



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117777307 B

(45) 授权公告日 2024.08.20

(21) 申请号 202311251351.5

C12N 15/62 (2006.01)

(22) 申请日 2023.09.26

C12N 5/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 15/867 (2006.01)

申请公布号 CN 117777307 A

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2024.03.29

(56) 对比文件

(73) 专利权人 深圳豪石生物科技有限公司

US 5476786 A, 1995.12.19

地址 518101 广东省深圳市新桥街道黄埔

US 2020399364 A1, 2020.12.24

社区洪田路155号创新智慧岗2栋7层

审查员 张天祺

(72) 发明人 于川 李宜声 刘春蕙 刘冰

赖麒安

(74) 专利代理机构 北京预立生科知识产权代理

有限公司 11736

专利代理师 朱萍

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书4页 说明书14页

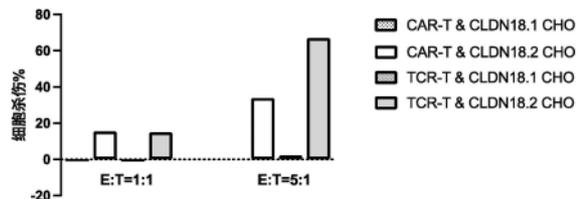
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种CLDN18.2特异性嵌合T细胞受体、嵌合T细胞受体免疫细胞及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种CLDN18.2特异性嵌合T细胞受体、嵌合T细胞受体免疫细胞及其应用,本发明将一种靶向CLDN18.2的人源化单克隆抗体F2H的重链可变区VH和轻链可变区VL重新构建到TCR α (Trac) 和TCR β (Trbc2) 链中,并运用了鼠源mTRAC, mTRBC系统,有效防止外源性TCR与内源性TCR错配,构建得到的TCR-T细胞具有特异性识别CLDN18.2并杀伤CLDN18.2过表达的细胞的能力。



1. 一种嵌合T细胞受体,其特征在于,所述嵌合T细胞受体包含:

- (1) 抗体重链可变区与T细胞受体第一亚基恒定区融合得到的第一肽链;
- (2) 抗体轻链可变区与T细胞受体第二亚基恒定区融合得到的第二肽链;

所述抗体为靶向CLDN18.2的抗体;

所述抗体重链可变区中HCDR1、HCDR2、HCDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3所示;

所述抗体轻链可变区中LCDR1、LCDR2、LCDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7所示;

所述T细胞受体第一亚基为mTRAC或mTRBC2,所述T细胞受体第二亚基为mTRBC2或mTRAC;

当所述T细胞受体第一亚基为mTRAC时,所述T细胞受体第二亚基为mTRBC2;或当所述T细胞受体第一亚基为mTRBC2时,所述T细胞受体第二亚基为mTRAC;

所述mTRAC恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示;

所述mTRBC2恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示。

2. 根据权利要求1所述的嵌合T细胞受体,其特征在于,所述T细胞受体第一亚基为mTRAC,所述T细胞受体第二亚基为mTRBC2。

3. 根据权利要求1所述的嵌合T细胞受体,其特征在于,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

4. 根据权利要求1所述的嵌合T细胞受体,其特征在于,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

5. 根据权利要求1所述的嵌合T细胞受体,其特征在于,所述嵌合T细胞受体还包含TCR信号肽1。

6. 根据权利要求5所述的嵌合T细胞受体,其特征在于,所述TCR信号肽1的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示。

7. 根据权利要求1所述的嵌合T细胞受体,其特征在于,所述嵌合T细胞受体还包含标签蛋白FLAG tag。

8. 根据权利要求7所述的嵌合T细胞受体,其特征在于,所述标签蛋白FLAG tag的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示。

9. 根据权利要求1所述的嵌合T细胞受体,其特征在于,所述嵌合T细胞受体还包含连接第一肽链和第二肽链的P2A。

10. 根据权利要求9所述的嵌合T细胞受体,其特征在于,所述P2A的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示。

11. 根据权利要求1所述的嵌合T细胞受体,其特征在于,所述嵌合T细胞受体还包含TCR信号肽2。

12. 根据权利要求11所述的嵌合T细胞受体,其特征在于,所述TCR信号肽2的氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示。

13. 根据权利要求1所述的嵌合T细胞受体,其特征在于,所述嵌合T细胞受体由TCR信号肽1、标签蛋白FLAG tag、所述抗体重链可变区、mTRAC、P2A、TCR信号肽2、所述抗体轻链可变区、mTRBC2依次串联得到。

14. 根据权利要求1所述的嵌合T细胞受体,其特征在于,所述嵌合T细胞受体特异性结合至靶抗原CLDN18.2。

15. 一种核酸分子,其特征在于,所述核酸分子编码权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体或编码权利要求1中所述的第一肽链或第二肽链。

16. 根据权利要求15所述的核酸分子,其特征在于,编码权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体或权利要求1中所述的第一肽链或第二肽链中的抗体重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:11所示。

17. 根据权利要求15所述的核酸分子,其特征在于,编码权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体或权利要求1中所述的第一肽链或第二肽链中的抗体轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:12所示。

18. 根据权利要求15所述的核酸分子,其特征在于,编码权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体或权利要求1中所述的第一肽链或第二肽链中的mTRAC恒定区的核苷酸序列如SEQ ID NO:33所示。

19. 根据权利要求15所述的核酸分子,其特征在于,编码权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体或权利要求1中所述的第一肽链或第二肽链中的mTRBC2恒定区的核苷酸序列如SEQ ID NO:36所示。

20. 根据权利要求15所述的核酸分子,其特征在于,编码权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体中的TCR信号肽1的核苷酸序列如SEQ ID NO:32所示。

21. 根据权利要求15所述的核酸分子,其特征在于,编码权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体中的标签蛋白FLAG tag的核苷酸序列如SEQ ID NO:26所示。

22. 根据权利要求15所述的核酸分子,其特征在于,编码权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体中的P2A的核苷酸序列如SEQ ID NO:34所示。

23. 根据权利要求15所述的核酸分子,其特征在于,编码权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体中的TCR信号肽2的核苷酸序列如SEQ ID NO:35所示。

24. 一种表达载体,其特征在于,所述表达载体包含权利要求15-23中任一项所述的核酸分子。

25. 根据权利要求24所述的表达载体,其特征在于,所述载体选自质粒、病毒来源的载体、噬菌粒、粘粒或人工染色体。

26. 根据权利要求25所述的表达载体,其特征在于,所述病毒来源的载体选自逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或腺相关病毒载体。

27. 一种嵌合T细胞受体免疫细胞,其特征在于,所述嵌合T细胞受体免疫细胞包含权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体、权利要求15-23中任一项所述的核酸分子和/或权利要求24-26中任一项所述的表达载体。

28. 根据权利要求27所述的嵌合T细胞受体免疫细胞,其特征在于,所述免疫细胞选自T细胞、NK细胞、iNKT细胞、B细胞、CTL细胞、单核细胞、髓样细胞、树突状细胞、巨噬细胞和/或肥大细胞。

29. 根据权利要求28所述的嵌合T细胞受体免疫细胞,其特征在于,所述免疫细胞为T细胞。

30. 一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细

胞受体、权利要求15-23中任一项所述的核酸分子、权利要求24-26中任一项所述的表达载体和/或权利要求27-29中任一项所述的嵌合T细胞受体免疫细胞。

31. 一种药物组合物,其特征在於,所述药物组合物包含权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体、权利要求15-23中任一项所述的核酸分子、权利要求24-26中任一项所述的表达载体和/或权利要求27-29中任一项所述的嵌合T细胞受体免疫细胞。

32. 根据权利要求31所述的药物组合物,其特征在於,所述药物组合物还包含药学上可接受的载体和/或辅料。

33. 一种药物制剂,其特征在於,所述药物制剂包含权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体、权利要求15-23中任一项所述的核酸分子、权利要求24-26中任一项所述的表达载体和/或权利要求27-29中任一项所述的嵌合T细胞受体免疫细胞。

34. 一种检测试剂,其特征在於,所述检测试剂包含可检测标记的权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体和/或权利要求15-23中任一项所述的核酸分子、和/或赋予抗生素抗性的权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体和/或权利要求15-23中任一项所述的核酸分子。

35. 一种非诊断和非治疗目的地杀伤递呈靶抗原CLDN18.2的靶细胞的方法,其特征在於,所述方法包括如下步骤:将靶细胞与权利要求27-29中任一项所述的嵌合T细胞受体免疫细胞相接触,其中,所述嵌合T细胞受体免疫细胞特异性结合至靶抗原CLDN18.2并杀伤靶细胞。

36. 一种制备权利要求27-29中任一项所述的嵌合T细胞受体免疫细胞的方法,其特征在於,所述方法包括如下步骤:将权利要求15-23中任一项所述的核酸分子或权利要求24-26中任一项所述的表达载体引入到免疫细胞中,获得权利要求27-29中任一项所述的嵌合T细胞受体免疫细胞。

37. 根据权利要求36所述的方法,其特征在於,所述免疫细胞选自T细胞、NK细胞、iNKT细胞、B细胞、CTL细胞、单核细胞、髓样细胞、树突状细胞、巨噬细胞和/或肥大细胞。

38. 根据权利要求37所述的方法,其特征在於,所述免疫细胞为T细胞。

39. 权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体、权利要求15-23中任一项所述的核酸分子、权利要求24-26中任一项所述的表达载体或权利要求27-29中任一项所述的嵌合T细胞受体免疫细胞在制备用于治疗 and/或预防CLDN18.2相关疾病的药物中的应用;

所述CLDN18.2相关疾病选自胃癌、胰腺癌、食管癌、胆管癌、乳腺癌、肝癌、头颈癌、肺癌、卵巢癌、肾癌、膀胱癌、结直肠癌或黑色素瘤。

40. 权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体、权利要求15-23中任一项所述的核酸分子、权利要求24-26中任一项所述的表达载体或权利要求27-29中任一项所述的嵌合T细胞受体免疫细胞在制备用于治疗 and/或预防CLDN18.2相关疾病的药物制剂中的应用;

所述CLDN18.2相关疾病选自胃癌、胰腺癌、食管癌、胆管癌、乳腺癌、肝癌、头颈癌、肺癌、卵巢癌、肾癌、膀胱癌、结直肠癌或黑色素瘤。

41. 权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体、权利要求15-23中任一项所述的核酸分子、权利要求24-26中任一项所述的表达载体或权利要求27-29中任一项所述的嵌合T细胞受体免疫细胞在制备用于治疗、预防和/或诊断CLDN18.2相关疾病的试剂盒中的应用;

所述CLDN18.2相关疾病选自胃癌、胰腺癌、食管癌、胆管癌、乳腺癌、肝癌、头颈癌、肺

癌、卵巢癌、肾癌、膀胱癌、结直肠癌或黑色素瘤。

42. 权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体、权利要求15-23中任一项所述的核酸分子、权利要求24-26中任一项所述的表达载体、权利要求27-29中任一项所述的嵌合T细胞受体免疫细胞在制备用于治疗、预防和/或诊断CLDN18.2相关疾病的检测试剂中的应用；

所述CLDN18.2相关疾病选自胃癌、胰腺癌、食管癌、胆管癌、乳腺癌、肝癌、头颈癌、肺癌、卵巢癌、肾癌、膀胱癌、结直肠癌或黑色素瘤。

43. 权利要求1-14中任一项所述的嵌合T细胞受体、权利要求15-23中任一项所述的核酸分子和/或权利要求24-26中任一项所述的表达载体在制备用于治疗和/或预防CLDN18.2相关疾病的嵌合T细胞受体免疫细胞中的应用；

所述CLDN18.2相关疾病选自胃癌、胰腺癌、食管癌、胆管癌、乳腺癌、肝癌、头颈癌、肺癌、卵巢癌、肾癌、膀胱癌、结直肠癌或黑色素瘤。

一种CLDN18.2特异性嵌合T细胞受体、嵌合T细胞受体免疫细胞及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体地,本发明涉及一种CLDN18.2特异性嵌合T细胞受体、嵌合T细胞受体免疫细胞及其应用。

背景技术

[0002] 细胞连接密蛋白(Claudin或CLDN)在人、鼠等物种中均有表达,是细胞间层密封关联蛋白,在控制对细胞层间离子流、维持细胞极性和细胞间信号转递中具有重要作用。CLDN18有两个同源分子,分别称为密蛋白18.1(CLDN18.1)和密蛋白18.2(CLDN18.2)。人CLDN18.1和人CLDN18.2高度同源,氨基酸同源性高达92%。人CLDN18.2在正常组织中表达非常有限,仅见于胃黏膜分化上皮细胞,但在不同癌症,包括大约70%的胃癌、50%的胰腺癌、30%的食道癌、25%的肺癌和卵巢癌等的患者组织都有表达。Claudin18.2是临床证明有效的肿瘤治疗药物开发靶点。

[0003] T细胞受体(T cell receptor,TCR)是免疫球蛋白超级家族的异源二聚体细胞表面蛋白,其与参与介导信号转导的CD3复合体的不变蛋白关联。TCR以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在,它们在结构上相似,但是具有截然不同的结构位置和可能截然不同的功能。天然异源二聚体 $\alpha\beta$ TCR的 α 和 β 链是跨膜蛋白,每个蛋白都包含两个胞外结构域、一个膜近端恒定域和一个膜远端可变域。恒定域和可变结构域中的每一个都包含链内二硫键。可变域包含高多态性的环,这些环具有与抗体的互补决定区(CDR)类似的识别特异性。TCR-T免疫治疗技术通过与主要组织相容性复合体(MHC)的有效相互作用激活宿主的免疫系统。

[0004] 目前,虽然TCR-T技术在肿瘤治疗领域取得了一定的进展,但是如何优化TCR链的配对、提高TCR在T细胞中的亲和力以及增强其表面表达效率等仍是本领域面临的亟待解决的主要问题。

发明内容

[0005] 为了解决上述现有技术中存在的技术问题,本发明的目的在于提供一种CLDN18.2特异性嵌合T细胞受体、嵌合T细胞受体免疫细胞及其应用。

[0006] 本发明的上述目的通过以下技术方案得以实现:

[0007] 第一方面,本发明提供了一种嵌合T细胞受体。

[0008] 进一步,所述嵌合T细胞受体包含:

[0009] (1) 抗体重链可变区与T细胞受体第一亚基恒定区融合得到的第一肽链;

[0010] (2) 抗体轻链可变区与T细胞受体第二亚基恒定区融合得到的第二肽链;

[0011] 所述抗体为靶向CLDN18.2的抗体;

[0012] 所述抗体重链可变区中HCDR1、HCDR2、HCDR3的氨基酸序列为如SEQ ID NO:4所示的重链可变区中的CDR1、CDR2、CDR3;

[0013] 所述抗体轻链可变区中LCDR1、LCDR2、LCDR3的氨基酸序列为如SEQ ID NO:8所示

的轻链可变区中的CDR1、CDR2、CDR3；

[0014] 所述T细胞受体第一亚基为mTRAC或mTRBC2,所述T细胞受体第二亚基为mTRBC2或mTRAC；

[0015] 当所述T细胞受体第一亚基为mTRAC时,所述T细胞受体第二亚基为mTRBC2;或当所述T细胞受体第一亚基为mTRBC2时,所述T细胞受体第二亚基为mTRAC；

[0016] 所述mTRAC的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示或与SEQ ID NO:21具有至少90%同源性的氨基酸序列；

[0017] 所述mTRBC2的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示或与SEQ ID NO:24具有至少90%同源性的氨基酸序列。

[0018] 进一步,所述T细胞受体第一亚基为mTRAC,所述T细胞受体第二亚基为mTRBC2；

[0019] 优选地,所述HCDR1、HCDR2、HCDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3所示或分别为与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3具有至少90%同源性的氨基酸序列；优选地,所述LCDR1、LCDR2、LCDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7所示或分别为与SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7具有至少90%同源性的氨基酸序列；更优选地,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示或与SEQ ID NO:4具有至少90%同源性的氨基酸序列；更优选地,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示或与SEQ ID NO:8具有至少90%同源性的氨基酸序列；

[0020] 优选地,所述嵌合T细胞受体还包含TCR信号肽1；更优选地,所述TCR信号肽1的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示或与SEQ ID NO:20具有至少90%同源性的氨基酸序列；

[0021] 优选地,所述嵌合T细胞受体还包含标签蛋白FLAG tag；更优选地,所述标签蛋白FLAG tag的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示或与SEQ ID NO:14具有至少90%同源性的氨基酸序列；

[0022] 优选地,所述嵌合T细胞受体还包含连接第一肽链和第二肽链的P2A；更优选地,所述P2A的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示或与SEQ ID NO:22具有至少90%同源性的氨基酸序列；

[0023] 优选地,所述嵌合T细胞受体还包含TCR信号肽2；更优选地,所述TCR信号肽2的氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示或与SEQ ID NO:23具有至少90%同源性的氨基酸序列；

[0024] 最优选地,所述嵌合T细胞受体由TCR信号肽1、标签蛋白FLAG tag、所述抗体重链可变区、mTRAC、P2A、TCR信号肽2、所述抗体轻链可变区、mTRBC2依次串联得到。

[0025] 进一步,所述嵌合T细胞受体特异性结合至靶抗原CLDN18.2；

[0026] 所述CLDN18.2相关疾病包括胃癌、胰腺癌、食管癌、胆管癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、支气管癌、肺癌、骨癌、卵巢癌、阴道癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、子宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、结直肠癌、肛门癌、胃肠道癌、皮肤癌、前列腺癌、睾丸癌、肾癌、膀胱癌、脑癌、垂体癌、星形细胞瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤。

[0027] 在本发明中,所述至少90%同源性的氨基酸序列是指与指定序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%同源性的氨基酸序列,只要与所述指定序列具有至少90%同源性的氨基酸均在本发明的保护范围内。

[0028] 在本发明中,所述CLDN18.2包括野生型CLDN18.2和CLDN18.2突变体,其中,所述

CLDN18.2突变体包括但不限于在野生型CLDN18.2序列的基础上进行一个或多个位点的突变(例如,置换、添加、缺失或其任意组合)之后得到的突变体。

[0029] 在本发明中,所述抗体的重链可变区和轻链可变区对应的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的序列可基于上述重链可变区和轻链可变区的全长序列(SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8)根据Kabat、IMGT、Chothia、AbM、Contact编号系统或其他编号系统定义(将来可能发现的新的编号系统、现有的编号系统)获得,根据Kabat、IMGT、Chothia、AbM、Contact编号系统或其他编号系统定义(将来可能发现的新的编号系统、现有的编号系统)中的任意一种或任意几种组合定义得到的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3对应的序列同样包含在本发明的保护范围内。

[0030] 在本发明中,与本发明所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3对应的氨基酸序列具有至少90%(包括90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%)序列同源性的氨基酸序列也均在本发明的保护范围内,所述具有至少90%序列同源性的氨基酸序列包括但不限于通过对亲本序列进行一个或者多个氨基酸或核苷酸缺失、插入和/或替换突变获得的氨基酸序列,其中,包括对所述抗体或其抗原结合片段进行的保守序列修饰。

[0031] 在本发明中,所述T细胞受体第一亚基和第二亚基并不局限于mTRAC或mTRBC2,任何能够与本发明所述的抗体重链可变区或抗体轻链可变区融合得到具有相应功能的第一肽链或第二肽链的TCR α 恒定区、TCR β 恒定区均在本发明的保护范围内,包括但不限于:野生型TCR α 和 β 恒定区、半胱氨酸单点突变型TCR α 和 β 恒定区、人鼠嵌合型TCR α 和 β 恒定区,以及含半胱氨酸单点突变的人鼠嵌合型TCR α 和 β 恒定区。

[0032] 本领域普通技术人员可以很容易地采用任何已知的方法,例如采用定向点突变的方法,对本发明提供的嵌合T细胞受体对应的核苷酸序列进行突变。那些经过人工修饰的、具有与本发明所述的嵌合T细胞受体对应的核苷酸序列75%或75%以上同源性的核苷酸,只要编码本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体,均是衍生于本发明的核苷酸序列并且等同于本发明的序列,同样包含在本发明的保护范围内。

[0033] 第二方面,本发明提供了一种核酸分子。

[0034] 进一步,所述核酸分子编码本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体或编码本发明第一方面中所述的第一肽链或第二肽链;

[0035] 优选地,编码本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体或本发明第一方面中所述的第一肽链或第二肽链中的抗体重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:11所示或与SEQ ID NO:11具有至少90%同源性的核苷酸序列;优选地,编码本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体或本发明第一方面中所述的第一肽链或第二肽链中的抗体轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:12所示或与SEQ ID NO:12具有至少90%同源性的核苷酸序列;优选地,编码本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体或本发明第一方面中所述的第一肽链或第二肽链中的mTRAC的核苷酸序列如SEQ ID NO:33所示或与SEQ ID NO:33具有至少90%同源性的核苷酸序列;优选地,编码本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体或本发明第一方面中所述的第一肽链或第二肽链中的mTRBC2的核苷酸序列如SEQ ID NO:36所示或与SEQ ID NO:36具有至少90%同源性的核苷酸序列;优选地,编码本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体中的TCR信号肽1的核苷酸序列如SEQ ID NO:32所示或与SEQ ID NO:32具有至少90%同源性的

核苷酸序列;优选地,编码本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体中的标签蛋白FLAG tag的核苷酸序列如SEQ ID NO:26所示或与SEQ ID NO:26具有至少90%同源性的核苷酸序列;优选地,编码本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体中的P2A的核苷酸序列如SEQ ID NO:34所示或与SEQ ID NO:34具有至少90%同源性的核苷酸序列;优选地,编码本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体中的TCR信号肽2的核苷酸序列如SEQ ID NO:35所示或与SEQ ID NO:35具有至少90%同源性的核苷酸序列。

[0036] 在一些实施方案中,所述核酸分子是分离或纯化的。DNA分子的序列可以用常规技术,或利用杂交瘤技术获得。一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列相对较长的片段。

[0037] 在一些实施方案中,本领域技术人员可以根据实际情况或需要改变TCR信号肽1、标签蛋白FLAG tag、所述抗体重链可变区、mTRAC、P2A、TCR信号肽2、所述抗体轻链可变区、mTRBC2等的组合顺序和序列,无论基于何种形式的改变,只要该嵌合T细胞受体具有类似于或基本类似于本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体的效果,其均包含在本发明的保护范围内。

[0038] 第三方面,本发明提供了一种表达载体。

[0039] 进一步,所述表达载体包含本发明第二方面所述的核酸分子;

[0040] 优选地,所述载体包括质粒、病毒来源的载体、噬菌粒、粘粒、人工染色体;更优选地,所述病毒来源的载体包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体。

[0041] 在一些实施方案中,所述表达载体中的核酸分子与启动子可操作性地连接,所述启动子的实例包括但不限于:tac启动子、lac启动子、lacUV5启动子、lpp启动子、pLλ启动子、pRλ启动子、rac5启动子、amp启动子、recA启动子、SP6启动子、trp启动子、T7启动子、SV40启动子、CMV启动子、MMTV启动子。

[0042] 在一些实施方案中,本发明对载体的类型并无特别的限制,其选择取决于所期望的功能。载体的非限制性实例包括质粒载体、病毒来源的载体(例如慢病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体、杆状病毒载体、乳头状瘤病毒载体、乳头多瘤空泡病毒载体)、噬菌体载体和其他常规用于例如遗传工程的载体。可基于本领域技术人员所熟知的方法构建各种质粒和载体。

[0043] 在一些实施方案中,所述表达载体还包含适当启动子或者控制序列的载体。这些表达载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达特定的蛋白质。宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性的实例有:细菌细胞如大肠杆菌,链霉菌属;鼠伤寒沙门氏菌;真菌细胞如酵母;植物细胞;昆虫细胞如果蝇S2或Sf9;动物细胞如CHO、COS7、NS0或Bowes黑素瘤细胞等。特别适用于本发明的宿主细胞是真核宿主细胞,尤其是哺乳动物细胞,例如CHO细胞、293细胞等。

[0044] 第四方面,本发明提供了一种嵌合T细胞受体免疫细胞。

[0045] 进一步,所述嵌合T细胞受体免疫细胞包含本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体、本发明第二方面所述的核酸分子和/或本发明第三方面所述的表达载体;

[0046] 优选地,所述免疫细胞包括T细胞、NK细胞、iNKT细胞、B细胞、CTL细胞、单核细胞、髓样细胞、树突状细胞、巨噬细胞和/或肥大细胞;更优选地,所述免疫细胞为T细胞。

[0047] 在一些实施方案中,本发明对免疫细胞并无特别的限制,任何本领域技术人员了解的能够与本发明提供的嵌合T细胞受体结合形成嵌合T细胞受体免疫细胞的免疫细胞均在本发明的保护范围内。在本发明的具体实施方案中,所述免疫细胞为T细胞。

[0048] 在一些实施方案中,所述嵌合T细胞受体免疫细胞包括嵌合T细胞受体免疫细胞、嵌合T细胞受体免疫细胞群体,其中,所述嵌合T细胞受体免疫细胞群体包含本发明所述的嵌合T细胞受体免疫细胞;在另一些实施方案中,所述嵌合T细胞受体免疫细胞群体还包含不包含本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体、本发明第二方面所述的核酸分子和/或本发明第三方面所述的表达载体的免疫细胞;在另一些实施方案中,所述免疫细胞包括T细胞、NK细胞、iNKT细胞、B细胞、CTL细胞、单核细胞、髓样细胞、树突状细胞、巨噬细胞和/或肥大细胞;在优选的实施方案中,所述免疫细胞为T细胞。

[0049] 第五方面,本发明提供了一种试剂盒。

[0050] 进一步,所述试剂盒包含本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的表达载体和/或本发明第四方面所述的嵌合T细胞受体免疫细胞。

[0051] 第六方面,本发明提供了一种药物组合物、药物制剂或衍生物。

[0052] 进一步,所述药物组合物包含本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的表达载体和/或本发明第四方面所述的嵌合T细胞受体免疫细胞;

[0053] 优选地,所述药物制剂包含本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的表达载体和/或本发明第四方面所述的嵌合T细胞受体免疫细胞;

[0054] 优选地,所述衍生物包括可检测标记的本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体和/或本发明第二方面所述的核酸分子、赋予抗生素抗性的本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体和/或本发明第二方面所述的核酸分子、与治疗剂结合或偶联的本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体和/或本发明第二方面所述的核酸分子;

[0055] 更优选地,所述药物组合物还包含药学上可接受的载体和/或辅料。

[0056] 在一些实施方案中,所述药物组合物还包括用于辅助治疗和/或预防CLDN18.2阳性相关疾病的治疗剂;更优选地,所述治疗剂包括烷化剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、有丝分裂抑制剂、染色质功能抑制剂、抗血管生成剂、抗雌激素、抗雄激素、免疫调节剂和/或细胞毒素;在一些实施方案中,本发明对所述烷化剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、有丝分裂抑制剂、染色质功能抑制剂、抗血管生成剂、抗雌激素、抗雄激素、免疫调节剂和/或细胞毒素的具体类型并无特别限制,任何能够与本发明提供的嵌合T细胞受体免疫细胞联合发挥或基本发挥相应作用的药物均在本发明的保护范围内。

[0057] 更优选地,所述CLDN18.2阳性相关疾病包括实体瘤、血液瘤和/或其任意组合;更优选地,所述CLDN18.2阳性相关疾病包括胃癌、胰腺癌、食管癌、胆管癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、支气管癌、肺癌、骨癌、卵巢癌、睾丸癌、肾癌、膀胱癌、脑癌、子宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、结直肠癌、肛门癌、胃肠道癌、皮肤癌、前列腺癌、垂体癌、阴道癌、甲状腺癌、胶

质母细胞瘤、星形细胞瘤、黑色素瘤。

[0058] 在一些实施方案中,所述药学上可接受的载体和/或辅料在Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed.,1995)中有详细的记载,这些物质根据需要用于帮助配方的稳定性或有助于提高活性或活性物质的生物有效性或在口服的情况下产生可接受的口感或气味,在这种药物组合物中可以使用的制剂可以是其原始化合物本身的形式,或任选地使用其药理学可接受的盐的形式。如此配制的药物组合物根据需要可选择本领域技术人员已知的任何适当的方式将药物进行给药,使用药物组合物时,是将安全有效量的本发明所述的药物组合物施用于人。

[0059] 在一些实施方案中,所述可检测标记包括荧光染料、胶体金、化学发光标记物、化学发光催化剂;更优选地,所述化学发光标记物包括鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吡啶酯、吡啶酯衍生物、金刚烷、稀土元素、联吡啶钌配合物;更优选地,所述化学发光催化剂包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶;

[0060] 优选地,所述抗生素抗性的基因包括青霉素抗性基因、四环素抗性基因、氯霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因;优选地,所述治疗剂包括放射性核素、细胞因子、金纳米颗粒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒、前药激活酶、化疗剂;更优选地,所述细胞因子包括IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IFN- γ 、TNF- β 、TNF- α 、G-CSF、M-CSF;更优选地,所述化疗剂包括顺铂、紫杉醇、长春新碱、门冬酰胺酶、奥沙利铂、草酸铂、乐沙定。

[0061] 第七方面,本发明提供了如下任一种方法:

[0062] (1)一种非诊断和非治疗目的地杀伤递呈靶抗原CLDN18.2的靶细胞的方法,所述方法包括如下步骤:将靶细胞与本发明第四方面所述的嵌合T细胞受体免疫细胞相接触,其中,所述嵌合T细胞受体免疫细胞特异性结合至靶抗原CLDN18.2并杀伤靶细胞;

[0063] (2)一种制备本发明第四方面所述的嵌合T细胞受体免疫细胞的方法,所述方法包括如下步骤:将本发明第二方面所述的核酸分子或本发明第三方面所述的表达载体引入到免疫细胞中,获得本发明第四方面所述的嵌合T细胞受体免疫细胞;

[0064] 优选地,所述免疫细胞包括T细胞、NK细胞、iNKT细胞、B细胞、CTL细胞、单核细胞、髓样细胞、树突状细胞、巨噬细胞和/或肥大细胞;更优选地,所述免疫细胞为T细胞。

[0065] 此外,本发明还提供了一种治疗CLDN18.2阳性相关疾病或延迟其进展的方法,所述方法包括如下步骤:给有需要的受试者施用有效量的本发明第四方面所述的嵌合T细胞受体免疫细胞、本发明第六方面中所述的药物组合物、药物制剂或衍生物。

[0066] 此外,本发明还提供了一种在有需要的受试者中提供免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本发明第四方面所述的嵌合T细胞受体免疫细胞、本发明第六方面中所述的药物组合物、药物制剂或衍生物。

[0067] 在一些实施方案中,所述方法包括施用如本文描述的嵌合T细胞受体免疫细胞与增强此类细胞的活性的药剂的组合,其中该药剂是细胞因子,例如IL-7、IL-15、IL-21或其组合。可以与施用细胞组合,例如同时或在施用细胞之后不久递送细胞因子。可替代地,可以在施用细胞后延长的时间段后,例如,在评估受试者对细胞的应答之后递送细胞因子。在一个实施例中,将细胞因子与施用如本文描述的嵌合T细胞受体免疫细胞或细胞群体同时(例如,在同一天施用)或在施用该细胞或细胞群体之后不久(例如,在施用该细胞或细胞群

体之后1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天施用)施用至受试者。在其他实施例中,将细胞因子在施用如本文描述的嵌合T细胞受体免疫细胞或细胞群体之后或在评估受试者对细胞的应答之后延长的时间段(例如,至少2周、3周、4周、6周、8周、10周或更长时间)后施用至受试者。

[0068] 第八方面,本发明提供了如下任一种应用:

[0069] (1) 本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的表达载体、本发明第四方面所述的嵌合T细胞受体免疫细胞在制备用于治疗 and/或预防CLDN18.2相关疾病的药物中的应用;

[0070] (2) 本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的表达载体、本发明第四方面所述的嵌合T细胞受体免疫细胞在制备用于治疗 and/或预防CLDN18.2相关疾病的药物制剂中的应用;

[0071] (3) 本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的表达载体、本发明第四方面所述的嵌合T细胞受体免疫细胞在制备用于治疗、预防和/或诊断CLDN18.2相关疾病的试剂盒中的应用;

[0072] (4) 本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的表达载体、本发明第四方面所述的嵌合T细胞受体免疫细胞在制备用于治疗、预防和/或诊断CLDN18.2相关疾病的衍生物中的应用;

[0073] (5) 本发明第一方面所述的嵌合T细胞受体、本发明第二方面所述的核酸分子和/或本发明第三方面所述的表达载体在制备用于治疗 and/或预防CLDN18.2相关疾病的嵌合T细胞受体免疫细胞中的应用;

[0074] 优选地,所述CLDN18.2相关疾病包括胃癌、胰腺癌、食管癌、胆管癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌、头颈癌、支气管癌、肺癌、骨癌、卵巢癌、阴道癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、子宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、结直肠癌、肛门癌、胃肠道癌、皮肤癌、前列腺癌、睾丸癌、肾癌、膀胱癌、脑癌、垂体瘤、星形细胞瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤。

[0075] 在本发明中,所述CLDN18.2相关疾病包括任何与CLDN18.2表达相关的疾病,包括但不限于本文描述的与CLDN18.2表达相关的具体疾病类型,还包括与CLDN18.2表达相关的癌症(或恶性肿瘤)或癌前病状;或与CLDN18.2表达相关的非癌症相关适应症。

附图说明

[0076] 图1为由CAR-T到TCR-T序列转化示意图;

[0077] 图2为CAR(CAR-T)序列结构示意图;

[0078] 图3为TCR(TCR-T)序列结构示意图;

[0079] 图4为采用CLDN18.1和CLDN18.2过表达的CHO细胞作为靶细胞,进行CAR-T和TCR-T杀伤验证的结果图;

[0080] 图5为CLDN18.2和CLDN18.1胞外段序列中8个氨基酸的差异示意图;

[0081] 图6为载体中对应过表达CLDN18.2序列(或点突变)的结构示意图;

[0082] 图7为流式检测分析抗体与8个不同的抗原结合情况的结果图;

[0083] 图8为TCR-T细胞对过表达CLDN18.2及突变CLDN18.2的293T细胞的识别杀伤情况的结果图。

具体实施方式

[0084] 本发明将一种靶向CLDN18.2的人源化单克隆抗体F2H的重链可变区VH和轻链可变区VL重新构建到TCR α (Trac) 和TCR β (Trbc2) 链中,并运用了鼠源mTRAC,mTRBC系统,有效防止外源性TCR与内源性TCR错配,构建得到TCR-T细胞以实现靶向识别CLDN18.2的特异性杀伤系统。

[0085] 由抗体序列拆分构建TCR序列制备得到的TCR-T细胞具备以下潜在优势:(1)使TCR-T细胞直接识别细胞表面抗原,克服TCR-T因MHC呈递导致的限制性;(2)TCR-T无CAR-T中使用的共刺激因子4-1BB或CD28等,在杀伤过程可以一定程度降低因过激反应导致的细胞因子风暴等;(3)TCR-T能通过原始的T细胞突出激活生成方式识别靶细胞,从而更好地实现实体瘤浸润,增加抗原的敏感度。

[0086] 由CAR-T到TCR-T序列转化示意图如图1所示,本发明构建得到的靶向CLDN18.2的CAR-T(CAR)序列结构示意图、靶向CLDN18.2的TCR-T(TCR)序列结构示意图分别如图2和图3所示。其中,靶向CLDN18.2的CAR由CD8 α 信号肽、标签蛋白FLAG tag、F2H抗体(VL-Linker(G4S)-VH)、CD8铰链区、CD8跨膜结构域、4-1BB共刺激信号结构域、CD3 ζ 胞内信号传导结构域依次串联得到;靶向CLDN18.2的TCR由TCR信号肽1、标签蛋白FLAG tag、F2H抗体VH、mTRAC、P2A、TCR信号肽2、F2H抗体VL、mTRBC2依次串联得到。

[0087] 其中,所述单克隆抗体F2H的氨基酸序列见下表1,所述CAR和TCR中单克隆抗体F2H的核苷酸序列见下表2,所述CAR和TCR中各部分对应的氨基酸序列见下表3,所述CAR和TCR中各部分对应的核苷酸序列见下表4。

[0088] 表1单克隆抗体F2H的氨基酸序列

单克隆抗体	氨基酸序列	序号	
重链可变区(VH)	CDR1	GFTFSRYA	SEQ ID NO:1
	CDR2	ISSGGSNT	SEQ ID NO:2
	CDR3	AKAYYGNDY	SEQ ID NO:3
	可变区	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKRELVVAEISSGGSNTYYVDSVKGRFTISRDNKSTLYLQMISLRAEDTAVYYCAKAYYGNDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:4
轻链可变区(VL)	CDR1	QSLNNGNQKNY	SEQ ID NO:5
	CDR2	WAS	SEQ ID NO:6
	CDR3	QNNYYYPLM	SEQ ID NO:7
	可变区	DIVMTQSPDSLTVSLGERATINCKSSQSLNNGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLSLAEDVAVYYCQNNYYYPLMFGQGQTKLEIK	SEQ ID NO:8

[0090] 表2 CAR和TCR中单克隆抗体F2H的核苷酸序列

单克隆抗体	核苷酸序列	序号
[0091] CAR 中重链可变区 (VH)	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGATACGCCATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAAGACTGGAATGGGTCGCCGAGATCTCTAGCGCGGCAGCAATACCTACTACGTGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAGCACCTGTACTGACGATGATCAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAAGGCCTACTACGGCAACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTGTCTATCT	SEQ ID NO:9
[0091] CAR 中轻链可变区 (VL)	GACATCGTGATGACACAGAGCCCCGATAGCCTGACCGTGTCTCTGGGAGAGAGAGCCACCA TCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACGGCGGCAACCAGAAGAAGTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGA AAGCGCGCTGCCGATAGATTTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTACCCTGACAATTT CTAGCCTGCAAGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGAACAATACTACTACCCTCTGATGTTCCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG	SEQ ID NO:10
[0091] TCR 中重链可变区 (VH)	GAGGTGCAGCTTTTGGAGTCGGGTGGGGCCTGGTGCAGCCTGGGGGCTCCTTGGCGCTCTCATGCGCTGCTTCTGGCTTACGTTCTCCCGCTACGCGATGTCTTGGGTGCCGCCAGGCCCGGGAAAGCGTCTGGAGTGGGTTGCTGAGATCTCATCTGGCGGCTCCAACACTTACTACGTGGACAGTGTAAAGGGCCGCTTACCATCTCTCGGGACAACAGCAAAAGCACCTTTACCTGCA GATGATCAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCCAAGCGTACTACGGC AACGCAATGGATTATTGGGGCCAGGGTACCTTCGTACCGTCACTAGTAGC	SEQ ID NO:11
[0091] TCR 中轻链可	GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGACAGTCTGACTGTATCTCTTGGCGAGCGCGCTACAA TAAACTGCAAAAGCTCCAGTCCCTTCTGAACGGAGGCAACCAGAAGAAGTACTCTGACCTG	SEQ ID NO:12
[0092] 变区 (VL)	GTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCACCAAGCTGCTCATCTACTGGGCTTCTACTCGCGAA AGCGCGTGCAGAGGTTTTCAGGTAGTGATCTGGCACCGATTTCACCCTGACTATCTC GAGCCTTCAGGCAGAAGATGTGGCGGTGTACTACTGTGCAACAATACTACTACCCCTG ATGTTTGGACAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAG	

[0093] 表3 CAR和TCR中各部分对应的氨基酸序列

名称	氨基酸序列	序号
[0094] CD8 α 信号肽	MALPVTALLPLALLHAARP	SEQ ID NO:13
FLAG tag	DYKDDDDK	SEQ ID NO:14
G4S linker	GGGSGGGSGGGGS	SEQ ID NO:15
CD8 铰链区	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	SEQ ID NO:16
CD8 跨膜结构域	IYTWAPLAGTCGVLLSLVITLYC	SEQ ID NO:17
4-1BB 共刺激信号结构域	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	SEQ ID NO:18
[0094] CD3 ζ 胞内信号传导结构域	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPMEGG KPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQUALPPR	SEQ ID NO:19
TCR 信号肽 1	METLLGLLILWLQLQWVSS	SEQ ID NO:20
mTRAC (TCR α)	IQNPEPAVYQLKDPQSSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLD MKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTQDIFKETNATYPSSDVPCDADLTKESF ETDMLNLFQNLQSVMLRILLKLVAGFNLLMTRLRWSS	SEQ ID NO:21
P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	SEQ ID NO:22
TCR 信号肽 2	MSIGLCCAALSLLWAGPVNA	SEQ ID NO:23
[0094] mTRBC2 (TCR β)	EDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWN GKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAFVHNPRNHFRQCQVQF HGLSEEDKWPEGSPKPVQTNISAEAWGRADCGITSASYHQVLSATILY EILLGKATLYAVLVSLVLMAMVKKKNS	SEQ ID NO:24

[0095] 表4 CAR和TCR中各部分对应的核苷酸序列

名称	核苷酸序列	序号
CD8 α 信号肽	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGTGCTTCCGCTGGCTTCTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC	SEQ ID NO:25
FLAG tag	GACTACAAGGACGATGACGATAAG	SEQ ID NO:26
G4S linker	GGAGGCGGAGGTTCTGGCGGCGGAGGAAGTGGTGGCGGAGGCTCT	SEQ ID NO:27
CD8 铰链区	ACCACGACGCCAGCGCCGACCAACACCGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCC TGCGCCAGAAGCGTGCCGGCCAGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCG CCTGTGAT	SEQ ID NO:28
CD8 跨膜结构域	ATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGTCTGCTGCTTTCACCTCGTGATCACTCTT TACTGT	SEQ ID NO:29
4-1BB 共刺激信号结构域	AAGCGGGTGGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTCATGAGGCTGTGCAGACTA CTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTG CGCGTGAAATTCAGCCGACGCGAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACAGCTCTACA ACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGATACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACC CAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAA AGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAG GCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAGGACACCTATGACGCTCTTCACAT GCAGGCCGCGCCCTCGG	SEQ ID NO:30
CD3 ζ 胞内信号传导结构域		SEQ ID NO:31
TCR 信号肽 1	ATGGAACCCGTGTTGGGTCTGCTGATCTGTGGCTCCAACCTACAGTGGGTCTCCAGC	SEQ ID NO:32
mTRAC	ATCCAGAATCCAGAGCCCGCTCTATCAGCTGAAGGACCCGCGCAGCCAGGACTCCACCCTGT GCCTTTTCACAGACTTTGACTCGAAATTAATGTCCAAAACCATGGAGTCGGGTACGTTTCATT	SEQ ID NO:33
	ACGGACAAAACCGTCTGGACATGAAGGCCATGGATTCCAAGTCTAACGGTGCATCGCGTGGT CTAATCAAACCTCCTTTACCTGCCAGGACATCTTTAAAGAGACCAACGCAACCTACCCCTCTTCT GATGTGCCGTGTGACGCTACACTGACCGAGAAGTCTTCGAGACGGACATGAACCTCAACTCC AGAACCTGAGTGTGATGGCCTCCGGATCCTGCTACTGAAAGTGGCGGTTTCAACCTGCTGATG ACCCTGCGTCTTTGGTCTTCG	
P2A	GCCACCAACTTCTCGCTCCTGAAGCAGGCCGTGACGTGGAGGAGAATCCTGGCCCT	SEQ ID NO:34
TCR 信号肽 2	ATGTCTATCGGTTTGTGTGCTGCGCCGACTCAGCCTGCTGTGGGTGGGCCCTCAACGCG	SEQ ID NO:35
mTRBC2	GAGGACCTGCGCAATGTGACTCCTCCTAAGGTGTCTTATTTCGAACCGTCCAAGGCCGAAATTC CAACAAGCAGAAGGCTACTCTGGTCTGTCTGGCTCGTGGGTCTTCCCGACCATGTGGAGCTGA GTTGGTGGGTCAATGGGAAGGAGGTACACTCGGGCGTCACTACTGATCCTCAGGCCTACAAGGA GTCGAACTATTCTATTGCCTGTCTCCCGCTTGAGAGTGTCCGCTACGTTCTGGCACAACCCCG CAACCACTTAGGTGTCAGGTTCACTTGGACTGAGCGAGGAGATAAATGGCCCGAGGGC TCCCCGAAGCCAGTGACCAGAACATCTCGGCTGAGGCCTGGGGCCGAGCGGACTGCGGGATCA CCTCCGCTCTTACCACAGGGGGTGTGTCCGCCACAATTCTATATGAGATCCTCCTCGGCAAG GCCACTGTACGCGGTCTGTGTGAGCGCCCTGGTGTGATGGCCATGGTGAAGAAGAAAAACA GC	SEQ ID NO:36

[0098] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0099] 术语“T细胞受体(TCR)”,是指由两条不同肽链构成的异二聚体,由 α 、 β 两条肽链组成,每条肽链又可分为可变区(V区)和恒定区(C区)两部分,其中,恒定区又包括胞外区、跨膜区和胞内末端三部分;其特点是胞内区很短。TCR分子属于免疫球蛋白超家族,其抗原特异性存在于V区。TCR分为两类:TCR1和TCR2;TCR1由 γ 和 δ 两条链组成,TCR2由 α 和 β 两条链组成。外周血中,90%-95%的T细胞表达TCR2;而且任一T细胞只表达TCR2或TCR1之一。虽然目前TCR-T技术在肿瘤治疗领域取得了一定的进展,但是仍存在较多可改进之处,例如:如何优化TCR链的配对、提高TCR在T细胞中的亲和力以及增强其表面表达效率等。

[0100] 术语“嵌合T细胞受体”,是指抗体抗原结合片段与T细胞受体(TCR)进行融合形成的抗体-T细胞受体结合的嵌合T细胞受体,不仅提高了 α 链和 β 链的配对,而且提高了TCR的结合活性,此外,对体内的原始TCR改造相对CAR-T要少,减少了外源氨基酸的引入,降低了副作用的发生风险,并提高了安全性。

[0101] 术语“CLDN18.2相关疾病”,是指任何与CLDN18.2表达相关的疾病,包括但不限于本文描述的与CLDN18.2表达相关的具体疾病类型。在一个方面,与如本文描述的肿瘤抗原CLDN18.2的表达相关的癌症是血液癌症。在另一个方面,与如本文描述的肿瘤抗原

CLDN18.2的表达相关的癌症是实体癌。与本文描述的肿瘤抗原CLDN18.2的表达相关的其他疾病包括但不限于例如非典型和/或非经典癌症、恶性肿瘤、癌前病状或与如本文描述的肿瘤抗原CLDN18.2的表达相关的其他疾病。

[0102] 在一些实施方案中,表达肿瘤抗原CLDN18.2的细胞表达或在任何时间表达编码肿瘤抗原的mRNA。在实施例中,表达肿瘤抗原CLDN18.2的细胞产生肿瘤抗原蛋白(例如野生型或突变体),并且肿瘤抗原蛋白可以以正常水平或降低的水平存在。在实施例中,表达肿瘤抗原CLDN18.2的细胞在一个时间点产生可检测水平的肿瘤抗原蛋白,并且随后基本上不产生可检测的肿瘤抗原蛋白。

[0103] 术语“保守序列修饰”,是指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段的结合特征的氨基酸修饰。此类保守修饰包括氨基酸置换、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术(如定点诱变和PCR介导的诱变)将修饰引入本发明所述的抗体或其抗原结合片段中。保守氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基置换的取代。

[0104] 具有类似侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中进行了定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(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、色氨酸)、非极性侧链(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)、 β 分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,本发明所述的嵌合T细胞受体内的一个或多个氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基替代,并且可以使用本领域技术人员公知的功能测定法测试经改变后的嵌合T细胞受体的效果。

[0105] 术语“编码”,是指多核苷酸(如基因、cDNA或mRNA)中特定核苷酸序列用作在生物过程中用于合成具有确定核苷酸序列(例如,rRNA、tRNA和mRNA)或确定氨基酸序列的其他聚合物和大分子的模板的固有特性,以及由此产生的生物学特性。因此,如果与基因对应的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,则该基因、cDNA或RNA编码该蛋白质。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同)和非编码链(用作基因或cDNA转录的模板)都可以称为编码蛋白质或者该基因或cDNA的其他产物。

[0106] 术语“核酸分子”,是指包括DNA或RNA的聚合物,即多核苷酸,其可以是单链或双链的并且可以含有非天然的或改变的核苷酸。本文所用的术语“核酸”和“多核苷酸”是指任何长度的核苷酸的聚合形式,核糖核苷酸(RNA)或脱氧核糖核苷酸(DNA)。这些术语是指分子的一级结构,因此包括双链和单链DNA,以及双链和单链RNA。该术语包括,作为等同物的由核苷酸类似物制备的RNA或DNA的类似物以及修饰的多核苷酸,例如但不限于甲基化和/或加帽的多核苷酸。核酸通常通过磷酸键连接以形成核酸序列或多核苷酸,尽管本领域已知许多其它连接(例如硫代磷酸酯,硼烷磷酸酯(boranophosphate)等)。

[0107] 术语“转染”,同“转入”、“引入”,是指通过使用物理或化学方法将一种或多种外源多核苷酸引入宿主细胞中。多种转染技术是本领域已知的并且包括例如磷酸钙DNA共沉淀(参见例如Murray E. J. (编辑), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, Gene Transfer and Expression Protocols, Humana Press (1991)); DEAE-葡聚糖;电穿孔;阳离子脂质体介导的转染;钨颗粒促进的微粒轰击(Johnston, *Nature*, 346:776-777 (1990));和

磷酸锶DNA共沉淀(Brash等人, *Mol. Cell Biol.*, 7:2031-2034(1987))。可以在感染性颗粒在合适的包装细胞(其中的多种是可商购的)中生长后,将噬菌体或病毒载体引入宿主细胞。

[0108] 术语“表达载体”,是指包含重组多核苷酸的载体,该重组多核苷酸包含与要表达的核苷酸序列可操作地连接的表达控制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件;其他用于表达的元件可以由宿主细胞或在体外表达系统中提供。表达载体包括本领域已知的所有表达载体,包括掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸露的或包含在脂质体中的)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0109] 术语“治疗”,是指成功治疗或改善损伤、病理、病况(例如,癌症、血液性疾病)或症状(例如,认知损害)的任何标记,包括任何客观或主观参数,如消除、缓解、减轻症状或者使症状、损伤、病理或病况对患者更耐受;降低症状进展率;降低症状或病况的频率或持续时间;或者,在一些情况下,预防症状的发作。症状的治疗或改善可以基于任何客观或主观参数,包括例如身体检查的结果。

[0110] 术语“有效量”,是指在必要的剂量和时间内有效达到期望的治疗结果的量。治疗有效量可根据诸如个体的疾病状态,年龄,性别和体重等因素以及治疗剂在个体中引起所需反应的能力而变化。例如,本发明的治疗剂(本发明所述的嵌合T细胞受体免疫细胞、药物组合物或药物制剂等)的治疗有效量是指能够在受试者体内产生免疫应答(例如,药理学和/或生理学治疗效果)的量。可选地,药理学和/或生理学治疗效果可以是预防性的,即,该效果完全或部分地预防疾病或其症状。在这方面,本发明的方法包括施用“预防有效量”的结合剂。“预防有效量”是指在必要的剂量和时间内有效达到期望的预防结果(例如,预防疾病发作)的量。

[0111] 典型的剂量可以是例如1pg/kg至20mg/kg动物或人体重的范围内;然而,低于或高于该示例性范围的剂量同样包含在本发明的保护范围内。治疗或预防功效可通过定期评估所治疗的患者来监测。对于几天或更长时间内的重复施用,取决于病况,可以重复治疗直至出现期望的对疾病症状的抑制。然而,其它剂量方案可能是有用的并且在本发明的范围内。期望的剂量可通过组合物的单次团注施用,组合物的多次团注施用或组合物的连续输注施用来递送。只要能够产生预期的效果,其均在本发明的保护范围内。

[0112] 术语“免疫细胞”,是指参与免疫应答,例如,促进免疫效应子应答的细胞。免疫效应细胞的示例包括但不限于T细胞(例如, α/β T细胞、 γ/δ T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞)、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NK T)细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、树突细胞和肥大细胞。

[0113] 术语“同源性”,是指两个聚合分子之间,例如两个核酸分子之间,例如两个DNA分子或两个RNA分子之间,或两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个分子中的一个亚基位置被相同单体亚基占据时;例如,如果两个DNA分子的每一个中的一个位置被腺嘌呤占据,则它们在该位置同源或相同。两个序列之间的同源性是匹配或同源位置数目的直接函数;例如,如果两个序列中一半的位置(例如,聚合物中十个亚基长度的五个位置)是同源的,则两个序列有50%同源性;如果90%的位置(例如,10个中的9个)匹配或同源,则两个序列有90%同源性。序列间同源性的计算如下进行。为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比,出于最佳比较目的而对序列进行比对(例如,可以在第一和第二氨基酸

或核酸序列中的一个或两个中引入空位,以供最佳比对,并且出于比较的目的可以忽略非同源序列)。在一个优选的实施方案中,出于比较目的的比对的参考序列的长度为参考序列长度的至少30%,优选至少40%,更优选至少50%、60%,并且甚至更优选至少70%、80%、90%、100%。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置的相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置是相同的。在考虑到需要将其引入以供两个序列进行最佳比对的空位的数目和每个空位的长度的情况下,两个序列之间的同一性百分比是由该序列共享的相同位置的数目的函数。可以使用数学算法来完成序列的比较和两个序列之间的同一性百分比的确定。在一个优选实施方案中,使用Needleman和Wunsch((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453)算法(已结合到GCG软件包中的GAP程序中(可从<http://www.gcg.com>获取)),使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵以及空位权重为16、14、12、10、8、6或4以及长度权重为1、2、3、4、5或6,来确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比。在又一个优选的实施方案中,使用GCG软件包(可从<http://www.gcg.com>获得)中的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵,空位权重为40、50、60、70或80以及长度权重为1、2、3、4、5或6,来确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比。

[0114] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。本领域的普通技术人员可以理解为:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法;下述实施例中所用的试剂、生物材料等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0115] 实施例1 CAR-T和TCR-T细胞对表达CLDN18.1和CLDN18.2细胞的杀伤验证

[0116] 1、实验方法

[0117] (1) CAR-T和TCR-T细胞制备

[0118] 基于上述CAR和TCR序列合成构建pCDH-EF1 α 慢病毒表达质粒。将慢病毒系统质粒(pCDH-EF1 α 慢病毒表达质粒、PsPAX2、pMD2.G三质粒系统,按质量比3:2:1混合)转染到对数生长期的贴壁293T细胞,收获转染48-72小时的细胞培养上清,通过浓缩过滤后,获得CAR和TCR慢病毒存于-80 $^{\circ}$ C条件下备用。从人外周血分离外周血单个核细胞(PBMC),使用人源CD3/28磁珠分离T细胞,并在激活72小时内进行病毒转导,转导24小时后换液培养至第8天,离心收集细胞并重悬于生理盐水中。使用流式细胞鉴定T细胞表面FLAG分子,确保阳性率大于30%以上,低于则使用FLAG-PE磁珠进行富集分选。按照CAR-T和TCR-T细胞收获的阳性比例与靶细胞混合进行后续杀伤实验。

[0119] (2) CAR-T和TCR-T细胞杀伤实验验证

[0120] 采用1:1、5:1两个效靶比(E:T),采用CLDN18.1和CLDN18.2过表达的CHO细胞作为靶细胞,分别对上述制备得到的CAR-T细胞和TCR-T细胞进行杀伤效果的验证。

[0121] 2、实验结果

[0122] 结果如图4所示,结果显示,制备得到的TCR-T细胞具有特异性识别CLDN18.2并杀伤CLDN18.2过表达的细胞的能力,且其对CLDN18.2过表达的细胞的杀伤效果高于CAR-T细胞。

[0123] 实施例2 CLDN18.2的点突变对单克隆抗体F2H和TCR-T识别杀伤的影响

[0124] 1、实验方法

[0125] (1) 载体构建

[0126] CLDN18.2人源化抗体为特异性识别CLDN18.2而不识别CLDN18.1的抗体,根据胞外段序列分析CLDN18.2和CLDN18.1仅有8个位点的不同(见图5),将CLDN18.2不同的位点分别突变为CLDN18.1对应的氨基酸即Q29M,N37D,A42S,N45Q,Q47E,E56Q,G65P和L69I进行抗原表位的检测。将不同位点突变的CLDN18.2基因合成,同时添加T2A-EGFP用于阳性率的检测。基因合成后分别亚克隆至pcDNA3.4表达载体中,构建不同表位的抗原表达载体(采用本领域技术人员公知的常规表达载体构建方法进行构建)。其中,载体中对应过表达CLDN18.2序列(或点突变)结构如图6所示。

[0127] (2) 流式检测分析结合情况

[0128] 将上述构建的8个不同抗原表达载体瞬时转染至293细胞中,分别与F2H人源化抗体及阳性对照抗体hu8E5共孵育。将上述转染的不同表达的细胞以及空白293F细胞分为若干份,每份细胞的数量为 3×10^5 个细胞,分别加入100 μ L抗体纯化人源化抗体(1 μ g/mL),充分混匀后,室温孵育1h;800xg室温离心5分钟,去掉含有抗体的上清,使用PBS洗涤细胞3次;加入100 μ L Alexa Fluor®647AffiniPure Goat Anti-Human IgG(H+L)(1:500稀释),充分混匀后,室温避光孵育45min;800xg室温离心5分钟,去掉含有二抗的上清,使用PBS洗涤细胞3次;使用200 μ L PBS重悬细胞,进行流式检测。使用flowJo进行作图分析。

[0129] (3) TCR-T细胞杀伤实验验证

[0130] 在此基础上,构建TCR-T细胞,验证当抗体序列拆分到 α 、 β 链后,TCR-T细胞对过表达CLDN18.2及突变CLDN18.2的293T细胞的识别杀伤情况。具体验证方法如下:

[0131] TCR-T细胞通过实施例1中记载的方案培养获得。使用CMV启动的CLDN18.2以及对应突变CLDN18.2序列质粒,构建表达对应CLDN18.2及突变CLDN18.2的293T细胞。将TCR-T细胞与对应的293T靶细胞在X-VIVO培养基中按照2.5:1(TCR-T:293T)的效靶比进行共培养,18小时后,通过乳酸脱氢酶(LDH)释放实验来评估TCR-T细胞对靶细胞的杀伤效果。

[0132] 2、实验结果

[0133] 流式检测分析结果如图7所示,结果显示,阳性对照hu8E5抗体结合位点主要在E56Q,56位点的氨基酸突变对抗体识别影响大,而F2H抗体虽然也受E56Q影响,但影响较小。

[0134] TCR-T细胞杀伤实验验证结果如图8所示,结果显示,当CLDN18.2进行E56Q和N37D突变后对TCR-T杀伤产生部分影响,和F2H抗体流式预测结果接近,表明了将F2H克隆抗体拆分为TCR-T的 α 、 β 链后仍可保留F2H克隆抗体的特性,同时具有一定程度降低因过激反应导致的细胞因子风暴等、更好地实现实体瘤浸润、增加抗原的敏感度等特性。

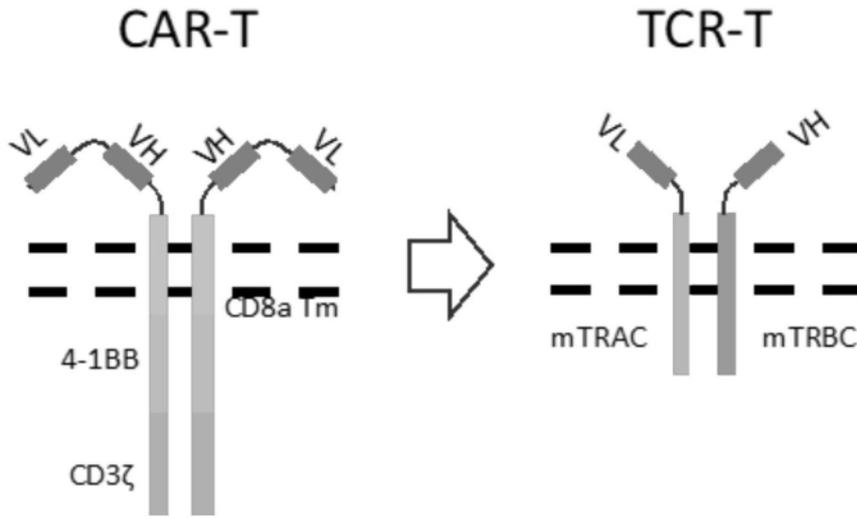


图1



图2



图3

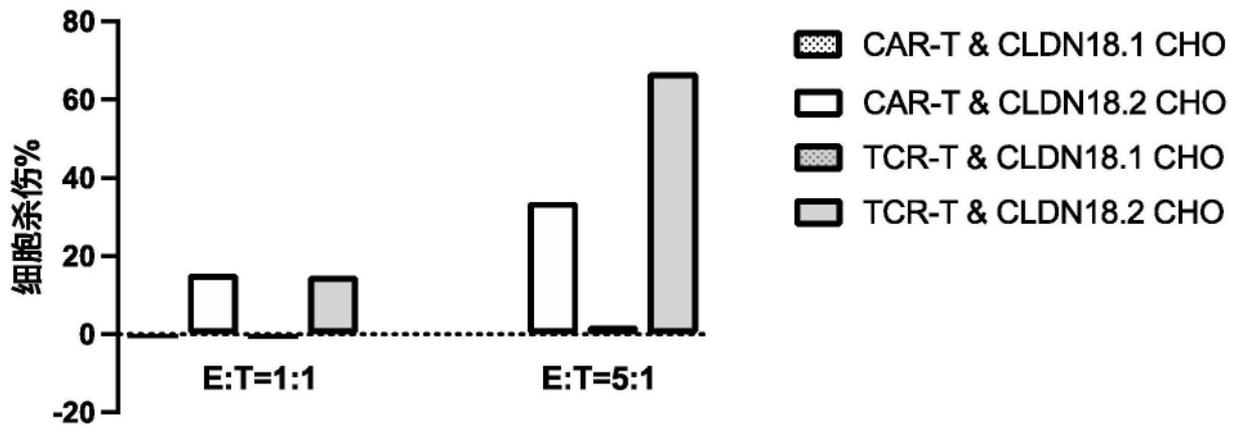


图4

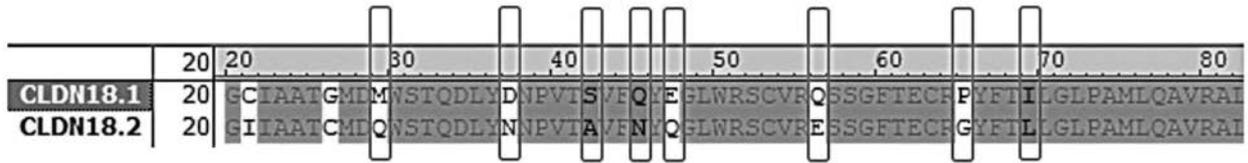


图5

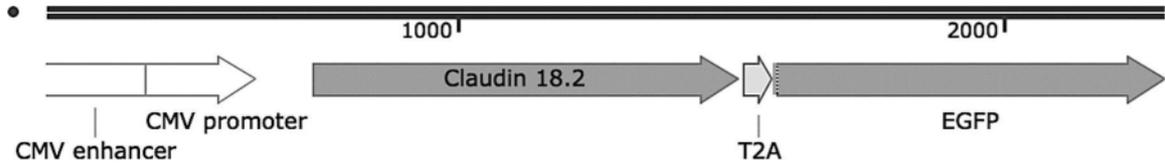
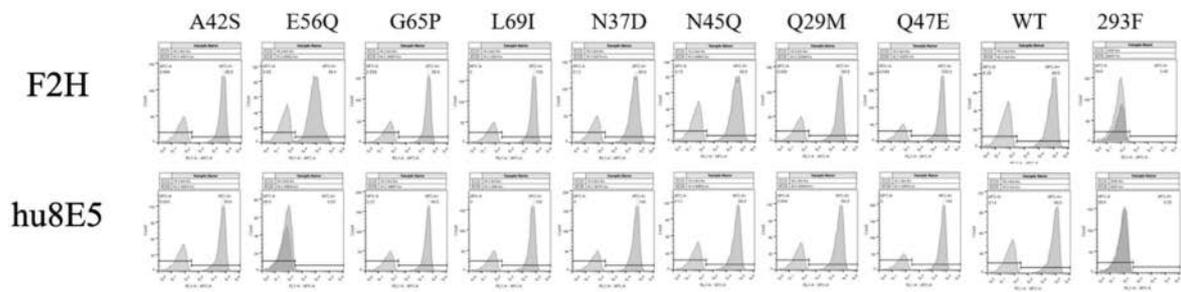


图6



		MFI									
		293F	A42S	E56Q	G65P	L69I	N37D	N45Q	Q29M	Q47E	WT
F2H		265	49752	10568	38957	54652	41470	50388	49433	46675	86265
hu8E5		104	52191	64.5	39340	48202	52019	55432	53185	53059	88764

图7

TCR-T杀伤验证

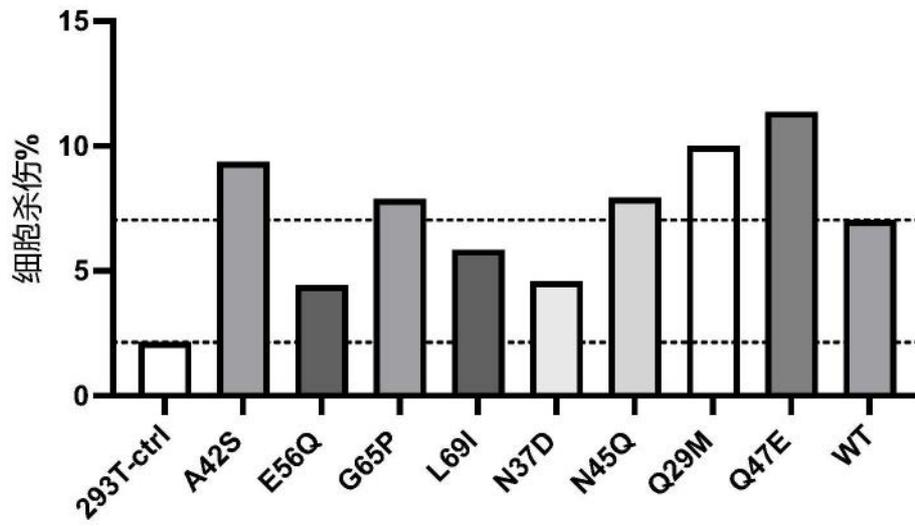


图8