

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024年8月8日 (08.08.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/159695 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 14/705 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *C07K 14/755* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/103857

(22) 国际申请日: 2023年6月29日 (29.06.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310093577.0 2023年1月31日 (31.01.2023) CN

(71) 申请人: 上海恩凯细胞技术有限公司 (SHANGHAI NK CELL TECH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区周浦镇半夏路100弄7号, Shanghai 201318 (CN)。

(72) 发明人: 王焱 (WANG, Ting); 中国上海市浦东新区周浦镇半夏路100弄7号, Shanghai 201318 (CN)。张彩 (ZHANG, Cai); 中国上海市浦东新区周浦镇半夏路100弄7号, Shanghai 201318 (CN)。胡渊 (HU, Yuan); 中国上海市浦东新区周浦镇半夏路100弄7号, Shanghai 201318 (CN)。陈敏华 (CHEN, Minhua); 中国上海市浦东新区周浦镇半夏路100弄7号, Shanghai 201318 (CN)。谢思奇 (XIE, Siqi); 中国上海市浦东新区周浦镇半夏路100弄7号, Shanghai 201318 (CN)。

(74) 代理人: 北京知帆远景知识产权代理有限公司 (ZHIFAN & PARTNERS); 中国北京市海淀区阜成路73号裕惠大厦B座805, Beijing 100142 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

(54) Title: SYNNOTCH RECEPTOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: SynNotch受体及其用途

(57) Abstract: Provided in the present invention is a chimeric polypeptide. The chimeric polypeptide comprises: an extracellular region having an activity of binding to a first molecule; a transmembrane region, the N-terminus of the transmembrane region being connected to the C-terminus of the extracellular region; and an intracellular region, the N-terminus of the intracellular region being connected to the C-terminus of the transmembrane region, wherein the transmembrane region comprises an isolated polypeptide having at least 80% identity to the transmembrane region of the Notch receptor protein derived from *Xenopus tropicalis*.

(57) 摘要: 本发明提出了一种嵌合多肽。所述嵌合多肽包括: 胞外区, 所述胞外区具有结合第一分子活性; 跨膜区, 所述跨膜区的N端与所述胞外区的C端相连; 胞内区, 所述胞内区的N端与所述跨膜区的C端相连; 其中, 所述跨膜区包括分离的多肽, 所述分离的多肽与来源于热带爪蟾的Notch受体蛋白的跨膜区具有至少80%的同一性。



WO 2024/159695 A1

SynNotch 受体及其用途

技术领域

5 本领域属于生物技术领域，具体地，本发明涉及一种 SynNotch 受体及其用途，更具体地，本发明涉及一种分离的多肽在制备 SynNotch 合成受体中的用途、嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体、重组细胞、药物组合物及其用途、激活免疫细胞的方法、追踪第一细胞-第二细胞接触的方法。

背景技术

10 随着合成生物学的发展，通过改造细胞使之可以识别细胞外特定的信号，并在改造的细胞中传递识别到的信号，进而做出人工设计的反应已经成为现实，并已经逐渐在生物医疗领域展开了应用。如嵌合抗原受体（CAR）技术在临床治疗中的应用，除此之外，在 2016 年，Wend ell A.Lim 团队基于 Notch 信号通路开发出了一套 SynNotch 受体系统，该系统同样可以识别细胞膜表面配体，并且其信号输出并不局限于单纯的免疫细胞激活信号，可以实现多种不同的信号输出类型，如特定基因的表达激活与抑制等。该受体系统可以实现不同输入信号与输出信号的多种组合，且同一体系（细胞）
15 内的多组系统间具有正交性；同时在众多细胞中均可运行，具有普适性；同时具有简易性和可调控性等诸多优秀特征，是应用合成生物学对细胞进行改造的一个强力工具。

生物学中，传统的 Notch 信号通路（系统）包括 Notch 对应的配体、Notch 分子和 Notch 调控的下游基因。其中 Notch 分子是一个跨膜分子，其可以分为胞外结构、跨膜结构域和胞内结构域 3 个部分。其胞外结构域与对应的 Notch 配体结合后，配体所在的细胞出现胞吞活动，拉扯 Notch 分子，使 Notch 分子的胞外结构域上的 S2 蛋白酶切割位点暴露出来，
20 被金属蛋白酶 ADAMs 家族成员等切割；进一步的，伴随着胞外结构域的切割断裂，Notch 分子的胞内结构域被 γ -分泌酶切割后释放到细胞内，随后入核作为转录因子调控下游相关基因的表达。Wend ell A.Lim 团队改造了鼠的 Notch1 受体，将其胞外域用单链抗体或者纳米抗体替换，胞内域用转录激活或转录抑制的结构域替换，仅保留了可以被蛋白酶识别切割的跨膜结构域，还配备了下游被调控的基因元件。针对不同靶标，胞外域采用特异识别该抗原的抗体单链，而胞内域调控预先设定的目标基因或因子的表达。在同一细胞中可以设计由不同抗原启动的基因调控环路，并具有很好的正交性。
25 SynNotch 系统可以被应用到许多细胞类型中，包括神经细胞、肿瘤细胞、表皮细胞和免疫细胞等。CAR 技术和 SynNotch 系统组合应用到免疫细胞改造中，可以实现免疫细胞的“与门”激活，即只有当细胞同时表达两种特定的表面抗原时，才能将免疫细胞激活。改变 SynNotch 下游调控的基因元件，免疫细胞可以在接触特定抗原后，分泌单链抗体、细胞因子等等具有治疗作用的因子，并且在体外、体内都具有抗肿瘤的作用。可见 SynNotch 受体系统，在细胞改造中具有极大的技术优势。

30

发明内容

本发明旨在至少在一定程度上解决现有技术中存在的技术问题至少之一。为此，本发明提供了一种 SynNotch 受体，该 SynNotch 受体可增强其对下游基因的激活能力和减少本底泄露激活水平。

本发明是基于发明人的下列发现而完成的：

35 SynNotch 系统功能十分强大，但是目前常用的初始版本 SynNotch 系统（又称 SynNotch 合成受体、SynNotch）具有如下缺点：第一，初始版本 SynNotch 被激活后，其下游转录表达调控能力并不是很强，即激活下游基因的表达量并不很高，会局限 SynNotch 的使用，特别是针对需要下游基因有较高的表达量才能发挥效用的情况。第二，初始版本 SynNotch 的本底泄露水平较高，对于下游需要严谨调控的基因，其较高水平的泄露表达可能会导致 SynNotch 分子开关的失效，分子表达线路会直接越过 SynNotch 分子开关实现表达。

40 然而，发明人经过试验意外发现，上述问题的关键点在于 SynNotch 分子的跨膜结构域存在不足。初始版本 SynNotch 合成受体选择了小鼠来源 Notch 分子的跨膜结构域来作为 SynNotch 合成受体的跨膜结构域。考虑到不同种属来源的 Notch 跨膜结构域上所携带的 S2 和 S3 切割序列存在差异，以及不同物种来源的 S2 和 S3 切割酶存在的构象和序列偏好性，在不同物种的细胞中，使用不同的跨膜结构域所构建的 SynNotch 合成受体其激活效率和泄露效率必然有所差异。发明人用 SynNotch 合成受体改造人源细胞为最终目的，在试验过程中意外发现选择热带爪蟾的 Notch 跨膜结构域，可以提高
45 SynNotch 合成受体对下游基因转录激活的能力和效率，以及降低 SynNotch 合成受体的本底泄露激活，使 SynNotch 合成受体能够更加有效的发挥作用。

因此，在本发明的一个方面，本发明提出了一种分离的多肽在制备 SynNotch 合成受体中的用途，所述分离的多肽与来源于热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)的 Notch 受体蛋白的跨膜区具有至少 80% 的同一性。发明人发现，选择热带爪蟾的 Notch 受体蛋白的跨膜区制备的 SynNotch 合成受体，可以提高其对下游基因转录激活的能力和效率，降低 SynNotch 合成受体的本底泄露。

5 本发明的另一方面，本发明提出了一种嵌合多肽。根据本发明的实施例，所述嵌合多肽包括：胞外区，所述胞外区具有结合第一分子活性；跨膜区，所述跨膜区的 N 端与所述胞外区的 C 端相连；胞内区，所述胞内区的 N 端与所述跨膜区的 C 端相连；其中，所述跨膜区包括分离的多肽，所述分离的多肽与来源于热带爪蟾的 Notch 受体蛋白的跨膜区具有至少 80% 的同一性。本发明的嵌合多肽选择热带爪蟾的 Notch 受体蛋白的跨膜区作为嵌合多肽（即为 SynNotch 合成受体）的跨膜区，可以提高嵌合多肽对下游基因转录激活的能力和效率，以及降低嵌合多肽的本底泄露。

10 在本发明的又一方面，本发明提出了一种第一核酸分子。根据本发明的实施例，所述第一核酸分子编码权利要求前述的嵌合多肽。根据本发明实施例的第一核酸分子所编码前述的嵌合多肽。

在本发明的又一方面，本发明提出了一种第一表达载体。根据本发明的实施例，所述第一表达载体携带前述的第一核酸分子。本发明的第一表达载体导入合适的接收细胞后，可实现前述的嵌合多肽的表达。

15 在本发明的又一方面，本发明提出了一种重组细胞。根据本发明的实施例，所述重组细胞包括：携带前述的第一核酸分子或前述的第一表达载体；或，表达前述的嵌合多肽。本发明的重组细胞可有效地表达前述的嵌合多肽。

在本发明的又一方面，本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例，所述药物组合物包括前述的嵌合多肽、前述的第一核酸分子、前述的第一表达载体或前述的重组细胞。由前可知，表达上述嵌合多肽的细胞可识别第一分子，其在结合第一分子后可以实现多种不同的信号输出类型，如特定基因的表达激活与抑制等，或者采用表达嵌合多肽的免疫细胞在接触第一分子后，可分泌具有治疗作用的因子（如单链抗体、细胞因子等），用于抗肿瘤；并且，第一核酸分子和第一表达载体可在细胞（例如免疫细胞）表达嵌合多肽，前述的重组细胞上可表达嵌合多肽。因此，采用含有前述的嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体或重组细胞的药物组合物可靶向第一分子，用于预防和/或治疗相关疾病，例如用于治疗癌症等。

20 在本发明的又一方面，本发明提出了一种前述的嵌合多肽、前述的第一核酸分子、前述的第一表达载体、前述的重组细胞或前述的药物组合物在制备药物中用途，所述药物用于预防和/或治疗疾病。由前可知，表达上述嵌合多肽的细胞可识别第一分子，其在结合第一分子后可以实现多种不同的信号输出类型，如特定基因的表达激活与抑制等，或者采用表达嵌合多肽的免疫细胞在接触第一分子后，可分泌具有治疗作用的因子（如单链抗体、细胞因子等），用于抗肿瘤；并且，第一核酸分子和第一表达载体可在细胞（例如免疫细胞）表达嵌合多肽，前述的重组细胞上可表达嵌合多肽，以及药物组合物包含前述的嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体或重组细胞。由此，含有嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体、重组细胞或药物组合物的药物可靶向第一分子，用于预防和/或治疗相关疾病，例如用于治疗癌症等。

30 在本发明的又一方面，本发明提出了一种前述的嵌合多肽、前述的第一核酸分子、前述的第一表达载体、前述的重组细胞或前述的药物组合物，用于预防和/或治疗疾病。由前可知，表达上述嵌合多肽的细胞可识别第一分子，其在结合第一分子后可以实现多种不同的信号输出类型，如特定基因的表达激活与抑制等，或者采用表达嵌合多肽的免疫细胞在接触第一分子后，可分泌具有治疗作用的因子（如单链抗体、细胞因子等），用于抗肿瘤；并且，第一核酸分子和第一表达载体可在细胞（例如免疫细胞）表达嵌合多肽，前述的重组细胞上可表达嵌合多肽，以及药物组合物包含前述的嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体或重组细胞。由此，含有嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体、重组细胞或药物组合物的药物可靶向第一分子，用于预防和/或治疗相关疾病，例如癌症等。

35 在本发明的又一方面，本发明提出了一种治疗或预防疾病的方法。根据本发明的实施例。所述方法包括：向受试者施用药学上可接受量的前述的重组细胞或前述的药物组合物。由前可知，表达上述嵌合多肽的细胞可识别第一分子，其在结合第一分子后可以实现多种不同的信号输出类型，如特定基因的表达激活与抑制等，或者采用表达嵌合多肽的免疫细胞在接触第一分子后，可分泌具有治疗作用的因子（如单链抗体、细胞因子等），用于抗肿瘤；并且，第一核酸分子和第一表达载体可在细胞（例如免疫细胞）表达嵌合多肽，前述的重组细胞上可表达嵌合多肽，以及药物组合物包含前述的嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体或重组细胞。由此，含有嵌合多肽的重组细胞或药物组合物的药物可靶向第一分子，用于预防和/或治疗相关疾病，例如癌症等。

40 在本发明的又一方面，本发明提出了一种激活免疫细胞的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：将所述免疫细胞与第一分子进行第一接触，其中，所述免疫细胞表达前述的嵌合多肽。由此，表达上述嵌合多肽的免疫细胞可识别第一分子，其在结合第一分子后可以实现激活免疫细胞。

45

在本发明的又一方面，本发明提出了一种追踪第一细胞-第二细胞接触的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：将所述第一细胞和所述第二细胞进行第二接触，其中，所述第一细胞表达前述的嵌合多肽和报告基因蛋白，所述嵌合多肽的胞内区为转录激活蛋白，编码所述报告基因蛋白的第三核酸分子的5'端与诱导表达核酸序列与诱导表达核酸序列相连，所述诱导表达核酸序列用于结合所述转录激活蛋白，所述第二细胞表达所述第一分子；基于所述第一细胞中所述报告基因蛋白的检测结果，确定第一细胞和第二细胞的接触情况。由此，采用上述方法可基于报告基因蛋白的检测结果，确定第一细胞和第二细胞之间是否接触。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图1为本发明实施例1中SynNotch合成受体的结构示意图；

图2为本发明实施例2中SynNotch合成受体细胞识别特定胞外信号的示意图；

图3为本发明实施例2中膜锚定的GFP的结构示意图；

图4为本发明实施例2中含有鼠Notch跨膜结构域的SynNotch合成受体与含有热带爪蟾Notch跨膜结构域的SynNotch合成受体的泄露效率和有效激活效率；

图5为本发明实施例3中膜锚定的CD19的结构示意图；

图6为本发明实施例3中靶癌细胞对SynNotch-CAR-Jurkat T细胞的激活结果；

图7为本发明实施例4中SynNotch-CAR-NK 92细胞对靶癌细胞的杀伤效率。

具体实施方式

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，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

需要说明的是，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个、两个或者更多个该特征。进一步地，在本发明的描述中，除非另有说明，“多个”的含义是两个或两个以上。

在本文中，术语“包含”或“包括”为开放式表达，即包括本发明所指明的内容，但并不排除其他方面的内容。

在本文中，术语“任选地”、“任选的”或“任选”通常是指随后所述的事件或状况可以但未必发生，并且该描述包括其中发生该事件或状况的情况，以及其中未发生该事件或状况的情况。

在本文中，术语“同一性”、“同源性”或“相似性”均用于描述相对于参考序列的氨基酸序列或核酸序列时，采用通过常规的方法进行确定两个氨基酸序列或核酸序列之间的相同氨基酸或核苷酸的百分比，例如参见，Ausubel等，编著(1995)，*Current Protocols in Molecular Biology*，第19章(Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York)；和ALIGN程序(Dayhoff(1978)，*Atlas of Protein Sequence and Structure 5: Suppl.3*(National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.)。关于比对序列和测定序列同一性有很多算法，包括，Needleman等(1970)*J.Mol.Biol.*48: 443的同源性比对算法；Smith等(1981)*Adv.Appl.Math.*2: 482的局部同源性算法；Pearson等(1988)*Proc.Natl.Acad.Sci.*85: 2444的相似性搜索方法；Smith-Waterman算法(*Meth.Mol.Biol.*70: 173-187(1997)；和BLASTP, BLASTN, 和BLASTX算法(参见Altschul等(1990)*J.Mol.Biol.*215: 403-410)。利用这些算法的计算机程序也是可获得的，并且包括但不限于：ALIGN或Megalalign(DNASTAR)软件，或者WU-BLAST-2(Altschul等，*Meth.Enzym.*, 266: 460-480(1996))；或者GAP, BESTFIT, BLAST Altschul等，上文，FASTA, 和TFASTA, 在Genetics Computing Group(GCG)包，8版，Madison, Wisconsin, USA中可获得；和Intelligenetics, Mountain View, California提供的PC/Gene程序中的CLUSTAL。

在本文中，术语“至少80%同一性”指与各参考序列至少为80%，可为80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性。

在本文中，术语“表达载体”通常是指能够插入在合适的宿主中自我复制的核酸分子，其将插入的核酸分子转移到宿主细胞中和/或宿主细胞之间。所述表达载体可包括主要用于将DNA或RNA插入细胞中的载体、主要用于复制DNA或RNA的载体，以及主要用于DNA或RNA的转录和/或翻译的表达的载体。所述表达载体还包括具有多种上述功能的载体。所述表达载体可以是当引入合适的宿主细胞时能够转录并翻译成多肽的多核苷酸。通常，通过培养包含所述表达载

体的合适的宿主细胞，所述表达载体可以产生期望的表达产物。

在本文中，术语“重组细胞”通常是指采用基因工程技术或细胞融合技术对宿主细胞的遗传物质进行修饰改造或重组，获得具有稳定遗传的独特性状的细胞。其中，术语“宿主细胞”是指可导入重组表达载体的原核细胞或真核细胞。本文所用术语“转化的”或“转染的”是指通过本领域已知的各种技术将核酸（例如载体）引入细胞。合适的宿主细胞可以用本发明的 DNA 序列转化或转染，并且可以用于靶蛋白的表达和/或分泌。

在本文中，术语“药物组合物”通常是指单位剂量形式，并且可以通过制药领域中熟知的方法的任何一种进行制备。所有的方法包括使活性成分与构成一种或多种附属成分的载体相结合的步骤。通常，通过均匀并充分地使活性嵌合多肽或重组细胞与液体载体、细碎固体载体或这两者相结合，制备组合物。

在本文中，术语“药学上可接受的辅料”均可包括任何溶剂、固体赋形剂、稀释剂或其他液体赋形剂等等，适合于特定的目标剂型。除了任何常规的辅料与本发明的嵌合多肽或重组细胞不相容的范围，例如所产生的任何不良的生物效应或与药学上可接受的组合物的任何其他组分以有害的方式产生的相互作用，它们的用途也是本发明所考虑的范围。

在本文中，术语“给药”指将预定量的物质通过某种适合的方式引入病人。本发明的重组细胞或药物组合物可以通过任何常见的途径被给药，只要它可以到达预期的组织。给药的各种方式是可以预期的，包括腹膜、静脉注射、肌肉注射、皮下注射等等，但是本发明不限于这些已举例的给药方式。优选地，本发明的组合物采用静脉注射或皮下注射方式被给药。

在本文中，术语“治疗”是指用于获得期望的药理学和/或生理学效果。所述效果就完全或部分预防疾病或其症状而言可以是预防性的，和/或就部分或完全治愈疾病和/或疾病导致的不良作用而言可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖哺乳动物、特别是人的疾病，包括：(a)在容易患病但是尚未确诊得病的个体中预防疾病或病症发生；(b)抑制疾病，例如阻滞疾病发展；或(c)缓解疾病，例如减轻与疾病相关的症状。本文使用的“治疗”涵盖将嵌合多肽、重组细胞、药物组合物或药物给予个体以治疗、治愈、缓解、改善、减轻或抑制个体的疾病的任何用药，包括但不限于将含本文所述嵌合多肽、重组细胞或药物组合物的药物给予有需要的个体。

本发明提出了一种分离的多肽在制备 SynNotch 合成受体中的用途、嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体、重组细胞、药物组合物及其用途、激活免疫细胞的方法、追踪第一细胞-第二细胞接触的方法，下面将分别对其进行详细描述。

分离的多肽在制备 SynNotch 合成受体中的用途

在本发明的一个方面，本发明提出了一种分离的多肽在制备 SynNotch 合成受体中的用途，所述分离的多肽与来源于热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)的 Notch 受体蛋白的跨膜区具有至少 80% 的同一性。发明人发现，选择热带爪蟾的 Notch 受体蛋白的跨膜区制备的 SynNotch 合成受体，可以提高其对下游基因转录激活的能力和效率，以及降低 SynNotch 合成受体的本底泄露。

根据本发明的实施例，所述分离的多肽与来源于热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)的 Notch 受体蛋白的跨膜区具有 100% 的同一性。

根据本发明的实施例，所述来源于热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)的 Notch 受体蛋白的跨膜区具有如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。

```
ILDYGFIFGLGKNITPPDNEEICENEQCAELADNKICNANCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFN
DGKCDSCQCNNSGCLYDGFDCQKVEVQCNPLOYDQYCRDHFQDGHCDQGCNNAECEWDGLDCDNMPENLAEGTLLIVV
LMPPEKLNNSVNFLELSRVLHTNVVFKKDSKGEYKIYPYYGNEEELKHHIKRRAASWSDAPTAIFSTMKESVLPGR
RRRELDQMEVRSIVYLEIDNRQCYKSSQCFTSATDVAAFLGALATHGNLNIPYKIEAVKSEIVETAKPPPLYAMFMSMLV
IPLLIIFVIMVVIVNKKRRR (SEQ ID NO:1)。
```

嵌合多肽

在本发明的另一方面，本发明提出了一种嵌合多肽。根据本发明的实施例，所述嵌合多肽包括：胞外区，所述胞外区具有结合第一分子活性；跨膜区，所述跨膜区的 N 端与所述胞外区的 C 端相连；胞内区，所述胞内区的 N 端与所述跨膜区的 C 端相连；其中，所述跨膜区包括分离的多肽，所述分离的多肽与来源于热带爪蟾的 Notch 受体蛋白的跨膜区具有至少 80% 的同一性。

发明人发现，选择热带爪蟾的 Notch 受体蛋白的跨膜区作为嵌合多肽（即为 SynNotch 合成受体）的跨膜区，可以提高嵌合多肽对下游基因转录激活的能力和效率，以及降低嵌合多肽的本底泄露。并且，使表达该嵌合多肽的细胞可识别

第一分子，其在结合第一分子后可以实现多种不同的信号输出类型，如特定基因的表达激活与抑制等，以及用于制备表达嵌合多肽的免疫细胞，该免疫细胞在接触第一分子后，可分泌具有治疗作用的因子（如单链抗体、细胞因子等），用于抗肿瘤。

根据本发明的实施例，所述分离的多肽与来源于热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)的 Notch 受体蛋白的跨膜区具有 100% 的同一性。

根据本发明的实施例，所述来源于热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)的 Notch 受体蛋白的跨膜区具有如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。

根据本发明的实施例，所述跨膜区进一步包括表皮生长因子样重复序列 (EGF repeat) 和/或 RAM 序列。由此，可进一步降低 SynNotch 合成受体的本底泄露激活。

根据本发明的实施例，所述表皮生长因子样重复序列如 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列。

VVSPCASRPCYNGGTCQFSPEEPFFQCFCTNFNGLFCH (SEQ ID NO:15)。

根据本发明的实施例，所述 RAM 序列如 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列。

EHGQLWFP (SEQ ID NO:16)。

根据本发明的实施例，所述表皮生长因子样重复序列的 C 端和所述分离的多肽的 N 端相连；和/或，所述分离的多肽的 C 端和所述 RAM 序列的 N 端相连。

根据本发明的实施例，所述第一分子包括肿瘤抗原、病毒、细菌、内毒素、抗体、细胞受体和细胞受体的配体中的至少之一。

在本文中，术语“肿瘤抗原”通常是指在肿瘤发生、发展过程中新出现或过度表达的抗原物质。根据肿瘤抗原特异性的分类法分为肿瘤特异性抗原和肿瘤相关抗原，其中，肿瘤特异性抗原 (tumor specific antigen, TSA) 是肿瘤细胞特有的或只存在于某种肿瘤细胞而不存在于正常细胞的新抗原，肿瘤相关抗原 (tumor-associated antigen, TAA) 是指非肿瘤细胞所特有的、正常细胞和其他组织上也存在的抗原，只是其含量在细胞癌变时明显增高。其中，包括但不限于 PD-L1、PD-1、TGF- β 、CEA、GD2 和 GD3 等。

在本文中，术语“细胞受体”或“受体”应做广义理解，可以是指位于细胞膜上、可识别细胞外的各种信号分子 (配体) 并为之结合的分子，包括但不限于生长因子受体 (如 VEGF 受体)、(NKG2D 多肽 (MICA、MICB 和 ULB6 的受体)、细胞因子受体 (如 IL-13 受体、IL-2 受体等)、表皮生长因子 (EGF) 受体、Her2、CD27、天然细胞毒性受体 (NCR) (如 NKP30 (NCR3/CD337) 多肽 (HLA-B 相关转录物 3 (BAT3) 和 B7-H6 的受体) 等)、T 细胞抗原受体、二氢叶酸受体、嵌合细胞因子受体、Fc 受体、细胞外基质受体 (例如整联蛋白)、细胞粘附受体 (例如钙粘蛋白)、免疫调节受体 (包括正辅助受体 (例如 CD28) 和负 (免疫抑制) 辅助受体 (例如 PD1)) 以及免疫调节分子 (例如 TGF β) 的受体等。

在本文中，术语“细胞受体的配体”应做广义理解，可以是指能与细胞膜受体结合、相互作用并产生特定生物学效应的化学物质，例如多肽、核酸、糖蛋白、小分子、碳水化合物、脂质、糖脂、脂蛋白、脂多糖等，包括但不限于细胞因子 (例如，IL-13 等)、生长因子 (例如，heregulin、血管内皮生长因子 (VEGF) 等)、肽激素、整联蛋白结合肽 (例如包括序列 Arg-Gly-Asp 的肽)、N-聚糖等。

示例性地，配体为 VEGF、受体为 VEGF 受体；或者配体为 heregulin、受体为 Her2。

在本文中，术语“细胞因子”应做广义理解，可以是指一类能在细胞间传递信息、具有免疫调节和效应功能的蛋白质或小分子多肽，例如 IL-10。“细胞因子受体”应做广义理解，可以是指细胞表面上可与细胞因子结合的受体，例如 Her2 和 IL-10R 等。

在本发明的一个优选实施例中，所述肿瘤抗原为肿瘤特异性抗原。

根据本发明的实施例，所述第一分子包括 GFP、eGFP、CD19、ALPPL2、BCMA、SIRP α 、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8b、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD44、CD44v6、CD45、CD48、CD51、CD52、CD56、CD59、CD66、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD79A、CD79B、CD80、CD86、CD94、CD95、CD133、CD134、CD140、CD152、CD154、CD158、CD178、CD181、CD182、CD183、CD200、CD210、CD221、CD246、CD252、CD253、CD261、CD262、CD273、CD274、CD276、CD279、CD295、CD339、CD340、EGFR、HER2、FGFR2、AFP、CA125、MSLN、GPC3、CEA、CLDN18.2、EpCAM、PSCA、GD2、IL-13、IL-13RA2、ROR1、MUC \square 1、PSMA、MAGEA1、4-1BB、5T4、BAFF、CA242、CA-IX、MET、CCR4、CNT0888、FAP、MORAb-009、VEGF-A、VEGFR-1 和 VEGFR-2 中的至少之一。

VVSPCASRPCYNGGTCQFSPEEPFFQFCPTNFNGLFCHILDYGFIGGLGKNITPPDNEEICENEQCAELADNKICNAN
 CNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFNDGKCDSCNNSGCLYDGFDCQKVEVQCNPYDQYCRDHFQ
 DGHCDQGCNNAECEWDGLDCDNMPENLAEGTLLIVVLMPEKLNNSVNFLRELSRVLHTNVVFKKDSKGEYKIYPY
 GNEEELKHHIKRSAASWSDAPTAIFSTMKESVLPGRRRRELDQMEVRSIVYLEIDNRQCYKSSSQCFTSATDVA AFL
 5 GALATHGNLNIPYKIEAVKSEIVETAKPPPPLYAMFMSLVIPLLIFVIMVVIVNKKRRREHGQLWFPMKLLSSIEQACDICR
 LKKLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGL
 FVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSEESSNKGQRQLTVSAAAGSGSGSGSDALDDFDLDMLGSDAL
 DDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDAL (SEQ ID NO:3)。

根据本发明的实施例，所述嵌合多肽具有如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

10 MALPVTALLLPLALLHAARPEQKLISEEDLMADVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISMAAMSWFRQAPGK
 EREFVAGISRSAGSAVHADSVKGRFTISRDN TKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAVRTSGFFGSIPTGTAFDYWGQGTQV
 TVSVVSPCASRPCYNGGTCQFSPEEPFFQFCPTNFNGLFCHILDYGFIGGLGKNITPPDNEEICENEQCAELADNKICNAN
 CNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFNDGKCDSCNNSGCLYDGFDCQKVEVQCNPYDQYCRDHFQ
 15 DGHCDQGCNNAECEWDGLDCDNMPENLAEGTLLIVVLMPEKLNNSVNFLRELSRVLHTNVVFKKDSKGEYKIYPY
 GNEEELKHHIKRSAASWSDAPTAIFSTMKESVLPGRRRRELDQMEVRSIVYLEIDNRQCYKSSSQCFTSATDVA AFL
 GALATHGNLNIPYKIEAVKSEIVETAKPPPPLYAMFMSLVIPLLIFVIMVVIVNKKRRREHGQLWFPMKLLSSIEQACDICR
 LKKLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGL
 FVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSEESSNKGQRQLTVSAAAGSGSGSGSDALDDFDLDMLGSDAL
 DDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDAL (SEQ ID NO:4)。

20

核酸分子、载体、重组细胞和药物组合物

在本发明的又一方面，本发明提出了一种第一核酸分子。根据本发明的实施例，所述第一核酸分子编码权利要求前
 述的嵌合多肽。根据本发明实施例的第一核酸分子可编码获得上述的嵌合多肽。

根据本发明的实施例，所述核酸分子为 DNA。

25 需要说明的是，对于本文中所提及的第一核酸分子，本领域技术人员应当理解，实际包括互补双链的任意一条，或
 者两条。为了方便，在本文中，虽然多数情况下只给出了一条链，但实际上也公开了与之互补的另一条链。另外，本发
 明中的分子序列包括 DNA 形式或 RNA 形式，公开其中一种，意味着另一种也被公开。

在本发明的又一方面，本发明提出了一种第一表达载体。根据本发明的实施例，所述第一表达载体携带前述的第一
 核酸分子。在将上述第一核酸分子连接到载体上时，可以将第一核酸分子与载体上的控制元件直接或者间接相连，只要
 30 这些控制元件能够控制第一核酸分子的翻译和表达等即可。当然这些控制元件可以直接来自于载体本身，也可以是外源
 性的，即并非来自于载体本身。当然，第一核酸分子与控制元件进行可操作地连接即可。

本文中“可操作地连接”是指将外源基因连接到载体上，使得载体内的控制元件，例如转录控制序列和翻译控制序列
 等等，能够发挥其预期的调节外源基因的转录和翻译的功能。常用的载体例如可以为质粒、噬菌体等等。根据本发明
 的一些具体实施例的载体导入合适的接收细胞（又称为受体细胞或宿主细胞）后，可在调控系统的介导下，有效实现前述
 35 的嵌合多肽的表达。

根据本发明的实施例，所述第一表达载体为真核表达载体、原核表达载体、病毒或噬菌体。

根据本发明的实施例，所述第一表达载体为质粒表达载体。

在本发明的又一方面，本发明提出了一种重组细胞。根据本发明的实施例，所述重组细胞包括：携带前述的第一核
 酸分子或前述的第一表达载体；或，表达前述的嵌合多肽。利用该重组细胞在适合条件下，能够在重组细胞内有效地表
 40 达前述的嵌合多肽。

需要说明的是，本发明中所述的“适合条件”，是指适合前述的嵌合多肽表达的条件。本领域技术人员容易理解的是，
 适合前述的嵌合多肽表达的条件包括但不限于合适的转化或转染方式、合适的转化或转染条件、健康的细胞状态、合适
 的细胞密度、适宜的细胞培养环境、适宜的细胞培养时间。“适合条件”不受特别限制，本领域技术人员可根据实验室的
 具体环境，优化最适的嵌合多肽表达的条件。

45 根据本发明的实施例，所述重组细胞是通过将前述的第一表达载体引入至宿主细胞中而获得的。

根据本发明的实施例，所述宿主细胞包括免疫细胞、神经元、祖细胞或前体细胞、上皮细胞、内皮细胞和干细胞中

的至少之一。

根据本发明的实施例，所述宿主细胞包括 T 细胞、B 细胞、单核细胞、NK 细胞、树突细胞、巨噬细胞、调节 T 细胞、辅助 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、NKT 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞中的至少之一。

根据本发明的实施例，所述重组细胞进一步包括：编码嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体的第二核酸分子或携带所述第二核酸分子的第二表达载体；或表达所述嵌合抗原受体、T 细胞受体或 NK 细胞受体。发明人经过试验发现，将本发明的嵌合多肽与嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体进行联用，共同改造免疫细胞（如 Jurkat 细胞和 NK-92 细胞），发现嵌合多肽+CAR/TCR 联用的免疫细胞可识别相应的配体，并高效激活免疫细胞（如 Jurkat 细胞和 NK-92 细胞），以行使杀伤目标（如肿瘤细胞等）的功能。

在本文中，术语“嵌合抗原受体(CAR)”是一种融合蛋白，其包含能够结合抗原的胞外结构域，与胞外结构域衍生自不同多肽的跨膜结构域，以及至少一个胞内结构域。“嵌合抗原受体(CAR)”也称为“嵌合受体”、“T-体”或“嵌合免疫受体(CIR)”。所述的“能够结合抗原的胞外结构域”是指能够结合某一抗原的任何寡肽或多肽。“胞内结构域”是指已知的作为传递信号以激活或抑制细胞内生物过程的结构域起作用的任何寡肽或多肽。

本文中，术语“T 细胞受体（简称 TCR）”是一种可以在 T 细胞表面上找到的分子，其负责识别可与 MHC 分子结合的抗原。天然存在的 TCR 异二聚体由约 95% 的 T 细胞中的 α (α)和 β (β)链组成，而约 5% 的 T 细胞具有由 γ (γ)和 δ (δ)链组成的 TCR。在抗原加工过程中，抗原在细胞内被降解，然后被主要组织相容性复合物(MHC)分子携带到细胞表面，T 细胞能够识别抗原呈递细胞表面上的此抗原肽-MHC 复合物，TCR 与抗原肽-MHC 复合物的结合导致 T 淋巴细胞活化，在 T 淋巴细胞上通过由相关的酶、共受体和专门的辅助分子介导的一系列生化反应来表达 TCR。其中，MHC 分子可以是 I 类或 II 类 MHC 分子。该复合物可以在抗原呈递细胞，例如：树突状细胞、B 细胞或任何其他细胞（如 K562 细胞）。人白细胞抗原系统(HLA)是编码人类主要组织相容性复合物(MHC)的基因复合物的名称，并且包括 HLA I 类抗原(A、B 和 C)和 HLA II 类抗原(DP、DQ 和 DR)。HLA 等位基因 A、B 和 C 呈递主要源自细胞内蛋白质，例如在细胞内表达的蛋白质的肽。

本文中，术语“NK 细胞受体”是一种可以在 NK 细胞表面上找到的分子，且根据其所介导的功能不同又可分为抑制性受体和激活性受体。其中，抑制性受体用于识别正常细胞表面表达的特定分子后，转导杀伤抑制信号，抑制自身的杀伤功能；抑制性受体种类较多，包括但不限于 CD161、CLRG1、PD1、TIM3、LAG 3、CD96 和 TIGIT。激活性受体用于识别靶细胞表面对应的配体后，向细胞内转导活化信号，发挥杀伤作用。激活受体包括但不限于 NKp30、NKp44、NKp46 和 CD16。

根据本发明的实施例，所述胞内区包括转录激活蛋白，编码所述嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体的第二核酸分子的 5'端与诱导表达核酸序列相连，所述诱导表达核酸序列用于结合所述转录激活蛋白。

示例性地，所述胞内区为 Gal4⁻VP64，所述诱导表达核酸序列为 UAS-minimal-CMV 序列。

所述 UAS-minimal-CMV 序列具有如 SEQ ID NO:14 所示的核酸序列。

```
GGAGCACTGTCCTCCGAACGTCGGAGCACTGTCCTCCGAACGTCGGAGCACTGTCCTCCGAACGTCGGAGCAC
TGTCCTCCGAACGGAGCATGTCCTCCGAACGTCGGAGCACTGTCCTCCGAACGACTAGTTAGCGGTGTACGGTGGGA
GGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAG
AAGACACCGGGACCGATCCAGC (SEQ ID NO:14)。
```

在本发明的一个可选实施例中，所述嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体具有结合第二分子活性。例如，嵌合抗原受体主要通过其胞外区结合第二分子。

根据本发明的实施例，所述第二分子包括肿瘤抗原、病毒、细菌、内毒素、抗体、细胞受体和细胞受体的配体中的至少之一。

在本发明的一个可选实施例中，所述第二分子包括 GFP、eGFP、CD19、ALPPL2、BCMA、SIRP α 、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8b、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD44、CD44v6、CD45、CD48、CD51、CD52、CD56、CD59、CD66、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD79A、CD79B、CD80、CD86、CD94、CD95、CD133、CD134、CD140、CD152、CD154、CD158、CD178、CD181、CD182、CD183、CD200、CD210、CD221、CD246、CD252、CD253、CD261、CD262、CD273、CD274、CD276、CD279、CD295、CD339、CD340、EGFR、HER2、FGFR2、AFP、CA125、MSLN、GPC3、CEA、CLDN18.2、EpCAM、PSCA、GD2、IL-13、IL-13RA2、ROR1、MUC η 1、PSMA、MAGEA1、4-1BB、5T4、BAFF、CA242、CA-IX、MET、CCR4、CNT0888、FAP、MORA β -009、VEGF-A、VEGFR-1 和 VEGFR-2

中的至少之一。

在本发明的又一方面，本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例，所述药物组合物包括前述的嵌合多肽、前述的第一核酸分子、前述的第一表达载体或前述的重组细胞。由前可知，表达上述嵌合多肽的细胞可识别第一分子，其在结合第一分子后可以实现多种不同的信号输出类型，如特定基因的表达激活与抑制等，或者采用表达嵌合多肽的免疫细胞在接触第一分子后，可分泌具有治疗作用的因子（如单链抗体、细胞因子等），用于抗肿瘤；并且，第一核酸分子和第一表达载体可在细胞（例如免疫细胞）表达嵌合多肽，前述的重组细胞上可表达嵌合多肽。因此，采用含有前述的嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体或重组细胞的药物组合物可靶向第一分子，用于预防和/或治疗相关疾病，例如癌症等。

根据本发明的实施例，进一步包括药学上可接受的辅料。

用途

在本发明的又一方面，本发明提出了一种前述的嵌合多肽、前述的第一核酸分子、前述的第一表达载体、前述的重组细胞或前述的药物组合物在制备药物中用途，所述药物用于预防和/或治疗疾病。由前可知，表达上述嵌合多肽的细胞可识别第一分子，其在结合第一分子后可以实现多种不同的信号输出类型，如特定基因的表达激活与抑制等，或者采用表达嵌合多肽的免疫细胞在接触第一分子后，可分泌具有治疗作用的因子（如单链抗体、细胞因子等），用于抗肿瘤；并且，第一核酸分子和第一表达载体可在细胞（例如免疫细胞）表达嵌合多肽，前述的重组细胞上可表达嵌合多肽，以及药物组合物包含前述的嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体或重组细胞。由此，含有嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体、重组细胞或药物组合物的药物可靶向第一分子，用于预防和/或治疗相关疾病，例如癌症等。

在本发明的又一方面，本发明提出了一种前述的嵌合多肽、前述的第一核酸分子、前述的第一表达载体、前述的重组细胞或前述的药物组合物，用于预防和/或治疗疾病。由前可知，表达上述嵌合多肽的细胞可识别第一分子，其在结合第一分子后可以实现多种不同的信号输出类型，如特定基因的表达激活与抑制等，或者采用表达嵌合多肽的免疫细胞在接触第一分子后，可分泌具有治疗作用的因子（如单链抗体、细胞因子等），用于抗肿瘤；并且，第一核酸分子和第一表达载体可在细胞（例如免疫细胞）表达嵌合多肽，前述的重组细胞上可表达嵌合多肽，以及药物组合物包含前述的嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体或重组细胞。由此，含有嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体、重组细胞或药物组合物的药物可靶向第一分子，用于预防和/或治疗相关疾病，例如癌症等。

根据本发明的实施例，上述两个方面的用途还可以进一步包括如下技术特征的至少之一：

根据本发明的实施例，所述疾病包括癌症或肿瘤、免疫相关疾病。

根据本发明的实施例，所述疾病包括癌症或肿瘤、自身免疫性疾病、炎症及由细胞衰老所引发的相关疾病。

在本文中，术语“癌症”或“肿瘤”均可以是任何不受调控的细胞生长。示例性地，可以是非小细胞肺癌、乳头状甲状腺癌、多形性胶质细胞瘤、结肠癌、直肠癌、肺癌、头颈癌、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、肝癌、胆管癌或肉瘤、急性骨髓性白血病、大细胞神经内分泌癌、成神经细胞瘤、前列腺癌、成神经细胞瘤、胰腺癌、黑色素瘤、头颈鳞状细胞癌、宫颈癌、皮肤癌、神经胶质瘤、食道癌、口腔鳞状细胞癌或胃癌等等。

方法

在本发明的又一方面，本发明提出了一种激活免疫细胞的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：将所述免疫细胞与第一分子进行第一接触，其中，所述免疫细胞表达前述的嵌合多肽。由此，表达上述嵌合多肽的免疫细胞可识别第一分子，其在结合第一分子后可以实现激活免疫细胞，尤其是适用于科学研究，通过对免疫细胞进行体外细胞培养，以便获得被激活的免疫细胞。

根据本发明的实施例，所述嵌合多肽的胞内区包括转录激活蛋白，所述免疫细胞表达嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体，所述嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体包括结合预定抗原的抗体或其功能性片段，编码所述嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体的第二核酸分子的 5'端与诱导表达核酸序列相连，所述诱导表达核酸序列用于结合所述转录激活蛋白；所述方法进一步包括：所述第一接触之后，所述免疫细胞释放所述转录激活蛋白，并表达所述嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体；将所述免疫细胞的嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体与预定抗原结合，以便激活所述免疫细胞。

根据本发明的实施例，所述诱导表达核酸序列具有如 SEQ ID NO:14 所示的核酸序列。

根据本发明的实施例，所述第一分子为肿瘤抗原。

在本发明的一个可选实施例中，所述第一分子包括 GFP、eGFP、CD19、ALPPL2、BCMA、SIRP α 、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8b、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD44、CD44v6、CD45、CD48、CD51、CD52、CD56、CD59、CD66、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD79A、CD79B、CD80、CD86、CD94、CD95、CD133、CD134、CD140、CD152、CD154、CD158、CD178、CD181、CD182、CD183、CD200、CD210、CD221、CD246、CD252、CD253、CD261、CD262、CD273、CD274、CD276、CD279、CD295、CD339、CD340、EGFR、HER2、FGFR2、AFP、CA125、MSLN、GPC3、CEA、CLDN18.2、EpCAM、PSCA、GD2、IL-13、IL-13RA2、ROR1、MUC η 1、PSMA、MAGEA1、4-1BB、5T4、BAFF、CA242、CA-IX、MET、CCR4、CNTO888、FAP、MORAb-009、VEGF-A、VEGFR-1 和 VEGFR-2 中的至少之一。

根据本发明的实施例，所述免疫细胞包括 T 细胞、B 细胞、单核细胞、NK 细胞、树突细胞、巨噬细胞、调节 T 细胞、辅助 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、NKT 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞中的至少之一。

在本发明的又一方面，本发明提出了一种追踪第一细胞-第二细胞接触的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：将所述第一细胞和所述第二细胞进行第二接触，其中，所述第一细胞表达前述的嵌合多肽和报告基因蛋白，所述嵌合多肽的胞内区为转录激活蛋白，编码所述报告基因蛋白的第三核酸分子的 5'端与诱导表达核酸序列相连，所述诱导表达核酸序列用于结合所述转录激活蛋白，所述第二细胞表达所述第一分子；基于所述第一细胞中所述报告基因蛋白的检测结果，确定第一细胞和第二细胞的接触情况。由此，采用上述方法可基于报告基因蛋白的检测结果，确定第一细胞和第二细胞之间是否接触，尤其是适用于科学研究，可通过该方法用于体外判断两种细胞之间是否进行了接触。

根据本发明的实施例，所述诱导表达核酸序列具有如 SEQ ID NO:14 所示的核酸序列。

根据本发明的实施例，所述第一分子在第二细胞的表面上、固定在不溶性基材上、存在于细胞外基质中、存在于人工基质中，或是可溶的。

根据本发明的实施例，所述第一分子为肿瘤抗原。

在本发明的一个可选实施例中，所述第一分子包括 GFP、eGFP、CD19、ALPPL2、BCMA、SIRP α 、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8b、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD44、CD44v6、CD45、CD48、CD51、CD52、CD56、CD59、CD66、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD79A、CD79B、CD80、CD86、CD94、CD95、CD133、CD134、CD140、CD152、CD154、CD158、CD178、CD181、CD182、CD183、CD200、CD210、CD221、CD246、CD252、CD253、CD261、CD262、CD273、CD274、CD276、CD279、CD295、CD339、CD340、EGFR、HER2、FGFR2、AFP、CA125、MSLN、GPC3、CEA、CLDN18.2、EpCAM、PSCA、GD2、IL-13、IL-13RA2、ROR1、MUC η 1、PSMA、MAGEA1、4-1BB、5T4、BAFF、CA242、CA-IX、MET、CCR4、CNTO888、FAP、MORAb-009、VEGF-A、VEGFR-1 和 VEGFR-2 中的至少之一。

根据本发明的实施例，所述第一细胞或第二细胞包括免疫细胞、神经元、祖细胞或前体细胞、上皮细胞、内皮细胞和干细胞中的至少之一。

根据本发明的实施例，所述第一细胞包括 T 细胞、B 细胞、单核细胞、NK 细胞、树突细胞、巨噬细胞、调节 T 细胞、辅助 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、NKT 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞中的至少之一。

在本发明的又一方面，本发明提出了一种调控细胞活性的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：将所述细胞与第一分子进行第三接触，其中，所述细胞表达前述的嵌合多肽。

根据本发明的实施例，所述细胞包括免疫细胞、神经元、祖细胞或前体细胞、上皮细胞、内皮细胞和干细胞中的至少之一。

根据本发明的实施例，所述细胞包括 T 细胞、B 细胞、单核细胞、NK 细胞、树突细胞、巨噬细胞、调节 T 细胞、辅助 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、NKT 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞中的至少之一。

在本发明的又一方面，本发明提出了一种促进细胞内基因或蛋白表达的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：将所述细胞与第一分子进行第四接触，其中，所述细胞表达前述的嵌合多肽，所述细胞携带所述基因或表达所述蛋白，其中，所述基因包括编码嵌合抗原受体、第二嵌合多肽、翻译调控子、细胞因子、激素、趋化因子、抗体和位于所述胞内区的蛋白中的至少之一的核酸分子，或者，所述蛋白包括嵌合抗原受体、第二嵌合多肽、翻译调控子、细胞因子、激素、趋化因子、抗体和位于所述胞内区的蛋白中的至少之一。

根据本发明的实施例，所述嵌合多肽的胞内区为转录激活蛋白，所述嵌合抗原受体、第二嵌合多肽、翻译调控子、

细胞因子、激素、趋化因子或抗体包含所述转录激活蛋白的第二结合蛋白或其片段。

根据本发明的实施例，所述细胞包括免疫细胞、神经元、祖细胞或前体细胞、上皮细胞、内皮细胞和干细胞中的至少之一。

5 根据本发明的实施例，所述细胞包括 T 细胞、B 细胞、单核细胞、NK 细胞、树突细胞、巨噬细胞、调节 T 细胞、辅助 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、NKT 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞中的至少之一。

在本发明的又一方面，本发明提出了一种治疗或预防疾病的方法。根据本发明的实施例。所述方法包括：向受试者施用药学上可接受量的前述的重组细胞或前述的药物组合物。由前可知，表达上述嵌合多肽的细胞可识别第一分子，其在结合第一分子后可以实现多种不同的信号输出类型，如特定基因的表达激活与抑制等，或者采用表达嵌合多肽的免疫细胞在接触第一分子后，可分泌具有治疗作用的因子（如单链抗体、细胞因子等），用于抗肿瘤；并且，第一核酸分子和第一表达载体可在细胞（例如免疫细胞）表达嵌合多肽，前述的重组细胞上可表达嵌合多肽，以及药物组合物包含前述的嵌合多肽、第一核酸分子、第一表达载体或重组细胞。由此，含有嵌合多肽的重组细胞或药物组合物的药物可靶向第一分子，用于预防和/或治疗相关疾病，例如癌症等。

10 本发明所述的重组蛋白或药物组合物的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于：所述的活性成分的药代动力学参数例如生物利用率、代谢、半衰期等；患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。例如，由治疗状况的迫切要求，可每天给予若干次分开的剂量，或将剂量按比例地减少。

本发明的重组蛋白或药物组合物可掺入适用于胃肠外施用(例如静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内)的药物中。这些药物可以被制备成各种形式。例如液体、半固体和固体剂型等，包括但不限于液体溶液(例如，注射溶液和输注溶液)或冻干粉。典型的药物为注射溶液或输注溶液形式。前述重组蛋白或药物组合物可通过静脉输注或注射或肌肉内或皮下注射来施用。

20 根据本发明的实施例，所述方法的给药途径采用皮下注射或静脉注射。

根据本发明的实施例，所述疾病包括癌症或肿瘤、免疫相关疾病。根据本发明的实施例，所述疾病包括癌症或肿瘤、自身免疫性疾病、炎症及由细胞衰老所引发的相关疾病。

25 根据本发明的实施例，所述肿瘤或癌症包括但不限于非小细胞肺癌、乳头状甲状腺癌、多形性成胶质细胞瘤、结肠癌、直肠癌、肺癌、头颈癌、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、肝癌、胆管癌或肉瘤、急性骨髓性白血病、大细胞神经内分泌癌、成神经细胞瘤、前列腺癌、成神经细胞瘤、胰腺癌、黑色素瘤、头颈鳞状细胞癌、宫颈癌、皮肤癌、神经胶质瘤、食道癌、口腔鳞状细胞癌或胃癌等。

30 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。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。

实施例 1: SynNotch 合成受体设计及其表达质粒载体构建

35 1、SynNotch 合成受体（简称 SynNotch 受体）的结构包括胞外域（又称胞外区）、Notch 跨膜结构域（又称 Notch 受体蛋白的跨膜区，简称跨膜区）和胞内域（又称胞内区），其中，胞外域可用单链抗体或者纳米抗体等替换，胞内域可用转录激活或转录抑制的结构域等替换。本发明以 anti-GFP 单链抗体作为胞外域部分，以 GAL4-VP64 作为胞内域部分，并以能够被蛋白酶识别切割的鼠或热带爪蟾或 Notch 跨膜结构域作为 Notch 跨膜结构域，获得改造后的 SynNotch 受体，本发明设计改造的 SynNotch 受体的结构如图 1 所示。图 1 显示了包含有鼠或热带爪蟾的 Notch 跨膜结构域（Notch core）的 SynNotch 受体的结构。

40 2、构建上述 SynNotch 合成受体的表达质粒载体，具体步骤如下所示：

（1）含有热带爪蟾 Notch 跨膜结构域的 SynNotch 合成受体（简称 SynNotch 合成受体 1）具有如 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列和具有如 SEQ ID NO:5 所示的核苷酸序列，含有鼠 Notch 跨膜结构域的 SynNotch 合成受体（简称 SynNotch 合成受体 2）具有如 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列和具有如 SEQ ID NO:7 所示的核苷酸序列，然后由金唯智公司分别将 SEQ ID NO:5 所示的核苷酸序列和 SEQ ID NO:7 所示的核苷酸序列合成至 Puc57 载体中；

45 （2）将 pCDH-EV 载体使用 EocR1 和 BamH1 核酸内切酶进行双酶切，使用 1%的琼脂糖凝胶电泳 20min 后，切胶回收双酶切载体；

GATCAGCGAGGAGGATCTGATGGCTGATGTGCAACTCGTAGAGTCCGGTGGCGGACTCGTCCAGGCGGGAGGCTCC
 CTGCGCCTGAGTTGCGCTGCGTCCGGAAGAAGTATTAGCATGGCCGCCATGAGTTGGTTCAGACAGGCGCCTGGAAA
 GGAGAGGGAGTTCGTGGCAGGCATAAGTCGCTCCGAGGGTTCAGCCGTCCATGCCGACTCCGTAAAGGGACGCTTT
 ACCATCTCCAGAGATAACACAAAAACACGCTCTATCTCCAAATGAATTCTTTGAAGGCCGAGGACACAGCCGTGTA
 5 CTACTGCGCCGTTAGGACCAGCGGATTTTTTGAAGCATTCTTAGGACAGGGACAGCCTTTGATTACTGGGGCCAGG
 GAACGCAGGTTACCGTTTCCATCCTGGACTACAGCTTACAGGTGGCGCTGGGCGCGACATCCCCACCGCAGATT
 GAGGAGGCCTGTGAGCTGCCTGAGTGCCAGGTGGATGCAGGCAATAAGGTCTGCAACCTGCAGTGTAAATACAG
 CATGTGGCTGGGATGGTGGCGACTGCTCCCTCAACTTCAATGACCCCTGGAAGAAGTGCACGCAGTCTCTACAGTGC
 TGGAAGTATTTTAGCGACGGCCACTGTGACAGCCAGTGAACCTCGGCCGGCTGCCTCTTTGATGGCTTCGACTGCCA
 10 GCTCACCGAGGGACAGTGAACCCCTGTATGACCAGTACTGCAAGGACCACTTCAGTGATGGCCACTGCGACCAG
 GGCTGTAACAGTGCCGAATGTGAGTGGGATGGCCTAGACTGTGCTGAGCATGTACCCGAGCGGCTGGCAGCCGGCA
 CCCTGGTGTGGTGGTGTCTTCCACCCGACCAGCTACGGAACAACCTCCTTCCACTTTCTGCGGGAGCTCAGCCAC
 GTGCTGCACACCAACGTGGTCTTCAAGCGTGATGCGCAAGGCCAGCAGATGATCTTCCGTAAGTATGGCCACGAGGA
 AGAGCTGCGCAAGCACCAATCAAGCGCTCTACAGTGGGTTGGGCCACCTTCTACTGCTTCTTGGTACCAGTGGTG
 15 GGCGCCAGCGCAGGGAGCTGGACCCATGGACATCCGTGGCTCCATTGTCTACCTGGAGATCGACAACCGGCAATGT
 GTGCAGTCATCCTCGCAGTGCTTCCAGAGTGCCACCGATGTGGCTGCCTTCTAGGTGCTTTCGCTCACTTGGCAG
 CCTCAATATCCTTACAAGATTGAGGCCGTGAAGAGTGAAGCGGTGGAGCCTCCGCTGCCCTCGCAGCTGCACCTCA
 TGTACGTGGCAGCGGCCCTTCGTGCTCCTGTTCTTTGTGGGCTGTGGGGTGTGCTGTCCCAGGCGCCGGCGG
 ATGAAGCTGCTGAGCAGCATCGAGCAGGCTGTGACATCTGCCGGCTGAAGAACTGAAGTGCAGCAAAGAAAAG
 20 CCAAGTGCGCCAAGTGCCTGAAGAACAACCTGGGAGTGCCGGTACAGCCCAAGACCAAGAGAAGCCCCCTGACC
 AGAGCCCACCTGACCGAGGTGGAAAAGCCGGCTGGAAAGACTGGAACAGCTGTTTCTGCTGATCTTCCACGCGAGG
 ACCTGGACATGATCCTGAAGATGGACAGCCTGCAGGACATCAAGGCCCTGCTGACCGGCCTGTTCGTGCAGGACAA
 CGTGAACAAGGACGCCGTGACCGACAGACTGGCCAGCGTGAAACCACATGCCCTGACCCCTGCGGCAGCACAG
 AATCAGCGCCACCAGCAGCAGCGAGGAAAGCAGCAACAAGGGCCAGCGGCAGCTGACAGTGTCTGCTGCTGCAGG
 25 CGGAAGCGGAGGCTCTGGCGGATCTGATGCCCTGGACGACTTCGACCTGGATATGCTGGGACGCGACGCCCTGGATG
 ATTTTATCTGGACATGCTGGGATCTGACGCTCTGGACGATTTTCGATCTCGACATGTTGGGATCAGATGCACTGGATG
 ACTTTGACCTGGACATGCTCGGATCATGA (SEQ ID NO:7)。

实施例 2: SynNotch 受体在细胞水平的试验及验证

30 本实施例中, SynNotch 受体细胞识别特定胞外信号的具体过程为: 当 SynNotch 受体的胞外域部分 anti-GFP 抗体单
 链结合到传输细胞(sender cell)的 GFP 抗原后, Notch 跨膜结构域被蛋白酶切割, GAL4VP64 被释放入胞内, GAL4 可以
 特异识别并结合到 GAL4 结合位点 (UAS 区域), VP64 转录激活元件就会激活下游 BFP 基因的转录, 促进 BFP 荧光蛋
 白表达。具体参见图 2。

35 本发明以 HT1080 细胞作为传输细胞 (sender cell), 同样以另一批 HT1080 细胞作为接收细胞(receiver cell), 对实施
 例 1 制备的表达质粒载体(pCDH-antiGFP-XENTR-SynNotch-Gal4VP64)增强下游基因转录激活的能力进行细胞水平的验
 证, 具体的验证步骤如下:

(1)HT1080 细胞系感染慢病毒, 可稳定表达膜锚定的 GFP, 作为传输细胞 (膜锚定的 GFP 的结构如图 3 所示, GFP
 具有如 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列以及如 SEQ ID NO:9 所示的核苷酸序列)。

其中, GFP 的氨基酸和核苷酸序列如下所示:

40 METDTLLLWVLLLWVPGSTGDMVSKGEELFTGVVPIVLELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLP
 VPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEKDTLVNRIELKGIDFKED
 GNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPN
 EKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYKNAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLILIMLWQKKPR (SEQ ID
 NO:8);

45 ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGCAGCACCGGCGACATGGTGAGCA
 AGGGCGAGGAGCTGTTACCGGCGTGGTGCCATCCTGGTGGAGCTGGACGGCGACGTGAACGGCCACAAGTTCA

GCGTGAGCGGCGAGGGCGAGGGCGACGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC
 TGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTGGTGACCACCTGACCTACGGCGTGAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATG
 AAGCAGCACGACTTCTCAAGAGCGCCATGCCCCGAGGGCTACGTGCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACG
 GCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG
 5 ACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGCCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTGTACATCATGGC
 CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTGGC
 CGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAG
 AGCGCCCTGAGCAAGGACCCCAACGAGAAGCGCGACCACATGGTGTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGCATCA
 CCCTGGGCATGGACGAGCTGTACAAGAACGCCGTGGGCCAGGACACCCAGGAGGTGATCGTGGTGGCCACAGCCT
 10 GCCCTTCAAGGTGGTGGTGTATCAGCGCCATCCTGGCCCTGGTGGTGTGACCATCATCAGCCTGATCATCCTGATCAT
 GCTGTGGCAGAAGAAGCCCCGC (SEQ ID NO:9)。

取另一批 HT1080 细胞作为接收细胞, 先感染 pHR_Gal4UAS_tBFP_PGK_mCherry 慢病毒(购自 Addgene, #79130, 该慢病毒感染宿主细胞后, 可被 GAL4VP64 诱导表达 BFP 荧光蛋白), 分选出能稳定高表达 pHR_Gal4UAS_tBFP_PGK_mCherry 的细胞, 然后感染 pCDH-antiGFP-XENTR-SynNotch-Gal4VP64 慢病毒。

15 pHR_Gal4UAS_tBFP_PGK_mCherry 和 pCDH-antiGFP-XENTR-SynNotch-Gal4VP64 慢病毒是将表达质粒 (pCDH-antiGFP-XENTR-SynNotch-Gal4VP64 或 pHR_Gal4UAS_tBFP_PGK_mCherry)、pMD2.G 和 psPAX2 共转染进入含密度为 90% 的 HEK293-T 细胞的 15cm 培养皿中, 三天后收取细胞上清液, 使用 0.45 μ M 过滤器过滤病毒液并行病毒浓缩即得。

20 (2)取上述稳定转染的接收细胞 HT1080 细胞, 以细胞密度为 3 \times 10⁵ 个/mL 接种到 24 孔板中, 加入细胞密度为 3 \times 10⁵ 个/mL 且能表达 GFP 的 HT1080 细胞共培养 48 小时。使用 Olympus 倒置荧光显微镜拍摄细胞照片, 并使用 ImageJ 分析细胞表达的荧光强度, 结果如图 4 所示。

图 4A 为荧光显微镜照片比较, 其中, MOUSE-Syn 表示含有鼠 Notch 跨膜结构域的 SynNotch 合成受体(简称 SynNotch 合成受体 2), 即为原始的系统; XENTR-Syn 表示含有热带爪蟾 Notch 跨膜结构域的 SynNotch 合成受体(简称 SynNotch 合成受体 1)。由图 4A 可知, 与 SynNotch 合成受体 2 相比, SynNotch 合成受体 1 可显著地提高了激活的效率。

25 图 4B 为 ImageJ 软件分析 HT1080 细胞中表达 BFP 蓝色荧光蛋白的平均荧光强度。由图 4B 可知, 与 SynNotch 合成受体 2 (即为 MOUSE 组) 相比, SynNotch 合成受体 1 (即为 XENTR 组) 的激活效率有 95.1% 的提升, 且 SynNotch 合成受体 1 (即为 XENTR 组) 的泄露水平下降了 56.4%。

30 由于细胞间的接触存在三种形式, 包括贴壁细胞与贴壁细胞间的接触, 贴壁细胞与悬浮细胞间的接触、悬浮细胞与悬浮细胞间的接触。三种接触形式也一定程度的反映着体内细胞三种真实的接触环境, 因此确认三种细胞接触方式都能够有效激活 SynNotch 系统十分的关键。而 HT1080 是一种贴壁细胞, 上述的图 4A 和图 4B 结果仅能证明在贴壁细胞与贴壁细胞间的接触能够激活 SynNotch 系统, 但是在其他两种接触体系中却不能确定。因此, 进一步按照本实施例步骤 (1) 的方式构建了悬浮的接收细胞 Jurkat 和悬浮的发射细胞 K562。进一步地, 按照本实施例步骤 (2) 的方式, 将发射细胞 K562 和接收细胞 Jurkat 共培养 48 小时, 观察悬浮细胞与悬浮细胞间的接触能否激活 SynNotch 系统; 同时, 也将发射细胞 HT1080 和接收细胞 Jurkat 共培养 48 小时, 观察悬浮细胞与贴壁细胞间的接触能否激活 SynNotch 系统。结果如图 4C
 35 和图 4D 所示, 不论在悬浮接收细胞与悬浮发射细胞间的接触中, 还是悬浮接受细胞与贴壁发射细胞间的接触中, XENTR-SynNotch 和 MOUSE-SynNotch 都能够有效的激活。并且, XENTR-SynNotch 的泄露激活效率远低于 MOUSE-SynNotch, 有效激活效率略高于 MOUSE-SynNotch。

因此, 可说明本发明设计的含有来源于热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)的 Notch 受体蛋白的跨膜区的 SynNotch 系统比原始含有来源于鼠的 Notch 受体蛋白的跨膜区的 SynNotch 受体系统具有更强的激活效率。

40

实施例 3: 靶癌细胞对 SynNotch-CAR 门控嵌合抗原受体联用的 Jurkat 细胞的激活

目前, 以表达嵌合抗原受体(CAR)的 T 细胞作为某些 B 细胞癌症的治疗是有效的。然而, CAR-T 细胞癌症免疫疗法的一个主要问题是脱靶效应, 其中治疗性 CAR-T 细胞会破坏正常组织, 从而导致严重的副作用甚至死亡。为缓解此类问题的可能策略是, 使治疗性的 CAR-T 细胞具有更精确的肿瘤识别靶点, 而增加一个肿瘤抗原识别才能使 CAR 表达从而
 45 提供更精确的 T 细胞应答, 是一种有效的手段。为了实现这一策略, 推断 SynNotch 合成受体可用于治疗性 CAR-T 细胞的设计, 即首先通过结合肿瘤特异性细胞表面抗原检测肿瘤并且仅对肿瘤中的第二肿瘤特异性抗原引发 CAR 的表达, 由

此即提供了关于 CAR-T 细胞活性的双抗原控制，又提供了肿瘤定位性应答。

基于此，发明人设计了 SynNotch-CAR 门控嵌合抗原受体联用的 Jurkat 细胞（简称 SynNotch-CAR- Jurkat T 细胞）含有通过在 Jurkat 细胞（T 细胞系）中进行相应实验给出，具体包括以下步骤：

(1) 将实施例 2 中的 SynNotch 合成受体 1 进行慢病毒包装，同时慢病毒包装可以识别 CD19 的 CAR 分子，编码该 CAR 分子的核酸的 5'端前包括一段 UAS-minimal-CMV 序列，该序列可以与 SynNotch 合成受体激活后产生的胞内多肽结合，诱导该 CAR 分子的表达（由金唯智公司直接合成并进行慢病毒包装，该 CAR 分子具有如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列以及如 SEQ ID NO:11 所示的核苷酸序列，后续称该 CAR 分子为诱导型 CAR 分子）。将上述两种病毒同时感染 Jurkat T 细胞，通过筛选得到稳定表达上述 SynNotch 合成受体和诱导型 CAR 分子的 Jurkat T 细胞；

(2) 采用本领域的常规方法构建单独表达膜锚定 GFP、单独表达膜锚定 CD19（结构如图 5 所示，CD19 具有如 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列以及如 SEQ ID NO:13 所示的核苷酸序列）和共同表达膜锚定 GFP 和 CD19 的 K562 细胞作为传输细胞；

(3) 将上述步骤 (2) 的 3 种 K562 细胞分别与步骤 (1) 中所构建的 Jurkat 细胞进行共孵育，在 24 小时后检测各组 Jurkat 细胞 CD69 的表达和 IL-2、TNF-α 的分泌情况，结果参见图 6。其中，CD69 的表达和 IL-2、TNF-α 的分泌代表着 Jurkat T 细胞的激活。

如图 6 所示，只有当暴露于表达两种抗原（GFP 和 CD19）的 K562 时，SynNotch-CAR- Jurkat T 细胞才能被激活。

MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSVFLKMNSLQTDATAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:10);

GGAGCACTGTCCTCCGAACGTCGGAGCACTGTCCTCCGAACGTCGGAGCACTGTCCTCCGAACGTCGGAGCAC TGTCCTCCGAACGGAGCATGTCCTCCGAACGTCGGAGCACTGTCCTCCGAACGACTAGTTAGGCGTGTACGGTGGGA GGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAG AAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCTCGACATTCGTTGGATCCATGGCATTGCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCAC TGGCCTTGTTGCTCCACGCCGCGCGCCAGAACAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGATCTGGATATACAGATGACGCA GACAACGTCAAGTCTTTCCGCCAGCTTGGGAGACCGAGTGACTATATCTGTAGAGCAAGCCAGGATATTTCTAAGTA TCTTAAGTGTACCAACAAAAGCCGATGGAACGGTTAAGCTGCTTATATAACCATAACAGTAGACTCCACTCCGGCGT ACCATCACGGTTTTCTGGCAGTGGCTCCGGGACCGACTATCTTTGACGATCTCTAATCTCGAACAAGAGGATATTGC AACATACTTTTGTGCAAGGCAATACCTTGCCATATACTTTGGGGGCGGGACAAAACCTTGAGATAACCGGCGGGC GTGGTTGAGGCGGTGGCGGTTCCGGTGGTGGGGGATCAGAGGTTAAGCTTCAGGAATCCGGACCAGGTTTGGTTGC CCCCAGCCAATCTCTCAGCGTTACATGCACGGTTTCAGGCGTCAGTCTCCCCGATTACGGTGTAAGTTGGATTCCGGCA ACCTCCGCGAAAGGGTCTGGAATGGCTGGGGGTTATTTGGGGGAGTGAGACAACCTTATTACAACCTCTGCACTTAAGA GTCGGCTTACCATCATCAAGGATAATTCAAATCACAAGTATTCCTGAAGATGAACTCATTGCAAAACAGATGATACAG CTATATACTATTGTGCCAAGCATTACTATTATGGTGGTTCTTATGCAATGGATTACTGGGGGCAAGGCACGTCAGTGAC AGTGAGTTCAAAGCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG TCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGCGGGGGCGCAGTGACACAGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATA TCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCAAACGGGGCAGAAAG AAACCTCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGA TTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAG CAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTG GCCGGGACCTGAGATGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGA AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCC TTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:11);

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYPYDVPDYAGAQPAREEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTS DGPTQQLTWSRESPL
 KPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLK
 NRSSEGPSPPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWE GEPPLPPRDSL NQSLSDLTMAPGSTLWLSGVPDPSVSRGPLSWTHV
 HPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWV METGLLLPRATAQDAGKY YCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVDE
 5 QKLISEEDLNAV GQDTQEIVIVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR (SEQ ID NO:12);
 ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGCAGCACCGGCGACTACCCCTACG
 ACGTGCCCGACTACGCCGGCGCCAGCCCGCCCGCCCGAGGAGCCCCTGGTGGTGAAGGTGGAGGAGGGCGACA
 ACGCCGTGCTGCAGTGCCTGAAGGGCACCAGCGACGGCCCCACCCAGCAGCTGACCTGGAGCCGCGAGAGCCCC
 TGAAGCCCTTCTGAAGCTGAGCCTGGGCCTGCCCGGCCTGGGCATCCACATGCGCCCCCTGGCCATCTGGCTGTTC
 10 ATCTTCAACGTGAGCCAGCAGATGGGCGGCTTCTACCTGTGCCAGCCCGCCCCCAGCGAGAAGGCCTGGCAGC
 CCGGCTGGACCGTGAACGTGGAGGGCAGCGGCGAGCTGTTCCGCTGGAACGTGAGCGACCTGGGCGGCCTGGGCT
 GCGGCCTGAAGAACC GCAGCAGCGAGGGCCCCAGCAGCCCCAGCGCAAGCTGATGAGCCCCAAGCTGTACGTGT
 GGGCCAAGGACCGCCCCGAGATCTGGGAGGGCAGCCCCCTGCCTGCCCGCCCGCAGCAGCCTGAACCAGAGCCT
 GAGCCAGGACCTGACCATGGCCCCCGGCAGCACCCCTGTGGCTGAGCTGCGGCGTGCCCCCGACAGCGTGAGCCGC
 15 GGCCCCCTGAGCTGGACCCACGTGCACCCCAAGGGCCCCAAGAGCCTGCTGAGCCTGGAGCTGAAGGACGACCCGC
 CCGCCCCGCGACATGTGGGTGATGGAGACCGGCCTGCTGCTGCCCGCGCCACCGCCAGGACGCGCGCAAGTACT
 ACTGCCACCGCGCAACCTGACCATGAGCTTCCACCTGGAGATCACCGCCCCCGCCCGTGTGTGGCACTGGCTGCTG
 CGCACCGGCGGCTGGAAGGTGGACGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGAACGCCGTGGGCCAGGACACC
 CAGGAGGTGATCGTGGTGCCCCACAGCCTGCCCTTCAAGGTGGTGGTATCAGCGCCATCTGGCCCTGGTGGTGTCT
 20 GACCATCATCAGCCTGATCATCCTGATCATGCTGTGGCAGAAGAAGCCCCGC (SEQ ID NO:13)。

实施例 4: SynNotch-CAR 门控嵌合抗原受体联用的 NK-92 细胞 (简称 SynNotch-CAR- NK-92 细胞) 对靶癌细胞的杀伤

本发明涉及的 SynNotch 合成受体 1 不仅在 T 细胞中能够发挥作用, 在其他类型的免疫细胞中也应该是通用的。发明
 25 人通过在 NK-92 细胞中应用与实施例 4 中所述相同的 SynNotch-CAR 系统证实了其在其他免疫细胞中同样能够发挥作用,
 具体包括以下步骤:

(1) 将实施例 2 中的 SynNotch 合成受体 (SynNotch 合成受体 1 或 SynNotch 合成受体 2) 进行慢病毒包装, 同时慢
 病毒包装可以识别 CD19 的 CAR 分子, 编码该 CAR 分子的核酸序列的 5' 的前端包括一段 UAS-minimal-CMV 序列, 该
 30 序列可以与 SynNotch 合成受体激活后产生的胞内多肽结合, 诱导该 CAR 分子的表达 (由金唯智公司直接合成并进行慢
 病毒包装, 该 CAR 分子具有如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列以及如 SEQ ID NO:11 所示的核苷酸序列)。将上述两种
 病毒同时感染 NK-92 细胞, 通过筛选得到稳定表达上述 SynNotch 合成受体和 CAR 分子的 NK-92 细胞; 同时设置稳定表
 达的可以识别 CD19 的 CAR 分子的 NK-92 细胞 (即为 CAR-NK) 作为阳性杀伤对照组, NK-EV (感染了空白质粒生产的
 的病毒的 NK 细胞) 作为阴性杀伤对照组;

(2) 构建单独表达膜锚定 GFP、单独表达膜锚定 CD19 (具体序列参见实施例 3 的步骤 (2)) 和共同表达膜锚定 GFP
 35 和 CD19 的 Huh7 细胞作为传输细胞;

(3) 将 (2) 中所述传输细胞用 CTV 染料标记 (购自赛默飞);

(4) 将步骤 (3) 中的 3 种 Huh7 细胞分别与 (1) 中所构建的 NK-92 细胞进行共孵育, 在 48 小时后收集细胞, 并
 用 PI 染料标记死细胞, 分析检测各组 Huh7 细胞的死活情况, 具体参见图 7。其中, Huh7 细胞的死亡比例代表着 NK-92
 40 细胞对传输细胞的杀伤情况。

如图 7 所示, 当暴露于同时表达两种抗原 (GFP 和 CD19) 的 Huh7 细胞时, SynNotch-CAR- NK-92 细胞才能够被显
 著地激活, 发挥出更高的对 Huh7 细胞的杀伤效应。其中, 相较于含有 SynNotch 合成受体 2 的 SynNotch-CAR (M-Syn-CAR)
 联用, 含有 SynNotch 合成受体 1 的 SynNotch-CAR (X-Syn-CAR) 联用的杀伤效率略微提升; 并且, 含有 SynNotch 合成
 受体 1 的 SynNotch-CAR 联用的 NK-92 细胞杀伤效率与稳定表达可以识别 CD19 的 CAR 分子 (CAR-NK) 的 NK-92 细胞
 相比, 没有显著差异。

45 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。

- 5 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。

权利要求书

1. 分离的多肽在制备 SynNotch 合成受体中的用途, 所述分离的多肽与来源于热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)的 Notch 受体蛋白的跨膜区具有至少 80% 的同一性。

2. 一种嵌合多肽, 其特征在于, 包括:

胞外区, 所述胞外区具有结合第一分子活性;

跨膜区, 所述跨膜区的 N 端与所述胞外区的 C 端相连;

胞内区, 所述胞内区的 N 端与所述跨膜区的 C 端相连;

其中, 所述跨膜区包括分离的多肽, 所述分离的多肽与来源于热带爪蟾的 Notch 受体蛋白的跨膜区具有至少 80% 的同一性。

3. 根据权利要求 1 所述的用途或权利要求 2 所述的嵌合多肽, 其特征在于, 所述分离的多肽与来源于热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)的 Notch 受体蛋白的跨膜区具有 100% 的同一性。

4. 根据权利要求 1 所述的用途或权利要求 2 所述的嵌合多肽, 其特征在于, 所述来源于热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)的 Notch 受体蛋白的跨膜区具有如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。

5. 根据权利要求 2 所述的嵌合多肽, 其特征在于, 所述第一分子包括肿瘤抗原、病毒、细菌、内毒素、抗体、细胞受体和细胞受体的配体中的至少之一。

6. 根据权利要求 5 所述的嵌合多肽, 其特征在于, 所述肿瘤抗原包括肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原中的至少之一, 优选为肿瘤特异性抗原。

7. 根据权利要求 2 所述的嵌合多肽, 其特征在于, 所述第一分子包括但不限于 GFP、eGFP、CD19、ALPPL2、BCMA、SIRP α 、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8b、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD44、CD44v6、CD45、CD48、CD51、CD52、CD56、CD59、CD66、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD79A、CD79B、CD80、CD86、CD94、CD95、CD133、CD134、CD140、CD152、CD154、CD158、CD178、CD181、CD182、CD183、CD200、CD210、CD221、CD246、CD252、CD253、CD261、CD262、CD273、CD274、CD276、CD279、CD295、CD339、CD340、EGFR、HER2、FGFR2、AFP、CA125、MSLN、GPC3、CEA、CLDN18.2、EpCAM、PSCA、GD2、IL-13、IL-13RA2、ROR1、MUC \square 1、PSMA、MAGEA1、4-1BB、5T4、BAFF、CA242、CA-IX、MET、CCR4、CNTO888、FAP、MORAb-009、VEGF-A、VEGFR-1 和 VEGFR-2 中的至少之一。

8. 根据权利要求 2 所述的嵌合多肽, 其特征在于, 所述胞外区包括结合所述第一分子的第一结合蛋白或其片段。

9. 根据权利要求 8 所述的嵌合多肽, 其特征在于, 所述第一结合蛋白或其片段包括抗体或其功能性片段、受体、受体的配体和细胞黏附分子中的至少之一。

10. 根据权利要求 8 所述的嵌合多肽, 其特征在于, 所述第一结合蛋白或其片段为结合所述第一分子的单抗或多抗。

11. 根据权利要求 10 所述的嵌合多肽, 其特征在于, 所述单抗包括 Fab 抗体、F(ab') $_2$ 片段、Fv 抗体、单链抗体、单域抗体以及最小识别单位的至少之一。

12. 根据权利要求 2 所述的嵌合多肽, 其特征在于, 所述胞内区包括转录激活蛋白、转录阻遏蛋白、转录因子、位点特异性核酸酶、重组酶、活化性免疫受体胞内结构域和抑制性免疫受体胞内结构域中的至少之一。

13. 根据权利要求 12 所述的嵌合多肽, 其特征在于, 所述胞内区包括 GaL4 \square VP64、GaL4 \square VP16、tetR \square VP64、ZFHD1 \square VP64、Gal4 \square KRAB、HAP1 \square VP16、LexA-VP64、Cas9 和 Cas13 中的至少之一。

14. 根据权利要求 13 所述的嵌合多肽, 其特征在于, 所述 Gal4 \square VP64 具有如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 2 所述的嵌合多肽, 其特征在于, 所述跨膜区和胞内区具有如 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列; 和/或

所述嵌合多肽具有如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

16. 一种第一核酸分子, 其特征在于, 所述第一核酸分子编码权利要求 2~15 任一项所述的嵌合多肽; 所述核酸分子为 DNA。

17. 一种第一表达载体, 其特征在于, 携带权利要求 16 所述的第一核酸分子。

18. 根据权利要求 17 所述的第一表达载体, 其特征在于, 所述第一表达载体为真核表达载体、原核表达载体、病毒或噬菌体, 优选为质粒表达载体。

19. 一种重组细胞，其特征在于，包括：

携带权利要求 16 所述的第一核酸分子或权利要求 17~18 任一项所述的第一表达载体；或，
表达权利要求 2~15 任一项所述的嵌合多肽。

20. 根据权利要求 19 所述的重组细胞，其特征在于，所述重组细胞是通过将权利要求 17~18 任一项所述的第一表达载体引入至宿主细胞中而获得的；

所述宿主细胞包括免疫细胞、神经元、祖细胞或前体细胞、上皮细胞、内皮细胞和干细胞中的至少之一。

21. 根据权利要求 20 所述的重组细胞，其特征在于，所述宿主细胞包括 T 细胞、B 细胞、单核细胞、NK 细胞、树突细胞、巨噬细胞、调节 T 细胞、辅助 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、NKT 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞中的至少之一。

22. 根据权利要求 19 所述的重组细胞，其特征在于，所述重组细胞进一步包括：

10 编码嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体的第二核酸分子或携带所述第二核酸分子的第二表达载体；或表达所述嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体。

23. 根据权利要求 22 所述的重组细胞，其特征在于，所述嵌合多肽的胞内区包括转录激活蛋白，编码所述嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体的第二核酸分子的 5'端与诱导表达核酸序列相连，所述诱导表达核酸序列用于结合所述转录激活蛋白。

15 24. 一种药物组合物，其特征在于，包括权利要求 2~15 任一项所述的嵌合多肽、权利要求 16 所述的第一核酸分子、权利要求 17~18 任一项所述的第一表达载体或权利要求 19~23 任一项所述的重组细胞；

以及任选地进一步包括药学上可接受的辅料。

25. 权利要求 2~15 任一项所述的嵌合多肽、权利要求 16 所述的第一核酸分子、权利要求 17~18 任一项所述的第一表达载体、权利要求 19~23 任一项所述的重组细胞或权利要求 24 所述的药物组合物在制备药物中用途，所述药物用于预防
20 和/或治疗疾病；

任选地，所述疾病包括癌症或肿瘤、自身免疫性疾病、炎症及由细胞衰老所引发的相关疾病。

26. 权利要求 2~15 任一项所述的嵌合多肽、权利要求 16 所述的第一核酸分子、权利要求 17~18 任一项所述的第一表达载体、权利要求 19~23 任一项所述的重组细胞或权利要求 24 所述的药物组合物，用于预防和/或治疗疾病；

任选地，所述疾病包括癌症或肿瘤、自身免疫性疾病、炎症及由细胞衰老所引发的相关疾病。

25 27. 一种预防和/或治疗疾病的方法，其特征在于，包括：

向受试者施用药学上可接受剂量的权利要求 2~15 任一项所述的嵌合多肽、权利要求 16 所述的第一核酸分子、权利要求 17~18 任一项所述的第一表达载体、权利要求 19~23 任一项所述的重组细胞或权利要求 24 所述的药物组合物；

任选地，所述疾病包括癌症或肿瘤、自身免疫性疾病、炎症及由细胞衰老所引发的相关疾病。

28. 一种激活免疫细胞的方法，其特征在于，包括：

30 将所述免疫细胞与第一分子进行第一接触，其中，所述免疫细胞表达权利要求 2~15 任一项所述的嵌合多肽。

29. 根据权利要求 28 所述的方法，其特征在于，所述嵌合多肽的胞内区包括转录激活蛋白，所述免疫细胞表达嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体，所述嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体包括结合预定抗原的抗体或其功能性片段，编码所述嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体的第二核酸分子的 5'端与诱导表达核酸序列相连，所述诱导表达核酸序列用于结合所述转录激活蛋白；

35 所述方法进一步包括：

所述第一接触之后，所述免疫细胞释放所述转录激活蛋白，并表达所述嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体；

将所述免疫细胞的嵌合抗原受体、NK 细胞受体或 T 细胞受体与所述预定抗原结合，以便激活所述免疫细胞；

任选地，所述免疫细胞包括 T 细胞、B 细胞、单核细胞、NK 细胞、树突细胞、巨噬细胞、调节 T 细胞、辅助 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、NKT 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞中的至少之一。

40 30. 一种追踪第一细胞-第二细胞接触的方法，其特征在于，包括：

将所述第一细胞和所述第二细胞进行第二接触，其中，所述第一细胞表达权利要求 2~15 任一项所述的嵌合多肽和报告基因蛋白，所述嵌合多肽的胞内区为转录激活蛋白，编码所述报告基因蛋白的第三核酸分子的 5'端与诱导表达核酸序列相连，所述诱导表达核酸序列用于结合所述转录激活蛋白，所述第二细胞表达第一分子；

基于所述第一细胞中所述报告基因蛋白的检测结果，确定第一细胞和第二细胞的接触情况。

45 31. 根据权利要求 30 所述的方法，其特征在于，所述第一细胞或第二细胞包括免疫细胞、神经元、祖细胞或前体细胞、上皮细胞、内皮细胞和干细胞中的至少之一；

任选地，所述第一细胞包括 T 细胞、B 细胞、单核细胞、NK 细胞、树突细胞、巨噬细胞、调节 T 细胞、辅助 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、NKT 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞中的至少之一。



图 1

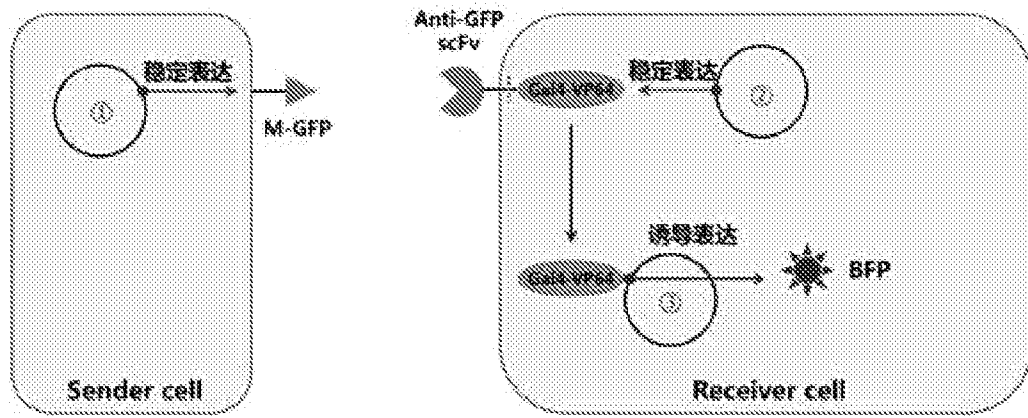
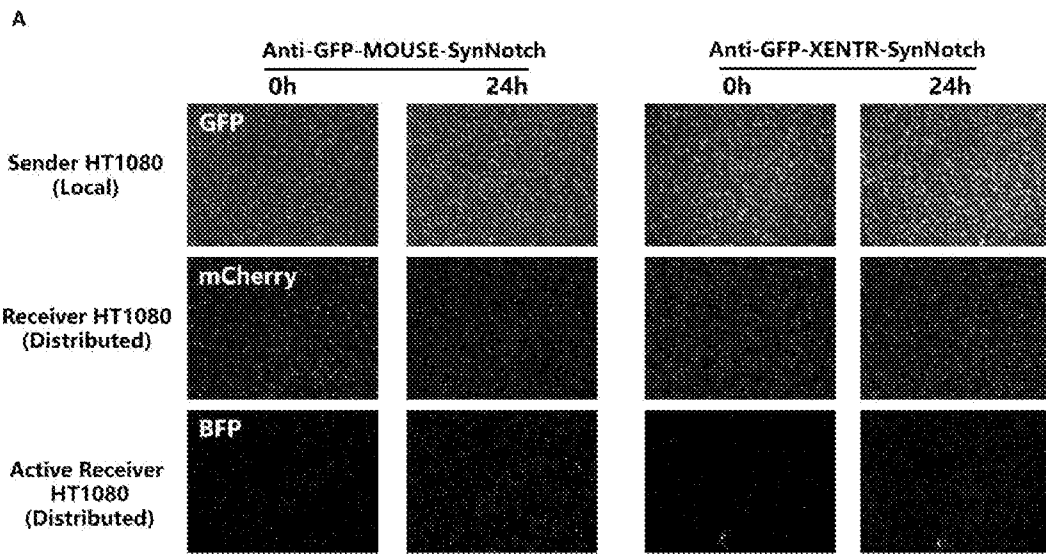


图 2



图 3



图A量化结果

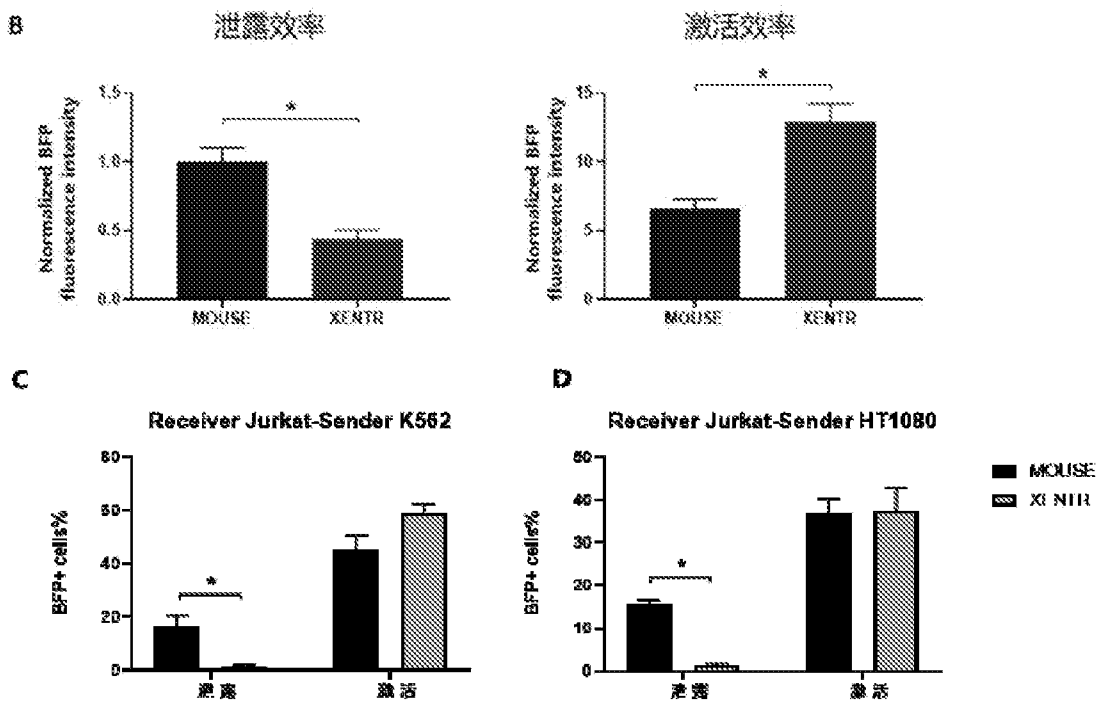


图4

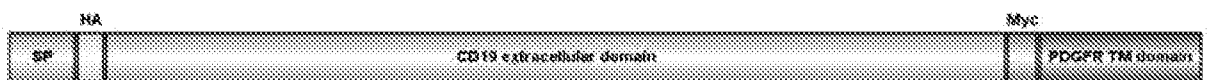


图5

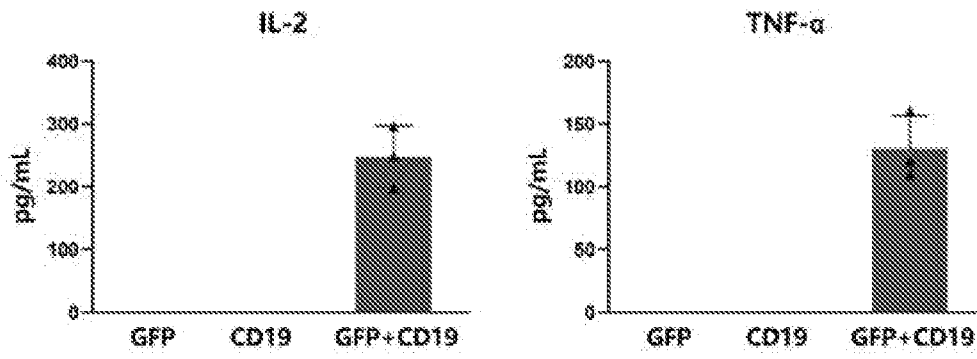


图 6

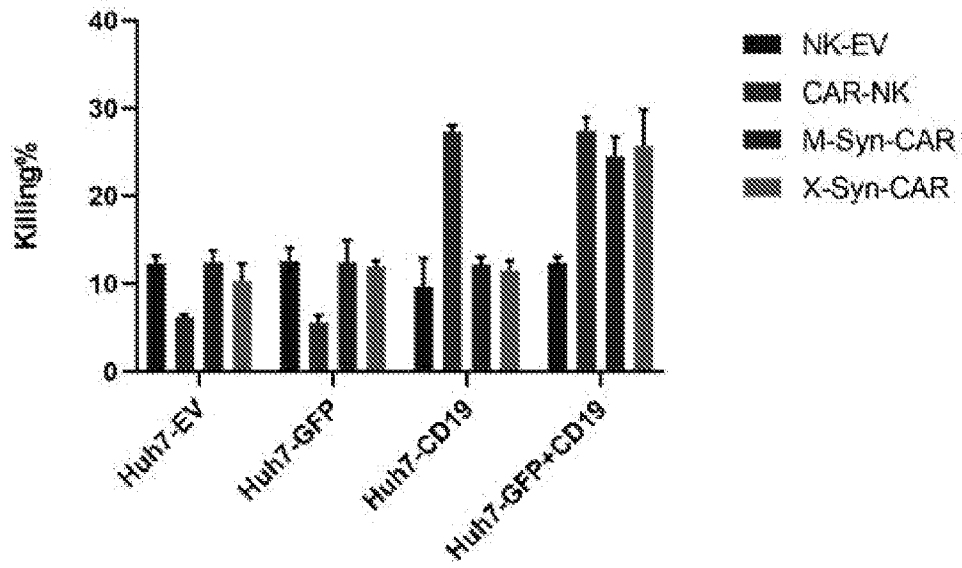


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/103857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K14/705(2006.01)i; C12N15/12(2006.01)i; C07K19/00(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; C12N15/867(2006.01)i; A61K39/00(2006.01)i; C07K16/30(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; A61P35/02(2006.01)i; G01N33/50(2006.01)i; G01N33/68(2006.01)i; C07K14/755(2006.01)i; C07K14/705(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC:C07K14; C12N15; C07K19; A61K39; C07K16; A61P35; G01N33		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT, ENTXTC, ENTXT, OETXT, VEN, CJFD, PubMed, ISI web of knowledge, GenBank, EMBL, STN, CNKI, 万方, WANFANG, 百度, Baidu, 百度学术, Baidu Scholar, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System: 热带爪蟾, 西部爪蟾, 跨膜区, 跨膜结构域, 嵌合, 肽, Xenopus tropicalis, SynNotch, Notch, +Notch, chimeric, +peptide, transmembrane, SEQ ID NOs: 1-5		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 109843929 A (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 04 June 2019 (2019-06-04) claims 1-90, and SEQ ID NO: 6	1-31
A	US 2020331985 A1 (UNIV CALIFORNIA et al.) 22 October 2020 (2020-10-22) abstract, description, pages 41-47, and SEQ ID NO: 29	1-31
A	CN 115232217 A (SHENZHEN XIANKANGDA LIFE SCIENCE CO., LTD.) 25 October 2022 (2022-10-25) description, paragraphs 0009-0027	1-31
A	CN 109180805 A (SOUTHERN MEDICAL UNIVERSITY) 11 January 2019 (2019-01-11) description, paragraphs 0005-0018	1-31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“D” document cited by the applicant in the international application</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 12 October 2023		Date of mailing of the international search report 12 October 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/103857

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Marko T. Boskovski et al. "The Heterotaxy Gene GALNT11 Glycosylates Notch to Orchestrate Cilia Type and Laterality" <i>Nature</i> , Vol. vol. 504, 13 November 2013 (2013-11-13), pages 456-459 ISSN: 1476-4687, pages 456-459	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/103857

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

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

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

1. Claims Nos.: **27-29**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 27 relates to a method for preventing and/or treating diseases, which falls within methods for treatment of diseases as defined in PCT Rule 39.1(iv). Claim 28 relates to a method for activating immune cells, and claim 29 refers to claim 28 and further defines the method. The description of the present application recites that efficient activation of immune cells may achieve the function of killing targets (such as tumor cells), that is, claims 28-29 also relate to a method for treating diseases, which falls within methods for treatment of diseases as defined in PCT Rule 39.1(iv). The present report is provided on the basis of a reasonable expectation that claims 27-29 are amended to be pharmaceutical use claims.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/103857

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109843929	A	04 June 2019	JP	2019528077	A	10 October 2019
				JP	2022106714	A	20 July 2022
				US	2019202918	A1	04 July 2019
				US	11401332	B2	02 August 2022
				KR	20230038295	A	17 March 2023
				CA	3034093	A1	01 March 2018
				KR	20190051956	A	15 May 2019
				EP	3504245	A1	03 July 2019
				WO	2018039247	A1	01 March 2018
				US	2022324982	A1	13 October 2022
				AU	2017316649	A1	07 March 2019
				SG	11201901528	A1	28 March 2019
				SG	10201913583	A1	27 February 2020
				IL	264835	A	31 March 2019
US	2020331985	A1	22 October 2020	CA	3082782	A1	23 May 2019
				WO	2019099689	A1	23 May 2019
				AU	2018370002	A1	28 May 2020
				EP	3710042	A1	23 September 2020
				EP	3710042	A4	24 November 2021
CN	115232217	A	25 October 2022	CN	115232217	B	06 June 2023
CN	109180805	A	11 January 2019	WO	2020037800	A1	27 February 2020
				CN	109180805	B	28 December 2021

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K14/705(2006.01)i; C12N15/12(2006.01)i; C07K19/00(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; C12N15/867(2006.01)i; A61K39/00(2006.01)i; C07K16/30(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; A61P35/02(2006.01)i; G01N33/50(2006.01)i; G01N33/68(2006.01)i; C07K14/755(2006.01)i; C07K14/705(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC:C07K14; C12N15; C07K19; A61K39; C07K16; A61P35; G01N33</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNTEXT,ENTXT,ENTXT,ENTXT,OETXT,VEN,CJFD,PubMed,ISI web of knowledge,GenBank, EMBL,STN,CNKI,万方,百度,百度学术,中国专利生物序列检索系统:热带爪蟾,西部爪蟾,跨膜区,跨膜结构域,嵌合,肽, Xenopus tropicalis,SynNotch, Notch,+Notch,chimeric,+peptide,transmembrane,SEQ ID NO:1-5</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 109843929 A (加利福尼亚大学董事会) 2019年6月4日 (2019 - 06 - 04) 权利要求1-90、SEQ ID NO:6</td> <td>1-31</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2020331985 A1 (UNIV CALIFORNIA et al.) 2020年10月22日 (2020 - 10 - 22) 摘要、说明书第41-47页、SEQ ID NO:29</td> <td>1-31</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 115232217 A (深圳市先康达生命科学有限公司) 2022年10月25日 (2022 - 10 - 25) 说明书第0009-0027段</td> <td>1-31</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109180805 A (南方医科大学) 2019年1月11日 (2019 - 01 - 11) 说明书第0005-0018段</td> <td>1-31</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Marko T. Boskovski et al. "The heterotaxy gene GALNT11 glycosylates Notch to orchestrate cilia type and laterality" Nature, 第504卷, 2013年11月13日 (2013 - 11 - 13), 第456 - 459页 ISSN: 1476-4687, 第456 - 459页</td> <td>1-31</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "D" 申请人在国际申请中引证的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 109843929 A (加利福尼亚大学董事会) 2019年6月4日 (2019 - 06 - 04) 权利要求1-90、SEQ ID NO:6	1-31	A	US 2020331985 A1 (UNIV CALIFORNIA et al.) 2020年10月22日 (2020 - 10 - 22) 摘要、说明书第41-47页、SEQ ID NO:29	1-31	A	CN 115232217 A (深圳市先康达生命科学有限公司) 2022年10月25日 (2022 - 10 - 25) 说明书第0009-0027段	1-31	A	CN 109180805 A (南方医科大学) 2019年1月11日 (2019 - 01 - 11) 说明书第0005-0018段	1-31	A	Marko T. Boskovski et al. "The heterotaxy gene GALNT11 glycosylates Notch to orchestrate cilia type and laterality" Nature, 第504卷, 2013年11月13日 (2013 - 11 - 13), 第456 - 459页 ISSN: 1476-4687, 第456 - 459页	1-31
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	CN 109843929 A (加利福尼亚大学董事会) 2019年6月4日 (2019 - 06 - 04) 权利要求1-90、SEQ ID NO:6	1-31																		
A	US 2020331985 A1 (UNIV CALIFORNIA et al.) 2020年10月22日 (2020 - 10 - 22) 摘要、说明书第41-47页、SEQ ID NO:29	1-31																		
A	CN 115232217 A (深圳市先康达生命科学有限公司) 2022年10月25日 (2022 - 10 - 25) 说明书第0009-0027段	1-31																		
A	CN 109180805 A (南方医科大学) 2019年1月11日 (2019 - 01 - 11) 说明书第0005-0018段	1-31																		
A	Marko T. Boskovski et al. "The heterotaxy gene GALNT11 glycosylates Notch to orchestrate cilia type and laterality" Nature, 第504卷, 2013年11月13日 (2013 - 11 - 13), 第456 - 459页 ISSN: 1476-4687, 第456 - 459页	1-31																		
国际检索实际完成的日期	2023年10月12日	国际检索报告邮寄日期	2023年10月12日																	
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	授权官员	段珊 电话号码 (+86) 020-28950756																	

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
 - a. 作为国际申请的一部分提交的:
 - b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求：27-29
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求27涉及一种预防和/或治疗疾病的方法，属于PCT细则39.1 (iv) 规定的疾病的治疗方法。
权利要求28涉及一种激活免疫细胞的方法，权利要求29引用权利要求28，进一步限定了所述的方法，本申请说明书记载了高效激活免疫细胞可行使杀伤目标(如肿瘤细胞等)的功能，即权利要求28-29也涉及疾病的治疗方法，属于PCT细则39.1 (iv) 规定的疾病的治疗方法。本报告基于合理预期权利要求27-29修改为制备药物的用途权利要求而作出。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/103857

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109843929	A	2019年6月4日	JP	2019528077	A	2019年10月10日
				JP	2022106714	A	2022年7月20日
				US	2019202918	A1	2019年7月4日
				US	11401332	B2	2022年8月2日
				KR	20230038295	A	2023年3月17日
				CA	3034093	A1	2018年3月1日
				KR	20190051956	A	2019年5月15日
				EP	3504245	A1	2019年7月3日
				WO	2018039247	A1	2018年3月1日
				US	2022324982	A1	2022年10月13日
				AU	2017316649	A1	2019年3月7日
				SG	11201901528	A1	2019年3月28日
				SG	10201913583	A1	2020年2月27日
				IL	264835	A	2019年3月31日
US	2020331985	A1	2020年10月22日	CA	3082782	A1	2019年5月23日
				WO	2019099689	A1	2019年5月23日
				AU	2018370002	A1	2020年5月28日
				EP	3710042	A1	2020年9月23日
				EP	3710042	A4	2021年11月24日
CN	115232217	A	2022年10月25日	CN	115232217	B	2023年6月6日
CN	109180805	A	2019年1月11日	WO	2020037800	A1	2020年2月27日
				CN	109180805	B	2021年12月28日