



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113621073 A

(43) 申请公布日 2021.11.09

(21) 申请号 202110793058.6

(22) 申请日 2021.07.14

(71) 申请人 上海易慕峰生物科技有限公司

地址 200120 上海市浦东新区中国(上海)
自由贸易试验区蔡伦路781号702室

(72) 发明人 李彦涛 钟云鹏 王有涛 王玉晗
易桥勇

(74) 专利代理机构 上海申新律师事务所 31272
代理人 郎祺

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页
序列表14页 附图6页

(54) 发明名称

一种新型嵌合受体组合物、重组载体、细胞及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种新型嵌合受体组合物、重组载体、细胞及其应用。该新型嵌合受体组合物包括传统的嵌合抗原受体和包括NKG2D、DAP10和/或DAP12的全长序列或者截短片段的NKG2D嵌合受体,简称Dual CAR。本发明提供的嵌合受体组合物使常规CAR-T细胞表达NKG2D胞外区及胞内信号区,扩大CAR-T抗原识别谱,解决肿瘤异质性的同时,实现了较低水平的因子释放,降低因子风暴发生的可能,增加CAR-T安全性。

21007	CAR
21067	CAR P2A DAP12ICD DAP10ICD NKG2DFL
21068	CAR P2A DAP12ICD DAP10ICD NKG2DECD+TM
21069	CAR P2A NKG2DECD DAP10FL DAP12ICD
21070	CAR P2A NKG2DECD CD8 HINGE+TM DAP10ECD DAP12ICD
21071	CAR P2A NKG2DECD CD8 HINGE+TM 4-1BB DAP12ICD
21072	CAR P2A NKG2DECD CD28 HINGE+TM+ICD DAP12ICD
21073	CAR DAP12FL
21074	CAR P2A NKG2DFL T2A DAP12FL P2A DAP10FL

1. 一种新型嵌合受体组合物,其特征在于,包括嵌合抗原受体和包括NKG2D、DAP10和/或DAP12的全长序列或者截短片段的NKG2D嵌合受体。

2. 根据权利要求1所述的嵌合受体组合物,其特征在于,包括嵌合抗原受体和NKG2D嵌合受体;所述NKG2D嵌合受体包括NKG2D胞外区和DAP12胞内区序列。

3. 根据权利要求2所述的嵌合受体组合物,其特征在于,所述NKG2D嵌合受体还包括一个共刺激分子;所述共刺激分子选自:CD28、4-1BB、DAP10、ICOS、OX40和CD40。

4. 根据权利要求1所述的嵌合受体组合物,其特征在于,所述嵌合抗原受体包括:胞外识别区、胞外铰链区、跨膜区和胞内信号区。

5. 根据权利要求4所述的嵌合受体组合物,其特征在于,所述嵌合抗原受体的胞外识别区包括识别肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原的抗体或抗体片段;所述肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原优选选自:CD19、BCMA、CD22、CD20、CD123、CD30、CD38、CD138、CD56、CD7、CLL-1、CD10、CD34、CS1、CD16、CD4、CD5、IL-1-RAP、ITGB7、k-IgG、TAC1、TRBC1、MUC1、NKG2D、PD-L1、CD133、CD177、LeY、CD70、ROR1、AFP、AXL、CD80、CD86、DLL3、DR5、FAP、LMP1、MAGE-A1、MAGE-A4、MG7、MUC16、PMEL、ROR2、VEGFR2、CD171、Claudin 18.2、Claudin 6、EphA2、ErbB、Fra、PSCA、cMet、IL13Ra2、EPCAM、EGFR、PSMA、EGFRvIII、GPC3、CEA、HER2、GD2和Mesothelin。

6. 根据权利要求4所述的嵌合受体组合物,其特征在于,所述铰链区的序列来源于CD8 α 、CD28、4-1BB、ICOS、OX40、CD40、CD80和IgG的至少一种,所述跨膜区的序列来源于CD2、CD27、LFA-1、CD8 α 、CD28、4-1BB、ICOS、OX40、CD40、CD80、CD3 ζ 和CD3 ϵ 的至少一种,所述胞内信号区的序列来源于Toll样受体、CD2、CD27、LFA-1、CD8 α 、CD28、4-1BB、ICOS、OX40、CD40、CD80、DAP10、DAP12、CD3 ζ 和CD3 ϵ 中的至少一种。

7. 根据权利要求1所述的嵌合受体组合物,其特征在于,所述嵌合抗原受体的氨基酸序列为SEQ ID NO.1。

8. 根据权利要求1所述的嵌合受体组合物,其特征在于,还包括连接肽,连接所述嵌合抗原受体和嵌合受体;该连接肽为自切割多肽2A肽;该2A肽包括F2A、P2A、T2A和E2A;优选为P2A,其氨基酸序列为SEQ ID NO.10。

9. 根据权利要求1所述的嵌合受体组合物,其特征在于,所述嵌合受体的氨基酸序列选自以下序列的一条:SEQ ID NO.2~SEQ ID NO.9;优选为SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.7。

10. 一种编码如权利要求1-9任一项所述嵌合受体组合物的核酸序列。

11. 一种包含如权利要求10所述的核酸序列的载体。

12. 一种表达如权利要求1-9任一项所述嵌合受体组合物、含有如权利要求10所述核酸序列或者如权利要求11所述载体的细胞。

13. 根据权利要求12所述的细胞,其特征在于,所述细胞选自以下细胞中的一种:T细胞、NK细胞、DC细胞和巨噬细胞;优选为 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或NKT细胞。

14. 一种治疗肿瘤的生物制剂,其特征在于,包括如权利要求12或13所述的细胞作为主要活性成分。

15. 一种如权利要求12或13所述细胞的制备方法,其特征在于,包括将如权利要求11所述载体转染所述细胞的步骤。

16. 如权利要求1-9任一项所述的嵌合受体组合物、如权利要求10所述的核酸序列、如权利要求11所述的载体或如权利要求12或13所述的细胞在制备抗肿瘤药物中的应用。

一种新型嵌合受体组合物、重组载体、细胞及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体涉及一种新型嵌合受体组合物、重组载体、细胞及其应用。

背景技术

[0002] 传统肿瘤治疗的方法包括手术、放疗、化疗、靶向治疗等;近些年免疫疗法的发展为肿瘤治疗领域带来深刻的改变,尤其是以CTLA-4、PD-1/PD-L1通路抑制剂为代表的免疫检查点疗法和以CAR-T为代表的过继性细胞疗法。过继性细胞疗法包括TIL、NK、TCR-T、CAR-T/NK/NKT/TIL/M ϕ 等。其中靶向CD19的CAR-T疗法在B细胞肿瘤中取得了优秀的临床疗效,并且在2017年有两款CAR-T产品被FDA批准用于B细胞白血病或者淋巴瘤的治疗。

[0003] 虽然CAR-T在血液瘤中取得了重大进展,但在治疗血液瘤中细胞因子风暴等副作用发生率较高,大部分患者在接受CAR-T治疗过程中需要使用辅助手段降低细胞因子风暴带来的副作用。CAR-T在实体瘤治疗中效果差,其中一个重要原因为肿瘤异质性,CAR-T细胞杀伤实体瘤能力较弱并且无法完全清除肿瘤细胞,另外CAR-T在实体瘤治疗因子风暴发生率及因子风暴水平较血液瘤更高,副作用更严重,获益与临床风险比低影响了临床实体瘤患者对CAR-T治疗的接受度。

[0004] 现有的解决方案一般采用双靶点等解决肿瘤异质性,在治疗过程中或提前介入,采用抗体对症治疗因子风暴或在CAR-T上设计安全开关,当因子风暴发生或CAR-T过度增殖时,使用抗体中和细胞因子或清除CAR-T细胞,降低CAR-T毒副作用。

[0005] NK细胞表面表达NKG2D,通过识别其配体如MICA或MICB等激活下游信号DAP10及DAP12等从而杀伤靶细胞,T细胞表面本身也表达NKG2D,胞内表达DAP10而不表达DAP12,正常情况下T细胞表面NKG2D识别其配体后无法有效激活胞内信号,从而不能杀伤靶细胞。本发明拟设计在常规CAR-T细胞表达NKG2D胞外区及胞内信号区,扩大CAR-T抗原识别谱的同时,解决肿瘤异质性。

发明内容

[0006] 为了克服现有技术中的缺陷,本发明提供了一种新型嵌合受体组合物、重组载体、细胞及其应用,扩大CAR-T抗原识别谱的同时,解决肿瘤异质性,且降低因子风暴发生的可能,增加了CAR-T安全性。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 本发明的第一方面是提供一种新型嵌合受体组合物,其包括嵌合抗原受体和包括NKG2D、DAP10和/或DAP12的全长序列或者截短片段的NKG2D嵌合受体。

[0009] 进一步地,该嵌合受体组合物包括嵌合抗原受体和NKG2D嵌合受体;该NKG2D嵌合受体包括NKG2D胞外区和DAP12胞内区序列。

[0010] 进一步地,上述NKG2D嵌合受体还包括一个共刺激分子;该共刺激分子选自:CD28、4-1BB、DAP10、ICOS、OX40和CD40。

[0011] 进一步地,上述嵌合抗原受体包括:胞外识别区、胞外铰链区、跨膜区和胞内信号区。

[0012] 进一步地,上述胞外识别区包括识别肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原的抗体或抗体片段。

[0013] 进一步地,上述肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原选自:CD19、BCMA、CD22、CD20、CD123、CD30、CD38、CD138、CD56、CD7、CLL-1、CD10、CD34、CS1、CD16、CD4、CD5、IL-1-RAP、ITGB7、k-IgG、TAC1、TRBC1、MUC1、NKG2D、PD-L1、CD133、CD177、LeY、CD70、ROR1、AFP、AXL、CD80、CD86、DLL3、DR5、FAP、LMP1、MAGE-A1、MAGE-A4、MG7、MUC16、PMEL、ROR2、VEGFR2、CD171、Claudin 18.2、Claudin 6、EphA2、ErbB、Fra、PSCA、cMet、IL13Ra2、EPCAM、EGFR、PSMA、EGFRvIII、GPC3、CEA、HER2、GD2和Mesothelin。

[0014] 进一步地,上述铰链区的序列来源于CD8 α 、CD28、4-1BB、ICOS、OX40、CD40、CD80和IgG的至少一种,上述跨膜区的序列来源于CD2、CD27、LFA-1 (CD11a/CD18)、CD8 α 、CD28、4-1BB、ICOS、OX40、CD40、CD80、CD3 ζ 和CD3 ϵ 的至少一种,上述胞内信号区的序列来源于To11样受体、CD2、CD27、LFA-1 (CD11a/CD18)、CD8 α 、CD28、4-1BB、ICOS、OX40、CD40、CD80、DAP10、DAP12、CD3 ζ 和CD3 ϵ 等中的至少一种。

[0015] 进一步地,上述嵌合抗原受体的氨基酸序列为SEQ ID NO.1。

[0016] 进一步地,上述嵌合受体组合物还包括连接肽,连接上述嵌合抗原受体和嵌合受体;该连接肽为自切割多肽2A肽;该2A肽包括F2A、P2A、T2A和E2A;优选为P2A,其氨基酸序列为SEQ ID NO.10。

[0017] 进一步地,上述嵌合受体的氨基酸序列选自以下序列的一条:SEQ IDNO.2~SEQ ID NO.9;优选为SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.7。

[0018] 本发明的第二方面是提供编码上述嵌合受体组合物的核酸序列。

[0019] 本发明的第三方面是提供包含上述核酸序列的载体。

[0020] 本发明的第四方面是提供表达上述嵌合受体组合物、含有上述核酸序列或者上述载体的细胞。

[0021] 进一步地,上述细胞选自以下细胞中的一种:T细胞、NK细胞、DC细胞和巨噬细胞。

[0022] 进一步地,上述T细胞选自 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或NKT细胞。

[0023] 本发明的第五方面是提供一种治疗肿瘤的生物制剂,包括上述细胞作为主要活性成分。

[0024] 本发明的第六方面是提供上述细胞的制备方法,包括将上述载体转染细胞的步骤。

[0025] 本发明的第七方面是提供上述嵌合受体组合物、核酸序列、载体或细胞在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0026] 本发明采用以上技术方案,与现有技术相比,具有如下技术效果:

[0027] 本发明提供的嵌合受体组合物使常规CAR-T细胞表达NKG2D胞外区及胞内信号区,扩大CAR-T抗原识别谱,解决肿瘤异质性,在增强CAR-T对表达目标靶抗原肿瘤细胞的杀伤能力的同时,实现了较低水平的因子释放,降低因子风暴发生的可能,增加CAR-T安全性。

附图说明

[0028] 图1是本发明一实施例中序列名称为21007、21067-21074的嵌合受体组合物的结构示意图；

[0029] 图2显示了本发明一实施例中构建的CAR-T细胞anti-CLDN18.2-CAR及NKG2D的表达结果；

[0030] 图3显示了本发明一实施例中构建的细胞系293-CLDN18.2高表达CLDN18.2；

[0031] 图4显示了本发明一实施例中293T表达较高水平的NKG2D配体MICA/B；

[0032] 图5显示了本发明一实施例中Dual CAR-T细胞对细胞系293-CLDN18.2的杀伤效果；

[0033] 图6显示了本发明一实施例中与细胞系293-CLDN18.2共孵育，CAR-T的增殖倍数；

[0034] 图7显示了本发明一实施例中Dual CAR-T细胞对293T细胞的杀伤效果；

[0035] 图8显示了本发明一实施例中Dual CAR-T细胞在杀伤的靶细胞293-CLDN18.2时有更低的因子分泌水平，其中图A-D分别显示了IL-2、IFN- γ 、IL6和TNF- α 的分泌水平；

[0036] 图9显示了本发明一实施例中Dual CAR-T细胞在杀伤表达MICA/B的靶细胞时释放中等水平的细胞因子，其中图A-D分别显示了IFN- γ 、TNF- α 、IL6和IL-2的分泌水平。

具体实施方式

[0037] 本发明构建了一种嵌合受体组合物，在传统的嵌合抗原受体表达载体基础上增加包括NKG2D、DAP10和/或DAP12的全长序列或者截短片段的NKG2D嵌合受体，将载体包装为慢病毒，将慢病毒转导细胞制备针对同时靶向CLDN18.2并表达NKG2D的免疫细胞，增加免疫细胞疗法的安全性。

[0038] 本发明一实施例提供了一种新型嵌合受体组合物，其包括嵌合抗原受体和包括NKG2D、DAP10和/或DAP12的全长序列或者截短片段的NKG2D嵌合受体。

[0039] 在本发明一优选的实施方式中，该嵌合受体组合物包括嵌合抗原受体和NKG2D嵌合受体；该NKG2D嵌合受体包括NKG2D胞外区和DAP12胞内区序列。

[0040] 在本发明一优选的实施方式中，上述NKG2D嵌合受体还包括一个共刺激分子；该共刺激分子选自：CD28、4-1BB、DAP10、ICOS、OX40和CD40。

[0041] 在本发明一优选的实施方式中，上述嵌合抗原受体包括：胞外识别区、胞外铰链区、跨膜区和胞内信号区。

[0042] 在本发明一优选的实施方式中，上述胞外识别区包括识别肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原的抗体或抗体片段。

[0043] 在本发明一优选的实施方式中，上述肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原选自但不限于：CD19、BCMA、CD22、CD20、CD123、CD30、CD38、CD138、CD56、CD7、CLL-1、CD10、CD34、CS1、CD16、CD4、CD5、IL-1-RAP、ITGB7、k-IgG、TAC1、TRBC1、MUC1、NKG2D、PD-L1、CD133、CD177、LeY、CD70、ROR1、AFP、AXL、CD80、CD86、DLL3、DR5、FAP、LMP1、MAGE-A1、MAGE-A4、MG7、MUC16、PMEL、ROR2、VEGFR2、CD171、Claudin 18.2、Claudin 6、EphA2、ErbB、Fra、PSCA、cMet、IL13Ra2、EPCAM、EGFR、PSMA、EGFRvIII、GPC3、CEA、HER2、GD2和Mesothelin。

[0044] 在本发明一优选的实施方式中，上述铰链区的序列来源于CD8 α 、CD28、4-1BB、ICOS、OX40、CD40、CD80和IgG的至少一种，上述跨膜区的序列来源于CD2、CD27、LFA-1

(CD11a/CD18)、CD8 α 、CD28、4-1BB、ICOS、OX40、CD40、CD80、CD3 ζ 和CD3 ϵ 的至少一种,上述胞内信号区的序列来源于Toll样受体、CD2、CD27、LFA-1 (CD11a/CD18)、CD8 α 、CD28、4-1BB、ICOS、OX40、CD40、CD80、DAP10、DAP12、CD3 ζ 和CD3 ϵ 等中的至少一种。

[0045] 在本发明一优选的实施方式中,上述嵌合抗原受体的氨基酸序列为SEQ ID NO.1。

[0046] 在本发明一优选的实施方式中,上述嵌合受体组合物还包括连接肽,连接上述嵌合抗原受体和嵌合受体;该连接肽为自切割多肽2A肽;该2A肽包括F2A、P2A、T2A和E2A;优选为P2A,其氨基酸序列为SEQ ID NO.10。

[0047] 在本发明一优选的实施方式中,上述嵌合受体的氨基酸序列选自以下序列的一条:SEQ ID NO.2~SEQ ID NO.9;优选为SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.7。

[0048] 本发明一实施例提供了编码上述嵌合受体组合物的核酸序列。

[0049] 本发明一实施例提供了包含上述核酸序列的载体。

[0050] 本发明一实施例提供了表达上述嵌合受体组合物、含有上述核酸序列或者上述载体的细胞。

[0051] 在本发明一优选的实施方式中,上述细胞选自以下细胞中的一种:T细胞、NK细胞、DC细胞和巨噬细胞。

[0052] 在本发明一优选的实施方式中,上述T细胞选自 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或NKT细胞。

[0053] 本发明一实施例提供了一种治疗肿瘤的生物制剂,包括上述细胞作为主要活性成分;优选地还包括药学上可接受载体、稀释剂或赋形剂。

[0054] 本发明一实施例提供了上述细胞的制备方法,包括将上述载体转染细胞的步骤。

[0055] 本发明一实施例提供了上述嵌合受体组合物、核酸序列、载体或细胞在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0056] 下面通过具体实施例和附图对本发明进行详细和具体的介绍,以使更好的理解本发明,但是下述实施例并不限制本发明范围。

[0057] 实施例中方法如无特殊说明的采用常规方法,使用的试剂如无特殊说明的使用常规市售试剂或按常规方法配制的试剂。

[0058] 实施例1

[0059] 本实施例提供了一种新型嵌合受体组合物;该新型嵌合受体组合物(在下文中称为Dual CAR,其对应的CAR-T细胞称为Dual CAR-T)包括氨基酸序列为SEQ ID NO.1的anti-CLDN18.2-CAR(传统二代Claudin18.2 CAR分子,下文称为21007),以及如SEQ ID NO.2~9所示的嵌合受体序列(结构序列如图1所示),具体的氨基酸序列对应下表1中的序列名称为21067~21074的序列。

[0060] 表1 anti-CLDN18.2-CAR以及嵌合受体组合物的序列信息

序列/质粒名称	氨基酸序列
[0061] 21007	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGSFFRIVAMGWYRQAPGKGRELVATITRGGSTYYADSMKGRSTI SRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCNVRVEVPFMQPNDYWG

[0062]

	<p>QGTLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPS KPFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN TPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGN QLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR (SEQ ID NO. 1)</p>
21067	<p>YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDL NTQRPYYKLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGMGWIRRRSRH SWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSCKRENASPPFF CCFIAVAMGIRFIIMVTIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKN WICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDL LKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDC ALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV (SEQ ID NO. 2)</p>
21068	<p>YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDL NTQRPYYKLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGPPFFCCFIAMG IRFIIMVTIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNC YQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYH WMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDCALYASSFKG YIENCSTPNTYICMQRTV (SEQ ID NO. 3)</p>
21069	<p>MIHLGHILFLLLLPVAAAFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNC YQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYH WMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDCALYASSFKG YIENCSTPNTYICMQRTVQTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCSLS LPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPG RGYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYS DLNTQRPYYK (SEQ ID NO. 4)</p>
21070	<p>MALPVTALLPLALLLHAARPFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICY KNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLV</p>

[0063]

	<p>KSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLIITEMQKGDICALYAS SFKGYIENCSTPNTYICMQRVTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCL CARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGYFLGRLVPRGRGAAEAATRQK RITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO. 5)</p>
21071	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICY KNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLV KSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLIITEMQKGDICALYAS SFKGYIENCSTPNTYICMQRVTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELYFLG RLVPRGRGAAEAATRQKQ RITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRP YYK (SEQ ID NO. 6)</p>
21072	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICY KNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLV KSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLIITEMQKGDICALYAS SFKGYIENCSTPNTYICMQRVIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKG KHLCPSPFPGPSKPFVVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSYFLGRL VPRGRGAAEAATRQKQ RITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPY YK (SEQ ID NO. 7)</p>
21073	<p>MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLG IVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRQKQ RITETESPY QELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO. 8)</p>
21074	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPMGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYN LDLKKSDFSTRWQKQRCVVKSKRENASPPFFCCFIAMGIRFI IMVTIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQF FDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWM</p>

[0064]	<p>GLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDICALYASSFKGYIE NCSTPNTYICMQRTVGSGEGRGSLTTCGDVEENPGPMGGLEPCS RLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVL TVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGQR SDVYSDLNTQRPYYKSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMIHLGHI LFLLLPVAAAQTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLPLLAGLV AADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG (SEQ ID NO. 9)</p>
--------	--

[0065] 如图1所示,上述嵌合受体组合物除包括氨基酸序列如SEQ ID NO.1的嵌合抗原受体,还包括的序列信息如下:

[0066] (1) P2A,其氨基酸序列如下:

[0067] GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO.10);

[0068] (2) DAP12ICD (胞内区),其氨基酸序列如下:

[0069] YFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO.11);

[0070] (3) DAP10ICD,其氨基酸序列如下:

[0071] LCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG (SEQ ID NO.12);

[0072] (4) NKG2DFL (全长序列),其氨基酸序列如下:

[0073] MGWIRRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPPVVKSKRENASPPFFCCFIAMGIRFI
IMVTIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPNWICYKNNCYQFFDESKNWAYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQD
LLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDICALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV (SEQ
ID NO.13);

[0074] (5) CD8 hinge (铰链区),其氨基酸序列如下:

[0075] TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO.14);

[0076] (6) CD8 TM (跨膜区),其氨基酸序列如下:

[0077] IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC (SEQ ID NO.15);

[0078] (7) DAP10FL,其氨基酸序列如下:

[0079] MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAV
FLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG (SEQ ID NO.16);

[0080] (8) DAP12FL,其氨基酸序列如下:

[0081] MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLV
PRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRP YYK (SEQ ID NO.17);

[0082] (9) DAP12ECD+TM (胞外区及跨膜区),其氨基酸序列如下:

[0083] LRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAV (SEQ ID NO.18);

[0084] (10) T2A,其氨基酸序列如下:

[0085] GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO.19)。

[0086] 实施例2

[0087] 本实施例提供表达上述嵌合受体的Dual CAR-T细胞,其构建方法包括如下步骤:

[0088] 1.表达载体构建: Dual CAR分子和慢病毒载体骨架部分分别由CRO公司使用全基因合成技术构建得到。通过常规分子克隆手段,将Dual CAR片段克隆至慢病毒载体,所构建的质粒名称如上表1所示。各质粒通过对插入片段全序列测序验证证明构建成功。

[0089] 2.慢病毒包装和滴度测定

[0090] 第一天:

[0091] 1) 在T75培养瓶中接种293T细胞,数量为 5×10^6 ,培养体积为20ml;

[0092] 第二天:

[0093] 2) 包病毒前确认293T细胞汇合度在70%-80%左右,并进行等体积换液;

[0094] 3) 转染复合物的配制和转染:

[0095] 分别配置Tube A和Tube B,体系如下所示,并进行颠倒或者低速振荡混匀;

[0096] Tube A: Opti-MEM (2ml) + Lipo3000 (55 μ l);

[0097] Tube B: Opti-MEM (2ml) + P3000 (46 μ l) + 辅助质粒18 μ g + Dual CAR主质粒6 μ g;

[0098] 将Tube A加入到Tube B中,振荡混匀,室温孵育15分钟;

[0099] 将第3步中换过液的培养瓶翻面,使培养基处于培养瓶另一面,将Tube A+B混合物加入,轻摇混匀后,再将培养瓶缓慢翻回正面,后继续培养48h;

[0100] 第四天:

[0101] 4) 转染完成培养2天后,收集上清,500g离心10min,用0.45 μ m滤器过滤上清至50ml离心管中,包好封口膜,10000g,4 $^{\circ}$ C离心过夜,可见白色病毒沉淀;弃上清后倒置离心管至上清流尽后用200 μ l AIM-V培养基溶解沉淀后,取2 μ l按照后续步骤测定滴度,其余置于-80 $^{\circ}$ C保存。

[0102] 5) 将2 μ l重悬病毒上清加至198 μ l 1640培养基中稀释病毒,后在24孔板中按照每孔 2×10^5 数量Jurkat T细胞分别加入稀释后的病毒2 μ l、10 μ l和50 μ l一共3个孔,并加入终浓度为5 μ g/ml的Polybrene辅助病毒感染。

[0103] 第六天:

[0104] 6) 使用Anti-VHH-FITC抗体检测病毒滴度,滴度在 2.5×10^7 - 1.2×10^8 之间,可满足常规体外CAR-T构建实验要求。

[0105] 3. CAR-T的检测

[0106] 将上述包装的慢病毒感染T细胞,检测T细胞上anti-CLDN18.2-CAR及NKG2D的表达,结果如图2所示。

[0107] 由图2可知,anti-CLDN18.2-CAR-T细胞有较低水平的NKG2D表达,Dual CAR-T细胞相比anti-CLDN18.2-CAR-T细胞有较高的NKG2D表达水平,同时正常表达anti-CLDN18.2-CAR。说明NKG2D嵌合受体在Dual CAR-T细胞表面成功表达。

[0108] 实施例3

[0109] 本实施例验证Dual CAR-T细胞对靶细胞的杀伤效果,具体的步骤和结果如下:

[0110] (1) 293细胞基础上构建了过表达CLDN18.2抗原的细胞系293-CLDN18.2,该细胞系高表达CLDN18.2(如图3)。

[0111] (2) 检测细胞系NKG2D配体MICA/B的表达: 鉴定了239T细胞系上MICA/B的表达水平,293T细胞系表达较高水平的MICA/B(如图4)。

[0112] (3) CAR-T细胞与293-CLDN18.2按2:1及0.5:1的效靶比混合,孵育5h,Annexin V流式检测CAR-T对靶细胞杀伤效果,anti-CLDN18.2-CAR-T及Dual CAR-T相对unT(未转导的T)细胞,对293-CLDN18.2有较强的杀伤效果,其中21069及21072在2:1效靶比时有相对传统CAR-T(21007)更强的杀伤效果(如图5)。此外,将293-CLDN18.2与CAR-T共孵育,21069及21072Dual CAR-T增殖倍数明显高于传统的CAR-T细胞(21007)(如图6)。

[0113] CAR-T细胞与293T细胞按2:1及0.5:1的效靶比混合,孵育5h,Annexin V流式检测CAR-T对靶细胞杀伤效果,anti-CLDN18.2-CAR-T及Dual CAR-T相对unT(未转导的T)细胞,对表达MICA/B的靶细胞有较强的杀伤效果,其中21069及21072在2:1效靶比时有相对传统CAR-T更强的杀伤效果(如图7)。

[0114] 实施例4

[0115] 本实施例验证Dual CAR-T细胞在杀伤的靶细胞293-CLDN18.2时有更低的因子分泌水平,具体的步骤和结果如下:

[0116] 采用实施例3构建的细胞系293-CLDN18.2;将CAR-T细胞与293-CLDN18.2按2:1的效靶比混合,孵育24h,流式检测CAR-T细胞因子释放,使用Biolegend的多因子检测试剂盒,取15 μ l/样品的效应细胞与靶细胞孵育的上清至新的V型96孔板中,加入混合稀释后的磁珠15 μ l/样品及15 μ l/样品的assay buffer,封板膜密封,500rpm室温震荡2h,250g离心5min,去上清,加入200 μ l/样品的wash buffer,250g离心5min,去上清,加入15 μ l/样品的检测抗体,500rpm室温震荡1h,加入15 μ l/样品的SA-PE,500rpm室温震荡30min,250g离心5min,去上清,加入200 μ l/样品的wash buffer,250g离心5min,去上清,加入150 μ l/样品的Wash Buffer,上机检测。结果显示anti-CLDN18.2-CAR-T及Dual CAR-T细胞在杀伤293-CLDN18.2靶细胞时,21067、21068、21069、21070、21072等Dual CAR-T有明显更低的IFN- γ 、IL2、IL6和TNF- α 分泌水平(如图8)。

[0117] 实施例5

[0118] 本实施例验证Dual CAR-T细胞在杀伤表达MICA/B的靶细胞时释放中等水平的细胞因子,具体的步骤和结果如下:

[0119] 将CAR-T细胞与293T按2:1的效靶比混合,孵育24h,流式检测CAR-T细胞因子释放,anti-CLDN18.2-CAR-T细胞及Dual CAR-T细胞在杀伤293T靶细胞时,21068、21069、21070、21072等Dual CAR-T有中等水平的IFN- γ 分泌水平,较低的TNF- α 、IL2及IL6分泌水平(如图9)。

[0120] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只作为范例,本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

序列表

<110> 上海易慕峰生物科技有限公司

<120> 一种新型嵌合受体组合物、重组载体、细胞及其应用

<160> 19

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

```

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1           5           10           15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
           20           25           30
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
           35           40           45
Ser Phe Phe Arg Ile Val Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly
           50           55           60
Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Arg Gly Gly Ser Thr Tyr
65           70           75           80
Tyr Ala Asp Ser Met Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
           85           90           95
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
           100          105          110
Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Val Arg Val Glu Val Pro Phe Met Gln Pro
           115          120          125
Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ile Glu
           130          135          140
Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr
145          150          155          160
Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro
           165          170          175
Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
           180          185          190
Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
           195          200          205
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
           210          215          220

```


Phe Phe Phe Cys Cys Phe Ile Ala Val Ala Met Gly Ile Arg Phe Ile
 130 135 140
 Ile Met Val Thr Ile Trp Ser Ala Val Phe Leu Asn Ser Leu Phe Asn
 145 150 155 160
 Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro
 165 170 175
 Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu
 180 185 190
 Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala
 195 200 205
 Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu
 210 215 220
 Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly
 225 230 235 240
 Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr
 245 250 255
 Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe
 260 265 270
 Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met
 275 280 285
 Gln Arg Thr Val
 290
 <210> 3
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <400> 3
 Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala
 1 5 10 15
 Ala Thr Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu
 20 25 30
 Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg
 35 40 45
 Pro Tyr Tyr Lys Leu Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Glu
 50 55 60
 Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly Pro Phe Phe Phe
 65 70 75 80
 Cys Cys Phe Ile Ala Val Ala Met Gly Ile Arg Phe Ile Ile Met Val
 85 90 95

Thr Ile Trp Ser Ala Val Phe Leu Asn Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val
 100 105 110
 Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp
 115 120 125
 Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn
 130 135 140
 Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu
 145 150 155 160
 Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser
 165 170 175
 Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln
 180 185 190
 Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu
 195 200 205
 Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr
 210 215 220
 Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr
 225 230 235 240
 Val
 <210> 4
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <400> 4
 Met Ile His Leu Gly His Ile Leu Phe Leu Leu Leu Leu Pro Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys
 20 25 30
 Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln
 35 40 45
 Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met
 50 55 60
 Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp
 65 70 75 80
 Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile
 85 90 95
 Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro
 100 105 110
 Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr

115	120	125
Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr		
130	135	140
Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Gln Thr Thr Pro Gly Glu Arg Ser		
145	150	155
Ser Leu Pro Ala Phe Tyr Pro Gly Thr Ser Gly Ser Cys Ser Gly Cys		
165	170	175
Gly Ser Leu Ser Leu Pro Leu Leu Ala Gly Leu Val Ala Ala Asp Ala		
180	185	190
Val Ala Ser Leu Leu Ile Val Gly Ala Val Phe Leu Cys Ala Arg Pro		
195	200	205
Arg Arg Ser Pro Ala Gln Glu Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met Pro		
210	215	220
Gly Arg Gly Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala		
225	230	235
Ala Glu Ala Ala Thr Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro		
245	250	255
Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn		
260	265	270
Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys		
275		
<210> 5		
<211> 300		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<400> 5		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu		
20	25	30
Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn		
35	40	45
Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala		
50	55	60
Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu		
65	70	75
Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu		
85	90	95
Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile		

	100		105		110														
Leu	Ser	Pro	Asn	Leu	Leu	Thr	Ile	Ile	Glu	Met	Gln	Lys	Gly	Asp	Cys				
	115						120					125							
Ala	Leu	Tyr	Ala	Ser	Ser	Phe	Lys	Gly	Tyr	Ile	Glu	Asn	Cys	Ser	Thr				
	130						135					140							
Pro	Asn	Thr	Tyr	Ile	Cys	Met	Gln	Arg	Thr	Val	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala				
145					150						155			160					
Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser				
				165							170			175					
Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr				
	180										185			190					
Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala				
	195										200			205					
Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys				
	210										215			220					
Leu	Cys	Ala	Arg	Pro	Arg	Arg	Ser	Pro	Ala	Gln	Glu	Asp	Gly	Lys	Val				
225						230					235			240					
Tyr	Ile	Asn	Met	Pro	Gly	Arg	Gly	Tyr	Phe	Leu	Gly	Arg	Leu	Val	Pro				
				245							250			255					
Arg	Gly	Arg	Gly	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Thr	Arg	Lys	Gln	Arg	Ile	Thr				
				260							265			270					
Glu	Thr	Glu	Ser	Pro	Tyr	Gln	Glu	Leu	Gln	Gly	Gln	Arg	Ser	Asp	Val				
				275							280			285					
Tyr	Ser	Asp	Leu	Asn	Thr	Gln	Arg	Pro	Tyr	Tyr	Lys								
	290										295			300					
<210>	6																		
<211>	318																		
<212>	PRT																		
<213>	Artificial Sequence																		
<400>	6																		
Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu				
1				5						10				15					
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Phe	Asn	Gln	Glu	Val	Gln	Ile	Pro	Leu	Thr	Glu				
				20						25				30					
Ser	Tyr	Cys	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys	Asn	Trp	Ile	Cys	Tyr	Lys	Asn	Asn				
				35						40				45					
Cys	Tyr	Gln	Phe	Phe	Asp	Glu	Ser	Lys	Asn	Trp	Tyr	Glu	Ser	Gln	Ala				
				50						55				60					
Ser	Cys	Met	Ser	Gln	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Val	Tyr	Ser	Lys	Glu				

	20		25		30
Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn					
	35		40		45
Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala					
	50		55		60
Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu					
65		70		75	80
Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu					
		85		90	95
Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile					
	100		105		110
Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys					
	115		120		125
Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr					
	130		135		140
Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Ile Glu Val Met Tyr					
145		150		155	160
Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His					
	165		170		175
Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser					
	180		185		190
Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr					
	195		200		205
Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys					
	210		215		220
Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg					
225		230		235	240
Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp					
	245		250		255
Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly					
	260		265		270
Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr					
	275		280		285
Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser					
	290		295		300
Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys					
305		310			

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 8

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

Lys

<210> 9

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 9

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

Asn Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser
 130 135 140
 Gln Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser
 145 150 155 160
 Lys Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met
 165 170 175
 Gly Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly
 180 185 190
 Ser Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly
 195 200 205
 Asp Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys
 210 215 220
 Ser Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
 245 250 255
 Gly Pro Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro
 260 265 270
 Leu Leu Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln
 275 280 285
 Ser Asp Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile
 290 295 300
 Val Met Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr
 305 310 315 320
 Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala
 325 330 335
 Thr Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu
 340 345 350
 Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro
 355 360 365
 Tyr Tyr Lys Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala
 370 375 380
 Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ile His Leu Gly His Ile
 385 390 395 400
 Leu Phe Leu Leu Leu Leu Pro Val Ala Ala Ala Gln Thr Thr Pro Gly
 405 410 415
 Glu Arg Ser Ser Leu Pro Ala Phe Tyr Pro Gly Thr Ser Gly Ser Cys
 420 425 430
 Ser Gly Cys Gly Ser Leu Ser Leu Pro Leu Leu Ala Gly Leu Val Ala

435	440	445
Ala Asp Ala Val Ala Ser Leu	Leu Ile Val Gly Ala Val Phe Leu Cys	
450	455	460
Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Glu Asp Gly Lys Val Tyr Ile		
465	470	475
Asn Met Pro Gly Arg Gly		480
	485	
<210> 10		
<211> 22		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<400> 10		
Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val		
1	5	10
Glu Glu Asn Pro Gly Pro		15
	20	
<210> 11		
<211> 52		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<400> 11		
Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala		
1	5	10
Ala Thr Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu		15
	20	25
Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg		30
	35	40
		45
Pro Tyr Tyr Lys		
	50	
<210> 12		
<211> 24		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<400> 12		
Leu Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Glu Asp Gly Lys Val		
1	5	10
Tyr Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly		15
	20	
<210> 13		

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 13

Met	Gly	Trp	Ile	Arg	Gly	Arg	Arg	Ser	Arg	His	Ser	Trp	Glu	Met	Ser
1				5					10					15	
Glu	Phe	His	Asn	Tyr	Asn	Leu	Asp	Leu	Lys	Lys	Ser	Asp	Phe	Ser	Thr
				20					25					30	
Arg	Trp	Gln	Lys	Gln	Arg	Cys	Pro	Val	Val	Lys	Ser	Lys	Cys	Arg	Glu
				35					40					45	
Asn	Ala	Ser	Pro	Phe	Phe	Phe	Cys	Cys	Phe	Ile	Ala	Val	Ala	Met	Gly
				50					55					60	
Ile	Arg	Phe	Ile	Ile	Met	Val	Thr	Ile	Trp	Ser	Ala	Val	Phe	Leu	Asn
65						70					75				80
Ser	Leu	Phe	Asn	Gln	Glu	Val	Gln	Ile	Pro	Leu	Thr	Glu	Ser	Tyr	Cys
				85							90				95
Gly	Pro	Cys	Pro	Lys	Asn	Trp	Ile	Cys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Cys	Tyr	Gln
				100							105				110
Phe	Phe	Asp	Glu	Ser	Lys	Asn	Trp	Tyr	Glu	Ser	Gln	Ala	Ser	Cys	Met
				115							120				125
Ser	Gln	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Val	Tyr	Ser	Lys	Glu	Asp	Gln	Asp
				130										140	
Leu	Leu	Lys	Leu	Val	Lys	Ser	Tyr	His	Trp	Met	Gly	Leu	Val	His	Ile
145						150					155				160
Pro	Thr	Asn	Gly	Ser	Trp	Gln	Trp	Glu	Asp	Gly	Ser	Ile	Leu	Ser	Pro
						165					170				175
Asn	Leu	Leu	Thr	Ile	Ile	Glu	Met	Gln	Lys	Gly	Asp	Cys	Ala	Leu	Tyr
				180							185				190
Ala	Ser	Ser	Phe	Lys	Gly	Tyr	Ile	Glu	Asn	Cys	Ser	Thr	Pro	Asn	Thr
				195							200				205
Tyr	Ile	Cys	Met	Gln	Arg	Thr	Val								
				210											215

<210> 14

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 14

Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala
1				5							10				15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 35 40 45

<210> 15

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 15

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 20

<210> 16

<211> 93

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 16

Met Ile His Leu Gly His Ile Leu Phe Leu Leu Leu Leu Pro Val Ala
 1 5 10 15

Ala Ala Gln Thr Thr Pro Gly Glu Arg Ser Ser Leu Pro Ala Phe Tyr
 20 25 30

Pro Gly Thr Ser Gly Ser Cys Ser Gly Cys Gly Ser Leu Ser Leu Pro
 35 40 45

Leu Leu Ala Gly Leu Val Ala Ala Asp Ala Val Ala Ser Leu Leu Ile
 50 55 60

Val Gly Ala Val Phe Leu Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly
 85 90

<210> 17

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 17

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp
 20 25 30

Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met
 35 40 45
 Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
 50 55 60
 Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 65 70 75 80
 Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
 85 90 95
 Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr
 100 105 110

Lys

<210> 18

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 18

Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp Cys Ser Cys Ser Thr
 1 5 10 15
 Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met Gly Asp Leu Val Leu
 20 25 30
 Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val
 35 40

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 19

Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Pro Gly Pro
 20

21007	CAR						
21067	CAR	P2A	DAP12ICD	DAP10ICD	NKG2DFL		
21068	CAR	P2A	DAP12ICD	DAP10ICD	NKG2DECD+TM		
21069	CAR	P2A	NKG2DECD	DAP10FL	DAP12ICD		
21070	CAR	P2A	NKG2DECD	CD8 HINGE+TM	DAP10ECD	DAP12ICD	
21071	CAR	P2A	NKG2DECD	CD8 HINGE+TM	4-1BB	DAP12ICD	
21072	CAR	P2A	NKG2DECD	CD28 HINGE+TM+ICD	DAP12ICD		
21073	CAR	DAP12FL					
21074	CAR	P2A	NKG2DFL	T2A	DAP12FL	P2A	DAP10FL

图1

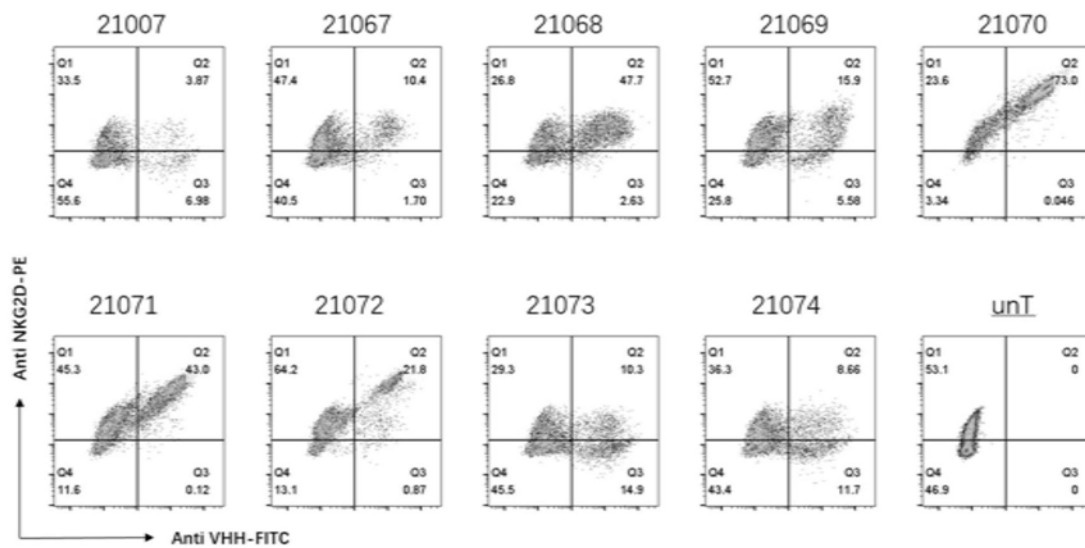


图2

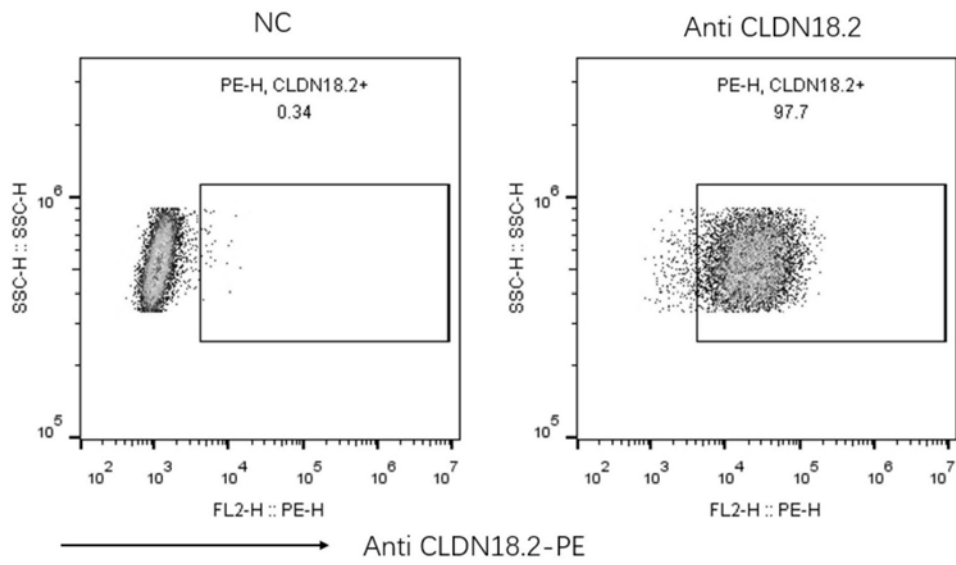


图3

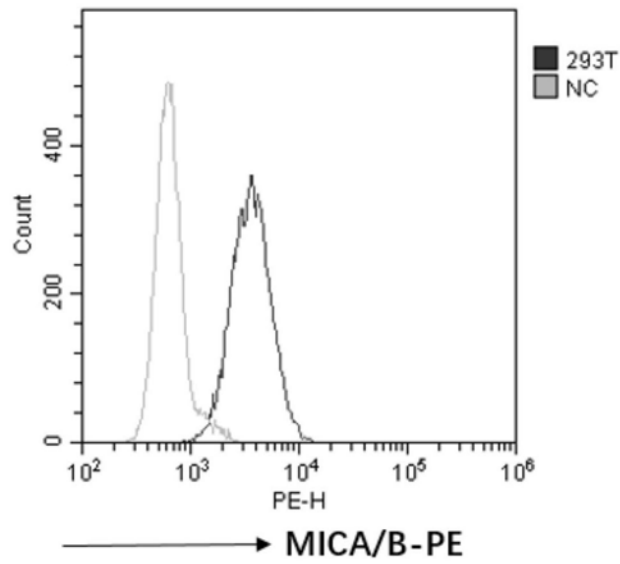


图4

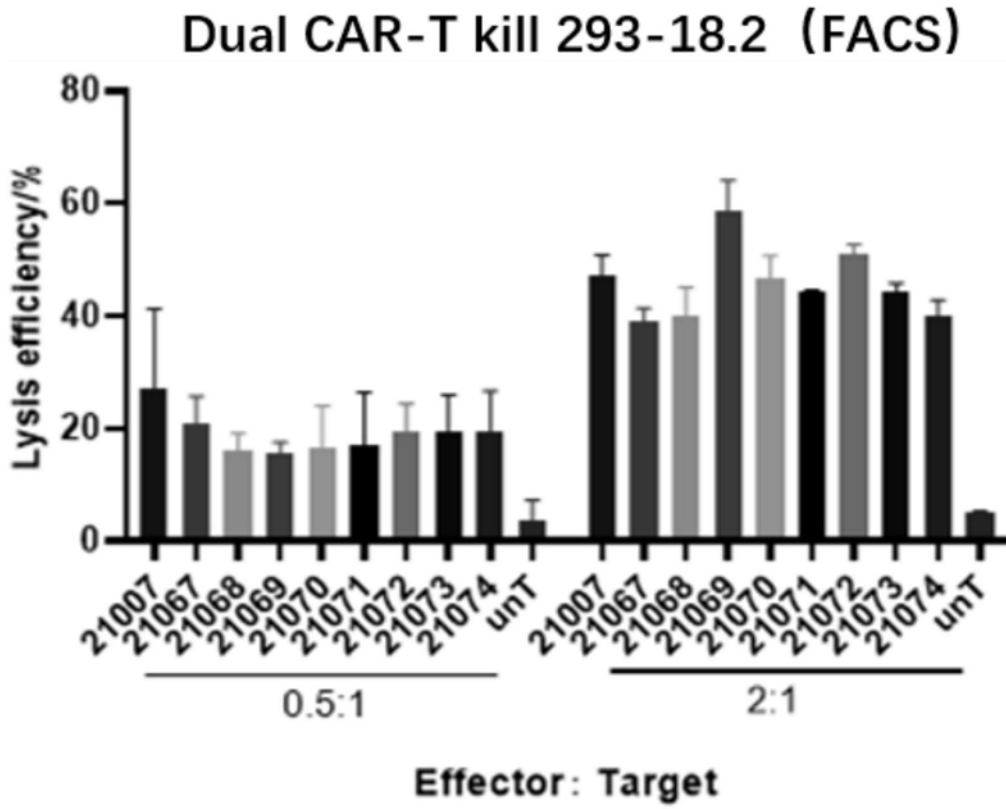


图5

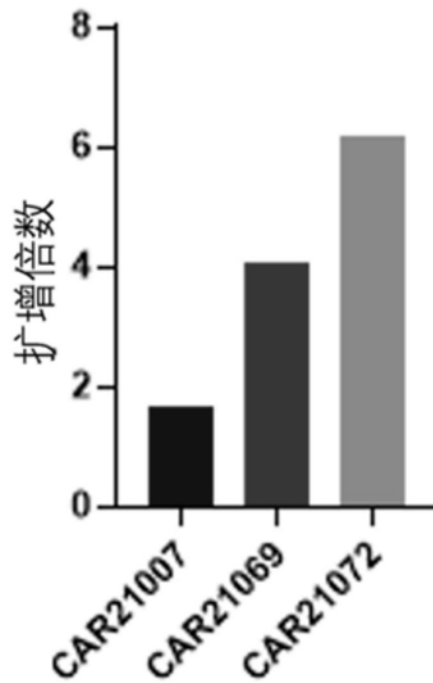


图6

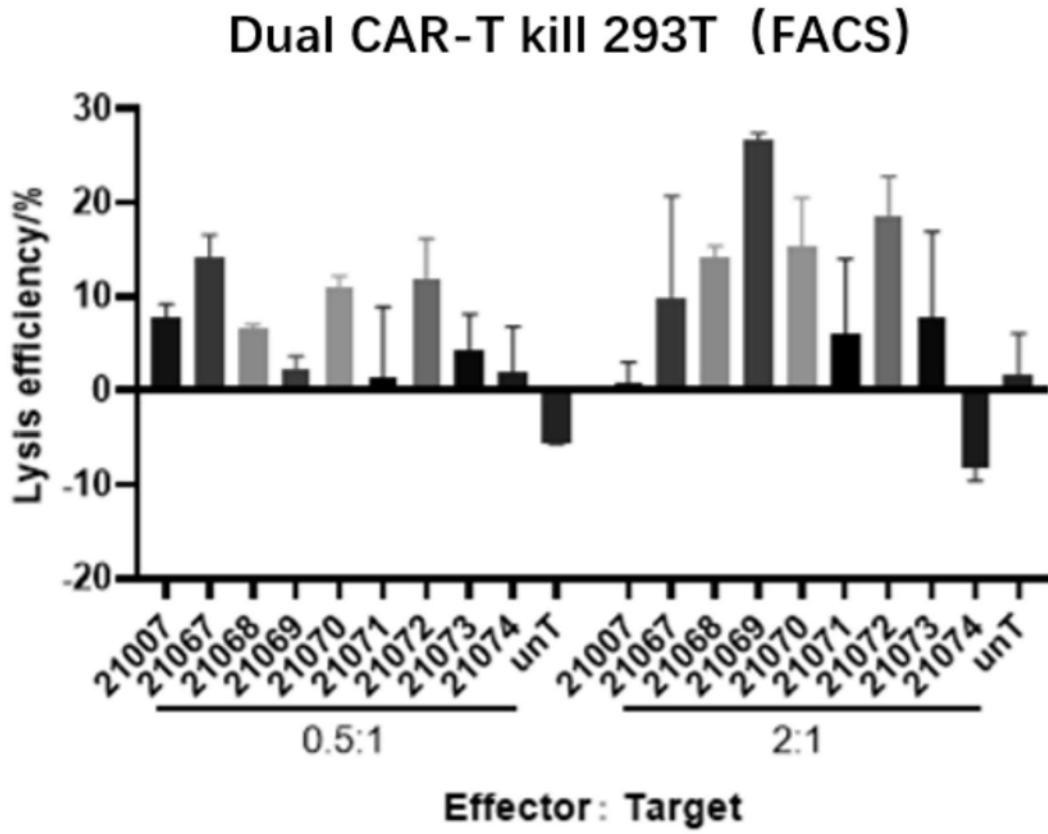


图7

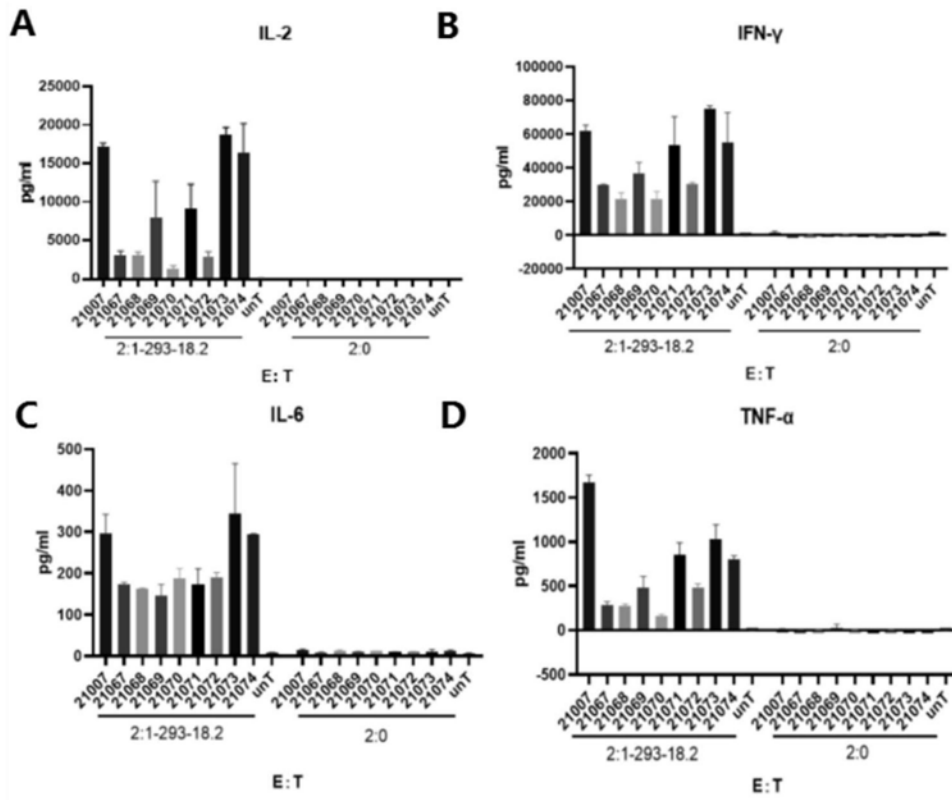


图8

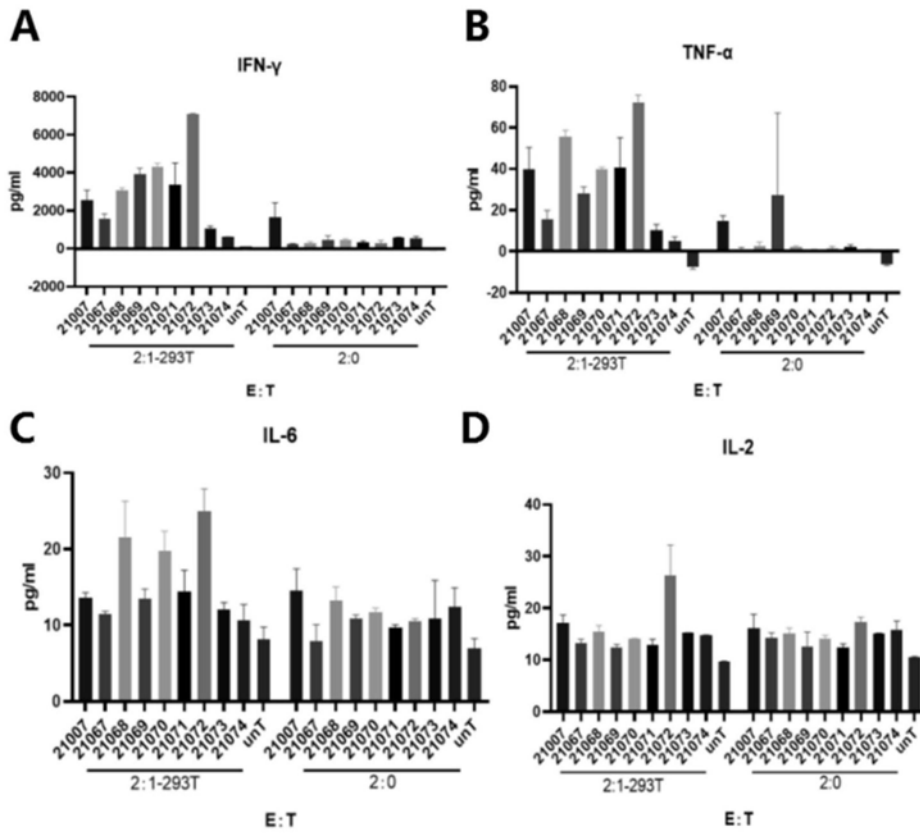


图9