

靶向 CLL1 的 CAR-T 细胞及其制备方法与应用

技术领域

5 本发明属于细胞免疫治疗技术领域，具体涉及靶向 CLL1 的 CAR-T 细胞及其制备方法与应用。

背景技术

急性髓细胞白血病（Acute Myeloid Leukemia, AML）是一种髓系造血干/祖细胞恶性疾病，长期以来，一直采用蒽环类和阿糖胞苷化疗来治疗轻度患者，使用造血干细胞移植来治疗中、高危患者。急性髓细胞白血病的异质性导致目前 AML 患者的治疗仍是一种挑战。近年来，研究人员发现，以 CLL1 为靶点的免疫靶向疗法治疗 AML 的效果显著。C 型凝集素样分子 1（C-type lectin-like molecule 1, CLL1）也称为 C 型凝集素结构域家族 12 成员 A（C-type lectin domain family 12 member A, CLEC12A），是一种 II 型跨膜糖蛋白，作为抑制性受体在免疫调节中发挥重要作用。CLL1 存在于外周血和骨髓的髓系细胞以及大部分 AML 细胞中，同时表达于多数 AML 的 CD34⁺CD38⁻干细胞上，正常人的 CD34⁺CD38⁻干细胞则不表达，CLL1 因其特殊的表达模式成为 AML 治疗和诊断的潜在靶点。此外，CLL1 还在骨髓增生异常综合征（Myelodysplastic Syndromes, MDS）和慢性髓细胞白血病（Chronic Myeloid Leukemia, CML，慢性粒细胞白血病）细胞上表达。

20 传统的放疗、化疗及造血干细胞移植治疗 AML 的有效率低，而 CAR-T 细胞疗法的出现使得治愈 AML 成为了可能。CAR-T 全称是 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy，即嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法。嵌合抗原受体技术是采用基因工程技术修饰免疫细胞，使其表达外源性抗肿瘤基因（CAR 基因），使得淋巴细胞等免疫细胞具有识别肿瘤细胞表面抗原的能力，并特异性识别和杀伤肿瘤细胞，没有组织相容复合体（MHC）的限制。CAR 的结构主要由细胞外识别肿瘤细胞表面抗原的结构域和细胞内信号转导结构域组成，细胞外的结构域用于特异性地识别肿瘤表面特异性蛋白（抗原），细胞内的结构域含有共刺激分子结构域，用于在识别肿瘤表面特异性蛋白（抗原）后启动淋巴细胞的免疫应答，针对特异性的靶细胞发挥细胞毒性的作用，从而杀伤靶细胞（肿瘤细胞）。目前，CAR-T 技术已经能够应用于临床医疗，并在全世界获得了诸多成功的临床案例，CAR-T 细胞治疗在 B 细胞等血液系统肿瘤中取得了令人鼓舞的疗效，但是髓系的抗原属性与 B 系有着本质的区别，正常髓系细胞被 CAR-T 杀灭会导致骨髓衰竭并且缺乏相应的替代治疗，这使得 AML 的 CAR-T 治疗进展一直非常缓慢。CAR-T 技术成功应用于 AML 还面临诸多挑战，因此，进一步深入研究和开发抗新型有效的 CAR-T 细胞、提高 CAR-T 细胞疗效对于 AML 的免疫细胞治疗具有重要的理论意义和临床应用价值。

发明概述

本发明的目的之一是提供一种用于治疗急性髓细胞白血病（AML）的靶向 CLL1 的 CAR-T 细胞。所要解决的技术问题不限于所描述的技术主题，本领域技术人员通过以下描述可以清楚地理解本文未提及的其它技术主题。

为了实现上述目的，本发明首先提供了 CAR-T 细胞，所述 CAR-T 细胞含有
5 嵌合抗原受体，所述嵌合抗原受体可包括单域抗体、铰链区、跨膜区和胞内信号区，所述单域抗体的氨基酸序列可为 SEQ ID No. 1 的第 22-150 位。

所述 CAR-T 细胞（即表达 CAR 的 T 细胞或 CAR 修饰的 T 细胞）可为靶向 CLL1 的 CAR-T 细胞，所述 CAR-T 细胞表达所述嵌合抗原受体。

进一步地，所述胞内信号区可包括共刺激结构域 4-1BB 和激活结构域 CD3 ζ ，
10 所述 4-1BB 的氨基酸序列可为 SEQ ID No. 1 的第 220-266 位，所述 CD3 ζ 的氨基酸序列可为 SEQ ID No. 1 的第 267-378 位。

进一步地，所述铰链区可为氨基酸序列是 SEQ ID No. 1 的第 151-195 位的 CD8a 铰链区，所述跨膜区可为氨基酸序列是 SEQ ID No. 1 的第 196-219 位的 CD8a 跨膜区。

15 进一步地，所述嵌合抗原受体名称可为 CLL1-VHH-16 CAR，可包括下述任一种：

A1) 氨基酸序列是 SEQ ID No. 1 的第 22-378 位所示的蛋白质；

A2) 将 SEQ ID No. 1 的第 22-378 位所示的氨基酸序列经过氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与 A1) 所示的蛋白质具有 80% 以上的同一性且具
20 有相同功能的蛋白质；

A3) 在 A1) 或 A2) 的 N 端和/或 C 端连接标签或信号肽得到的与 A1) 具有相同功能的融合蛋白质。

进一步地，A3) 中所述信号肽的氨基酸序列可为 SEQ ID No. 1 的第 1-21 位。

进一步地，所述嵌合抗原受体可包括下述任一种：

25 E1) 氨基酸序列是 SEQ ID No. 1 的蛋白质；

E2) 将 SEQ ID No. 1 所示的氨基酸序列经过氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与 E1) 所示的蛋白质具有 80% 以上的同一性且具有相同功能的蛋白质；

E3) 在 E1) 或 E2) 的 N 端和/或 C 端连接标签得到的与 E1) 具有相同功能的
30 的融合蛋白质。

本文所述标签包括但不限于：GST（谷胱甘肽巯基转移酶）标签蛋白、His6 标签蛋白（His-tag）、MBP（麦芽糖结合蛋白）标签蛋白、Flag 标签蛋白、SUMO 标签蛋白、HA 标签蛋白、Myc 标签蛋白、eGFP（增强型绿色荧光蛋白）、eCFP（增强型青色荧光蛋白）、eYFP（增强型黄绿色荧光蛋白）、mCherry（单体红
35 色荧光蛋白）或 AviTag 标签蛋白。

本领域普通技术人员可以很容易地采用已知的方法，例如定向进化或点突变的方法，对本发明的编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列进行突变。那些经

过人工修饰的、具有与本发明所述嵌合抗原受体的核苷酸序列 75%或者更高同一性的核苷酸，只要编码所述嵌合抗原受体且具有所述嵌合抗原受体的功能，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。

本文中任一所述的嵌合抗原受体也在本发明的保护范围内。

- 5 所述嵌合抗原受体自 N-末端至 C-末端依次可包含所述信号肽、所述单域抗体、所述铰链区、所述跨膜区、所述共刺激结构域和所述激活结构域。

本发明还提供了生物材料，所述生物材料可为下述任一种：

- B1) 编码本文中任一所述的嵌合抗原受体的核酸分子；
B2) 含有 B1) 所述核酸分子的表达盒；
10 B3) 含有 B1) 所述核酸分子的重组载体、或含有 B2) 所述表达盒的重组载体；
B4) 含有 B1) 所述核酸分子的重组微生物、或含有 B2) 所述表达盒的重组微生物、或含有 B3) 所述重组载体的重组微生物。

上述生物材料中，B1) 所述核酸分子可为下述任一种：

- 15 C1) 核苷酸序列或编码序列是 SEQ ID No. 2 的第 64-1134 位所示的 DNA 分子；
C2) 与 C1) 限定的核苷酸序列具有 75%或 75%以上同一性，且具有相同功能的 DNA 分子；
C3) 核苷酸序列或编码序列是 SEQ ID No. 2 的 DNA 分子；
20 C4) 与 C3) 限定的核苷酸序列具有 75%或 75%以上同一性，且具有相同功能的 DNA 分子。

- 在本发明的一个实施方案中，所述嵌合抗原受体名称为 CLL1-VHH-16 CAR，自 N-末端至 C-末端依次为信号肽 (Signal)、单域抗体 (CLL1-VHH-16)、CD8a 铰链区 (Hinge)、CD8a 跨膜区、共刺激结构域 4-1BB 和激活结构域 CD3 ζ (图 1)。其中，单域抗体为特异性结合 CLL1 蛋白的单域抗体 CLL1-VHH-16，单域抗体 CLL1-VHH-16 是 CAR 的胞外抗原结合区，负责识别并结合肿瘤表面抗原 CLL1；抗原结合区的前面 (N 端) 带有一段信号肽 (Signal)，用于引导抗原结合区的肽链转移到细胞外，从而识别肿瘤细胞表面抗原 CLL1；CD8a 铰链区 (Hinge) 是 CAR 位于细胞外的一段肽链，连接胞外抗原结合区和 CD8a 跨膜区；CD8a 跨膜区用于将单域抗体 (CLL1-VHH-16) 锚定在细胞膜上；胞内信号区包括共刺激结构域 4-1BB 和激活结构域 CD3 ζ ，用于协同刺激 T 细胞，活化细胞内信号，使 T 细胞能够持续增殖并释放细胞因子，提高 T 细胞的抗肿瘤能力，同时发挥 T 细胞信号转导功能，促进更强大和持久的 T 细胞反应。

- 30 所述 CLL1-VHH-16 CAR 氨基酸序列如 SEQ ID No. 1 所示，SEQ ID No. 1 的第 1-21 位为信号肽 (Signal) 的氨基酸序列；SEQ ID No. 1 的第 22-150 位为单域抗体 (CLL1-VHH-16) 的氨基酸序列；SEQ ID No. 1 的第 151-195 位为 CD8a 铰链区 (Hinge) 的氨基酸序列；SEQ ID No. 1 的第 196-219 位为 CD8a 跨膜区的氨基

酸序列；SEQ ID No. 1 的第 220-266 位为共刺激结构域 4-1BB 的氨基酸序列；SEQ ID No. 1 的第 267-378 位为激活结构域 CD3 ζ 的氨基酸序列。

所述 CLL1-VHH-16 CAR 的编码基因为 CLL1-VHH-16 CAR 基因，其核苷酸序列如 SEQ ID No. 2 所示，SEQ ID No. 2 的第 1-63 位为信号肽（Signal）的核苷酸序列；SEQ ID No. 2 的第 64-450 位为单域抗体（CLL1-VHH-16）的核苷酸序列；SEQ ID No. 2 的第 451-585 位为 CD8a 铰链区（Hinge）的核苷酸序列；SEQ ID No. 2 的第 586-657 位为 CD8a 跨膜区的核苷酸序列；SEQ ID No. 2 的第 658-798 位为共刺激结构域 4-1BB 的核苷酸序列；SEQ ID No. 2 的第 799-1134 位为激活结构域 CD3 ζ 的核苷酸序列。

10 上述 75% 或 75% 以上同一性，可为 80%、85%、90% 或 95% 以上的同一性。

所述 80% 以上的同一性可为至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。所述 85% 以上的同一性可为至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。所述 90% 以上的同一性可为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。所述 95% 以上的同一性可为至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。

本文中，同一性是指氨基酸序列或核苷酸序列的同一性。可使用国际互联网上的同源性检索站点测定氨基酸序列的同一性，如 NCBI 主页网站的 BLAST 网页。例如，可在高级 BLAST2.1 中，通过使用 blastp 作为程序，将 Expect 值设置为 10，将所有 Filter 设置为 OFF，使用 BLOSUM62 作为 Matrix，将 Gap existence cost，Per residue gap cost 和 Lambda ratio 分别设置为 11，1 和 0.85（缺省值）并进行检索以对氨基酸序列的同一性进行计算，然后即可获得同一性的值（%）。

25 本文所述载体是指能够把外源 DNA 或目的基因运载进入宿主细胞进行扩增和表达的载体，所述载体可以是克隆载体也可以是表达载体，包括但不限于：质粒、噬菌体（如 λ 噬菌体或 M13 丝状噬菌体等）、黏粒（即柯斯质粒）、病毒载体（如杆状病毒载体、逆转录病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒或疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）等）。在本发明的一个或多个实施方案中，所述载体为 pUC57 载体和/或逆转录病毒载体 MP71。

35 本文所述微生物可为细菌、酵母、藻或真菌。其中，细菌可来自埃希氏菌属（*Escherichia sp.*）、欧文氏菌属（*Erwinia sp.*）、土壤杆菌属（*Agrobacterium sp.*）、黄杆菌属（*Flavobacterium sp.*）、产碱菌属（*Alcaligenes sp.*）、假单胞菌属（*Pseudomonas sp.*）、芽胞杆菌属（*Bacillus sp.*）等但不限于此。所述酵母可来自酿酒酵母（*Saccharomyces sp.*）、毕赤酵母（*Pichia sp.*）、耶氏酵母（*Yarrowia sp.*）、假丝酵母（*Candida sp.*）、裂殖酵母（*Schizosaccharomyces sp.*）、汉逊酵母（*Hansenula sp.*）、克鲁维酵母（*Kluyveromyces sp.*）等但不

限于此。所述藻可来自墨角藻属 (*Fucus sp.*)、曲壳藻属 (*Achnanthes sp.*)、
蜇形藻属 (*Amphiprora sp.*)、双眉藻属 (*Amphora sp.*)、纤维藻属 (*Ankistrodesmus*
sp.)、星胞藻属 (*Asteromonas sp.*)、黄金色藻属 (*Boekelovia sp.*) 等但不限
于此。所述真菌可来自镰刀菌属 (*Fusarium sp.*)、丝核菌属 (*Rhizoctonia sp.*)、
5 轮枝菌属 (*Verticillium sp.*)、青霉属 (*Penicillium sp.*)、曲霉属 (*Aspergillus*
sp.)、头孢霉属 (*Cephalosporium sp.*) 等但不限于此。在本发明的一个或多个
实施方案中, 所述微生物为大肠杆菌 DH5 α 。

本文所述重组载体是指将外源目的基因与载体在体外连接构建而成的重组
载体 DNA 分子, 可以任何合适的方式构建, 只要构建的重组载体可携带外源目
10 的基因进入受体细胞、并为外源目的基因提供在受体细胞内的复制、整合、扩
增和/或表达能力即可。在本发明的一个或多个实施方案中, 所述重组载体为重
组逆转录病毒载体 MP71-CLL1-VHH-16 CAR。

所述重组逆转录病毒载体 MP71-CLL1-VHH-16 CAR 是将逆转录病毒载体 MP71
的 *NotI* 和 *EcoRI* 识别位点间的片段 (小片段) 替换为核苷酸序列是序列表中 SEQ
15 ID No. 2 的 DNA 片段, 保持逆转录病毒载体 MP71 的其他核苷酸序列不变, 得到
的重组表达载体。

本文所述重组微生物是指对目的微生物的基因进行操作和修饰, 从而得到
功能发生变化的微生物, 如将外源目的基因或重组载体导入目的微生物后得到
的重组微生物, 或直接对目的微生物的内源基因进行基因编辑后得到的重组微
20 生物。在本发明的一个或多个实施方案中, 所述重组微生物为将所述重组逆
录病毒载体 MP71-CLL1-VHH-16 CAR 导入大肠杆菌 DH5 α 得到的重组菌, 其含有
SEQ ID No. 2 所示的 DNA 分子。

本文所述 CAR-T 细胞是通过基因工程体外重组的方法将构建的嵌合抗原受
体 (Chimeric Antigen Receptor, CAR) 基因转入 T 细胞中稳定表达而得到的
25 重组细胞。进一步地, 本文所述 CAR-T 细胞可为将 CLL1-VHH-16 CAR 基因 (SEQ
ID No. 2) 转入 T 细胞中稳定表达而得到的 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞。

具体地, 所述 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞可为将所述重组逆转录病毒载体
MP71-CLL1-VHH-16 CAR 通过包装细胞包装得到重组逆转录病毒后, 将所述重组
逆转录病毒导入 T 细胞得到的重组细胞, 所述包装细胞可为 Phoenix Ecotropic
30 (EC0) 细胞和 PG13 细胞。

所述 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞含有和/或表达 CLL1-VHH-16 CAR 基因 (SEQ ID
No. 2)。

本文所述 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞具有下述至少任一特性:

- 35 F1) 分泌特异性效应分子 IFN- γ ;
F2) 特异性杀伤 CLL1⁺肿瘤细胞;
F3) 抑制 CLL1⁺肿瘤细胞增殖。

本发明还提供了所述嵌合抗原受体 CLL1-VHH-16 CAR 在制备所述

CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞中的应用。

本发明还提供了药物组合物，所述药物组合物可含有本文中任一所述的 CAR-T 细胞。

所述药物组合物用于预防或治疗 CLL1 靶点相关疾病。

5 进一步地，所述药物组合物还可包括一种或者多种药学上可接受的载体。

进一步地，所述药学上可接受的载体可为赋形剂、稳定剂、悬浮剂或稀释剂等，是本领域的技术人员所周知的。

本发明还提供了本文中任一所述的 CAR-T 细胞，或所述嵌合抗原受体，或所述生物材料，或所述药物组合物的下述任一种应用：

10 D1) 在制备用于预防或治疗肿瘤的药物中的应用，或在预防或治疗肿瘤中的应用；

D2) 在制备用于预防或治疗 CLL1 靶点相关疾病的药物中的应用，或在预防或治疗 CLL1 靶点相关疾病中的应用。

15 进一步地，上述应用中，所述 CLL1 靶点相关疾病可为 CLL1 阳性癌症（即表达 CLL1 的癌症）。

进一步地，所述 CLL1 阳性癌症可为急性髓细胞白血病（Acute Myeloid Leukemia, AML）、骨髓增生异常综合征（Myelodysplastic Syndromes, MDS）或慢性髓细胞白血病（Chronic Myeloid Leukemia, CML，慢性粒细胞白血病）。

20 本发明还提供了制备本文中任一所述 CAR-T 细胞的方法，所述方法可包括：将本文中任一所述的核酸分子转入 T 细胞中稳定表达，得到所述 CAR-T 细胞。

进一步地，所述方法可包括如下步骤：

（1）将 CLL1-VHH-16 CAR 基因（SEQ ID No. 2）构建到逆转录病毒载体 MP71 的 *NotI* 和 *EcoRI* 识别位点间，得到重组逆转录病毒载体 MP71-CLL1-VHH-16 CAR；

25 （2）将所述重组逆转录病毒载体 MP71-CLL1-VHH-16 CAR 导入包装细胞进行包装，得到重组逆转录病毒；

（3）将所述重组逆转录病毒感染人的 T 细胞，得到重组细胞，即 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞。

进一步地，所述包装细胞可为 Phoenix Ecotropic (ECO) 细胞和 PG13 细胞。

30 本发明还提供了预防或治疗 CLL1 靶点相关疾病的方法，所述方法可包括向患有 CLL1 靶点相关疾病的受试者施用本文中任一所述的 CAR-T 细胞或所述药物组合物。

进一步地，所述 CLL1 靶点相关疾病可为 CLL1 阳性癌症。

进一步地，所述 CLL1 阳性癌症可为急性髓细胞白血病、骨髓增生异常综合征或慢性髓细胞白血病。

35 本文所述 CLL1 为 C 型凝集素样分子 1 (C-type lectin-like molecule 1) 也称为 C 型凝集素结构域家族 12 成员 A (C-type lectin domain family 12 member A, CLEC12A)，是一种 II 型跨膜糖蛋白，作为抑制性受体在免疫调节中发挥重

要作用。CLL1 存在于外周血和骨髓的髓系细胞以及大部分急性髓细胞白血病（Acute Myeloid Leukemia, AML）细胞中，同时表达于多数 AML 的 CD34⁺CD38⁻干细胞上，正常人的 CD34⁺CD38⁻干细胞则不表达，CLL1 因其特殊的表达模式成为 AML 治疗和诊断的潜在靶点。

- 5 本发明设计了具有新颖结构的靶向 CLL1 的 CAR-T 细胞（CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞），实验证明，本发明的 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞能够很好地分泌 T 细胞特异性效应分子 IFN- γ ，有效地特异性杀伤 CLL1⁺靶细胞，具有良好的体内杀瘤活性，不仅可以显著抑制肿瘤细胞在小鼠体内的增殖，还能显著延长小鼠的生存时间。本发明的 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞抗肿瘤能力好，可用于 CLL1 靶点相关疾病（如急性髓细胞白血病、骨髓增生异常综合征或慢性髓细胞白血病）的免疫治疗，具有广阔的临床应用前景。
- 10

附图说明

- 图 1 为 CLL1-VHH-16 CAR 分子结构示意图。
- 图 2 为 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞中 CAR 表达检测。
- 15 图 3 为 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞分泌 IFN- γ 的细胞功能检测。
- 图 4 为 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞的细胞毒作用检测。
- 图 5 为 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞的体内杀瘤活性检测。

本发明的实施方式

- 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述，给出的实施例仅为
- 20 了阐明本发明，而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南，并不以任何方式构成对本发明的限制。

- 下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。下述实施例中所用的材料、
- 25 试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

- 下述实施例中的逆转录病毒载体 MP71 记载于如下文献中：Engels B, Cam H, et al. Retroviral Vectors for High-Level Transgene Expression in T Lymphocytes [J]. Human Gene Therapy, 2003, 14(12):1155-1168.，公众可从
- 30 申请人处获得该生物材料，该生物材料只为重复本发明的实验所用，不可作为其它用途使用。

下述实施例中的外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)来源于健康志愿者的静脉血。

下述实施例中的 U937 细胞（CLL1 阳性细胞）为急性髓细胞白血病细胞，北京百欧博伟生物技术有限公司产品，货号 bio-73180。

- 35 **实施例 1、嵌合抗原受体（CAR）的结构和序列**

本实施例设计构建的嵌合抗原受体（CAR）名称为 CLL1-VHH-16 CAR，自 N-末端至 C-末端依次为信号肽（Signal）、单域抗体（CLL1-VHH-16）、CD8a 铰链

区 (Hinge)、CD8a 跨膜区、共刺激结构域 4-1BB 和激活结构域 CD3 ζ (图 1)。

其中,单域抗体为特异性结合 CLL1 蛋白的单域抗体 CLL1-VHH-16,单域抗体 CLL1-VHH-16 是 CAR 的胞外抗原结合区,负责识别并结合肿瘤表面抗原 CLL1;抗原结合区的前面 (N 端) 带有一段信号肽 (Signal),用于引导抗原结合区的肽链转移到细胞外,从而识别肿瘤细胞表面抗原 CLL1;CD8a 铰链区 (Hinge) 是 CAR 位于细胞外的一段肽链,连接胞外抗原结合区和 CD8a 跨膜区;CD8a 跨膜区用于将单域抗体 (CLL1-VHH-16) 锚定在细胞膜上;胞内信号区包括共刺激结构域 4-1BB 和激活结构域 CD3 ζ ,用于协同刺激 T 细胞,活化细胞内信号,使 T 细胞能够持续增殖并释放细胞因子,提高 T 细胞的抗肿瘤能力,同时发挥 T 细胞信号转导功能,促进更强大和持久的 T 细胞反应。

上述设计的 CLL1-VHH-16 CAR 氨基酸序列如 SEQ ID No. 1 所示,SEQ ID No. 1 的第 1-21 位为信号肽 (Signal) 的氨基酸序列;SEQ ID No. 1 的第 22-150 位为单域抗体 (CLL1-VHH-16) 的氨基酸序列;SEQ ID No. 1 的第 151-195 位为 CD8a 铰链区 (Hinge) 的氨基酸序列;SEQ ID No. 1 的第 196-219 位为 CD8a 跨膜区的氨基酸序列;SEQ ID No. 1 的第 220-266 位为共刺激结构域 4-1BB 的氨基酸序列;SEQ ID No. 1 的第 267-378 位为激活结构域 CD3 ζ 的氨基酸序列。

CLL1-VHH-16 CAR 的编码基因为 CLL1-VHH-16 CAR 基因,其核苷酸序列如 SEQ ID No. 2 所示,SEQ ID No. 2 的第 1-63 位为信号肽 (Signal) 的核苷酸序列;SEQ ID No. 2 的第 64-450 位为单域抗体 (CLL1-VHH-16) 的核苷酸序列;SEQ ID No. 2 的第 451-585 位为 CD8a 铰链区 (Hinge) 的核苷酸序列;SEQ ID No. 2 的第 586-657 位为 CD8a 跨膜区的核苷酸序列;SEQ ID No. 2 的第 658-798 位为共刺激结构域 4-1BB 的核苷酸序列;SEQ ID No. 2 的第 799-1134 位为激活结构域 CD3 ζ 的核苷酸序列。

实施例 2、CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞的制备

本实施例制备的 CAR-T 细胞是将实施例 1 中的 CLL1-VHH-16 CAR 基因 (SEQ ID No. 2) 转入 T 细胞中稳定表达,得到表达 CLL1-VHH-16 CAR 基因的 T 细胞,命名为 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞,具体步骤如下:

2-1、构建重组逆转录病毒载体

(1) 用 *NotI* (NEB) 和 *EcoRI* (NEB) 双酶切重组载体 pUC57-CLL1-VHH-16 CAR,切胶回收目的基因片段。其中重组载体 pUC57-CLL1-VHH-16 CAR 是将 CLL1-VHH-16 CAR 基因 (SEQ ID No. 2) 克隆在 pUC57 载体上得到的重组载体,由擎科生物科技有限公司合成提供。

(2) 用 *NotI* 和 *EcoRI* 双酶切逆转录病毒载体 MP71,切胶回收载体大片段。

(3) 用 T4 连接酶 (NEB) 连接上述目的基因片段和载体大片段,即得到携带 CLL1-VHH-16 CAR 基因的重组逆转录病毒载体 MP71-CLL1-VHH-16 CAR。

(4) 将重组逆转录病毒载体 MP71-CLL1-VHH-16 CAR 转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,使用 Qiagen 公司的质粒纯化试剂盒提取并纯化质粒,得到 MP71-CLL1-VHH-16 CAR 质粒。

- 重组逆转录病毒载体 MP71-CLL1-VHH-16 CAR (即 MP71-CLL1-VHH-16 CAR 质粒)
- 5 是将逆转录病毒载体 MP71 的 *NotI* 和 *EcoRI* 识别位点间的片段(小片段)替换为核苷酸序列是序列表中 SEQ ID No. 2 的 DNA 片段,保持逆转录病毒载体 MP71 的其他核苷酸序列不变,得到的重组表达载体。

2-2、逆转录病毒包装

- 将步骤 2-1 中制备的 MP71-CLL1-VHH-16 CAR 质粒导入包装细胞进行包装,完成病毒装配,得到逆转录病毒。病毒包装具体步骤如下:
- 10

a) 第 1 天: Phoenix Ecotropic (ECO) 细胞应是小于 20 代、不过分长满的。以 0.6×10^6 /ml 的细胞密度铺板, 10 cm 皿添加 10 mL DMEM 培养基,充分混匀细胞, 37°C 培养过夜;

- b) 第 2 天: ECO 细胞融合度达到 90% 左右进行转染(通常是铺板 14-18 h 左右); 准备质粒 12.5 μ g, 1.25 M CaCl_2 250 μ L, H_2O 1 mL, 总体积为 1.25 mL; 在另一个管里添加跟质粒复合物等体积的 2 $\times$ HBS, 边加质粒复合物边涡旋震荡 20 s。温柔地将混合物沿着边加入到 ECO 皿中, 37°C 培养 4 h, 去除培养基, PBS 洗一遍, 重新加入预热的新鲜培养基;
- 15

- c) 第 4 天: 转染 48 h 后收集上清, 用 0.45 μ m 滤器过滤即得到逆转录病毒溶液, 分装保存于 -80°C;
- 20

d) NTC 6 孔板中每孔加入 1.2 mL 15 μ g/mL 的 Retronectin 包板溶液, 4°C 过夜;

e) 小心吸去封闭液, 加入 2 mL/孔 PBS 洗涤, 每孔加入 5 mL 上述病毒溶液, 32°C、2000 $\times$ g 离心 2 h, 吸弃未结合的病毒上清;

- f) 取对数期 PG13 细胞用 10 mL PBS 润洗一次, 加入 1 mL 0.25% 的重组胰酶, 室温静置 2-3 min;
- 25

g) 加入 5 ml 含 10% FBS 的完全培养基, 终止消化, 1500 rpm 离心 5 min;

h) 弃上清, 用完全培养基调整细胞密度为 0.5×10^5 cell/mL, 按照 3 mL/孔加入上述病毒包板过的 NTC 6 孔板中, 使最终细胞数为 1.5×10^5 cell/孔;

- i) 1000 rpm 离心 1 min, 37°C、5% CO_2 培养 48 h;
- 30

j) 传代 1~2 代后转到 T175 培养瓶中用含 12% FBS 的 DEME 培养基培养 2 d;

k) 更换新的含 12% FBS 的 DEME 培养基继续培养 48 h 后收集上清, 用 0.45 μ m 滤器过滤即得到逆转录病毒溶液, 分装保存于 -80°C。

2-3、逆转录病毒感染人的 T 细胞

- a) 复苏冻存的健康人外周血 PBMC, 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培养基调整细胞密度为 1×10^6 - 2×10^6 个细胞/mL。
- 35

b) Ficoll 分离液 (天津灏洋) 收集 PBMC, 磁珠法分离获得 CD3⁺T 细胞, 按磁珠:CD3⁺细胞=3:1 加入临床级 Dynabeads Human T Expander CD3/CD28 磁珠 (Invitrogen) 活化 T 细胞。

c) T 细胞活化后第二天, 用 PBS 稀释至终浓度为 15 μ g/mL 的 RetroNectin (TAKARA) 包被非组织处理培养板, 6 孔板每孔 1.2 mL。避光, 4℃过夜备用。

d) T 细胞活化培养两天后, 取出包被好的 6 孔板, 吸弃包被液, 加入 PBS 洗板一次。

e) 步骤 2-2 中制备的逆转录病毒溶液加入孔内, 每孔加 5-6 mL, 32℃、2000 $\times$ g 离心 2 h。每孔加入含 hIL-2 (500 U/mL) 的新鲜完全培养基 3 mL, 继续培养 1 天。

f) 细胞感染后, 每天观察细胞的密度, 适时补加含 100 U/mL IL-2 的 T 细胞培养液, 使 T 细胞的密度维持在 5×10^5 /mL 左右, 便于细胞扩增。

g) 由此获得感染了步骤 2-2 中制备的逆转录病毒的 CAR-T 细胞, 命名为 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞 (即表达核苷酸序列为 SEQ ID No.2 的 CLL1-VHH-16 CAR 基因的 T 细胞)。

构建好的 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞和 CTR T 细胞 (即无病毒转染的 T 细胞, 作为对照) 采用含 10%胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培养基于 37℃培养, 并记为 D0 天, 培养至 D10 天进行各项功能检测。

实施例 3、CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞中 CAR 表达检测

构建的 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞含有核苷酸序列是 SEQ ID No.2 的 CLL1-VHH-16 CAR 基因, 表达氨基酸序列是 SEQ ID No.1 的嵌合抗原受体 CLL1-VHH-16 CAR, 其 CAR 表达检测步骤如下:

1、细胞离心 (1500 rpm $\times$ 5 min) 后弃上清, 96孔圆形底板中每孔加入200 μ L FACS buffer (1 $\times$ PBS含0.1% NaN₃和2% FBS) 重悬, 1500 rpm离心5 min;

2、每孔加入60 μ L配制好的荧光标记抗人CD4-APC Cy7/CLL1-FITC重悬混匀, 4℃孵育30 min;

3、每孔加入200 μ L FACS buffer, 1500 rpm离心5 min;

4、弃上清, 用 400 μ L FACS buffer 重悬细胞转移至流式读数管中, 流式细胞仪 (BDCanto-II) 读取细胞, 分析 CLL1 抗体在 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞中的百分比。

检测结果如图 2 所示, CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞能够很好地表达 CLL1 抗体 (即单域抗体 CLL1-VHH-16), 说明 CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞中 CAR 分子的表达达到预期设计。

实施例 4、CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞分泌特异性效应分子 IFN- γ 的功能检测

1、受试细胞CLL1-VHH-16 CAR-T细胞和CTR T细胞 (即无病毒转染的T细胞, 作为对照) 调整细胞密度至 2×10^6 个/mL, 取100 μ L加入96孔U底板, 以受试细胞:靶细胞=1:1的比例加入U937细胞, 每孔加入终浓度为5 μ g/mL的Brefeldin A (Med Chem Express, HY-16592), 置于37℃培养箱孵育6小时。

CTR+U937: 每孔1 mL共 1×10^6 个无病毒转染的T细胞(CTR T细胞)中加入1 mL共 1×10^6 个U937细胞;

CLL1-VHH-16 CAR-T+U937: 每孔1 mL共 1×10^6 个CLL1-VHH-16 CAR-T细胞中加入1 mL共 1×10^6 个U937细胞;

5 2、孵育完成后进行流式细胞染色, 操作步骤如下:

(1) 细胞离心(1500 rpm $\times$ 5 min)后弃上清, 每孔加入200 μ L FACS buffer (1 $\times$ PBS含0.1% NaN₃和2% FBS)重悬, 1500 rpm离心5 min, 重复此步骤2次;

(2) 每孔加入60 μ L配制好的荧光标记的CLL1(rp)-PE重悬混匀, 避光、室温孵育10 min;

10 (3) 每孔加入200 μ L FACS buffer, 1500 rpm离心5 min后弃上清;

(4) 每孔加入150 μ L Cytofix/Cytoperm (BD公司, 货号55472)重悬混匀, 避光、室温孵育15 min;

(5) 1500 rpm离心5 min弃上清后, 每孔加入200 μ L Perm/Wash buffer (BD 公司, 货号554723)重悬混匀, 1500 rpm离心5 min, 离心洗涤2次;

15 (6) 每孔加入20 μ L稀释的APC标记的抗人IFN- γ (Biolegend, 货号506510)重悬混匀, 避光、室温孵育20 min;

(7) 每孔加入200 μ L Perm buffer, 1500 rpm离心5 min。弃上清后, 用400 μ L FACS buffer重悬细胞并转移至流式读数管中, 用流式细胞仪(BD Canto-II)读取细胞, 分析功能效应分子IFN- γ 在CLL1-VHH-16 CAR-T细胞和对照细胞中的百分比。

检测结果如图3所示, 与U937靶细胞共培养后, CLL1-VHH-16 CAR-T细胞能够很好地分泌T细胞特异性效应分子IFN- γ 。

实施例5、CLL1-VHH-16 CAR-T细胞的细胞毒作用检测

1、效应细胞CLL1-VHH-16 CAR-T细胞和CTR T细胞(即无病毒转染的T细胞, 25 作为对照)调整细胞密度至 2×10^5 个/mL, 取100 μ L加入96孔U底板中; 加入终浓度为100 μ g/mL的D-萤火虫荧光素钠盐(Yeasen Biotechnology, 货号40901ES08, 储存浓度为100 mg/mL), 重复3孔;

2、按不同的效靶比率(9:1、3:1、1:1、1:3)分别加入靶细胞U937-luc(1:1条件下靶细胞的细胞密度为 2×10^4 个细胞), 37 $^{\circ}$ C培养16 h。

30 3、用TECAN spark酶标仪测量荧光数值, 取三个重复孔的平均值计算CLL1-VHH-16 CAR-T细胞的特异性杀伤活性(Cytotoxicity):

$$\text{Specific lysis \%} = 100 - 100 \times (\text{Eexp} - \text{Emin}) / (\text{Tmax} - \text{Tmin})$$

Eexp: 效应细胞和靶细胞共培养时的RLU数值;

Emin: 无细胞的情况下, 效应细胞的自发死亡RLU数值;

35 Tmax: 无效应细胞的情况下, 靶细胞的自发死亡RLU数值;

Tmin: 最大杀伤率条件下的RLU数值。

检测结果如图4所示, CLL1-VHH-16 CAR-T细胞能够有效地特异性杀伤CLL1⁺

靶细胞（U937 细胞），而对照 CTR T 细胞对 CLL1⁺靶细胞无杀伤作用。

实施例 6、CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞的体内杀瘤活性检测

- 1、8 只雌性 NSG 小鼠（上海南方模式生物科技股份有限公司，目录号 NM-NSG-001，8~10 周龄），每只小鼠尾静脉接种 2.0×10^6 个 U937-Luc-GFP 细胞；
- 5 2、接种 6 天后随机分为 2 组，每只尾静脉注射 4.0×10^6 个 CLL1-VHH-16 CAR-T 或 CTR T（即无病毒转染的 T 细胞，作为对照）细胞，并记为 D0 天；
- 3、D7、D14、D21、D28、D35、D42 天用 Photo Acquisition 小动物成像仪拍摄肿瘤发光信号。

- 检测结果如表 1 和图 5 所示，相比于 CTR 对照组，CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞
- 10 不仅可以显著抑制肿瘤细胞在小鼠体内的增殖，还能显著延长小鼠的生存时间，到 D35 和 D42 天时，小鼠体内的肿瘤组织已完全消失。

表 1、荷瘤小鼠体内肿瘤细胞的生物发光强度（P/S）

组别	序号	D-1	D7	D14	D21	D28	D34	D42
CTR	1	3.57E+06	7.29E+07	2.41E+09	N/A	N/A	N/A	N/A
	2	2.42E+06	4.77E+07	1.01E+09	6.39E+10	N/A	N/A	N/A
	3	2.87E+06	4.86E+07	2.41E+09	8.71E+09	N/A	N/A	N/A
	4	3.16E+06	1.04E+07	1.21E+09	3.42E+10	N/A	N/A	N/A
CLL1-VHH-16 CAR-T	1	1.34E+07	6.30E+05	7.73E+06	1.47E+07	8.19E+06	1.66E+06	5.84E+05
	2	1.58E+07	8.03E+05	4.86E+07	1.10E+09	2.27E+09	3.06E+06	7.71E+05
	3	1.50E+07	2.09E+06	8.03E+06	2.19E+07	1.19E+07	1.62E+06	4.25E+05
	4	1.31E+07	6.74E+05	7.22E+06	1.28E+07	3.05E+06	1.41E+06	4.46E+05

- 以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说，在不脱离本发明的宗旨和范围，以及无需进行不必要的实验情况下，可在等同参数、浓度和条件下，
- 15 在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例，应该理解为，可以对本发明作进一步的改进。总之，按本发明的原理，本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进，包括脱离了本申请中已公开范围，而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围，可以进行一些基本特征的应用。

工业实用性

- 20 本发明设计的具有新颖结构的靶向CLL1的CAR-T细胞（CLL1-VHH-16 CAR-T 细胞）能够很好地分泌T细胞特异性效应分子IFN- γ ，有效地特异性杀伤CLL1⁺靶细胞，具有良好的体内杀瘤活性，不仅可以显著抑制肿瘤细胞在小鼠体内的增殖，还能显著延长小鼠的生存时间。本发明的CLL1-VHH-16 CAR-T细胞抗肿瘤能力好，可用于CLL1靶点相关疾病（如急性髓细胞白血病、骨髓增生异常综合
- 25 征或慢性髓细胞白血病）的免疫治疗，具有广阔的临床应用前景。

权利要求

- 1、CAR-T 细胞，其特征在于，所述 CAR-T 细胞含有嵌合抗原受体，所述嵌合抗原受体包括单域抗体、铰链区、跨膜区和胞内信号区，所述单域抗体的氨基酸序列为 SEQ ID No.1 的第 22-150 位。
- 5 2、根据权利要求 1 所述的 CAR-T 细胞，其特征在于，所述胞内信号区包括共刺激结构域 4-1BB 和激活结构域 CD3 ζ ，所述 4-1BB 的氨基酸序列为 SEQ ID No.1 的第 220-266 位，所述 CD3 ζ 的氨基酸序列为 SEQ ID No.1 的第 267-378 位。
- 10 3、根据权利要求 1 或 2 所述的 CAR-T 细胞，其特征在于，所述铰链区为氨基酸序列是 SEQ ID No.1 的第 151-195 位的 CD8a 铰链区，所述跨膜区为氨基酸序列是 SEQ ID No.1 的第 196-219 位的 CD8a 跨膜区。
- 4、根据权利要求 1-3 中任一所述的 CAR-T 细胞，其特征在于，所述嵌合抗原受体包括下述任一种：
- 15 A1) 氨基酸序列是 SEQ ID No.1 的第 22-378 位所示的蛋白质；
- A2) 将 SEQ ID No.1 的第 22-378 位所示的氨基酸序列经过氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与 A1) 所示的蛋白质具有 80% 以上的同一性且具有相同功能的蛋白质；
- A3) 在 A1) 或 A2) 的 N 端和/或 C 端连接标签或信号肽得到的与 A1) 具有相同功能的融合蛋白质。
- 20 5、根据权利要求 4 所述的 CAR-T 细胞，其特征在于，A3) 中所述信号肽的氨基酸序列为 SEQ ID No.1 的第 1-21 位。
- 6、权利要求 1-5 中任一所述的嵌合抗原受体。
- 7、生物材料，其特征在于，所述生物材料为下述任一种：
- 25 B1) 编码权利要求 6 所述嵌合抗原受体的核酸分子；
- B2) 含有 B1) 所述核酸分子的表达盒；
- B3) 含有 B1) 所述核酸分子的重组载体、或含有 B2) 所述表达盒的重组载体；
- B4) 含有 B1) 所述核酸分子的重组微生物、或含有 B2) 所述表达盒的重组微生物、或含有 B3) 所述重组载体的重组微生物。
- 30 8、根据权利要求 7 所述的生物材料，其特征在于，B1) 所述核酸分子为下述任一种：
- C1) 核苷酸序列或编码序列是 SEQ ID No.2 的第 64-1134 位所示的 DNA 分子；
- C2) 与 C1) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性，且具有相同功
- 35 能的 DNA 分子；
- C3) 核苷酸序列或编码序列是 SEQ ID No.2 的 DNA 分子；
- C4) 与 C3) 限定的核苷酸序列具有 75% 或 75% 以上同一性，且具有相同功

能的 DNA 分子。

9、药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有权利要求 1-5 中任一所述的 CAR-T 细胞。

10、权利要求 1-5 中任一所述的 CAR-T 细胞，或权利要求 6 所述的嵌合抗原受体，或权利要求 7 或 8 所述的生物材料，或权利要求 9 所述的药物组合物的下述任一种应用：

D1) 在制备用于预防或治疗肿瘤的药物中的应用，或在预防或治疗肿瘤中的应用；

10 D2) 在制备用于预防或治疗 CLL1 靶点相关疾病的药物中的应用，或在预防或治疗 CLL1 靶点相关疾病中的应用。

11、根据权利要求 10 所述的应用，其特征在于，所述 CLL1 靶点相关疾病为 CLL1 阳性癌症。

12、根据权利要求 11 所述的应用，其特征在于，所述 CLL1 阳性癌症为急性髓细胞白血病、骨髓增生异常综合征或慢性髓细胞白血病。

15 13、制备权利要求 1-5 中任一所述 CAR-T 细胞的方法，其特征在于，所述方法包括：将权利要求 7 或 8 中所述的核酸分子转入 T 细胞中稳定表达，得到所述 CAR-T 细胞。

14、预防或治疗 CLL1 靶点相关疾病的方法，其特征在于，所述方法包括向患有 CLL1 靶点相关疾病的受试者施用权利要求 1-5 中任一所述的 CAR-T 细胞或权利要求 9 所述的药物组合物。

15、根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述 CLL1 靶点相关疾病为 CLL1 阳性癌症。

16、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于，所述 CLL1 阳性癌症为急性髓细胞白血病、骨髓增生异常综合征或慢性髓细胞白血病。

25