



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116253794 A

(43) 申请公布日 2023.06.13

(21) 申请号 202210999396.X

(22) 申请日 2022.08.19

(71) 申请人 首都医科大学宣武医院

地址 100053 北京市西城区长椿街45号

(72) 发明人 陈志国 赵宇

(74) 专利代理机构 北京辰权知识产权代理有限公司

公司 11619

专利代理师 侯君然

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

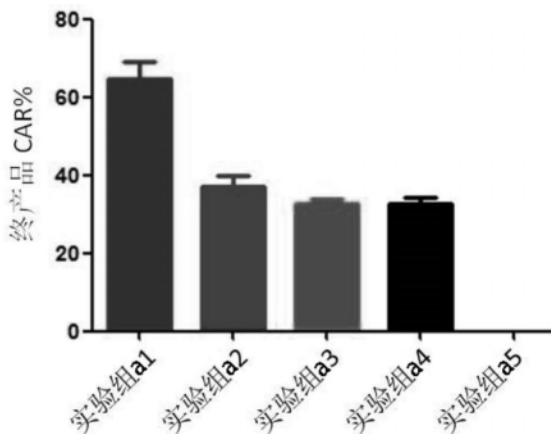
权利要求书1页 说明书9页  
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种用于CAR-T细胞调控的抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种用于CAR-T细胞调控的抗体及其应用,该抗体可以识别含有特定人工抗原表位的CAR受体分子,在制备相应的CAR-T的过程中,通过加入本发明的抗体,可实现CAR-T细胞的定向扩增,提高终产品中CAR阳性细胞的比例;同时还可以诱导CAR阳性细胞向Tcm亚群分化,提高终产品抗肿瘤的持久性。而且通过该抗体制备得到的CAR-T细胞具有更高的体内抗肿瘤活性;此外,在施用CAR-T之后,还能够通过该抗体对体内的CAR-T细胞的数量进行调控。



1. 一种抗体,其特征在于,所述抗体包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3的重链可变区以及含有LCDR1、LCDR2和LCDR3的轻链可变区;

其中,所述HCDR1、HCDR2和HCDR3的氨基酸序列选自下组:

HCDR1:TYAMN (SEQ ID NO:5),HCDR2:RIRSKSNNYATFYGESVRG (SEQ ID NO:6),HCDR3:DYFGSYADY (SEQ ID NO:7);

或者,HCDR1:TFAMN (SEQ ID NO:15),HCDR2:RMRSKNNYYTTFYADSVKD (SEQ ID NO:16),HCDR3:DYFGFNNAVVDY (SEQ ID NO:17);

所述LCDR1、LCDR2和LCDR3的氨基酸序列选自下组:

LCDR1:RSSKSLLSHNGNTYLY (SEQ ID NO:8),LCDR2:RMSNLAS (SEQ ID NO:9),LCDR3:MQYLEYPYT (SEQ ID NO:10);

或者,LCDR1:RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:18),LCDR2:LASNLES (SEQ ID NO:19),LCDR3:QHSRELPWT (SEQ ID NO:20)。

2. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或者SEQ ID NO:11所示;

优选地,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2或者SEQ ID NO:12所示。

3. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体为全长抗体、Fab片段、F(ab)<sub>2</sub>片段、双链Fv片段或单链Fv片段。

4. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体为单克隆抗体。

5. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体还包括重链恒定区和轻链恒定区;

优选地,所述重链恒定区包括如SEQ ID NO:3或者SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列;

优选地,所述轻链恒定区包括如SEQ ID NO:4或者SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

6. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体的羧基端和/或氨基端融合有标签蛋白和/或信号肽;

优选地,所述信号肽包括如SEQ ID NO:21或者SEQ ID NO:22所示的序列。

7. 一种产品,其特征在于,所述产品为以下i)、ii)或iii),

i) 核酸分子,其编码权利要求1-6任一项所述的抗体;

ii) 载体,其包含i)中所述的核酸分子。

iii) 宿主细胞,其表达权利要求1-6任一项所述的抗体,或包含i)中所述的核酸分子,或包含ii)中所述的载体。

8. 权利要求1-6任一项所述抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:在允许表达所述抗体的条件下培养权利要求7所述的宿主细胞;和从所得培养物中分离纯化所述抗体。

9. 权利要求1-6任一项所述的抗体在制备嵌合抗原受体修饰性T细胞中的应用,所述嵌合抗原受体具有分选结构域,所述分选结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:27。

10. 权利要求1-6任一项所述的抗体在制备A)或B)药物中的应用:

A) 调控体内嵌合抗原受体修饰性T细胞数量的药物;

B) 调控嵌合抗原受体修饰性T细胞体内抗肿瘤活性的药物。

## 一种用于CAR-T细胞调控的抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因治疗和细胞治疗领域,具体涉及一种用于CAR-T细胞调控的抗体及其应用。

### 背景技术

[0002] 嵌合抗原受体修饰性T细胞(CAR-T)在B细胞肿瘤的治疗中已经取得了令人瞩目的临床疗效,并且已经有两款CAR-T制品获得美国FDA的批准上市。然而,CAR-T在临床应用中依然存在着诸多技术瓶颈,对其进一步的推广造成了阻碍。其中,如何实现稳定的高纯度CAR-T的制备,减少因不同批次的T细胞对慢病毒批间差造成的较大变异;以及如何避免CAR-T回输后在体内因不可控扩增引发严重临床副反应等,这些均为目前尚未解决的主要技术难题。

[0003] 尽管已有研究报道,利用无活性的EGFR受体在与CAR共表达后,可以作为CAR-T的筛选标志分子;利用小分子化合物联合iCas9蛋白原件构建融合性CAR分子,可以实现CAR-T输注后的体内调控。但是上述技术效果的实现必须在构建CAR表达载体时,将不同的蛋白功能原件与CAR受体共表达。这样的技术方案,一方面增加了CAR载体构建的难度,另一方面,引入过多的大分子原件也增加了修饰后T细胞功能的不确定性。因此,如何利用更为简便的方法实现高纯度CAR阳性T细胞的制备以及CAR-T输注后的体内控制依然是本领域的技术难题。

### 发明内容

[0004] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种用于CAR-T细胞调控的抗体及其应用。该抗体可以识别含有特定人工抗原表位的CAR受体分子,在制备相应的CAR-T的过程中,通过加入本发明的抗体,可实现CAR-T细胞的定向扩增,提高终产品中CAR阳性细胞的比例;同时还可以诱导CAR阳性细胞向T<sub>cm</sub>亚群分化,提高终产品抗肿瘤的持久性。

[0005] 为此,第一方面,本发明提供了一种抗体,其包含含有HCDR1、HCDR2和HCDR3的重链可变区以及含有LCDR1、LCDR2和LCDR3的轻链可变区;

[0006] 其中,所述HCDR1、HCDR2和HCDR3的氨基酸序列选自下组:

[0007] HCDR1:TYAMN(SEQ ID NO:5),HCDR2:RIRSKSNNYATFYGESVRG(SEQ ID NO:6),HCDR3:DYFGSYADY(SEQ ID NO:7);

[0008] 或者,HCDR1:TFAMN(SEQ ID NO:15),HCDR2:RMRSKNYYTTFYADSVKD(SEQ ID NO:16),HCDR3:DYFGFNNAVVDY(SEQ ID NO:17);

[0009] 所述LCDR1、LCDR2和LCDR3的氨基酸序列选自下组:

[0010] LCDR1:RSSKSLLSNGNTYLY(SEQ ID NO:8),LCDR2:RMSNLAS(SEQ ID NO:9),LCDR3:MQYLEYPYT(SEQ ID NO:10);

[0011] 或者,LCDR1:RASKSVSTSGYSYMH(SEQ ID NO:18),LCDR2:LASNLES(SEQ ID NO:19),LCDR3:QHSRELPWT(SEQ ID NO:20)。

[0012] 在一些实施方式中,所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3选自下组:

[0013] HCDR1:TYAMN (SEQ ID NO:5),HCDR2:RIRSKSNNYATFYGESVRG (SEQ ID NO:6),HCDR3:DYFGSYADY (SEQ ID NO:7);LCDR1:RSSKSLLSNGNTYLY (SEQ ID NO:8),LCDR2:RMSNLAS (SEQ ID NO:9),LCDR3:MQYLEYPYT (SEQ ID NO:10);

[0014] 或者,HCDR1:TFAMN (SEQ ID NO:15),HCDR2:RMRSKNNYYTTFYADSVKD (SEQ ID NO:16),HCDR3:DYFGFNNAVY (SEQ ID NO:17);LCDR1:RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:18),LCDR2:LASNLES (SEQ ID NO:19),LCDR3:QHSRELPWT (SEQ ID NO:20)。

[0015] 在一些实施方式中,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或者SEQ ID NO:11所示。

[0016] 在一些实施方式中,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2或者SEQ ID NO:12所示。

[0017] 在某实施方式中,所述重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:1,所述轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:2。

[0018] 在某实施方式中,所述重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:11,所述轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:12。

[0019] 在一些实施方式中,所述抗体为全长抗体、Fab片段、F(ab)<sub>2</sub>片段、双链Fv片段或单链Fv片段

[0020] 在一些实施方式中,所述抗体为单克隆抗体。

[0021] 在一些实施方式中,所述抗体还包括重链恒定区和轻链恒定区;所述重链恒定区包括如SEQ ID NO:3或者SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列;所述轻链恒定区包括如SEQ ID NO:4或者SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0022] 在某实施方式中,所述重链恒定区包括如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,所述轻链恒定区包括如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0023] 在某实施方式中,所述重链恒定区包括如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,所述轻链恒定区包括如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施方式中,所述抗体的羧基端和/或氨基端融合有标签蛋白和/或信号肽。

[0025] 在一些实施方式中,所述信号肽包括如SEQ ID NO:21或者SEQ ID NO:22所示的序列。

[0026] 第二方面,本发明提供一种核酸分子,其编码本发明所述的抗体。

[0027] 第三方面,本发明提供一种载体,其包含本发明所述的核酸分子。

[0028] 第四方面,本发明提供一种宿主细胞,其表达本发明所述的抗体,或包含本发明所述的核酸分子,或包含本发明所述的载体。

[0029] 第五方面,本发明提供一种生产所述抗体的方法,其包括以下步骤:在允许表达所述抗体的条件下培养本发明所述的宿主细胞;和从所得培养物中分离纯化所述抗体。

[0030] 第六方面,本发明还提供所述抗体在制备嵌合抗原受体修饰性T (CAR-T) 细胞中的应用,所述嵌合抗原受体具有分选结构域,所述分选结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:27。

[0031] 在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体修饰性T细胞的制备方法包括:使活化后的T细胞感染编码嵌合抗原受体的病毒,然后在培养体系中加入本发明第一方面所述的抗体。

[0032] 第七方面,本发明提供所述抗体在制备A)或B)药物中的应用:

[0033] A) 调控体内嵌合抗原受体修饰性T(CAR-T)细胞数量的药物;

[0034] B) 调控体内嵌合抗原受体修饰性T(CAR-T)细胞抗肿瘤活性的药物。

[0035] 本发明的发明人在此前研究中,报道了一种具有人工抗原表位的CAR分子,可以通过二次分选的方法将表达CAR阳性的目的细胞进行高效分选,以提高终产品中阳性CAR-T细胞的比例(CN108017717A)。在此研究基础上,发明人意外地发现,在制备过程中,利用抗人工抗原表位的抗体对导入CAR的T细胞进行特异性激活,不仅可以提高终产品中CAR阳性T细胞的比例,还可以显著提高CAR阳性T细胞中Tcm的比例,带来意料不到的技术效果。在此研究技术上,本发明进一步开发了可特异性识别人工抗原表位E-tag,并且可以有效激活相应CAR-T细胞的抗体。还进一步发现了,该抗体不仅可在CAR-T细胞的制备阶段起到上述作用,而且通过该抗体制备得到的CAR-T细胞具有更高的体内抗肿瘤活性;此外,在施用CAR-T之后,还能够通过该抗体对体内的CAR-T细胞的数量进行调控。

[0036] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0037] 1、本发明提供的抗体可用于CAR-T细胞的制备中,并且可有效提高产品中CAR阳性T细胞的比例,和可以实现CAR阳性T细胞中Tcm亚群的体外的特异性扩增,显著提高Tcm在终产品中的比例。

[0038] 2、本发明提供的抗体用于CAR-T细胞的制备中,有效克服了Tcm在体外无法长期培养的技术问题,实现了Tcm在体外的长期培养,有效提高了Tcm的产量;现有技术培养到第6天左右,Tcm比例开始下降,而本发明的技术方案培养至第12天时,Tcm比例依然可以维持较高水平。

[0039] 3、CAR-T技术在临床应用中一直存在以下问题:如何在CAR-T细胞回输体内后进行调控,以提高其安全性;如何对CAR-T在体内的活性进行有效调控,进一步提高其临床抗肿瘤活性。本发明提供的抗体经实验验证,可用于CAR-T回输之后的体内调控,提高了CAR-T技术在临床应用的安全性和可控性。

## 附图说明

[0040] 通过阅读下文优选实施方式的详细描述,各种其他的优点和益处对于本领域普通技术人员将变得清楚明了。附图仅用于示出优选实施方式的目的,而并不认为是对本发明的限制。在附图中:

[0041] 图1:本发明制备得到的抗体的SDS-PAGE鉴定结果;

[0042] 图2:在CAR-T细胞制备过程中,采用本发明提供的抗体进行特异性激活,对各组细胞的增殖能力的分析结果;

[0043] 图3:在CAR-T细胞制备过程中,采用本发明提供的抗体进行特异性激活,制备得到的细胞产品中CAR阳性T细胞比例;

[0044] 图4:在CAR-T细胞制备过程中,采用本发明提供的抗体进行特异性激活,制备得到的细胞产品中CAR阳性T细胞中Tcm的比例;

[0045] 图5:在CAR-T细胞制备过程中,采用本发明提供的抗体进行特异性激活,制备得到的细胞对靶细胞的体外杀伤活性检测结果;

[0046] 图6:通过本发明提供的抗体进行特异性激活制备得到的CAR-T细胞在体内抗肿瘤

活性的评价结果；

[0047] 图7:应用本发明提供的抗体对体内CAR-T细胞数量进行调控,外周血中CAR-T细胞相对倍数随时间的变化情况。

### 具体实施方式

[0048] 下面将参照附图更详细地描述本公开的示例性实施方式。虽然附图中显示了本公开的示例性实施方式,然而应当理解,可以以各种形式实现本公开而不应被这里阐述的实施方式所限制。相反,提供这些实施方式是为了能够更透彻地理解本公开,并且能够将本公开的范围完整的传达给本领域的技术人员。

[0049] 实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J.萨姆布鲁克等著,贺福初等译的《分子克隆实验指南》,第四版,科学出版社;J.E.科利根等著,曹雪涛等译的《精编免疫学实验指南》,科学出版社等)或者按照产品说明书进行。

[0050] 实施例1靶向嵌合抗原受体分选肽单克隆抗体的制备

[0051] (1)人工抗原表位多肽与卵清蛋白采用碳二亚胺(EDC)法进行偶联,制备成融合抗原:

[0052] 取5mg目的抗原多肽(氨基酸序列为SEQ ID NO:27,KPLPEVTDEY)和2.5mg卵清蛋白(购自索莱宝公司,货号A8040)溶解在250 $\mu$ l TE buffer(pH 8.0)中,充分震荡使其溶解,再取79mg EDC·HCl充分溶解于250 $\mu$ l TE buffer(pH 8.0)中。将目的抗原肽和卵清蛋白的混合溶液边震荡边逐滴加入EDC溶液,在37 $^{\circ}$ C摇床中反应2h以上。先用Sephadex柱分离偶联产物和未结合的目的抗原肽小分子,再透析纯化,将0.5ml溶液在PBS中透析3天,每天换液两次,每次换液200ml。透析产物即为制备得到的融合抗原,小剂量分装,于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0053] (2)按照单克隆抗体制备的常规技术方法,将步骤(1)制备得到的融合抗原对5只Ba1 b/c小鼠进行免疫。免疫周期结束后,以该抗原多肽(氨基酸序列:KPLPEVTDEY)为抗原,卵清蛋白为阴性对照,检测小鼠血清抗体滴度,检测结果见表1所示。将血清滴度最高的4号小鼠进行处死,取脾脏分离脾细胞,与S/P 20骨髓瘤细胞系进行融合,制备杂交瘤细胞。经过亚克隆筛选后,共获得两株阳性细胞株,分别为:MM02H(SmAb-1)、MM04H(SmAb-2)。

[0054] 表1免疫小鼠血清滴度检测

免疫小鼠编号	血清稀释滴度	OD450检测值-1	OD450检测值-2	OD450平均值
1	1:500	0.403	0.353	0.378
	1:1000	0.329	0.279	0.304
2	1:500	0.736	0.686	0.711
	1:1000	0.536	0.513	0.5245
3	1:500	0.84	0.79	0.815
	1:1000	0.617	0.567	0.592
4	1:500	2.376	2.326	2.351
	1:1000	2.086	2.036	2.061
5	1:500	0.281	0.231	0.256
	1:1000	0.21	0.16	0.185
阴性对照	1:500	0.047	-0.03	0.0085
	1:1000	0.044	-0.006	0.019

[0055] 实施例2单克隆抗体的鉴定

[0057] 将实施例1获得的两株阳性细胞株扩增后,分别注射到Ba1 b/c小鼠腹腔,注射后10天,将小鼠处死,取腹水。腹水经1200rpm离心后,上清利用Protein-A凝胶柱进行纯化,获得单克隆抗体。抗体经沉淀后,复溶在PBS中,保存于-80℃用于后期实验。将获得的抗体经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定,检测结果见图1所示,其中分子量较大的条带为抗体重链,分子量较小的条带为抗体轻链,体的纯度均可达95%以上。利用ELISA进行滴度测定,测定结果见表2所示,两株抗体与抗原的结合滴度均可达到1:1000。

[0058] 表2抗体滴度检测

抗体克隆号	稀释比例	OD450检测值-1	OD450检测值-2	OD450平均值
MM02H	1:1000	2.734	2.632	2.683
MM04H	1:1000	2.911	2.764	2.836

[0060] 将表达单克隆抗体的两株杂交瘤细胞进行基因组提取并对抗体编码序列和蛋白序列进行测序,获得的两株单克隆抗体序列信息。

[0061] 根据检测结果,MM02H(SmAb-1)的重链氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示,其中第1-20位为信号肽,第21-140位为重链可变区,第141-466位为重链恒定区;轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示,其中第1-19位为信号肽,第20-131位为轻链可变区,第132-237位为轻链恒定区。具体地,MM02H(SmAb-1)的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;重链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,轻链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。可变区CDR区序列如表3所示。

[0062] 表3 MM02H(SmAb-1)可变区CDR区序列

重链可变区	序列	SEQ ID NO:	轻链可变区	序列	SEQ ID NO:
HCDR1	TYAMN	5	LCDR1	RSSKSLLSNGNTYLY	8
HCDR2	RIRSKSNNYATFYGE SVRG	6	LCDR2	RMSNLAS	9
HCDR3	DYFGSYADY	7	LCDR3	MQYLEYPYT	10

[0064] 根据检测结果,MM04H(SmAb-2)的重链氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,其中第1-20位为信号肽,第21-142位为重链可变区,第143-468位为重链恒定区;轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示,其中第1-19位为信号肽,第20-129位为轻链可变区,第130-236位为轻链恒定区。具体地,MM04H(SmAb-2)的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示,轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示;重链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,轻链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示。可变区CDR区序列如表4所示。

[0065] 表4 MM04H(SmAb-2)可变区CDR区序列

[0066]	重链可	序列	SEQ	轻链可	序列	SEQ ID
	变区		ID NO:	变区		NO:
[0067]	HCDR1	TFAMN	15	LCDR1	RASKSVSTSGYSYMH	18
	HCDR2	RMRSKNNYYTTFYA DSVKD	16	LCDR2	LASNLES	19
	HCDR3	DYFGFNNAVY	17	LCDR3	QHSRELPWT	20

[0068] 实施例3嵌合抗原受体编码病毒的制备

[0069] 本实施例制备了分别编码CD19sCAR、CD19CAR和EGFP的慢病毒。具体步骤如下:

[0070] (1) 嵌合抗原受体的表达载体的构建:

[0071] 嵌合抗原受体CD19sCAR可靶向CD19抗原且包含人工抗原表位E-tag (SEQ ID NO: 27), CD19sCAR的氨基酸序列见SEQ ID NO:28,核苷酸序列见SEQ ID NO:29。

[0072] 同时设置不包含人工抗原表位的对照嵌合抗原受体CD19CAR,其氨基酸序列见SEQ ID NO:30,核苷酸序列见SEQ ID NO:31。

[0073] 使用化学合成的方法分别将CD19sCAR、CD19CAR核苷酸序列进行全序列合成,同时在其两端加入限制性酶切位点,将合成得到的序列分别利用基因克隆的方法插入含有CMV启动子的慢病毒表达载体pLenti6.4的CMV启动子下游。获得CD19sCAR的慢病毒表达载体和CD19CAR的慢病毒表达载体。

[0074] (2) 嵌合抗原受体编码病毒的制备

[0075] 利用HEK293T作为包装细胞进行嵌合抗原受体编码病毒的制备。将对数生长期的HEK293T细胞消化,800rpm离心5min,弃去培养基后用含有10%FBS的DMEM培养基重悬。进行细胞计数后,将细胞悬液的密度调整至 $3.6 \times 10^6$ /ml,放置于37°C细胞培养箱中待用。

[0076] 病毒包装质粒的转染使用Lipofectamine 3000试剂盒(Thermo Fisher公司),并按照试剂盒说明书进行操作。将慢病毒包装需要的三种质粒,包括慢病毒表达载体(分别使用步骤1制备得到的CD19sCAR慢病毒表达载体、CD19CAR慢病毒表达载体和含有EGFP编码基因的慢病毒载体pLenti6.4-CMV-EGFP)、编码病毒核衣壳蛋白Gag/Pol和Rev的质粒psPAX2和编码病毒包膜蛋白的质粒pVSVG,与Lipofectamine 3000按照说明书推荐比例混合配制成DNA脂质体复合物,室温下静置15min。静置结束后,取一块6孔培养板,将DNA-脂质体复合物加入到6孔板中,每孔1ml,再将之前制备的HEK293T细胞悬液轻柔混匀,加入到6孔板中,与脂质体复合物混匀。培养板放入培养箱继续培养,分别在培养24h和48h收集含有病毒的培养上清。在最后一次收集上清后,将上清2000g离心10min,用0.45μm的滤膜过滤,即制备得到了分别编码CD19sCAR、CD19CAR和EGFP的慢病毒,分装后冻存于-80°C保存待用。



[0077] 实施例4嵌合抗原受体修饰性T细胞的制备

[0078] 选择实施例2中检测滴度最高的一株抗体(MM04H, SmAb-2)检测其对CD19sCAR修饰性T细胞的体外选择性扩增能力。

[0079] 用Ficol密度梯度离心法分离外周血中的单个核细胞(PBMC),将PBMC用D-PBS重悬后将密度调整为 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$ 。按照T细胞绝对数与CD3/CD28分选磁珠1:1的比例,加入分选磁珠,室温轻柔混匀20min。混匀后的细胞-磁珠混合悬液利用分选磁力架进行CD3+T细胞的分选。将分选后的T细胞进行T细胞活化:用含有50ng/mL OKT-3和500IU/mL IL-2的X-VIVO15培养基按照 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 重悬T细胞,接种至培养容器中进行培养,培养条件为放入37°C,5%CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中培养24h。T细胞活化后,将细胞收集到50mL离心管中,进行计数,将细胞密度调整至 $3 \times 10^6/\text{mL}$ 。

[0080] 将活化后的T细胞按照表5进行分组,其中SmAb为实施例2制备得到的抗体MM04H(SmAb-2),阴性对照组是利用编码EGFP的慢病毒感染T细胞的处理组。

[0081] 表5实验组分组

[0082]

序号	分组编号	处理及培养方法
1	实验组a1	感染CD19sCAR后利用SmAb进行特异性激活
2	实验组a2	感染CD19sCAR后不利用SmAb进行特异性激活
3	实验组a3	感染CD19CAR后利用SmAb进行特异性激活
4	实验组a4	感染CD19CAR后不利用SmAb进行特异性激活
5	实验组a5	阴性对照组

[0083] 活化后的T细胞按照表5进行分组后,分别感染实施例3制备得到的编码CD19sCAR、CD19CAR和EGFP的慢病毒。感染后24h,将各处理组的细胞转移至含有80ng/mL IL-7、500IU/mL IL-2和20ng/mL IL-15的X-VIVO15培养基中进行培养,培养条件为37°C,含有5%CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱。在培养的第6天,根据实验分组的处理方式,将实验组a1和实验组a3进行活化处理,处理方式为:将实验组a1和实验组a3的细胞转移至包被有20μg/mL SmAb抗体的培养容器,继续用含80ng/mL IL-7、500IU/mL IL-2和20ng/mL IL-15的X-VIVO15培养基以原相同的条件进行培养。

[0084] 培养期间,每2-3天根据细胞生长情况对细胞进行补液。之后各组细胞继续培养至第12天,分别收获细胞制品。

[0085] 统计3个独立批次的实验,对各实验组的终产品进行以下分析检测:

[0086] 对各实验组的细胞的增殖能力进行分析,分析结果见图2所示,由图2可知,实验组a1的细胞经SmAb刺激活化后,增殖水平显著优于其他实验组细胞;对各实验组的终产品进行流式检测分析,检测结果见图3所示,由图3可知,实验组a1的终产品中CAR阳性T细胞比例显著高于其他实验组,说明将SmAb应用于sCAR-T的制备,可促进CAR阳性T细胞的扩增,提高其在终产品中的比例。

[0087] 实施例5 SmAb对sCAR修饰性T细胞的体外分化能力的影响

[0088] 将实施例4经12天培养获得的各组T细胞进行流式检测分析,检测终产品中不同T细胞亚群的比例,包括中央记忆型T细胞(Tcm),效应记忆型T细胞(Tem),初始型T细胞(NaïveT)以及终末分化型T细胞(Tte)。分选不同T细胞的分子标志物包括CD3、CD45RO、CD197和sCAR。

[0089] 检测结果见图4所示,实验组a1收获的终产品中,Tcm比例显著高于其他实验组,说明将SmAb应用于sCAR-T的制备,可以有效的促进CAR阳性T细胞向中央记忆型T细胞分化,提高终产品中Tcm的比例。

[0090] 实施例6 SmAb对sCAR修饰性T细胞的体外杀伤活性的影响

[0091] 以人淋巴瘤细胞系raji为靶细胞,按照 $5 \times 10^4$ /mL接种至U型底96孔板,将实施例4经12天培养获得的各实验组CAR-T细胞,按照效靶比(E/T)比例25:1、12.5:1、6.25:1、1:1的比例进行共培养,培养基为不含血清的RPMI1640培养基,培养条件为37℃,5%CO<sub>2</sub>,饱和湿度培养箱,培养12h后,利用乳酸脱氢酶释放法(LDH法)检测不同实验组的CAR-T细胞对靶细胞的杀伤活性,检测结果见图5。由图5的实验结果可知,将SmAb应用于sCAR-T的制备获得的细胞产品的杀伤活性显著优于其他实验组。

[0092] 实施例7 SmAb对sCAR修饰性T细胞抗肿瘤活性的调控

[0093] 选择6-8周龄的NOD/SCID IL2R  $\gamma$  c<sup>-/-</sup>免疫缺陷小鼠,将稳定表达荧光素酶蛋白的人Raji细胞系(Raji-Luci)以 $10^6$ /100 $\mu$ L/只的剂量,经过尾静脉注射的方式建立荷瘤小鼠模型。注射肿瘤细胞3天后,按照实施例4的实验分组,每组实验动物通过尾静脉按照 $1 \times 10^6$ /100 $\mu$ L/只注射实施例4制备得到的CAR-T细胞制品。注射后每周利用小动物成像系统观测实验动物的体内肿瘤进展,直至全部实验动物死亡。对实验数据的统计分析结果见图6所示,与其他实验组相比,实验组a1获得的CAR-T细胞可以有效的延长荷瘤小鼠的中位生存时间,延缓肿瘤体内的进展,具有更持久的体内抗肿瘤活性,表明将SmAb应用于sCAR-T的制备,可有效提高制备得到的CAR-T细胞产品的体内抗肿瘤活性。

[0094] 实施例8 SmAb对sCAR修饰性T细胞的体内调控

[0095] (1) 将SmAb抗体与抗微管蛋白类小分子药物美登醇(Maytansinoid,DM1)进行偶联,制备SmAb-DM1。具体步骤如下:

[0096] 将MM04H(SmAb-2)抗体以1mg/mL溶解于含有1.8N的DTT和1mM DTPA的PBS中,用50mM硼酸将缓冲液pH调至8.0,37℃孵育1h,使抗体进行还原变性。将还原后的抗体溶液平衡至4℃,用G25脱盐柱层析柱进行纯化。将纯化后变性的抗体,硫醚连接子-DM1按照2.4:4.6的比例混合,4℃反应1小时,反应后加入20倍体积的半胱氨酸终止反应。反应的混合物经过G25脱盐柱纯化,终产品即为偶联了DM1的SmAb,SmAb-DM1抗体以5mg/mL浓度保存于4℃,用于后续实验。

[0097] (2) 将NOD/SCID IL2R  $\gamma$  c<sup>-/-</sup>免疫缺陷小鼠按照表6进行分组,不同实验组的小鼠按照 $1 \times 10^7$ /200 $\mu$ L/只通过尾静脉注射不同的CAR-T细胞制品,注射后2h,采集小鼠外周血作为基线数据,再按照实验分组通过尾静脉分别注射SmAb 1mg/kg,SmAb-DM1 1mg/kg或者PBS。注射后24h采集小鼠外周血,利用流式检测样本中的CAR-T细胞。检测使用的分子标注物为CD45、CD3和CAR。检测结果如图7所示,输注了CD19sCAR-T并给予SmAb-DM1的小鼠体内的CAR-T细胞比例随着检测时间点的推移显著降低,表明SmAb-DM1可以有效的清除体内的sCAR-T细胞。

[0098] 表6动物实验分组

[0099]

序号	分组编号	处理及培养方法
1	实验组b1	回输CD19sCAR-T后注射SmAb-DM1
2	实验组b2	回输CD19sCAR-T后注射SmAb

3	实验组b3	回输CD19sCAR-T后注射PBS
4	实验组b4	回输CD19CAR-T后注射SmAb-DM1
5	实验组b5	回输CD19CAR-T后注射SmAb
6	实验组b6	回输CD19CAR-T后注射PBS
7	实验组b7	阴性对照组

[0100] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

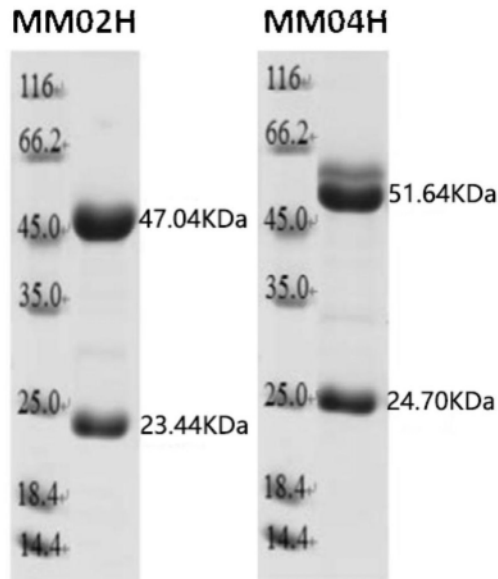


图1

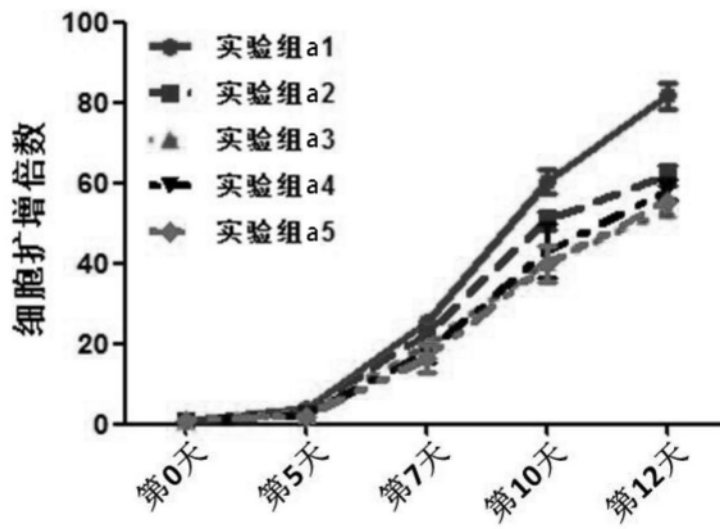


图2

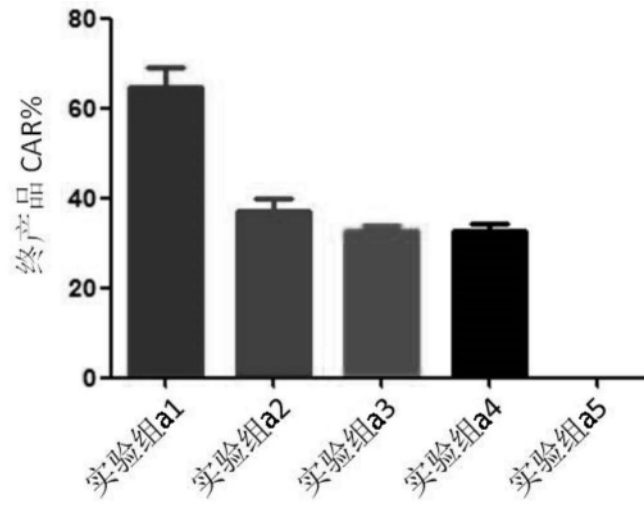


图3

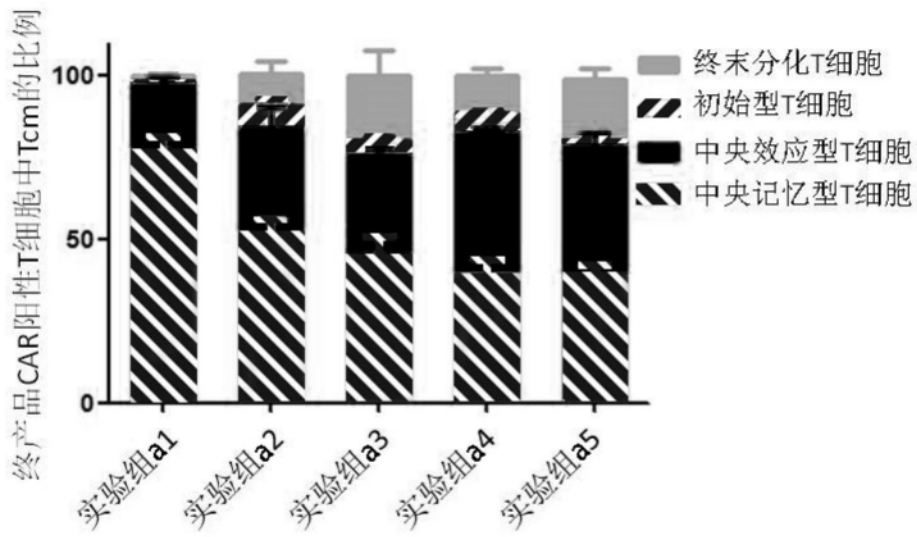


图4

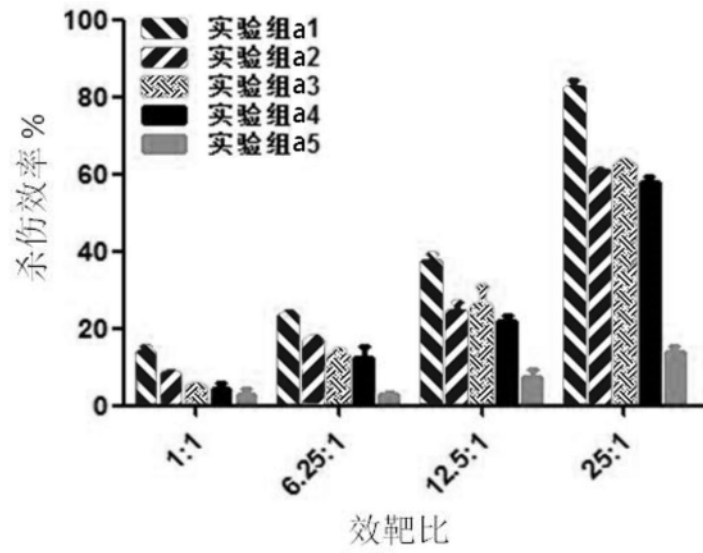


图5

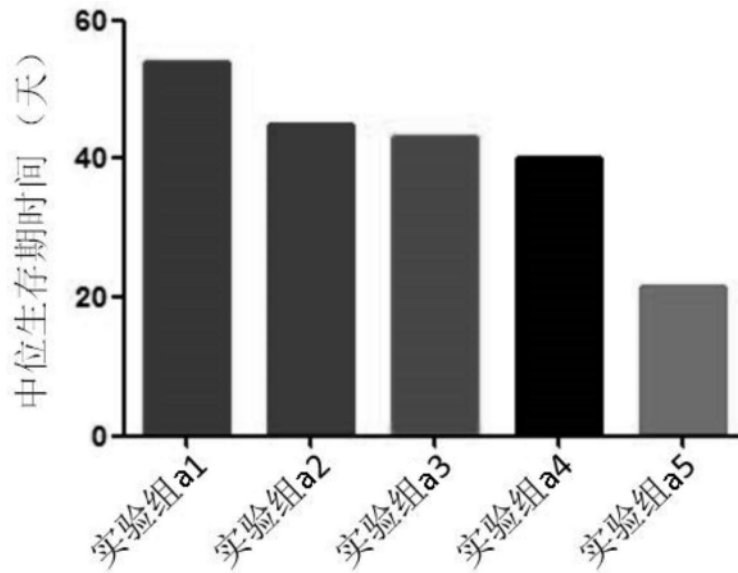


图6

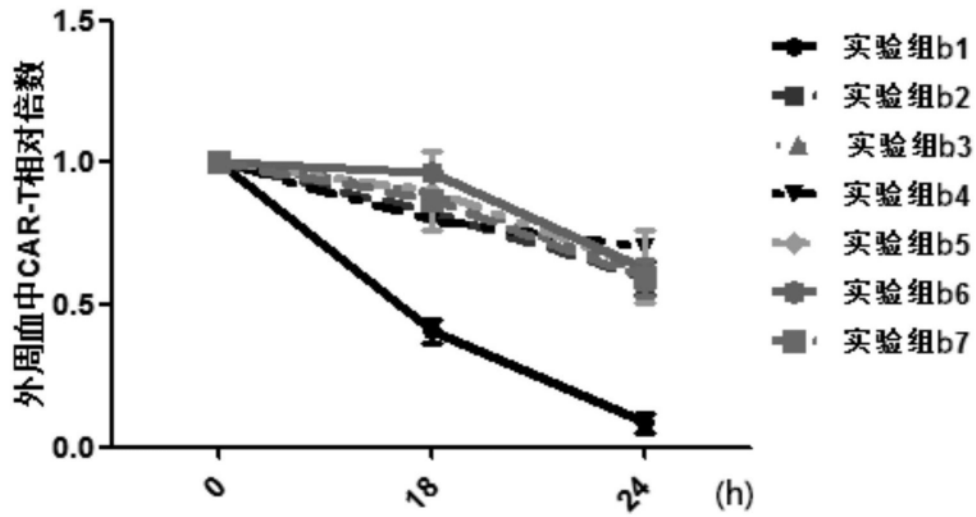


图7