



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116082518 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 09

(21) 申请号 202211025353.8

(22) 申请日 2019.01.31

(66) 本国优先权数据

201810100549.6 2018.02.01 CN

201811228154.0 2018.10.19 CN

(62) 分案原申请数据

201980002363.X 2019.01.31

(71) 申请人 南京驯鹿生物技术股份有限公司

地址 211500 江苏省南京市江北新区新锦湖路3-1号中丹生态生命科学产业园二期D栋10层

申请人 信达生物制药(苏州)有限公司

(72) 发明人 周剑峰 刘军建 胡广 杨永坤

孟广荣 高文静 王玉玉 牛盼盼

(74) 专利代理机构 上海巛石知识产权代理事务所(普通合伙) 31309

专利代理师 张琤 蒋舫玮

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

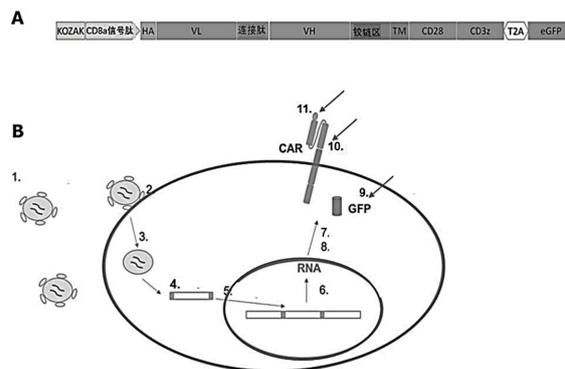
权利要求书2页 说明书24页  
序列表(电子公布) 附图12页

## (54) 发明名称

一种结合BCMA的嵌合抗原受体(CAR)及其应用

## (57) 摘要

本申请提供了一种可以特异性结合BCMA蛋白的嵌合抗原受体(CAR),其包含BCMA结合结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和胞内信号传导结构域。本申请还提供了所述CAR在用于治疗与BCMA的表达相关的疾病或病症中的应用。



1. 嵌合抗原受体 (CAR), 其中所述CAR包含BCMA结合结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和胞内信号传导结构域, 所述BCMA结合结构域包含特异性结合BCMA的抗体或其片段, 其中所述抗体包含重链互补决定区1 (HCDR1), 重链互补决定区2 (HCDR2) 和重链互补决定区3 (HCDR3), 所述HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示, 所述HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示, 且所述HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

2. 根据权利要求1所述的CAR, 其中所述抗体包含轻链互补决定区1 (LCDR1), 轻链互补决定区2 (LCDR2) 和轻链互补决定区3 (LCDR3), 所述LCDR1的氨基酸序列如SEQ IDNO:17所示, 所述LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示且所述LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的CAR, 其中所述抗体包含重链可变区, 所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的CAR, 其中所述抗体包含轻链可变区, 所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的CAR, 其中所述抗体为单链抗体。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的CAR, 其中所述抗体包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的CAR, 其中所述跨膜结构域包含源自选自下述蛋白的跨膜结构域: T细胞受体的 $\alpha$ ,  $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD3e、CD45、CD4、CD5、CD8a、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的CAR, 其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的CAR, 其中所述共刺激结构域包含源自选自下述蛋白的共刺激结构域: CD28、4-1BB、OX-40和ICOS。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR, 其中所述共刺激结构域包含SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的CAR, 其中所述胞内信号传导结构域包含源自CD3 $\zeta$ 的信号传导结构域。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的CAR, 其中所述胞内信号传导结构域包含SEQ IDNO:33所示的氨基酸序列。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的CAR, 其中所述CAR还包含铰链区, 所述铰链区连接所述BCMA结合结构域和所述跨膜结构域。

14. 根据权利要求13所述的CAR, 其中所述铰链区包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的CAR, 其中所述CAR还连接信号肽。

16. 根据权利要求15所述的CAR, 其中所述信号肽包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的CAR, 其中所述CAR还连接剪切肽。

18. 根据权利要求17所述的CAR, 其中所述剪切肽包含来自T2A肽的氨基酸序列。

19. 根据权利要求17-18中任一项所述的CAR, 其中所述剪切肽包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列。

20. 根据权利要求1-19中任一项所述的CAR,其包含SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列。

21. 根据权利要求1-20中任一项所述的CAR,其中所述BCMA为人BCMA。

22. 分离的核酸分子,其编码权利要求1-21中任一项所述的CAR。

23. 编码CAR的分离的核酸分子,其包含SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:52所示的核酸序列。

24. 一种载体,其包含权利要求22-23中任一项所述的核酸分子。

25. 根据权利要求24所述的载体,其中所述载体选自质粒、逆转录病毒载体和慢病毒载体。

26. 一种免疫效应细胞,其包含权利要求1-21中任一项所述的CAR,权利要求22-23中任一项所述的核酸分子,或权利要求24-25中任一项所述的载体。

27. 根据权利要求26所述的细胞,其中所述免疫效应细胞选自T淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞。

28. 一种制备免疫效应细胞的方法,其包括向免疫效应细胞中引入权利要求27所述的载体。

29. 组合物,其包含权利要求26-27中任一项所述的免疫效应细胞。

30. 权利要求1-21中任一项所述的CAR,权利要求22-23中任一项所述的核酸分子,权利要求24-25所述的载体,或权利要求26-27中任一项所述的免疫效应细胞用于制备药物的用途,其中所述药物用于治疗与BCMA的表达相关的疾病或病症。

31. 根据权利要求30所述的用途,其中所述与BCMA的表达相关的疾病或病症为癌症或恶性肿瘤。

## 一种结合BCMA的嵌合抗原受体(CAR)及其应用

[0001] 本申请是申请日为2019年01月31日、申请号为201980002363X、发明名称为“一种结合BCMA的嵌合抗原受体(CAR)及其应用”的中国专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本申请涉及生物医药领域,具体涉及一种能与BCMA蛋白特异性结合的嵌合抗原受体。

### 背景技术

[0003] B细胞成熟抗原(BCMA),又名CD269或TNFRSF17,是肿瘤坏死因子受体家族成员。研究表明,BCMA可以结合B细胞激活因子受体(BAFF)和B细胞增殖诱导配体(APRIL),促进B细胞在不同发育阶段的存活。而异常的信号传导可促使B细胞异常增殖,导致自身免疫疾病和肿瘤形成(参见Rickert等人,Immunological Reviews,2011,第244卷:115-133)。

[0004] 嵌合抗原受体(CAR)是被设计为以人白细胞抗原-非依赖性的方式识别细胞表面抗原的抗原受体。利用表达CAR的基因修饰的T细胞(CAR-T)治疗这些类型患者的尝试已经得到一定程度的成功(Molecular Therapy,2010,18:4,666-668;Blood,2008,112:2261-2271)。

[0005] 鉴于BCMA在B细胞恶性肿瘤,尤其是多发性骨髓瘤中作为治疗靶点的有效性,本领域亟待开发新的细胞疗法,以通过作用于BCMA而实现治疗目的。

### 发明内容

[0006] 本申请提供了一种可以特异性结合BCMA的嵌合抗原受体及其应用。本申请提供的BCMA嵌合抗原受体具有下列性质中的一种或多种:1)对BCMA蛋白有较高亲和力;2)利用所述CAR制得的CAR-T细胞可以稳定表达所述CAR;3)利用所述CAR制得的CAR-T细胞有较高CAR阳性率;4)所述CAR可以促进细胞因子的释放;5)可以用于治疗与BCMA的表达相关的疾病或病症。

[0007] 一方面,本申请包括一种嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR包含BCMA结合结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和胞内信号传导结构域,所述BCMA结合结构域包含特异性结合BCMA的抗体或其片段,其中所述抗体包含重链互补决定区1(HCDR1),重链互补决定区2(HCDR2)和重链互补决定区3(HCDR3),所述HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,所述HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示且所述HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

[0008] 在某些实施方式中,所述抗体包含轻链互补决定区1(LCDR1),轻链互补决定区2(LCDR2)和轻链互补决定区3(LCDR3),所述LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,所述LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示且所述LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示。在某些实施方式中,所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。在某些实施方式中,所述抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示。在某些实施方式中,所述抗体为单链抗体。在某些实施方式中,所述抗

体包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列。

[0009] 在某些实施方式中,所述CAR的跨膜结构域包含源自选自下述蛋白的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD3e、CD45、CD4、CD5、CD8a、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154。在某些实施方式中,所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列。

[0010] 在某些实施方式中,所述CAR的共刺激结构域包含源自选自下述蛋白的共刺激结构域:CD28、4-1BB、OX-40和ICOS。在某些实施方式中,所述共刺激结构域包含SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列。

[0011] 在某些实施方式中,所述CAR的胞内信号传导结构域包含源自CD3 $\zeta$ 的信号传导结构域。在某些实施方式中,所述胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列。

[0012] 在某些实施方式中,所述CAR还包含铰链区,所述铰链区连接所述BCMA结合结构域和所述跨膜结构域。在某些实施方式中,所述铰链区包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列。

[0013] 在某些实施方式中,所述CAR还连接信号肽。在某些实施方式中,所述信号肽包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。

[0014] 在某些实施方式中,所述CAR还连接剪切肽。在某些实施方式中,所述剪切肽包含来自T2A肽的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述剪切肽包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列。

[0015] 在某些实施方式中,所述的CAR包含SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列。

[0016] 另一方面,本申请还包括分离的核酸分子,其编码本申请所述的CAR。

[0017] 另一方面,本申请还包括编码CAR的分离的核酸分子,其包含SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:52所示的核酸序列。

[0018] 另一方面,本申请还包括一种载体,其包含本申请所述的核酸分子。在某些实施方式中,所述载体选自质粒、逆转录病毒载体和慢病毒载体。

[0019] 另一方面,本申请还包括一种免疫效应细胞,其包含本申请所述的CAR,本申请所述的核酸分子,或本申请所述的载体。在某些实施方式中,所述免疫效应细胞选自T淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞。

[0020] 另一方面,本申请还包括一种制备免疫效应细胞的方法,其包括向免疫效应细胞中引入本申请所述的载体。

[0021] 另一方面,本申请还包括一种组合物,其包含本申请所述的免疫效应细胞。

[0022] 另一方面,本申请还包括所述的CAR,所述的核酸分子,所述的载体,或所述的免疫效应细胞用于制备药物的用途,其中所述药物用于治疗与BCMA的表达相关的疾病或病症。在某些实施方式中,所述与BCMA的表达相关的疾病或病症为癌症或恶性肿瘤。

[0023] 本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的,本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行修改而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地,本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的,而非为限制性的。

## 附图说明

- [0024] 图1A显示的是本申请所述CAR的结构。
- [0025] 图1B显示的是通过GFP信号评估本申请所述CAR的表达情况。
- [0026] 图2A显示的是使用本申请所述CAR质粒瞬时转染T细胞的过程示意图;图2B显示的是本申请所述CAR质粒瞬时转染T细胞后CAR分子的表达情况。
- [0027] 图3显示的是本申请所述CAR质粒瞬时转染T细胞后CAR分子的表达情况。
- [0028] 图4显示的是本申请所述CAR质粒进行慢病毒包装后的生物滴度检测结果。
- [0029] 图5显示的是本申请所述CAR-T细胞的生长情况。
- [0030] 图6显示的是本申请所述CAR-T细胞的CAR分子与BCMA蛋白结合能力的检测情况。
- [0031] 图7显示的是本申请所述CAR-T细胞的CD107a脱粒实验的流式检测结果。
- [0032] 图8显示的是本申请所述CAR-T细胞与不同靶细胞孵育后的CD107a脱粒实验结果。
- [0033] 图9显示的是在BCMA蛋白竞争条件下的本申请所述CAR-T细胞与不同靶细胞孵育后的CD107a脱粒实验结果。
- [0034] 图10显示的是本申请所述CAR-T细胞和靶细胞共孵育后的细胞因子释放检测结果。
- [0035] 图11显示的是本申请所述不同供体的CAR-T细胞功能测定结果。
- [0036] 图12显示的是本申请所述CAR-T细胞对靶细胞的体外杀伤效果测试。
- [0037] 图13显示的是本申请所述CAR-T细胞的肿瘤杀伤效果的荷瘤小鼠模型实验结果。
- [0038] 图14和图15显示的是本申请所述CAR-T细胞给药后荷瘤小鼠模型中细胞因子的变化。
- [0039] 图16显示的是本申请所述CAR-T细胞给药后荷瘤小鼠外周血CAR拷贝数的变化。
- [0040] 图17显示的是本申请所述CAR-T细胞在给药后受试者体内疗效评估。
- [0041] 图18显示的是本申请所述受试者体内外周血中的CAR拷贝数的变化。

## 具体实施方式

[0042] 以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。本申请所述的CAR可特异性结合BCMA,利用所述CAR制得的CAR-T细胞可以稳定表达所述CAR,利用所述CAR制得的CAR-T细胞有较高的CAR阳性率。此外,所述CAR可促进细胞因子的释放,并可用于治疗与BCMA的表达相关的疾病或病症。

[0043] 除非明确指明相反,否则本申请的实施将采用本领域技术内的常规化学、生物化学、有机化学、分子生物学、微生物学、重组DNA技术、遗传学、免疫学和细胞生物学的方法。这些方法的描述可以参见,例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版,2001);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,1989);Maniatis等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1982);Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley和Sons,2008年7月更新);Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Greenlee Pub.Associates和Wiley-Interscience;Glover,DNA Cloning:A Practical Approach,vol.I&II(IRL Press,Oxford,1985);Anand,Techniques

for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Harlow 和 Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) Current Protocols in Immunology (Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach 和 W. Strober, eds., 1991); Annual Review of Immunology; 以及期刊专著如 Advances in Immunology。

[0044] 除非另有定义, 否则本申请中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域一般技术人员通常所理解的含义相同的含义。为了本申请的目的, 下文定义了以下术语。

[0045] 在本申请中, 术语“嵌合抗原受体”(Chimeric Antigen Receptor, CAR) 通常是指包含能够结合抗原的胞外结构域和至少一个胞内结构域的融合蛋白。CAR是嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)的核心部件, 其可包括抗原(例如, 肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA))结合区、跨膜结构域、共刺激结构域和胞内信号结构域。在本申请中, 所述CAR可以基于抗体的抗原(例如BCMA)特异性与T细胞受体活化胞内结构域组合在一起。经遗传修饰表达CAR的T细胞可以特异地识别和消除表达靶抗原的恶性细胞。关于CAR和CAR T细胞的描述, 可以参见例如 Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov.* 2013; 3(4): 388-398; Turtle CJ, Hudecek M, Jensen MC, Riddell SR. Engineered T cells for anti-cancer therapy. *Curr Opin Immunol.* 2012; 24(5): 633-639; Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, Brenner MK. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev.* 2014; 257(1): 107-126; 以及 W02013154760、W02016014789。

[0046] 在本申请中, 术语“BCMA”和“B细胞成熟抗原”可互换地使用, 通常是指由 TNFRSF17 基因编码的蛋白。BCMA蛋白是肿瘤坏死因子受体家族成员。在本申请中, 所述BCMA可以为人类BCMA, 其GenBank登录号为BAB60895.1。BCMA是III型跨膜蛋白, 在胞外结构域(ECD)中具有TNFR家族成员所特征性的富半胱氨酸结构域(CRD), 该结构域形成配体结合基序。BCMA作为一种B细胞生物标志物, 在肿瘤细胞(例如多发性骨髓瘤细胞)中表达, 或位于肿瘤细胞(例如存在于多发性骨髓瘤恶性浆细胞)的表面。BCMA蛋白也可包括BCMA的片段, 诸如胞外结构域及其片段, 例如: 结合结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和胞内信号传导结构域以及能结合本申请任何抗体的片段。

[0047] 在本申请中, 术语“BCMA结合结构域”通常是指可以与BCMA蛋白特异性结合的结构域。例如, 所述BCMA结合结构域可包含能特异性结合B细胞上表达的人BCMA多肽的嵌合抗原受体或其片段, 抗BCMA抗体或其抗原结合片段。在本申请中使用的术语“结合结构域”、“胞外结构域”、“胞外结合结构域”、“抗原特异性结合结构域”和“胞外抗原特异性结合结构域”可互换使用, 并且提供了具有特异性结合目标靶抗原(例如BCMA)的能力的CAR的结构域或片段。BCMA结合结构域可以为天然来源、合成来源、半合成来源或重组来源。

[0048] 在本申请中, 术语“抗体”通常是指一种能够特异性识别和/或中和特定抗原的多肽分子。例如, 抗体可包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链组成的免疫球蛋白, 并且包括任何包含其抗原结合部分的分子。术语“抗体”包括单克隆抗体、抗体片段或抗体衍生物, 包括但不限于人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单域抗体(例如, dAb), 单

链抗体(例如,scFv),以及与抗原结合的抗体片段(例如,Fab、Fab'和(Fab)<sub>2</sub>片段)。术语“抗体”还包括抗体的所有重组体形式,例如在原核细胞中表达的抗体、未糖基化的抗体以及所述的任何与抗原结合的抗体片段及其衍生物。每条重链可由重链可变区(VH)和重链恒定区构成。每条轻链可由轻链可变区(VL)和轻链恒定区构成。VH和VL区可进一步被区分为称为互补决定区(CDR)的高变区,它们散布在称为构架区(FR)的更保守的区域中。每个VH和VL可由三个CDR和四个FR区构成,它们从氨基端至羧基端可按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导该免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一成分(C1q)。

[0049] 在本申请中,术语“抗原结合分子”通常是指包含能够与靶抗原结合的抗原结合区或抗原结合部分的分子。例如,抗原结合分子可为蛋白质或多肽。在本申请中,当靶抗原是B细胞成熟抗原(BCMA)时,结合BCMA的抗原结合分子也称作BCMA结合分子。抗原结合分子包括例如抗体及其抗原结合片段、单链scFv抗体、基于scFv构建的各种融合物和缀合物,例如scFv-Fc抗体、免疫缀合物、抗体药物偶联物(ADC)、多/双特异性抗体、嵌合抗原受体(CAR)。如本领域技术人员明了的,抗体的抗原结合部分通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。在一些情况下,根据上下文,“BCMA结合分子”与“本申请抗体”或“抗BCMA抗体”可以互换使用。

[0050] 在本申请中,术语“单链抗体”可以是由所述重链可变区和所述轻链可变区通过连接肽连接而成的抗体。

[0051] 在本申请中,术语“跨膜结构域”(Transmembrane Domain)通常是指CAR中穿过细胞膜的结构域,其与细胞内信号转导结构域相连接,起着传递信号的作用。

[0052] 在本申请中,术语“共刺激结构域”通常是指可以提供免疫共刺激分子的胞内结构域,所述共刺激分子为淋巴细胞对抗原的有效应答所需要的细胞表面分子。所述共刺激结构域可包括CD28的共刺激结构域,还可包括TNF受体家族的共刺激结构域,例如OX40和4-1BB的共刺激结构域。

[0053] 在本申请中,术语“铰链区”通常是指抗原结合区和免疫细胞Fc受体(FcR)结合区之间的连接区。

[0054] 在本申请中,术语“HA-标签”通常是指一种基于人流感病毒血凝素(Human influenza hemagglutinin)抗原的蛋白标签,其化学本质为一段来自人流感病毒血凝素98-106号氨基酸的短氨基酸序列。使用分子生物学手段将HA-标签序列接合到目的蛋白的一端后,就可以使用抗HA-标签的特异性抗体结合该重组蛋白,利于免疫组织化学(IHC)、Western Blotting等实验的进行(参见Schembri,Laura等人The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis.Nature Methods.February 2007,4(2):107-108)。

[0055] 在本申请中,术语“胞内信号传导结构域”通常是指位于细胞内部能够转导信号的结构域。在本申请中,所述胞内信号传导结构域可以将信号传导至细胞内。例如,所述胞内信号传导结构域是所述嵌合抗原受体的胞内信号传导结构域。例如,在某些实施方式中,所述胞内信号传导结构域可选自CD3 $\zeta$ 胞内域,CD28胞内域,CD28胞内域,4-1BB胞内域和OX40胞内域。

[0056] 在本申请中,术语“信号肽”(Signal peptide)通常是指引导蛋白质转移的肽链。在某些实施方式中,信号肽可为短肽链,其长度可为5-30个氨基酸。

[0057] 在本申请中,术语“剪切肽”是指能够实现剪切蛋白的功能的一类多肽。例如,所述剪切肽可以经核糖体跳跃而非蛋白酶水解来实现蛋白质剪切。例如,所述剪切肽可为剪切2A肽,其可包括T2A,F2A和P2A等。

[0058] 在本申请中,术语“标记检测信号”通常是指已知功能或序列的能够起到特异性标记作用,发出可以被检测到的信号的基因、蛋白质或其他分子。所述标记检测信号可以为荧光蛋白,如:GFP、RFP和YFP等。所述标记检测信号可以为EGFRt。

[0059] 在本申请中,术语“EGFRt”通常是指编码截短的人表皮生长因子受体多肽的基因。EGFRt缺乏远端膜EGF结合域和细胞质信号传导尾,但保留了由抗EGFR抗体识别的细胞外表位。EGFRt可用作具有遗传修饰细胞功能的非免疫原性选择工具以及追踪标记。在本申请中,所述EGFRt可作为CAR-T细胞的标记分子。所述EGFRt可以在必要时清除体内的CAR-T细胞西妥昔单抗介导的ADCC途径(cetuximab mediated ADCC pathway)(参见US8802374B2)。

[0060] 在本申请中,术语“Kozak序列”通常是指在真核生物的mRNA中共有的(gcc)gccRccAUGG序列。其在翻译过程的启动中有重要作用,被核糖体识别为翻译起始位点(参见De Angioletti M等人a novel silent beta-thalassaemia mutation,the first in the Kozak sequence.Br J Haematol.2004,124(2):224-31.)。

[0061] 在本申请中,术语“分离的”通常是指抗体是已经与它的天然环境中的组分分离的抗体。在某些实施方式中,将抗体纯化至大于95%或99%纯度,所述纯度通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如,离子交换或反相HPLC)确定。关于评价抗体纯度的方法的综述可参见Flatman,S.等,J.Chrom.B 848(2007)79-87。

[0062] 在本申请中,术语“核酸分子”通常是指任何长度的分离形式的核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。在某些实施方式中,本申请所述的核酸分子可以为从天然环境中分离的。在某些实施方式中,本申请所述的核酸分子可以通过以下方法产生或合成的:(i)在体外扩增的,例如通过聚合酶链式反应(PCR)扩增产生的,(ii)通过克隆重组产生的,(iii)纯化的,例如通过酶切和凝胶电泳分级分离,或者(iv)合成的,例如通过化学合成。在某些实施方式中,所述分离的核酸是通过重组DNA技术制备的核酸分子。在本申请中,可以通过本领域已知的多种方法来制备编码所述抗体或其抗原结合片段的核酸,这些方法包括但不限于,采用限制性片段操作或采用合成性寡核苷酸的重叠延伸PCR,具体操作可参见Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989;和Ausube等人Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing and Wiley-Interscience,New York N.Y.,1993。

[0063] 在本申请中,所述“载体”通常是指能够在合适的宿主中自我复制的核酸分子,用以将插入的核酸分子转移到宿主细胞中和/或宿主细胞之间。所述载体可包括主要用于将DNA或RNA插入细胞中的载体、主要用于复制DNA或RNA的载体,以及主要用于DNA或RNA的转录和/或翻译的表达的载体。所述载体还包括具有多种上述功能的载体。所述载体可以是当引入合适的宿主细胞时能够转录并翻译成多肽的多核苷酸。通常,通过培养包含所述载体的合适的宿主细胞,所述载体可以产生期望的表达产物。在本申请中,所述载体中可包含一

种或多种所述核酸分子。此外,所述载体中还可包含其他基因,例如允许在适当的宿主细胞中和在适当的条件下选择该载体的标记基因。此外,所述载体还可包含允许编码区在适当宿主中正确表达的表达控制元件。这样的控制元件为本领域技术人员所熟知的,例如,可包括启动子、核糖体结合位点、增强子和调节基因转录或mRNA翻译的其他控制元件等。在某些实施方式中,所述表达控制序列为可调的元件。所述表达控制序列的具体结构可根据物种或细胞类型的功能而变化,但通常包含分别参与转录和翻译起始的5'非转录序列和5'及3'非翻译序列,例如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。例如,5'非转录表达控制序列可包含启动子区,启动子区可包含用于转录控制功能性连接核酸的启动子序列。本申请所述载体可选自质粒、逆转录病毒载体和慢病毒载体。本申请所述质粒、逆转录病毒载体和慢病毒载体可包含CAR。

[0064] 在本申请中,术语“质粒”通常是指细菌、酵母菌等生物中染色体或拟核以外的DNA分子。质粒可存在于细胞质中,具有自主复制能力,使其能够在子代细胞中保持恒定的拷贝数,并表达所携带的遗传信息。质粒在遗传工程研究中被用作基因的载体。

[0065] 在本申请中,术语“逆转录病毒载体”通常是指可以克隆并表达外源基因,但不能自我包装成有增殖能力的病毒颗粒。此类病毒多具有反转录酶。反转录病毒至少含有三种基因:gag,包含组成病毒中心和结构的蛋白质的基因;pol,包含反转录酶的基因和env,包含组成病毒外壳的基因。通过逆转录病毒转染,逆转录病毒载体可将自身基因组及其携带的外源基因随机、稳定地整合入宿主细胞基因组中,例如,可将CAR分子整合进宿主细胞中。

[0066] 在本申请中,术语“慢病毒载体”通常是指属于逆转录病毒的一种二倍体RNA病毒载体。慢病毒载体是以慢病毒的基因组为基础,将其中多个和病毒活性相关的序列结构去除,使其具有生物学的安全性,然后再在这个基因组骨架中引入实验所需要的目标基因的序列和表达结构制备成的载体。通过慢病毒载体转染,逆转录病毒载体可将自身基因组及其携带的外源基因随机、稳定地整合入宿主细胞基因组中,例如,可将CAR分子整合进宿主细胞中。

[0067] 在本申请中,术语“转座子”通常是指含有转座酶基因的离散DNA片段。侧翼是含有转座酶结合位点的末端反向重复序列(TIR)。转座酶可与TIR结合并使转座子转移到新的位点。本申请所述转座子是由一个携带CAR(转座子)的质粒和另一个携带转座酶的质粒组成的双组分系统。所述转座子可以通过电转导等方式导入靶细胞。例如,首先,两种组分被电穿孔到外周血单核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cell,PBMC)中,表达的转座酶作用于CAR两侧的末端反向重复序列(terminal inverted repeat,TIR),切割CAR(转座子)并随后整合到靶细胞(例如T细胞)基因组中的TA二核苷酸序列上。转座和稳定的基因组整合完成后,靶细胞表面就能表达出CAR蛋白(参见Cheng Zhang,Jun Liu,Jiang F Zhong,et al.Engineering CAR-T cells.Biomarker Research.2017,5:22)。

[0068] 在本申请中,术语“基因编辑”通常是指对基因组进行定点修饰的技术。其可包括基于锌指核酸酶(zinc finger nucleases,ZFNs)、转录激活子样效应因子核酸酶(transcription activator like effector nucleases,TALENs)、规律性重复短回文序列簇(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated(Cas9),CRISPR/Cas9)等的技术。其可以对基因组进行高效靶向修饰,通过在基因组的特定位置添加、去除或改变遗传物质来进行修饰。本申请所述基因编辑可包括通过

基因编辑的技术(例如CRISPR-Cas9),将CAR分子导入受体细胞的基因组中。

[0069] 在本申请中,术语“免疫效应细胞”通常是指在免疫应答中参与清除异物抗原和行使效应功能的免疫细胞。例如,在某些实施方式中,所述免疫效应细胞可为浆细胞、细胞毒性T细胞、NK细胞、APSC多能细胞、肥大细胞等。

[0070] 在本申请中,术语“药学上可接受的佐剂”通常是指药学上可接受的制剂载体、溶液或加强制剂特性的添加剂。此类添加剂是所属领域技术人员熟知的。

[0071] 在本申请中,术语“癌症”通常是指由控制细胞增殖的机制失常而引起的疾病。在本申请中,被称为癌症的过度增殖性疾病包括但不限于实体瘤,例如发生在乳腺、呼吸道、脑、生殖器官、消化道、尿道、眼、肝脏、皮肤、头颈、甲状腺、甲状旁腺的癌症,以及它们的远端转移。这类疾病还包括淋巴瘤、肉瘤和白血病。乳腺癌的实例包括但不限于浸润性导管癌、浸润性小叶癌、乳腺导管原位癌和乳腺小叶原位癌。呼吸道癌症的实例包括但不限于小细胞肺癌和非小细胞肺癌,以及支气管腺瘤和胸膜肺母细胞瘤。脑癌的实例包括但不限于脑干和下丘脑胶质瘤、小脑和大脑星状细胞瘤、髓母细胞瘤、室管膜瘤,以及神经外胚层和松果体肿瘤。男性生殖器肿瘤包括但不限于前列腺和睾丸癌。女性生殖器肿瘤包括但不限于子宫内膜癌、宫颈癌、卵巢癌、阴道癌和外阴癌,以及子宫瘤。消化道肿瘤包括但不限于肛门、结肠、结肠直肠、食管、胆囊、胃、胰腺、直肠、小肠和唾液腺癌。尿道肿瘤包括但不限于膀胱、阴茎、肾、肾盂、输尿管和尿道癌。眼癌包括但不限于眼球内黑素瘤和视网膜母细胞瘤。肝癌的实例包括但不限于肝细胞癌(有或没有纤维板层变异的肝细胞癌)、胆管癌(肝内胆管癌)和混合型肝细胞胆管细胞癌。皮肤癌包括但不限于鳞状细胞癌、卡波西(Kaposi's)肉瘤、恶性黑素瘤、Merkel细胞皮肤癌和非黑素瘤型皮肤癌。头颈癌包括但不限于喉/下咽/鼻咽/口咽癌,和嘴唇和口腔癌。淋巴瘤包括但不限于AIDS相关的淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金氏病,以及中枢神经系统淋巴瘤。肉瘤包括但不限于软组织肉瘤、骨肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、淋巴肉瘤和横纹肌肉瘤。白血病包括但不限于急性髓样白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病和毛细胞白血病。

[0072] 术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项的两项。

[0073] 如本申请中所用,术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤,但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本申请中,当使用术语“包含”或“包括”时,除非另有指明,否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如,当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时,也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

[0074] 在本申请中,术语“约”通常是指在指定数值以上或以下0.5%-10%的范围内变动,例如在指定数值以上或以下0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或10%的范围内变动。

[0075] 嵌合抗原受体

[0076] 在本申请中,所述CAR可以包含特异性结合BCMA的胞外结构域、跨膜结构域、胞内共刺激信号传导结构域和胞内信号传导结构域。在本申请中,所述CAR的胞外结构域可以包含本申请所述的单链抗体(scFv)。例如,所述单链抗体可以通过铰链区,例如CD8铰链,与跨膜结构域连接。在本申请中,所述CAR可以用于转导免疫效应细胞(例如T细胞)并在细胞表面表达。由此本申请也可提供表达所述嵌合抗原受体的T细胞,以及该T细胞和/或所述CAR用于制备治疗B细胞相关疾病的药物中的用途。

[0077] 在本申请中,所述嵌合抗原受体(CAR)可包含BCMA结合结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和胞内信号传导结构域。

[0078] 在本申请中,所述BCMA结合结构域可包含特异性结合BCMA的抗体片段,所述抗体可包含重链互补决定区1(HCDR1),重链互补决定区2(HCDR2)和重链互补决定区3(HCDR3),所述HCDR1-3可以依次分别包含SEQ ID NO:9-11所示的氨基酸序列;所述抗体可包含轻链互补决定区1(LCDR1),轻链互补决定区2(LCDR2)和轻链互补决定区3(LCDR3),所述LCDR1-3可以依次分别包含SEQ ID NO:17-19所示的氨基酸序列。在本申请中,所述抗体可包含重链可变区,所述重链可变区可包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。在本申请中,所述抗体可包含轻链可变区,所述轻链可变区可包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。

[0079] 在本申请中,所述抗体可为单链抗体。在某些实施方案中,所述抗体可包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列。例如,所述单链抗体可包括scFv0026,其序列如SEQ ID NO:43所示。

[0080] 例如,本申请所述单链抗体可以为scFv0026,其序列如SEQ ID NO:43所示。单链抗体scFv0026的LCDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18(AAS)和SEQ ID NO:19所示;VL的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示;HCDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11所示;VH的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0081] 本申请所述CAR可包括跨膜结构域,所述跨膜结构域可包含来自选自下述蛋白的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD3e、CD45、CD4、CD5、CD8a、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154。在本申请中,所述跨膜结构域可包含SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列。例如,本申请的跨膜结构域可包括CD8a的跨膜结构域,其序列如SEQ ID NO:27所示。

[0082] 在本申请中,所述共刺激结构域可包含来自选自下述蛋白的共刺激结构域:CD28、4-1BB、OX40和ICOS。在本申请中,所述共刺激结构域可包含SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列。

[0083] 本申请所述CAR可包括胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域可包含来自CD3 $\zeta$ 的信号传导结构域。在本申请中,所述胞内信号传导结构域可包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列。

[0084] 本申请所述CAR可包括铰链区,所述铰链区可连接所述抗体和所述跨膜结构域。在本申请中,所述铰链区可包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列。

[0085] 本申请所述CAR还可包括HA-标签,所述HA-标签可位于所述CAR的N端。在本申请中,所述HA-标签可包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。在本申请中,可以通过运用抗HA抗体与其特异性结合来检测本申请所述CAR的表达并用于富集CAR-T细胞以进行功能性研究。

[0086] 本申请所述CAR可连接信号肽,所述信号肽可包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。例如,所述信号肽可为CD8a信号肽,其序列如SEQ ID NO:3所示。例如,CAR0037、CAR0085、CAR0087可连接所述CD8a信号肽。

[0087] 在本申请中,所述CAR还可连接剪切肽。在本申请中,所述剪切肽可包含来自T2A肽的氨基酸序列。在本申请中,所述剪切肽可包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列。例如,所述剪切肽可为T2A,其序列如SEQ ID NO:35所示。例如,CAR0037、CAR0087可连接所述剪切肽T2A。

[0088] 在本申请中,所述CAR还可连接标记检测信号,所述标记检测信号可位于所述CAR的C端。在本申请中,所述标记检测信号可为荧光蛋白,其可选自以下组:GFP、RFP和YFP。在本申请中,可以通过检测GFP的信号来间接评估CAR分子的表达情况。例如,所述CAR可包括CAR0037,其标记检测信号序列如SEQ ID NO:37所示。在本申请中,所述标记检测信号可为EGFRt。例如,CAR0087可连接序列如SEQ ID NO:39所示的标记检测信号。

[0089] 在本申请中,所述CAR可连接Kozak序列,其序列如SEQ ID NO:1所示。在本申请中,所述CAR可连接Kozak序列,所述Kozak序列可位于所述CAR的N端。例如,CAR0037、CAR0085或CAR0087可连接序列如SEQ ID NO:1所示的Kozak序列(AAT)。

[0090] 在本申请中,所述CAR可包含SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列。例如,所述CAR可选自CAR0037,其序列如SEQ ID NO:49所示。又例如,所述CAR可选自CAR0085,其序列如SEQ ID NO:51所示;所述CAR可选自CAR0087,其序列如SEQ ID NO:51所示。

[0091] 在某些实施方式中,本申请所述CAR可自N端依次包括BCMA结合结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和胞内信号传导结构域。其中,所述CAR可包括BCMA结合结构域,所述BCMA结合结构域序列如SEQ ID NO:43所示。其中,所述BCMA结合结构域可包括HCDR1-3,其序列分别依次如SEQ ID NO:9-11所示;并且,BCMA结合结构域可包括LCDR1-3,其序列分别依次如SEQ ID NO:17-19所示。例如,所述CAR可包括CAR0037或与其具有相同的LCDR1-3及HCDR1-3的本申请所述的CAR。所述BCMA结合结构域可包括重链可变区,其序列如SEQ ID NO:7所示;并且,所述BCMA结合结构域还可包括轻链可变区,其序列如SEQ ID NO:15所示。例如,所述CAR可包括CAR0037或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的本申请所述的CAR。所述轻链可变区和所述重链可变区之间还可包括连接肽,其序列如SEQ ID NO:23所示。例如,所述CAR可包括CAR0037或与其具有相同的连接肽的本申请所述的CAR。所述跨膜结构域的可包含来自CD8a的跨膜结构域,其序列可以如SEQ ID NO:27所示。例如,所述CAR可包括CAR0037或与其具有相同的跨膜结构域的本申请所述的CAR。所述共刺激结构域可包含来自CD28的共刺激结构,其序列可以如SEQ ID NO:29所示。例如,所述CAR可包括CAR0037或与其具有相同的共刺激结构域的本申请所述的CAR。所述胞内信号传导结构域可包含来自CD3 $\zeta$ 的信号传导结构域,其序列如SEQ ID NO:33所示。例如,所述CAR可包括CAR0037或与其具有相同的胞内信号转导结构域的本申请所述CAR。

[0092] 所述CAR还可包含铰链区,所述铰链区可位于所述BCMA结合结构域的C端且位于所述跨膜结构域的N端,其序列如SEQ ID NO:25所示。例如,所述CAR可包括CAR0037或与其具有相同的铰链区的本申请所述CAR。

[0093] 所述CAR还可连接HA-标签,所述HA-标签可位于所述BCMA结合结构域的N端,其序列如SEQ ID NO:5所示。例如,所述CAR可包括CAR0037或与其具有相同的HA-标签的本申请所述CAR。

[0094] 所述CAR还可连接信号肽,其可位于所述CAR的N端,其序列可以如SEQ ID NO:3所示。

[0095] 所述CAR还可连接剪切肽,例如:T2A。所述剪切肽可以位于所述胞内信号转导域的C端,其序列可以如SEQ ID NO:35所示。所述CAR还可连接标记检测信号,其可位于所述CAR(或者,所述剪切肽)的C端。所述标记检测信号可选自以下组:GFP、RFP和YFP,其序列如SEQ ID NO:37所示。

[0096] 例如,本申请所述的CAR可以为CAR0037,其LCDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18(AAS)和SEQ ID NO:19所示;VL的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示;HCDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11所示;VH的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示;VH与VL之间的连接肽的序列如SEQ ID NO:23所示;其铰链区如SEQ ID NO:25所示;其跨膜结构域如SEQ ID NO:27所示;其共刺激结构域为CD28共刺激结构域,如SEQ ID NO:29所示;其CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域如SEQ ID NO:33所示;所述CAR0043还可包含如SEQ ID NO:35所示的剪切肽,以及如SEQ ID NO:37所示的GFP标记检测信号;所述CAR0037还可包含如SEQ ID NO:1所示的KOZAK序列(AAT),如SEQ ID NO:3所示的CD8a信号肽,如SEQ ID NO:5所示的HA-标签。

[0097] 例如,本申请所述的CAR可以为CAR0085,其LCDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18(AAS)和SEQ ID NO:19所示;VL的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示;HCDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11所示;VH的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示;VH与VL之间的连接肽的序列如SEQ ID NO:23所示;其铰链区如SEQ ID NO:25所示;其跨膜结构域如SEQ ID NO:27所示;其共刺激结构域为4-1BB共刺激结构域,如SEQ ID NO:31所示;其CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域如SEQ ID NO:33所示;所述CAR0085还可包含如SEQ ID NO:1所示的KOZAK序列(AAT),如SEQ ID NO:3所示的CD8a信号肽。

[0098] 例如,本申请所述的CAR可以为CAR0087,其LCDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18(AAS)和SEQ ID NO:19所示;VL的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示;HCDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11所示;VH的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示;VH与VL之间的连接肽的序列如SEQ ID NO:23所示;其铰链区如SEQ ID NO:25所示;其跨膜结构域如SEQ ID NO:27所示;其共刺激结构域为4-1BB共刺激结构域,如SEQ ID NO:31所示;其CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域如SEQ ID NO:33所示;所述CAR0085还可包含如SEQ ID NO:35所示的剪切肽,以及如SEQ ID NO:39所示的EGFRt标记检测信号;所述CAR0087还可包含如SEQ ID NO:1所示的KOZAK序列(AAT),如SEQ ID NO:3所示的CD8a信号肽。

[0099] 在本申请中涉及的蛋白质、多肽和/或氨基酸序列,还应理解为至少包含以下的范围:与该所述蛋白质或多肽具备相同或类似功能的功能性变体或同源物。

[0100] 在本申请中,所述功能性变体可以为,在所述蛋白质和/或所述多肽(例如,特异性结合BCMA的抗体或其片段)的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽。例如,所述功能性变体可包含已经通过至少1个,例如1-30个、1-20个或1-10个,又例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的蛋白质或多肽。所述功能性变体可基本上保持改变(例如取代、缺失或添加)之前的所述蛋白质或所述多肽的生物学特性。例如,所述功能性变体可保持改变之前的所述蛋白质或所述多肽的至少60%,70%,80%,90%,或100%的生物学活性(例如抗原结合能力)。例如,所述取代可以为保守取代。

[0101] 在本申请中,所述同源物可以为,与所述蛋白质和/或所述多肽(例如,特异性结合BCMA的抗体或其片段)的氨基酸序列具有至少约85%(例如,具有至少约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更高的)序列同源

性的蛋白质或多肽。

[0102] 在本申请中,所述同源性通常是指两个或多个序列之间的相似性、类似或关联。可以通过以下方式计算“序列同源性百分比”:将两条待比对的序列在比较窗中进行比较,确定两条序列中存在相同核酸碱基(例如,A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置的数目以得到匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数(即,窗大小),并且将结果乘以100,以产生序列同源性百分比。为了确定序列同源性百分数而进行的比对,可以按本领域已知的多种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数,包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。所述同源性也可以通过以下的方法测定:FASTA和BLAST。对FASTA算法的描述可以参见W.R.Pearson和D.J.Lipman的“用于生物学序列比较的改进的工具”,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.),85:2444-2448,1988;和D.J.Lipman和W.R.Pearson的“快速灵敏的蛋白质相似性搜索”,Science,227:1435-1441,1989。对BLAST算法的描述可参见S.Altschul、W.Gish、W.Miller、E.W.Myers和D.Lipman的“一种基本的局部对比(alignment)搜索工具”,分子生物学杂志,215:403-410,1990。

[0103] 核酸、载体、细胞、制备方法和组合物

[0104] 另一方面,本申请提供了一种分离的核酸分子,其可编码本申请所述的CAR。本申请所述编码CAR的分离的核酸分子,其可包含SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:52所示的核酸序列或其功能性变体。本申请所述的核酸分子可以为分离的。例如,其可以通过以下方法产生或合成的:(i)在体外扩增的,例如通过聚合酶链式反应(PCR)扩增产生的,(ii)通过克隆重组产生的,(iii)纯化的,例如通过酶切和凝胶电泳分级分离,或者(iv)合成的,例如通过化学合成。在某些实施方式中,所述分离的核酸是通过重组DNA技术制备的核酸分子。

[0105] 另一方面,本申请提供了一种载体,其可包含所述的核酸分子。在本申请中,所述载体可选自质粒、逆转录病毒载体和慢病毒载体中的一种或多种。本申请所述慢病毒载体可包含CAR。例如,本申请所述慢病毒载体可包含SEQ ID NO:50和/或SEQ ID NO:52所示的核酸序列或其功能性变体。此外,所述载体中还可包含其他基因,例如允许在适当的宿主细胞中和在适当的条件下选择该载体的标记基因。此外,所述载体还可包含允许编码区在适当宿主中正确表达的表达控制元件。这样的控制元件为本领域技术人员所熟知的,例如,可包括启动子、核糖体结合位点、增强子和调节基因转录或mRNA翻译的其他控制元件等。在某些实施方式中,所述表达控制序列为可调的元件。所述表达控制序列的具体结构可根据物种或细胞类型的功能而变化,但通常包含分别参与转录和翻译起始的5'非转录序列和5'及3'非翻译序列,例如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。例如,5'非转录表达控制序列可包含启动子区,启动子区可包含用于转录控制功能性连接核酸的启动子序列。本申请所述的一种或多种核酸分子可以与所述表达控制元件可操作地连接。所述载体可以包括,例如质粒、粘粒、病毒、噬菌体或者在例如遗传工程中通常使用的其他载体。例如,所述载体为表达载体,包括载体scFv质粒和/或CAR质粒。

[0106] 在某些实施方式中,所述病毒包含的载体可为慢病毒载体,其可包含载体scFv质粒和/或CAR质粒。例如,所述病毒可为慢病毒LV0002,其可包含载体scFv质粒PXL0008,其可

包含核酸scFv0008分子;和/或,CAR质粒PXL0009,其可包含核酸CAR0009分子。例如,所述病毒可为慢病毒LV0011,其可包含载体scFv质粒PXL0008,其可包含核酸scFv0008分子,和/或CAR质粒PXL0041,其可包含核酸CAR0041分子。例如,所述病毒可为慢病毒LV0007,其可包含载体scFv质粒PXL0026,其可包括核酸scFv0026,和/或CAR质粒PXL0037,其可包含核酸CAR0037。例如,所述病毒可为慢病毒LV0020,其可包含载体scFv质粒PXL0026,其可包含核酸scFv0026,和/或CAR质粒PXL0085,其可包括核酸CAR0085。例如,所述病毒可为慢病毒LV0021,其可包含载体scFv质粒PXL0026,其可包含核酸scFv0026,和/或CAR质粒PXL0087,其可包含核酸CAR0087。在某些实施方式中,所述病毒包含的载体还可包括逆转录病毒载体,其可包括所述的scFv质粒和/或CAR质粒。

[0107] 另一方面,本申请提供了一种免疫效应细胞,其可包含本申请所述的CAR,所述的核酸分子,或所述的载体。在本申请中,所述免疫效应细胞可为哺乳动物细胞。在本申请中,免疫效应细胞可选自T淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞。

[0108] 在本申请中,所述T淋巴细胞可包括胸腺细胞、天然T淋巴细胞、未成熟T淋巴细胞、成熟T淋巴细胞、静息T淋巴细胞或活化的T淋巴细胞。所述T细胞可以是辅助T细胞(Th),例如辅助T细胞1(Th1)或辅助T细胞2(Th2)细胞。所述T淋巴细胞可以是CD4<sup>+</sup>辅助T细胞(HTL;CD4<sup>+</sup>T细胞)、细胞毒性T细胞(CTL;CD8<sup>+</sup>T细胞)、肿瘤浸润细胞毒性T细胞(TIL;CD8<sup>+</sup>T细胞)、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>T细胞或任何其他T淋巴细胞亚型。在某些实施方式中,所述T淋巴细胞可为初始T细胞(T<sub>N</sub>细胞)。在某些实施方式中,所述T淋巴细胞可为中央记忆T细胞(T<sub>CM</sub>)。在某些实施方式中,所述T淋巴细胞可为效应T细胞(T<sub>EM</sub>细胞)。在某些实施方式中,所述T淋巴细胞可为NKT细胞。在本申请中,所述T淋巴细胞可来自外周血细胞、脐带血细胞和/或白细胞。

[0109] 在本申请中,所述T淋巴细胞可以为T<sub>CM</sub>细胞,其可带有CD45RO<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>的特征。所述T淋巴细胞可以为T<sub>EM</sub>细胞,其可带有CD45RO<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup>的特征。所述T淋巴细胞可以为T<sub>N</sub>细胞,其可带有CD45RO<sup>-</sup>/CD62L<sup>+</sup>的特征。所述T淋巴细胞可以为NKT细胞,其可分为NK1.1<sup>+</sup>以及NK1.1<sup>-</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>-</sup>、CD8<sup>+</sup>以及CD8<sup>-</sup>。活化后,NKT细胞可以产生大量的干扰素- $\gamma$ 、IL-4(白细胞介素4),以及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)。此外,NKT细胞还可以产生一些细胞因子和趋化因子(如IL-2、IL-13、IL-17、IL-21、肿瘤坏死因子- $\alpha$ )。

[0110] 另一方面,本申请提供了一种制备免疫效应细胞的方法,其可包括向免疫效应细胞中引入本申请所述的载体。例如,可将本申请所述的载体引入所述免疫效应细胞中,例如T淋巴细胞或自然杀伤(NK)细胞。在某些实施方式中,每种或每个细胞可包含一个或一种本申请所述的载体。在某些实施方式中,每种或每个细胞可包含多个(例如,2个或以上)或多种(例如,2种或以上)本申请所述的载体。在本申请中,可将所述载体引入免疫效应细胞中可通过本领域已知的方法将本申请所述的载体引入所述细胞中。例如,可以通过逆转录病毒载体进行转染免疫效应细胞,将带有CAR分子的病毒基因组整合到宿主基因组,保证目的基因长期、稳定地表达。又例如,利用转座子,通过携带CAR(转座子)的质粒和携带转座酶的质粒导入到靶细胞中。又例如,可以通过基因编辑的方式(例如CRISPR/Cas9)将CAR分子添加进基因组中。在本申请中,可通过本领域已知的方法将本申请所述的带有CAR分子的载体引入所述细胞中,例如电穿孔、脂质体法转染(lipofectamine 2000, Invitrogen)等。

[0111] 另一方面,本申请提供了一种组合物,其可包含所述的免疫效应细胞和药学上可接受的佐剂。

[0112] 所述药学上可接受的佐剂可以包括缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、低分子量多肽、蛋白质、亲水聚合物、氨基酸、糖、螯合剂、反离子、金属复合物和/或非离子表面活性剂等。

[0113] 在本申请中,所述组合物可被配制用于口服给药,静脉内给药(例如,静脉注射,I.V.),肌肉内给药(例如,肌肉注射,I.M.),在肿瘤部位的原位给药,吸入,直肠给药,阴道给药,经皮给药或通过皮下储存库给药。

[0114] 本申请所述的组合物可以包含治疗有效量的所述抗体或其抗原结合片段。所述治疗有效量是能够预防和/或治疗(至少部分治疗)患有或具有发展风险的受试者中的病症或病症(例如癌症)和/或其任何并发症而所需的剂量。

#### [0115] 制药用途

[0116] 另一方面,本申请提供了所述的CAR、所述的核酸分子、所述的载体或所述的免疫效应细胞用于制备药物的用途,其中所述药物用于治疗与BCMA的表达相关的疾病或病症。

[0117] 在本申请中,所述与BCMA的表达相关的疾病或病症可为癌症或恶性肿瘤。在某些实施方式中,所述癌症或恶性肿瘤可选自浆细胞恶性肿瘤疾病,例如多发性骨髓瘤,还可选自B细胞恶性疾病,例如霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。

[0118] 另一方面,本申请提供了所述的CAR、所述的核酸分子、所述的载体或所述的免疫效应细胞,其治疗与BCMA的表达相关的疾病或病症。

[0119] 另一方面,本申请提供了一种治疗与BCMA的表达相关的疾病或病症的方法,包括向患者施用所述的CAR,所述的核酸分子,所述的载体,或所述的免疫效应细胞。

[0120] 不欲被任何理论所限,下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的嵌合抗原受体、载体、细胞、组合物的工作方式,而不用于限制本申请发明的范围。

#### [0121] 实施例

##### [0122] 实施例1重组慢病毒载体的构建

[0123] 首先,人工合成以下核苷酸序列:KOZAK(其核苷酸序列为SEQ ID NO:2, gccgccacc)、CD8a信号肽(其核苷酸序列为SEQ ID NO:4)、HA-标签(其核苷酸序列为SEQ ID NO:6)、scFv0026(其核苷酸序列为SEQ ID NO:44)、铰链区(其核苷酸序列为SEQ ID NO:26)、跨膜区(其核苷酸序列为SEQ ID NO:28)、CD28共刺激因子(其核苷酸序列为SEQ ID NO:30)、4-1BB共刺激结构域(其核苷酸序列为SEQ ID NO:32)、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域(其核苷酸序列为SEQ ID NO:34)、T2A剪切肽(其核苷酸序列为SEQ ID NO:36)、GFP(其核苷酸序列为SEQ ID NO:38)、EGFRt(其核苷酸序列为SEQ ID NO:40)。

[0124] 同时,构建scFv0008分子作为对照,scFv0008分子的氨基酸序列如SEQ ID NO:41所示(参见US9034324,SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4)。

[0125] 其中HA-标签位于CAR分子的N端,其与CD8a信号肽直接相连。当CAR分子在细胞表面表达时,HA-tag可以作为标签,用于检测CAR分子或者富集CAR-T细胞。此外,GFP位于CAR分子的最C端,其与T2A剪切肽直接相连。T2A剪切后会形成等量的CAR分子和GFP蛋白(参见Szymczak等人correction of multi-gene deficiency in vivo using a single self-cleaving 2A peptide-based retroviral vector.nature biotechnology,2004.22:p.589)。因此,可以通过检测GFP的信号来间接评估CAR分子的表达情况(如图1B所示)。图1B

具体展示了其检测过程为：慢病毒颗粒(1)通过细胞膜融合(2)进入细胞，然后除包装(3)，随后进行逆转录(4)，随后进行整合(5)并转录(6)、翻译(7)，并由T2A剪切肽进行剪切(8)。其转导效率可由GFP的表达来评估(9)，scFv和BCMA蛋白的结合效率可通过BCMA-Fc来研究(10)，抗HA抗体可用于检测CAR的表达并用于富集CAR-T细胞以进行功能性分析(11)。

[0126] 除检测GFP蛋白外，CAR分子的表达还可以通过其他方法进行。例如，可以用适量的生物素化的(biotinylated)BCMA和PE链霉素(streptavidin)标记CAR分子，然后通过PE信号来反映CAR分子的表达。又例如，可以通过适量的生物素化的抗HA单克隆抗体(biotinylated anti-HA mAb)和PE链霉素(streptavidin)标记CAR分子用于检测。

[0127] 在本申请中，所用包含scFv分子的质粒、包含CAR分子的质粒与其对应的慢病毒如表1所示：

[0128] 表1慢病毒载体的类型

[0129]

序号	scFv质粒	scFv分子	CAR质粒	CAR分子	慢病毒
1	PXL0008	scFv0008	PXL0009	CAR0009	LV0002
2	PXL0008	scFv0008	PXL0041	CAR0041	LV0011
3	PXL0026	scFv0026	PXL0037	CAR0037	LV0007
4	PXL0026	scFv0026	PXL0085	CAR0085	LV0020
5	PXL0026	scFv0026	PXL0087	CAR0087	LV0021

[0130] 制备以下CAR质粒(参见图1A)：

[0131] 将慢病毒载体PLVX-EF1alpha-IRES-Puro用NotI和MluI进行双酶切，回收载体片段。对候选scFv质粒PXL0026(其核苷酸序列为SEQ ID NO:44)进行PCR扩增，并用延伸PCR在5'端依次带上NotI酶切位点(含保护碱基)、CD8a信号肽、HA-标签；铰链区、跨膜区、CD28共刺激因子、CD3ζ胞内信号传导结构域基因合成，PCR扩增；T2A剪切肽和eGFP从质粒pMy-BirA-T2A-eGFP PCR扩增出，3'端带上MluI酶切位点及保护碱基；然后用overlap PCR得到5'端带NotI酶切位点3'端带有MluI位点的PCR片段，对该片段进行NotI及MluI双酶切，并回收。T4连接构建得到编号为PXL0037的CAR质粒(CAR0037的核苷酸序列如SEQ ID NO:50所示)。

[0132] 用类似的方法获得编号为PXL0085的CAR质粒，将慢病毒载体PLVX-EF1alpha-IRES-Puro用NotI和MluI进行双酶切，回收载体片段。对候选scFv质粒PXL0026进行PCR扩增，并用延伸PCR在5'端依次带上NotI酶切位点(含保护碱基)、CD8a信号肽、铰链区、跨膜区、4-1BB共刺激因子(其核苷酸序列为SEQ ID NO:32)、CD3ζ胞内信号传导结构域基因合成，PCR扩增；然后用overlap PCR得到5'端带NotI酶切位点3'端带有MluI位点的PCR片段，对该片段进行NotI及MluI双酶切，并回收。T4连接构建得到编号为PXL0085的CAR质粒(CAR0085的CAR分子部分的核苷酸序列如SEQ ID NO:52所示)。

[0133] 用类似的方法获得编号为PXL0087的CAR质粒，将慢病毒载体PLVX-EF1alpha-IRES-Puro用NotI和MluI进行双酶切，回收载体片段。对候选scFv质粒PXL0026进行PCR扩增，并用延伸PCR在5'端依次带上NotI酶切位点(含保护碱基)、CD8a信号肽、铰链区、跨膜区、4-1BB共刺激因子(其核苷酸序列为SEQ ID NO:32)、CD3ζ胞内信号传导结构域、T2A剪切肽、EGFRt(其核苷酸序列为SEQ ID NO:40)基因合成，PCR扩增；然后用overlap PCR得到5'端带NotI酶切位点3'端带有MluI位点的PCR片段，对该片段进行NotI及MluI双酶切，并回

收。T4连接构建得到编号为PXL0087的CAR质粒(CAR0087的CAR分子部分的核苷酸序列如SEQ ID NO:52所示)。

[0134] 同时构建包含scFv质粒PXL0008的CAR质粒作为对照:

[0135] 然后用相同方法获得编号为PXL0041的CAR质粒(CAR0041的CAR分子部分的核苷酸序列如SEQ ID NO:48所示)。将慢病毒载体PLVX-EF1 $\alpha$ -IRES-Puro用NotI和MluI进行双酶切,回收载体片段。对候选scFv质粒PXL0008(其核苷酸序列为SEQ ID NO:42)进行PCR扩增,并用延伸PCR在5'端依次带上NotI酶切位点(含保护碱基)、CD8a信号肽、HA-标签、铰链区、跨膜区、CD28共刺激因子、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域基因合成,PCR扩增;T2A剪切肽和GFP从质粒pMy-BirA-T2A-eGFP PCR扩增出,3'端带上MluI酶切位点及保护碱基;然后用overlap PCR得到5'端带NotI酶切位点3'端带有MluI位点的PCR片段,对该片段进行NotI及MluI双酶切,并回收。T4连接构建得到编号为PXL0041的CAR质粒(CAR0041的CAR分子部分的核苷酸序列如SEQ ID NO:48所示)。

[0136] 用类似的方法获得编号为PXL0009的CAR质粒,将慢病毒载体PLVX-EF1 $\alpha$ -IRES-Puro用NotI和MluI进行双酶切,回收载体片段。对候选scFv质粒PXL0008进行PCR扩增,并用延伸PCR在5'端依次带上NotI酶切位点(含保护碱基)、CD8a信号肽;铰链区、跨膜区、CD28共刺激因子、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域基因合成,PCR扩增;然后用overlap PCR得到5'端带NotI酶切位点3'端带有MluI位点的PCR片段,对该片段进行NotI及MluI双酶切,并回收。T4连接构建得到编号为PXL0009的CAR质粒(CAR0009的CAR分子部分的核苷酸序列如SEQ ID NO:46所示)。

[0137] 实施例2瞬时转染的293T细胞样品上CAR分子的表达

[0138] 如图2A所示,使用PEI作为转染试剂,瞬时转染实施例1制备的PXL0009、PXL0041和PXL0037的CAR质粒至293T细胞中,分别得到PXL0009-293T细胞、PXL0041-293T细胞和PXL0037-293T细胞。瞬时转染72小时后的PXL0009-293T细胞、PXL0041-293T细胞和PXL0037-293T细胞用于评价候选CAR分子的表达能力。在图2A中,1表示质粒和转染试剂,2表示瞬时转染,3表示表达和T2A剪切肽剪切。

[0139] 利用实施例1中所述方法检测CAR分子的表达。具体来说:在过量且固定浓度的PE链霉素(PE streptavidin)存在情况下,通过梯度稀释来改变生物素化的BCMA(biotinylated BCMA)的用量,可以得到PE信号的变化(如图2B所示)。其中,X轴为细胞中表达的GFP蛋白信号,Y轴为使用梯度稀释的生物素化的BCMA(biotinylated BCMA)和固定量的PE链霉素(PE-streptavidin)标记CAR分子所得的PE信号。

[0140] 使用梯度稀释的生物素化的BCMA(biotinylated BCMA)蛋白(295.86nM至3.79pM)检测候选CAR质粒瞬时转染的293T细胞所得PE信号变化曲线(如图3所示)。从曲线拟合计算出BCMA蛋白与细胞表面CAR分子结合的EC<sub>50</sub>值如表2所示。

[0141] 表2通过GFP蛋白检测CAR分子表达结果

[0142]

样品	GFP%	用500ng BCMA标记的CAR%	CAR%:GFP%	EC <sub>50</sub> (nM)
PXL0037-293T	38.5	9.2	0.24	0.64
PXL0041-293T	41.8	16.1	0.39	0.30
PXL0009-293T	N/A	18.0	N/A	1.59

[0143] 类似的,瞬时转染72小时后的293T细胞样品,使用生物素化的抗HA单克隆抗体

(anti-HA mAb) 和PE链霉素 (PE streptavidin) 标记CAR分子,用流式检测获得的GFP阳性率 (GFP%)、CAR阳性率 (CAR%)、以及二者的比值,结果如表3所示。

[0144] 表3 CAR分子表达流式检测结果

样品	GFP%	用500ng anti-HA mAb标记的CAR%	CAR%:GFP%
PXL0037-293T	35.9	29.4	0.82
PXL0041-293T	43.1	18.8	0.44
PXL0009-293T	N/A	N/A	N/A

[0146] PXL0009为已知可以正常表达CAR分子的参比质粒,其不含编码GFP蛋白和HA标签的基因,其序列如SEQ ID NO:45所示。在细胞样品中应该无法检测到GFP信号,也没有CAR与生物素化的抗HA单克隆抗体 (biotinylated anti-HA mAb) 结合的PE信号。因此,PXL0009-293T细胞样品可以用作流式检测的对照样品。与PXL0009不同,作为参比质粒的PXL0041和PXL0037编码GFP蛋白和HA标签,因此,可以在PXL0041-293T细胞样品中检测到GFP信号,也可以分别检测到CAR与生物素化的BCMA (biotinylated BCMA) 蛋白或者与生物素化的抗HA单克隆抗体 (biotinylated anti-HA mAb) 的结合 (PE信号),可以作为阳性对照。

[0147] 结果显示,PXL0037-293T细胞样品中可以检测到GFP信号,也可以检测到CAR与生物素化的BCMA (biotinylated BCMA) 蛋白或者与生物素化的抗HA单克隆抗体 (biotinylated anti-HA mAb) 的结合 (PE信号),这说明PXL0037质粒编码的CAR分子可以在细胞上表达,且可以正常结合BCMA蛋白。

[0148] 实施例3慢病毒转导的293T细胞样品上CAR分子的表达

[0149] 3.1慢病毒的包装

[0150] 实施例1制备的编号为PXL0009、PXL0041和PXL0037的CAR质粒需要利用穿梭质粒和其他包装质粒同时共转染293T细胞,在细胞中进行慢病毒的包装。具体步骤如下:

[0151] 以在10厘米培养皿中进行慢病毒的包装为例,将293T细胞以 $6 \times 10^4$ 个/cm<sup>2</sup>的密度接种在含有10%FBS的DMEM培养基中,并置于37℃,5%CO<sub>2</sub>和饱和湿度的环境下进行培养,接种3天后实施转染。转染前取两支EP管,每支加500μl opti-MEM,向其中一支管加入慢病毒辅助载体3μg PSPAX2、2pMD2.G及实施例1制备的载体 (编号为PXL0009、PXL0041或PXL0037的CAR质粒) 5μg,混匀,得到含有质粒的支管;向另一支管加入浓度为1mg/ml PEI 30μl,充分混匀。然后将上述另一支管中的加有PEI的溶液逐滴加入至所述含有质粒的支管中,边加边混匀,室温静止30min后,逐滴均匀加入至前述293T细胞中。转染后24小时更换6ml含10%FBS的DMEM培养基。

[0152] 72小时后,收取上清液至离心管中,3000g 4℃离心10min,并将上清液用0.45μm的滤器过滤后,准备进行纯化。

[0153] 将上清液用超速离心机进行离心,于27000g 4℃离心4小时。弃去上清,用100μl预冷PBS对沉淀进行重悬,无颗粒后置于4℃重悬过夜。过夜后,将病毒悬液取出并分装。分别得到LV0002 (对应PXL0009的CAR质粒)、LV0011 (对应PXL0041的CAR质粒) 和LV0007 (对应PXL0037的CAR质粒) 慢病毒。

[0154] 3.2慢病毒的包装效率评价

[0155] 通过检测慢病毒包装过程中收获的上清液中具有转导活性的病毒滴度 (生物滴度),可以评价慢病毒的包装效率。具体检测步骤如下:

[0156] 将293T细胞以 $1 \times 10^5$ /孔的量接种在六孔板中,并置于 $37^\circ\text{C}$ , $5\% \text{CO}_2$ 和饱和湿度的环境下,用 $500\mu\text{l}$ 含有 $10\% \text{FBS}$ 的DMEM培养基进行培养。细胞培养24小时后,进行慢病毒转导,分别取 $100\mu\text{l}$ 、 $50\mu\text{l}$ 、 $25\mu\text{l}$ 和 $12.5\mu\text{l}$ 的上述的上清液加入到六孔板中(每个取样量设置2个孔)。然后置于 $37^\circ\text{C}$ , $5\% \text{CO}_2$ 和饱和湿度的环境下继续培养细胞。慢病毒转导72小时后,将293T细胞消化重悬后用于流式检测。

[0157] 由于LV0007中同时携带了编码CAR分子和GFP蛋白的基因,因此LV0007转导的293T细胞会同时表达CAR分子和GFP蛋白。通过流式检测293T细胞中的GFP荧光信号,可以用于计算上清液中的慢病毒生物滴度(称为GFP滴度):

[0158] 生物滴度(TU/ml) = (GFP阳性率  $\times$  293T细胞数) / 病毒取样体积

[0159] 或者,LV0007转导的293T细胞用生物素化的BCMA(biotinylated BCMA)和PE链霉素(PE-streptavidin)进行标记,流式检测CAR阳性率(称为CAR滴度):

[0160] 生物滴度(TU/ml) = (CAR阳性率  $\times$  293T细胞数) / 病毒取样体积

[0161] 上述包装过程中收获的上清液生物滴度检测结果如图4和表4所示。

[0162] 表4显示的是慢病毒包装上清的生物滴度数据。其中,“GFP滴度”通常是指通过GFP信号检测待测病毒转导的293T细胞中GFP阳性率,计算所得的滴度;“CAR滴度”通常是指通过生物素化的BCMA和PE链霉素(PE-streptavidin)检测待测病毒转导的293T细胞中CAR阳性率,计算所得的滴度。

[0163] 表4慢病毒包装的生物滴度检测结果

样品	CAR滴度(TU/ml)	GFP滴度(TU/ml)
LV0002	1.52E+05	N/A
LV0007	8.73E+05	1.05E+06
LV0011	4.68E+05	5.38E+05

[0165] 实施例4CAR-T细胞的制备

[0166] 第1天,采集约65ml健康供者的外周血,使用Ficoll分离得到PBMC,进一步使用CD3MicroBeads分选获得T细胞。分选后的T细胞使用CD3/CD28 Dynabeads进行活化。活化约24小时后(第2天),分别加入实施例3制备的LV0007和LV0011慢病毒转导(MOI=4),转导时T cells密度约为 $1.5 \times 10^6$ 个细胞/ml。在第3天时,对转导后的T细胞进行一次换液。之后,每天进行计数,并维持细胞密度在 $(0.6 \sim 2.0) \times 10^6$ 个细胞/ml之间,并绘制细胞的生长曲线。

[0167] 细胞培养至第6天时,使用流式细胞术检测CAR阳性率(CAR%)、GFP阳性率(GFP%)、CD4/CD8比率。在第10天时,进行CAR-T细胞的体外功能评价。

[0168] 根据上述过程,得到了LV0007-CAR-T和LV0011-CAR-T细胞,并且以供者的T细胞作为对照。表5总结了上述CAR-T细胞的制备过程。

[0169] 表5 CAR-T细胞的制备过程

时间	事项	数据
[0170] 第 1 天	采集健康供者外周血	65 ml
	Ficoll 分离所得 PBMC	$2.05 \times 10^8$ 个细胞
	CD3 MicroBeads 分选所得 T 细胞	$9.16 \times 10^7$ 个细胞
	CD3/CD28 Dynabeads 活化时长	~24h
	CAR-T 细胞培养基条件	CTS OpTmizer, 1% CTS Immune Cell SR, 50~200 IU/ml IL-2, 1% L-Glu
第 2 天	慢病毒转导 T 细胞	MOI = 4, 细胞浓度 = $1.49 \times 10^6$ 个细胞/ml; T 细胞对照组除不加慢病毒外, 其他操作和 CAR-T 细胞组一致。
第 6 天	测定 CAR 阳性率	数据如表 6 所示
第 10 天	CD107a 脱粒测试	数据如表 8 和图 10 所示

[0171] LV0007-CAR-T细胞、LV0011-CAR-T细胞和T细胞对照组的生长曲线如图5所示。细胞培养至第6天时,使用流式细胞术检测所得CAR阳性率等数据如表6所示。

[0172] 表6流式细胞术检测CAR阳性率结果

样品	CAR%	CAR MFI	CD8%	CD4中的CAR%	CD8中的CAR%
LV0007-CAR-T	56.3	25.1	35.6	54.0	56.5
LV0011-CAR-T	62.8	30.7	37.6	58.3	68.5
T细胞	N/A	N/A	29.6	N/A	N/A

[0174] 实施例5CAR分子与BCMA蛋白结合的数据

[0175] 进一步的,在固定浓度且过量的PE链霉素(PE streptavidin)条件下,使用梯度稀释的生物素化的BCMA(biotinylated BCMA)蛋白标记CAR分子的方式(与实施例2的方法相同),对实施例4中制备的CAR-T上表达的CAR分子与BCMA蛋白结合能力进行检测,结果如图6和表7所示。

[0176] 表7 CAR分子与BCMA蛋白结合结果

样品	EC <sub>50</sub>
LV0007-CAR-T	6.00
LV0011-CAR-T	0.31

[0178] 根据以上数据,T细胞上表达的候选CAR分子可以正常结合BCMA蛋白。但是,不同批次制备的细胞样品测定的EC<sub>50</sub>值存在较大差异。这种差异可能是由于细胞种类、样品制备方法和批次不同,导致细胞表面CAR分子表达密度不同而造成的。

[0179] 实施例6CD107a脱粒实验

[0180] 6.1CD107a脱粒实验

[0181] 使用CD107a脱粒实验进行CAR-T细胞的体外生物学效力评估。CD107a是细胞内微囊泡的标志物,当负载有颗粒酶的微囊泡与细胞膜融合后,细胞膜上的CD107a会增加,当用莫能酶素(monesin,购自BioLegend)阻断其回收时,可以定量反映微囊泡释放的强度。当CAR-T受靶细胞上靶抗原刺激后,会造成颗粒酶释放,并可通过流式检测CD107a的增加来判断T细胞的激活。

[0182] 首先将从实施例4获得的CAR-T细胞(LV0007-CAR-T细胞或LV0011-CAR-T细胞)与靶细胞U266、莫能酶素和CD107a抗体共同孵育3~6小时,CAR-T细胞与靶细胞的细胞密度均为 $5 \times 10^5$ 个细胞/ml。然后用CD8、PD1抗体标记样品后,进行流式检测。其中,候选CAR-T细胞

中的CAR阳性细胞通过共表达的GFP检测,而作为对照的LV0011-CAR-T细胞通过生物素化的BCMA-Fc和PE链霉素来标记CAR阳性细胞。实验中的阴性对照采用K562细胞和CAR-T细胞共孵育,阳性对照采用混合物(cocktail)代替靶细胞来激活CAR-T细胞。

[0183] 以LV0007-CAR-T细胞为例,流式结果如图7所示。

[0184] 对于LV0007-CAR-T和U266共孵育的细胞样品,在FSC:SSC散点图上选取P1门,去除左下角的细胞碎片;对P1门中的细胞,可进一步分析CD8:PD1,从而得到CD8+/PD1-细胞群(Q3);在CD8+/PD1-细胞群中,可再次分析GFP:CD107a,可分别得到CD8+/PD1-/CAR+细胞群(以共表达的GFP信号标记CAR阳性细胞)和CD8+/PD1-/CAR-细胞群中表达CD107a的比例。

[0185] LV0007-CAR-T和K562共孵育的细胞样品,在FSC:SSC散点图上,细胞分成了P1和P2两群,其中P2群中的细胞几乎不表达CD8,因此可能是K562细胞;对P1门中的细胞可以进一步分析CD8:PD1;在CD8+/PD1-细胞群(Q3)中,可再次分析GFP:CD107a,从而也得到CD8+/PD1-/CAR+和CD8+/PD1-/CAR-细胞群中表达CD107a的比例。

[0186] 6.2CD107a脱粒实验数据

[0187] 根据本实施例6.1部分的实验操作,CAR-T细胞样品(LV0007-CAR-T和LV0011-CAR-T细胞)分别和靶细胞U266(BCMA阳性)或K562(BCMA阴性)共孵育3小时后进行流式检测。细胞样品的CD107a脱粒实验数据结果如表8和图8所示,表8和图8中均显示了CD8+/PD1-/CAR+和CD8+/PD1-/CAR-两个亚群细胞中表达CD107a阳性细胞比率。

[0188] 表8不同细胞亚群中CD107a阳性细胞比率

样品	CD8+/PD1-/CAR+亚群		CD8+/PD1-/CAR-亚群	
	K562	U266	K562	U266
[0189] LV0007-CAR-T	0.97	25.10	1.01	3.91
LV0011-CAR-T	2.01	10.70	2.71	3.33
T 细胞	N/A	N/A	0.64	1.09

[0190] 如表8和图8所示,U266细胞共孵育的CAR-T样品中,CD8+/PD1-/CAR+亚群细胞上的CD107a数值,可以反映CAR-T细胞被特异性激活的情况;而K562细胞共孵育的CAR-T样品中,CD8+/PD1-/CAR+亚群细胞上的CD107a数值,可以反映CAR-T细胞被非特异性激活的情况。比较U266共孵育时的CD8+/PD1-/CAR+亚群细胞上的CD107a数值,可以看出LV0007-CAR-T细胞的CD8+/PD1-/CAR+亚群可以被BCMA阳性细胞(U266)特异性的激活,并且LV0007-CAR-T细胞的激活情况强于作为对照的LV0011-CAR-T细胞。

[0191] 6.3BCMA蛋白竞争条件下的CD107a脱粒实验数据

[0192] 此外,由于多发性骨髓瘤(MM)细胞表面上表达的BCMA蛋白的胞外部分可以被 $\gamma$ -分泌酶( $\gamma$ -secretase)切割,从而形成可溶性BCMA(sBCMA)。可溶性BCMA在MM病人血清中会升高,且浓度与肿瘤恶性程度呈正相关。因此,在CAR-T细胞与靶细胞共孵育时,在培养基中加入1 $\mu$ g/ml BCMA蛋白,用来评估可溶性BCMA对CAR-T细胞激活的影响。

[0193] CAR-T细胞样品,在BCMA蛋白竞争条件下的CD107a脱离实验检测结果如表9和图9所示。如图9显示,LV0007转导的细胞样品,U266细胞对CAR-T细胞的激活没有受到BCMA蛋白的竞争性抑制;而作为对照的LV0011-CAR-T细胞样品的激活收到明显抑制。

[0194] 表9 BCMA蛋白竞争条件下的CD107a脱粒实验数据

样品	CD8 <sup>+</sup> /PD1 <sup>-</sup> /CAR <sup>+</sup> 亚群		CD8 <sup>+</sup> /PD1 <sup>-</sup> /CAR <sup>-</sup> 亚群	
	U266 和 BCMA	U266	U266 和 BCMA	U266
[0195] LV0007-CAR-T	72.46	39.61	7.51	2.95
LV0011-CAR-T	21.18	67.05	7.54	8.97
T 细胞	N/A	N/A	0.00	8.58

[0196] 实施例7细胞因子释放测定

[0197] 细胞因子释放测定实验是将待测CAR-T细胞( $5 \times 10^5$ 个细胞, 100 $\mu$ l)和靶细胞( $5 \times 10^5$ 个细胞, 100 $\mu$ l)在RPMI-1640培养基中共孵育24小时后,收集细胞培养上清液,然后使用CBA法测定IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 等因子的分泌情况。

[0198] CAR-T细胞样品分别和靶细胞共孵育后的细胞因子释放检测结果如表10和图10所示。图10中所示的细胞因子释放量为相对于样本中检测所得的最大值的百分比。由表10和图10所示,受BCMA阳性的靶细胞U266刺激后(+U266),LV0007-CAR-T细胞分泌的TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 和IL-2都大幅增加。而受到BCMA阴性的K562刺激(+K562),LV0007-CAR-T没有出现TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 和IL-2的分泌增加。

[0199] 表10细胞因子释放测定

样品	IL-2	IL-17A	IL-4	IL-6	IL-10	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$
[0200] LV0011-CAR-T	44.72	4.61	14.12	10.83	5.85	277.35	569.91
LV0011-CAR-T+U266	8181.1	343.74	160.77	31.82	47.66	4847.04	3265.38
LV0011-CAR-T+K562	117.31	4.1	3.04	126.72	0.45	4.25	942.7
LV007-CAR-T	1487.07	36.95	20.63	17.46	15.15	1248.25	986.38
LV0007-CAR-T+U266	8181.1	443.26	96.62	43.42	48.17	3555.68	7658.65
LV0007-CAR-T+K562	1652.22	18.65	5	279.96	10.6	1438.33	19.54
T	7.03	N/A	8.17	8.35	3.82	171.96	315.4
T+U266	N/A	N/A	N/A	5.29	2.47	21.85	83.8
T+K562	N/A	N/A	N/A	55.54	N/A	N/A	123.2

[0201] 实施例8不同供体的CAR-T细胞功能

[0202] 采用类似实施例4的实验方法,通过转导实施例3制备的慢病毒LV0002和LV0021,制得LV0002-CAR-T细胞和LV0021-CAR-T细胞,使用LV0021病毒(对应PXL0087质粒编码的CAR分子,其共刺激因子为4-1BB)和LV0002病毒(对应PXL0009质粒编码的CAR分子,其共刺激因子为CD28)转导不同供体的T细胞,制备CAR-T细胞。其中,将LV0002病毒转导供体1的T细胞命名为LV0002-D01-CAR-T细胞,将LV0002病毒转导供体1的T细胞命名为LV0002-D02-CAR-T细胞,将LV0002病毒转导供体3的T细胞命名为LV0002-D03-CAR-T细胞;将LV0021病毒转导供体1的T细胞命名为LV0021-D01-CAR-T细胞,将LV0021病毒转导供体2的T细胞命名为LV0021-D01-CAR-T细胞,将LV0021病毒转导供体3的T细胞命名为LV0021-D03-CAR-T细胞。同时,以供体自身T细胞作为对照。其中,将来自供体1的T细胞命名为T细胞-D01,将来自供体2的T细胞命名为T细胞-D02,将来自供体3的T细胞命名为T细胞-D03。这些CAR-T细胞的功能也使用实施例6中的CD107a脱粒实验进行检测,结果如表11和图11所示。

[0203] 结果显示,两位不同供者的LV0021-CAR-T细胞的结果相近,都可以被BCMA阳性的U266细胞特异性的刺激产生CD107a,而在BCMA阴性的K562细胞刺激下,产生的CD107a数值和未受刺激的数值相似(空白)。作为对照的LV0002-CAR-T细胞在U266细胞刺激下可以产生更高的CD107a,这可能是因为二者的scFv和共刺激因子都不同而造成的。并且,LV0002-CAR-T细胞在未刺激(空白)和受K562细胞刺激的情况下,都会有较高的CD107a值。此外,LV0021-CAR-T产生CD107a的能力受游离BCMA蛋白的影响较小,而LV0002-CAR-T产生CD107a的能力受游离BCMA蛋白的影响较大。

[0204] 表11不同供体的CAR-T细胞功能比较

供体	样品	CD8 <sup>+</sup> /PD1 <sup>-</sup> /CAR <sup>+</sup> 亚群			
		U266	U266 和 BCMA	K562	空白对照
供体 1	LV0021-D01-CAR-T	35.2	31.1	9.10	2.34
	T 细胞-D01	1.43	1.47	0.02	0.01
供体 2	LV0021-D02-CAR-T	56.3	43.6	3.91	7.13
	LV0002-D02-CAR-T	74.3	43.3	30.0	39.2
	T 细胞-D02	4.29	4.24	1.15	1.01
供体 3	LV0021-D03-CAR-T	79.6	72.5	6.62	12.6
	T 细胞-D03	2.25	3.01	0.86	0.55

[0205] 实施例9CAR-T对靶细胞的体外杀伤实验

[0207] 使用实施例8中制备得到的CAR-T细胞LV0021-D02-CAR-T进行体外杀伤功能检测,具体可以通过钙黄绿素荧光法进行检测。其检测步骤如下:分别取 $5 \times 10^5$ 个BCMA阳性的U266细胞和BCMA阴性的K562细胞,在PBS+4%FBS溶液中重悬成 $1 \times 10^6$ 个/ml的细胞悬液。然后用25 $\mu$ M的钙黄绿素(Calcein-AM)分别标记U266和K562细胞。将标记后的U266和K562细胞按照每孔5000个细胞的量分别接种到U底96孔板中;然后在相应的孔中,分别按照效应细胞与靶细胞的比值(E:T值)50:1、25:1、5:1的比例加入待测的CAR-T细胞或者作为对照的T细胞,每孔的溶液体积为200 $\mu$ l。此外,使用PBS溶液代替效应细胞加入U266或K562细胞中,作为检测的阴性对照;使用细胞裂解液溶液代替效应细胞加入U266或K562细胞中,作为检测的阳性对照。然后,将U底96孔板避光在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时,之后从每孔中吸取上清溶液(避免吸取细胞)进行荧光检测(激发光波长485/20nm,发射光波长530/25nm)。靶细胞(U266或K562)被效应细胞杀伤并裂解释放出钙黄绿素的相对比例可以通过下列公式计算:

[0208] 溶解比例(%)= 
$$\frac{F_{test} - F_{spont.}}{F_{max.} - F_{spont.}}$$

[0209] 其中, $F_{test}$ 是含有靶细胞和待测T/CAR-T细胞的复孔间的平均荧光值, $F_{spont.}$ 是含有靶细胞和PBS的复孔间的平均荧光值, $F_{max.}$ 是含有靶细胞和裂解液的复孔间的平均荧光值。

[0210] 以LV0021-D02-CAR-T样品为例,CAR-T细胞对靶细胞的体外杀伤效果如图12所示,CAR-T细胞对BCMA阳性的U266细胞有较强的杀伤效果,并且杀伤效果随着E:T值的增大而增强,表现为更大比例的U266细胞被裂解释放出钙黄绿素。作为对比,CAR-T细胞对BCMA阴性的K562细胞杀伤效果较差。此外,T细胞对U266细胞有一定的非特异杀伤,且非特异性杀伤不会随着E:T值的增大而变化。因此,CAR-T细胞有明显的针对BCMA特异性的杀伤效果。

[0211] 实施例10荷瘤动物模型体内肿瘤抑制检测

[0212] 使用实施例8制备的来自供体2的CAR-T细胞(LV0021-D02-CAR-T)进行动物模型实验。并将所述LV0021-CAR-T细胞命名为XL103-07。同时,以来自供体2的T细胞(T细胞-D02)作为对照T细胞。按照每只小鼠 $2 \times 10^6$ 个细胞的量,将扩增中的U266细胞皮下注射接种至免疫缺陷型NSG小鼠,建立U266皮下荷瘤模型。当肿瘤大小到达100-150mm<sup>3</sup>时,按照表12所示,将荷瘤小鼠分成5组,分别注射CAR-T细胞(XL103-07)、对照T细胞(T细胞-D02)、PBS或细胞冻存液(其包括7.5%的DMSO、23%的人血白蛋白、32.5%的复方电解质液、35%的葡萄糖注射液和2%的生理盐水)。其中分组及给药方案如表12所示。

[0213] 表12动物模型实验的分组方案

组别	只数	CAR-T信息	给药方式	给药剂量	给药频率
1	5	PBS对照	I.V.	100 $\mu$ l	单次
2	5	对照T细胞	I.V.	$10 \times 10^6$ 个细胞/动物	单次
3	5	CAR-T细胞 (低剂量组)	I.V.	$2 \times 10^6$ 个细胞/动物	单次
4	5	CAR-T细胞 (高剂量组)	I.V.	$10 \times 10^6$ 个细胞/动物	单次
5	5	细胞冻存液	I.V.	100 $\mu$ l	单次

[0214] [0215] 连续饲养小鼠,并记录肿瘤体积和小鼠体重,以及小鼠生存状态。结果如图13所示。小鼠模型实验的结果表明,单次注射CAR-T细胞后,无论高剂量组还是低剂量组均有良好的肿瘤杀伤效果,肿瘤在注射后19天完全消失。而注射对照T细胞、PBS、或者细胞冻存液的小鼠体内的肿瘤均持续生长。

[0216] 实施例11荷瘤动物模型体内细胞因子检测

[0217] 取与实施例10中所述相同的CAR-T细胞XL103-07,通过流式微球阵列法(cytometric beads array,CBA)法(具体方法参见BD<sup>TM</sup> CBA Flex Set Reagents以及BD FACS Array<sup>TM</sup> Bioanalyzer)检测给药后小鼠外周血血浆中细胞因子(IFN  $\gamma$ 、IL2、IL10、IL7、IL6和TNF- $\alpha$ )变化。将荷瘤小鼠分成三组:对照T细胞组,XL103-07高剂量组和XL103-07低剂量组,每组5只。其中,XL103-07-H代表高剂量组,剂量为 $10 \times 10^6$ 个细胞(XL103-07细胞)/动物;XL103-07-L代表低剂量组,剂量为 $2 \times 10^6$ 个细胞(XL103-07细胞)/动物。

[0218] IFN  $\gamma$  和IL2结果如图14所示。结果显示,可见低剂量组小鼠体内IFN  $\gamma$  和IL2的峰值分别在第10天和第7天;高剂量组IFN  $\gamma$  和IL2的峰值分别在第3-7天和第3天;峰值出现时间比低剂量组提前。对照T细胞组水平很低,且无明显变化趋势。

[0219] IL10,IL7,IL6和TNF- $\alpha$ 的结果如图15所示。图15的结果显示细胞因子水平均较低,与对照T细胞组相比无明显变化趋势。

[0220] 实施例12荷瘤动物模型体内CAR分子拷贝数的变化检测

[0221] 通过定量PCR方法检测实施例10中动物模型荷瘤小鼠外周血细胞基因组DNA中XL103-07的CAR分子的DNA拷贝数变化,分析CAR-T细胞在小鼠体内的扩增情况,结果如图16所示。类似地,将荷瘤小鼠分成三组:对照T细胞组,XL103-07高剂量组和XL103-07低剂量组,每组5只。其中,XL103-07-H代表高剂量组,剂量为 $10 \times 10^6$ 个细胞(XL103-07细胞)/动物;XL103-07-L代表低剂量组,剂量为 $2 \times 10^6$ 个细胞(XL103-07细胞)/动物。

[0222] 结果显示,与对照T细胞组相比,高剂量组中的CAR拷贝数在第三天即出现上升,并

在第10天后达到峰值后,一直维持到第15天。而Mock-T和其它对照组未出现扩增。说明CAR-T细胞在杀伤肿瘤过程中大量扩增。

[0223] 实施例13:探索性临床研究

[0224] 在通过药学研究获得稳定的PXL0085质粒、LV0020慢病毒载体和CART细胞的生产工艺后,我们开展了探索性临床研究,考察其安全性、耐受性和初步有效性,同时探索PK/PD特征。该研究在试验样品制备、研究者和研究机构、试验方案、伦理审查和知情同意过程、受试者入组筛查和诊断治疗、不良反应报告和处理、试验数据的汇总和统计分析等方面遵循GCP原则。

[0225] 临床研究共入组和治疗了5例患有复发/难治性多发性骨髓瘤的受试者(分别编号为001,002,004,005和007)。采用国际骨髓瘤工作组(IMWG)2016版推荐的多发性骨髓瘤治疗疗效标准进行了疗效评估。5例受试者最佳疗效的整体响应率达100%。其中3例完全缓解(CR),1例部分缓解(PR),1例微小缓解(MR),PR和MR受试者,疗效持续加深(图17)。

[0226] 实施例14受试者体内CAR的DNA拷贝数检测

[0227] 采用微滴数字PCR法(参见Bio-Rad QX200说明书)检测了实施例13中所述5位受试者外周血中CAR的DNA拷贝数,以评价CAR-T细胞的药代动力学特征。结果如图18所示。给药后,本品在体内扩增迅速,且在60天时仍能被检测到。大部分受试者体内CAR-T达峰时间在10天左右,001号受试者达峰时间17天。

[0228] 实施例15受试者体内药代动力学分析

[0229] 用R 3.5.0软件NonCompartment包对实例14中的CAR的DNA拷贝数变化进行了进一步分析,计算药代动力学相关参数,结果如表13所示。表13中T0表示初次观测到非零浓度时间,药峰浓度(Cmax)表示药品浓度达到的最大峰值,达峰时间(Tmax)表示达到药峰浓度所需的时间,AUC(0-28)指表示0至28天的曲线下积分面积,AUC(0-CLST)指0至最后观察时间的曲线下积分面积。

[0230] 表13药代动力学研究分析

受试者编号	T0 (天)	药峰浓度(Cmax) (拷贝数/ $\mu$ g DNA)	达峰时间 (Tmax) (天)	AUC (0-28)	AUC(0-CLST)
[0231] 001	1	148182	17	2449678	5004465
002	2	91250	10	1050197	1389729
004	0	56500	10	420084.9	417261.2
005	1	10725	10	142147.7	92527.47
007	1	54250	12	493486.2	251114

[0232] 结果显示,第一剂量组平均Cmax( $98644 \pm 5000$ )拷贝数/ $\mu$ g DNA,平均AUC(0-28)为( $1306653.3 \pm 100000$ );第二剂量组平均Cmax为( $32487.5 \pm 2000$ )拷贝数/ $\mu$ g DNA,平均AUC(0-28)为( $317816.95 \pm 150000$ )。

[0233] 前述详细说明是以解释和举例的方式提供的,并非要限制所附权利要求的范围。目前本申请所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的,且保留在所附的权利要求和其等同方案的范围内。

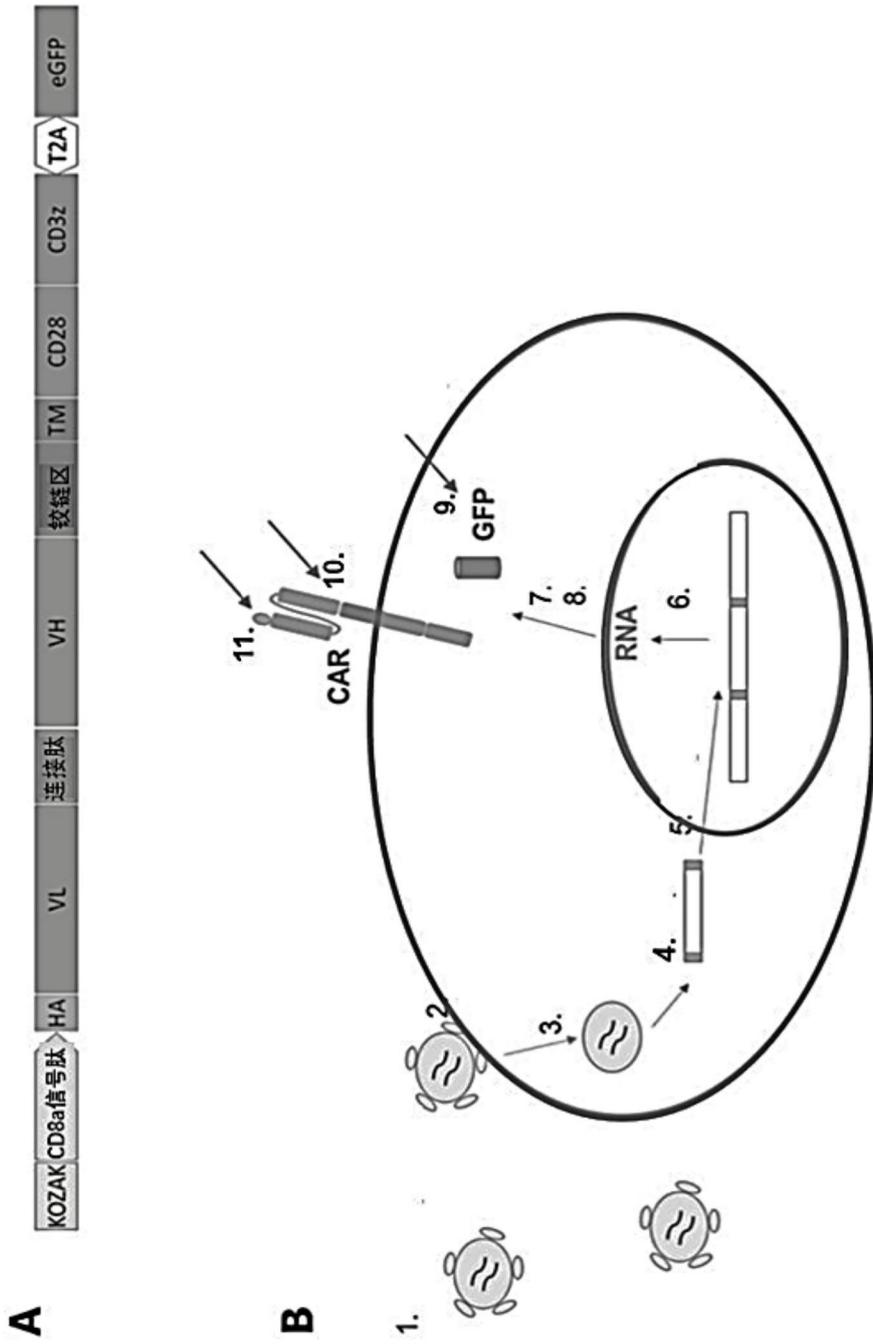


图1

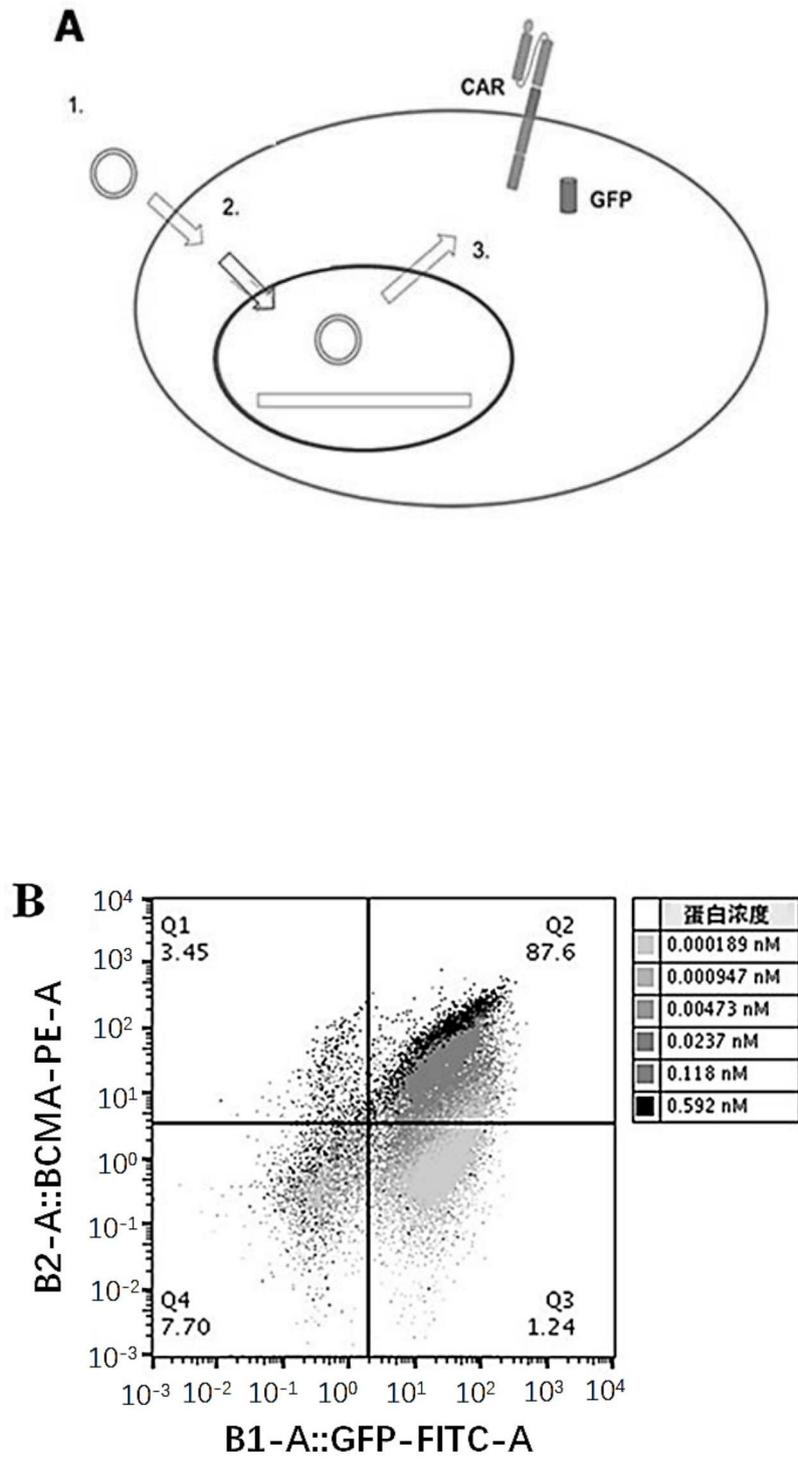


图2

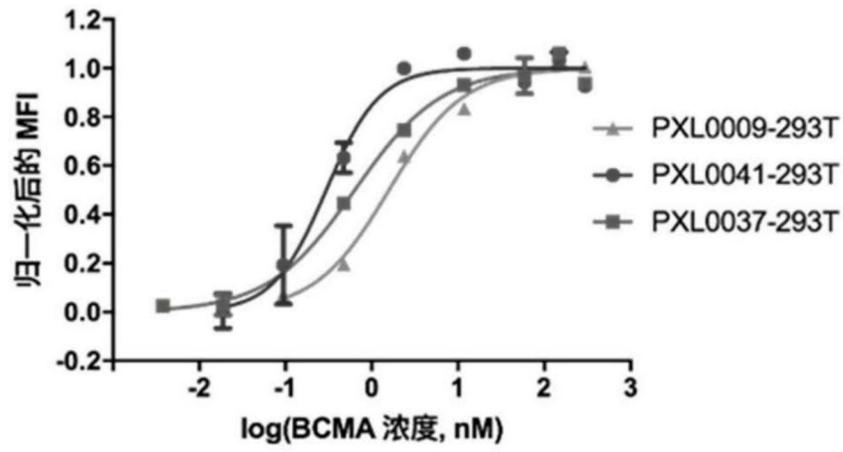


图3

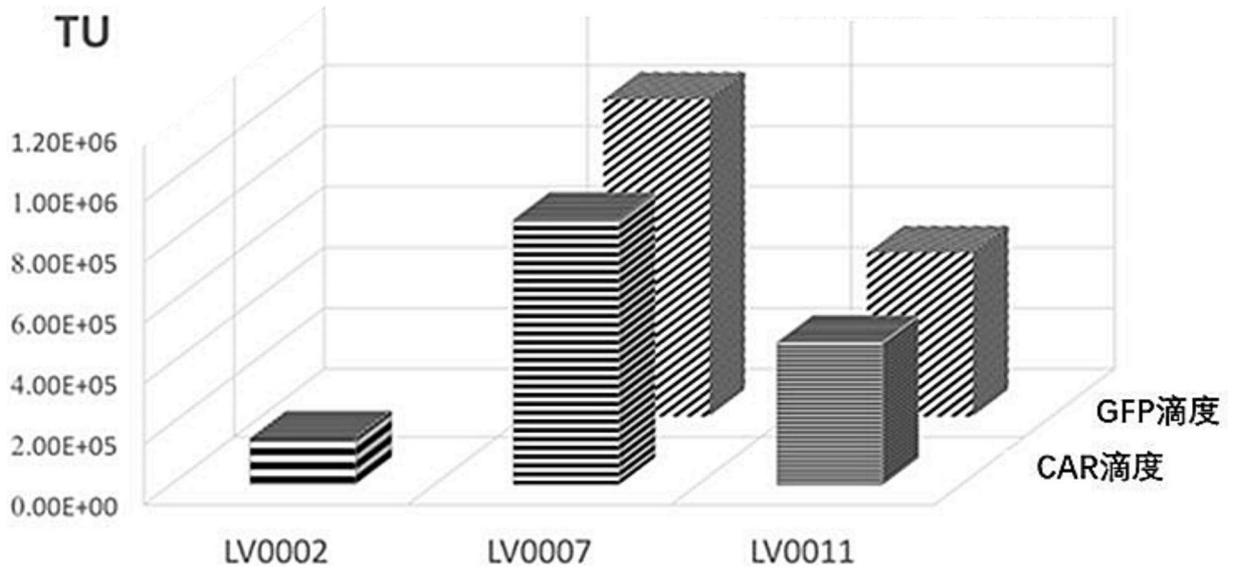


图4

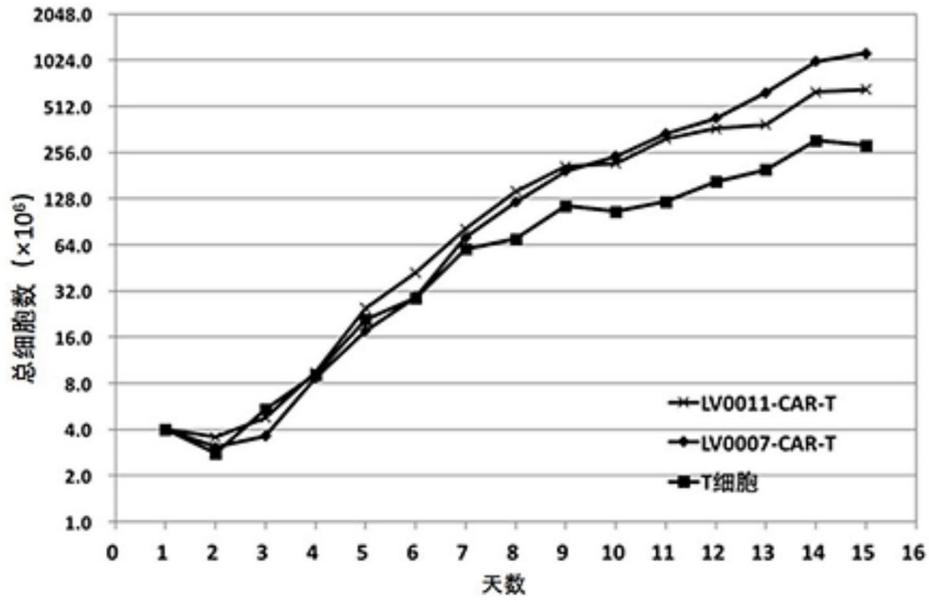


图5

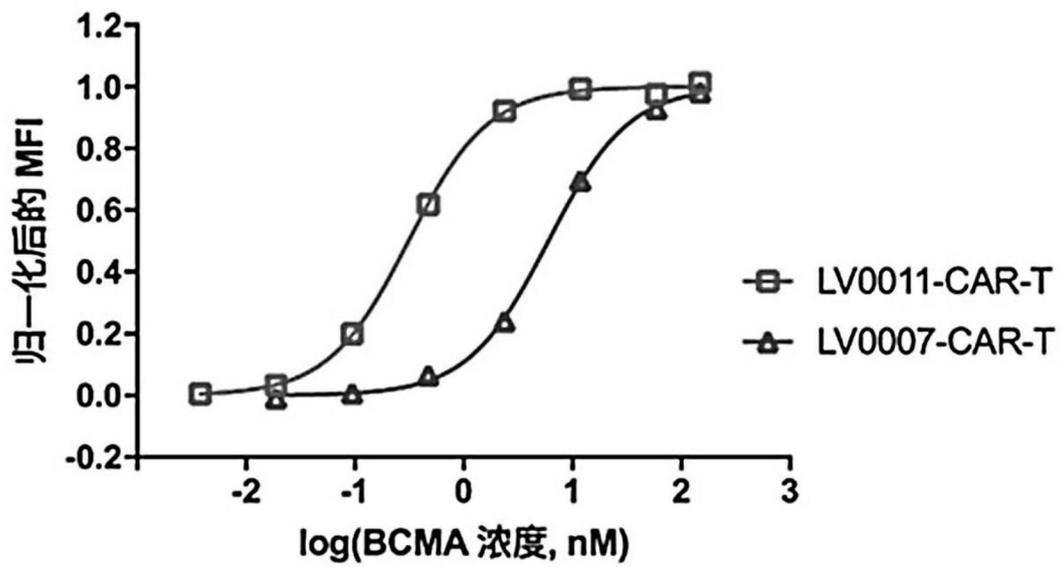


图6

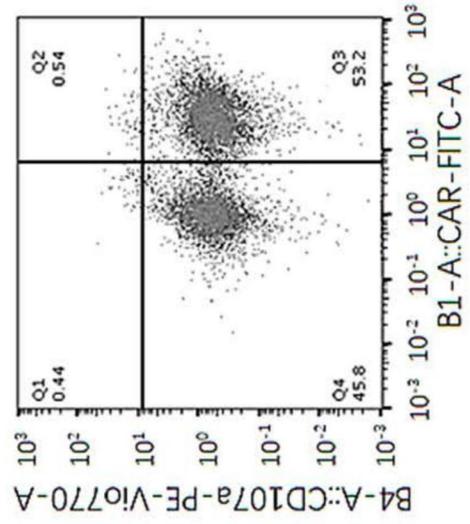
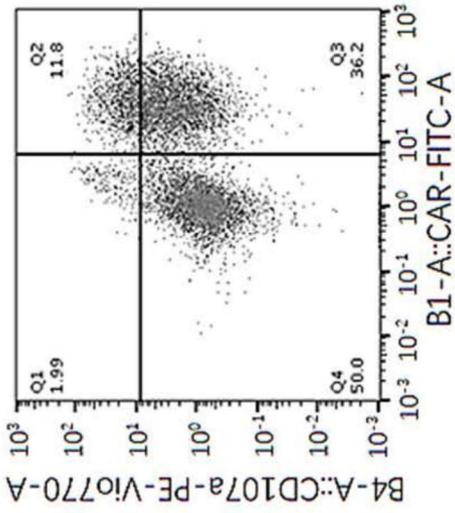
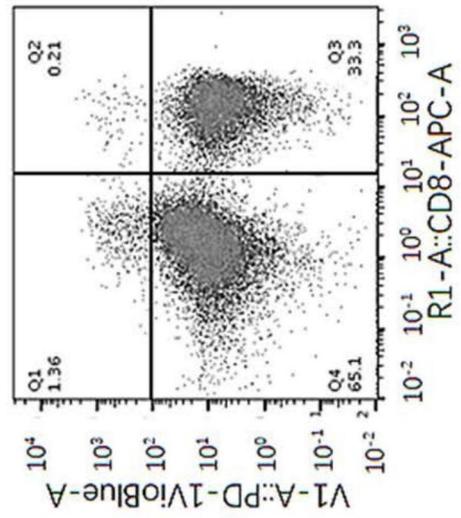
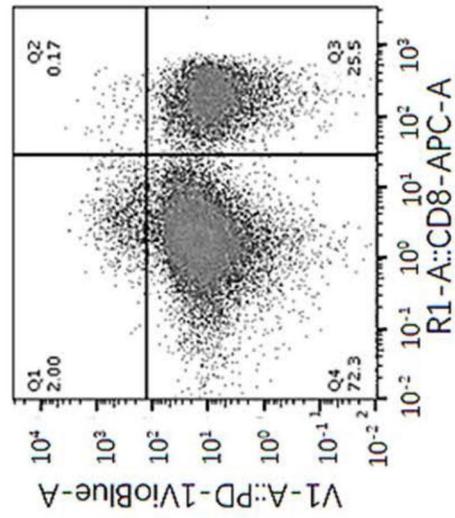
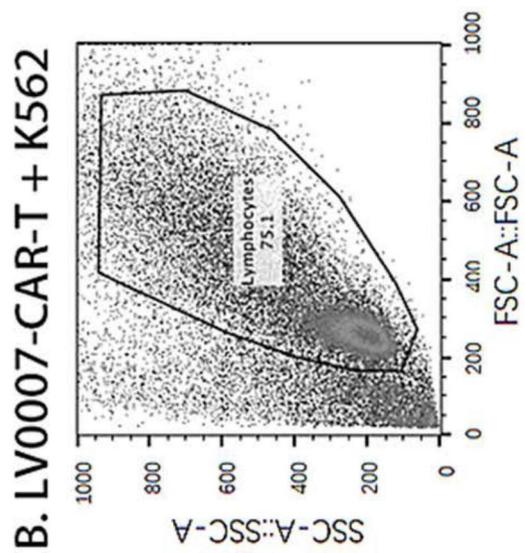
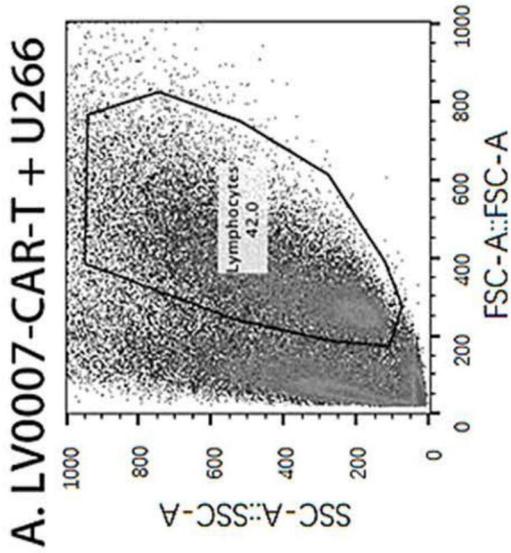


图7

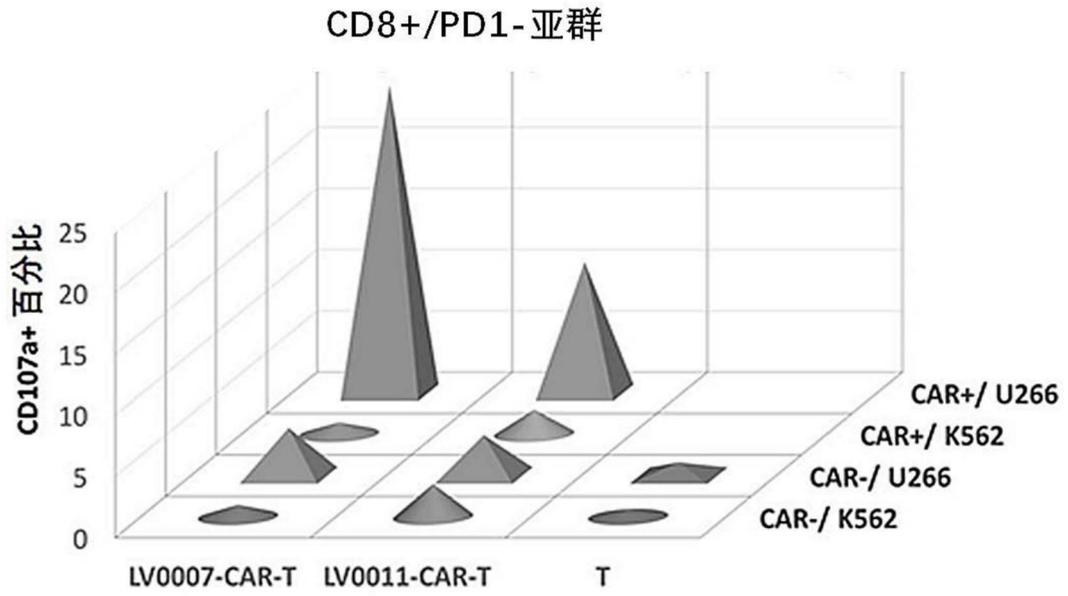


图8

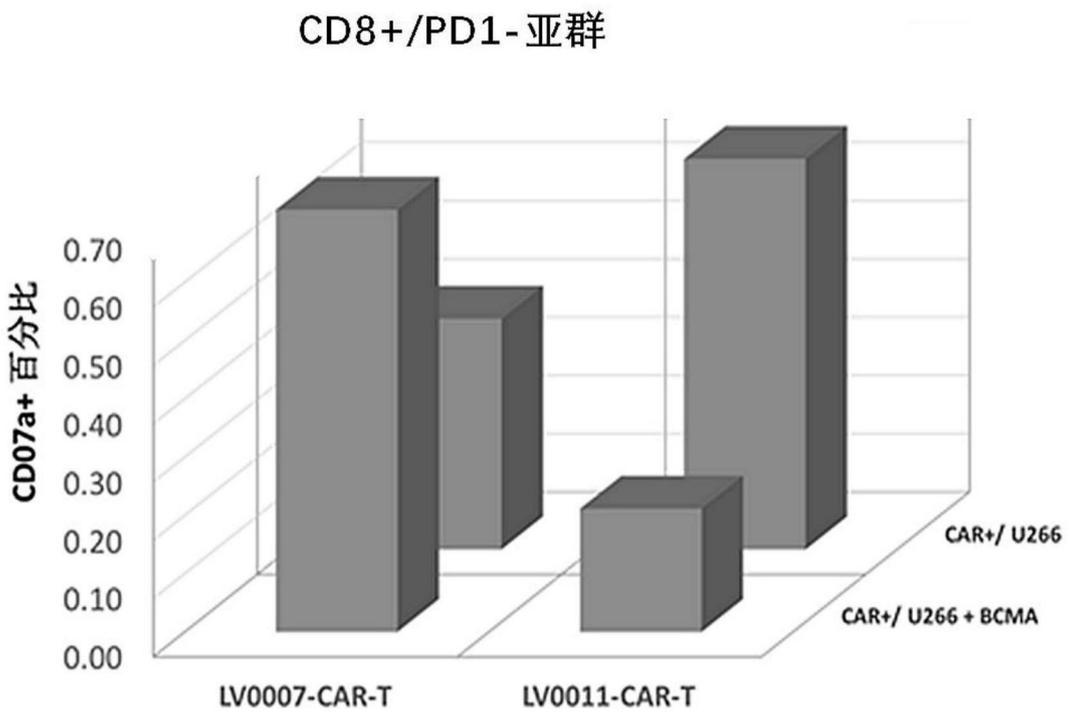


图9

细胞因子释放测定

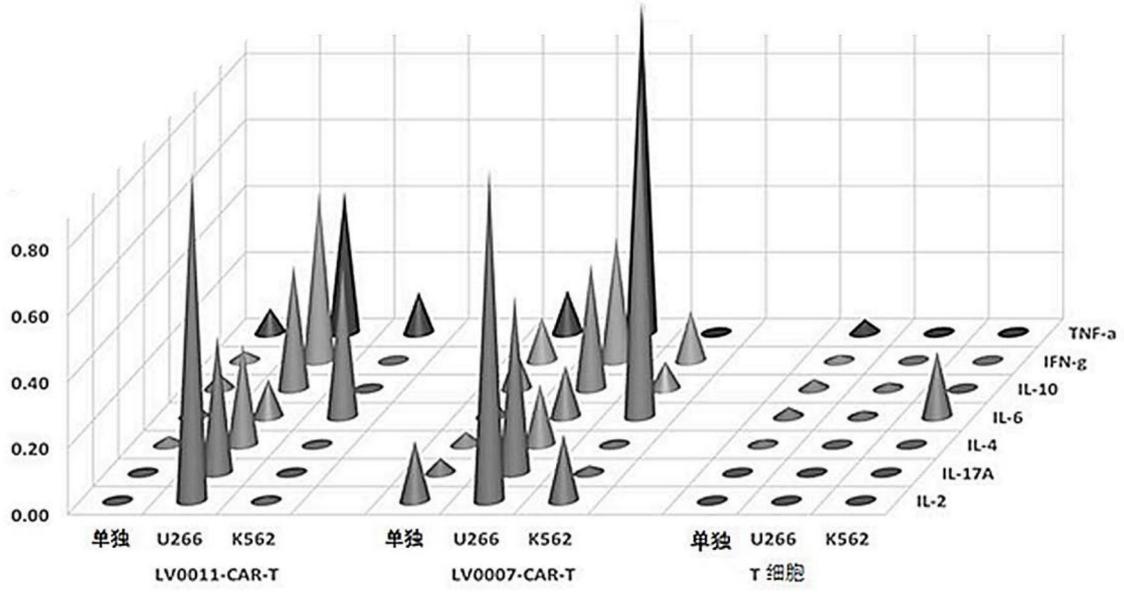


图10

CD8+ /PD1-/CAR+亚群

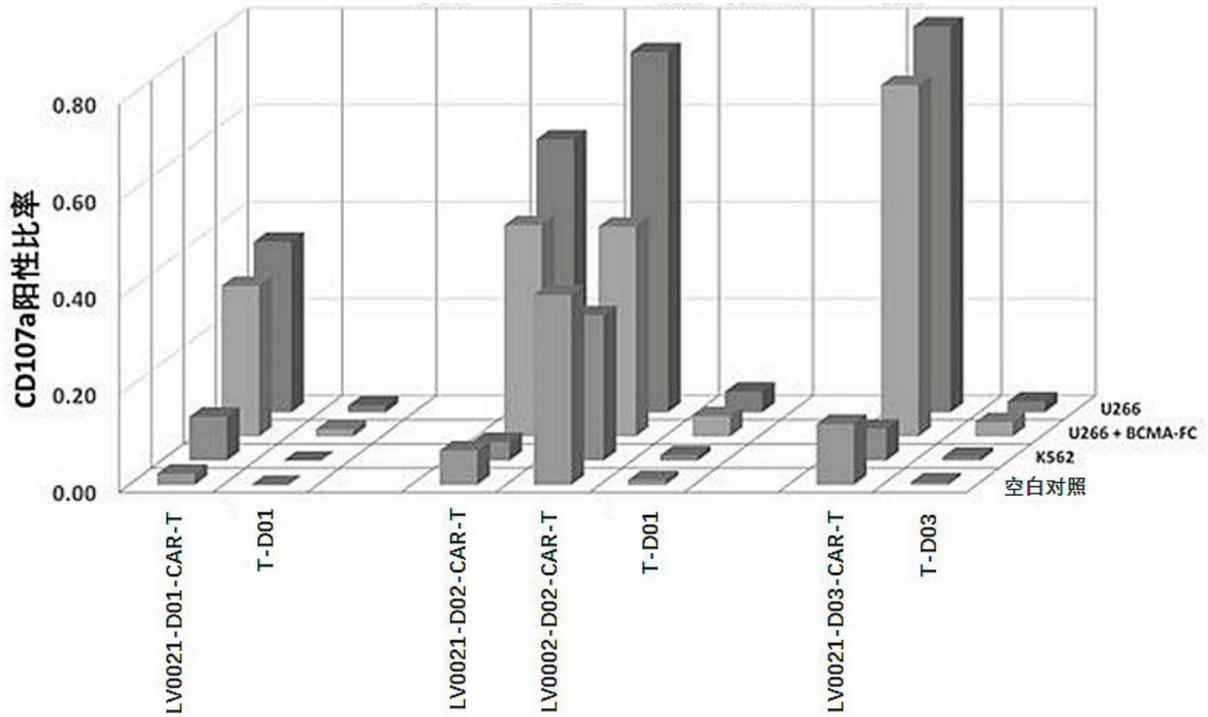


图11

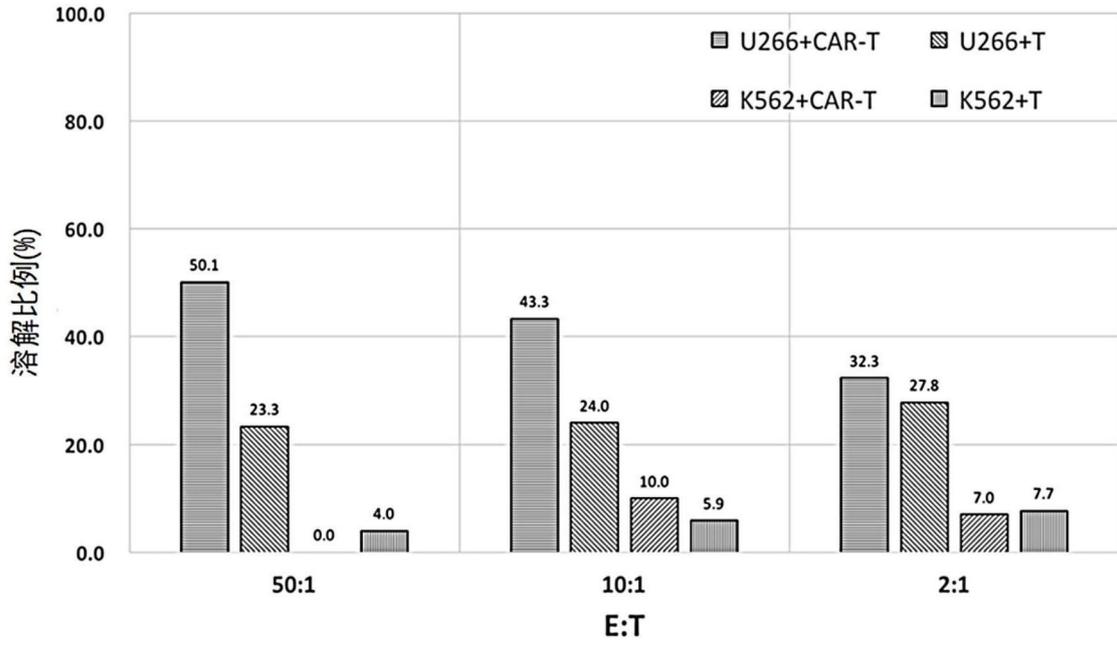


图12

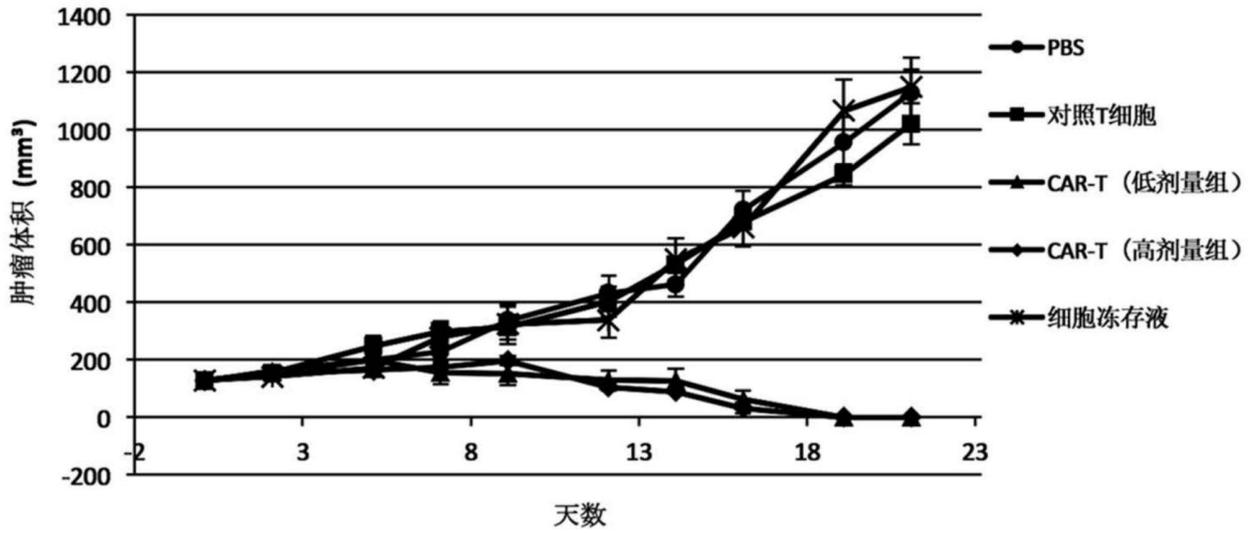


图13

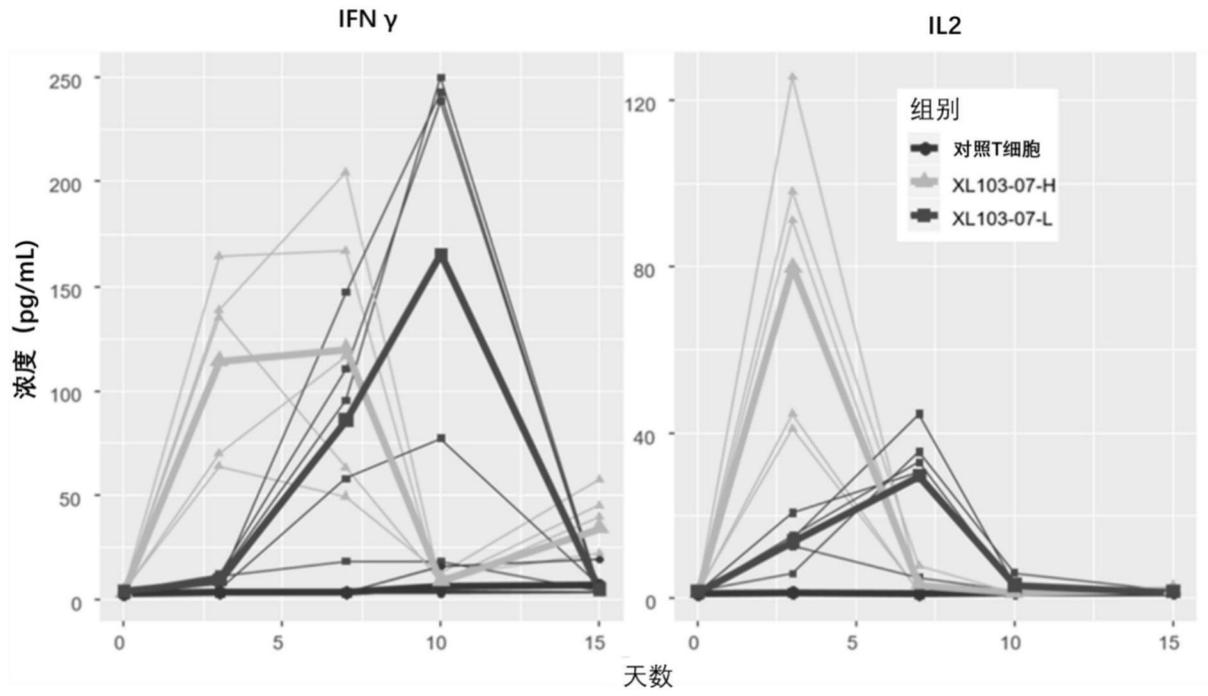


图14

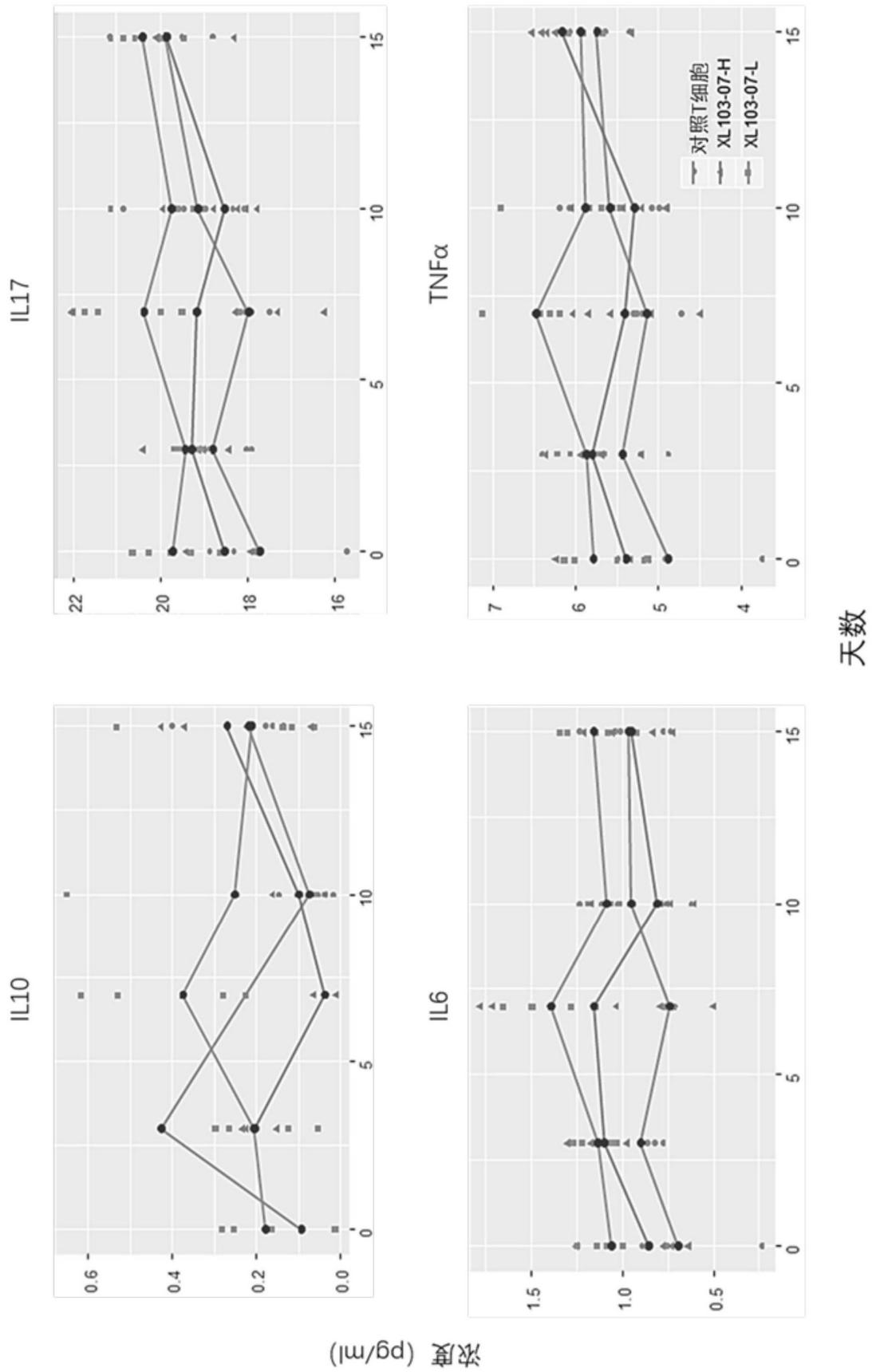


图15

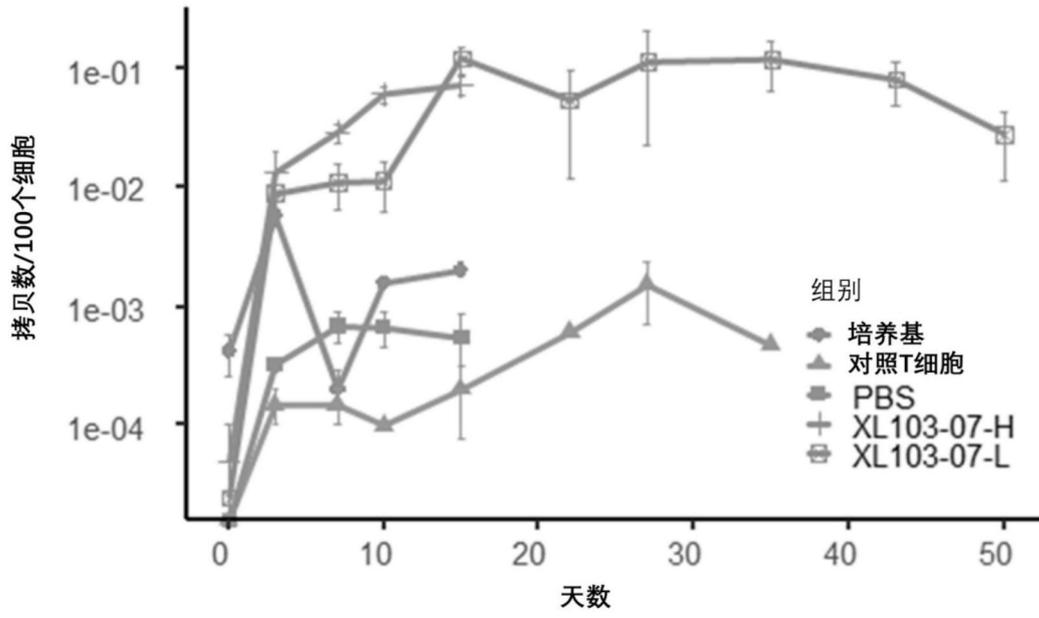


图16

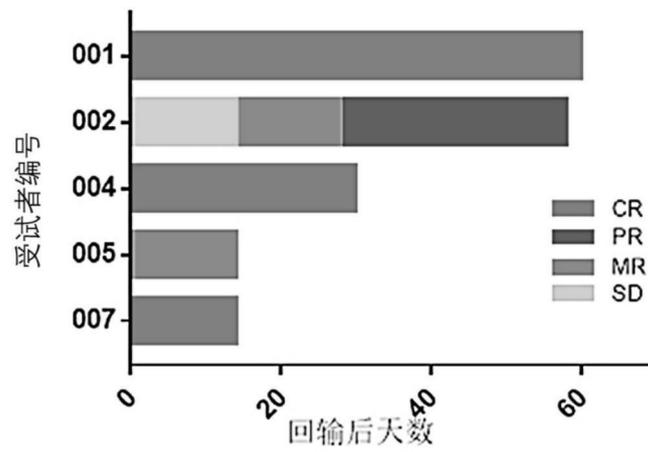


图17

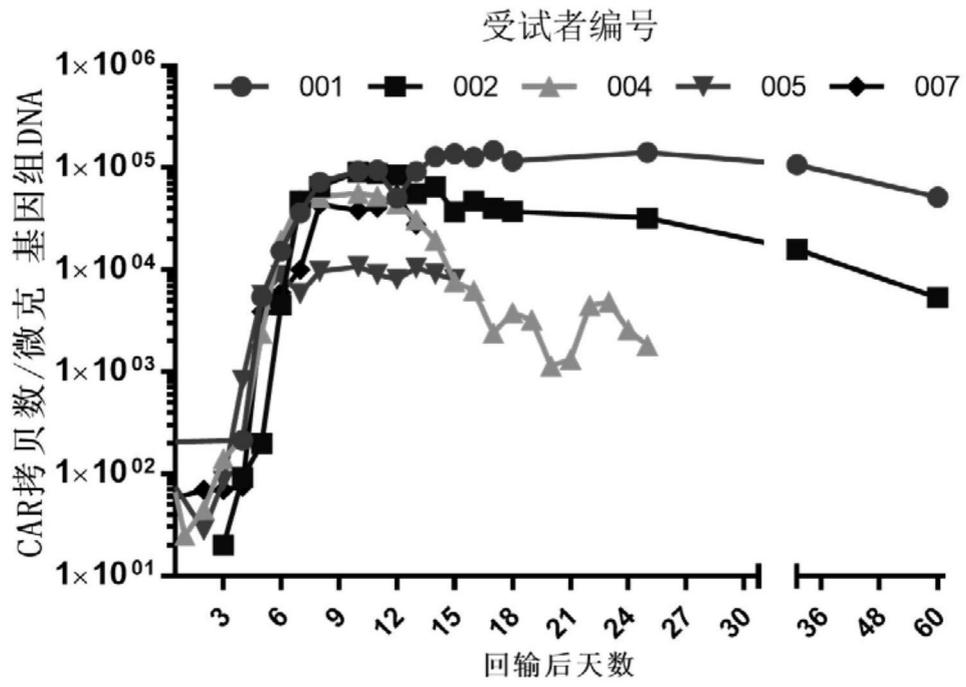


图18