



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108624607 B

(45) 授权公告日 2021.11.16

(21) 申请号 201710158195.6

(22) 申请日 2017.03.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108624607 A

(43) 申请公布日 2018.10.09

(73) 专利权人 上海恒润达生生物科技股份有限公司

地址 201210 上海市浦东新区中国(上海)
自由贸易区张江路1238弄1号楼1楼D
座

(72) 发明人 黄飞 金涛 王海鹰 何凤
史子啸

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 陶启长 韦东

(51) Int.Cl.

G12N 15/62 (2006.01)

G07K 19/00 (2006.01)

G12N 15/867 (2006.01)

G12N 5/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 105330750 A, 2016.02.17

CN 105330750 A, 2016.02.17

CN 105849120 A, 2016.08.10

CN 103648525 A, 2014.03.19

WO 2015188141 A2, 2015.12.10

审查员 刘俊

权利要求书3页 说明书14页
序列表6页 附图3页

(54) 发明名称

靶向mesothelin的嵌合抗原受体并对其双重修饰的方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及靶向间皮素的嵌合抗原受体及其用途。具体而言,本发明提供一种多核苷酸序列,选自:(1)含有依次连接的抗间皮素单链抗体的编码序列、人CD8 α 较链区的编码序列、人CD8跨膜区的编码序列、人CD28胞内区的编码序列、人41BB胞内区的编码序列、人CD3 ζ 胞内区的编码序列、任选的EGFR的含胞外结构域III和胞外结构域IV的片段的编码序列和人的IL18结构编码序列的多核苷酸序列;和(2)(1)所述多核苷酸序列的互补序列。本发明还提供相关的融合蛋白、含所述编码序列的载体,以及所述融合蛋白、编码序列、载体的用途。本发明制备的MesotEGFR-IL18 CART细胞对特异性肿瘤细胞具强烈的杀伤功能,本发明制备的CART细胞带有tEGFR组件其具有体内示踪和安全开关的作用,本发明制备的CART细胞还能分泌高浓度的IL18细胞因子。

CN 108624607 B

1. 一种多核苷酸序列,所述多核苷酸序列选自:

(1) 含有依次连接的抗间皮素单链抗体的编码序列、人CD8 α 铰链区的编码序列、人CD8跨膜区的编码序列、人CD28胞内区的编码序列、人41BB胞内区的编码序列、人CD3 ζ 胞内区的编码序列、任选含有EGFR的含胞外结构域III和胞外结构域IV的片段的编码序列、和任选含有人IL-18片段的编码序列的多核苷酸序列;和

(2) (1)所述多核苷酸序列的互补序列,

其中,所述抗间皮素单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第23-128位氨基酸序列所示;所述抗间皮素单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第141-259位氨基酸序列所示;所述人CD8 α 铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第260-306位氨基酸序列所示;所述人CD8跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第307-328位氨基酸序列所示;所述人CD28胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第329-369位氨基酸序列所示;所述人41BB胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第370-417位氨基酸序列所示;所述人CD3 ζ 胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第418-528位氨基酸序列所示;所述EGFR的片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第577-911位氨基酸序列所示;所述人IL-18片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第957-1113位氨基酸序列所示,

所述多核苷酸序列还含有2A肽和人IL-2信号肽的编码序列,所述2A肽和人IL-2信号肽设置于所述人IL-18片段的N端。

2. 如权利要求1所述的多核苷酸序列,其特征在于,

所述抗间皮素单链抗体的轻链可变区的编码序列如SEQ ID NO:1第67-384位多核苷酸所示;所述抗间皮素单链抗体的重链可变区的编码序列如SEQ ID NO:1第421-777位多核苷酸所示;所述人CD8 α 铰链区的编码序列如SEQ ID NO:1第778-918位多核苷酸所示;所述人CD8跨膜区的编码序列如SEQ ID NO:1第919-984位多核苷酸所示;所述人CD28胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1第985-1107位多核苷酸所示;所述人41BB胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1第1108-1251位多核苷酸所示;所述人CD3 ζ 胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1第1252-1584位多核苷酸所示;所述EGFR的片段的编码序列如SEQ ID NO:1第1743-2733位多核苷酸所示;所述人IL-18的片段的编码序列如SEQ ID NO:1第2869-3339位多核苷酸所示。

3. 如权利要求1或2所述的多核苷酸序列,其特征在于,所述多核苷酸序列在所述抗间皮素单链抗体的编码序列前还含有信号肽的编码序列。

4. 如权利要求3所述的多核苷酸序列,其特征在于,在所述抗间皮素单链抗体的编码序列前的所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第1-22位氨基酸序列所示。

5. 如权利要求4所述的多核苷酸序列,其特征在于,在所述抗间皮素单链抗体的编码序列前的所述信号肽的编码序列如SEQ ID NO:1第1-66位多核苷酸所示。

6. 如权利要求1或2所述的多核苷酸序列,其特征在于,所述多核苷酸序列还含有2A肽和GM-CSF受体 α 链信号肽的编码序列,所述2A肽和GM-CSF受体 α 链信号肽设置于所述EGFR片段的N端。

7. 如权利要求6所述的多核苷酸序列,其特征在于,所述GM-CSF受体 α 链信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第555-576位氨基酸所示。

8. 如权利要求6或7所述的多核苷酸序列,其特征在于,所述GM-CSF受体 α 链信号肽的编码序列如SEQ ID NO:1第1663-1742位多核苷酸所示。

9. 如权利要求1或2所述的多核苷酸序列,其特征在于,所述人IL-2信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第937-956位氨基酸所示。

10. 如权利要求9所述的多核苷酸序列,其特征在于,所述人IL-2信号肽的编码序列如SEQ ID NO:1第2809-2868位多核苷酸所示。

11. 一种融合蛋白,所述融合蛋白含有依次连接的抗间皮素单链抗体、人CD8 α 铰链区、人CD8跨膜区、人CD28胞内区、人41BB胞内区和人CD3 ζ 胞内区的融合蛋白,任选含有EGFR的胞外结构域III和胞外结构域IV的片段的编码序列,和任选含有人IL18片段的编码序列,

所述抗间皮素单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第23-128位氨基酸序列所示;所述抗间皮素单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第141-259位氨基酸序列所示;所述人CD8 α 铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第260-306位氨基酸序列所示;所述人CD8跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第307-328位氨基酸序列所示;所述人CD28胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第329-369位氨基酸序列所示;所述人41BB胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第370-417位氨基酸序列所示;所述人CD3 ζ 胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第418-528位氨基酸序列所示;所述EGFR的片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第577-911位氨基酸序列所示;所述人IL-18片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第957-1113位氨基酸序列所示,

所述融合蛋白还在所述人IL-18片段的N端含有2A肽和人IL-2信号肽。

12. 如权利要求11所述的融合蛋白,其特征在于,所述抗间皮素单链抗体为抗间皮素单克隆抗体SS1。

13. 如权利要求11或12所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白具有以下一个或多个特征:

所述融合蛋白在所述抗间皮素单链抗体的N端还含有信号肽;

所述融合蛋白还含有2A肽和GM-CSF受体 α 链信号肽,所述2A肽和GM-CSF受体 α 链信号肽设置于所述EGFR片段的N端。

14. 如权利要求13所述的融合蛋白,其特征在于,

所述抗间皮素单链抗体的N端的信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第1-22位氨基酸所示;

所述GM-CSF受体 α 链信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第555-576位氨基酸所示;

所述人IL-2信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第937-956位氨基酸所示。

15. 如权利要求11所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第23-528位氨基酸所示,或如SEQ ID NO:2第23-911位氨基酸所示,或如SEQ ID NO:2第1-1113位氨基酸所示,或如SEQ ID NO:2所示。

16. 一种核酸构建物,所述核酸构建物含有权利要求1-10中任一项所述的多核苷酸序列。

17. 如权利要求16所述的核酸构建物,其特征在于,所述核酸构建物为载体。

18. 如权利要求16或17所述的核酸构建物,其特征在于,所述核酸构建物为逆转录病毒载体,含有复制起始位点,3' LTR,5' LTR,ps包装信号,酶切位点,土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件,以及权利要求1-11中任一项所述的多核苷酸序列。

19. 一种逆转录病毒,所述逆转录病毒含有权利要求16-18中任一项所述的核酸构建

物。

20. 一种基因修饰的T细胞或含该基因修饰的T细胞的药物组合物,其特征在于,所述细胞含有权利要求1-10中任一项所述的多核苷酸序列,或含有权利要求16-18中任一项所述的核酸构建物,或感染了权利要求19所述的逆转录病毒,或稳定表达权利要求11-15中任一项所述的融合蛋白。

21. 权利要求1-10中任一项所述的多核苷酸序列、权利要求11-15中任一项所述的融合蛋白、权利要求16-18中任一项所述的核酸构建物或权利要求19所述的逆转录病毒在制备包含活化的T细胞的试剂中的应用。

22. 权利要求1-10中任一项所述的多核苷酸序列、权利要求11-15中任一项所述的融合蛋白、权利要求16-18中任一项所述的核酸构建物、权利要求19所述的逆转录病毒、或权利要求20所述的基因修饰的T细胞或其药物组合物在制备治疗间皮素介导的疾病的药物中的用途。

23. 如权利要求22所述的用途,其特征在于,所述间皮素介导的疾病选自卵巢癌、胸膜间皮瘤、胰腺癌,以及宫颈、头、颈、阴道、肺及食管的鳞癌。

24. 如权利要求22所述的用途,其特征在于,所述间皮素介导的疾病为恶性胸膜间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌或肺癌。

靶向mesothelin的嵌合抗原受体并对其双重修饰的方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于嵌合抗原受体领域,具体涉及靶向间皮素的嵌合抗原受体及其用途。

背景技术

[0002] 胰腺癌(Pancreatic Carcinoma)是临床上常见的消化系统恶性肿瘤,多见于50岁以上的人群。其发病率有明显的地区差异,近年来发病率呈逐渐上升趋势,在欧美国家已是第4位常见的恶性肿瘤,居消化道癌症死因的第2位,仅次于大肠癌,其发病隐匿,早期症状无特异性,手术切除率低。在肿瘤发生发展的进程中,很多基因的活化及其产物的表达起到了重要的作用,其内在确切的分子机制尚不完全明确,随着现代影像及内镜技术的飞速发展,对一些症状体征及影像表现较为明显的胰腺癌,明确诊断已没有太大困难,但此时大多已失去最佳手术时机,而对于一些早期患者诊断较难。因此寻求新的治疗手段,对于胰腺癌的治疗是当务之急。

[0003] 在肿瘤的浸润转移过程的研究方面,间皮素(Mesothelin)也是当前研究的热点。1996年Chang等利用宫颈癌HeLa细胞克隆出单克隆抗体识别的抗原,研究发现该抗原存在于正常间皮细胞,故命名为Mesothelin。肿瘤患者术后生存率低预后差的主要原因与它的浸润转移有关,肿瘤的浸润转移机制研究是目前的热点和难点。Mesothelin基因编码一种69kDa的前体蛋白,经加工形成一个40kDa的膜结合蛋白(即Mesothelin)和一个31kDa称之为巨核细胞促进因子MPF的脱落片断。间皮素高表达于多种肿瘤组织中,卵巢癌患者血清中的Mesothelin mRNA和蛋白质水平高表达,组织切片染色显示非粘蛋白卵巢癌中有66%呈间皮素阳性;在胸膜间皮瘤的检测中发现,15例确诊为上皮性间皮瘤的病例全都呈阳性,4例肉瘤性间皮瘤全为阴性;Argani等研究报道,切除的原发性胰腺癌中,免疫组化法检测表明60例有54例强阳性,而周围正常胰腺组织则无Mesothelin反应活性;在其他实体肿瘤分析中,宫颈、头、颈、阴道、肺及食管的鳞癌冰冻切片中均可发现间皮素免疫活性,肺腺癌、子宫内膜癌、交界性滑膜肉瘤及结缔组织增生性小圆细胞肿瘤有少量间皮素表达,在乳腺癌,甲状腺癌、肾细胞癌、膀胱移行细胞癌、黑色素癌及肝癌中仅有少许或没有Mesothelin表达。Mesothelin的生物学功能尚未明确。Pastan等构建了一种Mesothelin基因突变小鼠,这些基因突变小鼠与同胞的野生型小鼠生长和繁殖相同,并且二者的血小板计数没有统计学差异;有研究显示Mesothelin与CA 125结合能介导细胞粘附,由此研究者们也认为CA 125和Mesothelin在卵巢癌的转移扩散中可能起重要作用;另外,有研究亦表明,Mesothelin基因的表达受到Wnt等重要信号途径的调节,如在卵巢癌和胰腺癌中,Wnt信号转导途径持续激活促使Mesothelin表达增加。虽然,Mesothelin的功能及其致癌作用仍有待于进一步明确,但其在正常组织中的分布有限而在某些肿瘤组织高度表达的特征,因而Mesothelin可作为肿瘤特异性抗体治疗的靶向。

[0004] 嵌合抗原受体(Chimeric Antigen Receptor-T cell,CAR-T)T细胞是指经基因修饰后,能以MHC非限制性方式识别特定目的抗原,并且持续活化扩增的T细胞。2012年国际细

胞治疗协会年会中指出生物免疫细胞治疗已经成为手术、放疗、化疗外的第四种治疗肿瘤的手段,并将成为未来肿瘤治疗必选手段。嵌合抗原受体(CAR)是CAR-T的核心部件,赋予T细胞HLA非依赖的方式识别肿瘤抗原的能力,这使得经过CAR改造的T细胞相较于天然T细胞表面受体TCR能够识别更广泛的目标。CAR的基础设计中包括一个肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)结合区(通常来源于单克隆抗体抗原结合区域的scFV段),一个胞外铰链区,一个跨膜区和一个胞内信号区。目标抗原的选择对于CAR的特异性、有效性以及基因改造T细胞自身的安全性来讲都是关键的决定因素。

[0005] 目前在ClinicalTrials.gov注册的抗Mesothelin CAR-T细胞治疗临床试验有10项,主要针对胰腺癌、卵巢癌、胸膜瘤、肺癌以及乳腺癌等恶性肿瘤。在宾夕法尼亚大学开展的I期临床研究中,病人都是在接受过一线治疗后病情进一步发展,并且肿瘤组织表达Mesothelin,他们接受了瞬转CAR mRNA的T细胞治疗。这种Mesothelin特异性的二代CAR具有CD3 ξ 和4-1BB共刺激因子结构域。这些Mesothelin特异性的CAR T存活期短,在两位病人中表现出了抗肿瘤作用,可见Mesothelin能够作为CAR T细胞识别的抗原,并且瞬转mRNA的方式也是可行的。另一项宾夕法尼亚大学开展的I期临床研究使用的是慢病毒转染的Mesothelin特异性CAR。这项开始于2014年7月的研究是针对耐化疗的恶性胰腺癌、上皮性卵巢癌和恶性上皮胸膜间皮瘤。在6位病人的早期研究结果中,4位病人在CAR T细胞输注28天后病情稳定。CAR T细胞输注没有引起急性副反应,并且相比mRNA瞬转,慢病毒转染构建的CAR T细胞的持续性得到提升。

[0006] 通过临床试验的开展以及对试验结果的分析,研究者们对抗Mesothelin CAR-T细胞治疗方法在应用中的缺陷有了更深刻的认识,从而能进一步开展针对性的研究克服存在的问题。鉴于在实体瘤治疗中,促使CAR-T细胞最大效率地进入肿瘤组织是取得治疗功效的重要保证。根据胸膜间皮瘤细胞能大量分泌趋化因子CCL2,宾夕法尼亚大学Car1 June研究小组设计了同时表达CCL2受体CCR2的抗Mesothelin CAR-T细胞,从而通过CCL2/CCR2的作用趋化CAR-T细胞至肿瘤组织高效发挥杀伤作用。斯隆-凯特琳癌症中心则恶性胸膜瘤中比较了胸腔内输注和系统输注CAR T细胞的效果,发现胸腔内输注方式能使细胞持续性强,肿瘤内部积聚多,发挥更好的抗肿瘤作用。斯隆-凯特琳癌症中心即将就该种输注方式的安全性进一步开展临床研究。

[0007] CAR-T细胞的一大优点是它们是活性药物,一旦输入,生理机制会调控T细胞的平衡、记忆形成和抗原驱动的扩增。然而,这种治疗尚未完善,T细胞会脱靶而攻击其他的组织,或扩增量过高,超出治疗所需。鉴于CAR-T细胞已被纳入标准治疗范围,设计病人或药物可控的启动或关闭机制来调控CAR-T细胞的存在是非常有用的。由于技术原因,关闭机制更易应用于T细胞。作为其中之一,iCas9系统正在临床研究当中。细胞在表达iCas9时,使用小分子化合物可诱导iCas9前体分子形成二聚体,激活凋亡途径,从而实现清除细胞的目的。在移植物抗宿主病中,小分子AP1903已被用于诱导iCas9二聚体和清除T细胞,表明了这种方法的可行性(Clin Cancer Res.2016Apr 15;22(8):1875-84.)。

[0008] 另外,还可利用临床上已经使用的清除性抗体,使CAR-T细胞同时表达这些抗体针对的蛋白,如tEGFR,在治疗相关的毒性反应产生或是治疗已经完成后,通过给予抗体药物清除相应的CAR-T细胞(Sci Transl Med 2015;7:275ra22.)。

[0009] 白细胞介素18(interleukin-18),首先作为INF- γ 诱导因子,由于其在炎症和免

疫应答中的重要作用而被发现。IL-18是1995年Okamura等在脂多糖诱导的小鼠中毒性休克的肝脏中提取出[Nature, 1995, 378 (6552): 88.], 结构及胞内信号转导通路类似于IL-1家族, 而功能类似于IL-12家族的1种蛋白分子。但是与IL-12相比, IL-18有更强的诱导生成INF- γ 的能力。T细胞、NK细胞、树突状细胞、枯否细胞、关节软骨细胞、成骨细胞及滑膜成纤维细胞等均能分泌IL-18。一些报道也提到了, 癌症细胞也可以分泌IL-18。IL-18通过与其受体, 即IL-18R的结合来发挥其作用。IL-18受体(IL-18R)由异源二聚体组成, 即 α 链(IL-18R α)和 β 链(IL-18R β)。IL-18R广泛地存在于多种细胞中, 由于其只表达于Th1细胞表面, 所以可以将IL-18R作为区分Th1和Th2 2种细胞的表面分子标志。同时, IL-18R也在NK细胞和中性粒细胞中表达[Interferon Cytokine Res, 2006, 26 (7): 489.]。

[0010] 众所周知, IL-18有强效的诱导产生INF- γ 的能力, 它在独立或者有IL-12参与的情况下可以激活免疫细胞。IL-18通过将AP-1连接到INF- γ 启动子区域来直接调节INF- γ 启动子的活性, 而IL-12只有在T细胞CD28联合刺激信号激活后才诱导INF- γ 产生[Immunol, 1998, 160 (8): 3642.]。IL-18同样也有激活免疫细胞来对抗病原的作用, 它介导的免疫应答可以对抗细菌、病毒和真菌感染, 还可以通过激活T细胞及NK细胞来对抗病原。

[0011] IL-18作为1种免疫激活剂而被熟知, 通过IL-18激活的NK或者T细胞可以消除自发性肿瘤或者病原感染细胞。IL-18在肿瘤移植中通过提高NK细胞的活性进而发挥其抗肿瘤作用, 有报道证实了IL-18的抗肿瘤作用通过NK细胞来介导。IL-18还可以通过抑制血管生成而有效抑制肿瘤细胞生长[Biochem Biophys Res Commun, 2006, 344 (4): 1284.]。

[0012] 本发明对构建的靶向Mesothelin的四代CAR, 进行了双重修饰, 第一重修饰是引入了安全开关即tEGFR结构, 它既可以使CAR-T细胞体内进行很好的被示踪, 更重要的是此结构可以作为CAR-T细胞的安全开关: 即不想其发挥作用时可加入妥西单抗, 安全有效的控制输注的针对Mesothelin靶点的CAR-T细胞在体内发挥作用; 第二重修饰是引入了IL18结构, IL18是INF- γ 的激活剂, 有了此结构的加入, 构建的CAR-T细胞将会有更强有力的杀伤功能。所以本发明既在安全性上对CAR-T细胞进行了修饰又增加了CAR-T细胞的功能性。为临床实验和临床治疗奠定良好的基础。

[0013] 随着CAR-T细胞治疗经验的积累和不断完善, 其在实体肿瘤中的应用越来越受到各界关注。在此环境下, 我们要加快步伐, 利用自身已有的工作基础、研发团队、医疗团队申请开展临床试验, 推动CAR-T细胞治疗在实体瘤的道路上快速前进。

发明内容

[0014] 本发明第一方面提供一种多核苷酸序列, 所述多核苷酸序列选自:

[0015] (1) 含有依次连接的抗间皮素单链抗体的编码序列、人CD8 α 铰链区的编码序列、人CD8跨膜区的编码序列、人CD28胞内区的编码序列、人41BB胞内区的编码序列、人CD3 ζ 胞内区的编码序列、任选的EGFR的含胞外结构域III和胞外结构域IV的片段的编码序列、和人的IL18结构编码序列的多核苷酸序列; 和

[0016] (2) (1)所述多核苷酸序列的互补序列。

[0017] 在一个或多个实施方案中, 所述多核苷酸序列在所述抗间皮素单链抗体的编码序列前还含有信号肽的编码序列。在一个或多个实施方案中, 所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2第1-22位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中, 所述抗间皮素单链抗体的轻链可

变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第23-128位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述抗间皮素单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第141-259位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD8 α 铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第260-306位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD8跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第307-328位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD28胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第329-369位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述人41BB胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第370-417位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD3 ζ 胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第418-528位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述EGFR的片段含有EGFR的胞外结构域III、胞外结构域IV以及跨膜区,或由EGFR的胞外结构域III、胞外结构域IV以及跨膜区组成。在一个或多个实施方案中,所述EGFR的片段含有人EGFR的第310-646位氨基酸序列,或由人EGFR的第310-646位氨基酸序列组成。在一个或多个实施方案中,所述EGFR的片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第577-911位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述多核苷酸序列还含有GM-CSF受体 α 链信号肽的编码序列,所述GM-CSF受体 α 链信号肽设置于所述EGFR片段的N端。在一个或多个实施方案中,所述GM-CSF受体 α 链信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第555-576位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述多核苷酸序列还含有连接所述GM-CSF受体 α 链信号肽与所述人CD3 ζ 胞内区的接头序列的编码序列。在一个或多个实施方案中,所述接头序列的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第529-554位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述IL-2信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第937-956位氨基酸所示。在一个或多个实施方案中,所述IL-18的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第957-1113位氨基酸所示。

[0018] 在一个或多个实施方案中,在所述抗间皮素单链抗体的编码序列前的所述信号肽的编码序列如SEQ ID NO:1第1-66位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述抗间皮素单链抗体的轻链可变区的编码序列如SEQ ID NO:1第67-384位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述抗间皮素单链抗体的重链可变区的编码序列如SEQ ID NO:1第421-777位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD8 α 铰链区的编码序列如SEQ ID NO:1第778-918位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD8跨膜区的编码序列如SEQ ID NO:1第919-984位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD28胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1第985-1107位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述人41BB胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1第1108-1251位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述人CD3 ζ 胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1第1252-1584位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,连接所述GM-CSF受体 α 链信号肽与所述人CD3 ζ 胞内区的所述接头序列的编码序列如SEQ ID NO:1第1585-1662位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述GM-CSF受体 α 链信号肽的编码序列如SEQ ID NO:1第1663-1728位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述EGFR的片段的编码序列如SEQ ID NO:1第1729-2733位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述IL-2信号肽的编码序列如SEQ ID NO:1第2809-2868位核苷酸序列所示。在一个或多个实施方案中,所述IL-18的片段的编码序列如SEQ ID NO:1第2869-3339位核苷酸序列所示。

[0019] 本发明第二方面提供一种融合蛋白,所述融合蛋白选自:

[0020] (1) 含有依次连接的抗间皮素单链抗体、人CD8 α 铰链区、人CD8跨膜区、人CD28胞内

区、人41BB胞内区和人CD3 ζ 胞内区的融合蛋白和任选的EGFR的含胞外结构域III和胞外结构域IV的片段的编码序列和人的IL18结构编码序列；和

[0021] (2) 在(1)限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且保留活化T细胞活性的由(1)衍生的融合蛋白；

[0022] 优选地,所述抗间皮素单链抗体为抗间皮素单克隆抗体SS1。

[0023] 本发明第三方面提供一种核酸构建物,所述核酸构建物含有本文所述的多核苷酸序列。

[0024] 在一个或多个实施方案中,所述核酸构建物为载体。在一个或多个实施方案中,所述核酸构建物为逆转录病毒载体,含有复制起始位点,3' LTR,5' LTR,pis包装信号,酶切位点,土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件,本文所述的多核苷酸序列,以及任选的可选择的标记。

[0025] 本发明第四方面提供一种逆转录病毒,所述逆转录病毒含有本文所述的核酸构建物,优选含有所述载体,更优选含有所述逆转录病毒载体。

[0026] 本发明第五方面提供一种基因修饰的T细胞,所述细胞含有本文所述的多核苷酸序列,或含有本文所述的核酸构建物,或感染了本文所述的逆转录病毒,或稳定表达本文所述的融合蛋白和任选的EGFR的含胞外结构域III、胞外结构域IV和任选的跨膜区的片段,或稳定表达本文所述的融合蛋白和任选的IL-18片段部分。

[0027] 本发明第六方面提供一种含本文所述的基因修饰的T细胞的药物组合物。

[0028] 本发明第七方面提供本文所述的多核苷酸序列、融合蛋白、核酸构建物或逆转录病毒在制备活化的T细胞中的应用。

[0029] 本发明第八方面提供本文所述的多核苷酸序列、融合蛋白、核酸构建物、逆转录病毒、或基因修饰的T细胞或其药物组合物在制备治疗间皮素介导的疾病的药物中的用途。

[0030] 在一个或多个实施方案中,所述间皮素介导的疾病为卵巢癌、胸膜间皮瘤、胰腺癌,以及宫颈、头、颈、阴道、肺及食管的鳞癌。在一个或多个实施方案中,所述间皮素介导的疾病为恶性胸膜间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌及肺癌。

附图说明

[0031] 图1:MSCV-Meso-tEGFR-IL18CAR逆转录病毒表达载体(RV-Meso-tEGFR-IL18)示意图。SP:信号肽;VL:轻链可变区;Lk:接头(G_4S)₃;VH:重链可变区;H:CD8 α 铰链区;TM:CD8跨膜区;WPRE:土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件。

[0032] 图2:MSCV-Meso-tEGFR-IL18CAR逆转录病毒表达载体(RV-Meso-tEGFR-IL18)的部分测序结果峰值图。

[0033] 图3为流式细胞仪显示逆转录病毒感染T细胞72小时的Meso-tEGFR-IL18 CART表达效率

[0034] 图4为ELISA检测RV-Meso CAR-tEGFR-IL18病毒上清和Meso-tEGFR-IL18 CART上清中IL18量

[0035] 图5为流式细胞仪显示靶细胞K562-Meso细胞Mesothelin表达

[0036] 图6为制备5天的Meso-tEGFR-IL18 CART细胞与靶细胞共培养5小时CD107a表达

[0037] 图7为制备5天的Meso-tEGFR-IL18 CART细胞与靶细胞共培养5小时INF- γ 的分泌

[0038] 图8为制备5天的Meso-tEGFR-IL18 CART细胞与靶细胞共培养16小时后对肿瘤细胞的杀伤作用

具体实施方式

[0039] 本发明提供一种靶向间皮素的嵌合抗原受体(CAR)。该CAR含有依次连接的抗间皮素单链抗体、人CD8 α 铰链区、人CD8跨膜区、人CD28胞内区、人41BB胞内区、人CD3 ζ 胞内区、任选的EGFR的胞外结构域III和胞外结构域IV的片段和人的IL18结构片段。

[0040] 适用于本发明的抗间皮素单链抗体可衍生自本领域周知的各种抗间皮素单克隆抗体。优选的是,这些单克隆抗体特异性识别间皮素第296到390位氨基酸区段。

[0041] 因此,在某些实施方案中,适用于本发明的抗间皮素单链抗体含有特异性识别人间皮素的第296到390位氨基酸区段的单克隆抗体的轻链可变区和重链可变区。任选地,所述轻链可变区和重链可变区可通过接头序列连接在一起。可举例的这类单链抗体包括但不限于YP218Fv-PE38、YP223和SS1。在某些实施方案中,所述单克隆抗体是SS1。

[0042] 形成本发明的融合蛋白,如抗间皮素单链抗体的轻链可变区和重链可变区、人CD8 α 铰链区、人CD8跨膜区、人CD28胞内区、41BB和人CD3 ζ 胞内区等,相互之间可直接连接,或者可通过接头序列连接。接头序列可以是本领域周知的适用于抗体的接头序列,例如含G和S的接头序列。通常,接头含有一个或多个前后重复的基序。例如,该基序可以是GGGS、GGGGS、SSSSG、GSGSA和GGSGG。优选地,该基序在接头序列中是相邻的,在重复之间没有插入氨基酸残基。接头序列可以包含1、2、3、4或5个重复基序组成。接头的长度可以是3~25个氨基酸残基,例如3~15、5~15、10~20个氨基酸残基。在某些实施方案中,接头序列是多甘氨酸接头序列。接头序列中甘氨酸的数量无特别限制,通常为2~20个,例如2~15、2~10、2~8个。除甘氨酸和丝氨酸外,接头中还可含有其它已知的氨基酸残基,例如丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)、苯丙氨酸(F)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)等。

[0043] 应理解,在基因克隆操作中,常常需要设计合适的酶切位点,这势必在所表达的氨基酸序列末端引入了一个或多个不相干的残基,而这并不影响目的序列的活性。为了构建融合蛋白、促进重组蛋白的表达、获得自动分泌到宿主细胞外的重组蛋白、或利于重组蛋白的纯化,常常需要将一些氨基酸添加至重组蛋白的N-末端、C-末端或该蛋白内的其它合适区域内,例如,包括但不限于,适合的接头肽、信号肽、前导肽、末端延伸等。因此,本发明的融合蛋白(即所述CAR)的氨基端或羧基端还可含有一个或多个多肽片段,作为蛋白标签。任何合适的标签都可以用于本文。例如,所述的标签可以是FLAG,HA,HA1,c-Myc,Poly-His,Poly-Arg,Strep-TagII,AU1,EE,T7,4A6, ϵ ,B,gE以及Ty1。这些标签可用于对蛋白进行纯化。

[0044] 本发明也包括SEQ ID NO:2第23-528位氨基酸序列所示的CAR、SEQ ID NO:2第23-911位氨基酸序列所示的CAR、SEQ ID NO:2第1-528位氨基酸序列所示的CAR或SEQ ID NO:2所示的CAR的突变体。这些突变体包括:与该CAR具有至少80%,优选至少85%,优选至少90%,优选至少95%,优选至少97%的序列相同性并保留该CAR的生物学活性(如活化T细胞)的氨基酸序列。可采用例如NCBI的BLASTp计算两条比对的序列之间的序列相同性。

[0045] 突变体还包括:在SEQ ID NO:2第23-528位所示的氨基酸序列、SEQ ID NO:2第23-911位所示的氨基酸序列、SEQ ID NO:2第1-528位所示的氨基酸序列或SEQ ID NO:2所示的

氨基酸序列中具有一个或数个突变(插入、缺失或取代)、同时仍保留该CAR的生物学活性的氨基酸序列。所述数个突变通常指1—10个以内,例如1—8个、1—5个或1—3个。取代优选是保守性取代。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行保守性取代时,通常不会改变蛋白质或多肽的功能。“性能相近或相似的氨基酸”包括例如,具有相似侧链的氨基酸残基的家族,这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,在本发明多肽中用来自同一侧链类的另一氨基酸残基替换一个或几个位点,将不会在实质上影响其活性。

[0046] 本发明包括编码本发明融合蛋白的多核苷酸序列。本发明的多核苷酸序列可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。本发明也包括编码融合蛋白的多核苷酸序列的简并变体,即编码相同的氨基酸序列但核苷酸序列有所不同的核苷酸序列。

[0047] 本文所述的多核苷酸序列通常可以用PCR扩增法获得。具体而言,可根据本文所公开的核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。例如,在某些实施方案中,编码本文所述融合蛋白的多核苷酸序列如SEQ ID NO:1第67—1584位核苷酸所示,或如SEQ ID NO:1第1-1584位核苷酸所示。

[0048] 在某些实施方案中,本发明的多核苷酸序列还包含编码EGFR的片段的核苷酸序列。

[0049] 适用于本发明的EGFR可以是本领域周知的EGFR,例如来自人的EGFR。EGFR含有N末端胞外结构域I和II,胞外结构域III,胞外结构域IV,跨膜区,近膜区结构域以及酪氨酸激酶结构域。本发明优选使用截短的EGFR(“tEGFR”,即本文所述的EGFR的片段),尤其是不包括其胞内区域(近膜区结构域及酪氨酸激酶结构域)的截短的EGFR。在某些实施方案中,还可以进一步将不包括胞内区域的EGFR进一步截短成不包括胞外结构域I和II。因此,在某些实施方案中,本发明使用的tEGFR含有EGFR的胞外结构域III、胞外结构域IV以及跨膜区,或由EGFR的胞外结构域III、胞外结构域IV以及跨膜区组成。在某些实施方案中,所述tEGFR含有人EGFR的第310-646位氨基酸序列,或由人EGFR的第310-646位氨基酸序列组成,其中第310-480位氨基酸序列为人EGFR的胞外结构域III,第481-620为人EGFR的胞外结构域IV,第621-646位氨基酸为人EGFR的跨膜区。在某些实施例中,所述tEGFR的氨基酸序列的胞外结构域III和IV如SEQ ID NO:2第577-888位氨基酸所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述tEGFR的跨膜区序列如SEQ ID NO:2第889-911位氨基酸所示。

[0050] 为促进tEGFR的表达,还可在其N端设置前导序列。在某些实施方案中,本发明使用来自GM-CSF受体(“GMCSFR”) α 链的信号肽。在某些实施方案中,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第555-576位氨基酸所示。

[0051] 除此之外,可通过T2A多肽的编码序列将所述信号肽及tEGFR的编码序列与本发明

CAR中人CD3 ζ 胞内区的编码序列相连。在一个或多个实施方案中,所述T2A肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2第529-554位氨基酸所示。

[0052] 因此,在某些实施方案中,本发明的多核苷酸序列含有本发明CAR的编码序列、T2A多肽的编码序列、来自GM-CSF受体 α 链的信号肽的编码序列、以及tEGFR的编码序列。在某些实施方案中,本发明多核苷酸的序列如SEQ ID NO:1第67-2733位核苷酸所示,或如SEQ ID NO:1所示。

[0053] 本发明也涉及核酸构建物,该核酸构建物含有本文所述的多核苷酸序列,以及与这些序列操作性连接的一个或多个调控序列。本发明所述的多核苷酸序列可以多种方式被操作以保证所述融合蛋白(CAR和/或tEGFR)的表达。在将核酸构建物插入载体之前可根据表达载体的不同或要求而对核酸构建物进行操作。利用重组DNA方法来改变多核苷酸序列的技术是本领域已知的。

[0054] 调控序列可以是合适的启动子序列。启动子序列通常与待表达蛋白的编码序列操作性连接。启动子可以在所选择的宿主细胞中显示转录活性的任何核苷酸序列,包括突变的、截短的和杂合启动子,并且可以从编码与该宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。调控序列也可以是合适的转录终止子序列,由宿主细胞识别以终止转录的序列。终止子序列与编码该多肽的核苷酸序列的3'末端操作性连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。调控序列也可以是合适的前导序列,对宿主细胞翻译重要的mRNA的非翻译区。前导序列与编码该多肽的核苷酸序列的5'末端可操作连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。

[0055] 在某些实施方案中,所述核酸构建物是载体。通常通过可操作地连接本发明的多核苷酸序列至启动子,并将构建体并入表达载体,实现本发明多核苷酸序列的表达。该载体对于复制和整合真核细胞可为合适的。典型的克隆载体包含可用于调节期望核酸序列表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。

[0056] 本发明的多核苷酸序列可被克隆入许多类型的载体。例如,可被克隆入质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。进一步地,载体是表达载体。表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是公知的并在例如Sambrook等(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒。

[0057] 通常,合适的载体包含在至少一种有机体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制酶位点和一个或多个可选择的标记(例如,WO 01/96584;W001/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0058] 例如,在某些实施方案中,本发明使用逆转录病毒载体,该逆转录病毒载体含有复制起始位点,3' LTR,5' LTR,pis包装信号,酶切位点,土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件,本文所述的多核苷酸序列,以及任意的可选择的标记。所述土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件可增强病毒转录物的稳定性。

[0059] 合适的启动子的一个例子为即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-1 α (EF-1 α)。然而,也可使用其他组成型启

动子序列,包括但不限于类人猿病毒40 (SV40) 早期启动子、小鼠乳癌病毒 (MMTV)、人免疫缺陷病毒 (HIV) 长末端重复 (LTR) 启动子、MoMuLV启动子、鸟类白血病毒启动子、EB病毒即时早期启动子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子,诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红素启动子和肌酸激酶启动子。进一步地,也可考虑使用诱导型启动子。诱导型启动子的使用提供了分子开关,其能够在期限表达时打开可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达,而在当表达是不期望的时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0060] 为了评估CAR多肽或其部分的表达,被引入细胞的表达载体也可包含可选择的标记基因或报道基因中的任一个或两者,以便于从通过病毒载体寻求被转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在其他方面,可选择的标记可被携带在单独一段DNA上并用于共转染程序。可选择的标记和报道基因两者的侧翼都可具有适当的调节序列,以便能够在宿主细胞中表达。有用的可选择标记包括例如抗生素抗性基因,诸如neo等等。

[0061] 报道基因用于鉴定潜在转染的细胞并用于评价调节序列的功能性。在DNA已经被引入受体细胞后,报道基因的表达在合适的时间下进行测定。合适的报道基因可包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因。合适的表达系统是公知的并可利用已知技术制备或从商业上获得。

[0062] 将基因引入细胞和将基因表达入细胞的方法在本领域中是已知的。载体可通过在本领域中的任何方法容易地引入宿主细胞,例如,哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如,表达载体可通过物理、化学或生物学手段转移入宿主细胞。

[0063] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染法、粒子轰击、微注射、电穿孔等等。将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠;和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。

[0064] 将多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用病毒载体,特别是逆转录病毒载体,这已经成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物例如人细胞的方法。其他病毒载体可源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺伴随病毒等等。已经开发了许多基于病毒的系统,用于将基因转移入哺乳动物细胞。例如,逆转录病毒提供了用于基因传递系统的方便的平台。可利用本领域中已知的技术将选择的基因插入载体并包装入逆转录病毒颗粒。该重组病毒可随后被分离和传递至体内或离体的对象细胞。许多反转录病毒系统在本领域中是已知的。在一些实施方案中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体在本领域中是已知的。在一个实施方案中,使用慢病毒载体。

[0065] 因此,在某些实施方案中,本发明还提供用于活化T细胞的逆转录病毒,该病毒含有本文所述的逆转录病毒载体以及相应的包装基因,如gag、pol和vsug。

[0066] 适用于本发明的T细胞可以是各种来源的各种类型的T细胞。例如,T细胞可来源于B细胞恶性肿瘤患者的PBMC。

[0067] 在某些实施方案中,获得T细胞后,可先用适量的(例如30~80ng/ml,如50ng/ml)的CD3抗体刺激活化,然后在含有适量的(例如30~80IU/ml,如50IU/ml)的IL2培养基进行培养备用。

[0068] 因此,在某些实施方案中,本发明提供一种基因修饰的T细胞,该基因修饰的T细胞

含有本文所述的多核苷酸序列,或含有本文所述的逆转录病毒载体,或感染了本文所述的逆转录病毒,或采用本文所述的方法制备得到,或稳定表达本文所述的融合蛋白和任选的tEGFR。

[0069] 本发明的CAR-T细胞可经历稳固的体内T细胞扩展并在血液和骨髓中以高水平持续延长的时间量,并形成特异性记忆T细胞。不希望被任何具体的理论所束缚,在遇到并随后消除表达替代抗原的靶细胞后,本发明的CAR-T细胞可体内分化成中心记忆样状态。

[0070] 本发明还包括一类细胞疗法,其中T细胞被基因修饰以表达本文所述的CAR和任选的tEGFR,和CAR-T细胞被注入需要其的接受者中。注入的细胞能够杀死接受者的肿瘤细胞。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。

[0071] 由CAR-T细胞引起的抗肿瘤免疫应答可为主动或被动免疫应答。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-T细胞诱导对CAR中的抗原结合部分特异性的免疫应答。

[0072] 因此,可采用本发明的CAR、其编码序列、核酸构建物、表达载体、病毒以及CAR-T细胞治疗的疾病优选为间皮素介导的疾病。

[0073] 具体而言,本文中,“间皮素介导的疾病”尤其包括各种类型的卵巢癌、胸膜间皮瘤(如上皮性间皮瘤)、胰腺癌,以及宫颈、头、颈、阴道、肺及食管的鳞癌。在某些实施方案中,所述间皮素介导的疾病为恶性胸膜间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌及肺癌。

[0074] 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/或其他组分诸如相关的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CAR-T细胞,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。

[0075] 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。

[0076] 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。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,New Eng.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。

[0077] 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、通过静脉内注射或腹膜内施用给患者。在一个实施方案中,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。在另一个实施方案中,本发明的T细胞组合物优选通过静脉注射施用。T细胞的组合物可被直接注入肿瘤、淋巴结或感染位置。

[0078] 在本发明的一些实施方案中,本发明的CAR-T细胞或其组合物可与本领域已知的其它疗法结合。所述疗法包括但不限于化疗、放疗和免疫抑制剂。例如,可结合本领域周知

的治疗间皮素介导的疾病的放疗或化疗制剂进行治疗。

[0079] 本文中，“抗肿瘤效应”指一种生物学效应，其可由肿瘤体积的减少、肿瘤细胞数的减少、转移数的减少、预期寿命的增加或与癌相关的各种生理症状的改善表示。

[0080] “患者”、“对象”、“个体”等等在本文中可交换使用，指可引起免疫应答的活有机体，如哺乳动物。例子包括但不限于人、狗、猫、小鼠、大鼠和其转基因物种。

[0081] 本发明采用抗间皮素抗体(具体是衍生自SS1的scFv)的基因序列，本发明全基因合成嵌合抗原受体Mesothelin scFv-CD8H&TM-CD28-41BB-CD3 ζ -tEGFR-IL18的基因片段，插入到逆转录病毒载体MSCV，空载体MSCV，其可以用于重组引入目的核酸序列，即编码CAR的核酸序列。重组质粒在293T细胞中包装病毒，感染T细胞，使T细胞表达该嵌合抗原受体。在本发明的一个实施方案中，实现嵌合抗原受体基因修饰的T淋巴细胞的转化方法是基于逆转录病毒转化方法。该方法具有转化效率高，外源基因能够稳定表达，且可以缩短体外培养T淋巴细胞到达临床级数量的时间等优点。在该转基因T淋巴细胞表面，转化的核酸通过转录、翻译表达在其上。本发明所获得的表达CAR的逆转录病毒通过Retronectin法制备CAR-T细胞，制备3天后的CAR-T细胞用流式检测CAR的感染效率，ELISA检测CART细胞上清IL18分泌，制备5天后CAR-T细胞在体外与Mesothelin阳性的肿瘤细胞(K562-Mesothelin)共培养5小时检测CD107a表达和INF- γ 的分泌，制备5天后CAR-T细胞在体外与Mesothelin阳性的肿瘤细胞(K562-Meso)共培养16小时检测CAR-T细胞对肿瘤细胞的特异性杀伤作用(细胞毒性)。因此本发明所述Mesothelin-tEGFR CART-IL18可在间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌等治疗中得到应用。更进一步地，本发明的CAR还携带tEGFR组件，该组件的空间构象可与药物级别的抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗紧密结合，可以作为细胞表面的标记，同时也适合T细胞的体内追踪(可通过流式和免疫组化检测)；也可以在体内被妥西单抗(cetuximab)清除，即不希望本发明的CAR发挥作用时可加入妥西单抗，安全有效的控制该CAR-T细胞在体内发挥作用。因此，本发明的CAR还具有体内示踪和安全开关的作用。

[0082] 本发明通过参考以下实验实施例进一步详细地进行描述。这些实施例仅出于说明性的目的提供，并不意欲为限制性的，除非另有规定。因此，本发明决不应被解释为限于以下实施例，而是应被解释为包括由于本文提供的教导变得显而易见的任何和全部的变化。实施例中所用的方法和试剂，除非另有说明，否则为本领域常规的方法和试剂。

[0083] 实施例中所用的NT细胞为与实施例4相同来源的未转染的T细胞，用作对照细胞。K562细胞来源于ATCC细胞库，为阴性表达间皮素的细胞，用作对照细胞。K562-Mesothelin细胞(简称，K562-Meso)是经遗传工程手段使其高表达间皮素的K562稳定细胞株。

[0084] 实施例1:Meso CAR-tEGFR-IL18基因序列的确定

[0085] 从NCBI网站数据库搜索到人的IL18成熟肽序列信息，序列在网站<http://sg.idtdna.com/site>上进行密码子优化，保证在编码氨基酸序列不变的情况下更适合人类细胞表达。

[0086] 各基因核苷酸和氨基酸序列信息见(SEQUENCE ID NO.1-2)

[0087] 将上述序列依次进行连接，在各序列连接处引入不同酶切位点，形成完整的MesothelinCAR-tEGFR-IL18基因序列信息，本专利中简称Meso CAR-tEGFR-IL18。

[0088] 实施例2:包含CAR分子的核酸序列的病毒载体的构建

[0089] 将实施例1中制备的CAR分子的核苷酸序列经NotI (NEB) 和EcoRI (NEB) 双酶切、经

T4连接酶(NEB)连接插入逆转录病毒RV载体的NotI-EcoRI位点,转化到感受态E.coli (DH5 α),将重组质粒送上海生工生物技术有限公司进行测序,将测序结果与拟合成的Meso-CAR-tEGFR-IL18序列比对来验证序列是否正确。测序引物为:

[0090] 正义序列:AGCATCGTTCTGTGTTGTCTC (SEQUNCE ID NO.3)

[0091] 反义序列:TGTTTGTCTTGTGGCAATACAC (SEQUNCE ID NO.4)

[0092] 经测序正确后,使用Qiagen公司的质粒纯化试剂盒提取并纯化质粒,纯化质粒的质粒磷酸钙法转染293T细胞进行逆转录病毒包装实验。

[0093] 本实施例所构建得到的质粒图谱如图1所示。图2显示该逆转录病毒表达质粒的部分测序结果峰值图。

[0094] 实施例3:逆转录病毒包装

[0095] 1.第1天293T细胞应是小于20代,不过分长满的。以 0.6×10^6 cells/ml铺板,10cm皿添加10ml的DMEM培养基,充分混匀细胞,37度培养过夜。

[0096] 2.第2天293T细胞融合度达到90%左右进行转染(通常是铺板14-18h左右);准备质粒复合物,各种质粒的量为Retro backbone (MSCV)为12.5ug,Gag-pol为10ug,VSVg为6.25ug,CaCl₂ 250ul,H₂O为1ml总体积为1.25ml;在另一个管里添加跟质粒复合物等体积的HBS,边加质粒复合物边涡旋震荡20s。温柔地将混合物沿着边加入到293T皿中,37度培养4h,去除培养基,PBS洗一遍,重新加入预热的新鲜培养基。

[0097] 3.第4天:转染48h后收集上清并用0.45um滤器过滤后分装保存于-80度,继续添加预热的新鲜DMEM培养基。

[0098] 实施例4:逆转录病毒感染人的T细胞

[0099] 1.用Ficcol分离液(天津灏洋)分离获得较纯的CD3+T细胞,用含5%AB血清X-VIVO (LONZA)培养基调整细胞密度为 1×10^6 /mL。将细胞以1ml/孔接种到预先用抗人50ng/ml CD3抗体(北京同立海元)和50ng/ml CD28抗体(北京同立海元),再加入100IU/ml的白细胞介素2(北京双鹭),刺激培养48小时后病毒感染;

[0100] 2.T细胞活化培养后隔天,PBS稀释至终浓度为15μg/ml的Retronectin (Takara) 包被non-tissue treated培养板,24孔板每孔250μl。避光,4℃过夜备用。

[0101] 3.T细胞活化培养两天后,取出2块包被好的24孔板,吸弃包被液,加入含2%BSA的HBSS室温封闭30min。封闭液体积为每孔500μl,吸弃封闭液,用含2.5%HEPES的HBSS洗板两次。

[0102] 4.病毒液加入孔内,每孔加2ml病毒液,32℃,2000g,离心2h。

[0103] 5.弃去上清液,24孔板每孔加入活化后的T细胞 1×10^6 个,体积1ml,培养基为T细胞培养基中添加IL-2 200IU/ml。30℃,1000g,离心10min。

[0104] 6.离心完毕后,将培养板置于37℃,5%CO₂培养箱中培养。

[0105] 7.感染后24h,将细胞悬液吸出,1200rpm,4℃,离心7min。

[0106] 8.细胞感染后,每天观察细胞的密度,适时补加含IL-2 100IU/ml的T细胞培养液,使T细胞的密度维持在 5×10^5 /ml左右,使细胞扩增。

[0107] 由此获得分别感染了实施例3所示逆转录病毒的CART细胞,分别命名为meso-tEGFR CART细胞和meso-t-IL18 CART细胞。

[0108] 实施例5:流式细胞仪检测感染后T淋巴细胞的比例及表面CAR蛋白的表达

[0109] 分别离心收集感染后72小时的CAR-T细胞和NT细胞(对照组),PBS洗涤1次后弃上清,加入相应的抗体避光30min后PBS洗涤,重悬,最后流式细胞仪检测。CAR+由Anti-mouse IgG F(ab') antibody (Jackson Immunoresearch) 和APC-EGFR抗体检测。

[0110] 图3显示,使用实施例3制备得到的逆转录病毒感染T细胞72小时后,meso-t-IL18 CAR+的表达效率为40%。

[0111] 实施例6:ELISA检测CAR-T细胞上清中IL18含量

[0112] 取病毒上清和病毒感染后72小时的CAR-T细胞上清,按照Human Interleukin-18 (Hu IL-18) ELISA kit (Invitrogen) 的操作说明书检测各病毒上清 (Mesothelin-tEGFR, Mesothelin-tEGFR-IL18, Mesothelin-tEGFR-IL15D) 以及各CART细胞 (Mesothelin-tEGFR, Mesothelin-tEGFR-IL18, Mesothelin-tEGFR-IL15D) 上清液中IL18的含量。

[0113] 本实施例的结果在图4中显示, Mesothelin-tEGFR-IL18病毒液上清IL18的含量为13000pg/ml, Mesothelin-tEGFR-IL18 CART细胞上清IL18的含量为3500pg/ml。

[0114] 实施例7:CAR-T细胞与靶细胞共培养后CD107a表达检测

[0115] 1. 取一块V底96孔板,每孔加CART/NT细胞 2×10^5 个和靶细胞 (K562-Meso) /对照细胞 (K562) 2×10^5 个,重悬于100ul不含IL-2的X-VIVO完全培养基,加入BD GolgiStop(含monesin,每1ml培养基中加入1ul BD GolgiStop),每孔加入2ul CD107a抗体(1:50),37℃孵育5小时,收集细胞。

[0116] 2. 将样品离心去除培养基,PBS洗细胞一次,400g,4℃离心5分钟。弃上清,每管加入适量特异性表面抗体(CD107a抗体,Biolegend),重悬体积100ul,冰上避光孵育30分钟。

[0117] 3. 每管用3mL的PBS清洗细胞1次,400g离心5分钟。仔细吸去上清。

[0118] 4. 适量PBS重悬,流式细胞仪检测CD107a。

[0119] 结果显示在图6中。图6显示, Meso-tEGFR-IL18 CART细胞CD107a表达率为26.9%。

[0120] 实施例8:CAR-T细胞与靶细胞共培养后INF- γ 分泌检测

[0121] 1. 取制备好的CAR-T细胞,重悬于Lonza培养基中,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL。

[0122] 2. 实验组每孔含靶细胞 (K562-Meso) 或阴性对照细胞 (K562) 2×10^5 个,CAR-T细胞 2×10^5 个,200ul不含IL-2的Lonza培养基。充分混匀后加入96孔板中。同时加入BD GolgiPlug(含BFA,每1ml细胞培养基中加入1ul BD GolgiPlug),充分混匀后,37℃孵育5-6小时。收集细胞,作为实验组。

[0123] 3. 每管用1mL的PBS清洗细胞1次,300g离心5分钟。弃上清,每管加入适量特异性表面抗体CAR、CD3、CD4、CD8,重悬体积100ul,冰上避光孵育30分钟。

[0124] 4. PBS洗细胞后,加入250ul/EP管Fixation/Permeabilization solution,4℃孵育20分钟以固定细胞及破膜。用 $1 \times$ BD Perm/Wash™ buffer清洗细胞2次,1mL/次。

[0125] 5. 进行胞内因子染色,取适量INF- γ 细胞因子荧光抗体或阴性对照,用BD Perm/Wash™ buffer稀释至50ul。用此抗体稀释液充分重悬已固定破膜的细胞,4℃避光孵育30min, $1 \times$ BD Perm/Wash™ buffer 1mL/次清洗细胞2次,然后用PBS重悬。

[0126] 6. 流式细胞仪检测。

[0127] 结果显示在图7中。图7显示, Meso-tEGFR-IL18 CART细胞INF- γ 表达率为47.3%。

[0128] 实施例9:CAR-T细胞与靶细胞共培养后检测肿瘤特异性细胞杀伤作用

[0129] 1. K562细胞(阴性对照细胞)重悬在无血清培养基(1640)中,调整细胞浓度为 $1 \times$

10^6 /ml,加入荧光染料BMQC (2,3,6,7-tetrahydro-9-bromomethyl-1H,5Hquinolizino (9,1-gh) coumarin) 至终浓度为 $5\mu\text{M}$ 。

[0130] 2.混匀,37°C孵育30min。

[0131] 3.室温,1500rpm离心5min,弃上清,并重悬细胞于细胞毒性培养基(无酚红1640+5%AB血清)中,37°C孵育60min。

[0132] 4.新鲜细胞毒性培养基清洗细胞两遍,并重悬在新鲜细胞毒性培养基中,密度 1×10^6 /ml。

[0133] 5.靶细胞(K562-Meso)悬浮在含有0.1%BSA的PBS中,调整浓度为 1×10^6 /ml。

[0134] 6.加入荧光染料CFSE (carboxyfluoresceindiacetatesuccinimidyl ester) 至终浓度为 $1\mu\text{M}$ 。

[0135] 7.混匀,37°C孵育10min。

[0136] 8.孵育结束后,加入与细胞悬液等体积的FBS,室温孵育2min以终止标记反应。

[0137] 9.清洗细胞并重悬在新鲜细胞毒性培养基中,密度 1×10^6 /ml。

[0138] 10.清洗效应T细胞并悬浮在细胞毒性培养基中,调整浓度为 5×10^6 /ml。

[0139] 11.在所有的实验中,CAR-T细胞的细胞毒性和未感染的阴性对照效应T细胞(NT)的细胞毒性做比较。

[0140] 12.CAR-T和NT,按照效应细胞:靶细胞=5:1,1:1,的比例,于5ml无菌试验管(BD Biosciences)进行培养,每组设置两复孔。每一个共培养组中,靶细胞50,000个(50 μl),阴性对照细胞为50,000个(50 μl)。同时设置一组只包含靶细胞和阴性对照细胞。

[0141] 13.将共培养细胞置于37°C孵育16h。

[0142] 14.孵育完成后,PBS清洗细胞,然后立即按照说明书推荐的浓度快速加入7-AAD (7-aminoactinomycin D),冰上孵育30min。

[0143] 15.不需清洗,直接进行流式上机检测,数据用Flow Jo进行分析。

[0144] 16.分析使用7AAD阴性的活细胞设门,测定T细胞和靶细胞共培养后活的U266靶细胞和活的K562阴性对照细胞的比例。

[0145] 17.对于每一组共培养的T细胞和靶细胞

[0146] 18.细胞毒性杀伤细胞%=100-校准的靶细胞存活%,即(无效应细胞时靶细胞活细胞数-含效应细胞时靶细胞活细胞数)/对照细胞活细胞数的比例。

[0147] 结果显示在图8中。结果显示,在效靶比为5:1情况下,Meso-tEGFR-IL18 CART细胞对K562-Meso细胞的杀伤率为45%。

[0001] 序列表

[0002] <110> 上海恒润达生物科技有限公司

[0003] <120> 靶向mesothelin的嵌合抗原受体并对其双重修饰的方法和用途

[0004] <170> PatentIn version 3.3

[0005] <210> 1

[0006] <211> 3339

[0007] <212> DNA

[0008] <213> 人工序列

[0009] <400> 1

[0010] atggacttcc aggtgcagat ttttagtttt cttttgatct cgcagcgt gataatgtca 60

[0011] cgaggagata tagagctcac ccagagtccc gcaatcatgt cagcctctcc cggcgaaaaa 120

[0012] gtgaccatga cctgtagtgc ttccagttct gttagttata tgcactggta tcaacagaag 180

[0013] tccgggacaa gtctctaaac ctggatttat gacacttcca aactggcttc tggagtgcct 240

[0014] gggcggttca gcgggagcgg ttccggtaac tcttacagcc tgaccatctc ttcagtcgaa 300

[0015] gctgaagacg atgccacgta ttattgccag caatggagta agcaccact gacatttggg 360

[0016] tgcgggacca agcttgaaat aaagggtggc ggcagcgggg gcggaagcgg cgggggaagc 420

[0017] caggtgcaac ttcagcaatc aggtcccag ttggaaaagc cgggagccag cgttaagatc 480

[0018] tcatgcaaag ctacgggcta ctctttcaca ggatatacca tgaattgggt caagcaaagc 540

[0019] catgaaaat gtttggatg gatcggactg attaccctt acaacggggc cagctcctac 600

[0020] aatcagaaat ttaggggtaa ggccactctc acagtggata aaagctcaag tactgcctat 660

[0021] atggacctgc ttagtctgac ctacagaggat agtgccgtgt acttttgtgc cagaggcggg 720

[0022] tacgacgggc gagggtttga ctactggggg caggggacga cggttactgt gtctagtacg 780

[0023] acaactcccg ctccccggcc tcccaccct gccccaacta ttgcctccca gcctctttcc 840

[0024] ttgcgccccg aagcctgcag gcccgcagct gggggcgtg tgcatacaag gggctctgac 900

[0025] ttgcatgcg acatctacat ttgggcaccc ttggccggga cctgtggagt gctcctctc 960

[0026] agcctggatg tcaactgta ctgcaggtcc aaaagatcta ggctgctgca ttctgattac 1020

[0027] atgaacatga cgccgcgccc ccctggtcca accagaaagc attatcagcc ctatgcacc 1080

[0028] cctagagact ttgccgcta tcgttcgaag ttcagtgtcg tgaagagagg ccggaagaag 1140

[0029] ctgctgtaca tctcaagca gcctttcatg aggccctgc agactacca ggaggaagat 1200

[0030] ggatgcagct gtagattccc tgaagaggag gaaggagct gtgagctgag agtgaagttc 1260

[0031] tcccgaagcg cagatgcccc agcctatcag caggacaga atcagctgta caacgagctg 1320

[0032] aacctgggaa gacgggagga atacgatgtg ctggacaaaa ggcggggcag agatcctgag 1380

[0033] atggcggca aaccaagacg gaagaacccc caggaagtc tgtataatga gctgcagaaa 1440

[0034] gacaagatgg ctgaggccta ctcaaaatc gggatgaagg gcgaaagaag gagaggaaaa 1500

[0035] gcccacgacg gactgtacca ggggtgagt acagcaaca aagacaccta tgacgctctg 1560

[0036] cacatgcagg ctctgccacc aagacgagct aaacgaggct caggcgcgac gaactttagt 1620

[0037] ttgctgaagc aagctgggga ttagaggaa aatccgggtc ccatgttct ccttgtgacg 1680

[0038] agctcctgc tctgcgagct gcccatacca gccttctcc tcatcccgg gaaggtgtgc 1740

[0039] aatggcatag gcattggcga gtttaaatg tctctgagca taaatgctac gaatattaag 1800

[0040] cattcaaga attgtacttc tattagtggc gacctcata ttcttccggt gccttcagg 1860

[0041] ggtgactctt tcaccacac acctccattg gatccacaag aacttgacat cctgaagacg 1920

[0042] gttaaagaga ttacaggctt cctccttate caagcgtggc ccgagaacag aacggacttg 1980
 [0043] cacgcctttg agaacctcga aataatacgg ggtcggacga agcaacacgg ccaatttagc 2040
 [0044] cttgcggttg ttagtctgaa cattaactct ctcggccttc gctctttgaa agaaatcagc 2100
 [0045] gacggagatg tcatcattag tggaacaag aacctgtgct acgcgaacac aatcaactgg 2160
 [0046] aagaagctct tcggtacttc aggccaaaag acaaagatta ttagtaacag aggagagaat 2220
 [0047] agctgtaagg ctaccggaca agtttgcac gccttgtgta gtccagaggg ttgctgggga 2280
 [0048] ccggaaccaa gggattgcgt cagttgccg aacgtgagtc gcggacgcga gtgtgtggat 2340
 [0049] aagtgaatc ttctggaagg ggaaccgcga gagttttagt aaaattccga atgtatacag 2400
 [0050] tgtcatcccg agtgtcttc acaagcaatg aatatcacat gtacaggag gggtcctgat 2460
 [0051] aactgtatcc aatgtgcaca ctacatagat ggtcctcact gtgtaaagac gtgccccgcc 2520
 [0052] ggagtaatgg gtgaaaacaa caccctcgtg tggaagtacg ccgatgccg gcatgtctgt 2580
 [0053] catttgtgtc atcccaactg cacatatggc tgtaccggtc ctggattgga gggctgtcca 2640
 [0054] acaaacgggc cgaaaatacc gagtatcga acaggcatgg tgggagcact tttgcttctc 2700
 [0055] ctcgttgcg ccctgggcat cggcttgttc atgagagcca agcggggctc tggcgagggc 2760
 [0056] agaggtctc tgctgacctg cggagatgtg gaagaaaatc ccggccctat gtacagaatg 2820
 [0057] cagctgttgt cttgtattgc ctttctctc gcctctgtaa caaattcata cttcgggaaa 2880
 [0058] cttgagagca agctctcagt cattcgaaat ctgaacgacc aggtactctt tatagaccaa 2940
 [0059] ggtaaccgcc cccttttga agacatgacg gattccgatt gcagagataa cgcaccagg 3000
 [0060] acaatcttca tcatcagtat gtacaaggat tctcaaccac gcggtatggc ggtgaccata 3060
 [0061] agtgtgaaat gtgagaaaat tagcacactt agctgcgaaa acaaaataat atcctttaag 3120
 [0062] gaaatgaatc ctctgataa tatcaaggac acgaagtctg acattatctt tttccagagg 3180
 [0063] tctgtaccag gacatgacaa taagatgcag tttgaatcca gctcctacga gggatacttc 3240
 [0064] ctgcctgtg aaaaggaacg cgacttgttc aagctcatct tgaaaaaaga ggacgaactt 3300
 [0065] ggtgaccgat ccattatggt tacagtacag aatgaggat 3339
 [0066] <210> 2
 [0067] <211> 1113
 [0068] <212> PRT
 [0069] <213> 人工序列
 [0070] <400> 2
 [0071] Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 [0072] 1 5 10 15
 [0073] Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 [0074] 20 25 30
 [0075] Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 [0076] 35 40 45
 [0077] Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 [0078] 50 55 60
 [0079] Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 [0080] 65 70 75 80
 [0081] Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 [0082] 85 90 95
 [0083] Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

[0084]	100	105	110
[0085]	Ser Lys His Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0086]	115	120	125
[0087]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu		
[0088]	130	135	140
[0089]	Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile		
[0090]	145	150	155
[0091]	Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp		
[0092]	165	170	175
[0093]	Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Thr		
[0094]	180	185	190
[0095]	Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala		
[0096]	195	200	205
[0097]	Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Asp Leu Leu		
[0098]	210	215	220
[0099]	Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly		
[0100]	225	230	235
[0101]	Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr		
[0102]	245	250	255
[0103]	Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro		
[0104]	260	265	270
[0105]	Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro		
[0106]	275	280	285
[0107]	Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp		
[0108]	290	295	300
[0109]	Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu		
[0110]	305	310	315
[0111]	Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu		
[0112]	325	330	335
[0113]	His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg		
[0114]	340	345	350
[0115]	Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg		
[0116]	355	360	365
[0117]	Ser Lys Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile		
[0118]	370	375	380
[0119]	Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp		
[0120]	385	390	395
[0121]	Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
[0122]	405	410	415
[0123]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly		
[0124]	420	425	430
[0125]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		

[0126]	435	440	445
[0127]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
[0128]	450	455	460
[0129]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
[0130]	465	470	475
[0131]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
[0132]	485	490	495
[0133]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
[0134]	500	505	510
[0135]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0136]	515	520	525
[0137]	Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln		
[0138]	530	535	540
[0139]	Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val Thr		
[0140]	545	550	555
[0141]	Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro		
[0142]	565	570	575
[0143]	Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu		
[0144]	580	585	590
[0145]	Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile		
[0146]	595	600	605
[0147]	Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe		
[0148]	610	615	620
[0149]	Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr		
[0150]	625	630	635
[0151]	Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn		
[0152]	645	650	655
[0153]	Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg		
[0154]	660	665	670
[0155]	Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile		
[0156]	675	680	685
[0157]	Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val		
[0158]	690	695	700
[0159]	Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp		
[0160]	705	710	715
[0161]	Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn		
[0162]	725	730	735
[0163]	Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu		
[0164]	740	745	750
[0165]	Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser		
[0166]	755	760	765
[0167]	Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu		

[0168]	770	775	780
[0169]	Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln		
[0170]	785	790	795 800
[0171]	Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly		
[0172]	805	810	815
[0173]	Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro		
[0174]	820	825	830
[0175]	His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr		
[0176]	835	840	845
[0177]	Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His		
[0178]	850	855	860
[0179]	Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro		
[0180]	865	870	875 880
[0181]	Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala		
[0182]	885	890	895
[0183]	Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg		
[0184]	900	905	910
[0185]	Ala Lys Arg Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly		
[0186]	915	920	925
[0187]	Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser		
[0188]	930	935	940
[0189]	Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Tyr Phe Gly Lys		
[0190]	945	950	955 960
[0191]	Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu		
[0192]	965	970	975
[0193]	Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser		
[0194]	980	985	990
[0195]	Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr		
[0196]	995	1000	1005
[0197]	Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys		
[0198]	1010	1015	1020
[0199]	Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser		
[0200]	1025	1030	1035
[0201]	Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser		
[0202]	1040	1045	1050
[0203]	Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys		
[0204]	1055	1060	1065
[0205]	Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys		
[0206]	1070	1075	1080
[0207]	Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp		
[0208]	1085	1090	1095
[0209]	Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp		

[0210]	1100	1105	1110
[0211]	<210> 3		
[0212]	<211> 21		
[0213]	<212> DNA		
[0214]	<213> 人工序列		
[0215]	<223> 引物		
[0216]	<400> 3		
[0217]	agcatcgttc tgtgtgtct c 21		
[0218]	<210> 4		
[0219]	<211> 22		
[0220]	<212> DNA		
[0221]	<213> 人工序列		
[0222]	<223> 引物		
[0223]	<400> 4		
[0224]	tgtttgtctt gtggcaatac ac 22		

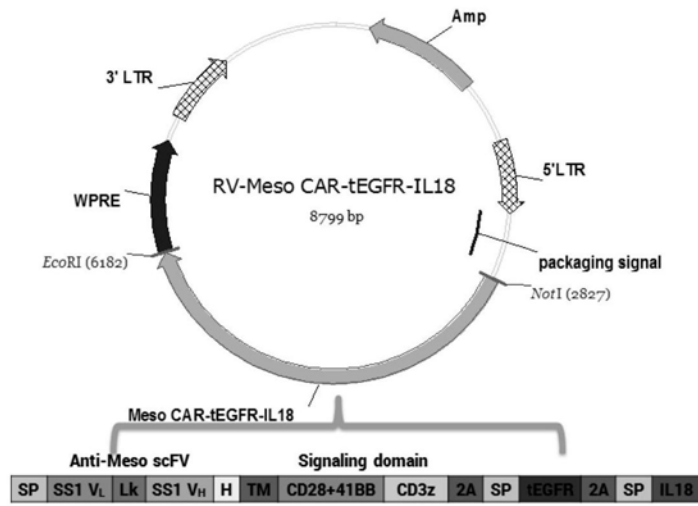


图1

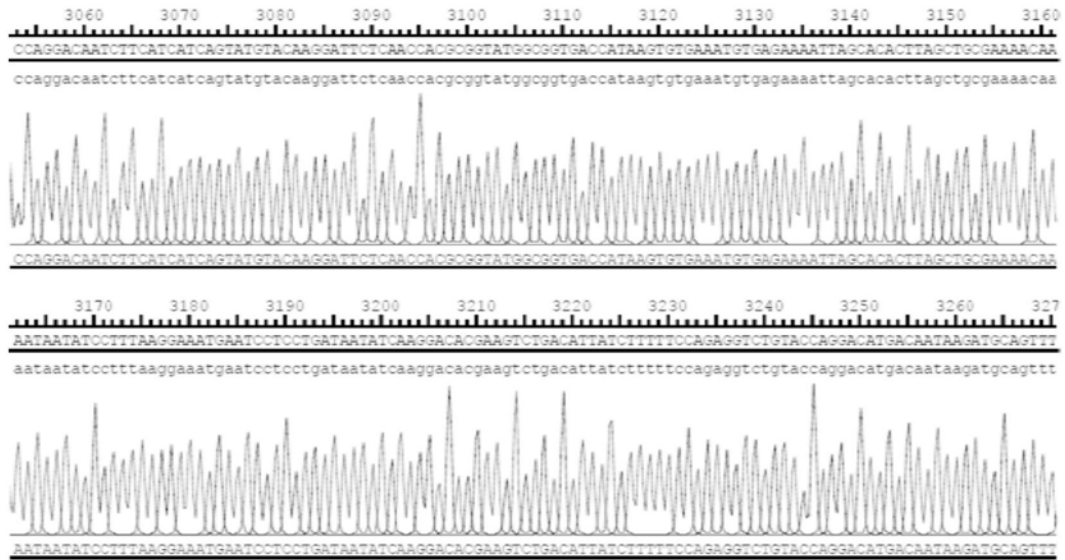


图2

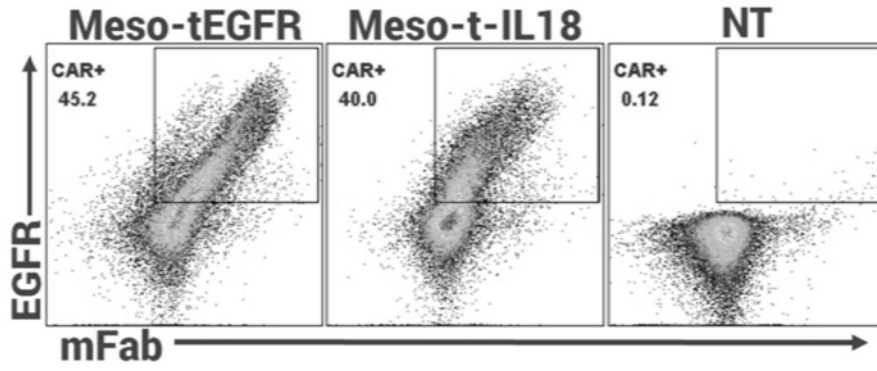


图3

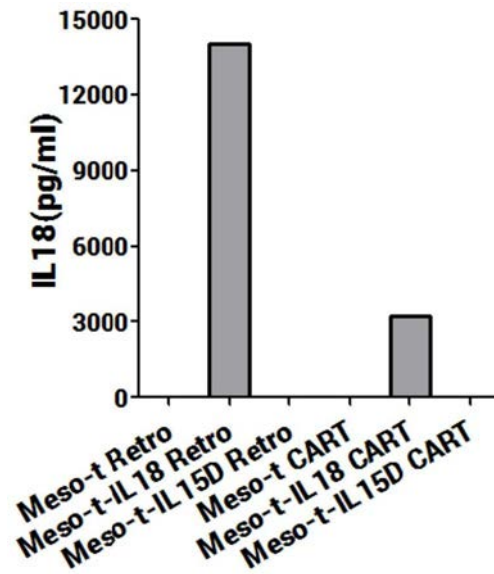


图4

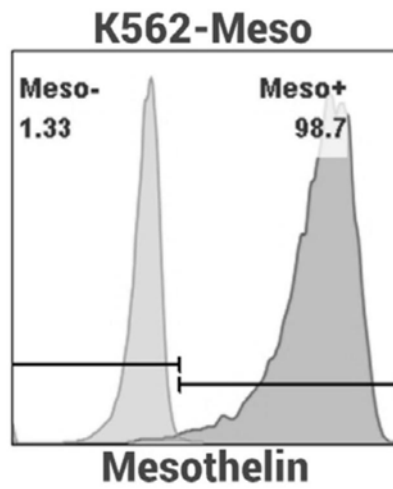


图5

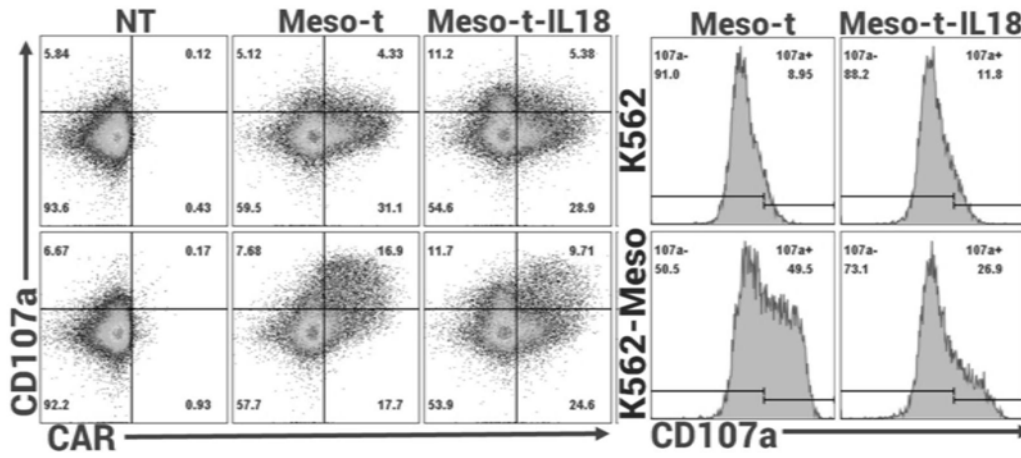


图6

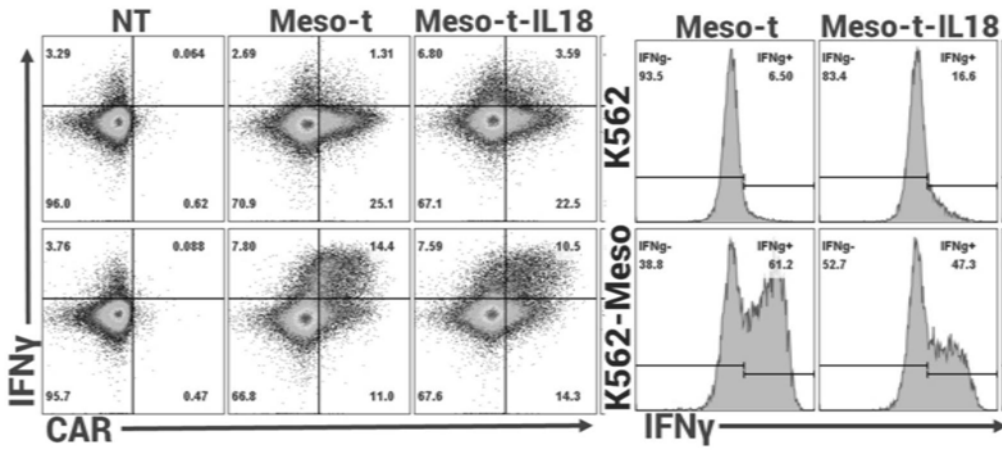


图7

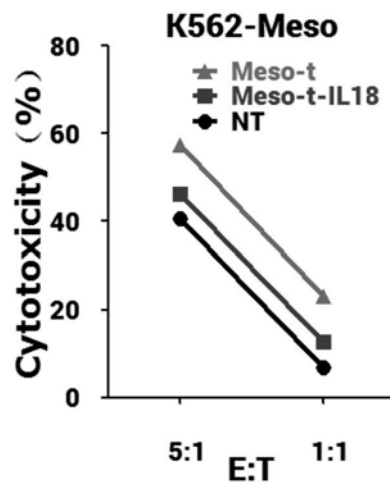


图8