



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109321530 B

(45) 授权公告日 2021.03.12

(21) 申请号 201810146084.8

审查员 黄炎

(22) 申请日 2018.02.12

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109321530 A

(43) 申请公布日 2019.02.12

(73) 专利权人 华东师范大学

地址 200241 上海市闵行区东川路500号

专利权人 上海邦耀生物科技有限公司

(72) 发明人 江文正 陶雷 胡雪菲 苏琼

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限

公司 31266

代理人 王正君 徐迅

(51) Int. Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书17页

序列表6页 附图2页

(54) 发明名称

一种安全型嵌合抗原受体T细胞及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种安全型嵌合抗原受体T细胞及其用途,具体地,本发明提供了一种表达靶向HLA结合域的第一CAR和靶向肿瘤抗原的第二CAR。本发明的工程化免疫细胞可选择性杀伤肿瘤细胞,还可保护正常细胞免受杀伤作用。

1. 一种工程化免疫细胞,其特征在于,所述工程化免疫细胞包括表达靶向HLA结合域的第一CAR和靶向肿瘤抗原的第二CAR,

并且所述第一CAR的结构如式I所示:

L1-T1-Z1-Z2-TM1-C1 (I)

式中,

L1为任选的信号肽序列;

T1为HLA结合域,所述HLA结合域包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的胞外段,所述HLA结合域为杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的KIR2DL2的胞外段;

Z1为无或绞链区;

Z2为无或间隔序列区;

TM1为跨膜结构域;

C1为胞内T细胞抑制信号转导域,所述C1选自下组:程序性死亡因子-1(PD-1)的胞内段、CTLA-4、LAG-3、2B4、BTLA、TIM-3、或其组合;

所述第二CAR的结构如式II所示:

L2-T2-Z3-TM2-C2-CD3 ζ (II)

式中,

L2为任选的信号肽序列;

T2为肿瘤抗原结合域;和

Z3为无或绞链区;

TM2为跨膜结构域;

C2为共刺激信号分子;

CD3 ζ 为源于CD3 ζ 的胞浆信号传导序列,并且所述第二CAR为靶向CD19的CAR;

并且上述各式中,各“-”独立地为连接肽或肽键。

2. 如权利要求1所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述工程化免疫细胞还包括表达第三抗原结合域的第三CAR,所述第三抗原结合域选自下组:OPCML、HYAL2、DCC、SMAR1、E-cadherin、或其组合。

3. 如权利要求2所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述第三CAR具有式III所示的结构:

L3-T3-Z4-Z5-TM3-C3 (III)

式中,

L3为任选的信号肽序列;

T3为第三抗原结合域,所述第三抗原结合域选自下组:OPCML、HYAL2、DCC、SMAR1、E-cadherin、或其组合;

Z4为无或绞链区;

Z5为无或间隔序列区;

TM3为跨膜结构域;

C3为胞内T细胞抑制信号转导域;

并且各“-”独立地为连接肽或肽键。

4. 如权利要求1所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述HLA结合域包括HLA-C1结合

域。

5. 如权利要求1或3所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述的L1、L2和L3各自独立地为选自下组的蛋白的信号肽:CD8、CD28、GM-CSF、CD4、CD137、或其组合。

6. 如权利要求1或3所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述的Z1、Z3和Z4各自独立地为选自下组的蛋白的铰链区:CD8、CD28、CD137、或其组合。

7. 如权利要求1或3所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述Z2和Z5为选自下组的间隔物域:CD8、CD28、或其组合。

8. 如权利要求3所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述C3选自下组:程序性死亡因子-1(PD-1)的胞内段、CTLA-4、LAG-3、2B4、BTLA、TIM-3、或其组合。

9. 如权利要求1或3所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述的TM1、TM2和TM3各自独立地为选自下组的蛋白的跨膜区:CD28、CD3 epsilon(T细胞表面糖蛋白)、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、或其组合。

10. 如权利要求1所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述的C2为选自下组的蛋白的共刺激信号分子:OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD134、4-1BB(CD137)、PD1、Dap10、CDS、ICAM-1、LFA-1、ICOS(CD278)、NKG2D、GITR、TLR2、或其组合。

11. 如权利要求10所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述LFA-1包括CD11a/CD18。

12. 如权利要求1所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述肿瘤抗原结合域为抗体或抗原结合片段。

13. 如权利要求1所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述第一CAR的氨基酸序列如SEQ ID No.:5所示。

14. 一种制备工程化免疫细胞的方法,其特征在于,所述免疫细胞包括表达靶向HLA结合域的第一CAR和靶向肿瘤抗原的第二CAR,其中所述方法包括步骤:

向所述免疫细胞导入编码表达靶向HLA结合域的第一CAR的核酸序列和编码靶向肿瘤抗原的第二CAR的编码序列,从而获得工程化免疫细胞,其中所述第一CAR和第二CAR的结构如权利要求1中所定义。

15. 如权利要求14所述的方法,其特征在于,所述方法还包括表达向所述免疫细胞导入编码第三抗原结合域的第三CAR的编码序列。

16. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物含有权利要求1所述的工程化免疫细胞;以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

17. 一种权利要求1所述的工程化免疫细胞的用途,其特征在于,用于制备选择性杀伤肿瘤细胞的药物或制剂。

18. 一种用于选择性杀伤肿瘤细胞的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有容器,以及位于容器内的权利要求1所述的工程化免疫细胞。

一种安全型嵌合抗原受体T细胞及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫治疗领域,具体地,涉及一种安全型嵌合抗原受体T细胞及其用途。

背景技术

[0002] 肿瘤免疫治疗被认为是继手术、放疗、化疗后的第四种肿瘤治疗方式,细胞免疫治疗是免疫治疗极其重要的组成部分。通过转基因方式表达嵌合抗原受体(Chimerical Antigen Receptor, CAR)的T/NK细胞,即CAR-T/CAR-NK是国际上最广泛应用的细胞类型,该类细胞能特异性地识别肿瘤细胞表面的靶点,进而被激活,特异性地杀伤靶细胞。

[0003] 现有CAR-T细胞产品是向T细胞导入提供激活信号的CAR基因制备而成,只赋予T细胞简单地执行识别,激活,杀伤功能,产生严重的副作用。目前CAR-T识别的靶点为肿瘤相关抗原或某一细胞类型的特异性生物标志物,而这些靶点也会在正常细胞上表达,导致CAR-T细胞会靶向正常组织细胞,产生脱靶效应(on target off tumor),造成致命的并发症。如CAIX-CART治疗转移性肾癌,结果靶向正常胆管细胞,引起胆管炎;Her2-CAR-T治疗转移性结直肠癌,结果靶向肺上皮细胞,引起肺水肿、呼吸衰竭;CD19-CAR-T治疗B细胞血液肿瘤,结果靶向正常B细胞,引起B细胞发育不良。

[0004] 因此本领域迫切需要开发一种只对肿瘤细胞具有杀伤效果,而不杀伤正常细胞的安全型的嵌合抗原受体T细胞。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种只对肿瘤细胞具有杀伤效果,而不杀伤正常细胞的安全型的嵌合抗原受体T细胞。

[0006] 本发明第一方面提供了一种工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞包括表达靶向HLA结合域的第一CAR和靶向肿瘤抗原的第二CAR,

[0007] 并且所述第一CAR的结构如式I所示:

[0008] L1-T1-Z1-Z2-TM1-C1 (I)

[0009] 式中,

[0010] L1为任选的信号肽序列;

[0011] T1为HLA结合域,所述HLA结合域包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的胞外段;

[0012] Z1为无或绞链区;

[0013] Z2为无或间隔物域(或间隔序列区);

[0014] TM1为跨膜结构域;

[0015] C1为胞内T细胞抑制信号转导域;

[0016] 所述第二CAR的结构如式II所示:

[0017] L2-T2-Z3-TM2-C2-CD3 ζ (II)

[0018] 式中,

- [0019] L2为任选的信号肽序列；
- [0020] T2为肿瘤抗原结合域；和
- [0021] Z3为无或绞链区；
- [0022] TM2为跨膜结构域；
- [0023] C2为共刺激信号分子；
- [0024] CD3 ζ 为源于CD3 ζ 的胞浆信号传导序列；
- [0025] 并且上述各式中，各“-”独立地为连接肽或肽键。
- [0026] 在另一优选例中，所述工程化免疫细胞还包括表达第三抗原结合域的第三CAR，所述第三抗原结合域选自下组：OPCML、HYAL2、DCC、SMAR1、E-cadherin、或其组合。
- [0027] 在另一优选例中，所述第三CAR具有式III所示的结构：
- [0028] L3-T3-Z4-Z5-TM3-C3 (III)
- [0029] 式中，
- [0030] L3为任选的信号肽序列；
- [0031] T3为第三抗原结合域，所述第三抗原结合域选自下组：OPCML、HYAL2、DCC、SMAR1、E-cadherin、或其组合；
- [0032] Z4为无或绞链区；
- [0033] Z5为无或间隔物域；
- [0034] TM3为跨膜结构域；
- [0035] C3为胞内T细胞抑制信号转导域；
- [0036] 并且各“-”独立地为连接肽或肽键。
- [0037] 在另一优选例中，所述第一CAR、第二CAR和任选的第三CAR定位于所述免疫细胞的细胞膜。
- [0038] 在另一优选例中，所述免疫细胞的细胞膜上表达有所述第一CAR、所述第二CAR和任选的所述第三CAR。
- [0039] 在另一优选例中，所述第一CAR、所述第二CAR和任选的所述第三CAR经重组表达。
- [0040] 在另一优选例中，所述第一CAR、所述第二CAR和任选的所述第三CAR由载体表达。
- [0041] 在另一优选例中，所述第一CAR、所述第二CAR和任选的所述第三CAR是外源性或内源性的。
- [0042] 在另一优选例中，所述HLA结合域还包含Fab、scFv、配体、特异性配体和/或多价配体。
- [0043] 在另一优选例中，所述HLA结合域包括HLA-C1结合域。
- [0044] 在另一优选例中，所述HLA结合域包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的KIR2DL2的胞外段。
- [0045] 在另一优选例中，所述的L1、L2和L3各自独立地为选自下组的蛋白的信号肽：CD8、CD28、GM-CSF、CD4、CD137、或其组合。
- [0046] 在另一优选例中，所述的Z1、Z3和Z4各自独立地为选自下组的蛋白的绞链区：CD8、CD28、CD137、或其组合。
- [0047] 在另一优选例中，所述Z2和Z5为选自下组的间隔物域：CD8、CD28、或其组合。
- [0048] 在另一优选例中，所述C1和C3各自独立地选自下组：程序性死亡因子-1(PD-1)的

胞内段、CTLA-4、LAG-3、2B4、BTLA、TIM-3、或其组合。

[0049] 在另一优选例中,所述的TM1、TM2和TM3各自独立地为选自下组的蛋白的跨膜区:CD28、CD3epsilon、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、或其组合。

[0050] 在另一优选例中,所述的C2为选自下组的蛋白的共刺激信号分子:OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD134、4-1BB (CD137)、PD1、Dap10、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、NKG2D、GITR、TLR2、或其组合。

[0051] 在另一优选例中,所述肿瘤抗原结合域为抗体或抗原结合片段。

[0052] 在另一优选例中,所述抗原结合片段是Fab或scFv或单结构域抗体sdFv。

[0053] 在另一优选例中,所述的免疫细胞选自下组:

[0054] (i) 嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T细胞);

[0055] (ii) 嵌合抗原受体NK细胞 (CAR-NK细胞);或

[0056] (iii) 外源T细胞受体 (TCR) T细胞 (TCR-T细胞)。

[0057] 在另一优选例中,所述免疫细胞为自体的。

[0058] 在另一优选例中,所述免疫细胞为非自体的。

[0059] 在另一优选例中,所述第一CAR的氨基酸序列如SEQ ID No.:5所示。

[0060] 此外,本发明还提供了本发明第一CAR和/或第二CAR的氨基酸序列、编码第一CAR和/或第二CAR的核酸序列以及含所述核酸序列的载体。

[0061] 在另一优选例中,一种编码本发明第一CAR的核酸序列如SEQ ID No.:6所示。

[0062] 本发明第二方面提供了一种制备工程化免疫细胞的方法,所述免疫细胞包括表达靶向HLA结合域的第一CAR和靶向肿瘤抗原的第二CAR,其中所述方法包括步骤:

[0063] 向所述免疫细胞导入编码表达靶向HLA结合域的第一CAR的核酸序列和编码靶向肿瘤抗原的第二CAR的编码序列,从而获得工程化免疫细胞,其中所述第一CAR和第二CAR的结构如本发明第一方面中所定义。

[0064] 在另一优选例中,所述导入包括同时、先后、或依次导入。

[0065] 在另一优选例中,所述方法还包括表达向所述免疫细胞导入编码第三抗原结合域的第三CAR的编码序列。

[0066] 本发明第三方面提供了一种药物组合物,所述药物组合物含有本发明第一方面所述的工程化免疫细胞;以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0067] 在另一优选例中,所述药物组合物为液态制剂。

[0068] 在另一优选例中,所述药物组合物的剂型为注射剂。

[0069] 在另一优选例中,所述的工程化免疫细胞是 (i) 嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T细胞);或 (ii) 嵌合抗原受体NK细胞 (CAR-NK细胞)。

[0070] 在另一优选例中,所述药物组合物中,所述CAR-T细胞或CAR-NK细胞的浓度为 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^6$ 个细胞/Kg体重,较佳地 $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ 个细胞/Kg体重。

[0071] 在另一优选例中,所述药物组合物还含有选择性杀伤肿瘤细胞的其他药物 (如新兴的抗体药物、其他CAR-T药物或化疗药物)。

[0072] 本发明第四方面提供了一种本发明第一方面所述的工程化免疫细胞的用途,用于制备选择性杀伤肿瘤细胞的药物或制剂。

[0073] 在另一优选例中,所述药物或制剂不杀伤或基本不杀伤正常细胞。

[0074] 在另一优选例中,所述的工程化免疫细胞满足下式: $K1/K0 \geq 20$, 较佳地,50,更佳地,100,更佳地,500,式中K1为所述的工程化免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤率,K0为所述的工程化免疫细胞对正常细胞(较佳地,所述的正常细胞的类型与肿瘤细胞是同一类型的细胞,例如肝细胞vs肝癌细胞)的杀伤率。

[0075] 在另一优选例中,所述的正常细胞包括除了肿瘤细胞之外的各种正常细胞。

[0076] 在另一优选例中,所述肿瘤细胞来源于选自下组的肿瘤:B细胞肿瘤、T细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、肝癌、肺癌、胰腺癌、皮肤癌、结直肠癌、头颈部肿瘤、鼻咽癌、食管癌、乳腺癌、宫颈癌、肾癌、骨肉瘤、前列腺癌、或其组合。

[0077] 本发明第五方面提供了一种用于选择性杀伤肿瘤细胞的试剂盒,所述试剂盒含有容器,以及位于容器内的本发明第一方面所述的工程化免疫细胞。

[0078] 在另一优选例中,所述试剂盒还含有标签或使用说明书。

[0079] 本发明第六方面提供了一种选择性杀伤肿瘤细胞的方法,包括:

[0080] 给需要治疗的对象施用安全有效量的本发明第一方面所述的工程化免疫细胞、或本发明第三方面所述的药物组合物。

[0081] 在另一优选例中,所述对象包括人或非人哺乳动物。

[0082] 在另一优选例中,所述非人哺乳动物包括啮齿动物(如小鼠、大鼠、兔)、灵长类动物(如猴)。

[0083] 在另一优选例中,所述方法为非治疗性和非诊断性的。

[0084] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0085] 图1为iKP CAR结构示意图;

[0086] 图2为iKPt CAR结构示意图;

[0087] 图3为iKP-19CAR结构示意图;

[0088] 图4为iKPt-19CAR结构示意图;

[0089] 图5为CAR-T-19、CAR-T-iKP-19、CAR-T-iKPt-19细胞CAR阳性率;

[0090] 图6A显示CAR-T-iKP-19对CD19+/HLA-肿瘤细胞杀伤效果同CAR-T-19、CAR-T-iKPt-19相当,图6B显示CAR-T-iKP-19对CD19+/HLA-肿瘤细胞或正常细胞杀伤效果显著低于CAR-T-19、CAR-T-iKPt-19。综合图6A、6B说明CAR-T-iKP-19能选择性杀伤CD19+/HLA-肿瘤细胞,保护HLA+正常细胞。

具体实施方式

[0091] 本发明人经过广泛而深入地研究,首次意外地发现一种同时靶向肿瘤抗原和HLA(包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的胞外段)的工程化免疫细胞,其可选择性地杀伤肿瘤细胞,还可保护正常细胞免受杀伤作用。在此基础上,本发明人完成了本发明。

[0092] 本发明以CAR-T细胞为例,代表性地对本发明的工程化的免疫细胞进行详细说明。

本发明的工程化的免疫细胞不限于上下文所述的CAR-T细胞,本发明的工程化的免疫细胞具有与上下文所述的CAR-T细胞相同或类似的技术特征和有益效果。具体地,当免疫细胞表达嵌合抗原受体CAR时,NK细胞等同于T细胞(或T细胞可替换NK细胞);当免疫细胞为T细胞时,TCR等同于CAR(或CAR可替换为TCR)。

[0093] 术语

[0094] 为了可以更容易地理解本公开,首先定义某些术语。如本申请中所使用的,除非本文另有明确规定,否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。在整个申请中阐述了其它定义。

[0095] 术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成,其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。

[0096] “内源性”是指核酸分子或多肽正常地在细胞或组织中表达。

[0097] “外源性”是指核酸分子或多肽并不内源地存在于细胞中,或者并未以足以达到在过表达时得到的功能效果的水平存在。因此,术语“外源性”包括任何在细胞中表达的重组核酸分子或多肽,例如,外来的、异源性的以及过表达的核酸分子和多肽。

[0098] 抗体

[0099] 术语“抗体”(Ab)应包括但不限于免疫球蛋白,其特异性结合抗原并包含通过二硫键互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链,或其抗原结合部分。每条H链包含重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个恒定结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个恒定结构域CL。VH和VL区可以进一步细分为称为互补决定区(CDR)的高变区,其散布有更保守的称为框架区(FR)的区域。每个VH和VL包含三个CDR和四个FR,从氨基末端到羧基末端按照以下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。

[0100] 在本发明中,术语“抗体”不仅指完整的抗体分子,还指抗体分子的保持免疫原结合能力的片段。这些片段也是本领域公知的,并经常在体外和体内使用。因此,如本文所用,术语“抗体”不仅指完整的免疫球蛋白分子,还指公知的活性片段 $F(ab')_2$ 和Fab。 $F(ab')_2$ 和Fab片段缺少完整抗体的Fc片段,更迅速地从循环中清除,并且可能具有完整抗体的稍弱的非特异性组织结合(Wahl等人,J.Nucl.Med.24:316-325(1983))。本发明的抗体包括完整天然抗体、双特异性抗体;嵌合抗体;Fab;Fab'、单链V区片段(scFv)、融合多肽以及非常规抗体。

[0101] 抗体的制备

[0102] 任何适于产生单克隆抗体的方法都可用于产生本发明的抗肿瘤抗原(如CD19)和所述HLA结合域(包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的胞外段)的抗体。例如,可以用连接或天然存在的肿瘤抗原(如CD19)和所述HLA结合域(包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的胞外段)同源二聚体或其片段免疫动物。可以使用合适的免疫接种方法,包括佐剂、免疫刺激剂、重复加强免疫接种,可以使用一种或多种途径。

[0103] 任何合适形式的肿瘤抗原(如CD19)和所述HLA结合域(包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的胞外段)都可以作为免疫原(抗原),用于产生对肿瘤抗原(如CD19)和所述HLA结合域(包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的胞外段)特异的非人抗体,筛选所述抗

体的生物学活性。激发免疫原可以是全长的成熟人的肿瘤抗原(如CD19)和所述HLA结合域(包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的胞外段),包括天然的同源二聚体,或含单个/多个表位的肽。免疫原可以单独使用,或与本领域已知的一种或多种免疫原性增强剂组合使用。免疫原可以由天然来源纯化,或者在遗传修饰的细胞中产生。编码免疫原的DNA在来源上可以是基因组或非基因组的(例如cDNA)。可以使用合适的遗传载体表达编码免疫原的DNA,所述载体包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、杆状病毒载体、质粒和非病毒载体。

[0104] 全人源化抗体可以选自任何种类的免疫球蛋白,包括IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。通过用下文实施例中描述的生物学测定筛选抗体易于实现必需恒定结构域序列的最优化,以产生所需生物学活性。

[0105] 同样,任一类轻链都可以在本文的化合物和方法中使用。具体地说, κ 、 λ 链或其变体在本发明的化合物和方法中是可以用的。

[0106] 本发明抗体或其片段的DNA分子的序列可以用常规技术,比如利用PCR扩增或基因组文库筛选等方法获得。此外,还可将轻链和重链的编码序列融合在一起,形成单链抗体。

[0107] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0108] 此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。

[0109] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0110] 宿主细胞为本领域常规的各种宿主细胞,只要能满足使上述重组表达载体稳定地自行复制,且所携带所述的核酸可被有效表达即可。具体地,宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。优选的动物细胞包括(但并不限于):CHO-S、CHO-K1、HEK-293细胞。

[0111] 优选的宿主细胞包括E.coli TG1或BL21细胞(表达单链抗体或Fab抗体),或者CHO-K1细胞(表达全长IgG抗体)。

[0112] 本发明中所述的用重组DNA转化宿主细胞的步骤可用本领域熟知的技术进行。获得的转化子可用常规方法培养,转化子表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,用常规培养基在合适的条件下培养。

[0113] 通常,在适合本发明抗体表达的条件下,培养转化所得的宿主细胞。然后用常规的免疫球蛋白纯化步骤,如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析或亲和层析等本领域技术人员熟知的常规分离纯化手段纯化得到本发明的抗体。

[0114] 所得单克隆抗体可用常规手段来鉴定。比如,单克隆抗体的结合特异性可用免疫沉淀或体外结合试验(如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来测定。

[0115] CD19

[0116] CD19表达于B系细胞(不包括成熟浆细胞)及滤泡树突状细胞上,CD19是一种重要的信号传导分子,调节B淋巴细胞的生长激活和活化,在调节B淋巴细胞抗原受体或其他表

面受体的信号阈值中起重要作用,是与B淋巴细胞分化、活化、增殖及抗体产生有关的重要膜抗原,是诊断B淋巴细胞系肿瘤和鉴定B淋巴细胞的最好标志

[0117] HLA

[0118] HLA分子即人类白细胞抗原,广泛表达于人类各组织类型细胞表面,可分为I、II、III类分子3种类型,其中I、II类分子参与免疫应答过程。HLAI类分子参与外源抗原及肿瘤抗原的递呈,又可分为HLA-A、HLA-B、HLA-C 3种亚型,HLA-C在95%以上汉族人群中表达

[0119] 在本发明的一个优选实施方式中,选择的靶点是HLA-C。

[0120] 杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的胞外段

[0121] KIR即杀伤细胞免疫球蛋白受体,主要表达于NK细胞及少数CD8+T细胞表面,位于染色体19q13.4,分为抑制性和活化性作用类型。按结构分为两个和三个(KIR2D和KIR3D)免疫球蛋白样胞外区,可以特异性识别MHC-I类分子。

[0122] 具有长胞内段的KIR分子在其胞浆区含有2个免疫酪氨酸抑制基序,主要传导抑制性信号;具有短胞内段的KIR分子胞浆区无此基序,却在跨膜区有一特征性带电荷的残基,通过此残基可与其他含有免疫酪氨酸激活基序的分子偶联而传导激活性信号。

[0123] 在本发明的一个优选实施方式中,选择的是能结合HLA-C的KIR2DL2分子的胞外段。

[0124] 嵌合抗原受体(CAR)

[0125] 嵌合免疫抗原受体(Chimeric antigen receptors,CARs)由胞外抗原识别区域,通常是scFv(single-chain variable fragment),跨膜区以及胞内共刺激信号区域组成。CARs的设计经历了以下过程:第一代CAR只有一个胞内信号组份CD3 ζ 或者Fc γ RI分子,由于胞内只有一个活化结构域,因此它只能引起短暂的T细胞增殖和较少的细胞因子分泌,而不能提供长时间的T细胞增殖信号和持续的体内抗肿瘤效应,所以并没有取得很好地临床疗效。第二代CARs在原有结构基础上引入一个共刺激分子,如CD28、4-1BB、OX40、ICOS,与一代CARs相比功能有很大提高,进一步加强CAR-T细胞的持续性和对肿瘤细胞的杀伤能力。在二代CARs基础上串联一些新的免疫共刺激分子如CD27、CD134,发展成为三代和四代CARs。

[0126] CARs的胞外段可识别一个特异的抗原,随后通过胞内结构域转导该信号,引起细胞的活化增殖、细胞溶解毒性和分泌细胞因子,进而清除靶细胞。首先分离病人自体细胞(或者异源供体),激活并进行基因改造产生CAR的免疫细胞,随后注入同一病人体内。这种方式患移植物抗宿主病概率极低,抗原被免疫细胞以非MHC限制方式识别。

[0127] CAR-免疫细胞治疗在血液恶性肿瘤治疗中取得了非常高的临床反应率,这样的高反应率是以往任何一种治疗手段都无法达到的,在世界各引发了临床研究的热潮。

[0128] 具体地,本发明的嵌合抗原受体(CAR)包括细胞外结构域、跨膜结构域、和细胞内结构域。胞外结构域包括靶-特异性结合元件(也称为抗原结合结构域)。细胞内结构域包括共刺激信号传导区和/或 ζ 链部分。共刺激信号传导区指包括共刺激分子的细胞内结构域的一部分。共刺激分子为淋巴细胞对抗原的有效应答所需要的细胞表面分子,而不是抗原受体或它们的配体。

[0129] 在CAR的胞外结构域和跨膜结构域之间,或在CAR的胞浆结构域和跨膜结构域之间,可并入接头。如本文所用的,术语“接头”通常指起到将跨膜结构域连接至多肽链的胞外结构域或胞浆结构域作用的任何寡肽或多肽。接头可包括0-300个氨基酸,优选地2至100个

氨基酸和最优选地3至50个氨基酸。

[0130] 本发明的CAR当在T细胞中表达时,能够基于抗原结合特异性进行抗原识别。当其结合其关联抗原时,影响肿瘤细胞,导致肿瘤细胞不生长、被促使死亡或以其他方式被影响,并导致患者的肿瘤负荷缩小或消除。抗原结合结构域优选与来自共刺激分子和/或 ζ 链中的一个或多个的细胞内结构域融合。优选地,抗原结合结构域与4-1BB信号传导结构域和/或CD3 ζ 信号结构域组合的细胞内结构域融合。

[0131] 如本文所用,“抗原结合结构域”“单链抗体片段”均指具有抗原结合活性的Fab片段,Fab'片段,F(ab')₂片段,或单一Fv片段。Fv抗体含有抗体重链可变区、轻链可变区,但没有恒定区,并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般的,Fv抗体还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,且能够形成抗原结合所需的结构。抗原结合结构域通常是scFv(single-chain variable fragment)。scFv的大小一般是一个完整抗体的1/6。单链抗体优选是由一条核苷酸链编码的一条氨基酸链序列。作为本发明的优选方式,所述scFv包含特异性识别肿瘤高表达抗原CD47和MSLN的抗体,较佳地为单链抗体。

[0132] 在本发明中,本发明的scFv还包括其保守性变异体,指与本发明scFv的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。

[0133] 在本发明中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量,优选为不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%,更优选为不超过35%,更优选为1-33%,更优选为5-30%,更优选为10-25%,更优选为15-20%。

[0134] 在本发明中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量通常是1、2、3、4或5个,较佳地为1-3个,更佳地为1-2个,最佳地为1个。

[0135] 对于绞链区和跨膜区(跨膜结构域),CAR可被设计以包括融合至CAR的胞外结构域的跨膜结构域。在一个实施方式中,使用天然与CAR中的结构域之一相关联的跨膜结构域。在一些例子中,可选择跨膜结构域,或通过氨基酸置换进行修饰,以避免将这样的结构域结合至相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域,从而最小化与受体复合物的其他成员的相互作用。

[0136] 在本发明中,第一CAR和第二CAR以及任选的第三CAR如本发明第一方面所述。

[0137] 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)

[0138] 如本文所用,术语“CAR-T细胞”、“CAR-T”、“本发明CAR-T细胞”均指本发明第一方面所述的CAR-T细胞,本发明CAR-T细胞可同时靶向HLA结合域(包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的胞外段)和肿瘤抗原(如CD19)。

[0139] 本发明所述第一CAR和第二CAR和任选的第三CAR表达后,会穿过细胞膜并定位在细胞膜上。

[0140] CAR-T细胞较其它基于T细胞的治疗方式存在以下优势:(1) CAR-T细胞的作用过程不受MHC的限制;(2) 鉴于很多肿瘤细胞表达相同的肿瘤抗原,针对某一种肿瘤抗原的CAR基因构建一旦完成,便可以广泛利用;(3) CAR既可以利用肿瘤蛋白质抗原,又可利用糖脂类非蛋白质抗原,扩大了肿瘤抗原的靶点范围;(4) 使用患者自体细胞降低了排异反应的风险;(5) CAR-T细胞具有免疫记忆功能,可以长期在体内存活。

[0141] 在本发明中,本发明的第一CAR为抑制T细胞激活的安全型嵌合抗原受体

inhibitory KIR-PD-1chimeric antigen receptor, 简称为iKP CAR, 包含(i) 人类白细胞抗原(HLA) 结合域, 其包含杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR) 的胞外段; (ii) 间隔物域(iii) 跨膜域; 和(iv) 胞内T细胞抑制信号转导域, 其包含程序性死亡因子-1(PD-1) 的胞内段。

[0142] 当本发明表达第一CAR(即iKP CAR) 的T细胞识别HLA时, 胞内PD-1信号被激活, 抑制第二CAR(即CD19CAR) 的信号, 使T细胞恢复到静息状态。利用慢病毒载体将其导入传统的表达本发明的第二CAR的T细胞(如CD19-CAR-T细胞) 中, 制备出新型CAR-T细胞, 简称为CAR-T-iKP-19。

[0143] 在一优选例中, 当CAR-T-iKP-19识别B细胞肿瘤时, 因肿瘤细胞高表达CD19蛋白, 低表达或不表达HLA蛋白, 本发明第二CAR(即CD19CAR) 的信号被激活, T细胞被激活, 发挥杀伤功能; 当CAR-T-iKP-19识别正常B细胞时, 正常B细胞同时表达高表达CD19蛋白和HLA蛋白, iKPCAR信号被激活, 通过招募磷酸酶SHP-2, 去磷酸化本发明第二CAR(如CD19CAR) 信号, 使T细胞恢复到静息状态, 不能杀伤正常B细胞。

[0144] 本发明第三CAR可与本发明的第一CAR联用, 抑制第二CAR(即CD19CAR) 的信号, 使T细胞恢复到静息状态。

[0145] 嵌合抗原受体NK细胞(CAR-NK细胞)

[0146] 如本文所用, 术语“CAR-NK细胞”、“CAR-NK”、“本发明CAR-NK细胞”均指本发明第一方面所述的CAR-NK细胞。本发明CAR-NK细胞可同时靶向HLA结合域(包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR) 的胞外段) 和肿瘤抗原(如CD19)。

[0147] 自然杀伤(NK) 细胞是一类主要的免疫效应细胞, 通过非抗原特异性途径去保护机体免受病毒感染和肿瘤细胞的侵袭。通过工程化(基因修饰) 的NK细胞可能获得新的功能, 包括特异性识别肿瘤抗原的能力及具有增强的抗肿瘤细胞毒作用。

[0148] 与自体CAR-T细胞相比, CAR-NK细胞还具有一下优点, 例如: (1) 通过释放穿孔素和颗粒酶直接杀伤肿瘤细胞, 而对机体正常的细胞没有杀伤作用; (2) 它们释放很少量的细胞因子从而降低了细胞因子风暴的危险; (3) 体外极易扩增及发展为“现成的”产品。除此之外, 与CAR-T细胞治疗类似。

[0149] 外源T细胞抗原受体

[0150] 如本文所用, 外源T细胞抗原受体(T cell receptor, TCR) 为通过基因转移技术从肿瘤反应性T细胞中克隆出TCR的 α 链和 β 链, 通过基因工程的手段, 以慢病毒或逆转录病毒为载体, 外源性转入到T细胞内的TCR。

[0151] 外源TCR修饰的T细胞能够特异性识别和杀伤肿瘤细胞, 并通过优化TCR与肿瘤性特异性抗原的亲合力, 可以提高T细胞与肿瘤的亲合力, 提高抗肿瘤效果。

[0152] 制剂

[0153] 本发明提供了一种本发明第一方面所述的工程化的免疫细胞, 以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一个实施方式中, 所述制剂为液态制剂。优选地, 所述制剂为注射剂。优选地, 所述制剂中所述CAR-T细胞的浓度为 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$ 个细胞/Kg体重, 更优地 $1 \times 10^4 - 1 \times 10^7$ 个细胞/Kg体重。

[0154] 在一个实施方式中, 所述制剂可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐等等; 碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇; 蛋白质; 多肽或氨基酸诸如甘氨酸; 抗氧化剂; 螯合剂诸如EDTA或谷胱甘肽; 佐剂(例如, 氢氧化铝); 和防腐剂。本发明

的制剂优选配制用于静脉内施用。

[0155] 治疗性应用

[0156] 本发明包括用编码本发明表达盒的慢病毒载体 (LV) 转导的细胞 (例如, T细胞) 进行的治疗性应用。转导的T细胞可靶向HLA结合域 (包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 的胞外段) 和肿瘤抗原 (如CD19), 当本发明的改造的T细胞识别B细胞肿瘤时, 因肿瘤细胞高表达CD19蛋白, 低表达或不表达HLA蛋白, CD19CAR信号被激活, T细胞被激活, 发挥杀伤功能; 当本发明的改造的T细胞识别正常B细胞时, 正常B细胞同时表达高表达CD19蛋白和HLA蛋白, iKPCAR信号被激活, 通过招募磷酸酶SHP-2, 去磷酸化CD19CAR信号, 使T细胞恢复到静息状态, 不能杀伤正常B细胞。

[0157] 因此, 本发明也提供了刺激对哺乳动物的靶细胞群或组织的T细胞-介导的免疫应答的方法, 其包括以下步骤: 给哺乳动物施用本发明的CAR-T细胞。

[0158] 在一个实施方式中, 本发明包括一类细胞疗法, 分离病人自体T细胞 (或者异源供体), 激活并进行基因改造产生CAR-T细胞, 随后注入同一病人体内。这种方式患移植物抗宿主病概率极低, 抗原被T细胞以无MHC限制方式识别。此外, 一种CAR-T就可以治疗表达该抗原的所有癌症。不像抗体疗法, CAR-T细胞能够体内复制, 产生可导致持续肿瘤控制的长期持久性。

[0159] 在一个实施方式中, 本发明的CAR-T细胞可经历稳固的体内T细胞扩展并可持续延长的时间量。另外, CAR介导的免疫应答可为过继免疫疗法步骤的一部分, 其中CAR-修饰T细胞诱导对CAR中的抗原结合结构域特异性的免疫应答。例如, 抗HLA结合域 (包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 的胞外段) 和肿瘤抗原 (如CD19) 的CAR-T细胞引起抗表达HLA结合域 (包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 的胞外段) 和肿瘤抗原 (如CD19) 细胞的特异性免疫应答。

[0160] 尽管本文公开的数据具体公开了包括抗HLA结合域 (包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 的胞外段) 的scFv、抗肿瘤抗原 (如CD19) 的scFv、铰链和跨膜区、和4-1BB和CD3 ζ 信号传导结构域的慢病毒载体, 但本发明应被解释为包括对构建体组成部分中的每一个的任何数量的变化。

[0161] 可治疗的癌症包括没有被血管化或基本上还没有被血管化的肿瘤, 以及血管化的肿瘤。癌症可包括非实体瘤 (诸如血液学肿瘤, 例如白血病和淋巴瘤) 或可包括实体瘤。用本发明的CAR治疗的癌症类型包括但不限于癌、胚细胞瘤和肉瘤, 和某些白血病或淋巴恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、和恶性瘤, 例如肉瘤、癌和黑素瘤。也包括成人肿瘤/癌症和儿童肿瘤/癌症。

[0162] 血液学癌症为血液或骨髓的癌症。血液学 (或血原性) 癌症的例子包括白血病, 包括急性白血病 (诸如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病和成髓细胞性、前髓细胞性、粒-单核细胞型、单核细胞性和红白血病)、慢性白血病 (诸如慢性髓细胞 (粒细胞性) 白血病、慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤 (无痛和高等级形式)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、多毛细胞白血病和脊髓发育不良。

[0163] 实体瘤为通常不包含囊肿或液体区的组织的异常肿块。实体瘤可为良性或恶性的。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞类型命名 (诸如肉瘤、癌和淋巴瘤)。实体瘤诸如肉

瘤和癌的例子包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤间皮瘤、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌卵巢癌。

[0164] 本发明的CAR-修饰T细胞也可用作对哺乳动物离体免疫和/或体内疗法的疫苗类型。优选地,哺乳动物为人。

[0165] 对于离体免疫,以下中的至少一项在将细胞施用进入哺乳动物前在体外发生:i) 扩增细胞,ii) 将编码CAR的核酸引入细胞,和/或i ii) 冷冻保存细胞。

[0166] 离体程序在本领域中是公知的,并在以下更完全地进行讨论。简单地说,细胞从哺乳动物(优选人)中分离并用表达本文公开的CAR的载体进行基因修饰(即,体外转导或转染)。CAR-修饰的细胞可被施用给哺乳动物接受者,以提供治疗益处。哺乳动物接受者可为人,和CAR-修饰的细胞可相对于接受者为自体的。可选地,细胞可相对于接受者为同种异基因的、同基因的(syngeneic)或异种的。

[0167] 除了就离体免疫而言使用基于细胞的疫苗之外,本发明也提供了体内免疫以引起针对患者中抗原的免疫应答的组合物和方法。

[0168] 本发明提供了治疗肿瘤的方法,其包括施用给需要其的对象治疗有效量的本发明的CAR-修饰的T细胞。

[0169] 本发明的CAR-修饰的T细胞可被单独施用或作为药物组合物与稀释剂和/或其他组分或其他细胞因子或细胞群结合施用。简单地说,本发明的药物组合物可包括如本文所述的靶细胞群,与一种或多种药学或生理学上可接受载体、稀释剂或赋形剂结合。这样的组合物可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐水等等;碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂诸如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明的组合物优选配制用于静脉内施用。

[0170] 本发明的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由这样的因素确定,如患者的病症、和患者疾病的类型和严重程度——尽管适当的剂量可由临床试验确定。

[0171] 当指出“免疫学上有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤-抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本发明组合物的精确量可由医师确定,其考虑患者(对象)的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移程度和病症的个体差异。可通常指出:包括本文描述的T细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg体重的剂量,优选 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重的剂量(包括那些范围内的所有整数)施用。T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。细胞可通过使用免疫疗法中公知的注入技术(见例如Rosenberg等,NewEng.J.of Med.319:1676,1988)施用。对于具体患者的最佳剂量和治疗方案可通过监测患者的疾病迹象并因此调节治疗由医学领域技术人员容易地确定。

[0172] 对象组合物的施用可以以任何方便的方式进行,包括通过喷雾法、注射、吞咽、输液、植入或移植。本文描述的组合物可被皮下、皮内、瘤内、结内、脊髓内、肌肉内、通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内施用给患者。在一个实施方式中,本发明的T细胞组合物通过皮内或皮下注射被施用给患者。在另一个实施方式中,本发明的T细胞组合物优选通过i.v.注射施用。T细胞的组合物可被直接注入肿瘤,淋巴结或感染位置。

[0173] 在本发明的某些实施方式中,利用本文描述的方法或本领域已知的其他将T细胞扩展至治疗性水平的方法活化和扩展的细胞,与任何数量的有关治疗形式结合(例如,之

前、同时或之后)施用给患者,所述治疗形式包括但不限于用以下试剂进行治疗:所述试剂诸如抗病毒疗法、西多福韦和白细胞介素-2、阿糖胞苷(也已知为ARA-C)或对MS患者的那他珠单抗治疗或对牛皮癣患者的厄法珠单抗治疗或对PML患者的其他治疗。在进一步的实施方式中,本发明的T细胞可与以下结合使用:化疗、辐射、免疫抑制剂,诸如,环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨喋呤、麦考酚酯和FK506,抗体或其他免疫治疗剂。在进一步的实施方式中,本发明的细胞组合物与骨髓移植、利用化疗剂诸如氟达拉滨、外部光束放射疗法(XRT)、环磷酸胺结合(例如,之前、同时或之后)而施用给患者。例如,在一个实施方式中,对象可经历高剂量化疗的标准治疗,之后进行外周血干细胞移植。在一些实施方式中,在移植后,对象接受本发明的扩展的免疫细胞的注入。在一个额外的实施方式中,扩展的细胞在外科手术前或外科手术后施用。

[0174] 施用给患者的以上治疗的剂量将随着治疗病症的精确属性和治疗的接受者而变化。人施用的剂量比例可根据本领域接受的实践实施。通常,每次治疗或每个疗程,可将 1×10^6 个至 1×10^{10} 个本发明经修饰的T细胞(如,CAR-T20细胞),通过例如静脉回输的方式,施用于患者。

[0175] 本发明的主要优点包括:

[0176] (1) 本发明的工程化免疫细胞可同时靶向HLA结合域(包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的胞外段)和肿瘤抗原(如CD19),从而选择性的杀伤肿瘤细胞,抑制对正常细胞的杀伤。

[0177] (2) 本发明通过向T细胞同时导入激活信号和抑制信号,赋予T细胞自我调控的功能,即当CAR-T细胞识别肿瘤细胞时,发挥杀伤功能;当CAR-T细胞识别正常细胞时,杀伤功能受抑制。

[0178] (3) 本发明首次设计一种T细胞激活的安全型嵌合抗原受体inhibitory KIR-PD-1chimeric antigen receptor,简称为iKP CAR,当iKP CAR识别HLA时,胞内PD-1信号被激活,抑制正常CAR的信号,使T细胞恢复到静息状态。当CAR-T-iKP-19识别B细胞肿瘤时,因肿瘤细胞高表达CD19蛋白,低表达或不表达HLA蛋白,CD19CAR信号被激活,T细胞被激活,发挥杀伤功能;当CAR-T-iKP-19识别正常B细胞时,正常B细胞同时表达高表达CD19蛋白和HLA蛋白,iKPCAR信号被激活,通过招募磷酸酶SHP-2,去磷酸化CD19CAR信号,使T细胞恢复到静息状态,不能杀伤正常B细胞。

[0179] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0180] 除非特别说明,否则本发明实施例中所用材料和试剂均为市售产品。

[0181] 本发明主要构建3种慢病毒包装质粒,分别为pCDH-19、pCDH-iKP-19、pCDH-iKPt-19(PD-1删除),pCDH-19、pCDH-iKPt-19为pCDH-iKP-19的阴性对照质粒。

[0182] 实施例1质粒构建

[0183] 1.1iKP/iKPt CAR的构建

[0184] 1.1.1KIR胞外段序列查找

[0185] 根据uniprot数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 查找KIR2DL2胞外识别域氨基酸序列为(除去信号肽):

[0186] HEGVHRKPSLLAHPGRLVKSEETVILQCWSDVRFEHFLHREGKFKDTLHLIGEHHDGVSKANFSIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTVLAGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHECRFSAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFRDSPYEWSNSSDPLLVSIVIGNPSNSWSPTEPSSKTGNPRHLH (SEQ ID NO.:1)

[0187] 对应的核苷酸序列为:

[0188] CATGAGGGAGTCCACAGAAAACCTTCCCTCCTGGCCCACCCAGGTCGCCTGGTGAAATCAGAAGAGACAGTCATCCTGCAATGTTGGTCAGATGTCAGGTTTGGAGCACTTCTTCTGCACAGAGAAGGGAAGTTTAAGGACACTTTGCACCTCATTGGAGAGCACCATGATGGGGTCTCCAAAGCCAATTCTCCATCGGTCCCATGATGCAAGACCTTG CAGGGACCTACAGATGCTACGGTCTGTTACTCACTCCCCCTATCAGTTGTCAGCTCCAGTGACCCTCTGGACATCGTCATCACAGGTCTATATGAGAAAACCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTCTGGCAGGAGAGAGCGTGACCTTGTCTCTGCAGCTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGAGGCCCATGAATGTAGGT TCTCTGCAGGGCCCAAGGTCAACGGAACATTCCAGGCCGACTTTCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGAACCTA CAGATGCTTCGGCTCTTCCGTGACTCTCCATACGAGTGGTCAAACCTCGAGTGACCCACTGCTTGTCTTCTGTCATA GAAACCCTTCAAATAGTTGGCCTCACCCACTGAACCAAGCTCTAAAACCGGTAACCCCGACACCTGCAC (SEQ ID NO.:2)

[0189] 1.1.2PD-1胞内信号传导域序列查找

[0190] 根据uniprot数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 查找PD-1胞内信号传导域氨基酸序列为:

[0191] CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO.:3)

[0192] 对应的核苷酸序列为:

[0193] TGCTCCCGGGCCGCACGAGGGACAATAGGAGCCAGGCGCACCCGGCCAGCCCCTGAAGGAGGACCCCTCAGCCGTGCCTGTGTTCTCTGTGGACTATGGGGAGCTGGATTTCCAGTGGCGAGAGAAGACCCCGGAGCCCCCGTGCCCTGTGTCCCTGAGCAGACGGAGTATGCCACCATTGTCTTTCTTAGCGGAATGGGCACCTCATCCCCGCCCGCAGGGGCTCAGCTGACGGCCCTCGGAGTGCCAGCCACTGAGGCCTGAGGATGGACACTGCTCTTGGCCCCTC (SEQ ID NO.:4)

[0194] 1.1.3iKP/iKPt CAR构建

[0195] 将KIR胞外识别结构域与PD-1胞内信号传导结构域用CD8hinge和CD8跨膜区序列进行连接,再N端加上CD8信号肽,构建成完整的嵌合抗原受体iKP CAR,结构如图1所示。同时,将PD-1胞内段截断,构建阴性对照嵌合抗原受体iKPtCAR (PD-1truncated),结构如图2所示。

[0196] iKP CAR氨基酸序列:

[0197] MALPVTALLLPLALLLHAARPHEGVHRKPSLLAHPGRLVKSEETVILQCWSDVRFEHFLHREGKFKDTLHLIGEHHDGVSKANFSIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTVLAGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHECRFSAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFRDSPYEWSNSSDPLLVSIVIGNPSNSWSPTEPSSKTGNPRHLHTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCCSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYA

TIVFPSMGMTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO.:5)

[0198] 对应核苷酸序列为:

[0199] ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGCATGAGGGAGTCCACAGAAAACCTTCCCTCCTGGCCCACCCAGGTCGCCTGGTGAATCAGAAGAGACAGTCATCCTGCAATGTTGGTCAGATGTCAGGTTTGAGCACTTCCCTTCTGCACAGAGAAGGGAAGTTTAAGGACACTTTGCACCTCATTGGAGAGCACCATGATGGGGTCTCCAAAGCCAACTTCTCCATCGGTCCCATGATGCAAGACCTTGCAGGGACCTACAGATGCTACGGTTCTGTTACTCACTCCCCCTATCAGTTGTCAGCTCCCAGTGACCCTCTGGACATCGTCATCACAGGCTATATGAGAAAACCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTTCTGGCAGGAGAGAGCGTGACCTTGTCTGCACTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGGAGGCCATGAATGTAGGTTCTCTGCAGGGCCCAAGGTCAACGGAACATTCCAGGCCGACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGAACCTACAGATGCTTCGGCTCTTTCCGTGACTCTCCATACGAGTGGTCAAACCTCGAGTGACCCACTGCTTGTTCTGTCATAGGAAACCCTTCAAATAGTTGGCCTTACCCACTGAACCAAGCTCTAAAACCGGTAACCCCCGACACCTGCACACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCTGCTCCCGGGCCGACGAGGACAATAGGAGCCAGGCGCACCGGCCAGCCCCTGAAGGAGGACCCCTCAGCCGTGCCTGTGTTCTCTGTGGACTATGGGGAGCTGGATTTCCAGTGGCGAGAGAAGACCCCGGAGCCCCCGTGCCTGTGTCCCTGAGCAGACGGAGTATGCCACCATTGTCTTTCCATGCGGAATGGGCACCTCATCCCCGCCCAGGGGCTCAGCTGACGGCCCTCGGAGTGCCAGCCACTGAGGCCTGAGGATGGACACTGCTCTTGGCCCCTCTGA (SEQ ID NO.:6)

[0200] iKPt CAR氨基酸序列:

[0201] MALPVTALLLPLALLLHAARPHEGVHRKPSLLAHPGRLVKSEETVILQCWSDVRFELHLLHREGKFKD TLHLIGEHHDGVSKANFSIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTVLAGES VTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHECRFSAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFRDSPYEWSNSSDPLLVSVIGNPSNSWSPTEPSSKTGNPRHLHTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO.:7)

[0202] 对应核苷酸序列为:

[0203] ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGCATGAGGGAGTCCACAGAAAACCTTCCCTCCTGGCCCACCCAGGTCGCCTGGTGAATCAGAAGAGACAGTCATCCTGCAATGTTGGTCAGATGTCAGGTTTGAGCACTTCCCTTCTGCACAGAGAAGGGAAGTTTAAGGACACTTTGCACCTCATTGGAGAGCACCATGATGGGGTCTCCAAAGCCAACTTCTCCATCGGTCCCATGATGCAAGACCTTGCAGGGACCTACAGATGCTACGGTTCTGTTACTCACTCCCCCTATCAGTTGTCAGCTCCCAGTGACCCTCTGGACATCGTCATCACAGGCTATATGAGAAAACCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTTCTGGCAGGAGAGAGCGTGACCTTGTCTGCACTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGGAGGCCATGAATGTAGGTTCTCTGCAGGGCCCAAGGTCAACGGAACATTCCAGGCCGACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGAACCTACAGATGCTTCGGCTCTTTCCGTGACTCTCCATACGAGTGGTCAAACCTCGAGTGACCCACTGCTTGTTCTGTCATAGGAAACCCTTCAAATAGTTGGCCTTACCCACTGAACCAAGCTCTAAAACCGGTAACCCCCGACACCTGCACACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCTGA (SEQ ID NO.:8)

- [0204] 1.2pCDH-iKP-19、pCDH-iKPt-19表达载体的构建
- [0205] 将构建好的iKPCAR/iKPtCAR片段通过T2A连接到实验室已保存的表达CD19CAR的载体pCDH-CD19上,命名为pCDH-iKP-19、pCDH-iKPt-19,结构如图3、4所示。
- [0206] 实施例2慢病毒包装
- [0207] 将pCDH-19、pCDH-iKP-19、pCDH-iKPt-19三种质粒包装的慢病毒命名为lenti-19、lenti-iKP-19、lenti-iKPt-19。
- [0208] 2.1. 质粒转染
- [0209] 1) 将质粒,PEI,Opti-MEM培养基置于室温5min;
- [0210] 2) 取Opti-MEM 436 μ l于1.5mlEP管中,再加入64 μ g PEI混匀,室温静置5min;
- [0211] 3) 取12 μ g载体质粒pCDH-19、pCDH-iKP-19、pCDH-iKPt-19,8 μ g psPA \times 2,4 μ g pMD2.G,加入Opti-MEM至500 μ l,室温静置5min;
- [0212] 4) 将配好的PEI-Opti-MEM溶液加入含质粒的Opti-MEM中,室温静置20min;
- [0213] 5) 将1ml DNA/PEI混合物慢慢滴入前一天铺好的293T培养皿中,轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C培养箱孵育,6-8h后更换新鲜培养基,放入37 $^{\circ}$ C培养箱继续孵育。
- [0214] 2.2病毒收集和浓缩
- [0215] 1) 质粒转染48h后,收集上清后,添加10ml新鲜培养基继续培养至72h,再次收集上清,与48h收集的上清混合后,置于4 $^{\circ}$ C冰箱内待用;
- [0216] 2) 4 $^{\circ}$ C,4000g离心10min,除去细胞碎片;
- [0217] 3) 以0.45 μ m滤器过滤得到的上清;
- [0218] 4) 将过滤后的病毒上清转入超速离心管中,25000转离心2h,用1/100上清体积的PBS进行稀释,反复吹打后转入密闭的离心管中4 $^{\circ}$ C过夜;
- [0219] 5) 将病毒液分装至合适的体积,置于-80 $^{\circ}$ C中保存,并取200 μ l病毒进行滴度测定。
- [0220] 2.3病毒滴度测定
- [0221] 1) 消化293T细胞,离心后计数,用含血清培养基制成细胞悬液,调整细胞密度为4 \times 10⁵/ml,加入polybrene至12 μ g/ml,向24孔培养板的每孔中加入0.5ml细胞悬液;
- [0222] 2) 用全培养基按以下比例稀释病毒上清:1:3;1:9;1:27;
- [0223] 3) 分别将100 μ l病毒原液及按不同比例稀释后的病毒液,加入到已接种细胞的24孔板中;
- [0224] 4) 16h后弃去感染上清,添加0.5ml新鲜全培养基;
- [0225] 5) 48h后流式检测被感染细胞的目的基因表达;
- [0226] 6) 计算滴度,滴度=2 \times 10⁵*感染效率*稀释倍数。
- [0227] 结果如下:
- [0228] 病毒收集浓缩后,经滴度检测,lenti-19、lenti-iKP-19、lenti-iKPt-19三种慢病毒的滴度分别为3 \times 10⁸、1 \times 10⁸、1.2 \times 10⁸。
- [0229] 实施例3CAR-T细胞制备
- [0230] 将慢病毒lenti-19、lenti-iKP-19、lenti-iKPt-19感染人原代T细胞分别得到三种CAR-T细胞,分别命名为CAR-T-19、CAR-T-iKP-19、CAR-T-iKPt-19。
- [0231] d0,取新鲜来源的脐血通过密度梯度离心分离PBMC后,用CD4/CD8磁珠进行免疫磁珠筛选,获得的阳性细胞按照1 \times 10⁶/ml的密度进行接种,添加含10%FBS、100U/ml IL-2的

X-vivo15培养基,然后按照1:100的比例加入TransAct;

[0232] d2收集T细胞,离心换液,将pCDH-19、pCDH-iKP-19、pCDH-iKPt-19三种慢病毒分别按照MOI=10:1的比例加入到培养基中,16h后离心换液,加入新鲜培养基继续培养。

[0233] d6收集细胞进行流式检测。

[0234] 结果如图5所示。结果显示成功制备CAR-T-19、CAR-T-iKP-19、CAR-T-iKPt-19。

[0235] 实施例4靶细胞选择

[0236] 本发明主要筛选了3种靶细胞,Daudi为B淋巴细胞肿瘤细胞系,CD19阳性/HLA阴性;Raji为B淋巴细胞肿瘤细胞系,CD19阳性/HLA阳性;B细胞为正常B淋巴细胞,CD19阳性/HLA阳性。

[0237] 实施例5CAR-T-iKP-19对靶细胞的选择性杀伤

[0238] 5.1靶细胞标记

[0239] 制备单细胞悬液, 1×10^6 /ml。加入2ml PBS离心洗涤两次,清洗掉血清。

[0240] 用PBS重悬细胞,调整细胞密度为 2×10^6 /ml。加入等体积的 $10 \mu\text{M}$ eFluor670试剂,涡旋细胞, 37°C 避光孵育10分钟;加入4-5倍体积预冷的10%血清的完全培养基,冰上孵育5分钟;完全培养基洗3次。将Daudi、Raji、B标上eFluor 670。

[0241] 5.2靶细胞与效应细胞混合培养

[0242] 将上述经eFluor 670染色后的Daudi、Raji、B分别按照 1×10^5 /孔的数量接种至48孔板中;

[0243] 将CAR-T-19、CAR-T-iKP-19、CAR-T-iKPt-19三种CART和未感染病毒的T细胞分别按照效靶比1:5、1:1、5:1接种至上述三种靶细胞中,每组设三个重复,每孔补液至1ml;

[0244] 将细胞混合后的培养板放至 37°C 培养箱中培养4h;

[0245] 4h后,收集每孔中所有细胞,将细胞转移至流式管中,并加入PI进行孵育,上机检测。

[0246] 5.3杀伤效率分析

[0247] 流式细胞仪上选择FL4通道进行eFluor 670的检测,圈出所有eFluor 670阳性的细胞;eFluor 670阳性圈门后,选择FL2通道进行PI染色检测,PI染色阳性的细胞即为凋亡靶细胞。根据流式结果,计算CAR-T-19、CAR-T-iKP-19、CAR-T-iKPt-19各组别对Daudi、Raji、B的杀伤效率,如图6A、6B所示。图6A的结果表明,CAR-T-iKP-19对CD19+/HLA-Daudi杀伤结果同CAR-T-iKPt-19一致,没有杀伤选择性;图6B的结果表明,CAR-T-iKP-19对CD19+/HLA+Raji杀伤效果相比CAR-T-19、CAR-T-iKPt-19显著降低,显示出选择性杀伤效果。

[0248] 讨论

[0249] CAR-T细胞治疗是目前最有希望攻克癌症的疗法,已率先在血液肿瘤治疗中取得了显著优于传统放、化疗乃至骨髓移植的疗效。然而,CAR-T细胞治疗作为一种新兴的癌症治疗技术,临床上有许多问题亟待解决。其中脱靶效应是医、患最担心的副反应之一(如前所述)。本发明通过向临床上通用的二代CAR结构中引入抑制T细胞激活的负信号去调控CAR-T细胞的活性,即构建了一条传递T细胞激活抑制性信号的CAR,与提供激活信号的CAR共表达在同一个T细胞上。本发明中负信号CAR胞外识别结构域为KIR2DL2分子的胞外段(KIR家族共有16个成员),识别的靶点是在正常组织细胞中高表达,在肿瘤细胞中低表达的HLA分子。相应地,类似的靶点还包括OPCML/HYAL2/DCC/SMAR1/E-cadherin等(在正常组织

细胞表面高表达、在肿瘤细胞表面低表达的分子)。传递负信号的胞内信号传导结构域为PD-1分子的胞内段,相应地,类似能抑制T细胞激活的负信号分子包括TIM-3/LAG-3/CTLA-4等(含有免疫受体络氨酸抑制基序ITIM或免疫受体络氨酸转换基序ITSM)分子。本发明实施例中选用的B淋巴细胞白血病模型及CD19靶点,应拓展至其他类型肿瘤及相应靶点。本发明提供了一种能识别正常组织细胞及肿瘤细胞上的靶点进而进行信号自我调控的创新型CAR-T细胞,能选择性地杀伤肿瘤细胞,保护正常组织细胞。

[0250] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001] 序列表

[0002] <110> 华东师范大学

[0003] 上海邦耀生物科技有限公司

[0004] <120> 一种安全型嵌合抗原受体T细胞及其用途

[0005] <130> P2018-0186

[0006] <160> 8

[0007] <170> PatentIn version 3.5

[0008] <210> 1

[0009] <211> 224

[0010] <212> PRT

[0011] <213> 人工序列(artificial sequence)

[0012] <400> 1

[0013] His Glu Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Arg

[0014] 1 5 10 15

[0015] Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val

[0016] 20 25 30

[0017] Arg Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly Lys Phe Lys Asp Thr

[0018] 35 40 45

[0019] Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe

[0020] 50 55 60

[0021] Ser Ile Gly Pro Met Met Gln Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr

[0022] 65 70 75 80

[0023] Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro

[0024] 85 90 95

[0025] Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala

[0026] 100 105 110

[0027] Gln Pro Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Ser Val Thr Leu Ser Cys

[0028] 115 120 125

[0029] Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu

[0030] 130 135 140

[0031] Ala His Glu Cys Arg Phe Ser Ala Gly Pro Lys Val Asn Gly Thr Phe

[0032] 145 150 155 160

[0033] Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Arg

[0034] 165 170 175

[0035] Cys Phe Gly Ser Phe Arg Asp Ser Pro Tyr Glu Trp Ser Asn Ser Ser

[0036] 180 185 190

[0037] Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Ile Gly Asn Pro Ser Asn Ser Trp Pro

[0038] 195 200 205

[0039] Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His

[0040] 210 215 220

[0041] <210> 2

- [0042] <211> 672
- [0043] <212> DNA
- [0044] <213> 人工序列 (artificial sequence)
- [0045] <400> 2
- [0046] catgagggag tccacagaaa accttcctc ctggcccacc caggtcgcct ggtgaaatca 60
- [0047] gaagagacag tcatcctgca atgttggtca gatgtcaggt ttgagcactt ctttctgca 120
- [0048] agagaaggga agttaaagga cactttgcac ctattggag agcaccatga tggggtctcc 180
- [0049] aaagccaact tctccatgg tcccatgatg caagacctg caggaccta cagatgctac 240
- [0050] gtttctgtta ctactcccc ctatcagttg tcagctcca gtgacctct ggacatcgtc 300
- [0051] atcacaggtc tatatgagaa accttctctc tcagcccagc cgggccccac gtttctggca 360
- [0052] ggagagagcg tgacctgtc ctgcagctcc cggagctct atgacatgta ccatctatcc 420
- [0053] agggaggggg aggcccata atgtaggtc tctgcaggc ccaaggtcaa cggaacattc 480
- [0054] caggccgact ttctctggg ccctgccacc cacggaggaa cctacagatg cttcggtctc 540
- [0055] ttccgtgact ctccatacga gtggtaaac tcgagtgacc cactgcttgt ttctgtcata 600
- [0056] gaaaccctt caaatagttg gccttcccc actgaaccaa gctctaaaac cggtaacccc 660
- [0057] cgacacctgc ac 672
- [0058] <210> 3
- [0059] <211> 97
- [0060] <212> PRT
- [0061] <213> 人工序列 (artificial sequence)
- [0062] <400> 3
- [0063] Cys Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln
- [0064] 1 5 10 15
- [0065] Pro Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr
- [0066] 20 25 30
- [0067] Gly Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val
- [0068] 35 40 45
- [0069] Pro Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser
- [0070] 50 55 60
- [0071] Gly Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro
- [0072] 65 70 75 80
- [0073] Arg Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro
- [0074] 85 90 95
- [0075] Leu
- [0076] <210> 4
- [0077] <211> 291
- [0078] <212> DNA
- [0079] <213> 人工序列 (artificial sequence)
- [0080] <400> 4
- [0081] tgctccggg ccgcacgagg gacaatagga gccaggcgca ccggccagcc cctgaaggag 60
- [0082] gaccctcag ccgtgcctgt gttctctgtg gactatggg agctggattt ccagtggcga 120
- [0083] gagaagaccc cggagcccc cgtgccctgt gtcctgagc agacggagta tgccaccatt 180

[0084] gtctttccta gcggaatggg cacctcatcc cccgcccgca ggggctcagc tgacggcct 240
 [0085] cggagtcccc agccactgag gcctgaggat ggacactgct cttggcccct c 291
 [0086] <210> 5
 [0087] <211> 411
 [0088] <212> PRT
 [0089] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0090] <400> 5
 [0091] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 [0092] 1 5 10 15
 [0093] His Ala Ala Arg Pro His Glu Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu
 [0094] 20 25 30
 [0095] Ala His Pro Gly Arg Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln
 [0096] 35 40 45
 [0097] Cys Trp Ser Asp Val Arg Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly
 [0098] 50 55 60
 [0099] Lys Phe Lys Asp Thr Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val
 [0100] 65 70 75 80
 [0101] Ser Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Met Met Gln Asp Leu Ala Gly
 [0102] 85 90 95
 [0103] Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser
 [0104] 100 105 110
 [0105] Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys
 [0106] 115 120 125
 [0107] Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Ser
 [0108] 130 135 140
 [0109] Val Thr Leu Ser Cys Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu
 [0110] 145 150 155 160
 [0111] Ser Arg Glu Gly Glu Ala His Glu Cys Arg Phe Ser Ala Gly Pro Lys
 [0112] 165 170 175
 [0113] Val Asn Gly Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His
 [0114] 180 185 190
 [0115] Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Asp Ser Pro Tyr Glu
 [0116] 195 200 205
 [0117] Trp Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Ile Gly Asn Pro
 [0118] 210 215 220
 [0119] Ser Asn Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn
 [0120] 225 230 235 240
 [0121] Pro Arg His Leu His Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 [0122] 245 250 255
 [0123] Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 [0124] 260 265 270
 [0125] Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala

[0126]	275	280	285		
[0127]	Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu				
[0128]	290	295	300		
[0129]	Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Cys Ser Arg Ala Ala Arg				
[0130]	305	310	315	320	
[0131]	Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp Pro				
[0132]		325	330	335	
[0133]	Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Gln				
[0134]		340	345	350	
[0135]	Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu Gln				
[0136]		355	360	365	
[0137]	Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser Ser				
[0138]		370	375	380	
[0139]	Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro Leu				
[0140]		385	390	395	400
[0141]	Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu				
[0142]		405	410		
[0143]	<210> 6				
[0144]	<211> 1236				
[0145]	<212> DNA				
[0146]	<213> 人工序列 (artificial sequence)				
[0147]	<400> 6				
[0148]	atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60				
[0149]	ccgcatgagg gaggccacag aaaaccttcc ctctggccc acccaggtcg cctggtgaaa 120				
[0150]	tcagaagaga cagtcacct gcaatgttg tcagatgtca ggtttgagca cttccttctg 180				
[0151]	cacagagaag ggaagttaa ggacacttg cacctcattg gagagacca tgatggggtc 240				
[0152]	tccaaagcca acttctccat cggctccatg atgcaagacc ttgcagggac ctacagatgc 300				
[0153]	tacggttctg ttactcactc cccctatcag ttgtcagctc ccagtgacc tctggacatc 360				
[0154]	gtcatcacag gtctatatga gaaaccttct ctctcagccc agccgggccc caccggttctg 420				
[0155]	gcaggagaga gcgtgacctt gtctgcagc tcccggagct cctatgacat gtaccatcta 480				
[0156]	tccaggagg gggaggcca tgaatgtagg ttctctgcag ggcccaaggt caacggaaca 540				
[0157]	ttccaggccg actttcctct gggccctgcc acccagggag gaacctacag atgcttcggc 600				
[0158]	tctttccgtg actctccata cgagtgtgca aactcagtg acccactgct tgtttctgtc 660				
[0159]	atagaaacc cttcaaatag ttggccttca cccactgaac caagctctaa aaccggtaac 720				
[0160]	ccccgacacc tgcacaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc 780				
[0161]	gcgtgcagc ccctgtcct gcgcccagag gcgtgccggc cagcggcggg gggcgagtg 840				
[0162]	cacacgagg ggctggactt cgctgtgat atctacatct gggcgccctt ggccgggact 900				
[0163]	tgtgggtcc ttctctgtc actggttata acccttact gctgctccc ggccgcacga 960				
[0164]	gggacaatag gagccaggcg caccggccag cccctgaagg aggacccctc agccgtgctt 1020				
[0165]	gtgttctctg tggactatgg ggagctgat ttccagtggc gagagaagac cccggagccc 1080				
[0166]	cccgtgccct gtgtccctga gcagacggag tatgccacca ttgtctttcc tagcggaatg 1140				
[0167]	ggcaccatcat cccccccg caggggtca gctgacggcc ctccggagtgc ccagccactg 1200				

[0168] aggcctgagg atggacactg ctcttgcccc ctctga 1236
 [0169] <210> 7
 [0170] <211> 314
 [0171] <212> PRT
 [0172] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0173] <400> 7
 [0174] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 [0175] 1 5 10 15
 [0176] His Ala Ala Arg Pro His Glu Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu
 [0177] 20 25 30
 [0178] Ala His Pro Gly Arg Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln
 [0179] 35 40 45
 [0180] Cys Trp Ser Asp Val Arg Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly
 [0181] 50 55 60
 [0182] Lys Phe Lys Asp Thr Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val
 [0183] 65 70 75 80
 [0184] Ser Lys Ala Asn Phe Ser Ile Gly Pro Met Met Gln Asp Leu Ala Gly
 [0185] 85 90 95
 [0186] Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser
 [0187] 100 105 110
 [0188] Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys
 [0189] 115 120 125
 [0190] Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Ser
 [0191] 130 135 140
 [0192] Val Thr Leu Ser Cys Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu
 [0193] 145 150 155 160
 [0194] Ser Arg Glu Gly Glu Ala His Glu Cys Arg Phe Ser Ala Gly Pro Lys
 [0195] 165 170 175
 [0196] Val Asn Gly Thr Phe Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His
 [0197] 180 185 190
 [0198] Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Asp Ser Pro Tyr Glu
 [0199] 195 200 205
 [0200] Trp Ser Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Ile Gly Asn Pro
 [0201] 210 215 220
 [0202] Ser Asn Ser Trp Pro Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn
 [0203] 225 230 235 240
 [0204] Pro Arg His Leu His Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 [0205] 245 250 255
 [0206] Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 [0207] 260 265 270
 [0208] Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
 [0209] 275 280 285

[0210] Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
 [0211] 290 295 300
 [0212] Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 [0213] 305 310
 [0214] <210> 8
 [0215] <211> 945
 [0216] <212> DNA
 [0217] <213> 人工序列 (artificial sequence)
 [0218] <400> 8
 [0219] atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
 [0220] ccgcatgagg gagtccacag aaaaccttcc ctctggccc acccaggtcg cctggtgaaa 120
 [0221] tcagaagaga cagtcatcct gcaatgttgg tcagatgtca ggtttgagca cttccttctg 180
 [0222] cacagagaag ggaagttaa ggacaccttg cacctcattg gagagcacca tgatggggtc 240
 [0223] tccaaagcca acttctccat cggctccatg atgcaagacc ttgcagggac ctacagatgc 300
 [0224] tacggttctg ttactcactc cccctatcag ttgtcagctc ccagtgacc tctggacatc 360
 [0225] gtcatcacag gtctatatga gaaaccttct ctctcagccc agccgggccc cacggttctg 420
 [0226] gcaggagaga gcgtgacctt gtctgcagc tcccggagct cctatgacat gtaccatcta 480
 [0227] tccagggagg gggaggcca tgaatgtagg ttctctgcag ggcccaaggt caacggaaca 540
 [0228] ttccaggccg actttcctct gggccctgcc acccacggag gaacctacag atgcttcggc 600
 [0229] tctttccgtg actctccata cgagtgttca aactcgagtg acccactget tgtttctgtc 660
 [0230] atagaaacc cttcaaatag ttggccttca cccactgaac caagctctaa aaccggtaac 720
 [0231] ccccgacacc tgcacaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gcccaccatc 780
 [0232] gcgtcgcagc ccctgtccct gcgcccagag gcgtgccggc cagcggcggg gggcgcagtg 840
 [0233] cacacgaggg ggctggactt cgctgtgat atctacatct gggcgccctt ggccgggact 900
 [0234] tgtggggtec ttctctgtc actggttata accctttact gctga 945



图1



图2



图3

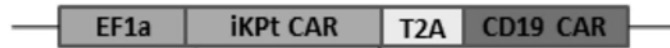


图4

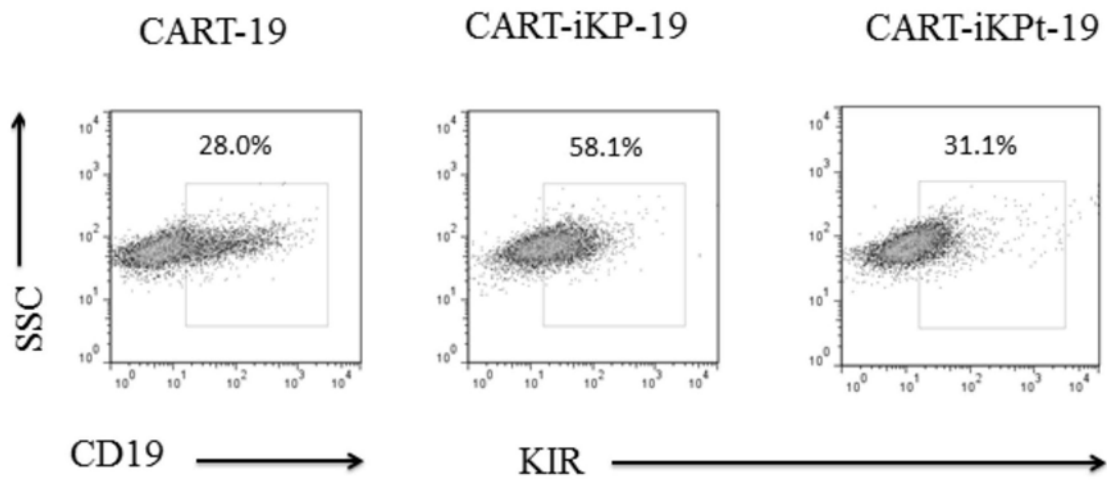
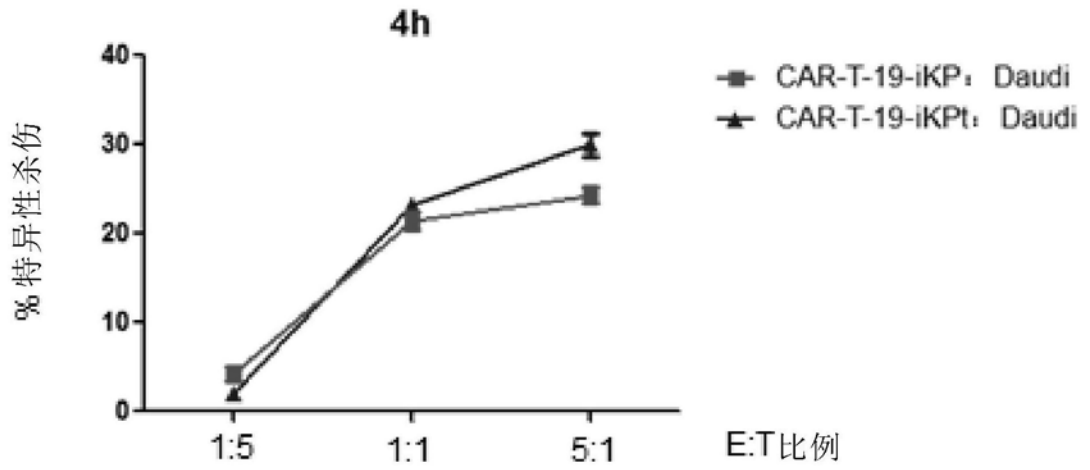


图5

6A



6B

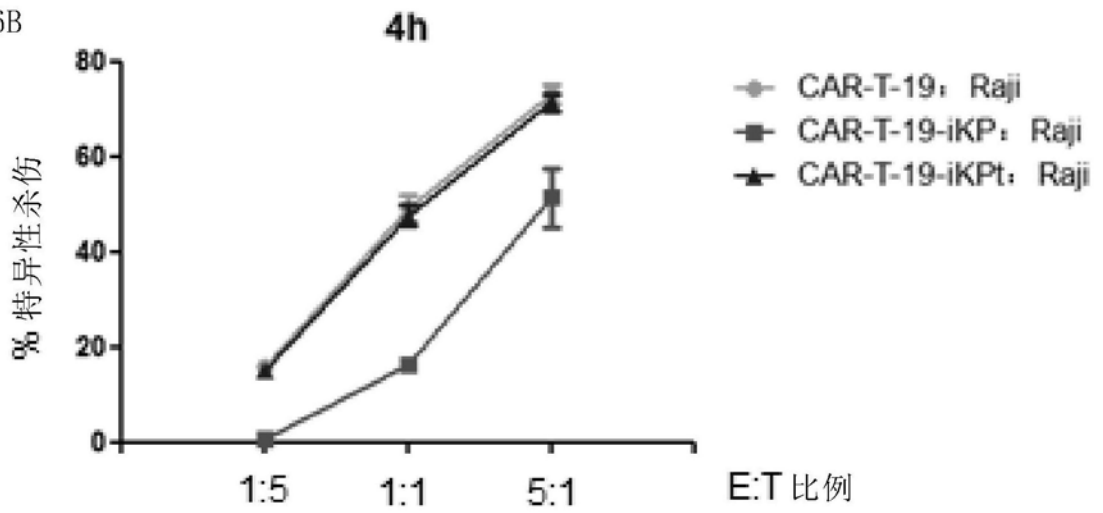


图6