



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109971716 B

(45) 授权公告日 2023.08.01

(21) 申请号 201711459132.0	C12N 15/13 (2006.01)
(22) 申请日 2017.12.28	C12N 15/62 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号	C12N 15/63 (2006.01)
申请公布号 CN 109971716 A	C07K 19/00 (2006.01)
(43) 申请公布日 2019.07.05	C07K 16/28 (2006.01)
(73) 专利权人 上海细胞治疗研究院	A61K 39/395 (2006.01)
地址 201805 上海市嘉定区园国路1585号	A61P 35/00 (2006.01)
专利权人 上海细胞治疗集团有限公司	(56) 对比文件
(72) 发明人 钱其军 金华君 江芷青 李赫	WO 2017027422 A1, 2017.02.16
刘祥箴 李林芳 王超	CN 105874061 A, 2016.08.17
(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公	CN 107074957 A, 2017.08.18
司 31100	审查员 张进
专利代理师 韦东	
(51) Int. Cl.	
C12N 5/10 (2006.01)	权利要求书2页 说明书13页 序列表7页 附图5页

(54) 发明名称

自分泌CD47抗体的EGFR特异性CAR-T细胞及其用途

(57) 摘要

本发明提供自分泌CD47抗体的EGFR特异性CAR-T细胞及其用途。本发明的T细胞含有识别EGFR的嵌合抗原受体的编码序列和CD47抗体的编码序列；和/或表达识别EGFR的嵌合抗原受体和CD47抗体。本发明的T细胞在特异性靶向EGFR高表达的肿瘤细胞同时，可以分泌CD47抗体，消除肿瘤细胞的免疫逃逸，恢复巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用，从而达到更好的抗肿瘤效果。

1. 一种T细胞,所述T细胞:(1)含有识别EGFR的嵌合抗原受体的编码序列和CD47抗体的编码序列;和/或(2)表达识别EGFR的嵌合抗原受体和CD47抗体,其中,

所述CD47抗体含有CD47配体和IgG4Fc序列,所述IgG4Fc的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第139-367位氨基酸残基所示,所述CD47配体的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第21-138位氨基酸残基所示,

所述嵌合抗原受体从N端到C端依次含有:信号肽、抗EGFR的单链抗体、CD8 α 铰链区、CD8跨膜区、CD28胞内结构域和CD3 ζ 的酪氨酸活化基序,所述抗EGFR的单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第23-263氨基酸残基所示。

2. 如权利要求1所述的T细胞,其特征在于,所述T细胞的基因组中整合了识别EGFR的嵌合抗原受体的表达框和CD47抗体的表达框。

3. 如权利要求1所述的T细胞,其特征在于,所述信号肽为CD8信号肽。

4. 如权利要求3所述的T细胞,其特征在于,所述CD8信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第1-22位氨基酸残基所示。

5. 如权利要求1所述的T细胞,其特征在于,所述CD8 α 铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第264-318位氨基酸残基所示。

6. 如权利要求1所述的T细胞,其特征在于,所述跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第319-344位氨基酸残基所示。

7. 如权利要求1所述的T细胞,其特征在于,所述CD28的胞内结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第345-385位氨基酸残基所示。

8. 如权利要求1所述的T细胞,其特征在于,所述CD3 ζ 胞内信号域的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第386-497位氨基酸残基所示。

9. 如权利要求1中任一项所述的T细胞,其特征在于,所述嵌合抗原受体具有以下一项或多项特征:

所述信号肽的核苷酸序列如SEQ ID NO:4第1-66位碱基所示;

所述单链抗体的核苷酸序列如SEQ ID NO:4第67-789位碱基序列所示;

所述铰链区的核苷酸序列如SEQ ID NO:4第490-954位碱基序列所示;

所述跨膜区的核苷酸序列如SEQ ID NO:4第955-1032位碱基所示;

所述胞内共刺激信号域的核苷酸序列如SEQ ID NO:4第1033-1155位碱基所示;和

所述胞内信号域的核苷酸序列如SEQ ID NO:4第1156-1491所示。

10. 如权利要求1所述的T细胞,其特征在于,所述嵌合抗原受体的氨基酸序列SEQ ID NO:1第23-497位氨基酸残基所示,或如SEQ ID NO:1所示。

11. 如权利要求10所述的T细胞,其特征在于,所述嵌合抗原受体的编码序列如SEQ ID NO:4第67-1491位碱基所示,或如SEQ ID NO:4所示。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的T细胞,其特征在于,所述CD47抗体具有以下一项或多项特征:

所述抗体还含有信号肽序列,

所述CD47抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第21-367位氨基酸序列所示,或者如SEQ ID NO:2所示;

所述CD47抗体的编码序列如SEQ ID NO:5第61-1101位碱基所示,或如SEQ ID NO:5所

示。

13. 如权利要求12所述的T细胞,其特征在于,所述信号肽为轻链信号肽。

14. 如权利要求13所述的T细胞,其特征在于,所述轻链信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第1-20位氨基酸残基所示。

15. 一种组合物,所述组合物含有:

(1) 含权利要求1-11中任一项所限定的嵌合抗原受体的表达框的载体,所述载体用于将所述表达框整合到宿主细胞的基因组中;和

(2) 含权利要求1、12-14中任一项所限定的CD47抗体的表达框的载体,所述载体用于将所述表达框整合到宿主细胞的基因组中。

16. 一种试剂盒,所述试剂盒含有:

(1) 含权利要求1-11中任一项所限定的嵌合抗原受体的表达框的载体,所述载体用于将所述表达框整合到宿主细胞的基因组中;和

(2) 含权利要求1、12-14中任一项所限定的CD47抗体的表达框的载体,所述载体用于将所述表达框整合到宿主细胞的基因组中。

17. 一种药物组合物,所述药物组合物含有权利要求1-15中任一项所述的T细胞。

18. 权利要求1-15中任一项所述的T细胞在制备治疗或预防恶性肿瘤的药物中的用途,所述癌症为其癌细胞表面异常表达EGFR的癌症。

19. 如权利要求18所述的用途,其特征在于,所述癌症选自:胶质细胞癌、肾癌、腺癌、肺癌、结肠癌、大肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌、胆管癌、胆囊癌、食管癌、胰腺癌或前列腺癌。

自分泌CD47抗体的EGFR特异性CAR-T细胞及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程学和免疫学,涉及自分泌CD47抗体的EGFR特异性CAR-T细胞及其用途。

背景技术

[0002] 癌症现在已成为人类健康的头号杀手,快速的生活节奏、巨大的工作压力、不健康的饮食习惯、糟糕的环境都是癌症发生的帮凶,使得癌症的高发率和年轻化趋势也越来越明显。目前常用的治疗手段效果十分有限,仍需探索一个更加有效的治疗方法,来提高癌症患者的生存率和生存质量。

[0003] 针对恶性肿瘤的免疫治疗近年来发展迅速,取得了令人瞩目的临床疗效。自2011年,Nature及临床肿瘤最顶级杂志JCO分别发表相同题目“肿瘤免疫治疗的时代已经来临”的评论文章(Nature.2011;480(7378):480;J Clin Oncol.2011;29(36):4828),肿瘤免疫细胞治疗迎来新一轮的研究热潮。

[0004] 嵌合抗原受体T细胞疗法作为肿瘤免疫治疗的重要分支之一,在恶性血液肿瘤中已经取得了非常好的疗效,对复发难治性B细胞白血病的完全缓解率超过90%。2017年8月,美国FDA批准了诺华的tisagenlecleucel嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)治疗用于治疗儿童和年轻成年患者急性淋巴细胞性白血病(ALL),成为第一个批准上市的CAR-T药物。紧接着同年10月,美国FDA又宣布批准了Kite Pharma的CAR-T疗法Yescarta上市,治疗罹患特定类型的大B细胞淋巴瘤成人患者。CAR-T药物的陆续获批使得CAR-T治疗迈上了一个新的台阶。

[0005] 嵌合抗原受体是一种人工合成受体,它通常包含胞外抗原结合域、跨膜铰链区和胞内信号转导区。通过将识别肿瘤相关抗原(tumor associated antigen,TAA)的抗体单链可变区(single-chain fragment variable,scFv)和胞内信号域“免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motifs,ITAM)”在体外进行基因重组。再通过病毒或其它载体系统将其导入T细胞中,这样经过基因改造的T细胞称之为CAR-T细胞。CAR-T细胞在体外经大规模扩增后,回输到患者体内,能够以非MHC限制性的模式表现强效的抗癌作用。

[0006] 但是,CAR-T细胞治疗实体瘤的疗效目前仍不足。主要原因包括:1.实体瘤异质性强,缺乏适合CAR-T治疗的细胞表面靶点。2.实体瘤具有强烈抑制免疫的微环境。

[0007] EGFR(简称为EGFR、ErbB-1或HER1)是表皮生长因子受体(HER)家族成员之一。该家族包括HER1(erbB1,EGFR)、HER2(erbB2,NEU)、HER3(erbB3)及HER4(erbB4)。HER家族在细胞生理过程中发挥重要的调节作用。EGFR广泛分布于哺乳动物上皮细胞、成纤维细胞、胶质细胞、角质细胞等细胞表面,EGFR信号通路对细胞的生长、增殖和分化等生理过程发挥重要的作用。研究表明在许多实体肿瘤中存在EGFR的高表达或异常表达。EGFR与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移及细胞凋亡的抑制有关。EGFR的过表达在恶性肿瘤的演进中起重要作用,胶质细胞癌、肾癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌等组织中都有EGFR的过表达,因

此EGFR是一个很有潜力的肿瘤治疗靶点。

[0008] 目前已有多种以EGFR为靶点的药物。有作用于受体胞内区的小分子络氨酸激酶抑制剂(TKI),如吉非替尼、erlotinib、EKB-549、PKI-166、GW-2016及CI-1033。作用于受体胞外区的单克隆抗体(Mab),如西妥昔单抗、ABX-EGF及EMD 72000等。以及其它一些免疫导治疗、基因治疗等。

[0009] CD47主要表达于癌细胞表面,通常被认为是癌细胞免于宿主免疫系统攻击的保护性受体。研究表明T细胞与树突状细胞(DC)可以通过CD47阻断效应发挥抗肿瘤的效应。CD47是一类“don't eat me”信号,它通过与巨噬细胞表面的SIRP- α 相互结合抑制巨噬细胞的功能。CD47作为癌症治疗的靶点具有不可比拟的优势:1.它广泛地表达于各类癌细胞表面,因此可以用于治疗各种类型的癌症;2.正常细胞由于缺乏“eat me”信号,因此单单阻断CD47并不能引发巨噬细胞对正常细胞的吞噬效应,因此CD47阻断剂的副作用也十分小。

[0010] 本发明通过构建一种自表达CD47抗体的EGFR-CAR T细胞,在特异性靶向EGFR高表达的肿瘤细胞同时,可以分泌CD47抗体,消除肿瘤细胞的免疫逃逸,恢复巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用,从而达到更好的抗肿瘤效果。此外,我们设计的CD47抗体Fc片段为突变型的IgG4Fc,避免了与树突状细胞表面的 γ -2受体结合而被巨噬细胞识别并吞噬,使自表达CD47抗体的CAR-T细胞发挥功能的同时又不引起AICD反应。

发明内容

[0011] 本发明提供一种T细胞,所述T细胞:(1)含有识别EGFR的嵌合抗原受体的编码序列和CD47抗体的编码序列;和/或(2)表达识别EGFR的嵌合抗原受体和CD47抗体。

[0012] 在一个或多个实施方案中,所述T细胞的基因组中整合了所述识别EGFR的嵌合抗原受体的表达框和所述CD47抗体的表达框。

[0013] 在一个或多个实施方案中,从N端到C端,该嵌合抗原受体依次含有任意的信号肽、抗EGFR的单链抗体、长50个氨基酸残基以上的铰链区、跨膜区、胞内共刺激信号域和胞内信号域。

[0014] 在一个或多个实施方案中,所述信号肽为CD8信号肽、CD28信号肽、CD4信号肽或轻链信号肽;更优选地为CD8信号肽;优选地,所述CD8信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第1-22位氨基酸残基所示。

[0015] 在一个或多个实施方案中,所述单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第23-263氨基酸残基所示。

[0016] 在一个或多个实施方案中,所述长50个氨基酸残基以上的铰链区选自CD8 α 铰链区、IgD铰链区、IgG1Fc CH2CH3铰链区和IgG4Fc CH2CH3铰链区;优选地,所述铰链区是CD8 α 铰链区或IgG4Fc CH2CH3铰链区;更优选地,所述CD8 α 铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第264-318位氨基酸残基所示。

[0017] 在一个或多个实施方案中,所述跨膜区为CD28跨膜区、CD8跨膜区、CD3 ζ 跨膜区、CD134跨膜区、CD137跨膜区、ICOS跨膜区和DAP10跨膜区中的一种;优选为CD8跨膜区,优选其氨基酸序列如SEQ ID NO:1第319-344位氨基酸残基所示。

[0018] 在一个或多个实施方案中,所述胞内共刺激信号域包括共刺激信号分子的胞内结构域,包括CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶、诱导性T细胞

共刺激因子 (ICOS) 和DNAX激活蛋白10的胞内结构域;优选地,所述胞内共刺激信号域为CD28的胞内结构域;优选地,所述CD28的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第345-385位氨基酸残基所示。

[0019] 在一个或多个实施方案中,所述胞内信号域为CD3 ζ 胞内信号域或Fc ϵ RI γ 胞内信号域;优选为CD3 ζ 胞内信号域,优选地所述CD3 ζ 胞内信号域的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第386-497位氨基酸残基所述。

[0020] 在一个或多个实施方案中,所述嵌合抗原受体从N端到C端依次含有CD8信号肽、抗EGFR的单链抗体、CD8 α 铰链区、CD8跨膜区、CD28胞内结构域和CD3 ζ 的酪氨酸活化基序。

[0021] 在一个或多个实施方案中,所述嵌合抗原受体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第23-497位氨基酸残基所示,或如SEQ ID NO:1所示。

[0022] 在一个或多个实施方案中,所述嵌合抗原受体的编码序列包括以下一项或多项特征:

[0023] 所述信号肽的核苷酸序列如SEQ ID NO:4第1-66位碱基所示;

[0024] 所述单链抗体的核苷酸序列如SEQ ID NO:4第67-789位碱基序列所示;

[0025] 所述铰链区的核苷酸序列如SEQ ID NO:4第490-954位碱基序列所示;

[0026] 所述跨膜区的核苷酸序列如SEQ ID NO:4第955-1032位碱基所示;

[0027] 所述胞内共刺激信号域的核苷酸序列如SEQ ID NO:4第1033-1155位碱基所示;和

[0028] 所述胞内信号域的核苷酸序列如SEQ ID NO:4第1156-1491所示。

[0029] 在一个或多个实施方案中,所述嵌合抗原受体的编码序列如SEQ ID NO:4第67-1491位碱基所示,或如SEQ ID NO:4所示。

[0030] 在一个或多个实施方案中,所述CD47抗体含有CD47配体和IgG4Fc序列;其中,所述IgG4Fc的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第139-367位氨基酸残基所示;优选地,所述CD47配体的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第21-138位氨基酸残基所示;优选地,所述抗体还含有信号肽序列,优选为轻链信号肽,更优选地,所述轻链信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第1-20位氨基酸残基所示。

[0031] 在一个或多个实施方案中,所述CD47抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第21-367位氨基酸序列所示,或者如SEQ ID NO:2所示。

[0032] 在一个或多个实施方案中,所述CD47抗体的编码序列如SEQ ID NO:5第61-1101位碱基所示,或如SEQ ID NO:5所示。

[0033] 本发明还提供一种CD47抗体,所述CD47抗体含有CD47配体和IgG4Fc序列;其中,所述IgG4Fc的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第139-367位氨基酸残基所示。

[0034] 在一个或多个实施方案中,所述CD47配体的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第21-138位氨基酸残基所示。

[0035] 在一个或多个实施方案中,所述抗体还含有信号肽序列,优选为轻链信号肽,更优选地,所述轻链信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第1-20位氨基酸残基所示。

[0036] 在一个或多个实施方案中,所述CD47抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第21-367位氨基酸序列所示,或者如SEQ ID NO:2所示。

[0037] 本发明还提供本文所述的CD47抗体的编码序列或其互补序列;优选地,所述编码序列如SEQ ID NO:5第61-1101位碱基所示,或如SEQ ID NO:5所示。

[0038] 本发明还提供一种组合物,所述组合物含有:

[0039] (1) 含本文所述的嵌合抗原受体的表达框的载体,所述载体用于将所述表达框整合到宿主细胞的基因组中;和

[0040] (2) 含本文所述CD47抗体的表达框的载体,所述载体用于将所述表达框整合到宿主细胞的基因组中。

[0041] 本发明还提供一种试剂盒,所述试剂盒含有:

[0042] (1) 含本文所述的嵌合抗原受体的表达框的载体,所述载体用于将所述表达框整合到宿主细胞的基因组中;和

[0043] (2) 含本文所述CD47抗体的表达框的载体,所述载体用于将所述表达框整合到宿主细胞的基因组中。

[0044] 本发明还提供一种药物组合物,所述药物组合物含有本文所述的T细胞和/或CD47抗体。

[0045] 本发明还提供本文所述的T细胞和/或CD47抗体在制备治疗或预防恶性肿瘤的药物中的用途;优选地,所述癌症为其癌细胞表面异常表达EGFR的癌症,优选地,所述癌症选自:胶质细胞癌、肾癌、腺癌、肺癌、结肠癌、大肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌、胆管癌、胆囊癌、食管癌、胰腺癌或前列腺癌。

附图说明

[0046] 图1:EGFR-CAR与CD47抗体的质粒结构示意图。

[0047] 图2A:流式检测 α CD47-EGFR-CAR T细胞CAR的阳性率。

[0048] 图2B:ELISA检测 α CD47-EGFR-CAR T细胞CD47抗体的表达。

[0049] 图3A:EGFR-CAR与CD47抗体的质粒不同配比条件下构建出的 α CD47-EGFR-CAR T细胞的CAR-T阳性率。

[0050] 图3B:EGFR-CAR与CD47抗体的质粒不同配比条件下构建出的 α CD47-EGFR-CAR T细胞CD47抗体表达量。

[0051] 图4:流式检测Mock T细胞、EGFR-CAR T细胞以及 α CD47-EGFR-CAR T细胞的CD47表达。

[0052] 图5: α CD47-EGFR-CAR T细胞对不同肿瘤细胞的杀伤。

[0053] 图6: α CD47-EGFR-CAR T细胞上清与不同肿瘤细胞共培养后封闭肿瘤细胞表面的CD47。

[0054] 图7:封闭肿瘤细胞表面CD47可以提升巨噬细胞对其吞噬作用。

[0055] 图8: α CD47-EGFR-CAR T细胞小鼠体内抗肿瘤效果。

具体实施方式

[0056] 下面对本发明涉及的部分术语进行解释。

[0057] 在本发明中,术语“表达框”是指表达一个基因所需的完整元件,包括启动子和基因编码序列。

[0058] 术语“编码序列”在文中定义为核酸序列中直接确定其蛋白产物(例如CAR,单链抗体,铰链区和跨膜区)的氨基酸序列的部分。编码序列的边界通常是由紧邻mRNA5'端开放读

码框上游的核糖体结合位点(对于原核细胞)和紧邻mRNA 3'端开放读码框下游的转录终止序列确定。编码序列可以包括,但不限于DNA、cDNA和重组核酸序列。

[0059] 术语“Fc”即抗体的可结晶段(fragment crystallizable, Fc),是指位于抗体分子“Y”结构的柄部末端,包含抗体重链恒定区CH2和CH3结构域的肽段,是抗体与效应分子或者细胞相互作用的部位。

[0060] 术语“共刺激分子”是指存在于抗原提呈细胞表面,能与Th细胞上的共刺激分子受体结合,产生协同刺激信号的分子。淋巴细胞的增殖不仅需要抗原的结合,还需要接受共刺激分子的信号。共刺激信号传递给T细胞主要是通过表达在抗原呈递细胞表面的共刺激分子CD80, CD86与T细胞表面的CD28分子结合。B细胞接受共刺激信号可以通过一般的病原体成分例如LPS,或者通过补体成分,或者通过激活了的抗原特异性的Th细胞表面的CD47L。

[0061] 术语“接头”或铰链是连接不同蛋白或多肽之间的多肽片段,其目的是使所连接的蛋白或多肽保持各自的空间构象,以维持蛋白或多肽的功能或活性。示例性的接头包括含有G和/或S的接头,以及例如Furin 2A肽。

[0062] 术语“特异性结合”是指抗体或者抗原结合片段与其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中,特异性结合某抗原的抗体(或对某抗原具有特异性的抗体)是指,抗体以小于大约 $10^{-5}M$,例如小于大约 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 或 $10^{-10}M$ 或更小的亲和力(KD)结合该抗原。“特异性识别”具有类似的含义。

[0063] 术语“药学上可接受的辅料”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂,其是本领域公知的(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995),并且包括但不限于:pH调节剂,表面活性剂,佐剂,离子强度增强剂。例如,pH调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液;表面活性剂包括但不限于阳离子,阴离子或者非离子型表面活性剂,例如Tween-80;离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

[0064] 术语“有效量”是指可在受试者中实现治疗、预防、减轻和/或缓解本发明所述疾病或病症的剂量。

[0065] 术语“疾病和/或病症”是指所述受试者的一种身体状态,该身体状态与本发明所述疾病和/或病症有关。

[0066] 术语“受试者”或者“患者”可以指患者或者其它接受本发明药物组合物以治疗、预防、减轻和/或缓解本发明所述疾病或病症的动物,特别是哺乳动物,例如人、狗、猴、牛、马等。

[0067] 术语“嵌合抗原受体”(CAR)是人工改造受体,能够将识别肿瘤细胞表面抗原的特异性分子(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。CAR通常依次包含任选的信号肽、结合肿瘤细胞膜抗原的多肽如单链抗体、铰链区、跨膜区和胞内信号区。通常,结合肿瘤细胞膜抗原的多肽能够以中等亲和力结合肿瘤细胞广泛表达的膜抗原。结合肿瘤细胞膜抗原的多肽可以是天然多肽或人工合成多肽;优选地,人工合成多肽为单链抗体或Fab片段。

[0068] 术语“单链抗体”(scFv)是指由抗体轻链可变区(VL区)氨基酸序列和重链可变区(VH区)氨基酸序列经铰链连接而成,具有结合抗原能力的抗体片段。在某些实施方案中,感兴趣单链抗体(scFv)来自感兴趣的抗体。感兴趣的抗体可以是人抗体,包括人鼠嵌合抗体

和人源化抗体。抗体可以是分泌型或膜锚定型。

[0069] 本发明通过构建一种自表达CD47抗体的EGFR-CAR T细胞,在特异性靶向EGFR高表达的肿瘤细胞同时,可以分泌CD47抗体,消除肿瘤细胞的免疫逃逸,恢复巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用,从而达到更好的抗肿瘤效果。此外,本发明设计的CD47抗体Fc片段为突变型的IgG4Fc,避免了与树突状细胞表面的 γ -2受体结合而被巨噬细胞识别并吞噬,使自表达CD47抗体的CAR-T细胞发挥功能的同时又不引起AICD反应。

[0070] 因此,本发明提供一种CD47抗体,其含有CD47配体和IgG4Fc。在某些实施方案中,所述IgG4Fc的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第139-367位氨基酸残基所示;优选地,其编码序列如SEQ ID NO:5第415-1101位碱基序列所示。

[0071] 在某些实施方案中,所述CD47配体的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第21-138位氨基酸残基所示;优选地,其编码序列如SEQ ID NO:5第61-414位碱基序列所示。

[0072] 在某些实施方案中,所述CD47抗体还含有轻链信号肽。在某些实施方案中,所述CD47抗体从N端到C端,依次含有轻链信号肽、CD47配体和IgG4Fc。在某些实施方案中,所述轻链信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第1-20位氨基酸残基所示;优选地,所示轻链信号肽的编码序列如SEQ ID NO:5第1-60位碱基序列所示。

[0073] 在某些实施方案中,所述CD47抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第21-367位氨基酸序列所示,或者如SEQ ID NO:2所示。

[0074] 本发明还包括所述CD47抗体的编码序列或其互补序列,所述编码序列至少包括本文所述的IgG4Fc的编码序列或其互补序列。在某些实施方案中,所述CD47抗体的编码序列含有SEQ ID NO:5第61-1101位碱基序列所示的序列,优选含有SEQ ID NO:5所示的序列。

[0075] 本发明还包括一种核酸构建物,所述核酸构建物含有本发明所述的CD47抗体的编码序列或其互补序列。优选地,所述核酸构建物是表达载体或用于将所述编码序列或其互补序列整合入宿主细胞的整合载体。

[0076] 本发明还提供一种宿主细胞,所述宿主细胞含有本文所述的核酸构建物。

[0077] 本发明还提供所述CD47抗体、其编码序列或互补序列、核酸构建物以及宿主细胞在制备治疗或预防恶性肿瘤中的用途,所述肿瘤尤其是与CD47相关的肿瘤,包括但不限于本文所述的各种恶性肿瘤。

[0078] 本发明还提供一种经EGFR-CAR基因修饰并能表达CD47抗体的T细胞,该T细胞能高水平稳定的表达EGFR-CAR基因及CD47抗体。所述EGFR-CAR基因及CD47抗体基因可经PB转座酶系统整合到T细胞的基因组中,从而在T细胞中稳定持续的表达。

[0079] 本发明的CAR通常含有任意的信号肽序列、识别EGFR的scFv、铰链区、跨膜区、胞内共刺激信号域和胞内信号域。

[0080] 信号肽是引导新合成的蛋白质向分泌通路转移的短肽链(长度5-30个氨基酸),常指新合成多肽链中用于指导蛋白质的跨膜转移(定位)的N-末端的氨基酸序列(有时不一定在N端),它负责把蛋白质引导到细胞含不同膜结构的亚细胞器内。信号肽可以是分泌型信号肽或膜结合型信号肽。在本发明的某些实施方案中,信号肽为CD8信号肽、CD28信号肽或CD4信号肽或轻链信号肽;更优选地为CD8信号肽。CD8信号肽的氨基酸序列可如SEQ ID NO:1第1-22位氨基酸残基所示;在某些实施方案中,其编码序列如SEQ ID NO:4第1-66位碱基所示。

[0081] 本文所述的识别EGFR的scFv可以是本领域周知的针对EGFR的单链抗体。示例性的识别EGFR的单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第23-263位氨基酸残基所示,其示例性的编码序列如SEQ ID NO:4第67-789位核苷酸序列所示。

[0082] 本文中,铰链区指免疫球蛋白重链CH1和CH2功能区之间的区域,该区富含脯氨酸,不形成 α 螺旋,易发生伸展及一定程度扭曲,有利于抗体的抗原结合部位与抗原表位间的互补性结合。适用于本文的铰链区可选自CD8的胞外铰链区、IgG1Fc CH2CH3铰链区、IgD铰链区、CD28的胞外铰链区、IgG4Fc CH2CH3铰链区和CD4的胞外铰链区的任意一种或多种。铰链区优选是长50个氨基酸残基以上、更优选长80个氨基酸以上的铰链区。在某些实施方案中,本文使用CD8 α 铰链区或IgG4Fc CH2CH3铰链区。示例性的CD8 α 铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第264-318位氨基酸残基所示,其示例性的核苷酸序列可如SEQ ID NO:4第490-954位碱基序列所示。

[0083] 跨膜区可以是CD28跨膜区、CD8跨膜区、CD3 ζ 跨膜区、CD134跨膜区、CD137跨膜区、ICOS跨膜区和DAP10跨膜区中的一种;优选为CD8跨膜区,优选其氨基酸序列如SEQ ID NO:1第319-344所示;在某些实施方案中,其编码序列如SEQ ID NO:4第955-1032位碱基所示。

[0084] 胞内共刺激信号域包括共刺激信号分子的胞内结构域可选自CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK)、诱导性T细胞共刺激因子(ICOS)和DNAX激活蛋白10(DAP10)的胞内结构域。在某些实施方案中,所述共刺激信号分子的胞内结构域为CD28的胞内结构域,优选其氨基酸序列如SEQ ID NO:1第345-385位氨基酸残基所示,其示例性的编码序列如SEQ ID NO:4第1033-1155位碱基所示。

[0085] 胞内信号域优选为免疫受体酪氨酸活化基序,可以是CD3 ζ 胞内信号域或Fc ϵ RI γ 胞内信号域;优选为CD3 ζ 胞内信号域,优选地所述CD3 ζ 胞内信号域的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第386-497位氨基酸残基所述;在某些实施方案中,其编码序列如SEQ ID NO:4第1156-1491所示。

[0086] 在某些实施方案中,所述嵌合抗原受体从N端到C端依次含有:任选的CD8信号肽、抗EGFR的scFv、CD8 A 铰链区、CD8跨膜区、CD28的胞内结构域和CD3 ζ 胞内信号域;优选地,所述嵌合抗原受体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第23-497位氨基酸残基所示。在某些实施方案中,所述嵌合抗原受体还含有CD8信号肽,优选地,该嵌合抗原受体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1第1-22位氨基酸残基所示。

[0087] 应理解,本发明也包括本文所述的嵌合抗体受体及其编码序列。

[0088] 形成本文嵌合抗原受体的上述各部分,如信号肽、抗间皮素单链抗体的轻链可变区和重链可变区、铰链区、跨膜区、胞内共刺激信号域和胞内信号域等,相互之间可直接连接,或者可通过接头序列连接。接头序列可以是本领域周知的适用于抗体的接头序列,例如含G和S的接头序列。接头的长度可以是3~25个氨基酸残基,例如3~15、5~15、10~20个氨基酸残基。在某些实施方案中,接头序列是多甘氨酸接头序列。接头序列中甘氨酸的数量无特别限制,通常为2~20个,例如2~15、2~10、2~8个。除甘氨酸和丝氨酸外,接头中还可含有其它已知的氨基酸残基,例如丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)、苯丙氨酸(F)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)等。

[0089] 应理解,在基因克隆操作中,常常需要设计合适的酶切位点,这势必在所表达的氨基酸序列末端引入了一个或多个不相干的残基,而这并不影响目的序列的活性。为了构建

融合蛋白、促进重组蛋白的表达、获得自动分泌到宿主细胞外的重组蛋白、或利于重组蛋白的纯化,常常需要将一些氨基酸添加至重组蛋白的N-末端、C-末端或该蛋白内的其它合适区域内,例如,包括但不限于,适合的接头肽、信号肽、前导肽、末端延伸等。因此,本文的CAR的氨基端或羧基端还可含有一个或多个多肽片段,作为蛋白标签。任何合适的标签都可以用于本文。例如,所述的标签可以是FLAG,HA,HA1,c-Myc,Poly-His,Poly-Arg,Strep-TagII,AU1,EE,T7,4A6, ϵ ,B,gE以及Ty1。这些标签可用于对蛋白进行纯化。

[0090] 本文还包括编码所述嵌合抗原受体的多核苷酸序列。本文的多核苷酸序列可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。

[0091] 本文所述的多核苷酸序列通常可以用PCR扩增法获得。具体而言,可根据本文所公开的核苷酸序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增得到有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。例如,在某些实施方案中,编码本文所述融合蛋白的多核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0092] 本文还包括核酸构建物,其含有本文所述的编码所述嵌合抗原受体的多核苷酸序列或编码所述CD47抗体的多核苷酸序列,以及与这些序列操作性连接的一个或多个调控序列。在某些实施方案中,所述核酸构建物是表达框。

[0093] 调控序列可以是合适的启动子序列。启动子序列通常与待表达蛋白的编码序列操作性连接。启动子可以在所选择的宿主细胞中显示转录活性的任何核苷酸序列,包括突变的、截短的和杂合启动子,并且可以从编码与该宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。

[0094] 调控序列也可以是合适的转录终止子序列,由宿主细胞识别以终止转录的序列。终止子序列与编码该多肽的核苷酸序列的3'末端操作性连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本文。

[0095] 在某些实施方案中,所述核酸构建物是载体。具体而言,可将本文CAR的编码序列或CD47抗体的编码序列克隆入许多类型的载体,例如这些类型的载体包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。载体可以是表达载体。表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。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。

[0096] 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,在某些实施方案中,本发明使用逆转录病毒载体,该逆转录病毒载体含有复制起始位点,3' LTR,5' LTR,本文所述CAR的编码序列或CD47抗体的编码序列,以及任意的可选择的标记。

[0097] 合适的启动子包括但不限于即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-1 α (EF-1 α)。然而,也可使用其他组成型启动子序列,包括但不限于类人猿病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳癌病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、鸟类白血病毒启动子、EB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,也可考虑使用诱导型启动子。诱导型启动子的使用提供了分子开关,其能够在期限表达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,而在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。

[0098] 在某些实施方案中,可使用CN201510021408.1所公布的各种启动子序列,包括但不限于该申请SEQ ID NO:5所示的含mCMV增强子、hCMV增强子和EF1 α 启动子的CCEF启动子;SEQ ID NO:7所示的含CD3e增强子、mCMV增强子、hCMV增强子和EF1 α 启动子的TCEF启动子;SEQ ID NO:8所示的含mCMV增强子、hCMV增强子和含内含子的EF1 α 启动子的CCEFI启动子;SEQ ID NO:3所示的含CD3e增强子和含内含子的EF1 α 启动子的TEFI启动子;以及SEQ ID NO:3所示的含CD3e增强子、mCMV增强子、hCMV增强子和含内含子的EF1 α 启动子的TCEFI启动子。本文将该申请的全部内容以引用的方式纳入本文。

[0099] 可选择的标记包括可选择的标记基因或报道基因中的任一个或两者,以便于从被病毒载体感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。有用的可选择标记基因包括例如抗生素抗性基因,诸如neo等。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基因的基因。

[0100] 在某些实施方案中,将本文所述嵌合抗原受体的编码序列和CD47抗体的编码序列分别克隆到用于将目的核酸序列整合到宿主细胞的基因组中的载体(也称为整合载体)中,尤其是转座子载体。在某些实施方案中,该转座子载体是含有选自piggybac、sleeping beauty、frog prince、Tn5或Ty的转座元件的真核表达载体。这类转座子载体含有相应转座子的5'反向末端重复序列(5'LTR)和相应转座子的3'反向末端重复序列(3'LTR)。转座酶可以是来自piggybac、sleeping beauty、frog prince、Tn5或Ty转座系统的转座酶。当使用来自不同转座系统的转座酶时,所述载体中的5'LTR和3'LTR的序列也相应改变为与该转座系统适配的序列,这可由本领域技术人员容易地确定。在5'LTR和3'LTR之间是本发明的CAR或抗体的表达框,包括相应的启动子序列、CAR或抗体的编码序列以及polyA加尾信号序列。

[0101] 在某些实施方案中,转座酶是来自piggybac转座系统的转座酶。因此,在这些实施方案中,转座子5'反向末端重复序列和3'反向末端重复序列分别为piggybac转座子的5'反向末端重复序列和3'反向末端重复序列。在某些实施方案中,转座子5'反向末端重复序列如CN 201510638974.7(本文将其内容以引用的方式纳入本文)SEQ ID NO:1所示。在某些实施方案中,转座子3'反向末端重复序列如CN 201510638974.7SEQ ID NO:4所示。在某些实施方案中,piggybac转座酶为含c-myc核定位信号编码序列的转座酶。在某些实施方案中,piggybac转座酶的编码序列如CN 201510638974.7SEQ ID NO:5所示。

[0102] 转座酶编码序列的启动子可以是本领域已知的用于控制转座酶编码序列表达的各种启动子。在某些实施方案中,使用CMV启动子控制转座酶编码序列的表达。CMV启动子的序列可如CN 201510638974.7SEQ ID NO:6所示。

[0103] 在某些实施方案中,本发明含嵌合抗原受体的编码序列的载体为CN 201510638974.7所公开的pNB328载体。可采用本领域常规的方法制备本发明的嵌合抗原受体的编码序列,并将其克隆入合适的载体中。

[0104] 在某些实施方案中,所述用于将目的基因整合到宿主细胞的基因组中的载体不含有转座酶编码序列。例如,可在pNB328载体的基础上除去转座酶编码序列即可获得这类载

体。通常,用这类载体将CD47抗体的编码序列及信号肽编码序列(如轻链信号肽的编码序列)整合到宿主细胞的基因组中。示例性的轻链信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第1-20位氨基酸残基所示,示例性的轻链信号肽的编码序列如SEQ ID NO:5第1-60位碱基所示。

[0105] 在某些实施方案中,本文所述的经EGFR-CAR基因修饰并能表达CD47抗体的T细胞可转入:用于在T细胞基因组中整合入本文所述的嵌合抗原受体编码序列的含转座酶编码序列的载体,和用于在T细胞基因组中整合入本文所述的CD47抗体的编码序列的不含转座酶编码序列的载体。

[0106] 优选地,所述T细胞转入了以pNB328载体为骨架载体构建的含嵌合抗原受体编码序列的载体以及以pS328载体(与pNB328相比不含转座酶编码序列)为骨架载体构建的含CD47抗体编码序列的载体。在某些实施方案中,所述嵌合抗原受体的编码序列如SEQ ID NO:4所示;所述CD47抗体的编码序列如SEQ ID NO:5第61-1101位碱基序列。在某些实施方案中,所述含CD47抗体的编码序列的载体中,CD47抗体的信号肽为轻链信号肽。示例性的轻链信号肽的氨基酸序列可如SEQ ID NO:2第1-20位氨基酸残基所示;示例性的轻链信号肽的编码序列如SEQ ID NO:5第1-60位核苷酸序列所示。更具体而言,在某些实施方案中,所述在T细胞基因组中整合入嵌合抗原受体编码序列的含转座酶编码序列的载体在5' LTR、启动子、CD8信号肽编码序列、识别EGFR的scFv的编码序列、CD8 A 铰链区的编码序列、CD8跨膜区的编码序列、CD28胞内结构域的编码序列、CD3 ζ 胞内信号域的编码序列、polyA加尾信号序列、3' LTR以及转座酶的编码序列及其启动子;所述在T细胞基因组中整合入本文所述的CD47抗体的编码序列的不含转座酶编码序列的载体在5' LTR和3' LTR之间依次含有启动子、轻链信号肽的编码序列、CD47抗体的编码序列和polyA加尾信号序列。

[0107] 优选地,转染时,含嵌合抗原受体编码序列的载体与含CD47抗体编码序列的载体的质量比为1~7:1~3,优选1:1~3,更优选1:1~2,更优选1:1。

[0108] 转染的方法为本领域常规的方法,包括但不限于:病毒转导、显微注射、粒子轰击、基因枪转化和电转等。在某些实施方案中,采用电转将所述载体转染感兴趣的细胞中。

[0109] 感兴趣的细胞可以是本领域周知的各种T细胞,包括但不限于外周血T淋巴细胞、细胞毒杀伤T细胞(CTL)、辅助T细胞、抑制/调节性T细胞、 γ δ T细胞以及细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)等混合细胞群体的T细胞。在某些实施方案中,T细胞可来源于B细胞恶性肿瘤患者的PBMC。在某些实施方案中,T细胞为原代培养T细胞。

[0110] 本发明还提供一种组合物,所述组合物含有含本文所述嵌合抗原受体表达框的载体和含本文所述CD47抗体的表达框的载体。该组合物中还可含有合适的试剂,包括但不限于转染用的试剂。

[0111] 本发明还提供一种试剂盒,所述试剂盒含有含本文所述嵌合抗原受体表达框的载体和含本文所述CD47抗体的表达框的载体,或者含有本文所述的组合物。试剂盒中还可配有将所述载体转入细胞中的试剂或仪器。

[0112] 如本文所述,所述表达框中除含有嵌合抗原受体或CD47抗体的编码序列外,至少还含有合适的启动子和polyA加尾信号序列。

[0113] 本发明还提供一种药物组合物,所述药物组合物含有本文所述的T细胞和/或所述的CD47抗体。药物组合物中可含有合适的药学上可接受的载体或辅料。药物组合物中含有治疗或预防有效量的T细胞和/或所述的CD47抗体。可根据患者的病情等因素确定T细胞和/

或所述的CD47抗体的治疗或预防有效量。

[0114] 本发明还提供本文所述的T细胞或其药物组合物和/或所述的CD47抗体在制备治疗或预防恶性肿瘤(癌症)的药物中的用途。本发明还提供恶性肿瘤的治疗或预防方法,所述方法包括给予需要的对象治疗或预防有效量的本发明所述的T细胞和/或所述的CD47抗体。适用于本文所述T细胞和/或所述的CD47抗体进行治疗或预防的癌症优选癌细胞表面异常表达EGFR的癌症;优选地,所述癌症选自:胶质细胞癌、肾癌、腺癌、肺癌、结肠癌、大肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌、胆管癌、胆囊癌、食管癌、胰腺癌或前列腺癌。

[0115] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市场购买获得的常规产品。

[0116] 实施例1:重组质粒PNB328-EGFR-CAR、pS328- α CD47的构建

[0117] 委托商业公司合成EGFR-CAR(其核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示,编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示)、 α CD47基因(其核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示,编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示),其结构模式如图1所示,将其分别装入pNB328、pS328载体EcoRI和SalI酶切位点之间,构建出的重组质粒分别命名为pNB328-EGFR-CAR、pS328- α CD47。pNB328的结构及序列参见CN 201510638974.7,本文将其全部内容以引用的方式纳入本文;与pNB328相比,pS328缺少PB转座子序列,其它元件与pNB328载体相同。

[0118] 另外,采用相同的方法,使用野生型 α CD47基因(其核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示,编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示)构建得到pS328-wt- α CD47重组质粒。

[0119] 实施例2: α CD47-EGFR-CAR T细胞的构建

[0120] 外周血单核细胞(PBMCs)由Ficoll分离法分离获得。将PBMC贴壁培养2-4h,其中未贴壁的悬浮细胞即为初始T细胞,将悬浮细胞收集到15ml离心管中,1200rpm离心3min,弃上清,加入生理盐水,1200rpm离心3min,弃生理盐水,并重复此步骤;取1.5ml离心管,每管加入 5×10^6 个细胞,1200rpm离心3min,弃上清,取电转试剂盒(来自Lonza公司),按比例加入电转试剂100ul,加入pNB328-EGFR-CAR和pS328- α CD47质粒各4ug,将混合液转移至电转杯中,放入电转仪,选取U-014程序,进行电击;使用试剂盒中的微量吸管将电转好的细胞悬液转移到加好培液的六孔板中(含2%FBS的AIM-V培液),混匀,置于37°C,5%CO₂培养箱培养,六小时后加入刺激因子IL-2和anti-CD3/anti-CD28,37°C,继续培养4~5天,观察T细胞的生长情况,获得 α CD47-EGFR-CAR T细胞。

[0121] 另外,采用相同的方法,单用6ug的pNB328-EGFR-CAR质粒构建得到EGFR-CAR T细胞;单用6ug的空白质粒pNB328构建得到Mock T细胞;采用4ug的pNB328-EGFR-CAR和4ug的pS328-wt- α CD47构建得到wt- α CD47-EGFR-CAR T细胞。

[0122] 实施例3:检测 α CD47-EGFR-CAR T细胞CAR及CD47抗体的表达

[0123] 1. 流式检测CAR T细胞阳性率

[0124] 收集实施例2获得的 α CD47-EGFR-CAR T细胞,各分为两份,每份 1×10^6 个细胞,生理盐水洗涤两遍,100ul生理盐水重悬细胞,一份加入1ug的EGFR-生物素,另一份不加,4°C孵育30分钟。生理盐水洗涤两遍,再次用100ul生理盐水重悬细胞,加入1ul的链霉素-PE抗

体,4℃孵育30分钟。生理盐水洗涤两遍,上机检测,以电转了空载质粒(pNB328)的T细胞为对照。结果如图2A所示。

[0125] 2.ELISA检测 α CD47-EGFR-CAR T细胞CD47抗体表达量。

[0126] ①用包被液将CD47抗原稀释至0.5ug/ml(5ul+1ml包被液),100ul/孔包被酶标反应板,4℃过夜。

[0127] ②用PBST清洗5遍,每次3分钟,用吸水纸拍干,200ul/孔。

[0128] ③每孔加封闭液100ul,37℃孵育1小时。

[0129] ④用PBST清洗5遍,每次3分钟,用吸水纸拍干,200ul/孔。

[0130] ⑤加入样品及标准品,100ul/孔,设复孔和对照孔,37℃孵育1小时。

[0131] ⑥用PBST清洗5遍,每次3分钟,用吸水纸拍干,200ul/孔。

[0132] ⑦封闭液将IgG Fc-HRP按1:30000稀释,100ul/孔,37℃孵育45分钟。

[0133] ⑧用PBST清洗5遍,每次3分钟,用吸水纸拍干,200ul/孔。

[0134] ⑨加入显色液TMB,100ul/孔,37℃避光显色10-15min。

[0135] ⑩加入终止液终止反应,50ul/孔。

[0136] ⑪酶标仪上450nm处测OD值,绘制标准曲线,计算CD47抗体浓度。

[0137] 结果如图2B。

[0138] 实施例4:比较pNB328-EGFR-CAR、pS328- α CD47两种质粒不同配比条件下构建 α CD47-EGFR-CAR T细胞阳性率及抗体分泌量

[0139] 分别将实施例1构建得到的pNBS328-EGFR-CAR与pS328- α CD47质粒的量设置为1ug+7ug、2ug+6ug、3ug+5ug、4ug+4ug、5ug+3ug、6ug+2ug、7ug+1ug这7种配比,进行CAR T细胞构建,构建方法同实施例2。分别检测7种配比下构建出的CAR-T细胞阳性率及抗体分泌量(检测方法同实施例3)。

[0140] 结果如图3A、3B所示,在4ug+4ug的配比下,CAR-T阳性率及抗体分泌量都能处于较好水平。

[0141] 实施例5:检测Mock T细胞、EGFR-CAR T细胞以及 α CD47-EGFR-CAR T细胞的CD47表达

[0142] 收集实施例2构建得到的Mock T细胞、EGFR-CAR T细胞以及 α CD47-EGFR-CAR T细胞,使用BD的流式抗体鼠抗人CD47-FITC检测CD47的表达,流式方法同实施例3。

[0143] 结果如图4所示, α CD47-EGFR-CAR T分泌的CD47抗体可以封闭细胞自身的CD47表达。

[0144] 实施例6:Mock T细胞、EGFR-CAR T细胞以及 α CD47-EGFR-CAR T细胞对肿瘤细胞的杀伤作用

[0145] 选取肺癌细胞株H23、卵巢癌细胞株SKOV3、胰腺癌细胞株ASPC-1三种EGFR阳性细胞为靶细胞,应用艾森公司的实时无标记细胞功能分析仪(RTCA)检测实施例2获得的Mock T细胞、EGFR-CAR T细胞以及 α CD47-EGFR-CAR T细胞的体外杀伤活性,具体步骤如下:

[0146] (1) 调零:每孔加入50 μ l DMEM或1640培养液,放入仪器中,选择步骤1,调零;

[0147] (2) 靶细胞铺板:肺癌细胞株H23、卵巢癌细胞株SKOV3、胰腺癌细胞株ASPC-1(购买于美国菌种保藏中心ATCC)按每孔 10^4 个细胞/50 μ l铺在含有检测电极的板中,放置数分钟,待细胞稳定一下,再放入仪器中,开始步骤2,培养细胞;

[0148] (3) 加入效应细胞:靶细胞培养24h后,暂停步骤2,加入效应细胞,每孔50 μ l,效靶比分别设置为4:1,以转入pNB328空载体的Mock T细胞作为对照,开始步骤3,继续共培养24h后,观察细胞增殖曲线。

[0149] 结果如图5所示。EGFR-CAR T细胞以及 α CD47-EGFR-CAR T细胞的体外杀伤活性要明显高于Mock T细胞,且自表达CD47抗体并不会影响CAR-T细胞的杀伤功能。

[0150] 实施例7: α CD47-EGFR-CAR T细胞培养上清可以封闭肿瘤细胞表面CD47

[0151] 将实施例2获得的 α CD47-EGFR-CAR T细胞的培养上清分别与肺癌细胞株H23、卵巢癌细胞株SKOV3、胰腺癌细胞株ASPC-1共培养,24小时后,收集肿瘤细胞,检测CD47的表达,以未与 α CD47-EGFR-CAR T细胞上清共培养的为对照。流式检测方法同实施例3。

[0152] 结果如图6所示, α CD47-EGFR-CAR T细胞上清中的CD47抗体可以封闭肿瘤细胞表面CD47。

[0153] 实施例8:封闭肿瘤细胞表面CD47可以提升巨噬细胞对其吞噬作用

[0154] 1. 巨噬细胞的分离及培养:Ficoll密度梯度离心法分离出外周血单核细胞(PBMC),置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱贴壁培养4h,用预温的培养基洗去未贴壁细胞,加入AIM-V培养基及rhGM-CSF(终浓度1000U/ml)。隔两天半量换液,培养7天,得贴壁细胞,即为巨噬细胞。

[0155] 2. 巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用:将肿瘤细胞用Hoechst染料染成蓝色,将巨噬细胞用CM-Dil染成红色,具体染色方法见染料说明书。将染色好的两种细胞混合,分为两份,一份加入实施例2构建得到的EGFR-CAR T细胞的培养上清作为对照,另一份加入实施例2构建得到的 α CD47-EGFR-CAR T细胞的培养上清,共聚焦显微镜观察吞噬作用,并细胞数统计吞噬效率。

[0156] 结果如图7所示,加入 α CD47-EGFR-CAR T细胞的培养上清组其巨噬细胞的吞噬作用要明显高于对照组。

[0157] 实施例9: α CD47-EGFR-CAR T细胞体内抗肿瘤作用

[0158] 购买4~6周龄NSG小鼠20只,平均分为5组,每组4只,接种肺癌细胞株H23,每只 1×10^7 个细胞,成瘤10天后,分别尾静脉注射PB(100 μ l)S和实施例2获得的Mock T细胞、EGFR-CAR T细胞、wt- α CD47-EGFR-CAR T细胞和 α CD47-EGFR-CAR T细胞(1×10^7 个细胞/只),观察记录肿瘤体积。结果显示PBS、Mock T细胞、wt- α CD47-EGFR-CAR T细胞对肿瘤模型没有治疗效果,EGFR-CAR T细胞和 α CD47-EGFR-CAR T细胞都有很好的抗肿瘤效果,且 α CD47-EGFR-CAR T细胞效果更好。具体如图8所示。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 上海细胞治疗研究院
 [0003] 上海细胞治疗工程技术研究中心集团有限公司
 [0004] <120> 自分泌CD47抗体的EGFR特异性CAR-T细胞及其用途
 [0005] <130> 17A013
 [0006] <160> 6
 [0007] <170> SIPOSequenceListing 1.0
 [0008] <210> 1
 [0009] <211> 497
 [0010] <212> PRT
 [0011] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0012] <400> 1
 [0013] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 [0014] 1 5 10 15
 [0015] His Ala Ala Arg Pro Ser Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile
 [0016] 20 25 30
 [0017] Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser
 [0018] 35 40 45
 [0019] Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly
 [0020] 50 55 60
 [0021] Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile
 [0022] 65 70 75 80
 [0023] Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser
 [0024] 85 90 95
 [0025] Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln
 [0026] 100 105 110
 [0027] Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 [0028] 115 120 125
 [0029] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 [0030] 130 135 140
 [0031] Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 [0032] 145 150 155 160
 [0033] Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 [0034] 165 170 175
 [0035] Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 [0036] 180 185 190
 [0037] Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 [0038] 195 200 205
 [0039] Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 [0040] 210 215 220
 [0041] Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

[0042]	225	230	235	240
[0043]	Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0044]		245	250	255
[0045]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys			
[0046]		260	265	270
[0047]	Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile			
[0048]		275	280	285
[0049]	Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala			
[0050]		290	295	300
[0051]	Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr			
[0052]	305	310	315	320
[0053]	Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu			
[0054]		325	330	335
[0055]	Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu			
[0056]		340	345	350
[0057]	His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg			
[0058]		355	360	365
[0059]	Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg			
[0060]		370	375	380
[0061]	Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln			
[0062]	385	390	395	400
[0063]	Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu			
[0064]		405	410	415
[0065]	Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly			
[0066]		420	425	430
[0067]	Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln			
[0068]		435	440	445
[0069]	Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu			
[0070]		450	455	460
[0071]	Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr			
[0072]	465	470	475	480
[0073]	Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro			
[0074]		485	490	495
[0075]	Arg			
[0076]	<210> 2			
[0077]	<211> 367			
[0078]	<212> PRT			
[0079]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0080]	<400> 2			
[0081]	Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro			
[0082]	1	5	10	15
[0083]	Asp Thr Thr Gly Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser			

[0084]	20	25	30
[0085]	Val Leu Val Ala Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr		
[0086]	35	40	45
[0087]	Ser Leu Phe Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro		
[0088]	50	55	60
[0089]	Gly Arg Val Leu Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val		
[0090]	65	70	75
[0091]	Thr Thr Val Ser Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile		
[0092]	85	90	95
[0093]	Arg Ile Gly Asn Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile		
[0094]	100	105	110
[0095]	Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala		
[0096]	115	120	125
[0097]	Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Glu Ser Lys Tyr Gly Pro		
[0098]	130	135	140
[0099]	Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val		
[0100]	145	150	155
[0101]	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
[0102]	165	170	175
[0103]	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
[0104]	180	185	190
[0105]	Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
[0106]	195	200	205
[0107]	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
[0108]	210	215	220
[0109]	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
[0110]	225	230	235
[0111]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
[0112]	245	250	255
[0113]	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
[0114]	260	265	270
[0115]	Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
[0116]	275	280	285
[0117]	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
[0118]	290	295	300
[0119]	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
[0120]	305	310	315
[0121]	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
[0122]	325	330	335
[0123]	Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
[0124]	340	345	350
[0125]	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		

[0126]	355	360	365
[0127]	<210> 3		
[0128]	<211> 367		
[0129]	<212> PRT		
[0130]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0131]	<400> 3		
[0132]	Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro		
[0133]	1	5	10
[0134]	Asp Thr Thr Gly Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser		
[0135]	20	25	30
[0136]	Val Leu Val Ala Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr		
[0137]	35	40	45
[0138]	Ser Leu Phe Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro		
[0139]	50	55	60
[0140]	Gly Arg Val Leu Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val		
[0141]	65	70	75
[0142]	Thr Thr Val Ser Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile		
[0143]	85	90	95
[0144]	Arg Ile Gly Asn Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile		
[0145]	100	105	110
[0146]	Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala		
[0147]	115	120	125
[0148]	Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Glu Ser Lys Tyr Gly Pro		
[0149]	130	135	140
[0150]	Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val		
[0151]	145	150	155
[0152]	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
[0153]	165	170	175
[0154]	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
[0155]	180	185	190
[0156]	Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
[0157]	195	200	205
[0158]	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
[0159]	210	215	220
[0160]	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
[0161]	225	230	235
[0162]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
[0163]	245	250	255
[0164]	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
[0165]	260	265	270
[0166]	Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
[0167]	275	280	285

[0168]	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
[0169]	290	300	
[0170]	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
[0171]	305	315	320
[0172]	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
[0173]	325	330	335
[0174]	Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
[0175]	340	345	350
[0176]	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[0177]	355	360	365
[0178]	<210> 4		
[0179]	<211> 1494		
[0180]	<212> DNA		
[0181]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0182]	<400> 4		
[0183]	atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60	
[0184]	ccgagcgaca tcttgctgac tcagtctcca gtcctcctgt ctgtgagtcc aggagaaaga	120	
[0185]	gtcagtttct cctgcagggc cagtcagagt attggcaca acatacactg gtatcagcaa	180	
[0186]	agaacaaatg gttctccaag gcttctcata aagtatgctt ctgagtctat ctctgggatc	240	
[0187]	ccttcaggt ttagtggcag tggatcagg acagatttta ctcttagcat caacagtgtg	300	
[0188]	gagtctgaag atattgcaga ttattactgt caacaaaata ataactggcc aaccacgttc	360	
[0189]	ggtgctggga ccaagctgga gctgaaaggt ggaggcggt caggcggagg tggcagcggc	420	
[0190]	ggtggcgggt cgcagtgca gctgaagcag tcaggacctg gcctagtgca gccctcacag	480	
[0191]	agcctgtcca tcacctgac agtctctggt ttctcattaa ctaactatgg tgtactactg	540	
[0192]	gttcgccagt ctccaggaaa gggctctggag tggctgggag tgatatggag tgggtgaaac	600	
[0193]	acagactata atacacctt cacatccaga ctgagcatca acaaggaca ttccaagagc	660	
[0194]	caagtttct ttaaaatgaa cagtctgca tctaatagaca cagccatata ttactgtgcc	720	
[0195]	agagccctca cctactatga ttacagttt gcttactggg gccaaaggac tctggtcact	780	
[0196]	gtctcttctg tegtccggt cttctgcca gcaagccca ccacgacgc agcgcgcga	840	
[0197]	ccaccaaac cggcgccac catcgctcg cagccctgt ccctgcgcc agaggcgtgc	900	
[0198]	cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg agggggctgg acttcgcctg tgatatctac	960	
[0199]	atctgggcgc ccctggccgg gacttgctgg gtccttctcc tgtcactggt taccacctt	1020	
[0200]	tactgcaacc acaggagtaa gaggagcagg ctctgcaca gtgactacat gaacatgact	1080	
[0201]	ccccgccgc ccggggccac ccgcaagcat taccagcct atgccccacc acgcgacttc	1140	
[0202]	gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag	1200	
[0203]	ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg	1260	
[0204]	gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag	1320	
[0205]	gaagcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg	1380	
[0206]	atgaaaggcg agcgcgggag gggcaaggg cagcatggcc tttaccagg tctcagtaca	1440	
[0207]	gccaccaagg acacctacga cgccctcac atgcaggccc tgccccctcg ctga	1494	
[0208]	<210> 5		
[0209]	<211> 1104		

[0210]	<212> DNA	
[0211]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0212]	<400> 5	
[0213]	atggaagccc cagctcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga	60
[0214]	gaggaggagc tgcagatcat tcagcctgac aagtccgtgt tggttgcagc tggagagaca	120
[0215]	gccactctgc gctgcactat cacctctctg ttccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga	180
[0216]	ggagctggac caggccgggt gttaatctac aatcaaagac agggccccct cccccgggta	240
[0217]	acaactgttt cagacaccac aaagagaaac aacatggact tttccatccg catcggtaac	300
[0218]	atcaccccag cagatgccgg cacctactac tgtatcaagt tccgaaagg gagccccgat	360
[0219]	gacgtggagt ttaagtctgg agcaggcact gagctgtctg tgcgcgcaa acccgagtcc	420
[0220]	aaatatggtc ccccatgccc accatgcca gcacctgagt tcgagggggg accatcagtc	480
[0221]	ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg	540
[0222]	tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat	600
[0223]	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgaggagg agcagttcca gacacgtac	660
[0224]	cgtgtggtca gcgtctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag	720
[0225]	tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgctc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	780
[0226]	gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag	840
[0227]	aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag	900
[0228]	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg tctggactcc	960
[0229]	gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg	1020
[0230]	aatgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc	1080
[0231]	ctctccctgt ctctgggtaa atga	1104
[0232]	<210> 6	
[0233]	<211> 1104	
[0234]	<212> DNA	
[0235]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0236]	<400> 6	
[0237]	atggaagccc cagctcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga	60
[0238]	gaggaggagc tgcagatcat tcagcctgac aagtccgtgt tggttgcagc tggagagaca	120
[0239]	gccactctgc gctgcactat cacctctctg ttccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga	180
[0240]	ggagctggac caggccgggt gttaatctac aatcaaagac agggccccct cccccgggta	240
[0241]	acaactgttt cagacaccac aaagagaaac aacatggact tttccatccg catcggtaac	300
[0242]	atcaccccag cagatgccgg cacctactac tgtatcaagt tccgaaagg gagccccgat	360
[0243]	gacgtggagt ttaagtctgg agcaggcact gagctgtctg tgcgcgcaa acccgagtcc	420
[0244]	aaatatggtc ccccatgccc accatgcca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc	480
[0245]	ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg	540
[0246]	tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat	600
[0247]	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgaggagg agcagttcaa cagcagctac	660
[0248]	cgtgtggtca gcgtctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag	720
[0249]	tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgctc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	780
[0250]	gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag	840
[0251]	aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag	900

[0252] tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 960
[0253] gacggctcct tcttctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1020
[0254] aatgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactaac acagaagagc 1080
[0255] ctctccctgt ctctggtaa atga 1104

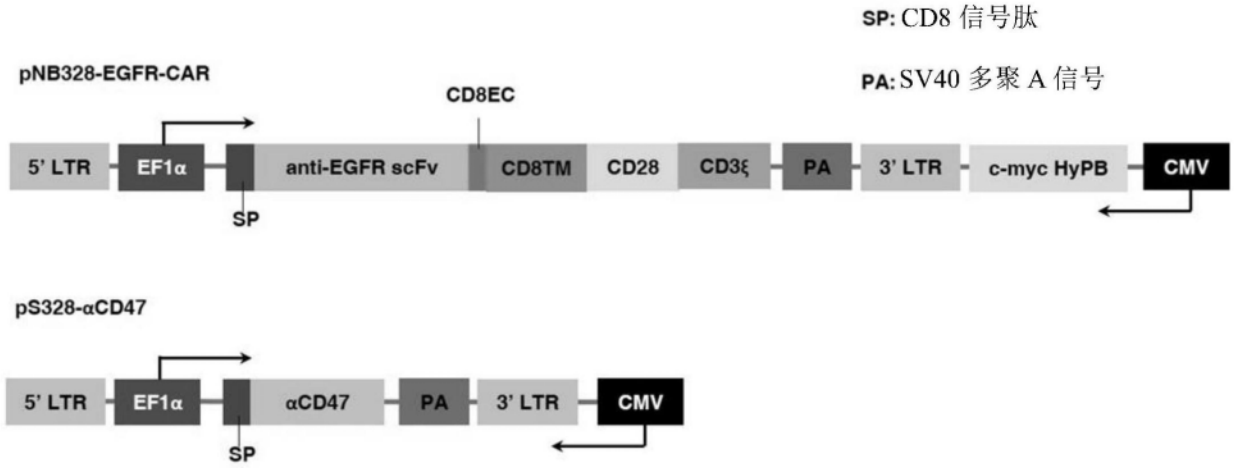


图1

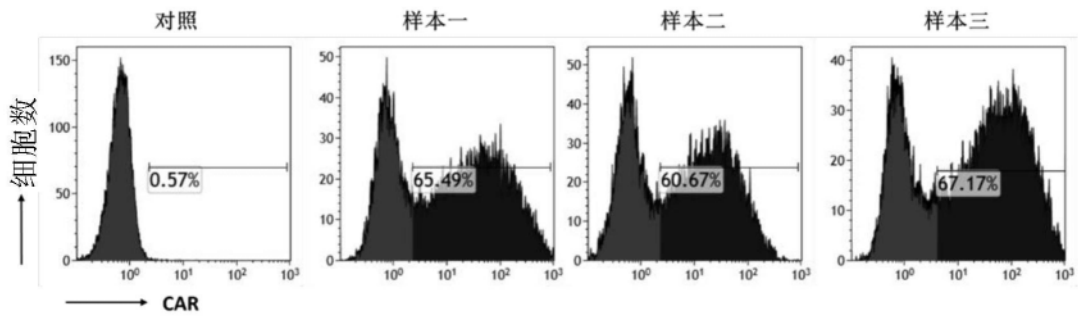
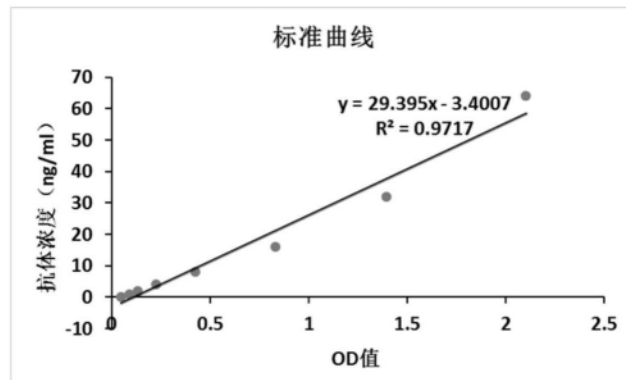


图2A



αCD47-EGFR-CART	抗体分泌量 (ng/ml)
样本一	1112.325
样本二	959.256
样本三	1068.218

图2B

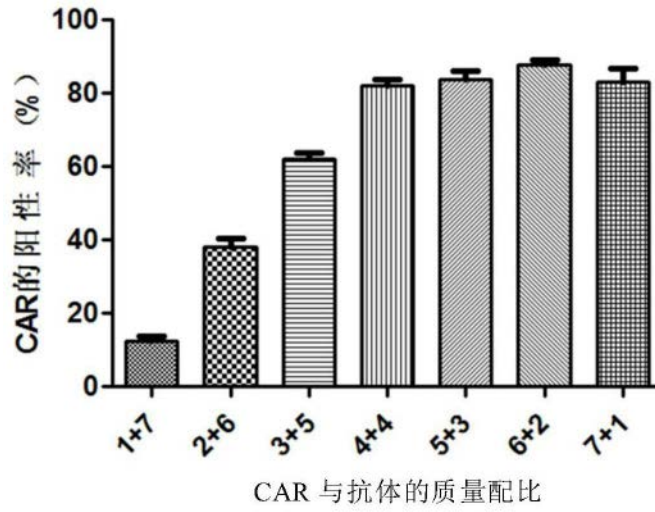


图3A

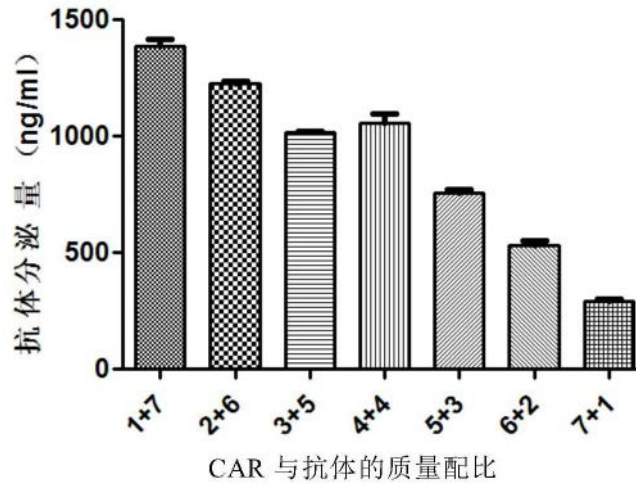


图3B

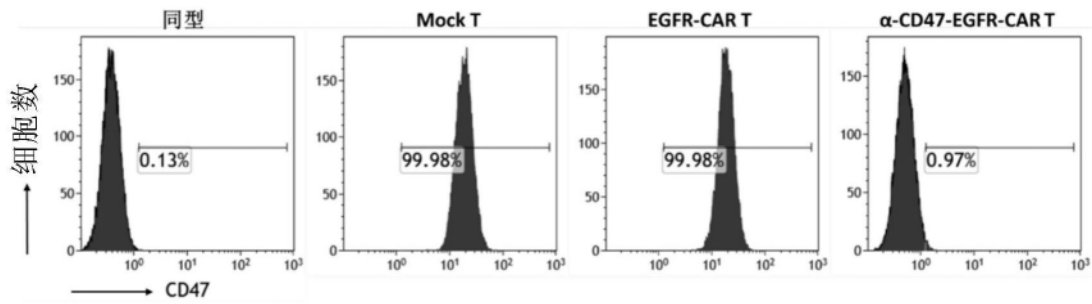


图4

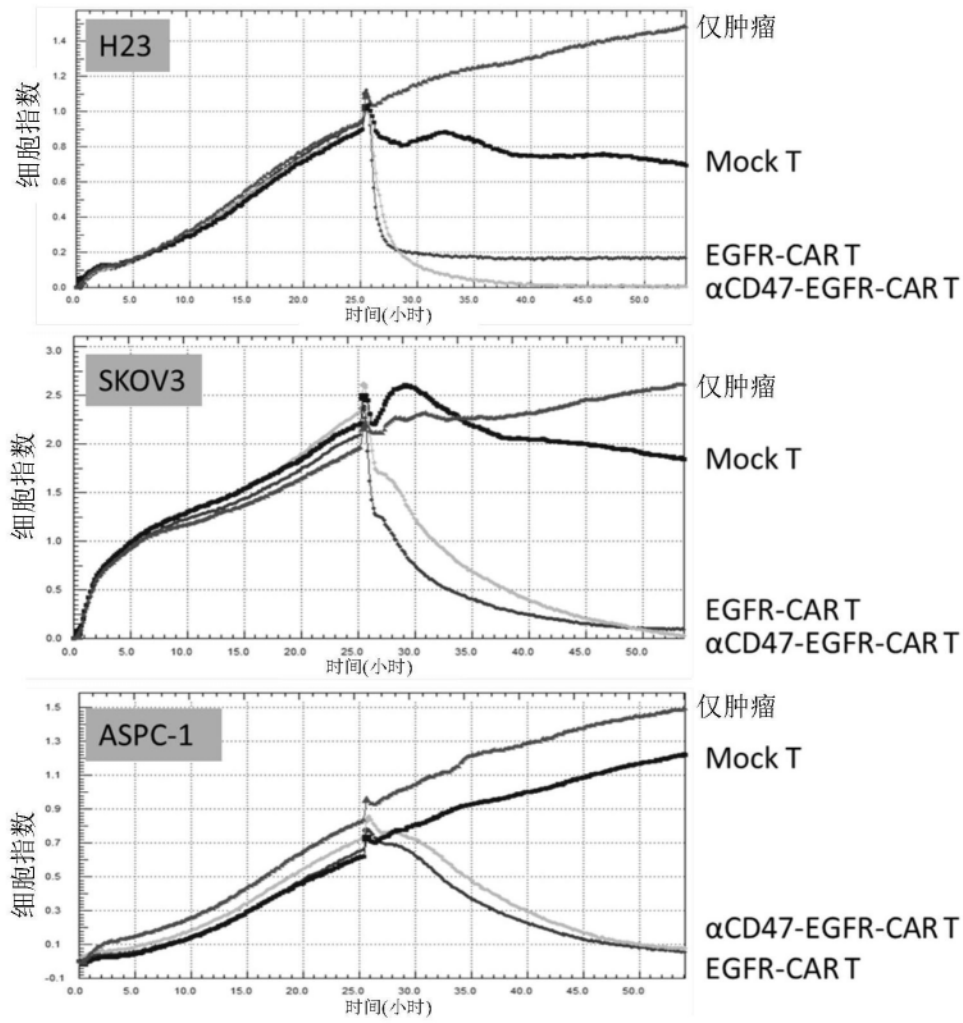


图5

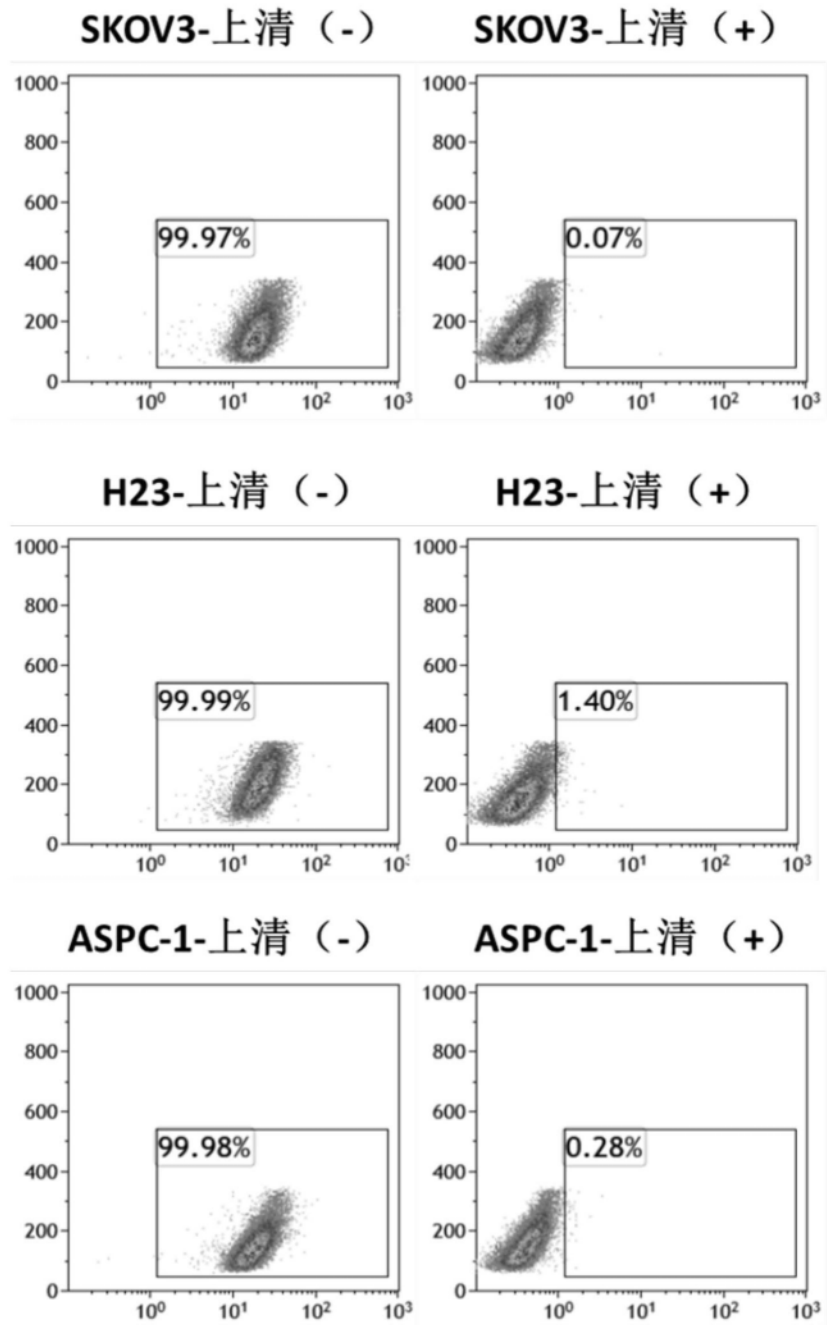


图6

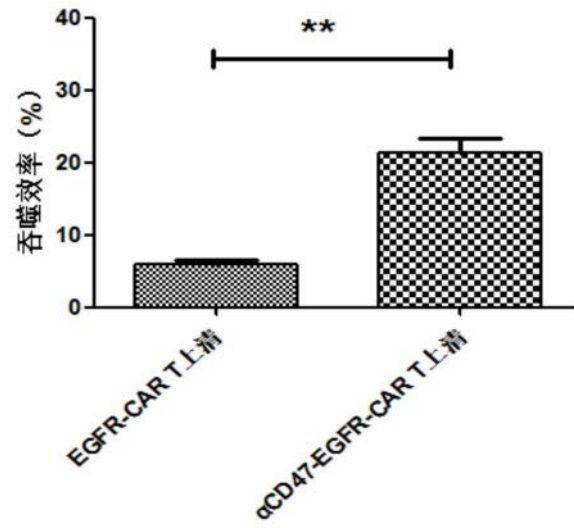


图7

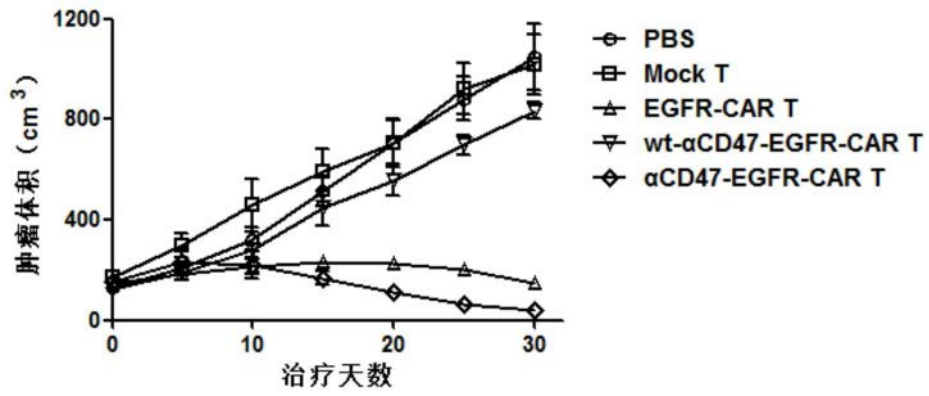


图8