



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104910279 B

(45)授权公告日 2019.02.22

(21)申请号 201510304389.3

C12N 5/10(2006.01)

(22)申请日 2015.06.05

A61K 35/17(2015.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61K 48/00(2006.01)

申请公布号 CN 104910279 A

A61P 35/00(2006.01)

(43)申请公布日 2015.09.16

审查员 刘俊

(73)专利权人 重庆精准生物技术有限公司

地址 400000 重庆市九龙坡区含谷镇含兴路38号

(72)发明人 钱程 杨智

(74)专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司 11275

代理人 王贵君

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

C12N 15/867(2006.01)

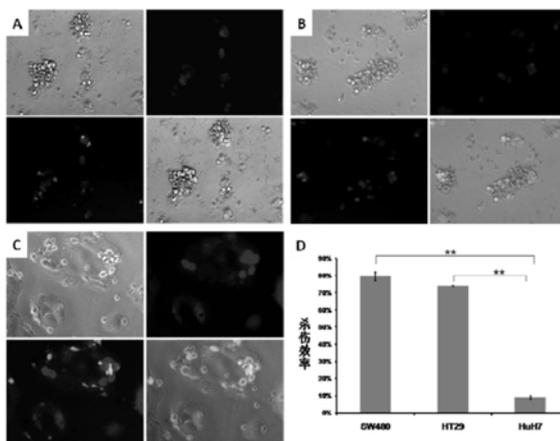
序列表10页 附图4页

(54)发明名称

靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体、慢病毒表达载体及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体、慢病毒表达载体及其制备方法和应用,靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体由前导肽、靶向癌胚抗原的单链抗体、连接ScFv所用的铰链区、跨膜结构域和免疫受体酪氨酸活化基序组成,将该嵌合抗原受体构建成慢病毒表达载体,然后感染免疫细胞,能够在免疫细胞表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体,通过识别肿瘤细胞表面的癌胚抗原,从而杀死表达癌胚抗原的肿瘤,实现肿瘤治疗目的,为肿瘤靶向治疗提供了新的工具。



1. 靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体,其特征在于:所述嵌合抗原受体依次由前导肽、靶向癌胚抗原的单链抗体、连接ScFv所用的铰链区、跨膜结构域、免疫共刺激分子、免疫受体酪氨酸活化基序组成;所述免疫共刺激分子由CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、LCK、ICOS和DAP10胞内结构域中的一种或两种组成;

所述前导肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示;所述靶向癌胚抗原的单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,所述连接ScFv所用的铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示,所述跨膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO.10所示,所述免疫共刺激分子由CD28和CD137胞内结构域组成,所述CD28胞内结构域氨基酸序列如SEQ ID NO.14所示,所述CD137胞内结构域氨基酸序列如SEQ ID NO.16所示,所述免疫受体酪氨酸活化基序的氨基酸序列如SEQ ID NO.12所示。

2. 表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体,其特征在于:所述慢病毒载体的启动子与终止子之间依次连有前导肽、靶向癌胚抗原的单链抗体、连接ScFv所用的铰链区、跨膜结构域和免疫受体酪氨酸活化基序;所述前导肽位于所述启动子下游,所述靶向癌胚抗原的单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。

3. 根据权利要求2所述表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体,其特征在于:所述慢病毒载体的启动子与终止子之间依次前导肽、靶向癌胚抗原的单链抗体、连接ScFv所用的铰链区、跨膜结构域、免疫共刺激分子和免疫受体酪氨酸活化基序;所述前导肽位于所述启动子下游,所述靶向癌胚抗原的单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,所述免疫共刺激分子由CD28和CD137胞内结构域组成。

4. 权利要求1任一项所述靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体或权利要求2~3任一项所述表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体在制备表达靶向癌胚抗原嵌合抗原受体的免疫细胞中的应用。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于:所述免疫细胞为T细胞、B淋巴细胞,NK淋巴细胞、CIK细胞、单核细胞或中性粒细胞。

6. 利用权利要求1任一项所述靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体或权利要求4~5任一项所述表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体制备的表达靶向癌胚抗原嵌合抗原受体的免疫细胞。

7. 权利要求1任一项所述靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体或权利要求4~5任一项所述表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体在制备治疗表达CEA抗原肿瘤的药物中的应用。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于:所述表达CEA抗原肿瘤包括肺癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、胰腺癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫内膜癌、前列腺癌、小肠腺癌、口腔癌或鼻咽癌。

靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体、慢病毒表达载体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物领域,具体涉及靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体,还涉及表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体,以及慢病毒表达载体的制备方法和应用。

背景技术

[0002] 过继细胞治疗(adoptive cell therapy,ACT)是生物治疗技术的一种,对自体免疫细胞(主要是T细胞)进行体外扩增,然后将其回输给肿瘤患者以达到治疗目的的方法,被认为是继手术、放、化疗后的第4种治疗方式,在临床治疗中受到广泛应用。过继细胞治疗广泛应用的主要是:淋巴因子活化的杀伤细胞(lymphokine activated killer cell,LAK),与IL-2联合治疗晚期恶性肿瘤取得了一定疗效;肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes,TIL),临床试验中治疗转移性黑色素瘤取得了较好的效果;细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer cell,CIK),目前国内开展较多的临床试验,对肝癌、肺癌等肿瘤取得了显著的效果。但是目前上述三种治疗方法均需活化T细胞,T细胞活化需要两种活化信号,即T细胞表面的TCR-CD3与MHC-I分子结合为活化的第一信号,决定T细胞对肿瘤细胞的杀伤活性;T细胞表面的共刺激分子与相应配体结合为活化的第二信号,决定T细胞增殖。但肿瘤细胞、肿瘤微环境可下调MHC、配体分子,从而抑制T细胞对肿瘤细胞的杀伤活性。因此需要可进行基因改造,主要有两种方式:基因转导TCR(T cell receptor,TCR)和嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)。

[0003] CAR是模拟TCR功能的人工受体,由抗原识别域、铰链区和跨膜区及胞内信号域依次连接组成,胞内信号域通常为CD3 ζ 链或FcR γ ,或与一种或多种共刺激分子相连,如4-1BB(CD137),CD28,ICOS(CD278)。肿瘤细胞表面的抗原(受体)与嵌合抗原受体的抗体(配体)结合时,通过铰链区和跨膜区将信号传递至胞内,胞内信号域将信号转化为活化信号,激活效应细胞,效应细胞增殖、产生细胞因子从而杀伤肿瘤细胞。嵌合抗原受体较TCR改造更具优势:(1)特异性:抗体(配体)特异性识别抗原(受体);(2)效率高:不会出现转基因TCR与患者内源性TCR发生错配;(3)非MHC-I限制性:不需要与MHC-I分子结合,可克服肿瘤细胞、肿瘤微环境下调MHC-I分子造成的免疫逃逸;(4)抗原选择范围广:抗原可以是糖类、脂类、蛋白质。目前CAR修饰的免疫细胞治疗的临床试验大量开展,其中,抗CD19、CD20CAR修饰的T细胞治疗B系肿瘤效果显著。实体肿瘤临床试验则有抗叶酸嵌合抗原受体治疗卵巢癌,抗碳酸酐酶IX(CAIX)嵌合抗原受体治疗肾癌,抗二唾液酸神经节苷脂(GD2)嵌合抗原受体治疗经母细胞瘤等。

[0004] 癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)是一种糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族,相对分子质量为200kDa,最初由Gold和Freedman报道,表达于上皮源性肿瘤中如结直肠癌,胃癌、肺癌、子宫内膜腺癌、卵巢癌,目前广泛应用于临床辅助诊断。BW431/26是CEA特异性人单克隆抗体,是制备嵌合抗原受体的理想抗体。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的之一在于提供靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体,表达该嵌合抗原受体的免疫细胞(T细胞、NK细胞、B细胞等)可有效杀伤癌胚抗原阳性的肿瘤细胞,而对癌胚抗原阴性的细胞无毒副作用;本发明的目的之二在于提供表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体;本发明的目的之三在于提供靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体或表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体在制备表达靶向癌胚抗原嵌合抗原受体的免疫细胞中的应用;本发明的目的之四在于提供靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体或表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体制备的表达靶向癌胚抗原嵌合抗原受体的免疫细胞;本发明的目的之五在于提供靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体或表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体在制备治疗表达CEA抗原肿瘤的药物中的应用。

[0006] 为实现上述发明目的,经研究,本发明提供如下技术方案:

[0007] 1、靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体依次由前导肽、靶向癌胚抗原的单链抗体、连接ScFv所用的铰链区、跨膜结构域和免疫受体酪氨酸活化基序组成;所述靶向癌胚抗原的单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0008] 本发明中CEA抗原CEA基因家族成员5,CEACAM5 (CD66e),其抗原结合结构域采用CEA特异性人源化单克隆抗体,如BW431/26,ZCE-025,hMN14等;优选为BW431/26来源的抗体结合结构域。

[0009] 本发明中嵌合抗原受体信号传导结构域可以为CD3 ζ 、Fc ϵ RI γ 信号链,优选的,信号传导结构域为CD3 ζ 信号链。

[0010] 作为更优选的,所述嵌合抗原受体依次由前导肽、靶向癌胚抗原的单链抗体、连接ScFv所用的铰链区、跨膜结构域、免疫共刺激分子、免疫受体酪氨酸活化基序组成;所述免疫共刺激分子由CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、LCK、ICOS和DAP10胞内结构域的一种或两种组成;更优选的,所述共刺激信号分子胞内为CD28和CD137结构域的组成。

[0011] 优选的,所述前导肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示;所述连接ScFv所用的铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示,所述跨膜结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO.10所示,所述免疫共刺激分子由CD28和CD137胞内结构域组成,所述CD28胞内结构域氨基酸序列如SEQ ID NO.14所示,所述CD137胞内结构域氨基酸序列如SEQ ID NO.16所示,所述免疫受体酪氨酸活化基序的氨基酸序列如SEQ ID NO.12所示;作为更优选的,CD28位于CD137上游。

[0012] 优选的,所述靶向癌胚抗原的单链抗体的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示,所述前导肽的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;所述连接ScFv所用的铰链区的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示,所述跨膜结构域的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示,所述CD28胞内结构域的核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示,所述CD137胞内结构域的核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示,所述免疫受体酪氨酸活化基序的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示。

[0013] 2、表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体,所述慢病毒载体的启动子与终止子之间依次连有前导肽、靶向癌胚抗原的单链抗体、连接ScFv所用的铰链区、跨膜结构域和免疫受体酪氨酸活化基序;所述前导肽位于所述启动子下游,所述靶向癌胚抗原的单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0014] 优选的,所述慢病毒载体的启动子与终止子之间依次前导肽、靶向癌胚抗原的单链抗体、连接ScFv所用的铰链区、跨膜结构域、免疫共刺激分子和免疫受体酪氨酸活化基

序;所述前导肽位于所述启动子下游,所述靶向癌胚抗原的单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,所述免疫共刺激分子由CD28和CD137胞内结构域组成。

[0015] 3、所述靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体或所述表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体在制备表达靶向癌胚抗原嵌合抗原受体的免疫细胞中的应用。

[0016] 本发明中免疫细胞可以为T细胞、B淋巴细胞,NK淋巴细胞,如CIK细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、单核细胞、中性粒细胞、调节T细胞,优选的所述免疫细胞为外周血来源的T细胞。

[0017] 4、利用所述靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体或所述表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体制备的表达靶向癌胚抗原嵌合抗原受体的免疫细胞。

[0018] 本发明所述将载体导入免疫细胞的方法可以为基因枪法、电转法、病毒转导法,本发明的一个实施方案中所述导入法为病毒转导法。

[0019] 5、所述靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体或所述表达靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的慢病毒表达载体在制备治疗表达CEA抗原肿瘤的药物中的应用。

[0020] 优选的,所述表达CEA抗原肿瘤包括肺癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、胰腺癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫内膜癌、前列腺癌、小肠腺癌、口腔癌或鼻咽癌。

[0021] 本发明中术语“嵌合抗原受体”是人工改造受体,能够将识别肿瘤抗原的特异性分子(如抗体)锚定在免疫细胞(如T细胞)上,使免疫细胞识别肿瘤抗原或病毒抗原和杀死肿瘤细胞或病毒感染的细胞。

[0022] 本发明中术语“T细胞活化相关信号”是指与T细胞活化所需要两个信号,即T细胞表面TCR-CD3复合体与抗原肽-MHC分子结合,提供T细胞活化的第一信号,决定T细胞的杀伤特异性;

[0023] 本发明中术语“共刺激信号分子”(Co-stimulating molecule)是指免疫细胞表面的一些粘附分子,如CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、CD40等,通过与其配体结合,激活免疫细胞的第二信号,增强免疫细胞的增殖能力及细胞因子的分泌功能,延长活化免疫细胞的存活时间。

[0024] 本发明中术语“免疫受体酪氨酸活化基序”(immunoreceptor tyrosine-base activation motifs,ITAM)是指免疫细胞活化相关受体(如BCR/Ig α /Ig β ,TCR/CD3、Fc α R和FcR γ 等)胞浆区所共有的以酪氨酸残基(tyrosine,Y)为基础的氨基酸序列基序,其特征为:两个酪氨酸残基被大约13外其它氨酸残基隔开(\cdots YXX[L/V]X₇₋₁₁YXX[L/V] \cdots),其中酪氨酸是蛋白激酶磷酸化位点,被磷酸化后能够与信号转导途径下游的信号分子结合,导致细胞的活化。

[0025] 发明中术语“肿瘤特异性抗原”(tumor specific antigen,TSA)是肿瘤细胞特有的或只存在于某种肿瘤细胞而不存在于正常细胞的新抗原。

[0026] 发明中术语“肿瘤相关抗原”(tumor-associated antigen,TAA)是指非肿瘤细胞所特有的、正常细胞和其他组织上也存在的抗原,只是其含量在细胞癌变时明显增高的抗原。

[0027] 发明中术语“单链抗体”(single-chain antibody variable region fragment,scFv)是指由抗体VL区氨基酸序列和VH区氨基酸序列经Linker连接而成,具有结合抗原能力的抗体片段。

[0028] 本发明的有益效果在于：本发明公开了靶向癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 的嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR), 其包括前导肽、靶向癌胚抗原的单链抗体 ((single-chain antibody variable region fragment, scFv))、连接 ScFv 所用的铰链区、跨膜结构域、和免疫受体酪氨酸活化基序；将该嵌合抗原受体在免疫细胞中表达后, 可有效杀伤癌胚抗原阳性的肿瘤细胞, 而对癌胚抗原阴性的细胞无毒副作用, 因此能够用于肿瘤的靶向治疗。

附图说明

[0029] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚, 本发明提供如下附图：

[0030] 图1是靶向CEA的嵌合抗原受体的结构示意图。

[0031] 图2是慢病毒表达载体 (LV-EF1 α -ScFv (CEA) -CD3-WPRE) 的示意图 (A) 以及本发明所述慢病毒表达质粒LV-EF1 α -ScFv (CEA) -CD3-WPRE限制性内切酶HindIII酶切电泳鉴定图

[0032] (B), 其中, 1泳道: DNA分子量标记 (HindIII Marker); 2泳道: HindIII酶切慢病毒表达质粒LV-EF1 α -ScFv (CEA) -CD3-WPRE, 得到3341bp, 3216bp, 826bp, 584bp, 553bp, 526bp, 313bp的片段。

[0033] 图3是慢病毒表达质粒LV-EF1 α -ScFv (CEA) -CD3-WPRE修饰T细胞生长情况 (A: 细胞生长形态, 细胞有明显增殖克隆形成; B: 细胞生长曲线)。

[0034] 图4是表达靶向CEA嵌合抗原受体的T细胞抗嵌合原受体表达通过Westernblot检测结果。

[0035] 图5是表达靶向CEA嵌合抗原受体的T细胞经过14天的培养其细胞表型检测结果, CD3阳性率为93.8%, CD3CD4双阳性细胞比率为51.6%, CD3CD8双阳性细胞比率为43.4%, CD3CD56双阳性细胞比率为16.2%。

[0036] 图6是表达靶向CEA嵌合抗原受体的T细胞对CEA阳性和阴性肿瘤细胞的杀伤情况 (A: CAR-T细胞与CEA阳性的结直肠癌SW480细胞共培养24h后, CAR-T细胞与SW480细胞形成葡萄状细胞团; B: CAR-T细胞与CEA阳性的结直肠癌HT29细胞共培养24h后, CAR-T细胞与SW480细胞形成葡萄状细胞团; C: CAR-T细胞与CEA阴性的肝癌HuH7细胞共培养24h后, CAR-T细胞与HuH7细胞无法形成葡萄状细胞团; D: 统计CAR-T细胞对CEA阳性的SW480, HT29和CEA阴性的HuH7细胞的杀伤效率)。

[0037] 图7是比较表达接入CD28CD137共刺激分子结构域的靶向癌胚抗原 (CEA) 的嵌合抗原受体的T细胞与未接入CD28CD137共刺激分子结构域的靶向CEA抗原的嵌合抗原受体的T淋巴细胞对CEA阳性肿瘤细胞的杀伤能力 (A: 不同效靶比下感染Lv-scFV (CEA) -CD3-WPRE和感染Lv-scFV (CEA) -CD28-CD137CD3-WPRE病毒的T细胞对SW480细胞的杀伤效果; B: 不同效靶比下感染Lv-scFV (CEA) -CD3-WPRE和感染Lv-scFV (CEA) -CD28-CD137CD3-WPRE病毒的T细胞对HT29细胞的杀伤效果)。

具体实施方式

[0038] 下面将结合附图, 对本发明的优选实施例进行详细的描述。实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 例如分子克隆实验指南 (第三版, J. 萨姆布鲁克等著) 中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。

[0039] 实施例1、表达靶向癌胚抗原 (CEA) 的嵌合抗原受体的慢病毒制备

[0040] (1) 制备靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体的基因序列

[0041] 设计如下引物,并将其由南京金斯瑞生物科技公司合成,具体引物如下:

[0042] 引物1:5'-aggctagcatgggatggagctgtatcat-3' (SEQ ID NO.1),下划线为NheI限制性内切酶位点;

[0043] 引物2:5'-gattgtcgcacttagcagggggcagggcctgcatgtga-3' (SEQ ID NO.2),下划线为SalI限制性内切酶位点。

[0044] 合成依次含前导肽(又称信号肽)、抗人CEA抗原的单链抗体ScFv, hFc铰链区、跨膜区和免疫受体酪氨酸活化基序的嵌合抗原受体序列,其结构如图1所示。其中前导肽的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示;抗人CEA抗原的单链抗体ScFv的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示;hFc铰链区的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.8;跨膜区的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.10所示;免疫受体酪氨酸活化基序的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.12所示。

[0045] 然后以SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示序列为引物,嵌合抗原受体序列为模板进行PCR扩增,反应体系按KOD FX NEO DNA聚合酶(购自TOYOBO公司)说明书加样,PCR反应条件为95℃预变性5min;95℃变性10s,55℃退火15s,68℃延伸30s,30个循环。将扩增产物用1%琼脂糖凝胶进行鉴定,结果显示,扩增获得约2000bp的DNA片段,然后用回收试剂盒(Promega公司)进行DNA片段回收,具体方法见说明书,回收获得嵌合抗原受体,将DNA回收片段送南京金斯瑞生物科技公司测序。

[0046] (2) 构建表达嵌合抗原受体的慢病毒载体

[0047] 将克隆获得的编码嵌合抗原受体的基因序列用限制性内切酶NheI和SalI(购自Thermo公司)双酶切,同时用限制性内切酶NheI和SalI酶切慢病毒表达载体pRRLSIN.cPPT.EF1a-GFP.WPRE,酶切反应按说明书进行。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离后用琼脂糖凝胶DNA片段回收试剂盒进行DNA片段回收,然后将的目的片段和载体片段通过T4连接酶(购自Promega公司)进行连接,获得表达嵌合抗原受体的慢病毒载体lv-EF1a-scFv (CEA)-CD3-WPRE,结构如图2中A所示。将慢病毒载体lv-EF1a-scFv (CEA)-CD3-WPRE取5 μl转化大肠杆菌TOP10,30℃培养16h后挑取单克隆,挑取的单克隆在30℃条件下培养12h后用质粒抽提试剂盒(Invitrogen公司)抽提质粒,具体方法见说明书。抽提的质粒经限制性内切酶HindIII酶切电泳鉴定,结果如图2中B所示。

[0048] pRRLSIN.cPPT.EF1a-GFP.WPRE质粒由Trono实验室pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE质粒(<http://www.addgene.org/12252/>)改造而来,具体改造方法如下:利用限制性内切酶ClaI和SalI酶切pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE质粒,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离后用琼脂糖凝胶DNA片段回收试剂盒进行6078bp的DNA片段回收,然后将合成的带有CaII, NheI和SalI酶切位点的EF1a序列片段(SEQ ID NO.17),将SEQ ID NO.17所示序列用限制性内切酶ClaI和SalI同时酶切后与上述回收得到的6078bp的DNA片段进行连接,即可获得pRRLSIN.cPPT.EF1a-GFP.WPRE。

[0049] 按照如上述相同的方法构建Lv-EF1a-scFv (CEA)-CD28-CD137-CD3-WPRE,区别在于合成依次含前导肽(又称信号肽)、抗人CEA抗原的单链抗体ScFv, hFc铰链区、跨膜区、免

疫共刺激分子(CD28和CD137)和免疫受体酪氨酸活化基序的嵌合抗原受体序列。其中前导肽的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示;抗人CEA抗原的单链抗体ScFv的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示;hFc铰链区的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.8;跨膜区的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.10所示;所述CD28胞内结构域核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.14所示;所述CD137胞内结构域核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.16所示;免疫受体酪氨酸活化基序的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.12所示;

[0050] 实施例2、癌胚抗原的嵌合抗原受体修饰T细胞的制备

[0051] (1) 慢病毒的包装

[0052] 本实施例包装慢病毒采用磷酸钙法,具体步骤如下:用含10% (wt) FBS的DMEM培养基培养293T细胞,至较佳状态;然后将293T细胞以 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度传至1个75 cm^2 的培养瓶中培养22h,保证转染时细胞汇合度为70-80%;再用预热的含2% (wt) FBS的DMEM培养基换液,培养2h,备用;将680 μl ddH₂O、20 μg 慢病毒载体lv-EF1 α -scFv (CEA)-CD3-WPRE、20 μg pMDLg/pRRE质粒、20 μg pRSV-Rev和10 μg pMD2.G质粒、100 μl 2.5mM CaCl₂加入15ml离心管中,混合均匀,混匀后用移液器向混合液中逐滴加入2 \times HBS,同时用10ml移液器吹打混匀,混匀后室温静置15min,然后将混合液逐滴加入上述制备的细胞中,继续培养12-16h后,用含10%FBS (wt) 的DMEM培养基更换培液,继续培养48h、72h后分别收集细胞上清并用于病毒纯化。

[0053] (2) 慢病毒的纯化

[0054] 将病毒上清收集在50ml离心管中,3000r/min离心10min;然后用0.45 μm 过滤膜过滤,滤液在3000r/min离心10min至新的50ml离心管;然后根据病毒上清量,分别加入质量分数为50%的PEG6000和4M NaCl,再用医用盐水定容至35mL,使PEG6000终浓度为8.5%,NaCl终浓度为0.3M,定溶后于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置90min,30min/次颠倒混匀;然后于4 $^{\circ}\text{C}$ 、5000r/min条件下离心30min,弃尽上清,用200 μl 含10%FBS的DMEM培养基重悬病毒,1.5mlEP管分装,每管40 μl , -80°C 保存备用。

[0055] (3) 慢病毒滴度测定

[0056] 1) 病毒感染293T细胞

[0057] 感染前将293T细胞以铺24孔板中,取已纯化的病毒1 μl ,用医用生理盐水稀释10倍,再向每孔细胞中加入1 μl Polybrene溶液,然后将1 μl 和9 μl 稀释后的病毒液分别加到293T细胞中,24h后用含10%FBS (wt) 的DMEM培养基换液,感染72h后于1000r/min条件下离心5min以收集细胞,抽提基因组。

[0058] 2) 抽提基因组

[0059] 基因组抽提试剂盒为QIAamp DNA Blood Mini Kit购于Qiagen公司(货号511004),按试剂盒说明书操作,具体如下:将收集的细胞用PBS重悬,1000r/min离心5min,弃尽上清,重复1次;再用200 μL PBS重悬细胞,并加入20 μl 蛋白酶K,200 μl AL裂解液,吹打混匀,56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10min;然后加入200 μl 预冷的乙醇,上下颠倒混匀,将溶液转移至过滤柱中,室温静置1min,8000r/min离心1min,弃尽上清;接着加入700 μl AW1溶液,8000r/min离心1min,弃尽上清;再加入500 μl AW2溶液,8000r/min离心1min,弃尽上清,将过滤柱转移至新

的1.5ml EP管中,开盖静置1min以挥发乙醇;加入50 μ l灭菌ddH₂O(60℃预热),静置2min,12000g/min离心1min。

[0060] 3) qRT-PCR测定病毒滴度

[0061] 反应体系如下:SYBR[®]Premix Ex Taq[™] II(2 \times)10 μ l,上游引物(GAG up)1 μ l,下游引物(GAG dn)1 μ l,抽提的基因组1 μ l,RNase-Free dH₂O 7 μ l,每个样品、标准品至少3个重复孔。然后按如下程序进行扩增:95℃预变性30s,95℃变性5s,60℃退火30s,72℃延伸30s,反应结束后,用分析软件分析数据,根据标准曲线计算病毒滴度。计算结果显示,病毒滴度为1 \times 10⁸TU/ml。

[0062] (4) 慢病毒感染T细胞及感染后细胞的扩增培养

[0063] 1) 人外周血单核细胞的分离

[0064] 用加有抗凝剂的采血管采集外周血约60ml,分装于50ml离心管各30ml,加入7.5ml羟乙基淀粉稀释;室温自然沉降约30min,收集上层血浆,将收集的上层血浆于1400rpm/min条件下离心15min;然后用生理盐水重悬沉淀,约1:1加到淋巴细胞分离液上,梯度离心,400g/min,离心机降速DEC为5,离心15min;离心后,离心管由上至下分为:第一层:血浆层;第二层:环状乳白色淋巴细胞层;第三层:透明分离液层;第四层:红细胞层;取第二层白色淋巴细胞层,并用生理盐水洗涤2次,第一次400g/min,离心10min,第二次1100rpm/min,离心5min,生理盐水重悬细胞,加入含有10%FBS的RPMI 1640完全培养基培养,得人外周血单核细胞。

[0065] 2) 慢病毒载体感染T淋巴细胞

[0066] 用含10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养基培养新制备的单个核细胞PBMC,第1天加入抗CD3单克隆抗体活化;前3天进行慢病毒感染;加入20MOI的慢病毒载体1v-EF1 α -scFv(CEA)-CD3-WPRE,未感染的T淋巴细胞作为空白对照;24h后将培养基更换为含有500IU/ml重组人IL-2的RPMI 1640完全培养基,继续培养10-20天,然后观察T淋巴细胞生长情况,结果如图3所示。结果显示:细胞在感染1v-EF1 α -scFv(CEA)-CD3-WPRE病毒后,依然能够形成典型的增殖克隆团,通过对细胞进行计数,绘制细胞增殖曲线可见,细胞在19天的时间内增殖了近3000倍。

[0067] 实施例3、靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体(CAR)表达检测

[0068] (1) Western blot法检测CAR在T淋巴细胞中的表达

[0069] 1) 细胞蛋白的提取

[0070] 将慢病毒载体感染的T淋巴细胞培养至约80%密度时,用移液器收集细胞至离心管中,1000g/min离心5min,PBS溶液洗涤3次;将1 \times 10⁶个慢病毒载体慢病毒载体1v-EF1 α -scFv(CEA)-CD3-WPRE感染后的T细胞、3 \times 10⁶个未感染的T细胞转移至1.5ml Ep管中,1000g/min离心5min,弃尽上清;根据蛋白裂解液说明书(M-PER[™] Mammalian Protein Extraction Reagent,Thermo Scientific公司,货号78501)分别加入100 μ l/300 μ l裂解液充分重悬细胞,冰上裂解30min,期间5~6min震荡1次;4℃、12,000g/min条件下离心10min沉淀细胞碎片;将上清液转移至新的已标记的Ep管中,-80℃保存,备用。

[0071] 2) 制胶

[0072] 玻璃板两面均用ddH₂O洗净,37℃烘干;将玻璃板下缘对齐,放入制胶夹中卡紧,垂直固定在制胶架上;

[0073] 配制10%分离胶:

ddH₂O 1.9 ml;

30% Acr-Bis 1.7 ml;

[0074]

1.5M Tris-HCl, pH8.8 1.3 ml;

10%过硫酸铵 0.65 ml;

[0075] TEMED 0.02 ml;

[0076] 立即混匀,迅速灌入玻璃板的间隙中,分离胶上层缓慢加入无水乙醇,隔绝空气,使液面保持平整;室温静置30min,分离胶完全凝固,与上层无水乙醇交界清晰,弃上层液体,并用滤纸吸干;

[0077] 配制5%浓缩胶:

ddH₂O 1.4 ml;

30% Acr-Bis 0.33 ml;

[0078] 1.5M Tris-HCl, pH6.8 0.25 ml;

10%过硫酸铵 0.02 ml;

TEMED 0.002 ml;

[0079] 立即混匀,迅速灌入玻璃板的间隙中,插入梳子;

[0080] 室温静置30min,浓缩胶凝固后,小心拔出梳子,取下玻璃板,立即使用或保鲜膜包裹后4℃保存备用;

[0081] 3) BCA法测定蛋白浓度

[0082] BCA法测定蛋白浓度采用Thermo Scientific公司的Pierce™ BCA Protein Assay Kit试剂盒,货号为23225,方法参照试剂盒说明书进行。制作标准曲线:用ddH₂O溶解蛋白标准品冻干粉,制备成2.0mg/ml蛋白标准溶液备用;根据说明书将蛋白标准溶液配制浓度分别为2000μg/ml,1500μg/ml,1000μg/ml,750μg/ml,500μg/ml,250μg/ml,125μg/ml,25μg/ml的溶液;将试剂盒中A液体积:试剂盒中B液体积等于50:1的倍数混匀;然后向96孔板中分别加入25μl标准品、样品,每个样品3个重复孔;每孔加入BCA工作液200μl,混匀;37℃孵育30min,检测562nm处OD值;根据蛋白浓度标准曲线,得到标准曲线方程,用于计算待检样本蛋白浓度。

[0083] 4) Western blot

[0084] 上样前准备:将胶置于电泳槽内,倒入电泳液(无SDS),在电流为30mA下电泳30min,以除尽胶孔中杂质;取出已制备的蛋白样品,根据已测浓度调平上样量(第2,3泳道为5μl,第5,6泳道为10μl);根据蛋白体积分别加入5×非还原非变性蛋白上样缓冲液(根据蛋白上样缓冲液使用说明书)25μl/75μl,充分吹打混匀;然后使用微量进样器进行加样,并记录加样顺序;上样后在电压为80V条件下电泳150min,至溴酚蓝全部跑出分离胶底时终止;电泳结束后撬开玻璃板,切除浓缩胶;剪取与凝胶尺寸相同的NC膜和滤纸,浸入电转缓冲液(无甲醛)中;按照“三层滤纸-凝胶-NC膜-三层滤纸”的顺序制作“三明治”,去除各层间的气泡,放入凝胶转印装置中;在冰浴下,电流为30mA条件下转膜150min;转膜结束后,取出

NC膜并标记;然后PBST洗膜1次,放入封闭液中,小型摇床室温封闭2h;然后将NC膜用PBST洗涤3次,每次1~2min,去除封闭液;将一抗山羊抗人IgGFc用抗体稀释液按体积比为1:1000稀释,充分混匀后加至NC膜上,膜完全被抗体覆盖,4℃孵育过夜;一抗孵育结束后,用PBST洗膜3次,每次洗膜10~15min;然后将二抗(辣根过氧化物酶兔抗羊IgG抗体)用PBST按照1:1000稀释,NC膜加入二抗中,小型摇床室温孵育2~4h;二抗孵育结束后再次用PBST溶液洗膜3次,每次5~10min;最后加入显色液,凝胶成像仪自动曝光显影,结果如图4所示。由图4可知,靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体在T淋巴细胞中的成功表达。

[0085] (2) 流式细胞术检测CAR在T细胞中的表达

[0086] 将培养至14天的已感染病毒的T细胞,300g/min,离心5min,弃尽上清以收集细胞;用含有1%胎牛血清的PBS溶液重悬细胞,并将细胞调整密度为 1×10^6 个/ml;将收集的细胞分装为6管,每管100 μ l,向每管细胞中加入20 μ l PE标记抗小鼠抗人CD4单克隆抗体(BD公司PRA-T4克隆)、Percep标记小鼠抗人CD8单克隆抗体(BD公司SK1克隆)抗体、APC标记小鼠抗人CD56单克隆抗体(BD公司B159克隆);2 μ l羊抗鼠Fab单克隆抗体(sigma公司);4℃孵育30min,PBS溶液洗涤2次,上流式细胞仪进行检测,结果如图5所示。结果显示经过14天的培养,CAR-T细胞CD3阳性率为93.8%,CD3CD4双阳性细胞比率为51.6%,CD3CD8双阳性细胞比率为43.4%,CD3CD56双阳性细胞比率为16.2%。

[0087] 实施例4、表达靶向CEA的嵌合抗原受体的T淋巴细胞抗肿瘤效果验证

[0088] 以稳定表达萤火虫荧光蛋白luciferase的CEA阳性结直肠细胞系W480、HT29作为靶细胞,以稳定表达荧光素酶的CEA阴性的肝癌细胞系HuH7作为对照,效应细胞为慢病毒载体lv-EF1 α -scFv(CEA)-CD3-WPRE感染的T细胞;将靶细胞按照密度 1×10^5 个/ml接种96孔板中,每孔100 μ l;按照1:1效靶比将效应细胞加入靶细胞,置于5%CO₂、37℃培养箱培养24h;利用荧光素酶检测系统试剂盒(E4550)检测孔板中剩余细胞内Luciferase含量,用下列公式计算杀伤效率;

[0089] 细胞杀伤率 = $\frac{1 - \text{效应细胞靶细胞共培养孔荧光强度}}{\text{单独靶细胞孔荧光强度}} \times 100\%$

[0090] 结果如图6所示。结果表明,表达靶向CEA抗原的嵌合抗原受体的T淋巴细胞对CEA阳性肿瘤细胞具有杀伤作用,而对CEA阴性细胞无杀伤作用。

[0091] 最后说明的是,以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述,但本领域技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

[0092] 实施例5、表达接入CD28CD137共刺激分子结构域的靶向癌胚抗原(CEA)的嵌合抗原受体的T淋巴细胞抗肿瘤效果验证

[0093] 以稳定表达萤火虫荧光蛋白luciferase的CEA阳性结直肠细胞系W480、HT29作为靶细胞,分别用慢病毒载体lv-EF1 α -scFv(CEA)-CD3-WPRE和Lv-EF1 α -scFv(CEA)-CD28-CD137-CD3-WPRE感染的T细胞制得效应细胞;将靶细胞按照密度 2.5×10^5 个/ml, 5×10^5 个/ml, 10×10^5 个/ml的密度接种96孔板中,每孔100 μ l;按照10:1,5:1,2.5:1效靶比将效应细胞加入靶细胞,置于5%CO₂、37℃培养箱培养6h;利用荧光素酶检测系统试剂盒(E4550)检测孔板中剩余细胞内Luciferase含量,用下列公式计算杀伤效率;

$$[0094] \quad \text{细胞杀伤率} = \frac{1 - \text{效应细胞靶细胞共培养孔荧光强度}}{\text{单独靶细胞孔荧光强度}} \times 100\%$$

[0095] 结果如图7所示。结果表明,表达接入CD28CD137共刺激分子结构域的靶向癌胚抗原(CEA)的嵌合抗原受体的T细胞较未接入CD28CD137共刺激分子结构域的靶向CEA抗原的嵌合抗原受体的T淋巴细胞对CEA阳性肿瘤细胞具有更强杀伤作用。

[0096] 最后说明的是,以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述,但本领域技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

- <110> 重庆倍思益生物科技有限公司
- <120> 靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体、慢病毒表达载体及其制备方法和应用
- <160> 17
- <210> 1
- <211> 28
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体上游引物
- <400> 1
- aggctagcat gggatggagc tgtatcat 28
- [0001] <210> 2
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 靶向癌胚抗原的嵌合抗原受体下游引物
- <400> 2
- aggtcgacgg tatcgataag ctttg 25
- <210> 3
- <211> 732
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> ScFv(CEA) 核苷酸序列
- <400> 3
- gacatccaga tgaccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagaactgacc 60

```

atcacctgta gtaccagctc ggggtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccaggt 120
aaggctccaa ggetgctgat ctacagcaca tccaacctgg cttctggtgt gccaagcaga 180
ttcagcggta gcggtagcgg taccgacttc acctcacca tcagcagcct ccagccagag 240
gacatcgcca cctactactg ccatcagtgg agtagttatc ccacgttcgg ccaagggacc 300
aaggtggaaa tcaaaggatc cacttccggt tcaggaaagc ccgggagtgg tgaaggtage 360
actgaaggcc aggtccagct gcaggagagc ggtccaggtc ttgtgagacc tagccagacc 420
ctgagcctga cctgcaccgt gtctggcttc accatcagca gtggttatag ctggcactgg 480
gtgagacagc cacctggacg aggtcttgag aggattggat acatacagta cagtgtatc 540
actaactaca acccctctct caaaagtaga gtgacaatgc tggtagacac cagcaagaac 600
cagttcagcc tgagactcag cagcgtgaca gccgccgaca ccgcggtcta ttattgtgca 660
agagaagact atgattacca ctggtacttc gatgtctggg gtcaaggcag cacggtcacc 720
gtctcctcag gt 732

```

<210> 4

<211> 244

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ScFv(CEA) 氨基酸序列

[0002]

<400> 4

```

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

```

| | | | |
|-----------------|---------------------|---------------------|-----|
| | 155 | 160 | 165 |
| Gly Arg Gly Leu | Glu Arg Ile Gly Tyr | Ile Gln Tyr Ser Gly | Ile |
| | 170 | 175 | 180 |
| Thr Asn Tyr Asn | Pro Ser Leu Lys Ser | Arg Val Thr Met Leu | Val |
| | 185 | 190 | 195 |
| Asp Thr Ser Lys | Asn Gln Phe Ser Leu | Arg Leu Ser Ser Val | Thr |
| | 200 | 205 | 210 |
| Ala Ala Asp Thr | Ala Val Tyr Tyr Cys | Ala Arg Glu Asp Tyr | Asp |
| | 215 | 220 | 225 |
| Tyr His Trp Tyr | Phe Asp Val Trp Gly | Gln Gly Ser Thr Val | Thr |
| | 230 | 235 | 240 |
| Val Ser Ser Gly | | | |
| | 244 | | |

<210> 5

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0003]

<223> 前导肽核苷酸序列

<400> 5

atgggatgga gctgtatcat cctcttctcg gtagcaacag ctacaggcgt gcacagt 57

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 前导肽氨基酸序列

<400> 6

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

1 5 10 15

Gly Val His Ser

19

- <210> 7
- <211> 704
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> Fc较链区核苷酸序列
- <400> 7

```

gcggccgccc agcccaaate ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct 60
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc ttcccccaa aacccaagga caccctcatg 120
atctcccgga ccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 180
gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg 240
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagegtcc tcaccgtcct gcaccaggac 300
tggtgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 360
gagaaaacca tctcaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 420
ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagectga cctgcctggt caaaggettc 480
tatcccagcg acatgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 540
accacgctc cegtgetgga ctccgacggc tctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg 600
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct cegtgatgca tgaggctctg 660
cacaaccact acacgcagaa gacgctctcc ctgtctccgg gtaa 704
    
```

[0004]

- <210> 8
- <211> 234
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> Fc较链区氨基酸序列
- <400> 8

```

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 80 85 90
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 95 100 105
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 110 115 120
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 125 130 135
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 140 145 150
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 155 160 165
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 170 175 180
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 185 190 195
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 200 205 210
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 215 220 225
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 230 234

[0005]

<210> 9

<211> 73

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 跨膜区核苷酸序列

<400> 9

gateccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctette atctatgggtg tcattctcac 60
 tgccttgttc ctg 73

<210> 10

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 跨膜区氨基酸序列

<400> 10

Gln Glu Gln Gly Ser Glu Asn Asp Thr Ile Asp Glu Glu Asp Ser
 1 5 10 15
 Ile Gln Gln Val Ala Glu Phe Gly Ile
 20 24

<210> 11

<211> 408

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 包内信号区核苷酸序列

<400> 11

[0006] gatcccaaac tctgctacct gctggatgga atcctcttca tctatggtgt catttctcact 60
 gccttgttcc tgagagtgaa gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc 120
 cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac 180
 aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa 240
 ggctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg 300
 aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accagggtct cagtacagcc 360
 accaaggaca cctacgacgc cttcacatg caggccctgc cccctcgc 408

<210> 12

<211> 136

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包内信号区氨基酸序列

<400> 12

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

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 50 55 60
 Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 65 70 75
 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 80 85 90
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 95 100 105
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 110 115 120
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 125 130 135
 Arg
 136

<210> 13
 <211> 204
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0007]

<220>
 <223> CD28 核苷酸序列
 <400> 13

ttttgggtgc tgggtggtgt tgggtggagtc ctggettgt atagcttgct agtaacagtg 60
 gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg 120
 aacatgactc cccgcgcgcc cgggcccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca 180
 cgcgacttcg cagcctatcg ctcc 204

<210> 14
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CD28 氨基酸序列
 <400> 14

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
 1 5 10 15

[0009]

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Met | Arg | Pro | Val | Gln | Thr | Thr | Gln | Glu | Glu | Asp | Gly | Cys | Ser |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 |
| Cys | Arg | Phe | Pro | Glu | Glu | Glu | Glu | Gly | Gly | Cys | Glu | Leu | | |
| | | | | 35 | | | | | 40 | | | 43 | | |

<210> 17

<211> 1345

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 带有 *Call*, *NheI* 和 *SalI* 酶切位点的 *EF1a* 序列

<400> 17

```

ttatc gatgg tttattacag ggacagcaga gatccacttt ggtcgataag ctttgcaaag 60
atggataaag ttttaaacag agaggaatct ttgcagctaa tggaccttct aggtcttgaa 120
aggagtggga attggctccg gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc ccacagtccc 180
cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aaccggtgcc tagagaaggt ggcgcgggggt 240
aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt cccgagggtg ggggagaacc 300
gtatataagt gcagtagtcg ccgtgaacgt tctttttcgc aacgggtttg ccgccagaac 360
acaggtaagt gccgtgtgtg gttcccgcgg gcttggcctc tttacgggtt atggccttg 420
cgtgccttga attacttcca cctggctgca gtacgtgatt cttgatcccg agcttcgggt 480
tggaagtggg tgggagagtt cgaggccttg cgcttaagga gccccttcgc ctcgtgcttg 540
agttgaggcc tggcctgggc gctggggccg ccgcgtgcga atctggtggc accttcgcgc 600
ctgtctcgct gctttcgata agtctctagc catttaaat ttttgatgac ctgctgcgac 660
gctttttttc tggcaagata gtcttgtaaa tgcgggccaa gatctgcaca ctggtatttc 720
ggttttttggg gccgcgggcg gcgacggggc ccgtgcgtcc cagcgcacat gttcggcgag 780
gcggggcctg cgagcgcggc caccgagaat cggacggggg tagtctcaag ctggccggcc 840

```

[0010]

tgctctggtg cctggcctcg cgccgccgtg tategccccg cctggggcgg caaggctggc 900
ccggtcggca ccagttgcgt gagcggaag atggccgctt cccggccctg ctgcaggag 960
ctcaaatgg aggacgcggc gctcgggaga gcgggcgggt gagtcacca cacaaaggaa 1020
aagggccttt cegtctcag ccgtcgcttc atgtgactcc acggagtacc gggcgccgtc 1080
caggcacctc gattagttct cgagcttttg gactacgtcg tcttaggtt ggggggagg 1140
gtttatgcg atggagtctc cccacactga gtgggtggag actgaagtta ggccagcttg 1200
gcacttgatg taattctcct tggatttgc ccttttgag ttggatctt ggttcattct 1260
caagctcag acagtgttc aaagttttt tcttcattt caggtgtcgt gaggaattga 1320
tcctcgaag ctacgtcga caatc 1345

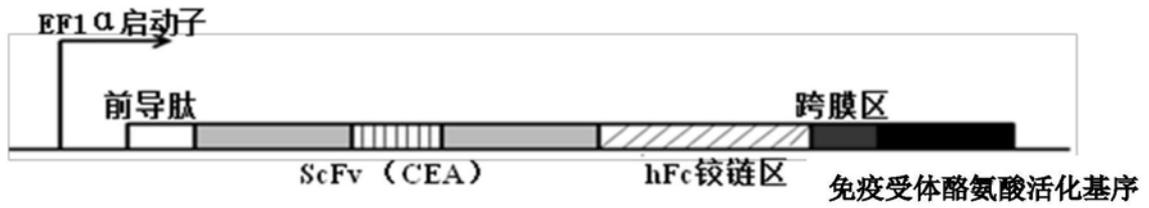


图1

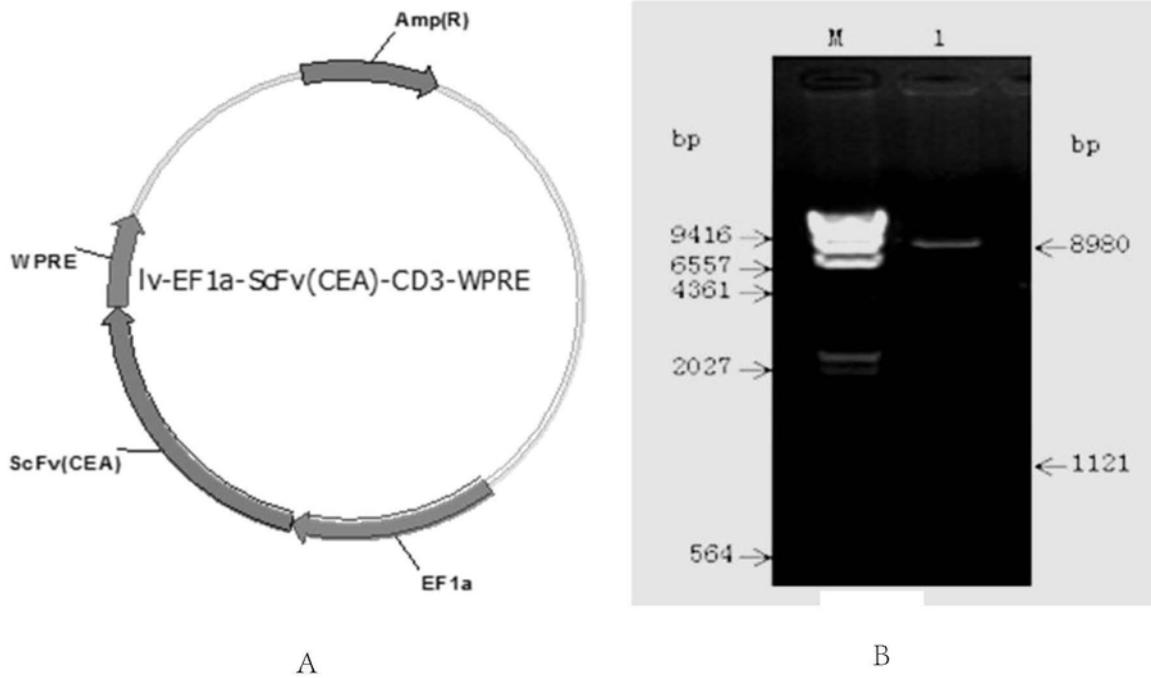


图2

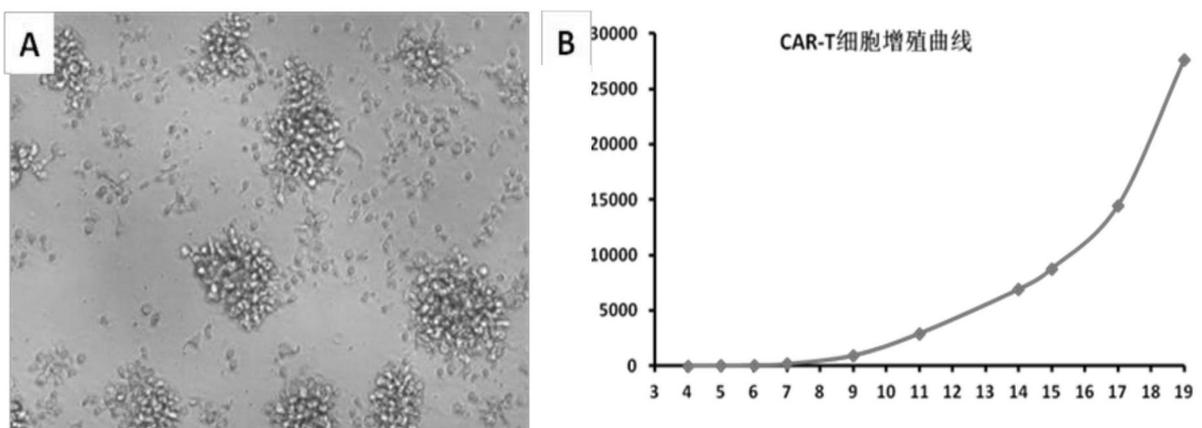


图3

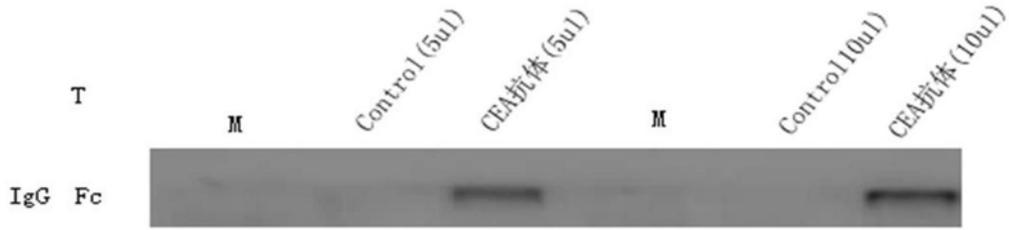


图4

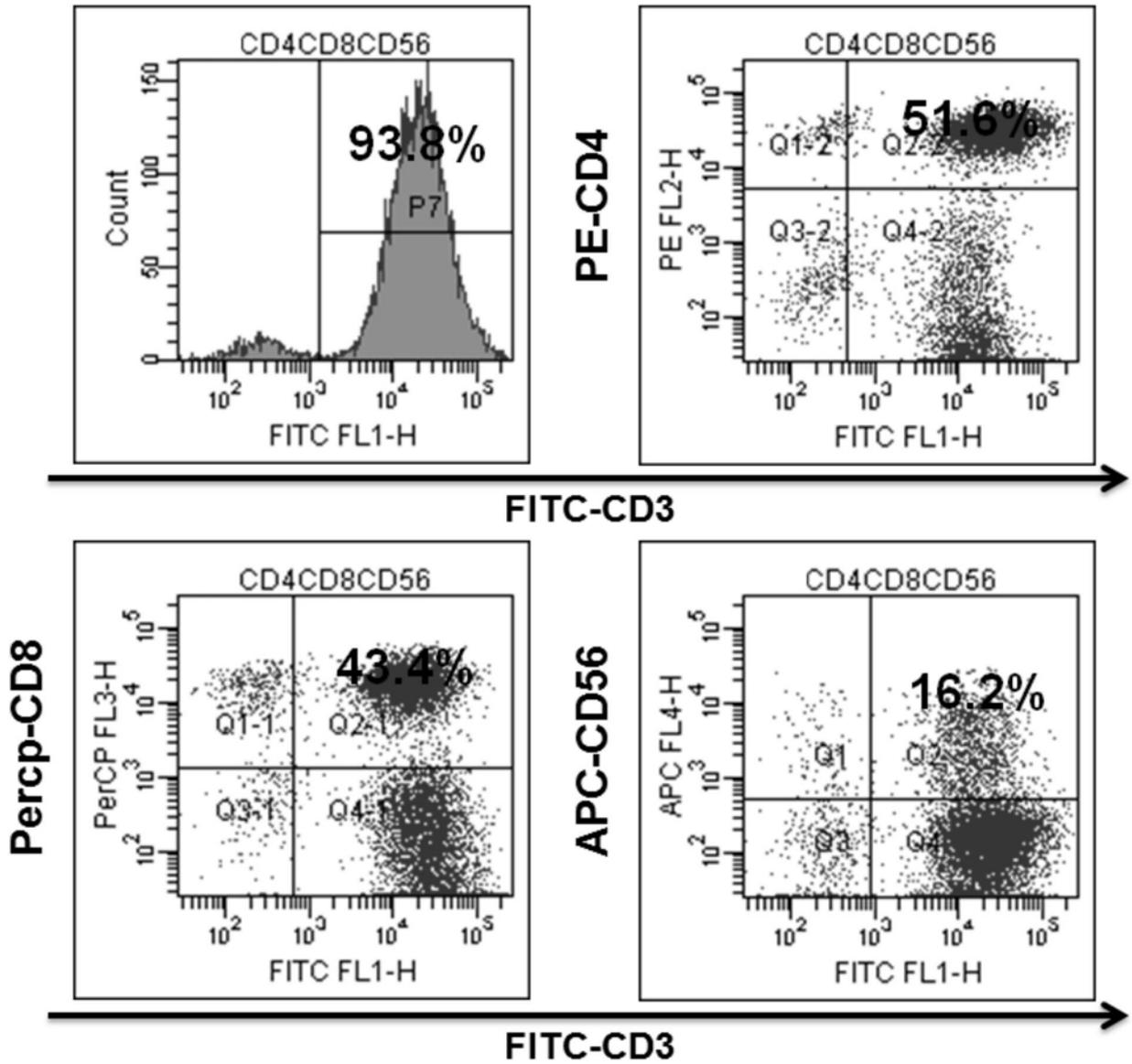


图5

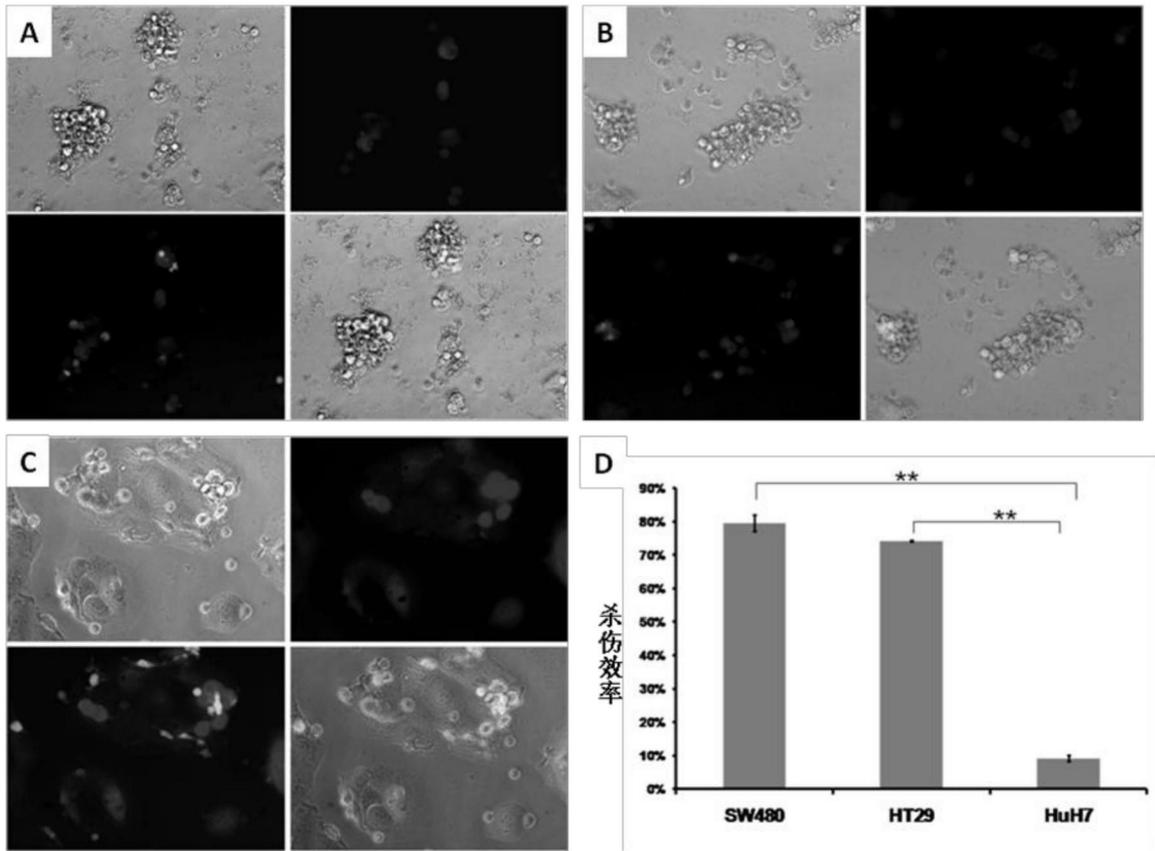


图6

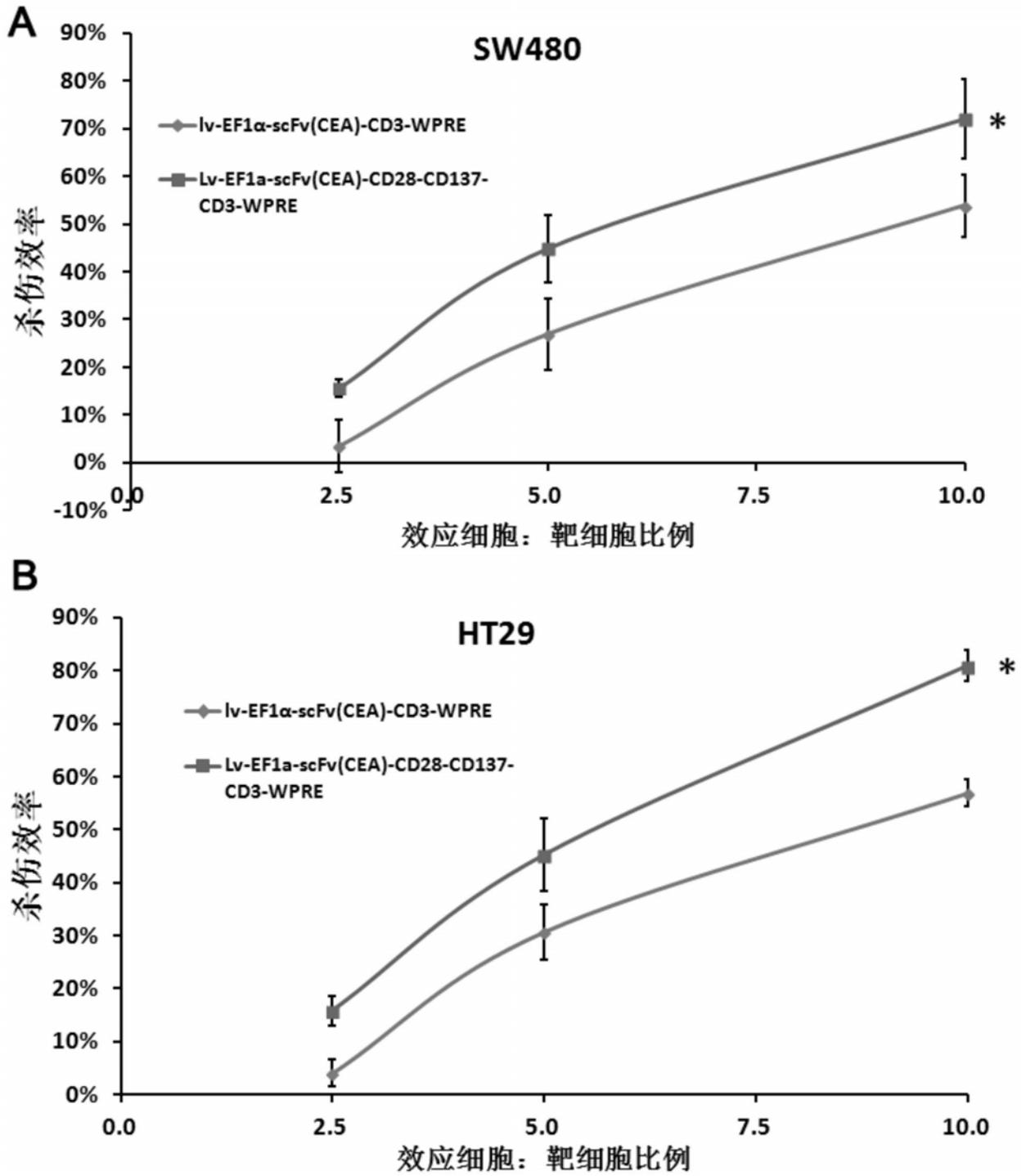


图7