



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107793481 A

(43)申请公布日 2018.03.13

(21)申请号 201610795955.X

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2016.08.31

A61P 35/02(2006.01)

(71)申请人 南京传奇生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区秣陵街
道雍熙路28号3幢1060室

(72)发明人 庄秋传 范晓虎 杨蕾 王平艳

(74)专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11436

代理人 程淼

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

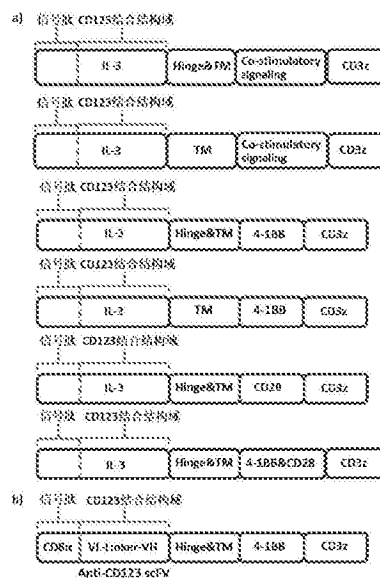
权利要求书2页 说明书20页 附图6页

(54)发明名称

一种靶向人CD123的嵌合受体配体及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种靶向人CD123的嵌合受体配体,包含基于IL-3分子的CD123结合结构域、跨膜区及胞内信号结构域。本发明还提供了一种靶向人CD123的嵌合受体配体修饰的T细胞,能够特异地与肿瘤细胞表面的CD123结合,进而对肿瘤细胞产生特异的杀伤作用。本发明还涉及所述靶向人CD123的嵌合受体配体及其免疫效应细胞在制备抗肿瘤免疫治疗药物中的应用。



1. 一种靶向人CD123的嵌合受体配体,包含:基于IL-3分子的CD123结合结构域、跨膜区及胞内信号结构域。

2. 根据权利要求1所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其中CD123结合结构域包含SEQ ID NO:1的至少100个连续氨基酸残基。

3. 根据权利要求1所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其中编码CD123结合结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:1或2所示,或与其具有85%~99%或90%~99%或95%~99%同一性的改造的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1或2所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其中所述嵌合受体配体包含两个或更多个基于IL-3分子的CD123结合结构域。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其中所述跨膜区选自CD4、CD8 α 、CD28、PD1和/或4-1BB跨膜区。

6. 根据权利要求5所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其特征在于跨膜区为CD8 α 跨膜区。

7. 根据权利要求1~6任一项所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其特征在于胞内信号结构域包括信号传导结构域和/或共刺激信号结构域,选自以下信号分子的细胞内结构域:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、CD3、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83特异性结合的配体和其任意组合。

8. 根据权利要求7所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其特征在于胞内信号结构域包括信号传导结构域和/或共刺激信号结构域,进一步优选CD3、4-1BB和/或CD28信号结构域。

9. 根据权利要求1~8任一项所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其特征在于包含胞外信号肽结构,优选CD8 α 信号肽、GM-CSFR α 信号肽、CD4信号肽或IL-3信号肽。

10. 根据权利要求9所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其特征在于胞外信号肽优选CD8 α 信号肽或IL-3信号肽,更优选为IL-3信号肽。

11. 根据权利要求9~10任一项所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其胞外信号肽包含SEQ ID NO:3所示的IL-3信号肽氨基酸序列。

12. 根据权利要求9~10任一项所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其胞外信号肽包含SEQ ID NO:4所示的CD8 α 信号肽氨基酸序列。

13. 根据权利要求1~12任一项所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其特征在于不包含铰链区结构。

14. 根据权利要求1~12任一项所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其特征在于包括铰链区结构,优选CD8 α 分子。

15. 根据权利要求14所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其铰链区包含SEQ ID NO:5所示的CD8 α 铰链区氨基酸序列。

16. 根据权利要求1~15任一项所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其特征在于跨膜区结构包含SEQ ID NO:6所示的CD8 α 跨膜区氨基酸序列,或SEQ ID NO:7所示的CD28跨膜区氨基酸序列。

17. 根据权利要求1~16任一项所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其特征在于胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:8所示的CD3zeta氨基酸序列。

18. 根据权利要求1~17任一项所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其特征在于胞内

共刺激信号结构域包含SEQ ID NO:9所示的4-1BB氨基酸序列,和/或SEQ ID NO:10所示的CD28氨基酸序列。

19.根据权利要求1~18任一项所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其特征在于编码的氨基酸序列为SEQ ID NO:14所示,或与其具有95%~99%同一性的氨基酸序列。

20.根据权利要求1~18任一项所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,其特征在于编码的氨基酸序列为SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19所示,或与其具有95%~99%同一性的氨基酸序列。

21.一种核酸分子,其特征在于编码权利要求1~20任一项所述靶向人CD123的嵌合受体配体的核苷酸序列。

22.根据权利要求21所述的核酸分子,其特征在于核苷酸编码序列如SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:38所示。

23.一种载体,其特征在于包含权利要求21或22所述的核酸分子。

24.一种基因工程改造的免疫细胞,其特征在于包含权利要求21或22所述的核酸分子。

25.根据权利要求24所述的基因工程改造的免疫细胞,其特征在于包含权利要求23所述的载体。

26.根据权利要求24~25任一项所述的基因工程改造的免疫细胞,其特征在于可选自T淋巴细胞、NK细胞、造血干细胞、多能干细胞或胚胎干细胞培养分化的免疫细胞,进一步优选T淋巴细胞。

27.根据权利要求24~26任一项所述的基因工程改造的免疫细胞,其特征在于表达的靶向人CD123的嵌合受体配体包含胞外信号肽、基于IL-3分子的CD123结合结构域、跨膜区及胞内信号结构域。

28.根据权利要求24~27任一项所述的基因工程改造的免疫细胞,其特征在于表达的靶向人CD123的嵌合受体配体具有SEQ ID NO:14所示氨基酸序列,或与其具有95%~99%同一性的氨基酸序列。

29.根据权利要求24~27任一项所述的基因工程改造的免疫细胞,其特征在于表达的靶向人CD123的嵌合受体配体具有SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19所示氨基酸序列,或与其具有95%~99%同一性的氨基酸序列。

30.一种方法,其特征在于制备权利要求1~20中任一项所述靶向人CD123的嵌合受体配体。

31.根据权利要求30所述的方法,其特征在于制备权利要求24~29所述的基因工程改造的免疫细胞。

32.权利要求1~20中任一项所述靶向人CD123的嵌合受体配体在制备抗肿瘤药物中的应用;优选在制备抗血液恶性肿瘤药物中的应用。

33.权利要求24~29中任一项所述的基因工程改造的免疫细胞在制备抗肿瘤药物中的应用;优选在制备抗血液恶性肿瘤药物中的应用。

一种靶向人CD123的嵌合受体配体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学或生物制药技术领域,涉及一种靶向人CD123的嵌合受体配体及其应用。

背景技术

[0002] CD123,即人白介素3受体 α 链(Interleukin-3receptor subunit alpha,IL-3R α),全长378个氨基酸(NP_002174.1),其中信号肽包含18个氨基酸(1-18),胞外区包含287个氨基酸(19-305),跨膜区包含20个氨基酸(306-325),胞内区包含53个氨基酸(326-378)。过去20年的研究表明,CD123在许多血液肿瘤中过量表达,包括急性髓系白血病(AML),急性B细胞型淋巴细胞白血病(B-ALLs),多毛细胞白血病(Hairy Cell Leukemia),母细胞性浆细胞树突细胞瘤(BPDCN)。Muñoz L等人检测64例急性白血病病例,发现其中的45例AML病人中有43例为CD123阳性,2例M7的AML病人为CD123阴性,其中的13例B细胞急性白血病均为CD123阳性,而其中的6例T细胞急性白血病均为CD123阴性(Haematologica.2001,Dec;86(12):1261-9)。计雪强等人报道健康儿童骨髓淋巴细胞CD123为阴性表达,91例儿童B-ALL患者中65例骨髓淋巴细胞CD123阳性表达(阳性率71.43%),且表达水平与白血病细胞成熟度呈负相关(江苏大学学报:医学版,2012)。A Ehninger等人也报道79%(232/298)的AML病人细胞表达CD123分子。这些报道均显示CD123是AML的一个良好的血液病治疗靶标(Blood Cancer Journal,2014)。

[0003] 人白介素3(IL-3)是CD123的天然配体。人IL-3基因位于人的五号染色体(5q23-31),分子量约15-17kDa。IL-3分子在进化上并不保守,人的IL-3分子和小鼠的IL-3分子仅有29%的氨基酸同源性。IL-3与其受体CD123(IL-3R)具有极高的亲和力($K_d=0.1\sim 1\text{nM}$)。

[0004] DT388IL-3是一种IL-3分子和白喉类毒素(diphtheria toxin)的融合蛋白。在体外研究中,DT388IL-3显示出与CD123具有良好的亲和力($K_d=3\text{nM}$)和良好的CD123抗原选择性细胞杀伤作用($IC_{50}=5\sim 10\text{pM}$)(Protein Eng.2000,Aug;13(8):575-81),并且对正常细胞无显著的杀伤作用(Cancer Res.2002,Mar 15;62(6):1730-6)。在小鼠的体内实验中,DT388IL-3显著提高荷载IL-3受体阳性AML细胞小鼠的生存期,且未出现明显的副作用(Leukemia.2003Jan;17(1):155-9)。在食蟹猴的安全性评估中,DT388IL-3也显示出良好的安全性(Leuk Lymphoma.2004,Aug;45(8):1647-56)。DT388IL-3良好的安全性也揭示了利用IL-3和CD123之间的配体和受体相互作用进行疾病治疗的安全性。

[0005] 嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(Chimeric Antigen Receptor Modified T cell therapy,CAR-T)近年来在血液性疾病治疗临床试验取得了令人鼓舞的进展。从2013年Carl.H June小组报道第一例使用靶向CD19的CAR-T治疗患有急性B淋巴细胞性白血病的儿童(Emily Whitehead)得到完全缓解开始,短短几年时间CAR-T细胞免疫疗法进入了飞速发展的阶段。以诺华/宾夕法尼亚大学为代表开发的以CD19为靶点的CTL019在复发性/难治性急性淋巴细胞白血病(r/r ALL)儿童及年轻成人患者中完全缓解率达到90%以上。截至到2016年8月,美国临床试验注册网站(<https://clinicaltrials.gov/>)检索信息显示,全世

界有142项CAR-T注册临床试验,其中美国注册71项,而中国也注册了51项。目前,CAR-T治疗在如急性髓系白血病(AML),多发性骨髓瘤(MM),神经胶质瘤,结肠癌,前列腺癌等疾病中也正得到全面的研究与产品开发。

[0006] 嵌合抗原受体(CAR)是由一个肿瘤相关抗原结合区或抗原结合结构域、胞外铰链区、跨膜区以及胞内信号转导区等结构组成。一般CAR的抗原结合结构域由不同形式的抗体组成。目前绝大多数开发的嵌合抗原受体T细胞免疫疗法,其抗原识别序列均为基于scFv抗体片段的形式。例如,美国宾夕法尼亚大学Abramson Cancer Center以及美国City of Hope相关研究组使用的抗人CD123鼠源抗体为克隆32716(clone32716)、克隆26292(clone26292)。其中克隆32716显示出比克隆26292更好的体外和体内杀伤CD123阳性细胞抗肿瘤活性,可在两周内清除小鼠模型中的CD123阳性肿瘤细胞(J Immunother. 2007, Sep; 30(6):607-13; US20140271582A1; Blood. 2013; 122(18):3138-3148)。法国CELECTIS公司也开发了CD123 CAR-T载体,其中所使用的CD123抗体为K1on43(W02015193406A1)。在美国注册临床试验网站注册的针对AML的CAR-T治疗临床试验主要是City of Hope的NCT02159495以及Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania的NCT02623582。这些基于scFv抗体设计的嵌合抗原受体T细胞及其免疫疗法均存在因选用抗体本身可能具有交叉反应而导致嵌合抗原受体技术常有的脱靶效应的可能,因此都需要在临床试验中谨慎验证其安全性。由于以上CD123 CAR-T均使用鼠源单克隆抗体作为CD123的靶向分子,因此应用到人体中时还可能具有潜在的免疫原性。

发明内容

[0007] 本发明利用配体和受体间的相互作用原理,提供了一种靶向人CD123的嵌合受体配体(Chimeric Receptor Ligand, CRL),不同于传统基于抗体scFv片段的嵌合抗原受体的构造,是一种全新的、非抗体依赖性的、靶向人CD123的类似嵌合抗原受体的结构。本发明提供的靶向人CD123的嵌合受体配体(CD123 CRL)可以包含基于自然IL-3分子的CD123特异结合结构域、铰链区或无铰链区、跨膜区、以及胞内信号传导结构域等。本发明进一步提供了一种由嵌合受体配体修饰的免疫细胞,即CD123嵌合受体配体修饰的T细胞(Chimeric Receptor Ligand Modified T cell, CRL-T)。本发明提供的靶向人CD123的嵌合受体配体及其免疫细胞具有比传统的基于scFv抗体的CD123 CAR-T更好的CD123靶点特异性肿瘤杀伤效果及安全性;使用基于天然的人IL-3分子靶向CD123分子进行免疫疗法,不会产生异源免疫原性;在治疗CD123阳性的血液疾病和其他疾病有极高的临床应用价值。

[0008] 本发明的一个目的是提供一种靶向人CD123的嵌合受体配体。

[0009] 本发明的另一目的是提供一种基因工程改造的免疫效应细胞。

[0010] 本发明的另一目的是提供靶向人CD123的嵌合受体配体及其免疫效应细胞的应用。

[0011] 本发明的又一目的是提供一种制备靶向人CD123嵌合受体配体及其免疫效应细胞的方法。

[0012] 本发明的目的可通过以下技术方案实现:

[0013] 一种靶向人CD123的嵌合受体配体,包含基于IL-3分子的CD123特异结合结构域、跨膜区及胞内信号结构域。

[0014] 在本发明的实施方案中,所述靶向人CD123的嵌合受体配体,其CD123特异结合结构域包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的特异性结合CD123的氨基酸序列,或与其具有85%~99%或90%~99%或95%~99%同一性的氨基酸序列。

[0015] 在本发明的实施方案中,所述靶向人CD123的嵌合受体配体,其胞内信号结构域包括信号传导结构域,和/或共刺激信号结构域。

[0016] 所述的胞内信号结构域,其信号传导结构域可选自CD3zeta,CD3gamma,CD3delta,CD3epsilon,common FcR gamma (FCER1G),FcR beta (Fc Epsilon R1b),CD79a,CD79b,Fc gamma RIIa,DAP10,and DAP12分子,优选CD3zeta分子。

[0017] 所述的胞内信号结构域,其共刺激信号结构域可选自以下信号分子的细胞内结构域:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、CD2、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、LIGHT、NKG2C、B7-H3、PD-1、ICOS、CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、CD7、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、CD8alpha、CD8beta、IL2Rbeta、IL2R gamma、IL7R alpha、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244,2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A, Ly108)、SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、CD83特异性结合的配体或其任意组合。

[0018] 所述胞内信号结构域进一步优选以下分子的细胞内信号结构域:CD3zeta、4-1BB和/或CD28。

[0019] 所述靶向人CD123的嵌合受体配体,其跨膜结构域可选自TCR α 、TCR β 、TCR γ 、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD5、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD154、CD152、CD4、CD8 α 、CD28、PD1和4-1BB跨膜区,优选CD8 α 、CD28和/或4-1BB跨膜区。

[0020] 在本发明的实施方案中,所述靶向人CD123的嵌合受体配体包含蛋白质分泌相关信号肽序列,可选自CD8 α 信号肽,GM-CSFR α 信号肽,CD4信号肽或IL-3信号肽,优选IL-3信号肽。

[0021] 所述靶向人CD123的嵌合受体配体,可包含铰链区结构,或不包含铰链区结构,铰链区可选自CD8 α 、CD28分子。

[0022] 所述靶向人CD123的嵌合受体配体,其胞外区和跨膜区之间可以包含Linker结构,或不包含Linker结构。

[0023] 本发明所述的靶向人CD123的嵌合受体配体,可包含两个或两个以上重复CD123嵌合受体配体串联,或是多个基于IL-3分子的CD123结合结构域相互串联,或基于IL-3分子的CD123结合结构域与基于抗体的抗原结合结构域串联形成的多价的靶点特异性的嵌合受体配体组合,重复单元间可由一个或多个Linker结构连接。

[0024] 在本发明的实施方案中,所述靶向人CD123的嵌合受体配体,其特征在于编码的氨基酸序列为SEQ ID NO:14~SEQ ID NO:19所示,或与其具有85%~99%或90%~99%或95%~99%同一性的改造氨基酸序列。

[0025] 一种核酸分子,其特征在于编码以上所述靶向人CD123的嵌合受体配体的核苷酸序列。

[0026] 在本发明的实施方案中,所述的核酸分子,其特征在于核苷酸编码序列如SEQ ID NO:33~SEQ ID NO:38所示。

[0027] 一种载体,其特征在于包含以上编码所述靶向人CD123的嵌合受体配体的核酸序列。

[0028] 一种基因工程改造的免疫效应细胞,包含编码本发明所述的靶向人CD123的嵌合受体配体的基因序列。

[0029] 所述的免疫效应细胞优选T淋巴细胞、NK细胞、造血干细胞、多能干细胞或胚胎干细胞培养分化的免疫细胞,进一步优选T淋巴细胞。

[0030] 所述的基因工程改造的免疫细胞,其特征在于表达的靶向人CD123的嵌合受体配体包含基于IL-3分子的CD123特异结合结构域、跨膜区及胞内信号结构域。

[0031] 在本发明的实施方案中,所述的基因工程改造的免疫细胞,其特征在于表达的靶向人CD123的嵌合受体配体具有SEQ ID NO:14所示氨基酸序列,或与其具有85%~99%或90%~99%或95%~99%同一性的氨基酸序列。

[0032] 在本发明的实施方案中,所述的基因工程改造的免疫细胞,其特征在于表达的靶向人CD123的嵌合受体配体具有SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19所示氨基酸序列,或与其具有85%~99%或90%~99%或95%~99%同一性的氨基酸序列。

[0033] 本发明提供一种方法,其特征在于制备上述靶向人CD123的嵌合受体配体及其修饰的免疫效应细胞。

[0034] 本发明涉及所述的靶向人CD123的嵌合受体配体及其免疫效应细胞在制备抗肿瘤免疫治疗药物中的应用,优选在制备治疗急性髓细胞白血病药物中的应用。

[0035] 有益效果:

[0036] 本发明提供了一种靶向人CD123的嵌合受体配体(CD123 CRL),创造性地使用人IL-3分子作为胞外特异性靶向CD123分子的结合区,通过配体/受体特异性地识别肿瘤相关表面抗原CD123,然后通过胞内共刺激信号分子将识别的信号传递到细胞内,激活免疫细胞的杀伤性,进而减少和消除肿瘤细胞。本发明同时提供了一种靶向人CD123的嵌合受体配体修饰的T细胞(CD123 CRL-T),能够特异地与肿瘤细胞表面的CD123结合,进而对肿瘤细胞产生特异的杀伤作用。与传统基于抗体如scFv片段的CD123 CAR-T相比,CD123 CRL-T显示出更好的CD123靶点特异性的肿瘤杀伤效果以及细胞因子释放量,提高了靶向治疗的特异性及安全性。

附图说明

[0037] 图1为本发明构建的靶向人CD123的嵌合受体配体结构示意图。图1a为本发明提供的基于IL-3的CD123嵌合受体配体结构示意图,其中信号肽部分结构可选自IL-3、CD8 α 分子。共刺激信号结构域以4-1BB和/或CD28信号分子为例。图1b为传统基于scFv抗体的CD123 CAR-T结构图。

[0038] 图2为本发明构建的靶向人CD123嵌合受体配体载体示意图。以CRL1为例展示本发明构建的CD123 CRL载体结构图,所示CRL1包含IL-3胞外信号肽及CD123结合结构域,CD8 α 铰链区(Hinge)及跨膜区(TM),CD137胞内共刺激结构域(Cyto)及CD3 ζ 信号传导结构域。

[0039] 图3为K562.CD123.Luc细胞系的验证。构建的clone 8细胞系的CD123分子表达水平最高, Luciferase表达水平也较高, clone 8被命名为K562.CD123.Luc。

[0040] 图4为靶向CD123嵌合受体配体体外活性功能研究。如图4a所示, 纵坐标显示的是共培养结束后, 反应孔中所剩余的荧光素酶相对活性RLU, 对应孔中活细胞的相对量。CAR1-T、CAR2-T、CAR3-T及CRL1-T细胞对RPMI8226.Luc细胞均有较好的体外杀伤活性。图4b显示CAR1-T、CAR2-T、CAR3-T及CRL1-T细胞均能在RPMI8226.Luc细胞存在的情况下释放细胞因子IFN γ 。而在没有RPMI8226.Luc靶细胞存在的情况下, CRL1-T显示出比CAR1-T、CAR2-T及CAR3-T更低的细胞因子IFN γ 释放量。

[0041] 图5为基于IL-3分子的CD123 CRL-T的细胞因子IFN- γ 释放水平检测试验。图5a显示在过表达及低表达CD123分子的K562.CD123.Luc存在的情况下, CRL1-T细胞释放的IFN- γ 水平; 图5b为在低表达CD123分子的RPMI8226.Luc细胞刺激下, CRL1-T细胞释放出的IFN- γ 水平; 图5c为在CD123阴性的A549.Luc细胞刺激的情况下, CRL1-T细胞释放的IFN- γ 水平。

[0042] 图6为基于IL-3分子的CD123 CRL-T的细胞因子IL-2释放水平检测试验。图6a显示在过表达及低表达CD123分子的K562.CD123.Luc存在的情况下, CRL1-T细胞释放的IL-2水平; 图6b为在低表达CD123分子的RPMI8226.Luc细胞刺激下, CRL1-T细胞释放出的IL-2水平; 图6c为在CD123阴性的A549.Luc细胞刺激的情况下, CRL1-T细胞释放的IL-2水平。

[0043] 图7为基于IL-3分子的CD123 CRL-T功能性和特异性评估。图7a显示与阴性对照UnT细胞相比, CRL1-T对过表达CD123的K562.CD123.Luc细胞出良好的体外杀伤作用; 图7b显示CRL1-T对CD123阴性的K562.CD19.Luc细胞则几乎没有体外杀伤作用; 图7c显示CRL1-T细胞对低表达CD123分子的RPMI8226.Luc细胞系具有良好的体外杀伤作用; 图7d显示CRL1-T细胞对不表达CD123分子的肺癌细胞系A549.Luc则完全没有体外杀伤活性。

具体实施方式

[0044] 本发明提供了一种靶向人CD123的嵌合受体配体, 包含: 基于IL-3分子的CD123结合结构域、跨膜区及胞内信号结构域。

[0045] 本文所用的术语“基于IL-3分子的CD123结合结构域”是指来源于天然人IL-3氨基酸序列的CD123结合结构域。

[0046] 天然人IL-3的氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示, 共含有152个氨基酸残基。天然人IL-3分子N端的19个氨基酸残基为IL-3信号肽, 其氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0047] 如果从天然人IL-3分子中除去信号肽部分(SEQ ID NO:3), 即可得到SEQ ID NO:1序列(含有133个氨基酸)。SEQ ID NO:1可以用作IL-3受体结合域(也可称为CD123结合结构域), 具有特异结合CD123的能力。

[0048] 如果将SEQ ID NO:1的C端9个氨基酸去除, 即可获得SEQ ID NO:2(含有124个氨基酸)。只包含SEQ ID NO:2序列的IL-3片段也能结合CD123, 可以用作IL-3受体结合域。

[0049] 本文所述的“基于IL-3分子的CD123结合结构域”具有特异结合CD123的能力。例如, 在本发明的实施方案中, 基于IL-3分子的CD123结合结构域可以包含SEQ ID NO:1的至少100个连续氨基酸残基, 例如102、105、110、115或120个连续氨基酸残基。

[0050] 在本发明的优选实施方案中, 基于IL-3分子的CD123结合结构域可以为SEQ ID

NO:1或SEQ IDNO:2。

[0051] 本发明的靶向人CD123的嵌合受体配体中,可以包含一个基于IL-3分子的CD123结合结构域,也可以包含两个或更多个基于IL-3分子的CD123结合结构域。这些CD123结合结构域可以彼此相同或不同。例如,可以包含两个或两个以上重复CD123嵌合受体配体串联,或是多个基于IL-3分子的CD123结合结构域相互串联,或基于IL-3分子的CD123结合结构域与基于抗体的抗原结合结构域串联形成的多价的靶点特异性的嵌合受体配体组合,重复单元间可由一个或多个Linker结构连接。

[0052] 此处所用的术语“Linker”也称连接肽或接头,是用于连接两个结构域的柔性氨基酸序列。连接肽的选择和制备对本领域技术人员来说是容易的。

[0053] 本文所用的术语“跨膜区”(简称TM)可以与“跨膜结构域”互换使用,指的是锚定在细胞膜内具有热力学稳定的蛋白质结构区域。跨膜区可以从天然蛋白质中获得,可选自CD8 α 分子或CD28分子。例如,SEQ IDNO:6或7所示氨基酸序列。

[0054] 本文所用的术语“胞内信号结构域”指的是能够传导细胞效应功能信号并指导细胞执行特定功能的蛋白质结构区域。胞内信号结构域可以包括信号传导结构域和/或共刺激信号结构域。

[0055] 本文所用的术语氨基酸序列的“同一性”(identity)可以与“相同性”互换使用,指的是氨基酸序列之间通过序列比对软件例如BLAST确定的相似程度。氨基酸序列比对的方法和软件对于本领域技术人员是公知的。

[0056] 可以通过对已知氨基酸序列进行一个或几个(例如1-15个,例如2、3、5、8、10或12个)氨基酸残基的取代、缺失和/或添加而获得经改造的氨基酸序列。

[0057] 例如,通过常规蛋白质工程手段(例如氨基酸保守取代等),对本发明SEQ ID NO:1所示的CD123结合结构域进行改造,可以获得与SEQ ID NO:1具有至少85%(例如85%~99%或90%~99%或95%~99%)序列同一性,并且具有基本相同的结合CD123能力的变体序列(例如保留至少80%,例如至少85%、90%甚至95%结合能力)。

[0058] 本文所用的术语“scFv”或“scFv抗体”是指单链抗体(single chain antibody fragment, scFv),是由抗体重链可变区和轻链可变区通过15~20个氨基酸的短肽连接而成。

[0059] 优选地,本发明的靶向人CD123的嵌合受体配体还可以包含胞外信号肽结构。例如,IL-3信号肽或CD8 α 信号肽。

[0060] 本发明通过对人IL-3自然分子与共刺激因子等嵌合受体配体结构结合进行设计,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。

[0061] 实施例1构建表达CD123的K562细胞系K562.CD123.Luc

[0062] K562细胞几乎不表达CD123。本发明首先基因合成编码人CD123分子的核苷酸序列,由南京金斯瑞生物科技有限公司提供基因合成技术服务。合成的CD123核苷酸序列在T4连接酶的作用下,20℃过夜连接到预先进行BamHI和XbaI限制酶切位点酶切后的pLVX-Puro(Clontech,货号#632164)慢病毒载体上。将连接产物转化到DH5 α 感受态细胞中并涂布细菌平板,挑取多个克隆斑进行质粒的提取(Qiagen Endofree Mega kit)。经酶切鉴定、测序比对,构建成功的载体命名为pLVX-CD123-Puro。

[0063] 将提取的pLVX-CD123-Puro表达质粒和pCMV- Δ R-8.74及pMD2.G辅助质粒,按一定

比例混合,共转染293FT细胞。转染96h后,收集含有病毒的细胞培养上清,4℃、3000rpm离心5min。上清经0.45μm滤器过滤后,经4℃、25000rpm高速离心120min。弃上清重悬溶解后即获得病毒浓缩液,-80℃保存备用。携带萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase/Luciferase)报告基因的慢病毒载体也采用同样的方法进行制备。

[0064] K562细胞系购自ATCC(货号CCL-243),使用90%IMDM(Life technology,货号A10491-01)+10%FBS(Life technology,货号10099-141)+1%青霉素/链霉素(Life technology,货号15140-122)进行常规培养。将构建的携带CD123基因的慢病毒载体与携带萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase/Luciferase)报告基因的慢病毒载体加入到培养的K562细胞上清中,共同转导K562细胞系。转导后24h,加入终浓度为10μg/ml的Puromycin,每三天换一次培养液并添加相同浓度的Puromycin,进一步进行单克隆的筛选获得一些单克隆细胞。

[0065] 利用流式细胞术对上述获得的单克隆细胞进行CD123的表达鉴定。设置未转导CD123基因的K562细胞作为阴性对照。分别吸取 5×10^5 细胞数的细胞悬液至15ml离心管中,室温离心300g、10min后弃上清,用DPBS重悬洗一次后重悬到200μl DPBS中,再加入2μl anti-CD123-FITC抗体(Miltenyi,货号130-098-886),室温孵育45min。加入1ml DPBS,室温离心300g、10min后弃上清。再次加入1ml DPBS,室温离心300g、10min后弃上清,最后加入200μl的DPBS重悬细胞,并在FACScalibur流式细胞仪(BD公司)上检测FITC的信号。荧光素酶的检测,采用One-Glo Luciferase assay试剂盒(Promega,货号E6110):把每个克隆的细胞密度调整到2000个细胞/20μl,然后加入到384-孔微孔检测板中,然后每孔加入20μl One-Glo Luciferase assay检测试剂,室温离心300g、1min后静置10min,然后在酶标仪PHERAStar(购自BMG公司)上检测化学发光信号。

[0066] 通过上述过程,获得9个高表达CD123分子和Luciferase的稳定细胞系。根据表1所示,所构建的细胞系表达CD123分子的阳性率和Luciferase相对酶活性(RLU,relative light unit,相对发光值)检测结果表明,所构建的不同克隆号的细胞系分别表达不同水平的CD123分子,以及不同水平的Luciferase。克隆8的CD123分子表达水平最高,92.9%的细胞为CD123阳性细胞,而未转导的K562细胞CD123阳性率仅为3.31%。同时,克隆8的Luciferase表达水平也较高,其信号值是未转导的阴性K562细胞对照的659倍(相对酶活性761623/1156)。综合起来克隆8是一个比较好的细胞系,clone 8被命名为K562.CD123.Luc,作为后续的实验工具细胞。

[0067] 表1构建表达CD123的K562细胞系K562.CD123.Luc

[0068]

克隆号	CD123 阳性率	Luciferase 相对酶活性 (RLU)
clone 1	3.27%	27052
clone 2	56.20%	371620
clone 3	70.20%	944192
clone 4	80.80%	360250
clone 5	70.90%	230302
clone 6	73.30%	273153
clone 7	74.10%	211465
clone 8	92.90%	761623
clone 9	85.20%	56267
未转导 K562	3.31%	1156

[0069] 实施例2基于人IL-3分子的靶向人CD123嵌合受体配体的构建

[0070] 本发明通过将人IL-3分子的核苷酸序列进行密码子优化,以利于在人细胞中优化表达。密码子优化利用南京金斯瑞生物科技有限公司OptimumGene™密码子优化技术完成。密码子优化后的IL-3核苷酸序列如SEQ ID NO:39所示,其编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示,由该基因表达的IL-3分子包括IL-3信号肽及IL-3受体结合域。

[0071] 本发明按以下编码基因的顺序设计CD123 CRL融合基因片段:胞外信号肽,基于IL-3的CD123结合结构域,铰链区(Hinge),跨膜区(TM),胞内共刺激信号结构域及胞内信号结构域。融合基因合成由南京金斯瑞生物科技有限公司提供技术服务。本发明所提供的基于IL-3的靶向人CD123的嵌合受体配体的基本结构如表2所示,包括CRL1~CRL6所示嵌合受体配体结构,其对应的嵌合受体配体氨基酸序列分别为SEQ ID NO:14~SEQ ID NO:19所示。

[0072] 本发明同时设计传统CAR作为实验对照,分别以CD8α信号肽、anti-CD123scFv、CD8α铰链区(Hinge)、CD8α跨膜区(TM)、4-1BB胞内共刺激信号结构域及CD3ζ胞内信号结构域顺序通过基因合成技术直接合成该融合基因,如表2所示CAR1、CAR2及CAR3结构。

[0073] 本发明设计的CD123 CRL主要结构成分及序列如下:

[0074] CD123结合结构域:CD123结合结构域包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列中至少100个连续氨基酸序列。在本发明的实施例中,基于IL-3分子的CD123结合结构域包含如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示氨基酸序列。其核苷酸编码序列如SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21所示。

[0075] 胞外信号肽:可选自IL-3信号肽或CD8α信号肽。IL-3信号肽,其氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,其核苷酸编码序列如SEQ ID NO:22所示;CD8α信号肽,其氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,其核苷酸编码序列如SEQ ID NO:23所示。

[0076] 铰链区:可选自多种分子的铰链区,CRL1选用CD8α铰链区,其氨基酸序列如SEQ ID

NO:5所示,其核苷酸编码序列如SEQ ID NO:24所示。

[0077] 跨膜区:可选自CD8 α 跨膜区或CD28跨膜区。CD8 α 跨膜区,其氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,其核苷酸编码序列如SEQ ID NO:25所示;CD28跨膜区,其氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,其核苷酸编码序列如SEQ ID NO:26所示。

[0078] 胞内信号传导结构域:CD3zeta,其氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示,其核苷酸编码序列如SEQ ID NO:27所示。

[0079] 胞内共刺激信号结构域:选自4-1BB信号分子或CD28信号分子。4-1BB信号分子,其氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,其核苷酸编码序列如SEQ ID NO:28所示。CD28信号分子,其氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,其核苷酸编码序列如SEQ ID NO:29所示。

[0080] 表2本发明涉及的主要CRL及CAR组合结构说明

[0081]

编号	CD123 结合结构域来源	其他组分	氨基酸序列
CAR1	32716 scFv	CD8 α 信号肽、4-1BB 共刺激结构域及 CD3 信号传导结构域	SEQ ID NO:11

[0082]

CAR2	26292 scFv	CD8 α 信号肽、4-1BB 共刺激结构域及 CD3 信号传导结构域	SEQ ID NO:12
CAR3	Klon43 scFv	CD8 α 信号肽、4-1BB 共刺激结构域及 CD3 信号传导结构域	SEQ ID NO:13
CRL1	IL-3	IL-3 信号肽、4-1BB 共刺激结构域及 CD3 信号传导结构域	SEQ ID NO:14
CRL2	IL-3	IL-3 信号肽、CD28 共刺激结构域及 CD3 信号传导结构域	SEQ ID NO:15
CRL3	IL-3	IL-3 信号肽、CD28 + 4-1BB 共刺激结构域及 CD3 信号传导结构域	SEQ ID NO:16
CRL4	IL-3	CD8 α 信号肽、4-1BB 共刺激结构域及 CD3 信号传导结构域	SEQ ID NO:17
CRL5	IL-3	CD8 α 信号肽、CD28 共刺激结构域及 CD3 信号传导结构域	SEQ ID NO:18
CRL6	IL-3	CD8 α 信号肽、CD28 + 4-1BB 共刺激结构域及 CD3 信号传导结构域	SEQ ID NO:19

[0083] 实施例3 CD123特异性嵌合受体配体修饰的T细胞的制备

[0084] (一) CD123嵌合受体配体慢病毒表达载体的构建

[0085] 本发明将购自Clontech公司的pLVX-Puro载体经ClaI和EcoRI限制酶的酶切反应,

将CMV启动子敲除,并将人EF1 α 启动子 (GenBank: J04617.1) 克隆到经酶切后的载体上,从而获得pLVX-hEF1 α 载体。将基因合成的CD123 CRL融合基因序列克隆到表达质粒pLVX-hEF1 α 上形成重组CRL表达质粒。提取重组CRL表达质粒 (pLLV-CRL), 并与pCMV-AR-8.74及pMD2.G辅助质粒按一定比例混合,共转染293FT细胞。转染96h后,收集含有病毒的细胞培养上清,4℃、3000rpm离心5min。上清经0.45 μ m滤器过滤后,经4℃、25000rpm高速离心120min。弃上清重悬溶解后即获得病毒浓缩液,-80℃保存备用。

[0086] 通过以上方法获得的重组CRL慢病毒表达载体分别被命名为pLLV-CRL1、pLLV-CRL2、pLLV-CRL3……pLLV-CRL6。

[0087] 作为实验的对照,本发明合成了上述clone 32716、clone 26292和Klon43的scFv抗体序列,并克隆到慢病毒表达载体上,分别命名为pLLV-CAR1、pLLV-CAR2和pLLV-CAR3。

[0088] 构建上述载体使用的是常规的分子生物学技术即酶切、连接、转化、以及克隆鉴定技术,是本行业从业人员能容易掌握和操作的。

[0089] (二) T淋巴细胞的制备

[0090] 取50mL志愿者新鲜外周血,通过淋巴细胞分离液、密度梯度离心方法分离外周血单核细胞(PBMC)。利用Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech) 对细胞进行磁珠标记,并分离纯化出T淋巴细胞。纯化后的T细胞,再利用CD3/CD28磁珠进行T淋巴细胞激活及增殖。

[0091] (三) 慢病毒转导T淋巴细胞

[0092] 收集激活的T淋巴细胞,重悬在RPMI1640培养基中。用慢病毒感染 1×10^6 个活化的T淋巴细胞,将细胞悬液加在6孔板中,置37℃、5%CO₂培养箱中孵育过夜。第二天,再次离心并换新鲜培养基,每隔2天加入新鲜培养基,继续扩大培养。

[0093] (四) 荧光定量实时qPCR法检测CRL的转导效率

[0094] 离心收集制备的CRL-T及CAR-T细胞,分别用DPBS洗3次后利用人基因组提取试剂盒Gentra Puregene Cell Kit (购自Qiagen) 制备基因组DNA。制备的DNA利用NanoDrop2000 (Thermo Scientific) 检测OD_{260nm}和OD_{280nm}吸光度并计算浓度。根据试剂盒SYBR Green Realtime PCR Master mix plus (购自Toyobo) 说明书配置50 μ l反应体系,然后在荧光定量PCR仪 (ABI#7300) 上进行基因拷贝数的检测。qPCR检测采用精确定量的包含目的片段的质粒作为阳性对照,并绘制标准曲线。根据qPCR各个不同拷贝数浓度的CT值与对应的拷贝数绘制直线并拟合标准曲线,其他检测样品根据标准曲线的拟合方程计算相对的拷贝数。

[0095] 本发明中CRL-T细胞表达嵌合受体配体的检测,以CAR-T细胞表达CAR作阳性对照,以未转导的T淋巴细胞(UnT)作为空白对照。

[0096] CRL及CAR整合拷贝数检测结果如表3显示。结果显示:CRL1-T细胞基因组中检测到CRL1基因的整合,且其拷贝数(2.34×10^5 拷贝/ng基因组DNA)与CAR-T细胞中转导的CAR基因拷贝数相当(3.1×10^4 到 2.77×10^5 拷贝/ng基因组DNA),空白对照UnT检测值极低(16个拷贝/ng基因组DNA),属于检测的背景。

[0097] 表3 qPCR法检测CRL的细胞转导效率

[0098]

组别	Ct 检测值 1	Ct 检测值 1	Ct 检测平均值	拷贝数/ng 基因组 DNA
CAR1	18.05	19.88	18.96	3.10E+04
CAR2	18.26	18.32	18.29	4.77E+04
CAR3	15.47	15.62	15.54	2.77E+05
CRL1	15.73	15.89	15.81	2.34E+05

[0099]

UnT	30.77	30.77	30.77	16
-----	-------	-------	-------	----

[0100] 实施例4靶向CD123分子的嵌合受体配体体外活性功能研究

[0101] RPMI8226细胞表达一定水平的CD123受体 (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000185291-IL-3RA/tissue>), 且有报道靶向CD123分子的CAR-T对RPMI8226细胞有较好的体外杀伤作用(WO2015193406A1)。本发明构建了稳定表达Luciferase的RPMI8226细胞系(RPMI8226.Luc), 构建方法可参照实施例1。本发明通过使用RPMI8226.Luc细胞作为模式细胞对CRL-T细胞进行体外功能的研究, 并以CAR1、CAR2、CAR3修饰的T细胞作为对照, 分别命名为CAR1-T、CAR2-T及CAR3-T。

[0102] 分别将CRL-T细胞、CAR-T细胞、及UnT细胞与靶细胞按20:1比例在37℃, 5%CO₂条件下共培养过夜。共培养结束后, 离心后加入ONE-GloTM Luciferase Assay试剂, 并使用PHERAStar Plus检测RLU读值, 评估体外杀伤效果。如图4a所示, 纵坐标显示的是共培养结束后, 反应孔中所剩余的荧光素酶相对活性(RLU, relative light unit)对应孔中活细胞的相对量, 如果显示的荧光素酶RLU值高, 则表示反应孔中剩余的未被杀死的靶细胞多, 表明孔中的细胞杀伤作用弱; 反之, 如果显示的荧光素酶RLU值低, 则表示反应孔中的未被杀死的靶细胞少, 表明孔中的细胞杀伤作用强。

[0103] 如图4a所示, CAR1-T、CAR2-T、CAR3-T及CRL1-T细胞对RPMI8226.Luc细胞均有较好的体外杀伤活性, 其中CAR1-T处理组剩余活细胞的相对Luciferase信号值为 1413 ± 152 , CAR2-T处理组剩余活细胞的相对Luciferase信号值为 3883 ± 423 RLU, CAR3-T处理组剩余活细胞的相对Luciferase信号值为 3184 ± 262 , CRL1-T处理组剩余活细胞的相对Luciferase信号值为 4531 ± 276 , 相对于UnT处理组剩余活细胞的相对Luciferase信号值为 9442 ± 1553 , 显示出良好的杀伤活性。

[0104] 抗原特异性刺激下细胞因子(γ -干扰素/IFN- γ 和白介素2/IL-2)的释放是评估CAR-T体外活性和应用安全性的指标。良好的CAR-T载体可在靶标抗原存在的情况下释放上述细胞因子, 而在靶标抗原缺失的情况下释放水平较低。图4b检测结果显示CAR1-T、CAR2-T、CAR3-T及CRL1-T细胞均能在RPMI8226.Luc细胞存在的情况下释放细胞因子IFN γ 。其中, 尽管CAR1-T显示较CAR2-T、CAR3-T及CRL1-T较好的体外杀伤作用(图4a), 但是CAR1-T在没有RPMI8226.Luc靶细胞存在的情况下能释放出明显高于CAR2-T、CAR3-T及CRL1-T释放的细胞因子IFN γ , 具有较高的非特异性。在没有RPMI8226.Luc靶细胞存在的情况下, CRL1-T显

示出比CAR1-T、CAR2-T及CAR3-T更低的细胞因子IFN γ 释放量,同时CRL1-T对RPMI8226.Luc的杀伤效果与CAR2-T、CAR3-T相当,显示出较好的体外有效性和安全性。

[0105] 实施例5基于IL-3分子的CD123 CRL-T细胞对肿瘤的细胞因子的释放

[0106] 本发明优选CRL1载体进行T细胞修饰,并通过对CD123阳性的肿瘤细胞进行细胞因子IFN- γ 和IL-2的刺激试验。本发明将CRL1-T细胞与不同的靶细胞按比例在37℃、5%CO₂条件下共培养过夜。共培养结束后,将实验微孔板离心200g、5min,然后小心取出部分上清,使用实时荧光分辨技术试剂盒(HTRF,Cisbio#64IL2PEB)检测上清中的IFN- γ 和IL-2的分泌水平。

[0107] 如图5a所示,在过表达CD123分子的K562.CD123.Luc存在的情况下,CRL1-T细胞释放出高水平的IFN- γ (4383 ± 236.1 pg/ml),而阴性T细胞(UnT)释放水平则很低(108.6 ± 23.97 pg/ml),接近基线(29.78 ± 37.52 pg/ml);在K562.CD123.Luc缺失的情况下,CRL1-T细胞释放出极低水平的本底IFN- γ (109.3 ± 10.41 pg/ml),接近基线(29.78 ± 37.52 pg/ml)。而在低表达CD123分子的RPMI8226.Luc细胞刺激下,CRL1-T细胞也能比UnT细胞释放出更高水平的IFN- γ (697.4 ± 0.00 pg/ml, 261.6 ± 3.1 pg/ml)(图5b)。在CD123阴性的A549.Luc细胞刺激的情况下,CRL1-T细胞和UnT细胞对照类似,释放出低水平的IFN- γ (315 ± 0.00 pg/ml, 58.54 ± 11.53 pg/ml)(图5c)。

[0108] 如图6a所示,在过表达CD123分子的K562.CD123.Luc存在的情况下,CRL1-T细胞释放出高水平的IL-2 (2.41 ± 0.06 IU/ml),而UnT细胞释放水平则很低(0.60 ± 0.00 IU/ml),接近基线(0.59 ± 0.00 IU/ml);在缺少K562.CD123.Luc细胞刺激的情况下,CRL1-T细胞释放出极低水平的IL-2 (0.59 ± 0.00 IU/ml),与基线(0.59 ± 0.00 IU/ml)一样。而在低表达CD123分子的RPMI8226.Luc细胞刺激下,CRL1-T细胞释放出的IL-2水平也较低(0.61 ± 0.00 IU/ml)(图6b)。在CD123阴性的A549.Luc细胞刺激的情况下,CRL1-T细胞和UnT细胞阴性对照类似,释放出极低水平的IL-2 (0.60 ± 0.00 IU/ml, 0.60 ± 0.00 IU/ml)(图6c)。

[0109] 实施例6基于IL-3分子的CD123 CRL-T细胞功能性和特异性评估

[0110] 分别将CRL1-T细胞、CAR-T细胞、及UnT细胞与靶细胞按20:1比例在37℃,5%CO₂条件下共培养过夜。共培养结束后,离心后加入ONE-GloTM Luciferase Assay试剂,并使用PHERAStar Plus检测RLU读值,评估体外杀伤效果。如图7所示,同实施例4,纵坐标显示的是共培养结束后,反应孔中所剩余的荧光素酶相对活性RLU对应孔中活细胞的相对量。如果显示的荧光素酶RLU值高,则表示反应孔中剩余的未被杀死的靶细胞多,进而表明孔中的细胞杀伤作用弱;反之,如果显示的荧光素酶RLU值低,则表示反应孔中的未被杀死的靶细胞少,进而表明孔中的细胞杀伤作用强。

[0111] 如图7所示,CRL1-T对过表达CD123的K562.CD123.Luc细胞显示出良好的体外杀伤作用,97.5%的K562.CD123.Luc细胞被CRL1-T杀伤,而不被阴性对照UnT细胞杀伤:CRL1杀伤组剩余细胞Luciferase相对发光值为 7307 ± 3639 ,而阴性对照UnT细胞杀伤组剩余细胞Luciferase相对发光值为 292420 ± 19102 (图7a)。而CRL1-T对CD123阴性的K562.CD19.Luc细胞则几乎没有体外杀伤作用:CRL1杀伤组剩余细胞Luciferase相对发光值为 411629 ± 14399 ,而阴性对照UnT细胞杀伤组剩余细胞Luciferase相对发光值为 458030 ± 11222 (图7b)。图7a和图7b显示出CRL1-T的细胞杀伤具有严格的靶点特异性。

[0112] 本发明进一步在低表达CD123分子的多发性骨髓瘤细胞系RPMI8226.Luc细胞和不

表达CD123分子的肺癌细胞系A549.Luc进行体外的杀伤实验。如图7c所示,同实施例4,CRL1-T细胞对RPMI8226.Luc细胞系具有良好的体外杀伤作用:CRL1杀伤组剩余细胞Luciferase相对发光值为 2467 ± 239.6 ,而阴性对照UnT细胞杀伤组剩余细胞Luciferase相对发光值为 13248 ± 331.3 ;而对不表达CD123分子的肺癌细胞系A549.Luc则完全没有体外杀伤活性:CRL1杀伤组剩余细胞Luciferase相对发光值为 577341 ± 17365 ,而阴性对照UnT细胞杀伤组剩余细胞Luciferase相对发光值为 522895 ± 14198 (图7d)。图7c和图7d进一步显示出CRL1-T细胞的杀伤具有严格的靶点特异性及安全性。

[0113] 本申请文件中未详细记载的实验方法均为本领域的常规技术,可通过申请日以前的文献或技术手段实现。

[0114] 序列

[0115] IL-3受体结合域氨基酸序列:SEQ ID NO:1 1-133aa

[0116] APMTQTTPLKTSWVNCSNMIDEIITHLKQPPLPLLDNFNNLNGEDQDILMENNLRRPNLEAFNRAVK

[0117] SLQNASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIKGDWNEFRRLTFYKLTLENAQAQQTTLSLAIF

[0118] IL-3受体结合域氨基酸序列:SEQ ID NO:2 1-124aa

[0119] APMTQTTPLKTSWVNCSNMIDEI ITHLKQPPLPLLDNFNNLNGEDQDILMENNLRRPNLEAFNRAVK

[0120] SLQNASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIKGDWNEFRRLTFYKLTLENAQAQ

[0121] IL-3信号肽氨基酸序列:SEQ ID NO:3

[0122] MSRLPVLLLLQLLVRPGLQ

[0123] CD8 α 信号肽氨基酸序列:SEQ ID NO:4

[0124] MALPVTALLLPLALLHAARP

[0125] CD8 α 铰链区氨基酸序列:SEQ ID NO:5

[0126] TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

[0127] CD8 α 跨膜区氨基酸序列:SEQ ID NO:6

[0128] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

[0129] CD28跨膜区氨基酸序列:SEQ ID NO:7

[0130] FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV

[0131] CD3 ζ 氨基酸序列:SEQ ID NO:8

[0132] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0133] CD137 (4-1BB) 胞内区氨基酸序列:SEQ ID NO:9

[0134] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0135] CD28胞内区氨基酸序列:SEQ ID NO:10

[0136] RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[0137] CAR1氨基酸序列:SEQ ID NO:11

[0138] MALPVTALLLPLALLHAARPDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGNTFMHWYQQKPGQPP
KLLIYRASNLSEGI PARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPPTFGAGTKLELKGSGSGSGSGG
SQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTNYGMNWVKQAPGKSFKWMGWINTYTGESTYSADFKGRFAFSLETSA
STAYLHINDLKNETATYFCARSGGYDPM DYWGQTSVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE

LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0139] CAR2氨基酸序列:SEQ ID NO:12

[0140] MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNKYPTYFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGNWDDYWGQGTTLTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0141] CAR3氨基酸序列:SEQ ID NO:13

[0142] MALPVTALLLPLALLLHAARPMADYKDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQNVDSAWAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSVPDRFTGRGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQQYYSTPWTFGGGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGGSEVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYMSWVRQPPGKALEWLALIRSKADGYTTEYSASVKGRFTLSRDDQSILYLQMNALRPEDSATYYCARDAAYSYSPEGAMDYWGQGTSTVTSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0143] CRL1氨基酸序列:SEQ ID NO:14

[0144] MSRLPVLLLLQLLVRPGLQAPMTQTTPPKTSWVNCSNMIDEIITHLKQPPLPLLDNFNNLNGEDQDILMENLRRPNLEAFNRAVKSLQNASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIKGDWNEFRRLTFYKLTLENAQAQQTTLSLAIFTSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0145] CRL2氨基酸序列:SEQ ID NO:15

[0146] MSRLPVLLLLQLLVRPGLQAPMTQTTPPKTSWVNCSNMIDEIITHLKQPPLPLLDNFNNLNGEDQDILMENLRRPNLEAFNRAVKSLQNASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIKGDWNEFRRLTFYKLTLENAQAQQTTLSLAIFTSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0147] CRL3氨基酸序列:SEQ ID NO:16

[0148] MSRLPVLLLLQLLVRPGLQAPMTQTTPPKTSWVNCSNMIDEIITHLKQPPLPLLDNFNNLNGEDQDILMENLRRPNLEAFNRAVKSLQNASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIKGDWNEFRRLTFYKLTLENAQAQQTTLSLAIFTSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0149] CRL4氨基酸序列:SEQ ID NO:17

[0150] MALPVTALLLPLALLLHAARP

[0151] APMTQTTPKTSWVNCSNMIDEIITHLKQPPLPLLDNFNNLNGEDQDILMENNLRPNLEAFNRAVKSQ
NASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIKGDWNEFRRLTFYLKTLENAQAQQTTLSLAIFTSTTTPAPRPPTP
APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV
QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0152] CRL5氨基酸序列:SEQ ID NO:18

[0153] MALPVTALLLPLALLLHAARPAPMTQTTPKTSWVNCSNMIDEIITHLKQPPLPLLDNFNNLNGEDQDIL
MENNLRPNLEAFNRAVKSQNASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIKGDWNEFRRLTFYLKTLENAQAQQ
TTLSLAIFTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGP
TRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0154] CRL6氨基酸序列:SEQ ID NO:19

[0155] MALPVTALLLPLALLLHAARPAPMTQTTPKTSWVNCSNMIDEIITHLKQPPLPLLDNFNNLNGEDQDIL
MENNLRPNLEAFNRAVKSQNASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIKGDWNEFRRLTFYLKTLENAQAQQ
TTLSLAIFTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGP
TRKHYPYAPPRDFAAYRSYIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0156] IL-3受体结合域核苷酸序列:SEQ ID NO:201-399

[0157] GCCCAATGACACAGACAACCCCACTGAAAACCTCTTGGGTGAAGTGCAGCAATATGATCGACGAGATC
ATCACACACCTGAAGCAGCCCCCTCTGCCCTGCTGGATTTCAACAATCTGAACGGCGAGGACCAGGATATCCTGAT
GGAGAACAACTCTGAGACGGCCCAACCTGGAGGCCTTTAATCGGGCCGTGAAGAGCCTGCAGAACGCCAGCGCCATCG
AGTCCATCCTGAAGAATCTGCTGCCATGTCTGCCACTGGCAACCGCAGCACCTACAAGGCACCCAATCCACATCAAG
GACGGCGATTGGAATGAGTTCAGGCGCAAGCTGACCTTTTACCTGAAAACACTGGAAAACGCTCAGGCACAGCAGAC
CACACTGTCACTGGCAATCTTC

[0158] IL-3受体结合域核苷酸序列:SEQ ID NO:211-372

[0159] GCCCAATGACACAGACAACCCCACTGAAAACCTCTTGGGTGAAGTGCAGCAATATGATCGACGAGATC
ATCACACACCTGAAGCAGCCCCCTCTGCCCTGCTGGATTTCAACAATCTGAACGGCGAGGACCAGGATATCCTGAT
GGAGAACAACTCTGAGACGGCCCAACCTGGAGGCCTTTAATCGGGCCGTGAAGAGCCTGCAGAACGCCAGCGCCATCG
AGTCCATCCTGAAGAATCTGCTGCCATGTCTGCCACTGGCAACCGCAGCACCTACAAGGCACCCAATCCACATCAAG
GACGGCGATTGGAATGAGTTCAGGCGCAAGCTGACCTTTTACCTGAAAACACTGGAAAACGCTCAGGCACAG

[0160] IL-3信号肽核苷酸序列:SEQ ID NO:22

[0161] ATGAGTAGACTGCCGTGCTGCTGCTGCTGCAGCTGCTGGTGCGACCTGGACTGCAG

[0162] CD8 α 信号肽核苷酸序列:SEQ ID NO:23

[0163] ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG

[0164] CD8 α 铰链区核苷酸序列:SEQ ID NO:24

[0165] ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGAGCCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGCCAGCGGCGGGGGGCGAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGAT

[0166] CD8 α 跨膜区核苷酸序列:SEQ ID NO:25

[0167] ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTAC
TGC

[0168] CD28跨膜区核苷酸序列:SEQ ID NO:26

[0169] TTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGC
TAGTAACAGTGG

[0170] CD3z核苷酸序列:SEQ ID NO:27

[0171] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG
CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCC
GAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG
GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACC
TACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[0172] CD137 (4-1BB) 胞内区核苷酸序列:SEQ ID NO:28

[0173] AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAA
GAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

[0174] CD28胞内区核苷酸序列:SEQ ID NO:29

[0175] CCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGAACATGACTC
CCCGCGCCCCGGGCCCCACCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC

[0176] CAR1核苷酸序列:SEQ ID NO:30

[0177] ATGGCTCTGCCCGTGACCGCACTGCTGCTGCCCCTGGCTCTGCTGCTGCACGCCGCCGACCTGGAAGC
GACATCGTCCTGACACAGAGCCCAGCATCCCTGGCCGTGTCCCTGGGACAGCGGGCCACCATCTCTTGCAAGCCTC
TGAGAGCGTGGACAACCTACGGCAATACATTCATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGA
TCTACCGGGCTCCAACCTGGAGTCTGGCATCCCCGCAAGGTTCTCCGATCTGGCAGCCGCACCGACTTTACCCTG
ACAATCAACCCTGTGGAGGCCGACGATGTGGCCACATACTATTGCCAGCAGAGCAATGAGGATCCACCCACCTTTGG
CGCCGGCACAAGCTGGAGCTGAAGGGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAAGCTCCGGAGGAGGCTCTCAGATCC
AGCTGGTGCAGAGCGGCCCTGAGCTGAAGAAGCCAGGCGAGACAGTGAAGATCAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACATC
TTCACAACTATGGCATGAATTGGGTGAAGCAGGCCCTGGCAAGTCTTTTAAGTGGATGGGCTGGATCAATACCTA
CACAGGCGAGTCTACCTATAGCGCCGATTTCAAGGGCCGGTTTCGCCCTTTAGCCTGGAGACAAGCGCCTCTACAGCCT
ACCTGCACATCAACGACCTGAAGAATGAGGATACCGCCACATATTTTGTGCCAGGTCAGGGGGGTATGATCCTATG
GACTATTGGGGGCAGGGGACCTCCGTGACCGTCTCAAGCACTAGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACC
GGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACA
CGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCA
CTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGT
ACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGA
AGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGA
AGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCC
TCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC
GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCAC
ATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[0178] CAR2核苷酸序列:SEQ ID NO:31

[0179] ATGGCCCTGCCCCGTCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCAAGACCCGATGTC
CAGATTACTCAGAGCCCATCTACCTGGCCGCCCTCTCCCGGCGAGACAATCACAATCAACTGCAGGGCCTCCAAGTC
TATCAGCAAGGACCTGGCCTGGTACCAGGAGAAGCCCGGCAAGACCAATAAGCTGCTGATCTATTCCGGCTCTACAC
TGCAGTCTGGCATCCCTAGCAGGTTACGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGGAG
CCTGAGGATTTGCGCATGTACTATTGCCAGCAGCACAACAAGTACCCATATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGA
GATCAAGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGCGGCGGCTCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCCGGCG
CCGAGCTGGTGCAGCCTGGAGCATCCGTGAAGCTGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATG
AACTGGGTGAAGCAGCGGCCAGACCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAGAATCGACCCCTACGATAGCGAGACACACTA
TAATCAGAAGTTTAAAGACAAGGCCATCTGACCGTGGATAAGTCTAGCTCCACAGCCTATATGCAGCTGTCTAGCC
TGACAAGCGAGGATTCCGCCGTGACTATTGTGCTCGGGGAACTGGGATGACTATTGGGGACAGGGGACAACTCTG
ACCGTCTCAAGCACTAGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCT
GTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATA
TCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGG
GGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTG
TAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG
CGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAG
AGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCA
GAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCC
TTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[0180] CAR3核苷酸序列:SEQ ID NO:32

[0181] ATGGCTCTGCCTGTGACCGCACTGCTGCTGCCCCCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCGCCCTATGGCC
GACTATAAAGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAGTTCATGTCTACAAGCGTGGGCGACCGGTGAACATCACCTG
CAAGGCCTCCCAGAATGTGGATTCTGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCCAAGGCCCTGATCT
ATTCCGCCTCTTACCGGTATTCTGGAGTGCTGACAGGTTACCCGGAAGAGGAAGCGGCACAGATTTTACCCTGACA
ATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGTGTACTATTGCCAGCAGTACTATAGCACCCCATGGACATTTGGCGG
CGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGATCCGGCGGCGGCGGCTCTGAGGTGA
AGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAGCCAGGAGGCAGCCTGTCCCTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTACC
TTTACAGACTACTATATGTCTGGGTGAGGCAGCCACCTGGAAAGGCAGTGGAGTGGCTGGCACTGATCAGGAGCAA
GGCCGATGGCTACACCACAGAGTATAGCGCCTCCGTGAAGGGCAGGTTACCCCTGTCCCGCGACGATTCTCAGAGCA
TCCTGTACCTGCAGATGAACGCACTGCGGCCTGAGGACTCCGCAACATACTATTGTGCCAGAGATGCCGCCTACTAT
TCTTACTATTACCCAGAAGGGGCTATGGATTATTGGGGGCAGGGGACAAGCGTCACCGTCTCATCATCAACTAGTAC
CACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGT
GCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTG
GCCGGGACTTGTGGGGTCCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTA
TATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAG
AAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAAC
CAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGA
GATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG
CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACA

GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[0182] CRL1核苷酸序列:SEQ ID NO:33

[0183] ATGAGTAGACTGCCCCGTGCTGCTGCTGCTGCAGCTGCTGGTGCGACCTGGACTGCAGGCCCAATGACA
CAGACAACCCCACTGAAAACCTCTTGGGTGAAGTGCAGCAATATGATCGACGAGATCATCACACACCTGAAGCAGCC
CCCTCTGCCCCCTGCTGGATTTCAACAATCTGAACGGCGAGGACCAGGATATCCTGATGGAGAACAATCTGAGACGGC
CCAACCTGGAGGCCTTTAATCGGGCCGTGAAGAGCCTGCAGAACGCCAGCGCCATCGAGTCCATCCTGAAGAATCTG
CTGCCATGTCTGCCACTGGCAACCGCAGCACCTACAAGGCACCCAATCCACATCAAGGACGGCGATTGGAATGAGTT
CAGGCGCAAGCTGACCTTTTACCTGAAAACACTGGAAAACGCTCAGGCACAGCAGACCACACTGTCACTGGCAATCT
TCACTAGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTG
GGCGCCCTTGCGCGGGACTTGTGGGGTCCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGA
AACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGA
TTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCA
GGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCC
GGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAG
ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGG
TCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[0184] CRL2核苷酸序列:SEQ ID NO:34

[0185] ATGAGTAGACTGCCCCGTGCTGCTGCTGCTGCTGCAGCTGCTGGTGCGACCTGGACTGCAGGCCCAATGACA
CAGACAACCCCACTGAAAACCTCTTGGGTGAAGTGCAGCAATATGATCGACGAGATCATCACACACCTGAAGCAGCC
CCCTCTGCCCCCTGCTGGATTTCAACAATCTGAACGGCGAGGACCAGGATATCCTGATGGAGAACAATCTGAGACGGC
CCAACCTGGAGGCCTTTAATCGGGCCGTGAAGAGCCTGCAGAACGCCAGCGCCATCGAGTCCATCCTGAAGAATCTG
CTGCCATGTCTGCCACTGGCAACCGCAGCACCTACAAGGCACCCAATCCACATCAAGGACGGCGATTGGAATGAGTT
CAGGCGCAAGCTGACCTTTTACCTGAAAACACTGGAAAACGCTCAGGCACAGCAGACCACACTGTCACTGGCAATCT
TCACTAGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTG
GGCGCCCTTGCGCGGGACTTGTGGGGTCCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCCCTTTATTATTTTCTG
GGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGGCCACCCGCA
AGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAC
GCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT
GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATG
AACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCAC
GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCG
CTAA

[0186] CRL3核苷酸序列:SEQ ID NO:35

[0187] ATGAGTAGACTGCCCCGTGCTGCTGCTGCTGCTGCAGCTGCTGGTGCGACCTGGACTGCAGGCCCAATGACA
CAGACAACCCCACTGAAAACCTCTTGGGTGAAGTGCAGCAATATGATCGACGAGATCATCACACACCTGAAGCAGCC
CCCTCTGCCCCCTGCTGGATTTCAACAATCTGAACGGCGAGGACCAGGATATCCTGATGGAGAACAATCTGAGACGGC
CCAACCTGGAGGCCTTTAATCGGGCCGTGAAGAGCCTGCAGAACGCCAGCGCCATCGAGTCCATCCTGAAGAATCTG

CTGCCATGTCTGCCACTGGCAACCGCAGCACCTACAAGGCACCCAATCCACATCAAGGACGGCGATTGGAATGAGTT
CAGGCGCAAGCTGACCTTTTACCTGAAAAACTGGAAAAAGCTCAGGCACAGCAGACCACACTGTCACTGGCAATCT
TCACTAGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTG
GGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCCCTTTATTATTTTCTG
GGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGGCCACCCGCA
AGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTAT
ATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGA
AGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACC
AGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGC
CTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAG
CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[0188] CRL4核苷酸序列:SEQ ID NO:36

[0189] ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGCCCCA
ATGACACAGACAACCCCACTGAAAACTCTTGGGTGAACTGCAGCAATATGATCGACGAGATCATCACACACCTGAA
GCAGCCCCCTCTGCCCCTGCTGGATTTCAACAATCTGAACGGCGAGGACCAGGATATCCTGATGGAGAACAATCTGA
GACGGCCCAACCTGGAGGCCTTTAATCGGGCCGTGAAGAGCCTGCAGAACGCCAGCGCCATCGAGTCCATCCTGAAG
AATCTGCTGCCATGTCTGCCACTGGCAACCGCAGCACCTACAAGGCACCCAATCCACATCAAGGACGGCGATTGGAA
TGAGTTCAGGCGCAAGCTGACCTTTTACCTGAAAAACTGGAAAAAGCTCAGGCACAGCAGACCACACTGTCACTGG
CAATCTTCACTAGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCC
CTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTA
CATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGGGGCA
GAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGC
TGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTA
CCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGAC
GTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAA
GATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTA
CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[0190] CRL5核苷酸序列:SEQ ID NO:37

[0191] ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGCCCCA
ATGACACAGACAACCCCACTGAAAACTCTTGGGTGAACTGCAGCAATATGATCGACGAGATCATCACACACCTGAA
GCAGCCCCCTCTGCCCCTGCTGGATTTCAACAATCTGAACGGCGAGGACCAGGATATCCTGATGGAGAACAATCTGA
GACGGCCCAACCTGGAGGCCTTTAATCGGGCCGTGAAGAGCCTGCAGAACGCCAGCGCCATCGAGTCCATCCTGAAG
AATCTGCTGCCATGTCTGCCACTGGCAACCGCAGCACCTACAAGGCACCCAATCCACATCAAGGACGGCGATTGGAA
TGAGTTCAGGCGCAAGCTGACCTTTTACCTGAAAAACTGGAAAAAGCTCAGGCACAGCAGACCACACTGTCACTGG
CAATCTTCACTAGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCC
CTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTA
CATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCCCTTTATTAT

TTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCA
CCCGAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC
GCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGA
TGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGT
ACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAG
GGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCC
CCCTCGC

[0192] CRL6核苷酸序列:SEQ ID NO:38

[0193] ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGCCCA
ATGACACAGACAACCCCACTGAAAACCTCTTGGGTGAACTGCAGCAATATGATCGACGAGATCATCACACACCTGAA
GCAGCCCCCTCTGCCCCTGCTGGATTTCAACAATCTGAACGGCGAGGACCAGGATATCCTGATGGAGAACAATCTGA
GACGGCCCAACCTGGAGGCCTTTAATCGGGCCGTGAAGAGCCTGCAGAACGCCAGCGCCATCGAGTCCATCCTGAAG
AATCTGCTGCCATGTCTGCCACTGGCAACCGCAGCACCTACAAGGCACCCAATCCACATCAAGGACGGCGATTGGAA
TGAGTTCAGGCGCAAGCTGACCTTTTACCTGAAAACACTGGAAAACGCTCAGGCACAGCAGACCACACTGTCACTGG
CAATCTTCACTAGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCC
CTGCGCCCAGAGGCGTGCCGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTA
CATCTGGGCGCCCTTGCGCCGGGACTTGTTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCCCTTTATTAT
TTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCA
CCCGAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAAACGGGGCAGAAAGAAACTC
CTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTC
AGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCC
AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGAC
CCTGAGATGGGGGAAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC
GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCA
GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[0194] 密码子优化后的IL-3核苷酸序列:SEQ ID NO:39

[0195] ATGAGTAGACTGCCCCGTGCTGCTGCTGCTGCAGCTGCTGGTGGACCTGGACTGCAGGCCCAATGACA
CAGACAACCCCACTGAAAACCTCTTGGGTGAACTGCAGCAATATGATCGACGAGATCATCACACACCTGAAGCAGCC
CCCTCTGCCCCTGCTGGATTTCAACAATCTGAACGGCGAGGACCAGGATATCCTGATGGAGAACAATCTGAGACGGC
CCAACCTGGAGGCCTTTAATCGGGCCGTGAAGAGCCTGCAGAACGCCAGCGCCATCGAGTCCATCCTGAAGAATCTG
CTGCCATGTCTGCCACTGGCAACCGCAGCACCTACAAGGCACCCAATCCACATCAAGGACGGCGATTGGAATGAGTT
CAGGCGCAAGCTGACCTTTTACCTGAAAACACTGGAAAACGCTCAGGCACAGCAGACCACACTGTCACTGGCAATCT
TC

[0196] IL-3氨基酸序列:SEQ ID NO:40

[0197] MSRLPVLLLL QLLVRPGLQA PMTQTTP LKT SWVNCSNMID EIITHLKQPP

[0198] LPLLDFFNNLN GEDQDILMEN NLRRPNLEAF NRAVKSLQNA SAIESILKNL

[0199] LPCLPLATAA PTRHPIHIKD GDWNEFRRKL TFYLKTLNA QAQQTTLSLAIF

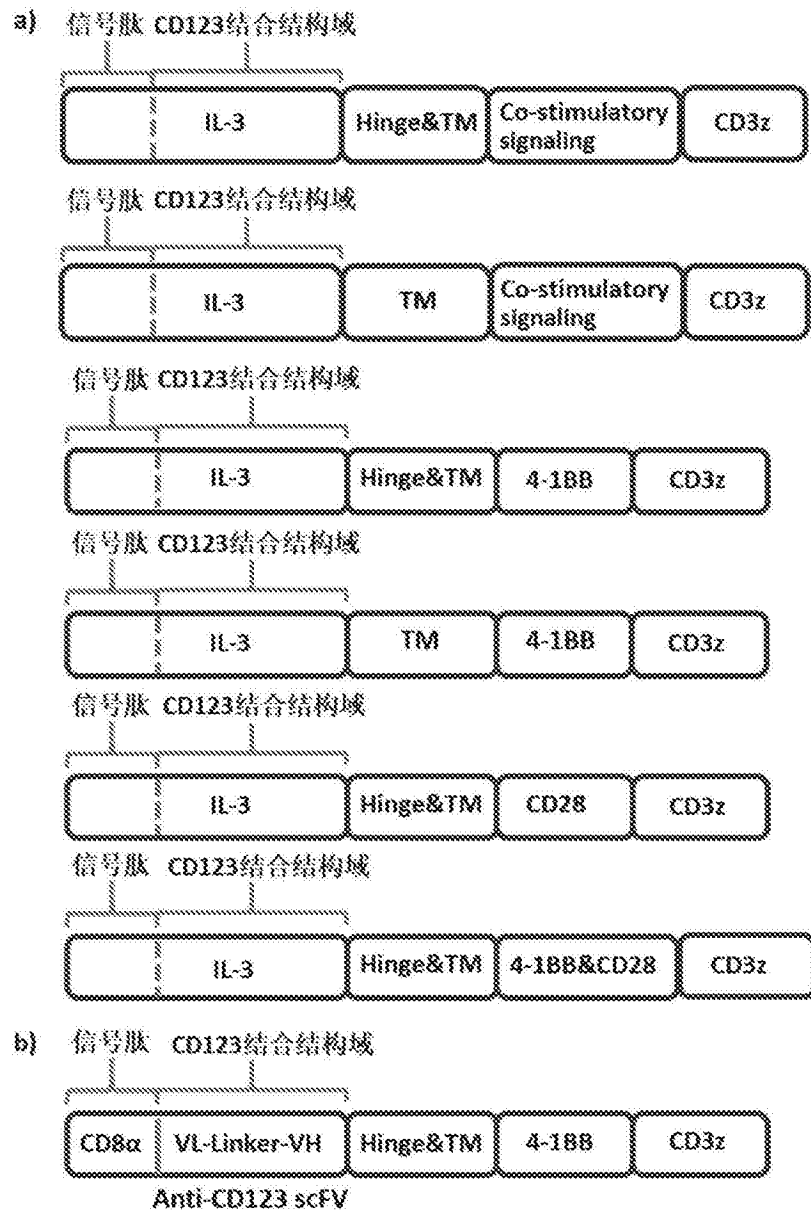


图1

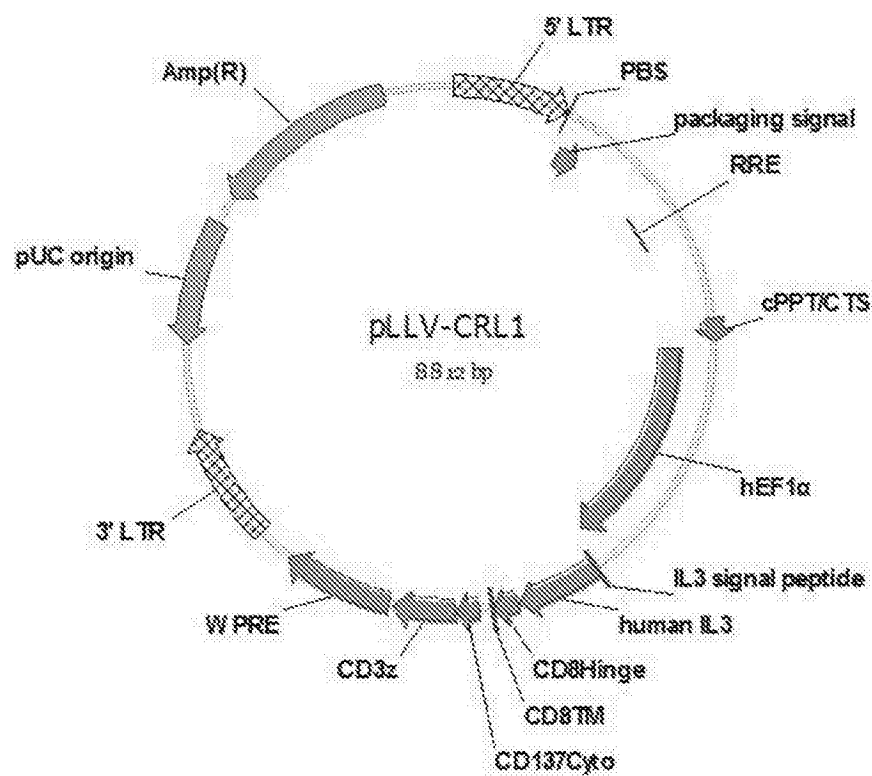


图2

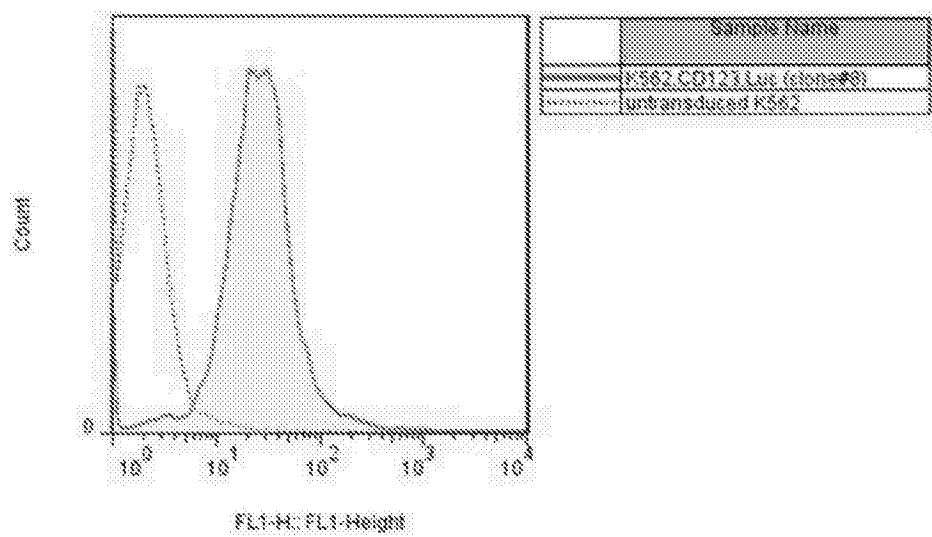


图3

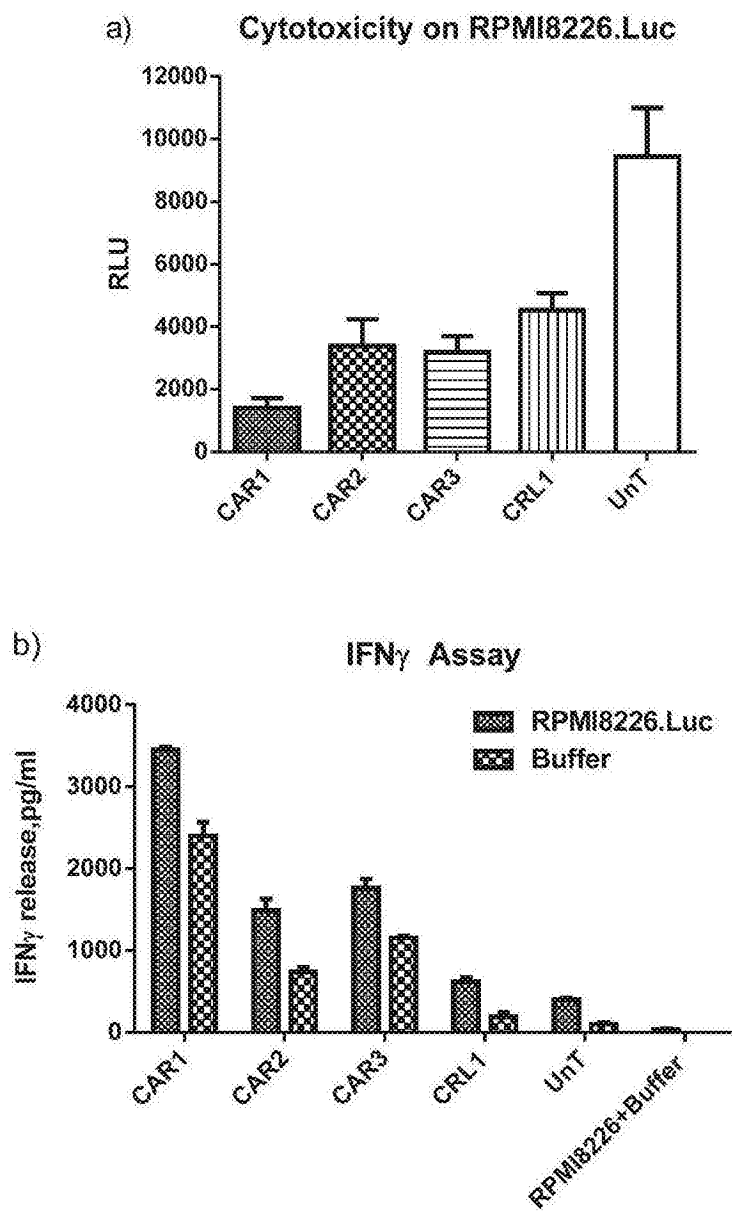


图4

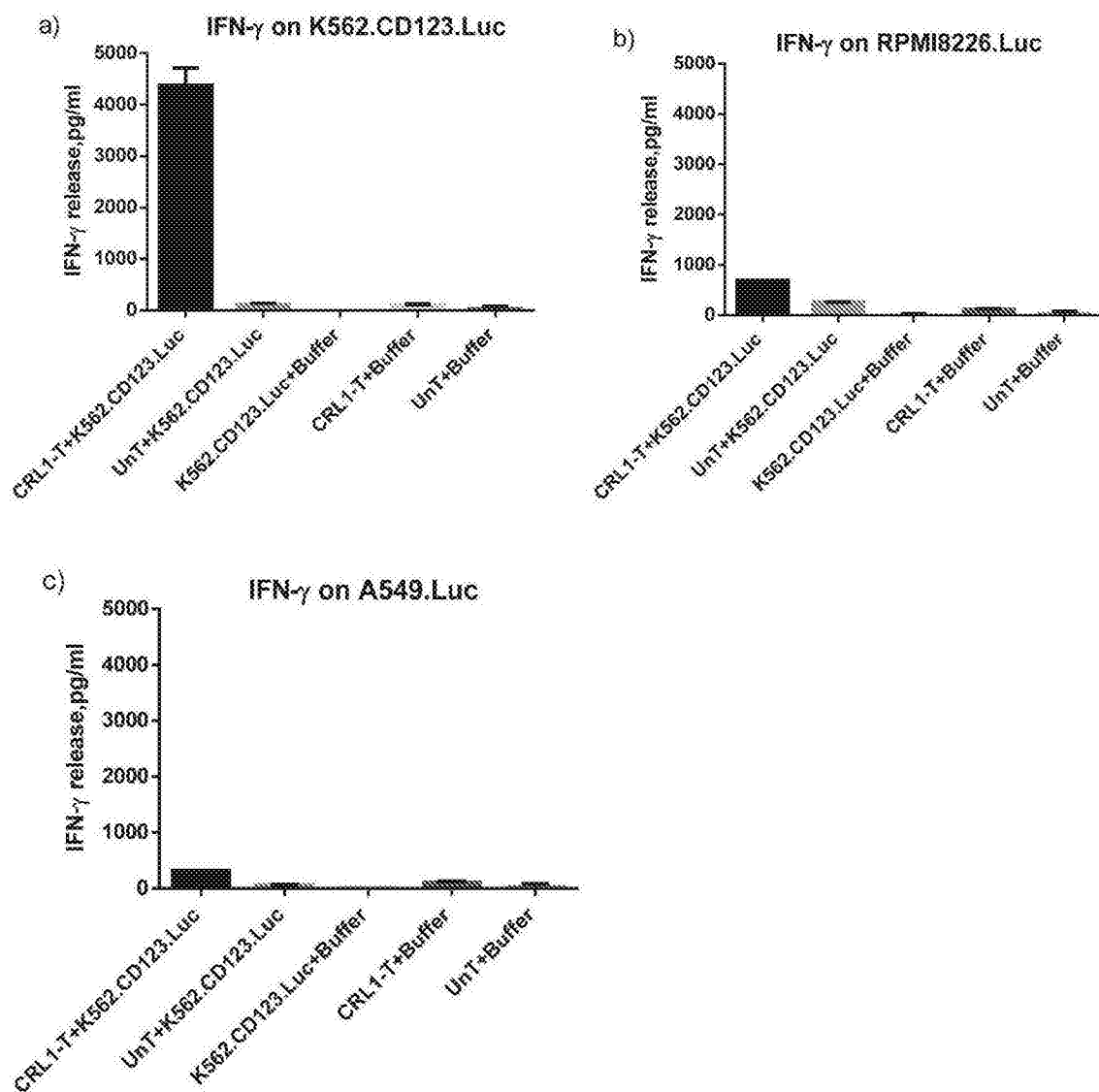


图5

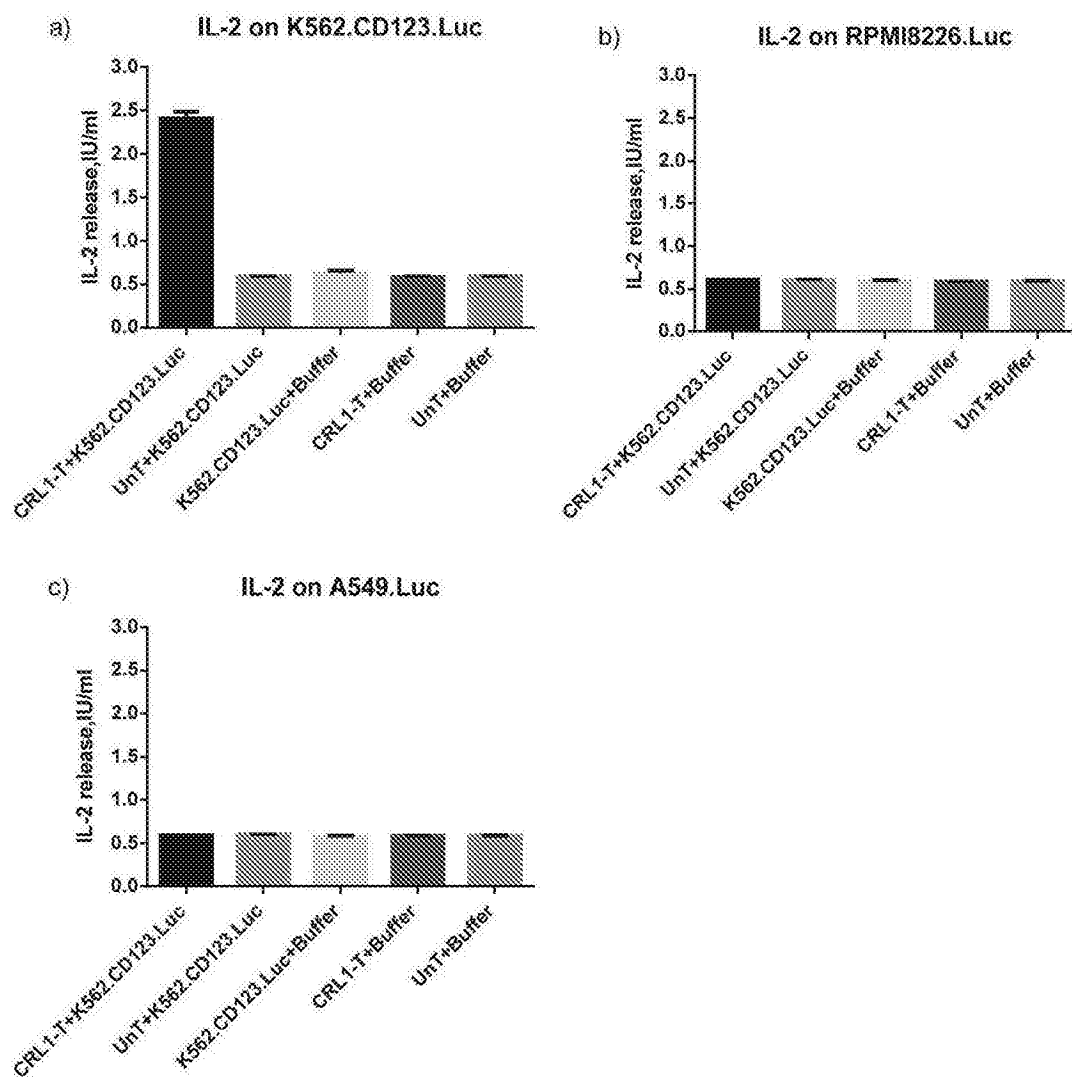


图6

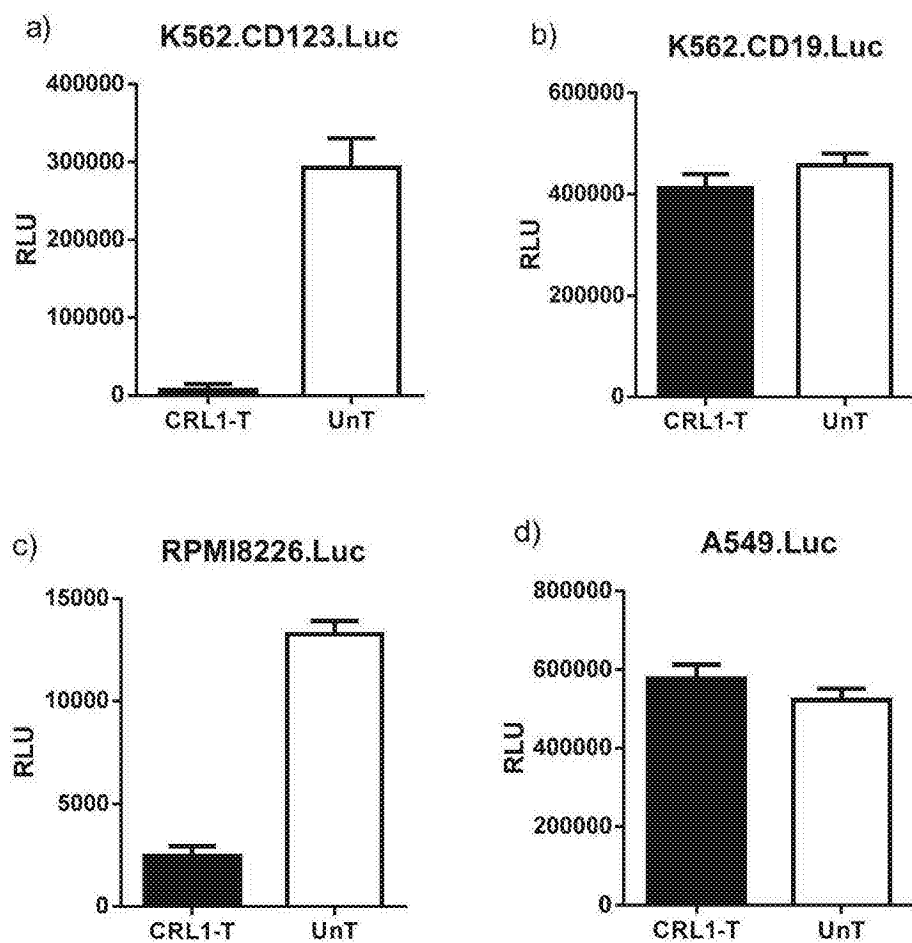


图7