



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118359727 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 19

(21) 申请号 202310081474.2

C12N 15/62 (2006.01)

(22) 申请日 2023.01.17

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

(71) 申请人 上海以慈生物科技有限公司

地址 200023 上海市黄浦区蒙自路757号平安滨江金融中心906室

申请人 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心

(72) 发明人 刘小龙 李心悦 刘海峰

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

专利代理师 韦东

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书12页

序列表 (电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

突变的PD1胞外域片段及含有该片段的CAR和NK细胞

(57) 摘要

本发明涉及突变的PD1胞外域片段及含有该片段的CAR和NK细胞。具体而言,本发明提供一种多肽,其为所述的突变的PD1胞外域片段,其含有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成。本发明的CAR含有所述多肽。本发明还提供表达所述CAR的NK细胞。本发明表达含有突变的PD1胞外段的CAR的NK细胞杀伤肿瘤细胞的能力明显强于表达含有野生型PD1胞外段的CAR的NK细胞。

1. 一种多肽,其含有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成。

2. 一种嵌合抗原受体,其特征在于,从N端到C端,所述嵌合抗原受体含有依次连接的任选的信号肽、权利要求1所述的多肽、铰链区、跨膜区、胞内共刺激信号域和胞内信号域。

3. 如权利要求2所述的嵌合抗原受体,其特征在于:

所述信号肽选自CD8信号肽、CD28信号肽或CD4信号肽;优选地,所述信号肽为CD8信号肽;优选地,所述CD8信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第1~20位氨基酸残基所示;和/或

所述铰链区选自CD8 α 铰链区、IgD铰链区、IgG1 Fc CH2CH3铰链区或IgG4 Fc CH2CH3铰链区;优选地,所述铰链区是CD8 α 铰链区;优选地,所述CD8 α 铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第171~225位氨基酸残基所示;和/或

所述跨膜区选自CD28跨膜区、CD8跨膜区、CD3 ζ 跨膜区、CD134跨膜区、CD137跨膜区、ICOS跨膜区或DAP10跨膜区;优选地,所述跨膜区为CD8跨膜区;优选地,所述CD8跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第226~246位氨基酸残基所示;和/或

所述胞内共刺激信号域为共刺激信号分子的胞内结构域,优选选自CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶、诱导性T细胞共刺激因子或DNAX激活蛋白10的胞内结构域;优选地,所述胞内共刺激信号域为4-1BB的胞内结构域;优选地,所述4-1BB的胞内结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第247~288位氨基酸残基所示;和/或

所述胞内信号域为CD3 ζ 胞内信号域或Fc ϵ RI γ 胞内信号域;优选地,所述胞内信号域为CD3 ζ 胞内信号域;优选地,所述CD3 ζ 胞内信号域的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第289~400位氨基酸残基所示。

4. 如权利要求3所述的嵌合抗原受体,其特征在于:所述嵌合抗原受体从N端到C端依次含有CD8信号肽、权利要求1所述的多肽、CD8 α 铰链区、CD8跨膜区、4-1BB胞内结构域和CD3 ζ 的酪氨酸活化基序;

优选地,所述嵌合抗原受体的氨基酸序列为从N端到C端依次连接的SEQ ID NO:3第1~20位氨基酸残基、SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3第171~400位氨基酸残基;或所述嵌合抗原受体的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

5. 一种核酸分子,所述核酸分子编码权利要求1所述的多肽或权利要求2~4中任一项所述的嵌合抗原受体;优选地,所述核酸分子为DNA分子或RNA分子;

优选地,所述核酸分子为权利要求1所述多肽的编码序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:2第70~510位核苷酸序列所示;

优选地,所述核酸分子从5'端到3'端依次含有:SEQ ID NO:2第1~60位所示的核苷酸序列和SEQ ID NO:2第70~1200位所示的核苷酸序列,或其核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

6. 一种核酸构建物,其含有权利要求5所述的核酸分子;

优选地,所述核酸构建物是表达框,除含有所述核酸分子外,还含有调控序列;或所述核酸构建物是载体,包括表达载体和用于将所述核酸分子整合到宿主细胞的基因组中的整合载体;优选地,所述载体是转座子载体,更优选地,所述转座子载体是含有选自piggybac、sleeping beauty、frog prince、Tn5或Ty的转座元件的真核表达载体。

7. 一种宿主细胞,所述宿主细胞含有权利要求6所述的核酸构建物,和/或表达权利要

求1所述的多肽或权利要求2~4中任一项所述的CAR;优选地,所述宿主细胞是NK细胞。

8.一种组合物或试剂盒,所述组合物或试剂盒含有权利要求6所述的载体和任选的转染用的试剂。

9.一种药物组合物,所述药物组合物含有权利要求7所述的NK细胞和药学上可接受的载体或辅料。

10.权利要求1所述的多肽、权利要求2~4所述的嵌合抗原受体、权利要求5所述的核酸分子、权利要求6所述的核酸构建物、权利要求7所述的宿主细胞或权利要求9所述的药物组合物在制备治疗或预防PD1或PDL1介导的癌症的药物中的用途;优选地,癌症选自胃癌、肺癌(如非小细胞肺癌)、肝癌、肝内胆管癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫颈癌、头颈鳞状细胞癌、鼻咽癌、食管癌、膀胱癌、肾细胞癌、皮肤癌和口腔鳞状细胞癌。

突变的PD1胞外域片段及含有该片段的CAR和NK细胞

技术领域

[0001] 本发明涉及突变的PD1胞外域片段及含有该片段的CAR和NK细胞。

背景技术

[0002] 在正常生理状态下,PD-1信号的激活可抑制过激炎症反应,预防自身免疫性疾病的发生,但在肿瘤环境中PD-1/PD-L1信号是肿瘤细胞免疫逃逸的重要途径。在肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、头颈癌和淋巴瘤等多种肿瘤患者中的血液中和肿瘤原位中均能检测到高表达的PD-L1蛋白。该PD-L1在肿瘤患者中与T、NK等免疫细胞中的PD-1受体相互作用,其中PD-1受体是介导T、NK等免疫细胞的刹车信号,其胞内包含两个抑制性的结构域,分别是ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) 和ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif),从而通过SHP蛋白的磷酸化抑制TCR信号/NK活化信号。目前有多种针对PD-1/PD-L1相关的抗体治疗,其在淋巴瘤和黑色素瘤等肿瘤中具有一定的效果,但依旧存在不足。一方面,抗体治疗只能通过抗体封闭的方式,只能一定阻挡肿瘤中免疫细胞和肿瘤细胞的相互作用,对于已经相互作用的免疫细胞依然具有免疫抑制作用等无法进行逆转。另一方面,抗体的Fc段很大程度上会和患者体内的免疫细胞发生ADCC/ADCP等作用,从而导致免疫系统紊乱。

[0003] NK-CAR (嵌合抗原受体NK细胞)技术是一种新型细胞疗法,它是将经过改造NK细胞回输至人体,直接杀伤肿瘤,激活自身免疫系统,可以克服传统治疗手段的细胞毒性,耐药性、复发的缺陷,被认为是目前最有效的恶性肿瘤的治疗方式之一。目前NK-CAR技术已在急性淋巴细胞白血病、淋巴瘤等血液系统恶性肿瘤(如B细胞淋巴瘤、急性B淋巴细胞白血病)中取得了令人瞩目的效果。

[0004] NK-CAR细胞具有较强的杀伤能力,但在肿瘤微环境中,肿瘤微环境中的PDL1等会通过免疫细胞的受体PD1会抑制杀伤性NK细胞的活性,从而使肿瘤细胞逃脱免疫监视。因此,希望利用肿瘤细胞的负反馈信号(PDL1-PD-1相互作用)来激活免疫细胞,从而达到减弱肿瘤细胞对免疫细胞的抑制作用,同时激活NK激活细胞,从而增强NK-CAR对肿瘤细胞的杀伤作用。

发明内容

[0005] 本发明提供一种多肽,其含有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成。

[0006] 本发明还提供一种嵌合抗原受体,从N端到C端,所述嵌合抗原受体含有依次连接的任选的信号肽、本文所述的多肽、铰链区、跨膜区、胞内共刺激信号域和胞内信号域。

[0007] 在一个或多个实施方案中,所述信号肽选自CD8信号肽、CD28信号肽或CD4信号肽;优选地,所述信号肽为CD8信号肽;优选地,所述CD8信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第1~20位氨基酸残基所示。

[0008] 在一个或多个实施方案中,所述铰链区选自CD8 α 铰链区、IgD铰链区、IgG1 Fc

CH2CH3铰链区或IgG4 Fc CH2CH3铰链区;优选地,所述铰链区是CD8 α 铰链区;优选地,所述CD8 α 铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第171~225位氨基酸残基所示。

[0009] 在一个或多个实施方案中,所述跨膜区选自CD28跨膜区、CD8跨膜区、CD3 ζ 跨膜区、CD134跨膜区、CD137跨膜区、ICOS跨膜区或DAP10跨膜区;优选地,所述跨膜区为CD8跨膜区;优选地,所述CD8跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第226~246位氨基酸残基所示。

[0010] 在一个或多个实施方案中,所述胞内共刺激信号域为共刺激信号分子的胞内结构域,优选选自CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶、诱导性T细胞共刺激因子或DNAX激活蛋白10的胞内结构域;优选地,所述胞内共刺激信号域为4-1BB的胞内结构域;优选地,所述4-1BB的胞内结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第247~288位氨基酸残基所示。

[0011] 在一个或多个实施方案中,所述胞内信号域为CD3 ζ 胞内信号域或Fc ϵ RI γ 胞内信号域;优选地,所述胞内信号域为CD3 ζ 胞内信号域;优选地,所述CD3 ζ 胞内信号域的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第289~400位氨基酸残基所示。

[0012] 在一个或多个实施方案中,所述嵌合抗原受体从N端到C端依次含有CD8信号肽、权利要求1所述的多肽、CD8 α 铰链区、CD8跨膜区、4-1BB胞内结构域和CD3 ζ 的酪氨酸活化基序。

[0013] 在一个或多个实施方案中,所述嵌合抗原受体的氨基酸序列为从N端到C端依次连接的SEQ ID NO:3第1~20位氨基酸残基、SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3第171~400位氨基酸残基;或所述嵌合抗原受体的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0014] 本发明提供一种核酸分子,所述核酸分子编码本文所述的多肽嵌合抗原受体;优选地,所述核酸分子为DNA分子或RNA分子。

[0015] 在一个或多个实施方案中,所述核酸分子为权利要求1所述多肽的编码序列,其核苷酸序列如SEQ ID NO:2第70~510位核苷酸序列所示。

[0016] 在一个或多个实施方案中,所述核酸分子从5'端到3'端依次含有:SEQ ID NO:2第1~60位所示的核苷酸序列和SEQ ID NO:2第70~1200位所示的核苷酸序列,或其核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0017] 在一个或多个实施方案中,所述核酸分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0018] 本发明还提供一种核酸构建物,其含有本文所述的核酸分子。

[0019] 在一个或多个实施方案中,所述核酸构建物是表达框,除含有所述核酸分子外,还含有调控序列。

[0020] 在一个或多个实施方案中,所述核酸构建物是载体,包括表达载体和用于将所述核酸分子整合到宿主细胞的基因组中的整合载体;优选地,所述载体是转座子载体,更优选地,所述转座子载体是含有选自piggybac、sleeping beauty、frog prince、Tn5或Ty的转座元件的真核表达载体。

[0021] 本发明还提供一种宿主细胞,所述宿主细胞含有本文所述的核酸构建物,和/或表达本文所述的多肽或CAR;优选地,所述宿主细胞是NK细胞。

[0022] 本发明还提供一种组合物或试剂盒,所述组合物或试剂盒含有本文所述的载体和任选的转染用的试剂。

[0023] 在一个或多个实施方案中,所述试剂盒含有所述组合物。

[0024] 本发明还提供一种药物组合物,所述药物组合物含有本文所述的NK细胞和药学上

可接受的载体或辅料。

[0025] 本发明还提供本文所述的多肽、嵌合抗原受体、核酸分子、所述的核酸构建物、宿主细胞或药物组合物在制备治疗或预防PD1或PDL1介导的癌症的药物中的用途；优选地，癌症选自胃癌、肺癌（如非小细胞肺癌）、肝癌、肝内胆管癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫颈癌、头颈鳞状细胞癌、鼻咽癌、食管癌、膀胱癌、肾细胞癌、皮肤癌和口腔鳞状细胞癌。

附图说明

[0026] 图1:靶向PDL1的NK-PD1M-CAR的序列。

[0027] 图2:NK-PD1M-CAR中CD56表达和CAR的表达情况。图中，对照（“control”）为未转入嵌合抗原受体PD1M-CAR的编码基因的同一批次的NK细胞。

[0028] 图3:NK细胞体外对PD-L1过表达的K562肿瘤细胞系杀伤结果。

[0029] 图4:NK+HAC和NK-PD1M-CAR对A549的杀伤结果。以图中最右侧的曲线为准，从上到下依次对应于：A549；A549+NK+HAC，E/T=0.625；A549+NK，E/T=1.25；A549+NK+HAC，E/T=1.25；A549+NK-PD1M-CAR，E/T=0.625；A549+NK-PD1M-CAR，E/T=1.25。

[0030] 图5:NK-PD1WT-CAR和NK-PD1M-CAR对A549的杀伤结果。以图中最右侧的曲线为准，从上到下依次对应于：A549；A549+NK-GFP+HAC，E/T=0.625；A549+NK-PD1WT-CAR，E/T=0.625；A549+NK-PD1M-CAR，E/T=0.625；A549+NK-GFP+HAC，E/T=1.25；A549+NK-PD1WT-CAR，E/T=1.25；A549+NK-PD1M-CAR，E/T=1.25。

[0031] 图6:NK-PD1WT-CAR和NK-PD1M-CAR对H1299的杀伤结果。以图中最右侧的曲线为准，从上到下依次对应于：H1299；H1299+NK-GFP+HAC；H1299+NK-PD1WT-CAR；H1299+NK-PD1M-CAR。

[0032] 图7:NK-PD1WT-CAR和NK-PD1M-CAR对HCC827的杀伤结果。以图中最右侧的曲线为准，从上到下依次对应于：HCC827；HCC827+NK-GFP+HAC；HCC827+NK-PD1WT-CAR；HCC827+NK-PD1M-CAR。

[0033] 图8:NK-PD1M-CAR靶向HCC827的杀伤作用。

[0034] 图9:几种细胞系的PDL1表达情况。

[0035] 图10:NK-PD1WT-CAR中CD56表达和CAR的表达情况。图中，对照（“control”）为未转入嵌合抗原受体PD1WT-CAR的编码基因的同一批次的NK细胞。

具体实施方式

[0036] 应理解，在本发明范围中，本发明的上述各技术特征和在下文（如实施例）中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成优选的技术方案。

[0037] 在本发明中，术语“表达框”是指表达一个基因所需的完整元件，包括启动子、基因编码序列、PolyA加尾信号序列。

[0038] 术语“编码序列”指为核酸序列中直接确定其蛋白产物（例如CAR）的氨基酸序列的部分。编码序列的边界通常是由紧邻mRNA 5'端开放读码框上游的核糖体结合位点（对于原核细胞）和紧邻mRNA 3'端开放读码框下游的转录终止序列确定。编码序列可以包括但不限于DNA、cDNA和重组核酸序列。

[0039] 术语“共刺激分子”是指存在于抗原提呈细胞表面，能与Th细胞上的共刺激分子受

体结合,产生协同刺激信号的分子。淋巴细胞的增殖不仅需要抗原的结合,还需要接受共刺激分子的信号。共刺激信号传递给T细胞主要是通过表达在抗原呈递细胞表面的共刺激分子CD80,CD86与T细胞表面的CD28分子结合。B细胞接受共刺激信号可以通过一般的病原体成分例如LPS,或者通过补体成分,或者通过激活了的抗原特异性的Th细胞表面的CD40L。

[0040] 术语“接头”或铰链是连接不同蛋白或多肽之间的多肽片段,其目的是使所连接的蛋白或多肽保持各自的空间构象,以维持蛋白或多肽的功能或活性。示例性的接头包括含有G和/或S的接头,以及例如Furin 2A肽。

[0041] 术语“药学上可接受的辅料”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂,其是本领域公知的(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995),并且包括但不限于:pH调节剂,表面活性剂,佐剂,离子强度增强剂。例如,pH调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液;表面活性剂包括但不限于阳离子,阴离子或者非离子型表面活性剂,例如Tween-80;离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

[0042] 术语“有效量”是指可在受试者中实现治疗、预防、减轻和/或缓解本发明所述疾病或病症的剂量。

[0043] 术语“疾病和/或病症”是指所述受试者的一种身体状态,该身体状态与本发明所述疾病和/或病症有关。

[0044] 术语“受试者”或者“患者”可以指患者或者其它接受本发明药物组合物以治疗、预防、减轻和/或缓解本发明所述疾病或病症的动物,特别是哺乳动物,例如人、狗、猴、牛、马等。

[0045] 术语“嵌合抗原受体”(CAR)是人工改造受体,能够将识别肿瘤细胞表面抗原的特异性分子(如抗体)锚定在免疫细胞(如T细胞)上,使免疫细胞识别肿瘤抗原或病毒抗原和杀死肿瘤细胞或病毒感染的细胞。CAR通常依次包含任选的信号肽、结合肿瘤细胞膜抗原的多肽、铰链区、跨膜区和胞内信号区。

[0046] 本发明利用突变的PD1胞外段构建的CAR,并在NK细胞中表达该CAR。本发明发现,表达含有突变的PD1胞外段的CAR的NK细胞杀伤肿瘤细胞的能力明显强于表达含有野生型PD1胞外段的CAR的NK细胞,由此完成本发明。

[0047] 因此,本发明第一方面提供一种突变的多肽,其为PD1胞外段的突变体。在一些实施方案中,该多肽含有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成。本发明的多肽也包括与SEQ ID NO:1相比具有1~8个、优选1~5个、更优选1~3个氨基酸突变(包括插入、缺失和/或取代)的突变。突变优选是本领域熟知的保守性取代,例如用具有相同或类似的性质(如根据侧链基团分类或根据化学结构分类)氨基酸残基替换SEQ ID NO:1中的1个或多个(如1~8个、1~5个或1~3个)。应理解,该SEQ ID NO:1的突变体保留了SEQ ID NO:1的生物学活性,尤其是SEQ ID NO:1在本文中所展现的生物学活性。

[0048] 本发明第二方面提供一种嵌合抗原受体(CAR),从N端到C端,其含有依次连接的信号肽、本文所述的PD1胞外段的突变体、铰链区、跨膜区、胞内共刺激信号域和胞内信号域。

[0049] 信号肽是引导新合成的蛋白质向分泌通路转移的短肽链(长度5-30个氨基酸),常指新合成多肽链中用于指导蛋白质的跨膜转移(定位)的N-末端的氨基酸序列(有时不一定在N端),它负责把蛋白质引导到细胞含不同膜结构的亚细胞器内。在一些实施方案中,本文

所用的信号肽可选自CD8信号肽、CD28信号肽或CD4信号肽。优选地,所述信号肽为CD8信号肽。优选地,所述CD8信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第1~20位氨基酸残基所示。

[0050] 铰链区指免疫球蛋白重链CH1和CH2功能区之间的区域,该区富含脯氨酸,不形成 α 螺旋,易发生伸展及一定程度扭曲。在一些实施方案中,本文所用的铰链区可选自CD8 α 铰链区、IgD铰链区、IgG1 Fc CH2CH3铰链区和IgG4Fc CH2CH3铰链区。优选地,所述铰链区是CD8 α 铰链区或IgG4 Fc CH2CH3铰链区。更优选地,所述CD8 α 铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第171~225位氨基酸残基所示。

[0051] 在一些实施方案中,本文所用的跨膜区可为CD28跨膜区、CD8跨膜区、CD3 ζ 跨膜区、CD134跨膜区、CD137跨膜区、ICOS跨膜区和DAP10跨膜区中的一种。优选地,本文使用CD8跨膜区;更优选地,所述CD8跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第226~246位氨基酸残基所示。

[0052] 在一些实施方案中,本文所用的胞内共刺激信号域包括共刺激信号分子的胞内结构域,包括CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶、诱导性T细胞共刺激因子(ICOS)和DNAX激活蛋白10的胞内结构域。优选地,所述胞内共刺激信号域为4-1BB的胞内结构域。更优选地,所述4-1BB的胞内结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第247~288位氨基酸残基所示。

[0053] 在一些实施方案中,本文所用的胞内信号域为CD3 ζ 胞内信号域或Fc ϵ RI γ 胞内信号域。优选地,本文使用CD3 ζ 胞内信号域;更优选地,所述CD3 ζ 胞内信号域的氨基酸序列如SEQ ID NO:3第289~400位氨基酸残基所示。

[0054] 在一些实施方案中,本文所述的嵌合抗原受体从N端到C端依次含有CD8信号肽、本文所述的PD1胞外段的突变体、CD8 α 铰链区、CD8跨膜区、4-1BB胞内结构域和CD3 ζ 的酪氨酸活化基序。

[0055] 形成本文嵌合抗原受体的上述各部分,如信号肽、PD1胞外段的突变体、铰链区、跨膜区、胞内共刺激信号域和胞内信号域等,相互之间可直接连接,或者可通过接头序列连接。接头序列可以是本领域周知的适用于抗体的接头序列,例如含G和S的接头序列。接头的长度可以是3~25个氨基酸残基,例如3~15、5~15、10~20个氨基酸残基。在某些实施方案中,接头序列是多甘氨酸接头序列。接头序列中甘氨酸的数量无特别限制,通常为2~20个,例如2~15、2~10、2~8个。除甘氨酸和丝氨酸外,接头中还可含有其它已知的氨基酸残基,例如丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)、苯丙氨酸(F)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)等。

[0056] 应理解,在基因克隆操作中,常常需要设计合适的酶切位点(例如SEQ IDNO:3的第21~23位氨基酸残基),这势必在所表达的氨基酸序列末端引入一个或多个不相干的残基,而这并不影响目的序列的活性。此外,为了构建融合蛋白、促进重组蛋白的表达、获得自动分泌到宿主细胞外的重组蛋白、或利于重组蛋白的纯化,常常需要将一些氨基酸添加至重组蛋白的N-末端、C-末端或该蛋白内的其它合适区域内。因此,本文的CAR的氨基端或羧基端或其各元件之间还可含有一个或多个多肽片段,作为蛋白标签。任何合适的标签都可以用于本文。例如,所述的标签可以是FLAG,HA,HA1,c-Myc,Poly-His,Poly-Arg,Strep-TagII,AU1,EE,T7,4A6, ϵ ,B,gE以及Ty1。这些标签可用于对蛋白进行纯化。

[0057] 在一些实施方案中,本文所述的嵌合抗原受体的氨基酸序列为从N端到C端依次连

接的SEQ ID NO:3第1~20位氨基酸残基、SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3第171~400位氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所述的嵌合抗原受体的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0058] 本发明还提供一种核酸分子,所述核酸分子编码本文任一实施方案所述的突变的多肽或嵌合抗原受体。所述核酸分子可以是DNA分子,也可以是RNA分子。在一些实施方案中,所述核酸分子是mRNA分子。DNA可以是单链的或是双链的。

[0059] 本文所述的核酸分子通常可以用PCR扩增法获得。具体而言,可根据本文所公开的核苷酸序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增得到有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

[0060] 在一些实施方案中,所述核酸分子为本文所述多肽的编码序列,优选其核苷酸序列如SEQ ID NO:2第70~510位核苷酸序列所示。

[0061] 在一些实施方案中,所述核酸分子从5'端到3'端依次含有:SEQ ID NO:2第1~60位所示的核苷酸序列和SEQ ID NO:2第70~1200位所示的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述核酸分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0062] 在一些实施方案中,本发明还提供一种核酸构建物,其含有本文任一实施方案所述的核酸分子。在一些实施方案中,所述核酸构建物是表达框,除含有所述核酸分子外,还含有调控序列。

[0063] 调控序列可以是合适的启动子序列。启动子序列通常与待表达蛋白的编码序列操作性连接。启动子可以在所选择的宿主细胞中显示转录活性的任何核苷酸序列,包括突变的、截短的和杂合启动子,并且可以从编码与该宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。

[0064] 调控序列也可以是合适的转录终止子序列,由宿主细胞识别以终止转录的序列。终止子序列与编码多肽的核苷酸序列的3'末端操作性连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本文。

[0065] 在某些实施方案中,所述核酸构建物是载体。具体而言,可将本文CAR的编码序列克隆入许多类型的载体,这些类型的载体包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。载体可以是表达载体,或是用于将本文所述核酸分子整合入宿主细胞的整合载体。表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒。

[0066] 通常,合适的载体包含在至少一种有机体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制酶位点和一个或多个可选择的标记。例如,在某些实施方案中,本发明使用逆转录病毒载体,该逆转录病毒载体含有复制起始位点,3' LTR,5' LTR,本文所述CAR的编码序列,以及任选的可选择的标记。

[0067] 合适的启动子包括但不限于即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-1 α (EF-1 α)。然而,也可使用其他组成型启动子序列,包括但不限于类人猿病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳癌病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、鸟类白血病病毒启动子、EB病毒即时早期启动子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子,诸如但不限于肌动蛋白启动子、

肌球蛋白启动子、血红素启动子和肌酸激酶启动子。进一步地,也可考虑使用诱导型启动子。诱导型启动子的使用提供了分子开关,其能够在期限表达时打开可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达,而在当表达是不期望的时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0068] 可选择的标记包括标记基因或报道基因中的任一个或两者,以便于从被病毒载体感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。有用的可选择标记基因包括例如抗生素抗性基因,诸如neo等。合适的报道基因可包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因。

[0069] 在某些实施方案中,将本文所述嵌合抗原受体的编码序列克隆到用于将目的核酸序列整合到宿主细胞的基因组中的载体(也称为整合载体)中,尤其是转座子载体。合适的转座子载体是含有选自piggybac、sleeping beauty、frog prince、Tn5或Ty的转座元件的真核表达载体。这类转座子载体含有相应转座子的5'反向末端重复序列(5'LTR)和相应转座子的3'反向末端重复序列(3'LTR)。转座酶可以是来自piggybac、sleeping beauty、frog prince、Tn5或Ty转座系统的转座酶。当使用来自不同转座系统的转座酶时,所述载体中的5'LTR和3'LTR的序列也相应改变为与该转座系统适配的序列,这可由本领域技术人员容易地确定。在5'LTR和3'LTR之间是本发明的CAR的表达框,包括相应的启动子序列、CAR的编码序列以及polyA加尾信号序列。

[0070] 本发明还提供一种宿主细胞,所述宿主细胞含有本文所述的核酸构建物,和/或表达本文所述的CAR。在一些实施方案中,所述宿主细胞是NK细胞。

[0071] 可采用本领域熟知的技术将本发明的核酸构建物转染到宿主细胞中。转染的方法为本领域常规的方法,包括但不限于:病毒转导、显微注射、粒子轰击、基因枪转化和电转等。在某些实施方案中,采用电转将所述载体转染感兴趣的细胞中。

[0072] 本发明还提供一种组合物,所述组合物含有含本文所述嵌合抗原受体表达框的载体。该组合物中还可含有合适的试剂,包括但不限于转染用的试剂。

[0073] 本发明还提供一种试剂盒,所述试剂盒含有含本文所述嵌合抗原受体表达框的载体,或者含有本文所述的组合物。试剂盒中还可配有将所述载体转入细胞中的试剂或仪器。

[0074] 本发明还提供一种药物组合物,所述药物组合物含有本文所述的NK细胞。药物组合物中可含有合适的药学上可接受的载体或辅料。药物组合物中含有治疗或预防有效量的NK细胞。可根据患者的病情等因素确定NK细胞的治疗或预防有效量。

[0075] 本发明还提供本文所述的PD1胞外段的突变体、CAR、其编码序列或互补序列、核酸构建物以及宿主细胞在制备治疗治疗或预防癌症的药物中的用途。本发明还提供用于治疗或预防癌症的本文所述的PD1胞外段的突变体、CAR、其编码序列或互补序列、核酸构建物以及宿主细胞。本发明还提供癌症的治疗或预防方法,所述方法包括给予需要的对象治疗或预防有效量的本发明所述的NK细胞或其药物组合物。本文所述的癌症优选为PD1或PDL1介导的癌症,即通过阻断PD1与PDL1的信号通路而能治疗或预防的癌症,或由PD-L1表达所导致或者以PD-L1表达为症状/特征的疾病或病症,包括T细胞功能失调性疾病,如癌症和炎症性疾病。在一些实施方案中,本发明所述的癌症包括但不限于胃癌、肺癌(如非小细胞肺癌)、肝癌、肝内胆管癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫颈癌、头颈鳞状细胞癌、鼻咽癌、食管癌、膀胱癌、肾细胞癌、皮肤癌和口腔鳞状细胞癌。

[0076] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列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。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0077] 实施例1:UCB-NK制备

[0078] (1)分离CBMC

[0079] 将一个单位的脐带血用三倍的含2%EDTA的PBS进行稀释,每35ml稀释脐带血用移液管垂直从底部加入10mL Ficol1离心液,400g离35min,升速为1,降速为0。离心结束后细胞分层,取中间淋巴细胞层;经PBS洗涤后,得到CBMC。

[0080] (2)去除CD3+细胞纯化NK

[0081] 取上述CBMC,加入含1% EDTA的PBS,配成细胞悬液;按照试剂盒依次加入去除抗体和磁珠,孵育5min,采用磁铁对孵育好的细胞进行筛选;PBS洗涤,去除免疫磁珠后,得到CD3阴性淋巴细胞。

[0082] (3)NK纯化和成熟

[0083] 取上述经过免疫磁珠分离法得到的CD3阴性淋巴细胞,培养的第5天进行细胞计数和离心换液,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,接种,培养;培养的第7天,观察细胞状态,如果细胞密度增大,则稀释细胞浓度为 0.5×10^6 个/mL,检测细胞活性,继续培养。扩增培养到第10-14天,收集NK细胞。

[0084] 实施例2:CAR序列设计及其表达载体的制备

[0085] 分别制备UTR、CD8信号肽、hPD-1突变体(PD1M)、CD8 α 铰链区、CD8跨膜区、4-1BB信号区和CD3 ζ 信号区的编码基因。通过PCR方法将上述UTR、CD8信号肽、PD-1、CD8 α 铰链区、CD8跨膜区、4-1BB信号区和CD3 ζ 信号区的编码基因依次从5'端到3'端连接到一起,得到嵌合抗原受体PD1M-CAR的编码基因,所述PD1M-CAR的模式图如图1所示。

[0086] hPD-1突变体的氨基酸序列为(SEQ ID NO:1):

[0087] FLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVVWHRESP SGQTDTLAAFPEDRSQPG QDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGYV CGVISLAPKIQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQ FQTLV。

[0088] 该嵌合抗原受体PD1M-CAR的编码序列为(SEQ ID NO:2):

[0089] gcattgcccgtgaccgccctgctgctgccactggccttggtgctccacgccgcggcccaatgggatac
cTTCCTGGACTCCCCTGACAGACCCCTGGAACCCCTCTACCTTTTCCCCGCTCTGCTGGTGACCGAGGGAGAT
AACGCCACCTTCACCTGCAGCTTTAGCAACACCTCCGAGAGCTTCCACGTGGTGTGGCACAGAGAATCCCCCTCCG
GACAGACCGACACCCCTGGCTGCTTTCCCTGAAGACAGAAGCCAGCCCGGCCAGGATTGCAGATTTAGAGTGACCCA
GCTGCCAAACGGCAGAGATTTTACATGAGCGTGGTGCGCGCTAGAAGAAACGACTCCGGCACCTATGTGTGCGGC
GTGATCAGCCTGGCTCCCAAAATCCAGATCAAGGAAAGCCTGAGAGCCGAGCTGAGAGTGACCGAGAGAAGAGCCG
AGGTGCCACAGCTCACCTAGTCCTAGCCCTAGGCCTGCTGGACAGTTCCAGACCCTGGTGttcgtgcccgttctt
cctgccagcgaagcccaccacgacgccagcgcgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgctgcagccccctg
tccttgcgcccagaggcgtgccggccagcggcggggggcgcagtgccacacgagggggctggacttcgcctgtgata
tctacatctgggcgcccttgccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcaccaaacggggcagaaa
gaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgc
cgatttccagaagaagaagaaggagatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacc

agcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacg
tgcccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaa
gataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggccttt
accagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgctaa。

[0090] 该嵌合抗原受体PD1M-CAR的氨基酸序列为:

[0091] ALPVTALLLPLALLLHAARPMGSFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHVVWH
RESPSGQTDTLAAFPEDRSQPGQDCFRFVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYYVCGVISLAPKIQIKESLRAELRV
TERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*(SEQ ID NO:3)。

[0092] 采用相同的方法获得表达野生型PD-1胞外段的PD1WT-CAR,该PD1WT-CAR除胞外段
为野生型PD-1胞外段外,其余部分与PD1M-CAR相同。该野生型PD-1胞外段的氨基酸序列如
下(SEQ ID NO:4):

[0093] FLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSP SNQTDKLAAFPEDRSQPG
QDCFRFVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGYL CGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQ
FQTLV。

[0094] (1)构建T7-PD1M-CAR重组质粒

[0095] 通过PCR的方法将PD1M-CAR重组到T7质粒,然后转入大肠杆菌感受态细胞DH5 α ,进
行阳性克隆PCR鉴定和测序鉴定。经过PCR产物凝胶电泳检测和测序鉴定符合目的片段大小
和序列,成功构建。通过体外抽提的方式,获得大量的质粒。

[0096] 采用同样的方法构建T7-PD1WT-CAR的重组质粒。

[0097] (2)mRNA合成

[0098] 通过PCR的方式从T7质粒中获得PD1M-CAR的序列和PD1WT-CAR的序列,在通过体外
进行加帽加尾,转录获得修饰后的mRNA,通过琼脂糖电泳检测RNA的长度和完整性。将纯化
后的RNA按照1-1.5ug/u1溶解于无核酸酶的水/柠檬酸钠溶剂中,用于后续的RNA电转实验。

[0099] 实施例3:NK细胞转染

[0100] 将上述获得的成熟NK离心后去除培养基,通过血球计数板进行计数,每20u1电转
缓冲液中包含0.5-1 $\times 10^6$ 的NK细胞,通过LONZA 4D电转仪用实施例2制备得到的RNA电转
后,放置到完全的NK培养基(CST EXPAND MEDIUM#A5019001)中培养,获得表达嵌合抗原受
体PD1M-CAR的NK细胞(NK-PD1M-CAR细胞)。培养8h后通过流式细胞仪检测PD1M-CAR表达。

[0101] 结果如图2所示。PD1M-CAR的表达最高为88.8%。图2的结果显示,NK-PD1M-CAR的
细胞活性和CD56的表达并没有受到影响。

[0102] 采用相同方法获得表达PD1WT-CAR的NK细胞(NK-PD1WT-CAR细胞)。结果如图10所
示。PD1WT-CAR的表达87.9%。图10结果显示NK-PD1WT-CAR的细胞活性和CD56的表达和转染
前没有差异性。

[0103] 实施例4:NK细胞体外对PD-L1过表达的K562肿瘤细胞系杀伤作用

[0104] 在体外将实施例3制备得到的NK-PD1M-CAR细胞、未经处理的NK细胞(阴性对照组)
与靶细胞(表达PDL1的K562细胞)按效靶比为5:1、2.5:1、1.25:1和0.625:1的比例在37 $^{\circ}$ C、

5%CO₂下进行共培养,在培养后的第6小时,250g离心后收集上清,通过LDH试剂盒检测每组中上清的LDH含量,用于评估NK的杀伤能力。

[0105] 每组两个重复,NK细胞来源于三个及以上的样本受体,结果如图3所示。从图3可看出,NK-PD1M-CAR细胞添加得越多(即效靶比越高),对肿瘤细胞的杀伤力越强。以上结果说明,本发明的靶向PDL1的NK-PD1M-CAR细胞具有高效且特异性的肿瘤杀伤能力,可避免肿瘤细胞逃脱免疫监视。

[0106] 实施例5:NK细胞体外对非小细胞肺癌细胞系A549的杀伤作用

[0107] 本实施例对实施例3制备得到的NK-PD1M-CAR细胞、未经处理的NK细胞(阴性对照组)、表达GFP的NK淋巴细胞(阴性对照组)、过表达PD-1-WT的NK淋巴细胞(阴性对照组)、单独使用PD-1-M1的microbody(阴性对照)的体外肿瘤杀伤效果进行比较。具体实验方法包括:

[0108] 1.第1天

[0109] 首先通过胰酶消化肺癌细胞系A549,分别计数后,重悬于NK培养基中,后续按照安捷伦公司中的RTCA仪器操作手册操作,将10000肿瘤细胞均匀接种于96孔电极板中,靶细胞在96孔的培养10h或者20h后再进行下一步操作

[0110] 2.第2天

[0111] 按照1.25:1和0.625:1的效靶比混合实施例3制备得到的NK-PD1M-CAR细胞、未经处理的NK细胞(NK,阴性对照组)、表达GFP的NK淋巴细胞(NK-GFP,阴性对照组)、过表达PD-1-WT的NK淋巴细胞(NK-PD1WT-CAR,阴性对照组)与靶细胞,在37℃、5%CO₂下进行共培养。在加入PD-1-M1的microbody(HAC,SEQ ID NO:5)时,其添加浓度为0.25μM。通过实时检测电极板,反应了靶细胞的死亡情况。

[0112] 使用NK-PD1M-CAR细胞进行的实验分组如下:

[0113] (1)A549;

[0114] (2)A549+NK-GFP,E/T=0.625;

[0115] (3)A549+NK-GFP,E/T=1.25;

[0116] (4)A549+NK-GFP+HAC,E/T=0.625;

[0117] (5)A549+NK-GFP+HAC,E/T=1.25;

[0118] (6)A549+NK-PD1M-CAR,E/T=0.625;

[0119] (7)A549+NK-PD1M-CAR,E/T=1.25。

[0120] 每组两个重复。

[0121] 使用过表达PD-1-WT的NK淋巴细胞的实验分组如下:

[0122] (1)A549;

[0123] (2)A549+NK-GFP+HAC,E/T=0.625;

[0124] (3)A549+NK-GFP+HAC,E/T=1.25;

[0125] (4)A549+NK-PD1WT-CAR,E/T=0.625;

[0126] (5)A549+NK-PD1WT-CAR,E/T=1.25;

[0127] (6)A549+NK-PD1M-CAR,E/T=0.625;

[0128] (7)A549+NK-PD1M-CAR,E/T=1.25。

[0129] 每组两个重复。

[0130] 结果如图4和5所示。从图4可以看出,相比于NK-GFP,NK-PD1M-CAR具有较强的杀伤作用,HAC有一些增强NK-GFP的杀伤功能,但远远低于NK-PD1M-CAR的杀伤能力。

[0131] 从图5中发现,NK-PD1M-CAR相比于补加HAC的NK-GFP具有较强的杀伤作用,同时相比于PD-1-WT-CAR,具有较强的杀伤作用。

[0132] 实施例6:NK细胞体外对非小细胞肺癌细胞系H1299的杀伤作用

[0133] 本实施例对实施例3制备得到的NK-PD1M-CAR细胞、未经处理的NK细胞(阴性对照组)、表达GFP的NK淋巴细胞(阴性对照组)、过表达PD-1-WT的NK淋巴细胞(阴性对照组)的体外肿瘤杀伤效果进行比较。具体实验方法包括:

[0134] 1. 第1天

[0135] 首先通过胰酶消化肺癌细胞系H1299,分别计数后,重悬于NK培养基中,后续按照安捷伦公司中的RTCA仪器操作手册操作,将10000个肿瘤细胞均匀接种于96孔电极板中,靶细胞在96孔的培养20h后再进行下一步操作

[0136] 2. 第2天

[0137] 按照1.25:1效靶比混合实施例3制备得到的NK-PD1M-CAR细胞、表达GFP的NK淋巴细胞(NK-GFP,阴性对照组)、过表达PD-1-WT的NK淋巴细胞(NK-PD1WT-CAR,阴性对照组)与靶细胞,在37℃、5%CO₂下进行共培养。在加入PD-1-M1的microbody(HAC)时,其添加浓度为0.25μM。通过实时检测电极板,反应了靶细胞的死亡情况。

[0138] 使用NK-PD1M-CAR细胞进行的实验分组如下:

[0139] (1)H1299;

[0140] (2)H1299+NK-GFP+HAC,E/T=1.25;

[0141] (3)H1299+NK-PD1WT-CAR,E/T=1.25;

[0142] (4)H1299+NK-PD1M-CAR,E/T=1.25。

[0143] 每组三个重复。

[0144] 从图6中发现,NK-PD1M-CAR相比于补加HAC的NK-GFP具有较强的杀伤作用,同时相比于PD-1-WT-CAR,具有较强的杀伤作用。

[0145] 实施例7:NK细胞体外对非小细胞肺癌细胞系HCC827的杀伤作用

[0146] 本实施例对实施例3制备得到的NK-PD1M-CAR细胞、未经处理的NK细胞(阴性对照组)、表达GFP的NK淋巴细胞(阴性对照组)、过表达PD-1-WT的NK淋巴细胞(阴性对照组)的体外肿瘤杀伤效果进行比较。具体实验方法包括:

[0147] 1. 第1天

[0148] 首先通过胰酶消化肺癌细胞系HCC827,分别计数后,重悬于NK培养基中,后续按照安捷伦公司中的RTCA仪器操作手册操作,将10000肿瘤细胞均匀接种于96孔电极板中,靶细胞在96孔的培养20h后再进行下一步操作

[0149] 2. 第2天

[0150] 按照1.25:1效靶比混合实施例3制备得到的NK-PD1M-CAR细胞、表达GFP的NK淋巴细胞(NK-GFP,阴性对照组)、过表达PD-1-WT的NK淋巴细胞(NK-PD1WT-CAR,阴性对照组)与靶细胞,在37℃、5%CO₂下进行共培养。在加入PD-1-M1的microbody(HAC)时,其添加浓度为0.25μM。通过实时检测电极板,反应了靶细胞的死亡情况。

[0151] 使用NK-PD1M-CAR细胞进行的实验分组如下:

[0152] (1)HCC827;

[0153] (2)HCC827+NK-GFP+HAC,E/T=1.25;

[0154] (3)HCC827+NK-PD1WT-CAR,E/T=1.25;

[0155] (4)HCC827+NK-PD1M-CAR,E/T=1.25。

[0156] 每组三个重复。

[0157] 从图7中发现,NK-PD1M-CAR相比于补加HAC的NK-GFP具有较强的杀伤作用,同时相比于PD-1-WT-CAR,具有较强的杀伤作用。

[0158] 实施例8:NK细胞体外对高表达PDL1-HCC827肿瘤细胞系杀伤作用

[0159] 在体外将实施例3制备得到的NK-PD1M-CAR细胞、过表达PD-1-WT的NK淋巴细胞(NK-PD1WT-CAR,阴性对照组)与靶细胞(表达PDL1的HCC827细胞)按效靶比为5:1、2.5:1、1.25:1的比例在37℃、5%CO₂下进行共培养,在培养后的第4小时,250g离心后收集上清,通过LDH试剂盒检测每组中上清的LDH含量,用于评估NK的杀伤能力。

[0160] 每组两个重复,NK细胞来源于三个及以上的样本受体,结果如图8所示。从图8可看出,NK-PD1M-CAR细胞添加得越多(即效靶比越高),对肿瘤细胞的杀伤力越强。相比于NK-PD1WT-CAR具有较强的杀伤作用。以上结果说明,本发明的靶向PDL1的NK-PD1M-CAR细胞具有高效且特异性的肿瘤杀伤能力,可避免肿瘤细胞逃脱免疫监视。

[0161] 实施例9:靶细胞的PDL1表达情况

[0162] 按照常规细胞抗体染色方法,通过胰酶分别消化A549、H1299、HCC827,300g离心5min后,用PBS重悬获得单个细胞悬液,对每种细胞进行细胞计数,取1百万个细胞于5ml的圆底玻璃管中,加入2-3ml的PBS洗涤细胞,300g离心5min后弃掉上清,分别加入5ul isotype-APC(Biolegend#402206),PDL1-APC(Biolegend#329708),4℃染色30min后通过流式细胞仪(cytoflex5)检测。

[0163] 检测结果如图9所示。该结果说明A549、H1299、HCC827均表达PDL1,其PDL1的表达量为:HCC827>H1299>A549。

UTR	前导肽	Myc	hPD-1 突变体	CD8 铰 链区	CD8 跨 膜区	4-1BB	CD3 ζ	UTR
-----	-----	-----	--------------	-------------	-------------	-------	-------------	-----

图1

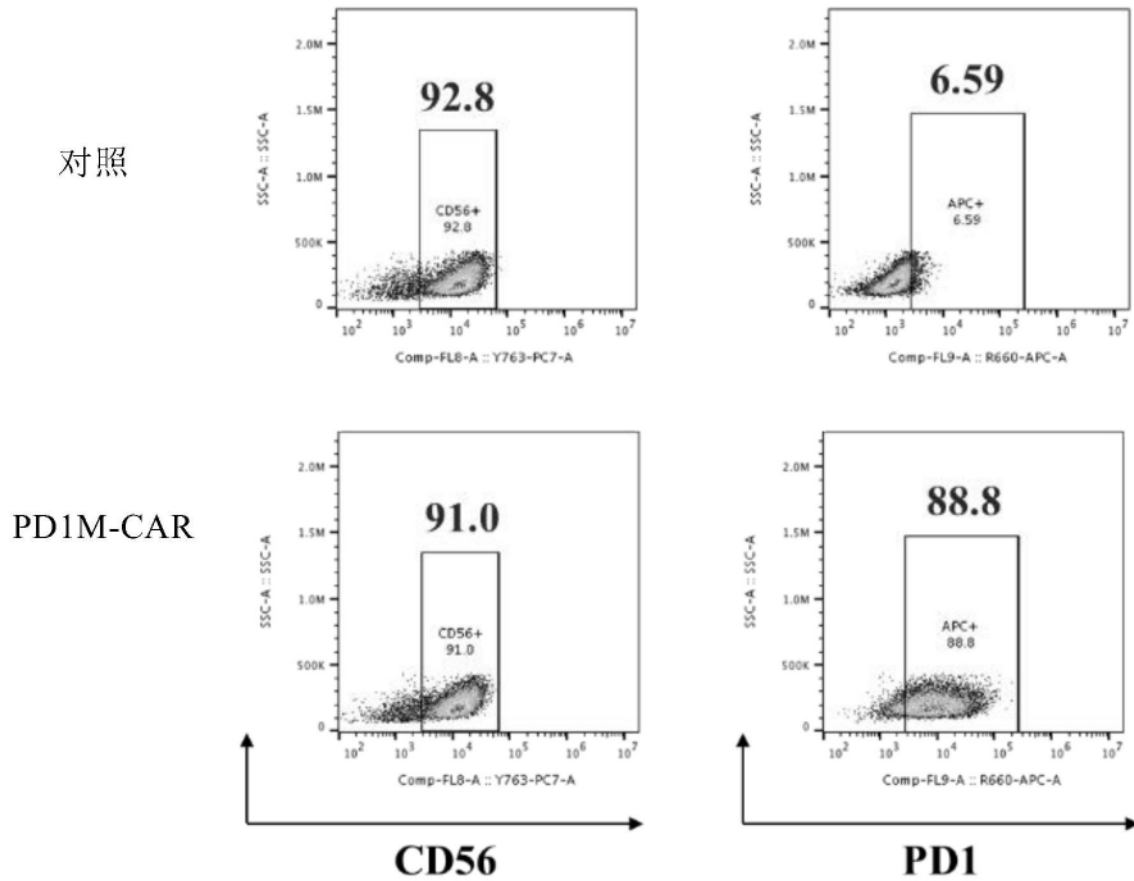


图2

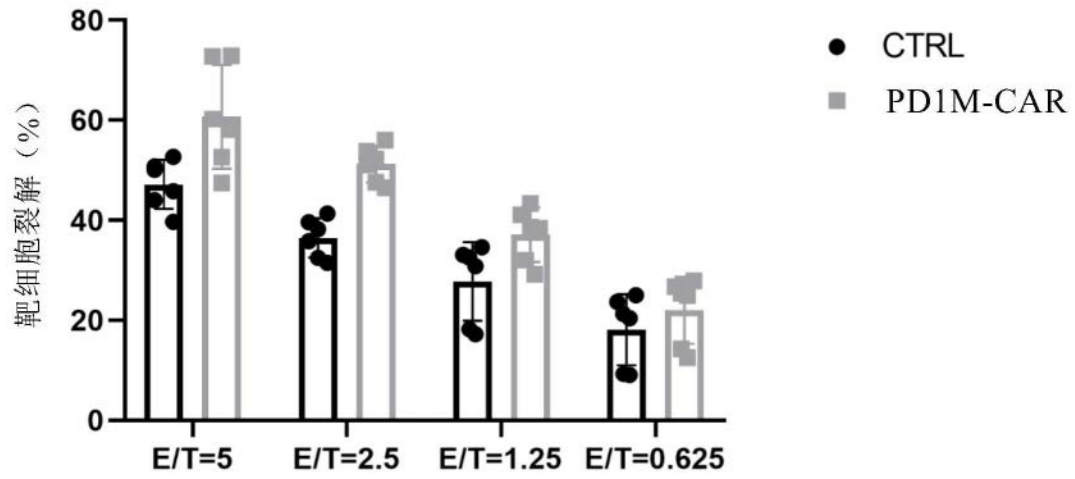


图3

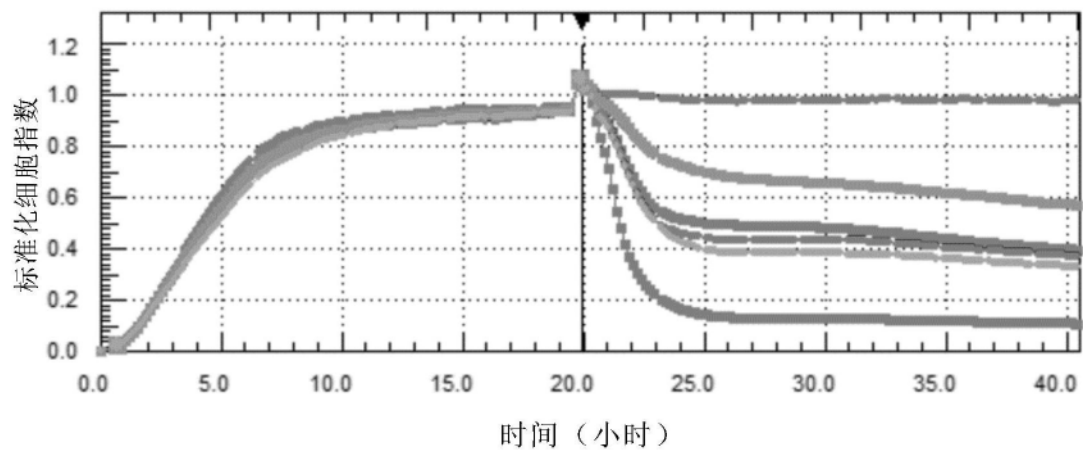


图4

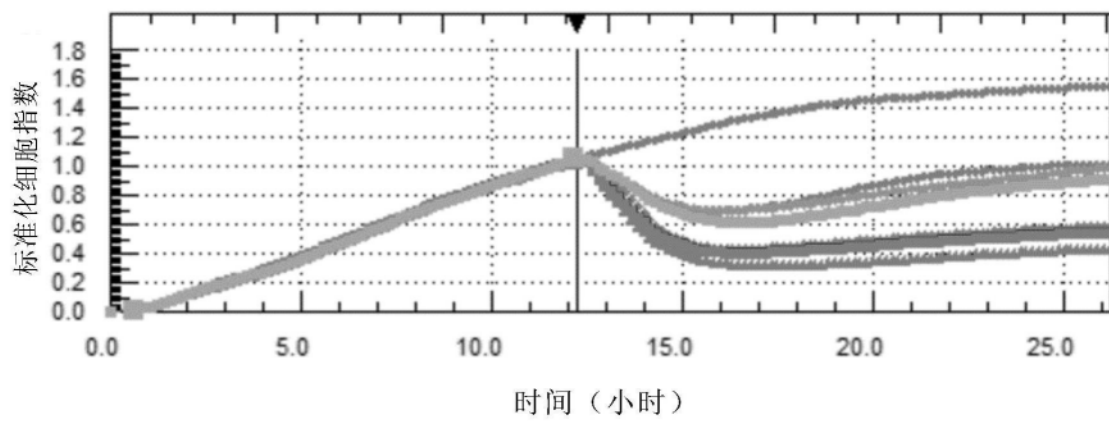


图5

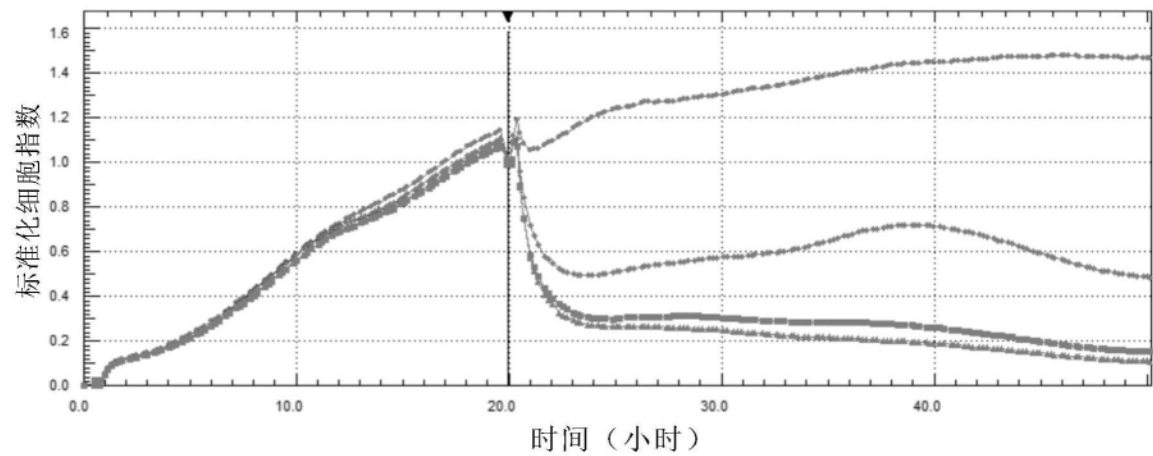


图6

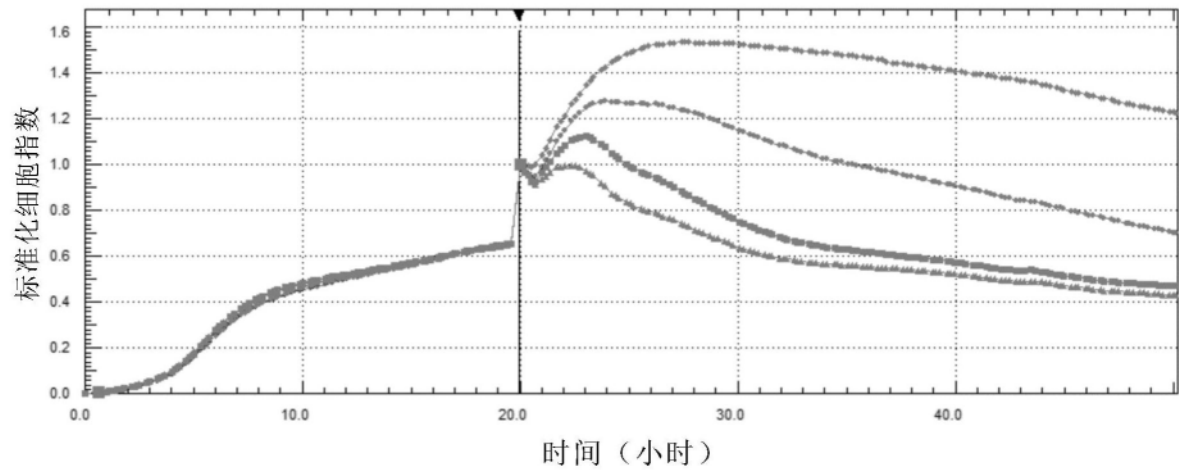


图7

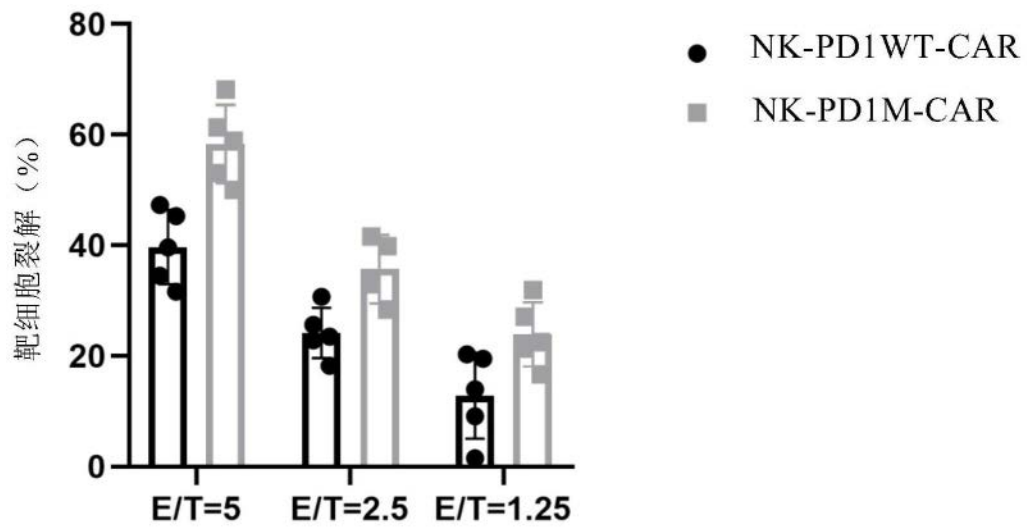


图8

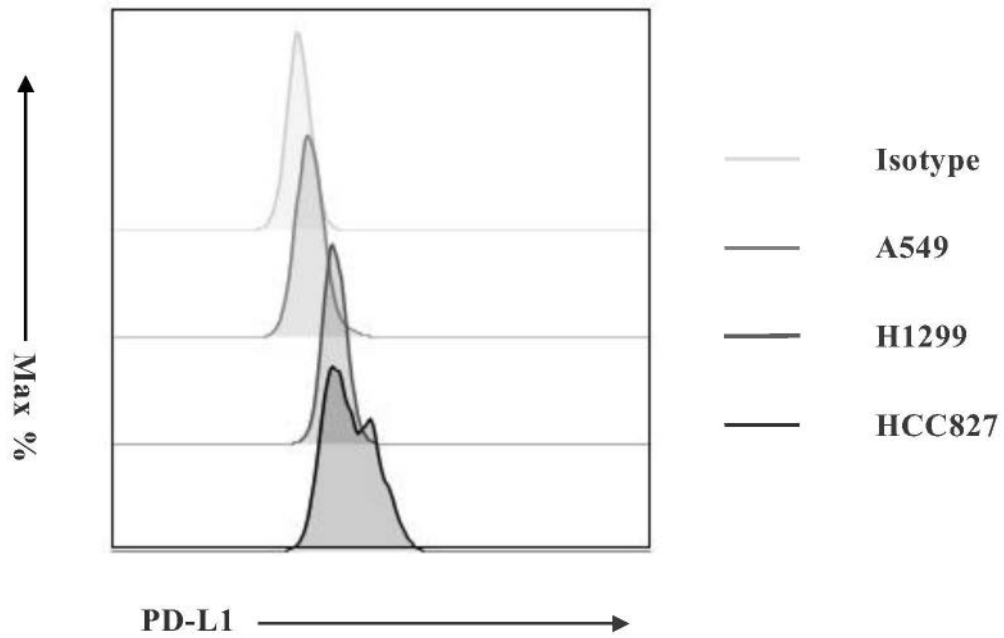


图9

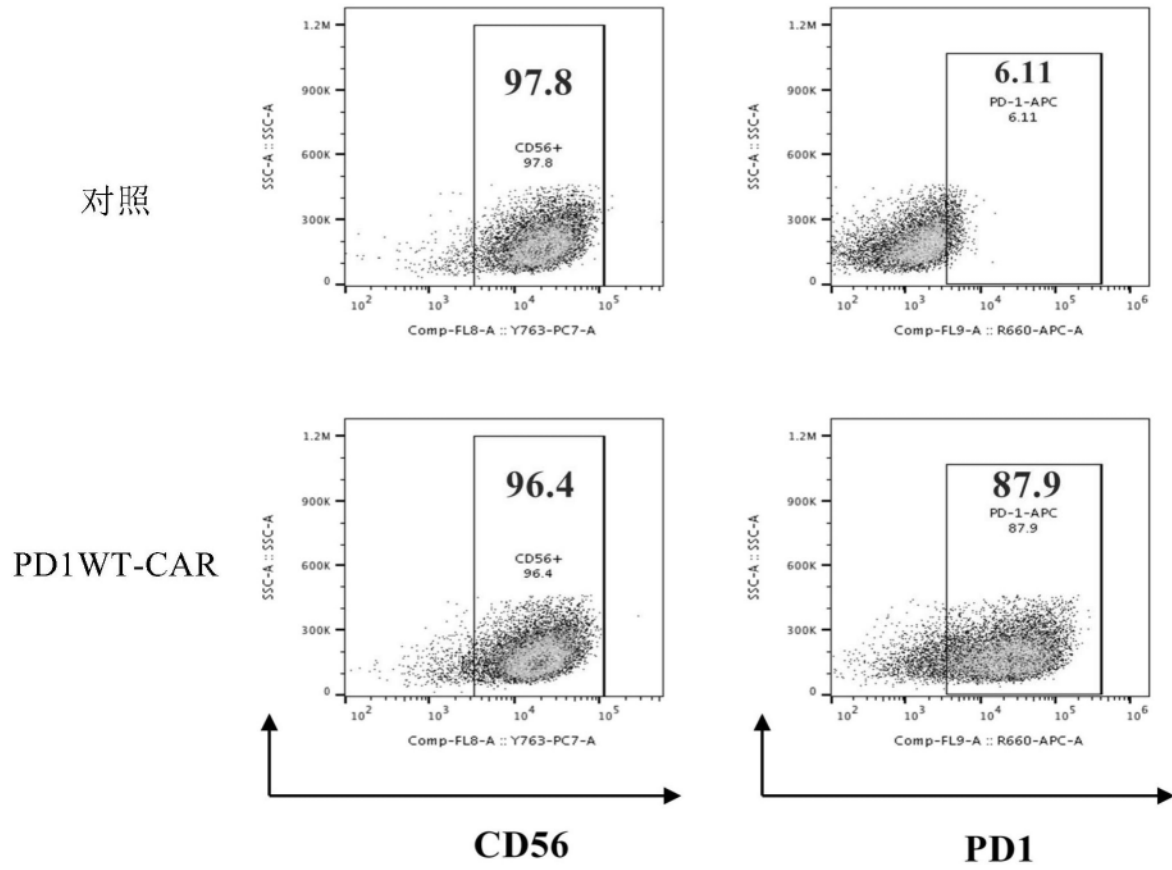


图10