



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107827990 B

(45)授权公告日 2020.07.10

(21)申请号 201711104358.9

C12N 15/62(2006.01)

(22)申请日 2017.11.10

C12N 15/867(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12N 7/01(2006.01)

申请公布号 CN 107827990 A

C12N 5/10(2006.01)

(43)申请公布日 2018.03.23

A61K 35/17(2015.01)

(66)本国优先权数据

A61P 35/00(2006.01)

201711034769.5 2017.10.30 CN

G01N 33/68(2006.01)

(73)专利权人 河北森朗生物科技有限公司

(56)对比文件

地址 050000 河北省石家庄市高新区黄河

WO 2017149515 A1,2017.09.08

大道136号科技中心1号楼512室

Eloah Rabello Suarez.Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model.《Oncotarget》.2016,第7卷(第23期),第34341-34355页.

(72)发明人 李建强

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 刘伟 赵青朵

审查员 张智贤

(51)Int.Cl.

权利要求书1页 说明书13页

C07K 19/00(2006.01)

序列表13页 附图5页

(54)发明名称

一种多肽、编码其的核酸、其修饰的T淋巴细胞及其应用

(57)摘要

本发明属于生物技术领域,公开了一种包含两个嵌合抗原受体结构的多肽、编码的核酸、修饰的T淋巴细胞及其制备方法和应用。本发明所述多肽包含两个嵌合抗原受体结构一个特异地靶向于肿瘤细胞,另一个特异地靶向于正常B淋巴细胞,使CAR-T细胞通过识别血液循环系统的B淋巴细胞获得有效扩增,以保证更多的CAR-T细胞到达实体瘤部位对肿瘤细胞进行特异性杀伤提高实体瘤的治疗效果。进一步还包括抗PD-L1单克隆抗体的ScFv结构,能让CAR-T细胞同时分泌PD-L1单抗,阻断PD1/PDL1信号途径介导的免疫抑制作用和T细胞衰竭,从而提高对实体瘤的治疗效果,同时延长免疫细胞在体内的功能活性,最终减缓甚至避免肿瘤复发。

1. 一种多肽,其特征在于,是一个复合结构,包含以下三个组分:
 - (1) 含有特异性靶向于肿瘤细胞抗原的ScFv的嵌合抗原受体结构;和
 - (2) 含有特异性靶向于正常外周血细胞表面抗原的ScFv的嵌合抗原受体结构;和
 - (3) 含有特异靶向于PD-L1的ScFv结构;其序列从氨基端到羧基端依次拼接为:ScFv (CD30) -Hinge (CD8) -TM (CD8) -CD137-CD3 ζ -T2A-ScFv (CD22) -Hinge (IgG4-short) -TM (CD28) -CD137-CD3 ζ -P2A-ScFv (PD-L1)。
2. 根据权利要求1所述的多肽,其特征在于,其氨基酸序列如SEQ ID N 0.1所示。
3. 编码权利要求1或2所述的多肽的核酸。
4. 包含权利要求3所述的核酸的载体。
5. 根据权利要求4所述的载体,其特征在于,所述载体为慢病毒载体。
6. 一种慢病毒,其特征在于,所述慢病毒由权利要求5所述的慢病毒载体制备得到。
7. 一种T淋巴细胞,其特征在于,经权利要求6所述慢病毒转染且表达权利要求1或2所述多肽的T淋巴细胞。
8. 权利要求7所述T淋巴细胞在制备抗霍奇金淋巴瘤药物中的应用。

一种多肽、编码其的核酸、其修饰的T淋巴细胞及其应用

[0001] 本申请要求于2017年10月30日提交中国专利局、申请号为201711034769.5、发明名称为“一种多肽、编码其的核酸、其修饰的T淋巴细胞及其制备方法和应用”的中国专利申请优先权,其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

[0002] 本发明属于生物技术领域,涉及一种多肽、编码其的核酸、其修饰的T淋巴细胞及其制备方法和应用,具体涉及包含两个嵌合抗原受体结构的多肽及编码其的核酸、其修饰的T淋巴细胞及其制备方法和应用。

背景技术

[0003] 进入21世纪后,随着CAR-T为代表的过继细胞疗法和以PD-1/PD-L1为核心的免疫检查点抑制剂疗法两大技术领域取得突破性进展,肿瘤免疫治疗已成为继手术、放疗、化疗、靶向治疗后一个新兴的极具前景的治疗手段。其中,过继性细胞免疫治疗是将体外培养、活化、基因修饰的自体或异体免疫细胞回输给患者,用于发挥抗肿瘤活性。嵌合抗原受体(ChimericAntigenReceptor,CAR)修饰的T细胞治疗技术是通过基因工程技术修饰免疫效应细胞,使被修饰的细胞能特异性识别和杀伤表达特异性抗原的靶细胞,从而达到特异性清除肿瘤细胞的目的。特异靶向于B淋巴细胞表面标志物CD19分子的CAR-T细胞,在治疗B淋巴细胞恶性肿瘤中的疗效最为显著,可使90%的复发难治的B系急性淋巴细胞白血病患者获得完全缓解。

[0004] CAR结构一般由胞外抗原结合区、跨膜区和胞内信号转导区组成。胞外抗原结合区一般是具有特异性抗原结合能力的来源于单克隆抗体的单链可变区(Single-chainvariablefragment,scFv),由轻链和重链的可变区通过中间带韧性的铰链区连接形成。胞内信号转导区主要是来源于CD3 ζ 的免疫受体酪氨酸活化基序(immunereceptorrrtyrosine-basedactivationmotifs,ITAM)以及来源于共刺激信号分子CD28或CD137的胞内功能区。目前CAR-T淋巴细胞技术发展到了第三代,几代CAR-T的区别在于细胞内信号转导区连入了不同的正向共刺激信号。共刺激信号的作用是使CAR-T细胞在体内发挥作用的时间延长。第一代CAR由ScFv通过跨膜区域与胞内信号传导区(ITAM)直接相连,没有共刺激功能区的存在;第二代CAR的胞内信号转导区引入了一个共刺激分子,主要为CD28或CD137分子的功能区序列;第三代CAR引入了两个共刺激分子,主要为CD28分子加上CD137或CD134等。第一代CAR-T淋巴细胞研究较多,但是大多数试验在细胞扩增、体内存活时间、细胞因子分泌等方面还存在不足,没有达到预期的临床效果。研究表明,T淋巴细胞的完全活化有赖于双信号和细胞因子的作用。其中第一信号为特异性信号,由TCR识别抗原递呈细胞表面的抗原肽-MHC复合物所启动;第二信号为协同刺激信号,通过CD28/B7等重要的共刺激分子,促进IL-2合成,并使T淋巴细胞充分活化及免于凋亡。即使T淋巴细胞与抗原接触,如果没有协同刺激信号,细胞难以发挥正常功能。相应的,仅含有CD3 ζ 序列的嵌合抗原受体,如没有协同刺激信号,也难以高效激活CAR-T淋巴细胞。因此,依照T淋巴细胞活

化的双信号学说,第二和第三代CAR在嵌合抗原受体上加上如CD28、CD137等共刺激分子,以提高T淋巴细胞的细胞毒性、增殖活性,维持T淋巴细胞应答,延长T淋巴细胞存活时间等。研究证实第二代的CAR-T淋巴细胞在杀瘤活性和体内存活时间均优于第一代。目前第三代CAR-T淋巴细胞临床应用还比较少,其结构的构建、安全性和有效性还需进一步观察和优化。

[0005] 相比CAR-T细胞治疗,免疫检查节点抑制剂疗法在实体瘤治疗中的效果更加广泛和稳定。免疫检查节点是对免疫活动进行抑制的信号通路,通过抑制T细胞活性来避免免疫攻击,从而维持机体的免疫平衡,避免免疫反应过度造成的组织损伤或对自身抗原的攻击。然而,这种抑制性的通路也会被肿瘤劫持用来对抗免疫系统,从而逃避免疫系统的攻击。通过抑制免疫检查点蛋白CTLA4和PD1/PD-L1,就可以让免疫应答持续攻击肿瘤。目前,PD1/PD-L1疗法只能使一部分肿瘤患者获得治疗效果:对黑色素瘤的有效率可达40%~50%,对肺癌、肝癌、肾癌的有效率为30%,膀胱癌为40%,霍奇金淋巴瘤为90%。如何进一步提高治疗的应答率和有效率,是这类治疗手段进一步发展亟需解决的问题。已经上市的CTLA4单抗Ipilimumab,Ⅲ期临床表明25%的恶性黑色素瘤患者生存期超过2年,成为黑色素瘤治疗领域的重大突破。PD1/PDL1单抗比CTLA4单抗有更强的抗肿瘤作用。全球首个批准上市的PD-1单抗是百时美施贵宝公司的nivolumab单抗,率先在日本获批用于治疗晚期黑色素瘤,目前被FDA批准的PD-1单抗还有默沙东的Pembrolizumab(默沙东),罗氏的Atezolizumab是首个PD-L1单抗药物,目前已获批用于非小细胞肺癌和尿路上皮癌的治疗。

[0006] 但和CAR-T相比,免疫检查节点抑制剂的局限性体现在其仅能解除已经位于肿瘤边缘的T细胞的束缚或加强提呈,不能直接促使T细胞攻击肿瘤。目前各大药企在推进各自临床项目的同时,尝试与各种上市或没上市的药物联用,以发掘该类药物的最大临床潜力。EvaluatePharma的报告显示,目前有多家企业在研究PD-1/PD-L1抗体与其他药物的组合,组合药物包括疫苗、小分子药物、化疗药物、免疫抑制剂等。从数据来看,与其他药物组合的研究占据了31%。但免疫疗法也显示出一定的不良反应,尤其是复方组合,有些组合毒性太大而疗效一般。

[0007] CAR-T治疗与免疫检查节点抑制剂免疫治疗的联合应用是解决以上技术瓶颈最有发展前景的治疗手段,有望实现实体瘤治疗中的进一步突破。但如何找到经济可行、临床实用、副反应小的最佳的联合应用治疗方案,是目前拓展肿瘤免疫治疗面临的一个新的课题。

发明内容

[0008] 本发明的第一方面的目的是提供一种多肽,其包含两个嵌合抗原受体结构(CAR结构):

[0009] (1) 含有特异性靶向于肿瘤细胞抗原的ScFv的嵌合抗原受体结构(第一种CAR结构);和

[0010] (2) 含有特异性靶向于正常外周血细胞表面抗原的ScFv的嵌合抗原受体结构(第二种CAR结构)。

[0011] 其中,所述正常外周血细胞为正常B淋巴细胞。

[0012] 本发明所述多肽可以同时表达两种CAR结构,第一种CAR结构的ScFv能特异性地识别肿瘤相关抗原,第二种CAR结构的ScFv特异性靶向于外周血细胞正常表达的表面抗原。通

过特异地靶向于正常外周血细胞CAR结构识别血液循环系统的B淋巴细胞获得数量上的有效扩增,从而保证更多的T细胞到达实体瘤部位,通过靶向于肿瘤细胞的CAR结构对肿瘤细胞进行特异性杀伤,最终达到有效治疗实体肿瘤的目的,克服了目前临床CAR-T细胞的数量不足,限制了它对于实体肿瘤的治疗效果的问题。

[0013] 本发明所述多肽的第一种CAR结构的ScFv,其序列从氨基端到羧基端依次拼接为:ScFv (TAA)-Hinge (CD8)-TM (CD8)-CD137-CD3 ζ ,即从氨基端到羧基端依次拼接为:肿瘤相关抗原(Tumor Associated Antigen,TAA)的单链可变区、CD8a铰链区及跨膜区、CD137信号域、CD3 ζ 胞内区。根据不同肿瘤抗原表达的不同,ScFv (TAA)可做相应更换。其中肿瘤抗原包括但不限于CD30、HER2、GD2、EGFR、EGFRvIII、EphA2、IL13Ra2、CD133、ROR1、IGF1R、L1CAM。

[0014] 本发明所述多肽的第二种CAR结构的ScFv序列从氨基端到羧基端依次拼接为:ScFv (正常外周血细胞表面抗原)-Hinge (IgG4-short)-TM (CD28)-CD137-CD3 ζ ,即从氨基端到羧基端依次拼接为:正常外周血细胞表面抗原的单链可变区、IgG4的铰链区、CD28的跨膜区、CD137信号域、CD3 ζ 胞内区。其中正常外周血细胞表面抗原包括但不限于CD22、CD19、CD20、BCMA、CLL1、CD33。

[0015] 所述两个嵌合抗原受体结构之间通过自剪切多肽连接。如第一种CAR结构通过自剪切多肽T2A与第二种CAR结构串联。

[0016] 在一些实施方案中,所述含有特异性靶向于肿瘤细胞抗原的ScFv的嵌合抗原受体结构为靶向于CD30的嵌合抗原受体结构。

[0017] 进一步的,所述靶向于CD30的嵌合抗原受体结构从氨基端到羧基端依次拼接为ScFv (CD30)-Hinge (CD8)-TM (CD8)-CD137-CD3 ζ 。

[0018] 优选的,所述靶向于CD30的嵌合抗原受体结构的氨基酸序列及连接序列如SEQ ID NO.3所示。更优选的,所述靶向于CD30的嵌合抗原受体结构的核酸序列及连接序列如SEQ ID NO.4所示。

[0019] 在一些实施方案中,所述含有特异性靶向于肿瘤细胞抗原的ScFv的嵌合抗原受体结构为靶向于脑胶质瘤相关抗原(GAAs)的嵌合抗原受体结构。所述GAAs包括但不限于:IL13受体alpha2 (IL13Ra2)、EGFRvIII、Her2、GD2以及EphA2。

[0020] 进一步的,所述靶向于GAAs的嵌合抗原受体结构从氨基端到羧基端依次拼接为ScFv (GAAs)-Hinge (CD8)-TM (CD8)-CD137-CD3 ζ 。

[0021] 在一些实施方案中,所述含有特异性靶向于正常外周血细胞表面抗原的ScFv的嵌合抗原受体结构为靶向于CD22的嵌合抗原受体结构。

[0022] 进一步的,所述靶向于CD22的嵌合抗原受体结构从氨基端到羧基端依次拼接为ScFv (CD22)-Hinge (IgG4-short)-TM (CD28)-CD137-CD3 ζ 。

[0023] 优选的,所述靶向于CD22的嵌合抗原受体结构的氨基酸序列及连接序列如SEQ ID NO.5所示。更优先的,所述靶向于CD22的嵌合抗原受体结构的核酸序列及连接序列如SEQ ID NO.6所示。

[0024] 优选的,所述自剪切多肽T2A的氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示。更优选的,其核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示。

[0025] 在一些实施方案中,本发明所述多肽还包括抗PD-L1单克隆抗体来源的单链抗体ScFv。

[0026] 所述多肽中的两种CAR结构都具有跨膜区序列,共表达在细胞膜表面,而PD-L1的ScFv没有跨膜区,将以可溶性的方式分泌到细胞外,可以使T细胞同时分泌PD-L1单抗,从而阻断PD1/PDL1信号途径,突破CAR-T细胞和免疫检查节点抑制剂治疗单独治疗应用的局限性,提高对于实体瘤的治疗效果。同时通过阻断PD1/PDL1信号途径介导的T细胞衰竭,延长这些免疫细胞在体内的功能活性,最终减缓甚至避免肿瘤的复发。与传统的免疫检查点抑制剂相比较具有两个优势:1)更易于输送到肿瘤组织;2)有可能保持在体内的长期药物活性。

[0027] 优选的,所述PD-L1的ScFv的氨基酸序列及连接序列如SEQ ID NO.7所示。

[0028] 进一步的,所述PD-L1单抗的ScFv的核酸序列及连接序列如SEQ ID NO.8所示。

[0029] 所述PD-L1单抗的ScFv位置没有特别限定。可以与第二种CAR结构串联,也可以介于两个CAR结构之间。

[0030] 在一些实施方案中,所述PD-L1单抗的ScFv通过自剪切多肽与第二种CAR结构连接,即与含有特异性靶向于正常外周血细胞表面抗原的ScFv的嵌合抗原受体结构连接,将PD-L1单抗的ScFv序列整合到第二种CAR结构当中。

[0031] 优选的,所述自剪切多肽为自剪切多肽P2A。

[0032] 所述自剪切多肽P2A的氨基酸序列如SEQ ID NO.11所示。更优选的,其核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示。

[0033] 优选的,所述多肽的序列从氨基端到羧基端依次拼接为:ScFv (TAA)-Hinge (CD8)-TM (CD8)-CD137-CD3 ζ -T2A-ScFv (CD22)-Hinge (IgG4-short)-TM (CD28)-CD137-CD3 ζ -P2A-ScFv (PD-L1)。

[0034] 进一步优选的,所述多肽的序列从氨基端到羧基端依次拼接为:ScFv (CD30)-Hinge (CD8)-TM (CD8)-CD137-CD3 ζ -T2A-ScFv (CD22)-Hinge (IgG4-short)-TM (CD28)-CD137-CD3 ζ -P2A-ScFv (PD-L1)。

[0035] 优选情况下,所述多肽,即嵌合抗原受体的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0036] 本发明还提供了编码上述多肽的DNA核酸。

[0037] 优选情况下,所述编码上述多肽的DNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0038] 本发明的第三方面的目的是提供一种载体,所述载体包含编码上述多肽的DNA核酸。

[0039] 优选情况下,所述载体为慢病毒载体。本领域技术人员可以理解,本发明对于慢病毒载体没有特别的限定。

[0040] 在一些实施方案中,本发明的慢病毒载体为第三代自灭活慢病毒载体系统,该系统共有三个质粒即编码蛋白Gag/Pol、编码Rev蛋白的包装质粒psPAX2;编码VSV-G蛋白的包膜质粒PMD2.G(购自addgene)及基于空载体pLenti-EF1a-MCS-WPRE的编码目的基因CAR的重组表达载体。在空载体pLenti-EF1a-MCS-WPRE中,自带的延长因子-1a(elongationfactor-1a,EF1a)的启动子可调控下游插入编码区序列的表达,而编码区下游的土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)通过较高的转录和翻译过程增强了插入序列的表达。在空载体中插入前述构建的核酸序列后,形成编码插入目的基因的重组表达载体,其中通过具有自剪切功能的多肽2A串联CAR (CD30)、CAR (CD22)和PD-L1的ScFv,实现三者的共表达。2A又称为“自剪切多肽2A”,通过一段具备“自剪切”功能的核心序列,实现上游和下游

基因共表达。2A由于其剪切效率高、上下游基因表达平衡性高及自身序列短小的优点为构建基因治疗多顺反子载体提供了一种有效的可行策略。本发明实施例构建了由2A相连的CAR (CD30)、CAR (CD22) 和PD-L1的ScFv三者共表达的慢病毒表达载体,统称为pLenti-EF1a-CAR (CD30)-CAR (CD22)-aPDL1-WPRE。

[0041] 对于慢病毒载体pLenti-EF1a-CAR (CD30)-CAR (CD22)-aPDL1-WPRE的制备方法没有特别的限定,可以为本领域技术人员能够想到的各种方法。

[0042] 优选情况下,制备方法如下:合成如SEQIDNO.2所示的核苷酸序列,该序列两端包含额外加入的酶切位点Pac I和Spe I;将合成的序列Pac I和Spe I限制性内切酶双酶切,连入同样双酶切的pLenti-EF1a-MCS-WPRE载体中,从而构建含目的基因的慢病毒载体。构建成功的载体经Pac I和Spe I酶切鉴定及序列测定正确后,可以准备用于慢病毒包装。本发明对于包装所述慢病毒载体的方法没有特别的限定,可以为本领域技术人员常用的各种方法。

[0043] 本发明的第四方面的目的是提供一种慢病毒,所述慢病毒由上述慢病毒载体制备得到,载有编码本发明所述包含两个嵌合抗原受体结构的多肽的核酸。

[0044] 本发明的第五方面的目的是提供一种T淋巴细胞,经本发明所述慢病毒转染且表达本发明所述多肽的T淋巴细胞。该T淋巴细胞经双嵌合抗原受体修饰,表达两种嵌合抗原受体,还同时具有外源性单抗/蛋白类药物(比如PD-L1抗体)的分泌功能。通过静脉输注的方式将共表达两种CAR受体的T细胞输入肿瘤患者体内,CAR-T细胞通过靶向于外周血细胞抗原的CAR受体获得有效的活化,在外周血中分化和扩增,释放大量的细胞因子,并同时分泌抗PD-L1的ScFv结构。血中大量扩增的CAR-T细胞通过释放细胞因子发生的免疫炎症反应,使足够数量的CAR-T细胞到达实体瘤组织,并通过第一种CAR识别肿瘤抗原获得第二次活化和扩增,直接杀伤肿瘤细胞,同时通过释放细胞因子和分泌PDL1单抗的ScFv,实现对肿瘤的多重联合攻击,从而大大提高对实体肿瘤的治疗效果。

[0045] 因此,本发明的第六方面的目的是提供所述双嵌合抗原受体修饰的T淋巴细胞在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0046] 本发明的第七方面的目的是提供一种鉴定和分选所述双嵌合抗原受体修饰的T细胞的方法,用CAR (CD22) 的作为阳性细胞鉴定和分选标签,用生物素标记CD22-Fc和SA-PE染色,采用流式细胞术检测CAR阳性表达细胞表面CAR (CD22) 的表达,磁珠分选法分选纯化同时表达CAR (CD22) 和CAR (CD30) 结构的T细胞。

[0047] 本发明的第八方面的目的是提供一种鉴定前述的多肽表达分泌到溶液中的抗PD-L1抗体浓度的方法,用PDL1-Fc包被微珠,然后利用流式细胞术检测微珠表面荧光强度的变化来定量血清或细胞培养液中抗PD-L1抗体的浓度。

[0048] 由上述技术方案可知,本发明提供了一种多肽、编码其的核酸序列、其修饰的T淋巴细胞及其制备方法和应用。与现有技术相比本发明至少具有下述优点之一:

[0049] (1) 本发明所述多肽包含两个嵌合抗原受体结构,其修饰的T细胞表面同时表达两个CAR结构,一个CAR结构包含的ScFv特异地靶向于肿瘤细胞,另一个CAR结构包含的ScFv特异地靶向于正常B淋巴细胞,从而使CAR-T细胞通过识别血液循环系统的B淋巴细胞获得数量上的有效扩增,以保证更多的CAR-T细胞到达实体瘤部位,通过靶向于肿瘤细胞的CAR对肿瘤细胞进行特异性杀伤,最终达到有效治疗实体肿瘤的目的。

[0050] (2) 本发明所述多肽还包括包含PD-L1单抗的ScFv,能让CAR-T细胞同时分泌PD-L1单抗的ScFv,阻断PD1/PDL1信号途径介导的免疫抑制作用,突破CAR-T细胞和免疫检查节点抑制剂治疗单独应用的局限性,从而提高对于实体瘤的治疗效果。

[0051] (3) 本发明所述多肽中包含PD-L1单抗的ScFv,还能阻断PD1/PDL1信号途径介导的T细胞衰竭,延长这些免疫细胞在体内的功能活性,最终减缓甚至避免肿瘤的复发。

附图说明

[0052] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0053] 图1示CAR (TAA) -CAR (CD22) -aPDL1修饰的T细胞体内发挥体内抗肿瘤效应示意图,转染阳性的T细胞的表面同时表达CAR (TAA) 和CAR (CD22),并分泌PD-L1单抗的ScFv片段,通过CAR (CD22) 结合正常B细胞上的CD22分子活化,数量上获得大量扩增,并分泌细胞因子,引起免疫炎症,可以破坏血管壁或血液和组织间的屏障,从而使扩增的T细胞更有效到达肿瘤组织,再利用CAR (TAA) 识别肿瘤细胞特异表达的某种肿瘤相关抗原 (TAA),获得第二次活化扩增,通过分泌PD-L1单抗的ScFv,有效克服肿瘤微环境中PD-L1的表达对CAR-T细胞的抑制作用,实现对实体肿瘤的有效攻击和清除;

[0054] 图2示实施例1所述的慢病毒质粒图谱及克隆位点;






[0055] 图3示实施例4流式细胞术检测CAR (CD22) 的表达作为双CAR结构表达的检测和筛选标签,其中图A为CAR (CD22) 质粒转染的T细胞,用生物素化的CD22-Fc标记后,再标记PE偶联的亲合素;图B为CAR (CD30) -CAR (CD22) -aPDL1质粒转染的T细胞,用生物素化的CD22-Fc标记,再标记PE偶联的亲合素;图C和图B所用细胞相同,用生物素化的CD30-Fc标记,再标记PE偶联的亲合素;图D为图B所示细胞,用生物素化的CD22-Fc标记,再用亲合素标记的磁珠进行阳性筛选,筛选后细胞用流式细胞术检测CAR (CD30) 的表达;以上流式细胞图显示的细胞都是CD3+T细胞;

[0056] 图4示实施例5CAR-T细胞体外功能测试的结果图,图中体外生产的表达双CAR的T细胞作为效应细胞,分别与表达不同cDNAs的靶细胞混合,在如图所示的效应细胞:靶细胞比值的情况下,对不同靶细胞的杀伤活性比较;

[0057] 图5示qPCR检测CAR-T细胞在患者体内的扩增的结果图,曲线显示的是每微克外周血基因组DNA中CAR+DNA的拷贝数;灰色曲线代表患者接受第一次输注前后不同时间点的数值,黑色曲线代表患者接受第二次输注前后不同时间点的数值;第一次输注的细胞是表达CAR (CD30) 的T细胞,第二次输注的是表达CAR (CD30) -CAR (CD22) -aPDL1的T细胞;

[0058] 图6示流式细胞术检测患者外周血血浆中aPDL1的表达的结果图,图中显示的是患者接受第二次输注前后不同时间点的数值,灰色曲线代表阳性微珠占所有微珠的百分比,以此数值代表aPDL1在血浆中的含量,该数值与CAR-T细胞在体内的扩增(黑色曲线)趋势一致;

[0059] 图7示T细胞转染不同的双CAR结构后,用CAR (CD22) 表达作为标签来代表另外一个CAR结构的表达水平;T细胞所转染的双CAR结构分别为:A. CAR (IL13Ra2) -CAR (CD22) -aPDL1、B. CAR (EGFRvIII) -CAR (CD22) -aPDL1、C. CAR (Her2) -CAR (CD22) -aPDL1、D. CAR (GD2) -CAR (CD22) -aPDL1、E. CAR (EphA2) -CAR (CD22) -aPDL1;

[0060] 图8示将转染不同双CAR结构的T细胞作为效应细胞与表达不同cDNAs的293T细胞作为靶细胞混合培养16小时后,检测上清中细胞因子浓度,A为IFN-gamma,B为TNF-alpha;  为CAR (IL13Ra2) -CAR (CD22) -aPDL1、 为CAR (EGFRvIII) -CAR (CD22) -aPDL1、 为CAR (Her2) -CAR (CD22) -aPDL1、 为CAR (GD2) -CAR (CD22) -aPDL1、 为CAR (EphA2) -CAR (CD22) -aPDL1;效应细胞和靶细胞的比例为3:1;GD2+NB:GD2阳性的神经母细胞瘤原代细胞。

具体实施方式

[0061] 本发明公开了一种多肽、编码其的核酸序列、其修饰的T淋巴细胞及其制备方法和应用。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现本发明目的。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明中。本发明的方法及产品已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和产物进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0062] 为了进一步理解本发明,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0063] 本发明提供的实施例部分,通过一个基因片段同时串联了多功能CAR结构的各个组分,当把这个基因片段克隆到慢病毒质粒,再包装成病毒,转染T细胞,使T细胞通过一次转染即可实现多个组分的同时表达,包括CAR (CD22) 和CAR (CD30) 的表面表达、PD-L1单链抗体的分泌。本领域技术人员可以通过调整基因片段中各组分的顺序,或者分别克隆不同组分的基因片段进入不同的慢病毒质粒,分别包装病毒,不同病毒共转染T细胞来实现本发明,总之是通过不同的克隆和转染途径达到和本发明一致的目的,即使T细胞同时表达多个组分,均在本发明的保护范围内。

[0064] 另外,本发明提供的实施例部分,靶向于正常外周血细胞抗原靶点选择的是CD22。本领域技术人员通过选择其它类似靶点,包括但不限于CD19、CD20、CLL1、BCMA等,也可达到同样的目的,需予以保护。

[0065] 本发明的多功能CAR-T细胞治疗的疾病类型包括但不限于癌、胚细胞瘤、肉瘤、白血病、恶性淋巴瘤。本发明提供的实施例部分,选择的CD30靶点是霍奇金淋巴瘤的常见靶点,事实上本发明方案适用于所有实体瘤或非实体瘤的CAR-T治疗,即CAR-T靶向的肿瘤抗原可以是其它任何肿瘤抗原,包括但不限于CD30、CD19、神经胶质瘤相关的抗原、癌胚抗原(CEA)、β-人绒毛膜促性腺素、α-胎蛋白(AFP)、凝集素-反应的AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶反转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧酸酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶、前列腺-特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、prostelin、PSMA、GD2、Her2/neu、存活素和端粒酶、前列腺-癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、MAGE、ELF2M、中性白细胞弹性蛋白酶、EphA2、IL13受体alpha2、胰岛素生长因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体和间皮素。

[0066] 本发明提供的实施例部分,多功能CAR-T具有分泌PD-L1单链抗体的功能,本领域

技术人员也可以选择分泌类似功能的其它蛋白或抗体,包括可溶性PD-1、PD-1单抗、其它形式的PD-1或PD-L1阻断剂。

[0067] 如无特殊说明,本发明实施例中所涉及的试剂均为市售产品,均可以通过商业渠道购买获得。

[0068] 实施例1、CAR (CD30) -CAR (CD22) -aPDL1慢病毒载体的构建

[0069] 发明人根据基因工程技术设计了3个目的基因结构,其序列从氨基端到羧基端依次拼接为:

[0070] 1. CAR (CD30) :ScFv (CD30) -Hinge (CD8) -TM (CD8) -CD137-CD3 ζ

[0071] 2. CAR (CD22) :ScFv (CD22) -Hinge (IgG4-short) -TM (CD28) -CD137-CD3 ζ

[0072] 3. CAR (CD30) -CAR (CD22) -aPDL1:

[0073] ScFv (CD30) -Hinge (CD8) -TM (CD8) -CD137-CD3 ζ -T2A-ScFv (CD22) -Hinge (IgG4-short) -TM (CD28) -CD137-CD3 ζ -P2A-ScFv (PD-L1)。

[0074] 其中,ScFv (CD30) -Hinge (CD8) -TM (CD8) -CD137-CD3 ζ 表达一个靶向于CD30的嵌合抗原受体,其基因序列依次为:CD30抗体的单链可变区、CD8a较链区及跨膜区、CD137信号域、CD3 ζ 链胞内区。以上序列通过自剪切多肽T2A串联靶向于CD22的抗原嵌合受体的序列。CAR (CD22) 序列由CD22抗体的单链可变区、IgG4的较链区、CD28的跨膜区、CD137信号域、CD3 ζ 链胞内区依次串联而成。

[0075] 为进一步提高上述双CAR结构对于实体瘤的治疗效果,发明者在羧基端通过另外一类自剪切多肽P2A串联了PD-L1抗体的单链可变区序列。CAR (TAA) 和CAR (CD22) 都具有跨膜区序列,所以共表达在细胞膜表面;PD-L1的ScFv因为没有跨膜区,将以可溶性的方式分泌到细胞外。

[0076] 所述嵌合抗原受体的氨基酸序列如SEQIDNO.1所示。

[0077] 编码上述嵌合抗原受体的基因的核苷酸序列如SEQIDNO.2所示。

[0078] 含有上述基因的重组表达载体为第三代自灭活慢病毒载体系统,该系统共有三个质粒即编码蛋白Gag/Pol、编码Rev蛋白的包装质粒psPAX2;编码VSV-G蛋白的包膜质粒PMD2.G(购自addgene)及基于空载体pLenti-EF1a-MCS-WPRE的编码目的基因CAR的重组表达载体。在空载体pLenti-EF1a-MCS-WPRE中,自带的延长因子-1a (elongationfactor-1a, EF1a) 的启动子可调控下游插入编码区序列的表达,而编码区下游的土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)通过较高的转到和翻译过程增强了插入序列的表达。在空载体中插入本实施例前述构建的构建体(所述嵌合抗原受体的基因)后,形成编码插入目的基因的重组表达载体,其中通过具有自剪切功能的多肽2A串联CAR (CD30)、CAR (CD22) 和PD-L1的ScFv,构建了由2A相连的CAR (CD30)、CAR (CD22) 和PD-L1的ScFv三者共表达的慢病毒表达载体,称为pLenti-EF1a-CAR (CD30) -CAR (CD22) -aPDL1-WPRE,实现CAR (CD30)、CAR (CD22) 和PD-L1的ScFv三者的共表达。

[0079] 2A又称为“自剪切多肽2A”,通过一段具备“自剪切”功能的核心序列,实现上游和下游基因共表达。2A由于其剪切效率高、上下游基因表达平衡性高及自身序列短小的优点为构建基因治疗多顺反子载体提供了一种有效的可行策略。本实施例构建了由2A相连的CAR (CD30)、CAR (CD22) 和PD-L1的ScFv三者共表达的慢病毒表达载体,统称为pLenti-EF1a-CAR (CD30) -CAR (CD22) -aPDL1-WPRE (图2)。

[0080] 慢病毒表达载体pLenti-EF1a-CAR (CD30)-CAR (CD22)-aPDL1-WPRE的制备方法如下:合成如SEQIDNO.2所示的核苷酸序列,该序列两端包含额外加入的酶切位点Pac I和Spe I;将合成的序列Pac I和Spe I限制性内切酶双酶切,连入同样双酶切的pLenti-EF1a-MCS-WPRE载体中,从而构建含目的基因的慢病毒载体。构建成功的载体经Pac I和SpeI酶切鉴定及序列测定正确后,可以准备用于慢病毒包装。

[0081] 实施例2、慢病毒包装

[0082] 包装的操作步骤如下:

[0083] 将已长到80%-90%的293FT细胞培养瓶(T175)从37℃5%CO₂的细胞培养箱中取出,加入2mL不含EDTA-0.25%Trypsin消化后收集洗涤细胞,每10cm细胞培养皿中加入 4.5×10^6 个细胞,加9mL DMEM培养基,轻轻摇匀,放入37℃5%CO₂培养箱中培养。

[0084] 第2天,按每个平皿500μL jetPRIME® buffer、6μg目的基因、3μg psPAX2、1.5μg pMD2.G的量将以上溶液混合均匀。向混合液中加入 jetPRIME® 25μL/10cm平皿,再次混合均匀,室温静置10min。将用于包装病毒的293FT细胞从37℃5%CO₂的细胞培养箱中取出,将上述混合液平均加到每平皿中,轻轻摇匀,放入37℃5%CO₂培养箱中。4h后,弃旧培养基,加入10mL已预热的PBS清洗细胞,再加入9mL新鲜的已预热的含10%胎牛血清的DMEM培养基,放入37℃5%CO₂培养箱中培养。

[0085] 继续培养48h-72h后收取培养上清作为病毒原液。将原液收集到用0.45μm滤器过滤到50ml离心管中,4℃18500g高速离心2h。将上清液弃净,加入无血清培养基重悬病毒颗粒。加入的培养基体积:病毒原液体积=1:500。此即为病毒浓缩液。将病毒浓缩液按100μl/管分装,另外留取10μl进行病毒滴度测定。将分装好的浓缩液置于-80℃冰箱保存。

[0086] 实施例3、CAR-T细胞制备

[0087] 一、细胞扩增 (Day0)

[0088] 无菌采集患者静脉血50-100ml,将血样进行密度梯度离心,获取外周血单个核细胞(PBMC)。用CD3分选磁珠(德国美天旎公司)分选CD3+细胞。将分选阳性细胞先用2ml培养基重悬,按照阳性细胞与磁珠1:1比例加入T细胞活化磁珠(美国Gibco公司)。然后按照 3×10^5 细胞/500μl培养基/孔铺24孔板,移入37℃,5%CO₂细胞培养箱培养2天。

[0089] 二、细胞转染 (Day2)

[0090] 将24孔板提前从培养箱内取出放置在生物安全柜中,让其冷却至室温。然后按照1‰(V/V)加入Protamine Sulfate。将病毒融化后按照相应的体积加入到24孔板中,并用移液枪吹吸混匀病毒。35℃,2000rpm,离心两个小时后。离心结束后轻轻地将24孔板从离心机中取出,用移液器随机取出200μl细胞上清液做血琼脂平皿检测,喷洒75%酒精消毒后移入37℃,5%CO₂细胞培养箱继续培养。

[0091] 三、扩大培养 (Day4-14)

[0092] 转染第二天进行换液,将24孔板从培养箱取出,用移液枪每孔吸出一半的上清液,并补充一半的完全培养基(包含200U/ml的人重组IL-2),继续培养。当细胞浓度到达 $1.5-2 \times 10^6$ /ml的状态下,转瓶或转袋,每三天补加一次200IU/ml的IL-2。细胞培养至第10-14天,取200μl细胞悬液进行TrypanBlue计数,并进行后续的细胞鉴定、分选,以及功能测试。

[0093] 实施例4、用CAR (CD22) 的表达作为标签来鉴定和分选阳性细胞

[0094] 1、生物素标记CD22-Fc和CD30-Fc

[0095] 纯化的CD30-Fc和CD22-Fc皆购于义翘神州生物技术有限公司。取100 μ g纯化蛋白粉末,重悬于pH7.2的PBS中,终浓度为0.5-1 μ g/ μ l备用;用纯度>99.9%的二甲基亚砜(DMSO)溶解适量生物素(biotin-xx,SE),配制成2mM的悬液;按蛋白:生物素=1:10的摩尔比例将二者混匀,室温静置1小时,每隔15分钟混匀一次;用脱盐柱脱盐,根据体积不同,可以选择PD-10或G-25脱盐柱,操作步骤参考使用说明书。

[0096] 2、流式细胞仪检测细胞表面CAR (CD22) 和CAR (CD30) 的表达

[0097] 慢病毒转染后48-72小时,取T细胞检测转染效率。每管 $1-2 \times 10^5$ 的细胞,分别加入1 μ l生物素标记的CD30-Fc或CD22-Fc,冰上孵育10分钟,加1ml的流式缓冲液(PBS+2%FBS)重悬,离心洗涤两次。再加入SA-PE、CD3-APC、CD4-PE、Cy7、CD8-VioBlue(美天旎公司),冰上孵育10分钟,离心洗涤两次,重悬于200 μ l的流式缓冲液中,用MACSQuant 10(美天旎公司)流式细胞仪检测,FlowJo分析CAR (CD22) 和CAR (CD30) 的表达,图3B和图3C的流式图显示双CAR转染后T细胞获得CAR (CD22) 和CAR (CD30) 的同时表达。

[0098] 3、磁珠分选纯化CAR阳性细胞

[0099] 经流式细胞术鉴定CAR (CD22) 表达阳性的细胞,用美天旎公司的磁珠分选技术分选纯化CD22-Fc标记阳性的T细胞,分选后细胞用CD30-Fc标记,证实分选后的细胞都表达CAR (CD30) (图3D)。磁珠分选操作程序如下:

[0100] 1) 上述的CAR-T细胞培养至10-14天,收集所有细胞,离心,结束后尽可能的将上清液弃掉。

[0101] 2) 按照每 1×10^7 T细胞加入100 μ l缓冲液和5 μ l的生物素标记的CD22-Fc的比例加入,吹吸混匀后放入4 $^{\circ}$ C冰箱避光孵育15分钟,中间每隔5分钟轻轻拍打混匀。

[0102] 3) 孵育完成后按照每 1×10^7 PBMC加入1-2ml缓冲液,上下颠倒混匀后移入低速冷冻离心机1500rpm,4 $^{\circ}$ C离心10min。

[0103] 4) 离心期间将分选磁力架消毒后放入生物安全柜,放置好磁力柱,并用3ml缓冲液冲洗平衡磁力柱。

[0104] 5) 离心结束后尽可能的将上清液弃掉,按照每 1×10^7 T细胞加入90 μ l缓冲液和10 μ l的SA-磁珠的比例加入,吹吸混匀后放入4 $^{\circ}$ C冰箱避光孵育15分钟,中间每隔5分钟轻轻拍打混匀。

[0105] 6) 孵育完成后按照每 1×10^7 PBMC加入1-2ml缓冲液,上下颠倒混匀后离心,1500rpm,4 $^{\circ}$ C离心10min。

[0106] 7) 离心结束后尽可能的将上清液弃掉,按照 1×10^8 PBMC加入500 μ l缓冲液吹吸混匀细胞沉淀层。然后将细胞悬液加入已经准备好的磁力柱中,让其自由滴下,下面用50ml离心管接收,切记要等到没有液体滴下后再加入3ml缓冲液清洗磁力柱,重复2遍。

[0107] 8) 滴下的细胞悬液就是分选得到的阴性细胞,而留在磁力柱中的细胞即为阳性细胞。将磁力柱从磁力架中移出,放置在15ml离心管中,加入5ml缓冲液用磁力柱中的活塞用力挤压磁力柱中缓冲液,用来将磁力柱中的阳性细胞冲洗下来流入15ml离心管中。

[0108] 9) 将收集的分选阳性细胞离心后重悬,计数,流式检测CAR阳性细胞的纯度,继续培养或直接用于后续的功能测试。

[0109] 实施例5、CAR-T细胞体外功能测试

[0110] 1、靶细胞株的建立

[0111] 建立以下稳定表达细胞株:293T-CD19、293T-CD22、293T-CD30、293T-CD22-CD30。

[0112] 2、效应细胞与靶细胞混合培养

[0113] 3、流式细胞术测定CAR-T的特异杀伤活性

[0114] 以上获得的靶细胞株,分别加入2 μ M的CFSE,5%CO₂、37℃孵育30分钟;加入10mlPBS,1200rpm5min离心洗涤三次,重悬后待用;在96孔细胞培养板中,每孔加入1 \times 10⁴的CFSE标记的靶细胞;然后按效应细胞:靶细胞分别为100:1、30:1、10:1、3:1、1:1的比例将相应数量分选纯化的CAR-T细胞分别加入对应各孔,分别设置效应细胞和靶细胞空白对照孔;置5%CO₂、37℃培养箱中共培养4-6小时;将细胞混合液取出,PBS洗涤二次,加入5 μ l7-AAD,避光孵育15分钟;洗涤后,流式细胞仪检测被杀伤的靶细胞(CFSE+7AAD+)占有靶细胞(CSFE+)的百分比,即为杀伤率。如图4所示,表达双CAR的T细胞对图中所示的表达不同cDNAs的293T细胞的杀伤效率比较,横坐标代表效应细胞和靶细胞的比值,纵坐标代表计算得到的杀伤效率。表达CAR(CD30)-CAR(CD22)-aPDL1的T细胞对于表达CD19的293T细胞不具有杀伤能力,对于表达CD22、CD30以及同时表达以上两个cDNAs的293T细胞具有特异性的杀伤能力。

[0115] 4、细胞因子水平测定

[0116] 在96孔细胞培养板中,每孔加入1 \times 10⁴的CFSE标记的靶细胞;然后按效应细胞:靶细胞为3:1的比例将相应数量分选纯化的CAR-T细胞分别加入对应各孔,分别设置效应细胞和靶细胞空白对照孔;置5%CO₂、37℃培养箱中共培养16小时;使用Biolegend公司的LegendDplex人炎症因子检测试剂盒,按照操作手册检测上清液中的细胞因子浓度。

[0117] 5、CD137表达鉴定

[0118] 在96孔细胞培养板中,每孔加入1 \times 10⁴的CFSE标记的靶细胞;然后按效应细胞:靶细胞为3:1的比例将相应数量分选纯化的CAR-T细胞分别加入对应各孔,分别设置效应细胞和靶细胞空白对照孔;置5%CO₂、37℃培养箱中共培养16小时;将细胞混合液取出,PBS洗涤二次,加入单克隆抗体CD3-APC.Cy7、CD4-PE.Cy7、CD8-VioBlue、CD137-PE,冰上孵育10-15分钟;流式细胞液(PBS+2%FBS)洗涤,重悬后,流式细胞仪上样分析。

[0119] 实施例6、CAR(CD30)-CAR(CD22)-aPDL1修饰的T细胞的临床应用

[0120] 在本实施例中,CD30⁺的进展期霍奇金淋巴瘤患者,先后接受两次CAR-T治疗:第一次回输的CAR-T细胞是CAR(CD30)修饰的自身T淋巴细胞,虽然治疗后28天评估时疾病未进展(Stable Disease,SD),但3个月因肿瘤进展再次住院。经评估无标准治疗方案后,与患者签署协议,给予CAR(CD30)-CAR(CD22)-aPDL1修饰的T细胞治疗,治疗后28天获得部分应答(PartialResponse,PR)。随访2个月,疾病仍未出现进展。

[0121] 实施例7、实时荧光定量PCR技术检测CAR-T细胞在外周血中的含量

[0122] 1、样本制备

[0123] 用德国凯杰公司(Qiagen)的基因组提取试剂盒(货号:51104),根据厂家的操作手册,从200 μ l全血中提取基因组DNA;用NanoDrop2000分光光度计测量提取的基因组DNA浓度。

[0124] 准备稀释好的10-10⁶个/ μ l的质粒、不含目的片段的空白样本(浓度为100ng/ μ l)、引物(上游和下游引物,浓度为10mM)、探针(浓度为5mM)、不含DNase和RNase的水、

TaqMan® Gene Expression Master Mix (购自赛默飞世尔科技公司, 货号4369016)。引物和探针序列为:

- [0125] WPRE正向引物: 5' -CCGTTGTCAGGCAACGTG-3' ,
 [0126] WPRE反向引物: 5' -AGCTGACAGGTGGTGGCAAT-3' ,
 [0127] 探针: 5' -FAM-TGCTGACGCAACCCCCACTGGT-3'
 [0128] 按下表制备反应体系

| | 标准曲线 | 样本 |
|-----------------------|------------------|--------------------------|
| 引物 (F/R) (μl) | 0.3+0.3 | 0.3+0.3 |
| 探针 (μl) | 0.2 | 0.2 |
| [0129] 模板 (μl) | 1+1 ¹ | 100ng/(Xμl) ² |
| H ₂ O (μl) | 7.2 | 9.2-X |
| Mix (μl) | 10 | 10 |
| Total (μl) | 20 | 20 |

[0130] 注: 1:1+1表示1μl的空白模板和1μl的质粒 (10-10⁶, 共6个梯度)

[0131] 2: X由不同样本的浓度决定, 加入的模板量为100ng

[0132] 每个样本做3个复孔, 标准曲线为6个浓度梯度。分装入八连排0.2μl Ep管或96孔0.2μl Ep管进行QPCR反应。

[0133] 将以上制备的反应体系置于ABI7500实时荧光定量PCR仪中, 按以下程序进行扩增:

| | 温度 | 时间 | 循环数 |
|--------|--------|-------|--------|
| | 50.0°C | 2min | |
| [0134] | 95°C | 10min | |
| | 95°C | 15S | 40 个循环 |
| | 60°C | 1min | |

[0135] 反应完成后, 根据标准曲线计算出1μg基因组中CAR-T细胞拷贝数。如图5和6所示, 横坐标代表患者CAR-T细胞回输后的检测的不同时间点, 纵坐标代表用qPCR技术检测的每微克全血基因组DNA中所含有的WPRE基因 (即CAR+DNA) 的拷贝数。图5显示结果证实, 第二次输注CAR (CD30)-CAR (CD22)-aPDL1转染的T细胞后, CAR-T细胞在体内的扩增强度要远高于患者第一次接受CAR (CD30)-T细胞回输后, 而且在回输后7天和21天出现了两个扩增高峰, 第二个高峰的绝对拷贝数要高于第一个高峰的, 可能提示CAR-T细胞分别针对两个抗原靶点, 出现了两次体内扩增。

[0136] 实施例8、PDL1单抗ScFv在患者外周血中含量的检测

[0137] 用化学交联法将PDL1-Fc标记到表面羧基化的检测用微珠上。具体操作为将10μl 150mg/ml的EDC和10μl 150mg/ml的NHS在PH=5.8磷酸缓冲液中与1×10⁶微珠混合20-30min。用PBS中洗涤两次后, 与5-12μg的购买的重组PDL1-Fc (义翘神州) 进行偶联 (室温振荡4h或4°C振荡过夜)。用含有0.02%-0.5% Tween-20的PBS洗涤孵育15min两次, 即获得PDL1-Fc偶联微珠。

[0138] 取 1×10^4 偶联微珠与含有PDL1ScFv的血浆或培养上清混合,室温,400rpm,振荡1h。接着向反应管中加入0.4 μ g生物素化的PDL1-Fc,室温,400rpm,振荡1h。向反应管中加入链霉亲和素藻红蛋白(SA-PE),室温,400rpm,振荡30min。随后,PBS洗涤,重悬后用流式细胞仪检测,PE阳性微珠所占百分比的变化即代表检测血清或细胞培养上清中PDL1抗体ScFv的水平变化。检测结果如图6所示,在接受CAR (CD30) -CAR (CD22) -aPDL1的T细胞回输的患者外周血中,aPDL1阳性微珠的百分比变化与CAR-T细胞在体内的扩增趋势保持一致。

[0139] 实施例9、

[0140] 选择脑胶质瘤作为肿瘤细胞。所述含有特异性靶向于肿瘤细胞抗原的ScFv的嵌合抗原受体结构为靶向于脑胶质瘤相关抗原的嵌合抗原受体结构。脑胶质瘤治疗的最大障碍是血脑屏障的存在阻碍了血液里的成分(包括肿瘤特异的T淋巴细胞)进入脑组织。而本发明中的T淋巴细胞经双嵌合抗原受体修饰,表达两种嵌合抗原受体,还同时具有外源性单抗/蛋白类药物(比如PD-L1抗体)的分泌功能。

[0141] 脑胶质瘤相关抗原(Brain Glioma Associated Antigens,GAAs)指的是脑胶质瘤细胞高表达的一些蛋白质,在正常细胞中不表达或少量表达。GAAs包括但不限于:IL13受体 α 2(IL13Ra2)、EGFRvIII、Her2、GD2以及EphA2。根据所针对的抗原不同,所形成的抗原嵌合受体结构分别为:CAR (IL13Ra2) -CAR (CD22) -aPDL1、CAR (EGFRvIII) -CAR (CD22) -aPDL1、CAR (Her2) -CAR (CD22) -aPDL1、CAR (GD2) -CAR (CD22) -aPDL1以及CAR (EphA2) -CAR (CD22) -aPDL1。

[0142] 按照实施例1中提供的方法,分别构建了含有以上嵌合抗原受体基因结构的慢病毒载体,并按照实施例2-3中提供的方法,体外扩增生产相应结构的CAR-T细胞,再按实施例4中提供的方法,用CAR (CD22) 的表达作为标签来代表另外一个CAR结构的表达水平。如图7所示,用生物素化的CD22-Fc,继而加入SA-PE来鉴定CAR (CD22) 的阳性表达,从而反映不同CAR (GAAs) 结构的转染效率。为进一步验证CAR (CD22) 阳性细胞代表了另外一个CAR,即CAR (GAAs) 的表达情况,根据实施例5第4项细胞因子检测的技术方案,将不同效应细胞与表达不同cDNAs的293T细胞混合培养后,检测上清中细胞因子浓度,通过细胞因子的变化来判定效应细胞对相应的肿瘤抗原获得了的特异性的免疫应答,图8所示的结果证实了针对不同GAAs构建的双CAR结构,只对表达相应抗原的靶细胞产生特异应答,释放更多的IFN- γ 和TNF- α ,这个结果同时证实了CAR (CD22) 的表达可以作为标签反映另外一个针对胶质瘤肿瘤相关抗原 (GAAs) 的CAR结构的表达水平。

[0143] 根据实施例6中的临床应用模式,通过静脉输注的方式将共表达两种CAR受体的T细胞输入肿瘤患者体内,CAR-T细胞通过CAR (CD22) 在血中获得有效的活化扩增,并释放大量细胞因子,产生免疫炎症反应,从而破坏血脑屏障,使足够数量的CAR-T细胞到达脑部组织;并通过针对脑胶质瘤抗原的CAR识别脑胶质瘤细胞获得第二次活化和扩增,直接杀伤脑胶质瘤细胞,同时通过释放细胞因子和分泌anti-PDL1,实现对肿瘤的多重联合攻击,大大提高对脑胶质瘤的治疗效果。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 河北森朗生物科技有限公司
 [0003] <120> 一种多肽、编码其的核酸、其修饰的T淋巴细胞及其应用
 [0004] <130> MP1726973
 [0005] <160> 12
 [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 1225
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0011] <400> 1
 [0012] Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
 [0015] 20 25 30
 [0016] Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
 [0017] 35 40 45
 [0018] Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Arg
 [0019] 50 55 60
 [0020] Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Gly Cys Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr
 [0023] 85 90 95
 [0024] Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr
 [0025] 100 105 110
 [0026] Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly
 [0027] 115 120 125
 [0028] Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 [0029] 130 135 140
 [0030] Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 [0031] 145 150 155 160
 [0032] Gly Gly Ser Val Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr
 [0033] 165 170 175
 [0034] Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Val Thr Tyr Lys Ala Ser Gln Asn Val
 [0035] 180 185 190
 [0036] Gly Thr Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 [0037] 195 200 205
 [0038] Val Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg
 [0039] 210 215 220
 [0040] Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn
 [0041] 225 230 235 240

| | | | |
|--------|---|-----|-------------|
| [0042] | Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His Thr | | |
| [0043] | | 245 | 250 255 |
| [0044] | Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser | | |
| [0045] | | 260 | 265 270 |
| [0046] | Asp Pro Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro | | |
| [0047] | | 275 | 280 285 |
| [0048] | Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro | | |
| [0049] | | 290 | 295 300 |
| [0050] | Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu | | |
| [0051] | | 305 | 310 315 320 |
| [0052] | Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp | | |
| [0053] | | 325 | 330 335 |
| [0054] | Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly | | |
| [0055] | | 340 | 345 350 |
| [0056] | Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn Lys Arg Gly | | |
| [0057] | | 355 | 360 365 |
| [0058] | Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val | | |
| [0059] | | 370 | 375 380 |
| [0060] | Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu | | |
| [0061] | | 385 | 390 395 400 |
| [0062] | Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp | | |
| [0063] | | 405 | 410 415 |
| [0064] | Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn | | |
| [0065] | | 420 | 425 430 |
| [0066] | Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg | | |
| [0067] | | 435 | 440 445 |
| [0068] | Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly | | |
| [0069] | | 450 | 455 460 |
| [0070] | Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu | | |
| [0071] | | 465 | 470 475 480 |
| [0072] | Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu | | |
| [0073] | | 485 | 490 495 |
| [0074] | Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His | | |
| [0075] | | 500 | 505 510 |
| [0076] | Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly | | |
| [0077] | | 515 | 520 525 |
| [0078] | Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Gln | | |
| [0079] | | 530 | 535 540 |
| [0080] | Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr | | |
| [0081] | | 545 | 550 555 560 |
| [0082] | Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser | | |
| [0083] | | 565 | 570 575 |

| | |
|--------|---|
| [0084] | Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp |
| [0085] | 580 585 590 |
| [0086] | Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val |
| [0087] | 595 600 605 |
| [0088] | Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln |
| [0089] | 610 615 620 |
| [0090] | Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr |
| [0091] | 625 630 635 640 |
| [0092] | Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp Leu Glu Asp Ala Phe Asp Ile |
| [0093] | 645 650 655 |
| [0094] | Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser |
| [0095] | 660 665 670 |
| [0096] | Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly |
| [0097] | 675 680 685 |
| [0098] | Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr |
| [0099] | 690 695 700 |
| [0100] | Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile |
| [0101] | 705 710 715 720 |
| [0102] | Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly |
| [0103] | 725 730 735 |
| [0104] | Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala |
| [0105] | 740 745 750 |
| [0106] | Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln |
| [0107] | 755 760 765 |
| [0108] | Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly |
| [0109] | 770 775 780 |
| [0110] | Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly |
| [0111] | 785 790 795 800 |
| [0112] | Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile |
| [0113] | 805 810 815 |
| [0114] | Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln |
| [0115] | 820 825 830 |
| [0116] | Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser |
| [0117] | 835 840 845 |
| [0118] | Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys |
| [0119] | 850 855 860 |
| [0120] | Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln |
| [0121] | 865 870 875 880 |
| [0122] | Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu |
| [0123] | 885 890 895 |
| [0124] | Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg |
| [0125] | 900 905 910 |

| | |
|--------|---|
| [0126] | Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met |
| [0127] | 915 920 925 |
| [0128] | Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly |
| [0129] | 930 935 940 |
| [0130] | Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp |
| [0131] | 945 950 955 960 |
| [0132] | Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly |
| [0133] | 965 970 975 |
| [0134] | Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn |
| [0135] | 980 985 990 |
| [0136] | Pro Gly Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala |
| [0137] | 995 1000 1005 |
| [0138] | Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val |
| [0139] | 1010 1015 1020 |
| [0140] | Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys |
| [0141] | 1025 1030 1035 1040 |
| [0142] | Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg |
| [0143] | 1045 1050 1055 |
| [0144] | Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser |
| [0145] | 1060 1065 1070 |
| [0146] | Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr |
| [0147] | 1075 1080 1085 |
| [0148] | His Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser |
| [0149] | 1090 1095 1100 |
| [0150] | Ser Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln |
| [0151] | 1105 1110 1115 1120 |
| [0152] | Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe |
| [0153] | 1125 1130 1135 |
| [0154] | Ser Asp Ser Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu |
| [0155] | 1140 1145 1150 |
| [0156] | Glu Trp Val Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala |
| [0157] | 1155 1160 1165 |
| [0158] | Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn |
| [0159] | 1170 1175 1180 |
| [0160] | Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val |
| [0161] | 1185 1190 1195 1200 |
| [0162] | Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly |
| [0163] | 1205 1210 1215 |
| [0164] | Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser |
| [0165] | 1220 1225 |
| [0166] | <210> 2 |
| [0167] | <211> 3678 |

| | | |
|--------|--|------|
| [0168] | <212> DNA | |
| [0169] | <213> 人工序列 (Artificial Sequence) | |
| [0170] | <400> 2 | |
| [0171] | atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg | 60 |
| [0172] | atccccagaa tggcccaggt gcaactgcag cagtcagggg ctgagctggc tagacctggg | 120 |
| [0173] | gcttcagtga agatgtcctg caaggcttct ggctacacct ttactaccta cacaatacac | 180 |
| [0174] | tgggtaagac ggaggcctgg acacgatctg gaatggattg gatacattaa tcctagcagt | 240 |
| [0175] | ggatgttctg actacaatca aaacttcaag ggcaagacca cattgactgc agacaagtcc | 300 |
| [0176] | tccaacacag cctacatgca actgaacagc ctgacatctg aggactctgc ggtctattac | 360 |
| [0177] | tgtgcaagaa gagcggacta tggtaactac gaatatacct ggtttgctta ctggggccaa | 420 |
| [0178] | gggaccacgg tcaccgtctc ctcaagtga ggcggttcag gtggagggtg ctctggcggt | 480 |
| [0179] | ggcgatcgg tcatcgagct cactcagtct ccaaaattca tgtccacatc agtaggagac | 540 |
| [0180] | agggtcaacg tcacctaaa ggccagtcag aatgtgggta ctaatgtagc ctggtttcaa | 600 |
| [0181] | caaaaaccag ggcaatctcc taaagtctg atttactcgg catcttaccg atacagtga | 660 |
| [0182] | gtccctgatc gcttcacagg cagtggatct ggaacagatt tcaactctac catcagcaat | 720 |
| [0183] | gtgcagtctg aagacttggc agagtatttc tgtcagcaat atcacaceta tcctctcacg | 780 |
| [0184] | ttcggagggg gcaccaagct ggaaatcaa cggtcggatc ccgccctgag caactccatc | 840 |
| [0185] | atgtacttca gccacttctg gccggtcttc ctgccagcga agcccaccac gacgccagcg | 900 |
| [0186] | ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc gcgtcgcagc ccctgtccct gcgcccagag | 960 |
| [0187] | gcgagccggc cagcggcggg gggcgcagtg cacacgaggg ggctggactt cgcctgtgat | 1020 |
| [0188] | atctacatct gggcgcctt ggccgggact tgtgggtcc ttctctctgc actggttatac | 1080 |
| [0189] | accctttact gcaacaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt | 1140 |
| [0190] | atgagaccag tacaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa | 1200 |
| [0191] | gaagaaggag gatgtgaact gcgggtgaag ttcagcagaa gcgccgacgc ccctgcctac | 1260 |
| [0192] | cagcagggcc agaatcagct gtacaacgag ctgaacctgg gcagaaggga agagtacgac | 1320 |
| [0193] | gtcttgata agcggagagg ccgggacct gagatggcg gcaagcctcg gcggaagaac | 1380 |
| [0194] | cccaggaag gcctgtataa cgaactgcag aaagacaaga tggccgaggc ctacagcgag | 1440 |
| [0195] | atcggcatga agggcgagcg gaggcggggc aagggccacg acggcctgta tcagggcctg | 1500 |
| [0196] | tccaccgcca ccaaggatac ctacgacgcc ctgcacatgc aggcctgcc cccaaggctc | 1560 |
| [0197] | gaggcggcg gagaggcag aggaagtctt ctaacatgcg gtgacgtgga ggagaatccc | 1620 |
| [0198] | ggccctagc aggtgcagct gcagcagtct ggccctggcc tcgtgaagcc tagccagacc | 1680 |
| [0199] | ctgagcctga cctgtgcat cagcggcgat agcgtgtcca gcaatagcgc cgcctggaac | 1740 |
| [0200] | tggatcagac agagccctag cagaggcctg gaatggctgg gccggacctc ctaccggtcc | 1800 |
| [0201] | aagtgtaca acgactacgc cgtgtccgtg aagtcccga tcaccatcaa ccccgacacc | 1860 |
| [0202] | agcaagaacc agttctccct gcagctgaac agcgtgacct ccgaggatac cgcctgttac | 1920 |
| [0203] | tactgcgcca gagaagtac cggcgacctg gaagatgcct tcgacatctg gggccagggc | 1980 |
| [0204] | acaatggtca ccgtgtctag cggaggcggc ggaagcgaca tccagatgac acagagcccc | 2040 |
| [0205] | agtcctctga gcgccagct gggagacaga gtgaccatca cctgtcgggc cagccagacc | 2100 |
| [0206] | atctggtect acctgaactg gtatcagcag cggcctggca agggcccaaa cctgctgatac | 2160 |
| [0207] | tatgccgcca gctcactgca gagcggcgtg cccagcagat tttccggcag aggcagcggc | 2220 |
| [0208] | accgacttca ccctgacaat cagttccctg caggccgagg acttcgccac ctactactgc | 2280 |
| [0209] | cagcagagct acagcatccc ccagacctc ggccagggga ccaagctgga aatcaaagaa | 2340 |

[0210] tctaagtacg gaccgccttg cccccccttgc cctatgttct gggtgctggt ggtggtcgga 2400
 [0211] ggctgctggt cctgctacag cctgctggtc accgtggcct tcatcatctt ttgggtgaaa 2460
 [0212] cgcggccgca aaaaactgct gtatatTTTT aaacagccgt ttatgcgccc ggtgcagacc 2520
 [0213] acccaggaag aagatggctg cagctgccgc tttccggaag aagaagaagg cggctgcgaa 2580
 [0214] ctgctgctga aatttagccg cagcgcggat gcgcccggct atcagcaggg ccagaaccag 2640
 [0215] ctgtataacg aactgaacct gggccgccgc gaagaatatg atgtgctgga taaacgccgc 2700
 [0216] ggccgcgatc cggaaatggg cggcaaacg cggcgaaaa acccgcagga aggctgtat 2760
 [0217] aacgaactgc agaaagataa aatggcggaa gcgtatagcg aaattggcat gaaaggcgaa 2820
 [0218] cgccgccgcg gcaaaggcca tgatggcctg tatcagggcc tgagcaccgc gaccaaagat 2880
 [0219] acctatgatg cgctgcatat gcaggcctg ccgccgcgcg gcagcggcgc caccaacttc 2940
 [0220] agcctgctga agcaggcccg cgacgtggag gaaaaccctg gccccgacat acaaatgact 3000
 [0221] cagtcccat ctagcttgag cgcctcagtt ggagaccggg ttaccataac ctgccgcgca 3060
 [0222] agccaagatg tatccacagc tgtagcatgg tatcaacaga aaccaggaaa ggctccgaag 3120
 [0223] ctctgatata actccgcatc tttcttgat agcggagtcc cgtctcggtt ctcaggctca 3180
 [0224] ggcagcggaa cggactttac cttgaccata tcttactcc agcccgaaga ttttgcaact 3240
 [0225] tattactgcc agcaatacct ctaccatccc gcgactttcg gacagggcac taagggtgaa 3300
 [0226] attaagggca gcagtgggtg agaggtacaa ctctagaaa gtggtggtgg actggtgcag 3360
 [0227] cccggtggga gtctgcgct gtctgtgca gcctccgggt tcactttctc tgattcttgg 3420
 [0228] atccactggg ttaggcaagc ccctggcaag ggtctggagt gggtcgcgtg gatttcccc 3480
 [0229] tatggagggt ccaactacta cgcggactct gtcaaaggc ggtttacgat ttctgcagac 3540
 [0230] actagcaaga aactgccta cttcaaatg aacagcctca gggcggaaga tacggctgtg 3600
 [0231] tattactgcg caagaaggca ctggccggga ggctttgatt actgggtca gggaactttg 3660
 [0232] gtaaccgtgt ctagctaa 3678
 [0233] <210> 3
 [0234] <211> 519
 [0235] <212> PRT
 [0236] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0237] <400> 3
 [0238] Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 [0239] 1 5 10 15
 [0240] Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
 [0241] 20 25 30
 [0242] Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
 [0243] 35 40 45
 [0244] Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Arg
 [0245] 50 55 60
 [0246] Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser
 [0247] 65 70 75 80
 [0248] Gly Cys Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr
 [0249] 85 90 95
 [0250] Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr
 [0251] 100 105 110

| | |
|--------|---|
| [0252] | Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly |
| [0253] | 115 120 125 |
| [0254] | Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val |
| [0255] | 130 135 140 |
| [0256] | Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |
| [0257] | 145 150 155 160 |
| [0258] | Gly Gly Ser Val Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr |
| [0259] | 165 170 175 |
| [0260] | Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Val Thr Tyr Lys Ala Ser Gln Asn Val |
| [0261] | 180 185 190 |
| [0262] | Gly Thr Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys |
| [0263] | 195 200 205 |
| [0264] | Val Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg |
| [0265] | 210 215 220 |
| [0266] | Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn |
| [0267] | 225 230 235 240 |
| [0268] | Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His Thr |
| [0269] | 245 250 255 |
| [0270] | Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser |
| [0271] | 260 265 270 |
| [0272] | Asp Pro Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro |
| [0273] | 275 280 285 |
| [0274] | Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro |
| [0275] | 290 295 300 |
| [0276] | Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu |
| [0277] | 305 310 315 320 |
| [0278] | Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp |
| [0279] | 325 330 335 |
| [0280] | Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly |
| [0281] | 340 345 350 |
| [0282] | Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn Lys Arg Gly |
| [0283] | 355 360 365 |
| [0284] | Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val |
| [0285] | 370 375 380 |
| [0286] | Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu |
| [0287] | 385 390 395 400 |
| [0288] | Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp |
| [0289] | 405 410 415 |
| [0290] | Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn |
| [0291] | 420 425 430 |
| [0292] | Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg |
| [0293] | 435 440 445 |

[0294] Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 [0295] 450 455 460
 [0296] Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 [0297] 465 470 475 480
 [0298] Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 [0299] 485 490 495
 [0300] Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 [0301] 500 505 510
 [0302] Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 [0303] 515
 [0304] <210> 4
 [0305] <211> 1560
 [0306] <212> DNA
 [0307] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0308] <400> 4
 [0309] atgtctctgc tggtagaccag cctgctctctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60
 [0310] atccccagaa tggcccagggt gcaactgcag cagtcagggg ctgagctggc tagacctggg 120
 [0311] gcttcagtga agatgtcctg caaggcttct ggctacacct ttactaccta cacaatacac 180
 [0312] tgggtaagac ggaggcctgg acacgatctg gaatggattg gatacattaa tcctagcagt 240
 [0313] ggatgttctg actacaatca aaacttcaag ggcaagacca cattgactgc agacaagtcc 300
 [0314] tccaacacag cctacatgca actgaacagc ctgacatctg aggactctgc ggtctattac 360
 [0315] tgtgcaagaa gagcggacta tggtaactac gaatatacct ggtttgctta ctggggccaa 420
 [0316] gggaccacgg tcaccgtctc ctcaagtga ggcggttcag gtggaggtgg ctctggcggg 480
 [0317] ggcggatcgg tcatcgagct cactcagtct caaaattca tgtccacatc agtaggagac 540
 [0318] agggtaacg tcacctaca ggccagtcag aatgtgggta ctaatgtagc ctggtttcaa 600
 [0319] caaaaaccag ggcaatctcc taaagtctg atttactcgg catcttaccg atacagtga 660
 [0320] gtccctgatc gttcacagg cagtggatct ggaacagatt tcaactctac catcagcaat 720
 [0321] gtgcagtctg aagacttggc agagtatttc tgcagcaat atcacaccta tctctcagc 780
 [0322] ttcggagggg gcaccaagct ggaaatcaaa cggtcggatc ccgccctgag caactccatc 840
 [0323] atgtacttca gccacttctg gccggtcttc ctgccagcga agcccaccac gacgccagcg 900
 [0324] ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc gcgtcgcagc ccctgtccct gcgcccagag 960
 [0325] gcgagccggc cagcggcggg gggcgcagtg cacacgaggg ggctggactt cgcctgtgat 1020
 [0326] atctacatct gggcgcctt ggccgggact tgtgggtcc ttctctgtc actggttatac 1080
 [0327] acccttact gcaacaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt 1140
 [0328] atgagaccag taaaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa 1200
 [0329] gaagaaggag gatgtgaact gcgggtgaag ttcagcagaa gcgccgacgc ccctgcctac 1260
 [0330] cagcagggcc agaatcagct gtacaacgag ctgaacctgg gcagaaggga agagtacgac 1320
 [0331] gtcttgata agcggagagg ccgggacct gagatgggcg gcaagcctcg gcggaagaac 1380
 [0332] cccaggaag gcctgtataa cgaactgcag aaagacaaga tggccgagc ctacagcgag 1440
 [0333] atcggcatga agggcgagcg gaggcggggc aaggccacg acggcctgta tcagggcctg 1500
 [0334] tccaccgcca ccaaggatac ctacgacgcc ctgcacatgc aggcctgcc cccaaggtaa 1560
 [0335] <210> 5

| | | |
|--------|---|---------------------------|
| [0336] | <211> | 452 |
| [0337] | <212> | PRT |
| [0338] | <213> | 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0339] | <400> | 5 |
| [0340] | Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro | |
| [0341] | 1 | 5 10 15 |
| [0342] | Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly | |
| [0343] | | 20 25 30 |
| [0344] | Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly | |
| [0345] | | 35 40 45 |
| [0346] | Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser | |
| [0347] | | 50 55 60 |
| [0348] | Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys | |
| [0349] | | 65 70 75 80 |
| [0350] | Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn | |
| [0351] | | 85 90 95 |
| [0352] | Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr | |
| [0353] | | 100 105 110 |
| [0354] | Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp | |
| [0355] | | 115 120 125 |
| [0356] | Leu Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val | |
| [0357] | | 130 135 140 |
| [0358] | Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser | |
| [0359] | | 145 150 155 160 |
| [0360] | Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala | |
| [0361] | | 165 170 175 |
| [0362] | Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly | |
| [0363] | | 180 185 190 |
| [0364] | Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly | |
| [0365] | | 195 200 205 |
| [0366] | Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu | |
| [0367] | | 210 215 220 |
| [0368] | Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln | |
| [0369] | | 225 230 235 240 |
| [0370] | Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu | |
| [0371] | | 245 250 255 |
| [0372] | Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe | |
| [0373] | | 260 265 270 |
| [0374] | Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu | |
| [0375] | | 275 280 285 |
| [0376] | Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys | |
| [0377] | | 290 295 300 |

[0420] cgcgtagaat ttagccgcag cgcggatgcg ccggcgtatc agcagggcca gaaccagctg 1080
 [0421] tataacgaac tgaacctggg ccgccgcgaa gaatatgatg tgctggataa acgcccgggc 1140
 [0422] cgcgatccgg aatggggcg caaaccgcgc cgcaaaaacc cgcaggaagg cctgtataac 1200
 [0423] gaactgcaga aagataaaat ggcggaagcg tatagcgaat ttggcatgaa aggcgaacgc 1260
 [0424] cgcccgggca aaggccatga tggcctgtat cagggcctga gcaccgcgac caaagatacc 1320
 [0425] tatgatgctg tgcatatgca ggcgctgccg ccgcgctaa 1359
 [0426] <210> 7
 [0427] <211> 230
 [0428] <212> PRT
 [0429] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0430] <400> 7
 [0431] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0432] 1 5 10 15
 [0433] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 [0434] 20 25 30
 [0435] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 [0436] 35 40 45
 [0437] Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0438] 50 55 60
 [0439] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0440] 65 70 75 80
 [0441] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 [0442] 85 90 95
 [0443] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Ser Gly Gly
 [0444] 100 105 110
 [0445] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0446] 115 120 125
 [0447] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 [0448] 130 135 140
 [0449] Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0450] 145 150 155 160
 [0451] Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0452] 165 170 175
 [0453] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 [0454] 180 185 190
 [0455] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0456] 195 200 205
 [0457] Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 [0458] 210 215 220
 [0459] Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0460] 225 230
 [0461] <210> 8

- [0462] <211> 693
- [0463] <212> DNA
- [0464] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0465] <400> 8
- [0466] gacatacaaa tgactcagtc cccatctagc ttgagcgcct cagttggaga ccgggttacc 60
- [0467] ataacctgcc gcgcaagcca agatgtatcc acagctgtag catggtatca acagaaacca 120
- [0468] ggaaaggctc cgaagetct gatatactcc gcattttct tgtatagcgg agtcccgtct 180
- [0469] cggttctcag gctcaggcag cggaacggac tttacctga ccatacttc actccagccc 240
- [0470] gaagattttg caacttatta ctgccagcaa tacctctacc atcccgcgac tttcggacag 300
- [0471] ggcactaagg tggaaattaa gggcagcagt ggtggagagg tacaactcgt agaaagtgg 360
- [0472] ggtggactgg tgcagcccgg tgggagtctg cgctgtcct gtgcagcctc cgggttact 420
- [0473] ttctctgatt cttggatcca ctgggtgagg caagcccctg gcaagggtct ggagtgggtc 480
- [0474] gcgtggattt ccccctatgg agggctcact tactacgcgg actctgtcaa agggcggttt 540
- [0475] acgatttctg cagacactag caagaacact gcctacctc aatgaacag cctcagggcg 600
- [0476] gaagatacgg ctgtgtatta ctgcgcaaga aggcactggc cgggaggctt tgattactgg 660
- [0477] ggtcagggaa ctttgtaac cgtgtctagc taa 693
- [0478] <210> 9
- [0479] <211> 24
- [0480] <212> PRT
- [0481] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0482] <400> 9
- [0483] Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp
- [0484] 1 5 10 15
- [0485] Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg
- [0486] 20
- [0487] <210> 10
- [0488] <211> 72
- [0489] <212> DNA
- [0490] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0491] <400> 10
- [0492] ctcgagggcg gcggagaggg cagaggaagt cttctaacat gcggtgacgt ggaggagaat 60
- [0493] cccggcccta gg 72
- [0494] <210> 11
- [0495] <211> 22
- [0496] <212> PRT
- [0497] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0498] <400> 11
- [0499] Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
- [0500] 1 5 10 15
- [0501] Glu Glu Asn Pro Gly Pro
- [0502] 20
- [0503] <210> 12

-
- [0504] <211> 66
[0505] <212> DNA
[0506] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0507] <400> 12
[0508] ggcagcggcg ccaccaactt cagcctgctg aagcaggccg gcgacgtgga ggaaaaccct 60
[0509] ggcccc 66

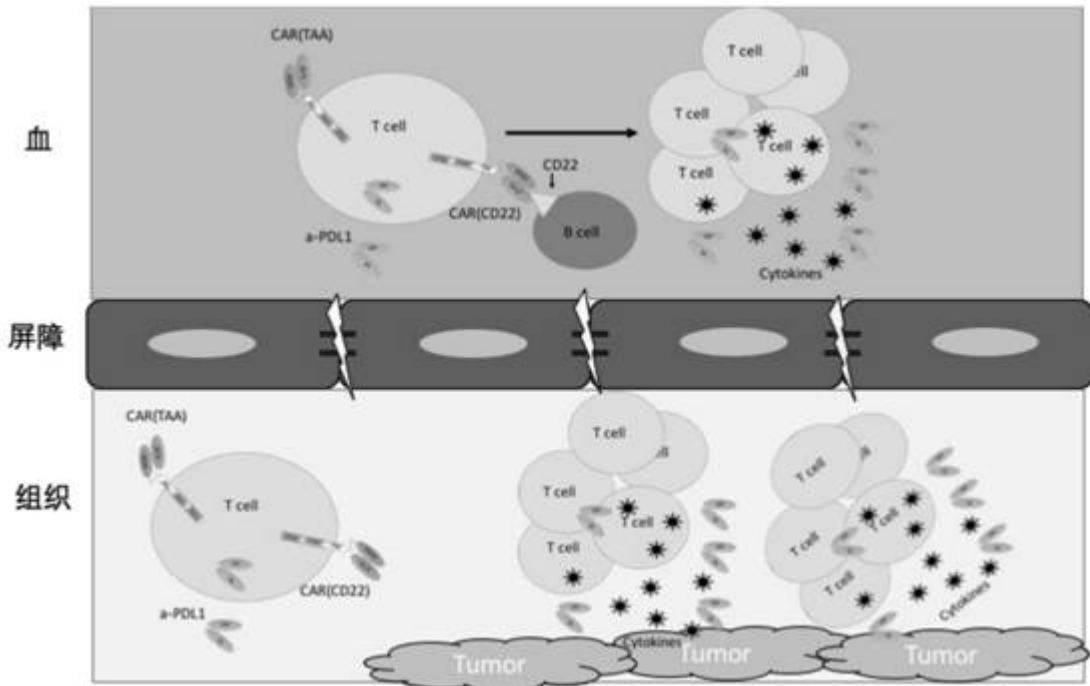


图1

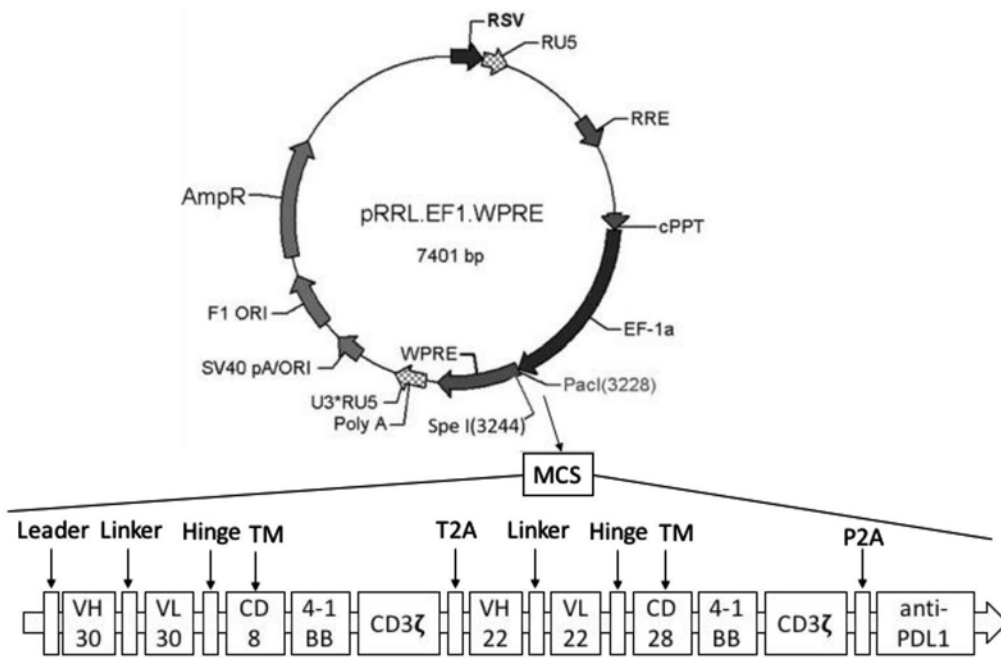


图2

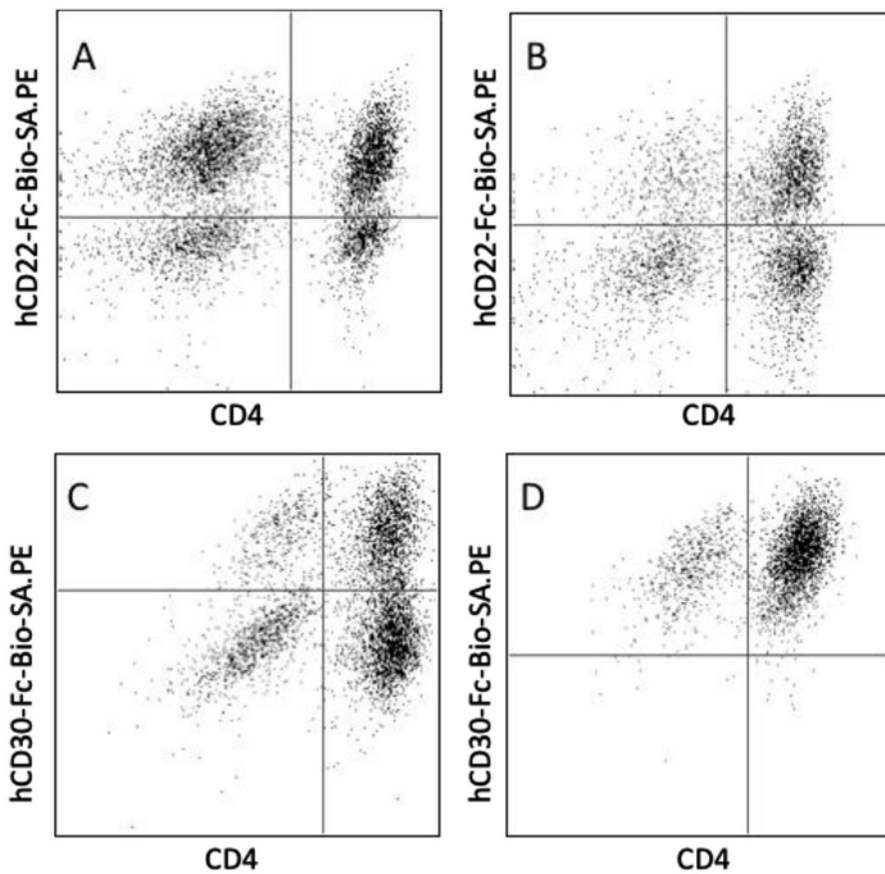


图3

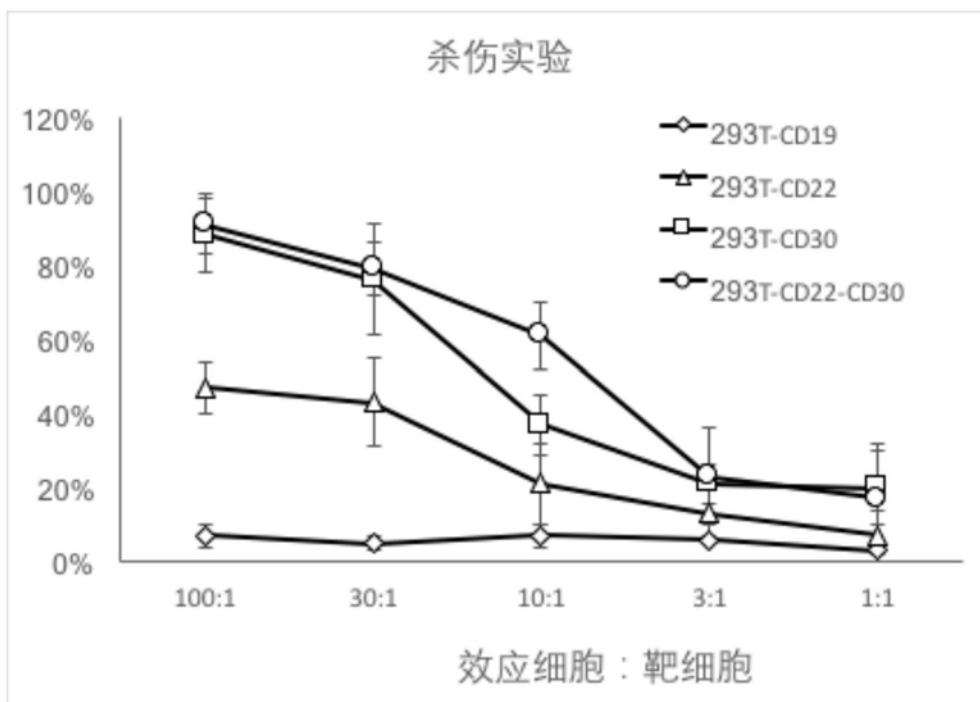


图4

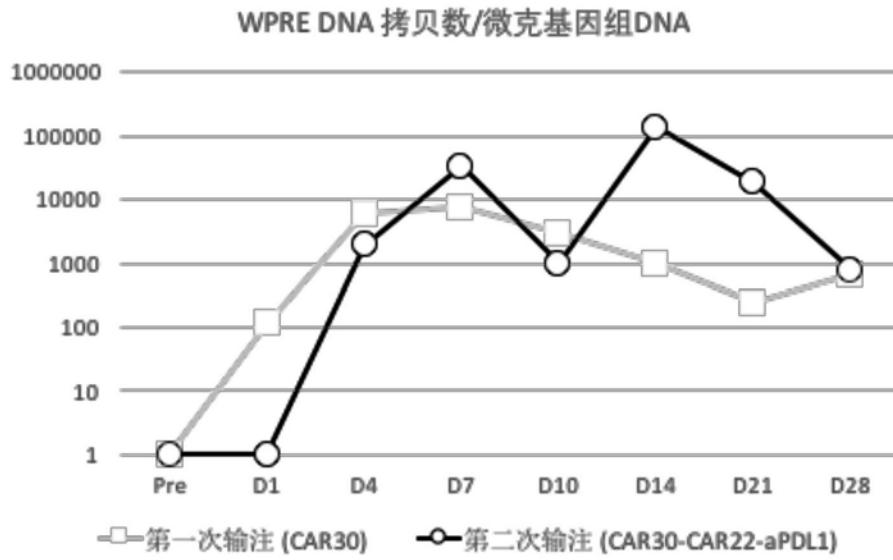


图5

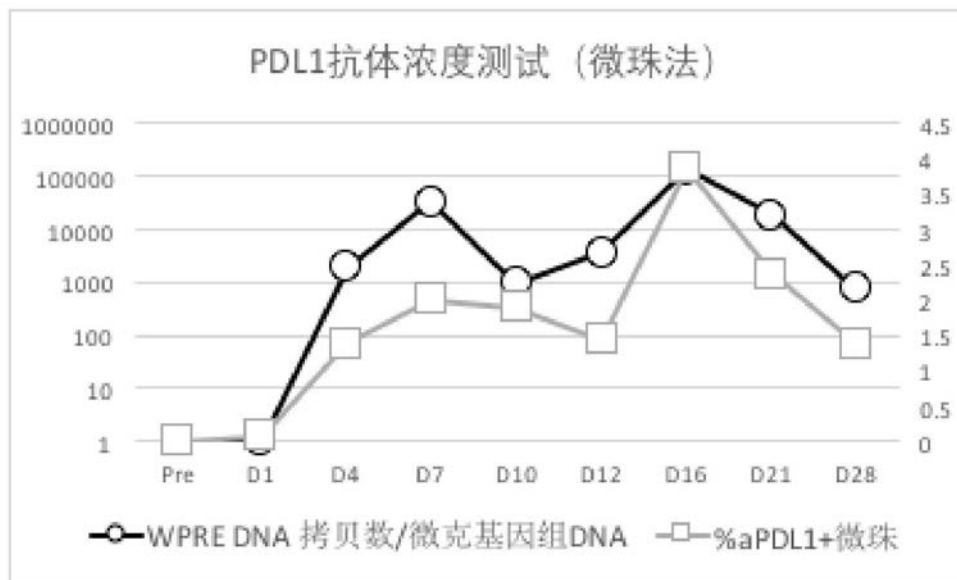


图6

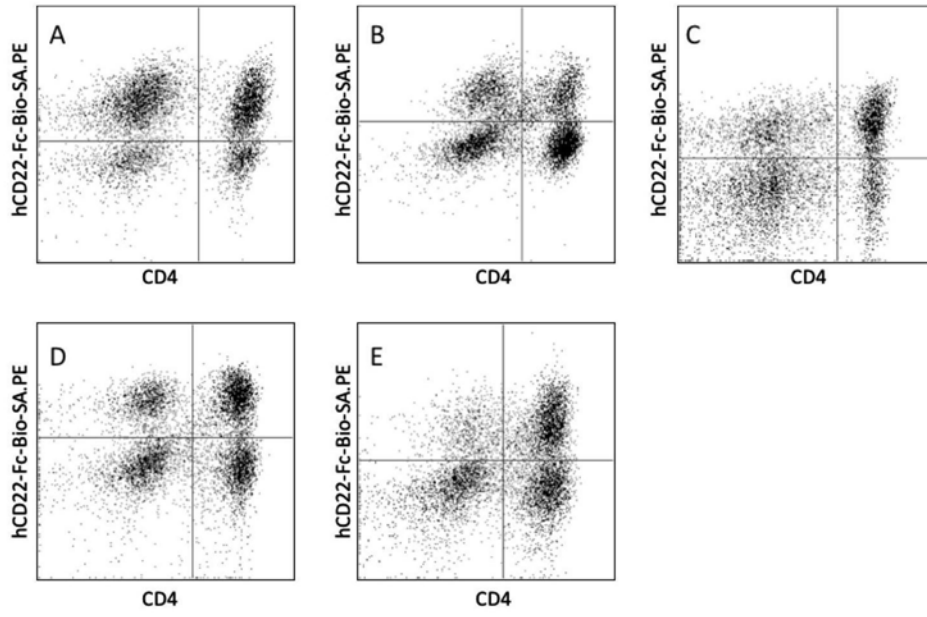


图7

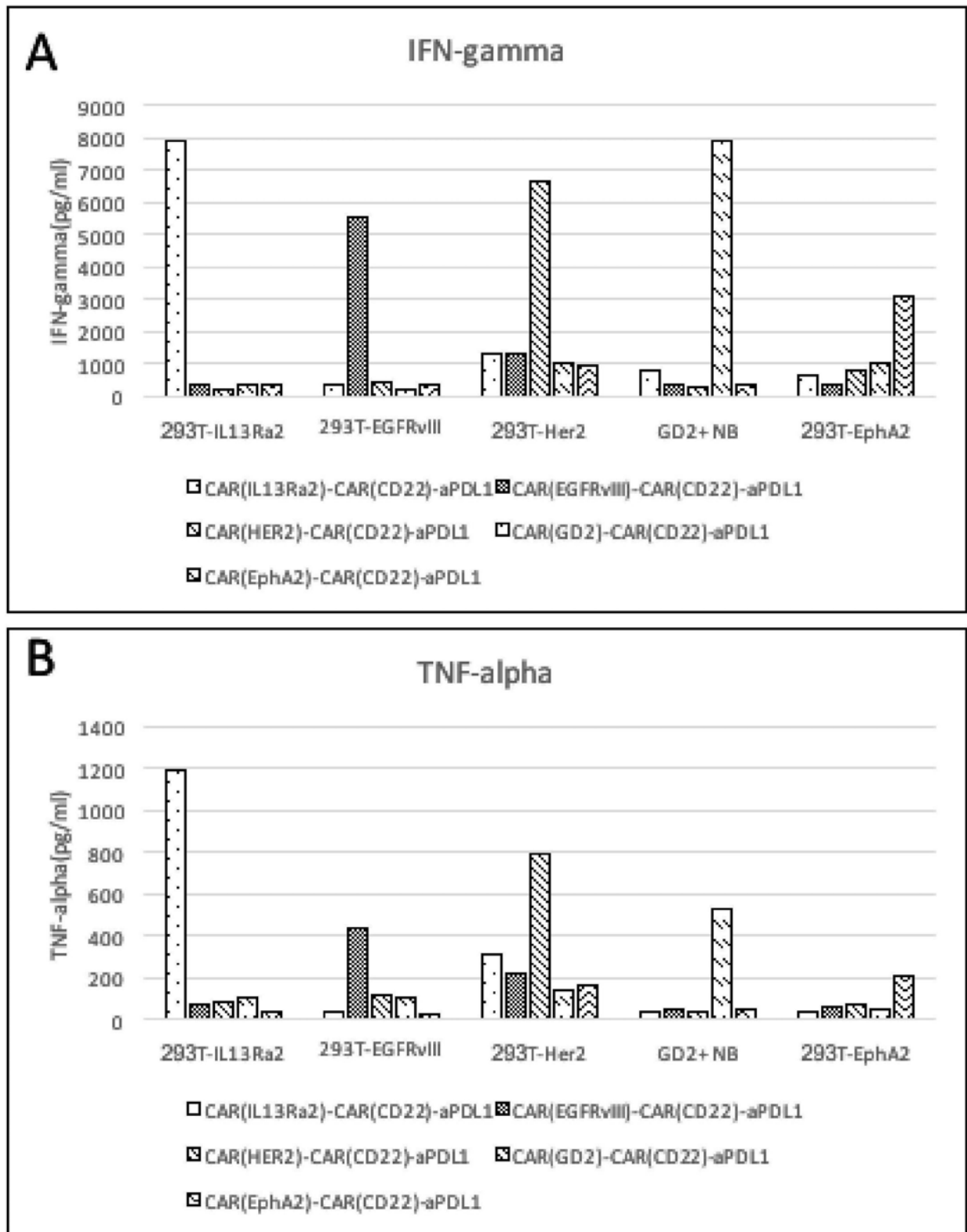


图8