



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106967681 A

(43)申请公布日 2017.07.21

(21)申请号 201610021438.7 *A61K 48/00*(2006.01)

(22)申请日 2016.01.13 *A61K 38/17*(2006.01)

(71)申请人 北京马力喏生物科技有限公司 *A61P 35/00*(2006.01)

地址 101111 北京市大兴区经济技术开发  
区科创六街88号院6号楼1单元701-1  
室

(72)发明人 严勇朝 朱益林 陈思毅

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11201

代理人 李志东

(51)Int.Cl.

*C12N 5/0783*(2010.01)

*C12N 5/10*(2006.01)

*C12N 7/01*(2006.01)

*C12N 15/867*(2006.01)

权利要求书3页 说明书30页 附图2页

(54)发明名称

治疗脑胶质母细胞瘤的治疗组合物

(57)摘要

本发明为治疗脑胶质母细胞瘤的治疗组合物,提出了一种转基因淋巴细胞、一种构建体和一种治疗癌症的治疗组合物,该转基因淋巴细胞的细胞检查点被沉默、表达无功能EGFR受体以及表达嵌合抗原受体。该转基因淋巴细胞具有抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制的特性,对肿瘤细胞的杀伤能力显著增强,尤其对EGFRvIII突变的脑胶质母细胞瘤具有显著的定向杀伤作用,且安全性高。

1. 一种T淋巴细胞,其特征在于,所述T淋巴细胞的免疫检查点被沉默;  
表达无功能EGFR受体;  
以及表达嵌合抗原受体,其中,  
所述嵌合抗原受体包括:  
胞外区,所述胞外区包括单链抗体的重链可变区和轻链可变区,所述单链抗体特异性识别抗原EGFRvIII;  
跨膜区,所述跨膜区与所述胞外区相连,并且嵌入到所述T淋巴细胞的细胞膜中;  
胞内区,所述胞内区与所述跨膜区相连,并且所述胞内区包括CD28或4-1BB的胞内段以及CD3 $\zeta$ 链。
2. 一种慢病毒,其特征在于,所述慢病毒携带下列核酸分子:
  - (a) 编码嵌合抗原受体的核酸分子,所述嵌合抗原受体具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,所述编码嵌合抗原受体的核酸分子具有SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列;
  - (b) 沉默细胞免疫检查点的核酸分子,所述沉默细胞免疫检查点的核酸分子的核苷酸序列为选自SEQ ID NO:3~135的至少之一;以及
  - (c) 编码无功能EGFR受体的核酸分子,所述无功能EGFR受体具有SEQ ID NO:136所示的氨基酸序列,所述编码无功能EGFR受体的核酸分子具有SEQ ID NO:137所示的核苷酸序列。
3. 一种慢病毒,其特征在于,所述慢病毒携带含有SEQ ID NO:138、139、140或141所示的核苷酸序列。
4. 一种转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞细胞免疫检查点被沉默;  
表达无功能EGFR受体;  
以及表达嵌合抗原受体。
5. 根据权利要求4所述的转基因淋巴细胞,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。
6. 根据权利要求5所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述抗原是肿瘤抗原。
7. 根据权利要求6所述的转基因淋巴细胞,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。
8. 根据权利要求7所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述抗体为单链抗体。
9. 根据权利要求8所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述抗原为EGFRvIII。
10. 根据权利要求4所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞细胞免疫检查点独立地选自CTLA4、PD-1、TIM-3、BTLA、LAG-1、IRAK-M、SOCS-1、A20、CBL-B的至少之一。
11. 根据权利要求4所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞细胞表面免疫检查点被沉默是通过shRNA、反义核酸、核酶、显性负突变、CRISPR和锌指核酸酶至少之一实现的。
12. 根据权利要求5所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述免疫共刺激分子胞内段独立地选自4-1BB、OX-40、CD40L、CD27、CD30、CD28以及他们的衍生物的至少一种。
13. 根据权利要求10所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞细胞免疫检查点是CTLA4、PD-1、CBL-B。

14. 根据权利要求11所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞细胞内免疫检查点被沉默是通过shRNA实现的。

15. 根据权利要求12所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述免疫共刺激分子胞内段是4-1BB或CD28的胞内段。

16. 根据权利要求4所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞是CD3+T淋巴细胞。

17. 根据权利要求4所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞是自然杀伤细胞。

18. 根据权利要求4所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞是自然杀伤T细胞。

19. 一种构建体,其特征在于,所述构建体包括:

第一核酸分子,所述第一核酸分子编码嵌合抗原受体;

第二核酸分子,所述第二核酸分子沉默细胞免疫检查点;以及

第三核酸分子,所述第三核酸分子编码无功能EGFR受体,

其中,所述细胞免疫检查点、所述嵌合抗原受体、所述无功能EGFR受体是如权利要求2、4~18任一项中所定义的。

20. 根据权利要求19所述的构建体,其特征在于,所述第一核酸分子、所述第二核酸分子和所述第三核酸分子被设置为在权利要求4~18任一项所述的淋巴细胞中表达所述嵌合抗原受体、沉默细胞免疫检查点和表达无功能EGFR受体,并且所述嵌合抗原受体与所述无功能EGFR受体呈非融合形式。

21. 根据权利要求19所述的构建体,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;

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;以及

第三启动子,所述第三启动子与所述第三核酸分子可操作地连接。

22. 根据权利要求21所述的构建体,其特征在于,所述第一启动子、所述第二启动子、所述第三启动子分别独立地选自U6, H1, CMV, EF-1, LTR, 或RSV启动子。

23. 根据权利要求19所述的构建体,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三核酸分子之间,所述内部核糖体进入位点具有SEQ ID NO:142所示的核苷酸序列。

24. 根据权利要求19所述的构建体,其特征在于,进一步包括:

第四核酸分子,设置在所述第一核酸分子与所述第三核酸分子之间,并且所述第四核酸分子编码连接肽,所述连接肽能够在所述淋巴细胞中被切割。

25. 根据权利要求24所述的构建体,其特征在于,所述连接肽具有SEQ ID NO:143所示的氨基酸序列。

26. 根据权利要求19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。

27. 根据权利要求26所述的构建体,其特征在于,所述构建体的载体是病毒载体,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。

28. 一种制备权利要求1所述的T淋巴细胞或者权利要求4~18任一项所述的转基因淋

巴细胞的方法,其特征在于,包括:

将权利要求19~27任一项所述的构建体或者权利要求2~3任一项所述的慢病毒引入到淋巴细胞中或者T淋巴细胞。

29.一种用于治疗癌症的治疗组合物,其特征在于,包括:

权利要求19~27任一项所述的构建体、权利要求2~3任一项所述的慢病毒、权利要求1所述的T淋巴细胞或者权利要求4~18任一项所述的转基因淋巴细胞。

30.根据权利要求29所述的治疗组合物,其特征在于,所述癌症包括脑胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、乳腺癌或卵巢癌。

31.一种提高淋巴细胞活性和治疗安全性的方法,所述淋巴细胞携带嵌合抗原受体,其特征在于,所述方法包括:

使所述淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默,以及

使所述淋巴细胞表达无功能EGFR受体,

所述细胞内免疫检查点、所述淋巴细胞、所述嵌合抗原受体、所述无功能EGFR受体如权利要求2、4~18任一项中所定义的,

所述淋巴细胞活性包括所述淋巴细胞在体外的增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力以及所述淋巴细胞在肿瘤病人体内的定向杀伤能力的至少一种。

## 治疗脑胶质母细胞瘤的治疗组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体地,本发明涉及一种T淋巴细胞、一种慢病毒、一种转基因淋巴细胞、一种构建体、一种用于治疗癌症的治疗组合物和一种提高淋巴细胞活性和治疗安全性的方法。

### 背景技术

[0002] 脑胶质母细胞瘤是恶性度最高的脑瘤,占中枢神经系统恶性肿瘤的~81%,恶性胶质瘤的发病率为3-6/10万,每年中国因此病死亡人数为3万人。恶性胶质瘤呈浸润性生长,与正常脑组织无明显界限,并且多数不限于一个脑叶,呈指状深入破坏脑组织,手术不可能完全切除。虽然术前采用了最为积极的治疗手段,但中位生存期仍只有<15个月,单独使用放疗,仅有不足1%的患者可以存活5年,即使新出现的放疗与替莫唑胺(TMZ)化疗的联用方案,也只使近10%患者存活至5年以上。

[0003] 由此可见,开发有效治疗脑胶质母细胞瘤的方法尤为迫切。

### 发明内容

[0004] 本申请是基于发明人对以下事实和问题的发现和认识作出的:

[0005] EGFR突变体EGFRvIII(EGFR胞外段的267个氨基酸被去除,其是由EGFR基因的第2~7个外显子(275~1075位核苷酸)去除后的基因编码的)在约30%的胶质母细胞瘤患者中表达,但在正常组织中未检测到,因此,EGFRvIII可代表胶质母细胞瘤的特异性突变。

[0006] 基于上述发现,发明人提出了一种携带沉默细胞免疫检查点的核酸分子和编码无功能EGFR的核酸分子以及编码嵌合抗原受体的核酸分子的构建体和一种以此构建体导入后形成的转基因淋巴细胞,其编码的嵌合抗原受体特异性结合抗原EGFRvIII。因此,本发明提出的构建体和转基因淋巴细胞用于肿瘤,尤其是胶质母细胞瘤的过继T细胞的免疫治疗,可以大大提高T淋巴细胞对脑胶质母细胞瘤细胞的特异杀伤能力,且治疗安全性显著提高。

[0007] 在本发明的第一方面,本发明提出了一种T淋巴细胞。根据本发明的实施例,所述T淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默;表达无功能EGFR受体;以及表达嵌合抗原受体,其中,所述嵌合抗原受体包括:胞外区,所述胞外区包括单链抗体的重链可变区和轻链可变区,所述单链抗体特异性识别抗原EGFRvIII;跨膜区,所述跨膜区与所述胞外区相连,并且嵌入到所述T淋巴细胞的细胞膜中;胞内区,所述胞内区与所述跨膜区相连,并且所述胞内区包括CD28或4-1BB的胞内段以及CD3ζ链。其中,细胞免疫检查点包括细胞表面或细胞内至少之一的免疫检查点。无功能EGFR受体缺少N-端配体结合区和细胞内受体酪氨酸激酶活性,但包括野生型EGFR受体的跨膜区和完整的与抗EGFR抗体结合的序列,无功能EGFR受体可作为淋巴细胞的自杀标记。根据本发明的实施例,本发明实施例的T淋巴细胞具有抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制的特性,在体外的增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力显著提高,对肿瘤细胞的杀伤能力显著增强,尤其对EGFRvIII突变的脑胶质母细胞瘤具有显著的定向杀伤作用,安全性高。

[0008] 在本发明的第二方面,本发明提出了一种慢病毒。根据本发明的实施例,所述慢病毒携带下列核酸分子:(a)编码嵌合抗原受体的核酸分子,所述嵌合抗原受体具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,所述编码嵌合抗原受体的核酸分子具有SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列;(b)沉默细胞免疫检查点的核酸分子,所述沉默细胞免疫检查点的核酸分子的核苷酸序列为选自SEQ ID NO:3~135的至少之一;以及(c)编码无功能EGFR受体的核酸分子,所述无功能EGFR受体具有SEQ ID NO:136所示的氨基酸序列,所述编码无功能EGFR受体的核酸分子具有SEQ ID NO:137所示的核苷酸序列。

[0009] M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P G S D I Q M T Q S P S S L S  
A S V G D R V T I T C R A S Q G I R N N L A W Y Q Q K P G K A P K R L I Y A A  
S N L Q S G V P S R F T G S G S G T E F T L I V S S L Q P E D F A T Y Y C L Q  
H H S Y P L T S G G G T K V E I K R T G S T S G S G K P G S G E G S E V Q V L  
E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G K G  
L E W V S A I S G S G G S T N Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M  
N S L R A E D T A V Y Y C A G S S G W S E Y W G Q G T L V T V S S A A A F V P  
V F L P A K P T T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A C R P A A G  
G A V H T R G L D F A C D I Y I W A P L A G T C G V L L L S L V I T L Y C N H  
R N K R G R K K L L Y I F K Q P F M R P V Q T T Q E E D G C S C R F P E E E E  
G G C E L R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V  
L D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E  
I G M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R  
(SEQ ID NO:1)。

[0010]

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGGATCCGACATCCA  
GATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTGGGCCAGCCAGGGCA  
TCAGAAACAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGAGACTGATCTACGCTGCCAGCAATCTG  
CAGAGCGGCGTGCCAGCAGATTCACCGGAAGCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCCTGATCGTGTCCAGCCTGCAGCC  
CGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGCACACAGCTACCCTCTGACCAGCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGA  
TCAAGCGGACCGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGAAGCGAGGTCCAGGTGCTGGAATCT  
GGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTACGAGCTACGC  
CATGTCTTGGGTCCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCGGCTCTGGCGGCTCCACCA  
ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTATCTGCAGATGAAC  
AGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCGGCAGCAGCGGGTGGAGCGAGTACTGGGGCCAGGGCAC  
ACTGGTCACAGTGTCTAGCGCGGCCGATTCTGTGCCGGTCTTCCCTGCCAGCGAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGC  
GACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTGCAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGGCGGCCAGCGGCGGGG  
GGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGT  
CCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAACCACAGGAACAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATAT  
TCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAA  
GAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT  
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG

GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC  
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCAC  
CAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA(SEQ ID NO:2)。

- [0011] GGCCAGGATGGTTCTTAGACT(SEQ ID NO:3)。
- [0012] GGATTTCCAGTGGCGAGAGAA(SEQ ID NO:4)。
- [0013] GCCUGUGUUCUCUGUGGACUAUG(SEQ ID NO:5)。
- [0014] GGUGCUGCUAGUCUGGGUCCUGG(SEQ ID NO:6)。
- [0015] GACAGAGAGAAGGGCAGAAGUGC(SEQ ID NO:7)。
- [0016] CAGCUUCUCCAACACAUCGGAGA(SEQ ID NO:8)。
- [0017] CCGUGUCACACAACUGCCCAACG(SEQ ID NO:9)。
- [0018] UAUGCCACCAUUGUCUUUCCUAG(SEQ ID NO:10)。
- [0019] UGCUAAACUGGUACCGCAUGAGC(SEQ ID NO:11)。
- [0020] GUGACAGAGAGAAGGGCAGAAGU(SEQ ID NO:12)。
- [0021] CUGAGGAUGGACACUGCUCUUGG(SEQ ID NO:13)。
- [0022] AUCGGAGAGCUUCGUGC AAAACU(SEQ ID NO:14)。
- [0023] GGCAACGGAACCCAGATTTAT(SEQ ID NO:15)。
- [0024] GGAACCCAAATTACGTGTACT(SEQ ID NO:16)。
- [0025] GAACCCAAATTACGTGTACTA(SEQ ID NO:17)。
- [0026] GGGAGAAGACTATATTGTACA(SEQ ID NO:18)。
- [0027] GACGTTTATAGCCGAAATGAT(SEQ ID NO:19)。
- [0028] GACACTAATACACCAGGTAGA(SEQ ID NO:20)。
- [0029] ACCUCACUAUCCAAGGACUGAGG(SEQ ID NO:21)。
- [0030] AUGAGUUGACCUUCCUAGAUGAU(SEQ ID NO:22)。
- [0031] GGGGAAUGAGUUGACCUUCCUAG(SEQ ID NO:23)。
- [0032] CUCUGGAUCCUUGCAGCAGUUAG(SEQ ID NO:24)。
- [0033] CUCCUCUGGAUCCUUGCAGCAGU(SEQ ID NO:25)。
- [0034] UUUUGUGUGAGUAUGCAUCUCC(SEQ ID NO:26)。
- [0035] CACCUCCAGUGGAAAUCAAGUGA(SEQ ID NO:27)。
- [0036] CACGGGACUCUACAUCUGCAAGG(SEQ ID NO:28)。
- [0037] UUCUGACUCCUCCUCUGGAUCC(SEQ ID NO:29)。
- [0038] AAGUCUGUGCGGCAACCUACAUG(SEQ ID NO:30)。
- [0039] GGTCGGTCAGAATGCCTATCT(SEQ ID NO:31)。
- [0040] GCCAATGACTTACGGGACTCT(SEQ ID NO:32)。
- [0041] GCAGAGGGAATTCGCTCAGAA(SEQ ID NO:33)。
- [0042] GGAAATTCGGGCACATCATAT(SEQ ID NO:34)。
- [0043] GATTAAGAGATGACTGGACTA(SEQ ID NO:35)。
- [0044] GAGATGACTGGACTAGGTCTA(SEQ ID NO:36)。
- [0045] AGGAAAUUCGGGCACAUCAUAUG(SEQ ID NO:37)。
- [0046] GACUGAUGAAAGGAUGUGAAUU(SEQ ID NO:38)。

- [0047] GCCACUGAUUUUCAAGAGAUCU(SEQ ID NO:39)。  
[0048] AGCAGAGUUUUCCCAUUUCAGA(SEQ ID NO:40)。  
[0049] AACUUAAACAGGCAUGUCAUUGC(SEQ ID NO:41)。  
[0050] UUCAGAAGAUAAUGACUCACAUG(SEQ ID NO:42)。  
[0051] GCCUCUGUAAAAAGCCAACAGA(SEQ ID NO:43)。  
[0052] UGCUCAUGUGAUUGUGGAGUAGA(SEQ ID NO:44)。  
[0053] AUGUUUUCACAUCUCCCUUUGA(SEQ ID NO:45)。  
[0054] GAGAGACUUCACUGCAGCCUUC(SEQ ID NO:46)。  
[0055] GATTGCCTCTACTCATCTACTA(SEQ ID NO:47)。  
[0056] UCCUAAUGACAAUGGGUCAUACC(SEQ ID NO:48)。  
[0057] AAGACAUUGCCUGCCAUGCUUGG(SEQ ID NO:49)。  
[0058] GUCAUACCGCUGUUCUGCAAAUU(SEQ ID NO:50)。  
[0059] CUCCUGUAUAGUUUACUCCUUU(SEQ ID NO:51)。  
[0060] UACCGCUGUUCUGCAAAUUUCA(SEQ ID NO:52)。  
[0061] AAAACAAACCAGGCAUUGUUUAU(SEQ ID NO:53)。  
[0062] AACUAGAAUGCCCUGUGAAUAC(SEQ ID NO:54)。  
[0063] GUGACUUGGUGCAAGCUAAUGG(SEQ ID NO:55)。  
[0064] AUCCAUGGAAAGAAUCAUGUGA(SEQ ID NO:56)。  
[0065] UGGUGCAAGCUAAUGGAACAAC(SEQ ID NO:57)。  
[0066] GCTGCTCACCTTATGAACCT(SEQ ID NO:58)。  
[0067] AGGACAUGGUGGUGGACGAGUGC(SEQ ID NO:59)。  
[0068] UGCUCUCCUGCACGAUAUCAGU(SEQ ID NO:60)。  
[0069] ACCUCUACUGGUUCCUGUACAUC(SEQ ID NO:61)。  
[0070] CCCUCCAACUCUGCUCCUCUAGG(SEQ ID NO:62)。  
[0071] CCCUGAGUGGACAGUCGUCUUCG(SEQ ID NO:63)。  
[0072] CUGCUCCAGGGAAGCUUCAUGG(SEQ ID NO:64)。  
[0073] CGCUCAAGGUCCUGUAUGCCACC(SEQ ID NO:65)。  
[0074] GAGUUCACCAAGCUCAACAUUUU(SEQ ID NO:66)。  
[0075] UGCUGCUGCUCACCCUUAUGAAC(SEQ ID NO:67)。  
[0076] CCCAUCUCGGUGCUCUUCUUUGA(SEQ ID NO:68)。  
[0077] GGGACATCGTCGAGCTATTCA(SEQ ID NO:69)。  
[0078] GGACATCGTCGAGCTATTTCAT(SEQ ID NO:70)。  
[0079] GCCAATGTCACCGTGGATAAT(SEQ ID NO:71)。  
[0080] GTCATCTGTGGCAGTATATCA(SEQ ID NO:72)。  
[0081] GGATGTAGAGTAGTGTTAGAT(SEQ ID NO:73)。  
[0082] GGCAAAGTTAAGACCATCAAT(SEQ ID NO:74)。  
[0083] GACCAAATCCACGCTCAATTA(SEQ ID NO:75)。  
[0084] UACUGCUUUAAUCUCCAUCAGC(SEQ ID NO:76)。  
[0085] GACUGAGAAGUUCUGUCUGAUUU(SEQ ID NO:77)。

- [0086] CUGUUUCAUCACCCAAACAUACU(SEQ ID NO:78)。  
[0087] GAAGAUCUCCCAUCACUAAA(SEQ ID NO:79)。  
[0088] UAGACCAAGGUAAAAGUGGAACA(SEQ ID NO:80)。  
[0089] AAGAGGUUUUAUCUGAGCUUGA(SEQ ID NO:81)。  
[0090] UACCUGCACAACGUUCAACCAUG(SEQ ID NO:82)。  
[0091] GCCUGGAUUCAUGUCUCUCAUUU(SEQ ID NO:83)。  
[0092] CCCUCGGAAUUUCUCUGCCAAGC(SEQ ID NO:84)。  
[0093] UGCUGAAGAUCUCCCAUCAC(SEQ ID NO:85)。  
[0094] GCACCTCCTACCTCTTCATGT(SEQ ID NO:86)。  
[0095] CGCACUUCGACAUUCCGUUCG(SEQ ID NO:87)。  
[0096] GGGGAGGGUCUCUGGCUUUUUU(SEQ ID NO:88)。  
[0097] CAGCAUUAACUGGGAUGCCGUGU(SEQ ID NO:89)。  
[0098] CCAGGACCUGAACUCGCACCUCC(SEQ ID NO:90)。  
[0099] UACAUAUACCCAGUAUCUUUGCA(SEQ ID NO:91)。  
[0100] GCCGACAAUGCAGUCUCCACAGC(SEQ ID NO:92)。  
[0101] CCCUGGUUGUUGUAGCAGCUUA(SEQ ID NO:93)。  
[0102] CUGCUGUGCAGAAUCCUAAAAU(SEQ ID NO:94)。  
[0103] UGGGAUGCCGUGUUUUUUGUUA(SEQ ID NO:95)。  
[0104] UCGCACCUCUACCUCUUAUGU(SEQ ID NO:96)。  
[0105] GCGGAAAGCTGTGAAGATACG(SEQ ID NO:97)。  
[0106] ACAAAGCCCTCATCGACAGAA(SEQ ID NO:98)。  
[0107] ATGCCACTTCTCAGTACATGT(SEQ ID NO:99)。  
[0108] GTGGACTTCAGTACAACCTCAC(SEQ ID NO:100)。  
[0109] GTGGAATTTACTTGCCTCTCC(SEQ ID NO:101)。  
[0110] GTTGGATGAAGCTAACTTACC(SEQ ID NO:102)。  
[0111] ACTGGGAAGACGTGTAACCTCT(SEQ ID NO:103)。  
[0112] AAGGAATTGCATCCAAGGTAT(SEQ ID NO:104)。  
[0113] GGAATTGCATCCAAGGTATAAC(SEQ ID NO:105)。  
[0114] GGATGAGACTGGCAATGGTCA(SEQ ID NO:106)。  
[0115] UCCUCAGUUUCGGGAGAUCAUCC(SEQ ID NO:107)。  
[0116] GAGUCUCUAAAUCUCAGGAAUU(SEQ ID NO:108)。  
[0117] AGCUCUAGUCCUUUUUGUGUAAU(SEQ ID NO:109)。  
[0118] CACUGGAAAUGUUCAGAACUUGC(SEQ ID NO:110)。  
[0119] AUGAUGAAUGGGACAAUCUUAUC(SEQ ID NO:111)。  
[0120] CACACUGUGUUUCAUCGAGUACA(SEQ ID NO:112)。  
[0121] GCAGAACCAUCCAUGGACUGUGA(SEQ ID NO:113)。  
[0122] AAAGAUGUGGCCUUUUUGUGAUGG(SEQ ID NO:114)。  
[0123] UUCAGAACUUGCCAGUUUUUGUCC(SEQ ID NO:115)。  
[0124] AUGAGACUGGCAAUGGUCACAGG(SEQ ID NO:116)。

- [0125] GTCAATTCCAGGGAGATAACT(SEQ ID NO:117)。
- [0126] GCCTGGAAGCAATGGCTCTAA(SEQ ID NO:118)。
- [0127] GCACCAAACCCGGAAGCTATA(SEQ ID NO:119)。
- [0128] GTTGCACCTCGATTGGGACAGT(SEQ ID NO:120)。
- [0129] GGATTATGTGAACCTACACCT(SEQ ID NO:121)。
- [0130] GGAATCACAGCGAGTTCAAAT(SEQ ID NO:122)。
- [0131] GCAAGGCATAGTCTCATTGAA(SEQ ID NO:123)。
- [0132] GGTGAAGAGAGCCTTAGAGAT(SEQ ID NO:124)。
- [0133] GTGAAGAGAGCCTTAGAGATA(SEQ ID NO:125)。
- [0134] AGGAGCUAAGGUCUUUCCAAUG(SEQ ID NO:126)。
- [0135] AUGUCGAUGCAAAAAUUGCAAAA(SEQ ID NO:127)。
- [0136] GUCACAUGCUGGCAGAAAUCAAA(SEQ ID NO:128)。
- [0137] UCCAGGUUACAUGGCAUUUCUCA(SEQ ID NO:129)。
- [0138] UUGAACUUUGAACCGUGAAAUG(SEQ ID NO:130)。
- [0139] UCCACAUCAACAGCUAAAUCAUU(SEQ ID NO:131)。
- [0140] AUGCUGGCAGAAAUCAAAGCAAU(SEQ ID NO:132)。
- [0141] UGCAGAGAAUGACAAAGAUGUCA(SEQ ID NO:133)。
- [0142] GGCAGAACUCACCAGUCACAUCA(SEQ ID NO:134)。
- [0143] UCGGUCCUGUGAUAUGGUCACU(SEQ ID NO:135)。
- [0144] M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P G S R K V C N G I G I G E F  
K D S L S I N A T N I K H F K N C T S I S G D L H I L P V A F R G D S F T H T  
P P L D P Q E L D I L K T V K E I T G F L L I Q A W P E N R T D L H A F E N L  
E I I R G R T K Q H G Q F S L A V V S L N I T S L G L R S L K E I S D G D V I  
I S G N K N L C Y A N T I N W K K L F G T S G Q K T K I I S N R G E N S C K A  
T G Q V C H A L C S P E G C W G P E P R D C V S C R N V S R G R E C V D K C N  
L L E G E P R E F V E N S E C I Q C H P E C L P Q A M N I T C T G R G P D N C  
I Q C A H Y I D G P H C V K T C P A G V M G E N N T L V W K Y A D A G H V C H  
L C H P N C T Y G C T G P G L E G C P T N G P K I P S I A T G M V G A L L L L  
L V V A L G I G L F M R R(SEQ ID NO:136)。
- [0145]  
ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCCGCACGCCCTGGGAGTCGCAAAGT  
CTGTAATGGGATCGGCATCGGCGAGTTCAAGGACAGCCTGTCCATCAACGCCACCAATATCAAGCACTTTAAGAATT  
GCACATCTATCAGCGGGACCTGCACATCCTGCCAGTGGCCTTCCGGGGCGATTCTTTTACCCACACACCCCCTCTG  
GACCCTCAGGAGCTGGATATCCTGAAGACCGTGAAGGAGATCACAGGCTTCCCTGCTGATCCAGGCCTGGCCTGAGAA  
CAGAACCGATCTGCACGCCTTTGAGAATCTGGAGATCATCCGGGGCAGAACAAAGCAGCACGGCCAGTTCTCCCTGG  
CCGTGGTGTCTCTGAACATCACCAGCCTGGGCCTGAGGTCCCTGAAGGAGATCTCTGACGGCGATGTGATCATCTCC  
GGCAACAAGAACCTGTGCTACGCCAACACAATCAATTGGAAGAAGCTGTTGGCACCTCTGGCCAGAAGACAAAGAT  
CATCTCTAACCGGGGGCAGAAATAGCTGCAAGGCAACCGGACAGGTGTGCCACGCACTGTGCAGCCCAGAGGGATGTT  
GGGGCCCAGAGCCACGGGACTGCGTGAGCTGTAGAAACGTGTCCAGGGGCCGAGTGCCTGGATAAGTGTAATCTG

CTGGAGGGCGAGCCAAGGGAGTTCGTGGAGAACTCCGAGTGCATCCAGTGTACCCCCGAGTGCCTGCCTCAGGCCAT  
GAACATCACCTGTACAGGCCGCGGCCCGACAATTGCATCCAGTGTGCCACTATATCGATGGCCCTACTGCGTGA  
AGACCTGTCCAGCCGGCGTGATGGGCGAGAACAATACACTGGTGTGGAAGTACGCAGACGCAGGACACGTGTGCCAC  
CTGTGCCACCCCAATTGCACCTATGGCTGTACAGGACCAGGCCTGGAGGGATGCCAACCAACGGCCCTAAGATCCC  
AAGCATCGCCACAGGCATGGTGGGGCACTGCTGCTGCTGCTGGTGGTGGCTCTGGGGATTGGGCTGTTTATGAGAA  
GGTAA(SEQ ID NO:137)。

[0146] 根据本发明的实施例,将本发明实施例的慢病毒导入淋巴细胞所得的转基因淋巴细胞,其具有抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制的特性,在体外的增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力显著增强,对肿瘤细胞的杀伤能力显著增强,尤其对EGFRvIII突变的脑胶质母细胞瘤具有显著的定向杀伤作用,安全性高。

[0147] 在本发明的第三方面,本发明提出了一种慢病毒。根据本发明的实施例,所述慢病毒携带含有SEQ ID NO:138、139、140或141所示的核苷酸序列。

[0148]

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCCGCAGGCCGGGATCCGACATCCA  
GATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCCGGCCAGCCAGGGCA  
TCAGAAACAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGAGACTGATCTACGCTGCCAGCAATCTG  
CAGAGCGGCGTGCCAGCAGATTCACCGGAAGCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGATCGTGTCCAGCCTGCAGCC  
CGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGCACCACAGCTACCCTCTGACCAGCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGA  
TCAAGCGGACCGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGAAGCGAGGTCCAGGTGCTGGAATCT  
GGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGC  
CATGTCTTGGGTCCGGCAGGCTCCTGGAAAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCGGCTCTGGCGGCTCCACCA  
ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTATCTGCAGATGAAC  
AGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTAATACTACTGTGCCGGCAGCAGCGGGTGGAGCGAGTACTGGGGCCAGGGCAC  
ACTGGTACAGTGTCTAGCGCGGCCGATTCGTGCCGGTCTTCCCTGCCAGCGAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGC  
GACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGACGCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGG  
GGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGT  
CCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAACCACAGGAACAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATAT  
TCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAA  
GAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT  
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG  
GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC  
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGTCTCAGTACAGCCAC  
CAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAATCCTACTGCGTCGACTTCAATTTAAAT  
CGGATCCGCGGCCGCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGT  
GCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTT  
CTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTGCTGAAGGAAGCAG  
TTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTGCAGGCAGCGAACCCCCACCTGGCGAC  
AGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAG  
TTGGATAGTTGTGAAAGAGTCAAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTAC

CCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTA  
GGCCCCCGAACACGGGGACGTGGTTTTCCCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGCGTCCGGAT  
CTAGAATGGCTCTGCCCCACCGCTCTGCTGCTGCCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCCGCACGCCCTGGGAGTCGC  
AAAGTCTGTAATGGGATCGGCATCGGCGAGTTCAAGGACAGCCTGTCCATCAACGCCACCAATATCAAGCACTTTAA  
GAATTGCACATCTATCAGCGGCGACCTGCACATCCTGCCAGTGGCCTTCCGGGGCGATTCTTTTACCCACACACCCC  
CTCTGGACCCTCAGGAGCTGGATATCCTGAAGACCGTGAAGGAGATCACAGGCTTCCTGCTGATCCAGGCCTGGCCT  
GAGAACAGAACCGATCTGCACGCCTTTGAGAATCTGGAGATCATCCGGGGCAGAACAAGCAGCACGGCCAGTTCTC  
CCTGGCCGTGGTGTCTCTGAACATCACCAGCCTGGGCCTGAGGTCCCTGAAGGAGATCTCTGACGGCGATGTGATCA  
TCTCCGGCAACAAGAACCTGTGTACGCCAACACAATCAATTGGAAGAAGCTGTTTGGCACCTCTGGCCAGAAGACA  
AAGATCATCTCTAACCGGGGCGAGAATAGCTGCAAGGCAACCGGACAGGTGTGCCACGCACTGTGCAGCCCAGAGGG  
ATGTTGGGGCCAGAGCCACGGGACTGCGTGAGCTGTAGAAACGTGTCCAGGGGCCGAGTGCCTGGATAAGTGTA  
ATCTGCTGGAGGGCGAGCCAAGGGAGTTCGTGGAGAACTCCGAGTGCATCCAGTGTACCCCCAGTGCCTGCCTCAG  
GCCATGAACATCACCTGTACAGGCCGCGGCCCGACAATTGCATCCAGTGTGCCACTATATCGATGGCCCTCACTG  
CGTGAAGACCTGTCCAGCCGGCGTGATGGGCGAGAACAATACTGGTGTGGAAGTACGCAGACGCAGGACACGTGT  
GCCACCTGTGCCACCCCAATTGCACCTATGGCTGTACAGGACCAGGCCTGGAGGGATGCCAACCAACGGCCCTAAG  
ATCCCAAGCATCGCCACAGGCATGGTGGGGGCACTGCTGCTGCTGCTGGTGGTGGCTCTGGGGATTGGGCTGTTTAT  
GAGAAGGTAATCCTACTGCGAATTCGTCGACCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCC  
CGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTC  
TGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGG  
CATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTGACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCA  
TATTTGCATATAACGATAACAAGGCTGTTAGAGAGATAAATAGAATTAATTGACTGTAACACAAAAGATATTAGTACA  
AAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAAATTATGTTTTAAAAATGGACTATCATA  
TGCTTACCGTAACTTGAAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTGTGGAAAGGACGAAACACCTCCCCAGGC  
GCAGATCAAAGAGAGTTCAAGAGACTCTCTTTGATCTGCGCCTTTTTTAGCTATCGATAGCTAAAAAACACAGACG  
CCATGATTTGCTCTCTTGAAGCAAATCATGGCGTCTGTGTTGGGGAAGATCTGTGGTCTCATAACAGAACTTATAAGA  
TTCCCAAATCCAAAGACATTTACGTTTATGGTGATTTCCCGAACACATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGCGCC  
ACTCCCCTGTCCCTCACAGCCATCTTCCTGCCAGGGCGCACGCGCGCTGGGTGTTCCCGCCTAGTGACACTGGGCCC  
GCGATTCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTCGAATTGTCGAC(SEQ ID NO:138)。

[0149]

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGAGCCGGGATCCGACATCCA  
GATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCCGGCCAGCCAGGGCA  
TCAGAAACAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCAAGAGACTGATCTACGCTGCCAGCAATCTG  
CAGAGCGGCGTGCCAGCAGATTCACCGGAAGCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGATCGTGTCCAGCCTGCAGCC  
CGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGCACCACAGCTACCCTCTGACCAGCGGCGAGGCACCAAGGTGGAGA  
TCAAGCGGACCGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGAAGCGAGGTCCAGGTGCTGGAATCT  
GGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTACGAGCTACGC  
CATGTCTTGGGTCCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCGGCTCTGGCGGCTCCACCA  
ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTATCTGCAGATGAAC  
AGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTACTACTGTGCCGGCAGCAGCGGGTGGAGCGAGTACTGGGGCCAGGGCAC

ACTGGTCACAGTGTCTAGCGCGGCCGATTTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGC  
GACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGAGCCCCGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGCGGG  
GGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGT  
CCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAACCACAGGAACAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATAT  
TCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAA  
GAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT  
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG  
GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC  
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCAC  
CAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGTAATCCTACTGCGTCGACTTCGAATTTAAAT  
CGGATCCGCGGCCGCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGT  
GCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTT  
CTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAG  
TTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAAACAGTCTGTAGCGACCCTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGAC  
AGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAG  
TTGGATAGTTGTGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTAC  
CCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTA  
GGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGCGTCCGGAT  
CTAGAATGGCTCTGCCCGTCAACCGCTCTGCTGCTGCCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCCGACGCCCTGGGAGTCG  
AAAGTCTGTAATGGGATCGGCATCGGCGAGTTCAAGGACAGCCTGTCCATCAACGCCACCAATATCAAGCACTTTAA  
GAATTGCACATCTATCAGCGGCGACCTGCACATCCTGCCAGTGGCCTTCCGGGGCGATTCTTTTACCCACACACCCC  
CTCTGGACCCTCAGGAGCTGGATATCCTGAAGACCGTGAAGGAGATCACAGGCTTCCTGCTGATCCAGGCCTGGCCT  
GAGAACAGAACCGATCTGCACGCCTTTGAGAATCTGGAGATCATCCGGGGCAGAACAAAGCAGCACGGCCAGTTCTC  
CCTGGCCGTGGTGTCTCTGAACATCACCAGCCTGGGCCTGAGGTCCCTGAAGGAGATCTCTGACGGCGATGTGATCA  
TCTCCGGCAACAAGAACCCTGTGCTACGCCAACACAATCAATTGGAAGAAGCTGTTTGGCACCTCTGGCCAGAAGACA  
AAGATCATCTCTAACCGGGGCGAGAATAGCTGCAAGGCAACCGGACAGGTGTGCCACGCACTGTGCAGCCCAGAGGG  
ATGTTGGGGCCAGAGCCACGGGACTGCGTGAGCTGTAGAAACGTGTCCAGGGGCCGCGAGTGCCTGGATAAGTGTA  
ATCTGCTGGAGGGCGAGCCAAGGGAGTTCGTGGAGAACTCCGAGTGCATCCAGTGTACCCCCGAGTGCCTGCCTCAG  
GCCATGAACATCACCTGTACAGGCCGCGGCCCGACAATTGCATCCAGTGTGCCACTATATCGATGGCCCTCACTG  
CGTGAAGACCTGTCCAGCCGGCGTGATGGGCGAGAACAATACTGGTGTGGAAGTACGCAGACGCAGGACACGTGT  
GCCACCTGTGCCACCCCAATTGCACCTATGGCTGTACAGGACCAGGCCTGGAGGGATGCCAACCAACGGCCCTAAG  
ATCCCAAGCATCGCCACAGGCATGGTGGGGGCACTGCTGCTGCTGCTGGTGGTGGCTCTGGGGATTGGGCTGTTTAT  
GAGAAGGTAATCCTACTGCGAATTCGTCGACCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCC  
CGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCCTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTC  
TGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGG  
CATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTGCACATCGATAGCTAAAAAACACAGACGCCATGATTTGCTCTCTTG  
AAGCAAATCATGGCGTCTGTGTTGGGAAGATCTGTGGTCTCATAACAGAACTTATAAGATTCCCAAATCCAAAGACA  
TTTCACGTTTATGGTGATTTCCAGAACACATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGCGCCACTCCCCTGTCCCTCACA  
GCCATCTTCCCTGCCAGGGCGCACGCGCTGGGTGTTCCCGCCTAGTGACACTGGGCCCGGATTCTTGGAGCGGG

TTGATGACGTCAGCGTTCGAATTGTCGAC(SEQ ID NO:139)。

[0150]

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGGATCCGACATCCA  
GATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCA  
TCAGAAACAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGAGACTGATCTACGCTGCCAGCAATCTG  
CAGAGCGGCGTGCCAGCAGATTCACCGGAAGCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCGTATCGTGTCCAGCCTGCAGCC  
CGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGCACACAGCTACCCTCTGACCAGCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGA  
TCAAGCGGACCGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGAAGCGAGGTCCAGGTGCTGGAATCT  
GGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTACGAGCTACGC  
CATGTCTTGGGTCCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCGGCTCTGGCGGCTCCACCA  
ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGACAACAGCAAGAACCCTGTATCTGCAGATGAAC  
AGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTAATACTACTGTGCCGGCAGCAGCGGTTGGAGCGAGTACTGGGGCCAGGGCAC  
ACTGGTCACAGTGTCTAGCGCGGCCGATTCTGTGCCGGTCTTCCCTGCCAGCGAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGC  
GACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGG  
GGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGT  
CCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAACCACAGGAACAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATAT  
TCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAA  
GAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT  
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG  
GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC  
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCAC  
CAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAATCCTACTGCGTGCAGTTCGAATTTAAAT  
CGGATCCGCGGCCGCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGT  
GCGTTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTT  
CTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTGCGTGAAGGAAGCAG  
TTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAAACAGTCTGTAGCGACCCTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGAC  
AGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAG  
TTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTAC  
CCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTA  
GGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACAGATGATAATATGGCCACAACCATGGCGTCCGGAT  
CTAGAATGGCTCTGCCCGTACCGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCCGACGCCCTGGGAGTCGC  
AAAGTCTGTAATGGGATCGGCATCGGCGAGTTCAAGGACAGCCTGTCCATCAACGCCACCAATATCAAGCACTTTAA  
GAATTGCACATCTATCAGCGGCGACCTGCACATCCTGCCAGTGGCCTCCGGGGCGATTCTTTTACCCACACACCCC  
CTCTGGACCCTCAGGAGCTGGATATCCTGAAGACCGTGAAGGAGATCACAGGCTTCCCTGCTGATCCAGGCCTGGCCT  
GAGAACAGAACCGATCTGCACGCCTTTGAGAATCTGGAGATCATCCGGGGCAGAACAAGCAGCACGGCCAGTTCTC  
CCTGGCCGTGGTGTCTCTGAACATCACCAGCCTGGCCCTGAGTCCCTGAAGGAGATCTCTGACGGCGATGTGATCA  
TCTCCGGCAACAAGAACCCTGTGCTACGCCAACACAATCAATTGGAAGAAGCTGTTGGCACCTCTGGCCAGAAGACA  
AAGATCATCTTAACCGGGGCGAGAATAGCTGCAAGGCAACCGGACAGGTGTGCCACGCACTGTGCAGCCCAGAGGG  
ATGTTGGGGCCAGAGCCACGGGACTGCGTGAGCTGTAGAAACGTGTCCAGGGGCCGAGTGCCTGGATAAGTGTA

ATCTGCTGGAGGGCGAGCCAAGGGAGTTCGTGGAGAACTCCGAGTGCATCCAGTGTACCCCCGAGTGCCTGCCTCAG  
GCCATGAACATCACCTGTACAGGCCGCGGCCCGACAATTGCATCCAGTGTGCCACTATATCGATGGCCCTCACTG  
CGTGAAGACCTGTCCAGCCGGCGTGATGGGCGAGAACAATACACTGGTGTGGAAGTACGCAGACGCAGGACACGTGT  
GCCACCTGTGCCACCCCAATTGCACCTATGGCTGTACAGGACCAGGCCTGGAGGGATGCCCAACCAACGGCCCTAAG  
ATCCCAAGCATCGCCACAGGCATGGTGGGGGCACTGCTGCTGCTGCTGGTGGTGGCTCTGGGGATTGGGCTGTTTAT  
GAGAAGGTAATCCTACTGCGAATTCGTCGACCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCC  
CGTGCCTTCCCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTCCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTC  
TGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGG  
CATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTGACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCA  
TATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACA  
AAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAAATTATGTTTTAAAAATGGACTATCATA  
TGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTTGGAAAGGACGAAACACCTCCCCAGGC  
GCAGATCAAAGAGAGTTCAAGAGACTCTCTTTGATCTGCGCCTTTTTTAGCTGTGCAC(SEQ ID NO:140)。

[0151]

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCCGCCAGGCCGGGATCCGACATCCA  
GATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCCGGCCAGCCAGGGCA  
TCAGAAACAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGAGACTGATCTACGCTGCCAGCAATCTG  
CAGAGCGGCGTGCCAGCAGATTCACCGGAAGCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGATCGTGTCCAGCCTGCAGCC  
CGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGCACCACAGCTACCCTCTGACCAGCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGA  
TCAAGCGGACCGGCAGCACCAGCGGCAGCGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGAAGCGAGGTCCAGGTGCTGGAATCT  
GGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTACGAGCTACGC  
CATGTCTTGGGTCCGGCAGGCTCCTGGAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCGGCTCTGGCGGCTCCACCA  
ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTATCTGCAGATGAAC  
AGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCGGCAGCAGCGGGTGGAGCGAGTACTGGGGCCAGGGCAC  
ACTGGTACAGTGTCTAGCGCGGCCGATTCGTGCCGGTCTTCCCTGCCAGCGAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGC  
GACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGAGCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGG  
GGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGT  
CCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAACCACAGGAACAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATAT  
TCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAA  
GAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT  
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG  
GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC  
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCAC  
CAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCTCGCTAATCCTACTGCGTCGACTTCAATTTAAAT  
CGGATCCGCGGCCGCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGT  
GCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCCGAAACCTGGCCCTGTCTT  
CTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAG  
TTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCGTAGCGACCCTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGAC  
AGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAG

TTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTAC  
CCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTTCGAGGTTAAAAAACGTCTA  
GGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGCGTCCGGAT  
CTAGAATGGCTCTGCCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCCGACGCCCTGGGAGTCGC  
AAAGTCTGTAATGGGATCGGCATCGGCGAGTTCAAGGACAGCCTGTCCATCAACGCCACCAATATCAAGCACTTTAA  
GAATTGCACATCTATCAGCGGCGACCTGCACATCCTGCCAGTGGCCTTCCGGGGCGATTCTTTTACCCACACACCCC  
CTCTGGACCCTCAGGAGCTGGATATCCTGAAGACCGTGAAGGAGATCACAGGCTTCCCTGCTGATCCAGGCCTGGCCT  
GAGAACAGAACCGATCTGCACGCCTTTGAGAATCTGGAGATCATCCGGGGCAGAACAAAGCAGCACGGCCAGTTCTC  
CCTGGCCGTGGTGTCTCTGAACATCACCAGCCTGGGCCTGAGTCCCTGAAGGAGATCTCTGACGGCGATGTGATCA  
TCTCCGGCAACAAGAACCTGTGCTACGCCAACACAATCAATTGGAAGAAGCTGTTTGGCACCTCTGGCCAGAAGACA  
AAGATCATCTTAACCGGGGCGAGAATAGCTGCAAGGCAACCGGACAGGTGTGCCACGCACTGTGCAGCCCAGAGGG  
ATGTTGGGGCCAGAGCCACGGGACTGCGTGAGCTGTAGAAACGTGTCCAGGGGCCGAGTGCCTGGATAAGTGTA  
ATCTGCTGGAGGGCGAGCCAAGGGAGTTCGTGGAGAACTCCGAGTGCATCCAGTGTACCCCCAGTGCCTGCCTCAG  
GCCATGAACATCACCTGTACAGGCCGCGCCCCGACAATTGCATCCAGTGTGCCACTATATCGATGGCCCTCACTG  
CGTGAAGACCTGTCCAGCCGGCGTGATGGGCGAGAACAATACTGTTGTTGGAAGTACGCAGACGCAGGACACGTGT  
GCCACCTGTGCCACCCCAATTGCACCTATGGCTGTACAGGACCAGGCCTGGAGGGATGCCAACCAACGGCCCTAAG  
ATCCCAAGCATGCCACAGGCATGGTGGGGGCACTGCTGCTGCTGCTGGTGGTGGCTCTGGGGATTGGGCTGTTTAT  
GAGAAGGTAATCCTACTGCGAATTCGTCGACCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCC  
CGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCCTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTC  
TGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGG  
CATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTCCACCAAGTCCGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCA  
TATTTGCATATAACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTGACTGTAAACACAAAAGATATTAGTACA  
AAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATA  
TGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGAAAGGACGAAACACCTCCCCAGGC  
GCAGATCAAAGAGAGTTCAAGAGACTCTCTTTGATCTGCGCCTTTTTTAGCTATCGATAGCTAAAAAACACAGACG  
CCATGATTTGCTCTCTTGAAGCAAATCATGGCGTCTGTGTTGGGGAAGATCTGTGGTCTCATAACAGAACTTATAAGA  
TTCCCAAATCCAAAGACATTTACGTTTATGGTGATTTCCCAGAACACATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGCGCC  
ACTCCCCTGTCCCTCACAGCCATCTTCCCTGCCAGGGCGCACGCGCGTGGGTGTTCCCGCCTAGTGACACTGGGCCC  
GCGATTCCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTCGAATTGTCGAC(SEQ ID NO:141)。

[0152] 根据本发明的实施例,将本发明实施例的慢病毒导入淋巴细胞所得的转基因淋巴细胞,其具有抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制的特性,在体外的增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力显著增强,对肿瘤细胞的杀伤能力显著增强,尤其对EGFR $\nu$ III突变的脑胶质母细胞瘤具有显著的定向杀伤作用,且安全性更高。

[0153] 在本发明的第八方面,本发明提出了一种转基因淋巴细胞。根据本发明的实施例,所述淋巴细胞细胞免疫检查点被沉默;表达无功能EGFR受体;以及表达嵌合抗原受体。发明人惊奇的发现,细胞免疫检查点被沉默、表达无功能EGFR受体和表达嵌合抗原受体的淋巴细胞的体外增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力以及在肿瘤病人体内的对肿瘤细胞的特异性杀伤能力大大提高,尤其对EGFR $\nu$ III突变的脑胶质母细胞瘤具有显著的定向杀伤作用,安全性高。

[0154] 根据本发明的实施例,上述转基因淋巴细胞还可以具有下列附加技术特征至少之一:

[0155] 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。具有上述结构的嵌合抗原受体的存在,大大提高了本发明实施例的转基因淋巴细胞的靶向定位,大大提高了本发明实施例的转基因淋巴细胞对抗原表达肿瘤细胞的定向杀伤作用。

[0156] 根据本发明的实施例,所述抗原是肿瘤抗原。因此,本发明实施例的转基因淋巴细胞对肿瘤的定向杀伤作用更加显著。

[0157] 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。抗原抗体的特异性结合作用,大大提高了本发明实施例的转基因淋巴细胞的靶向定位和对表达抗原的肿瘤细胞的定向杀伤作用。

[0158] 根据本发明的实施例,所述抗体为单链抗体。单链抗体可去除非特异性反应的竞争性表面蛋白,同时单链抗体更易渗透肿瘤组织增加药物治疗浓度。本发明实施例的转基因淋巴细胞表达单链抗体的嵌合抗原受体,大大提高了本发明实施例的转基因淋巴细胞对靶向肿瘤细胞的定向杀伤作用。

[0159] 根据本发明的实施例,所述抗原为EGFRvIII。因此所述转基因淋巴细胞针对表达抗原EGFRvIII的细胞具有定向性杀伤作用,抗原抗体的特异性结合作用更强,大大提高了本发明实施例的转基因淋巴细胞对EGFRvIII抗原表达肿瘤细胞的定向杀伤作用。

[0160] 根据本发明的实施例,所述淋巴细胞细胞免疫检查点独立地选自CTLA4、PD-1、TIM-3、BTLA、LAG-1、IRAK-M、SOCS-1、A20、CBL-B的至少之一。其中,CTLA4、PD-1、TIM-3、BTLA、LAG-1为细胞表面免疫检查点,IRAK-M、SOCS-1、A20、CBL-B为细胞内免疫检查点。本发明实施例的免疫检查点具有负向调控和减弱细胞免疫应答的作用,其通过与肿瘤细胞上相应的配体的特异结合,导致T淋巴细胞增生性反应的下调,细胞因子的分泌减少,和T细胞的无能或凋亡。根据本发明的实施例,本发明实施例的细胞表面或细胞内免疫检查点的成功沉默,进一步提高了转基因淋巴细胞抵抗肿瘤介导的免疫抑制的功效,转基因淋巴细胞在体外扩增及在肿瘤病人体内的增殖和生存能力,对肿瘤细胞的定向杀伤作用进一步加强。

[0161] 根据本发明的实施例,所述淋巴细胞细胞表面免疫检查点被沉默是通过shRNA、反义核酸、核酶、显性负突变、CRISPR和锌指核酸酶至少之一实现的。根据本发明的实施例,本发明实施例的细胞免疫检查点的成功沉默,可显著提高本发明实施例的淋巴细胞抵抗肿瘤介导的免疫抑制的特性,进一步提高了转基因淋巴细胞增殖肿瘤细胞的定向杀伤作用。

[0162] 根据本发明的实施例,所述免疫共刺激分子胞内段独立地选自4-1BB、OX-40、CD40L、CD27、CD30、CD28以及他们的衍生物的至少一种。本发明实施例的免疫共刺激分子胞内段的表达以及细胞免疫检查点的沉默联合具有正向调控和增强细胞免疫应答的作用,本发明实施例的免疫共刺激分子胞内段的表达、无功能EGFR受体的表达以及细胞免疫检查点的沉默的联合,使得本发明实施例的转基因淋巴细胞增殖对肿瘤的定向杀伤作用更加显著和安全。

[0163] 根据本发明的实施例,所述淋巴细胞细胞免疫检查点是CTLA4、PD-1、CBL-B。其中,CTLA4、PD-1是细胞表面免疫检查点,CBL-B是细胞内免疫检查点。根据本发明的实施例,本发明实施例的淋巴细胞细胞表面免疫检查点CTLA4或PD-1被沉默,或淋巴细胞细胞内免疫

检查点是CBL-B被沉默,阻止了PD1或CTLA4分子表达与其相应配体PD-L1及PD-L2或CD80及CD86的结合,从而有效抑制了对T淋巴细胞无能或凋亡,或通过CBL-B沉默,增强T细胞受体信号传导,使得转基因淋巴细胞在肿瘤病人体内的增殖和生存能力得到进一步提高,对肿瘤的定向杀伤作用效果更加显著。

[0164] 根据本发明的实施例,所述淋巴细胞细胞内免疫检查点被沉默是通过shRNA实现的。根据本发明的实施例,本发明实施例的shRNA携带特异性沉默细胞表面或细胞内免疫检查点至少之一免疫检查点的shRNA,本发明实施例的shRNA具有高效、特异性的沉默细胞表面或细胞内至少之一免疫检查点的作用,细胞免疫点,即细胞表面或细胞内免疫检查点的成功沉默,阻止了免疫检查点与相应配体的特异性结合,从而有效抑制了免疫检查点对T淋巴细胞无能或凋亡等的负调控机制,进而使得本发明实施例的转基因淋巴细胞在在肿瘤病人体内的增殖和生存能力得到进一步提高,配合嵌合抗原受体的抗原靶向性,使得本发明实施例的转基因淋巴细胞对肿瘤的定向杀伤作用效果更加显著。

[0165] 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。本发明中的转基因淋巴细胞的嵌合抗原受体的免疫共刺激分子胞内段是CD28或者4-1BB的胞内段。根据本发明的实施例,免疫共刺激分子胞内段是CD28或者4-1BB的胞内段,进一步增强了本发明实施例的转基因淋巴细胞的定向杀伤作用。

[0166] 根据本发明的实施例,本发明实施例的转基因淋巴细胞表达的无功能EGFR受体缺少N-端配体结合区和细胞内受体酪氨酸激酶活性,但包括野生型EGFR受体的跨膜区和完整的与抗EGFR抗体结合的结构域,无功能EGFR受体可作为本发明实施例的转基因淋巴细胞的自杀标记。无功能EGFR受体的表达,联合嵌合抗原受体的表达,并进一步联合细胞免疫检查点的沉默,可在有效保证转基因淋巴细胞的靶向杀伤作用的前提下,如果病人出现严重不良反应,转基因淋巴细胞可被抗EGFR抗体清除,进而可进一步提高本发明实施例的转基因淋巴细胞治疗EGFRvIII突变的肿瘤病人的安全性。

[0167] 根据本发明的实施例,所述淋巴细胞是CD3+T淋巴细胞或自然杀伤细胞或自然杀伤T细胞。本发明实施例的上述淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默和表达无功能EGFR受体,同时表达抗原特异性的嵌合抗原受体,如本发明的实施例的EGFRvIII抗原特异性的嵌合抗原受体,上述淋巴细胞的细胞免疫杀伤作用的靶向性更强,在肿瘤病人体内的增殖和生存能力得到进一步提高,对肿瘤的定向杀伤作用效果更加显著,安全性更高。

[0168] 在本发明的第九方面,本发明提出了一种构建体。根据本发明的实施例,所述构建体包括:第一核酸分子,所述第一核酸分子编码嵌合抗原受体;第二核酸分子,所述第二核酸分子沉默细胞免疫检查点,以及第三核酸分子,所述第三核酸分子编码无功能EGFR受体。其中,所述细胞免疫检查点、所述嵌合抗原受体、所述无功能EGFR受体如前所述。根据本发明的实施例,本发明实施例的构建体成功导入本发明实施例的淋巴细胞后,可有效沉默细胞表面或细胞内至少之一免疫检查点和表达无功能EGFR受体以及表达抗原特异性的嵌合抗原受体,从而本发明实施例的淋巴细胞对肿瘤细胞,尤其是EGFRvIII突变的肿瘤细胞的定向杀伤作用更加显著,安全性高。

[0169] 根据本发明的实施例,上述构建体还可以进一步包括下列附加技术特征至少之一:

[0170] 根据本发明的实施例,其特征就在于所述第一核酸分子与所述第二核酸分子和所述

第三核酸分子被设置在前面所述的淋巴细胞中表达所述嵌合抗原受体、沉默细胞免疫检查点和表达无功能EGFR受体,并且所述嵌合抗原受体与所述无功能EGFR受体呈非融合形式。。根据本发明的实施例,成功设置了上述第一核酸分子以及第二核酸分子和第三核酸分子的淋巴细胞,其淋巴细胞的细胞表面或细胞内至少之一的免疫检查点被成功沉默并在淋巴细胞表面成功表达无功能EGFR受体,同时在淋巴细胞表面成功表达了抗原特异性,如本发明实施例的EGFRvIII特异性的嵌合抗原受体,其具有杀伤力更强和特异性更强的肿瘤杀伤效果,安全性更高。

[0171] 根据本发明的实施例,所述构建体进一步包括: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;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;以及第三启动子,所述第三启动子与所述第三核酸分子可操作地连接。根据本发明的实施例,第一启动子以及第二和第三启动子的引入,使得第一核酸分子以及第二核酸分子和第三核酸分子分别独立的表达,有效保证了嵌合抗原受体抗原靶向性的生物学作用及以有效沉默了细胞的免疫检查点和表达了无功能EGFR受体,使得本发明实施例的淋巴细胞的靶向作用更强,对肿瘤的杀伤作用,尤其对EGFRvIII突变的肿瘤细胞的定向杀伤更加显著,安全性更高。

[0172] 根据本发明的实施例,所述第一启动子、所述第二启动子和所述第三启动子分别独立地选自U6,H1,CMV,EF-1,LTR,RSV启动子。根据本发明的实施例,本发明实施例的上述启动子具有启动效率高、特异性强的特点,从而保证了细胞免疫检查点的高效沉默和无功能EGFR受体的高效表达以及嵌合抗原受体的高效表达,从而本发明实施例的淋巴细胞的体外增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力大大提高,对肿瘤的定向杀伤效果更加显著,安全性更高。

[0173] 根据本发明的实施例,所述构建体进一步包括: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三核酸分子之间,所述内部核糖体进入位点具有SEQ ID NO:142所示的核苷酸序列。

[0174]

```
TTTAAATCGGATCCGCGGCCGCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGG
CCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTCTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCC
CTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGTCTTTCCCTCTCGCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAG
GAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACC
TGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACG
TTGTGAGTTGGATAGTTGTGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAG
AAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAA
ACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGCG
(SEQ ID NO:142).
```

[0175] 内部核糖体进入位点序列的引入使得第一核酸分子和第三核酸分子分别独立的表达。根据本发明的实施例,内部核糖体进入位点序列的引入保证了嵌合抗原受体抗原靶向性的生物学作用和无功能EGFR受体的高效表达,进而使得本发明实施例的淋巴细胞对肿瘤的定向杀伤效果更加显著,淋巴细胞对肿瘤杀伤的安全性更高。

[0176] 根据本发明的实施例,所述构建体进一步包括:第四核酸分子,设置在所述第一核

酸分子与所述第三核酸分子之间,并且所述第四核酸分子编码连接肽,所述连接肽能够在所述淋巴细胞中被切割。所述连接肽具有SEQ ID NO:143所示的氨基酸序列。

[0177] GSGATNFSLKQAGDVEENPGP(SEQ ID NO:143)。

[0178] 第四核酸分子及其相应表达的连接肽的引入使得无功能EGFR受体和嵌合抗原受体成非融合状态表达在淋巴细胞膜上。根据本发明的实施例,本发明实施例连接肽的引入保证了无功能EGFR受体和嵌合抗原受体的生物学作用,其具特异性更强的肿瘤杀伤效果,安全性更高。

[0179] 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。非致病性病毒载体的引入大大提高了构建体在淋巴细胞中的复制和扩增效率,从而大大提高了细胞免疫检查点的沉默和无功能EGFR受体的表达以及嵌合抗原受体在淋巴细胞中的高效表达,使得淋巴细胞体外增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力大大提高,淋巴细胞的靶向作用进一步增强,对肿瘤细胞的杀伤作用更加显著,安全性进一步提高。

[0180] 根据本发明的实施例,所述构建体的载体是病毒载体,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。本发明实施例的病毒的载体在病毒包装和感染过程中,病毒感染范围广泛,既可感染终末分化细胞,又可感染处于分裂期的细胞,其基因组既可整合到宿主染色体,又可游离在宿主染色体之外,从而可实现广谱而高效的感染效率,细胞免疫检查点被高效沉默和无功能EGFR受体在淋巴细胞中高效表达以及嵌合抗原受体在淋巴细胞中的高效表达,使得本发明实施例的淋巴细胞的体外增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力大大提高,淋巴细胞的靶向作用进一步增强,对肿瘤细胞,尤其是EGFRvIII突变的肿瘤细胞的定向杀伤作用更加显著,淋巴细胞的杀伤作用安全性更高。

[0181] 在本发明的第十方面,本发明提出了一种制备前面所述的T淋巴细胞或者转基因淋巴细胞的方法。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者前面所述的慢病毒引入到淋巴细胞中或者T淋巴细胞。所述构建体或慢病毒成功引入上述淋巴细胞或者T淋巴细胞中,实现了淋巴细胞的细胞免疫检查被沉默和表达无功能EGFR受体以及嵌合抗原受体的表达,从而本发明实施例的制备方法制备的转基因淋巴细胞或T淋巴细胞在肿瘤病人体内和体外的增殖及肿瘤病人体内存活能力大大提高,转基因淋巴细胞或T淋巴细胞对肿瘤细胞,尤其是对EGFRvIII突变的肿瘤细胞的靶向杀伤作用更强,安全性更高。

[0182] 在本发明的第十一方面,本发明提出了一种用于治疗癌症的治疗组合物。根据本发明的实施例,所述治疗组合物包括:上述构建体、慢病毒、T淋巴细胞或者转基因淋巴细胞。上述任意一种治疗组合物的组成均可实现转基因淋巴细胞或T淋巴细胞的细胞表面或细胞内免疫检查点的沉默和无功能EGFR受体的表达和嵌合抗原受体在转基因淋巴细胞或T淋巴细胞中的高效表达,从而使得所得转基因淋巴细胞或T淋巴细胞具有显著的抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制,在肿瘤病人体外和体内的增殖及肿瘤病人体内存活能力大大提高,转基因淋巴细胞或T淋巴细胞对肿瘤细胞的靶向杀伤作用更强,本发明实施例的治疗癌症的治疗组合物对肿瘤细胞的靶向杀伤作用显著增强,尤其是对EGFRvIII突变的肿瘤细胞的靶向杀伤作用显著增强、安全性进一步提高。

[0183] 根据本发明的实施例,上述治疗组合物还可以进一步包括下列附加技术特征至少之一:

[0184] 根据本发明的实施例,所述癌症包括脑胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、乳腺癌或卵巢癌。脑胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、乳腺癌或卵巢癌癌细胞具有EGFRvIII的特异性表达,本发明实施例的治疗组合物可使淋巴细胞细胞表面或细胞内免疫检查点的沉默和表达无功能EGFR受体以及高效表达抗原特异性嵌合抗原受体,如本发明实施例的EGFRvIII抗原特异性嵌合抗原受体,所得淋巴细胞或T淋巴细胞具有显著的抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制的特性,在脑胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、乳腺癌或卵巢癌的微环境中的存活能力大大提高,所得淋巴细胞或T淋巴细胞对EGFRvIII突变的脑胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、乳腺癌或卵巢癌的肿瘤细胞的靶向杀伤作用更强、安全性更高。

[0185] 在本发明的第十二方面,本发明提出了一种提高淋巴细胞活性和治疗安全性的方法,所述淋巴细胞携带嵌合抗原受体,根据本发明的实施例,所述方法包括:使所述淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默,以及使所述淋巴细胞表达无功能EGFR受体。所述细胞免疫检查点、所述淋巴细胞、所述嵌合抗原受体和所述无功能EGFR受体是如前所定义的,所述淋巴细胞活性包括所述淋巴细胞体外增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力以及所述淋巴细胞在肿瘤病人体内的定向杀伤能力的至少一种。根据本发明的实施例,本发明实施例的淋巴细胞的细胞表面或细胞内免疫检查点被沉默,淋巴细胞被活化、增生性反应上调、细胞因子分泌增多、抗凋亡能力增强,使得本发明实施例的淋巴细胞在体外扩增、在肿瘤病人体内的增殖及肿瘤病人体内存活能力大大提高上述淋巴细胞细胞免疫检查点的沉默配合淋巴细胞嵌合抗原受体的抗原特异性功效,从而实现了有效抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制,对EGFRvIII突变的肿瘤细胞的靶向杀伤作用显著增强。无功能EGFR受体缺少N-端配体结合区和细胞内受体酪氨酸激酶活性,但包括野生型EGFR受体的跨膜区和完整的与抗EGFR抗体结合的序列,无功能EGFR受体可作为淋巴细胞的自杀标记。本发明是实施例的淋巴细胞在用于治疗治疗EGFRvIII突变的肿瘤细胞时,如果病人出现严重不良反应,本发明实施例的淋巴细胞可被抗EGFR抗体清除,进而可提高本发明实施例的淋巴细胞治疗EGFRvIII突变的肿瘤病人的安全性。

[0186] 根据本发明的实施例,所述肿瘤包括选自EGFRvIII突变的脑胶质母细胞瘤、EGFRvIII突变的非小细胞肺癌、EGFRvIII突变的乳腺癌或EGFRvIII突变的卵巢癌的至少之一。本发明实施例的提高淋巴细胞活性的方法,是使淋巴细胞携带EGFRvIII抗原特异性的嵌合抗原受体,同时使淋巴细胞的免疫检查点被沉默,本发明实施例的提高淋巴细胞活性的方法特异性进一步提高了对EGFRvIII突变的肿瘤细胞的定向杀伤能力,如上述EGFRvIII突变的肿瘤细胞。

[0187] 需要说明的是,本发明中所使用的术语“细胞免疫检查点”包括细胞表面免疫检查点和细胞内免疫检查点,“细胞表面免疫检查点”是一种淋巴细胞表面的膜蛋白,其与肿瘤细胞上表达的配体相互作用,可以抑制抗肿瘤淋巴细胞反应。“细胞内免疫检查点”是一种细胞内蛋白,此种细胞免疫检查点蛋白一种负调控的细胞信号传导机构,可以抑制抗肿瘤淋巴细胞反应。

## 附图说明

[0188] 图1是根据本发明实施例的共表达EGFRvIII抗原特异性的嵌合抗原受体和沉默人类细胞免疫检查点以及表达无功能EGFR受体的慢病毒载体的结构示意图;

[0189] 图2是根据本发明实施例的共表达抗EGFRvIII的嵌合抗原受体,沉默PD1-shRNA,和无功能EGFR受体的淋巴细胞被抗EGFR抗体杀伤清除的结果图;以及

[0190] 图3是根据本发明实施例的共表达EGFRvIII抗原特异性的嵌合抗原受体,沉默PD1-shRNA,和无功能EGFR受体的淋巴细胞杀伤肿瘤细胞能力的结果图。

### 具体实施方式

[0191] 下面详细描述本发明的实施例,下面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。

[0192] T淋巴细胞或转基因淋巴细胞

[0193] 在本发明的一方面,本发明提出了一种T淋巴细胞或转基因淋巴细胞。根据本发明的实施例,本发明实施例的T淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默;表达无功能EGFR受体;以及表达嵌合抗原受体,其中,嵌合抗原受体包括:胞外区,胞外区包括单链抗体的重链可变区和轻链可变区,单链抗体特异性识别抗原EGFRvIII;跨膜区,跨膜区与胞外区相连,并且嵌入到所T淋巴细胞的细胞膜中;胞内区,胞内区与跨膜区相连,并且胞内区包括CD28或4-1BB的胞内段以及CD3 $\zeta$ 链。其中,细胞免疫检查点包括细胞表面或细胞内至少之一的免疫检查点。无功能EGFR受体缺少N-端配体结合区和细胞内受体酪氨酸激酶活性,但包括野生型EGFR受体的跨膜区和完整的与抗EGFR抗体结合的序列,无功能EGFR受体可作为淋巴细胞的自杀标记。本发明实施例的T淋巴细胞或转基因淋巴细胞细胞表达无功能EGFR受体联合表达EGFRvIII抗原特异性的嵌合抗原受体和细胞免疫检查点被沉默,本发明实施例的T淋巴细胞或转基因淋巴细胞在肿瘤病人体内和体外的增殖和生存能力以及在肿瘤病人体内的对特异性肿瘤细胞的杀伤能力显著增强,尤其对EGFRvIII突变的脑胶质母细胞瘤细胞的特异性杀伤效果大大提高,并且安全性也显著提高。

[0194] 肿瘤可以避免免疫监视,通过刺激其免疫抑制性受体的表达而关闭淋巴细胞对其的免疫杀伤反应;作为免疫负调节机制,激活的细胞毒性T淋巴细胞(CTLs)也表达负调控的监管机构,即细胞表面或细胞内的免疫检查点分子。如本发明实施例的程序性细胞死亡1受体(PD-1)表达在活化CTLs上,其与肿瘤细胞上表达的程序性死亡配体1(PD-L1)相互作用,可以抑制抗肿瘤T细胞反应。许多肿瘤,包括淋巴瘤、肺癌、卵巢癌、黑色素瘤、胰腺肿瘤,表达PD-L1。PD-L1与其配体PD-1的结合,导致CTLs增生性反应的下调,细胞因子的分泌减少,和T细胞的无能或凋亡。本发明实施例的细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)是另一个T细胞的关键负面调节因子,其可抑制T细胞活化,其通过与表达在抗原递呈细胞上的配体B7.1、B7.2(CD80和CD86)的相互作用而抑制T细胞的活化。本发明实施例的细胞毒性T淋巴细胞内的CBL-B(E3泛素蛋白连接酶CBL-B)是细胞内的另一个关键负面调节因子,其通过抑制T细胞受体(TCR)信号传导,来抑制T细胞的活性。因此,本发明实施例的T淋巴细胞或转基因淋巴细胞的免疫检查点被沉默,T淋巴细胞或转基因淋巴细胞的在肿瘤病人体内的增殖和生存能力显著提高。

[0195] 另外,根据本发明的实施例,本发明实施例的无功能EGFR受体缺少N-端配体结合区和细胞内受体酪氨酸激酶活性,但包括野生型EGFR受体的跨膜区和完整的与抗EGFR抗体结合的序列,无功能EGFR受体可作为淋巴细胞的自杀标记。无功能EGFR受体表达淋巴细胞可被抗EGFR抗体在体内清除。从而,本发明实施例的T淋巴细胞或转基因淋巴细胞表达无功

能EGFR受体,在保证转基因淋巴细胞的靶向杀伤作用的前提下,如果病人出现严重不良反应,转基因淋巴细胞可被抗EGFR抗体清除,进而可进一步提高本发明实施例的转基因淋巴细胞或T淋巴细胞治疗EGFRvIII突变的肿瘤病人的安全性。

[0196] 另外,根据本发明的实施例,上述嵌合抗原受体胞外区的抗体为单链抗体。发明人发现,单链抗体可去除非特异性反应的竞争性表面蛋白,同时单链抗体更易渗透肿瘤组织增加药物治疗浓度。本发明实施例的转基因淋巴细胞表达单链抗体的嵌合抗原受体,大大提高了转基因淋巴细胞对靶向肿瘤细胞的定向杀伤作用。

[0197] 根据本发明的另外一些实施例,上述抗体的结合抗原为EGFRvIII。因此本发明实施例的转基因淋巴细胞针对表达抗原EGFRvIII的细胞具有定向性杀伤作用,抗原抗体的特异性结合作用更强,大大提高了本发明实施例的转基因淋巴细胞对EGFRvIII抗原表达肿瘤细胞的定向杀伤作用。

[0198] 根据本发明的另外一些实施例,淋巴细胞的细胞免疫检查点包括细胞表面和细胞内的免疫检查点,本发明实施例的淋巴细胞细胞表面免疫检查点独立地选自CTLA4、PD-1、TIM-3、BTLA、LAG-1至少之一,淋巴细胞细胞内免疫检查点独立地选自IRAK-M、SOCS-1、A20、CBL-B的至少之一。上述分子能够与肿瘤细胞表达的抗原特异性结合,抑制淋巴细胞的活化,促进淋巴细胞的无能或凋亡,从而负向调控和减弱细胞免疫应答。根据本发明的实施例,上述细胞表面或细胞内免疫检查点的成功沉默,进一步提高了转基因淋巴细胞在肿瘤病人体内的增殖和生存能力,对肿瘤细胞的定向杀伤作用进一步加强。

[0199] 根据本发明的另外一些实施例,本发明实施例的淋巴细胞细胞表面免疫检查点被沉默是通过shRNA、反义核酸、核酶、显性负突变、锌指核酸酶和CRISPR至少之一实现的。

[0200] 小发夹RNA或短发夹RNA(shRNA)是siRNA(小干扰RNA)的导入形式,siRNA是一种小RNA分子(由21~25个核苷酸组成),由Dicer(RNAase III家族中对双链RNA具有特异性剪切作用的酶)加工而成;siRNA在RNA沉默通路中起中心作用,对特定信使RNA(mRNA)进行降解,为转录水平后调控。

[0201] 反义核酸包括反义RNA和反义DNA,反义RNA是指能和mRNA完全互补的一段小分子RNA或寡聚核苷酸片段,反义DNA是指能与基因DNA双链中的有义链互补结合的短小DNA分子,反义RNA和反义DNA主要是通过mRNA的翻译和基因DNA的转录而发挥作用的;反义核酸一方面通过与靶mRNA结合形成空间位阻效应,阻止核糖体与mRNA结合,另一方面其与mRNA结合后激活内源性RNA酶或核酶,进而降解mRNA;反义DNA与基因DNA双螺旋的调控区特异结合形成DNA三聚体,或与DNA编码区结合,终止正在转录的mRNA链的延长;反义核酸还可抑制转录后mRNA的加工修饰,如5'端加帽、3'端加尾、中间剪接和内部碱基甲基化等,并阻止成熟mRNA由细胞核向细胞浆内运输,因此,反义RNA是一种有效的沉默目的基因的技术。

[0202] 核酶是具有催化功能的RNA分子,是生物催化剂,可降解特异的mRNA序列,核酶通过催化转磷酸酯和磷酸二酯键水解反应参与RNA自身剪切、加工过程,与一般的反义RNA相比,核酶具有较稳定的空间结构,不易受到RNA酶的攻击,更重要的是,核酶在切断mRNA后,又可从杂交链上解脱下来,重新结合和切割其它的mRNA分子。

[0203] 显性负性突变是指某些信号转导蛋白突变后不仅自身无功能,还能抑制或阻断同一细胞内的野生型信号转导蛋白的作用,其主要通过和野生型蛋白形成二聚物的方式实现,这种突变毒性作用大,能显著抑制或阻断细胞内目标信号转导蛋白的作用。

[0204] 锌指核酸酶由一个DNA识别域和一个非特异性核酸内切酶构成,DNA识别域是由一系列Cys2-His2锌指蛋白串联组成(一般3~4个),每个锌指蛋白识别并结合一个特异的三联体碱基,锌指蛋白形成 $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ 二级结构,其中 $\alpha$ 螺旋的16氨基酸残基决定锌指的DNA结合特异性,骨架结构保守,对决定DNA结合特异性的氨基酸引入序列的改变可以获得新的DNA结合特异性,从而可以针对不同的目的基因设计不同的氨基酸引入序列,实现不同目的基因的特异性沉默。

[0205] CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats规律成簇间隔短回文重复),是一种基因编辑器,是细菌用以保护自身对抗病毒的一个系统。它可以用来删除、添加、激活或抑制其他生物体的目标基因,这些目标基因包括人细胞内的目标基因。

[0206] CRISPR簇是一个广泛存在于细菌和古生菌基因组中的特殊DNA重复序列家族,其序列由一个前导区(Leader)、多个短而高度保守的重复序列(Repeat)和多个间隔区(Spacer)组成。前导区一般位于CRISPR簇上游,是富含AT长度为300~500bp的区域,被认为是CRISPR簇的启动子序列。重复序列区长度为21~48bp,含有回文序列,可形成发卡结构。重复序列之间被长度为26~72bp的间隔区隔开。Spacer区域由俘获的外源DNA组成,当含有同样序列的外源DNA入侵时,可被细菌机体识别,并进行剪切使之表达沉默,达到保护自身安全的目的。通过对CRISPR簇的侧翼序列分析发现,在其附近存在一个多态性家族基因。该家族编码的蛋白质均含有可与核酸发生作用的功能域(具有核酸酶、解旋酶、整合酶和聚合酶等活性),并且与CRISPR区域共同发挥作用,因此被命名为CRISPR关联基因(CRISPR associated),缩写为Cas。目前发现的Cas包括Cas1~Cas10等多种类型。Cas基因与CRISPR共同进化,共同构成一个高度保守的系统。当细菌抵御噬菌体等外源DNA入侵时,在前导区的调控下,CRISPR被转录为长的RNA前体(Pre CRISPR RNA,pre-crRNA),然后加工成一系列短的含有保守重复序列和间隔区的成熟crRNA,最终识别并结合到与其互补的外源DNA序列上发挥剪切作用。pre-crRNA的加工由Cas家族中的Cas9参与。Cas9含有在氨基末端的RuvC和蛋白质中部的HNH2个独特的活性位点,在crRNA成熟和双链DNA剪切中发挥作用。pre-crRNA转录的同时,与其重复序列互补的反式激活crRNA(Trans-activating crRNA,tracrRNA)也转录出来,并且激发Cas9和双链RNA特异性RNase III核酸酶对pre-crRNA进行加工。加工成熟后,crRNA、tracrRNA和Cas9组成复合体,识别并结合于crRNA互补的序列,然后解开DNA双链,形成R-loop,使crRNA与互补链杂交,另一条链保持游离的单链状态,然后由Cas9中的HNH活性位点剪切crRNA的互补DNA链,RuvC活性位点剪切非互补链,最终引入DNA双链断裂(DSB)。通过人工设计RNA,可以改造形成具有引导作用的sgRNA(short guide RNA),足以引导Cas9对DNA的定点目标基因切割。

[0207] 综上所述,shRNA、反义核酸、核酶、显性负突变、CRISPR锌指核酸酶为特异性沉默目标基因的有效手段,沉默基因的手段不受特别限制,本领域技术人员可根据具体的实验目的和条件选择,如本发明实施例所采用的shRNA、反义核酸、核酶、显性负突变,CRISPR或锌指核酸酶的至少之一,实现目的基因的特异性沉默。根据本发明的实施例,淋巴细胞细胞表面或细胞内免疫检查点被沉默优选采用shRNA实现。ShRNA所携带的siRNA分子通常是一个长度在10和30之间的碱基对的双重区域。本发明实施例的PD1或CTLA4或CBL-B siRNA被设计为同源于PD1或CTLA4或CBL-B mRNA的编码区域,通过mRNA的降解来抑制基因表达。

siRNA关联于被称为诱导RNA沉默复合物(RISC)的多重蛋白复合物,在此期间正义链被酶裂解。被激活的RISC中基于序列同源性,指引RISC到对应的mRNA;相同的核酸酶切割靶向PD1或CTLA4或CBL-B mRNA,产生特定基因PD1或CTLA4或Cbl沉默,抑制特定基因PD1或CTLA4或CBL-B的表达。siRNA以shRNA的形式导入细胞(shRNA包含大约18-23的核苷酸siRNA序列,后跟一个9-15长度的核苷酸环和一个siRNA序列的反向补充),shRNA的设计较好的避免了在3'UTR细胞基因中的匹配点;确保了适当的链选择。一个单一siRNA分子可被重复应用于多靶向mRNA分子的分裂。RNAi(RNA干扰)可通过引入合成siRNA的方式被诱导。根据本发明的实施例,本发明实施例的shRNA不断产自细胞内,因此其效果更加持久,从而延长shRNA周期,本发明实施例采用的shRNA具有高效、特异性的沉默细胞表面或细胞内免疫检查点的作用,细胞表面或细胞内免疫检查点的成功沉默,使得转基因淋巴细胞具有显著的抵抗肿瘤介导的免疫抑制的特性,在肿瘤病人体内的增殖和生存能力得到进一步提高,对肿瘤的定向杀伤作用效果更加显著。

[0208] 另外,根据本发明的实施例,所述免疫共刺激分子胞内段独立地选自4-1BB、OX-40、CD40L、CD27、CD30、CD28以及他们的衍生物的至少一种。免疫共刺激分子胞内段的表达和细胞表面或细胞内至少之一免疫检查点的沉默联合具有正向调控和增强细胞免疫应答的作用,使得转基因淋巴细胞具有显著的抵抗肿瘤介导的免疫抑制的特性,在肿瘤病人体内的增殖和生存能力得到进一步提高,对EGFRvIII突变的肿瘤的定向杀伤作用效果更加显著,免疫共刺激分子胞内段的表达联合无功能EGFR受体的表达,使得转基因淋巴细胞的免疫杀伤作用更加安全有效。

[0209] 根据本发明的另外一些实施例,淋巴细胞细胞表面免疫检查点优选CTLA4或PD-1,淋巴细胞内免疫检查点优选CBL-B。根据本发明的时施例,淋巴细胞细胞表面免疫检查点CTLA4或PD-1被沉默或细胞内免疫检查点CBL-B被沉默,使得转基因淋巴细胞具有更加显著的抵抗肿瘤介导的免疫抑制的特性,其在肿瘤病人体内的增殖和生存能力得到进一步提高,对肿瘤的定向杀伤作用效果更加显著。

[0210] 根据本发明的实施例,本发明实施例的淋巴细胞是CD3+淋巴细胞或自然杀伤细胞或自然杀伤T细胞。CD3+淋巴细胞是总T细胞,自然杀伤细胞是免疫细胞的一种,非特异性识别靶细胞,自然杀伤T细胞是具有T细胞和自然杀伤细胞受体的T细胞亚群。上述淋巴细胞中免疫检查点被沉默和表达嵌合抗原受体,使得上述淋巴细胞的细胞免疫的靶向杀伤性更强,对肿瘤细胞的杀伤作用效果更加显著;上述淋巴细胞表达无功能EGFR受体和表达嵌合抗原受体,使得上述淋巴细胞的细胞免疫杀伤作用更加安全有效。

[0211] 慢病毒或构建体

[0212] 在本发明的另一方面,本发明提出了一种慢病毒或构建体。根据本发明的实施例,慢病毒或构建体携带下列核酸分子:(a)编码嵌合抗原受体的核酸分子,嵌合抗原受体具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,编码嵌合抗原受体的核酸分子具有SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列;(b)沉默细胞表面或细胞内免疫检查点的核酸分子,沉默细胞表面免疫检查点的核酸分子的核苷酸序列为选自SEQ ID NO:3~68的至少之一,沉默细胞内免疫检查点的核酸分子的核苷酸序列为选自SEQ ID NO:69~135的至少之一;以及(c)编码无功能EGFR受体的核酸分子,所述无功能EGFR受体具有SEQ ID NO:136所示的氨基酸序列,所述编码无功能EGFR受体的核酸分子具有SEQ ID NO:137所示的核苷酸序列。其中,SEQ ID NO:3~14是人

类程序性死亡受体1(PD1)siRNA核苷酸序列,SEQ ID NO:15~30是人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4)siRNA序列,SEQ ID NO:31~46是人类T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列,SEQ ID NO:47~57是人类T淋巴细胞衰减因子(BTLA)siRNA序列,SEQ ID NO:58~68是人类淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG1)siRNA序列,SEQ ID NO:69~85是人类IRAK-M siRNA(人类白细胞介素-1受体相关激酶3)核苷酸序列,SEQ ID NO:86~96是人类SOCS1siRNA(人类细胞因子信号转导抑制因子1)序列,SEQ ID NO:97~116是人类A20siRNA(人类肿瘤坏死因子- $\alpha$ 诱导蛋白A20)序列,SEQ ID NO:117~135是人类CBL-B siRNA(E3泛素蛋白连接酶CBL-B)序列,根据本发明的实施例,将本发明实施例的慢病毒或构建体导入淋巴细胞所得的转基因淋巴细胞中,其细胞表面的免疫检查点PD1、CTLA4、TIM3、BTLA、LAG1或细胞内免疫检查点IRAK-M、SOCS1、A20、CBL-B、被特异性沉默和抑制表达和表达无功能EGFR受体,同时在其细胞表面表达抗EGFRvIII的嵌合抗原受体,从而本发明实施例的转基因淋巴细胞具有了显著的抵抗肿瘤介导的免疫抑制的功效,抗凋亡能力和增殖能力增强、定向杀伤能力显著提高,免疫杀伤安全性显著提高,本发明实施例的转基因淋巴细胞在肿瘤病人体内和体外的增殖和生存能力以及在肿瘤病人体内的杀伤能力大大提高,尤其对EGFRvIII突变的脑胶质母细胞瘤细胞特异性杀伤效果尤为显著。

[0213] 根据本发明地实施例,本发明实施例的逆转录病毒或构建体携带含有SEQ ID NO:138、139、140或141所示的核苷酸序列。其中,SEQ ID NO:138表示的是共表达抗EGFRvIII嵌合抗原受体、无功能EGFR受体、沉默细胞表面免疫检查点PD1和沉默细胞内免疫检查点CBL-B的核酸分子(EvIII-CAR/iPD1-CBL-B/tEGFR),SEQ ID NO:139是共表达抗EGFRvIII嵌合抗原受体、无功能EGFR受体和沉默细胞内免疫检查点CBL-B的核酸分子(EvIII-CAR/iCBL-B/tEGFR),SEQ ID NO:140是共表达抗EGFRvIII嵌合抗原受体、无功能EGFR受体和沉默细胞表面免疫检查点PD-1的核酸分子(EvIII-CAR/iPD1/tEGFR),SEQ ID NO:141表示的是共表达抗EGFRvIII嵌合抗原受体、无功能EGFR受体、沉默细胞表面免疫检查点PD1和沉默细胞表面另一个免疫检查点CTLA4的核酸分子(EvIII-CAR/iPD1-CTLA4/tEGFR)。根据本发明的实施例,将本发明实施例的慢病毒导入淋巴细胞所得的转基因淋巴细胞,其细胞表面的免疫检查点PD1或CTLA4被特异性沉默,或细胞内的免疫检查点CBL-B被特异性沉默以及表达无功能EGFR受体和抗EGFRvIII的嵌合抗原受体表达,使得转基因淋巴细胞具有显著的抵抗肿瘤介导的免疫抑制的功效,其抗凋亡能力和增殖能力增强、定向杀伤能力显著提高,免疫杀伤安全性显著提高,从而使得转基因淋巴细胞在肿瘤病人体外和体内的增殖和生存能力以及在肿瘤病人体内的杀伤能力大大提高,尤其对EGFRvIII突变的脑胶质母细胞瘤细胞的特异性杀伤效果尤为显著,对EGFRvIII突变的脑胶质母细胞瘤细胞的特异性杀伤安全性显著提高。

[0214] 根据本发明的实施例,发明人是通过如下方式的至少之一实现上述细胞嵌合抗原受体、表面或细胞内免疫检查点shRNA以及无功能EGFR受体分别独立地表达的,其中,需要说明的是,此处的表达既指蛋白的表达又指RNA转录。

[0215] 内部核糖体进入位点序列(IRES),本发明实施例的内部核糖体进入位点序列设置在编码嵌合抗原受体的核酸分子与表达无功能EGFR受体的核酸分子之间,内部核糖体进入位点具有SEQ ID NO:142所示的核苷酸序列。内部核糖体进入位点通常位于RNA病毒基因组的5'非翻译区(UTR),这样一个病毒蛋白的翻译就可以不依赖于5'帽子结构,另一个蛋白通

常靠5'帽子结构起始翻译,IRES前后的两个基因的表达通常是成比例的。内部核糖体进入位点序列的引入使得编码嵌合抗原受体的核酸分子与编码无功能EGFR受体的核酸分子分别独立的表达。根据本发明的实施例,本发明实施例采用内部核糖体进入位点序列有效保证了嵌合抗原受体和无功能EGFR受体的高效表达,使得淋巴细胞对肿瘤的特异性杀伤效果更加显著,免疫杀伤安全性进一步提高。

[0216] 启动子:第一启动子,第一启动子与编码嵌合抗原受体的核酸分子可操作地连接;第二启动子,第二启动子与沉默免疫检查点的核酸分子可操作地连接;以及第三启动子,第三启动子与表达无功能EGFR受体的核酸分子可操作地连接。根据本发明的实施例,所采用的第一启动子、第二启动子和第三启动子分别独立地选自U6,CMV,H1,EF-1,LTR,RSV启动子,第一以及第二启动子和第三启动子的引入,使得编码嵌合抗原受体的核酸分子和沉默免疫检查点的核酸分子以及表达无功能EGFR受体的核酸分子分别独立的表达,从而有效沉默了细胞表面或细胞内免疫检查点或高效表达了无功能EGFR受体,并且保证了嵌合抗原受体的高效表达,使得淋巴细胞在肿瘤环境中的成活率大大提高,淋巴细胞的靶向作用更强,对肿瘤的特异性杀伤作用更加显著,免疫杀伤的安全性进一步提高。

[0217] 第四核酸分子:第四核酸分子设置在所述第一核酸分子与所述第三核酸分子之间,并且所述第四核酸分子编码连接肽,所述连接肽能够在所述淋巴细胞中被切割。连接肽具有SEQ ID NO:143所示的氨基酸序列。第四核酸分子及其相应表达的连接肽的引入使得无功能EGFR受体和嵌合抗原受体成非融合状态表达在淋巴细胞膜上。根据本发明的实施例,本发明实施例连接肽的引入保证了无功能EGFR受体和嵌合抗原受体的生物学作用,其具特异性更强的肿瘤杀伤效果,安全性更高。

[0218] 通过上述内部核糖体进入位点序列、或第一、第二、第三启动子或第三核酸分子的引入,使得细胞表面或细胞内免疫检查点被高效沉默和无功能EGFR受体高效地表达以及嵌合抗原受体高效地表达在本发明实施例的转基因淋巴细胞膜上,并且无功能EGFR受体和嵌合抗原受体呈非融合状态表达在淋巴细胞膜上,从而高效抑制了免疫检查点的免疫负调控和保证了嵌合抗原受体的生物学作用,有效实现了转基因淋巴细胞的及时清除,从而使得淋巴细胞在肿瘤环境中的成活率大大提高,淋巴细胞的靶向杀伤作用更加显著,免疫杀伤的安全性进一步提高。

[0219] 另外,根据本发明的实施例,本发明实施例的构建体的载体是非致病性病毒载体。非致病性病毒载体大大提高了构建体在淋巴细胞中的复制和扩增效率,进而本发明实施例的淋巴细胞在肿瘤病人体内的增殖和生存能力大大提高,淋巴细胞的靶向作用进一步增强,对肿瘤细胞的杀伤作用更加显著,免疫杀伤安全性进一步提高。

[0220] 根据本发明的实施例,本发明实施例的构建体的载体是病毒载体,病毒载体选自反转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或腺病毒关联病毒载体的至少之一。根据本发明的实施例,本发明实施例的病毒的载体在病毒包装和感染过程中,病毒感染范围广泛,既可感染终末分化细胞,又可感染处于分裂期的细胞,既可整合到宿主染色体,又可游离在宿主染色体之外,实现广谱而高效的感染效率,从而细胞表面或细胞内免疫检查点被高效沉默和无功能EGFR被高效表达以及嵌合抗原受体在淋巴细胞中高效表达,本发明实施例的淋巴细胞的在肿瘤病人体内的增殖和生存能力大大提高,淋巴细胞的靶向作用进一步增强,对肿瘤细胞的杀伤作用更加显著,淋巴细胞的免疫杀伤安全性进一步提高。

[0221] 根据本发明的具体实施例,以构建一个慢病毒载体为例,发明人为了构建一个慢病毒载体,在某些病毒序列的位置,将目的核酸插入到病毒基因组中,从而产生复制缺陷的病毒。为了产生病毒体,发明人进而构建包装细胞系(包含gag,pol和env基因,但不包括LTR和包装成分)。发明人将含有目的基因的重组质粒,连同慢病毒LTR和包装序列,一起引入包装细胞系中。包装序列允许重组质粒RNA转录产物被包装到病毒颗粒中,然后被分泌到培养基中。进而发明人收集包含重组慢病毒的基质,有选择性地浓缩,并用于基因转移。慢载体可以感染多种细胞类型,包括可分裂细胞和不可分裂细胞。

[0222] 另外,根据本发明的实施例,本发明实施例的慢病毒是复合慢病毒,除了常见的慢病毒基因gag,pol和env,还包含有调控和结构功能的其他基因。慢病毒载体是本领域技术人员所熟知的,慢病毒包括:人类免疫缺陷病毒HIV-1,HIV-2和猿猴免疫缺陷病毒SIV。慢病毒载体通过多重衰减艾滋病毒致病基因产生,例如全部删除基因env,vif,vpr,vpu和nef,使慢病毒载体形成生物安全型载体。重组慢病毒载体能够感染非分裂细胞,同时可用于体内和体外基因转移和核酸序列表达。例如:在合适的宿主细胞中,和带有包装功能(gag,pol,env,rev和tat)的两个或更多的载体一起,能够感染非分裂细胞。重组病毒的靶向性,是通过抗体或特定配体(靶向特定细胞类型受体)与膜蛋白的结合来实现的。同时,重组病毒的靶向性通过插入一个有效序列(包括调控区域)到病毒载体中,连同另一个编码了特定靶细胞上的受体的配体的基因,使载体具有了特定的靶向。各种有用的慢病毒载体,以及各种方法和操作等产生的载体,用于改变细胞的表达。根据本发明的实施例,本发明实施例的慢病毒载体可有效运送和共表达shRNA(siRNA的转运形式),该小shRNA可以有效抑制PD1或CTLA4或CBL-B的表达。

[0223] 根据本发明的实施例,本发明实施例的腺关联病毒载体(AAV)可使用一种或多种为人熟知的血清类型腺关联病毒载体的DNA构建。本领域技术人员构建一个合适的腺关联病毒载体,以此携带和共表达小发夹RNA,该小发夹RNA可以抑制PD1或CTLA4或CBL-B基因的表达。

[0224] 另外,根据本发明的实施例,本发明实施例的也包含微基因。微基因意味着用组合(选定的核苷酸序列和可操作的必要的相关连接序列)来指导转化、转录和/或基因产物在体内或体外的宿主细胞中的表达。应用“可操作的连接”序列包含连续目的基因的表达控制序列,和作用于反式或远距离控制目的基因的表达控制序列。

[0225] 另外,本发明实施例的载体还包括常规控制元素,在和质粒载体一起的细胞转染或/和病毒载体一起的细胞感染中,这些元素允许转录、转化和/或小发夹RNA的表达。大量的表达控制序列(包括天然的,可诱导和/或特定组织的启动子)可能被使用。根据本发明的实施例,表达shRNA的启动子为RNA聚合酶启动子。同时,根据本发明的实施例,启动子为选自U6,H1,pol I,pol II and pol III的RNA聚合酶启动子。根据本发明的实施例,启动子为组织特异型启动子。根据本发明的实施例,启动子为诱导型启动子。根据本发明的实施例,启动子为选自基于所选载体的启动子。根据本发明的实施例,当选择慢病毒载体时,启动子为U6,H1,CMV IE基因,EF-1 $\alpha$ ,泛素C,或磷酸甘油激酶(PGK)启动子。其他常规表达控制序列包括可选标记或报告基因,包括编码遗传霉素,潮霉素,氨苄青霉素或嘌呤霉素耐药性等的核苷酸序列。载体的其他组件包括复制起点。

[0226] 构建载体的技术为本领域技术人员所熟知的,这些技术包括常规克隆技术,例如

在本发明实施例中所使用的shRNA、聚合酶链反应和任何适当的提供所需的核苷酸序列的方法。

[0227] 根据本发明的实施例,发明人构建了共表达小发夹RNA(shRNA)(用来抑制免疫检查点)和无功能EGFR受体以及嵌合抗原受体(CAR)的病毒载体。本发明实施例的运送沉默PD1或CTLA4或CBL-B的siRNA的小发夹RNA和表达无功能EGFR受体的核酸分子以及表达嵌合抗原受体(CAR)的病毒载体或质粒是复合的,此病毒载体或质粒可结合聚合物或其他材料来增加其稳定性,或协助其靶向运动。

[0228] 制备转基因淋巴细胞的方法

[0229] 在本发明的另一方面,本发明提出了一种制备前面所述的T淋巴细胞或者转基因淋巴细胞的方法。根据本发明的实施例,该方法包括:将前面所述的构建体或者前面所述的慢病毒引入到淋巴细胞中或者T淋巴细胞。引入方式可以选自电转或病毒感染宿主细胞的方式引入。本发明实施例的构建体或慢病毒成功引入上述淋巴细胞或者T淋巴细胞中,实现了针对抗原EGFRvIII的嵌合抗原受体的表达和淋巴细胞的细胞表面或细胞内免疫检查点被沉默以及无功能EGFR受体的表达,从而使得所得淋巴细胞或T淋巴细胞具有显著的抵抗肿瘤介导的免疫抑制的功效,在肿瘤病人体内和体外的增殖及肿瘤病人体内存活能力大大提高,淋巴细胞或T淋巴细胞对肿瘤细胞,尤其是EGFRvIII突变的脑胶质母细胞瘤细胞的靶向杀伤作用更强,免疫杀伤的安全性高。

[0230] 治疗癌症的治疗组合物

[0231] 在本发明的另一方面,本发明的提出了一种用于治疗癌症的治疗组合物。根据本发明的实施例,该治疗组合物包括:上述构建体、上述慢病毒、上述T淋巴细胞或者上述转基因淋巴细胞。上述任意一种治疗组合物的组成均可实现针对抗原EGFRvIII嵌合抗原受体在转基因淋巴细胞或T淋巴细胞中的高效表达和转基因淋巴细胞或T淋巴细胞细胞表面或细胞内免疫检查点的沉默;以及无功能EGFR受体在转基因淋巴细胞或T淋巴细胞表面的表达,从而使得所得转基因淋巴细胞或T淋巴细胞在体外扩增、在肿瘤病人体内的增殖及肿瘤病人体内存活能力大大提高,转基因淋巴细胞或T淋巴细胞对EGFRvIII肿瘤细胞的靶向杀伤作用更强,免疫杀伤的安全性更高。

[0232] 根据本发明的实施例,提供给患者的本发明实施例的治疗组合物,较好的应用于生物兼容溶液或可接受的药学运载载体。作为准备的各种治疗组合物被悬浮或溶解在医药上或生理上可接受的载体,如生理盐水;等渗的盐溶液或其他精于此道的人的比较明显的配方中。适当的载体在很大程度上取决于给药途径。其他有水和无水的等渗无菌注射液和有水和无水的无菌悬浮液,是医药上可接受的载体。

[0233] 根据本发明的实施例,足够数量的病毒载体被转导入靶向T细胞中,并提供足够强度的转基因,沉默PD1或CTLA4或CBL-B和表达无功能EGFR受体以及表达特有的EGFRvIII嵌合抗原受体。治疗试剂的剂量主要取决于治疗状况,年龄,体重,病人的健康程度,从而可能造成病人的变异性。

[0234] 沉默PD1或CTLA4或CBL-B和表达无功能EGFR受体以及表达特有的针对抗原EGFRvIII嵌合抗原受体的这些方法是联合治疗的一部分。这些病毒载体和用于过继免疫治疗的抗肿瘤T细胞,可以被单独或结合其他治疗癌症的方法一起执行。在合适的条件下,一个治疗方法的包括使用一个或多个药物疗法。

[0235] 根据本发明的实施例,所述癌症包括脑胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、乳腺癌或卵巢癌。细胞表面或细胞内免疫检查点的沉默和无功能EGFR受体的表达,联合嵌合抗原受体在转基因淋巴细胞或T淋巴细胞中的高效表达,使得所得淋巴细胞或T淋巴细胞在脑胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、乳腺癌或卵巢癌的环境中的存活能力大大提高,淋巴细胞或T淋巴细胞对脑胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、乳腺癌或卵巢癌的肿瘤细胞的靶向杀伤作用更强,尤其对EGFRvIII突变的上述肿瘤细胞的杀伤作用更加显著,对EGFRvIII突变的上述肿瘤细胞的免疫杀伤作用更加安全有效。

[0236] 提高淋巴细胞活性和治疗安全性的方法

[0237] 在本发明的另一方面,本发明提出了一种提高淋巴细胞活性和治疗安全性的方法,本发明实施例的淋巴细胞携带嵌合抗原受体,根据本发明的实施例,该方法包括:使所述淋巴细胞的细胞表面或细胞内至少之一免疫检查点被沉默;以及使所述淋巴细胞表达无功能EGFR受体,细胞表面或细胞内免疫检查点、淋巴细胞、嵌合抗原受体、无功能EGFR受体是如前所定义的。根据本发明的实施例,本发明实施例的淋巴细胞活性包括淋巴细胞体外增殖能力,在肿瘤病人体内的增殖和生存能力以及淋巴细胞在肿瘤病人体内的杀伤能力的至少一种。根据本发明的实施例,本发明实施例的淋巴细胞的细胞表面或细胞内免疫检查点被沉默,淋巴细胞被活化、增生性反应上调、细胞因子分泌增多、抗凋亡能力增强。本发明实施例的淋巴细胞在体外扩增和增殖、对肿瘤细胞的靶向杀伤作用显著增强。

[0238] 无功能EGFR受体缺少N-端配体结合区和细胞内受体酪氨酸激酶活性,但包括野生型EGFR受体的跨膜区和完整的与抗EGFR抗体结合的序列,无功能EGFR受体可作为淋巴细胞的自杀标记。本发明是实施例的淋巴细胞在用于治疗治疗EGFRvIII突变的肿瘤细胞时,如果病人出现严重不良反应,本发明实施例的淋巴细胞可被抗EGFR抗体清除,进而可提高本发明实施例的淋巴细胞治疗EGFRvIII突变的肿瘤病人的安全性。

[0239] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。

[0240] 本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0241] 实施例1

[0242] 本发明实施例中所用到的细胞系和基本实验技术如下所述:

[0243] 慢病毒的产生和人T淋巴细胞的转导

[0244] 产生复制缺陷的慢病毒载体,并将慢病毒载体离心收集用于人T淋巴细胞的转导。下面简要介绍慢病毒载体的产生、收集的实验过程:将293T细胞铺在底面积为150-平方厘米的细胞培养皿中,并根据说明书,使用Express-In(购自Open Biosystems/Thermo Scientific,Waltham,MA)对293T细胞进行病毒转导。每盘细胞加入15 $\mu$ g的慢病毒转基因质粒、5 $\mu$ g的pVSV-G(VSV糖蛋白表达质粒)、10 $\mu$ g的pCMVR8.74质粒(Gag/Pol/Tat/Rev表达质粒)和174 $\mu$ l的Express-In(浓度为1 $\mu$ g/ $\mu$ l)。分别于24小时和48小时收集上清,并使用超速离心机在28,000rpm(离心机转子为Beckman SW 32 Ti,购自Beckman Coulter,Brea,CA)的条件下离心2小时。最后用0.75ml的RPMI-1640培养基对病毒质粒沉淀进行重悬。

[0245] 从健康志愿者供体上分离人原代T淋巴细胞。人T淋巴细胞培养在RPMI-1640培养基中并使用抗CD3和CD28的单克隆抗体包被的珠(购自Invitrogen, Carlsbad, CA)进行刺激激活。人T淋巴细胞激活后的18~24小时,采用自旋-接种的方法对T淋巴细胞进行转导,转导过程如下所述:在24-孔板中,每孔铺有 $0.5 \times 10^6$ T淋巴细胞,向每孔细胞中加入0.75ml的上述重悬的病毒上清和Polybrene(浓度为 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ )。细胞和病毒质粒的混合液在台式离心机(购自Sorvall ST 40; Thermo Scientific)中离心,离心条件是室温,2500rpm,时间为90分钟。人重组白细胞介素-2(IL-2; 购自Novartis, Basel, Switzerland)每隔2~3天加入T淋巴细胞培养液中,IL-2的终浓度为100-IU/ml,在T淋巴细胞培养过程中,保持细胞的密度为 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ 。一旦被转导的T淋巴细胞出现休眠,例如细胞生长速度变慢和细胞变小,其中,细胞生长速度和大小是通过Coulter Counter(购自Beckman Coulter)评估的,或被转导的T淋巴细胞在某个计划的时间点上,T淋巴细胞即可用来做功能分析。

[0246] 本申请的实施例中所用的流式细胞仪为BD FACSCanto II(购自BD Biosciences),并且流式细胞分析数据使用FlowJo version 7.2.5软件(购自Tree Star, Ashland, OR)进行分析。

[0247] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)

[0248] 在有关ADCC的实施例中,采用4小时 $^{51}\text{Cr}$ -释放法评估抗-EGFR抗体诱导表达无功能EGFR受体的淋巴细胞的细胞依赖性裂解的能力。被转导了慢病毒载体的人类T淋巴细胞被用作靶细胞。 $100 \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (购自GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA)标定 $2 \sim 5 \times 10^6$ 靶细胞,标定条件是 $37^\circ\text{C}$ 下震荡孵育1小时。细胞采用PBS润洗三次,并且用培养基重悬(细胞密度是 $1 \times 10^5/\text{ml}$ )。继而,被标定的细胞铺在96-孔板中(每孔铺有 $5 \times 10^3$ 个细胞,加有 $50 \mu\text{l}$ 培养基),并加入 $50 \mu\text{l}$ 的抗-EGFR抗体(购自Erbix, Genentech)(终浓度为 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ),在常温条件下预培养30分钟。继而将含有抗体的培养基换成普通培养基,由此来检测 $^{51}\text{Cr}$ 的自发释放。加入终浓度为1%的Triton X-100以保证 $^{51}\text{Cr}$ 的最大释放量。在以下有关ADCC实施例中,人PBMC(效应细胞)加入孔板中(每孔 $5 \times 10^5$ 个细胞)并将细胞在 $37^\circ\text{C}$ 培养过夜。第二天,收集细胞上清,并利用 $\gamma$ 计数器计算cpm以此来确定 $^{51}\text{Cr}$ 的释放。细胞毒性比例用以下公式计算: $\% \text{特异性裂解} = (\text{实验释放cpm数据} - \text{自发释放cpm数据}) / (\text{最大释放cpm数据} - \text{自发释放cpm数据}) * 100$ ,其中,最大释放cpm数据通过靶细胞中加入Triton X-100实现的,自发释放cpm数据是在没有抗EGFR抗体和效应细胞的条件下测量的。

[0249] 铬释放实验

[0250] 实施例中应用4-小时 $^{51}\text{Cr}$ 释放法分析评估抗EGFRvIII嵌合抗原受体T细胞(抗EGFRvIII CAR T淋巴细胞)的细胞毒活性。具体步骤如下:目标测试细胞用 $^{51}\text{Cr}$ 在 $37^\circ\text{C}$ 下标记1小时。标记后,用含有10%胎牛血清(FCS)的RPMI培养基润洗细胞。润洗后,将细胞重悬在相同的培养基中,重悬细胞的浓度是 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。转导后T细胞以不同的效靶细胞比值(E:T)加入目标测试细胞悬浮液中,并将细胞种在96-孔中,每孔体积是200微升。将细胞在 $37^\circ\text{C}$ 培养箱中培养4小时。4小时后,从每孔中取出30微升的上清放于计数器的96-微孔板进行计数分析。分析仪器是顶级计数NXT微闪烁计数器(购自Packard Bioscience)。所有计数孔中效应细胞的数目是基于T细胞总数来计算的。被标记的目标测试细胞是EGFRvIII-U87脑瘤细胞。

[0251] 实施例2构建共表达shRNA、无功能EGFR和抗EGFRvIII嵌合抗原受体的载体

[0252] 本实施例中,发明人将编码有抗人EGFRvIII的单链抗体的序列、4-1BB胞内段和T细胞受体组合的 $\zeta$ -链序列克隆到含有EF-1启动子的慢病毒载体(lentiviral vector)上,克隆过程中,选择的限制性酶切是XbaI和NotI双酶切,以及NotI和XhoI双酶切,通过酶切、连接、筛选和目的质粒的扩增,生成表达抗EGFRvIII嵌合抗原受体的慢病毒质粒(LV-EGFRvIII CAR)。包含U6启动子和人PD1-shRNA(iPD1)或CBL-B-shRNA(iCBL-B)的序列被克隆进LV-EGFRvIII CAR载体质粒,构建成LV-EGFRvIII CAR/iPD1或LV-EGFRvIII CAR/iCBL-B,或包含合成IRES和表达无功能EGFR受体的序列、U6启动子和人PD1-shRNA序列和H1启动子和CBL-B-shRNA的序列被克隆进LV-EGFRvIII CAR载体质粒,构建成LV-EGFRvIII CAR/iPD1-Cb1/tEGFR。图1是慢病毒载体的示意图,包含编码抗EGFRvIII嵌合抗原受体的序列,IRES、U6 and H1启动子序列,PD1-shRNA或CBL-B-shRNA序列,及编码无功能EGFR受体序列。抗EGFRvIII嵌合抗原受体的序列在启动子EF-1的启动调控下,CTLA4,PD1或者CBL-B shRNA序列在启动子U6或H1的启动调控下,表达无功能EGFR受体的序列作为一个单独的mRNA转录单元从IRES序列后开始翻译。

[0253] 实施例3抗EGFR抗体可有效杀伤清除共表达PD1-shRNA、无功能EGFR受体和抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T淋巴细胞

[0254] 在本实施例中,外周血淋巴细胞取自不记名供血者。外周血淋巴细胞通过梯度离心进行分离,梯度离心机为Ficoll-Hypaque。在T淋巴细胞激活因子磁珠CD3/CD28(购自Invitrogen,Carlsbad,CA)存在下,被激活的T淋巴细胞经过慢病毒载体转导、体外扩增培养,方法如实施例1所述。激活培养72小时后,用洗液润洗细胞,将磁珠洗去。将T细胞种在铺有重组纤连蛋白片段(FN ch-296;Retronectin)细胞培养皿上,并用慢病毒转导,转导慢病毒分别为LV-EGFRvIII-CAR/iPD1/tEGFR,LV-EGFRvIII-CAR/iPD1或空载(LV-GFP)转导过程如实施例1所述。转导后表达无功能EGFR受体的T细胞用抗EGFR抗体染色后,然后FACS分离。分离后T细胞培养在RPMI-1640培养基中并用重组人类IL-2因子(100ng/ml;购自R&D Systems)进行诱导扩增7-10天,然后作为实验的靶细胞。发明人用ADCC检测法测量抗EGFR抗体介导ADCC的对转导了不同慢病毒的T细胞(靶细胞)的杀伤作用,测量方法采用标准4-小时<sup>51</sup>铬释放法,4-小时<sup>51</sup>铬释放法如实施例1所述。结果如图2所示。如图2所示,抗EGFR抗体可有效介导杀伤共表达抗EGFRvIII嵌合抗原受体,PD1-shRNA(iPD1),和无功能EGFR受体的T淋巴细胞,但抗EGFR抗体不能介导对表达抗EGFRvIII嵌合抗原受体和PD1-shRNA的T淋巴细胞杀伤。抗EGFR抗体也不能介导对空载慢病毒转导的T淋巴细胞杀伤。统计数据代表三个孔的平均值 $\pm$ SEM。

[0255] 实施例4共表达PD1-shRNA、无功能EGFR受体和抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T淋巴细胞肿瘤细胞溶解能力。

[0256] 在本实施例中,外周血淋巴细胞取自不记名供血者。外周血淋巴细胞通过梯度离心进行分离,梯度离心机为Ficoll-Hypaque。T淋巴细胞与T细胞激活因子磁珠CD3/CD28(购自Invitrogen,Carlsbad,CA)在5%CO<sub>2</sub>、37摄氏度下孵育培养72小时,培养基是加有2mmol/L谷氨酰胺,10%高温灭活的胎牛血清(FCS)(购自Sigma-Aldrich Co.)和100U/ml的青霉素/链霉素双抗的RPMI培养基1640(购自Invitrogen Gibco Cat.no.12633-012)。激活培养72小时后,用洗液润洗细胞,将磁珠洗去。将T细胞种在铺有重组纤连蛋白片段(FN ch-296;Retronectin)细胞培养皿上,并用慢病毒转导,转导慢病毒分别为LV-EGFRvIII CAR/iPD1/

tEGFR, LV-EGFRvIII CAR/iPD1, LV-tEGFR, 或空载(LV-GFP)转导过程如实施例1所述。转导后的T细胞培养在RPMI-1640培养基中并用重组人类IL-2因子(100ng/ml; 购自R&D Systems)进行诱导扩增7-10天, 然后进行功能测试实验。发明人测量转导了不同慢病毒的T细胞(效应细胞)对EGFRvIII突变的脑胶质瘤靶细胞的杀伤作用, 效靶细胞比例是50:1, 25:1, 或10:1, 测量方法采用标准4-小时<sup>51</sup>铬释放法, 4-小时<sup>51</sup>铬释放法如实施例1所述。结果如图3所示。如图3所示, 共表达抗EGFRvIII嵌合抗原受体、PD1-shRNA(iPD1)和无功能EGFR受体慢病毒转导的T淋巴细胞, 及共表达抗EGFRvIII嵌合抗原受体和PD1-shRNA(iPD1)受体慢病毒转导的T淋巴细胞都可有效的杀死EGFRvIII突变的脑瘤靶细胞。无功能EGFR受体慢病毒转导的T淋巴细胞(LV-tEGFR T淋巴细胞)或空载慢病毒转导的T淋巴细胞(对照LV-GFP T淋巴细胞)对EGFRvIII突变的脑瘤靶细胞无明显杀伤作用。统计数据代表三个孔的平均值±SEM。这些结果表明共表达无功能EGFR受体标记不影响抗EGFRvIII CAR对脑瘤细胞杀伤作用。

[0257] 实施例5共表达PD1-shRNA、无功能EGFR受体和抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T细胞, 共表达CBL-B-shRNA、无功能EGFR受体和抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T细胞, 共表达PD1-shRNA, CTLA4-shRNA, 无功能EGFR受体和抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T细胞的细胞, 共表达PD1-shRNA, CBL-B-shRNA、抗EGFRvIII嵌合抗原受体、无功能EGFR受体的T细胞, 溶解能力增强并且具有细胞因子分泌更多和细胞增殖更强的特点

[0258] 在本实施例中, 发明人还考察了共表达1个shRNA(CBL-B-shRNA或PD1-shRNA)、无功能EGFR受体和抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T细胞, 共表达2个shRNA(PD1-shRNA和CBL-B-shRNA或PD1-shRNA和CTLA4-shRNA)、无功能EGFR受体和抗EGFRvIII嵌合抗原受体的淋巴细胞, 肿瘤溶解能力、细胞因子分泌能力和细胞增殖能力。上述T细胞, 比单独表达抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T细胞的细胞溶解能力增强, 细胞因子分泌更多和细胞增殖更强。共表达2个shRNA(PD1-shRNA和CTLA4-shRNA或PD1-shRNA和CBL-B-shRNA)、无功能EGFR受体和抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T细胞比共表达1个shRNA(PD1-shRNA或CBL-B-shRNA)、无功能EGFR受体和抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T细胞的细胞溶解能力更强, 细胞因子分泌更多和细胞增殖更强。

[0259] 实施例6无功能EGFR受体的表达对T细胞的细胞溶解能力、细胞因子分泌能力和细胞增殖能力的影响

[0260] 在本实施例中, 发明人考察了表达无功能EGFR受体对T淋巴细胞的细胞溶解能力、细胞因子分泌能力和细胞增殖能力的影响。发明人发现, 共表达2个shRNA(PD1-shRNA和CBL-B-shRNA或PD1-shRNA和CTLA4-shRNA)、抗EGFRvIII嵌合抗原受体和无功能EGFR受体的T细胞的细胞溶解能力、细胞因子分泌能力和细胞增殖能力与共表达2个shRNA(PD1-shRNA和CBL-B-shRNA或PD1-shRNA和CTLA4-shRNA)和抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T细胞相当; 共表达1个shRNA(PD1-shRNA或CBL-B-shRNA)、无功能EGFR受体和抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T细胞的细胞溶解能力、细胞因子分泌能力和细胞增殖能力与共表达1个shRNA(PD1-shRNA或CBL-B-shRNA)和抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T细胞相当; 且共表达抗EGFRvIII嵌合抗原受体和无功能EGFR受体的T细胞与单独表达抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T细胞的细胞溶解能力、细胞因子分泌能力和细胞增殖能力相当。由此可见无功能EGFR受体的表达不影响T淋巴细胞的细胞溶解能力、细胞因子分泌能力和细胞的增殖能力, 发明人在T细胞中引入无功

能EGFR受体,从而本发明实施例的淋巴细胞在用于治疗治疗EGFR<sub>vIII</sub>突变的肿瘤细胞时,如果病人出现严重不良反应,本发明实施例的淋巴细胞可被抗EGFR抗体清除,进而可提高本发明实施例的淋巴细胞治疗EGFR<sub>vIII</sub>突变的肿瘤病人的安全性。

[0261] 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任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。

[0262] 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。

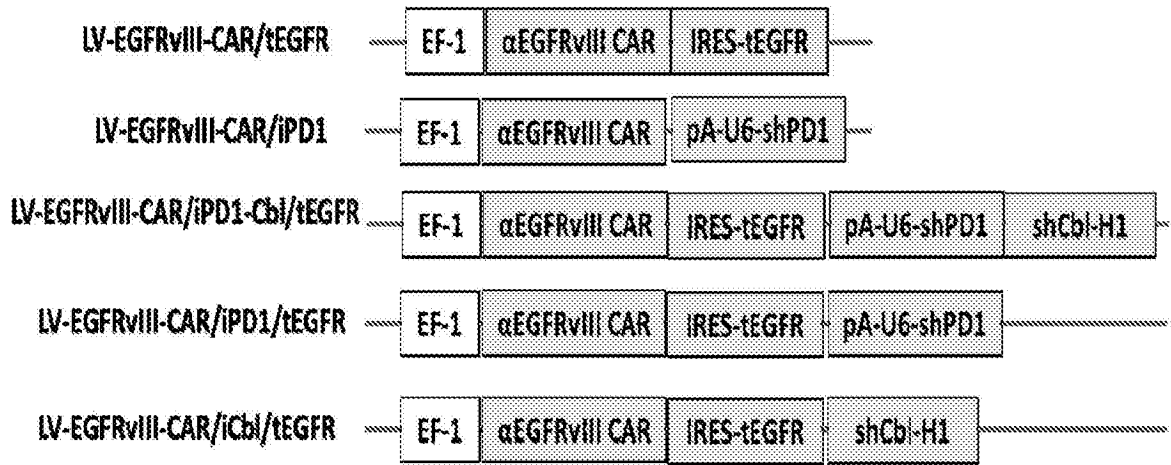


图1

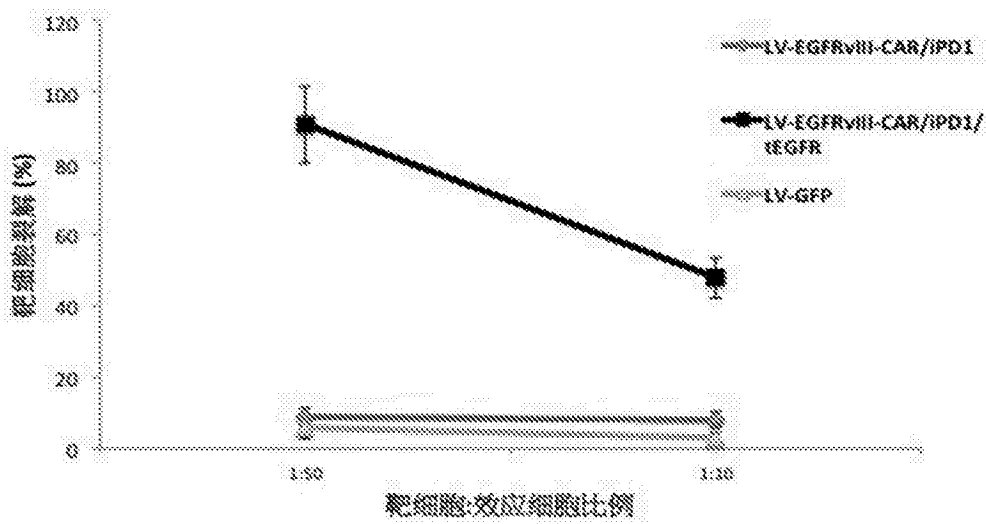


图2

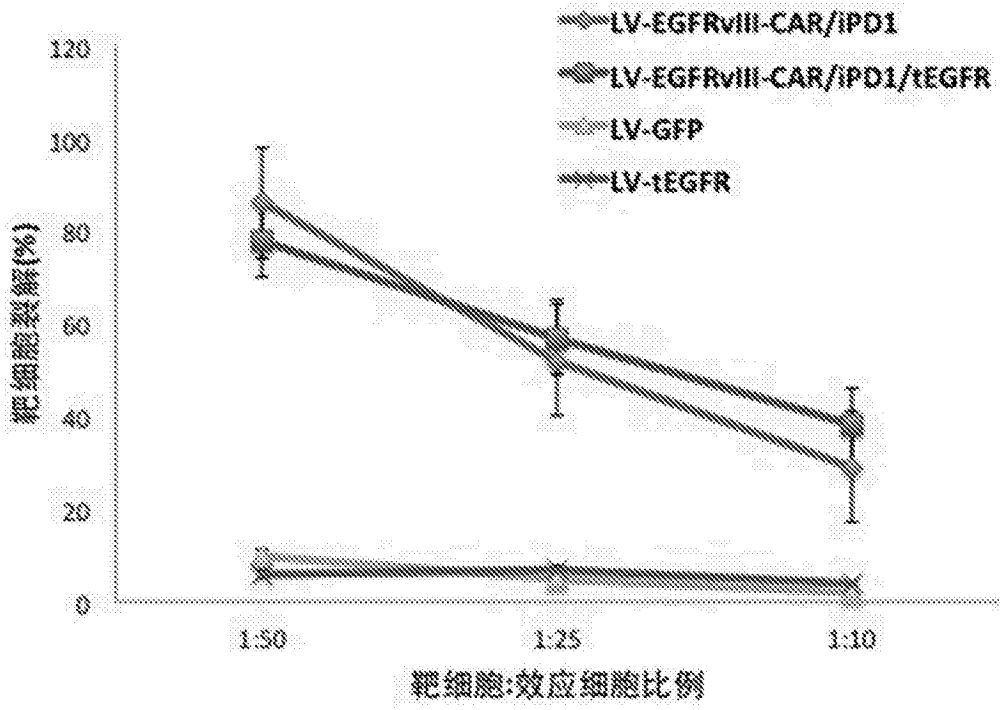


图3