



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116179495 A

(43) 申请公布日 2023.05.30

(21) 申请号 202211505642.8

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2022.11.28

(71) 申请人 上海恩凯细胞技术有限公司

地址 201318 上海市浦东新区周浦镇半夏路100弄7号

(72) 发明人 张彩 胡渊 陈敏华 王焯
伏永玲

(74) 专利代理机构 北京知帆远景知识产权代理有限公司 11890

专利代理师 肖阳

(51) Int. Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

权利要求书4页 说明书17页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

转基因免疫细胞及其应用

(57) 摘要

本发明提出一种转基因免疫细胞及其应用,所述免疫细胞表达嵌合抗原受体以及免疫刺激分子,所述免疫刺激分子包括IL-15。所述转基因免疫细胞能够同时表达和分泌嵌合抗原受体和免疫刺激分子,使得免疫细胞能够靶向对应抗原,定位至表达所述抗原的细胞表面,此外,所述免疫刺激分子进一步促进免疫细胞的活化和增殖,维持免疫细胞在肿瘤局部微环境中的数量和活性,使其保持强大的肿瘤杀伤活性,有效避免全身高剂量或反复多次注射带来的毒副作用。

1. 一种转基因免疫细胞,其特征在于,所述免疫细胞表达嵌合抗原受体以及免疫刺激分子,所述免疫刺激分子包括IL-15。

2. 根据权利要求1所述的转基因免疫细胞,其特征在于,所述嵌合抗原受体包括:

胞外区,所述胞外区能够与抗原特异性结合;

跨膜区;以及

胞内区,所述胞内区包括免疫共刺激分子胞内段和信号转导结构域;

其中,所述胞外区的C端与所述跨膜区的N端相连,所述跨膜区的C端与所述胞内区的N端相连。

3. 根据权利要求2所述的转基因免疫细胞,其特征在于,所述抗原是肿瘤相关抗原。

4. 根据权利要求2所述的转基因免疫细胞,其特征在于,所述胞外区包括抗体的重链可变区和轻链可变区,所述抗体结合所述抗原。

5. 根据权利要求2所述的转基因免疫细胞,其特征在于,所述抗体为单链抗体。

6. 根据权利要求2所述的转基因免疫细胞,其特征在于,所述抗原包括选自间皮素、HER2、EGFR、GPC3、MUC1、CEA、CLDN 18.2、EpCAM、GD2、PSCA、CD133、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、BCMA中的至少之一;

优选地,所述抗原为间皮素;

任选地,所述胞外区包括抗间皮素单链抗体;

任选地,所述抗间皮素单链抗体包括抗间皮素抗体的轻链可变区、连接肽1以及抗间皮素抗体的重链可变区;

任选地,所述连接肽1具有(GGGGS)_n所示的氨基酸序列,其中n为大于或等于1的整数,优选为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

任选地,抗间皮素单链抗体包括SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。

7. 根据权利要求6所述的转基因免疫细胞,其特征在于,所述胞外区进一步包括铰链区片段,所述铰链区片段的N端与所述单链抗体的C端相连;

任选地,所述铰链区片段包括选自CD8、CD28和免疫球蛋白的铰链区中的至少之一;

任选地,所述铰链片段包括CD8的铰链区;

任选地,所述铰链片段包括SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

8. 根据权利要求2所述的转基因免疫细胞,其特征在于,所述跨膜区包括选自CD4、CD8 α 、CD28和CD3 ζ 中的至少之一或其片段;

任选地,所述跨膜区包括CD8跨膜区或其片段;

任选地,所述跨膜区具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列。

9. 根据权利要求2所述的转基因免疫细胞,其特征在于,所述免疫共刺激分子包括选自CD28、ICOS、4-1BB、OX40和CD27中的至少之一;

任选地,所述免疫共刺激分子胞内段是4-1BB或CD28的胞内段或其片段;

任选地,所述免疫共刺激分子胞内段包括SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

10. 根据权利要求2所述的转基因免疫细胞,其特征在于,所述免疫共刺激分子胞内段的C端与所述信号转导结构域的N端相连;

任选地,所述信号转导结构域包括选自CD3 ζ 或Fc ϵ RI γ 中的至少之一或其片段;

任选地,所述信号转导结构域包括CD3 ζ 或其片段;

任选地,所述信号转导结构域包括SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。

11. 根据权利要求1所述的转基因免疫细胞,其特征在于,所述免疫细胞包括T细胞和NK细胞中的至少之一,优选为NK细胞;

任选地,所述NK细胞包括选自外周血NK细胞、脐带血NK细胞、诱导多能细胞(iPSC)衍生NK细胞和NK-92细胞中的至少之一;

任选地,所述T细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。

12. 一种分离的核酸,其特征在于,所述分离的核酸包括:

第一核酸分子,所述第一核酸分子编码嵌合抗原受体;以及

第二核酸分子,所述第二核酸分子编码免疫刺激分子,所述免疫刺激分子包括IL-15。

13. 根据权利要求12所述的分离的核酸,其特征在于,所述嵌合抗原受体是如权利要求2~10任一项中所定义的。

14. 根据权利要求12所述的分离的核酸,其特征在于,所述第一核酸分子以及所述第二核酸分子被设置在免疫细胞中表达所述嵌合抗原受体和所述免疫刺激分子,并且所述免疫刺激分子与所述嵌合抗原受体呈非融合形式。

15. 根据权利要求12所述的分离的核酸,其特征在于,进一步包括:

内部核糖体进入位点序列,所述内部核糖体进入位点序列设置在所述第一核酸分子与所述第二核酸分子之间,所述内部核糖体进入位点具有SEQ ID NO:16所示的核苷酸序列。

16. 根据权利要求12所述的分离的核酸,其特征在于,进一步包括:

第三核酸分子,设置在所述第一核酸分子与所述第二核酸分子之间,并且所述第三核酸分子编码连接肽2,所述连接肽2能够在所述免疫细胞中被切割;

任选地,所述连接肽2包括2A肽或其片段;

任选地,所述连接肽2包括P2A、T2A、E2A和F2A中的至少之一或其片段;

任选地,所述连接肽2包括P2A或其片段;

任选地,所述连接肽2包括SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。

17. 根据权利要求12所述的分离的核酸,其特征在于,进一步包括:

第一启动子,所述第一启动子与所述第一核酸分子可操作地连接;以及

第二启动子,所述第二启动子与所述第二核酸分子可操作地连接。

18. 根据权利要求12所述的分离的核酸,其特征在于,所述第一启动子、所述第二启动子分别独立地选自U6、H1、CMV、EF-1、LTR或RSV启动子。

19. 根据权利要求12所述的分离的核酸,其特征在于,进一步包括:

第四核酸分子,所述第四核酸分子编码信号肽;

任选地,所述第四核酸分子与所述第一核酸分子可操作性地相连;

任选地,所述信号肽包括选自CSF2R和CD8 α 中的至少之一或其片段;

任选地,所述信号肽包括CSF2R或其片段;

任选地,所述信号肽包括SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

20. 根据权利要求12~19任一项所述的分离的核酸,其特征在于,所述第一核酸分子具有SEQ IDNO:3、4、5、6和7所示的核苷酸序列中的至少之一;

任选地,所述第二核酸分子具有SEQ ID NO:9所示的核苷酸序列;

任选地,所述第三核酸分子具有SEQ ID NO:8所示的核苷酸序列;

任选地,所述第四核酸分子具有SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列。

21. 一种构建体,其特征在于,所述构建体携带权利要求12~20任一项所述的分离的核酸。

22. 根据权利要求21所述的构建体,其特征在于,所述构建体的载体是非致病性病毒载体;

任选地,所述病毒载体包括选自反转录病毒载体、慢病毒载体和腺病毒相关病毒载体的至少之一。

23. 一种重组细胞,其特征在于,携带权利要求12~20任一项所述的分离的核酸或权利要求21或22所述的构建体;

任选地,所述重组细胞包括真核细胞,优选为哺乳动物细胞。

24. 一种CAR-NK或CAR-T细胞,其特征在于,携带权利要求12~20任一项所述的分离的核酸或权利要求21或22所述的构建体;

任选地,所述NK细胞包括选自外周血NK细胞、脐带血NK细胞、诱导多能细胞(iPSC)衍生NK细胞和NK-92细胞中的至少之一;

任选地,所述T细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。

25. 一种获得病毒的方法,其特征在于,将权利要求21或22所述的构建体导入第一受体细胞;将导入所述的构建体的第一受体细胞进行培养,以便获得所述病毒。

26. 根据权利要求25所述的方法,其特征在于,所述病毒包括慢病毒;

任选地,所述第一受体细胞为293T。

27. 一种病毒,其特征在于,是通过权利要求25或26所述的方法获得的。

28. 一种病毒,其特征在于,包括具有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

29. 一种药物组合物,其特征在于,包括有效量的权利要求1~11任一项所述的转基因免疫细胞、权利要求12~20任一项所述的分离的核酸、权利要求21或22所述的构建体、权利要求23所述的重组细胞、权利要求24所述的CAR-NK或CAR-T细胞或者权利要求27~28任一项所述的病毒。

30. 一种试剂盒,其特征在于,包括:权利要求12~20任一项所述的分离的核酸、权利要求21或22所述的构建体或权利要求27~28任一项所述的病毒。

31. 一种将病毒导入激活免疫细胞的方法,其特征在于,利用权利要求21或22所述的构建体电转或转染所述激活免疫细胞或利用权利要求27~28任一项所述的病毒感染所述激活免疫细胞;

任选地,所述免疫细胞包括T细胞和NK细胞中的至少之一,优选为NK细胞;

任选地,所述NK细胞包括选自外周血NK细胞、脐带血NK细胞、诱导多能细胞(iPSC)衍生NK细胞和NK-92细胞中的至少之一;

任选地,所述T细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。

32. 一种获得嵌合抗原受体和免疫刺激分子的方法,其特征在于,包括:

将权利要求21或22所述的构建体或权利要求27~28任一项所述的病毒导入第二受体细胞;

将导入表达载体或病毒的第二受体细胞进行培养,以便获得所述嵌合抗原受体和免疫刺激分子;

任选地,所述导入第二受体细胞是通过电转、转染或感染的方式进行的;

任选地,所述第二受体细胞为T细胞和NK细胞中的至少之一;

任选地,所述第二受体细胞为NK细胞;

任选地,所述NK细胞包括选自外周血NK细胞、脐带血NK细胞、诱导多能细胞(iPSC)衍生NK细胞和NK-92细胞中的至少之一;

任选地,所述T细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞;

任选地,所述病毒包括慢病毒。

33. 一种获得表达嵌合抗原受体和免疫刺激分子的CAR-NK或CAR-T细胞的方法,其特征在于,包括:

将权利要求21或22所述的构建体或权利要求27~28任一项所述的病毒导入NK细胞或T细胞;

将导入所述构建体或病毒的NK细胞或T细胞进行培养,以便获得所述CAR-NK或CAR-T细胞;

任选地,所述导入NK细胞或T细胞是通过电转、转染或感染的方式进行的;

任选地,所述NK细胞包括选自外周血NK细胞、脐带血NK细胞、诱导多能细胞(iPSC)衍生NK细胞和NK-92细胞中的至少之一;

任选地,所述T细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。

34. 权利要求1~11任一项所述的转基因免疫细胞、权利要求12~20任一项所述的分离的核酸、权利要求21或22所述的构建体、权利要求23所述的重组细胞、权利要求24所述的CAR-NK或CAR-T细胞或权利要求27~28任一项所述的病毒在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于治疗或预防肿瘤;

任选地,所述肿瘤包括间皮素阳性肿瘤、HER2阳性肿瘤、EGFR阳性肿瘤、GPC3阳性肿瘤、MUC1阳性肿瘤、CEA阳性肿瘤、CLDN 18.2阳性肿瘤、EpCAM阳性肿瘤、GD2阳性肿瘤、PSCA阳性肿瘤、CD133阳性肿瘤、CD19阳性肿瘤、CD20阳性肿瘤、CD22阳性肿瘤、CD30阳性肿瘤、CD33阳性肿瘤和BCMA阳性肿瘤中的至少之一;

任选地,所述间皮素阳性肿瘤包括胰腺癌、卵巢癌、间皮瘤、胆管癌和肺癌中的至少之一。

35. 权利要求12~20任一项所述的分离的核酸、权利要求21或22所述的构建体或权利要求27~28任一项所述的病毒在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于促进NK细胞或T细胞活化或者增殖;

任选地,所述NK细胞包括选自外周血NK细胞、脐带血NK细胞、诱导多能细胞(iPSC)衍生NK细胞和NK-92细胞中的至少之一;

任选地,所述T细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。

转基因免疫细胞及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地,本发明涉及转基因免疫细胞及其应用。

背景技术

[0002] 近年来,嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptorT,CAR-T)细胞在血液恶性肿瘤治疗中取得了令人瞩目的效果。但是CAR-T细胞在临床应用中易产生细胞因子风暴、神经毒性、GVHD等不良反应,而且,CAR-T细胞对实体瘤的治疗效果尚不理想,使得CAR-T细胞的临床应用仍面临挑战。

[0003] CAR-NK细胞较CAR-T细胞具有安全性好的优势,一般不会引起细胞因子风暴和GVHD等副作用;且NK细胞不需要抗原递呈、不受MHC限制,即可发挥直接的杀伤肿瘤细胞的作用;CAR-NK细胞可以以CAR依赖和NKR依赖等多种识别机制识别和杀伤肿瘤,抗癌谱广。因此,CAR-NK细胞在抗肿瘤治疗中具有广泛的应用前景,已成为细胞免疫治疗研发领域的热点。然而,CAR-NK细胞研发过程中面临的难题之一是NK细胞在体内的存活时间较短,影响了其在体内效应的发挥。

[0004] IL-15为一种能促进T细胞和NK细胞存活、增殖和功能的细胞因子,IL-15与IL-2共用IL-2/15R β γ c受体,IL-15和IL-15R α 形成二聚体后结合IL-15R β γ c激活下游JAK1/JAK3和STAT3/STAT5信号通路,进而促进NK细胞的增殖、活化和效应功能。因此,IL-15已成为增强淋巴细胞在体内的持久性和增殖活性的药物研发热门靶点。

[0005] 但是,IL-15在体内应用存在的问题是半衰期短、体内药效有限,需要使用较大的剂量,且要频繁施用,导致各种副作用,包括低血压、血小板减少、AST与ALT升高等,这可能导致癌症患者不能耐受这种治疗。临床应用和药物研发中应尽量保持IL-15的促进淋巴细胞增殖与持久性及促进免疫应答的活性,同时尽可能降低IL15相关的副作用。

[0006] 基于以上研究和开发现状,有待于进一步研究安全有效的提高CAR-NK细胞体内持久性的方法。

发明内容

[0007] 本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。为此,本发明提出了一种转基因免疫细胞,其增殖能力和体内存活时间,以及其抗肿瘤能力都较天然的免疫细胞得到显著提高,且具有更高的安全性。

[0008] 因此,在本发明的第一方面,本发明提出了一种转基因免疫细胞。根据本发明的实施例,所述免疫细胞表达嵌合抗原受体以及免疫刺激分子,所述免疫刺激分子包括IL-15。根据本发明实施例的所述转基因免疫细胞能够同时表达和分泌嵌合抗原受体和免疫刺激分子。其中,所述嵌合抗原受体能够使得免疫细胞靶向对应抗原,定位至表达所述抗原的细胞表面,此外,所述免疫刺激分子进一步促进免疫细胞的活化和增殖,维持免疫细胞在肿瘤局部微环境中的数量和活性,使其保持强大的肿瘤杀伤活性,能够有效避免全身高剂量或反复多次注射带来的毒副作用。

[0009] 根据本发明的实施例,上述转基因免疫细胞还可以包括下列附加技术特征中的至少之一:

[0010] 根据本发明的实施例,所述嵌合抗原受体包括:胞外区,所述胞外区能够与抗原特异性结合;跨膜区;以及胞内区,所述胞内区包括免疫共刺激分子胞内段和信号转导结构域;其中,所述胞外区的C端与所述跨膜区的N端相连,所述跨膜区的C端与所述胞内区的N端相连。本申请中,所述嵌合抗原受体识别的抗原种类不受特别限制,适用于特异性识别多种抗原。

[0011] 根据本发明的实施例,所述抗原是肿瘤相关抗原。根据发明的一些具体实施例,所述抗原的种类不受特别限制。

[0012] 根据本发明的实施例,所述胞外区包括抗体的重链可变区和轻链可变区,所述抗体结合所述抗原。本领域技术人员可以理解,所述胞外区包括识别所述抗原的结合区即可,所述胞外区可以包括全抗抗体、Fab抗体、Fab'抗体、F(ab')₂抗体、Fv抗体、单链抗体以及纳米抗体中的至少之一。根据本发明的一些优选的实施例,所述胞外区包括单链抗体。

[0013] 根据本发明的实施例,所述抗原包括选自间皮素、HER2、EGFR、GPC3、MUC1、CEA、CLDN 18.2、EpCAM、GD2、PSCA、CD133、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、BCMA中的至少之一。

[0014] 根据本发明的实施例,所述抗原为间皮素。根据本发明的一些具体实施例,当所述抗原为间皮素时,所述转基因免疫细胞能够有效靶向间皮素阳性肿瘤,并保留较高的增殖活性,具有较高的抗肿瘤能力。

[0015] 根据本发明的实施例,所述胞外区包括抗间皮素单链抗体。

[0016] 根据本发明的实施例,所述抗间皮素单链抗体包括抗间皮素抗体的轻链可变区、连接肽1以及抗间皮素抗体的重链可变区。

[0017] 根据本发明的实施例,所述连接肽1具有(GGGGS)_n所示的氨基酸序列,其中n为大于或等于1的整数,优选为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0018] 根据本发明的实施例,抗间皮素单链抗体包括SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。在一些具体的实施例中,当所述抗间皮素单链抗体具有上述氨基酸序列时,所述转基因免疫细胞能够有效靶向间皮素阳性肿瘤,并保留较高的增殖活性,具有较高的抗肿瘤能力。

[0019] 根据本发明的实施例,所述胞外区进一步包括铰链区片段,所述铰链区片段的N端与所述单链抗体的C端相连。

[0020] 根据本发明的实施例,所述铰链区片段包括选自CD8、CD28和免疫球蛋白的铰链区中的至少之一。

[0021] 根据本发明的实施例,所述铰链片段包括CD8的铰链区。

[0022] 根据本发明的实施例,所述铰链片段包括SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

[0023] 根据本发明的实施例,所述跨膜区包括选自CD4、CD8 α 、CD28和CD3 ζ 中的至少之一或其片段。

[0024] 根据本发明的实施例,所述跨膜区包括CD8跨膜区或其片段。

[0025] 根据本发明的实施例,所述跨膜区具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列。

[0026] 根据本发明的实施例,所述免疫共刺激分子包括选自CD28、ICOS、4-1BB、OX40和CD27中的至少之一。

[0027] 根据本发明的实施例,所述免疫共刺激分子胞内段是4-1BB或CD28的胞内段或其

片段。

[0028] 根据本发明的实施例,所述免疫共刺激分子胞内段包括SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0029] 根据本发明的实施例,所述免疫共刺激分子胞内段的C端与所述信号转导结构域的N端相连。

[0030] 根据本发明的实施例,所述信号转导结构域包括选自CD3 ζ 或Fc ϵ RI γ 中的至少之一或其片段。

[0031] 本领域技术人员可以理解,所述铰链区、跨膜区、免疫共刺激分子胞内段和信号转导结构域的选择不受特别限制,本领域常规的嵌合抗原受体中可用的铰链区、跨膜区、免疫共刺激分子胞内段和信号转导结构域均可以使用。

[0032] 根据本发明的实施例,所述信号转导结构域包括CD3 ζ 或其片段。

[0033] 根据本发明的实施例,所述信号转导结构域包括SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。

[0034] 根据本发明的实施例,所述免疫细胞包括T细胞和NK细胞中的至少之一。本申请中,所述免疫刺激分子的种类并不受特别限制,能够促进T细胞和NK细胞中的至少之一的免疫功能的促进因子均可以使用,本申请的一些具体实施例中,所述免疫刺激分子为IL-15。

[0035] 根据本发明的实施例,所述免疫细胞优选为NK细胞。

[0036] 根据本发明的实施例,所述NK细胞包括选自外周血NK细胞、脐带血NK细胞、诱导多能细胞(iPSC)衍生NK细胞和NK-92细胞中的至少之一。

[0037] 根据本发明的实施例,所述T细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和 γ δ T细胞。

[0038] 在本发明的第二方面,本发明提出了一种分离的核酸。根据本发明的实施例,所述分离的核酸包括:1) 第一核酸分子,所述第一核酸分子编码嵌合抗原受体;2) 第二核酸分子,所述第二核酸分子编码免疫刺激分子,所述免疫刺激分子包括IL-15。IL-15是一种多效性细胞因子,具有激活T细胞、B细胞和NK细胞,并可介导这些细胞的增殖和存活的功能。此外,IL-15能激活、维持和扩增CD8⁺记忆性T细胞,而不激活调节性T淋巴细胞。根据本发明实施例的分离的核酸导入受体细胞后能够包装出较高滴度的病毒,并实现病毒对免疫细胞的特异性感染,如NK细胞。将所述分离的核酸导入免疫细胞后,所述免疫细胞能够同时表达和分泌嵌合抗原受体和免疫刺激分子,使得免疫细胞能够靶向对应抗原,定位至表达所述抗原的细胞表面,此外,免疫刺激分子,如IL-15进一步促进免疫细胞的活化和增殖,维持免疫细胞在肿瘤局部微环境中的数量和活性,使其保持强大的肿瘤杀伤活性,有效避免全身高剂量或反复多次注射带来的毒副作用,还能避免全身应用高剂量或反复多次注射重组IL-15带来的毒副作用。

[0039] 根据本发明的实施例,上述分离的核酸还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0040] 根据本发明的实施例,所述嵌合抗原受体是如第一方面所定义的。

[0041] 根据本发明的实施例,所述第一核酸分子以及所述第二核酸分子被设置在免疫细胞中表达所述嵌合抗原受体和所述免疫刺激分子,并且所述免疫刺激分子与所述嵌合抗原受体呈非融合形式。

[0042] 根据本发明的实施例,所述分离的核酸进一步包括:内部核糖体进入位点序列,所

述内部核糖体进入位点序列设置在所述第一核酸分子与所述第二核酸分子之间,所述内部核糖体进入位点具有SEQ ID NO:16所示的核苷酸序列。

[0043] 根据本发明的实施例,所述分离的核酸进一步包括第三核酸分子,所述第三核酸分子设置在所述第一核酸分子与所述第二核酸分子之间,所述第三核酸分子编码连接肽2,所述连接肽2能够被切割。所述连接肽2能够将所述第一核酸分子与第二核酸分子隔开,减少二者功能干扰。

[0044] 根据本发明的实施例,所述连接肽2包括2A肽或其片段。本领域技术人员可以理解,所述连接肽2不受特别限制,常规的具有自切割功能的肽均可使用。

[0045] 根据本发明的实施例,所述连接肽2包括P2A、T2A、E2A和F2A中的至少之一或其片段。

[0046] 根据本发明的实施例,所述连接肽2包括P2A或其片段。

[0047] 根据本发明的实施例,所述连接肽2包括SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。

[0048] 根据本发明的实施例,所述分离的核酸进一步包括:第一启动子,所述第一启动子与所述第一核酸分子可操作地连接;以及第二启动子,所述第二启动子与所述第二核酸分子可操作地连接。

[0049] 根据本发明的实施例,所述第一启动子、所述第二启动子分别独立地选自U6、H1、CMV、EF-1、LTR或RSV启动子。

[0050] 根据本发明的实施例,所述分离的核酸还包括第四核酸分子,所述第四核酸分子编码信号肽。根据本发明的具体实施例,所述编码信号肽的基因表达的信号肽位于嵌合抗原受体的氨基末端,是嵌合抗原受体膜定位端肽,在帮助嵌合抗原受体定位到内质网上,蛋白成熟后就水解脱离,因此,病毒颗粒上的嵌合抗原受体并不含有该信号肽。

[0051] 根据本发明的实施例,所述第四核酸分子与所述第一核酸分子可操作性地相连。

[0052] 根据本发明的实施例,所述信号肽包括选自CSF2R和CD8 α 中的至少之一或其片段。本领域技术人员可以理解,所述信号肽的种类不受特别限制,本领域常规信号肽均可以使用。

[0053] 根据本发明的实施例,所述信号肽包括CSF2R或其片段。

[0054] 根据本发明的实施例,所述信号肽包括SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

[0055] 根据本发明的实施例,所述第一核酸分子具有SEQ ID NO:3、4、5、6和7所示的核苷酸序列中的至少之一。

[0056] 根据本发明的实施例,所述第二核酸分子具有SEQ ID NO:9所示的核苷酸序列。

[0057] 根据本发明的实施例,所述第三核酸分子具有SEQ ID NO:8所示的核苷酸序列。

[0058] 根据本发明的实施例,所述第四核酸分子具有SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列。

[0059] 根据本发明的实施例,所述分离的核酸具有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

[0060] 在本发明的第三方面,本发明提出了一种构建体。根据本发明的实施例,所述构建体携带前面所述的分离的核酸。在将上述分离的核酸连接到载体上时,可以将所述分离的核酸与载体上的控制元件直接或者间接相连,只要这些控制元件能够控制所述分离的核酸的翻译和表达等即可,即所述分离的核酸与控制元件进行可操作地连接。当然,这些控制元件可以直接来自于载体本身,也可以是外源性的,即并非来自于载体本身。

[0061] 根据本发明的实施例,上述构建体还可以进一步包括如下附加技术特征至少之

一：

[0062] 根据本发明的实施例，所述构建体的载体是非致病性病毒载体。根据本发明的一些具体实施例，当所述表达载体为病毒载体时，具有较高的表达效率。

[0063] 根据本发明的实施例，所述病毒载体包括选自反转录病毒载体、慢病毒载体或腺病毒相关病毒载体的至少之一。

[0064] 在本发明的第四方面，本发明提出了一种重组细胞。根据本发明的实施例，所述重组细胞携带前面所述的分离的核酸或构建载体。根据本发明实施例的重组细胞可用于在适合条件下体外表达和大量获得前面所述的分离的核酸所编码的蛋白质，如嵌合抗原受体和免疫刺激分子，如IL-15和间皮素。

[0065] 根据本发明的实施例，上述重组细胞还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

[0066] 根据本发明的实施例，所述重组细胞包括真核细胞，优选为哺乳动物细胞。

[0067] 需要注意的是，本发明所述重组细胞不受特别限制，可以为原核细胞、真核细胞或噬菌体。示例性的，所述原核细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、链霉菌或奇异变形菌等；所述真核细胞包括巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌，草地粘虫等昆虫细胞，烟草等植物细胞，BHK细胞、CHO细胞、COS细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。在一些实施例中，本发明所述重组细胞优选为哺乳动物细胞，包括T细胞、B细胞、NK细胞、BHK细胞、CHO细胞、NSO细胞或COS细胞，且不包括动物生殖细胞、受精卵或胚胎干细胞。

[0068] 在本发明的第五方面，本发明提出了一种CAR-NK或CAR-T细胞。根据本发明的实施例，所述CAR-NK细胞携带前面所述的分离的核酸或构建体。根据本发明实施例的所述CAR-NK细胞能够同时表达和分泌嵌合抗原受体以及免疫刺激分子。发明人在实验中发现，本发明所提出的IL-15修饰策略可使NK细胞或T细胞在肿瘤局部分泌IL-15，明显提高CAR-NK细胞或T细胞的体内外增殖能力，增强NK细胞或T细胞的体内存活时间，提高NK细胞或T细胞的体内抗肿瘤功能。且这种在局部持续缓慢释放的IL-15可避免全身应用重组IL-15或反复多次给药所带来的毒副作用。

[0069] 根据本发明的一些实施例，所述NK细胞包括选自外周血NK细胞、脐带血NK细胞、诱导多能细胞(iPSC)衍生NK细胞和NK-92细胞中的至少之一。

[0070] 根据本发明的实施例，所述T细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。

[0071] 在本发明的第六方面，本发明提出了一种获得病毒的方法。根据本发明的实施例，将前面所述的构建体导入第一受体细胞；将导入构建体的第一受体细胞进行培养，以便获得所述病毒。根据本发明一些优选的实施例的方法能够获得较高滴度的病毒。

[0072] 根据本发明的实施例，所述病毒包括慢病毒。

[0073] 根据本发明的实施例，所述第一受体细胞为293T。

[0074] 在本发明的第七方面，本发明提出了一种病毒。根据本发明的实施例，是通过前面所述的获得病毒的方法获得的。

[0075] 在本发明的第八方面，本发明提出了一种病毒。根据本发明的实施例，所述病毒包括具有SEQ IDNO:1所示的核苷酸序列。

[0076] 根据本发明的实施例，所述病毒包括反转录病毒、慢病毒和腺病毒中的至少之一。

[0077] 根据本发明的实施例，所述病毒包括慢病毒。

[0078] 在本发明的第八方面,本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例,所述药物组合物包括:前面所述的分离的转基因免疫细胞、核酸、构建体、重组细胞、CAR-NK或CAR-T细胞或者病毒。如前所述,所述分离的核酸、表达载体或者携带所述分离的核酸或表达载体的细胞或病毒能够同时表达和分泌嵌合抗原受体和免疫刺激分子,使得免疫细胞能够靶向对应抗原,定位至表达所述抗原的细胞表面,此外,免疫刺激分子,如IL-15进一步促进免疫细胞的活化和增殖,维持免疫细胞在肿瘤局部微环境中的数量和活性,使其保持强大的肿瘤杀伤活性,有效避免全身高剂量或反复多次注射带来的毒副作用,还能避免全身应用高剂量或反复多次注射重组IL-15带来的毒副作用。因此,包含上述物质的药物组合物同样具备上述功能,此处不再累述。

[0079] 根据本发明的实施例,上述药物组合物还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0080] 根据本发明的实施例,所述药物组合物进一步包括药学上可接受的载体,除了任何常规的辅料与本发明的化合物不相容的范围,例如所产生的任何不良的生物效应或与药学上可接受的组合物的任何其他组分以有害的方式产生的相互作用,它们的用途也是本发明所考虑的范围。

[0081] 例如,本发明的分离的核酸、表达载体或者携带分离的核酸或表达载体的细胞可掺入适用于胃肠外施用(例如静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内)的药物中。这些药物可以被制备成各种形式。例如液体、半固体和固体剂型等,包括但不限于液体溶液(例如,注射溶液和输注溶液)、分散剂或悬浮剂、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。典型的药物为注射溶液或输注溶液形式。所述分离的核酸、表达载体或者携带分离的核酸或表达载体的细胞可通过静脉输注或注射或肌肉内或皮下注射来施用。

[0082] 本发明所述的分离的核酸、表达载体或者携带分离的核酸或表达载体的细胞的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于:所述的活性成分的药代动力学参数例如生物利用率、代谢、半衰期等;患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。例如,依据治疗状况的迫切要求,可每天给予若干次分开的剂量,或将剂量按比例地减少。

[0083] 在本发明的第十方面,本发明提出了一种试剂盒。根据本发明的实施例,所述试剂盒包括:前面所述的分离的核酸、构建体或病毒。所述分离的核酸、构建体或者病毒能够显著促进NK细胞或T细胞的活化或者增殖,因此,包含上述物质的试剂盒同样具备促进NK细胞或T细胞的活化或者增殖的功能。所述试剂盒可以用于科学研究,如逆转增殖活性低的NK细胞或者T细胞,使其增殖活性由低升高,以获得符合预期的生物样本。

[0084] 在本发明的第十一方面,本发明提出了一种将病毒导入激活免疫细胞的方法。根据本发明的实施例,利用前面所述的构建体电转或转染所述激活免疫细胞或利用前面所述的病毒感染所述激活免疫细胞。

[0085] 根据本发明的实施例,所述免疫细胞包括T细胞和NK细胞中的至少之一。

[0086] 根据本发明的实施例,所述免疫细胞优选为NK细胞。

[0087] 根据本发明的实施例,所述NK细胞包括选自外周血NK细胞、脐带血NK细胞、诱导多能细胞(iPSC)衍生NK细胞和NK-92细胞中的至少之一。

[0088] 根据本发明的实施例,所述T细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。

[0089] 在本发明的第十二方面,本发明提出了一种获得嵌合抗原受体和免疫刺激分子的方法。根据本发明的实施例,所述方法包括:将前面所述的构建体或病毒导入第二受体细胞;将导入构建体或病毒的第二受体细胞进行培养,以便获得所述嵌合抗原受体和免疫刺激分子。如前所述,所述构建体或病毒在合适条件下能够同时表达所述嵌合抗原受体和免疫刺激分子,因此,根据本发明实施例的方法能够大量获得所述嵌合抗原受体和免疫刺激分子。

[0090] 根据本发明的实施例,所述导入第二受体细胞是通过电转、转染或感染的方式进行的。需要说明的是,所述“电转”或“转染”是将病毒载体导入受体细胞的方法,所述“感染”是指病毒主动结合和融合细胞膜进而进入细胞的过程。其中,“电转”是指通过电刺激的方式,将病毒包装用载体导入受体细胞的方法,所述“转染”是指通过化学介导体,如脂质体,将病毒包装用载体导入受体细胞的方法。

[0091] 根据本发明的实施例,所述第二受体细胞为T细胞和NK细胞中的至少之一。

[0092] 根据本发明的实施例,所述第二受体细胞为NK细胞。

[0093] 根据本发明的实施例,所述NK细胞包括选自外周血NK细胞、脐带血NK细胞、诱导多能细胞(iPSC)衍生NK细胞和NK-92细胞中的至少之一。

[0094] 根据本发明的实施例,所述T细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。

[0095] 根据本发明的实施例,所述病毒包括选自反转录病毒、慢病毒和腺病毒中至少之一。

[0096] 根据本发明的实施例,所述病毒包括慢病毒。

[0097] 在本发明的第十三方面,本发明提出了一种获得嵌合抗原受体和免疫刺激分子的CAR-NK或CAR-T细胞的方法。根据本发明的实施例,包括:将前面所述的构建体或病毒导入NK细胞或T细胞;将导入构建体或病毒的NK细胞或T细胞进行培养,以便获得所述CAR-NK或CAR-T细胞。根据本发明的一些具体实施例,构建靶向间皮素并同时表达IL-15的慢病毒表达载体,经慢病毒包装出病毒颗粒感染NK细胞或者T细胞,获得高感染效率和CAR阳性NK细胞或T细胞,该CAR-NK或CAR-T细胞不仅能够靶向杀伤间皮素阳性的恶性肿瘤,而且,由于其能够在局部持续分泌IL-15,因而具有较未修饰NK细胞或T细胞更高的增殖能力和杀伤活性,尤其是能够维持NK细胞或T细胞在体内的长期存活,使NK细胞或T细胞能够保持较高的增殖活力和杀伤活性,发挥更强的持续杀伤肿瘤的能力。更重要的是,这种局部分泌的IL-15在肿瘤局部发挥有效的生物学功能,能够有效避免全身应用高剂量或反复多次注射重组IL-15带来的毒副作用。

[0098] 根据本发明的实施例,所述导入NK细胞或T细胞是通过电转、转染或感染的方式进行的。

[0099] 在本发明的第十四方面,本发明提出了前面所述的分离的核酸、构建体、重组细胞、CAR-NK或CAR-T细胞或者病毒在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于治疗或预防肿瘤。如前所述,所述分离的核酸、构建体,或者携带上述物质的细胞在合适的条件下能够同时表达和分泌嵌合抗原受体和免疫刺激分子,使得细胞能够靶向对应抗原,定位至表达所述抗原的细胞表面,此外,免疫刺激分子,如IL-15进一步促进免疫细胞的活化和增殖,维持免疫细胞在肿瘤局部微环境中的数量和活性,使其保持强大的肿瘤杀伤活性,有效

避免全身高剂量或反复多次注射带来的毒副作用,还能避免全身应用高剂量或反复多次注射重组IL-15带来的毒副作用。

[0100] 根据本发明的实施例,所述肿瘤包括间皮素阳性肿瘤、HER2阳性肿瘤、EGFR阳性肿瘤、GPC3阳性肿瘤、MUC1阳性肿瘤、CEA阳性肿瘤、CLDN 18.2阳性肿瘤、EpCAM阳性肿瘤、GD2阳性肿瘤、PSCA阳性肿瘤、CD133阳性肿瘤、CD19阳性肿瘤、CD20阳性肿瘤、CD22阳性肿瘤、CD30阳性肿瘤、CD33阳性肿瘤和BCMA阳性肿瘤中的至少之一。

[0101] 根据本发明的实施例,所述间皮素阳性肿瘤包括胰腺癌、卵巢癌、间皮瘤、胆管癌和肺癌中的至少之一。

[0102] 在本发明的第十五方面,本发明提出了前面所述的分离的核酸、构建体或病毒在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于促进NK细胞或T细胞活化或者增殖。根据本发明的一些具体实施例,所述分离的核酸、构建体或者病毒能够显著促进NK细胞或T细胞的活化或者增殖,因此,包含上述物质的试剂盒同样具备促进NK细胞或T细胞的活化或者增殖的功能。所述试剂盒可以用于科学研究,如逆转增殖活性低的NK细胞或者T细胞,使其增殖活性由低升高,以获得符合预期的生物样本。

附图说明

[0103] 图1是根据本发明实施例1的靶向MSLN并用IL-15修饰的CAR的结构模式图,其中,SP表示编码信号肽的核苷酸序列, α -MSLN-scFv表示编码抗MSLN单链抗体的核苷酸序列,CD8 hinge+TM表示编码CD8铰链区和跨膜区的核苷酸序列,4-1BB表示编码4-1BB共刺激信号域的核苷酸序列,CD3 ζ 表示编码CD3 ζ 胞内区的核苷酸序列,P2A表示编码P2A自剪切区的核苷酸序列,IL15表示编码IL15全长的核苷酸序列;

[0104] 图2是根据本发明实施例2的NK-92、 α -MSLN-CAR-NK-92和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞IL-15的分泌水平检测结果图;

[0105] 图3是根据本发明实施例2的IL-15的NK-92、 α -MSLN-CAR-NK-92和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞STAT5磷酸化水平检测结果图;

[0106] 图4是根据本发明实施例2的IL-15的NK-92、 α -MSLN-CAR-NK-92和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞体外杀伤能力检测结果图;

[0107] 图5是根据本发明实施例2的NK-92、 α -MSLN-CAR-NK-92和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞体外增殖能力检测结果图;

[0108] 图6是根据本发明实施例3的表达IL-15的CAR-NK细胞治疗胰腺癌Aspc-1细胞荷瘤小鼠的操作流程图;

[0109] 图7是根据本发明实施例3的NK-92、 α -MSLN-CAR-NK-92和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞在胰腺癌Aspc-1细胞荷瘤小鼠体内的生存能力检测结果图;和

[0110] 图8是根据本发明实施例3的NK-92、 α -MSLN-CAR-NK-92和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞对胰腺癌Aspc-1细胞荷瘤小鼠抗肿瘤能力检测结果图。

具体实施方式

[0111] 下面详细描述本发明的实施例,所述实施例的示例在附图中示出。其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附

图描述的实施例是示例性的,旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0112] 在对本发明描述的过程中,对于本文中有关的术语进行了解释和说明,这些解释和说明仅仅是为了方便对于方案的理解,并不能看做是对本发明保护方案的限制。

[0113] 在本文中,术语“包含”或“包括”为开放式表达,即包括本发明所指明的内容,但并不排除其他方面的内容。

[0114] 在本文中,术语“任选地”、“任选的”或“任选”通常是指随后所述的事件或状况可以但未必发生,并且该描述包括其中发生该事件或状况的情况,以及其中未发生该事件或状况的情况。

[0115] 本文中“可操作地连接”是指将外源基因连接到载体上,使得载体内的控制元件,例如转录控制序列和翻译控制序列等等,能够发挥其预期的调节外源基因的转录和翻译的功能。常用的载体例如可以为病毒载体、质粒、噬菌体等等。根据本发明的一些具体实施例的表达载体导入合适的受体细胞后,可在调控系统的介导下,有效实现前面所述的分离的核酸的表达,进而实现所述分离的核酸编码的蛋白质的体外大量获得。

[0116] 本文中,所述的“适合条件”,是指适合本申请所述分离的核酸编码的蛋白表达的条件。本领域技术人员容易理解的是,适合所述分离的核酸编码的蛋白表达的条件包括但不限于合适的转化或转染方式、合适的转化或转染条件、健康的宿主细胞状态、合适的宿主细胞密度、适宜的细胞培养环境、适宜的细胞培养时间。“适合条件”不受特别限制,本领域技术人员可根据实验室的具体环境,优化最适的所述分离的核酸编码的蛋白表达的条件。

[0117] 本申请构建了一种同时表达嵌合抗原受体和免疫刺激分子的转基因免疫细胞,其中,所述嵌合抗原受体靶向的抗原可以有多种,使得免疫细胞能够靶向对应抗原,定位至表达所述抗原的细胞表面,所述免疫刺激分子能够进一步促进所述免疫细胞的活化、增殖,如本申请中使用的IL-15,经实验验证后,同时表达嵌合抗原受体和IL-15的免疫细胞的增殖活性以及肿瘤杀伤能力均得到显著提高,有效避免全身高剂量或反复多次注射带来的毒副作用。

[0118] 本文中涉及的氨基酸或核酸序列如下所示。

	atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccacccgc ctttctgctg	60
	atccccgaca tcagatggc ccaggtccag ctggtgcagt ctggggctga ggtgaagagg	120
	cctggggcct cagtgaggt atctgcaga gcatctggct atagtatcaa tacttactat	180
	atgcagtggg tgcggcagge ccctggagca ggccctgagt ggatgggctg tataacccc	240
	agtgggtgca caagttacg acagaagtc cagggcagag tcactttgac caacgacag	300
	tccacaaaca cagtctacat gcagtgaac agtctgacat ctgccgacac ggccgtctac	360
[0119]	tactgtgca gatgggcctt atggggggac ttcggtatgg acgtctgggg caaggaacc	420
	ctggtcaccg tctcgagtgg tggagcggg tcaggcggag gtggcagcgg cggtagcgga	480
	tggacatcc agatgaccca gtctcttcc accctgtctg catctattgg agacagagtc	540
	accatcacct gccgggccag tgagggatt taccctggg tggcctggta tcagcagaag	600
	ccagggaaag ccctaaact cctgatctat aaggcctcta gtttagccag tggggcccca	660
	tcaaggtca gcggcagtgg atctgggaca gattcactc tcaccatcag cagcctgcag	720
	cctgatgatt ttgcaacta ttactgcaa caatatagta attatccgct cacttcggc	780

ggagggacca agctggagat caaacgtacc acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg	840
gcgcccacca tcgctcgcga gccctgtcc ctgcgccag aggcgtgccg gccagcggcg	900
ggggcgcgag tgcacacgag ggggctggac ttcgcctgtg atatctacat ctgggcgccc	960
ttggccggga ctgtggggt ccttctcctg tcaactggta tcacccttta ctgcaaacgg	1020
ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaaactact	1080
caagaggag atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg	1140
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc	1200
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg tttggacaa gagacgtggc	1260
cgggacctg agatgggggg aaagcccgag agaaggaaga accctcagga agcctgtac	1320
aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag	1380
cgccggagg gcaaggggca cgtatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac	1440
acctacgacg cccctacat gcagcccctg cccctcgcg ctactaactt cagcctgtg	1500
aagcaggctg gagacgtgga ggagaacct ggacctgca tgagaattc gaaaccacat	1560
ttgagaagta ttccatcca gtgctacttg tgttacttc taaacagtca tttctaact	1620
gaagctggca ttcatgtctt catfttgggc tgtttcagtg caggcctcc taaaacagaa	1680
[0120] gccactggg tgaatgtaat aagtatttg aaaaaattg aagatctat tcaatctatg	1740
catattgatg ctactttata tacggaaagt gatgttacc ccagttgcaa agtaacagca	1800
atgaagtget ttctcttga gttacaagtt atttacttg agtccggaga tgcaagtatt	1860
catgatacag tagaaaatct gatcacccta gcaacaaca gttgtcttc taatgggaat	1920
gtaacagaat ctggatgcaa agaattgtgag gaactggagg aaaaaatat taaagaattt	1980
ttgcagagt ttgtacatat tgcctaatg ttcatcaaca cttctga (SEQ ID NO:1)。	
atgtctctgc tggtagaccg cctgctgctg tgcgagctgc cccacccgc cttctgctg	60
atcccc (SEQ ID NO:2)。	
gacatccaga tggcccaggc ccagctgggt cagctgggg ctgaggtgaa gagcctggg	60
gcctcagtgc aggtatcctg cagagcatct ggctatagta tcaatactta ctatatgcag	120
tgggtcggc agggccctgg agcagccctt gactggatgg gcgtatcaa cccagttgt	180
gtcaaaagt acgcacagaa gttccagggc agagtcaact tgaccaacga cagtcacaa	240
aacacagtct acatgcagtt gaacagtctg acatctgcc acacggccgt ctactactgt	300
gcgagatggg ccttatgggg ggacttcggt atggactct ggggcaaggg aacctggtc	360

	accgtctcga gtggtggagg cggtcaggc ggagggtgca gcggcgggtg cgatcggac	420
	atccagatga cccagtctcc tccaccctg tctgcatcta ttggagacag agtcaccate	480
	acctgccggg ccagtgaggg tattatcac tggttggcct ggtatcagca gaagccaggg	540
	aaagccecta aactcctgat ctataaggcc tctagtttag ccagtggggc cecatcaagg	600
	ttcagcggca gtggatctgg gacagattc actctacca tcagcagcct gcagcctgat	660
	gattttgcaa ctattactg ccaacaatat agtaattate cgctcacttt cggcggaggg	720
	accaagctgg agatcaaag t (SEQ ID NO:3)。	
	accacgacg cagcggcgg accaccaaca ccggcgcca ccatcgcgtc gcagccctg	60
	tccttgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg	120
	gacttgcct gtgat (SEQ ID NO:4)。	
	atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtgggttcc ttctcctgc actggttate	60
	acccttact gc (SEQ ID NO:5)。	
[0121]	aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaacaac catttatgag accagtacaa	60
	actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgattccag aagaagaaga aggaggatgt	120
	gaactg (SEQ ID NO:6)。	
	agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc	60
	tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg tttggacaa gagactggc	120
	cgggacctg agatgggggg aaagcccgag agaaggaaga accctcagga aggctgtac	180
	aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaagcgag	240
	cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac	300
	acctacgac ccttccat gcagccctg cccctcgc (SEQ ID NO:7)。	
	gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaacc tggacct (SEQ ID NO:8)。	
	atgagaatt cgaaccaca ttgagaagt atttccatcc agtgctactt gtgtttactt	60
	ctaaacagtc attttctaac tgaagctggc attcatgtct tcaatttggg ctgtttcagt	120
	gcagggcttc ctaaacaga agccaactgg gtgaatgtaa taagtattt gaaaaaatt	180

	gaagatctta ttcaatctat gcatattgat gctactttat atacggaaag tgatgtcac	240
	cccagttgca aagtaacagc aatgaagtgc ttctcttgg agtfacaagt tatttcaact	300
[0122]	gagtcggag atgcaagtat tcatgataca gtagaaaatc tgatcatcct agcaaacaac	360
	agtttgtctt ctaatgggaa tgtaacagaa tctggatgca aagaatgtga ggaactggag	420
	gaaaaaata ttaaagaatt ttgcagagt ttgtacata ttgtccaaat gttcatcaac	480
	acttct (SEQ ID NO:9)。	

[0123] Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro(SEQ IDNO:10)。

[0124] Asp Ile Gln Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala Ser Val Gln ValSer Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Asn Thr Tyr Tyr Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Ala Gly Leu GluTrp Met Gly Val Ile Asn Pro Ser Gly Val Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Asn AspThr Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg TrpAla Leu Trp Gly Asp Phe Gly MetAsp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly SerGly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile GlyAsp Arg Val Thr Ile Thr Cys ArgAla Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp LeuAla Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys AlaPro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser LeuAla Ser GlyAla Pro SerArg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly ThrAspPhe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro LeuThr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile LysArg(SEQ ID NO: 11)。

[0125] Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro GluAla Cys Arg Pro AlaAla Gly GlyAla Val His ThrArg Gly LeuAsp PheAla Cys Asp(SEQ ID NO:12)。

[0126] Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys(SEQ ID NO:13)。

[0127] Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe MetArg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu GluAsp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu(SEQ ID NO:14)。

[0128] Arg Val Lys Phe SerArg SerAlaAsp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly GlnAsn Gln Leu TyrAsn Glu Leu AsnLeu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro GlnArg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu TyrAsn Glu Leu Gln Lys Asp Lys MetAla Glu Ala Tyr Ser Glu Ile GlyMet Lys Gly Glu ArgArg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser ThrAla Thr Lys Asp Thr TyrAsp Ala Leu His Met GlnAla Leu Pro ProArg(SEQ ID NO:15)。

ccctctccc tccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaat aaggccggtg 60
 tgcgtttgtc tatatgttat ttccaccat attgccgtct ttggcaatg tgagggcccg 120
 gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat tctaggggt ctttcccctc tcgccaagg 180
 aatgcaaggt ctgttgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt cttgaagaca 240
 aacaacgtct gtacgaccc ttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg acaggtgctt 300
 [0129] ctgcccgaag aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac cccagtcca 360
 cgttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tctcaagcg tattcaaca 420
 ggggctgaag gatgccaga aggtacccca ttgatggga tctgatctgg ggcctcgggtg 480
 cacatgcttt acatgtgttt agtcgaggtt aaaaaacgt ctaggcccc cgaaccacgg 540
 ggacgtggtt ttccttgaa aaacacgatg ataa (SEQ ID NO:16) 。

[0130] Ala ThrAsn Phe Ser Leu Leu Lys GlnAla GlyAsp Val Glu GluAsn Pro Gly Pro (SEQ ID NO:17) 。

[0131] 下面将更详细地描述本发明的实施例,所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的,旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0132] 需要说明的是,以下实施中所述的“质粒”与“载体”具有相同的意义,可互换使用。

[0133] 实施例1:CAR-NK细胞的制备

[0134] 1.1CAR表达质粒的构建

[0135] 本发明设计靶向间皮素 (MSLN) 并表达IL-15的CAR载体 (anti-MSLN-CAR-IL15) 序列,包含信号肽 (SP)、靶向识别MSLN的胞外区 (抗MSLN单链抗体,anti-MSLN scFv)、CD8a较链 (Hinge) 区与跨膜区 (TM)、4-1BB胞内共刺激信号域与胞内信号转导分子CD3 ζ 及由P2A连接的IL-15基因片段。所述CAR载体中的各基因元件结构如图1所示。其中:

[0136] 所述各元件组成的CAR载体的基因全长序列如SEQ ID NO:1所示;

[0137] 所述信号肽为CSF2R,其核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示;

[0138] 所述anti-MSLN scFv的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示;

[0139] 所述CD8较链区的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示;

[0140] 所述CD8跨膜区的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示;

[0141] 所述4-1BB共刺激信号域的核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示;

[0142] 所述CD3 ζ 胞内区的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示;

[0143] 所述自剪切区P2A的核苷酸序列如SEQ ID NO:8所示;

[0144] 所述IL-15的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0145] 首先将anti-MSLN-CAR片段插入慢病毒载体pLent-EF1 α -P2A-CMV-GP中构建pLent-anti-MSLN-CAR-P2A-CMV-GP载体。从人PBMC细胞cDNA中扩增出IL-15基因片段,通过酶切位点Not I将IL-15基因片段插入到pLent-anti-MSLN-CAR-P2A-CMV-GP载体中。经PCR鉴定和测序验证序列正确,说明成功构建pLent-anti-MSLN-CAR-P2A-IL15-CMV-GP载体。

[0146] 1.2慢病毒的包装及病毒液浓缩

[0147] 取处于对数生长期的293T细胞 5×10^6 接种于10cm的培养皿中,加入10mLDMEM培养基,于37℃、5%CO₂培养箱中培养过夜。待细胞密度达到80%时,更换10mL新鲜的DMEM培养基用于病毒包装,将细胞培养皿继续置于培养箱中备用。配制慢病毒包装体系,分别将慢病毒包装辅助质粒psPAX26 μ g与pMD2.G 3 μ g,目的基因载体质粒6 μ g加入至体积为250 μ L无血清DMEM培养基中配制质粒混合液,混合均匀。将15 μ L PEIpro加到体积为235 μ L的无血清DMEM培养基中,混合均匀。将PEIpro®混合液一次性加入到上述质粒混合液中,混匀,室温孵育15min,孵育结束后将混合液加入293T细胞培养皿中。24h后进行换液,将培养皿放回37℃、5%CO₂培养箱中,培养48h后收取细胞上清,于400 \times g离心5min,去除细胞碎片,将上清用0.45 μ m的滤头过滤至50mL离心管中。加入5 \times PEG8000溶液进行病毒液浓缩,上下颠倒离心管混合均匀,放于4℃冰箱中过夜。4℃,4000 \times g离心20min,弃上清,加适量无血清DMEM重悬病毒沉淀,转移入EP管中,放于-80℃冰箱中保存。

[0148] 1.3慢病毒滴度检测

[0149] 取对数生长期的293T细胞,调整浓度为 1×10^5 /mL。取24孔板,每孔加1mL细胞悬液(1×10^5 /孔),设置3个加入病毒体积梯度。置于37℃、5%CO₂培养箱过夜培养。先将浓缩病毒液进行10倍稀释:取1mLEP管,吸取60 μ L病毒浓缩液到EP管中,用540 μ LDMEM培养基进行稀释,混合均匀。对293T细胞用新鲜DMEM培养基进行换液,分别吸取5 μ L、50 μ L与500 μ L稀释后病毒液加到相应的孔中,做好标记,然后将培养板放回37℃、5%CO₂培养箱中。24h后,吸弃孔板中病毒液,再加入1mL新鲜DMEM培养基。72h后,用胰酶消化收获细胞,使用流式仪检测293T细胞GFP表达率,根据下列公式换算病毒滴度:

[0150] 滴度(TU/mL) = (C \times N \times D \times 1000) / V

[0151] 其中:C=流式检测的GFP阳性率

[0152] N=感染时细胞的数目(约为 1×10^5)

[0153] D=病毒载体的稀释倍数

[0154] V=加入的稀释病毒的体积数。

[0155] 1.4慢病毒感染人NK细胞

[0156] 取处于生长对数期的NK-92细胞(购自ATCC),于100 \times g离心5min收获细胞,加入适量 α -MEM培养基重悬细胞,调整细胞密度为 5×10^5 个/mL。在24孔板中分别接入 5×10^5 个NK-92细胞,病毒浓缩液1mL与鱼精蛋白(购自索莱宝,终浓度8 μ g/mL),混合均匀,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。24h后,观察细胞状态,换液,将感染的细胞转移入EP管中,100 \times g离心5min,加入少量新鲜 α -MEM培养基重悬细胞,将细胞转入细胞培养瓶中,加入10mL新鲜 α -MEM培养基和IL-2(终浓度为200IU/mL)继续培养48h。将细胞转移入流式管中,加入3mL 1 \times PBS溶液,100 \times g离心5min,弃上清,弹起细胞沉淀,使用1 \times PBS溶液再次洗涤一遍。使用流式仪检测GFP的表达率。继续扩大培养,调整感染后NK-92细胞的状态进行扩增。将感染后的NK-92细胞通过流式仪分选GFP阳性的CAR-NK-92细胞,用于后期实验。

[0157] 实施例2:CAR-NK细胞分泌IL-15的水平及细胞增殖能力测定

[0158] 本实施例以实施例1获得的CAR-NK-92(全文简称为CAR-NK)细胞进行IL-15分泌水平及细胞增殖能力的测定

[0159] 2.1ELISA检测CAR-NK-92细胞IL-15的分泌水平

[0160] 分别将NK-92、 α -MSLN-CAR-NK-92(携带靶向MSLN的CAR)和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-

92(携带靶向MSLN的CAR并表达IL-15)细胞接板培养,24h收集上清。ELISA检测不同组上清中IL-15的含量。实验结果如图2所示,其中,NK-92与 α -MSLN-CAR-NK-92细胞上清中几乎检测不到IL-15。但在CAR-IL15-NK-92细胞上清检测出明显的IL-15,水平为 $74.10 \pm 5.86 \text{ pg/mL}$ 。说明本发明设计修饰的 α -MSLN-CAR-IL15-NK细胞具有分泌IL-15的能力。

[0161] 2.2CAR-NK细胞STAT5磷酸化水平检测

[0162] IL-15与IL-15受体结合后,激活下游STAT5磷酸化(pSTAT5),pSTAT5进入细胞核后促进活化、增殖和抗凋亡相关基因的表达。因此,发明人进一步观察本发明修饰的CAR-NK细胞分泌的IL-15是否具有生物活性,使下游STAT5磷酸化。分别将上述NK-92、 α -MSLN-CAR-NK-92和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞在无血清RPMI 1640培养基中培养12h进行饥饿处理,饥饿处理是为了降低自身STAT5的磷酸化水平。收取细胞,通过流式检测pSTAT5的水平。结果如图3所示,NK-92细胞组和 α -MSLN-CAR-NK-92细胞组STAT5磷酸化水平较低,而 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞组STAT5磷酸化水平明显高于对照组。

[0163] 2.3CAR-NK细胞体外杀伤能力检测

[0164] 发明人将上述NK-92、 α -MSLN-CAR-NK-92和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞分别与胰腺癌细胞系Aspc-1共孵育5h后检测杀伤效率。从图4中可以看出, α -MSLN-CAR-NK-92和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92在效靶比为5:1时对Aspc-1细胞的杀伤效率分别为 $48.01 \pm 2.00\%$ 和 $48.60 \pm 1.78\%$,明显高于NK-92细胞($35.59 \pm 2.46\%$);但 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞与 α -MSLN-CAR-NK-92组的杀伤效率未见明显差异。

[0165] 2.4CAR-NK细胞体外增殖能力检测

[0166] 发明人进一步验证自分泌IL-15对NK-92细胞的促存活作用。分别将相同细胞数量的所述NK-92、 α -MSLN-CAR-NK-92和 α -MSLN-CAR-IL-15-NK-92细胞接板于96孔板中,每3天进行细胞计数,培养24天,绘制细胞增殖曲线。从图5中可以看出,培养至第12天时, α -MSLN-CAR-IL-15-NK-92细胞的数量与NK-92、 α -MSLN-CAR-NK-92两组细胞相比开始出现差异。至第21天时,开始有十分显著的差异。说明分泌的IL-15可明显促进CAR-NK细胞的存活和增殖能力。

[0167] 实施例3:表达IL-15的CAR-NK细胞体内抗肿瘤能力及CAR-NK细胞在体内的存活能力检测

[0168] 本实施例建立了胰腺癌Aspc-1细胞荷瘤小鼠移植模型以观察CAR-NK-92细胞对胰腺癌的治疗作用。具体的实验操作如下:

[0169] 选择6周龄BALB/c-nu裸鼠进行腋下皮下荷瘤,荷瘤剂量为 2×10^6 细胞/只。在4天左右成瘤,一周后开始进行细胞治疗。治疗前测量肿瘤体积大小,根据肿瘤体积大小随机分为PBS组、NK-92细胞治疗组、 α -MSLN-CAR-NK-92细胞治疗组和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞治疗组。给治疗组小鼠尾静脉注射效应细胞 1×10^7 个/只,未治疗组注射等体积的 $1 \times \text{PBS}$,每隔一周注射一次,共治疗5次,并且每隔3天尾静脉注射IL-2($5 \times 10^4 \text{ IU/只}$),具体的实验设置及操作流程参考图6。为了研究IL-15对CAR-NK-92细胞的促存活作用,在治疗后第一、三、七天采集小鼠外周血,红细胞裂解后标记PerCP/Cyanine5.5anti-human CD56抗体,流式检测外周血淋巴细胞中CD56细胞群的比例,即NK-92细胞的比例。每隔3天测量肿瘤体积大小,绘制肿瘤生长曲线。

[0170] 结果如图7所示,在NK细胞治疗一天时,小鼠体内NK-92细胞、 α -MSLN-CAR-NK-92细

胞和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞占外周血淋巴细胞的比例分别为27.3%、29.6%和26.8%，各组NK-92细胞在体内比例相近。第三天时，小鼠体内NK-92细胞、 α -MSLN-CAR-NK-92细胞和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞占外周血淋巴细胞比例分别为8.32%、9.83%、和11.5%。可以看出与第一天相比，第三天时各组NK-92细胞比例都有所下降，NK-92组从27.3%下降到8.32%， α -MSLN-CAR-NK-92组从29.6%下降到9.83%， α -MSLN-CAR-IL15-NK-92从28.7%下降到11.762%。第七天时，NK-92细胞、 α -MSLN-CAR-NK-92细胞和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞在体内比例分别为0.13%、3.32%、和9.27%。可以看出与NK-92组和 α -MSLN-CAR-NK-92组相比，IL-15修饰的 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞在体内的比例最高，体内持久性更突出。因此，表达IL-15可以提高NK细胞在体内的生存能力，局部分泌的IL-15具有明显的维持NK细胞体内存活的效果。

[0171] 通过测量肿瘤大小绘制肿瘤生长曲线，由图8可以看出，与对照PBS组、NK-92细胞治疗组相比， α -MSLN-CAR-NK92细胞和 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞治疗可明显抑制肿瘤生长，且 α -MSLN-CAR-IL15-NK-92细胞显示出较 α -MSLN-CAR-NK-92细胞更好的抗肿瘤作用。以上结果说明靶向间皮素的CAR-NK-92细胞可以抑制胰腺癌生长，具有良好的治疗效果。IL-15基因修饰可以提高CAR-NK-92细胞在体内的持久性，提高CAR-NK-92细胞在体内的生存能力，提高CAR-NK-92细胞的抗肿瘤效果。

[0172]

[0173] 此外，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。在本发明的描述中，“多个”的含义是至少两个，例如两个，三个等，除非另有明确具体的限定。

[0174] 在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0175] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。



图1

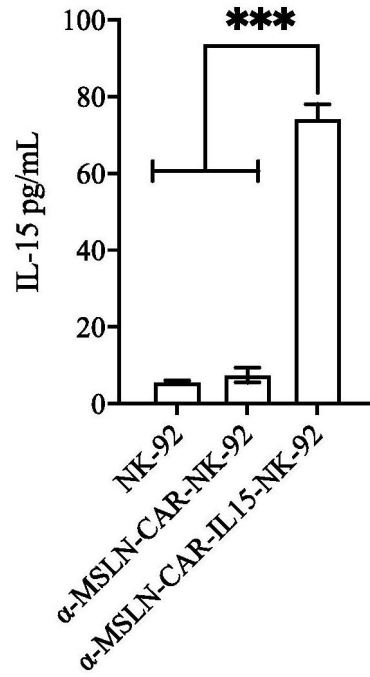


图2

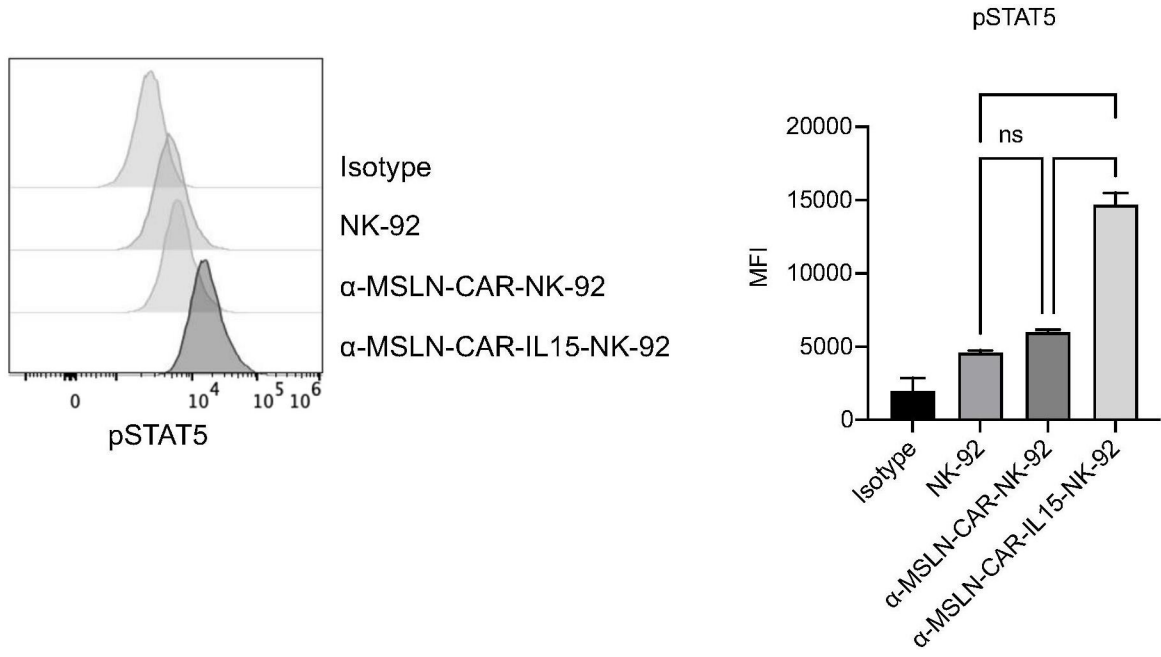


图3

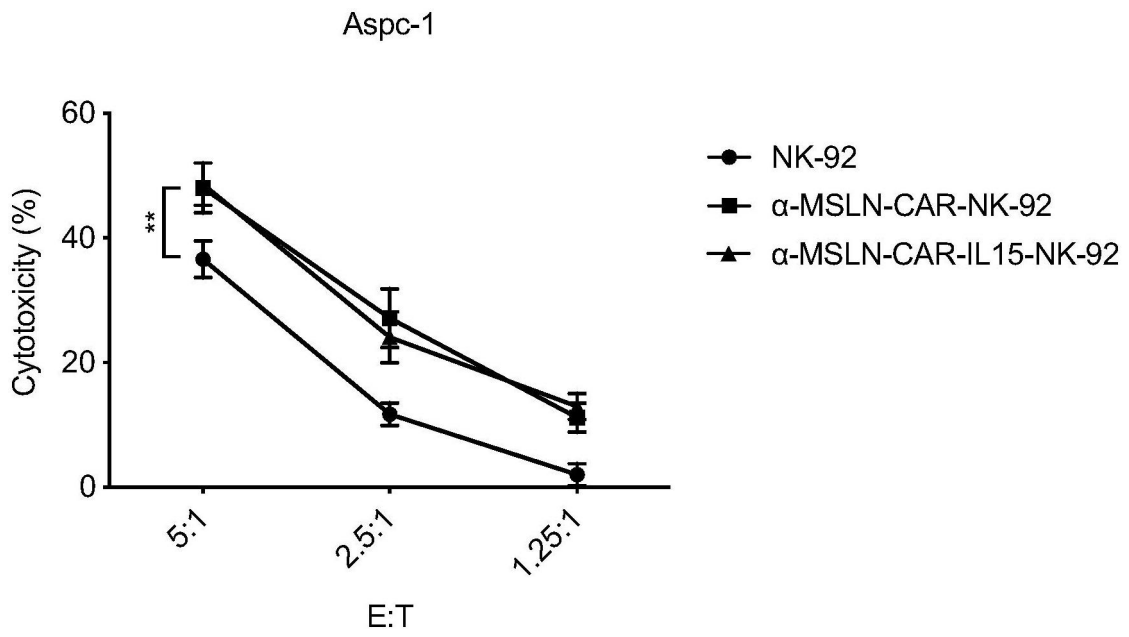


图4

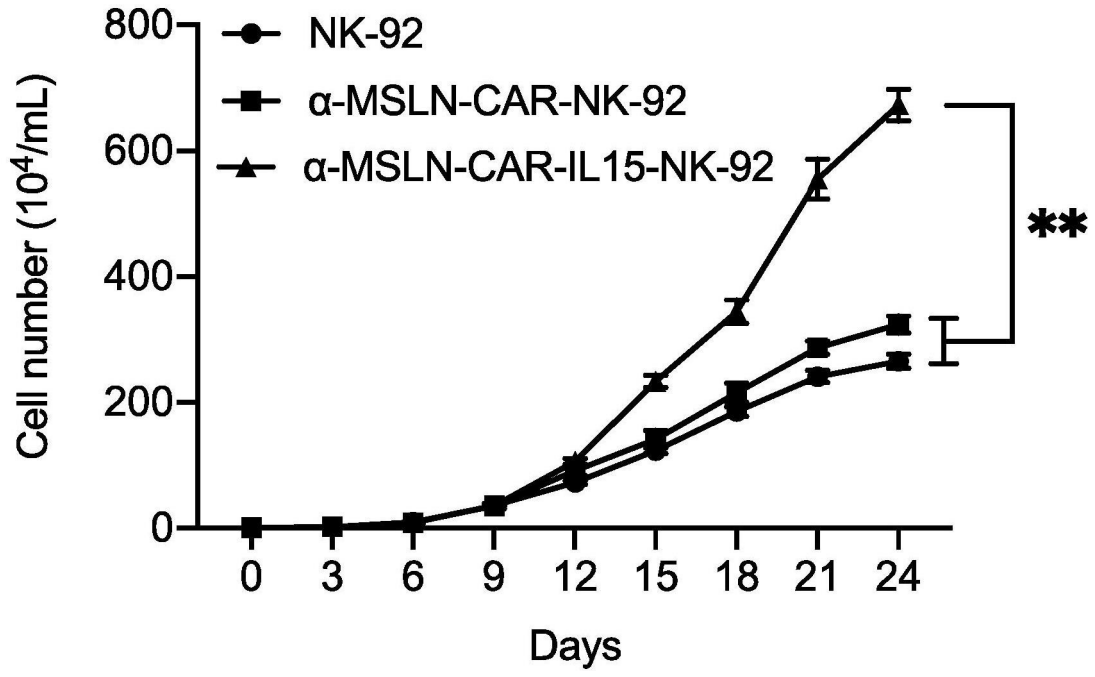


图5

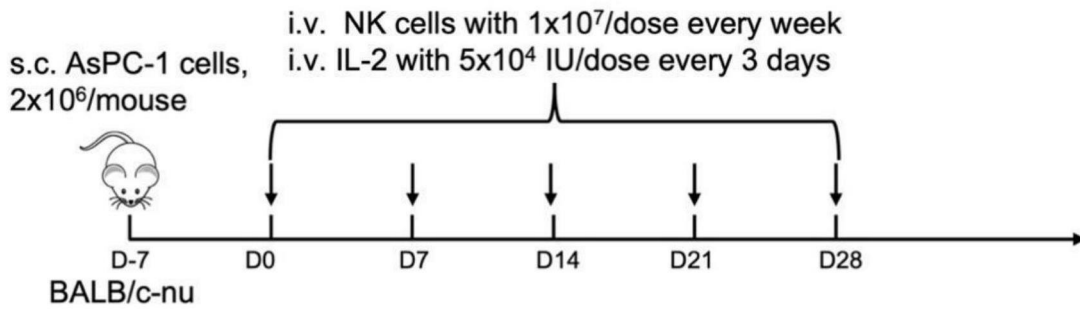


图6

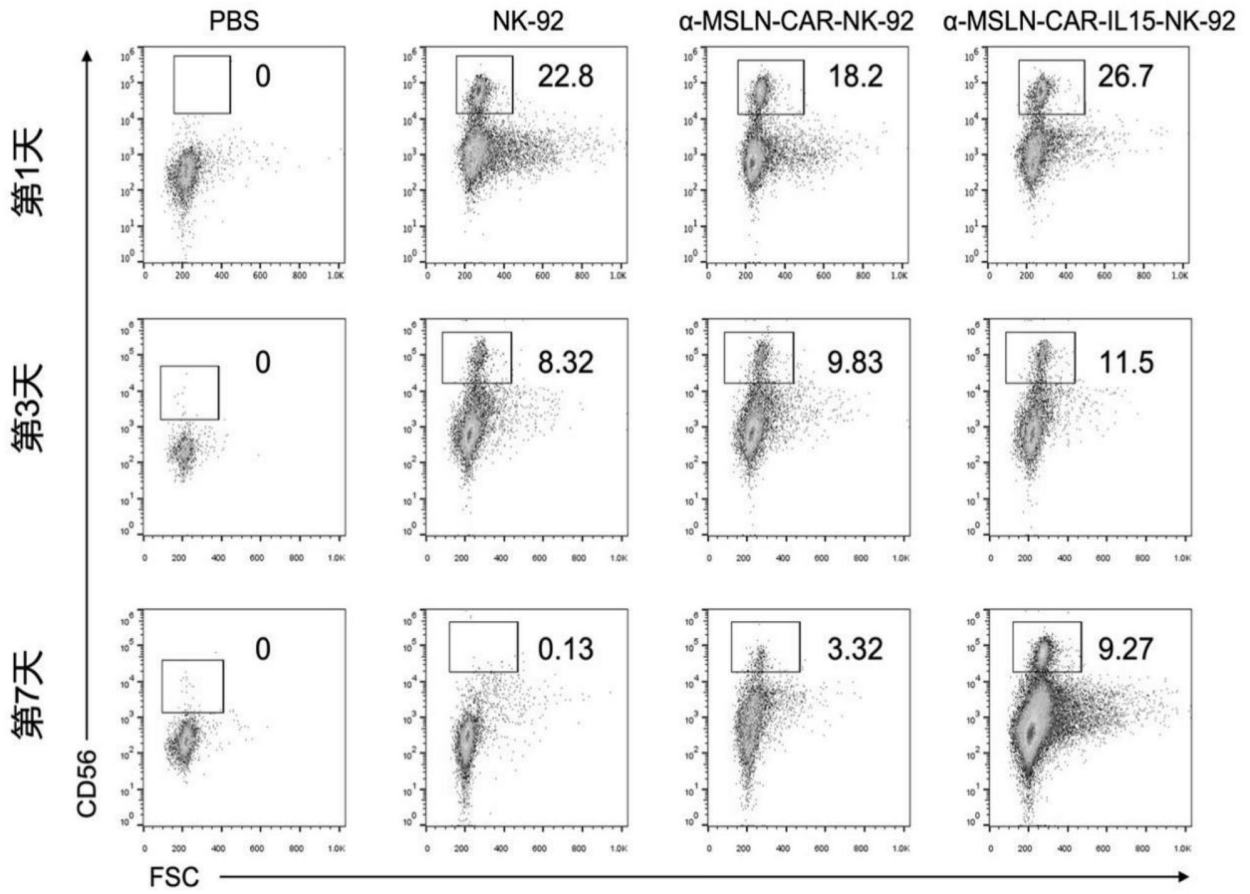


图7

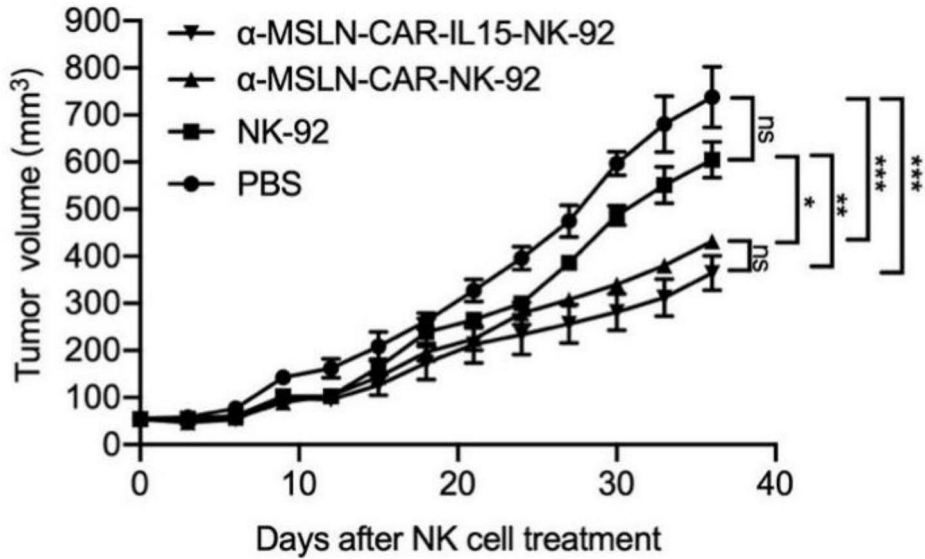


图8