



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110981973 B

(45) 授权公告日 2023. 03. 31

(21) 申请号 201911358647.0

(22) 申请日 2019.12.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110981973 A

(43) 申请公布日 2020.04.10

(73) 专利权人 新乡医学院
地址 453003 河南省新乡市金穗大道东段

(72) 发明人 郭长江 陈涵 张会勇 牛志远
支灵通 朱武凌

(74) 专利代理机构 郑州睿信知识产权代理有限公司 41119
专利代理师 牛爱周

(51) Int. Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2018183385 A1, 2018.10.04

CN 109777784 A, 2019.05.21

CN 110121505 A, 2019.08.13

CN 110343712 A, 2019.10.18

Kelong Tao 等. Development of NKG2D-based chimeric antigen receptor-T cells for gastric cancer treatment.《Cancer Chemotherapy and Pharmacology》.2018,第82卷

ZeNan Chang 等. Rewiring T-cell responses to soluble factors with chimeric antigen receptors.《Nat Chem Biol》.2018,第14卷(第3期),

Obiedat A. 等. NKG2-D type II integral membrane protein [Homo sapiens].《Genbank 登录号:NP_030386.2》.2019,

审查员 蔡玉品

权利要求书1页 说明书12页
序列表6页 附图6页

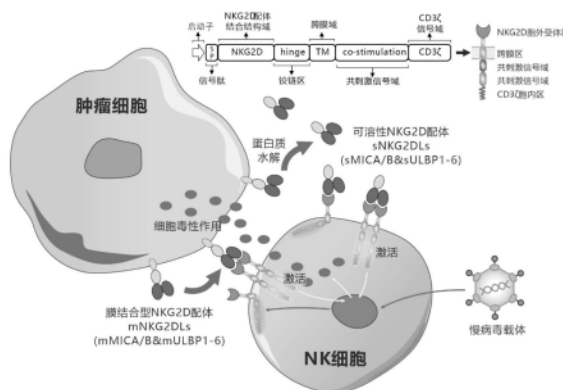
(54) 发明名称

靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体、核酸分子、免疫效应细胞及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体、核酸分子、免疫效应细胞及其应用,属于生物学或生物工程技术领域。本发明中靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体使用人天然NKG2D分子的配体结合结构域靶向多种NKG2D配体,通过“配体/受体”特异性识别肿瘤相关表面抗原NKG2DLs,并经由胞内的信号传导分子将活化信号传递到免疫细胞内,从而激活免疫细胞的杀伤活性,最终清除肿瘤细胞。基于NKG2D-NKG2DLs蛋白质复合体结构以及受体二聚化活化机制,本发明使用单体型铰链区使得该嵌合受体可以同时响应于肿瘤细胞表面的NKG2DLs和脱落到肿瘤微环境中的可溶性

NKG2DLs,从而将可溶性NKG2DLs的免疫抑制作用重新转变为免疫激活作用。



1. 一种靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体,其特征在于:所述嵌合受体包括依次串联的信号肽区、基于人NKG2D分子的NKG2D配体结合结构域、铰链区、跨膜区和胞内信号结构域;所述NKG2D配体结合结构域为SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;所述铰链区为单体型铰链区结构;所述单体型铰链区为单体型IgG4铰链区,单体型IgG4铰链区为SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;所述跨膜区为CD28跨膜区;所述胞内信号结构域包括保内信号传导结构域和胞内共刺激信号结构域;所述胞内信号传导结构域为CD3 ζ ;所述共刺激信号结构域为CD28和CD137。

2. 根据权利要求1所述的靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体,其特征在于:所述靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体为如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。

3. 一种核酸分子,其特征在于:所述核酸分子为编码如权利要求1-2中任一项所述的靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体的核苷酸序列。

4. 根据权利要求3所述的核酸分子,其特征在于:所述核酸分子为如SEQ ID NO:16所示的核苷酸序列。

5. 一种病毒载体,其特征在于:所述病毒载体包含如权利要求3或4所述的编码靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体的核苷酸序列。

6. 一种嵌合受体基因改造的免疫效应细胞,其特征在于:所述免疫效应细胞包含如权利要求3或4所述的核酸分子,或者包含如权利要求5所述的病毒载体。

7. 一种如权利要求6所述的嵌合受体基因改造的免疫效应细胞的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:将如权利要求5所述的病毒载体转入免疫效应细胞中,筛选得到嵌合受体基因改造的免疫效应细胞。

8. 一种如权利要求1-2中任一项所述的靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体、或者如权利要求6所述的嵌合受体基因改造的免疫效应细胞在制备抗肿瘤免疫治疗药物中的应用。

9. 一种抗肿瘤免疫治疗药物,其特征在于:所述抗肿瘤免疫治疗药物以权利要求6所述的嵌合受体基因改造的免疫效应细胞作为药效成分。

靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体、核酸分子、免疫效应细胞及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体、核酸分子、免疫效应细胞及其应用,属于生物学或生物工程技术领域。

背景技术

[0002] 近年来,以嵌合抗原受体改造T细胞(CAR-T)为代表的肿瘤免疫细胞治疗技术因其对恶性肿瘤的卓越疗效而备受关注。目前以CD19为靶点的CAR-T疗法在血液恶性肿瘤中取得了显著效果,为人类攻克恶性肿瘤打开了新的希望之门(Nature Reviews Clinical Oncology,2018,15:31-46)。然而,现有CAR-T技术存在着若干缺陷,如易诱发细胞因子风暴(CRS)、对实体瘤疗效不佳等(International Reviews of Immunology,2015,34(2):154-187)。而治疗实体瘤才是抗肿瘤的真正主战场。

[0003] 研究发现,自然杀伤(NK)细胞具有替代T细胞成为免疫疗法理想载体的潜力(Molecular Therapy,2017,25(8):1769-1781)。NK细胞是重要的免疫细胞,是机体抗肿瘤的第一道防线。与T细胞相比,NK细胞具有许多自身的免疫特性和优势。作为最常用的人NK细胞系,NK92细胞的临床研究证明其对多种实体肿瘤细胞具有毒性,并且对人体安全无毒副作用,可实现异体治疗,但其疗效十分有限(Immunotherapy,2016,65(4):485-492)。这提示我们将CAR-T的设计原理应用到NK细胞上,利用具有更高的安全性和可控性的NK92细胞(Immunotherapy,2017,9(9):753-765),有望实现更经济的现货供应(Off-the-Shelf)式的实体肿瘤治疗。

[0004] NK细胞的主要活化受体NKG2D在肿瘤免疫监视中起着关键作用。NKG2D表达于NK细胞和NKT细胞等(International Journal of Molecular Sciences,2018,19(1):177),其单独活化足以刺激NK细胞的活化,引发脱粒和细胞因子产生。NKG2D是极具潜力的CAR-NK构建元件。NKG2D受体是C型凝集素样受体,属于NKG2家族,由位于12p12.3-p13.1的NK基因复合体(NKC)编码,具有使NK细胞识别和清除感染或肿瘤细胞的能力。人体内NKG2D的配体(NKG2DLs)主要为MICA/B及人巨细胞病毒蛋白UL16的结合蛋白(ULBPs)两大类,共计8种。正常细胞表面极少表达NKG2DLs,其表达主要发生在细胞感染或恶性转化的过程中,尤其是肿瘤细胞表面通常至少表达一种NKG2DL,因此被称为是细胞应激状态的指示器。

[0005] 然而,恶性细胞(如肿瘤细胞)发展了多种途径来阻止或降低NKG2DLs的表达,进而躲避免疫监视。研究发现,NKG2DLs阳性肿瘤细胞免疫逃逸的主要机制是肿瘤细胞往往将其膜表面的NKG2DLs(即膜结合型mNKG2DLs)通过金属蛋白酶水解方式脱落下来,以可溶性NKG2DLs(sNKG2DLs)的形式存在于肿瘤微环境中。可溶性NKG2DLs与NKG2D结合后促进受体内化,从而降低NK细胞或CD8⁺T细胞对其杀伤作用(Frontiers in Immunology.2018;9:2040)。此外,结合sNKG2DLs后引起NKG2D的持续性活化也会严重损伤NKG2D介导的NK细胞的毒性作用。因此,增强NKG2D与NKG2DLs的识别作用,并阻断sNKG2DL引起的免疫抑制效应可成为实体瘤免疫治疗的新途径。

[0006] 公布号为CN 109803983 A的中国发明专利申请公开了一种靶向结合人NKG2DL的特异性嵌合抗原受体,其氨基酸序列从氨基端到羧基端由引导序列、人NKG2DL序列、人CD8跨膜区序列、人CD8铰链区、人CD28胞内结构域序列、人4-1BB胞内结构域序列和CD3 ζ 胞内结构域序列依次串联而成;公布号为CN 110028589 A的中国发明专利申请公开了一种嵌合抗原受体,包括抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激信号传导区,其结构为NKG2D-CD8 α hinge-CD8TM-4-1BB-CD3 ζ ;公布号为CN 110494558 A的中国发明专利申请公开了一种NKG2D嵌合蛋白,通过PCR从PMBC cDNA文库扩增人NKG2D的细胞外结构域(NKG2D-ED, uniprot P26718-1, 氨基酸83-216),并将NKG2D-ED与CD8 α 铰链和跨膜区(CD8 H-TM, uniprot P01732, 氨基酸128-210)、CD3 ζ 或DAP12信号传导部分融合来构建NKG2D嵌合蛋白;上述专利申请中所涉及的嵌合受体(CAR)均属于I型跨膜蛋白,其发挥作用的关键在于细胞膜外的NKG2D胞外域可正常形成其天然构象,这是NKG2D结合其配体的前提。然而,天然人NKG2D蛋白属于II型跨膜蛋白,现有的NKG2D-CAR均是使用I跨膜蛋白的信号肽和跨膜域将其强制反转作为I型蛋白使用,这无疑会影响NKG2D胞外域天然构象的形成,从而影响其与配体的特异性结合,进而造成功能受限和安全隐患。此外,传统的嵌合抗原受体(CAR)使用的是天然的CD8 α 或IgG来源的铰链区,这些铰链区序列中的半胱氨酸的存在使得其所在嵌合受体可以二硫键形式在细胞膜上发生聚合,进而形成二聚体或多聚体结构。也因为如此,传统CAR只有和细胞膜上的膜型配体结合时才能被激活。然而,肿瘤细胞往往通过金属蛋白酶将其膜上的NKG2D配体脱落下来,形成可溶性配体释放到肿瘤微环境和血液中。这些可溶性配体可以显著抑制传统设计的NKG2D-CAR的活性,从而阻断免疫反应形成免疫逃逸,这对肿瘤临床治疗来说是非常不利的,这也是目前许多CAR疗法临床实验效果不佳的重要原因。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体,该嵌合受体的设计首次基于受体二聚化活化机制及NKG2D与配体结合三聚体结构模型,通过特殊的单体型铰链区的使用构建了可被可溶性NKG2D配体激活的嵌合受体,从而逆转可溶性NKG2D配体的免疫抑制作用,有望克服肿瘤免疫逃逸而极大提高临床应用疗效。

[0008] 本发明还提供一种编码上述靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体的核酸分子。

[0009] 本发明还提供一种包含上述核酸分子的病毒载体。

[0010] 本发明还提供一种嵌合受体基因改造的免疫效应细胞。

[0011] 本发明还提供一种嵌合受体基因改造的免疫效应细胞的制备方法。

[0012] 本发明还提供一种靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体或者嵌合受体基因改造的免疫效应细胞在制备抗肿瘤免疫治疗药物中的应用。

[0013] 本发明还提供一种抗肿瘤免疫治疗药物。

[0014] 为了实现以上目的,本发明所采用的技术方案是:

[0015] 一种靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体,包括依次串联的信号肽区、基于人NKG2D分子的NKG2D配体结合结构域、铰链区、跨膜区和胞内信号结构域;所述NKG2D配体结合结构域包含SEQ ID NO:1所示的至少100个连续氨基酸残基,或与其具有85%-99%同一性的改造的氨基酸序列;所述铰链区为单体型铰链区结构,选自IgG4分子或CD8 α

分子。

[0016] 需要说明的是,与上述NKG2D配体结合结构域结合的配体分子与恶性肿瘤有关,包括但不限于MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5、ULBP6等任意NKG2D配体及其组合。

[0017] 本发明中靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体(NKG2D-CAR或chNKG2D),使用人天然NKG2D分子的配体结合结构域靶向多种NKG2D配体(NKG2DLs),通过“配体/受体”特异性识别肿瘤相关表面抗原NKG2DLs(如MICA、MICB),并经由胞内的信号传导分子将活化信号传递到免疫细胞内,从而激活免疫细胞的杀伤活性,最终清除肿瘤细胞。基于NKG2D-NKG2DLs蛋白质复合体结构以及受体二聚化活化机制,本发明创造性地使用单体型铰链区使得该嵌合受体可以同时响应于肿瘤细胞表面的NKG2DLs(mNKG2DLs)和脱落到肿瘤微环境中的可溶性NKG2DLs(sNKG2DLs),从而将sNKG2DLs的免疫抑制作用重新转变为免疫激活作用。

[0018] 所述靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体中,信号肽区(或称为胞外信号肽结构)具有与蛋白质分泌相关的信号肽序列,可选自CD8 α 、PD1、DAP10、DNAM-1、CD137(或称为4-1BB)等I型跨膜蛋白信号肽;进一步优选为CD8 α 信号肽。所述CD8 α 信号肽包含SEQ NO:2所示的氨基酸序列,编码其序列的核酸分子的序列如SEQ ID NO:9所示。

[0019] 所述靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体中,铰链区优选为单体型IgG4铰链区(即IgG4分子)。所述IgG4分子包含SEQ NO:3所示的氨基酸序列,编码其序列的核酸分子的序列如SEQ ID NO:10所示。

[0020] 所述靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体中,跨膜区(或称为跨膜结构域)可选自TCR α 、TCR β 、TCR γ 、CD3 ζ 、CD4、CD16、CD8 α 、CD28、PD1、DAP10、DNAM1、CD137(或称为4-1BB)等I型跨膜蛋白跨膜区;进一步优选为CD28跨膜区。所述CD28跨膜区包含SEQ NO:4所示的氨基酸序列,编码其序列的核酸分子的序列如SEQ ID NO:11所示。

[0021] 所述靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体中,胞内信号结构域包括胞内信号传导结构域和/或胞内共刺激信号结构域,胞内信号传导结构域和胞内共刺激信号结构域可选自CD3 ζ 、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD83、CD137(或称为4-1BB)、2B4、OX40、DAP10、DNAM1、LIGHT、NKG2C、B7-H3、DAP10等活化受体胞内区或其任意组合;进一步的,胞内信号传导结构域优选为CD3 ζ ,胞内共刺激信号结构域优选为CD28和CD137。所述CD3 ζ 包含SEQ NO:5所示的氨基酸序列,编码其序列的核酸分子的序列如SEQ ID NO:12所示。所述CD28包含SEQ NO:6所示的氨基酸序列,编码其序列的核酸分子的序列如SEQ ID NO:13所示。所述CD137包含SEQ NO:7所示的氨基酸序列,编码其序列的核酸分子的序列如SEQ ID NO:14所示。

[0022] 所述靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体中,信号肽区与NKG2D配体结合结构域之间还连接有Flag标签序列,Flag标签序列包含SEQ NO:17所示的氨基酸序列,编码其序列的核酸分子的序列如SEQ ID NO:18所示。

[0023] 进一步的,所述靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体具有如SEQ NO:15所示的氨基酸序列。

[0024] 一种核酸分子,编码上述靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体的核苷酸序列。

[0025] 具体的,所述核酸分子具有如SEQ ID NO:16所示的核苷酸序列。

[0026] 一种病毒载体,包含上述编码靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体的核苷酸序列。

[0027] 一种嵌合受体基因改造的免疫效应细胞(即基因工程改造的免疫效应细胞),包含编码靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体的核苷酸序列或者病毒载体。

[0028] 本发明中嵌合受体基因改造的免疫效应细胞可以表达靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体,具有如SEQ NO:15所示的氨基酸序列。本发明中靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体修饰的NK细胞(NKG2D-CAR-NK92),能够特异性地与肿瘤细胞表面以及肿瘤微环境中的NKG2D配体结合(如图10所示),进而对肿瘤细胞产生特异性的杀伤作用,进一步地,该杀伤作用不受sNKG2DLs的抑制。

[0029] 本发明基于跨膜蛋白三级结构高精度建模方法,通过NKG2D胞外域序列选择范围的改变和铰链区序列的优化,使得该嵌合受体具有与天然NKG2D蛋白高度一致的胞外构象,最大限度地保留了其与各配体特异性结合的能力,可同时响应于细胞膜表面的膜结合型NKG2D配体及脱落的可溶性NKG2D配体。本发明还基于NKG2D与其配体相结合的异源三聚体结构(即两个NKG2D分子结合一个NKG2D配体),使用NKG2D分子胞外的配体结合结构域构建单体型CAR分子,进而通过配体介导的CAR分子二聚化活化方式突破传统CAR分子只能响应膜结合型配体而受可溶性配体抑制的局限。此外,本发明使用跨膜蛋白质结构建模理性设计技术(Molecular Immunology,2019,114:108-113),成功解决了II型跨膜蛋白NKG2D构建CAR分子时所存在的构象变化难题,构建了一种可实现实体肿瘤临床治疗应用的靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的新型嵌合受体。

[0030] 一种嵌合受体基因改造的免疫效应细胞的制备方法,包括以下步骤:将上述病毒载体转入免疫效应细胞中,筛选得到嵌合受体基因改造的免疫效应细胞。

[0031] 所述免疫效应细胞可选自T淋巴细胞、NK细胞、造血干细胞、多能干细胞或胚胎干细胞培养分化的免疫细胞;进一步优选为NK细胞。

[0032] 本发明中靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体修饰的NK细胞(NKG2D-CAR-NK92),能够特异性地与肿瘤细胞表面以及肿瘤微环境中的NKG2D配体结合,进而对肿瘤细胞产生特异性的杀伤作用,该杀伤作用不受sNKG2DLs的抑制。

[0033] 一种靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体或者嵌合受体基因改造的免疫效应细胞在制备抗肿瘤免疫治疗药物中的应用。

[0034] 具体的,靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体或者嵌合受体基因改造的免疫效应细胞在制备治疗实体肿瘤的药物中的应用。

[0035] 一种抗肿瘤免疫治疗药物,以嵌合受体基因改造的免疫效应细胞作为药效成分。

[0036] 本发明的抗肿瘤免疫治疗药物在治疗NKG2D配体阳性的实体肿瘤中有极高的临床应用价值,可以为肿瘤免疫治疗提供更广谱性的靶点,同时逆转肿瘤微环境中的可溶性免疫抑制性分子的免疫抑制作用。

[0037] 本发明的有益效果:

[0038] 本发明利用NK细胞活化受体NKG2D与其配体的相互作用原理以及受体二聚化活化机制,设计了一种靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体。不同于传统嵌合抗原受体的经典构造,这是一种全新的、基于天然受体的、同时靶向响应细胞膜表面的膜结合型和

脱落的可溶性NKG2D配体的嵌合受体。本发明中靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体包含基于天然的人NKG2D分子的配体结合结构域、单体型铰链区、跨膜区以及胞内信号传导区等；由该嵌合受体改造的免疫细胞，即NKG2D-CAR嵌合受体修饰的NK92细胞(Chimeric NKG2D Receptor Modified NK92 cells, chNKG2D-NK92)。本发明中靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体及其免疫效应细胞具有比传统嵌合抗原受体更好的NKG2D配体靶点特异性和广谱性肿瘤杀伤效果，使用基于天然的人NKG2D分子可实现对其8种配体的同时特异性靶向响应，并且肿瘤微环境中脱落的可溶性NKG2D配体可以激活该嵌合受体而非抑制。该嵌合受体还具有更好的安全性，不同于以单链抗体为构建元件的嵌合抗原受体，使用基于天然的人NKG2D分子靶向其配体进行免疫治疗不会产生异源免疫原性，因此本发明的嵌合受体及其免疫效应细胞在治疗NKG2D配体阳性的实体肿瘤中具有极高的临床应用价值。

[0039] 细胞膜上受体对可溶性配体识别和响应的一种重要的机制是配体诱导受体二聚化活化，如蛋白酪氨酸激酶型受体。该活化机制的关键在于一个配体(或配体复合体)可以同时与两个或多个受体结合，从而诱导受体的二聚化活化效应。本发明通过蛋白质结构信息分析发现，NKG2D与其配体的结合恰好满足这一条件，即一个NKG2D配体结合两个NKG2D分子。因此本发明提出了使用NKG2D分子胞外的配体结合结构域构建单体型CAR分子，进而通过配体介导的CAR分子二聚化活化方式突破传统CAR分子只能响应膜结合型配体而受可溶性配体抑制的局限，从而很好地解决肿瘤免疫治疗临床应用因脱落的可溶性配体分子所造成的免疫逃逸问题，取得更好的临床应用疗效。

[0040] 本发明的创新点主要体现在以下三个方面：1) 使用跨膜蛋白结构建模技术优化序列和嵌合受体胞外构象；2) 结合NKG2D-配体结构设计具有二聚化活化功能的嵌合受体；3) 构建可同时被膜型配体和可溶性配体激活从而阻断肿瘤免疫逃逸的嵌合受体。

[0041] 综上所述，本发明所构建的新型嵌合受体与传统设计具有明显的结构差异和功能优势：基于受体二聚化活化机制及NKG2D-NKG2DL三聚体结构模型，结合跨膜蛋白结构建模技术，首次使用单体型铰链区成功构建了可同时响应膜型和可溶性两种形式配体的嵌合受体。该嵌合受体可有效避免传统设计的嵌合受体易受可溶性分子抑制的缺陷(该缺陷往往是造成临床应用失败的关键)，从而具有嵌合受体其他所不具备的抗肿瘤功能鲁棒性优势，因而具有大幅提高临床治疗效果的巨大潜力，非常有利于我国的新型肿瘤免疫细胞疗法的发展、临床推广和普及。

附图说明

[0042] 图1为本发明实施例1中构建的靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体(NKG2D-CAR)结构示意图和载体示意图；

[0043] 图2为本发明实施例1中构建的靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体(NKG2D-CAR)蛋白质三级结构建模图；

[0044] 图3为本发明实施例4中慢病毒转染后NK92细胞显微镜观察图；

[0045] 图4为本发明实施例4中流式细胞术检测未转染的NK92细胞(a)与NKG2D-CAR转染的NK92细胞(b)表面NKG2D分子表达的结果图；

[0046] 图5为本发明实施例1中流式细胞术检测宫颈癌HeLa细胞(a)、胃癌SGC-7901细胞

(b)、骨肉瘤U2OS细胞(c)与肺癌H1299细胞(d)表面NKG2D主要配体MICA/B分子的表达结果图;

[0047] 图6为本发明试验例1中为乳酸脱氢酶法检测未转染的NK92细胞与NKG2D-CAR转染的NK92细胞对四种肿瘤细胞(He1a、SGC7901、U2OS、H1299)的体外细胞毒性;

[0048] 图7为本发明试验例1中乳酸脱氢酶法检测未转染的NK92细胞与NKG2D-CAR转染的NK92细胞在不同浓度NKG2D抗体封闭时对SGC7901细胞的体外细胞毒性变化;

[0049] 图8为本发明试验例2中不同浓度MICA蛋白分别与未转染NK92细胞、NKG2D-CAR-NK92细胞共孵育24h后ELISA检测IFN- γ 的释放量;

[0050] 图9为本发明试验例2中MICA蛋白处理对NKG2D-CAR-NK92细胞体外毒性的影响;

[0051] 图10为本发明中嵌合受体基因改造的免疫效应细胞与肿瘤细胞表面的或脱落的NKG2D配体结合示意图。

具体实施方式

[0052] 下述实施例仅对本发明作进一步详细说明,但不构成对本发明的任何限制。

[0053] 本发明中靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体(NKG2D-CAR)包括依次串联的信号肽区、基于人NKG2D分子的NKG2D配体结合结构域、铰链区、跨膜区和胞内信号结构域。

[0054] 本文所用的术语“基于人NKG2D分子的NKG2D配体结合结构域”是指来源于天然人NKG2D蛋白氨基酸序列的NKG2D配体特异性结合结构域。

[0055] 天然人NKG2D分子的氨基酸序列共含有216个氨基酸(UniProt:P26718),为II型跨膜蛋白,去除其N端的胞内域和跨膜域(1-72),即可得到其配体结合结构域的氨基酸序列(73-216),如SEQ ID NO:1所示。该结构域具有特异结合NKG2D配体(如MICA、MICB)的能力。

[0056] 本文所用术语氨基酸序列的“同一性”指的是氨基酸序列之间通过序列比对软件例如BLAST确定的相似程度。

[0057] 通常可以通过对已知氨基酸序列进行一个或多个氨基酸残基的取代、缺失和/或添加而获得经改造的氨基酸序列。例如,通过常规蛋白质工程手段(如氨基酸保守取代等),对本发明SEQ ID NO:1所示的NKG2D配体结合结构域进行改造,可以获得与SEQ ID NO:1具有至少85%序列同一性,并且具有基本相同的结合NKG2D配体能力的变体序列。

[0058] 本发明的靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体中包含胞外信号肽结构(即信号肽区)。胞外信号肽结构可从天然蛋白质中获得,可选自CD8 α 、PD1、DAP10、DNAM-1、CD137(或称为4-1BB)等分子,优选为CD8 α ,如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0059] 本发明的靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体中包含一个基于IgG4分子(如SEQ ID NO:3所示)或CD8 α 分子的单体型铰链区结构,是用于连接NKG2D配体结合结构域和跨膜域的柔性氨基酸序列。该铰链结构既可以使本发明的NKG2D-CAR获得接近天然NKG2D分子的构象,又能保证NKG2D-CAR分子以单体形式存在于细胞膜上。

[0060] 本文所用术语“跨膜区”(简称TM)可以与“跨膜结构域”(简称跨膜域)互换使用,指的是锚定在细胞膜内具有热力学稳定的蛋白质结构区域。跨膜区可以从天然蛋白质中获得,可选自TCR α 、TCR β 、TCR γ 、CD3 ζ 、CD4、CD16、CD8 α 、CD28、PD1、DAP10、DNAM1、CD137(或称为4-1BB)等分子,优选为CD28,如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0061] 本文所用术语“胞内信号结构域”或“胞内信号传导区”指的是能够传导细胞效应功能信号并指导细胞执行特定功能的蛋白质结构区域。胞内信号结构域可以包括信号传导结构域和/或共刺激信号结构域。胞内信号结构域可从天然蛋白质中获得,可选自CD3 ζ 、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD83、CD137(或称为4-1BB)、2B4、OX40、DAP10、DNAM1、LIGHT、NKG2C、B7-H3、DAP10等分子,胞内信号传导结构域优选为CD3 ζ ,胞内共刺激信号结构域优选为CD28和CD137,分别如SEQ ID NO:5、6和7所示的氨基酸序列。

[0062] 实施例1

[0063] 本实施例中靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体的理性设计与构建:

[0064] 按如下编码基因的顺序设计NKG2D-CAR融合基因片段:胞外信号肽、Flag标签、基于NKG2D分子的NKG2D配体结合结构域、铰链区、跨膜区、胞内共刺激信号结构域与胞内信号传导结构域。图1为本发明实施例1中构建的靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体(NKG2D-CAR)的结构示意图和载体示意图。图1a为本发明中NKG2D-CAR结构示意图,其中信号肽部分优选为CD8 α 分子,跨膜域部分优选为CD28分子,信号传导域以CD28、CD137和CD3 ζ 信号分子为例。图1b为本发明构建的NKG2D-CAR表达载体结构示意图。

[0065] 由于NKG2D分子为II跨膜蛋白,而其他元件则为I型跨膜蛋白,二者具有截然相反的跨膜链向,因此需要通过跨膜蛋白质结构建模分析优化设计NKG2D-CAR分子,使其胞外域及跨膜域具有与天然人NKG2D胞外域及跨膜域相似的三维构象。

[0066] 结合使用跨膜蛋白结构预测工具PredMP (<http://predmp.com>)和蛋白质结构综合预测工具I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>)对NKG2D-CAR的胞外域及跨膜域进行三级结构建模,其中PredMP用于预测跨膜域结构,而I-TASSER用于NKG2D胞外域结构的重建和优化。结果显示,使用单体型IgG4铰链结构连接的NKG2D-CAR具有近天然NKG2D构象(如图2所示)。图2为本发明实施例1中构建的靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体(NKG2D-CAR)蛋白质三级结构建模图。图2a为天然人NKG2D蛋白分子的跨膜域与胞外域的三级结构;图2b为人NKG2D蛋白分子配体结合域、IgG4铰链区与CD28跨膜域的三级结构图。建模方法为跨膜蛋白结构建模工具PredMP与蛋白质结构综合建模工具I-TASSER的结合。

[0067] 经过以上结构建模理性设计,本发明实施例1的NKG2D-CAR融合基因片段构建方式如下:CD8 α 胞外信号肽(1-63bp)、Flag标签序列(64-87bp)、基于人NKG2D分子的NKG2D配体结合结构域(88-492bp)、单体型IgG4铰链区(493-528bp)、CD28跨膜区(529-609bp)、胞内共刺激信号结构域(CD28:610-732bp、CD137:733-858bp)与胞内信号传导结构域(CD3 ζ :859-1197bp)。

[0068] 实施例2

[0069] 本实施例中编码靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体的核酸分子的合成及病毒载体的构建(即NKG2D-CAR融合基因的合成与表达载体构建):

[0070] 首先通过全基因合成的方法,合成了实施例1中所得到的编码靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体(NKG2D-CAR)分子的核苷酸序列(SEQ ID NO:16),由南京金斯瑞生物科技有限公司提供基因合成技术服务。

[0071] 将合成的融合基因片段克隆到pCDH-CMV-MCS-P2A-copGFP-T2A-Puro慢病毒载体上,如图1所示。采用限制性内切酶Xba I和EcoR I,分别酶切慢病毒载体及基因片段(见表

1), 得到酶切后线性化的慢病毒载体以及酶切后的NKG2D-CAR基因片段, 采用T4DNA连接酶体系, 在16℃下孵育3h (见表2)。然后转化大肠杆菌Stb13感受态细胞中并涂布含有氨苄青霉素的培养基平板, 挑取多个克隆菌落进行质粒提取, 经酶切鉴定、测序比对, 构建成功的载体命名为pCDH-NKG2D-CAR。

[0072] 表1慢病毒载体与NKG2D-CAR融合基因基因的酶切反应体系

组分	用量
慢病毒载体或目的基因	2.5 μg
内切酶 Xba I (10U/μL)	2.5 μL
[0073] 内切酶 EcoR I (10U/μL)	2.5 μL
10×M Buffer (酶切缓冲液)	5.0 μL
0.1% BSA (牛血清白蛋白)	5.0 μL
补灭菌蒸馏水至 50 μL, 于 37℃下反应 3 h	

[0074] 表2慢病毒载体与NKG2D-CAR融合基因的连接反应体系

组分	用量
线性化慢病毒载体	X μL
NKG2D-CAR 基因片段	Y μL
[0075] 10×T4 DNA 连接酶 (350U/μL)	1.0 μL
10×T4 DNA 连接酶缓冲液	1.0 μL
补灭菌蒸馏水至 10μL, 16℃孵育 3h	

[0076] 注: $N_{\text{载体片段}}:N_{\text{目的基因}}=0.03\text{pmol}:0.3\text{pmol}$, 1mol 1000bp的DNA的质量约为0.66μg, 根据以上关系确定连接反应中加入线性化载体及基因片段的体积。

[0077] 实施例3

[0078] 本实施例中病毒载体 (即NKG2D-CAR慢病毒表达载体) 的包装、浓缩与滴度测定:

[0079] (一) NKG2D-CAR慢病毒表达载体的包装

[0080] 取 8×10^6 个 HEK293T 细胞 (购自 ATCC, 货号为 CRL-1573) 接种于 175cm^2 的细胞培养瓶中, 于 37℃ 培养过夜, 待细胞密度达到 75% - 85% 时, 提前 1h 更换 25mL 新鲜的含有 6% FBS (BI, 货号为 04-001-1ACS) 的不含青霉素与链霉素的 DMEM 培养基 (Hyclone, 货号为 SH30022.01), 继续置于培养箱中进行培养, 1h 后进行病毒包装。

[0081] 采用磷酸钙试剂盒 (碧云天, 货号为 C0508) 进行包装, 包装步骤: 将实施例 2 中提取的重组 NKG2D-CAR 表达质粒 (pCDH-NKG2D-CAR), 与辅助质粒 pSPAX2、pMD2.G 按照 4:3:1 比例混匀, 加入到 CaCl_2 溶液 (试剂盒提供) 中, 吹打混匀, 将混合溶液逐滴加入 BBS 中, 吹打混匀, 室温孵育 15-30min, 液体澄清, 此时无白色沉淀生成, 将上述混合液加入 HEK293T 细胞中, 混匀, 放入培养箱继续培养 8-16h, 去除上清, PBS 洗一遍, 更换 35mL 新鲜的含有 10% FBS 的 DMEM

培养基,分别于48h、72h、96h后收集病毒。将收集得到的慢病毒上清液,以3500g离心10分钟,以去除细胞碎片沉淀。

[0082] (二) NKG2D-CAR慢病毒表达载体的浓缩

[0083] 在收获的慢病毒上清中加入5×PEG,4℃静置24h,3500g、4℃离心收集病毒颗粒沉淀,取预冷PBS进行重悬。浓缩以一瓶175cm²培养瓶收获病毒上清浓缩至200-300μL为准。将浓缩后的慢病毒原液分装于冻存管中,于-80℃保存,避免反复冻融。

[0084] (三) NKG2D-CAR慢病毒表达载体滴度的测定

[0085] 使用qPCR慢病毒滴度试剂盒(爱必梦,货号为LV900)对慢病毒浓缩液进行滴度测定,本实施例中所得慢病毒滴度为3×10⁹左右。

[0086] 通过以上方法获得的重组NKG2D-CAR慢病毒表达载体被命名为pCDH-NKG2D-CAR,而不带有融合基因的原始慢病毒表达载体被命名为pCDH。

[0087] 实施例4

[0088] 本实施例中嵌合受体基因改造的免疫效应细胞(NKG2D-CAR修饰NK92细胞)及其制备方法,包括以下步骤:

[0089] (一) 慢病毒转染NK92细胞

[0090] 取3-5×10⁵个NK92细胞(ATCC,货号为CRL-2407)接种于24孔板中,加入pCDH-NKG2D-CAR慢病毒浓缩液(MOI=20-80),每孔加入终浓度为8μg/mL的聚凝胺(翊圣生物,货号为40804ES76),混匀,置于37℃培养箱中进行培养,12-15h后离心,去除病毒上清,更换新鲜的培养基。72h后,以未转染的NK92细胞、空载pCDH转染的NK92细胞为对照,使用荧光定量实时qPCR法检测NKG2D-CAR的表达效率。验证后用浓度为800ng/ml嘌呤霉素进行抗性筛选,1-2周后得到稳定表达NKG2D-CAR的NK92细胞株。在荧光显微镜对NKG2D-CAR-NK92细胞进行观察,20×倍镜下细胞形态如图3所示。图3a为白光通道观察图,图3b为绿色荧光通道观察图。其中,图右下短线表示100μm。绿色荧光的检出表明NKG2D-CAR融合基因的成功表达。

[0091] (二) 流式细胞术检测转染细胞中NKG2D-CAR蛋白分子的表达

[0092] 分别取慢病毒转染成功的NKG2D-CAR-NK92细胞和未转染的NK92细胞各1×10⁶个,300g离心5min,用含1%FBS的PBS(以下简称wash buffer)洗涤2次,在100μL体系下加入APC标记的小鼠抗人NKG2D单抗(Thermo Fisher,货号为1997140),冰上避光孵育30min,用wash buffer洗涤2-3次。最后加入400μL的PBS重悬细胞,用流式细胞仪(Guava easycycte8)进行检测分析,检测结果如图4所示。图4为流式细胞术检测未转染的NK92细胞(a)与NKG2D-CAR转染的NK92细胞(b)表面NKG2D分子表达的结果图。

[0093] 从图中可以看出,NK92细胞的表达率为1.42%,NKG2D-CAR-NK92细胞的表达率96.2%,可见NKG2D-CAR分子在其转染的NK92细胞中成功表达并定位到细胞膜上。

[0094] 实施例5

[0095] 本实施例中嵌合受体基因改造的免疫效应细胞在制备抗肿瘤免疫治疗药物中的应用以及抗肿瘤免疫治疗药物,所述抗肿瘤免疫治疗药物以嵌合受体基因改造的免疫效应细胞作为药效成分,用于肿瘤免疫治疗。

[0096] 试验例1

[0097] NKG2D-CAR-NK92细胞的体外抗肿瘤活性功能:

[0098] (一) 肿瘤细胞表面NKG2D主要配体MICA/B表达的检测

[0099] 分别取宫颈癌HeLa细胞、胃癌SGC-7901细胞、骨肉瘤U2OS细胞和肺癌H1299细胞,细胞数为 1×10^6 个,用PE标记的小鼠抗人MICA/B抗体(BioLegend, 货号为320906)进行流式检测,分析结果如图5所示。图5为流式细胞术检测宫颈癌HeLa细胞(a)、胃癌SGC-7901细胞(b)、骨肉瘤U2OS细胞(c)与肺癌H1299细胞(d)表面NKG2D主要配体MICA/B分子的表达结果图。

[0100] 从图中可以看出,四种实体肿瘤细胞表面MICA/B的表达率分别为53.3%、63.5%、73.4%与97.9%,均呈现出高水平的MICA/B表达,可作为靶细胞来检测NKG2D-CAR-NK92细胞的抗肿瘤活性。

[0101] (二) NKG2D-CAR-NK92细胞对四种肿瘤细胞的体外毒性作用

[0102] 分别取对数生长期的HeLa细胞、SGC-7901细胞、U2OS细胞、H1299细胞,接种于96孔板中,保证每孔 1×10^4 个细胞,每种细胞设置3个复孔,置于5%CO₂、37℃培养箱中过夜培养。采用CytoTox96^R Non-Radioactive Cytotoxicity Assay(Promega, 货号为G1781)进行检测。分别按效靶比(E:T,即效应细胞数量与靶细胞数量比率)2.5:1、5:1、10:1,将NKG2D-CAR-NK92细胞与靶细胞置于5%CO₂、37℃培养箱中共孵育6h,以未转染的NK92细胞为对照。与此同时,设置3组对照,即靶细胞对照孔、样品最大酶活性对照孔(未加效应细胞处理的用于后续裂解的靶细胞孔),空白细胞对照孔,每孔总体积100μL。

[0103] 在预定的检测时间点前45min,取出96孔板,在“样品最大酶活性对照孔”中加入Lysis Solution(10×),加入量为原有培养液体积的10%。加入Lysis Solution后,反复吹打混匀,然后放入培养箱中培养45min。达到共孵育时间后,以300g离心5分钟。分别取各孔的上清液50μL,转移到新的96孔板(命名为板①)。相应的孔中,进行如下测定。样品测定步骤如下:向板①各孔中分别加入50μL CytoTox96^R(试剂盒提供),将板①室温下避光孵育30min,加入50μL Stop Solution,然后用酶标仪在490nm波长处测定吸光度,所测得的各孔吸光度值均应减去背景空白对照孔的吸光度值,并按如下公式计算各实验组的细胞毒性:

[0104] 细胞毒性(%) = (实验组 - 效应细胞对照孔 - 靶细胞对照孔) / (样品最大酶活性对照孔 - 靶细胞对照孔) × 100。

[0105] 结果显示:在不同的效靶比下,NKG2D-CAR-NK92对4种MICA/B阳性肿瘤细胞的细胞毒性均显著高于未转染的NK92细胞(其中效靶比为5:1时的细胞毒性如图6所示,图中“***”代表P<0.001)。

[0106] 从图中可以看出,对于四种MICA/B阳性的肿瘤细胞,NKG2D-CAR转染的NK92细胞均显示出比转染的NK92细胞更高的杀伤活性,并且细胞毒性作用(即杀伤力)接近100%。这表明本发明构建的NKG2D-CAR-NK92细胞对NKG2D配体阳性的多种肿瘤细胞具有很强的杀伤能力。

[0107] (三) NKG2D抗体抑制NKG2D-CAR-NK92细胞体外毒性作用

[0108] 以胃癌SGC-7901为例,按上述体外毒性实验操作步骤,在实验中分为3组,分别添加0μg/mL(即不添加)、2.5μg/mL、10μg/mL NKG2D抗体(义翘神州,货号为10575-MM02)封闭NKG2D-CAR的配体结合域,检测不同抗体浓度下的肿瘤细胞杀伤活性,检测结果如图7所示,图中“***”代表P<0.001。

[0109] 图7为乳酸脱氢酶法检测未转染的NK92细胞与NKG2D-CAR转染的NK92细胞在不同浓度NKG2D抗体封闭时对SGC7901细胞的体外细胞毒性变化。结果表明,NKG2D抗体封闭显著

降低了NKG2D-CAR转染NK92细胞的肿瘤杀伤活性,且抗体浓度越高抑制作用越强。这说明NKG2D-CAR-NK92细胞的肿瘤杀伤活性来源于本发明所构建的NKG2D-CAR。

[0110] 试验例2

[0111] 可溶性MICA蛋白对NKG2D-CAR-NK92细胞的作用:

[0112] (一)不同浓度MICA蛋白处理下NKG2D-CAR-NK92细胞的IFN- γ 释放量

[0113] 取对数生长期的NKG2D-CAR-NK92细胞和未转染的NK92细胞,接种于96孔板中,保证每孔 1×10^5 个细胞,分别用0、0.5、2.5、5、25、50、250、500ng/mL的MICA蛋白进行处理,每组细胞设置3个复孔,置于5%CO₂、37°C培养箱中24h。收集细胞上清,用ELISA试剂盒(爱博泰克,货号为RK00015)检测各组中IFN- γ 的分泌水平,检测结果如图8所示,图中“***”代表P<0.001。

[0114] 图8为不同浓度MICA蛋白分别与未转染NK92细胞、NKG2D-CAR-NK92细胞共孵育24h后,ELISA检测IFN- γ 的释放量。纵坐标表示IFN- γ 释放浓度,横坐标表示共孵育的MICA蛋白的浓度。

[0115] 从图中可以看出,相同浓度MICA蛋白处理时,NKG2D-CAR-NK92细胞的IFN- γ 释放量均显著高于NK92细胞。对于NKG2D-CAR-NK92细胞组,随着MICA蛋白浓度的提高,IFN- γ 释放量呈现出先增加后减少的趋势,其中在50ng/mL MICA蛋白处理时IFN- γ 的释放量达到最高峰(约350pg/mL),而NK92细胞组IFN- γ 的释放量与MICA蛋白浓度之间未显示出明显的相关性。由此可看出,NKG2D-CAR-NK92细胞具有响应可溶性MICA蛋白的能力,并且表现出剂量依赖效应。

[0116] (二)MICA蛋白不同处理方式对NKG2D-CAR-NK92细胞的体外细胞毒性的影响

[0117] 取对数生长期的SGC-7901胃癌细胞,接种于96孔板中,保证每孔 1×10^4 个细胞,每种细胞设置3个复孔,置于5%CO₂、37°C培养箱中过夜培养。设置5种情况下的效应细胞,0ng/ml MICA蛋白处理组,5ng/ml MICA蛋白处理组、50ng/ml MICA蛋白处理组、5ng/ml MICA蛋白提前24h处理组和50ng/ml MICA蛋白提前24h处理组,效靶比分别为5:1、10:1,以未转染的NK92细胞为对照。检测方法同试验例1(一)。检测结果如图9所示,图中“***”代表P<0.001。

[0118] 图9为MICA蛋白处理对NKG2D-CAR-NK92细胞体外毒性的影响。效靶比为5:1(a)和10:1(b)时,不同MICA蛋白浓度与不同处理方式下,荧光素酶法检测亲本NK92细胞和NKG2D-CAR-NK92细胞对SGC-7901胃癌细胞的杀伤效果。其中,横坐标为MICA浓度和处理方式,“(24)”表示使用MICA蛋白预先处理细胞24后检测杀伤,其他表示杀伤过程中进行MICA蛋白孵育。

[0119] 从图中可以看出,在不同MICA蛋白处理下,NKG2D-CAR-NK92细胞对SGC-7901胃癌细胞的体外毒性作用没有显著变化,即NKG2D-CAR-NK92细胞对MICA/B高表达肿瘤细胞的杀伤活性不受可溶性MICA蛋白的抑制。即不同MICA蛋白处理方式下的NKG2D-CAR-NK92的细胞毒性显著高于NK92细胞,且在较高浓度MICA蛋白的作用下,其杀伤效果仍接近100%,细胞毒性极其显著。因此,NKG2D-CAR-NK92细胞对MICA/B高表达肿瘤细胞的杀伤活性不受可溶性MICA蛋白的抑制。

[0120] 以上实施例、试验例及结果证明,本发明中靶向人膜结合型和可溶性NKG2D配体的嵌合受体基因改造的免疫效应细胞不仅可以靶向并高效杀伤多种MICA/B阳性的实体肿瘤

细胞,还可以被可溶性MICA蛋白激活从而免受其抑制作用。

[0121] 本发明的另一个优势在于:与传统CAR-T/NK技术往往靶向单个肿瘤相关抗原相比,本发明基于天然人NKG2D分子构建的NKG2D-CAR可通过特异性识别八种NKG2D配体来靶向杀伤肿瘤细胞,因大多数实体肿瘤至少表达一种NKG2D配体,使得本发明所提供的NKG2D-CAR具有广谱的肿瘤抗性。

[0122] 本发明的再一个优势在于:基于安全且可体外扩增的NK92细胞所制备的NKG2D-CAR-NK92细胞可以突破传统自体CAR-T/NK细胞疗法的局限,有潜力实现同种异体过继治疗,从而成为真正的现货(off-the-shelf)细胞免疫疗法,大大缩短治疗的周期,并减低治疗的成本,最终实现肿瘤免疫细胞疗法的临床推广和普及。

[0123] 上述未详细记载的实验方法均为本领域的常规技术,可通过申请日以前的文献或技术手段实现。

序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 新乡医学院

<120> 靶向人膜结合型和可溶性 NKG2D 配体的嵌合受体、核酸分子、免疫效应细胞及其应用

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<160> 18

<211> 135

<212> PRT

<213> 人 NKG2D 分子

<221> NKG2D 配体结合结构域氨基酸序列

<400> 1

LFNQEVIPL TESYCGPCPK NWICYKNNCY QFFDESKNWX ESQASCMSQN ASLLKVYSKE 60

DQDLLKLVKS YHWMGLVHIP TNGSWQWEDG SILSPNLLTI IEMQKGDAL YASSFKGYIE 120

NCSTPNTYIC MQRTV 135

<211> 21

<212> PRT

<213> 人 CD8 α 分子

<221> CD8 α 信号肽氨基酸序列

<400> 2

MALPVTALLL PLALLLHAAR P 21

<211> 12

<212> PRT

<213> 人 IgG4 分子

<221> IgG4 单体型铰链区氨基酸序列

<400> 3

ESKYGPPAPP AP 12

<211> 27

<212> PRT

<213> 人 CD28 分子

<221> CD28 跨膜区氨基酸序列

[0001]

[0002]

<400> 4

FWVLVVVGGV LACYLLVTV AFIIIFWV 27

<211> 113

<212> PRT

<213> 人 CD3 ζ 分子<221> CD3 ζ 胞内信号传导结构域氨基酸序列

<400> 5

RVKFSRSADA PAYQQGQNL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPENGGKPK RRKNPQEGLY 60

NELQKDKMAE AYSEIGMKGE RRRGKGDGL YQGLSTATKD TYDALHMQAL PPR 113

<211> 41

<212> PRT

<213> 人 CD28 分子

<221> CD28 胞内共刺激信号结构域氨基酸序列

<400> 6

RSKRSLLHS DYMNTPRRP GPTRKHYQPY APPRDFAAAYR S 41

<211> 42

<212> PRT

<213> 人 CD137 分子

<221> CD137 胞内共刺激信号结构域氨基酸序列

<400> 7

KRGRKLLLYI FKQPFMRPVQ TTQEEDGCSC RFPEEEEGGC EL 42

<211> 405

<212> DNA

<213> 人 NKG2D 分子

<221> NKG2D 配体结合结构域核苷酸序列

<400> 8

TTATTCAACC AAGAAGTTCA AATTCCTTG ACCGAAAGTT ACTGTGGCCC ATGTCCTAAA 60

AACTGGATAT GTTACAAAAA TAACTGCTAC CAATTTTTTG ATGAGAGTAA AACTGGTAT 120

GAGAGCCAGG CTTCTGTAT GTCTCAAAT GCCAGCCTC TGAAAGTATA CAGCAAAGAG 180

GACCAGGATT TACTTAACT GGTGAAGTCA TATCATTGGA TGGGACTAGT ACACATTCCA 240

ACAAATGGAT CTTGGCAGTG GGAAGATGGC TCCATTCTCT CACCCAACCT ACTAACAATA 300
ATTGAAATGC AGAAGGGAGA CTGTGCACTC TATGCCTCGA GCTTTAAAGG CTATATAGAA 360
AACTGTTCAA CTCCAAATAC GTACATCTGC ATGCAAAGGA CTGTG 405

<211> 63

<212> DNA

<213> 人 CD8 α 分子

<221> CD8 α 信号肽核苷酸序列

<400> 9

ATGGCCTTAC CAGTGACCGC CTTGCTCCTG CCGCTGGCCT TGCTGCTCCA CGCCGCCAGG 60
CCG 63

<211> 36

<212> DNA

<213> 人 IgG4 分子

<221> IgG4 单体型铰链区核苷酸序列

<400> 10

[0003]

GAATCTAAAT ATGGGCCTCC AGCACCACCC GCGCCT 36

<211> 81

<212> DNA

<213> 人 CD28 分子

<221> CD28 跨膜区氨基酸序列

<400> 11

TTTTGGGTGC TGGTGGTGGT TGGTGGAGTC CTGGCTTGCT ATAGCTTGCT AGTAACAGTG 60
GCCTTTATTA TTTTCTGGGT G 81

<211> 339

<212> DNA

<213> 人 CD3 ζ 分子

<221> CD3 ζ 胞内信号传导结构域核苷酸序列

<400> 12

AGAGTGAAGT TCAGCAGGAG CGCAGACGCC CCCGCGTACC AGCAGGGCCA GAACCAGCTC 60
TATAACGAGC TCAATCTAGG ACGAAGAGAG GAGTACGATG TTTTGGACAA GAGACGTGGC 120

CGGGACCCTG AGATGGGGGG AAAGCCGCAG AGAAGGAAGA ACCCTCAGGA AGGCCTGTAC 180
 AATGAACTGC AGAAAGATAA GATGGCGGAG GCCTACAGTG AGATTGGGAT GAAAGGCGAG 240
 CGCCGGAGGG GCAAGGGGCA CGATGGCCTT TACCAGGGTC TCAGTACAGC CACCAAGGAC 300
 ACCTACGACG CCCTTCACAT GCAGGCCCTG CCCCCTCGC 339

<211> 123

<212> DNA

<213> 人 CD28 分子

<221> CD28 胞内共刺激信号结构域核苷酸序列

<400> 13

AGGAGTAAGA GGAGCAGGCT CCTGCACAGT GACTACATGA ACATGACTCC CCGCCGCCCC 60
 GGGCCACCC GCAAGCATT A CCAGCCCTAT GCCCACCAC GCGACTTCGC AGCCTATCGC 120
 TCC 123

<211> 126

<212> DNA

<213> 人 CD137 分子

[0004]

<221> CD137 胞内共刺激信号结构域核苷酸序列

<400> 14

AAACGGGGCA GAAAGAACT CCTGTATATA TTCAAACAAC CATTTATGAG ACCAGTACAA 60
 ACTACTCAAG AGGAAGATGG CTGTAGCTGC CGATTCCAG AAGAAGAAGA AGGAGGATGT 120
 GAACTG 126

<211> 399

<212> PRT

<213> 人工合成

<221> NKG2D-CAR 氨基酸序列

<400> 15

MALPVTALLL PLALLLHAAR PDYKDDDDKL FNQEVQIPLT ESYCGPCPKN WICYKNNCYQ 60
 FFDESKNWYE SQASCMSQNA SLLKVYSKED QDLLKLVKSY HWMGLVHIPT NGSWQWEDGS 120
 ILSPNLLTII EMQKGDALY ASSFKGYIEN CSTPNTYICM QRTVESKYGP PAPPAPFWVL 180
 VVVGVLACY SLLVTVAFII FWVRSKRSRL LHSDYMNMTF RRPGPTRKHY QPYAPPRDFA 240
 AYRSKRGRKK LLYIFKQPFM RPVQTTQEED GCSCRFPEEE EGGCELRVKF SRSADAPAYQ 300

QGQNQLYNEL NLGRREEYDV LDKRRGRDPE MGGKPQRRKN PQEGLYNELQ KDKMAEAYSE 360

IGMKGERRRG KGHDGLYQGL STATKDTYDA LHMQUALPPR 399

<211> 1197

<212> DNA

<213> 人工合成

<221> NKG2D-CAR 核苷酸序列

<400> 16

ATGGCCTTAC CAGTGACCGC CTTGCTCCTG CCGCTGGCCT TGCTGCTCCA CGCCGCCAGG 60

CCGGACTACA AAGACGATGA CGACAAGTTA TTCAACCAAG AAGTTCAAAT TCCCTTGACC 120

GAAAGTTACT GTGGCCCATG TCCTAAAAAC TGGATATGTT AAAAAATAA CTGCTACCAA 180

TTTTTTGATG AGAGTAAAAA CTGGTATGAG AGCCAGGCTT CTTGTATGTC TCAAAATGCC 240

AGCCTTCTGA AAGTATACAG CAAAGAGGAC CAGGATTTAC TTAAACTGGT GAAGTCATAT 300

CATTGGATGG GACTAGTACA CATTCCAACA AATGGATCTT GGCAGTGGGA AGATGGCTCC 360

ATTCTCTCAC CCAACCTACT AACAATAATT GAAATGCAGA AGGGAGACTG TGCACTCTAT 420

[0005]

GCCTCGAGCT TTAAAGGCTA TATAGAAAAC TGTTCAACTC CAAATACGTA CATCTGCATG 480

CAAAGGACTG TGGAATCTAA ATATGGGCCT CCAGCACCAC CCGCGCCTTT TTGGGTGCTG 540

GTGGTGGTTG GTGGAGTCCT GGCTTGCTAT AGCTTGCTAG TAACAGTGGC CTTTATTATT 600

TTCTGGGTGA GGAGTAAGAG GAGCAGGCTC CTGCACAGTG ACTACATGAA CATGACTCCC 660

CGCCGCCCCG GGCCACCCG CAAGCATTAC CAGCCCTATG CCCCACCACG CCACTTCGCA 720

GCCTATCGCT CCAAACGGGG CAGAAAGAAA CTCCTGTATA TATTCAAACA ACCATTTATG 780

AGACCAGTAC AACTACTCA AGAGGAAGAT GGCTGTAGCT GCCGATTTCC AGAAGAAGAA 840

GAAGGAGGAT GTGAACTGAG AGTGAAGTTC AGCAGGAGCG CAGACGCCCC CGCGTACCAG 900

CAGGGCCAGA ACCAGCTCTA TAACGAGCTC AATCTAGGAC GAAGAGAGGA GTACGATGTT 960

TTGGACAAGA GACGTGGCCG GGACCCTGAG ATGGGGGGAA AGCCGCAGAG AAGGAAGAAC 1020

CCTCAGGAAG GCCTGTACAA TGAAGTGCAG AAAGATAAGA TGGCGGAGGC CTACAGTGAG 1080

ATTGGGATGA AAGGCGAGCG CCGGAGGGG AAGGGGCACG ATGGCCTTTA CCAGGGTCTC 1140

AGTACAGCCA CCAAGGACAC CTACGACGCC CTTCACATGC AGGCCCTGCC CCCTCGC 1197

<211> 8

<212> PRT

<213> 人 Flag 标签

<221> Flag 标签氨基酸序列
<400> 17
DYKDDDDK 8
<211> 24
[0006] <212> DNA
<213> 人 Flag 标签
<221> Flag 标签核苷酸序列
<400> 18
GACTACAAAG ACGATGACGA CAAG 24

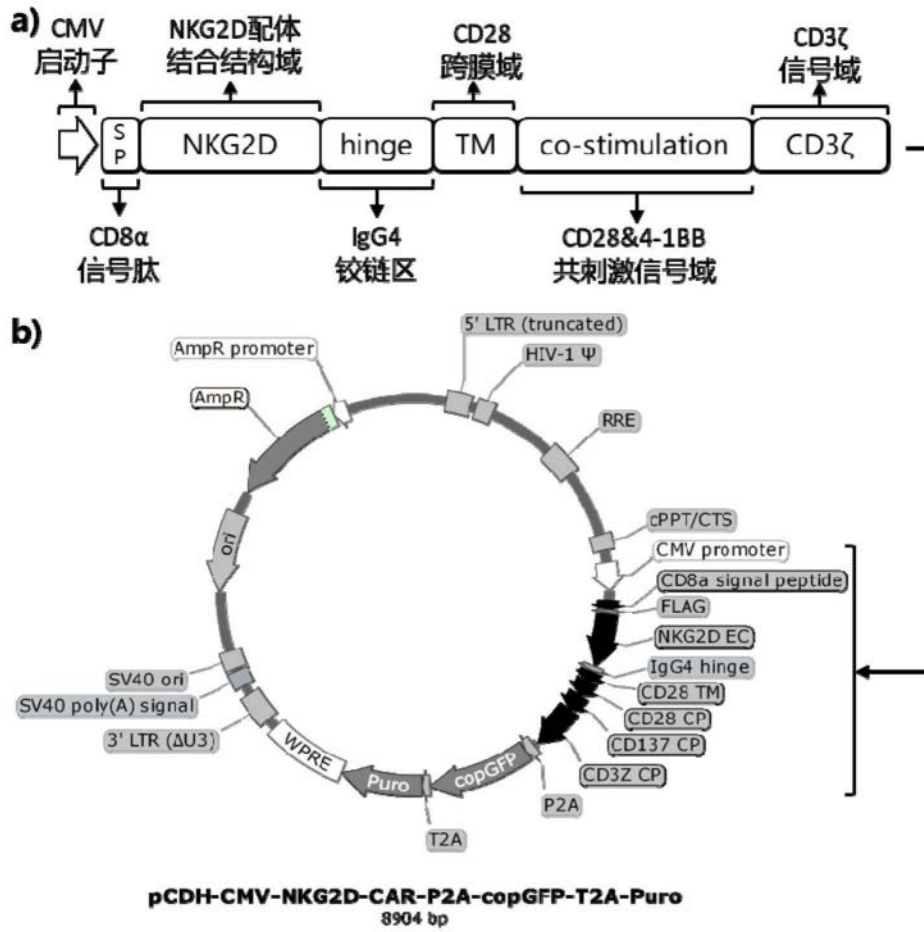


图1

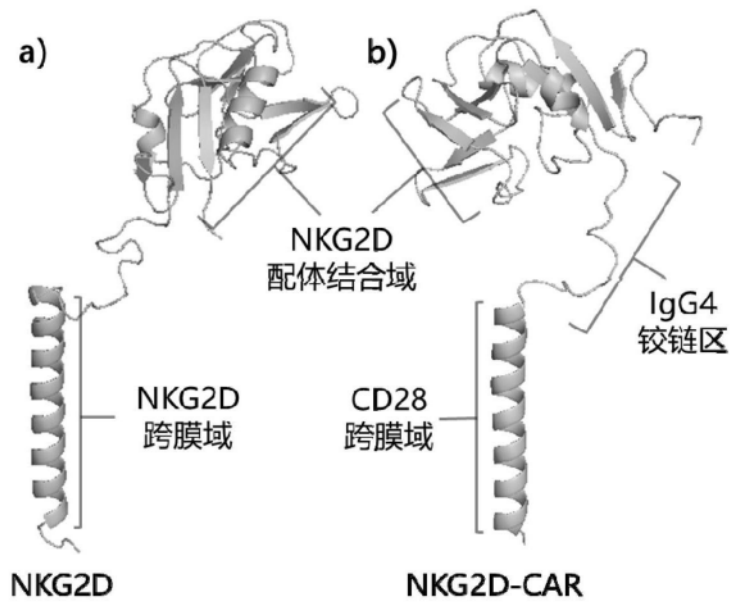


图2

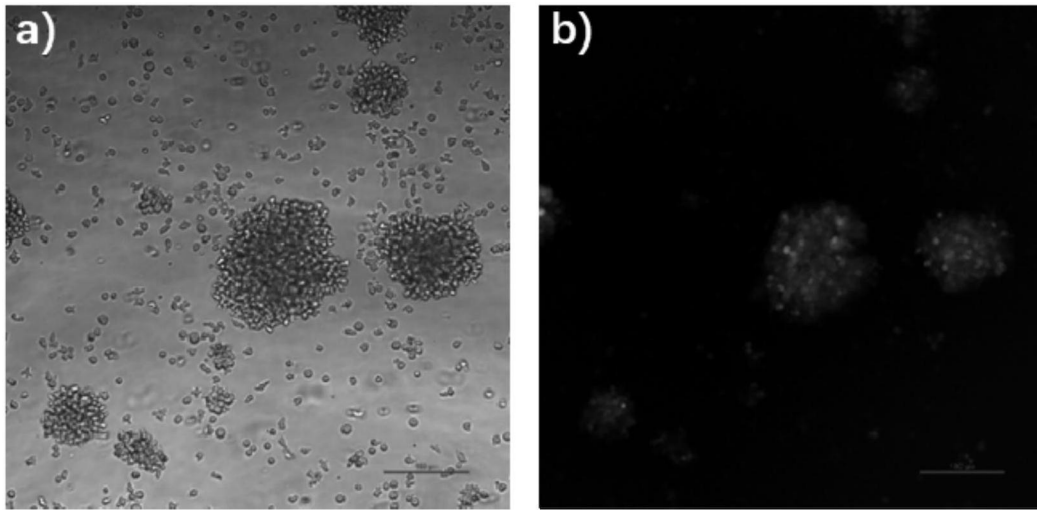


图3

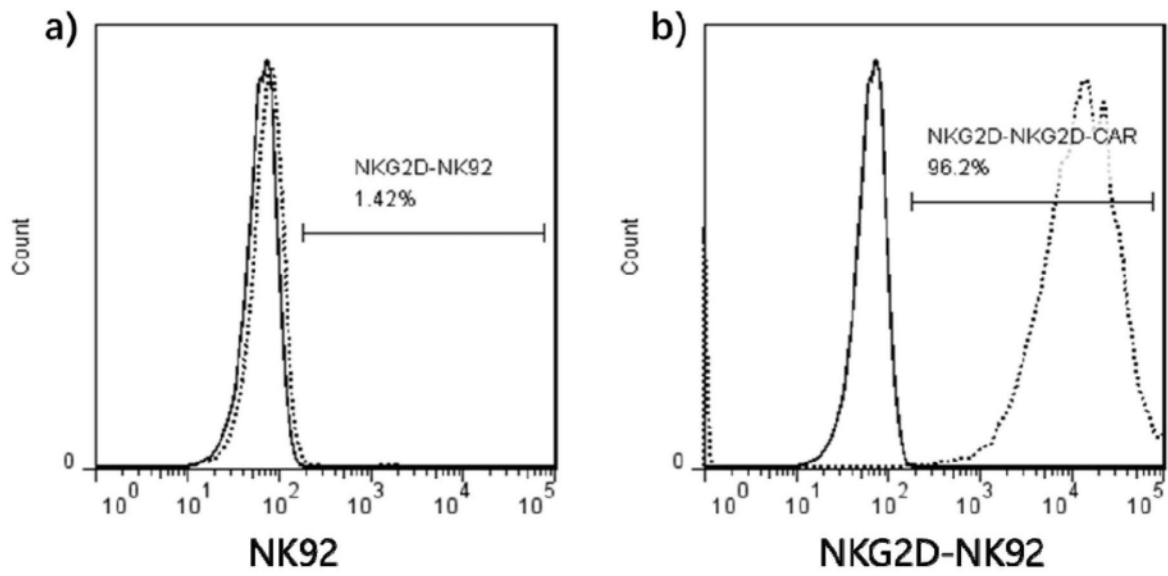


图4

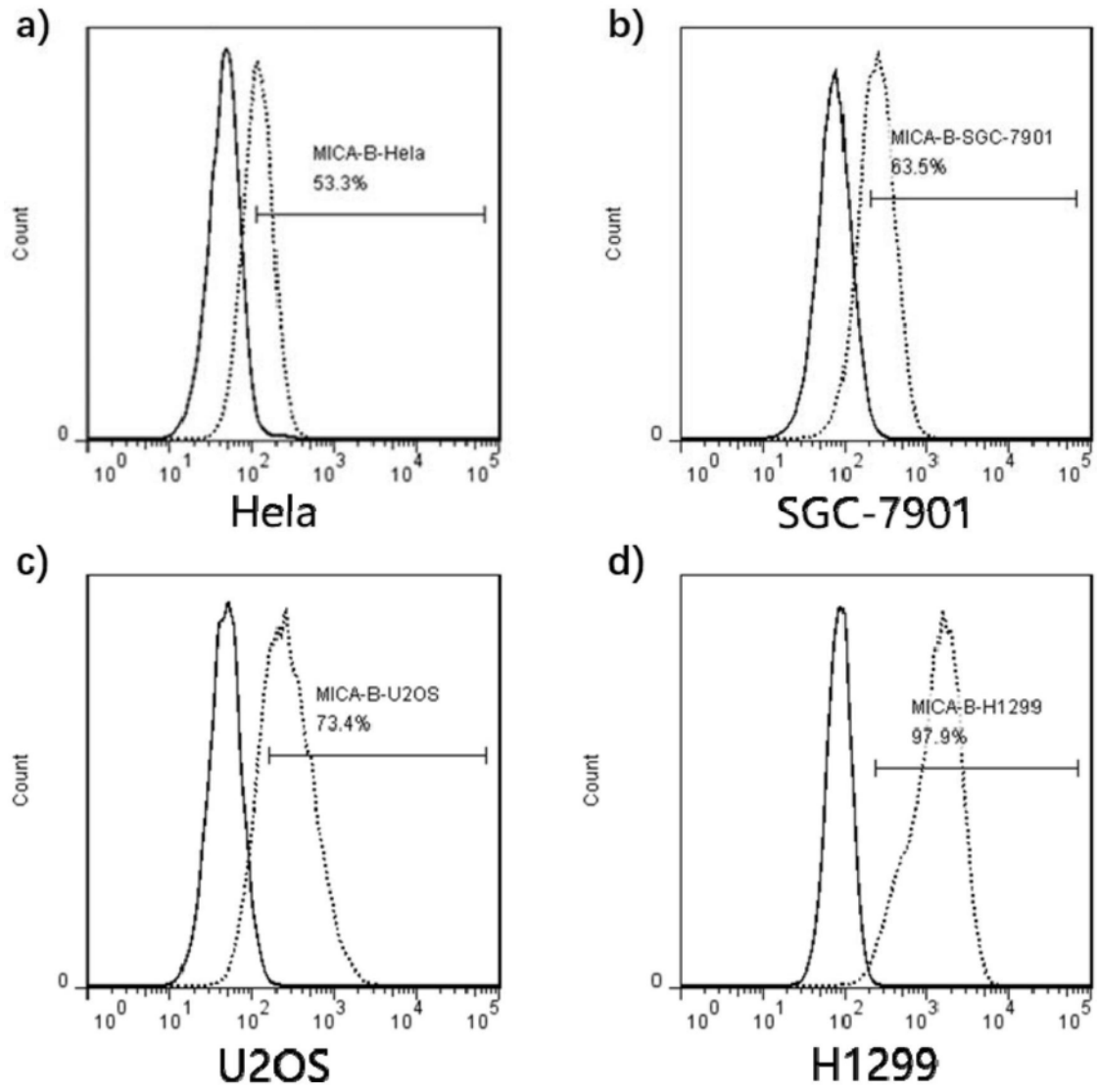


图5

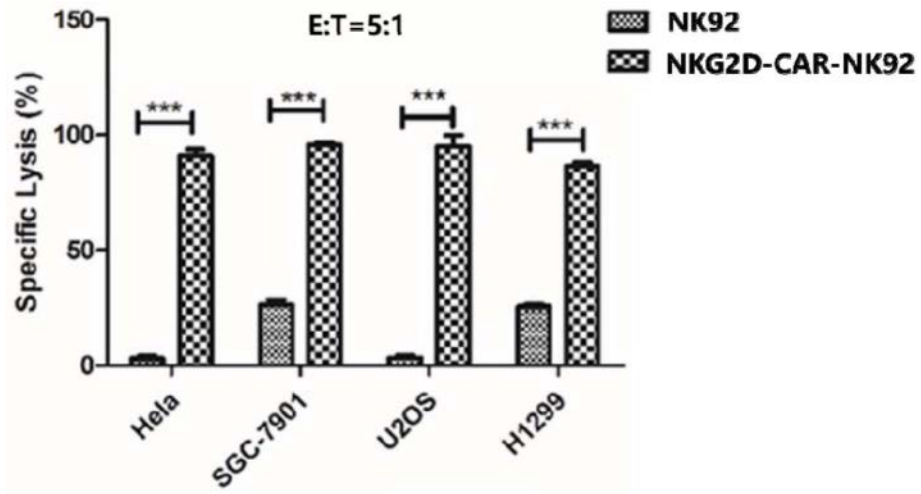


图6

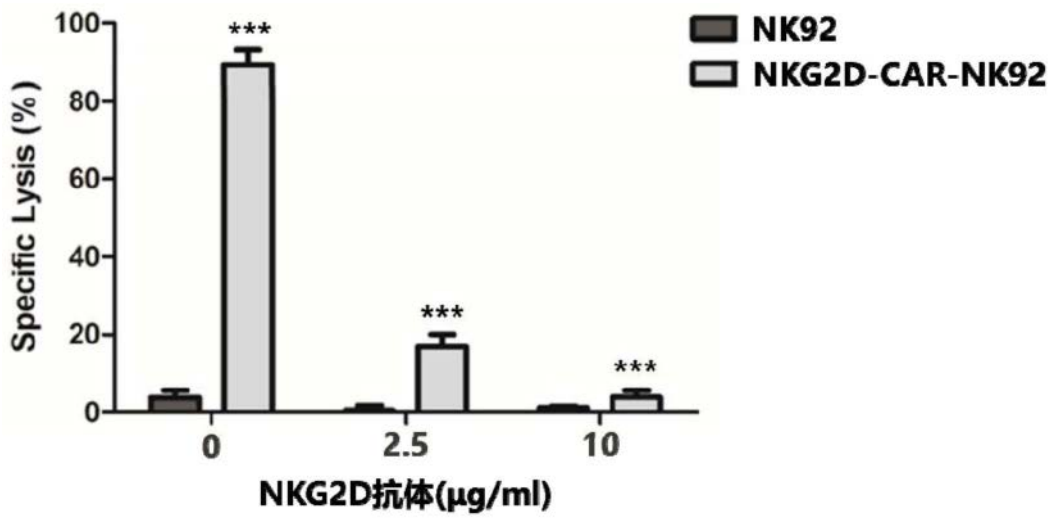


图7

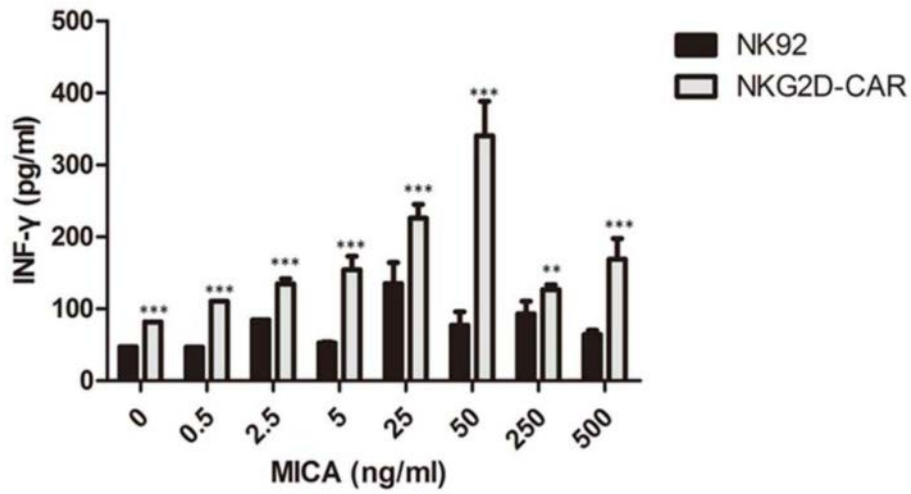


图8

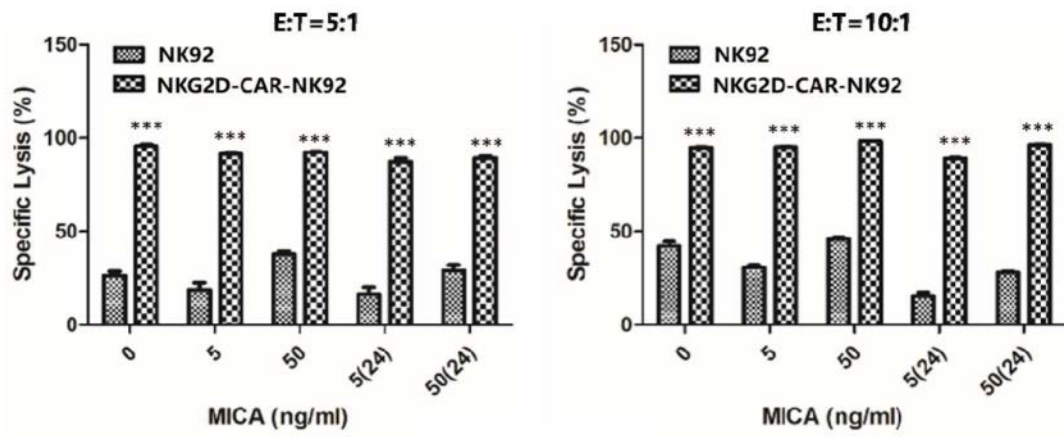


图9

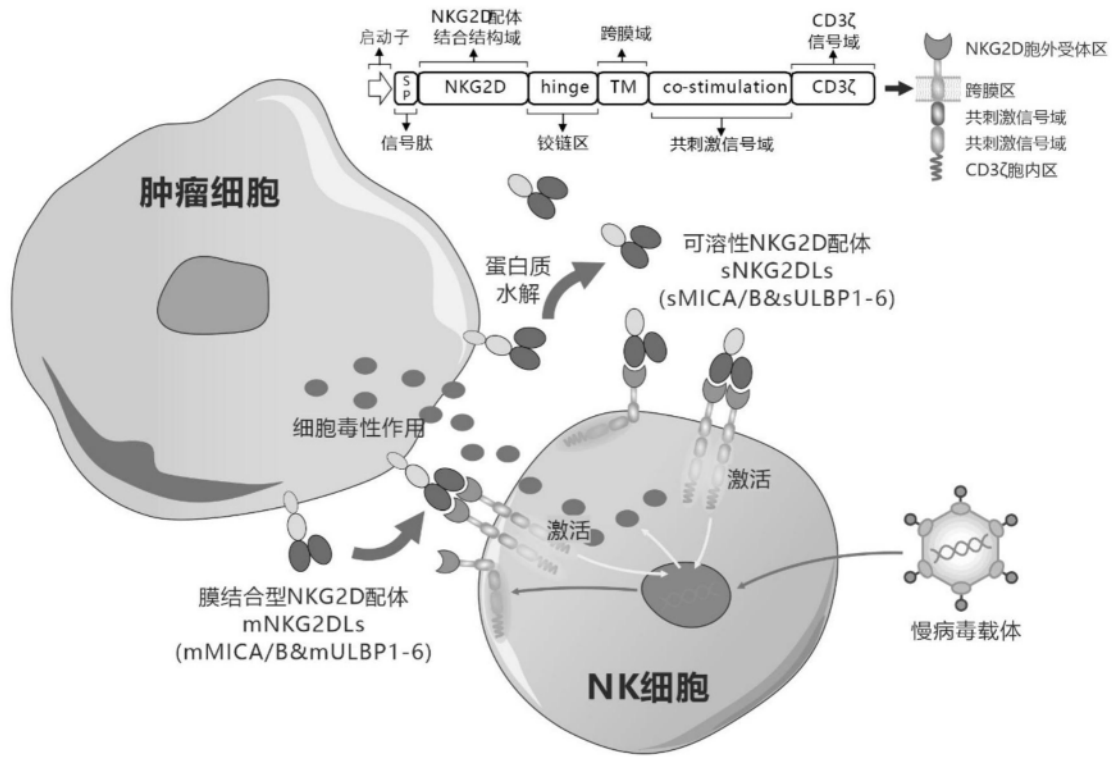


图10