



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108409840 A

(43)申请公布日 2018.08.17

(21)申请号 201810207761.2

C07K 19/00(2006.01)

(22)申请日 2018.03.14

C12N 15/867(2006.01)

(66)本国优先权数据

C12N 5/10(2006.01)

201710353632.X 2017.05.18 CN

A61K 35/17(2015.01)

A61P 35/02(2006.01)

(71)申请人 重庆精准生物技术有限公司

地址 400038 重庆市九龙坡区含谷镇含兴路38号

(72)发明人 张巍 单娟娟 赵文旭 陈军

黄霞 赵永春 徐艳敏 张茜真

(74)专利代理机构 北京元本知识产权代理事务

所 11308

代理人 黎昌莉

(51)Int.Cl.

C07K 14/00(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

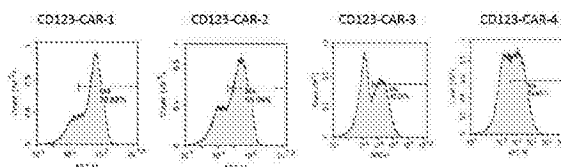
序列表10页 附图3页

(54)发明名称

抗CD123单链抗体及其组合的嵌合抗原受体和应用

(57)摘要

本发明属于基因工程领域,具体涉及一种抗CD123单链抗体及其组合的嵌合抗原受体和应用。本发明的识别CD123抗原的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。抗CD123抗原的嵌合抗原受体,由识别CD123抗原的多肽(ScFv),铰链区,跨膜区和胞内信号域依次连接组成。抗CD123抗原的嵌合抗原受体在免疫细胞中表达后,不仅可以有效的清除表达CD123抗原的肿瘤靶细胞,而对阴性抗原(不表达CD123)的肿瘤细胞没有毒性作用;并且能够维持靶向CD123的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)在病人细胞培养过程中的阳性率,在靶抗原刺激后能够长时间的进行增殖,能够用于肿瘤的靶向治疗。



1. 识别CD123抗原的多肽,其特征在于,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 权利要求1所述的多肽在制备抗CD123抗原的单链抗体的应用。
3. 含有权利要求1所述多肽的抗CD123抗原的嵌合抗原受体,其特征在于,由识别CD123抗原的多肽,铰链区,跨膜区和胞内信号域依次连接组成;所述识别CD123抗原的多肽的氨基酸序列含有权利要求1所述的多肽。
4. 根据权利要求3所述的嵌合抗原受体,其特征在于,铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25所示。
5. 根据权利要求3所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4所示。
6. 根据权利要求3所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述胞内信号域为CD28和/或CD137和/或CD3 ζ 链;所述CD28的氨基酸序列如SEQ ID NO:7,所述CD137的氨基酸序列如SEQ ID NO:8,所述CD3 ζ 链的氨基酸序列如SEQ ID NO:9。
7. 权利要求3所述的嵌合抗原受体的慢病毒载体的制备方法,其特征在于,具体包括以下步骤:
 - 1) 合成抗CD123抗原的嵌合抗原受体的嵌合抗原受体的基因序列:合成依次含前导肽、抗人抗CD123抗原的不同的单链抗体(ScFv)、铰链区、跨膜区和胞内信号域;所述铰链区核酸序列如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15、跨膜区核酸序列如SEQ ID NO:16或17、胞内信号域核酸序列如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20;
 - 2) 构建表达嵌合抗原受体的慢病毒载体:设计引物,正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:21所示,反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:22所示,以所述嵌合抗原受体的序列为模板进行PCR扩增,得DNA片段;
将所述DNA片段的基因序列用限制性内切酶NheI和SalI双酶切,同时用限制性内切酶NheI和SalI酶切慢病毒表达载体pCDH-EF1,然后将酶切后的目的片段和慢病毒表达载体片段通过T4连接酶进行连接,获得表达嵌合抗原受体的慢病毒载体。
8. 权利要求7所述的制备方法所得的慢病毒载体。
9. 权利要求8所述的慢病毒载体感染的T细胞。
10. 权利要求9所述的T细胞在用于制备治疗恶性血液病的药物中的应用。
11. 根据权利要求10所述的应用,其特征在于,所述恶性血液病的细胞或组织能够表达CD123。
12. 权利要求1所述的多肽在用于制备治疗恶性血液病的药物中的应用。
13. 根据权利要求12所述的应用,其特征在于,所述的恶性血液病的细胞能够表达CD123。
14. 权利要求1所述的多肽在用于制备精准捕获能够表达CD123恶性血液病细胞的载体中的应用。
15. 如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列在制备CAR-T骨架中的抗原识别域的应用。

抗CD123单链抗体及其组合的嵌合抗原受体和应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域,涉及抗CD123单链抗体及其组合的嵌合抗原受体和应用,还涉及抗CD123抗原的嵌合抗原受体的慢病毒载体和应用。

背景技术

[0002] 过继细胞治疗(adoptive cell therapy,ACT)是生物治疗技术的一种,对自体免疫细胞(主要是T细胞)进行体外扩增,然后将其回输给肿瘤患者以达到治疗目的的方法,被认为是继手术、放、化疗后的第4种治疗方式,在临床治疗中受到广泛应用。过继细胞治疗广泛应用的主要是:淋巴因子活化的杀伤细胞(lymphokine activated killer cell,LAK)与IL-2联合治疗晚期恶性肿瘤取得了一定疗效;肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes,TIL)临床试验中治疗转移性黑色素瘤取得了较好的效果;细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer cell,CIK),目前国内开展较多的临床试验,对肝癌、肺癌等肿瘤取得了显著的效果。但是目前上述三种治疗方法均需活化T细胞,T细胞活化需要两种活化信号,即T细胞表面的TCR-CD3与MHC-I分子结合为活化的第一信号,决定T细胞对肿瘤细胞的杀伤活性;T细胞表面的共刺激分子与相应配体结合为活化的第二信号,决定T细胞增殖。但肿瘤细胞、肿瘤微环境可下调MHC、配体分子,从而抑制T细胞对肿瘤细胞的杀伤活性。因此需要可进行基因改造,主要有两种方式:基因转导TCR(T cell receptor,TCR)和嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)。

[0003] 嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor)简称CAR,是模拟TCR功能的人工受体,由抗原识别域、铰链区和跨膜区及胞内信号域依次连接组成,胞内信号域通常为CD3 ζ 链或FcR γ ,或与一种或多种共刺激分子相连,如4-1BB(CD137),CD28,ICOS(CD278)。肿瘤细胞表面的抗原(受体)与嵌合抗原受体的抗体(配体)结合时,通过铰链区和跨膜区将信号传递至胞内,胞内信号域将信号转化为活化信号,激活效应细胞,效应细胞增殖、产生细胞因子从而杀伤肿瘤细胞。虽然CAR-T治疗肿瘤已经显现出了一定的肿瘤清除能力,尤其是CD19-CAR在血液系统肿瘤方面的治疗取得了突破性的进展,但是CAR-T治疗仍然还存在一系列问题仍需进一步探索解决:1,CAR-T细胞在体内增殖能力差;2,由于是人工受体仍然存在一定的安全隐患。

[0004] 急性髓性白血病(Acute myeloid leukemia,AML)是髓系造血干/祖细胞恶性疾病,以骨髓与外周血中原始和幼稚髓性细胞异常增生为主要特征多数病例病情急重,预后凶险,如不及时治疗常可危及生命;常规的诱导化疗虽然能够缓解AML但是最终并不能阻止AML的复发以及复发患者高的死亡率。然而AML的常规治疗已经50年未有改变,急需寻找新的改变。

[0005] CD123又称白介素3受体 α 链(IL-3R α)高表达于白血病干细胞或白血病幼稚细胞,在正常造血干细胞不表达或者低表达,是白血病相关抗原也是急性髓性白血病的特异性抗原。CD123靶标的出现是AML治疗的新突破;由于CD123在AML高表达,理论上以CD123为靶标的免疫治疗具有更安全有效的治疗效果,国外也已经在进行以CD123为靶标的靶向药物的

临床试验,但是功效均很有限并且仍有安全性问题的发生;因此需要寻找特异性更好更有效的靶向CD123的新疗法,目前虽然有一些靶点的CAR正在试验正在进行,但是用于治疗AML的CAR相对较少,在CAR性能的稳定性和安全性上仍需进一步的改造试验,如何选择更稳定适合的scFv(单链抗体)也是CAR研究中未能解决的关键问题,所以一种更安全有效的以CD123为靶点的CD123-CAR的研发制备是极有必要的。

[0006] 目前针对表达CD123的髓系肿瘤还没有很好地治疗方案,抗原嵌合受体在T细胞上转染的稳定性也没有很好的解决方案,也没有报道显示CD123-scFv结合抗原嵌合受体对嵌合抗原受体细胞的稳定性和对CD123髓系肿瘤疗效的影响。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的目的之一在于提供一种抗CD123单链抗体及其组合的嵌合抗原受体和应用,本发明的包含CD123-scFv的嵌合抗原受体能够更稳定的表达于T淋巴细胞,能更好的清除表达CD123抗原的肿瘤靶细胞,对阴性抗原(不表达CD123)的肿瘤细胞没有毒性作用。

[0008] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0009] 识别CD123抗原的多肽,所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0010] 本发明的目的之二在于提供一种上述的多肽在制备抗CD123抗原的单链抗体的应用。

[0011] 本发明的目的还在于提供一种抗CD123抗原的嵌合抗原受体,由识别CD123抗原的多肽(ScFv),铰链区,跨膜区和胞内信号域依次连接组成;所述识别CD123抗原的多肽的氨基酸序列含有上述SEQ ID NO:1所述的多肽。

[0012] 本发明的目的还在于提供一种抗CD123抗原的嵌合抗原受体,由识别CD123抗原的多肽(ScFv),铰链区,跨膜区和胞内信号域依次连接组成;所述识别CD123抗原的多肽的氨基酸序列含有上述SEQ ID NO:1所述的多肽。

[0013] 单链抗体(Single-chain variable fragment(scFv))是由抗体的可变区(VH和VL区)通过15-20个氨基酸的短肽(Linker)连接而成,scFv能较好地保留其对抗原的亲合活性,并具有分子量小、穿透力强和抗原性弱等特点。

[0014] Linker连接单链抗体重链和轻链的方式为VH-Linker-VL或者VL-Linker-VH两种方式。Linker的选择可能会影响单链抗体的稳定性以及聚集度。前最常用的Linker为以氨酸(Gly)和丝氨酸(Ser)连接形成的GGGGS为单位,一个或多个单位连接形成,发明人通过前期探索发现本专利所述抗CD123抗原的单链抗体(ScFv)以VL-Linker-VH连接方式连接能够更好的保持单链抗体的稳定性。所述Linker氨基酸序列如SEQ ID NO.31或核酸序列如SEQ ID NO.32。

[0015] 所述的嵌合抗原受体需要逾越两个技术障碍,一是寻找更稳定有效的识别CD123抗原的scFv。

[0016] 如何改造识别癌胚抗原的抗体,使之能够较好地保留其对抗原的亲合活性,并且组合为最佳的识别CD123嵌合抗原受体,是一个难题。发明人团队在未有更有效的技术提示的情况下通过一系列改造试验再经过不同的组合方式构建CAR(嵌合抗原受体)进行筛选,发明人选择了CD123-scFv-1和CD123-scFv-2两个单链抗体,氨基酸序列如SEQ ID NO:1或

SEQ ID NO:2所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13所示进行CAR组合的研究。

[0017] 在保护所述的嵌合抗原受体时,我们还淘汰了三组其他组合思路下的嵌合抗原受体,而仅仅由本发明所保护的这几组,具有预料不到的技术效果。

[0018] 筛选最佳的嵌合抗原受体组合的方法,是保持抗原识别序列不变,对铰链区,跨膜区以及包内信号域进行随机组合;或者是保持铰链区,跨膜区以及包内信号域不变,筛选不同的抗原识别序列(scFv)。方法的结果存在随机性,只有在配置得当的情况下,其亲和力才有可能和原有小鼠抗体的亲和力相当。

[0019] 本部分保护的CAR的组合方式,经过测试之后,可以起到稳定表达于病人来源的T淋巴细胞,并且具有更好的清除肿瘤细胞的能力,用于针对恶性血液病的过继细胞治疗。

[0020] 进一步,铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4所示。

[0021] 进一步,所述跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示。

[0022] 进一步,所述胞内信号域为CD28和/或CD137和/或CD3 ζ 链;所述CD28的氨基酸序列如SEQ ID NO:7,所述CD137的氨基酸序列如SEQ ID NO:8,所述CD3 ζ 链的氨基酸序列如SEQ ID NO:9。

[0023] 肿瘤细胞表面的抗原(受体)与所述的嵌合抗原受体的抗体(配体)结合时,通过铰链区和跨膜区将信号传递至胞内,胞内信号域将信号转化为活化信号,激活效应细胞,效应细胞增殖、产生细胞因子从而杀伤肿瘤细胞。嵌合抗原受体较TCR改造更具优势:(1)特异性:抗体(配体)特异性识别抗原(受体);(2)效率高:不会出现转基因TCR与患者内源性TCR发生错配;(3)非MHC-I限制性:不需要与MHC-I分子结合,可克服肿瘤细胞、肿瘤微环境下下调MHC-I分子造成的免疫逃逸;(4)抗原选择范围广:抗原可以是糖类、脂类、蛋白。

[0024] 进一步,所述嵌合抗原受体的氨基酸序列由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9序列依次串联而成。

[0025] 进一步,所述嵌合抗原受体的核苷酸序列由SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20序列依次串联而成。

[0026] 所述铰链区的核酸序列如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15所示;所述跨膜区的核酸序列如SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17所示;所述胞内信号域为CD28和/或CD137和/或CD3 ζ 链;所述CD28的核酸序列如SEQ ID NO:18,所述CD137的核酸序列如SEQ ID NO:19,所述CD3 ζ 链的核酸序列如SEQ ID NO:20。

[0027] 所述嵌合抗原受体核酸序列由所述的单链抗体,所述的铰链区,所述的跨膜区,所述的胞内信号域的核酸序列依次串联组合而成。

[0028] 本发明的目的还在于提供一种所述的嵌合抗原受体的慢病毒载体的制备方法,具体包括以下步骤:

[0029] 1) 合成抗CD123抗原的嵌合抗原受体的嵌合抗原受体的基因序列:合成依次含前导肽、抗人抗CD123抗原的不同的单链抗体(ScFv)、铰链区、跨膜区和胞内信号域;所述铰链区核酸序列如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15、跨膜区核酸序列如SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17、胞内信号域核酸序列如SEQ ID NO:18和或SEQ ID NO:19和或SEQ ID NO:20;

[0030] 2) 构建表达嵌合抗原受体的慢病毒载体:设计引物,正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:21所示,反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:22所示,以所述嵌合抗原受体的序列为模板进行PCR扩增,得DNA片段;

[0031] 将所述DNA片段的基因序列用限制性内切酶NheI和SalI双酶切,同时用限制性内切酶NheI和SalI酶切慢病毒表达载体pCDH-EF1,然后将酶切后的目的片段和慢病毒表达载体片段通过T4连接酶进行连接,获得表达嵌合抗原受体的慢病毒载体。

[0032] 进一步,在步骤2)之后,包装并纯化所述慢病毒载体。

[0033] 本发明的目的还在于提供一种所述的制备方法所得的慢病毒载体。

[0034] 在所述的方法下得到所述的慢病毒载体,这样的慢病毒载体的阳性表达率高,在病人细胞培养过程中很稳定,并且不会随着时间的推移会导致阳性率下降。于是,用所述慢病毒载体感染的T细胞,这样的T细胞具备杀伤靶细胞的功能。

[0035] 本发明的目的还在于提供一种所述的慢病毒载体感染的T细胞。

[0036] 本发明的目的还在于提供一种所述的T细胞在用于制备治疗恶性血液病的药物中的应用。本发明的嵌合抗原受体,其可以用于针对髓系肿瘤的过继细胞治疗。本发明所述的抗CD123抗原的嵌合抗原受体在免疫细胞中表达后,不仅可以有效的清除表达CD123抗原的肿瘤靶细胞,而对阴性抗原(不表达CD123)的肿瘤细胞没有毒性作用;并且能够维持靶向CD123的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)在病人细胞培养过程中的阳性率,在靶抗原刺激后能够长时间的进行增殖,能够用于肿瘤的靶向治疗。

[0037] 进一步,所述恶性血液病的细胞能够表达CD123。CD123又称白介素3受体 α 链(IL-3R α)高表达于白血病干细胞或白血病幼稚细胞,在正常造血干细胞不表达或者低表达,是白血病相关抗原也是急性髓性白血病的特异性抗原。CD123靶标的出现是AML治疗的新突破;由于CD123在AML高表达,理论上以CD123为靶标的免疫治疗具有更安全有效的治疗效果。

[0038] 进一步,所述恶性血液病为表达CD123的急性粒细胞白血病、急性淋巴细胞白血病以及B细胞慢性淋巴细胞增殖性疾病。

[0039] 本发明的目的还在于提供一种SEQ ID NO:1所述的多肽在用于制备治疗恶性血液病的药物中的应用。

[0040] 进一步,所述的恶性血液病的细胞能够表达CD123。

[0041] 另外,回到发明的起源端,本发明的目的还在于提供一种SEQ ID NO:1所述的多肽在用于制备精准捕获能够表达CD123恶性血液病细胞的载体中的应用。

[0042] 除了细胞治疗,也可以用于放射性治疗。所述抗CD123抗原的单链抗体(ScFv)的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0043] 本发明的目的还在于提供一种如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列在制备CAR-T骨架中的抗原识别域的应用。

[0044] 总的来说,本发明所述的scFV-CAR嵌合抗原受体在免疫细胞中表达后,不仅可以维持靶向CD123的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)在病人细胞培养过程中的阳性率并且能够加强CAR-T的增殖和杀伤肿瘤的能力,并且对抗原阴性的细胞无毒副作用,能够用于肿瘤的靶向治疗。

[0045] 本发明的有益效果在于:

[0046] 1) 本发明提供的抗CD123抗原的嵌合抗原受体在免疫细胞中表达后,不仅可以有效的清除表达CD123抗原的肿瘤靶细胞,而对阴性抗原(不表达CD123)的肿瘤细胞没有毒性作用;并且能够维持靶向CD123的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)在病人

细胞培养过程中的阳性率,在靶抗原刺激后能够长时间的进行增殖,能够用于肿瘤的靶向治疗。

[0047] 2) 本发明提供的通过改造的嵌合抗原受体人源化程度高,可以有效地降低CAR的免疫原性,增强CAR-T在体内的持续和安全性。

[0048] 3) 本发明提供的嵌合抗原受体能够稳定表达于T淋巴细胞尤其是病人来源的T淋巴细胞,可以用于制备治疗恶性血液病的药物中针对恶性血液病的过继细胞治疗。

附图说明

[0049] 图1为不同的CD123-CAR结构图。

[0050] 图2为图1中不同CD123-CAR转染正常捐献者T淋巴细胞的转染效率(CAR阳性率);结果显示CD123-CAR-3转染T细胞的效率最差。

[0051] 图3为图2中不同CD123-CAR-T细胞CD4/CD8流式检测结果以及统计结果。

[0052] 图4为FCM检测CD123在肿瘤细胞的表达水平;其中THP-1-Luc高表达CD123,U937-Luc中度表达CD123,作为阳性细胞;Raji-Luc低表达CD123作为阴性细胞。(所有细胞均稳转荧光素酶以便进行CAR-T杀伤能力的检测)

[0053] 图5为图3中各CD123-CAR-T细胞体外杀伤活性检测;图A表示杀伤6小时效靶比分别为5:1,1:1时CD123-CAR-T对图4的靶细胞的杀伤能力;图B表示24小时5:1,1:1时CD123-CAR-T对图4的靶细胞的杀伤能力;由CD123-scFV-1构建的CAR-T细胞CD123-CAR-1,CD123-CAR-2有相对较好的清除肿瘤细胞的能力。

[0054] 图6为不同CAR-T细胞杀伤肿瘤细胞后细胞因子释放的检测;收集图5实验中每组杀伤的CD123-CAR-T杀伤24小时的上清,利用ELISA检测IFN γ 和IL-2的分泌,图A为IFN γ 的分泌检测,图B为IL-2的分泌;结果显示与体外杀伤结果一致,CD123-CAR-1和CD123-CAR-2有较高的因子分泌,而CD123-CAR-3和CD123-CAR-4对阴性细胞有杀伤有较高因子释放,非特异性杀伤高用于体内实验有潜在风险。

[0055] 图7为不加外源细胞因子在靶细胞刺激下CD123-CAR-T细胞的增殖能力;利用CD123-scFV-1构建的CAR-T细胞增殖能力最强。

[0056] 图8为CD123-CAR-T细胞体外杀伤活性检测。

具体实施方式

[0057] 以下将参照附图,对本发明的优选实施例进行详细描述。优选实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如分子克隆实验指南(第三版,J.萨姆布鲁克等著)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。所举实施例是为了更好地对本发明的内容进行说明,但并不是本发明的内容仅限于所举实施例。所以熟悉本领域的技术人员根据上述发明内容对实施方案进行非本质的改进和调整,仍属于本发明的保护范围。

[0058] 实施例1嵌合抗原受体病毒的构建

[0059] 为了筛选更好的CAR组合方式分别需要构建如下6嵌合抗原受体:

[0060] CD123-CAR-1,CD123-CAR-2,CD123-CAR-3,CD123-CAR-4,CD123-CAR-5,CD123-CAR-6。

[0061] 1.合成含有不同scFV的靶向CD123的嵌合抗原受体的基因序列合成依次含前导肽

(又称信号肽)(简称LP)、抗人CD123抗原的不同的单链抗体ScFv, IgG4较链区(简称IgG4)、CD28跨膜区或CD8跨膜区(简称为TM),其结构如图1所示。

[0062] 2. 构建表达嵌合抗原受体的慢病毒载体

[0063] 1) 设计如下引物,并将其由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,具体引物如下:

[0064] 引物1:5' -aggctagcatgggatggagctgtatcat-3' (SEQ ID NO.21),下划线为NheI限制性内切酶位点;

[0065] 引物2:5' -gattgtcgacttagcgagggggcagggcctgcatgtga-3' (SEQ ID NO.22),下划线为SalI限制性内切酶位点。

[0066] 然后以SEQ ID NO.21和SEQ ID NO.22所示序列为引物,上述合成的各嵌合抗原受体序列为模板进行PCR扩增,反应体系按KOD FX NEO DNA聚合酶(购自TOYOBO公司)说明书加样,PCR反应条件为95℃预变性5min;95℃变性10s,55℃退火15s,68℃延伸30s,30个循环。将扩增产物用1%琼脂糖凝胶进行鉴定。结果显示,扩增获得约2000bp的DNA片段,然后用回收试剂盒(Promega公司)进行DNA片段回收,具体方法见说明书,回收获得嵌合抗原受体,将DNA回收片段送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

[0067] 将克隆获得的编码嵌合抗原受体的基因序列用限制性内切酶NheI和SalI(购自Thermo公司)双酶切,同时用限制性内切酶NheI和SalI酶切慢病毒表达载体pCDH-EF1(购至addgene Plasmid#72266),酶切反应按说明书进行。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离后用琼脂糖凝胶DNA片段回收试剂盒进行DNA片段回收,然后将的目的片段和载体片段通过T4连接酶(购自Promega公司)进行连接,获得表达嵌合抗原受体的慢病毒载体,命名为Lv-scFv(CEA)。将慢病毒载体取5μl转化大肠杆菌TOP10,30℃培养16h后挑取单克隆,挑取的单克隆在30℃条件下培养12h后用质粒抽提试剂盒(Invitrogen公司)抽提质粒,具体方法见说明书。

[0068] 按照如上方法分别构建CD123-CAR-1,CD123-CAR-2,CD123-CAR-3,CD123-CAR-4,CD123-CAR-5,CD123-CAR-6慢病毒载体;

[0069] 3. 慢病毒的包装

[0070] 本实施例包装慢病毒采用磷酸钙法,具体步骤如下:用含10%(wt)FBS的DMEM培养基培养293T细胞,至较佳状态;然后将293T细胞以 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度传至1个75cm²的培养瓶中培养22h,保证转染时细胞汇合度为70-80%;再用预热的含2%(wt)FBS的DMEM培养基换液,培养2h,备用;将680μl ddH₂O、20μg慢病毒载体、20μg pMDLg/pRRE质粒、20μg pRSV-Rev和10μg pMD2.G质粒、100μl 2.5mM CaCl₂加入15ml离心管中,混合均匀,混匀后用移液器向混合液中逐滴加入2×HBS,同时用10ml移液器吹打混匀,混匀后室温静置15min,然后将混合液逐滴加入上述制备的细胞中,继续培养12-16h后,用含10%FBS(wt)的DMEM培养基更换培养液,继续培养48h、72h后分别收集细胞上清并用于病毒纯化。

[0071] 4. 慢病毒的纯化

[0072] 将病毒上清收集在50ml离心管中,3000r/min离心10min;然后滤膜过滤,滤液在离心至新的50ml离心管;然后根据病毒上清量,分别加入质量分数为50%的PEG6000和4MNaCl,再用医用盐水定容至PEG6000终浓度为8.5%,NaCl终浓度为0.3M,定溶后于4℃冰箱静置90min,30min/次颠倒混匀;然后于4℃、5000r/min条件下离心30min,弃尽上清,用DMEM培养基重悬病毒,1.5mlEP管分装,每管40μl,-80℃保存备用。制得病毒分别命名为

CD123-CAR-1, CD123-CAR-2, CD123-CAR-3, CD123-CAR-4, CD123-CAR-5, CD123-CAR-6。

[0073] 5. 慢病毒的滴度测定

[0074] 1) 病毒感染293T细胞

[0075] 感染前将293T细胞以铺24孔板中, 取已纯化的病毒1 μ l, 用医用生理盐水稀释10倍, 再向每孔细胞中加入1 μ l聚凝胺 (Polybrene) 溶液, 然后将1 μ l和9 μ l稀释后的病毒液分别加到293T细胞中, 24h后用含10%FBS (wt) 的DMEM培养基换液, 感染72h后于1000r/min条件下离心5min以收集细胞, 抽提基因组。

[0076] 2) 抽提基因组

[0077] 基因组抽提试剂盒为QIAamp DNA Blood Mini Kit购于Qiagen公司 (货号511004), 按试剂盒说明书操作。

[0078] 3) qRT-PCR测定病毒滴度

[0079] 反应体系如下: Premix Ex TaqTM II (2 \times) 10 μ l, 上游引物 (GAG up) 1 μ l, 下游引物 (GAGdn) 1 μ l, 抽提的基因组1 μ l, RNase-Free dH₂O 7 μ l, 每个样品、标准品至少3个重复孔。然后按如下程序进行扩增: 95 $^{\circ}$ C预变性30s, 95 $^{\circ}$ C变性5s, 60 $^{\circ}$ C退火30s, 72 $^{\circ}$ C延伸30s, 反应结束后, 用分析软件分析数据, 根据标准曲线计算病毒滴度。

[0080] 实施例2嵌合抗原受体在T细胞内转染效率的检测

[0081] 1) 人外周血单核细胞的分离

[0082] 用加有抗凝剂的采血管采集外周血约60ml, 分装于50ml离心管各30ml, 加入7.5ml羟乙基淀粉稀释; 室温 (18~25 $^{\circ}$ C) 自然沉降约30min, 收集上层血浆, 将收集的上层血浆于1400rpm/min条件下离心15min; 然后用生理盐水重悬沉淀, 按体积比为1:1加到淋巴细胞分离液上, 梯度离心, 400g/min, 离心机降速设置为1, 离心20min; 离心后, 离心管由上至下分为: 第一层: 血浆层; 第二层: 环状乳白色淋巴细胞层; 第三层: 透明分离液层; 第四层: 红细胞层; 取第二层白色淋巴细胞层, 并用生理盐水洗涤2次, 第一次400g/min, 离心10min, 第二次1100rpm/min, 离心5min, 生理盐水重悬细胞, 加入含有10%FBS的RPMI 1640完全培养基培养, 得人外周血单核细胞。

[0083] 2) 慢病毒载体感染T淋巴细胞

[0084] 用含10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养基培养新制备的单个核细胞PBMC, 第1天加入抗CD3单克隆抗体活化; 前3天进行慢病毒感染; 加入5MOI对应的慢病毒载体, 未感染的T淋巴细胞作为空白对照; 24h后将培养基更换为含有500IU/ml重组人IL-2的RPMI1640完全培养基, 继续培养10-20天。检测结果如图2所示, 几种CAR结构均能较好的转染T淋巴细胞。

[0085] 实施例3 CAR分子阳性率以及CD4, CD8比例的检测

[0086] 培养11天的CD123-CAR-T细胞300g/min, 离心5min, 弃尽上清后用1ml PBS重悬, 重复本步骤两次后用100 μ l PBS细胞加入标记CD3, CD4, CD8 (BD公司) 以及Protein-L (北京义翘神州公司) 的流式检测抗体四度孵育30分钟, PBS洗涤3次, 再加入AF647标记的小鼠抗Protein-L抗体 (南京金斯瑞公司), 四度孵育30分钟PBS洗涤两次, 弃尽上清后加入200 μ l PBS重悬标记好的细胞后进行流式检测结果如表1和图3所示。

[0087] 表1不同CD123-CAR-T细胞CD4/CD8流式检测结果以及统计结果

[0088]

CAR名称	CD4 (%)	CD8 (%)	PL (%) (10d)	细胞活力 (%)
-------	---------	---------	--------------	----------

CD123-CAR-1	7.7	82.9	76.89	94
CD123-CAR-2	4.0	80.8	65.09	91
CD123-CAR-3	10.3	80.1	43.68	90
CD123-CAR-4	4.2	85.5	53.68	90

[0089] 实施例4 FCM检测CD123在肿瘤细胞的表达水平

[0090] 1) 靶细胞Luc构建

[0091] 利用体外转染的方式转染表达荧光素酶的慢病毒载体至进行试验的肿瘤靶细胞内。

[0092] 2) 外源高表达CD123肿瘤细胞株构建

[0093] 为了更好地验证不同组合的CD123-CAR-T细胞的杀伤能力,利用不表达CD123的肿瘤细胞通过外源转染的方式构建了高表达CD123的细胞,结果如图4示,两株高表达CD123细胞均达到高表达要求,可以进行细胞实验。

[0094] 3) 不同肿瘤靶细胞CD123阳性率检测

[0095] 肿瘤细胞300g/min,离心5min,弃尽上清后用1ml PBS重悬,重复本步骤两次后用100u1PBS细胞加入标记CD123的流式检测抗体(购于BD)四度孵育30分钟后PBS洗涤两次重悬于200u1 PBS中上机检测。结果如图4所示分别检测了Raji-Luc,U937-Luc和THP-1-Luc细胞表面的CD123表达,结果显示Raji-Luc不表达CD123,U937-Luc中度表达CD123(56.73%表达),THP-1-Luc高表达CD123(99.85%表达)。

[0096] 实施例5各CD123-CAR-T细胞体外杀伤活性检测

[0097] 不同scFV的嵌合抗原受体对靶细胞的杀伤能力分别通过ACEA xCELLigence RTCA MP仪器以及荧光素酶分析的方法完成。

[0098] 1) 荧光素酶法:96孔板铺板,标记有萤火虫荧光素酶的表达CD123的肿瘤细胞(THP-1,U937) 1×10^4 每孔铺板,依据不同的效靶比(1:2,1:1,5:1,10:1)铺板靶细胞(肿瘤细胞),放置于细胞培养箱37度分别共培养6小时,24小时通过检测荧光素酶的荧光度检测剩余靶细胞的量间接检测CD123-CAR对靶细胞的杀伤能力。结果如图5所示:CD123-CAR-1和CD123-CAR-2对肿瘤细胞具有高的杀伤活性和高的特异性,只针对表达CD123的肿瘤细胞进行杀伤,而CD123阴性的肿瘤细胞几乎未见杀伤。表2为图5杀伤结果的统计数据。

[0099] 表2:不同时间段不同效靶比CD123-CAR-T细胞对CD123阳性肿瘤细胞的杀伤百分比

	CD123-CAR-1	CD123-CAR-2	CD123-CAR-3	CD123-CAR-4
E:T=1:1 杀伤率				
6h	4.21%	2.21%	13.31%	16.04%
24h	48.55%	26.20%	19.30%	12.31%
E:T=5:1 杀伤率				
6h	55.84%	69.67%	28.15%	23.31%
24h	96.62%	89.99%	65.29%	61.28%

[0101] 2) ACEA xCELLigence RTCA MP仪器:实验步骤依据仪器说明书进行;第一天将靶细胞(构建的表达CD123的肿瘤细胞以及阴性对照细胞)以 $2-5 \times 10^4$ 每孔铺板于仪器配备的96孔板中,附着于孔底的肿瘤细胞以电阻指数为数据每15分钟记录一次,24小时后依据预

先设计的效靶比每孔铺入相应的CAR-T细胞,记录CAR-T细胞铺入24小时的电阻指数,24小时后收集各组上清进行酶联免疫(ELISA)检测并通过仪器分析的各组电阻指数分析结果, CAR-T细胞杀伤率=基线电阻指数-实时电阻指数,具体结果分析,1表示起始细胞指数,细胞指数高于1如细胞指数为2表示肿瘤细胞增殖2倍,细胞指数低于1如指数为0.3表示肿瘤细胞被杀伤70%;如果细胞指数均高于1但是小于T-con和medium组指数,表示CAR对肿瘤细胞的增殖有抑制作用但并不能很好的清除肿瘤细胞。结果如图8所示,CD123-scFV1作为抗原识别区构建的嵌合抗原受体具有较好的特异性和高的杀伤CD123阳性的肿瘤细胞的活性,优选的CD123-CAR-5即CD123-scFV-1-CD8hinge-CD28TM-CD28-CD137-CD3的嵌合抗与受体的组合具有更高的有效性和安全性。结果统计如下表3:

[0102] 表3:不同scFV和铰链(hinge)结构组合的CAR转染的T细胞的杀伤能力统计

	CD123-CAR-1	CD123-CAR-5	CD123-CAR-3	CD123-CAR-6
[0103]	E:T=5:1 杀伤率			
	6h	67.69%	32.21%	43.66%
	24h	93.01%	78.98%	78.89%

[0104] 实施例6:细胞因子检测

[0105] 1) 细胞因子检测采用Elisa的方法,使用BD公司试剂盒进行。

[0106] 2) 标准品的稀释:样品稀释方式详见产品说明书。

[0107] 3) 在酶标包被板上设标准品孔,依次加入不同浓度的标准品50 μ l,每个浓度做2个平行孔。

[0108] 4) 加样:分别设空白孔(空白对照孔不加样品、酶标试剂及生物素标记的抗体,其余各步操作相同)、待测样品孔;在酶标包被板上待测样品孔中先加样品40 μ l,然后再加生物素标记的抗体10 μ l。加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀;

[0109] 5) 温育:用封板膜封板后置37 $^{\circ}$ C温育30分钟;

[0110] 6) 配液:将30倍浓缩洗涤液用蒸馏水30倍稀释后备用;

[0111] 7) 洗涤:小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30秒后弃去,如此重复5次,拍干;

[0112] 8) 加酶:每孔加入酶标试剂50 μ l,空白孔除外;

[0113] 9) 温育:操作同3;

[0114] 10) 洗涤:操作同5;

[0115] 11) 终止:每孔加终止液50 μ l,终止反应;

[0116] 12) 测定:以空白空调零,450nm波长依序测量各孔的吸光度(OD值)。

[0117] 结果如图6所示CD123-CAR-1和CD123-CAR-2对表达CD123的肿瘤细胞杀伤有高的IFN- γ 和IL-2分泌,对阴性细胞特异性较好。结果统计如表4所示:

[0118] 表4:不同组合的CAR转染的T细胞杀伤肿瘤细胞后细胞因子分泌

[0119]

	CD123-CAR-1	CD123-CAR-2	CD123-CAR-3	CD123-CAR-4	con
IFN- γ	5550.827	3772.863	1759.522	1497.438	289.7076
IL-2	1025.895	1706.253	1284.273	366.5646	484.0675

[0120] 实施例7不加外源细胞因子在靶细胞刺激下CD123-CAR-T细胞的增殖能力

[0121] 为了模仿体内环境,在不加外源细胞因子的情况下通过靶细胞刺激CD123-CAR-T细胞观察CD123-CAR-T细胞的递增倍数。正常培养的CD123-CAR-T细胞300g/min,离心5min后弃尽上清用2ml PBS重悬后重复离心步骤2次,用新鲜的未加外源细胞因子的培养基稀释细胞到 1×10^6 /ml,24孔板靶细胞每孔 2×10^5 /500u1铺板,效靶比1:1,每7天刺激一次,刺激后第3-4,第7天进行细胞计数统计细胞总数绘制增殖曲线。如图7所示CD123-CAR-1在没有外源细胞因子刺激下,通过CD123阳性肿瘤细胞活化后增殖能力最强。表5统计了刺激14天时CAR-T细胞的增殖倍数

[0122] 表5:CD123阳性肿瘤细胞刺激CAR-T细胞后CAR-T细胞增殖倍数

[0123]

	CD123-CAR-1	CD123-CAR-2	CD123-CAR-3	CD123-CAR-4	con
增殖倍数	5.72	2.83	1.52	1.56	1.56

[0124] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

	200	205	210
Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn			
	215	220	225
Trp Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
	230	235	240
<210> 2			
<211> 247			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> CD123-scFV-2			
<400> 2			
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly			
	5	10	15
Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr			
	20	25	30
Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Ser Phe			
	35	40	45
Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr			
	50	55	60
Ser Ala Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser			
	65	70	75
Ala Ser Thr Ala Tyr Leu His Ile Asn Asp Leu Lys Asn Glu Asp			
	80	85	90
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Asp Pro Met			
	95	100	105
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Ser			
	110	115	120
Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys			
	125	130	135
Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser			
	140	145	150
Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val			
	155	160	165
Asp Asn Tyr Gly Asn Thr Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro			
	170	175	180
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu			
	185	190	195
Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp			

	200	205	210
Phe Thr Leu Thr	Ile Asn Pro Val	Glu Ala Asp Asp	Val Ala Thr
	215	220	225
Tyr Tyr Cys Gln	Gln Ser Asn Glu	Asp Pro Pro Thr	Phe Gly Ala
	230	235	240
Gly Thr Lys Leu	Glu Leu Lys		
	245		
<210>3			
<211>	229		
<212>	PRT		
<213>			
<220>			
<223>	IgG4铰链		
<400>	3		
Glu Ser Lys Tyr	Gly Pro Pro Cys	Pro Pro Cys Pro	Ala Pro Glu
	5	10	15
Phe Leu Gly Gly	Pro Ser Val Phe	Leu Phe Pro Pro	Lys Pro Lys
	20	25	30
Asp Thr Leu Met	Ile Ser Arg Thr	Pro Glu Val Thr	Cys Val Val
	35	40	45
Val Asp Val Ser	Gln Glu Asp Pro	Glu Val Gln Phe	Asn Trp Tyr
	50	55	60
Val Asp Gly Val	Glu Val His Asn	Ala Lys Thr Lys	Pro Arg Glu
	65	70	75
Glu Gln Phe Asn	Ser Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val	Leu Thr Val
	80	85	90
Leu His Gln Asp	Trp Leu Asn Gly	Lys Glu Tyr Lys	Cys Lys Val
	95	100	105
Ser Asn Lys Gly	Leu Pro Ser Ser	Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys
	110	115	120
Ala Lys Gly Gln	Pro Arg Glu Pro	Gln Val Tyr Thr	Leu Pro Pro
	125	130	135
Ser Gln Glu Glu	Met Thr Lys Asn	Gln Val Ser Leu	Thr Cys Leu
	140	145	150
Val Lys Gly Phe	Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu	Trp Glu Ser
	155	160	165
Asn Gly Gln Pro	Glu Asn Asn Tyr	Lys Thr Thr Pro	Pro Val Leu
	170	175	180
Asp Ser Asp Gly	Ser Phe Phe Leu	Tyr Ser Arg Leu	Thr Val Asp

	185	190	195
Lys Ser Arg Trp	Gln Glu Gly Asn Val	Phe Ser Cys Ser Val	Met
	200	205	210
His Glu Ala Leu	His Asn His Tyr Thr	Gln Lys Ser Leu Ser	Leu
	215	220	225
Ser Leu Gly Lys			
<210>4			
<211> 47			
<212> PRT			
<213>			
<220>			
<223> CD8铰链			
<400> 4			
Lys Pro Thr Thr Thr	Pro Ala Pro Arg	Pro Pro Thr Pro Ala	Pro
	5	10	15
Thr Ile Ala Ser Gln	Pro Leu Ser Leu	Arg Pro Glu Ala Cys	Arg
	20	25	30
Pro Ala Ala Gly Gly	Ala Val His Thr	Arg Gly Leu Asp Phe	Ala
	35	40	45
Cys Asp			
<210> 5			
<211> 24			
<212> PRT			
<213>			
<220>			
<223> CD8跨膜区			
<400>5			
Ile Tyr Ile Trp Ala	Pro Leu Ala Gly Thr	Cys Gly Val Leu Leu	
	5	10	15
Leu Ser Leu Val Ile	Thr Leu Tyr Cys		
	20		
<210>6			
<211> 27			
<212> PRT			
<213>			
<220>			
<223> CD28跨膜区			
<400>6			
Phe Trp Val Leu Val	Val Val Gly Gly	Val Leu Ala Cys Tyr	Ser

	5	10	15
Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val			
	20	25	
<210>7			
<211> 68			
<212> PRT			
<213>			
<220>			
<223> CD28共刺激信号			
<400> 7			
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser			
	5	10	15
Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys			
	20	25	30
Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg			
	35	40	45
Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro			
	50	55	60
Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser			
	65		
<210>8			
<211> 44			
<212> PRT			
<213>			
<220>			
<223> CD137共刺激信号			
<400>8			
Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro			
	5	10	15
Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser			
	20	25	30
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg			
	35	40	
<210>9			
<211> 111			
<212> PRT			
<213>			
<220>			
<223> CD3共刺激信号			

<400>9

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
20 25 30
Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
35 40 45
Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
50 55 60
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
65 70 75
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
80 85 90
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
95 100 105
Gln Ala Leu Pro Pro Arg
110

<210> 10

<211>18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223>Linker

<400> 10

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
5 10 15

Thr Lys Gly

<210>11

<211>54

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Linker

<400>11

ggcagcacca gcggcagcgg caaacccgggc agcggcgaag gcagcaccaa aggc 54

<210>12

<211>720

<212>DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CD123-scFv-1

<400>12

gatgtgcaga ttaccagag cccgagctat ctggcggcga gcccgggcga aaccattacc 60
 attaactgcc gcgcgagcaa aagcattagc aaagatctgg cgtggtatca ggaaaaaccg 120
 ggcaaaaacca acaaaactgct gatttatagc ggcagcacc tgcagagcgg cattccgagc 180
 cgcttttagcg gcagcggcag cggcaccgat ttaccctga ccattagcag cctggaaccg 240
 gaagattttg cgatgtatta ttgccagcag cataacaaat atccgtatac ctttggcggc 300
 ggcaccaaac tggaaattaa ggcagcacca gcggcagcgg caaacggggc agcggcgaag 360
 gcagcaccaa aggcacaggt gcagctgcag cageccggcg cggaactggt gcgcccgggc 420
 gcgagcgtga aactgagctg caaagcgagc ggctatacct ttaccagcta ttggatgaac 480
 tgggtgaaac agcggccgga tcagggcctg gaatggattg gccgcattga tccgtatgat 540
 agcgaaaacc attataacca gaaatttaaa gataaagcga ttctgaccgt ggataaaagc 600
 agcagcaccg cgtatatgca gctgagcagc ctgaccagcg aagatagcgc ggtgtattat 660
 tgcgcgcgcg gcaactggga tgattattgg ggccagggca ccaccctgac cgtgagcagc 720

<210>13

<211>741

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CD123-scFV-2

<400>13

gatattgtgc tgaccagag cccggcgagc ctggcgggtga gcctgggcca gcgcgcgacc 60
 attagctgcc gcgcgagcga aagcgtggat aactatggca acacctttat gcattggtat 120
 cagcagaaac cgggccagcc gccgaaactg ctgatttate gcgcgagcaa cctggaagc 180
 ggcattccgg cgcgctttag cggcagcggc agccgcaccg atttaccct gaccattaac 240
 ccggtggaag cggatgatgt ggcgacctat tattgccagc agagcaacga agatccgccg 300
 acctttggcg cgggcaccaa actggaactg aaaggcagca ccagcggcag cggcaaacg 360
 ggcagcggcg aaggcagcac caaaggccag attcagctgg tgcagagcgg cccggaactg 420
 aaaaaaccgg gcgaaaccgt gaaaattagc tgcaaagcga gcggctatat tttaccaac 480
 tatggcatga actgggtgaa acaggcgcgg ggcaaaagct ttaaattgat gggctggatt 540
 aacacctata ccggcgaaaag cacctatagc gcggatttta aaggccgctt tgcgtttagc 600
 ctggaacca gcgcgagcac cgcgtatctg catattaacg atctgaaaaa cgaagatacc 660
 gcgacctatt tttgcgcgcg cageggcggc tatgatecca tggattattg gggccagggc 720
 accagcgtga ccgtgagcag c 741

<210>14

<211> 687

<212> DNA

<213>

<220>

<223>IgG4铰链

<400> 14

gaaagcaaat atggcccgcc gtgcccgcg tgcccggcgc cggaatttct gggcggcccc 60
 agcgtgtttc tgtttccgcc gaaaccgaaa gataccctga tgattagccg caccccggaa 120
 gtgacctgcg tgggtggtgga tgtgagccag gaagatccgg aagtgcagtt taactggtat 180
 gtggatggcg tggaagtgca taacgcgaaa accaaaccgc gcgaagaaca gtttaacagc 240
 acctatcgcg tggtagcgt gctgaccgtg ctgcatcagg attggctgaa cggcaaagaa 300
 tataaatgca aagtgagcaa caaaggcctg ccgagcagca ttgaaaaaac cattagcaaa 360
 gcgaaaggcc agccgcgcga accgcaggtg tatacctgc cgccgagcca ggaagaaatg 420
 accaaaaacc aggtgagcct gacctgctg gtgaaaggt tttatccgag cgatattgag 480
 gtggaatggg aaagcaacgg ccagccggaa aacaactata aaaccacccc gccggtgctg 540
 gatagcgatg gcagcttttt tctgtatagc cgctgaccg tggataaaag ccgctggcag 600
 gaaggcaacg tgtttagctg cagcgtgatg catgaagcgc tgcataacca ttataccag 660
 aaaagcctga gcctgagcct gggcaaa 687

<210>15

<211> 141

<212> DNA

<213>

<220>

<223>CD8铰链

<400>15

aagcccacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcccacat cgcgtcgcag 60
 cccctgtccc tgcgcccaga ggctgcccgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg 120
 gggctggact tcgctgcga c 141

<210> 16

<211> 72

<212> DNA

<213>

<220>

<223>CD8跨膜区

<400> 16

atctacatct gggcgcctt ggccgggaet tgtggggtcc ttctctgtc actggttate 60
 acccttact gc 72

<210>17

<211> 87

<212> DNA

<213>

<220>

<223>CD28跨膜区

<400>17

gaattcttct gggtgctggt cgtgggtgggt ggcgtgctgg cctgctacag cctgctggtg 60
acagtggcct tcatcatctt ttgggtg 87

<210>18

<211> 204

<212> DNA

<213>

<220>

<223>CD28共刺激信号

<400>18

ttttgggtgc tgggtgggtg tgggtggagtc ctggettget atagcttget agtaacagtg 60
gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag aggagcagge tectgcacag tgactacatg 120
aacatgactc cccgccgccc cgggcccacc cgcaagcatt accagcccta tgecccacca 180
cgcgacttcg cagcctatcg ctcc 204

<210>19

<211> 132

<212> DNA

<213>

<220>

<223>CD137共刺激信号

<400>19

gttaaacggg gcagaaagaa actcctgtat atattcaaac aaccatttat gagaccagta 60
caactactc aagaggaaga tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga 120
tgtgaactga ga 132

<210>20

<211> 333

<212> DNA

<213>

<220>

<223>CD3共刺激信号

<400> 20

gtgaagttca gcaggagcgc agacgceccc gcgtaccage agggccagaa ccagctctat 60
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg 120
gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 180
ctgcagaaag ataagatgge ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgcggg 240
aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 300
gacgcccttc acatgcagge cctgccccct cgc 333

<210>21

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223>正向引物

<400>21

aggctagcat gggatggagc tgtatcat 28

<210>22

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 反向引物

<400>22

gattgtcgac ttagcgaggg ggcagggcct gcatgtga 38

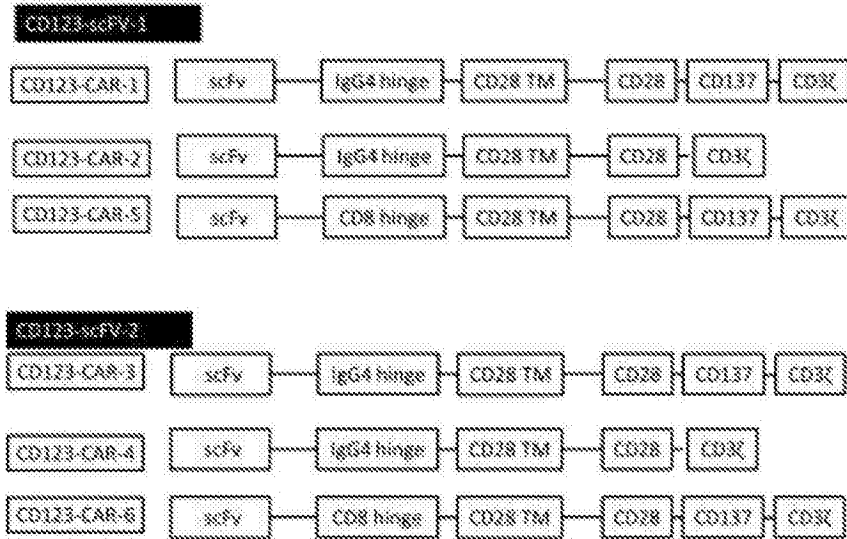


图1

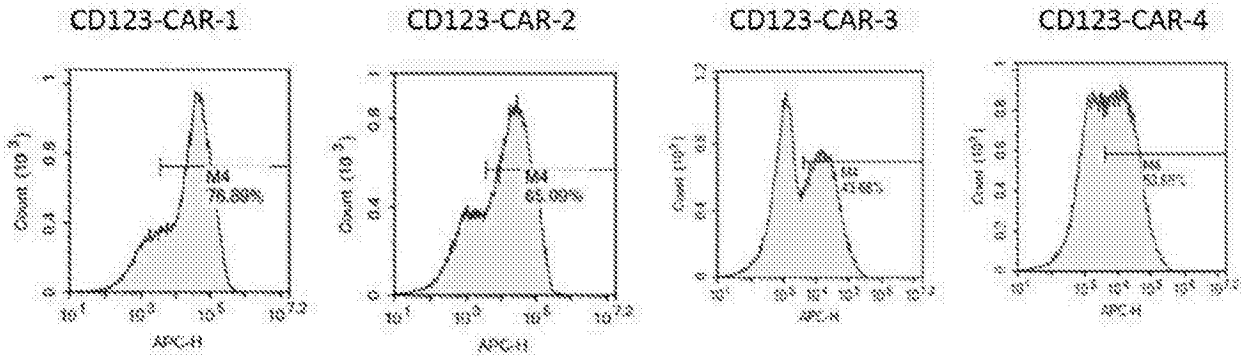


图2

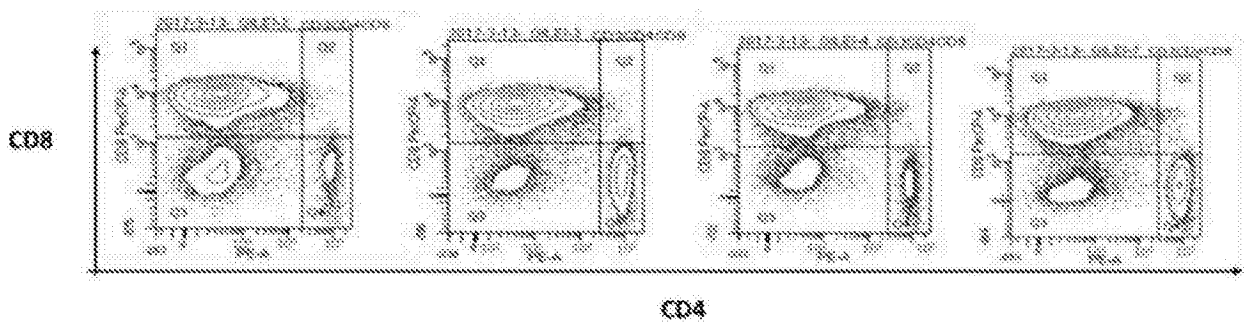


图3

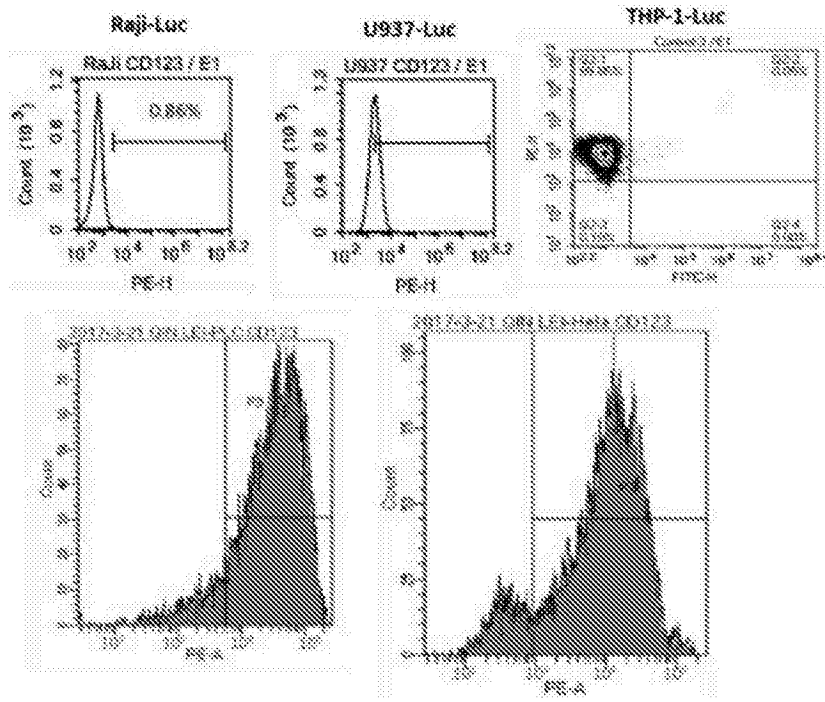


图4

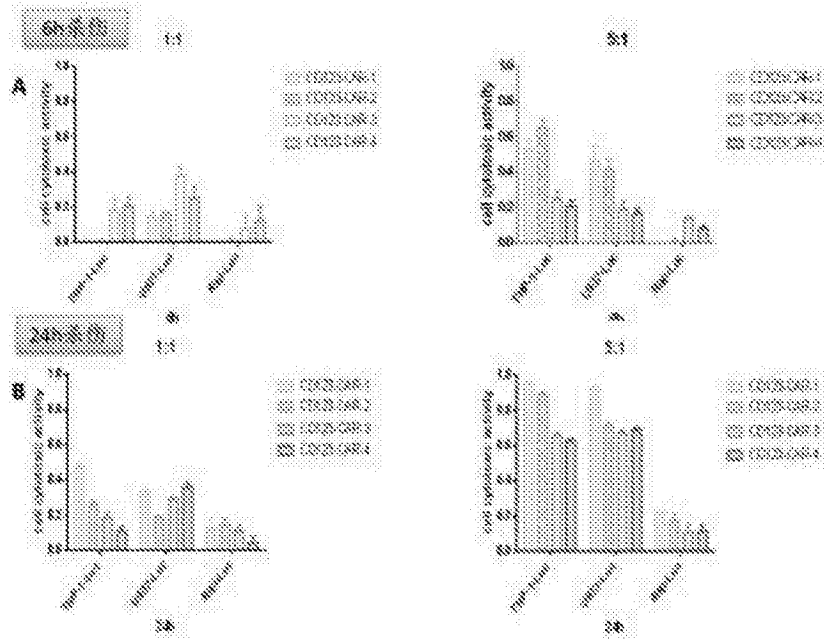


图5

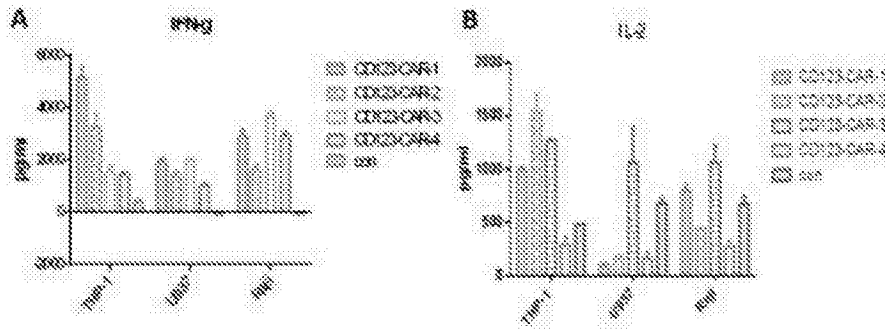


图6

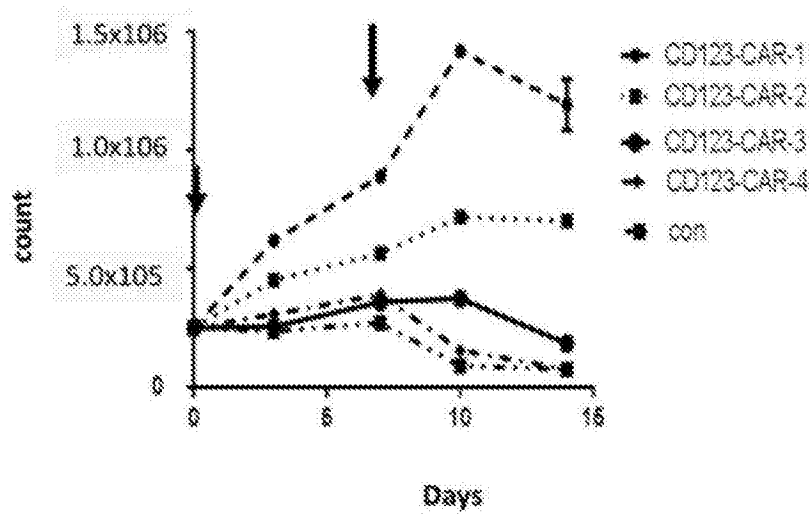


图7

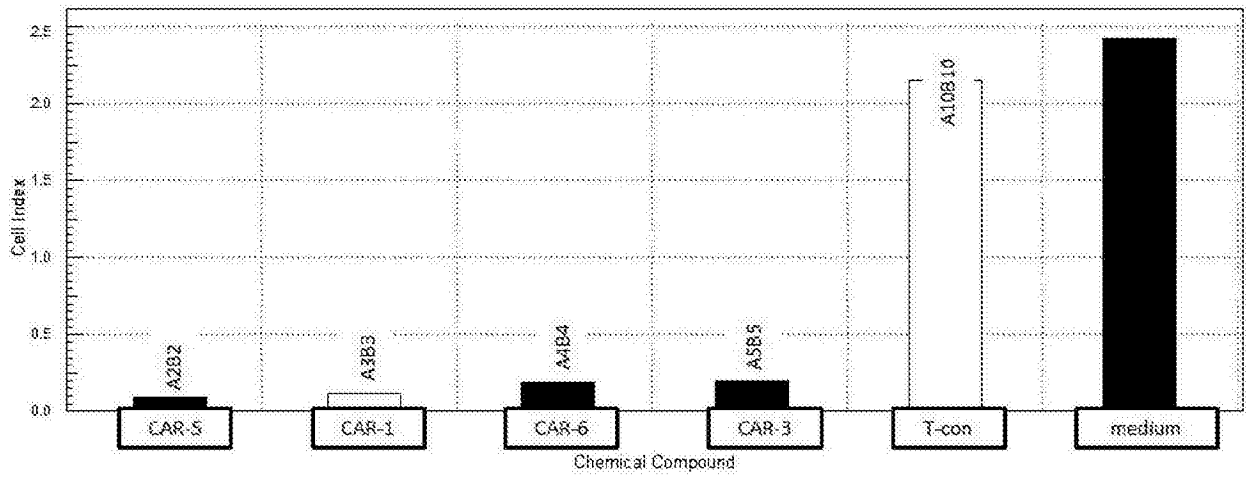


图8