



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115976035 A

(43) 申请公布日 2023.04.18

(21) 申请号 202211258438.0

(22) 申请日 2022.10.14

(71) 申请人 武汉大学

地址 430000 湖北省武汉市武昌珞珈山

(72) 发明人 王惠明 王刚

(74) 专利代理机构 武汉蓝宝石专利代理事务所

(特殊普通合伙) 42242

专利代理师 方菲

(51) Int. Cl.

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

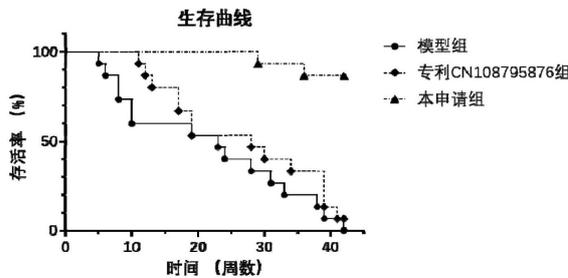
权利要求书1页 说明书15页  
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

可调控通用型CAR、CAR-T细胞及融合引导多肽

(57) 摘要

本发明提供一种用于治疗自身免疫性肾病的可调控通用型CAR、CAR-T细胞及可变融合引导多肽。该可调控通用型CAR-T细胞具有能特异性识别结合特定引导序列的嵌合抗原受体(CAR)，能够通过可变融合引导多肽来激活、引导和调控，从而精准靶向识别杀伤不同的自身反应性B细胞，实现治疗不同自身免疫性肾病的目的。



1. 一种编码抗引导多肽单链抗体的基因,其特征在于,其序列如SEQ ID NO:11或者SEQ ID NO:27所示。

2. 一种抗引导多肽单链抗体,其特征在于,其序列如SEQ ID NO:12所示。

3. 一种可调控通用型CAR的编码基因,其特征在于,其序列主要由CD3 $\zeta$ 区段、共刺激区段、跨膜区段、铰链区段、抗引导多肽单链抗体区段及信号肽区段组成,所述抗引导多肽单链抗体区段的基因序列如SEQ ID NO:11或者SEQ ID NO:27所示。

4. 根据权利要求3所述可调控通用型CAR的编码基因,其特征在于,所述CD3 $\zeta$ 区段携带的基因序列如SEQ ID NO:1所示;和/或

所述共刺激区段的基因序列如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5所示;和/或

所述跨膜区段的基因序列如SEQ ID NO:7所示;和/或

所述铰链区段的基因序列如SEQ ID NO:9所示;和/或

所述信号肽区段的基因序列如SEQ ID NO:13所示。

5. 根据权利要求4所述可调控通用型CAR的编码基因,其特征在于,其序列如SEQ ID NO:15或者SEQ ID NO:17所示。

6. 一种包含权利要求5所述可调控通用型CAR的编码基因的表达载体。

7. 一种可调控通用型CAR,其特征在于,其氨基酸序列如SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:18所示。

8. 一种包含权利要求1所述的抗引导多肽单链抗体或权利要求7所述可调控通用型CAR的CAR-T细胞。

9. 一种用于配套权利要求8所述可调控通用型CAR-T细胞应用的融合引导多肽,其特征在于,所述融合引导多肽由引导多肽、连接子以及自身抗体亲和肽顺序连接组成,所述引导多肽的序列如SEQ ID NO:19所示。

10. 根据权利要求9所述的融合引导多肽,其特征在于,所述融合引导多肽的序列如SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、或者SEQ ID NO:26所示。

## 可调控通用型CAR、CAR-T细胞及融合引导多肽

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫治疗技术领域,具体涉及一种用于治疗自身免疫性肾病的可调控通用型CAR、CAR-T细胞及融合引导多肽。

### 背景技术

[0002] 自身免疫性肾病是自身免疫介导的肾脏损伤,是全球慢性肾病的主要原因。自身免疫性肾病实际上属于一类自身免疫性疾病,主要包括系统性自身免疫反应疾病在肾脏的表现和肾脏特异性的自身免疫性疾病;前者如狼疮性肾炎(LN),后者如特发性膜性肾病(IMN)、IgA肾病(IgAN)、Goodpasture综合征等。自身抗体是许多自身免疫性肾病的标志,其中血液或肾脏中自身抗体的检测是诊断的关键。目前多种肾脏疾病中关键的自身抗体及其抗原已得到鉴定,如抗PLA2R、抗Gd-IgA1、抗dsDNA、抗ANCA和抗GBM抗体等。这些自身抗体会攻击肾脏组织,形成抗原抗体复合物在肾脏沉积并引起抗体介导的免疫反应,导致肾脏损伤。每一种自身抗体均由其对应的自身反应性B细胞克隆分泌。因此,可以说自身免疫性肾病与B细胞恶性肿瘤一样,本质上也属于一种B细胞疾病。

[0003] 目前,针对自身免疫性肾病的治疗方案主要包括免疫抑制剂和激素类药物。不过,这些药物会带来全身性的免疫抑制效果,从而增加感染和癌症等严重并发症的风险。靶向B细胞的抗体类药物或细胞治疗方案是正在探索的方向之一。例如,抗CD20单抗(利妥昔单抗)可以与B细胞表面CD20分子结合后介导杀伤B细胞,其在治疗系统性红斑狼疮尤其是重症狼疮性肾炎中的临床效果十分明显。利妥昔单抗在治疗膜性肾病的同时,也可以明显减少患者体内抗PLA2R抗体的水平。利妥昔单抗还可用于ANCA相关性血管炎的治疗。不过,与B细胞恶性肿瘤不同,致病性的自身反应性B细胞克隆只占人体B细胞的极少一部分,对B细胞进行广泛的清除并不是最好的选择。

[0004] CAR-T细胞技术是近年来肿瘤治疗领域的突破性创新技术。该技术通过将识别肿瘤相关抗原的单链抗体(scFv)和胞内结构域(包括共刺激域及信号转导域)偶联形成嵌合抗原受体(CAR),在体外通过基因转导的方法转染天然T细胞,形成表达CAR的T细胞(简称为CAR-T细胞)。CAR-T细胞能够以抗原依赖、非MHC限制的方式结合肿瘤抗原,启动并活化特异性杀伤携带肿瘤相关抗原的肿瘤细胞。

[0005] 目前,用于自身反应B细胞的靶向识别和杀伤的CAR-T细胞已有研究。例如,专利文献CN108795876公开一种采用通用型CAR-T细胞联合融合多肽引导子治疗自身免疫性肾病的新方案,可以很方便的应对自身免疫性肾病患者自身反应性B细胞的异质性。但是,该专利中公开的通用型CAR-T细胞的嵌合抗原受体的单链抗体序列序列偏短,经分析发现其重链CDR3区可能存在缺失,这将影响CAR-T细胞识别特异性及结合能力,进而影响其在治疗自身免疫性肾病中的应用。

### 发明内容

[0006] 基于此,本发明提供一种用于治疗自身免疫性肾病的可调控通用型CAR、CAR-T细

胞及可变融合引导多肽。

[0007] 本发明采用如下技术方案：

[0008] 本发明提供一种编码抗引导多肽单链抗体(anti-GP scFv)的基因,其序列如SEQ ID NO:11或者SEQ ID NO:27所示。抗引导多肽单链抗体的序列如SEQ ID NO:12所示。

[0009] 本发明还提供一种可调控通用型CAR的编码基因,其序列主要由CD3 $\zeta$ 区段、共刺激区段、跨膜区段、铰链区段、抗引导多肽单链抗体区段及信号肽区段组成,所述抗引导多肽单链抗体区段的基因序列如SEQ ID NO:11或者SEQ ID NO:27所示。所述CD3 $\zeta$ 区段携带的基因序列如SEQ ID NO:1所示。所述共刺激区段的基因序列如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5所示。所述跨膜区段的基因序列如SEQ ID NO:7所示。所述铰链区段的基因序列如SEQ ID NO:9所示。所述信号肽区段的基因序列如SEQ ID NO:13所示。

[0010] 优选地,所述可调控通用型CAR的编码基因的序列如SEQ ID NO:15或者SEQ ID NO:17所示。

[0011] 本发明还提供一种可调控通用型CAR,其序列如SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:18所示。

[0012] 本发明还提供一种包含上述抗引导多肽单链抗体或上述可调控通用型CAR的CAR-T细胞。

[0013] 本发明还提供用于配套所述可调控通用型CAR-T细胞应用的可变融合引导多肽(variable fusion guide polypeptide,vfGP),由引导多肽、连接子以及自身抗体亲和肽顺序连接组成,所述引导多肽的序列如SEQ ID NO:19所示。

[0014] 优选地,vfGP的序列如SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、或者SEQ ID NO:26所示。

[0015] 与现有技术相比,本发明的有益效果是：

[0016] 1) 本发明设计的可调控通用型CAR-T细胞所表达的抗引导多肽单链抗体(anti-GP scFv)能识别特定的引导多肽序列,且与后者具有极高的亲和力,从而能与包含上述引导多肽序列的vfGP配合,高效识别杀伤对应的自身反应性B细胞。

[0017] 2) 本发明设计的可调控通用型CAR能够应用于不同的自身免疫性肾病,不同于传统的CAR-T细胞需要针对不同疾病设计不同的CAR,能缩短CAR-T细胞制备时间和降低制备成本。

[0018] 3) 本发明设计的可调控通用型CAR-T细胞并不直接识别靶细胞,因此在回输入病人体内后,不会立即攻击异常的自身反应性B细胞;只有在后续输注vfGP后,才会在后者的引导下攻击靶细胞,且攻击效能与输注的vfGP的剂量有关。基于这一特性,可以很方便的控制CAR-T细胞在体内的免疫效应强度,有助于减少一般CAR-T细胞治疗中的细胞因子风暴等副反应或其它风险。

[0019] 4) 本发明可调控通用型CAR-T细胞具有能特异性识别结合特定引导序列的嵌合抗原受体(CAR),能够通过vfGP来激活、引导和调控,从而精准靶向识别杀伤不同的自身反应性B细胞,实现治疗不同自身免疫性肾病的目的。本发明设计的可调控通用型CAR-T细胞与vfGP在治疗自身免疫性肾病的方面的应用可扩展到自身免疫性疾病,且在开发针对新病种的治疗体系时,只需要筛选设计新的vfGP,大大缩短了研发周期、节省了研发成本。

## 附图说明

- [0020] 图1为实施例2中重组anti-GP scFv与vfGP的亲性和特异性测试统计图。
- [0021] 图2为实施例5中vfGP激活可调控通用型CAR-T细胞的流式细胞术检测结果及统计图。
- [0022] 图3为实施例5中流式细胞术检测vfGP介导可调控通用型CAR-T细胞对靶细胞的杀伤效果统计图。
- [0023] 图4为实施例7中竞争ELISA反应曲线。
- [0024] 图5为实施例8中实验小鼠生存曲线。
- [0025] 图6为实施例8中实验小鼠24h尿蛋白、血清尿素氮、血清肌酐及抗ds-DNA抗体水平含量变化情况。

## 具体实施方式

[0026] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细说明,以使本领域的技术人员更加清楚地理解本发明。

[0027] 以下各实施例,仅用于说明本发明,但不止用来限制本发明的范围。基于本发明中的具体实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的情况下,所获得的其他所有实施例,都属于本发明的保护范围。

[0028] 在本发明实施例中,若无特殊说明,所有原料组分均为本领域技术人员熟知的市售产品;在本发明实施例中,若未具体指明,所用的技术手段均为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0029] 一种可调控通用型嵌合抗原受体(CAR)的编码基因由CD3 $\zeta$ 区段、共刺激区段、跨膜区段、铰链区段、抗引导多肽单链抗体区段及信号肽组成。

[0030] 其中,CD3 $\zeta$ 区段携带的基因序列如下:

[0031] agagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcaggccagaaccagctctataacga  
gctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggacctgagatgggggaaag  
ccgagaaggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgaga  
ttgggatgaaaggcgagcggcgaggggcaagggcagcagatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaagga  
cacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc (SEQ ID NO:1)。

[0032] CD3 $\zeta$ 区段携带的基因翻译的蛋白序列如下:

[0033] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPGEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA  
EAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:2)。

[0034] 共刺激区段携带的基因序列选自下面2种基因序列的一种:

[0035] CD28共刺激区段的基因序列:

[0036] aggagtaagaggagcaggtcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggccccac  
ccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcc (SEQ ID NO:3)。

[0037] CD28共刺激区段翻译的蛋白序列如下:

[0038] RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:4)。

[0039] CD137共刺激区段的基因序列:

[0040] aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactca

agaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactg (SEQ ID NO:5)。

[0041] CD137共刺激区段翻译的蛋白序列如下：

[0042] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO:6)。

[0043] 跨膜区段携带的基因序列为：

[0044] atctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggctccttctcctgtcactggttatcaccttta  
ctgcaaccacaggaac (SEQ ID NO:7)。

[0045] 跨膜区段翻译的蛋白序列为：IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:8)。

[0046] 铰链区段的基因序列如下：gagtccaagtatgggcctccatgcctccatgtcct (SEQ ID  
NO:9)。

[0047] 铰链区段翻译的蛋白序列为：ESKYPPCPPCP (SEQ ID NO:10)。

[0048] 抗引导多肽单链抗体区段的基因序列如下：

[0049] gatgcggtggtgaccaggaaagcgcgctgaccaccagcccgggcgaaaccgtgacctgacctgccg  
cagcagcaccggcgcggtgaccaccagcaactatgcgagctgggtgcaggaaaaaccggatcatctgtttaccggc  
ctgattggcggcaccacaaccgcgcgccgggctgcccggcgcgcttttagcggcagcctgattggcgataaagcgg  
cgctgaccattaccggcgcgcagaccgaagatgaagcgattttatTTTTTgcgcgctgtggtatagccatcattgggt  
gtttggcggcggcaccaaactgaccgtgctgggcggcagcaccagcggcagcggcaaaccgggcagcggcgaaggc  
agcaccaaaaggcgatgtgcagctgcaggaaagcggccccgggctggtggcgcgagccagagcctgagcattacct  
gcaccgtgagcggctttagcctgaccgattatggcgtgaactgggtgcgccagagcccgggcaaaggcctggaatg  
gctgggcgtgattttggggcgatggcattaccgattataacagcgcgctgaaaagccgctgagcgtgaccaaagat  
aacagcaaaaagccaggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagagcggcgatagcgcgcgctattattgcgtgaccg  
gcctgtttgattattggggccagggcaccaccctgaccgtgagcagc (SEQ ID NO:11)。

[0050] 抗引导多肽单链抗体区段基因翻译的蛋白序列如下：

[0051] DAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYASWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSL  
IGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSHHWVFGGKTLTVLGGSTSGSGKPGSGEGSTKGDVQLQESGPLVAPSQ  
SLSITCTVSGFSLTDYGVNWRQSPGKGLEWLGVWGDGITDYNALKSRLSVTKDNSKSQVFLKMNSLQSGDSAR  
YYCVTGLFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:12)。

[0052] 信号肽区段的基因序列如下：

[0053] atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgcccaggccg (SEQ  
ID NO:13)。

[0054] 信号肽区段基因翻译的蛋白序列如下：

[0055] MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:14)。

[0056] 优选地,包含CD28共刺激区段的嵌合抗原受体 (svCAR) 基因的完整基因序列如下：

[0057] atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgcccaggccggatgc  
ggtggtgaccaggaaagcgcgctgaccaccagcccgggcgaaaccgtgaccctgacctgccgcagcagcaccggc  
gcggtgaccaccagcaactatgcgagctgggtgcaggaaaaaccggatcatctgtttaccggcctgattggcggca  
ccaacaaccgcgcgccgggctgcccggcgcgcttttagcggcagcctgattggcgataaagcggcgtgaccattac  
cggcgcgcagaccgaagatgaagcgattttatTTTTTgcgcgctgtggtatagccatcattgggtgtttggcggcggc  
accaaactgaccgtgctgggcggcagcaccagcggcagcggcaaaccgggcagcggcgaaggcagcaccaaaggcg  
atgtgcagctgcaggaaagcggccccgggctggtggcgcgagccagagcctgagcattacctgcaccgtgagcgg

ctttagcctgaccgattatggcgtgaactgggtgcgccagagcccgggcaaaggcctggaatggctgggcgtgatt  
tggggcgatggcattaccgattataacagcgcgctgaaaagccgcctgagcgtgaccaagataacagcaaaagcc  
aggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagagcggcgatagcgcgcgctattattgcgtgaccggcctgtttgatta  
ttggggccagggcaccaccctgaccgtgagcagcagtcgaagtatgggcctccatgccctccatgtcctatctac  
atctgggcgcccttggccgggacttgtggggctcttctcctgtcactggttatcaccctttactgcaaccacagga  
acaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggccccaccgcaa  
gcattaccagccctatgccccaccacgcgacttgcagcctatcgtccagagtgaagttcagcaggagcgcagac  
cccccgcgctaccagcaggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttt  
tggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaa  
tgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcagcgcggaggggcaagggg  
cacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccc  
ctcgc (SEQ ID NO:15)。

[0058] 包含CD28共刺激区段的嵌合抗原受体 (svCAR) 基因所翻译的蛋白序列如下:

[0059] MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEKPDHLFT  
GLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSHHWVFGGKTLTVLGGSTSGSGKPGSGE  
GSTKGDVQLQESGPLVAPSQSLITCTVSGFSLTDYGVNWRQSPGKLEWLGVWGDITDYNALKSRLSVTK  
DNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGGTTLTVSSESKYGPPPCPIYIWAPLAGTCVLLLSLVITL  
YCNHRNRSKRSRLHSDYMNMPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR  
EEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALH  
MQALPPR (SEQ ID NO:16)。

[0060] 优选地,包含CD137共刺激区段的嵌合抗原受体 (svCAR) 基因的序列如下:

[0061] atggccttaccagtgaccgccttgcctcctgccgctggccttgcctcctccacgccgaccaggccggatgc  
ggtggtgaccaggaaagcgcgctgaccaccagcccgggcaaacctgaccctgacctgccgcagcagcaccggc  
gcggtgaccaccagcaactatgcgagctgggtgcaggaaaaaccggatcatctgtttaccggcctgattggcggca  
ccaacaaccgcgcgccgggctgcccggcgcgcttttagcggcagcctgattggcgataaagcggcgtgaccattac  
cggcgcgcagaccgaagatgaagcgatttatttttgcgcgctgtggtatagccatcattgggtgtttggcggcggc  
accaaactgaccgtgctggcggcagcaccagcggcagcggcaaacccggcagcggcgaaggcagcaccaaaaggcg  
atgtgcagctgcaggaaagcggcccggcctggtggcggcagccagagcctgagcattacctgcaccgtgagcgg  
ctttagcctgaccgattatggcgtgaactgggtgcgccagagcccgggcaaaggcctggaatggctgggcgtgatt  
tggggcgatggcattaccgattataacagcgcgctgaaaagccgcctgagcgtgaccaagataacagcaaaagcc  
aggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagagcggcgatagcgcgcgctattattgcgtgaccggcctgtttgatta  
ttggggccagggcaccaccctgaccgtgagcagcagtcgaagtatgggcctccatgccctccatgtcctatctac  
atctgggcgcccttggccgggacttgtggggctcttctcctgtcactggttatcaccctttactgcaaccacagga  
acaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagagga  
agatggctgtagctgccgattccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcga  
gaccccccgctaccagcaggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatg  
ttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgta  
caatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcagcgcggaggggcaag  
gggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgc

cccctcgc (SEQ ID NO:17)。

[0062] 包含CD137共刺激区段的嵌合抗原受体 (svCAR) 基因所翻译的蛋白序列如下:

[0063] MALPVTALLLPLALLLHAARPDVAVTQESALTTSPGETVTLTCRSTGAVTTSNYASWVQEKPDHLFT  
GLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSHHWVFGGGTKLTVLGGSTSGSGKPGSGE  
GSTKGDVQLQESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTDYGVNWRQSPGKGLEWLGVIWGDGITDYNALSRLSVTK  
DNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLTVSSESKYGPCCPCPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL  
YCNHRNKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGR  
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL  
HMQALPPR (SEQ IDNO:18)。

[0064] 一种可调控通用型CAR-T细胞,制备步骤包括:委托生物公司合成两端带有同源臂的完整可调控通用型CAR基因序列,其序列如SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:17所示;利用同源重组酶通过同源重组的方式将上述CAR基因序列克隆至慢病毒载体中,与慢病毒包装质粒共同转染293T细胞,制备CAR慢病毒;用CAR慢病毒转染活化的T细胞,获得可调控通用型CAR-T细胞。

[0065] 一种配套可调控通用型CAR-T细胞的可变融合引导多肽 (vfGP),由引导多肽 (guiding peptide,GP)、连接子以及自身抗体亲和肽 (Autoantibody affinity peptide, AAP) 组成。

[0066] 其中,引导多肽的氨基酸序列如下:

[0067] HLENEVARLKKLVGER (SEQ ID NO:19)。

[0068] 连接子用于连接引导多肽和自身抗体亲和肽,其氨基酸序列如下:

[0069] GGGGS (SEQ ID NO:20)。

[0070] 自身抗体亲和肽 (AAP) 是能够与自身反应性B细胞的BCR分子特异性结合的多肽片段,其氨基酸序列是可变的,与作为攻击靶标的自身反应性B细胞相对应。

[0071] 具体地,vfGP可以为与可调控通用型CAR-T细胞联合治疗特发性膜性肾病 (IMN) 的vfGP-IMN,序列如下:

[0072] HLENEVARLKKLVGERGGGGSWQDKGIFVIQSESLKKCIQAGKSVLTLENCK (SEQ ID NO:21)。

[0073] 具体地,vfGP可以为与可调控通用型CAR-T细胞联合治疗IgA肾病 (IgAN) 的vfGP-IgAN,序列如下:

[0074] HLENEVARLKKLVGERGGGGSYCSKVCRPWNYRRPYYYGMDVW (SEQ ID NO:22)。

[0075] 具体地,vfGP可以为与可调控通用型CAR-T细胞联合治疗狼疮性肾炎 (LN) 的vfGP-LN,序列如下:

[0076] HLENEVARLKKLVGERGGGGSWEYSVWLSN (SEQ ID NO:23)。

[0077] 具体地,vfGP可以为与可调控通用型CAR-T细胞联合治疗MPO型-ANCA相关血管炎 (MPO-AAV) 的vfGP-MA,序列如下:

[0078] HLENEVARLKKLVGERGGGGSRLDNRYQPMPEPN (SEQ ID NO:24)。

[0079] 具体地,vfGP可以为与可调控通用型CAR-T细胞联合治疗PR3型-ANCA相关血管炎 (PR3-AAV) 的vfGP-PA,序列如下:

[0080] HLENEVARLKKLVGERGGGGSVVLGAHNVRTQ (SEQ ID NO:25)。

[0081] 具体地,vfGP可以为与可调控通用型CAR-T细胞联合治疗Goodpasture综合征的

vfGP-P14,序列如下:

[0082] HLENEVARLKKLVGERGGGGSTDIPPCPHGWISLWKGFSFIMF (SEQ ID NO:26)。

[0083] 与上述vfGP相对应的自身抗体亲和肽(AAP)的序列分别为:

[0084] AAP-IMN:WQDKGIFVIQSESLKKCIQAGKSVLTLENCK (SEQ ID NO:28)。

[0085] AAP-IgAN:YCSKVCRPWNRYRRPYYYGMDVW (SEQ ID NO:29)。

[0086] AAP-LN:DWEYSVWLSN (SEQ ID NO:30)。

[0087] AAP-MA:RLDNRYQPMEPN (SEQ ID NO:31)。

[0088] AAP-PA:VVLGAHNVRTQ (SEQ ID NO:32)。

[0089] AAP-P14:TDIPPCPHGWISLWKGFSFIMF (SEQ ID NO:33)。

[0090] 下面举例说明:

[0091] 实施例1

[0092] 本实施例提供一种抗引导多肽单链抗体(anti-GP scFv)制备方法,包括如下步骤:

[0093] (1)制备抗原:委托上海强耀生物公司合成如上述SEQ ID NO:19所示引导多肽(GP),利用KLH蛋白偶联试剂盒(美国Bioquest公司)将GP偶联至KLH载体蛋白。

[0094] (2)免疫小鼠:利用弗氏佐剂乳化步骤1制备的抗原后,常规流程免疫Bal b/c小鼠。

[0095] (3)制备杂交瘤细胞株:三免后,提取小鼠脾脏细胞与SP2/0细胞融合制备杂交瘤细胞。按常规流程进行杂交瘤细胞的培养及亚克隆,酶联免疫吸附测定筛选出能分泌高亲和力和抗GP单抗的杂交瘤细胞株。

[0096] (4)单抗测序:委托武汉普健生物公司对筛选出的杂交瘤细胞株进行测序,获得抗GP单抗的轻链与重链基因序列。

[0097] (5)重组anti-GP scFv的真核表达过程委托武汉普健生物公司完成,步骤如下:

[0098] ①将步骤4中测得的抗GP单抗轻链和重链基因以一段linker基因序列(参见见序列中的斜体下划线)连接,形成完整anti-GP scFv基因序列:

[0099] gatgcggtggtgaccaggaaagcgcgctgaccaccagcccggcgaaaccgtgaccctgacctgccgc  
agcagcaccggcgcggtgaccaccagcaactatgcgagctgggtgcaggaaaaaccgatcatctgtttaccggc  
ctgattggcgccaccaacaaccgcgcgccggcgctgccggcgcgctttagcggcagcctgattggcgataaagc  
ggcgctgaccattaccggcgcgagaccgaagatgaagcgattatTTTTgcgcgctgtggtatagccatcattgggt  
gtttggcgggcgccaccaaactgaccgtgctgggcggcagcaccagcggcagcggcaaacggggcagcggcg  
aaggcagcaccaaaggcgatgtgcagctgcaggaaagcggccccggcctggtggcgccgagccagagcctg  
agcattacctgcaccgtgagcggctttagcctgaccgattatggcgtgaactgggtgcgccagagccccgggcaaa  
ggcctggaatggctgggcgctgatttggggcgatggcattaccgattataacagcgcgctgaaaagccgcctgagc  
gtgaccaaagataacagcaaaagccaggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagagcggcgatagcgcgcgctatt  
attgctgaccggcctgtttgattattggggccagggcaccaccctgaccgtgagcagc (SEQ ID NO:27)。

[0100] ②合成完整的anti-GP scFv基因,将anti-GP scFv基因克隆至真核表达载体。

[0101] ③将anti-GP scFv表达载体瞬时转染CHO细胞表达重组anti-GP scFv,收集培养上清。将引导多肽偶联至N-羟基琥珀酰亚胺活化琼脂糖,制备成抗原亲和纯化柱,对上述培养上清进行亲和纯化收集重组anti-GP scFv,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。

[0102] 实施例2

[0103] 本实施例提供一种通过竞争ELISA法检测重组anti-GP scFv与vfGP的亲合性、特异性的方法,具体步骤包括:(1)多肽合成:委托上海强耀生物公司合成SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21-26、SEQ ID NO:28-33所示的多肽。(2)取适量上述多肽,以DMSO分别溶解为2mg/mL储存液备用。(3)包被酶标板:取适量GP储存液,以包被缓冲液(0.05M, pH 9.6碳酸盐缓冲液)稀释成1 $\mu$ g/mL,按100 $\mu$ L每孔的量加入96孔酶标板,4 $^{\circ}$ C包被过夜。(4)包被结束后,弃去酶标板孔中抗原液,每孔中加入200 $\mu$ L PBST溶液洗涤1次。(5)封闭:每孔添加200 $\mu$ L含5%牛血清白蛋白(BSA)的PBS(0.01M, pH7.4)溶液,室温封闭2小时。(6)另取适量步骤2中的多肽储存液分别以含1% BSA的PBS溶液稀释为如下浓度梯度:0、1、5、25、125nM。(7)抗原预阻断:取适量实施例1制备中获得的重组anti-GP scFv,用含1% BSA的PBS溶液稀释为0.1 $\mu$ g/mL。分别取步骤6中不同浓度梯度的多肽与重组anti-GP scFv溶液等体积混合,于室温下预孵育1小时。(8)封闭结束后,弃去酶标板孔中封闭液,加入100 $\mu$ L步骤7中的混合溶液,每种组合设计3个复孔;另设空白孔,加入100 $\mu$ L含1% BSA的PBS溶液,于室温下孵育2小时。(9)孵育结束后,弃去孔中液体,加入250 $\mu$ L PBST溶液洗涤4次,拍干。(10)向酶标板孔内加入100 $\mu$ L HRP标记羊抗小鼠IgG Light-Chain Specific Antibody,于室温下孵育1小时。(11)孵育结束后,弃去孔中液体,加入250 $\mu$ L PBST溶液洗涤5次,拍干。(12)向酶标板孔内加入TMB显色液100 $\mu$ L,室温避光反应10-15分钟。(13)向酶标板孔内加入100 $\mu$ L终止液,将酶标板置于酶标仪测定450nm吸光度值(OD<sub>450nm</sub>)。

[0104] 竞争ELISA检测结果如图1所示。结果显示:GP(SEQ ID NO:19)及vfGP(SEQ ID NO:21-26)均能竞争抑制重组anti-GP scFv与包被在酶标板上的GP结合,且抑制效果与浓度正相关;与此相对,自身抗体亲和肽(SEQ ID NO:28-33)均未显示出阻断效果。证明本申请新构建的重组anti-GP scFv能特异性识别GP及包含GP序列的vfGP,且不与自身抗体亲和肽发生交叉反应。

[0105] 此外,研究结果还显示:使用同等浓度的vfGP或GP对anti-GP scFv进行预阻断测得的OD<sub>450nm</sub>值没有显著差异,表明anti-GP scFv与vfGP和GP的亲合性相近。

[0106] 由于anti-GP scFv是本申请所述可调控通用型CAR-T细胞的抗原识别结构域,以上实验结果也表明该CAR-T细胞能特异性识别并结合vfGP。

[0107] 实施例3

[0108] 本实施例提供一种以夹心ELISA法证明vfGP能桥接anti-GP scFv与肾病患者自身抗体的实验过程,包括如下步骤:

[0109] 收集含自身抗体的自身免疫性肾病患者血清,包括:经临床检验确认含有抗PLA2R抗体的IMN患者血清;经临床检验确认含有抗GdIgA1抗体的IgAN患者血清;经临床检验确认含有抗dsDNA抗体的LN患者血清;经临床检验确认含有抗MPO抗体的MPO型-ANCA相关血管炎(MPO-AAV)患者血清;经临床检验确认含有抗PR3抗体的PR3型-ANCA相关血管炎(PR3-AAV)患者血清;经临床检验确认含有抗GBM抗体的Goodpasture综合征患者血清。

[0110] 包被酶标板：取实施例1中获得的重组anti-GP scFv,以包被缓冲液稀释成2ug/mL,按100μL每孔的量加入96孔酶标板,4℃包被过夜。包被结束后,弃去酶标板孔中液体,每孔中加入200μL PBST溶液洗涤1次。封闭：每孔添加200μL含5% BSA的PBS(0.01M,pH7.4)溶液,室温封闭2小时。取适量实施例2步骤2中制备的可变融合引导多肽(vfGP,SEQ IDNO:21-26)储存液,分别以含1% BSA的PBS溶液稀释为如下浓度梯度:0、1、10、100、1000pM。封闭结束后,弃去酶标板孔中封闭液,加入上述不同浓度梯度的vfGP,每种多肽每个浓度设3个复孔、每孔100μL,于室温下孵育1小时。孵育结束后,弃去孔中液体,加入250μL PBST溶液洗涤4次,拍干。将前述自身免疫性肾病患者血清1/10稀释后加入对应的酶标板孔中(例:向加入vfGP-IMN肽孵育过的酶标板孔中加入IMN患者血清),每个样品设置3个复孔;加样完成后,于室温下孵育1小时。孵育结束后,弃去孔中液体,加入250μL PBST溶液洗涤4次,拍干。向酶标板孔内加入100μL HRP标记羊抗人IgG,于室温下孵育1小时。孵育结束后,弃去孔中液体,加入250μL PBST溶液洗涤5次,拍干。向酶标板孔内加入TMB显色液100μL,室温避光反应10-15分钟。向酶标板孔内加入100μL终止液,将酶标板置于酶标仪测定450nm吸光度值( $OD_{450nm}$ )。

[0111] 夹心ELISA检测结果如表1所示:

[0112] 表1 夹心ELISA检测结果

[0113]

vfGP-IMN		IMN 患者血清			vfGP-IgAN		IgAN 患者血清		
浓度 (pM)	0	0.0161	0.0100	0.0101	浓度 (pM)	0	0.0171	0.0142	0.0144
	1	0.2372	0.2457	0.2634		1	0.2146	0.2312	0.2494
	10	0.6382	0.6029	0.6667		10	0.6951	0.6020	0.5738
	100	1.7526	1.6661	1.6733		100	1.7616	1.6208	1.6122
	1000	2.1583	2.2732	2.2633		1000	2.2684	2.3751	2.1722
vfGP-LN		LN 患者血清			vfGP-MA		MPO-AAV 患者血清		
浓度 (pM)	0	0.0166	0.0162	0.0153	浓度 (pM)	0	0.0100	0.0166	0.0131
	1	0.1814	0.2253	0.2005		1	0.2684	0.2087	0.2582
	10	0.5952	0.5723	0.5882		10	0.6584	0.5546	0.6551
	100	1.4635	1.5021	1.5160		100	1.8056	1.7553	1.6753
	1000	1.9781	2.0189	2.0298		1000	2.4544	2.3214	2.1653
vfGP-PA		PR3-AAV 患者血清			vfGP-P14		Goodpasture 患者血清		
浓度 (pM)	0	0.0170	0.0138	0.0115	浓度 (pM)	0	0.0109	0.0174	0.0174
	1	0.2224	0.2630	0.2229		1	0.1807	0.1911	0.1904
	10	0.5692	0.6023	0.5550		10	0.4405	0.5034	0.4230
	100	1.5864	1.5873	1.5320		100	1.3202	1.4256	1.3645
	1000	2.1720	2.2030	2.0918		1000	1.9039	1.9788	1.8659

[0114] 以不加vfGP测得的OD值的2.1倍作为阳性cut-off值,结果显示:加入不同浓度的vfGP测得的OD值均为阳性,OD值大小与vfGP浓度呈正相关,表明与anti-GP scFv结合后的的vfGP能够继续与肾病患者自身抗体发生特异性结合。

[0115] 由于肾病患者的自身抗体与自身反应性B细胞BCR的抗原结合序列完全相同,这些实验结果证明本申请vfGP能够同时与可调控通用型CAR-T细胞的单链抗体区(即anti-GP scFv)和自身反应性B细胞的BCR结合,从而介导可调控通用型CAR-T细胞靶向自身反应性B细胞。

[0116] 实施例4

[0117] 本实施提供一种可调控通用型CAR-T细胞制备方法,包括如下步骤:

[0118] (1) 委托通用生物公司合成两端带有同源臂的完整可调控通用型CAR基因序列,其序列如上述SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:17所示。

[0119] (2) 利用同源重组酶通过同源重组方式,将可调控通用型CAR基因序列克隆至pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP载体(购自优宝生物,货号VT1479),获得pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-CAR载体。

[0120] (3) 将pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-CAR载体与慢病毒包装质粒pLP1-gag/pol、

pLP2-Rev和pLP/VSVG(购自Invitrogen,商品名:ViraPower™Lentiviral Packaging Mix,货号K497500)共同转染293T细胞,制备CAR慢病毒。

[0121] (4)采用密度梯度离心法从新鲜人全血中分离获得外周血单核细胞(PBMC),以CD3磁珠分选获得T细胞。

[0122] (5)以抗CD3和抗CD28单抗活化T细胞。

[0123] (6)用CAR慢病毒转染活化的T细胞,获得可调控通用型CAR-T细胞。

[0124] (7)采用T细胞扩增培养基扩增可调控通用型CAR-T细胞。

[0125] 实施例5

[0126] 本实施例以特发性膜性肾病(IMN)患者自身反应性B细胞为例,提供一种体外验证实施例4的可调控通用型CAR-T细胞(CAR基因序列如SEQ ID NO:15所示)通过vfGP杀伤靶细胞的实验方法,包括如下步骤:

[0127] (1)靶细胞构建:从IMN患者外周血中分离PBMC,以CD19磁珠和抗人IgG磁珠分步分选出IgG分泌B细胞,再以EB病毒转化使其永生代化,再以有限稀释法挑选AAP-IMN(序列如SEQ ID NO:28所示)阳性反应克隆并进行传代培养获得EBV-IMN-B细胞。

[0128] (2)将EBV-IMN-B细胞接种至6孔板,调整细胞浓度为 $2 \times 10^5$ /mL,每孔1mL;再向各孔中加入1mL细胞浓度为 $2 \times 10^6$ /mL的可调控通用型CAR-T细胞。

[0129] (3)取适量实施例2步骤2中制备的vfGP-IMN储存液以无菌PBS溶液稀释为如下浓度梯度:0、0.01、0.1、1、10nM。

[0130] (4)将不同浓度的vfGP-IMN加入到步骤2的6孔板中,每孔20 $\mu$ L,即vfGP-IMN终浓度分别为:0、0.1、1、10、100pM;每个浓度设置3个复孔,混匀后置二氧化碳培养箱孵育24小时。

[0131] (5)乳酸脱氢酶(LDH)释放试验:利用LDH细胞毒性检测试剂盒(购自Invitrogen,货号C20300)检测培养上清中的LDH含量,分析可调控通用型CAR-T细胞(CAR基因序列如SEQ ID NO:15所示)对靶细胞的杀伤活性。统计结果见表2:

[0132] 表2 LDH释放试验检测结果

	vfGP-IMN 浓度 (pM)				
	0	0.1	1	10	100
[0133] LDH 酶活力 (mU)	68.6 $\pm$ 8.39	86.33 $\pm$ 6.39*	422.27 $\pm$ 11.76**	808.1 $\pm$ 7.73**	815.93 $\pm$ 5.13**
注: 加 vfGP-IMNVS 不加 vfGP-IMN, * $P < 0.1$ , ** $P < 0.01$ 。					

[0134] 上表结果显示:加入vfGP-IMN后,培养上清中LDH酶活力显著增加,且与vfGP-IMN浓度存在相关性;其中,vfGP-IMN终浓度达到10pM时,LDH酶活力到达峰值。

[0135] (6)采用流式细胞术检测可调控通用型CAR-T细胞激活情况:用CD3-percp、CD25-PE、CD69-APC抗体对细胞进行标记后,利用流式细胞仪进行检测。其中,激活的CAR-T细胞为CD3+/CD25+/CD69+。

[0136] 流式测试结果见图2。结果显示:加入vfGP-IMN后,激活的可调控通用型CAR-T细胞比例显著增多,且与vfGP-IMN浓度存在相关性。

[0137] (7)流式细胞术检测靶细胞杀伤率:用CD3-percp和CD19-APC对细胞进行标记后,利用流式细胞仪进行检测,分析靶细胞杀伤率;其中,靶细胞为CD3-/CD19+,可调控通用型CAR-T细胞为CD3+/CD19-。计算方法如下:

[0138] 靶细胞杀伤率(%) = [(不加vfGP-IMN组靶细胞比例 - 加vfGP-IMN组靶细胞比例) /

(不加vfGP-IMN组靶细胞比例)] $\times 100\%$ 。

[0139] 靶细胞杀伤率统计结果见图3。结果显示:加入vfGP-IMN后,靶细胞比例显著减少,且与vfGP-IMN浓度存在相关性;其中,vfGP-IMN终浓度达到10pM时,已经基本检测不到靶细胞,杀伤率达到100%。

[0140] 实施例6

[0141] 本实施例以Goodpasture综合征大鼠模型为例,提供一种利用动物模型验证可调控通用型CAR-T细胞通过vfGP杀伤靶细胞的实验方法,包括如下步骤:

[0142] (1) 委托上海强耀生物公司合成Goodpasture综合征自身抗体亲和肽P14 (SEQ ID NO:29),以PBS溶解为0.4mg/mL,过滤除菌备用。

[0143] (2) GBM大鼠模型构建:健康雌性WKY大鼠,4周龄,体重65-80g,适应性饲养1周后,以等体积弗氏完全佐剂乳化步骤1中的P14肽,在大鼠后脚垫多点注射进行单次免疫,剂量为200 $\mu$ g/kg。

[0144] (3) 可调控通用型CAR-T细胞制备:从WKY大鼠全血中分离PBMC细胞;采用T细胞扩增培养基扩增后,以CD3磁珠分选获得T细胞。以抗CD3和抗CD28单抗活化T细胞;用CAR慢病毒转染活化的T细胞,获得可调控通用型CAR-T细胞;采用T细胞扩增培养基扩增可调控通用型CAR-T细胞。

[0145] (4) 准备vfGP:委托上海强耀生物公司合成vfGP-P14,以DMSO溶解为2mg/mL储存液;再取适量储存液以无菌PBS溶液稀释为1nM备用。

[0146] (5) 实验分组:将P14肽免疫4周后的模型大鼠随机分为模型组和治疗组,每组10只。将 $1 \times 10^7$ 个步骤3中获得的可调控通用型CAR-T细胞(CAR基因序列如SEQ ID NO:15所示)从尾静脉输注入治疗组大鼠体内,6小时后再通过尾静脉注入100 $\mu$ L浓度为1nM的vfGP-P14。模型组仅通过尾静脉输入等体积生理盐水。

[0147] (6) 监测指标:以周为时间观察单位,检测各组大鼠24h尿蛋白、血清尿素氮及血清肌酐含量变化情况。

[0148] 统计结果见下表3:

[0149] 表3 大鼠24h尿蛋白、血清尿素氮及血清肌酐含量变化情况

监测指标		治疗后时间			
		第1周	第2周	第3周	第4周
[0150] 24h 尿蛋白 (mg/24h)	模型组	42.8 $\pm$ 11.81	61.91 $\pm$ 12.49	79.29 $\pm$ 11.08	67 $\pm$ 13.83
	治疗组	36.07 $\pm$ 8.05	27.42 $\pm$ 9.86**	16.18 $\pm$ 5.74**	11.85 $\pm$ 5.01**
[0151] 血清尿素氮 (mM)	模型组	17.48 $\pm$ 2.61	24.22 $\pm$ 3.82	35.32 $\pm$ 10.14	63.2 $\pm$ 11.32
	治疗组	16.36 $\pm$ 3.02	17.95 $\pm$ 2.21**	14.62 $\pm$ 3.72**	13.95 $\pm$ 2.84**
[0151] 血清肌酐 ( $\mu$ M)	模型组	52.49 $\pm$ 12.53	54.31 $\pm$ 9.06	86.17 $\pm$ 16.7	127.99 $\pm$ 25.62
	治疗组	48.66 $\pm$ 12.16	42.63 $\pm$ 9.07**	40.57 $\pm$ 7.11**	39.22 $\pm$ 8.35**

注: 治疗组 VS 模型组, \*\* $P < 0.01$ 。

[0152] 上表结果显示:与对照组相比,治疗组大鼠24h尿蛋白、血清尿素氮及血清肌酐含量均显著改善,表明应用本申请可调控通用型CAR-T细胞联合vfGP-P14治疗显著改善了Goodpasture综合征模型大鼠肾功能。

[0153] 实施例7

[0154] 本实施例提供前述抗引导多肽单链抗体与专利文献CN108795876公开的抗GCN单

链抗体亲和力比较。采用非竞争ELISA法分别测定本申请中抗引导多肽单链抗体与专利文献CN108795876公开的抗GCN单链抗体亲和常数。具体步骤如下：

[0155] (1) 按照专利文献CN108795876公开的抗GCN单链抗体序列合成完整的anti-GCN scFv基因,将anti-GCN scFv基因克隆至真核表达载体。将anti-GCN scFv表达载体瞬时转染CHO细胞表达重组anti-GCN scFv,收集培养上清。将引导多肽偶联至N-羟基琥珀酰亚胺活化琼脂糖,制备成抗原亲和纯化柱,对上述培养上清进行亲和纯化收集重组anti-GCN scFv,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。

[0156] (2) 多肽合成:委托上海强耀生物公司合成专利文献CN108795876公开的GCN肽。

[0157] (3) 用DMSO将GCN肽溶解为2mg/mL储存液。

[0158] (4) 包被酶标板:取实施例2中制备的GP多肽储存液,以碳酸盐缓冲液(0.05M, pH 9.6)稀释成3种浓度:2 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mL,按100 $\mu$ L每孔的量加入96孔酶标板,4 $^{\circ}$ C包被过夜。按相同的方式制备GCN肽包被酶标板。包被结束后,弃去酶标板孔中抗原液,每孔中加入200 $\mu$ L PBST溶液洗涤1次。封闭:每孔添加200 $\mu$ L含5%牛血清白蛋白(BSA)的PBS(0.01M, pH7.4)溶液,室温封闭2小时。取适量实施例1制备中获得的重组anti-GP scFv,用含1% BSA的PBS(0.01M, pH7.4)溶液稀释为0.5 $\mu$ g/mL(相当于20nM),然后再进行倍比稀释至1:2-128倍。按相同的方式稀释配制不同浓度梯度的anti-GCN scFv。封闭结束后,弃去酶标板孔中封闭液,加入100 $\mu$ L上述步骤中的梯度抗体溶液,每种组合设计3个复孔;另设空白孔,加入100 $\mu$ L含1% BSA的PBS(0.01M, pH7.4)溶液,于室温下孵育2小时。孵育结束后,弃去孔中液体,加入250 $\mu$ L PBST溶液洗涤4次,拍干。向酶标板孔内加入100 $\mu$ L HRP标记羊抗小鼠IgG Light-Chain Specific Antibody,于室温下孵育1小时。孵育结束后,弃去孔中液体,加入250 $\mu$ L PBST溶液洗涤5次,拍干。向酶标板孔内加入TMB显色液100 $\mu$ L,室温避光反应10-15分钟。向酶标板孔内加入100 $\mu$ L终止液,将酶标板置于酶标仪测定450nm吸光度值(OD<sub>450</sub>)。

[0159] 以单抗的浓度为横坐标,以其相应的OD<sub>450nm</sub>值为纵坐标,绘制反应曲线见图4。以5%递减法确定出竞争ELISA反应曲线的结合反应平台期,通过作图法取不同抗原包被浓度下最大OD值一半时的抗体浓度,计为[Ab]<sub>t</sub>。

[0160] 根据公式 $K_a = (n-1) / (2[Ab']_t - [Ab]_t)$ 计算亲和常数。其中, $n = [Ag]_t / [Ag']_t$ , $[Ag]_t$ 和 $[Ag']_t$ 为不同包被抗原的浓度; $[Ab]_t$ 、 $[Ab']_t$ 是对应不同包被抗原的浓度下,反应曲线上最大OD<sub>450nm</sub>值一半时对应的抗体的浓度。由于设置了3种不同的抗原包被浓度,两两组合可以求得3个 $K_a$ 值,其平均值即为抗体的亲和常数。

[0161] 亲和常数的统计结果见下表4:

[0162] 表4 anti-GP scFv和anti-GCN scFv的亲和常数

抗体	$K_a$ (L/mol), n=2		$K_a$ (L/mol), n=4	$X \pm s$
[0163] anti-GP scFv	8.77 $\times 10^9$	5.35 $\times 10^9$	6.15 $\times 10^9$	(6.76 $\pm 1.79$ ) $\times 10^9$
anti-GCN scFv	2.89 $\times 10^6$	3.26 $\times 10^6$	3.13 $\times 10^6$	(3.09 $\pm 0.19$ ) $\times 10^6$

[0164] 结果显示,在相同的抗体浓度下,anti-GP scFv的OD<sub>450nm</sub>值远高于anti-GCN scFv。根据上述公式,计算出anti-GP scFv的亲和常数为:(6.76 $\pm 1.79$ ) $\times 10^9$ L/mol。与此相对,在10nM~0.07813nM范围内,anti-GCN scFv没有检测出阳性。进一步提高anti-GCN scFv的浓度进行重复实验后,测得anti-GCN scFv的亲和常数为:(3.09 $\pm 0.19$ ) $\times 10^6$ L/mol。

[0165] 这些结果表明,anti-GP scFv对靶标的亲和力远高于专利文献CN108795876公开的anti-GCN scFv,提示本申请中以anti-GP scFv作为抗体识别区的可调控通用型CAR-T细胞的靶标识别特异性及结合能力远高于专利文献CN108795876公开的通用型CAR-T细胞。

[0166] 实施例8

[0167] 本实施例提供狼疮肾炎模型鼠治疗效果比较试验,以本申请可调控通用型CAR-T细胞联合vfGP与专利文献CN108795876公开的一种采用通用型CAR-T细胞联合PdN肽治疗狼疮性肾炎的比较研究。

[0168] 狼疮肾炎小鼠模型:NZB和NZW杂交F1代小鼠培养至第20周构建自发狼疮肾炎小鼠模型。

[0169] 本申请CAR-T细胞制备:从小鼠全血中分离PBMC细胞;采用T细胞扩增培养基扩增后,以CD3磁珠分选获得T细胞。其余步骤参考实施例4方法,构建小鼠CAR-T细胞。

[0170] 按CN108795876专利实施例一所述方法制备CN108795876-CAR-T细胞。

[0171] 委托上海强耀生物公司合成狼疮肾炎vfGP-LN(SEQ ID NO:23)及CN108795876专利PdN肽,均以DMSO溶解为2mg/mL储存液;再取适量储存液以无菌PBS溶液稀释为1nM备用。

[0172] 分组及处理:20周龄雌性NZB/W F1小鼠随机分为3组,每组15只。具体如下:

[0173] 模型组:通过尾静脉注射20 $\mu$ L无菌PBS。

[0174] 本申请组:将 $1 \times 10^7$ 个本申请可调控通用型CAR-T细胞从尾静脉注入小鼠体内。6h后,向小鼠尾静脉内注入20 $\mu$ L浓度为1nM的vfGP-LN(终浓度10pM)。

[0175] 专利CN108795876组:将 $1 \times 10^7$ 个CN108795876-CAR-T细胞从尾静脉注入小鼠体内。6h后,向小鼠尾静脉内注入20 $\mu$ L浓度为1nM的PdN肽(终浓度10pM)。

[0176] 给药完成后,记录各组小鼠死亡情况,直至模型组小鼠全部死亡。以给药完成时为第0周,制作生存曲线,如图5所示。

[0177] 结果表明,专利CN108795876组小鼠生存期相对模型组有一定改善,但差异不显著( $p=0.1894$ );而本申请组小鼠生存期相较专利CN108795876组及模型组均明显延长( $p$ 值均 $<0.0001$ )。

[0178] 小鼠肾功能监测:每2周检测1次各组实验鼠24h尿蛋白、血清尿素氮、血清肌酐及抗ds-DNA抗体水平含量变化情况,直至模型组小鼠死亡率超过50%(第23周)。

[0179] 如图6所示,结果显示:多个时间点测得的专利CN108795876组小鼠24h尿蛋白、血清尿素氮、血清肌酐及抗ds-DNA抗体水平相对模型组均有所降低,但整体仍随时间逐渐升高,表明模型小鼠肾功能逐渐恶化的趋势没有改变。

[0180] 与此相对,本申请组模型小鼠24h尿蛋白、血清尿素氮、血清肌酐及抗ds-DNA抗体水平较专利CN108795876组及模型组均显著下降,且整体呈现随时间逐渐下降的趋势,表明应用本申请可调控通用型CAR-T细胞联合vfGP-LN治疗能够逐渐恢复狼疮肾炎模型小鼠肾功能。

[0181] 总的来讲,利用上述可调控通用型CAR-T细胞及vfGP治疗的方法,包括:

[0182] 第一阶段:可调控通用型CAR-T细胞体外制备与回输。按照常规流程操作,即抽取外周血、分选T细胞、活化T细胞(以抗CD3/CD28或人工APC等激活)、转染CAR(电转、慢病毒等技术)、扩增CAR-T细胞及回输。

[0183] 第二阶段:输注vfGP体内激活。根据疾病种类、病情活动度(主要的自身抗体滴度

等)给予不同种类和剂量的vfGP,并可根据临床病情变化后续调整。给药后,体内可调控通用型CAR-T细胞将被动员并引导攻击自身反应性B细胞,达到精准治疗疾病的目的。

[0184] 在此有必要指出的是,以上实施例仅限于对本发明的技术方案做进一步的阐述和说明,并不是对本发明的技术方案的进一步的限制,本发明的方法仅为较佳的实施方案。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

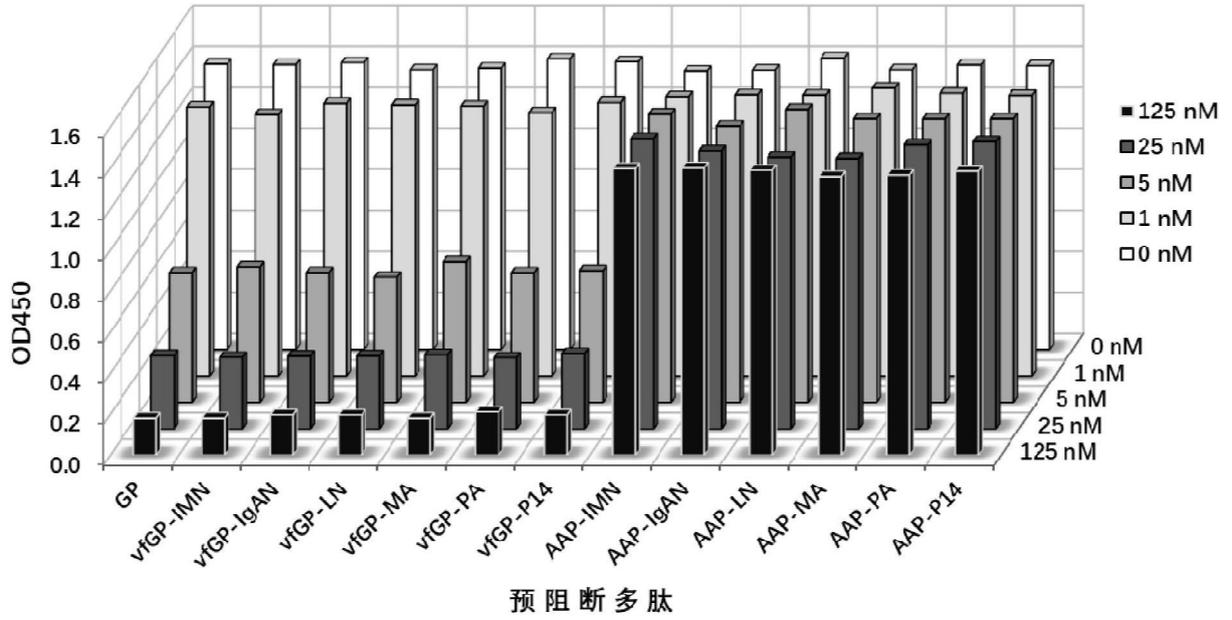


图1

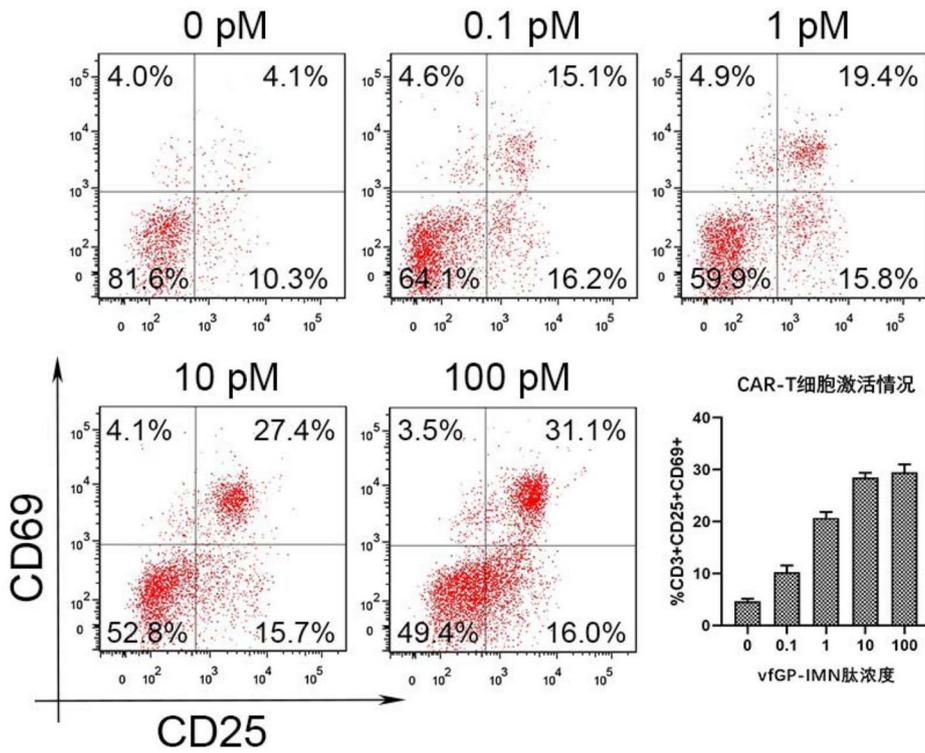


图2

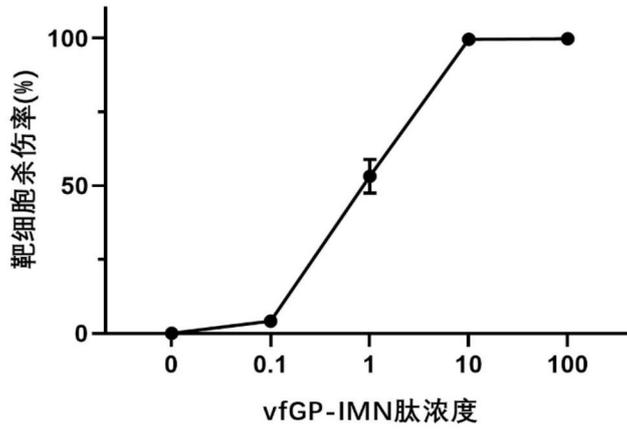


图3

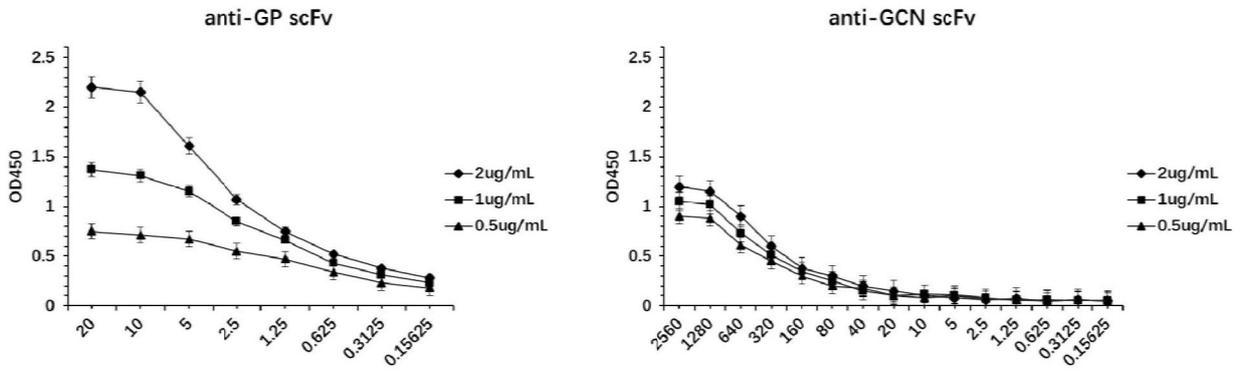


图4

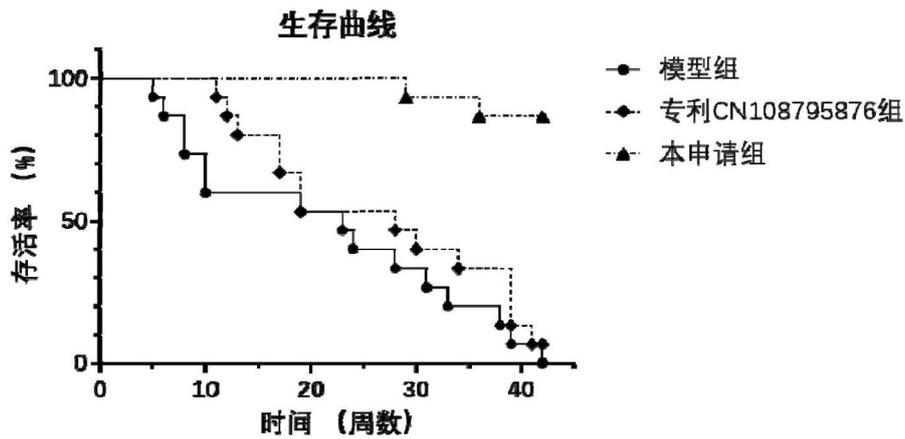


图5

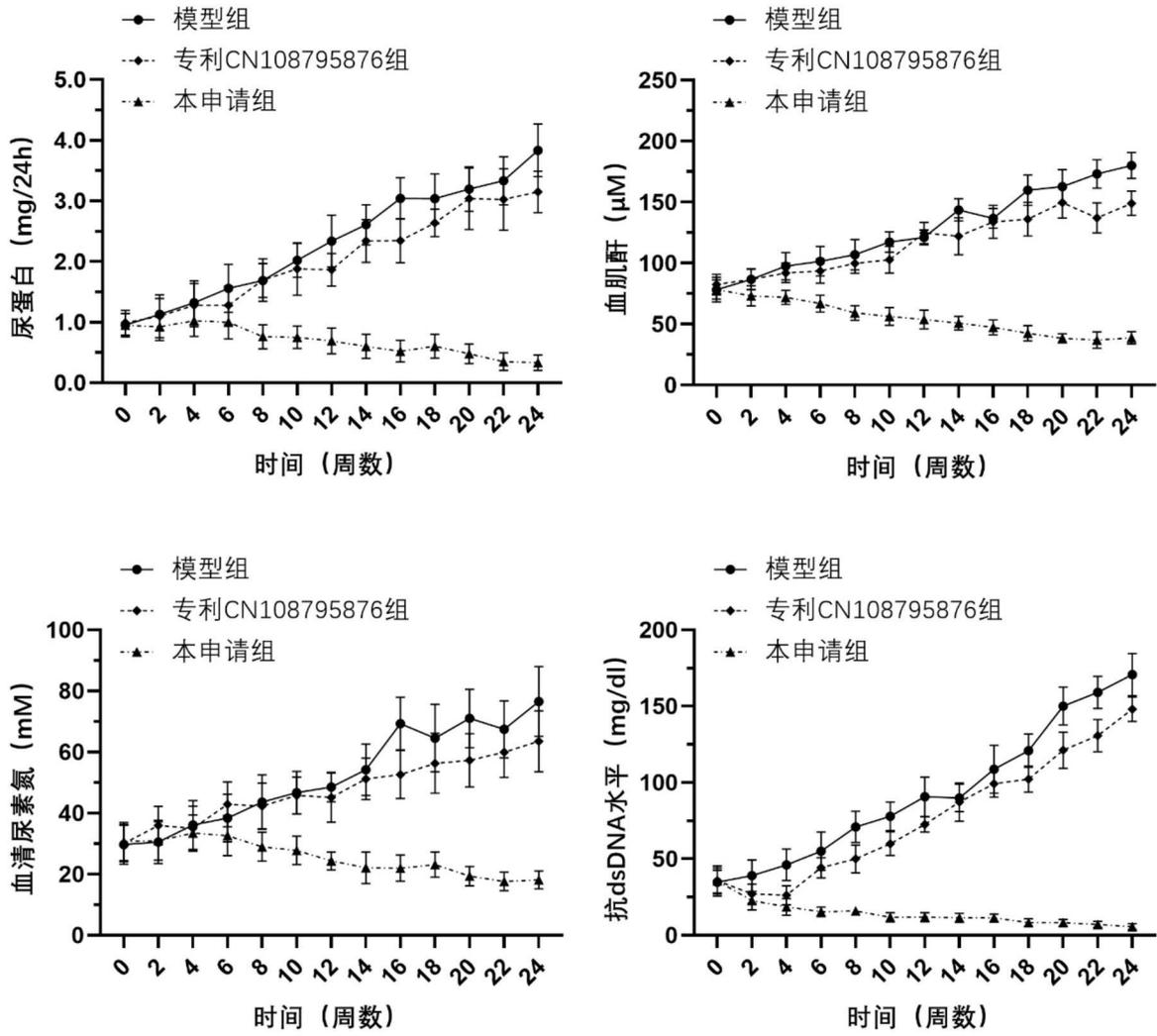


图6