



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110343712 B

(45) 授权公告日 2023. 12. 26

(21) 申请号 201910269936.7

A61K 39/00 (2006.01)

(22) 申请日 2019.04.03

A61P 35/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110343712 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2019.10.18

AU 2012202895 A1, 2012.06.07

CN 107573419 A, 2018.01.12

(66) 本国优先权数据
201810299324.8 2018.04.04 CN

CN 107771215 A, 2018.03.06

WO 2014117121 A1, 2014.07.31

IN 201717002003 A, 2017.06.02

(73) 专利权人 达仁生物科技有限公司
地址 中国香港西贡区, 清水湾, 坑口永隆路
42号

Heather VanSeggelen .T Cells Engineered With Chimeric Antigen Receptors Targeting NKG2D Ligands Display Lethal Toxicity in Mice.《Mol Ther》.2015, 第23卷(第10期), 全文.

(72) 发明人 谢雍

姚惟琦; 饶巍; 周宏灏. 嵌合抗原受体修饰 CIK细胞抗肿瘤研究进展. 中国肿瘤生物治疗杂志. 2016, (第05期), 全文.

(74) 专利代理机构 北京启坤知识产权代理有限公司 11655
专利代理师 赵晶

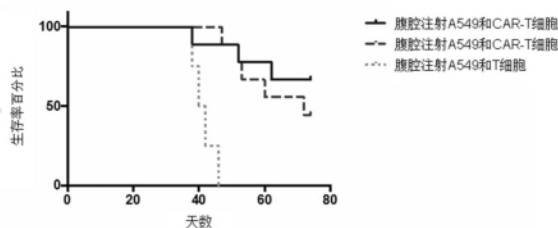
审查员 修旺珊

(51) Int. Cl.
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书1页 说明书13页
序列表7页 附图6页

(54) 发明名称
嵌合抗原受体和其治疗肺癌的方法

(57) 摘要
本发明提供了新的嵌合抗原受体。本发明提供了表达所述嵌合抗原受体的表达载体和宿主细胞。本发明还提供了嵌合抗原受体在治疗癌症或制备治疗癌症的药物中的用途。本发明提供的嵌合抗原受体和药物能够有效地治疗肺癌。



1. 宿主细胞在用于制备治疗或预防肺癌的药物中的用途,其中所述宿主细胞为由分离自受试者的T细胞衍生的T细胞,其包含核酸或是包含所述核酸的表达载体,

其中所述核酸包括编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸和编码DAP10的核酸,所述CAR包含:(a)抗原结合结构域,其包括NKG2D的a.a.82-216片段,其为氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的第82-216个氨基酸的多肽;(b)跨膜结构域,其氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示;和(c)从氨基端到羧基端按顺序为CD28、4-1BB和CD3 ζ 的胞内信号传导结构域,其中CD28胞内结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,4-1BB胞内结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,CD3 ζ 胞内结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示;

以及,所述DAP10氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;编码所述CAR的核酸片段和编码所述DAP10的核酸片段之间具有IRES的片段;

其中所述核酸还包括编码(a)抗原结构域和(b)跨膜结构域之间的铰链区的核酸,所述铰链区为IgGH1,其氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中编码所述CAR的(a)抗原结合结构域的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;编码所述CAR的(b)跨膜结构域的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示;编码所述CAR的(c)从氨基端到羧基端按顺序为CD28、4-1BB和CD3 ζ 的胞内信号传导结构域的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:13所示;编码所述DAP10的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示;以及,编码所述CAR的核酸片段和编码所述DAP10的核酸片段之间的IRES的核苷酸序列如SEQ ID NO:19所示;

其中编码(a)抗原结构域和(b)跨膜结构域之间的铰链区的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中编码所述CAR的(c)从氨基端到羧基端按顺序为CD28、4-1BB和CD3 ζ 的胞内信号传导结构域的核苷酸序列如SEQ ID NO:20所示。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述核酸还包括编码位于所述NKG2D片段的上游的前导片段的核酸,所述前导片段为CD33的前导片段,其氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述核酸中编码位于所述NKG2D片段的上游的前导片段的核酸的上游具有转录子,其为Kozak片段。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中所述T细胞为CD4+T细胞或CD8+T细胞。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中所述表达载体为慢病毒载体。

嵌合抗原受体和其治疗肺癌的方法

[0001] 本申请要求2018年4月4日提交的、申请号为201810299324.8、发明名称为“NKG2D嵌合抗原受体和其治疗癌症的方法”的中国专利申请的优先权,其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

[0002] 本发明涉及免疫学和医药领域。具体的,本发明提供了新的嵌合抗原受体。本发明还提供了所述新的嵌合抗原受体在治疗癌症或制备治疗癌症的药物中的用途。

背景技术

[0003] 肺癌是发病率和死亡率增长最快,对人群健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一。近50年来许多国家都报道肺癌的发病率和死亡率均明显增高,男性肺癌发病率和死亡率均占有所有恶性肿瘤的第一位,女性发病率占第二位,死亡率占第二位。

[0004] NKG2D(natural-killer group 2 member D,或NKG2D受体),即杀伤细胞凝集素样受体亚家族K成员1,是在所有自然杀伤细胞,自然杀伤T细胞和 $\gamma\delta^+$ T细胞表达的II型跨膜蛋白。在人体中,NKG2D受体主要与两种配体结合,这两种配体分别是UL16-结合蛋白(UL16-binding protein,ULBP)和MHC I型链相关蛋白A/B(MHC class I-chain-related protein,MICA/B)。人类NKG2D配体的表达很少在健康组织中检测到,但在肿瘤细胞中以及在细胞应激和病毒感染期间上调。NKG2D及其配体的结合作为针对肿瘤和病毒感染的免疫应答中的激活信号。

[0005] 近年在使用利用基因工程化产生的嵌合抗原受体(CAR)T细胞进行自体治疗的B细胞淋巴瘤和白血病中获得了空前的效果,所以已经开始将该方法应用至实体肿瘤。经CAR修饰的T细胞将单克隆抗体的独立于HLA的靶向特异性与被激活的T细胞的溶细胞活性、增殖和归巢性质相结合,但是不响应于检查点抑制。但是,由于其直接杀死表达靶标的抗原的能力,CAR T细胞对于任何抗原阳性的细胞或组织是高度毒性的,这使得有需要通过高度肿瘤特异性的结构构建CAR。

[0006] 2005年,NKG2D受体-NKG2D配体系统首次用于嵌合抗原受体(CAR)治疗(T.Zhang等,Blood,vol.106,no.5,pp.1544-1551,Sep.2005)。在自然杀伤细胞和T细胞中,DNAX活化蛋白10(DAP10)是NKG2D受体的细胞表面衔接子。

[0007] 化疗是肺癌的主要治疗方法,90%以上的肺癌需要接受化疗治疗。化疗对小细胞肺癌的疗效无论早期或晚期均较肯定,甚至有约1%的早期小细胞肺癌通过化疗治愈。但是化疗除能杀死肿瘤细胞外,对人体正常细胞也有损害。

[0008] 因此,本领域需要更有效以及更安全的用于治疗肺癌的药物。

发明内容

[0009] 本发明提供了一种新的嵌合抗原受体,其包含:(a)抗原结合结构域,其包括NKG2D或其活性片段;(b)跨膜结构域和(c)胞内信号传导结构域。本发明还提供了新的嵌合抗原

受体和其辅助蛋白DAP10或其活性片段的联合。本发明还提供了编码所述嵌合抗原受体和/或DAP10的核酸和表达载体,以及表达所述嵌合抗原受体和/或DAP10的细胞。本发明还提供了采用所述嵌合抗原受体和/或DAP10的、其表达载体和细胞在治疗癌症的方法和制备治疗癌症的药物中的用途。

[0010] 本发明提供了一种嵌合抗原受体(CAR),其包含:(a)抗原结合结构域,其包括NKG2D或其活性片段;(b)跨膜结构域和(c)胞内信号传导结构域。

[0011] 本发明还提供了一种前面所述的嵌合抗原受体(CAR)和一种辅助蛋白的组合,其中所述CAR包含:(a)抗原结合结构域,其包括NKG2D或其活性片段;(b)跨膜结构域和(c)胞内信号传导结构域,以及其中所述辅助蛋白为DAP10或其活性片段。在本发明的其中一个方面,所述DAP10具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0012] “NKG2D”或“NKG2D受体”,亦称“NKG2-D”、“CD314”、“KLRK1”、“杀伤细胞凝集素样受体亚家族K成员1”,是指哺乳动物特别是人的杀伤细胞激活性受体基因(其mRNA如NCBI RefSeq NM_007360)或其基因产物(如NCBI RefSeq NP_031386)或其天然存在的变体。在人类NK细胞和T细胞中,配体结合形式的NKG2D受体是同二聚体(Li等,Nat Immunol 2001;2:443-451)。NKG2D活性,包括细胞活化、抗体识别等,还包括与两种配体结合,这两种配体分别是UL16-结合蛋白(UL16-binding protein,ULBP)和MHC I型链相关蛋白A/B(MHC class I-chain-related protein MICA/B)。

[0013] DAP10(membrane protein 10)是指哺乳动物特别是人的表面蛋白基因或其基因产物(如GenBank:AAG29425.1所示)。DAP10的活性包括与NKG2D形成复合体(Wu, J.等, Science 285(5428),730-732,1999)。

[0014] 在本发明的其中一个方面,所述嵌合抗原受体(CAR)的抗原结合结构域包含NKG2D的活性片段。所述活性片段例如为NKG2D的a.a.82-216片段,即具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的第82-216个氨基酸:LFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASL LKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDICALYASSFKGYIENCSTPNTYI CMQRTV。

[0015] 在本发明的其中一个方面,所述抗原结合结构域可包含前导序列(leading peptide)。前导序列可协助蛋白在细胞膜上的表达或进出膜。本领域已知的前导序列可用于本发明的CAR。在本发明中,前导序列可以位于所述NKG2D或其活性片段的上游。在本发明的其中一种实施方案中,在所述前导序列为CD33的前导序列,其具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。前导序列可以促进CAR在细胞表面上的表达,但是在表达的CAR中存在前导序列不是CAR发挥功能所必需的。在本发明的实施方案中,CAR在细胞表面上表达后,前导序列可以从CAR上切除。因此,在本发明的实施方案中,CAR可以没有前导序列。

[0016] 在本发明的其中一个方面,所述CAR包括跨膜结构域。本领域已知的跨膜结构域可用于本发明。跨膜结构域包括T细胞受体的 α 、 β 、或 ζ 、CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), CD160, CD19, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4

(CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46等的跨膜结构域。

[0017] 在本发明的其中一个方面,本发明的CAR的跨膜结构域包含i) CD8和/或ii) CD28的跨膜结构域。在本发明的其中又一个方面,本发明的CAR的跨膜结构域为CD28的跨膜结构域,例如,其可具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0018] 在本发明的其中一个方面,所述CAR包括胞内信号传导结构域。包含可用于本发明的胞内信号传导结构域的实例包括来自CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD134、CD137、ICOS和CD154的胞内信号传导结构域。其具体实例包括具有以下序列的肽:CD2 (NCBI RefSeq: NP_001758.2)的氨基酸编号236-351、CD4 (NCBI RefSeq: NP_000607.1)的氨基酸编号421-458、CD5 (NCBI RefSeq: NP_055022.2)的氨基酸编号402-495、CD8 α (NCBI RefSeq: NP_001759.3)的氨基酸编号207-235、CD8 β (GenBank: AAA35664.1)的氨基酸编号196-210、CD28 (NCBI RefSeq: NP_006130.1)的氨基酸编号181-220 (SEQ ID NO: 25)、CD137 (4-1BB, NCBI RefSeq: NP_001552.2)的氨基酸编号214-255、CD134 (OX40, NCBI RefSeq: NP_003318.1)的氨基酸编号241-277和ICOS (NCBI RefSeq: NP_036224.1)的氨基酸编号166-199等,及其与这些肽具有相同功能的变体。

[0019] 优选的,本发明CAR的细胞内T细胞信号传导结构域包含以下任何一种或多种的:i) CD28, ii) 4-1BB, 和/或iii) CD3 ζ 的胞内信号传导结构域。在优选的实施方案中,本发明CAR的细胞内T细胞信号传导结构域为CD28、4-1BB和CD3 ζ 的胞内信号传导结构域。更优选的,本发明CAR的细胞内T细胞信号传导结构域从氨基端到羧基端按顺序为CD28、4-1BB和CD3 ζ 。其中,CD28为T细胞共刺激中重要的T细胞标志物,其胞内信号传导结构域的序列例如可以包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。4-1BB,也被称为CD137,向T细胞传送有效的共刺激信号,从而促进T淋巴细胞的分化并增强其长期存活。CD3 ζ 与TCR联合以产生信号并含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM)。在本发明的其中一个方面,所述CAR的细胞内T细胞信号传导结构域包含的CD28、4-1BB和CD3 ζ 的胞内信号传导结构域分别具有SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在本发明的其中又一个方面,所述CAR的细胞内T细胞信号传导结构域包含的CD28的胞内信号传导结构域具有例如SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在本发明的其中又一个方面,所述CAR的细胞内T细胞信号传导结构域包含的4-1BB的胞内信号传导结构域具有例如SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在本发明的其中又一个方面,所述CAR的细胞内T细胞信号传导结构域包含的CD3 ζ 的胞内信号传导结构域具有例如SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0020] 在包含多个胞内信号传导结构域的CAR中,可在胞内结构域之间插入寡肽接头或多肽接头以连接各结构域。优选地,可使用长度为2-10个氨基酸的接头。尤其是,可使用具有甘氨酸-丝氨酸连续序列的接头。

[0021] 在本发明的其中一种实施方案中,所述CAR包含 (a) 抗原结合结构域,其为NKG2D的 a.a. 82-216片段; (b) CD28的跨膜结构域和 (c) 从氨基端按顺序为CD28、4-1BB和CD3 ζ 的胞内信号传导结构域。

[0022] 在本发明的其中一个方面,其中所述CAR中, (a) 抗原结构域和 (b) 跨膜结构域之间还具有铰链区。本领域已知的铰链区可用于本发明,包括IgG1H, IgG2H, IgG3H, IgG4H。在本

发明的其中又一个方面, (a) 抗原结构域和 (b) 跨膜结构域之间的铰链区包含IgG1H或其片段或变体, 其氨基酸序列例如为SEQ ID NO:6。

[0023] 包括在本发明范围内的是本文描述的本发明的蛋白质的功能变体, 如CAR或其中各功能片段 (包括抗原结合结构域, 跨膜结构域, 胞内信号传导结构域, 铰链区, 前导序列等) 的功能变体。本文使用的术语“功能变体”是指具有与亲本蛋白质, 如CAR大量的或显著的序列同一性或相似性的CAR、多肽或蛋白质, 所述功能变体保留了CAR变体的生物活性。功能变体涵盖, 例如, 本文描述的CAR (亲本CAR) 的那些变体, 其保留了能够以与亲本CAR类似的程度、以与亲本CAR相同的程度或以比亲本CAR更高的程度识别靶细胞。关于亲本CAR, 功能变体的氨基酸序列与亲本CAR的氨基酸序列可, 例如, 具有至少约30%、约50%、约75%、约80%、约90%、约98%、约99%或更高的同一性。

[0024] 功能变体可, 例如, 包含具有至少一个保守性氨基酸置换的亲本CAR的氨基酸序列。替代地或另外地, 功能变体可包含具有至少一个非保守性氨基酸置换的亲本CAR的氨基酸序列。在这种情况下, 优选的是不会干扰或抑制功能变体的生物活性的非保守性氨基酸置换。非保守性氨基酸置换可以增强功能变体的生物活性, 使得功能变体的生物活性与亲本CAR相比有所增加。

[0025] 本发明的实施方案还提供包含编码本文描述的任何CAR的核苷酸序列的分离的核酸。本发明的核酸可包含编码本文描述的任何前导序列、抗原结合结构域、跨膜结构域和/或细胞内T细胞信号传导结构域的核苷酸序列。

[0026] 在本发明的其中一个方面, 提供了分离的核酸, 其包括编码前面所述的嵌合抗原受体 (CAR) 的核苷酸序列, 所述CAR包含: (a) 抗原结合结构域, 其包括NKG2D或其活性片段; (b) 跨膜结构域和 (c) 胞内信号传导结构域,

[0027] 在本发明的其中又一个方面, 其中编码所述CAR的抗原结合结构域的核苷酸序列包含编码NKG2D的活性片段, 优选为编码NKG2D的a.a.82-216片段的核苷酸序列, 例如其具有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

[0028] 在本发明的其中又一个方面, 其中编码所述跨膜结构域的核苷酸序列包括编码CD8和/或CD28的跨膜结构域, 优选为CD28的跨膜结构域的核苷酸序列, 例如为SEQ ID NO:7的核苷酸序列。

[0029] 在本发明的其中又一个方面, 其中编码所述胞内信号传导结构域的核苷酸序列包括编码CD28, 4-1BB和CD3 ζ 的胞内信号传导结构域中的一个或多个的核苷酸序列, 优选包括编码CD28, 4-1BB和CD3 ζ 的胞内信号传导结构域的核苷酸序列, 更优选包括编码从氨基端到羧基端按顺序为CD28, 4-1BB和CD3 ζ 的蛋白质的核酸序列;

[0030] 本发明的其中又一个方面, 所述编码CD28的胞内信号传导结构域的核酸具有例如SEQ ID NO:9的核苷酸序列;

[0031] 本发明的其中又一个方面, 所述编码4-1BB的胞内信号传导结构域具有例如SEQ ID NO:11的核苷酸序列;

[0032] 本发明的其中又一个方面, 所述编码CD3 ζ 的胞内信号传导结构域具有例如SEQ ID NO:13的核苷酸序列;

[0033] 本发明的其中又一个方面, 其中编码所述CAR的胞内信号传导结构域的核苷酸序列具有如SEQ ID NO:20的核苷酸序列, 其包括编码CD28, 4-1BB和CD3 ζ 的胞内信号传导结构

域的核苷酸序列。

[0034] 本发明的其中又一个方面,本发明提供的核酸中还包括编码(a)抗原结构域和(b)跨膜结构域之间还具有的铰链区的核苷酸序列,优选为编码IgGH1的核苷酸序列,其具有例如SEQ ID NO:5的核苷酸序列。

[0035] 本发明的其中又一个方面,本发明提供的核酸中还包括编码位于所述NKG2D或其活性片段的上游的前导序列的核苷酸序列,优选为编码CD33的前导序列的核苷酸序列,例如为SEQ ID NO:17所示的核苷酸序列。

[0036] 如前所述,本发明还提供了前面定义的嵌合抗原受体(CAR)和一种辅助蛋白的组合,所述辅助蛋白为DAP10或其活性片段。

[0037] 本发明的其中又一个方面,本发明提供的核酸中还包括编码该嵌合抗原受体(CAR)和所述辅助蛋白的核苷酸序列,所述CAR包含:(a)抗原结合结构域,其包括NKG2D或其活性片段;(b)跨膜结构域和(c)胞内信号传导结构域,以及所述辅助蛋白为DAP10或其活性片段。其中,编码所述CAR的抗原结合结构域的核苷酸序列包含编码NKG2D的活性片段,例如为NKG2D的a.a.82-216片段的核苷酸序列,例如为SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。以及,其中编码所述DAP10的核酸具有序列为SEQ ID NO:3的核苷酸序列。

[0038] 本文使用的“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”,并且通常意指DNA或RNA的聚合物,其可为单链或双链的,由天然来源合成或获得(如分离和/或纯化)的,可含有天然的、非天然的或改变的核苷酸,以及可含有天然的、非天然的或改变的核苷酸间连接,如氨基磷酸酯键或硫代磷酸酯键替代未修饰的寡核苷酸的核苷酸之间存在的磷酸二酯。在一些实施方案中,核酸不包含任何插入、缺失、倒置和/或置换。然而,在一些情况下,如本文所讨论的,包含一个或多个插入、缺失、倒置和/或置换的核酸可能为合适的。在一些实施方案中,核酸可以编码不会影响CAR的功能并且在宿主细胞表达核酸之后可以被翻译或不被翻译的另外的氨基酸序列。

[0039] 本发明的实施方案还提供分离或纯化的核酸,所述核酸包含与本文描述的任何核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列或在严格条件下与本文描述的任何核酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0040] 在严格条件下杂交的核苷酸序列可以在高严格条件下杂交。“高严格条件”意指核苷酸序列以强于非特异性杂交可检测的量与靶序列(本文描述的任何核酸的核苷酸序列)特异性杂交。

[0041] 本发明还提供包含与本文描述的任何核酸具有至少约70%或更高,如约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性的核苷酸序列的核酸。

[0042] 在实施方案中,本发明的核酸可掺入至重组表达载体中。在这方面,本发明的实施方案提供包含本发明的任何核酸的重组表达载体。为了本文的目的,术语“重组表达载体”意指基因修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,当构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列,并且在足以在细胞内表达mRNA、蛋白质、多肽或肽的条件下载体与细胞接触时,所述基因修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体允许宿主细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽。本发明的载体并非是整个天然存在的。然而,载体的一部分可为天然存在的。本发明的重组表达载体可包含任何类型的核苷酸,包括但不限于DNA和RNA,所述DNA和RNA可为单链

或双链,部分由天然来源合成或获得,并且可含有天然的、非天然的或改变的核苷酸。重组表达载体可包含天然存在的或非天然存在的核苷酸间连键或者这两种类型的连键。优选地,非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间连键不会阻碍载体的转录或复制。

[0043] 在实施方案中,本发明的重组表达载体可为任何合适的重组表达载体,并且可用于转化或转染任何合适的宿主细胞。本发明的合适的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达或这两者的那些载体,如质粒和病毒。载体可选自pUC系列(Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD)、pBluescript系列(Stratagene, La Jolla, CA)、pET系列(Novagen, Madison, WI)、pGEX系列(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)和pEX系列(Clontech, Palo Alto, CA)。也可使用噬菌体载体,如 λ GT10、 λ GT11、 λ ZapII (Stratagene)、 λ EMBL4和 λ NM1149。植物表达载体的实例包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。重组表达载体可以为病毒载体,如逆转录病毒载体或慢病毒载体。

[0044] 重组表达载体可包含天然或非天然的启动子,其可操作地连接至编码CAR(包括其功能部分和功能变体)的核苷酸序列或至与编码CAR的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列。启动子的选择,如强、弱、可诱导的、组织特异的和发育特异的,在本领域技术人员的能力内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在本领域技术人员的普通技术内。启动子可为非病毒启动子或病毒启动子,如EF1 α 启动子,巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子。EF1 α 启动子来源于EF1 α 启动子来自人类靶向延长因子1 α (EF1A)基因。在本发明的其中一个又一个方面,本发明的重组表达载体中采用EF1 α 启动子,其具有例如为SEQ ID NO:15的核苷酸序列。

[0045] 在本发明的一个方面,提供了前述本发明的嵌合抗原受体(CAR)表达载体,包含编码所述CAR的核酸,所述CAR包含:(a)抗原结合结构域,其包括NKG2D或其活性片段;(b)跨膜结构域和(c)胞内信号传导结构域。

[0046] 在本发明的一个方面,还提供了前述本发明的嵌合抗原受体(CAR)和辅助蛋白的表达载体,其包含编码所述CAR的核酸和编码辅助蛋白的核酸,所述CAR包含:(a)抗原结合结构域,其包括NKG2D或其活性片段;(b)跨膜结构域和(c)胞内信号传导结构域,以及所述辅助蛋白为DAP10或其活性片段。在本发明的其中一个又一个方面,本发明的嵌合抗原受体(CAR)和辅助蛋白的表达载体可以在不同载体上具有编码所述嵌合抗原受体(CAR)或所述辅助蛋白的核酸。优选的,本发明的嵌合抗原受体(CAR)和辅助蛋白的表达载体在同一个载体上具有编码所述嵌合抗原受体(CAR)和所述辅助蛋白的核酸。

[0047] 在本发明的一个方面,本发明的表达载体中编码所述CAR的抗原结合结构域的核苷酸序列包含编码NKG2D的活性片段,例如为NKG2D的a.a.82-216片段的核苷酸序列,例如为SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

[0048] 在本发明的一个方面,本发明的表达载体中中编码所述跨膜结构域的核苷酸序列包括编码CD8和/或CD28的跨膜结构域,优选为CD28的跨膜结构域的核苷酸序列,例如为SEQ ID NO:7的核苷酸序列。

[0049] 在本发明的一个方面,本发明的表达载体中中编码所述胞内信号传导结构域的核苷酸序列包括编码CD28,4-1BB和CD3 ζ 的胞内信号传导结构域中的一个或多个的核苷酸序列,优选包括编码CD28,4-1BB和CD3 ζ 的胞内信号传导结构域的核苷酸序列,更优选包括编

码从氨基端到羧基端按顺序为CD28、4-1BB和CD3 ζ 的蛋白质的核酸序列。

[0050] 其中,编码CD28的胞内信号传导结构域的核酸可具有例如SEQ ID NO:9的核苷酸序列。

[0051] 其中,编码4-1BB的胞内信号传导结构域可具有例如SEQ ID NO:11的核苷酸序列;

[0052] 其中,编码CD3 ζ 的胞内信号传导结构域可具有例如SEQ ID NO:13的核苷酸序列;

[0053] 在本发明的又一个方面,其中编码所述CAR的胞内信号传导结构域的核苷酸序列具有如SEQ ID NO:20的核苷酸序列。

[0054] 在本发明的一个方面,本发明的表达载体中还包括编码(a)抗原结构域和(b)跨膜结构域之间的铰链区的核苷酸序列,优选为编码IgGH1的核苷酸序列,其具有例如SEQ ID NO:5的核苷酸序列。

[0055] 在本发明的一个方面,本发明的表达载体中还包括编码位于所述NKG2D或其活性片段的上游的前导序列的核苷酸序列,优选为编码CD33的前导序列的核苷酸序列,例如为SEQ ID NO:17所示的核苷酸序列。

[0056] 在本发明的一个方面,本发明的表达载体中还包括编码所述抗原结构域的引导肽的序列的上游的转录子,优选为Kozak片段的核苷酸序列,例如为SEQ ID NO:16的核苷酸序列。

[0057] 在本发明的一个方面,本发明的表达载体中编码所述抗原结构域的引导肽的序列的上游具有启动子,优选为EF1 α 启动子,例如其序列为SEQ ID NO:15的核苷酸序列。

[0058] 在本发明的一个方面,本发明的表达载体中编码所述DAP10的核酸具有序列为SEQ ID NO:3的核苷酸序列。

[0059] 在本发明的一个方面,本发明的表达载体中,编码CAR和DAP10的片段之间还具有IRES的核苷酸序列,例如为SEQ ID NO:19的核苷酸序列。

[0060] 在本发明的其中一个方面,还提供了表达前面描述的嵌合抗原受体(CAR)的宿主细胞。在本发明的其中一个方面,还提供了表达前面描述的嵌合抗原受体(CAR)和辅助蛋白的组合的宿主细胞。在本发明的其中一个方面,还提供包含前面描述的任何重组表达载体的宿主细胞。

[0061] 如本文所用,术语“宿主细胞”是指可含有本发明重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可为真核细胞,如植物、动物、真菌或藻类,或者可为原核细胞,如细菌或原生动物。宿主细胞可为培养的细胞或原代细胞,即直接分离自生物体,如人。宿主细胞可为粘附细胞或悬浮细胞,即在悬浮液中生长的细胞。合适的宿主细胞为本领域中已知的并且包括,例如DH5 α 大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞等。为了扩增或复制重组表达载体的目的,宿主细胞可以为原核细胞,如DH5 α 细胞。为了产生重组CAR的目的,宿主细胞可以为哺乳动物细胞。宿主细胞可以为人类细胞。宿主细胞可为任何细胞类型,可来源于任何类型的组织并且可为任何发育阶段。例如,宿主细胞可以为外周血淋巴细胞(PBL)或外周血单核细胞(PBMC)。

[0062] 在本发明的其中一个方面,宿主细胞为T细胞。为了本文的目的,T细胞可为任何T细胞,如培养的T细胞,例如原代T细胞或来自培养的T细胞系的T细胞,如Jurkat、SupT1等,或从哺乳动物获得的T细胞。如果从哺乳动物获得,则T细胞可从许多来源获得,包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其它组织或液体。T细胞也可被富集或纯化。T细胞可以为人类T

细胞。T细胞可以为分离自人的T细胞。T细胞可为任何类型的T细胞并且可为任何发育阶段，包括但不限于CD4+/CD8+双阳性T细胞、CD4+辅助T细胞如Th 1和Th 2细胞、CD8+T细胞(如细胞毒性T细胞)、肿瘤浸润细胞、记忆T细胞、初始T细胞等。T细胞可以为CD8+T细胞或CD4+T细胞。

[0063] 在本发明的其中一个方面，宿主细胞是自然杀伤(NK)细胞。术语“NK细胞”(也被称为自然杀伤细胞)是指起源于骨髓并且在先天免疫系统中起重要作用的一类淋巴细胞。NK细胞提供针对病毒感染的细胞、肿瘤细胞或其他应激细胞的快速免疫反应，即使是细胞表面上不存在抗体和主要组织相容性复合体。NK细胞可以是被分离的，也可以从商业上可获得的来源得到。

[0064] 术语“分离的细胞”通常是指细胞基本上和组织的其他细胞分离。“免疫细胞”包括例如衍生自在骨髓中产生的造血干细胞(HSC)的白血细胞(白细胞)、淋巴细胞(T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞)和骨髓来源的细胞(嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞)。“T细胞”包括表达CD3的所有类型的免疫细胞，包括T辅助细胞(CD4+细胞)、细胞毒性T细胞(CD8+细胞)、自然杀伤T细胞、T调节细胞(Treg)和 $\gamma\delta$ T细胞。“细胞毒性细胞”包括CD8+T细胞、自然杀伤(NK)细胞和嗜中性粒细胞，这些细胞能够介导细胞毒性反应。

[0065] 本发明的CAR物质可以配制成药物组合物。在这方面，本发明的实施方案提供包含任何CAR、功能部分、功能变体、核酸、表达载体、宿主细胞(包括其群体)和抗体(包括其抗原结合部分)以及药学上可接受的载体的药物组合物。含有任何本发明的CAR物质的本发明药物组合物可包含多于一种的本发明CAR物质，如CAR和核酸，或两种或更多种不同的CAR。可选地，药物组合物可包含与其它药物活性剂或药物如化学治疗剂，如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、阿霉素、氟尿嘧啶、吉西他滨(gemcitabine)、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗(rituximab)、长春碱、长春新碱等组合的本发明的CAR物质。在优选的实施方案中，药物组合物包含本发明的宿主细胞或其群体。

[0066] 关于药物组合物，药学上可接受的载体可为任何常规使用的那些载体并且仅受限于化学-物理考虑因素，如溶解性和与活性剂缺乏反应性以及给予途径。本文描述的药学上可接受的载体，例如媒介物、佐剂、赋形剂和稀释剂，为本领域技术人员熟知的并且公众容易获得。优选的是对活性剂为化学惰性的药学上可接受的载体和在使用条件下无有害的副作用或毒性的药学上可接受的载体。

[0067] 用于制备可给予的(如可胃肠外给予的)组合物的方法为已知的或对本领域技术人员为显而易见的，且更详细地描述于，例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 第21版(2005年5月1日)。

[0068] 用于口服、气雾、胃肠外(如皮下、静脉内、动脉内、肌内、皮内、腹膜内和硬膜内)和外用给予的以下制剂仅为示例性的而非限制。可使用多于一种途径来给予本发明的CAR物质，并且在某些情况下，特定的途径可提供比另一途径更直接且更有效的应答。

[0069] 为了本发明方法的目的，其中给予宿主细胞或细胞群体时，所述细胞可为与哺乳动物同种异体或哺乳动物自体的细胞。优选地，所述细胞为哺乳动物自体的。

[0070] 本文提及的哺乳动物可为任何哺乳动物。如本文所用，术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物，包括但不限于啮齿目的哺乳动物，如小鼠和仓鼠，以及兔形目的哺乳动物，如兔

子。哺乳动物可以来自食肉目,包括猫科动物(猫)和犬科动物(犬)。哺乳动物可以来自偶蹄目,包括牛科动物(牛)和猪科动物(猪)或奇蹄目,包括马科动物(马)。哺乳动物可以为灵长目、猿目或猴目(猴)或猿猴亚目(人和猿)。优选地,哺乳动物为人。

[0071] 本发明的药物组合物可用于治疗或预防肺癌。

[0072] 本发明还提供了采用前面所述的本发明的嵌合抗原受体(CAR)、或所述嵌合抗原受体(CAR)和辅助蛋白的组合,或所述核酸或是所述表达载体,或所述宿主细胞治疗或预防肺癌的方法。本发明还提供了前面所述的本发明的嵌合抗原受体(CAR)、或所述嵌合抗原受体(CAR)和辅助蛋白的组合,或所述核酸或是所述表达载体,或所述宿主细胞在制备用于治疗或预防肺癌的药物中的用途。

附图说明

[0073] 图1在Raji细胞株上检测NKG2D配体的表达的流式细胞仪分析结果图。

[0074] 图2表达载体构建图。A:pCCL-DRCAR-IRES-DAP10表达载体;B:pHAGE-DRCAR表达载体。

[0075] 图3表达载体pCCL-DRCAR-IRES-DAP10插入片段核苷酸序列和说明示意图。

[0076] 图4表达载体pHAGE-DRCAR插入片段核苷酸序列和说明示意图。

[0077] 图5质粒共转染293T细胞表达DRCAR的流式细胞仪分析结果图。最左边为对照(仅加入慢病毒包装质粒,不包括重组质粒)。中间为加入pHAGE-DRCAR重组质粒后包装慢病毒感染。右边为加入pCCL-DRCAR-IRES-DAP10重组质粒后包装慢病毒感染。

[0078] 图6表达DRCAR的慢病毒的滴定。(A)为用不同量表达DRCAR的慢病毒的比例的流式细胞仪分析结果。(B)为对应柱状图。(C)根据流式细胞仪分析数据计算慢病毒滴度公式和结果。

[0079] 图7.DRCAR-T细胞杀灭癌细胞效果图。图7(a)-图7(d)显示对表达NKG2D配体的肺癌细胞的效果。图7(e)显示对不表达NKG2D配体的Raji细胞的效果。用流式细胞仪分析癌细胞的死亡率。

[0080] 图8.在肺癌移植小鼠注射DRCAR T细胞的动物存活结果图。

具体实施方式

[0081] 实施例1实验和方法

[0082] 细胞

[0083] 白细胞层(buffy coat)从香港红十字会输血服务组织(Hong Kong Red Cross Blood Transfusion Service)获得。通过使用Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare)从白细胞层中分离外周血单核细胞(PBMC)。通过使用CD3/CD28 Dynabeads(Thermo)从PBMC分离T细胞。将分离自PBMC的T细胞在由补充有5%人血清(Sigma),2mM L-谷氨酰胺(Thermo)和50U/ml IL-2(Peprotech)的AIM-V培养基(Thermo)组成的起始培养基或由补充有5%人血清,2mM L-谷氨酰胺和300U/ml IL-2的AIM-V培养基组成的扩增培养基(expansion medium)。

[0084] 所有以下细胞系来自ATCC、ECACC或中国科学院细胞库。

[0085] 在补充有10%FBS,100U/ml青霉素和100U/ml链霉素的RPMI1640培养基(Thermo)

中培养肺癌细胞系-NCI-H522(ATCC#CRL-5810)。

[0086] 在补充有10%FBS,100U/ml青霉素和100U/ml链霉素的F12培养基(Thermo)中培养肺癌细胞系-A549(ATCC#CCL-185)。

[0087] 在无血清ACL-4培养基(Thermo)中培养肺癌细胞系-NCI-H1155(ATCC#CRL-5818)和肺癌细胞系-NCI-H1355(ATCC#CRL-5865)。

[0088] 逆转录病毒质粒构建

[0089] 慢病毒包装,浓缩和纯化

[0090] 通过磷酸钙转染法将第三代慢病毒质粒pMDLg/pRRE,pMD2.G,pRSV-Rev和构建的表达载体以2:1:1:4的比例将质粒共转染293T细胞产生慢病毒。将新收集或解冻的含有慢病毒的上清液以300g离心3分钟以排除上清液中的细胞碎片。将上清液通过连接至30-ml注射器(TERUMO)的0.45- μ m微型注射器过滤器过滤。将上清液在20000g,4℃下离心90分钟。超速离心后,除去上清液。将1/10起始慢病毒体积的AIM-V培养基加入离心管中重新悬浮沉淀。通过移液将慢病毒悬浮液混合。将浓缩的慢病毒分装并储存在-80℃冰箱中。

[0091] 慢病毒滴度测定

[0092] 在补充有10%FBS,100U/ml青霉素和100U/ml链霉素的1ml RPMI1640培养基中,将 1×10^5 个Jurkat细胞接种到12孔板的每个孔中。过夜培养后,将不同量的(5 μ l至100 μ l)浓缩的慢病毒分别加入孔中。样品重复三次以提高准确性。加入聚凝胺(Sigma)至每个孔中6ug/ μ l的终浓度。24小时后,通过离心收集细胞并重悬于1ml补充有10%FBS,100U/ml青霉素和100U/ml链霉素的RPMI1640培养基中。另外48小时后,收集细胞并通过流式细胞术测定表达CAR的Jurkat细胞的百分比。慢病毒滴度按下式计算。

$$[0093] \quad \text{慢病毒滴度(TU/ml)} = \frac{\text{细胞个数} \times \text{阳性报告子细胞}\% \times \text{稀释因子}}{\text{载体体积(ml)} \times 100}$$

[0094] T细胞分离,转导和培养

[0095] 通过使用包被有CD3和CD28抗体的Dynabeads,以3:1的磁珠与细胞比率用于分离 1×10^7 个PBMC的CD³⁺细胞。将细胞和磁珠混合物在摇床上在室温下孵育1小时。用磁铁进行CD³⁺细胞富集,并以 1×10^6 个细胞/ml重新悬浮在起始培养基中。24小时后,通过离心(300xg,3分钟)收集细胞。丢弃上清液。将500 μ l AIM-V培养基中 5×10^8 TU慢病毒加入细胞并以2000 \times g离心2小时。将细胞重悬于慢病毒培养物中并加入1.5ml起始培养基。将细胞放回6孔板并置于培养箱(37度,5%CO₂)中。24小时后,再次进行转导。另外24小时后,通过离心(300xg,3分钟)收集细胞并重悬于2ml扩增培养基中。将细胞放回6孔板并置于培养箱(37度,5%CO₂)中。72小时后,将细胞转移至100-cm培养皿并以 4×10^5 个细胞/ml的浓度重新悬浮于扩增培养基中。转导率可以通过使用流式细胞仪来确定,并且当T细胞足够时可以进行细胞毒性测定。

[0096] 蛋白表达和流式细胞术分析

[0097] 为了检测细胞表面上的CAR表达(T细胞和Jurkat细胞),将 1×10^6 个细胞重悬于1ml PBS缓冲液中并用生物素山羊抗人IgG(H+L)(Jason Lab)染色,随后用链霉亲和素-Apc(eBioscience)。

[0098] 细胞毒性分析

[0099] 通过离心收集靶细胞并以 1×10^6 个细胞/ml的浓度重悬于PBS中。将5ml细胞用

2.5ul Oregon Green 488 (Thermo) 在37度下染色20分钟。加入20ml培养基以吸收过量的染料。将靶细胞以 4×10^5 个细胞/ml的浓度重新悬浮于培养基中。

[0100] 通过离心收集T细胞并用靶细胞所需的培养基重新悬浮,浓度为 1.6×10^7 个细胞/ml。

[0101] 将T细胞和靶细胞以5, 10, 20和40的比率混合。

[0102] E:T比例 ^[注]	40:1	20:1	10:1	5:1	0:1
靶细胞	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L
T细胞	500 μ L	250 μ L	125 μ L	62.5 μ L	0 μ L
靶细胞培养基	0 μ L	250 μ L	375 μ L	437.5 μ L	500 μ L

[0103] [注:E:T比例即效应细胞(T细胞)与靶细胞的比例。]

[0104] 将细胞在培养箱中相应地孵育5~8小时。通过离心收集细胞并重悬于500 μ l 7-AAD溶液(1 μ g/ml)中。细胞在冰上孵育30分钟。用流式细胞仪分析死亡率(7-AAD:激发波长561nm,发射波长670nm)。

[0105] 实施例2 NKG2D配体在各种癌症细胞株上的表达

[0106] 在不同癌症细胞株上检测NKG2D配体(人MICA/B和人ULBP1-ULBP6)的表达,以判断以NKG2D作为抗原结构域的CAR是否可用于杀伤这些细胞株。

[0107] 为了检测人MICA/B,将 1×10^6 个待测细胞重悬于0.5ml PBS缓冲液中,并用单克隆小鼠抗人MICA/B(R&D Cat#MAB13001),然后用生物素山羊抗小鼠IgG(H+L)和链霉亲和素-APC染色。

[0108] 为了检测人ULBP2/5/6,将 1×10^6 个待测细胞重悬于0.5ml PBS缓冲液中,并用单克隆小鼠抗人ULBP2/5/6(R&D Cat#MAB1298),然后用生物素山羊抗小鼠IgG(H+L)和链霉亲和素-APC染色。

[0109] 为了检测人ULBP1,将 1×10^6 个待测细胞重悬于0.5ml PBS缓冲液中,并用单克隆小鼠抗人ULBP1(R&D Cat#MAB1380),然后用生物素山羊抗小鼠IgG(H+L)和链霉亲和素-APC染色。

[0110] 为了检测人ULBP3,将 1×10^6 个待测细胞重悬于0.5ml PBS缓冲液中,并用单克隆小鼠抗人ULBP3(R&D Cat#MAB1517),然后用生物素山羊抗小鼠IgG(H+L)和链霉亲和素-APC染色。

[0111] 为了检测人ULBP4,将 1×10^6 个待测细胞重悬于0.5ml PBS缓冲液中,并用单克隆小鼠抗人ULBP4(R&D Cat#AF6285),然后用生物素牛抗山羊IgG(H+L)和链霉亲和素-APC染色。

[0112] 对以下4种癌细胞株进行检测NKG2D配体(人MICA/B和人ULBP1-ULBP6)的表达的检测:

[0113] 肺癌细胞系-NCI-H522(ATCC#CRL-5810),肺癌细胞系-A549(ATCC#CCL-185),肺癌细胞系-NCI-H1155(ATCC#CRL-5818)和肺癌细胞系-NCI-H1355(ATCC#CRL-5865)。

[0114] 实验结果证明,在上述4种肺癌细胞株中,表达了NKG2D配体(人MICA/B或人ULBP1-ULBP6)。将上述3种癌症细胞株在下面的CAR T细胞杀伤实验作为靶细胞进行测试。

[0115] 另外,如图1所示,Raji细胞不表达NKG2D配体(人MICA/B和人ULBP1-ULBP6)。Raji细胞在CAR T细胞杀伤实验中作为阴性对照。

[0116] 实施例3表达DRCAR的慢病毒载体的构建

[0117] 1. 构建pCCL-DRCAR-IRES-DAP10

[0118] pCCL-DRCAR-IRES-DAP10具有如图2A所示的结构。pCCL-DRCAR-IRES-DAP10的构建通过以下方法。

[0119] 合成核苷酸序列如图3所示的编码DRCAR和DAP10的核酸插入片段。该插入片段从5'端到3'端包括:1.HpaI酶切位点;2.EF1 α 启动子;3.Kozak;4.CD33前导序列;5.NKG2D的a.a.82-216片段;6.作为铰链区的IgG1H;7.CD28跨膜结构域;8.CD28的胞内信号传导结构域;9.4-1BB胞内信号传导结构域;10.CD3 ζ 的胞内信号传导结构域;11.连接片段;12.IRES;13.连接片段;14.DAP10;15.Sal I酶切位点。

[0120] 将上述插入片段与质粒Pax5 (Addgene, plasmid#35003)用限制性内切酶HpaI和Sal I进行双酶切,酶切产物切胶回收后,用T4连接酶16 $^{\circ}$ C过夜连接。连接后转化大肠杆菌感受态,涂布平板,次日挑取单克隆进行双酶切及测序鉴定,得到pCCL-DRCAR-IRES-DAP10。

[0121] 2. 构建pHAGE-DRCAR

[0122] pHAGE-DRCAR具有如图2B所示的结构。pHAGE-DRCAR的构建通过以下方法。

[0123] 合成核苷酸序列如图4所示的编码DRCAR的核酸插入片段。该插入片段从5'端到3'端包括:1.HpaI酶切位点;2.EF1 α 启动子;3.Kozak;4.CD33前导序列;5.NKG2D的a.a.82-216片段;6.作为铰链区的IgG1H;7.CD28跨膜结构域;8.CD28的胞内信号传导结构域;9.4-1BB胞内信号传导结构域;10.CD3 ζ 的胞内信号传导结构域;11.Sal I酶切位点。

[0124] 将上述插入片段与质粒Pax5用限制性内切酶HpaI和Sal I进行双酶切,酶切产物切胶回收后,用T4连接酶16 $^{\circ}$ C过夜连接。连接后转化大肠杆菌感受态,涂布平板,次日挑取单克隆进行双酶切及测序鉴定,得到pHAGE-DRCAR。

[0125] 3. 产生慢病毒载体

[0126] 分别以pHAGE-DRCAR和pCCL-DRCAR-IRES-DAP10作为表达质粒,与第三代慢病毒质粒pMDLg/pRRE,pMD2.G,pRSV-Rev,共转染293T细胞制备得到对应的慢病毒载体。

[0127] 根据实施例1记载方法计算慢病毒表达DRCAR的能力。图5是质粒共转染293T细胞表达DRCAR的流式细胞仪分析结果图。结果显示,与pHAGE-DRCAR相比,含有pCCL-DRCAR-IRES-DAP10的慢病毒的DRCAR表达水平明显较高。

[0128] 根据实施例1记载方法计算含pCCL-DRCAR-IRES-DAP10的慢病毒的滴度。图6显示pCCL-DRCAR-IRES-DAP10包装慢病毒的滴度为约 2×10^7 TU/ml。与pHAGE-DRCAR相比,含有pCCL-DRCAR-IRES-DAP10的慢病毒,慢病毒效价较高。

[0129] 实施例4 DRCAR-T细胞体外杀伤癌细胞

[0130] 根据实施例1记载的方法,从人的PBMC中提取和获得T细胞。然后用实施例3制备得到的含有pCCL-DRCAR-IRES-DAP10的慢病毒转染T细胞。

[0131] 根据实施例1记载的方法进行细胞毒性测定,检查表达DRCAR的T细胞对各种肿瘤细胞的特异性细胞毒性作用。其中,分别以含有pCCL-DRCAR-IRES-DAP10的T细胞和未用慢病毒转染的T细胞作为效应细胞,以4种肺癌细胞作为靶细胞。

[0132] 使用不表达NKG2D配体的Raji细胞株作为阴性对照。

[0133] 结果如图7(a)-图7(c)所示,在相同实验条件下,与不含有DRCAR的正常T细胞相比,表达DRCAR的T细胞能够诱导显著更多的靶肿瘤细胞死亡。所述肿瘤细胞包括:

[0134] 肺癌细胞系-NCI-H522(ATCC#CRL-5810),肺癌细胞系-A549(ATCC#CCL-185),肺癌细胞系-NCI-H1155(ATCC#CRL-5818)和肺癌细胞系-NCI-H1355(ATCC#CRL-5865)。

[0135] 如图7(d)所示,在不表达NKG2D配体的Raji细胞株的阴性对照中,DRCAR-T细胞没有表现出比对照的天然T细胞有所区别。

[0136] 实施例5 DRCAR T细胞在人肺癌移植动物模型体内抑制肿瘤

[0137] 实验小鼠8(NSG小鼠,6-8周龄,北京大学免疫系动物饲养室提供)共24只,分为DRCAR T细胞治疗组(随机选择16只,分为治疗组1和治疗组2)和对照组(8只)。所有小鼠在实验第0天注射肺癌细胞系A549细胞(1×10^6 个),各组在实验第2周(14天)、第4周(第28天)和第6周(第42天)分三次注射DRCAR T细胞(治疗组)或T细胞(对照组)。每天观察小鼠肿瘤生长情况和生存情况,并记录数据。

[0138] 治疗组1:在实验第2周、第4周和第6周分三次注射 2.5×10^6 个的DRCAR T细胞

[0139] 治疗组2:在实验第2周、第4周和第6周分三次注射 5×10^6 个的DRCAR T细胞

[0140] 对照组:在实验第2周、第4周和第6周分三次注射 5×10^6 个T细胞

[0141] 实验结果如图8所示。

[0142] 从实验结果得出,和对照组比较,本发明的DRCAR T细胞能够比不含有DRCAR的天然T细胞更有效地保护患癌动物的存活。

[0143] 以上各实验结果表明,本发明提供的具有NKG2D抗原受体结构的DRCAR和DRCAR-T细胞,能够有效地识别具有NKG2D配体的癌症细胞,并激活肿瘤细胞特异性的抗肿瘤细胞免疫应答和杀伤相关肿瘤细胞。实验还证明,本发明提供的DRCAR和DRCAR-T细胞能够广谱地杀伤各种癌症细胞,并在动物体内证明了其抑制各种癌症的效果。

[0144] 上面是对本发明进行的说明,不能将其看成是对本发明进行的限制。除非另外指出,本发明的实践将使用有机化学、聚合物化学、生物技术等的常规技术,显然除在上述说明和实施例中所特别描述之外,还可以别的方式实现本发明。其它在本发明范围内的方面与改进将对本发明所属领域的技术人员显而易见。根据本发明的教导,许多改变和变化是可行的,因此其在本发明的范围之内。以下

[0145] 如无特别表示,本文中出现的温度的单位“度”是指摄氏度,即 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0146] 以下文献以全文引入方式在本申请进行参考。

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	达仁生物科技有限公司
[0003]	<120>	嵌合抗原受体和其治疗肺癌的方法
[0004]	<160>	20
[0005]	<170>	PatentIn version 3.5
[0006]	<210>	1
[0007]	<211>	405
[0008]	<212>	DNA
[0009]	<213>	人
[0010]	<400>	1
[0011]		ttattcaacc aagaagttca aattcccttg accgaaagtt actgtggccc atgtcctaaa 60
[0012]		aactggatat gttacaaaaa taactgctac caattttttg atgagagtaa aaactggtat 120
[0013]		gagagccagg cttcttgtat gtctcaaaat gccagccttc tgaaagtata cagcaaagag 180
[0014]		gaccaggatt tacttaaaact ggtgaagtca tatcattgga tgggactagt acacattcca 240
[0015]		acaaatggat cttggcagtg ggaagatggc tccattctct cacccaacct actaacaata 300
[0016]		attgaaatgc agaagggaga ctgtgcactc tatgcctcga gctttaaagg ctatatagaa 360
[0017]		aactgttcaa ctccaaatac atacatctgc atgcaaagga ctgtg 405
[0018]	<210>	2
[0019]	<211>	216
[0020]	<212>	PRT
[0021]	<213>	人
[0022]	<400>	2
[0023]		Met Gly Trp Ile Arg Gly Arg Arg Ser Arg His Ser Trp Glu Met Ser
[0024]		1 5 10 15
[0025]		Glu Phe His Asn Tyr Asn Leu Asp Leu Lys Lys Ser Asp Phe Ser Thr
[0026]		20 25 30
[0027]		Arg Trp Gln Lys Gln Arg Cys Pro Val Val Lys Ser Lys Cys Arg Glu
[0028]		35 40 45
[0029]		Asn Ala Ser Pro Phe Phe Phe Cys Cys Phe Ile Ala Val Ala Met Gly
[0030]		50 55 60
[0031]		Ile Arg Phe Ile Ile Met Val Thr Ile Trp Ser Ala Val Phe Leu Asn
[0032]		65 70 75 80
[0033]		Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys
[0034]		85 90 95
[0035]		Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln
[0036]		100 105 110
[0037]		Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met
[0038]		115 120 125

[0039]	Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp			
[0040]	130	140		
[0041]	Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile			
[0042]	145	150	155	160
[0043]	Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro			
[0044]	165	170	175	
[0045]	Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr			
[0046]	180	185	190	
[0047]	Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr			
[0048]	195	200	205	
[0049]	Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val			
[0050]	210	215		
[0051]	<210>	3		
[0052]	<211>	282		
[0053]	<212>	DNA		
[0054]	<213>	人		
[0055]	<400>	3		
[0056]	atgatccatc tgggtcacat cctcttctctg cttttgctcc cagtggctgc agctcagacg	60		
[0057]	actccaggag agagatcatc actccctgcc ttttaccctg gcacttcagg ctcttggtcc	120		
[0058]	ggatgtgggt ccctctctct gccgctcctg gcaggcctcg tggctgctga tgcggtggca	180		
[0059]	tcgctgctca tcgtgggggc ggtgttctctg tgcgcacgcc cacgccgcag ccccgcccaa	240		
[0060]	gaagatggca aagtctacat caacatgcca ggcaggggct ga	282		
[0061]	<210>	4		
[0062]	<211>	93		
[0063]	<212>	PRT		
[0064]	<213>	人		
[0065]	<400>	4		
[0066]	Met Ile His Leu Gly His Ile Leu Phe Leu Leu Leu Leu Pro Val Ala			
[0067]	1	5	10	15
[0068]	Ala Ala Gln Thr Thr Pro Gly Glu Arg Ser Ser Leu Pro Ala Phe Tyr			
[0069]	20	25	30	
[0070]	Pro Gly Thr Ser Gly Ser Cys Ser Gly Cys Gly Ser Leu Ser Leu Pro			
[0071]	35	40	45	
[0072]	Leu Leu Ala Gly Leu Val Ala Ala Asp Ala Val Ala Ser Leu Leu Ile			
[0073]	50	55	60	
[0074]	Val Gly Ala Val Phe Leu Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln			
[0075]	65	70	75	80
[0076]	Glu Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly			
[0077]	85	90		

[0078]	<210>	5	
[0079]	<211>	693	
[0080]	<212>	DNA	
[0081]	<213>	人	
[0082]	<400>	5	
[0083]	cccaaattctt	gtgacaaaac	tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 60
[0084]	ggaccgtcag	tcttctctt	cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 120
[0085]	cctgaggtca	catgcgtggt	ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 180
[0086]	tggtacgtgg	acggcgtgga	ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 240
[0087]	aacagcacgt	accgtgtggt	cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 300
[0088]	aaggagtaca	agtgcaaggt	ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 360
[0089]	tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 420
[0090]	gagctgacca	agaaccaggt	cagcctgacc tgcttgggtca aaggttcta tcccagcgac 480
[0091]	atgcccgtag	agtgggagag	caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 540
[0092]	gtgctggact	ccgacggctc	cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 600
[0093]	tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 660
[0094]	acacagaaga	gcctctcct	gtctccgggt aaa 693
[0095]	<210>	6	
[0096]	<211>	231	
[0097]	<212>	PRT	
[0098]	<213>	人	
[0099]	<400>	6	
[0100]	Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
[0101]	1	5	10 15
[0102]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
[0103]		20	25 30
[0104]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
[0105]		35	40 45
[0106]	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
[0107]		50	55 60
[0108]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
[0109]		65	70 75 80
[0110]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
[0111]		85	90 95
[0112]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
[0113]		100	105 110
[0114]	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
[0115]		115	120 125
[0116]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys		

[0117]	130	135	140	
[0118]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
[0119]	145	150	155	160
[0120]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
[0121]		165	170	175
[0122]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
[0123]		180	185	190
[0124]	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser			
[0125]		195	200	205
[0126]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
[0127]		210	215	220
[0128]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[0129]	225	230		
[0130]	<210>	7		
[0131]	<211>	72		
[0132]	<212>	DNA		
[0133]	<213>	human		
[0134]	<400>	7		
[0135]	atctacatct gggcgcccct ggccgggact tgtgggggtcc ttctcctgtc actggttatac			60
[0136]	accctttact gc			72
[0137]	<210>	8		
[0138]	<211>	24		
[0139]	<212>	PRT		
[0140]	<213>	人		
[0141]	<400>	8		
[0142]	Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu			
[0143]	1	5	10	15
[0144]	Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys			
[0145]		20		
[0146]	<210>	9		
[0147]	<211>	126		
[0148]	<212>	DNA		
[0149]	<213>	人		
[0150]	<400>	9		
[0151]	gtgaggagta agaggagcag gctcctgcac agtgactaca tgaacatgac tccccgccgc			60
[0152]	ccccggccca cccgcaagca ttaccagccc tatgccccac cagcgactt cgcagcctat			120
[0153]	cgctcc			126
[0154]	<210>	10		
[0155]	<211>	42		

[0156] <212> PRT
 [0157] <213> 人
 [0158] <400> 10
 [0159] Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met
 [0160] 1 5 10 15
 [0161] Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala
 [0162] 20 25 30
 [0163] Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 [0164] 35 40
 [0165] <210> 11
 [0166] <211> 126
 [0167] <212> DNA
 [0168] <213> 人
 [0169] <400> 11
 [0170] aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
 [0171] actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
 [0172] gaactg 126
 [0173] <210> 12
 [0174] <211> 42
 [0175] <212> PRT
 [0176] <213> human
 [0177] <400> 12
 [0178] Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 [0179] 1 5 10 15
 [0180] Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 [0181] 20 25 30
 [0182] Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 [0183] 35 40
 [0184] <210> 13
 [0185] <211> 336
 [0186] <212> DNA
 [0187] <213> human
 [0188] <400> 13
 [0189] agagtgaagt tcagcaggag cgcagagccc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
 [0190] tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
 [0191] cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
 [0192] gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
 [0193] cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
 [0194] tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

[0195]	<210>	14	
[0196]	<211>	112	
[0197]	<212>	PRT	
[0198]	<213>	人	
[0199]	<400>	14	
[0200]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly		
[0201]	1	5	10 15
[0202]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
[0203]		20	25 30
[0204]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
[0205]		35	40 45
[0206]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
[0207]		50	55 60
[0208]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
[0209]		65	70 75 80
[0210]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
[0211]		85	90 95
[0212]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0213]		100	105 110
[0214]	<210>	15	
[0215]	<211>	212	
[0216]	<212>	DNA	
[0217]	<213>	人工序列	
[0218]	<400>	15	
[0219]	gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa	60	
[0220]	cgggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc	120	
[0221]	gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc	180	
[0222]	tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac ag	212	
[0223]	<210>	16	
[0224]	<211>	18	
[0225]	<212>	DNA	
[0226]	<213>	人工序列	
[0227]	<400>	16	
[0228]	gaaggagagg ccaccatg		18
[0229]	<210>	17	
[0230]	<211>	51	
[0231]	<212>	DNA	
[0232]	<213>	人	
[0233]	<400>	17	

[0234]	atgccgctgc tgctactgct gccctgctg tgggcagggg ccctggctat g	51
[0235]	<210> 18	
[0236]	<211> 17	
[0237]	<212> PRT	
[0238]	<213> 人	
[0239]	<400> 18	
[0240]	Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala	
[0241]	1 5 10 15	
[0242]	Met	
[0243]	<210> 19	
[0244]	<211> 578	
[0245]	<212> DNA	
[0246]	<213> 人工序列	
[0247]	<400> 19	
[0248]	ctccccccc cetaacgta ctggccgaag ccgcttggaa taaggccggt gtgcgtttgt	60
[0249]	ctatatgtta ttttccacca tattgcccgc ttttggcaat gtgagggccc ggaaacctgg	120
[0250]	ccctgtcttc ttgacgagca ttccctagggg tctttcccct ctcgcaaag gaatgcaagg	180
[0251]	tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc	240
[0252]	tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaacc ccacctggc gacaggtgcc tctgcgcca	300
[0253]	aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa ggcggcacia cccacgtgcc acgttgtgag	360
[0254]	ttgatagtt gtggaaagag tcaaatggct ctcctcaagc gtattcaaca aggggctgaa	420
[0255]	ggatgcccag aaggtacccc attgtatggg atctgatctg gggcctcggg gcacatgctt	480
[0256]	tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg gggacgtggt	540
[0257]	tttcctttga aaaacacgat gataatatgg ccacacat	578
[0258]	<210> 20	
[0259]	<211> 591	
[0260]	<212> DNA	
[0261]	<213> 人工序列	
[0262]	<400> 20	
[0263]	gtgaggagta agaggagcag gctcctgcac agtgactaca tgaacatgac tccccgccgc	60
[0264]	ccccggccca cccgcaagca ttaccagecc tatgcccac cacgcgactt cgcagcctat	120
[0265]	cgctccaaac ggggcagaaa gaaactcctg tatatatcca aacaaccatt tatgagacca	180
[0266]	gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt agctgccgat ttccagaaga agaagaagga	240
[0267]	ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg agcgcagagc ccccccgta ccagcagggc	300
[0268]	cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac	360
[0269]	aagagacgtg gccgggacct tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa	420
[0270]	ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg	480
[0271]	aaagcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accaggtct cagtacagcc	540
[0272]	accaaggaca cctacgacgc cttcacatg caggccctgc ccctcgccta a	591

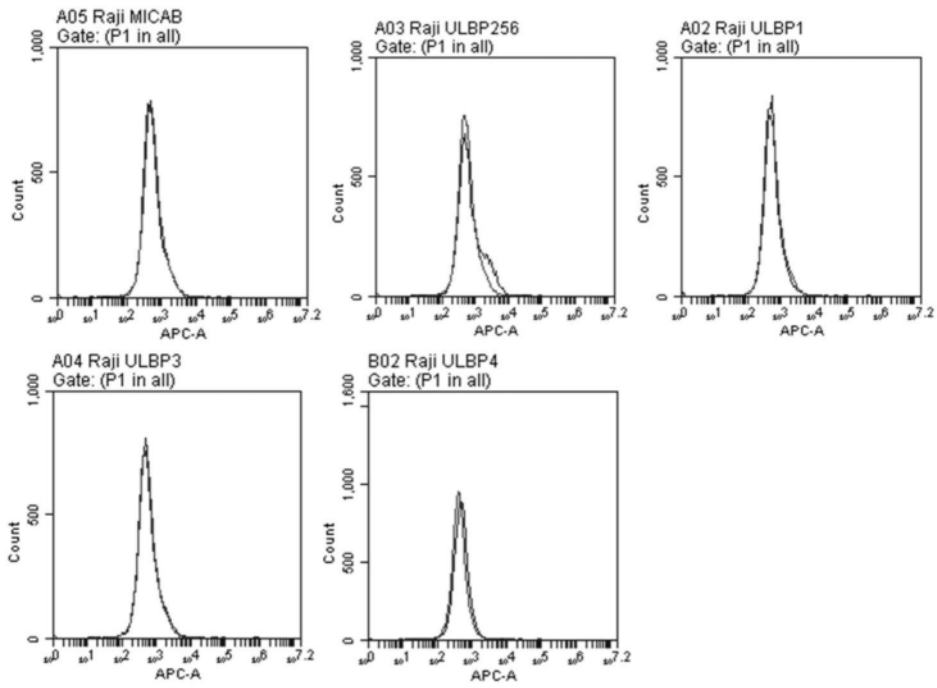
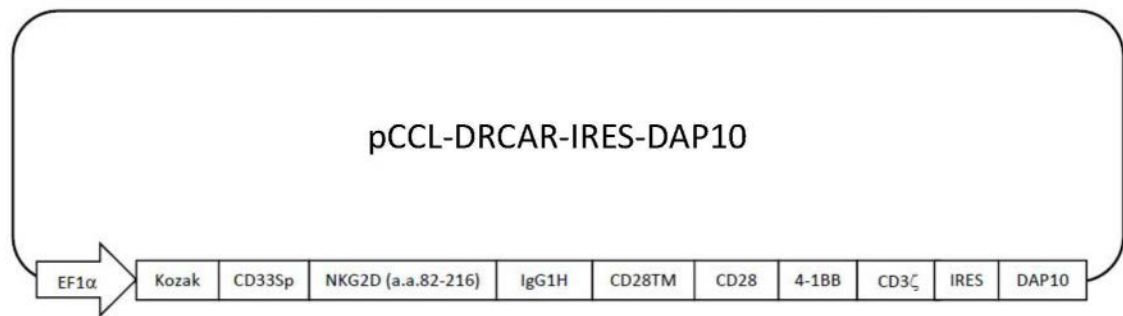


图1

A



B

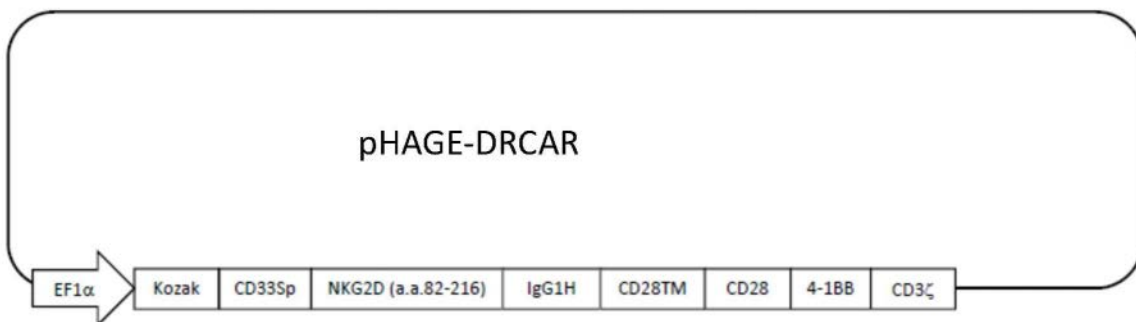


图2

GTTAACGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACGGGTGCCT
AGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGA
GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGAAGGAGA
 GGCCACCATGATGCCGCTGCTGCTACTGCTGCCCTGCTGTGGGCAGGGGCCCTGGCTATGTTATTCAACCAAGAAGTTC
 AAATTCCTTGACCGAAAGTTACTGTGGCCATGTCTAAAACTGGATATGTTACAAAAATAACTGCTACCAATTTTTGATGAG
 AGTAAAACTGGTATGAGAGCCAGGCTTCTGTATGTCTCAAAATGCCAGCCTTCTGAAAGTATACAGCAAAGAGGACCAGGATTT
 ACTTAACTGGTGAAGTCATATCATTGGATGGGACTAGTACACATTCCAACAAATGGATCTTGGCAGTGGGAAGATGGCTCCATTC
 TCTACCCAACTACTAACAATAATTGAAATGCAGAAGGGAGACTGTGCACCTATGCCTCGAGCTTTAAAGGCTATATAGAAAAC
 TGTTCACTCCAATACATACATCTGCATGCAAAGGACTGTGCCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCC
CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTCAGCGT
CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGG
ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC
TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATATCTACATCTGGGCGCCCTGGCCGGGACTGTG
 GGGTCTTCTCCTGCTACTGGTTATCACCCCTTACTGCGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGACTACAT
GAACATGACTCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCACCACGCGACTTCGACGCCT
ATCGTCTCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGAT
 GGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAGCCCCC
GCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC
AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATG
AACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGG
GCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCC
CTCGCTAAATCGGATCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTG
TATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTCTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTGACGAGC
ATCCTAGGGGTCTTCCCCTCTCGCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGG
AAGCTTCTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCT
CTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGAT
AGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCA
TTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGCTTAGGC
CCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACAGATGATAATATGGCCACACATCTCGAGATGATCCATC
TGGGTCACATCCTTCTGCTTTTGTCCAGTGGCTGCAGCTCAGACGACTCCAGGAGAGAGATCATCACTCCCT
GCCTTTACCCTGGCACTTCAGGCTCTTGTCCGGATGTGGTCCCTCTCTGCCGCTCCTGGCAGGCCTCGTGGCT
GCTGATGCGGTGGCATCGCTGCTCATCGTGGGGGCGGTGTTCTGTGCGCACGCCACGCCGAGCCCCGCCAAAG
AAGATGGCAAAGTCTACATCAACATGCCAGGCAGGGGCTGAGTCGAC

说明：以两种字体（分别为正常字体或**粗体+下划线**）为区分标记，将插入片段中各部分进行间隔和标示。从 5'端到 3'端（图中从左到右）的各部分分别为：1. 酶切位点或连接片段；2. EF1 α 启动子；3. Kozak；4. CD33 前导序列；5. NKG2D (a.a.82-216)；6. IgG1H；7. CD28 跨膜结构域；8. CD28 的胞内信号传导结构域；9. 4-1BB 胞内信号传导结构域；10. CD3 ζ 的胞内信号传导结构域；11. 酶切位点或连接片段；12. IRES；13. 酶切位点或连接片段；14. DAP10；15. 酶切位点序列。

图3

GTTAACGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACGGGTGCCT
AGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGA
GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGAAGGAGA
 GGCCACCATGATGCCGCTGCTGCTACTGCTGCCCTGCTGTGGGCAGGGGCCCTGGCTATGTTATTCAACCAAGAAGTTC
 AAATTCCTTGACCGAAAGTTACTGTGGCCATGTCTAAAAACTGGATATGTTACAAAAATAACTGCTACCAATTTTTTGATGAG
 AGTAAAAACTGGTATGAGAGCCAGGCTTCTGTATGTCTCAAAATGCCAGCCTTCTGAAAGTATACAGCAAAGAGGACCAGGATTT
 ACTTAAACTGGTGAAGTCATATCATTGGATGGGACTAGTACACATTCCAACAAATGGATCTTGGCAGTGGGAAGATGGCTCCATTC
 TCTACCCAACTACTAACAATAATTGAAATGCAGAAGGGAGACTGTGCACCTATGCCTCGAGCTTTAAAGGCTATATAGAAAAC
 TGTTCAACTCCAATACATACATCTGCATGCAAAGGACTGTGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCC
CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTCAGCGT
CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGG
ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC
TACAGCAAGCTACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATCTACATCTGGGCGCCCTGGCCGGGACTTGT
 GGGTCTCTCTCTGCTACTGGTTATCACCTTTACTGCGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACAT
GAACATGACTCCCGCCGCCCGGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCACCACGCGACTTCGACGCCT
ATCGTCCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGAT
 GGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAGCCCCC
CGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC
AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATG
AACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGG
GCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCC
CTCGCTAAGTCGAC

说明：以两种字体（分别为正常字体或**粗体+下划线**）为区分标记，将插入片段中各部分进行间隔和标示。从 5'端到 3'端（图中从左到右）的各部分分别为：1. 酶切位点或连接片段；2. EF1α启动子；3. Kozak；4. CD33 前导序列；5. NKG2D (a.a.82-216)；6. IgG1H；7. CD28 跨膜结构域；8. CD28 的胞内信号传导结构域；9. 4-1BB 胞内信号传导结构域；10. CD3ζ 的胞内信号传导结构域；11. 酶切位点或连接片段。

图4

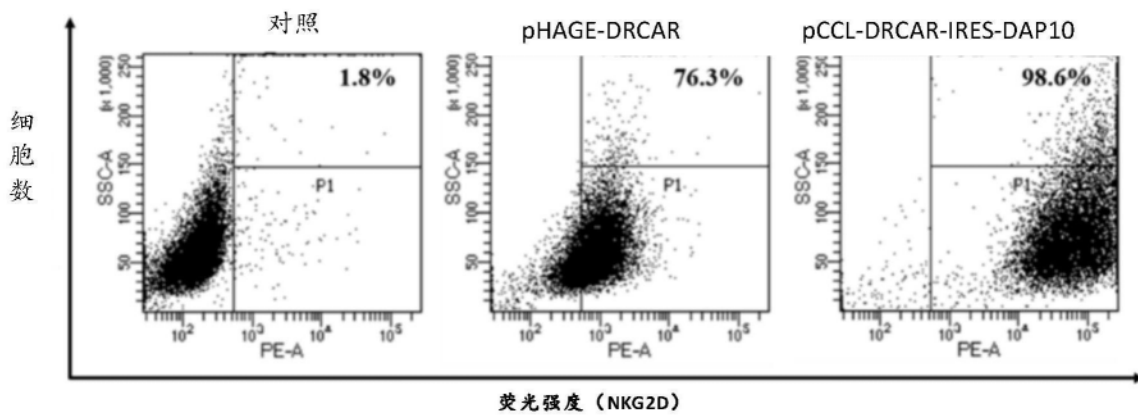
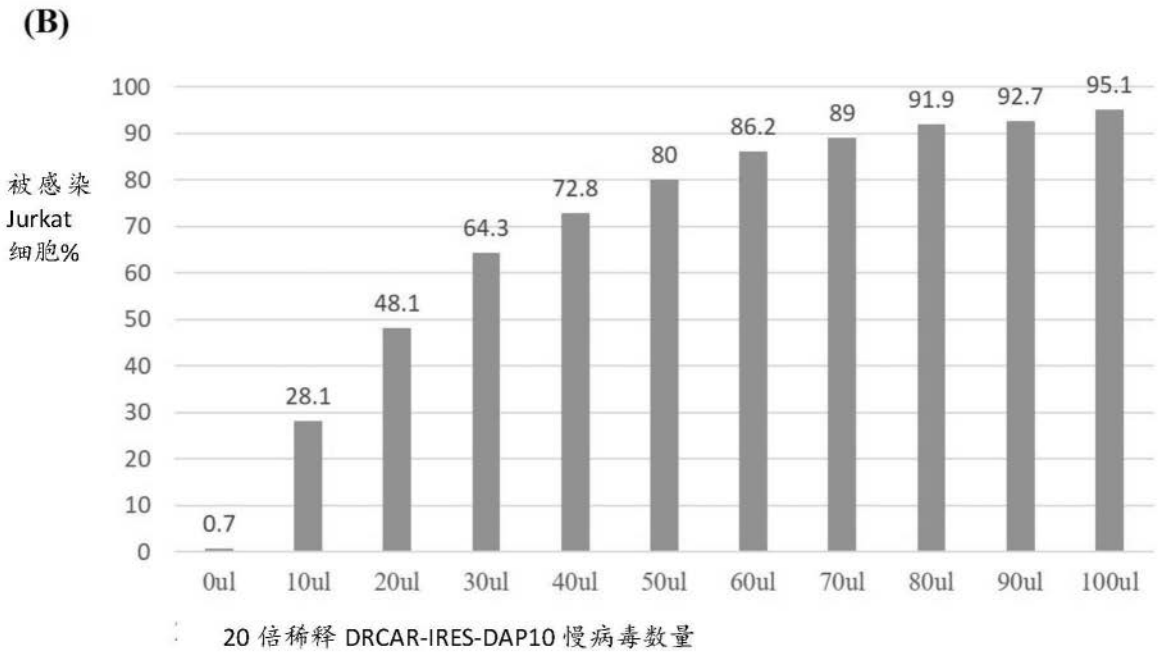
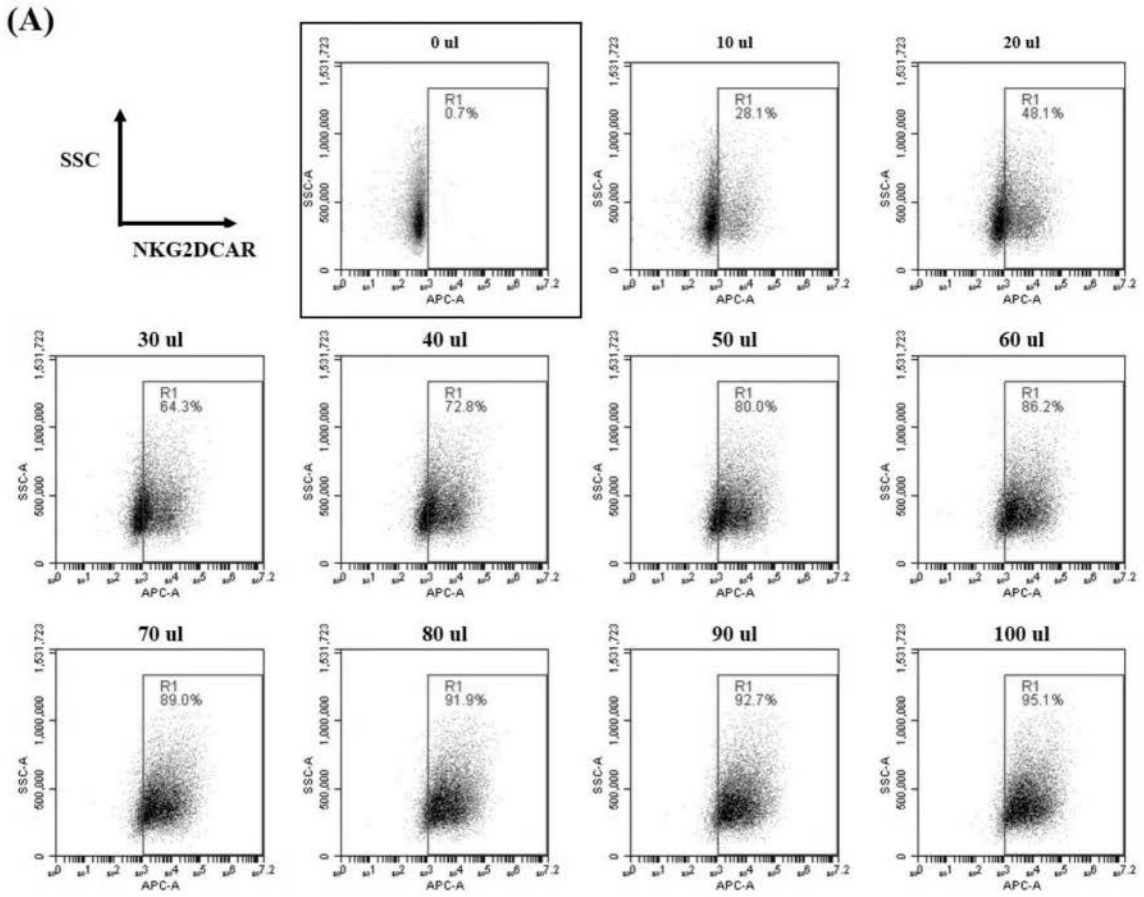


图5



(C)

$$\text{慢病毒滴度(TU/ml)} = \frac{\text{细胞个数} \times \text{阳性报告子细胞}\% \times \text{稀释因子}}{\text{载体体积(ml)} \times 100} = 2 \times 10^7 \text{ TU/ml}$$

图6

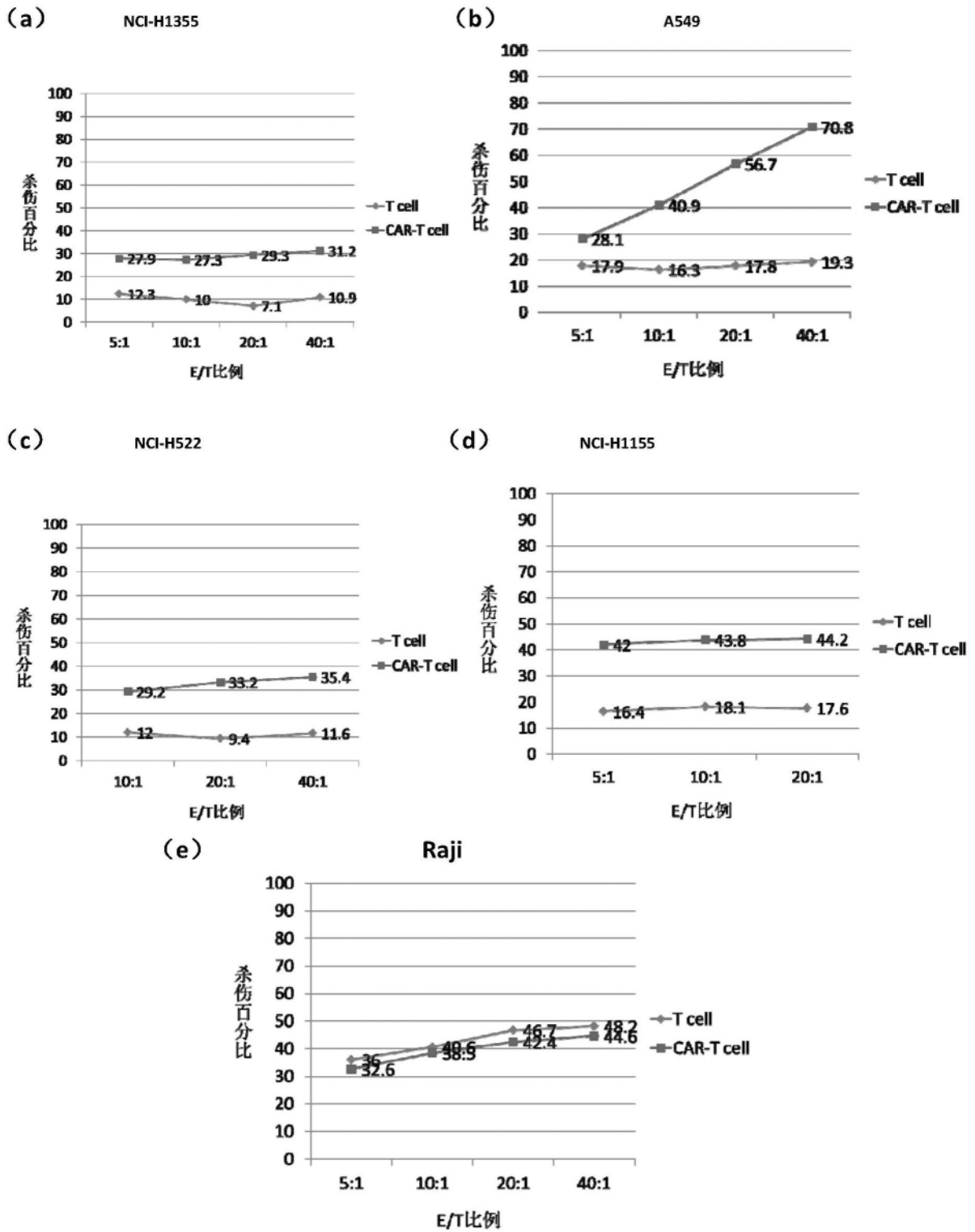


图7

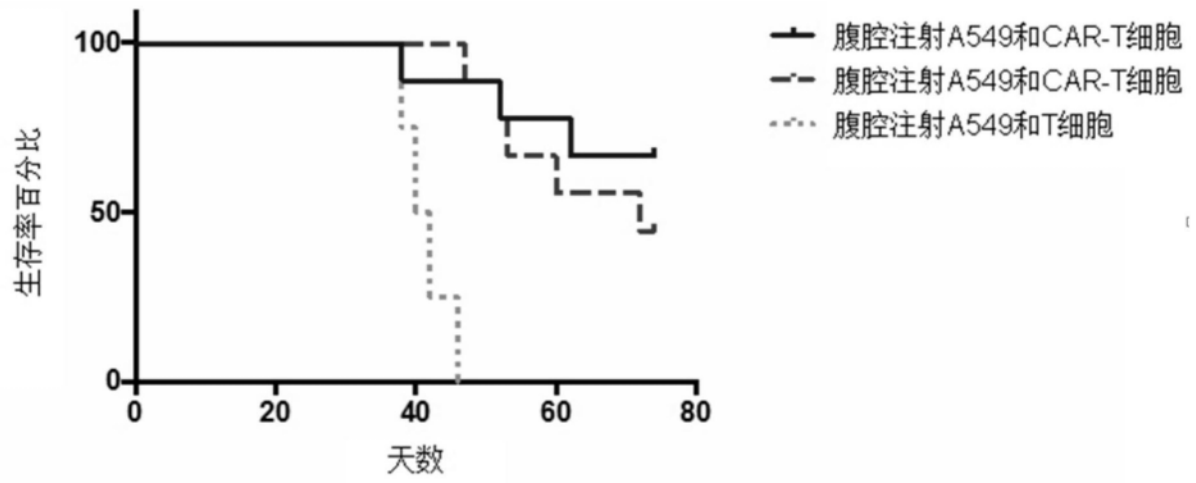


图8