



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107236762 A

(43)申请公布日 2017.10.10

(21)申请号 201710462493.4

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2017.06.19

(71)申请人 河北浓孚雨生物科技有限公司

地址 050035 河北省石家庄市高新区长江大道238号宏昌工业园

(72)发明人 蔡守锋 蔡子琪 韩锦胜 杜萍萍 叶学帅

(74)专利代理机构 北京市领专知识产权代理有限公司 11590

代理人 林辉轮

(51)Int.Cl.

C12N 15/85(2006.01)

C12N 15/66(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图7页

(54)发明名称

一种微环DNA转染T细胞制备临床级CAR-T细胞制剂的方法

(57)摘要

本发明公开了一种微环DNA转染T细胞制备临床级CAR-T细胞制剂的方法,所述方法包括应用非病毒的微环DNA(minicircle DNA,mcDNA)载体高效率转染T细胞制备临床级CAR-T细胞制剂的技术,所述mcDNA转染技术包括携带目的基因的嵌合抗原受体(CAR)的设计与合成、目的基因-CAR亲本载体质粒的构建、目的基因-CAR-mcDNA载体质粒的提取、目的基因-CAR-mcDNA载体质粒转染T细胞、及应用mcDNA转染技术所制备的临床级CAR-T细胞制剂,进一步公开了所述mcDNA转染技术的用途,发现本mcDNA转染技术具有对哺乳动物T细胞转染效率高、表达稳定、功能稳定、不影响细胞基因特性的特征;所制备CAR-T细胞制剂具有靶向性强、杀伤效率高、临床安全等特征,所述mcDNA转染技术可用于治疗各种实体肿瘤及血液和淋巴系统肿瘤的临床级CAR-T细胞制剂的制备。

1. 一种微环DNA转染T细胞制备临床级CAR-T细胞制剂的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

- (1) 目的基因-CAR的设计与合成;
- (2) 目的基因-CAR亲本载体质粒的构建与保存;
- (3) 目的基因-CAR-mcDNA载体质粒的提取;
- (4) 目的基因-CAR-mcDNA转染T细胞制备CAR-T细胞;
- (5) 临床级、目的基因-CAR-T细胞制剂的制备及应用。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法步骤如下:

目的基因-CAR的设计,其方法如下:①. 使用DNASTAR 8.0软件分析筛选出抗目的基因的Fab序列及VH和VL序列,用于设计CAR中的scFv序列;②. 设计信号肽序列IgGkappa,置于目的基因-scFv前端以引导CAR结构穿透靶细胞膜;③. 按照Genebank (NCBI) 中CD8、CD28、CD137及CD3 ζ 的基因序列设计目的基因-CAR的整体框架结构,并于该序列的前后端分别设置EcoRI和BamHI酶切位点;

目的基因-CAR的合成,其方法如下:①. 按上述结构进行目的基因-CAR的全基因序列合成;②. 将合成后的目的基因-CAR全基因序列亚克隆到pUC57载体中制备成目的基因-CAR-pUC57质粒;

目的基因-CAR亲本载体质粒的构建,其方法如下:①. 应用质粒提取试剂盒分别对上述目的基因-CAR-pUC57质粒及微环DNA载体试剂盒(MC-Easy™ Minicircle DNA Production kit; SBI)提供的微环DNA亲本载体质粒(pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA)进行质粒提取,获得质粒提取物;②. 对步骤①所获目的基因-CAR-pUC57及pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA质粒提取物进行EcoRI及BamHI酶切反应获得酶切产物;③. 将步骤②所获目的基因-CAR-pUC57及pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA酶切产物进行连接反应获得连接产物;④. 将步骤③所获连接产物转化到微环DNA载体试剂盒所提供的特殊感受态菌液(ZYCY10P3S2TE.coli)中,30℃、250rpm摇菌培养90min,获得含有目的基因-CAR的亲本载体质粒菌液;⑤. 将步骤④所获菌液50-200 μ l平铺在含50 μ g/ml卡那霉素的LB琼脂糖培养板上,37℃培养过夜,挑选克隆,小剂量提取质粒,酶切、电泳、测序鉴定;如基因序列正确,则将步骤④所获含目的基因-CAR的亲本载体质粒菌液-80℃甘油储存,以备后续目的基因-CAR-mcDNA载体质粒的提取;

目的基因-CAR-mcDNA载体质粒的提取,其方法如下:①. 将步骤(2)获取的目的基因-CAR亲本载体质粒菌液从-80℃移出,接种于含有50 μ g/ml卡那霉素的2ml的LB琼脂糖培养基上,30℃,250rpm,摇菌1-2h,测OD值以备培养条件调控;②. 将目的基因-CAR亲本载体质粒菌液接种于含200ml生长培养基的无菌培养瓶中,30℃、250rpm摇菌过夜;③. 取少量培养基检测PH值及OD值,调整PH值在6.9-7.4间,OD₆₀₀值在4-6间,继续30℃、250rpm摇菌5-5.5hr;④. 按QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi Kit操作步骤大剂量提取目的基因-CAR-mcDNA载体质粒,检测合格后-20℃冰箱保存备用;

制备目的基因-CAR-T细胞制剂,其方法如下:①. 自体或同种异体PBMC分离获取T细胞,1000U/ml的IFN- γ 刺激后,37℃、5% CO₂培养箱中培养过夜,次日day 1分别加入CD3单抗1 μ g/ml、CD28单抗1 μ g/ml、及IL-2 500U/ml培养,day 2加入IL-15 10U/ml培养,day 3只加入含IL-2 500U/ml的完全培养基培养扩增T细胞,每2-3天更换培养基;②. 按4D-

Nucleofector电转仪(LONZA)操作说明配制电转液,重悬上述T细胞,加入目的基因-CAR-mcDNA载体质粒轻柔混匀后移至电转杯,放入电转仪,设置电转程序,电转3s完成CAR-T制备;③.上述目的基因-CAR-T移至预热的含500U/ml IL-2 的AIM-V无血清培养基中培养扩增10-15天收获临床数量级目的基因-CAR-T细胞;④.目的基因-CAR-T细胞生理盐水离心洗3-4次祛除细胞碎片,移入含人血白蛋白2.0g的200ml回输用生理盐水袋/瓶,制备成临床级目的基因-CAR-T细胞制剂。

3.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法步骤如下:

所述目的基因-CAR的设计与合成,其特征是:所设计的目的基因Fab序列,选自:PSCA、PSMA、CEA、EGFR、EGFRvIII、HER2、MSLN、GD2、IL13R α 2、GPC3、CAIX、L1-CAM、CA125、CD133、FAP、CTAG1B、MUC1、FR- α 、GUCY2C;

所述目的基因-CAR的设计与合成,其特征是:所设计的CAR序列为含有scFv-CD3 ζ 、CD28及4-1BB/OX40/ICOS基因序列的第三代CAR序列,以及仅含有scFv-CD3 ζ 及CD28基因序列的第二代CAR序列,以及仅含有scFv-CD3 ζ 基因序列的第一代CAR序列,以及仅含有第四代的TRUCK细胞CAR序列;

所述目的基因-CAR-mcDNA载体质粒的提取,其特征是:所述及的目的基因-CAR-mcDNA载体质粒,是任何一种目的基因-CAR-mcDNA载体质粒;

所述电转T细胞制备目的基因-CAR-T细胞制剂,其特征是:转染所用的T细胞,选自:自体T细胞、同种异体T细胞、以及各T细胞亚群。

4.根据权利要求2方法所述的方法,其特征在于,其中,步骤(4)所述将目的基因-CAR亲本载体质粒的菌液接种于含200ml生长培养基的无菌培养瓶中30 $^{\circ}$ C、250rpm摇菌过夜,其特征是:①.摇菌过夜时间在16hr以内;②.确保生长培养基PH值在6.9-7.4之间,最优选为7.0;③.确保生长培养基OD₆₀₀值在4-6之间。

5.用权利要求1所述的方法制备的临床级目的基因-CAR-T细胞制剂。

6.权利要求5所述的目的基因-CAR-T细胞制剂在制备抗肿瘤药物中的应用。

一种微环DNA转染T细胞制备临床级CAR-T细胞制剂的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及应用微环DNA转染技术,制备临床级CAR-T细胞制剂的方法。

背景技术

[0002] 肿瘤生物治疗已被公认为继手术、放疗、化疗三大传统治疗手段之后的第四大手段。生物治疗主要包括细胞免疫治疗和抗体靶向药物两大类。近年来细胞免疫治疗发展迅猛,在CTL/TIL获得良好临床疗效的基础上,免疫检测点阻断CTL/TIL、TCR-T、及CAR-T等新型细胞制剂大量进入临床试验,以CD-19/CD20靶向CAR-T治疗B细胞性淋巴瘤为代表的临床试验,获得了90%以上的杀伤效率而成为里程碑式突破。因而CAR-T细胞免疫治疗可能成为肿瘤的重要治疗手段。

[0003] 嵌合抗原受体(CAR)的典型结构包括由识别抗原的单链抗体的轻链和重链可变区连接成的scFv构成细胞外绑定区、能使单链抗体具有灵活性的铰链区、以及跨膜区和胞内信号肽区。胞外绑定区scFv不需要以MHC/抗原肽复合物的形式识别抗原,而是直接识别抗原,并且不管抗原的本质是蛋白类还是糖脂类。铰链区的大小,灵活度及伸展范围决定了scFv与肿瘤细胞表面抗原结合的能力。跨膜区在T细胞活化中起重要的信号传导作用,常选用CD3、CD8、CD28的跨膜区进行构建。胞内信号区由共刺激分子和酪氨酸活化基序ITAM组成,不同的共刺激分子其应答类型,分泌细胞因子水平,维持细胞存活时间等方面各不相同。通过基因工程将CAR结构转入T细胞所制备的CAR-T,是否特异性识别和杀伤能力强、表达是否稳定、功能是否长久,与CAR结构的构建密切相关。CAR的设计经历了三代的改进历程。第一代CAR只包括CD3 ζ 或者Fc ϵ RI γ 链;第二代CAR包括CD3 ζ 和一个共刺激分子如CD28/4-1BB/CD27/ICOS/OX40,这些共刺激分子能增强CD3 ζ 的信号传导;第三代CAR包含了CD3 ζ 和两个共刺激分子,使CAR的功能更加强大。另有学者对CAR的基因改造上除了嵌合抗原受体基因外,还增加了一个或多个编码CAR及其启动子的载体,并且载体可通过某些细胞因子如IL-12的释放进一步激活CAR的信号通路,称之为第四代CAR。CAR可以直接识别并结合肿瘤细胞表面的肿瘤相关抗原(TAA),并将抗原信号传入T细胞,使T细胞活化并分泌和释放大量IL-2、TNF- α 、INF- γ 、穿孔素和颗粒酶等细胞因子,对肿瘤细胞发挥杀伤功能。

[0004] 应用合适的载体将上述CAR基因序列转染进T细胞即可制备CAR-T细胞制剂。目前常用的载体主要是病毒载体和非病毒载体两大类。病毒载体以慢病毒和腺病毒载体为主,其中腺病毒载体系统感染细胞时作用机制是病毒DNA不能整合到染色体,只游离在细胞核,因此不能维持基因长期的表达,并且反复应用后引发免疫反应。而慢病毒载体系统可感染分裂期和未分裂期细胞,并且可以将外源目的基因整合到染色体上,实现目的基因长期有效表达,因而被美国FDA批准用于临床。但应用病毒载体制备临床级CAR-T细胞制剂,仍具有转染效率低(40%)、存在安全隐患(基因变异及至瘤性)等问题。病毒载体导入的外源基因是随机整合到染色体的,存在着插入点突变和诱导细胞发生转化甚至致毒、致瘤的风险。非病毒载体常用的有脂质体、多聚物及分子偶联体等,最近新兴的睡美人载体和转座子系统也

用于CAR T细胞的修饰,但具有转染效率低(20%-40%)、工艺复杂、时间长、成本较高等缺憾。

[0005] 微环DNA是近年新出现的一种非病毒载体,是由传统质粒在大肠杆菌体内通过酶切作用产生位点特异性重组得到的一种小环超螺旋表达框。有研究使用微环DNA携带目的基因成功转染了小鼠的心肌细胞和骨骼肌细胞,使之稳定表达人血管表皮生长因子,另有学者使用微环DNA成功的转染了人的多功能干细胞。研究表明,非病毒载体微环DNA是基因治疗最好的选择,因其缺乏抗性标记基因及细菌复制序列,显著提高了微环DNA在临床上应用的安全性。微环DNA能否携带目的基因实现人T细胞的转染和修饰呢,至今尚无实验证实。我们率先对该项技术进行了深入研究,首先我们设计了携带目的基因PSCA的第三代CAR序列,将该目的基因-CAR序列构建到微环亲本载体质粒中,并成功提取了包含目的基因的微环DNA载体质粒,借助于电穿孔方法将携带的目的基因的微环DNA成功转染各种手段均难以转染的人T细胞,而且获得58%以上的高转染率,远高于现有病毒或非病毒转染手段,而且转染后8天,目的基因-CAR的表达率高达89%,并随着T细胞的扩增传代稳定表达2周以上。电转染可使部分T细胞膜破坏而导致细胞死亡,我们研究发现,电转染后T细胞存活率在60%左右且生长缓慢,但培养3天后可完全恢复正常的扩增与传代,且T细胞表型和正常T细胞相同。经*in vitro*和*in vivo*杀伤实验研究证明,所制备的目的基因-CAR-T细胞制剂,能够高效率、特异性识别相应肿瘤抗原,并产生高效率、特异性肿瘤杀伤。本发明与现有CAR-T制备技术相比,具有以下突出特点:(1)首次应用非病毒的微环DNA载体转染人T细胞成功;(2)证明了微环DNA载体对人T的转染效率高达58%,高于现有任何一种病毒或非病毒转染技术;(3)目的基因-CAR在T细胞表达率高达90%,且随T细胞的扩增传代稳定表达;(4)本发明所制备的目的基因-CAR-T细胞制剂,对目的基因高表达的肿瘤细胞具有强大的特异性杀伤功能;(5)本发明所制备的目的基因-CAR-T细胞制剂不存在病毒复制、细菌复制、远期至瘤等潜在风险,因而临床安全。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种微环DNA转染T细胞制备临床级CAR-T细胞制剂的新技术。

[0007] 为实现以上目标,本发明提供一种微环DNA转染T细胞制备临床级CAR-T细胞制剂的方法,所述方法包括如下步骤:

- (1) 目的基因-CAR的设计与合成;
- (2) 目的基因-CAR亲本载体质粒的构建与保存;
- (3) 目的基因-CAR-mcDNA载体质粒的提取;
- (4) 目的基因-CAR-mcDNA转染T细胞制备CAR-T细胞;
- (5) 临床级、目的基因-CAR-T细胞制剂的制备及应用。

[0008] 优选的,本发明所述方法步骤如下:

(1) 目的基因-CAR的设计,其方法如下:①.使用DNASTAR8.0软件分析筛选出抗体的Fab序列及VH和VL序列,用于设计CAR中的scFv序列;②.设计信号肽序列IgGkappa,置于目的基因-scFv前端以引导CAR结构穿透靶细胞膜;③.按照Genbank(NCBI)中CD8、CD28、CD137及CD3 ζ 的基因序列设计目的基因-CAR的整体框架结构,并于该序列的前后端分别设置EcoR1和BamH1酶切位点;

(2) 目的基因-CAR的合成,其方法如下:①.按上述结构进行目的基因-CAR的全基因序列合成;②.将合成后的目的基因-CAR全基因序列亚克隆到pUC57载体中制备成目的基因-CAR-pUC57质粒;

(3) 目的基因-CAR亲本载体质粒的构建,其方法如下:①.应用质粒提取试剂盒分别对上述目的基因-CAR-pUC57质粒及微环DNA载体试剂盒(MC-Easy™ Minicircle DNA Production kit;SBI)提供的微环DNA亲本载体质粒(pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA)进行质粒提取,获得质粒提取物;②.对步骤①所获目的基因-CAR-pUC57及pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA质粒提取物进行EcoRI及BamHI酶切反应获得酶切产物;③.将步骤②所获目的基因-CAR-pUC57及pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA酶切产物进行连接反应获得连接产物;④.将步骤③所获连接产物转化到微环DNA载体试剂盒所提供的特殊感受态菌液(ZYCY10P3S2TE.coli)中,30℃、250rpm摇菌培养90min,获得含有目的基因-CAR的亲本载体质粒菌液;⑤.将步骤④所获菌液50-200μl平铺在含50μg/ml卡那霉素的LB琼脂糖培养板上,37℃培养过夜,挑选克隆,小剂量提取质粒,酶切、电泳、测序鉴定;如基因序列正确,则将步骤④所获含目的基因-CAR的亲本载体质粒菌液-80℃甘油储存,以备后续目的基因-CAR-mcDNA载体质粒的提取;

(4) 目的基因-CAR-mcDNA载体质粒的提取,其方法如下:①.将步骤(2)获取的目的基因-CAR亲本载体质粒菌液从-80℃移出,接种于含有50μg/ml卡那霉素的2ml的LB琼脂糖培养基上,30℃,250rpm,摇菌1-2h,测OD值以备培养条件调控;②.将目的基因-CAR亲本载体质粒菌液接种于含200ml生长培养基的无菌培养瓶中,30℃、250rpm摇菌过夜;③.取少量培养基检测PH值及OD值,调整PH值在6.9-7.4间,OD₆₀₀值在4-6间,继续30℃、250rpm摇菌5-5.5hr;④.按QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi Kit操作步骤大剂量提取目的基因-CAR-mcDNA载体质粒,检测合格后-20℃冰箱保存备用;

优选的,所述将目的基因-CAR亲本载体质粒的菌液接种于含200ml生长培养基的无菌培养瓶中30℃、250rpm摇菌过夜,其特征是:①.摇菌过夜时间在16hr以内;②.确保生长培养基PH值在6.9-7.4之间,最优选为7.0;③.确保生长培养基OD₆₀₀值在4-6之间。

[0009] (5) 制备目的基因-CAR-T细胞制剂,其方法如下:①.自体或同种异体PBMC分离获取T细胞,1000U/ml的IFN-γ刺激后,37℃、5% CO₂培养箱中培养过夜,次日day 1分别加入CD3单抗1μg/ml、CD28单抗1μg/ml、及IL-2 500U/ml培养,day 2加入IL-15 10U/ml培养,day 3只加入含IL-2 500U/ml的完全培养基培养扩增T细胞,每2-3天更换培养基;②.按4D-Nucleofector电转仪(LONZA)操作说明配制电转液,重悬上述T细胞,加入目的基因-CAR-mcDNA载体质粒轻柔混匀后移至电转杯,放入电转仪,设置电转程序,电转3s完成CAR-T制备;③.上述目的基因-CAR-T移至预热的含500U/ml IL-2的AIM-V无血清培养基中培养扩增10-15天收获临床数量级目的基因-CAR-T细胞;④.目的基因-CAR-T细胞生理盐水离心洗3-4次祛除细胞碎片,移入含人血白蛋白2.0g的200ml回输用生理盐水袋/瓶,制备成临床级目的基因-CAR-T细胞制剂。

[0010] 本发明所述方法,其中所述目的基因-CAR的设计与合成,其中所设计的目的基因Fab序列,选自:PSCA、PSMA、CEA、EGFR、EGFRvIII、HER2、MSLN、GD2、IL13Rα2、GPC3、CAIX、L1-CAM、CA125、CD133、FAP、CTAG1B、MUC1、FR-α、GUCY2C;

其中所设计的CAR序列为含有scFv-CD3ζ、CD28及4-1BB/OX40/ICOS基因序列的第三代

CAR序列,以及仅含有scFv-CD3 ζ 及CD28基因序列的第二代CAR序列,以及仅含有scFv-CD3 ζ 基因序列的第一代CAR序列,以及仅含有第四代的TRUCK细胞CAR序列;

所述目的基因-CAR-mcDNA载体质粒的提取,其中,所述及的目的基因-CAR-mcDNA载体质粒,是任何一种目的基因-CAR-mcDNA载体质粒;

所述电转T细胞制备目的基因-CAR-T细胞制剂,其中,转染所用的T细胞,选自:自体T细胞、同种异体T细胞、以及各T细胞亚群。

[0011] 本发明还包括,用本发明所述的方法制备的临床级目的基因-CAR-T细胞制剂。以及所述的目的基因-CAR-T细胞制剂在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0012] 以下为本发明技术内容的详细描述:

1. 目的基因-CAR的设计与合成:

1.1 使用生物学软件DNASTAR8.0分析筛选出抗目的基因的Fab、VH及VL序列,用于设计嵌合抗原受体(CAR)的scFv序列;设计信号肽序列IgGkappa,置于目的基因-scFv序列前段以引导CAR结构穿透细胞膜;按照Genebank (NCBI)中CD8、CD28、CD137及CD3 ζ 基因序列合成第三代CAR的框架结构,并于CAR的前后端分别设置EcoRI及BamHI酶切位点。按照以上全基因序列合成目的基因-CAR(附图1)。

[0013] 1.2 将含有EcoRI, BamHI酶切位点的目的基因-CAR亚克隆到pUC57载体质粒中,命名为目的基因-CAR-pUC57载体质粒(附图2)。

[0014] 2. 目的基因-CAR亲本载体质粒的构建与保存:

2.1 质粒提取:应用质粒提取试剂盒(TIANGEN)分别对上述目的基因-CAR-pUC57质粒及微环DNA载体试剂盒(MC-EasyTM Minicircle DNA Production kit;SBI)所提供的微环DNA亲本载体质粒(pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA)进行质粒提取,获取质粒提取物。

[0015] 2.2 酶切:对上述目的基因-CAR-pUC57及pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA质粒提取物进行EcoRI及BamHI酶切反应,反应体系如下:

EcoRI	2 μ l
BamHI	2 μ l
10 \times K buffer	10 μ l
PSCA-CAR-pUC57或者	
pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA	15 μ l

加超纯水至100 μ l,将酶切反应管放到37 $^{\circ}$ C水浴1h,加入缓冲液终止酶切反应;1%的琼脂糖凝胶电泳,紫外光下切取目的片段,应用DNA凝胶回收试剂盒(TIANGEN)分别回收目的片段,获取目的基因-CAR及pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA的酶切产物。

[0016] 2.3 连接反应:将上述目的基因和载体的酶切产物通过下列反应体系进行连接反应:

目的基因酶切产物	5 μ l
载体酶切产物	1 μ l
10 \times T4 DNA连接酶缓冲液	1 μ l
T4 DNA连接酶	0.6 μ l

加超纯水至10 μ l,将连接反应管置于4 $^{\circ}$ C过夜连接获取连接产物,其结构示意图见附图3。

[0017] 2.4 转化:将上述连接产物加入微环DNA载体试剂盒所提供的特殊感受态菌液(ZYCY10P3S2TE.coli)中,冰上孵育细胞30分钟,42℃的水浴箱30秒,冰上放置2分钟;加入室温S.O.C.培养基到装有感受态细胞的小瓶中,置于细菌培养箱,30℃、250rpm摇菌培养90min,获得目的基因-CAR亲本载体质粒菌液。

[0018] 2.5克隆鉴定:将上述菌液平铺含50μg/ml卡那霉素的LB琼脂糖培养板,37℃培养过夜,次日挑选细菌克隆,小剂量提取质粒,EcoR1及BamH1双酶切、电泳、测序鉴定;测序结果表明:基因序列正确,表明目的基因-CAR亲本载体质粒构建成功(附图3)。

[0019] 2.6将上述目的基因-CAR亲本载体质粒菌液-80℃甘油储存,以备后续目的基因-CAR-mcDNA载体质粒的提取。

[0020] 3.目的基因-CAR-mcDNA载体质粒的提取:

3.1 将5倍的生长培养基(5X Minicircle Growth medium,SBI)稀释成1倍。

[0021] 3.2 将目的基因-CAR亲本载体质粒从-80℃移出,接种到1倍生长培养基200ml中,移至无菌瓶(无菌瓶体积/培养基体积=5:1)30℃、250rpm、摇菌过夜(<16hr)。

[0022] 3.3 次日,取少量培养基测PH值及OD₆₀₀值,保证PH值在7左右、OD₆₀₀值在4-6之间。必要时需用NaOH及新鲜1倍生长培养基分别调整PH值及OD₆₀₀值达到上述标准。

[0023] 3.4 继续30℃、250rpm、摇菌5-5.5hr(<5.5hr),小剂量提取质粒、EcoR1和BamH1酶切、凝胶电泳、检验目的基因-CAR-mcDNA载体质粒的质量。

[0024] 3.5 质量合格,按QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi Kit步骤大剂量提取目的基因-CAR-mcDNA载体质粒,EndoFree buffer TE重溶质粒并定量质粒浓度,获取目的基因-CAR-mcDNA载体质粒(附图4-5),-20℃保存备用。

[0025] 4.目的基因-CAR-mcDNA转染T细胞制备CAR-T细胞:

4.1 PBMC的获取:采取肿瘤病人自体外周血、基因全相合或半相合健康人外周血50-100ml,肝素钠抗凝,转运至GMP样细胞培养室;取50ml离心管加入Ficoll分离液20ml,沿壁缓慢加入上述血液30ml于分离液上层,20℃、2500rpm、梯度离心20min;仔细吸取自体血浆另存备用,仔细吸取白膜层(PBMC)置于新的离心管,生理盐水1500rpm离心5min洗涤3次弃上清,AIM-V无血清培养基重悬细胞计数。

[0026] 4.2 T细胞培养与扩增:上述T细胞悬液移入悬浮培养瓶,加入1000U/ml的IFN-γ,置于37℃、5%CO₂培养箱培养过夜;次日(day 1)加入1μg/mlCD3单抗,1μg/ml CD28单抗,500U/ml IL-2培养;Day 2加入10U/ml IL-15培养48hr;Day 3添加500U/ml IL-2的完全培养基继续扩增传代,每2-3天换液。

[0027] 4.3 微环DNA电转T细胞制备CAR-T:

4.3.1 培养瓶包被及预热:培养瓶加入浓度为1μg/ml的CD3单抗和CD28单抗,置于4℃冰箱包被过夜,次日弃上清,含0.5% BSA的PBS洗涤,加入含500U/ml的IL-2细胞培养基,37℃培养箱中预热备用。

[0028] 4.3.2 电转液配置:100微升电转杯的电转液配置:82μl nucleofector solution +18μl supplement,室温放置备用;

4.3.3 微环DNA电转T细胞制备CAR-T:取上述T细胞,每管 5×10^6 个,室温200g离心10min,完全祛除上清,电转液100μl重悬细胞加入电转杯;枪头置于杯底部轻柔加入目的基因-CAR-mcDNA载体质粒(对照组加入试剂盒提供的pmaxGFP质粒),避免产生气泡;设定

LONZA Nucleofector TM4D电转仪的电转程序,3s完成电转,目的基因-CAR-T细胞制备完成。

[0029] 4.3.4 目的基因-CAR-T细胞的培养与扩增:上述电转制备的目的基因-CAR-T细胞,移入预热的含500U/ml IL-2的AIM-V无血清培养基,培养扩增10-15天,每3天换液,定期计数细胞数量。

[0030] 4.4 目的基因-CAR-T的鉴定:

4.4.1 电转对T细胞存活率及增殖活性的影响:电转对T细胞产生损伤,并对其增殖活性造成短暂影响。流式细胞检测电转24h后的T细胞发现,其存活率约60%;电转染3天内T细胞增殖活性降低,3天后增殖活性明显恢复。

[0031] 4.4.2 电转对T细胞表型的影响:转染后24小时,流式检测T细胞表面CD3、CD4及CD8的表达水平与正常T细胞无差别,表明电转不影响T细胞的表型特征。

[0032] 4.4.3 微环DNA转染人T细胞的转染效率:荧光显微镜下观察,转染后6hr少量细胞出现荧光,24hr约60%的细胞、48hr约90%以上的细胞表达荧光(附图6)。转染后24hr流式检测发现,所制备CAR-T中GFP荧光表达率高达58%以上(附图7)。

[0033] 4.4.4 流式检测目的基因在CAR-T表面的表达:Biotin-protein L结合CAR-T表面单链抗体中的轻链VL、PE-SA标记后流式检测发现,目的基因-scFv-CAR在T细胞表面的表达率高达80%以上(附图8)。

[0034] 4.4.5 Western检测目的基因-CAR蛋白的表达:分子量为57kDa的目的基因-CAR蛋白在CAR-T细胞表达清晰,而对照细胞无表达(附图9)。

[0035] 5. 临床级目的基因-CAR-T细胞制剂的制备及应用:

5.1 临床级目的基因-CAR-T细胞制剂的制备:取4.3.4所获目的基因-CAR-T细胞 $1-2 \times 10^9$ 个,生理盐水离心洗3-4次祛除细胞碎片,按常规制剂学标准将细胞移入200ml回输用生理盐水袋/瓶(含1%人血白蛋白2.0g,IL-2 20万单位),制备成临床级目的基因-CAR-T细胞制剂。5.2 细胞的冻存:取4.3.4所获目的基因-CAR-T细胞,更换培养基培养24hr使细胞处于对数生长期;取一离心管加入培养基、5%的自体血清、20%的DMSO配置冻存液;离心收集细胞,新鲜培养基重悬,加入等量冻存液(DMSO浓度保持在5-10%),细胞计数及活力评估,分装于冻存管($2-3 \times 10^9$ 个细胞/管)密封标识,程序降温保存于 -80°C 冰箱或液氮罐。使用时取出冻存管快速复苏,按5.1所述方法制备细胞制剂。

[0036] 5.3 细胞的运输:取5.1所获或冻存复苏后按5.1方法制备的目的基因-CAR-T细胞制剂,瓶口密封,标注制备日期、时间及批号,置于 4°C 环境保温箱(干冰或电冰箱),防颠簸陆路或航空输送至病房,12 hr内静脉输注使用。

[0037] 5.4 目的基因-CAR-T细胞制剂的应用:静脉回输治疗前,需核对制备时间及输液袋的密封度;轻柔混匀细胞制剂以减少细胞团块,采用带滤网的输血器生理盐水冲管后输入细胞,输入完毕再次生理盐水冲管;按临床规范对症处理各种不良反应。

[0038] 附图说明:

附图1. 第三代目的基因-CAR结构图(PSCA-scFv-CD28-CD137-CD3 ζ)。

[0039] 附图2. 含EcoR1及BamH1酶切位点的PSCA-CAR-pUC57载体质粒。

[0040] 附图3. 微环DNA亲本载体质粒(pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA)结构图。

[0041] 附图4. PSCA-CAR-mcDNA载体质粒提取产物示意图。

[0042] 附图5. PSCA-CAR-mcDNA载体质粒的凝胶电泳。L1:亲本载体质粒(8651bp);L2:PSCA-CAR-mcDNA载体质粒(4575bp)。

[0043] 附图6. 荧光显微镜下观察T细胞的转染效率(100×)。

[0044] 附图7. PSCA-CAR-mcDNA载体质粒(B)对人T细胞的转染效率高达58.66%,显著高于对照质粒(A)的转染效率。

[0045] 附图8. 转染后24hr流式检测PSCA-CAR在T细胞表面的表达率高达80%以上(Triplicate)。

[0046] 附图9. Western blot检测到57kDa的CAR蛋白表达(C),而未转染T(A)及mock cell(B)只表达15kDa的CD3 ζ ,不表达CAR蛋白。

[0047] 附图10. *in vitro*杀伤效率。PSCA-CAR-T对PSCA高表达的RT4细胞具有强大的杀伤效率($p < 0.05$),而对PSCA低表达的PC-3M细胞无明显杀伤。

[0048] 附图11. 与高表达PSCA的AT4细胞共培养后,PSCA-CAR-T的INF- γ 及IL-2分泌量显著升高($p < 0.05$, respectively)。

[0049] 附图12. 人体免疫重建NOD/SCID鼠(B)外周血人CD3(T细胞)及CD19(B细胞)的表达率分别为67.29%和21.5%,而未重建鼠(A)表达阴性。

[0050] 附图13. *In vivo*杀伤效率。PSCA-CAR-T对PSCA高表达的AT4肿瘤的杀伤效率显著高于mock T($p < 0.05$)。

[0051] 附图14. PSCA-CAR-T能显著抑制PSCA高表达的AT4肿瘤生长。

[0052] 具体实施方式:

以下通过具体实施例进一步说明本发明,但不作为本发明的限制。

[0053] 微环DNA转染T细胞制备临床级PSCA-CAR-T细胞制剂的技术,步骤如下:

1. PSCA-CAR基因序列的设计与合成:

1.1 应用生物学软件DNastar8.0设计抗PSCA的Fab、VH及VL序列,用于设计CAR的scFv序列;设计信号肽序列IgGkappa置于PSCA-scFv序列前段;按Genebank(NCBI)中CD8、CD28、CD137及CD3 ζ 基因序列合成第三代CAR的框架结构,并于CAR的前后端分别设置EcoR1及BamH1酶切位点。按照以上设计,合成PSCA-CAR的全基因序列(附图1)。

[0054] 1.2 将PSCA-CAR基因序列亚克隆到pUC57载体质粒,命名为PSCA-CAR-pUC57(附图2)。

[0055] 2. PSCA-CAR亲本载体质粒的构建:

2.1 质粒提取:应用TIANGEN质粒小提试剂盒,分别对上述PSCA-CAR-pUC57质粒及微环DNA载体试剂盒所提供的微环DNA亲本载体质粒(pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA)进行质粒提取,获取质粒提取物。

[0056] 2.2 酶切与连接反应:将PSCA-CAR-pUC57及pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA质粒提取物进行EcoR1及BamH1酶切、回收、及连接反应,获取连接产物。

[0057] 2.3 感受态菌液转化与克隆:将连接产物加入微环DNA载体试剂盒所提供的特殊感受态菌液(ZYCY10P3S2TE.coli),置于细菌培养箱,30℃、250rpm摇菌培养,获得PSCA-CAR亲本载体质粒菌液;将质粒菌液平铺含50 μ g/ml卡那霉素的LB琼脂糖培养板,37℃培养过夜,次日挑选细菌克隆;小剂量提取质粒,EcoR1及BamH1双酶切、电泳,测序正确,PSCA-CAR亲本载体质粒构建成功(附图3)。

[0058] 2.4 亲本载体质粒的保存:将上述PSCA-CAR亲本载体质粒菌液-80℃甘油储存,以备后续PSCA-CAR-mcDNA载体质粒的提取。

[0059] 3.PSCA-CAR-mcDNA载体质粒的提取:

3.1 将PSCA-CAR亲本载体质粒从-80℃移出,接种到1×Minicircle Growth medium 200ml中,移至无菌瓶(无菌瓶体积/培养基体积=5:1)30℃、250rpm、摇菌过夜(<16hr)。

[0060] 3.2 次日,取少量培养基测PH值及OD₆₀₀值,调整PH值在7左右、OD₆₀₀值在4-6之间;继续摇菌培养5-5.5hr(<5.5hr);小剂量提取质粒、EcoRI和BamHI酶切、凝胶电泳、检验PSCA-CAR-mcDNA载体质粒的质量合格,按QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi Kit步骤大剂量提取PSCA-CAR-mcDNA载体质粒,EndoFree buffer TE重溶质粒并定量,获取PSCA-CAR-mcDNA载体质粒(附图4-5),-20℃保存备用。

[0061] 4.PSCA-CAR-mcDNA转染T制备PSCA-CAR-T细胞:

4.1 PBMC的获取:采取肿瘤病人自体外周血50-100ml,取50ml离心管加入Ficoll分离液20ml,沿壁缓慢加入上述血液30ml于分离液上层,20℃、2500rpm、梯度离心20min;仔细吸取自体血浆另存备用,仔细吸取白膜层(PBMC)置于新的离心管,生理盐水1500rpm、5min离心洗3次,弃上清,AIM-V无血清培养基重悬细胞计数。

[0062] 4.2 T细胞培养与扩增:上述T细胞悬液移入悬浮培养瓶,加入1000U/ml的IFN- γ ,置于37℃、5%CO₂培养箱培养过夜;次日day 1加入1 μ g/ml的CD3单抗、1 μ g/ml的CD28单抗及500U/ml的IL-2培养;Day 2加入10U/ml的IL-15培养48hr;Day 3添加500U/ml的IL-2的完全培养基继续扩增传代,每2-3天换液。

[0063] 4.3 微环DNA电转T制备CAR-T:

4.3.1 培养瓶包被及预热:培养瓶加入浓度为1 μ g/ml的CD3单抗和CD28单抗,置于4℃冰箱包被过夜,次日弃上清,含0.5% BSA的PBS洗涤,加入含500U/ml的IL-2的AIM-V无血清培养基,37℃培养箱中预热备用。

[0064] 4.3.2 电转染:82 μ l nucleofector solution与18 μ l supplement混合,配置100微升电转杯所需的电转液;取上述T细胞 5×10^6 个,室温200g离心10min,完全祛除上清,电转液100 μ l重悬细胞加入100微升电转杯;枪头置于杯底轻柔加入PSCA-CAR-mcDNA载体质粒,注意不能产生气泡;设定LONZA Nucleofector TM4D电转仪的电转程序,启动电转,PSCA-CAR-T细胞制备完成。

[0065] 4.3.3 PSCA-CAR-T的培养与扩增:将PSCA-CAR-T细胞移入上述预热的培养基,培养扩增10-15天,每3天换液,定期计数细胞数量。

[0066] 4.4 PSCA-CAR-T的鉴定:

4.4.1 电转对T细胞的影响:流式细胞检测发现,电转24h后T细胞存活率约60%,受损率约40%。电转3天内T细胞增殖活性降低,3天后增殖活性明显恢复。T细胞CD3、CD4及CD8表达与正常T细胞无差异。

[0067] 4.4.2 微环DNA对人T细胞的转染效率:荧光显微镜下观察,电转后6hr少量细胞、24hr约60%细胞、48hr约90%以上细胞表达荧光(附图6)。流式检测发现,电转后24hr细胞内荧光表达率高达58%(附图7)。

[0068] 4.4.3 流式检测T表面PSCAscFv-CAR的表达率:Biotin-protein L结合CAR-T表面单链抗体中的轻链VL,行PE-SA标记后流式检测发现,PSCAscFv-CAR在T细胞表面的表达率

高达80%以上(附图8)。

[0069] 4.4.4 Western检测PSCA-CAR蛋白表达:分子量为57kDa的PSCA-CAR蛋白在CAR-T细胞表达清晰,而对照细胞无表达(附图9)。

[0070] 5. 临床级PSCA-CAR-T细胞制剂的制备及应用:

5.1 临床级PSCA-CAR-T细胞制剂的制备:取4.3.3所获扩增培养的PSCA-CAR-T细胞 $1-2 \times 10^9$ 个,生理盐水离心洗3-4次,移入200ml生理盐水袋/瓶(含1%人血白蛋白2.0g,IL-2 20万单位)制成临床级PSCA-CAR-T细胞制剂。

[0071] 5.2 PSCA-CAR-T的冻存:取4.3.3所获对数生长期PSCA-CAR-T,加入等量冻存液(含5%的自体血清及5-10%的DMSO),分装于冻存管($2-3 \times 10^9$ 个细胞/管)密封标识,程序降温保存于 -80°C 冰箱或液氮罐。

[0072] 5.3 PSCA-CAR-T的运输:取5.1所获临床级PSCA-CAR-T细胞制剂, 4°C 环境保温箱(干冰或电冰箱),防颠簸陆路或航空输送至病房,12 hr内静脉输注使用。

[0073] 5.4 PSCA-CAR-T的体外杀伤效率研究(in vitro):

5.4.1 靶细胞:前列腺癌细胞株RT4(实验组)和PC-3M(对照组)用作靶细胞;流式检测确定RT4细胞高表达PSCA(82%),PC-3M细胞不表达PSCA(0.01%)。

[0074] 5.4.2 分组:普通T(normal T)、GFP-mcDNA空转T(mock T)、PSCA-CAR-mcDNA转染T(PSCA-CAR-T)。

[0075] 5.4.3 CCK-8 assay:96孔板分别加入实验组及对照组靶细胞(每组4个复孔), 4°C 、5%CO₂条件下贴壁培养2hr,分别按E:T = 2:1 / 5:1 / 10:1 / 20:1加入效应细胞, 37°C 、5%CO₂条件下共培养12hr;洗涤更换普通培养基后,每孔加入CCK-8液10 μl , 37°C 、5%CO₂条件下培养4hr,酶标仪测定OD值;杀伤效率(%) = $\{1 - \text{E+T组OD值} / \text{T组OD值}\} \times 100\%$ 。

[0076] 结果:PSCA-CAR-T能特异性识别和杀伤PSCA表达阳性的RT4细胞,杀伤效率高达85.16%,显著高于对照组的normal T和mock T($p < 0.05$; 附图10);而对表达阴性的PC-3M细胞几无杀伤。

[0077] 5.4.4 ELISA检测细胞因子分泌量:24孔板分别加入靶细胞(RT4及PC-3M), 37°C 、5%CO₂条件下贴壁培养2hr;按分组分别加入normal T、mock T及PSCA-CAR-T效应细胞,继续培养24hr;取各组上清500 μl ,4000rpm、离心10min去除颗粒物质和聚合物,然后分别按试剂盒说明书检测IFN- γ 和IL-2的分泌量。结果:PSCA阳性的RT4细胞可以明显刺激PSCA-CAR T细胞分泌大量IFN- γ 和IL-2,而normal T和mock T分泌量很低($p < 0.05$; 附图11)。

[0078] 5.5 PSCA-CAR-T的体内杀伤效率研究(in vivo):

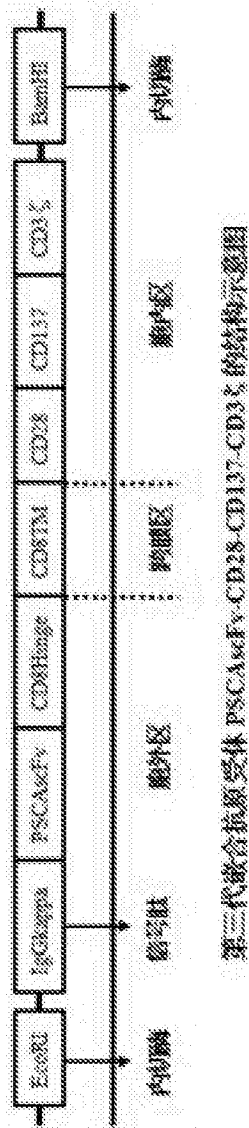
5.5.1 NOD/SCID鼠人体免疫重建:取健康人PBMC 4×10^7 个/0.5ml小鼠尾静脉注射,饲养4周获取小鼠外周血,流式检测见CD3+T淋巴细胞的表达率为67.29%,CD19+B淋巴细胞的表达率为21.5%,人体免疫重建成功(附图12)。

[0079] 5.5.2 人源化NOD/SCID小鼠造模:取人源化NOD/SCID小鼠,分别背部皮下接种 3×10^6 个AT4细胞或PC-3M细胞造模,成瘤率100%;3天可见皮下结节,10-15天长至250-300mm³,造模成功。

[0080] 5.5.3 in vivo杀伤试验:模型鼠随机分为3组,每组8只;分别于第1、8天尾静脉注射 1×10^7 个normal T、mock T及PSCA-CAR-T,观察小鼠生活状态、不良反应、肿瘤生长等指标。结果:各组小鼠均无生活习性及其行为的改变,无过敏、皮疹、腹泻、脱毛等不良反应;

PSCA-CAR-T组肿瘤体积显著缩小 ($p < 0.05$; 附图13-14)。

[0081] 5.6 PSCA-CAR-T的临床应用: 静脉回输治疗前, 需核对制备时间及输液袋的密封度; 轻柔摇晃细胞制剂以减少细胞团块, 采用带滤网的输血器生理盐水冲管后输入细胞, 输入完毕再次生理盐水冲管; 按临床规范对症处理发烧、皮疹、过敏反应等不良反应。



第三代嵌合抗原受体 PSCA&Fv-CD28-CD137-CD3& 的结构示意图

图1

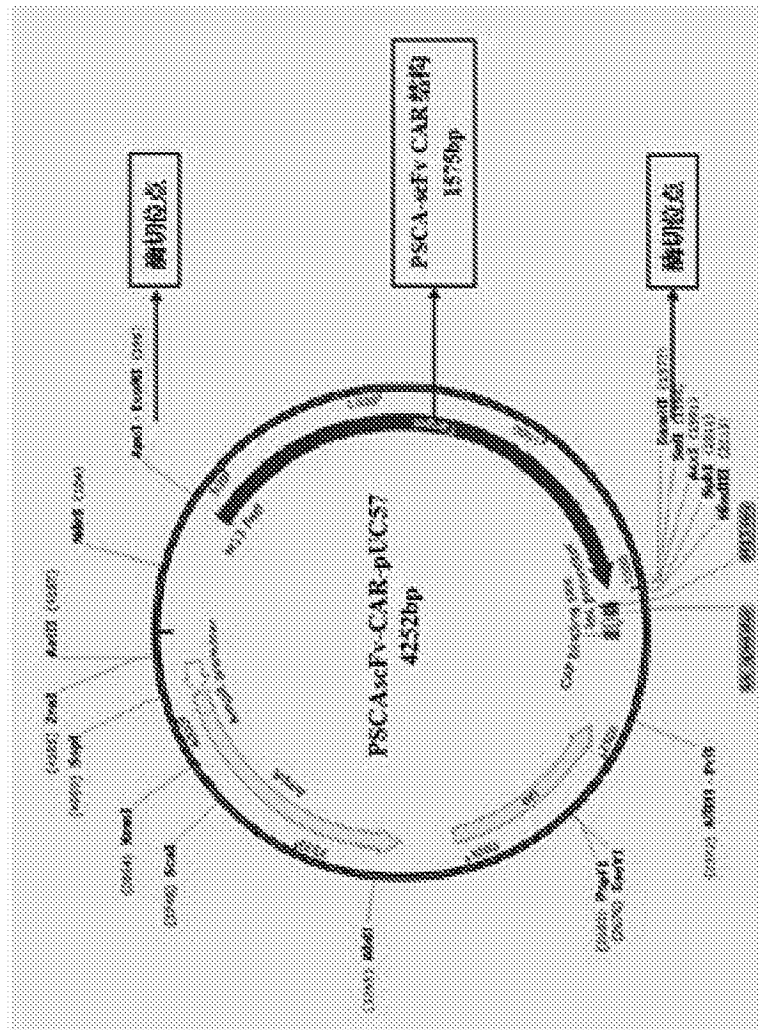


图2

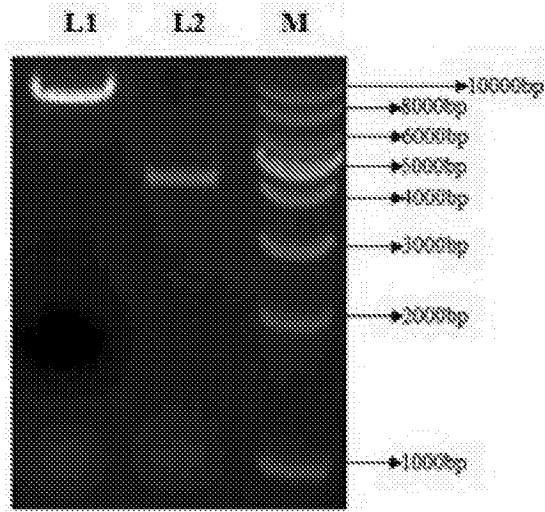


图5

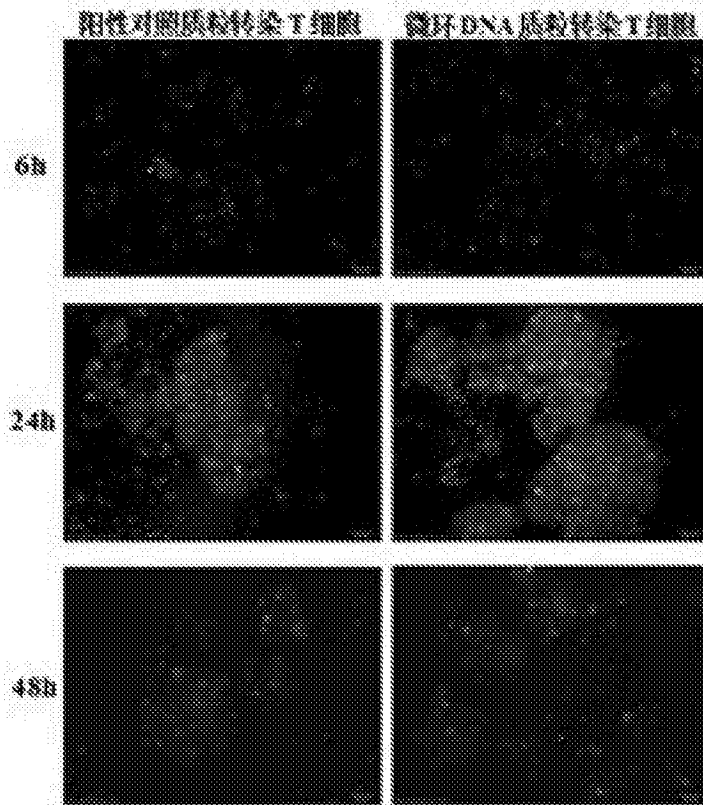


图6

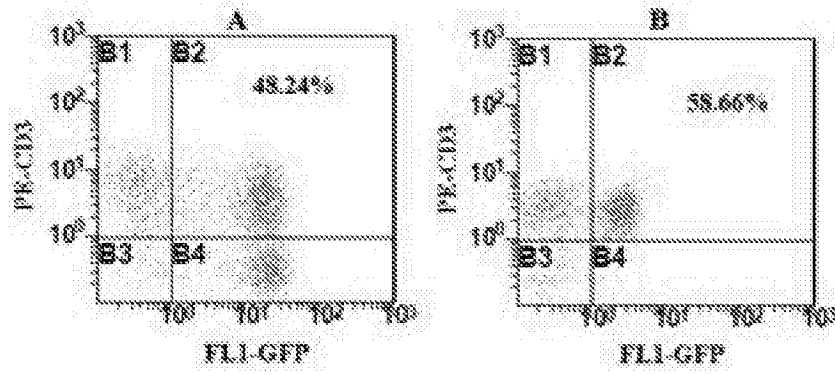


图7

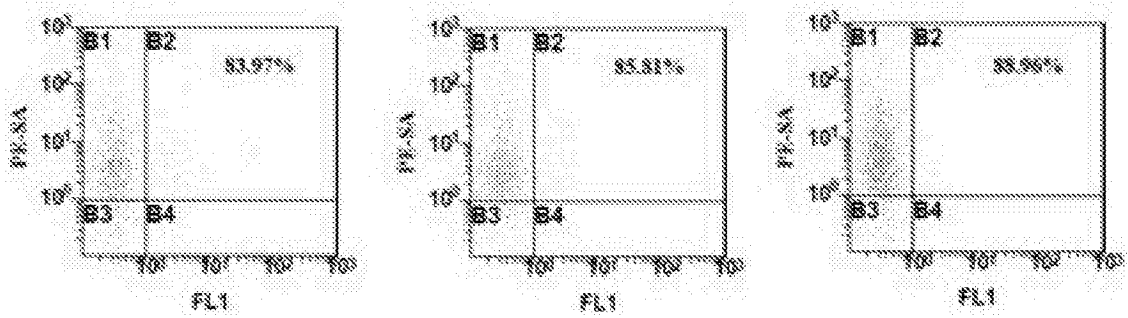


图8

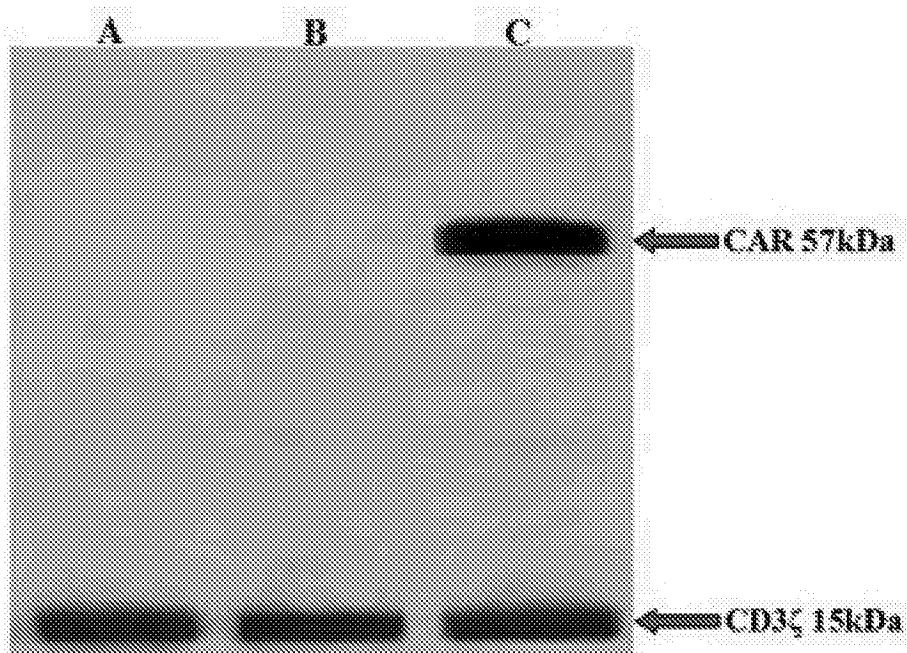


图9

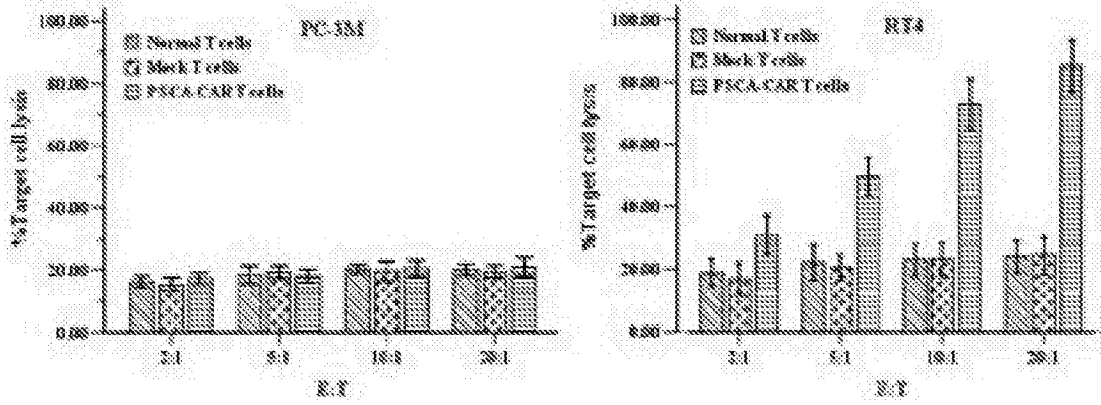


图10

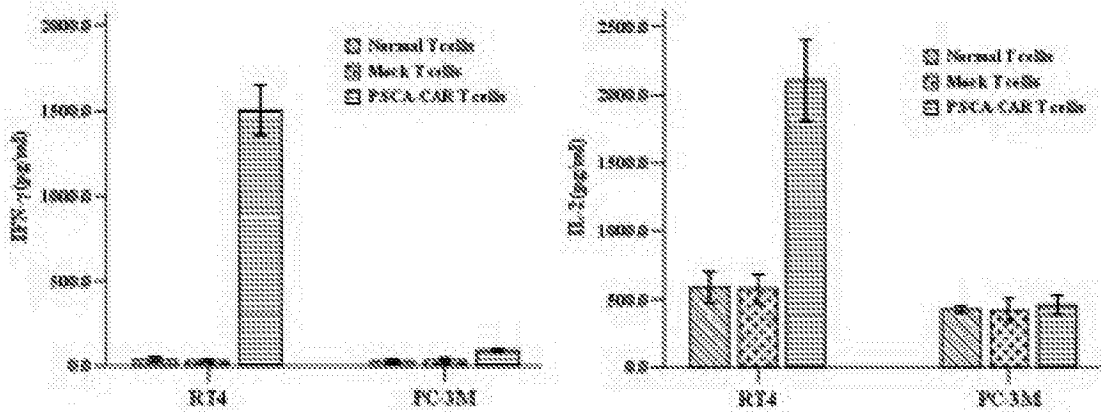


图11

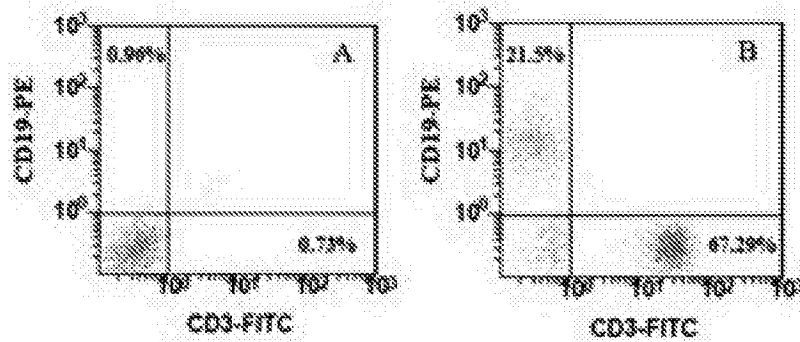


图12

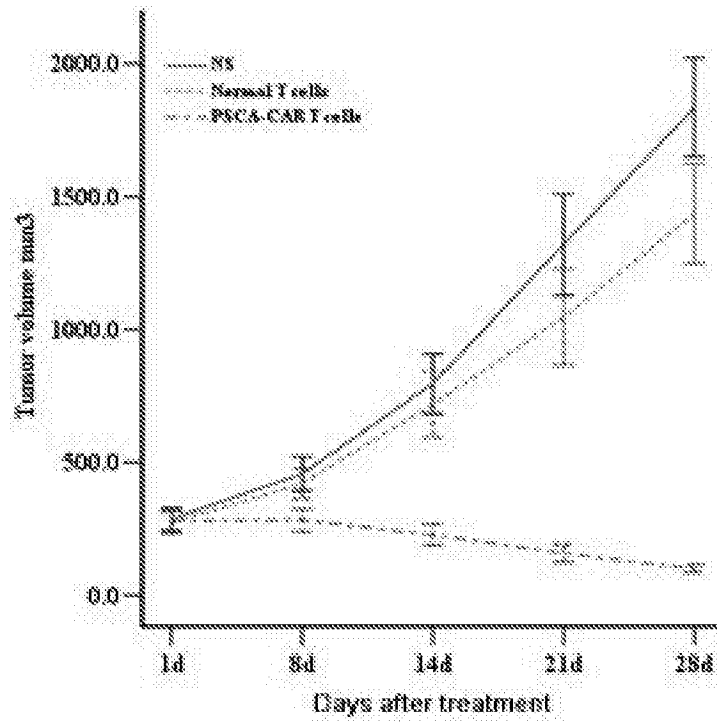


图13

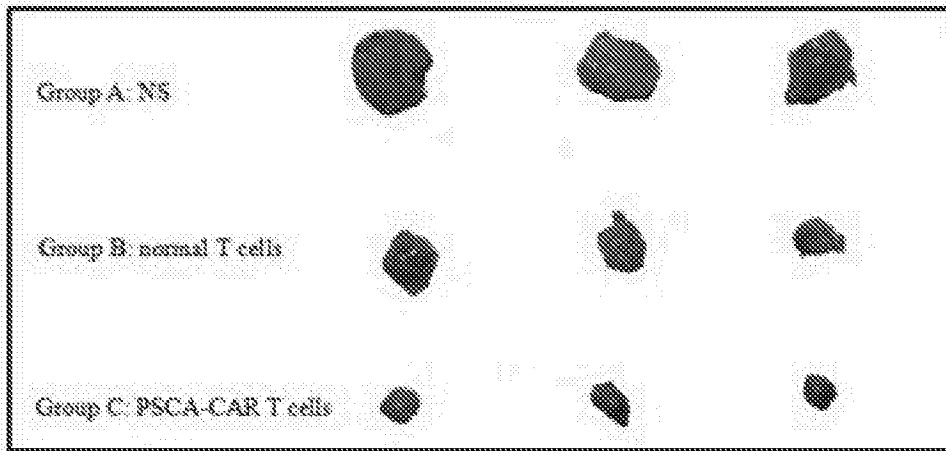


图14