



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117924518 A

(43) 申请公布日 2024.04.26

(21) 申请号 202410016644.3 *C12N 15/867* (2006.01)
(22) 申请日 2024.01.05 *C12N 15/864* (2006.01)
(71) 申请人 苏州艾凯利元生物科技有限公司 *A61K 39/00* (2006.01)
地址 215123 江苏省苏州市自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区桑田街218号生物医药产业园二期乐橙广场5楼E495单元 *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
(72) 发明人 刘晓东 贺智勇 张晓芳 徐翔
(74) 专利代理机构 上海市锦天城律师事务所
31273
专利代理师 倪申文
(51) Int. Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
G12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书3页 说明书41页
序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

用于NK细胞的嵌合抗原受体及工程化的NK细胞

(57) 摘要

本发明提供用于NK细胞的嵌合抗原受体及工程化的NK细胞。本发明提供的嵌合抗原受体,依次包含抗原结合域、铰链域、跨膜域、共刺激域和信号传导域,其中铰链域包含或为4-1BB铰链域,所述跨膜域选自NKG2D、KIR2DS1、CD3 ζ 、CD28、2B4、NKP44和NKP30跨膜域,所述共刺激域选自2B4、DAP12、4-1BB、NTB-A和CD2共刺激域,所述信号传导域包含或为CD3 ζ 信号传导域。本发明提供的工程化的NK细胞能够稳定表达所述嵌合抗原受体并且具有强烈的细胞杀伤作用。

1. 嵌合抗原受体,依次包含抗原结合域、铰链域、跨膜域、共刺激域和信号传导域,其中铰链域包含或为4-1BB铰链域,所述跨膜域选自NKG2D、KIR2DS1、CD3 ζ 、CD28、2B4、NKP44和NKP30跨膜域,所述共刺激域选自2B4、DAP12、4-1BB、NTB-A和CD2共刺激域,所述信号传导域包含或为CD3 ζ 信号传导域。

2. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述铰链域包含或为4-1BB铰链域,所述跨膜域选自NKG2D、CD3 ζ 、2B4、NKP44跨膜域,所述共刺激域选自2B4、DAP12、4-1BB和NTB-A共刺激域,所述信号传导域为CD3 ζ 信号传导域。

3. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]的结构选自以下结构式中的任何一种,其中[]表示结构域,-[]表示结构域之间的连接,优选为键或肽接头,例如由甘氨酸和丝氨酸组成的肽接头:

- (a) [4-1BB]-[NKG2D]-[2B4]-[CD3 ζ]
- (b) [4-1BB-KIR2DS1]-[KIR2DS1]-[2B4]-[CD3 ζ]
- (c) [4-1BB]-[CD3 ζ]-[2B4]-[CD3 ζ]
- (d) [4-1BB]-[CD28]-[2B4]-[CD3 ζ]
- (e) [4-1BB]-[2B4]-[2B4]-[CD3 ζ]
- (f) [4-1BB]-[NKP44]-[2B4]-[CD3 ζ]
- (g) [4-1BB]-[NKP30]-[2B4]-[CD3 ζ]
- (h) [4-1BB]-[NKG2D]-[DAP12]-[CD3 ζ]
- (i) [4-1BB]-[NKG2D]-[4-1BB]-[CD3 ζ]
- (j) [4-1BB]-[NKG2D]-[NTB-A]-[CD3 ζ],以及
- (k) [4-1BB-KIR2DS1]-[KIR2DS1]-[CD2]-[CD3 ζ]

4. 根据权利要求1至3任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原结合域为结合至肿瘤特异性抗原或肿瘤相关性抗原的结构域,优选为对应抗原的抗体的抗原结合片段,优选为scFv或VHH,优选地所述肿瘤特异性抗原或肿瘤相关性抗原选自HER2、PSMA、BCMA、CD20、CD33、CD19、CD22、CD123、CD30、GPC-3、CEA、Claudin18.2、EpCAM、GD2、MSLN、EGFR、MUC1、EGFRVIII、CD38、Trop-2、c-MET、Nectin-4、CD79b、CCK4、GPA33、HLA-A2、CLEC12A、p-cadherin、TDO2、MART-1、Pmel 17、MAGE-1、AFP、CA125、TRP-1、TRP-2、NY-ESO、PSA、CDK4、BCA225、CA125、MG7-Ag、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TAAL6和TAG72;优选地,所述抗原结合域结合HER2抗原;优选地,所述抗原结合域为抗HER2 scFv,优选包含或为SEQ ID NO.19所示的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1至4任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原结合域在其N端进一步包含信号肽,优选地所述信号肽为CD8 α 的信号肽,优选地包含或为SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1至5任一项所述的嵌合抗原受体,其中:

(a) 4-1BB铰链域包含或为SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

(b) 4-1BB-KIR2DS1铰链域包含或为SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

(c) NKG2D跨膜域包含或为SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.5所示的氨

氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列；

(d) KIR2DS1跨膜域包含或为SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列；

(e) CD3 ζ 跨膜域包含或为SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列；

(f) CD28跨膜域包含或为SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列；

(g) 2B4跨膜域包含或为SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列；

(i) NKP44跨膜域包含或为SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列；

(j) NKP34跨膜域包含或为SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列；

(k) 2B4共刺激域包含或为SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列；

(l) DAP12共刺激域包含或为SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列；

(m) 4-1BB共刺激域包含或为SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列；

(n) NTB-A共刺激域包含或为SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列；

(o) CD2共刺激域包含或为SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列；和/或

(p) CD3 ζ 信号传导域包含或为SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

7. 根据权利要求6所述的嵌合抗原受体,其中所述嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]包含或为如SEQ ID NO.49至59任一项所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.49至59任一项所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

8. 根据权利要求1至6任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述嵌合抗原受体包含或为如SEQ ID NO.22至32任一项所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.22至32任一项所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

9. 一种工程化的NK细胞,其被改造以在细胞表面上表达嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体为权利要求1至8任一项所述的嵌合抗原受体;所述NK细胞例如是诱导多能干细胞分化产生的NK细胞、是来源于外周血或脐血的NK细胞或NK92细胞系。

10. 工程化的NK细胞群,其包含权利要求9所述的工程化的NK细胞;优选地,所述细胞群包含 1×10^5 至 1×10^7 个细胞。

11. 编码权利要求1至8任一项所述的嵌合抗原受体的多核苷酸。

12. 根据权利要求11所述的多核苷酸,其序列选自SEQ ID NO.36至46中的任一项。

13. 一种载体,其包含权利要求11或12所述的多核苷酸;优选地,所述载体是病毒载体,

优选为逆转录病毒或腺相关病毒载体;优选地所述载体包含表达调控序列,包括启动子。

14.一种制备工程化的NK细胞的方法,包括使用权利要求13所述的病毒载体转染NK细胞,使所述多核苷酸在所述NK细胞中表达,从而在细胞表面上表达权利要求1至8任一项所述的嵌合抗原受体;所述NK细胞例如是诱导多能干细胞分化产生的NK细胞、是来源于外周血或脐血的NK细胞或NK92细胞系。

15.一种制备工程化的NK细胞的方法,包括使用权利要求13所述的病毒载体转染诱导多能干细胞iPSC,并且诱导分化iPSC为NK细胞,所述NK细胞的表面上表达权利要求1至8任一项所述的嵌合抗原受体。

用于NK细胞的嵌合抗原受体及工程化的NK细胞

技术领域

[0001] 本发明涉及遗传修饰的自然杀伤(NK)细胞及其制造方法。具体地,本发明涉及CAR-NK细胞、制造这些CAR-NK细胞的方法以及这些CAR-NK细胞在医学中、特别是用于治疗癌症中的用途。

背景技术

[0002] 自然杀伤(Natural Killer NK)细胞是人体免疫细胞家族中的重要成员,是人体免疫系统的第一道防线,在人体的抗肿瘤免疫中发挥着重要的免疫监视和免疫清除作用。在过去的10多年时间里,国际上开展了多项回输NK细胞治疗血液瘤和实体瘤的临床研究,初步证明了NK细胞的有效性和安全性。NK细胞在抗肿瘤领域扮演着重要的角色,CAR技术的发展也催生了CAR-NK的诞生。经过CAR结构修饰后的NK细胞,理论上也能够高效的识别肿瘤细胞,并通过释放杀伤介质、诱导靶细胞凋亡等多种手段杀伤肿瘤细胞。但相对于CAR-T,由于NK细胞的天然特性,CAR-NK的治疗过程中不会产生严重的细胞因子风暴,因此在临床使用中,安全性可能较CAR-T更高。其次,由于NK细胞在体内的存活时间较T细胞更短,导致CAR-NK在体内的存活时间较CAR-T更短。这一特性或许会导致CAR-NK细胞疗效不如CAR-T,但是从安全性的角度来说,这种特性反而避免了经过基因修饰的免疫细胞长期存在于人体可能导致的一系列未知的风险。

[0003] 研究表明在NK细胞中过表达外源的CAR分子可以增强NK细胞的肿瘤靶向能力和杀伤能力。国际上也开展了多项回输CAR-NK细胞治疗血液瘤和实体瘤的临床试验,这些临床试验所使用CAR结构主要可分为两大类,其中一类CAR结构是原本为T细胞激活设计的,并不完全适合NK细胞激活,不能最大程度增强NK细胞功能。另一类则是为NK细胞激活量身设计的,但是这一类CAR结构种类较少。

[0004] 有鉴于此,本领域亟需更多的可用于CAR NK细胞制备的CAR结构设计。

发明内容

[0005] 本发明的一个方面提供嵌合抗原受体,依次包含抗原结合域、铰链域、跨膜域、共刺激域和信号传导域,其中铰链域包含或为4-1BB铰链域,所述跨膜域选自NKG2D、KIR2DS1、CD3 ζ 、CD28、2B4、NKP44和NKP30跨膜域,所述共刺激域选自2B4、DAP12、4-1BB、NTB-A和CD2共刺激域,所述信号传导域包含或为CD3 ζ 信号传导域。

[0006] 在一些实施方式中,本发明提供嵌合抗原受体,其中所述铰链域包含或为4-1BB铰链域,所述跨膜域选自NKG2D、CD3 ζ 、2B4、NKP44跨膜域,所述共刺激域选自2B4、DAP12、4-1BB和NTB-A共刺激域,所述信号传导域为CD3 ζ 信号传导域。

[0007] 在一些实施方式中,本发明提供的所述嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]的结构选自以下结构式中的任何一种,其中[]表示结构域,-[]表示结构域之间的连接,优选为键或肽接头,例如由甘氨酸和丝氨酸组成的肽接头:

[0008] (a) [4-1BB]-[NKG2D]-[2B4]-[CD3 ζ]

[0009] (b) [4-1BB-KIR2DS1] - [KIR2DS1] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0010] (c) [4-1BB] - [CD3 ζ] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0011] (d) [4-1BB] - [CD28] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0012] (e) [4-1BB] - [2B4] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0013] (f) [4-1BB] - [NKP44] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0014] (g) [4-1BB] - [NKP30] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0015] (h) [4-1BB] - [NKG2D] - [DAP12] - [CD3 ζ]

[0016] (i) [4-1BB] - [NKG2D] - [4-1BB] - [CD3 ζ]

[0017] (j) [4-1BB] - [NKG2D] - [NTB-A] - [CD3 ζ], 以及

[0018] (k) [4-1BB-KIR2DS1] - [KIR2DS1] - [CD2] - [CD3 ζ]。

[0019] 在一些实施方式中,在本发明提供的所述嵌合抗原受体中,所述抗原结合域为结合至肿瘤特异性抗原或肿瘤相关性抗原的结构域,优选为对应抗原的抗体的抗原结合片段,优选为scFv或VHH,优选地所述肿瘤特异性抗原或肿瘤相关性抗原选自HER2、PSMA、BCMA、CD20、CD33、CD19、CD22、CD123、CD30、GPC-3、CEA、Claudin18.2、EpCAM、GD2、MSLN、EGFR、MUC1、EGFRV III、CD38、Trop-2、c-MET、Nectin-4、CD79b、CCK4、GPA33、HLA-A2、CLEC12A、p-cadherin、TDO2、MART-1、Pmel 17、MAGE-1、AFP、CA125、TRP-1、TRP-2、NY-ESO、PSA、CDK4、BCA225、CA125、MG7-Ag、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TAAL6和TAG72;优选地,所述抗原结合域结合HER2抗原;优选地,所述抗原结合域为抗HER2 scFv,优选包含或为SEQ ID NO.19所示的氨基酸序列。

[0020] 在一些实施方式中,在本发明提供的所述嵌合抗原受体中,所述抗原结合域在其N端进一步包含信号肽,优选地所述信号肽为CD8 α 的信号肽,优选地包含或为SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方式中,在本发明提供的所述嵌合抗原受体中:

[0022] (a) 4-1BB铰链域包含或为SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

[0023] (b) 4-1BB-KIR2DS1铰链域包含或为SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

[0024] (c) NKG2D跨膜域包含或为SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

[0025] (d) KIR2DS1跨膜域包含或为SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

[0026] (e) CD3 ζ 跨膜域包含或为SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

[0027] (f) CD28跨膜域包含或为SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

[0028] (g) 2B4跨膜域包含或为SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

[0029] (i) NKP44跨膜域包含或为SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

[0030] (j) NKP34跨膜域包含或为SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

[0031] (k) 2B4共刺激域包含或为SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

[0032] (l) DAP12共刺激域包含或为SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

[0033] (m) 4-1BB共刺激域包含或为SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

[0034] (n) NTB-A共刺激域包含或为SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

[0035] (o) CD2共刺激域包含或为SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和/或

[0036] (p) CD3 ζ 信号传导域包含或为SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0037] 在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]包含或为如SEQ ID NO.49至59任一项所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.49至59任一项所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0038] 在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体包含或为如SEQ ID NO.22至32任一项所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.22至32任一项所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0039] 在另一个方面,本发明提供一种工程化的NK细胞,其被改造以在细胞表面上表达嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体为本发明提供的任一种所述的嵌合抗原受体。在一些实施方式中,所述NK细胞例如是诱导多能干细胞分化产生的NK细胞、是来源于外周血或脐血的NK细胞或NK92细胞系。

[0040] 在另一个方面,本发明提供工程化的NK细胞群,其包含本发明所提供的工程化的NK细胞;优选地,所述细胞群包含 1×10^5 至 1×10^7 个细胞。

[0041] 本发明还提供编码本发明的任一项所述的嵌合抗原受体的多核苷酸。在一些实施方式中,所述多核苷酸的序列选自SEQ ID NO.30至42中的任一项。

[0042] 在另一个方面,本发明提供一种载体,其包含本发明提供的多核苷酸;优选地,所述载体是病毒载体,优选为逆转录病毒或腺相关病毒载体;优选地所述载体包含表达调控序列,包括启动子。

[0043] 本发明还提供制备工程化的NK细胞的方法,包括使用本发明提供的病毒载体转染NK细胞,使所述多核苷酸在所述NK细胞中表达,从而在细胞表面上表达本发明所述的嵌合抗原受体;所述NK细胞例如是诱导多能干细胞分化产生的NK细胞、是来源于外周血或脐血的NK细胞或NK92细胞系。

[0044] 本发明还提供制备工程化的NK细胞的方法,包括使用本发明提供的病毒载体转染诱导多能干细胞iPSC,并且诱导分化iPSC为NK细胞,所述NK细胞的表面上表达本发明所述的嵌合抗原受体。

附图说明

- [0045] 图1显示本发明测试各个CAR结构的实验流程示意图。
- [0046] 图2显示流式细胞术检测各个CAR分子在293T细胞上的表达情况。
- [0047] 图3显示各个CAR分子在293T细胞中阳性表达百分比。
- [0048] 图4显示各个CAR分子在293T细胞中的表达丰度(MFI,平均荧光强度)。
- [0049] 图5显示8个CAR分子在PG13细胞上的CAR表达阳性率。
- [0050] 图6显示细胞术检测8个CAR分子在NK92细胞上的表达情况。
- [0051] 图7显示8个CAR分子的阳性率和CAR蛋白丰度(MFI)。
- [0052] 图8显示8个CAR分子对NK92细胞活率的影响。
- [0053] 图9显示6个表达CAR分子的NK92细胞对靶细胞的杀伤作用。
- [0054] 图10显示2个表达CAR分子的NK92细胞对靶细胞的杀伤作用。
- [0055] 图11显示3个CAR分子在PG13细胞上的CAR表达阳性率。
- [0056] 图12显示细胞术检测3个CAR分子在NK92细胞上的表达情况。
- [0057] 图13显示3个CAR分子的阳性率和CAR蛋白丰度(MFI)。
- [0058] 图14显示3个CAR分子对NK92细胞活率的影响。
- [0059] 图15显示3个表达CAR分子的NK92细胞对靶细胞的杀伤作用。
- [0060] 图16显示另外3个CAR分子在PG13细胞上的CAR表达阳性率。
- [0061] 图17显示细胞术检测另外3个CAR分子在NK92细胞上的表达情况。
- [0062] 图18显示另外3个CAR分子的阳性率和CAR蛋白丰度(MFI)。
- [0063] 图19显示另外3个CAR分子对NK92细胞活率的影响。
- [0064] 图20显示另外3个表达CAR分子的NK92细胞对靶细胞的杀伤作用。

具体实施方式

[0065] 定义

[0066] 术语“嵌合抗原受体(Chimeric Antigen Receptor,CAR)”通常是指包含能够结合抗原的胞外结构域和至少一个胞内结构域的融合蛋白。CAR是嵌合抗原受体NK细胞(CAR-NK)的核心部件,其可包括抗原(例如,肿瘤特异性抗原和/或肿瘤相关抗原)结合域、跨膜域、共刺激域和胞内信号传导域。在本发明中,所述CAR可以基于抗体的抗原特异性与胞内结构域组合在一起。经遗传修饰表达CAR的NK细胞可以特异地识别和消除表达靶抗原的恶性细胞。

[0067] 术语“抗原结合域”是指CAR结构中能与细胞表面表达的抗原结合的结构域,该结构域可以是抗该抗原的抗体的抗原结合片段。术语“抗体”通常是指一种能够特异性识别和/或中和特定抗原的多肽分子。例如,抗体可包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链组成的免疫球蛋白,并且包括任何包含其抗原结合部分的分子。术语“抗体”包括单克隆抗体和多特异性抗体(例如双特异性或三特异性抗体),包括但不限于人抗体、人源化抗体和嵌合抗体。抗体可以是IgG形式或重链抗体。抗体的抗原结合片段包括但不限于scFv、Fab、Fab'、(Fab)₂或VHH。在CAR结构中,优选的抗原结合域是抗体的scFv或VHH。

[0068] 术语“VHH”或“纳米抗体”是指由骆驼科(如羊驼、大羊驼)动物或鲨鱼产生的仅重

链抗体(HcAb)的单个抗原结合片段。VHH或纳米抗体是重链抗体的单个重链可变区,由3个高度可变区(CDR1、CDR2、CDR3)和将高度可变区间隔开的4个框架区(FR1、FR2、FR3和FR4)构成。

[0069] 术语“跨膜域”通常是指CAR中穿过细胞膜的结构域,其与细胞内信号转导结构域相连接,起着传递信号的作用。

[0070] 术语“共刺激域”通常是指可以提供免疫共刺激分子的胞内结构域,所述共刺激分子为淋巴细胞对抗原的有效应答所需要的细胞表面分子。

[0071] 术语“铰链域”通常是指抗原结合域和跨膜区之间的连接区。

[0072] 术语“信号传导域”通常是指位于细胞内部能够转导信号的结构域。在本发明中,所述胞内信号传导域可以将信号传导至细胞内。

[0073] 术语“肿瘤”包括血液肿瘤和实体肿瘤。术语“血液肿瘤”、“造血肿瘤”或“淋巴肿瘤”可互换使用,意指造血组织或淋巴组织的肿瘤。血液肿瘤包括但不限于:白血病、淋巴瘤、骨髓增生异常综合征或骨髓瘤,优选地选自以下的白血病、淋巴瘤或骨髓瘤:急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性T细胞白血病、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性单核细胞白血病(AMoL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、组织细胞性淋巴瘤或多发性骨髓瘤,优选地是AML。实体肿瘤包括但不限于:腺癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌、未分化癌、大细胞癌或小细胞癌、肝细胞癌、肝母细胞瘤、结肠腺癌、肾细胞癌、肾细胞腺癌、结肠直肠癌、结肠直肠腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、头颈癌、肺癌、乳腺癌、默克尔细胞癌、横纹肌肉瘤、恶性黑色素瘤、表皮样癌、肺癌、肾癌、肾腺癌、乳房癌、乳房腺癌、乳腺导管癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、口腔癌、肛门癌、皮肤癌、尤因肉瘤、胃癌、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、维尔姆斯瘤(Wilms tumour)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、胰腺癌、胰腺腺癌、子宫颈癌、鳞状细胞癌、髓母细胞瘤、前列腺癌、结肠癌、结肠腺癌、移行细胞癌、骨肉瘤、导管癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、卵巢腺癌、卵巢畸胎瘤、膀胱乳头状瘤、成神经细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、上皮样癌、黑色素瘤或视网膜母细胞瘤的恶性赘生物或转移性诱导性继发性肿瘤。

[0074] 术语“接头”是用于连接CAR结构中的抗原结合域、铰链域、跨膜域、共刺激域和/或细胞内信号传导域的化学实体。CAR可包含一个、两个、三个、四个或五个或更多个接头。接头可以是肽接头,肽的长度为约1至约25个氨基酸、约5至约20个氨基酸、或约10至约20个氨基酸、或任何中间长度的氨基酸。示例性的肽接头包括甘氨酸聚合物(G)_n;甘氨酸-丝氨酸聚合物(G₁₋₅S₁₋₅)_n,其中n是1至5整数;甘氨酸-丙氨酸聚合物;丙氨酸-丝氨酸聚合物;和本领域已知的其他柔性接头。

[0075] 术语“约”通常是指在指定数值以上或以下0.5%-10%的范围内变动,例如在指定数值以上或以下0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或10%的范围内变动。

[0076] 嵌合抗原受体

[0077] 本发明的一些方面提供嵌合抗原受体(CAR),其为融合多肽,特别适合于在NK细胞中稳定表达,以获得经CAR改造的NK细胞(CAR-NK细胞),实验证实,所获得的CAR-NK能够有效杀伤靶细胞,如卵巢癌细胞。

[0078] 在一个方面,本发明提供嵌合抗原受体,其依次包含抗原结合域、铰链域、跨膜域、

共刺激域和信号传导域,其中铰链域包含或为4-1BB铰链域,所述跨膜域选自NKG2D、KIR2DS1、CD3 ζ 、CD28、2B4、NKP44和NKP30跨膜域,所述共刺激域选自2B4、DAP12、4-1BB、NTB-A和CD2共刺激域,所述信号传导域包含或为CD3 ζ 信号传导域。

[0079] 在一些实施方式中,本发明提供嵌合抗原受体,其依次包含抗原结合域、铰链域、跨膜域、共刺激域和信号传导域,其中铰链域为4-1BB铰链域或4-1BB-KIR2DS1嵌合铰链域,所述跨膜域选自NKG2D、KIR2DS1、CD3 ζ 、CD28、2B4、NKP44和NKP30跨膜域,所述共刺激域选自2B4、DAP12、4-1BB、NTB-A和CD2共刺激域,所述信号传导域包含或为CD3 ζ 信号传导域。

[0080] 在一些实施方式中,本发明提供嵌合抗原受体,其依次包含抗原结合域、铰链域、跨膜域、共刺激域和信号传导域,其中铰链域为4-1BB铰链域,所述跨膜域选自NKG2D、KIR2DS1、CD3 ζ 、CD28、2B4、NKP44和NKP30跨膜域,所述共刺激域选自2B4、DAP12、4-1BB、NTB-A和CD2共刺激域,所述信号传导域包含或为CD3 ζ 信号传导域。

[0081] 在优选的实施方式中,本发明提供嵌合抗原受体,其中所述铰链域包含或为4-1BB铰链域,所述跨膜域选自NKG2D、CD3 ζ 、2B4、NKP44跨膜域,所述共刺激域选自2B4、DAP12、4-1BB和NTB-A共刺激域,所述信号传导域为CD3 ζ 信号传导域。

[0082] 在优选的实施方式中,本发明提供嵌合抗原受体,其中所述铰链域为4-1BB铰链域或4-1BB-KIR2DS1嵌合铰链域,所述跨膜域选自NKG2D、CD3 ζ 、2B4、NKP44跨膜域,所述共刺激域选自2B4、DAP12、4-1BB和NTB-A共刺激域,所述信号传导域为CD3 ζ 信号传导域。

[0083] 在优选的实施方式中,本发明提供嵌合抗原受体,其中所述铰链域为4-1BB铰链域,所述跨膜域选自NKG2D、CD3 ζ 、2B4、NKP44跨膜域,所述共刺激域选自2B4、DAP12、4-1BB和NTB-A共刺激域,所述信号传导域为CD3 ζ 信号传导域。

[0084] 在一些具体的实施方式中,本发明提供嵌合抗原受体,其中所述嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]的结构选自以下结构式中的任何一种,其中[]表示结构域,-[]表示结构域之间的连接:

[0085] (a) [4-1BB] - [NKG2D] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0086] (b) [4-1BB-KIR2DS1] - [KIR2DS1] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0087] (c) [4-1BB] - [CD3 ζ] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0088] (d) [4-1BB] - [CD28] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0089] (e) [4-1BB] - [2B4] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0090] (f) [4-1BB] - [NKP44] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0091] (g) [4-1BB] - [NKP30] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0092] (h) [4-1BB] - [NKG2D] - [DAP12] - [CD3 ζ]

[0093] (i) [4-1BB] - [NKG2D] - [4-1BB] - [CD3 ζ]

[0094] (j) [4-1BB] - [NKG2D] - [NTB-A] - [CD3 ζ], 以及

[0095] (k) [4-1BB-KIR2DS1] - [KIR2DS1] - [CD2] - [CD3 ζ]。

[0096] 在优选的实施方式中,本发明提供嵌合抗原受体,其中所述嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]的结构选自以下结构式中的任何一种,其中[]表示结构域,-[]表示结构域之间的连接:

[0097] (a) [4-1BB] - [NKG2D] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0098] (c) [4-1BB] - [CD3 ζ] - [2B4] - [CD3 ζ]

- [0099] (e) [4-1BB] - [2B4] - [2B4] - [CD3 ζ]
 [0100] (f) [4-1BB] - [NKP44] - [2B4] - [CD3 ζ]
 [0101] (h) [4-1BB] - [NKG2D] - [DAP12] - [CD3 ζ]
 [0102] (i) [4-1BB] - [NKG2D] - [4-1BB] - [CD3 ζ], 以及
 [0103] (j) [4-1BB] - [NKG2D] - [NTB-A] - [CD3 ζ].

[0104] 在一些实施方式中, 本发明提供的嵌合抗原受体, 其中所述抗原结合域为结合至肿瘤特异性抗原 (TSA) 或肿瘤相关性抗原 (TAA) 的结构域。在一些实施方式中, 所述抗原结合域是 TSA 或 TAA 的抗体的抗原结合片段, 例如是 scFv 或 VHH。示例性的 TSA 或 TAA 包括但不限于 HER2、PSMA、BCMA、CD20、CD33、CD19、CD22、CD123、CD30、GPC-3、CEA、Claudin18.2、EpCAM、GD2、MSLN、EGFR、MUC1、EGFRVIII、CD38、Trop-2、c-MET、Nectin-4、CD79b、CCK4、GPA33、HLA-A2、CLEC12A、p-cadherin、TD02、MART-1、Pmel 17、MAGE-1、AFP、CA125、TRP-1、TRP-2、NY-ESO、PSA、CDK4、BCA225、CA125、MG7-Ag、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TAAL6 和 TAG72。

[0105] 在一个示例性实施方式中, 本发明提供的嵌合抗原受体中的抗原结合域结合 HER2 抗原。在这样的实施方式中, 所述抗原结合域可以是抗 HER2 scFv。一个示例性的抗 HER2 scFv 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.19 所示。

[0106] 在一些实施方式中, 本发明提供的嵌合抗原受体, 其中所述抗原结合域在其 N 端进一步包含信号肽 (SP)。信号肽有利于嵌合抗原受体穿透细胞膜而将所述抗原结合域暴露于细胞表面。在一些实施方式中, 信号肽为 CD8 α 的信号肽。一个示例性的 CD8 α 的信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.20 所示。

[0107] 因此, 在一些实施方式中, 本发明提供嵌合抗原受体, 其中所述嵌合抗原受体的 [抗原结合域] - [铰链域] - [跨膜域] - [共刺激域] - [信号传导域] 的结构选自以下结构式中的任何一种, 其中 [] 表示结构域, - [表示结构域之间的连接:

- [0108] (a) [SP-scFv] - [4-1BB] - [NKG2D] - [2B4] - [CD3 ζ]
 [0109] (b) [SP-scFv] - [4-1BB-KIR2DS1] - [KIR2DS1] - [2B4] - [CD3 ζ]
 [0110] (c) [SP-scFv] - [4-1BB] - [CD3 ζ] - [2B4] - [CD3 ζ]
 [0111] (d) [SP-scFv] - [4-1BB] - [CD28] - [2B4] - [CD3 ζ]
 [0112] (e) [SP-scFv] - [4-1BB] - [2B4] - [2B4] - [CD3 ζ]
 [0113] (f) [SP-scFv] - [4-1BB] - [NKP44] - [2B4] - [CD3 ζ]
 [0114] (g) [SP-scFv] - [4-1BB] - [NKP30] - [2B4] - [CD3 ζ]
 [0115] (h) [SP-scFv] - [4-1BB] - [NKG2D] - [DAP12] - [CD3 ζ]
 [0116] (i) [SP-scFv] - [4-1BB] - [NKG2D] - [4-1BB] - [CD3 ζ]
 [0117] (j) [SP-scFv] - [4-1BB] - [NKG2D] - [NTB-A] - [CD3 ζ], 以及
 [0118] (k) [SP-scFv] - [4-1BB-KIR2DS1] - [KIR2DS1] - [CD2] - [CD3 ζ].

[0119] 在优选的实施方式中, 本发明提供嵌合抗原受体, 其中所述嵌合抗原受体的 [抗原结合域] - [铰链域] - [跨膜域] - [共刺激域] - [信号传导域] 的结构选自以下结构式中的任何一种, 其中 [] 表示结构域, - [表示结构域之间的连接:

- [0120] (a) [SP-scFv] - [4-1BB] - [NKG2D] - [2B4] - [CD3 ζ]
 [0121] (c) [SP-scFv] - [4-1BB] - [CD3 ζ] - [2B4] - [CD3 ζ]
 [0122] (e) [SP-scFv] - [4-1BB] - [2B4] - [2B4] - [CD3 ζ]

[0123] (f) [SP-scFv]-[4-1BB]-[NKP44]-[2B4]-[CD3ζ]

[0124] (h) [SP-scFv]-[4-1BB]-[NKG2D]-[DAP12]-[CD3ζ]

[0125] (i) [SP-scFv]-[4-1BB]-[NKG2D]-[4-1BB]-[CD3ζ], 以及

[0126] (j) [SP-scFv]-[4-1BB]-[NKG2D]-[NTB-A]-[CD3ζ]。

[0127] 在一些具体的实施方式中, 本发明提供嵌合抗原受体, 其中所述嵌合抗原受体的[抗原结合域]-[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]的结构选自以下结构式中的任何一种, 其中[]表示结构域,]-[表示结构域之间的连接:

[0128] (a) [CD8αSP-HER2 scFv]-[4-1BB]-[NKG2D]-[2B4]-[CD3ζ]

[0129] (b) [CD8αSP-HER2 scFv]-[4-1BB-KIR2DS1]-[KIR2DS1]-[2B4]-[CD3ζ]

[0130] (c) [CD8αSP-HER2 scFv]-[4-1BB]-[CD3ζ]-[2B4]-[CD3ζ]

[0131] (d) [CD8αSP-HER2 scFv]-[4-1BB]-[CD28]-[2B4]-[CD3ζ]

[0132] (e) [CD8αSP-HER2 scFv]-[4-1BB]-[2B4]-[2B4]-[CD3ζ]

[0133] (f) [CD8αSP-HER2 scFv]-[4-1BB]-[NKP44]-[2B4]-[CD3ζ]

[0134] (g) [CD8αSP-HER2 scFv]-[4-1BB]-[NKP30]-[2B4]-[CD3ζ]

[0135] (h) [CD8αSP-HER2 scFv]-[4-1BB]-[NKG2D]-[DAP12]-[CD3ζ]

[0136] (i) [CD8αSP-HER2 scFv]-[4-1BB]-[NKG2D]-[4-1BB]-[CD3ζ]

[0137] (j) [CD8αSP-HER2 scFv]-[4-1BB]-[NKG2D]-[NTB-A]-[CD3ζ], 以及

[0138] (k) [CD8αSP-HER2 scFv]-[4-1BB-KIR2DS1]-[KIR2DS1]-[CD2]-[CD3ζ]。

[0139] 在以上任何一个结构式中, 结构域之间的连接可以是直接键或是如本文所定义的肽接头, 肽接头例如是由甘氨酸(G)和丝氨酸(S)组成的肽接头, 例如是G4S接头。此外, 在一些实施方式中, 在单个嵌合抗原受体中, 其中一个或多个结构域之间的连接是直接键, 而另一个或另一些结构域之间的连接是肽接头。本领域技术人员可以根据常规实验来决定结构域之间的连接方式。

[0140] 在一些实施方式中, 本发明的嵌合抗原受体中的4-1BB铰链域包含或为SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中, 本发明的嵌合抗原受体中的4-1BB铰链域为SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。

[0141] 在一些实施方式中, 本发明的嵌合抗原受体中的4-1BB-KIR2DS1铰链域包含或为SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中, 本发明的嵌合抗原受体中的4-1BB-KIR2DS1铰链域为SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列。

[0142] 在一些实施方式中, 本发明的嵌合抗原受体中的NKG2D跨膜域包含或为SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中, 本发明的嵌合抗原受体中的NKG2D跨膜域为SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列。

[0143] 在一些实施方式中, 本发明的嵌合抗原受体中的KIR2DS1跨膜域包含或为SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中, 本发明的嵌合抗原受体中的KIR2DS1跨膜域为SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列。

[0144] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的CD3 ζ 跨膜域包含或为SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的CD3 ζ 跨膜域为SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列。

[0145] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的CD28跨膜域包含或为SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的CD28跨膜域为SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列。

[0146] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的2B4跨膜域包含或为SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的2B4跨膜域为SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列。

[0147] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的NKP44跨膜域包含或为SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的NKP44跨膜域为SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列。

[0148] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的NKP34跨膜域包含或为SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的NKP34跨膜域为SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列。

[0149] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的2B4共刺激域包含或为SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的2B4共刺激域为SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列。

[0150] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的DAP12共刺激域包含或为SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的DAP12共刺激域为SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列。

[0151] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的4-1BB共刺激域包含或为SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的4-1BB共刺激域为SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列。

[0152] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的NTB-A共刺激域包含或为SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的NTB-A共刺激域为SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列。

[0153] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的CD2共刺激域包含或为SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的CD2共刺激域为SEQ ID NO.17

所示的氨基酸序列。

[0154] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的CD3 ζ 信号传导域包含或为SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的CD3 ζ 信号传导域为SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列。

[0155] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的对应铰链域、跨膜域、共刺激域和信号传导域中的至少两个(例如两个、三个或四个)具有如上对应结构域的所述的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的对应铰链域、跨膜域、共刺激域和信号传导域的氨基酸序列为如上对应结构域的所述的氨基酸序列。如上文所述,在结构域之间的连接可以是直接键或是如本文所定义的肽接头,肽接头例如是由甘氨酸(G)和丝氨酸(S)组成的肽接头,例如是G4S接头。例如,在本发明的嵌合抗原受体中,每个结构域之间都具有G4S接头。

[0156] 在优选的实施方式中,本发明的嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]包含或为如SEQ ID NO.49至59任一项所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.49至59任一项所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.49至59任一项所示的氨基酸序列。

[0157] 在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.49所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.50所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.51所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.52所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.53所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.54所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.55所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.56所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.57所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.58所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.59所示的氨基酸序列。

[0158] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体是靶向HER2的嵌合抗原受体。在一些实施方式中,本发明提供的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为如SEQ ID NO.22至32任一项所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.22至32任一项所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体的氨基酸序列如SEQ ID NO.22至32任一项所示。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体

包含或为SEQ ID NO.22所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为SEQ ID NO.23所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为SEQ ID NO.24所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为SEQ ID NO.25所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为SEQ ID NO.26所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为SEQ ID NO.27所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为SEQ ID NO.28所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为SEQ ID NO.29所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为SEQ ID NO.30所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为SEQ ID NO.31所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为SEQ ID NO.32所示的氨基酸序列。

[0159] 本发明的另一些方面提供嵌合抗原受体,其依次包含抗原结合域、铰链域、跨膜域、共刺激域和信号传导域,其中铰链域包含或为IgD铰链域,所述跨膜域为NKG2D或DAP10跨膜域,所述共刺激域2B4共刺激域,所述信号传导域包含或为CD3 ζ 信号传导域。

[0160] 在一些实施方式中,本发明提供嵌合抗原受体,其依次包含抗原结合域、铰链域、跨膜域、共刺激域和信号传导域,其中铰链域为IgD铰链域,所述跨膜域为NKG2D或DAP10跨膜域,所述共刺激域2B4共刺激域,所述信号传导域包含或为CD3 ζ 信号传导域。

[0161] 在一些实施方式中,本发明提供嵌合抗原受体,其依次包含抗原结合域、铰链域、跨膜域、共刺激域和信号传导域,其中铰链域为IgD-DAP10嵌合铰链域,所述跨膜域为NKG2D或DAP10跨膜域,所述共刺激域2B4共刺激域,所述信号传导域包含或为CD3 ζ 信号传导域。

[0162] 在一些具体的实施方式中,本发明提供嵌合抗原受体,其中所述嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]的结构选自以下结构式中的任何一种,其中[]表示结构域,-[]表示结构域之间的连接:

[0163] (a) [IgD]-[NKG2D]-[2B4]-[CD3 ζ],以及

[0164] (b) [IgD-DAP10]-[DAP10]-[2B4]-[CD3 ζ]。

[0165] 在一些实施方式中,本发明提供的嵌合抗原受体,其中所述抗原结合域为结合至肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关性抗原(TAA)的结构域。在一些实施方式中,所述抗原结合域是TSA或TAA的抗体的抗原结合片段,例如是scFv或VHH。示例性的TSA或TAA包括但不限于HER2、PSMA、BCMA、CD20、CD33、CD19、CD22、CD123、CD30、GPC-3、CEA、Claudin18.2、EpCAM、GD2、MSLN、EGFR、MUC1、EGFRVIII、CD38、Trop-2、c-MET、Nectin-4、CD79b、CCK4、GPA33、HLA-A2、CLEC12A、p-cadherin、TD02、MART-1、Pmel 17、MAGE-1、AFP、CA125、TRP-1、TRP-2、NY-ESO、PSA、CDK4、BCA225、CA125、MG7-Ag、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TAAL6和TAG72。

[0166] 在一个示例性实施方式中,本发明提供的嵌合抗原受体中的抗原结合域结合HER2抗原。在这样的实施方式中,所述抗原结合域可以是抗HER2 scFv。一个示例性的抗HER2 scFv的氨基酸序列如SEQ ID NO.19所示。

[0167] 在一些实施方式中,本发明提供的嵌合抗原受体,其中所述抗原结合域在其N端进一步包含信号肽(SP)。信号肽有利于嵌合抗原受体穿透细胞膜而将所述抗原结合域暴露于细胞表面。在一些实施方式中,信号肽为CD8 α 的信号肽。一个示例性的CD8 α 的信号肽的氨基

酸序列如SEQ ID NO.20所示。

[0168] 因此,在一些实施方式中,本发明提供嵌合抗原受体,其中所述嵌合抗原受体的[抗原结合域]-[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]的结构选自以下结构式中的任何一种,其中[]表示结构域,-[]表示结构域之间的连接:

[0169] (a) [SP-scFv]-[IgD]-[NKG2D]-[2B4]-[CD3 ζ],以及

[0170] (b) [SP-scFv]-[IgD-DAP10]-[DAP10]-[2B4]-[CD3 ζ]。

[0171] 在一些具体的实施方式中,本发明提供嵌合抗原受体,其中所述嵌合抗原受体的[抗原结合域]-[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]的结构选自以下结构式中的任何一种,其中[]表示结构域,-[]表示结构域之间的连接:

[0172] (a) [CD8 α SP-HER2 scFv]-[IgD]-[NKG2D]-[2B4]-[CD3 ζ],以及

[0173] (b) [CD8 α SP-HER2 scFv]-[IgD-DAP10]-[DAP10]-[2B4]-[CD3 ζ]。

[0174] 在以上任何一个结构式中,结构域之间的连接可以是直接键或是如本文所定义的肽接头,肽接头例如是由甘氨酸(G)和丝氨酸(S)组成的肽接头,例如是G4S接头。此外,在一些实施方式中,在单个嵌合抗原受体中,其中一个或多个结构域之间的连接是直接键,而另一个或另一些结构域之间的连接是肽接头。本领域技术人员可以根据常规实验来决定结构域之间的连接方式。

[0175] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的IgD铰链域包含或为SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的IgD铰链域为SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列。

[0176] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的IgD-DAP10嵌合铰链域包含或为SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的IgD-DAP10嵌合铰链域为SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列。

[0177] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的NKG2D跨膜域包含或为SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的NKG2D跨膜域为SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列。

[0178] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的DAP10跨膜域包含或为SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的DAP10跨膜域为SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列。

[0179] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的2B4共刺激域包含或为SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的2B4共刺激域为SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列。

[0180] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的CD3 ζ 信号传导域包含或为SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的CD3 ζ 信号传导域为SEQ ID

NO.18所示的氨基酸序列。

[0181] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的对应铰链域、跨膜域、共刺激域和信号传导域中的至少两个(例如两个、三个或四个)具有如上对应结构域的所述的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体中的对应铰链域、跨膜域、共刺激域和信号传导域的氨基酸序列为如上对应结构域的所述的氨基酸序列。如上文所述,在结构域之间的连接可以是直接键或是如本文所定义的肽接头,肽接头例如是由甘氨酸(G)和丝氨酸(S)组成的肽接头,例如是G4S接头。例如,在本发明的嵌合抗原受体中,每个结构域之间都具有G4S接头。

[0182] 在优选的实施方式中,本发明的嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]包含或为如SEQ ID NO.60或61所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.60或61所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.60所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明嵌合抗原受体的[铰链域]-[跨膜域]-[共刺激域]-[信号传导域]为如SEQ ID NO.61所示的氨基酸序列。

[0183] 在一些实施方式中,本发明的嵌合抗原受体是靶向HER2的嵌合抗原受体。在一些实施方式中,本发明提供的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为如SEQ ID NO.33或34所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO.33或34所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体的氨基酸序列如SEQ ID NO.33或34任一项所示。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为SEQ ID NO.33所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的靶向HER2的嵌合抗原受体包含或为SEQ ID NO.34所示的氨基酸序列。

[0184] 多核苷酸及载体

[0185] 本发明的另一个方面提供一种核酸分子,其编码本发明提供的嵌合抗原受体。如本文所用,术语“多核苷酸”或“核酸”在本发明中可互换使用,是指信使RNA(mRNA)、RNA、基因组RNA(gRNA)、正链RNA(RNA(+))、负链RNA(RNA(-))、基因组DNA(gDNA)、互补DNA(cDNA)或重组DNA。多核苷酸包括单链和双链多核苷酸。

[0186] 在一些实施方式中,本发明提供编码嵌合抗原受体的多核苷酸,所述嵌合抗原受体可以是以上“嵌合抗原受体”小节中描述的任何一种嵌合抗原受体。

[0187] 在一些实施方式中,本发明提供编码嵌合抗原受体的DNA,所述嵌合抗原受体可以是以上“嵌合抗原受体”小节中描述的任何一种嵌合抗原受体。

[0188] 在一些实施方式中,本发明提供编码嵌合抗原受体的RNA,所述嵌合抗原受体可以是以上“嵌合抗原受体”小节中描述的任何一种嵌合抗原受体。

[0189] 在一些实施方式中,本发明提供编码嵌合抗原受体的多核苷酸,其编码如SEQ ID NO.22至34任一项所示的氨基酸序列或与它们中的任何一个具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0190] 在一些实施方式中,本发明提供的多核苷酸,其具有如SEQ ID NO.36至48任一项所示的核苷酸序列。

[0191] 本发明还提供包含上述任何一个多核苷酸的载体。在一些实施方式中,载体是用于递送的载体。本发明还提供了用于将本发明的多核苷酸递送至受试者和/或受试者的细

胞的载体。此类载体的实例包括但不限于质粒、自主复制序列、转座元件、噬菌粒、粘粒、人工染色体如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或PI衍生人工染色体 (PAC)、噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体和病毒载体。

[0192] 可用作病毒载体的动物病毒的类别的实例包括但不限于逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳多空病毒(例如,SV40)。

[0193] 逆转录病毒是基因递送的常用工具。在特定实施方案中,逆转录病毒用于将编码本发明的CAR的多核苷酸递送至细胞。如本文所用,术语“逆转录病毒”是指将其基因组RNA逆转录成线性双链DNA拷贝并随后将其基因组DNA共价整合到宿主基因组中的RNA病毒。一旦病毒整合到宿主基因组中,其就被称为“原病毒”。原病毒作为RNA聚合酶II的模板并指导RNA分子的表达,这些RNA分子编码产生新病毒颗粒所需的结构蛋白和酶。适用于特定实施方案的说明性逆转录病毒包括但不限于:莫洛尼鼠白血病病毒(M-MuLV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猫白血病病毒(FLV)、泡沫病毒属(spumavirus)、Friend鼠白血病病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)以及慢病毒。

[0194] 可以使用本领域已知的技术将所选核酸序列插入载体中并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可以分离重组病毒并将其例如在体外或离体地递送到细胞中。可以使用检测编码CAR的核酸的mRNA、DNA或基因产物的标准测定(诸如RT-PCR、FACS、Northern印迹、Western印迹、ELISA或免疫组织化学)来评估本文所述的任何CAR多肽的高效表达。

[0195] 用于本发明的方法的示例性慢病毒载体包含慢病毒基因组的至少以下部分:a) 5'长末端重复序列(LTR);b) 包装序列psi;c) Rev应答元件(RRE);d) 可操作地连接至目的基因的启动子;e) 3'长末端重复序列(LTR)。在一个优选实施例中,将5'LTR的U3区替换为选自由以下组成的组的异源启动子:巨细胞病毒(CMV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、或猿猴病毒40(SV40);由此使慢病毒转录tat独立。在一个另外的优选实施例中,3'LTR序列含有U3区的缺失(即载体是自失活载体或SIN载体)。慢病毒载体可以进一步包含慢病毒中央多聚嘌呤区(cPPT)和土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件(WPRE)。

[0196] 可以使用瞬时的或稳定的包装系统进行慢病毒载体的制造。在瞬时系统中,至少用以下共转染包装细胞(例如HEK293细胞或HEK293 T HEK293-SF、TE671、HT1080或HeLa):编码慢病毒Gag/Pol的包装质粒、编码目的包膜蛋白的质粒、和携带如以上披露的必需慢病毒基因组元件和目的基因的转移质粒。在另外的瞬时系统中,慢病毒调控蛋白Rev可以在第四个单独的质粒上反式表达。适合的env基因的实例包括但不限于VSV-G env、MLV4070env、RD114 env、RD114-TR、RD114pro、杆状病毒5GP64 env、GALV或源自麻疹病毒的包膜蛋白。可以使用本领域熟知的方法,例如使用磷酸钙或可商购的配制品进行共转染。用于产生慢病毒载体的适合的包装细胞系披露于例如WO 2012/028681或WO 2004/022761中。

[0197] CAR-NK细胞及细胞群

[0198] 本发明的另一个方面提供工程化的NK细胞,其被改造以在细胞表面上表达嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体为本发明提供的任何一种嵌合抗原受体。这样的工程化的NK细胞在本发明中被称为CAR-NK细胞。

[0199] 在一些实施方式中,本发明提供CAR-NK细胞,其在细胞表面表达在“嵌合抗原受

体”小节中描述的任何一种嵌合抗原受体。

[0200] 在一些实施方式中,本发明提供的CAR-NK细胞来源于外周血或脐血的NK细胞,或来源于诱导多能干细胞分化的NK细胞,或来源于NK92细胞系。

[0201] 本发明的另一个方面提供一种NK细胞群,其实质上由NK细胞组成并且包含多个根据本发明以上任一实施方式所述的经改造的NK细胞。

[0202] 术语“实质上由NK细胞组成”是指在指定数量的细胞群中,NK细胞(包括野生型NK细胞以及本发明的经改造的NK细胞)占该细胞群的比例不低于约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%。

[0203] 在一些实施方式中,所述细胞群中包含约 1×10^5 至 1×10^7 个细胞,例如 1×10^5 个、 2×10^5 个、 3×10^5 个、 4×10^5 个、 5×10^5 个、 6×10^5 个、 7×10^5 个、 8×10^5 个、 9×10^5 个、 1×10^6 个、 2×10^6 个、 3×10^6 个、 4×10^6 个、 5×10^6 个、 6×10^6 个、 7×10^6 个、 8×10^6 个、 9×10^6 个或 1×10^7 个。在其他实施方式中,所述细胞群中包含少于约 1×10^5 个细胞。在其他实施方式中,所述细胞群中包含大于 1×10^7 个细胞。

[0204] 在一些实施方式中,在所述NK细胞群中,所述经改造的NK细胞占所述细胞群的至少30%,例如,约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或约99%。

[0205] 在一些实施方式中,当所述细胞群被递送在体内时,其在体内的存续时间为至少7天、至少14天、至少21天、至少28天或至少35天。优选地,在一些实施方式中,当所述细胞群被递送在体内时,其在体内的存续时间为至少35天或更长。优选地,在一些实施方式中,当所述细胞群被递送在体内时,所述细胞群在体内扩增并持续扩增至少7天、至少14天、至少21天、至少28天或至少35天。

[0206] 如上所述,可通过本领域已知的方法将本发明的带有编码CAR的核酸的载体引入所述细胞中,非限制性的实例包括病毒转导、电穿孔转染、脂质体递送、聚合物载体、化学载体、脂质复合物、聚合复合物、树枝状聚合物、纳米粒子、乳剂、天然内吞或吞噬途径、细胞穿透肽、显微注射法、微针递送法、粒子轰击法等。例如,可采用电穿孔转染法。

[0207] 在一些实施方式中,本发明提供一种制备本发明的CAR-NK细胞的方法,包括使用以上“多核苷酸和载体”小节所述的任何一种病毒载体(例如逆转录病毒载体或腺相关病毒载体)转染NK细胞,使病毒载体所携带的编码本发明的嵌合抗原受体的多核苷酸在所述NK细胞中表达,从而在细胞表面上表达本发明所述的嵌合抗原受体。如前所述,被转染的NK细胞可以是来源于外周血或脐血的NK细胞,或来源于诱导多能干细胞分化的NK细胞,或来源于NK92细胞系。

[0208] 在使用诱导多能干细胞的情况下,也可以通过以下方法制备本发明的CAR-NK细胞。例如,在一些实施方式中,本发明提供一种制备CAR-NK细胞的方法,包括使用以上“多核苷酸和载体”小节所述的任何一种病毒载体(例如逆转录病毒载体或腺相关病毒载体)转染诱导多能干细胞,并且诱导分化iPSC为NK细胞,所述NK细胞的表面上表达本发明所述的嵌合抗原受体。

[0209] 疗法及用途

[0210] 本发明的另一个方面提供了一种治疗受试者的肿瘤的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据上文所述的任一工程化的NK细胞或细胞群。

[0211] 本发明的另一个方面提供了一种治疗受试者的肿瘤的方法,该方法包括向有需要

的对象施用治疗有效量的包含根据上文所述的任一工程化的NK细胞或细胞群的药物组合物,所述施用优选持续足以治疗所述肿瘤的时间。

[0212] 本发明的工程化的NK细胞或细胞群的施用可以任何方式进行,例如,通过肠胃外或非肠胃外施用,包括通过气溶胶吸入、注射、输注、摄取、输液、植入或移植。例如,可以经动脉、皮内、皮下、肿瘤内、髓内、结节内、肌内、通过静脉内(i.v.)注射、或腹膜内施用于患者。在一个方面,本公开的细胞或细胞群通过i.v.注射施用。在一个方面,本公开的细胞或细胞群通过皮内注射或皮下注射施用于受试者。在一些实施方式中,本发明的细胞或细胞群可以例如直接注射到肿瘤、淋巴结、组织、器官或感染部位中。

[0213] 在一些实施方案中,可在一天、两天、三天、四天、五天、六天、一周、两周、三周、一个月、五周、六周、七周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月或更长时间之后重复施用。也可以重复治疗过程,按照慢性施用一样。重复施用可为相同剂量或不同剂量。

[0214] 可以将本发明的细胞或细胞群与至少一种附加治疗剂组合施用。

[0215] 在一些实施方案中,所述至少一种附加治疗剂为外科手术、化学疗法、免疫疗法、雄激素阻断疗法、放射疗法或它们的任何组合。在一些实施方式中,所述免疫疗法选自抗PD-1单抗(例如Nivolumab或Pembrolizumab)、抗CTLA-4单抗(例如Ipilimumab)、抗PD-L1单抗(例如Avelumab或Atezolizumab)、抗VEGF单抗(Bevacizumab)及其组合。

[0216] 在一些实施方案中,一种治疗的递送在第二种治疗的递送开始时仍在进行,使得在施用方面存在重叠。这在本文中有时称为“同时”或“同时递送”。在其他实施方案中,一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前结束。在任一种情况的一些实施方案中,由于组合施用,治疗更有效。例如,与在不存在第一种治疗的情况下施用第二种治疗时、或者在使用第一种治疗时观察到的类似情况相比,第二治疗更有效,例如,在使用较少的第二种治疗时观察到等同的效果,或者第二种治疗更大程度地减轻了症状。在一些实施方案中,递送使得症状减轻或与疾病相关的其他参数减小的程度大于在递送一种治疗而不存在另一种治疗的情况下将观察到的减轻或减小的程度。两种治疗的效果可以是部分相加的、完全相加的,或比相加的结果大。所述递送可以使得递送的第一种治疗的效果在递送第二种治疗时仍然是可检测的。

[0217] 相应地,本发明还提供根据上文所述的任一工程化的NK细胞或细胞群在制备治疗肿瘤的药物中的用途。本发明还提供上文所述的任一嵌合抗原受体或编码它的多核苷酸在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0218] 本发明还提供用于治疗肿瘤的根据上文所述的任一工程化的NK细胞或细胞群。本发明还提供用于治疗肿瘤的根据上文所述的任一嵌合抗原受体或编码它的多核苷酸。

[0219] 以上关于疗法和用途的实施方式中,所述肿瘤可以是血液肿瘤或实体肿瘤。示例性的血液肿瘤包括但不限于:白血病、淋巴瘤、骨髓增生异常综合征或骨髓瘤,优选地选自以下的白血病、淋巴瘤或骨髓瘤:急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性T细胞白血病、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性单核细胞白血病(AMoL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、组织细胞性淋巴瘤或多发性骨髓瘤,优选地是AML。

[0220] 示例性的实体肿瘤包括但不限于:腺癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌、未分化癌、大细胞癌或小细胞癌、肝细胞癌、肝母细胞瘤、结肠腺癌、肾细胞癌、肾细胞腺癌、结肠直肠癌、结肠直肠腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、头颈癌、肺癌、乳腺癌、默克尔细胞癌、横纹肌肉瘤、恶

性黑色素瘤、表皮样癌、肺癌、肾癌、肾腺癌、乳房癌、乳房腺癌、乳腺导管癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、口腔癌、肛门癌、皮肤癌、尤因肉瘤、胃癌、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、维尔姆斯瘤 (Wilms tumour)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、胰腺癌、胰腺腺癌、子宫颈癌、鳞状细胞癌、髓母细胞瘤、前列腺癌、结肠癌、结肠腺癌、移行细胞癌、骨肉瘤、导管癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、卵巢腺癌、卵巢畸胎瘤、膀胱乳头状瘤、成神经细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、上皮样癌、黑色素瘤或视网膜母细胞瘤的恶性赘生物或转移性诱导性继发性肿瘤。

[0221] 序列表

SEQ ID NO.	描述	序列
1	4-1BB Hinge	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQ
2	4-1BB - KIR2DS1 Hinge	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQSWPSPTEPSSETGNPRHLH

3	IgD Hinge	QRRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE PKAQASSVPTAQPOAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKE EQEERETKTPE
4	IgD-DAP10 Hinge	QRRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE PKAQASSVPTAQPOAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKE EQEERETKTPEQTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCGLSLP
5	NKG2D TM	AVMIIFRIGMAVAIFCCFFFP
6	KIR2DS1 TM	VLIGHTSVVKIPFTILLFFL
7	CD3 ζ TM	LCYLLDGILFIYGVILTALFL
8	CD28 TM	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
9	2B4 TM	FLVIVILSALFLGTLACFCV
10	NKP44 TM	LVPVFCGLLVAKSLVLSALLV
11	NKP30 TM	AGTVLLLRAGFYAVSFLSVAV
12	DAP10 TM	LLAGLVAADAVASLLIVGAVF
13	2B4 cSD	WRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFGGGSTI YSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIY EVIGKSQPKAQNPAPLSRKELENFDVYS
14	DAP12 cSD	YFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQQRSDVYSDLNT QRPYK
15	4-1BB cSD	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
16	NTB-A cSD	LRKRRDSLSTQRTQGAESARNLEYVSVSPTNNTVYASVTHSNR ETEIWTPRENDTITITYSTINHSKESKPTFSRATALDNV
17	CD2 cSD	KRKKQRSRRNDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPQNPAQSQ PPPPGHRSQAPSHRPPPPGHRVQHQPQKRPPAPSGTQVHQKQKGP LPRPRVQPKPPHGAENSLSPSSN
18	CD3 ζ SD	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQG LSTATKDTYDALHMQUALPPR
19	HER2 scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDVNTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGLVTVSS
20	CD8 α SP	MALPVTALLLPLALLLHAARP
21	CAR1 AA	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDVNTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGGSGGGG GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSTTTTAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDAVMIIFRIGMAVAI FCCFFFPWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFF

		<p>PGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSP SFNSTIYEVIGKSQPKAQNPAPLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR</p>
22	CAR3 AA	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSDCTPGFHCLGAGC SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQAVMI I FRIGMAVAIFCCFFFPWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTR RNHEQEQTTPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKS GSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPAPLSRKELENFDVYSRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQUALPPR</p>
23	CAR7 AA	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSDCTPGFHCLGAGC SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQSWPS PTEPSSETGNPRHLHVLIGTSVVKIPFTILLFFLWRRKRKEKQSET SPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTTPGGGSTIYSMIQSQSSAPT SQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQN PARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRRE EYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
24	CAR8 AA	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSDCTPGFHCLGAGC SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQLCYLL</p>

		DGILFIYGVILTALFLWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTR RNHEQEQTFFGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKS GSRKRNHSPSFNSTIYEVI GKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLS TATKDTYDALHMQUALPPR
25	CAR9 AA	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSDCTPGFHCLGAGC SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQFVWL VVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDV KDLKTRRNHEQEQTFFGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLI QPSRKS GSRKRNHSPSFNSTIYEVI GKSQPKAQNPARLSRKELENF DVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHG LYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
26	CAR10 AA	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSDCTPGFHCLGAGC SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQFLV VILSALFLGTLACFCVWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTR RNHEQEQTFFGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKS GSRKRNHSPSFNSTIYEVI GKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLS TATKDTYDALHMQUALPPR
27	CAR11 AA	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSDCTPGFHCLGAGC SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS

		VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQLVPVF CGLLVAKSLVLSALLVWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTR RNHEQEQTFFGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKS GSRKRNHSPSFNSTIYEVIIGKSQPKAQNPAPARLSRKELENFDVYSRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQUALPPR
28	CAR13 AA	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSDCTPGFHCLGAGC SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQAGTVL LLRAGFYAVSFLSVAVWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTR RNHEQEQTFFGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKS GSRKRNHSPSFNSTIYEVIIGKSQPKAQNPAPARLSRKELENFDVYSRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQUALPPR
29	CAR19 AA	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSDCTPGFHCLGAGC SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQAVMI I FRIGMAVAIFCCFFFPYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPY QELQQRSDVYSDLNTQRPYKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
30	CAR21 AA	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSDCTPGFHCLGAGC SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQAVMI I

		FRIGMAVAIFCCFFFPKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
31	CAR23 AA	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSDCTPGFHCLGAGC SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQAVMI FRIGMAVAIFCCFFFLRKRRLSLSLSTQRTQGAESARNLEYVSV SPTNNTVYASVTHSNRETEIWTPRENDTITIYSTINHSKESKPTFS RATALDNVRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
32	CAR26 AA	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSDCTPGFHCLGAGC SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQSWPS PTEPSETGNPRHLHVLIGTSVVKIPFTIILLFFLKRKKQRSRRNDE ELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPQNPATSQHPPPPGHRSQAP SHRPPPPGHRVQHQPQKRPPAPSGTQVHQKGPPLPRPRVQPKPPH GAAENSLSPSSNRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
33	CAR2 AA	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSQRRDSYMTSSQL STPLQQRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPEPKAQASSVPTAQ QAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPE AVMIIFRIGMAVAIFCCFFFPWRRKRKEKQSETSPKEFLTIEDVK DLKTRRNHEQEQTFFGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQ

		<p>PSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFD VYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
34	CAR5 AA	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVVSSQRRDSYYMTSSQL STPLQQRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPEPKAQASSVPTAQF QAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPEQT TPGERSLPAFYPGTSGSCSGCGLSLPLLAGLVAADAVASLLIVG AVFWRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFPGGG STIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNS TIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
35	CAR1 DNA	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCGCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCTCCTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC ACACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTCAGCAGCACTACACAACACCTCCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGCGGCTCCGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTCCGG CTTTAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC CGATAACAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGCGACG GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGT GTCTCCACCACCACCCTGCCCCAGACCTCCCACCCAGCTCCA ACCATCGCCAGCCAGCCCCTGAGCCTGAGGCCTGAGGCCTGTAGAC CTGCCCGCGGCGGAGCTGTGCACACAAGAGGCCTGGATTTGCGCTG CGACCGGTGATGATCATCTTTAGAAATCGGCATGGCCGTGGCCATC TTTTGCTGCTTTTTCTTCCCCTGGAGAAGAAAGAGAAAGGAGAAGC AGTCCGAGACAAGCCCCAAGGAGTTCCTGACAATCTACGAGGACGT</p>

		<p>GAAGGACCTGAAGACCAGAAGAAACCACGAGCAGGAGCAGACATTC CCTGGCGGCGGCAGCACAATCTACAGCATGATCCAGTCCCAGTCCA GCGCCCCACATCCCAGGAGCCCGCTTACACACTGTACAGCCTGAT CCAGCCTAGCAGGAAGTCCGGCTCCAGAAAGAGGAATCACTCCCCT TCCTTCAATTCCACCATCTACGAGGTCATTGGCAAGAGCCAGCCTA AGGCCCAGAACCCCGCCAGGCTGTCCAGAAAGGAGCTGGAGAATTT TGATGTGTACAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGGTCGCGGACGCCCT GCCTACCAGCAGGGACAGAATCAGCTGTACAATGAGCTGAACCTGG GCAGAAGGGAGGAGTACGATGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGA TCCTGAGATGGGCGCAAGCCTAGAAGAAAGAATCCTCAGGAGGGC CTGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCG AGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGG CCTGTACCAGGGCCTGAGCACAGCCACAAAGGATACCTACGACGCC CTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCTAGGTAA</p>
<p>36</p>	<p>CAR3 DNA</p>	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCGCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCTCCTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC AACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTCAGCAGCACTACACAACACCTCCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTCCGG CTTTAAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC CGATAACCAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGCGACG GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGT GTCCTCCGACTGTACCCCCGGCTTCCACTGCCTGGGCGCCGGATGT TCCATGTGTGAGCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAGCTGACAAAGA AGGGCTGCAAGGATTGTTGCTTCGGCACATTCAATGACCAGAAGAG GGGCATCTGCAGACCTTGACCAATTGTAGCCTGGACGGCAAGTCC GTGCTGGTGAACGGCACCAAGGAGAGGGATGTGGTGTGCGGCCCTT CCCCTGCCGACCTGAGCCCAGGAGCCTCCTCCGTGACCCCCCAGC TCCAGCTAGAGAGCCTGGCCACAGCCCTCAGGCCGTGATGATCATC TTTAGAATCGGCATGGCCGTGGCCATCTTTTGTGCTTTTTCTTCC CCTGGAGAAGAAAGAGAAAGGAGAAGCAGTCCGAGACAAGCCCCAA GGAGTTCCTGACAATCTACGAGGACGTGAAGGACCTGAAGACCAGA AGAAACCACGAGCAGGAGCAGACATTCCTGGCGGCGGCAGCACAA TCTACAGCATGATCCAGTCCCAGTCCAGCGCCCCACATCCCAGGA GCCCCGTTACACACTGTACAGCCTGATCCAGCCTAGCAGGAAGTCC</p>

		<p>GGCTCCAGAAAGAGGAATCACTCCCCTTCCTTCAATTCCACCATCT ACGAGGTCATTGGCAAGAGCCAGCCTAAGGCCCCAGAACCCCGCCAG GCTGTCCAGAAAGGAGCTGGAGAATTTTGATGTGTACAGCAGGGTG AAGTTTTCCAGGTCCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGA ATCAGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAGGAGTACGA TGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCGGCAAG CCTAGAAGAAAGAATCCTCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGA AGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGA GAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGC ACAGCCACAAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGC CTCCTAGGTA</p>
<p>37</p>	<p>CAR7 DNA</p>	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCGCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCCTCCTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC AACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTCAGCAGCACTACACAACACCTCCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGCGGGCTCCGGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTCCGG CTTTAAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC CGATAACCAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGGACG GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGT GTCCTCCGATTGCACCCCCGGCTTCCACTGCCTGGGCGCTGGATGC TCCATGTGTGAGCAGGATTGTAAGCAGGGCCAGGAGCTGACCAAGA AGGGCTGCAAGGACTGCTGTTTCGGCACATTCAATGATCAGAAGAG AGGCATCTGCAGGCCCTGGACAAACTGTTCCCTGGACGGCAAGTCC GTGCTGGTGAACGGCACAAAGGAGAGGGATGTGGTGTGCGGCCCTT CCCCCGCCGACCTGTCTCCTGGAGCCTCCAGCGTGACACCTCCTGC CCCCCTAGGGAGCCCGGACATAGCCCTCAGAGCTGGCCTTCCCCT ACCGAGCCCTCCAGCGAGACAGGCAATCCCAGACACCTGCACGTGC TGATCGGCACATCCGTGGTGAAGATCCCTTTCACAATCCTGCTGTT CTTTCTGTGGAGAAGAAAGAGAAAGGAGAAGCAGTCCGAGACAAGC CCCAAGGAGTTCCCTGACAATCTACGAGGACGTGAAGGACCTGAAGA CCAGAAGAAACCACGAGCAGGAGCAGACATTCCCTGGCGGCGGCAG CACAATCTACAGCATGATCCAGTCCCAGTCCAGCGCCCCCACATCC CAGGAGCCCGCTTACACACTGTACAGCCTGATCCAGCCTAGCAGGA AGTCCGGCTCCAGAAAGAGGAATCACTCCCCTTCTTCAATTCCAC CATCTACGAGGTCATTGGCAAGAGCCAGCCTAAGGCCCCAGAACCC</p>

		<p>GCCAGGCTGTCCAGAAAGGAGCTGGAGAATTTTGATGTGTACAGCA GGGTGAAGTTTTCCAGGTCCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGG ACAGAATCAGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAGGAG TACGATGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCG GCAAGCCTAGAAGAAAGAATCCTCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCT GCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAG GGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTACCAGGGCC TGAGCACAGCCACAAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGC CCTGCCTCCTAGGTA</p>
38	CAR8 DNA	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCGCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCCTCCTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC ACACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTGAGCAGCACTACACAACACCTCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTCCGG CTTTAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC CGATAACCAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGCGACG GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCCT GTCCTCCGACTGTACACCCGCTTTCACTGTCTGGGCGCCGGCTGT TCCATGTGCGAGCAGGATTGTAAGCAGGGCCAGGAGCTGACAAAGA AGGGCTGCAAGGACTGCTGTTTTGGCACCTTTAACGATCAGAAGAG GGGCATCTGTAGACCCTGGACAAATTGCAGCCTGGATGGCAAGTCC GTGCTGGTGAATGGCACCAAGGAGAGAGACGTGGTGTGTGGCCCT CCCCCGCCGATCTGTCCCAGGAGCTTCCAGCGTGACCCCCCTGC CCCAGCTAGAGAGCCCGGACACAGCCCCAGCTGTGTTACCTGCTG GATGGCATCCTGTTTCATCTACGGCGTGATCCTGACCGCCCTGTTTC TGTGGAGAAGAAAGAGAAAGGAGAAGCAGTCCGAGACAAGCCCCAA GGAGTTCCTGACAATCTACGAGGACGTGAAGGACCTGAAGACCAGA AGAAACCACGAGCAGGAGCAGACATTCCTGGCGGCGGCAGCACAA TCTACAGCATGATCCAGTCCCAGTCCAGCGCCCCACATCCCAGGA GCCCCGTTACACACTGTACAGCCTGATCCAGCCTAGCAGGAAGTCC GGCTCCAGAAAGAGGAATCACTCCCCTTCTTCAATTCCACCATCT ACGAGGTCATTGGCAAGAGCCAGCCTAAGGCCAGAACCCCGCCAG GCTGTCCAGAAAGGAGCTGGAGAATTTTGATGTGTACAGCAGGGTG AAGTTTTCCAGGTCCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGA ATCAGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAGGAGTACGA</p>

		<p>TGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCGGCAAG CCTAGAAGAAAGAATCCTCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGA AGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGA GAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGC ACAGCCACAAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGC CTCCTAGGTAA</p>
<p>39</p>	<p>CAR9 DNA</p>	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCGCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCCAAGCTGCTGATCTACTCCGCTCCTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC ACACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTCAGCAGCACTACACAACACCTCCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTCCGG CTTTAAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC CGATAACCAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCCGTGACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGCGACG GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGT GTCCTCCGATTGTACACCCGGCTTCCACTGTCTGGGCGCCGGCTGT AGCATGTGTGAGCAGGATTGTAAGCAGGGCCAGGAGCTGACCAAGA AGGGCTGTAAGGACTGCTGTTTTCGGCACCTTTAACGACCAGAAGAG AGGCATCTGTAGACCTGGACCAATTGTAGCCTGGACGGCAAGAGC GTGCTGGTGAACGGCACAAGGAGAGAGACGTGGTGTGTGGCCCTT CCCCCGCCGACCTGAGCCCAGGAGCTTCCAGCGTGACCCCTCCTGC CCCCCTAGGGAGCCTGGACACTCCCCACAGTTCTGGGTGCTGGTG GTGGTGGGCGGCGTGTGGCTTGTTACAGCCTGCTGGTGACCGTGG CCTTCATCATCTTTTGGGTGTGGAGAAGAAAGAGAAAGGAGAAGCA GTCCGAGACAAGCCCCAAGGAGTTCCTGACAATCTACGAGGACGTG AAGGACCTGAAGACCAGAAGAAACCACGAGCAGGAGCAGACATTCC CTGGCGGCGGCGAGCACAATCTACAGCATGATCCAGTCCCAGTCCAG CGCCCCACATCCCAGGAGCCCGCTTACACACTGTACAGCCTGATC CAGCCTAGCAGGAAGTCCGGCTCCAGAAAGAGGAATCACTCCCCTT CCTTCAATTCCACCATCTACGAGGTCATTGGCAAGAGCCAGCCTAA GGCCAGAAACCCCGCAGGCTGTCCAGAAAGGAGCTGGAGAATTTT GATGTGTACAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGGTCCGCCGACGCCCTG CCTACCAGCAGGGACAGAATCAGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGG CAGAAGGGAGGAGTACGATGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGAT CCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAATCCTCAGGAGGGCC TGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGA</p>

		<p>GATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGC CTGTACCAGGGCCTGAGCACAGCCACAAAGGATACCTACGACGCCC TGCACATGCAGGCCCTGCCTCCTAGGTAA</p>
<p>40</p>	<p>CAR10 DNA</p>	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCGCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCTCCTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC AACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTCAGCAGCACTACACAACACCTCCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGGCGGCTCCGGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTCCGG CTTTAAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC CGATAACCAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCCGTGTAATACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGGCAGC GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGT GTCCTCCGATTGCACCCCCGGCTTTCACTGCCTGGGCGCCGGATGC TCCATGTGCGAGCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAGCTGACAAAGA AGGGCTGTAAGGACTGCTGTTTTGGCACATTCAACGATCAGAAGAG AGGCATCTGTAGGCCTTGACCAATTGTAGCCTGGACGGCAAGTCC GTGCTGGTGAACGGCACAAAGGAGAGGGATGTGGTGTGCGGCCCTA GCCCTGCCGATCTGAGCCCCGGAGCCTCCAGCGTGACACCCCCAGC TCCTGCCAGAGAGCCCGCCATTCCCCTCAGTTCCTGGTCATTATC GTGATCCTGTCCGCCCTGTTTCTGGGCACCCTGGCCTGTTTTTTCG TGTGGAGAAGAAAGAGAAAGGAGAAGCAGTCCGAGACAAGCCCCAA GGAGTTCCTGACAATCTACGAGGACGTGAAGGACCTGAAGACCAGA AGAAACCACGAGCAGGAGCAGACATTCCCTGGCGGGCGGCAGCACAA TCTACAGCATGATCCAGTCCCAGTCCAGCGCCCCCACATCCCAGGA GCCCCGTTACACACTGTACAGCCTGATCCAGCCTAGCAGGAAGTCC GGCTCCAGAAAGAGGAATCACTCCCCTTCCTTCAATTCCACCATCT ACGAGGTCATTGGCAAGAGCCAGCCTAAGGCCAGAACCCCGCCAG GCTGTCCAGAAAGGAGCTGGAGAATTTTGATGTGTACAGCAGGGTG AAGTTTTCCAGGTCCGCGGACGCCCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGA ATCAGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAGGAGTACGA TGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCGGCAAG CCTAGAAGAAAGAATCCTCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGA AGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGA GAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGC ACAGCCACAAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGC CTCCTAGGTAA</p>

41	CAR11 DNA	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCGCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCCTCCTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC ACACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTGAGCAGCACTACACAACACCTCCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCTCCGG CTTTAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC CGATAACCAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGCGACG GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGT GTCCTCCGACTGCACACCCGGCTTCCACTGCCTGGGCGCCGGATGT AGCATGTGTGAGCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAGCTGACCAAGA AGGGCTGTAAGGACTGTTGTTTTGGCACATTCAATGACCAGAAGAG AGGCATCTGTAGACCTTGGACCAACTGCTCCCTGGACGGCAAGTCC GTGCTGGTGAACGGCACCAAGGAGAGAGATGTGGTGTGCGGCCCT CCCCTGCCGACCTGTCTCCAGGAGCCAGCAGCGTGACACCTCCC GC CCCAGCTAGGGAGCCTGGCCATTCCCCCAGCTGGTGCCTGTGTTC TGTGGCCTGCTGGTGGCCAAGAGCCTGGTGTGTCCGCCCTGCTGG TGTGGAGAAGAAAGAGAAAGGAGAAGCAGTCCGAGACAAGCCCCAA GGAGTTCCTGACAATCTACGAGGACGTGAAGGACCTGAAGACCAGA AGAAACCACGAGCAGGAGCAGACATTCCTGGCGGCGGCAGCACAA TCTACAGCATGATCCAGTCCCAGTCCAGCGCCCCACATCCCAGGA GCCCCGTTACACACTGTACAGCCTGATCCAGCCTAGCAGGAAGTCC GGCTCCAGAAAGAGGAATCACTCCCCTTCTTCAATTCCACCATCT ACGAGGTCATTGGCAAGAGCCAGCCTAAGGCCAGAACCCCGCCAG GCTGTCCAGAAAGGAGCTGGAGAATTTTGATGTGTACAGCAGGGTG AAGTTTTCCAGGTCCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGA ATCAGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAGGAGTACGA TGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCGGCAAG CCTAGAAGAAAGAATCCTCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGA AGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGA GAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGC ACAGCCACAAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGC CTCCTAGGTAA</p>
42	CAR13 DNA	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCGCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC</p>

		<p>AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCTCCTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC ACACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTCAGCAGCACTACACAACACCTCCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTCCGG CTTTAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC CGATAACCAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCCGTGTAATACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGCGAGC GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGT GTCCTCCGATTGCACCCCCGGCTTCCACTGCCTGGGCGCTGGATGT TCCATGTGTGAGCAGGATTGTAAGCAGGGCCAGGAGCTGACCAAGA AGGGCTGCAAGGATTGTTGTTTTCGGCACCTTCAACGACCAGAAGAG AGGCATCTGTAGGCCTTGGACAAATTGTTCCCTGGACGGCAAGAGC GTGCTGGTGAACGGCACCAAGGAGAGGGACGTGGTGTGCGGCCCTT CCCCCGCTGATCTGAGCCCTGGCGCCAGCAGCGTGACACCCCCTGC TCCTGCCAGGGAGCCCGGACATTCCCCCAGGCTGGCACCGTGCTG CTGCTGAGGGCCGGATTCTACGCCGTGTCCTTTCTGTCCGTGGCCG TGTGGAGAAGAAAGAGAAAGGAGAAGCAGTCCGAGACAAGCCCCAA GGAGTTCCTGACAATCTACGAGGACGTGAAGGACCTGAAGACCAGA AGAAACCACGAGCAGGAGCAGACATTCCCTGGCGGCGGCAGCACAA TCTACAGCATGATCCAGTCCAGTCCAGCGCCCCACATCCCAGGA GCCCCGTTACACACTGTACAGCCTGATCCAGCCTAGCAGGAAGTCC GGCTCCAGAAAGAGGAATCACTCCCCTTCTTCAATTCCACCATCT ACGAGGTCATTGGCAAGAGCCAGCCTAAGGCCCAGAACCCCGCCAG GCTGTCCAGAAAGGAGCTGGAGAATTTTGATGTGTACAGCAGGGTG AAGTTTTCCAGGTCCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGA ATCAGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAGGAGTACGA TGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCGGCAAG CCTAGAAGAAAGAATCCTCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGA AGGACAAGATGGCCGAGGCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGA GAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGC ACAGCCACAAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGC CTCCTAGGTAA</p>
43	CAR19 DNA	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCGCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCTCCTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC</p>

		<p>ACACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTCAGCAGCACTACACAACACCTCCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCTCCGG CTTTAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC CGATAACCAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGCGACG GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGT GTCCTCCGACTGTACCCCCGGCTTCCACTGCCTGGGCGCCGATGT TCCATGTGTGAGCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAGCTGACAAAGA AGGGCTGCAAGGATTGTTGCTTCGGCACATTCAATGACCAGAAGAG GGGCATCTGCAGACCTTGACCAATTGTAGCCTGGACGGCAAGTCC GTGCTGGTGAACGGCACCAAGGAGAGGGATGTGGTGTGCGGCCCTT CCCCTGCCGACCTGAGCCCAGGAGCCTCCTCCGTGACCCCCCAGC TCCAGCTAGAGAGCCTGGCCACAGCCCTCAGGCCGTGATGATCATC TTTAGAATCGGCATGGCCGTGGCCATCTTTTGTGCTTTTTCTTCC CCTACTTCTGGGCAGGCTGGTGGCCAGGGGCAGGGGAGCTGCTGA GGCTGCTACAAGGAAGCAGAGAATCACCGAGACAGAGTCCCCTTAC CAGGAGCTGCAGGGCCAGAGGTCCGACGTGTACTCCGACCTGAATA CACAGAGGCCCTACTACAAGAGGGTGAAGTTTTCCAGGTCCGCCGA CGCCCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGAATCAGCTGTACAATGAGCTG AACCTGGGCAGAAGGGAGGAGTACGATGTGCTGGACAAGAGAAGAG GCAGAGATCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAATCCTCA GGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCC TACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGGCAAGGGCC ACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACAGCCACAAAGGATACCTA CGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCTAGGTAA</p>
44	CAR21 DNA	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCGCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCCTCCTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC ACACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTCAGCAGCACTACACAACACCTCCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCTCCGG CTTTAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC</p>

		<p>CGATACCAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGCGACG GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGT GTCCCTCCGACTGTACCCCCGGCTTCCACTGCCTGGGCGCCGGATGT TCCATGTGTGAGCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAGCTGACAAAGA AGGGCTGCAAGGATTGTTGCTTCGGCACATTCAATGACCAGAAGAG GGGCATCTGCAGACCTTGACCAATTGTAGCCTGGACGGCAAGTCC GTGCTGGTGAACGGCACCAAGGAGAGGGATGTGGTGTGCGGCCCTT CCCCTGCCGACCTGAGCCCAGGAGCCTCCTCCGTGACCCCCCAGC TCCAGCTAGAGAGCCTGGCCACAGCCCTCAGGCCGTGATGATCATC TTTAGAATCGGCATGGCCGTGGCCATCTTTTGTGCTTTTTCTTCC CCAAGAGAGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCTTT TATGAGGCCTGTGCAGACCACACAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGC AGGTTTCCCTGAGGAGGAGGAGGGCGGCTGCGAGCTGAGGGTGAAGT TTTCCAGGTCCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGAATCA GCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAGGAGTACGATGTG CTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTA GAAGAAAGAATCCTCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGAAGGA CAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGA AGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACAG CCACAAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCC TAGGTAA</p>
<p>45</p>	<p>CAR23 DNA</p>	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCGCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCCTCCTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC AACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTCAGCAGCACTACACAACACCTCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCTCCGG CTTTAAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC CGATACCAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGCGACG GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGT GTCCCTCCGACTGTACCCCCGGCTTCCACTGCCTGGGCGCCGGATGT TCCATGTGTGAGCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAGCTGACAAAGA AGGGCTGCAAGGATTGTTGCTTCGGCACATTCAATGACCAGAAGAG GGGCATCTGCAGACCTTGACCAATTGTAGCCTGGACGGCAAGTCC GTGCTGGTGAACGGCACCAAGGAGAGGGATGTGGTGTGCGGCCCTT</p>

		<p>CCCCTGCCGACCTGAGCCCAGGAGCCTCCTCCGTGACCCCCCAGC TCCAGCTAGAGAGCCTGGCCACAGCCCTCAGGCCGTGATGATCATC TTTAGAATCGGCATGGCCGTGGCCATCTTTTGTGCTTTTTCTTCC CCCTGAGAAAGAGGAGGGACAGCCTGAGCCTGTCCACACAGAGAAC CCAGGGCCCCGCGAGAGCGCTAGGAACCTGGAGTACGTGTCCGTG AGCCCTACCAATAATACAGTGTACGCCAGCGTGACCCACTCCAATA GGGAGACAGAGATCTGGACCCCTAGGGAGAATGATACCATCACAAT CTACAGCACAATCAATCACAGCAAGGAGTCCAAGCCTACCTTCAGC AGAGCCACAGCCCTGGATAATGTGAGGGTGAAGTTTTCCAGGTCCG CCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGAATCAGCTGTACAATGA GCTGAACCTGGGCAGAAGGGAGGAGTACGATGTGCTGGACAAGAGA AGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAATC CTCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGA GGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAG GGCCACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACAGCCACAAAGGATA CCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCTAGGTAA</p>
<p>46</p>	<p>CAR26 DNA</p>	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCGCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCTCCTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC ACACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTCAGCAGCACTACACAACACCTCCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTCCGG CTTTAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC CGATAACCAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGCGACG GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGT GTCCTCCGATTGCACCCCCGGCTTCCACTGCCTGGGCGCTGGATGC TCCATGTGTGAGCAGGATTGTAAGCAGGGCCAGGAGCTGACCAAGA AGGGCTGCAAGGACTGCTGTTTTCGGCACATTCAATGATCAGAAGAG AGGCATCTGCAGGCCCTGGACAAACTGTTCCCTGGACGGCAAGTCC GTGCTGGTGAACGGCACAAAGGAGAGGGATGTGGTGTGCGGCCCTT CCCCCGCCGACCTGTCTCCTGGAGCCTCCAGCGTGACACCTCCTGC CCCCGCTAGGGAGCCCGGACATAGCCCTCAGAGCTGGCCTTCCCCT ACCGAGCCCTCCAGCGAGACAGGCAATCCCAGACACCTGCACGTGC TGATCGGCACATCCGTGGTGAAGATCCCTTTCACAATCCTGCTGTT CTTTCTGAAGAGAAAGAAGCAGAGAAGCAGAAGGAACGACGAGGAG CTGGAGACAAGAGCCCACAGAGTGGCCACAGAGGAGAGGGGCAGAA</p>

		<p>AGCCCCACCAGATCCCTGCCTCCACCCCTCAGAACCCCGCCACCTC CCAGCACCCCTCCTCCTCCAGGCCACAGGAGCCAGGCCCCATCC CACAGGCCCTCCACCAGGACACAGGGTGCAGCACCAGCCCCAGA AGAGGCCCTGCCCATCCGGTACACAGGTGCACCAGCAGAAGGG CCCCCCTGCCTAGACCTAGAGTGCAGCCTAAGCCTCCTCACGGC GCCGCCGAGAATAGCCTGAGCCCCAGCAGCAACAGGGTGAAGTTTT CCAGGTCCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGAATCAGCT GTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAGGAGTACGATGTGCTG GACAAGAGAAGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCGCAAGCCTAGAA GAAAGAATCCTCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAA GATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGA AGAGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACAGCCA CAAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCTAG GTAA</p>
<p>47</p>	<p>CAR2 DNA</p>	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCCCTTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC AACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTCAGCAGCACTACACAACACCTCCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTCCGG CTTTAAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC CGATAACCAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGCGACG GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGT GTCCTCCCAGAGGAGAGACAGCTACTACATGACCTCCTCCCAGCTG TCCACACCTCTGCAGCAGTGGAGGCAGGGCGAGTACAAGTGTGTGG TGCAGCACACCGCCTCCAAGTCCAAGAAGGAGATCTTTAGGTGGCC CGAGAGCCCTAAGGCCAGGCCAGCTCCGTGCCTACCGCCCAACCC CAGGCCGAGGGAAGCCTGGCTAAGGCCACAACAGCCCTGCCACAA CAAGGAATACAGGCAGAGGGCGGAGGAGAAGAAGAAGGAGAAGGA GAAGGAAGAACAAGAGGAGAGGGAGACAAAGACACCTGAGGCCGTG ATGATCATCTTCAGGATCGGCATGGCCGTGGCCATCTTTTGTGCT TTTTCTTTCCCTGGAGAAGAAAGAGAAAGGAGAAGCAGTCCGAGAC AAGCCCCAAGGAGTTCTTGACAATCTACGAGGACGTGAAGGACCTG AAGACCAGAAGAAACCACGAGCAGGAGCAGACATTCCCTGGCGGCG GCAGCACAATCTACAGCATGATCCAGTCCCAGTCCAGCGCCCCAC ATCCCAGGAGCCCGCTTACACACTGTACAGCCTGATCCAGCCTAGC</p>

		<p>AGGAAGTCCGGCTCCAGAAAGAGGAATCACTCCCCTTCTTCAATT CCACCATCTACGAGGTCATTGGCAAGAGCCAGCCTAAGGCCAGAA CCCC GCCAGGCTGTCCAGAAAGGAGCTGGAGAATTTTGATGTGTAC AGCAGGGTGAAGTTTTCCAGGTCCGCCGACGCCCTGCCTACCAGC AGGGACAGAATCAGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGA GGAGTACGATGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGATCCTGAGATG GCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAATCCTCAGGAGGGCCTGTACAACG AGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCAT GAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTACCAG GGCTGAGCACAGCCACAAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGC AGGCCCTGCCTCCTAGGTAA</p>
<p>48</p>	<p>CAR5 DNA</p>	<p>ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGC TCCACGCCGCTAGGCCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACAATCACCTGCAGAGCC AGCCAGGATGTGAACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCCTCCTTTCTGTACAG CGGCGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCAGAAGCGGCACAGACTTC AACTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACCTACT ACTGTCAGCAGCACTACACAACACCTCCCACCTTCGGCCAGGGCAC AAAGGTGGAGATCAAGGGCGGGCGGCTCCGGAGGAGGAGGAAGC GGAGGAGGCGGCTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGAC TGGTGCAGCCTGGAGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCTCCGG CTTTAAACATCAAGGATACCTACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCT GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAGAATCTACCCTACAAACGGCT ACACAAGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACTATCTCCGC CGATAACCAGCAAGAATACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCAGCAGGTGGGGCGGGACG GCTTTTACGCTATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGT GTCCTCCCAGAGAAGAGACTCCTACTACATGACATCCAGCCAGCTG AGCACCCCCCTGCAGCAGTGGAGACAGGGCGAGTACAAGTGTGTGG TGCAGCACACAGCCTCCAAGTCCAAGAAGGAGATCTTTAGGTGGCC CGAGAGCCCTAAGGCCAGGCCAGCAGCGTGCCACCGCTCAACCC CAGGCCGAGGGAAGCCTGGCCAAGGCTACCACCGCCCTGCCACAA CCAGAAATACCGGCAGAGGCGGCGAGGAGAAGAAGAAGGAGAAGGA GAAGGAAGAACAAGAGGAGAGAGAGACAAAGACACCCGAGCAGACA ACACCCGGCGAGAGGAGCAGCCTGCCCGCTTTCTACCCGGCACAA GCGGCAGCTGTAGCGGCTGTGGCAGCCTGTCCCTGCCCTGCTGGC CGGACTGGTGGCTGCTGATGCCGTGGCCTCCCTGCTGATCGTGGGC GCTGTGTTTTGGAGAAGAAAGAGAAAGGAGAAGCAGTCCGAGACAA GCCCAAGGAGTTCCTGACAATCTACGAGGACGTGAAGGACCTGAA GACCAGAAGAAACCACGAGCAGGAGCAGACATTCCCTGGCGGGCGGC AGCACAAATCTACAGCATGATCCAGTCCCAGTCCAGCGCCCCACAT CCCAGGAGCCCGCTTACACACTGTACAGCCTGATCCAGCCTAGCAG GAAGTCCGGCTCCAGAAAGAGGAATCACTCCCCTTCTTCAATTCC</p>

		<p>ACCATCTACGAGGTCATTGGCAAGAGCCAGCCTAAGGCCAGAACCCCGCCAGGCTGTCCAGAAAGGAGCTGGAGAATTTTGTATGTGTACAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGGTCGCGGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGAATCAGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAGGAGTACGATGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAATCCTCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACAGCCACAAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCTAGGTAA</p>
49	CAR3 铰链域-跨膜域-共刺激域-信号传导域 AA	<p>DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGI CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQAVMIIFRIGMAVAIFCCFFFPWRRKRKEKQSETSPKEFLTIIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFGGGSTIYSMISQSSAPTSEQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPFNSTIYEVIGKSQPKAQNPAPLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
50	CAR7 铰链域-跨膜域-共刺激域-信号传导域 AA	<p>DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGI CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQSWPSPTEPSSETGNPRHLHVLIGTSVVKIPFTIILLFFLWRRKRKEKQSETSPKEFLTIIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFGGGSTIYSMISQSSAPTSEQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPFNSTIYEVIGKSQPKAQNPAPLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
51	CAR8 铰链域-跨膜域-共刺激域-信号传导域 AA	<p>DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGI CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQLCYLLDGILFIYGVILTALFLWRRKRKEKQSETSPKEFLTIIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFGGGSTIYSMISQSSAPTSEQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPFNSTIYEVIGKSQPKAQNPAPLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
52	CAR9 铰链域-跨膜域-共刺激域-信号传导域 AA	<p>DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGI CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIIFWVWRRKRKEKQSETSPKEFLTIIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFGGGSTIYSMISQSSAPTSEQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPFNSTIYEVIGKSQPKAQNPAPLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR</p>

		EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
53	CAR10 铰链 域-跨膜域- 共刺激域-信 号传导域 AA	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRG I CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPA REPGHSPQFLVIIVILSALFLGTLACFCVWRRKRKEKQSETSPKEF LTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFGGGSTIYSMISQSSAPT SQEPA YTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLS RKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
54	CAR11 铰链 域-跨膜域- 共刺激域-信 号传导域 AA	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRG I CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPA REPGHSPQLVPVFCGLLVAKSLVLSALLVWRRKRKEKQSETSPKEF LTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFGGGSTIYSMISQSSAPT SQEPA YTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLS RKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
55	CAR13 铰链 域-跨膜域- 共刺激域-信 号传导域 AA	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRG I CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPA REPGHSPQAGTVLLLRAGFYAVSFLSVAVWRRKRKEKQSETSPKEF LTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFGGGSTIYSMISQSSAPT SQEPA YTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLS RKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
56	CAR19 铰链 域-跨膜域- 共刺激域-信 号传导域 AA	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRG I CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPA REPGHSPQAVMIIIFRIGMAVAIFCCFFFPYFLGRLVPRGRGAAEAA TRKQRITETESPYQELQGQSDVYSDLNTQRPYYKRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR
57	CAR21 铰链 域-跨膜域- 共刺激域-信 号传导域 AA	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRG I CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPA REPGHSPQAVMIIIFRIGMAVAIFCCFFFPKRGRKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

58	CAR23 铰链域-跨膜域-共刺激域-信号传导域 AA	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGI CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPA REPGHSPQAVMIIFRIGMAVAIFCCFFFLRKRKRRDLSLSLSTQRTQG PAESARNLEYVSVSPTNNTVYASVTHSNRETEIWTPRENDTITIYS TINHSKESKPTFSRATALDNVRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
59	CAR26 铰链域-跨膜域-共刺激域-信号传导域 AA	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGI CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPA REPGHSPQSWPSPTEPSSSETGNPRHLHVLIGTSVVKIPFTILLFFL KRKKQRSRRNDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPQNPATSQH PPPPPGHRSQAPSHRPPPPGHRVQHQPQKRPPAPSGTQVHQKQKGP LPRPRVQPKPPHGAENSLSPSSNRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
60	CAR2 铰链域-跨膜域-共刺激域-信号传导域 AA	QRRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE PKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKE EQEERETKTPEAVMIIFRIGMAVAIFCCFFFPWRKRKEKQSETSP KEFLTIIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQ EPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPA RLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
61	CAR5 铰链域-跨膜域-共刺激域-信号传导域 AA	QRRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE PKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKE EQEERETKTPEQTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCSLSLPLLAGL VAADAVASLLIVGAVFWRKRKEKQSETSPKEFLTIIYEDVKDLKTR RNHEQEQTFFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKS GSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQUALPPR

实施例

[0222] 实施例1.Her2-CAR的合成及CAR-NK细胞的测试流程

[0223] 发明人通过前期筛选获得了13个靶向HER2的CAR结构,命名为Her2-CAR+编号(或简称CAR+编号),其这些CAR结构如表1所示,它们具有相同的信号肽(CD8 α 信号肽,SEQ ID NO.20)和抗原结合域(抗HER2 scFv,SEQ ID NO.19,来源于曲妥珠单抗)。Her2-CAR1来源于文献,作为阳性对照。Her2-CAR2、3、5、7-11、13、19、21、23和26为根据本发明设计的CAR结构。SP代表信号肽、scFv代表单链可变片段、Hinge表示铰链域、TM表示跨膜域、cSD表示共刺激域、SD表示信号传导域。这些CAR结构的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.21至34所示,其核

核苷酸序列分别如SEQ ID NO.35至48所示。

[0224] 表1.本发明合成的CAR的结构域组成

ID	SP	scFv	Hinge	TM	cSD	SD	SEQ ID NO.
1	CD8 α SP	Herceptin scFv	CD8 α	NKG2D	2B4	CD3 ζ	21
2	CD8 α SP	Herceptin scFv	IgD	NKG2D	2B4	CD3 ζ	33
3	CD8 α SP	Herceptin scFv	4-1BB	NKG2D	2B4	CD3 ζ	22
5	CD8 α SP	Herceptin scFv	IgD-DAP10	DAP10	2B4	CD3 ζ	34
7	CD8 α SP	Herceptin scFv	4-1BB-KIR2DS1	KIR2DS1	2B4	CD3 ζ	23
8	CD8 α SP	Herceptin scFv	4-1BB	CD3 ζ	2B4	CD3 ζ	24
9	CD8 α SP	Herceptin scFv	4-1BB	CD28	2B4	CD3 ζ	25
10	CD8 α SP	Herceptin scFv	4-1BB	2B4	2B4	CD3 ζ	26
11	CD8 α SP	Herceptin scFv	4-1BB	NKP44	2B4	CD3 ζ	27
13	CD8 α SP	Herceptin scFv	4-1BB	NKP30	2B4	CD3 ζ	28
19	CD8 α SP	Herceptin scFv	4-1BB	NKG2D	DAP12	CD3 ζ	29
21	CD8 α SP	Herceptin scFv	4-1BB	NKG2D	4-1BB	CD3 ζ	30
23	CD8 α SP	Herceptin scFv	4-1BB	NKG2D	NTB-A	CD3 ζ	31
26	CD8 α SP	Herceptin scFv	4-1BB-KIR2DS1	KIR2DS1	CD2	CD3 ζ	32

[0225] 实验流程如图1所示,简要描述如下。

[0226] (1) 得到克隆合成成功的14个表达Her2-CAR结构的逆转录病毒穿梭载体质粒后,将该质粒和vsvg包膜蛋白质粒、gag-pol质粒一起转染到293T细胞中包装得到表达Her2-CAR的包膜蛋白为vsvg的逆转录病毒。

[0227] (2) 使用表达Her2-CAR的vsvg逆转录病毒感染PG13细胞,获得表达Her2-CAR的包膜蛋白为GaLV的逆转录病毒。

[0228] (3) 使用表达Her2-CAR的GaLV逆转录病毒感染NK92细胞,获得表达CAR的NK92细胞。

[0229] (4) 检测NK92细胞CAR分子表达的阳性率。

[0230] (5) 共培养表达CAR分子的NK92细胞和肿瘤靶细胞(表达荧光素酶的SKOV3细胞SKOV3-Luci),共培养24小时后通过体外实验检测肿瘤细胞释放的荧光信号强弱判断CAR-NK92细胞对于肿瘤细胞杀伤能力的强弱,从而筛选出能够增强NK细胞杀伤功能的CAR结构分子。

[0231] 实施例2.HER2-CAR的表达及CAR-NK细胞杀伤效果

[0232] 由于CAR分子是人工合成的融合蛋白,所以不同的CAR分子其蛋白稳定性可能千差万别,所以我们首先把14个表达CAR分子的质粒转染到293T细胞中,48小时后流式细胞术检测CAR分子在293T细胞的表达情况(图2-图4),Her2-CAR 1、8、9、10、11、19、21、23分子的稳定性较好,是理想的候选目标CAR分子。后续实验我们把Her2-CAR 1、8、9、10、11、19、21、23分为一组进行比较筛选,而把剩余的CAR分子分为两组进行比较筛选。

[0233] 首先,我们分别把表达Her2-CAR 1、8、9、10、11、19、21、23的8个逆转录病毒穿梭载体质粒和vsvg包膜蛋白质粒、gag-pol质粒一起转染到293T细胞中包装得到表达上述8个不

同Her2-CAR分子的包膜蛋白为vsvg的逆转录病毒。然后将这8个vsvg逆转录病毒分别感染PG13细胞,48小时后我们检测了8个Her2-CAR在PG13细胞的CAR表达阳性率(图5),实验结果表明上述8个不同的vsvg逆转录病毒全部成功感染了PG13细胞,虽然19号CAR分子的阳性率稍低。

[0234] 随后我们扩大培养表达CAR分子的PG13细胞然后浓缩细胞培养基上清,获得表达上述8个不同Her2-CAR分子的GaLV逆转录病毒,然后将这8个新的GaLV逆转录病毒分别感染NK92细胞,NK92细胞感染逆转录病毒一周后流式细胞术检测CAR阳性率和CAR蛋白丰度(MFI)(图6-图7),实验结果表明除了1号和19号CAR结构阳性率较低之外,其余的CAR结构阳性率都在30%以上,所以在后续实验中我们把Her2-CAR 8、9、10、11、21、23六个结构放在一组里进行比较,把Her2-CAR 1,19两个结构放在另一组里面比较。进行杀伤实验前,我们对这8个表达CAR分子的NK92细胞进行活率检测(图8),结果表明表达不同CAR结构的NK92细胞活率都在90%左右,与野生型未处理NK92细胞活率相当,这说明NK92细胞转染逆转录病毒表达CAR分子不会显著降低细胞活率。

[0235] 随后我们进行了肿瘤细胞杀伤实验,肿瘤靶细胞为Her2蛋白表达阳性且同时表达荧光素酶的SK-0V-3细胞(人类卵巢癌细胞),实验流程大致如下:首先我们将表达CAR分子的NK92细胞与SK-0V-3细胞进行共培养,实验中我们设置了3种不同的NK92细胞与肿瘤细胞培养比例即效靶比(2:1、1:1、1:2),理论上效靶比越高,最后观察到的肿瘤细胞杀伤能力越强,NK92细胞与SK-0V-3细胞共培养24小时后我们进行杀伤效果检测,杀伤效果检测的原理如下:NK92细胞与SK-0V-3细胞共培养24小时后,我们往共培养的细胞孔板中加入荧光素的底物,存在于SK-0V-3活细胞中的荧光素酶会催化分解荧光素酶底物然后产生荧光,然后使用仪器检测荧光信号强度,如果荧光信号越强则说明SK-0V-3活细胞越多,NK92细胞的杀伤效果越差,荧光信号越弱则说明SK-0V-3活细胞越少,NK92细胞的杀伤效果越好,实验中不表达CAR分子的WT NK92细胞为阴性对照细胞,需要注意的是NK92细胞相比T细胞,往往会对肿瘤细胞存在一定的本底杀伤能力。实验结果表明相比于WT NK92细胞,表达了Her2-CAR 1、8、9、10、11、19、21、23这8个CAR分子的NK92细胞杀伤能力显著提高且在三个不同效靶比实验条件下得到的结果都比较一致(图9-图10)。

[0236] 紧接着我们对剩余CAR结构序列进行了筛选。我们分别把表达Her2-CAR 3、5、7这三个结构的逆转录病毒穿梭载体质粒和vsvg包膜蛋白质粒、gag-pol质粒一起转染到293T细胞中包装得到表达上述3个不同Her2-CAR分子的vsvg逆转录病毒。然后将这三个逆转录病毒分别感染PG13细胞,48小时后我们检测了3个PG13细胞CAR表达阳性率(图11),实验结果表明上述3个不同的vsvg逆转录病毒全部成功感染了PG13细胞,PG13细胞的CAR阳性率都在50%以上。

[0237] 随后我们扩大培养剩余的PG13细胞然后浓缩培养基上清获得表达上述3个不同Her2-CAR分子的GaLV逆转录病毒,然后将这三个新的GaLV的逆转录病毒分别感染NK92细胞,NK92细胞感染逆转录病毒一周后流式细胞术检测CAR阳性率和CAR蛋白丰度(MFI)(图12-图13),结果表明Her2-CAR 3、5、7这三个CAR结构在NK92中的阳性率高于20%。

[0238] 进行杀伤实验前,我们对三个表达Her2-CAR 3、5、7的NK92细胞进行活率检测(图14),结果表明表达不同CAR结构的NK92细胞活率都在90%左右与野生型未处理NK92细胞活率相当。随后我们进行了肿瘤细胞杀伤实验,肿瘤靶细胞为Her2阳性且表达荧光素酶的SK-

OV-3细胞(人类卵巢癌细胞),实验结果表明相比于WT NK92细胞,表达了Her2-CAR 3、5、7这3个CAR分子的NK92细胞杀伤能力显著提高且在三个不同效靶比实验条件下得到的结果都比较一致(图15),其中表达Her2-CAR 3的NK92细胞对肿瘤细胞的杀伤能力最强,Her2-CAR 7次之,Her2-CAR 5相对最差。

[0239] 最后我们对剩余的3个结构Her2-CAR 2、13、26进行了筛选,我们分别把表达Her2-CAR 2、13、26这3个结构的逆转录病毒穿梭载体质粒和vsvg包膜蛋白质粒、gag-pol质粒一起转染到293T细胞中包装得到表达上述3个不同Her2-CAR分子的vsvg逆转录病毒。然后将这3个逆转录病毒分别感染PG13细胞,48小时后我们检测了3个PG13细胞CAR表达阳性率(图16),实验结果表明上述3个不同的vsvg逆转录病毒成功感染了PG13细胞,PG13细胞的CAR阳性率都在50%以上。

[0240] 随后我们扩大培养剩余的PG13细胞然后浓缩培养基上清获得表达上述Her2-CAR 2、13、26分子的GaLV逆转录病毒,然后将这3个新的GaLV的逆转录病毒分别感染NK92细胞,NK92细胞感染逆转录病毒一周后流式细胞术检测CAR阳性率和CAR蛋白丰度(MFI)(图17-图18),结果表明Her2-CAR 2、13、26这三个CAR结构在NK92中的阳性率接近或高于20%。

[0241] 进行杀伤实验前,我们对表达Her2-CAR 2、13、26这3个结构的NK92细胞进行活率检测(图19),结果表明表达不同CAR结构的NK92细胞活率都在90%左右与野生型未处理NK92细胞活率相当。随后我们进行了肿瘤细胞杀伤实验,肿瘤靶细胞为Her2阳性且表达荧光素酶的SK-OV-3细胞(人类卵巢癌细胞),实验结果表明相比于WT NK92细胞,表达了Her2-CAR 2、13、26这3个CAR分子的NK92细胞杀伤肿瘤细胞的能力显著提高且在三个不同效靶比实验条件下得到的结果都比较一致(图20),其中表达Her2-CAR 13的NK92细胞对肿瘤细胞的杀伤能力最强,Her2-CAR 2次之,Her2-CAR 26相对最差。

[0242] 通过实验,我们成功筛选到了13种全新的可以显著增强NK细胞的功能的CAR结构(Her2-CAR 2、3、5、7、8、9、10、11、13、19、21、23、26)。之前有多项研究表明CAR分子含有2B4蛋白的胞内共刺激结构域可以显著增强NK细胞的杀伤功能,本项研究表明,CAR分子即使不采用2B4蛋白的共刺激结构域而采用其他蛋白比如NTB-A(Her2-CAR 23)或CD2(Her2-CAR 26)的共刺激结构域也可以很好地增强NK细胞的杀伤功能,说明2B4蛋白的胞内共刺激结构域并非不可替代。此外,本发明还发现,使用4-1BB铰链域或IgD铰链域的CAR结构在NK细胞中可稳定地表达,并且所获得的CAR-NK对靶细胞有强烈的杀伤作用。

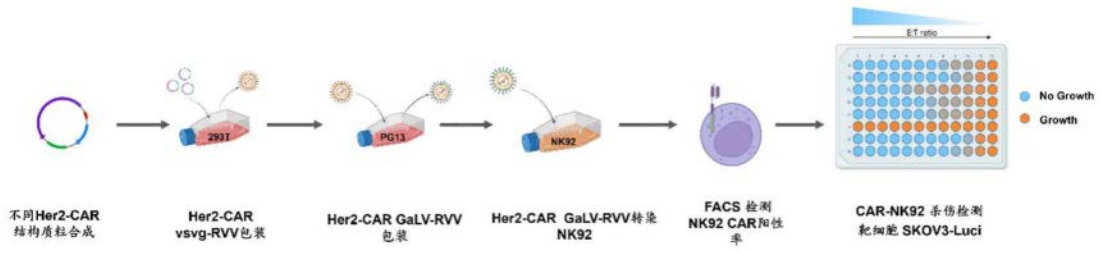


图1

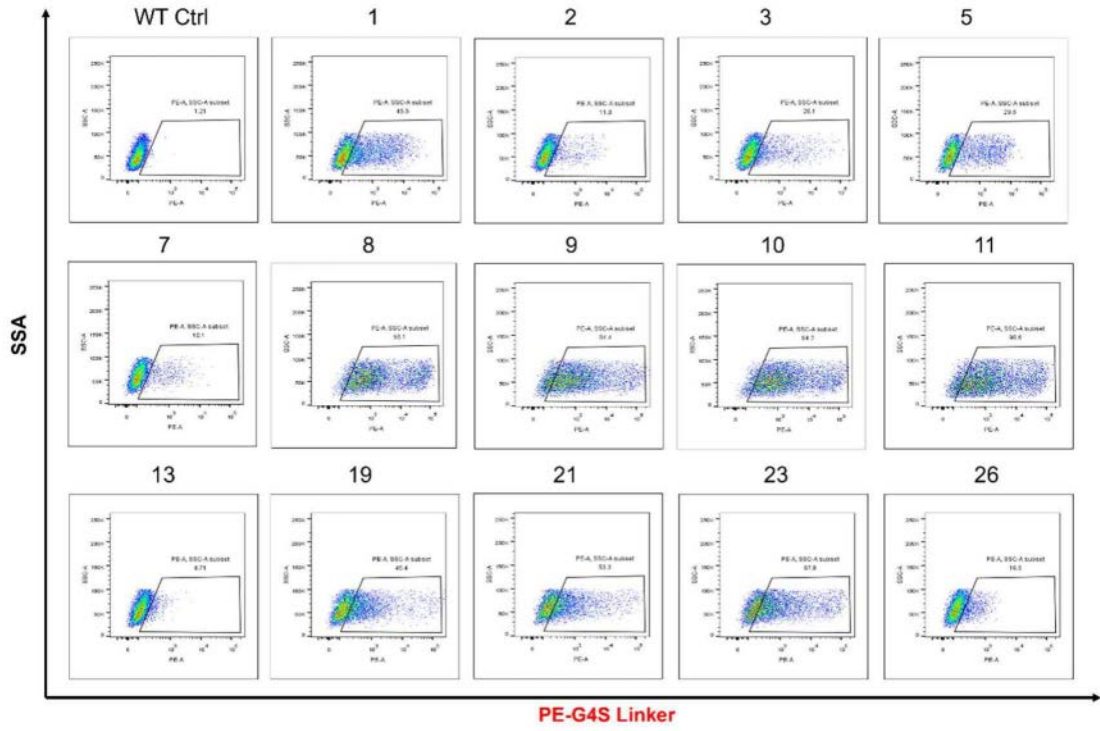


图2

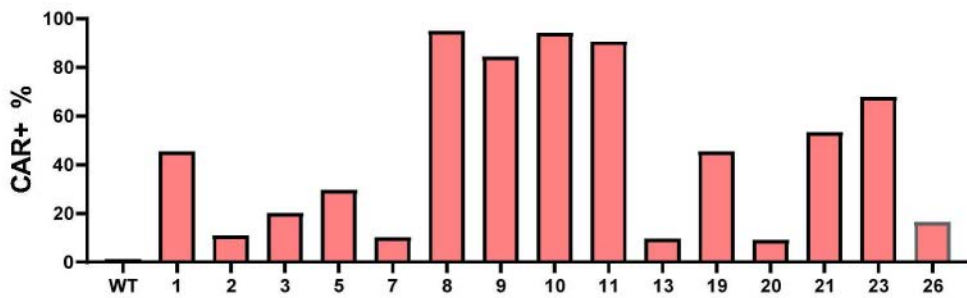


图3

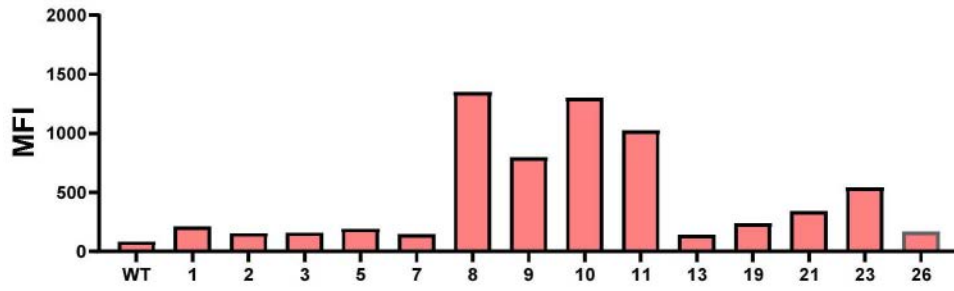


图4

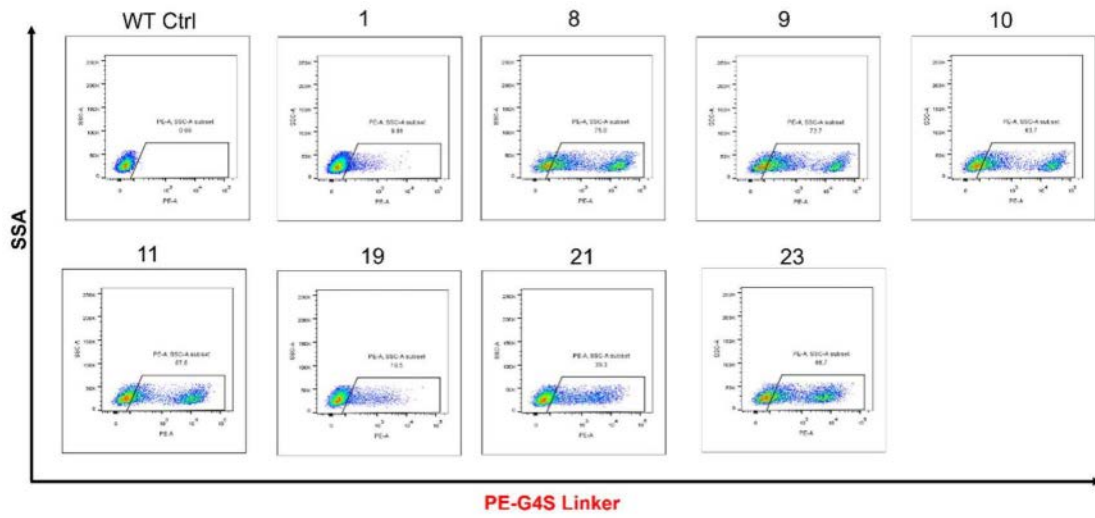


图5

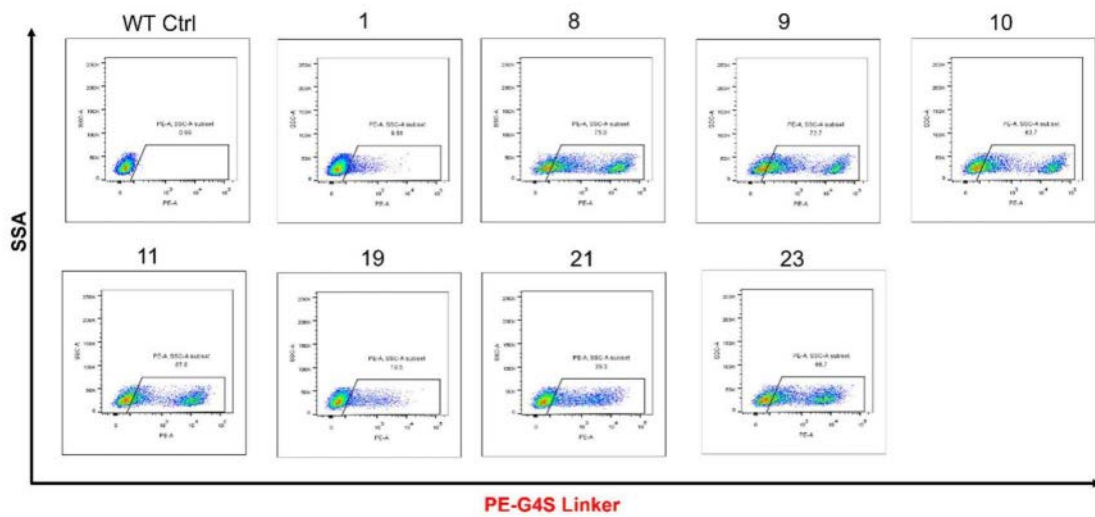


图6

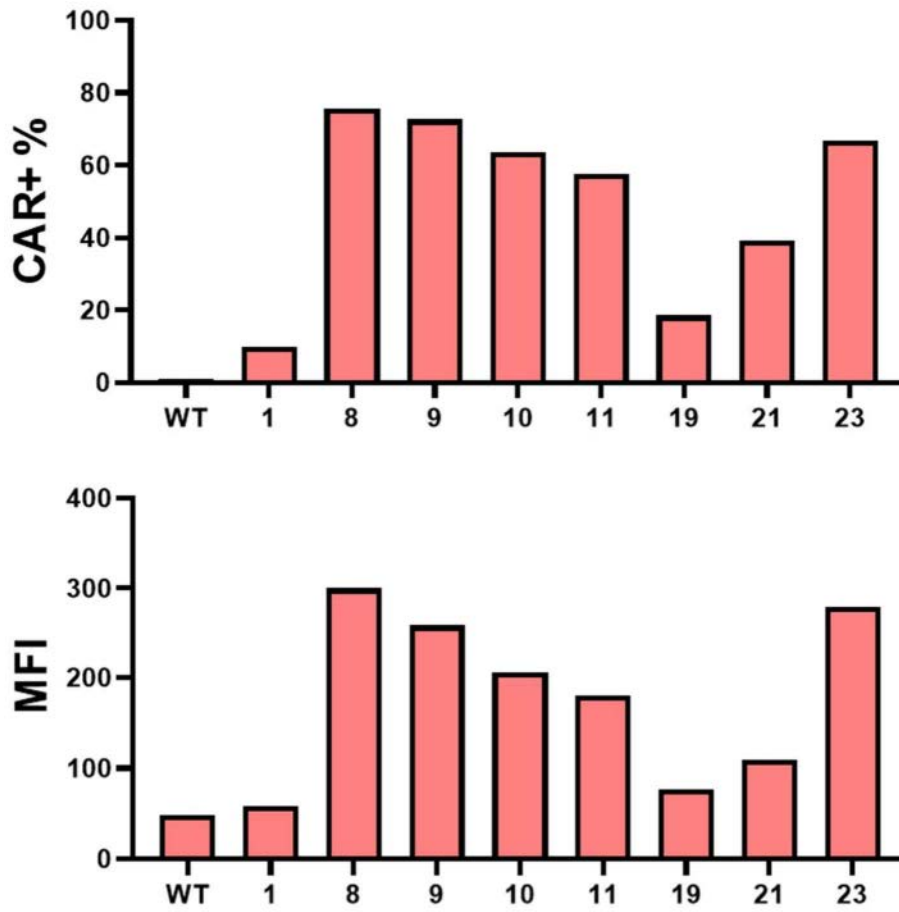


图7

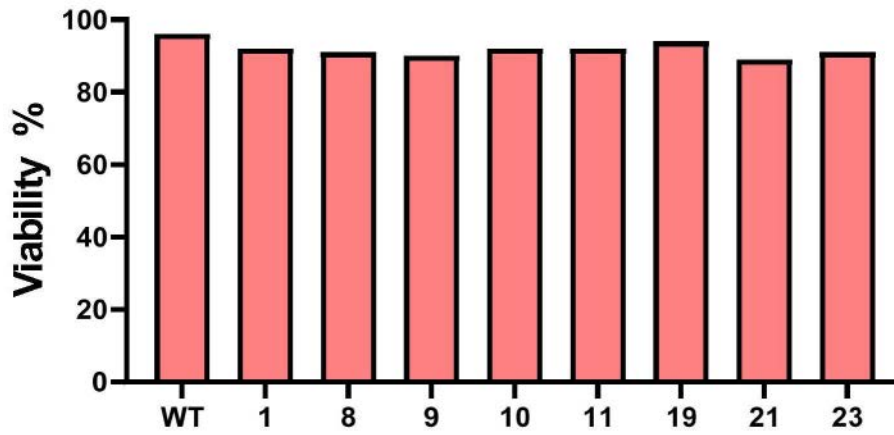


图8

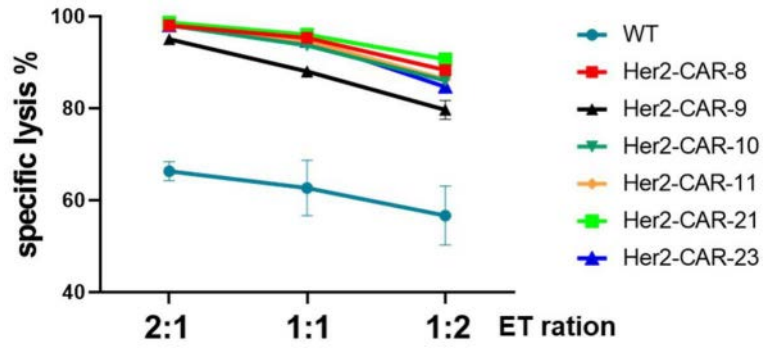


图9

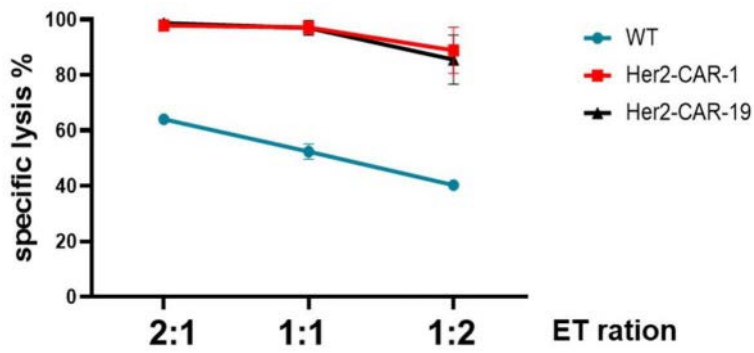


图10

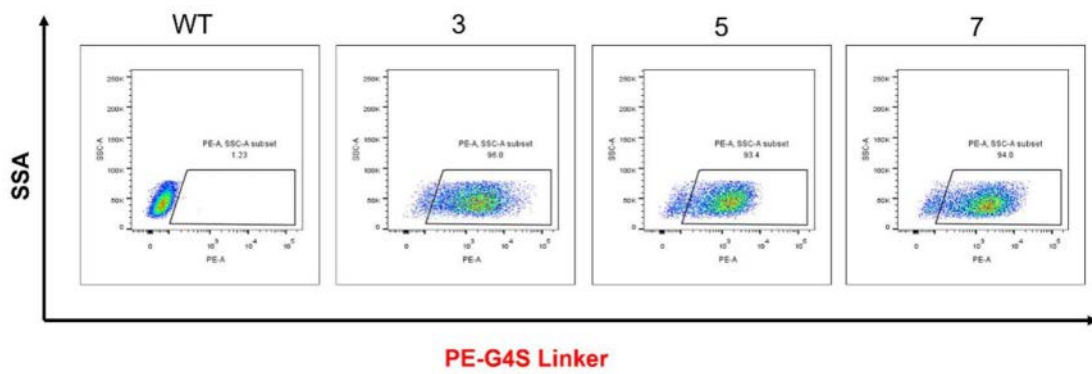


图11

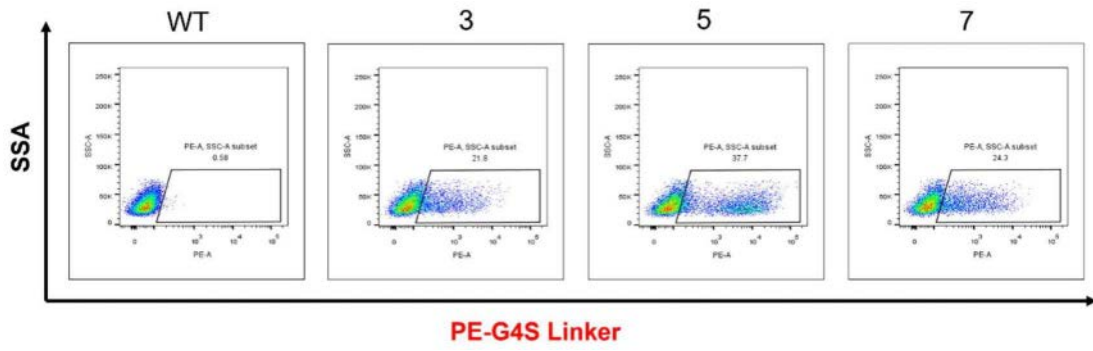


图12

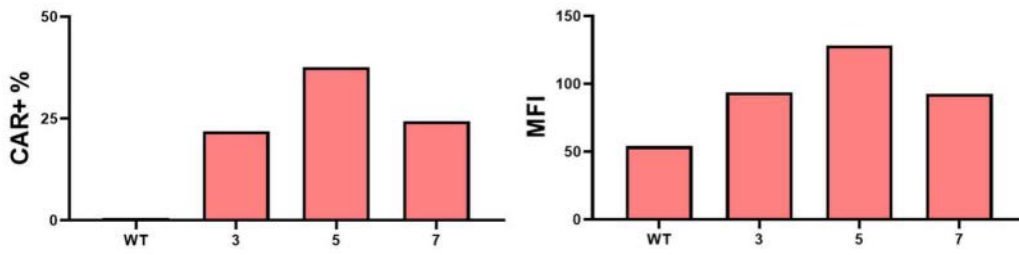


图13

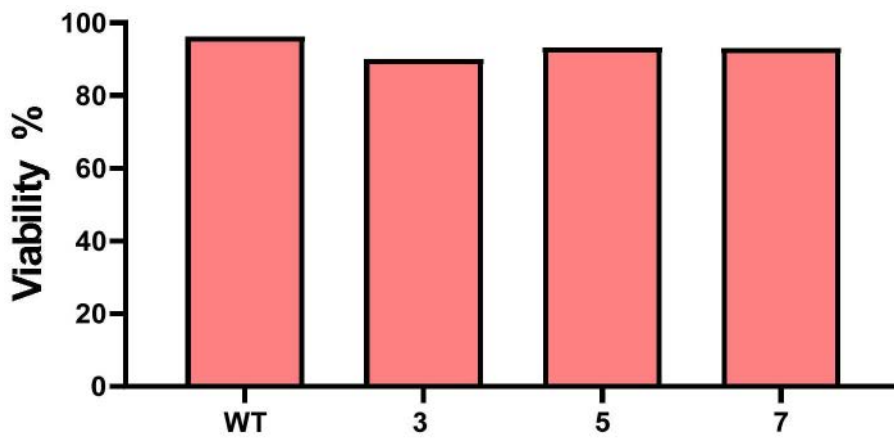


图14

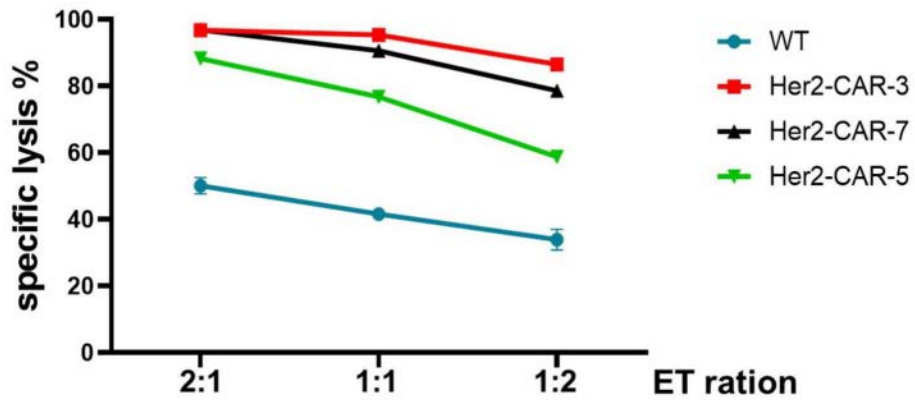


图15

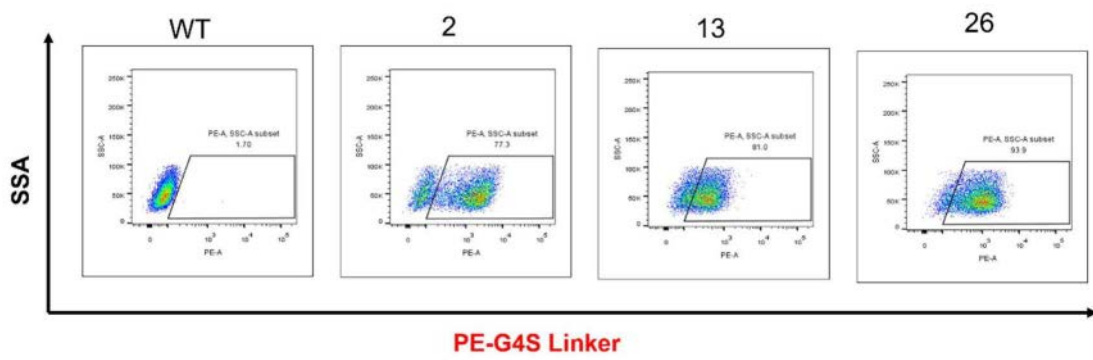


图16

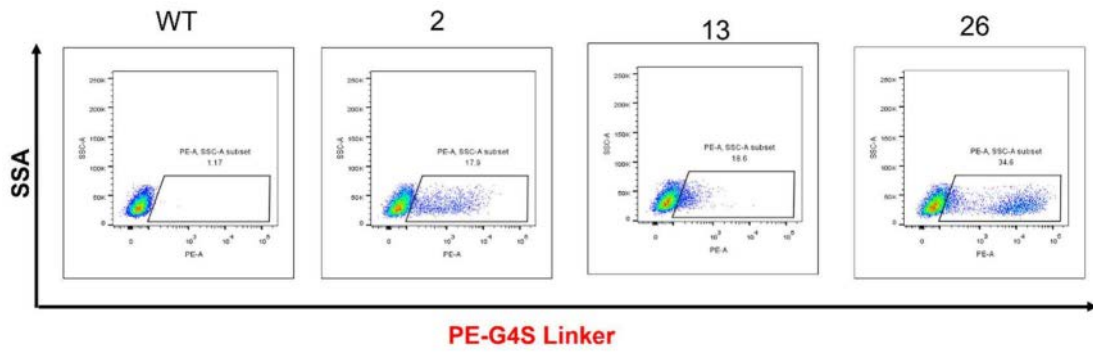


图17

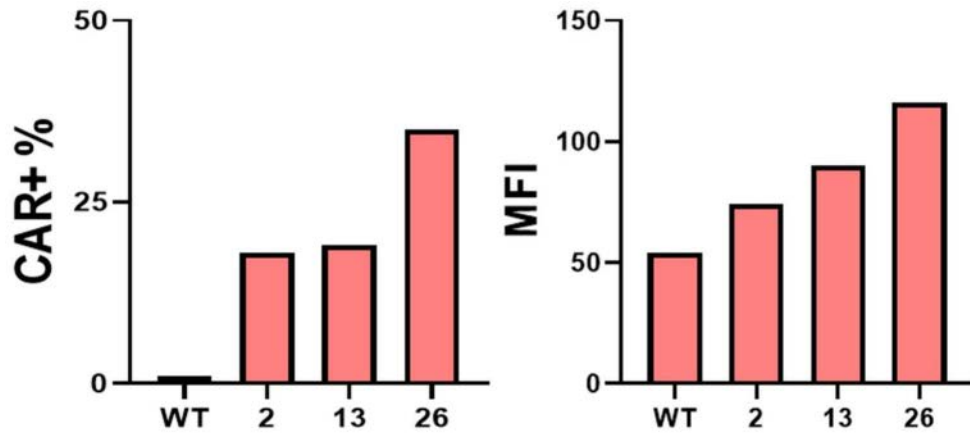


图18

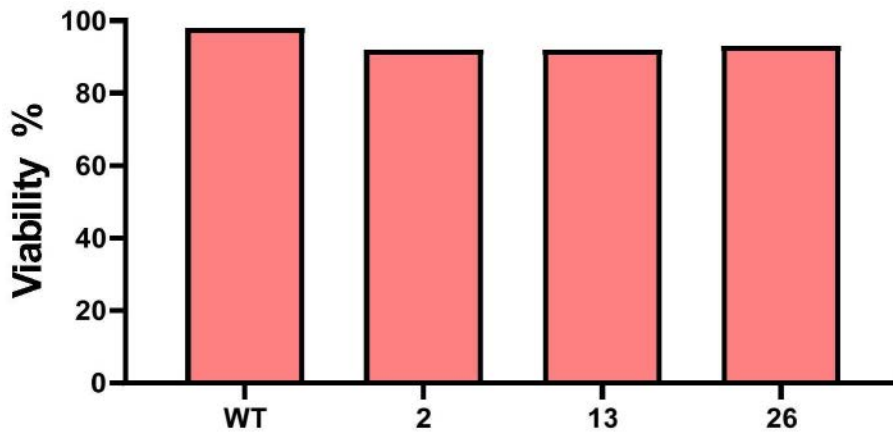


图19

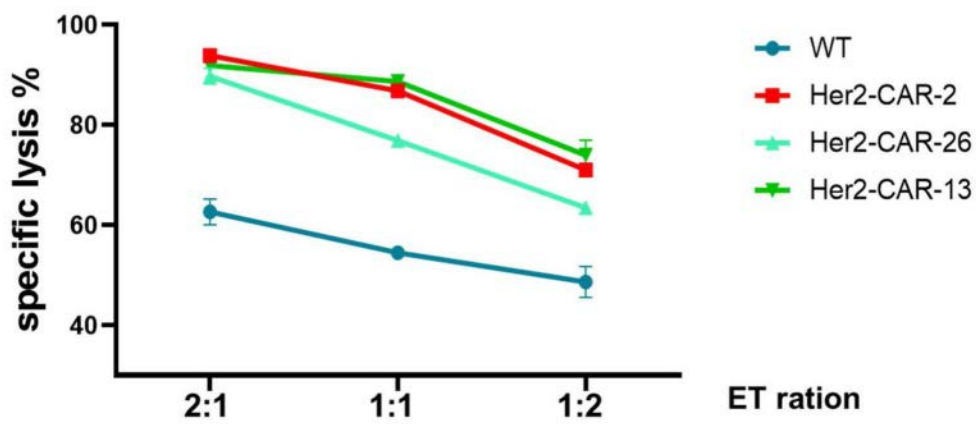


图20