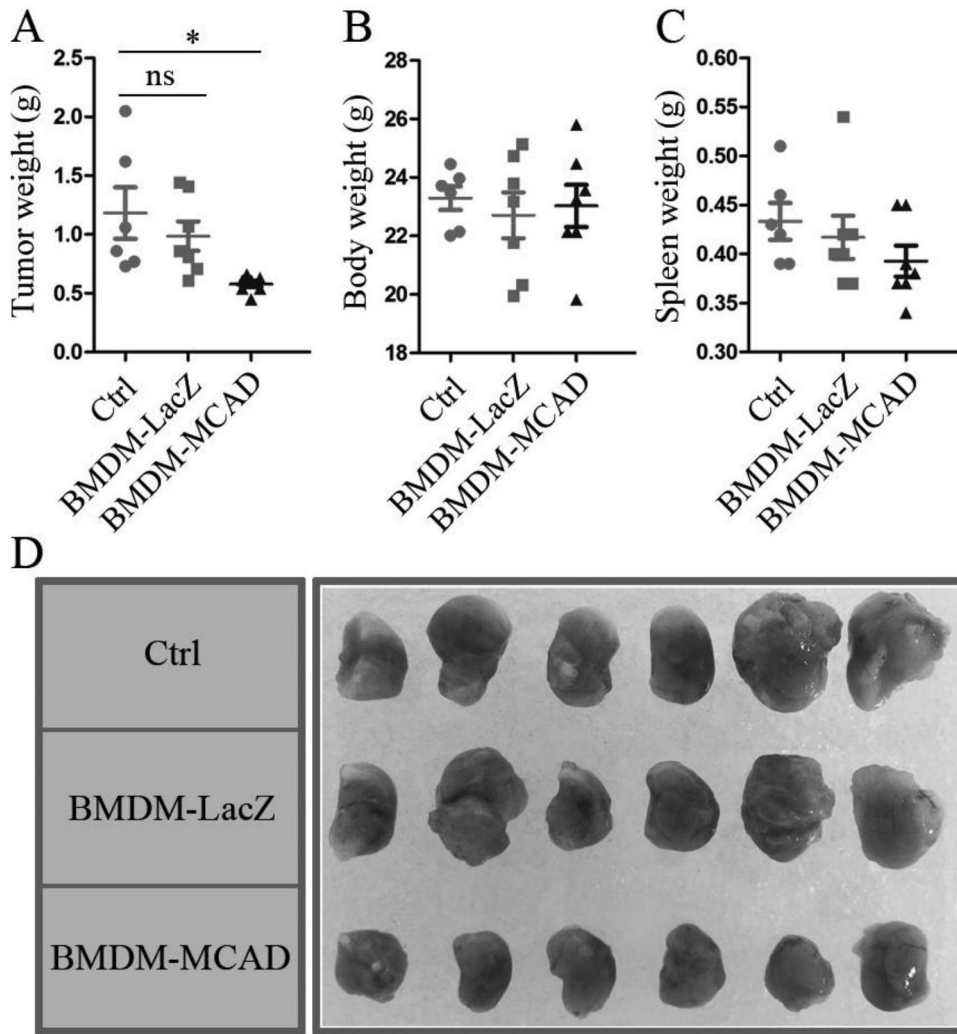


图3

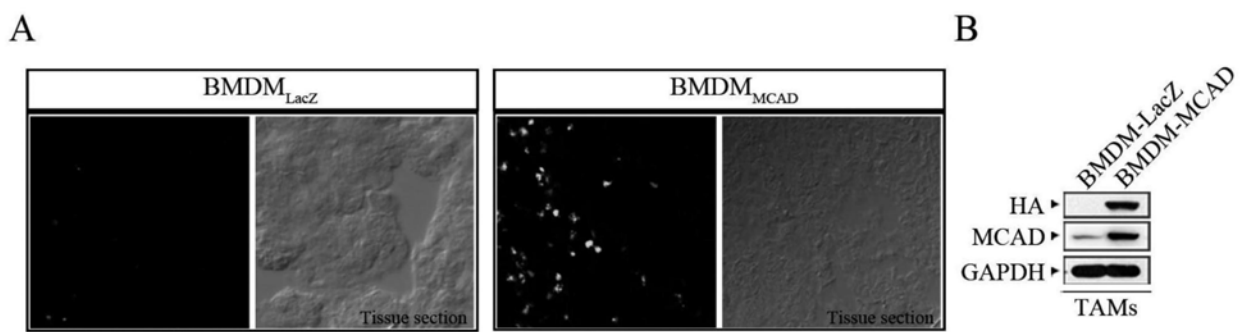


图4

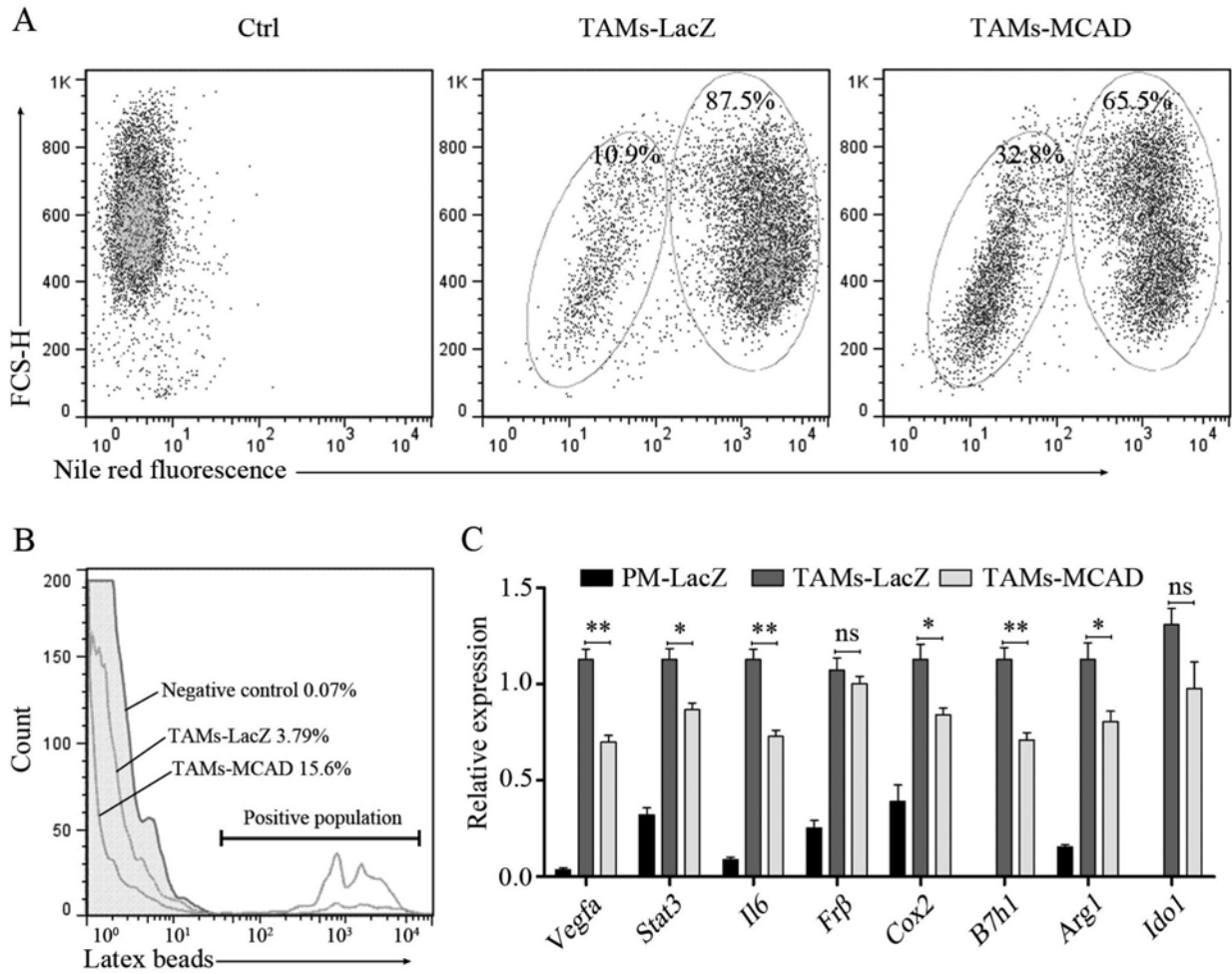


图5

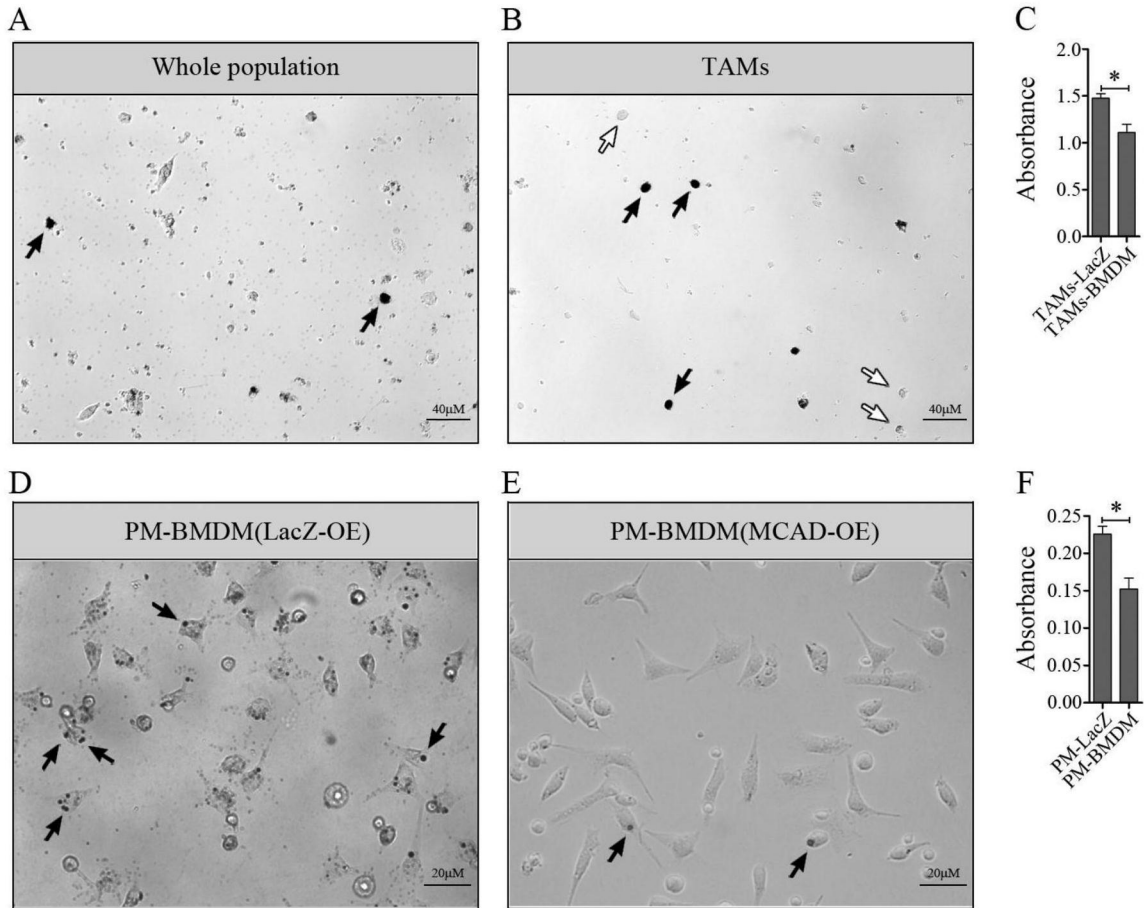


图6

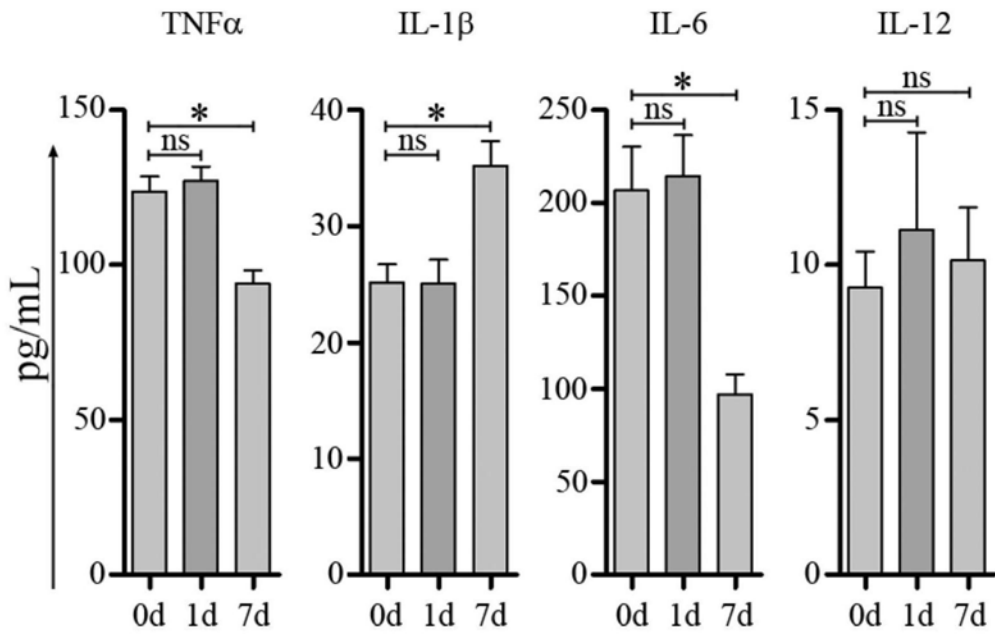


图7