



(10) 授权公告号 CN 111918964 B

(45) 授权公告日 2025. 05. 30

(21) 申请号 201980022452.0

李慧姣 王华菁 应碧 杨焕凤

(22) 申请日 2019.03.25

(74) 专利代理机构 上海巛石知识产权代理事务
所(普通合伙) 31309

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111918964 A

专利代理师 张琤

(43) 申请公布日 2020.11.10

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

201810251875.7 2018.03.26 CN

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.09.25

(56) 对比文件

CN 108392492 A, 2018.08.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2019/079576 2019.03.25

US 2020179510 A1, 2020.06.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/184886 ZH 2019.10.03

Ping He等.Co-expressing LRP6 With
Anti-CD19 CAR-T Cells for Improved
Therapeutic Effect Against B-ALL.

(73) 专利权人 原启生物科技(上海)有限责任公
司

地址 201203 上海市浦东新区张衡路1227
号1幢303室

《Frontiers in Oncology》.2020,第10卷卷第
1-9页.

审查员 彭熹

权利要求书3页 说明书29页

序列表37页 附图6页

(72) 发明人 凌有国 郭昊 何晓文 马海立

(54) 发明名称

促进免疫细胞增殖的方法

(57) 摘要

本申请公开了一种促进免疫细胞增殖的方法。所述方法包括以下步骤:使该免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

1. 一种经遗传修饰的免疫细胞,其中所述遗传修饰使得该免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其功能性片段的表达量上调,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其功能性片段选自:低密度脂蛋白受体相关蛋白5或其功能性片段,或者低密度脂蛋白受体相关蛋白6或其功能性片段,所述功能性片段包含所述低密度脂蛋白受体相关蛋白的胞内区,所述免疫细胞为T细胞,所述免疫细胞还表达嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。

2. 根据权利要求1所述的免疫细胞,其中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6或其功能性片段包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5或其功能性片段包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的免疫细胞,其中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6或其功能性片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24所示,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5或其功能性片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:26或28所示。

4. 根据权利要求1所述的免疫细胞,其中所述CAR包含细胞内结构域,所述细胞内结构域包含信号传导结构域和/或共刺激结构域。

5. 根据权利要求4所述的免疫细胞,其中所述信号传导结构域包含选自下组的部分:CD3 ζ 的信号传导结构域、CD3 δ 的信号传导结构域和CD3 ϵ 的信号传导结构域。

6. 根据权利要求5所述的免疫细胞,其中所述信号传导结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示。

7. 根据权利要求5所述的免疫细胞,其中编码所述信号传导结构域的核酸分子的核酸序列如SEQ ID NO:17所示。

8. 根据权利要求4所述的免疫细胞,其中所述共刺激结构域选自下组:CD27的共刺激结构域、CD28的共刺激结构域和4-1BB的共刺激结构域。

9. 根据权利要求8所述的免疫细胞,其中所述共刺激结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16所示。

10. 根据权利要求8所述的免疫细胞,其中编码所述共刺激结构域的核酸分子的核酸序列如SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15所示。

11. 根据权利要求4所述的免疫细胞,其中所述CAR包含铰链区。

12. 根据权利要求11所述的免疫细胞,其中所述铰链区选自下组:IgG4的铰链区、IgG1的铰链区和CD8的铰链区。

13. 根据权利要求11所述的免疫细胞,其中所述铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:31所示。

14. 根据权利要求11所述的免疫细胞,其中编码所述铰链区的核酸分子的核酸序列如SEQ ID NO:32所示。

15. 根据权利要求4所述的免疫细胞,其中所述CAR包含跨膜区。

16. 根据权利要求15所述的免疫细胞,其中所述跨膜区选自下组:CD8的跨膜区、CD28的跨膜区和/或CD24的跨膜区。

17. 根据权利要求15所述的免疫细胞,其中所述跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:33所示。

18. 根据权利要求15所述的免疫细胞,其中编码所述跨膜区的核酸分子的核酸序列如SEQ ID NO:34所示。

19. 根据权利要求4所述的免疫细胞,其中所述CAR包含靶向部分。

20. 根据权利要求19所述的免疫细胞,其中所述靶向部分包含ScFv。

21. 根据权利要求19所述的免疫细胞,其中所述靶向部分特异性结合和/或识别肿瘤抗原。

22. 根据权利要求19所述的免疫细胞,其中所述靶向部分特异性结合和/或识别选自下组的靶标: B淋巴细胞表面抗原、TNF家族成员、HER家族成员和GPC家族成员。

23. 根据权利要求19所述的免疫细胞,其中所述靶向部分特异性结合和/或识别选自下组的靶标: CD19、BCMA、HER2、Mesothelin和GPC3。

24. 根据权利要求19所述的免疫细胞,其中所述靶向部分为特异性结合和/或识别CD19的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:46所示;所述LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:47所示;所述LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:48所示;所述HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:43所示;所述HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:44所示;且所述HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:45所示。

25. 根据权利要求24所述的免疫细胞,其中所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:49所示。

26. 根据权利要求19所述的免疫细胞,其中所述靶向部分为特异性结合和/或识别BCMA的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:54所示;所述LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:55所示;所述LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:56所示;所述HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:51所示;所述HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:52所示;且所述HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:53所示。

27. 根据权利要求26所述的免疫细胞,其中所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:58所示,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:57所示。

28. 根据权利要求19所述的免疫细胞,其中所述靶向部分为特异性结合和/或识别HER2的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:70所示;所述LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:71所示;所述LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:72所示;所述HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:67所示;所述HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:68所示;且所述HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:69所示。

29. 根据权利要求28所述的免疫细胞,其中所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:74所示,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:73所示。

30. 根据权利要求19所述的免疫细胞,其中所述靶向部分为特异性结合和/或识别Mesothelin的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:62所示;所述LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:63所示;所述LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:64所示;所述HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:59所示;所述HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:60所示;且所述HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:61所示。

31. 根据权利要求30所述的免疫细胞,其中所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:66所示,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:65所示。

32. 根据权利要求19所述的免疫细胞,其中所述靶向部分为特异性结合和/或识别GPC3的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:38所示;所述LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:39所示;所述LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示;所述HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示;所述HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:36;

且所述HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:37所示。

33. 根据权利要求32所述的免疫细胞,其中所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:41所示。

34. 根据权利要求19所述的免疫细胞,其中所述靶向部分的氨基酸序列如SEQ ID NO:2、4、6、8或10所示。

35. 根据权利要求19所述的免疫细胞,其中编码所述靶向部分的核酸分子的核酸序列如SEQ ID NO:1、3、5、7或9所示。

36. 组合物,其包含权利要求1-35中任一项所述的经遗传修饰的免疫细胞。

37. 根据权利要求36所述的组合物,其还包含任选地药学上可接受的载体。

38. 权利要求1-35中任一项所述的经遗传修饰的免疫细胞和/或权利要求36-37中任一项所述的组合物在制备药物中的用途,其中所述药物用于治疗肿瘤,所述肿瘤选自肝癌、肺癌、白血病和间皮瘤。

39. 制备权利要求1-35中任一项所述经遗传修饰的免疫细胞的方法,所述方法包括以下的步骤,使所述经遗传修饰的免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

40. 根据权利要求39所述的方法,其包括以下步骤:向所述经遗传修饰的免疫细胞中引入使得所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调的载体。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中所述载体选自以下组:逆转录病毒载体、慢病毒载体和转座子质粒。

42. 根据权利要求39-41中任一项所述的方法,其中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段包含下述任一项所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:22、24、26和28。

促进免疫细胞增殖的方法

技术领域

[0001] 本申请涉及一种促进免疫细胞增殖的方法。特别地,本申请的方法可以使该免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

背景技术

[0002] 嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(CAR-T,Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy),是通过基因工程手段修饰T细胞,使其表达嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor,CAR)并识别肿瘤细胞表面抗原的抗体,以此增强T细胞对肿瘤的特异性杀伤。CAR一般包含特异性识别肿瘤相关抗原(Tumor associated antigen,TAA)的单链可变区结构域(Single chain variable fragment,scFv)、铰链区、跨膜区和胞内信号传导区。

[0003] 近年来,CAR-T免疫疗法在急性白血病和非霍奇金淋巴瘤的治疗上有显著的疗效,但表达CAR的免疫细胞的增殖能力极为有限。

发明内容

[0004] 本申请提供了一种经遗传修饰的免疫细胞,以及一种促进免疫细胞增殖的方法。本申请提供的方法可以使该免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。本申请提供的方法还可以促进记忆性免疫细胞产生。本申请提供的方法还可以抑制免疫细胞分化。本申请提供的方法还可以增强免疫细胞释放细胞因子。本申请提供的方法还可以增强免疫细胞对肿瘤杀伤能力。此外,本申请提供的方法能够用于预防受试者中肿瘤复发。本申请还提供了一种治疗有需要的受试者中的肿瘤的方法。本申请还提供了包含所述经遗传修饰的免疫细胞的组合物,以及所述经遗传修饰的免疫细胞和所述组合物在制备药物中的用途。本申请还提供了制备所述经遗传修改的免疫细胞的方法。

[0005] 一方面,本申请提供了一种促进免疫细胞增殖的方法,其包含以下步骤:使所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0006] 一方面,本申请提供了一种促进记忆性免疫细胞产生的方法,其包含以下步骤:使免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调,从而促进所述免疫细胞分化为记忆性免疫细胞。

[0007] 一方面,本申请提供了一种抑制免疫细胞分化的方法,其包含以下步骤:使所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调,从而抑制所述免疫细胞分化为分化型免疫细胞。

[0008] 一方面,本申请提供了一种增强免疫细胞释放细胞因子的方法,其包含以下步骤:使所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0009] 在某些实施方式中,所述细胞因子包含白介素、干扰素和/或肿瘤坏死因子。在某些实施方式中,所述细胞因子包含IL-2、IL4、IL6、IL7、IL10、IL12、TNF- α 和/或IFN γ 。

[0010] 一方面,本申请提供了一种增强免疫细胞对肿瘤杀伤能力的方法,其包含以下步

骤:使所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0011] 一方面,本申请提供了一种预防受试者中肿瘤复发的方法,所述方法包含:向易患肿瘤的受试者施用免疫细胞,其中所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0012] 一方面,本申请提供了一种治疗有需要的受试者中的肿瘤的方法,其包含以下步骤:向所述受试者施用免疫细胞,其中所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0013] 在某些实施方式中,所述肿瘤选自肝癌、肺癌、白血病和间皮瘤。

[0014] 在某些实施方式中,所述方法包括体内方法和体外方法。

[0015] 在某些实施方式中,所述免疫细胞包含淋巴细胞。在某些实施方式中,所述免疫细胞包含T细胞。在某些实施方式中,所述T细胞包含记忆性干细胞样T细胞(TSCM)和/或中央记忆性T细胞(TCM)。在某些实施方式中,所述TSCM为CCR7⁺和/或CD62L⁺。在某些实施方式中,所述TSCM还具有选自下组的一种或多种性质:CD45RA⁺或CD45RA⁻、CD45RO⁺或CD45RO⁻、CD27⁺、CD28⁺、CD127⁺、CD122⁺、CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺。

[0016] 在某些实施方式中,所述免疫细胞包含经遗传修饰的免疫细胞,且所述经遗传修饰的免疫细胞表达嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。在某些实施方式中,所述经遗传修饰的免疫细胞包括经遗传修饰的T细胞。

[0017] 在某些实施方式中,所述CAR包含细胞内结构域,所述细胞内结构域包括信号传导结构域和/或共刺激结构域。

[0018] 在某些实施方式中,所述信号传导结构域包含选自下组的部分:CD3 ζ 的信号传导结构域、CD3 δ 的信号传导结构域和CD3 ϵ 的信号传导结构域。在某些实施方式中,所述信号传导结构域包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,编码所述信号传导结构域的核酸分子包含SEQ ID NO:17所示的核酸序列或与其具备至少80%同源性的核酸序列。

[0019] 在某些实施方式中,所述共刺激结构域包含选自下组的部分:CD27的共刺激结构域、CD28的共刺激结构域和4-1BB的共刺激结构域。在某些实施方式中,所述共刺激结构域包含下述任一项所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16。在某些实施方式中,编码所述共刺激结构域的核酸分子包含下述任一项所示的核酸序列或与其具备至少80%同源性的核酸序列:SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:15。

[0020] 在某些实施方式中,所述CAR包含铰链区。在某些实施方式中,所述铰链区包含选自下组的部分:IgG4的铰链区、IgG1的铰链区和CD8的铰链区。在某些实施方式中,所述铰链区包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,编码所述铰链区的核酸分子包含SEQ ID NO:32所示的核苷酸序列。

[0021] 在某些实施方式中,所述CAR包含跨膜区。在某些实施方式中,所述跨膜区包含选自下组的部分:CD8的跨膜区、CD28的跨膜区和CD24的跨膜区。在某些实施方式中,所述跨膜区包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,编码所述跨膜区的核酸分子包含SEQ ID NO:34所示的核苷酸序列。

[0022] 在某些实施方式中,所述CAR包含靶向部分。在某些实施方式中,所述靶向部分包

括ScFv。

[0023] 在某些实施方式中,所述靶向部分特异性结合和/或识别肿瘤抗原。在某些实施方式中,所述靶向部分特异性结合和/或识别选自下组的靶标:B淋巴细胞表面抗原、TNF家族成员、HER家族成员和GPC家族成员。在某些实施方式中,所述靶向部分特异性结合和/或识别选自下组的靶标:CD19、BCMA、HER2、Mesothelin和GPC3。

[0024] 在某些实施方式中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别CD19的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1包含SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2包含SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3包含SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2包含SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3包含SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0025] 在某些实施方式中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别BCMA的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1包含SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3包含SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2包含SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0026] 在某些实施方式中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别HER2的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2包含SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3包含SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:

67所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2包含SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3包含SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0027] 在某些实施方式中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别Mesothelin的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3包含SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2包含SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3包含SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0028] 在某些实施方式中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别GPC3的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1包含SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2包含SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3包含SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3包含SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0029] 在某些实施方式中,所述靶向部分包含下述任一项所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6、8和10或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,编码所述靶向部分的核酸分子包含下述任一项所示的核酸序列:SEQ ID NO:1、3、5、7和9或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0030] 在某些实施方式中,所述方法还包括以下步骤:分离获得外周血单核细胞PBMC、CD3⁺T淋巴细胞、CD8⁺T淋巴细胞、CD4⁺T淋巴细胞或调节T细胞。

[0031] 在某些实施方式中,所述方法还包括:向经分离的所述PBMC加入一种或多种T细胞刺激因子。在某些实施方式中,所述T细胞刺激因子选自以下组:B淋巴细胞表面抗原抗体、

TNF抗体、细胞内聚酯和抗生素。在某些实施方式中,所述T细胞刺激因子选自以下组:CD3抗体、CD28抗体、4-1BB抗体、CD80抗体、CD86抗体、PHA、PMA和离子霉素。

[0032] 在某些实施方式中,所述T细胞刺激因子包括CD3抗体,且所述CD3抗体的浓度为1-10000ng/mL。在某些实施方式中,所述T细胞刺激因子包括CD28抗体,且所述CD28抗体的浓度为1-10000ng/mL。

[0033] 在某些实施方式中,所述方法还包括:向经分离的所述PBMC加入一种或多种细胞因子剂。

[0034] 在某些实施方式中,所述细胞因子剂包括白细胞介素。

[0035] 在某些实施方式中,所述白细胞介素包括选自下组的一种或多种:IL2、IL21、IL7和IL15。在某些实施方式中,所述白细胞介素包括IL2,且所述IL2的浓度为0.1-10000U/mL。在某些实施方式中,所述白细胞介素包括IL21,且所述IL21的浓度为0.01-1000ng/mL。在某些实施方式中,所述白细胞介素包括IL7,且所述IL7的浓度为0.01-1000ng/mL。在某些实施方式中,所述白细胞介素包括IL15,且所述IL15的浓度为0.01-1000ng/mL。

[0036] 在某些实施方式中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白包括选自下组的一种或多种:低密度脂蛋白受体相关蛋白1-12和其功能性片段。在某些实施方式中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段来源于人。

[0037] 在某些实施方式中,所述功能性片段包含具备所述低密度脂蛋白受体相关蛋白活性的所述低密度脂蛋白受体相关蛋白的片段或截短体。在某些实施方式中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白包含低密度脂蛋白受体相关蛋白6和其截短体,和/或低密度脂蛋白受体相关蛋白5和其截短体。在某些实施方式中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的截短体包含所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的胞内区;和/或,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的截短体包含所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的胞内区。在某些实施方式中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的截短体包含所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的跨膜区和所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的LDLR区;和/或,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的截短体包含所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的跨膜区和所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的LDLR区。在某些实施方式中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段包含下述任一项所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:22、24、26和28或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,编码所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的核酸分子包含下述任一项所示的核酸序列:SEQ ID NO:21、23、25和27或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0038] 另一方面,本申请提供了一种经遗传修饰的免疫细胞,其中所述遗传修饰使得该免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0039] 在某些实施方式中,所述经遗传修饰的免疫细胞包含淋巴细胞。在某些实施方式中,所述经遗传修饰的免疫细胞包括经遗传修饰的T细胞。在某些实施方式中,所述经遗传修饰的免疫细胞包含经遗传修饰的记忆性干细胞样T细胞(TSCM)和/或经遗传修饰的中央记忆性T细胞(TCM)。在某些实施方式中,所述TSCM为CCR7⁺和/或CD62L⁺。在某些实施方式中,所述TSCM还具有选自下组的一种或多种性质:CD45RA⁺或CD45RA⁻、CD45RO⁺或CD45RO⁻、CD27⁺、CD28⁺、CD127⁺、CD122⁺、CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺。

[0040] 在某些实施方式中,所述免疫细胞包含经遗传修饰的免疫细胞,且所述经遗传修饰的免疫细胞表达嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。

[0041] 在某些实施方式中,所述CAR包含细胞内结构域,所述细胞内结构域包括信号传导结构域和/或共刺激结构域。在某些实施方式中,所述信号传导结构域包含选自下组的部分:CD3 ζ 的信号传导结构域、CD3 δ 的信号传导结构域和CD3 ϵ 的信号传导结构域。在某些实施方式中,所述信号传导结构域包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,编码所述信号传导结构域的核酸分子包含SEQ ID NO:17所示的核酸序列或与其具备至少80%同源性的核酸序列。

[0042] 在某些实施方式中,所述共刺激结构域包含选自下组的部分:CD27的共刺激结构域、CD28的共刺激结构域和4-1BB的共刺激结构域。在某些实施方式中,所述共刺激结构域包含下述任一项所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,编码所述共刺激结构域的核酸分子包含下述任一项所示的核酸序列:SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:15或与其具备至少80%同源性的核酸序列。

[0043] 在某些实施方式中,所述CAR包含铰链区。在某些实施方式中,所述铰链区包含选自下组的部分:IgG4的铰链区、IgG1的铰链区和CD8的铰链区。在某些实施方式中,所述铰链区包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,编码所述铰链区的核酸分子包含SEQ ID NO:32所示的核酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0044] 在某些实施方式中,所述CAR包含跨膜区。在某些实施方式中,所述跨膜区包含选自下组的部分:CD8的跨膜区、CD28的跨膜区和CD24的跨膜区。在某些实施方式中,所述跨膜区包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,编码所述跨膜区的核酸分子包含SEQ ID NO:34所示的核酸序列或与其具备至少80%同源性的核酸序列。

[0045] 在某些实施方式中,所述CAR包含靶向部分。在某些实施方式中,所述靶向部分包括ScFv。在某些实施方式中,所述靶向部分特异性结合和/或识别肿瘤抗原。在某些实施方式中,所述靶向部分特异性结合和/或识别选自下组的靶标:B淋巴细胞表面抗原、TNF家族成员、HER家族成员和GPC家族成员。在某些实施方式中,所述靶向部分特异性结合和/或识别选自下组的靶标:CD19、BCMA、HER2、Mesothelin和GPC3。

[0046] 在某些实施方式中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别CD19的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1包含SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2包含SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3包含SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2包含SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3包含SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸

序列。

[0047] 在某些实施方式中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别BCMA的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1包含SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3包含SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2包含SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0048] 在某些实施方式中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别HER2的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2包含SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3包含SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2包含SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3包含SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0049] 在某些实施方式中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别Mesothelin的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2包含SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3包含SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2包含SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3包含SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨

基酸序列。

[0050] 在某些实施方式中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别GPC3的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1包含SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2包含SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3包含SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3包含SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0051] 在某些实施方式中,所述靶向部分包含下述任一项所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6、8和10。在某些实施方式中,编码所述靶向部分的核酸分子包含下述任一项所示的核酸序列或与其具备至少80%同源性的核酸序列:SEQ ID NO:1、3、5、7和9。

[0052] 在某些实施方式中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白包括选自下组的一种或多种:低密度脂蛋白受体相关蛋白1-12和其功能性片段。在某些实施方式中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段来源于人。

[0053] 在某些实施方式中,所述功能性片段包含具备所述低密度脂蛋白受体相关蛋白活性的所述低密度脂蛋白受体相关蛋白的片段或截短体。在某些实施方式中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白包含低密度脂蛋白受体相关蛋白6和其截短体,和/或低密度脂蛋白受体相关蛋白5和其截短体。在某些实施方式中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的截短体包含所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的胞内区;和/或,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的截短体包含所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的胞内区。在某些实施方式中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的截短体包含所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的跨膜区和所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的LDLR区;和/或,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的截短体包含所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的跨膜区和所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的LDLR区。在某些实施方式中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段包含下述任一项所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:22、24、26和28。在某些实施方式中,编码所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的核酸分子包含下述任一项所示的核酸序列或与其具备至少80%同源性的核酸序列:SEQ ID NO:21、23、25和27。

[0054] 另一方面,本申请提供了一种组合物,其包含所述的经遗传修饰的免疫细胞。

[0055] 在某些实施方式中,所述组合物还包含任选地药学上可接受的载体。

[0056] 另一方面,本申请提供了一种所述经遗传修饰的细胞和/或所述的组合物在制备药物中的用途,其中所述药物用于治疗和/或预防肿瘤。

[0057] 在某些实施方式中,所述肿瘤选自肝癌、肺癌、白血病和间皮瘤。

[0058] 另一方面,本申请提供了一种制备所述组合物的方法,所述方法包括以下的步骤:使所述经遗传修饰的免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0059] 在某些实施方式中,所述的方法包括以下步骤:向所述经遗传修饰的免疫细胞中引入使得所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调的载体。在某些实施方式中,所述载体选自以下组:逆转录病毒载体、慢病毒载体和转座子质粒。

[0060] 在某些实施方式中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段包含下述任一项所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:22、24、26和28。

[0061] 在某些实施方式中,所述经遗传修饰的免疫细胞包含淋巴细胞。在某些实施方式中,所述经遗传修饰的免疫细胞表达嵌合抗原受体(CAR)。在某些实施方式中,所述方法包括分离并激活所述经遗传修饰的免疫细胞的步骤,其中所述激活包括向经分离的所述经遗传修饰的免疫细胞施用T细胞培养基。

[0062] 在某些实施方式中,所述T细胞培养基选自以下组中的一种或多种:DMEM培养基、1640培养基、MEM培养基和X-VIVO培养基。

[0063] 在某些实施方式中,所述的方法还包括向所述经遗传修饰的免疫细胞施用T细胞刺激因子。

[0064] 本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本公开的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本公开的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的,本公开的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地,本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的,而非为限制性的。

附图说明

[0065] 本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述 of 的示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明书如下:

[0066] 图1显示的是本申请所述慢病毒中所述CAR的结构示意图。

[0067] 图2显示的是本申请所述经遗传修饰的免疫细胞促进记忆性免疫细胞产生的结果。

[0068] 图3显示的是本申请所述经遗传修饰的免疫细胞抑制免疫细胞分化的结果。

[0069] 图4显示的是本申请所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段促进本申请所述免疫细胞增殖的结果。

[0070] 图5A-5B显示的是本申请所述经遗传修饰的免疫细胞增强细胞因子释放的结果。

[0071] 图6显示的是本申请所述经遗传修饰的免疫细胞抗肿瘤的效果。

[0072] 图7显示的是本申请所述经遗传修饰的免疫细胞预防肿瘤复发的效果。

具体实施方式

[0073] 以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

[0074] 在本申请中,术语“免疫细胞”通常是指参与免疫应答或与免疫应答相关的细胞。

所述免疫细胞可以包括淋巴细胞和各种吞噬细胞。所述免疫细胞也可以包含天然的和经遗传修饰的免疫细胞。在本申请中,所述经遗传修饰的免疫细胞可以表达嵌合抗原受体(CAR)。其中,所述淋巴细胞可以包含T淋巴细胞和B淋巴细胞。在本申请中,所述免疫细胞可以包括T细胞。

[0075] 在本申请中,术语“记忆型免疫细胞”通常是指具备免疫记忆的免疫细胞。所述免疫记忆可以指对某一抗原产生特异性识别及应答后,再次遇到同一抗原能够产生快速和强烈的免疫应答。在本申请中,所述记忆型免疫细胞可以包括记忆型T细胞。所述记忆型T细胞可以分为记忆性干细胞样T细胞(TSCM)和中央记忆性T细胞(TCM)。

[0076] 在本申请中,术语“分化型免疫细胞”通常是指具有一定分化程度的免疫细胞。例如,所述分化型免疫细胞可以为具备一定分化程度的T细胞。在本申请中,所述分化型免疫细胞可以通过培养所述免疫细胞使其分化至一定程度而获得。例如,所述分化型免疫细胞可以包含调节性T细胞(Treg)。

[0077] 在本申请中,术语“调节性T细胞”(regulatory T cell,Treg)通常是指一群具有负调节机体免疫反应的淋巴细胞。所述调节性T细胞的分子标记可以为种转录因子Foxp3⁺或CD127⁻。在本申请中,所述调节性T细胞可被分为自然存在和诱导产生两类。其中自然存在为CD4⁺CD25⁺细胞,诱导产生为T_R1细胞和T_H3细胞。

[0078] 在本申请中,术语“易患有肿瘤的受试者”通常是指与普通受试者相比,患有肿瘤的概率增大的受试者。例如,所述易患有肿瘤的受试者可以为曾经患有肿瘤被治愈,但是存在转移、复发的风险的受试者。所述易患有肿瘤的受试者也可以为已经被诊断出存在患有肿瘤的危险因素的受试者。例如,所述危险因素可以包括一些证明与肿瘤相关的基因突变(包括缺失、增加或替换)。在本申请中,所述易患有肿瘤的受试者也可以为长时间接触致癌环境的受试者。例如,所述致癌环境可以包括强辐射、高浓度的致癌物质

[0079] 在本申请中,术语“遗传修饰”通常是指遗传结构层面上发生的改动或修饰。例如,所述遗传修饰可以为基因水平、转录水平和/或翻译水平的修饰。又例如,所述遗传修饰可以包括生物体(包括其组织、细胞、DNA、mRNA或蛋白质及其片段等)上任何遗传特性的改变。所述的遗传修饰可以包括使所述生物体表达特定的蛋白质或其片段。例如,所述遗传修饰可以包括使所述生物体包含能够表达所述特定的蛋白质或其片段的载体。

[0080] 在本申请中,术语“T细胞”又称T淋巴细胞,是白细胞的一种亚型,其在细胞介导的免疫中发挥中心作用。T细胞可以通过细胞表面存在的T细胞受体与其他淋巴细胞如B细胞和自然杀伤细胞区分开来。在本申请中,所述T细胞可以包括记忆性干细胞样T细胞(TSCM)和中央记忆性T细胞(TCM)。

[0081] 在本申请中,术语“记忆性干细胞样T细胞”(T memory stem cells,TSCM)通常是指通常是指处于记忆性T细胞早期分化阶段,具有干细胞特征,具有较强的多向分化潜能的细胞。TSCM细胞在应答抗原刺激后,能够分化为中央记忆性T细胞(central memory T cells,TCM)、效应记忆性T细胞(effector memory T cells,TEM)和效应性T细胞(effector T cells,TEF)。

[0082] 在本申请中,术语“中央记忆性T细胞”(central memory T cells,TCM)通常是指是幼稚T细胞(Naive T Cell)经过抗原激活后,产生的具有长期记忆性的T细胞。所述TCM的生物标记可以包含CD62L⁺和CD45RO⁺。所述中央记忆性T细胞能够通过淋巴屏蔽,回归淋巴

结,同时处于被抗原激活的状态。

[0083] 在本申请中,术语“T细胞受体”通常又称“TCR”,通常是指T细胞特异性识别和结合抗原肽-MHC分子的分子结构。所述T细胞受体可以与CD3分子呈复合物形式存在于T细胞表面。所述TCR可以是一个固定在细胞膜上的异源二聚体,多数由高度易变的 α 亚基和 β 亚基通过二硫键连接组成;少数由 γ 和 δ 肽链组成。所述TCR可以包含可变区和恒定区,其中所述恒定区可以靠近细胞膜,连接着跨膜区和胞内的末端,而所述可变区负责识别多肽/MHC复合体。

[0084] 在本申请中,术语“嵌合抗原受体”通常又称“CAR”,通常是指包含能够结合抗原的胞外结构域和至少一个胞内结构域的融合蛋白。本申请中,所述CAR可包含细胞内结构域,所述细胞内结构域包括信号传导结构域和/或共刺激结构域。在本申请中,CAR的一组多肽可位于相同的多肽链中(例如,包含嵌合融合蛋白),也可以彼此不连续,例如,可位于不同的多肽链中。在本申请中,参与诱导的信号可以经CD3和 ζ 链转导入T细胞的细胞质。在本申请中,细胞内结构域可包含一个一级信号传导结合域(例如,CD3-zeta(ζ)的主要信号结构域)。在一个方面,细胞质信号结构域还可包含一种或多种衍生自至少一种共刺激分子的共刺激结构域。例如,所述共刺激结构域可为4-1BB(即CD137),CD27,ICOS和/或CD28。在本申请中,CAR可包含嵌合融合蛋白,例如,在氨基末端(N-ter)上含有任选的前导序列。其中,所述前导序列任选地在细胞加工过程中将抗原结合结构域(例如,ScFv)切割并将CAR定位于细胞膜。

[0085] 在本申请中,术语“信号传导结构域”通常是指位于细胞内部能够转导信号的结构域。在本申请中,所述胞内信号传导结构域可以将信号传导至细胞内。例如,所述胞内信号传导结构域是所述嵌合抗原受体的胞内信号传导结构域。在本申请中,所述信号传导结构域可以包含选自下组的部分:CD3 ζ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 的信号传导结构域。

[0086] 在本申请中,术语“共刺激结构域”通常是指CAR中穿过细胞膜的结构域,其与细胞内信号转导结构域相连接,起着传递信号的作用。在本申请中,所述共刺激结构域可以包含选自下组的部分:CD27、CD28和4-1BB的共刺激结构域。

[0087] 在本申请中,术语“铰链区”通常是指抗原结合区和免疫细胞Fc受体(FcR)结合区之间的连接区。例如,所述铰链区可以为免疫球蛋白中重链CH1和CH2功能区之间的区域。在本申请中,所述铰链区可以为位于scFv和T细胞膜之间的一段区域。所述铰链区可以来源于IgG1或IgG4,还可以来源于IgD或CD8。在本申请中,铰链区可以包含选自下组的部分:IgG4的铰链区、IgG1的铰链区和CD8的铰链区。

[0088] 在本申请中,术语“跨膜区”通常是指跨膜区连接胞外抗原结合域和胞内信号域,一般由二聚体膜蛋白组成,主要包括CD3 ζ 、CD4、CD8、CD28等,能将CAR结构锚定于T细胞膜上。跨膜区不同的设计能影响导入的CAR基因的表达。在本申请中,所述跨膜区可以包含选自下组的部分:CD8的跨膜区、CD28的跨膜区和CD24的跨膜区。

[0089] 在本申请中,术语“单链抗体”(ScFv)通常是指由所述重链可变区和所述轻链可变区通过连接子连接而成的抗体。在本申请中,所述连接子可以为连接肽。

[0090] 在本申请中,术语“肿瘤抗原”通常是指在肿瘤细胞内或由肿瘤细胞产生的抗原物质,其可能具有在宿主中触发免疫应答的能力。例如,肿瘤抗原可以是构成肿瘤细胞的一部分并且能够诱导肿瘤特异性细胞毒性T淋巴细胞的蛋白质,多肽,肽或其片段。在一些实施

方案中,术语“肿瘤抗原”还可以指在癌细胞上专门或优先或差异表达和/或与癌细胞相关的生物分子(例如,蛋白质,碳水化合物,糖蛋白等)从而提供癌症优先或特异性的靶标。例如,与生物体中的任何其他细胞相比,优先表达可以为常规的优先表达,或者在生物体的特定区域内的优先表达(例如在特定器官或组织内)。在本申请中,所述肿瘤抗原可以包括B淋巴细胞表面抗原、TNF家族成员、HER家族成员和GPC家族成员。

[0091] 在本申请中,术语“B淋巴细胞表面抗原”通常是指B淋巴细胞在不同阶段产生的位于B淋巴细胞表面的抗原。例如,所述B淋巴细胞表面抗原可以包括CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD38、CD39和CD40。在本申请中,B淋巴细胞表面抗原可以包括CD19。

[0092] 在本申请中,术语“CD19”通常是指是指分化群19蛋白,其是可在白血病前体细胞上检测的抗原决定簇。人CD19在UniProt/Swiss-Prot的登录号为P15391,编码人CD19的核苷酸序列在GenBank的登录号为NM_001178098。在本申请中,CD19还可以包括包含突变的蛋白质或其功能性片段,例如全长野生型CD19的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0093] 在本申请中,术语“TNF家族成员”通常是指属于TNF(肿瘤坏死因子Tumor Necrosis Factor)家族的成员。TNF家族成员可以包括CD40LG(TNFSF5)、CD70(TNFSF7)、EDA、FASLG(TNFSF6)、LTA(TNFSF1)、LTB(TNFSF3)、TNFSF4(OX40L)、TNFSF8(CD153)、TNFSF9(4-1BB)、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF11(RANKL)、TNFSF12(TWEAK)、TNFSF13、TNFSF13B、TNFSF14、TNFSF15、TNFSF17(BCMA)和TNFSF18。在本申请中,所述TNF家族成员可以包括BCMA和4-1BB。

[0094] 在本申请中,术语“BCMA”通常是指B细胞成熟抗原(B Cell Maturation Antigen, BCMA, CD269)。BCMA是肿瘤坏死因子受体(TNF)超家族的成员,可结合B细胞激活因子(BAFF)和增殖诱导配体(APRIL)。BCMA常见于多发性骨髓瘤患者的浆细胞表面。人BCMA在GenBank的登录号为BAB60895.1。

[0095] 术语“CD137蛋白”,又名4-1BB或TNFRS9,通常是指肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRS)的一种跨膜蛋白质,是激活诱导的共刺激分子是免疫应答的重要调节剂。研究表明CD137激动型单克隆抗体在许多模型中增加共刺激分子表达,并且显著增强细胞溶解性T淋巴细胞应答,发挥抗肿瘤作用(参见Vinay, Dass S., and Young S. Kwon. "4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy." *BMB reports* 47.3 (2014): 122)。人CD137在GenBank的登录号为NP_001552.2。

[0096] 在本申请中,术语“HER家族成员”通常是指属于HER(人表皮生长因子human epidermal growth factor receptor)家族的成员。HER家族成员可以包括EGFR(ErbB-1)、HER2/c-neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)以及Her4(ErbB-4)。在本申请中,所述HER家族成员可以包括HER2。

[0097] 在本申请中,术语“HER2”通常是指人类HER2蛋白,其属于HER家族成员。例如,参见Semba et al., *PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985)和Yamamoto et al., *Nature* 319:230-234 (1986)。人HER2的GenBank登录号可以包括XP_024306409.1。

[0098] 在本申请中,术语“GPC家族成员”通常是指磷脂酰肌醇蛋白聚糖(glypican),在哺乳动物中鉴定存在6种glypican,分别称为GPC1至GPC6。癌症中glypicans存在异常表达,所述癌症包括人肝细胞癌、卵巢癌、间皮瘤、胰腺癌、神经胶质瘤和乳腺癌。在本申请中,所述GPC家族成员可以包括GPC3。

[0099] 在本申请中,术语“GPC3”通常是指由磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (NCBI数据库基因ID: 2719) 编码的蛋白质,其是肝癌的早期标志物。GPC3在肝细胞癌中高度表达,并在早期肝细胞癌患者组织中检测到。人GPC3的GenBank登录号可以为AAB87062.1。

[0100] 在本申请中,术语“Mesothelin” (间皮素,或缩写为MSLN) 通常是指一种肿瘤分化抗原,通常存在于胸膜、腹膜和心包膜衬里的间皮细胞上。其在癌症中高度表达,所述癌症包括恶性间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌和肺腺癌。人Mesothelin的GenBank登录号可以为AAH09272.1。

[0101] 在本申请中,术语“外周血单核细胞”通常是指外周血中具有单个核的细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。所述外周血单核细胞可以包括淋巴细胞和单核细胞。在本申请中,分离所述外周血单核细胞可使用Ficoll-hypaque (葡聚糖-泛影葡胺) 密度梯度离心法,根据血液中各成分的比重差异进行分离。

[0102] 在本申请中,术语“T细胞激活因子”通常是指促进T细胞活化、增殖的物质。在本申请中,所述T细胞激活因子可以包括B淋巴细胞表面抗原抗体、TNF抗体、细胞内聚酯和/或抗生素。在本申请中,所述T细胞刺激因子可选自以下组:CD3抗体、CD28抗体、4-1BB抗体、CD80抗体、CD86抗体、PHA、PMA和离子霉素。

[0103] 在本申请中,术语“B淋巴细胞表面抗原抗体”通常是指与B淋巴细胞表面抗原特异性结合的抗体。在本申请中,B淋巴细胞表面抗原抗体可以包括CD3抗体、CD28抗体、CD80抗体和CD86抗体。

[0104] 在本申请中,术语“TNF抗体”通常是指与TNF家族成员特异性结合的抗体。在本申请中,所述TNF抗体可以包括4-1BB抗体。

[0105] 在本申请中,术语“细胞内聚酯”通常是指微生物合成的、在细胞内以包涵体形式存在的天然高分子生物材料。细胞内聚酯具有良好的生物学性能。在本申请中,细胞内聚酯可以包括聚羟基脂肪酸酯 (PHA)。

[0106] 在本申请中,术语“抗生素”通常是指由微生物或动植物所产生的具有抗病原体或其它活性的代谢产物,其能干扰其他生活细胞发育功能及发挥作用。在本申请中,所述抗生素可以包括 β -内酰胺类、氨基糖苷类、酰胺醇类、大内环酯类、多肽类、硝基咪唑类和四环素类。例如,所述抗生素可以包括离子霉素。

[0107] 在本申请中,术语“PHA”通常是指聚羟基脂肪酸酯,其属于由多种细菌合成的细胞内聚酯,在生物体内可以以细胞质内不连续的包涵体的形式而存在。PHA可以具有类似于合成塑料的物理、化学特性,以及生物可降解性、生物相容性、光学活性、压电性、气体阻隔性等。

[0108] 在本申请中,术语“PMA”通常是指丙二醇甲醚醋酸酯 (Phorbol-12-myristate-13-acetate)。

[0109] 在本申请中,术语“CD3抗体”通常是指特异性结合CD3的抗体或其抗原结合片段。CD3可以为T细胞膜上重要的分化抗原,可以传递T细胞活化的信号。所述CD3抗体可以为huOKT3g1或HuM291。

[0110] 在本申请中,术语“CD28抗体”通常是指特异性结合CD28的抗体或其抗原结合片段。人CD28定位于2q33,与CTLA4有相似的外显子和内含子,两者的配体是B7家族,包括B7-1 (CD80) 和B7-2 (CD86)。

[0111] 在本申请中,术语“细胞因子”通常是指由免疫细胞(如单核、巨噬细胞、T细胞、B细胞、NK细胞等)和某些非免疫细胞(内皮细胞、表皮细胞、纤维母细胞等)经刺激而合成、分泌的一类具有广泛生物学活性的小分子蛋白质。所述细胞因子可具有调节固有免疫和适应性免疫、血细胞生成、细胞生长、APSC多能细胞以及损伤组织修复等多种功能。在本申请中,所述细胞因子可包括白细胞介素、干扰素、肿瘤坏死因子超家族、集落刺激因子、趋化因子和生长因子。例如,所述细胞因子可以为白细胞介素。

[0112] 在本申请中,术语“白细胞介素”通常是指能够促进T和/或B淋巴细胞和/或造血细胞的发育和分化的分泌蛋白或信号分子。白介素可以由辅助CD4T淋巴细胞,以及通过单核细胞,巨噬细胞和内皮细胞合成。在本申请中,术语“白细胞介素”可以包括全长白介素或片段(例如截短形式)或其变体,其基本上保持相应野生型白细胞介素的生物学活性(例如,具有生物活性至少80%,至少90%,至少95%,至少98%,至少99%,或甚至至少100%的相应野生型白细胞介素的生物活性)。本文所用的白细胞介素可以来自任何哺乳动物物种。在某些实施方式中,白细胞介素来自选自人、马、牛、鼠、猪、兔、猫、狗、大鼠、山羊、绵羊和非人灵长类动物的物种。在某些实施方式中,白细胞介素可以是突变形式。例如,在本申请中,所述细胞因子包括选自下组的一种或多种:IL2、IL21、IL7和IL15。

[0113] 在本申请中,术语“IL2”通常是指T细胞生长因子,TCGF。其由T细胞产生,以自分泌和旁分泌的方式发挥效益,能够活化T细胞,促进细胞因子的产生;刺激NK细胞增殖,诱导LAK细胞产生;促进B细胞增殖和分泌抗体,还能激活巨噬细胞。

[0114] 在本申请中,术语“IL21”与IL-2、IL-4、IL-15空间结构同源,通常可以促进骨髓NK细胞的增殖与分化,与抗CD40抗体协同刺激B细胞的增殖,与抗CD3抗体协同刺激T细胞的增殖。

[0115] 在本申请中,术语“IL7”通常是指由骨髓基质细胞分泌的糖蛋白,其基因位于第8号染色体。IL7的靶向细胞为淋巴细胞,尤其是能够促进来自人或小鼠骨髓的B祖细胞、胸腺细胞及外周成熟的T细胞的生长。在较高浓度时,IL-7还能增强巨噬细胞的细胞毒活性,诱导单核细胞分泌细胞因子。

[0116] 在本申请中,术语“IL15”通常是指由活化的单核-巨噬细胞、表皮细胞和成纤维细胞等多种细胞产生,与IL2有很多相似之处。IL15属于IL2家族成员,通过改变Bcl-1家族成员(如Bcl-2和Bcl-XL)的表达来调节T和NK细胞的激活和增殖,也可诱导B细胞增殖。

[0117] 在本申请中,术语“低密度脂蛋白受体相关蛋白”(Low density lipoprotein receptor-related protein,LRP)通常是指一种包含839个氨基酸(除去21个氨基酸信号肽后)的镶嵌蛋白。嵌入在LDL(Low density lipoprotein)颗粒的外部磷脂层中属于一种内吞性受体,可以介导富含胆固醇的LDL的内吞作用,是低密度脂蛋白受体(Low density lipoprotein receptor,LDLR)基因家族中的一员。所述LRP在支气管上皮细胞和肾上腺和皮质组织中表达最显著。在本申请中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白可以包括选自下组的一种或多种:低密度脂蛋白受体相关蛋白1-12或截短体。

[0118] 在本申请中,术语“低密度脂蛋白受体相关蛋白6”(LRP-6)和“低密度蛋白受体相关蛋白5”(LRP-5)通常是指低密度脂蛋白受体(LDLR)家族中独特的亚群。人LRP-6在UniProt中的登录号为075581。人LRP-5在UniProt中的登录号为075197。

[0119] 在本申请中,术语“截短体”(Truncated protein)通常是指截短的蛋白质。所述截

短体可以通过蛋白质水解或操作结构基因消除蛋白质的N-或C-末端部分而得到。或者,所述截短体可以通过无义突变而导致结构基因中存在终止密码子而提前终止翻译而得到。

[0120] 在本申请中,术语“胞内区”通常是指蛋白质位于细胞膜内的结构域。在本申请中,所述胞内域可以指所述低密度脂蛋白受体相关蛋白细胞膜内的结构域。在本申请中,所述胞内区可包括SEQ NO.24中的第24位至第243位的序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列,或者,包括SEQ NO.28中的第24位至第231位的序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0121] 在本申请中,术语“跨膜区”通常是指蛋白质中横跨细胞膜的结构域。在本申请中,所述跨膜区可以指所述低密度脂蛋白受体相关蛋白横跨细胞膜的结构域。所述跨膜区可以由23个疏水性氨基酸所组成。该结构域主要为LDLR在细胞膜上的结合提供锚定的功能。在本申请中,所述跨膜区可以包括SEQ NO.24中的第1位至第23位的序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列,或者,包括SEQ NO.28中的第1位至第23位的序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0122] 在本申请中,术语“LDLR区”通常是指所述低密度脂蛋白受体相关蛋白在跨膜区以外靠近N段的结构域。该结构域该结构域可以具有增强Wnt信号的功能。在本申请中,所述LDLR区可包括SEQ NO.22中的第5位至第119位或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列,或SEQ NO.26中的第4位至第119位的序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0123] 在本申请中,术语“核糖体跳跃位点”又叫内部核糖体进入位点(Internal ribosome entry site, IRES),通常是指位于mRNA序列中部为转译起始而备用的一段核苷酸序列。所述核糖体跳跃位点可以允许以不依赖于帽子的方式起始翻译。IRES通常位于5'UTR中。在本申请中,所述核糖体跳跃位点可包括SEQ NO.29中的第1位至第578位序列。

[0124] 在本申请中,术语“2A序列”通常是指一段不依赖于蛋白酶的自剪切氨基酸序列。所述2A序列可以有助于转录产生两种蛋白。在本申请中,所述2A序列可以包括SEQ NO.75中的第1位至第54位的序列。

[0125] 在本申请中,术语“药学上可接受的载体”可包括缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、低分子量多肽、蛋白质、亲水聚合物、氨基酸、糖、螯合剂、反离子、金属复合物和/或非离子表面活性剂等。

[0126] 在本申请中,术语“逆转录病毒载体”通常是指一种RNA病毒,其可在受染细胞内逆转录产生DNA互补链,并以此DNA单链作为模板合成第二条DNA链,并掺入细胞基因组DNA中。所述逆转录病毒载体可利用宿主细胞的酶自行转录与复制RNA合成蛋白,再包装病毒,从胞内释放,成为感染性病毒。所述逆转录病毒的转导效率高,能够有效提高基因的转染率。

[0127] 在本申请中,术语“慢病毒载体”是指以HIV-1(人类免疫缺陷I型病毒)为基础发展起来的基因治疗载体。所述慢病毒载体可以对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。其可以有效地感染包括神经元细胞、肝细胞等几乎所有的哺乳动物细胞,感染效率高。慢病毒可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上,从而达到持久性表达。

[0128] 在本申请中,术语“转座子质粒”通常是指存在于染色体DNA上可自主复制和位移的基本单位。所述转座子质粒可以通过切割、重新整合等一系列过程从基因组的一个位置“跳跃”到另一个位置。

[0129] 在本申请中,术语“肿瘤”通常是指机体在各种致癌因素作用下,局部组织的某一

个细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控,导致其克隆性异常增生而形成的新生物(neogrowth),因为这种新生物多呈占位性块状突起,也称赘生物(neoplasm)。在本申请中,所述肿瘤可以包括实体瘤和非实体瘤。在本申请中,所述肿瘤可以包括肝癌、肺癌、白血病和间皮瘤。

[0130] 在本申请中,术语“显著增加”通常是指水平(例如蛋白表达量、细胞数量)增加, $P < 0.05$ 、 $P < 0.04$ 、 $P < 0.03$ 、 $P < 0.02$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.005$ 或 $P < 0.001$ 。又例如,所述显著增加可以指增加了5%或更多、10%或更多、20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、100%或更多。

[0131] 在本申请中,术语“基本上未增加”通常是指水平(例如蛋白表达量、细胞数量)与原来一致,或增加了3%或更少、增加了2%或更少、增加了1%或更少、增加了0.5%或更少、增加了0.4%或更少、增加了0.3%或更少、增加了0.2%或更少、增加了0.1%或更少。

[0132] 在本申请中,术语“约”通常是指在指定数值以上或以下0.5%-10%的范围内变动,例如在指定数值以上或以下0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或10%的范围内变动。

[0133] 低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段

[0134] 在本申请中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白可包括选自下组的一种或多种:低密度脂蛋白受体相关蛋白1-12和其功能性片段。

[0135] 在本申请中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段可以来源于哺乳动物。例如,可以来源于人、猕猴、大鼠和小鼠。

[0136] 在本申请中,所述功能性片段可包含具备所述低密度脂蛋白受体相关蛋白活性的所述低密度脂蛋白受体相关蛋白的片段或截短体。例如,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白可以包含低密度脂蛋白受体相关蛋白6和其截短体,和/或,低密度脂蛋白受体相关蛋白5和其截短体。

[0137] 在本申请中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的截短体可以包含所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的胞内区;和/或,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的截短体可以包含所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的胞内区。又例如,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的截短体可以包含所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的跨膜区和所述低密度脂蛋白受体相关蛋白6的LDLR区;和/或,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的截短体可以包含所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的跨膜区和所述低密度脂蛋白受体相关蛋白5的LDLR区。

[0138] 在本申请中,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段包含下述任一项所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:22、24、26和28。

[0139] 在本申请中,编码所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的核酸分子包含下述任一项所示的核酸序列或与其具备至少80%同源性的核酸序列:SEQ ID NO:21、23、25和27。

[0140] 经遗传修饰的免疫细胞

[0141] 本申请提供了一种经遗传修饰的免疫细胞,其中所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0142] 在本申请中,所述经遗传修饰的免疫细胞可以包含淋巴细胞。在本申请中,所述经遗传修饰的免疫细胞包含包括经遗传修饰的T细胞。在本申请中,所述经遗传修饰的免疫细

胞包含包含经遗传修饰的记忆性干细胞样T细胞 (TSCM) 和/或经遗传修饰的中央记忆性T细胞 (TCM)。在本申请中,所述TSCM包含为CCR7⁺和/或CD62L⁺。在本申请中,所述TSCM还包含具有选自下组的一种或多种性质:CD45RA⁺或CD45RA⁻、CD45RO⁺或CD45RO⁻、CD27⁺、CD28⁺、CD127⁺、CD122⁺、CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺。

[0143] 在本申请中,所述免疫细胞可以包含经遗传修饰的免疫细胞,且所述经遗传修饰的免疫细胞表达嵌合抗原受体 (CAR)。

[0144] 在本申请中,所述CAR可以包含细胞内结构域,所述细胞内结构域可以包括信号传导结构域和/或共刺激结构域。

[0145] 例如,所述信号传导结构域可以包含选自下组的部分:CD3 ζ 的信号传导结构域、CD3 δ 的信号传导结构域和CD3 ϵ 的信号传导结构域。例如,所述信号传导结构域可以包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列,编码所述信号传导结构域的核酸分子可以包含SEQ ID NO:17所示的核酸序列或与其具备至少80%同源性的核酸序列。

[0146] 例如,所述共刺激结构域可以包含选自下组的部分:CD27的共刺激结构域、CD28的共刺激结构域和4-1BB的共刺激结构域。例如,所述共刺激结构域可以包含下述任一项所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列,编码所述共刺激结构域的核酸分子可以包含下述任一项所示的核酸序列:SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:15或与其具备至少80%同源性的核酸序列。

[0147] 在本申请中,所述CAR可以包含铰链区。例如,所述铰链区可以包含选自下组的部分:IgG4的铰链区、IgG1的铰链区和CD8的铰链区。例如,所述铰链区可以包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列,编码所述铰链区的核酸分子可以包含SEQ ID NO:32所示的核酸序列或与其具备至少80%同源性的核酸序列。

[0148] 在本申请中,所述CAR可以包含跨膜区。例如,所述跨膜区可以包含选自下组的部分:CD8的跨膜区、CD28的跨膜区和CD24的跨膜区。例如,所述跨膜区可以包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列,编码所述跨膜区的核酸分子可以包含SEQ ID NO:34所示的核酸序列或与其具备至少80%同源性的核酸序列。

[0149] 在本申请中,所述CAR可以包含靶向部分。在本申请中,所述靶向部分可以包括抗体或抗原结合片段。所述抗原结合片段可以选自下组:Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、Fv和ScFv片段。例如,所述靶向部分可以为ScFv。

[0150] 在本申请中,所述靶向部分可以特异性结合和/或识别肿瘤抗原。例如,所述靶向部分可以特异性结合和/或识别选自下组的靶标:B淋巴细胞表面抗原、TNF家族成员、HER家族成员和GPC家族成员。又例如,所述靶向部分可以特异性结合和/或识别选自下组的靶标:CD19、BCMA、HER2、Mesothelin和GPC3。

[0151] 在本申请中,所述靶向部分可以为特异性结合和/或识别CD19的抗体或其抗原结合片段。所述抗体或其抗原结合片段可以包含轻链可变区,所述轻链可变区可以包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1可以包含SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2可以包含SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3可以包含SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。所述轻链可变区可以包含SEQ ID NO:50所示的氨

氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在本申请中,所述抗体或其抗原结合片段可以包含重链可变区,所述重链可变区可以包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1可以包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2可以包含SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3可以包含SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。所述重链可变区可以包含SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0152] 在本申请中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别BCMA的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段可以包含轻链可变区,所述轻链可变区可以包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1可以包含SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2可以包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3可以包含SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。所述轻链可变区可以包含SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在本申请中,所述抗体或其抗原结合片段可以包含重链可变区,所述重链可变区可以包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1可以包含SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2可以包含SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。所述重链可变区可以包含SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0153] 在本申请中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别HER2的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段可以包含轻链可变区,所述轻链可变区可以包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1可以包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2可以包含SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3可以包含SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。所述轻链可变区可以包含SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在本申请中,所述抗体或其抗原结合片段可以包含重链可变区,所述重链可变区可以包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1可以包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2可以包含SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3可以包含SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。所述重链可变区可以包含SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0154] 在本申请中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别Mesothelin的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段可以包含轻链可变区,所述轻链可变区可以包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1可以包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2可以包含SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3可以包含SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。所述轻链可变区可以包含SEQ ID NO:66所示的氨

氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。所述抗体或其抗原结合片段可以包含重链可变区,所述重链可变区可以包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1可以包含SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2可以包含SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3可以包含SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。所述重链可变区可以包含SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0155] 在本申请中,所述靶向部分为特异性结合和/或识别GPC3的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段可以包含轻链可变区,所述轻链可变区可以包含LCDR1-LCDR3,其中所述LCDR1可以包含SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR2可以包含SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述LCDR3可以包含SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。所述轻链可变区可以包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。在本申请中,所述抗体或其抗原结合片段可以包含重链可变区,所述重链可变区可以包含HCDR1-HCDR3,其中所述HCDR1可以包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR2可以包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列;所述HCDR3可以包含SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。所述重链可变区可以包含SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列。

[0156] 在本申请中,所述靶向部分可以包含下述任一项所示的氨基酸序列或与其具备至少80%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、4、6、8和10。在本申请中,编码所述靶向部分的核酸分子可以包含下述任一项所示的核酸序列或与其具备至少80%同源性的核酸序列:SEQ ID NO:1、3、5、7和9。

[0157] 本申请中,CDR的氨基酸位点的起讫以Kabat的方式计算。

[0158] 在本申请中涉及的蛋白质、多肽、氨基酸序列和/或核酸序列,还应理解为至少包含以下的范围:与该所述蛋白质或多肽具备相同或类似功能的变体或同源物。和/或编码与该所述蛋白质或多肽具备相同或类似功能的变体或同源物的核酸序列。

[0159] 在本申请中,所述变体可以为,在所述蛋白质和/或所述多肽(例如,特异性结合GPC3蛋白的抗体或其片段,或者,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段)的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽。例如,所述功能性变体可包含已经通过至少1个,例如1-30个、1-20个或1-10个,又例如1个、2个、3个、4个或5个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的蛋白质或多肽。所述功能性变体可基本上保持改变(例如取代、缺失或添加)之前的所述蛋白质或所述多肽的生物学特性。例如,所述功能性变体可保持改变之前的所述蛋白质或所述多肽的至少60%,70%,80%,90%,或100%的生物学活性(例如抗原结合能力,或者,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的生物学功能)。例如,所述取代可以为保守取代。

[0160] 在本申请中,所述同源物可以为,与所述蛋白质和/或所述多肽(例如,特异性结合GPC3蛋白的抗体或其片段,或者,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段)的氨基酸序列具有至少约85%(例如,具有至少约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、

约96%、约97%、约98%、约99%或更高的)序列同源性的蛋白质或多肽。

[0161] 在本申请中,所述同源性通常是指两个或多个序列之间的相似性、类似或关联。可以通过以下方式计算“序列同源性百分比”:将两条待比对的序列在比较窗中进行比较,确定两条序列中存在相同核酸碱基(例如,A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置的数目以得到匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数(即,窗大小),并且将结果乘以100,以产生序列同源性百分比。为了确定序列同源性百分数而进行的比对,可以按本领域已知的多种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数,包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。所述同源性也可以通过以下的方法测定:FASTA和BLAST。对FASTA算法的描述可以参见W.R.Pearson和D.J.Lipman的“用于生物学序列比较的改进的工具”,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.),85:2444-2448,1988;和D.J.Lipman和W.R.Pearson的“快速灵敏的蛋白质相似性搜索”,Science,227:1435-1441,1989。对BLAST算法的描述可参见S.Altschul、W.Gish、W.Miller、E.W.Myers和D.Lipman的“一种基本的局部对比(alignment)搜索工具”,分子生物学杂志,215:403-410,1990。

[0162] 在本申请中,所述CAR可以从N端到C端依次包含所述靶向部分、所述铰链区、所述跨膜区、所述共刺激结构域和所述信号传导结构域。

[0163] 在本申请中,编码所述CAR的多核苷酸分子可以从5'端到3'端依次包含编码所述靶向部分的核苷酸序列、编码所述铰链区的核苷酸序列、编码所述跨膜区的核苷酸序列、编码所述跨膜区的核苷酸序列、编码所述共刺激结构域的核苷酸序列和编码所述信号传导结构域的核苷酸序列。

[0164] 在本申请中,编码所述CAR的多核苷酸分子还可以包含前导序列。例如,编码所述前导序列的核酸分子可以包含SEQ ID NO:30所示的核酸序列或与其具备至少80%同源性的核酸序列。编码所述前导序列的核酸分子可以位于编码所述靶向部分的核苷酸序列的5'端。

[0165] 在本申请中,所述经遗传修饰的免疫细胞可以表达所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段。例如,所述经遗传修饰的免疫细胞可以包含能够表达所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的载体。所述载体中可包含编码所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的核苷酸分子。例如,所述多核苷酸分子可以包含下述任一项所示的核酸序列:SEQ ID NO:21、23、25和27或与其具备至少80%同源性的核酸序列。又例如,所述载体可以选自下组:逆转录病毒载体、慢病毒载体和/或转座子质粒。

[0166] 在本申请中,所述经遗传修饰的免疫细胞可以表达所述嵌合抗原受体(CAR)。例如,所述经遗传修饰的免疫细胞可以包含能够表达所述嵌合抗原受体(CAR)的载体。所述载体中可包含编码所述嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸分子。又例如,所述载体可以选自下组:逆转录病毒载体、慢病毒载体和/或转座子质粒。

[0167] 在本申请中,所述能够表达所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的载体与所述能够表达所述嵌合抗原受体(CAR)的载体可以为同一个载体,也可以为不同的载体,只要这一个或多个载体可以表达所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段和所述嵌合抗原受

体 (CAR),从而使所述经遗传修饰的免疫细胞同时具备所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段和所述嵌合抗原受体 (CAR) 即可。

[0168] 例如,所述能够表达所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的载体与所述能够表达所述嵌合抗原受体 (CAR) 的载体可以为同一个载体。在该载体中,所述编码所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的核苷酸分子和所述编码所述嵌合抗原受体 (CAR) 的核苷酸分子可以位于同一个表达框中。例如,所述编码所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的核苷酸分子可以位于所述编码所述嵌合抗原受体 (CAR) 的核苷酸分子的3' 端。

[0169] 在本申请中,所述编码所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的核苷酸分子可以与所述编码所述嵌合抗原受体 (CAR) 的核苷酸分子直接或间接连接。例如,所述的间接连接可以通过连接序列进行连接。所述连接序列的5' 端可以与所述编码所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的核苷酸分子的3' 端连接,且所述连接序列的3' 端可以与所述编码所述嵌合抗原受体 (CAR) 的核苷酸分子的5' 端连接。在本申请中,所述连接序列可以包含下述任一项所示的核酸序列:SEQ ID NO:19和29或与其具备至少80%同源性的核酸序列。

[0170] 在本申请中,所述经遗传修饰的免疫细胞所表达得到的所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段和所述嵌合抗原受体 (CAR) 可以是两个独立的蛋白。即,两者没有任何的相互连接关系而形成任何形式的二(多)聚体或蛋白质复合物。然而,所述经遗传修饰的免疫细胞所表达得到的所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段和所述嵌合抗原受体 (CAR) 也可以是相互连接的。例如,在某些情况下,翻译形成的这两种蛋白没有被切割完全,所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段和所述嵌合抗原受体形成了复合体。

[0171] 制备方法

[0172] 本申请提供了一种制备所述经遗传修饰的免疫细胞的方法,所述方法包括以下的步骤:使所述经遗传修饰的免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0173] 本申请还提供了一种制备所述组合物的方法,所述方法包括以下的步骤:使所述经遗传修饰的免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0174] 在本申请中,所述方法可以还包括以下步骤:分离获得外周血单核细胞PBMC、CD3⁺T淋巴细胞、CD8⁺T淋巴细胞、CD4⁺T淋巴细胞或调节T细胞。

[0175] 在本申请中,所述方法可以包括分离并激活所述经遗传修饰的免疫细胞的步骤,其中所述激活包括向经分离的所述经遗传修饰的免疫细胞施用T细胞培养基。

[0176] 在本申请中,所述T细胞培养基可以选自以下组中的一种或多种:DMEM培养基、1640培养基、MEM培养基和X-VIVO培养基。

[0177] 在本申请中,所述方法还可以包括以下的步骤:向经分离的所述外周血单核细胞PBMC加入一种或多种T细胞刺激因子。

[0178] 例如,所述T细胞刺激因子可以选自以下组:B淋巴细胞表面抗原抗体、TNF抗体、细胞内聚酯和抗生素。又例如,所述T细胞刺激因子可以选自以下组:CD3抗体、CD28抗体、4-1BB抗体、CD80抗体、CD86抗体、PHA、PMA和离子霉素。

[0179] 在本申请中,所述T细胞刺激因子可以包括CD3抗体,且所述CD3抗体的浓度可以为1-10000ng/mL。例如,所述CD3抗体的浓度可以为1-9000ng/mL、1-5000ng/mL、1-4000ng/mL、

1-3000ng/mL、1-1000ng/mL、1-500ng/mL、1-400ng/mL、1-300ng/mL、1-200ng/mL、1-100ng/mL、1-50ng/mL、1-40ng/mL、1-30ng/mL、1-20ng/mL、1-10ng/mL或1-5ng/mL。在本申请中,所述T细胞刺激因子可以包括CD28抗体,且所述CD28抗体的浓度可以为1-10000ng/mL。例如,所述CD28抗体的浓度可以为1-9000ng/mL、1-5000ng/mL、1-4000ng/mL、1-3000ng/mL、1-1000ng/mL、1-500ng/mL、1-400ng/mL、1-300ng/mL、1-200ng/mL、1-100ng/mL、1-50ng/mL、1-40ng/mL、1-30ng/mL、1-20ng/mL、1-10ng/mL或1-5ng/mL。

[0180] 在本申请中,所述方法还可以包括:向经分离的所述PBMC加入一种或多种细胞因子剂。在本申请中,所述细胞因子剂可以包括白细胞介素。例如,所述白细胞介素可以包括选自下组的一种或多种:IL2、IL21、IL7和IL15。

[0181] 在本申请中,所述白细胞介素可以包括IL2,且所述IL2的浓度可以为0.1-10000U/mL。例如,所述IL2的浓度可以为0.1-8000U/mL、0.1-6000U/mL、0.1-4000U/mL、0.1-2000U/mL、5-2000U/mL、5-1900U/mL、5-1800U/mL、5-1700U/mL、5-1600U/mL、5-1500U/mL、5-1400U/mL、5-1300U/mL、5-1200U/mL、5-1100U/mL、5-1000U/mL、5-900U/mL、5-800U/mL、5-700U/mL、5-600U/mL、5-500U/mL、5-400U/mL、5-300U/mL、5-200U/mL、5-500U/mL、5-400U/mL、5-300U/mL、5-200U/mL、5-100U/mL、5-50U/mL、5-40U/mL、5-30U/mL、5-20U/mL或5-10U/mL。

[0182] 在本申请中,所述白细胞介素可以包括IL21,且所述IL21的浓度可以为0.01-1000ng/mL。例如,所述IL21的浓度可以为0.01-800ng/mL、0.01-600ng/mL、0.01-400ng/mL、0.01-200ng/mL、0.01-100ng/mL、0.1-100ng/mL、0.1-90ng/mL、0.1-80ng/mL、0.1-70ng/mL、0.1-60ng/mL、0.1-50ng/mL、0.1-40ng/mL、0.1-30ng/mL、0.1-20ng/mL、0.1-10ng/mL或0.1-5ng/mL。

[0183] 在本申请中,所述白细胞介素可以包括IL7,且所述IL7的浓度可以为0.01-1000ng/mL。例如,所述IL7的浓度可以为0.01-800ng/mL、0.01-600ng/mL、0.01-400ng/mL、0.01-200ng/mL、0.01-100ng/mL、0.1-100ng/mL、0.1-90ng/mL、0.1-80ng/mL、0.1-70ng/mL、0.1-60ng/mL、0.1-50ng/mL、0.1-40ng/mL、0.1-30ng/mL、0.1-20ng/mL、0.1-10ng/mL或0.1-5ng/mL。

[0184] 在本申请中,所述白细胞介素可以包括IL15,且所述IL15的浓度可以为0.01-1000ng/mL。例如,所述IL15的浓度可以为0.01-800ng/mL、0.01-600ng/mL、0.01-400ng/mL、0.01-200ng/mL、0.01-100ng/mL、0.1-100ng/mL、0.1-90ng/mL、0.1-80ng/mL、0.1-70ng/mL、0.1-60ng/mL、0.1-50ng/mL、0.1-40ng/mL、0.1-30ng/mL、0.1-20ng/mL、0.1-10ng/mL或0.1-5ng/mL。

[0185] 促进免疫细胞增殖、促进记忆性免疫细胞产生、抑制免疫细胞分化、增强释放细胞因子和增强对肿瘤的杀伤能力

[0186] 一方面,本申请提供了一种促进免疫细胞增殖的方法,其包含以下步骤:使所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0187] 一方面,本申请提供了一种促进记忆性免疫细胞产生的方法,其包含以下步骤:使免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调,从而促进所述免疫细胞分化为记忆性免疫细胞。

[0188] 一方面,本申请提供了一种抑制免疫细胞分化的方法,其包含以下步骤:使所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调,从而抑制所述免疫细胞分化

为分化型免疫细胞。

[0189] 一方面,本申请提供了一种增强免疫细胞释放细胞因子的方法,其包含以下步骤:使所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0190] 在本申请中,所述细胞因子可以包含白介素、干扰素和/或肿瘤坏死因子。在本申请中,所述细胞因子可以包含IL-2、IL4、IL6、IL7、IL10、IL21、TNF- α 和/或IFN γ 。

[0191] 一方面,本申请提供了一种增强免疫细胞对肿瘤杀伤能力的方法,其包含以下步骤:使所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0192] 一方面,本申请提供了一种预防受试者中肿瘤复发的方法,所述方法包含:向易患肿瘤的受试者施用免疫细胞,其中所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0193] 一方面,本申请提供了一种治疗有需要的受试者中的肿瘤的方法,其包含以下步骤:向所述受试者施用免疫细胞,其中所述免疫细胞中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量上调。

[0194] 在本申请中,所述肿瘤可以选自肝癌、肺癌、白血病和间皮瘤。在本申请中,所述方法可以包括体内方法和体外方法。

[0195] 在本申请中,所述表达量上调可为使所述免疫细胞中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量与对照免疫细胞的表达量相比显著上调(例如,上调了5%或更多、10%或更多、20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、100%或更多),其中所述对照免疫细胞为其中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量基本上未上调的相应免疫细胞。

[0196] 在本申请中,所述促进记忆性免疫细胞产生可以为使所述免疫细胞产生记忆性免疫细胞的数量与对照免疫细胞所产生记忆性免疫细胞的数量相比显著上调(例如,上调了5%或更多、10%或更多、20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、100%或更多),其中所述对照免疫细胞为其中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量基本上未上调的相应免疫细胞。

[0197] 在本申请中,所述抑制免疫细胞分化可以为使所述免疫细胞产生分化型免疫细胞的数量与对照免疫细胞所产生记忆性免疫细胞的数量相比显著下调(例如,下调了5%或更多、10%或更多、20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、100%或更多),其中所述对照免疫细胞为其中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量基本上未上调的相应免疫细胞。

[0198] 在本申请中,所述增强免疫细胞释放细胞因子可以为使所述免疫细胞释放细胞因子的数量与对照免疫细胞所释放的细胞因子的数量相比显著上调(例如,上调了5%或更多、10%或更多、20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、100%或更多),其中所述对照免疫细胞为其中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量基本上未上调的相应免疫细胞。

[0199] 在本申请中,所述增强免疫细胞对肿瘤杀伤能力可以为使所述免疫细胞对肿瘤的杀伤能力与对照免疫细胞对肿瘤的杀伤能力相比显著提高(例如,提高了5%或更多、10%或更多、20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、100%或更多),其中所述对照免疫细胞为其中低密度脂蛋白受体相关

蛋白或其片段的表达量基本上未上调的相应免疫细胞。

[0200] 在本申请中,所述预防受试者中肿瘤复发可以为使所述免疫细胞针对预防受试者中肿瘤复发能力与对照免疫细胞针对预防受试者中肿瘤复发能力相比显著提高(例如,提高了5%或更多、10%或更多、20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、100%或更多),其中所述对照免疫细胞为其中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量基本上未上调的相应免疫细胞。

[0201] 在本申请中,所述治疗有需要的受试者中的肿瘤可以为使所述免疫细胞对肿瘤的治疗效果与对照免疫细胞对肿瘤的治疗效果相比显著提高(例如,提高了5%或更多、10%或更多、20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、100%或更多),其中所述对照免疫细胞为其中低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量基本上未上调的相应免疫细胞。

[0202] 例如,所述相应的免疫细胞可以包含淋巴细胞。在本申请中,所述相应的免疫细胞可以包含T细胞。在本申请中,所述T细胞可以包含记忆性干细胞样T细胞(TSCM)和/或中央记忆性T细胞(TCM)。在本申请中,所述TSCM可以为CCR7⁺和/或CD62L⁺。在本申请中,所述TSCM还可以具有选自下组的一种或多种性质:CD45RA⁺或CD45RA⁻、CD45RO⁺或CD45RO⁻、CD27⁺、CD28⁺、CD127⁺、CD122⁺、CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺。在本申请中,所述相应的免疫细胞可以包含经遗传修饰的免疫细胞,且所述经遗传修饰的免疫细胞表达嵌合抗原受体(CAR)。在本申请中,所述相应的免疫细胞可以包括经遗传修饰的T细胞。

[0203] 在本申请中,所述相应的免疫细胞中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的含量可以仅仅为正常机体中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的表达量,或者为与正常机体中所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的含量相比基本上未上调的表达量。例如,所述基本上未上调可以指上调至多4.5%、至多4%、至多3%、至多2%、至多1%、至多0.5%、至多0.3%、至多0.1%、至多0.01%或更少。在本申请中,所述相应的免疫细胞可以不含有包含编码所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的核苷酸分子的载体,和/或,所述相应的免疫细胞可以不包含编码所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段的核苷酸分子。

[0204] 在本申请中,检测所述低密度脂蛋白受体相关蛋白或其片段,和/或所述细胞因子的表达量的方法可以包括定量PCR、western blot和免疫组化法。

[0205] 在本申请中,检测所述记忆性免疫细胞和/或所述分化型免疫细胞的方法可以包括流式细胞术、免疫荧光法、磁珠分离法、ELISA、ELISPOT和定量PCR。

[0206] 在本申请中,评价肿瘤的治疗效果可以使用选自下组的指标:肿瘤体积、总生存期(OS)、总缓解期(DOR)、病情稳定持续时间、无病生存时间(DFS)、无进展生存时间(PFS)、疾病控制率(DCR)、客观缓解率(ORR)和/或临床受益反应比率。

[0207] 在本申请中,评价预防受试者中肿瘤复发的效果可以使用选自下组的指标:肿瘤标志物(例如,肿瘤相关抗原、肿瘤特异性基因和抑癌基因)的表达水平、组织学检测结果(例如上皮型增生、息肉消失的程度)、影像学检测结果(例如钼靶检测结果)和/或血清标志物(例如血清游离DNA、甲基化DNA)的表达水平。

[0208] 组合物及其用途

[0209] 本申请提供了一种组合物,其包含所述的经遗传修饰的免疫细胞。

[0210] 在本申请中,所述组合物还可以包含任选地药学上可接受的载体。所述药学上可接受的载体可以包括缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、低分子量多肽、蛋白质、亲水聚合物、氨基酸、糖、螯合剂、反离子、金属复合物和/或非离子表面活性剂等。

[0211] 在本申请中,所述组合物可被配制用于口服给药,静脉内给药,肌肉内给药,在肿瘤部位的原位给药,吸入,直肠给药,阴道给药,经皮给药或通过皮下储存库给药。

[0212] 所述组合物可以用于抑制肿瘤生长。例如,本申请的组合物可以抑制或延缓疾病的发展或进展,可以减小肿瘤大小(甚至基本消除肿瘤),和/或可以减轻和/或稳定疾病状态。

[0213] 本申请所述的组合物可以包含治疗有效量的所述抗体或其抗原结合片段。所述治疗有效量是能够预防和/或治疗(至少部分治疗)患有或具有发展风险的受试者中的病症或病症(例如癌症)和/或其任何并发症而所需的剂量。

[0214] 本申请提供了一种所述经遗传修饰的细胞和/或所述的组合物在制备药物中的用途,其中所述药物用于治疗 and/或预防肿瘤。

[0215] 在本申请中,所述肿瘤可以选自肝癌、肺癌、白血病和间皮瘤。

[0216] 不欲被任何理论所限,下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的装置、方法和系统的工作方式,而不用于限制本申请发明的范围。

[0217] 实施例

[0218] 实施例1慢病毒载体的构建

[0219] 所述CAR-T以靶向GPC3、CD19、Mesothelin (MSLN)、HER2、BCMA为例,人工合成包含CAR结构的片段,并构建到慢病毒载体(LV100A, System Biosciences公司),随后依照其说明书记载的方式转染获得慢病毒(如图1所示),分别得到GPC3-41BB、GPC3-41BB-L6、GPC3-41BB-TL6、GPC3-CD28、GPC3-CD28-L6、GPC3-CD28-TL6、GPC3-41BB-L5、GPC3-41BB-TL5、BCMA-41BB、BCMA-41BB-L6、BCMA-41BB-TL6、CD19-41BB、CD19-41BB-L6、CD19-41BB-TL6、MSLN-41BB、MSLN-41BB-L6、MSLN-41BB-TL6、HER2-41BB、HER2-41BB-L6和HER2-41BB-TL6慢病毒。

[0220] GPC3-41BB由前导序列、GPC3 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15和SEQ ID NO.17所示。

[0221] GPC3-41BB-L6由前导序列、GPC3 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta、2A、L6从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.21所示。

[0222] GPC3-41BB-TL6由前导序列、GPC3 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta、2A、TL6从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.23所示。

[0223] GPC3-41BB-L5由前导序列、GPC3 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta、2A、L5从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.25所示。

[0224] GPC3-41BB-TL5由前导序列、GPC3 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta、2A、TL5从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.1、

SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.27所示。

[0225] GPC3-CD28由前导序列、GPC3 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、CD28、CD3zeta从5'端至3'端依次拼接构建。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.13和SEQ ID NO.17所示。

[0226] GPC3-CD28-L6由前导序列、GPC3 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、CD28、CD3zeta、2A、L6从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.21所示。

[0227] GPC3-CD28-TL6由前导序列、GPC3 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、CD28、CD3zeta、2A、TL6从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.23所示。

[0228] BCMA-41BB由前导序列、BCMA ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15和SEQ ID NO.17所示。

[0229] BCMA-41BB-L6由前导序列、BCMA ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta、2A、L6从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.21所示。

[0230] BCMA-41BB-TL6由前导序列、BCMA ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta、2A、TL6从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.23所示。

[0231] CD19-41BB由前导序列、CD19 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15和SEQ ID NO.17所示。

[0232] CD19-41BB-L6由前导序列、CD19 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta、2A、L6从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.21所示。

[0233] CD19-41BB-TL6由前导序列、CD19 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta、2A、TL6从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.23所示。

[0234] MSLN-41BB由前导序列、MSLN ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15和SEQ ID NO.17所示。

[0235] MSLN-41BB-L6由前导序列、MSLN ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta、2A、L6从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.21所示。

[0236] MSLN-41BB-TL6由前导序列、MSLN ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta、2A、TL6从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.23所示。

[0237] HER2-41BB由前导序列、HER2 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、

SEQ ID NO.15和SEQ ID NO.17所示。

[0238] HER2-41BB-L6由前导序列、HER2 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta、2A、L6从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.21所示。

[0239] HER2-41BB-TL6由前导序列、HER2 ScFv、CD8铰链区和跨膜区、41BB、CD3zeta、2A、TL6从5'端至3'端依次拼接构建而成。其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19和SEQ ID NO.23所示。

[0240] 实施例2慢病毒感染T细胞

[0241] 通过ficoll分离液分离新鲜人外周血,获得大于 1×10^7 的外周血单核淋巴细胞(PBMC)。用PBS稀释抗人CD3及抗人CD28抗体,使其终浓度达到 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。然后,向细胞培养皿中加入稀释后的抗体混合液,然后将其均匀铺至细胞培养皿中,于室温孵育2小时。2小时后,用PBS洗涤一次抗体混合液。随后,将分离的PBMC用含有Xvivo15培养基、5%FBS、200U/ml IL2T或Xvivo15培养基、5%FBS、20ng/ml IL21、10ng/ml IL7的淋巴细胞培养液进行重悬,使其终浓度达到 1×10^6 个细胞/ml,加入放置抗体混合液的培养皿中于 37°C 、5% CO_2 培养24小时,以激活T细胞。

[0242] 取一定量的T细胞培养液,加入终浓度为 $1\text{mg}/\text{ml}$ 的synperonic F108混匀,于水浴锅加热至 37°C ,配制未感染试剂。随后,准备实验所需细胞培养皿。先取 $1\text{mg}/\text{ml}$ 抗人CD3抗体和 $0.5\text{mg}/\text{ml}$ 抗人CD28抗体先用PBS缓冲液按1:1000的体积比稀释并混匀,然后用retronectin($1\text{mg}/\text{ml}$)试剂按1:40的体积比稀释并混匀,然后将其均匀铺至细胞培养皿中,于室温孵育2小时。2小时后,用PBS进行洗涤,细胞培养皿准备完成。

[0243] 用所配感染试剂稀释已激活的T细胞,并按 $\text{MOI} = 3$ 的比例分别加入实施例1所制备的各个慢病毒并混匀。随后均匀铺在所述细胞培养皿中,进行慢病毒感染,从而获得分别表达GPC3-41BB、GPC3-41BB-L6、GPC3-41BB-TL6、GPC3-CD28、GPC3-CD28-L6、GPC3-CD28-TL6、GPC3-41BB-L5、GPC3-41BB-TL5、BCMA-41BB、BCMA-41BB-L6、BCMA-41BB-TL6、CD19-41BB、CD19-41BB-L6、CD19-41BB-TL6、MSLN-41BB、MSLN-41BB-L6、MSLN-41BB-TL6、HER2-41BB、HER2-41BB-L6和HER2-41BB-TL6的T细胞。感染后监测细胞密度,使这些感染后的细胞的密度维持在 1×10^6 个细胞/ml。14天后,细胞数可扩增10-100倍。

[0244] 实施例3 LRP6、LRP6截短体、LRP5或LRP5截短体促进记忆性T细胞形成

[0245] 于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中体外培养实施例2中所得的分别表达GPC3-41BB、GPC3-41BB-L6、GPC3-41BB-TL6、GPC3-CD28、GPC3-CD28-L6、GPC3-CD28-TL6、GPC3-41BB-L5、GPC3-41BB-TL5、BCMA-41BB、BCMA-41BB-L6、BCMA-41BB-TL6、CD19-41BB、CD19-41BB-L6、CD19-41BB-TL6、MSLN-41BB、MSLN-41BB-L6、MSLN-41BB-TL6、HER2-41BB、HER2-41BB-L6和HER2-41BB-TL6的T细胞,共培养9天或13天。

[0246] 用BD流式检测T细胞中CD3、CD8、CD45RO、CD45RA、CD62L、CCR7、CD95、CD122、CD127、CD27、CD28蛋白的表达情况。其中,测量得到的蛋白表达结果如图2所示。

[0247] 结果显示,在表达GPC3-41BB-L6或GPC3-41BB-TL6的T细胞中,记忆性干细胞样T细胞(TSCM)和中央记忆性T细胞(TCM)占总细胞比例均显著高于对照组;在表达GPC3-CD28-L6或GPC3-CD28-TL6的T细胞中,TSCM和TCM占总细胞百分比均显著高于对照组;在表达GPC3-41BB-L5或GPC3-41BB-TL5的T细胞中,TSCM和TCM占总细胞百分比均显著高于对照组;在表

达BCMA-41BB-L6或BCMA-41BB-TL6的T细胞中,TSCM和TCM占总细胞百分比均显著高于对照组;在表达CD19-41BB-L6或CD19-41BB-TL6的T细胞中,TSCM和TCM占总细胞百分比均显著高于对照组;在表达MSLN-41BB-L6或MSLN-41BB-TL6的T细胞中,TSCM和TCM占总细胞百分比均显著高于对照组;在表达HER2-41BB-L6或HER2-41BB-TL6的T细胞中,TSCM和TCM占总细胞百分比也均显著高于对照组。

[0248] 实施例4 LRP6或其截短体抑制Treg细胞的分化

[0249] 于37°C,5%CO₂细胞培养箱中体外培养实施例2中所得的分别表达GPC3-41BB和GPC3-41BB-L6的T细胞,共培养9天或12天。用BD流式检测T细胞中CD3、CD4、CD25、CD127、FoxP3蛋白的表达情况,测量得到的蛋白表达结果如图3所示。结果说明,在表达GPC3-41BB-L6的T细胞中,调节性T细胞(Treg)占CD4+T细胞百分比显著低于对照组表达GPC3-41BB的T细胞。

[0250] 实施例5 LRP6、LRP6截短体、LRP5或LRP5截短体促进肿瘤抗原诱导的特异性CAR-T细胞扩增

[0251] 将实施例2中所得的表达GPC3-41BB、GPC3-41BB-L6或GPC3-41BB-TL6的T细胞与辐照的Huh7或HepG2细胞(中科院细胞库购得)按1:1的细胞个数比用Xvivo15培养基进共培养,每5天重新补加辐照的Huh7或HepG2进行刺激,刺激3次,每次用台盼蓝染色进行计数;将表达GPC3-41BB、GPC3-41BB-L5或GPC3-41BB-TL5的T细胞与辐照的Huh7或HepG2细胞(中科院细胞库购得)按1:1的细胞个数比用Xvivo15培养基进共培养,每5天重新补加辐照的Huh7或HepG2进行刺激,刺激3次,每次用台盼蓝染色进行计数;将表达HER2-41BB、HER2-41BB-L6或HER2-41BB-TL6的T细胞与辐照的SKOV3细胞(中科院细胞库购得)按1:1的细胞个数比用Xvivo15培养基进共培养,每5天重新补加辐照的SKOV3进行刺激,刺激3次,每次用台盼蓝染色进行计数;各组细胞增殖情况如图4所示。结果显示,表达GPC3-41BB-L6或GPC3-41BB-TL6的T细胞的扩增倍数远高于对照组(表达GPC3-41BB的T细胞),表达GPC3-41BB-L5或GPC3-41BB-TL5的T细胞的扩增倍数远高于对照组,表达HER2-41BB-L6或HER2-41BB-TL6的T细胞的扩增倍数也远高于对照组(表达HER2-41BB的T细胞)。

[0252] 实施例6 LRP6或其截短体促进CAR-T细胞体内增殖以及细胞因子的释放

[0253] 向NSG小鼠(百奥赛图公司购得)皮下接种Huh7细胞(1×10^7 个/只),14天后,测得小鼠瘤体体积约100mm³。此时将小鼠分为4组,分别为T细胞组、GPC3-41BB组、GPC3-41BB-L6组和GPC3-41BB-TL6组,每组6只。然后通过尾静脉分别向其注射细胞(即每组分别注射未经修饰的T细胞、表达GPC3-41BB的T细胞、表达GPC3-41BB-L6的T细胞和表达GPC3-41BB-TL6的T细胞,剂量为 3×10^6 个/只),于第8天从小鼠尾部取血50μl。用BD流式检测每组中人CD8、CD4蛋白的表达。结果如图5A所示。图5A的结果说明,GPC3-41BB-L6或GPC3-41BB-TL6组中表达CD8、CD4蛋白的细胞占总细胞数的比例远高于其他对照组。

[0254] 向NSG小鼠(百奥赛图公司购得)皮下接种Huh7细胞(1×10^7 个/只),14天后,测得小鼠瘤体体积约100mm³。此时将小鼠分为5组,分别为T细胞组、GPC3-41BB组和GPC3-41BB-L6组,每组6只。然后通过尾静脉分别向T细胞组注射T细胞(即每注射未经修饰的T细胞,剂量为 2×10^6 个/只),向GPC3-41BB组注射表达GPC3-41BB的T细胞(剂量为 8×10^5 个/只),向GPC3-41BB-L6组注射表达GPC3-41BB-L6的T细胞(剂量为 3×10^5 个/只、 8×10^5 个/只或 2×10^6 个/只),于第8天从小鼠尾部取血50μl。用BD流式检测每组中人IL-2、IL4、IL6、IL10、

TNF- α 和IFN γ 细胞因子的表达。结果如图5B所示。图5B的结果说明, GPC3-41BB-L6组中IFN γ 细胞因子的表达显著高于其他对照组。

[0255] 实施例7 LRP6或其截短体增强CAR-T细胞抗肿瘤效果

[0256] 向NSG小鼠(百奥赛图公司购得)皮下接种Huh7细胞(剂量为 1×10^7 个/只), 14天后, 测得小鼠瘤体积约 100mm^3 。此时将小鼠分为4组, 分别为T细胞组、GPC3-41BB组和GPC3-41BB-L6组, 每组8只。然后通过尾静脉分别向T细胞组注射T细胞(即每注射未经修饰的T细胞, 剂量为 8×10^5 个/只), 向GPC3-41BB组注射表达GPC3-41BB的T细胞(剂量为 8×10^5 个/只), 向GPC3-41BB-L6组注射表达GPC3-41BB-L6的T细胞(剂量为 3×10^5 个/只或 8×10^5 个/只)。

[0257] 于每周的周一和周四分别测量瘤体积大小, 并记录小鼠死亡情况。结果如图6所示, 结果显示GPC3-41BB-L6组抑瘤效果和与小鼠存活率均显著高于其他对照组, 约是对照组GPC3-41BB组的3倍。

[0258] 实施例8 LRP6或其截短体促进CAR-T细胞在体内长期存活且预防肿瘤复发

[0259] 向NSG小鼠(百奥赛图公司购得)皮下接种Huh7细胞(剂量为 1×10^7 个/只), 14天后, 测得小鼠瘤体积约 100mm^3 。此时将小鼠分为3组, 分别为T细胞组、GPC3-41BB组和GPC3-41BB-L6组, 每组9只。然后通过尾静脉分别向T细胞组注射T细胞(剂量为 2×10^6 个/只), 向GPC3-41BB组注射表达GPC3-41BB的T细胞(剂量为 2×10^6 个/只), 向GPC3-41BB-L6组注射表达GPC3-41BB-L6的T细胞(剂量为 2×10^6 个/只)。

[0260] 待肿瘤完全消85天后, NSG小鼠皮下再次接种Huh7细胞(剂量为 3×10^7 个/只)。于第99天从小鼠尾部取血 $50\mu\text{l}$, 用BD流式检测每组中人CD8、CD4和CD3蛋白的表达; 于第120天, 取小鼠骨髓, 用BD流式检测每组中人CD8、CD4和CD3蛋白的表达。

[0261] 结果如图7所示。结果显示GPC3-41BB-L6组外周血中表达CD8或CD4蛋白的细胞占总细胞数的比例以及骨髓中表达CD3蛋白的细胞占总细胞数的比例均远高于GPC3-41BB组, 而且GPC3-41BB-L6组小鼠即使再次接种肿瘤细胞, 也无法形成肿瘤。这就说明LRP6或其截短体促进CAR-T细胞在体内长期存活且具有预防肿瘤复发的特点。

[0262] 前述详细说明是以解释和举例的方式提供的, 并非要限制所附权利要求的范围。目前本文所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的, 且保留在所附的权利要求和其等同方案的范围内。

序列表

<110>	上海原能细胞医学技术有限公司	
<120>	促进免疫细胞增殖的方法	
<130>	0065-PA-019CN	
<160>	74	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	789	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	GPC3 scFv 核苷酸	
<400>	1	
	atggctctgc ctgtgaccgc tctgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgccgcaaga	60
	cctgatgtcg tgatgacca gtcctcactg tcctgccag tgacaccagg agagcctgca	120
	tcctctctt gccggagctc ccagtctctg gtgcacagca acggcaatac ctacctgca	180
[0001]	tggtalctgc agaagccagg ccagagcccc cagctgctga tctacaaggt gtccaaccgg	240
	ttctctggag tgccagaccg gttcagcggc tccggctctg gcaccgattt cactgaag	300
	atcagcaggg tggaggcaga ggacgtgggc gtgtactatt gctcccagaa taccacgtg	360
	cccctacat ttggccaggg caccaagctg gagatcaagg gaggaggagg cagcggcggg	420
	ggaggctccg gcggcggcgg ctctcaggtg cagctggtgc agtccggagc agaggtgaag	480
	aagcctggag ccagcgtgaa ggtgtcctgt aaggcctctg gctacacctt cacagattat	540
	gagatgcaact ggggtcggca ggcacctgga cagggactgg agtggatggg cggcctggac	600
	caaagaccg gcgatacagc ctactctcag aagttaagg gcagggtgac cctgacagcc	660
	gacgagagca cctccacagc ctatattggag ctgtctagcc tgcgcagcga ggataccgcc	720
	gtgtactatt gcaccgctt ctacagttac acttattggg ggcagggcac tctggtcaca	780
	gtctcttca	789
<210>	2	
<211>	263	
<212>	PRT	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	GPC3 scFv	
<400>	2	

	65	70	75	80
	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr			
		85	90	95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser			
	100	105	110	
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu			
	115	120	125	
	Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys			
	130	135	140	
	Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg			
	145	150	155	160
	Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser			
	165	170	175	
	Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile			
	180	185	190	
	Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln			
	195	200	205	
[0004]	Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly			
	210	215	220	
	Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val			
	225	230	235	240
	Ser Ser			
	<210> 5			
	<211> 738			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
	<220>			
	<223> BCMA scFv 核苷酸			
	<400> 5			
	gacatcgtgc tgaccagag ccccgcttct ttagctgtgt ctttaggaga gagggccacc			60
	atcaattgic gtcctccga gtccgtgtcc gtgattggcg cccattaat ccaactgtac			120
	cagcagaaac ccggccagcc cccaagctg ctgatctatt tagccagcaa tctggagacc			180
	ggcgtgcccc ccagatttag cggaagcggc tccggcaccg attttacttt aaccatttcc			240
	tctttacaag ctgaggacgc cgccatctac tactgtttac agagcagaat ctttctcgt			300

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 165 170 175
 Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp
 180 185 190
 Phe Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala
 195 200 205
 Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 210 215 220
 Cys Ala Arg Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 7
 <211> 777
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>

[0006]

<223> MSLN scFv 核苷酸
 <400> 7

caggtgcagc tgcaacagag cggcctggc ctggtgacac ctcccagac cctcagcctc 60
 acctgcgcca tctccggcga ttccgtgtcc agcaatagcg ccacctggaa ctggatcaga 120
 cagagcccta gcagaggcct ggagtggctg ggcaggacct attataggag caagtggatc 180
 aacgactacg ccgtgtccgt caagtccaga atgagcatca accccgacac cagcaagaat 240
 cagttcagcc tgcagctgaa cagcgtgacc cccgaggaca cagccgtgta ttactgcgcc 300
 aggggcatga tgacctacta ctacggcatg gacgtgtggg gccaaaggcac cacagtgacc 360
 gtgagcagcg gcatlctggg cagcggagga ggcggtaccg gcggcggagg cagcggagga 420
 ggaggcagcc agcctgtgct gaccagctcc agctcctgt cegctcccc tggagcctcc 480
 gttccctga cctgcacct gaggtccggc atcaatgtgg gccctacag gatctactgg 540
 tatcagcaga agcctggcag cccccccag tacctgctga actacaagag cgacagcgac 600
 aagcagcagg gcagcggagt gcctagcaga ttacgggat ccaaggacgc ctccgcaat 660
 gctggcgtgc tgctgatctc cggcctgaga agcaggacg aagccgacta ctactgcatg 720
 atctggcaca gcagcgtgc cgtgttggga ggcggcacc aactgacagt cctgtcc 777

<210> 8
 <211> 259
 <212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> MSLN scFv
 <400> 8
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Met Ser Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Met Met Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 [0007] 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ile Leu Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 130 135 140
 Pro Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ile Asn Val Gly Pro Tyr
 165 170 175
 Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu
 180 185 190
 Leu Asn Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val Pro
 195 200 205
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Val Leu
 210 215 220
 Leu Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met
 225 230 235 240
 Ile Trp His Ser Ser Ala Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr

	245	250	255	
	Val Leu Ser			
	<210> 9			
	<211> 723			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
	<220>			
	<223> HER2 scFv 核苷酸			
	<400> 9			
	cagggccagc tgcagcagag cggacccgag ctcaagaagc ccggcgagac cgtgaagatc			60
	agctgtaagg ccagcggcta ccctttacc aactatggaa tgaactgggt gaagcaagct			120
	cccgccagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacaa gcaccggaga aagcacctc			180
	gctgacgact tcaaggcag attgacttc tcctcgaga cctccgcaa caccgctac			240
	ctgcagatca acaatctgaa gtccaggac agcgtacct acttctgcgc cagatgggag			300
	gtgtaccatg gctacgtccc ttattggggc caaggcacca ccgtgaccgt gacgagcggg			360
	ggagcgggt ctggaggcgg cggcagcggc ggcgccggca ggcacattca gctgaccag			420
[0008]	tcccacaagt tectgagcac ctccgtgggc gacagggtga gcattactg caaggccagc			480
	caggacgtgt acaatgccgt ggcttggtac cagcagaagc ctggacagag cccaagctg			540
	ctgatctaca gccttcctc caggtacacc ggcgtccctt ccagattac cgctccggc			600
	tccggccccg acttcacctt caccatcagc tccgtgcagg ccgaagacct ggccgtgtac			660
	ttctgccaac agcactcag gacccccctt acctttggca gcggaaccaa gctggagatc			720
	aaa			723
	<210> 10			
	<211> 241			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
	<220>			
	<223> HER2 scFv			
	<400> 10			
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu			
	1	5	10	15
	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr			
	20	25	30	
	Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met			

	35	40	45	
	Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp Phe			
	50	55	60	
	Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr			
	65	70	75	80
	Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys			
	85	90	95	
	Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110	
	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	115	120	125	
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe			
	130	135	140	
	Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser			
	145	150	155	160
	Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	165	170	175	
[0009]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr Gly Val			
	180	185	190	
	Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Phe Thr			
	195	200	205	
	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln			
	210	215	220	
	His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
	225	230	235	240
	Lys			
	<210> 11			
	<211> 207			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
	<220>			
	<223> CD8 铰链区和跨膜区核苷酸			
	<400> 11			
	accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg			60

<212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CD3zeta 核苷酸
 <400> 17
 agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 120
 cgggacctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacac 300
 tacgacgcc ttacatgca ggccctgccc cctcgttaa 339

<210> 18
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0012]

<220>
 <223> CD3zeta
 <400> 18
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 19
 <211> 54
 <212> DNA

atcagctccc tcagtatcat ggggggaagc agtggacccc cctatgaccg agcccatgtt 720
 acaggagcat catcaagtag ttctcaagc accaaaggca ctacttccc tgcaattttg 780
 aaccctccac catccccagc cacagagcga tcacattaca ctatggaatt tggatattct 840
 tcaaacagtc ctccactca taggtcatac agctacaggc catatagcta ccggcacttt 900
 gcacccccca ccacacctg cagcacagat gtttgtgaca gtgactatgc tctagtctgg 960
 agaatgacct cagtggcaac agccaagggc tataccagtg acttgaacta tgattcagaa 1020
 cctgtgcccc cacctccac accccgaagc caatacttgt cagcagagga gaactatgaa 1080
 agctgccac cttctcata cacagagagg agctattctc atcacctcta cccaccgcca 1140
 ccctctcct gtacagactc ctctga 1167

<210> 22
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> L6
 <400> 22

[0014] Gly Glu Pro Pro Thr Cys Ser Pro Gln Gln Phe Thr Cys Phe Thr Gly 15
 1 5 10
 Glu Ile Asp Cys Ile Pro Val Ala Trp Arg Cys Asp Gly Phe Thr Glu 30
 20 25
 Cys Glu Asp His Ser Asp Glu Leu Asn Cys Pro Val Cys Ser Glu Ser 45
 35 40
 Gln Phe Gln Cys Ala Ser Gly Gln Cys Ile Asp Gly Ala Leu Arg Cys 60
 50 55
 Asn Gly Asp Ala Asn Cys Gln Asp Lys Ser Asp Glu Lys Asn Cys Glu 80
 65 70 75
 Val Leu Cys Leu Ile Asp Gln Phe Arg Cys Ala Asn Gly Gln Cys Ile 95
 85 90
 Gly Lys His Lys Lys Cys Asp His Asn Val Asp Cys Ser Asp Lys Ser 110
 100 105
 Asp Glu Leu Asp Cys Tyr Pro Thr Glu Glu Pro Ala Pro Gln Ala Thr 125
 115 120
 Asn Thr Val Gly Ser Val Ile Gly Val Ile Val Thr Ile Phe Val Ser 140
 130 135
 Gly Thr Val Tyr Phe Ile Cys Gln Arg Met Leu Cys Pro Arg Met Lys

	145	150	155	160
	Gly Asp Gly Glu Thr Met Thr Asn Asp Tyr Val Val His Gly Pro Ala			
		165	170	175
	Ser Val Pro Leu Gly Tyr Val Pro His Pro Ser Ser Leu Ser Gly Ser			
	180		185	190
	Leu Pro Gly Met Ser Arg Gly Lys Ser Met Ile Ser Ser Leu Ser Ile			
	195		200	205
	Met Gly Gly Ser Ser Gly Pro Pro Tyr Asp Arg Ala His Val Thr Gly			
	210		215	220
	Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Lys Gly Thr Tyr Phe Pro Ala			
	225		230	235
	Ile Leu Asn Pro Pro Pro Ser Pro Ala Thr Glu Arg Ser His Tyr Thr			
		245		250
	Met Glu Phe Gly Tyr Ser Ser Asn Ser Pro Ser Thr His Arg Ser Tyr			
	260		265	270
	Ser Tyr Arg Pro Tyr Ser Tyr Arg His Phe Ala Pro Pro Thr Thr Pro			
	275		280	285
[0015]	Cys Ser Thr Asp Val Cys Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Ser Arg Arg Met			
	290		295	300
	Thr Ser Val Ala Thr Ala Lys Gly Tyr Thr Ser Asp Leu Asn Tyr Asp			
	305		310	315
	Ser Glu Pro Val Pro Pro Pro Pro Thr Pro Arg Ser Gln Tyr Leu Ser			
		325		330
	Ala Glu Glu Asn Tyr Glu Ser Cys Pro Pro Ser Pro Tyr Thr Glu Arg			
	340		345	350
	Ser Tyr Ser His His Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Ser Pro Cys Thr Asp			
	355		360	365
	Ser Ser			
	370			
	<210>	23		
	<211>	804		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>			
	<223>	TL6 核苷酸		

	100	105	110	
	Ala Ile Leu Asn Pro Pro Pro Ser Pro Ala Thr Glu Arg Ser His Tyr			
	115	120	125	
	Thr Met Glu Phe Gly Tyr Ser Ser Asn Ser Pro Ser Thr His Arg Ser			
	130	135	140	
	Tyr Ser Tyr Arg Pro Tyr Ser Tyr Arg His Phe Ala Pro Pro Thr Thr			
145	150	155	160	
	Pro Cys Ser Thr Asp Val Cys Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Ser Arg Arg			
	165	170	175	
	Met Thr Ser Val Ala Thr Ala Lys Gly Tyr Thr Ser Asp Leu Asn Tyr			
	180	185	190	
	Asp Ser Glu Pro Val Pro Pro Pro Pro Thr Pro Arg Ser Gln Tyr Leu			
	195	200	205	
	Ser Ala Glu Glu Asn Tyr Glu Ser Cys Pro Pro Ser Pro Tyr Thr Glu			
	210	215	220	
	Arg Ser Tyr Ser His His Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Ser Pro Cys Thr			
225	230	235	240	

[0017] Asp Ser Ser

<210> 25

<211> 1089

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> L5 核苷酸

<400> 25

ggagagccgc ccacctgctc cccggaccag ttgcatgtg ccacagggga gatcgactgt	60
atccccgggg cctggcgctg tgacggcttt cccgagtgcg atgaccagag cgacgaggag	120
ggctgccccg tgtgtccgc cgcccagttc cctgcgcgc ggggtcagtg tgtggacctg	180
cgctgcgct gcgacggcga ggcagactgt caggaccgct cagacaggc ggactgtgac	240
gccatctgcc tgccaacca gtccgggtg gcgagcggcc agtgtgtcct catcaaacag	300
cagtgcgact ccttccccga ctgtatcgac ggctccgacg agctcatgtg tgaatcacc	360
aagccgcct cagacgacag cccggcccc agcagtgcca tcgggcccgt cattggcatc	420
atctctctc tcttctcat ggggtgtgtc tattttgtg gccagcgcgt ggtgtgccag	480
cgctatgcgg gggccaacgg gccttccc cagcagtatg tcagcgggac cccgcactg	540

ccctcaatt tcatagcccc gggcggttcc cagcatggcc ccttcacagg catcgcacgc 600
 ggaaagtcca tgatgagctc cgtgagcctg atggggggcc ggggcggggt gcccctctac 660
 gaccggaacc acgtcacagg ggcctcgtcc agcagctcgt ccagcacgaa ggccacgctg 720
 taccgcccga tctgaaccc gccgccctcc cgggccacgg acccctccct gtacaacatg 780
 gacatgttct actcttcaaa cattccggcc actgcgagac cgtacaggcc ctacatcatt 840
 cgaggaatgg cgccccgcac gacgccctgc agcaccgacg tgtgtgacag cgactacagc 900
 gccagccgct ggaaggccag caagtactac ctggattga actcggactc agaccctat 960
 ccacccccac ccacgcccac cagccagtac ctgtcggcgg aggacagctg cccgcctcgc 1020
 cccgccaccg agaggagcta ctccatctc ttccgcccc ctccgtcccc ctgcacggac 1080
 tcatcctga 1089
 <210> 26
 <211> 362
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> L5
 <400> 26

[0018]

Gly	Glu	Pro	Pro	Thr	Cys	Ser	Pro	Asp	Gln	Phe	Ala	Cys	Ala	Thr	Gly	1	5	10	15
Glu	Ile	Asp	Cys	Ile	Pro	Gly	Ala	Trp	Arg	Cys	Asp	Gly	Phe	Pro	Glu	20	25	30	
Cys	Asp	Asp	Gln	Ser	Asp	Glu	Glu	Gly	Cys	Pro	Val	Cys	Ser	Ala	Ala	35	40	45	
Gln	Phe	Pro	Cys	Ala	Arg	Gly	Gln	Cys	Val	Asp	Leu	Arg	Leu	Arg	Cys	50	55	60	
Asp	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys	Gln	Asp	Arg	Ser	Asp	Glu	Ala	Asp	Cys	Asp	65	70	75	80
Ala	Ile	Cys	Leu	Pro	Asn	Gln	Phe	Arg	Cys	Ala	Ser	Gly	Gln	Cys	Val	85	90	95	
Leu	Ile	Lys	Gln	Gln	Cys	Asp	Ser	Phe	Pro	Asp	Cys	Ile	Asp	Gly	Ser	100	105	110	
Asp	Glu	Leu	Met	Cys	Glu	Ile	Thr	Lys	Pro	Pro	Ser	Asp	Asp	Ser	Pro	115	120	125	
Ala	His	Ser	Ser	Ala	Ile	Gly	Pro	Val	Ile	Gly	Ile	Ile	Leu	Ser	Leu	130	135	140	

	Phe Val Met Gly Gly Val Tyr Phe Val Cys Gln Arg Val Val Cys Gln		
	145	150	160
	Arg Tyr Ala Gly Ala Asn Gly Pro Phe Pro His Glu Tyr Val Ser Gly		
		165	175
	Thr Pro His Val Pro Leu Asn Phe Ile Ala Pro Gly Gly Ser Gln His		
		180	190
	Gly Pro Phe Thr Gly Ile Ala Cys Gly Lys Ser Met Met Ser Ser Val		
		195	205
	Ser Leu Met Gly Gly Arg Gly Gly Val Pro Leu Tyr Asp Arg Asn His		
		210	220
	Val Thr Gly Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Lys Ala Thr Leu		
	225	230	240
	Tyr Pro Pro Ile Leu Asn Pro Pro Pro Ser Pro Ala Thr Asp Pro Ser		
		245	255
	Leu Tyr Asn Met Asp Met Phe Tyr Ser Ser Asn Ile Pro Ala Thr Ala		
		260	270
	Arg Pro Tyr Arg Pro Tyr Ile Ile Arg Gly Met Ala Pro Pro Thr Thr		
[0019]		275	285
	Pro Cys Ser Thr Asp Val Cys Asp Ser Asp Tyr Ser Ala Ser Arg Trp		
		290	300
	Lys Ala Ser Lys Tyr Tyr Leu Asp Leu Asn Ser Asp Ser Asp Pro Tyr		
	305	310	320
	Pro Pro Pro Pro Thr Pro His Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Glu Asp Ser		
		325	335
	Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Glu Arg Ser Tyr Phe His Leu Phe Pro		
		340	350
	Pro Pro Pro Ser Pro Cys Thr Asp Ser Ser		
		355	360
	<210> 27		
	<211> 696		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> TL5 核苷酸		
	<400> 27		

agtgccatcg ggcccgtcat tggcatcadc ctctctctct tcgtcatggg tgggtctat 60
 ttgtgtgcc agcgcgtggt gtgcagcgc tatgcggggg ccaacgggcc ctcccgcac 120
 gagtatgca gcgggacccc gcacgtgcc ctcaattca tagccccggg cgggtccag 180
 catggcccct tcacagcat cgcacgcca aagtccatga tgagctcct gagcctgatg 240
 gggggccggg gcggggtgcc cctctacgac cggaccacg tcacaggggc ctctccagc 300
 agctctcca gcacgaaggc cacgtgtac ccgccatcc tgaaccgcc gcctccccg 360
 gccacggacc cctccctgta caacatggac atgttctact ctcaaacat tccggcact 420
 gcgagaccgt acaggccta catcattca ggaatggcgc ccccagcgc gcctgcagc 480
 accgacgtgt gtgacagcga ctacagcgc agccgctgga aggccagcaa gtactacctg 540
 gatttgaact cggactcaga ccctatcca cccccacca cggccacag ccagtacctg 600
 tcggcggagg acagtgccc gcctcgcgc gccaccgaga ggagctactt ccatctctc 660
 ccgccccctc cgtccccctg cacggactca tctgta 696

<210> 28
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>

[0020]

<223> TL5
 <400> 28
 Ser Ala Ile Gly Pro Val Ile Gly Ile Ile Leu Ser Leu Phe Val Met
 1 5 10 15
 Gly Gly Val Tyr Phe Val Cys Gln Arg Val Val Cys Gln Arg Tyr Ala
 20 25 30
 Gly Ala Asn Gly Pro Phe Pro His Glu Tyr Val Ser Gly Thr Pro His
 35 40 45
 Val Pro Leu Asn Phe Ile Ala Pro Gly Gly Ser Gln His Gly Pro Phe
 50 55 60
 Thr Gly Ile Ala Cys Gly Lys Ser Met Met Ser Ser Val Ser Leu Met
 65 70 75 80
 Gly Gly Arg Gly Gly Val Pro Leu Tyr Asp Arg Asn His Val Thr Gly
 85 90 95
 Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Lys Ala Thr Leu Tyr Pro Pro
 100 105 110
 Ile Leu Asn Pro Pro Pro Ser Pro Ala Thr Asp Pro Ser Leu Tyr Asn
 115 120 125

Met Asp Met Phe Tyr Ser Ser Asn Ile Pro Ala Thr Ala Arg Pro Tyr
 130 135 140
 Arg Pro Tyr Ile Ile Arg Gly Met Ala Pro Pro Thr Thr Pro Cys Ser
 145 150 155 160
 Thr Asp Val Cys Asp Ser Asp Tyr Ser Ala Ser Arg Trp Lys Ala Ser
 165 170 175
 Lys Tyr Tyr Leu Asp Leu Asn Ser Asp Ser Asp Pro Tyr Pro Pro Pro
 180 185 190
 Pro Thr Pro His Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Glu Asp Ser Cys Pro Pro
 195 200 205
 Ser Pro Ala Thr Glu Arg Ser Tyr Phe His Leu Phe Pro Pro Pro Pro
 210 215 220
 Ser Pro Cys Thr Asp Ser Ser
 225 230

<210> 29

<211> 578

<212> DNA

[0021] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> IRES 序列

<400> 29

tcctccccc cccctaacg ttactggccg aagccgcttg gaataaggcc ggtgtgcgtt 60
 tgtctatag ttatttcca ccatattgcc gtctttggc aatgtgaggg cccgaaacc 120
 tggccctgtc ttcttgacga gcattcctag gggctttcc cctctcgcca aaggaatgca 180
 aggtctgttg aatgtcgtga aggaagcagt tcctctggaa gcttcttgaa gacaacaac 240
 gtctgtagcg accctttgca ggcagcggaa cccccacct ggcgacaggt gcctctgagg 300
 ccaaaagcca cgtgtataag atacacctgc aaaggcggca caacccagtg gccacgttgt 360
 gagttggata gttgtggaaa gagtcaaag gctctcctca agcgtattca acaaggggct 420
 gaaggatgcc cagaaggtac cccattgtat gggatctgat ctggggcctc ggtgcacatg 480
 cttacatgt gtttagtcga ggtaaaaaa acgtctagge cccccaacc acggggacgt 540
 ggtttcctt tgaaaaaac gatgataata tggccaca 578

<210> 30

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <223> 前导序列 核苷酸
 <400> 30
 atggctctgc ctgtgaccgc tctgctgctg ccctctggctc tgctgctgca cgccgcaaga 60
 cct 63
 <210> 31
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CD8 铰链序列
 <400> 31
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 [0022] 35 40 45
 <210> 32
 <211> 135
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CD8 铰链序列 核苷酸
 <400> 32
 accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca cggggcccca ccatcgcgtc gcagcccctg 60
 tcctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120
 gacttcgct gtgat 135
 <210> 33
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> CD8 跨膜序列

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> GPC3 HCDR3
 <400> 37
 Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp
 1 5
 <210> 38
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> GPC3 LCDR1
 <400> 38
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 [0024] <210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> GPC3 LCDR2
 <400> 39
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> GPC3 LCDR3
 <400> 40
 Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr
 1 5

<210> 41
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> GPC3 VH
 <400> 41
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 [0025] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 42
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> GPC3 VL
 <400> 42
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

	1	5	10
	<210>	46	
	<211>	11	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	CD19 LCDR1	
	<400>	46	
	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn		
	1	5	10
	<210>	47	
	<211>	7	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	CD19 LCDR2	
	<400>	47	
[0027]	His Thr Ser Arg Leu His Ser		
	1	5	
	<210>	48	
	<211>	9	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	CD19 LCDR3	
	<400>	48	
	Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr		
	1	5	
	<210>	49	
	<211>	119	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	CD19 VH	
	<400>	49	

	Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln		
	1	5	10 15
	Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr		
		20	25 30
	Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu		
		35	40 45
	Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys		
		50	55 60
	Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu		
	65	70	75 80
	Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala		
		85	90 95
	Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
		100	105 110
	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser		
		115	
[0028]	<210>	50	
	<211>	107	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	CD19 VL	
	<400>	50	
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
	1	5	10 15
	Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr		
		20	25 30
	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile		
		35	40 45
	Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
		50	55 60
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln		
	65	70	75 80
	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr		
		85	90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr

100

105

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> BCMA HCDR1

<400> 51

Asp Tyr Ser Ile Asn

1 5

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> BCMA HCDR2

[0029] <400> 52

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> BCMA HCDR3

<400> 53

Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

1 5

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <223> BCMA LCDR1
 <400> 54
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Val Ile Gly Ala His Leu Ile His
 1 5 10 15
 <210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> BCMA LCDR2
 <400> 55
 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5
 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 [0030] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> BCMA LCDR3
 <400> 56
 Leu Gln Ser Arg Ile Phe Pro Arg Thr
 1 5
 <210> 57
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> BCMA VH
 <400> 57
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

	35	40	45	
	Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe			
	50	55	60	
	Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr			
	65	70	75	80
	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95	
	Ala Arg Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
	100	105	110	
	Val Thr Val Ser Ser			
	115			
<210>	58			
<211>	111			
<212>	PRT			
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)			
<220>				
<223>	BCMA VL			
[0031] <400>	58			
	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
	1	5	10	15
	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Val Ile			
	20	25	30	
	Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
	35	40	45	
	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ala			
	50	55	60	
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
	65	70	75	80
	Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg			
	85	90	95	
	Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110	
<210>	59			
<211>	7			
<212>	PRT			

<210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> MSLN LCDR2
 <400> 63
 Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser
 1 5 10
 <210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> MSLN LCDR3
 <400> 64
 Met Ile Trp His Ser Ser Ala Ala Val
 [0033] 1 5
 <210> 65
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> MSLN VH
 <400> 65
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Met Ser Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80

	Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val		
	85	90	95
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Met Met Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val		
	100	105	110
	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
	<210> 66		
	<211> 116		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> MSLN VL		
	<400> 66		
	Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala		
	1	5	10
			15
	Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ile Asn Val Gly Pro		
	20	25	30
[0034]	Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr		
	35	40	45
	Leu Leu Asn Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val		
	50	55	60
	Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Val		
	65	70	75
			80
	Leu Leu Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Met Ile Trp His Ser Ser Ala Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu		
	100	105	110
	Thr Val Leu Ser		
	115		
	<210> 67		
	<211> 5		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> HER2 HCDR1		

<400> 67

Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> HER2 HCDR2

<400> 68

Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

[0035] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> HER2 HCDR3

<400> 69

Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp

1 5 10

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> HER2 LCDR1

<400> 70

Lys Ala Ser Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala

1 5 10

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HER2 LCDR2
 <400> 71
 Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HER2 LCDR3
 <400> 72
 Gln Gln His Phe Arg Thr Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 73
 <211> 119
 [0036] <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> HER2 VH
 <400> 73
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly

	100	105	110
	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115		
	<210> 74		
	<211> 107		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> HER2 VL		
	<400> 74		
	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly		
[0037]	1	5	10
	Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Tyr Asn Ala		
	20	25	30
	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
	35	40	45
	Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly		
	50	55	60
	Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala		
	65	70	75
	Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln His Phe Arg Thr Pro Phe		
	85	90	95
	Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100	105	

慢病毒名称	结构示意图
GPC3-41BB	GPC3 scFv-CD8-41BB-CD3z
GPC3-41BB-L6	GPC3 scFv-CD8-41BB-CD3z-2A-L6
GPC3-41BB-TL6	GPC3 scFv-CD8-41BB-CD3z-2A-TL6
GPC3-CD28	GPC3 scFv-CD8-CD28-CD3z
GPC3-CD28-L6	GPC3 scFv-CD8-CD28-CD3z-2A-L6
GPC3-CD28-TL6	GPC3 scFv-CD8-CD28-CD3z-2A-TL6
GPC3-41BB-L5	GPC3 scFv-CD8-41BB-CD3z-2A-L5
GPC3-41BB-TL5	GPC3 scFv-CD8-41BB-CD3z-2A-TL5
CD19-41BB	CD19 scFv-CD8-41BB-CD3z
CD19-41BB-L6	CD19 scFv-CD8-41BB-CD3z-2A-L6
CD19-41BB-TL6	CD19 scFv-CD8-41BB-CD3z-2A-TL6
BCMA-41BB	BCMA scFv-CD8-41BB-CD3z
BCMA-41BB-L6	BCMA scFv-CD8-41BB-CD3z-2A-L6
BCMA-41BB-TL6	BCMA scFv-CD8-41BB-CD3z-2A-TL6
MSLN-41BB	MSLN scFv-CD8-41BB-CD3z
MSLN-41BB-L6	MSLN scFv-CD8-41BB-CD3z-2A-L6
MSLN-41BB-TL6	MSLN scFv-CD8-41BB-CD3z-2A-TL6
HER2-41BB	HER2 scFv-CD8-41BB-CD3z
HER2-41BB-L6	HER2 scFv-CD8-41BB-CD3z-2A-L6
HER2-41BB-TL6	HER2 scFv-CD8-41BB-CD3z-2A-TL6

图1

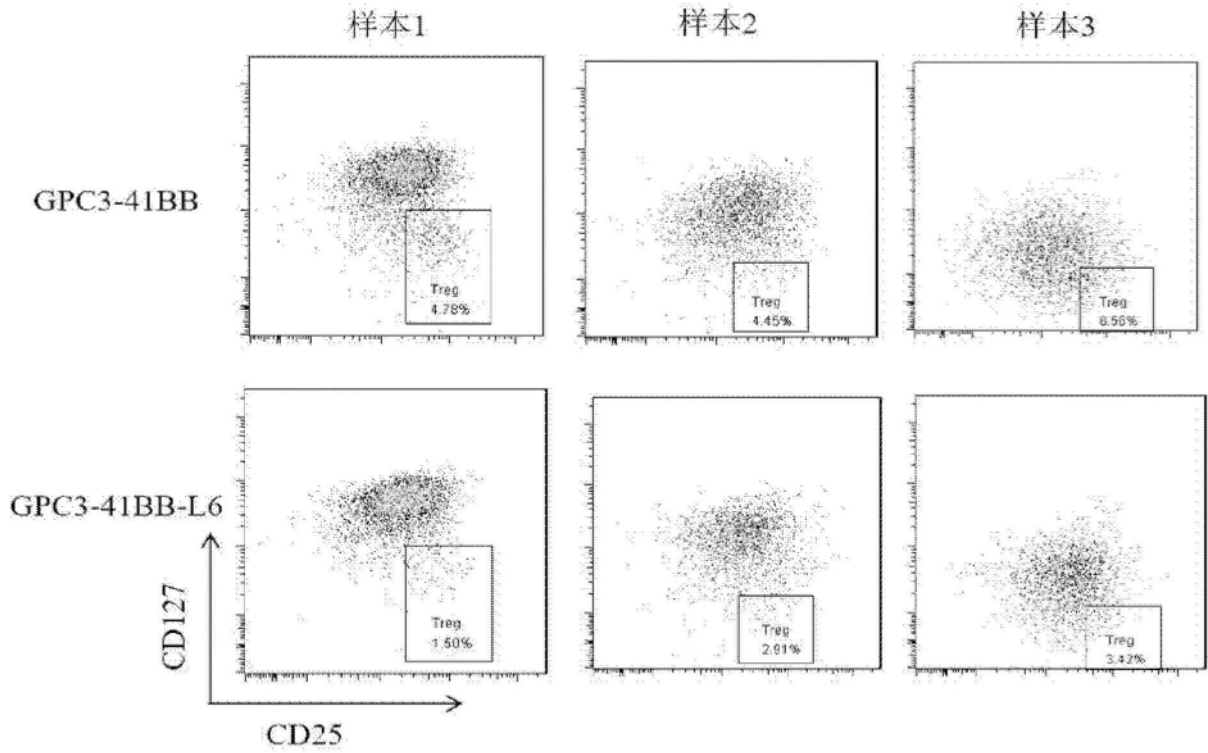


图3

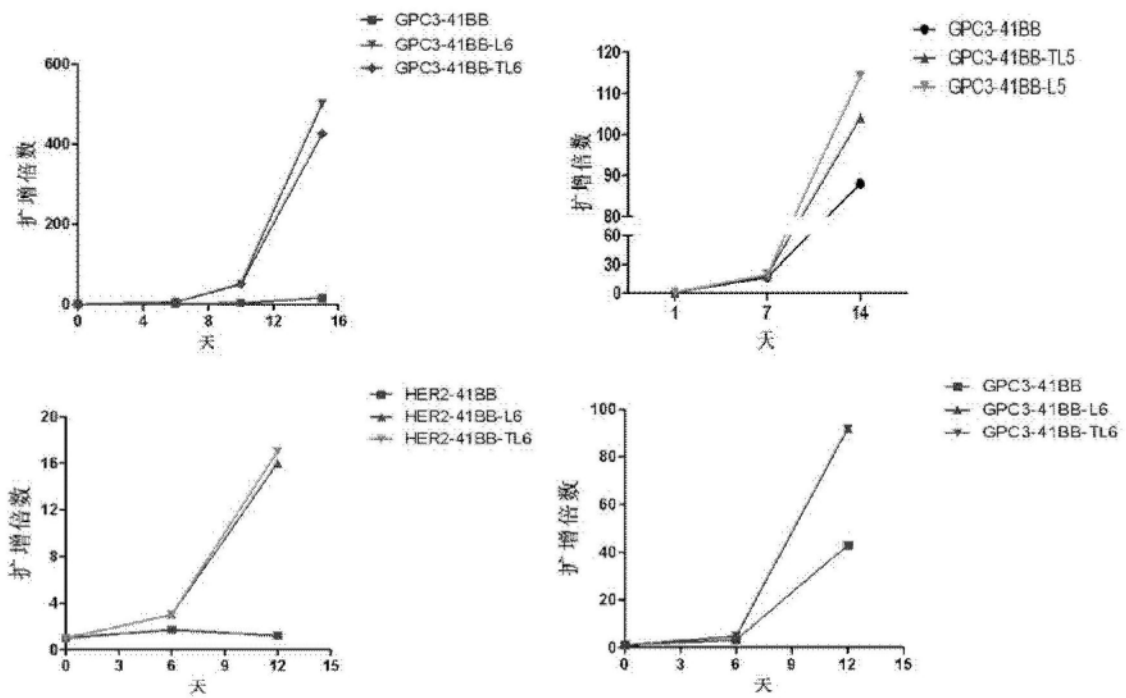


图4

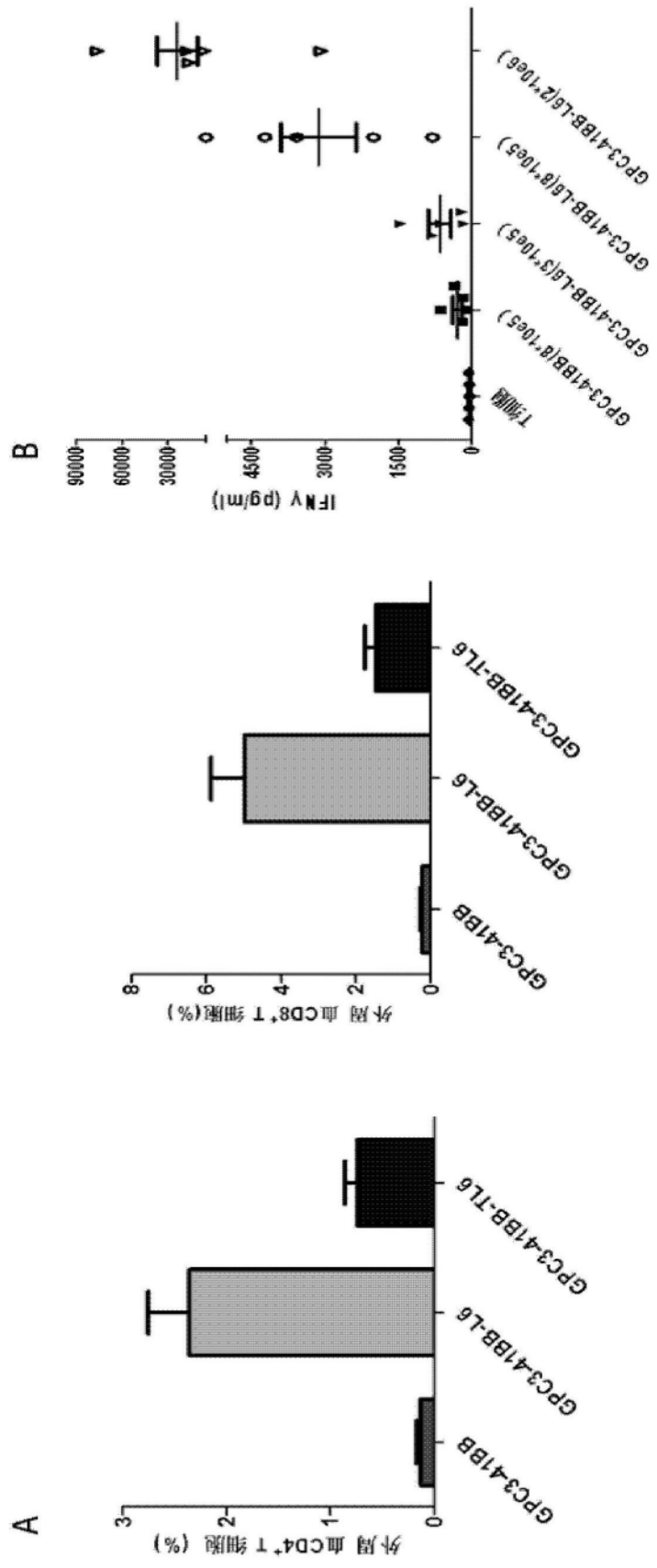


图5

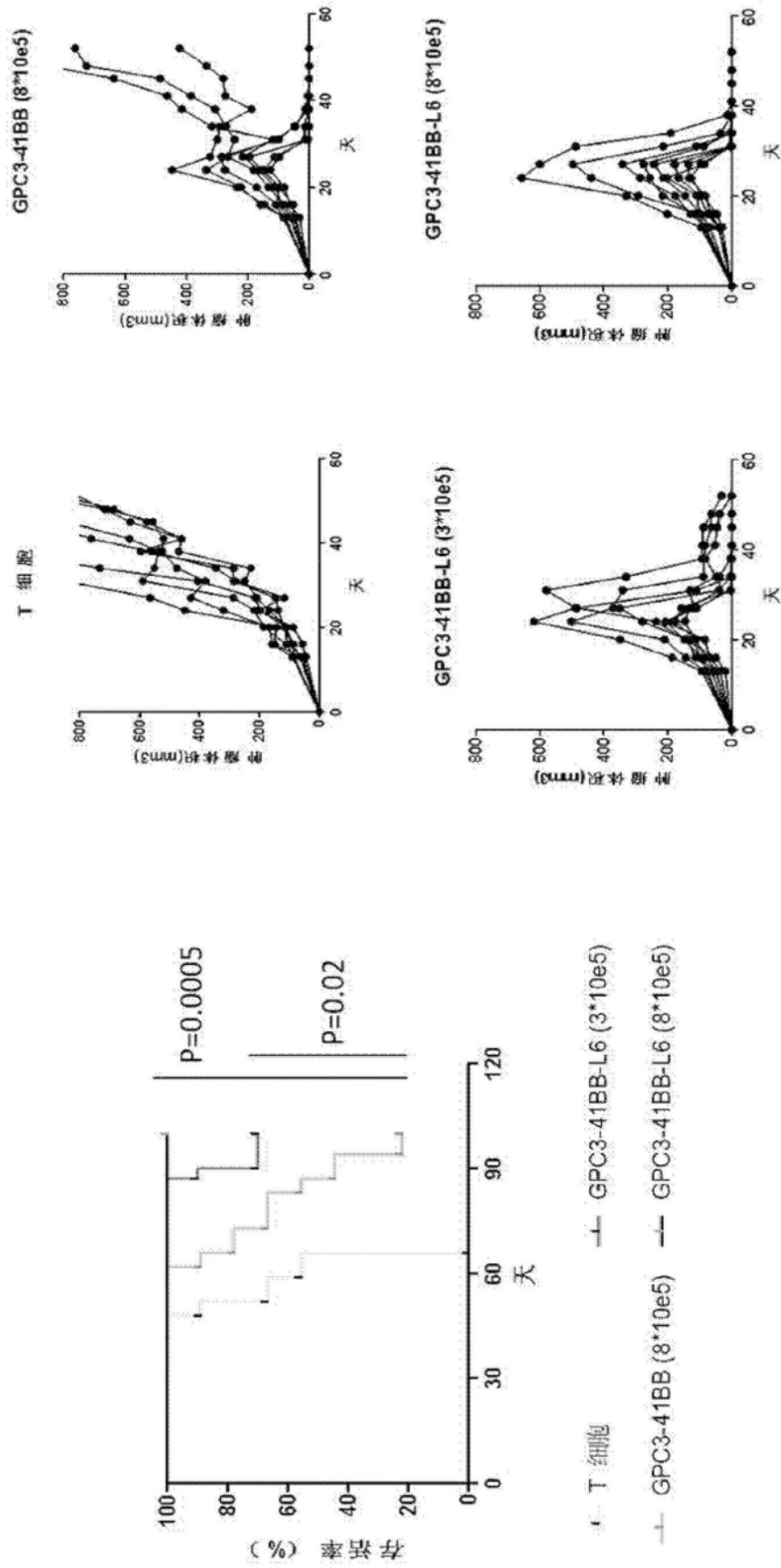


图6

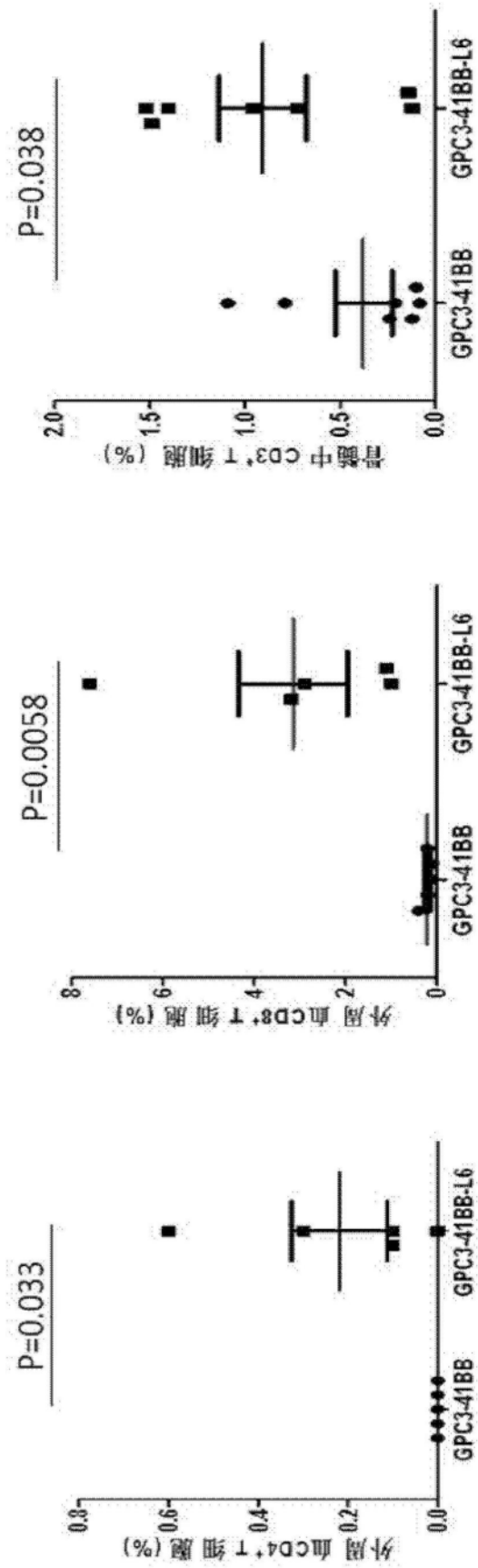


图7