



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108342363 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201710056395.0

A61K 35/17(2006.01)

(22)申请日 2017.01.25

A61P 35/00(2006.01)

(71)申请人 北京马力喏生物科技有限公司

地址 101111 北京市大兴区经济技术开发
区科创六街88号院亦庄生物医药园
A1-501室

(72)发明人 严勇朝 朱益林 陈思毅

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

代理人 赵天月

(51)Int.Cl.

C12N 5/10(2015.01)

C12N 7/01(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

C12N 15/864(2006.01)

权利要求书2页 说明书25页
序列表37页 附图2页

(54)发明名称

共表达抗MSLN嵌合抗原受体和免疫检查点抑制分子的转基因淋巴细胞及其用途

(57)摘要

本发明提出了一种转基因淋巴细胞、一种构建体和一种治疗癌症的治疗组合物,该转基因淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默以及表达嵌合抗原受体。其中,所述嵌合抗原受体包括:胞外区,所述胞外区包括单链抗体的重链可变区和轻链可变区,所述单链抗体特异性识别抗原MSLN;跨膜区,所述跨膜区与所述胞外区相连,并且嵌入到所述T淋巴细胞的细胞膜中;胞内区,所述胞内区与所述跨膜区相连,并且所述胞内区包括CD28的胞内段以及CD3 ζ 链。该转基因淋巴细胞具有抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制的特性,对肿瘤细胞的杀伤能力显著增强,尤其高表达MSLN的肿瘤具有显著的定向杀伤作用。

1. 一种T淋巴细胞,其特征在于,所述T淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默;
以及表达嵌合抗原受体,其中,
所述嵌合抗原受体包括:
胞外区,所述胞外区包括单链抗体的重链可变区和轻链可变区,所述单链抗体特异性识别抗原MSLN;
跨膜区,所述跨膜区与所述胞外区相连,并且嵌入到所述T淋巴细胞的细胞膜中;
胞内区,所述胞内区与所述跨膜区相连,并且所述胞内区包括CD28的胞内段以及CD3 ζ 链。
2. 一种慢病毒,其特征在于,所述慢病毒携带下列核酸分子:
编码嵌合抗原受体的核酸分子,所述嵌合抗原受体具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,所述编码嵌合抗原受体的核酸分子具有SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列;以及
沉默细胞免疫检查点的核酸分子,所述沉默细胞免疫检查点的核酸分子的核苷酸序列为选自SEQ ID NO:3~135的至少之一。
3. 一种慢病毒,其特征在于,所述慢病毒携带含有SEQ ID NO:136~141所示的核苷酸序列。
4. 一种转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞细胞免疫检查点被沉默;以及表达嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包括:
胞外区,所述胞外区包括抗体的重链可变区和轻链可变区,所述抗体能够与肿瘤抗原特异性结合;
跨膜区;以及
胞内区,所述胞内区包括免疫共刺激分子胞内段,
其中,所述抗体为单链抗体,所述肿瘤抗原为MSLN。
5. 根据权利要求4所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞细胞免疫检查点独立地选自CTLA4、PD1、TIM3、BTLA、LAG-3、IRAK-M、SOCS1、A20、CBL-B的至少之一。
6. 根据权利要求4所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞细胞免疫检查点被沉默是通过shRNA、反义核酸、核酶、显性负突变、CRISPR和锌指核酸酶至少之一实现的。
7. 根据权利要求4所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述免疫共刺激分子胞内段独立地选自4-1BB、OX-40、CD40L、CD27、CD30、CD28以及他们的衍生物的至少一种。
8. 根据权利要求5所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞细胞免疫检查点独立地选自CTLA4、PD1、CBL-B的至少之一。
9. 根据权利要求6所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞细胞免疫检查点被沉默是通过shRNA实现的。
10. 根据权利要求7所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述免疫共刺激分子胞内段是4-1BB或CD28的胞内段。
11. 根据权利要求4所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞是CD3⁺T淋巴细胞。
12. 根据权利要求4所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞是自然杀伤细胞。
13. 根据权利要求4所述的转基因淋巴细胞,其特征在于,所述淋巴细胞是自然杀伤T细

胞。

14. 一种构建体,其特征在于,所述构建体包括:

第一核酸分子,所述第一核酸分子编码嵌合抗原受体;以及

第二核酸分子,所述第二核酸分子沉默细胞免疫检查点,其中,所述细胞免疫检查点、所述嵌合抗原受体是如权利要求4~13任一项中所定义的。

15. 根据权利要求14所述的构建体,其特征在于所述第一核酸分子与所述第二核酸分子被设置在权利要求4~13任一项所述的淋巴细胞中表达所述嵌合抗原受体和沉默细胞免疫检查点。

16. 根据权利要求14所述的构建体,其特征在于,进一步包括:

第一启动子,所述第一启动子与所述第一核酸分子可操作地连接;以及

第二启动子,所述第二启动子与所述第二核酸分子可操作地连接。

17. 根据权利要求16所述的构建体,其特征在于,所述第一启动子和所述第二启动子分别独立地选自U6, H1, CMV, EF-1, LTR或RSV启动子。

18. 根据权利要求14所述的构建体,其特征在于,所述构建体的载体是非致病性病毒载体。

19. 根据权利要求18所述的构建体,其特征在于,所述病毒载体包括选自反转录病毒载体、慢病毒载体或腺病毒相关病毒载体的至少之一。

20. 一种制备权利要求1所述的T淋巴细胞或者权利要求4~13任一项所述的转基因淋巴细胞的方法,其特征在于,包括:

将权利要求14~19任一项所述的构建体或者权利要求2或3所述的慢病毒引入到淋巴细胞中或者T淋巴细胞。

21. 一种用于治疗癌症的治疗组合物,其特征在于,包括:

权利要求14~19任一项所述的构建体、权利要求2或3所述的慢病毒、权利要求1所述的T淋巴细胞或者权利要求4~13任一项所述的转基因淋巴细胞。

22. 根据权利要求21所述的治疗组合物,其特征在于,所述癌症包括选自间皮瘤,胰腺癌,卵巢癌,胆管癌,肺癌,胃癌,肠癌,食管癌和乳腺癌的至少之一。

23. 一种提高淋巴细胞活性的方法,所述淋巴细胞携带嵌合抗原受体,其特征在于,使所述淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默,

所述细胞免疫检查点、所述淋巴细胞、所述嵌合抗原受体如权利要求4~13任一项中所定义的,

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

24. 根据权利要求23所述的方法,其特征在于,所述肿瘤包括选自间皮瘤,胰腺癌,卵巢癌,胆管癌,肺癌,胃癌,肠癌,食管癌和乳腺癌的至少之一。

共表达抗MSLN嵌合抗原受体和免疫检查点抑制分子的转基因 淋巴细胞及其用途

技术领域

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

背景技术

[0002] 间质素(mesothelin,MSLN)是一种分化抗原,它在人类正常组织的表达仅限于的胸膜、心包膜和腹膜衬里的间皮细胞。然而,间质素却在多种人类癌症组织中高表达,包括几乎所有的间皮瘤和胰腺癌和约70%的卵巢癌和约50%的肺腺癌以及其他癌症,例如胆管癌,胃癌,肠癌,食管癌,乳腺癌。间质素基因编码71KDa的前体蛋白,前体蛋白继而被加工成31KDa的脱落片段和40KDa的蛋白片段,31KDa的脱落片段被称为巨核细胞促进因子(MPF),而40KDa的蛋白片段即被称为间质素,间质素通过糖基磷脂酰肌醇(glycosyl-phosphatidylinositol,GPI)的锚定作用固定在细胞膜上。

[0003] 以间皮瘤为例,间皮瘤有胸膜间皮瘤和腹膜间皮瘤之分,胸膜间皮瘤是胸膜原发性肿瘤,有局限型(多为良性)和弥漫型(都是恶性)之分,其中弥漫型恶性间皮瘤是胸部预后最坏的肿瘤之一。腹膜间皮瘤是指原发于腹膜间皮细胞的肿瘤。临床表现不具有特征性,常见的症状和体征有:腹痛、腹水、腹胀及腹部包块等。恶性胸膜间皮瘤的治疗,目前仍然没有有效的根治方法。治疗方法上,有姑息性治疗、外科治疗、化学治疗及放射治疗等,一般认为对于肿瘤相对局限的I期病人,主张做根治的胸膜肺切除术。对于II、III、IV期病人,根治性手术已经没有意义了,只有施行姑息性手术。事实上,多数病人到疾病明确诊断时,已处于II期以上。迅速增长的胸水常导致患者严重的呼吸困难,姑息性手术只能暂时提高这些晚期病人的生活质量,而无法根治。

[0004] 由此可见,开发针对间质素高表达肿瘤的治疗方法尤为迫切。

发明内容

[0005] 本申请是基于发明人对以下事实和问题的发现和认识作出的:

[0006] 间质素却在多种人类癌症组织中高表达,包括几乎所有的间皮瘤和胰腺癌和约70%的卵巢癌和约50%的肺腺癌以及其他癌症,例如胆管癌,胃癌,肠癌,食管癌,乳腺癌。因此,间质素代表着肿瘤免疫治疗领域中一个有着巨大吸引力的靶点。

[0007] 基于上述发现,发明人提出了一种携带沉默细胞免疫检查点的核酸分子和编码嵌合抗原受体的核酸分子的构建体和一种以此构建体导入后形成的转基因淋巴细胞,其编码的嵌合抗原受体特异性结合抗原MSLN。因此,本发明提出的构建体和转基因淋巴细胞可用于肿瘤,尤其是间质素阳性肿瘤的过继T细胞的免疫治疗;本发明所提出转基因淋巴细胞对高表达间质素肿瘤的特异杀伤能力强,对正常MSLN表达水平的间皮细胞具有较弱的杀伤。

[0008] 在本发明的第一方面,本发明提出了一种T淋巴细胞。根据本发明的实施例,所述T

淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默;以及表达嵌合抗原受体,其中,所述嵌合抗原受体包括:胞外区,所述胞外区包括单链抗体的重链可变区和轻链可变区,所述单链抗体特异性识别抗原MSLN;跨膜区,所述跨膜区与所述胞外区相连,并且嵌入到所述T淋巴细胞的细胞膜中;胞内区,所述胞内区与所述跨膜区相连,并且所述胞内区包括CD28的胞内段以及CD3 ζ 链。其中,细胞免疫检查点包括细胞表面或细胞内至少之一的免疫检查点。根据本发明的实施例,本发明实施例的T淋巴细胞具有抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制的特性,在体外的增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力显著提高,对肿瘤细胞的杀伤能力显著增强,尤其对高表达MSLN的肿瘤细胞具有显著的定向杀伤作用。

[0009] 在本发明的第二方面,本发明提出了一种慢病毒。根据本发明的实施例,所述慢病毒携带下列核酸分子:编码嵌合抗原受体的核酸分子,所述嵌合抗原受体具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,所述编码嵌合抗原受体的核酸分子具有SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列;以及沉默细胞免疫检查点的核酸分子,所述沉默细胞免疫检查点的核酸分子的核苷酸序列为选自SEQ ID NO:3~135的至少之一。

[0010]

MVLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQAQVQLVQSGAEVKRPGASVQVSCRASGYSINTYYMQWVRQAPGAGLEWMGVI
NPSGVTSYAQKFQGRVTLTNDTSTNTVYMQLNLSLTSADTAVYYCARWALWGDFGMDVWGKGLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSTLSASIGDRVITICRASEGIYHWLAWYQQKPKGKAPKLLIYKASSLASGAPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYPLTFGGGTKLEIKRASFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR
PAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:1)。

[0011]

ATGTTCTGCTGGTGACATCTCTCCTGCTCTGTGAAGTGCCTCATCCCCTTTTCTGCTCATTCCCACATTTCAGGC
TCAAGTCCAAGTGGTCCAAAGTGGTGTGAAGTCAAACGCCCGGTGCCCTCCGTCCAAGTCTCCTGCCGTGCCTCTG
GCTACTCGATTAACACCTATTACATGCAGTGGGTCCGTCAAGCACCGGGTGCAGGTCTGGAATGGATGGGTGTCATC
AATCCGTCCGGCGTGACCTCATATGCGCAGAAATTTCAAGTCCGCTTACCCTGACGAACGATACCAGCACGAATAC
CGTCTACATGCAGCTGAACTCTCTGACGAGTGCAGACACCGCGGTGTATTACTGCGCACGTTGGGCACTGTGGGGCG
ATTTCCGCATGGATGTTTGGGGCAAAGGTACGCTGGTGACCGTTAGCTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGT
AGTGGCGGTGGCGTTCTGATATTCAGATGACGCAAAGCCCGTCTACCCTGAGTGCCTCCATTGGTGACCGTGTAC
GATCACCTGTGCGCATCCGAAGGCATCTATCATTGGCTGGCTTGGTACCAGCAAAAACCGGGTAAAGCGCCGAAAC
TGCTGATCTATAAAGCAAGTTCCTGGCATCGGGTGTCCGAGCCGCTTTTTCAGTTCCGGTAGCGGCACCGATTTC
ACGCTGACCATCTCATCGCTGCAGCCGGACGATTTTCGCTACCTACTACTGCCAACAATACTCAAACCTACCCGCTGAC
CTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGCTAGCTTCGTGCCGGTCTTCTGCCAGCGAAGCCCACCACGA
CGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGG
CCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGG
GACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAACCACAGGAACAAACGGGGCAGAAAGAAAC
TCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTT
CCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGG
CCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGG

ACCCTGAGATGGGGGAAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAAGATAAGATG
GCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCT
CAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID NO:2)。

- [0012] GGCCAGGATGGTTCTTAGACT (SEQ ID NO:3)。
- [0013] GGATTTCCAGTGGCGAGAGAA (SEQ ID NO:4)。
- [0014] GCCUGUGUUCUCUGUGGACUAUG (SEQ ID NO:5)。
- [0015] GGUGCUGCUAGUCUGGGUCCUGG (SEQ ID NO:6)。
- [0016] GACAGAGAGAAGGGCAGAAGUGC (SEQ ID NO:7)。
- [0017] CAGCUUCUCCAACACAUCGGAGA (SEQ ID NO:8)。
- [0018] CCGUGUCACACAACUGCCCAACG (SEQ ID NO:9)。
- [0019] UAUGCCACCAUUGUCUUCCUAG (SEQ ID NO:10)。
- [0020] UGCUAAACUGGUACCGCAUGAGC (SEQ ID NO:11)。
- [0021] GUGACAGAGAGAAGGGCAGAAGU (SEQ ID NO:12)。
- [0022] CUGAGGAUGGACACUGCUCUUGG (SEQ ID NO:13)。
- [0023] AUCGGAGAGCUUCGUGC AAAACU (SEQ ID NO:14)。
- [0024] GGCAACGGAACCCAGATTTAT (SEQ ID NO:15)。
- [0025] GGAACCCAAATTACGTGTACT (SEQ ID NO:16)。
- [0026] GAACCCAAATTACGTGTACTA (SEQ ID NO:17)。
- [0027] GGGAGAAGACTATATTGTACA (SEQ ID NO:18)。
- [0028] GACGTTTATAGCCGAAATGAT (SEQ ID NO:19)。
- [0029] GACACTAATACACCAGGTAGA (SEQ ID NO:20)。
- [0030] ACCUCACUAUCCAAGGACUGAGG (SEQ ID NO:21)。
- [0031] AUGAGUUGACCUUCCUAGAUGAU (SEQ ID NO:22)。
- [0032] GGGGAAUGAGUUGACCUUCCUAG (SEQ ID NO:23)。
- [0033] CUCUGGAUCCUUGCAGCAGUUAG (SEQ ID NO:24)。
- [0034] CUCCUCUGGAUCCUUGCAGCAGU (SEQ ID NO:25)。
- [0035] UUUGUGUGAGUAUGCAUCUCC (SEQ ID NO:26)。
- [0036] CACCUCCAGUGGAAAUCAAGUGA (SEQ ID NO:27)。
- [0037] CACGGGACUCUACAUCUGCAAGG (SEQ ID NO:28)。
- [0038] UUCUGACUCCUCCUCUGGAUCC (SEQ ID NO:29)。
- [0039] AAGUCUGUGCGGCAACCUACAUG (SEQ ID NO:30)。
- [0040] GGTCGGTCAGAATGCCTATCT (SEQ ID NO:31)。
- [0041] GCCAATGACTTACGGGACTCT (SEQ ID NO:32)。
- [0042] GCAGAGGGAATTCGCTCAGAA (SEQ ID NO:33)。
- [0043] GGAAATTCGGGCACATCATAT (SEQ ID NO:34)。
- [0044] GATTAAGAGATGACTGGACTA (SEQ ID NO:35)。
- [0045] GAGATGACTGGACTAGGTCTA (SEQ ID NO:36)。
- [0046] AGGAAAUUCGGGCACAUCAUAUG (SEQ ID NO:37)。
- [0047] GACUGAUGAAAGGAUGUGAAUU (SEQ ID NO:38)。

- [0048] GCCACUGAUUUUCAAGAGAUCU (SEQ ID NO:39)。
- [0049] AGCAGAGUUUUCCCAUUUCAGA (SEQ ID NO:40)。
- [0050] AACUUAAACAGGCAUGUCAUUGC (SEQ ID NO:41)。
- [0051] UUCAGAAGAUAAUGACUCACAUG (SEQ ID NO:42)。
- [0052] GCCUCUGUAUUUAAGCCAACAGA (SEQ ID NO:43)。
- [0053] UGCUCAUGUGAUUGUGGAGUAGA (SEQ ID NO:44)。
- [0054] AUGUUUUCACAUCUCCCUUUGA (SEQ ID NO:45)。
- [0055] GAGAGACUUCACUGCAGCCUUC (SEQ ID NO:46)。
- [0056] GATTGCCTCTACTCATCTACTA (SEQ ID NO:47)。
- [0057] UCCUAAUGACAAUGGGUCAUACC (SEQ ID NO:48)。
- [0058] AAGACAUUGCCUGCCAUGCUUGG (SEQ ID NO:49)。
- [0059] GUCAUACCGCUGUUCUGCAAAU (SEQ ID NO:50)。
- [0060] CUCCUGUAUAGUUUACUCCUUU (SEQ ID NO:51)。
- [0061] UACCGCUGUUCUGCAAAUUUCA (SEQ ID NO:52)。
- [0062] AAAACAAACCAGGCAUUGUUUAU (SEQ ID NO:53)。
- [0063] AACUAGAAUGCCCUGUGAAUAC (SEQ ID NO:54)。
- [0064] GUGACUUGGUGCAAGCUAAUGG (SEQ ID NO:55)。
- [0065] AUCCAUGGGAAGAAUCAUGUGA (SEQ ID NO:56)。
- [0066] UGGUGCAAGCUAAUGGAACAAC (SEQ ID NO:57)。
- [0067] GCTGCTCACCTTATGAACCT (SEQ ID NO:58)。
- [0068] AGGACAUGGUGGUGGACGAGUGC (SEQ ID NO:59)。
- [0069] UGCUCUCCUGCACGAUAUCAGU (SEQ ID NO:60)。
- [0070] ACCUCUACUGGUUCCUGUACAUC (SEQ ID NO:61)。
- [0071] CCCUCCAACUCUGCUCCUCUAGG (SEQ ID NO:62)。
- [0072] CCCUGAGUGGACAGUCGUCUUCG (SEQ ID NO:63)。
- [0073] CUGCUCCAGGGAAGCUUCAUGG (SEQ ID NO:64)。
- [0074] CGCUCAAGGUCCUGUAUGCCACC (SEQ ID NO:65)。
- [0075] GAGUUCACCAAGCUACAUAUUUA (SEQ ID NO:66)。
- [0076] UGCUGCUGCUCACCCUUAUGAAC (SEQ ID NO:67)。
- [0077] CCCAUCUCGGUGCUCUUCUUUGA (SEQ ID NO:68)。
- [0078] GGGACATCGTCGAGCTATTCA (SEQ ID NO:69)。
- [0079] GGACATCGTCGAGCTATTCAT (SEQ ID NO:70)。
- [0080] GCCAATGTCACCGTGGATAAT (SEQ ID NO:71)。
- [0081] GTCATCTGTGGCAGTATATCA (SEQ ID NO:72)。
- [0082] GGATGTAGAGTAGTGTTAGAT (SEQ ID NO:73)。
- [0083] GGCAAAGTTAAGACCATCAAT (SEQ ID NO:74)。
- [0084] GACCAAATCCACGCTCAATTA (SEQ ID NO:75)。
- [0085] UACUGCUAAAUCUCCAUCAGC (SEQ ID NO:76)。
- [0086] GACUGAGAAGUUCUGUCUGAUUU (SEQ ID NO:77)。

- [0087] CUGUUUCAUCACCCAAACAUACU (SEQ ID NO:78)。
[0088] GAAGAUCUCCCAUCAUCUAAA (SEQ ID NO:79)。
[0089] UAGACCAAGGUAAAAGUGGAACA (SEQ ID NO:80)。
[0090] AAGAGGUUUUAUCUGAGCUUGA (SEQ ID NO:81)。
[0091] UACCUGCACAACGUUCAACCAUG (SEQ ID NO:82)。
[0092] GCCUGGAUUCAUGUCUCUCAUUU (SEQ ID NO:83)。
[0093] CCCUCGGAAUUUCUCUGCCAAGC (SEQ ID NO:84)。
[0094] UGCUGAAGAUCUCCCAUCAUCAC (SEQ ID NO:85)。
[0095] GCACCTCCTACCTCTTCATGT (SEQ ID NO:86)。
[0096] CGCACUUCGCGACAUUCGUUCG (SEQ ID NO:87)。
[0097] GGGGAGGGUCUCUGGCUUUUUU (SEQ ID NO:88)。
[0098] CAGCAUUAACUGGGAUGCCGUGU (SEQ ID NO:89)。
[0099] CCAGGACCUGAACUCGCACCUCC (SEQ ID NO:90)。
[0100] UACAUAUACCCAGUAUCUUUGCA (SEQ ID NO:91)。
[0101] GCCGACAAUGCAGUCUCCACAGC (SEQ ID NO:92)。
[0102] CCCUGGUUGUUGUAGCAGCUUA (SEQ ID NO:93)。
[0103] CUGCUGUGCAGAAUCCUAAAA (SEQ ID NO:94)。
[0104] UGGGAUGCCGUGUUUUUUGUUA (SEQ ID NO:95)。
[0105] UCGCACCUCUACCUCUUAUGU (SEQ ID NO:96)。
[0106] GCGGAAAGCTGTGAAGATACG (SEQ ID NO:97)。
[0107] ACAAAGCCCTCATCGACAGAA (SEQ ID NO:98)。
[0108] ATGCCACTTCTCAGTACATGT (SEQ ID NO:99)。
[0109] GTGGACTTCAGTACAACTCAC (SEQ ID NO:100)。
[0110] GTGGAATTTACTTGCCTCTCC (SEQ ID NO:101)。
[0111] GTTGGATGAAGCTAACTTACC (SEQ ID NO:102)。
[0112] ACTGGGAAGACGTGTA ACTCT (SEQ ID NO:103)。
[0113] AAGGAATTGCATCCAAGGTAT (SEQ ID NO:104)。
[0114] GGAATTGCATCCAAGGTATAC (SEQ ID NO:105)。
[0115] GGATGAGACTGGCAATGGTCA (SEQ ID NO:106)。
[0116] UCCUCAGUUUCGGGAGAUCAUCC (SEQ ID NO:107)。
[0117] GAGUCUCUAAAUCUCAGGAAUU (SEQ ID NO:108)。
[0118] AGCUCUAGUCCUUUUUGUGUAAU (SEQ ID NO:109)。
[0119] CACUGGAAAUGUUCAGAACUUGC (SEQ ID NO:110)。
[0120] AUGAUGAUGGGACAAUCUUAUC (SEQ ID NO:111)。
[0121] CACACUGUGUUUCAUCGAGUACA (SEQ ID NO:112)。
[0122] GCAGAACCAUCCAUGGACUGUGA (SEQ ID NO:113)。
[0123] AAAGAUGUGGCCUUUUUGUGAUGG (SEQ ID NO:114)。
[0124] UUCAGAACUUGCCAGUUUUGUCC (SEQ ID NO:115)。
[0125] AUGAGACUGGCAAUGGUCACAGG (SEQ ID NO:116)。

- [0126] GTCAATTCCAGGGAGATAACT (SEQ ID NO:117)。
[0127] GCCTGGAAGCAATGGCTCTAA (SEQ ID NO:118)。
[0128] GCACCAAACCCGGAAGCTATA (SEQ ID NO:119)。
[0129] GTTGCACTCGATTGGGACAGT (SEQ ID NO:120)。
[0130] GGATTATGTGAACCTACACCT (SEQ ID NO:121)。
[0131] GGAATCACAGCGAGTTCAAAT (SEQ ID NO:122)。
[0132] GCAAGGCATAGTCTCATTGAA (SEQ ID NO:123)。
[0133] GGTGAAGAGAGCCTTAGAGAT (SEQ ID NO:124)。
[0134] GTGAAGAGAGCCTTAGAGATA (SEQ ID NO:125)。
[0135] AGGAGCUAAGGUCUUUCCAAUG (SEQ ID NO:126)。
[0136] AUGUCGAUGCAAAAAUUGCAAAA (SEQ ID NO:127)。
[0137] GUCACAUGCUGGCAGAAAUCAAA (SEQ ID NO:128)。
[0138] UCCAGGUUACAUGGCAUUUCUCA (SEQ ID NO:129)。
[0139] UUGAACUUUGAACCGUGAAAUG (SEQ ID NO:130)。
[0140] UCCACAUCAACAGCUAAAUCAUU (SEQ ID NO:131)。
[0141] AUGCUGGCAGAAAUCAAGCAAU (SEQ ID NO:132)。
[0142] UGCAGAGAAUGACAAAGAUGUCA (SEQ ID NO:133)。
[0143] GGCAGAACUCACCAGUCACAUCA (SEQ ID NO:134)。
[0144] UCGGUCCUGUGAUAUGGUCACU (SEQ ID NO:135)。

[0145] 根据本发明的实施例,将本发明的慢病毒导入淋巴细胞所得的转基因淋巴细胞,其具有抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制的特性,在体外的增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力显著增强,对肿瘤细胞的杀伤能力显著增强,尤其对高表达MSLN的肿瘤细胞具有显著的定向杀伤作用。

[0146] 在本发明的第三方面,本发明提出了一种慢病毒。根据本发明的实施例,所述慢病毒携带含有SEQ ID NO:136、137、138、139、140或141所示的核苷酸序列。

[0147]

```
ATGGTTCTGCTGGTGACATCTCTCCTGCTCTGTGAACTGCCTCATCCCGCTTTTCTGCTCATTCCCGACATTCAGGC
TCAAGTCCAAGTGGTCCAAAGTGGTGTGAACTCAAACGCCCGGGTGCCTCCGTCCAAGTCTCCTGCCGTGCCTCTG
GCTACTCGATTAACACCTATTACATGCAGTGGGTCCGTCAAGCACCGGGTGCAGGTCTGGAATGGATGGGTGTCATC
AATCCGTCCGGCGTGACCTCATATGCGCAGAAATTTCAAGTTCGCGTTACCCTGACGAACGATAACCAGCACGAATAC
CGTCTACATGCAGCTGAACTCTCTGACGAGTGCAGACACCGCGGTGTATTACTGCGCACGTTGGGCACTGTGGGGCG
ATTTCCGCATGGATGTTTGGGGCAAAGGTACGCTGGTGACCGTTAGCTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGT
AGTGGCGGTGGCGGTTCTGATATTCAGATGACGCAAAGCCCGTCTACCCTGAGTGCCTCCATTGGTGACCGTGTAC
GATCACCTGTGCGCATCCGAAGGCATCTATCATTGGCTGGCTGGTACCAGCAAAAACCGGGTAAAGCGCCGAAAC
TGCTGATCTATAAAGCAAGTTCCTGGCATCGGGTGTCCGAGCCGCTTTTCAGGTTCCGGTAGCGGCACCGATTTC
ACGCTGACCATCTCATCGCTGCAGCCGGACGATTTGCTACCTACTACTGCCAACAATACTCAAACCTACCCGCTGAC
CTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGCTAGCACCCTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTC
CTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGG
GGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGTCTGCTGCTTTCACTCGT
```

GATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGA
CTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTC
AGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGA
GGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAG
AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGA
AGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCA
GGCCCTGCCGCTCGGTAATCCTACTGCgtcgaGCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTC
CCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATT
GTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC
AGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTCGACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCT
TCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGT
ACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATC
ATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCTCCCCA
GGCGCAGATCAAAGAGAGTTCAAGAGACTCTCTTTGATCTGCGCCTTTTTT (SEQ ID NO:136)。

[0148]

ATGGTTCTGCTGGTGACATCTCTCCTGCTCTGTGAACTGCCTCATCCCGCTTTTCTGCTCATTCCCGACATTCAGGC
TCAAGTCCAAGTGGTCCAAAGTGGTGTGAAGTCAAACGCCGGGTGCCTCCGTCCAAGTCTCCTGCCGTGCCTCTG
GCTACTCGATTAACACCTATTACATGCAGTGGGTCCGTCAAGCACCGGGTGCAGGTCTGGAATGGATGGGTGTCATC
AATCCGTCCGGCGTGACCTCATATGCGCAGAAATTTCAAGTTCGCGTACCCTGACGAACGATACCAGCACGAATAC
CGTCTACATGCAGCTGAACTCTCTGACGAGTGCAGACACCGCGGTGATTACTGCGCACGTTGGGCACTGTGGGGCG
ATTTCCGCATGGATGTTTGGGGCAAAGGTACGCTGGTGACCGTTAGCTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGT
AGTGGCGGTGGCGTTCTGATATTCAGATGACGCAAAGCCCGTCTACCCGAGTGCCTCCATTGGTGACCGTGTAC
GATCACCTGTGCGCATCCGAAGGCATCTATCATTTGGCTGGCTGGTACCAGCAAAAACCGGGTAAAGCGCCGAAAC
TGCTGATCTATAAAGCAAGTTCCTGGCATCGGGTCTCCGAGCCGCTTTTCAGGTTCCGGTAGCGGCACCGATTTT
ACGCTGACCATCTCATCGCTGCAGCCGGACGATTTGCTACCTACTACTGCCAACAATACTCAAACCTACCCGCTGAC
CTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGCTAGCACCCTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTC
CTACCATCGCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGG
GGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGTCTGCTGCTTTCACTCGT
GATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGA
CTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTC
AGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGA
GGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAG
AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGA
AGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCA
GGCCCTGCCGCTCGGTAATCCTACTGCgtcgaGCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTC
CCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATT
GTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC
AGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTCGACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCT
TCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGT

ACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATC
ATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGAAAGGACGAAACACCTCCCCA
ACACAGACGCCATGATTTGCTTCAAGAGAGCAAATCATGGCGTCTGTGTTTTTTT (SEQ ID NO:137)。

[0149]

ATGGTTCTGCTGGTGACATCTCTCCTGCTCTGTGAACTGCCTCATCCCGCTTTTCTGCTCATTCCCGACATTCAGGC
TCAAGTCCAAGTGGTCCAAAGTGGTGTGAAGTCAAACGCCGGGTGCCTCCGTCCAAGTCTCCTGCCGTGCCTCTG
GCTACTCGATTAACACCTATTACATGCAGTGGGTCCGTCAAGCACCGGGTGCAGGTCTGGAATGGATGGGTGTCATC
AATCCGTCCGGCGTGACCTCATATGCGCAGAAATTTCAAGGTCGCGTTACCCTGACGAACGATACCAGCACGAATAC
CGTCTACATGCAGCTGAACTCTCTGACGAGTGCAGACACCGCGGTGTATTACTGCGCACGTTGGGCACTGTGGGGCG
ATTTCCGCATGGATGTTTGGGGCAAAGGTACGCTGGTGACCGTTAGCTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGT
AGTGGCGGTGGCGGTTCTGATATTCAGATGACGCAAAGCCCGTCTACCCTGAGTGCCTCCATTGGTGACCGTGTAC
GATCACCTGTGCGCATCCGAAGGCATCTATCATTGGCTGGCTGGTACCAGCAAAAACCGGGTAAAGCGCCGAAAC
TGCTGATCTATAAAGCAAGTTCCTTGGCATCGGGTGTCCGAGCCGCTTTTCAGGTTCCGGTAGCGGCACCGATTTCC
ACGCTGACCATCTCATCGCTGCAGCCGGACGATTTCCGCTACCTACTACTGCCAACAATACTCAAACCTACCCGCTGAC
CTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGCTAGCACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTC
CTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGG
GGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGT
GATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGA
CTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCAGAGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTC
AGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCCGAGAGA
GGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAG
AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGA
AGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCA
GGCCCTGCCGCTCGGTAATCCTACTGCGTggaGCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTC
CCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATT
GTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC
AGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTCGACCAAGGTCCGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCCT
TCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGT
ACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATC
ATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGAAAGGACGAAACACCTCCCCG
CATCACTTGGGATTAATATTCAAGAGATATTAATCCCAAGTGATGCTTTTT (SEQ ID NO:138)。

[0150]

ATGGTTCTGCTGGTGACATCTCTCCTGCTCTGTGAACTGCCTCATCCCGCTTTTCTGCTCATTCCCGACATTCAGGC
TCAAGTCCAAGTGGTCCAAAGTGGTGTGAAGTCAAACGCCGGGTGCCTCCGTCCAAGTCTCCTGCCGTGCCTCTG
GCTACTCGATTAACACCTATTACATGCAGTGGGTCCGTCAAGCACCGGGTGCAGGTCTGGAATGGATGGGTGTCATC
AATCCGTCCGGCGTGACCTCATATGCGCAGAAATTTCAAGGTCGCGTTACCCTGACGAACGATACCAGCACGAATAC
CGTCTACATGCAGCTGAACTCTCTGACGAGTGCAGACACCGCGGTGTATTACTGCGCACGTTGGGCACTGTGGGGCG
ATTTCCGCATGGATGTTTGGGGCAAAGGTACGCTGGTGACCGTTAGCTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGT
AGTGGCGGTGGCGGTTCTGATATTCAGATGACGCAAAGCCCGTCTACCCTGAGTGCCTCCATTGGTGACCGTGTAC

GATCACCTGTCGCGCATCCGAAGGCATCTATCATTGGCTGGCTTGGTACCAGCAAAAACCGGGTAAAGCGCCGAAAC
TGCTGATCTATAAAGCAAGTTCCTTGGCATCGGGTGTCCGAGCCGCTTTTCAGGTTCCGGTAGCGGCACCGATTTC
ACGCTGACCATCTCATCGCTGCAGCCGGACGATTCGCTACCTACTACTGCCAACAATACTCAAACCTACCCGCTGAC
CTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGCTAGCACCCTACCCAGCACCAGGGCCACCCACCCCGGCTC
CTACCATCGCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGG
GGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCCCTGCTGCTTTCACTCGT
GATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGA
CTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTC
AGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCCGAGAGA
GGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAG
AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAACCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGA
AGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCA
GGCCCTGCCGCTCGGTAATCCTACTGCGTegaGCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTC
CCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATT
GTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC
AGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTCGACCAAGGTCCGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCT
TCATATTTGCATATACGATAACAAGGCTGTTAGAGAGATAAATAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGT
ACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATC
ATATGCTTACCCTAACTTGAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCTCCCCA
GGCGCAGATCAAAGAGAGTTCAAGAGACTCTCTTTGATCTGCGCCTTTTTTAGCTATCGATAGCTAAAAAACACAG
ACGCCATGATTTGCTCTCTTGAAGCAAATCATGGCGTCTGTGTTGGGAAGATCTGTGGTCTCATAACAGAACTTATA
AGATTCCCAAATCCAAAGACATTTACGTTTATGGTGATTTCCAGAACACATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGC
GCCACTCCCCTGTCCCTCACAGCCATCTTCCCTGCCAGGGCGCACGCGCGCTGGGTGTTCCCGCCTAGTGACACTGGG
CCCGCGATTCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTCGAATTGTCGAC (SEQ ID NO: 139)。

[0151]

ATGGTTCTGCTGGTGACATCTCTCTGCTCTGTGAACTGCCTCATCCCGCTTTTCTGCTCATTCCCGACATTCAGGC
TCAAGTCCAAGTGGTCCAAAGTGGTGTGAAGTCAAACGCCGGGTGCCCTCCGTCCAAGTCTCTGCCGTGCCTCTG
GCTACTCGATTAACACCTATTACATGCAGTGGGTCCGTCAAGCACCGGGTGCAGGTCTGGAATGGATGGGTGTCATC
AATCCGTCCGGCGTGACCTCATATGCGCAGAAATTTCAAGTTCGCGTTACCCTGACGAACGATACCAGCACGAATAC
CGTCTACATGCAGCTGAACTCTCTGACGAGTGCAGACACCGCGGTGTATTACTGCGCACGTTGGGCACTGTGGGGCG
ATTTCCGCATGGATGTTTGGGGCAAAGGTACGCTGGTGACCGTTAGCTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGT
AGTGGCGGTGGCGGTTCTGATATTACAGATGACGCAAAGCCCGTCTACCCTGAGTGCCTCCATTGGTGACCGTGTAC
GATCACCTGTCGCGCATCCGAAGGCATCTATCATTGGCTGGCTTGGTACCAGCAAAAACCGGGTAAAGCGCCGAAAC
TGCTGATCTATAAAGCAAGTTCCTTGGCATCGGGTGTCCGAGCCGCTTTTCAGGTTCCGGTAGCGGCACCGATTTC
ACGCTGACCATCTCATCGCTGCAGCCGGACGATTCGCTACCTACTACTGCCAACAATACTCAAACCTACCCGCTGAC
CTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGCTAGCACCCTACCCAGCACCAGGGCCACCCACCCCGGCTC
CTACCATCGCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGG
GGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCCCTGCTGCTTTCACTCGT
GATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGA

CTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTC
AGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGA
GGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAG
AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGA
AGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCA
GGCCCTGCCGCTCGGTAATCCTACTGCGt_{ega}GCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTC
CCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATT
GTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC
AGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTCGACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCT
TCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGT
ACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTGGGTAGTTTGAGTTTTAAAATTTATGTTTTAAAATGGACTATC
ATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGCTTTATATATCTTGTTGAAAGGACGAAACACCTCCCCA
GGCGCAGATCAAAGAGAGTTCAAGAGACTCTCTTTGATCTGCGCCTTTTTTAGCTATCGATAGCTAAAAAGCATCAC
TTGGGATTAATATCTCTTGAATATTAATCCCAAGTGATGCGGGGAAGATCTGTGGTCTCATAACAGAACTTATAAGAT
TCCCAAATCCAAAGACATTTACGTTTATGGTGATTTCCAGAACACATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGCGCCA
CTCCCCTGTCCCTCACAGCCATCTTCTGCCAGGGCGCACGCGCTGGGTGTTCCCGCCTAGTGACACTGGGCCCG
CGATTCTTGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTCGAATTGTCGAC (SEQ ID NO:140)。

[0152]

ATGGTTCTGCTGGTGACATCTCTCCTGCTCTGTGAACTGCCTCATCCCCTTTTCTGCTCATTCCCACATTCAGGC
TCAAGTCCAAGTGGTCCAAAGTGGTGCTGAAGTCAAACGCCGGGTGCCTCCGTCCAAGTCTCCTGCCGTGCCTCTG
GCTACTCGATTAACACCTATTACATGCAGTGGGTCCGTCAAAGCACCGGGTGCAGGTCTGGAATGGATGGGTGTCATC
AATCCGTCCGGCGTGACCTCATAATGCGCAGAAATTTCAAGTTCGCGTTACCCTGACGAACGATACCAGCACGAATAC
CGTCTACATGCAGCTGAACTCTCTGACGAGTGACAGACACCGCGGTGATTACTGCGCACGTTGGGCACTGTGGGGCG
ATTTCCGCATGGATGTTTGGGGCAAAGGTACGCTGGTGACCGTTAGCTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGT
AGTGGCGGTGGCGGTTCTGATATTCAGATGACGCAAAGCCCGTCTACCCTGAGTGCCTCCATTGGTGACCGTGTAC
GATCACCTGTGCGCATCCGAAGGCATCTATCATTGGCTGGCTGGTACCAGCAAAAACCGGGTAAAGCGCCGAAAC
TGCTGATCTATAAAGCAAGTTCCCTGGCATCGGGTGCTCCGAGCCGCTTTTCAGGTTCCGGTAGCGGCACCGATTTT
ACGCTGACCATCTCATCGCTGCAGCCGGACGATTTGCTACCTACTACTGCCAACAATACTCAAACCTACCCGCTGAC
CTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGCTAGCACCCTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTC
CTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGG
GGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGT
GATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGA
CTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTC
AGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGA
GGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAG
AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGA
AGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCA
GGCCCTGCCGCTCGGTAATCCTACTGCGTCGAGCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTC
CCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATT

GTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC
AGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTGCGACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCT
TCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGT
ACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATC
ATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCTCCCCA
GGCGCAGATCAAAGAGAGTTCAAGAGACTCTCTTTGATCTGCGCCTTTTTTAGCTATCGATAGCTAAAAAGCCTAGA
GAAGTTTTCAGGGAATCTCTTGAATTCCTGAAACTTCTCTAGGCGGGGAAGATCTGTGGTCTCATACAGAACTTATA
AGATTCCCAAATCCAAAGACATTTACGTTTTATGGTGATTTCCAGAACACATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGC
GCCACTCCCCTGTCCCTCACAGCCATCTTCTGCCAGGGCGCACGCGCGTGGGTGTTCCCGCCTAGTGACTGGG
CCCGCGATTCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTCAATTGTCGAC (SEQ ID NO:141)。

[0153] 根据本发明的实施例,将本发明的慢病毒导入淋巴细胞所得的转基因淋巴细胞,其具有抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制的特性,在体外的增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力显著增强,对肿瘤细胞的杀伤能力显著增强,尤其对高表达MSLN的肿瘤细胞具有显著的定向杀伤作用。

[0154] 在本发明的第四方面,本发明提出了一种转基因淋巴细胞。根据本发明的实施例,所述淋巴细胞细胞免疫检查点被沉默;以及表达嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包括:胞外区,所述胞外区包括抗体的重链可变区和轻链可变区,所述抗体能够与肿瘤抗原特异性结合;跨膜区;以及胞内区,所述胞内区包括免疫共刺激分子胞内段,其中,所述抗体为单链抗体,所述肿瘤抗原为MSLN。发明人惊奇的发现,细胞免疫检查点被沉默和表达抗MSLN的嵌合抗原受体的淋巴细胞的体外增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力以及在肿瘤病人体内的对肿瘤细胞的特异性杀伤能力大大提高,尤其对高表达MSLN的肿瘤细胞具有显著的定向杀伤作用。

[0155] 根据本发明的实施例,上述转基因淋巴细胞还可以具有下列附加技术特征至少之一:

[0156] 根据本发明的实施例,所述淋巴细胞细胞免疫检查点独立地选自CTLA4、PD1、TIM3、BTLA、LAG-3、IRAK-M、SOCS1、A20、CBL-B的至少之一。其中,CTLA4、PD1、TIM3、BTLA、LAG-3为细胞表面免疫检查点,IRAK-M、SOCS1、A20、CBL-B为细胞内免疫检查点。本发明实施例的免疫检查点具有负向调控和减弱细胞免疫应答的作用,其通过与肿瘤细胞上相应的配体的特异结合,导致T淋巴细胞增生性反应的下调,细胞因子的分泌减少,和T细胞的无能或凋亡。根据本发明的实施例,本发明实施例的细胞表面或细胞内免疫检查点的成功沉默,进一步提高了转基因淋巴细胞抵抗肿瘤介导的免疫抑制的功效,转基因淋巴细胞在体外扩增及在肿瘤病人体内的增殖和生存能力、对肿瘤细胞的定向杀伤作用进一步加强。

[0157] 根据本发明的实施例,所述淋巴细胞细胞表面免疫检查点被沉默是通过shRNA、反义核酸、核酶、显性负突变、CRISPR和锌指核酸酶至少之一实现的。根据本发明的实施例,本发明实施例的细胞免疫检查点的成功沉默,可显著提高本发明实施例的淋巴细胞抵抗肿瘤介导的免疫抑制的特性,进一步提高了转基因淋巴细胞对肿瘤细胞的定向杀伤作用。

[0158] 根据本发明的实施例,所述免疫共刺激分子胞内段独立地选自4-1BB、OX-40、CD40L、CD27、CD30、CD28以及他们的衍生物的至少一种。本发明实施例的免疫共刺激分子胞内段的表达以及细胞免疫检查点的沉默联合具有正向调控和增强细胞免疫应答的作用,使

得本发明实施例的转基因淋巴细胞增殖对肿瘤的定向杀伤作用效果更加显著；本发明实施例的免疫共刺激分子胞内段的表达以及细胞免疫检查点的沉默的联合，使得本发明实施例的转基因淋巴细胞的增殖能力以及对肿瘤的定向杀伤作用更加显著。

[0159] 根据本发明的实施例，所述淋巴细胞细胞免疫检查点是CTLA4、PD1、CBL-B。其中，CTLA4、PD1是细胞表面免疫检查点，CBL-B是细胞内免疫检查点。根据本发明的实施例，本发明实施例的淋巴细胞细胞表面免疫检查点CTLA4或PD1被沉默，或淋巴细胞细胞内免疫检查点是CBL-B被沉默，阻止了PD1或CTLA4分子表达与其相应配体PD-L1及PD-L2或CD80及CD86的结合，从而有效抑制了对T淋巴细胞的无能或凋亡，或通过CBL-B沉默，增强T细胞受体信号传导，使得转基因淋巴细胞在肿瘤病人体内的增殖和生存能力得到进一步提高，对肿瘤的定向杀伤作用效果更加显著。

[0160] 根据本发明的实施例，所述淋巴细胞细胞内免疫检查点被沉默是通过shRNA实现的。根据本发明的实施例，本发明实施例的shRNA携带特异性沉默细胞表面或细胞内至少之一免疫检查点的shRNA，本发明实施例的shRNA具有高效、特异性的沉默细胞表面或细胞内至少之一免疫检查点的作用，细胞免疫检查点的成功沉默，即细胞表面或细胞内免疫检查点的成功沉默，阻止了免疫检查点与相应配体的特异性结合，从而有效抑制了免疫检查点对T淋巴细胞无能或凋亡等的负调控机制，进而使得本发明实施例的转基因淋巴细胞在肿瘤病人体内的增殖和生存能力得到进一步提高，配合嵌合抗原受体的抗原靶向性，使得本发明实施例的转基因淋巴细胞对肿瘤的定向杀伤作用效果更加显著。

[0161] 根据本发明的实施例，所述免疫共刺激分子胞内段是4-1BB或CD28的胞内段。本发明中的转基因淋巴细胞的嵌合抗原受体的免疫共刺激分子胞内段是CD28或者4-1BB的胞内段。根据本发明的实施例，免疫共刺激分子胞内段是CD28或者4-1BB的胞内段，进一步增强了本发明实施例的转基因淋巴细胞的定向杀伤作用。

[0162] 根据本发明的实施例，所述淋巴细胞是CD3⁺T淋巴细胞或自然杀伤细胞或自然杀伤T细胞。本发明实施例的上述淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默，同时表达抗原特异性的嵌合抗原受体，如本发明的实施例的MSLN抗原特异性的嵌合抗原受体，上述淋巴细胞的细胞免疫杀伤作用的靶向性更强，在肿瘤病人体内的增殖和生存能力得到进一步提高，对肿瘤的定向杀伤作用效果更加显著。

[0163] 在本发明的第九方面，本发明提出了一种构建体。根据本发明的实施例，所述构建体包括：第一核酸分子，所述第一核酸分子编码嵌合抗原受体；以及第二核酸分子，所述第二核酸分子沉默细胞免疫检查点。其中，所述细胞免疫检查点、所述嵌合抗原受体如前所述。根据本发明的实施例，本发明实施例的构建体成功导入本发明实施例的淋巴细胞后，可有效沉默细胞表面或细胞内至少之一免疫检查点和表达抗原特异性的嵌合抗原受体，从而本发明实施例的淋巴细胞对肿瘤细胞，尤其是高表达MSLN的肿瘤细胞的定向杀伤作用更加显著。

[0164] 根据本发明的实施例，上述构建体还可以进一步包括下列附加技术特征至少之一：

[0165] 根据本发明的实施例，其特征在于所述第一核酸分子与所述第二核酸分子被设置在前面所述的淋巴细胞中沉默细胞免疫检查点和表达所述嵌合抗原受体。根据本发明的实施例，成功设置了上述第一核酸分子以及第二核酸分子的淋巴细胞，其淋巴细胞的细胞表

面或细胞内至少之一的免疫检查点被成功沉默,同时在淋巴细胞表面成功表达了抗原特异性嵌合抗原受体,如本发明实施例的MSLN特异性的嵌合抗原受体,其具有杀伤力更强和特异性更强的肿瘤杀伤效果。

[0166] 根据本发明的实施例,所述构建体进一步包括:第一启动子,所述第一启动子与所述第一核酸分子可操作地连接;以及第二启动子,所述第二启动子与所述第二核酸分子可操作地连接。根据本发明的实施例,第一启动子以及第二启动子的引入,使得第一核酸分子以及第二核酸分子分别独立的表达,有效保证了嵌合抗原受体抗原靶向性的生物学作用及以有效沉默了细胞免疫检查点,使得本发明实施例的淋巴细胞的靶向作用更强,对肿瘤的杀伤作用,尤其对高表达MSLN的肿瘤细胞的定向杀伤更加显著。

[0167] 根据本发明的实施例,所述第一启动子、所述第二启动子分别独立地选自U6,H1,CMV,EF-1,LTR,RSV启动子。根据本发明的实施例,本发明实施例的上述启动子具有启动效率高、特异性强的特点,从而保证了细胞免疫检查点的高效沉默和嵌合抗原受体的高效表达,从而本发明实施例的淋巴细胞的体外增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力大大提高,对肿瘤的定向杀伤效果更加显著。

[0168] 根据本发明的实施例,所述构建体的载体是非致病性病毒载体。非致病性病毒载体的引入大大提高了构建体在淋巴细胞中的复制和扩增效率,从而大大提高了细胞免疫检查点的沉默和嵌合抗原受体在淋巴细胞中的高效表达,使得淋巴细胞体外增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力大大提高,淋巴细胞的靶向作用进一步增强,对肿瘤细胞的杀伤作用更加显著。

[0169] 根据本发明的实施例,所述病毒载体包括选自反转录病毒载体、慢病毒载体或腺病毒相关病毒载体的至少之一。本发明实施例的病毒的载体在病毒包装和感染过程中,病毒感染范围广泛,既可感染终末分化细胞,又可感染处于分裂期的细胞,其基因组既可整合到宿主染色体,又可游离在宿主染色体之外,从而可实现广谱而高效的感染效率,细胞免疫检查点被高效沉默和嵌合抗原受体在淋巴细胞中的高效表达,使得本发明实施例的淋巴细胞的体外增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力大大提高,淋巴细胞的靶向作用进一步增强,对肿瘤细胞,尤其对高表达MSLN的肿瘤细胞的定向杀伤作用更加显著。

[0170] 在本发明的第十方面,本发明提出了一种制备前面所述的T淋巴细胞或者转基因淋巴细胞的方法。根据本发明的实施例,所述方法包括:将前面所述的构建体或者前面所述的慢病毒引入到淋巴细胞中或者T淋巴细胞。所述构建体或慢病毒成功引入上述淋巴细胞或者T淋巴细胞中,实现了淋巴细胞的细胞免疫检查被沉默和嵌合抗原受体的表达,从而本发明实施例的制备方法制备的转基因淋巴细胞或T淋巴细胞在肿瘤病人体内和体外的增殖及肿瘤病人体内存活能力大大提高,转基因淋巴细胞或T淋巴细胞对肿瘤细胞,尤其是对高表达MSLN的肿瘤细胞的靶向杀伤作用更强。

[0171] 在本发明的第十一方面,本发明提出了一种用于治疗癌症的治疗组合物。根据本发明的实施例,所述治疗组合物包括:上述构建体、慢病毒、T淋巴细胞或者转基因淋巴细胞。上述任意一种治疗组合物的组成均可实现转基因淋巴细胞或T淋巴细胞的细胞表面或细胞内免疫检查点的沉默和嵌合抗原受体在转基因淋巴细胞或T淋巴细胞中的高效表达,从而使得所得转基因淋巴细胞或T淋巴细胞具有显著的抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制,在肿瘤病人体外和体内的增殖及肿瘤病人体内存活能力大大提高,转基因淋巴细胞或T淋巴

细胞对肿瘤细胞的靶向杀伤作用更强,本发明实施例的治疗癌症的治疗组合物对肿瘤细胞的靶向杀伤作用显著增强,尤其是对高表达MSLN的肿瘤细胞的靶向杀伤作用显著增强。

[0172] 根据本发明的实施例,上述治疗组合物还可以进一步包括下列附加技术特征至少之一:

[0173] 根据本发明的实施例,所述癌症包括选自间皮瘤,胰腺癌,卵巢癌,胆管癌,肺癌,胃癌,肠癌,食管癌和乳腺癌的至少之一。上述肿瘤细胞具有MSLN的特异性高表达,本发明实施例的治疗组合物可使淋巴细胞细胞表面或细胞内免疫检查点的沉默和高效表达抗原特异性嵌合抗原受体,如本发明实施例的MSLN抗原特异性嵌合抗原受体,所得淋巴细胞或T淋巴细胞具有显著的抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制的特性,在肿瘤的微环境中的存活能力大大提高,所得淋巴细胞或T淋巴细胞对高表达MSLN的肿瘤细胞的靶向杀伤作用更强。

[0174] 在本发明的第十二方面,本发明提出了一种提高淋巴细胞活性的方法,所述淋巴细胞携带嵌合抗原受体,根据本发明的实施例,所述方法包括:使所述淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默。所述细胞免疫检查点、所述淋巴细胞和所述嵌合抗原受体是如前所定义的,所述淋巴细胞活性包括所述淋巴细胞体外增殖能力、在肿瘤病人体内的增殖和生存能力以及所述淋巴细胞在肿瘤病人体内的定向杀伤能力的至少一种。根据本发明的实施例,本发明实施例的淋巴细胞的细胞表面或细胞内免疫检查点被沉默,淋巴细胞被活化、增生性反应上调、细胞因子分泌增多、抗凋亡能力增强,使得本发明实施例的淋巴细胞在体外扩增、在肿瘤病人体内的增殖及肿瘤病人体内存活能力大大提高,上述淋巴细胞细胞免疫检查点的沉默配合淋巴细胞嵌合抗原受体的抗原特异性功效,从而实现了有效抵抗肿瘤细胞介导的免疫抑制,对高表达MSLN的肿瘤细胞的靶向杀伤作用显著增强。

[0175] 根据本发明的实施例,上述提高淋巴细胞活性的方法还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0176] 根据本发明的实施例,所述肿瘤包括选自间皮瘤,胰腺癌,卵巢癌,胆管癌,肺癌,胃癌,肠癌,食管癌和乳腺癌的至少之一。上述肿瘤细胞特异性高表达MSLN。本发明实施例的提高淋巴细胞活性的方法,使淋巴细胞表达MSLN抗原特异性的嵌合抗原受体,同时使淋巴细胞的免疫检查点被沉默,本发明实施例的提高淋巴细胞活性的方法进一步提高了对高表达MSLN的肿瘤细胞的定向杀伤能力,如上述间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌、胆管癌、肺癌、胃癌、肠癌、食管癌或乳腺癌细胞。

[0177] 需要说明的是,本发明中所使用的术语“细胞免疫检查点”包括细胞表面免疫检查点和细胞内免疫检查点,“细胞表面免疫检查点”是一种淋巴细胞表面的膜蛋白,其与肿瘤细胞上表达的配体相互作用,可以抑制抗肿瘤淋巴细胞反应。“细胞内免疫检查点”是一种细胞内蛋白,此种细胞免疫检查点蛋白一种负调控的细胞信号传导机构蛋白,可以抑制抗肿瘤淋巴细胞反应。

附图说明

[0178] 图1是根据本发明实施例的共表达MSLN抗原特异性的嵌合抗原受体和沉默人类细胞免疫检查点的慢病毒载体的结构示意图;

[0179] 图2是根据本发明实施例的共表达MSLN抗原特异性的嵌合抗原受体和沉默PD1的淋巴细胞,其增殖能力增强的结果图;

[0180] 图3是根据本发明实施例的共表达MSLN抗原特异性的嵌合抗原受体和沉默PD1的淋巴细胞,其干扰素- γ 分泌增多的结果图;以及

[0181] 图4是根据本发明实施例的共表达MSLN抗原特异性的嵌合抗原受体和沉默PD1的淋巴细胞,其杀伤肿瘤细胞能力增强的结果图。

具体实施方式

[0182] 下面详细描述本发明的实施例,下面描述的实施例是示例性的,旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0183] T淋巴细胞或转基因淋巴细胞

[0184] 在本发明的一方面,本发明提出了一种T淋巴细胞或转基因淋巴细胞。根据本发明的实施例,本发明实施例的T淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默;以及表达嵌合抗原受体,其中,嵌合抗原受体包括:胞外区,胞外区包括单链抗体的重链可变区和轻链可变区,单链抗体特异性识别抗原MSLN;跨膜区,跨膜区与胞外区相连,并且嵌入到所T淋巴细胞的细胞膜中;胞内区,胞内区与跨膜区相连,并且胞内区包括CD28或4-1BB的胞内段以及CD3 ζ 链。其中,细胞免疫检查点包括细胞表面或细胞内的免疫检查点。本发明实施例的T淋巴细胞或转基因淋巴细胞细胞免疫检查点被沉默联合表达MSLN抗原特异性的嵌合抗原受体,本发明实施例的T淋巴细胞或转基因淋巴细胞在肿瘤病人体内和体外的增殖和生存能力以及在肿瘤病人体内的对特异性肿瘤细胞的杀伤能力显著增强,尤其对高效表达MSLN的肿瘤细胞的特异性杀伤效果大大提高。

[0185] 肿瘤可以避免免疫监视,通过刺激其免疫抑制性受体的表达而关闭淋巴细胞对其的免疫杀伤反应;作为免疫负调节机制,激活的细胞毒性T淋巴细胞(CTLs)也表达负调控的监管机构,即细胞表面或细胞内的免疫检查点分子。如本发明实施例的程序性细胞死亡1受体(PD1)表达在活化CTLs上,其与肿瘤细胞上表达的程序性死亡配体1(PD-L1)相互作用,可以抑制抗肿瘤T细胞反应。许多肿瘤表达PD-L1,PD-L1与其配体PD-1的结合,导致CTLs增生性反应的下调,细胞因子的分泌减少和T细胞的无能或凋亡。本发明实施例的细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA4)是另一个T细胞的关键负面调节因子,其可抑制T细胞活化,其通过与表达在抗原递呈细胞上的配体B7.1、B7.2(CD80和CD86)的相互作用而抑制T细胞的活化。本发明实施例的细胞毒性T淋巴细胞内的CBL-B(E3泛素蛋白连接酶CBL-B)是细胞内的另一个关键负面调节因子,其通过抑制T细胞受体(TCR)信号传导,来抑制T细胞的活性。因此,本发明实施例的T淋巴细胞或转基因淋巴细胞的免疫检查点被沉默,T淋巴细胞或转基因淋巴细胞的在肿瘤病人体内的增殖和生存能力显著提高。

[0186] 另外,根据本发明的实施例,上述嵌合抗原受体胞外区的抗体为单链抗体。发明人发现,单链抗体可去除非特异性反应的竞争性表面蛋白,同时单链抗体更易渗透肿瘤组织增加药物治疗浓度。本发明实施例的转基因淋巴细胞表达单链抗体的嵌合抗原受体,大大提高了转基因淋巴细胞对靶向肿瘤细胞的定向杀伤作用。

[0187] 根据本发明的另外一些实施例,上述抗体的结合抗原为MSLN。因此本发明实施例的转基因淋巴细胞针对表达抗原MSLN的细胞具有定向性杀伤作用,抗原抗体的特异性结合作用更强,大大提高了本发明实施例的转基因淋巴细胞对MSLN抗原表达肿瘤细胞的定向杀伤作用。

[0188] 根据本发明的另外一些实施例,淋巴细胞的细胞免疫检查点包括细胞表面和细胞内的免疫检查点,本发明实施例的淋巴细胞细胞表面免疫检查点独立地选自CTLA4、PD1、TIM3、BTLA、LAG-3至少之一,淋巴细胞细胞内免疫检查点独立地选自IRAK-M、SOCS1、A20、CBL-B的至少之一。上述分子能够与肿瘤细胞表达的抗原特异性结合,抑制淋巴细胞的活化,促进淋巴细胞的无能或凋亡,从而负向调控和减弱细胞免疫应答。根据本发明的实施例,上述细胞表面或细胞内免疫检查点的成功沉默,进一步提高了转基因淋巴细胞在肿瘤病人体内的增殖和生存能力,对肿瘤细胞的定向杀伤作用进一步加强。

[0189] 根据本发明的另外一些实施例,本发明实施例的淋巴细胞细胞表面免疫检查点被沉默是通过shRNA、反义核酸、核酶、显性负突变、锌指核酸酶和CRISPR至少之一实现的。

[0190] 小发夹RNA或短发夹RNA (shRNA) 是siRNA (小干扰RNA) 的导入形式,siRNA是一种小RNA分子(由21~25个核苷酸组成),由Dicer (RNAase III 家族中对双链RNA具有特异性剪切作用的酶) 加工而成;siRNA在RNA沉默通路中起中心作用,对特定信使RNA (mRNA) 进行降解,为转录水平后调控。

[0191] 反义核酸包括反义RNA和反义DNA,反义RNA是指能和mRNA完全互补的一段小分子RNA或寡聚核苷酸片段,反义DNA是指能与基因DNA双链中的有义链互补结合的短小DNA分子,反义RNA和反义DNA主要是通过mRNA的翻译和基因DNA的转录而发挥作用的;反义核酸一方面通过与靶mRNA结合形成空间位阻效应,阻止核糖体与mRNA结合,另一方面其与mRNA结合后激活内源性RNA酶或核酶,进而降解mRNA;反义DNA与基因DNA双螺旋的调控区特异结合形成DNA三聚体,或与DNA编码区结合,终止正在转录的mRNA链的延长;反义核酸还可抑制转录后mRNA的加工修饰,如5'端加帽、3'端加尾、中间剪接和内部碱基甲基化等,并阻止成熟mRNA由细胞核向细胞浆内运输,因此,反义RNA是一种有效的沉默目的基因的技术。

[0192] 核酶是具有催化功能的RNA分子,是生物催化剂,可降解特异的mRNA序列,核酶通过催化转磷酸酯和磷酸二酯键水解反应参与RNA自身剪切、加工过程,与一般的反义RNA相比,核酶具有较稳定的空间结构,不易受到RNA酶的攻击,更重要的是,核酶在切断mRNA后,又可从杂交链上解脱下来,重新结合和切割其它的mRNA分子。

[0193] 显性负性突变是指某些信号转导蛋白突变后不仅自身无功能,还能抑制或阻断同一细胞内的野生型信号转导蛋白的作用,其主要通过和野生型蛋白形成二聚物的方式实现,这种突变毒性作用大,能显著抑制或阻断细胞内目标信号转导蛋白的作用。

[0194] 锌指核酸酶由一个DNA识别域和一个非特异性核酸内切酶构成,DNA识别域是由一系列Cys2-His2锌指蛋白串联组成(一般3~4个),每个锌指蛋白识别并结合一个特异的三联体碱基,锌指蛋白形成 α - β - β 二级结构,其中 α 螺旋的16氨基酸残基决定锌指的DNA结合特异性,骨架结构保守,对决定DNA结合特异性的氨基酸引入序列的改变可以获得新的DNA结合特异性,从而可以针对不同的目的基因设计不同的氨基酸引入序列,实现不同目的基因的特异性沉默。

[0195] CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats,规律成簇间隔短回文重复),是一种基因编辑器,是细菌用以保护自身对抗病毒的一个系统。它可以用来删除、添加、激活或抑制其他生物体的目标基因,这些目标基因包括人细胞内的目标基因。

[0196] CRISPR簇是一个广泛存在于细菌和古生菌基因组中的特殊DNA重复序列家族,其

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

[0197] 综上所述,shRNA、反义核酸、核酶、显性负突变、CRISPR、锌指核酸酶为特异性沉默目标基因的有效手段,沉默基因的手段不受特别限制,本领域技术人员可根据具体的实验目的和条件选择,如本发明实施例所采用的shRNA、反义核酸、核酶、显性负突变,CRISPR或锌指核酸酶的至少之一,实现目的基因的特异性沉默。

[0198] 根据本发明的实施例,淋巴细胞细胞表面或细胞内免疫检查点被沉默优选采用shRNA实现。ShRNA所携带的siRNA分子通常是一个长度在10和30之间的碱基对的双重区域。本发明实施例的PD1或CTLA4或CBL-B siRNA被设计为同源于PD1或CTLA4或CBL-B mRNA的编码区域,通过mRNA的降解来抑制基因表达。siRNA关联于被称为诱导RNA沉默复合物 (RISC) 的多重蛋白复合物,在此期间正义链被酶裂解。被激活的RISC中基于序列同源性,指引RISC到对应的mRNA;相同的核酸酶切割靶向PD1或CTLA4或CBL-B mRNA,产生特定基因PD1或CTLA4或CBL-B沉默,抑制特定基因PD1或CTLA4或CBL-B的表达。siRNA以shRNA的形式导入细胞 (shRNA包含大约18-23的核苷酸siRNA序列,后跟一个9-15长度的核苷酸环和一个siRNA序列的反向补充),shRNA的设计较好的避免了在3' UTR细胞基因中的匹配点;确保了适当的链选择。一个单一siRNA分子可被重复应用于多靶向mRNA分子的分裂。RNAi (RNA干扰) 可通过引入合成siRNA的方式被诱导。根据本发明的实施例,本发明实施例的shRNA不断产自细胞内,因此其效果更加持久,从而延长shRNA周期,本发明实施例采用的shRNA具有高效、特异性的沉默细胞表面或细胞内免疫检查点的作用,细胞表面或细胞内免疫检查点的成功沉默,使得转基因淋巴细胞具有显著的抵抗肿瘤介导的免疫抑制的特性,在肿瘤病人体内的

增殖和生存能力得到进一步提高,对肿瘤的定向杀伤作用效果更加显著。

[0199] 另外,根据本发明的实施例,所述免疫共刺激分子胞内段独立地选自4-1BB、OX-40、CD40L、CD27、CD30、CD28以及他们的衍生物的至少一种。免疫共刺激分子胞内段的表达和细胞表面或细胞内至少之一免疫检查点的沉默联合具有正向调控和增强细胞免疫应答的作用,使得转基因淋巴细胞具有显著的抵抗肿瘤介导的免疫抑制的特性,在肿瘤病人体内的增殖和生存能力得到进一步提高,对高表达MSLN的肿瘤的定向杀伤作用效果更加显著。

[0200] 根据本发明的另外一些实施例,淋巴细胞细胞表面免疫检查点优选CTLA4或PD1,淋巴细胞内免疫检查点优选CBL-B。根据本发明的实施例,淋巴细胞细胞表面免疫检查点CTLA4或PD1被沉默或细胞内免疫检查点CBL-B被沉默,使得转基因淋巴细胞具有更加显著的抵抗肿瘤介导的免疫抑制的特性,其在肿瘤病人体内的增殖和生存能力得到进一步提高,对肿瘤的定向杀伤作用效果更加显著。

[0201] 根据本发明的实施例,本发明实施例的淋巴细胞是CD3⁺淋巴细胞或自然杀伤细胞或自然杀伤T细胞。CD3⁺淋巴细胞是总T细胞,自然杀伤细胞是免疫细胞的一种,非特异性识别靶细胞,自然杀伤T细胞是具有T细胞和自然杀伤细胞受体的T细胞亚群。上述淋巴细胞中免疫检查点被沉默和表达嵌合抗原受体,使得上述淋巴细胞的细胞免疫的靶向杀伤性更强,对肿瘤细胞的杀伤作用效果更加显著。

[0202] 慢病毒或构建体

[0203] 在本发明的另一方面,本发明提出了一种慢病毒或构建体。根据本发明的实施例,慢病毒或构建体携带下列核酸分子:编码嵌合抗原受体的核酸分子,嵌合抗原受体具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,编码嵌合抗原受体的核酸分子具有SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列;以及沉默细胞表面或细胞内免疫检查点的核酸分子,沉默细胞表面免疫检查点的核酸分子的核苷酸序列为选自SEQ ID NO:3~68的至少之一,沉默细胞内免疫检查点的核酸分子的核苷酸序列为选自SEQ ID NO:69~135的至少之一。其中,SEQ ID NO:3~14是人类程序性死亡受体1 (PD1) siRNA核苷酸序列,SEQ ID NO:15~30是人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4 (CTLA4) siRNA序列,SEQ ID NO:31~46是人类T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3 (TIM3) siRNA序列,SEQ ID NO:47~57是人类T淋巴细胞衰减因子 (BTLA) siRNA序列,SEQ ID NO:58~68是人类淋巴细胞活化基因3蛋白 (LAG-3) siRNA序列,SEQ ID NO:69~85是人类IRAK-M (白细胞介素-1受体相关激酶3) siRNA核苷酸序列,SEQ ID NO:86~96是人类SOCS1 (细胞因子信号转导抑制因子1) siRNA序列,SEQ ID NO:97~116是人类A20 (肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) siRNA序列,SEQ ID NO:117~135是人类CBL-B (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) siRNA序列,根据本发明的实施例,将本发明实施例的慢病毒或构建体导入淋巴细胞所得的转基因淋巴细胞中,其细胞表面的免疫检查点PD1、CTLA4、TIM3、BTLA、LAG-3或细胞内免疫检查点IRAK-M、SOCS1、A20、CBL-B被特异性沉默和抑制表达,同时在其细胞表面表达抗MSLN的嵌合抗原受体,从而本发明实施例的转基因淋巴细胞具有了显著的抵抗肿瘤介导的免疫抑制的功效,抗凋亡能力和增殖能力增强、定向杀伤能力显著提高,本发明实施例的转基因淋巴细胞在肿瘤病人体内和体外的增殖和生存能力以及在肿瘤病人体内的杀伤能力大大提高,尤其对高表达MSLN的肿瘤细胞特异性杀伤效果尤为显著。

[0204] 根据本发明地实施例,本发明实施例的慢病毒或构建体携带含有SEQ ID NO:136、

137、138、139、140或141所示的核苷酸序列。其中,SEQ ID NO:136是共表达抗MSLN嵌合抗原受体和沉默细胞免疫检查点PD-1的核酸分子(MSLN-CAR/iPD1),SEQ ID NO:137是共表达抗MSLN嵌合抗原受体和沉默细胞免疫检查点CBL-B的核酸分子(MSLN-CAR/iCBL-B),SEQ ID NO:138是共表达抗MSLN嵌合抗原受体和沉默细胞免疫检查点CTLA4的核酸分子(MSLN-CAR/iCTLA4),SEQ ID NO:139是共表达抗MSLN嵌合抗原受体、沉默细胞免疫检查点PD1和沉默另一个细胞免疫检查点CBL-B的核酸分子(MSLN-CAR/iPD1-CBL-B),SEQ ID NO:140是共表达抗MSLN嵌合抗原受体、沉默细胞免疫检查点PD1和沉默另一个细胞免疫检查点CTLA4的核酸分子(MSLN-CAR/iPD1-CTLA4),SEQ ID NO:141是共表达抗MSLN嵌合抗原受体、第一沉默细胞免疫检查点PD1的核酸分子和第二沉默细胞免疫检查点PD1的核酸分子(MSLN-CAR/iPD1-PD1)。根据本发明的实施例,将本发明实施列的慢病毒导入淋巴细胞所得的转基因淋巴细胞,其细胞的免疫检查点PD1或CTLA4或CBL-B被特异性沉默,以及抗MSLN的嵌合抗原受体表达,使得转基因淋巴细胞具有显著的抵抗肿瘤介导的免疫抑制的功效,其抗凋亡能力和增殖能力增强、定向杀伤能力显著提高,从而使得转基因淋巴细胞在肿瘤病人体外和体内的增殖和生存能力以及在肿瘤病人体内的杀伤能力大大提高,尤其对高表达MSLN的肿瘤细胞的特异性杀伤效果尤为显著。

[0205] 根据本发明的实施例,发明人是通过如下方式实现上述细胞嵌合抗原受体以及表面或细胞内免疫检查点shRNA分别独立地表达的,其中,需要说明的是,此处的表达既指蛋白的表达又指RNA转录。

[0206] 启动子:第一启动子,第一启动子与编码嵌合抗原受体的核酸分子可操作地连接;以及第二启动子,第二启动子与沉默细胞免疫检查点的核酸分子可操作地连接。根据本发明的实施例,所采用的第一启动子、第二启动子分别独立地选自U6,CMV,H1,EF-1,LTR,RSV启动子,第一以及第二启动子的引入,使得编码嵌合抗原受体的核酸分子和沉默细胞免疫检查点的核酸分子分别独立的表达,从而有效沉默了细胞表面或细胞内免疫检查点,并且保证了嵌合抗原受体的高效表达,使得淋巴细胞在肿瘤环境中的成活率大大提高,淋巴细胞的靶向作用更强,对肿瘤的特异性杀伤作用更加显著。

[0207] 根据本发明的实施例,也可进一步引入第三启动子,第三启动子独立地选自U6,CMV,H1,EF-1,LTR,RSV启动子的至少之一,第三启动子与沉默细胞的免疫检查点的核酸分子可操作的连接,第三启动子和第二启动子所连接的沉默细胞的免疫检查的核酸分子不同,第三启动子和第二启动子分别启动沉默不同免疫检查点的shRNA。

[0208] 通过上述第一、第二启动子或进一步第三启动子的引入,使得细胞表面或细胞内免疫检查点被高效沉默和嵌合抗原受体高效地表达在本发明实施例的转基因淋巴细胞膜上,从而高效抑制了免疫检查点的免疫负调控和保证了嵌合抗原受体的生物学作用,从而使得淋巴细胞在肿瘤环境中的成活率大大提高,淋巴细胞的靶向杀伤作用更加显著。

[0209] 另外,根据本发明的实施例,本发明实施例的构建体的载体是非致病性病毒载体。非致病性病毒载体大大提高了构建体在淋巴细胞中的复制和扩增效率,进而本发明实施例的淋巴细胞在肿瘤病人体内的增殖和生存能力大大提高,淋巴细胞的靶向作用进一步增强,对肿瘤细胞的杀伤作用更加显著。

[0210] 根据本发明的实施例,本发明实施例的构建体的病毒载体选自反转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或腺病毒关联病毒载体的至少之一。根据本发明的实施例,本发明

实施例的病毒的载体在病毒包装和感染过程中,病毒感染范围广泛,既可感染终末分化细胞,又可感染处于分裂期的细胞,既可整合到宿主染色体,又可游离在宿主染色体之外,实现广谱而高效的感染效率,从而细胞表面或细胞内免疫检查点被高效沉默和嵌合抗原受体在淋巴细胞中高效表达,本发明实施例的淋巴细胞的在肿瘤病人体内的增殖和生存能力大大提高,淋巴细胞的靶向作用进一步增强,对肿瘤细胞的杀伤作用更加显著。

[0211] 根据本发明的具体实施例,以构建一个慢病毒载体为例,发明人为了构建一个慢病毒载体,在某些病毒序列的位置,将目的核酸插入到病毒基因组中,从而产生复制缺陷的病毒。为了产生病毒体,发明人进而构建包装细胞系(包含gag,pol和env基因,但不包括LTR和包装成分)。发明人将含有目的基因的重组质粒,连同慢病毒LTR和包装序列,一起引入包装细胞系中。包装序列允许重组质粒RNA转录产物被包装到病毒颗粒中,然后被分泌到培养基中。进而发明人收集包含重组慢病毒的基质,有选择性地浓缩,并用于基因转移。慢载体可以感染多种细胞类型,包括可分裂细胞和不可分裂细胞。

[0212] 另外,根据本发明的实施例,本发明实施例的慢病毒是复合慢病毒,除了常见的慢病毒基因gag,pol和env,还包含有调控和结构功能的其他基因。慢病毒载体是本领域技术人员所熟知的,慢病毒包括:人类免疫缺陷病毒HIV-1,HIV-2和猿猴免疫缺陷病毒SIV。慢病毒载体通过多重衰减艾滋病毒致病基因产生,例如全部删除基因env,vif,vpr,vpu和nef,使慢病毒载体形成生物安全型载体。重组慢病毒载体能够感染非分裂细胞,同时可用于体内和体外基因转移和核酸序列表达。例如:在合适的宿主细胞中,和带有包装功能(gag,pol,env,rev和tat)的两个或更多的载体一起,能够感染非分裂细胞。重组病毒的靶向性,是通过抗体或特定配体(靶向特定细胞类型受体)与膜蛋白的结合来实现的。同时,重组病毒的靶向性通过插入一个有效序列(包括调控区域)到病毒载体中,连同另一个编码了特定靶细胞上的受体的配体的基因,使载体具有了特定的靶向。各种有用的慢病毒载体,以及各种方法和操作等产生的载体,用于改变细胞的表达。根据本发明的实施例,本发明实施例的慢病毒载体可有效运送和共表达shRNA(siRNA的转运形式),该小shRNA可以有效抑制PD1或CTLA4或CBL-B的表达。

[0213] 根据本发明的实施例,本发明实施例的腺关联病毒载体(AAV)可使用一种或多种为人熟知的血清类型腺关联病毒载体的DNA构建。本领域技术人员构建一个合适的腺关联病毒载体,以此携带和共表达小发夹RNA,该小发夹RNA可以抑制PD1或CTLA4或CBL-B基因的表达。

[0214] 另外,根据本发明的实施例,本发明实施例的也包含微基因。微基因意味着用组合(选定的核苷酸序列和可操作的必要的相关连接序列)来指导转化、转录和/或基因产物在体内或体外的宿主细胞中的表达。应用“可操作的连接”序列包含连续目的基因的表达控制序列,和作用于反式或远距离控制目的基因的表达控制序列。

[0215] 另外,本发明实施例的载体还包括常规控制元素,在和质粒载体一起的细胞转染或/和病毒载体一起的细胞感染中,这些元素允许转录、转化和/或小发夹RNA的表达。大量的表达控制序列(包括天然的,可诱导和/或特定组织的启动子)可能被使用。根据本发明的实施例,表达shRNA的启动子为RNA聚合酶启动子。同时,根据本发明的实施例,启动子为选自U6,H1,pol I,pol II and pol III的RNA聚合酶启动子。根据本发明的实施例,启动子为组织特异型启动子。根据本发明的实施例,启动子为诱导型启动子。根据本发明的实施例,

启动子为选自基于所选载体的启动子。根据本发明的实施例,当选择慢病毒载体时,启动子为U6,H1,CMV IE基因,EF-1 α ,泛素C,或磷酸甘油激酶(PGK)启动子。其他常规表达控制序列包括可选标记或报告基因,包括编码遗传霉素,潮霉素,氨苄青霉素或嘌呤霉素耐药性等的核苷酸序列。载体的其他组件包括复制起点。

[0216] 构建载体的技术为本领域技术人员所熟知的,这些技术包括常规克隆技术,例如在本发明实施例中所使用的shRNA、聚合酶链反应和任何适当的提供所需的核苷酸序列的方法。

[0217] 根据本发明的实施例,发明人构建了共表达小发夹RNA(shRNA)(用来抑制免疫检查点)以及嵌合抗原受体(CAR)的病毒载体。本发明实施例的运送沉默PD1或CTLA4或CBL-B的siRNA的小发夹RNA以及表达嵌合抗原受体(CAR)的病毒载体或质粒是复合的,此病毒载体或质粒可结合聚合物或其他材料来增加其稳定性,或协助其靶向运动。

[0218] 制备转基因淋巴细胞的方法

[0219] 在本发明的另一方面,本发明提出了一种制备前面所述的T淋巴细胞或者转基因淋巴细胞的方法。根据本发明的实施例,该方法包括:将前面所述的构建体或者前面所述的慢病毒引入到淋巴细胞中或者T淋巴细胞。引入方式可以选自电转或病毒感染宿主细胞的方式引入。本发明实施例的构建体或慢病毒成功引入上述淋巴细胞或者T淋巴细胞中,实现了针对抗原MSLN的嵌合抗原受体的表达和淋巴细胞的细胞表面或细胞内免疫检查点被沉默,从而使得所得淋巴细胞或T淋巴细胞具有显著的抵抗肿瘤介导的免疫抑制的功效,在肿瘤病人体内和体外的增殖及肿瘤病人体内存活能力大大提高,淋巴细胞或T淋巴细胞对肿瘤细胞,尤其对高表达MSLN的肿瘤细胞的靶向杀伤作用更强。

[0220] 治疗癌症的治疗组合物

[0221] 在本发明的另一方面,本发明的提出了一种用于治疗癌症的治疗组合物。根据本发明的实施例,该治疗组合物包括:上述构建体、上述慢病毒、上述T淋巴细胞或者上述转基因淋巴细胞。上述任意一种治疗组合物的组成均可实现针对抗原MSLN嵌合抗原受体在转基因淋巴细胞或T淋巴细胞中的高效表达和转基因淋巴细胞或T淋巴细胞细胞表面或细胞内免疫检查点的沉默,从而使得所得转基因淋巴细胞或T淋巴细胞在体外扩增、在肿瘤病人体内的增殖及肿瘤病人体内存活能力大大提高,转基因淋巴细胞或T淋巴细胞对高表达MSLN的肿瘤细胞的靶向杀伤作用更强。

[0222] 根据本发明的实施例,提供给患者的本发明实施例的治疗组合物,较好的应用于生物兼容溶液或可接受的药学运载载体。作为准备的各种治疗组合物被悬浮或溶解在医药上或生理上可接受的载体,如生理盐水;等渗的盐溶液或其他精于此道的人的比较明显的配方中。适当的载体在很大程度上取决于给药途径。其他有水和无水的等渗无菌注射液和有水和无水的无菌悬浮液,是医药上可接受的载体。

[0223] 根据本发明的实施例,足够数量的病毒载体被转导入靶向T细胞中,并提供足够强度的转基因,沉默PD1或CTLA4或CBL-B和表达特有的抗MSLN嵌合抗原受体。治疗试剂的剂量主要取决于治疗状况,年龄,体重,病人的健康程度,从而可能造成病人的变异性。

[0224] 沉默PD1或CTLA4或CBL-B以及表达特有的针对抗原MSLN嵌合抗原受体的这些方法是联合治疗的一部分。这些病毒载体和用于过继免疫治疗的抗肿瘤T细胞,可以被单独或结合其他治疗癌症的方法一起执行。在合适的条件下,一个治疗方法的包括使用一个或多个

药物治疗。

[0225] 根据本发明的实施例,所述癌症包括选自间皮瘤,胰腺癌,卵巢癌,胆管癌,肺癌,胃癌,肠癌,食管癌和乳腺癌的至少之一。下列生物效应:细胞免疫检查点的沉默,联合嵌合抗原受体在转基因淋巴细胞或T淋巴细胞中的高效表达,使得所得淋巴细胞或T淋巴细胞在上述肿瘤的微环境中的存活能力大大提高,淋巴细胞或T淋巴细胞对肿瘤细胞的靶向杀伤作用更强,尤其对高表达MSLN的上述肿瘤细胞的杀伤作用更加显著。

[0226] 提高淋巴细胞活性的方法

[0227] 在本发明的另一方面,本发明提出了一种提高淋巴细胞活性的方法,本发明实施例的淋巴细胞携带嵌合抗原受体,根据本发明的实施例,该方法包括:使所述淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默,细胞免疫检查点、淋巴细胞、嵌合抗原受体是如前所定义的。根据本发明的实施例,本发明实施例的淋巴细胞活性包括淋巴细胞体外增殖能力,在肿瘤病人体内的增殖和生存能力以及淋巴细胞在肿瘤病人体内的杀伤能力的至少一种。根据本发明的实施例,本发明实施例的淋巴细胞的细胞免疫检查点被沉默,淋巴细胞被活化、增生性反应上调、细胞因子分泌增多、抗凋亡能力增强。本发明实施例的淋巴细胞在体外扩增和增殖、对肿瘤细胞的靶向杀伤作用显著增强。

[0228] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。

[0229] 本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J.萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0230] 实施例1

[0231] 本发明实施例中所用到的细胞系和基本实验技术如下所述:

[0232] 慢病毒的产生和人T淋巴细胞的转导

[0233] 产生复制缺陷的慢病毒载体,并将慢病毒载体离心收集用于人T淋巴细胞的转导。下面简要介绍慢病毒载体的产生、收集的实验过程:将293T细胞铺在底面积为150-平方厘米的细胞培养皿中,并根据说明书,使用Express-In(购自Open Biosystems/Thermo Scientific,Waltham,MA)对293T细胞进行病毒转导。每盘细胞加入15微克的慢病毒转基因质粒、5微克的pVSV-G(VSV糖蛋白表达质粒)、10微克的pCMV8.74质粒(Gag/Pol/Tat/Rev表达质粒)和174微升的Express-In(浓度为1微克/微升)。分别于24小时和48小时收集上清,并使用超速离心机在28,000rpm(离心机转子为Beckman SW 32Ti,购自Beckman Coulter,Brea,CA)的条件下离心2小时。最后用0.75ml的RPMI-1640培养基对病毒质粒沉淀进行重悬。

[0234] 从健康志愿者供体上分离人原代T淋巴细胞。人T淋巴细胞培养在RPMI-1640培养基中并使用抗CD3和CD28的单克隆抗体包被的珠(购自Invitrogen,Carlsbad,CA)进行刺激激活。人T淋巴细胞激活后的18~24小时,采用自旋-接种的方法对T淋巴细胞进行转导,转导过程如下所述:在24-孔板中,每孔铺有 0.5×10^6 T淋巴细胞,向每孔细胞中加入0.75ml的上述重悬的病毒上清和Polybrene(浓度为8微克/ml)。细胞和病毒质粒的混合液在台式离心机(购自Sorvall ST 40;Thermo Scientific)中离心,离心条件是室温,2500rpm,时间为

90分钟。人重组白细胞介素-2 (IL-2; 购自Novartis, Basel, Switzerland) 每隔2~3天加入T淋巴细胞培养液中, IL-2的终浓度为100-IU/ml, 在T淋巴细胞培养过程中, 保持细胞的密度为 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ /ml。一旦被转导的T淋巴细胞出现休眠, 例如细胞生长速度变慢和细胞变小, 其中, 细胞生长速度和大小是通过Coulter Counter (购自Beckman Coulter) 评估的, 或被转导的T淋巴细胞在某个计划的时间点上, T淋巴细胞即可用来做功能分析。

[0235] 本申请的实施例中所用的流式细胞仪为BD FACSCanto II (购自BD Biosciences), 并且流式细胞分析数据使用FlowJo version 7.2.5软件 (购自Tree Star, Ashland, OR) 进行分析。

[0236] 测定细胞因子的分泌

[0237] 在质粒转导后的2-7天, 非转导或转导了嵌合抗原受体质粒的T细胞 (细胞个数是 1×10^6 /孔) 与人胸膜间皮瘤细胞, human pleural mesothelioma cells (来自ATCC) 共培养, 实验过程中改变不同的效靶细胞比例。应用特定的酶联免疫吸附测定法 (细胞因子酶联免疫吸附测试试剂盒, 购自R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) 检测细胞上清液中细胞因子的产量。上述细胞上清液取自培养了24小时、48小时和72小时之后的细胞的上清, 测定结果用来衡量有代表性的细胞因子 (干扰素- γ) (IFN γ) 的产量。

[0238] 简要测定过程如下: 酶标板中加入100微升/孔的作为一系列标准对照的细胞因子稀释溶液 (如IFN γ) 或待测细胞上清溶液, 并将酶标板在室温下放置2小时。2小时后吸弃酶标板中溶液并用400微升的洗液润洗酶标板, 润洗四次。润洗后, 向酶标板每个孔中加入200微升的酶联抗细胞因子抗体。继续在室温下放置2个小时, 之后向每孔中加入200微升的底物溶液。加入底物溶液后, 将酶标板在室温下放置30分钟, 之后, 向每孔中加入50微升的终止反应液。在30分钟内测定酶标板每孔的光密度。酶标仪设置在450nm。

[0239] 铬释放实验

[0240] 实施例中应用4-小时⁵¹Cr释放法分析评估抗MSLN嵌合抗原受体T细胞 (抗MSLN CAR T淋巴细胞) 的细胞毒活性。具体步骤如下: 目标测试细胞用⁵¹Cr在37摄氏度下标记1小时。标记后, 用含有10%胎牛血清 (FCS) 的RPMI培养基润洗细胞。润洗后, 将细胞重悬在相同的培养基中, 重悬细胞的浓度是 1×10^5 /ml。转导后T细胞以不同的靶效细胞比值 (T:E) 加入目标测试细胞悬浮液中, 并将细胞种在96-孔中, 每孔体积是200微升。将细胞在37度培养箱中培养4小时。4小时后, 从每孔中取出30微升的上清放于计数器的96-微孔板进行计数分析。分析仪器是顶级计数NXT微闪烁计数器 (购自Packard Bioscience)。所有计数孔中效应细胞的数目是基于T细胞总数来计算的。被标记的目标测试细胞是MSLN⁺MSTO-211H (人胸膜间皮瘤细胞, human pleural mesothelioma cells (来自ATCC))。

[0241] 实施例2构建共表达沉默细胞免疫检查点shRNA和抗MSLN嵌合抗原受体的载体

[0242] 本实施例中, 发明人将编码有抗人MSLN的单链抗体的序列、4-1BB胞内段和T细胞受体组合的 ζ -链序列克隆到含有EF-1启动子的慢病毒载体 (lentiviral vector) 上, 克隆过程中, 选择的限制性酶切是XbaI和NotI双酶切, 以及NotI和XhoI双酶切, 通过酶切、连接、筛选和目的质粒的扩增, 生成表达抗MSLN嵌合抗原受体的慢病毒质粒 (LV-MSLN CAR)。包含U6启动子和人PD1 shRNA (iPD1) 或CBL-B shRNA (iCBL-B) 或CTLA4 shRNA (iCTLA4) 的序列被克隆进LV-MSLN CAR载体质粒, 构建成LV-MSLN CAR/iPD1或LV-MSLN CAR/iCBL或LV-MSLN CAR/iCTLA4。图1是慢病毒载体的示意图, 包含编码抗MSLN嵌合抗原受体的序列, U6或H1启

动子序列,PD1 shRNA或CBL-B shRNA或CTLA4 shRNA序列。抗MSLN嵌合抗原受体的序列在启动子EF-1的启动调控下,CTLA4,PD1或者CBL-B shRNA序列在启动子U6或H1的启动调控下。

[0243] 实施例3共表达PD1 shRNA和抗MSLN嵌合抗原受体的T淋巴细胞具有细胞增殖能力更高的特点

[0244] 在本实施例中,外周血淋巴细胞取自不记名供血者。外周血淋巴细胞通过梯度离心进行分离,梯度离心机为Ficoll-Hypaque。在T淋巴细胞激活因子磁珠CD3/CD28(购自Invitrogen,Carlsbad,CA)存在下,被激活的T淋巴细胞经过慢病毒载体转导、体外扩增培养,方法如实施例1所述。在慢病毒载体转导后的2-7天,转导的T细胞(细胞个数是 1×10^6 /孔)与MSLN⁺MSTO-211H共培养,4天后,细胞数目前由流式仪检测。实验结果如图2所示。图2结果表明,转导了LV-MSLN CAR/iPD1的T淋巴细胞比转导了LV-MSLN CAR或空载LV-GFP的T淋巴细胞的细胞数显著增加。标注代表每3个孔的平均值 \pm SD。(P<0.05;LV-MSLN CAR/iPD1 vs. LV-MSLN CAR)。

[0245] 实施例4共表达PD1 shRNA和抗MSLN嵌合抗原受体的T淋巴细胞具有细胞因子分泌更多的特点

[0246] 在T淋巴细胞激活因子磁珠CD3/CD28存在下,被激活的T淋巴细胞经过慢病毒载体转导、体外扩增培养,方法如实施例1所述。在慢病毒载体转导后的2-7天,转导的T细胞(细胞个数是 1×10^6 /孔)与MSLN⁺MSTO-211H细胞共培养,4天后,通过ELISA检测细胞因子的分泌。实验结果如图3所示。图3结果表明,转导了LV-MSLN CAR/iPD1的T淋巴细胞比转导了LV-MSLN CAR或空载LV-GFP的T淋巴细胞分泌更多的IFN γ (P<0.05;LV-MSLN CAR/iPD1 vs. LV-MSLN CAR)。这说明转导了LV-MSLN CAR/iPD1的T淋巴细胞比转导LV-MSLN CAR的T淋巴细胞的产生细胞因子能力显著提高。

[0247] 实施例5共表达PD1 shRNA和抗MSLN嵌合抗原受体的T淋巴细胞肿瘤细胞溶解能力增强。

[0248] 在本实施例中,外周血淋巴细胞取自不记名供血者。外周血淋巴细胞通过梯度离心进行分离,梯度离心机为Ficoll-Hypaque。T淋巴细胞与T细胞激活因子磁珠CD3/CD28(购自Invitrogen,Carlsbad,CA)在5%CO₂、37摄氏度下孵育培养72小时,培养基是加有2mmol/L谷氨酰胺,10%高温灭活的胎牛血清(FCS)(购自Sigma-Aldrich Co.)和100U/ml的青霉素/链霉素双抗的RPMI培养基1640(购自Invitrogen Gibco Cat.no.12633-012)。激活培养72小时后,用洗液润洗细胞,将磁珠洗去。将T细胞种在铺有重组纤连蛋白片段(FNch-296; Retronectin)细胞培养皿上,并用慢病毒转导,转导慢病毒分别为LV-MSLN CAR/iPD1, LV-MSLN CAR或空载(LV-GFP)转导过程如实施例1所述。转导后的T细胞培养在RPMI-1640培养基中并用重组人类IL-2因子(100ng/ml;购自R&D Systems)进行诱导扩增7-10天,然后进行功能测试实验。发明人测量转导了不同慢病毒的T细胞(效应细胞)对MSLN⁺MSTO-211H靶细胞的杀伤作用,靶效细胞比例是1:25或1:5,测量方法采用标准4-小时⁵¹铬释放法,4-小时⁵¹铬释放法如实施例1所述。结果如图4所示。如图4所示,共表达抗MSLN嵌合抗原受体和PD1 shRNA (iPD1)的T淋巴细胞比单独表达抗MSLN嵌合抗原受体的T淋巴细胞,可更为有效的杀死MSLN⁺MSTO-211H靶细胞。空载慢病毒转导的T淋巴细胞(对照LV-GFP T淋巴细胞)对MSLN⁺MSTO-211H细胞无明显杀伤作用。统计数据代表三个孔的平均值 \pm SEM。

[0249] 实施例6共表达CBL-B shRNA和抗MSLN嵌合抗原受体的T细胞,共表达CTLA4 shRNA

和抗MSLN嵌合抗原受体的T细胞,共表达PD1 shRNA,CBL-B shRNA和抗MSLN嵌合抗原受体的T细胞,共表达PD1 shRNA,CTLA4 shRNA和抗MSLN嵌合抗原受体的T细胞的细胞,溶解能力增强并且具有细胞因子分泌更多和细胞增殖更强的特点。

[0250] 在本实施例中,发明人还考察了共表达CBL-B shRNA和抗MSLN嵌合抗原受体的T细胞、共表达CTLA4 shRNA和抗MSLN嵌合抗原受体的T细胞,共表达2个shRNA (PD1 shRNA和CBL-B shRNA或PD1 shRNA和CTLA4 shRNA或针对不同PD1区域的2个PD1 shRNAs) 和抗MSLN嵌合抗原受体的T细胞的肿瘤溶解能力、细胞因子分泌能力和细胞增殖能力。实验过程与实施例3,4和5相同。上述T细胞比单独表达抗MSLN嵌合抗原受体的T细胞的细胞溶解能力增强,细胞因子分泌更多和细胞增殖更强。共表达2个shRNA (PD1 shRNA和CTLA4 shRNA或PD1 shRNA和CBL-B shRNA或针对不同PD1区域的2个PD1 shRNAs) 和抗MSLN嵌合抗原受体的T细胞比共表达1个shRNA (PD1 shRNA或CBL-B shRNA或CTLA4 shRNA) 和抗MSLN嵌合抗原受体的T细胞的细胞溶解能力更强,细胞因子分泌更多和细胞增殖更强。

[0251] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0252] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

SEQUENCE LISTING

<110> 北京马力啫生物科技有限公司

<120> 共表达抗MSLN嵌合抗原受体和免疫检查点抑制分子的

<130> PIDC1153486

<160> 141

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 507

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 嵌合抗原受体的氨基酸序列

<400> 1

```

Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1           5           10           15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln
           20           25           30
Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala Ser Val Gln Val Ser Cys
           35           40           45
Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Asn Thr Tyr Tyr Met Gln Trp Val Arg
           50           55           60
Gln Ala Pro Gly Ala Gly Leu Glu Trp Met Gly Val Ile Asn Pro Ser
65           70           75           80
Gly Val Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr
           85           90           95
Asn Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr
           100          105          110
Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Ala Leu Trp Gly
           115          120          125
Asp Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
           130          135          140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145          150          155          160
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly
           165          170          175
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp
           180          185          190
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

```

195	200	205
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
210	215	220
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
225	230	235
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu		
245	250	255
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ser Phe Val		
260	265	270
Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro		
275	280	285
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro		
290	295	300
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu		
305	310	315
Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys		
325	330	335
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg		
340	345	350
Asn Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe		
355	360	365
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg		
370	375	380
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser		
385	390	395
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
405	410	415
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
420	425	430
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
435	440	445
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
450	455	460
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly		
465	470	475
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		
485	490	495
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
500	505	

<210> 2

<211> 1524

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 编码嵌合抗原受体的核酸分子的核苷酸序列

<400> 2

```

atggttctgc tggtgacatc tctcctgctc tgtgaactgc ctcatcccgc ttttctgctc 60
attcccgcaca ttcaggetca agtccaactg gtccaaagtg gtgctgaagt caaacgcccc 120
ggtgcctccg tccaagtctc ctgccgtgcc tctggctact cgattaacac ctattacatg 180
cagtgggtcc gtcaagcacc ggggtgcaggt ctggaatgga tgggtgtcat caatccgtcc 240
ggcgtgacct catatgcgca gaaatttcaa ggtcgcgtta cctgacgaa cgataccagc 300
acgaataccg tctacatgca gctgaaactc ctgacgagtg cagacaccgc ggtgtattac 360
tgcgcacgtt gggcactgtg gggcgatttc ggcatggatg tttggggcaa aggtacgctg 420
gtgaccgtta gctctgggtg tgggtggtct ggtggtggtg gtagtgccgg tggcggttct 480
gatattcaga tgacgcaaag cccgtctacc ctgagtgcct ccattggtga ccgtgttacg 540
atcacctgtc gcgcacccga aggcatctat cattggettg cttggtacca gcaaaaaccg 600
ggtaaagcgc cgaaactgct gatctataaa gcaagttccc tggcatcggg tgctccgagc 660
cgcttttcag gttcgggtag cggcaccgat ttcacgetga ccatctcacc gctgcagccc 720
gacgatttcg ctacctacta ctgccaacaa tactcaaact acccgetgac cttegggtga 780
gggaccaagc tggagatcaa acgtgctagc ttcgtgccgg tcttctgcc agcgaagccc 840
accacgacgc cagcggccgc accaccaaca ccggcgccca ccatecgtc gcagcccctg 900
tccttgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 960
gacttcgcct gtgatatcta catctgggcg cccttggccc ggacttgttg ggtccttctc 1020
ctgtcactgg ttatcacctt ttactgcaac cacaggaaca aacggggcag aaagaaactc 1080
ctgtatata tcaaacaacc atttatgaga ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc 1140
tntagctgcc gatttcaga agaagaagaa ggaggatgtg aactgagagt gaagttcagc 1200
aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1260
ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1320
gggggaaagc cgagaaggaa gaacctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1380
aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcggccggag gggcaagggg 1440
cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1500
atgcaggccc tgccccctcg ctaa 1524

```

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人类程序性死亡受体1(PD1) siRNA核苷酸序列

<400> 3	
ggccaggatg gttcttagac t	21
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类程序性死亡受体1(PD1) siRNA核苷酸序列	
<400> 4	
ggatttccag tggcgagaga a	21
<210> 5	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类程序性死亡受体1(PD1) siRNA核苷酸序列	
<400> 5	
gccuguguuc ucuguggacu aug	23
<210> 6	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类程序性死亡受体1(PD1) siRNA核苷酸序列	
<400> 6	
ggugcugcua gucugggucc ugg	23
<210> 7	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类程序性死亡受体1(PD1) siRNA核苷酸序列	
<400> 7	
gacagagaga agggcagaag ugc	23
<210> 8	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	

<223> 人类程序性死亡受体1(PD1) siRNA核苷酸序列	
<400> 8	
cagcuucucc aacacaucgg aga	23
<210> 9	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类程序性死亡受体1(PD1) siRNA核苷酸序列	
<400> 9	
ccgugucaca caacugccca acg	23
<210> 10	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类程序性死亡受体1(PD1) siRNA核苷酸序列	
<400> 10	
uauGCCacca uugucuuucc uag	23
<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类程序性死亡受体1(PD1) siRNA核苷酸序列	
<400> 11	
ugcuaaacug guaccgcaug agc	23
<210> 12	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类程序性死亡受体1(PD1) siRNA核苷酸序列	
<400> 12	
gugacagaga gaagggcaga agu	23
<210> 13	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220>		
<223>	人类程序性死亡受体1(PD1) siRNA核苷酸序列	
<400>	13	
	cugaggaugg acacugcucu ugg	23
<210>	14	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	人类程序性死亡受体1(PD1) siRNA核苷酸序列	
<400>	14	
	aucggagagc uucgugcuaa acu	23
<210>	15	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400>	15	
	ggcaacggaa cccagattta t	21
<210>	16	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400>	16	
	ggaacccaaa ttacgtgtac t	21
<210>	17	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400>	17	
	gaaccctaat tacgtgtact a	21
<210>	18	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400> 18	
gggagaagac tatattgtac a	21
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400> 19	
gacgtttata gccgaaatga t	21
<210> 20	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400> 20	
gacactaata caccaggtag a	21
<210> 21	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400> 21	
accucacuau ccaaggacug agg	23
<210> 22	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400> 22	
augaguugac cuuccuagau gau	23
<210> 23	
<211> 23	

<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400> 23	
ggggaaugag uugaccuucc uag	23
<210> 24	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400> 24	
cucuggaucc uugcagcagu uag	23
<210> 25	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400> 25	
cuccucugga uccuugcagc agu	23
<210> 26	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400> 26	
uuugugugug aguaugcauc ucc	23
<210> 27	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400> 27	
caccuccagu ggaaaucaag uga	23
<210> 28	

<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400> 28	
cacgggacuc uacaucugca agg	23
<210> 29	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400> 29	
uucugacuuc cuccucugga ucc	23
<210> 30	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4) siRNA序列	
<400> 30	
aagucugugc ggcaaccuac aug	23
<210> 31	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 31	
ggtcggtcag aatgcctate t	21
<210> 32	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 32	
gccaatgact tacgggactc t	21

<210> 33	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 33	
gcagagggaa ttcgctcaga a	21
<210> 34	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 34	
ggaaattcgg gcacatcata t	21
<210> 35	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 35	
gattaagaga tgactggact a	21
<210> 36	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 36	
gagatgactg gactaggtct a	21
<210> 37	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 37	

aggaaauucg ggcacaucau aug	23
<210> 38	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 38	
gacugaugaa agggauguga auu	23
<210> 39	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 39	
gccacugauu uucaaagaga ucu	23
<210> 40	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 40	
agcagaguuu ucccuuuuuc aga	23
<210> 41	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 41	
aacuuaaaca ggcaugucau ugc	23
<210> 42	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	

<400> 42	
uucagaagau aaugacucac aug	23
<210> 43	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 43	
gccucuguau uuaagccaac aga	23
<210> 44	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 44	
ugcucaugug auuguggagu aga	23
<210> 45	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 45	
auguuuucac aucuuccuu uga	23
<210> 46	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)siRNA序列	
<400> 46	
gagagacuuc acugcagccu uuc	23
<210> 47	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	

<223> 人类 T淋巴细胞衰减因子(BTLA) siRNA序列	
<400> 47	
gattgcctct actcatcact a	21
<210> 48	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T淋巴细胞衰减因子(BTLA) siRNA序列	
<400> 48	
uccuaaugac aaugggucau acc	23
<210> 49	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T淋巴细胞衰减因子(BTLA) siRNA序列	
<400> 49	
aagacauugc cugccaugcu ugg	23
<210> 50	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T淋巴细胞衰减因子(BTLA) siRNA序列	
<400> 50	
gucauaccgc uguucugcaa auu	23
<210> 51	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T淋巴细胞衰减因子(BTLA) siRNA序列	
<400> 51	
cuccuguaua guuuacuucc uuu	23
<210> 52	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220>		
<223> 人类 T淋巴细胞衰减因子(BTLA) siRNA序列		
<400> 52		
uaccgcuguu cugcaaaauu uca		23
<210> 53		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> 人类 T淋巴细胞衰减因子(BTLA) siRNA序列		
<400> 53		
aaaacaaacc aggcauuguu uau		23
<210> 54		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> 人类 T淋巴细胞衰减因子(BTLA) siRNA序列		
<400> 54		
aacuagaaug ccugugaaa uac		23
<210> 55		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> 人类 T淋巴细胞衰减因子(BTLA) siRNA序列		
<400> 55		
gugacuuggu gcaagcucaa ugg		23
<210> 56		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> 人类 T淋巴细胞衰减因子(BTLA) siRNA序列		
<400> 56		
auccauggga aagaaucaug uga		23
<210> 57		
<211> 23		
<212> DNA		

<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 T淋巴细胞衰减因子(BTLA) siRNA序列	
<400> 57	
uggugcaagc ucaauggaac aac	23
<210> 58	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG1) siRNA序列	
<400> 58	
gctgctcacc cttatgaacc t	21
<210> 59	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG1) siRNA序列	
<400> 59	
aggacauggu gguggacgag ugc	23
<210> 60	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG1) siRNA序列	
<400> 60	
ugcucuuccu gcacgauauc agu	23
<210> 61	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG1) siRNA序列	
<400> 61	
accucuacug guuccuguac auc	23
<210> 62	
<211> 23	

<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG1) siRNA序列	
<400> 62	
cccuccaacu cugcuccucu agg	23
<210> 63	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG1) siRNA序列	
<400> 63	
cccugagugg acagucgucu ucg	23
<210> 64	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG1) siRNA序列	
<400> 64	
cugcuccagg gaagcuucua ugg	23
<210> 65	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG1) siRNA序列	
<400> 65	
cgcucaaggu ccuguaugec acc	23
<210> 66	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG1) siRNA序列	
<400> 66	
gaguucacca agcucaacau uua	23
<210> 67	

<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG1) siRNA序列	
<400> 67	
ugcugcugcu cacccuuauug aac	23
<210> 68	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG1) siRNA序列	
<400> 68	
cccaucuccg ugcucuucuu uga	23
<210> 69	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 69	
gggacatcgt cgagctattc a	21
<210> 70	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 70	
ggacatcgtc gagctattca t	21
<210> 71	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 71	
gccaatgtca ccgtggataa t	21

<210> 72	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 72	
gtcatctgtg gcagtatata c	21
<210> 73	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 73	
ggatgtagag tagtgtaga t	21
<210> 74	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 74	
ggcaaagtta agaccatcaa t	21
<210> 75	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 75	
gaccaaattcc acgetcaatt a	21
<210> 76	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 76	

uacugcuuaa aucuuccauc agc	23
<210> 77	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 77	
gacugagaag uucugucuga uuu	23
<210> 78	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 78	
cuguuucauc acccaaacau acu	23
<210> 79	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 79	
gaagauccuc ccacaucacu aaa	23
<210> 80	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 80	
uagaccaagg uaaaagugga aca	23
<210> 81	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	

<400> 81	
aagagguuuu uaucugagcu uga	23
<210> 82	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 82	
uaccugcaca acguucaacc aug	23
<210> 83	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 83	
gccuggauuc augucucuca uuu	23
<210> 84	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 84	
cccucggaau uucucugcca agc	23
<210> 85	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 IRAK-M siRNA (人类白细胞介素-1受体相关激酶3) 核苷酸序列	
<400> 85	
ugcugaagau ccucccacau cac	23
<210> 86	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	

<223> 人类 SOCS1 siRNA(人类细胞因子信号转导抑制因子1)序列	
<400> 86	
gcacctccta cctcttcatg t	21
<210> 87	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 SOCS1 siRNA(人类细胞因子信号转导抑制因子1)序列	
<400> 87	
cgcacuuccg cacauuccgu ucg	23
<210> 88	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 SOCS1 siRNA(人类细胞因子信号转导抑制因子1)序列	
<400> 88	
ggggaggguc ucuggcuuuu uuu	23
<210> 89	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 SOCS1 siRNA(人类细胞因子信号转导抑制因子1)序列	
<400> 89	
cagcauuuac ugggaugccg ugu	23
<210> 90	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 SOCS1 siRNA(人类细胞因子信号转导抑制因子1)序列	
<400> 90	
ccaggaccug aacucgcacc ucc	23
<210> 91	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220>	
<223> 人类 SOCS1 siRNA(人类细胞因子信号转导抑制因子1)序列	
<400> 91	
uacauauacc caguaucuuu gca	23
<210> 92	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 SOCS1 siRNA(人类细胞因子信号转导抑制因子1)序列	
<400> 92	
gccgacaauug cagucuccac age	23
<210> 93	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 SOCS1 siRNA(人类细胞因子信号转导抑制因子1)序列	
<400> 93	
cccugguug uuguagcagc uua	23
<210> 94	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 SOCS1 siRNA(人类细胞因子信号转导抑制因子1)序列	
<400> 94	
cugcugugca gaauccuauu uua	23
<210> 95	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 SOCS1 siRNA(人类细胞因子信号转导抑制因子1)序列	
<400> 95	
ugggaugccg uguuauuuug uua	23
<210> 96	
<211> 23	
<212> DNA	

<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 SOCS1 siRNA(人类细胞因子信号转导抑制因子1)序列	
<400> 96	
ucgcaccucc uaccucuca ugu	23
<210> 97	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA(人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20)序列	
<400> 97	
gcggaaagct gtgaagatac g	21
<210> 98	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA(人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20)序列	
<400> 98	
acaaagccct catcgacaga a	21
<210> 99	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA(人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20)序列	
<400> 99	
atgccacttc tcagtacatg t	21
<210> 100	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA(人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20)序列	
<400> 100	
gtggacttca gtacaactca c	21
<210> 101	
<211> 21	

<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 101	
gtggaattta cttgcctctc c	21
<210> 102	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 102	
gttggatgaa gctaacttac c	21
<210> 103	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 103	
actgggaaga cgtgtaactc t	21
<210> 104	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 104	
aaggaattgc atccaaggta t	21
<210> 105	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 105	
ggaattgcat ccaaggata c	21
<210> 106	

<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 106	
ggatgagact ggcaatggtc a	21
<210> 107	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 107	
uccucaguuu cgggagauca ucc	23
<210> 108	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 108	
gagucucuca aaucucagga auu	23
<210> 109	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 109	
agcucuaguc cuuuuugugu aau	23
<210> 110	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 110	
cacuggaaau guucagaacu ugc	23

<210> 111	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 111	
augaugaaug ggacaaucuu auc	23
<210> 112	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 112	
cacacugugu uucaucgagu aca	23
<210> 113	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 113	
gcagaaccau ccauggacug uga	23
<210> 114	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 114	
aaagaugugg ccuuuuguga ugg	23
<210> 115	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 115	

uucagaacuu gccaguuuug ucc	23
<210> 116	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 A20 siRNA (人类肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白A20) 序列	
<400> 116	
augagacugg caauggucac agg	23
<210> 117	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 117	
gtcaattcca gggagataac t	21
<210> 118	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 118	
gcctggaagc aatggctcta a	21
<210> 119	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 119	
gcaccaaacc cggaagetat a	21
<210> 120	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	

<400> 120	
gttgcactcg attgggacag t	21
<210> 121	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 121	
ggattatgtg aacctacacc t	21
<210> 122	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 122	
ggaatcacag cgagttcaaa t	21
<210> 123	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 123	
gcaaggcata gtctcattga a	21
<210> 124	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 124	
ggtgaagaga gccttagaga t	21
<210> 125	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	

<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 125	
gtgaagagag ccttagagat a	21
<210> 126	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 126	
aggagcuaag gucuuuucca aug	23
<210> 127	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 127	
augucgaugc aaaaauugca aaa	23
<210> 128	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 128	
gucacaugcu ggcagaaauc aaa	23
<210> 129	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 129	
uccagguuac auggcauuuc uca	23
<210> 130	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	

<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 130	
uugaacuuug aaccugugaa aug	23
<210> 131	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 131	
uccacaucaa cagcuaaauc auu	23
<210> 132	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 132	
augcuggcag aaaucaaagc aau	23
<210> 133	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 133	
ugcagagaau gacaaaug uca	23
<210> 134	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列	
<400> 134	
ggcagaacuc accagucaca uca	23
<210> 135	
<211> 23	
<212> DNA	

<213> Artificial

<220>

<223> 人类 CBL-B siRNA (E3泛素蛋白连接酶CBL-B) 序列

<400> 135

ucgguccugu gauaaugguc acu

23

<210> 136

<211> 2053

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> MSLN-CAR/iPD1的核苷酸序列

<400> 136

atggttctgc tggtagacatc tctcctgctc tgtgaactgc ctcatcccgc ttttctgctc 60
attcccgaca ttcaggetca agtccaactg gtccaaagtg gtgctgaagt caaacgcccc 120
ggtagcctccg tccaagtctc ctgccgtgcc tctggtactc cgattaacac ctattacatg 180
cagtgggtcc gtcaagcacc gggtagcagg ctggaatgga tgggtgtcat caatccgtcc 240
ggcgtgacct catatgcgca gaaatttcaa ggtcgcgcta ccctgacgaa cgataccagc 300
acgaataccg tctacatgca gctgaactct ctgacgagtg cagacaccgc ggtgtattac 360
tgcgcacgtt gggcactgtg gggcgatttc ggcatggatg tttggggcaa aggtacgctg 420
gtgaccgtta gctctgggtg tgggtgttct ggtggtggtg gtagtggecg tggcggttct 480
gatattcaga tgacgcaaag cccgtctacc ctgagtgcct ccattggtga ccgtgttacg 540
atcacctgtc gcgcatccga aggcattctat cattggtctg cttggtacca gcaaaaaccg 600
ggtaaagcgc cgaaactgct gatctataaa gcaagttccc tggcatcggg tgctccgagc 660
cgcttttcag gttcgggtag cggcaccgat ttcacgctga ccatctcatc gctgcagccc 720
gacgatttctg ctacctacta ctgccaacaa tactcaaact acccgctgac cttaggtgga 780
gggaccaagc tggagatcaa acgtgctagc accactacc cagcaccgag gccaccacc 840
ccggctccta ccatcgctc ccagcctctg tcctgctgc cggaggcatg tagaccgca 900
gctggtgggg ccgtgcatac ccgggttctt gacttcgctc gcgatatcta catttggccc 960
cctctggctg gtacttgctg ggtcctgctg ctttactctg tgatcactct ttactgtaag 1020
cgcggtcggg agaagctgct gtacatcttt aagcaacct tcatgaggcc tgtgcagact 1080
actcaagagg aggacggtg ttcatgccgg tteccagagg aggaggaagg cggctgcgaa 1140
ctgcgcgtga aattcagccg cagcgcagat gctccagcct accagcaggg gcagaaccag 1200
ctctacaacg aactcaatct tggtagcaga gaggagtacg acgtgctgga caagcggaga 1260
ggacgggacc cagaaaatggg cgggaagccg cgcagaaaga atccccaga gggcctgtac 1320
aacgagctcc aaaaggataa gatggcagaa gcctatagcg agattggtat gaaaggggaa 1380
cgcagaagag gcaaaggcca cgacggactg taccagggac tcagcaccgc caccaaggac 1440
acctatgacg ctcttccatc gcaggecctg ccgcctcggt aatcctactg cgtcgagcga 1500
ctgtgccttc tagttgccag ccattctgtt tttgccctc ccccgctgct tcttgacc 1560
tggaaaggtg cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 1620

tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 1680
 ggggaagaaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatgggtcga ccaaggtcgg 1740
 gcaggaagag ggcctatttc ccatgattcc ttcatatttg catatacgat acaaggctgt 1800
 tagagagata attagaatta atttgactgt aaacacaaag atattagtac aaaatacgtg 1860
 acgtagaaaag taataatttc ttgggtagtt tgcagtttta aaattatgtt ttaaaatgga 1920
 ctatcatatg cttaccgtaa cttgaaagta tttcgatttc ttggctttat atatcttgtg 1980
 gaaaggacga aacacctccc caggcgcaga tcaaagagag ttcaagagac tctctttgat 2040
 ctgctccttt ttt 2053

<210> 137

<211> 2057

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> MSLN-CAR/iCBL-B的核苷酸序列

<400> 137

atggttctgc tggtgacatc tctcctgctc tgtgaactgc ctcatcccgc ttttctgctc 60
 attcccgaca ttcaggetca agtccaactg gtccaaagtg gtgctgaagt caaacgcccc 120
 ggtgcctccg tccaagtctc ctgccgtgcc tctggctact cgattaacac ctattacatg 180
 cagtgggtcc gtcaagcacc ggggtgcaggt ctggaatgga tgggtgtcat caatccgtcc 240
 ggcgtgacct catatgcgca gaaatttcaa ggtcgcgtta ccctgacgaa cgataccagc 300
 acgaataccg tctacatgca gctgaactct ctgacgagtg cagacaccgc ggtgtattac 360
 tgcgcacggt gggcactgtg gggcgatttc ggcatggatg tttggggcaa aggtacgctg 420
 gtgaccgtta gctctgggtg tgggtggtct ggtgggtggg gtagtggcgg tggcggttct 480
 gatattcaga tgacgcaaag cccgtctacc ctgagtgcct ccattggtga ccgtgttacg 540
 atcacctgtc gcgcatccga aggcatctat cattggctgg cttggtacca gcaaaaaccg 600
 ggtaaagcgc cgaaactgct gatctataaa gcaagttccc tggcatcggg tgctccgagc 660
 cgcttttcag gttcgggtag cggcaccgat ttacgctga ccatctcatc gctgcagccc 720
 gacgatttcg ctacctacta ctgccaacaa tactcaaact acccgctgac cttcgggtga 780
 gggaccaagc tggagatcaa acgtgctagc accactacc cagcaccgag gccaccacc 840
 ccggctccta ccatcgctc ccagcctctg tcctgctc cggaggeatg tagaccgca 900
 gctggtgggg ccgtgcatac ccggggtctt gaettegct gcgatatcta catttgggcc 960
 cctctggctg gtacttgctg ggtcctgctg ctttactc tgatcactet ttactgtaag 1020
 cgcggtcgga agaagctgct gtacatcttt aagcaacct tcatgaggcc tgtgcagact 1080
 actcaagagg aggacgctg ttcatgccgg ttcccagagg aggaggaagg cggctgcgaa 1140
 ctgcgcgtga aattcagccg cagcgcagat getccagcct accagcaggg gcagaaccag 1200
 ctctacaacg aactcaatct tggtcggaga gaggagtacg acgtgctgga caagcggaga 1260
 ggacgggacc cagaaaatggg cgggaagccg cgcagaaaga atccccaaaga gggcctgtac 1320
 aacgagctcc aaaaggataa gatggcagaa gcctatagcg agattggtat gaaaggggaa 1380
 cgcagaagag gcaaaggcca cgacggactg taccagggac tcagcaccgc caccaaggac 1440

acctatgacg ctcttcacat gcaggccctg ccgcctcggg aatcctactg cgtcgagcga 1500
 ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgccctc ccccggtcct tccttgacce 1560
 tggaagggtc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 1620
 tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 1680
 ggggaagaaa tagcaggcat gctgggggatg cggtggggctc tatgggtcga ccaaggtcgg 1740
 gcaggaagag ggcctatttc ccatgattcc ttcattttg catatacgat acaaggctgt 1800
 tagagagata attagaatta atttgactgt aaacacaaag atattagtac aaaatacgtg 1860
 acgtagaaaag taataatttc ttgggtagtt tgcagtttta aaattatgtt ttaaaatgga 1920
 ctatcatatg cttaccgtaa cttgaaagta tttegatttc ttggctttat atatcttgtg 1980
 gaaaggacga aacacctccc caacacagac gccatgattt gcttcaagag agcaaatcat 2040
 ggcgtctgtg ttttttt 2057

<210> 138

<211> 2053

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> MSLN-CAR/iCTLA4的核苷酸序列

<400> 138

atggttctgc tggtagacatc tctcctgctc tgtgaactgc ctcatcccgc ttttctgctc 60
 attcccgaca ttcaggctca agtccaactg gtccaaagtg gtgctgaagt caaacgcccg 120
 ggtgcctccg tccaagtctc ctgccgtgcc tctggetact cgattaacac ctattacatg 180
 cagtgggtcc gtcaagcacc ggggtgcaggt ctggaatgga tgggtgtcat caatccgtcc 240
 ggcgtgacct catatgcgca gaaatttcaa ggtegcgta ccctgacgaa cgataccagc 300
 acgaataccg tctacatgca gctgaactct ctgacgagtg cagacaccgc ggtgtattac 360
 tgcgcacggt gggcactgtg gggcgatttc ggcatggatg tttggggcaa aggtacgctg 420
 gtgaccgtta gctctgggtg tgggtgttct ggtgggtggtg gtagtggcgg tggcggttct 480
 gatattcaga tgacgcaaag cccgtctacc ctgagtgcct ccattggtga ccgtgttacg 540
 atcacctgtc gcgcatccga aggcattctat cattggetgg cttggtacca gcaaaaaccg 600
 ggtaaagcgc cgaactgct gatctataaa gcaagttccc tggcatcggg tgctccgagc 660
 cgctttttcag gttcgggtag cggcaccgat ttcacgtga ccatctcctc gctgcagccc 720
 gacgatttcg ctacctacta ctgccaacaa tactcaaact acccgtgac cttcgggtgga 780
 gggaccaagc tggagatcaa acgtgctagc accactacc cagcaccgag gccaccacc 840
 ccggtccta ccatcgctc ccagcctctg tcctgcgctc cggaggcatg tagaccgca 900
 gctggtgggg ccgtgcatac ccgggggtett gaettegct gcgatatcta catttgggcc 960
 cctctggctg gtacttgctg ggtcctgctg ctttactcg tgatcactct ttactgtaag 1020
 cgcggtcggg agaagctgct gtacatcttt aageaacct tcatgaggec tgtgcagact 1080
 actcaagagg aggacggtg ttcattgccg ttcccagagg aggaggaagg cggctgcgaa 1140
 ctgcgcgtga aattcagccc cagcgcagat gctccagcct accagcaggg gcagaaccag 1200
 ctctacaacg aactcaatct tggctcggaga gaggagtacg acgtgctgga caagcggaga 1260

ggacgggacc cagaaatggg cgggaagccg cgcagaaaga atceccaaga gggcctgtac 1320
 aacgagctcc aaaaggataa gatggcagaa gcctatagcg agattggtat gaaaggggaa 1380
 cgcagaagag gcaaaggcca cgacggactg taccagggac tcagcaccgc caccaaggac 1440
 acctatgacg ctcttcacat gcaggccctg ccgcctcggg aatcctactg cgtcgagcga 1500
 ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgccctc ccccggtgct tccttgacc 1560
 tggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgattgtc 1620
 tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg ggggtgggca ggacagcaag ggggaggatt 1680
 ggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatgggtcga ccaaggtcgg 1740
 gcaggaagag ggcctatttc ccatgattec ttcattttg catatacgat acaaggctgt 1800
 tagagagata attagaatta atttgactgt aaacacaaag atattagtac aaaatacgtg 1860
 acgtagaaaag taataatttc ttgggtagtt tgcagttta aaattatggt ttaaaatgga 1920
 ctatcatatg cttaccgtaa cttgaaagta tttegatttc ttggctttat atatcttgtg 1980
 gaaaggacga aacacctccc cgcatacctt gggattaata ttcaagagat attaatccca 2040
 agtgatgctt ttt 2053

<210> 139

<211> 2360

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> MSLN-CAR/iPD1- CBL-B的核苷酸序列

<400> 139

atggttctgc tggtagacatc tctcctgctc tgtgaactgc ctcatcccgc ttttctgctc 60
 attcccgaca ttcaggctca agtccaactg gtccaaagtg gtgctgaagt caaacgcccc 120
 ggtgcctccg tccaagtctc ctgccgtgcc tctggctact cgattaacac ctattacatg 180
 cagtgggtcc gtcaagcacc gggtagcagg ctggaatgga tgggtgtcat caatccgtcc 240
 ggcgtgacct catatgcgca gaaatttcaa ggtcgcgta ccctgacgaa cgataccagc 300
 acgaataaccg tctacatgca gctgaactct ctgacgagt cagacaccgc ggtgtattac 360
 tgcgcacggt gggcactgtg gggcgatttc ggcattgatg tttggggcaa aggtacgctg 420
 gtgaccgtta gctctgggtg tgggtggtct ggtggtggtg gtagtggcgg tggcggttct 480
 gatattcaga tgacgcaaag cccgtctacc ctgagtgcct ccattggtga ccgtgttacg 540
 atcacctgtc gcgcataccg aggcatctat cattggtggt cttggtacca gcaaaaaccg 600
 ggtaaagcgc cgaaactgct gatctataaa gcaagttccc tggcatcggg tgctccgagc 660
 cgcttttcag gttcgggtag cggcaccgat ttcacgtga ccatctcacc gctgcagccg 720
 gacgatttcg ctacctacta ctgccaacaa tactcaaact acccgtgac cttegggtgga 780
 gggaccaagc tggagatcaa acgtgctagc accactacc cagcaccgag gccaccacc 840
 ccggtccta ccatgcctc ccagcctctg tccttgctc cggaggcatg tagaccgca 900
 gctggtgggg ccgtgcatac ccggggtctt gacttcgct gcgatatcta catttgggccc 960
 cctctggctg gtacttgagg ggtcctgctg ctttactcgt tgatcactct ttactgtaag 1020
 cgcggtcggg agaagctgct gtacatcttt aagcaacct tcatgaggcc tgtgcagact 1080

actcaagagg aggacggctg ttcattgccg ttcccagagg aggaggaagg cggctgcgaa 1140
 ctgcgcgtga aattcagccg cagcgcagat gctccagcct accagcaggg gcagaaccag 1200
 ctctacaacg aactcaatct tggtcggaga gaggagtacg acgtgctgga caagcggaga 1260
 ggacgggacc cagaaatggg cgggaagccg cgcagaaaga atcccgaaga gggcctgtac 1320
 aacgagctcc aaaaggataa gatggcagaa gcctatagcg agattggtat gaaaggggaa 1380
 cgcagaagag gcaaaggcca cgacggactg taccagggac tcagcaccgc caccaaggac 1440
 acctatgacg ctcttccat gcagccctg ccgctcgggt aatcctactg cgtcagcga 1500
 ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgccctc cccctgect tccttgacc 1560
 tggaaagtgc cactcccact gtccttct aataaaatga ggaaattgca tcgattgtc 1620
 tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg gggtagggca ggacagcaag ggggaggatt 1680
 ggaagacaa tagcagcagat gctggggatg cggtagggctc tatgggtcga ccaaggtcgg 1740
 gcaggaagag ggcctattc ccatgatcc ttcattttg catatacagat acaaggctgt 1800
 tagagagata attagaatta attgactgt aaacacaaag atattagtagt aaaatagctg 1860
 acgtagaaag taataattc ttgggtagtt tgcagttta aaattatggt ttaaaatgga 1920
 ctatcatatg cttaccgtaa cttgaaagta tttcgattc ttggctttat atatcttgtg 1980
 gaaaggacga aacacctccc caggcgcaga tcaaagagag ttcaagagac tctctttgat 2040
 ctgcgccttt tttagctatc gatagctaaa aaaacacaga cgccatgatt tgctctcttg 2100
 aagcaaatca tggcgtctgt gttggggaag atctgtggtc tcatacagaa cttataagat 2160
 tcccaaatcc aaagacattt cacgtttatg gtgatttccc agaacacata gcgacatgca 2220
 aatattgcag ggcgccactc cctgtccct cacagccatc ttctgccag ggcgcacgcg 2280
 cgctgggtgt tcccgcctag tgacactggg cccgcgatc cttggagcgg gttgatgacg 2340
 tcagcgttcg aattgtcgac 2360

<210> 140

<211> 2356

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> MSLN-CAR/iPD1-CTLA4的核苷酸序列

<400> 140

atggttctgc tggtagacatc tctctgctc tgtgaactgc ctcateccgc ttttctgctc 60
 attcccagaca ttcaggctca agtccaactg gtccaaagtg gtgctgaagt caaacgcccc 120
 ggtgcctccg tccaagtctc ctgccgtgcc tctggctact cgattaacac ctattacatg 180
 cagtgggtcc gtcaagcacc gggtagcagg ctggaatgga tgggtgtcat caatccgtcc 240
 ggcgtgacct catatgcgca gaaatttcaa ggtcgcgcta cctgacgaa cgataccagc 300
 acgaataccg tctacatgca gctgaactct ctgacgagtg cagacaccgc ggtgtattac 360
 tgcgcacgtt gggcactgtg gggcgatttc ggcattggatg tttggggcaa aggtacgctg 420
 gtgaccgtta gctctgggtg tggtagttct ggtggtggtg gtagtgccg tggcggttct 480
 gatattcaga tgacgcaaag cccgtctacc ctgagtgcct ccattggtga ccgtgttacg 540
 atcacctgtc gcgcattcca aggcattctat cattggtcgg cttggtacca gcaaaaaccg 600

ggtaaagcgc cgaaactgct gatctataaa gcaagttccc tggcatcggg tgctccgagc 660
 cgcttttcag gttcgggtag cggcaccgat ttcacgctga ccatctcatc gctgcagccg 720
 gacgatttcg ctacctacta ctgccaacaa tactcaaact acccgctgac cttcgggtga 780
 gggaccaagc tggagatcaa acgtgctagc accactacce cagcaccgag gccaccacc 840
 ccggctccta ccatcgctc ccagcctctg tccttgcgtc cggaggcatg tagaccgca 900
 gctgggtggg ccgtgcatac ccggggtctt gacttcgect gcgatatcta catttgggcc 960
 cctctggctg gtacttgcgg ggtcctgctg ctttactcgt tgatcactct ttactgtaag 1020
 cgcggtcggg agaagctgct gtacatcttt aagcaacct tcatgaggcc tgtgcagact 1080
 actcaagagg aggacggctg ttcattgccc ttcccagagg aggaggaagg cggctgcgaa 1140
 ctgctcgtga aattcagccg cagcgcagat gctccagcct accagcaggg gcagaaccag 1200
 ctctacaacg aactcaatct tggctcggaga gaggagtacg acgtgctgga caagcggaga 1260
 ggacgggacc cagaaatggg cgggaagccg cgcagaaaga atcccgaaga gggcctgtac 1320
 aacgagctcc aaaaggataa gatggcagaa gcctatagcg agattggtat gaaaggggaa 1380
 cgcagaagag gcaaaggcca cgacggactg taccagggac tcagcaccgc caccaaggac 1440
 acctatgacg ctcttccatc gcagccctg ccgctcgggt aatcctactg cgtcagcga 1500
 ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgccctc ccccgctgect tccttgacc 1560
 tggaaaggtc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgattgtc 1620
 tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 1680
 gggaaagaaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatgggtcga ccaaggtcgg 1740
 gcaggaagag ggcctatttc ccatgattcc ttcattttg catatacgat acaaggctgt 1800
 tagagagata attagaatta atttgactgt aaacacaaag atattagtac aaaatacgtg 1860
 acgtagaaaag taataatttc ttgggtagtt tgcagtttta aaattatggt ttaaaatgga 1920
 ctatcatatg cttaccgtaa cttgaaagta tttcgatttc ttggctttat atatcttgtg 1980
 gaaaggacga aacacctccc caggcgcaga tcaaagagag ttcaagagac tctctttgat 2040
 ctgctccttt tttagctatc gatagctaaa aagcatcact tgggattaat atctcttgaa 2100
 tattaatccc aagtgatgcg gggaaagatc gtggtctcat acagaactta taagattccc 2160
 aaatccaaag acatttcacg tttatggtga tttcccagaa cacatagcga catgcaaata 2220
 ttgcagggcg cactcccct gtcctcaca gccatcttc tgccagggcg cacgcgcgct 2280
 ggggtgtccc gcctagtgac actgggcccg cgattccttg gagcgggttg atgacgtcag 2340
 cgttcgaatt gtcgac 2356
 <210> 141
 <211> 2360
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> MSLN-CAR/iPD1- PD1的核苷酸序列
 <400> 141
 atggttctgc tggtgacatc tctcctgctc tgtgaactgc ctcatcccgc ttttctgctc 60
 attcccgaca ttcaggctca agtccaactg gtccaaagtg gtgctgaagt caaacccccg 120

ggtgcctccg tccaagtctc ctgccgtgcc tctggctact cgattaacac ctattacatg 180
 cagtgggtcc gtcaagcacc ggggtgcaggt ctggaatgga tgggtgtcat caatccgtcc 240
 ggcgtgacct catatgcgca gaaatttcaa ggtcgcgta ccctgacgaa cgataccagc 300
 acgaataccg tctacatgca gctgaactct ctgacgagtg cagacaccgc ggtgtattac 360
 tgcgcacggt gggcactgtg gggcgatttc ggcatggatg tttggggcaa aggtacgctg 420
 gtgaccgtta gctctgggtg tgggtggttct ggtgggtggg gtagtggcgg tggcggttct 480
 gatattcaga tgacgcaaag cccgtctacc ctgagtgcct ccattggtga ccgtgttacg 540
 atcacctgtc gcgcatccga aggcatctat cattggctgg cttggtacca gcaaaaaccg 600
 ggtaaagcgc cgaaactgct gatctataaa gcaagttccc tggcatcggg tgctccgagc 660
 cgcttttcag gttcgggtag cggcaccgat ttcacgctga ccactcctc gctgcagccg 720
 gacgatttcg ctacctacta ctgccaacaa tactcaaact acccgctgac cttegggtgga 780
 gggaccaagc tggagatcaa acgtgctagc accactacc cagcaccgag gccaccacc 840
 ccggtccta ccatcgctc ccagcctctg tccctgcgtc cggaggcatg tagaccgca 900
 gctgggtggg ccgtgcatac ccggggtctt gaettegct gcgatateta catttgggce 960
 cctctggctg gtacttgctg ggtcctgctg ctttactctg tgatcactct ttactgtaag 1020
 cgcggtcggg agaagctgct gtacatcttt aagcaacct tcatgaggcc tgtgcagact 1080
 actcaagagg aggacggctg ttcattgccg tcccagagg aggaggaagg cggctgcgaa 1140
 ctgctcgtga aattcagccg cagcgcagat gctccagcct accagcaggg gcagaaccag 1200
 ctctacaacg aactcaatct tggtcggaga gaggagtac acgtgctgga caagcggaga 1260
 ggacgggacc cagaaatggg cgggaagccg cgcagaaaga atcccaaga gggcctgtac 1320
 aacgagctcc aaaaggataa gatggcagaa gcctatagcg agattggtat gaaaggggaa 1380
 cgcagaagag gcaaaggcca cgacggactg taccagggac tcagcaccgc caccaaggac 1440
 acctatgacg ctcttccat gcaggccctg ccgctcggg aatcctactg cgtcagcga 1500
 ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgccctc ccccgctgct tccttgacc 1560
 tggaaagtgc cactcccact gtcctttct aataaaatga ggaaattgca tcgattgtc 1620
 tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 1680
 gggaaagaaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatgggtcga ccaaggtcgg 1740
 gcaggaagag ggcctatttc ccatgattcc ttcattttg catatacga acaaggctgt 1800
 tagagagata attagaatta atttgactgt aaacacaaag atattagtac aaaatacgtg 1860
 acgtagaaaag taataatttc ttgggtagtt tgcagttta aaattatgtt ttaaaatgga 1920
 ctatcatatg cttaccgtaa cttgaaagta tttcgatttc ttggctttat atatcttgtg 1980
 gaaaggacga aacacctccc caggcgcaga tcaaagagag ttcaagagac tctctttgat 2040
 ctgctccttt tttagctatc gatagctaaa aagcctagag aagtttcagg gaatctcttg 2100
 aattccctga aacttcteta ggcggggaag atctgtggtc tcatacagaa cttataagat 2160
 tcccaaatcc aaagacattt cacgtttatg gtgatttccc agaacacata gcgacatgca 2220
 aatattgcag ggcgccactc cctgtccct cacagccatc ttctgccag ggcgcacgcg 2280
 cgctgggtgt tcccgcctag tgacactggg cccgcgattc cttggagcgg gttgatgacg 2340
 tcagcgttcg aattgtcgac 2360

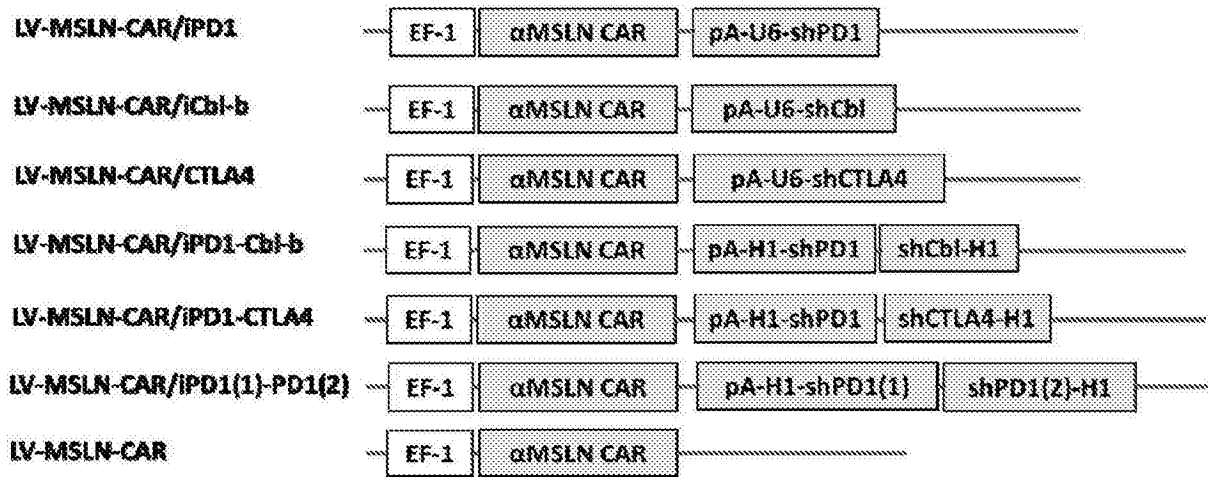


图1

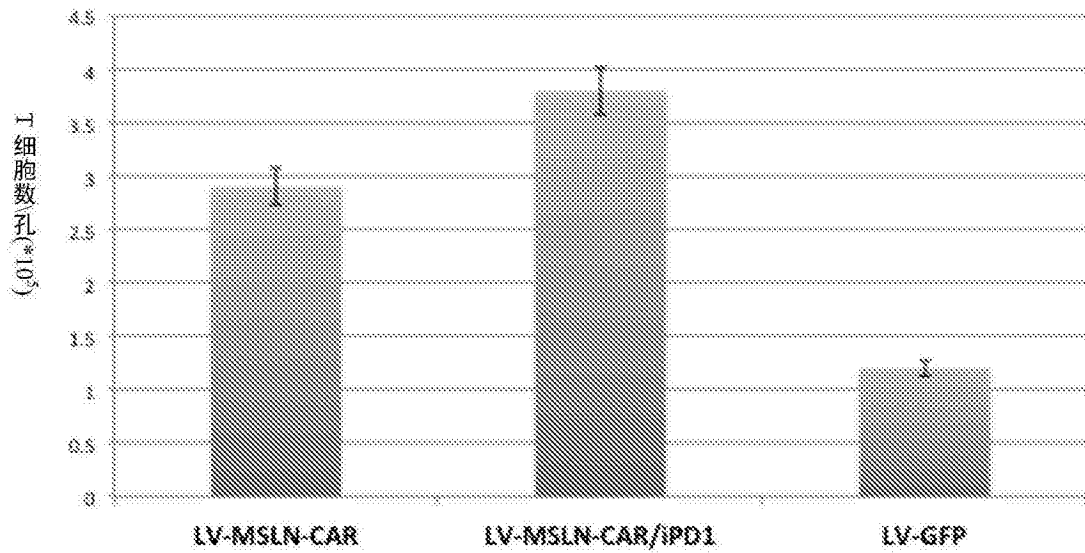


图2

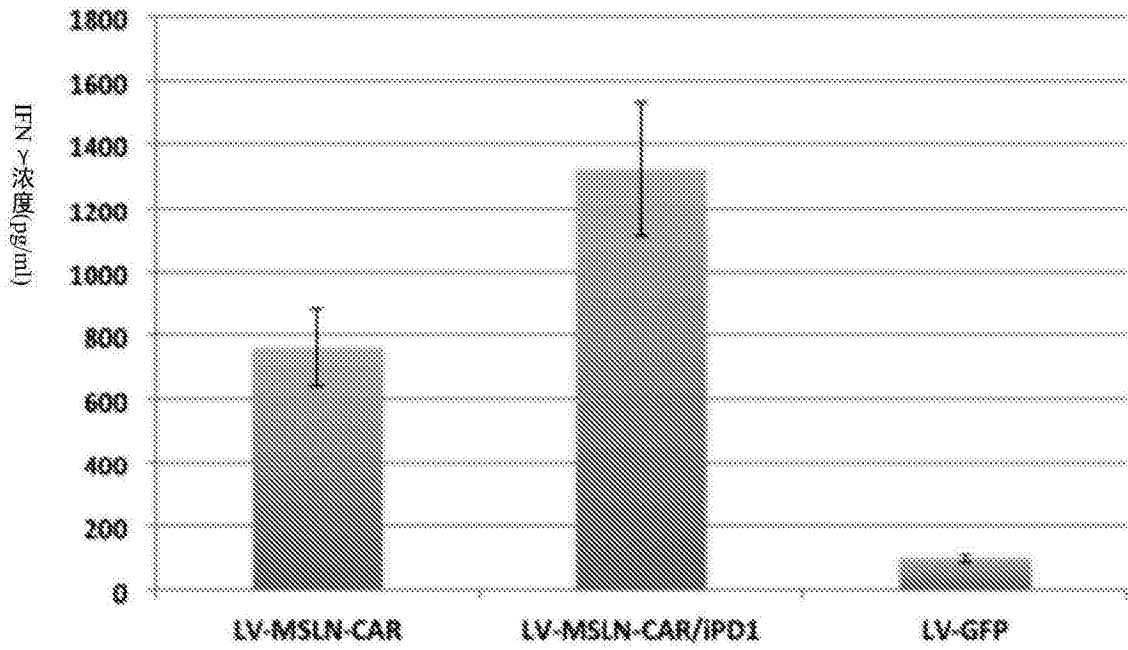


图3

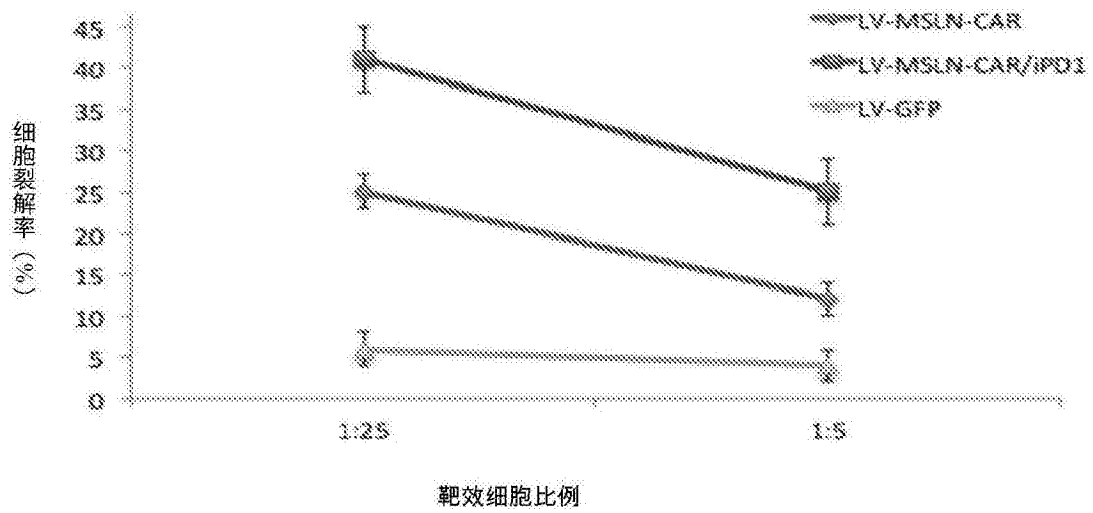


图4