

## 说明书

### 发明名称: 一种靶向CD38和CLL1 的双特异性嵌合抗原受体及其应用

#### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫细胞治疗领域，具体地，涉及靶向CD38和CLL1的双特异性嵌合抗原受体及其应用。

#### 背景技术

[0002] 急性骨髓性白血病(AML)是骨髓系血细胞癌症，其特征在于恶性造血细胞的克隆性扩增，这些恶性造血细胞在骨髓和血液中积累并干扰正常血细胞。AML的生物学和临床复杂性来源于AML的多种亚型，大大增加了AML治疗的难度。AML常用的治疗方法包括化学治疗和造血干细胞移植，但是由于AML最常见于老年人，大部分患者无法接受密集的化学疗法，同时干细胞移植供体来源较少，因此患者生存率极差且复发率较高。需要寻求新的治疗手段来治疗。

[0003] 嵌合抗原受体(CAR)是模拟T细胞受体功能的人工受体，其融合了抗体的抗原识别片段(或抗原对应配体)以及T细胞的下游信号结构域。在该嵌合受体作用下，将T细胞特异性靶向到肿瘤细胞表面表达的肿瘤相关或特异性抗原，诱导CAR-T细胞活化，增殖和随后的肿瘤杀伤。

[0004] CD38抗原是一种45kDa大小的II型跨膜糖蛋白，能够催化环腺苷二磷酸核糖的合成和降解，CD38还与细胞凋亡和细胞增殖的调节有关，并具有重要的粘附特性。大多数AML原始细胞具有较高的CD38表达使其成为AML治疗的潜在靶点。

[0005] C型凝集素样-1(CLL1)是糖蛋白受体和参与免疫调节的C型凝集素样受体家族的成员。CLL1主要在造血细胞，主要在包括单核细胞、DC和粒细胞的先天免疫细胞和骨髓祖细胞中表达。CLL-1也在急性骨髓性白血病(AML)母细胞、白血病干细胞(例如CD34+/CD38-)以及一小部分造血祖细胞(CD34+/CD38+或者CD34+/CD33+)中发现，但是在正常的造血干细胞(CD34+/CD38-或者CD34+/CD33-)上不表达。

[0006] 由于缺乏合适的靶向表面抗原，CAR-T细胞在治疗AML迟迟未能突破。因为靶向的AML抗原经常在健康的造血干细胞/祖细胞(HSPC)上共同表达，导致所有髓系后代细胞的缺失。人们正在寻求创造性的解决方案来克服这些障碍，从而使CART疗法成为AML患者的可行选择。

## 发明内容

[0007] 为了解决上述提到的问题，本发明提供如下技术方案：

[0008] 本发明第一个方面公开了一种靶向CD38和CLL1的双特异性嵌合抗原受体，所述嵌合抗原受体融合蛋白从N末端到C末端至少包括：

[0009] i)特异性结合CD38和/或CLL1的抗原结合域；

[0010] ii)跨膜结构域；

[0011] iii)至少一个共刺激结构域；

[0012] iv)信号转导结构域。

[0013] 优选地，上述抗原结合域为单价或多价，即所述抗原结合域含有单个抗原决定簇或多个抗原决定簇，可以特异性地结合单个抗原表位或多个抗原表位。

[0014] 优选地，上述抗原结构域包括单域抗体；其他还可以选用如骆驼Ig、IgNAR、Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、F(ab')<sub>3</sub>片段、Fv、单链抗体(例如scFv、di-scFv、(scFv)<sub>2</sub>)、微型抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、二硫键稳定的Fv蛋白(“dsFv”)，嵌合抗体、人源化抗体、单结构域抗体、双特异性抗体或多特异性抗体、结合配体或蛋白结构域。

[0015] 优选地，抗原结构域有两个单域抗体，例如，VHH1，其表示第一抗原结合域的单域抗体，VHH2，其表示第二抗原结合域的单域抗体；所述第一抗原结合域靶向并结合CD38，所述第二抗原结合域靶向并结合CLL1。

[0016] 所述第一抗原结合域和所述第二抗原结合域从氨基末端到羧基末端以选自下组之一的模式排列：

[0017] i)VHH1-VHH2；或

[0018] ii)VHH2-VHH1。

[0019] 本申请优选单域抗体为重链单域抗体。

- [0020] 作为本申请一种优选的实施例，其中所述VHH1的CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示；所述VHH1的CDR2包括氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示；所述VHH1的CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。
- [0021] 作为另一个优选的实施例，所述VHH1的CDR1、CDR2、CDR3氨基酸序列分别还包括与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:11具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)，优选地，所述置换为保守置换。
- [0022] 作为本申请一种优选的实施例，其中所述VHH1的CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示；所述VHH1的CDR2包括氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示；所述VHH1的CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示。
- [0023] 作为另一个优选的实施例，所述VHH1的CDR1、CDR2、CDR3氨基酸序列分别还包括与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)，优选地，所述置换为保守置换。
- [0024] 作为本申请一种优选的实施例，其中所述VHH1的CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示；所述VHH1的CDR2包括氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示；所述VHH1的CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示。
- [0025] 作为另一个优选的实施例，所述VHH1的CDR1、CDR2、CDR3氨基酸序列分别还包括与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨

基酸的置换、缺失或添加(例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加), 优选地, 所述置换为保守置换。

[0026] 优选地, 所述VHH1包括SEQ ID NO:1-3所示的氨基酸序列、或由其组成。

[0027] 作为另一个优选的实施例, 所述VHH1的氨基酸序列还包括分别与SEQ ID NO:1-3具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列; 或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加), 优选地, 所述置换为保守置换。

[0028] 优选地, 上述VHH2的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17所示。

[0029] 作为另一个优选的实施例, 所述VHH2的CDR1、CDR2、CDR3氨基酸序列还包括分别与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列; 或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加), 优选地, 所述置换为保守置换。

[0030] 优选地, 上述VHH2的CDR1、CDR2、CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18所示。

[0031] 作为另一个优选的实施例, 所述VHH2的CDR1、CDR2、CDR3氨基酸序列还包括分别与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列; 或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加), 优选地, 所述置换为保守置换。

[0032] 优选地, 所述VHH2包括SEQ ID NO:4或5所示的氨基酸序列、或由其组成。

- [0033] 作为另一个优选的实施例，所述VHH2的氨基酸序列还包括分别与SEQ ID NO:4或5具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)，优选地，所述置换为保守置换。
- [0034] 优选地，上述跨膜结构域包括选自下列的分子：CD8 $\alpha$ 、CD28、IgG1、IgG4、4-1BB、PD-1、CD34、OX40、CD3 $\epsilon$ 、IL-2受体、IL-7受体中的一种。
- [0035] 更优选地，所述跨膜结构域选为CD8 $\alpha$ 或CD28，所述CD8 $\alpha$ 的跨膜结构域包括SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列、或由其组成；所述CD28的跨膜结构域包括SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列、或由其组成。。
- [0036] 作为另一个优选的实施例，所述跨膜结构域的氨基酸序列还包括分别与SEQ ID NO:19或20具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)，优选地，所述置换为保守置换。
- [0037] 优选地，所述胞内信号传导结构域包括下列分子：CD3 $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、TCR $\zeta$ 、CD4、CD5、CD8、CD21、CD22、CD79a、CD79b、CD278、Fc $\epsilon$ RI、DAP10、DAP12、CD66d中的一种或其组合。
- [0038] 更优选地，上述胞内信号传导结构域优选为CD3 $\zeta$ 的胞浆信号传导序列。所述CD3 $\zeta$ 的胞浆信号传导序列具有如SEQ ID NO: 21所示的氨基酸序列。
- [0039] 作为另一个优选的实施例，所述CD3 $\zeta$ 的胞浆信号传导序列的氨基酸序列还包括与SEQ ID NO:21具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)，优选地，所述置换为保守置换。

- [0040] 作为另一个优选的实施例，上述CD3  $\zeta$  的胞浆信号传导序列还包括其野生型、或其突变体/修饰体。
- [0041] 优选地，上述共刺激信号结构域包括选自下列的分子：4-1BB(CD137)、CD27、CD19、CD4、CD28、ICOS(CD278)、CD8  $\alpha$ 、CD82  $\beta$ 、BAFFR、HVEM、LIGHT、KIRDS2、SLAMF7、NKp30、NKp46、CD40、CDS、ICAM-1、B7-H3、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、CD2、CD7、CD226中的一种或其组合。
- [0042] 更优选地，所述共刺激信号结构域优选为4-1BB或CD28。所述4-1BB的共刺激信号结构包括SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列、或由其组成；所述CD28的共刺激信号结构包括SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列、或由其组成。
- [0043] 作为另一个优选的实施例，所述共刺激信号结构的氨基酸序列还包括分别与SEQ ID NO:22或23具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)，优选地，所述置换为保守置换。
- [0044] 上述嵌合抗原受体还包括铰链区。
- [0045] 优选地，所述铰链区优选为CD8  $\alpha$ 。所述CD8  $\alpha$  的铰链区具有如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列。
- [0046] 作为另一个优选的实施例，所述铰链区的氨基酸序列还包括与SEQ ID NO:24具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)，优选地，所述置换为保守置换。
- [0047] 上述嵌合抗原受体还包括信号肽。
- [0048] 优选地，所述信号肽包括选自下列的分子：T细胞受体的  $\alpha$  链及  $\beta$  链、CD3  $\zeta$ 、CD3  $\epsilon$ 、CD4、CD5、CD8、CD9、CD28、CD16、CD22、CD33、CD3

7、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、GITR、GM-CSF。

[0049] 更优选地，所述信号肽优选为CD8 $\alpha$ 。所述CD8 $\alpha$ 的信号肽具有如SEQ ID NO: 25所示的氨基酸序列。

[0050] 根据上述信号肽、抗原结合域、铰链区、跨膜结构域、共刺激信号结构域和信号传导序列串联得到，具体结构为：

[0051] L-VHH1-L1-VHH2-F-H-TM-C-CD3 $\zeta$  (Ia)

[0052] 式中，

[0053] 各“-”独立地为连接肽或肽键；

[0054] L为信号肽序列；

[0055] VHH1为特异性结合CD38或CLL1的抗原结合域；

[0056] VHH2为特异性结合CLL1或CD38的抗原结合域；

[0057] L1为连接肽；

[0058] F为无或者Flag标签序列(Flag Tag)；

[0059] H为铰链区；

[0060] TM为跨膜结构域；

[0061] C为共刺激信号结构域；

[0062] CD3 $\zeta$ 为源于CD3 $\zeta$ 的胞浆信号传导序列，还包括其野生型、或其突变体/修饰体。

[0063] 优选地，组成CAR-T的具体结构为：

[0064] L-VHH1-L1-VHH2-H-TM-C-CD3 $\zeta$

[0065] 各“-”独立地为连接肽或肽键；

[0066] L为CD8a信号肽分子；

[0067] VHH1为特异性结合CD38或CLL1的抗原结合域；

[0068] VHH2为特异性结合CLL1或CD38的抗原结合域；

[0069] L1为连接肽；

[0070] H为CD8a的铰链区；

[0071] TM为CD8a的跨膜结构域；

- [0072] C为4-1BB共刺激结构域；
- [0073] CD3  $\zeta$  为源于CD3  $\zeta$  的胞浆信号传导序列。
- [0074] 优选地，组成CAR-NK的具体结构为：
- [0075] L-VHH1-L1-VHH2-F-H-TM-C-CD3  $\zeta$
- [0076] 各“-”独立地为连接肽或肽键；
- [0077] L为CD8a信号肽分子；
- [0078] VHH1为特异性结合CD38或CLL1的抗原结合域；
- [0079] VHH2为特异性结合CLL1或CD38的抗原结合域；
- [0080] L1为连接肽；
- [0081] F为Flag标签序列(Flag Tag)；
- [0082] H为CD8a的铰链区；
- [0083] TM为CD28的跨膜结构域；
- [0084] C为CD28的共刺激结构域；
- [0085] CD3  $\zeta$  为源于CD3  $\zeta$  的胞浆信号传导序列。
- [0086] 优选地，上述连接肽选自以下氨基酸序列的接头：SGG、GGG、SGGG、SSGG、GGGG、SGGGG、GGGGG、SGGGGG、GGGGGG、SGGGGGG、SGGGGGGG、SGGGGGGGG、SGGGGGGGG、SGGGGGGGGG、SGGGGGGGGGG或GGGGSGGGSGGGG。
- [0087] 优选地，所述融合蛋白表达标签为Flag tag，由SEQ ID NO：27的氨基酸序列所示。
- [0088] 作为另一个优选的实施例，所述Flag tag的氨基酸序列还包括与SEQ ID NO:27具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列；或者与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)，优选地，所述置换为保守置换。
- [0089] 本发明第二个方面公开了一种核酸分子，所述核酸分子为编码上述嵌合抗原受体的核苷酸序列。

- [0090] 优选地，优选编码SEQ ID NO:2与SEQ ID NO:5所示氨基酸的核酸分子C9B5，所述C9B5的核苷酸序列由SEQ ID NO:30所示。
- [0091] 所述的核酸分子还包括SEQ ID NO:28-29、或31-51任一项所示的核苷酸序列。
- [0092] 本发明第三个方面公开了一种重组载体，所述载体包含所述的嵌合抗原受体，或所述的核酸分子。
- [0093] 优选地，所述重组载体包括DNA载体、RNA载体、质粒、转座子载体、CRISPR/Cas9载体或病毒载体。
- [0094] 更优选地，所述病毒载体包括慢病毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体。
- [0095] 本发明第四个方面公开了工程改造的免疫细胞，所述工程改造的免疫细胞包括和/或表达所述的嵌合抗原受体，所述核酸分子，或所述的重组表达载体。
- [0096] 优选地，所述免疫细胞利用FAST-CAR工艺制备。
- [0097] 更优选地，所述FAST CAR将激活、转导和扩增步骤转化为一个单一的“同步激活-转导”步骤，其中所述工程化免疫细胞经历了少于72小时的离体扩增。
- [0098] 作为另一个优选的实施例，利用FAST-CAR工艺制备的工程化免疫细胞可以减少在生产过程中由于CD38CAR识别免疫细胞表面CD38抗原从而引发的自相残杀；或由于其他CAR识别免疫细胞表面对应的靶点抗原(例如，CD70CAR识别T细胞表面CD70抗原)引起的自相残杀的影响，同时所述免疫细胞可应用任何CAR靶向抗原和不同的肿瘤标志物中。
- [0099] 作为另一个优选的实施例，利用FAST-CAR工艺制备的工程化免疫细胞与经历离体扩增1周或更多周的可比群体中的细胞相比，观察到经过FAST-CAR工艺制备的免疫细胞表型更年轻。特征在于其中 $T_{n/scm}(CD45RO^{-}, CCR7^{+})$ 和 $T_{cm}(CD45RO^{+}, CCR7^{+})$ 占比更高。
- [0100] 作为另一个优选的实施例，利用FAST-CAR工艺制备的工程化免疫细胞，与经历离体扩增1周或更多周的可比群体中的细胞相比，观察到经过FAST-CAR工艺制备的免疫细胞体外扩增和持续杀伤能力更强。
- [0101] 优选地，所述免疫细胞包含T细胞、NK细胞、iNKT细胞、CTL细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞和/或NKT细胞。

- [0102] 更优选地，所述免疫细胞优选地可以为T细胞和NK细胞。
- [0103] 本发明第五个方面公开了上述的嵌合抗原受体、核酸分子、重组表达载体或工程改造的免疫细胞在制备用于治疗肿瘤药物或药物组合物中的应用。所述肿瘤可以是癌症。优选地，所述肿瘤为表达CD38和CLL1的肿瘤或癌症。
- [0104] 更优选地，所述肿瘤为急性骨髓性白血病。
- [0105] 优选地，所述药物组合物还包括药学上可接受的载体、辅剂。
- [0106] 上述的嵌合抗原受体与以下的一种或多种组合在制备用于治疗和/或预防癌症的药物组合中的用途：
- [0107] (1)增加包含CAR核酸或CAR多肽的细胞的功效的作用剂；
- [0108] (2)改善与施用包含CAR核酸或CAR多肽的细胞相关的一种或多种副作用的作用剂；
- [0109] (3)治疗与CD38和CLL1相关疾病的另外的作用剂。
- [0110] 优选地，所述治疗和/或预防还包括与第二疗法组合使用，所述第二疗法选自手术、化疗、放疗、免疫疗法、基因疗法、DNA疗法、RNA疗法、纳米疗法、病毒疗法、辅助疗法及其任意组合。
- [0111] 本发明相对于现有技术具有如下的显著优点及效果：
- [0112] (1)本发明的双靶向CAR T细胞对CLL1阳性和/或CD38阳性靶细胞显示高特异性的体外细胞毒性。
- [0113] (2)本发明使用FAST工艺生产的双靶向CAR T细胞不受基于CD38-CAR的自相残杀的影响；
- [0114] (3)本发明使用FAST工艺生产的双靶向CAR T细胞比传统工艺生产的双靶向CAR T细胞表型更年轻，并在体外实验中表现出更持久的肿瘤杀伤能力和扩增能力；
- [0115] (4)本发明使用FAST工艺生产的双靶向CAR T细胞能在较低剂量条件下有效抑制体内CD38和CLL1阳性肿瘤的生长，并显示出持久抗肿瘤药效。

## 附图说明

- [0116] 图1为实施例1所述靶细胞表面抗原表达示意图；
- [0117] 图2为实施例2所述Dual-CAR的结构示意图；

- [0118] 图3为实施例3使用抗原检测Dual-CAR T细胞的CAR阳性率；
- [0119] 图4为实施例4中Dual-CAR T对Hela-WT和CLL1、CD38过表达Hela细胞的杀伤结果示意图；
- [0120] 图5为实施例4中Dual-CAR T对表达CLL1、CD38的靶细胞杀伤结果示意图；
- [0121] 图6为实施例5中CAR-T细胞体外多轮杀伤流式细胞术分析流程示意图；
- [0122] 图7为实施例5中Dual-CAR T对HL60细胞多轮杀伤结果示意图；
- [0123] 图8为实施例5中Dual-CAR T对KG1细胞多轮杀伤结果示意图；
- [0124] 图9为实施例5中Dual-CAR T对THP1细胞多轮杀伤结果示意图；
- [0125] 图10为实施例8中CAR-NK92分选后的CAR阳性率的示意图；
- [0126] 图11为实施例9中CAR-NK92对肿瘤细胞的杀伤结果的示意图；
- [0127] 图12为实施例10中CAR-NK92的多轮杀伤结果的示意图；
- [0128] 图13为实施例12中F Dual-CAR T复苏后CD38表达、CAR表达、扩增和活率变化示意图；
- [0129] 图14为实施例12中F Dual-CAR T和C Dual-CAR T细胞分化表型比较示意图；
- [0130] 图15为实施例13中F Dual-CAR T和C Dual-CAR T细胞体外杀伤结果示意图；
- [0131] 图16为实施例14中F Dual-CAR T和C Dual-CAR T细胞体外多轮杀伤结果示意图；
- [0132] 图17为实施例15中F Dual-CAR T和C Dual-CAR T细胞小鼠体内药效实验图。

## 具体实施方式

- [0133] 下面通过具体实施例对本发明进行进一步的阐述，应该理解，下述实施例仅是为了用于说明本发明，并不对发明内容进行限定。
- [0134] 实施例中所用原料和设备均为本领域技术人员熟知，且均为市场上能够购买到或容易获得或制得。
- [0135] 如本文所用，术语“抗原”是指能够被选择性结合剂结合的分子或其片段。例如，抗原可以是可被选择性结合剂例如受体结合的配体。作为另一个实例，抗原可以是可被选择性结合剂例如免疫蛋白(例如抗体)结合的抗原分子。抗原也可以指能够在动物中使用以产生能够与该抗原结合的抗体的分子或其片段。在一

些情况下，抗原可以结合至底物(例如细胞膜)。或者，抗原可以不与底物结合(例如，分泌的分子，例如分泌的多肽)。

[0136] 术语“抗体”(Ab)应包括但不限于免疫球蛋白，其特异性结合抗原并包含通过二硫键互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链，或其抗原结合部分。每条H链包含重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个恒定结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个恒定结构域CL。VH和VL区可以进一步细分为称为互补决定区(CDR)的高变区，其散布有更保守的称为框架区(FR)的区域。每个VH和VL包含三个CDR和四个FR，从氨基末端到羧基末端按照以下顺序排列：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，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。

[0137] 应理解，本文中氨基酸名称采用国际通用的单英文字母标识，与其相对应的氨基酸名称三英文字母简写分别是：Ala(A)、Arg(R)、Asn(N)、Asp(D)、Cys(C)、Gln(Q)、Glu(E)、Gly(G)、His(H)、Ile(I)、Leu(L)、Lys(K)、Met(M)、Phe(F)、Pro(P)、Ser(S)、Thr(T)、Trp(W)、Tyr(Y)、Val(V)。

[0138] 术语“互补性决定区”或“CDR”是指免疫球蛋白的重链和轻链的高度可变区，如Kabat等人所定义(Kabat等人，Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed"US Department of Health and Human Services, NIH, 1991, 和后来的版本)。本申请采用Kabat编号系统对CDR进行定义。有三种重链CDR和三种轻链CDR。此处，取决于情况，术语“CDR”和“CDRs”用于指包含一种或多种或者甚至全部的对抗体与其识别的抗原或表位的结合亲和力起作用的主要氨基酸残基的区域。在另一具体实施方式中，CDR区或CDR是指IMGT定义的免疫球蛋白的重链和轻链的高度可变区。

[0139] 抗体的制备

[0140] 本发明的抗体可以本领域已知的各种方法来制备，例如通过基因工程重组技术来获得。例如，通过化学合成或PCR扩增获得编码本发明抗体的重链和轻链基因的DNA分子。将所得DNA分子插入表达载体内，然后转染宿主细胞。然后，在特定条件下培养转染后的宿主细胞，并表达本发明的抗体。

- [0141] 本发明的抗原结合片段可以通过水解完整的抗体分子获得(参见Morimoto等人J.Biochem.Biophys.Methods 24:107–117(1992)和Brennan等人,Science229:81(1985))。另外,这些抗原结合片段也可以直接由重组宿主细胞产生(综述于Hudson,Curr.Opin.Immunol.11:548–557(1999); Little等人,Immunol.Today,21:364–370(2000))。比如,Fab'片段可以直接从宿主细胞中获得;可以将Fab'片段化学偶联形成F(ab')<sub>2</sub>片段(Carter等人,Bio/Technology,10:163–167(1992))。另外,Fv、Fab或F(ab')<sub>2</sub>片段也可以直接从重组宿主细胞培养液中直接分离得到。本领域的普通技术人员完全知晓制备这些抗原结合片段的其它技术。
- [0142] 保守置换
- [0143] 如本文中所使用的,术语“保守置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换。例如,可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和PCR介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换,例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似(例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质,包括形成共价键或氢键的能力等)的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 $\beta$ 分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,优选用来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。
- [0144] 嵌合抗原受体(CAR)
- [0145] 本发明的嵌合抗原受体(CAR)包括细胞外结构域、跨膜结构域、和细胞内结构域。胞外结构域包括靶点特异性结合元件(也称为抗原结合结构域)和铰链区。细胞内结构域包括共刺激信号传导区和CD3  $\zeta$  链部分。
- [0146] 靶点特异性结合元件(也称为抗原结合结构域)指的是能够基于抗原结合特异性进行抗原识别的元件。

- [0147] 对于绞链区和跨膜区(跨膜结构域), CAR可被设计以包括融合至CAR的胞外结构域的跨膜结构域。在一些例子中,可选择跨膜结构域,或通过氨基酸置换进行修饰,以避免将这样的结构域结合至相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域,从而最小化与受体复合物的其他成员的相互作用。
- [0148] 在CAR的胞外结构域和跨膜结构域之间,或在CAR的胞浆结构域和跨膜结构域之间,可并入接头。如本文所用的,术语“接头”通常指起到将跨膜结构域连接至多肽链的胞外结构域或胞浆结构域作用的任何寡肽或多肽。接头可包括0-300个氨基酸,优选地2至100个氨基酸和最优选地3至50个氨基酸。
- [0149] 共刺激信号传导区指包括共刺激分子的细胞内结构域的一部分。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,而不是抗原受体或它们的配体。
- [0150] 本发明的CAR当在T细胞中表达时,抗原结合结构域与绞链区和跨膜区、来自共刺激分子和CD3  $\zeta$  链中的一个或多个的细胞内结构域融合。
- [0151] 在另一优选例中,抗原结合结构域与CD8a绞链区和CD8a跨膜区、4-1BB信号传导结构域和CD3  $\zeta$  信号结构域组合的细胞内结构域融合。
- [0152] 在另一优选例中,抗原结合结构域与CD8a绞链区和CD28跨膜区、CD28信号传导结构域和CD3  $\zeta$  信号结构域组合的细胞内结构域融合。
- [0153] 靶向CD38和CLL1的双特异性CAR
- [0154] 双特异性是指同一个CAR可以特异结合、免疫识别两个不同的抗原, CAR结合任意一个抗原都能产生免疫反应。
- [0155] 在另一优选例中,所述靶向CD38和CLL1的双特异性CAR如本发明第一方面所述。
- [0156] 在本发明的一个较佳的实施方式中,本发明提供的CAR的胞外结构域包括靶向CD38和CLL1的抗原结合结构域。
- [0157] 在另一优选例中,本发明提供一个针对CD38和CLL1抗原的双特异性嵌合抗原受体。同时靶向CD38和CLL1的CAR结构组分可以包括信号肽,抗CD38的单域抗体,抗CLL1的单域抗体,绞链区,跨膜区,和胞内T细胞信号区。

- [0158] 双靶向CAR-T治疗范围更广泛。同时靶向CD38和CLL1的CAR-免疫细胞可以减少因单一表面抗原下调或者缺失造成的抗原逃逸的可能性。另外，针对CD38和CLL1的靶标组合的双特异性嵌合抗原受体，显示高特异性的体外细胞毒性。
- [0159] 自然杀伤细胞(natural killer cell, NK细胞)
- [0160] NK细胞是机体内重要的免疫细胞，NK细胞形态上属于大颗粒淋巴细胞，来源于骨髓，是除T细胞、B细胞之外的第三大类淋巴细胞，约占血液中所有免疫细胞(白细胞数量)的15%，属于天然免疫系统的核心细胞，主要分布于外周血、肝脏和脾脏，在人体内NK细胞主要特征为CD3-CD56+淋巴细胞群，其中血液中主要为CD16+CD56dim亚型(根据细胞上CD56分子表达密度的差异，将NK细胞分为CD56dim和CD56bright两个亚群；CD56dim占NK细胞90%以上，主要为细胞毒作用，表达中度亲和力的IL-2受体(IL-2R)，具有更强的杀伤活性；CD56bright可产生大量细胞因子，主要起免疫调节作用，高表达IL-2R)。
- [0161] 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)
- [0162] 如本文所用，术语“CAR-T细胞”、“CAR-T”、“本发明CAR-T细胞”。嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)是将能识别某种肿瘤抗原的抗体的抗原结合部与CD3- $\zeta$ 链或Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ 的胞内部分在体外偶联为一个嵌合蛋白，通过基因转导的方法转染患者的T细胞，使其表达嵌合抗原受体(CAR)。患者的T细胞被“重编码”后，生成大量肿瘤特异性的CAR-T细胞。基本原理就是利用病人自身的免疫细胞来清除癌细胞。
- [0163] CAR-NK过继细胞疗法(ACT)是指将NK细胞经过嵌合抗原受体(CAR)基因修饰，赋予NK细胞靶向识别肿瘤细胞的能力，经过体外扩展后注入人体从而达到肿瘤治疗的效果。目前临床上使用的NK细胞主要有五种来源：人外周血(PB)、脐带血(UCB)、人胚胎干细胞(hESCs)、诱导多能干细胞(iPSCs)以及NK-92细胞系。
- [0164] NK-92细胞系是目前在CAR-NK中研究最为广泛的细胞系，于1992年从1例50岁的非霍奇金氏淋巴瘤男性患者体内分离得到，生长呈IL-2依赖性。与原代NK细胞相比，NK-92细胞系最大的优势在于其表面的抑制性受体(如KIR)表达很低，抑制性受体信号的缺失使得其对多种肿瘤的杀伤能力要优于原代NK细胞或

者经细胞因子活化的其他杀伤细胞。此外，NK-92在实体瘤治疗中也有一定的潜力。CAR-T在实体瘤中效果不佳的重要原因是肿瘤细胞高表达PD-L1与T细胞表面的抑制分子PD-1结合进而抑制了其杀伤活性，而NK-92表面抑制性受体的缺失使之能够避免类似抑制信号的干扰。但是NK-92也存在着一些明显的缺点，例如潜在的致瘤性和EB病毒易感性等，因此，NK-92必须经过辐照后才能够使用。

[0165] FAST-CAR平台

[0166] 包括本文所述的“FAST工艺”是一种工程化免疫细胞制备工艺。

[0167] 在传统的CAR-T生产过程中，首先使用CD3和/或CD28抗体激活患者的T细胞，然后以病毒载体转导，以表达一种或多种CAR。这些经过改造的CAR-T细胞在被注射回人体前会在体外进行扩增，生产过程整体通常需要1到6周。

[0168] FasTCAR平台，能够使用来自慢病毒且具有高质量、并表现出高基因转导效率的XLenti载体，同时激活和转导处于静息状态的T细胞。在转导后，一种或多种CAR会整合到T细胞基因组中并稳定表达。基于我们的临床前研究，经过转导的T细胞具有较高的扩增和肿瘤细胞清除活性，去除了体外细胞扩增步骤的必要性，可直接成剂、给患者使用。基于这样的创新，FasTCAR技术能将激活、转导和扩增步骤转化为一个单一的“同步激活-转导”步骤。该技术能将自体CAR-T细胞生产时间从行业标准的1到6周，显著缩短到72小时内生产完毕。

[0169] 载体

[0170] 编码期望分子的核酸序列可利用在本领域中已知的重组方法获得，诸如例如通过从表达基因的细胞中筛选文库，通过从已知包括该基因的载体中得到该基因，或通过利用标准的技术，从包含该基因的细胞和组织中直接分离。可选地，感兴趣的基因可被合成生产。

[0171] 本发明也提供了其中插入本发明的表达盒的载体。源于逆转录病毒诸如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具，因为它们允许转基因长期、稳定的整合并且其在子细胞中增殖。慢病毒载体具有超过源自致癌逆转录病毒诸如鼠科白血病病毒的载体的优点，因为它们可转导非增殖的细胞，诸如肝细胞。它们也具有低免疫原性的优点。

- [0172] 简单概括，通常可操作地连接本发明的表达盒或核酸序列至启动子，并将其并入表达载体。该载体适合于复制和整合真核细胞。典型的克隆载体包含可用于调节期望核酸序列表达的转录和翻译终止子、初始序列和启动子。
- [0173] 本发明的表达构建体也可利用标准的基因传递方案，用于核酸免疫和基因疗法。基因传递的方法在本领域中是已知的。见例如美国专利号5,399,346、5,580,859、5,589,466，在此通过引用全文并入。在另一个实施方式中，本发明提供了基因疗法载体。
- [0174] 该核酸可被包载入许多类型的载体。例如，该核酸可被克隆入载体，其包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特定的感兴趣载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。
- [0175] 进一步地，表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是公知的并在例如Sambrook等(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常，合适的载体包含在至少一种有机体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制酶位点和一个或多个可选择的标记(例如，WO01/96584；WO01/29058；和美国专利号6,326,193)。
- [0176] 已经开发许多基于病毒的系统，用于将基因转移入哺乳动物细胞。例如，逆转录病毒提供了用于基因传递系统的方便的平台。可利用在本领域中已知的技术将选择的基因插入载体并包装入逆转录病毒颗粒。该重组病毒可随后被分离和传递至体内或离体的对象细胞。许多逆转录病毒系统在本领域中是已知的。在一些实施方式中，使用腺病毒载体。许多腺病毒载体在本领域中是已知的。在一个实施方式中，使用慢病毒载体。
- [0177] 额外的启动子元件，例如增强子，可以调节转录开始的频率。通常地，这些位于起始位点上游的30–110bp区域中，尽管最近已经显示许多启动子也包含起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔经常是柔性的，以便当元件相对于另一个被倒置或移动时，保持启动子功能。在胸苷激酶(tk)启动子中，启动子

元件之间的间隔可被增加隔开50bp，活性才开始下降。取决于启动子，表现出单个元件可合作或独立地起作用，以启动转录。

[0178] 合适的启动子的一个例子为即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列为能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-1  $\alpha$  (EF-1  $\alpha$ )。然而，也可使用其他组成型启动子序列，包括但不限于类人猿病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳癌病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、鸟类白血病病毒启动子、艾伯斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒即时早期启动子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子，诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红素启动子和肌酸激酶启动子。进一步地，本发明不应被限于组成型启动子的应用。诱导型启动子也被考虑为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关，其能够当这样的表达是期望的时，打开可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达，或当表达是不期望的时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0179] 为了评估CAR多肽或其部分的表达，被引入细胞的表达载体也可包含可选择的标记基因或报道基因中的任一个或两者，以便于从通过病毒载体寻求被转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在其他方面，可选择的标记可被携带在单独一段DNA上并用于共转染程序。可选择的标记和报道基因两者的侧翼都可具有适当的调节序列，以便能够在宿主细胞中表达。有用的可选择标记包括例如抗生素抗性基因，诸如neo等等。

[0180] 报道基因用于鉴定潜在转染的细胞并用于评价调节序列的功能性。通常地，报道基因为以下基因：其不存在于受体有机体或组织或由受体有机体或组织进行表达，并且其编码多肽，该多肽的表达由一些可容易检测的性质例如酶活性清楚表示。在DNA已经被引入受体细胞后，报道基因的表达在合适的时间下进行测定。合适的报道基因可包括编码荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白的基因(例如，Ui-Tei等，2000FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是公知的并可利用已知技术制备或从商业上获

得。通常，显示最高水平的报道基因表达的具有最少5个侧翼区的构建体被鉴定为启动子。这样的启动子区可被连接至报道基因并用于评价试剂调节启动子-驱动转录的能力。

- [0181] 将基因引入细胞和将基因表达入细胞的方法在本领域中是已知的。在表达载体的内容中，载体可通过在本领域中的任何方法容易地引入宿主细胞，例如，哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如，表达载体可通过物理、化学或生物学手段转移入宿主细胞。
- [0182] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染法、粒子轰击、微注射、电穿孔等等。生产包括载体和/或外源核酸的细胞的方法在本领域中是公知的。见例如Sambrook等(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。将多核苷酸引入宿主细胞的优选方法为磷酸钙转染。
- [0183] 将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体，特别是逆转录病毒载体，已经成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物例如人细胞的方法。其他病毒载体可源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺伴随病毒等等。见例如美国专利号5,350,674和5,585,362。
- [0184] 将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统，诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠；和基于脂质的系统，包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内传递工具(delivery vehicle)的示例性胶体系统为脂质体(例如，人造膜囊)。
- [0185] 在使用非病毒传递系统的情况下，示例性传递工具为脂质体。考虑使用脂质制剂，以将核酸引入宿主细胞(体外、离体(ex vivo)或体内)。在另一方面，该核酸可与脂质相关联。与脂质相关联的核酸可被封装入脂质体的水性内部中，散布在脂质体的脂双层内，经与脂质体和寡核苷酸两者都相关联的连接分子附接至脂质体，陷入脂质体，与脂质体复合，分散在包含脂质的溶液中，与脂质混合，与脂质联合，作为悬浮液包含在脂质中，包含在胶束中或与胶束复合，或以其他方式与脂质相关联。与组合物相关联的脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体不限于溶液中的任何具体结构。例如，它们可存在于双分子层结构中，作为

胶束或具有“坍塌的(collapsed)”结构。它们也可简单地被散布在溶液中，可能形成大小或形状不均一的聚集体。脂质为脂肪物质，其可为天然发生或合成的脂质。例如，脂质包括脂肪小滴，其天然发生在细胞质以及包含长链脂肪族烃和它们的衍生物诸如脂肪酸、醇类、胺类、氨基醇类和醛类的该类化合物中。

[0186] 药物组合物

[0187] 本发明的分离的核酸分子、载体、宿主细胞、本发明的经改造的免疫细胞或免疫细胞组合物可以配制成医学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、绝剂、锭剂、栓剂、注射剂(包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液)、吸入剂、喷雾剂等。优选剂型取决于预期的给药方式和治疗用途。本发明的药物组合物应当是无菌的并在生产和储存条件下稳定。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。此外，可以将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂(例如，通过真空干燥或冷冻干燥)以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中，例如注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液(例如0.9% (w/v) NaCl)、葡萄糖溶液(例如5%葡萄糖)、含有表面活性剂的溶液(例如0.01%聚山梨醇20)、pH缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲溶液)、Ringer氏溶液及其任意组合。

[0188] 本发明的分离的核酸分子、载体、宿主细胞、本发明的经改造的免疫细胞或免疫细胞组合物可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用，包括但不限于，口服、口腔、舌下、眼球、局部、肠胃外、直肠、叶鞘内、内胞浆网槽内、腹股沟、膀胱内、局部(如，粉剂、药膏或滴剂)，或鼻腔途径。但是，对于许多治疗用途而言，优选的给药途径/方式是胃肠外给药(例如静脉注射或推注，皮下注射，腹膜内注射，肌内注射)。本领域技术人员应理解，给药途径和/或方式将根据预期目的而发生变化。在某些实施方案中，分离的核酸分子、核酸构建体、载体、宿主细胞、本发明的经改造的免疫细胞或免疫细胞组合物通过静脉注射或推注给予。

[0189] 本发明的药物组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的分离的核酸分子、核酸构建体、载体、宿主细胞、本发明的经改造的免疫细胞或免疫细胞组合物。“预防有效量”是指足以预防、阻止或延迟疾病的发生的量。“治疗

有效量”是指足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。分离的核酸分子、核酸构建体、载体、宿主细胞、本发明的经改造的免疫细胞或免疫细胞组合物的治疗有效量可根据如下因素发生变化:待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄, 体重和性别, 药物的施用方式, 以及同时施用的其他治疗等等。

[0190] 在本发明中, 可调整给药方案以获得最佳目的反应(例如治疗或预防反应)。例如, 可以单次给药, 可以在一段时间内多次给药, 或者可以随治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。

[0191] 治疗性应用

[0192] 因此, 本发明也提供了刺激对哺乳动物的靶细胞群或组织的T细胞-介导的免疫应答的方法, 其包括以下步骤: 给哺乳动物施用本发明的CAR-T细胞。

[0193] 在一个实施方式中, 本发明包括一类细胞疗法, 分离病人自体T细胞(或者异源供体来源的NK细胞), 激活并进行基因改造产生CAR-T、CAR-NK细胞, 随后注入病人体内。这种方式患移植物抗宿主病概率极低, 抗原被T细胞或NK细胞以MHC非依赖的方式识别。此外, 一种CAR-T、CAR-NK就可以治疗表达该抗原的所有癌症。不像抗体疗法, CAR-T、CAR-NK细胞能够体内复制, 产生可导致持续肿瘤控制的长期持久性。

[0194] 在一个实施方式中, 本发明的CAR-T细胞可经历稳固的体内T细胞扩展并可持续延长的时间量。另外, CAR介导的免疫应答可为过继免疫疗法步骤的一部分, 其中CAR中的抗原结合结构域诱导CAR-修饰的免疫细胞对抗原表达靶细胞的特异性的免疫应答。例如, 抗CD38和/或CLL1的CAR-T、CAR-NK细胞引起抗表达CD38和/或CLL1的细胞的特异性免疫应答。

[0195] 尽管本文公开的数据具体公开了包括CD38和/或CLL1抗原识别结合域、铰链和跨膜区、4-1BB或CD28共刺激结构域和CD3  $\zeta$  胞内信号域的慢病毒载体, 但本发明应被解释为包括对构建体组成部分中的每一个的任何数量的变化。

[0196] 本发明的CAR-修饰T细胞也可用作对哺乳动物离体免疫和/或体内疗法的疫苗类型。优选地, 哺乳动物为人。

- [0197] 对于离体免疫，以下中的至少一项在将细胞施用进入哺乳动物前在体外发生：  
i) 扩增细胞，ii) 将编码CAR的核酸引入细胞，和/或iii) 冷冻保存细胞。
- [0198] 离体程序在本领域中是公知的，并在以下更完全地进行讨论。简单地说，细胞从哺乳动物(优选人)中分离并用表达本文公开的CAR的载体进行基因修饰(即，体外转导或转染)。CAR-修饰的细胞可被施用给哺乳动物接受者，以提供治疗益处。哺乳动物接受者可为人，和CAR-修饰的细胞可相对于接受者为自体的。可选地，细胞可相对于接受者为同种异基因的、同基因的(syngeneic)或异种的。
- [0199] 除了就离体免疫而言使用基于细胞的疫苗之外，本发明也提供了体内免疫以引起针对患者中抗原的免疫应答的组合物和方法。
- [0200] 本发明提供了治疗肿瘤的方法，其包括施用给需要其的对象治疗有效量的本发明的CAR-修饰的T细胞。
- [0201] 本发明的CAR-修饰的T细胞可被单独施用或作为药物组合物与稀释剂和/或其他组分诸如IL-2、IL-17或其他细胞因子或细胞群结合施用。简单地说，本发明的药物组合物可包括如本文所述的靶细胞群，与一种或多种药学或生理学上可接受载体、稀释剂或赋形剂结合。这样的组合物可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐水等等；碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇；蛋白质；多肽或氨基酸诸如甘氨酸；抗氧化剂；螯合剂诸如EDTA或谷胱甘肽；佐剂(例如，氢氧化铝)；和防腐剂。本发明的组合物优选配制用于静脉内施用。
- [0202] 本发明的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由这样的因素确定，如患者的病症、和患者疾病的类型和严重程度——尽管适当的剂量可由临床试验确定。
- [0203] 实施例1：细胞培养及构建
- [0204] KG1-LucG细胞、HL60-LucG细胞、U937-LucG细胞、THP1-LucG细胞、Molm13-LucR细胞、Molm13-CLL1-LucR细胞和K562-LucG细胞均使用RPMI 1640培养基培养；293T和野生型，与表达CD38，表达CLL1，同时表达CLL1和CD38的Hela细胞(Hela-WT, Hela-CD38, Hela-CLL1, Hela-CLL1-CD38)，使用DMEM培养基培养。以上所有培养基均添加10%(v/v)胎牛血清和100U/ml的青霉

素和链霉素，2mML-谷氨酰胺，1mM丙酮酸钠。细胞在37℃，5%CO<sub>2</sub>和饱和度下培养。

[0205] 其中，表达CD38的Hela细胞是通过慢病毒载体将CD38抗原转入Hela细胞后获得的稳转细胞系，能够特异性的表达CD38蛋白分子；表达CLL1的Hela细胞是通过慢病毒载体将CLL1抗原转入Hela细胞后获得的稳转细胞系，能够特异性的表达CLL1蛋白分子；同时表达CLL1和CD38的Hela细胞是在表达CLL1的Hela细胞上再次通过慢病毒载体将CD38抗原转入后获得的稳转细胞系，能够特异性的表达CLL1和CD38蛋白分子。Molm13-LucR细胞是使用表达firefly luciferase-RFP(T2A连接)的慢病毒感染后筛选得到的稳转细胞系。KG1-LucG细胞、HL60-LucG细胞、U937-LucG细胞、THP1-LucG细胞和K562-LucG细胞是使用表达firefly luciferase-GFP(T2A连接)的慢病毒感染后筛选得到的稳转细胞系。Molm13-CLL1-LucR细胞是通过慢病毒载体将CLL1抗原转入Molm13-LucR细胞后获得的稳转细胞系，能够特异性的表达CLL1蛋白分子。

[0206] 所使用的靶细胞表面抗原的表达情况如图1所示。Hela-CD38为过表达CD38的细胞，Hela-CLL1为过表达CLL1的细胞，Hela-CLL1-CD38为过表达CLL1和CD38的细胞，Hela-WT和K562为CLL1和CD38双阴细胞，Molm13为CD38单阳细胞，HL60、KG1、U937、THP1和Molm13-CLL1为CLL1和CD38双阳细胞。

[0207] 实施例2：双CAR载体构建和病毒制备

[0208] 同时靶向CLL1和CD38的CAR(Dual CAR)结构如图2所示，由CD8 $\alpha$ 信号肽，识别CD38(或CLL1)的VHH，G4S序列，识别CLL1(或CD38)的VHH，Flag标签，铰链与跨膜区，共刺激信号区，CD3z信号区组成。将Dual CAR基因置于EF1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )的启动子下，形成Dual CAR表达载体。Dual CAR表达载体根据VHH序列的组成分别编号为C7B5，C7B8，C9B5，C9B8，B5C7，B5C9，B8C7，B8C9，C7B3，C9B3，B3C7，B3C9。

[0209] 其中B3、B5、B8、C7、C9分别表示具有B3羊驼抗体氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)、B5羊驼抗体氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)、B8羊驼抗体氨基酸序列(SEQ ID NO: 3)、C7羊驼抗体氨基酸序列(SEQ ID NO: 4)、C9羊驼抗体氨基酸序列(SEQ ID NO: 5)的单域抗体。

| 编号 | 描述           | 序列                                                                                                 |
|----|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | B3 羊驼抗体氨基酸序列 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLACTASGNIFASQVMNWYRQAPGSPRE<br>LVATITPGGRTTYADSAKGRFTVATDNAKATAYLQLTSLTPEDTGVVY |

|   |              |                                                                                                                                         |
|---|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |              | CHVRLFPATDYWGQGTQVTVSS                                                                                                                  |
| 2 | B5 羊驼抗体氨基酸序列 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFRLDYYAIGWFRQAPGKERE<br>AISCIDITGMHTNYGDSVMGRFTISRDDAKRTVYLQMNSLEAEDTGI<br>YYCAPAQYAACSA LGVKVSFTSWGQGTQVTVSP |
| 3 | B8 羊驼抗体氨基酸序列 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFRLDYYAIGWFRQAPGKERE<br>AIACIDITGFHTNYGDSVSGRFTISRDNAGTTVYLQMNSLEAEDTGIY<br>YCAPARYAACSA LDVKLSFTSWGQGTQVTVSS |
| 4 | C7 羊驼抗体氨基酸序列 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMGWARQVPGKEVE<br>WVSGIYSDGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAV<br>YIICATDPTVIHSDLPVWGQGTQVTVSS        |
| 5 | C9 羊驼抗体氨基酸序列 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMGWARQVPGKDVE<br>WVSGIYSDGSTYYADSVKGRFTISRYNAKNTVYLQMNSLPEDTAV<br>YYCATDPTLENQTTAWGQGTQVTVSS           |

- [0210] 将 $2.5 \times 10^6$ 个293T细胞接种在150cm<sup>2</sup>的培养皿中的10 % FBS的DMEM培养基中，在转染前将细胞在37℃，5 % CO<sub>2</sub>和饱和湿度下培养过夜。
- [0211] 第二天将辅助质粒和Dual CAR表达载体加入含有13.8mL Opti MEM培养基的离心管中，然后向管中加入80 μg PEI得到混合物。将混合物在室温下静置20分钟，然后补充12mLOpti MEM培养基以获得转染培养基。对于转染，去除培养基后，将293T细胞与转染培养基一起温育4–6小时，然后将转染培养基替换为含有2 % FBS的20mL DMEM培养基。72小时后，收集培养基并在3000g、4℃下离心15 min。上清液进一步在27000g、4℃下离心2小时。收集沉淀物并用400 μL预冷的X–VIVO培养基重悬以获得Dual CAR慢病毒悬浮液，并在4℃下保持过夜。第二天，将病毒悬浮液等分以供进一步使用。
- [0212] 实施例3：Dual–CAR T细胞制备
- [0213] T细胞均使用X–VIVO培养基培养。将Pan T细胞与CD3/CD28 Dynabeads以1：1的比例(CD3/CD28 Dynabeads：T细胞)以及300IU/mL IL2一起温育以激活细胞。2天后，将激活的细胞进行电转敲除CD38基因再进行病毒转染制备Dual–CAR T。

- [0214] 具体操作如下：将0.25nmol靶向CD38基因的gRNA和16.5ug的Cas9蛋白混合均匀后在37℃下孵育15min制备RNP；孵育期间在82uL Nucleofector Solution中加入18uL supplement buffer配制成100uL lonza P3电转缓冲液；同时使用磁力柱去除CD3/CD28 Dynabeads，并取出 $1 \times 10^7$ 个激活的T细胞，400g离心5min后收集细胞沉淀；孵育结束后使用100uL lonza P3电转缓冲液重悬 $1 \times 10^7$ 个T细胞沉淀再加入RNP中混合均匀，随后转移至电转杯中放入lonza 2B电转仪，使用FI-115程序进行电转，电转后的细胞与300IU/mL IL2一起温育过夜。
- [0215] 电转后第2天在37℃下以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞密度用Dual CAR病毒转染T细胞，将转染后的细胞继续培养扩增，在扩增过程中和冻存时使用CLL1和CD38抗原检测Dual-CAR T细胞的CAR阳性率，每隔2-3天更换一半培养基，在去除CD3/CD28 Dynabeads后第8天收获得到Dual-CAR T细胞。
- [0216] 图3展示了使用抗原检测Dual-CAR T细胞的CAR阳性率，病毒转染后的T细胞表面能够同时使用CLL1抗原和CD38抗原检测到CLL1CAR及CD38CAR的表达。
- [0217] 实施例4：Dual-CAR T细胞体外杀伤
- [0218] 对获得的Dual-CAR T细胞进行体外杀伤实验。使用过表达CLL1和CD38的Hela过表达细胞系进行RTCA杀伤分析或者使用荧光素酶标记的肿瘤靶细胞进行检测。
- [0219] 通过将荧光素酶基因转入靶细胞，克隆筛选后获得稳转细胞株(HL60、Molm13、U937和K562)。进行实验时，加入荧光素底物，荧光素酶与荧光素反应即可产生荧光，通过检测荧光的强度可以测定荧光素酶的活性，检测细胞的存活比率，即可得到CAR-T细胞的杀伤效应。
- [0220] 结果显示，将CAR-T细胞与各靶细胞(CL1/CD38双阳、CL1单阳、CD38单阳)共培养后，靶细胞都会裂解，表明Dual-CAR T对CL1/CD38双阳、CL1单阳、CD38单阳的细胞都有杀伤作用。
- [0221] 具体结果如图4显示，双特异CAR-T对单阳CL1阳性靶细胞(Hela-CL1)或单阳的CD38阳性靶细胞(Hela-CD38)均有显著杀伤，并对CL1和CD38双阳的靶细胞Hela-CL1-CD38也有显著杀伤。说明CL1与CD38组合的双特异性CAR-T

细胞对单靶和双靶细胞都有杀伤作用。并且Dual-CAR T对于CLL1和CD38双阴的靶细胞Hela没有杀伤效果。

[0222] 图5显示, Dual-CAR T可以对表达CD38和CLL1的肿瘤靶细胞HL60、U937和Molm13有显著杀伤, 同时对CLL1与CD38双阴细胞K562不具有杀伤作用。

[0223] 实施例5: Dual-CAR T细胞体外多轮杀伤

[0224] 在第一天将Dual-CAR T复苏, 在37℃下以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞密度和300IU/mL IL2一起温育培养。在第二天分别取出 $1 \times 10^5$ 个细胞样品使用CLL1和CD38抗原检测Dual CAR阳性细胞得占比。

[0225] 根据细胞CAR阳性率取出 $2 \times 10^5$ 的CAR阳性的Dual-CAR T细胞分别与 $6 \times 10^5$ 个HL60-LucG和KG1-LucG细胞共培养(E:T=1:3)进行多轮杀伤分析。在每一轮进行至第3天时, 取出部分共培养细胞通过流式细胞术进行分析, 分析流程见图6, 具体方法描述如下: 从主细胞群中圈出7AAD阴性的活细胞群, 再通过GFP信号区分T细胞(GFP阴性)与靶细胞(GFP阳性), 在T细胞群中使用CLL1和CD38抗原标记分析CAR阳性率。根据流式细胞术和细胞计数结果, 取出相同数量的Dual-CAR T细胞, 并补加肿瘤细胞至固定的效靶比(E:T为1:3)进行下一轮杀伤实验。

[0226] 针对HL60靶细胞的多轮杀伤结果如图7所示。图7A展示Dual-CAR T细胞在每轮结束时靶细胞(HL60)残余细胞扩增倍数; 图7B展示Dual-CAR T细胞在针对HL60的多轮杀伤过程中CAR阳性率的变化; 图7C展示Dual-CAR T细胞在针对HL60的多轮杀伤过程中CAR T细胞总扩增倍数。

[0227] 从图7A中可观察到C7B3和C9B5对于HL60细胞的抑制能力强于其他Dual-CAR T; 在第三轮结束时大部分的Dual-CAR T已不能抑制HL60细胞且CAR阳性率开始下降(图7B); 从图7C中可观察到在针对HL60进行的多轮杀伤中, C7B3的扩增要明显优于其他Dual-CAR T。

[0228] 针对KG1靶细胞的多轮杀伤结果如图8所示。图8A展示Dual-CAR T细胞在每轮结束时靶细胞(KG1)残余细胞扩增倍数; 图8B展示Dual-CAR T细胞在针对KG1的多轮杀伤过程中CAR阳性率的变化; 图8C展示Dual-CAR T细胞在针对KG1的多轮杀伤过程中CAR T细胞总扩增倍数。

- [0229] 在第三轮结束时所有Dual-CAR T细胞都不能很好地抑制KG1细胞，但C9B5和C9B8对于KG1细胞的抑制能力强于其他Dual-CAR T(图8A)。从图8C中可观察到在针对KG1进行的多轮杀伤中，C9B5和C9B8的扩增要优于其他Dual-CAR T细胞。
- [0230] 针对THP1靶细胞的多轮杀伤结果如图9所示。图9A展示Dual-CAR T细胞在每轮结束时靶细胞(THP1)残余细胞扩增倍数；图9B展示Dual-CAR T细胞在针对THP1的多轮杀伤过程中CAR阳性率的变化；图9C展示Dual-CAR T细胞在针对THP1的多轮杀伤过程中CAR T细胞总扩增倍数。
- [0231] 在第五轮结束时所有Dual-CAR T细胞都不能很好地抑制THP1细胞，但C7B5、C9B5和C9B8维持CAR表达的能力强于其他Dual-CAR T(图9B)。从图9C中可观察到在针对THP1进行的多轮杀伤中，C9B8、C7B5和C9B5的扩增要优于其他Dual-CAR T细胞。
- [0232] 实施例6：NK细胞及培养方法
- [0233] NK92细胞完全培养基是Alpha MEM中添加12.5%FBS、12.5%Horse Serum、1%Pen/strep、1%sodium pyruvate、1%L-glutamine、100U IL2.HL60、Molm13、KG-1、THP-1、K562细胞完全培养基是RPMI1640中添加10%FBS、1%Pen/strep、1%sodium pyruvate、1%L-glutamine。细胞在37℃，5%CO<sub>2</sub>和饱和湿度下培养。
- [0234] 实施例7：CAR-NK慢病毒包装及转染
- [0235] 复苏293T接种1个150cm<sup>2</sup>培养皿，置于CO<sub>2</sub>培养箱中培养72h。两次传代后接种于150cm<sup>2</sup>培养皿，用于转染。将慢病毒表达载体、辅助质粒gag/pol、Rev、VSV-G构成的四质粒系统与PEI转染试剂混合后，加至一定体积的无血清DMEM中，混匀放置15min；将上述混合液加至铺有293T细胞的150cm<sup>2</sup>培养皿中，轻轻混匀，于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养6h。6h后更换新鲜培养基，继续培养，于48、72h后收集慢病毒培养上清进行感染。将收获上清转移至离心管，离心4000rpm，10min，去除细胞碎片。将所有离心后的LVV上清转移至0.45μm过滤器中过滤澄清，滤液再转移至新的离心管中。将澄清后的慢病毒上清液加入到超速离心管中并于天平上配平。将配平后的超速离心管放入吊杯中，吊杯放入

转子对应位置，随后一起放入超速离心机中离心，离心温度4℃，转速100000g，离心时间90min，升速度和降速度设置为最高。超速离心结束后弃去上清，每管加入0.5mL培养基，2-8℃重悬2h。收获的病毒加入1e6NK92混合于24孔板中，置于CO<sub>2</sub>培养箱中培养72h。

[0236] 实施例8：CAR-NK流式检测及分选

[0237] 取出细胞悬液，用DPBS洗三次，离心300g,5min,弃去上清，加入抗体混合液(anti-FLAG-APC, 1: 100加入DPBS中)，混匀置于4℃，染色30min，用DPBS洗三次，离心300g, 5min。用DPBS重悬后，用于流式检测和流式分选。分选时，圈选PE阳性的细胞，收集于5ml流式管中，分选结束后，离心300g, 5min，弃去上清，用预热的培养基重悬细胞，置于37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱。

[0238] 分选后的CAR-NK92细胞，通过anti-FLAG-APC抗体染色，进行流式检测CAR的表达。

[0239] 流式检测的结果如图10所示，经过分选后的各CAR-NK92细胞CAR阳性率均到了98%以上。

[0240] 实施例9：CAR-NK杀伤实验

[0241] 使用荧光素酶标记的肿瘤靶细胞进行杀伤能力的检测。通过将荧光素酶基因转入靶细胞，获得Molm13、HL60、THP-1和KG1的荧光素酶基因表达的稳转细胞株。进行实验时，加入荧光素底物，荧光素酶与荧光素反应即可产生荧光，通过检测荧光的强度可以测定荧光素酶的活性，通过检测细胞的存活比率，即可得到各效应细胞的杀伤效应。

[0242] 结果如图11所示，所有CAR-NK92在各靶细胞上均显示出比NK92更明显的杀伤，提示CAR介导的杀伤作用。

[0243] 实施例10：CAR-NK多轮杀伤实验

[0244] 在实验前一天，取带有荧光靶细胞THP1重悬计数，调整细胞密度为 $8 \times 10^4$ /ml，以100ul每孔铺96孔板。实验当天，取相应数量NK92、CAR-NK92细胞加入孔中。放入Cellcyte中开始实验，通过明场和荧光通道每4个小时进行一次拍照。每两天为一轮，一轮杀伤结束后，去掉部分上清，转移至新的铺好靶细胞的板

子上，放入Cellcyte开始新一轮杀伤。Killing Index是通过调整过零时刻和细胞正常生长误差之后，以荧光细胞数量的减少来计算杀伤。

[0245] 多轮杀伤实验结果如图12所示，各CAR-NK92细胞都显示出了比NK92细胞更强的杀伤能力，提示CAR介导的杀伤在持续发挥作用。

[0246] 实施例11：Fast Dual-CAR T细胞制备

[0247] 从健康供体采集外周血，通过密度梯度离心机以500-600g离心20-30分钟分离P BMC。结合CD28抗体和CD3抗体(CD3/CD28 Dynabeads)的磁珠用于分选和富集T细胞。进一步将与CD3/CD28 Dynabeads结合的T细胞和300IU/mL IL2一起温育以激活细胞。同时在37℃下以 $0.1-10 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞密度用Dual-CAR病毒过夜转染，第二天用盐水缓冲液洗涤后直接冻存。无需进一步扩增，即可获得FAST Dual-CAR T细胞。在该过程中，细胞被激活，这些细胞也被称为F Dual-CAR T细胞。

[0248] 实施例12：Fast Dual-CAR T细胞表型

[0249] 由于T细胞表面存在CD38蛋白，CD38CAR的表达会导致自相残杀，从而导致表达CD38的T细胞被清除。为分析FAST工艺生产的Dual-CAR T是否会发生严重的自相残杀，在F Dual-CAR T细胞复苏后进行CAR阳性标定的同时，也关注细胞活率、扩增情况以及细胞表面CD38表达。

[0250] 将F Dual-CAR T细胞复苏后在37℃条件以及300IU/mL IL2的存在下以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞密度进行培养，在复苏后的D2、D3、D5、D8分别对细胞计数，并取出 $1 \times 10^5$ 个细胞样品使用CLL1和CD38抗原检测Dual-CAR阳性细胞占比，同时使用靶向CD38的抗体分析T细胞表面CD38的表达。

[0251] 复苏后F Dual-CAR T细胞数据如图13所示。图13A显示为T细胞表面CD38<sup>+</sup>百分比，F-C9B5具有有F-NT相似的CD38<sup>+</sup>比例，F-B8C9在复苏前期CD38<sup>+</sup>细胞占比较少，但在复苏后第五天恢复至与F-NT相似水平，而F-C7B3则未能在细胞表面检测到CD38<sup>+</sup>细胞。各组F Dual-CAR T在复苏后CAR阳性率逐渐上调(图13B)。F-C9B5具有有F-NT相似的细胞扩增和活率，而F-B8C9和F-C7B3扩增和活率较低(图13C、B)，结合CD38<sup>+</sup>百分比推测可能是由于自相残杀导致细胞活率和扩增倍数降低。

- [0252] 在F Dual-CAR T复苏后第三天,使用CD45RO和CCR7对F Dual-CAR T和C Dual-CAR T(传统生产工艺)细胞分化表型进行分析。将Stem memory-like T cells(Tscm)定义为CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>, central memory T cells(Tcm)定义为CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, effector memory T cells(Tem)定义为CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>, 终末分化的effector T cells(Teff)定义为CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>。如图14所示, F-C9B5细胞具有较大比例的年轻的Tscm和Tcm表型, 而C-C9B5细胞则大部分处于分化后期的Tem和Teff表型。
- [0253] 实施例13: Fast Dual-CAR T细胞和C Dual-CAR T细胞体外杀伤实验
- [0254] 第一天将Fast Dual-CAR T复苏, 在37℃下以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞密度和300IU/mL IL2一起温育培养。在第二天将C Dual-CAR T复苏, 在37℃下以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞密度和300IU/mL IL2一起温育培养。在第三天分别与表达萤火虫荧光素酶的K562、HL60、Molm13和THP1共培养, 分别在共培养4小时和24小时后检测杀伤效果。结果如图15所示, F-C9B5与C-C9B5具有相似的杀伤靶细胞的效果。
- [0255] 实施例14: F Dual-CAR T细胞和C Dual-CAR T细胞体外多轮杀伤
- [0256] 在第一天将F CAR T复苏, 在37℃下以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞密度和300IU/mL IL2一起温育培养。在第二天将C CAR T复苏, 在37℃下以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞密度和300IU/mL IL2一起温育培养。在第三天分别取出 $2 \times 10^5$ 个CAR阳性的F Dual-CAR T细胞和C Dual-CAR T细胞分别与 $1 \times 10^6$ 个HL60、Molm13和THP1细胞(E:T均为1:5)共培养进行多轮杀伤分析。在每一轮进行至第3天时, 取出1/6共培养细胞直接加入 $1 \times 10^6$ 个对应靶细胞进行下一轮杀伤实验。同时取出部分共培养细胞计数并通过流式细胞术分析残余靶细胞比例和CAR<sup>+</sup>细胞比例, 结合计数结果可计算CAR T细胞累计扩增倍数。
- [0257] 多轮杀伤结果如图16所示, 无论针对何种靶细胞, F-C9B5都能获得比C-C9B5更持久的体外杀伤靶细胞的能力(图16B)和更多的扩增倍数(图16A)。
- [0258] 实施例15: F Dual-CAR T细胞和C Dual-CAR T细胞小鼠体内药效比较
- [0259] 选取4-6周大的NOG-dKO小鼠, 尾静脉注射 $2 \times 10^6$ Molm13-CLL1-LucR细胞。三天后通过小动物活体成像检测肿瘤负荷, 当天分组并分别注射F-C9B5细

胞和C-C9B5细胞，T细胞处理后每周两次通过小动物活体成像评估小鼠肿瘤负荷。

[0260] 结果如图17所示，相比NT对照组，注射CAR T细胞的小鼠肿瘤生长均受到抑制；F-C9B5细胞存在剂量相关的药效，且能在较低剂量条件下获得比C-C9B5更持久的持久的肿瘤抑制作用。各组CAR T细胞的回输对小鼠的体重都没有产生显著的影响。

[0261] 至此，本领域技术人员应认识到，虽然本文已详尽示出和描述了本发明的多个示例性实施例，但是，在不脱离本发明精神和范围的情况下，仍可根据本发明公开的内容直接确定或推导出符合本发明原理的许多其他变型或修改。因此，本发明的范围应被理解和认定为覆盖了所有这些其他变型或修改。

## 权利要求书

- [权利要求 1] 一种靶向CD38和CLL1的双特异性嵌合抗原受体，所述嵌合抗原受体融合蛋白从N末端到C末端至少包括：
- i) 特异性识别CLL1和CD38的抗原结合域；
  - ii) 跨膜结构域；
  - iii) 至少一个共刺激结构域；
  - iv) 信号转导结构域。
- [权利要求 2] 如权利要求1所述的嵌合抗原受体，所述抗原结合域为单价或多价。
- [权利要求 3] 如权利要求2所述的嵌合抗原受体，所述抗原结构域包括单域抗体。
- [权利要求 4] 如权利要求3所述的嵌合抗原受体，所述单域抗体经过人源化改造处理。
- [权利要求 5] 如权利要求4所述的嵌合抗原受体，所述抗原结合域包括两个单域抗体VHH1和VHH2，其中VHH1表示第一抗原结合域的单域抗体，VHH2表示第二抗原结合域的单域抗体；
- 所述第一抗原结合域靶向CD38，所述第二抗原结合域靶向CLL1；
- 所述第一抗原结合域和所述第二抗原结合域从氨基末端到羧基末端以选自下组之一的模式排列：
- i) VHH1-VHH2；或
  - ii) VHH2-VHH1。
- [权利要求 6] 如权利要求5所述的嵌合抗原受体，其中所述VHH1的CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示；所述VHH1的CDR2包括氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示；所述VHH1的CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。
- [权利要求 7] 如权利要求5所述的嵌合抗原受体，其中所述VHH1的CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示；所述VHH1的CDR2包括氨基酸序列如S

- EQ ID NO:9所示；所述VHH1的CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示。
- [权利要求 8] 如权利要求5所述的嵌合抗原受体，其中所述VHH1的CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示；所述VHH1的CDR2包括氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示；所述VHH1的CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示。
- [权利要求 9] 如权利要求6-8任一项所述的嵌合抗原受体，所述VHH1包括SEQ ID NO:1-3所示的氨基酸序列、或由其组成。
- [权利要求 10] 如权利要求5所述的嵌合抗原受体，其中所述VHH2的CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示；所述VHH2的CDR2氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示；所述VHH2的CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示。
- [权利要求 11] 如权利要求5所述的嵌合抗原受体，其中所述VHH2的CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示；所述VHH2的CDR2氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示；所述VHH2的CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示。
- [权利要求 12] 如权利要求10或11所述的嵌合抗原受体，所述VHH2包括SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列、或由其组成。
- [权利要求 13] 如权利要求1所述的嵌合抗原受体，所述跨膜结构域为CD8  $\alpha$  或CD28。
- [权利要求 14] 如权利要求13所述的嵌合抗原受体，所述CD8  $\alpha$  的跨膜结构域包括SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列、或由其组成；所述CD28的跨膜结构域包括SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列、或由其组成。
- [权利要求 15] 如权利要求1所述的嵌合抗原受体，所述胞内信号传导结构域包括选自下列的分子：CD3  $\zeta$ 、FcR  $\gamma$ 、FcR  $\beta$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3  $\delta$ 、CD3  $\epsilon$ 、TCR  $\zeta$ 、CD4、CD5、CD8、CD21、CD22、CD79a、CD79b、CD278、Fc  $\epsilon$  RI、DAP10、DAP12、CD66d中的一种或其组合。

- [权利要求 16] 如权利要求15所述的嵌合抗原受体，所述胞内信号传导结构域优选为CD3  $\zeta$  的胞浆信号传导序列。
- [权利要求 17] 如权利要求16所述的嵌合抗原受体，所述CD3  $\zeta$  的胞浆信号传导序列包括SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列、或由其组成。
- [权利要求 18] 如权利要求16所述的嵌合抗原受体，所述CD3  $\zeta$  的胞浆信号传导序列还包括其野生型、或其突变体/修饰体。
- [权利要求 19] 如权利要求18所述的嵌合抗原受体，所述共刺激信号结构域包括选自下列的分子：4-1BB(CD137)、CD27、CD19、CD4、CD28、ICOS(CD278)、CD82  $\beta$ 、BAFFR、HVEM、LIGHT、KIRDS2、SLAMF7、Nkp30、Nkp46、CD40、ICAM-1、B7-H3、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、CD2、CD7、CD226中的一种或其组合。
- [权利要求 20] 如权利要求19所述的嵌合抗原受体，所述共刺激信号结构域优选为4-1BB或CD28。
- [权利要求 21] 如权利要求20所述的嵌合抗原受体，所述4-1BB的共刺激信号结构包括SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列、或由其组成；所述CD28的共刺激信号结构包括SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列、或由其组成。
- [权利要求 22] 如权利要求21所述的嵌合抗原受体，所述嵌合抗原受体还包括铰链区。
- [权利要求 23] 如权利要求22所述的嵌合抗原受体，所述铰链区优选为CD8  $\alpha$ 。
- [权利要求 24] 如权利要求23所述的嵌合抗原受体，所述CD8  $\alpha$  的铰链区具有如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列。
- [权利要求 25] 如权利要求24所述的嵌合抗原受体，所述嵌合抗原受体还包括信号肽；  
所述信号肽选自下列的分子：T细胞受体的 $\alpha$ 链及 $\beta$ 链、CD3  $\zeta$ 、CD3  $\epsilon$ 、CD4、CD5、CD8、CD9、CD28、CD16、CD22、CD3

3、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、GITR、GM-CSF中的一种或其组合。

[权利要求 26] 如权利要求25所述的嵌合抗原受体，所述信号肽优选为CD8 $\alpha$ 。

[权利要求 27] 如权利要求26所述的嵌合抗原受体，所述CD8 $\alpha$ 的信号肽包括SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列、或由其组成。

[权利要求 28] 如权利要求27所述的嵌合抗原受体，其具体结构为：

L-VHH1-L1-VHH2-H-TM-C-CD3 $\zeta$

各“-”独立地为连接肽或肽键；

L为CD8a信号肽分子；

VHH1为特异性结合CD38或CLL1的抗原结合域；

VHH2为特异性结合CLL1或CD38的抗原结合域；

L1为连接肽；

H为CD8a的铰链区；

TM为CD8a的跨膜结构域；

C为4-1BB共刺激结构域；

CD3 $\zeta$ 为源于CD3 $\zeta$ 的胞浆信号传导序列。

[权利要求 29] 如权利要求27所述的嵌合抗原受体，其具体结构为：

L-VHH1-L1-VHH2-F-H-TM-C-CD3 $\zeta$

各“-”独立地为连接肽或肽键；

L为CD8a信号肽分子；

VHH1为特异性结合CD38或CLL1的抗原结合域；

VHH2为特异性结合CLL1或CD38的抗原结合域；

L1为连接肽；

F为Flag标签序列(Flag Tag)；

H为CD8a的铰链区；

TM为CD28的跨膜结构域；

C为CD28的共刺激结构域；

CD3 $\zeta$ 为源于CD3 $\zeta$ 的胞浆信号传导序列。

- [权利要求 30] 如权利要求28-29任一项所述的嵌合抗原受体, 所述连接肽选自以下氨基酸序列的接头: SGG、GGS、SGGS、SSGGS、GGGG、SGGGG、GGGGS、SGGGGS、GGGGGS、SGGGGGS、SGGGGG、GSGGGGS、GGGGGGGS、SGGGGGGG、SGGGGGGGS、SGGGGSGGGGS或GGGGSGGGGS。SGGGGS。
- [权利要求 31] 如权利要求30所述的嵌合抗原受体, 所述连接肽优选为GGGGSGGGSGGGGS, 由SEQ ID NO:26的氨基酸序列所示。
- [权利要求 32] 如权利要求29所述的嵌合抗原受体, 所述融合蛋白表达标签Flag tag由SEQ ID NO:27的氨基酸序列所示。
- [权利要求 33] 一种核酸分子, 所述核酸分子为编码权利要求6-12任一项所述嵌合抗原受体的核苷酸序列。
- [权利要求 34] 如权利要求33所述的核酸分子, 优选编码SEQ ID NO:2与SEQ ID NO:5所示氨基酸的核酸分子C9B5, 所述C9B5的核苷酸序列由SEQ ID NO:30所示。
- [权利要求 35] 如权利要求33所述的核酸分子, 所述的核酸分子还包括SEQ ID NO:28-29、或31-51任一项所示的核苷酸序列。
- [权利要求 36] 一种重组载体, 所述重组载体包含权利要求6-12任一项所述的嵌合抗原受体, 或权利要求33-35任一项所述的核酸分子。
- [权利要求 37] 如权利要求36所述的重组载体, 其特征在于, 所述重组载体包括DNA载体、RNA载体、质粒、转座子载体、脂质体、CRISPR/Cas9载体或病毒载体。
- [权利要求 38] 如权利要求37所述的重组载体, 所述病毒载体包含慢病毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体。
- [权利要求 39] 工程改造的免疫细胞, 所述工程改造的免疫细胞包含权利要求6-12任一项所述的嵌合抗原受体, 或权利要求33-35任一项所述的核酸分子, 或权利要求36-38任一项所述的重组表达载体。
- [权利要求 40] 如权利要求39所述的工程改造的免疫细胞, 所述免疫细胞利用FAS T-CAR工艺制备。

- [权利要求 41] 如权利要求40所述的工程改造的免疫细胞，所述FAST CAR将激活、转导和扩增步骤转化为一个单一的“同步激活-转导”步骤，其中所述工程化免疫细胞经历了少于72小时的离体扩增。
- [权利要求 42] 如权利要求41所述的工程改造的免疫细胞，可以减少在生产过程中由于CD38 CAR识别免疫细胞表面CD38抗原引起的自相残杀的影响，或由于其他CAR识别免疫细胞表面对应的靶点抗原引起的自相残杀的影响，如CD70 CAR识别T细胞表面CD70抗原引起的T细胞的凋亡；  
所述免疫细胞可应用任何CAR靶向抗原和不同的肿瘤标志物中。
- [权利要求 43] 如权利要求41所述的工程改造的免疫细胞，与经历离体扩增1周或更多周的可比群体中的细胞相比，所述免疫细胞的细胞表型更年轻。
- [权利要求 44] 如权利要求43所述的所述的工程改造的免疫细胞，所述年轻的特征在于所述免疫细胞中 $T_{n/scm}(CD45RO^{-}, CCR7^{+})$ 和 $T_{cm}(CD45RO^{+}, CCR7^{+})$ 占比更高。
- [权利要求 45] 如权利要求41所述的所述的工程改造的免疫细胞，与经历离体扩增1周或更多周的可比群体中的细胞相比，观察到所述免疫细胞的体外扩增和持续杀伤能力更强。
- [权利要求 46] 如权利要求39所述的工程改造的免疫细胞，所述免疫细胞包含T细胞、NK细胞、iNKT细胞、CTL细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞和/或NKT细胞。
- [权利要求 47] 如权利要求46所述的工程改造的免疫细胞，所述免疫细胞优选为T细胞和NK细胞。
- [权利要求 48] 如权利要求6-12任一项所述的嵌合抗原受体、权利要求33-35任一项所述的核酸分子、权利要求36-38所述的重组表达载体或权利要求39-47任一项所述的工程改造的免疫细胞在制备用于治疗肿瘤的药物中的应用。

- [权利要求 49] 如权利要求48所述的应用，所述肿瘤为表达CD38和/或CLL1的肿瘤。
- [权利要求 50] 如权利要求49所述的应用，所述肿瘤为急性骨髓性白血病。
- [权利要求 51] 如权利要求48所述的应用，所述药物还包括药学上可接受的载体、辅剂。
- [权利要求 52] 如权利要求6-12任一项所述的嵌合抗原受体与以下的一种或多种组合在制备用于治疗 and/or 预防癌症的药物组合中的用途：  
(1)增加包含CAR核酸或CAR多肽的细胞的功效的作用剂；  
(2)改善与施用包含CAR核酸或CAR多肽的细胞相关的一种或多种副作用的作用剂；  
(3)治疗与CD38和CLL1相关疾病的另外的作用剂。
- [权利要求 53] 如权利要求52所述的应用，所述治疗和/or预防还包括与第二疗法组合使用，所述第二疗法选自手术、化疗、放疗、免疫疗法、基因疗法、DNA疗法、RNA疗法、纳米疗法、病毒疗法、辅助疗法及其任意组合。