(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108070608 B
(45)授权公告日 2020.12.08

(21)申请号 201611026631.6
(22)申请日 2016.11.15
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108070608 A
(43)申请公布日 2018.05.25
(73)专利权人 上海恒润达生生物科技有限公司
地址 201210 上海市浦东新区张江路1238弄恒越国际大厦1号楼8楼
(72)发明人 黄飞 金涛 王海鹰 何凤 史子啸
(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 韦东
(51)Int.Cl.
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/867(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 7/01(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
A61K 35/17(2015.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
(56)对比文件
CN 104788573 A,2015.07.22
CN 105949324 A,2016.09.21
James N. Kochenderfer等.Construction and Pre-clinical Evaluation of an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor.《J Immunother》.2010,第32卷(第7期),
NCBI.ADM64594.1.《GenBank》.2012,
审查员 刘东川

权利要求书3页 说明书15页
序列表6页 附图5页

(54)发明名称

靶向CD19-CD28-tEGFR的嵌合抗原受体及其用途

(57)摘要

本发明涉及靶向CD19的嵌合抗原受体及其用途。具体而言，本发明提供一种多核苷酸序列，选自：(1)含有依次连接的抗CD19单链抗体的编码序列、人CD8α铰链区的编码序列、人CD28跨膜区的编码序列、人CD28胞内区的编码序列、人CD3ζ胞内区的编码序列和任选的EGFR的含胞外结构域III和胞外结构域IV的片段的编码序列的多核苷酸序列；和(2)(1)所述多核苷酸序列的互补序列。本发明还提供相关的融合蛋白、含所述编码序列的载体，以及所述融合蛋白、编码序列、载体的用途。

CN 108070608 B

1.一种多核苷酸,所述多核苷酸的序列选自:

(1)含有依次连接的抗CD19单链抗体的编码序列、人CD8α铰链区的编码序列、人CD28跨膜区的编码序列、人CD28胞内区的编码序列、人CD3ζ胞内区的编码序列和EGFR的含胞外结构域III和胞外结构域IV的片段的编码序列的多核苷酸序列,所述抗CD19单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第22-128位氨基酸所示;所述抗CD19单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第144-263位氨基酸所示;和

(2) (1)所述多核苷酸序列的互补序列,

其中,所述人CD8α铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第264-310位氨基酸所示;所述人CD28跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第311-337位氨基酸所示;所述人CD28胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第338-378位氨基酸所示;所述人CD3ζ胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第379-489位氨基酸所示;所述EGFR的片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第538-872位氨基酸所示。

2.如权利要求1所述的多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸在所述抗CD19单链抗体的编码序列前还含有信号肽的编码序列。

3.如权利要求2所述的多核苷酸,其特征在于,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第1-21位氨基酸所示。

4.如权利要求1所述的多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸还含有GM-CSF受体α链信号肽的编码序列,所述GM-CSF受体α链信号肽设置于所述EGFR片段的N端。

5.如权利要求4所述的多核苷酸,其特征在于,所述GM-CSF受体α链信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第516-537位氨基酸所示。

6.如权利要求4所述的多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸还含有连接所述GM-CSF受体α链信号肽与所述人CD3ζ胞内区的接头序列的编码序列。

7.如权利要求6所述的多核苷酸,其特征在于,所述接头序列的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第490-515位氨基酸所示。

8.如权利要求2所述的多核苷酸,其特征在于,在所述抗CD19单链抗体的编码序列前的所述信号肽的编码序列如SEQ ID NO:1第1-63位核苷酸序列所示。

9.如权利要求1所述的多核苷酸,其特征在于,

所述抗CD19单链抗体的轻链可变区的编码序列如SEQ ID NO:1第64-384位核苷酸序列所示;

所述抗CD19单链抗体的重链可变区的编码序列如SEQ ID NO:1第430-789位核苷酸序列所示;

所述人CD8α铰链区的编码序列如SEQ ID NO:1第790-930位核苷酸序列所示;

所述人CD28跨膜区的编码序列如SEQ ID NO:1第931-1010位核苷酸序列所示;

所述人CD28胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1第1011-1134位核苷酸序列所示;

所述人CD3ζ胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1第1135-1467位核苷酸序列所示;和

所述EGFR的片段的编码序列如SEQ ID NO:1第1626-2619位核苷酸序列所示;或

所述多核苷酸编码如SEQ ID NO:2第22-489位所示的氨基酸序列,或编码如SEQ ID NO:2第22-515位所示的氨基酸序列,或编码如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;或

所述多核苷酸含有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:1第1-1467位所示的核苷酸序列、SEQID

NO:1第64-1467位所示的核苷酸序列或SEQ ID NO:1第64-2619位所示的核苷酸序列，或由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:1第1-1467位所示的核苷酸序列、SEQ ID NO:1第64-1467位所示的核苷酸序列或SEQ ID NO:1第64-2619位所示的核苷酸序列组成。

10.如权利要求4所述的多核苷酸，其特征在于，所述GM-CSF受体α链信号肽的编码序列如SEQ ID NO:1第1546-1625位核苷酸序列所示。

11.如权利要求6所述的多核苷酸，其特征在于，连接所述GM-CSF受体α链信号肽与所述人CD3ζ胞内区的所述接头序列的编码序列如SEQ ID NO:1第1468-1545位核苷酸序列所示。

12.一种融合蛋白，所述融合蛋白含有依次连接的抗CD19单链抗体、人CD8α铰链区、人CD8跨膜区、人CD28胞内区和人CD3ζ胞内区的融合蛋白和EGFR的含胞外结构域III和胞外结构域IV的片段的编码序列，所述抗CD19单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第22-128位氨基酸所示，所述抗CD19单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第144-263位氨基酸所示；所述人CD8α铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第264-310位氨基酸所示；所述人CD28跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第311-337位氨基酸所示；所述人CD28胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第338-378位氨基酸所示；所述人CD3ζ胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第379-489位氨基酸所示；所述EGFR的片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第538-872位氨基酸所示。

13.如权利要求12所述的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白在所述抗CD19单链抗体的N端还含有信号肽。

14.如权利要求13所述的融合蛋白，其特征在于，所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第1-21位氨基酸所示。

15.如权利要求12所述的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白还含有GM-CSF受体α链信号肽，所述GM-CSF受体α链信号肽设置于所述EGFR片段的N端。

16.如权利要求15所述的融合蛋白，其特征在于，所述GM-CSF受体α链信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第516-537位氨基酸所示。

17.如权利要求15所述的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白还含有连接所述GM-CSF受体α链信号肽与所述人CD3ζ胞内区的接头序列。

18.如权利要求17所述的融合蛋白，其特征在于，所述接头序列的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第490-515位氨基酸所示。

19.如权利要求12所述的融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第22-489位氨基酸所示，或如SEQ ID NO:2第22-515位氨基酸所示，或如SEQ ID NO:2第1-515位氨基酸所示，或如SEQ ID NO: 2所示。

20.一种核酸构建物，所述核酸构建物含有权利要求1-11中任一项所述的多核苷酸。

21.如权利要求20所述的核酸构建物，其特征在于，所述核酸构建物为载体。

22.如权利要求20所述的核酸构建物，其特征在于，所述核酸构建物为逆转录病毒载体，含有复制起始位点，3'LTR，5'LTR，以及权利要求1-11中任一项所述的多核苷酸。

23.一种逆转录病毒，所述逆转录病毒含有权利要求1-11中任一项所述的多核苷酸。

24.一种基因修饰的T细胞或含该基因修饰的T细胞的药物组合物，其特征在于，所述细胞含有权利要求1-11中任一项所述的多核苷酸，或含有权利要求20-22中任一项所述的核酸构建物，或感染了权利要求23所述的逆转录病毒，或稳定表达权利要求12-19中任一项所

述的融合蛋白。

25.权利要求1-11中任一项所述的多核苷酸、权利要求12-19中任一项所述的融合蛋白、权利要求20-22中任一项所述的核酸构建物或权利要求23所述的逆转录病毒在制备用于活化T细胞的试剂中的应用。

26.权利要求1-11中任一项所述的多核苷酸、权利要求12-19中任一项所述的融合蛋白、权利要求20-22中任一项述的核酸构建物、权利要求23所述的逆转录病毒、或权利要求24所述的基因修饰的T细胞或其药物组合物在制备治疗CD19介导的疾病的药物中的用途。

27.如权利要求26所述的用途，其特征在于，所述CD19介导的疾病为白血病或淋巴瘤。

28.如权利要求26所述的用途，其特征在于，所述CD19介导的疾病选自B细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病、和急性髓性白血病。

靶向CD19-CD28-tEGFR的嵌合抗原受体及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于嵌合抗原受体领域，具体涉及靶向CD19的嵌合抗原受体及其用途。

背景技术

[0002] 嵌合抗原受体(Chimeric Antigen Receptor-T cell,CAR-T)T细胞是指经基因修饰后，能以MHC非限制性方式识别特定目的抗原，并且持续活化扩增的T细胞。2012年国际细胞治疗协会年会中指出生物免疫细胞治疗已经成为手术、放疗、化疗外的第四种治疗肿瘤的手段，并将成为未来肿瘤治疗必选手段。CAR-T细胞回输治疗是当前肿瘤治疗中最明确有效的免疫治疗形式。大量研究表明，CAR-T细胞可以有效的识别肿瘤抗原，引起特异性的抗肿瘤免疫应答，显著改善患者的生存状况。

[0003] 嵌合抗原受体(CAR)是CAR-T的核心部件，赋予T细胞HLA非依赖的方式识别肿瘤抗原的能力，这使得经过CAR改造的T细胞相较于天然T细胞表面受体TCR能够识别更广泛的目标。CAR的基础设计中包括一个肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen,TAA)结合区(通常来源于单克隆抗体抗原结合区域的scFV段)，一个胞外铰链区，一个跨膜区和一个胞内信号区。目标抗原的选择对于CAR的特异性、有效性以及基因改造T细胞自身的安全性来讲都是关键的决定因素。

[0004] 随着嵌合抗原受体T细胞(Chimeric Antigen Receptor-T cell,CAR-T)技术的不断发展，目前CAR-T主要可划分为四代。

[0005] 第一代CAR-T细胞由胞外结合区-单链抗体(single-chain fragment variable,scFV)、跨膜区(transmembrane region,TM)和胞内信号区——免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptortyrosine-based activation motif,ITAM)组成，其中嵌合抗原受体各部分按如下形式连接：scFv-TM-CD3ζ。第一代CAR虽然能够看到一些特异性的细胞毒性，但2006年对其进行临床试验总结的时候却发现疗效差强人意。究其原因是因为第一代CAR-T细胞在病人体内很快就会耗竭，其持久性(persistence)很差，以至于CAR-T细胞还没有来得及接触到大量的肿瘤细胞时就已经凋亡了该种CAR-T细胞可以激发抗肿瘤的细胞毒性效应，但是细胞因子分泌比较少，但其在体内的存活期较短不能激发持久的抗肿瘤效应。[ZhangT.et.al.Chimeric NKG2D-modified T cells inhibit systemic T-cell lymphomagrowth in a manner involvingmultiple cytokines and cytotoxic pathways,Cancer Res2007,67(22):11029-11036.]

[0006] 第二代CAR-T细胞优化CAR设计中T细胞活化信号区仍然是研究的热点。T细胞的完全活化有赖于双信号和细胞因子的作用。其中第一信号为特异性信号，由TCR识别抗原递呈细胞表面的抗原肽-MHC复合物所启动；第二信号为协同刺激信号。早在1998年就出现了第二代CAR(Finney HM et al.J Immunol.1998;161(6):2791-7.)。第2代CAR在胞内信号肽区添加了一个协同刺激分子，即把协同刺激信号组装到CAR里面，能够更好的为CAR-T细胞提供活化信号，这样CAR识别肿瘤细胞后能够同时活化协同刺激分子和胞内信号，实现双重活化，能明显提高T细胞增殖分泌能力和抗肿瘤效应。第一个被详细研究的T细胞共刺激信号

受体是CD28，它能够与靶细胞表面的B7家族成员结合。CD28的共刺激能够促进T细胞的增殖，IL-2的合成和表达以及增强T细胞抵抗凋亡的能力。随后又出现了CD134(OX40)和CD137(4-1BB)等共刺激分子，以提高T细胞的细胞毒性、增殖活性，维持T细胞应答，延长T细胞存活时间等。这样的第二代CAR在随后的临床试验中产生了意想不到的效果，从2010年起基于第二代CAR的临床报道屡次引发震动，特别是对于复发性、难治性的ALL病人，其完全缓解率高达90％以上。

[0007] 第三代CAR信号肽区整合2个以上的协同刺激分子，可使T细胞持续活化增殖，细胞因子持续分泌，T细胞杀伤肿瘤细胞的能力更加显著，即新一代的CAR可获得更强的抗肿瘤应答(Pule MA et al.Mol Ther.2005,12(5):933-941.)。最典型的就是UPen Carl June在CD28刺激因子的作用下又加了一个CD137(4-1BB)的刺激因子。

[0008] 第四代的CAR-T细胞则加入了细胞因子或共刺激配体，例如四代CAR可以产生IL-12，其能够调节免疫微环境-增加T细胞的激活，同时激活固有免疫细胞使其发挥作用来清除靶抗原阴性的癌细胞，从而达到双向调节的作用。[Chmielewski M,Abken H.TRUCKs:the fourth generation of CARs.Expert Opin Biol Ther.2015;15(8):1145-54.]。

[0009] CD19是一种B细胞表面的95kDa的糖蛋白，从B细胞发育的早期即开始表达，直至其分化为浆细胞。CD19是免疫球蛋白(Ig)超家族的成员之一，作为B细胞表面信号转导复合物的组成元素之一，参与调控了B细胞受体的信号转导过程。在CD19缺陷的小鼠模型中，外周淋巴组织中B细胞的数量会出现明显的减少，对疫苗和丝裂原的应答也会下降，同时伴有血清Ig水平的减低。通常认为，CD19的表达只限于B细胞系(B-cell lineage)，而不表达于多能造血干细胞表面。CD19还表达于大多数B细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、ALLs、CLLs、多毛细胞白血病，和一部分急性髓性白血病细胞的表面。因此，在对白血病/淋巴瘤的治疗中，CD19是一种非常有价值的免疫治疗靶点。重要的是，CD19不会表达于除B细胞外的大多数正常细胞表面，包括多能造血干细胞，这一特征使CD19可以作为一种安全的治疗靶点，可将患者发生自身免疫性疾病或不可逆性骨髓毒性损伤的风险降至最低。当前，已经研制出了抗CD19的抗体或scFv片段，并且在小鼠模型和人类/灵长类动物中证明了其应用的前景。

[0010] 近年来，CD19 CAR T细胞领域竞争激烈，一些大的制药公司也和研究机构建立了合作关系。接受表达CD28或4-1BB的CD19 CAR T细胞治疗后，小儿和成人复发或难治性急性B细胞淋巴瘤具有大约90％的完全缓解率。最近，CD19 CAR T细胞治疗在弥漫性大B细胞淋巴瘤，滤泡淋巴瘤或慢性淋巴瘤中具有50％-100％的总体缓解率。CD19CAR T细胞治疗多发性骨髓瘤病人中具有临床优势，由于终末分化的浆细胞不表达CD19，恶性B细胞前体持续产生恶性浆细胞。

[0011] 众所周知，对于T细胞的激活而言，需要两条重要的信号通路的激活，第一是MHC复合体和T细胞受体的结合，第二需要CD80或CD86和T细胞上的CD28的结合这一条共刺激信号。而4-1BB信号通路，有T细胞受体通路激活，可以增加活化T细胞的增殖以及细胞因子的分泌。第二代CAR将CD28或4-1BB整合的此种改进，增强了被改造T细胞的复制及存活能力。

[0012] 对于CD28和4-1BB共刺激因子不同的代谢途径，科学家们通过实验证实，CD28共刺激因子参与的信号转导通路为PI3K-Akt，此有过程Glut1和转运蛋白参与并增加了葡萄糖摄取，其抑制丙酮酸脱羧并抑制葡萄糖进入三羧酸循环(TCA)，那么此过程伴随着增加了糖酵解，CD28 CAR T细胞向CD45RO+CCR7-效应记忆性细胞发育。相反，4-1BB CAR T细胞显示

增强氧化脂肪酸分解代谢活性同时增强了线粒体生物发生和氧化代谢能力，与CD28 CAR T细胞相比，提高了线粒体有氧呼吸能力(Kawalekar,O.U.,et al.(2016).Immunity 44, this issue,380-390.)。CD28CART细胞清除肿瘤的时间比4-1BB CAR T细胞发生的较早，而4-1BB CAR T细胞持续时间较长，综合来看两种共刺激因子最终取得了类似的肿瘤消除疗效。最近，Ligtenberg等人报道了一个策略使CD28 CAR T细胞更具有弹性的抗氧化能力即通过共表达过氧化氢酶来增加其通过代谢过氧化氢从而应对ROS的引起的氧化应激反应。这样过氧化氢酶-CD28 CAR T细胞发挥实质保护作用对其他旁路免疫细胞包括NK细胞。未来发展可能结合代谢重编程和诱导成熟等策略提高CAR T细胞对恶性肿瘤微环境的抗性。本发明专利用到的是CD28共刺激元件，此共刺激元件的CAR T细胞在输注体内能迅速的发挥作用，本发明的体外实验结果也证实了带有CD28共刺激因子的CAR T细胞无论是在INF-γ的释放还是细胞的杀伤作用都有良好的作用。

[0013] 研究显示，CD19 CAR T细胞的长期存在有利有弊，利在于对疾病有监视作用，而弊在于会造成B细胞的长期缺陷。除了CAR本身所具有的信号结构域，其他的因素也会影响CAR T的存在时间，比如细胞培养系统、基因转移的方式、基因表达的启动子、所输注T细胞的功能和表型，这些也都会受到病人年龄、所患疾病类型和已受过的治疗手段的影响。

[0014] CAR-T细胞的一大优点是它们是活性药物，一旦输入，生理机制会调控T细胞的平衡、记忆形成和抗原驱动的扩增。然而，这种治疗尚未完善，T细胞会脱靶而攻击其他的组织，或扩增量过高，超出治疗所需。鉴于CAR-T细胞已被纳入标准治疗范围，设计病人或药物可控的启动或关闭机制来调控CAR-T细胞的存在是非常有用的。由于技术原因，关闭机制更易应用于T细胞。作为其中之一，iCas9系统正在临床研究当中。细胞在表达iCas9时，使用小分子化合物可诱导iCas9前体分子形成二聚体，激活凋亡途径，从而实现清除细胞的目的。在移植物抗宿主病中，小分子AP1903已被用于诱导iCas9二聚体和清除T细胞，表明了这种方法的可行性(Clin Cancer Res.2016Apr 15;22(8):1875-84.)。

[0015] 另外，还可利用临床上已经使用的清除性抗体，使CAR-T细胞同时表达这些抗体针对的蛋白，如tEGFR，在治疗相关的毒性反应产生或是治疗已经完成后，通过给予抗体药物清除相应的CAR-T细胞(Sci Transl Med.2015;7:275ra22.)。基于安全性的考虑我们的car-t细胞引入了安全开关即tEGFR,构建好的CD19-tEGFR可实时安全的控制其在体内的表达。我们专利是以CD19的scFV的重链和轻链作为CAR的结构，同时也引入了tEGFR结构。tEGFR缺乏细胞外的N末端配体结合结构域和胞内受体酪氨酸激酶活性，但保留了天然氨基酸序列，属于I型跨膜细胞表面定位，其空间构象可与药物级别的抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗紧密结合(BLOOD.2011Aug4;118(5):1255-63.)。tEGFR的主要功能：可以作为细胞表面的标记，同时也适合T细胞的体内追踪可通过流式和免疫组化检测；也可以在体内被妥西单抗(cetuximab)清除。本发明专利引入此tEGFR结构既可以在使CAR-T细胞体内进行很好的被示踪，更重要的是此结构可以作为CAR-T细胞的安全开关：即不想其发挥作用时可加入妥西单抗，安全有效的控制输注的针对CD19靶点的CAR-T细胞在体内发挥作用。为临床实验和临床治疗奠定良好的基础。

发明内容

[0016] 本发明第一方面提供一种多核苷酸序列，所述多核苷酸序列选自：

[0017] (1)含有依次连接的抗CD19单链抗体的编码序列、人CD8α铰链区的编码序列、人CD28跨膜区的编码序列、人CD28胞内区的编码序列、人CD3ζ胞内区的编码序列和任选的EGFR的含胞外结构域III和胞外结构域IV的片段的编码序列的多核苷酸序列;和

[0018] (2)(1)所述多核苷酸序列的互补序列。

[0019] 在一个或多个实施方案中,所述多核苷酸序列在所述抗CD19单链抗体的编码序列前还含有信号肽的编码序列。在一个或多个实施方案中,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第1-21位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述抗CD19单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第22-128位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述抗CD19单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第144-263位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD8α铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第264-310位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD28跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第311-337位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD28胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第338-378位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD3ζ胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第379-489位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述EGFR的片段含有EGFR的胞外结构域III、胞外结构域IV以及跨膜区,或由EGFR的胞外结构域III、胞外结构域IV以及跨膜区组成。在一个或多个实施方案中,所述EGFR的片段含有人EGFR的第310-646位氨基酸序列,或由人EGFR的第310-646位氨基酸序列组成。在一个或多个实施方案中,所述多核苷酸序列还含有GM-CSF受体α链信号肽的编码序列,所述GM-CSF受体α链信号肽设置于所述EGFR片段的N端。在一个或多个实施方案中,所述GM-CSF受体α链信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第516-537位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述多核苷酸序列还含有连接所述GM-CSF受体α链信号肽与所述人CD3ζ胞内区的接头序列的编码序列。在一个或多个实施方案中,所述接头序列的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第490-515位氨基酸所示。

[0020] 在一个或多个实施方案中,在所述抗CD19单链抗体的编码序列前的所述信号肽的编码序列如SEQ ID NO:1第1-63位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述抗CD19单链抗体的轻链可变区的编码序列如SEQ ID NO:1第64-384位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述抗CD19单链抗体的重链可变区的编码序列如SEQ ID NO:1第430-789位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD8α铰链区的编码序列如SEQ ID NO:1第790-930位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD28跨膜区的编码序列如SEQ ID NO:1第931-1010位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD28胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1第1011-1134位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD3ζ胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1第1135-1467位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述GM-CSF受体α链信号肽的编码序列如SEQ ID NO:1第1546-1625位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述EGFR的片段的编码序列如SEQ ID NO:1第1626-2619位核苷酸序列所示。

[0021] 本发明第二方面提供一种融合蛋白,所述融合蛋白选自:

[0022] (1)含有依次连接的抗CD19单链抗体、人CD8α铰链区、人CD28跨膜区、人CD28胞内区和人CD3ζ胞内区的融合蛋白和任选的EGFR的含胞外结构域III和胞外结构域IV的片段的编码序列;和

[0023] (2)在(1)限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且保留活

化T细胞活性的由(1)衍生的融合蛋白；

[0024] 优选地，所述抗CD19单链抗体为抗CD19单克隆抗体FMC63。

[0025] 在一个或多个实施方案中，所述融合蛋白在所述抗CD19单链抗体的N端还含有信号肽。在一个或多个实施方案中，所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第1-21位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中，所述抗CD19单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第22-132位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中，所述抗CD19单链抗体的重链可变区的氨基酸序列可如SEQ ID NO:1第144-263位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中，所述人CD8α铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第264-310位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中，所述人CD28跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第311-337位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中，所述人CD28胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第338-378位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中，所述人CD3ζ胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第379-489位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中，所述EGFR的片段含有EGFR的胞外结构域III、胞外结构域IV以及跨膜区，或由EGFR的胞外结构域III、胞外结构域IV以及跨膜区组成。在一个或多个实施方案中，所述EGFR片段含有人EGFR的第310-646位氨基酸序列，或由人EGFR的第310-646位氨基酸序列组成。在一个或多个实施方案中，所述EGFR片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第538-872位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中，所述融合蛋白还含有GM-CSF受体α链信号肽，所述GM-CSF受体α链信号肽设置于所述EGFR片段的N端。在一个或多个实施方案中，所述GM-CSF受体α链信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第516-537位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中，所述融合蛋白还含有连接所述GM-CSF受体α链信号肽与所述人CD3ζ胞内区的接头序列。在一个或多个实施方案中，所述接头序列的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第490-515位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中，所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第22-489位氨基酸所示或如SEQ ID NO:2第22-515位氨基酸所示，或如SEQ ID NO:2所示。

[0026] 本发明第三方面提供一种核酸构建物，所述核酸构建物含有本文所述的多核苷酸序列。

[0027] 在一个或多个实施方案中，所述核酸构建物为载体。在一个或多个实施方案中，所述核酸构建物为逆转录病毒载体，含有复制起始位点，3'LTR，5'LTR，本文所述的多核苷酸序列，以及任选的可选择的标记。

[0028] 本发明第四方面提供一种逆转录病毒，所述逆转录病毒含有本文所述的核酸构建物，优选含有所述载体，更优选含有所述逆转录病毒载体。

[0029] 本发明第五方面提供一种基因修饰的T细胞，所述细胞含有本文所述的多核苷酸序列，或含有本文所述的核酸构建物，或感染了本文所述的逆转录病毒，或稳定表达本文所述的融合蛋白和任选的EGFR的含胞外结构域III、胞外结构域IV和任选的跨膜区的片段。

[0030] 本发明第六方面提供一种含本文所述的基因修饰的T细胞的药物组合物。

[0031] 本发明第七方面提供本文所述的多核苷酸序列、融合蛋白、核酸构建物或逆转录病毒在制备活化的T细胞中的应用。

[0032] 本发明第八方面提供本文所述的多核苷酸序列、融合蛋白、核酸构建物、逆转录病毒、或基因修饰的T细胞或其药物组合物在制备治疗CD19介导的疾病的药物中的用途。

[0033] 在一个或多个实施方案中，CD19介导的疾病为白血病、淋巴瘤。

附图说明

[0034] 图1为CD19-CAR逆转录病毒表达载体(CD19-28z)示意图。SP:信号肽;VL:轻链可变区;Lk:接头$(G_4S)_3$;VH:重链可变区;H:CD8α铰链区;TM:CD28跨膜区。

[0035] 图2为CD19-CAR逆转录病毒表达载体(CD19-28z)的部分测序结果峰值图。

[0036] 图3为CD19-tEGFR-CAR逆转录病毒表达载体(CD19CAR-tEGFR)示意图。SP:信号肽;VL:轻链可变区;Lk:接头$(G_4S)_3$;VH:重链可变区;H:CD8α铰链区;TM:CD8跨膜区;2A:P2A肽。

[0037] 图4为CD19-CAR逆转录病毒表达载体(CD19-28z)的部分测序结果峰值图。

[0038] 图5为流式细胞仪显示逆转录病毒感染T细胞72小时的CD19-28z和CD19-28z-tEGFR CART表达效率。

[0039] 图6为制备5天的CD19-28z和CD19-28z-tEGFR CART细胞与靶细胞共培养5小时CD107a脱颗粒作用。

[0040] 图7为制备5天的CD19-28z和CD19-28z-tEGFR CART细胞与靶细胞共培养5小时IFNγ的分泌。

[0041] 图8为制备5天的CD19-28z和CD19-28z-tEGFR CART细胞与靶细胞共培养5小时后对肿瘤细胞的杀伤作用。

[0042] 图9为CD19-28z-tEGFR CART细胞tEGFR刹车体外功能的检测(ADCC)。

具体实施方式

[0043] 本发明提供一种靶向CD19的嵌合抗原受体(CAR)。该CAR含有依次连接的抗CD19单链抗体、人CD8α铰链区、人CD28跨膜区、人CD28胞内区、人CD3ζ胞内区和任选的EGFR的含胞外结构域III和胞外结构域IV的片段。

[0044] 适用于本发明的抗CD19单链抗体可衍生自本领域周知的各种抗CD19单克隆抗体。

[0045] 任选地,所述轻链可变区和重链可变区可通过接头序列连接在一起。可举例的这类单链抗体包括但不限于FMC63,SJ25C1。在某些实施方案中,所述单克隆抗体是克隆号为FMC63的单克隆抗体。在某些实施方案中,所述抗CD19单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2的第22-128位氨基酸残基所示。在其它实施方案中,所述抗CD19单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2的第144-263位氨基酸残基所示。

[0046] 适用于本发明的人CD8α铰链区的氨基酸序列可如SEQ ID NO:2第264-310位氨基酸所示。

[0047] 适用于本发明的人CD28跨膜区可以是本领域常用于CAR的各种人CD28跨膜区序列。在某些实施方案中,所述人CD28跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第311-337位氨基酸所示。

[0048] 适用于本发明的CD28可以是本领域已知的各种用于CAR的CD28。作为示范性例子,本发明使用SEQ ID NO:2第338-378位氨基酸序列所示的CD28。

[0049] 适用于本发明的人CD3ζ胞内区可以是本领域常规用于CAR的各种人CD3ζ胞内区。在某些实施方案中,所述人CD3ζ胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第379-489位氨基酸所示。

[0050] 形成本发明的融合蛋白的上述各部分,如抗CD19单链抗体的轻链可变区和重链可变区、人CD8α铰链区、人CD28跨膜区、CD28和人CD3ζ胞内区等,相互之间可直接连接,或者可

通过接头序列连接。接头序列可以是本领域周知的适用于抗体的接头序列，例如含G和S的接头序列。通常，接头含有一个或多个前后重复的基序。例如，该基序可以是GGGS、GGGGS、SSSSG、GSGSA和GGSGG。优选地，该基序在接头序列中是相邻的，在重复之间没有插入氨基酸残基。接头序列可以包含1、2、3、4或5个重复基序组成。接头的长度可以是3～25个氨基酸残基，例如3～15、5～15、10～20个氨基酸残基。在某些实施方案中，接头序列是多甘氨酸接头序列。接头序列中甘氨酸的数量无特别限制，通常为2～20个，例如2～15、2～10、2～8个。除甘氨酸和丝氨酸来，接头中还可含有其它已知的氨基酸残基，例如丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)、苯丙氨酸(F)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)等。作为例子，接头可由SEQ ID NO:7-18中任一氨基酸序列组成。在某些实施方案中，本发明抗CD19单链抗体的轻链可变区和重链可变区之间由$(GGGGS)_n$连接，其中n为1～5的整数。

[0051] 在某些实施方案中，本发明CAR的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第22-489位氨基酸所示或如SEQ ID NO:2第1-489位氨基酸所示。在某些实施方案中，本发明的CAR的氨基酸系列中还包含如下文所述的EGFR的含胞外结构域III和胞外结构域IV的片段，其信号肽以及接头序列。

[0052] 应理解，在基因克隆操作中，常常需要设计合适的酶切位点，这势必在所表达的氨基酸序列末端引入了一个或多个不相干的残基，而这并不影响目的序列的活性。为了构建融合蛋白、促进重组蛋白的表达、获得自动分泌到宿主细胞外的重组蛋白、或利于重组蛋白的纯化，常常需要将一些氨基酸添加至重组蛋白的N-末端、C-末端或该蛋白内的其它合适区域内，例如，包括但不限于，适合的接头肽、信号肽、前导肽、末端延伸等。因此，本发明的融合蛋白(即所述CAR)的氨基端或羧基端还可含有一个或多个多肽片段，作为蛋白标签。任何合适的标签都可以用于本文。例如，所述的标签可以是FLAG，HA，HA1，c-Myc，Poly-His，Poly-Arg，Strep-TagII，AU1，EE，T7，4A6，ε，B，gE以及Ty1。这些标签可用于对蛋白进行纯化。

[0053] 本发明也包括SEQ ID NO:2第22-489位氨基酸序列所示的CAR、SEQ ID NO:2第22-489位氨基酸序列所示的CAR、SEQ ID NO:2第1-489位氨基酸序列所示的CAR或SEQ ID NO:2所示的CAR的突变体。这些突变体包括：与该CAR具有至少80％，优选至少85％，优选至少90％，优选至少95％，优选至少97％的序列相同性并保留该CAR的生物学活性(如活化T细胞)的氨基酸序列。可采用例如NCBI的BLASTp计算两条比对的序列之间的序列相同性。

[0054] 突变体还包括：在SEQ ID NO:2第22-489位所示的氨基酸序列、SEQ ID NO:2第22-489位所示的氨基酸序列、SEQ ID NO:2第1-489位所示的氨基酸序列或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列中具有一个或数个突变(插入、缺失或取代)、同时仍保留该CAR的生物学活性的氨基酸序列。所述数个突变通常指1－10个以内，例如1－8个、1－5个或1－3个。取代优选是保守性取代。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行保守性取代时，通常不会改变蛋白质或多肽的功能。“性能相近或相似的氨基酸”包括例如，具有相似侧链的氨基酸残基的家族，这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有β-分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙

氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,在本发明多肽中用来自同一侧链类的另一氨基酸残基替换一个或几个位点,将不会在实质上影响其活性。

[0055] 本发明包括编码本发明融合蛋白的多核苷酸序列。本发明的多核苷酸序列可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。本发明也包括编码融合蛋白的多核苷酸序列的简并变异体,即编码相同的氨基酸序列但核苷酸序列有所不同的核苷酸序列。

[0056] 本文所述的多核苷酸序列通常可以用PCR扩增法获得。具体而言,可根据本文所公开的核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。例如,在某些实施方案中,编码本文所述融合蛋白的多核苷酸序列如SEQ ID NO:1第64－1467位核苷酸所示,或如SEQ ID NO:1第1-1467位核苷酸所示。

[0057] 在某些实施方案中,本发明的多核苷酸序列还包含编码EGFR的片段的核苷酸序列。

[0058] 适用于本发明的EGFR可以是本领域周知的EGFR,例如来自人的EGFR。EGFR含有N末端胞外结构域I和II,胞外结构域III,胞外结构域IV,跨膜区,近膜区结构域以及酪氨酸激酶结构域。本发明优选使用截短的EGFR(“tEGFR”,即本文所述的EGFR的片段),尤其是不包括其胞内区域(近膜区结构域及酪氨酸激酶结构域)的截短的EGFR。在某些实施方案中,还可以进一步将不包括胞内区域的EGFR进一步截短成不包括胞外结构域I和II。因此,在某些实施方案中,本发明使用的tEGFR含有EGFR的胞外结构域III、胞外结构域IV以及跨膜区,或由EGFR的胞外结构域III、胞外结构域IV以及跨膜区组成。在某些实施方案中,所述tEGFR含有人EGFR的第310-646位氨基酸序列,或由人EGFR的第310-646位氨基酸序列组成,其中第310-480位氨基酸序列为人EGFR的胞外结构域III,第481-620为人EGFR的胞外结构域IV,第621-646位氨基酸为人EGFR的跨膜区。在某些实施例中,所述tEGFR的氨基酸序列的胞外结构域III和IV如SEQ ID NO:2第538-872位氨基酸所示的氨基酸序列

[0059] 为促进tEGFR的表达,还可在其N端设置前导序列。在某些实施方案中,本发明使用来自GM-CSF受体(“GMCSFR”)α链的信号肽。在某些实施方案中,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第516-537位氨基酸所示。

[0060] 除此之外,可通过P2A多肽的编码序列将所述信号肽及tEGFR的编码序列与本发明CAR中人CD3ζ胞内区的编码序列相连。在一个或多个实施方案中,所述P2A肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第490-515位氨基酸所示。

[0061] 因此,在某些实施方案中,本发明的多核苷酸序列含有本发明CAR的编码序列、P2A多肽的编码序列、来自GM-CSF受体α链的信号肽的编码序列、以及tEGFR的编码序列。在某些实施方案中,本发明多核苷酸的序列如SEQ ID NO:1第64-2619位核苷酸所示,或如SEQ ID NO:1所示。

[0062] 本发明也涉及核酸构建物,该核酸构建物含有本文所述的多核苷酸序列,以及与这些序列操作性连接的一个或多个调控序列。本发明所述的多核苷酸序列可以多种方式被操作以保证所述融合蛋白(CAR和/或tEGFR)的表达。在将核酸构建物插入载体之前可根据表达载体的不同或要求而对核酸构建物进行操作。利用重组DNA方法来改变多核苷酸序列

的技术是本领域已知的。

[0063] 调控序列可以是合适的启动子序列。启动子序列通常与待表达蛋白的编码序列操作性连接。启动子可以是在所选择的宿主细胞中显示转录活性的任何核苷酸序列，包括突变的、截短的和杂合启动子，并且可以从编码与该宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。调控序列也可以是合适的转录终止子序列，由宿主细胞识别以终止转录的序列。终止子序列与编码该多肽的核苷酸序列的3'末端操作性连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。调控序列也可以是合适的前导序列，对宿主细胞翻译重要的mRNA的非翻译区。前导序列与编码该多肽的核苷酸序列的5′末端可操作连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。

[0064] 在某些实施方案中，所述核酸构建物是载体。通常通过可操作地连接本发明的多核苷酸序列至启动子，并将构建体并入表达载体，实现本发明多核苷酸序列的表达。该载体对于复制和整合真核细胞可为合适的。典型的克隆载体包含可用于调节期望核酸序列表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。

[0065] 本发明的多核苷酸序列可被克隆入许多类型的载体。例如，可被克隆入质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。进一步地，载体是表达载体。表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是公知的并在例如Sambrook等(2001，Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒。

[0066] 通常，合适的载体包含在至少一种有机体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制酶位点和一个或多个可选择的标记(例如，WO 01/96584;WO01/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0067] 例如，在某些实施方案中，本发明使用逆转录病毒载体，该逆转录病毒载体含有复制起始位点，3'LTR，5'LTR，本文所述的多核苷酸序列，以及任选的可选择的标记。

[0068] 合适的启动子的一个例子为即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-1α(EF-1α)。然而，也可使用其他组成型启动子序列，包括但不限于类人猿病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳癌病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、鸟类白血病病毒启动子、EB病毒即时早期启动子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子，诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红素启动子和肌酸激酶启动子。进一步地，也可考虑使用诱导型启动子。诱导型启动子的使用提供了分子开关，其能够在期限表达时打开可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达，而在当表达是不期望的时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0069] 为了评估CAR多肽或其部分的表达，被引入细胞的表达载体也可包含可选择的标记基因或报道基因中的任一个或两者，以便于从通过病毒载体寻求被转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在其他方面，可选择的标记可被携带在单独一段DNA上并用于共转染程序。可选择的标记和报道基因两者的侧翼都可具有适当的调节序列，以便能够在宿主细胞中表达。有用的可选择标记包括例如抗生素抗性基因，诸如neo等等。

[0070] 报道基因用于鉴定潜在转染的细胞并用于评价调节序列的功能性。在DNA已经被引入受体细胞后，报道基因的表达在合适的时间下进行测定。合适的报道基因可包括编码荧光素酶、β-半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色萤光蛋白基因的基因。合适的表达系统是公知的并可利用已知技术制备或从商业上获得。

[0071] 将基因引入细胞和将基因表达入细胞的方法在本领域中是已知的。载体可通过在本领域中的任何方法容易地引入宿主细胞，例如，哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如，表达载体可通过物理、化学或生物学手段转移入宿主细胞。

[0072] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染法、粒子轰击、微注射、电穿孔等等。将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统，诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠；和基于脂质的系统，包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。

[0073] 将多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用病毒载体，特别是逆转录病毒载体，这已经成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物例如人细胞的方法。其他病毒载体可源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺伴随病毒等等。已经开发了许多基于病毒的系统，用于将基因转移入哺乳动物细胞。例如，逆转录病毒提供了用于基因传递系统的方便的平台。可利用本领域中已知的技术将选择的基因插入载体并包装入逆转录病毒颗粒。该重组病毒可随后被分离和传递至体内或离体的对象细胞。许多反转录病毒系统在本领域中是已知的。在一些实施方案中，使用腺病毒载体。许多腺病毒载体在本领域中是已知的。在一个实施方案中，使用慢病毒载体。

[0074] 因此，在某些实施方案中，本发明还提供用于活化T细胞的逆转录病毒，该病毒含有本文所述的逆转录病毒载体以及相应的包装基因，如gag、pol和vsvg。

[0075] 适用于本发明的T细胞可以是各种来源的各种类型的T细胞。例如，T细胞可来源于B细胞恶性肿瘤患者的PBMC。

[0076] 在某些实施方案中，获得T细胞后，可先用适量的(例如30～80ng/ml，如50ng/ml)的CD3抗体刺激活化，然后在含有适量的(例如30～80IU/ml，如50IU/ml)的IL2培养基进行培养备用。

[0077] 因此，在某些实施方案中，本发明提供一种基因修饰的T细胞，该基因修饰的T细胞含有本文所述的多核苷酸序列，或含有本文所述的逆转录病毒载体，或感染了本文所述的逆转录病毒，或采用本文所述的方法制备得到，或稳定表达本文所述的融合蛋白和任选的tEGFR。

[0078] 本发明的CAR-T细胞可经历稳固的体内T细胞扩展并在血液和骨髓中以高水平持续延长的时间量，并形成特异性记忆T细胞。不希望被任何具体的理论所束缚，在遇到并随后消除表达替代抗原的靶细胞后，本发明的CAR-T细胞可体内分化成中心记忆样状态。

[0079] 本发明还包括一类细胞疗法，其中T细胞被基因修饰以表达本文所述的CAR和任选的tEGFR，和CAR-T细胞被注入需要其的接受者中。注入的细胞能够杀死接受者的肿瘤细胞。不像抗体疗法，CAR-T细胞能够体内复制，产生可导致持续肿瘤控制的长期持久性。

[0080] 由CAR-T细胞引起的抗肿瘤免疫应答可为主动或被动免疫应答。另外，CAR介导的免疫应答可为过继免疫疗法步骤的一部分，其中CAR-T细胞诱导对CAR中的抗原结合部分特异性的免疫应答。

[0081] 因此，可采用本发明的CAR、其编码序列、核酸构建物、表达载体、病毒以及CAR-T细胞治疗的疾病优选为CD19介导的疾病。

[0082] 本发明的CAR-修饰的T细胞可被单独施用或作为药物组合物与稀释剂和/或与其他组分诸如相关的细胞因子或细胞群结合施用。简单地说，本发明的药物组合物可包括如本文所述的CAR-T细胞，与一种或多种药学或生理学上可接受载体、稀释剂或赋形剂结合。这样的组合物可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐水等等；碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇；蛋白质；多肽或氨基酸诸如甘氨酸；抗氧化剂；螯合剂诸如EDTA或谷胱甘肽；佐剂(例如，氢氧化铝)；和防腐剂。

[0083] 本发明的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由这样的因素确定，如患者的病症、和患者疾病的类型和严重度。

[0084] 当指出“免疫学上有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤-抑制有效量”或“治疗量”时，待施用的本发明组合物的精确量可由医师确定，其考虑患者(对象)的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移程度和病症的个体差异。可通常指出：包括本文描述的T细胞的药物组合物可以以10^4至10^9个细胞/kg体重的剂量，优选10^5至10^6个细胞/kg体重的剂量。T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。细胞可通过使用免疫疗法中公知的注入技术(见例如Rosenberg等，New Eng.J.of Med.319:1676，1988)施用。对于具体患者的最佳剂量和治疗方案可通过监测患者的疾病迹象并因此调节治疗由医学领域技术人员容易地确定。

[0085] 对象组合物的施用可以以任何方便的方式进行，包括通过喷雾法、注射、吞咽、输液、植入或移植。本文描述的组合物可被皮下、皮内、瘤内、结内、脊髓内、肌肉内、通过静脉内注射或腹膜内施用给患者。在一个实施方案中，本发明的T细胞组合物通过皮内或皮下注射被施用给患者。在另一个实施方案中，本发明的T细胞组合物优选通过静脉注射施用。T细胞的组合物可被直接注入肿瘤、淋巴结或感染位置。

[0086] 在本发明的一些实施方案中，本发明的CAR-T细胞或其组合物可与本领域已知的其它疗法结合。所述疗法包括但不限于化疗、放疗和免疫抑制剂。例如，可结合本领域周知的治疗CD19介导的疾病的放疗或化疗制剂进行治疗。

[0087] 本文中，“抗肿瘤效应”指一种生物学效应，其可由肿瘤体积的减少、肿瘤细胞数的减少、转移数的减少、预期寿命的增加或与癌相关的各种生理症状的改善表示。

[0088] “患者”、“对象”、“个体”等等在本文中可交换使用，指可引起免疫应答的活有机体，如哺乳动物。例子包括但不限于人、狗、猫、小鼠、大鼠和其转基因物种。

[0089] 本发明采用抗CD19抗体(具体是衍生自克隆号FMC63的scFV)的基因序列，并从NCBI GenBank数据库中搜索到人的CD8α铰链区、人的CD28跨膜区、人的CD28胞内区和人的CD3ζ胞内区基因序列信息，全基因合成嵌合抗原受体抗CD19 scFv-CD8铰链区-CD28TM-CD28-CD3ζ与抗CD19 scFv-CD8铰链区-CD28TM-CD28-CD3ζ-GMCSFR前导序列-tEGFR的基因片段，插入到逆转录病毒载体中。重组质粒在293T细胞中包装病毒，感染T细胞，使T细胞表达该嵌合抗原受体。本发明实现嵌合抗原受体基因修饰的T淋巴细胞的转化方法是基于逆转录病毒转化方法。该方法具有转化效率高，外源基因能够稳定表达，且可以缩短体外培养T淋巴细胞到达临床级数量的时间等优点。在该转基因T淋巴细胞表面，转化的核酸通过转录、翻译表达在其上。本发明制备的CAR-T细胞对特异性肿瘤细胞具强烈的杀伤功能，效靶比是5比1的情况下，杀伤效率超过80％。更进一步地，本发明的CAR还携带tEGFR组件，该组

件的空间构象可与药物级别的抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗紧密结合，可以作为细胞表面的标记，同时也适合T细胞的体内追踪(可通过流式和免疫组化检测)；也可以在体内被妥西单抗(cetuximab)清除，即不希望本发明的CAR发挥作用时可加入妥西单抗，安全有效的控制该CAR-T细胞在体内发挥作用。因此，本发明的CAR还具有体内示踪和安全开关的作用。

[0090] 本发明通过参考以下实验实施例进一步详细地进行描述。这些实施例仅出于说明性的目的提供，并不意欲为限制性的，除非另有规定。因此，本发明决不应被解释为限于以下实施例，而是应被解释为包括由于本文提供的教导变得显而易见的任何和全部的变化。实施例中所用的方法和试剂，除非另有说明，否则为本领域常规的方法和试剂。

[0091] 实施例1：CD19scFv-CD8α-CD28-CD3ζ基因序列的确定

[0092] 从NCBI网站数据库搜索到人的CD8α铰链区、人的CD28跨膜区和胞内区、人的CD3ζ胞内区基因序列信息，抗CD19单链抗体克隆号为FMC63，这些序列在网站http://sg.idtdna.com/site上进行密码子优化，保证在编码氨基酸序列不变的情况下更适合人类细胞表达。

[0093] 采用重叠PCR将上述序列依次按抗CD19scFv、人CD8α铰链区基因、人CD28跨膜区基因和胞内区基因、人CD3ζ胞内区基因序列进行连接，在各序列连接处引入不同酶切位点，形成完整的CD19-CAR基因序列信息。

[0094] 用NotI(NEB)和EcoRI(NEB)双酶切该CAR分子的核苷酸序列，经T4连接酶(NEB)连接插入逆转录病毒MSCV(Addgene)的NotI-EcoRI位点，转化到感受态大肠杆菌(DH5α)。

[0095] 将重组质粒送上海生工生物技术有限公司进行测序，将测序结果与拟合成CD19-CAR序列比对来验证序列是否正确。测序引物为：

[0096] 正义:AGCATCGTTCTGTGTTGTCTC

[0097] 反义:TGTTTGTCTTGTGGCAATACAC

[0098] 本实施例所构建得到的质粒图谱如图1所示。图2显示该逆转录病毒表达质粒的部分测序结果峰值图。

[0099] 实施例2：CD19CAR-GMCSFR leader-tEGFR基因序列的确定

[0100] 从NCBI网站数据库搜索到人的EGFR胞外区基因序列信息，序列在网站http://sg.idtdna.com/site上进行密码子优化，保证在编码氨基酸序列不变的情况下更适合人类细胞表达。

[0101] 采用重叠PCR将上述序列依次按实施例1的CD19CAR、2A、GMCSFR leader、tEGFR进行连接，在各序列连接处引入不同酶切位点，形成完整的CD19CAR-tEGFR基因序列信息。

[0102] 用NotI(NEB)和EcoRI(NEB)双酶切该CAR分子的核苷酸序列，经T4连接酶(NEB)连接插入逆转录病毒MSCV(Addgene)的NotI-EcoRI位点，转化到感受态大肠杆菌(DH5α)。

[0103] 将重组质粒送上海生工生物技术有限公司进行测序，将测序结果与拟合成的CD19CAR-tEGFR序列比对来验证序列是否正确。测序引物为：

[0104] 正义:AGCATCGTTCTGTGTTGTCTC

[0105] 反义:TGTTTGTCTTGTGGCAATACAC

[0106] 本实施例所构建得到的质粒图谱如图3所示。图4显示该逆转录病毒表达质粒的部分测序结果峰值图。

[0107] 实施例3：包含CAR分子的核酸序列的病毒载体的构建

[0108] 将实施例1中制备的CAR分子的核苷酸序列经NotI(NEB)和EcoRI(NEB)双酶切、经T4连接酶(NEB)连接插入逆转录病毒RV载体的NotI-EcoRI位点，转化到感受态E.coli(DH5α)，经测序正确后，使用Qiagen公司的质粒纯化试剂盒提取并纯化质粒，纯化质粒的质粒磷酸钙法转染293T细胞进行逆转录病毒包装实验。

[0109] 实施例4：逆转录病毒包装

[0110] 1.第1天293T细胞应是小于20代，不过分长满的。以0.6*10^6cells/ml铺板，10cm皿添加10ml的DMEM培养基，充分混匀细胞，37度培养过夜；

[0111] 2.第2天293T细胞融合度达到90％左右进行转染(通常是铺板14-18h左右)；准备质粒复合物，各种质粒的量为RV-CD19-28z-tEGFR为12.5ug，Gag-pol为10ug，VSVg为6.25ug，$CaCl_2$ 250ul，H_2O为1ml总体积为1.25ml；在另一个管里添加跟质粒复合物等体积的HBS，边加质粒复合物边涡旋震荡20s。温柔地将混合物沿着边加入到293T皿中，37度培养4h，去除培养基，PBS洗一遍，重新加入预热的新鲜培养基；

[0112] 3.第4天：转染48h后收集上清并用0.45um滤器过滤后分装保存于-80度，继续添加预热的新鲜DMEM培养基。

[0113] 实施例5：逆转录病毒感染人的T细胞

[0114] 1.用Ficcol分离液(天津灏洋)分离获得较纯的CD3+T细胞，用含5％AB血清X-VIVO(LONZA)培养基调整细胞密度为1×10^6/mL。将细胞以1ml/孔接种到预先用抗人50ng/ml CD3抗体(北京同立海元)和50ng/ml CD28抗体(北京同立海元)，再加入100IU/ml的白细胞介素2(北京双鹭)，刺激培养48小时后病毒感染。

[0115] 2.T细胞活化培养后隔天，PBS稀释至终浓度为15μg/ml的Retronectin(Takara)包被non-tissue treated培养板，24孔板每孔250μl。避光，4℃过夜备用。

[0116] 3.T细胞活化培养两天后，取出2块包被好的24孔板，吸弃包被液，加入含2％BSA的HBSS室温封闭30min。封闭液体积为每孔500μl，吸弃封闭液，用含2.5％HEPES的HBSS洗板两次。

[0117] 4.病毒液加入孔内，每孔加2ml病毒液，32℃，2000g，离心2h。

[0118] 5.弃去上清液，24孔板每孔加入活化后的T细胞1×10^6个，体积1ml，培养基为T细胞培养基中添加IL-2 200IU/ml。30℃，1000g，离心10min。

[0119] 6.离心完毕后，将培养板置于37℃，5％CO2培养箱中培养。

[0120] 7.感染后24h，将细胞悬液吸出，1200rpm，4℃，离心7min。

[0121] 8.细胞感染后，每天观察细胞的密度，适时补加含IL-2 100IU/ml的T细胞培养液，使T细胞的密度维持在5×10^5/ml左右，使细胞扩增。

[0122] 由此获得分别感染了实施例4所示逆转录病毒的CART细胞，分别命名为CD19CART细胞(表达实施例1的CD19CAR)和CD19-tEGFR CART细胞(表达实施例2的CD19CAR和tEGFR)。

[0123] 实施例6：流式细胞仪检测感染后T淋巴细胞表面CAR蛋白的表达

[0124] 分别离心收集感染后72小时的CAR-T细胞和NT细胞(对照组)，PBS洗涤1次后弃上清，加入相应的抗体避光30min后PBS洗涤，重悬，最后流式细胞仪检测CAR(anti-mouse IgG F(ab')antibody(Jackson Immunoresearch))。

[0125] 图5显示，使用实施例3制备得到的逆转录病毒感染T细胞72小时后，CD19-tEGFR CAR+的表达效率达78.731％，CD19-tEGFR CAR+的表达效率达61.82％。

[0126] 实施例7:CAR-T细胞与靶细胞共培养后CD107a脱颗粒作用

[0127] 1.取一块V底96孔板,每孔加CART/NT细胞2*10^5个和靶细胞(Raji)/对照细胞(K562)2*10^5个,重悬为200ul不含IL-2的X-VIVO完全培养基,加入BD GolgiStop(含monesin,每1ml培养基中加入1μl BD GolgiStop),每孔加入2ul CD107a抗体(1:50),37℃孵育4小时,收集细胞。

[0128] 2.将样品离心去除培养基,PBS洗细胞一次,400g,4℃离心5分钟。弃上清,每管加入适量特异性表面抗体CD3(Biolegend)、CD4(Biolegend)、CD8(Biolegend),重悬体积100ul,冰上避光孵育30分钟。

[0129] 3.每管用3mL的PBS清洗细胞1次,400g离心5分钟。仔细吸去上清。

[0130] 4.适量PBS重悬,流式细胞仪检测CD107a。

[0131] 显示在图6中。图6显示,CD19CART细胞和CD19-tEGFR CART细胞在与Raji细胞共培养后CD8阳性细胞中CD107a脱颗粒的百分率分别为81%和90.2%;CD19CART细胞和CD19-tEGFR CART细胞在与Raji细胞共培养后CD4阳性细胞中CD107a脱颗粒的百分率分别为74.6%和78.4%。

[0132] 实施例8:CAR-T细胞与靶细胞共培养后IFNγ分泌检测

[0133] 1.取制备好的CAR-T细胞,重悬与Lonza培养基中,调整细胞浓度为1×10^6/mL。

[0134] 2.实验组每孔含靶细胞(Raji)或阴性对照细胞(K562)2×10^5个,CAR-T/NT细胞2×10^5个,200μl不含IL-2的Lonza培养基。充分混匀后加入96孔板中。加入BD GolgiStop(含monesin,每1ml培养基中加入1μl BD GolgiStop),充分混匀后,37℃孵育5小时。收集细胞,作为实验组。

[0135] 3.每管用1mL的PBS清洗细胞1次,300g离心5分钟。仔细吸去或倒掉上清。

[0136] 4.PBS洗细胞后,加入250μl/EP管Fixation/Permeabilization solution,4℃孵育20分钟以固定细胞及破膜。用1×BD Perm/Wash™ buffer清洗细胞2次,1mL/次。

[0137] 5.进行胞内因子染色,取适量IFN-γ细胞因子荧光抗体或阴性对照,用BD Perm/Wash™ buffer稀释至50μl。用此抗体稀释液充分重悬已固定破膜的细胞,4℃避光孵育30min,1×BD Perm/Wash™ buffer 1mL/次清洗细胞2次,然后用PBS重悬。

[0138] 6.流式细胞仪检测。

[0139] 显示在图7中。图7显示,CD19 CART细胞和CD19-tEGFR CART细胞在与Raji细胞共培养后CD8阳性细胞中INF-γ分泌的百分率分别为6.46%和7.73%;CD19 CART细胞和CD19-tEGFR CART细胞在与Raji细胞共培养后CD4阳性细胞中INF-γ分泌的百分率分别为12.2%和14.7%。

[0140] 实施例9:CAR-T细胞与靶细胞共培养后检测肿瘤特异性细胞杀伤作用

[0141] 1.K562细胞(不含CD19靶蛋白,为靶细胞的阴性对照细胞)重悬在无血清培养基(1640)中,调整细胞浓度为1×10^6/ml,加入荧光染料BMQC(2,3,6,7-tetrahydro-9-bromomethyl-1H,5Hquinolizino(9,1-gh)coumarin)至终浓度为5μM。

[0142] 2.混匀,37℃孵育30min。

[0143] 3.室温,1500rpm离心5min,弃上清,并重悬细胞于细胞毒性培养基(无酚红1640+5%AB血清)中,37℃孵育60min。

[0144] 4.新鲜细胞毒性培养基清洗细胞两遍,并重悬在新鲜细胞毒性培养基中,密度1×

10^6/ml。

[0145] 5.Raji细胞(含CD19靶蛋白,为靶细胞)悬浮在含有0.1%BSA的PBS中,调整浓度为1×10^6/ml。

[0146] 6.加入荧光染料CFSE(carboxyfluoresceindiacetatesuccinimidyl ester)至终浓度为1μM。

[0147] 7.混匀,37℃孵育10min。

[0148] 8.孵育结束后,加入与细胞悬液等体积的FBS,室温孵育2min以终止标记反应。

[0149] 9.清洗细胞并重悬在新鲜细胞毒性培养基中,密度1×10^6/ml。

[0150] 10.清洗效应T细胞并悬浮在细胞毒性培养基中,调整浓度为5×10^6/ml。

[0151] 11.在所有的实验中,感染了CD19-28z-tEGFR CAR的效应T细胞(CAR-T cell)的细胞毒性和未感染的阴性对照效应T细胞(NT cel l)的细胞毒性做比较,并且这些效应T细胞来自同一个病人。

[0152] 12.CD19-28z-tEGFR CAR-T和阴性对照效应T细胞,按照T细胞:靶细胞=5:1,1:1,的比例,于5ml无菌试验管(BD Biosciences)进行培养。每一个共培养组中,靶细胞为Raj i细胞100,000个(50μl),阴性对照细胞为100,000个K562细胞(50μl)。同时设置一组只包含Raji靶细胞和K562阴性对照细胞。

[0153] 13.将共培养细胞置于37℃孵育5h。

[0154] 14.孵育完成后,PBS清洗细胞,然后立即按照说明书推荐的浓度快速加入7-AAD(7-aminoactinomycin D),冰上孵育30min。

[0155] 15.不需清洗,直接进行流式上机检测,数据用Flow Jo进行分析。

[0156] 16.分析使用7AAD阴性的活细胞设门,测定T细胞和靶细胞共培养后活的Raji靶细胞和活的K562阴性对照细胞的比例。

[0157] a)对于每一组共培养的T细胞和靶细胞,

[0158] 17.靶细胞存活%=Raji活细胞数/K562活细胞数。

[0159] a)细胞毒性杀伤细胞%=100-校准的靶细胞存活%,即(无效应细胞时Raji活细胞数-含效应细胞时Raji活细胞数)/K562活细胞数的比例。

[0160] 结果显示在图8中。图8显示,在效靶比为5:1情况下,CD19CART细胞和CD19-tEGFR CART细胞对靶细胞Raj i的杀伤效率分别为78%和80%。

[0161] 实施例10:CD19-28z-tEGFR CART细胞tEGFR刹车体外功能的检测(ADCC)

[0162] 从PBMC中分离NK细胞(美天旎NK isolation kit)作为效应细胞,按1:1与CD19-28z CART或CD19-28z-tEGFR CART共培养,加入或不加入西妥昔单抗(Cetuximab)终浓度10ug/mL,4h后,流式检测CD3和CAR表达。

[0163] ADCC百分比=(1-单抗组CAR阳性率/无抗体组CAR阳性率)*100%

[0164] 结果显示在图9中。图9显示CD19-tEGFR CART细胞对NK细胞的ADCC效应为41%。

[0001] 序列表

[0002] <110> 上海恒润达生生物科技有限公司

[0003] <120> 靶向CD19-CD28-tEGFR的嵌合抗原受体及其用途

[0004] <160> 1

[0005] <170> PatentIn version 3.3

[0006] <210> 1

[0007] <211> 2619

[0008] <212> DNA

[0009] <213> 人工序列

[0010] <400> 1

[0011] atggctctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgccgctcgg 60

[0012] cctgacattc agatgactca gaccacaagc agcctcagtg cgagcctggg ggacagggtg 120

[0013] actatcagct gccgggccag ccaggacatt tccaagtacc tgaattggta ccagcagaag 180

[0014] cccgatggta ctgtgaaact cctgatatat catacttcta ggctccattc cggggttcca 240

[0015] agccgattca gtggctccgg ttccggtaca gattattccc tgaccattag caacttggaa 300

[0016] caggaggaca ttgcaacgta tttctgtcag caaggcaaca cattgcccta cacattcggg 360

[0017] ggcgggacta aactcgaaat aactggcggc ggggttctg gtggcggcgg cagcggcggt 420

[0018] ggaggatcag aagtgaagct gcaggaaagt ggccccgggc tggtagcccc aagtcagtcc 480

[0019] ctgagtgtaa cctgtacagt gagtggagtg tctcttcctg actacggggt aagttggatt 540

[0020] cggcaacctc cacgcaaggg cctggagtgg ctcggcgtga tttggggatc tgagacaact 600

[0021] tactacaatt ccgccctgaa gagcaggctg accatcatta aggacaatag caagtcacag 660

[0022] gtgtttctga agatgaactc actgcagacc gacgacaccg ccatctatta ctgcgccaaa 720

[0023] cattattatt atggcgggag ttatgctatg gactactggg gccagggcac tagcgtcacc 780

[0024] gtcagcagta ctacaactcc agcacccaga ccccctacac ctgctccaac tatcgcaagt 840

[0025] cagcccctgt cactgcgccc tgaagcctgt cgccctgctg ccgggggagc tgtgcatact 900

[0026] cggggactgg actttgcctg tgatatctac ttctgggtgc tggtcgtggt cggaggggtg 960

[0027] ctggcctgtt atagcctgct ggtgactgtc gccttcatta tcttctgggt gcggagcaag 1020

[0028] aggtctcgcg gtgggcattc cgactacatg aacatgaccc ctagaaggcc tggcccaacc 1080

[0029] agaaagcact accagccata cgcccctccc agagatttcg ccgcttatcg aagcgtgaag 1140

[0030] ttctcccgaa gcgcagatgc cccagcctat cagcagggac agaatcagct gtacaacgag 1200

[0031] ctgaacctgg gaagacggga ggaatacgat gtgctggaca aaaggcgggg cagagatcct 1260

[0032] gagatgggcg gcaaaccaag acggaagaac ccccaggaag gtctgtataa tgagctgcag 1320

[0033] aaagacaaga tggctgaggc ctactcagaa atcgggatga agggcgaaag aaggagagga 1380

[0034] aaaggccacg acggactgta ccaggggctg agtacagcaa caaaagacac ctatgacgct 1440

[0035] ctgcacatgc aggctctgcc accaagacga gctaaacgag gctcaggcgc gacgaacttt 1500

[0036] agtttgctga agcaagctgg ggatgtagag gaaaatccgg gtcccatgtt gctccttgtg 1560

[0037] acgagcctcc tgctctgcga gctgccccat ccagccttcc tcctcatccc gcggaaggtg 1620

[0038] tgcaatggca taggcattgg cgagtttaaa gattctctga gcataaatgc tacgaatatt 1680

[0039] aagcatttca agaattgtac ttctattagt ggcgacctcc atattcttcc ggttgccttc 1740

[0040] aggggtgact ctttcaccca cacacctcca ttggatccac aagaacttga catcctgaag 1800

[0041] acggttaaag agattacagg cttcctcctt atccaagcgt ggcccgagaa cagaacggac 1860

[0042] ttgcacgcct ttgagaacct cgaaataata cggggtcgga cgaagcaaca cggccaattt 1920
[0043] agccttgcgg ttgttagtct gaacattact tctctcggcc ttcgctcttt gaaagaaatc 1980
[0044] agcgacggag atgtcatcat tagtggaaac aagaacctgt gctacgcgaa cacaatcaac 2040
[0045] tggaagaagc tcttcggtac ttcaggccaa aagacaaaga ttattagtaa cagaggagag 2100
[0046] aatagctgta aggctaccgg acaagtttgt cacgccttgt gtagtccaga gggttgctgg 2160
[0047] ggaccggaac caagggattg cgtcagttgc cggaacgtga gtcgcggacg cgagtgtgtg 2220
[0048] gataagtgca atcttctgga aggggaaccg cgagagtttg tagaaaattc cgaatgtata 2280
[0049] cagtgtcatc ccgagtgtct tccacaagca atgaatatca catgtacagg gaggggtcct 2340
[0050] gataactgta tccaatgtgc acactacata gatggtcctc actgtgtaaa gacgtgcccc 2400
[0051] gccggagtaa tgggtgaaaa caacaccctc gtgtggaagt acgccgatgc cgggcatgtc 2460
[0052] tgtcatttgt gtcatcccaa ctgcacatat ggctgtaccg gtcctggatt ggagggctgt 2520
[0053] ccaacaaacg ggccgaaaat accgagtatc gcaacaggca tggtgggagc acttttgctt 2580
[0054] ctcctcgttg tcgccctggg catcggcttg ttcatgtga 2619
[0055] <160> 1
[0056] <170> PatentIn version 3.3
[0057] <210> 2
[0058] <211> 873
[0059] <212> PRT
[0060] <213> 人工序列
[0061] <400> 2
[0062] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0063] 1 5 10 15
[0064] His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
[0065] 20 25 30
[0066] Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
[0067] 35 40 45
[0068] Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
[0069] 50 55 60
[0070] Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
[0071] 65 70 75 80
[0072] Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
[0073] 85 90 95
[0074] Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
[0075] 100 105 110
[0076] Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
[0077] 115 120 125
[0078] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
[0079] 130 135 140
[0080] Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser
[0081] 145 150 155 160
[0082] Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
[0083] 165 170 175

[0084] Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
[0085] 180 185 190
[0086] Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
[0087] 195 200 205
[0088] Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
[0089] 210 215 220
[0090] Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
[0091] 225 230 235 240
[0092] His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0093] 245 250 255
[0094] Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
[0095] 260 265 270
[0096] Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
[0097] 275 280 285
[0098] Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
[0099] 290 295 300
[0100] Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val
[0101] 305 310 315 320
[0102] Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp
[0103] 325 330 335
[0104] Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met
[0105] 340 345 350
[0106] Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala
[0107] 355 360 365
[0108] Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Val Lys Phe Ser Arg Ser
[0109] 370 375 380
[0110] Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
[0111] 385 390 395 400
[0112] Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
[0113] 405 410 415
[0114] Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
[0115] 420 425 430
[0116] Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
[0117] 435 440 445
[0118] Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
[0119] 450 455 460
[0120] Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
[0121] 465 470 475 480
[0122] Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly
[0123] 485 490 495
[0124] Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
[0125] 500 505 510

[0126] Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu
[0127] 515 520 525
[0128] Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile
[0129] 530 535 540
[0130] Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile
[0131] 545 550 555 560
[0132] Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu
[0133] 565 570 575
[0134] Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp
[0135] 580 585 590
[0136] Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe
[0137] 595 600 605
[0138] Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe
[0139] 610 615 620
[0140] Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe
[0141] 625 630 635 640
[0142] Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser
[0143] 645 650 655
[0144] Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn
[0145] 660 665 670
[0146] Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser
[0147] 675 680 685
[0148] Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys
[0149] 690 695 700
[0150] Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp
[0151] 705 710 715 720
[0152] Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly
[0153] 725 730 735
[0154] Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu
[0155] 740 745 750
[0156] Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro
[0157] 755 760 765
[0158] Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile
[0159] 770 775 780
[0160] Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro
[0161] 785 790 795 800
[0162] Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp
[0163] 805 810 815
[0164] Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys
[0165] 820 825 830
[0166] Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro
[0167] 835 840 845

[0168] Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val
[0169] 850 855 860
[0170] Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
[0171] 865 870
[0172] <210> 3
[0173] <211> 21
[0174] <212> DNA
[0175] <213> 人工序列
[0176] <220>
[0177] <223> 引物
[0178] <400> 3
[0179] agcatcgttc tgtgttgtct c 21
[0180] <210> 4
[0181] <211> 22
[0182] <212> DNA
[0183] <213> 人工序列
[0184] <220>
[0185] <223> 引物
[0186] <400> 4
[0187] tgtttgtctt gtggcaatac ac 22
[0188] <210> 5
[0189] <211> 21
[0190] <212> DNA
[0191] <213> 人工序列
[0192] <220>
[0193] <223> 引物
[0194] <400> 5
[0195] agcatcgttc tgtgttgtct c 21
[0196] <210> 6
[0197] <211> 22
[0198] <212> DNA
[0199] <213> 人工序列
[0200] <220>
[0201] <223> 引物
[0202] <400> 6
[0203] tgtttgtctt gtggcaatac ac 22
[0204] <210> 7
[0205] <211> 21
[0206] <212> PRT
[0207] <213> 人工序列
[0208] <220>
[0209] <223> 接头序列

[0210] <400> 7

[0211] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Leu

[0212] 1 5 10 15

[0213] Gly Ser Thr Glu Phe

[0214] 20

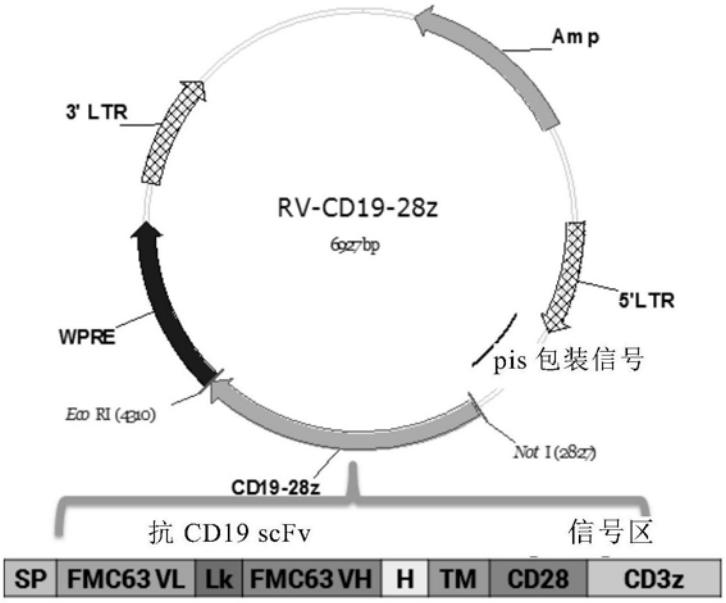

Amp
3' LTR
RV-CD19-28z
6927bp
5'LTR
WPRE
pis 包装信号
Eco RI (4310)
Not I (28z)
CD19-28z
抗 CD19 scFv
信号区
SP
FMC63 VL
Lk
FMC63 VH
H
TM
CD28
CD3z

图1

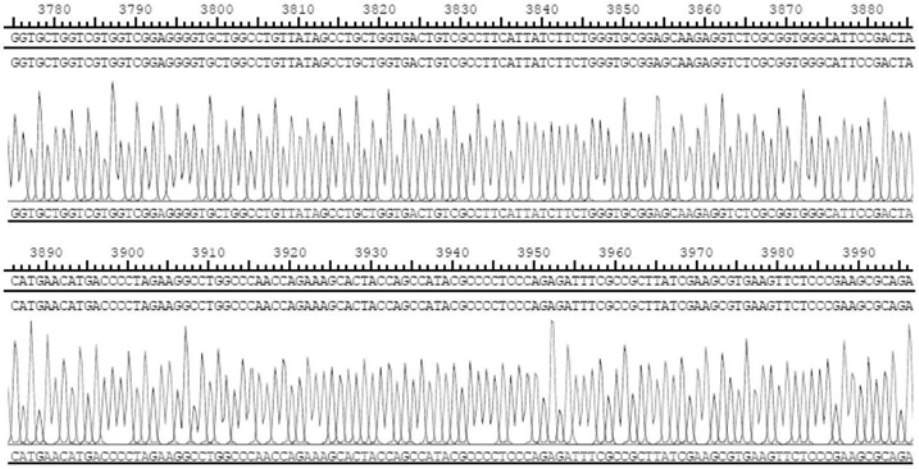


图2

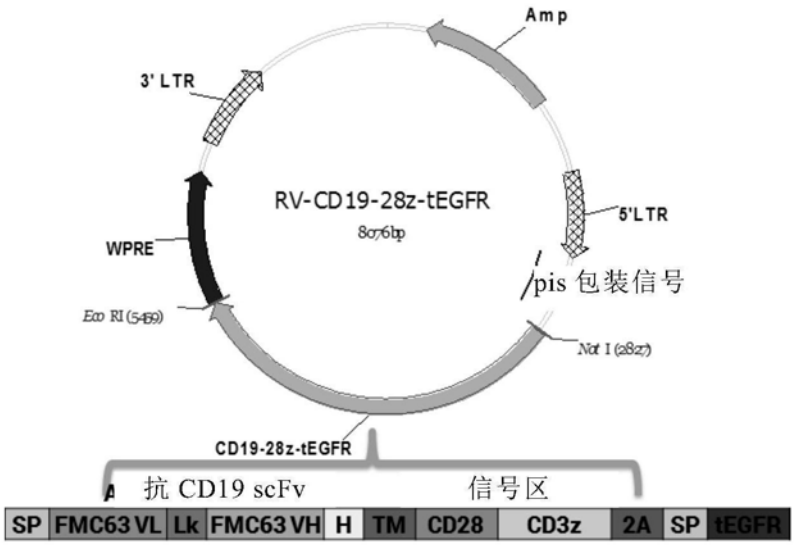

Amp
3' LTR
RV-CD19-28z-tEGFR
8076bp
5'LTR
WPRE
pis 包装信号
Eco RI (5459)
Not I (2827)
CD19-28z-tEGFR
抗 CD19 scFv
信号区
SP
FMC63 VL
Lk
FMC63 VH
H
TM
CD28
CD3z
2A
SP
tEGFR

图3

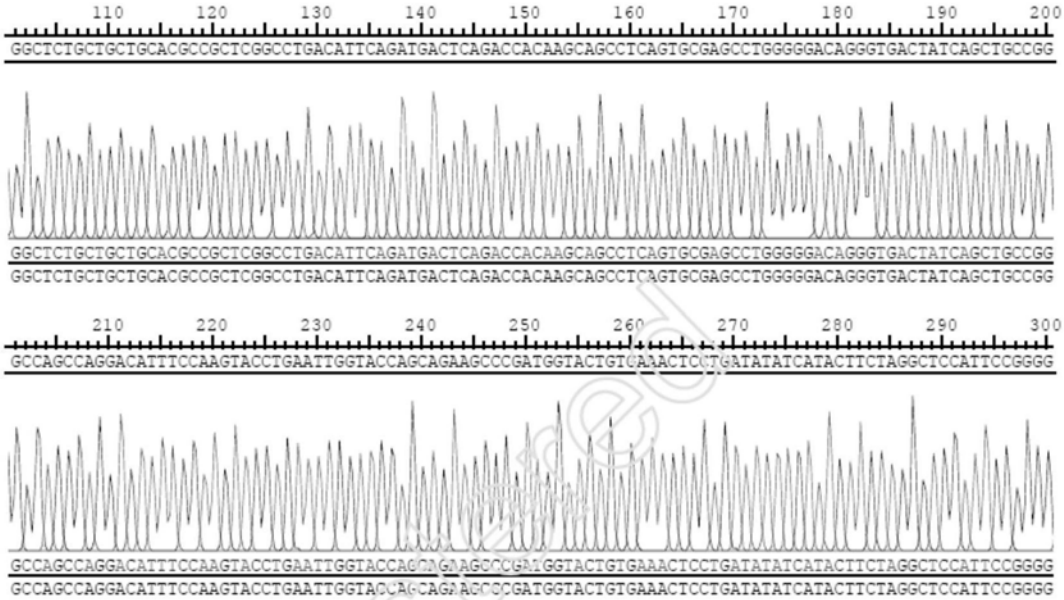

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
GGCTCTGCTGCTGCACGCCGCTCGGCCTGACATTCAGATGACTCAGACCACAAGCAGCCTCAGTGCGAGCCTGGGGGACAGGGTGACTATCAGCTGCCGG
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
GCCAGCCAGGACATTTCCAAGTACCTGAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGATGGTACTGTGAAACTCCTGATATATCATACTTCTAGGCTCCATTCCGGGG

图4

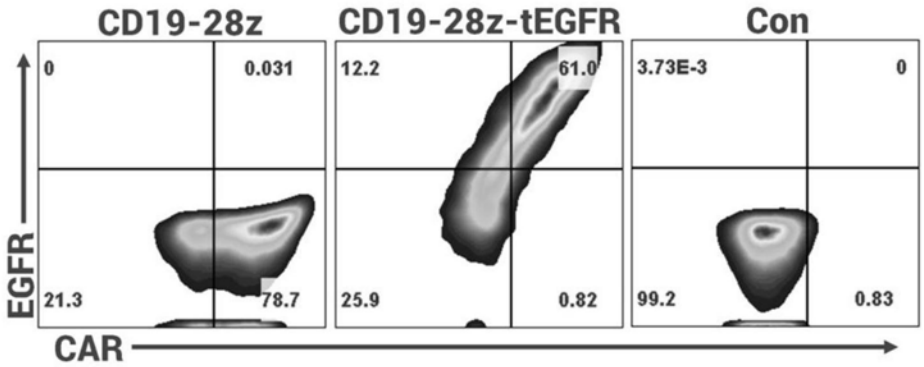

CD19-28z
CD19-28z-tEGFR
Con
0
0.031
12.2
61.0
3.73E-3
0
21.3
78.7
25.9
0.82
99.2
0.83
EGFR
CAR

图5

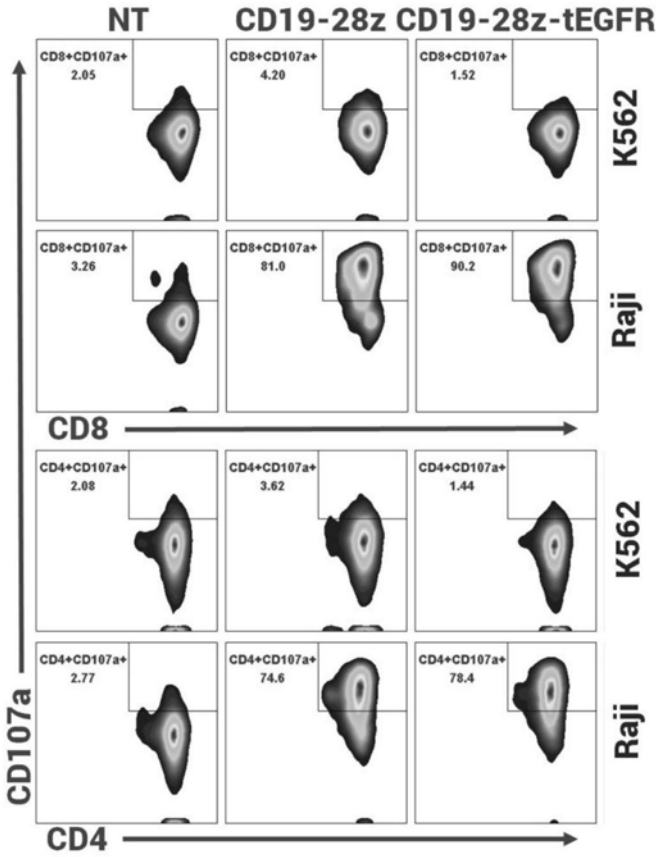

NT
CD19-28z
CD19-28z-tEGFR
CD8+CD107a+
2.05
4.20
1.52
K562
3.26
81.0
90.2
Raji
CD8
CD4+CD107a+
2.08
3.62
1.44
K562
2.77
74.6
78.4
Raji
CD107a
CD4

图6

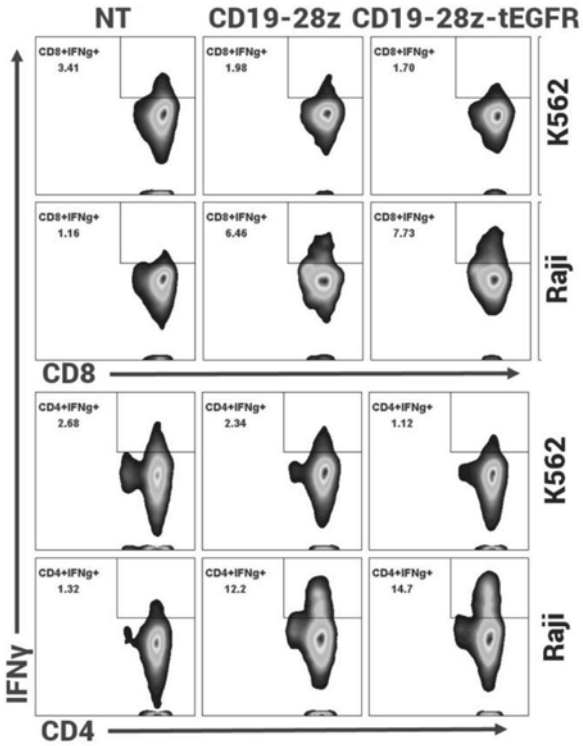

NT
CD19-28z
CD19-28z-tEGFR
CD8+IFNg+
3.41
CD8+IFNg+
1.98
CD8+IFNg+
1.70
K562
CD8+IFNg+
1.16
CD8+IFNg+
6.46
CD8+IFNg+
7.73
Raji
CD8
CD4+IFNg+
2.68
CD4+IFNg+
2.34
CD4+IFNg+
1.12
K562
CD4+IFNg+
1.32
CD4+IFNg+
12.2
CD4+IFNg+
14.7
Raji
IFNγ
CD4

图7

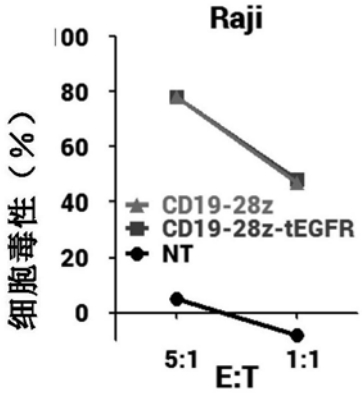
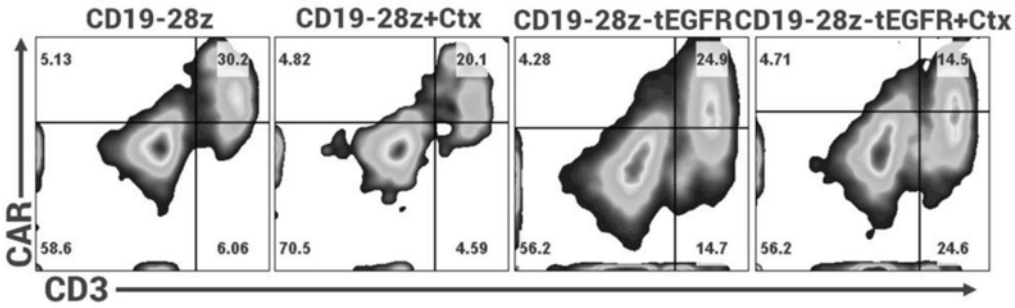

Raji
100
80
60
40
20
0
细胞毒性（%）
CD19-28z
CD19-28z-tEGFR
NT
5:1
1:1
E:T

图8


CD19-28z
CD19-28z+Ctx
CD19-28z-tEGFR
CD19-28z-tEGFR+Ctx
5.13
30.2
58.6
6.06
4.82
20.1
70.5
4.59
4.28
24.9
56.2
14.7
4.71
14.5
56.2
24.6
CAR
CD3

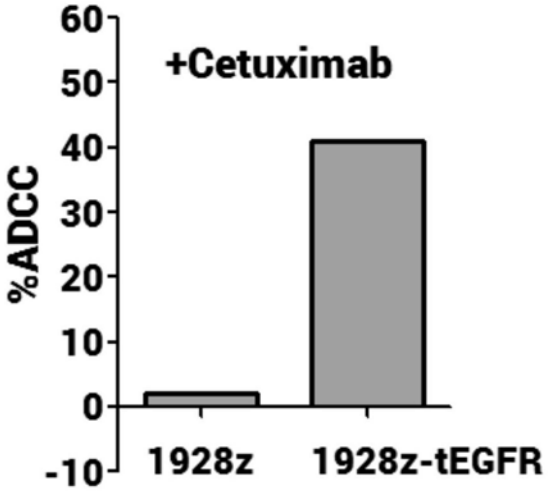

+Cetuximab
%ADCC
60
50
40
30
20
10
0
-10
1928z
1928z-tEGFR

图9