(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 108004259 B
(45)授权公告日 2020.06.30

(21)申请号 201610943985.0

(22)申请日 2016.11.02

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108004259 A

(43)申请公布日 2018.05.08

(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)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/867(2006.01)
C12N 7/00(2006.01)
A61K 35/17(2015.01)
A61P 35/00(2006.01)

审查员 刘东川

权利要求书2页 说明书13页
序列表4页 附图4页

(54)发明名称

靶向B细胞成熟抗原的嵌合抗原受体及其用途

(57)摘要

本发明涉及靶向BCMA(J22.9)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BCMA单链抗体的编码序列、人CD8α铰链区的编码序列、人CD8跨膜区的编码序列、人41BB胞内区的编码序列；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 108004259 B

1.一种分离的多核苷酸,所述多核苷酸的序列选自:

(1)含有依次连接的抗BCMA单链抗体的编码序列、人CD8α铰链区的编码序列、人CD8跨膜区的编码序列、人41BB胞内区的编码序列、人CD3ζ胞内区的编码序列的多核苷酸序列,所述抗BCMA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BCMA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CD8跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第311-332位氨基酸所示;所述人41BB胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第333-380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381-491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,所述多核苷酸的序列在所述抗BCMA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2所述的多核苷酸,其特征在于,在所述抗BCMA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。

5.如权利要求1所述的多核苷酸,其特征在于,

所述抗BCMA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BCMA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CD8跨膜区的编码序列如SEQ ID NO:1第931-996位核苷酸序列所示;所述人41BB胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1第997-1140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1141-1473位核苷酸序列所示。

6.一种融合蛋白,所述融合蛋白含有依次连接的抗BCMA单链抗体、人CD8α铰链区、人CD8跨膜区、人41BB胞内区和人CD3ζ胞内区的融合蛋白,所述抗BCMA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BCMA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CD8跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第311-332位氨基酸所示;所述人41BB胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第333-380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381-491位氨基酸所示。

7.如权利要求6所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白在所述抗BCMA单链抗体的N端还含有信号肽。

8.如权利要求7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。

9.一种核酸构建物,所述核酸构建物含有权利要求1-5中任一项所述的多核苷酸。

10.如权利要求9所述的核酸构建物,其特征在于,所述核酸构建物为载体。

11.如权利要求9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1-5中任一项所述的多核苷酸。

12.一种逆转录病毒,所述逆转录病毒含有权利要求9-11中任一项所述的核酸构建物。

13.一种基因修饰的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1-5中任一项所述的多核苷酸，或含有权利要求9-11中任一项所述的核酸构建物，或感染了权利要求12所述的逆转录病毒。

14.权利要求1-5中任一项所述的多核苷酸、权利要求6-8中任一项所述的融合蛋白、权利要求9-11中任一项所述的核酸构建物或权利要求12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。

15.权利要求1-5中任一项所述的多核苷酸、权利要求6-8中任一项所述的融合蛋白、权利要求9-11中任一项所述的核酸构建物、权利要求12所述的逆转录病毒、或权利要求13所述的基因修饰的T细胞或其药物组合物在制备治疗BCMA介导的疾病的药物中的用途。

16.如权利要求15所述的用途，其特征在于，所述BCMA介导的疾病为多发性骨髓瘤。

靶向B细胞成熟抗原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BCMA的嵌合抗原受体及其用途。

背景技术

[0002] 多发性骨髓瘤是一种恶性浆细胞疾病，表现为骨髓浆细胞恶性克隆性增生，分泌单克隆免疫球蛋白或其片段(M蛋白)，导致骨骼、肾脏等相关靶器官或组织损伤，常见临床表现为骨痛、贫血、肾功能不全、感染等[Multiple myeloma.N Engl J Med,2011.364(11):p.1046-60.]。目前多发性骨髓瘤为血液系统第二大恶性肿瘤，占血液系统恶性肿瘤的10％，多发病于男性，其发病率随着年龄的增长逐年增高，近几年更是有年轻化的趋势[Siegel,R.,et al.,Cancer statistics,2014.CA Cancer J Clin,2014.64(1):p.9-29.]。

[0003] B细胞成熟抗原(B-cell maturation antigen,BCMA)，又称CD269，由184个氨基酸残基组成，其胞内区含80个氨基酸残基，胞外区序列很短，只有一个糖类识别结构域为B细胞表面分子。BCMA属于缺少信号肽的I型跨膜信号蛋白，是肿瘤坏死因子受体家族(TNFR)一员，它可分别与B细胞激活因子BAFF或增殖诱导配体(a proliferation induced ligand,APRIL)两种配体相结合[Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding.Curr Opin Struct Biol,2004.14(2):p.154-60.]。在正常组织中，BCMA表达于成熟B细胞和浆细胞表面，BCMA基因剔除小鼠免疫系统表现正常，有正常的脾结构，B淋巴细胞的发育正常，但浆细胞数量明显减少，证明BCMA在维持浆细胞的存活中起了重要的作用，其机制主要包括BCMA与BAFF蛋白结合，并上调抗凋亡基因Bcl-2,Mcl-1及Bclw等，维持细胞生长[BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells.J Exp Med,2004.199(1):p.91-8.]。同样地，该机制也在骨髓瘤细胞中发挥了功能，对骨髓瘤细胞的恶性增生起了重要的促进作用[BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6deprivation and dexamethasone.Blood,2004.103(8):p.3148-57.]。研究表明，BCMA普遍表达于多发性骨髓瘤细胞系，在多发性骨髓瘤患者中的检测也得到了一致性的结果[Expression of BCMA,TACI,and BAFF-R in multiple myeloma:a mechanism for growth and survival.Blood,2004.103(2):p.689-94.]。Kochenderfer等在已有报道的基础上，又联合应用Q-PCR、Flow Cytometry和免疫组化方法深入研究了BCMA的表达特征，确认BCMA在成熟B细胞、浆细胞之外的正常人体组织无表达，且在CD34+造血细胞中也无表达[B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma.Clin Cancer Res,2013.19(8):p.2048-60.]。结合BCMA表达特征与CD19的高度相似性，以及抗CD19CAR T细胞治疗的成功进展，提示我们BCMA可以作为CAR-T细胞的靶点之一用于多发性骨髓瘤的细胞免疫治疗。

[0004] 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。

[0005] 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。

[0006] 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。

[0007] 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(immunoreceptor tyrosine 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〔Chimeric NKG2D-modified T cells inhibit systemic T-cell lymphoma growth in a manner involving multiple cytokines and cytotoxic pathways，Cancer Res 2007，67(22)：11029-11036〕。

[0008] 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(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41BB(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。

[0009] 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(Mol Ther.，2005，12(5)：933-941)。最典型的就是U Pen Carl June在CD28刺激因子的作用下又加了一个41BB的刺激因子。

[0010] 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〔TRUCKs：the fourth generation of CARs，Expert Opin Biol Ther.，2015；15(8)：1145-54〕。

[0011] 2015年9月，Carl June研究小组在医学界的顶级期刊新英格兰杂志发表了使用CD19分子靶向CAR-T细胞疗法成功治疗1例复发难治多发性骨髓瘤(MM)患者的文章[Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19for Multiple Myeloma.N Engl J Med，2015.373(11)：p.1040-7.]。虽然多发性骨髓瘤作为B细胞系肿瘤通常不表达CD19，因此CD19不作为多发性骨髓瘤免疫治疗的靶标。有报道指出微量的具有耐药性及疾病复发特性的多发性骨髓瘤克隆，具有B细胞表型(即CD19阳性)。在明确BCMA可作为CAR T细胞的靶点后，美国国家癌症研究院Kochenderfer等成功构建了抗BCMA CAR T细胞，并在临床前研究表明该CAR T细胞特异性地识别BCMA，并在被BCMA激活后大量扩增、分泌细胞因子并发挥杀伤功能，在小鼠成瘤模型中也具有抗肿瘤效应[B-cell maturation antigen i s a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma.Clin Cancer Res，2013.19(8)：p.2048-60.]。2014年美国国家癌症研究院开展抗BCMA CAR T细胞治疗多发性骨髓瘤的I期临床研究，针对现今标准治疗方案无反应的多发性骨髓瘤患者，验证抗BCMA CAR T细胞的临床安全性和有效性(Cl inicalTrials.gov Identifier：NCT02215967)。在2015年12月初的第57届美国血液年会上，美国国家癌症研究院医学肿瘤科Syed Abbas Al i教授团队报告了多发性骨髓瘤患者CAR-T细胞治疗I期临床试验结果。该研究共纳入了12例3线以上化疗失败的难治复发多发性骨髓瘤患者，有的患者骨髓中骨髓瘤细胞≥50％。这些患者输入BCMA CAR-T细胞后，1例患者完全缓解，3例患者部分缓解，其余均病情稳定，由此第一次证明抗BCMA CAR-T细胞疗法在多发性骨髓瘤有效，且无重大副作用，被评为ASH年度最具影响力的临床研究之一(Late-Breaking Abstracts，大会摘要号：LAB-1)。目前，艾森布拉姆宾夕法尼亚大学艾布拉姆森癌症中心也已注册了抗BCMA CAR T细胞治疗多发性骨髓瘤的I期临床试验，并在紧锣密鼓的研究开展中(ClinicalTrials.gov Identifier：NCT02546167)。

[0012] BCMA-J22.9抗体为人-鼠嵌合抗体，作为靶向多发性骨髓瘤(MM)免疫治疗的一个靶标，此高亲和力的抗体阻断了BCMA与天然配体B细胞激活因子(B cell activating factor，BAFF)或增殖诱导配体(a proliferation induced ligand，APRIL)的结合。此抗体识别BCMA的氨基酸残基是6位-41位。实验结果显示此抗体在Elisa和流式检测等实验都具有很好的特异性。体内实验的结果显示腹腔注射BCMA-J22.9抗体减轻了小鼠的肿瘤负荷并显著延长了其生存期。BCMA-J22.9嵌合抗体治疗不仅局限于多发性骨髓瘤的治疗(MM)，由于BCMA也是治疗自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮或类风湿性关节炎的免疫靶标[Potent anti-tumor response by targeting B cell maturation antigen(BCMA)in a mouse model of multiple myeloma.1TMol Oncol.2015Aug；9(7)：1348-58]。

[0013] 我们专利是以BCMA-J22.9抗体的scFV的重链和轻链作为CAR的结构，本发明的CART细胞体外实验显示了对靶细胞较强的杀伤作用。此临床前实验结果为临床实验和临床治疗奠定良好的基础。

发明内容

[0014] 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:

[0015] (1)含有依次连接的抗BCMA单链抗体的编码序列、人CD8α铰链区的编码序列、人CD8跨膜区的编码序列、人41BB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

[0016] (2)(1)所述多核苷酸序列的互补序列。

[0017] 在一个或多个实施方案中,所述多核苷酸序列在所述抗BCMA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BCMA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BCMA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CD8跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第311-332位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述人41BB胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第333-380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381-491位氨基酸所示。

[0018] 在一个或多个实施方案中,在所述抗BCMA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BCMA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BCMA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CD8跨膜区的编码序列如SEQ ID NO:1第931-996位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述人41BB胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1第997-1140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1141-1473位核苷酸序列所示。本发明第二方面提供一种融合蛋白,所述融合蛋白选自:

[0019] (1)含有依次连接的抗BCMA单链抗体、人CD8α铰链区、人CD8跨膜区、人41BB胞内区和人CD3ζ胞内区的融合蛋白;和

[0020] (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;

[0021] 优选地,所述抗BCMA单链抗体为抗BCMA单克隆抗体J22.9。

[0022] 在一个或多个实施方案中,所述融合蛋白在所述抗BCMA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BCMA单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第22-128位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述抗BCMA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CD8跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第311-332位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述人41BB胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第333-380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381-491位氨基酸所示。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。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 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。

[0027] 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。

[0028] 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BCMA介导的疾病的药物中的用途。

[0029] 在一个或多个实施方案中，所述BCMA介导的疾病为多发性骨髓瘤。

附图说明

[0030] 图1为BCMA-CAR逆转录病毒表达载体(BCMA-41BBz)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。

[0031] 图2为BCMA-CAR逆转录病毒表达载体(BCMA-41BBz)的部分测序结果峰值图。

[0032] 图3为流式细胞仪显示逆转录病毒感染T细胞72小时的BCMA(J22.9)CART和BCMA(C11D5.3)CART表达效率。

[0033] 图4为流式细胞仪显示靶细胞BCMA表达。

[0034] 图5为制备5天的BCMA(J22.9)CART和BCMA(C11D5.3)CART细胞与靶细胞共培养4小时CD107a表达。

[0035] 图6为制备5天的BCMA(J22.9)CART和BCMA(C11D5.3)CART细胞与靶细胞共培养4小时INFγ的分泌。

[0036] 图7为制备5天的BCMA(J22.9)CART和BCMA(C11D5.3)CART细胞与靶细胞共培养5小时后对肿瘤细胞的杀伤作用。

具体实施方式

[0037] 本发明提供一种靶向BCMA的嵌合抗原受体(CAR)。该CAR含有依次连接的抗BCMA单链抗体、人CD8α铰链区、人CD8跨膜区、人41BB胞内区、人CD3ζ胞内区的片段。

[0038] 适用于本发明的抗BCMA单链抗体可衍生自本领域周知的各种抗BCMA单克隆抗体。

[0039] 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C11D5.3，J22.9。在某些实施方案中，所述单克隆抗体是克隆号为J22.9的单克隆抗体。在某些实施方案中，所述抗BCMA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BCMA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。

[0040] 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。

[0041] 适用于本发明的人CD8跨膜区可以是本领域常用于CAR的各种人CD8跨膜区序列。在某些实施方案中，所述人CD8跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第311-332位氨基酸所示。

[0042] 适用于本发明的41BB可以是本领域已知的各种用于CAR的41BB。作为示范性例子，本发明使用SEQ ID NO:2第333-380位氨基酸序列所示的41BB。

[0043] 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381-491位氨基酸所示。

[0044] 形成本发明的融合蛋白的上述各部分，如抗BCMA单链抗体的轻链可变区和重链可变区、人CD8α铰链区、人CD8跨膜区、41BB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BCMA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。

[0045] 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。

[0046] 本发明也包括SEQ ID NO:2第22-491位氨基酸序列SEQ ID NO:2第1-491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。

[0047] 突变体还包括：在SEQ ID NO:2第22-491位所示的氨基酸序列、SEQ ID NO:2第1-

491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。

[0048] 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。

[0049] 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64－1473位核苷酸所示，或如SEQ ID NO:1第1-1473位核苷酸所示。

[0050] 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。

[0051] 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64-2628位核苷酸所示，或如SEQ ID NO:1所示。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] 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)。

[0056] 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。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 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BCMA介导的疾病。

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 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。

[0072] 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。

[0073] 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BCMA介导的疾病的放疗或化疗制剂进行治疗。

[0074] 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。

[0075] “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。

[0076] 本发明采用抗BCMA抗体(具体是衍生自克隆号J22.9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CD8跨膜区、人的41BB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BCMA scFv-CD8铰链区-CD8TM-41BB-CD3ζ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10比1的情况下，杀伤效率超过40％。

[0077] 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。

[0078] 实施例1：mBCMA(J22.9)scFv-CD8α-41BB-CD3ζ基因序列的确定

[0079] 1.1从NCBI网站数据库搜索到人的CD8α铰链区、人的CD8α跨膜区、人的41BB胞内区和人的CD3ζ胞内区基因序列信息，抗BCMA(J22.9)单链抗体克隆号为J22.9，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。

[0080] 各氨基酸和基因序列信息见SEQENCE LISTING(SEQUNCE ID NO.1)。

[0081] 将上述序列依次按抗BCMA(J22.9)scFv、人CD8α铰链区基因、人CD8α跨膜区基因、人41BB胞内区基因、人CD3ζ胞内区基因序列进行连接，在序列连接处引入酶切位点，形成完整的mBCMA(J22.9)-CAR基因序列信息。

[0082] 1.2重组质粒测序

[0083] 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mBCMA(J22.9)-CAR序列比对来验证序列是否正确。测序引物为：

[0084] 正义：AGCATCGTTCTGTGTTGTCTC

[0085] 反义：TGTTTGTCTTGTGGCAATACAC

[0086] 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。

[0087] 实施例2：包含CAR分子的核酸序列的病毒载体的构建

[0088] 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pRetro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。

[0089] 实施例3:逆转录病毒包装

[0090] 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;

[0091] 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Retro backbone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;

[0092] 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。

[0093] 实施例4:逆转录病毒感染人的T细胞

[0094] 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。

[0095] 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-ti ssue treated培养板,24孔板每孔250μl。避光,4℃过夜备用。

[0096] 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。

[0097] 4.病毒液加入孔内,每孔加2ml病毒液,32℃,2000g,离心2h。

[0098] 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。

[0099] 6.离心完毕后,将培养板置于37℃,5%CO2培养箱中培养。

[0100] 7.感染后24h,将细胞悬液吸出,1200rpm,4℃,离心7min。

[0101] 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。

[0102] 由此获得分别感染了实施例3所示逆转录病毒的CART细胞,分别命名为BCMA CART细胞(表达实施例1的BCMA CAR)

[0103] 实施例5:流式细胞仪检测感染后T淋巴细胞的比例及表面CAR蛋白的表达

[0104] 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阳性率。抗体为anti-mouse IgG F(ab')antibody(Jackson Immunoresearch)。

[0105] 图3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,BCMA(J22.9)CART表达效率为51.3%和BCMA(C11D5.3)CART表达效率为85.3%

[0106] 图4显示,用BCMA抗体检测靶细胞中BCMA的百分含量,在U266细胞中百分含量是

95.5%,证明靶细胞是高表达BCMA。

[0107] 实施例6:CAR-T细胞与靶细胞共培养后CD107a表达检测

[0108] 1.取一块V底96孔板,每孔加CART/NT细胞$2*10^5$个和靶细胞(U266)/对照细胞(K562)$2*10^5$个,重悬为100ul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。

[0109] 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、CD4、CD8,重悬体积100ul,冰上避光孵育30分钟。

[0110] 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。

[0111] 4.适量PBS重悬,流式细胞仪检测CD107a。

[0112] 显示在图5中。图5显示,BCMA(J22.9)CART细胞在CD8阳性的U266细胞中CD107a分泌的百分率分别为45.1%,BCMA(J22.9)CART细胞在CD4阳性的U266细胞CD107a分泌的百分率分别为39.4%。

[0113] 实施例7:CAR-T细胞与靶细胞共培养后INF-γ分泌检测

[0114] 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。

[0115] 2.实验组每孔含靶细胞(U266)或阴性对照细胞(K562)2×10^5个,CAR-T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。同时加入BD GolgiPlug(含BFA,每1ml细胞培养基中加入1μl BD GolgiPlug),充分混匀后,37℃孵育5-6小时。收集细胞,作为实验组。

[0116] 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。

[0117] 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。

[0118] 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。

[0119] 6.流式细胞仪检测。

[0120] 显示在图6中。图6显示,BCMA(J22.9)CART细胞在CD8阳性的U266细胞中INF-γ分泌的百分率分别为8.11%,BCMA(J22.9)CART细胞在CD4阳性的U266细胞INF-γ分泌的百分率分别为10.7%。

[0121] 实施例8: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

[0122] 1.K562细胞(不含BCMA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。

[0123] 2.混匀,37℃孵育30min。

[0124] 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。

[0125] 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。

[0126] 5.U266细胞(含BCMA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。

[0127] 6.加入荧光染料CFSE(carboxyfluoresceindiacetatesuccinimidyl ester)至终浓度为1μM。

[0128] 7.混匀,37℃孵育10min。

[0129] 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。

[0130] 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。

[0131] 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。

[0132] 11.在所有的实验中,CAR-T细胞的细胞毒性和未感染的阴性对照效应T细胞(NT cell)的细胞毒性做比较,并且这些效应T细胞来自同一个病人。

[0133] 12.CAR-T和NT,按照效应细胞:靶细胞＝10:1,2:1,的比例,于5ml无菌试验管(BD Biosciences)进行培养,每组设置两复孔。每一个共培养组中,靶细胞为U266细胞50,000个(50μl),阴性对照细胞为50,000个K562细胞(50μl)。同时设置一组只包含U266靶细胞和K562阴性对照细胞。

[0134] 13.将共培养细胞置于37℃孵育5h。

[0135] 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。

[0136] 15.不需清洗,直接进行流式上机检测,数据用Flow Jo进行分析。

[0137] 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U266靶细胞和活的K562阴性对照细胞的比例。

[0138] a)对于每一组共培养的T细胞和靶细胞

[0139] 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。

[0140] 结果显示在图7中。图7显示,在效靶比为10:1情况下,BCMA(J22.9)CART细胞对U266细胞的杀伤率为40％。

[0001] 序列表

[0002] <110> 上海恒润达生生物科技有限公司

[0003] <120> 靶向B细胞成熟抗原的嵌合抗原受体及其用途

[0004] <170> PatentIn version 3.3

[0005] <210> 1

[0006] <211> 1473

[0007] <212> DNA

[0008] <213> 人工序列

[0009] <400> 1

[0010] atggctctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgccgctcgg 60

[0011] cctgatatag tgatgactca aagtcaaaga tttatgacca catctgtcgg agatcgggtc 120

[0012] tctgtgacct gtaaggcatc ccagagtgtt gactccaacg tagcctggta ccagcagaaa 180

[0013] ccgcgacagt ctcccaaggc attgatattt tcagctagtc tgaggttttc aggtgtacct 240

[0014] gctcggttca ccgggtctgg tagcggaaca gacttcactt tgacaattag taatcttcaa 300

[0015] agtgaagacc ttgcggaata cttctgtcag cagtacaaca attatcccct tacctttggg 360

[0016] gcaggaacaa agcttgaatt gaagggcggc gggggttctg gtggcggcgg cagcggcggt 420

[0017] ggaggatcac aggtacagct tcagcagagc gggggaggtt tggtacaacc tggcggatct 480

[0018] ttgaaacttt cctgtgcagc ttcaggaata gacttttcac ggtactggat gagctgggtc 540

[0019] cgccgagcac ctgggaaagg tcttgaatgg attggggaga taaatccaga ttcttccaca 600

[0020] attaactatg ctcccagttt gaaggacaag ttcatcatta gccgcgataa cgctaaaaac 660

[0021] actttgtact tgcagatgag taaagtacgg agtgaggata cagcgttgta ctactgcgcg 720

[0022] agcttgtatt atgattacgg agatgccatg gattactggg gccaaggcac gtctgtgact 780

[0023] gtatcttcta ctacaactcc agcacccaga ccccctacac ctgctccaac tatcgcaagt 840

[0024] cagcccctgt cactgcgccc tgaagcctgt cgccctgctg ccgggggagc tgtgcatact 900

[0025] cggggactgg actttgcctg tgatatctac atctgggcgc ccttggccgg gacttgtggg 960

[0026] gtccttctcc tgtcactggt tatcaccctt tactgcaggt tcagtgtcgt gaagagaggc 1020

[0027] cggaagaagc tgctgtacat cttcaagcag cctttcatga ggcccgtgca gactacccag 1080

[0028] gaggaagatg gatgcagctg tagattccct gaagaggagg aaggaggctg tgagctgaga 1140

[0029] gtgaagttct cccgaagcgc agatgcccca gcctatcagc agggacagaa tcagctgtac 1200

[0030] aacgagctga acctgggaag acgggaggaa tacgatgtgc tggacaaaag gcggggcaga 1260

[0031] gatcctgaga tgggcggcaa accaagacgg aagaaccccc aggaaggtct gtataatgag 1320

[0032] ctgcagaaag acaagatggc tgaggcctac tcagaaatcg ggatgaaggg cgaaagaagg 1380

[0033] agaggaaaag gccacgacgg actgtaccag gggctgagta cagcaacaaa agacacctat 1440

[0034] gacgctctgc acatgcaggc tctgccacca aga 1473

[0035] <210> 2

[0036] <211> 491

[0037] <212> PRT

[0038] <213> 人工序列

[0039] <400> 2

[0040] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

[0041] 1 5 10 15

[0042] His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met

[0043] 20 25 30

[0044] Thr Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln

[0045] 35 40 45

[0046] Ser Val Asp Ser Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Gln Ser

[0047] 50 55 60

[0048] Pro Lys Ala Leu Ile Phe Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Val Pro

[0049] 65 70 75 80

[0050] Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

[0051] 85 90 95

[0052] Ser Asn Leu Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr

[0053] 100 105 110

[0054] Asn Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

[0055] 115 120 125

[0056] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

[0057] 130 135 140

[0058] Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser

[0059] 145 150 155 160

[0060] Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Arg Tyr Trp

[0061] 165 170 175

[0062] Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

[0063] 180 185 190

[0064] Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys

[0065] 195 200 205

[0066] Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

[0067] 210 215 220

[0068] Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala

[0069] 225 230 235 240

[0070] Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[0071] 245 250 255

[0072] Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro

[0073] 260 265 270

[0074] Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu

[0075] 275 280 285

[0076] Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp

[0077] 290 295 300

[0078] Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
[0079] 305 310 315 320
[0080] Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Phe Ser Val
[0081] 325 330 335
[0082] Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
[0083] 340 345 350
[0084] Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
[0085] 355 360 365
[0086] Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
[0087] 370 375 380
[0088] Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
[0089] 385 390 395 400
[0090] Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
[0091] 405 410 415
[0092] Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
[0093] 420 425 430
[0094] Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
[0095] 435 440 445
[0096] Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
[0097] 450 455 460
[0098] His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
[0099] 465 470 475 480
[0100] Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0101] 485 490
[0102] <210> 3
[0103] <211> 21
[0104] <212> DNA
[0105] <213> 人工序列
[0106] <220>
[0107] <223> 引物
[0108] <400> 3
[0109] agcatcgttc tgtgttgtct c 21
[0110] <210> 4
[0111] <211> 22
[0112] <212> DNA
[0113] <213> 人工序列
[0114] <220>
[0115] <223> 引物
[0116] <400> 4

[0117] tgtttgtctt gtggcaatac ac 22

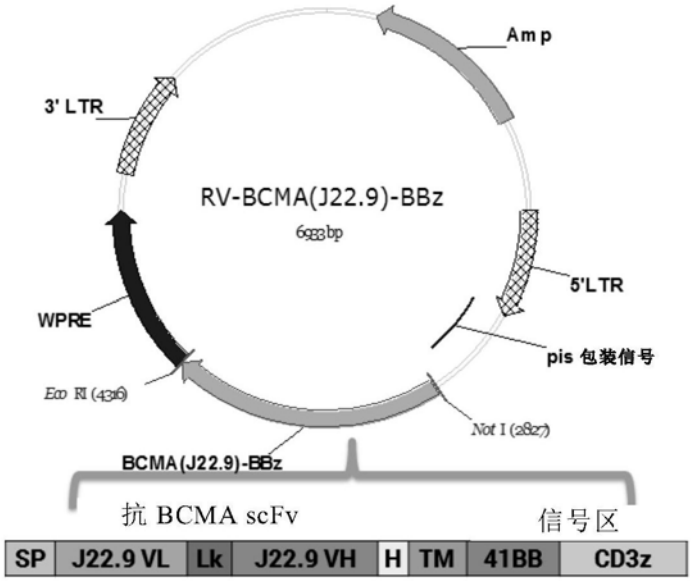
Amp
3' LTR
RV-BCMA(J22.9)-BBz
6933bp
5'LTR
WPRE
pis 包装信号
Eco RI (4316)
Not I (2827)
BCMA(J22.9)-BBz
抗 BCMA scFv
信号区
SP
J22.9 VL
Lk
J22.9 VH
H
TM
41BB
CD3z

图1

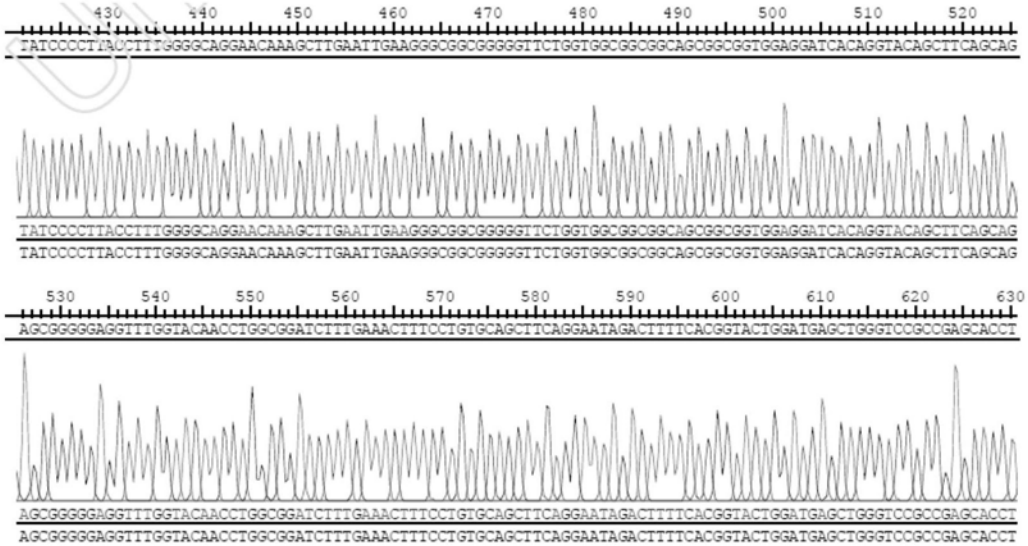
430 440 450 460 470 480 490 500 510 520
TATCCCCTTACCTTTGGGGCAGGAACAAAGCTTGAATTGAAGGGCGGCGGGGGTTCTGGTGGCGGCGGCAGCGGCGGTGGAGGATCACAGGTACAGCTTCAGCAG
530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630
AGCGGGGGAGGTTTGGTACAACCTGGCGGATCTTTGAAACTTTCCTGTGCAGCTTCAGGAATAGACTTTTCACGGTACTGGATGAGCTGGGTCCGCCGAGCACCT

图2

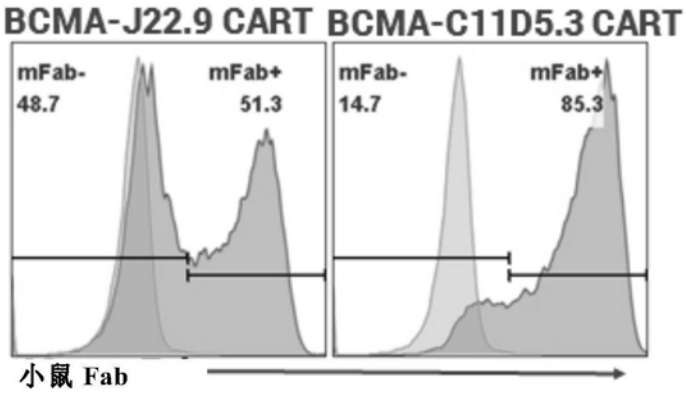
BCMA-J22.9 CART
BCMA-C11D5.3 CART
mFab-
48.7
mFab+
51.3
mFab-
14.7
mFab+
85.3
小鼠 Fab

图3

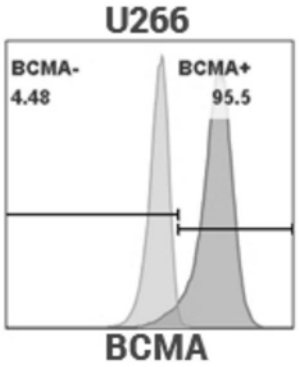
U266
BCMA-
4.48
BCMA+
95.5
BCMA

图4

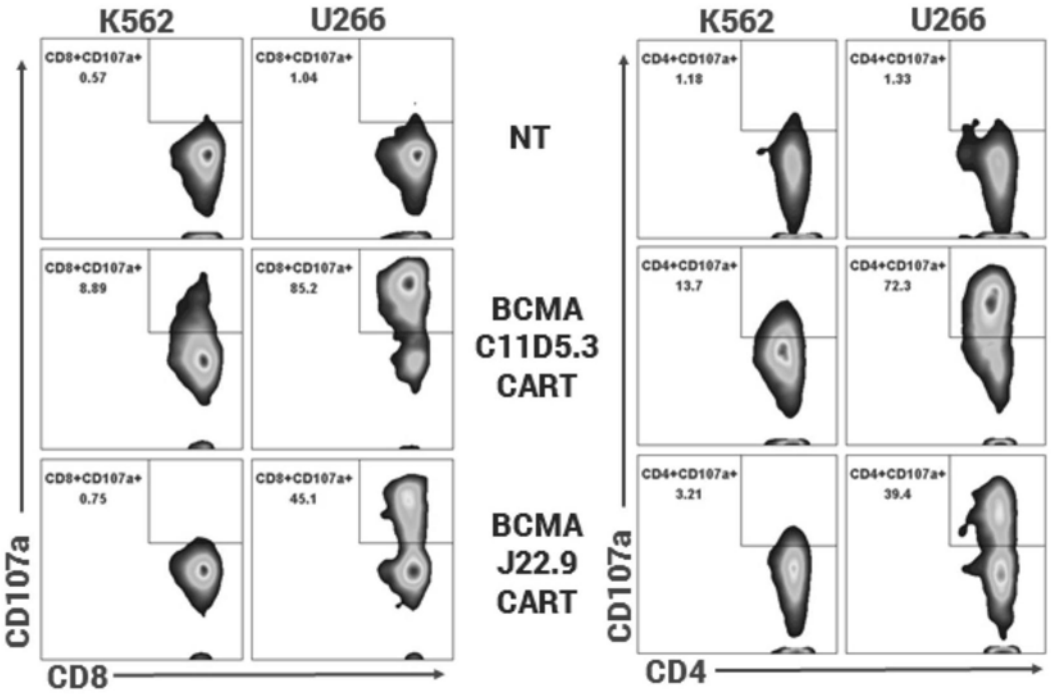
K562
U266
K562
U266
CD8+CD107a+
0.57
CD8+CD107a+
1.04
NT
CD4+CD107a+
1.18
CD4+CD107a+
1.33
CD8+CD107a+
8.89
CD8+CD107a+
85.2
BCMA
C11D5.3
CART
CD4+CD107a+
13.7
CD4+CD107a+
72.3
CD8+CD107a+
0.75
CD8+CD107a+
45.1
BCMA
J22.9
CART
CD4+CD107a+
3.21
CD4+CD107a+
39.4
CD107a
CD8
CD107a
CD4

图5

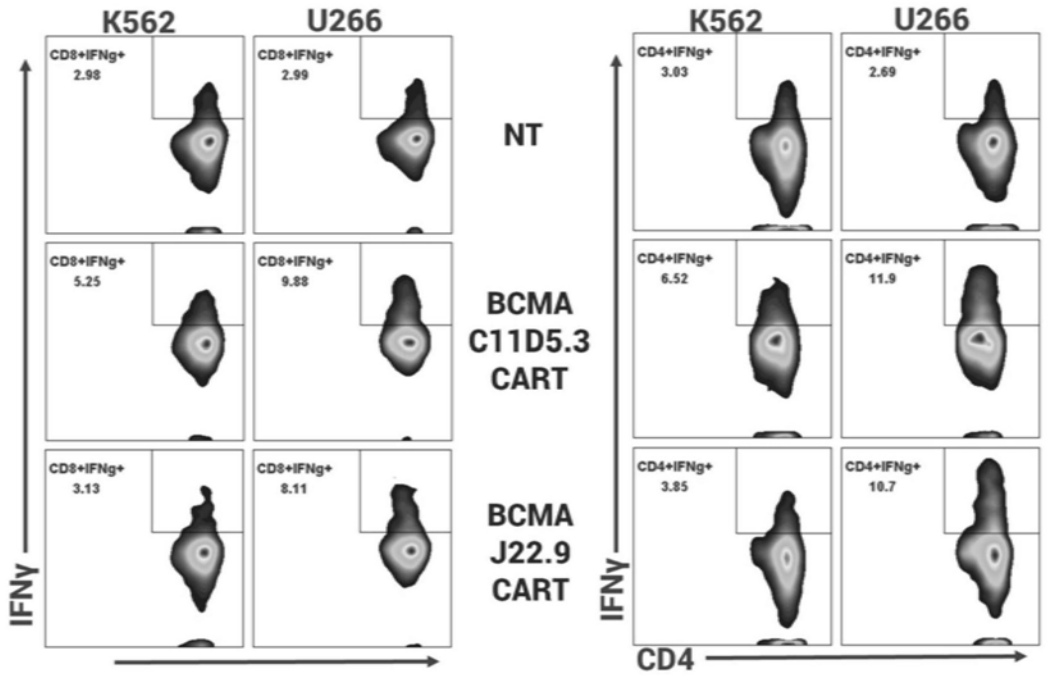
K562
U266
K562
U266
CD8+IFNg+
2.98
CD8+IFNg+
2.99
NT
CD4+IFNg+
3.03
CD4+IFNg+
2.69
CD8+IFNg+
5.25
CD8+IFNg+
9.88
BCMA
C11D5.3
CART
CD4+IFNg+
6.52
CD4+IFNg+
11.9
CD8+IFNg+
3.13
CD8+IFNg+
8.11
BCMA
J22.9
CART
CD4+IFNg+
3.85
CD4+IFNg+
10.7
IFNγ
IFNγ
CD4

图6

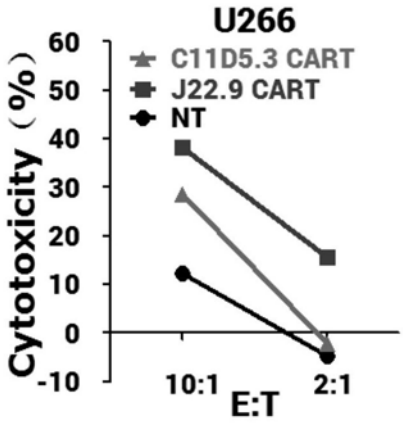
U266
C11D5.3 CART
J22.9 CART
NT
Cytotoxicity（%）
60
50
40
30
20
10
0
-10
10:1
2:1
E:T

图7