



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107353343 A

(43)申请公布日 2017. 11. 17

(21)申请号 201710539303.4

(22)申请日 2017.07.04

(71)申请人 武汉波睿达生物科技有限公司

地址 430075 湖北省武汉市东湖新技术开发区高新大道666号生物城B4栋2楼

(72)发明人 张同存 顾潮江 胡广

(74)专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限公司 11212

代理人 杨立 陈振玉

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

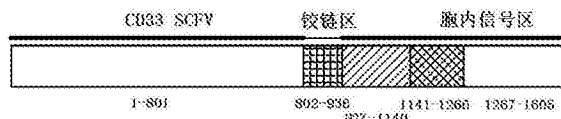
权利要求书1页 说明书3页  
序列表4页 附图2页

(54)发明名称

一种靶向表达CD33表面抗原的细胞的嵌合抗原受体

(57)摘要

本发明涉及一种靶向表达CD33表面抗原的细胞的嵌合抗原受体,其特征在于,包含CD33结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号结构域,所述CD33结合结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。本发明还涉及编码所述嵌合抗原受体的核酸,还涉及表达所述嵌合抗原受体的重组表达载体。通过将本发明的嵌合抗原受体表达于T细胞中可使得到CAR T细胞能够有效并且特异性地靶向表达CD33表面抗原的恶性细胞,从而为治疗一些表达CD33表面抗原的恶性疾病,例如AML等,提供更高效并且副作用和不良反应更少的方法。



1. 一种靶向表达CD33表面抗原的细胞的嵌合抗原受体,其特征在于,包含CD33结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号结构域,所述CD33结合结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

2. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述跨膜结构域为CD8,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

3. 根据权利要求1或2所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述细胞内信号结构域由CD28、4-1BB和CD3组成,其氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

4. 一种编码权利要求1-3中任一项所述的嵌合抗原受体的核酸,其特征在于,序列如SEQ ID NO:4所示。

5. 一种表达权利要求1-3中任一项所述的嵌合抗原受体的重组表达载体,其特征在于,包括嵌合抗原受体表达框,所述嵌合抗原受体表达框由可在T细胞中表达的启动子和位于所述启动子下游的编码所述嵌合抗原受体的核酸组成。

6. 根据权利要求5所述的重组表达载体,其特征在于,所述启动子为巨细胞病毒启动子、SV40启动子、EF1alpha启动子或RSV启动子。

7. 根据权利要求6所述的重组表达载体,其特征在于,所述重组表达载体通过将所述编码嵌合抗原受体的核酸插入慢病毒表达载体中的CMV启动子的3'下游得到。

## 一种靶向表达CD33表面抗原的细胞的嵌合抗原受体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细胞免疫治疗领域,更特别地,涉及一种靶向表达CD33表面抗原的细胞的嵌合抗原受体及其编码序列和表达载体。

### 背景技术

[0002] CD33是一个白细胞分化抗原,具有364个氨基酸的跨膜糖蛋白,与唾液酸粘附素家族的成员具有序列同源性,该家族包括髓鞘相关糖蛋白和CD22,以及唾液酸粘附素本身。它可被骨髓祖细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞前体等细胞表达。尽管CD33的特殊功能还不清楚,但其与唾液酸粘附素的同源性提示其在凝集素家族的碳水化合物结合特性中的作用,这种作用随后被证实。临床研究显示,CD33可在超过80%的急性骨髓性白血病(AML)病例中呈阳性表达。由于CD33的选择性表达,结合细胞毒类药物的免疫偶联物,能特异识别和结合CD33的单克隆抗体,已经被建议用于选择性靶向AML细胞。

[0003] 细胞免疫治疗是一种正在兴起的治疗肿瘤或恶性疾病的方法,其通过分子生物学技术构建嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)的表达载体,并将该表达载体导入到从人体分离的免疫细胞中,使其细胞表面表达CAR后,将其回输至人体。表达CAR的免疫细胞能够特异性识别靶细胞,并对其进行杀伤。

[0004] 在这种治疗方法中,CAR的作用至关重要。嵌合抗原受体包括单链抗体结构域、跨膜结构域、胞内信号结构域。其中,单链抗体结构域将免疫细胞靶向目标细胞,胞内信号结构域释放胞内信号,启动免疫细胞的杀伤活性。

### 发明内容

[0005] 为解决以上问题,本发明提供了一种靶向表达CD33表面抗原的细胞的嵌合抗原受体,其特征在于,包含CD33结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号结构域,所述CD33结合结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0006] 优选地,所述跨膜结构域为CD8,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0007] 优选地,所述细胞内信号结构域由CD28、4-1BB和CD3组成,其氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0008] 本发明还提供了一种编码上述嵌合抗原受体的核酸,其序列如SEQ ID NO:4所示。

[0009] 本发明还提供了一种表达上述嵌合抗原受体的重组表达载体,其包括嵌合抗原受体表达框和复制系统,所述嵌合抗原受体表达框由可在T细胞中表达的启动子和位于所述启动子下游的编码所述嵌合抗原受体的核酸组成。

[0010] 优选地,所述启动子为巨细胞病毒启动子、SV40启动子、EF1a1pha启动子或RSV启动子。

[0011] 优选地,所述重组表达载体通过将所述编码嵌合抗原受体的核酸插入慢病毒表达载体中的CMV启动子得到。

[0012] 通过将本发明的嵌合抗原受体表达于T细胞中可使得得到CAR T细胞能够有效并且

特异性地靶向表达CD33表面抗原的恶性细胞,从而为治疗一些表达CD33表面抗原的恶性疾病,例如AML等,提供更高效并且副作用和不良反应更少的方法。

### 附图说明

[0013] 图1为实施例中编码CD33嵌合抗原受体的DNA片段的示意图;

[0014] 图2为CAR T细胞、GAR T细胞和T细胞对高表达CD33的AML细胞的杀伤活性统计图;

[0015] 图3为CAR T细胞、GAR T细胞和T细胞对不表达CD33的人成纤维细胞BJ的杀伤活性统计图。

### 具体实施方式

[0016] 以下结合实例对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0017] 1. CD33SCFV嵌合抗原受体表达质粒的构建

[0018] 通过人工合成SEQ ID NO:4所示的长度为1605bp的DNA片段,其中,第1-801位的核苷酸编码CD33SCFV,第802-936位的核苷酸编码CD8铰链区,第937-1140位的核苷酸编码CD28,第1141-1266位的核苷酸编码41BB,第1267-1605位的核苷酸编码CD3(图1)。后面三个区域构成胞内信号区。

[0019] 将上述DNA片段插入慢病毒表达载体pLVX-IRES-puro的CMV启动子下游,得到CD33SCFV嵌合抗原受体表达质粒。

[0020] 2. CD33SCFV嵌合抗原受体表达质粒转染T细胞

[0021] 1) 慢病毒的包装制备

[0022] 将CD33SCFV嵌合抗原受体表达质粒和辅助质粒psPAX2、pMD2.G以4:3:1的比例用lipo2000转染试剂(Invitrogen)转染,具体方法见lipo2000转染试剂说明书。转染48小时后,将含有病毒的细胞培养上清吸入EP管中,4℃2000g离心10min,转移上清至新EP管中,0.45μm滤器过滤后-80℃保存。

[0023] 2) T细胞的制备

[0024] 取10ml健康人的新鲜血液,用淋巴细胞分离液(Mediatech)分离外周血单核细胞,具体方法见说明书。用含有300IU/ml的IL-2、50ng/ml的OKT-3和5%人AB血清(Invitrogen)的AIM-V培养基(Invitrogen)诱导培养48h,得到T细胞。

[0025] 3) 慢病毒感染T细胞及感染后T细胞的扩增培养

[0026] 从-80℃取出2ml病毒液,加入终浓度为8μg/ml的聚凝胺(购自Sigma公司),用该病毒液重悬 $1 \times 10^6$ 个上述诱导培养的T细胞。将细胞悬液加入24孔板的1个孔中,1000g,32℃,离心1h。37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养8h后,1000g,32℃,再次离心1h。吸弃1.4ml培养上清,加入1.4ml新鲜的含有300IU/ml的IL-2、50ng/ml的OKT-3和5%人AB血清的AIM-V培养基,继续培养。每2-3天检测一次细胞密度,当细胞密度达到 $2 \times 10^6$ 个/ml时,吸取1ml细胞悬液,加入另一个孔中,分别向两个孔中加入1ml新鲜的含有300IU/ml的IL-2和5%人AB血清的AIM-V培养基,继续扩大培养。如此反复,直至细胞扩增至足够的用量。

[0027] 检验CD33SCFV嵌合抗原受体在T细胞中有效表达后,即获得针对CD33的CART细胞。

[0028] 3. CAR T细胞的对CD33阳性的恶性细胞的特异性杀伤活性

[0029] 分别取 $5 \times 10^4$ 个AML细胞(高表达CD33)和人成纤维细胞BJ接种于96孔板,过夜培养后,分别向两种细胞培养孔中按效应细胞(E):靶细胞(T)=10:1和3:1的比例加入CAR-T细胞、对照病毒修饰的T细胞(GFP-T)和未加修饰的T细胞(T)。孵育5h后,按照LDH细胞毒性分析试剂盒(Cayman Chemical)说明书进行操作,检测CAR T细胞对AML细胞的特异杀伤活性。结果显示CAR T细胞组与GFP-T组和T细胞组相比,在效靶比为10:1和3:1的情况下,对高表达CD33的AML细胞都具有更强的杀伤作用,且这种差异具有显著性( $p < 0.05$ ) (图2);对不表达CD33的人成纤维细胞BJ的杀伤作用无显著性差异( $p > 0.05$ ) (图3)。因此CAR T细胞对高表达CD33的AML细胞具有特异杀伤活性。

## 序列表

&lt;110&gt; 武汉波睿达生物科技有限公司

&lt;120&gt; 一种靶向表达CD33表面抗原的细胞的嵌合抗原受体

&lt;130&gt; 1

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 246

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 1

```

Asn Ile Met Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1           5           10           15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser
           20           25           30
Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln
           35           40           45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
           50           55           60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80
Ile Ser Ser Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
           85           90           95
Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110
Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
           115          120          125
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
           130          135          140
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
145          150          155          160
Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
           165          170          175
Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
           180          185          190
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
           195          200          205
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

```

210	215	220
Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr		
225	230	235
Thr Val Thr Val Ser Ser		240
	245	
<210> 2		
<211> 45		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<400> 2		
Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val		
1	5	10
Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile		
	20	25
		30
His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp		
	35	40
		45
<210> 3		
<211> 203		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<400> 3		
Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Asn		
1	5	10
Phe Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala		
	20	25
		30
Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr		
	35	40
		45
Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala		
	50	55
		60
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly		
65	70	75
		80
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr		
	85	90
		95
Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Val		
	100	105
		110
Thr Tyr Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Phe Gln		
	115	120
		125
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr		
	130	135
		140

Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 145 150 155 160  
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu  
 165 170 175  
 Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly  
 180 185 190  
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Pro Ala  
 195 200

<210> 4

<211> 1605

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

atggccttac cagtgaccgc cttgetcctg ccgetggcct tgctgctcca cgccgccagg 60  
 ccgaacatta tgctgacaca gtcgccatca tctctggetg tgtctgcagg agaaaaggte 120  
 actatgagct gtaagtccag tcaaagtgtt ttttctcagtt caagtcagaa gaactacttg 180  
 gcctgggtacc aacagatacc agggcagttt cctaaacttc tgatctactg ggcatccact 240  
 agggaatctg gtgtccctga tcgcttcaca ggcagtggtt ctgggacaga ttttactctt 300  
 accatcagca gtgtacaatc tgaagacctg gcaatttatt actgctcatc atacctctcc 360  
 tcgctggcgt tcggtggagg caccaaactg gaaatcaaac gaggtggcgg tggctctggg 420  
 ggcggtggct ccggtggcgg tggtccacag gtgcaactgc agcagcctgg ggctgaggtg 480  
 gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc tgcaaggett ctggctacac atttaccagt 540  
 tactatatac actggataaa gcagacacct ggacagggcc tggaatgggt tggagttatt 600  
 tatccaggaa atgatgatat ttctacaat cagaagtcca aaggcaaggc cacattgact 660  
 gcagacaaat cctccaccac agcctacatg caactcagca gcctgacatc tgaggactct 720  
 gcggtctatt actgtgcaag agaggttcgt ctacggctact tcgatgtctg ggcgcaggg 780  
 accacggtea ccgtctcctc aaccacgacg ccagcgcgcg gaccaccaac accggcggcc 840  
 accatcgctg cgcagcccct gtccctgcgc ccagaggcgt gccggccagc ggcggggggc 900  
 gcagtgacac cgagggggct ggacttcgcc tgtgattttt ggggtgctggg gttggttggg 960  
 ggagtccctg cttgctatag cttgctagta acagtggcct ttattatttt ctgggtgagg 1020  
 agtaagagga gcaggtcct gcacagtgac tacatgaaca tgactccccg ccgccccggg 1080  
 cccacccgca agcattacca gccctatgce ccaccacgag acttegcage ctatcgctcc 1140  
 aaacggggca gaaagaaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtaca 1200  
 actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggaggatgt 1260  
 gaactgagag tgaagttcag caggagcgcg gacgcccccg cgtaccagca gggccagAAC 1320  
 cagctctata acgagctcaa tctaggacga agagaggagt acgatgtttt ggacaagaga 1380  
 cgtggccggg accctgagat ggggggaaag ccgagaagga agaacctca ggaaggcctg 1440  
 tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc 1500  
 gagcgcggga ggggcaaggg gcacgatggc ctttaccagg gtctcagtac agccaccaag 1560



---

gacacctag acgccctca catgcaggcc ctgccccctc gctaa

1605

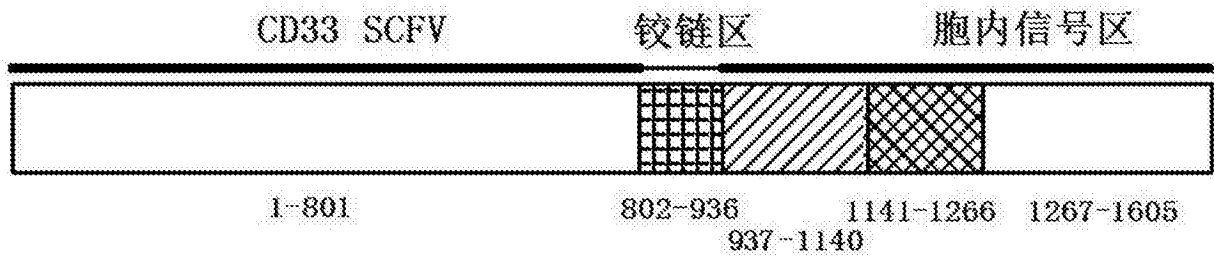


图1

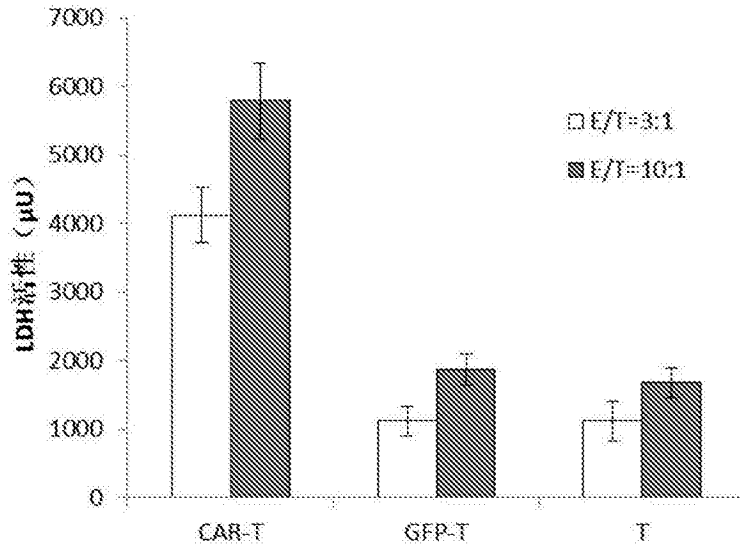


图2

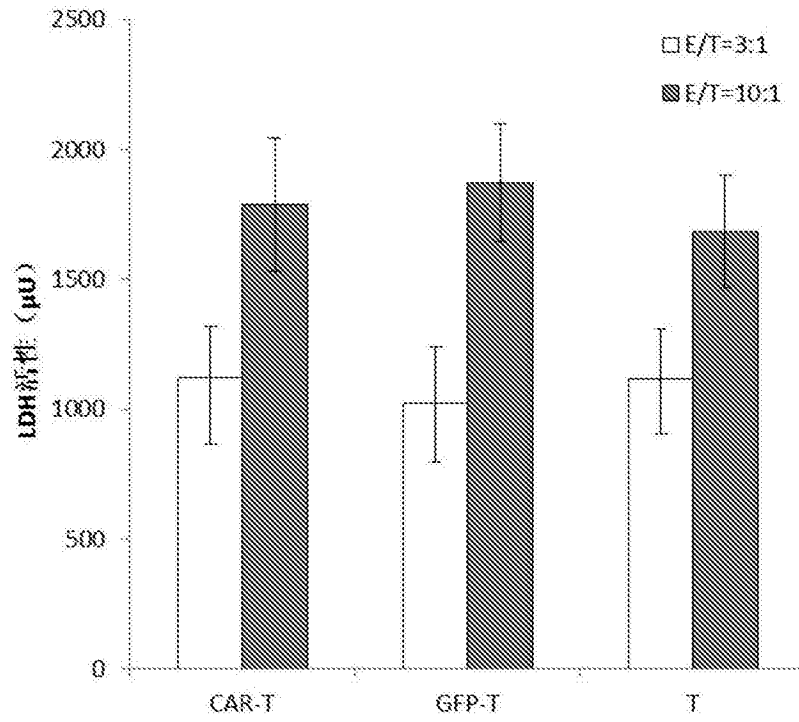


图3