



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112074279 A

(43) 申请公布日 2020.12.11

(21) 申请号 202080002522.9

(22) 申请日 2020.01.15

(30) 优先权数据

62/793,274 2019.01.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.10.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/013662 2020.01.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/150339 EN 2020.07.23

(71) 申请人 卡里布生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 吴力军 维塔·戈鲁博夫斯卡娅

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

序列表8页 附图10页

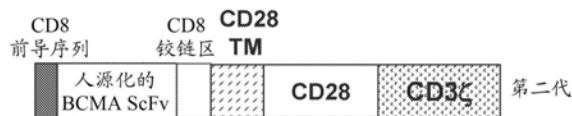
(54) 发明名称

人源化BCMA抗体和BCMA-CAR-T细胞

(57) 摘要

本发明涉及人源化BCMA单链可变片段(scFv),其包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的V<sub>H</sub>和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的V<sub>L</sub>。本发明还涉及BCMA嵌合抗原受体融合蛋白,其从N末端到C末端包含:(i)本发明的单链可变片段(scFv), (ii)跨膜结构域, (iii)至少一个共刺激结构域,和(iv)激活结构域。这种人源化BCMA-CAR-T细胞对BCMA阳性肿瘤细胞具有特异性杀伤活性。

人源化的BCMA ScFv-CD28-CD3ζ



1. 抗人BCMA抗体,其包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸的V<sub>H</sub>和具有SEQ ID NO:5的氨基酸的V<sub>L</sub>。
2. 单链可变片段(scFv),其包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸的V<sub>H</sub>和具有SEQ ID NO:5的氨基酸的V<sub>L</sub>。
3. 如权利要求2所述的scFv,其还包含V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>之间的连接子。
4. 如权利要求3所述的scFv,其具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。
5. 嵌合抗原受体(CAR),其从N末端到C末端包含:
  - (i) 权利要求2所述的scFv,
  - (ii) 跨膜结构域,
  - (iii) 至少一个共刺激结构域,和
  - (iv) 激活结构域。
6. 如权利要求5所述的CAR,其中所述scFv具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。
7. 如权利要求5所述的CAR,其中所述共刺激结构域是CD28或4-1BB。
8. 如权利要求5所述的CAR,其中所述激活结构域是CD3 $\zeta$ 。
9. 如权利要求5所述的CAR,其具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列。
10. 核酸,其编码权利要求5所述的CAR。
11. T细胞或自然杀伤细胞,其经修饰以表达权利要求5所述的CAR。

## 人源化BCMA抗体和BCMA-CAR-T细胞

[0001] 序列列表、表格或计算机程序的引用

[0002] 序列列表以ASCII格式的文本文件与说明书一起同时通过EFS-Web提交,文件名为:序列列表.txt(Sequence Listing.txt),创建日期为2020年1月13日,大小为4千字节。通过EFS-Web提交的序列列表是说明书的一部分,并且在此通过引用整体并入本文中。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及特异性降低多发性骨髓瘤肿瘤生长的人源化BCMA抗体(PMC306)和BCMA-CAR-T细胞,其可用于肿瘤的过继性免疫基因疗法领域。

[0004] 发明背景

[0005] 免疫疗法作为一种非常有希望的治疗癌症的方法而出现。T细胞或T淋巴细胞(我们免疫系统的武装力量)不断寻找外源抗原,并将异常(癌症或受感染的细胞)与正常细胞区分开来。用CAR(嵌合抗原受体)构建体基因修饰T细胞是设计肿瘤特异性T细胞的最常见的方法。可以将靶向肿瘤相关抗原(TAA)的CAR-T细胞输注至患者(被称为过继性细胞转移或ACT),这代表有效的免疫治疗方法[1,2]。与化学疗法或抗体相比,CAR-T技术的优点是经重新编程的工程化T细胞可以在患者中增殖并持续存在(“活体药物”)[1,2]。

[0006] CAR通常由在N末端部分的单克隆抗体衍生的单链可变片段(scFv)、铰链区、跨膜结构域以及与激活CD3- $\zeta$ 结构域串联的许多细胞内共激活结构域组成,所述细胞内共激活结构域为:(i)CD28,(ii)CD137(4-1BB)、CD27或其它共刺激结构域(图1)。CAR的进化经历了从第一代(无共刺激结构域)发展到第二代(有一个共刺激结构域),再到第三代CAR(有几个共刺激结构域)。产生具有两个共刺激结构域的CAR(所谓的第三代CAR)已经使得产生增加的细胞溶解CAR-T细胞活性、改善的CAR-T细胞持久性,这使得其产生增强的抗肿瘤活性。

[0007] BCMA

[0008] B细胞成熟抗原(BCMA)是细胞表面受体,也被称为CD269和肿瘤坏死因子受体超家族成员17(TNFRSF17),其由TNFRSF17基因编码。该受体主要在成熟的B淋巴细胞中表达,并且在大多数情况下在多发性骨髓瘤(MM)中过表达[4]。在MM中靶向BCMA的当前疗法包括单克隆抗体、双特异性抗体和T细胞免疫疗法、CAR-T疗法[4,5]。

[0009] 人BCMA蛋白由184个氨基酸组成:第1-54位为胞外结构域;第55-77位为跨膜结构域;第78-184位为胞浆结构域。BCMA的氨基酸序列如图2所示。BCMA缺乏信号肽并且类似于其它受体BAFF受体和跨膜激活剂以及亲环蛋白配体交互剂和钙调节剂(TACI)[4]。这些受体在B细胞成熟和分化成浆细胞中起主要作用。它们的配体包括在MM患者中表达增加的BAFF和APRIL[4]。

[0010] 附图简述

[0011] 图1显示了CAR的结构[3]。左图显示了第一代的结构(无共刺激结构域)。中间的图显示了第二代的结构(CD28或4-BB的一个共刺激结构域)。右图显示了第三代的结构(两个或多个共刺激结构域)。

[0012] 图2显示了BCMA蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。胞外结构域加下划线。

[0013] 图3显示了人源化BCMA CAR构建体的结构。

[0014] 图4显示了用荧光标记重组BCMA蛋白,通过FACS分析检测人源化BCMA-CAR构建体。在慢病毒人源化BCMA-CAR转导T细胞后,检测人源化BCMA-CAR阳性细胞。

[0015] 图5A-图5B显示了人源化BCMA-CAR-T细胞杀伤CHO-BCMA细胞,而不杀伤CHO细胞。XCelligence实时细胞毒性测定被用于检测人源化BCMA-CAR-T细胞的细胞毒性。归一化的细胞指数显示在Y轴上,时间显示在X轴上。图5A显示了CHO-BCMA靶细胞。在右侧从上到下为:模拟CAR-T细胞、T细胞、仅靶细胞和人源化CAR-T细胞。图5B显示了CHO靶细胞。在右侧从上到下为:模拟CAR-T细胞、人源化BCMA CAR-T细胞、T细胞和仅靶细胞。

[0016] 图6显示了人源化BCMA-CAR-T细胞与CHO-BCMA阳性细胞一起分泌高水平的IFN- $\gamma$ ,而与BCMA阴性CHO对照细胞一起则没有分泌高水平的IFN- $\gamma$ 。 $p < 0.05$ ,相对于T细胞和模拟CAR-T细胞,在BCMA-CAR-T细胞的CHO-BCMA细胞中的IFN- $\gamma$ 分泌。

[0017] 图7显示了人源化BCMA-CAR-T细胞针对多发性骨髓瘤细胞分泌高水平的IFN- $\gamma$ ,但针对BCMA阴性K562对照细胞则没有分泌高水平的IFN- $\gamma$ 。 $*p < 0.05$ ,相对T细胞和模拟CAR-T细胞,在BCMA-CAR-T细胞多发性骨髓瘤细胞中的IFN- $\gamma$ 分泌。

[0018] 图8A显示了人源化BCMA-CAR-T细胞显著降低RPMI8226异种移植肿瘤的生长。在第7天和第20天通过静脉注射以 $1 \times 10^7$ 个细胞/小鼠注射CAR-T细胞。条显示平均肿瘤体积 $\pm$ 标准误差。 $*p < 0.05$ ,BCMA CAR-T细胞相对于模拟T细胞。

[0019] 图8B显示了人源化BCMA-CAR-T细胞没有降低小鼠体重。条显示平均小鼠体重 $\pm$ 标准偏差。

[0020] 图8C显示了用BCMA重组蛋白通过FACS在小鼠血液中检测到人源化BCMA-CAR-T细胞,而没有检测到模拟Car-T细胞。在研究结束时通过流式细胞仪分析外周血细胞与人BCMA蛋白和特异性针对人T(CD4+/CD8+)细胞的抗体的结合。与CD4抗体结合的细胞的百分比显示在图8C的左图上,也与BCMA蛋白结合的那些人T细胞的百分比显示在图8C的右图上。

[0021] 发明详述

[0022] 定义

[0023] 如本文中所使用的“嵌合抗原受体(CAR)”是一种受体蛋白,其被工程化以赋予T细胞靶向特定蛋白的新能力。该受体是嵌合的,因为它们将抗原结合功能与T细胞激活功能结合成单个受体。CAR是包含能够结合抗原的胞外结构域、跨膜结构域和至少一个胞内结构域的融合蛋白。“嵌合抗原受体(CAR)”有时被称为“嵌合受体”、“T体(T-body)”或“嵌合免疫受体(CIR)”。“能够结合抗原的胞外结构域”意指可以结合某种抗原的任何寡肽或多肽。“胞内结构域”意指已知起结构域作用的任何寡肽或多肽,所述结构域传递信号以引起细胞中生物过程的激活或抑制。

[0024] 如本文中所使用的“结构域”意指多肽中的一个区域,其独立于其它区域被折叠成特定结构。

[0025] 如本文中所使用的“人源化抗体”是衍生自非人物种的抗体,其蛋白序列已经被修饰以增加它们与人中天然产生的抗体变体的相似性。例如,在开发小鼠抗体后,可以对编码该抗体的DNA进行测序。然后可以确定对应于抗体CDR的DNA序列。可以将CDR序列插入含有人抗体变体DNA的构建体中以制备人源化抗体。

[0026] 如本文中所使用的“单链可变片段(scFv)”意指衍生自抗体的单链多肽,其保留了

与抗原结合的能力。scFv的实例包括通过重组DNA技术形成的抗体多肽,其中免疫球蛋白重链(H链)和轻链(L链)片段的Fv区域经由间隔序列连接。用于工程化scFv的各种方法是本领域技术人员已知的。

[0027] 如本文中所使用的“肿瘤抗原”意指具有抗原性的生物分子,其表达引起癌症。

[0028] 本发明的发明人已经从衍生自小鼠单克隆抗体克隆4C8A的小鼠单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区开始对人源化BCMA scFv进行工程化。小鼠4C8A抗体展现出与人BCMA的强和选择性结合[6]。本发明的发明人已经产生了基于人源化BCMA抗体的BCMA-CAR-T细胞以靶向过表达BCMA肿瘤抗原的癌细胞。本发明的BCMA-CAR-T细胞对几种癌细胞系具有高细胞毒性活性。

[0029] 本发明涉及人源化抗人BCMA抗体,其包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸的V<sub>H</sub>和具有SEQ ID NO:5的氨基酸的V<sub>L</sub>。

[0030] 在一个实施方案中,人源化抗人BCMA抗体是单链可变片段(scFv)。scFv可以是V<sub>H</sub>-连接子-V<sub>L</sub>或V<sub>L</sub>-连接子-V<sub>H</sub>。

[0031] 本发明还涉及嵌合抗原受体融合蛋白,其从N末端到C末端包含:(i)针对BCMA的单链可变片段(scFv),其中V<sub>H</sub>具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列,V<sub>L</sub>具有SEQ ID NO:5的氨基酸,(ii)跨膜结构域,(iii)至少一个共刺激结构域,和(iv)激活结构域。

[0032] 在一个实施方案中,在图2中显示了CAR结构。

[0033] 在一个实施方案中,共刺激结构域选自:CD28、4-1BB、GITR、ICOS-1、CD27、OX-40和DAP10。优选的共刺激结构域是CD28。

[0034] 优选的激活结构域是CD3 $\zeta$ (CD3Z或CD3 $\zeta$ )。

[0035] 跨膜结构域可以衍生自天然多肽,或者可以是人工设计的。衍生自天然多肽的跨膜结构域可以从任何膜结合蛋白或跨膜蛋白获得。例如,可以使用以下的跨膜结构域:T细胞受体 $\alpha$ 或 $\beta$ 链、CD3 $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154或GITR。人工设计的跨膜结构域是主要包含疏水残基(如亮氨酸和缬氨酸)的多肽。优选在合成的跨膜结构域的每一端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。任选地,短寡肽连接子或多肽连接子(例如长度为2至10个氨基酸的连接子)可以排列在跨膜结构域和胞内结构域之间。在一个实施方案中,可以使用具有甘氨酸-丝氨酸连续序列的连接子序列。

[0036] 本发明提供了编码BCMA-CAR的核酸。编码CAR的核酸可以通过常规方法从特定CAR的氨基酸序列制备。编码氨基酸序列的碱基序列可以从上述NCBI RefSeq ID或GenBank中针对每个结构域的氨基酸序列的登录号获得,并且本发明的核酸可以使用标准分子生物学和/或化学程序制备。例如,基于碱基序列,可以合成核酸,并且本发明的核酸可以使用聚合酶链式反应(PCR)通过组合从cDNA文库获得的DNA片段来制备。

[0037] 可以将编码本发明CAR的核酸插入到载体中,并且可以将载体引入到细胞中。例如,可以使用病毒载体,诸如逆转录病毒载体(包括致癌逆转录病毒载体、慢病毒载体和假型载体)、腺病毒载体,腺相关病毒(AAV)载体、猴病毒载体、痘苗病毒载体或仙台病毒载体、爱泼斯坦-巴尔病毒病毒(an Epstein-Barr virus,EBV)载体和HSV载体。优选使用在受感染细胞中缺乏复制能力而不能自我复制的病毒载体。

[0038] 例如,当使用逆转录病毒载体时,可以选择基于LTR序列和载体所具有的包装信号

序列的合适的包装细胞来使用包装细胞制备逆转录病毒颗粒。包装细胞的实例包括PG13 (ATCC CRL-10686)、PA317 (ATCC CRL-9078)、GP+E-86和GP+envAm-12以及Psi-Crip。还可使用具有高转染效率的293细胞或293T细胞制备逆转录病毒颗粒。基于逆转录病毒和可以被用于包装逆转录病毒载体的包装细胞产生的许多种类的逆转录病毒载体可从许多公司广泛地商购获得。

[0039] CAR-T细胞经由CAR与特异性抗原结合,从而将信号传递到细胞中,从而激活细胞。表达CAR的细胞的激活根据宿主细胞的种类和CAR的胞内结构域而变化,并且可以基于例如细胞因子的释放、细胞增殖速率的改善、细胞表面分子的变化等作为指标来确认。例如,细胞毒性细胞因子(肿瘤坏死因子、淋巴毒素等)从激活细胞中的释放引起表达抗原的靶细胞的破坏。此外,细胞因子的释放或细胞表面分子的变化刺激其它免疫细胞(例如B细胞、树突状细胞、NK细胞和巨噬细胞)。

[0040] 表达CAR的细胞可以被用作疾病治疗剂。治疗剂包含表达CAR作为活性成分的细胞,并且它还可以包含合适的赋形剂。

[0041] 本发明的发明人已经基于特异性靶向BCMA的人源化BCMA ScFv序列产生了CAR-T细胞。本发明的发明人已经产生了人源化BCMA-CAR-T细胞以靶向过表达BCMA肿瘤抗原的癌细胞。本发明的人源化BCMA-CAR-T细胞针对多发性骨髓瘤细胞分泌高水平的细胞因子,并杀伤CHO-BCMA阳性靶细胞,但不杀伤对照亲本CHO细胞。

[0042] 本发明的人源化BCMA-ScFv相对于相应的小鼠ScFv的优点包括由于人源化BCMA scFv序列而对人的免疫原性较低。因此,本发明的人源化BCMA抗体在许多临床应用中作为治疗剂是高度有效和有利的。

[0043] 本发明的人源化BCMA ScFv可以被用于免疫治疗应用:毒素/药物缀合的抗体、单克隆治疗性抗体和CAR-T细胞免疫疗法。

[0044] 使用本发明的人源化BCMA ScFv的人源化BCMA-CAR-T细胞有效地靶向BCMA阳性癌细胞系(如卵巢癌、结肠癌、胰腺癌、黑素瘤、宫颈癌和其它BCMA阳性癌症)中的BCMA抗原。

[0045] 人源化BCMA-CAR-T细胞可以与不同的化学疗法组合使用:检查点抑制剂、靶向疗法、小分子抑制剂和抗体。

[0046] 人源化BCMA-CAR-T细胞可以在临床上用于BCMA阳性癌细胞。

[0047] 共激活结构域(如CD28、4-1BB等等)的修饰可以被用于增加CAR-T细胞的功效。标签缀合的人源化BCMA scFv可以被用于CAR产生。

[0048] 人源化BCMA-CAR-T细胞可以与不同的安全转换剂(safety switches)一起使用,诸如t-EGFR、RQR(利妥昔单抗-CD34-利妥昔单抗)、诱导型半胱天冬酶-9等等。

[0049] 第三代CAR-T或其它共激活信号传导结构域可以与人源化BCMA-scFv一起使用以制备BCMA-CAR-T。

[0050] 人源化BCMA CAR可以与靶向其它肿瘤抗原或肿瘤微环境(例如VEGFR-1-3、PDL-1)的CAR组合。可以产生针对BCMA和CD3或其它抗原的双特异性抗体用于治疗。

[0051] 人源化BCMA-CAR可以被用于产生可以靶向BCMA阳性癌症的其它类型的细胞,诸如CAR-自然杀伤(NK)细胞、BCMA-CAR-巨噬细胞、同种异体CAR-T细胞、基因编辑的T细胞和其它BCMA-CAR造血细胞。

[0052] 本发明提供了经修饰以表达BCMA-CAR的T细胞、NK细胞、巨噬细胞或造血细胞。



P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q N G H S F P P T  
F G G G T K V E I K

[0070] 实施例2.人源化BCMA-CAR序列

[0071] 图3显示了人源化 (PMC306) BCMA-CAR构建体的方案。使用具有EF1a启动子的慢病毒载体克隆人源化scFv CAR序列。

[0072] BCMA-CAR结构包括人CD8信号肽、人源化BCMA scFv (V<sub>H</sub>-连接子-V<sub>L</sub>)、CD8铰链区、CD28跨膜、激活结构域CD3 $\zeta$  (图3)。

[0073] 下面显示了CD8信号-BCMAscFv (V<sub>H</sub>-连接子-V<sub>L</sub>)-CD8铰链区-CD28<sup>TM</sup>-CD28-CD3 $\zeta$ 的核苷酸序列和一些氨基酸序列。

[0074] <CD8前导序列>

[0075] 核苷酸

[0076] ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCAGGCCG (SEQ ID NO:7)

[0077] 氨基酸

[0078] MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:8)

[0079] <Nhe I位点>

[0080] gctagc

[0081] <人源化BCMA,PMC 306scFv>

[0082] V<sub>H</sub>-连接子-V<sub>L</sub>,参见实施例1的核酸序列和氨基酸序列。

[0083] <XhoI限制位点>

[0084] CTCGAG

[0085] <CD8铰链区>

[0086] 核苷酸

[0087] AAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTC  
 CCTGCGCCCAGAGGCGAGCCGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCAGTGAT (SEQ  
 ID NO:9)

[0088] 氨基酸

[0089] KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFASD (SEQ ID NO:10)

[0090] <aagccc>

[0091] <CD28跨膜>

[0092] 核苷酸

[0093] TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTAT  
 TATTTTCTGGGTG (SEQ ID NO:11)

[0094] 氨基酸

[0095] FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:12)

[0096] <CD28共刺激>

[0097] 核苷酸

[0098] AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCAC  
 CCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:13)



[0099] 氨基酸

[0100] RSKRSLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:14)

[0101] <CD3 $\zeta$ >终止密码子加下划线

[0102] 核苷酸

[0103] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGA  
GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAG  
CCGCAGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTG  
AGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAA  
GGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAAtag (SEQ ID NO:15)

[0104] 氨基酸

[0105] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKM  
AEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:16)

[0106] <EcoRI限制位点>

[0107] gaattc

[0108] 人源化BCMA-CAR蛋白的翻译的氨基酸序列 (SEQ ID NO:17)

[0109] M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P A S Q V Q L V Q S G A E V K  
K P G S S V K V S C K A S G Y T F T S Y V M H W V R Q A P G Q G L E W M G Y I  
I P Y N D A T K Y N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D  
T A V Y Y C A R Y N Y D G Y F D V W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G G S G  
G G G S E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S I S D Y L H W  
Y Q Q K P G Q A P R L L I Y Y A S Q S I T G I P A R F S G S G S G T D F T L T  
I S S L E P E D F A V Y Y C Q N G H S F P P T F G G G T K V E I K L E K P T T  
T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A S R P A A G G A V H T R G L D  
F A S D K P F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V R S K R S R  
L L H S D Y M N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y R S R V K F  
S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R G R D P  
E M G G K P Q R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R R  
R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R (SEQ ID NO:17)

[0110] 实施例3. CAR慢病毒的产生

[0111] 如[7]中所述的,使用293T细胞通过标准程序产生慢病毒。本发明的发明人产生了克隆到慢病毒载体的Xba I和Eco R I位点中的慢病毒载体内部的人源化BCMA-ScFv-CAR构建体。pCD510-FMC63-28z慢病毒CAR构建体在Xba I克隆位点和Eco RI克隆位点之间包含人源化BCMA ScFv-CD28-CD3 $\zeta$ 插入片段。

[0112] 在293T细胞中产生慢病毒,并且通过RT-PCR确定滴度。然后使用相等剂量的慢病毒转导T细胞。

[0113] 实施例4. 从全血中分离外周血单个核细胞 (PBMC)

[0114] 在10mL肝素真空采血管 (Becton Dickinson) 中收集来自个体或混合供体 (取决于所需的血液量) 的全血 (斯坦福医院血液中心, 加利福尼亚州斯坦福 (Stanford Hospital Blood Center, Stanford, CA))。在50ml离心管中, 将大约10ml的全抗凝血液与无菌磷酸盐

缓冲盐水 (PBS) 缓冲液 (PBS, pH7.4, 无Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>) 混合, 总体积为20ml。将血液/PBS (20ml) 轻轻放在锥形离心管中的15mL聚蔗糖-Paque PLUS (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) 顶部, 然后将样品在室温下以400×g离心30-40min。除去在稀释的血浆/聚蔗糖界面处含有外周血单个核细胞 (PBMC) 的细胞层, 洗涤, 并在室温下以200×g离心10min。用血细胞计数器对细胞计数。用含有5% AB血清和1.25μg/mL两性霉素B (Gemini Bioproducts, Woodland, CA)、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的CAR-T培养基 (AIM V-AlbuMAX (BSA) (Life Technologies) 洗涤PBMC一次, 并用于实验或在-80℃冷冻。

[0115] 实施例5. 从PBMC激活T细胞

[0116] 将分离的PBMC细胞重悬于含有300U/mL huIL2 (来自1000×储备液; Invitrogen) 的CAR-T培养基中, 并以1:1的珠与细胞比与CD3-CD28珠混合。在进行病毒转导之前, 将细胞在CO<sub>2</sub>存在下于37℃下孵育24小时。

[0117] 实施例6. T细胞的转导和扩增

[0118] 在PBMC激活后, 将细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>下孵育24小时。向每个孔中加入1×10<sup>6</sup>个细胞、5×10<sup>6</sup>个慢病毒和2μL/mL的Transplus培养基 (Alstem, 里士满, CA) (最终稀释度为1:500)。在重复加入病毒之前, 将细胞再孵育24小时。然后使细胞在连续存在含有IL-2的300U/ML IL-2新鲜培养基的情况下生长12-14天的时期 (总孵育时间取决于所需的CAR-T细胞的最终数量)。每2-3天分析细胞浓度, 此时加入培养基以将细胞悬浮液稀释至1×10<sup>6</sup>个细胞/mL。

[0119] 实施例7. 人源化BCMA-CAR-T细胞表达BCMAscFv

[0120] 我们设计了具有实施例2中所示的人源化BCMA-CAR构建体的人源化BCMA-CAR-T细胞。我们使用具有无关ScFv的模拟scFv并产生模拟CAR-T细胞作为阴性对照。在慢病毒人源化BCMA-CAR转导入T细胞后检测人源化BCMA-CAR阳性细胞 (图4)。

[0121] 实施例8. 人源化BCMA-CAR-T细胞杀伤CHO-BCMA细胞, 但不杀伤CHO细胞。

[0122] 我们将人源化BCMA-CAR-T细胞与靶标CHO-BCMA靶细胞以及CHO (BCMA阴性) 对照细胞一起孵育。人源化BCMA-CAR-T细胞特异性地杀伤CHO-BCMA细胞 (图5A), 而不杀伤CHO细胞 (图5B)。结果证明人源化BCMA-CAR-T细胞对靶向BCMA抗原和杀伤BCMA阳性细胞具有高度特异性。

[0123] 实施例9. 人源化CAR-T细胞针对靶标CHO-BCMA细胞显著分泌IFN-γ, 但是针对CHO细胞不分泌IFN-γ。

[0124] 我们在人源化BCMA-CAR-T细胞和靶标CHO-BCMA以及亲本CHO细胞共孵育后收集上清液并进行IFN-γ测定。BCMA-CAR-T细胞与CHO-BCMA细胞一起分泌IFN-γ, 但与阴性对照CHO细胞一起不分泌IFN-γ (图6)。结果证实了人源化BCMA-CAR-T细胞的特异性。

[0125] 实施例10. 人源化CAR-T细胞针对BCMA阳性RPMI8226多发性骨髓瘤细胞分泌高水平的IFN-γ, 但是针对BCMA阴性K562白血病细胞则不分泌高水平的IFN-γ。

[0126] 我们将BCMA-CAR-T细胞与多发性骨髓瘤细胞RPMI8266以及BCMA阴性K562细胞 (慢性骨髓性白血病细胞) 一起孵育, 并根据制造商的方案, 使用来自Fisher的试剂盒对IFN-γ进行ELISA。人源化BCMA-CAR-T细胞针对BCMA阳性多发性骨髓瘤细胞分泌高水平的IFN-γ, 但是针对BCMA阴性K562细胞则不分泌高水平的IFN-γ (图7)。BCMA-CAR-T细胞的IFN-γ的杀伤和分泌水平显著高于T细胞和模拟CAR-T细胞的IFN-γ的杀伤和分泌水平。这

证实了人源化BCMA-CAR-T细胞针对血液学BCMA阳性细胞的特异性。

[0127] 实施例11.人源化BCMA-CAR-T细胞在体内小鼠模型中显著降低了RPMI8226异种移植肿瘤的生长。

[0128] 将多发性骨髓瘤RPMI8226细胞皮下注射到NSG小鼠( $1 \times 10^7$ 个细胞/小鼠)中,然后通过静脉内注射人源化BCMA-CAR-T细胞两次( $1 \times 10^7$ 个CAR-T细胞/小鼠)。人源化BCMA-CAR-T细胞显著降低小鼠中的RPMI8226肿瘤生长(图8A)。用人源化BCMA-CAR-T细胞处理的小鼠不引起小鼠体重降低,这表明CAR-T细胞对小鼠无毒性(图8B)。在研究期间没有观察到行为或视觉变化。

[0129] 在研究结束时通过流式细胞仪分析外周血细胞与人BCMA蛋白以及特异性针对人T(CD4+/CD8+)细胞的抗体的结合。与CD4 mAb结合的细胞的百分比显示在图8C的左图上,也与BCMA蛋白结合的那些人T细胞的百分比显示在图8C的右图上。结果表明,用BCMA重组蛋白通过FACS在小鼠血液中检测到人源化BCMA-CAR-T细胞,但没有检测到模拟Car-T细胞。

[0130] 参考文献

[0131] 1.Maus,M.V.,Haas,A.R.,Beatty,G.L.,Albelda,S.M.,Levine,B.L.,Liu,X.,Zhao,Y.,Kalos,M.,and June,C.H.(2013).T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans.Cancer Immunol Res 1,26-31.

[0132] 2.Maus,M.V.,Grupp,S.A.,Porter,D.L.,and June,C.H.(2014).Antibody-modified T cells:CARs take the front seat for hematologic malignancies.Blood 123,2625-2635.

[0133] 3.Golubovskaya V,Wu L.(2016)Different Subsets of T Cells,Memory, Effector Functions,and CAR-T Immunotherapy.Cancers,15,8(3).PMID:26999211

[0134] 4.Ali,S.A.,Shi,V.,Maric,I.,Wang,M.,Stroncek,D.F.,Rose,J.J.,Brudno,J.N.,Stetler-Stevenson,M.,Feldman,S.A.,Hansen,B.G.,et al.(2016).T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma.Blood 128,1688-1700.

[0135] 5.Tai,Y.T.,and Anderson,K.C.(2015).Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma.Immunotherapy.7(11):1187-99.doi:10.2217/imt.15.77.Epub2015 Sep 15.Review.PMID:26370838

[0136] 6.WO2019/195017

[0137] 7.Berahovich R,Xu S,Zhou H,Harto H,Xu Q,Garcia A,Liu F,Golubovskaya VM,Wu L.FLAG-tagged CD19-specific CAR-T cells eliminate CD19-bearing solid tumor cells in vitro and in vivo.Front Biosci(Landmark Ed).2017 Jun 1;22:1644-1654

## 序列表

<110> 普曼生物技术有限公司 (ProMab Biotechnologies, Inc.)  
弗艾泰柯生物科技有限公司 (Forevertek Biotechnology Co., Ltd.)

<120> 人源化BCMA抗体和BCMA-CAR-T细胞

<130> 119995-8021.W001

<150> US 62/793,274

<151> 2019-01-16

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1           5           10           15
Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
           20           25           30
Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
           35           40           45
Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
           50           55           60
Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
65           70           75           80
Asn Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu
           85           90           95
Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
           100          105          110
Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
           115          120          125
Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
           130          135          140
Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
145          150          155          160
Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
           165          170          175
Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
           180

```

<210> 2

<211> 720

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

```
caggtgcagc tggcgcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaaagtg 60
agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc agctatgtga tgcattgggt gcgccaggcg 120
ccgggccagg gcctggaatg gatgggctat attattccgt ataacgatgc gaccaaatat 180
aacgaaaaat ttaaaggccg cgtgaccatt accgcggata aaagcaccag caccgcgtat 240
atggaactga gcagcctgcg cagcgaagat accgcggtgt attattgcgc gcgctataac 300
tatgatggct attttgatgt gtggggccag ggcacctgg tgaccgtgag cagcggcggc 360
ggcggcagcg gcggcggcgg cagcggcggc ggcggcagcg aaattgtgct gaccagagc 420
ccggcgacc tgagcctgag cccgggcgaa cgcgcgacc tgagctgccg cgcgagccag 480
agcattagcg attatctgca ttggtatcag cagaaaccgg gccaggcgcc gcgcctgctg 540
atattattat cgagccagag cattaccggc attccggcgc gcttttagcg cagcggcagc 600
ggcaccgatt ttaccctgac cattagcagc ctggaaccgg aagattttgc ggtgtattat 660
tgccagaacg gccatagctt tccgccgacc tttggcggcg gcaccaaagt ggaaattaa 720
```

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
           20           25           30
Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
           35           40           45
Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Ala Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
           50           55           60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Tyr Asn Tyr Asp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
           100          105          110
Leu Val Thr Val Ser Ser
           115
```

<210> 4



50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
Ala Arg Tyr Asn Tyr Asp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr		
	100	105
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
	115	120
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu		
	130	140
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln		
145	150	155
Ser Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala		
	165	170
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Thr Gly Ile Pro		
	180	185
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile		
	195	200
Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly		
	210	220
His Ser Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
225	230	235
		240

<210> 7

<211> 63

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 7

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccg 63

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 8

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1

5

10

15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 9

<211> 141

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 9

aagcccacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcccacat cgcgtcgcag 60  
 cccctgtccc tgcgccaga ggcgagccgg ccagcggcgg gggcgagcagt gcacacgagg 120  
 gggctggact tcgccagtga t 141

<210> 10

<211> 47

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 10

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr  
 1                    5                    10                    15  
 Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala  
                   20                    25                    30  
 Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Ser Asp  
                   35                    40                    45

<210> 11

<211> 81

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 11

ttttgggtgc tgggtggtggt tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60  
 gcctttatta ttttctgggt g 81

<210> 12

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 12

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val  
                   20                    25

<210> 13

<211> 123

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)



<400> 13

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgcccggcc 60  
gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120  
tcc 123

<210> 14

<211> 41

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 14

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr  
1                   5                   10                   15  
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
                  20                   25                   30  
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
                  35                   40

<210> 15

<211> 345

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 15

agagtgaagt tcagcaggag cgagacgcc cccgcgtacc agcaggcca gaaccagctc 60  
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 120  
cgggaccctg agatgggggg aaagccgag agaaggaaga accctcagga aggcctgtac 180  
aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag 240  
cgccggagggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac 300  
acctacgacg cccttcacat gcaggccctg cccctcgtct aatag 345

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 16

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
1                   5                   10                   15  
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
                  20                   25                   30  
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
                  35                   40                   45  
Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln  
                  50                   55                   60





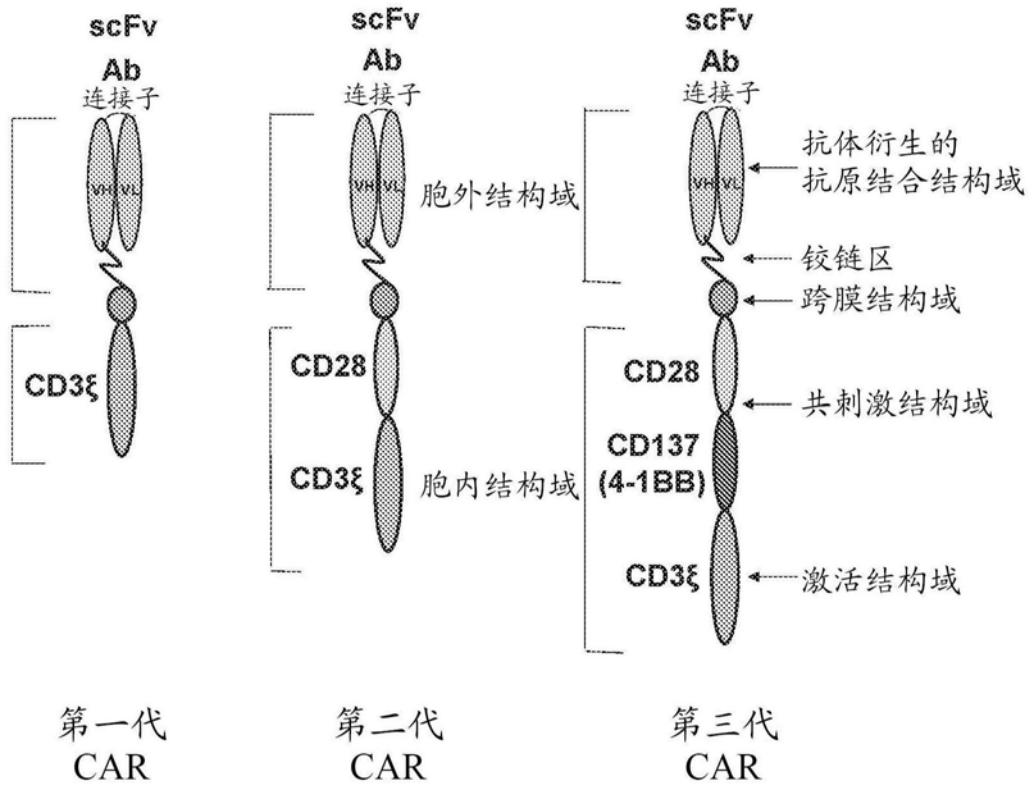


图1

10	20	30	40	50
MLQMAGQCSQ	NEYFDSLHA	CIPCQLRCSS	NTPPLTCORY	CNASVTNSVK
60	70	80	90	100
GTNAILWTCL	GLSLIISLAV	FVLMFLLRKI	NSEPLKDEFK	NTGSGLLGMA
110	120	130	140	150
NIDLEKSRTG	DEIILPRGLE	YTVEECTCED	CIKSKPKVDS	DHCFPLPAME
160	170	180		
EGATILVTTK	TNDYCKSLPA	ALSATEIEKS	ISAR	

图2

人源化的BCMA ScFv-CD28-CD3 $\zeta$

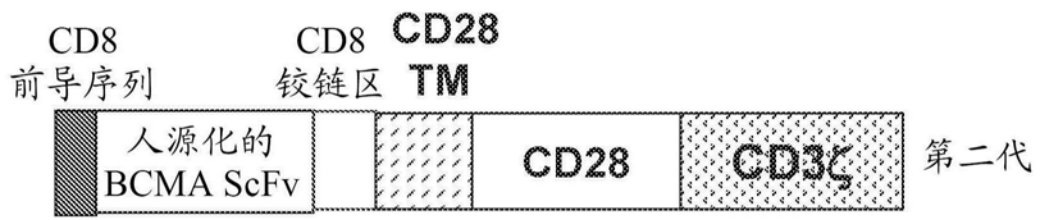


图3

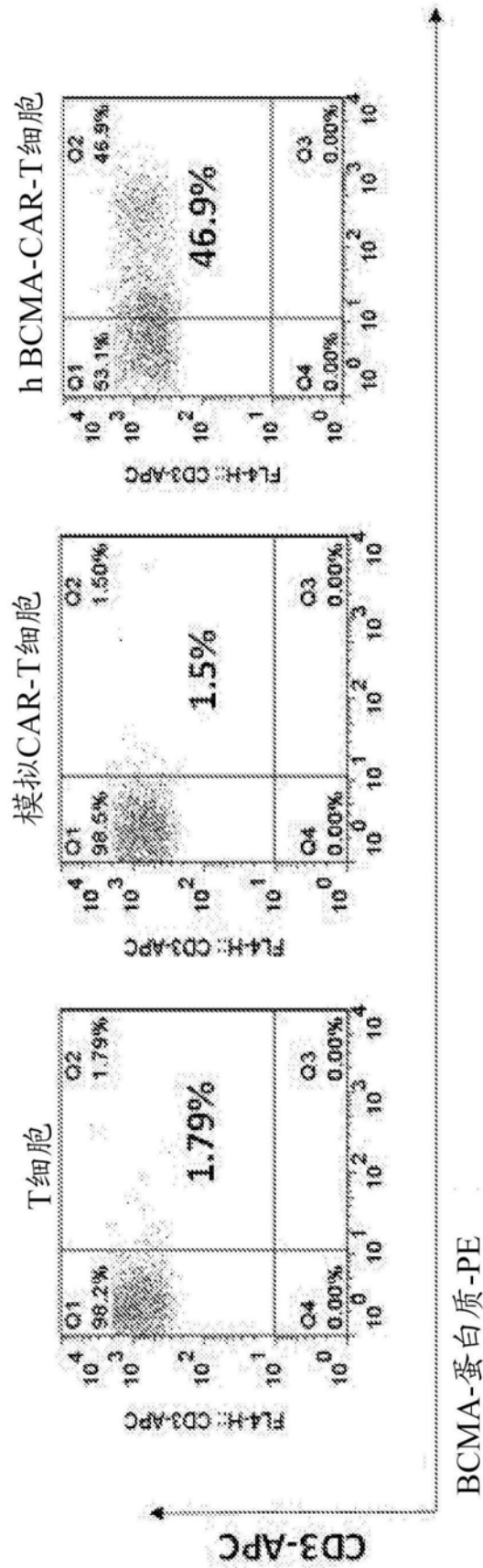


图4

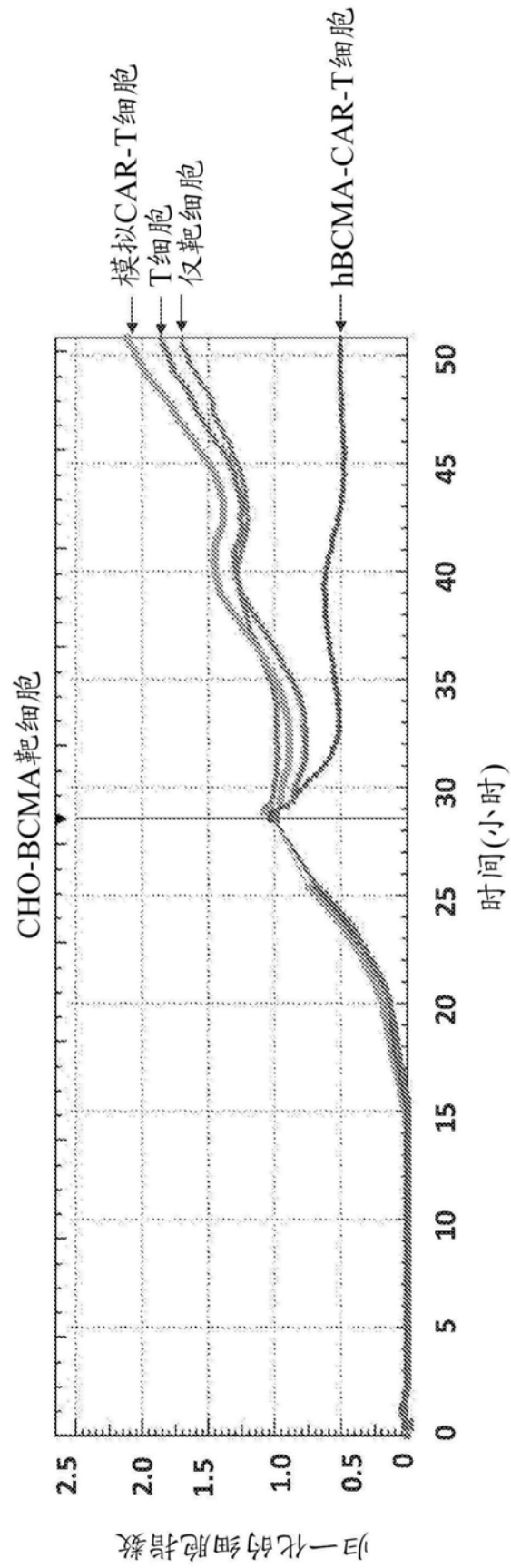


图5A

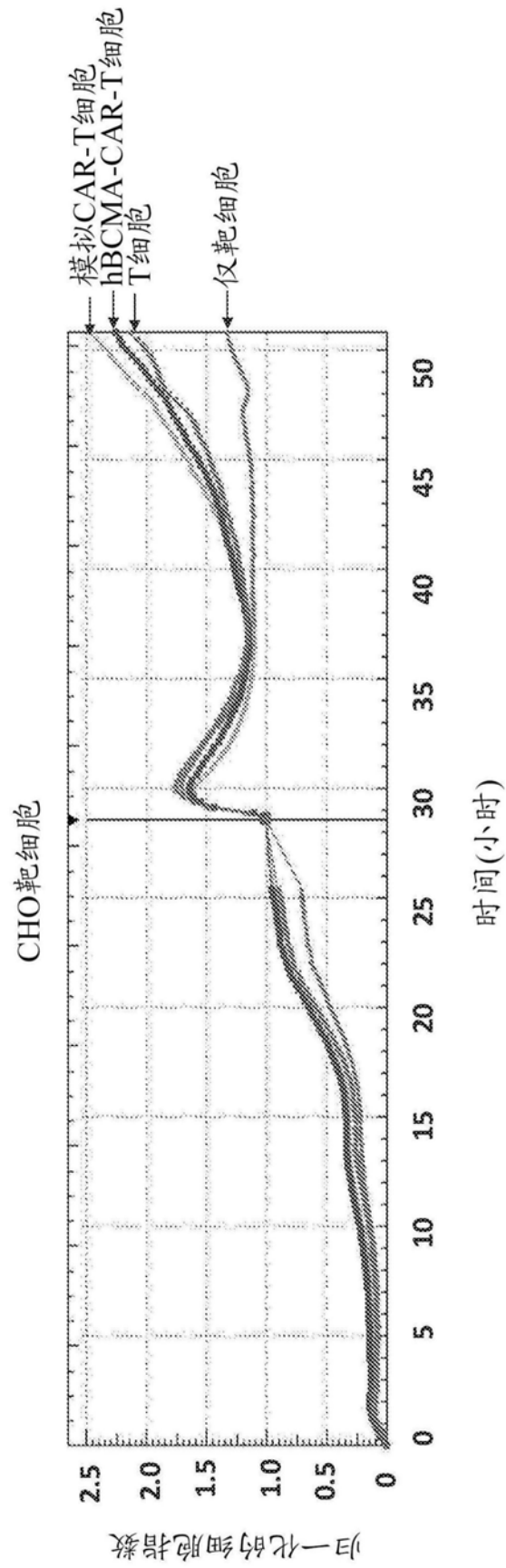


图5B



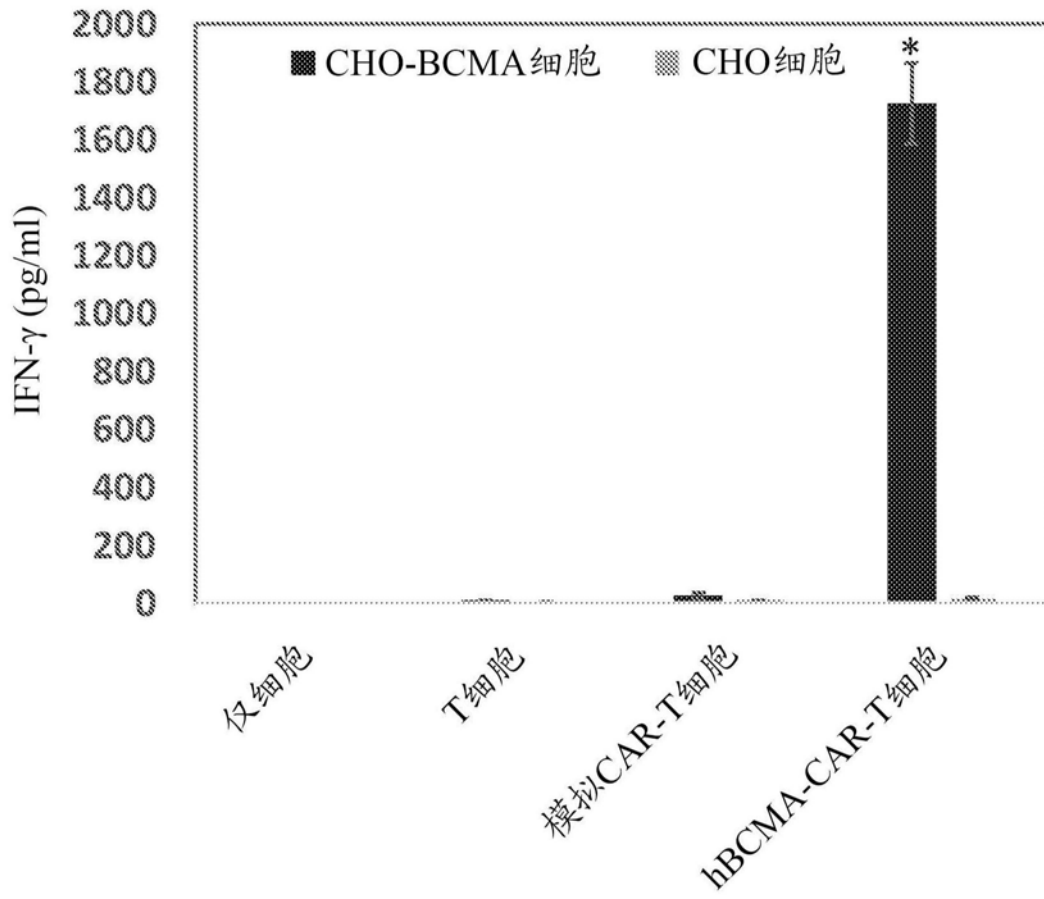


图6

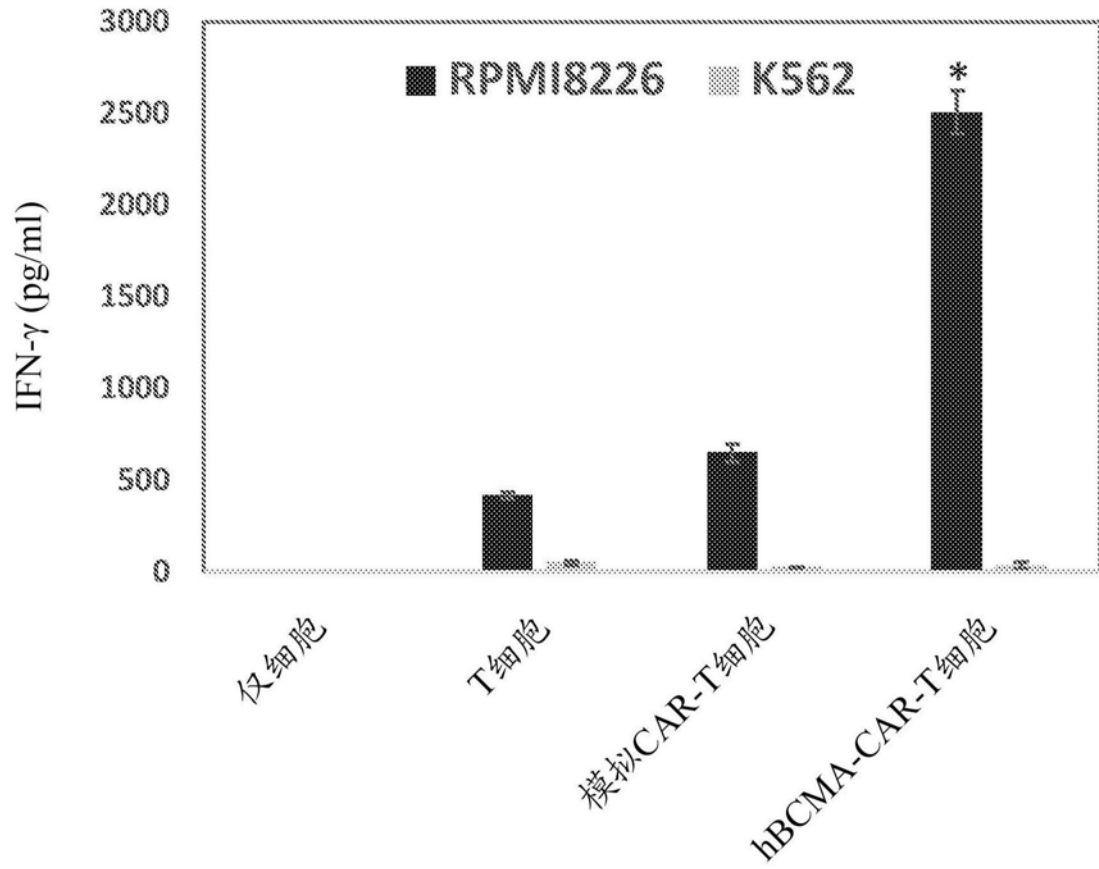


图7

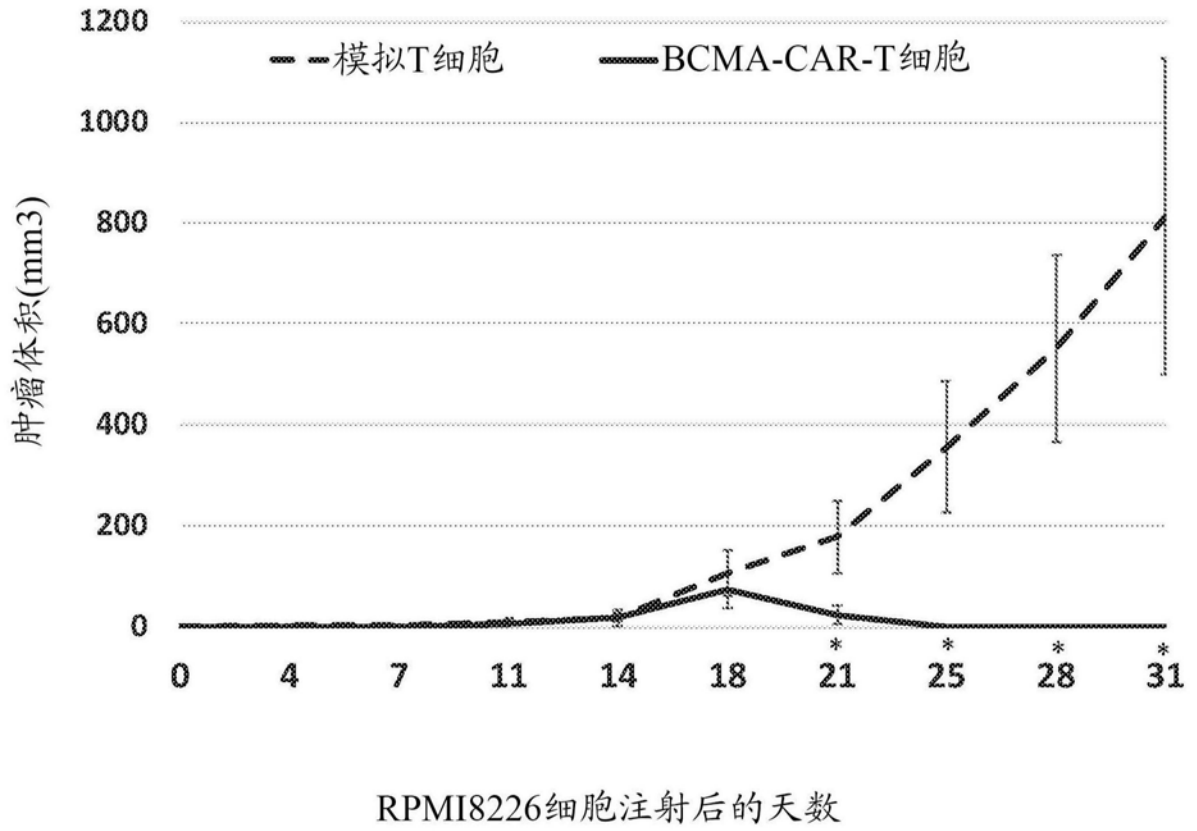


图8A

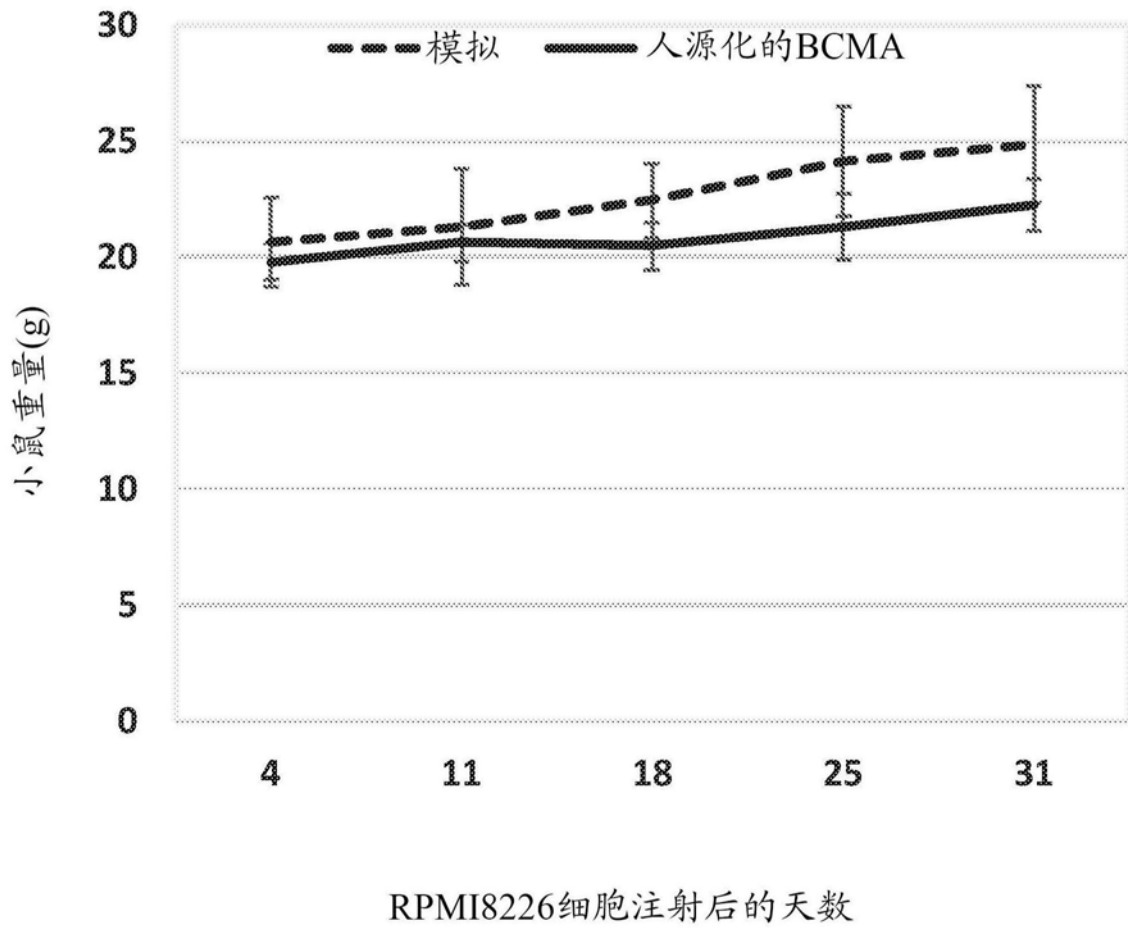


图8B

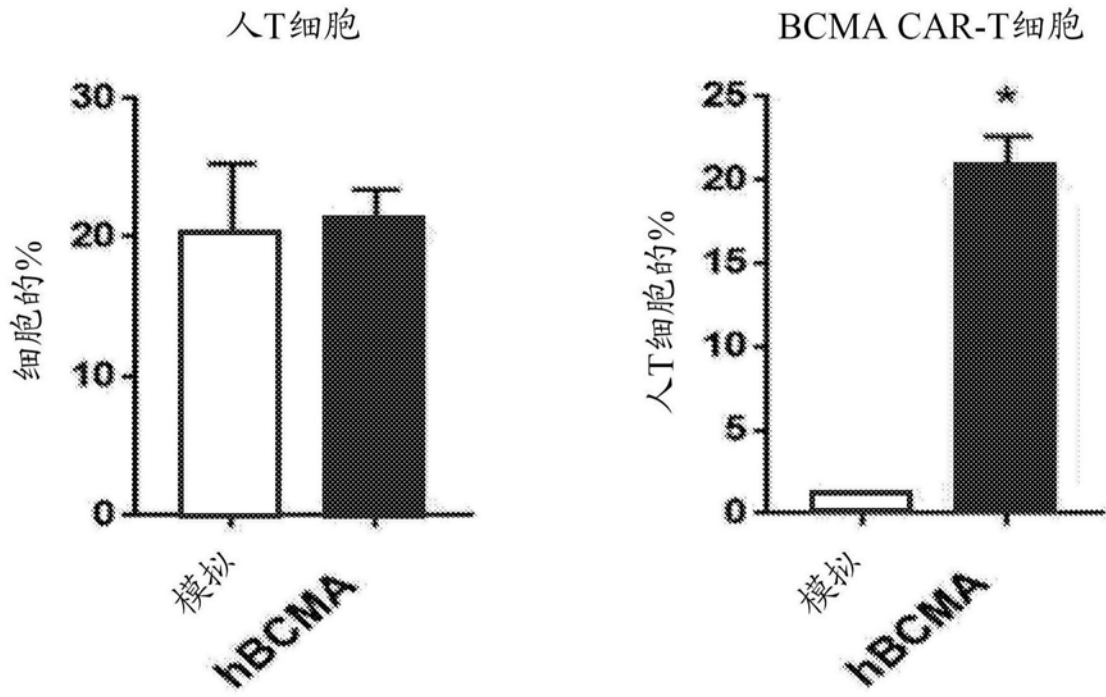


图8C