

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 6 月 14 日 (14.06.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/103501 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/113 (2010.01) *A61K 35/17* (2015.01)
C12N 15/867 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/110653

(22) 国际申请日: 2017 年 11 月 13 日 (13.11.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201611123283.4 2016 年 12 月 8 日 (08.12.2016) CN

(71) 申请人: 上海优卡迪生物医药科技有限公司 (SHANGHAI UNICAR-THERAPY BIOMEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区哈雷路 998 号 4 号楼 202 室, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 祁伟 (QI, Wei); 中国上海市浦东新区哈雷路 998 号 4 号楼 202 室, Shanghai 201203 (CN)。

俞磊 (YU, Lei); 中国上海市浦东新区哈雷路 998 号 4 号楼 202 室, Shanghai 201203 (CN)。康立清 (KANG, Liqing); 中国上海市浦东新区哈雷路 998 号 4 号楼 202 室, Shanghai 201203 (CN)。余宙 (YU, Zhou); 中国上海市浦东新区哈雷路 998 号 4 号楼 202 室, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 上海宏京知识产权代理事务所 (普通合伙) (SHANGHAI HONGJING INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国上海市黄浦区北京东路 668 号科技京城西楼 21 层 A 室, Shanghai 200001 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(54) Title: HUMAN PD-1 KNOCKDOWN SIRNA, RECOMBINANT EXPRESSION CAR-T VECTOR, PREPARATION METHOD THEREOF, AND APPLICATION OF SAME

(54) 发明名称: 敲减人 PD-1 的 siRNA、重组表达 CAR-T 载体及其构建方法和应用

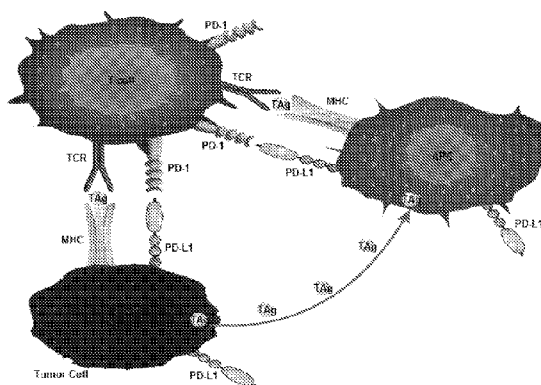


图 1

(57) Abstract: Provided are a human PD-1 knockdown siRNA, a recombinant expression CAR-T vector, a preparation method thereof, and an application of the same. A PD-1 knockdown siRNA expression cassette and an siRNA expression product thereof can be applied to a CAR-T therapy of multiple myeloma (MM) for eliminating or alleviating a tumor immune escape mechanism, and in the suppression of an immune escape mechanism in a CAR-T therapy of a tumor, such as pancreatic cancer, brain glioma, and myeloma.

(57) 摘要: 提供了一种敲减人 PD-1 的 siRNA、重组表达 CAR-T 载体及其构建方法和应用。其中 PD-1 敲减 siRNA 表达框及其 siRNA 表达产物, 不仅可以应用于 CAR-T 治疗多发性骨髓瘤 (MM) 中用于消除或减轻肿瘤的免疫逃脱机制, 还可应用于抑制 CAR-T 治疗诸如胰腺癌、脑胶质瘤、骨髓瘤等等类型肿瘤时的免疫逃脱机制。



WO 2018/103501 A1

PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格 (细则4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

敲减人 PD-1 的 siRNA、重组表达 CAR-T 载体及其构建方法和应用

技术领域

本发明属于肿瘤免疫治疗技术领域,具体涉及一种敲减人程序性死亡受体 1(PD-1)的 siRNA、重组表达 CAR-T 载体(尤其是一种通过敲减 PD-1 消除或减轻肿瘤的免疫逃逸机制的 CAR-T 转基因载体)及其构建方法和应用。

背景技术

肿瘤免疫治疗的理论基础是免疫系统具有识别肿瘤相关抗原、调控机体攻击肿瘤细胞(高度特异性的细胞溶解)的能力。1950 年代, Burnet 和 Thomas 提出了“免疫监视”理论,认为机体中经常会出现的突变的肿瘤细胞可被免疫系统所识别而清除,为肿瘤免疫治疗奠定了理论基础[Burnet FM.Immunological aspects of malignant disease.Lancet,1967;1: 1171-4]。随后,各种肿瘤免疫疗法包括细胞因子疗法、单克隆抗体疗法、过继免疫疗法、疫苗疗法等相继应用于临床。

2013 年一种更先进的肿瘤免疫疗法--- CAR-T 疗法成功用于临床,并表现了前所未有的临床疗效。CAR-T, 全称是 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy, 嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法。CAR-T 疗法在临床上最领先的有诺华的 CLT019, 采用 CLT019 治疗复发难治急性淋巴细胞白血病患者, 六个月的肿瘤无进展生存率达到 67%, 其中最长的应答时间达到两年多。总部位于中国上海的上海优卡迪生物医药科技有限公司与医院合作, 共治疗复发难治急性淋巴细胞白血病患者 36 例, 其中完全 24 例, 缓解比例达到 66.6%。这是抗癌研究的颠覆性突破。CAR-T 细胞疗法可能是最有可能治愈癌症的手段之一, 并被《Science》杂志评为 2013 年度十大科技突破之首。

CAR-T 疗法虽然效果显著,但是在治疗实体肿瘤的过程中遇到很多困难,其中一个很重要的原因就是 PD1/PDL1 抑制性免疫检查点(如图 1A 所示),它们结合传递抑制信号,抑制了 T 细胞的免疫活性,在免疫耐受中发挥了重要作用,同时也是促使肿瘤细胞逃逸的重要原因。

PD-1(又称 CD279)是一种免疫抑制性受体,属于 CD28 家族成员的 I 型跨膜蛋白,程序性细胞死亡分子-1 受体 1992 年由 Ishida 等[Ishida Y,Agata Y,Shibahara K,et al. Induced expression of PD-1,a novel member of the immunoglobulin gene superfamily,upon programmed cell death (J).EMBO J,1992,11 (11) :3887-3895.]采用消减杂交方法于凋亡的 T 细胞杂交瘤中得到并命名。人 PD-1 基因位于 2q37.35 染色体上,编码一个约 55kD 的跨膜糖蛋白。PD-1 在激活的 T 细胞、B 细胞、单核细胞和树突状细胞表面广泛表达,PD-1 结构上与 CTLA-4 有 30%的同源性,胞内区存在两个酪氨酸残基,分别参与构成了 N 端的一个免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM)和 C 端的一个免疫受体酪氨酸依赖的转换基序(immunoreceptor tyrosin-based switch motif, ITSM);胞外区则是由一个 IgV 样结构域组成,含有多个糖基化位点并被重度糖基化,该结构域可以与配体结合,从而发挥抑制 T 细胞活化的功能[李瑛,焦顺昌等. PD-1/PD-L1 信号通路在肿瘤免疫逃逸中的作用及临床意义[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, Jul 2015,36(7).]。

PD-L1 在多数癌症组织中过量表达,包括 NSCLC、黑色素瘤、乳腺癌、胶质瘤、淋巴瘤、白血病及各种泌尿系肿瘤、消化道肿瘤、生殖系肿瘤等[Intlekofer AM,Thompson CB. At the bench:preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy[J]. J Leukoc Biol,2013,94(1):25-39.]. Parsa 在鼠和人的肿瘤细胞中,发现 T 细胞异常分泌的 IFN- γ , IFN- γ 可以诱导肿瘤细胞上的 PD-L1 高表达[Ding H,Wu X,Wu J,et al.Delivering PD-1 inhibitory signal concomitant with blocking ICOS co-stimulation suppresses lupus-like syndrome in autoimmune BXSB mice[J]. Clin Immunol, 2006,118(2/3):258-267.]. PD-L1 高表达,可以通过抑制 RAS 及 PI3K/AKT 信号通路,进而调控细胞周期检查点蛋白和细胞增殖相关蛋白表达,最终导致 T 细胞增殖的抑制[11]。Dong 等体外实验和小鼠模型还发现,PD-1/PD-L1 信号通路的激活可以诱导特异性 CTL 调

亡,使CTL的细胞毒杀伤效应敏感性下降,促使肿瘤细胞发生免疫逃逸[Dong H,Strome SE,Salomao DR,et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion[J]. Nat Med,2002,8(8):793-800.]。

目前临床上主要是是使用商品化的 PD-1 单抗,作为免疫检查点抑制剂,来抑制肿瘤细胞的免疫逃脱。2014 年 9 月 3 日,百时美施贵宝公司抗 PD-1 药物 Opdivo (Nivolumab) 在日本正式上市,在日本国内此药物目前仍然只限于黑色素瘤患者。药物被设定为每 100mg, 729849 日元(约合人民币 43000 元)的价格。体重每 1kg 就需要 2mg 的使用量,因此体重 50kg 的人则需要 100mg 的使用量。并且,体重每增加 10kg 用药剂量需要增加 20mg (150200 日元,约合人民币 8778 元),每 3 周为一个疗程。价格相当昂贵,普通家庭难以承受。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供了一种敲减人 PD-1 的 siRNA、重组表达 CAR-T 载体及其构建方法 and 应用

本发明的目的通过以下技术方案来实现:

本发明的第一目的在于提供一种敲减人 PD-1 的 siRNA,所述 siRNA 选自下述中的 a-g 中的任一对:

- a. SEQ ID NO.41 和 SEQ ID NO.42 所示的核苷酸序列;
- b. SEQ ID NO.43 和 SEQ ID NO.44 所示的核苷酸序列;
- c. SEQ ID NO.45 和 SEQ ID NO.46 所示的核苷酸序列;
- d. SEQ ID NO.47 和 SEQ ID NO.48 所示的核苷酸序列;
- e. SEQ ID NO.49 和 SEQ ID NO.50 所示的核苷酸序列;
- f. SEQ ID NO.51 和 SEQ ID NO.52 所示的核苷酸序列;
- g. SEQ ID NO.53 和 SEQ ID NO.54 所示的核苷酸序列。

进一步的,优选 a.SEQ ID NO.41 和 SEQ ID NO.42 所示的核苷酸序列。

本发明的第二目的在于提供上述 siRNA 在制备消除或减轻肿瘤的免疫逃脱机制药物中的应用。

本发明的第三目的在于提供一种包含上述 siRNA 的重组表达载体。

进一步的,所述表达载体为慢病毒表达载体、逆转录病毒表达载体、腺病毒表达载体、腺相关病毒表达载体或质粒;优选的,包含上述 siRNA 的慢病毒表达载体。

进一步的,所述的慢病毒表达载体包括:用于质粒复制的原核复制子 pUC Ori 序列,如 SEQ ID NO.2 所示;用于目的菌株大量扩增的含氨苄青霉素抗性基因 AmpR 序列,如 SEQ ID NO.1 所示;用于增强真核细胞内的复制的病毒复制子 SV40 Ori 序列,如 SEQ ID NO.3 所示;用于慢病毒包装的慢病毒包装顺式元件;用于真核细胞表达绿色荧光的 ZsGreen1 绿色荧光蛋白,如 SEQ ID NO.11 所示;用于共同转录表达蛋白质的 IRES 核糖体结合序列,如 SEQ ID NO.12 所示;用于嵌合抗原受体基因的真核转录的人 EF1 α 启动子,如 SEQ ID NO.15 所示;用于组成集识别、传递、启动于一体的二代 CAR 或三代 CAR 的抗 BCMA 嵌合抗原受体的编码基因;用于增强转基因的表达效率的 eWPRE 增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件,如 SEQ ID NO.13 所示;用于胞内转录 siRNA 的人 RNA 聚合酶 III 启动子 hU6,如 SEQ ID NO.14 所示。

进一步的,所述慢病毒包装顺式元件采用第二代慢病毒载体包括:如 SEQ ID NO.5 所示的慢病毒 5 terminal LTR、如 SEQ ID NO.6 所示的慢病毒 3 terminal Self-Inactivating LTR、如 SEQ ID NO.7 所示的 Gag 顺式元件、如 SEQ ID NO.8 所示的 RRE 顺式元件、如 SEQ ID NO.9 所示的 env 顺式元件、如 SEQ ID NO.10 所示的 cPPT 顺式元件。

进一步的,所述慢病毒包装顺式元件采用第三代慢病毒载体包括:如 SEQ ID NO.5 所示的慢病毒 5 terminal LTR、如 SEQ ID NO.6 所示的慢病毒 3 terminal Self-Inactivating LTR、如 SEQ ID NO.7 所示的 Gag 顺式元件、如 SEQ ID NO.8 所示的 RRE 顺式元件、如 SEQ ID NO.9 所示的 env

顺式元件、如 SEQ ID NO.10 所示的 cPPT 顺式元件所述慢病毒包装顺式元件, 以及如 SEQ ID NO.4 所示的 RSV 启动子。

进一步的, 所述 eWPRE 增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件有 6 个核苷酸的增强突变, 具体为: g.396G>A、g.397C>T、g.398T>C、g.399G>A、g.400A>T、g.411A>T。

进一步的, 所述抗 BCMA 嵌合抗原受体 (二代 CAR), 包括依次串联的如 SEQ ID NO.16 所示的 CD8 leader 嵌合受体信号肽、如 SEQ ID NO.17 所示的 BCMA 单链抗体轻链 VL、如 SEQ ID NO.18 所示的 Optimal Linker C、如 SEQ ID NO.19 所示的 BCMA 单链抗体重链 VH、如 SEQ ID NO.20 所示的 CD8 Hinge 嵌合受体铰链、如 SEQ ID NO.21 所示的 CD8 Transmembrane 嵌合受体跨膜区、如 SEQ ID NO.22 所示的 CD137 嵌合受体共刺激因子, 以及如 SEQ ID NO.23 所示的 TCR 嵌合受体 T 细胞激活域。

进一步的, 所述抗 BCMA 嵌合抗原受体 (三代 CAR), 包括依次串联的如 SEQ ID NO.16 所示的 CD8 leader 嵌合受体信号肽、如 SEQ ID NO.17 所示的 BCMA 单链抗体轻链 VL、如 SEQ ID NO.18 所示的 Optimal Linker C、如 SEQ ID NO.19 所示的 BCMA 单链抗体重链 VH、如 SEQ ID NO.20 所示的 CD8 Hinge 嵌合受体铰链、如 SEQ ID NO.21 所示的 CD8 Transmembrane 嵌合受体跨膜区、如 SEQ ID NO.24 所示的 CD28 嵌合受体共刺激因子、如 SEQ ID NO.22 所示的 CD137 嵌合受体共刺激因子以及如 SEQ ID NO.23 所示的 TCR 嵌合受体 T 细胞激活域。

本发明的第四目的在于提供一种包含上述 siRNA 的慢病毒表达载体的构建方法, 包括以下步骤:

(1) 将含氨苄青霉素抗性基因 AmpR 序列 (如 SEQ ID NO.1 所示)、原核复制子 pUC Ori 序列 (如 SEQ ID NO.2 所示)、病毒复制子 SV40 Ori 序列 (如 SEQ ID NO.3 所示)、用于慢病毒包装的慢病毒包装顺式元件、ZsGreen1 绿色荧光蛋白 (如 SEQ ID NO.11 所示)、IRES 核糖体结合序列 (如 SEQ ID NO.12 所示)、eWPRE 增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件 (如 SEQ ID NO.13 所示)、人 RNA 聚合酶 III 启动子 hU6 (如 SEQ ID NO.14 所示) 存储于慢病毒骨架质粒 (pLenti-3G silencer) 上;

(2) 将人 EF1 α 启动子 (如 SEQ ID NO.15 所示)、用于组成集识别、传递、启动于一体的二代 CAR 或三代 CAR 的抗 BCMA 嵌合抗原受体组合成二代 CAR 或三代 CAR 设计方案, 经过酶切、连接、重组反应克隆至慢病毒骨架质粒中, 得到二代 CAR 或三代 CAR 设计的重组慢病毒质粒 pCARbcma-silencer;

(3) 将上述 siRNA 以及如 SEQ ID NO.55 和 SEQ ID NO.56 所示的 negative control 序列, 分别克隆至步骤 (2) 所得的重组慢病毒质粒中, 得到 PD-1 敲减重组慢病毒质粒 (pCARbcma-1453~pCARbcma-1459 和 negative control pCARbcma-1460);

(4) 将步骤 (3) 得到的重组慢病毒质粒 (pCARbcma-1453~pCARbcma-1460) 分别与慢病毒包装质粒 pPac-GP、pPac-R 以及膜蛋白质粒 pEnv-G 共同转染 HEK293T/17 细胞, 在 HEK293T/17 细胞中进行基因转录表达后, 包装成功重组慢病毒载体释放到细胞培养上清中, 收集包含的重组慢病毒载体的上清液;

(5) 将得到的重组慢病毒上清采用抽滤、吸附、洗脱的离子交换方式进行纯化, 分别得到重组慢病毒载体。

进一步的, 步骤 (1) 中, 所述慢病毒包装顺式元件采用第二代慢病毒载体包括: 如 SEQ ID NO.5 所示的慢病毒 5 terminal LTR、如 SEQ ID NO.6 所示的慢病毒 3 terminal Self-Inactivating LTR、如 SEQ ID NO.7 所示的 Gag 顺式元件、如 SEQ ID NO.8 所示的 RRE 顺式元件、如 SEQ ID NO.9 所示的 env 顺式元件、如 SEQ ID NO.10 所示的 cPPT 顺式元件; 所述慢病毒包装顺式元件采用第三代慢病毒载体包括: 如 SEQ ID NO.5 所示的慢病毒 5 terminal LTR、如 SEQ ID NO.6 所示的慢病毒 3 terminal Self-Inactivating LTR、如 SEQ ID NO.7 所示的 Gag 顺式元件、如 SEQ ID NO.8 所

示的 RRE 顺式元件、如 SEQ ID NO.9 所示的 env 顺式元件、如 SEQ ID NO.10 所示的 cPPT 顺式元件所述慢病毒包装顺式元件，以及如 SEQ ID NO.4 所示的 RSV 启动子。

进一步的，步骤（2）中，所述用于组成集识别、传递、启动于一体的二代 CAR 的所述抗 BCMA 嵌合抗原受体，包括依次串联的如 SEQ ID NO.16 所示的 CD8 leader 嵌合受体信号肽、如 SEQ ID NO.17 所示的 BCMA 单链抗体轻链 VL、如 SEQ ID NO.18 所示的 Optimal Linker C、如 SEQ ID NO.19 所示的 BCMA 单链抗体重链 VH、如 SEQ ID NO.20 所示的 CD8 Hinge 嵌合受体铰链、如 SEQ ID NO.21 所示的 CD8 Transmembrane 嵌合受体跨膜区、如 SEQ ID NO.22 所示的 CD137 嵌合受体共刺激因子，以及如 SEQ ID NO.23 所示的 TCR 嵌合受体 T 细胞激活域；所述用于组成集识别、传递、启动于一体的三代 CAR 的抗 BCMA 嵌合抗原受体，包括依次串联的如 SEQ ID NO.16 所示的 CD8 leader 嵌合受体信号肽、如 SEQ ID NO.17 所示的 BCMA 单链抗体轻链 VL、如 SEQ ID NO.18 所示的 Optimal Linker C、如 SEQ ID NO.19 所示的 BCMA 单链抗体重链 VH、如 SEQ ID NO.20 所示的 CD8 Hinge 嵌合受体铰链、如 SEQ ID NO.21 所示的 CD8 Transmembrane 嵌合受体跨膜区、如 SEQ ID NO.24 所示的 CD28 嵌合受体共刺激因子、如 SEQ ID NO.22 所示的 CD137 嵌合受体共刺激因子以及如 SEQ ID NO.23 所示的 TCR 嵌合受体 T 细胞激活域。

进一步的，步骤（1）中，所述 eWPRE 增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件有 6 个核苷酸的增强突变，具体为：g.396G>A、g.397C>T、g.398T>C、g.399G>A、g.400A>T、g.411A>T。

进一步的，步骤（2）中，由人 EF1 α 启动子启动整个 CAR 基因表达；CD8 leader 嵌合受体信号肽位于 CAR 编码序列的 N 端，用于引导 CAR 蛋白定位于细胞膜；CD19 单链抗体轻链 VL、Optimal Linker C、CD19 单链抗体重链 VH 组合成 scFv 区域，用于识别 CD19 抗原；CD8 Hinge 嵌合受体铰链用于将 scFv 锚定于细胞膜外侧；CD8 Transmembrane 嵌合受体跨膜区用于将整个嵌合受体固定于细胞膜上；CD137 嵌合受体共刺激因子用于刺激 T 细胞增殖和细胞因子分泌；TCR 嵌合受体 T 细胞激活域用于激活下游信号通路的表达；当 scFv 区域与 CD20 抗原结合时，信号通过嵌合受体传递至细胞内，从而产生包括 T 细胞增殖、细胞因子分泌增加、抗细胞凋亡蛋白分泌增加、细胞死亡延迟、裂解靶细胞的一系列生物学效应。

进一步的，步骤（4）中，所述慢病毒载体有带荧光标签 zsGreen1 的版本和不带荧光标签 zsGreen1 版本，带荧光标签的版本用于体外实验，不带荧光标签的版本用于临床实验。

进一步的，步骤（5）中，所述抽滤步骤控制上清体积在 200ml~2000ml，真空度控制在 -0.5MPa~-0.9MPa，防止由于堵孔带来的载体损失；所述吸附步骤控制溶液的 PH 值在 6~8，防止 PH 的变化导致载体失活；所述洗脱步骤控制洗脱液的离子强度在 0.5M~1.0M，防止离子强度的变化导致洗脱不完全或者载体失活。

本发明的第五目的在于提供包含上述 siRNA 的重组表达载体在制备 CAR-T 治疗肿瘤过程中消除或减轻肿瘤免疫逃脱机制药物中的应用。

本发明的第六目的在于提供一种 CART 细胞，所述的 CAR-T 细胞是由上述 siRNA 修饰的 T 淋巴细胞。

本发明的再一目的在于提供上述 CAR-T 细胞在制备治疗多发性骨髓瘤、胰腺癌、脑胶质瘤、骨髓瘤药物中的应用。

这种干扰效应可以持续很久，而且在细胞分裂后仍然有效。并且，RNAi 具有非常好的序列特异性【Kisielow, M. et al. (2002) Isoform-specific knockdown and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA, J. of Biochemistry 363: 1-5】。因此，RNAi 系统可以特异性敲减一种类型的转录本，而不影响序列相近的其它 mRNA。这些特性使 siRNA 系统在抑制基因表达、基因功能研究和药物靶点验证方面表现出潜力和价值。此外，siRNA 系统可以用来治疗相关疾病，包括（1）基因过表达或错误表达引起的疾病；（2）的基因突变引起的疾病。

本发明是将人 RNA 聚合酶 III 启动子 hU6、人 EF1 α 启动子、CD8 leader 嵌合受体信号肽、BCMA 单链抗体轻链 VL、Optimal Linker C、BCMA 单链抗体重链 VH、CD8 Hinge 嵌合受体较

链、CD8 Transmembrane 嵌合受体跨膜区、CD137 嵌合受体共刺激因子、TCR 嵌合受体 T 细胞激活域构建进入重组慢病毒载体，由人 EF1 α 启动子启动整个 CAR 基因表达。CAR 蛋白定位于细胞膜表面，识别 BCMA 抗原，刺激 T 细胞增殖和细胞因子分泌，激活下游信号通路的表达。当 scfv 区域与 BCMA 抗原结合时，信号通过嵌合受体传递至细胞内，从而产生 T 细胞增殖、细胞因子分泌增加、抗细胞凋亡蛋白分泌增加、细胞死亡延迟、裂解靶细胞等一系列生物学效应。由人 RNA 聚合酶 III 启动子 hU6 启动 PD1siRNA 的表达，通过 RISC complex 的作用，降解 PD-1 mRNA，抑制 PD-1 的蛋白质合成，阻断 PD1 的与 PDL1 的结合，从而阻断 PD1/PDL1 的信号通路，达到抑制免疫逃脱的效果。

本发明所采用的表达载体包括原核复制子 (pUC ori) 用于质粒复制；原核筛选标记 (AmpR) 用于目的菌株大量扩增；病毒复制子 (SV40 Ori) 用于增强真核细胞内的复制；慢病毒包装顺式元件 (RSV、5 terminal LTR、3 terminal Self-Inactivating LTR、Gag、RRE、env、cPPT) 用于慢病毒包装；人 RNA 聚合酶 III 启动子 (hU6) 用于胞内转录 siRNA；真核荧光标签蛋白 (ZsGreen1) 用于真核细胞表达绿色荧光；共表达元件 (IRES) 用于共同转录表达蛋白质；真核启动子 (EF1 α) 用于嵌合抗原受体基因的真核转录；嵌合抗原受体 (CD8 leader、BCMA VL、Optimal Linker C、BCMA VH、CD8 Hinge、CD8 Transmembrane、CD28 (SEQ ID NO.24)、CD137、TCR) 用于组成集识别、传递、启动于一体的二代和三代 CAR；转录后调控元件 (eWPRES) 用于增强转基因的表达效率。

本发明涉及含肽的医药配置品，具体涉及：

一、人 RNA 聚合酶 III 启动子 hU6、含氨苄青霉素抗性基因 AmpR 序列、原核复制子 pUC Ori 序列、病毒复制子 SV40 Ori 序列、RSV 启动子、人 EF1 α 启动子、慢病毒 5 terminal LTR、慢病毒 3 terminal Self-Inactivating LTR、Gag 顺式元件、RRE 顺式元件、env 顺式元件、cPPT 顺式元件、IRES 核糖体结合序列、ZsGreen1 绿色荧光蛋白、WPRES 土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件的重组慢病毒载体骨架，这种重组慢病毒载体骨架可以搭载不同的治疗性基因并广泛的用于过继性细胞治疗领域，搭载不同的 siRNA 并广泛的用于基因过表达、错误表达和基因突变引起的疾病。

二、重组慢病毒载体骨架、PD1-siRNA、CD8 leader 嵌合受体信号肽、BCMA 单链抗体轻链 VL、单链抗体较链 Linker C、BCMA 单链抗体重链 VH、CD8 Hinge 嵌合受体较链、CD8 Transmembrane 嵌合受体跨膜区、CD28 嵌合受体共刺激因子、CD137 嵌合受体共刺激因子、TCR 嵌合受体 T 细胞激活域构建形成重组慢病毒载体，该方法得到的重组慢病毒载体可以实现人 T 淋巴细胞上表达 BCMA 嵌合抗原受体，引导并激活 T 淋巴细胞对 BCMA 阳性细胞的杀伤作用，在临床上用于治疗多发性骨髓瘤 (MM)。在人 T 淋巴细胞内表达程序性死亡受体 1 (PD-1) 的 siRNA，有效降低 T 细胞表面程序性死亡受体 1 的表达水平，阻断 PD-1/PD-L1 免疫负调节信号通路，临床上可用于抑制肿瘤的免疫逃脱，提高 CAR-T 细胞免疫治疗的疗效。

本发明所采用的是针对 PD-1 的 siRNA 基因沉默技术，自从 20 世纪 90 年代以来，研究人员发现双链 RNA (“dsRNA”) 可以用来抑制蛋白表达。这种沉默基因的能力在治疗人类疾病方面具有具有广泛的潜力，和许多研究人员和商业实体目前投入相当大的资源在发展中基于这种技术的治疗方法。

从机制的角度来看，当 dsRNA 进入植物和无脊椎动物细胞后，被 III 型核酸内切酶 Dicer 分解成 siRNA。【Sharp, RNA interference-2001, Genes Dev.2001, 15:485】。III 型核糖核酸酶 Dicer，将 dsRNA 分解成带有 2 碱基凸出 3' 粘性末端的 19-23bp 的 siRNA。【Bernstein, Caudy, Hammond, & Hannon, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference, Nature 2001, 409:363】。siRNA 与 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC) 整合，复合体中一个或多个解旋酶解开双链 siRNA，使互补反义链引导靶点识别。【Nykanen, Haley, & Zamore, ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway, Cell 2001, 107:309】。在结合相应的目标 mRNA 后，RISC 复合物中的一个或多个核酸内切酶切割目标 mRNA 引起 mRNA 沉默。【Elbashir,

Elbashir, Lendeckel, & Tuschl, RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs, Genes Dev 2001, 15:188】。

本发明设计的 PD1siRNA 序列含有 21 个 bp 的核苷酸，采用 N2[CG]N8[AU]N8[AU]N2 的寡核苷酸排列模式，互补序列之间采用 stem-loop 的发卡结构，通过 siRNA pattern、GC percentage、T or A or G in a row、consecutiver GC、3'end nt pattern、thermodynamic value、siRNA target、identity、alignment 等条件的筛选，大大提高 siRNA 设计的干扰成功率。

本发明所采用的人 RNA 聚合酶 III 启动子 hU6 转录 PD1siRNA，抑制 PD-1 表达的系统，在 T 细胞杀伤实验中，经过 QPCR 检测，能有效抑制 PD-1 mRNA 的转录水平，能有效减少 T 细胞表面 PD-1 受体的表达量，从而阻断 PD-1/PDL-1 的信号通路，达到抑制免疫逃脱的效果；将来可以应用于临床，抑制 CAR-T 细胞内的 PD-1 表达水平，增强 CAR-T 细胞在体内对肿瘤的杀伤效果。

本发明采用慢病毒载体方式递送 siRNA(如图 2 所示)。首先，节约了成本，避免 PD1siRNA 体外合成的昂贵费用。其次，避免了 PD1siRNA 的在体递送效率低的问题。第三，使用人 RNA 聚合酶 III 启动子 hU6 表达 PD1siRNA，能够有效利用细胞内的 RNA 转录体系，大量表达出相应的 PD1siRNA，经过一系列的酶促作用，达到良好的基因沉默效果。

本发明所采用的载体骨架为第三代慢病毒载体（如图 3A 所示），3' SIN LTR 去除了 U3 区域，消除了慢病毒载体自我复制的可能性，大大提高了安全性；增加了 cPPT 和 WPRE 元件，提高了转导效率和转基因的表达效率；采用 RSV 启动子保证了慢病毒载体包装时核心 RNA 的持续高效转录；采用人自身的 EF1 α 启动子，使 CAR 基因能够在人体内长时间持续表达。

本发明所采用的 siRNA 敲减方案，同样可以应用于第三代 CAR 设计方案。第三代 CAR 设计与第二代设计相比，增加了 CD28 嵌合受体共刺激因子（SEQ ID NO.24）。

本发明所采用的慢病毒载体柱纯化系统（如图 8 所示），系本公司开发出的慢病毒规模化生产工艺。常用的超速离心法或者高速离心法，是利用离心沉降原理分离慢病毒颗粒，不可避免的会残留很多沉降系数相近的杂质，对后续实验带来不利影响。并且，装管过程复杂、操作繁琐、多次转换容器带来更多的污染机会。而本发明的慢病毒载体柱纯化工艺为半自动化操作，全部过程在百级实验区域完成，避免人工操作的繁琐和污染几率，所回收的慢病毒载体在内毒素、支原体等指标上完全达到临床标准。后续可跟进开发全自动纯化仪。

本发明所采用 CAR 设计方案也可以应用于第二代慢病毒载体结构上。第二代和第三代慢病毒载体在结构上的区别（如图 3B 所示），主要是第三代慢病毒载体把第二代载体 5'LTR 的 U3 区域替换为 RSV 启动子，这样就消除了 U3 转录时对 Tat 蛋白的依赖，既可以在慢病毒的结构基因里去除 Tat 序列，也提高了慢病毒基因组转录水平和转录持续性。第二代和第三代慢病毒载体主要是基因组转录方式的区别，因此本发明所采用 CAR 设计方案可以应用于这两代慢病毒载体。

本发明的第三代慢病毒骨架质粒，采用 enhancedWPRE 元件，与宾州大学 Carl H. June 等人（Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptormodified T cells in chronic lymphoid leukemia.N Engl J Med 2011;365:725-33.）所采用的 WPRE 元件相比，有 6 个核苷酸的增强突变（g.396G>A、g.397C>T、g.398T>C、g.399G>A、g.400A>T、g.411A>T），能够增强初级转录产物的多聚腺苷化，增加细胞内 mRNA 的含量，增强转基因的表达效率。

本发明的 Lentival 包装系统是无辅助病毒的四质粒包装系统，通过四种质粒共同转染至 HEK293T/17 细胞中，产生重组慢病毒载体。重组后的慢病毒载体是复制缺陷型载体，能将外源片段整合入宿主基因，一次性使用，无法复制和增殖，安全性有很大提高。

本发明采用的慢病毒载体有带荧光标签 zsGreen1 的版本和不带荧光标签 zsGreen1 版本，带荧光标签的版本用于体外实验，不带荧光标签的版本用于临床实验。

本发明采用的 scfv 段的 Linker 设计，能够显著提高细胞因子的分泌、CAR-T 细胞的体外杀伤作用以及临床治疗效果。

可见，本发明所述的重组慢病毒载体在给多发性骨髓瘤(MM)的 CAR-T 治疗提供可靠转基因

保障的同时,可以阻断肿瘤的免疫逃脱机制,提高 CAR-T 细胞治疗的疗效,大大降低患者承担的医疗成本。

本发明所述的 PD-1 敲减 siRNA 表达框及其 siRNA 表达产物,不仅可以应用于 CAR-T 治疗多发性骨髓瘤(MM)中用于消除或减轻肿瘤的免疫逃脱机制,还可应用于抑制 CAR-T 治疗诸如胰腺癌、脑胶质瘤、骨髓瘤等等类型肿瘤时的免疫逃脱机制。

附图说明

图 1 是本发明的 PD-1/PD-L1 信号通路;

图 2 是本发明的慢病毒递送 PD1siRNA 的方式示意图;

图 3 是本发明的慢病毒载体结构示意图;其中,图 3 (A) 是本发明采用的第三代慢病毒载体结构示意图,图 3 (B) 是第二代和第三代慢病毒载体结构比较;

图 4 是本发明的重组慢病毒载体的构建流程图;其中,(A) 图是慢病毒骨架质粒 pLenti-3G silencer 的结构示意图;(B) 图是 pCARbcma-silencer 质粒的结构示意图;(C) 图是 pCARbcma-1453~pCARbcma-1460 质粒的示意图;(D) 图是慢病毒包装质粒 pPac-GP 的结构示意图;(E) 图是慢病毒包装质粒 pPac-R 的结构示意图;(F) 图是膜蛋白 pEnv-G 的结构示意图;

图 5 是慢病毒骨架质粒 pLenti-3G silencer 的酶切预测及酶切琼脂糖凝胶电泳图;其中,图 5A 是慢病毒骨架质粒 pLenti-3G silencer 的酶切预测示意图,其中, lane1 是 1kb DNA ladder Marker: 条带从上到下依次为: 10kb、8kb、6kb、5 kb、4kb、3.5kb、3kb、2.5kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bp; lane2 是 pLenti-3G silencer 的 Cla I+BamH I 酶切预测: 条带从上到下依次为: 7381bp、23bp; 图 5B 是慢病毒骨架质粒 pLenti-3G silencer 的酶切琼脂糖凝胶电泳图,其中, lane1 是 1kb DNA ladder Marker 的电泳结果; lane2 是 pLenti-3G silencer 的 Cla I+BamH I 酶切电泳结果;

图 6 是重组慢病毒质粒 pCARbcma-silencer 的酶切预测及酶切琼脂糖凝胶电泳图;其中,图 6A 是重组慢病毒质粒 pCARbcma-silencer 的酶切预测示意图,其中, lane1 是 1kb DNA ladder Marker: 条带从上到下依次为: 10kb、8kb、6kb、5 kb、4kb、3.5kb、3kb、2.5kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bp; lane2 是 pCARbcma-silencer 的 Pvu I 酶切预测: 条带从上到下依次为: 8898bp、896bp、249bp; 图 6B 是重组慢病毒质粒 pCARbcma-silencer 的酶切琼脂糖凝胶电泳图,其中, lane1 是 1kb DNA ladder Marker 的电泳结果; lane2 是 pCARbcma-silencer 的 Pvu I 酶切电泳结果;

图 7 是 PD-1 敲减重组慢病毒质粒 pCARbcma-1453~pCARbcma-1460 的测序比对结果;其中, A 是 pCARbcma-1453 的测序比对结果; B 是 pCARbcma-1454 的测序比对结果; C 是 pCARbcma-1455 的测序比对结果; D 是 pCARbcma-1456 的测序比对结果; E 是 pCARbcma-1457 的测序比对结果; F 是 pCARbcma-1458 的测序比对结果; G 是 pCARbcma-1459 的测序比对结果; H 是 pCARbcma-1460 的测序比对结果;

图 8 是离子交换色谱法纯化重组慢病毒载体的流程图;

图 9 是重组慢病毒载体的滴度检测结果;

图 10 是重组慢病毒载体的不同纯化方式的支原体检测结果, lane1 为 DL2000 marker, 从上到下条带条带从上到下依次为: 2kb、1kb、750 bp、500 bp、250 bp、100bp;

lane2 为阳性对照; lane3 为阴性对照; lane4 为 PBS; lane5 为水; lane6 为 lvCARbcma-1453;

lane7 为 lvCARbcma-1454; lane8 为 lvCARbcma-1455; lane9 为 lvCARbcma-1456; lane10 为 lvCARbcma-1457; lane11 为 lvCARbcma-1458; lane12 为 lvCARbcma-1459; lane13 为 lvCARbcma-1460;

图 11 为 mRNA 相对表达量的柱状图;

图 12 为 CAR 蛋白表达量的 WB 检测图;其中,图 12A, lane1 为 PBMC 空细胞, lane2 为对照病毒 MOCK, lane3 为 lvCARbcma-1453, lane4 为 lvCARbcma-1454, lane5 为 lvCARbcma-1455, lane6 为 lvCARbcma-1456, lane7 为 lvCARbcma-1457, lane8 为 lvCARbcma-1458, lane9 为 lvCARbcma-1459, lane10 为 lvCARbcma-1460; 图 12B, 是 beta-actin 内参条带;

图 13 为 PD-1 敲减重组慢病毒 lvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460 转导的 CAR-T 细胞,与靶细胞孵育 24h 后, RT-QPCR 检测 PD-1 的 mRNA 转录水平;

图 14 为不同效应细胞分别与靶细胞以 10:1 的比例共培养条件下, 24h 后检测对靶细胞的杀伤情况, E 为效应细胞, T 为靶细胞。

具体实施方式

以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1 构建重组慢病毒载体

一、材料

1、慢病毒骨架质粒 pLenti-3G silencer, 慢病毒包装质粒 pPac-GP、pPac-R 以及膜蛋白质粒 pEnv-G, HEK293T/17 细胞、同源重组酶、Oligo Annealing Buffer 由世翱(上海)生物医药科技有限公司提供;

2、引物: 根据引物设计原则设计扩增 DNA 片段和靶位点所需的引物, 该引物由上海生物公司合成, 具体为:

EF1 α -F: 5'-ATTCAAAATTTTATCGATGCTCCGGTGCCCGTCAGT-3' (SEQ ID NO.25)

EF1 α -R: 5'-TCACGACACCTGAAATGGAAGA-3' (SEQ ID NO.26)

CD8 leader-F: 5'-GGTGTCGTGAGGATCCGCCACCATGGCCTTACCAGTGACCGC-3' (SEQ ID NO.27)

CD8 leader-R: 5'-GTGTCATCTGGATGTCCGGCCTGGCGGCGTG-3' (SEQ ID NO.28)

VL-F: 5'-CACGCCGCCAGGCCGGACATCCAGATGACCCAGAGCC-3' (SEQ ID NO.29)

VL-R: 5'-ACGCTTGATCTCCAGTTTGGT-3' (SEQ ID NO.30)

OLC-VH-F: 5'-ACTGGAGATCAAGCGTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCCG GTGGCGGCGGATCTCAGGTGCAGCTGGTCCAGAG-3' (SEQ ID NO.31)

VH-R: 5'-GCTGGACACGGTCACTAGTGTG-3' (SEQ ID NO.32)

CD8 Hinge-F: 5'-AGTGACCGTGTCCAGCACACGACGCCAGCGCC-3' (SEQ ID NO.33)

CD8 Hinge-R: 5'-GTAGATATCACAGGCGAAGTCCA-3' (SEQ ID NO.34)

CD8 Transmembrane-F: 5'-CGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGC-3' (SEQ ID NO.35)

CD8 Transmembrane-R: 5'-TCTTTCTGCCCCGTTTGCAGTAAAGGGTGATAACCAGTG-3' (SEQ ID NO.36)

CD137-F: 5'-AAACGGGGCAGAAAGAAACTC-3' (SEQ ID NO.37)

CD137-R: 5'-TGCTGAACTTCACTCTCAGTTCACATCCTCCTTCTTCTTC-3' (SEQ ID NO.38)

TCR-F: 5'-AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCG-3' (SEQ ID NO.39)

TCR-R: 5'-GGAGAGGGGCGTCGACTTAGCGAGGGGGCAGGGC-3' (SEQ ID NO.40)

siRNA1453-F: 5'-CCGGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCTCGAGTCATGCGGTACCA GTTAGCATTTTTTG-3' (SEQ ID NO.41)

siRNA1453-R: 5'-AATTCAAAAAATGCTAAACTGGTACCGCATGACTCGAGGCTCATGC GGTACCA GTTTAG-3' (SEQ ID NO.42)

siRNA1454-F: 5'-CCGGCATTGTCTTTCCTAGCGGAATCTCGAGTCCGCTAGGAAAGAC AATGGTTTTTTG-3' (SEQ ID NO.43)

siRNA1454-R: 5'-AATTCAAAAAAACCATTGTCTTTCCTAGCGGACTCGAGATTCCGCT AGGAAAGACAATG-3' (SEQ ID NO.44)

siRNA1455-F: 5'-CCGGAGGCGCAGATCAAAGAGAGTTCTCGAGCTCTCTTTGATCTGC GCCTTGTTTTTTG-3' (SEQ ID NO.45)

siRNA1455-R: 5'- AATTCAAAAAACAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCTCGAGAACTCTC
TTTGATCTGCGCCT -3'(SEQ ID NO.46)

siRNA1456-F: 5'- CCGGCCCTGTGGTTCTATTATATTACTCGAGATATAATAGAACCACAG
GGAATTTTTTG -3'(SEQ ID NO.47)

siRNA1456-R: 5'- AATTCAAAAAATCCCTGTGGTTCTATTATATCTCGAGTAATATAATA
GAACCACAGGG -3'(SEQ ID NO.48)

siRNA1457-F: 5'- CCGGGGAACCCATTCTGAAATTATCTCGAGAATTCAGGAATGGGT
CCAATTTTTTG -3'(SEQ ID NO.49)

siRNA1457-R: 5'- AATTCAAAAAATTGGAACCCATTCTGAAATTCTCGAGATAATTTCA
GGAATGGGTTCC -3'(SEQ ID NO.50)

siRNA1458-F: 5'- CCGGCAGGCCTAGAGAAGTTTCAGGCTCGAGTGAACTTCTCTAGG
CCTGCATTTTTTG -3'(SEQ ID NO.51)

siRNA1458-R: 5'- AATTCAAAAAATGCAGGCCTAGAGAAGTTTCACTCGAGCCTGAAA
CTTCTCTAGGCCTG -3'(SEQ ID NO.52)

siRNA1459-F: 5'- CCGGCAGGACTCATGTCTCAATGCCCTCGAGCATTGAGACATGAGT
CCTGTGTTTTTTG -3'(SEQ ID NO.53)

siRNA1459-R: 5'- AATTCAAAAAACACAGGACTCATGTCTCAATGCTCGAGGGCATTGA
GACATGAGTCCTG -3'(SEQ ID NO.54)

siRNA1460-F: 5'- CCGGTTCTCCGAACGTGTCACGTCTCGAGACGTGACACGTTCCGGAG
AATTTTTTG -3'(SEQ ID NO.55)

siRNA1460-R: 5'- AATTCAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTCTCGAGACGTGACACG
TTCGGAGAA -3'(SEQ ID NO.56)

PD-1-QPCR-F: 5'- TGCAGCTTCTCCAACACAT -3'(SEQ ID NO.57)

PD-1-QPCR-R: 5'- CTTGTCCGTCTGGTTGCT -3'(SEQ ID NO.58)

WPRE-QPCR-F: 5'-CCTTTCCGGGACTTTTCGCTTT-3'(SEQ ID NO.59)

WPRE-QPCR-R: 5'-GCAGAATCCAGGTGGCAACA-3'(SEQ ID NO.60)

Actin-QPCR-F: 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'(SEQ ID NO.61)

Actin-QPCR-R: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'(SEQ ID NO.62)

CAR-QPCR-F: 5'-GACTTGTGGGGTCCTTCTCCT-3'(SEQ ID NO.63)

CAR-QPCR-R: 5'-GCAGCTACAGCCATCTTCCTC-3'(SEQ ID NO.64)

3、SEQ ID NO.15~SEQ ID NO.64 所示的 DNA 序列由上海捷瑞生物工程有限公司合成，并以寡核苷酸干粉或者质粒形式保存；

4、工具酶 BspE I、EcoR I、BamH I、Pvu I、Cla I、T4 DNA 连接酶均购自 NEB 公司；

5、高保真酶 PrimeSTAR、RN 购自 Takara 公司；

6、0.22μm-0.8μm PES 滤器购自 millipore 公司；

7、质粒抽提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自 MN 公司；

8、感受态细胞 TOP10 购自 tiangen 公司；

9、NaCl、KCl、Na₂HPO₄·12H₂O、KH₂PO₄、Trypsin、EDTA、CaCl₂、NaOH、PEG6000 均购自上海生工；

10、Opti-MEM、FBS、DMEM、1640、Pen-Srep、Hepes、购自 invitrogen 公司；

11、Biotinylated protein L 购自 GeneScript 公司；

12、辣根过氧化物酶标记的二抗、DAB 工作液均购自北京中杉金桥；

13、ECL+plusTM Western blotting system 购自 Amersham 公司；

14、DNeasy 试剂盒购自上海捷瑞公司；

15、淋巴细胞分离液购自深圳达科为公司；

16、SA-HRP 购自上海翊圣公司；

17、支原体检测试剂盒、内毒素检测试剂盒、BCMA-K562、BCMA-PDL1-K562 细胞株购自世翱（上海）公司；

18、LDH 检测试剂盒购自 promega 公司。

二、重组慢病毒载体 lvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460 的构建方法

参见图 4，本发明所述重组慢病毒载体的构建方法如下：

1、将人 EF1 α 启动子、CD8 leader 嵌合受体信号肽、BCMA 单链抗体轻链 VL、Optimal Linker C、BCMA 单链抗体重链 VH、CD8 Hinge 嵌合受体铰链、CD8 Transmembrane 嵌合受体跨膜区、CD137 嵌合受体共刺激因子、TCR 嵌合受体 T 细胞激活域片段克隆至慢病毒骨架质粒 pLenti-3G silencer，得到重组慢病毒质粒 pCARbcma-silencer，再将 siRNA 片段分别连接到 pCARbcma-silencer 中，得到 PD-1 敲减重组慢病毒质粒 pCARbcma-1453~ pCARbcma-1460。

（1）将慢病毒骨架质粒 pLenti-3G silencer 使用 Cla I 和 BamH I 限制性内切酶进行双酶切，产物经过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳，确认 7381bp 的片段 V1（图 5 所示），并割胶回收置于 Eppendorf 管内，用 MN 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段（见表 1），并测定产物的纯度和浓度；

1、溶胶	按 200 μ l NTI/100 mg gel 比例加入溶胶液，50℃水浴放置 5-10 分钟。
2、结合 DNA	11000g 离心 30 秒，弃去滤液。
3、洗膜	加入 700 μ l NT3，11000g 离心 30 秒，弃去滤液。
4、洗膜	重复第三步一次
5、晾干	11000g 离心 1 分钟，换新的收集管，室温放置 1 分钟。
6、洗脱 DNA	加入 15-30 μ l NE，室温放置 1 分钟，11000g 离心 1 分钟，收集滤液。

表 1 琼脂糖凝胶回收步骤

（2）用引物 EF1 α -F 和 EF1 α -R 以合成的 SEQ ID NO.15 为模板，使用表 2 中的体系，PCR 循环条件为：98℃ 3min，（98℃ 10sec，55℃ 15sec，72℃ 2min）*35cycle，72℃ 10min。产物经过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳，确认 1208bp 的片段 a，并割胶回收置于 Eppendorf 管内，用 MN 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段（见表 1），并测定产物的纯度和浓度；

试剂	体积（ μ l）
H ₂ O	32.5
5×Buffer（with Mg ²⁺ ）	10
dNTP（各 2.5mM）	4
Primer1（+）（10 μ M）	1
Primer2（-）（10 μ M）	1
Template	1
PrimeSTAR	0.5

表 2 50 μ l PCR 反应体系

（3）用引物 CD8 leader-F 和 CD8 leader-R 以合成的 SEQ ID NO.16 为模板，使用表 2 中的体系，PCR 循环条件为：98℃ 3min，（98℃ 10sec，55℃ 15sec，72℃ 30sec）*35cycle，72℃ 5min。产物经过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳，确认 101bp 的片段 b，并割胶回收置于 Eppendorf 管内，用 MN 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段（见表 1），并测定产物的纯度和浓度；

（4）用引物 VL-F 和 VL-R 以合成的 SEQ ID NO.17 为模板，使用表 2 中的体系，PCR 循环条件为：98℃ 3min，（98℃ 10sec，55℃ 15sec，72℃ 30sec）*35cycle，72℃ 5min。产物经过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳，确认 336bp 的片段 c，并割胶回收置于 Eppendorf 管内，用 MN 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段（见表 1），并测定产物的纯度和浓度；

(5) 用引物 OLC-VH-F 和 VH-R 以合成的 SEQ ID NO.19 为模板, 使用表 2 中的体系, PCR 循环条件为: 98℃ 3min, (98℃ 10sec, 55℃ 15sec, 72℃ 30sec) *35cycle, 72℃ 5min。产物经过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳, 确认 421bp 的片段 d, 并割胶回收置于 Eppendorf 管内, 用 MN 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段 (见表 1), 并测定产物的纯度和浓度;

(6) 用引物 CD8 Hinge-F 和 CD8 Hinge-R 以合成的 SEQ ID NO.20 为模板, 使用表 2 中的体系, PCR 循环条件为: 98℃ 3min, (98℃ 10sec, 55℃ 15sec, 72℃ 30sec) *35cycle, 72℃ 5min。产物经过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳, 确认 147bp 的片段 e, 并割胶回收置于 Eppendorf 管内, 用 MN 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段 (见表 1), 并测定产物的纯度和浓度;

(7) 用引物 CD8 Transmembrane-F 和 CD8 Transmembrane-R 以合成的 SEQ ID NO.21 为模板, 使用表 2 中的体系, PCR 循环条件为: 98℃ 3min, (98℃ 10sec, 55℃ 15sec, 72℃ 30sec) *35cycle, 72℃ 5min。产物经过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳, 确认 100bp 的片段 f, 并割胶回收置于 Eppendorf 管内, 用 MN 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段 (见表 1), 并测定产物的纯度和浓度;

(8) 用引物 CD137-F 和 CD137-R 以合成的 SEQ ID NO.22 为模板, 使用表 2 中的体系, PCR 循环条件为: 98℃ 3min, (98℃ 10sec, 55℃ 15sec, 72℃ 30sec) *35cycle, 72℃ 5min。产物经过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳, 确认 142bp 的片段 g, 并割胶回收置于 Eppendorf 管内, 用 MN 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段 (见表 1), 并测定产物的纯度和浓度;

(9) 用引物 TCR-F 和 TCR-R 以合成的 SEQ ID NO.23 为模板, 使用表 2 中的体系, PCR 循环条件为: 98℃ 3min, (98℃ 10sec, 55℃ 15sec, 72℃ 30sec) *35cycle, 72℃ 5min。产物经过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳, 确认 355bp 的片段 h, 并割胶回收置于 Eppendorf 管内, 用 MN 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段 (见表 1), 并测定产物的纯度和浓度;

(10) 将 DNA 片段 b、c、d 各 1μl 作为模板, 使用表 3 中的体系, 除引物外加入 Eppendorf 管内, PCR 循环条件为: 98℃ 3min, (98℃ 10sec, 60℃ 10sec, 72℃ 30sec) *6cycle, 加入引物 CD8 leader-F/VH-R, (98℃ 10sec, 60℃ 10sec, 72℃ 40sec) *24cycle, 72℃ 5min。产物经过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳, 确认 814bp 的片段 i, 并割胶回收置于 Eppendorf 管内, 用 MN 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段 (见表 1), 并测定产物的纯度和浓度;

试剂	体积 (μl)
H ₂ O	33.5-1*模板数
5×Buffer (with Mg ²⁺)	10
dNTP (各 2.5mM)	4
Primer1 (+) (10μM)	1
Primer2 (-) (10μM)	1
Template	1*模板数
PrimeSTAR	0.5

表 3 50 μl 重叠 PCR 反应体系

(11) 将 DNA 片段 e、f、g、h 各 1μl 作为模板, 使用表 3 中的体系, 除引物外加入 Eppendorf 管内, PCR 循环条件为: 98℃ 3min, (98℃ 10sec, 60℃ 10sec, 72℃ 30sec) *6cycle, 加入引物 CD8 Hinge-F/TCR-R, (98℃ 10sec, 60℃ 10sec, 72℃ 30sec) *24cycle, 72℃ 5min。产物经过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳, 确认 704bp 的片段 j, 并割胶回收置于 Eppendorf 管内, 用 MN 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段 (见表 1), 并测定产物的纯度和浓度;

(12) 将 DNA 片段 V1、a、i、j 以 5μl 总体积且摩尔比 1:1:1:1 的比例加入 Eppendorf 管内, 加入同源重组酶反应液 15μl, 混匀后在 42℃ 孵育 30 分钟, 转移至冰上放置 2-3 分钟, 将反应液加入 50μl TOP10 中, 轻轻旋转以混匀内容物, 在冰中放置 30 分钟, 将管放到预加温到 42℃ 的恒温水浴锅中热激 90 秒, 快速将管转移到冰浴中, 使细胞冷却 2-3 分钟, 每管加 900 μl LB 培养液, 然后将管转移到 37℃ 摇床上, 温育 1 小时使细菌复苏, 取 100μl 的转化菌液涂布于 Amp LB 琼脂平

板上，倒置平皿，于恒温培养箱中 37℃ 培养，16 小时。

挑取克隆进行菌落 PCR 鉴定，鉴定正确的克隆即为重组慢病毒质粒 pCARbcma-silencer，对正确的克隆进行酶切鉴定（见图 6）；

（13）将重组慢病毒质粒 pCARbcma-silencer 使用 BspE I 和 EcoR I 限制性内切酶进行双酶切，产物经过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳，确认 10035bp 的片段 V2，并割胶回收置于 Eppendorf 管内，用 MN 公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段（见表 1），并测定产物的纯度和浓度；

（14）将合成好的 siRNA1453-F/R~siRNA1460-F/R 分别用 oligo annealing buffer 溶解成 20μM，对应的 F 和 R 各取 30μl 混合。然后将 siRNA1453-F&R~siRNA1460-F&R 混合物在水浴锅中 95℃ 加热 5 分钟，然后水浴锅开盖置室温中自然冷却至室温，形成双链寡核苷酸片段。取 1μl 用于的连接反应（见表 4），4℃ 连接 16h，转移至冰上放置 2-3 分钟，将反应液加入 50μl TOP10 中，轻轻旋转以混匀内容物，在冰中放置 30 分钟，将管放到预加温到 42℃ 的恒温水浴锅中热激 90 秒，快速将管转移到冰浴中，使细胞冷却 2-3 分钟，每管加 900 μl LB 培养液，然后将管转移到 37℃ 摇床上，温育 1 小时使细菌复苏，取 100μl 的转化菌液涂布于 Amp LB 琼脂平板上，倒置平皿，于恒温培养箱中 37℃ 培养，16 小时。

挑取克隆进行菌落 PCR 鉴定，鉴定正确的克隆即为 PD-1 敲减重组慢病毒质粒 pCARbcma-1453~pCARbcma-1460，对正确的克隆进行测序鉴定（见图 7）。

试剂	体积 (μl)
H ₂ O	13
V2	3
10× T4 DNA ligase Buffer	2
T4 DNA ligase	1
退火的双链寡核苷酸	1

表 4 20 μl 连接反应体系

2、重组慢病毒载体 lvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460 的包装。

（1）完全培养基：取出预热好的新鲜培养基，加入 10%FBS +5ml Pen-Srep，上下颠倒混匀即可；

（2）1XPBS 溶液：称量 NaCl 8g，KCl 0.2，Na₂HPO₄·12H₂O 3.58g，KH₂PO₄ 0.24g

置于 1000ml 烧杯中，加入 900ml Milli-Q grade 超纯水溶解，溶解完成后，使用 1000ml 量筒定容至 1000ml，121℃ 高温湿热灭菌 20min；

（3）0.25%Trypsin 溶液：称量 Trypsin 2.5g，EDTA 0.19729g 置于 1000ml 烧杯中，加入 900ml 1XPBS 溶解，溶解完成后，使用 1000ml 量筒定容至 1000ml，0.22 μ M 过滤除菌，长期使用可保存至 -20℃ 冰箱；

（4）0.5M CaCl₂ 溶液：称量 36.75g CaCl₂ 用 400ml Milli-Q grade 超纯水溶解；用 Milli-Q grade 超纯水将总体积定容至 500ml，混匀；0.22μm 过滤除菌，分装保存到 50ml 离心管中，每管 45ml 左右，4℃ 保存。

（5）2XHBS 溶液：称量 4.09g NaCl，0.269g Na₂HPO₄，5.96g Hepes，用 400ml Milli-Q grade 超纯水溶解；校准 pH 仪后，用 2M NaOH 溶液将 HBS 溶液的 pH 调到 7.05。调整每瓶 HBS 的 PH 消耗 2M NaOH 为 3ml 左右；

（6）从液氮罐中取出冻存的 HEK293T/17 细胞，迅速转移到 37℃ 水浴中，1~2min 后转移到超净台中，无菌操作将冻存管中的液体全部转移至 10cm² 培养皿中，补足含 10%FBS 的 DMEM 至 8mL/10cm² dish，24h 后显微镜观察细胞，细胞汇合的程度大于 80% 进行传代；

（7）选择细胞状态良好、无污染的 HEK293T/17 细胞，每 2-6 个培养皿为一组，将细胞胰酶消化后，用电动移液器吸取 4-12ml 完全培养基，向每个消化后的培养皿中加 2ml，避免培养皿变干；使用 1ml 移液器将所有细胞吹打成单细胞悬液，转移到培养基瓶中；

（8）将上述 2-6 个培养皿中的剩余细胞转移到培养基瓶中，并用培养基再冲洗一便培养皿；

(9) 盖紧培养基瓶盖, 上下颠倒 10 次左右充分混匀细胞悬液, 将细胞传到 8-24 个 10cm^2 培养皿中, 每皿的细胞密度应当约 4×10^6 个/10ml 完全培养基左右。如果细胞密度和预期的相差较大, 则需要对细胞进行计数, 然后按照 4×10^6 个/皿的量接种;

(10) 每 6 个培养皿整理为一摞, 注意保持上下皿之间的配合。将培养皿左右, 前后晃动数次, 使细胞充分铺开, 然后放入 5% CO_2 培养箱。剩余细胞做同样处理;

(11) 检查所传代细胞, 细胞汇合度应当为 70-80%, 轮廓饱满, 贴壁良好, 在细胞培养皿中均匀分布;

(12) 为细胞换液, 将培养基替换为新鲜完全培养基, 每皿 9ml, 并将培养箱的 CO_2 浓度设定值提高到 8%;

(13) 按照 N+0.5 配 DNA/ CaCl_2 溶液。每皿 HEK293T/17 细胞转染质粒量按照下列比例使用: 重组慢病毒质粒(20 μg), pPac-GP (15 μg), pPac-R (10 μg), pEnv-G (7.5 μg)。取一个新的 5ml 离心管, 加入 0.5M CaCl_2 : 0.25ml, 重组慢病毒质粒 20 μg : pPac-GP 15 μg : pPac-R 10 μg : pEnv-G 7.5 μg , 补充超纯水至 0.5ml 盖上盖子, 充分混匀;

(14) 另取一支 5ml 离心管, 加入 0.5ml DNA/ CaCl_2 溶液。打开涡旋振荡器, 一只手拿住 5ml 离心管的上端, 使管底接触振荡头, 使液体在管壁上散开流动, 另一只手拿一把 1mL 移液枪, 吸取 0.5mL 2 $\times$ HBS 溶液, 缓慢滴加进入离心管, 控制流速, 以半分钟滴完为宜。2 $\times$ HBS 加入后, 继续振荡 5 秒钟, 停止振荡, 可直接加入需要转染的细胞中;

(15) 取一皿细胞, 将离心管中的 1mL 钙转液滴加进去, 尽可能使钙转试剂分布到整个培养皿中;

(16) 钙转液加入后, 在皿盖上做好标记, 将培养皿放还到另一个 5% CO_2 培养箱中。确保培养皿水平放置, 每摞培养皿不要超过 6 个。在 5% CO_2 培养箱中放置(6-8 h);

(17) 将第一个培养箱的 CO_2 浓度设定值调回到 5%;

(18) 24 小时后, 检查细胞状态。细胞汇合度应当为 80-85% 左右, 状态良好。将培养基吸走, 更换 10ml 新鲜的 DMEM 完全培养基;

(19) 48 小时后, 观察转染效率。绝大多数细胞仍然是贴壁的。可以看到超过 95% 细胞都会带有绿色荧光。将同一个病毒包装上清液收集到一起, 并向培养皿中继续添加 10mL 新鲜培养基;

(20) 72 小时后, 再次将同一个病毒上清液收集到一起, 两次收集的病毒可以放在一起, 丢弃培养皿; 此时收集的上清液包含了重组慢病毒载体 lvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460。

实施例 2 重组慢病毒载体的浓缩及检测

一、离子交换色谱法纯化重组慢病毒载体(如图 8 所示);

(1) 将收集的上清液使用 Thermo 真空泵, 经 0.22 μm -0.8 μm 的 PES 滤器抽滤, 除去杂质;

(2) 按 1:1~1:10 的比例往上清中加入 1.5M NaCl 250 mM Tris-HCl (pH 6-8);

(3) 将 2 个离子交换柱串联放置, 用 4ml 1M NaOH、4ml 1M NaCl、5ml 0.15M NaCl 25 mM Tris-HCl (pH 6-8) 溶液依次过柱;

(4) 将步骤 2 中获得的溶液通过蠕动泵以 1-10ml/min 的速度给离子交换柱上样;

(5) 全部上清液过柱后, 使用 10ml 0.15M NaCl 25 mM Tris-HCl (pH 6-8) 溶液清洗一遍;

(6) 根据上样量使用 1-5ml 1.5M NaCl 25 mM Tris-HCl (pH 6-8) 进行洗脱, 收集洗脱液;

(7) 将洗脱液分成 25 到 50 μl 一管, 冻存到 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 进行长期保存;

二、滴度测定

(1) 取 24 孔板接种 293T 细胞。每孔细胞为 5×10^4 个, 所加培养基体积为 500 μl , 不同种类的细胞生长速度有所差异, 进行病毒感染时的细胞融合率为 40%-60%;

(2) 准备 3 个无菌 EP 管, 在每个管中加入 90 μl 的新鲜完全培养基 (高糖 DMEM+10% FBS) 接种细胞 24 小时后, 取两个孔的细胞用血球计数板计数, 确定感染时细胞的实际数目, 记为 N;

(3) 取待测定的病毒原液 10 μl 加入到第一个管中, 轻轻混匀后, 取 10 μl 加入到第二个管中, 然后依

次操作直到最后一管；在每管中加入410ul完全培养基（高糖DMEM+10%FBS），终体积为500ul；

（4）感染开始后20小时，除去培养上清，更换为500μl完全培养基（高糖DMEM+10%FBS），5%CO₂继续培养48小时；

（5）72小时后，观察荧光表达情况，正常情况下，荧光细胞数随稀释倍数增加而相应减少，并拍照；

（6）用0.2ml 0.25%胰酶-EDTA溶液消化细胞，在37℃放置1分钟。用培养基吹洗整个细胞面，离心收集细胞。按照DNeasy试剂盒的说明抽提基因组DNA。每个样品管中加入200μl洗脱液洗下DNA并定量；

（7）准备目的DNA检测qPCRmix总管 I（QPCR引物序列为SEQ ID NO.59 --- SEQ ID NO.60）：

2× TaqMan Master Mix	25 μl × n
Forward primer (100 pmol ml ⁻¹)	0.1 μl × n
Reverse primer (100 pmol ml ⁻¹)	0.1 μl × n
Probe (100 pmol ml ⁻¹)	0.1 μl × n
H ₂ O	19.7 μl × n

n = number of reactions. 例如：总反应数为40，将1ml 2× TaqMan Universal PCR Master Mix，4μl forward primer，4μl reverse primer，4μl probe 和788μl H₂O混和。震荡后放在冰上；

（8）准备内参DNA检测qPCRmix管 II（QPCR引物序列为SEQ ID NO.61--- SEQ ID NO.62）：

2× TaqMan Master Mix	25 μl × n
10×RNaseP primer/probe mix	2.5 μl × n
H ₂ O	17.5 μl × n

n = number of reactions. 例如：总反应数为40，将1ml 2× TaqMan Universal PCR Master Mix，100μl 10×RNaseP primer/probe mix和700μl H₂O混和。震荡后放在冰上；

（9）在预冷的96孔PCR板上完成PCR体系建立。从总管 I 中各取45μl加入到A-D各行的孔中，从总管 II 中各取45μl加入到E-G各行的孔中。

（10）分别取5μl质粒标准品和待测样品基因组DNA加入到A-D行中，每个样品重复1次。另留1个孔加入5μl的水做为无模板对照（no-template control）。

（11）分别取5μl基因组标准品和待测样品基因组DNA加入到E-G行中，每个样品重复1次。另留1个孔加入5μl的水做为无模板对照（no-template control）。

（12）所使用定量PCR仪为ABI PRISM 7500定量系统。循环条件设定为：50℃ 2分钟，95℃ 10分钟，然后是95℃ 15秒，60℃ 1分钟的40个循环。

数据分析：测得的DNA样品中整合的慢病毒载体拷贝数用基因组数加以标定，得到每基因组整合的病毒拷贝数。

滴度（integration units per ml，IU ml⁻¹）的计算公式如下：

$$\text{IU ml}^{-1} = (\text{C} \times \text{N} \times \text{D} \times 1000) / \text{V}$$

其中：C = 平均每基因组整合的病毒拷贝数

N = 感染时细胞的数目（约为1×10⁵）

D = 病毒载体的稀释倍数

V = 加入的稀释病毒的体积数

（13）重组慢病毒载体lvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460的滴度结果（如图9所示）；

三、内毒素测定

（1）、内毒素工作标准品为15EU/支；

（2）、鲎试剂灵敏度 λ = 0.25EU/ml, 0.5ml/管

（3）、内毒素标准品稀释：取内毒素标准品一支，分别用BET水按比例稀释成4 λ 和2 λ 的溶解，封口膜封口，震荡溶解15min；稀释时每稀释一步均应在漩涡混合器上混匀30s；

（4）、加样：取鲎试剂若干支，每支加入BET水0.5ml溶解，分装至若干支无内毒素试管中，每管0.1ml。

其中 2支为阴性对照管，加入BET水0.1ml；

2支为阳性对照管，加入 2 λ 浓度的内毒素工作标准品溶液0.1ml；

2支为样品阳性对照管，加入0.1ml含2 λ 内毒素标准品的样品溶液（稀释20倍的待测样品1ml + 4 λ 的内毒素标准品溶液1ml=2ml含2 λ 内毒素标准品的稀释40倍样品）。

样品管中加入0.1ml样品，稀释比例见表5，37 $\pm$ 1℃水浴（或培养箱）保温60 $\pm$ 1min；

稀释倍数	原液	5	10	20	40	80	160
对应EU/ml	0.25	1.25	2.5	5	10	20	40
结果							

表5 内毒素稀释比例及对应内毒素含量

(5)、重组慢病毒载体lvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460的内毒素检测结果（如表6所示），内毒素含量在0~2.5 EU/ml之间，符合要求；

稀释倍数	原液	5	10	20	40	80	160
对应EU/ml	0.25	1.25	2.5	5	10	20	40
lvCARbcma-1453	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1454	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1455	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1456	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1457	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1458	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1459	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCARbcma-1460	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

表6 内毒素检测结果

四、支原体测定及比较

- (1) 在实验前三日，细胞样品用无抗生素培养基进行培养；
- (2) 收集 1ml 细胞悬浮液（细胞数大于 1*10⁵），置于 1.5ml 离心管中；
- (3) 13000 $\times$ g 离心 1min，收集沉淀，弃去培养基；
- (4) 加入 500 μ l PBS 用枪头吹吸或涡旋振荡，重悬沉淀。13000 $\times$ g 离心 5min；
- (5) 步骤 4 重复一次；
- (6) 加入 50 μ l Cell Lysis Buffer，用枪头吹吸，充分混匀后，在 55℃水浴中孵育 20min；
- (7) 将样品置于 95℃中加热 5min；
- (8) 13000 $\times$ g 离心 5min 后，取 5 μ l 上清作为模板，25 μ lPCR 反应体系为：ddH₂O 6.5 μ l、Myco Mix 1 μ l、2x Taq Plus Mix Master (Dye Plus) 12.5 μ l、模板 5 μ l；PCR 循环条件为：95℃ 30sec，（95℃ 30sec，56℃ 30sec，72℃ 30sec）*30cycle，72℃ 5min。
- (9) 支原体检测结果显示（如图 10 和表 7 所示），重组慢病毒载体 lvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460 均不含支原体。

PCR 模版	PCR 产物	判定说明
阳性对照	有 280bp 和 150bp 条带	阳性成立
	无或者只有一条带	阳性不成立
阴性对照	150bp 条带	阴性成立
	无或有两条带以上	阴性不成立
样品	有 280 和 150 条带	支原体污染
	只有 280 条带	支原体严重污染
	只有 150bp	无支原体污染
	无条带	细胞里过少或 PCR 反应被抑制

表 7 支原体检测结果

实施例 3 重组慢病毒载体 lvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460 的功能检测

一、CAR 基因的细胞水平表达检测：

(1)重组慢病毒载体 lvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460 和对照病毒 MOCK 感染 PBMC 细胞后，收集细胞采用 RT-PCR 进行 CAR mRNA 转录水平的检测，验证 CAR 基因的表达，如果 CAR mRNA 转录水平增高，则说明 CAR 基因的转录水平表达成功；

(2)重组慢病毒载体 lvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460 和对照病毒 MOCK 感染 PBMC 细胞后，收集细胞采用 western blot 进行 CAR 蛋白表达水平的检测，验证 CAR 基因的表达，如果 CAR 蛋白表达水平增高，则说明 CAR 基因的翻译水平表达成功；

(3) 分别将 MOI=15 的 lvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460 和对照病毒 MOCK 感染细胞，48h 后提取 6 孔板中细胞的总 RNA 和总蛋白分别进行荧光定量 PCR 实验和免疫印迹实验。具体步骤：包被 6 孔板的四个孔，每个孔加入相应的 PBS 和 RN，4℃过夜。12 小时后按 MOI=15 包被病毒，37℃培养箱放置 5h；取出的 6 孔板，弃掉病毒上清，用 PBS 洗两遍，按 1×10^6 /孔，包被 PBMC（用淋巴细胞分离液从人血中分离），加入 500ul 培养基（含 10%血清、20U/ml IL-2、Polybrene 8ug/ml）。静置 20min，1000g 20℃离心 30min，37℃培养 48h。

(4)Trizol 法提取 6 孔板中 PBMC 细胞的总 RNA，逆转录扩增 cDNA，用 QPCR 引物（序列为 SEQ ID NO.63---SEQ ID NO.64）进行荧光定量 PCR 实验，反应体系见表 8，以内参 Actin 为对照组，验证其 mRNA 的转录情况。

试剂	体积 (μl)
SYBR premix ex taq:	10 μl
ROX Reverse Dye(50x)	0.4μl
上游引物 (2.5μM):	0.5μl
下游引物 (2.5μM):	0.5μl
cDNA	1.0μl
ddH ₂ O	7.6μl

表 8 20μl qPCR 反应体系

(5) 蛋白免疫印迹(Western Blot) 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳将从PBMC中提取的总蛋白质按相对分子质量分离。采用湿转（4℃，400 mA，120min），将蛋白转移到PVDF膜上。用封闭液（含5%脱脂牛奶的TBST溶液）室温封闭PVDF膜1h，封闭液1:1000稀释Biotinylated protein L，然后与封闭好的PVDF膜室温孵育4℃过夜。TBST洗膜3次，每次10min。封闭液1:500稀释相应的SA-HRP，室温下孵育PVDF膜2h，TBST洗膜3次，每次10min。采用Amersham公司ECL+plus™ Western blotting system试剂盒进行显色。X光显影获得显示条带的胶片。

(6) RT-QPCR 检测显示，重组慢病毒载体感染 PBMC 后的 CAR 基因的转录水平比对照病毒

MOCK 和空细胞有明显升高（如图 11 和表 9 所示），说明 CAR 基因的转录水平表达成功。

Sample name	Actin (CT)	CAR (CT)	-ΔCt	-ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
lvCARbcma-1453	18.94781	27.9884	-9.04059	5.74913	53.74756
lvCARbcma-1454	18.63172	28.76517	-9.13345	5.65526	50.39696
lvCARbcma-1455	19.20012	28.48228	-9.28216	5.50655	45.46991
lvCARbcma-1456	18.34099	27.44321	-9.10222	5.6865	51.49997
lvCARbcma-1457	18.2057	27.45988	-9.25419	5.53453	46.35104
lvCARbcma-1458	18.31527	27.42907	-9.11379	5.67492	51.08833
lvCARbcma-1459	18.69971	27.8403	-9.1406	5.64812	50.14799
lvCARbcma-1460	19.56607	28.77406	-9.20799	5.58073	47.85924
MOCK	19.75225	34.55302	-14.8008	-0.01206	0.991675
Blank	19.72942	34.51814	-14.7887	0	1

表 9

(7) 蛋白免疫印迹(Western Blot) 的结果表明，重组慢病毒载体感染 PBMC 后 CAR 蛋白的表达水平比对照病毒 MOCK 和空细胞有明显升高（如图 12 所示），说明 CAR 基因的翻译水平表达成功。

二、PD-1 敲减效果评估（PD-1 mRNA 转录水平）

(1) 分别培养 BCMA-K562 细胞和 PBMC 细胞；

(2) 实验开始前 4 天，MOI=15 的 lvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460 的病毒感染 PBMC 细胞，培养 72-96h 后可安排开始实验；

(3) 收集靶细胞（BCMA-K562）4x10⁵cells 和效应细胞（lvCARbcma-1453-PBMC ~ lvCARbcma-1460-PBMC 细胞）2.8x10⁶cells，800g，6min 离心，弃上清；

(4) 用 1ml 1xPBS 溶液分别重悬靶细胞和效应细胞，800g，6min 离心，弃上清；

(5) 重复步骤 4 一次；

(6) 用 700ul 培养基（1640 培养基+10% FBS）重悬效应细胞，用 2ml 培养基（1640 培养基+10% FBS）重悬靶细胞；

(7) 设置效靶比为 10:1 的实验孔，并设置 Blank 组；

(8) 250xg，5min 平板离心；

(9) 37℃ 5%CO₂ 培养箱中共培养 24 小时，1000xg，2min 平板离心，收集细胞检测 PD-1 mRNA 转录水平；

(10) Trizol 法提取上述混合细胞的总 RNA，逆转录扩增 cDNA，用 QPCR 引物（序列为 SEQ ID NO.57--SEQ ID NO.58）进行荧光定量 PCR 实验，反应体系见表 6，以内参 Actin 为对照组，验证其 mRNA 的转录情况。

(11) RT-QPCR 检测结果显示，一部分 PD-1 敲减重组慢病毒载体转导的 PBMC 与靶细胞孵育后，PD-1 基因的 mRNA 比对照病毒 lvCARbcma-1460 有明显降低（如图 13 和表 10 所示），说明 PD1siRNA 对 PD-1 基因的转录水平有敲减作用，其中 lvCARbcma-1453 的敲减效果最好，达到 70% 以上。Blank 组由于不会被靶细胞激活，所以 PD-1 转录水平没有上调。

Sample name	Actin (CT)	PD-1 (CT)	-ΔCt	-ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
Blank	13.27986	35.211302	-21.9314	-7.01064	0.007755
lvCARbcma-1453	13.06656	30.328141	-17.2596	-2.33678	0.197677
lvCARbcma-1454	14.11226	30.347056	-16.2348	-1.314	0.402205
lvCARbcma-1455	13.23032	28.158707	-14.9284	-0.00759	0.994752
lvCARbcma-1456	14.93184	30.045561	-15.1137	-0.19293	0.874829
lvCARbcma-1457	14.74173	29.710368	-14.9686	-0.04764	0.967382
lvCARbcma-1458	14.89117	29.821291	-14.9301	-0.00933	0.993557
lvCARbcma-1459	13.08795	28.050568	-14.9626	-0.04182	0.971426
lvCARbcma-1460	14.17941	29.100206	-14.9208	0	1

表 10

三、细胞杀伤实验效果评估

- (1) 分别培养 BCMA-PDL1-K562 细胞和 PBMC 细胞;
- (2) 实验开始前 4 天, MOI=15 的 lvCARbcma-1453~lvCARbcma-1460 的病毒感染 PBMC 细胞, 培养 72-96h 后可安排开始实验;
- (3) 收集靶细胞 (BCMA-PDL1-K562) 4×10^5 cells 和效应细胞 (CART 细胞) 2.8×10^6 cells, 800g, 6min 离心, 弃上清;
- (4) 用 1ml 1xPBS 溶液分别重悬靶细胞和效应细胞, 800g, 6min 离心, 弃上清;
- (5) 重复步骤 3 一次;
- (6) 用 700ul 培养基 (1640 培养基+10% FBS) 重悬效应细胞, 用 2ml 培养基 (1640 培养基+10% FBS) 重悬靶细胞;
- (7) 设置效靶比为 10:1 的实验孔, 并设置对照组, 每组 3 个复孔;
- (8) 250xg, 5min 平板离心;
- (9) 37°C 5%CO₂ 培养箱中培养 24 小时;
- (10) 250xg, 5min 平板离心;
- (11) 取每个孔的 50ul 上清到新 96 孔板中, 并且每孔加入 50ul 底物溶液 (避光操作);
- (12) 避光孵育 25 分钟;
- (13) 每孔加入 50ul 终止液;
- (14) 酶标仪检测 490nm 吸光度;
- (15) 将 3 个复孔取平均值; 将所有实验孔、靶细胞孔和效应细胞孔的吸光值减去培养基背景吸光值的均值; 将靶细胞最大值的吸光值减去体积校正对照吸光值的均值。
- (16) 将步骤 15 中获得的经过校正的值带入下面公式, 计算每个效靶比所产生的细胞毒性百分比。结果如图 14 所示, PD-1 敲减重组慢病毒载体转导的 PBMC 细胞在 10:1 效靶比条件下杀伤效率明显高于 PBMC 空细胞, 其中 lvCARbcma-1453-PBMC 细胞对靶细胞的杀伤效率最高, 高于 40%。lvCARbcma-1454-PBMC 细胞对靶细胞的杀伤效率次之。其余 lvCARbcma-1455-PBMC~lvCARbcma-1458-PBMC 细胞对靶细胞的杀伤效率与对照 lvCARbcma-1460-PBMC 细胞相比相差不多, 对比图 13 的结果可以看出, 由于靶细胞中 PD-L1 的存在, 与 PD-1 结合后传递抑制信号, 抑制了 T 细胞的免疫活性, 导致 T 细胞对靶细胞的杀伤效率大幅度降低。而 PD-1 分子表达水平被大幅度降低的情况下, 可以有效阻断 PD-1/PDL-1 的信号通路的激活, 使得 T 细胞可以正常发挥对靶细胞的杀伤作用。未来 lvCARbcma-1453 载体及其转导的 T 细胞可以应用于临床, 抑制 CAR-T 细胞内的 PD-1 表达水平, 增强 CAR-T 细胞在体内对肿瘤的杀伤效果, 达到抑制免疫逃脱的效果。

$$\text{杀伤效率} = (\text{实验孔} - \text{效应细胞孔} - \text{靶细胞孔}) / (\text{靶细胞最大孔} - \text{靶细胞孔}) \times 100\%$$

以上已对本发明创造的较佳实施例进行了具体说明, 但本发明创造并不限于所述实施例, 熟悉本领域的技术人员在不违背本发明创造精神的前提下还可作出种种的等等的变型或替换, 这些等等的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

序列表

- <110> 上海优卡迪生物医药科技有限公司
 <120> 敲减人 PD-1 的 siRNA、重组表达 CAR-T 载体及其构建方法和应用
 <130> HPCT17-14125
 <160> 64
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1

<211> 861

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

atgagtattc aacatttccg tgtegccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct    60
gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca    120
cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc    180
gaagaacgtt ttccaatgat gaggcacttt aaagtctctg tatgtggcgc ggtattatcc    240
cgtattgacg cggggcaaga gcaactcggc cgcgcatac actattctca gaatgacttg    300
gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta    360
tgcagtgtcg ccataacatc gaggatgata actgcggcca acttacttct gacaacgata    420
ggaggaccga aggagctaac cgtttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt    480
gatcgttggg aaccggagct gaataagacc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg    540
cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct    600
tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc    660
tcggcccttc cggtctggtg gtttattgct gataaatctg gagccgggtg gcgtgggtct    720
cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac    780
acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgtctg gataggtgcc    840
tactgatta agcattggta a                                     861

```

<210> 2

<211> 674

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

```

cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatecttttt ttctgcgcgt aatctgctgc    60
ttgcaaaaca aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca    120
actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgctcttcta    180
gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgt    240

ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg    300
gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc    360
acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gataacctaca gcgtgagcta    420
tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg    480
gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt    540
cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg    600
cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg    660
ccttttgctc acat                                     674

```

<210> 3

<211> 147

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

atcccccccc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt 60
 tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga 120
 ggcttttttg gaggcctaga cttttgc 147

<210> 4

<211> 228

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gtagtcttat gcaatactct ttagtcttg caacatggta acgatgagtt agcaacatgc 60
 cttacaagga gagaaaaagc accgtgcatg ccgattgggtg gaagtaaggt ggtacgatcg 120
 tgccttatta ggaaggcaac agacgggtct gacatggatt ggacgaacca ctgaattgcc 180
 gcattgcaga gatattgtat ttaagtgcct agctcgatac aataaacg 228

<210> 5

<211> 180

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

ggtctctctg gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaaccac 60
 tgcttaagcc tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt 120
 gtgactctgg taactagaga tccctcagac ccttttagtc agtgtggaaa atctctagca 180

<210> 6

<211> 234

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

tgctagagat ttccacact gactaaaagg gtctgaggga tctctagtta ccagagtcac 60
 acaacagacg ggcacacact acttgaagca ctcaaggcaa gctttattga ggcttaagca 120
 gtgggttccc tagttagcca gagagctccc aggtcagat ctggtctaac cagagagacc 180
 cagtacaagc aaaaagcaga tcttattttc gttgggagtg aattagccct tcca 234

<210> 7

<211> 353

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

atgggtgcga gagegtcagt attaagcggg ggagaattag atcgcgatgg gaaaaaatc 60
 ggttaaggcc aggggggaaag aaaaaatata aattaaaca tatagtatgg gcaagcaggg 120
 agctagaacg attcgagtt aatcctggcc tgttagaac atcagaaggc ttagacaaa 180
 tactgggaca gctacaacca tcccttcaga caggatcaga agaacttaga tcattatata 240
 atacagtagc aacctctat tgtgtgcatc aaaggataga gataaaagac accaaggaag 300
 ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac caccgcacag caa 353

<210> 8
 <211> 233
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 8
 aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcctcaat 60
 gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 120
 gctgaggget attgaggegc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 180
 gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcc 233

<210> 9
 <211> 489
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 9
 tggggatttg gggttgctct ggaaaactca tttgcaccac tgctgtgcct tggaatgcta 60
 gttggagtaa taaatctctg gaacagattg gaatcacacg acctggatgg agtgggacag 120
 agaaattaac aattacacaa gcttaataca ctcttaatt gaagaatcgc aaaaccagca 180
 agaaaagaat gaacaagaat tattggaatt agataaatgg gcaagtttgt ggaattgggt 240
 taacataaca aattggctgt ggtatataaa attattcata atgatagtag gaggcttggt 300
 aggtttaaga atagtttttg ctgtactttc tatagtgaat agagttaggc agggatattc 360
 accattatcg tttcagaccc acctcccaac cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat 420
 agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acggatctcg 480
 acggttaac 489

<210> 10
 <211> 119
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 10
 ttttaaaaga aaagggggga ttggggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat 60
 agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaatttta 119

<210> 11
 <211> 696
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 11
 atggcccagt ccaagcacgg cctgaccaag gagatgacca tgaagtaccg catggagggc 60
 tgcgtggacg gccacaagtt cgtgatcacc ggcgagggca teggtaccc cttcaagggc 120
 aagcaggcca tcaacctgtg cgtggtggag ggcgccccct tgcccttcgc cgaggacatc 180
 ttgtccgccg cttcatgta cggcaaccgc gtgttcaccg agtaccacca ggacatcgtc 240
 gactacttca agaactcctg ccccgccggc tacacctggg accgetcctt cctgttcgag 300

gacggcgccg tgtgcatctg caacgccgac atcacctga gcgtggagga gaactgcatg 360
 taccacgagt ccaagttcta cggegtgaac ttecccgccg acggccccgt gatgaagaag 420
 atgaccgaca actgggagcc ctccctgcgag aagatcatcc ccgtgcccaa gcagggcac 480
 ttgaaggcg acgtgagcat gtacctgctg ctgaaggacg gtggccgctt gcgtgccag 540
 ttcgacaccg tgtacaaggc caagtccgtg ccccgcaaga tgcccgactg gcacttcac 600
 cagcacaagc tgaccgcga ggaccgcagc gacccaaga accagaagtg gcacctgacc 660
 gagcacgcca tcgcctccgg ctccgccttg cctga 696

<210> 12

<211> 575

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

gccccctccc ccccccccc cctaacttta ctggccgaag ccgcttgga taaggccggt 60
 gtgcgtttgt ctatatgtta tttccacca tattgcgctc ttttgcaat gtgaggcccc 120
 ggaaacctgg cctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg tcttcccct ctgccaaag 180
 gaatgcaagg tctgttgaat gtgctgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac 240
 aaacaacgct tgtagegacc ctttgcaggc agcggaaccc cccacctggc gacaggtgcc 300
 tctgcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa ggccgcacaa cccagtgcc 360
 acgttgtgag ttgtagatgt gtgaaagag tcaaatggct cacctcaagc gtattcaaca 420
 aggggctgaa ggatgccag aaggtacccc attgtatggg atctgatctg gggcctcggt 480
 gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaacgt ctaggcccc cgaaccacgg 540
 ggacgtggtt ttcctttgaa aaacacgatg ataat 575

<210> 13

<211> 592

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13

aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttget 60
 ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgctttgt atcatgctat tgcctcccg 120
 atggctttca tttctcctc cttgtataaa tcctgggtgc tgtctcttta tgaggagttg 180
 tggcccggtg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact 240
 ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttcgggga ctttcgcttt cccctccct 300
 attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgccgct gctggacagg ggctcggctg 360
 ttgggcaactg acaattccgt ggtgttgcg gggaaatcat cgtcctttcc ttggtgctc 420
 gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc 480
 aatccagcgg accttccttc ccgcggcctg ctgccgctc tgcggcctct tccgcgtctt 540
 cgccttcgcc ctccagacgag tcggatctcc ctttgggcgg cctccccgcc tg 592

<210> 14

<211> 256

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

```

ccccctcacc gagggectat tteccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaagge      60
tgttagagag ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac      120
gtgacgtaga aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat      180
ggactatcat atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatctt      240
gtggaaagga cgaaac                                                    256

```

<210> 15

<211> 1178

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 15

```

gctccggtgc ccgtcagtgg gcagagcgca catcgccac agtccccgag aagttggggg      60
gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagtg      120
atgtcgtgta ctggctccgc ctttttcccg aggggtggggg agaaccgtat ataagtgcag      180
tagtcgccgt gaacgttctt ttctgcaacg ggtttgccgc cagaacacag gtaagtccg      240
tgtgtggttc ccgcgggcct ggccctctta cgggttatgg cccttgcgtg ccttgaatta      300
cttcacctg getgcagtac gtgattcttg atcccgagct tcgggttggg agtgggtggg      360
agagttcgag gccttgcgt taaggagccc ctctgcctcg tgcctgagtt gaggcctggc      420
ctgggcgctg gggccgcgcg gtgcgaatct ggtggcacct tcgcgcctgt ctgcctgctt      480
tcgataagtc tctagccatt taaaattttt gatgacctgc tgcgacgctt tttttctggc      540
aagatagtct tgtaaagtcg ggccaagatc tgcacactgg tatttcggtt tttggggccg      600
cgggcggcga cggggcccggt gcgtcccagc gcacatgttc ggcgagggcg ggccctgcgag      660
cgcggccacc gagaatcgga cgggggtagt ctcaagctgg ccggcctgct ctggtgcctg      720
gcctcgcgcc gccgtgtatc gccccgccct gggeggcaag gctggcccgg tcggcaccag      780
ttgcgtgagc ggaaagatgg ccgcttcccg gccctgctgc agggagctca aaatggagga      840
cgcggcgctc gggagagcgg gcgggtgagt caccacaca aaggaaaagg gcctttccgt      900
cctcagccgt cgttcatgt gactccactg agtaccgggc gccgtccagg cacctcgatt      960
agttctcgag cttttggagt acgtcgtctt taggttgggg ggagggggtt tatgcgatgg      1020
agtttcccca cactgagtgg gtggagactg aagttaggcc agcttggcac ttgatgtaat      1080
tctccttggg atttgccctt tttgagtttg gatcttgggt cattctcaag cctcagacag      1140
tggttcaaag ttttttctt ccatttcagg tgctgtga                                1178

```

<210> 16

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 16

```

atggccttac cagtgaccgc cttgctctcg ccgtggcct tgctgctcca cgccgccagg      60
ccg                                                    63

```

<210> 17

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 17

gacatccaga tgacccagag ccctagctca ctgagcgcca gcgtgggcga cagggtgacc	60
attacctget ccgccagcca ggacatcagc aactacctga actggtacca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac acctccaacc tgcactccgg cgtgccccagc	180
aggttcagcg gaagcggcag cggcaccgat ttcacctga ccatctccag cctgcagccc	240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaggaagc tcccctggac ttteggccag	300
ggcaccaaac tggagatcaa gcgt	324

<210> 18

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 18

ggtggcggtg gctcgggcgg tggtaggtcg ggtggcggcg gatct	45
---	----

<210> 19

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 19

cagggtgcagc tggteccagag cggcgccgaa gtgaagaagc ccggcagctc cgtgaaagtg	60
agctgcaagg ccagcggcgg cacccttcagc aactactgga tgcactgggt gaggcaggcc	120
cccggacagg gctggagtg gatgggcgcc acctacaggg gccacagcga caccctactac	180
aaccagaagt tcaagggcgg ggtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac	240
atggaactga gcagcctcag gagecaggac accgctgtgt attactgcgc caggggcgcc	300
atctacgacg gctacgacgt gctggacaac tggggccagg gcacactagt gaccgtgtcc	360
agc	363

<210> 20

<211> 141

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 20

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg	60
tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg	120
gacttcgcct gtgatata c	141

<210> 21

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 21

atctgggcgc ccttgccgg gacttgtggg gtccttctcc tgctactggt taccaccctt	60
--	----

tactgc 66

<210> 22

<211> 126

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 22

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
gaactg 126

<210> 23

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 23

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggccca gaaccagctc 60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
tacgacgecc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 24

<211> 123

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 24

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60
gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120
tcc 123

<210> 25

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 25

attcaaaatt ttatcgatgc tccggtgccc gtcagt 36

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 26

tcacgacacc tgaaatggaa ga	22
<210> 27	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 27	
ggtgtcgtga ggatccgcca ccatggcctt accagtgacc gc	42
<210> 28	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 28	
gtgtcatctg gatgtccggc ctggcggcgt g	31
<210> 29	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 29	
cacgccgcca ggccggacat ccagatgacc cagagcc	37
<210> 30	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 30	
acgcttgatc tccagtttgg t	21
<210> 31	
<211> 81	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 31	
actggagatc aagcgtggtg gcggtggctc gggcgggtgt gggtcgggtg gcggcggatc	60
tcaggtgcag ctggtccaga g	81
<210> 32	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 32	
gctggacacg gtcactagtg tg	22

<210> 33
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 33
agtgaccgtg tccagcacca cgacgccagc gcc 33

<210> 34
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 34
gtagatatca caggcgaagt cca 23

<210> 35
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 35
cgcctgtgat atctacatct gggcgccctt ggc 33

<210> 36
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 36
tctttctgcc ccgtttgcag taaagggtga taaccagtg 39

<210> 37
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 37
aaacggggca gaaagaaact c 21

<210> 38
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 38
tgctgaactt cactctcagt tcacatcctc ctttctcttc 40

<210> 39

<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	39	
agagtgaagt tcagcaggag cg		22
<210>	40	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	40	
ggagaggggc gtcgacttag cgagggggca gggc		34
<210>	41	
<211>	59	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	41	
ccggctaaac tggtagccga tgagcctcga gtcgtaggt accagtttag catTTTTTg		59
<210>	42	
<211>	59	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	42	
aattcaaaaa atgctaaact ggtaccgat gactcgagc tcatcggtta ccagtttag		59
<210>	43	
<211>	59	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	43	
ccggcattgt ctttcctagc ggaatctcga gtccgctagg aaagacaatg gtttttttg		59
<210>	44	
<211>	59	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	44	
aattcaaaaa aaccattgtc tttcctagcg gactcgagat tccgctagga aagacaatg		59
<210>	45	
<211>	59	
<212>	DNA	

<213> 人工序列

<400> 45

ccggaggcgc agatcaaaga gatttctcga gctctctttg atctgcgcct tgtttttttg 59

<210> 46

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 46

aattcaaaaa acaaggcgca gatcaaagag agctcgagaa ctctctttga tctgcgcct 59

<210> 47

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 47

ccggccctgt ggttctatta tattactcga gatataatag aaccacaggg aatttttttg 59

<210> 48

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 48

aattcaaaaa attccctgtg gttctattat atctcgagta atataataga accacaggg 59

<210> 49

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 49

ccggggaacc cattcctgaa attatctcga gaatttcagg aatgggtcca attttttg 58

<210> 50

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 50

aattcaaaaa attggaaccc attcctgaaa ttctcgagat aatttcagga atgggttcc 59

<210> 51

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 51

ccggcaggcc tagagaagtt tcaggctcga gtgaaacttc tctaggcctg catTTTTTg 59

<210> 52

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 52

aattcaaaaa atgcaggcct agagaagttt cactcgagcc tgaaacttct ctaggcctg 59

<210> 53

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 53

ccggcaggac tcatgtctca atgccctcga gcattgagac atgagtcctg tgTTTTTg 59

<210> 54

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 54

aattcaaaaa acacaggact catgtctcaa tgctcgaggg cattgagaca tgagtcctg 59

<210> 55

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 55

ccggttctcc gaacgtgtca cgtctcgaga cgtgacacgt tcggagaatt ttttg 55

<210> 56

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 56

aattcaaaaa attctccgaa cgtgtcacgt ctcgagacgt gacacgttcg gagaa 55

<210> 57

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 57

tgcagcttct ccaacacat 19

<210>	58	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	58	
cttggtccgtc	tggttgct	18
<210>	59	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	59	
cctttccggg	actttcgctt t	21
<210>	60	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	60	
gcagaatcca	ggtggcaaca	20
<210>	61	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	61	
catgtacgtt	gctatccagg c	21
<210>	62	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	62	
ctccttaatg	tcacgcacga t	21
<210>	63	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	63	
gacttgtggg	gtccttctcc t	21
<210>	64	
<211>	21	

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 64

gcagctacag ccatttct c

21

权利要求书

- 1、一种敲减人 PD-1 的 siRNA，所述 siRNA 选自下述中的 a-g 中的任一对：
 - a. SEQ ID NO.41 和 SEQ ID NO.42 所示的核苷酸序列；
 - b. SEQ ID NO.43 和 SEQ ID NO.44 所示的核苷酸序列；
 - c. SEQ ID NO.45 和 SEQ ID NO.46 所示的核苷酸序列；
 - d. SEQ ID NO.47 和 SEQ ID NO.48 所示的核苷酸序列；
 - e. SEQ ID NO.49 和 SEQ ID NO.50 所示的核苷酸序列；
 - f. SEQ ID NO.51 和 SEQ ID NO.52 所示的核苷酸序列；
 - g. SEQ ID NO.53 和 SEQ ID NO.54 所示的核苷酸序列。
- 2、如权利要求 1 所述的 siRNA 在制备消除或减轻肿瘤的免疫逃脱机制药物中的应用。
- 3、一种包含权利要求 1 所述的 siRNA 的重组表达载体。
- 4、如权利要求 3 所述的重组表达载体，其特征在于：所述表达载体为慢病毒表达载体、逆转录病毒表达载体、腺病毒表达载体、腺相关病毒表达载体或质粒。
- 5、如权利要求 4 所述的重组表达载体，其特征在于：所述的慢病毒表达载体包括：用于质粒复制的原核复制子 pUC Ori 序列，如 SEQ ID NO.2 所示；用于目的菌株大量扩增的含氨苄青霉素抗性基因 AmpR 序列，如 SEQ ID NO.1 所示；用于增强真核细胞内的复制的病毒复制子 SV40 Ori 序列，如 SEQ ID NO.3 所示；用于慢病毒包装的慢病毒包装顺式元件；用于真核细胞表达绿色荧光的 ZsGreen1 绿色荧光蛋白，如 SEQ ID NO.11 所示；用于共同转录表达蛋白质的 IRES 核糖体结合序列，如 SEQ ID NO.12 所示；用于嵌合抗原受体基因的真核转录的人 EF1 α 启动子，如 SEQ ID NO.15 所示；用于组成集识别、传递、启动于一体的二代 CAR 或三代 CAR 的抗 BCMA 嵌合抗原受体的编码基因；用于增强转基因的表达效率的 eWPRE 增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件，如 SEQ ID NO.13 所示；用于胞内转录 siRNA 的人 RNA 聚合酶 III 启动子 hU6，如 SEQ ID NO.14 所示。
- 6、如权利要求 5 所述的重组表达载体，其特征在于：所述慢病毒包装顺式元件采用第二代慢病毒载体包括：如 SEQ ID NO.5 所示的慢病毒 5 terminal LTR、如 SEQ ID NO.6 所示的慢病毒 3 terminal Self-Inactivating LTR、如 SEQ ID NO.7 所示的 Gag 顺式元件、如 SEQ ID NO.8 所示的 RRE 顺式元件、如 SEQ ID NO.9 所示的 env 顺式元件、如 SEQ ID NO.10 所示的 cPPT 顺式元件。
- 7、如权利要求 5 所述的重组表达载体，其特征在于：所述慢病毒包装顺式元件采用第三代慢病毒载体包括：如 SEQ ID NO.5 所示的慢病毒 5 terminal LTR、如 SEQ ID NO.6 所示的慢病毒 3 terminal Self-Inactivating LTR、如 SEQ ID NO.7 所示的 Gag 顺式元件、如 SEQ ID NO.8 所示的 RRE 顺式元件、如 SEQ ID NO.9 所示的 env 顺式元件、如 SEQ ID NO.10 所示的 cPPT 顺式元件所述慢病毒包装顺式元件，以及如 SEQ ID NO.4 所示的 RSV 启动子。
- 8、如权利要求 5 所述的重组表达载体，其特征在于：所述 eWPRE 增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件有 6 个核苷酸的增强突变，具体为：g.396G>A、g.397C>T、g.398T>C、g.399G>A、g.400A>T、g.411A>T。
- 9、如权利要求 5 所述的重组表达载体，其特征在于：所述抗 BCMA 嵌合抗原受体，包括依次串联的如 SEQ ID NO.16 所示的 CD8 leader 嵌合受体信号肽、如 SEQ ID NO.17 所示的 BCMA 单链抗体轻链 VL、如 SEQ ID NO.18 所示的 Optimal Linker C、如 SEQ ID NO.19 所示的 BCMA 单链抗体重链 VH、如 SEQ ID NO.20 所示的 CD8 Hinge 嵌合受体铰链、如 SEQ ID NO.21 所示的 CD8 Transmembrane 嵌合受体跨膜区、如 SEQ ID NO.22 所示的 CD137 嵌合受体共刺激因子，以及如 SEQ ID NO.23 所示的 TCR 嵌合受体 T 细胞激活域。
- 10、如权利要求 5 所述的重组表达载体，其特征在于：所述抗 BCMA 嵌合抗原受体，包括依次串联的如 SEQ ID NO.16 所示的 CD8 leader 嵌合受体信号肽、如 SEQ ID NO.17 所示的 BCMA 单链抗体轻链 VL、如 SEQ ID NO.18 所示的 Optimal Linker C、如 SEQ ID NO.19 所示的 BCMA 单链

抗体重链 VH、如 SEQ ID NO.20 所示的 CD8 Hinge 嵌合受体铰链、如 SEQ ID NO.21 所示的 CD8 Transmembrane 嵌合受体跨膜区、如 SEQ ID NO.24 所示的 CD28 嵌合受体共刺激因子、如 SEQ ID NO.22 所示的 CD137 嵌合受体共刺激因子以及如 SEQ ID NO.23 所示的 TCR 嵌合受体 T 细胞激活域。

11、一种包含权利要求 1 所述的 siRNA 的慢病毒表达载体的构建方法，包括以下步骤：

(1) 将含氨苄青霉素抗性基因 AmpR 序列（如 SEQ ID NO.1 所示）、原核复制子 pUC Ori 序列（如 SEQ ID NO.2 所示）、病毒复制子 SV40 Ori 序列（如 SEQ ID NO.3 所示）、用于慢病毒包装的慢病毒包装顺式元件、ZsGreen1 绿色荧光蛋白（如 SEQ ID NO.11 所示）、IRES 核糖体结合序列（如 SEQ ID NO.12 所示）、eWPRE 增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件（如 SEQ ID NO.13 所示）、人 RNA 聚合酶 III 启动子 hU6（如 SEQ ID NO.14 所示）存储于慢病毒骨架质粒上；

(2) 将人 EF1 α 启动子（如 SEQ ID NO.15 所示）、用于组成集识别、传递、启动于一体的二代 CAR 或三代 CAR 的抗 BCMA 嵌合抗原受体组合成二代 CAR 或三代 CAR 设计方案，经过酶切、连接、重组反应克隆至慢病毒骨架质粒中，得到二代 CAR 或三代 CAR 设计的重组慢病毒质粒；

(3) 将上述 siRNA 以及如 SEQ ID NO.55 和 SEQ ID NO.56 所示的 negative control 序列，分别克隆至步骤（2）所得的重组慢病毒质粒中，得到 PD-1 敲减重组慢病毒质粒；

(4) 将步骤（3）得到的重组慢病毒质粒分别与慢病毒包装质粒 pPac-GP、pPac-R 以及膜蛋白质粒 pEnv-G 共同转染 HEK293T/17 细胞，在 HEK293T/17 细胞中进行基因转录表达后，包装成功重组慢病毒载体并释放到细胞培养上清中，收集包含的重组慢病毒载体的上清液；

(5) 将得到的重组慢病毒上清采用抽滤、吸附、洗脱的离子交换方式进行纯化，分别得到重组慢病毒载体。

12、如权利要求 11 所述的构建方法，其特征在于：步骤（5）中，所述抽滤步骤控制上清体积在 200ml~2000ml，真空度控制在 -0.5MPa~-0.9MPa，防止由于堵孔带来的载体损失；所述吸附步骤控制溶液的 PH 值在 6~8，防止 PH 的变化导致载体失活；所述洗脱步骤控制洗脱液的离子强度在 0.5M~1.0M，防止离子强度的变化导致洗脱不完全或者载体失活。

13、如权利要求 3-10 任一项所述的重组表达载体在制备 CAR-T 治疗肿瘤过程中消除或减轻肿瘤免疫逃脱机制药物中的应用。

14、一种 CART 细胞，所述的 CAR-T 细胞是由上述 siRNA 修饰的 T 淋巴细胞。

15、根据权利要求 14 所述的 CAR-T 细胞在制备治疗多发性骨髓瘤、胰腺癌、脑胶质瘤、骨髓瘤药物中的应用。

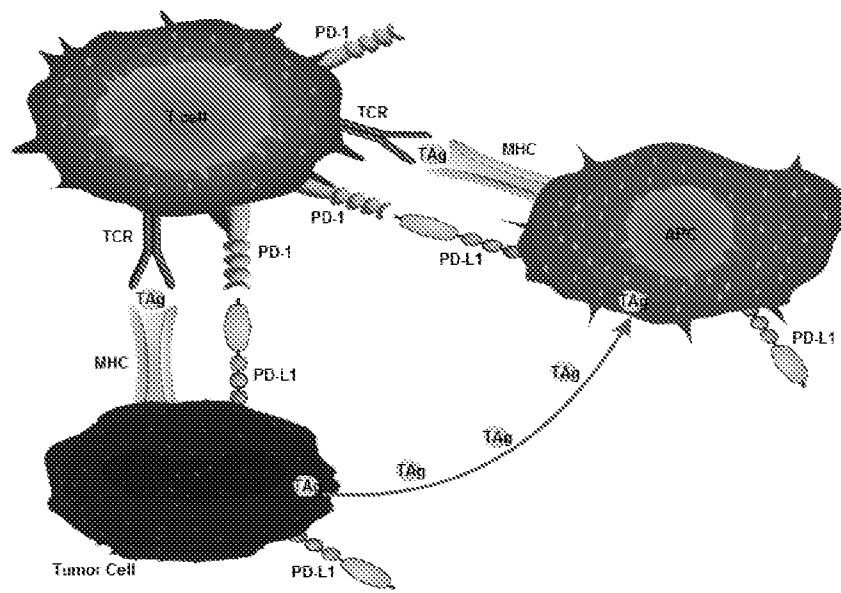


图 1

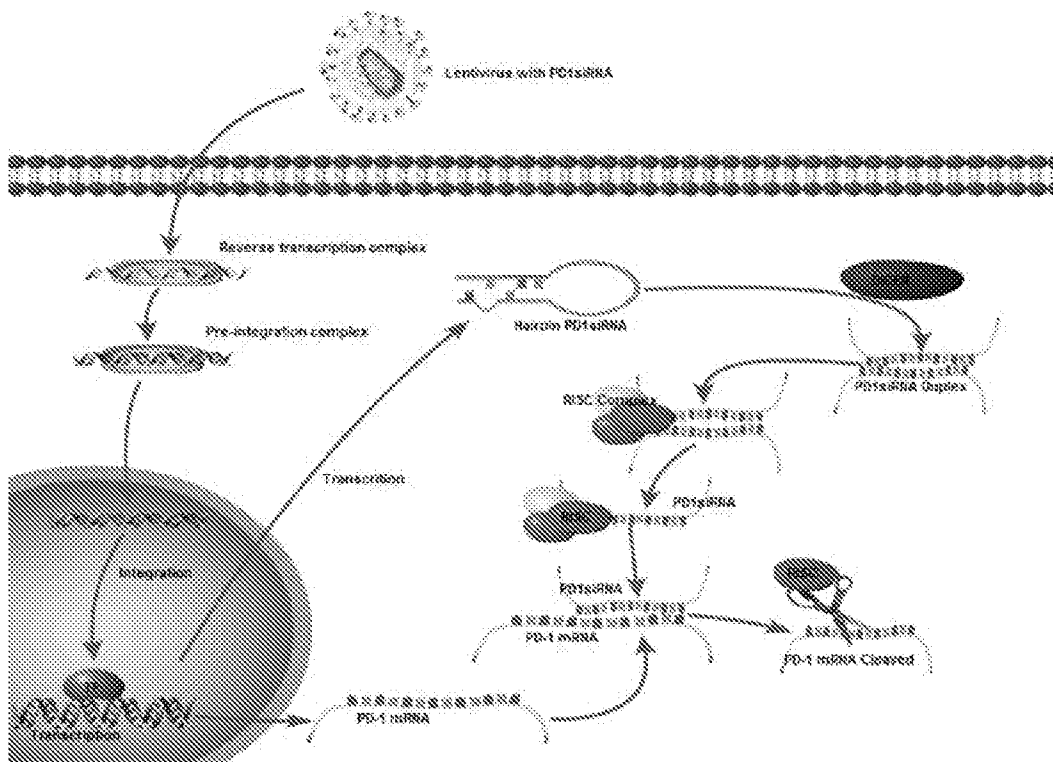
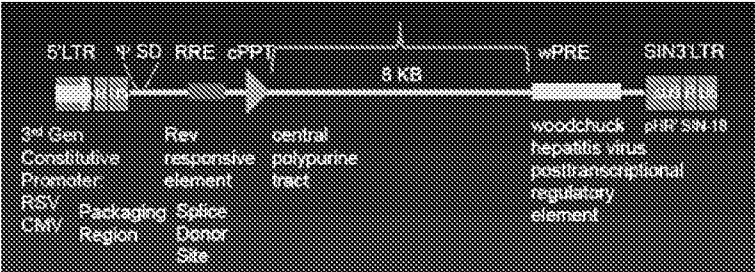
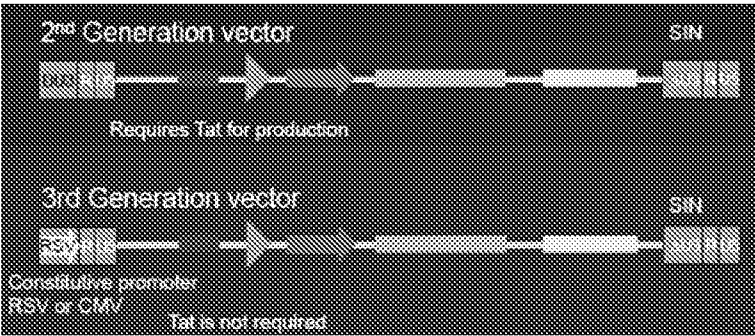


图2



A



B

图3

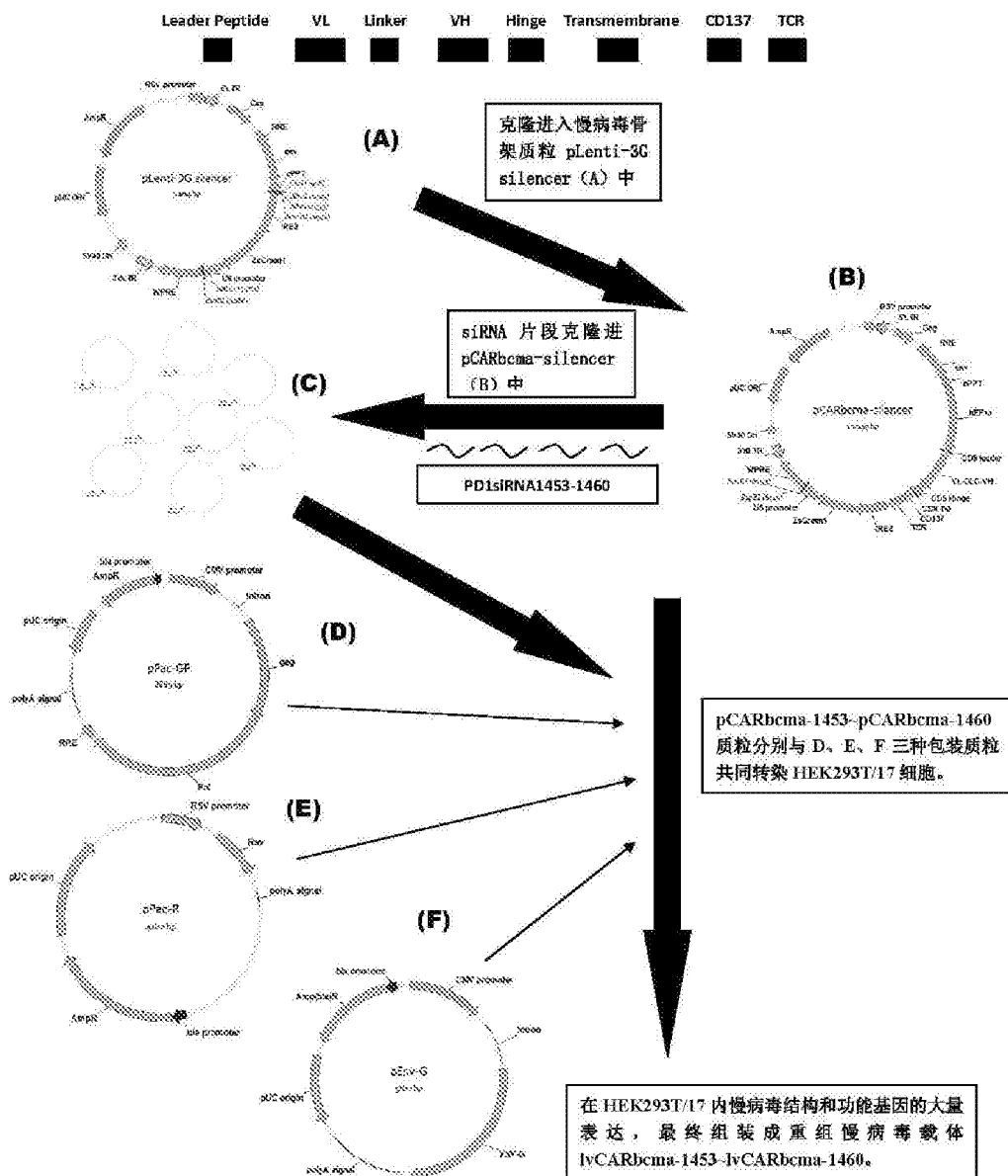


图4

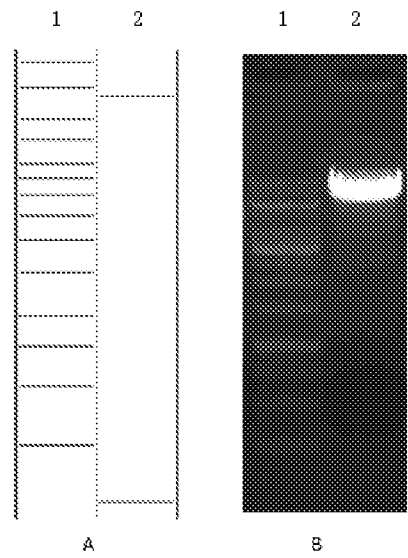


图5

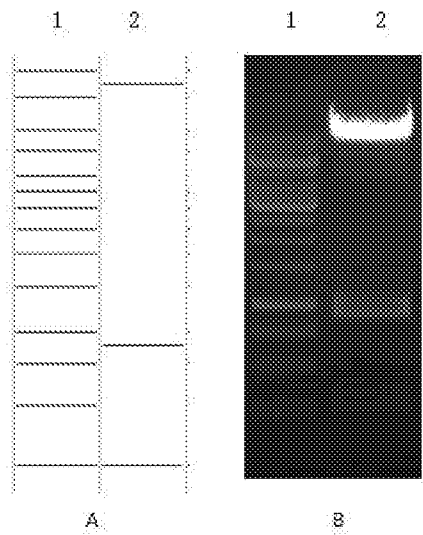


图6

A	pCARbema-1453	211	220	230	240	250	260	270	280
	CARbema-1453_1-H06_F_H06	1	-----CGGGTAAACTGTTTGGATATAGAGCTGAGTTATCGGTACCGTTTATGATTTTTT-----	211	CGAAACTCGGGTAAACTGTTTGGATATAGAGCTGAGTTATCGGTACCGTTTATGATTTTTTGAATTGG				
B	pCARbema-1454	210	220	230	240	250	260	270	280
	CARbema-1454_1-H06_F_A09	210	-----CGGACATTGTTTTCCTATCTTAATCTCGAATGTTAGAGAAAGCAATGGTTTTTTTT-----	210	CGAAACTCTGGCATTGTTTTCCTATAGCGAAATCTCGAATCGGCTAGAAAGCAATGGTTTTTTTGAATTGGT				
C	pCARbema-1455	211	220	230	240	250	260	270	280
	CARbema-1455_1-H06_F_B09	212	CGGAGAGTGTAAATCAAGAGGTTTTCGAGTCTCTTAATCTCGGCTGTTTTTTTTT-----	212	CGAAACTCTCGAGAGTGTAAATCAAGAGGTTTTCGAGTCTCTTAATCTCGGCTGTTTTTTTGAATTGGT				
D	pCARbema-1456	210	220	230	240	250	260	270	280
	CARbema-1456_1-H06_F_D09	210	-----CGGTTTGTTGTTCTATATATATCTACTGATATATAATAGAGGTTAGGAAATTTTTT-----	210	CGAAACTCTGGAGGCTGTGGTTTCTATATATATCTACTGATATATAAGAGGTCAGGAAATTTTTTGAATTGGT				
E	pCARbema-1457	211	220	230	240	250	260	270	280
	CARbema-1457_1-H06_F_E09	1	-----CGGGAACTCTTTCTTGAATTTATTTGAGGTTTTCGAAATGGGTTCCGATTTTTT-----	211	CGAAACTCTGGGAACTCTTTCTTGAATTTATCTGAAATTTTCGAAATGGGTTCCGATTTTTTGAATTGGT				
F	pCARbema-1458	211	220	230	240	250	260	270	280
	CARbema-1458_1-H06_F_F09	211	-----CGGGCAATCTTTAGAGAAATTTTCAGTTCTTGAATGATGATTTTCTAGAGCTTCATTTTTT-----	211	CGAAACTCTGGGCAATCTTTAGAGAAATTTTCAGTTCTTGAATGATGATTTCTAGAGCTTCGATTTTTTGAATTGGT				
G	pCARbema-1459	210	220	230	240	250	260	270	280
	CARbema-1459_1-H06_F_G09	210	-----CGGACAGGCTCTTATGTTCTCAATGCTCTGAGCATTGAGAGCTATGAGTCTGTGTTTTT-----	210	CGGAACTCTTGGCAGGCTCTTATGTTCTCAATGCTCTGAGCATTGAGAGCTATGAGTCTGTGTTTTTGAATTGGT				
H	pCARbema-1460	211	220	230	240	250	260	270	
	CARbema-1460_1-H06_F_C09	211	-----CGGTTCTCGCGAACTGTCTACGCTCTCGAGACGTTGAGACGTTTGAGAAATTTTTT-----	211	CGAAACTCTGGTTCTCGCGAACTGTCTACGCTCTCGAGACGTTGAGACGTTTGAGAAATTTTTTGAATTGGT				

图7

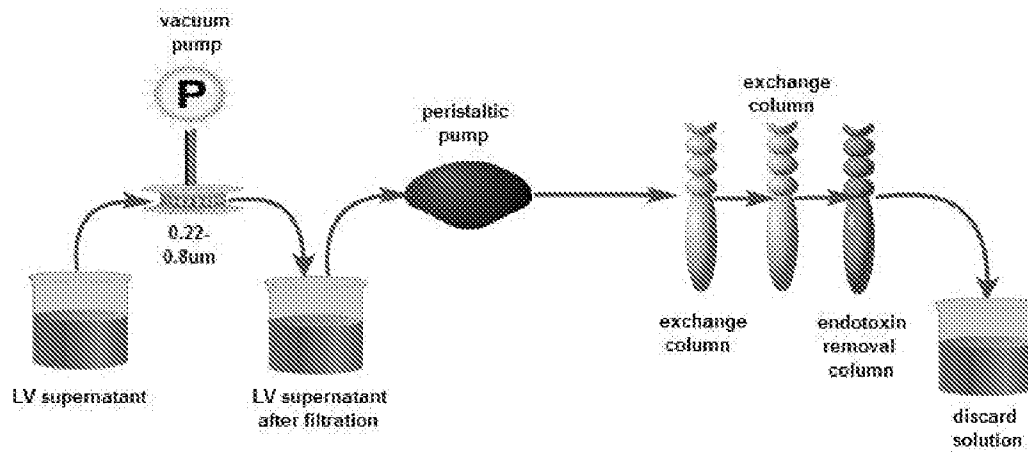


图8

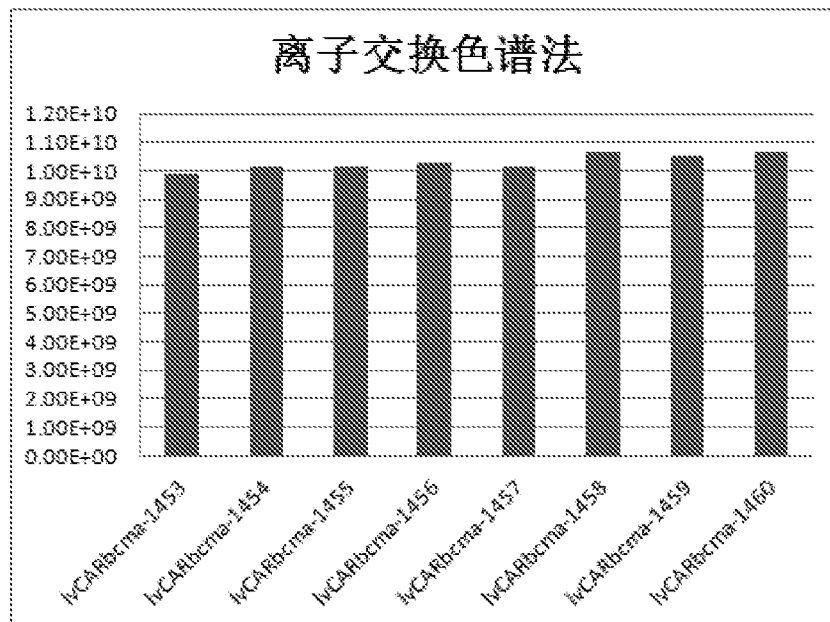


图9

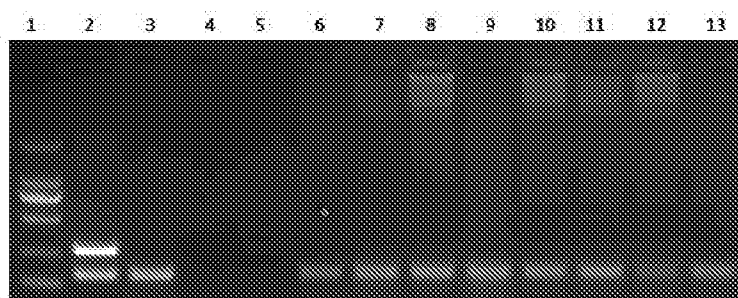


图10

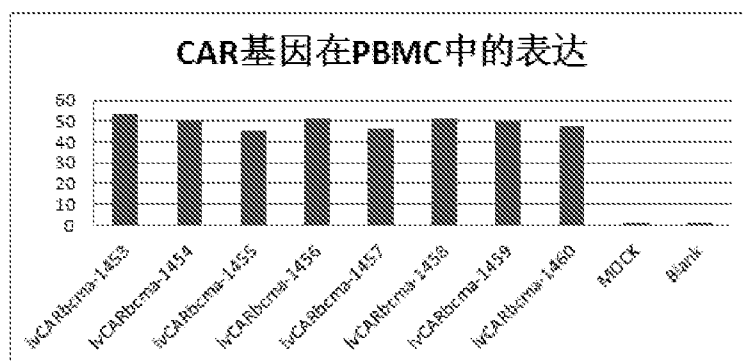


图11

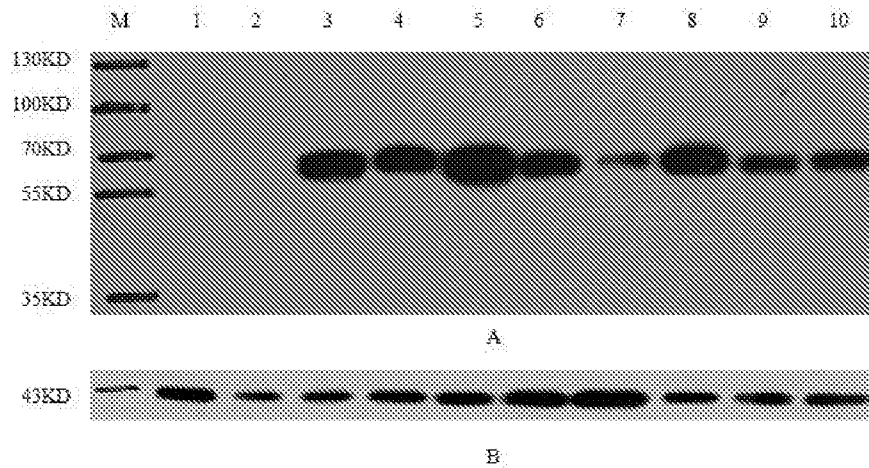


图12

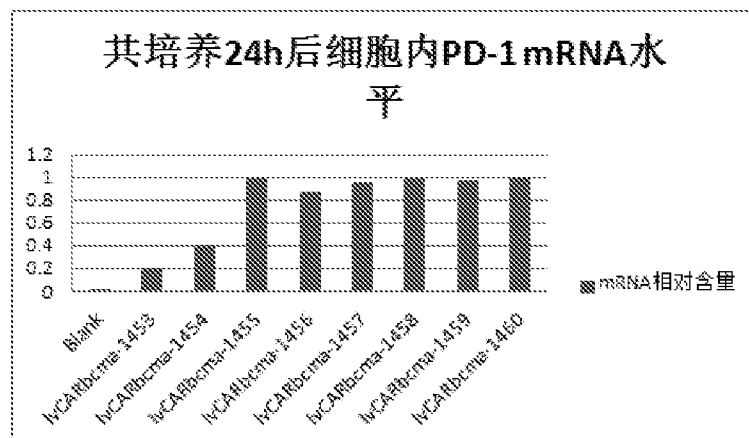


图13

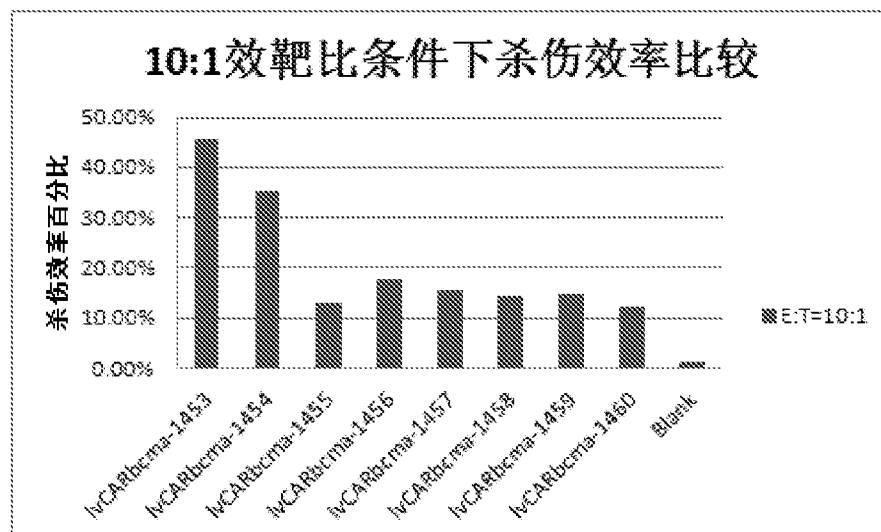


图14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/110653

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113 (2010.01) i; C12N 15/867 (2006.01) i; C12N 15/66 (2006.01) i; C12N 5/10 (2006.01) i; A61K 35/17 (2015.01) i; A61K 31/7088 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Database: DWPI, SIPOABS, CNABS, CPRSABS, CNKI, PUBMED, BAIDU XUESHU, GOOGLE

SCHOLAR, DDBJ+EMBL+GENBANK, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System Search words: 嵌合抗原受体, 细胞, 程序性死亡受体, 免疫治疗, 小干扰 RNA, 沉默, 抑制, CAR, CAR-T, PD-1, immunotherapy, siRNA, silent, inhibition, searching the sequence shown in SEQ ID NOs: 41-53

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107058315 A (SHANGHAI UNICAR-THERAPY BIO-MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD.) 18 August 2017 (18.08.2017), see claims 1-15	1-15
A	CN 106191062 A (GUANGDONG SOUTH CHINA VACCINE CORPORATION LIMITED) 07 December 2016 (07.12.2016), see the abstract, and claims 1-10	1-15
A	WO 2015023553 A3 (BIONUMERIK PHARMACEUTICALS INC.) 23 April 2015 (23.04.2015), see entire document	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 18 January 2018	Date of mailing of the international search report 14 February 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer SUN, Yanke Telephone No. (86-10) 62088439

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/110653

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☒ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/110653

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

[1]The first group inventions: claims 1-15 (all parts)

[2]Relate to a siRNA knocking down human's PD-1 and application thereof in the preparation of drugs for elimination or reduction of tumor immune evasion mechanism, comprise the siR-NA recombinant expression vector and construction method therefor and application thereof, and comprise the CART cells of siRNA and applications thereof. The sequence of the siRNA is shown in SEQ ID NOs: 41 and 42.

[3]The second to seventh group inventions: claims 1-15 (all parts)

[4]Respectively relate to a siRNA knocking down human's PD-1 and application thereof in the preparation of drugs for elimination or reduction of tumor immune evasion mechanism, comprise the siR-NA recombinant expression vector and construction method therefor and application thereof, and comprise the CART cells of siRNA and applications thereof. The sequence of the siRNA is shown in SEQ ID NOs: 43 and 44, 45 and 46, 47 and 48, 49 and 50, 51 and 52, 53 and 54.

[5]The above 7 groups of inventions are based on the 7 groups of siRNA targeting PD-1 gene respectively, since the PD-1 gene is a known gene, each target sequence and its corresponding siRNA are different from each other. Therefore, the above 7 groups of inventions do not share a same or corresponding special technical feature, and do not comply with the requirement of unity of invention as defined in PCT Rules 13.1 and 13.2.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/110653

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	周向军. 肿瘤个性化精准治疗:肿瘤免疫细胞治疗和基因测序分析的临床应用. 第十四届全国肿瘤生物治疗大会论文集. 15 May 2015 (15.05.2015), see entire document. non-official translation (ZHOU, Xiangjun. Accurate Treatment of Personalized Cancer: Clinical Application of Tumor Immunotherapy and Gene Sequencing Analysis. The 14th National Conference of Tumor Biotherapy Conference Proceedings.)	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/110653

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 107058315 A	18 August 2017	None	
CN 106191062 A	07 December 2016	None	
WO 2015023553 A3	23 April 2015	WO 2015023551 A1	19 February 2015
		WO 2015023552 A1	19 February 2015
		EP 3033150 A1	22 June 2016
		WO 2015023553 A2	19 February 2015
		EP 3033150 A4	28 June 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/110653

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; C12N 15/66(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: DWPI, SIPOABS, CNABS, CPRSABS, CNKI, PUBMED, 百度学术, GOOGLE学术, DDBJ+EMBL+GENBANK, 中国专利生物序列检索系统 检索词: 嵌合抗原受体, 细胞, 程序性死亡受体, 免疫治疗, 小干扰RNA, 沉默, 抑制, CAR, CAR-T, PD-1, immunotherapy, siRNA, silent, inhibition 对SEQ ID NOs: 41-53所示序列进行检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 107058315 A (上海优卡迪生物医药科技有限公司) 2017年 8月 18日 (2017 - 08 - 18) 参见权利要求1-15	1-15
A	CN 106191062 A (广东华南联合疫苗开发院有限公司) 2016年 12月 7日 (2016 - 12 - 07) 参见摘要以及权利要求1-10	1-15
A	WO 2015023553 A3 (BIONUMERIK PHARMACEUTICALS INC) 2015年 4月 23日 (2015 - 04 - 23) 参见全文	1-15
A	周向军. "肿瘤个性化精准治疗: 肿瘤免疫细胞治疗和基因测序分析的临床应用" 第十四届全国肿瘤生物治疗大会论文集, 2015年 5月 15日 (2015 - 05 - 15), 参见全文	1-15

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2018年 1月 18日

国际检索报告邮寄日期

2018年 2月 14日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

孙彦珂

电话号码 (86-10)62088439

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- ☐ 纸件形式
- ☒ 电子形式
- b. (提交时间)
- ☐ 含在申请提交时的国际申请中
- ☒ 以电子形式与国际申请一起提交
- ☐ 为检索之用随后提交本单位
2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 第1组发明：权利要求1-15（均为部分）
- [2] 涉及一种敲减人PD-1的siRNA及其在制备消除或减轻肿瘤的免疫逃逸机制药物中的应用，包含所述siRNA的重组表达载体及其构建方法、应用，和包含所述siRNA的CART细胞及其应用，其中siRNA的序列如SEQ ID NO：41和42所示；
- [3] 第2-7组发明：权利要求1-15（均为部分）
- [4] 分别涉及一种敲减人PD-1的siRNA及其在制备消除或减轻肿瘤的免疫逃逸机制药物中的应用，包含所述siRNA的重组表达载体及其构建方法、应用，和包含所述siRNA的CART细胞及其应用，其中siRNA的序列分别如SEQ ID NO：43和44、45和46、47和48、49和50、51和52、53和54所示；
- [5] 上述7组发明分别基于靶向PD-1基因的7组siRNA，由于PD-1基因是已知基因，且各个靶序列及其对应的siRNA都互不相同。因此，上述7组发明之间不具备相同或相应的特定技术特征，不符合PCT实施细则13.1和13.2有关单一性的规定。

1. ☒ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/110653

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	107058315	A	2017年 8月 18日	无			
CN	106191062	A	2016年 12月 7日	无			
WO	2015023553	A3	2015年 4月 23日	WO	2015023551	A1	2015年 2月 19日
				WO	2015023552	A1	2015年 2月 19日
				EP	3033150	A1	2016年 6月 22日
				WO	2015023553	A2	2015年 2月 19日
				EP	3033150	A4	2017年 6月 28日