



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106543288 A

(43)申请公布日 2017.03.29

(21)申请号 201610936628.1

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2016.10.24

(71)申请人 山东兴瑞生物科技有限公司

地址 261500 山东省潍坊市高密市高新技术产业开发区

(72)发明人 刘明录 吴东颖 万磊 金海峰
冯健海 强邦明 马洪华

(74)专利代理机构 昆明合众智信知识产权事务
所 53113

代理人 李松松

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

权利要求书2页 说明书8页
序列表3页 附图6页

(54)发明名称

一种间皮素嵌合抗原受体修饰的T细胞制备及胰腺癌治疗上的应用

(57)摘要

本发明提供了一种间皮素嵌合抗原受体修饰的T细胞制备及胰腺癌治疗上的应用,公开了一种嵌合抗原受体,特别是结合一个粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子受体作为导引序列的嵌合抗原受体;本发明还涉及表达所述嵌合抗原受体的T细胞,所述T细胞可靶向杀伤高表达间皮素的肿瘤细胞,并具有可制备治疗胰腺癌恶性肿瘤及病毒感染性疾病的药物的用途。

1. 一种嵌合抗原受体,其特征在於:所述嵌合抗原受体包括人源化抗人胰腺癌等肿瘤的抗原——间皮素的单链抗体、跨膜结构域、共刺激信号传导区和CD3 ζ 信号传导结构域,并结合一个粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子受体作为导引序列。

2. 如权利要求1所述的一种嵌合抗原受体,其特征在於:所述嵌合抗原受体包括人源化抗人胰腺癌等肿瘤的抗原——间皮素的单链抗体、CD8的Hinge区和跨膜区、CD28、CD137和CD3 ζ 的胞内信号结构域的核苷酸序列依次连接起来,并结合一个粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子受体作为导引序列。

3. 一种制备嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 修饰的T细胞的方法,其特征在於:将人源化抗人胰腺癌等肿瘤的抗原——间皮素的单链抗体、CD8的Hinge区和跨膜区、CD28、CD137和CD3 ζ 的胞内信号结构域的核苷酸序列依次连接起来,并结合一个粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子受体作为导引序列,得到编码嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的融合基因片段,将所述融合基因片段插入慢病毒表达载体,包装成携带(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 编码基因的慢病毒,将所述携带(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 编码基因的慢病毒感染患者自体单核细胞诱导的异质T淋巴细胞,得到表达嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的T淋巴细胞。

4. 如权利要求3所述的制备嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的T淋巴细胞的方法,其特征在於:所述的编码嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的融合基因片段为序列表SEQ. ID. NO. 1所示的核苷酸序列。

5. 如权利要求3所述的制备嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的T淋巴细胞(CIK)的方法,其特征在於,所述患者自体淋巴细胞诱导的CIK如下制备:取患者自体外周血,分离外周血单个核细胞,用含有重组干扰素的培养基诱导培养24小时后,加入重组白细胞介素、OKT-3和5%的患者自体血浆诱导继续培养24小时;每隔三天倍比加液,培养至第14天,流式细胞术检测CIK细胞的分子标记CD3 $^{+}$ 、CD56 $^{+}$ 的阳性表达率;当CD3 $^{+}$ 阳性率 $>80\%$,CD3 $^{+}$ CD56 $^{+}$ 双阳性率 $>20\%$,视为CIK诱导成功,收获患者自体淋巴细胞诱导的CIK。

6. 如权利要求3所述的制备嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的T淋巴细胞的方法,其特征在於,将所述携带(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 编码基因的慢病毒感染患者自体淋巴细胞诱导的CIK如下操作:所述携带(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 编码基因的慢病毒转染293T细胞后,所述293T细胞释放慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒感染患者自体T淋巴细胞。

7. 如权利要求3所述的制备嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的T淋巴细胞的方法,其特征在於,所述编码嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的融合基因片段如下制取:通过基因合成技术将编码粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子受体,CD8的Hinge区和跨膜区,CD28、CD137和CD3 ζ 的胞内信号结构域的核苷酸序列构成融合片段(GM-CSF)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ ,然后通过重叠延伸PCR将scFv-meso和融合片段(GM-CSF)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 拼接成所述编码嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的基因片段。

8. 一种治疗癌症的药物,其特征在於:含有权利要求3所述的嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 修饰的T细胞。

9. 权利要求3所述的嵌合抗原受体 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 修饰的T细胞用于制备治疗恶性肿瘤的药物的用途。

一种间皮素嵌合抗原受体修饰的T细胞制备及胰腺癌治疗上的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物与新医药技术领域,更具体的说,是一种间皮素嵌合抗原受体修饰的T细胞制备及胰腺癌治疗上的应用。

背景技术

[0002] 胰腺癌(pancreatic carcinoma)是一种恶性程度高,诊断和治疗都很困难的消化道恶性肿瘤,约90%为起源于腺管上皮的导管腺癌。胰腺癌早期的确诊率低,治愈率极低,是预后最差的恶性肿瘤之一,5年生存率<1%。导致死亡的主要原因是胰腺癌引起的转移性疾病,肿瘤的浸润和转移是一个连续的过程,由粘附分子介导,通过蛋白酶使细胞外基质(extracellular,ECM)降解和血管生成。胰腺癌可发生于胰腺的头、体、尾部或累及整个胰腺,但以胰头部最多,约占胰腺癌的60%~70%,发生于胰体者次之,尾部最少见。肉眼下肿瘤呈圆形或卵圆形,边界弥漫浸润与临近胰腺组织难以分辨。胰腺癌的治疗是众所周知的难题,它召集人体的天然免疫系统在肿瘤周围建造一个坚固的物理屏障,使杀死肿瘤细胞的免疫细胞不能穿透屏障。而且,胰腺癌肿瘤组织可以在相当匮乏的供血下生存,因此,传统化疗(血液循环给药)很难进入癌肿瘤内部。

[0003] 嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor,CAR)是一种将靶细胞表面抗原受体与T细胞信号分子融合而成的合成受体,能够增加T细胞的靶向性、杀伤能力和作用持久性。近年来,CAR-T细胞在B细胞恶性血液系统肿瘤治疗中取得了惊人的突破。例如,在临床应用中,CAR-T细胞对CD19阳性的难治复发白血病细胞的靶向杀伤作用及高缓解率(80~90%)的临床疗效。这一事实不仅再次证实了免疫细胞治疗的临床价值,同时也激发了学者对于实体肿瘤相关抗原和CAR-T细胞技术的拓展热情。然而在实体瘤中应用CAR-T细胞面临着诸多问题,实体肿瘤和血液肿瘤本身特质上的差异决定了这种治疗模式必须重新斟酌其细胞治疗本身的特点、作用规律等因素。例如,实体瘤具有高度异质性、等级性、转移性的特点,主要从CAR-T治疗安全性,实体肿瘤靶点的选择,多种CAR-T多靶点的组合治疗,CAR-T细胞的体内归巢与活化维持上就CAR-T的实体瘤治疗策略。

[0004] 间皮素(Mesothelin)是由体腔中的间皮细胞(mesothelial cells)所产生,一种细胞表面糖基化磷脂酰肌醇连接的糖蛋白,分子量为40kDa,是早期胰腺癌的肿瘤细胞表面的分子标记。几乎所有的胰腺癌组织都过量产生间皮素,而在正常组织中少量表达,早期研究表明,在所有74名胰腺癌患者中,有73名患者血液间皮素的水平要明显高于健康人。美国FredHutchinson癌症研究中心研究发现,间皮素可作为CAR-T细胞的设计靶点,识别并攻击胰腺癌细胞,该研究表明接受识别非癌蛋白的T细胞治疗的动物在它们检测到胰腺癌后平均生存54天,接受CAR(间皮素)-T细胞治疗的动物平均生存96天,即在胰腺癌晚期可延长78%的生存期,该研究成果也发表在《Cancer Cell》上。由于肿瘤病人对自身抗原的免疫耐受和肿瘤细胞的免疫逃逸,使得免疫治疗的效果受到局限,为了克服这些障碍,本发明设计了表达嵌合抗原受体(CAR-mesothelin)的肿瘤抗原特异性T细胞,能够特异性地与表达相

关抗原(间皮素)的肿瘤细胞特异性结合,达到直接进行肿瘤杀伤的目的。

发明内容

[0005] 本发明提供了一个可结合粒细胞-巨噬细胞簇因子受体的嵌合抗原受体(CAR),表达所述嵌合抗原受体的免疫反应细胞,以及所述免疫反应细胞用于制备治疗恶性肿瘤及病毒感染性疾病的药物中的用途。

[0006] 本发明的方案是:

[0007] 一种分离的嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包括人源化抗人胰腺癌等肿瘤的抗原——间皮素的单链抗体、跨膜结构域、共刺激信号传导区和CD3 ζ 信号传导结构域,并结合一个粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子受体作为导引序列。

[0008] 作为优选的技术方案,所述嵌合抗原受体包括人源化抗人胰腺癌等肿瘤的抗原——间皮素的单链抗体、CD8的Hinge区和跨膜区、CD28、CD137和CD3 ζ 的胞内信号结构域的核苷酸序列依次连接起来,并结合一个粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子受体作为导引序列。

[0009] 本发明还提供一种嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 修饰的T细胞的制备方法,将人源化抗人胰腺癌等肿瘤的抗原——间皮素的单链抗体、CD8的Hinge区和跨膜区、CD28、CD137和CD3 ζ 的胞内信号结构域的核苷酸序列依次连接起来,并结合一个粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子受体作为导引序列,得到编码嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的融合基因片段,将所述融合基因片段插入慢病毒表达载体,包装成携带(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 编码基因的慢病毒,将所述携带(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 编码基因的慢病毒感染患者自体单核细胞诱导的异质T淋巴细胞,得到表达嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的T淋巴细胞。

[0010] 作为优选的技术方案,所述的编码嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的融合基因片段为序列SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列。

[0011] 作为优选的技术方案,所述患者自体淋巴细胞诱导的CIK如下制备:取患者自体外周血,分离外周血单个核细胞,用含有重组干扰素的培养基诱导培养24小时后,加入重组白细胞介素、OKT-3和5%的患者自体血浆诱导继续培养24小时;每隔三天倍比加液,培养至第14天,流式细胞术检测CIK细胞的分子标记CD3 $^{+}$ 、CD56 $^{+}$ 的阳性表达率;当CD3 $^{+}$ 阳性率 $>80\%$,CD3 $^{+}$ CD56 $^{+}$ 双阳性率 $>20\%$,视为CIK诱导成功,收获患者自体淋巴细胞诱导的CIK。

[0012] 作为优选的技术方案,将所述携带(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 编码基因的慢病毒感染患者自体淋巴细胞诱导的CIK如下操作:所述携带(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 编码基因的慢病毒转染293T细胞后,所述293T细胞释放慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒感染患者自体T淋巴细胞。

[0013] 作为优选的技术方案,所述编码嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的融合基因片段如下制取:通过基因合成技术将编码粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子受体,CD8的Hinge区和跨膜区,CD28、CD137和CD3 ζ 的胞内信号结构域的核苷酸序列构成融合片段(GM-CSF)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ ,然后通过重叠延伸PCR将scFv(meso)和融合片段(GM-CSF)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 拼接成所述编码嵌合抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的基因片段。

[0014] 权利要求3所述的嵌合抗原受体 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 修饰的T细胞用于制备治疗恶性肿瘤的药物的用途。

[0015] 所述恶性肿瘤为胰腺癌,但并不局限于胰腺癌,还可以治疗间皮瘤和肺癌,乳腺癌,卵巢癌等肿瘤。

[0016] 由于采用了上述技术方案,将人源化抗人胰腺癌等肿瘤的抗原——间皮素的单链抗体、CD8的Hinge区和跨膜区、CD28、CD137和CD3 ζ 的胞内信号结构域的核苷酸序列依次连接起来,并结合一个粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子受体作为导引序列,得到编码嵌合抗原受体 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的融合基因片段,将所述融合基因片段插入慢病毒表达载体,包装成携带 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 编码基因的慢病毒,将所述携带 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 编码基因的慢病毒感染患者自体单核细胞诱导的异质T淋巴细胞,得到表达嵌合抗原受体 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的T淋巴细胞,抗原结合区包含一个导引子序列。导引子序列放在轻链可变区的氨基末端。本发明中的导引子序列是人粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子 (GM-CSF) 受体序列,粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子是一种单聚体糖蛋白,它的作用是通过信号传导激活细胞的转录和翻译,加强重组核苷酸序列在宿主细胞的表达。

[0017] 本发明中嵌合抗原受体 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的T淋巴细胞各模块。

[0018] (1) 一个抗原结合区 (scFv)

[0019] 本发明的嵌合抗原受体 (CAR) 提供了抗体的抗原结合区,抗原结合区可识别并与靶细胞表面的特定抗原结合。本发明中的特定抗原为间皮素抗原。抗原结合区可以是一个抗原结合位点,本发明使用单链可变区 (scFv) 抗体片段。

[0020] 本发明的单链可变区包括重链可变区、轻链可变区和连接子,为人源化抗间皮素抗原的单链可变区。本发明包括一个连接子,抗原可变区的重链可变区与轻链可变区通过连接子连接。单链可变区序列见序列表SEQ ID NO.3。

[0021] 本发明中的嵌合抗原受体中的功能部分,可能在这些功能部位的氨基和/或羧基端添加有额外的氨基酸,这些额外添加的氨基酸并不干扰嵌合抗原受体功能部分的生物功能,例如,识别和结合靶细胞,达到治疗和预防的目的。反而,这些额外添加的氨基酸能够加强嵌合抗原受体的生物学功能。如在谷氨酰胺的氨基端添加一个精氨酸,苏氨酸的氨基末端添加酪氨酸等,以增加嵌合抗原受体与特异性抗原(间皮素)的亲和力。Gln-Asn, Thr-Tyr, Cys-Met, Ala-Ile, Phe-Val, Pro-Gly。

[0022] 本发明中的嵌合抗原受体存在“功能性变体”,是指嵌合抗原受体中的氨基酸序列出现变化,其中的氨基酸序列出现添加、删除或改变。本发明中的氨基酸序列变化不会干扰或抑制嵌合抗原受体的生物学功能,相反,这些功能性变体,可以加强本发明中嵌合抗原受体的生物学功能。如序列中的变换A/G-G-C/T-A/T和AGX,此处的X可以是C或者T。

[0023] (2) 导引子 (leader)

[0024] 本发明的抗原结合区包含一个导引子序列。导引子序列放在轻链可变区的氨基末端。本发明中的导引子序列是人粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子 (GM-CSF) 受体序列,粒细胞-巨噬细胞簇刺激因子是一种单聚体糖蛋白,它的作用是通过信号传导激活细胞的转录和翻译,加强重组核苷酸序列在宿主细胞的表达。序列见序列表SEQ ID NO.2。

[0025] (3) 跨膜区 (transmembrane domain, TM)

[0026] 本发明中的嵌合抗原受体 (CAR) 包括一个跨膜区, 跨膜区与嵌合抗原受体中的单链可变区相连。跨膜区可以由 T 细胞受体的 α 链、 β 链及 ζ 链 CD8 或 CD28, CD3 λ , CD45, CD4CD5, CD9, CD16, CD22, CD33, CD47, CD80, CD86, CD134, CD154 等构成。嵌合抗原受体的跨膜区主要由疏水氨基酸构成, 像亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸, 及色氨酸等构成。本发明中的跨膜区由 CD8 α 铰链区 (CD8 α Hinge) 和 CD28 构成, CD8 α 铰链和 CD28 核苷酸序列是人源化 CD8 α 铰链和 CD28 核苷酸序列见序列 SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5。。

[0027] (4) 细胞内信号区 (intracellular domain, ICD)

[0028] 本发明中的嵌合抗原受体 (CAR) 包含一个细胞内 T 细胞信号区, 细胞内区与免疫细胞的效应器功能激活有关。免疫细胞的效应器功能包括免疫细胞对靶细胞 (肿瘤细胞) 的细胞裂解功能及细胞因子的分泌。细胞内信号区是指这个区域的蛋白分子能够转导效应器功能信号, 并指导细胞执行一些特殊的功能, 像使细胞释放颗粒酶、裂孔素杀伤肿瘤细胞, 同时还释放细胞因子, 像肿瘤坏死因子, γ -干扰素, 白介素-2 等。

[0029] 细胞内信号区包括 CD28, CD137 (4-1BB), 和 CD3 ζ 。CD28, CD137 和 CD3 ζ 是人源化 CD28, CD137 和 CD3 ζ 。CD28 是 T 细胞共刺激的重要标志, CD137, 也叫做 4-1BB, 能够强力转导共刺激信号到 T 细胞, 加强 T 细胞的分化, 延长 T 细胞的生存时间。CD3 与 TCR 产生信号并包含免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAMs), 其主要功能是参与免疫细胞的信号转导。本发明中的 CD28, CD137, CD3 ζ 的胞内区基因序列见序列 SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7。

[0030] (6) 重组表达载体

[0031] 本发明中使用的重组表达载体是慢病毒载体 pLent-C-GFP。pLent-C-GFP 表达基因载体含有一个原始复制子 (origin of replication), 一个巨细胞病毒的启动子序列 (CMV), 和限制性内切酶位点 (KpnI, AsiSI 等), 选择性的抗性基因 (抗氨苄青霉素) 及标签蛋白 (绿色荧光蛋白)。通过多聚酶链反应 (PCR) 合成的嵌合抗原受体 (CAR), 即目标 DNA, 在 T4 连接酶作用下, 与载体 DNA 连接, 形成表达嵌合抗原受体的完整载体 pLent-(GM-CSF)-scFv (meso)-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 见图 1。

[0032] (7) 宿主细胞

[0033] 本发明所用的宿主细胞为一种异质 T 淋巴细胞——CIK (多种细胞因子诱导的杀伤细胞, cytokine-induced killer)。CIK 是将人外周血单个核细胞在体外用多种细胞因子 (如抗 CD3 单克隆抗体、IL-2 和 IFN- γ 等) 共同培养一段时间后获得的一群细胞。CIK 细胞中的效应细胞 (CD3+CD56+) 在正常人外周血中极少, 仅 1%~5%。相对与普通的 T 淋巴细胞, CIK 具有以下优势: (1) CIK 细胞增值速度快; (2) CIK 具有识别肿瘤的机制, 对正常的细胞无毒性作用; (3) 杀瘤谱广, 可用于白血病、淋巴瘤、肺癌、胃癌、肠癌等多种肿瘤的治疗; (4) 典型的个性化生物治疗模式, 通过转基因 T 细胞受体 (T cell receptors, TCRs) 和表达嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptors) 等基因工程方法改良 CIK, 可对肿瘤进行精准杀伤; (5) 由于 CIK 是活化的自体细胞, 使用安全。

[0034] (8) 经 CAR 转染 T 细胞的应用途径及剂量

[0035] 本发明中包含有嵌合抗原受体的 T 细胞, 可以是自体的 T 细胞, 也可以是异体同源的 T 细胞。本发明中所用的 T 细胞为自体 T 细胞。所用 T 细胞的数量为 $0.5 \times 10^6 - 1 \times 10^9 / \text{Kg}$ 。通常所用的 T 细胞的剂量为 $0.5 \times 10^6 - 1.0 \times 10^7 / \text{kg}$ 。

附图说明

[0036] 图1为编码嵌合抗原受体 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的融合基因片段的设计图。

[0037] 图2为本发明所述的慢病毒表达质粒 (pLent-(GM-CSF) -scFv (meso)

[0038] -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ) 的示意图,其中,顺时针序列为正向基因片段,逆时针为反向基因片段。

[0039] 图3是本发明外周血淋巴细胞诱导的CIK体式显微镜下视野图。

[0040] 图4是本发明外周血淋巴细胞诱导的CIK的表面分子标记CD3⁺,CD56⁺表达的流式图 (B1+B2象限显示CD3⁺;B2+B4象限显示CD56⁺;B2象限显示CD3⁺,CD56⁺双阳性率为25.1%)。

[0041] 图5是本发明所述的慢病毒表达质粒 (pLent-(GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ) 转染293T细胞明视野图。

[0042] 图6是绿色荧光视野下观察慢病毒表达质粒 (pLent-(GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ) 转染293T细胞的转染效率图。

[0043] 图7是本发明所有的嵌合抗原受体 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 修饰的T细胞体式显微镜下视野图。

[0044] 图8是绿色荧光显微镜下观察嵌合抗原受体 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 修饰的T细胞表达效率图。

[0045] 图9是流式细胞术分析嵌合抗原受体 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 修饰的T细胞的表达CAR的效率为16.5%。

具体实施方式

[0046] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。

[0047] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0048] 本发明比较了经过嵌合抗原受体转染的外周血淋巴细胞与非转染的外周血淋巴细胞与几种肿瘤细胞共培养,其中包括有间皮素分泌的肿瘤细胞, γ 干扰素的分泌情况。

[0049] 实施例一:将融合基因片段 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 插入慢病毒表达载体pLent-C-GFP。

[0050] Anti-meso的CAR模块示意图1(完整核酸序列见附录SEQ ID NO.1)。

[0051] Anti-meso的CAR各模块序列

[0052] (1) GM-CSF信号肽核酸人工序列 (SEQ ID NO.2)

[0053] (2) Anti-mesothelin monoclonal antibody single chain Fv antibody (scFv) 核酸人工序列 (SEQ ID NO.3)

[0054] (3) CD8 α Hinge区核酸人工序列 (SEQ ID NO.4)

[0055] (4) CD28跨膜区及胞内区核酸人工序列 (SEQ ID NO.5)

[0056] (5) CD137胞内区核酸人工序列 (SEQ ID NO.6)

[0057] (6) CD3 ζ 胞内区核酸人工序列 (SEQ ID NO.7)

[0058] 分别按信号肽的核酸人工序列、Anti-meso的核酸人工序列、CD8的核酸人工序列、Linker的核酸人工序列、CD28TM的核酸人工序列、CD28ICD的核酸人工序列、CD137的核酸人工序列、CD3 ζ 的核酸人工序列,委托生工生物工程(上海)有限公司合成其整个表达框,插入pLent-C-GFP载体 (Invitrogen) KpnI-AsiSI位点(见图2),转化到E.coli (DH5 α),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,获得各重组表达载体的高品质质粒。

[0059] 实施例2:嵌合抗原受体 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 修饰的T细胞的制备

[0060] (一) 异质性T细胞——CIK的制备

[0061] 取75ml患者自体外周血,用TBD样本密度分离液(购自天津灏洋华科生物),分离外周血单个核细胞。用含有1000IU/ml的重组干扰素 α 2a(购自沈阳三生制药)的培养基(购自CORNING公司,88-551-CM)诱导培养24小时后,加入1000IU/ml的重组白细胞介素2(购自沈阳三生制药)、50ng/ml的OKT-3和5%的患者自体血浆诱导继续培养24小时。每隔三天倍比加液,培养至第14天,流式细胞术检测CIK细胞中的CD3 $^{+}$ 、CD56 $^{+}$ 的阳性表达率(CD3-FITC, CD16/CD56-PE抗体购自BECKMAN公司,A07735)。CD3 $^{+}$ 阳性率 $>80\%$,CD3 $^{+}$ CD56 $^{+}$ 双阳性率 $>20\%$,视为CIK诱导成功(见图3,图4),并留取该CIK待病毒感染。

[0062] (二) 慢病毒包装质粒脂质体转染239T细胞

[0063] 细胞培养到六孔板中,使第二天细胞能生长至70-80%满。转染前将六孔板中换成2ml的新鲜培养液,将LipoFiterTM脂质体转染试剂(购自汉恒生物)混匀,(GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 和辅助质粒psPAX2、pMDNA2G三种质粒以4:3:1的比例将4.0 μ g的DNA溶解于100 μ L的DMEM培养基(购自美国生命技术公司)中,同时12 μ L的LipoFiterTM溶于88 μ L的DMEM培养基中,室温静置5分钟。将以上两步中的DNA和LipoFiterTM混合,室温孵育20分钟。将LipoFiterTM-DNA混合物加入六孔板的一个孔中,八字摇摆混匀,培养6小时后,去除LipoFiterTM-DNA培养液,加入新鲜培养基继续培养。转染48小时后,荧光显微镜观察239T细胞中GFP的表达情况(见图5,图6),确定表达质粒pLent-(GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的转染效率。将含有病毒的细胞培养上清吸入EP管中,4 $^{\circ}$ C,2000g离心10min,转移至新的EP管中,4.5 μ m滤器过滤后-80 $^{\circ}$ C保存。

[0064] (三) 慢病毒感染T细胞及感染后T细胞的扩增培养

[0065] 从-80 $^{\circ}$ C拿出2ml病毒液,加入终浓度为8 μ g/ml的聚凝胺(购自Sigma公司),用该病毒液重悬 1×10^6 个上述诱导的T细胞。将细胞悬液加入到6孔板的1个孔中,使病毒颗粒数与T细胞数比例约为3:1,1000g,32 $^{\circ}$ C,离心90分钟。37 $^{\circ}$ C,5%的CO₂培养箱中培养8小时后,收集细胞,重新加入病毒液和聚凝胺,1000g,32 $^{\circ}$ C,再次离心90分钟后,37 $^{\circ}$ C,5%的CO₂培养箱中继续培养,如此反复进行多重感染,提高T细胞的感染效率。吸弃2ml培养上清,加入2ml的新鲜CORNING培养基,继续扩大培养,培养17天至细胞扩增至足够的用量。

[0066] (四) 免疫荧光显微镜观察嵌合抗原受体 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 在T细胞中的表达,利用流式细胞技术检测 (GM-CSF) -scFv (meso) -CD8-CD28-CD137-

CD3ζ在T细胞中的表达效率。

[0067] 以100μL生理盐水重悬T细胞,取细胞悬液制作细胞涂片,用荧光显微镜观察抗原受体(GM-CSF)-scFv(meso)-CD8-CD28-CD137-CD3ζ在T细胞中的表达效率(见图7,图8)

[0068] 从培养瓶中取出2mL感染细胞,利用流式细胞仪检测感染细胞FITC(异硫氰酸盐)通道中感染细胞的阳性表达率(见图9)。

[0069] 实施例5:遗传修饰后T细胞株的体外杀伤作用测定

[0070] 按不同的效靶比(50:1,25:1,5:1,1:1),经修饰细胞以及未修饰的T细胞与A431、A431-H9、HAY共培养,应用LDH乳酸脱氢酶-细胞毒性检测分析试剂盒(LDH-Cytotoxicity Assay Kit,Biovision)检测经遗传修饰后的T细胞对不同肿瘤细胞的体外杀伤能力。方法如下:靶细胞铺96孔板(5×10^3 /孔),设培养基背景、体积校正、靶细胞自发LDH释放、靶细胞最大LDH释放、效应细胞自发LDH释放对照孔,治疗组孔,每组重复3孔,每个孔的终体积相同且不少于100μL。250g离心4min,在37℃,5%CO₂孵育至少4h。在离心前45min,向靶细胞最大释放孔加入10×裂解液,体积校正孔加入等量的裂解液。再次离心,从每孔转移50μL上清至新的96孔板中,再加入50μL底物溶液,室温避光孵育30min。每孔加入50μL终止液,1h内测定D490。细胞毒性(%) = $[(D_{\text{实验孔}} - D_{\text{培养基背景孔}}) - (D_{\text{效应细胞自发LDH释放孔}} - D_{\text{培养基背景孔}}) - (D_{\text{靶细胞自发LDH释放孔}} - D_{\text{培养基背景孔}})] / [(D_{\text{靶细胞最大LDH释放孔}} - D_{\text{体积校正孔}}) - (D_{\text{靶细胞自发LDH释放孔}} - D_{\text{培养基背景孔}})] \times 100\%$ 。

[0071] 实施例6:表达嵌合抗原受体T细胞临床应用方法:

[0072] 本发明还提供了包含有嵌合抗原受体T细胞的应用方法,包括肠外应用,例如局部肿瘤注射、口腔、鼻腔、皮下、静脉、动脉、肌肉内、皮内,腹腔内、胸腔内等。在特定的环境中,并不局限于应用一种治疗方法,通常选择合适、有效的治疗途径。但目前通常用于肿瘤病人的治疗方法是局部肿瘤注射和静脉回输。

[0073] 本发明的目的是将一定剂量发明的嵌合抗原受体(CAR)给予动物或者病人,经过一定时间后,要引起足够的治疗或预防反应。例如,给予本发明中的嵌合抗原受体应该足以与抗原结合,经过一定时间后,如两个小时或更长,可以检测到、并达到预防或治疗作用。从嵌合抗原受体的应用到达到预防或治疗目的的时间可以是12小时,或24小时,或更长。给予嵌合抗原受体的剂量可以依据本发明中嵌合抗原受体的效率,病人本身的身体状况和治疗病人的年龄、体重等而定。

[0074] 本发明中对嵌合抗原受体的效率检测包括通过给予一定剂量的含有嵌合抗原受体的T细胞后,γ干扰素的分泌情况。通过给予病人含有嵌合抗原受体的不同剂量的T细胞,根据病人不同的反应状况,来确定药物应用的起始量和总的有效剂量。

[0075] 本发明还包括包含有嵌合抗原受体的T细胞应用前进行淋巴细胞抑制的化学药物治疗,放射治疗等。通常应用的化学药物为环磷酰胺和氟达拉滨,其常用剂量分别为60mg/kg和每天25mg/m²,但具体应用剂量还要依据治疗所要取得的效果及病人的综合身体状况及病人的体重决定。

[0076] 本发明中包含有嵌合抗原受体的T细胞,可以是自体的T细胞,也可以是异体同源的T细胞。本发明中所用的T细胞为自体T细胞。所用T细胞的数量为 $0.5 \times 10^6 - 1 \times 10^9$ /Kg。通常所用的T细胞的剂量为 $0.5 \times 10^6 - 1.0 \times 10^7$ /kg。

[0077] 由于本发明中的嵌合抗原受体是针对间皮素特异性抗原的嵌合抗原受体,由于间

皮素可以在许多癌症表达,所以本发明的方法可以用到许多癌症。包括卵巢癌、胰腺癌、肺癌(肺腺癌)、食管癌、胃癌、滑膜肉瘤及间皮瘤等。

[0078] 本发明中所提及的治疗和预防,不是指100%或完全的治疗或预防,而是指不同程度的治疗或预防,即药物应用后,可以有潜在的治疗或预防效果。

[0079] 本发明提供了嵌合抗原受体、核苷酸、重组表达载体、宿主细胞、及其在治疗和预防过程中的应用。

[0080] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

序列表

<110> 山东兴瑞生物科技有限公司

<120> 一种间皮素嵌合抗原受体修饰的T细胞制备及胰腺癌治疗上的应用

<130> 2016

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1665

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

atggttctgc tggtgacatc tctctgctc tgtgaactgc ctateccgc ctttctgctc 60
attcccgaca ttcaggccca agtccaactg gtccaaagtg gtgctgaagt caaacgcccc 120
ggcgcctccg tccaagtctc ctgccgtgcc tetggetact cgattaacac ctattacatg 180
castgggtcc gtcaagcacc ggggtgcaggt ctggaatgga tgggtgtcat caatecgtcc 240
ggcgtgacct catatgcgca gaaatttcaa ggtcgcgta cctgacgaa cgataccagc 300
acgaataccg tctacatgca gctgaactct ctgacgagt cagacaccgc ggtgtattac 360
tgcgcacggt gggcactgtg gggcgatttc ggcatggatg tttggggcaa aggtacgctg 420
gtgaccgtta gctctggtgg tgggtggtct ggtggtggtg gtagtggecg tggcggttct 480
gatattcaga tgacgcaaag cccgtctacc ctgagtgcct ccattggtga ccgtgttacg 540
atcacctgtc gcgcaccca aggcatctat cattggetgg cttggtacca gcaaaaaccg 600
ggtaaagcgc cgaaactgct gatctataaa gcaagttccc tggcatcggg tgctccgagc 660
cgcttttcag gttcgggtag cggcaccgat ttcacgtga ccatctcutc gctgcagccc 720
gacgatttcg ctacctacta ctgccaacaa tactcaaact acccgctgac cttcgggtga 780
gggaccaagc tggagatcaa acgtgcggcc gcattcgtgc cggcttctct gccagcaagc 840
ccaccacgac gccagcgccg cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc 900
tgtccctgcg cccagaggcg tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac acgagggggc 960
tggacctcgc ctgtgatatc tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt ggggtccttc 1020
tcctgtcact ggttatcacc ctttactgca accacaggaa caggagtaag aggagcaggc 1080
tcctgcacag tgactacatg aacatgactc cccgcccgcc cgggcccacc cgcaagcatt 1140
accagcccta tgccccacca cgcgacttcg cagectatcg ctcccgtttc tctgttgta 1200
aacggggcag aaagaagctc ctgtacatac tcaacaacc atttatgaga ccagtitcaa 1260
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggaggatgt 1320
gaactgagag tgaagttcag caggagcgcg gacgcccccg cgtaccagca gggccagaac 1380
cagctctata acgagctcaa tctaggacga agagaggagt acgatgtttt ggacaagaga 1440
cgtggccggg accctgagat ggggggaaaag ccgagaagga agaaccctca ggaaggcctg 1500
tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc 1560
gagcgcggga ggggcaaggg gcacgatggc ctttaccagg gtctcagtac agccaccaag 1620

```

gacacctacg acgcccttca catgcaggcc ctgccccctc gctaa	1665
<210> 2	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 2	
atgctgctgc tggtgaccag cctgctgtgc gagctggagc cccacccccg ctttctgctg	60
atccccgaca tccag	75
<210> 3	
<211> 732	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 3	
atggcccagg tccagctggt gcagtctggg gctgaggtga agaggcctgg ggcctcagtg	60
caggatctct gcagagcacc ttgctatagt atcaatactt actatatgca gtgggtgcgg	120
caggccccctg gagcaggcct tgagtggatg ggcgttatca accccagtgg tgtcacaagt	180
tacgcacaga agttccaggg cagagtcact ttgaccaacg acacgtccac aaacacagtc	240
tacatgcagt tgaacagtct gacatctgcc gacacggccg tctactactg tgcgagatgg	300
gccttatggg gggacttcgg tatggacgtc tggggcaagg gaacctggt caccgtctcg	360
agtgggtggag gcggttcagg cggaggtggc agcggcggtg gcgcatcgga catccagatg	420
accagtcctc ctccaccct gctcgcactt attggagaca gagtcacat caccctgccg	480
gccagtgagg gtatttatca ctggttgcc tggatcagc agaagccagg gaaagcccct	540
aaactcctga tctataaggc ctctagttta gccagtgggg cccatcaag gttcagcggc	600
agtggatctg ggacagattt cactctcacc atcagcagcc tgcagcctga tgattttgca	660
acttattact gccaacaata tagtaattat ccgctcactt tcggcggagg gaccaagctg	720
gagatcaaac gt	732
<210> 4	
<211> 180	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 4	
ctgagcaact ccatcatgta cttcagccac ttctgtgccg tcttctgccc agcgaagccc	60
accacgacgc cagcgcgcgc accaccaaca ccggcgccca ccatcgctc gcagccccctg	120
tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac	180
acgagggggc tggac	195
<210> 5	
<211> 193	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<400> 5

ttttgggtgc tgggtggtgt tgggtggagtc ctggettgct atagcttgct tagtaacagt 60
 ggcctttatt ttcgtgagga gtaagaggag caggctcctg cacagtgact acatgaacac 120
 tccccgccgc cccgggcca ccagcaagca ttaccagccc tatgccccac gcgacttcgc 180
 agcctatcgc tcc 193

<210> 6

<211> 120

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaaccat ttatgagacc agtaciaaact 60
 actcaagagg aagatggctg tagccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg 120

<210> 7

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

ctgagagtga agttcagcag gagcgacgcc cccgcgtacc agcaggcca gaaccagctc 60
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 120
 cgggaccctg agatgggggg aaagccgag agaaggaaga accctcagga aggcctgtac 180
 aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gggcgagcgc 240
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtetca gtacagccac caaggacacc 300
 tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

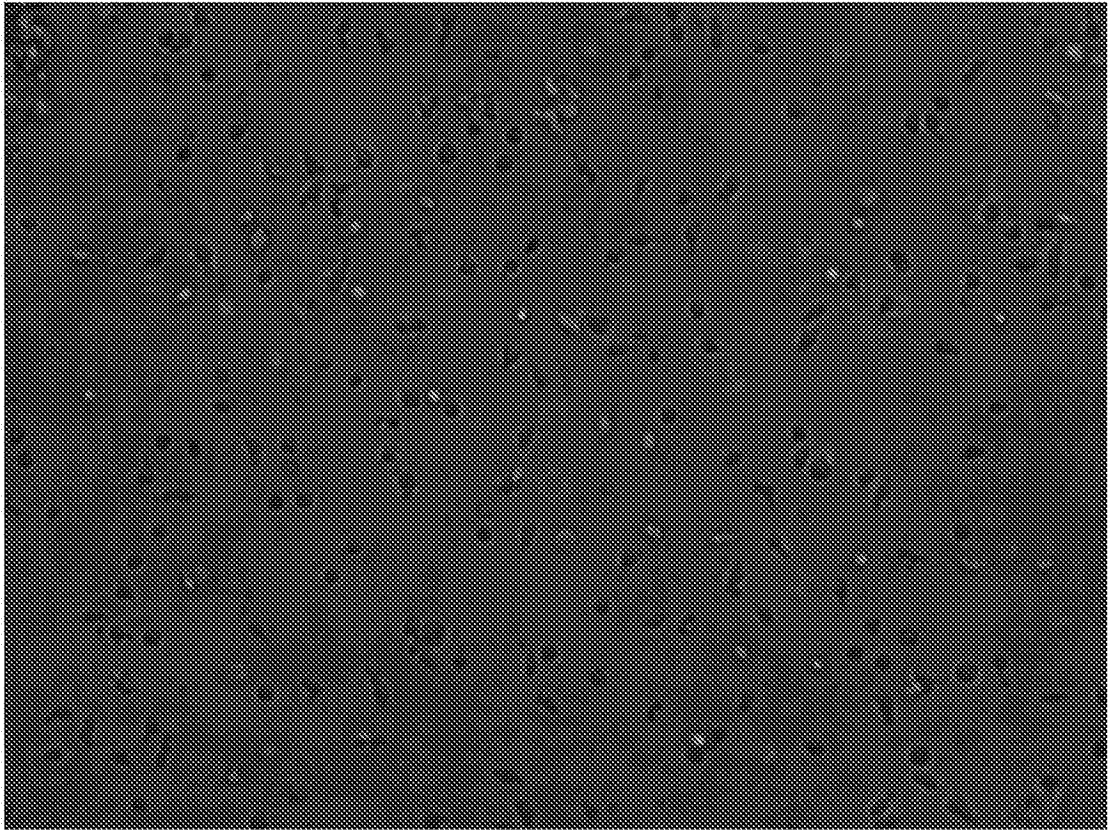


图3

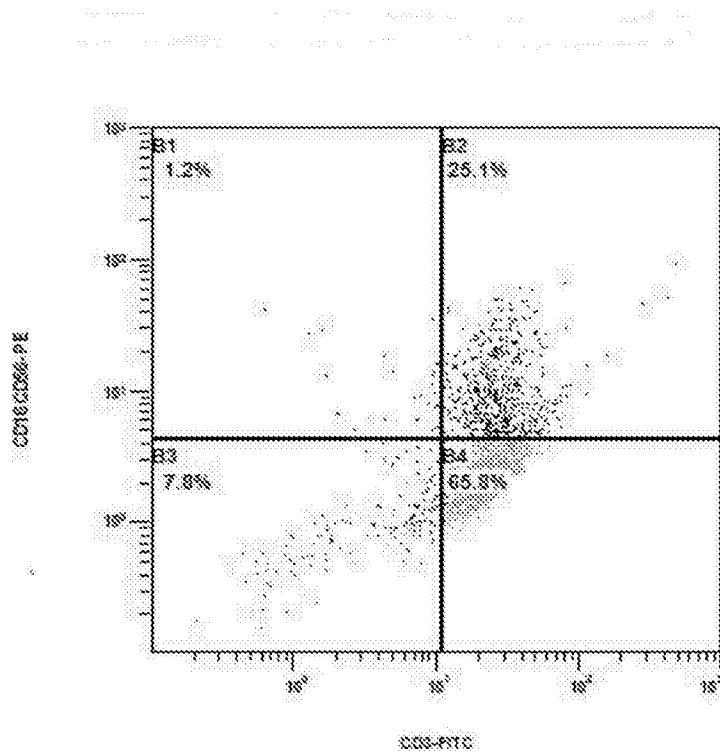


图4

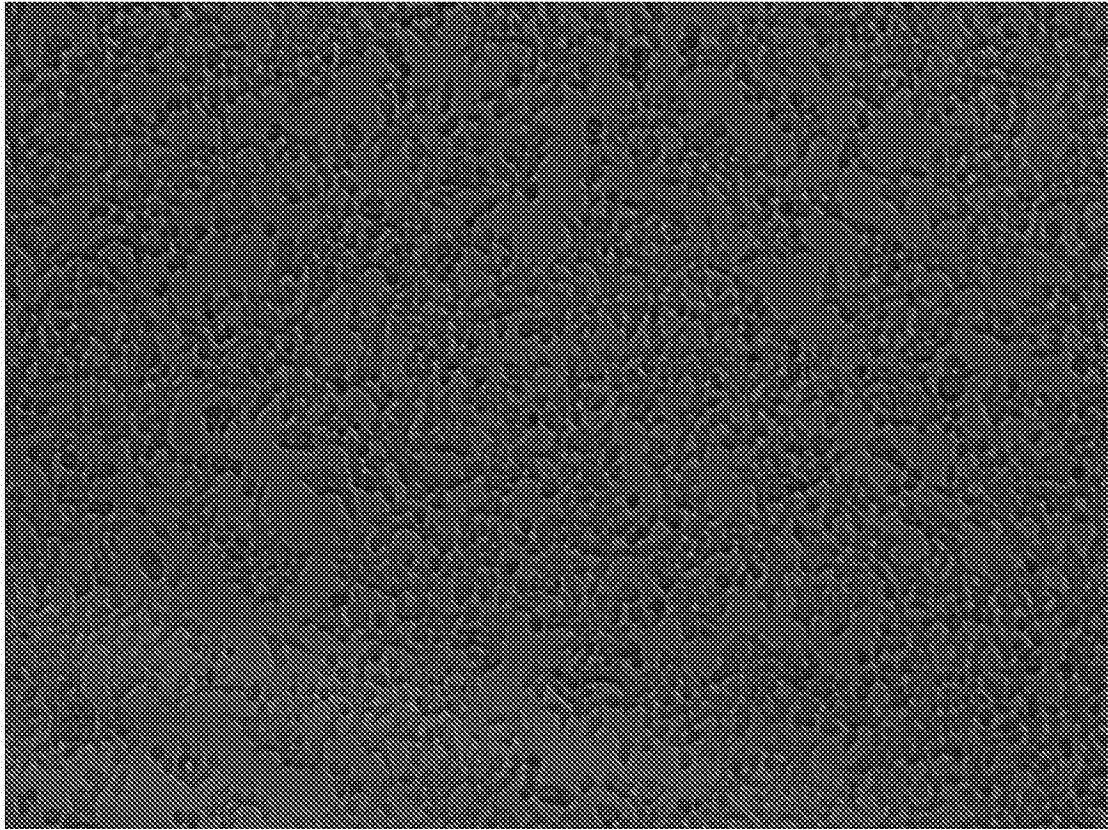


图5

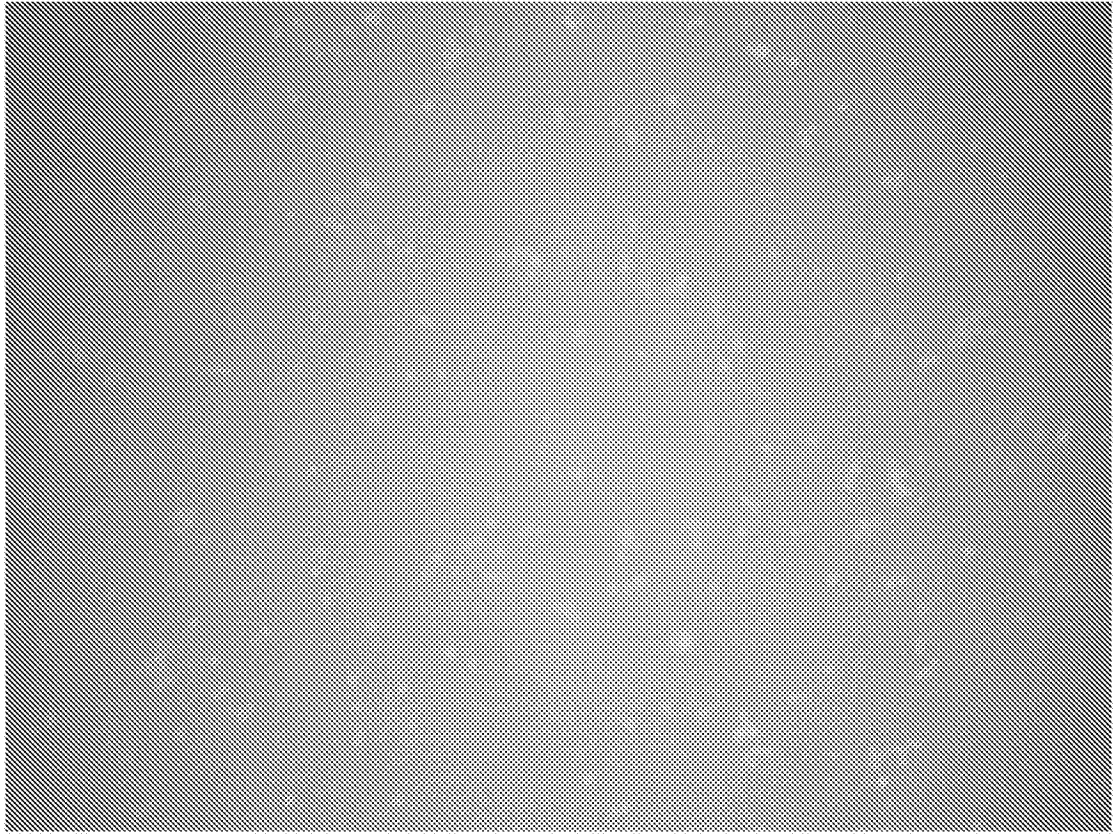


图6

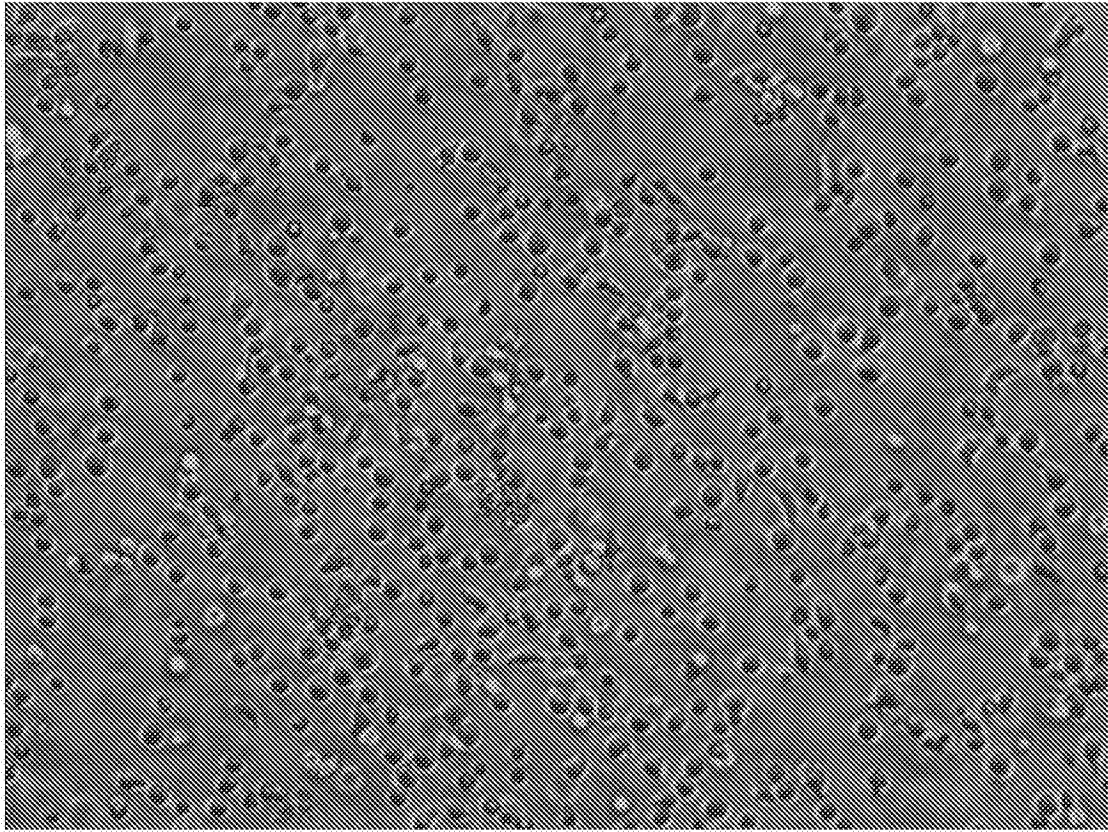


图7

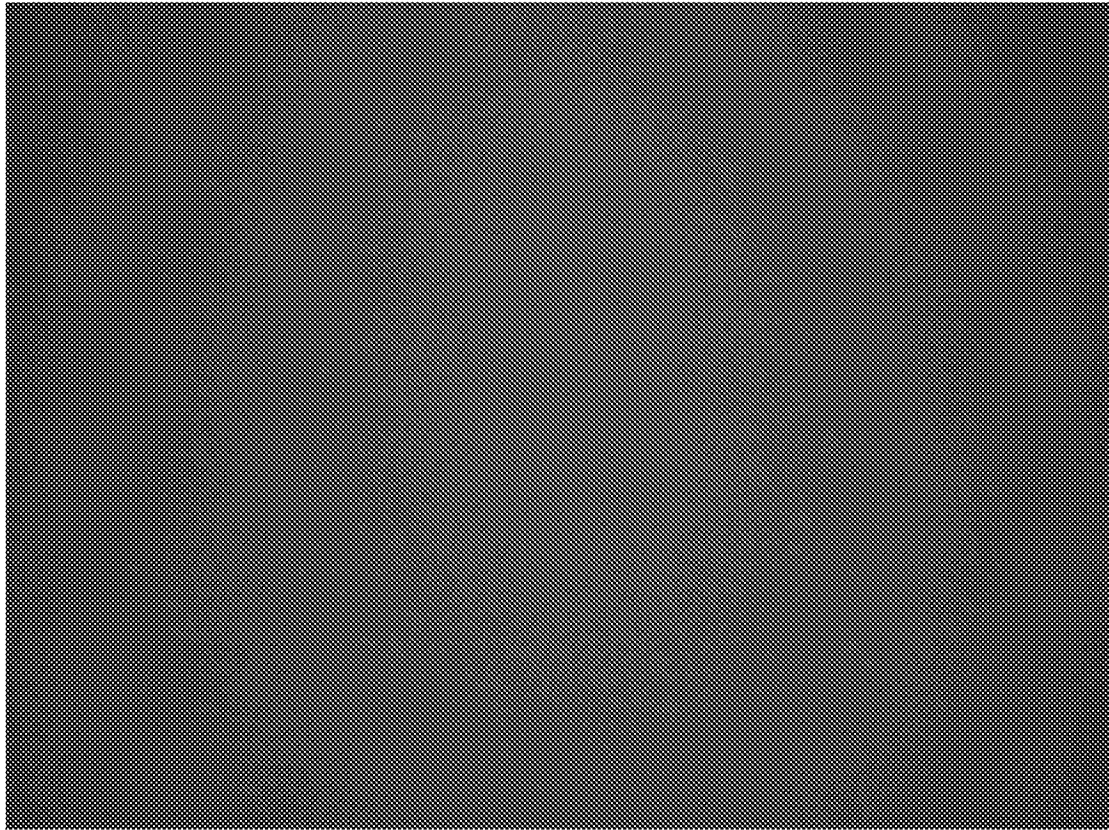


图8

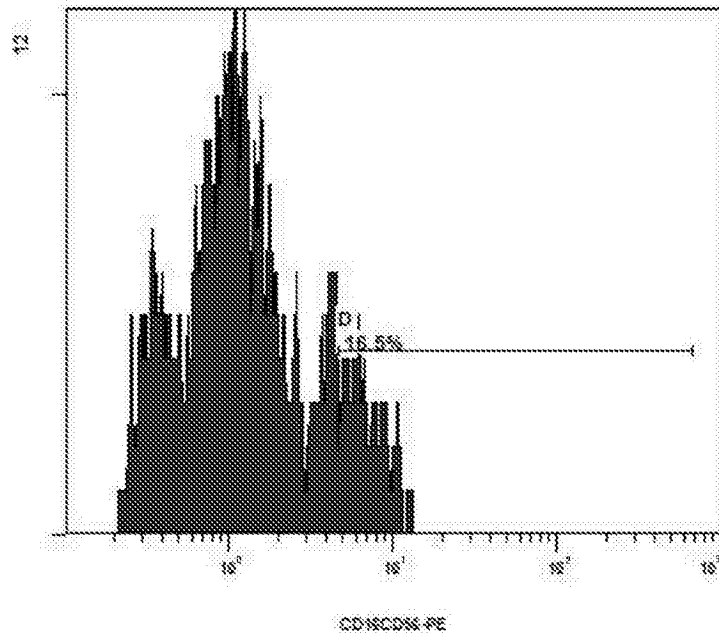


图9