

一种表达免疫调节因子的 CAR 载体及其应用

[1].本申请要求 2021 年 4 月 30 提交的中国发明专利申请【CN2021104819799】、名称为“一种表达免疫调节因子的 CAR 载体及其应用”的优先权，该优先权发明专利申请以引用方式全文并入。

技术领域

[2].本发明属于生物工程领域，具体涉及一种 CAR 表达载体及其应用。

背景技术

[3].嵌合抗原受体修饰的 T 细胞（CAR-T）在急性 B 细胞淋巴瘤等血液肿瘤治疗中展现出良好的临床效果，然而对实体肿瘤却疗效不佳。CAR 结构包含三部分，分别是用于识别肿瘤抗原的胞外区、锚定 CAR 结构的跨膜区和胞内 T 细胞激活信号传导结构域。CAR-T 杀伤肿瘤细胞依赖胞外的单链可变区与相应的肿瘤相关抗原特异性结合，然后通过胞内信号结构域启动下游信号传导，引起 CAR-T 细胞的活化、增殖并通过释放 IFN- γ 等细胞因子发挥细胞毒性。但是，在面对实体瘤时，目前传统的 CAR-T 疗效不佳。

[4].第一代 CAR 结构的胞内区仅有 CD3 ξ 的 3 个 ITAM 或者 FcR γ 的 2 个 ITAM 序列，只能提供 T 细胞活化的第一信号，分泌 IL-2 的能力有限，增殖能力弱，在临床试验中未取得令人满意的效果。第二代 CAR 结构在胞内信号序列后增加了串联的共刺激分子信号域，增殖

和杀伤能力相比第一代提高。第三代 CAR 结构的胞内信号包含更多的共刺激域，然而研究表明其杀伤活性并没有显著提升，而且副作用更大。第四代 CAR 是在二代 CAR 的基础上引入新的功能元件增强 CAR-T 细胞的抗肿瘤活性，例如分泌细胞因子 IL-12、IL-15 或 IL-18 的 CAR-T，能增强 CAR-T 细胞的增殖和存活能力，从而提高 CAR-T 细胞的抗肿瘤活性。

[5]. 目前认为, CAR-T 对实体肿瘤疗效不佳的原因有以下几个方面。与实体肿瘤内部复杂的环境和异常的血管构成有关，通常，肿瘤血管渗漏或发育不良，常导致杀伤性 T 细胞无法进入其中。而 CAR-T 细胞缺乏参与渗透到肿瘤组织的趋化因子的表达，以及实体瘤外部的肿瘤相关成纤维细胞（CAF）和血管组成的致密的物理屏障，导致了 CAR-T 细胞迁移及浸润至肿瘤组织内部的能力降低。此外，肿瘤微环境(TME)还能帮助肿瘤细胞逃避免疫监视，抑制机体抗肿瘤反应，也能抑制 CAR-T 细胞的浸润、增殖与存活，也是导致 CAR-T 细胞对实体肿瘤无效的主要原因之一。因此，设计构建一种能有效浸润至肿瘤组织并能逆转肿瘤免疫抑制微环境的 CAR-T 细胞，才有可能克服现有免疫治疗反应率偏低的问题，具备更有效的抗肿瘤作用。

[6]. 综上所述，本发明在改良的二代 CAR 基础上构建了一种新型的高表达 GM-CSF 的 CAR-T 细胞（CAR-GM-T），可以缓解现有技术中存在的缺陷与不足。

发明内容

[7].有鉴于此,本发明的目的在于提供一种新型 CAR 表达载体及其应用。

[8].为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[9].一种 CAR 表达载体,其包括编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸及编码免疫调节因子的核酸,其特征在于,所述编码免疫调节因子的核酸为编码粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的核酸全长或片段。

[10].进一步,所述编码嵌合抗原受体的核酸与所述编码粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的核酸通过编码自切割肽 P2A 的序列连接。

[11].进一步,所述编码嵌合抗原受体的核酸还包括靶向特异性肿瘤抗原的胞外区、锚定 CAR 结构的跨膜区和含有多个串联的共刺激分子的胞内信号传导结构域,包括 CD3 ζ 链、4-1BB 和 GM-CSF。

[12].进一步,所述靶向特异性肿瘤抗原的靶点包括 Her2、B7-H3、Claudin18.2、CD70、MUC16、FSHR、FR 或 Meso 中的一种或多种。在上述靶点中,已证实,Her2 主要是针对 HER2 阳性的乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌和肉瘤;Meso 针对胰腺癌、卵巢癌和肺癌;B7-H3 和 CD70 针对黑色素瘤,其次 MUC16、FSHR 和 FR 均针对卵巢癌。Claudin18.2 针对胃癌、食道胃结合部癌和胰腺癌。

[13].包含上述 CAR 表达载体的慢病毒,所述慢病毒包括 pWPXLd、psPAX2 和/或 pMD2.G。

[14].一种 CAR-T 细胞,表达上述嵌合抗原受体。

[15].上述 CAR-T 细胞在制备抗实体肿瘤药物中的应用。

[16].作为一种优选，所述实体肿瘤主要包括乳腺癌、卵巢癌和肺癌，但并不局限于此。

[17].进一步，所述 CAR-T 细胞可以增强 GM-CSF、IFN- γ 和 IL-2 分泌。

[18].进一步，所述 CAR-T 细胞通过表达粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子直接增强 CAR-T 细胞杀伤活性。

[19].进一步，所述 CAR-T 细胞可以增强浸润能力，更多的 CAR-T 细胞可以浸润到实体瘤内部发挥特异性杀伤肿瘤细胞的效力。

[20].进一步，所述 CAR-T 细胞浸润到实体瘤内部以后表达粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子发挥免疫调理功能调控肿瘤微环境。

[21].进一步，所述 CAR-T 细胞通过表达粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子来激活和招募树突状细胞到所述实体瘤内部，以激活内源性 T 细胞的抗原特异性肿瘤免疫反应。

[22].进一步，所述 CAR-T 细胞能抑制肿瘤细胞的淋巴结转移。

[23].本发明所述的“趋化”是指本发明制备的 CAR-T，即 CAR-GM-T，促使 DC 细胞向肿瘤细胞做定向移动。

[24].DC 细胞是体内的专职抗原呈递细胞，表达 MHC II 和共刺激分子，可以对肿瘤抗原进行摄取、捕获、加工，然后迁移到淋巴结内激活机体内源性 T 细胞抗肿瘤免疫反应。

[25].有益效果

[26].为进一步提高 CAR-T 对实体肿瘤的治疗效果，本发明在二代 CAR-T 的基础上构建了高表达 GM-CSF 的 CAR-T 细胞(CAR-GM-T)。

GM-CSF 是一种重要的免疫调节剂, GM-CSF 可以通过激活和招募树突状细胞 (DC), 激活 T 细胞免疫反应, 同时还可以激活其他免疫细胞, 如粒细胞、巨噬细胞和 NK 细胞, 在肿瘤免疫应答的调节中发挥重要作用。实验证实, 本发明构建的 CAR-GM-T 细胞可以高表达 GM-CSF, 不仅可以直接增强 CAR-T 细胞自身的杀伤活性和增殖能力, 同时还使这种 CAR-T 细胞比普通 CAR-T 细胞具备更强的免疫调节功能。特别地, 本发明制备得到的 CAR-GM-T 细胞在以下几个方面具有突出的效果:

[27].1) CAR-GM-T 对卵巢癌细胞的杀伤力显著高于常规 CAR-T 细胞;

[28].2) CAR-GM-T 对卵巢癌细胞的杀伤力显著高于 Meso-CAR-T 细胞;

[29].3) CAR-GM-T 能显著抑制黑色素瘤的生长, 并明显延长了实验动物的生存时间;

[30].4) CAR-GM-T 细胞在接触肿瘤细胞前后分泌的免疫调节因子 GM-CSF、IFN- γ 和 IL-2 显著高于常规 CAR-T 细胞;

[31].5) CAR-GM-T 比常规 CAR-T 细胞具有更强的浸润实体瘤组织的能力, 并且浸润至实体瘤内部以后发挥出更强的抗肿瘤效果;

[32].5) CAR-GM-T 抑制了肿瘤细胞向胞淋巴结的转移。

[33].综上, 本发明能重塑和逆转肿瘤微环境, 直接或辅助增强 T 细胞活性, 为实体瘤的治疗提供一种新策略。

附图说明

[34].为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作一简单地介绍。

[35].图 1 为 CAR-hGM 表达载体的构建图；

[36].图 2 为 CAR-GM-T 细胞分泌的 GM-CSF 显著高于常规 CAR-T 细胞；

[37].图 3 为 CAR-GM-T 细胞的杀伤活性图；

[38].图 4 为 Meso-CAR-GM-T 细胞对 SK-OV3-Meso 的杀伤效率显著高于 Meso-CAR-T，且杀伤效率随着效靶比的提高而增强；

[39].图 5 为 CAR-GM-T 杀伤肿瘤细胞时分泌的 GM-CSF，显著高于常规 CAR-T 细胞；

[40].图 6 为在效靶比为 5:1 时 CAR-GM-T 细胞分泌的 IFN- γ 是常规 CAR-T 细胞的 4.5 倍，在不同效靶比下 CAR-GM-T 细胞接触肿瘤细胞时分泌的 IFN- γ 均显著高于常规 CAR-T 细胞；

[41].图 7 为在不同效靶比下 CAR-GM-T 细胞在杀伤肿瘤细胞时分泌的 IL-2 也均显著增强；

[42].图 8 为 CAR-GM-T 细胞治疗小鼠腹腔瘤的效果图；

[43].图 9 为常规 CAR-T 对 B16F10-Her2 黑色素皮下移植瘤的生长无明显抑制作用，也不能延长小鼠生存期，而接受 CAR-GM-T 治疗能显著抑制小鼠黑色素皮下移植瘤的生长；

[44].图 10 为接受 CAR-GM-T 治疗能明显延长小鼠的生存时间；

[45].图 11 为小鼠接受治疗后第 24 天，分离小鼠肿瘤和淋巴结并将其制备为单细胞悬液，流式检测小鼠肿瘤和淋巴结内 CAR-T 细胞的比

例图；

[46].图 12 为进一步检测 CAR-GM-T 在人肿瘤组织中的浸润情况，在 NSG 小鼠腹腔瘤治疗后的 28 天，取腹腔内残余肿瘤进行免疫荧光染色，检测 CD3⁺T 细胞浸润情况图；

[47].图 13 为常规 CAR-T 治疗组 CD45.2⁺的免疫细胞仅占 5%，CAR-GM-T 治疗组小鼠肿瘤内免疫细胞浸润情况明显优于常规 CAR-T 治疗组；

[48].图 14 为 CAR-GM-T 治疗组小鼠肿瘤中 CD3⁺的 T 淋巴细胞占 CD45.2⁺细胞的 11%，而常规 CAR-T 治疗组 CD3⁺的 T 淋巴细胞仅占 5%，表明高表达 GM-CSF 显著提高了 CAR-T 细胞治疗后小鼠肿瘤中内源性 CD3⁺T 细胞的比例；

[49].图 15 为 CAR-GM-T 治疗组肿瘤内 CD11c⁺MHCII^{hi} 的 DC 细胞所占比例显著高于常规 CAR-T 治疗组；

[50].图 16 为引流淋巴结 HE 染色结果，显示 CAR-GM-T 能抑制肿瘤细胞的淋巴结转移。

具体实施方式

[51].为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护

的范围。

[52].需要说明的是，在本文中，术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含，从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者装置不仅包括那些要素，而且还包括没有明确列出的其他要素，或者是还包括为这种过程、方法、物品或者装置所固有的要素。在没有更多限制的情况下，由语句“包括一个……”限定的要素，并不排除在包括该要素的过程、方法、物品或者装置中还存在另外的相同要素。

[53].如在本说明书中使用的，术语“大约”，典型地表示为所述值的 $\pm 5\%$ ，更典型的是所述值的 $\pm 4\%$ ，更典型的是所述值的 $\pm 3\%$ ，更典型的是所述值的 $\pm 2\%$ ，甚至更典型的是所述值的 $\pm 1\%$ ，甚至更典型的是所述值的 $\pm 0.5\%$ 。

[54].在本说明书中，某些实施方式可能以一种处于某个范围的格式公开。应该理解，这种“处于某个范围”的描述仅仅是为了方便和简洁，且不应该被解释为对所公开范围的僵化限制。因此，范围的描述应该被认为是已经具体地公开了所有可能的子范围以及在此范围内的独立数字值。例如，范围 1~6 的描述应该被看作已经具体地公开了子范围如从 1 到 3，从 1 到 4，从 1 到 5，从 2 到 4，从 2 到 6，从 3 到 6 等，以及此范围内的单独数字，例如 1，2，3，4，5 和 6。无论该范围的广度如何，均适用以上规则。

[55].**实施例一**

[56].1.细胞培养

[57].表达荧光素酶 (Luciferase) 的人卵巢癌细胞系 (SK-OV3-Luc), 过表达 Her2 蛋白的小鼠黑色素瘤细胞系 (B16F10-Her2) 由四川大学生物治疗国家重点实验室保存, 使用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 37°C, 5%CO₂, 常氧条件下进行培养。

[58].2. CAR-GM-T 制备

[59].2.1 CAR-hGM 表达载体的构建及验证

[60].用自剪切多肽 P2A 连接 Her2-CAR 和 hGM-CSF, 构建高表达 hGM-CSF 的 Her2-CAR-hGM 表达载体 (pWPXLd-Her2-CAR-hGM-CSF) (图 1)。以 pWPXLd-Her2-CAR-EGFP 载体为模板扩增 Her2-CAR-P2A 片段, 以 pWPXLd-hGM-CSF 载体为模板扩增 hGM-CSF 片段。使用限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 酶切载体 pWPXLd 使其线性化, 利用同源重组的方法将片段 Her2-CAR 和 hGM-CSF 连接至线性化载体 pWPXLd 中。

[61].2.2 慢病毒的包装

[62].使用慢病毒三质粒系统进行慢病毒包装, 质粒转导方式为磷酸钙-DNA 共沉淀法, 辅助质粒为 psPAX2 和 pMD2.G, 包装细胞为 293T 细胞。转染后 48 小时和 72 小时分别收取病毒上清, 使用 0.22μm 的一次性针头式滤器 (PES 膜) 过滤病毒上清, 使用超高速离心机浓缩过滤的病毒液后分装冻存于 -80°C 冰箱。

[63].2.3 人 T 细胞的激活与感染

[64].1) 使用 Ficoll 分离外周血单核淋巴细胞。

[65].2) 根据外周血单核淋巴细胞数量, 取出适量 Human T-Expander

CD3/CD28 Dynabeads 磁珠，使用 5 mL DPBS 清洗磁珠 1 次，使用 T 细胞完全培养基重悬。将外周血单核淋巴细胞悬液与清洗后的磁珠混匀，放入 T75 培养中，37°C，5% CO₂ 培养。

[66].3) 根据病毒滴度计算病毒用量，使用 RetroNectin 增强感染效率，感染 72 小时后使用流式细胞术检测各组 CAR（包括常规 CAR）表达情况。

[67].2.4 鼠 T 细胞的激活与感染

[68].1) 从小鼠淋巴结中分离淋巴结细胞。

[69].2) 根据外周血单核淋巴细胞数量，取出适量 Human T-Expander CD3/CD28 Dynabeads 磁珠，使用 5 mL DPBS 清洗磁珠 1 次，使用 T 细胞完全培养基重悬。将外周血单核淋巴细胞悬液与清洗后的磁珠混匀，放入 T75 培养中，37°C，5% CO₂ 培养。

[70].3) 根据病毒滴度计算病毒用量，使用 polybrene 增强感染效率，感染 72 小时后使用流式细胞术检测各组 CAR（包括常规 CAR）表达情况。

[71].2.5 培养 CAR-GM-T 细胞。

[72].3. 细胞因子检测

[73]. 细胞因子分泌情况均通过 ELISA 的方法测定，包括 IL-2、IFN γ 、GM-CSF，样品来源于 CAR-T 细胞培养上清或 CAR-T 细胞杀伤肿瘤细胞后的上清。

[74].4. 杀伤活性检测

[75]. 体外杀伤活性使用乳酸脱氢酶（LDH）细胞毒性检测试剂盒进行

测定，具体步骤叙述如下：

[76].1) 取生长状态良好的肿瘤细胞，胰酶消化并计数，使用 X-VIVO 培养基重悬肿瘤细胞至终浓度 5×10^5 个/mL。

[77].2) 取状态良好的 CAR-T 细胞，轻轻吹散并计数，1000rpm 离心 3 分钟，弃上清，使用 X-VIVO 培养基重悬 CAR-T 细胞至终浓度 10^6 个/mL。

[78].3) 设置不同效靶比 1:1、2.5:1、5:1、10:1，肿瘤细胞均按照每孔 10^4 个计算，每个效靶比均设置以下 6 个分组 MOCK T（效应细胞自发组）、MOCK T + Tumor（试验组）、CAR-T、CAR-T + Tumor、CAR-GM-CSF-T、CAR-GM-CSF-T + Tumor，每组 3 个副孔，同时设置空白培养基组、肿瘤细胞自发组，肿瘤细胞最大释放组，每孔的终体积均为 200 μ L。

[79].4) 待杀伤进行 24 小时后，显微镜观察各组细胞杀伤情况。

[80].5) 取出 96 孔细胞培养板，肿瘤细胞最大释放组每孔加入 20 μ L Lysis Solution(10X)，37 $^{\circ}$ C 孵育 45 分钟。

[81].6) 孵育结束后，水平离心机室温 250g 离心 4 分钟。

[82].7) 每孔别取 50 μ L 上清至新的 96 孔板中用于后续 LDH 释放检测。

[83].8) 每孔加入 50 μ L LDH 检测反应液，室温避光孵育 30 分钟。

[84].9) 孵育完成后，每孔加入 50 μ L 终止液。

[85].10) 终止反应后，1 小时内使用酶标仪读取 490nm 的吸光度。

[86].11) 杀伤效率 % = $\frac{\text{试验组} - \text{效应细胞自发组} - \text{肿瘤细胞自发组} + \text{空白培养基作用}}{\text{肿瘤最大释放组} - \text{肿瘤自发组}} \times 100$

[87].5. 卵巢癌腹腔瘤模型的治疗

[88].5.1 动物饲养

[89].1) 该部分动物实验所用动物为百奥赛图公司自主研发的 B-NDG®小鼠(NOD-Prkdcscid Il2rgtm1/Bcgen), 该小鼠以 NOD-scid 为遗传背景、IL2rg 基因被敲除, T、B、NK 细胞缺失, 适合人源细胞或组织移植。

[90].2) 购置 5-6 周龄雌性 B-NDG 小鼠, 体重 18-20g, 购回后饲养于四川大学生物治疗国家重点实验室 SPF 级动物房。

[91].3) B-NDG 小鼠饲养期间, 室温维持在 25℃, 实验期间自由取食、饮水。

[92].5.2 卵巢癌腹腔模型构建

[93].1) 取生长状态良好的 SK-OV3-Luc 细胞, 胰酶消化并计数, 1200 rpm 离心 3 分钟, PBS 洗涤 2 次, 用无血清的 DMEM 培养基重悬细胞至终浓度为 10^6 个/ml。

[94].2) 抓取小鼠, 按照每只小鼠 200 μ L 细胞悬液进行腹腔注射接种 SK-OV3-Luc 细胞。

[95].3) 定期监测小鼠体重。

[96].5.3 卵巢癌腹腔模型的治疗

[97].1) 接种后第 6 天, 对每只小鼠进行活体成像, 根据成像的荧光值将小鼠分为 3 组, 每组 6 只, 分别为 PBS 组、Her2-CAR 组、Her2-CAR-GM-CSF 组。

[98].2) 接种后第 7 天, 收集生长状态良好、CAR 阳性率大于 50%的 Her2-CAR-T 和 Her2-CAR-GM-CSF-T 细胞, 使用 X-VIVO 培养基重

悬至终浓度 10^7 个/mL。

[99].3) 分别吸取 100 μ L 上述 CAR-T 细胞悬液, 经腹腔注射治疗每只小鼠。

[100].5.4 卵巢癌腹腔模型的治疗效果检测

[101].1) 小鼠治疗后, 每周进行 1 次活体呈像检测。

[102].2) 定期监测小鼠精神状态, 活动情况, 毛发光泽度, 进食情况, 观察是否有不良反应发生, 检测小鼠体重。

[103].3) 待监测结束后, 麻醉小鼠后脱颈处死, 取腹腔中残余的肿瘤进行免疫荧光染色, 检测 CAR-T 细胞浸润情况。

[104].6. 黑色素皮下移植瘤模型的治疗

[105].6.1 动物饲养

[106]. (1) 该部分动物实验所用的 C57BL/6 CD45.1 来自本实验室保种, C57BL/6 CD45.2 购自四川大学实验动物中心。

[107]. (2) 购置 5-6 周龄雌性 C57BL/6 CD45.2 小鼠, 体重 18-20g, 购回后饲养于四川大学 SPF 级动物房。

[108]. (3) 小鼠饲养期间, 室温维持在 25°C, 实验期间自由取食、饮水。

[109].6.2 过表达 Her2 蛋白的黑色素皮下移植瘤模型构建

[110]. (1) 模型构建采用 C57BL/6 CD45.2 小鼠, 小鼠购回后适应环境 1 周即可用于皮下移植瘤模型构建。

[111]. (2) 取生长状态良好的 B16F10-Her2 细胞, 胰酶消化并计数, 1200rpm 离心 3 分钟, PBS 洗涤 2 次, 用无血清的 DMEM 培养基重

悬细胞至终浓度为 5×10^6 个/ml。

[112]. (3) 取 100 μ L 上述肿瘤细胞悬液于小鼠右侧胁肋部皮下注射，注意不要刺破肌肉层。

[113]. 6.3 皮下移植瘤模型的治疗

[114]. (1) 取 200mg 环磷酰胺 (Cyclophosphamide, CPA) 溶解于 5mL 生理盐水中，0.22 μ m 的一次性针头式滤器过滤后，分装冻存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

[115]. (2) 接种后第 10 天，按照 200mg/kg 的剂量给每只荷瘤小鼠注射环磷酰胺，腹腔给药。

[116]. (3) 接种后第 12 天，测量移植瘤体积，根据肿瘤体积将小鼠分为 3 组，每组 15 只，分别为 PBS 组、Her2-CAR 组、Her2-CAR-GM-CSF 组。

[117]. (4) 接种后第 13 天，收集生长状态良好，C57BL/6 CD45.1 小鼠淋巴细胞制备的 Her2-CAR-T 和 Her2-CAR-GM-CSF-T 细胞，使用 1640 培养基重悬至终浓度 3×10^7 个/mL。

[118]. (5) 分别吸取 100 μ L 上述 CAR-T 细胞悬液，经尾静脉注射治疗每只小鼠。

[119]. 黑色素瘤皮下模型的治疗效果检测

[120]. (1) 小鼠每 3 天进行 1 次瘤子体积监测，使用游标卡尺测量并记录肿瘤纵横直径大小，测量黑色素皮下移植瘤的最长和最短直径，按照以下公式计算肿瘤体积：肿瘤体积 = $0.52 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{宽}$ ，绘制肿瘤生长曲线。

[121]. (2) 定期监测小鼠精神状态, 活动情况, 毛发光泽度, 进食情况, 观察是否有不良反应发生, 检测小鼠体重, 绘制生存期曲线。

[122]. (3) 治疗后 21 天, 部分小鼠麻醉后脱颈处死, 分离小鼠脾脏、引流淋巴结、淋巴结、肿瘤, 分别进行 HE 染色和流式分析。

[123]. 实施例二

[124]. 实验结果

[125]. 1. CAR-GM-T 细胞分泌 GM-CSF 的能力增强

[126]. 常规 CAR-T 细胞与 MOCK T 细胞激活前分泌的 GM-CSF 无明显差异, 而 CAR-GM-T 细胞分泌的 GM-CSF 显著高于常规 CAR-T 细胞 ($P < 0.001$), 符合预期 (图 2)。

[127]. 2. CAR-GM-T 细胞的杀伤活性增强

[128]. Her2-CAR-GM-T 细胞对天然表达 Her2 蛋白的 SK-OV3 细胞杀伤效率显著高于 Her2-CAR-T, 且杀伤效率随效靶比的升高而增强。

Her2-CAR-GM-T 细胞在效靶比为 1:1 时对 SK-OV3 的杀伤效率能达到 30%, 显著高于 Her2-CAR-T 组 ($P < 0.001$), 而 Her2-CAR-T 组在效靶比为 2.5:1 时杀伤效率才能达到 30%, Her2-CAR-GM-T 细胞在效靶比为 5:1 时杀伤效率接近 80%, 显著高于 Her2-CAR-T 细胞 60% 的杀伤效率 (图 3)。

[129]. 检测以 Meso 为靶点的 CAR-GM-T (Meso-CAR-GM-T) 细胞对靶点阳性的肿瘤细胞的杀伤效率。

[130]. Meso CAR-T 是宾夕法尼亚大学和诺华开发的以 meso 为靶点的 CAR-T 疗法, 而且 Meso CAR-T 还是诺华针对实体瘤推出的第一个

CAR-T 产品，适应证包括卵巢癌、肺癌以及胰腺癌。

[131].结果表明，Meso-CAR-GM-T 细胞对 SK-OV3-Meso 的杀伤效率显著高于 Meso-CAR-T，且杀伤效率也会随着效靶比的提高而增强（图 4）。以上结果表明高表达 CAR-GM-CSF 不仅针对靶点 Meso 有效，并且能提高不同靶点的 CAR-T 细胞的体外杀伤效率。

[132].3.CAR-GM-T 细胞杀伤肿瘤细胞时分泌 GM-CSF、IFN- γ 、IL-2 的能力增强

[133].检测 CAR-T 细胞杀伤肿瘤细胞时上清中细胞因子的分泌，当 CAR-GM-T 接触肿瘤细胞激活后分泌 GM-CSF 的能力提升，与常规 CAR-T 细胞相比分泌 GM-CSF 的能力更强（ $P<0.01$ ）（图 5）。在效靶比为 5:1 时 CAR-GM-T 细胞分泌的 IFN- γ 是 CAR-T 细胞的 4.5 倍，在不同效靶比下 CAR-GM-T 细胞接触肿瘤细胞时分泌的 IFN- γ 均显著高于 CAR-T 细胞（ $P<0.001$ ）（图 6）。此外在不同效靶比下 CAR-GM-T 细胞在杀伤肿瘤细胞时分泌的 IL-2 也均显著增强（图 7）。

[134].4.CAR-GM-T 细胞治疗卵巢癌的效果增强

[135].常规 CAR-T 细胞能控制住小鼠肿瘤生长，治疗后的第 14 天，有 1 只小鼠肿瘤消除，但在 21 天该小鼠肿瘤复发。而接受 CAR-GM-T 细胞治疗后的第 14 天，有 2 只小鼠肿瘤完全消退，1 只小鼠肿瘤基本消退，21 天时 2 只消退的小鼠肿瘤仍未复发，剩余 3 只小鼠肿瘤负荷非常小，明显小于常规 CAR-T 细胞治疗的小鼠肿瘤（图 8）。以上结果表明 CAR-GM-T 比常规 CAR-T 细胞具有更显著的体内抗肿瘤效果。

[136].5.CAR-GM-T 细胞在免疫健全鼠内抗高表达 HER2 的黑色素皮下移植瘤的效果增强

[137].CAR-T 对 B16F10-Her2 黑色素皮下移植瘤的生长无明显抑制作用，也不能延长小鼠生存期，而接受 CAR-GM-T 治疗能显著抑制小鼠黑色素皮下移植瘤的生长 ($P<0.05$) (图 9)，明显延长小鼠的生存时间 (图 10)。

[138].6.CAR-GM-T 细胞浸润至实体瘤内部的能力增强

[139].小鼠接受治疗后第 24 天，分离小鼠肿瘤和淋巴结并将其制备为单细胞悬液，流式检测小鼠肿瘤和淋巴结内 CAR-T 细胞的比例。结果显示，常规 CAR-T 治疗组肿瘤内 CAR^+ T 细胞占 CD3^+ T 细胞的 1.2%，而 CAR-GM-T 治疗组肿瘤内 CAR^+ T 细胞占 CD3^+ T 细胞的 2.4%，是常规 CAR-T 治疗组的 2 倍，差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。分析肿瘤引流淋巴结内 CAR^+ T 细胞比例也得到相似的结果：常规 CAR-T 治疗组肿瘤引流淋巴结内 CAR^+ T 细胞仅占 CD3^+ T 细胞的 0.04%，而 CAR-GM-T 治疗组小鼠肿瘤引流淋巴结内 CAR^+ T 细胞占 CD3^+ T 细胞的 0.4%，是常规 CAR-T 治疗组的 10 倍，显著高于常规 CAR-T 治疗组 ($P<0.01$) (图 11)。

[140].进一步检测 CAR-GM-T 在人肿瘤组织中的浸润情况，在 NSG 小鼠腹腔瘤治疗后的 28 天，取腹腔内残余肿瘤进行免疫荧光染色，检测人源 CD3^+ T 细胞浸润情况。结果显示，接受 CAR-T 治疗的小鼠肿瘤内人源 CD3^+ T 细胞仅在肿瘤边缘聚集，肿瘤内 T 细胞很少；而接受 CAR-GM-T 细胞治疗的小鼠肿瘤内，人源 CD3^+ T 细胞能浸润至

肿瘤内部，肿瘤内部组织中的 CD3⁺T 细胞明显增多，说明高表达 GM-CSF 除增强 CAR-T 细胞的杀伤活性以外还能增强 CAR-T 细胞渗透进入肿瘤内部的能力（图 12）。以上结果表明，高表达 GM-CSF 能增强 CAR-T 细胞的浸润能力，CAR-GM-T 细胞能更有效的进入肿瘤和淋巴结内发挥功能。

[141].7.CAR-GM-T 细胞激活内源性 T 细胞

[142].在小鼠肿瘤细胞中分析 CD45.2⁺的内源性免疫细胞，分析内源性免疫细胞的浸润情况。结果显示，CAR-GM-T 治疗组小鼠肿瘤中 CD45.2⁺的免疫细胞占 8%，而 CAR-T 治疗组 CD45.2⁺的免疫细胞仅占 5%，CAR-GM-T 治疗组小鼠肿瘤内免疫细胞浸润情况明显优于 CAR-T 治疗组（ $P<0.05$ ）（图 13）。

[143].在 CD45.2⁺的内源性免疫细胞中分析 CD3⁺的 T 淋巴细胞。结果显示，CAR-GM-T 治疗组小鼠肿瘤中 CD3⁺的 T 淋巴细胞占 CD45.2⁺细胞的 11%，而 CAR-T 治疗组 CD3⁺的 T 淋巴细胞仅占 5%，表明高表达 GM-CSF 显著提高了 CAR-T 细胞治疗后小鼠肿瘤中内源性 CD3⁺T 细胞的比例（ $P<0.01$ ）（图 14）。

[144].8.CAR-GM-T 细胞趋化 DC 细胞至肿瘤

[145].在 CD45.2⁺的细胞中分析 CD11b⁺CD11c⁺的细胞，再从这部分细胞中分析 CD11c⁺MHCII^{hi}的 DC 细胞。结果显示，CAR-GM-T 治疗组肿瘤内 CD11c⁺MHCII^{hi}的 DC 细胞所占比例显著高于常规 CAR-T 治疗组（ $P<0.01$ ）（图 15），表明 CAR-GM-T 治疗组肿瘤内成熟的 DC 细胞更多。

[146].9.CAR-GM-T 细胞抑制肿瘤细胞淋巴结转移

[147].B16F10 为小鼠黑素瘤高转移细胞株，本发明团队使用 CAR-T 细胞和 CAR-GM-T 细胞治疗 B16F10-Her2 黑色素皮下移植瘤模型。

引流淋巴结 HE 染色结果显示，PBS 治疗组有大量黑色素斑块，CAR-T 治疗组可见少量黑色素斑块，CAR-GM-T 治疗组可见大量淋巴细胞，无黑色素斑块。以上结果表明，未接受治疗的小鼠淋巴结内有大量肿瘤细胞转移，CAR-T 治疗能抑制部分肿瘤细胞转移，高表达 GM-CSF 能增强 CAR-T 细胞抑制肿瘤细胞淋巴结转移的能力（图 16）。

[148].上面结合附图对本发明的实施例进行了描述，但是本发明并不局限于上述的具体实施方式，上述的具体实施方式仅仅是示意性的，而不是限制性的，本领域的普通技术人员在本发明的启示下，在不脱离本发明宗旨和权利要求所保护的范围情况下，还可做出很多形式，这些均属于本发明的保护之内。

权利要求书

1. 一种 CAR 表达载体，其包括编码嵌合抗原受体的核酸及编码免疫调节因子的核酸，其特征在于，所述编码免疫调节因子的核酸为编码粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的核酸全长或片段。
2. 如权利要求 1 所述的 CAR 表达载体，其特征在于，所述编码嵌合抗原受体的核酸与所述编码粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的核酸通过编码自切割肽 P2A 的序列连接。
3. 如权利要求 1 所述的 CAR 表达载体，其特征在于，所述编码嵌合抗原受体的核酸还包括靶向特异性肿瘤抗原的胞外区、锚定 CAR 结构的跨膜区和含有串联的共刺激分子的胞内信号传导结构域，所述胞内信号传导结构域包括 CD3 ζ 链、4-1BB 和 GM-CSF。
4. 如权利要求 3 所述的 CAR 表达载体，其特征在于，所述靶向特异性肿瘤抗原的靶点包括 Her2、B7-H3、Claudin18.2、CD70、MUC16、FSHR、FR 或 Meso 中的一种或多种。
5. 包含权利要求 1-4 任一项所述 CAR 表达载体的慢病毒，其特征在于，所述慢病毒包括 pWPXLd、psPAX2 和/或 pMD2.G。
6. 一种 CAR-T 细胞，其特征在于，表达权利要求 1-4 任一项所述的嵌合抗原受体。
7. 权利要求 6 所述的 CAR-T 细胞在制备抗实体肿瘤药物中的应用。
8. 如权利要求 7 所述的应用，其特征在于，所述 CAR-T 细胞可以增强 GM-CSF、IFN- γ 和 IL-2 分泌。
9. 如权利要求 7 所述的应用，其特征在于，所述 CAR-T 细胞通过表达粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子直接增强 CAR-T 细胞杀伤活性。

- 10.如权利要求 7 所述的应用，其特征在于，所述 CAR-T 细胞可以增强浸润能力，更多的 CAR-T 细胞可以浸润到实体瘤内部发挥特异性杀伤肿瘤细胞的效力。
- 11.如权利要求 10 所述的应用，其特征在于，所述 CAR-T 细胞浸润到实体瘤内部后可以发挥免疫调理功能调控肿瘤微环境。
- 12.如权利要求 11 所述的应用，其特征在于，所述 CAR-T 细胞可以激活和招募树突状细胞到所述实体瘤内部，以激活内源性 T 细胞的抗原特异性肿瘤免疫反应。
- 13.如权利要求 7 所述的应用，其特征在于，所述 CAR-T 细胞能抑制肿瘤细胞的淋巴结转移。