无血清培养制备嵌合抗原受体 T 细胞的方法

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体地涉及无血清培养制备嵌合抗原受体 T 细胞的方法。

背景技术

嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法是一种利用基因编辑手段使 T 细胞拥有能特异性识别肿瘤相关抗原的 scFv 片段和胞内信号域，进而增强 T 细胞靶向性、杀伤性以及持久性的新型医疗技术。在近年来的肿瘤免疫治疗临床上有着很好的表现，给临床治愈肿瘤带来了希望。

嵌合抗原受体 T 细胞的制备过程相对复杂，涉及细胞活化、分选、转染、扩增培养等等众多操作。工艺流程、设备设施和试剂选择等任何一个环节的不足都会对于细胞制备的质量产生重要的影响，进而影响嵌合抗原受体 T 细胞的活力、收率、安全性以及后期的临床效果。

血清，作为传统细胞培养过程中的一个重要成分，由于其本身含有一些对细胞有毒副作用的物质。此外，各批次血清之间质量差异较大。另外，在血清取材过程中可能带入支原体、病毒等风险，这些都严重阻碍了细胞疗法的发展。

目前市场上没有一种令人满意的高效的无血清制备嵌合抗原受体 T 细胞的工艺，这严重影响了嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法的进一步开发、推广和应用。

因此，本领域迫切需要开发安全的、基于无血清细胞培养的、且高效制备嵌合抗原受体 T 细胞的方法。

发明内容

本发明的目的就是提供一种安全的、基于无血清细胞培养的、且高效制备嵌合抗原受体 T 细胞的方法。

在本发明的第一方面，提供了一种无血清制备嵌合抗原受体 T 细胞的方法，包括步骤：

(a) 提供 PBMC 细胞，所述 PBMC 细胞重悬于无血清培养基中；

(b) 对步骤(a)中的 PBMC 细胞进行负分选处理，从而获得经分选的 PBMC 细胞；

(c) 对步骤(b)获得的经分选的PBMC细胞进行活化处理，从而得到经活化的T细胞；

(d) 对步骤(c)获得的经活化的T细胞，用表达嵌合抗原受体的病毒载体进行基因转染，从而获得经转染的T细胞；

(e) 对所述经转染的T细胞，进行去除病毒处理，从而获得去除病毒的T细胞；和

(f) 将去除病毒的T细胞重悬于扩增培养基，并进行扩增培养，从而获得嵌合抗原受体T细胞，并且当所述嵌合抗原受体T细胞的数量达到预定数量时，收获所述嵌合抗原受体T细胞，其中所述扩增培养基是含细胞因子的无血清培养基。

在另一优选例中，在所述方法的所有步骤中使用无血清培养基。

在另一优选例中，在步骤(a)中，所述的PBMC细胞为已复苏的PBMC细胞。

在另一优选例中，所述PBMC细胞是自体的或同种异体的。

在另一优选例中，所述的PBMC细胞来源于人。

在另一优选例中，在步骤(b)中，所述的负分选处理使用CliniMACS。

在另一优选例中，在步骤(c)中，所述活化用抗CD3/CD28的抗体进行活化处理。

在另一优选例中，在步骤(c)中，所述活化处理在活化培养基中进行，所述活化培养基含有基础培养基和添加剂。

在另一优选例中，所述基础培养基选自下组：LONZA X-VIVO、LIFE CTS AIM V、LIFE OpTmizer SFM、RPMI 1640、ImmunoCult™ -XF、Stemlineä。

在另一优选例中，所述添加剂选自下组：人源血清白蛋白、重组人血清白蛋白、植物源重组白蛋白或其组合，优选重组白蛋白。

在另一优选例中，所述白蛋白浓度为0.01%-50%(W/V)，较佳地，0.05%-30%(W/V)，更佳地，0.1%-20%(W/V)。

在另一优选例中，所述活化处理选自下组：抗体包被处理、游离抗体处理、活化磁珠处理、或其组合。

在另一优选例中，在所述活化处理中，抗体浓度在10ng～100ng/ml。

在另一优选例中，在所述活化处理中，活化磁珠数量与细胞细胞的比例在0.25～5:1，较佳地；0.5-3：1。

在另一优选例中，所述活化处理的时间为3～8天。

在另一优选例中，在步骤(d)中，所述的病毒载体选自下组：慢病毒、腺相关

病毒(AAV)、腺病毒、或其组合。

在另一优选例中，所述基因转染的感染倍数 MOI 为 0.5-30，较佳地 1-20，更佳地 2-10。

在另一优选例中，在步骤(e)中，所述的去除病毒的处理包括：将经转染的细胞重悬于无血清培养基，离心，并吸取上清，从而获得去除病毒的 T 细胞。

在另一优选例中，在步骤(f)中，所述的预定数量为 1×10^{9}-1×10^{11}，较佳地 2×10^{9}-2×10^{10}。

在另一优选例中，在步骤(f)中的扩增培养基还含有细胞因子。

在另一优选例中，所述细胞因子选自下组：IL-2、IL-15、IL-7 或其组合。

在另一优选例中，所述各细胞因子浓度各自独立地为 1-100ng/ml，较佳地，2-80ng/ml，更佳地，5-50ng/ml。

在另一优选例中，在步骤(f)中，所述扩增培养在一容器中进行，所述容器选自下组：培养瓶、培养袋、或其组合。

在另一优选例中，所述的培养瓶选自下组：G-Rex 培养瓶、T75 培养瓶、或其组合。

在另一优选例中，所述容器为 G-Rex 培养瓶。

在另一优选例中，所述扩增培养的时间为 8-14 天。

在另一优选例中，在步骤(f)中，在所述扩增培养中，不进行更换容器的操作。

在另一优选例中，所述的嵌合抗原受体针对选自下组的靶点：CD19、CD23 等。

在本发明的第二方面，提供了一种嵌合抗原受体 T 细胞，所述的嵌合抗原受体 T 细胞是用权利要求 1 所述的无血清制备嵌合抗原受体 T 细胞的方法制备的。

在本发明的第三方面，提供了一种细胞制剂，所述的细胞制剂含有(a)权利要求 2 所述的嵌合抗原受体 T 细胞和(b)药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述的细胞制剂为液体制剂(如注射剂)。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。

限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

图 1 显示了 CAR-T 细胞在不同培养基的生长曲线变化。

图 2 显示了 CAR-T 细胞在 G-Rex 培养瓶、培养袋以及 T75 培养瓶中的生长曲线变化。

图 3 显示了 CAR-T 细胞在 G-Rex 培养瓶、培养袋以及 T75 培养瓶中的阳性率曲线变化。

图 4 显示了不同细胞培养添加物对 CAR-T 细胞增殖的影响。

图 5 显示了不同分选方式细胞的增殖速率。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，首次开发了一种独特的用于制备嵌合抗原受体 T 细胞的无血清培养创新工艺。基于本发明的无血清培养方法，不仅可以提高嵌合抗原受体 T 细胞的培养成功率和产率，而且可以避免血清对 CAR-T 细胞的毒副作用并显著降低或消除因血清而引入的风险，从而为嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法的进一步开发和推广提供帮助。在此基础上完成了本发明。

术语

方法

在本发明中，可以采用正分选或负分选。一种优选的分选方法是基于 MACS 的分选方法。例如可采用 CliniMACS 技术进行分选。

MACS 是一种高度特异的细胞分选技术。主要部件包括 MACS 微球，MACS 分选柱和 MACS 分离器。MACS 微球是与高度特异性单克隆抗体偶联的超顺磁颗粒。MACS 分选柱置于永磁场 MACS 分离器中。负分选是从细胞混合物中去除非靶标细胞中的磁性标记的方法，即非磁性标记的细胞是靶细胞。

优选地，本发明方法采用 CliniMACS 或 CliniMACS plus 分选技术(和设备)进行负分选，从而获得所需的靶细胞。

通常，在本发明经分选后的细胞中，基本上由 CD3 阳性细胞构成。

嵌合抗原受体(CAR)

如本文所用，嵌合免疫抗原受体(Chimeric antigen receptor，CAR)包括细胞外结构域、任选的铰链区、跨膜结构域、和细胞内结构域。胞外结构域包括任选的信号肽和靶-特异性结合元件(也称为抗原结合结构域)。细胞内结构域包括共刺激分子和 ζ 链部分。CAR 在 T 细胞中表达时，胞外段可识别一个特异的抗原，随后通过胞内结构域转导该信号，引起细胞的活化增殖、细胞溶解毒性和分泌细胞因子如 IL-2 和 IFN-γ 等，影响肿瘤细胞，导致肿瘤细胞不生长、被促使死亡或以其他方式被影响，并导致患者的肿瘤负荷缩小或消除。抗原结合结构域优选与来自共刺激分子和 ζ 链中的一个或多个的细胞内结构域融合。

制剂

本发明提供了一种细胞制剂，具体如本发明第三方面所述。在一个实施方式中，所述细胞制剂含有(a)本发明第二方面所述的嵌合抗原受体 T 细胞和(b)药学上可接受的载体。在一个实施方式中，所述的细胞制剂为液体制剂(如注射剂)。

本发明的主要优点包括：

(a) 本发明的培养方法与传统细胞培养相比，采用无血清培养基和 G-Rex 等培养体系，避免带入与细胞有毒副作用的物质，大大提升了嵌合抗原受体 T 细胞的培养成功率和安全性。

(b) 本发明的培养方法采用特别优化的工艺流程，从而显著提高嵌合抗原受体 T 细胞的培养有效性，尤其是显著提高了收获的 CAR-T 细胞的阳性率和产率。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如Sambrook等人， 分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

试剂

无血清培养基：基础培养基 + 白蛋白

实施例 1

培养基筛选

1.1 冻存或新鲜 PBMC

取冻存或新鲜的300×10^6-1000×10^6个细胞量的PBMC重悬于无血清培养基内。

1.2 分选

使用 CD19 和 CD14 标记磁珠对 PBMC 进行标记孵育 30 分钟。在 CliniMACS 上将分选所需管路按照要求进行安装，待细胞孵育结束后进行负分选操作，去除 CD19 和 CD14 标记的杂质细胞，获得以 CD3 阳性细胞为主要成分的分选细胞。

1.3 细胞活化

用 CD3/CD28 将分选所得细胞进行活化，然后按照 3×10^6-6×10^6/ml 的细胞密度使用加入含终浓度为 1.0%白蛋白的无血清培养基(补加 IL-2)进行接种培养，培养 2 天。

1.4 基因转导

将细胞离心弃上清后按照 MOI 2-10 加入所需体积的慢病毒，重悬于无血清培养基(含有终浓度为 1.0%的白蛋白)后重新转移至培养瓶中，37℃、5%CO_2培养(12-48 小时)。

其中，所述的慢病毒为表达目的 CAR 基因的病毒载体。

1.5 病毒去除

将细胞悬液离心 200-300g 离心 6-8 分钟。吸弃上清并重悬细胞后转移至无血清培养基(含有终浓度 1.0%白蛋白)中，添加 IL-2 浓度至 50-500IU/ml 后，从而获得去除病毒的 T 细胞。

1.6 扩增培养

将去除病毒的 T 细胞转移至 G-Rex 培养瓶中，于 37℃、5% CO_2进行扩增培养。

扩增培养 3-10 天后，将 G-Rex 瓶从培养箱中取出，混匀细胞后取样计数，补加 IL-2 浓度至 50-500IU/ml 后，继续培养至细胞产量达到 1×10^{9}-1×10^{10} CAR-T 细胞时，进行收获。

1.7 结果

经测定，在收获的细胞中，CAR-T 阳性率＞20%。

实施例 2.

实验耗材筛选

2.1 PBMC 复苏、分选、细胞活化、基因转导

使用与实施例 1 中相同的方法进行冻存 PBMC 复苏、分选、细胞活化、基因转导。

2.2 病毒去除

将上述细胞悬液 200-300g 离心 6-8 分钟。吸弃上清，轻弹重悬细胞，从而获得去除病毒的的 T 细胞。

2.3 扩增培养

将去除病毒的 T 细胞转移至培养基(OpTmizer SFM + 1.0%白蛋白)中，并添加 IL-2(终浓度为 25 IU/ml)后，分别转移至 G-Rex 培养瓶、培养袋以及 T75 培养瓶中，然后置于 37℃、5% CO_2 继续培养。

继续培养 3 天后，分别从 G-Rex 培养瓶、培养袋以及 T75 培养瓶中取样计数，记录细胞密度和细胞活率。留样检测。

补加 IL-2 后(终浓度为 25 IU/ml)，继续放回培养箱培养。

继续培养 1 天后，分别从 G-Rex 培养瓶、培养袋以及 T75 培养瓶中取样计数，记录细胞密度和细胞活率。留样检测。

继续培养 2 天后，分别从 G-Rex 培养瓶、培养袋以及 T75 培养瓶中取样计数，记录细胞密度和细胞活率。留样检测。

2.4 结果

如图 2 所示：CAR-T 细胞在 G-Rex 培养体系内从 Day3 至 Day5 表现出了较

培养袋和培养瓶更快的细胞增殖速率；如图 3 所示：CAR-T 细胞在 G-Rex 内能保持高水平的 CAR 阳性率，并且下降幅度较细胞培养袋和培养瓶都要小；综上所述，对于短时间内需要大量 CAR-T 阳性细胞，G-Rex 拥有比细胞培养袋和培养瓶更高增殖率和阳性率的优势。

实施例 3.

细胞培养添加物实验

3.1 方法

在本实施例中，在细胞培养基中添加不同的添加物 IL-2, IL-7,IL-15 或其组合，共设有 5 个实验组。

表 1

	实验组 1	实验组 2	实验组 3	实验组 4	实验组 5
IL-2	+	-	+	+	+
IL-7	-	+	+	+	-
IL-15	-	+	+	-	+

使用与实施例 1 中相同的方法进行冻存 PBMC 复苏、分选、磁珠标记活化、基因转导、磁珠去除、病毒去除和扩增培养。

1)使用的培养基为 OpTmizer SFM + 白蛋白(终浓度为 1.0%)。

2)所有添加 IL-2 的步骤分别替代为表 1 中实验组 2-5 对应的细胞因子，进行培养。

3.2 结果

如图 4 所示：培养体系中细胞因子 IL-2、IL-7、IL-15 三种因子联用对于细胞增殖的提升效果最好，有助于 CAR-T 细胞数量的提升。

实施例 4.

正分选和负分选的对比实验

4.1 考察对象：

相同 PBMC 通过正分选或负分选的不同方式对细胞培养的影响对比。

4.2 细胞分选：

将复苏的 PBMC 重悬于分选缓冲液内并等分两份，分别进行负分选 CD19+CD14+和正分选 CD3+。

4.3 细胞活化：

将分选后的细胞分别用培养基进行接种，并加入活化磁珠混匀培养。

4.4 病毒转染：

培养至第 2 天时,计算活化细胞数量，根据 MOI(2～10)计算所需慢病毒载体数量，取相应慢病毒载体用培养液重悬均匀，离心去除原细胞上清，加入慢病毒载体悬液重悬并继续培养。

4.5 去除病毒和活化磁珠：

培养至第 3 天时离心去除病毒和用磁力架去除活化磁珠，加培养基继续培养。

培养至第 8 天进行检测。

4.6 结果

结果如表 2 和图 5 所示：

表 2

	分选后					培养第8天				
	CD3+	CD19+	CD14+	红细胞	其他	CD3+	CD19+	CD14+	红细胞	其他
负分选	60%	2%	1%	34%	3%	98%	1%	0%	0%	1%
正分选	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%

采用负分选方式从 PBMC 中收集到的目的细胞的比例和正分选的比例相近，但是对于细胞增殖过程，负分选方法有较正分选明显的增长。综上所述，采用负分选方式最终收获得到的目的 CD3 阳性细胞总量更多。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。