



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113087806 B

(45) 授权公告日 2022. 09. 06

(21) 申请号 202011635074.4

A61K 39/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.31

A61P 35/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113087806 A

(56) 对比文件

US 2019175654 A1,2019.06.13

CN 110352245 A,2019.10.18

(43) 申请公布日 2021.07.09

CN 110511912 A,2019.11.29

(66) 本国优先权数据
201911415453.X 2019.12.31 CN

CN 110035768 A,2019.07.19

CN 108368176 A,2018.08.03

(73) 专利权人 华东师范大学
地址 200241 上海市闵行区东川路500号
专利权人 上海邦耀生物科技有限公司

US 2018256644 A1,2018.09.13

EP 3632461 A1,2020.04.08

(72) 发明人 张娜 杜冰 刘小红 吴诗佳
刘明耀 席在喜

Shiran Hoogi等.A TIGIT-based chimeric co-stimulatory switch receptor improves T-cell anti-tumor function.《Journal for ImmunoTherapy of Cancer》.2019,第7卷(第1期),1-13.

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
专利代理师 王正君 徐迅

Gao J等.CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors.《Cancer Sci.》.2017,第108卷(第10期),1934-1938.

(51) Int. Cl.

审查员 杨啸天

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书2页 说明书21页
序列表10页 附图9页

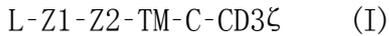
(54) 发明名称

靶向多种肿瘤的新型CAR-T细胞及其制备和方法

(57) 摘要

本发明涉及靶向多种肿瘤的新型CAR-T细胞及其制备和方法,具体地,本发明提供了一种嵌合抗原受体CAR,所述嵌合抗原受体CAR包含抗原结合结构域,所述抗原结合结构域特异性结合于CD155抗原。本发明的特异性靶向CD155的工程化免疫细胞可特异性、选择性地杀伤多种肿瘤,并且具有显著的杀伤效果。

1. 一种嵌合抗原受体CAR,其特征在於,所述嵌合抗原受体CAR包含抗原结合结构域,所述抗原结合结构域特异性结合于CD155抗原,所述的CAR的结构如式I所示:



式中,

各“-”独立地为连接肽或肽键;

L为任选的信号肽序列;

Z1为抗原结合结构域,所述抗原结合域包括TIGIT的胞外段或靶向CD155的抗体单链可变区序列;和

Z2为无或绞链区;

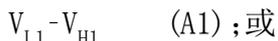
TM为跨膜结构域;

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;

其中所述TIGIT的胞外段蛋白的氨基酸序列SEQ ID NO: 1所示,所述靶向CD155的抗体单链可变区序列中的V_{L1}的氨基酸序列如SEQ ID NO:10的第152-289位所示,且V_{H1}的氨基酸序列如SEQ ID NO:10的第22-136位所示。

2. 如权利要求1所述的嵌合抗原受体CAR,其特征在於,所述的靶向CD155的抗体单链可变区序列的结构如式A1或A2所示:



其中,V_{L1}为抗CD155抗体的轻链可变区;V_{H1}为抗CD155抗体的重链可变区;“-”为连接肽或柔性接头或肽键。

3. 如权利要求1所述的嵌合抗原受体CAR,其特征在於,所述靶向CD155的抗体单链可变区序列的氨基酸序列如SEQ ID NO.19所示。

4. 如权利要求1所述的嵌合抗原受体CAR,其特征在於,所述的嵌合抗原受体CAR的结构如式II或II'所示:



式中,各元件分别如上所述。

5. 如权利要求1所述的嵌合抗原受体CAR,其特征在於,所述CAR的氨基酸序列如SEQ ID NO.: 6或10所示。

6. 一种核酸分子,其特征在於,所述核酸分子编码权利要求1所述的嵌合抗原受体(CAR)。

7. 一种载体,其特征在於,所述的载体含有权利要求6所述的核酸分子。

8. 一种宿主细胞,其特征在於,所述的宿主细胞含有权利要求7所述的载体或染色体中整合有外源的权利要求6所述的核酸分子或表达权利要求1所述的CAR。

9. 一种制备工程化免疫细胞的方法,其特征在於,所述的工程化免疫细胞表达权利要求1所述的CAR,包括以下步骤:将权利要求6所述的核酸分子或权利要求7所述的载体转入T细胞或NK细胞内,从而获得所述工程化免疫细胞。

10. 一种药物组合物,其特征在於,所述药物组合物含有权利要求1所述的嵌合抗原受

体、权利要求6所述的核酸分子、权利要求7所述的载体、或权利要求8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。

11. 一种如权利要求1所述的嵌合抗原受体、权利要求6所述的核酸分子、权利要求7所述的载体、权利要求8所述宿主细胞、或权利要求10所述的药物组合物的用途,其特征在于,用于制备选择性杀伤肿瘤的藥物或制剂。

12. 如权利要求11所述的用途,其特征在于,所述肿瘤包括高表达CD155的肿瘤。

13. 一种用于选择性杀伤肿瘤的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有容器,以及位于容器内的权利要求1所述的嵌合抗原受体、权利要求6所述的核酸分子、权利要求7所述的载体、或权利要求8所述的宿主细胞。

靶向多种肿瘤的新型CAR-T细胞及其制备和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫治疗领域,具体地,涉及靶向多种肿瘤的新型CAR-T细胞及其制备和方法。

背景技术

[0002] 嵌合抗原受体(CAR)修饰的T细胞(CAR-T)的过继细胞疗法是目前最有前景的免疫治疗方法之一,尤其是针对难治性白血病和淋巴瘤,取得了巨大的成效。虽然全球约90%的癌症病例是实体肿瘤,但与血液肿瘤相比,实体瘤的抗原异质性,免疫抑制性微环境,以及复杂的脉管系统影响CAR-T的浸润等困境让CAR-T细胞疗法难以有效发挥,因此本技术从开发克服免疫抑制性肿瘤环境、肿瘤抗原异质性两个切入点着手,发现了在多种晚期实体瘤中高表达新型抗原靶点,同时此靶点又可作为免疫检查点抑制NK和T细胞功能,通过针对这一靶点设计CAR-T,不仅可以直接杀伤多种实体瘤,还可以降低该靶点带来的对NK和T细胞的免疫抑制作用,有效提高CAR-T在实体瘤中的应用价值,解决了实体瘤中抗原靶点异质性和肿瘤免疫抑制微环境两大痛点。

[0003] 因此本领域迫切需要开发一种对多种肿瘤具有显著杀伤效果同时又能对抗免疫抑制微环境的嵌合抗原受体T细胞。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种对多种肿瘤具有显著杀伤效果同时又能对抗免疫抑制微环境的嵌合抗原受体T细胞。

[0005] 本发明第一方面提供了一种嵌合抗原受体CAR,所述嵌合抗原受体CAR包含抗原结合结构域,所述抗原结合结构域特异性结合于CD155抗原。

[0006] 在另一优选例中,所述抗原结合结构域为抗体、胞外段或抗原结合片段。

[0007] 在另一优选例中,所述抗原结合片段是Fab或scFv或单结构域抗体sdFv。

[0008] 在另一优选例中,所述抗原结合结构域包括TIGIT的胞外段。

[0009] 在另一优选例中,所述抗原结合结构域包括靶向CD155的抗体单链可变区序列。

[0010] 在另一优选例中,所述的CAR的结构如式I所示:

[0011] L-Z1-Z2-TM-C-CD3 ζ (I)

[0012] 式中,

[0013] 各“-”独立地为连接肽或肽键;

[0014] L为任选的信号肽序列;

[0015] Z1为抗原结合结构域,所述抗原结合域包括TIGIT的胞外段或靶向CD155的抗体单链可变区序列;和

[0016] Z2为无或绞链区;

[0017] TM为跨膜结构域;

[0018] C为共刺激信号分子;

- [0019] CD3 ζ 为源于CD3 ζ 的胞浆信号传导序列。
- [0020] 在另一优选例中,所述TIGIT的胞外段蛋白的氨基酸序列选自下组:
- [0021] (a) 如SEQ ID NO:1氨基酸序列的蛋白;
- [0022] (b) 将SEQ ID NO:1氨基酸序列经过一个或多个(如1-10个)氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有(a)蛋白功能的由(a)衍生的蛋白;或
- [0023] (c) 与(a)限定的蛋白序列有90%以上(较佳地 $\geq 95\%$)同源性且具有(a)蛋白功能的由(a)衍生的蛋白。
- [0024] 在另一优选例中,编码所述TIGIT的胞外段蛋白的核苷酸序列选自下组:
- [0025] (a) 核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示的多核苷酸;(b) 核苷酸序列与SEQ ID NO:2所示序列的同源性 $\geq 70\%$ (较佳地 $\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 或 $\geq 98\%$),且具有靶向或结合于CD155活性的多核苷酸;
- [0026] (c) 如SEQ ID NO:2所示多核苷酸的5'端和/或3'端截短1-60个(较佳地1-30个,更佳地1-6个)核苷酸,且具有靶向或结合于CD155活性的多核苷酸。
- [0027] 在另一优选例中,所述TIGIT的胞外段为人源。
- [0028] 在另一优选例中,所述的靶向CD155的抗体单链可变区序列的结构如式A1或A2所示:
- [0029] $V_{L1}-V_{H1}$ (A1);或
- [0030] $V_{H1}-V_{L1}$ (A2);
- [0031] 其中, V_{L1} 为抗CD155抗体的轻链可变区; V_{H1} 为抗CD155抗体的重链可变区;“-”为连接肽(或柔性接头)或肽键。
- [0032] 在另一优选例中,所述的 V_{L1} 和 V_{H1} 通过柔性接头相连。
- [0033] 在另一优选例中,所述的柔性接头为1-5个(较佳地,2-4个)连续的SEQ ID NO:20(GGGGS)所示的序列。
- [0034] 在另一优选例中, V_{L1} 的氨基酸序列如SEQ ID NO:10的第152-289位所示,且 V_{H1} 的氨基酸序列如SEQ ID NO:10的第22-136位所示。
- [0035] 在另一优选例中, V_{L1} 的氨基酸序列如SEQ ID NO.:12所示。
- [0036] 在另一优选例中, V_{H1} 的氨基酸序列如SEQ ID NO.:14所示。
- [0037] 在另一优选例中,所述靶向CD155的抗体单链可变区序列的氨基酸序列如SEQ ID NO.19所示。
- [0038] 在另一优选例中,所述的靶向CD155的抗体单链可变区序列为鼠源、人源、人源和鼠源嵌合、或者全人源化的单链抗体可变区片段。
- [0039] 在另一优选例中,所述的嵌合抗原受体CAR的结构如式II或II'所示:
- [0040] $L-V_{L1}-V_{H1}-Z2-TM-C-CD3\zeta$ (II);或
- [0041] $L-V_{H1}-V_{L1}-Z2-TM-C-CD3\zeta$ (II')
- [0042] 式中,各元件分别如上所述。
- [0043] 在另一优选例中,所述L为选自下组的蛋白的信号肽:TIGIT、CD8、CD8 α 、CD28、GM-CSF、CD4、CD137、FcR γ 、FcR β 、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD20、CD79a、CD79b、CD278(ICOS)、FcERI、CD66d、DAP10、DAP12、或其组合。
- [0044] 在另一优选例中,所述L为选自下组的蛋白的信号肽:TIGIT、CD8、CD8 α 、CD28、GM-

CSF、CD4、CD137、或其组合。

[0045] 在另一优选例中,所述L的信号肽为TIGIT的胞外段信号肽,氨基酸序列为MRWCLLLIWAQGLRQAPLASG (SEQ ID NO.:3)。

[0046] 在另一优选例,所述L的信号肽为CD8 α 信号肽,氨基酸序列为MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO.:18)。

[0047] 在另一优选例中,所述Z2为选自下组的蛋白的绞链区:CD8、Ig(免疫球蛋白)铰链、或其组合。

[0048] 在另一优选例中,所述Z2为CD8铰链区。

[0049] 在另一优选例中,Z2的氨基酸序列为:TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACD (SEQ ID NO.:8)。

[0050] 在另一优选例中,所述的TM为选自下组的蛋白的跨膜区:T细胞受体的 α 链、T细胞受体的 β 链、T细胞受体的 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、CD8 α 、ICOS、CD19、CD45、或其组合。

[0051] 在另一优选例中,所述的TM为选自下组的蛋白的跨膜区:CD8、CD28、CD33、CD37、CD8 α 、CD5、CD16、ICOS、CD9、CD22、CD134、CD137、CD154、CD19、CD45、CD4、CD3 ϵ 、或其组合。

[0052] 在另一优选例中,所述TM为选自下组的蛋白的跨膜区:CD8 α 。

[0053] 在另一优选例中,TM的氨基酸序列为:IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO.:9)。

[0054] 在另一优选例中,所述C为选自下组的蛋白的共刺激信号分子:CD27、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CD2、CD4、CD5、CD28、CD30、CD40、CD134、CD137、ICOS、CD154、4-1BB、OX40、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、OX40、活化NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、CDS、ICAM-L LFA-1 (CD11a/CD18)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96(触觉)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTBA、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、DAP10、DAP12、CD83的配体、MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子、或其组合。

[0055] 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:CD27、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CD2、CD4、CD5、CD28、CD30、CD40、CD134、CD137、ICOS、CD154、4-1BB、OX40、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、或其组合。

[0056] 在另一优选例中,所述的C为4-1BB来源的共刺激信号分子。

[0057] 在另一优选例中,所述C的共刺激信号分子的氨基酸序列为KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO.:4)。

[0058] 在另一优选例中,所述CD3 ζ 的氨基酸序列为RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLGYQLGLSTATKDTYDALHMQ

ALPPR (SEQ ID NO.:5)。

[0059] 在另一优选例中,所述CAR的氨基酸序列如SEQ ID NO.:6或10所示。

[0060] 本发明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)。

[0061] 在另一优选例中,所述核酸分子选自下组:

[0062] (a) 编码如SEQ ID NO:6或10所示多肽的多核苷酸;

[0063] (b) 序列如SEQ ID NO:7或11所示的多核苷酸;

[0064] (c) 核苷酸序列与(b)所示序列的同源性 $\geq 75\%$ (较佳地 $\geq 80\%$,更佳地,90%,更佳地,95%,更佳地,98%,更佳地,99%)的多核苷酸;

[0065] (d) 如(b)所示多核苷酸的5'端和/或3'端截短或添加1-60个(较佳地1-30,更佳地1-10个)核苷酸的多核苷酸;

[0066] (e) 与(a)-(d)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。

[0067] 在另一优选例中,所述的核酸分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:7或11所示。

[0068] 在另一优选例中,所述的核酸分子为多核苷酸。

[0069] 本发明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。

[0070] 在另一优选例中,所述的载体选自下组:质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体、或其组合。

[0071] 在另一优选例中,所述载体为慢病毒载体。

[0072] 本发明第四方面提供了一种宿主细胞,所述的宿主细胞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。

[0073] 在另一优选例中,所述细胞为分离的细胞,和/或所述细胞为基因工程化的细胞。

[0074] 在另一优选例中,所述细胞为哺乳动物细胞。

[0075] 在另一优选例中,所述细胞为T细胞或NK细胞。

[0076] 在另一优选例中,所述的宿主细胞为工程化的免疫细胞。

[0077] 在另一优选例中,所述的工程化的免疫细胞包括T细胞或NK细胞,较佳地为(i)嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞);(ii)嵌合抗原受体NK细胞(CAR-NK细胞);或(iii)外源T细胞受体(TCR)T细胞(TCR-T细胞)。

[0078] 在另一优选例中,所述免疫细胞为自体的。

[0079] 在另一优选例中,所述免疫细胞为非自体的。

[0080] 在另一优选例中,所述免疫细胞靶向CD155抗原。

[0081] 本发明第五方面提供了一种制备工程化免疫细胞的方法,所述的工程化免疫细胞表达本发明第一方面所述的CAR,包括以下步骤: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T细胞或NK细胞内,从而获得所述工程化免疫细胞。

[0082] 在另一优选例中,所述导入包括同时、先后、或依次导入。

[0083] 在另一优选例中,所述的细胞为CAR-T细胞或CAR-NK细胞。

[0084] 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。

[0085] 本发明第六方面提供了一种药物组合物,所述药物组合物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。

[0086] 在另一优选例中,所述药物组合物为液态制剂。

[0087] 在另一优选例中,所述药物组合物的剂型为注射剂。

[0088] 在另一优选例中,所述药物组合物中,所述细胞的浓度为 1×10^5 - 1×10^8 个细胞/ml,较佳地为 1×10^6 - 1×10^7 个细胞/ml,更佳地为 1×10^6 - 5×10^6 个细胞/ml。

[0089] 在另一优选例中,所述药物组合物还含有治疗癌症或肿瘤的其他药物(如新兴的抗体药物、其他CAR-T药物或化疗药物)。

[0090] 本发明第七方面提供了一种如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、本发明第四方面所述宿主细胞、或本发明第六方面所述的药物组合物的用途,用于制备选择性杀伤肿瘤的药物或制剂。

[0091] 在另一优选例中,所述肿瘤包括高表达CD155的肿瘤。

[0092] 在另一优选例中,所述肿瘤包括实体瘤和血液肿瘤。

[0093] 在另一优选例中,所述实体瘤选自下组:肝癌、头颈癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、膀胱癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、肺癌、软骨肉瘤、甲状腺癌、肾癌、间皮瘤、骨肉瘤、胆管癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、前列腺癌、脑膜瘤、胰腺癌、多发性鳞状细胞瘤、食管癌、肺小细胞癌、结直肠癌、乳腺癌、成神经管细胞瘤、乳腺癌、或其组合。

[0094] 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。

[0095] 本发明第八方面提供了一种用于选择性杀伤肿瘤的试剂盒,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。

[0096] 在另一优选例中,所述试剂盒还含有标签或使用说明书。

[0097] 本发明第九方面提供了一种选择性杀伤肿瘤的方法,包括:

[0098] 给需要治疗的对象施用安全有效量的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药物组合物。

[0099] 在另一优选例中,所述对象包括人或非人哺乳动物。

[0100] 在另一优选例中,所述非人哺乳动物包括啮齿动物(如小鼠、大鼠、兔)、灵长类动物(如猴)。

[0101] 在另一优选例中,所述方法为非治疗性和非诊断性的。

[0102] 本发明第十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安全有效量的本发明第六方面所述的药物组合物。

[0103] 在另一优选例中,所述方法还包括给需要治疗的对象施用治疗癌症或肿瘤的其他药物。

[0104] 在另一优选例中,所述其他药物包括CAR-T药物。

[0105] 在另一优选例中,所述疾病为癌症或肿瘤。

[0106] 在另一优选例中,所述肿瘤包括高表达CD155的肿瘤。

[0107] 在另一优选例中,所述肿瘤包括实体瘤和血液肿瘤。

[0108] 在另一优选例中,所述实体瘤选自下组:肝癌、头颈癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、膀胱癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、肺癌、软骨肉瘤、甲状腺癌、肾癌、间皮瘤、骨肉瘤、胆管癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、前列腺癌、脑膜瘤、胰腺癌、多发性鳞状细胞瘤、食管癌、肺小细胞癌、结直肠癌、乳腺癌、成神经管细胞瘤、乳腺癌、或其组合。

[0109] 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。

[0110] 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构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0111] 图1为CCLE数据库中多种实体瘤细胞系中CD155的表达水平。

[0112] 图2为CD155表达的组织芯片数据。图2-A为CD155在肿瘤组织中的表达。图2-B为CD155在癌旁组织中的表达。图2-C为CD155在正常组织中的表达。

[0113] 图3为流式检测CD155在肿瘤细胞系中的表达情况

[0114] 图4为实施例中的表达盒的结构示意图。

[0115] 图5为pELPS-TIGIT-CD8H-BBz和pELPS-TIGIT-BBz病毒滴度结果图。

[0116] 图6为TIGIT-CAR-T细胞的CAR的表达水平的流式图。

[0117] 图7为TIGIT-CAR-T对不同肿瘤细胞的细胞毒性结果图。

[0118] 图8为PVRbbz-CAR-T细胞的CAR的表达水平的流式图。

[0119] 图9为PC3细胞CD155敲除后流式验证结果图。

[0120] 图10为PVRbbz-CAR-T细胞对CD155敲除PC3细胞的杀伤情况图。

[0121] 图11为PVRbbz-CAR-T细胞对多种肿瘤细胞的杀伤情况图。

[0122] 图12为PVRbbz-CAR-T治疗骨转移肿瘤动物模型实验追踪结果图。

[0123] 图13为PVRbbz-CAR-T治疗实验动物后主要脏器HE染色结果图。

[0124] 图14为CD155抑制T细胞免疫功能实验结果图,图14A为CD155抑制T细胞细胞因子分泌流式结果图,图14B为CD155抑制CAR-T杀伤功能结果图。

具体实施方式

[0125] 本发明人经过广泛而深入地研究,经过对靶点的大量筛选,首次意外地发现一种特异性靶向CD155的工程化免疫细胞,其可特异性、选择性地杀伤多种肿瘤,并且具有显著的杀伤效果。在此基础上,本发明人完成了本发明。

[0126] 本发明以CAR-T细胞为例,代表性地对本发明的工程化的免疫细胞进行详细说明。本发明的工程化的免疫细胞不限于上下文所述的CAR-T细胞,本发明的工程化的免疫细胞具有与上下文所述的CAR-T细胞相同或类似的技术特征和有益效果。具体地,当免疫细胞表达嵌合抗原受体CAR时,NK细胞等同于T细胞(或T细胞可替换NK细胞);当免疫细胞为T细胞时,TCR等同于CAR(或CAR可替换为TCR)。

[0127] CD155

[0128] CD155又称PVR,最早发现是可以作为脊髓灰质炎病毒的受体介导病毒入侵细胞。CD155在很多癌细胞中都高表达,CD155的过度表达可能诱导肿瘤免疫逃逸。

[0129] 本发明的研究发现,CD155过表达促进肿瘤细胞的侵袭和迁移,并与肿瘤进展和不良预后有关。作为免疫调节分子,CD155可以与共刺激分子CD226以及共抑制分子TIGIT和CD96结合,分别发挥激活NK细胞和抑制T细胞和NK细胞的作用,在肿瘤免疫中具有双重功能,而浸润肿瘤的免疫细胞表达减少的CD226和增加的TIGIT。因此肿瘤细胞中高表达的CD155可作为肿瘤治疗的关键点。

[0130] 本发明的研究发现,CD226,TIGIT和CD96作为CD155目前已知的三个受体,TIGIT对CD155的亲合力最高,因此基于本发明的上述研究结果,本发明在设计CAR-T时,使用TIGIT作为CAR结构的胞外端部分会比CD226更高效,同时还可以中和CD155的抑制作用,可谓一举两得。与此同时,CD155在正常组织中几乎不表达,而在许多恶性肿瘤,比如肝癌,头颈癌,黑色素瘤,非霍奇金淋巴瘤等高度表达。与疾病预后极为相关。因此靶向CD155的CAR-T设计或可在多种实体瘤中发挥功能,同时TIGIT作为免疫检查点,利用其胞外端设计的CAR-T,可以结合CD155,从而激活CAR胞内信号发挥杀伤靶细胞作用,同时解除CD155对T细胞的免疫抑制作用。

[0131] TIGIT胞外段蛋白

[0132] 本发明意外发现,本发明特定的TIGIT胞外段蛋白可以与CD155特异性结合。

[0133] TIGIT(也称为WUCAM,Vstm3,VSIG9)是脊髓灰质炎病毒受体(PVR/nectin家族的成员,是免疫球蛋白超家族的一员。其表达严格限制于淋巴细胞,表达最高的是效应细胞和调节性CD4⁺ T细胞、滤泡辅助性CD4⁺ T细胞、效应CD8⁺ T细胞和自然杀伤细胞(NK)。TIGIT可以在癌症免疫周期的多个方面抑制免疫细胞。第一,TIGIT可以抑制NK细胞效应功能,从而防止最初的肿瘤细胞死亡和癌细胞抗原的释放。第二,T细胞上的TIGIT可以抑制树突细胞共刺激能力,导致癌症抗原呈递减少和抗炎细胞因子如IL-10增加。TIGIT还可以在其他细胞如肿瘤细胞上诱导PVR信号传导。第三,TIGIT⁺ Tregs或PVR刺激的骨髓细胞可以抑制CD8⁺ T细胞效应功能或向CD4⁺ T细胞极化。第四,TIGIT可以直接或者通过Tregs抑制CD8⁺ T细胞并阻止癌细胞的清除。阻断TIGIT-CD155途径可以促进逆转其介导的抑制作用,促进免疫系统对肿瘤的杀伤作用。TIGIT由胞外免疫球蛋白可变序列(IgV)结构域、1型跨膜结构域和具有典型免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)和免疫球蛋白酪氨酸尾部(ITT)基序的胞内结构域组成,本发明构建了一种以TIGIT胞外段为靶向的嵌合抗原受体T细胞,将TIGIT胞外段与CD8跨膜区以及共刺激因子4-1BB和胞内信号激活序列CD3zeta相连,构建一个二代CAR的结构,用来治疗高表达CD155蛋白的实体瘤。

[0134] 在本发明的一优选实施方式中,本发明的TIGIT胞外段蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.:1所示。

[0135] MMTGTIETTGNISAIEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP(SEQ ID NO.:1)

[0136] 编码本发明的TIGIT胞外段蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.:2所示。

[0137] ATGATGACAGGCACAATAGAAACAACGGGGAACATTTCTGCAGAGAAAGGTGGCTCTATCATCTTACAATGTCACCTCTCCTCCACCACGGCACAAGTGACCCAGGTCAACTGGGAGCAGCAGGACCAGCTTCTGGCCATTTGTAATGCTGACTTGGGGTGGCACATCTCCCCATCCTTCAAGGATCGAGTGGCCCCAGGTCCCGCCTGGGCCTCACCC

TCCAGTCGCTGACCGTGAACGATACAGGGGAGTACTTCTGCATCTATCACACCTACCCTGATGGGACGTACACTGG
GAGAATCTTCTGGAGGTCCTAGAAAGCTCAGTGGCTGAGCACGGTGCCAGGTTCCAGATTCCA (SEQ ID NO.:
2)

[0138] 嵌合抗原受体 (CAR)

[0139] 嵌合免疫抗原受体 (Chimeric antigen receptors, CARs) 由胞外抗原识别区域, 通常是 scFv (single-chain variable fragment), 跨膜区以及胞内共刺激信号区域组成。CARs 的设计经历了以下过程: 第一代 CAR 只有一个胞内信号组份 CD3 ζ 或者 Fc γ RI 分子, 由于胞内只有一个活化结构域, 因此它只能引起短暂的 T 细胞增殖和较少的细胞因子分泌, 而不能提供长时间的 T 细胞增殖信号和持续的体内抗肿瘤效应, 所以并没有取得很好地临床疗效。第二代 CARs 在原有结构基础上引入一个共刺激分子, 如 CD28、4-1BB、OX40、ICOS, 与一代 CARs 相比功能有很大提高, 进一步加强 CAR-T 细胞的持续性和对肿瘤细胞的杀伤能力。在二代 CARs 基础上串联一些新的免疫共刺激分子如 CD27、CD134, 发展成为三代和四代 CARs。

[0140] CARs 的胞外段可识别一个特异的抗原, 随后通过胞内结构域转导该信号, 引起细胞的活化增殖、细胞溶解毒性和分泌细胞因子, 进而清除靶细胞。首先分离病人自体细胞 (或者异源供体), 激活并进行基因改造产生 CAR 的免疫细胞, 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, 抗原被免疫细胞以非 MHC 限制方式识别。

[0141] CAR-免疫细胞治疗在血液恶性肿瘤治疗中取得了非常高的临床反应率, 这样的高反应率是以往任何一种治疗手段都无法达到的, 在世界各引发了临床研究的热潮。

[0142] 具体地, 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)。细胞内结构域包括共刺激信号传导区和/或 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。

[0143] 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。

[0144] 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/或 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/或 CD3 ζ 信号结构域组合的细胞内结构域融合。

[0145] 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 包含特异性识别肿瘤高表达抗原 CD155 的抗体, 较佳地为单链抗体。

[0146] 在一优选实施方式中,本发明CAR的抗原结合部分靶向CD155抗原。在一优选实施方式中,本发明的CAR的抗原结合部分是靶向CD155的TIGIT胞外段蛋白。

[0147] 在一优选实施方式中,TIGIT胞外段蛋白包含变体形式,所述变体与其野生型的TIGIT胞外段蛋白序列表具有 $\geq 80\%$ 、 $\geq 85\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 98\%$ 或 $\geq 99\%$ 的同源性。

[0148] 在本发明中,本发明的TIGIT胞外段蛋白还包括其保守性变异体,指与本发明TIGIT胞外段蛋白的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。

[0149] 在本发明中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量,优选为不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%,更优选为不超过35%,更优选为1-33%,更优选为5-30%,更优选为10-25%,更优选为15-20%。

[0150] 在本发明中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量通常是1、2、3、4或5个,较佳地为1-3个,更佳地为1-2个,最佳地为1个。

[0151] 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。

[0152] 本发明的CAR的胞外结构域包括TIGIT的胞外段蛋白,优选具有特定序列的TIGIT的胞外段蛋白。

[0153] 在本发明中,本发明的CAR中的胞内结构域包括CD8的跨膜区、4-1BB的共刺激因子、CD3 ζ 的信号传导结构域。

[0154] 在本发明的一优选实施方式中,所述CAR的氨基酸序列(含有TIGIT的胞外段的抗原结合结构域)如SEQ ID NO.:6所示。

[0155] MRWCLLLIWAQGLRQAPLASGMMGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAI
CNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYDPDGYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
MGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID
NO.:6)

[0156] 在本发明的一优选实施方式中,所述CAR的核苷酸序列(含有TIGIT的胞外段的抗原结合结构域)如SEQ ID NO.:7所示。

[0157] ATGCGCTGGTGTCTCCTCTGATCTGGGCCAGGGGCTGAGGCAGGCTCCCCTCGCCTCAGGAATGAT
GACAGGCACAATAGAAACAACGGGGAACATTTCTGCAGAGAAAGGTGGCTCTATCATCTTACAATGTCACCTCTCC
TCCACCACGGCACAAGTGACCCAGGTCAACTGGGAGCAGCAGGACCAGCTTCTGGCCATTTGTAATGCTGACTTGG
GGTGGCACATCTCCCATCCTTCAAGGATCGAGTGGCCCCAGGTCCCGCCTGGGCTCACCTCCAGTCGCTGAC
CGTGAACGATACAGGGGAGTACTTCTGCATCTATCACACCTACCCTGATGGGACGTACACTGGGAGAATCTTCTG
GAGGTCTAGAAAGCTCAGTGGCTGAGCACGGTGCCAGGTTCCAGATTCCAaccacgacgccagcgccgacccac
caacaccggcgccaccatcgcgctcgagccccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcgggggggcgcc
agtgcacacgagggggctggacttcgctgtgatatctacatctgggcgcccttgccgggacttgtggggtcctt

ctcctgtcactggttatcacctttactgcaaacggggcagaaagaactcctgtatataattcaacaaccattta
 tgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaaggaggatgtga
 actgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcaggccagaaccagctctataacgagctc
 aatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccga
 gaaggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgg
 gatgaaaggcgagcggcggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacc
 tacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc (SEQ ID NO.:7)

[0158] 其中,在SEQ ID NO.:6中第1—21位为信号肽;第22—141位为TIGIT的胞外段;第142—186为绞链区;第187—210位为跨膜区(如CD8的跨膜区);第211—252位为共刺激元件(如4-1BB);第253—364位为CD3ζ。

[0159] 本发明的CAR的胞外抗原识别区也可以为抗原特异性的scFv。

[0160] 当CAR的胞外抗原识别区为单链抗体片段时,信号肽为CD8α信号肽。

[0161] 所述CAR的信号肽为CD8α信号肽(CD8αLeader)的核苷酸序列如SEQ ID NO.:17所示:

[0162] atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgcctgctccacgccagccaggccg;

[0163] 所述CAR的CD8α信号肽(CD8αLeader)的氨基酸序列如SEQ ID NO.:18所示:
 MALPVTALLLPLALLLHAARP;

[0164] 在本发明的一优选实施方式中,所述CAR的氨基酸序列(含有的抗原结合结构域为本发明的抗原特异性的scFv)如SEQ ID NO.:10所示:

[0165] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKALGYTFDHEMHWVKQTPVHGLEW
 IGTIHPGSGVTAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSTLTSEDSAVYYCTPLWLRDWDGQGTTLTVSTGGGGSGGG
 GSGGGGSALDIQMTQTPKFMSTSVGDRVSVTKASQNVATNVVWFQQKSGQSPKALIYSASYRSGVPDRFTGSGS
 GTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELAAAAGAPVPYDPLEPRGAASAWSHPFQEKTTTPAPR
 PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQP
 FMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGK
 PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR。

[0166] 在本发明的一优选实施方式中,所述CAR的核苷酸序列(含有的抗原结合结构域为本发明的抗原特异性的scFv)如SEQ ID NO.:11所示:

[0167] atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgcctgctccacgccagccaggccgGAGGT
 TCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGGGCTGGGACTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTTGGGCTAC
 ACATTTACTGACCATGAAATGCACTGGGTGAAACAGACACCTGTGCATGGCCTGGAATGGATTGGAATATTCATC
 CAGGAAGTGGTGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCAC
 AGCCTACATGGAGCTCAGCACCTGACATCTGAAGACTCTGCTGTCTATTACTGTACACCACTTTGGTTACGACGG
 GACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTGTGACAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCG
 GAAGTGCCTCGATATCCAGATGACACAGACTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCAC
 CTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGCTACTAATGTAGTCTGGTTTCAACAGAAATCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTG
 ATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC
 TCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAACTATCCTCTCACGTT
 CGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGCGGCCGAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCAGATCCGCTGGAACCGCGT

GGGGCCGCAAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAaccacgacgccagcgcggcgaccaccaacaccggcgc
ccaccatcgctcgcagccccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcggggggcgagtgacacagag
ggggctggacttcgctgtgatatctacatctgggcgcccttgccgggacttggtgggtccttctcctgtcactg
gttatcaccctttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaccatttatgagaccagtac
aaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtga
gttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcaggggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacga
agagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaacc
ctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggccctacagtgagattgggatgaaaggcga
gcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgccctt
cacatgcaggccctgccccctcgc。

[0168] 在本发明的一优选实施方式中,所述CAR的 V_{L1} 的氨基酸序列如SEQ ID NO.:12所示:

[0169] ALDIQMTQTPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVATNVVWFQQKSGQSPKALIYSASYRYSVGPDRFTGSG
SGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELKAAAGAPVPYPDPLEPRGAASAWSHPQFEK。

[0170] 在本发明的一优选实施方式中,所述CAR的 V_{L1} 的核苷酸序列如SEQ ID NO.:13所示:

[0171] GCACTCGATATCCAGATGACACAGACTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGT
CACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGCTACTAATGTAGTCTGGTTTCAACAGAAATCAGGGCAATCTCCTAAAGCA
CTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA
CTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAACCTATCCTCTCAC
GTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGCGGCCGAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCAGATCCGCTGGAACCG
CGTGGGGCCGCAAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAA。

[0172] 在本发明的一优选实施方式中,所述CAR的 V_{H1} 氨基酸序列如SEQ ID NO.:14所示:

[0173] EVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKALGYFTDHEMHWVKQTPVHGLEWIGTIHPGSGVTAYNQKFKGKA
TLTADKSSSTAYMELSTLTSEDSAVYYCTPLWLRDWDGQGTTLTVST。

[0174] 在本发明的一优选实施方式中,所述CAR的 V_{H1} 的核苷酸序列如SEQ ID NO.:15所示:

[0175] GAGGTTGAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAA
GGCTTTGGGCTACACATTTACTGACCATGAAATGCACTGGGTGAAACAGACACCTGTGCATGGCCTGGAATGGATT
GGAACCTATTCATCCAGGAAGTGGTGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACA
AATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCACCCCTGACATCTGAAGACTCTGCTGTCTATTACTGTACACCACT
TTGTTACGACGGGACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTGTGACA。

[0176] 在本发明的一优选实施方式中,所述CAR的 V_{L1} 与 V_{H1} 之间的连接氨基酸序列为如SEQ ID NO.:16所示:

[0177] GGGSGGGSGGGGS。

[0178] 其中,在SEQ ID NO.:10中第1-21位为信号肽;第22-289位为靶向CD155的抗体单链可变区序列;第290-334位为绞链区;第335-358位为跨膜区(如CD8的跨膜区);第359-400位为共刺激元件(如4-1BB);第401-512位为CD3 ζ 。

[0179] 所述靶向CD155的抗体单链可变区序列的氨基酸序列(VH-VL)如SEQ ID NO.19所

示：

[0180] EVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKALGYTFTDHEMHWVKQTPVHGLEWIGTIHPGSGVTAYNQKFKGKA
TLTADKSSSTAYMELSTLTSEDSAVYYCTPLWLRDWDGQTTLTVSTGGGGSGGGGSGGGGSALDIQMTQTPKFMS
TSVGDVSVTCKASQNVATNVVWFQQKSGQSPKALIIYSASYRYSQVDPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC
QQYNNYPLTFGAGTKLELKAAGAPVYPDPLEPRGAASAWSHQFEK (SEQ ID NO.19)

[0181] 嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T细胞)

[0182] 如本文所用,术语“CAR-T细胞”、“CAR-T”、“本发明CAR-T细胞”均指本发明第六方面所述的CAR-T细胞,本发明CAR-T细胞可靶向CD155蛋白,用来治疗CD155高表达的肿瘤,尤其是实体瘤。

[0183] CAR-T细胞较其它基于T细胞的治疗方式存在以下优势:(1) CAR-T细胞的作用过程不受MHC的限制;(2) 鉴于很多肿瘤细胞表达相同的肿瘤抗原,针对某一种肿瘤抗原的CAR基因构建一旦完成,便可以广泛利用;(3) CAR既可以利用肿瘤蛋白质抗原,又可利用糖脂类非蛋白质抗原,扩大了肿瘤抗原的靶点范围;(4) 使用患者自体细胞降低了排异反应的风险;(5) CAR-T细胞具有免疫记忆功能,可以长期在体内存活。

[0184] 在本发明中,本发明的CAR包含(i)胞外结构域,其包含TIGIT的胞外段蛋白;(ii)任选的绞链区;(iii)跨膜域;(iv)共刺激因子;和(v)CD3 ζ 的信号传导结构域。

[0185] 嵌合抗原受体NK细胞 (CAR-NK细胞)

[0186] 如本文所用,术语“CAR-NK细胞”、“CAR-NK”、“本发明CAR-NK细胞”均指本发明第一方面所述的CAR-NK细胞。本发明CAR-NK细胞可靶向CD155蛋白,用于治疗CD155高表达的肿瘤,尤其是实体瘤。

[0187] 自然杀伤(NK)细胞是一类主要的免疫效应细胞,通过非抗原特异性途径去保护机体免受病毒感染和肿瘤细胞的侵袭。通过工程化(基因修饰)的NK细胞可能获得新的功能,包括特异性识别肿瘤抗原的能力及具有增强的抗肿瘤细胞毒作用。

[0188] 与自体CAR-T细胞相比,CAR-NK细胞还具有一下优点,例如:(1)通过释放穿孔素和颗粒酶直接杀伤肿瘤细胞,而对机体正常的细胞没有杀伤作用;(2)它们释放很少量的细胞因子从而降低了细胞因子风暴的危险;(3)体外极易扩增及发展为“现成的”产品。除此之外,与CAR-T细胞治疗类似。

[0189] 外源T细胞抗原受体

[0190] 如本文所用,外源T细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)为通过基因转移技术从肿瘤反应性T细胞中克隆出TCR的 α 链和 β 链,通过基因工程的手段,以慢病毒或逆转录病毒为载体,外源性转入到T细胞内的TCR。

[0191] 外源TCR修饰的T细胞能够特异性识别和杀伤肿瘤细胞,并通过优化TCR与肿瘤性特异性抗原的亲合力,可以提高T细胞与肿瘤的亲合力,提高抗肿瘤效果。

[0192] 载体

[0193] 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。

[0194] 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。

[0195] 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。

[0196] 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。

[0197] 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。

[0198] 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)。

[0199] 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。

[0200] 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,以起启动转录。

[0201] 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。

[0202] 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。

[0203] 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、 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。

[0204] 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。

[0205] 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。

[0206] 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。

[0207] 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)。

[0208] 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。

[0209] 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。

[0210] 制剂

[0211] 本发明提供了一种本发明第一方面所述的CAR、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 1×10^5 - 1×10^8 个细胞/ml,较佳地为 1×10^6 - 1×10^7 个细胞/ml,更佳地为 1×10^6 - 5×10^6 个细胞/ml。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。

[0212] 治疗性应用

[0213] 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CD155蛋白,协同激活T细胞,引起细胞免疫应答,从而显著提高其对实体瘤的杀伤效率。

[0214] 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。

[0215] 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。

[0216] 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,CD155的CAR-T细胞引起抗表达CD155的细胞的特异性免疫应答。

[0217] 尽管本文公开的数据具体公开了包括抗CD155的TIGIT的胞外段、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。

[0218] 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。

[0219] 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。

[0220] 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。

[0221] 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。

[0222] 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。

[0223] 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。

[0224] 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。

[0225] 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。

[0226] 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。

[0227] 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。

[0228] 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。

[0229] 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。

[0230] 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。

[0231] 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。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,通过例如静脉回输的方式,施用于患者。

[0232] 本发明的主要优点包括:

[0233] (1) 本发明的工程化免疫细胞可特异性的靶向CD155,从而选择性的杀伤来自特异性高表达CD155的肿瘤。

[0234] (2) 本发明首次发现,本发明的嵌合抗原受体改造的T细胞TIGIT CAR-T对高表达CD155的肿瘤细胞具有显著且特异性的杀伤效果,由于CD155在多种肿瘤细胞高表达,制备的TIGIT CAR-T细胞可用于多种肿瘤患者的治疗。

[0235] (3) 本发明首次发现,本发明的工程化免疫细胞可大大降低CAR-T疗法的脱靶效应,并且可以治疗多种肿瘤。

[0236] (4) 本发明首次发现,含有TIGIT的胞外段或靶向CD155的抗体单链可变区序列的嵌合抗原受体所改造的T细胞可对高表达CD155的肿瘤具有非常优异的杀伤效果,并且对正常细胞没有杀伤作用,具有非常好的特异性。

[0237] (5) 本发明中使用的TIGIT的胞外段是人源的,克服了鼠源单链抗体作为靶向的免疫原性问题。

[0238] (6) 本发明所述TIGIT CAR-T不仅对多种肿瘤具有杀伤作用,同时可以中和、解除由TIGIT介导的对T细胞、NK、DC等免疫细胞功能的抑制作用。

[0239] 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,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0240] 除非特别说明,否则本发明实施例中所用材料和试剂均为市售产品。

[0241] CD155在多种肿瘤中高表达。

[0242] 实施例1

[0243] 使用CCLE数据库调取CD155在肿瘤细胞系中的表达情况(<https://>

portals.broadinstitute.org/ccle/page?gene=PVR),结果如图1所示,CD155在多种实体肿瘤中高表达,甚至在T-cell_lymphoma、lymphoma_Hodgkin等血液瘤中也高表达。

[0244] 实施例2

[0245] 使用组织芯片免疫组化染色多种肿瘤组织及癌旁组织、正常组织,结果如图2所示,CD155在肝癌、前列腺癌、卵巢癌、胃癌、胰腺癌等肿瘤(图2-A)中高表达,在癌旁组织(图2-B)也有中表达,而在正常组织(图2-C)中低表达或者不表达。

[0246] 实施例3

[0247] 进一步使用流式细胞术染色不同肿瘤细胞系CD155的表达,取生长良好的肿瘤细胞,胰酶消化后,对细胞进行抗体染色,结果如图3所示,在肝癌细胞系huh7、前列腺癌细胞系PC3、卵巢癌细胞系ES-1、胃癌细胞系HGC、胰腺癌细胞系PANC1等细胞中,CD155高表达。

[0248] 以CAR胞外抗原识别区为TIGIT胞外段蛋白为例。

[0249] 实施例4

[0250] 构建表达盒的质粒载体,表达盒上的各元件结构和位置关系参考图2,质粒载体原始骨架为空载体(获自上海邦耀生物科技有限公司的慢病毒转移载体)。根据CAR结构序列,设计了三种CAR序列。包括如下元件:

[0251] (1) pELPS-TIGIT-CD8H-BBz:TIGIT ECD+CD8hinge+CD8 α TM+4-1BB+CD3 ζ (SEQ ID NO.6);

[0252] (2) 为了评估有无铰链区对抗肿瘤活性的影响,构建了与pELPS-TIGIT-CD8H-BBz相对应的无铰链区CD8hinge的CAR序列:

[0253] pELPS-TIGIT-BBz:TIGIT ECD+CD8 α TM+4-1BB+CD3 ζ

[0254] (3) pELPS-PVR-CD8H-BBz:anti-CD155 scfv+CD8hinge+CD8 α TM+4-1BB+CD3 ζ (SEQ ID NO.10);

[0255] 其前端具有CD8 α 信号肽。

[0256] 质粒设计后图谱交给质粒公司合成从公司购买得到。得到的慢病毒质粒载体命名为pELPS-TIGIT-CD8H-BBz和pELPS-TIGIT-BBz、pELPS-PVR-CD8H-BBz质粒,如图4所示。

[0257] 以下质粒pELPS-TIGIT-CD8H-BBz简称为CD8H-CD8TM,pELPS-TIGIT-BBz简称为CD8TM,统一称为TIGIT-CAR,获得的CAR-T称为TIGIT-CAR-T,pELPS-PVR-CD8H-BBz简称为PVRbbz,获得的CAR-T称为PVRbbz-CAR-T。

[0258] 实施例5

[0259] 构建含表达上述嵌合抗原受体的慢病毒

[0260] 方法如下:

[0261] 用常规方法,将实施例1两种目的质粒和慢病毒包装质粒psPAX2和慢病毒包膜质粒pMD2.G,利用转染试剂PEI将三质粒系统转染293T细胞,收获培养液上清,经超滤和超离浓缩后得到表达目的元件的慢病毒。

[0262] 实施例6

[0263] 构建表达嵌合抗原受体的T细胞

[0264] 使用磁珠法从人血中分离出T细胞,经CD3/CD28复合物激活后,使用包装好的慢病毒感染,48h流式细胞术检测表达水平。具体流程如下:

[0265] (1) 在350mL离心管中先加入淋巴细胞分离液,之后缓慢地保持界面清晰的状态下

将血液加入到淋巴细胞分离液上层(淋巴细胞分离液与血液的体积比为2:1),800g离心25分钟(期间离心机设定升速为1,降速为0)。

[0266] (2) 离心结束后,小心吸取真核细胞层,加入PBS轻轻吹打混匀,500g离心10分钟。

[0267] (3) 用PBS重悬细胞后,对细胞进行计数。计数后,300g离心10分钟后,弃去上清,加入含10%血清的x-vivo培养基的缓冲液(每 1×10^7 个细胞加入70 μ L)

[0268] (4) 按照 1×10^7 个细胞加入20 μ L CD4/CD8磁珠的用量加入磁珠后,4 $^{\circ}$ C用细胞缓冲液清洗后,再次重悬细胞。

[0269] (5) 将分离柱放入磁场,用缓冲液润洗柱子后,加入细胞悬液,待液体流尽后,用缓冲液冲洗柱子两次。

[0270] (6) 将柱子移出磁场,加入缓冲液后,迅速用活塞将细胞推入离心管中,300g离心10分钟。

[0271] (7) 离心结束后,弃去上清,加入x-vivo完全培养基(x-vivo培养基含有10%的血清,并按1:1000的比例加入IL-7、IL-15、IL-21)重悬细胞,对细胞进行计数。

[0272] (8) 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,按1:100的比例加入CD3和CD28的复合物对细胞进行激活。

[0273] (9) 激活48h后,可对细胞进行计数,用于后续慢病毒的感染。根据所制备病毒的滴度,在T细胞中加入慢病毒,32 $^{\circ}$ C 1800rpm离心1h,放于培养箱中培养,12h后换液,48h流式细胞术检测CAR的表达。

[0274] 实施例7

[0275] 在24孔板中铺入20万个293t细胞,细胞贴壁后加入不同数量的病毒,48h后通过检测细胞中TIGIT的表达,计算出病毒的滴度。结果如图5所示,1 μ L的病毒量就可以得到很高的阳性率,表现病毒滴度很高。

[0276] 实施例8

[0277] 检测TIGIT-CAR-T细胞的CAR表达水平;取被感染的CAR-T细胞,同批未感染的T细胞作为对照,细胞与TIGIT的流式抗体共孵育30分钟后,洗两次后使用流式细胞仪Fortessa检测,表达结果通过Flow Jo分析得到。结果见图6。图6结果显示,两种病毒感染后的T细胞的CAR表达水平分别为58.3%和60.8%。

[0278] 实施例9

[0279] 对不同种癌细胞(比如人前列腺癌细胞系PC3、胰腺癌细胞系Panc-1、卵巢癌细胞系OVCAR-83种癌细胞系)进行杀伤效果的检测。

[0280] 在低吸附孔板中加入靶细胞 2×10^4 个/孔,按效靶比(效应细胞的数量:靶细胞的数量)4:1、2:1、1:1、0.5:1、0:1加入相应数量的CAR-T细胞,同时做不同梯度靶细胞孔(0、1、2、4、8、10万)。共孵育(co-culture:CC)12-48h后,由于靶细胞可以表达荧光素酶,加入底物后,吸光值与细胞数量成线性关系,可以通过读值体现出两种CAR-T细胞对靶细胞的杀伤效果。

[0281] 由图7结果看来,未经修饰的T细胞对靶细胞基本无杀伤功能,但两种CAR-T细胞杀伤效果明显,且随着效靶比的增加,杀伤效果也逐步上升,说明当靶向CD155的CAR胞外抗原识别区为TIGIT胞外段蛋白时,上述TIGIT-CAR-T细胞有很好的抗肿瘤活性的效果。

[0282] 以CAR胞外抗原识别区为抗原特异性的单链抗体片段为例。

[0283] 实施例10

[0284] 构建表达嵌合抗原受体 (PVRbbz) 的T细胞

[0285] 使用上述方法包装慢病毒与采集分离得到T细胞后,根据病毒滴度计算,以MOI=10感染T细胞,32℃1800rpm离心2h,放于培养箱中培养,12h后换液,48h流式细胞术检测CAR的表达。

[0286] 结果见图8所示,阳性率可达61.5%。

[0287] 实施例11

[0288] 验证所述PVRbbz CAR-T特异性的杀伤CD155阳性的细胞

[0289] 使用crispr cas9将PC3细胞的CD155敲除,敲除结果如图9所示,在低吸附孔板中加入靶细胞 2×10^4 个/孔,按效靶比(效应细胞的数量:靶细胞的数量)0.625:1加入相应数量的CAR-T细胞,共孵育(co-culture:CC)12h后,检测杀伤效果,结果如图10所示,PVRbbz对CD155 KO的PC3细胞不具有杀伤效果,显示PVRbbzCAR-T可特异性的杀伤CD155阳性的肿瘤细胞,而对CD155阴性的细胞没有作用。

[0290] 实施例12

[0291] PVRbbz CAR-T对不同种癌细胞(人前列腺癌细胞系PC3、胰腺癌细胞系Panc-1、卵巢癌细胞系ES-1、骨肉瘤细胞系U205、肝癌细胞系Huh7、血液瘤细胞系mm1s 6种癌细胞系)进行杀伤效果的检测。

[0292] 在低吸附孔板中加入靶细胞 2×10^4 个/孔,按不同效靶比(效应细胞的数量:靶细胞的数量)加入相应数量的CAR-T细胞,共孵育(co-culture:CC)18h后通过光度计检测杀伤效率,同时使用IVIS成像系统进行拍照,结果如图11所示:PVRbbz对人前列腺癌细胞系PC3、胰腺癌细胞系Panc-1、卵巢癌细胞系ES-1、骨肉瘤细胞系U205、肝癌细胞系Huh7、血液瘤细胞系mm1s等6种癌细胞系都具有明显的杀伤效果,即使在低效靶比0.125:1情况下依然具有较强的杀伤效果。

[0293] 实施例13

[0294] PVRbbz CAR-T在骨转移模型中迅速的消退肿瘤

[0295] 通过胫骨注射人骨肉瘤细胞系143B构建的骨转移骨肉瘤模型,使用效应细胞 5×10^6 个/只小鼠,通过IVIS活体成像系统拍照成像追踪肿瘤变化,结果如图12所示,PVRbbz CAR-T展现出明显的抗肿瘤效果,在处死小鼠后体内主要脏器未发现明显毒性(如图13)。

[0296] 实施例14

[0297] CD155抑制T细胞的免疫功能

[0298] 将CD155敲除的PC3细胞(PC3-CD155KO)或未敲除CD155的PC3细胞(PC3-WT)与T细胞以1:1比例共孵育24h后通过流式检测T细胞(CD4与CD8)IFN γ 、TNF α 、颗粒酶B(GraB)的表达,结果如图14A所示,与CD155阳性的肿瘤细胞共孵育后明显降低了T细胞表达功能性细胞因子的能力。如在CD8中,与PC3-CD155KO细胞共孵育的T细胞IFN γ 表达比例为48.4%,TNF α 为70%,颗粒酶B为58.2%,与PC3-WT细胞共孵育的T细胞IFN γ 表达比例为33.4%,TNF α 为36.3%,颗粒酶B为43.9%。

[0299] 将CD155敲除的PC3-PSMA⁺细胞(PC3+CD155KO)或未敲除CD155的PC3-PSMA⁺细胞(PC3+WT)与靶向PSMA的PSMA-CAR-T细胞以低(靶抗原多)效靶比E:T(效应细胞:靶细胞):1:1、0.5:1、0.25:1、0.125:1共孵育12h后计算杀伤效率。结果如图14B,CD155的表达能明显降

低PSMA-CAR-T对靶细胞的杀伤效果。

[0300] 综上所述,本发明发现CD155在肝癌、前列腺癌、卵巢癌、胃癌、胰腺癌等实体肿瘤肿瘤及血液瘤中高表达,均一的抗原表达对于基于CAR T细胞的治疗非常重要,因为肿瘤靶标异质性是使用这些功能强大而特异的疗法治疗恶性肿瘤的一个限制因素,本发明靶向CD155的CAR T细胞,可对多种肿瘤细胞(包括实体瘤,液体瘤)表现出强大的活性。同时在体内也可以在没有毒性作用下发挥明显的抗肿瘤效果。靶向CD155的细胞免疫疗法或可在多种肿瘤中发挥抗肿瘤效果。

[0301] 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。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 华东师范大学
 [0003] 上海邦耀生物科技有限公司
 [0004] <120> 靶向多种肿瘤的新型CAR-T细胞及其制备和方法
 [0005] <130> P2020-2785
 [0006] <150> CN 201911415453.X
 [0007] <151> 2019-12-31
 [0008] <160> 20
 [0009] <170> SIPOSequenceListing 1.0
 [0010] <210> 1
 [0011] <211> 120
 [0012] <212> PRT
 [0013] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0014] <400> 1
 [0015] Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
 [0016] 1 5 10 15
 [0017] Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln
 [0018] 20 25 30
 [0019] Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys
 [0020] 35 40 45
 [0021] Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val
 [0022] 50 55 60
 [0023] Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn
 [0024] 65 70 75 80
 [0025] Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
 [0026] 85 90 95
 [0027] Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu
 [0028] 100 105 110
 [0029] His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro
 [0030] 115 120
 [0031] <210> 2
 [0032] <211> 360
 [0033] <212> DNA
 [0034] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0035] <400> 2
 [0036] atgatgacag gcacaataga aacaacgggg aacatttctg cagagaaagg tggctctatc 60
 [0037] atcttacaat gtcacctctc ctccaccacg gcacaagtga cccaggtcaa ctgggagcag 120
 [0038] caggaccagc ttctggccat ttgtaatgct gacttggggg ggcacatctc cccatccttc 180
 [0039] aaggatcgag tggccccagg tcccggcctg ggccctaccc tccagtcgct gaccgtgaac 240
 [0040] gatacagggg agtacttctg catctatcac acctaccctg atgggacgta cactgggaga 300
 [0041] atcttcctgg aggtcctaga aagctcagtg gctgagcacg gtgccaggtt ccagattcca 360

[0042] <210> 3
 [0043] <211> 21
 [0044] <212> PRT
 [0045] <213> 人工序列 (artificial sequence)
 [0046] <400> 3
 [0047] Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala
 [0048] 1 5 10 15
 [0049] Pro Leu Ala Ser Gly
 [0050] 20
 [0051] <210> 4
 [0052] <211> 42
 [0053] <212> PRT
 [0054] <213> 人工序列 (artificial sequence)
 [0055] <400> 4
 [0056] Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 [0057] 1 5 10 15
 [0058] Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 [0059] 20 25 30
 [0060] Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 [0061] 35 40
 [0062] <210> 5
 [0063] <211> 112
 [0064] <212> PRT
 [0065] <213> 人工序列 (artificial sequence)
 [0066] <400> 5
 [0067] Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
 [0068] 1 5 10 15
 [0069] Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 [0070] 20 25 30
 [0071] Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 [0072] 35 40 45
 [0073] Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 [0074] 50 55 60
 [0075] Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 [0076] 65 70 75 80
 [0077] Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 [0078] 85 90 95
 [0079] Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 [0080] 100 105 110
 [0081] <210> 6
 [0082] <211> 364
 [0083] <212> PRT

[0084]	<213> 人工序列(artificial sequence)															
[0085]	<400> 6															
[0086]	Met	Arg	Trp	Cys	Leu	Leu	Leu	Ile	Trp	Ala	Gln	Gly	Leu	Arg	Gln	Ala
[0087]	1			5						10					15	
[0088]	Pro	Leu	Ala	Ser	Gly	Met	Met	Thr	Gly	Thr	Ile	Glu	Thr	Thr	Gly	Asn
[0089]				20					25					30		
[0090]	Ile	Ser	Ala	Glu	Lys	Gly	Gly	Ser	Ile	Ile	Leu	Gln	Cys	His	Leu	Ser
[0091]				35					40					45		
[0092]	Ser	Thr	Thr	Ala	Gln	Val	Thr	Gln	Val	Asn	Trp	Glu	Gln	Gln	Asp	Gln
[0093]				50					55					60		
[0094]	Leu	Leu	Ala	Ile	Cys	Asn	Ala	Asp	Leu	Gly	Trp	His	Ile	Ser	Pro	Ser
[0095]	65					70						75				80
[0096]	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Ala	Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Thr	Leu	Gln
[0097]						85						90				95
[0098]	Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Asp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Phe	Cys	Ile	Tyr	His	Thr
[0099]						100								105		110
[0100]	Tyr	Pro	Asp	Gly	Thr	Tyr	Thr	Gly	Arg	Ile	Phe	Leu	Glu	Val	Leu	Glu
[0101]						115								120		125
[0102]	Ser	Ser	Val	Ala	Glu	His	Gly	Ala	Arg	Phe	Gln	Ile	Pro	Thr	Thr	Thr
[0103]						130								135		140
[0104]	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro
[0105]	145					150								155		160
[0106]	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val
[0107]						165								170		175
[0108]	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro
[0109]						180								185		190
[0110]	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu
[0111]						195								200		205
[0112]	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro
[0113]						210								215		220
[0114]	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys
[0115]	225					230								235		240
[0116]	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe
[0117]						245								250		255
[0118]	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu
[0119]						260								265		270
[0120]	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp
[0121]						275								280		285
[0122]	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys
[0123]						290								295		300
[0124]	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala
[0125]	305					310								315		320

[0126] Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 [0127] 325 330 335
 [0128] Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 [0129] 340 345 350
 [0130] Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 [0131] 355 360
 [0132] <210> 7
 [0133] <211> 1092
 [0134] <212> DNA
 [0135] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0136] <400> 7
 [0137] atgcgctggt gtctcctcct gatctgggcc caggggctga ggcaggetcc cctcgcctca 60
 [0138] ggaatgatga caggcacaat agaaacaacg gggaacattt ctgcagagaa aggtggctct 120
 [0139] atcatcttac aatgtcacct ctctccacc acggcacaag tgaccaggt caactgggag 180
 [0140] cagcaggacc agcttctggc catttgaat gctgacttgg ggtggcacat ctccccatcc 240
 [0141] ttcaaggatc gagtggcccc aggtcccggc ctgggctca ccctccagtc gctgaccgtg 300
 [0142] aacgatacag gggagtactt ctgcatctat cacacctacc ctgatgggac gtacactggg 360
 [0143] agaattctcc tggaggtcct agaaagctca gtggctgagc acggtgccag gttccagatt 420
 [0144] ccaaccacga cgccagcgcc gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc 480
 [0145] ctgtccctgc gcccagagge gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgca caccaggggg 540
 [0146] ctggacttgc cctgtgatat ctacatctgg gcgcccttgg ccgggacttg tggggtcctt 600
 [0147] ctctgtcac tggttatcac ctttactgc aaacggggca gaaagaaact cctgtatata 660
 [0148] ttcaaacac ctttatgag accagtacaa actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc 720
 [0149] cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt gaactgagag tgaagtccag caggagcgca 780
 [0150] gacgccccg cgtacaagca gggccagaac cagctctata acgagctcaa tctaggacga 840
 [0151] agagaggagt acgatgtttt ggacaagaga cgtggccggg accctgagat ggggggaaag 900
 [0152] ccgagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg 960
 [0153] gaggctaca gtgagattgg gatgaaagc gagcgccgga ggggcaaggg gcacgatggc 1020
 [0154] ctttaccagg gtctcagtac agccaccaag gacacctacg acgcccttca catgcaggcc 1080
 [0155] ctgccccctc gc 1092
 [0156] <210> 8
 [0157] <211> 45
 [0158] <212> PRT
 [0159] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0160] <400> 8
 [0161] Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 [0162] 1 5 10 15
 [0163] Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 [0164] 20 25 30
 [0165] Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 [0166] 35 40 45
 [0167] <210> 9

[0168] <211> 24
 [0169] <212> PRT
 [0170] <213> 人工序列 (artificial sequence)
 [0171] <400> 9
 [0172] Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 [0173] 1 5 10 15
 [0174] Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 [0175] 20
 [0176] <210> 10
 [0177] <211> 512
 [0178] <212> PRT
 [0179] <213> 人工序列 (artificial sequence)
 [0180] <400> 10
 [0181] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 [0182] 1 5 10 15
 [0183] His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
 [0184] 20 25 30
 [0185] Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr
 [0186] 35 40 45
 [0187] Thr Phe Thr Asp His Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His
 [0188] 50 55 60
 [0189] Gly Leu Glu Trp Ile Gly Thr Ile His Pro Gly Ser Gly Val Thr Ala
 [0190] 65 70 75 80
 [0191] Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 [0192] 85 90 95
 [0193] Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Thr Leu Thr Ser Glu Asp Ser
 [0194] 100 105 110
 [0195] Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Pro Leu Trp Leu Arg Arg Asp Trp Gly Gln
 [0196] 115 120 125
 [0197] Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 [0198] 130 135 140
 [0199] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr
 [0200] 145 150 155 160
 [0201] Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
 [0202] 165 170 175
 [0203] Lys Ala Ser Gln Asn Val Ala Thr Asn Val Val Trp Phe Gln Gln Lys
 [0204] 180 185 190
 [0205] Ser Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr
 [0206] 195 200 205
 [0207] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 [0208] 210 215 220
 [0209] Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe

[0210]	225	230	235	240
[0211]	Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys			
[0212]		245	250	255
[0213]	Leu Glu Leu Lys Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro			
[0214]		260	265	270
[0215]	Leu Glu Pro Arg Gly Ala Ala Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu			
[0216]		275	280	285
[0217]	Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile			
[0218]		290	295	300
[0219]	Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala			
[0220]	305	310	315	320
[0221]	Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr			
[0222]		325	330	335
[0223]	Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu			
[0224]		340	345	350
[0225]	Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile			
[0226]		355	360	365
[0227]	Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp			
[0228]		370	375	380
[0229]	Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu			
[0230]	385	390	395	400
[0231]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly			
[0232]		405	410	415
[0233]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr			
[0234]		420	425	430
[0235]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys			
[0236]		435	440	445
[0237]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys			
[0238]		450	455	460
[0239]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg			
[0240]	465	470	475	480
[0241]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala			
[0242]		485	490	495
[0243]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
[0244]		500	505	510
[0245]	<210> 11			
[0246]	<211> 1536			
[0247]	<212> DNA			
[0248]	<213> 人工序列 (artificial sequence)			
[0249]	<400> 11			
[0250]	atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60			
[0251]	ccggaggttc agctgcagca gtctggggct gagctggtga ggctgggac ttcagtgaag 120			

[0294]	100	105	110
[0295]	Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Gly Ala Ala		
[0296]	115	120	125
[0297]	Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys		
[0298]	130	135	
[0299]	<210> 13		
[0300]	<211> 414		
[0301]	<212> DNA		
[0302]	<213> 人工序列 (artificial sequence)		
[0303]	<400> 13		
[0304]	gcactcgata tccagatgac acagactcca aaattcatgt ccacatcagt aggagacagg 60		
[0305]	gtcagcgtca cctgcaaggc cagtcagaat gtggctacta atgtagtctg gtttcaacag 120		
[0306]	aaatcagggc aatctcctaa agcactgatt tactcggcat cctaccgta cagtggagtc 180		
[0307]	cctgatcgct tcacaggcag tggatctggg acagatttca ctctcacat cagcaatgtg 240		
[0308]	cagtctgaag acttggcaga gtatttctgt cagcaatata acaactatcc tctcacgttc 300		
[0309]	ggtgctggga ccaagctgga gctgaaagcg gccgcaggtg cgccggtgcc gtatccagat 360		
[0310]	ccgctggaac cgcgtggggc cgcaagcgt tggagccacc cgcagttcga aaaa 414		
[0311]	<210> 14		
[0312]	<211> 115		
[0313]	<212> PRT		
[0314]	<213> 人工序列 (artificial sequence)		
[0315]	<400> 14		
[0316]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr		
[0317]	1	5	10 15
[0318]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His		
[0319]	20	25	30
[0320]	Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile		
[0321]	35	40	45
[0322]	Gly Thr Ile His Pro Gly Ser Gly Val Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0323]	50	55	60
[0324]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0325]	65	70	75 80
[0326]	Met Glu Leu Ser Thr Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0327]	85	90	95
[0328]	Thr Pro Leu Trp Leu Arg Arg Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr		
[0329]	100	105	110
[0330]	Val Ser Thr		
[0331]	115		
[0332]	<210> 15		
[0333]	<211> 345		
[0334]	<212> DNA		
[0335]	<213> 人工序列 (artificial sequence)		

- [0336] <400> 15
- [0337] gaggttcagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgagc ctgggacttc agtgaagctg 60
- [0338] tcttcaagg ctttgggcta cacatttact gaccatgaaa tgcactgggt gaaacagaca 120
- [0339] cctgtgcatg gcctggaatg gattggaact attcatccag gaagtgggtg tactgcctac 180
- [0340] aatcagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
- [0341] atggagctca gcacctgac atctgaagac tctgctgtct attactgtac accactttgg 300
- [0342] ttacgacggg actggggcca aggcaccact ctcacagtgt cgaca 345
- [0343] <210> 16
- [0344] <211> 15
- [0345] <212> PRT
- [0346] <213> 人工序列 (artificial sequence)
- [0347] <400> 16
- [0348] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
- [0349] 1 5 10 15
- [0350] <210> 17
- [0351] <211> 63
- [0352] <212> DNA
- [0353] <213> 人工序列 (artificial sequence)
- [0354] <400> 17
- [0355] atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
- [0356] ccg 63
- [0357] <210> 18
- [0358] <211> 21
- [0359] <212> PRT
- [0360] <213> 人工序列 (artificial sequence)
- [0361] <400> 18
- [0362] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
- [0363] 1 5 10 15
- [0364] His Ala Ala Arg Pro
- [0365] 20
- [0366] <210> 19
- [0367] <211> 268
- [0368] <212> PRT
- [0369] <213> 人工序列 (artificial sequence)
- [0370] <400> 19
- [0371] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
- [0372] 1 5 10 15
- [0373] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
- [0374] 20 25 30
- [0375] Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
- [0376] 35 40 45
- [0377] Gly Thr Ile His Pro Gly Ser Gly Val Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe

[0378]	50	55	60
[0379]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0380]	65	70	75 80
[0381]	Met Glu Leu Ser Thr Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0382]		85	90 95
[0383]	Thr Pro Leu Trp Leu Arg Arg Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr		
[0384]		100	105 110
[0385]	Val Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[0386]		115	120 125
[0387]	Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Met Ser		
[0388]		130	135 140
[0389]	Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn		
[0390]		145	150 155 160
[0391]	Val Ala Thr Asn Val Val Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ser Pro		
[0392]		165	170 175
[0393]	Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp		
[0394]		180	185 190
[0395]	Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[0396]		195	200 205
[0397]	Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn		
[0398]		210	215 220
[0399]	Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ala		
[0400]		225	230 235 240
[0401]	Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Gly		
[0402]		245	250 255
[0403]	Ala Ala Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys		
[0404]		260	265
[0405]	<210> 20		
[0406]	<211> 5		
[0407]	<212> PRT		
[0408]	<213> 人工序列 (artificial sequence)		
[0409]	<400> 20		
[0410]	Gly Gly Gly Gly Ser		
[0411]	1	5	

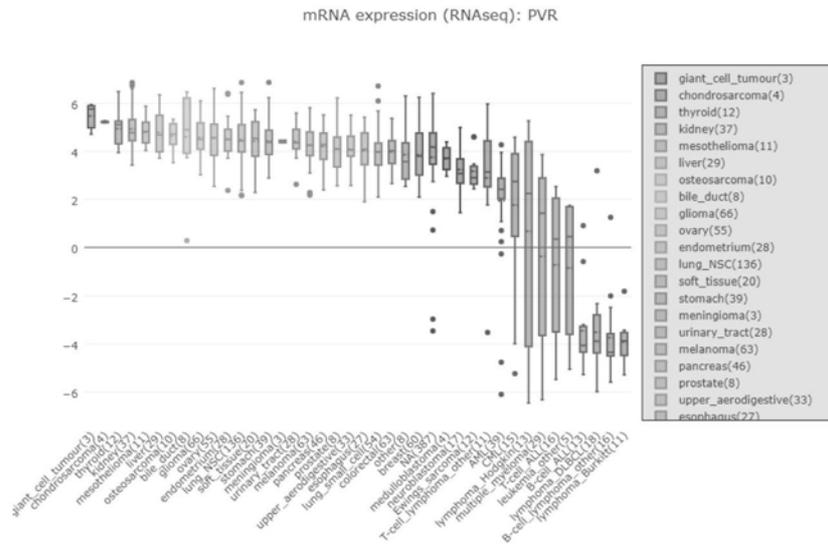


图1

Microarrays of human tumors were stained for IHC to detect the expression of CD155. Representative Images are shown

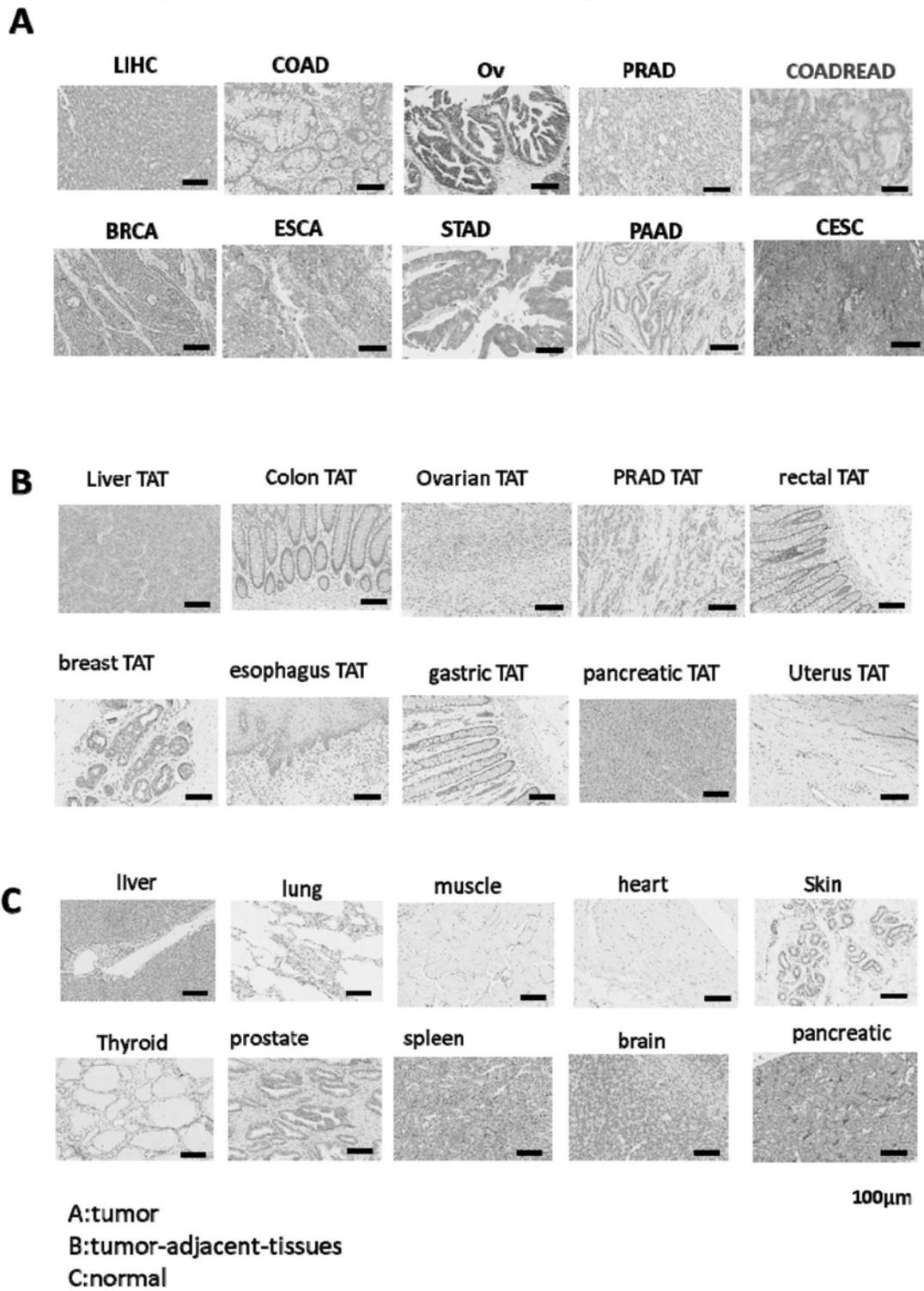


图2

Expression of CD155 in human tumor cell lines were evaluated by FACS.

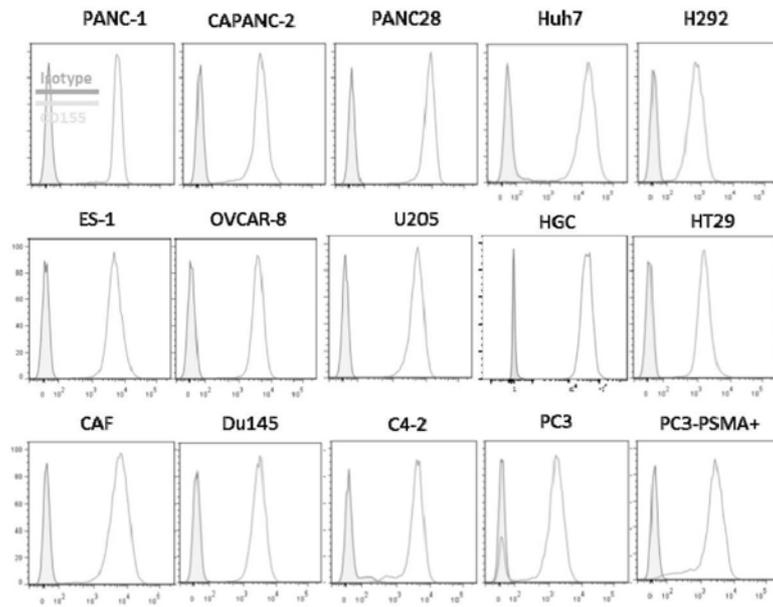


图3

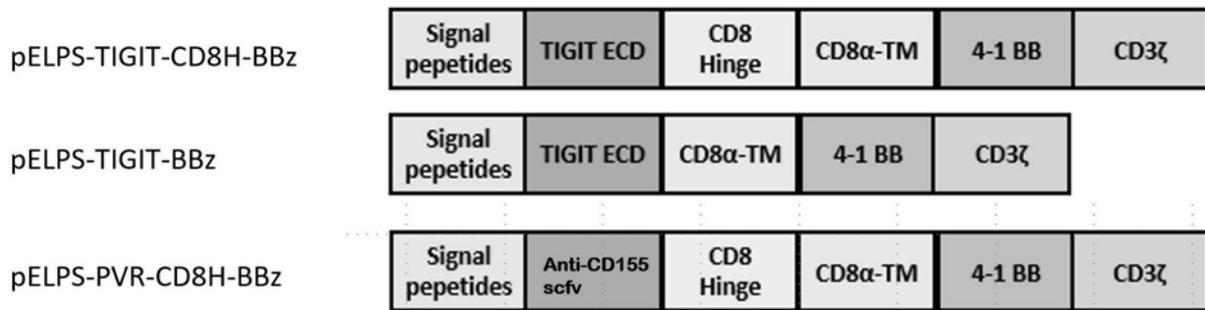


图4

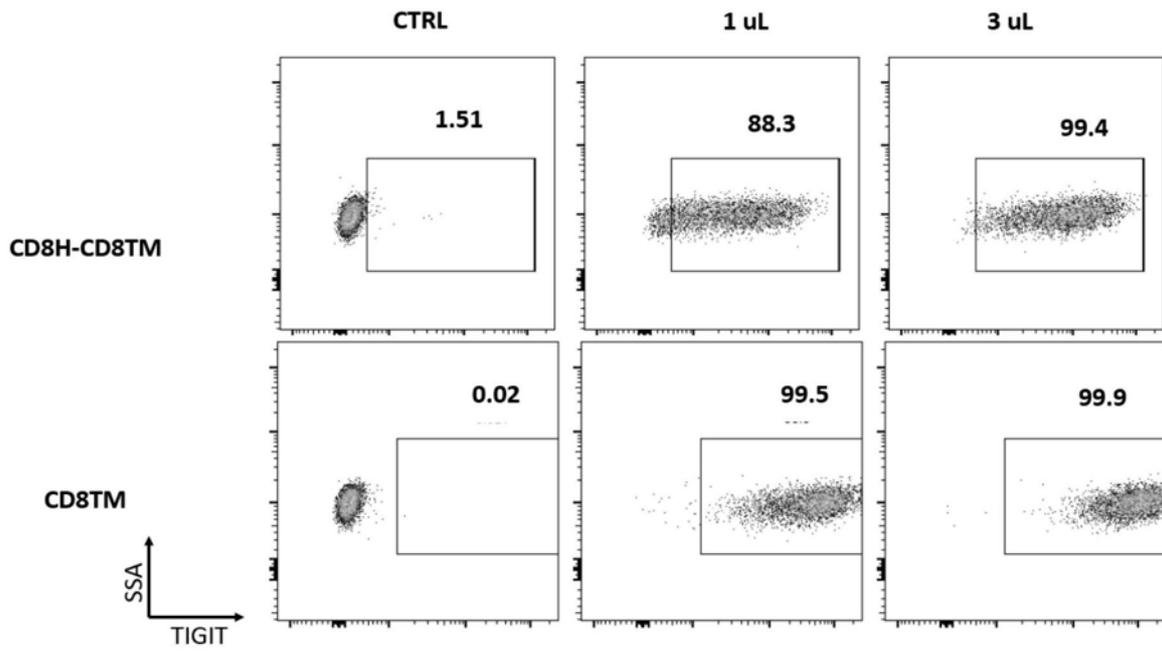


图5

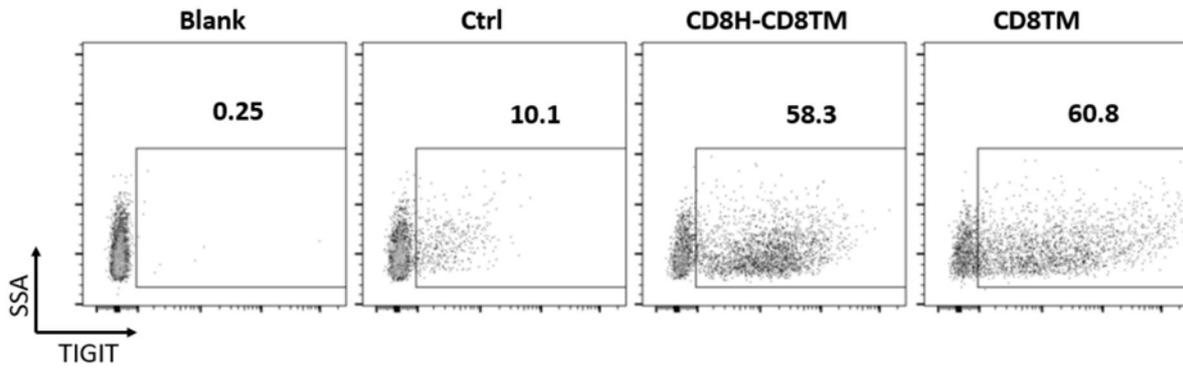


图6

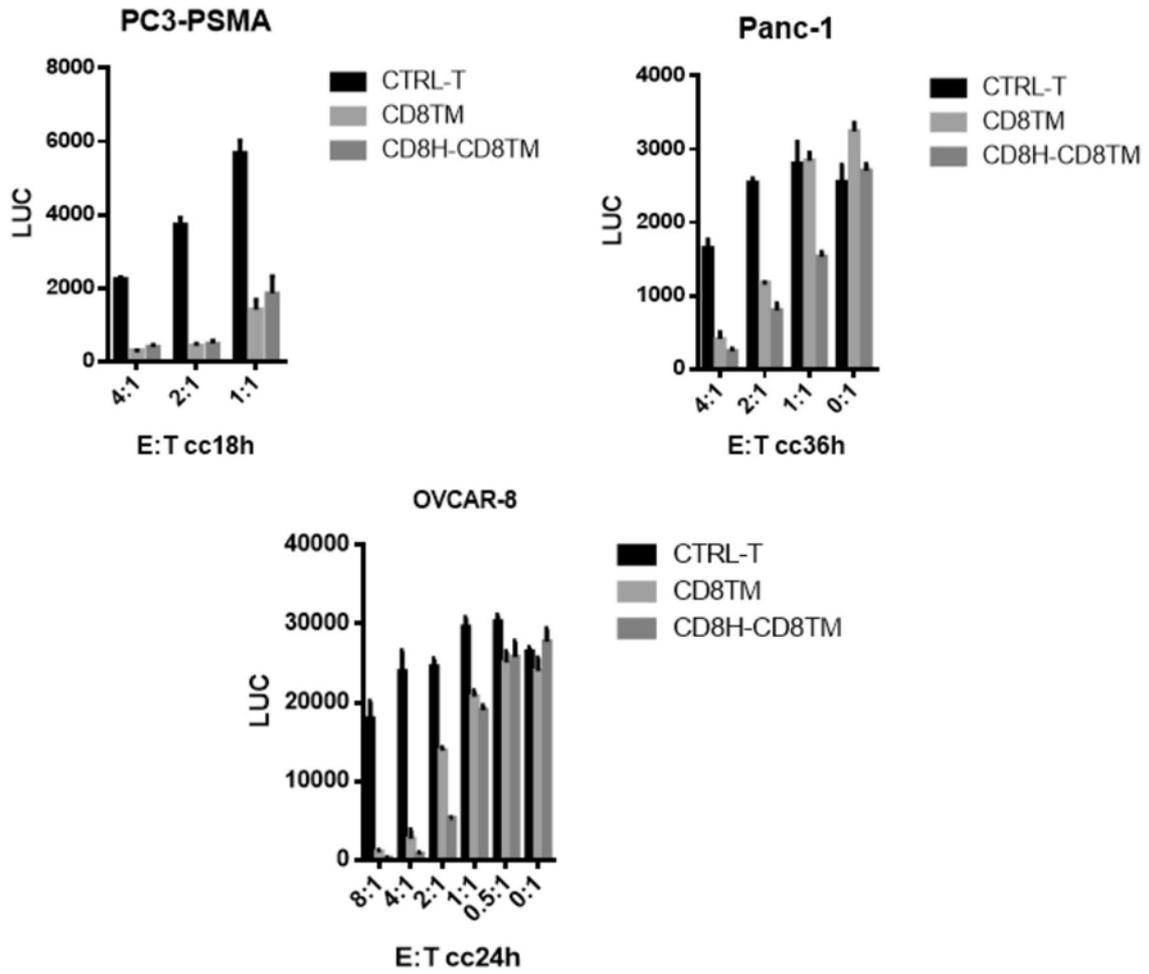


图7

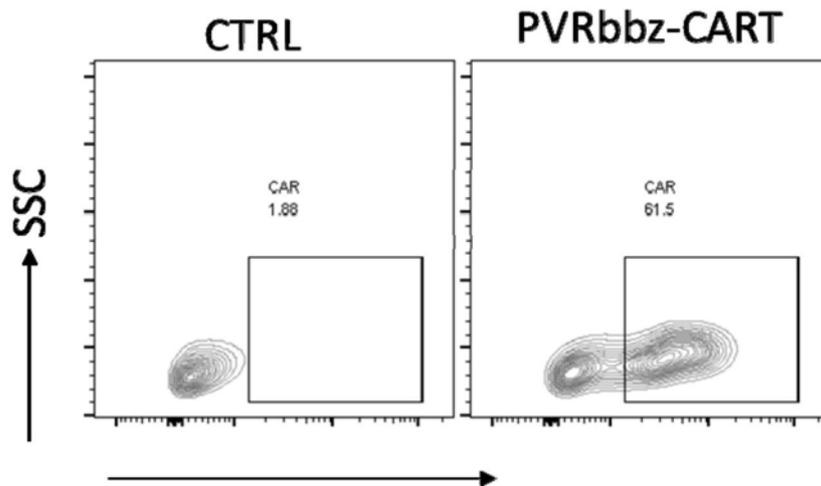


图8

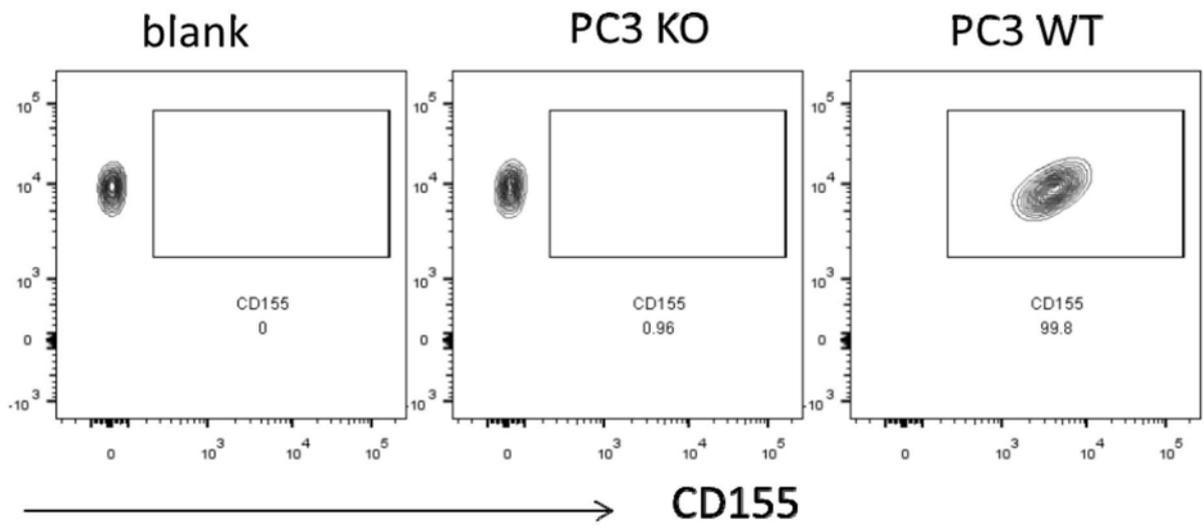


图9

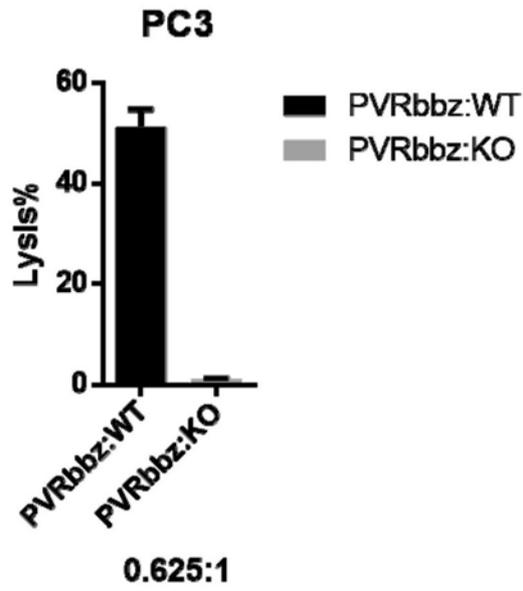


图10

Luciferase assay to measure the cytotoxicity of PVRbbz-CAR-T cells against different cancer cells at different E:T ratios.

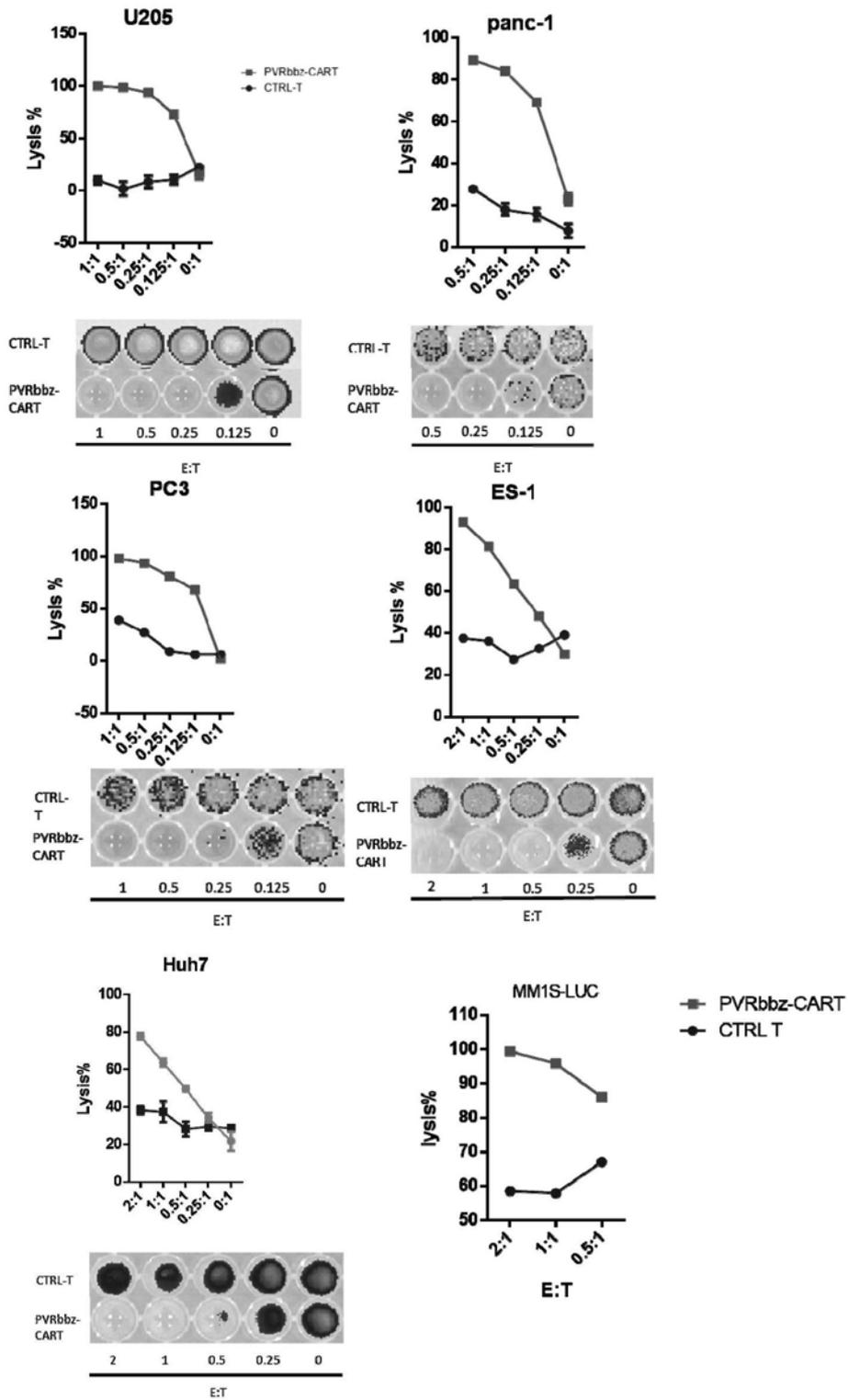


图11

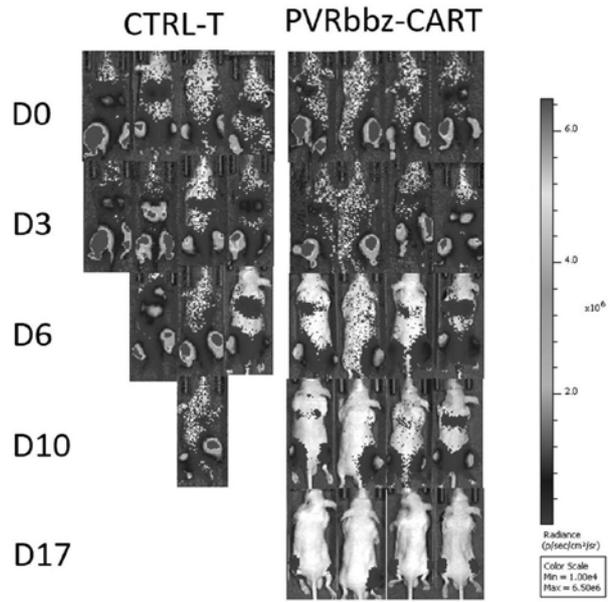


图12

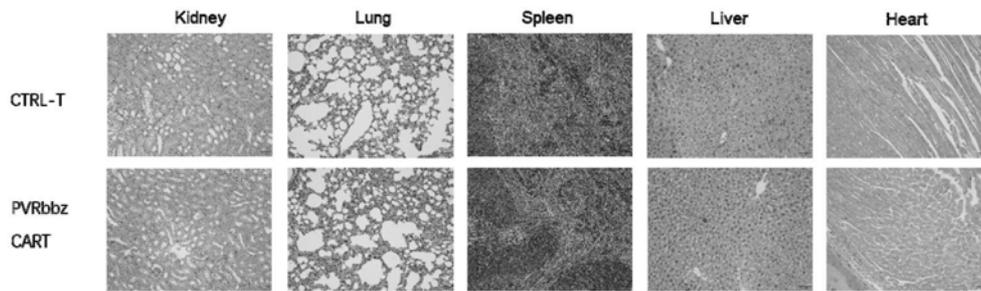


图13

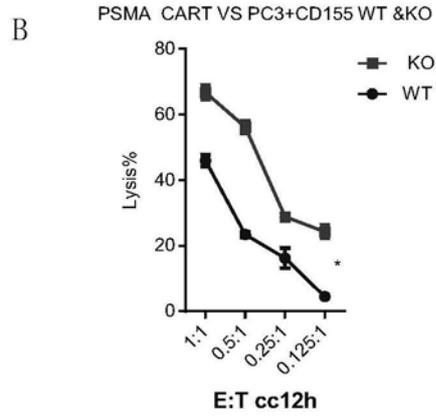
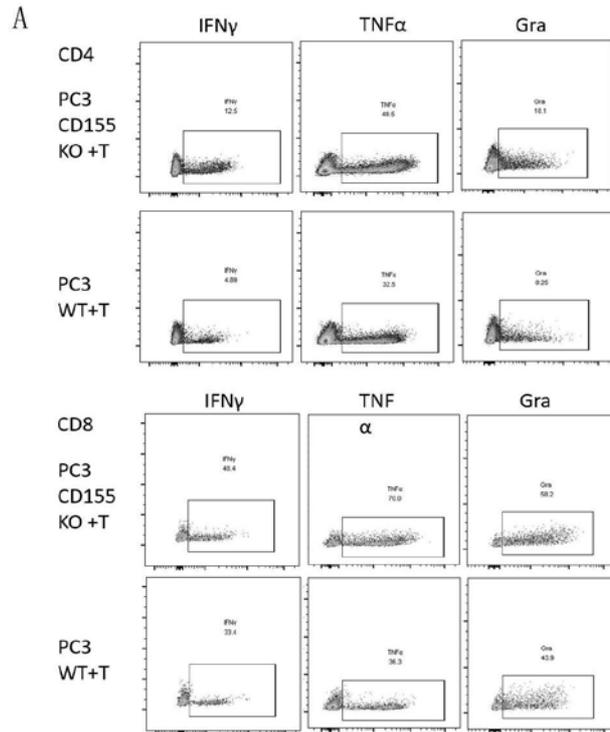


图14