(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
2018 年 2 月 22 日 (22.02.2018)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2018/032619 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 5/0781* (2010.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/104807

(22) 国际申请日: 2016 年 11 月 7 日 (07.11.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610692755.1 2016年8月18日 (18.08.2016) CN

(71) 申请人: 中山大学 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。

(72) 发明人: 张辉(ZHANG, Hui); 中国广东省广州市越秀区中山二路74号中山大学北校区科技楼北1308, Guangdong 510080 (CN)。 张译文(ZHANG, Yiwen); 中国广东省广州市越秀区中山二路74号中山大学北校区科技楼东1317, Guangdong 510080 (CN)。 高士麟(GAO, Shilin); 中国广东省广州市越秀区中山二路74号中山大学北校区科技楼东1317, Guangdong 510080 (CN)。

(74) 代理人: 广州嘉权专利商标事务所有限公司 (JIAQUAN IP LAW FIRM); 中国广东省广州市天河区黄埔大道西100号富力盈泰广场A栋910张萍, Guangdong 510627 (CN)。

(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, JP, KE, KG, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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)。

根据细则4.17的声明:
— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** APPLICATIONS OF SOLUBLE PROTEIN BAFF IN B CELL IN-VITRO CULTURE AND PROLIFERATION

(54) 发明名称: 可溶性蛋白BAFF在B细胞体外培养及扩增的应用

(57) **Abstract:** Disclosed in the present invention are applications of soluble protein BAFF in B cell in-vitro culture and proliferation. Peptide expressed by secretory BAFF peptide in the present invention can be effectively secreted out of cells to generate corresponding bioactivity. A cell line in the present invention can continuously secrete water-soluble BAFF protein having bioactivity in the process of culture, the water-soluble BAFF protein serving as tool cells and B cells are co-cultured, and in-vitro proliferation and antigen presentation effects of human B cells can be effectively improved.

(57) 摘要: 本发明公开了可溶性蛋白BAFF在B细胞体外培养及扩增的应用，本发明的分泌型BAFF肽，表达出的肽可以有效地分泌到细胞外，产生相应的生物活性。本发明的细胞系，在培养过程中可以持续分泌出具有生物活性的水溶性BAFF蛋白，作为工具细胞与B细胞共培养，可以有效促进人B细胞体外扩增及抗原递呈效果。

WO 2018/032619 A1

可溶性蛋白 BAFF 在 B 细胞体外培养及扩增的应用

技术领域

本发明涉及一种细胞的构建方法及其应用，特别涉及分泌型 BAFF 细胞系的构建方法及其在提高人外周血 B 细胞体外扩增和抗原递呈的应用。

背景技术

近年来由于 T 细胞在免疫系统中起着重要的作用，越来越多的研究小组尝试运用 T 细胞的过继治疗的方式来进行肿瘤或病毒感染的治疗。目前，国内外的多个研究小组正在研究如何维持 T 细胞的体外长期培养，提高 T 细胞的存活时间，提高 T 细胞的免疫学功能以用于过继免疫治疗。在进行 T 细胞治疗时，主要策略是先通过克隆扩增，得到足够量的具有杀伤功能的 T 细胞可以与抗原提呈细胞共培养。相对于通过构建人工抗原提呈细胞，利用人体自身的抗原递呈细胞大量扩增用于免疫治疗的 T 细胞，拥有不易引入外源细胞，不易受异体抗原干扰，呈递过程更接近生理状态，扩增成功率高的优点。

在人体主要的三种专职抗原呈递细胞中，B 细胞拥有细胞数量多，细胞获得容易，细胞扩增潜力强，从而易得到大量具有抗原呈递功能的 B 细胞。这些 B 细胞再呈递抗原给 T 细胞，促进 T 细胞的体外培养时间与扩增效率以及增强 T 细胞功能方面的作用已被证实。体外大量扩增抗原特异性的人外周血 B 细胞，并提高其抗原呈递功能对于肿瘤和感染的 T 细胞过继治疗具有非常重要的作用。

因此，如何大量扩增抗原特异性的人外周血 B 细胞，并提高其抗原呈递功能，便成为了近年研究的热点。Shultze 于 1997 年首先报道了由稳定表达 CD40L 的 NIH-3T3 细胞刺激并活化从而大量扩增体外 B 细胞的方法(Schultze et al., 1997)，并证明经过体外培养的 B 细胞可以高表达 CD80，CD86 等抗原呈递的必要分子。随后 von Bergwelt-Baildon 等又对该系统进行了多次的改进。尽管经过改进后，B 细胞的体外扩增效率大大提高，但由于活化的 B 细胞高表达 Fas 并极易发生凋亡(Garrone et al., 1995; Zhang et al., 1996)，而 CD40L 的持续刺激并不能抵消凋亡造成的影响，故若要进一步提高 B 细胞扩增效率，需要减少激活引起的 B 细胞凋亡。

BAFF(B-cell activating factor)属于 TNF 超家族，拥有三种受体，分别为 TACI,BCMA 和 BAFF-R。其中，BAFF 对 BAFF-R 的结合是促进 B 细胞存活的主要原因。除了能够促进 B 细胞存活，BAFF 还可以协同 CD40L 增加 B 细胞的扩增效率(Do et al., 2000; Moore et al., 1999)。BAFF 是一种跨膜蛋白，需要在蛋白水解酶的作用下才可以释放出具有活性的水溶性片断。

由于BAFF蛋白的这一特殊性质，导致BAFF尚未被引入人B细胞体外扩增与长期培养的体系中。

发明内容

本发明的目的在于提供可溶性蛋白BAFF在B细胞体外培养及扩增的应用。

本发明所采取的技术方案是：

分泌型BAFF肽，其氨基酸序列由BAFF的133-285位和其N端的IL-2肽组成，BAFF的133-285位的氨基酸序列为：AVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSALEEKENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGHLIQRKKVHVFGDELSLVTLFRCIQNMPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL（SEQ ID NO：1），IL-2肽的氨基酸序列为：MYRMQLLSCIALSLALVTNS（SEQ ID NO：2）。

一种分泌型BAFF肽的表达载体，其插入有表达上述分泌型BAFF肽的核苷酸序列。

作为上述表达载体的进一步改进，载体还插入有表达膜型CD40L的核苷酸序列。

一种表达分泌型BAFF肽的细胞，其转染有上述的表达载体。

作为上述细胞的进一步改进，细胞还转染有表达膜型CD40L的载体。

作为上述细胞的进一步改进，细胞为293T细胞。

一种人外周B细胞体扩增方法，包括将人外周B细胞与同时表达分泌型BAFF肽和膜型CD40L的细胞共培养。

作为上述人外周B细胞体扩增方法的进一步改进，将人外周B细胞培养在有胰岛素和转铁蛋白支持的IMDM培养基中，并添加CpG2006/2219和环孢素A刺激B细胞扩增，添加人IL-4，IL-2，IL-10维持细胞生长。

本发明的有益效果是：

本发明的分泌型BAFF肽，表达出的肽可以有效地分泌到细胞外，产生相应的生物活性。

本发明的细胞系，在培养过程中可以持续分泌出具有生物活性的水溶性BAFF蛋白，作为工具细胞与B细胞共培养，可以有效促进人B细胞体外扩增及抗原递呈效果。

附图说明

图1是CD40L和可溶性BAFF表达性质粒的示意图；

图2 是B细胞与293T，293T-CD40L或293T-CD40L-sBAFF细胞系作为饲养层细胞共培养的扩增情况；A）B细胞的扩增曲线；B）35天后收样统计B细胞的扩增倍数；

图3是 B细胞与293T，293T-CD40L或293T-CD40L-sBAFF细胞系作为饲养层细胞共培养7天后收样的扩增流式CFSE检测结果， A）流式细胞术分析扩增B细胞比例和B）比例

统计；

图 4 是 B 细胞与 293T，293T-CD40L 或 293T-CD40L-sBAFF 细胞系作为饲养层细胞共培养后，流式检测 B 细胞共培养至第 5 天或第 30 天时 CD80, CD86, CD70 和 CD275 的表达情况；

图 5 是利用 293T-CD40L-sBAFF 细胞系培养得到的 B 细胞作为抗原递呈细胞，教育 CD8 细胞；a、b）不同培养条件的 B 细胞教育 CTL 的 IFN-γ 分泌情况，c）CTL 杀伤能力检测；d）CTL 体内模型示意图；e）体内实验肿瘤体积检测。

具体实施方式

分泌型 BAFF 肽，其氨基酸序列由 BAFF 的 133-285 位和偶联在其 N 端的 IL-2 肽组成，BAFF 的 133-285 位的氨基酸序列为：AVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSALEEKENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGHLIQRKKVHVFGDELSLVTLFRCIQNMPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL，IL-2 肽的氨基酸序列为：MYRMQLLSCIALSLALVTNS。

作为示例，BAFF 的 133-285 位对应的核苷酸序列为：gccgttcagggtccagaagaaacagtcactcaagactgcttgcaactgattgcagacagtgaaacaccaactatacaaaaaggatcttacacatttgttccatggcttctcagctttaaaaggggaagtgccctagaagaaaaagagaataaaatattggtcaaagaaactggttacttttttatatatggtcaggttttatatactgataagacctacgccatgggacatctaattcagaggaagaaggtccatgtctttggggatgaattgagtctggtgactttgtttcgatgtattcaaaatatgcctgaaacactacccaataattcctgctattcagctggcattgcaaaactggaagaaggagatgaactccaacttgcaataccaagagaaaatgcacaaatatcactggatggagatgtcacatttttggtgcattgaaactgctgtga（SEQ ID NO：3）。IL-2 肽对应的核苷酸序列为：atgtacaggatgcaactcctgtcttgcattgcactaagtcttgcacttgtcacaaacagt（SEQ ID NO：4）。

一种分泌型 BAFF 肽的表达载体，其插入有表达上述分泌型 BAFF 肽的核苷酸序列。

作为上述表达载体的进一步改进，载体还插入有表达膜型 CD40L 的核苷酸序列。

一种表达分泌型 BAFF 肽的细胞，其转染有上述的表达载体。

作为上述细胞的进一步改进，细胞还转染有表达膜型 CD40L 的载体。

作为上述细胞的进一步改进，细胞为 293T 细胞。

在现有人外周 B 细胞体扩增方法的基础上，将人外周 B 细胞与同时表达分泌型 BAFF 肽和膜型 CD40L 的细胞共培养，可以有效促进人 B 细胞体外扩增及抗原递呈效果。

作为上述人外周 B 细胞体扩增方法的进一步改进，将人外周 B 细胞培养在有胰岛素和转铁蛋白支持的 IMDM 培养基中，并添加 CpG2006/2219 和环孢素 A 刺激 B 细胞扩增，添加人

IL-4，IL-2，IL-10 维持细胞生长。

下面，结合实验，进一步说明本发明的技术方案。

载体的构建

本文中所涉及的分子克隆实验，其模板均为 PBMC 细胞的 cDNA。所用到的 PCR 酶为 2×Premix PrimeSTAR® HS。所用到的引物如表所示：

本实验所合成的引物序列表

名称	序列	SEQ ID NO：
CD40L-F-NheI	CTTTGGCTTACTCAAACTCAGAATGAAACAAATC GAAGACAAGATCGAAGAAATCCTTT	5
CD40L-R-AgeI	AAAGGATTTCTTCGATCTTGTCTTCGATTTGTTTCA TTCTGAGTTTGAGTAAGCCAAAG	6
BAFF-F-ss-NheI	CTACTAGCATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGC ATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAACAGTGC CGTTCAGGGTCCAGAA	7
BAFF-R-Flag-AgeI	CATGCCATGCTCACTTGTCATCGTCATCCTTGTAAT CCAGCAGTTTCAATGCAC	8

PCR 体系如下表所示：

膜型 CD40L PCR 体系

试剂	用量
cDNA 模板	200 ng
CD40L-F-NheI	1μl
CD40L-R-AgeI	1μl
Premix PrimeSTAR® HS	25μl
H_2O	定容至 50μl

PCR 条件为 94 ℃30 s，62℃ 30 s，72 ℃ 1 min， 72 ℃ 7 min，最后 4 ℃静置。

分泌型 BAFF PCR 体系

试剂	用量
cDNA 模板	200 ng
BAFF-F-ss-NheI	1μl

BAFF-R-Flag-AgeI	1μl
Premix PrimeSTAR® HS	25μl
H_2O	定容至 50μl

PCR 条件为 94℃30 s，58℃ 30 s，72℃30s，72℃ 7 min，最后 4℃静置。

PCR 反应结束后，对 PCR 产物进行电泳，在蓝光下看到目的条带后，切下目的基因条带，随后利用胶回收试剂盒回收。

胶回收得到目的片段后，同时目的基因片段和相应载体分别进行双酶切反应。酶切产物回收后，将得到的目的基因片段与得到的目的载体片段利用 Takara 的 T4 DNA 连接酶进行 16℃过夜连接反应。其中，CD40L 片段链接 cPPT-mini-MMIG 载体，BAFF 片段连接 cPPT-IRES-RFP 载体。

293T-CD40L-sBAFF 细胞系的构建

1) 首先，用 1×多聚赖氨酸溶液处理 10 cm 细胞培养皿；待细胞密度达到 40%转染病毒包装质粒；转染 36 h 后，配制病毒浓缩液，将上清液用 0.45 μm 的滤头过滤后加入浓缩液中 4℃过夜；24 h 后将病毒上清以 4000 g 的速度离心 5 min，弃掉上清液后，用 1 ml DMEM 培养基重悬；
2) 预先用 1×多聚赖氨酸溶液处理 12 孔板；待感染细胞密度达到 75%左右时吸掉上清液并准备感染；
3) 向细胞中加入 1 ml 浓缩的病毒液和终浓度为 6ug/ml 的 Polybrene，随后以 1500 g 的速度离心感染 30 min；感染后 8 h 换液；随后进行扩大培养；
4) 将扩大培养的细胞系使用胰酶消化后，用 1×PBS 缓冲液洗涤细胞两次，运用流式细胞仪分选 FITC 通道阳性细胞（293T-CD40L）或 FITC 通道与 PE 通道双阳性细胞（293T-CD40L-sBAFF）；收集管使用 2 ml DMEM 收集细胞；细胞收集后，继续扩大培养并再次进行分选；
5) 经过 3-5 轮分选后，细胞阳性率保持在 90%（293T-CD40L）或 80%（293T-CD40L-sBAFF）以上，且阳性细胞比例保持长期稳定后停止分选。

人外周血细胞（PBMC）的分离

人外周血取自广州血液中心。将外周成分血加入到 1×PBS 缓冲液（含 2% BSA 和 0.5% EDTA）混合均匀后，在上方缓慢加入淋巴细胞分离液，二者的比例为 1:1 混合，1500 rpm 离心 40 min。小心吸取外周血单个核细胞层（白色絮状，即白膜层），置入另一离心管中，加入 5 倍体积的 1×PBS（含 0.5% BSA 和 2% EDTA）稀释，混合均匀后，380 g 离心 8 min。重

复以上一步骤一次。

使用阴选磁珠分离 B 细胞

按照每 10^7 的 PBMC 细胞加入 100 μl 1×PBS 缓冲液（含 0.5% BSA 和 2% EDTA）及 50 μl $CD19^+$ B 细胞阴选一抗，在室温下孵育 15 min。加入 10 倍体积的 1×PBS 缓冲液稀释，混合均匀后，380 g 离心 8 min，弃掉上清液。每 10^7 细胞加入 50 μl 带有磁珠的二抗，在室温下孵育 30 min 后，过磁力柱进行细胞分选，380 g 离心 8 min 后得到 B 细胞，加入含 10%胎牛血清和 1%双抗的 IMDM 培养基重悬细胞。使用计数板数细胞总数。其他细胞的阴选磁珠用法与此类似。

使用阳选磁珠分离 B 细胞

按照每 10^7 的 PBMC 细胞加入 100 μl 1×PBS 缓冲液（含 0.5% BSA 和 2% EDTA）及 50 μl $CD19^+$ B 细胞阳选磁珠，在室温下孵育 20 min。加入 10 倍体积的 1×PBS 缓冲液稀释，混合均匀后，380 g 离心 8 min，弃掉上清液。重悬后过柱进行细胞分选，380 g 离心 8 min 后得到 B 细胞，加入含 10%胎牛血清和 1%双抗的 RPMI1640 培养基重悬细胞。使用计数板数细胞总数。其他细胞的阳选磁珠用法与此类似。

B 细胞扩增

首先准备饲养细胞。预先用 1×多聚赖氨酸溶液处理 12 孔板后，将 293T 细胞系，293T-CD40L-sBAFF 细胞系与 293T-CD40L 细胞系铺入 12 孔板。待细胞密度长到 30%左右时，使用射线以 95Gy 辐照细胞或丝裂霉素 C 处理 3 h，使细胞停止生长。观察 12 h，确认细胞停止生长。

随后将 B 细胞铺入 12 孔板与饲养细胞共培养。经过一系列条件摸索试验后，发明人最终将 B 细胞的密度定位 5×10^5 个/孔。将 B 细胞按照 5×10^5/ml 悬于 IMDM 培养基中，在培养基中加入终浓度为 2 μg/ml CpG-ODN2006/2219，0.625 μg/ml CsA (Cyclosporine A)，10 ng/mL IL-2，10 ng/ml IL-10 和 20 ng/mL IL-4。随后将细胞悬液按照每孔 1 ml 的量加入 12 孔板中与饲养细胞共培养。每隔 4 天，将 B 细胞使用差速离心或密度梯度离心的办法与饲养细胞分离，台盼蓝染色计数，并按照 5×10^5 个/孔的密度转入铺有新的饲养细胞的 12 孔板。

ELISPOT 实验

测量细胞 IFN-γ 的 ELISPOT 实验采用了达科为公司的 human IFN-γ precoated ELISPOT

kit。将调整好浓度的细胞悬液加入实验孔，其中实验组加入与 CD40L-B 细胞或 CD40L-sBAFF-B 细胞共培养的 CD8+ T 细胞，阳性对照组加入被 PHA 刺激过 CD8+ T 细胞，阴性对照组加入未刺激过的 CD8+ T 细胞。CD8+ T 细胞的密度定为 105/孔。背景负对照组加入等体积 RMPI 1640。加完样品后，37℃孵育 16-20 h。

第二天，倒去孔内培养基，加入 4℃的去离子水 4℃下裂解细胞 10 min。使用 1×ELISPOT 洗脱液洗涤 5-7 次后，加入抗体工作液在 37℃孵育 1 h。随后倒去抗体，使用 1×ELISPOT 洗脱液洗涤 5-7 次后，再加入 HRP 工作液在 37℃孵育 1 h。

孵育结束后，再使用 1×ELISPOT 洗脱液洗涤 5-7 次，加入配置好的 AEC 显色液室温避光反应 25 min。反应结束后，用去离子水洗涤 5-7 次，将板放于阴凉处，待其晾干后用 CTL Immunospot S5 core analyzer 检测阳性斑点数，CTL ImmunoSpot software 进行斑点计数和统计学分析。

实验结果

发明人使用 293T 细胞来构建饲养细胞系。将包装好的带有膜型 CD40L 序列的慢病毒感染人 293T 细胞，经流式细胞术多轮筛选后得到稳定的细胞系（293T-CD40L 细胞系）。人 BAFF 的 1-46 位氨基酸为胞内段，47-73 位为跨膜区域，74-285 为胞外段。BAFF 在体内被 furin 蛋白酶切割后，133-285 位氨基酸形成可溶性的 BAFF，为 BAFF 发挥功能的主要形式。因此，发明人克隆了 BAFF 的 133-285 位氨基酸。为使 BAFF 能更好的分泌到胞外，发明人通过精心设计，在 BAFF 的 N 端插入了一段 IL-2 的分泌肽。同时，为了方便稍后检测分泌到上清液中的 BAFF 的量，发明人在可溶性 BAFF 的 C 端融合表达了 Flag 标签的序列。该融合蛋白被克隆到慢病毒载体 cPPT-IRES-RFP，与包装质粒 psPAX 和包膜蛋白 VSVG 共同转染 293T-CD40L 细胞系以包装病毒。经流式细胞术多轮筛选 RFP 阳性细胞后得到稳定的 GFP-RFP 双阳性细胞系（293T-CD40L-sBAFF）。本实验构建的质粒如图 1 所示。

随后，发明人使用新构建的 293T-CD40L-sBAFF 细胞系体外培养人外周血原代 B 细胞，培养方法如前所述。为了评估 293T-CD40L-sBAFF 细胞系对人外周血原代 B 细胞的扩增作用，发明人将 293T-CD40L-sBAFF 细胞系扩增 B 细胞的效果与之前文章所报道的 293T-CD40L，以及终浓度分别为 10 ng/ml，20 ng/ml，40 ng/ml 的 GMP 级重组人可溶性 BAFF（rhBAFF）对 B 细胞的扩增效果做了比较。结果表明，293T-CD40L-sBAFF 细胞系对 B 细胞的扩增能力好于之前报道的 293T-CD40L 细胞系，以及加入了终浓度为 10 ng/ml rhBAFF 的 293T-CD40L 细胞系，如图 2 所示。

除了通过细胞计数观察 B 细胞的扩增能力外，发明人还通过 CFSE 染色实验进一步分析

了 B 细胞的扩增情况。CFSE 结果显示，293T- CD40L-sBAFF 使 B 细胞的扩增能力更强，具有扩增活性的细胞比例也更高，提示 293T-CD40L-sBAFF 细胞系与 293T-CD40L 细胞系相比具有更强的扩增 B 细胞的能力，如图 3 所示。

由于激活的 B 细胞可以表达 MHC 类分子（MHC-I,MHC-II），共刺激因子(CD80，CD86)和粘附分子（CD54），具有呈递抗原并激活 T 细胞的能力，而共刺激分子 CD80 和 CD86 的表达水平与 B 细胞的抗原呈递功能密切相关，在共培养后收取 B 细胞并使用流式细胞术检测表面的 CD80 和 CD86 水平。结果显示，在共培养后，与 293T-CD40L-sBAFF 细胞系共培养的 B 细胞，其表面 CD80，CD86 分子有更高的表达水平。除 CD80 和 CD86 外，其他参与 B 细胞抗原呈递功能的协同刺激分子，如 CD275（ICOSLG），CD70（CD27L）表达均有上调，如图 4 所示。

在体外实验中发明人得到参与细胞抗原递呈的共刺激分子有所抬高，发明人进一步验证 293T-CD40L-sBAFF 细胞系培养得到的 B 细胞能否抬高肿瘤特异性抗原递呈的能力，从来在肿瘤过继回输治疗中发挥功能。黑色素瘤作为最好的肿瘤治疗模型，发明人选择了黑色素瘤特异性抗原表位 NY-ESO-1，使用 293T-CD40L-sBAFF 细胞系培养得到的 B 细胞与抗原肽共孵育，进行抗原的递呈。如图 5a，b，c 所示，使用 293T-CD40L-sBAFF 细胞系培养得到的 B 细胞递呈抗原的 CD8 细胞，在 ELISPOT 实验中可以分泌更多的 IFN-γ，并且在细胞杀伤实验中，杀伤效率几乎达到了 100%。为了进一步验证，使用 293T-CD40L-sBAFF 细胞系培养得到的 B 细胞递呈抗原的 CD8 细胞在体内也有更好的抗肿瘤活性，发明人构建了黑色素瘤的体内实验模型。如图 5d，e 所示，发明人将教育好的 CTL 细胞过继回输到小鼠体内，并对肿瘤大小进行测量，实验结果显示，由于 293T-CD40L-sBAFF 细胞系培养得到的 B 细胞递呈抗原的能力增强，所以教育得到的 CTL 在体内也具有更好的抗肿瘤活性。

参考文献：

Do, R. K., Hatada, E., Lee, H., Tourigny, M. R., Hilbert, D., & Chen-Kiang, S. (2000). Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. The Journal of experimental medicine, 192(7), 953-964.

Garrone, P., Neidhardt, E.-M., Garcia, E., Galibert, L., Van Kooten, C., &Banchereau, J. (1995). Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. The Journal of experimental medicine, 182(5), 1265-1273.

Mackay, F., & Schneider, P. (2009). Cracking the BAFF code. Nat Rev Immunol, 9(7), 491-502. doi: 10.1038/nri2572

Moore, P. A., Belvedere, O., Orr, A., Pieri, K., LaFleur, D. W., Feng, P., . . .Parmelee, D.

(1999). BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. Science, 285(5425), 260-263.

Schultze, J. L., Michalak, S., Seamon, M. J., Dranoff, G., Jung, K., Daley, J., . . . Nadler, L. M. (1997). CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. Journal of Clinical Investigation, 100(11), 2757.

Yang, M., Hase, H., Legarda-Addison, D., Varughese, L., Seed, B., & Ting, A. T. (2005). B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. The Journal of Immunology, 175(5), 2814-2824.

Zhang, X., Li, L., Choe, J., Krajewski, S., Reed, J. C., Thompson, C., & Choi, Y. S. (1996). Up-regulation of Bcl-x L expression protects CD40-activated human B cells from Fas-mediated apoptosis. Cellular immunology, 173(1), 149-154.

权 利 要 求 书

1. 分泌型 BAFF 肽，其氨基酸序列由 BAFF 的 133-285 位和其 N 端的 IL-2 肽组成，BAFF 的 133-285 位的氨基酸序列为：AVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSALEEKENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGHLIQRKKVHVFGDELSLVTLFRCIQNMPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL，IL-2 肽的氨基酸序列为：MYRMQLLSCIALSLALVTNS。
2. 一种分泌型 BAFF 肽的表达载体，其插入有表达权利要求 1 所述分泌型 BAFF 肽的核苷酸序列。
3. 根据权利要求 2 所述的表达载体，其特征在于：载体还插入有表达膜型 CD40L 的核苷酸序列。
4. 一种表达分泌型 BAFF 肽的细胞，其转染有权利要求 2 所述的表达载体。
5. 根据权利要求 4 所述的细胞，其特征在于：细胞还转染有表达膜型 CD40L 的载体。
6. 根据权利要求 4 所述的细胞，其特征在于：细胞转染有权利要求 3 所述的表达载体。
7. 根据权利要求 4～6 任意一项所述的细胞，其特征在于：细胞为 293T 细胞。
8. 一种人外周 B 细胞体扩增方法，其特征在于：将人外周 B 细胞与同时表达分泌型 BAFF 肽和膜型 CD40L 的细胞共培养。
9. 根据权利要求 8 所述的人外周 B 细胞体扩增方法，其特征在于：将人外周 B 细胞培养在有胰岛素和转铁蛋白支持的 IMDM 培养基中，并添加 CpG2006/2219 和环孢素 A 刺激 B 细胞扩增，添加人 IL-4，IL-2，IL-10 维持细胞生长。

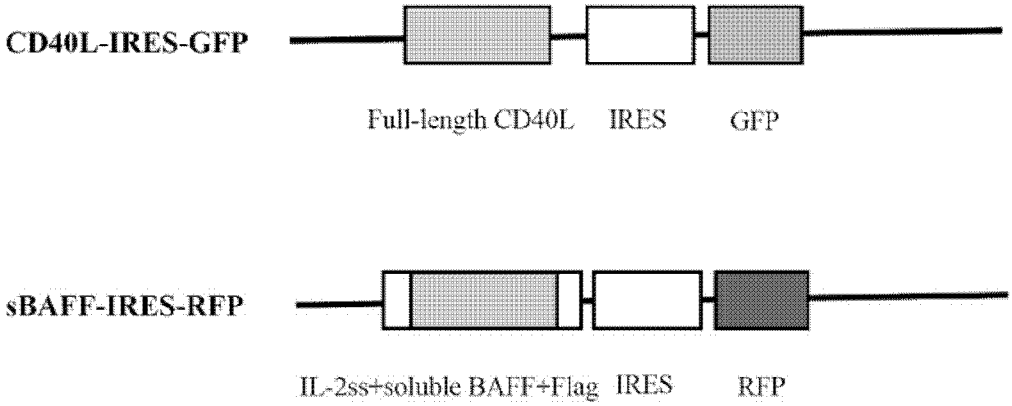

CD40L-IRES-GFP
Full-length CD40L
IRES
GFP
sBAFF-IRES-RFP
IL-2ss+soluble BAFF+Flag
IRES
RFP

图 1


A
细胞总数 (*10^5)
时间（天）
293T-CD40L
293T-CD40L-sBAFF
293T-CD40L+ rhBAFF(10ng/ml)
293T-CD40L+ rhBAFF(20ng/ml)
293T-CD40L+ rhBAFF(40ng/ml)
B
B细胞扩增倍数
***
***
*

图 2

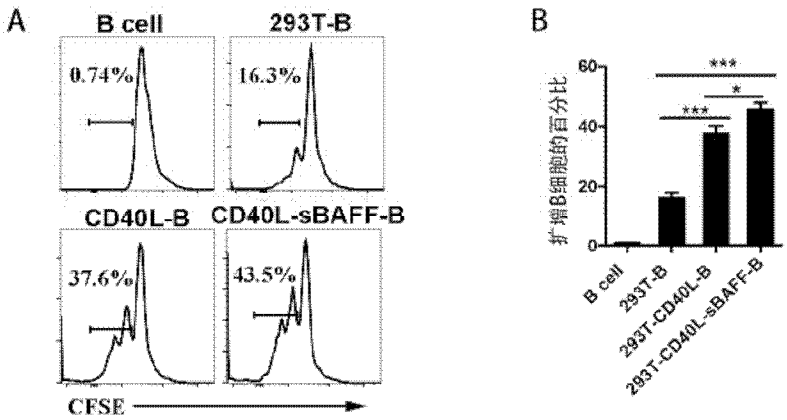

A
B cell
293T-B
0.74%
16.3%
CD40L-B
CD40L-sBAFF-B
37.6%
43.5%
CFSE
B
扩增B细胞的百分比
***
*
***
B cell
293T-B
293T-CD40L-B
293T-CD40L-sBAFF-B

图 3

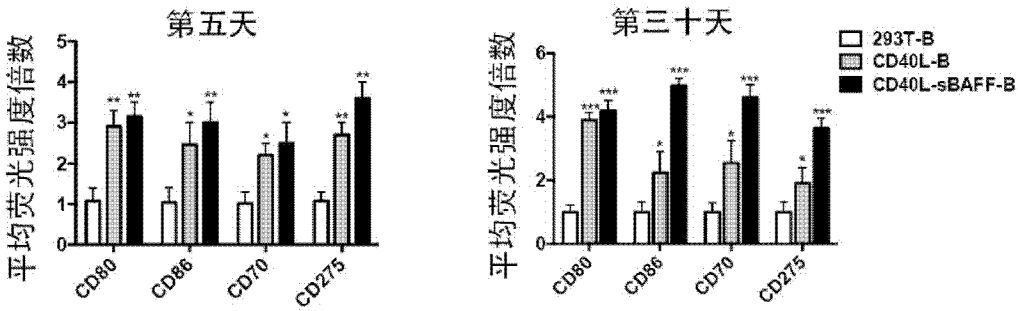

第五天
平均荧光强度倍数
CD80
CD86
CD70
CD275
第三十天
293T-B
CD40L-B
CD40L-sBAFF-B

图 4

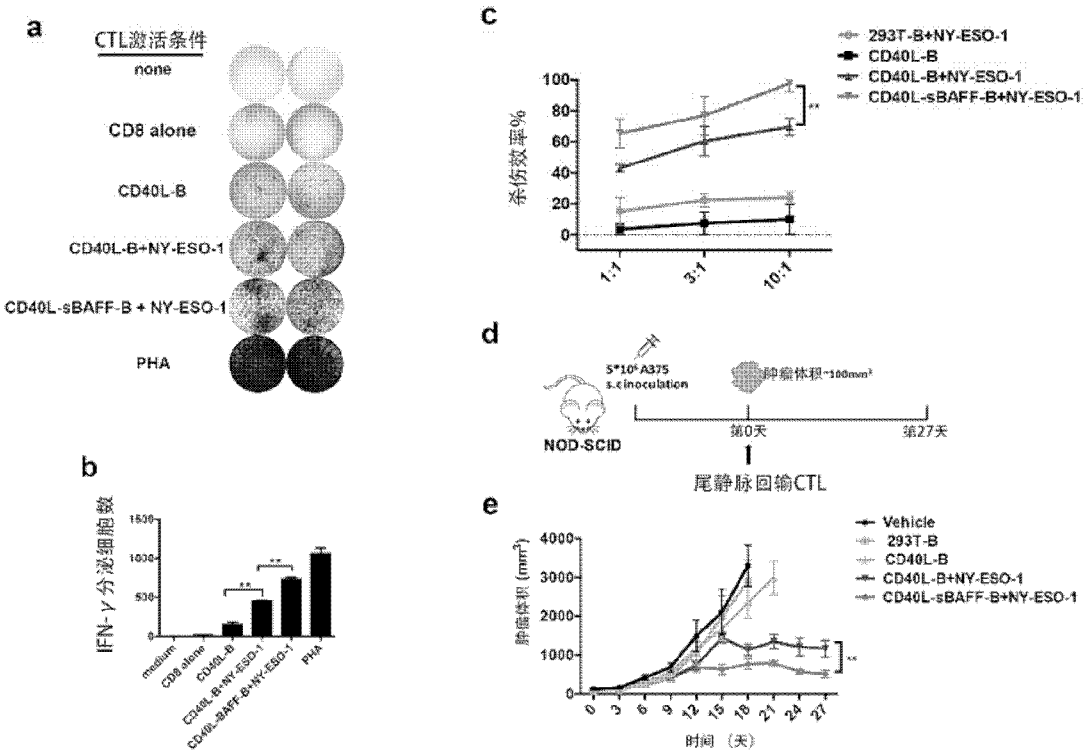

a
CTL激活条件
none
CD8 alone
CD40L-B
CD40L-B+NY-ESO-1
CD40L-sBAFF-B + NY-ESO-1
PHA
b
IFN-γ分泌细胞数
c
293T-B+NY-ESO-1
CD40L-B
CD40L-B+NY-ESO-1
CD40L-sBAFF-B+NY-ESO-1
杀伤效率%
d
NOD-SCID
第0天
第27天
尾静脉回输CTL
e
Vehicle
293T-B
CD40L-B
CD40L-B+NY-ESO-1
CD40L-sBAFF-B+NY-ESO-1
时间 (天)

图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/104807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00 (2006.01) i; C12N 15/85 (2006.01) i; C12N 5/0781 (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)

C07K; 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; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED AND KEYWORDS: BAFF, BLyS, B 细胞活化因子, TALL-1, THANK, zTNF4, TNFSF-13B, TNF, 肿瘤坏死因子, IL-2, 白介素, 白细胞介素, T 细胞生长因子, TCRF, CD40L, 293T, B 细胞, 融合蛋白, 癌症, 肿瘤, B-cell activating factor, tumor necrosisi factor, interleukin-2, interleukin, T cell growth factor, B cell, fusion protein, tumor, cancer etc.; Bio-Sequence Searching System of Chinese Patent; Genbank; EMBL and sequence: SEQ ID NOs: 1-8.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 101132813 A (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION) 27 February 2008 (27.02.2008), see entire document, especially description, page 1, paragraph 4, page 3, paragraph 4 to page 4, paragraph 1 and page 5, paragraph 2	1-9
Y	CN 1302305 A (RIGEL PHARMACEUTICALS, INC.) 04 July 2001 (04.07.2001), see description, page 25, paragraph 2, sequence table SEQ ID NO: 95	1-9
Y	CN 103946236 A (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG) 23 July 2014 (23.07.2014), see the abstract	3, 5-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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
05 May 2017	01 June 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Ying Telephone No. (86-10) 62412197

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/104807

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101851278 A (SICHUAN UNIVERSITY) 06 October 2010 (06.10.2010), see entire document	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/104807

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101132813 A	27 February 2008	ZA 200705803 B	27 August 2008
		CA 2595904 A1	10 August 2006
		US 2006171919 A1	03 August 2006
		EP 1855724 A2	21 November 2007
		RU 2393874 C2	10 July 2010
		JP 2008528633 A	31 July 2008
		RU 2007132875 A	10 March 2009
		WO 2006083961 A2	10 August 2006
		ZA 200705803 A	27 August 2008
		WO 2006083961 A3	10 May 2007
		AU 2006210769 A1	10 August 2006
CN 1302305 A	04 July 2001	WO 9951625 A9	05 July 2001
		AU 752168 B2	05 September 2002
		NZ 507063 A	28 November 2003
		AU 3469399 A	25 October 1999
		WO 9951625 A2	14 October 1999
		WO 9951625 A3	06 April 2000
		CA 2324284 A1	14 October 1999
		EP 1071705 A2	31 January 2001
		JP 2002510479 A	09 April 2002
CN 103946236 A	23 July 2014	MX 2014005479 A	18 August 2014
		SG 10201608341X A	29 November 2016
		EP 2782931 A1	01 October 2014
		RU 2014123164 A	27 December 2015
		HK 1200177 A1	31 July 2015
		CA 2850694 A1	30 May 2013
		JP 2014533514 A	15 December 2014
		EP 2782931 B1	14 December 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/104807

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		WO 2013076139 A1	30 May 2013
		SG 11201402194R A	26 September 2014
		US 2014315252 A1	23 October 2014
		KR 20140095066 A	31 July 2014
CN 101851278 A	06 October 2010	CN 101851278 B	13 March 2013
		JP 2013529900 A	25 July 2013
		EP 2578603 A4	26 March 2014
		KR 20130043642 A	30 April 2013
		WO 2011147320 A1	01 December 2011
		JP 2016019527 A	04 February 2016
		EP 2578603 A1	10 April 2013
		US 9290582 B2	22 March 2016
		US 2013089549 A1	11 April 2013

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/104807

A. 主题的分类

C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; C12N 5/0781(2010.01)i

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

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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））

CNABS;CPRSABS;CNTXT;DWPI;SIPOABS;EPTXT;WOTXT;USTXT;JPTXT;CNKI;PUBMED 和关键词：BAFF，BLyS，B细胞活化因子，TALL-1，THANK，zTNF4，TNFSF-13B，TNF，肿瘤坏死因子，IL-2，白介素，白细胞介素，T细胞生长因子，TCRF，CD40L，293T，B细胞，融合蛋白，癌症，肿瘤，B-cell activating factor，tumor necrosisi factor，interleukin-2，interleukin，T cell growth factor，B cell，fusion protein，tumor，cancer等； 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NOs:1-8。

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
Y	CN 101132813 A（研究发展基金会）2008年 2月 27日（2008 - 02 - 27） 见全文尤其说明书第1页第4段，第3页第4段-第4页第1段，第5页第2段	1-9
Y	CN 1302305 A（里格尔制药公司）2001年 7月 4日（2001 - 07 - 04） 见说明书第25页第2段，序列表SEQ ID NO:95	1-9
Y	CN 103946236 A（弗哈夫曼-拉罗切有限公司）2014年 7月 23日（2014 - 07 - 23） 见摘要	3，5-9
A	CN 101851278 A（四川大学）2010年 10月 6日（2010 - 10 - 06） 见全文	1-9

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“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）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“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

“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

“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

“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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2017年 5月 5日	2017年 6月 1日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 王颖 电话号码 (86-10)62412197

表 PCT/ISA/210（第2页）（2009年7月）

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/104807

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	101132813	A	2008年 2月 27日	ZA	200705803	B	2008年 8月 27日
				CA	2595904	A1	2006年 8月 10日
				US	2006171919	A1	2006年 8月 3日
				EP	1855724	A2	2007年 11月 21日
				RU	2393874	C2	2010年 7月 10日
				JP	2008528633	A	2008年 7月 31日
				RU	2007132875	A	2009年 3月 10日
				WO	2006083961	A2	2006年 8月 10日
				ZA	200705803	A	2008年 8月 27日
				WO	2006083961	A3	2007年 5月 10日
				AU	2006210769	A1	2006年 8月 10日
CN	1302305	A	2001年 7月 4日	WO	9951625	A9	2001年 7月 5日
				AU	752168	B2	2002年 9月 5日
				NZ	507063	A	2003年 11月 28日
				AU	3469399	A	1999年 10月 25日
				WO	9951625	A2	1999年 10月 14日
				WO	9951625	A3	2000年 4月 6日
				CA	2324284	A1	1999年 10月 14日
				EP	1071705	A2	2001年 1月 31日
				JP	2002510479	A	2002年 4月 9日
CN	103946236	A	2014年 7月 23日	MX	2014005479	A	2014年 8月 18日
				SG	10201608341X	A	2016年 11月 29日
				EP	2782931	A1	2014年 10月 1日
				RU	2014123164	A	2015年 12月 27日
				HK	1200177	A1	2015年 7月 31日
				CA	2850694	A1	2013年 5月 30日
				JP	2014533514	A	2014年 12月 15日
				EP	2782931	B1	2016年 12月 14日
				WO	2013076139	A1	2013年 5月 30日
				SG	11201402194R	A	2014年 9月 26日
				US	2014315252	A1	2014年 10月 23日
				KR	20140095066	A	2014年 7月 31日
CN	101851278	A	2010年 10月 6日	CN	101851278	B	2013年 3月 13日
				JP	2013529900	A	2013年 7月 25日
				EP	2578603	A4	2014年 3月 26日
				KR	20130043642	A	2013年 4月 30日
				WO	2011147320	A1	2011年 12月 1日
				JP	2016019527	A	2016年 2月 4日
				EP	2578603	A1	2013年 4月 10日
				US	9290582	B2	2016年 3月 22日
				US	2013089549	A1	2013年 4月 11日