

靶向 CD22 的嵌合抗原受体及其制法和应用

技术领域

- 5 本发明涉及生物医药领域，更具体地涉及一种靶向 CD22 的嵌合抗原受体及其制法和应用。

背景技术

- 10 血液系统的恶性肿瘤占人类恶性肿瘤约 10%，95%血液系统的恶性肿瘤是 B 淋巴细胞来源。传统的化疗和放疗对治疗血液系统的恶性肿瘤起着重要作用，但是传统的癌症治疗方法遇到了瓶颈，手术、放化疗特异性差，副作用明显，易复发转移。有的病人虽疗效显著，但大部分都难以治愈。因此更为有效的新治疗方法一直是这一领域探索的热点。

- 15 癌症治疗的重点转向了最有希望的肿瘤免疫治疗方面。目前国外已有两个靶向 CD19 的嵌合抗原受体 T 细胞疗法 (CAR-T) 产品获批上市，用于治疗儿童和年轻成年患者急性淋巴细胞白血病和成人二线或多线系统治疗的复发性或难治性大 B 细胞淋巴瘤。然而，anti-CD19 CAR-T 治疗后，40% 的患者在治疗 1 个月达到完全缓解之后又出现了复发，并且复发的患者中高于 60% 比例的患者出现了 CD19 阴性肿瘤细胞的逃逸。也有部分患者的肿瘤细胞 CD19 表达受限制，接受 anti-CD19 CAR-T 细胞治疗时常会出现无响应或者耐药性发生。因此，迫切需要筛选出靶向除 CD19 以外的 B 细胞白血病相关抗原的 CAR-T 结构，来治疗恶性淋巴瘤患者。

- 20 尽管抗 CD19 CAR-T 的疗效突出，但对于部分 B 细胞 CD19 抗原表达缺失的白血病患者却无效；部分患者因为抗 CD19 CAR-T 治疗后，CD19 抗原表达降低甚至丢失，导致治疗效果不佳，容易复发，而仍有 CD22 的持续表达。
- 25 因此，本领域急需开发新的有效治疗肿瘤的新药物。

发明内容

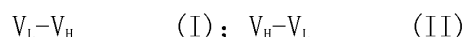
本发明的目的在于提供一种靶向 CD22 的嵌合抗原受体及其制法和应用。

- 30 具体地，本发明的目的在于提供一种靶向 CD22 抗原嵌合抗原受体的序列，及其修饰 T 细胞 (CART-CD22) 的制备方法和活性鉴定。本发明提供了一种用于治疗 CD22 阳性 B 细胞淋巴瘤的嵌合性抗原受体结构。

- 在本发明的第一方面，提供了一种嵌合抗原受体 (CAR)，所述嵌合抗原受体的抗原结合结构域 (即，scFv) 包括 SEQ ID NO: 1 或 3 所示的抗体重链可变区，和 SEQ ID NO: 2 或 4 所示的抗体轻链可变区。

在另一优选例中，所述抗体重链可变区和抗体轻链可变区通过连接肽相连。

在另一优选例中，所述的抗原结合结构域的结构如下式 I 或 II 所示：



其中， V_H 为抗体重链可变区； V_L 为抗体轻链可变区；“-”为连接肽或肽键。

在另一优选例中，所述的抗原结合结构域的结构如式 I 所示。

在另一优选例中，所述 V_L 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示， V_H 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。(注：CAR-T22.13)

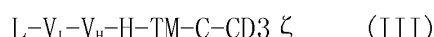
在另一优选例中，所述 V_L 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示， V_H 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示。(注：CAR-T22.14)

在另一优选例中，所述连接肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示。

在另一优选例中，所述抗原结合结构域结合于 CD22，较佳地为人 CD22。

在另一优选例中，所述抗原结合结构域的重链可变区和轻链可变区来源于人源化或来自于人的抗体。

10 在另一优选例中，所述嵌合抗原受体的结构如下式 III 所示：



其中，

L 为任选的引导序列(Leader sequence，即信号肽 signal peptide)；

H 为绞链区；

15 TM 为跨膜结构域；

C 为共刺激信号分子；

CD3 ζ 为源于 CD3 ζ 的胞浆信号传导序列；

V_H 、 V_L 和 “-” 分别如上所述。

在另一优选例中，所述的 L 为选自下组的蛋白的信号肽：CD8、CD28、GM-CSF、
20 CD4、CD137、或其组合。

在另一优选例中，所述的 L 为 CD8 来源的信号肽。

在另一优选例中，L 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示。

在另一优选例中，所述的 H 为选自下组的蛋白的绞链区：CD8、CD28、CD137、或其组合。

25 在另一优选例中，所述的 H 为 CD8 α 来源的绞链区。

在另一优选例中，H 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

在另一优选例中，所述的 TM 为选自下组的蛋白的跨膜区：CD28、CD3 epsilon、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、或其组合。

30 在另一优选例中，所述的 TM 为 CD8 α 来源的跨膜区。

在另一优选例中，TM 的序列如 SEQ ID NO: 11 所示。

在另一优选例中，所述的 C 为选自下组的蛋白的共刺激信号分子：OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD134、4-1BB(CD137)、PD1、Dap10、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、NKG2D、GITR、TLR2、或其组合。

35 在另一优选例中，所述的 C 为 4-1BB 或 CD28 来源的共刺激信号分子，较佳地为 4-1BB 来源的共刺激信号分子。

在另一优选例中，C 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示。

在另一优选例中，CD3 ζ 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 14 或 15 所示。

在本发明的第二方面，提供了一种核酸分子，所述核酸分子编码本发明第一方面所述的嵌合抗原受体(CAR)。

在另一优选例中，所述核酸分子为分离的。

5

在本发明的第三方面，提供了一种载体，所述的载体含有本发明第二方面所述的核酸分子。

在另一优选例中，所述的载体选自下组：DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体(AAV)、逆转录病毒载体、转座子、或其组合。

10

在另一优选例中，所述的载体选自下组：质粒、病毒载体。

在另一优选例中，所述载体为病毒颗粒的形式。

在另一优选例中，所述载体为慢病毒载体。

在另一优选例中，所述载体包含一个或多个启动子，所述启动子可操作地与所述核酸序列、增强子、转录终止信号、多腺苷酸化序列、复制起点、选择性标记、核酸限制性位点、和/或同源重组位点连接。

15

在本发明的第四方面，提供了一种宿主细胞，所述的宿主细胞中含有本发明第三方面所述的载体或染色体中整合有外源的本发明第二方面所述的核酸分子或表达本发明第一方面所述的CAR。

20

在另一优选例中，所述宿主细胞为分离的细胞。

在另一优选例中，所述宿主细胞为基因工程化的细胞。

在另一优选例中，所述宿主细胞为哺乳动物细胞。

在另一优选例中，所述宿主细胞为T细胞或NK细胞，较佳地为T细胞。

在另一优选例中，所述宿主细胞为CAR-T细胞或CAR-NK细胞，较佳地为CAR-T细胞。

25

在本发明的第五方面，提供了一种制备工程化的免疫细胞的方法，所述的免疫细胞表达本发明第一方面所述的CAR，所述方法包括以下步骤：

(a) 提供待改造的免疫细胞；和

(b) 将本发明第二方面所述的核酸分子或本发明第三方面所述的载体转导入所述免疫细胞内，从而获得所述工程化的免疫细胞。

30

在另一优选例中，所述工程化的免疫细胞为CAR-T细胞或CAR-NK细胞。

在另一优选例中，在步骤(a)中，还包括在含有0.1-10%(较佳地0.5%-5%，更佳地0.8%-2%)人血白蛋白的GT-551无血清培养基中培养所述待改造的免疫细胞，其中人血白蛋白的含量以培养基总重量计。

35

在另一优选例中，所述的方法还包括对获得的工程化免疫细胞进行功能和有效性检测的步骤。

在本发明的第六方面，提供了一种制剂，所述制剂含有本发明第一方面所述的

嵌合抗原受体、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的载体、或本发明第四方面所述的宿主细胞，以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

在另一优选例中，所述制剂为液态制剂。

在另一优选例中，所述制剂的剂型为注射剂。

- 5 在另一优选例中，所述制剂中所述 CAR-T 细胞的浓度为 1×10^3 – 1×10^8 个细胞/ml，较佳地 1×10^4 – 1×10^7 个细胞/ml。

- 10 在本发明的第七方面，提供了一种本发明第一方面所述的嵌合抗原受体、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的载体、或本发明第四方面所述的宿主细胞、或本发明第六方面所述的制剂的用途，用于制备预防和/或治疗癌症或肿瘤的药物或制剂。

在另一优选例中，所述肿瘤选自下组：血液肿瘤、实体瘤、或其组合。

- 15 在另一优选例中，所述血液肿瘤选自下组：急性髓细胞白血病 (AML)、多发性骨髓瘤 (MM)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性淋巴白血病 (ALL)、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)、或其组合。

在另一优选例中，所述实体瘤选自下组：胃癌、胃癌腹膜转移、肝癌、白血病、肾脏肿瘤、肺癌、小肠癌、骨癌、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、大肠癌、宫颈癌、卵巢癌、淋巴瘤、鼻咽癌、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤、非小细胞肺癌 (NSCLC)、脑胶质瘤、子宫内膜癌、或其组合。

- 20 在另一优选例中，所述的肿瘤为 CD22 阳性肿瘤，较佳地为 CD22 阳性 B 细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、或浆细胞白血病。

- 25 在本发明的第八方面，提供了一种用于制备本发明第四方面所述的宿主细胞的试剂盒，所述试剂盒含有容器，以及位于容器内的本发明第二方面所述的核酸分子、或本发明第三方面所述的载体。

在本发明的第九方面，提供了一种治疗疾病的方法，包括给需要治疗的对象施用适量的本发明第三方面所述的载体、本发明第四方面所述的宿主细胞、或本发明第六方面所述的制剂。

- 30 在另一优选例中，所述疾病为癌症或肿瘤。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

35

附图说明

图 1 显示了靶向 CD22 嵌合型抗原受体结构示意图。CAR 的结构包括前导序列、抗原识别序列、连接区、跨膜区、共刺激因子信号区和 CD3zeta 信号传导区。

图 2 显示了靶向 CD22 嵌合型抗原受体工程化 T 细胞转染效率的检测。经过重

组人CD22蛋白Fc段染色方法检测培养至第6天时在流式细胞仪上分析 CART-CD22s 细胞中 CAR 基因编码蛋白在 T 细胞膜表面的表达水平。

图 3A 显示了 T 细胞膜表面 CD137 的表达水平。图 3B 显示了培养上清中 IFN γ 的分泌水平。具体地，依次取 1×10^5 个培养到第 6 天的 CART-CD22s 细胞，分别与 CD22 阳性的 K562-CD22+C7，K562-CD22+A4，H929-CD22+E12，Raji 肿瘤细胞系，以及 CD22 阴性的 K562 肿瘤细胞系或不添加肿瘤细胞，在 200 μ l GT-551 培养基中按照 1:1 比例培养 18h 后分别检测 T 细胞膜表面 CD137 的表达水平和培养上清中 IFN- γ 的分泌水平。

图 4 显示了 CART-CD22s 诱导肿瘤细胞毒性的检测。具体地，分别取 1×10^4 个 CD22 阴性(K562)或 CD22 阳性的(K562-CD22+A4，H929-CD22+E12，Raji)肿瘤细胞系，在 100 μ l GT-551 培养基中按照图示比例与相应的 CART 细胞分别共培养 8h 后，吸取 50 μ l 培养基上清，加入 50 μ l 显色底物混合物，通过 30 分钟偶联的酶反应，检测肿瘤细胞被 CAR-T 细胞识别杀伤后，裂解时释放出的乳酸脱氢酶(LDH)的量，生成的红色产物的量与裂解的细胞数成正比。此图显示了 CART-CD22s 诱导肿瘤细胞毒性的百分比。

图 5 显示了 CART-CD22s 诱导肿瘤细胞晚期凋亡过程中 CD107a 释放水平的检测。具体地，取 2×10^5 个 CD22 阴性(K562)或 CD22 阳性(K562-CD22+A4，H929-CD22+E12，Raji)肿瘤细胞系和 1×10^5 个 CAR-T 细胞，在 200 μ l GT-551 培养基中按照体积比 1:1 比例培养 5h 后，检测 CAR-T 细胞被 CD22 阳性的肿瘤细胞激活后 T 细胞脱颗粒相关膜蛋白 CD107a 的表达水平变化。

图 6A、图 6B 和图 6C 为 CART-CD22s 对比例筛选结果图。图 6A 显示靶向 CD22 嵌合型抗原受体工程化 T 细胞转染效率的检测。采用 proteinL 染色方法鉴定培养到第 6 天的 CART-CD22s 细胞中 CAR 基因编码蛋白在 T 细胞膜表面的表达水平。依次取 1×10^5 培养到第 6 天的 CART-CD22s 细胞，分别与 CD22 阳性的 K562-CD22+肿瘤细胞系，天然表达 CD22 的肿瘤细胞系 Raji，以及 CD22 阴性的 K562 肿瘤细胞系或不添加肿瘤细胞，在 200 μ l GT-551 培养基中按照 1:1 比例培养 18h 后分别检测 T 细胞膜表面 CD137 的表达水平(图 6B)和培养上清中 IFN γ 的分泌水平(图 6C)。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入地研究，进行了大量的筛选，首次获得了能够有效靶向 CD22 抗原的嵌合抗原受体，所述嵌合抗原受体的细胞外抗原结合结构域包括 SEQ ID NO: 1 所示的抗体重链可变区和 SEQ ID NO: 2 所示的抗体轻链可变区；或者 SEQ ID NO: 3 所示的抗体重链可变区和 SEQ ID NO: 4 所示的抗体轻链可变区。本发明还制备了含有所述嵌合抗原受体的 CAR-T 细胞。实验结果表明，本发明提供的嵌合抗原受体及其 CAR-T 细胞显示出了极高的对肿瘤细胞的杀伤能力，CD107a 释放水平表达增加，并且特异性好，可以很好地诱导 CD22 阳性肿瘤细胞凋亡。在此基础上，完成了本发明。

具体地，本发明筛选的抗体包括 CAR-T22.3，CAR-T22.5，CAR-T22.7，CAR-T22.8，CAR-T22.9，CAR-T22.10，CAR-T22.11，CAR-T22.12，CAR-T22.13，

CAR-T22. 14, CAR-T22. 15, CAR-T22. 16, CAR-T22. 17。其中 CAR-T22. 3 和 CAR-T22. 5 是已发表的 CAR-T 序列，作为筛选的阳性对照。筛选的结果显示 CAR-T22. 13, CAR-T22. 14 和 CAR-T22. 5 所得到的 CAR-T 体外功能相近，进一步将这 3 个 CAR-T 进行了实验研究，完成了这些嵌合型抗原受体在原代 T 细胞中的表达水平、体外活化能力及肿瘤细胞杀伤效能等层面的分析与鉴定。研究表明，本发明的嵌合抗原受体靶向 CD22 阳性细胞，可以用于治疗 CD22 阳性 B 细胞白血病，包括一些抗 CD19 CAR-T 治疗后急性 B 细胞白血病复发的 CD19 阴性 CD22 阳性的患者。

具体地，本发明鉴定了不同 CAR 结构在病毒感染后细胞膜表面表达时间和表达强度的相关性，进而鉴定出不同 CAR 结构蛋白表达难易程度的差异，这一发现提示不同 CAR 结构在相同感染条件下 CAR 蛋白在膜表面的表达水平和 CART 体内活性持久性存在差异。经过大量的筛选，获得了本发明结构的 CAR (CAR-T22. 13, CAR-T22. 14)。结果表明，本发明中的 CAR 结构编码蛋白都可以充分表达和膜定位。并且诱导肿瘤细胞晚期凋亡能力强，有更好的 CD137 活化水平和 CD107a 释放水平，杀伤效果更好。

本发明还对靶向 CD22 抗原 CAR 结构修饰 T 细胞的制备工艺作了改进，主要是选用补加 1% 人血白蛋白的 GT-551 无血清培养基在体外培养淋巴细胞。

术语

为了可以更容易地理解本公开，首先定义某些术语。如本申请中所使用的，除非本文另有明确规定，否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。在整个申请中阐述了其它定义。

术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成，其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。

术语“给予”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任一种将本发明的产品物理引入受试者，包括静脉内，肌内，皮下，腹膜内，脊髓或其它肠胃外给药途径，例如通过注射或输注。

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。

CD22

CD22 为 I 型跨膜蛋白，是唾液酸结合的免疫球蛋白样凝集素家族的重要成员，具有调控 B 细胞激活作用的细胞表面粘附分子，有助于 B 细胞对抗原反应敏感性的控制，普遍存在于正常 B 细胞和 B 细胞恶性肿瘤中，又被称为 BL-CAM, B3, Leu-14,

Lyb-8 等。人类 CD22 基因位于 19 号染色体长臂(19q13.1)，有至少 15 个外显子，外显子 4-10 编码单链 Ig 域，外显子 11-15 编码跨膜域和胞内域。CD22 有 CD22 α 和 CD22 β 两种亚型，胞外域分别有 5 个和 7IgG 域。

CD22 最初表达于晚期前 B 细胞的胞质内，后转移至细胞表面，在前 B 细胞及未成熟 B 细胞有少量表达，在分化成熟的免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig) M⁺ 和 IgD⁺ B 细胞高表达。约有 60-80% 的 B 细胞恶性肿瘤表达 CD22，CD22 相对特异地表达于 B 细胞表面，且在靶向 CD19 CART 治疗失败复发时仍有较高水平的表达。大量试验证明靶向 CD22 的单克隆抗体治疗白血病有很大的效果。因此已成为调节 B 细胞免疫及 B 细胞恶性肿瘤免疫治疗的靶点。

10 尽管抗 CD19 CAR-T 的疗效突出，但对于部分 B 细胞 CD19 抗原表达缺失的白血病患者却无效；部分患者因为抗 CD19 CAR-T 治疗后，CD19 抗原表达降低甚至丢失，导致治疗效果不佳，容易复发，而仍有 CD22 的持续表达。CD22 表达于大多数 B 细胞性急性淋巴细胞白血病患者，包括一些抗 CD19 CAR-T 治疗后 CD19 阴性的患者中。Fry 等开展了一项针对 CD22 抗原 CAR-T 治疗的临床试验，在接受 $\geq 1 \times 10^6$ 15 抗 CD22 CAR-T 细胞治疗后，73%(11/15) 的患者获得了完全缓解。Ramakrishna 等认为，通过提高肿瘤细胞 CD22 抗原表达量，可提高抗 CD22 CAR-T 治疗 CD22 低表达的 B 细胞性白血病/淋巴瘤的疗效，但其进一步的疗效，有待动物实验及临床试验的验证。

20 近期，免疫疗法，特别是过继性 T 细胞疗法，在治疗针对血液系统的恶性肿瘤临床试验中显示了强大的疗效和光明前景。T 细胞可以被基因修饰来表达嵌合抗原受体(CAR)，它包括抗原识别部分和 T 细胞激活区。CAR 利用单克隆抗体的抗原结合性质能重定向 T 细胞的特异性和反应性并且以一种非 MHC 限制的方式靶向靶标。这种非 MHC 限制抗原识别使表达 CAR 的 T 细胞不需要抗原加工就能识别抗原，因此避免了肿瘤逃逸的一种主要机制。除此之外，CAR 也不会和内源性 TCR 的 α 25 链， β 链产生二聚体。

嵌合抗原受体(CAR)

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-特异性结合元件(也称为抗原结合结构域)。细胞内结构域 30 包括共刺激信号传导区和 ζ 链部分。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。

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”或“连接肽”通常指起到将跨 35 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。

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 CD22 的抗原结合结构域。本发明的 CAR 当在 T 细胞中表达时，能够基于抗原结合特异性进行抗原识别。当其结合其关联抗原时，影响肿瘤细胞，导致肿瘤细胞不

生长、被促使死亡或以其他方式被影响，并导致患者的肿瘤负荷缩小或消除。抗原结合结构域优选与来自共刺激分子和 ζ 链中的一个或多个的细胞内结构域融合。优选地，抗原结合结构域与 4-1BB 信号传导结构域、和 CD3 ζ 信号结构域组合的细胞内结构域融合。

- 5 如本文所用，“抗原结合结构域”“单链抗体片段”均指具有抗原结合活性的 Fab 片段，Fab' 片段，F(ab')₂ 片段，或单一 Fv 片段。Fv 抗体含有抗体重链可变区、轻链可变区，但没有恒定区，并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般的，Fv 抗体还包含 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头，且能够形成抗原结合所需的结构。抗原结合结构域通常是 scFv(single-chain variable fragment)。scFv 的大小一般是一个完整抗体的 1/6。单链抗体优选是由一条核苷酸链编码的一条氨基酸链序列。作为本发明的优选方式，所述 scFv 包含特异性识别 CD22 的抗体。

- 10 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。在一个实施方式中，使用天然与 CAR 中的结构域之一相关联的跨膜结构域。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。

15 本发明的 CAR 中的胞内结构域包括 4-1BB 的信号传导结构域和 CD3 ζ 的信号传导结构域。

- 20 优选的，本发明的 CAR 的结构包括前导序列、抗原识别序列(抗原结合结构域)、连接区、跨膜区、共刺激因子信号区和 CD3zeta 信号传导区(ζ 链部分)，连接顺序如下：

[CD8 LS]-[VL-Linker-VH]-[hinge-CD8TM]-[4-1BB]-[CD3zeta]

具体地，在本发明中选用序列如下：

(1) 前导序列为 CD8 抗原的前导序列：

- 25 MALPVTALLPLALLHAARP (SEQ ID NO: 9)

(2) CAR22.5 抗原识别序列：

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQVPGKGLEWVSYSISSGGGTYYPDVTKG
RFTISRDNRSRLTDLQMNSLRVEDTAVYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 5)

- 30 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWLQQKPGKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSG
SGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 6)

(3) CAR22.3 抗原识别序列：

VH

- 35 LQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKYNDYAVSVKS
RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTVS (SEQ ID NO: 7)

VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPKGAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSG
TDFTLTISLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEI (SEQ ID NO: 8)

(4) CAR-T 22.13 抗原识别序列:

VH

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQG
QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCATPTYFYGSAFVDIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 1)

5 VL

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 2)

(5) CAR-T 22.14 抗原识别序列:

VH

10 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKPSGDTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGMAIYAPKFQG
RVTITADKSTNTAFMDLTSLYFEDTAVYYCARAPTYWGS KDYFDYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 3)

VL

AIQLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISSGLAWYQQKPGTAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPD FAYYCCQFNSFPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 4)

15 上述抗原识别序列中, VH 与 VL 之间的连接序列如 SEQ ID NO: 16 所示, 序列
为: GGGGSGGGGSGGGGS。

(6) 铰链区和连接区的序列:

FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:
10)

20 (7) 跨膜区为 CD8 (CD8TM) 抗原的跨膜区序列:

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 11)

(8) 共刺激因子信号区来自 4-1BB 的胞内信号传导基序的序列:

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 12)

25 (9) CD3 zeta 的信号传导区来自 TCR 复合体中 CD3zeta 的以酪氨酸为中心的免
疫受体激活基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 的
序列:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 13)

30 优选的, 本发明的 CAR 为 CAR-T 22.13 或 CAR-T 22.14, CAR 结构中的 V_L 和 V_H
来自专利号 US9499632B2 的美国专利, 其中 16F7 为 22.13, 4G6 为 22.14。

CAR-T 22.13 的氨基酸序列如下:

35 MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTSYWIGWVRQMPGKGLE
WMGIIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCATPTYFYGSAFVDIWGQGTMTV
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYAS
QSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPYTFGQGTKLEIKFVPVFLPAKPTTTPAP
RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR (SEQ ID NO: 14)

CAR-T 22.14 的氨基酸序列如下：

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKPSGDTFSNYAISWVRQAPGQGLE
WMGRIIPILGMAIYAPKFQGRVTITADKSTNTAFMDLTSLYFEDTAVYYCARAPTYWGSKDYFDYWGGTL
VTVSSGGGSGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSGLAWYQQKPGTAPKLLIYDA
5 SSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDFFATYYCQQFNSFPYTFGQGTKLEIKFVPVFLPAKPTTTPA
PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL
LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
KRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR (SEQ ID NO: 15)

10 嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T 细胞)

如本文所用，术语“CAR-T 细胞”、“CAR-T”、“CART”、“本发明 CAR-T 细胞”均指本发明第四方面所述的 CAR-T 细胞。

本发明涉及靶向 CD22 嵌合抗原受体结构的构建、靶向 CD22 嵌合抗原受体工程化 T 细胞的制备方法及其活性鉴定。

15 本发明中，以 CD22 的序列为基础构建了靶向 CD22 抗原的多种类型的嵌合型抗原受体结构，并完成了这些嵌合型抗原受体在原始 T 细胞中的表达水平、体外活化能力及肿瘤细胞杀伤效能等层面的分析与鉴定。本发明发现了以 CAR22.13, 22.14 为基础构建的不同类型嵌合型抗原受体修饰的 T 细胞在体外杀伤和体内清除携带 CD22 抗原的恶性肿瘤的能力差异，为临床应用 CAR-T 治疗 CD22 阳性的白血病和淋巴瘤提供了新的有效方法和制剂。

载体

25 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。

30 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。

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。

35 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。

该核酸可被克隆入许多类型的载体。例如，该核酸可被克隆入如此载体，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。

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，W001/96584；W001/29058；和美国专利号 6,326,193)。

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。

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。

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 α (EF-1 α)。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。

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。

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。

- 5 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、 β -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 Letters479:79-82)。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。

10 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。

- 15 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。

- 20 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。

- 25 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)。

- 30 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。
- 35

在本发明的一个优选地实施方式中，所述载体为慢病毒载体。

制剂

- 5 本发明提供了一种含有本发明第一方面所述的 CAR-T 细胞，以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一个实施方式中，所述制剂为液态制剂。优选地，所述制剂为注射剂。优选地，所述制剂中所述 CAR-T 细胞的浓度为 1×10^3 – 1×10^8 个细胞/ml，更优地 1×10^4 – 1×10^7 个细胞/ml。

- 10 在一个实施方式中，所述制剂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。本发明的制剂优选配制用于静脉内施用。

治疗性应用

- 15 本发明包括用编码本发明表达盒的慢病毒载体(LV)转导的细胞(例如，T 细胞)进行的治疗性应用。转导的 T 细胞可靶向肿瘤细胞的标志物 CD22，协同激活 T 细胞，引起 T 细胞免疫应答，从而显著提高其对肿瘤细胞的杀伤效率。

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。

- 20 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)，激活并进行基因改造产生 CAR-T 细胞，随后注入同一病人体内。这种方式患移植物抗宿主病概率极低，抗原被 T 细胞以无 MHC 限制方式识别。此外，一种 CAR-T 就可以治疗表达该抗原的所有癌症。不像抗体疗法，CAR-T 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。

- 25 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-修饰 T 细胞诱导对 CAR 中的抗原结合结构域特异性的免疫应答。例如，表达 CD22 的肿瘤细胞引起抗 CD22 的 CAR-T 细胞的特异性免疫应答。

- 30 尽管本文公开的数据具体公开了包括抗 CD22 scFv、铰链和跨膜区、和 4-1BB 和 CD3 ζ 信号传导结构域的慢病毒载体，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。

- 35 可治疗的癌症包括没有被血管化或基本上还没有被血管化的肿瘤，以及血管化的肿瘤。癌症可包括非实体瘤(诸如血液学肿瘤，例如白血病和淋巴瘤)或可包括实体瘤。用本发明的 CAR 治疗的癌症类型包括但不限于癌、胚细胞瘤和肉瘤，和某些白血病或淋巴恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、和恶性瘤，例如肉瘤、癌和黑素瘤。也包括成人肿瘤/癌症和儿童肿瘤/癌症。

血液学癌症为血液或骨髓的癌症。血液学(或血原性)癌症的例子包括白血病，包括急性白血病(诸如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病和成髓细胞性、前髓细胞性、粒-单核细胞型、单核细胞性和红白血病)、慢性白血病(诸如慢性髓细胞(粒细胞性)白血病、慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞白血

病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤(无痛和高等级形式)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、多毛细胞白血病和脊髓发育不良。

- 5 实体瘤为通常不包含囊肿或液体区的组织的异常肿块。实体瘤可为良性或恶性的。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞类型命名(诸如肉瘤、癌和淋巴瘤)。实体瘤诸如肉瘤和癌的例子包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤间皮瘤、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌卵巢癌、。

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。

- 10 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。

- 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。
15 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。

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。

- 20 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。

- 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/或与其他组分诸如 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。
25

- 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——
30 尽管适当的剂量可由临床试验确定。

- 当指出“免疫学上有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤-抑制有效量”或“治疗量”时, 待施用的本发明组合物的精确量可由医师确定, 其考虑患者(对象)的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移程度和病症的个体差异。可通常指出: 包括本文描述的 T 细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg 体重的剂量, 优选 10^5 至 10^6 个细胞/kg 体重的剂量(包括那些范围内的所有整数值)施用。T 细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。细胞可通过使用免疫疗法中公知的注入技术(见例如 Rosenberg 等, NewEng. J. of Med. 319:1676, 1988)施用。对于具体患者的最佳剂量和治疗方案可通过监测患者的疾病迹象并因此调节治疗由医学领域技术人员容易地确定。
35

对象组合物的施用可以以任何方便的方式进行，包括通过喷雾法、注射、吞咽、输液、植入或移植。本文描述的组合物可被皮下、皮内、瘤内、结内、脊髓内、肌肉内、通过静脉内(i. v.)注射或腹膜内施用给患者。在一个实施方式中，本发明的T细胞组合物通过皮内或皮下注射被施用给患者。在另一个实施方式中，本发明的T细胞组合物优选通过i. v.注射施用。T细胞的组合物可被直接注入肿瘤，淋巴结或感染位置。

在本发明的某些实施方式中，利用本文描述的方法或本领域已知的其他将T细胞扩展至治疗性水平的方法活化和扩展的细胞，与任何数量的有关治疗形式结合(例如，之前、同时或之后)施用给患者，所述治疗形式包括但不限于用以下试剂进行治疗：所述试剂诸如抗病毒疗法、西多福韦和白细胞介素-2、阿糖胞苷(也已知为ARA-C)或对MS患者的那他珠单抗治疗或对牛皮癣患者的厄法珠单抗治疗或对PML患者的其他治疗。在进一步的实施方式中，本发明的T细胞可与以下结合使用：化疗、辐射、免疫抑制剂，诸如，环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨喋呤、麦考酚酯和FK506，抗体或其他免疫治疗剂。在进一步的实施方式中，本发明的细胞组合物与骨髓移植、利用化疗剂诸如氟达拉滨、外部光束放射疗法(XRT)、环磷酰胺结合(例如，之前、同时或之后)而施用给患者。例如，在一个实施方式中，对象可经历高剂量化疗的标准治疗，之后进行外周血干细胞移植。在一些实施方式中，在移植后，对象接受本发明的扩展的免疫细胞的注入。在一个额外的实施方式中，扩展的细胞在外科手术前或外科手术后施用。

施用给患者的以上治疗的剂量将随着治疗病症的精确属性和治疗的接受者而变化。病人施用的剂量比例可根据本领域接受的实践实施。通常，每次治疗或每个疗程，可将 1×10^6 个至 1×10^{10} 个本发明经修饰的T细胞(如，CART-CD22细胞)，通过例如静脉回输的方式，施用于患者。

25 本发明的主要优点包括：

(a) 本发明的嵌合抗原受体，其细胞外抗原结合结构域为特定的抗CD22 scFv，该特定的抗CD22 scFv结合特定的绞链区和胞内结构域形成的CAR显示出了极大的对肿瘤细胞的杀伤能力，而且特异性好，对T细胞本身的细胞毒性较小，副作用低。

(b) 本发明提供的嵌合抗原受体可在携带CAR基因的慢病毒感染T细胞后实现CAR蛋白的稳定表达和膜定位。

(c) 本发明的CAR修饰的T细胞在体内存活时间较长，且抗肿瘤效力较强；本发明所用的抗原结合结构域为人源化或来自于人的抗体，较小可能产生种特异的免疫排斥反应。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

实施例 1

慢病毒表达载体的构建

- 5 委托上海博益生物科技有限公司进行全长 DNA 合成和克隆，实现编码质粒的构建。选择 pWPT 慢病毒载体作为克隆载体，克隆位点为 BamH I 和 MluI 位点。具体序列如前所述。

实施例 2

CAR-T 细胞的制备

- 10 (1) 取健康人静脉血，通过密度梯度离心方法，分离获得单个核细胞(PBMCs)。
- (2) 在第 0 天，将 PBMCs 接种于经过终浓度为 5 μ g/mL CD3 单克隆抗体(OKT3)及终浓度为 5 μ g/mL 的 Retronectin(购自 TAKARA 公司)预包被的细胞培养瓶中，培养基为含 1%人血白蛋白的 GT-551 细胞培养基，培养基里添加终浓度为 1000 U/mL 的重组人白介素 2(IL-2)，在 37 $^{\circ}$ C，饱和湿度为 5% CO₂培养箱中培养。
- 15 (3) 在第 1 天，缓慢吸取并弃去培养 PBMCs 的上清液，并加入新的含 1%人血白蛋白的 GT-551 细胞培养基，培养基里添加终浓度为 1000 U/mL 的重组人白介素 2(IL-2)，在 37 $^{\circ}$ C，饱和湿度为 5% CO₂培养箱继续培养。
- (4) 在第 3 天，加入新鲜培养液，浓缩纯化的 CAR-CD22s 慢病毒液，protamine sulfate(12 μ g/ml)，以及终浓度为 1000U/mL IL-2。置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂培养箱中感染 12 小时后，弃培养液，加入新鲜的培养基，于 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂培养箱继续进行培养。
- 20 (5) 从第 6 天开始，取 CART-CD22s 细胞进行相应的体外活性检测。

实施例 3

25 CAR 基因在 T 细胞基因组整合率及其编码蛋白在膜表面表达水平的检测

- 分别取 0.2 $\times$ 10⁶ 个实施例 2 中培养到第 6 天(图 2)的 CART-CD22.5、CART-CD22.13 和 CART-CD22.14 细胞样品，在重组人 CD22 蛋白 Fc 段染色后，在流式细胞仪上分析 CAR-CD22 蛋白在 T 细胞膜表面的表达水平，未转导的 T 细胞(NT 细胞)用作对照。
- 30 结果如图 2 所示，3 种 CAR-T 细胞的 CAR 结构均可在其相应修饰的 T 细胞中表达并完成细胞膜表面定位，并有较高的表达率。其中，CART-CD22.5 和 CART-CD22.14 的表达率高于 CART-CD22.13。

实施例 4

35 CART-CD22s 体外激活能力的检测

采用实施例 2 中培养到第 7 天的 CART-CD22s 细胞(CART-CD22.5、CART-CD22.13 和 CART-CD22.14)进行细胞激活水平指标蛋白 CD137 和 IFN γ 的检测。依次取 1 $\times$ 10⁵ 个培养到第 6 天的 CART-CD22 细胞，分别与 CD22 阳性的 K562-CD22+C7，K562-CD22+A4，H929-CD22+E12，Raji 肿瘤细胞系，以及 CD22 阴性的 K562 肿瘤细

胞系或不添加肿瘤细胞，在 200 μ l GT-551 培养基中按照 1:1 比例培养 18h 后流式方法检测 T 细胞膜表面 CD137 的表达水平，ELISA 方法检测培养上清中 IFN γ 的分泌水平。

- 5 结果如图 3A 所示，3 种 CAR-T 细胞的表面均可以检测到 CD137 的表达，并且均可以在培养上清中检测到 IFN γ 的表达。其中，CAR-T22.13 及 CAR-T22.14 比 CAR-T22.5 有更好的 CD137 活化水平，但 CAR-T22.5 的 IFN γ 释放水平高于 CAR-T22.13 及 CAR-T22.14。

实施例 5

10 CART-CD22s 细胞诱导肿瘤细胞晚期凋亡活性的检测

- 按细胞数 5:1、10:1、20:1、40:1 的比例分别将实施例 2 中培养到第 14 天的 CART-CD22s 细胞与 1×10^4 个 CD22 阴性细胞 (K562) 或 CD22 阳性细胞 Raji，及自构细胞 K562-CD22 过表达肿瘤细胞株混合，在 100 μ l GT-551 培养体系中共培养 8h 后，吸取 50 μ l 培养基上清，加入显色底物混合物，通过 30 分钟偶联的酶反应，
15 检测肿瘤细胞被 CAR-T 细胞识别杀伤后，裂解时释放出的乳酸脱氢酶 (LDH) 的量，生成的红色产物的量与裂解的细胞数成正比。

- 结果如图 4 所示，所有 T 细胞对 CD22 阴性肿瘤细胞系 K562 无杀伤能力，且 3 种 CAR-T 细胞均可以较好的诱导 CD22 阳性肿瘤细胞凋亡。其中，CAR-T22.13、CAR-T22.14 比 CAR-T22.5 可以更好地诱导 CD22 阳性肿瘤细胞的晚期
20 凋亡；CAR-T22.14 诱导 CD22 阳性肿瘤细胞的晚期凋亡能力略优于 CAR-T22.13。

实施例 6

T 细胞脱颗粒相关膜蛋白 CD107a 的表达水平的检测

- 取 2×10^5 个 CD22 阴性 (K562) 或 CD22 阳性 (K562-CD22+A4, H929-CD22+E12, Raji) 肿瘤细胞系和 1×10^5 个 CAR-T 细胞，在 200 μ l GT-551 培养基中按照体积比 1:1 比例培养 5h 后，检测 CAR-T 细胞被 CD22 阳性的肿瘤细胞激活后 T 细胞脱颗粒相关膜蛋白 CD107a 的表达水平变化。
25

- 结果如图 5 所示，3 种 CAR-T 细胞被 CD22 阳性的肿瘤细胞 (K562-CD22+C7, K562-CD22+A4, H929-CD22+E12) 激活后，CD107a 释放水平表达增加，与 Raji 细胞共培养后，CAR-T 细胞的 CD107a 无明显表达增加。其中，CAR-T22.14 的 CD107a 释放高于 CAR-T22.13 及 CAR-T22.5，杀伤效果更强。
30

对比例

- 在本申请的嵌合抗原受体结构的筛选过程中，发明人测试了大量的候选序列。
35 候选的 CART 细胞包括 CAR-T22.3，CAR-T22.5，CAR-T22.7，CAR-T22.8，CAR-T22.9，CAR-T22.10，CAR-T22.11，CAR-T22.12，CAR-T22.15，CAR-T22.16，CAR-T22.17，其中 CART 细胞的制备方法同实施例 2，检测方法与实施例 3、4 相同。
候选 CAR-T 中包含的抗体序列来源于公布的文献和专利。其中，CAR-T22.3 所用 CD22 抗体 (m971) 的轻链重链序列来源于美国专利，专利号为 US8591889B2；

CAR-T22.5 所用 CD22 抗体 (KM196172) 的轻链重链序列来源于 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KM196172>; CAR-T22.7 所用 CD22 抗体 (VM1000) 的轻链重链序列来源于美国专利, 专利号为 US9856323B2; CAR-T22.8 所用 CD22 抗体 (LL2) 的轻链重链序列来源于文献 (Pawlak Byczkowska, E. J. et al., Cancer Res. 49:4568-4577 (1989)); CAR-T22.9 所用 CD22 抗体 (10F4) 的轻链重链序列来源于美国专利, 专利号为 US2014/0127197A1; CAR-T 22.10 所用 CD22 抗体 (19A3), 22.11 (23C6), 22.12 (16F7), 22.15 (4G6), 22.16 (21F4), 22.17 (21F4) 的轻链重链序列来源于美国专利, 专利号为 US9499632B2。

各个 CART 细胞的检测结果如图 6A、6B、6C 所示。通过阳性率检测 (图 6A), CD137 体外激活能力的检测 (图 6B) 以及对与靶细胞共培养后上清中 IFN γ 释放水平检测 (图 6C) 等实验对比发现, CAR-T22.3, CAR-T22.7, CAR-T22.8, CAR-T22.9, CAR-T22.10, CAR-T22.16, CAR-T22.17, 阳性率很低, 视为无效; 在 IFN γ 试验中发现, CAR-T22.5, CAR-T22.11, CAR-T22.13, CAR-T22.14, 与 CD22 阳性的肿瘤细胞共培养后, IFN γ 释放很高, CD137 表达也高, 表明 CAR-T 细胞被特异性激活。因此, 选择 22.13, 22.14 进行进一步的研究。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。