



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114958770 A

(43) 申请公布日 2022.08.30

(21) 申请号 202210678490.5

(22) 申请日 2022.06.16

(71) 申请人 华东师范大学

地址 200241 上海市闵行区东川路500号

(72) 发明人 江文正 郭丹丹

(74) 专利代理机构 上海麦其知识产权代理事务

所(普通合伙) 31257

专利代理师 董红曼

(51) Int. Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

序列表4页 附图4页

(54) 发明名称

嵌合抗原受体NK细胞及其制备方法和细胞药物及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种嵌合抗原受体NK细胞及其制备方法和细胞药物应用,涉及CAR-NK细胞治疗技术领域。本发明所述NK细胞表达靶向肿瘤相关抗原的嵌合抗原受体并且在所述嵌合抗原受体NK细胞中GPR116基因被敲除或其表达受到抑制。本发明嵌合抗原受体NK细胞比原有的CAR-NK细胞具有更强的肿瘤细胞杀伤能力,为肿瘤治疗提供了新的方向和思路。

1. 一种嵌合抗原受体NK细胞,其特征在于,所述嵌合抗原受体NK细胞为表达靶向肿瘤相关抗原并且GPR116基因被敲除或其表达受到抑制的嵌合抗原受体NK细胞。

2. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体NK细胞,其特征在于,所述GPR116基因的表达通过如下分子中的任意一种或几种的组合被抑制:shRNA、反义RNA、siRNA和/或antagomir;或者,所述嵌合抗原受体NK细胞的GPR116基因通过如下技术中的任意一种被敲除:CRISPR/Cas9技术、ZFN技术和/或TALEN技术。

3. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体NK细胞,其特征在于,所述嵌合抗原受体NK细胞含有shRNA分子,所述GPR116基因的表达通过所述shRNA分子受到抑制。

4. 根据权利要求3所述的嵌合抗原受体NK细胞,其特征在于,所述shRNA分子的靶序列如SEQ ID NO.1所示。

5. 根据权利要求4所述的嵌合抗原受体NK细胞,其特征在于,所述shRNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示。

6. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体NK细胞,其特征在于,所述肿瘤相关抗原选自NKG2D配体;所述嵌合抗原受体的抗原结合结构域能够特异性结合所述肿瘤相关抗原。

7. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体NK细胞,其特征在于,当所述肿瘤相关抗原为NKG2D配体时,所述嵌合抗原受体的抗原结合结构域为NKG2D蛋白,或者是选自NKG2D蛋白的具有结合活性的片段。

8. 根据权利要求6或7所述的嵌合抗原受体NK细胞,其特征在于,所述NKG2D配体选自MICA、MICB、ULBP1、ULBP 2、ULBP 3、ULBP 4、ULBP 5和ULBP 6中的任意一种。

9. 根据权利要求7所述的嵌合抗原受体NK细胞,其特征在于,所述肿瘤相关抗原为NKG2D配体,所述抗原结合结构域为选自NKG2D蛋白的胞外段。

10. 根据权利要求9所述的嵌合抗原受体NK细胞,其特征在于,所述NKG2D蛋白的胞外段的氨基酸序列如SEQ ID NO.16所示。

11. 根据权利要求6所述的嵌合抗原受体NK细胞,其特征在于,所述嵌合抗原受体还具有跨膜结构域和共刺激信号传导区;所述跨膜结构域选自:CD8、CD28、CD33、CD37、CD8 $\alpha$ 、CD5、CD16、ICOS、CD9、CD22、CD134、CD137、CD154、CD19、CD45、CD4、和CD3 $\epsilon$ 中的一种或多种的跨膜结构域。

12. 根据权利要求11所述的嵌合抗原受体NK细胞,其特征在于,所述跨膜结构域选自CD8的跨膜结构域;和/或,所述共刺激信号传导区包含共刺激分子的细胞内结构域,所述共刺激分子选自:CD27、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CD2、CD4、CD5、CD28、CD30、CD40、CD134、CD137、ICOS、CD154、4-1BB、OX40、CD7、LIGHT、NKG2C和B7-H3中的一种或多种;和/或,所述共刺激信号传导区包括4-1BB的细胞内结构域和CD3 $\zeta$ 的细胞内结构域。

13. 一种制备如权利要求1-12之任一项所述的嵌合抗原受体NK细胞的方法,其特征在于,其包括如下步骤:抑制嵌合抗原受体NK细胞的GPR116基因的表达或敲除所述嵌合抗原受体NK细胞的GPR116基因。

14. 一种细胞药物,其特征在于,其含有作为活性成分的如权利要求1-12之任一项所述的嵌合抗原受体NK细胞以及药学上可接受的辅料。

15. 一种GPR116基因表达的干扰剂或抑制剂,其特征在于,其可干扰或抑制GPR116基因

的表达;所述干扰剂或抑制剂为shRNA、反义RNA、siRNA和/或antagomir分子中的任意一种或几种的组合。

16.如权利要求1-12之任一项所述的嵌合抗原受体NK细胞、如权利要求14所述的细胞药物、或如权利要求15所述的干扰剂或抑制剂在制备治疗肿瘤疾病的药物中的应用、在CAR-NK治疗中的应用。

17.如权利要求16所述的应用,其特征在于,所述肿瘤选自实体瘤或非实体瘤;和/或,所述实体瘤为特异性表达NKG2D配体的肿瘤;和/或,所述实体瘤选自胰腺癌、前列腺癌、肝癌、直肠癌、胃癌、和乳腺癌中的任意一种。

18.如权利要求16所述的应用,其特征在于,通过构建所述靶向实体肿瘤的NKG2D-CAR-NK细胞,并且共表达能够提高CAR-NK细胞抗肿瘤能力干扰基因GPR116,提高NKG2D-CAR-NK细胞的抗肿瘤能力;所述NKG2D-CAR-NK细胞靶向治疗胰腺癌;和/或,通过在NK92细胞中下调GPR116基因,促进NK92细胞杀伤能力;和/或,通过干扰GPR116表达来增强NKG2D-CAR-NK细胞的抗肿瘤功能;和/或,利用所述干扰剂或抑制剂的RNA干扰的方法法在CAR-NK细胞中敲低GPR116基因的表达。

## 嵌合抗原受体NK细胞及其制备方法和细胞药物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及CAR-NK细胞治疗技术领域,具体而言,涉及一种嵌合抗原受体NK细胞及其制备方法和细胞药物。

### 背景技术

[0002] 目前,癌症已经是造成全球死亡的第二大原因,全球约有六分之一的死亡都是由癌症造成的。在所有癌症中,胰腺癌(Pancreatic carcinoma,PC)被称为“癌症之王”,其致死率和死亡率极高,5年相对存活率极低,低于9%。近年来,随着医疗技术的不断发展,越来越多的治疗方法应用于胰腺癌的治疗,如手术、放疗、化疗以及免疫治疗。细胞免疫疗法是目前治疗癌症和传染病最先进的方法之一,尤其是嵌合抗原受体T细胞疗法(Chimeric antigen receptor T,CAR-T)给癌症患者带来了新的福音。但是CAR-T细胞治疗存在的问题,包括细胞因子释放综合征(CRS)、移植物抗宿主病(GVHD)以及嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)制备周期等问题。此外,嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)治疗的高成本高费用也使得普通家庭难以承受。而NK细胞因其特殊的识别靶细胞机制、较短的培养周期、广泛的肿瘤杀伤能力等优势,被认为同样有潜力通过嵌合抗原受体修饰来增强其抗肿瘤能力。

[0003] NKG2D(Natural killer group 2,member D)受体属于NKG2家族,是一种II型跨膜糖蛋白。NKG2D受体是一种表达在多种免疫细胞表面的重要激活性受体,如天然杀伤(Natural killerNK)细胞、NKT细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、 $CD8^+$ T细胞等。当其与配体结合后能够启动包括抗菌免疫应答、免疫监视和抗肿瘤作用等在内的免疫应答。值得注意的是,NKG2D配体在多种肿瘤细胞中高表达,而在正常组织或细胞中一般不表达或者低表达。因此我们将NKG2D受体设计入CAR结构中,当其与配体结合时,便会激活NK细胞,产生一系列的抗肿瘤反应。

[0004] G蛋白偶联受体(Gprotein-coupled receptors,GPCR)是一种具有七次跨膜结构的受体,在机体的各种生理反应中起着较为重要的作用。G蛋白偶联受体GPR116属于黏附性G蛋白偶联受体家族的一员,具有很长的N-末端,胞外段具有C样免疫球蛋白重复序列和SEA结构域。有研究表明,GPR116的结构特点与LN-7TM受体很相似,可能与LN-7TM受体一样能够参与免疫应答的调节。现有的CAR-NK细胞存在其治疗实体瘤效果不佳的问题,有待解决。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种新的嵌合抗原受体NK细胞、嵌合抗原受体NK细胞的构建方法及其细胞药物中的应用。本发明提供的嵌合抗原受体NK细胞的效应性CAR-NK细胞可释放更强的细胞效应因子,具有更好的肿瘤细胞杀伤能力。

[0006] 本发明首次应用RNA干扰的方法在CAR-NK细胞中敲低GPR116基因的表达,目的在于增加效应性CAR-NK细胞的比例,增强CAR-NK细胞效应因子的释放,从而增强CAR-NK细胞对肿瘤细胞的杀伤能力。本发明在NKG2D-CAR的结构中加入GPR116的干扰序列实现增强NKG2D-CAR-NK的功能。

[0007] 本发明提供一种嵌合抗原受体NK细胞,所述嵌合抗原受体NK细胞表达靶向肿瘤相关抗原的嵌合抗原受体且所述嵌合抗原受体NK细胞的GPR116基因被敲除或其表达受到抑制。

[0008] 本发明首次创新提出了在CAR-NK细胞中抑制GPR116的表达,CAR-NK细胞的抗肿瘤能力有明显的提高,本发明为应用CAR-NK细胞治疗肿瘤提供了坚实的理论基础和广泛应用前景。本发明还提出了抑制或敲除CAR-NK细胞中GPR116基因的表达同样可以实现显著良好效果。

[0009] 本发明中,所述GPR116基因的表达通过包括但不限于如下分子中的任意一种或几种的组合被抑制:shRNA、反义RNA、siRNA和antagomir;或者,上述嵌合抗原受体NK细胞的GPR116基因通过包括但不限于下述方法中的任意一种敲除方法:CRISPR/Cas9技术、ZFN技术和TALEN技术。

[0010] 本发明提出,基于本发明实施例的内容,采用包括但不限于本领域常见技术对嵌合抗原受体NK细胞进行改造,以使其GPR116基因的表达受到抑制,或敲除GPR116基因,无论通过何种技术得到的嵌合抗原受体NK细胞,只要其GPR116基因被抑制表达或被敲除的嵌合抗原受体NK细胞即属于本发明的保护范围。

[0011] 在具体实施方案中,所述嵌合抗原受体NK细胞含有shRNA分子,所述GPR116基因的表达通过所述shRNA分子受到抑制。

[0012] 在具体实施方式中,所述shRNA分子的靶序列如SEQ ID NO.1所示。本发明实施例内容显示,利用shRNA分子靶向GPR116基因上如SEQ ID NO.1处的靶序列,GPR116基因表现出被抑制的效果,相应的嵌合抗原受体NK细胞均有抗肿瘤能力提高的表现。

[0013] 优选地,所述shRNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示:GCAGUCGGAUUCGUCUAUUGU。

[0014] 在具体实施方案中,所述肿瘤相关抗原包括但不限于选自NKG2D配体。在具体实施方案中,所述嵌合抗原受体的抗原结合结构域能够特异性结合所述肿瘤相关抗原。

[0015] 需要说明的是,基于本发明公开的内容,本领域技术人员可以选择合适的肿瘤相关抗原,无论选用何种肿瘤相关抗原均属于本发明的保护范围。

[0016] 在具体实施方式中,当所述肿瘤相关抗原为NKG2D配体时,所述嵌合抗原受体的抗原结合结构域为NKG2D蛋白,或者是选自NKG2D蛋白的具有结合活性的片段。

[0017] 在具体实施方式中,所述肿瘤相关抗原为NKG2D配体,上述抗原结合结构域为选自NKG2D蛋白的胞外段。

[0018] 在具体实施方式中,所述NKG2D蛋白的胞外段的氨基酸序列SEQ ID NO.16所示。

[0019] 在具体实施方式中,所述NKG2D配体选自MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP 4、ULBP 5和ULBP 6中的任意一种。

[0020] NKG2D及其配体的免疫学特征与肿瘤有着很大的联系。NKG2D的配体包括六个成员:MICA、MICB、ULBP1-6,但是机体大部分正常细胞表面一般不表达或者低表达这些配体,在某些实体肿瘤中,如胰腺癌、前列腺癌、肝癌细胞、直肠癌细胞、胃癌细胞、乳腺癌细胞等均有不同程度的NKG2D配体表达,将NKG2D受体设计到CAR结构中,当其与配体结合时,便会激活NK细胞,产生一系列的抗肿瘤反应。

[0021] 在具体实施方式中,所述嵌合抗原受体还具有跨膜结构域和共刺激信号传导区;

所述跨膜结构域选自：CD8、CD28、CD33、CD37、CD8 $\alpha$ 、CD5、CD16、ICOS、CD9、CD22、CD134、CD137、CD154、CD19、CD45、CD4、和CD3 $\epsilon$ 中的一种或多种的跨膜结构域。

[0022] 在具体实施方式中，所述跨膜结构域选自CD8的跨膜结构域。

[0023] 在具体实施方式中，所述共刺激信号传导区包含共刺激分子的细胞内结构域，所述共刺激分子选自：CD27、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CD2、CD4、CD5、CD28、CD30、CD40、CD134、CD137、ICOS、CD154、4-1BB、OX40、CD7、LIGHT、NKG2C和B7-H3中的一种或多种。

[0024] 在具体实施方式中，所述共刺激信号传导区包括4-1BB的细胞内结构域和CD3 $\zeta$ 的细胞内结构域。

[0025] 本发明所述嵌合抗原受体NK细胞包含但不限于NKG2D-CAR-NK细胞。

[0026] 本发明还提供一种制备如前所述任一项的嵌合抗原受体NK细胞的方法，其包括如下步骤：抑制所述嵌合抗原受体NK细胞的GPR116基因的表达或敲除所述嵌合抗原受体NK细胞的GPR116基因。

[0027] 需要说明的是，无论采用何种方法制备出本发明所述的嵌合抗原受体NK细胞，其均是属于本发明的保护范围。

[0028] 通过本发明方法能够增强CAR-NK细胞效应因子的释放，有利于增强CAR-NK细胞对肿瘤细胞的杀伤能力。

[0029] 本发明还提供了一种细胞药物，其含有作为活性成分的如前所述任一项的嵌合抗原受体NK细胞，以及药学上可接受的辅料。

[0030] 本发明还提出了一种GPR116基因表达的干扰剂或抑制剂，其可干扰或抑制GPR116基因的表达；所述干扰剂或抑制剂为shRNA、反义RNA、siRNA和/或antagomir分子中的任意一种或几种的组合。

[0031] 本发明还提供了所述嵌合抗原受体NK细胞、所述细胞药物、所述干扰剂或抑制剂在制备治疗肿瘤疾病的药物中的应用、在CAR-NK治疗中的应用。

[0032] 在具体实施方式中，所述细胞药物用于治疗肿瘤。

[0033] 在具体实施方式中，所述肿瘤选自实体瘤或非实体瘤。

[0034] 需要说明的是，基于本发明的内容，本领域技术人员容易想到将本发明嵌合抗原受体NK细胞应用于治疗各种肿瘤，不仅仅是实体瘤，也适用于非实体瘤，无论哪种肿瘤，其均属于本发明的保护范围。

[0035] 在具体实施方式中，所述实体瘤为特异性表达NKG2D配体的肿瘤。

[0036] 在具体实施方式中，所述实体瘤选自胰腺癌、前列腺癌、肝癌、直肠癌、胃癌和乳腺癌中的任意一种。

[0037] 本发明中，通过构建所述靶向实体肿瘤的NKG2D-CAR-NK细胞，并且共表达能够提高CAR-NK细胞抗肿瘤能力干扰基因GPR116，提高NKG2D-CAR-NK细胞的抗肿瘤能力；所述NKG2D-CAR-NK细胞靶向治疗胰腺癌；和/或，通过在NK92细胞中下调GPR116基因，促进NK92细胞杀伤能力；和/或，通过干扰GPR116表达来增强NKG2D-CAR-NK细胞的抗肿瘤功能。

[0038] 本发明中，利用RNA干扰法在CAR-NK细胞中敲低GPR116基因的表达，通过所述嵌合抗原受体NK细胞含有的shRNA、反义RNA、siRNA和/或antagomir之任意一种或几种组合抑制GPR116基因的表达。

[0039] 嵌合抗原受体T细胞疗法即CAR-T疗法,在治疗血液瘤的治疗过程中取得了很好的疗效,同时也面临巨大的挑战,主要是CRS,GVHD以及制备困难等。相较于CAR-T而言,CAR-NK具有其独特的优势,比如无抗宿主移植反应、生产周期短、较强的杀伤能力以及生产成本低等特点逐渐成为新的治疗方法。本发明通过构建靶向实体肿瘤的NKG2D-CAR-NK细胞,并且共表达能够提高CAR-NK细胞抗肿瘤能力干扰基因GPR116,结果发现干扰GPR116后能够显著有效地提高NKG2D-CAR-NK细胞的抗肿瘤能力,这些研究为治疗实体瘤提供了新的方向和思路。

[0040] 本发明首次揭示在NK92细胞中下调GPR116基因,能够有效的促进NK92细胞的杀伤能力。同时首次揭示靶向胰腺癌细胞的NKG2D-CAR-NK的细胞治疗,也是首次将shRNA-GPR116应用于CAR-NK治疗中。本研究通过体外实验不仅证明了NKG2D-CAR-NK能够有效地靶向治疗胰腺癌,同时证明了干扰GPR116后能够有效地增加NKG2D-CAR-NK细胞的抗肿瘤功能,为CAR-NK应用于实体瘤治疗提供了新的方向。

### 附图说明

[0041] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

[0042] 图1为NK92细胞中下调GPR116受体的表达,结果显示NK92细胞经过干扰以后促进了NK92细胞杀伤K562的能力。

[0043] 图2为GPR116受体缺失促进NK细胞抑制胰腺癌生长的能力。其中左图为肿瘤大小,右图为肿瘤重量。

[0044] 图3为pLL3.7-NKG2D-CAR、pLL3.7-NC-NKG2D-CAR和pLL3.7-shRNA-NKG2D-CAR三种质粒的部分表达元件的结构示意图。

[0045] 图4为重组质粒pLL3.7-NKG2D-CAR、pLL3.7-shRNA-A/B/C-NKG2D-CAR和pLL3.7-shRNA-NC-NKG2D-CAR经Nhe I和Xba I双酶切鉴定结果。

[0046] 图5为表达shRNA-A/B/C-NKG2D-CAR和shRNA-NC-NKG2D-CAR慢病毒感染的NK92细胞的GPR116基因Q-PCR(左图)和RT-PCR(右图)鉴定结果。

[0047] 图6为shRNA-NC-NKG2D-CAR-NK92、shRNA-A-NKG2D-CAR-NK92和感染对照病毒的NK92细胞杀伤胰腺癌细胞效率的结果。shRNA-A-NKG2D-CAR-NK92细胞杀伤效率更高。

[0048] 图7为shRNA-NC-NKG2D-CAR-NK92、shRNA-A-NKG2D-CAR-NK92和感染对照病毒的NK92细胞杀伤胰腺癌肿瘤荧光统计图。

### 具体实施方式

[0049] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0050] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0051] 实施例1

[0052] pLL3.7-shRNA-GPR 116干扰载体的构建

[0053] 1RNAi靶序列设计

[0054] 在NCBI网站中查找到Homo sapiens GPR116 (ADGRF5)的基因序号:001098518.2。根据基因编号在网站 (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/design.do>) 设计GPR116基因RNAi靶序列,结果表1所示。

[0055] 表1.GPR116基因RNAi靶序列

靶序列名称	起始位置	RNAi靶序列的核苷酸序列	GC%	SEQ ID NO.
靶序列A	2673	GCAGTCGGATTTCGTCTATTGT	52.1	SEQ ID NO.1

[0057] 2根据靶序列设计干扰序列:

[0058] 基于筛选出的靶序列,参考如下原则设计和确定干扰序列:5端以G开头,设定G+C含量为30%-50%。根据pLL3.7载体的要求:(1)在正义链5'端加T重建U6启动子1位的T。(2)干扰靶序列后加Loop环“TTCAAGAGA”。(3)加入反转互补序列及终止信号“TTTTT”。(4)在3'端再加上EcoR I酶切位点GAATTC以方便鉴定。(5)再补平Xho I酶切位点合成一对互补片段。

[0059] 将序列打乱设计成NC(Negative Control)序列,各序列如下表2所示。

[0060] 表2.针对靶序列和阴性对照序列分别设计的寡核苷酸序列

干扰序列名称	碱基序列 (5' ---3')	SEQ ID NO.
[0061] shRNA-GPR116- A-F	TGCAGTCGGATTTCGTCTATTGTTTCAAGAGAA CAATAGACGAATCCGACTGCTTTTTTGAATTCC	SEQ ID NO.2
shRNA-GPR116-A-R	TCGAGGAATTCAAAAAAGCAGTCGGATTTCGT CTATTGTTCTCTTGAAACAATAGACGAATCCG ACTGCA	SEQ ID NO.3
[0062] Negative Control-F	TGAACCCACCTCCAGTAAATGGTTCAAGAGAC CATTACTGGAGGTGGGTTCTTTTTTGAATTCC	SEQ ID NO.4
Negative Control-R	TCGAGGAATTCAAAAAAGAACCCACCTCCAG TAAATGGTCTCTTGAACCATTACTGGAGGTG GGTTCA	SEQ ID NO.5

[0063] 3构建靶向质粒pLL3.7-shRNA-NKG2D-CAR

[0064] 通过<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>和<https://www.uniprot.org/>网站查到NKG2D蛋白的胞外段基因序列然后加入CD8a信号肽的序列。经过RT-PCR的方式扩增得到Sig-NKG2D胞外段序列如下SEQ ID NO.6:

[0065] ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCAGGCCGATGTT  
ATTCAACCAAGAAGTTCAAATCCCTTGACCGAAAGTTACTGTGGCCCATGTCCTAAAACTGGATATGTTACAAA  
AATAACTGCTACCAATTTTTTGATGAGAGTAAAACTGGTATGAGAGCCAGGCTTCTGTATGTCTCAAATGCCA  
GCCTTCTGAAAGTATACAGCAAAGAGGACCAGGATTTACTTAACTGGTGAAGTCATATCATTGGATGGGACTAGT  
ACACATTCCAACAAATGGATCTTGGCAGTGGGAAGATGGCTCCATTCTCTCACCCAACCTACTAACAATAATTGAA  
ATGCAGAAGGGAGACTGTGCACTCTATGCCTCGAGCTTTAAAGGCTATATAGAAAAGTGTCAACTCCAATACAT  
ACATCTGCATGCAAAGGACTGTG;

[0066] 氨基酸序列如下 (SEQ ID NO.16) :

[0067] MALPVTALLLPLALLLHAARPMLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASC  
MSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDICALYASSFKGYIENC  
STPNTYICMQRTV。

[0068] 使用重叠PCR将sigNKG2DEX序列与二代CAR序列连接到一起。经测序鉴定后确定构建成功后插入GPR116干扰序列。

[0069] 实施例2

[0070] pLL3.7-NKG2D-CAR、pLL3.7-shRNA-NKG2D-CAR和pLL3.7-shRNA-NC-NKG2D-CAR质粒的扩增与病毒包装。

[0071] 1质粒转染

[0072] 1) 将质粒, PEI, Opti-MEM培养基从冰箱中取出并恢复至室温;

[0073] 2) 将质粒/Opti-MEM, PEI/Opti-MEM培养基混合均匀后室温静置5min;

[0074] 3) 静置结束后, 将两者混合并在漩涡震荡仪上震荡至完全混合均匀, 然后室温静置20min;

[0075] 4) 将1ml DNA/PEI混合物慢慢逐滴滴入铺有293T培养皿中, 37°C培养箱孵育, 6-8h后更换新鲜培养基, 放入37°C培养箱继续孵育。

[0076] 2病毒收集和浓缩

[0077] 1) 收集质粒转染后48h和72h后的上清;

[0078] 2) 4°C, 4000g离心10min后用0.45μm滤器过滤上清;

[0079] 3) 将过滤后的病毒上清转入超速离心管中, 25000转离心2h, 然后将病毒液分装至1.5ml EP管中, 置于-80°C保存。

[0080] 3病毒滴度测定

[0081] 1) 在24孔培养板中铺入密度为 $2 \times 10^5$ /ml的293T细胞;

[0082] 2) 向24孔培养板中加入0.1, 0.5, 1ul病毒浓缩液, 继续培养16h后更换新鲜培养基;

[0083] 3) 48h后流式检测被感染细胞的目的基因表达;

[0084] 4) 计算滴度, 滴度 =  $2 \times 10^5 \times$  感染效率  $\times$  1000 / 稀释倍数。

[0085] 实施例3

[0086] pLL3.7-shRNA-NKG2D-CAR载体干扰验证试验

[0087] 取出液氮中保存的NK92细胞, 迅速融化后800rpm/min离心5分钟。细胞沉淀用α-MEM完全培养基重悬并接种于24孔板中培养。将复苏好的NK92细胞分为3组: 无病毒感染阴性对照组、LV-shRNA-NC-NKG2D-CAR组和LV-shRNA-A-NKG2D-CAR慢病毒干扰组, 每组各2孔。两个实验组分别按照MOI = 10:1加入相应体积的病毒, 并加入10μg/ml polybrene促进感染。24h后将细胞进行收集, 1000g离心10min, 弃去培养基, 加入新鲜培养基。

[0088] 收集慢病毒感染48h后的细胞, 分别抽提总RNA后, 利用Q-PCR和RT-PCR检测GPR116基因的表达。如图5所示, 相比于对照组, 干扰组GPR116的表达有明显的下降, 其中shRNA-A-NKG2D-CAR组效果更加明显。

[0089] 实施例4

[0090] 靶细胞的选择及CAR-NK杀伤功能研究

[0091] 1实验室前期的研究发现胰腺癌细胞株PANC28高表达NKG2D配体,因此,选用PANC28作为靶细胞用于后续实验的研究。

[0092] 2靶细胞与效应细胞混合培养

[0093] 将胰腺癌细胞株PANC28分别按照 $4 \times 10^4$ /孔的数量接种至超低吸附细胞培养96孔板中;将shRNA-NC-NKG2D-CAR-NK92、shRNA-A-NKG2D-CAR-NK92和感染对照病毒的NK92细胞分别按照效靶比1:1、2.5:1、5:1接种至靶细胞中;4h后经流式检测其杀伤效率。

[0094] 3体外杀伤效率分析

[0095] 如图6所示,与NK92相比,shRNA-NC-NKG2D-CAR-NK92和shRNA-A-NKG2D-CAR-NK92均具有很强的杀伤胰腺癌的效果。并且与shRNA-NC-NKG2D-CAR-NK92相比,shRNA-A-NKG2D-CAR-NK92具有更强的杀伤效率,此实验表明,NKG2D可以很好的靶向胰腺癌细胞株发挥功能,并且干扰GPR116能增强NKG2D-CAR-NK92的杀伤效率。

[0096] 4体内抗肿瘤效果分析

[0097] 如图7所示,与NK92相比,shRNA-NC-NKG2D-CAR-NK92和shRNA-A-NKG2D-CAR-NK92均具有较好的抗肿瘤效果。并且与shRNA-NC-NKG2D-CAR-NK92相比,shRNA-A-NKG2D-CAR-NK92具有更强的抗肿瘤效果,此实验表明,NKG2D-CAR-NK92具有很好的抗胰腺癌作用,并且干扰GPR116能增强NKG2D-CAR-NK92的抗肿瘤效果。

[0098] 对比例

[0099] 针对多个不同靶序列设计了不同的对照干扰序列,并进行了相关实验。实验方法与前述方法相同。

[0100] 各对比例的靶序列见表3,各靶序列对应的干扰序列的上下游片段如表4所示,其中shRNA-A为本发明实施例1的原有序列。

[0101] 表3.GPR116基因的RNAi靶序列

[0102]

实施例	靶序列名称	起始位置	RNAi靶序列的核苷酸序列	GC%	SEQ ID NO.
实施例1	靶序列A	2673	GCAGTCGGATTCGTCTATTGT	52.1	1
对比例C1	靶序列B	1961	GCCCATCTATGAAGCTGAATC	52.39	7
对比例C2	靶序列C	1175	GCAGTCAGGGTAATGTTAATT	47.62	8

[0103] 表4.针对靶序列和阴性对照序列分别设计的寡核苷酸序列

干扰序列名称	碱基序列 (5' ---3')	SEQ ID NO.
shRNA- GPR116-A-F	TGCAGTCGGATTTCGTCTATTGTTTCAAGAGAA CAATAGACGAATCCGACTGCTTTTTTGAATTCC	SEQ ID NO.2
shRNA-GPR116-A-R	TCGAGGAATTCAAAAAAGCAGTCGGATTTCGT CTATTGTTCTCTTGAAACAATAGACGAATCCG ACTGCA	SEQ ID NO.3
shRNA- GPR116-B-F	TGCCCATCTATGAAGCTGAATCTTCAAGAGAG ATTCAGCTTCATAGATGGGCTTTTTTGAATTCC	SEQ ID NO.9
shRNA-GPR116-B-R	TCGAGGAATTCAAAAAAGCCCATCTATGAAG CTGAATCTCTCTTGAAAGATTCAGCTTCATAGA TGGGCA	SEQ ID NO.10
shRNA-GPR116-C-F	TGCAGTCAGGGTAATGTTAATTTTCAAGAGAA ATTAACATTACCCTGACTGCTTTTTTGAATTCC	SEQ ID NO.11
shRNA-GPR116-C-R	TCGAGGAATTCAAAAAAGCAGTCAGGGTAAT GTTAATTTCTCTTGAAAATTAACATTACCCTG ACTGCA	SEQ ID NO.12
Negative Control-F	TGAACCCACCTCCAGTAAATGGTTCAAGAGAC CATTACTGGAGGTGGGTTCTTTTTTGAATTCC	SEQ ID NO.4
Negative Control-R	TCGAGGAATTCAAAAAAGAACCCACCTCCAG TAAATGGTCTCTTGAAACCATTACTGGAGGTG GGTTCA	SEQ ID NO.5

[0105] 靶向靶序列A的shRNA的RNA序列为:GCAGUCGGAUUCGUCUAUUGU (SEQ ID NO.13)。

[0106] 靶向靶序列B的shRNA的RNA序列为:GCCCAUCUAUGAAGCUGAAUC (SEQ ID NO.14)。

[0107] 靶向靶序列C的shRNA的RNA序列为:GCAGUCAGGGUAAUGUAAUU (SEQ ID NO.15)。

[0108] 利用与上述载体构建相同的方法,设计干扰shRNA后由公司合成干扰序列DNA双链并连接到pLL3.7载体上,进行Nhe I和XbaI双酶切鉴定,结果如图4所示。

[0109] 利用相同的方法,进行慢病毒包装。

[0110] 图5结果显示,从GPR116 mRNA表达来看,在众多干扰RNA中,sh-GPR116-A干扰组GPR116的mRNA的表达水平低于sh-GPR116-B和sh-GPR116-C干扰组,因此sh-GPR116-A片段具有最优的干扰效果。上述实验的结果是本领域技术人员无法预料的。

[0111] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

## SEQUENCE LISTING

<110> 华东师范大学

<120> 嵌合抗原受体NK细胞及其制备方法和细胞药物及其应用

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gcagtcggat tcgtctattg t 21

<210> 2

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

tgcagtcgga ttcgtctatt gtttcaagag aacaatagac gaatccgact gcttttttga 60  
attcc 65

<210> 3

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

tcgaggaatt caaaaaagca gtcggattcg tctattgttc tcttgaaca atagacgaat 60  
ccgactgca 69

<210> 4

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

tgaaccacc tccagtaaat gtttcaagag accatttact ggaggtgggt tcttttttga 60  
attcc 65

<210> 5

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

tcgaggaatt caaaaaagaa cccacctcca gtaaattggtc tcttgaacca tttactggag 60

gtgggttca 69

<210> 6

<211> 471

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccgatgttat tcaaccaaga agttcaaatt cccttgaccg aaagttactg tggcccatgt 120

cctaaaaact ggatatgtta caaaaataac tgctaccaat tttttgatga gagtaaaaac 180

tggtatgaga gccaggcttc ttgtatgtct caaaatgccg gccttctgaa agtatacagc 240

aaagaggacc aggatttact taaactggtg aagtcatac attggatggg actagtacac 300

attccaacaa atggatcttg gcagtgggaa gatggctcca ttctctcacc caacctacta 360

acaataattg aaatgcagaa gggagactgt gcactctatg cctcgagctt taaaggctat 420

atagaaaact gttcaactcc aaatacatac atctgcatgc aaaggactgt g 471

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

gccccatctat gaagctgaat c 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

gcagtcaggg taatgttaat t 21

<210> 9

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

tgccccatcta tgaagctgaa tcttcaagag agattcagct tcatagatgg gcttttttga 60

attcc 65

<210> 10

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

tcgaggaatt caaaaaagcc catctatgaa gctgaatctc tcttgaagat tcagcttcat 60

agatgggca 69

<210> 11

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

tgcagtcagg gtaatgttaa ttttcaagag aaattaacat taccctgact gcttttttga 60

attcc 65

<210> 12

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

tcgaggaatt caaaaaagca gtcagggtaa tgtaatttc tcttgaaaat taacattacc 60

ctgactgca 69

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 13

gcagucggau ucgucuauug u 21

<210> 14

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 14

gccc\_aucuau gaagcugaau c 21

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 15

gcagucaggg uaauguuaau u 21

<210> 16

<211> 157

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 16

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 Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu			
	20	25	30
Thr Glu Ser Tyr Cys Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys			
	35	40	45
Asn Asn Cys Tyr Gln Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser			
	50	55	60
Gln Ala Ser Cys Met Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser			
65	70	75	80
Lys Glu Asp Gln Asp Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met			
	85	90	95
Gly Leu Val His Ile Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly			
	100	105	110
Ser Ile Leu Ser Pro Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly			
	115	120	125
Asp Cys Ala Leu Tyr Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys			
	130	135	140
Ser Thr Pro Asn Thr Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val			
145	150	155	

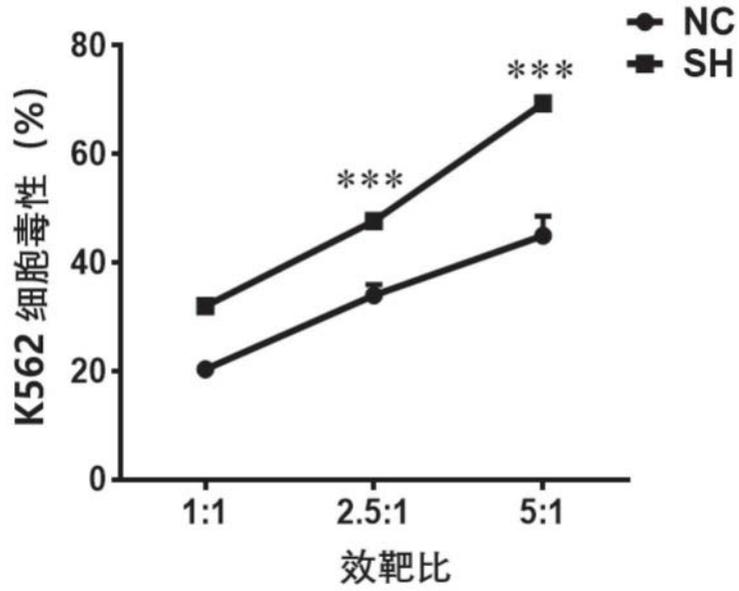


图1

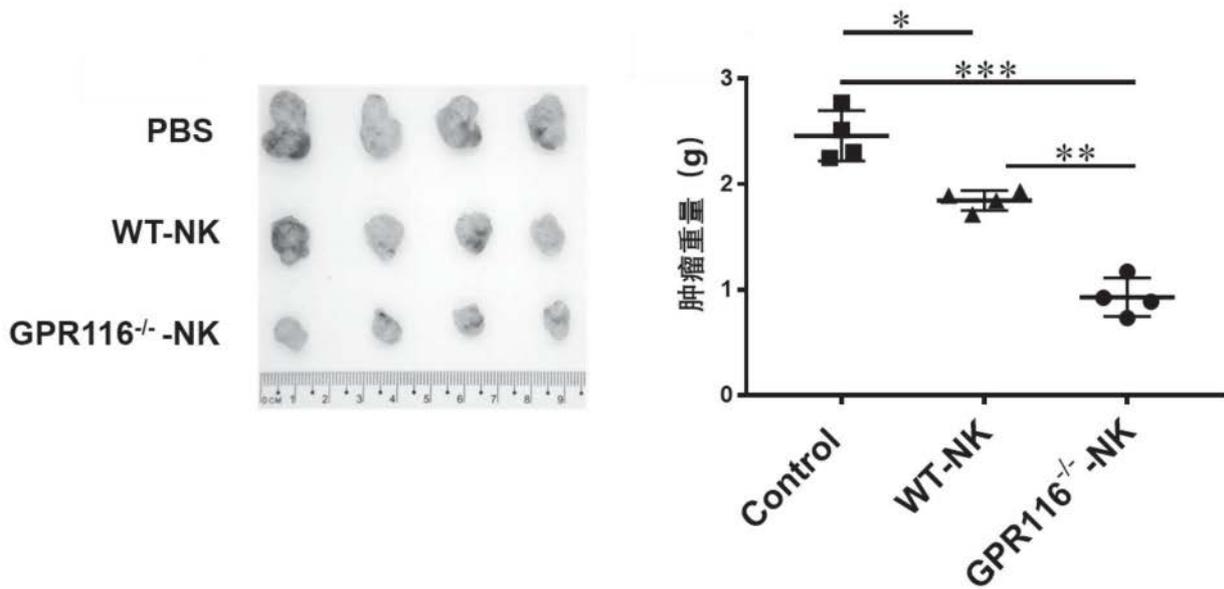


图2

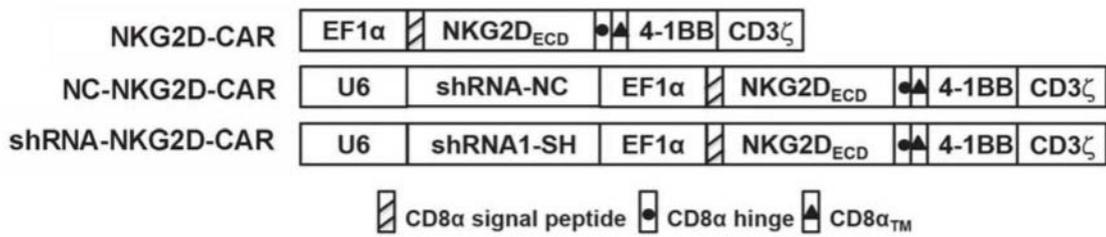
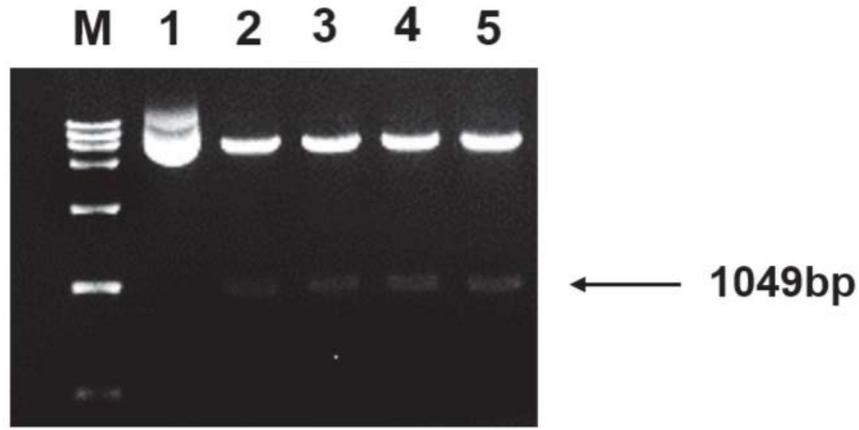


图3



M:DL15000

1: pLL3.7-NKG2D-CAR

2: pLL3.7-shRNA-NC-NKG2D-CAR

3: pLL3.7-shRNA-A-NKG2D-CAR

4: pLL3.7-shRNA-B-NKG2D-CAR

5: pLL3.7-shRNA-C-NKG2D-CAR

图4

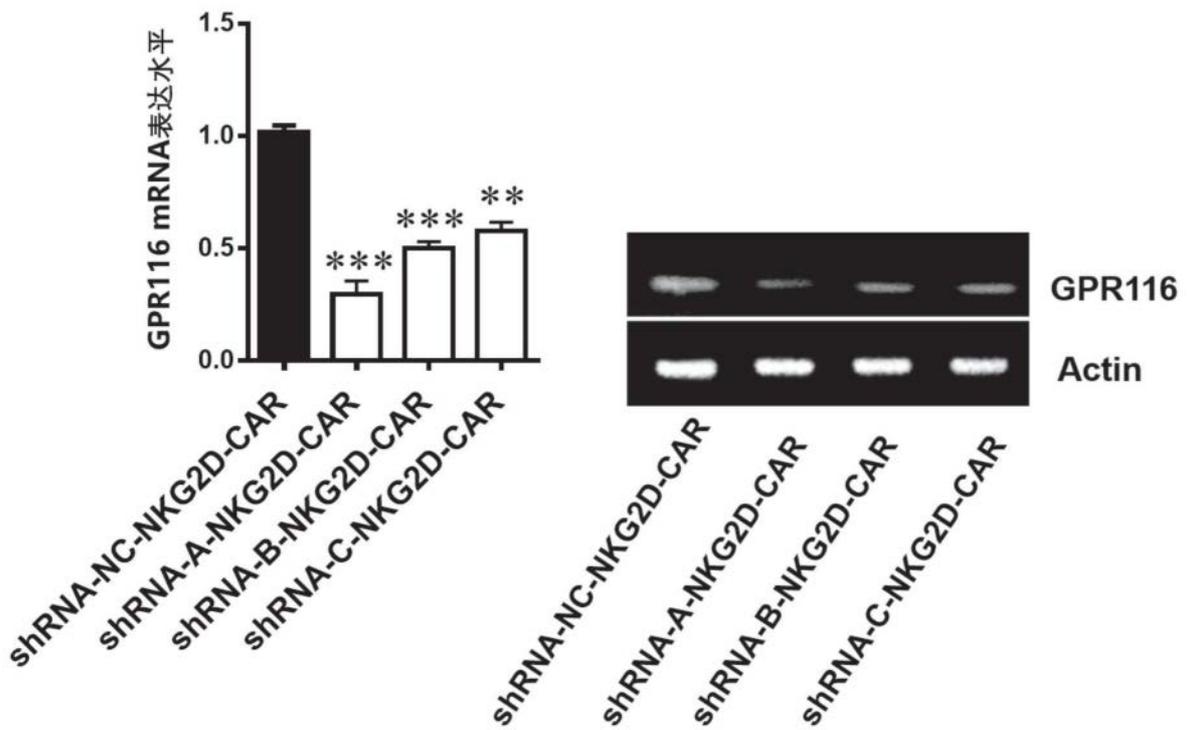


图5

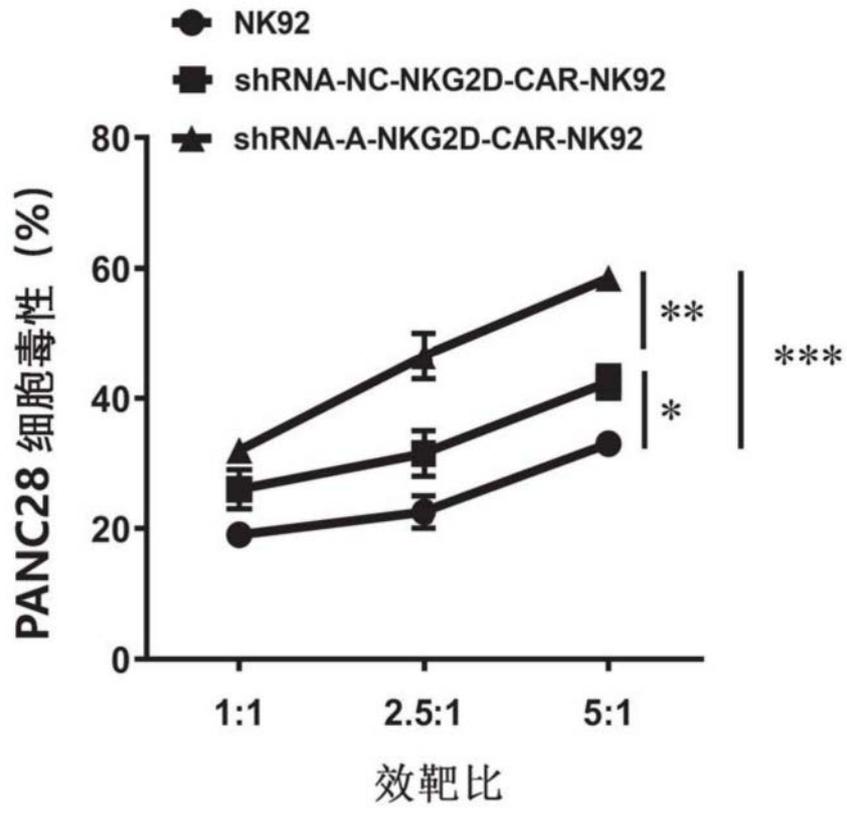


图6

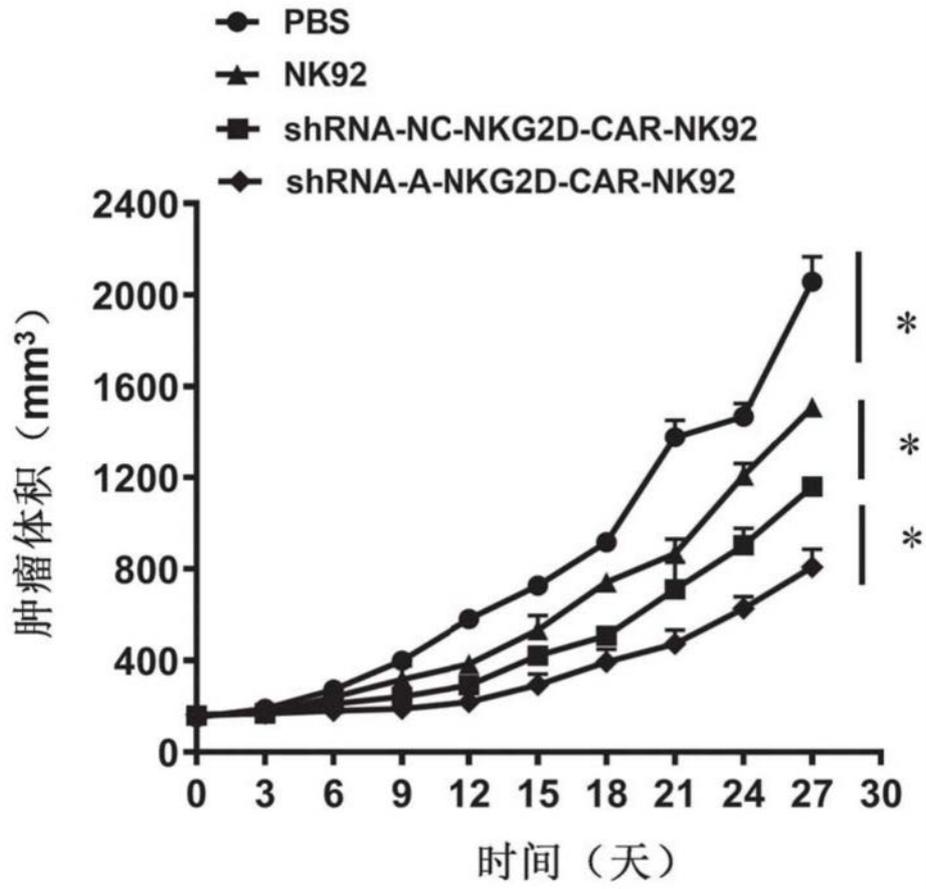


图7