

一种新型小型化 CAR 分子设计及制备方法和应用

优先权申请

[0001] 本申请要求 2023 年 5 月 31 提交的中国发明专利申请【CN202310631350.7】“一种靶向 HER2 阳性肿瘤的新型 CAR-T 细胞及制备方法和应用”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

[0002] 本发明属于分子细胞生物学领域，具体涉及一种新型小型化 CAR 分子设计及制备方法和应用。

背景技术

[0003] CAR-T 细胞疗法（Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy）全称为嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法，是一种新型的治疗肿瘤的精准靶向疗法。研究发现，CAR-T 细胞能够精准、快速、高效、特异地识别并杀伤肿瘤细胞，近几年通过优化改良在协助肿瘤的治疗上取得了良好的效果，是一种非常有前景且有可能治愈癌症的新型肿瘤免疫治疗研究方向。但目前 CAR-T 疗法在不同肿瘤，尤其是在实体肿瘤的杀伤效果上仍存在争议，实体肿瘤是 CAR-T 疗法亟待攻克的一个具有挑战性的目标。

[0004] 从 CAR 分子设计的发展进程来看，1990 年代后期设计出第一代 CAR，其包含完整 CD3 ζ 或 FcR γ 信号结构域，但由于其体外耐用性和持久性并不理想，在临床上仅显示出有限的疗效或甚至没有疗效。随后发展出具有一个共刺激结构域的第二代 CAR，其在结构上与 CD3 ζ 细胞内信号结构域串联。目前，FDA 批准的 CAR-T 治疗产品中两个最常见的共刺激域为 CD28 和 4-1BB（CD137）。然而第二代 CAR-T 目前在临床上主要是在多种血液系统恶性肿瘤中产生了较好的效果，但在实体肿瘤方面主要应用于胶质母细胞瘤、晚期肉瘤、肝转移瘤、卵巢癌等，其治疗效果不佳。为进一步提高治疗效果，研究人员又设计出含有两个与 CD3 ζ 串联的共刺激结构域的 CAR 分子，以产生更强的 T 细胞刺激信号，被称为第三代 CAR，然而第三代 CAR 并没能显著增强治疗效果，相反明显增加了副作用，因此第三代 CAR 已几乎不再研究。相较于前三代 CAR，第四代 CAR 在传统 CAR 设计的基础上增加了额外的调控元件（如细胞因子表达元件）以更好的激活免疫，增强抗肿瘤活性。然而第四代 CAR 尚处于早期研发阶段，临床有效性和安全性还有待验证。从上述 CAR 分子设计的发展进程可以看出，CAR 分子结构元件在持续进行改良优化。

[0005] 更多的研究发现，CAR 结构中任何一个部分的微小改变都会对 CAR-T 细胞的抗肿瘤活性产生影响。其中，不同的 scFv、铰链区、跨膜区、共刺激域或 ITAMs 信号域都可能影响 CAR-T 细胞的有效性或安全性。这是因为 T 细胞需接受抗原刺激才能被激活和扩增，但是过度激活以及对靶标的过度亲和反而会导致 T 细胞的耗竭和杀伤活性的降低，进而影响 CAR-T 细胞杀伤效果的持久性。

[0006] 综上所述，本发明将提供一种结构改良的新型小型化 CAR 设计及 CAR-T 细胞，以克服现有技术的不足。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种新型小型化 CAR 设计及制备方法和应用,具体技术方案如下。

[0008] 一种新型小型化的嵌合抗原受体,结构包括胞外段、跨膜区和胞内段,所述胞外段为抗原结合区和铰链区,所述胞内段为部分的 CD3 ζ 与共刺激分子串联,所述嵌合抗原受体的长度不超过 300 个氨基酸;所述胞外段抗原结合区的长度不超过 150 个氨基酸;所述铰链区和跨膜区的长度不超过 70 个氨基酸;所述胞内段的长度不超过 100 个氨基酸。

[0009] 优选的,所述嵌合抗原受体的长度为 280~300 个氨基酸。

[0010] 进一步,所述部分的 CD3 ζ 为 CD3 ζ ITAM 结构域。

[0011] 进一步,所述 CD3 ζ ITAM 结构域包括 CD3 ζ ITAM1 结构域、CD3 ζ ITAM2 结构域或 CD3 ζ ITAM3 结构域。

[0012] 优选的,进一步,所述部分的 CD3 ζ 为 CD3 ζ ITAM1 结构域,核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

[0013] 进一步,所述抗原结合区为靶向实体肿瘤或靶向血液瘤细胞靶点的抗体。

[0014] 进一步,所述抗体包括单域抗体或纳米抗体。

[0015] 进一步,所述共刺激分子为单个共刺激分子。

[0016] 进一步,所述铰链区包括 CD8 铰链区或 CD28 铰链区。

[0017] 进一步,所述跨膜区包括 CD8 跨膜区、CD28 跨膜区或 CD3 跨膜区。

[0018] 进一步,所述铰链区和跨膜区的连接方式包括 CD8 铰链区和 CD8 跨膜区连接(8H+8TM)、CD28 铰链区和 CD28 跨膜区连接(28H+28TM)、CD28 铰链区和 CD3 跨膜区连接(28H+3TM)或 CD8 铰链区和 CD3 跨膜区连接(8H+3TM)。

[0019] 。

[0020] 一种 CAR-T 细胞,表达上述的嵌合抗原受体。

[0021] 上述 CAR-T 细胞在制备靶向实体肿瘤或血液瘤药物中的应用。

[0022] 上述 CAR-T 细胞在制备治疗自身免疫疾病中的应用。

[0023] 优选的,所述实体肿瘤包括卵巢癌、乳腺癌、胃癌、肠癌、淋巴瘤和/或多发性骨髓瘤等靶点阳性的肿瘤;所述血液瘤包括白血病。

[0024] 进一步,所述 CAR-T 细胞的部分的 CD3 ζ ITAM 结构域用于适当激活 T 细胞下游信号。

[0025] 有益技术效果

[0026] 本发明提供的 CAR 结构是一种新型小型化的二代 CAR 结构,该新型小型化二代 CAR 结构短小(胞外段和胞内段均比较短小);表达量高,相较于普通 CAR 可提高 2 倍左右;还能高效激活 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用,在低效靶比(效靶比 1:1)时,24 小时杀伤活性最高可提高 7 倍左右;杀伤作用起始时间短,在效靶比 5:1 时,最早 6 小时左右即可产生杀伤。此外,使用不同分子来源的铰链区或跨膜区不影响该新型小型化二代 CAR 的杀伤活性。以上表明,本发明提供的新型小型化二代 CAR 能显著提高治疗的有效性。

[0027] 具体来说,本发明提供的 CAR 结构的蛋白序列长度为不到 300 个氨基酸,部分的 CD3 ζ 信号域仅与一个胞内共刺激分子(例如,4-1BB)相连,本发明证明这种小型化 CAR 可以在多种肿瘤(包括实体肿瘤和血液瘤)上具有较好的杀伤效果。CD3 ζ 信号域包括 CD3 ζ ITAM1、ITAM2 和 ITAM3,目前尚未见只采用单个 CD3 ζ ITAM 结构域合成的 CAR 及制备的 CAR-T 细胞在靶向实体肿瘤中具有良好杀伤效果的相关报道,因此本发明具有一定的开创性。本发明通过实验验证

了只采用单个 CD3 ζ ITAM1 合成的 CAR-T 具有良好的肿瘤杀伤效果，但这仅是示例，而不是限制。

[0028] 最后，本发明的 CAR-T 细胞仅保留单个 CD3 ζ ITAM 结构域，实验证明已达到足以激活 T 细胞下游信号的作用，促进 CAR-T 细胞对肿瘤细胞进行有效杀伤的效果。此外，部分的 CD3 ζ 信号域又可以避免 T 细胞下游信号过度激活对 CAR-T 细胞造成损伤，进而更好的发挥肿瘤杀伤作用。因此本发明制备的 CAR-T 细胞不仅具有有效的杀伤能力，还具有较好的杀伤持久性。

附图说明

[0029] 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简单地介绍。显而易见地，下面描述中的附图是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动性的前提下，还可以根据这些附图获得其它的附图。

[0030] 图 1 为本发明合成的新型小型化 CAR 结构示意图；

[0031] 图 2 为本发明其中一个实施例中合成的 HER2 CAR 阳性表达率结果图（APC 为荧光染料，H 代表高度；横坐标代表荧光强度）；

[0032] 图 3 为本发明其中一个实施例中 HER2 CAR-T 细胞体外杀伤（LDH）的效果图；

[0033] 图 4 为本发明其中一个实施例中 SKOV3-mCherry 肿瘤细胞与 HER2 CAR-T 细胞在 1:1 的效靶比下杀伤 24 小时的效果图（放大倍数为 100 倍）；

[0034] 图 5 为统计本发明其中一个实施例中 SKOV3-mCherry 肿瘤细胞与 HER2 CAR-T 细胞在 1:1 的效靶比下连续杀伤情况的曲线图；

[0035] 图 6 为本发明其中一个实施例中 SKOV3-mCherry 肿瘤细胞与 HER2 CAR-T 细胞在 1:2.5 的效靶比下杀伤 24 小时的效果图（放大倍数为 100 倍）；

[0036] 图 7 为本发明其中一个实施例中统计 SKOV3-mCherry 肿瘤细胞与 HER2 CAR-T 细胞在 1:2.5 的效靶比下连续杀伤情况的曲线图；

[0037] 图 8 为本发明其中一个实施例中 SKOV3-mCherry 肿瘤细胞与 HER2 CAR-T 细胞在 1:5 的效靶比下杀伤 24 小时的效果图（放大倍数为 100 倍）；

[0038] 图 9 为本发明其中一个实施例中统计 SKOV3-mCherry 肿瘤细胞与 HER2 CAR-T 细胞在 1:5 的效靶比下连续杀伤情况的曲线图；

[0039] 图 10 为本发明其中一个实施例中合成的 CLDN 18.2 CAR 阳性表达率结果图（PE 为荧光染料，A 代表面积；横坐标代表荧光强度）；

[0040] 图 11 为本发明其中一个实施例中 CLDN 18.2 CAR-T 细胞体外杀伤（LDH）效果图；

[0041] 图 12 为本发明其中一个实施例中 SKOV3-mCherry-CLDN 18.2 肿瘤细胞与 CLDN 18.2 CAR-T 细胞在 1:1 的效靶比下杀伤 24 小时的效果图（放大倍数为 100 倍）；

[0042] 图 13 为本发明其中一个实施例中统计 SKOV3-mCherry-CLDN 18.2 肿瘤细胞与 CLDN 18.2 CAR-T 细胞在 1:1 的效靶比下连续杀伤情况的曲线图；

[0043] 图 14 为本发明其中一个实施例中 SKOV3-mCherry-CLDN 18.2 肿瘤细胞与 CLDN 18.2 CAR-T 细胞在 1:2.5 的效靶比下杀伤 24 小时的效果图（放大倍数为 100 倍）；

[0044] 图 15 为本发明其中一个实施例中统计 SKOV3-mCherry-CLDN 18.2 肿瘤细胞与 CLDN 18.2 CAR-T 细胞在 1:2.5 的效靶比下连续杀伤情况的曲线图；

- [0045] 图 16 为本发明其中一个实施例中 SKOV3-mCherry-CLDN 18.2 肿瘤细胞与 CLDN 18.2 CAR-T 细胞在 1:5 的效靶比下杀伤 24 小时的效果图（放大倍数为 100 倍）；
- [0046] 图 17 为本发明其中一个实施例中统计 SKOV3-mCherry-CLDN 18.2 肿瘤细胞与 CLDN 18.2 CAR-T 细胞在 1:5 的效靶比下连续杀伤情况的曲线图；
- [0047] 图 18 为本发明其中一个实施例中合成的 BCMA CAR 阳性表达率结果图（APC 为荧光染料，A 代表面积；横坐标代表荧光强度）；
- [0048] 图 19 为本发明其中一个实施例中 BCMA CAR-T 细胞体外杀伤（LDH）效果图；
- [0049] 图 20 为本发明其中一个实施例中 MM1S-mCherry 肿瘤细胞与 BCMA CAR-T 细胞在 1:2.5 的效靶比下杀伤 24 小时的效果图（放大倍数为 100 倍）；
- [0050] 图 21 为本发明其中一个实施例中统计 MM1S-mCherry 肿瘤细胞与 BCMA CAR-T 细胞在 1:2.5 的效靶比下连续杀伤情况的曲线图；
- [0051] 图 22 为本发明其中一个实施例中 MM1S-mCherry 肿瘤细胞与 BCMA CAR-T 细胞在 1:5 的效靶比下杀伤 24 小时效果图（放大倍数为 100 倍）；
- [0052] 图 23 为本发明其中一个实施例中统计 MM1S-mCherry 肿瘤细胞与 BCMA CAR-T 细胞在 1:5 的效靶比下连续杀伤情况的曲线图；
- [0053] 图 24 为本发明其中一个实施例中 MM1S-mCherry 肿瘤细胞与 BCMA CAR-T 细胞在 1:10 的效靶比下杀伤 24 小时效果图（放大倍数为 100 倍）；
- [0054] 图 25 为本发明其中一个实施例中 MM1S-mCherry 统计肿瘤细胞与 BCMA CAR-T 细胞在 1:10 的效靶比下连续杀伤情况的曲线图；
- [0055] 图 26 为本发明其中一个实施例中 SKOV3-mCherry 肿瘤细胞与 HER2 CAR-T 细胞（不同跨膜区和铰链区）在 1:2.5 和 1:5 的效靶比下杀伤 24 小时效果图（放大倍数为 100 倍）。
- [0056] 图 27 为本发明其中一个实施例中合成的不同结构设计 HER2 CAR 阳性表达率结果图（APC 为荧光染料，H 代表高度；横坐标代表荧光强度）；
- [0057] 图 28 为本发明其中一个实施例中不同结构设计 HER2 CAR-T 细胞体外杀伤（LDH）的效果图；
- [0058] 图 29 为本发明其中一个实施例中 SKOV3-mCherry 肿瘤细胞与不同结构设计 HER2 CAR-T 细胞在 1:1 的效靶比下杀伤 24 小时的效果图（放大倍数为 100 倍）；
- [0059] 图 30 为统计本发明其中一个实施例中 SKOV3-mCherry 肿瘤细胞与不同结构设计 HER2 CAR-T 细胞在 1:1 的效靶比下连续杀伤情况的曲线图；
- [0060] 图 31 为本发明其中一个实施例中 SKOV3-mCherry 肿瘤细胞与不同结构设计 HER2 CAR-T 细胞在 1:2.5 的效靶比下杀伤 24 小时的效果图（放大倍数为 100 倍）；
- [0061] 图 32 为本发明其中一个实施例中统计 SKOV3-mCherry 肿瘤细胞与不同结构设计 HER2 CAR-T 细胞在 1:2.5 的效靶比下连续杀伤情况的曲线图；
- [0062] 图 33 为本发明其中一个实施例中 SKOV3-mCherry 肿瘤细胞与不同结构设计 HER2 CAR-T 细胞在 1:5 的效靶比下杀伤 24 小时的效果图（放大倍数为 100 倍）；
- [0063] 图 34 为本发明其中一个实施例中统计 SKOV3-mCherry 肿瘤细胞与不同结构设计 HER2 CAR-T 细胞在 1:5 的效靶比下连续杀伤情况的曲线图。

具体实施方式

[0064] 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做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。

[0065] 本文中“和/或”包括任何和所有一个或多个列出的相关项的组合。

[0066] 本文中“多个”意指两个或两个以上，即其包含两个、三个、四个、五个等。

[0067] 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。

[0068] 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 $\pm 0.5\%$ 。

[0069] 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。

[0070] 本发明所述的“适当激活”是指对 T 细胞下游信号起到有效激活的作用，使 CAR-T 细胞能对肿瘤细胞进行有效杀伤；但同时又避免对 T 细胞下游信号过度激活从而对 CAR-T 细胞本身造成损伤。

[0071] 实施例 1

[0072] 本实施例提供一种 CAR-T 细胞的制备方法示例。

[0073] 1. CAR 表达载体的构建

[0074] 1) CAR 结构由胞外 HER2 纳米抗体，CD8 铰链区、CD8 跨膜区，胞内共刺激分子（4-1BB）以及 CD3 ζ 部分信号域（CD3 ζ ITAM1）/CD3 ζ 全长结构域（对照）构成，结构片段采用基因合成的方法制备。

[0075] 可以理解的是，胞外纳米抗体可选的包括各种靶向实体肿瘤或血液瘤的纳米抗体。以下实施例中示出的纳米抗体仅为示例，而不是限制。本实施例中以靶向 HER2 的纳米抗体作为示例。

[0076] 2) 用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 分别对 Pwpxld 载体和 CAR 结构片段进行双酶切，以 T4 连接酶连接后进行转化和筛选培养，将得到的阳性克隆进行测序鉴定，最终获得 Her2 VH-BBZ_(short)-Pwpxld 表达载体和 Her2 VH-BBZ_(full)-Pwpxld 对照载体（含有 CD3 ζ 全长）。

[0077] 本发明的 CAR 结构见图 1。

[0078] 本实施例中合成/扩增得到的各片段序列如表 1 所示。

[0079] 表 1

NO.	序列	
1	Her2 CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCAC GCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGGGGGGACTGGTGC AGGCAGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCAAGCGGGATTACATTT AGTATCAACACAATGGGATGGTACAGGCAGGCTCCTGGCAAGCAGAGAGA GCTGGTGGCTCTGATTTCAAGCATCGGAGACACCTACTACGCCGACTCTGT GAAAGGACGGTTCACCATCAGCAGAGACAACGCAAAGAACACCGTCTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAAACCTGAAGACACAGCAGTGTACTATTGCAA AAGGTTCCGAACCGCTGCTCAGGGCACTGACTACTGGGGCCAGGGCACCC AGGTGACCGTGTCCAGCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACC GGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCC GGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTG TGATATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTG TCACTGGTTATCACCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAA CAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGC TGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGGCCCCCGCGTA CCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAG AGGAGTACGATGTTTTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTGA (281 个氨基酸)
2	CD3ζ ITAM1	GCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTA GGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCG C (34 个氨基酸)
3	HER2 纳米抗体	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGGGGGGACTGGTGCAGGCAGGAGGAA GCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCAAGCGGGATTACATTTAGTATCAACACAA TGGGATGGTACAGGCAGGCTCCTGGCAAGCAGAGAGAGCTGGTGGCTCTG ATTTCAAGCATCGGAGACACCTACTACGCCGACTCTGTGAAAGGACGGTTC ACCATCAGCAGAGACAACGCAAAGAACACCGTCTACCTGCAGATGAACAG CCTGAAACCTGAAGACACAGCAGTGTACTATTGCAAAAGGTTCCGAACCG CTGCTCAGGGCACTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCAGGTGACCGTGTCC AGC (118 个氨基酸)
4	CD8 铰 链区 +CD8 跨膜区	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTC GCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGC GCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCG CCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACC (66 个氨基酸)

- [0080] 2.慢病毒包装
- [0081] 1) 复苏培养 293T 细胞，融合度达到 80%左右时进行病毒包装。
- [0082] 2) 按照培养基 (DMEM+10%FBS) 的量加入氯喹溶液，使终浓度为 100μmol/L。
- [0083] 3) 病毒包装体系(10cm 培养皿)为: 50μl CaCl₂、20μg 构建的核心质粒、10μg Pspax2、5μg PMD2.0G、500μl Nuclease-free water (无核酸酶水)、500μl 2X BBS。
- [0084] 4) 10h 左右换新鲜预温培养基 (DMEM+10%FBS)。
- [0085] 5) 收集培养了 48h 和 72h 病毒液，0.22μm 滤膜过滤去除杂质。

[0086] 6) 超速离心, 用病毒原液 1/400 的 DPBS 重悬浓缩的病毒, 并按后续用量进行分装, -80°C 冻存备用。

[0087] 3. 外周血细胞分离

[0088] 1) 提前一天孵育 T 细胞培养方瓶 (T25), 4°C 孵育过夜。T 细胞培养基中含有抗人 CD3 和 CD28 单克隆抗体: 3ml DPBS、 $4\mu\text{g/mL}$ CD3、 $2\mu\text{g/mL}$ CD28。

[0089] 2) 抽取适量健康志愿者新鲜血液。

[0090] 3) 取 15mL BD 管, 加入 5mL Ficoll, 轻缓加入 5mL 新鲜血液。

[0091] 4) 常温离心, 1000g (离心机加速度, 升 1 降 1), 30min。

[0092] 5) 离心后小心吸取中间层 (白色) 的外周血淋巴细胞。

[0093] 6) 加入三倍体积预温的 DPBS 洗涤, 300g, 10min。

[0094] 7) 可选地加入 5mL 红细胞裂解液, 室温裂解 5min, 加入等体积预温 DPBS。

[0095] 8) 细胞计数, 常温离心, 100g, 10min。

[0096] 9) 按 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 加入适量 T 细胞培养液 (X-vivo, 5% AB 血清, 400IU IL2) 重悬细胞。

[0097] 10) 吸除 T25 方瓶中的抗体孵育液, 加入 T 细胞培养液重悬的 T 细胞, 37°C 正常培养 48h 左右。

[0098] 4. CAR-T 细胞制备

[0099] 1) 提前一天孵育 T 细胞培养板, 4°C 孵育过夜。采用 24 孔板, 每一孔中加入 0.5ml DPBS 和 10 μL RetroNectin (1mg/mL)。

[0100] 2) 吸除 RetroNectin 溶液。

[0101] 3) 每孔加入 1 mL 2% BSA 溶液, 37°C 封闭 30min。

[0102] 4) 吸除封闭液, 使用 DPBS 洗涤一次。

[0103] 5) 每孔 (非黏附孔板) 加入 200 μL 400X 病毒, 300 μL X-vivo 完全培养基, 32°C , 1000g (离心机加速度, 升 2 降 2) 离心 2h。

[0104] 6) 每孔加入 $2-2.5 \times 10^6$ 个激活 48h 左右的 T 细胞, X-vivo 完全培养基补足至 1mL/孔, 32°C , 300g (离心机加速度, 升 2 降 2) 离心 15min。

[0105] 本实施例合成的小型化 CAR-T 细胞简称为 Her2 VH-BBZ_(short), 全长的对照 CAR-T 简称为 Her2 VH-BBZ_(full)。

[0106] 7) 37°C 正常培养 72h 左右, 流式检测实验组和对照组 CAR 的阳性表达率, 见图 2。结果显示, Her2 VH-BBZ_(short) 的阳性表达率为 76.0%; Her2 VH-BBZ_(full) 的阳性表达率为 60.9%。

[0107] 实施例 2

[0108] 本实施例提供实施例 1 合成的 CAR-T 的体外杀伤检测试验

[0109] 1) 96 孔板杀伤: 肿瘤细胞 $1 \times 10^4/\text{孔}$, 用本发明实施例 1 合成的 CAR-T 细胞, 分别按照与肿瘤细胞以效靶比 (效应细胞: 靶细胞=CAR-T: 肿瘤细胞) 1:1、2.5:1、5:1 进行铺板共孵育, 每个效靶比 3 个复孔, 并做空白 T 细胞 (Mock) 对照。

[0110] 本实施例采用人卵巢癌细胞 Skov3-mCherry 细胞系, 其作为一种具有广泛代表性的细胞模型。

[0111] 2) 使用活细胞动态检测仪连续检测实验组和对照组 CAR-T 细胞体外杀伤情况。

[0112] 3) 共孵育 24h 左右取培养上清检测 LDH 以计算肿瘤裂解率。

[0113] 实验结果见图 3-图 9。

[0114] 图 3 显示, 实施例 1 合成的小型化 CAR-T 和对照 CAR-T 均能对 HER2 阳性表达的肿瘤细胞发挥有效杀伤, 但 Her2 VH-BBZ_(short) CAR-T 明显具有更好的肿瘤杀伤能力, 其中效靶比 E:T=1:1 时杀伤效果就明显优于 Her2 VH-BBZ_(full) CAR-T; 而在效靶比 E:T=5:1 时, 更是呈现出呈爆发趋势的的杀伤效果, 同样的效果在相同比效靶比的 Her2 VH-BBZ_(full) CAR-T 上未观察到。

[0115] 具体来说, 图 4-图 9 显示了不同的效靶比下的连续杀伤效果。从中可以看出, 以效靶比 E:T=1:1 时(E 代表 Effector cell, 即效应细胞; T 代表 Target cell, 即肿瘤细胞) 为例, 连续杀伤 24 小时, Her2 VH-BBZ_(short) CAR-T 和 Her2 VH-BBZ_(full) CAR-T 杀伤效果差别不大, 但 24h 后 Her2 VH-BBZ_(short) CAR-T 的杀伤效果呈现出逐渐优于 Her2 VH-BBZ_(full) CAR-T 的趋势, 在连续杀伤 48h 最为明显。这说明单个的 CD3 ζ ITAM (CD3 ζ ITAM1) 信号域发挥了足以激活 T 细胞下游信号的作用, 促进 CAR-T 细胞对肿瘤细胞进行有效杀伤的效果, 同时又避免了 T 细胞下游信号过度激活对 CAR-T 细胞造成损伤, 进而发挥出更好的肿瘤杀伤持续性。

[0116] 实施例 3

[0117] 本实施例提供另一种 CAR-T 细胞的制备方法示例

[0118] 1.CAR 表达载体的构建

[0119] 1) CAR 结构由胞外 CLDN18.2 纳米抗体, CD8 铰链区、CD8 跨膜区, 胞内共刺激分子 (4-1BB) 以及 CD3 ζ 部分信号域 (CD3 ζ ITAM1) /CD3 ζ 全长结构域 (对照) 构成, 结构片段采用基因合成的方法制备。

[0120] 本实施例中以靶向 CLDN18.2 的纳米抗体作为示例。

[0121] 2) 用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 分别对 Pwpxld 载体和 CAR 结构片段进行双酶切, 以 T4 连接酶连接后进行转化和筛选培养, 将得到的阳性克隆进行测序鉴定, 最终获得 CLDN18.2 VH-BBZ_(short)-Pwpxld 表达载体和 CLDN18.2 VH-BBZ_(full)-Pwpxld 对照载体 (含有 CD3 ζ 全长)。

[0122] 本实施例中合成/扩增得到的各片段序列如表 2 所示。

[0123] 表 2

NO.	序列	
5	CLDN 18.2 CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGAGGTCCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTCCAGCCAGGTGGCAGTCTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGAGTGGACATCTCTCCGACGTGATGGCCTGGTATAGGCAGGCACCTGGTAAGGGACTGGAATTGTCTCTGGTCTGACTAGAGGTGGCAGCATCAACTACGCTGACAGCGTCAAGGGAAGGTTTACCATCAGCAGGGACAACCTCAAGAACACCTTGACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAAGATACAGCCGTGTACTACTGCAACGCGAAATCTACACCGGCACCTTCTACCCACGGTCTTACTGGGGCCAGGGCACATTGGTAACCGTGTCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGCCAGCGGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG

		GAGTACGATGTTTTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTGA (282 个氨基酸)
6	CLDN 18.2 纳 米抗体	CAGGTCCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTCCAGCCAGGTGGCAG TCTGAGGCTGAGTTGCGCAGCCTCTGGAGTGGACATCTCTTCCGACGTGAT GGCCTGGTATAGGCAGGCACCTGGTAAGGGACTGGAATTTGTCTCTGGTCT GACTAGAGGTGGCAGCATCAACTACGCTGACAGCGTCAAGGGAAGGTTTA CCATCAGCAGGGACAACCTCCAAGAACACCTTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGAGAGCCGAAGATACAGCCGTGTACTACTGCAACGCCGAAATCTACAC CGGCACCTTCTACCCACGGTCTTACTGGGGCCAGGGCACATTGGTAACCGT GTCA (119 个氨基酸)

[0124] 2.慢病毒包装

[0125] 1) 复苏培养 293T 细胞, 融合度达到 80%左右时进行病毒包装。

[0126] 2) 按照培养基 (DMEM+10%FBS) 的量加入氯喹溶液, 使终浓度为 100 μ mol/L。

[0127] 3) 病毒包装体系(10cm 培养皿)为: 50 μ l CaCl₂、20 μ g 构建的核心质粒、10 μ g Pspax2、5 μ g PMD2.0G、500 μ l Nuclease-free water (无核酸酶水)、500 μ l 2X BBS。

[0128] 4) 10h 左右换新鲜预温培养基 (DMEM+10%FBS)。

[0129] 5) 收集培养了 48h 和 72h 病毒液, 0.22 μ m 滤膜过滤去除杂质。

[0130] 6) 超速离心, 用病毒原液 1/400 的 DPBS 重悬浓缩的病毒, 并按后续用量进行分装, -80 $^{\circ}$ C冻存储备用。

[0131] 3.外周血细胞分离

[0132] 1) 提前一天孵育 T 细胞培养方瓶 (T25), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。T 细胞培养基中含有抗人 CD3 和 CD28 单克隆抗体: 3ml DPBS、4 μ g/mL CD3、2 μ g/mL CD28。

[0133] 2) 抽取适量健康志愿者新鲜血液。

[0134] 3) 取 15mL BD 管, 加入 5mL Ficoll, 轻缓加入 5mL 新鲜血液。

[0135] 4) 常温离心, 1000g (离心机加速度, 升 1 降 1), 30min。

[0136] 5) 离心后小心吸取中间层 (白色) 的外周血淋巴细胞。

[0137] 6) 加入三倍体积预温的 DPBS 洗涤, 300g, 10min。

[0138] 7) 可选地加入 5mL 红细胞裂解液, 室温裂解 5min, 加入等体积预温 DPBS。

[0139] 8) 细胞计数, 常温离心, 100g, 10min。

[0140] 9) 按 2×10^6 /mL 加入适量 T 细胞培养液 (X-vivo, 5%AB 血清, 400IU IL2) 重悬细胞。

[0141] 10) 吸除 T25 方瓶中的抗体孵育液, 加入 T 细胞培养液重悬的 T 细胞, 37 $^{\circ}$ C正常培养 48h 左右。

[0142] 4.CAR-T 细胞制备

[0143] 1) 提前一天孵育 T 细胞培养板, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。采用 24 孔板, 每一孔中加入 0.5ml DPBS 和 10 μ l RetroNectin (1mg/mL)。

[0144] 2) 吸除 RetroNectin 溶液。

[0145] 3) 每孔加入 1 mL 2% BSA 溶液, 37 $^{\circ}$ C封闭 30min。

[0146] 4) 吸除封闭液, 使用 DPBS 洗涤一次。

[0147] 5) 每孔 (非黏附孔板) 加入 200 μ l 400X 病毒, 300 μ l X-vivo 完全培养基, 32 $^{\circ}$ C, 1000g (离心机加速度, 升 2 降 2) 离心 2h。

[0148] 6) 每孔加入 $2-2.5 \times 10^6$ 个激活 48h 左右的 T 细胞, X-vivo 完全培养基补足至 1mL/孔, 32°C , 300g (离心机加速度, 升 2 降 2) 离心 15min。

[0149] 本实施例合成的 CAR-T 细胞简称为 CLDN18.2 VH-BBZ_(short), 对照组 CAR-T 简称为 CLDN18.2 VH-BBZ_(full)。

[0150] 7) 37°C 正常培养 72h 左右, 流式检测实验组和对照组 CAR 阳性表达率, 见图 10。结果显示, CLDN18.2 VH-BBZ_(short) 的阳性表达率为 85.1%; CLDN18.2 VH-BBZ_(full) 的阳性表达率为 50.5%。

[0151] 实施例 4

[0152] 本实施例提供实施例 3 合成的 CAR-T 的体外杀伤检测试验

[0153] 1) 96 孔板杀伤: 肿瘤细胞 1×10^4 /孔, 用实施例 3 合成的 CAR-T 细胞, 分别按照 CAR-T 细胞与肿瘤细胞以效靶比 1:1、2.5:1、5:1 进行铺板共孵育, 每个效靶比 3 个复孔, 并做空白 T 细胞 (Mock) 对照。

[0154] 本实施例采用 Skov3-mCherry-Claudin18.2 细胞系, 其为一种过表达 Claudin18.2 (CLDN18.2) 的细胞模型。

[0155] 2) 使用活细胞动态检测仪连续检测实验组和对照组 CAR-T 细胞的体外杀伤情况。

[0156] 3) 共孵育 24h 左右取培养上清检测 LDH 以计算肿瘤裂解率。

[0157] 实验结果见图 11-图 17。

[0158] 图 11 显示, 实施例 3 合成的小型化 CAR-T 和对照组全长 CAR-T 均能对 CLDN18.2 阳性表达的肿瘤细胞发挥有效杀伤, 但 CLDN18.2 VH-BBZ_(short) CAR-T 明显具有更好的肿瘤杀伤能力, 其中效靶比 E:T=1:1 时就明显优于 CLDN18.2 VH-BBZ_(full) CAR-T; 并且这种肿瘤杀伤优势在效靶比 E:T=2.5:1 和 E:T=5:1 时仍能维持。

[0159] 具体来说, 图 12-图 17 显示了不同的效靶比下的连续杀伤效果。从中可以看出, 以效靶比 E:T=1:1 时 (E 代表 Effector cell, 即效应细胞; T 代表 Target cell, 即肿瘤细胞) 为例, 连续杀伤 24 小时, CLDN18.2 VH-BBZ_(short) CAR-T 的杀伤效果明显优于 CLDN18.2 VH-BBZ_(full) CAR-T, 并且这种杀伤优势随着时间的延长逐渐增强。相比于 CLDN18.2 VH-BBZ_(full) CAR-T, 当效靶比 E:T=2.5:1 连续杀伤 10 小时, 以及, 当效靶比 E:T=5:1 连续杀伤 8 小时, CLDN18.2 VH-BBZ_(short) CAR-T 就表现出明显更好的杀伤优势。这说明单个的 CD3 ζ ITAM (CD3 ζ ITAM1) 信号域发挥了足以激活 T 细胞下游信号的作用, 促进 CAR-T 细胞对肿瘤细胞进行有效杀伤的效果, 同时又避免了 T 细胞下游信号过度激活对 CAR-T 细胞造成损伤, 进而发挥出更好的肿瘤杀伤持续性。

[0160] 实施例 5

[0161] 本实施例提供另一种 CAR-T 细胞的制备方法示例

[0162] 1. CAR 表达载体的构建

[0163] 1) CAR 结构由胞外 BCMA 纳米抗体, CD8 铰链区、CD8 跨膜区, 胞内共刺激分子 (4-1BB) 以及 CD3 ζ 部分信号域 (CD3 ζ ITAM1) /CD3 ζ 全长结构域 (对照) 构成, 结构片段采用基因合成的方法制备。

[0164] 本实施例中以靶向 BCMA 的纳米抗体作为示例。

[0165] 2) 用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 分别对 Pwpxld 载体和 CAR 结构片段进行双酶切, 以 T4 连接酶连接后进行转化和筛选培养, 将得到的阳性克隆进行测序鉴定, 最终获得 BCMA VH-BBZ_(short)-Pwpxld 表达载体和 BCMA VH-BBZ_(full)-Pwpxld 对照载体 (含有 CD3 ζ 全长)。

[0166] 本实施例中合成/扩增得到的各片段序列如表 3 所示。

[0167] 表 3

NO.	序列	
7	BCMA CAR	ATGGCCCTGCCTGTTACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTTCTGCATG CCGCCAGACCTGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGC AGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTCTCATCTATTAGTGGTAGTGGTGATTACATATACTACGCAGACTCCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACATATCCAAGAACACGCTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAA AGAAGGTACGGGTGCCAACAGCAGCTTGGCAGACTACAGAGGCCAGGGC ACCCTGGTCACCGTCTCCTCATTCGTGCCCCGTGTTCTGCCTGCCAAGCCT ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTC GCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCG GCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCG CCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACAAA CGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCA GTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAGA AGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAAC CAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG CACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTGA (294 个氨基酸)
8	BCMA 纳米抗 体	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCT CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTAT TAGTGGTAGTGGTGATTACATATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTT CACCATCTCCAGAGACATATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGAAGGTACGG GTGCCAACAGCAGCTTGGCAGACTACAGAGGCCAGGGCACCCCTGGTCACC GTCTCCTCATTCGTGCCCCGTGTTCTGCCTGCCAAGCCT (131 个氨基酸)

[0168] 2.慢病毒包装

- [0169] 1) 复苏培养 293T 细胞，融合度达到 80%左右时进行病毒包装。
- [0170] 2) 按照培养基 (DMEM+10%FBS) 的量加入氯喹溶液，使终浓度为 100μmol/L。
- [0171] 3) 病毒包装体系(10cm 培养皿)为: 50μl CaCl₂、20μg 构建的核心质粒、10μg Pspax2、5μg PMD2.0G、500μl Nuclease-free water (无核酸酶水)、500μl 2X BBS。
- [0172] 4) 10h 左右换新鲜预温培养基 (DMEM+10%FBS)。
- [0173] 5) 收集培养了 48h 和 72h 病毒液，0.22μm 滤膜过滤去除杂质。
- [0174] 6) 超速离心，用病毒原液 1/400 的 DPBS 重悬浓缩的病毒，并按后续用量进行分装，-80℃冻存备用。
- [0175] 3.外周血细胞分离
- [0176] 1) 提前一天孵育 T 细胞培养方瓶 (T25)，4℃孵育过夜。T 细胞培养基中含有抗人 CD3 和 CD28 单克隆抗体: 3ml DPBS、4μg/mL CD3、2μg/mL CD28。

- [0177] 2) 抽取适量健康志愿者新鲜血液。
- [0178] 3) 取 15mL BD 管, 加入 5mL Ficoll, 轻缓加入 5mL 新鲜血液。
- [0179] 4) 常温离心, 1000g (离心机加速度, 升 1 降 1), 30min。
- [0180] 5) 离心后小心吸取中间层 (白色) 的外周血淋巴细胞。
- [0181] 6) 加入三倍体积预温的 DPBS 洗涤, 300g, 10min。
- [0182] 7) 可选地加入 5mL 红细胞裂解液, 室温裂解 5min, 加入等体积预温 DPBS。
- [0183] 8) 细胞计数, 常温离心, 100g, 10min。
- [0184] 9) 按 2×10^6 /mL 加入适量 T 细胞培养液 (X-vivo, 5% AB 血清, 400IU IL2) 重悬细胞。
- [0185] 10) 吸除 T25 方瓶中的抗体孵育液, 加入 T 细胞培养液重悬的 T 细胞, 37°C 正常培养 48h 左右。
- [0186] 4. CAR-T 细胞制备
- [0187] 1) 提前一天孵育 T 细胞培养板, 4°C 孵育过夜。采用 24 孔板, 每一孔中加入 0.5ml DPBS 和 10 μ l RetroNectin (1mg/mL)。
- [0188] 2) 吸除 RetroNectin 溶液。
- [0189] 3) 每孔加入 1 mL 2% BSA 溶液, 37°C 封闭 30min。
- [0190] 4) 吸除封闭液, 使用 DPBS 洗涤一次。
- [0191] 5) 每孔 (非黏附孔板) 加入 200 μ l 400X 病毒, 300 μ l X-vivo 完全培养基, 32°C, 1000g (离心机加速度, 升 2 降 2) 离心 2h。
- [0192] 6) 每孔加入 $2-2.5 \times 10^6$ 个激活 48h 左右的 T 细胞, X-vivo 完全培养基补足至 1mL/孔, 32°C, 300g (离心机加速度, 升 2 降 2) 离心 15min。
- [0193] 本实施例合成的 CAR-T 细胞简称为 BCMA VH-BBZ_(short), 对照组 CAR-T 简称为 BCMA VH-BBZ_(full)。
- [0194] 7) 37°C 正常培养 72h 左右, 流式检测实验组和对照组 CAR 阳性表达率, 见图 18。结果显示, BCMA VH-BBZ_(short) 的阳性表达率为 76.6%; BCMA VH-BBZ_(full) 的阳性表达率为 33.7%。
- [0195] 实施例 6
- [0196] 本实施例提供实施例 5 合成的 CAR-T 的体外杀伤检测试验
- [0197] 1) 96 孔板杀伤: 肿瘤细胞 1×10^4 /孔, 用实施例 5 合成的 CAR-T 细胞, 分别按照 CAR-T 细胞与肿瘤细胞以效靶比 2.5:1、5:1、10:1 进行铺板共孵育, 每个效靶比 3 个复孔, 并做空白 T 细胞 (Mock) 对照, 24h 左右取培养上清检测 LDH 以计算肿瘤裂解率。
- [0198] 本实施例采用人多发性骨髓瘤细胞 MM1S-mCherry 细胞系, 其为一种具有广泛代表性的细胞模型。
- [0199] 2) 另使用活细胞动态检测仪连续检测实验组和对照组 CAR-T 细胞体外杀伤情况, 分别按照与肿瘤细胞以效靶比 2.5:1、5:1、10:1 进行铺板共孵育, 每个效靶比 3 个复孔。
- [0200] 实验结果见图 19-图 25。
- [0201] 图 19 显示, 实施例 5 合成的 CAR-T 和对照组 CAR-T 均能对 BCMA 阳性表达的肿瘤细胞发挥有效杀伤, 但小型化的 BCMA VH-BBZ_(short) CAR-T 在高效靶比时明显具有更好的肿瘤杀伤能力, 在效靶比 E:T=5:1 时, 略优于 BCMA VH-BBZ_(full) CAR-T; 但在效靶比 E:T=10:1 时, 明显优于 BCMA VH-BBZ_(full) CAR-T。

[0202] 具体来说，图 20-图 25 显示了不同的效靶比下的连续杀伤效果。从中可以看出，以效靶比 E:T=10:1 时（E 代表 Effector cell，即效应细胞；T 代表 Target cell，即肿瘤细胞）为例，连续杀伤 7 小时，BCMA VH-BBZ_(short) CAR-T 和 BCMA VH-BBZ_(full) CAR-T 杀伤效果差别不大，但 7h 后 BCMA VH-BBZ_(short) CAR-T 的杀伤效果呈现出逐渐优于 BCMA VH-BBZ_(full) CAR-T 的趋势。以效靶比 E:T=5:1 时为例，连续杀伤 9 小时，BCMA VH-BBZ_(short) CAR-T 和 BCMA VH-BBZ_(full) CAR-T 效果差别不大，但 9h 后 BCMA VH-BBZ_(short) CAR-T 的杀伤效果呈现出逐渐优于 BCMA VH-BBZ_(full) CAR-T 的趋势。这说明单个的 CD3ζ ITAM（CD3ζ ITAM1）信号域发挥了足以激活 T 细胞下游信号的作用，促进 CAR-T 细胞对肿瘤细胞进行有效杀伤的效果，同时又避免了 T 细胞下游信号过度激活对 CAR-T 细胞造成损伤，进而发挥出更好的肿瘤杀伤持续性。

[0203] 实施例 1-6 提供了不同的小型化的二代 CAR 结构示例，其中，最小的 CAR 的氨基酸数量为 281 个氨基酸，最大的 CAR 的氨基酸数量为 294 个氨基酸。

[0204] 实施例 7

[0205] 本实施例提供另 3 种 CAR-T 细胞的制备方法示例

[0206] 1.CAR 表达载体的构建

[0207] 1)CAR 结构由胞外 HER2 纳米抗体、CD28 铰链区、CD28 跨膜区或 CD28 铰链区、CD3 跨膜区或 CD8 铰链区、CD3 跨膜区，胞内共刺激分子（4-1BB）以及 CD3ζ 部分信号域（CD3ζ ITAM1）/CD3ζ 全长结构域（对照）构成，结构片段采用基因合成的方法制备。

[0208] 可以理解的是，胞外纳米抗体可选的包括各种靶向实体肿瘤或血液瘤的纳米抗体。以下实施例中示出的纳米抗体仅为示例，而不是限制。本实施例中以靶向 HER2 的纳米抗体作为示例。

[0209] 2）用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 分别对 Pwpxld 载体和 CAR 结构片段进行双酶切，以 T4 连接酶连接后进行转化和筛选培养，将得到的阳性克隆进行测序鉴定，最终获得 Her2-28H+28TM-VH-BBZ_(short)-Pwpxld,Her2-28H+3TM-VH-BBZ_(short)-Pwpxld 和 Her2-8H+3TM-VH-BBZ_(short)-Pwpxld 表达载体。

[0210] 本发明的 CAR 结构见图 1。

[0211] 本实施例中合成/扩增得到的各片段序列如表 4-6 所示。

[0212] 表 4 Her2-28H+28TM-VH-BBZ_(short)

NO.	序列	
9	Her2 CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGGGGGGACTGGTGCAAGGCAGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCAAGCGGGATTACATTTAGTATCAACACAATGGGATGGTACAGGCAGGCTCCTGGCAAGCAGAGAGAGCTGGTGGCTCTGATTTCAAGCATCGGAGACACCTACTACGCCGACTCTGTGAAAGGACGGTTCACCATCAGCAGAGACAACGCAAAAGAACACCGTCTACTGCAGATGAACAGCCTGAAACCTGAAGACACAGCAGTGCTACTATTGCAAAAGGTTCCGAACCGCTGCTCAGGGCACTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCAGGTGACCGTGTCCAGCATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAA TGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTC CAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT

		TTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACC ATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGGCCCCCGCTACCAGC AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAG TACGATGTTTTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTGA (281 个氨基酸)
10	CD28 铰链区 +CD28 跨膜区	ATTGAAGTTATGTATCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGA ACCATATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCATTATCCC GGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCT TGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTG (66 个氨基酸)

[0213] 表 5 Her2-28H+3TM-VH-BBZ_(short)

NO.	序列	
11	Her2 CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCAC GCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGGGGGGACTGGTGC AGGCAGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCAAGCGGGATTACATTT AGTATCAACACAATGGGATGGTACAGGCAGGCTCCTGGCAAGCAGAGAGA GCTGGTGGCTCTGATTTCAAGCATCGGAGACACCTACTACGCCGACTCTGT GAAAGGACGGTTCACCATCAGCAGAGACAACGCAAAGAACACCGTCTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAAACCTGAAGACACAGCAGTGTACTATTGCAA AAGGTTCCGAACCGCTGCTCAGGGCACTGACTACTGGGGCCAGGGCACCC AGGTGACCGTGTCCAGCATTGAAGTTATGTATCCTCCTTACCTAGACAA TGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTC CAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCCCTCTGCTACCTGCTGGATGG AATCCTCTTCATCTATGGTGTCACTTCTCACTGCCTTGTTCTGAAACGGGGC AGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAA ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGA AGGAGGATGTGAACTGGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCT ATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGCACATGC AGGCCCTGCCCCCTCGCTGA (275 个氨基酸)
12	CD28 铰链区 +CD3 跨膜区	ATTGAAGTTATGTATCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGA ACCATATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCATTATCCC GGACCTTCTAAGCCCTCTGCTACCTGCTGGATGGAATCCTCTTCATCTATG GTGTCATTCTCACTGCCTTGTTCTG (60 个氨基酸)

[0214] 表 6 Her2-8H+3TM-VH-BBZ_(short)

NO.	序列	
13	Her2 CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCAC GCCGCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGGGGGGACTGGTGC AGGCAGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCAAGCGGGATTACATTT AGTATCAACACAATGGGATGGTACAGGCAGGCTCCTGGCAAGCAGAGAGA GCTGGTGGCTCTGATTTCAAGCATCGGAGACACCTACTACGCCGACTCTGT GAAAGGACGGTTCACCATCAGCAGAGACAACGCAAAGAACACCGTCTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAAACCTGAAGACACAGCAGTGTACTATTGCAA AAGGTTCCGAACCGCTGCTCAGGGCACTGACTACTGGGGCCAGGGCACCC AGGTGACCGTGTCCAGCACACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACC

		GGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCC GGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTG TGATCTCTGCTACCTGCTGGATGGAATCCTCTTCATCTATGGTGTCACTCTCA CTGCCTTGTTCTGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAAC AACCATTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCT GCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAAGTGGCCCCCGCGTAC CAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGA GGAGTACGATGTTTTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTGA (281 个氨基 酸)
14	CD8 铰 链区 +CD3 跨膜区	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTC GCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGC GCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATCTCTGCTACCTGCTG GATGGAATCCTCTTCATCTATGGTGTCACTCTCACTGCCTTGTTCTG (66 个 氨基酸)

- [0215] 2.慢病毒包装
- [0216] 1) 复苏培养 293T 细胞，融合度达到 80%左右时进行病毒包装。
- [0217] 2) 按照培养基 (DMEM+10%FBS) 的量加入氯喹溶液，使终浓度为 100μmol/L。
- [0218] 3) 病毒包装体系(10cm 培养皿)为: 50μl CaCl₂、20μg 构建的核心质粒、10μg Pspax2、5μg PMD2.0G、500μl Nuclease-free water (无核酸酶水)、500μl 2X BBS。
- [0219] 4) 10h 左右换新鲜预温培养基 (DMEM+10%FBS)。
- [0220] 5) 收集培养了 48h 和 72h 病毒液，0.22μm 滤膜过滤去除杂质。
- [0221] 6) 超速离心，用病毒原液 1/400 的 DPBS 重悬浓缩的病毒，并按后续用量进行分装，-80℃冻存备用。
- [0222] 3.外周血细胞分离
- [0223] 1) 提前一天孵育 T 细胞培养方瓶 (T25)，4℃孵育过夜。T 细胞培养基中含有抗人 CD3 和 CD28 单克隆抗体: 3ml DPBS、4μg/mL CD3、2μg/mL CD28。
- [0224] 2) 抽取适量健康志愿者新鲜血液。
- [0225] 3) 取 15mL BD 管，加入 5mL Ficoll，轻缓加入 5mL 新鲜血液。
- [0226] 4) 常温离心，1000g (离心机加速度，升 1 降 1)，30min。
- [0227] 5) 离心后小心吸取中间层 (白色) 的外周血淋巴细胞。
- [0228] 6) 加入三倍体积预温的 DPBS 洗涤，300g，10min。
- [0229] 7) 可选地加入 5mL 红细胞裂解液，室温裂解 5min，加入等体积预温 DPBS。
- [0230] 8) 细胞计数，常温离心，100g，10min。
- [0231] 9) 按 2×10^6 /mL 加入适量 T 细胞培养液(X-vivo, 5%AB 血清, 400IU IL2) 重悬细胞。
- [0232] 10) 吸除 T25 方瓶中的抗体孵育液，加入 T 细胞培养液重悬的 T 细胞，37℃正常培养 48h 左右。
- [0233] 4.CAR-T 细胞制备
- [0234] 1) 提前一天孵育 T 细胞培养板，4℃孵育过夜。采用 24 孔板，每一孔中加入 0.5ml DPBS 和 10μl RetroNectin (1mg/mL)。
- [0235] 2) 吸除 RetroNectin 溶液。

[0236] 3) 每孔加入 1 mL 2% BSA 溶液, 37°C 封闭 30min。

[0237] 4) 吸除封闭液, 使用 DPBS 洗涤一次。

[0238] 5) 每孔 (非黏附孔板) 加入 200 μ l 400X 病毒, 300 μ l X-vivo 完全培养基, 32°C, 1000g (离心机加速度, 升 2 降 2) 离心 2h。

[0239] 6) 每孔加入 $2-2.5 \times 10^6$ 个激活 48h 左右的 T 细胞, X-vivo 完全培养基补足至 1mL/孔, 32°C, 300g (离心机加速度, 升 2 降 2) 离心 15min。

[0240] 本实施例合成的小型化 CAR-T 细胞简称为 Her2-28H+28TM-VH-BBZ_(short) 或 Her2-28H+3TM-VH-BBZ_(short) 或 Her2-8H+3TM-VH-BBZ_(short), 全长的对照 CAR-T 简称为 Her2 VH-BBZ_(full) (全长对照 CAR-T 的铰链区和跨膜区均来自于 CD8 分子, 也表示为 Her2-8H+8TM-VH-BBZ_(full))。

[0241] 7) 37°C 正常培养 72h 左右进行体外杀伤检测试验。

[0242] 实施例 8

[0243] 本实施例提供实施例 7 合成的 CAR-T 的体外杀伤检测试验

[0244] 1) 96 孔板杀伤: 肿瘤细胞 1×10^4 /孔, 用本发明实施例 1 合成的 CAR-T 细胞, 分别按照与肿瘤细胞以效靶比 (效应细胞: 靶细胞=CAR-T: 肿瘤细胞) 2.5:1、5:1 进行铺板共孵育, 每个效靶比 3 个复孔, 并做空白 T 细胞 (Mock) 对照。

[0245] 本实施例采用人卵巢癌细胞 Skov3-mCherry 细胞系, 其作为一种具有广泛代表性的细胞模型。

[0246] 2) 使用活细胞动态检测仪于共孵育 24h 时单次拍摄记录各实验组和对照组 CAR-T 细胞体外杀伤情况。实验结果见图 26。

[0247] 图 26 显示, 实施例 7 合成的各小型化 CAR-T 和对照 CAR-T 均能对 HER2 阳性表达的肿瘤细胞发挥有效杀伤, 但与对照 Her2 VH-BBZ_(full) 相比 (铰链区和跨膜区均来自于 CD8 分子, 也表示为 Her2-8H+8TM-VH-BBZ_(full)), Her2-28H+28TM-VH-BBZ_(short) 和 Her2-8H+3TM-VH-BBZ_(short) 明显具有更好的肿瘤杀伤能力, Her2-28H+3TM-VH-BBZ_(short) 肿瘤杀伤能力略优于 Her2 VH-BBZ_(full) (铰链区和跨膜区均来自于 CD8 分子, 也表示为 Her2-8H+8TM-VH-BBZ_(full))。具体来说, 以上结果表明使用不同来源的铰链区和跨膜区均能发挥新型小型化 CAR 分子的优势杀伤作用, 足以激活 T 细胞下游信号的作用, 达到促进 CAR-T 细胞对肿瘤细胞进行有效杀伤的效果。

[0248] 实施例 9

[0249] 本实施例提供一种 CAR-T 细胞的制备方法示例。

[0250] 1. CAR 表达载体的构建

[0251] 1) CAR 结构由胞外 HER2 纳米抗体(VH)/HER2 单链抗体 (scFv) (对照), CD8 铰链区、CD8 跨膜区, 胞内共刺激分子 (4-1BB) 以及 CD3 ζ 部分信号域 (CD3 ζ ITAM1) /CD3 ζ 全长结构域 (对照) 构成, 结构片段采用基因合成的方法制备。

[0252] 本实施例中以靶向 HER2 的不同结构设计 CAR 作为示例。

[0253] 2) 用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 分别对 Pwpxld 载体和 CAR 结构片段进行双酶切, 以 T4 连接酶连接后进行转化和筛选培养, 将得到的阳性克隆进行测序鉴定, 最终获得 Her2 scFV-BBZ_(short)-Pwpxld, Her2 scFV-BBZ_(full)-Pwpxld (含有 CD3 ζ 全长), Her2 VH-BBZ_(short)-Pwpxld 表达载体和 Her2 VH-BBZ_(full)-Pwpxld 对照载体 (含有 CD3 ζ 全长)。

[0254] 本发明的 CAR 结构见图 1。

[0255] 本实施例中合成/扩增得到的各片段序列如下表所示。

[0256] 表 7 Her2 scFV-BBZ_(short)

NO.		序列
15	Her2 CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCAC GCCGCCAGGCCGATGCAGGTACAACCTGCAGCAGTCAGGACCTGAACTGAA GAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCCTCTGGGTATCCTT TCACAAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGACAGGGTTTA AAGTGGATGGGCTGGATTAACACCTCCACTGGAGAGTCAACATTTGCTGAT GACTTCAAGGGACGGTTTGACTTCTCTTTGAAAACCTCTGCCAACACTGCC TATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAGTGAAGACTCGGCTACATATTTCTGT GCAAGATGGGAGGTTTACCACGGCTACGTTCTTACTGGGGCCAAGGGAC CACGGTCACCGTTTCCTCTGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCCG GCGGTGGCGGTTCTGACATCCAGCTGACCCAGTCTCACAAATTCCTGTCCA CTTCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTG TATAATGCTGTTGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTT CTGATTTACTCGGCATCCTCCCGGTACACTGGAGTCCCTTCTCGCTTCACTG GCAGTGGCTCTGGGCCGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTG AAGACCTGGCAGTTTATTTCTGTCAGCAACATTTTCGTACTCCATTACGTT CGGCTCGGGGACAAAATTGGAGATCAAAACCACGACGCCAGCGCCGCGA CCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCC AGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTG GACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCCTGGCCGGGACTTGTGGG GTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCT GTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGA AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAC TGGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAAT CTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGCACATGCAGGCCCTGCCCC TCGCTGA (405 个氨基酸)
16	HER2 单链抗 体	ATGCAGGTACAACCTGCAGCAGTCAGGACCTGAACTGAAGAAGCCTGGAG AGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCCTCTGGGTATCCTTTCACAAACTATG GAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGACAGGGTTTAAAGTGGATGGG CTGGATTAACACCTCCACTGGAGAGTCAACATTTGCTGATGACTTCAAGG GACGGTTTGACTTCTCTTTGAAAACCTCTGCCAACACTGCCTATTTGCAGA TCAACAACCTCAAAAGTGAAGACTCGGCTACATATTTCTGTGCAAGATGG GAGGTTTACCACGGCTACGTTCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAC CGTTTCCTCTGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGGCG GTTCTGACATCCAGCTGACCCAGTCTCACAAATTCCTGTCCACTTCAGTAG GAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGTATAATGCT GTTGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTTCTGATTTAC TCGGCATCCTCCCGGTACACTGGAGTCCCTTCTCGCTTCACTGGCAGTGGC TCTGGGCCGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCT GGCAGTTTATTTCTGTCAGCAACATTTTCGTACTCCATTACGTTTCGGCTCG GGGACAAAATTGGAGATCAAA (242 个氨基酸)

[0257] 表 8 Her2 scFV-BBZ_(full)

NO.		序列
17	Her2 CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCAC GCCGCCAGGCCGATGCAGGTACAACCTGCAGCAGTCAGGACCTGAACTGAA GAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCCTCTGGGTATCCTT TCACAAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGACAGGGTTTA AAGTGGATGGGCTGGATTAACACCTCCACTGGAGAGTCAACATTTGCTGAT GACTTCAAGGGACGGTTTGACTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAACACTGCC TATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAGTGAAGACTCGGCTACATATTTCTGT GCAAGATGGGAGGTTTACCACGGCTACGTTTCCTTACTGGGGCCAAGGGAC CACGGTCACCGTTTCCTCTGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGCGGTGGCTCCG GCGGTGGCGGTTCTGACATCCAGCTGACCCAGTCTCACAAATTCCTGTCCA CTTCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTG TATAATGCTGTTGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTT CTGATTTACTCGGCATCCTCCCGGTACACTGGAGTCCCCTTCTCGCTTCACTG GCAGTGGCTCTGGGCGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTG AAGACCTGGCAGTTTATTTCTGTCAGCAACATTTTCGTACTCCATTACGTT CGGCTCGGGGACAAAATTGGAGATCAAAACCACGACGCCAGCGCCGCGA CCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCC AGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTG GACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCCTGGCCGGGACTTGTGGG GTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCT GTATATATTCAAAACAACATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGA AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAC TGGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAAT CTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGG ACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGG CCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGA TTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTA CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGC AGGCCCTGCCCCCTCGCTGA (476 个氨基酸)
18	CD3 ζ 全长	GCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCT AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGAC CCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGC CTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGAT TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTAC CAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCA GGCCCTGCCCCCTCGC (104 个氨基酸)

[0258] 2.慢病毒包装

[0259] 1) 复苏培养 293T 细胞，融合度达到 80%左右时进行病毒包装。

[0260] 2) 按照培养基（DMEM+10%FBS）的量加入氯喹溶液，使终浓度为 100μmol/L。

[0261] 3) 病毒包装体系(10cm 培养皿)为：50μl CaCl₂、20μg 构建的核心质粒、

10 μ g Pspax2、5 μ g PMD2.0G、500 μ l Nuclease-free water（无核酸酶水）、500 μ l 2X BBS。

[0262] 4) 10h 左右换新鲜预温培养基（DMEM+10%FBS）。

[0263] 5) 收集培养了 48h 和 72h 病毒液，0.22 μ m 滤膜过滤去除杂质。

[0264] 6) 超速离心，用病毒原液 1/400 的 DPBS 重悬浓缩的病毒，并按后续用量进行分装，-80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

[0265] 3.外周血细胞分离

[0266] 1) 提前一天孵育 T 细胞培养方瓶（T25），4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。T 细胞培养基中含有抗人 CD3 和 CD28 单克隆抗体：3ml DPBS、4 μ g/mL CD3、2 μ g/mL CD28。

[0267] 2) 抽取适量健康志愿者新鲜血液。

[0268] 3) 取 15mL BD 管，加入 5mL Ficoll，轻缓加入 5mL 新鲜血液。

[0269] 4) 常温离心，1000g（离心机加速度，升 1 降 1），30min。

[0270] 5) 离心后小心吸取中间层（白色）的外周血淋巴细胞。

[0271] 6) 加入三倍体积预温的 DPBS 洗涤，300g，10min。

[0272] 7) 可选地加入 5mL 红细胞裂解液，室温裂解 5min，加入等体积预温 DPBS。

[0273] 8) 细胞计数，常温离心，100g，10min。

[0274] 9) 按 2×10^6 /mL 加入适量 T 细胞培养液（X-vivo，5%AB 血清，400IU IL2）重悬细胞。

[0275] 10) 吸除 T25 方瓶中的抗体孵育液，加入 T 细胞培养液重悬的 T 细胞，37 $^{\circ}$ C 正常培养 48h 左右。

[0276] 4.CAR-T 细胞制备

[0277] 1) 提前一天孵育 T 细胞培养板，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。采用 24 孔板，每一孔中加入 0.5ml DPBS 和 10 μ l RetroNectin（1mg/mL）。

[0278] 2) 吸除 RetroNectin 溶液。

[0279] 3) 每孔加入 1 mL 2% BSA 溶液，37 $^{\circ}$ C 封闭 30min。

[0280] 4) 吸除封闭液，使用 DPBS 洗涤一次。

[0281] 5) 每孔（非黏附孔板）加入 200 μ l 400X 病毒，300 μ l X-vivo 完全培养基，32 $^{\circ}$ C，1000g（离心机加速度，升 2 降 2）离心 2h。

[0282] 6) 每孔加入 $2-2.5 \times 10^6$ 个激活 48h 左右的 T 细胞，X-vivo 完全培养基补足至 1mL/孔，32 $^{\circ}$ C，300g（离心机加速度，升 2 降 2）离心 15min。

[0283] 本实施例合成的小型化 CAR-T 细胞简称为 Her2 scFv-BBZ_(full)（含全长 CD3 ζ ），Her2 scFv-BBZ_(short)，Her2 VH-BBZ_(full)（含全长 CD3 ζ ）和 Her2 VH-BBZ_(short)。

[0284] 7) 37 $^{\circ}$ C 正常培养 72h 左右，流式检测实验组和对照组 CAR 的阳性表达率，见图 27。结果显示，Her2 scFv-BBZ_(full) 的阳性表达率为 46.4%；Her2 scFv-BBZ_(short) 的阳性表达率为 63.2%；Her2 VH-BBZ_(full) 的阳性表达率为 52.5%；Her2 VH-BBZ_(short) 的阳性表达率为 80.2%。

[0285] 实施例 10

[0286] 本实施例提供实施例 9 合成的 CAR-T 的体外杀伤检测试验。

[0287] 1) 96 孔板杀伤：肿瘤细胞 1×10^4 /孔，用本发明实施例 1 合成的 CAR-T 细胞，分别按照与肿瘤细胞以效靶比（效应细胞：靶细胞=CAR-T：肿瘤细胞）1:1、2.5:1、5:1 进行铺板共孵育，每个效靶比 3 个复孔，并做空白 T 细胞（Mock）对照。

[0288] 本实施例采用人卵巢癌细胞 Skov3-mCherry 细胞系，其作为一种具有广泛代表性的细胞模型。

[0289] 2) 使用活细胞动态检测仪连续检测实验组和对照组 CAR-T 细胞体外杀伤情况。

[0290] 3) 共孵育 24h 左右取培养上清检测 LDH 以计算肿瘤裂解率。

[0291] 实验结果见图 28-图 34。

[0292] 图 28 显示，实施例 9 合成的表达不同结构设计 CAR 的 CAR-T 均能对 HER2 阳性表达的肿瘤细胞发挥有效杀伤，但 Her2 VH-BBZ_(short) CAR-T 明显具有更好的肿瘤杀伤能力，其中效靶比 E:T=1:1、2.5:1 和 5:1 时杀伤效果均明显优于 Her2 scFv-BBZ_(full)，Her2 scFv-BBZ_(short) 和 Her2 VH-BBZ_(full)。

[0293] 具体来说，图 29-图 34 显示了不同的效靶比下的连续杀伤效果。从中可以看出，以效靶比 E:T=1:1、2.5:1 和 5:1 时（E 代表 Effector cell，即效应细胞；T 代表 Target cell，即肿瘤细胞），连续杀伤 24 小时，Her2 VH-BBZ_(short) CAR-T 的肿瘤杀伤能力均明显优于 Her2 scFv-BBZ_(full)，Her2 scFv-BBZ_(short) 和 Her2 VH-BBZ_(full)，其中 Her2 scFv-BBZ_(full) 杀伤效果最差。在效靶比 E:T=1:1，Her2 VH-BBZ_(short) CAR-T 最早在 16 小时左右开始产生杀伤；在效靶比 E:T=2:1，Her2 VH-BBZ_(short) CAR-T 最早在 9 小时左右开始产生杀伤；在效靶比 E:T=5:1，Her2 VH-BBZ_(short) CAR-T 最早在 6 小时左右开始产生杀伤，开始杀伤时间均早于 Her2 scFv-BBZ_(full)，Her2 scFv-BBZ_(short) 和 Her2 VH-BBZ_(full)，其中 Her2 scFv-BBZ_(full) 开始杀伤时间最晚。这说明 CAR 分子长度与 CAR-T 细胞杀伤效果和杀伤起始时间有相关性，具体表现为表达 CAR 分子长度越短，CAR-T 细胞杀伤效果约好，杀伤起始时间越早。

[0294] 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. 一种新型小型化的嵌合抗原受体，结构包括胞外段、跨膜区和胞内段，其特征在于，所述胞外段为抗原结合区和铰链区，所述胞内段为部分的 CD3 ζ 与共刺激分子串联，所述嵌合抗原受体的长度不超过 300 个氨基酸；所述胞外段的抗原结合区的长度不超过 150 个氨基酸；所述铰链区和跨膜区的长度不超过 70 个氨基酸；所述胞内段的长度不超过 100 个氨基酸。
2. 如权利要求 1 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述部分的 CD3 ζ 为 CD3 ζ ITAM 结构域。
3. 如权利要求 2 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述 CD3 ζ ITAM 结构域包括 CD3 ζ ITAM1 结构域、CD3 ζ ITAM2 结构域或 CD3 ζ ITAM3 结构域。
4. 如权利要求 1 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述抗原结合区为靶向实体肿瘤或靶向血液瘤细胞靶点的抗体。
5. 如权利要求 1 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述抗体包括单域抗体或纳米抗体。
6. 如权利要求 1 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述共刺激分子为单个共刺激分子。
7. 如权利要求 1 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述铰链区包括 CD8 铰链区或 CD28 铰链区。
8. 如权利要求 1 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述跨膜区包括 CD8 跨膜区、CD28 跨膜区或 CD3 跨膜区。
9. 如权利要求 1 所述的嵌合抗原受体，其特征在于，所述铰链区和跨膜区的连接方式包括 CD8 铰链区和 CD8 跨膜区连接、CD28 铰链区和 CD28 跨膜区连接、CD28 铰链区和 CD3 跨膜区连接或 CD8 铰链区和 CD3 跨膜区连接。
10. 一种 CAR-T 细胞，其特征在于，表达如权利要求 1-9 任一项所述的嵌合抗原受体。
11. 如权利要求 10 所述的 CAR-T 细胞在制备靶向实体肿瘤或血液瘤药物中的应用。
12. 如权利要求 10 所述的 CAR-T 细胞在制备治疗自身免疫疾病中的应用。
13. 如权利要求 11 所述的应用，其特征在于，所述实体肿瘤包括卵巢癌、乳腺癌、胃癌、肠癌、淋巴瘤和/或多发性骨髓瘤；所述血液瘤包括白血病。
14. 如权利要求 11 或 12 所述的应用，其特征在于，所述 CAR-T 细胞的部分的 CD3 ζ 用于适当激活 T 细胞下游信号。