(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112423793 A
(43)申请公布日 2021.02.26

(21)申请号 201980046782.3
(22)申请日 2019.06.04
(30)优先权数据
62/680,769 2018.06.05 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.01.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/035409 2019.06.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/236593 EN 2019.12.12
(71)申请人 宾夕法尼亚大学董事会
地址 美国宾夕法尼亚州
(72)发明人 A·S·佩恩 C·T·依尼布莱希特 S·欧 M·C·米龙
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 张全信
(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C07K 14/47(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)

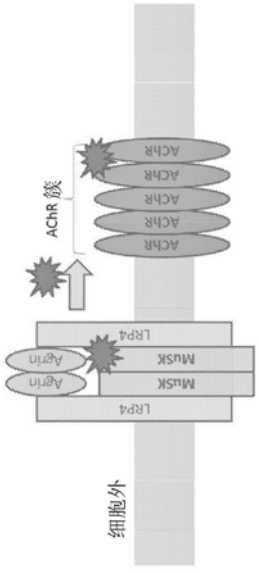
权利要求书4页 说明书44页
序列表28页 附图22页

(54)发明名称

肌肉特异性激酶嵌合自身抗体受体细胞的组合物和方法

(57)摘要

本发明包括对抗肌肉特异性激酶(MuSK)B细胞受体(BCR)具有特异性的嵌合自身抗体受体(CAAR)、包括CAAR的组合物、编码CAAR的多核苷酸、包括编码CAAR的多核苷酸的载体和包括CAAR的重组细胞。



CN 112423793 A

1.一种编码嵌合自身抗体受体(CAAR)的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域,以及任选地跨膜结构域、共刺激分子的细胞内结构域和/或信号传导结构域。

2.根据权利要求1所述的多核苷酸,其中所述MuSK自身抗原或其片段由包括选自SEQ ID NO:3、6、26和29的核酸序列的核酸序列编码。

3.根据权利要求1所述的多核苷酸,其中所述MuSK自身抗原或其片段由与选自SEQ ID NO:3、6、26和29的核酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的核酸序列编码。

4.根据权利要求1所述的多核苷酸,其中所述MuSK自身抗原或其片段包括选自SEQ ID NO:11和23的氨基酸序列。

5.根据权利要求1所述的多核苷酸,其中所述MuSK自身抗原或其片段包括与选自SEQ ID NO:11和23的氨基酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的氨基酸序列。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的多核苷酸,其中所述跨膜结构域包括CD8α跨膜结构域。

7.根据权利要求6所述的多核苷酸,其中所述CD8α跨膜结构域由包括SEQ ID NO:5或18的核酸序列编码。

8.根据权利要求6所述的多核苷酸,其中所述CD8α跨膜结构域包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的多核苷酸,其中所述共刺激分子的细胞内结构域包括4-1BB细胞内结构域。

10.根据权利要求9所述的多核苷酸,其中所述4-1BB细胞内结构域由包括SEQ ID NO:7或19的核酸序列编码。

11.根据权利要求9所述的多核苷酸,其中所述4-1BB细胞内结构域包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的多核苷酸,其中所述信号传导结构域包括CD3ζ信号传导结构域。

13.根据权利要求12所述的多核苷酸,其中所述CD3ζ信号传导结构域由包括SEQ ID NO:8或20的核酸序列编码。

14.根据权利要求12所述的多核苷酸,其中所述CD3ζ信号传导结构域包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

15.根据权利要求1-14中任一项所述的多核苷酸,其中所述CAAR由选自SEQ ID NO:1、16、21、24、25和28的核酸序列编码。

16.根据权利要求1-14中任一项所述的多核苷酸,其中所述CAAR包括选自SEQ ID NO:9、22、27和30的氨基酸序列。

17.根据权利要求1-5中任一项所述的多核苷酸，其中所述CAAR包括包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域、杀伤性免疫球蛋白样受体(KIR)跨膜结构域和KIR细胞质结构域。

18.一种载体，其包括根据权利要求1-17中任一项所述的多核苷酸。

19.根据权利要求18所述的载体，其中所述载体是慢病毒载体。

20.根据权利要求19所述的载体，其中所述载体是RNA载体。

21.根据权利要求18-20中任一项所述的载体，其中所述载体包括可操作地连接至编码所述CAAR的多核苷酸的诱导型启动子。

22.一种嵌合自身抗体受体(CAAR)，其包括包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域。

23.一种嵌合自身抗体受体(CAAR)，其包括包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域、跨膜结构域、共刺激分子的细胞内结构域和/或信号传导结构域。

24.根据权利要求22或权利要求23所述的CAAR，其中所述MuSK自身抗原或其片段由选自SEQ ID NO:3、6、26和29的核酸序列编码。

25.根据权利要求22或权利要求23所述的CAAR，其中所述MuSK自身抗原或其片段由与选自SEQ ID NO:3、6、26和29的核酸序列具有至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的核酸序列编码。

26.根据权利要求22或权利要求23所述的CAAR，其中所述MuSK自身抗原或其片段包括选自SEQ ID NO:11和23的氨基酸序列。

27.根据权利要求22或权利要求23所述的CAAR，其中所述MuSK自身抗原或其片段包括与选自SEQ ID NO:11和23的氨基酸序列具有至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的氨基酸序列。

28.根据权利要求23-27中任一项所述的CAAR，其中所述跨膜结构域包括CD8α跨膜结构域。

29.根据权利要求28所述的CAAR，其中所述CD8α跨膜结构域由包括SEQ ID NO:5或18的核酸序列编码。

30.根据权利要求28所述的CAAR，其中所述CD8α跨膜结构域包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

31.根据权利要求23-30中任一项所述的CAAR，其中所述共刺激分子的细胞内结构域包括4-1BB细胞内结构域。

32.根据权利要求31所述的CAAR，其中所述4-1BB细胞内结构域由包括SEQ ID NO:7或19的核酸序列编码。

33.根据权利要求31所述的CAAR，其中所述4-1BB细胞内结构域包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

34.根据权利要求23-33中任一项所述的CAAR，其中所述信号传导结构域包括CD3ζ信号

传导结构域。

35.根据权利要求34所述的CAAR，其中所述CD3ζ信号传导结构域由包括SEQ ID NO:8或20的核酸序列编码。

36.根据权利要求34所述的CAAR，其中所述CD3ζ信号传导结构域包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

37.根据权利要求23-36中任一项所述的CAAR，其中所述CAAR由选自SEQ ID NO:1、16、21、24、25和28的核酸序列编码。

38.根据权利要求23-36中任一项所述的CAAR，其中所述CAAR包括选自SEQ ID NO:9、22、27和30的氨基酸序列。

39.根据权利要求23-38中任一项所述的CAAR，其中所述CAAR包括包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域的细胞外结构域、KIR跨膜结构域和KIR细胞质结构域。

40.一种基因修饰的细胞，其包括根据权利要求22-39中任一项所述的CAAR。

41.根据权利要求40所述的细胞，其中所述细胞表达所述CAAR并且对B细胞上基于自身抗体的BCR具有高亲和力。

42.根据权利要求40或41所述的细胞，其中所述细胞表达所述CAAR并诱导杀死表达自身抗体的B细胞或可成熟为分泌抗体的细胞的B细胞。

43.根据权利要求40-42中任一项所述的细胞，其中所述细胞表达所述CAAR并且对健康细胞具有有限的毒性。

44.根据权利要求40-43中任一项所述的细胞，其中所述细胞选自辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、γδT细胞、天然杀伤细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞、其细胞系、T记忆干细胞、源自多能干细胞的T细胞和其他效应细胞。

45.一种基因修饰的细胞，其包括：(a)根据权利要求39所述的嵌合自身抗体受体；和(b)DAP12。

46.根据权利要求40-45中任一项所述的细胞，其中所述细胞包括可操作地连接至诱导型启动子的编码CAAR的多核苷酸。

47.一种药物组合物，其包括根据权利要求1-17中任一项所述的多核苷酸、根据权利要求22-39中任一项所述的CAAR或根据权利要求40-46中任一项所述的细胞，以及药学上可接受的赋形剂。

48.一种用于治疗受试者中自身抗体介导的神经肌肉接点(NMJ)疾病的方法，所述方法包括：向所述受试者施用有效量的包括编码嵌合自身抗体受体(CAAR)的多核苷酸的基因修饰的细胞，其中所述多核苷酸编码包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域，以及任选地跨膜结构域、共刺激分子的细胞内结构域和/或信号传导结构域，从而治疗所述受试者中的自身抗体介导的NMJ疾病。

49.一种用于预防或减少处于患有自身抗体介导的NMJ疾病的风险中或患有自身抗体介导的NMJ疾病的受试者中的神经肌肉接点(NMJ)损伤的方法，所述方法包括：向所述受试者施用有效量的包括编码嵌合自身抗体受体(CAAR)的多核苷酸的基因修饰的细胞，其中所述多核苷酸编码包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域，以及任选地跨膜结构域、共刺激分子的细胞内结构域和/或信号传导结构域，从而预防或减少所述受

试者中的NMJ损伤。

50.一种用于治疗受试者中自身抗体介导的神经肌肉接点(NMJ)疾病的方法,所述方法包括:向所述受试者施用有效量的基因修饰的细胞,所述细胞包括:(a)编码嵌合自身抗体受体(CAAR)的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码包括MuSK自身抗原或其片段的细胞外结构域、杀伤性免疫球蛋白样受体(KIR)跨膜结构域和KIR细胞质结构域;和(b)编码DAP12的多核苷酸,从而治疗所述受试者中的自身抗体介导的NMJ疾病。

51.一种用于预防或减少处于患有自身抗体介导的NMJ疾病的风险中或患有自身抗体介导的NMJ疾病的受试者中的神经肌肉接点(NMJ)损伤的方法,所述方法包括:向所述受试者施用有效量的基因修饰的细胞,所述细胞包括:(a)编码嵌合自身抗体受体(CAAR)的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码包括MuSK自身抗原或其片段的细胞外结构域、杀伤性免疫球蛋白样受体(KIR)跨膜结构域和KIR细胞质结构域;和(b)编码DAP12的多核苷酸,从而治疗受试者中自身抗体介导的NMJ疾病。

52.根据权利要求48和51中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸是根据权利要求1-17中任一项所述的多核苷酸。

53.根据权利要求48和51中任一项所述的方法,其中所述CAAR是根据权利要求22-39中任一项所述的CAAR。

54.根据权利要求48-53中任一项所述的方法,其中所述自身抗体介导的NMJ疾病是重症肌无力(MG)。

55.根据权利要求48-54中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

56.根据权利要求48-55中任一项所述的方法,其中所述修饰的细胞靶向B细胞。

57.根据权利要求48-56中任一项所述的方法,其中所述修饰的细胞是T细胞。

肌肉特异性激酶嵌合自身抗体受体细胞的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35 U.S.C.§119(e),本申请享有2018年6月5日提交的美国临时专利申请号62/680,769的优先权,在此通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0003] 重症肌无力(MG)是人类中最常见的自身抗体介导的疾病之一,在美国发病率为每年3,000名新患者,并且总计25,000-50,000患者患病;在美国、欧洲和亚洲,估计有超过一百万的患者患有重症肌无力。对神经肌肉接头(NMJ)表达的蛋白质的抗体攻击会导致肌肉无力,表现为眼睛下垂、复视、步态不稳、言语含糊以及吞咽和呼吸困难。MG患者产生的自身抗体通过固定补体或分解乙酰胆碱受体(AChR)簇来破坏NMJ。对于经由AChR进行信号转导必不可少的AChR簇的形成取决于跨膜蛋白,肌肉特异性激酶(MuSK)的激活。大多数MG患者显示抗AChR抗体(85%)或抗MuSK抗体(4%)。11%的患者被归类为“血清阴性的(seronegative)”,这归因于针对AChR、MuSK或其他NMJ蛋白比如LRP4的低效价抗体。肌无力危象,定义为有10-20%的MG患者存在由于危及生命的控制呼吸的肌肉的肌肉无力而需要机械通气;肌无力危象的总死亡率为4.5%。

[0004] 目前,尽管MuSK型MG患者通常对用乙酰胆碱酯酶抑制剂治疗的形式无反应,但是轻度MG用乙酰胆碱酯酶抑制剂治疗以抑制乙酰胆碱分解。在较晚期的疾病中,用强的松、抗增殖剂比如咪唑硫嘌呤和利妥昔单抗治疗更严重的MG。在利妥昔单抗后,抗MuSK抗体效价下降,甚至下降到负范围,表明寿命短的浆细胞产生了大多数抗MuSK抗体。

[0005] 在本领域中迫切需要实现针对重症肌无力的更特异性的和有效的治疗。本发明解决了这一需要。

发明内容

[0006] 提供了编码嵌合自身抗体受体(CAAR)的多核苷酸,其中多核苷酸编码包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域,以及任选地跨膜结构域、共刺激分子的细胞内结构域和/或信号传导结构域。在一些实施方式中,MuSK自身抗原或其片段由包括选自SEQ ID NO:3、6、26和29的核酸序列的核酸序列编码。在进一步的实施方式中,MuSK自身抗原或其片段由与选自SEQ ID NO:3、6、26和29的核酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的核酸序列编码。在一些实施方式中,MuSK自身抗原或其片段包括选自SEQ ID NO:11和23的氨基酸序列。在进一步的实施方式中,MuSK自身抗原或其片段包括与选自SEQ ID NO:11和23的氨基酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的

氨基酸序列。

[0007] 在一些实施方式中，跨膜结构域包括CD8α跨膜结构域。在进一步的实施方式中，CD8α跨膜结构域由包括SEQ ID NO:5或18的核酸序列编码。在又进一步的实施方式中，CD8α跨膜结构域包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0008] 在一些实施方式中，共刺激分子的细胞内结构域包括4-1BB细胞内结构域。在进一步的实施方式中，4-1BB细胞内结构域由包括SEQ ID NO:7或19的核酸序列编码。在又进一步的实施方式中，4-1BB细胞内结构域包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0009] 在一些实施方式中，信号传导结构域包括CD3ζ信号传导结构域。在进一步的实施方式中，CD3ζ信号传导结构域由包括SEQ ID NO:8或20的核酸序列编码。在又进一步的实施方式中，CD3ζ信号传导结构域包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0010] 在一些实施方式中，CAAR由选自SEQ ID NO:1、16、21、24、25和28的核酸序列编码。在进一步的实施方式中，CAAR包括选自SEQ ID NO:9、22、27和30的氨基酸序列。

[0011] 在一些实施方式中，CAAR包括包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域、杀伤性免疫球蛋白样受体(KIR)跨膜结构域和KIR细胞质结构域。

[0012] 提供了包括前述实施方式中任一项所述的多核苷酸的载体。在一些实施方式中，载体是慢病毒载体。在进一步的实施方式中，载体是RNA载体。

[0013] 在一些实施方式中，载体包括可操作地连接至编码CAAR的多核苷酸的诱导型启动子。

[0014] 还提供了一种嵌合自身抗体受体(CAAR)，其包括包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域。

[0015] 还提供了一种嵌合自身抗体受体(CAAR)，其包括包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域、跨膜结构域、共刺激分子的细胞内结构域和/或信号传导结构域。

[0016] 在一些实施方式中，MuSK自身抗原或其片段由选自SEQ ID NO:3、6、26和29的核酸序列编码。在进一步的实施方式中，MuSK自身抗原或其片段由与选自SEQ ID NO:3、6、26和29的核酸序列具有至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的核酸序列编码。

[0017] 在一些实施方式中，MuSK自身抗原或其片段包括选自SEQ ID NO:11和23的氨基酸序列。在进一步的实施方式中，MuSK自身抗原或其片段包括与选自SEQ ID NO:11和23的氨基酸序列具有至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的序列同一性的氨基酸序列。

[0018] 在一些实施方式中，跨膜结构域包括CD8α跨膜结构域。在进一步的实施方式中，CD8α跨膜结构域由包括SEQ ID NO:5或18的核酸序列编码。在又进一步的实施方式中，CD8α跨膜结构域包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0019] 在一些实施方式中，共刺激分子的细胞内结构域包括4-1BB细胞内结构域。在进一

步的实施方式中,4-1BB细胞内结构域由包括SEQ ID NO:7或19的核酸序列编码。在又进一步的实施方式中,4-1BB细胞内结构域包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0020] 在一些实施方式中,信号传导结构域包括CD3ζ信号传导结构域。在进一步的实施方式中,CD3ζ信号传导结构域由包括SEQ ID NO:8或20的核酸序列编码。在又进一步的实施方式中,CD3ζ信号传导结构域包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方式中,CAAR由选自SEQ ID NO:1、16、21、24、25和28的核酸序列编码。在进一步的实施方式中,CAAR包括选自SEQ ID NO:9、22、27和30的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方式中,CAAR包括包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域的细胞外结构域、KIR跨膜结构域和KIR细胞质结构域。

[0023] 提供为了一种基因修饰的细胞,其包括前述实施方式中任一项所述的CAAR。在一些实施方式中,细胞表达CAAR并且对B细胞上基于自身抗体的BCR具有高亲和力。在一些实施方式中,细胞表达CAAR并诱导杀死表达自身抗体的B细胞或可成熟为分泌抗体的细胞的B细胞。在进一步的实施方式中,细胞表达CAAR并且对健康细胞具有有限的毒性。在又进一步的实施方式中,细胞选自辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、γδT细胞、天然杀伤细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞、其细胞系、T记忆干细胞、源自多能干细胞的T细胞和其他效应细胞。

[0024] 还提供了基因修饰的细胞,其包括:(a)前述实施方式中任一项所述的嵌合自身抗体受体;和(b)DAP12。

[0025] 在一些实施方式中,前述实施方式中任一项所述的细胞包括可操作地连接至诱导型启动子的编码CAAR的多核苷酸。

[0026] 提供了一种药物组合物,其包括前述实施方式中任一项所述的多核苷酸、前述实施方式中任一项所述的CAAR或前述实施方式中任一项所述的细胞,以及药学上可接受的赋形剂。

[0027] 提供了一种用于治疗受试者中自身抗体介导的神经肌肉接点(NMJ)疾病的方法,该方法包括:向受试者施用有效量的包括编码嵌合自身抗体受体(CAAR)的多核苷酸的基因修饰的细胞,其中多核苷酸编码包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域,以及任选地跨膜结构域、共刺激分子的细胞内结构域和/或信号传导结构域,从而治疗受试者中自身抗体介导的NMJ疾病。

[0028] 提供了一种用于预防或减少处于患有自身抗体介导的NMJ疾病的风险中或患有自身抗体介导的NMJ疾病的受试者中的神经肌肉接点(NMJ)损伤的方法,该方法包括:向受试者施用有效量的包括编码嵌合自身抗体受体(CAAR)的多核苷酸的基因修饰的细胞,其中多核苷酸编码包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域,以及任选地跨膜结构域、共刺激分子的细胞内结构域和/或信号传导结构域,从而预防或减少受试者中的NMJ损伤。

[0029] 提供了一种用于治疗受试者中自身抗体介导的神经肌肉接点(NMJ)疾病的方法,该方法包括:向受试者施用有效量的基因修饰的细胞,该细胞包括:(a)编码嵌合自身抗体受体(CAAR)的多核苷酸,其中多核苷酸编码包括MuSK自身抗原或其片段的细胞外结构域、杀伤性免疫球蛋白样受体(KIR)跨膜结构域和KIR细胞质结构域;和(b)编码DAP12的多核苷酸,从而治疗受试者中自身抗体介导的NMJ疾病。

[0030] 提供了一种用于预防或减少处于患有自身抗体介导的NMJ疾病的风险中或患有自身抗体介导的NMJ疾病的受试者中的神经肌肉接点(NMJ)损伤的方法,该方法包括:向受试者施用有效量的基因修饰的细胞,该细胞包括:(a)编码嵌合自身抗体受体(CAAR)的多核苷酸,其中多核苷酸编码包括MuSK自身抗原或其片段的细胞外结构域、杀伤性免疫球蛋白样受体(KIR)跨膜结构域和KIR细胞质结构域;和(b)编码DAP12的多核苷酸,从而治疗受试者中自身抗体介导的NMJ疾病。

[0031] 在一些实施方式中,多核苷酸是本文描述的多核苷酸中的任一种。

[0032] 在一些实施方式中,CAAR是本文描述的CAAR中的任一种。

[0033] 在一些实施方式中,自身抗体介导的NMJ疾病是重症肌无力(MG)。

[0034] 在一些实施方式中,受试者是人。

[0035] 在一些实施方式中,修饰的细胞靶向B细胞。

[0036] 在一些实施方式中,修饰的细胞是T细胞。

附图说明

[0037] 当结合附图阅读时,将更好地理解本发明的优选实施方式的以下详细描述。出于图解本发明的目的,在附图中显示了目前优选的实施方式。然而,应当理解,本发明不限于附图中所示实施方式的精确布置和手段。

[0038] 图1是显示来自MG患者的自身抗体破坏AChR簇和NMJ的示意图:抗AChR抗体干扰AChR簇,并且抗MuSK抗体破坏调节AChR成簇的MuSK/LRP4复合物。

[0039] 图2是显示CAAR-T细胞特异性杀死识别自身抗原的B细胞的示意图。CAAR-T细胞在表面上表达自身抗原,作为嵌合免疫受体的细胞外结构域,其与T细胞受体信号传导域融合。Ag-特异性B细胞表达结合CAAR-T细胞的B细胞受体。CAAR-T细胞分泌介体(红色点)以杀死Ag-特异性B细胞。

[0040] 图3A-3B是显示示例性MuSK CAAR构建体的一系列图像。图3A:MuSK CAAR构建体pTRPE.MuSK$_{WT}$.BBz CAAR和pTRPE.MuSK$_{I96A}$.BBz CAAR的示意图。图3B:全长MuSK CAAR包括现有技术中描述的所有MuSK表位(Huijbers等人,Proc.Natl.Acad.Sci.110(51):20783-20788)。

[0041] 图4A-4B图解了MuSK CAAR构建体,并显示了CAAR-T细胞在细胞表面成功表达MuSK wt和MuSK I96A细胞外结构域(ECD)。图4A:MuSK野生型(wt)/I96A CAAR构建体的示意图。在MuSK wt ECD的第96氨基酸位的异亮氨酸突变为丙氨酸,并表示为白色框。图4B:将pTRPE慢病毒载体中的MuSK wt/I96A CAAR转导到原代人CD3$^+$T细胞中。在转导后第5天,使用抗MuSK抗体4A3检测MuSK wt/I96A CAAR的表面表达。

[0042] 图5A-5B是证明MuSK CAAR在转染的细胞表面的表达的一系列图、曲线图和直方图。图5A:MuSK CAAR构建体pTRPE.MuSK$_{WT}$.BBz CAAR和pTRPE.MuSK$_{I96A}$.BBz CAAR的图。图5B(上图):使用抗MuSK-APC抗体检测MuSK CAAR在未转染的(未转染的(Non)、左)、MuSK$_{WT}$(中间)和MuSK$_{I96A}$转染的细胞(右)上的表面表达。图5B(下图):上图中抗MuSK-APC抗体的均值荧光强度:未转染的细胞(右栏)、MuSK$_{WT}$(中栏)和MuSK$_{I96A}$(左栏)。使用Lipofectamine 2000转染293T细胞。使用慢病毒转导CD3$^+$T细胞。

[0043] 图6是显示MuSK CAAR识别抗MuSK BCR并激活TCR信号传导的一系列图和流式细胞

术图。将表达MuSK CAAR的Jurkat NFAT-GFP报道细胞与表达抗MuSK BCR的杂交瘤细胞共培养。Jurkat NFAT-GFP报道细胞中激活的TCR信号传导诱导GFP表达。通过抗MuSK BCR激活MuSK CAAR，并成功地启动TCR信号传导(粗体矩形)。(Non＝未转导的。在与4A3杂交瘤细胞共培养之后12小时进行流式细胞术分析。Jurkat细胞用抗CD3-APC抗体染色以区分4A3杂交瘤细胞。当TCR信号传导被转导时，Jurkat NFAT-GFP细胞诱导GFP表达)。

[0044] 图7是表明在与MuSK CAAR-T细胞共温育4小时之后，基于^{51}Cr-标记的4A3细胞的特异性裂解百分比，MuSK CAAR-工程化的原代人T细胞杀死4A3抗MuSK杂交瘤细胞的一系列图像和曲线图。相比之下，MuSK CAAR-T细胞不会杀死非靶标Nalm-6细胞，这表明靶细胞被MuSK CAAR-T细胞杀死的特异性。

[0045] 图8是显示在4A3靶细胞参与之后MuSK CAAR T细胞分泌干扰素γ，但是未转导的T细胞不会分泌干扰素γ的一系列直方图。

[0046] 图9A-9B图解了MuSK wt/I96A CAAR-T细胞特异性杀死被工程化以表达抗MuSK B细胞受体3-28的Nalm6 B细胞(图9A)，但是不会杀死Nalm-6wt细胞(图9B)。Nalm-6wt细胞稳定地表达在绿色荧光蛋白(GFP)通道中发射的叩头虫荧光素酶绿色(CBG)蛋白，以及对于表面免疫球蛋白作为B细胞受体(BCR)表达所必需的CD79a/CD79b。为了产生作为MuSK wt/I96A CAAR-T靶细胞的Nalm6 3-28(抗MuSK BCR)细胞，将3-28IgG4 BCR引入Nalm-6/CBG/CD79a/CD79b细胞中，并分选GFP^{+}hIgG^{+}细胞。将分选的Nalm6 3-28细胞或Nalm6 wt细胞与MuSK wt/I96A CAAR-T细胞或CART-19细胞在指定的效应子:靶标(E:T)比率下共培养22小时。通过添加荧光素至150μg/ml的最终浓度来检测Nalm6细胞中的荧光素酶活性。通过以下方程计算特异性裂解百分比:特异性裂解的％＝[(实验样品-自发细胞死亡样品)/(最大细胞死亡样品-自发细胞死亡样品样品)]*100。通过5％SDS裂解诱导最大细胞死亡。

[0047] 图10图解了MuSK wt/I96A CAAR-T细胞在与被工程化以表达抗MuSK B细胞受体3-28的Nalm6 B细胞相互作用之后分泌IFNγ。如图9A-9B中所显示，在分析荧光素酶活性之后，在自旋减慢之后收集上清液。通过人IFN-γDuoSet ELIS试剂盒(R&D Systems)检测人IFNγ。对仅含培养基的样品进行未配对的双尾t检验;ns:非显著，**:<0.005，***:<0.0005。柱形图从左向右:仅培养基、NTD、MuSK wt CAAR、MuSK I96A CAAR和CART-19。

[0048] 图11A-11B图解了MuSK wt/I96A CAAR-T细胞杀死产生抗MuSK抗体的4A3杂交瘤细胞并分泌IFNγ。图11A:使用^{51}Cr标记4A3杂交瘤细胞，并与MuSK wt/I96A CAAR-T细胞或CART-19细胞共培养21小时。通过下述方程计算特异性裂解百分比:特异性裂解的％＝[(实验样品-自发细胞死亡样品)/(最大细胞死亡样品-自发细胞死亡样品样品)]*100。通过添加5％SDS(最终5％)诱导最大细胞死亡。图11B:将MuSK wt/I96A CAAR-T细胞与未标记的4A3杂交瘤细胞共培养21小时。在自旋减慢之后收集上清液。通过人IFN-γDuoSet ELIS试剂盒(R&D Systems)检测人IFNγ。

[0049] 图12A-12B图解了MuSK wt/I96A CAAR-T细胞在体内消除抗MuSK靶细胞。图12A:在用静脉内免疫球蛋白(IVIG，Privigen，每天腹膜内注射600mg/kg，持续2天)预处理之后，将0.5x10^{6} CBG^{+}hIgG^{+}Nalm6 3-28细胞静脉内注射到NSG小鼠中。在4天之后，静脉内注射5x10^{6}指示的CAAR-或CAR-T细胞(橙色箭头)。由于Nalm6细胞表达CD19，将未转导的(NTD)T细胞和桥粒芯蛋白(DSG)3EC1-3 CAAR-T细胞视为阴性对照，并且将CART-19细胞用作阳性对照。在第1、3、5、7和9天用IVIS Lumina定量生物发光。同时，还每隔一天腹膜内施用600mg/kg

IVIG。使用Living Image 4.5软件(PerkinElmer)定量总通量。以1分钟间隔连续拍摄图像。图12B:图12B显示了图12A中的每个治疗组的生物发光通量(光子/秒),其图解了MuSK wt/I96A CAAR T细胞控制抗MuSK Nalm6靶细胞,在效力上与CART-19细胞相当,而阴性对照NTD和DSG3 EC1-3 CAAR T细胞不控制抗MuSK Nalm6靶细胞增长。

[0050] 图13A-13B图解了MuSK wt/I96A CAAR-T细胞分泌IFNγ以消除体内抗MuSK靶细胞。图13A:在图12A中的成像之后立即测量小鼠体重。计算相对于第1天(100%)的初始体重百分比。图13B:在T细胞注射之后24小时,通过眼眶后出血收集血液样品。将小鼠血清保持在-20℃,用于进一步分析。通过人IFN-γDuoSet ELIS试剂盒(R&D Systems)检测人IFNγ。用ND463_NTD进行未配对的双尾t检验;ns:非显著,**:<0.005。

[0051] 图14为MuSK wt/I96A CAAR的示意图。密码子优化的结构域表示为浅灰色框。除了图15和16中描述的那些以外,本文描述的所有实验均使用载体#2(pTRPE.MuSK$_{WT}$.BBz CAAR)和载体#4(pTRPE.MuSK$_{I96A}$.BBz CAAR)进行。载体#5(pTRPE.MuSK$_{WT_opt}$.BBz CAAR)和载体#6(pTRPE.MuSK$_{WT_opt}$.BBz CAAR)用于图15和16。载体#5和载体#6在细胞外结构域和GS接头之间没有限制酶位点(表示为没有轮廓的白点)。

[0052] 图15图解了密码子优化的MuSK wt/I96A CAAR在人原代CD3$^+$T细胞中表达。将pTRPE慢病毒载体中的MuSK wt_opt或MuSKI96A_opt CAAR转导到原代人CD3$^+$T细胞中。在转导后第5天,使用抗MuSK(4A3)PE-缀合抗体检测MuSK wt_opt或MuSK I96A_opt的表面表达。

[0053] 图16图解了密码子优化的MuSK wt/I96A CAAR-T细胞杀死被工程化以表达抗MuSK B细胞受体3-28的Nalm6 B细胞。

具体实施方式

[0054] 本发明包括对抗肌肉特异性激酶(MuSK)B细胞受体(BCR)具有特异性的嵌合自身抗体受体(CAAR)、包括CAAR的组合物、编码CAAR的多核苷酸、包括编码CAAR的多核苷酸的载体和重组细胞,例如,包括CAAR的T细胞。

[0055] 本发明还包括制备表达MuSK-CAAR的基因修饰的细胞,例如,基因修饰的T细胞的方法,其中表达的CAAR包括MuSK细胞外结构域。

[0056] 本发明通常还涉及被工程化以表达CAAR的细胞,例如T细胞用于治疗与自身抗原(例如,MuSK)的靶向相关的神经肌肉接点(NMJ)疾病(例如,重症肌无力(MG))的用途。在一个实施方式中,本发明的表达CAAR的细胞,例如T细胞特异性结合并杀死表达抗MuSK BCR的细胞,但是不结合和杀死表达正常BCR的细胞。

[0057] 定义

[0058] 除非另有定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料都可用于本发明的实践和/或用于测试本发明,但是本文描述了优选的材料和方法。在描述和要求保护本发明时,将根据定义的方式使用以下术语,其中提供了如下定义。

[0059] 还应理解,本文所使用的术语仅出于描述具体实施方式的目的,并不意欲被限制。

[0060] 冠词“一(a)”和“一(an)”在本文中用于指该冠词的语法对象中的一个或多个(即,至少一个)。举例来说,“一个元件”是指一个元件或多于一个元件。

[0061] 如本文所使用的,“约”在涉及可测量值比如量、时间持续时间等时,意在涵盖与规

定值±20%或±10%,在一些情况下±5%,在一些情况下±1%,和在一些情况下±0.1%的变量,因为这样的变量适合于执行所公开的方法。

[0062] 如本文所使用的,术语“抗体”是指与抗原结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是源自天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫应答性部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。抗体可以以多种形式存在,其中抗体表达为连续多肽链的一部分,包括例如单个结构域抗体片段(sdAb)、单链抗体(scFv)和人源化抗体(Harlow等人,1999,In:Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Harlow等人,1989,In:Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,New York;Houston等人,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Bird等人,1988,Science 242:423-426)。

[0063] 如本文所使用的,术语“高亲和力”是指结合分子与靶分子的结合或相互作用或吸引中的高特异性。例如,在一些实施方式中,结合分子对靶分子的亲和力可强于100nM、50nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM或1nM,例如,如通过表面等离子共振所确定的。

[0064] 本文所使用的术语“抗原”或“Ag”定义为引起免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体的产生,或特定免疫学上的感受态细胞的激活,或两者。技术人员将理解,任何大分子,包括事实上所有的蛋白质或肽都可以用作抗原。此外,抗原可以源自重组DNA或基因组DNA。因此,技术人员将理解,包括编码引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA均编码本文所使用的术语“抗原”。此外,本领域技术人员将理解抗原不必仅由基因的全长核苷酸序列编码。容易显而易见的是,本发明包括但不限于使用一个以上基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以各种组合排列以编码引发期望的免疫应答的多肽。此外,技术人员将理解,抗原根本不需要由“基因”编码。容易显而易见的是,抗原可以合成产生或可以源自生物样品。这样的生物样品可以包括但不限于组织样品、细胞或生物流体。

[0065] “自身抗原”是指刺激产生自身免疫应答例如产生自身抗体的内源抗原。自身抗原还包括自体抗原或来自正常组织的抗原,其是细胞介导的或抗体介导的免疫应答的靶标,该免疫应答可能导致自身免疫疾病的发展。自身抗原的实例包括但不限于MuSK及其片段。

[0066] 如本文所使用的,术语“有限的毒性”是指本发明的肽、多核苷酸、细胞和/或抗体对体外或体内的健康细胞、非恶性细胞、非靶细胞或这种细胞群表现出缺乏基本上负面的生物学作用或基本上负面的生理症状。

[0067] “自身抗体”是指对自身抗原具有特异性的抗体。

[0068] 如本文所使用的,术语“自身免疫疾病”定义为由抗体介导的针对自身抗原的自身免疫应答引起的障碍或病症。自身免疫性疾病导致不适当地产生和/或过度地产生自体抗原或自身抗原的自身抗体的产生。

[0069] 如本文所使用的,术语“自体的(autologous)”是指源自相同个体的任何材料,随后将其重新引入该个体中。

[0070] “同种异体的(allogeneic)”是指源自相同物种的不同动物的任何材料。

[0071] “异种异体的(xenogeneic)”是指源自不同物种的动物的任何材料。

[0072] “嵌合自身抗体受体”或“CAAR”是指在细胞例如T细胞或任何其他效应细胞类型例

如能够发生细胞介导的细胞毒性的效应细胞类型上表达的工程化受体。CAAR包括对BCR和/或自身抗体具有特异性的抗原或其片段。CAAR任选地还包括跨膜结构域、细胞内结构域和/或信号传导结构域。

[0073] 如本文所使用的，术语“保守序列修饰”是指不显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特性的氨基酸修饰。这样的保守修饰包括氨基酸取代、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术将修饰引入本发明的抗体中，比如定点诱变和PCR介导的诱变。保守氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的氨基酸取代。已在本领域中定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。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(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、色氨酸)、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)、具有β-支链侧链的氨基酸(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此，例如，本发明的CAAR的细胞外区域内的一个或多个氨基酸残基可以被具有相似侧链或电荷的其他氨基酸残基取代，并且可以使用本文描述的功能测定法测试改变的CAAR结合自身抗体的能力。

[0074] 如本文所使用的，“共刺激配体”包括抗原呈递细胞(例如，aAPC、树突细胞、B细胞等)上的分子，该分子特异性结合T细胞上的关联共刺激分子，从而除了通过例如TCR/CD3复合物与载有肽的MHC分子结合提供的主要信号外，提供介导T细胞应答包括但不限于增殖、激活、分化等的信号。

[0075] “共刺激分子”是指T细胞上的特异性结合伴侣，其与共刺激配体特异性结合，从而介导T细胞的共刺激应答，比如但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于I类MHC分子、BTLA和Toll配体受体。

[0076] “编码”是指多核苷酸中的特定核苷酸序列比如基因、cDNA或mRNA在生物过程中用作用于合成其他聚合物和大分子的模板的固有特性，该聚合物或大分子具有定义的核苷酸序列(即，rRNA、tRNA和mRNA)或定义的氨基酸序列，以及由此产生的生物学特性。因此，如果对应于该基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质，则该基因编码该蛋白质。编码链和非编码链二者都可以称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其他产物，编码链的核苷酸序列与mRNA序列相同并且通常在序列表中提供，非编码链用作基因或cDNA转录的模板。

[0077] “有效量”或“治疗有效量”在本文中可互换使用，并且是指如本文所描述的有效的实现特定生物学结果的化合物、制剂、材料或组合物的量。这样的结果可以包括但不限于通过本领域合适的任何手段所确定的抗MuSK B细胞和它们产生的抗体的消除。

[0078] 术语“效应子功能”是指细胞的专门功能。

[0079] 如本文所使用的，“内源的(endogenous)”是指来自生物体、细胞、组织或系统内部或在生物体、细胞、组织或系统内部产生的任何材料。

[0080] 如本文所使用的，术语“外源的(exogenous)”是指从生物体、细胞、组织或系统引入或在生物体、细胞、组织或系统外部产生的任何材料。

[0081] 如本文所使用的，术语“表达”定义为由启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0082] “表达载体”是指包括重组多核苷酸的载体，该重组多核苷酸包括可操作地连接至待表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包括足够的用于表达的顺式作用元件；用于表达的其他元件可以由宿主细胞供应或在体外表达系统中供应。表达载体包括本领域已知的所有载体，比如粘粒、质粒(例如，裸露或包含在脂质体中)、逆转录转座子(例如piggyback、睡美人(sleeping beauty))和病毒(例如，慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)，其并入重组多核苷酸。

[0083] 如本文所使用的，“同源的”是指两个聚合物分子之间，例如两个核酸分子，比如两个DNA分子或两个RNA分子之间，或两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个分子中两个亚基的位置都被相同的单体亚基占据时；例如，如果两个DNA分子中每个分子的位置被腺嘌呤占据，那么它们在该位置是同源的。两个序列之间的同源性是匹配数目或同源位置数目的直接函数；例如，如果两个序列中一半的位置(例如，长度为十个亚基的聚合物中的五个位置)是同源的，则两个序列是50％同源的；如果90％的位置(例如10个中的9个)是匹配的或同源的，则两个序列是90％同源的。

[0084] 如本文所使用的，“同一性”是指两个聚合物分子之间，特别是两个氨基酸分子之间，比如两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个氨基酸序列在相同位置具有相同残基时；例如，如果两个多肽分子的每一个中的一个位置被精氨酸占据，那么它们在那个位置是同一的。两个氨基酸序列在比对中的相同位置具有相同残基的同一性或程度通常用百分比表示。两个氨基酸序列之间的同一性是匹配数目或相同位置数目的直接函数；例如，如果两个序列中位置的一半(例如，长度为十个氨基酸的聚合物中的五个位置)同一，则两个序列为50％同一；如果90％的位置(例如10个中的9个)是匹配的或同一的，则两个氨基酸序列具有90％的同一性。

[0085] 如本文所使用的，“说明材料”包括出版物、记录、图表或可用于传达本发明的组合物和方法的有用性的任何其他表达介质。本发明的试剂盒的说明材料可以例如贴附在装有本发明的核酸、肽和/或组合物的容器上，或者与含有核酸、肽和/或组合物的容器一起运输。可替代地，说明材料可以与容器分开地运输，以使说明材料和化合物由接受者协同使用。

[0086] “细胞内结构域”是指位于细胞内部的分子的一部分或区域。

[0087] 术语“细胞内信号传导结构域”意思是包括足以转导效应子功能信号的细胞内结构域的任何全长或截短的部分。

[0088] “分离的(isolated)”是指从天然状态改变或去除。例如，没有“分离”天然存在于活体动物中的核酸或肽，而是“分离”与天然状态的共存材料部分或完全分开的相同核酸或肽。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在，或者可以存在于非天然环境，诸如例如宿主细胞中。

[0089] 在本发明的背景中，对于常见的核酸碱基使用以下缩写。“A”是指腺苷，“C”是指胞嘧啶，“G”是指鸟苷，“T”是指胸苷，“U”是尿苷。

[0090] 除非另有说明，否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此为简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可以包括内含子，大意是说(to the extent that)，一些形式的编码蛋白质的核苷酸序列可以包含内含子(一个或多个)。

[0091] 如本文所使用的，“慢病毒(lentivirus)”是指逆转录病毒科的属。慢病毒在能够感染非分裂细胞的逆转录病毒中是独特的；它们可以将大量遗传信息传递到宿主细胞的DNA中，因此它们是基因传递载体中最有效的方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的实例。源自慢病毒的载体提供了在体内实现显著水平的基因转移的手段。

[0092] 如本文使用的，“MuSK”或“$MuSK_{WT}$”涉及肌肉骨骼受体酪氨酸-蛋白激酶的野生型多核苷酸和多肽同种型(例如具有共有编码序列(CDS)CCDS48005.1的基因ID：4593；NM_005592.3；NP_005583.1)。在一些实施方式中，MuSK多核苷酸是密码子优化的。在一些实施方式中，I96A变体($MuSK_{I96A}$)用于本发明的组合物和方法中。本领域已知$MuSK_{I96A}$的突变对抗体结合的影响很小，但可能破坏与结合MuSK的第一个Ig样结构域的LRP4的结合(Zhang等人，J Biol Chem.2011Nov 25；286(47)：40624-40630)。在一些实施方式中，$MuSK_{I96A}$结合抗MuSK抗体，并且因此具有靶向抗MuSK BCR的能力。

[0093] 术语“可操作地连接”是指调控序列和异源核酸序列之间的功能性连接，导致后者表达。例如，当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时，第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如，如果启动子影响编码序列的转录或表达，则将启动子与编码序列可操作地连接。通常，可操作地连接的DNA序列是连续的，并且在需要连接两个蛋白质编码区的地方处于同一阅读框中。

[0094] 免疫原性组合物的“肠胃外”施用包括例如皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)或胸骨内注射或输注技术。

[0095] 如本文所使用的，“浆细胞”是指可以产生和分泌抗体的一类白细胞。浆细胞也称为浆细胞(plasmocyte)、浆细胞(plasmacyte)或效应B细胞。

[0096] 如本文所使用的，术语“多核苷酸”定义为核苷酸链。此外，核酸是核苷酸的聚合物。因此，本文所使用的核酸和多核苷酸是可互换的。本领域技术人员具有核酸是可被水解成单体“核苷酸”的多核苷酸的常识。单体核苷酸可以被水解成核苷。如本文所使用的，多核苷酸包括但不限于通过本领域可用的任何手段获得的所有核酸序列，包括但不限于重组手段，即，使用普通克隆技术和PCR™等，并通过合成手段从重组文库或细胞基因组克隆核酸序列。在一些实施方式中，认为核酸序列与本文公开的任何核酸序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性或同源性。

[0097] 如本文所使用的，术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用，并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸，并且对构成蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括包含通过肽键相互连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文使用的，该术语是指短链和长链，短链在本领域中通常也称为例如肽、寡肽和寡聚体，长链在本领域中通常称为蛋白质，其具有很多类型。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。在一些实施方式中，认为氨基酸序列与本文所述的任何氨基酸序列具有95％、96％、97％、98％或99％的同一性或同源性。

[0098] 术语“促炎细胞因子”是指促进炎症或炎性反应的细胞因子或因子。促炎细胞因子的实例包括但不限于趋化因子(CCL、CXCL、CX3CL、XCL)、白介素(例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9，IL-10和IL-15)、干扰素(IFNγ)和肿瘤坏死因子(TNFα和TNFβ)。

[0099] 如本文所使用的,术语“启动子”被定义为启动多核苷酸序列的特异性转录所需的细胞的合成机制或引入的合成机制识别的DNA序列。

[0100] 如本文所使用的,术语“启动子/调控序列”是指可操作地连接至启动子/调控序列的基因产物的表达所需的核酸序列。在一些情况下,该序列可以是核心启动子序列,而在其他情况下,该序列还可以包括基因产物的表达所需的增强子序列和其他调控元件。启动子/调控序列可以是例如以组织特异性方式表达基因产物的启动子/调控序列。

[0101] “组成型(constitutive)”启动子是这样的核苷酸序列,当其与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,在细胞的大多数或全部生理条件下引起该基因产物在细胞中产生。

[0102] “诱导型(inducible)”启动子是这样的核苷酸序列,当其与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,基本上仅当对应于该启动子的诱导物存在于细胞中时,才引起该基因产物在细胞中产生。

[0103] “组织特异性”启动子是这样的核苷酸序列,当其与编码或指定基因的多核苷酸可操作地连接时,仅当该细胞是对应于该启动子的组织类型的细胞时,才引起该基因产物在细胞中产生。

[0104] “信号转导途径”是指在信号从细胞的一部分传输到细胞的另一部分中起作用的多种信号转导分子之间的生化关系。短语“细胞表面受体”包括能够接收信号并跨细胞膜传输信号的分子和分子的复合物。

[0105] “信号传导结构域”是指响应于激活信号募集并与特定蛋白质相互作用的分子的一部分或区域。

[0106] 术语“受试者”旨在包括可以引发免疫应答的活生物体(例如,哺乳动物)。

[0107] 如本文所使用的,“基本上纯化的”细胞是基本上不含其他细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞还指已经与通常以其天然存在的状态与其结合的其他细胞类型分离的细胞。在一些情况下,基本上纯化的细胞群是指同质的细胞群。在其他情况下,该术语仅指与以其天然状态与其天然结合的细胞分离的细胞。在一些实施方式中,细胞在体外培养。在其他实施方式中,细胞不在体外培养。

[0108] 如本文所使用的,术语“治疗的(therapeutic)”是指治疗和/或预防。通过抑制、缓解或消除疾病状态可获得治疗效果。

[0109] 如本文所使用的,术语“转染的(transfected)”或“转化的(transformed)”或“转导的(transduced)”是指将外源核酸转移或引入宿主细胞中的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。该细胞包括原代受试者细胞及其子代。

[0110] “跨膜结构域”是指跨越脂质双层膜的分子的一部分或区域。

[0111] 如本文所使用的,短语“在转录控制下”或“可操作地连接的”是指启动子相对于多核苷酸处于正确的位置和方向,以控制RNA聚合酶的转录起始和多核苷酸的表达。

[0112] “载体”是包括分离的核酸并且可用于将分离的核酸递送至细胞内部的物质组合物。许多载体是本领域已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲性分子化合物相关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制质粒或病毒。该术语还应解释为包括有助于将核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物,诸如例如聚赖氨酸化合物、

脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0113] 如本文使用的，术语“特异性结合”意思是识别并结合样品中存在的关联结合伴侣(例如，T细胞上存在的刺激和/或共刺激分子)蛋白的抗体或配体，但是该抗体或配体基本上不识别或结合样品中的其他分子。

[0114] 术语“刺激”是指通过刺激分子(例如，TCR/CD3复合物)与其关联配体结合，从而介导信号转导事件，比如但不限于经由TCR/CD3复合物。刺激可以介导某些分子改变的表达，例如TGF-β的下调和/或细胞骨架结构的重组等。

[0115] 本文使用的术语“刺激分子”是指T细胞上与抗原呈递细胞上存在的关联刺激配体特异性结合的分子。

[0116] 如本文所使用的，“刺激配体”是指当存在于抗原呈递细胞(例如，aAPC、树突细胞、B细胞等)上时可以与关联结合伴侣(在本文中称为“刺激分子”)特异性结合的配体，从而介导T细胞的初级应答，包括但不限于激活、免疫应答的起始、增殖等。刺激配体在本领域中是众所周知的，并且尤其包括装载有肽、抗CD3抗体、超激动剂抗CD28抗体和超激动剂抗CD2抗体的MHC I类分子。

[0117] 范围：在整篇公开内容中，可以用范围格式来呈现本发明的各个方面。应当理解，范围格式的描述仅是为了方便和简洁，而不应被解释为对本发明的范围的僵化限制。因此，应该将范围的描述解释为已具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如，范围比如从1至6的描述应解释为具体地公开了子范围，比如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等，以及该范围内的单个数字，例如，1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论该范围的广度如何，这都适用。

[0118] 描述

[0119] 嵌合自身抗体受体(CAAR)

[0120] 本发明部分基于以下发现：嵌合自身抗体受体可用于靶向表达基于自身抗体的B细胞受体的B细胞，在激活和自身抗体分泌之后，该B细胞可能引起自身抗体介导的神经肌肉接点(NMJ)疾病(例如，重症肌无力(MG))。本发明包括对抗肌肉特异性激酶(MuSK)B细胞受体(BCR)具有特异性的嵌合自身抗体受体(CAAR)、包括CAAR的组合物、编码CAAR的多核苷酸、包括编码CAAR的多核苷酸的载体和重组细胞，例如包括CAAR的T细胞，。本发明还包括制备表达MuSK CAAR的基因修饰的细胞，例如基因修饰的T细胞的方法，其中表达的CAAR包括MuSK细胞外结构域。

[0121] 本发明包括用于治疗自身抗体介导的NMJ疾病的技术。特别地，靶向最终产生自身抗体并在其细胞表面展现自身抗体的B细胞的技术，将这些B细胞标记为用于治疗性干预的疾病特异性靶标。因此，本发明包括通过使用抗原特异性(例如，MuSK)嵌合自身抗体受体(或CAAR)靶向引起疾病的B细胞，有效靶向和杀死自身抗体介导的疾病中的致病性B细胞的方法。在本发明的一个实施方式中，仅杀死特定的表达抗MuSK BCR的B细胞，而使防止感染的有益B细胞和抗体保留完整。

[0122] 在一方面中，本发明包括嵌合自身抗体受体(CAAR)，其包括包含肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段的细胞外结构域。

[0123] 在一方面中，本发明包括包含MuSK自身抗原或其片段的嵌合多肽，其中MuSK自身

抗原或其片段连接至嵌合自身抗体受体(CAAR)的跨膜结构域。

[0124] 在一方面中,本发明包括编码嵌合自身抗体受体(CAAR)的多核苷酸,其中多核苷酸编码MuSK自身抗原或其片段。在一些实施方式中,多核苷酸还编码跨膜结构域、共刺激分子的细胞内结构域和/或信号传导结构域。

[0125] 在一个实施方式中,MuSK CAAR包括选自SEQ ID NO:9、22、27或30的氨基酸序列。在一个实施方式中,MuSK CAAR由选自SEQ ID NO:1、16、21、24、25和28的核酸序列编码。

[0126] 在一些实施方式中,MuSK CAAR包括与选自SEQ ID NO:9、22、27或30的氨基酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的氨基酸序列。在其他实施方式中,MuSK CAAR由与选自SEQ ID NO:1、16、21、24、25和28的核酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%的序列同一性的核酸序列编码。

[0127] 自身抗原部分

[0128] 在一个实施方式中,本发明的CAAR包括自身抗体结合结构域,其也称为自身抗原或其片段。用于本发明的自身抗原的选择取决于靶向的自身抗体或BCR的类型(例如抗-MuSK)。例如,可以选择自身抗原,因为它识别与特定自身抗体介导的疾病状态,例如重症肌无力(MG)相关的靶细胞,比如表达BCR的B细胞上的BCR或自身抗体。

[0129] 在一些情况下,有益的是自身抗体结合结构域源自最终将使用CAAR的相同物种。例如,对于在人类中使用,可能有益的是CAAR的自身抗体结合结构域包括结合人类BCR或自身抗体或其片段的人类自身抗原(或其片段)。

[0130] 在一个示例性实施方式中,基因工程化的嵌合自身抗体受体包括MuSK或其片段,其结合抗MuSK BCR,例如受试者的B细胞上的抗MuSK BCR。

[0131] 在一个实施方式中,CAAR包括MuSK自身抗原或其片段。在一些实施方式中,MuSK的细胞外结构域由选自SEQ ID NO:3、6、26和29的核酸序列编码。在一些实施方式中,MuSK自身抗原或其片段由与选自SEQ ID NO:3、6、26和29的核酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的核酸序列编码。在其他实施方式中,MuSK的细胞外结构域包括选自SEQ ID NO:11和23的氨基酸序列。在又其他实施方式中,MuSK自身抗原或其片段包括与选自SEQ ID NO:11和23的氨基酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的氨基酸序列。

[0132] 跨膜结构域

[0133] 在一些实施方式中,MUSK CAAR包括与MUSK CAAR的细胞外结构域融合的跨膜结构

域。在一个实施方式中，MUSK CAAR包括天然与MUSK CAAR的结构域中的一个相关的跨膜结构域。在一些情况下，通过氨基酸取代选择或修饰跨膜结构域，以避免与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合，以最小化与受体复合物的其他成员的相互作用。

[0134] 跨膜结构域可以源自天然或合成来源。当来源是天然的时，该结构域可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在一个实施方式中，跨膜结构域可以是合成的，在这种情况下，其将主要包括疏水性残基，例如亮氨酸和缬氨酸。在一方面中，将在合成的跨膜结构域的每个末端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。任选地，长度在2至10个氨基酸之间的短寡核苷酸或多肽接头可形成MUSK CAAR的跨膜结构域和细胞质信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸(GS)二联体提供了特别合适的接头。

[0135] 在一些情况下，还可以采用跨膜结构域之前的各种间隔结构域，包括CD8或人Ig(免疫球蛋白)铰链或甘氨酸-丝氨酸接头。

[0136] 铰链和/或跨膜结构域的实例包括但不限于T细胞受体、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIR、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、CD160、CD19、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(触觉)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D和/或NKG2C的α、β或ζ链的铰链和/或跨膜结构域。

[0137] 在一个实施方式中，MuSK CAAR包括跨膜结构域，比如，但不限于CD8α跨膜结构域：IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC(SEQ ID NO:13)

[0138] 在一些实施方式中，CD8α跨膜结构域由ATCTACATCTGGGCACCCTTGGCTGGAACATGCGGGGTCCTGCTGCTGAGCTTGGTGATCACCCTTTACTGC(SEQ ID NO:5)或ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGC(SEQ ID NO:18)编码。

[0139] 在一些实施方式中，CD8α跨膜结构域包括与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的氨基酸序列。在进一步的实施方式中，CD8α跨膜结构域由与SEQ ID NO:5或18的核酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的核酸序列编码。

[0140] 在另一个实施方式中，MuSK CAAR包括由GGAGGTGGAGGTAGTGGCGGTGGAGGCAGC(SEQ ID NO:4)或GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC(SEQ ID NO:17)编码的GS接头GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:12)。

[0141] 在一些实施方式中，MuSK CAAR包括由TTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCAACCACG

ACGCCAGCACCGCGACCACCAACACCTGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCA GACCAGCAGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT(SEQ ID NO:32)编码的CD8α铰链区:FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(SEQ ID NO:31)。

[0142] 在一些实施方式中,铰链区包括与SEQ ID NO:31的氨基酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的氨基酸序列,或由与SEQ ID NO:32具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的核酸序列编码。

[0143] 共刺激分子的细胞内结构域

[0144] 在一些实施方式中,MUSK CAAR包括共刺激分子的细胞内结构域。本发明的MUSK CAAR的共刺激分子的细胞内结构域是负责激活其中已经放置了MUSK CAAR的免疫细胞的至少一种正常效应子功能的细胞质结构域。

[0145] T细胞的效应子功能例如可以是溶细胞活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此,术语"共刺激分子的细胞内结构域"是指蛋白质的一部分,其转导效应子功能信号并指导细胞执行专门的功能。虽然可以使用共刺激分子的整个细胞内结构域,但是在许多情况下,不需要使用整个结构域。就使用共刺激分子的细胞内结构域的截短部分而言,只要该截短部分转导效应子功能信号,就可以代替完整结构域使用。

[0146] 共刺激分子的细胞内结构域是指包括共刺激分子的细胞内结构域的CAAR的一部分。共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效应答所需的除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。这种分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关的抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3,和与CD83、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(触觉)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D特异性结合的配体,本文所述的其他共刺激分子、其任何衍生物、变体或片段,具有相同功能能力的共刺激分子的任何合成序列及其任何组合。因此,虽然本发明主要以4-1BB(CD137)作为共刺激信号传导结构域来举例说明,但是其他共刺激结构域也在本发明的范围内。

[0147] 在一个实施方式中,共刺激分子的细胞内结构域的核酸序列编码包括共刺激分子4-1BB(也称为CD137细胞内结构域)的氨基酸序列:KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL(SEQ ID NO:14)。

[0148] 在仍另一个实施方式中,编码4-1BB细胞内结构域的核酸序列包括:

[0149] AAGCGCGGTCGCAAGAAACTGCTCTATATTTTTAAACAGCCATTCATGAGACCTGTCCAGACCACTCA

AGAGGAGGACGGATGTTCCTGTAGATTTCCTGAAGAGGAAGAGGGGGGGTGCGAGCTG(SEQ ID NO:7);或

[0150] AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG(SEQ ID NO:19)。

[0151] 在一些实施方式中,4-1BB细胞内结构域包括与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%的序列同一性的氨基酸序列。在其他实施方式中,4-1BB细胞内结构域由与选自SEQ ID NO:7和19的核酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的核酸序列编码。

[0152] 人细胞内4-1BB结构域在结合到细胞外自身抗原比如MUSK或其片段之后提供共刺激细胞内信号传导,而无需其原始配体。

[0153] 众所周知,仅通过TCR产生的信号不足以完全激活T细胞,并且还需要次级或共刺激信号。因此,可以说T细胞激活是由两类不同的细胞质信号传导序列介导的:通过TCR启动抗原依赖性初级激活的那些(初级细胞质信号传导序列)和以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级细胞质信号传导序列)。

[0154] 信号传导结构域

[0155] 在一些实施方式中,MUSK CAAR包括信号传导结构域。初级细胞质信号传导序列以刺激方式或抑制方式调节TCR复合物的初级激活。以刺激方式起作用的初级细胞质信号转导序列可包含信号传导基序,这些基序被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。

[0156] 在本发明中具体使用的包含ITAM的初级信号传导序列的实例包括源自TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。特别优选地,本发明的CAAR的信号传导分子包括源自CD3-ζ的信号传导结构域。

[0157] 在一个实施方式中,CAAR的信号传导结构域可以设计为单独包括CD3-ζ信号传导结构域,或者与本发明的CAAR的背景中有用的任何其他期望的细胞质结构域(一个或多个)组合。例如,CAAR的信号传导结构域可以包括CD3ζ链部分和共刺激信号传导结构域。

[0158] 在一些实施方式中,MUSK CAAR单独包括CD3-ζ信号传导结构域或与本发明的MUSK CAAR的背景中有用的任何其他期望的细胞质结构域(一个或多个)组合。例如,MUSK CAAR可以包括CD3ζ链部分和共刺激分子的细胞内结构域。在一些实施方式中,CD3ζ链部分是人T细胞表面糖蛋白CD3ζ链亚型3细胞内结构域(人CD247)。人细胞内CD3ζ结构域在结合至细胞外自身抗原,比如MUSK或其片段之后提供刺激细胞内信号传导,没有HLA限制。

[0159] 在一个实施方式中,信号传导结构域的核酸序列包括编码CD3ζ信号传导结构域的核酸序列。在另一个实施方式中,CD3ζ信号传导结构域的核酸序列编码包括RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR的氨基酸序列(SEQ ID NO:15)。在另一个实施方式中,编码CD3ζ信号传导结构域的核酸序列包括:AGAGTAAAGTTCAGTAGGTCCGCCGATGCCCCAGCCTATCAACAGGGGCAAAATCAACTCTACAACGAACTTAATCTGGGACGCCGAGAGGAGTACGATGTCTTGGATAAGAGACGCGGCAG

GGACCCTGAAATGGGCGGAAAGCCAAGACGGAAGAACCCCCAGGAAGGTCTGTACAATGAACTTCAGAAAGATAAG ATGGCCGAAGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAAGGAGAGAGGCGCCGCGGCAAAGGGCATGATGGACTGTATCAGG GTCTCAGTACTGCTACTAAGGACACATATGATGCCCTCCACATGCAGGCCCTGCCACCAAGGTGA(SEQ ID NO:8);或

[0160] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGA GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAG CCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGA TTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA CACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC(SEQ ID NO:20)。

[0161] 在一些实施方式中,CD3ζ信号传导结构域包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的氨基酸序列。在其他实施方式中,CD3ζ信号传导结构域由与选自SEQ ID NO:8和20的核酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的核酸序列编码。

[0162] 其他结构域

[0163] 在一些实施方式中,MUSK CAAR和编码MUSK CAAR的多核苷酸包括人T细胞表面糖蛋白CD8α链信号肽。人CD8α信号肽负责受体向T细胞表面的易位。

[0164] 在其他实施方式中,MuSK CAAR和编码MuSK CAAR的多核苷酸包括IgG信号肽。在一些实施方式中,IgG信号肽由包括ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGT GTCCAGTGC(SEQ ID NO:2)的核酸序列编码。在其他实施方式中,IgG信号肽包括MEFGLSWLFLVAILKGVQC的氨基酸序列(SEQ ID NO:10)。在一些实施方式中,IgG信号肽由与SEQ ID NO:2的核酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的核酸序列编码。在一些实施方式中,IgG信号肽包括与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的氨基酸序列。

[0165] 在一个实施方式中,编码MUSK CAAR的多核苷酸包括肽接头的核酸序列。在另一个实施方式中,MUSK CAAR包括肽接头。在又另一个实施方式中,MUSK CAAR的细胞内信号传导结构域内的细胞质信号传导序列可以以随机或指定顺序彼此连接。任选地,例如,长度在2和10个氨基酸之间的短的寡肽或多肽接头可以形成连锁。甘氨酸-丝氨酸(GS)二联体是特别合适的接头。

[0166] 在一些实施方式中,CAAR包括来自杀伤性免疫球蛋白样受体(KIR)家族蛋白质的

跨膜结构域和/或细胞质(细胞内)结构域。KIR基因家族具有至少15个基因位点(KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3)和在位于19号染色体(19q13.4)上的白细胞受体复合物(LRC)的100-200Kb区域编码的两个假基因(KIR2DP1和KIR3DP1)。LRC构成大的,1Mb且密集的快速进化的免疫基因簇,其包含编码具有独特Ig样细胞外结构域的其他细胞表面分子的基因。此外,扩增的LRC包含编码跨膜衔接子分子DAP10和DAP12的基因。因此,包括包含KIR跨膜结构域和/或细胞质结构域的本发明的CAAR的细胞还可以包括编码DAP10或DAP12的多核苷酸。在某些实施方式中,KIR是KIRS2或KIR2DS2。

[0167] 包括MuSK CAAR的载体

[0168] 在一方面中,本发明包括一种载体,该载体包括编码嵌合自身抗体受体(CAAR)的多核苷酸,其中多核苷酸包括编码包括人MuSK自身抗原或其片段的细胞外结构域、以及任选地跨膜结构域和/或细胞内信号传导结构域的核酸序列。在一些实施方式中,载体包括如本文描述的编码CAAR的任何核酸序列。本发明还提供了其中插入了编码本发明的CAAR的DNA的载体。

[0169] 可以将核酸克隆到许多不同类型的载体中。载体通常是一种能够在哺乳动物细胞中复制和/或也能够整合到哺乳动物细胞基因组中的载体。典型的载体包含用于调节所需核酸序列表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。例如,可以将核酸克隆到载体中,包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特别感兴趣的载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。在一些实施方式中,载体包括质粒载体、病毒载体、逆转录转座子(例如,piggyback、睡美人)、定点插入载体(例如CRISPR、锌指核酸酶、TALEN)或自杀表达载体或本领域其他已知的载体。在一些实施方式中,载体是RNA载体。

[0170] 在一些实施方式中,载体是病毒载体,比如慢病毒载体。

[0171] 病毒载体技术是本领域众所周知的,并且描述于例如Sambrook等人,2012,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,第1-4卷,Cold Spring Harbor Press,NY),以及其他病毒学和分子学生物学手册。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。通常,合适的载体包含在至少一种生物中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制性核酸内切酶位点和一种或多种选择标志物(例如,WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0172] 病毒载体,包括源自逆转录病毒比如慢病毒的载体,是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因长期稳定地整合及其在子代细胞中的增殖(propagation)。慢病毒载体与源自癌逆转录病毒的载体比如鼠白血病病毒相比具有附加的优势,因为它们可以转导非增生细胞,比如肝细胞。它们还具有在引入它们的受试者中导致低免疫原性的附加优势。

[0173] 在一些实施方式中,载体为第3代慢病毒载体。在一些实施方式中,可以使用第3代自灭活慢病毒载体质粒,其中CAR的表达由人延伸因子1α启动子调节。这导致CAR在宿主T细胞中稳定(永久)表达。作为一种替代方法,可以将编码的mRNA电穿孔到宿主细胞中,这将实现与病毒转导的T细胞相同的治疗效果,但不是永久的,因为mRNA会随细胞分裂而稀释。

[0174] 在一些实施方式中,载体是基于转座子的表达载体。“转座子”或“转座元件”是可以改变其在基因组中位置的DNA序列。转座子有两种不同的类型:II类转座子,由直接从一

地移动到另一地的DNA组成;和I类转座子,它们是首先将DNA转录为RNA并且然后使用逆转录酶使RNA的DNA拷贝插入新的位置的逆转录转座子。在转座子系统中,转录单位,例如包括编码CAAR的核酸序列,位于转座子的末端重复序列的两侧。转座子通常与转座酶相互作用,转座酶识别末端重复序列并介导转座子的移动。转座酶可以例如作为蛋白质共递送,在与CAAR相同的载体上编码或在单独的载体上编码。转座子/转座酶系统的非限制性实例包括睡美人、Piggybac、Frog Prince和Prince Charming。编码CAAR的天然或合成多核苷酸的表达通常是通过将编码CAAR多肽或其部分的核酸可操作地连接至启动子(例如,EF1α启动子),并将该构建体整合入表达载体中来实现的。

[0175] 另外的启动子元件,例如增强子,调节转录初始的频率。通常,这些位于起始位点上游30-110bp的区域中,尽管最近已显示许多启动子在起始位点下游也包含功能元件。启动子元件之间的间隔通常是灵活的,使得当元件相对于彼此反转或移动时,启动子功能得以保留。在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间隔可在活性开始下降之前增加到相距50bp。取决于启动子,似乎单个元件可以协同地或独立地起作用以激活转录。

[0176] 启动子的实例是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是能够驱动与其可操作地连接的任何多核苷酸序列的高水平表达的强组成型启动子序列。然而,还可以使用其他组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、埃-巴二氏病毒立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、延伸因子-1α启动子以及人类基因启动子,比如,但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。此外,本发明不应限于组成型启动子的使用。诱导型启动子也被认为是本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了一种分子开关,该分子开关能够开启多核苷酸序列的表达,当期望这种表达时,它可以可操作地连接,或者在不期望表达时关闭表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫氨酸(metallothionine)启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。在一些实施方式中,诱导型启动子响应于细胞外配体而被激活。例如,在一些实施方式中,诱导型启动子通过结合至合成受体的细胞外配体被激活(并调节CAAR的表达)。例如,在一些实施方式中,可以将合成受体,例如合成Notch受体(即“synNotch”)用作结合触发的转录开关,当其与其配体结合时,其激活与编码CAAR的核酸序列可操作地连接的启动子。因此,作为非限制性实例,这种系统可能需要存在配体(例如,与synNotch结合),以使免疫细胞对BCR或自身抗体(例如,与CAAR结合)进行应答。需要在分子电路中生成某些信号输出的特定组合导致逻辑门。参见,例如,Roybal等人,2016Cell 164(4):770-9。

[0177] 用于表达或调节嵌合受体表达的其他系统的实例包括在Wu等人,(2015)Science 350:aab4077;Fedorov等人,(2014)Cancer Journal 20:160-165;Kloss等人,(2013)Nature Biotechnology 31:71-75;Sakemura等人,(2016)Cancer Immunol.Res.4:658-668;Hill等人,(2018)Nature Chemical Biology 14:112-117;Di Stasi等人,(2011)N.Engl.J.Med.365:1673-1683;Budde等人,(2013)PLoS One 8:e82742;Wei等人,(2012)Nature 488:384-388;Ma等人,(2016)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 113:E450-458;Rodgers等人,(2016)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 113:E459-468;Kudo等人,(2014)Cancer Res.74:93-103和Chen等人,(2010)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 107,8531-8536中描述的那些。

[0178] 可以使用免疫印迹、免疫组织化学、流式细胞术或本领域熟知和可获得的其他技术来验证CAAR蛋白的表达。在优选的实施方式中，通过流式细胞术验证CAAR的表达。为了评估CAAR多肽或其部分的表达，要引入细胞中的表达载体还可以包含选择标志物基因或报道基因或两者，以促进从试图通过病毒载体转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在其他方面，选择标志物可以携带在分开的DNA片段上，并用于共转染程序中。选择标志物和报道基因的侧翼都可以带有合适的调控序列，以使其能够在宿主细胞中表达。有用的选择标志物包括例如抗生素抗性基因，例如新基因(neo)等。

[0179] 报道基因用于鉴定潜在转染的细胞并且用于评估调控序列的功能。通常，报道基因是在受体生物体或组织中不存在或不表达并编码多肽的基因，该多肽的表达通过一些易于检测的特性例如酶活性来体现的基因。在将DNA引入受体细胞后的适当时间评估报道基因的表达。合适的报道基因可以包括编码荧光素酶、β-半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌的碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因(例如，Ui-Tei等人，2000 FEBS Letters 479：79-82)。合适的表达系统是众所周知的，并且可以使用已知技术制备或从商业上获得。通常，将显示最高水平的报道基因表达的具有最小5'侧翼区的构建体鉴定为启动子。这样的启动子区域可以与报道基因连接，并用于评估试剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0180] 将基因导入细胞中并在细胞中表达的方法是本领域已知的。在表达载体的情况下，可以通过本领域中的任何方法将载体容易地引入宿主细胞，例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞中。例如，表达载体可以通过物理、化学或生物学手段转移到宿主细胞中。

[0181] 用于将多核苷酸引入宿主细胞中的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。产生包括载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域众所周知的。参见，例如，Sambrook等人，2012，MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL，第1-4卷，Cold Spring Harbor Press，NY。

[0182] 用于将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞中的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。RNA载体包括具有RNA启动子和/或用于产生RNA转录体的其他相关结构域的载体。病毒载体，并且特别是逆转录病毒载体，已成为用于将基因插入哺乳动物例如人细胞中的最广泛使用的方法。其他病毒载体可以源自慢病毒、痘病毒、单纯性疱疹病毒、腺病毒和腺伴随病毒等。参见，例如，美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0183] 用于将多核苷酸引入宿主细胞中的化学方法包括胶体分散系统，例如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠子和基于脂质的系统，该系统包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。在体外和体内用作递送媒介的示例性胶体系统是脂质体(例如人造膜囊泡)。

[0184] 在使用非病毒递送系统的情况下，示例性的递送媒介是脂质体。考虑使用脂质制剂将核酸引入宿主细胞中(体外、离体或体内)。在另一方面中，核酸可以与脂质缔合。可以将与脂质缔合的核酸封装在脂质体的水性内部中、散布在脂质体的脂质双层中、通过与脂质体和寡核苷酸二者都结合的连接分子与脂质体连接、捕获在脂质体中、与脂质体复合、散布在含有脂质的溶液中、与脂质混合、与脂质结合、作为悬浮液包含在脂质中、与胶束一起包含或复合或以其他方式与脂质缔合。与脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体缔合的组合物不限于溶液中的任何具体结构。例如，它们可以双层结构、胶束或“塌陷”结构存在。它们也可以简单地散布在溶液中，可能形成大小或形状不均匀的聚集体。脂质是脂肪物质，其可以是天然存在的或合成的脂质。例如，脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪滴(fatty droplet)

以及包含长链脂族烃及其衍生物比如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛的一类化合物。

[0185] 可以从商业来源获得适合使用的脂质。例如，二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)可以从Sigma,St.Louis,MO获得；磷酸二鲸蜡酯(“DCP”)可从K&K Laboratories(Plainview,NY)获得；胆固醇(“Choi”)可从Calbiochem-Behring获得；二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)和其他脂质可以从Avanti Polar Lipids,Inc.(Birmingham,AL.)获得。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的储备溶液可以在-20℃下存储。氯仿用作唯一的溶剂，因为它比甲醇更容易蒸发。“脂质体”是通用术语，涵盖通过产生封闭的脂质双层或聚集体而形成的各种单层和多层脂质媒介。脂质体可以被表征为具有带有磷脂质双层膜和内部水性介质的囊泡结构。多层脂质体具有被水性介质分开的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时，它们会自发形成。脂质组分在形成闭合结构之前经历自我重排，并在脂质双层之间捕获水和溶解的溶质(Ghosh等人，1991Glycobiology 5:505-10)。然而，还包括在溶液中具有与正常囊泡结构不同的结构的组合物。例如，脂质可以设想为胶束结构或仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。还考虑了脂质转染胺-核酸复合物。

[0186] CAAR、载体和启动子的任何结构域和/或片段可以是通过PCR或本领域已知的任何其他手段扩增的合成基因片段。

[0187] 包括CAAR的细胞

[0188] 在另一方面中，本发明包括包含本文公开的MUSK嵌合自身抗体受体(CAAR)的基因修饰的细胞。

[0189] 在另一个实施方式中，基因修饰的细胞表达MUSK CAAR。在该实施方式中，该细胞对B细胞上或对已经分化为浆细胞的B细胞上的基于MUSK自身抗体的B细胞受体(BCR)具有高亲和力。结果，基因修饰的细胞可以诱导抗MUSK B细胞的直接杀伤或表达MUSK自身抗体的浆细胞的间接杀伤。在又一个实施方式中，基因修饰的细胞对与Fc受体结合的抗体具有低亲和力。

[0190] 在一个实施方式中，基因修饰的细胞为T细胞，比如辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、γδT细胞、天然杀伤细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞、其细胞系、T记忆干细胞或其他T效应细胞。对健康细胞具有有限的毒性以及对表达自身抗体的细胞具有特异性的T细胞也是有用的。这样的特异性防止或减少了在对自身抗体不具有特异性的当前疗法中普遍存在的脱靶毒性。在一个实施方式中，T细胞对健康细胞具有有限的毒性。在一个实施方式中，T细胞是自体细胞。在另一个实施方式中，T细胞是同种异体的细胞。

[0191] 在一些实施方式中，本发明包括源自体外分化的多能干细胞的基因修饰的免疫细胞。在其他实施方式中，本发明包括T细胞，比如原代细胞、源自原代T细胞的扩增T细胞、源自体外分化的干细胞的T细胞、T细胞系比如Jurkat细胞、其他来源的T细胞、其组合以及其他效应细胞。例如，具有NFAT应答元件接着是GFP的转导的Jurkat细胞系可用于检测和分离MUSK特异性B细胞，并以全面且公正的方式克隆MUSK特异性抗体库。相互作用的B细胞和Jurkat细胞可以检测为GFP阳性二联体或多聚体，并通过流式细胞术进行分类。编码B细胞受体的基因的表达克隆将提供有关自身抗体介导的神经肌肉接点(NMJ)疾病，比如重症肌无力(MG)中自身免疫性和自身抗体如何发展的进一步信息。

[0192] 可以在Jurkat报道细胞系中评估CAAR结合自身抗体和血清例如，但不限于MG血清的功能能力，这取决于CAAR通过结合至自身抗体来激活(激活的细胞由于其中包含NFAT-

GFP报道基因构建体而发出绿色荧光)。这样的方法对于功能结合能力是有用且可靠的定性措施。细胞表面上自身抗原的正确加工也是重要的,并且可以使用单克隆抗体进行测量。此外,基于主要疾病表位的MUSK的截短或突变也是有用的并且包括在本文中。使用不同长度的铰链区的截短形式也是有用的。关于安全性,优选防止或减少转导的细胞之间或对神经肌肉接点的可能亲同种抗原和异嗜性相互作用以及激活(例如MuSK-LRP4)。

[0193] 例如,可以对CAAR的效力和安全性进行进一步评估,如下:

[0194] 可以将构建体瞬时转染到人类细胞比如293T/17中。表面表达可用单克隆抗体(IgG或ScFv)检测,该单克隆抗体对上述细胞外结构域(Ig1、Ig2、Ig3、Fz(Ig-样结构域和卷曲的结构域))、结构域之间的接头或CAAR中包括的其他结构具有特异性。可以用特异性二抗验证结合,并通过流式细胞术定量。

[0195] 任何同种型的人抗MUSK抗体的膜表达构建体的生产都可以用作测试不同的MUSK-CAAR的靶细胞。通过在细胞系(例如Nalm6或K562细胞)的表面上表达人单克隆抗体,可以根据需要产生另外的靶细胞系。

[0196] 自身免疫性疾病

[0197] 本发明还提供了在自身抗体介导的神经肌肉接点(NMJ)疾病的背景下预防、治疗和/或控制与表达自身抗体的细胞相关的病症或自身免疫疾病的方法。该方法包括向有需要的受试者施用包括与表达自身抗体的细胞结合的本发明的CAAR的基因修饰的细胞,例如T细胞。一方面,受试者是人。自身抗体介导的NMJ疾病的非限制性实例包括但不限于重症肌无力(MG)。

[0198] 相对于要接受治疗的受试者,待施用的本发明的细胞可以是自体的、同种异体的或异种异体的。在治疗方法中,可以修饰从受试者分离的细胞,例如T细胞以表达合适的CAAR,离体扩增,并且然后重新注入相同的受试者中(例如,细胞是自体细胞)。在一些实施方式中,将细胞,例如T细胞重新输注到与原始细胞的供体不同的受试者中(例如,细胞是同种异体的细胞)。修饰的细胞,例如T细胞识别靶细胞,比如产生MUSK自身抗体的B细胞或浆细胞,并且被激活,导致自身免疫靶细胞被杀死。

[0199] 自身免疫性疾病患者例如MG患者也可能发生复发。在用药物(例如,强的松或利妥昔单抗)治疗的患者中,复发可能由相同自身抗体B细胞克隆的持续存在(persistence)介导,而缓解与这些克隆的消失有关。通过注入MUSK CAAR细胞,例如T细胞,自身免疫细胞被耗尽以诱导长期缓解,这可能是由于MUSK CAAR细胞,例如T细胞的寿命长(longevity)和/或自身抗原反应性克隆未再出现。

[0200] 为了在体外、原位或体内监测表达MUSK CAAR的细胞,MUSK CAAR细胞可以进一步表达可检测的标志物。当MUSK CAAR结合靶标时,可检测的标志物被激活并表达,这可以通过本领域已知的测定法比如流式细胞术进行检测。在一个实施方式中,MUSK CAAR包括NFAT应答元件和可检测标志物,例如绿色荧光蛋白(GFP),以检测和定量表达MUSK CAAR的细胞。

[0201] T细胞的来源

[0202] 在基因修饰和/或扩增之前,从受试者获得T细胞(例如自体或同种异体的T细胞)。受试者的实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。T细胞可从多种来源获得,包括皮肤、外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、感染部位的组织、腹水、胸腔积液和脾组织。在本发明的某些实施方式中,可以使用本领域可获得的任何数量的T细胞系。

在本发明的某些实施方式中，可以使用本领域技术人员已知的多种技术，例如Ficoll TM分离，从受试者收集的单位血液中获得T细胞。在一个优选的实施方式中，通过单采血液成分法(apheresis)从个体的循环血液中获得细胞。单采血液成分法产物通常包含淋巴细胞，其包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他成核白细胞、红细胞和血小板。在一个实施方式中，可以洗涤通过单采血液成分法收集的细胞以除去血浆部分并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中以用于随后的加工步骤。在本发明的一个实施方式中，将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在可替代的实施方式中，洗涤溶液缺少钙，并且可能缺少镁，或者可能缺少许多(如果不是全部的话)二价阳离子。再次，令人惊讶地，在不存在钙的情况下的初始激活步骤导致放大的激活。如本领域普通技术人员将容易理解的，洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法来完成，比如按照制造商的说明通过使用半自动“流通式”离心机(例如Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)。在洗涤后，可将细胞重悬于多种生物相容的缓冲液中，诸如例如无钙、无镁的PBS，浆细胞A(PlasmaLyte A)或其他含或不含缓冲液的盐溶液。可替代地，可以去除单采血液成分法样品的不良成分，并将细胞直接重悬浮在培养基中。

[0203] 在另一个实施方式中，例如通过PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘析，通过裂解红细胞并消耗单核细胞从外周血淋巴细胞分离T细胞。可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离T细胞的特定亚群，例如$CD3^+$、$CD28^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD45RA^+$和$CD45RO^+$T细胞。例如，在一个实施方式中，通过与抗CD3/抗CD28(即3x28)缀合珠子，比如DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T一起温育足以阳性选择期望的T细胞的时间段来分离T细胞。在一个实施方式中，该时间段是大约30分钟。在进一步的实施方式中，该时间段的范围是从30分钟到36小时或更长，以及介于其间的所有整数值。在进一步的实施方式中，该时间段是至少1、2、3、4、5或6小时。在又另一个优选的实施方式中，该时间段是10至24小时。在一个优选的实施方式中，温育时间段是24小时。对于一些患者，使用更长的温育时间(比如24小时)可以提高细胞产量。在与其他细胞类型相比T细胞很少的任何情况下，可以使用更长的温育时间来分离T细胞，比如从免疫低下个体分离T细胞。此外，使用更长的温育时间可以提高捕获CD8+T细胞的效率。因此，通过简单地缩短或延长允许T细胞结合CD3/CD28珠子的时间和/或通过增加或降低珠子与T细胞的比例(如本文进一步所述)，可以在培养初始时或过程中的其他时间点对于(for)或针对(against)T细胞的亚群优先选择。另外，通过增加或降低珠子或其他表面上的抗CD3和/或抗CD28抗体的比例，可以在培养初始时或在其他期望的时间点对于或针对T细胞的亚群优先选择。技术人员将认识到，在本发明的背景中还可以使用多轮选择。在某些实施方式中，可能期望执行选择过程并在激活和扩增过程中使用“未选择”的细胞。“未选择”的细胞也可以经历下一轮的选择。

[0204] 通过阴性选择富集T细胞群可以通过针对阴性选择细胞特有的表面标志物的抗体组合来完成。一种方法是经由负磁免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择，其使用针对存在于阴性选择的细胞上的细胞表面标志物的单克隆抗体混合物(cocktail)。例如，为了通过阴性选择富集$CD4^+$细胞，单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些实施方式中，可能需要富集或阳性选择通常表达$CD4^+$、$CD25^+$、$CD62L^+$、$GITR^+$和$FoxP3^+$的调节性T细胞。可替代地，在某些实施方式中，T调节性细胞被抗CD25缀合的珠子或其他类似的选择方法耗尽。在其他实施方式中，T细胞的亚群，比如，

但不限于可以通过阳性或阴性选择技术分离的阳性或表达高水平的一种或多种表面标志物的细胞，例如，CD28+、CD8+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD45RA+和/或CD45RO+T细胞。

[0205] 为了通过阳性或阴性选择分离期望的细胞群，可以改变细胞和表面(例如，颗粒比如珠子)的浓度。在某些实施方式中，可能期望的是显著减小珠子和细胞混合在一起的体积(即，增加细胞的浓度)，以确保细胞和珠子的最大接触。例如，在一个实施方式中，使用了20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施方式中，使用10亿个细胞/ml的浓度。在进一步的实施方式中，使用大于1亿个细胞/ml。在另一个实施方式中，使用的细胞浓度为1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/ml。在又另一个实施方式中，使用7500、8000、8500、9000、9500万个或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方式中，可以使用1.25或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可以导致增加的细胞产量、细胞激活和细胞扩增。此外，使用高细胞浓度允许更有效地捕获可能弱表达感兴趣的靶抗原的细胞比如CD28阴性T细胞。这样的细胞群可能具有治疗价值并且将是期望获得的。例如，使用高浓度的细胞可以更有效地选择通常具有较弱的CD28表达的$CD8^+$T细胞。

[0206] 在相关的实施方式中，可能期望的是使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面(例如颗粒，比如珠子)的混合物，颗粒和细胞之间的相互作用被最小化。这选择了表达待结合至颗粒的大量的期望抗原的细胞。例如，在稀释浓度下，$CD4^+$T细胞比$CD8^+$T细胞表达更高水平的CD28，并且更有效地被捕获。在一个实施方式中，所使用的细胞浓度为5×10^6/ml。在其他实施方式中，所使用的浓度可以为约1×10^5/ml至1×10^6/ml，和其间的任何整数值。

[0207] 在其他实施方式中，可以在2-10℃或在室温下在旋转器上以不同的速度将细胞温育不同的时间长度。

[0208] 用于刺激的T细胞还可以在洗涤步骤后冷冻。希望不受理论的束缚，冷冻和随后的解冻步骤通过去除细胞群中的粒细胞和某种程度上的单核细胞而提供了更均匀的产物。在去除血浆和血小板的洗涤步骤之后，可以将细胞悬浮在冷冻溶液中。尽管许多冷冻溶液和参数是本领域已知的，并且在此背景下将是有用的，一种方法涉及使用包含20％DMSO和8％人血清白蛋白的PBS、或包含10％葡聚糖40和5％葡萄糖的培养基、20％人血清白蛋白和7.5％DMSO或31.25％浆细胞-A、31.25％葡萄糖5％、0.45％NaCl、10％葡聚糖40和5％葡萄糖、20％人血清白蛋白和7.5％DMSO或含有例如羟乙基淀粉(Hespan)和浆细胞A的其他合适的细胞冷冻培养基，然后将细胞以每分钟1℃的速度冷冻至-80℃，并储存在液氮储罐的气相中。可以使用其他控制冷冻的方法，以及在-20℃或在液氮中立即进行非控制冷冻。

[0209] 在某些实施方式中，如本文所述将冷冻保存的细胞解冻并洗涤，并在使用本发明的方法激活之前使其在室温下静置一小时。

[0210] 在本发明的背景中还考虑了在可能需要如本文所述的扩增细胞之前的时间段收集来自受试者的血液样品或单采血液成分法产物。这样，可以在任何必要的时间点收集待扩增细胞的来源，并将期望的细胞比如T细胞分离并冷冻，以用于以后的T细胞疗法中，用于受益于T细胞疗法的多种疾病或病症，比如本文描述的那些。在一个实施方式中，血液样品或单采血液成分法是从总体健康的受试者中获取的。在某些实施方式中，血液样品或单采血液成分法从具有发展为疾病的风险但尚未发展为疾病的总体健康的受试者中获取，并分离和冷冻感兴趣的细胞以备后用。在某些实施方式中，可以将T细胞扩增、冷冻并在以后使

用。在某些实施方式中，在如本文所述诊断特定疾病之后不久但在任何治疗之前从患者收集样品。在进一步的实施方式中，在许多相关治疗方式之前，从受试者的血样或单采血液成分法中分离细胞，包括但不限于用以下试剂处理，比如，但不限于利妥昔单抗或其他抗CD20或抗CD19剂、抗FcRn剂、Btk抑制剂、血浆置换疗法(plasmapheresis)、皮质类固醇、霉酚酸酯、咪唑硫嘌呤、甲氨蝶呤、环孢霉素、环磷酰胺。这些药物可抑制钙依赖性磷酸酶钙调磷酸酶(环孢霉素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导重要的p70S6激酶(雷帕霉素)。(Liu等人，Cell 66:807-815,1991;Henderson等人，Immun.73:316-321,1991;Bierer等人，Curr.Opin.Immun.5:763-773,1993)。在进一步的实施方式中，分离出患者的细胞，并且被冷冻，之后与烧蚀疗法比如氟达拉滨、外束放射疗法(XRT)、环磷酰胺或抗体比如OKT3或CAMPATH结合(例如，在此之前或同时)使用。在另一个实施方式中，细胞先被分离并且可以被冷冻以用于在B细胞消融疗法例如利妥昔单抗之后的以后治疗。

[0211] 在本发明的另一个实施方式中，在治疗后直接从患者获得T细胞。在这方面，已经观察到，在某些癌症治疗之后，特别是在损害免疫系统的药物治疗之后，在患者通常会从治疗中恢复的时期内治疗后不久，获得的T细胞的质量可能是最佳的或提高了其离体扩增的能力。同样，在使用本文描述的方法进行离体操作后，这些细胞可以处于增强移植和体内扩增的优选状态。因此，预期在本发明的背景中在该恢复阶段期间收集血细胞，包括T细胞、树突细胞或造血谱系的其他细胞。此外，在某些实施方式中，活动化(mobilization)(例如，用GM-CSF活动化)和调理方案可用于在受试者中产生其中特定细胞类型的再增、再循环、再生和/或扩增是有利的状态，特别是在治疗后限定的时间窗口内。示例性的细胞类型包括T细胞、B细胞、树突细胞和免疫系统的其他细胞。

[0212] T细胞的激活和扩增

[0213] 在一些实施方式中，使用例如在美国专利6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;和美国专利申请公开号20060121005中描述的方法激活和扩增T细胞。在其他实施方式中，T细胞被激活但未扩增，或者在使用前既未被激活也不被扩增。

[0214] 当被激活和扩增时，本发明的T细胞通常通过与其上附着有刺激CD3/TCR复合物相关信号的试剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体的表面接触而扩增。特别地，可以如本文所描述的刺激T细胞群，例如通过与抗CD3抗体或其抗原结合片段或固定在表面上的抗CD2抗体接触，或者通过与结合钙离子载体的蛋白激酶C激活剂(例如，苔藓抑素)接触。为了共同刺激T细胞表面上的辅助分子，使用结合辅助分子的配体。例如，可以在适于刺激T细胞增殖的条件下使T细胞群与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激$CD4^+$T细胞或$CD8^+$T细胞的增殖，抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone，Besançon，法国)，其可用作本领域通常已知的其他方法(Berg等人，Transplant Proc.30(8):3975-3977,1998;Haanen等人，J.Exp.Med.190(9):13191328,1999;Garland等人，J.Immunol Meth.227(1-2):53-63,1999)。

[0215] 在某些实施方式中，可以通过不同的方案提供T细胞的初级刺激信号和共刺激信号。例如，提供每个信号的试剂可以在溶液中或者偶联至表面。当偶联至表面时，试剂可以偶联至相同的表面(即，以“顺式”形式)或偶联至分开的表面(即，以“反式”形式)。可替代

地，可以将一种试剂偶联至表面，而将另一种试剂偶联至溶液中。在一个实施方式中，提供共刺激信号的试剂与细胞表面结合，并且提供初级激活信号的试剂在溶液中或偶联至表面。在某些实施方式中，两种试剂都可以在溶液中。在另一个实施方式中，试剂可以是可溶形式，并且然后交联到表面，比如表达Fc受体的细胞或将结合试剂的抗体或其他结合剂。在这方面，参见例如美国专利申请公开号20040101519和20060034810的人工抗原呈递细胞(aAPC)，预期该人工抗原呈递细胞用于激活和扩增本发明中的T细胞。

[0216] 在一个实施方式中，将两种试剂固定在珠子上，或者固定在同一珠子上，即“顺式”，或者分开的珠子上，即“反式”。例如，提供初级激活信号的试剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段，并且提供共刺激信号的试剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段；并将两种试剂以等价的分子量共同固定在同一珠子上。在一个实施方式中，针对$CD8^+$T细胞扩增和T细胞生长，使用1:1比例的与珠子结合的每种抗体。在一个实施方式中，针对$CD4^+$T细胞扩增和T细胞生长，使用1:1比例的与珠子结合的每种抗体。在本发明的某些方面中，使用与珠子结合的抗CD3:CD28抗体的比例，使得与使用1:1的比例观察到的扩增相比，观察到T细胞扩增的增加。在一个具体实施方式中，与使用1∶1的比例观察到的扩增相比，观察到约1至约3倍的增加。在一个实施方式中，CD3:CD28抗体与珠子结合的比例在100:1至1:100的范围内，以及其间的所有整数值。在本发明的一方面中，与抗CD3抗体相比，更多的抗CD28抗体与颗粒结合，即，CD3∶CD28的比例小于1。在本发明的某些实施方式中，与珠子结合的抗CD28抗体与抗CD3抗体的比例大于2:1。在一个具体实施方式中，使用比例为1:100的与珠子结合的抗体CD3:CD28。在进一步的实施方式中，使用比例为1:75的与珠子结合的抗体CD3:CD28。在进一步的实施方式中，使用比例为1:50的与珠子结合的抗体CD3:CD28。在另一个实施方式中，使用比例为1∶30的与珠子结合的抗体CD30∶CD28。在一个优选的实施方式中，使用比例为1∶10的与珠子结合的抗体CD3∶CD28。在另一个实施方式中，使用比例为1:3的与珠子结合的抗体CD3:CD28。在又另一个实施方式中，使用比例为3∶1的与珠子结合的抗体CD3∶CD28。

[0217] 比例为1:500至500:1以及在两者之间的任何整数值的颗粒与细胞可用于刺激T细胞或其他靶细胞。如本领域普通技术人员可以容易地理解的，颗粒与细胞的比例可以取决于相对于靶细胞的粒径。例如，小尺寸的珠子只能结合几个细胞，而大珠子可以结合许多细胞。在某些实施方式中，比例为1:100至100:1和在其间的任何整数值；和在进一步的实施方式中，比例为1:9至9:1和其间的任何整数值的细胞与颗粒也可用于刺激T细胞。如上所述，导致T细胞刺激的抗CD3和抗CD28偶联颗粒与T细胞的比例可以变化，然而，某些优选值包括1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1和15:1，一个优选的比例是颗粒与T细胞为至少1:1。在一个实施方式中，使用的颗粒与细胞的比例为1:1或更小。在一个具体实施方式中，优选的颗粒:细胞比例为1:5。在进一步的实施方式中，颗粒与细胞的比例可以根据刺激日期而变化。例如，在一个实施方式中，第一天颗粒与细胞的比例为1:1至10:1，并且之后每天或每隔一天将另外的颗粒以1:1到1:10(基于添加当天的细胞计数)的最终比例添加到细胞中，最多10天。在一个具体实施方式中，在刺激的第一天颗粒与细胞的比例为1:1，并且在刺激的第三天和第五天将其调整为1:5。在另一个实施方式中，基于每天或每隔一天添加颗粒，在刺激的第一天至1:1的最终比例，而在刺激的第三天和第五天至1:5的最终比例。在另一个实施方式中，颗粒与细胞的比例在刺激的第一天为2:1，并且在刺激的第三天和第五天调整为1:

10。在另一个实施方式中，基于每天或每隔一天添加颗粒，在刺激的第一天至1:1的最终比例，而在刺激的第三天和第五天至1:10的最终比例。本领域技术人员将认识到，各种其他比例可能适用于本发明。具体地，比例将根据颗粒大小以及细胞大小和类型而变化。

[0218] 在本发明的进一步的实施方式中，将细胞，比如T细胞与包被有试剂的珠子组合，随后分离珠子和细胞，并且然后培养细胞。在可选的实施方式中，在培养之前，不分离包被有试剂的珠子和细胞，而是在一起培养。在进一步的实施方式中，首先通过施加力比如磁力来浓缩珠子和细胞，从而导致细胞表面标志物的连接增加，从而诱导细胞刺激。

[0219] 举例来说，可以通过使附着有抗CD3和抗CD28的顺磁珠子(3×28珠子)接触T细胞来连接细胞表面蛋白。在一个实施方式中，将细胞(例如，10^4至10^9个T细胞)和珠子(例如，比例为1:1的DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T顺磁性珠子)在缓冲液，例如PBS(不含二价阳离子，比如钙和镁)中组合。此外，本领域普通技术人员可以容易地认识到可以使用任何细胞浓度。例如，靶细胞在样品中可能非常稀少，并且仅占样品的0.01％，或者整个样品(即100％)可以包括感兴趣的靶细胞。因此，任何细胞数目都在本发明的背景内。在某些实施方式中，可能期望的是显著减小颗粒和细胞混合在一起的体积(即，增加细胞的浓度)，以确保细胞和颗粒的最大接触。例如，在一个实施方式中，使用约20亿个细胞/ml的浓度。在另一个实施方式中，使用大于1亿个细胞/ml。在进一步的实施方式中，使用1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在又另一个实施方式中，使用7500、8000、8500、9000、9500万个或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方式中，可以使用1.25或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可导致增加的细胞产量、细胞激活和细胞扩增。此外，使用高细胞浓度可以更有效地捕获可能弱表达感兴趣的靶抗原的细胞，例如CD28阴性T细胞。这样的细胞群可能具有治疗价值，并且在某些实施方式中是期望的。例如，使用高浓度的细胞可以更有效地选择通常具有较弱的CD28表达的CD8+T细胞。

[0220] 在本发明的一个实施方式中，可将混合物培养数小时(约3小时)至约14天或介于两者之间的任何小时整数值。在另一个实施方式中，可以将混合物培养21天。在本发明的一个实施方式中，将珠子和T细胞一起培养约八天。在另一个实施方式中，将珠子和T细胞一起培养2-3天。还可能期望若干刺激周期，以使T细胞的培养时间可以是60天或更长。适用于T细胞培养的条件包括适当的培养基(例如，最小必需培养基或RPMI培养基1640或，X-vivo 15，(Lonza))，该培养基可能包含增殖和活力所必需的因子，包括血清(例如，胎牛或人血清)、白细胞介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN-γ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGFβ和TNF-α或技术人员已知的用于细胞生长的任何其他添加剂。用于细胞生长的其他添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉和还原剂，比如N-乙酰基-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可以包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、α-MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20，Optimizer，添加氨基酸、丙酮酸钠和维生素，其为无血清或补充适量的血清(或血浆)或一组限定的激素，和/或足以使T细胞生长和扩增的一定量的细胞因子(一种或多种)。抗生素，例如青霉素和链霉素仅包括在实验培养物中，而未包括在要注入受试者的细胞培养物中。将靶细胞维持在支持生长所必需的条件下，例如合适的温度(例如37℃)和大气(例如空气加5％CO_2)。

[0221] 暴露于不同刺激时间的T细胞可能展现出不同的特征。例如，典型的血液或去血的(apheresed)外周血单核细胞产物具有的辅助T细胞群(T_H，$CD4^+$)大于细胞毒性或抑制性T细

胞群(TC,$CD8^+$)。通过刺激CD3和CD28受体进行T细胞的离体扩增产生T细胞群,在大约8-9天之前该细胞群主要由T_H细胞组成,而在大约8-9天之后,该T细胞群包括越来越多的T_C细胞。因此,取决于治疗的目的,向受试者输注主要包括T_C细胞或T_H细胞的T细胞群可能是有利的。类似地,如果已经分离了T_C细胞的抗原特异性亚组,则将该亚组更大程度地扩增可能是有益的。

[0222] 此外,除了CD4和CD8标志物外,其他表型标志物在细胞扩增过程中也有显著的变化,但大部分是可重复的。因此,这种再现性使得能够针对特定目的定制激活的T细胞产物。

[0223] 治疗应用

[0224] 在一方面中,本发明包括用于治疗受试者中自身抗体介导的NMJ疾病的方法。该方法包括:向受试者施用有效量的基因修饰的细胞,例如T细胞,该细胞包括编码嵌合自身抗体受体(CAAR)的多核苷酸——其中该多核苷酸编码肌肉特异性激酶(MuSK)自身抗原或其片段——以及任选地跨膜结构域、共刺激分子的细胞内结构域和/或信号传导结构域,从而治疗受试者中自身抗体介导的NMJ疾病。在一些实施方式中,该多核苷酸进一步编码KIR元件。

[0225] 在另一方面中,本发明包括用于预防或减少处于患自身抗体介导的NMJ疾病的风险中或患有自身抗体介导的NMJ疾病的受试者中的NMJ损伤的方法。该方法包括:向受试者施用有效量的基因修饰的细胞,例如,T细胞,该细胞包括编码CAAR的多核苷酸——其中该多核苷酸编码MuSK自身抗原或其片段——以及任选地跨膜结构域、共刺激分子的细胞内结构域和/或信号传导结构域,从而预防或减少受试者中的NMJ损伤。在一些实施方式中,多核苷酸进一步编码KIR元件。

[0226] 在一个实施方式中,自身抗体介导的NMJ疾病是重症肌无力(MG)。在另一个实施方式中,受试者是人。

[0227] 不希望受任何具体理论的束缚,由CAAR修饰的细胞,例如T细胞引起的抗自身抗体免疫应答可以是主动或被动的免疫应答。在另一个实施方式中,修饰的细胞,例如T细胞靶向B细胞。例如,表达自身抗体的B细胞可能易于被先前已与相邻表达自身抗体的细胞反应的CAAR重定向的细胞,例如T细胞间接破坏。

[0228] 在一个实施方式中,本发明的基因修饰的细胞,例如T细胞被完全人CAAR修饰。在一个实施方式中,完全人CAAR基因修饰的细胞,例如T细胞可以是用于哺乳动物的离体免疫和/或体内治疗的一种疫苗。在一个实施方式中,哺乳动物是人。

[0229] 关于离体免疫,在将细胞施用于哺乳动物之前在体外至少发生以下之一:i)细胞扩增,ii)将编码CAAR的多核苷酸引入细胞中,iii)冷冻保存所述细胞。

[0230] 离体方法在本领域中是众所周知的,并在下面更全面地讨论。简而言之,将细胞从哺乳动物(例如人)分离,并用表达本文公开的CAAR的载体遗传修饰(即体外转导或转染)。可以将CAAR修饰的细胞给予哺乳动物受体以提供治疗益处。哺乳动物受体可以是人类,并且相对于受体,CAAR修饰的细胞可以是自体的。可替代地,相对于受体,细胞可以是同种异体的、同基因的或异种异体的。

[0231] 可以将在美国专利号5,199,942(通过引用并入本文)中描述的离体扩增造血干细胞和祖细胞的方法应用于本发明的细胞。其他合适的方法是本领域已知的,因此本发明不限于细胞离体扩增的任何具体方法。简而言之,T细胞的离体培养和扩增包括:(1)从外周血

收获物或骨髓外植体中收集来自哺乳动物的CD34+造血干细胞和祖细胞;(2)离体扩增这类细胞。除了在美国专利号5,199,942中描述的细胞生长因子以外,可以使用其他因子比如flt3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体来培养和扩增细胞。

[0232] 除了在离体免疫方面使用基于细胞的疫苗之外,本发明还包括用于体内免疫以在患者中引发针对抗原的免疫应答的组合物和方法。

[0233] 通常,如本文所述激活和扩增的细胞可用于治疗和预防免疫受损的个体中出现的疾病。具体地,本发明的MUSK CAAR修饰的细胞,例如T细胞用于治疗与自身抗体表达相关的疾病、障碍和病症。在某些实施方式中,本发明的细胞用于治疗处于发展与自身抗体表达相关的自身免疫性NMJ疾病、障碍和病症的风险的患者。因此,本发明提供了用于治疗或预防与自身抗体(抗MUSK)表达相关的自身免疫性NMJ疾病、障碍和病症的方法,包括向需要其的受试者施用治疗有效量的本发明的CAAR修饰的细胞,例如T细胞。

[0234] 本发明的CAAR修饰的细胞,例如T细胞可以单独施用,或者作为药物组合物与稀释剂和/或与其他成分比如IL-2或其他细胞因子或细胞群组合施用。简而言之,本发明的药物组合物可以包括如本文所描述的靶细胞群,其与一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合。这样的组合物可以包括缓冲液,比如中性缓冲盐溶液、磷酸盐缓冲盐溶液等;碳水化合物,比如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸比如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,比如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。在一方面中,本发明的组合物被配制用于静脉内施用。

[0235] 本发明的药物组合物可以以适合于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。尽管合适的剂量可以通过临床试验确定,但是施用的量和频率将由患者的病情、患者疾病的类型和严重性等因素决定。

[0236] 当指示“免疫学有效量”、“抗自身抗体有效量”、“抗BCR有效量”、“自体免疫疾病抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本发明的组合物的精确量可以由医生考虑到年龄、体重以及患者(受试者)的病情的个体差异来确定。通常可以指出,包含本文所述的细胞,例如T细胞的药物组合物可以以10^4至10^9个细胞/kg体重,在一些情况下以10^5至10^6个细胞/kg体重的剂量施用,包括那些范围内的所有整数值。细胞,例如T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。可以通过使用免疫疗法中公知的输注技术来施用细胞(参见,例如,Rosenberg等人,New Eng.J.Med.319:1676,1988)。通过监测患者的疾病征兆并相应地调整治疗,医学领域的技术人员可以容易地确定针对特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0237] 在某些实施方式中,将激活的细胞,例如T细胞施用至受试者。在施用之后,使用本文描述的方法重新抽血,或进行单采血液成分法,并且激活细胞,例如T细胞和从其扩增,并且然后将其重新注入患者体内。该过程可以每几周进行多次。在某些实施方式中,可以从抽取的10cc至400cc的血液激活细胞,例如T细胞。在某些实施方式中,从抽取的20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的血液激活细胞,例如T细胞。不受理论的束缚,使用这种多次抽血/多次再输注方案可以挑选某些细胞群,例如T细胞群。

[0238] 相对于接受治疗的受试者,待施用的本发明的细胞可以是自体的、同种异体的或异种异体的。

[0239] 本发明细胞的施用可以使用任何方便的方式进行,包括通过气雾吸入、注射、吞咽、输血、植入或移植。本文所述的组合物可以经动脉、经皮下、皮内、结节内、髓内、肌肉内、

经静脉内(i.v.)注射或经腹膜内施用至患者。在一个实施方式中,本发明的细胞,例如T细胞组合物通过皮内或皮下注射施用至患者。在另一个实施方式中,通过静脉内注射施用本发明的细胞,例如T细胞组合物。细胞,例如T细胞的组合物可以直接注射到淋巴结中或病理生理活性部位。

[0240] 在本发明的某些实施方式中,结合(例如,在此之前、同时或在此之后)任何数量的相关治疗方式,向患者施用使用本文描述的方法或本领域已知的将T细胞扩增至治疗水平的其他方法激活和扩增的细胞,相关治疗方式包括但不限于用以下试剂治疗,比如抗病毒的疗法、西多福韦、白细胞介素-2、阿糖胞苷(也称为ARA-C)、利妥昔单抗(或任何其他广义B细胞消耗剂比如Btk抑制剂或其他抗CD20/CD19或B细胞靶向剂)和/或Soliris®(依库珠单抗、末端补体抑制剂)。在进一步的实施方式中,本发明的细胞,例如T细胞可以与抗FcRn抗体、IVIg或血浆置换联合使用,以便降低治疗前的抗MuSK抗体的浓度。在其他实施方式中,温和的淋巴清除方案(例如低剂量氟达拉滨或细胞毒素)可以在用本发明的细胞,例如T细胞治疗之前。

[0241] 待施用至患者的上述治疗的剂量将随所治疗病症的确切性质和治疗接受者而变化。可以根据本领域公认的实践来缩放用于人类施用的剂量。对于成年患者,例如,CAMPATH的剂量通常将在1至约100mg的范围内,通常每天施用,持续的时间段为1至30天。优选的每日剂量是每天1至10mg,尽管在一些情况下可以使用每天最多40mg的较小或较大剂量(在美国专利号6,120,766中描述)。

[0242] 实验实施例

[0243] 参考以下实验实施例进一步详细描述了本发明。提供这些实施例仅出于说明的目的,并且除非另有说明,否则它们不意图构成限制。因此,本发明决不应解释为限于以下实施例,而应解释为涵盖由于本文提供的教导而变得显而易见的任何和所有变型。

[0244] 无需进一步描述,相信本领域普通技术人员可以使用前面的描述和以下说明性实施例来制备和利用本发明的化合物并实践所要求保护的方法。因此,以下工作实施例具体指出了本发明的优选实施方式,并且不应解释为以任何方式限制本公开内容的其余部分。

[0245] 现在描述用于进行本文公开的实验的材料和方法。

[0246] -MuSK CAAR构建体(如图3A、4A和14中所图解)

[0247] 载体#1:pTRPE.MuSK$_{WT}$.BBz CAAR(核酸序列,SEQ ID NO:1)。

*ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGC*GGAT
CC**CTTCCAAAAGCTCCTGTCATCACCACTCCTCTTGAAACAGTGGATGCCTTAG**
TTGAAGAAGTGGCTACTTTCATGTGTGCAGTGGAATCCTACCCCCAGCCTGAGA
TTTCCTGGACTAGAAATAAAATTCTCATTAAACTCTTTGACACCCGGTACAGCAT
CCGGGAGAATGGGCAGCTCCTCACCATCCTGAGTGTGGAAGACAGTGATGATG
GCATTTACTGCTGCACGGCCAACAATGGTGTGGGAGGAGCTGTGGAGAGTTGT
GGAGCCCTGCAAGTGAAGATGAAACCTAAAATAACTCGCCCTCCCATAAATGTG
AAAATAATAGAGGGATTAAAAGCAGTCCTACCATGTACTACAATGGGTAATCCCA
AACCATCAGTGTCTTGGATAAAGGGAGACAGCCCTCTCAGGGAAAATTCCCGAA
TTGCAGTTCTTGAATCTGGGAGCTTGAGGATTCATAACGTACAAAAGGAAGATG
[0248] **CAGGACAGTATCGATGTGTGGCAAAAAACAGCCTCGGGACAGCATATTCCAAAG**
TGGTGAAGCTGGAAGTTGAGGTTTTTGCCAGGATTCTGCGGGCTCCTGAATCCC
ACAATGTCACCTTTGGCTCCTTTGTGACCCTGCACTGTACAGCAACAGGCATTC
CTGTCCCCACCATCACCTGGATTGAAAACGGAAATGCTGTTTCTTCTGGGTCCA
TTCAAGAGAGTGTGAAAGACCGAGTGATTGACTCAAGACTGCAGCTGTTTATCA
CCAAGCCAGGACTCTACACATGCATAGCTACCAATAAGCATGGGGAGAAGTTCA
GTACTGCCAAGGCTGCAGCCACCATCAGCATAGCAGAATGGAGTAAACCACAGA
AAGATAACAAAGGCTACTGCGCCCAGTACAGAGGGGAGGTGTGTAATGCAGTC
CTGGCAAAAGATGCTCTTGTTTTTCTCAACACCTCCTATGCGGACCCTGAGGAG
GCCCAAGAGCTACTGGTCCACACGGCCTGGAATGAACTGAAAGTAGTGAGCCC
AGTCTGCCGGCCAGCTGCTGAGGCTTTGTTGTGTAACCACATCTTCCAGGAGTG
CAGTCCTGGAGTAGTGCCTACTCCTATTCCCATTTGCAGAGAGTACTGCTTGGC
AGTAAAGGAGCTCTTCTGCGCAAAAGAATGGCTGGTAATGGAAGAGAAGACCC
ACAGAGGACTCTACAGATCCGAGATGCATTTGCTGTCCGTGCCAGAATGCAGCA
AGCTTCCCAGCATGCATTGGGACCCCACGGCCTGTGCCAGACTGCCACATCTAG
ATTATAACAAAGAAAACCTAAAAACATTCCCACCAATGACGTCCTCAAAGCCAA
GTGTGGACATTCCAAATCTGCCTTCCTCCTCCTCTTCTTCCTTCTCTGTCTCACC
TACATACTCCATGACTGCTAGCGGAGGTGGAGGTAGTGGCGGTGGAGGCAGCTCTG
GT**ATCTACATCTGGGCACCCTTGGCTGGAACATGCGGGGTCCTGCTGCTGAGCT**
[0249] **TGGTGATCACCCTTTACTGC**AAGCGCGGTCGCAAGAAACTGCTCTATATTTTTAAAC
AGCCATTCATGAGACCTGTCCAGACCACTCAAGAGGAGGACGGATGTTCCTGTAGAT
TTCCTGAAGAGGAAGAGGGGGGGTGCGAGCTG***AGAGTAAAGTTCAGTAGGTCCGCC***
GATGCCCCAGCCTATCAACAGGGGCAAAATCAACTCTACAACGAACTTAATCTGGGAC
GCCGAGAGGAGTACGATGTCTTGGATAAGAGACGCGGCAGGGACCCTGAAATGGGCG
GAAAGCCAAGACGGAAGAACCCCCAGGAAGGTCTGTACAATGAACTTCAGAAAGATAA
GATGGCCGAAGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAAGGAGAGAGGCGCCGCGGCAAAGG
GCATGATGGACTGTATCAGGGTCTCAGTACTGCTACTAAGGACACATATGATGCCCTCC
ACATGCAGGCCCTGCCACCAAGGTGA (SEQ ID NO: 1)

[0250] IgG信号肽:1-57(SEQ ID NO:2)

[0251] MuSK ECD:64-1479(SEQ ID NO:3)

[0252] GS 接头(密码子优化的):1486-1515(SEQ ID NO:4)

[0253] **CD8 TMD (密码子优化的)**:1522-1593(SEQ ID NO:5)

[0254] 4-1BB 结构域(密码子优化的): 1594-1719 (SEQ ID NO: 7)

[0255] CD3ζ结构域(密码子优化的):1720-2055(SEQ ID NO:8)

[0256] 终止密码子:2056-2058

[0257] 载体#1:pTRPE.MuSK$_{WT}$.BBz CAAR(氨基酸序列,SEQ ID NO:9)。

[0258] *MEFGLSWLFLVAILKGVQC*GS**LPKAPVITTPLETVDALVEEVATFMCAVESYPQPEISW TRNKILIKLFDTRYSIRENGQLLTILSVEDSDDGIYCCTANNGVGGAVESCGALQVK MKPKITRPPINVKIIEGLKAVLPCTTMGNPKPSVSWIKGDSPLRENSRIAVLESGSLRI HNVQKEDAGQYRCVAKNSLGTAYSKVVKLEVEVFARILRAPESHNVTFGSFVTLHC TATGIPVPTITWIENGNAVSSGSIQESVKDRVIDSRLQLFITKPGLYTCIATNKHGEKF STAKAAATISIAEWSKPQKDNKGYCAQYRGEVCNAVLAKDALVFLNTSYADPEEAQ ELLVHTAWNELKVVSPVCRPAAEALLCNHIFQECSPGVVPTPIPICREYCLAVKELFC AKEWLVMEEKTHRGLYRSEMHLLSVPECSKLPSMHWDPTACARLPHLDYNKENL KTFPPMTSSKPSVDIPNLPSSSSSSFSVSPTYSMT**ASGGGGSGGGGSSGIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYC**KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL***RVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*** (SEQ ID NO: 9)

[0259]

[0260] IgG信号肽:1-19(SEQ ID NO:10)

[0261] MuSK ECD:22-493(SEQ ID NO:11)

[0262] GS 接头:496-505(SEQ ID NO:12)

[0263] **CD8 TMD**:508-531(SEQ ID NO:13)

[0264] 4-1BB 结构域: 532-573 (SEQ ID NO: 14)

[0265] CD3ζ结构域:574-685(SEQ ID NO:15)

[0266] 载体#2:pTRPE.MuSK$_{WT}$.BBz CAAR核苷酸序列(核酸序列,SEQ ID NO:16)

*ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGC*GGAT
CC**CTTCCAAAAGCTCCTGTCATCACCACTCCTCTTGAAACAGTGGATGCCTTAG**
TTGAAGAAGTGGCTACTTTCATGTGTGCAGTGGAATCCTACCCCCAGCCTGAGA
TTTCCTGGACTAGAAATAAAATTCTCATTAAACTCTTTGACACCCGGTACAGCAT
CCGGGAGAATGGGCAGCTCCTCACCATCCTGAGTGTGGAAGACAGTGATGATG
GCATTTACTGCTGCACGGCCAACAATGGTGTGGGAGGAGCTGTGGAGAGTTGT
GGAGCCCTGCAAGTGAAGATGAAACCTAAAATAACTCGCCCTCCCATAAATGTG
AAAATAATAGAGGGATTAAAAGCAGTCCTACCATGTACTACAATGGGTAATCCCA
AACCATCAGTGTCTTGGATAAAGGGAGACAGCCCTCTCAGGGAAAATTCCCGAA
TTGCAGTTCTTGAATCTGGGAGCTTGAGGATTCATAACGTACAAAAGGAAGATG
CAGGACAGTATCGATGTGTGGCAAAAAACAGCCTCGGGACAGCATATTCCAAAG
TGGTGAAGCTGGAAGTTGAGGTTTTTGCCAGGATTCTGCGGGCTCCTGAATCCC
ACAATGTCACCTTTGGCTCCTTTGTGACCCTGCACTGTACAGCAACAGGCATTC
CTGTCCCCACCATCACCTGGATTGAAAACGGAAATGCTGTTTCTTCTGGGTCCA
[0267] **TTCAAGAGAGTGTGAAAGACCGAGTGATTGACTCAAGACTGCAGCTGTTTATCA**
CCAAGCCAGGACTCTACACATGCATAGCTACCAATAAGCATGGGGAGAAGTTCA
GTACTGCCAAGGCTGCAGCCACCATCAGCATAGCAGAATGGAGTAAACCACAGA
AAGATAACAAAGGCTACTGCGCCCAGTACAGAGGGGAGGTGTGTAATGCAGTC
CTGGCAAAAGATGCTCTTGTTTTTCTCAACACCTCCTATGCGGACCCTGAGGAG
GCCCAAGAGCTACTGGTCCACACGGCCTGGAATGAACTGAAAGTAGTGAGCCC
AGTCTGCCGGCCAGCTGCTGAGGCTTTGTTGTGTAACCACATCTTCCAGGAGTG
CAGTCCTGGAGTAGTGCCTACTCCTATTCCCATTTGCAGAGAGTACTGCTTGGC
AGTAAAGGAGCTCTTCTGCGCAAAAGAATGGCTGGTAATGGAAGAGAAGACCC
ACAGAGGACTCTACAGATCCGAGATGCATTTGCTGTCCGTGCCAGAATGCAGCA
AGCTTCCCAGCATGCATTGGGACCCCACGGCCTGTGCCAGACTGCCACATCTAG
ATTATAACAAAGAAAACCTAAAAACATTCCCACCAATGACGTCCTCAAAGCCAA
GTGTGGACATTCCAAATCTGCCTTCCTCCTCCTCTTCTTCCTTCTCTGTCTCACC
TACATACTCCATGACTGCTAGCGGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCCTCCG
GA**ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC**
TGGTTATCACCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAAC
AACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGAT
TTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG***AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA***
GACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGAC
[0268] ***GAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGG***
GAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATA
AGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGG
GGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCT
TCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID NO：16)

[0269] IgG信号肽:1-57(SEQ ID NO:2)

[0270] MuSK ECD:64-1479(SEQ ID NO:3)

[0271] GS 接头:1486-1515(SEQ ID NO:17)

[0272] **CD8 TMD**:1522-1593(SEQ ID NO:18)

[0273] 4-1BB 结构域：1594-1719 (SEQ ID NO：19)

[0274] CD3ζ结构域:1720-2055(SEQ ID NO:20)

[0275] 终止密码子:2056-2058

[0276] 载体#2:pTRPE.MuSK$_{WT}$.BBz CAAR氨基酸序列(氨基酸序列,SEQ ID NO:9)

[0277] *MEFGLSWLFLVAILKGVQC*GS**LPKAPVITTPLETVDALVEEVATFMCAVESYPQPEISW TRNKILIKLFDTRYSIRENGQLLTILSVEDSDDGIYCCTANNGVGGAVESCGALQVK MKPKITRPPINVKIIEGLKAVLPCTTMGNPKPSVSWIKGDSPLRENSRIAVLESGSLRI HNVQKEDAGQYRCVAKNSLGTAYSKVVKLEVEVFARILRAPESHNVTFGSFVTLHC TATGIPVPTITWIENGNAVSSGSIQESVKDRVIDSRLQLFITKPGLYTCIATNKHGEKF STAKAAATISIAEWSKPQKDNKGYCAQYRGEVCNAVLAKDALVFLNTSYADPEEAQ ELLVHTAWNELKVVSPVCRPAAEALLCNHIFQECSPGVVPTPIPICREYCLAVKELFC AKEWLVMEEKTHRGLYRSEMHLLSVPECSKLPSMHWDPTACARLPHLDYNKENL KTFPPMTSSKPSVDIPNLPSSSSSSFSVSPTYSMT**ASGGGGSGGGGSSGIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYC**KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL***RVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*** (SEQ ID NO: 9)

[0278] IgG信号肽:1-19(SEQ ID NO:10)

[0279] MuSK ECD:22-493(SEQ ID NO:11)

[0280] GS 接头:496-505(SEQ ID NO:12)

[0281] **CD8 TMD**:508-531(SEQ ID NO:13)

[0282] 4-1BB 结构域:532-573(SEQ ID NO:14)

[0283] CD3ζ结构域:574-685(SEQ ID NO:15)

[0284] 载体#3:pTRPE.MuSK$_{I96A}$.BBz CAAR(核酸序列,SEQ ID NO:21)。

*ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGC*GGAT
CC**CTTCCAAAAGCTCCTGTCATCACCACTCCTCTTGAAACAGTGGATGCCTTAG**
TTGAAGAAGTGGCTACTTTCATGTGTGCAGTGGAATCCTACCCCCAGCCTGAGA
TTTCCTGGACTAGAAATAAAATTCTCATTAAACTCTTTGACACCCGGTACAGCAT
CCGGGAGAATGGGCAGCTCCTCACCATCCTGAGTGTGGAAGACAGTGATGATG
GC*GCA*TACTGCTGCACGGCCAACAATGGTGTGGGAGGAGCTGTGGAGAGTTGT
GGAGCCCTGCAAGTGAAGATGAAACCTAAAATAACTCGCCCTCCCATAAATGTG
AAAATAATAGAGGGATTAAAAGCAGTCCTACCATGTACTACAATGGGTAATCCCA
AACCATCAGTGTCTTGGATAAAGGGAGACAGCCCTCTCAGGGAAAATTCCCGAA
TTGCAGTTCTTGAATCTGGGAGCTTGAGGATTCATAACGTACAAAAGGAAGATG
CAGGACAGTATCGATGTGTGGCAAAAAACAGCCTCGGGACAGCATATTCCAAAG
TGGTGAAGCTGGAAGTTGAGGTTTTTGCCAGGATTCTGCGGGCTCCTGAATCCC
ACAATGTCACCTTTGGCTCCTTTGTGACCCTGCACTGTACAGCAACAGGCATTC
CTGTCCCCACCATCACCTGGATTGAAAACGGAAATGCTGTTTCTTCTGGGTCCA
TTCAAGAGAGTGTGAAAGACCGAGTGATTGACTCAAGACTGCAGCTGTTTATCA
CCAAGCCAGGACTCTACACATGCATAGCTACCAATAAGCATGGGGAGAAGTTCA
GTACTGCCAAGGCTGCAGCCACCATCAGCATAGCAGAATGGAGTAAACCACAGA
AAGATAACAAAGGCTACTGCGCCCAGTACAGAGGGGAGGTGTGTAATGCAGTC
[0285] **CTGGCAAAAGATGCTCTTGTTTTTCTCAACACCTCCTATGCGGACCCTGAGGAG**
GCCCAAGAGCTACTGGTCCACACGGCCTGGAATGAACTGAAAGTAGTGAGCCC
AGTCTGCCGGCCAGCTGCTGAGGCTTTGTTGTGTAACCACATCTTCCAGGAGTG
CAGTCCTGGAGTAGTGCCTACTCCTATTCCCATTTGCAGAGAGTACTGCTTGGC
AGTAAAGGAGCTCTTCTGCGCAAAAGAATGGCTGGTAATGGAAGAGAAGACCC
ACAGAGGACTCTACAGATCCGAGATGCATTTGCTGTCCGTGCCAGAATGCAGCA
AGCTTCCCAGCATGCATTGGGACCCCACGGCCTGTGCCAGACTGCCACATCTAG
ATTATAACAAAGAAAACCTAAAAACATTCCCACCAATGACGTCCTCAAAGCCAA
GTGTGGACATTCCAAATCTGCCTTCCTCCTCCTCTTCTTCCTTCTCTGTCTCACC
TACATACTCCATGACTGCTAGCGGAGGTGGAGGTAGTGGCGGTGGAGGCAGCTCTG
GT**ATCTACATCTGGGCACCCTTGGCTGGAACATGCGGGGTCCTGCTGCTGAGCT**
TGGTGATCACCCTTTACTGCAAGCGCGGTCGCAAGAAACTGCTCTATATTTTTAAAC
AGCCATTCATGAGACCTGTCCAGACCACTCAAGAGGAGGACGGATGTTCCTGTAGAT
TTCCTGAAGAGGAAGAGGGGGGGTGCGAGCTG***AGAGTAAAGTTCAGTAGGTCCGCC***
GATGCCCCAGCCTATCAACAGGGGCAAAATCAACTCTACAACGAACTTAATCTGGGAC
GCCGAGAGGAGTACGATGTCTTGGATAAGAGACGCGGCAGGGACCCTGAAATGGGCG
GAAAGCCAAGACGGAAGAACCCCCAGGAAGGTCTGTACAATGAACTTCAGAAAGATAA
GATGGCCGAAGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAAGGAGAGAGGCGCCGCGGCAAAGG
GCATGATGGACTGTATCAGGGTCTCAGTACTGCTACTAAGGACACATATGATGCCCTCC

[0286] ***ACATGCAGGCCCTGCCACCAAGG***TGA (SEQ ID NO: 21)

[0287] IgG信号肽:1-57(SEQ ID NO:2)

[0288] $MuSK_{I96A}$ ECD:64-1479,突变序列表示为粗斜体和双下划线。(SEQ ID NO:6)

[0289] GS 接头(密码子优化的):1486-1515(SEQ ID NO:4)

[0290] **CD8 TMD (密码子优化的)**:1522-1593(SEQ ID NO:5)

[0291] 4-1BB 结构域(密码子优化的):1594-1719(SEQ ID NO:7)

[0292] CD3ζ结构域(密码子优化的):1720-2055(SEQ ID NO:8)

[0293] 终止密码子:2056-2058

[0294] 载体#3:pTRPE.MuSK$_{I96A}$.BBz CAAR(氨基酸序列,SEQ ID NO:22)。

[0295] *MEFGLSWLFLVAILKGVQC*GS**LPKAPVITTPLETVDALVEEVATFMCAVESYPQPEISW TRNKILIKLFDTRYSIRENGQLLTILSVEDSDDGAYCCTANNGVGGAVESCGALQVK MKPKITRPPINVKIIEGLKAVLPCTTMGNPKPSVSWIKGDSPLRENSRIAVLESGSLRI HNVQKEDAGQYRCVAKNSLGTAYSKVVKLEVEVFARILRAPESHNVTFGSFVTLHC TATGIPVPTITWIENGNAVSSGSIQESVKDRVIDSRLQLFITKPGLYTCIATNKHGEKF STAKAAATISIAEWSKPQKDNKGYCAQYRGEVCNAVLAKDALVFLNTSYADPEEAQ ELLVHTAWNELKVVSPVCRPAAEALLCNHIFQECSPGVVPTPIPICREYCLAVKELFC AKEWLVMEEKTHRGLYRSEMHLLSVPECSKLPSMHWDPTACARLPHLDYNKENL KTFPPMTSSKPSVDIPNLPSSSSSSFSVSPTYSMT**ASGGGGSGGGGSSGIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL***RVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR* (SEQ ID NO: 22)

[0296] IgG信号肽:1-19(SEQ ID NO:10)

[0297] MuSK$_{I96A}$ ECD:22-493,突变序列表示为粗斜体和双下划线。(SEQ ID NO:23)

[0298] GS 接头:496-505(SEQ ID NO:12)

[0299] **CD8 TMD**:508-531(SEQ ID NO:13)

[0300] 4-1BB 结构域:532-(SEQ ID NO:14)

[0301] CD3ζ结构域:(SEQ ID NO:15)

[0302] 载体#4:pTRPE.MuSK$_{I96A}$.BBz CAAR核苷酸序列(SEQ ID NO:24)

[0303] *ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGC*GGAT CC**CTTCCAAAAGCTCCTGTCATCACCACTCCTCTTGAAACAGTGGATGCCTTAG TTGAAGAAGTGGCTACTTTCATGTGTGCAGTGGAATCCTACCCCCAGCCTGAGA TTTCCTGGACTAGAAATAAAATTCTCATTAAACTCTTTGACACCCGGTACAGCAT**

[0304] CCGGGAGAATGGGCAGCTCCTCACCATCCTGAGTGTGGAAGACAGTGATGATG GCGCATACTGCTGCACGGCCAACAATGGTGTGGGAGGAGCTGTGGAGAGTTGT GGAGCCCTGCAAGTGAAGATGAAACCTAAAATAACTCGCCCTCCCATAAATGTG AAAATAATAGAGGGATTAAAAGCAGTCCTACCATGTACTACAATGGGTAATCCCA AACCATCAGTGTCTTGGATAAAGGGAGACAGCCCTCTCAGGGAAAATTCCCGAA TTGCAGTTCTTGAATCTGGGAGCTTGAGGATTCATAACGTACAAAAGGAAGATG CAGGACAGTATCGATGTGTGGCAAAAAACAGCCTCGGGACAGCATATTCCAAAG TGGTGAAGCTGGAAGTTGAGGTTTTTGCCAGGATTCTGCGGGCTCCTGAATCCC ACAATGTCACCTTTGGCTCCTTTGTGACCCTGCACTGTACAGCAACAGGCATTC CTGTCCCCACCATCACCTGGATTGAAAACGGAAATGCTGTTTCTTCTGGGTCCA TTCAAGAGAGTGTGAAAGACCGAGTGATTGACTCAAGACTGCAGCTGTTTATCA CCAAGCCAGGACTCTACACATGCATAGCTACCAATAAGCATGGGGAGAAGTTCA GTACTGCCAAGGCTGCAGCCACCATCAGCATAGCAGAATGGAGTAAACCACAGA AAGATAACAAAGGCTACTGCGCCCAGTACAGAGGGGAGGTGTGTAATGCAGTC CTGGCAAAAGATGCTCTTGTTTTTCTCAACACCTCCTATGCGGACCCTGAGGAG GCCCAAGAGCTACTGGTCCACACGGCCTGGAATGAACTGAAAGTAGTGAGCCC AGTCTGCCGGCCAGCTGCTGAGGCTTTGTTGTGTAACCACATCTTCCAGGAGTG CAGTCCTGGAGTAGTGCCTACTCCTATTCCCATTTGCAGAGAGTACTGCTTGGC AGTAAAGGAGCTCTTCTGCGCAAAAGAATGGCTGGTAATGGAAGAGAAGACCC ACAGAGGACTCTACAGATCCGAGATGCATTTGCTGTCCGTGCCAGAATGCAGCA AGCTTCCCAGCATGCATTGGGACCCCACGGCCTGTGCCAGACTGCCACATCTAG ATTATAACAAAGAAAACCTAAAAACATTCCCACCAATGACGTCCTCAAAGCCAA GTGTGGACATTCCAAATCTGCCTTCCTCCTCCTCTTCTTCCTTCTCTGTCTCACC TACATACTCCATGACTGCTAGCGGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCCTCCG GAATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC TGGTTATCACCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAAC AACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGAT TTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA GACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGAC GAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGG GAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATA AGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGG GGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCT TCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID NO: 24)

[0305] IgG信号肽:1-57(SEQ ID NO:2)

[0306] MuSK$_{I96A}$ ECD:64-1479,突变序列表示为粗斜体和双下划线(SEQ ID NO:6)

[0307] GS 接头:1486-1515(SEQ ID NO:17)

[0308] **CD8 TMD**:1522-1593(SEQ ID NO:18)

[0309] 4-1BB 结构域:1594-1719(SEQ ID NO:19)

[0310] CD3ζ结构域:1720-2055(SEQ ID NO:20)

[0311] 终止密码子:2056-2058

[0312] 载体#4:pTRPE.MuSK$_{I96A}$.BBz CAAR氨基酸序列(SEQ ID NO:22)

[0313] *MEFGLSWLFLVAILKGVQC*GS**LPKAPVITTPLETVDALVEEVATFMCAVESYPQPEISW TRNKILIKLFDTRYSIRENGQLLTILSVEDSDDGAYCCTANNGVGGAVESCGALQVK MKPKITRPPINVKIIEGLKAVLPCTTMGNPKPSVSWIKGDSPLRENSRIAVLESGSLRI HNVQKEDAGQYRCVAKNSLGTAYSKVVKLEVEVFARILRAPESHNVTFGSFVTLHC TATGIPVPTITWIENGNAVSSGSIQESVKDRVIDSRLQLFITKPGLYTCIATNKHGEKF STAKAAATISIAEWSKPQKDNKGYCAQYRGEVCNAVLAKDALVFLNTSYADPEEAQ ELLVHTAWNELKVVSPVCRPAAEALLCNHIFQECSPGVVPTPIPICREYCLAVKELFC AKEWLVMEEKTHRGLYRSEMHLLSVPECSKLPSMHWDPTACARLPHLDYNKENL KTFPPMTSSKPSVDIPNLPSSSSSSFSVSPTYSMT**ASGGGGSGGGGSSGIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL***RVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR* (SEQ ID NO：22)

[0314] IgG信号肽:1-19(SEQ ID NO:10)

[0315] $MuSK_{I96A}$ ECD:22-493,突变序列表示为粗斜体和双下划线(SEQ ID NO:23)

[0316] GS 接头:496-505(SEQ ID NO:12)

[0317] **CD8 TMD**:508-531(SEQ ID NO:13)

[0318] 4-1BB 结构域:532-573(SEQ ID NO:14)

[0319] CD3ζ结构域:574-685(SEQ ID NO:15)

[0320] 载体#5:pTRPE.$MuSK_{WT_opt}$.BBz CAAR核苷酸序列(SEQ ID NO:25)

[0321] *ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGC*GGAT CC**CTTCCTAAAGCCCCGGTAATTACCACCCCATTGGAGACCGTCGATGCCCTTGT AGAGGAGGTTGCAACCTTTATGTGTGCTGTAGAGTCTTACCCGCAACCAGAGAT ATCATGGACCCGAAACAAGATTTTGATCAAGTTGTTCGATACTCGATACTCCATT CGAGAGAACGGGCAGCTCCTCACTATATTGAGCGTAGAAGACAGTGATGACGGT ATATACTGCTGCACCGCTAACAATGGTGTGGGAGGAGCAGTGGAAAGTTGTGGC GCACTTCAAGTAAAAATGAAGCCGAAAATTACGAGACCTCCGATTAACGTTAAA ATTATAGAGGGGCTGAAAGCTGTCCTGCCATGTACCACAATGGGTAATCCCAAG CCCAGCGTATCCTGGATCAAAGGTGATTCACCGTTGAGAGAAAATTCTAGGATA GCGGTATTGGAGTCCGGCTCACTTAGAATTCACAACGTCCAAAAAGAAGATGCT GGTCAGTACAGATGTGTCGCCAAAAATTCTCTCGGAACTGCATACAGTAAAGTG GTAAAGCTTGAAGTTGAAGTGTTTGCAAGGATTCTGCGAGCCCCGGAGTCACA**

[0322] **CAATGTAACCTTCGGTTCTTTTGTGACTCTTCATTGTACCGCTACTGGAATCCCA**
GTTCCCACGATTACGTGGATTGAAAACGGAAATGCCGTCTCAAGCGGCAGCATA
CAGGAGTCCGTGAAGGATAGAGTCATAGACTCCCGATTGCAACTGTTCATTACA
AAGCCTGGCCTTTATACATGCATTGCTACAAACAAGCATGGTGAGAAATTCAGTA
CAGCTAAGGCCGCCGCAACAATTTCCATTGCAGAGTGGAGCAAGCCACAAAAA
GATAACAAGGGTTACTGTGCCCAATATCGAGGGGAAGTTTGTAACGCTGTACTT
GCTAAGGACGCTCTCGTCTTCTTGAATACATCCTACGCGGACCCGGAGGAAGCC
CAGGAGCTCTTGGTGCACACTGCATGGAATGAACTTAAAGTAGTGTCCCCTGTA
TGCCGGCCAGCCGCGGAAGCGTTGCTCTGTAATCACATTTTCCAAGAATGTTCA
CCAGGGGTAGTACCAACGCCTATCCCGATATGTCGGGAATATTGTCTGGCGGTC
AAAGAGCTCTTTTGTGCTAAAGAATGGCTCGTGATGGAGGAAAAAACTCATCGG
GGTTTGTATCGCTCAGAAATGCACCTGCTGAGTGTCCCAGAATGCTCCAAGTTG
CCCAGTATGCACTGGgacCCTACGGCGTGCGCACGCTTGCCTCACCTGGACTACA
ATAAAGAAAATCTGAAAACATTTCCCCCTATGACTAGCAGTAAGCCTTCTGTTGA
TATTCCAAACCTCCCGTCATCCTCTTCATCTTCTTTCTCTGTCAGCCCGACTTAT
TCCATGACTGGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCCTCCGGA**ATCTACATCTG**
GGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCT
TTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAG
ACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA
AGAAGGAGGATGTGAACTG***AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGT***
ACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA
CGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAG
GAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGC
CTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCT
TTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC
CTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID NO: 25)

[0323] IgG信号肽:1-57(SEQ ID NO:2)

[0324] MuSK ECD(密码子优化的):64-1479(SEQ ID NO:26)

[0325] GS 接头:1480-1509(SEQ ID NO:17)

[0326] **CD8 TMD**:1515-1587(SEQ ID NO:18)

[0327] 4-1BB 结构域:1588-1713(SEQ ID NO:19)

[0328] CD3ζ结构域:1714-2049(SEQ ID NO:20)

[0329] 终止密码子:2050-2052

[0330] 载体#5:pTRPE.MuSK$_{WT_opt}$.BBz CAAR氨基酸序列(SEQ ID NO:27)

[0331] *MEFGLSWLFLVAILKGVQC*GS**LPKAPVITTPLETVDALVEEVATFMCAVESYPQPEISW**
TRNKILIKLFDTRYSIRENGQLLTILSVEDSDDGIYCCTANNGVGGAVESCGALQVK
MKPKITRPPINVKIIEGLKAVLPCTTMGNPKPSVSWIKGDSPLRENSRIAVLESGSLRI

[0332] **HNVQKEDAGQYRCVAKNSLGTAYSKVVKLEVEVFARILRAPESHNVTFGSFVTLHC TATGIPVPTITWIENGNAVSSGSIQESVKDRVIDSRLQLFITKPGLYTCIATNKHGEKF STAKAAATISIAEWSKPQKDNKGYCAQYRGEVCNAVLAKDALVFLNTSYADPEEAQ ELLVHTAWNELKVVSPVCRPAAEALLCNHIFQECSPGVVPTPIPICREYCLAVKELFC AKEWLVMEEKTHRGLYRSEMHLLSVPECSKLPSMHWDPTACARLPHLDYNKENL KTFPPMTSSKPSVDIPNLPSSSSSSFSVSPTYSMT**GGGGSGGGGSSG**IYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYC**KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL*RVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*** (SEQ ID NO: 27)

[0333] IgG信号肽:1-19(SEQ ID NO:10)

[0334] MuSK ECD:22-493(SEQ ID NO:11)

[0335] GS 接头:494-503(SEQ ID NO:12)

[0336] **CD8 TMD**:506-529(SEQ ID NO:13)

[0337] 4-1BB 结构域:530-571(SEQ ID NO:14)

[0338] CD3ζ结构域:572-683(SEQ ID NO:15)

[0339] 载体#6:pTRPE.MuSK$_{I96A_opt}$.BBz CAAR核苷酸序列(SEQ ID NO:28)

[0340] *ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGC*GGAT CC**CTTCCTAAAGCCCCGGTAATTACCACCCCATTGGAGACCGTCGATGCCCTTGT AGAGGAGGTTGCAACCTTTATGTGTGCTGTAGAGTCTTACCCGCAACCAGAGAT ATCATGGACCCGAAACAAGATTTTGATCAAGTTGTTCGATACTCGATACTCCATT CGAGAGAACGGGCAGCTCCTCACTATATTGAGCGTAGAAGACAGTGATGACGGT *GCA*TACTGCTGCACCGCTAACAATGGTGTGGGAGGAGCAGTGGAAAGTTGTGG CGCACTTCAAGTAAAAATGAAGCCGAAAATTACGAGACCTCCGATTAACGTTAA AATTATAGAGGGGCTGAAAGCTGTCCTGCCATGTACCACAATGGGTAATCCCAA GCCCAGCGTATCCTGGATCAAAGGTGATTCACCGTTGAGAGAAAATTCTAGGAT AGCGGTATTGGAGTCCGGCTCACTTAGAATTCACAACGTCCAAAAAGAAGATGC TGGTCAGTACAGATGTGTCGCCAAAAATTCTCTCGGAACTGCATACAGTAAAGT GGTAAAGCTTGAAGTTGAAGTGTTTGCAAGGATTCTGCGAGCCCCGGAGTCAC ACAATGTAACCTTCGGTTCTTTTGTGACTCTTCATTGTACCGCTACTGGAATCCC AGTTCCCACGATTACGTGGATTGAAAACGGAAATGCCGTCTCAAGCGGCAGCAT ACAGGAGTCCGTGAAGGATAGAGTCATAGACTCCCGATTGCAACTGTTCATTAC AAAGCCTGGCCTTTATACATGCATTGCTACAAACAAGCATGGTGAGAAATTCAGT ACAGCTAAGGCCGCCGCAACAATTTCCATTGCAGAGTGGAGCAAGCCACAAAA AGATAACAAGGGTTACTGTGCCCAATATCGAGGGGAAGTTTGTAACGCTGTACT TGCTAAGGACGCTCTCGTCTTCTTGAATACATCCTACGCGGACCCGGAGGAAGC CCAGGAGCTCTTGGTGCACACTGCATGGAATGAACTTAAAGTAGTGTCCCCTGT**

[0341] ATGCCGGCCAGCCGCGGAAGCGTTGCTCTGTAATCACATTTTCCAAGAATGTTC ACCAGGGGTAGTACCAACGCCTATCCCGATATGTCGGGAATATTGTCTGGCGGT CAAAGAGCTCTTTTGTGCTAAAGAATGGCTCGTGATGGAGGAAAAAACTCATCG GGGTTTGTATCGCTCAGAAATGCACCTGCTGAGTGTCCCAGAATGCTCCAAGTT GCCCAGTATGCACTGGgacCCTACGGCGTGCGCACGCTTGCCTCACCTGGACTAC AATAAAGAAAATCTGAAAACATTTCCCCCTATGACTAGCAGTAAGCCTTCTGTTG ATATTCCAAACCTCCCGTCATCCTCTTCATCTTCTTTCTCTGTCAGCCCGACTTA TTCCATGACTGGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCCTCCGGAATCTACATCT GGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCC TTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGA GACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAG AAGAAGGAGGATGTGAACTG*AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCG TACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGT ACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAA GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCC TTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGC CCTGCCCCCTCGC*TAA (SEQ ID NO: 28)

[0342] IgG信号肽:1-57(SEQ ID NO:2)

[0343] $MuSK_{I96A}$ ECD(密码子优化的):22-493,突变序列表示为粗斜体和双下划线(SEQ ID NO:29)

[0344] GS 接头:1480-1509(SEQ ID NO:17)

[0345] **CD8 TMD**:1515-1587(SEQ ID NO:18)

[0346] 4-1BB 结构域:1588-1713(SEQ ID NO:19)

[0347] CD3ζ结构域:1714-2049(SEQ ID NO:20)

[0348] 终止密码子:2050-2052

[0349] 载体#6:pTRPE.$MuSK_{I96A_opt}$.BBz CAAR氨基酸序列(SEQ ID NO:30)

[0350] *MEFGLSWLFLVAILKGVQC*GSLPKAPVITTPLETVDALVEEVATFMCAVESYPQPEISW TRNKILIKLFDTRYSIRENGQLLTILSVEDSDDG*A*YCCTANNGVGGAVESCGALQVK MKPKITRPPINVKIIEGLKAVLPCTTMGNPKPSVSWIKGDSPLRENSRIAVLESGSLRI HNVQKEDAGQYRCVAKNSLGTAYSKVVKLEVEVFARILRAPESHNVTFGSFVTLHC TATGIPVPTITWIENGNAVSSGSIQESVKDRVIDSRLQLFITKPGLYTCIATNKHGEKF STAKAAATISIAEWSKPQKDNKGYCAQYRGEVCNAVLAKDALVFLNTSYADPEEAQ ELLVHTAWNELKVVSPVCRPAAEALLCNHIFQECSPGVVPTPIPICREYCLAVKELFC AKEWLVMEEKTHRGLYRSEMHLLSVPECSKLPSMHWDPTACARLPHLDYNKENL KTFPPMTSSKPSVDIPNLPSSSSSSFSVSPTYSMTGGGGSGGGGSSGIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL*RVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR* (SEQ ID NO: 30)

[0352] IgG信号肽:1-19(SEQ ID NO:10)

[0353] $MuSK_{I96A}$ ECD:22-493,突变序列表示为粗斜体和双下划线(SEQ ID NO:23)

[0354] GS 接头:494-503(SEQ ID NO:12)

[0355] CD8 TMD:506-529(SEQ ID NO:13)

[0356] 4-1BB 结构域:530-571(SEQ ID NO:14)

[0357] CD3ζ结构域:572-683(SEQ ID NO:15)

[0358] 现在将描述实验结果。

[0359] 实施例1:MuSK CAART细胞

[0360] MG患者的自身抗体会破坏AChR簇和NMJ。抗AChR抗体干扰AChR簇,并且抗MuSK抗体破坏调节AChR成簇的MuSK/LRP4复合物(图1)。

[0361] 本发明的MuSK CAAR-T细胞特异性杀死识别自身抗原的B细胞。如图2中所示,CAAR-T细胞在表面上表达自身抗原,作为嵌合免疫受体的细胞外结构域,其与T细胞受体信号传导域融合。Ag-特异性B细胞表达结合CAAR-T细胞的B细胞受体。CAAR-T细胞分泌介体(红色点)以杀死Ag-特异性B细胞。

[0362] 图3A-3B中显示了本发明的示例性MuSK CAAR构建体,pTRPE.MuSK$_{WT}$.BBz CAAR和pTRPE.MuSK$_{I96A}$.BBz CAAR。

[0363] 图4A-4B图解了MuSK CAAR构建体,并显示了CAAR-T细胞在细胞表面成功表达MuSK wt和MuSK I96A细胞外结构域(ECD)。图4A是MuSK野生型(wt)/I96A CAAR构建体的示意图。在MuSK wt ECD的第96氨基酸位的异亮氨酸突变为丙氨酸,并表示为白色框。将pTRPE慢病毒载体中的MuSK wt/I96A CAAR转导到原代人CD3^{+}T细胞中。在转导后第5天,使用抗MuSK抗体4A3检测MuSK wt/I96A CAAR的表面表达。结果显示在图4B中。

[0364] 图5A-5B中证明了MuSK CAAR在转染的细胞表面的表达。如图5B中上图显示,使用抗MuSK-APC抗体检测MuSK CAAR在未转染的细胞(未转染,红色)、MuSK$_{WT}$ CAAR转染的细胞(中间)和MuSK$_{I96A}$(右)上的表面表达。图5B下图中的直方图总结了上图中抗MuSK-APC抗体染色的均值荧光强度。

[0365] 图6描绘了MuSK CAAR识别抗MuSK BCR并激活TCR信号传导。MuSK CAAR在Jurkat NFAT-GFP报道细胞中表达,该报道细胞与表达抗MuSK BCR的杂交瘤细胞共培养。Jurkat NFAT-GFP报道细胞中激活的TCR信号传导诱导GFP表达。通过抗MuSK BCR激活MuSK CAAR,并成功地启动TCR信号传导(粗体矩形)。

[0366] 实施例2:MuSK CAAR-T细胞杀伤测定

[0367] 图7显示了在与MuSK CAAR-T细胞共温育4小时之后,基于^{51}Cr-标记的4A3细胞的特异性裂解百分比,MuSK CAAR-工程化的原代人T细胞杀死4A3抗MuSK杂交瘤细胞。相比之下,CAAR-T细胞不会杀死非靶标Nalm-6细胞,这表明靶细胞被MuSK CAAR-T细胞杀死的特异性。

[0368] 如图8中所显示,在4A3靶细胞参与之后MuSK CAAR T细胞分泌干扰素γ,但是未转导的T细胞不会分泌干扰素γ。所描绘的MuSK CAAR识别抗MuSK BCR并成功地启动TCR信号传导,这对于CAART细胞的效应子功能消除靶细胞是必需的。

[0369] 如图9A-9B中所显示,MuSK wt/I96A CAAR-T细胞特异性杀死被工程化以表达抗MuSK B细胞受体3-28的Nalm6 B细胞。Nalm-6wt细胞稳定地表达在绿色荧光蛋白(GFP)通道中发射的叩头虫荧光素酶绿色(CBG)蛋白,以及对于表面免疫球蛋白作为B细胞受体(BCR)表达所必需的CD79a/CD79b。为了产生作为MuSK wt/I96A CAAR-T靶细胞的Nalm6 3-28(抗

MuSK BCR)细胞,将3-28IgG4 BCR引入Nalm-6/CBG/CD79a/CD79b细胞中,并分选GFP$^+$hIgG$^+$细胞。将分选的Nalm6 3-28细胞或Nalm6 wt细胞与MuSK wt/I96A CAAR-T细胞或CART-19细胞在指定的效应子:靶标(E:T)比率下共培养22小时。通过添加荧光素至150μg/ml的最终浓度来检测Nalm6细胞中的荧光素酶活性。通过以下方程计算特异性裂解百分比:特异性裂解的%=[(实验样品-自发细胞死亡样品)/(最大细胞死亡样品-自发细胞死亡样品样品)]*100。通过5%SDS裂解诱导最大细胞死亡。

[0370] 如图10中所显示,MuSK wt/I96A CAAR-T细胞在与被工程化以表达抗MuSK B细胞受体3-28的Nalm6 B细胞相互作用之后分泌IFNγ。如图9A-9B中所显示,在分析荧光素酶活性之后,在自旋减慢之后收集上清液。通过人IFN-γDuoSet ELIS试剂盒(R&D Systems)检测人IFNγ。对仅含培养基的样品进行未配对的双尾t检验;ns:非显著,**:<0.005,***:<0.0005。

[0371] 如图11A-11B中所显示,MuSK wt/I96A CAAR-T细胞杀死产生抗MuSK抗体的4A3杂交瘤细胞并分泌IFNγ。图11A显示了使用^{51}Cr标记4A3杂交瘤细胞,并与MuSK wt/I96A CAAR-T细胞或CART-19细胞共培养21小时。通过下述方程计算特异性裂解百分比:特异性裂解的%=[(实验样品-自发细胞死亡样品)/(最大细胞死亡样品-自发细胞死亡样品样品)]*100。通过添加5%SDS(最终5%)诱导最大细胞死亡。图11B显示了将MuSK wt/I96A CAAR-T细胞与未标记的4A3杂交瘤细胞共培养21小时。在自旋减慢之后收集上清液。通过人IFN-γDuoSet ELIS试剂盒(R&D Systems)检测人IFNγ。

[0372] 如图12A-12B中所显示,MuSK wt/I96A CAAR-T细胞在体内消除抗MuSK靶细胞。图12A显示了在用静脉内免疫球蛋白(IVIG,Privigen,每天腹膜内注射600mg/kg,持续2天)预处理之后,将0.5x10^6 CBG$^+$hIgG$^+$Nalm6 3-28细胞静脉内注射到NSG小鼠中。在4天之后,静脉内注射5x10^{6}指示的CAAR-或CAR-T细胞(橙色箭头)。由于Nalm6细胞表达CD19,将未转导的(NTD)T细胞和桥粒芯蛋白(DSG)3EC1-3 CAAR-T细胞视为阴性对照,并且将CART-19细胞用作阳性对照。在第1、3、5、7和9天用IVIS Lumina定量生物发光。同时,还每隔一天腹膜内施用600mg/kg IVIG。使用Living Image 4.5软件(PerkinElmer)定量总通量。以1分钟间隔连续拍摄图像。图12B显示了图12A中每个治疗组的生物发光通量(光子/秒),其图解了MuSK wt/I96A CAAR T细胞控制抗MuSK Nalm6靶细胞,在效力上与CART-19细胞相当,而阴性对照NTD和DSG3 EC1-3 CAAR T细胞不控制抗MuSK Nalm6靶细胞增长。

[0373] 如图13A-13B中所显示,MuSK wt/I96A CAAR-T细胞分泌IFNγ以消除体内抗MuSK靶细胞。在图12A中的成像之后立即测量小鼠体重。计算相对于第1天(100%)的初始体重百分比。结果显示在图13A中。在T细胞注射之后24小时,通过眼眶后出血收集血液样本。将小鼠血清保持在-20℃,用于进一步分析。通过人IFN-γDuoSet ELIS试剂盒(R&D Systems)检测人IFNγ。用ND463_NTD进行未配对的双尾t检验;ns:非显著,**:<0.005。结果显示在图13B中。

[0374] 本发明的MuSK CAAR构建体:载体#1、#2、#3、#4、#5和#6显示在图14中。密码子优化的结构域表示为浅灰色框。

[0375] 如图15中所显示,密码子优化的MuSK wt/I96A CAAR在人原代CD3+T细胞中表达。将pTRPE慢病毒载体中的MuSK wt_opt或MuSK I96A_opt CAAR转导到原代人CD3$^+$T细胞中。在转导后第5天,使用抗MuSK(4A3)PE-缀合抗体检测MuSK wt_opt或MuSK I96A_opt的表面

表达。

[0376] 如图16中所显示,密码子优化的MuSK wt/I96A CAAR-T细胞杀死被工程化以表达抗MuSK B细胞受体3-28的Nalm6 B细胞。

[0377] 本文引用的每篇专利、专利申请和出版物的公开内容通过引用以其整体并入本文。尽管已经参考具体实施方式公开了本发明,但是显然,本领域的其他技术人员可以设计出本发明的其他实施方式和变型而不背离本发明的真实精神和范围。所附权利要求旨在被解释为包括所有这样的实施方式和等同变型。

序列表

<110> 宾夕法尼亚大学董事会

A·S·佩恩

C·T·依尼布莱希特

S·欧

M·C·米龙

<120> 肌肉特异性激酶嵌合自身抗体受体细胞的组合物和方法

<130> 046483-7216WO1(02031)

<150> 62/680,769

<151> 2018-06-05

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2058

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pTRPE.MuSKWT.BBz CAAR

<400> 1

atggagtttg ggctgagctg gcttttтctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgcgga 60
tcccttccaa aagctcctgt catcaccact cctcttgaaa cagtggatgc cttagttgaa 120
gaagtggcta ctttcatgtg tgcagtggaa tcctaccccc agcctgagat ttcctggact 180
agaaataaaa ttctcattaa actctttgac acccggtaca gcatccggga gaatgggcag 240
ctcctcacca tcctgagtgt ggaagacagt gatgatggca tttactgctg cacggccaac 300
aatggtgtgg gaggagctgt ggagagttgt ggagccctgc aagtgaagat gaaacctaaa 360
ataactcgcc ctcccataaa tgtgaaaata atagagggat taaaagcagt cctaccatgt 420
actacaatgg gtaatcccaa accatcagtg tcttggataa agggagacag ccctctcagg 480
gaaaattccc gaattgcagt tcttgaatct gggagcttga ggattcataa cgtacaaaag 540
gaagatgcag gacagtatcg atgtgtggca aaaaacagcc tcgggacagc atattccaaa 600
gtggtgaagc tggaagttga ggtttttgcc aggattctgc gggctcctga atcccacaat 660
gtcacctttg gctcctttgt gaccctgcac tgtacagcaa caggcattcc tgtccccacc 720
atcacctgga ttgaaaacgg aaatgctgtt tcttctgggt ccattcaaga gagtgtgaaa 780
gaccgagtga ttgactcaag actgcagctg tttatcacca agccaggact ctacacatgc 840
atagctacca ataagcatgg ggagaagttc agtactgcca aggctgcagc caccatcagc 900
atagcagaat ggagtaaacc acagaaagat aacaaaggct actgcgccca gtacagaggg 960
gaggtgtgta atgcagtcct ggcaaaagat gctcttgttt ttctcaacac ctcctatgcg 1020
gaccctgagg aggcccaaga gctactggtc cacacggcct ggaatgaact gaaagtagtg 1080
agcccagtct gccggccagc tgctgaggct ttgttgtgta accacatctt ccaggagtgc 1140

agtcctggag tagtgcctac tcctattccc atttgcagag agtactgctt ggcagtaaag 1200
gagctcttct gcgcaaaaga atggctggta atggaagaga agacccacag aggactctac 1260
agatccgaga tgcatttgct gtccgtgcca gaatgcagca agcttcccag catgcattgg 1320
gaccccacgg cctgtgccag actgccacat ctagattata acaaagaaaa cctaaaaaca 1380
ttcccaccaa tgacgtcctc aaagccaagt gtggacattc caaatctgcc ttcctcctcc 1440
tcttcttcct tctctgtctc acctacatac tccatgactg ctagcggagg tggaggtagt 1500
ggcggtggag gcagctctgg tatctacatc tgggcaccct tggctggaac atgcggggtc 1560
ctgctgctga gcttggtgat cacccтttac tgcaagcgcg gtcgcaagaa actgctctat 1620
atttttaaac agccattcat gagacctgtc cagaccactc aagaggagga cggatgttcc 1680
tgtagatttc ctgaagagga agaggggggg tgcgagctga gagtaaagtt cagtaggtcc 1740
gccgatgccc cagcctatca acaggggcaa aatcaactct acaacgaact taatctggga 1800
cgccgagagg agtacgatgt cttggataag agacgcggca gggaccctga aatgggcgga 1860
aagccaagac ggaagaaccc ccaggaaggt ctgtacaatg aacttcagaa agataagatg 1920
gccgaagcct acagcgagat cggcatgaaa ggagagaggc gccgcggcaa agggcatgat 1980
ggactgtatc agggtctcag tactgctact aaggacacat atgatgccct ccacatgcag 2040
gccctgccac caaggtga 2058

<210> 2
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> IgG信号肽
<400> 2
atggagtttg ggctgagctg gcttttтctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgc 57

<210> 3
<211> 1416
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> MuSK细胞外结构域
<400> 3
cttccaaaag ctcctgtcat caccactcct cttgaaacag tggatgcctt agttgaagaa 60
gtggctactt tcatgtgtgc agtggaatcc taccccccagc ctgagatttc ctggactaga 120
aataaaattc tcattaaact ctttgacacc cggtacagca tccgggagaa tgggcagctc 180
ctcaccatcc tgagtgtgga agacagtgat gatggcattt actgctgcac ggccaacaat 240
ggtgtgggag gagctgtgga gagttgtgga gccctgcaag tgaagatgaa acctaaaata 300
actcgccctc ccataaatgt gaaaataata gagggattaa aagcagtcct accatgtact 360
acaatgggta atcccaaacc atcagtgtct tggataaagg gagacagccc tctcagggaa 420
aattcccgaa ttgcagttct tgaatctggg agcttgagga ttcataacgt acaaaaggaa 480

gatgcaggac agtatcgatg tgtggcaaaa aacagcctcg ggacagcata ttccaaagtg 540
gtgaagctgg aagttgaggt ttttgccagg attctgcggg ctcctgaatc ccacaatgtc 600
acctttggct cctttgtgac cctgcactgt acagcaacag gcattcctgt ccccaccatc 660
acctggattg aaaacggaaa tgctgtttct tctgggtcca ttcaagagag tgtgaaagac 720
cgagtgattg actcaagact gcagctgttt atcaccaagc caggactcta cacatgcata 780
gctaccaata agcatgggga gaagttcagt actgccaagg ctgcagccac catcagcata 840
gcagaatgga gtaaaccaca gaaagataac aaaggctact gcgcccagta cagaggggag 900
gtgtgtaatg cagtcctggc aaaagatgct cttgtttttc tcaacacctc ctatgcggac 960
cctgaggagg cccaagagct actggtccac acggcctgga atgaactgaa agtagtgagc 1020
ccagtctgcc ggccagctgc tgaggctttg ttgtgtaacc acatcttcca ggagtgcagt 1080
cctggagtag tgcctactcc tattcccatt tgcagagagt actgcttggc agtaaaggag 1140
ctcttctgcg caaaagaatg gctggtaatg gaagagaaga cccacagagg actctacaga 1200
tccgagatgc atttgctgtc cgtgccagaa tgcagcaagc ttcccagcat gcattgggac 1260
cccacggcct gtgccagact gccacatcta gattataaca aagaaaacct aaaaacattc 1320
ccaccaatga cgtcctcaaa gccaagtgtg gacattccaa atctgccttc ctcctcctct 1380
tcttccttct ctgtctcacc tacatactcc atgact 1416

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> GS接头(密码子优化的)
<400> 4
ggaggtggag gtagtggcgg tggaggcagc 30

<210> 5
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CD8跨膜结构域(密码子优化的)
<400> 5
atctacatct gggcaccctt ggctggaaca tgcggggtcc tgctgctgag cttggtgatc 60
acccttttact gc 72

<210> 6
<211> 1416
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> MuSK-I96A细胞外结构域

<400> 6

cttccaaaag ctcctgtcat caccactcct cttgaaacag tggatgcctt agttgaagaa 60
gtggctactt tcatgtgtgc agtggaatcc tacccccagc ctgagatttc ctggactaga 120
aataaaattc tcattaaact ctttgacacc cggtacagca tccgggagaa tgggcagctc 180
ctcaccatcc tgagtgtgga agacagtgat gatggcgcat actgctgcac ggccaacaat 240
ggtgtgggag gagctgtgga gagttgtgga gccctgcaag tgaagatgaa acctaaaata 300
actcgccctc ccataaatgt gaaaataata gagggattaa aagcagtcct accatgtact 360
acaatgggta atcccaaacc atcagtgtct tggataaagg gagacagccc tctcagggaa 420
aattcccgaa ttgcagttct tgaatctggg agcttgagga ttcataacgt acaaaaggaa 480
gatgcaggac agtatcgatg tgtggcaaaa aacagcctcg ggacagcata ttccaaagtg 540
gtgaagctgg aagttgaggt ttttgccagg attctgcggg ctcctgaatc ccacaatgtc 600
acctttggct cctttgtgac cctgcactgt acagcaacag gcattcctgt ccccaccatc 660
acctggattg aaaacggaaa tgctgtttct tctgggtcca ttcaagagag tgtgaaagac 720
cgagtgattg actcaagact gcagctgttt atcaccaagc caggactcta cacatgcata 780
gctaccaata agcatgggga gaagttcagt actgccaagg ctgcagccac catcagcata 840
gcagaatgga gtaaaccaca gaaagataac aaaggctact gcgcccagta cagaggggag 900
gtgtgtaatg cagtcctggc aaaagatgct cttgtttttc tcaacacctc ctatgcggac 960
cctgaggagg cccaagagct actggtccac acggcctgga atgaactgaa agtagtgagc 1020
ccagtctgcc ggccagctgc tgaggctttg ttgtgtaacc acatcttcca ggagtgcagt 1080
cctggagtag tgcctactcc tattcccatt tgcagagagt actgcttggc agtaaaggag 1140
ctcttctgcg caaaagaatg gctggtaatg gaagagaaga cccacagagg actctacaga 1200
tccgagatgc atttgctgtc cgtgccagaa tgcagcaagc ttcccagcat gcattgggac 1260
cccacggcct gtgccagact gccacatcta gattataaca aagaaaacct aaaaacattc 1320
ccaccaatga cgtcctcaaa gccaagtgtg gacattccaa atctgccttc ctcctcctct 1380
tcttccttct ctgtctcacc tacatactcc atgact 1416

<210> 7
<211> 126
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB细胞内结构域(密码子优化的)

<400> 7

aagcgcggtc gcaagaaact gctctatatt tttaaacagc cattcatgag acctgtccag 60
accactcaag aggaggacgg atgttcctgt agatttcctg aagaggaaga ggggggggtgc 120
gagctg 126

<210> 8
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3ζ细胞内结构域(密码子优化的)
<400> 8
agagtaaagt tcagtaggtc cgccgatgcc ccagcctatc aacaggggca aaatcaactc 60
tacaacgaac ttaatctggg acgccgagag gagtacgatg tcttggataa gagacgcggc 120
agggaccctg aaatgggcgg aaagccaaga cggaagaacc cccaggaagg tctgtacaat 180
gaacttcaga aagataagat ggccgaagcc tacagcgaga tcggcatgaa aggagagagg 240
cgccgcggca aagggcatga tggactgtat cagggtctca gtactgctac taaggacaca 300
tatgatgccc tccacatgca ggccctgcca ccaagg 336
<210> 9
<211> 685
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> pTRPE.MuSKWT.BBz CAAR
<400> 9
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gly Ser Leu Pro Lys Ala Pro Val Ile Thr Thr Pro Leu
20 25 30
Glu Thr Val Asp Ala Leu Val Glu Glu Val Ala Thr Phe Met Cys Ala
35 40 45
Val Glu Ser Tyr Pro Gln Pro Glu Ile Ser Trp Thr Arg Asn Lys Ile
50 55 60
Leu Ile Lys Leu Phe Asp Thr Arg Tyr Ser Ile Arg Glu Asn Gly Gln
65 70 75 80
Leu Leu Thr Ile Leu Ser Val Glu Asp Ser Asp Asp Gly Ile Tyr Cys
85 90 95
Cys Thr Ala Asn Asn Gly Val Gly Gly Ala Val Glu Ser Cys Gly Ala
100 105 110
Leu Gln Val Lys Met Lys Pro Lys Ile Thr Arg Pro Pro Ile Asn Val
115 120 125
Lys Ile Ile Glu Gly Leu Lys Ala Val Leu Pro Cys Thr Thr Met Gly
130 135 140
Asn Pro Lys Pro Ser Val Ser Trp Ile Lys Gly Asp Ser Pro Leu Arg
145 150 155 160
Glu Asn Ser Arg Ile Ala Val Leu Glu Ser Gly Ser Leu Arg Ile His
165 170 175
Asn Val Gln Lys Glu Asp Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Val Ala Lys Asn

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Lys Val Val Lys Leu Glu Val Glu Val

195 200 205

Phe Ala Arg Ile Leu Arg Ala Pro Glu Ser His Asn Val Thr Phe Gly

210 215 220

Ser Phe Val Thr Leu His Cys Thr Ala Thr Gly Ile Pro Val Pro Thr

225 230 235 240

Ile Thr Trp Ile Glu Asn Gly Asn Ala Val Ser Ser Gly Ser Ile Gln

245 250 255

Glu Ser Val Lys Asp Arg Val Ile Asp Ser Arg Leu Gln Leu Phe Ile

260 265 270

Thr Lys Pro Gly Leu Tyr Thr Cys Ile Ala Thr Asn Lys His Gly Glu

275 280 285

Lys Phe Ser Thr Ala Lys Ala Ala Ala Thr Ile Ser Ile Ala Glu Trp

290 295 300

Ser Lys Pro Gln Lys Asp Asn Lys Gly Tyr Cys Ala Gln Tyr Arg Gly

305 310 315 320

Glu Val Cys Asn Ala Val Leu Ala Lys Asp Ala Leu Val Phe Leu Asn

325 330 335

Thr Ser Tyr Ala Asp Pro Glu Glu Ala Gln Glu Leu Leu Val His Thr

340 345 350

Ala Trp Asn Glu Leu Lys Val Val Ser Pro Val Cys Arg Pro Ala Ala

355 360 365

Glu Ala Leu Leu Cys Asn His Ile Phe Gln Glu Cys Ser Pro Gly Val

370 375 380

Val Pro Thr Pro Ile Pro Ile Cys Arg Glu Tyr Cys Leu Ala Val Lys

385 390 395 400

Glu Leu Phe Cys Ala Lys Glu Trp Leu Val Met Glu Glu Lys Thr His

405 410 415

Arg Gly Leu Tyr Arg Ser Glu Met His Leu Leu Ser Val Pro Glu Cys

420 425 430

Ser Lys Leu Pro Ser Met His Trp Asp Pro Thr Ala Cys Ala Arg Leu

435 440 445

Pro His Leu Asp Tyr Asn Lys Glu Asn Leu Lys Thr Phe Pro Pro Met

450 455 460

Thr Ser Ser Lys Pro Ser Val Asp Ile Pro Asn Leu Pro Ser Ser Ser

465 470 475 480

Ser Ser Ser Phe Ser Val Ser Pro Thr Tyr Ser Met Thr Ala Ser Gly

485 490 495

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Ile Tyr Ile Trp Ala
500 505 510
Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
515 520 525
Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
530 535 540
Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
545 550 555 560
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
565 570 575
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
580 585 590
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
595 600 605
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
610 615 620
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
625 630 635 640
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
645 650 655
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
660 665 670
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
675 680 685

<210> 10
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IgG信号肽
<400> 10
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys

<210> 11
<211> 472
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> MuSK细胞外结构域

<400> 11

Leu Pro Lys Ala Pro Val Ile Thr Thr Pro Leu Glu Thr Val Asp Ala
1 5 10 15
Leu Val Glu Glu Val Ala Thr Phe Met Cys Ala Val Glu Ser Tyr Pro
20 25 30
Gln Pro Glu Ile Ser Trp Thr Arg Asn Lys Ile Leu Ile Lys Leu Phe
35 40 45
Asp Thr Arg Tyr Ser Ile Arg Glu Asn Gly Gln Leu Leu Thr Ile Leu
50 55 60
Ser Val Glu Asp Ser Asp Asp Gly Ile Tyr Cys Cys Thr Ala Asn Asn
65 70 75 80
Gly Val Gly Gly Ala Val Glu Ser Cys Gly Ala Leu Gln Val Lys Met
85 90 95
Lys Pro Lys Ile Thr Arg Pro Pro Ile Asn Val Lys Ile Ile Glu Gly
100 105 110
Leu Lys Ala Val Leu Pro Cys Thr Thr Met Gly Asn Pro Lys Pro Ser
115 120 125
Val Ser Trp Ile Lys Gly Asp Ser Pro Leu Arg Glu Asn Ser Arg Ile
130 135 140
Ala Val Leu Glu Ser Gly Ser Leu Arg Ile His Asn Val Gln Lys Glu
145 150 155 160
Asp Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Val Ala Lys Asn Ser Leu Gly Thr Ala
165 170 175
Tyr Ser Lys Val Val Lys Leu Glu Val Glu Val Phe Ala Arg Ile Leu
180 185 190
Arg Ala Pro Glu Ser His Asn Val Thr Phe Gly Ser Phe Val Thr Leu
195 200 205
His Cys Thr Ala Thr Gly Ile Pro Val Pro Thr Ile Thr Trp Ile Glu
210 215 220
Asn Gly Asn Ala Val Ser Ser Gly Ser Ile Gln Glu Ser Val Lys Asp
225 230 235 240
Arg Val Ile Asp Ser Arg Leu Gln Leu Phe Ile Thr Lys Pro Gly Leu
245 250 255
Tyr Thr Cys Ile Ala Thr Asn Lys His Gly Glu Lys Phe Ser Thr Ala
260 265 270
Lys Ala Ala Ala Thr Ile Ser Ile Ala Glu Trp Ser Lys Pro Gln Lys
275 280 285
Asp Asn Lys Gly Tyr Cys Ala Gln Tyr Arg Gly Glu Val Cys Asn Ala

290 295 300
Val Leu Ala Lys Asp Ala Leu Val Phe Leu Asn Thr Ser Tyr Ala Asp
305 310 315 320
Pro Glu Glu Ala Gln Glu Leu Leu Val His Thr Ala Trp Asn Glu Leu
325 330 335
Lys Val Val Ser Pro Val Cys Arg Pro Ala Ala Glu Ala Leu Leu Cys
340 345 350
Asn His Ile Phe Gln Glu Cys Ser Pro Gly Val Val Pro Thr Pro Ile
355 360 365
Pro Ile Cys Arg Glu Tyr Cys Leu Ala Val Lys Glu Leu Phe Cys Ala
370 375 380
Lys Glu Trp Leu Val Met Glu Glu Lys Thr His Arg Gly Leu Tyr Arg
385 390 395 400
Ser Glu Met His Leu Leu Ser Val Pro Glu Cys Ser Lys Leu Pro Ser
405 410 415
Met His Trp Asp Pro Thr Ala Cys Ala Arg Leu Pro His Leu Asp Tyr
420 425 430
Asn Lys Glu Asn Leu Lys Thr Phe Pro Pro Met Thr Ser Ser Lys Pro
435 440 445
Ser Val Asp Ile Pro Asn Leu Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Ser
450 455 460
Val Ser Pro Thr Tyr Ser Met Thr
465 470

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GS接头
<400> 12
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 13
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CD8跨膜结构域
<400> 13

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 14
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB细胞内结构域
<400> 14
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CD3ζ细胞内结构域
<400> 15
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 16

<211> 2058
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> pTRPE.MuSKWT.BBz CAAR
<400> 16

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgcgga 60
tcccttccaa aagctcctgt catcaccact cctcttgaaa cagtggatgc cttagttgaa 120
gaagtggcta ctttcatgtg tgcagtggaa tcctaccccc agcctgagat ttcctggact 180
agaaataaaa ttctcattaa actctttgac acccggtaca gcatccggga gaatgggcag 240
ctcctcacca tcctgagtgt ggaagacagt gatgatggca tttactgctg cacggccaac 300
aatggtgtgg gaggagctgt ggagagttgt ggagccctgc aagtgaagat gaaacctaaa 360
ataactcgcc ctcccataaa tgtgaaaata atagagggat taaaagcagt cctaccatgt 420
actacaatgg gtaatcccaa accatcagtg tcttggataa agggagacag ccctctcagg 480
gaaaattccc gaattgcagt tcttgaatct gggagcttga ggattcataa cgtacaaaag 540
gaagatgcag gacagtatcg atgtgtggca aaaaacagcc tcgggacagc atattccaaa 600
gtggtgaagc tggaagttga ggtttttgcc aggattctgc gggctcctga atcccacaat 660
gtcacctttg gctcctttgt gaccctgcac tgtacagcaa caggcattcc tgtccccacc 720
atcacctgga ttgaaaacgg aaatgctgtt tcttctgggt ccattcaaga gagtgtgaaa 780
gaccgagtga ttgactcaag actgcagctg tttatcacca agccaggact ctacacatgc 840
atagctacca ataagcatgg ggagaagttc agtactgcca aggctgcagc caccatcagc 900
atagcagaat ggagtaaacc acagaaagat aacaaaggct actgcgccca gtacagaggg 960
gaggtgtgta atgcagtcct ggcaaaagat gctcttgttt ttctcaacac ctcctatgcg 1020
gaccctgagg aggcccaaga gctactggtc cacacggcct ggaatgaact gaaagtagtg 1080
agcccagtct gccggccagc tgctgaggct ttgttgtgta accacatctt ccaggagtgc 1140
agtcctggag tagtgcctac tcctattccc atttgcagag agtactgctt ggcagtaaag 1200
gagctcttct gcgcaaaaga atggctggta atggaagaga agacccacag aggactctac 1260
agatccgaga tgcatttgct gtccgtgcca gaatgcagca agcttcccag catgcattgg 1320
gaccccacgg cctgtgccag actgccacat ctagattata acaaagaaaa cctaaaaaca 1380
ttcccaccaa tgacgtcctc aaagccaagt gtggacattc caaatctgcc ttcctcctcc 1440
tcttcttcct tctctgtctc acctacatac tccatgactg ctagcggtgg cggaggttct 1500
ggaggtggag gttcctccgg aatctacatc tgggcgccct tggccgggac ttgtggggtc 1560
cttctcctgt cactggttat cacccctttac tgcaaacggg gcagaaagaa actcctgtat 1620
atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga tggctgtagc 1680
tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc 1740
gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga 1800
cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga 1860
aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg 1920
gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat 1980

ggcctttacc agggtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgccct tcacatgcag 2040
gccctgcccc ctcgctaa 2058
<210> 17
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> GS接头
<400> 17
ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc 30
<210> 18
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CD8跨膜结构域
<400> 18
atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgtc actggttatc 60
acccttttact gc 72
<210> 19
<211> 126
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB细胞内结构域
<400> 19
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
gaactg 126
<210> 20
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CD3ζ细胞内结构域
<400> 20
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180

gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 21
<211> 2058
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> pTRPE.MuSKI96A.BBz CAAR
<400> 21

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgcgga 60
tcccttccaa aagctcctgt catcaccact cctcttgaaa cagtggatgc cttagttgaa 120
gaagtggcta ctttcatgtg tgcagtggaa tcctaccccc agcctgagat ttcctggact 180
agaaataaaa ttctcattaa actctttgac acccggtaca gcatccggga gaatgggcag 240
ctcctcacca tcctgagtgt ggaagacagt gatgatggcg catactgctg cacggccaac 300
aatggtgtgg gaggagctgt ggagagttgt ggagccctgc aagtgaagat gaaacctaaa 360
ataactcgcc ctcccataaa tgtgaaaata atagagggat taaaagcagt cctaccatgt 420
actacaatgg gtaatcccaa accatcagtg tcttggataa agggagacag ccctctcagg 480
gaaaattccc gaattgcagt tcttgaatct gggagcttga ggattcataa cgtacaaaag 540
gaagatgcag gacagtatcg atgtgtggca aaaaacagcc tcgggacagc atattccaaa 600
gtggtgaagc tggaagttga ggtttttgcc aggattctgc gggctcctga atcccacaat 660
gtcacctttg gctcctttgt gaccctgcac tgtacagcaa caggcattcc tgtccccacc 720
atcacctgga ttgaaaacgg aaatgctgtt tcttctgggt ccattcaaga gagtgtgaaa 780
gaccgagtga ttgactcaag actgcagctg tttatcacca agccaggact ctacacatgc 840
atagctacca ataagcatgg ggagaagttc agtactgcca aggctgcagc caccatcagc 900
atagcagaat ggagtaaacc acagaaagat aacaaaggct actgcgccca gtacagaggg 960
gaggtgtgta atgcagtcct ggcaaaagat gctcttgttt ttctcaacac ctcctatgcg 1020
gaccctgagg aggcccaaga gctactggtc cacacggcct ggaatgaact gaaagtagtg 1080
agcccagtct gccggccagc tgctgaggct ttgttgtgta accacatctt ccaggagtgc 1140
agtcctggag tagtgcctac tcctattccc atttgcagag agtactgctt ggcagtaaag 1200
gagctcttct gcgcaaaaga atggctggta atggaagaga agacccacag aggactctac 1260
agatccgaga tgcatttgct gtccgtgcca gaatgcagca agcttcccag catgcattgg 1320
gaccccacgg cctgtgccag actgccacat ctagattata acaaagaaaa cctaaaaaca 1380
ttcccaccaa tgacgtcctc aaagccaagt gtggacattc caaatctgcc ttcctcctcc 1440
tcttcttcct tctctgtctc acctacatac tccatgactg ctagcggagg tggaggtagt 1500
ggcggtggag gcagctctgg tatctacatc tgggcaccct tggctggaac atgcggggtc 1560
ctgctgctga gcttggtgat cacccctttac tgcaagcgcg gtcgcaagaa actgctctat 1620
atttttaaac agccattcat gagacctgtc cagaccactc aagaggagga cggatgttcc 1680
tgtagatttc ctgaagagga agaggggggg tgcgagctga gagtaaagtt cagtaggtcc 1740

gccgatgccc cagcctatca acaggggcaa aatcaactct acaacgaact taatctggga 1800
cgccgagagg agtacgatgt cttggataag agacgcggca gggaccctga aatgggcgga 1860
aagccaagac ggaagaaccc ccaggaaggt ctgtacaatg aacttcagaa agataagatg 1920
gccgaagcct acagcgagat cggcatgaaa ggagagaggc gccgcggcaa agggcatgat 1980
ggactgtatc agggtctcag tactgctact aaggacacat atgatgccct ccacatgcag 2040
gccctgccac caaggtga 2058

<210> 22
<211> 685
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> pTRPE.MuSKI96A.BBz CAAR
<400> 22

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gly Ser Leu Pro Lys Ala Pro Val Ile Thr Thr Pro Leu
20 25 30
Glu Thr Val Asp Ala Leu Val Glu Glu Val Ala Thr Phe Met Cys Ala
35 40 45
Val Glu Ser Tyr Pro Gln Pro Glu Ile Ser Trp Thr Arg Asn Lys Ile
50 55 60
Leu Ile Lys Leu Phe Asp Thr Arg Tyr Ser Ile Arg Glu Asn Gly Gln
65 70 75 80
Leu Leu Thr Ile Leu Ser Val Glu Asp Ser Asp Asp Gly Ala Tyr Cys
85 90 95
Cys Thr Ala Asn Asn Gly Val Gly Gly Ala Val Glu Ser Cys Gly Ala
100 105 110
Leu Gln Val Lys Met Lys Pro Lys Ile Thr Arg Pro Pro Ile Asn Val
115 120 125
Lys Ile Ile Glu Gly Leu Lys Ala Val Leu Pro Cys Thr Thr Met Gly
130 135 140
Asn Pro Lys Pro Ser Val Ser Trp Ile Lys Gly Asp Ser Pro Leu Arg
145 150 155 160
Glu Asn Ser Arg Ile Ala Val Leu Glu Ser Gly Ser Leu Arg Ile His
165 170 175
Asn Val Gln Lys Glu Asp Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Val Ala Lys Asn
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Lys Val Val Lys Leu Glu Val Glu Val
195 200 205

Phe Ala Arg Ile Leu Arg Ala Pro Glu Ser His Asn Val Thr Phe Gly
210 215 220
Ser Phe Val Thr Leu His Cys Thr Ala Thr Gly Ile Pro Val Pro Thr
225 230 235 240
Ile Thr Trp Ile Glu Asn Gly Asn Ala Val Ser Ser Gly Ser Ile Gln
245 250 255
Glu Ser Val Lys Asp Arg Val Ile Asp Ser Arg Leu Gln Leu Phe Ile
260 265 270
Thr Lys Pro Gly Leu Tyr Thr Cys Ile Ala Thr Asn Lys His Gly Glu
275 280 285
Lys Phe Ser Thr Ala Lys Ala Ala Ala Thr Ile Ser Ile Ala Glu Trp
290 295 300
Ser Lys Pro Gln Lys Asp Asn Lys Gly Tyr Cys Ala Gln Tyr Arg Gly
305 310 315 320
Glu Val Cys Asn Ala Val Leu Ala Lys Asp Ala Leu Val Phe Leu Asn
325 330 335
Thr Ser Tyr Ala Asp Pro Glu Glu Ala Gln Glu Leu Leu Val His Thr
340 345 350
Ala Trp Asn Glu Leu Lys Val Val Ser Pro Val Cys Arg Pro Ala Ala
355 360 365
Glu Ala Leu Leu Cys Asn His Ile Phe Gln Glu Cys Ser Pro Gly Val
370 375 380
Val Pro Thr Pro Ile Pro Ile Cys Arg Glu Tyr Cys Leu Ala Val Lys
385 390 395 400
Glu Leu Phe Cys Ala Lys Glu Trp Leu Val Met Glu Glu Lys Thr His
405 410 415
Arg Gly Leu Tyr Arg Ser Glu Met His Leu Leu Ser Val Pro Glu Cys
420 425 430
Ser Lys Leu Pro Ser Met His Trp Asp Pro Thr Ala Cys Ala Arg Leu
435 440 445
Pro His Leu Asp Tyr Asn Lys Glu Asn Leu Lys Thr Phe Pro Pro Met
450 455 460
Thr Ser Ser Lys Pro Ser Val Asp Ile Pro Asn Leu Pro Ser Ser Ser
465 470 475 480
Ser Ser Ser Phe Ser Val Ser Pro Thr Tyr Ser Met Thr Ala Ser Gly
485 490 495
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Ile Tyr Ile Trp Ala
500 505 510
Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr

515 520 525

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
530 535 540

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
545 550 555 560

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
565 570 575

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
580 585 590

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
595 600 605

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
610 615 620

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
625 630 635 640

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
645 650 655

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
660 665 670

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
675 680 685

<210> 23

<211> 472

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MuSK-I96A细胞外结构域

<400> 23

Leu Pro Lys Ala Pro Val Ile Thr Thr Pro Leu Glu Thr Val Asp Ala
1 5 10 15

Leu Val Glu Glu Val Ala Thr Phe Met Cys Ala Val Glu Ser Tyr Pro
20 25 30

Gln Pro Glu Ile Ser Trp Thr Arg Asn Lys Ile Leu Ile Lys Leu Phe
35 40 45

Asp Thr Arg Tyr Ser Ile Arg Glu Asn Gly Gln Leu Leu Thr Ile Leu
50 55 60

Ser Val Glu Asp Ser Asp Asp Gly Ala Tyr Cys Cys Thr Ala Asn Asn
65 70 75 80

Gly Val Gly Gly Ala Val Glu Ser Cys Gly Ala Leu Gln Val Lys Met

85 90 95

Lys Pro Lys Ile Thr Arg Pro Pro Ile Asn Val Lys Ile Ile Glu Gly
100 105 110

Leu Lys Ala Val Leu Pro Cys Thr Thr Met Gly Asn Pro Lys Pro Ser
115 120 125

Val Ser Trp Ile Lys Gly Asp Ser Pro Leu Arg Glu Asn Ser Arg Ile
130 135 140

Ala Val Leu Glu Ser Gly Ser Leu Arg Ile His Asn Val Gln Lys Glu
145 150 155 160

Asp Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Val Ala Lys Asn Ser Leu Gly Thr Ala
165 170 175

Tyr Ser Lys Val Val Lys Leu Glu Val Glu Val Phe Ala Arg Ile Leu
180 185 190

Arg Ala Pro Glu Ser His Asn Val Thr Phe Gly Ser Phe Val Thr Leu
195 200 205

His Cys Thr Ala Thr Gly Ile Pro Val Pro Thr Ile Thr Trp Ile Glu
210 215 220

Asn Gly Asn Ala Val Ser Ser Gly Ser Ile Gln Glu Ser Val Lys Asp
225 230 235 240

Arg Val Ile Asp Ser Arg Leu Gln Leu Phe Ile Thr Lys Pro Gly Leu
245 250 255

Tyr Thr Cys Ile Ala Thr Asn Lys His Gly Glu Lys Phe Ser Thr Ala
260 265 270

Lys Ala Ala Ala Thr Ile Ser Ile Ala Glu Trp Ser Lys Pro Gln Lys
275 280 285

Asp Asn Lys Gly Tyr Cys Ala Gln Tyr Arg Gly Glu Val Cys Asn Ala
290 295 300

Val Leu Ala Lys Asp Ala Leu Val Phe Leu Asn Thr Ser Tyr Ala Asp
305 310 315 320

Pro Glu Glu Ala Gln Glu Leu Leu Val His Thr Ala Trp Asn Glu Leu
325 330 335

Lys Val Val Ser Pro Val Cys Arg Pro Ala Ala Glu Ala Leu Leu Cys
340 345 350

Asn His Ile Phe Gln Glu Cys Ser Pro Gly Val Val Pro Thr Pro Ile
355 360 365

Pro Ile Cys Arg Glu Tyr Cys Leu Ala Val Lys Glu Leu Phe Cys Ala
370 375 380

Lys Glu Trp Leu Val Met Glu Glu Lys Thr His Arg Gly Leu Tyr Arg
385 390 395 400

Ser Glu Met His Leu Leu Ser Val Pro Glu Cys Ser Lys Leu Pro Ser
405 410 415
Met His Trp Asp Pro Thr Ala Cys Ala Arg Leu Pro His Leu Asp Tyr
420 425 430
Asn Lys Glu Asn Leu Lys Thr Phe Pro Pro Met Thr Ser Ser Lys Pro
435 440 445
Ser Val Asp Ile Pro Asn Leu Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Ser
450 455 460
Val Ser Pro Thr Tyr Ser Met Thr
465 470

<210> 24
<211> 2058
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> pTRPE.MuSKI96A.BBz CAAR
<400> 24

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgcgga 60
tcccttccaa aagctcctgt catcaccact cctcttgaaa cagtggatgc cttagttgaa 120
gaagtggcta ctttcatgtg tgcagtggaa tcctaccccc agcctgagat ttcctggact 180
agaaataaaa ttctcattaa actctttgac acccggtaca gcatccggga gaatgggcag 240
ctcctcacca tcctgagtgt ggaagacagt gatgatggcg catactgctg cacggccaac 300
aatggtgtgg gaggagctgt ggagagttgt ggagccctgc aagtgaagat gaaacctaaa 360
ataactcgcc ctcccataaa tgtgaaaata atagagggat taaaagcagt cctaccatgt 420
actacaatgg gtaatcccaa accatcagtg tcttggataa agggagacag ccctctcagg 480
gaaaattccc gaattgcagt tcttgaatct gggagcttga ggattcataa cgtacaaaag 540
gaagatgcag gacagtatcg atgtgtggca aaaaacagcc tcgggacagc atattccaaa 600
gtggtgaagc tggaagttga ggtttttgcc aggattctgc gggctcctga atcccacaat 660
gtcacctttg gctcctttgt gaccctgcac tgtacagcaa caggcattcc tgtccccacc 720
atcacctgga ttgaaaacgg aaatgctgtt tcttctgggt ccattcaaga gagtgtgaaa 780
gaccgagtga ttgactcaag actgcagctg tttatcacca agccaggact ctacacatgc 840
atagctacca ataagcatgg ggagaagttc agtactgcca aggctgcagc caccatcagc 900
atagcagaat ggagtaaacc acagaaagat aacaaaggct actgcgccca gtacagaggg 960
gaggtgtgta atgcagtcct ggcaaaagat gctcttgttt ttctcaacac ctcctatgcg 1020
gaccctgagg aggcccaaga gctactggtc cacacggcct ggaatgaact gaaagtagtg 1080
agcccagtct gccggccagc tgctgaggct ttgttgtgta accacatctt ccaggagtgc 1140
agtcctggag tagtgcctac tcctattccc atttgcagag agtactgctt ggcagtaaag 1200
gagctcttct gcgcaaaaga atggctggta atggaagaga agacccacag aggactctac 1260
agatccgaga tgcatttgct gtccgtgcca gaatgcagca agcttcccag catgcattgg 1320

gaccccacgg cctgtgccag actgccacat ctagattata acaaagaaaa cctaaaaaca 1380
ttcccaccaa tgacgtcctc aaagccaagt gtggacattc caaatctgcc ttcctcctcc 1440
tcttcttcct tctctgtctc acctacatac tccatgactg ctagcggtgg cggaggttct 1500
ggaggtggag gttcctccgg aatctacatc tgggcgccct tggccgggac ttgtggggtc 1560
cttctcctgt cactggttat cacccтttac tgcaaacggg gcagaaagaa actcctgtat 1620
atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga tggctgtagc 1680
tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc 1740
gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga 1800
cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga 1860
aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg 1920
gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat 1980
ggcctttacc agggtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgccct tcacatgcag 2040
gccctgcccc ctcgctaa 2058

<210> 25
<211> 2052
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> pTRPE.MuSKWT_opt.BBz CAAR
<400> 25

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgcgga 60
tcccttccta aagccccggt aattaccacc ccattggaga ccgtcgatgc ccttgtagag 120
gaggttgcaa cctttatgtg tgctgtagag tcttacccgc aaccagagat atcatggacc 180
cgaaacaaga ttttgatcaa gttgttcgat actcgatact ccattcgaga gaacgggcag 240
ctcctcacta tattgagcgt agaagacagt gatgacggta tatactgctg caccgctaac 300
aatggtgtgg gaggagcagt ggaaagttgt ggcgcacttc aagtaaaaat gaagccgaaa 360
attacgagac ctccgattaa cgttaaaatt atagaggggc tgaaagctgt cctgccatgt 420
accacaatgg gtaatcccaa gcccagcgta tcctggatca aaggtgattc accgttgaga 480
gaaaattcta ggatagcggt attggagtcc ggctcactta gaattcacaa cgtccaaaaa 540
gaagatgctg gtcagtacag atgtgtcgcc aaaaattctc tcggaactgc atacagtaaa 600
gtggtaaagc ttgaagttga agtgtttgca aggattctgc gagccccgga gtcacacaat 660
gtaaccttcg gttcttttgt gactcttcat tgtaccgcta ctggaatccc agttcccacg 720
attacgtgga ttgaaaacgg aaatgccgtc tcaagcggca gcatacagga gtccgtgaag 780
gatagagtca tagactcccg attgcaactg ttcattacaa agcctggcct ttatacatgc 840
attgctacaa acaagcatgg tgagaaattc agtacagcta aggccgccgc aacaatttcc 900
attgcagagt ggagcaagcc acaaaaagat aacaagggtt actgtgccca atatcgaggg 960
gaagtttgta acgctgtact tgctaaggac gctctcgtct tcttgaatac atcctacgcg 1020
gacccggagg aagcccagga gctcttggtg cacactgcat ggaatgaact taaagtagtg 1080
tcccctgtat gccggccagc cgcggaagcg ttgctctgta atcacatttt ccaagaatgt 1140

tcaccagggg tagtaccaac gcctatcccg atatgtcggg aatattgtct ggcggtcaaa 1200
gagctctttt gtgctaaaga atggctcgtg atggaggaaa aaactcatcg gggtttgtat 1260
cgctcagaaa tgcacctgct gagtgtccca gaatgctcca agttgcccag tatgcactgg 1320
gaccctacgg cgtgcgcacg cttgcctcac ctggactaca ataaagaaaa tctgaaaaca 1380
tttcccccta tgactagcag taagccttct gttgatattc caaacctccc gtcatcctct 1440
tcatcttctt tctctgtcag cccgacttat tccatgactg gtggcggagg ttctggaggt 1500
ggaggttcct ccggaatcta catctgggcg cccttggccg ggacttgtgg ggtccttctc 1560
ctgtcactgg ttatcaccct ttactgcaaa cggggcagaa agaaactcct gtatatattc 1620
aaacaaccat ttatgagacc agtacaaact actcaagagg aagatggctg tagctgccga 1680
tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac 1740
gcccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 1800
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 1860
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 1920
gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 1980
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg 2040
ccccctcgct aa 2052

<210> 26
<211> 1416
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> MuSK细胞外结构域（密码子优化的）
<400> 26

cttcctaaag ccccggtaat taccacccca ttggagaccg tcgatgccct tgtagaggag 60
gttgcaacct ttatgtgtgc tgtagagtct tacccgcaac cagagatatc atggacccga 120
aacaagattt tgatcaagtt gttcgatact cgatactcca ttcgagagaa cgggcagctc 180
ctcactatat tgagcgtaga agacagtgat gacggtatat actgctgcac cgctaacaat 240
ggtgtgggag gagcagtgga aagttgtggc gcacttcaag taaaaatgaa gccgaaaatt 300
acgagacctc cgattaacgt taaaattata gaggggctga aagctgtcct gccatgtacc 360
acaatgggta atcccaagcc cagcgtatcc tggatcaaag gtgattcacc gttgagagaa 420
aattctagga tagcggtatt ggagtccggc tcacttagaa ttcacaacgt ccaaaaagaa 480
gatgctggtc agtacagatg tgtcgccaaa aattctctcg gaactgcata cagtaaagtg 540
gtaaagcttg aagttgaagt gtttgcaagg attctgcgag ccccggagtc acacaatgta 600
accttcggtt cttttgtgac tcttcattgt accgctactg gaatcccagt tcccacgatt 660
acgtggattg aaaacggaaa tgccgtctca agcggcagca tacaggagtc cgtgaaggat 720
agagtcatag actcccgatt gcaactgttc attacaaagc ctggccttta tacatgcatt 780
gctacaaaca agcatggtga gaaattcagt acagctaagg ccgccgcaac aatttccatt 840
gcagagtgga gcaagccaca aaaagataac aagggttact gtgcccaata tcgaggggaa 900
gtttgtaacg ctgtacttgc taaggacgct ctcgtcttct tgaatacatc ctacgcggac 960

ccggaggaag cccaggagct cttggtgcac actgcatgga atgaacttaa agtagtgtcc 1020
cctgtatgcc ggccagccgc ggaagcgttg ctctgtaatc acattttcca agaatgttca 1080
ccaggggtag taccaacgcc tatcccgata tgtcgggaat attgtctggc ggtcaaagag 1140
ctcttttgtg ctaaagaatg gctcgtgatg gaggaaaaaa ctcatcgggg tttgtatcgc 1200
tcagaaatgc acctgctgag tgtcccagaa tgctccaagt tgcccagtat gcactgggac 1260
cctacggcgt gcgcacgctt gcctcacctg gactacaata aagaaaatct gaaaacattt 1320
ccccctatga ctagcagtaa gccttctgtt gatattccaa acctcccgtc atcctcttca 1380
tcttctttct ctgtcagccc gacttattcc atgact 1416

<210> 27
<211> 683
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> pTRPE.MuSKWT_opt.BBz CAAR
<400> 27

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gly Ser Leu Pro Lys Ala Pro Val Ile Thr Thr Pro Leu
20 25 30
Glu Thr Val Asp Ala Leu Val Glu Glu Val Ala Thr Phe Met Cys Ala
35 40 45
Val Glu Ser Tyr Pro Gln Pro Glu Ile Ser Trp Thr Arg Asn Lys Ile
50 55 60
Leu Ile Lys Leu Phe Asp Thr Arg Tyr Ser Ile Arg Glu Asn Gly Gln
65 70 75 80
Leu Leu Thr Ile Leu Ser Val Glu Asp Ser Asp Asp Gly Ile Tyr Cys
85 90 95
Cys Thr Ala Asn Asn Gly Val Gly Gly Ala Val Glu Ser Cys Gly Ala
100 105 110
Leu Gln Val Lys Met Lys Pro Lys Ile Thr Arg Pro Pro Ile Asn Val
115 120 125
Lys Ile Ile Glu Gly Leu Lys Ala Val Leu Pro Cys Thr Thr Met Gly
130 135 140
Asn Pro Lys Pro Ser Val Ser Trp Ile Lys Gly Asp Ser Pro Leu Arg
145 150 155 160
Glu Asn Ser Arg Ile Ala Val Leu Glu Ser Gly Ser Leu Arg Ile His
165 170 175
Asn Val Gln Lys Glu Asp Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Val Ala Lys Asn
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Lys Val Val Lys Leu Glu Val Glu Val
195 200 205
Phe Ala Arg Ile Leu Arg Ala Pro Glu Ser His Asn Val Thr Phe Gly
210 215 220
Ser Phe Val Thr Leu His Cys Thr Ala Thr Gly Ile Pro Val Pro Thr
225 230 235 240
Ile Thr Trp Ile Glu Asn Gly Asn Ala Val Ser Ser Gly Ser Ile Gln
245 250 255
Glu Ser Val Lys Asp Arg Val Ile Asp Ser Arg Leu Gln Leu Phe Ile
260 265 270
Thr Lys Pro Gly Leu Tyr Thr Cys Ile Ala Thr Asn Lys His Gly Glu
275 280 285
Lys Phe Ser Thr Ala Lys Ala Ala Ala Thr Ile Ser Ile Ala Glu Trp
290 295 300
Ser Lys Pro Gln Lys Asp Asn Lys Gly Tyr Cys Ala Gln Tyr Arg Gly
305 310 315 320
Glu Val Cys Asn Ala Val Leu Ala Lys Asp Ala Leu Val Phe Leu Asn
325 330 335
Thr Ser Tyr Ala Asp Pro Glu Glu Ala Gln Glu Leu Leu Val His Thr
340 345 350
Ala Trp Asn Glu Leu Lys Val Val Ser Pro Val Cys Arg Pro Ala Ala
355 360 365
Glu Ala Leu Leu Cys Asn His Ile Phe Gln Glu Cys Ser Pro Gly Val
370 375 380
Val Pro Thr Pro Ile Pro Ile Cys Arg Glu Tyr Cys Leu Ala Val Lys
385 390 395 400
Glu Leu Phe Cys Ala Lys Glu Trp Leu Val Met Glu Glu Lys Thr His
405 410 415
Arg Gly Leu Tyr Arg Ser Glu Met His Leu Leu Ser Val Pro Glu Cys
420 425 430
Ser Lys Leu Pro Ser Met His Trp Asp Pro Thr Ala Cys Ala Arg Leu
435 440 445
Pro His Leu Asp Tyr Asn Lys Glu Asn Leu Lys Thr Phe Pro Pro Met
450 455 460
Thr Ser Ser Lys Pro Ser Val Asp Ile Pro Asn Leu Pro Ser Ser Ser
465 470 475 480
Ser Ser Ser Phe Ser Val Ser Pro Thr Tyr Ser Met Thr Gly Gly Gly
485 490 495
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu

500 505 510

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
515 520 525

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
530 535 540

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
545 550 555 560

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
565 570 575

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
580 585 590

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
595 600 605

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
610 615 620

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
625 630 635 640

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
645 650 655

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
660 665 670

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
675 680

<210> 28

<211> 2052

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pTRPE.MuSKI96A_opt.BBz CAAR

<400> 28

atggagtttg ggctgagctg gcttttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgcgga 60

tcccttccta aagccccggt aattaccacc ccattggaga ccgtcgatgc ccttgtagag 120

gaggttgcaa cctttatgtg tgctgtagag tcttacccgc aaccagagat atcatggacc 180

cgaaacaaga ttttgatcaa gttgttcgat actcgatact ccattcgaga gaacgggcag 240

ctcctcacta tattgagcgt agaagacagt gatgacggtg catactgctg caccgctaac 300

aatggtgtgg gaggagcagt ggaaagttgt ggcgcacttc aagtaaaaat gaagccgaaa 360

attacgagac ctccgattaa cgttaaaatt atagaggggc tgaaagctgt cctgccatgt 420

accacaatgg gtaatcccaa gcccagcgta tcctggatca aaggtgattc accgttgaga 480

gaaaattcta ggatagcggt attggagtcc ggctcactta gaattcacaa cgtccaaaaa 540

gaagatgctg gtcagtacag atgtgtcgcc aaaaattctc tcggaactgc atacagtaaa 600
gtggtaaagc ttgaagttga agtgtttgca aggattctgc gagccccgga gtcacacaat 660
gtaaccttcg gttcttttgt gactcttcat tgtaccgcta ctggaatccc agttcccacg 720
attacgtgga ttgaaaacgg aaatgccgtc tcaagcggca gcatacagga gtccgtgaag 780
gatagagtca tagactcccg attgcaactg ttcattacaa agcctggcct ttatacatgc 840
attgctacaa acaagcatgg tgagaaattc agtacagcta aggccgccgc aacaatttcc 900
attgcagagt ggagcaagcc acaaaaagat aacaagggtt actgtgccca atatcgaggg 960
gaagtttgta acgctgtact tgctaaggac gctctcgtct tcttgaatac atcctacgcg 1020
gacccggagg aagcccagga gctcttggtg cacactgcat ggaatgaact taaagtagtg 1080
tcccctgtat gccggccagc cgcggaagcg ttgctctgta atcacatttt ccaagaatgt 1140
tcaccagggg tagtaccaac gcctatcccg atatgtcggg aatattgtct ggcggtcaaa 1200
gagctctttt gtgctaaaga atggctcgtg atggaggaaa aaactcatcg gggtttgtat 1260
cgctcagaaa tgcacctgct gagtgtccca gaatgctcca agttgcccag tatgcactgg 1320
gaccctacgg cgtgcgcacg cttgcctcac ctggactaca ataaagaaaa tctgaaaaca 1380
tttcccccta tgactagcag taagccttct gttgatattc caaacctccc gtcatcctct 1440
tcatcttctt tctctgtcag cccgacttat tccatgactg gtggcggagg ttctggaggt 1500
ggaggttcct ccggaatcta catctgggcg cccttggccg ggacttgtgg ggtccttctc 1560
ctgtcactgg ttatcaccct ttactgcaaa cggggcagaa agaaactcct gtatatattc 1620
aaacaaccat ttatgagacc agtacaaact actcaagagg aagatggctg tagctgccga 1680
tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac 1740
gcccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 1800
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 1860
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 1920
gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 1980
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg 2040
ccccctcgct aa 2052

<210> 29
<211> 1416
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> MuSK-I96A细胞外结构域 (密码子优化的)
<400> 29

cttcctaaag ccccggtaat taccacccca ttggagaccg tcgatgccct tgtagaggag 60
gttgcaacct ttatgtgtgc tgtagagtct tacccgcaac cagagatatc atggacccga 120
aacaagattt tgatcaagtt gttcgatact cgatactcca ttcgagagaa cgggcagctc 180
ctcactatat tgagcgtaga agacagtgat gacggtgcat actgctgcac cgctaacaat 240
ggtgtgggag gagcagtgga aagttgtggc gcacttcaag taaaaatgaa gccgaaaatt 300
acgagacctc cgattaacgt taaaattata gaggggctga aagctgtcct gccatgtacc 360

acaatgggta atcccaagcc cagcgtatcc tggatcaaag gtgattcacc gttgagagaa 420
aattctagga tagcggtatt ggagtccggc tcacttagaa ttcacaacgt ccaaaaagaa 480
gatgctggtc agtacagatg tgtcgccaaa aattctctcg gaactgcata cagtaaagtg 540
gtaaagcttg aagttgaagt gtttgcaagg attctgcgag ccccggagtc acacaatgta 600
accttcggtt cttttgtgac tcttcattgt accgctactg gaatcccagt tcccacgatt 660
acgtggattg aaaacggaaa tgccgtctca agcggcagca tacaggagtc cgtgaaggat 720
agagtcatag actcccgatt gcaactgttc attacaaagc ctggccttta tacatgcatt 780
gctacaaaca agcatggtga gaaattcagt acagctaagg ccgccgcaac aatttccatt 840
gcagagtgga gcaagccaca aaaagataac aagggttact gtgcccaata tcgaggggaa 900
gtttgtaacg ctgtacttgc taaggacgct ctcgtcttct tgaatacatc ctacgcggac 960
ccggaggaag cccaggagct cttggtgcac actgcatgga atgaacttaa agtagtgtcc 1020
cctgtatgcc ggccagccgc ggaagcgttg ctctgtaatc acattttcca agaatgttca 1080
ccaggggtag taccaacgcc tatcccgata tgtcgggaat attgtctggc ggtcaaagag 1140
ctcttttgtg ctaaagaatg gctcgtgatg gaggaaaaaa ctcatcgggg tttgtatcgc 1200
tcagaaatgc acctgctgag tgtcccagaa tgctccaagt tgcccagtat gcactgggac 1260
cctacggcgt gcgcacgctt gcctcacctg gactacaata aagaaaatct gaaaacattt 1320
ccccctatga ctagcagtaa gccttctgtt gatattccaa acctcccgtc atcctcttca 1380
tcttctttct ctgtcagccc gacttattcc atgact 1416

<210> 30
<211> 683
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> pTRPE.MuSKI96A_opt.BBz CAAR
<400> 30

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gly Ser Leu Pro Lys Ala Pro Val Ile Thr Thr Pro Leu
20 25 30
Glu Thr Val Asp Ala Leu Val Glu Glu Val Ala Thr Phe Met Cys Ala
35 40 45
Val Glu Ser Tyr Pro Gln Pro Glu Ile Ser Trp Thr Arg Asn Lys Ile
50 55 60
Leu Ile Lys Leu Phe Asp Thr Arg Tyr Ser Ile Arg Glu Asn Gly Gln
65 70 75 80
Leu Leu Thr Ile Leu Ser Val Glu Asp Ser Asp Asp Gly Ala Tyr Cys
85 90 95
Cys Thr Ala Asn Asn Gly Val Gly Gly Ala Val Glu Ser Cys Gly Ala
100 105 110

Leu Gln Val Lys Met Lys Pro Lys Ile Thr Arg Pro Pro Ile Asn Val
115 120 125
Lys Ile Ile Glu Gly Leu Lys Ala Val Leu Pro Cys Thr Thr Met Gly
130 135 140
Asn Pro Lys Pro Ser Val Ser Trp Ile Lys Gly Asp Ser Pro Leu Arg
145 150 155 160
Glu Asn Ser Arg Ile Ala Val Leu Glu Ser Gly Ser Leu Arg Ile His
165 170 175
Asn Val Gln Lys Glu Asp Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Val Ala Lys Asn
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Lys Val Val Lys Leu Glu Val Glu Val
195 200 205
Phe Ala Arg Ile Leu Arg Ala Pro Glu Ser His Asn Val Thr Phe Gly
210 215 220
Ser Phe Val Thr Leu His Cys Thr Ala Thr Gly Ile Pro Val Pro Thr
225 230 235 240
Ile Thr Trp Ile Glu Asn Gly Asn Ala Val Ser Ser Gly Ser Ile Gln
245 250 255
Glu Ser Val Lys Asp Arg Val Ile Asp Ser Arg Leu Gln Leu Phe Ile
260 265 270
Thr Lys Pro Gly Leu Tyr Thr Cys Ile Ala Thr Asn Lys His Gly Glu
275 280 285
Lys Phe Ser Thr Ala Lys Ala Ala Ala Thr Ile Ser Ile Ala Glu Trp
290 295 300
Ser Lys Pro Gln Lys Asp Asn Lys Gly Tyr Cys Ala Gln Tyr Arg Gly
305 310 315 320
Glu Val Cys Asn Ala Val Leu Ala Lys Asp Ala Leu Val Phe Leu Asn
325 330 335
Thr Ser Tyr Ala Asp Pro Glu Glu Ala Gln Glu Leu Leu Val His Thr
340 345 350
Ala Trp Asn Glu Leu Lys Val Val Ser Pro Val Cys Arg Pro Ala Ala
355 360 365
Glu Ala Leu Leu Cys Asn His Ile Phe Gln Glu Cys Ser Pro Gly Val
370 375 380
Val Pro Thr Pro Ile Pro Ile Cys Arg Glu Tyr Cys Leu Ala Val Lys
385 390 395 400
Glu Leu Phe Cys Ala Lys Glu Trp Leu Val Met Glu Glu Lys Thr His
405 410 415
Arg Gly Leu Tyr Arg Ser Glu Met His Leu Leu Ser Val Pro Glu Cys

420 425 430

Ser Lys Leu Pro Ser Met His Trp Asp Pro Thr Ala Cys Ala Arg Leu

435 440 445

Pro His Leu Asp Tyr Asn Lys Glu Asn Leu Lys Thr Phe Pro Pro Met

450 455 460

Thr Ser Ser Lys Pro Ser Val Asp Ile Pro Asn Leu Pro Ser Ser Ser

465 470 475 480

Ser Ser Ser Phe Ser Val Ser Pro Thr Tyr Ser Met Thr Gly Gly Gly

485 490 495

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu

500 505 510

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr

515 520 525

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe

530 535 540

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg

545 550 555 560

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser

565 570 575

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr

580 585 590

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys

595 600 605

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn

610 615 620

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu

625 630 635 640

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly

645 650 655

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr

660 665 670

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

675 680

<210> 31

<211> 55

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8α铰链区

<400> 31

Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro
1 5 10 15

Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
20 25 30

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
35 40 45

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
50 55

<210> 32

<211> 165

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8α铰链区

<400> 32

ttcgtgccgg tcttcctgcc agcgaagcca accacgacgc cagcaccgcg accaccaaca 60

cctgcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg tccctgcgcc cagaggcgtg cagaccagca 120

gcgggggcg cagtgcacac gagggggctg gacttcgcct gtgat 165

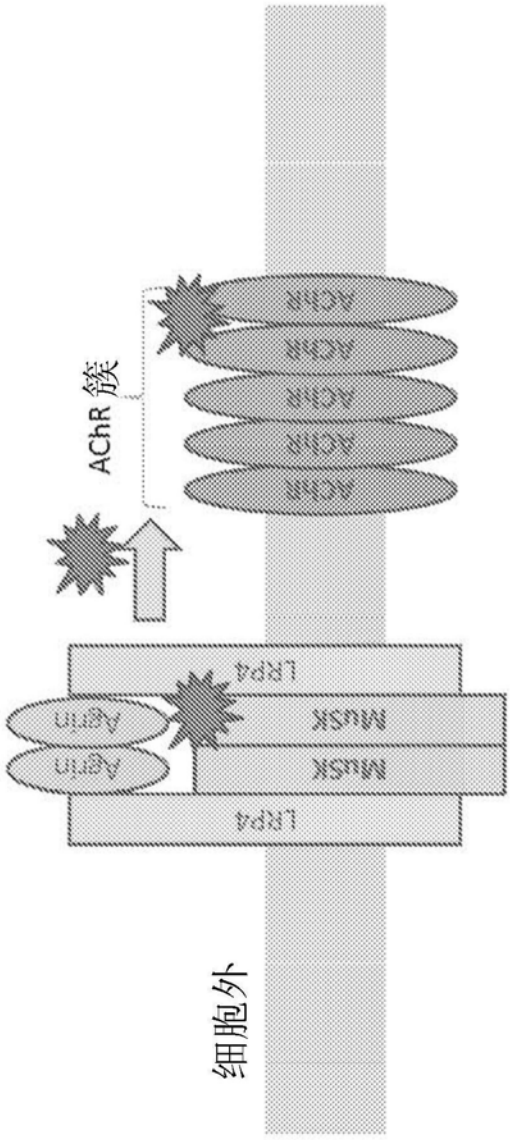

AChR
AChR
AChR
AChR
AChR
AChR 簇
LRP4
MuSK
MuSK
Agrin
Agrin
LRP4
细胞外

图1

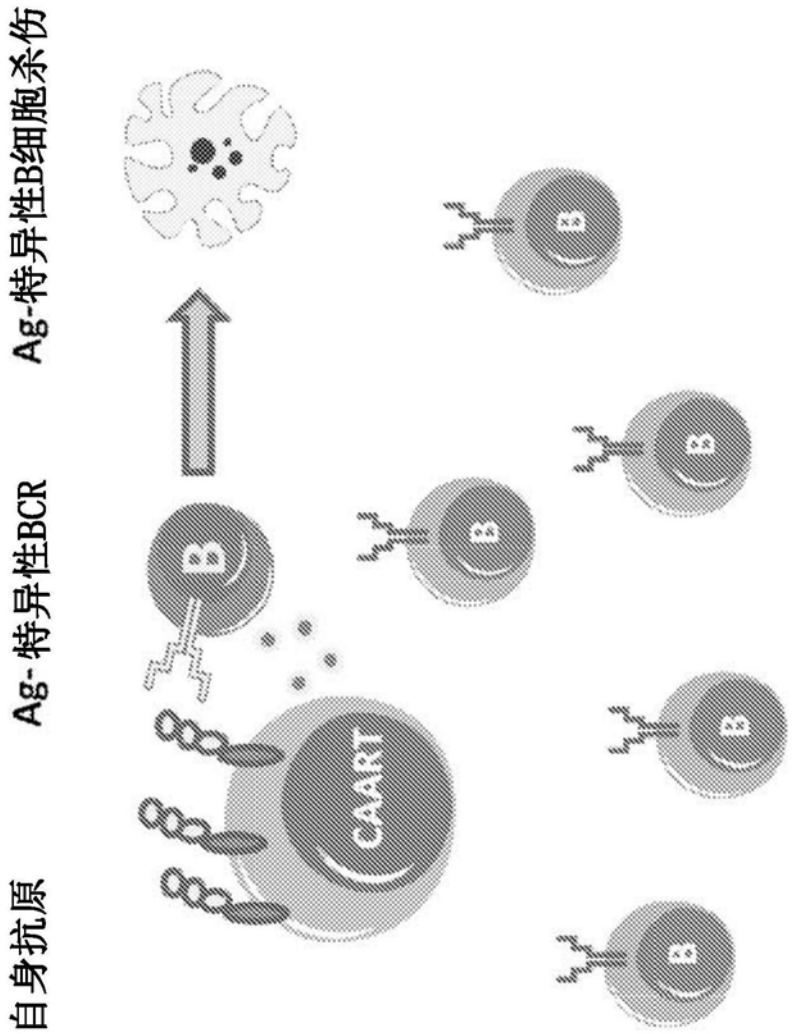


图2

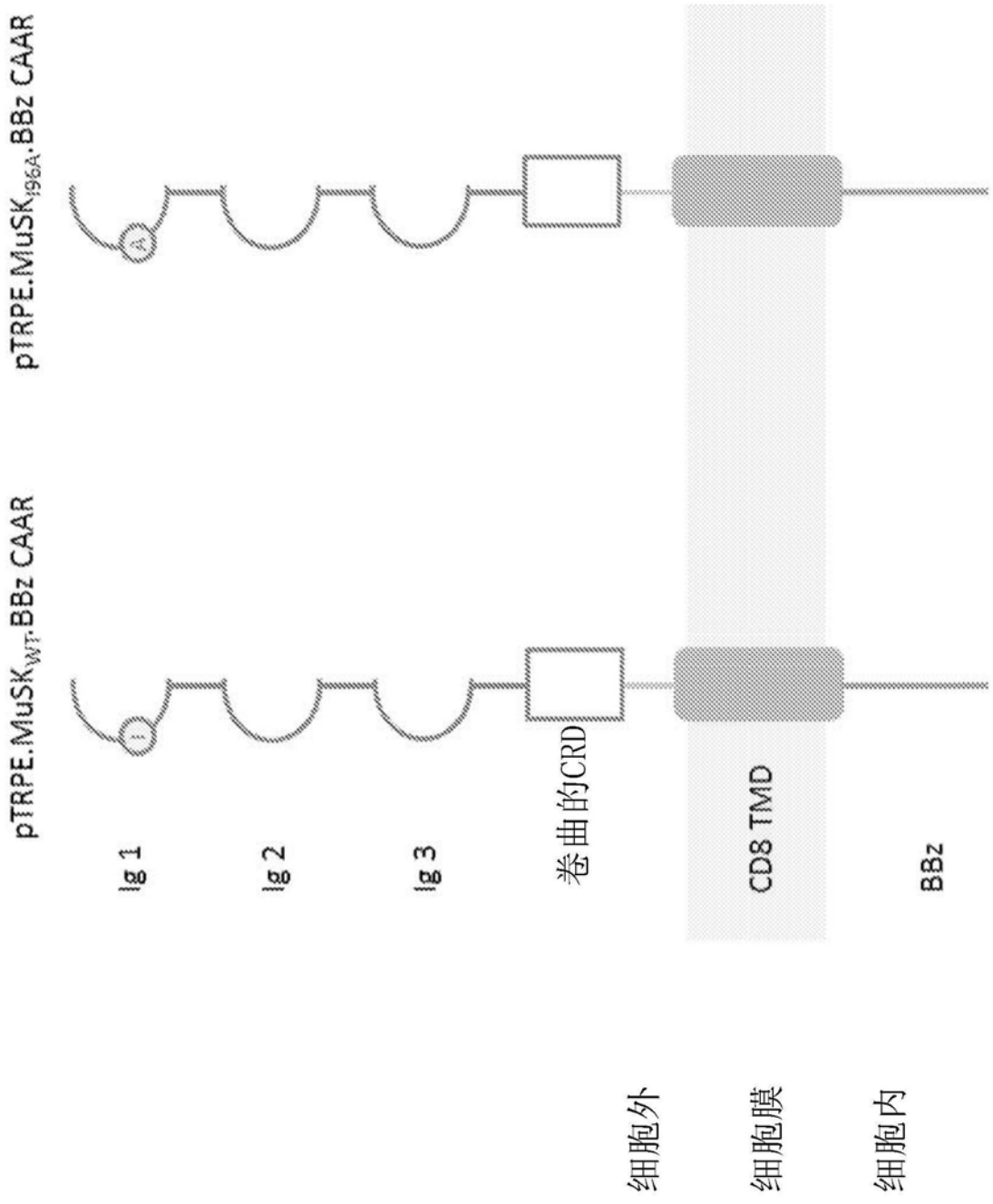

pTRPE.MuSK$_{V96A}$.BBz CAAR
pTRPE.MuSK$_{WT}$.BBz CAAR
A
T
Ig 1
Ig 2
Ig 3
卷曲的CRD
CD8 TMD
BBz
细胞外
细胞膜
细胞内

图3A

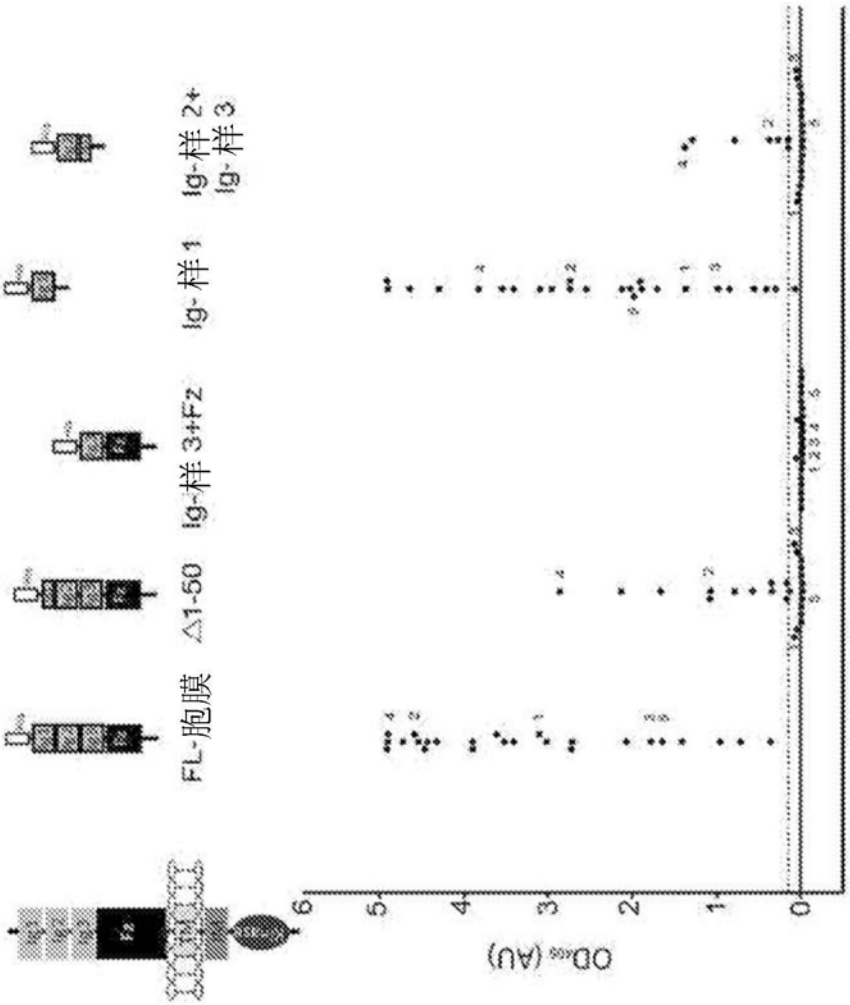


图3B

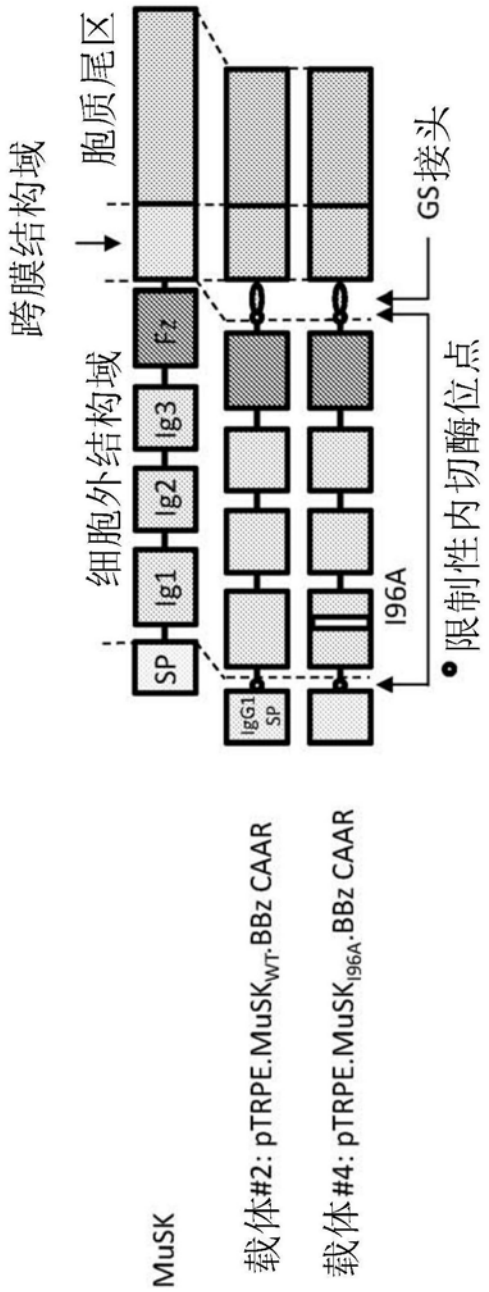

跨膜结构域
胞质尾区
细胞外结构域
SP
Ig1
Ig2
Ig3
Fz
GS接头
限制性内切酶位点
I96A
IgG1 SP
MuSK
载体#2: pTRPE.MuSK$_{WT}$.BBz CAAR
载体#4: pTRPE.MuSK$_{I96A}$.BBz CAAR

图4A

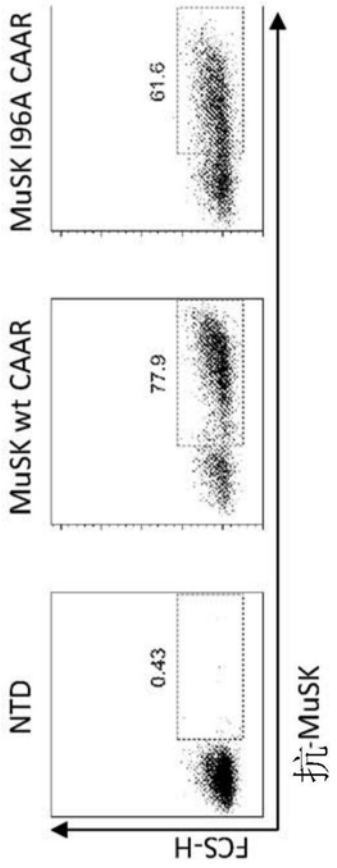


图4B

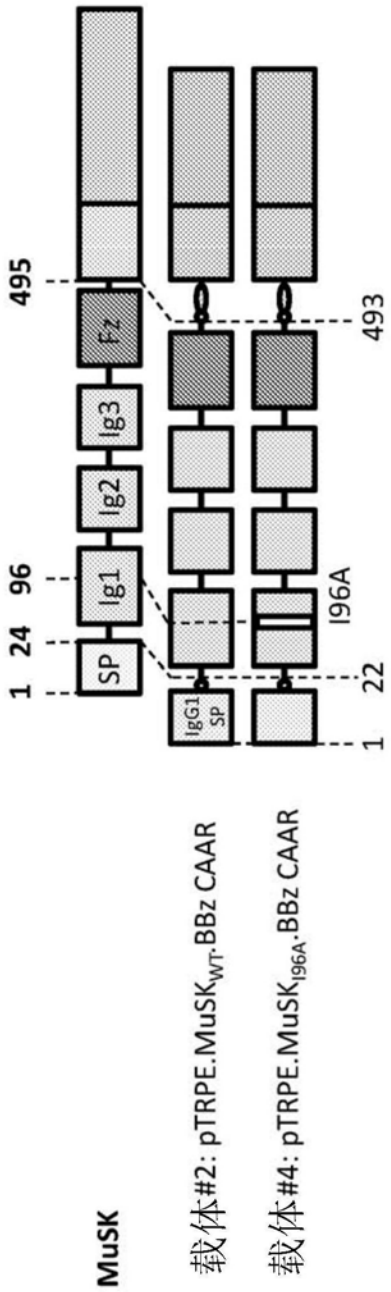

495
Fz
Ig3
Ig2
Ig1
96
24
SP
1
493
I96A
22
IgG1
SP
1
MuSK
载体#2: pTRPE.MuSK$_{WT}$.BBz CAAR
载体#4: pTRPE.MuSK$_{I96A}$.BBz CAAR

图5A

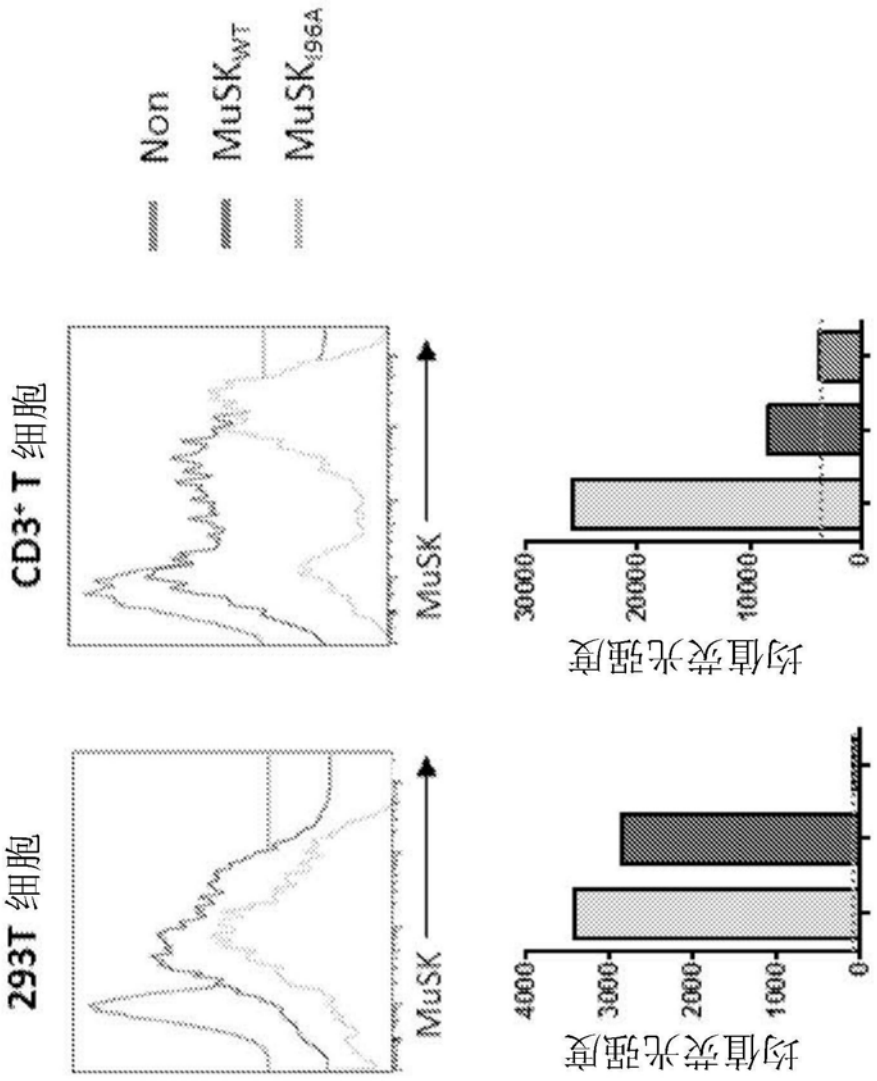

Non
MuSK$_{WT}$
MuSK$_{I96A}$
CD3$^+$ T 细胞
293T 细胞
MuSK
MuSK
均值荧光强度
均值荧光强度
0
10000
20000
30000
0
1000
2000
3000
4000

图5B

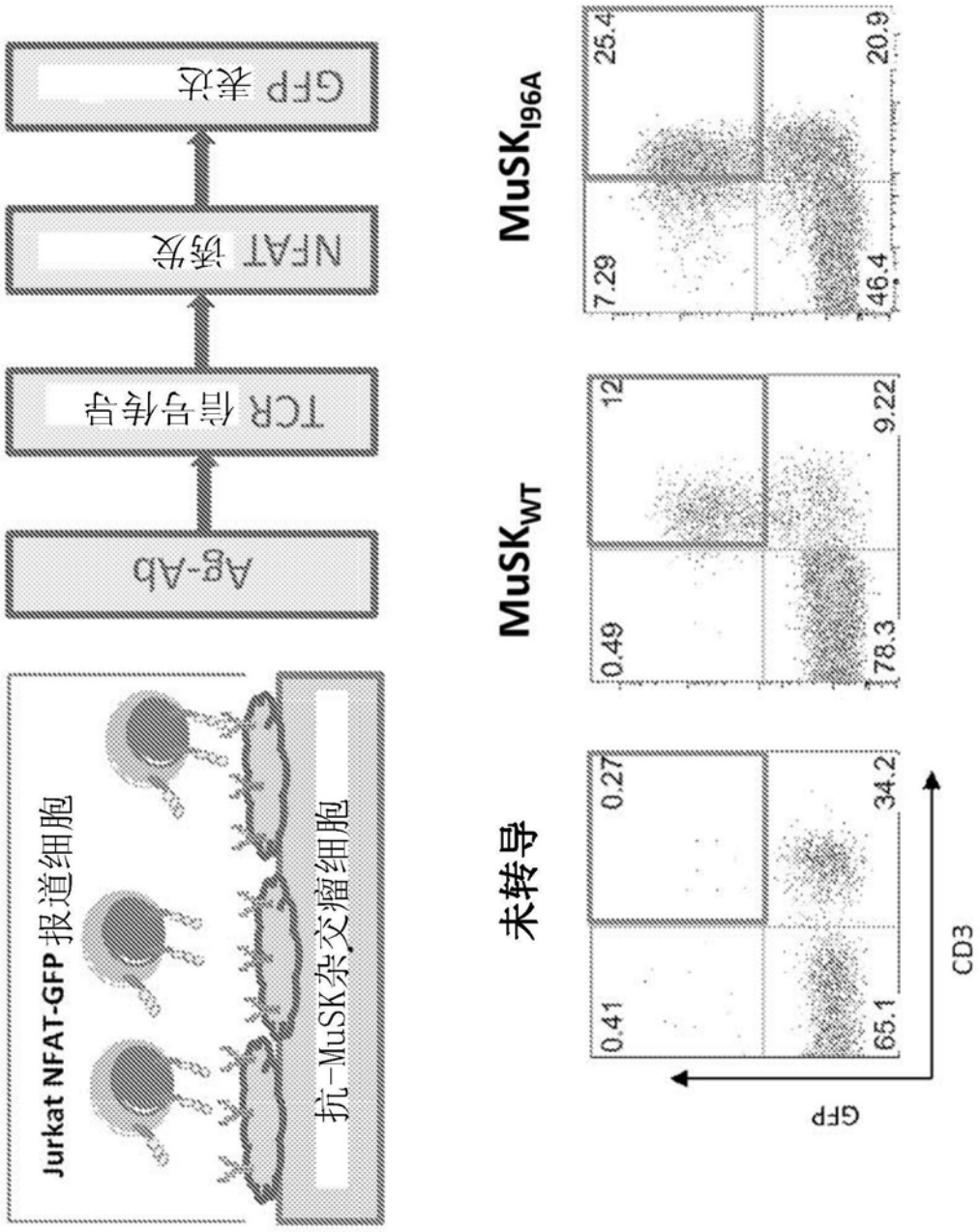

Jurkat NFAT-GFP 报道细胞
抗-MuSK杂交瘤细胞
Ag-Ab
TCR 信号传导
NFAT 诱发
GFP 表达
未转导
MuSK$_{WT}$
MuSK$_{I96A}$
0.41
0.27
34.2
65.1
0.49
12
9.22
78.3
7.29
25.4
20.9
46.4
GFP
CD3

图6

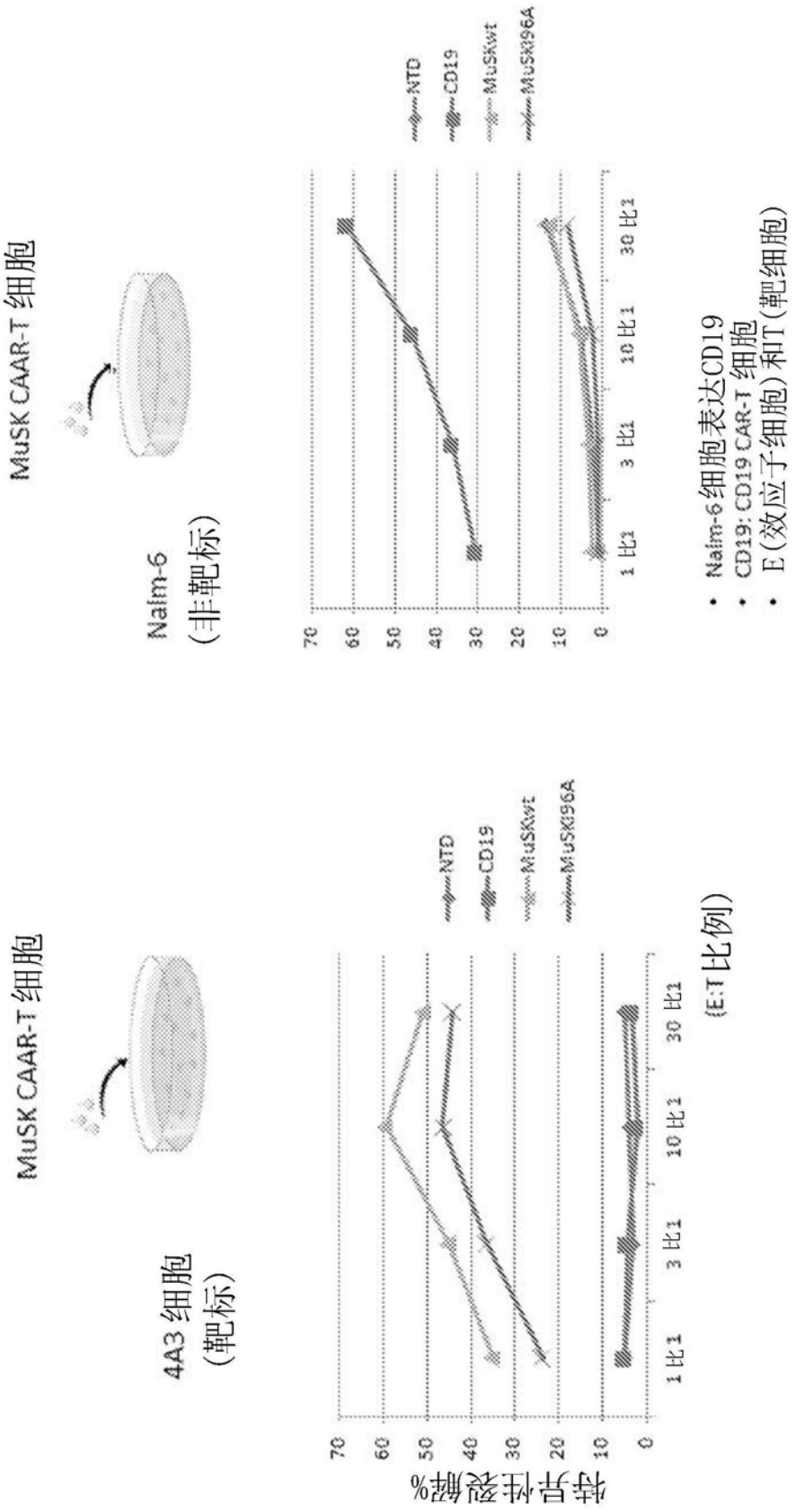

MuSK CAAR-T 细胞
4A3 细胞
(靶标)
Nalm-6
(非靶标)
特异性裂解%
NTD
CD19
MuSKwt
MuSK396A
1 比1
3 比1
10 比1
30 比1
(E:T 比例)
• Nalm-6细胞表达CD19
• CD19: CD19 CAR-T 细胞
• E(效应子细胞)和T(靶细胞)

图7

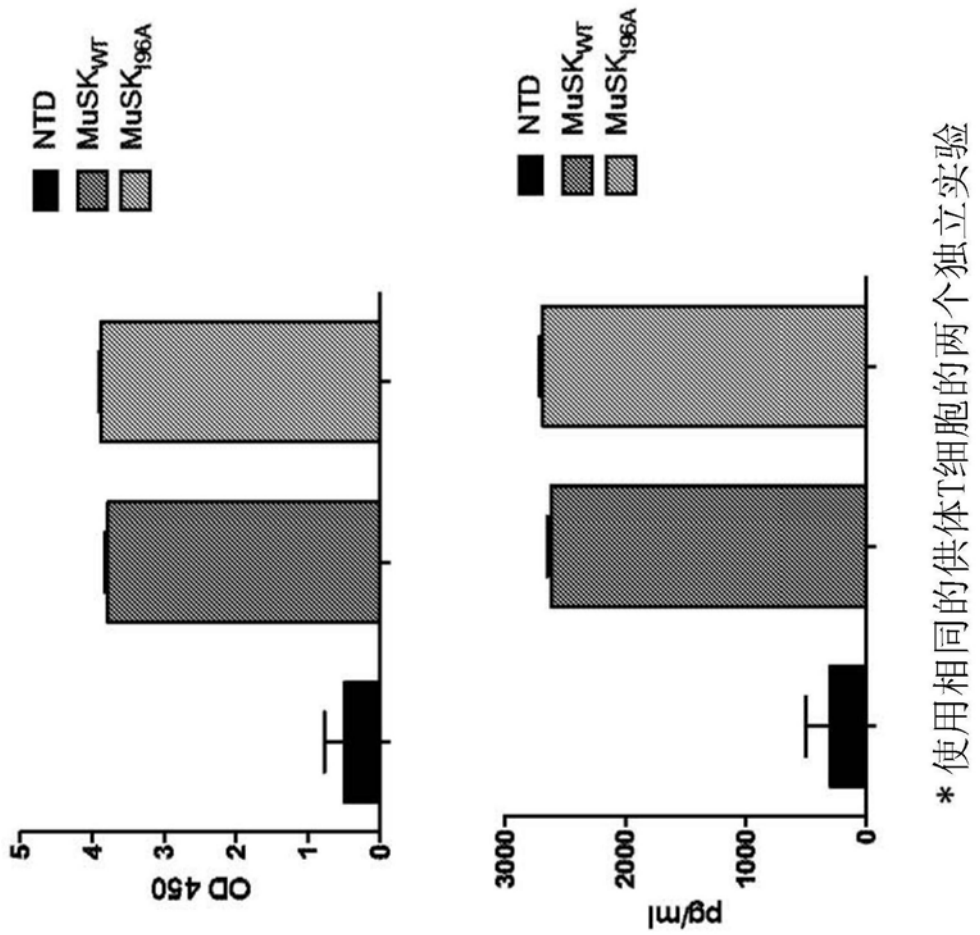

NTD
MuSK$_{WT}$
MuSK$_{196A}$
OD 450
0
1
2
3
4
5
pg/ml
0
1000
2000
3000
* 使用相同的供体T细胞的两个独立实验

图8

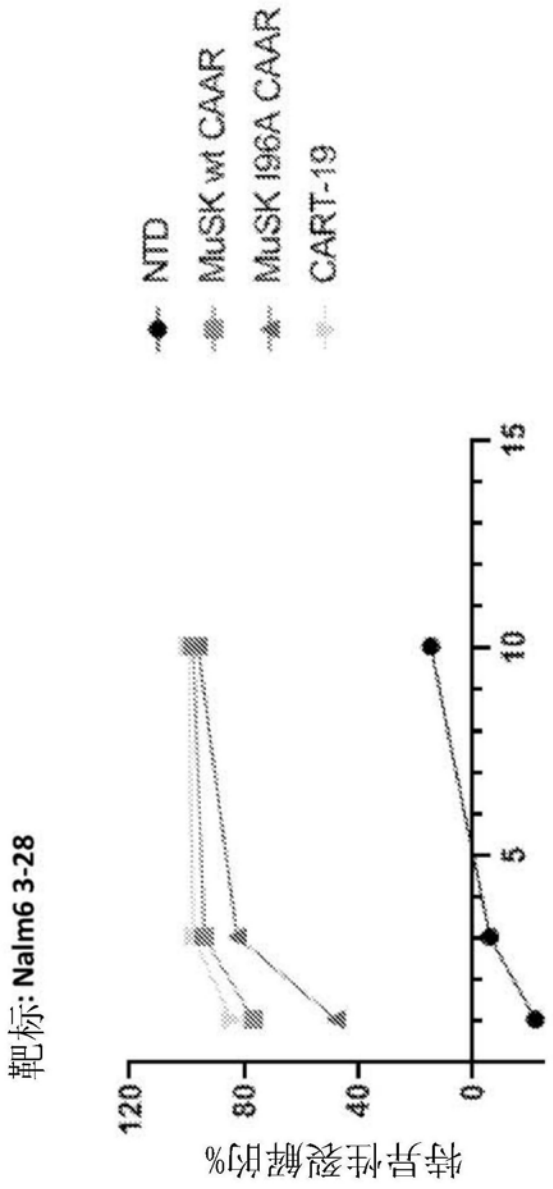

NTD
MuSK wt CAAR
MuSK I96A CAAR
CART-19
靶标: Nalm6 3-28
特异性裂解的%
120
80
40
0
5
10
15

图9A

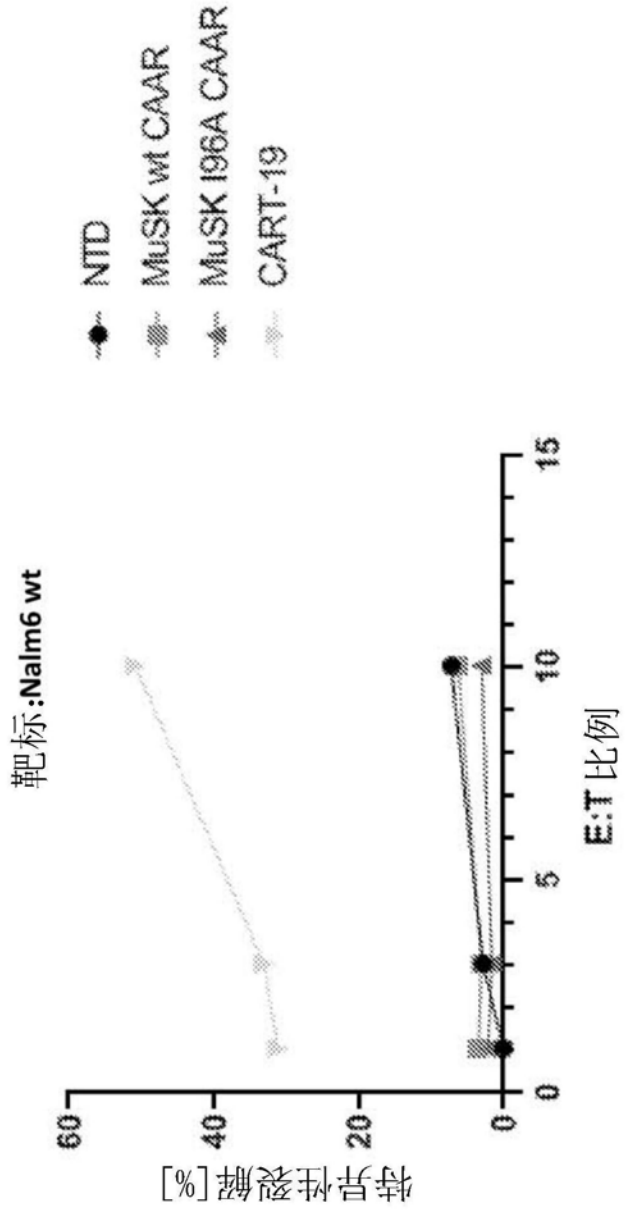

NTD
MuSK wt CAAR
MuSK I96A CAAR
CART-19
靶标:Nalm6 wt
特异性裂解[%]
60
40
20
0
0
5
10
15
E:T 比例

图9B

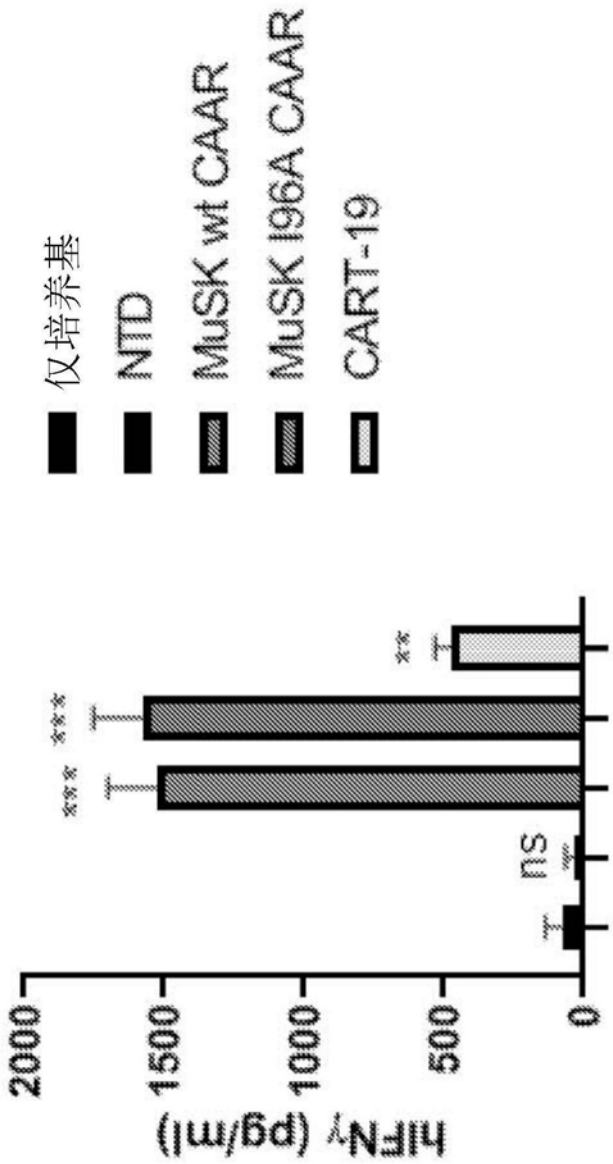

仅培养基
NTD
MuSK wt CAAR
MuSK I96A CAAR
CART-19
hIFNγ (pg/ml)
2000
1500
1000
500
0
ns
***
***
***
**

图10

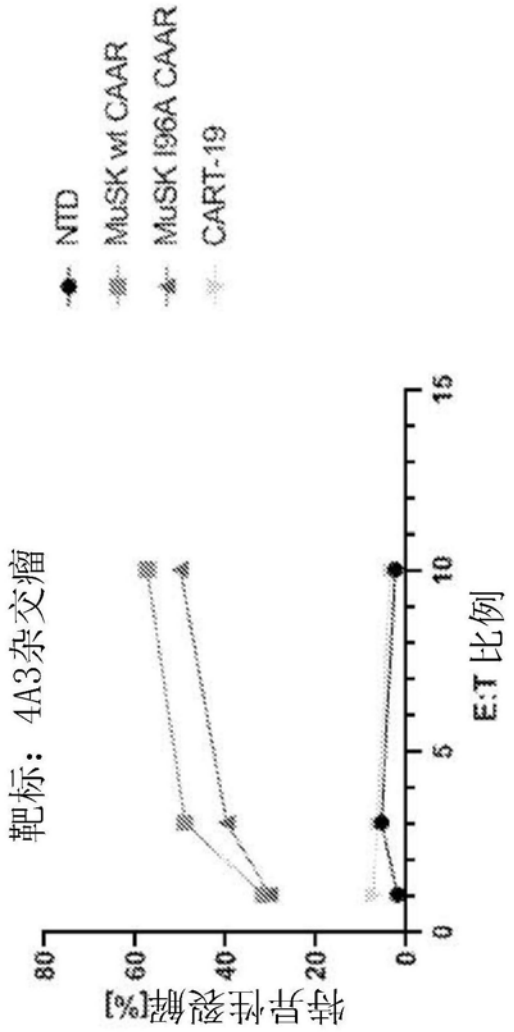

NTD
MuSK wt CAAR
MuSK I96A CAAR
CART-19
靶标： 4A3杂交瘤
特异性裂解[%]
0
20
40
60
80
0
5
10
15
E:T 比例

图11A

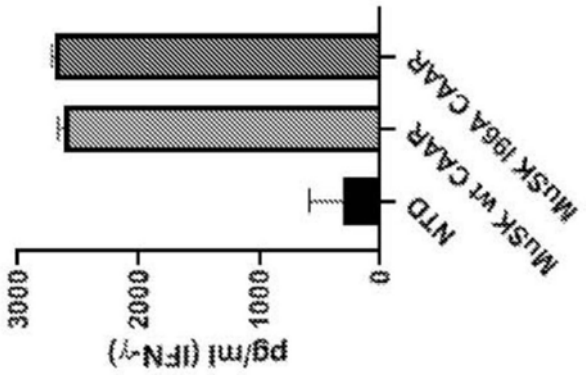

pg/ml (IFN-γ)
0
1000
2000
3000
NTD
MuSK wt CAAR
MuSK I96A CAAR

图11B

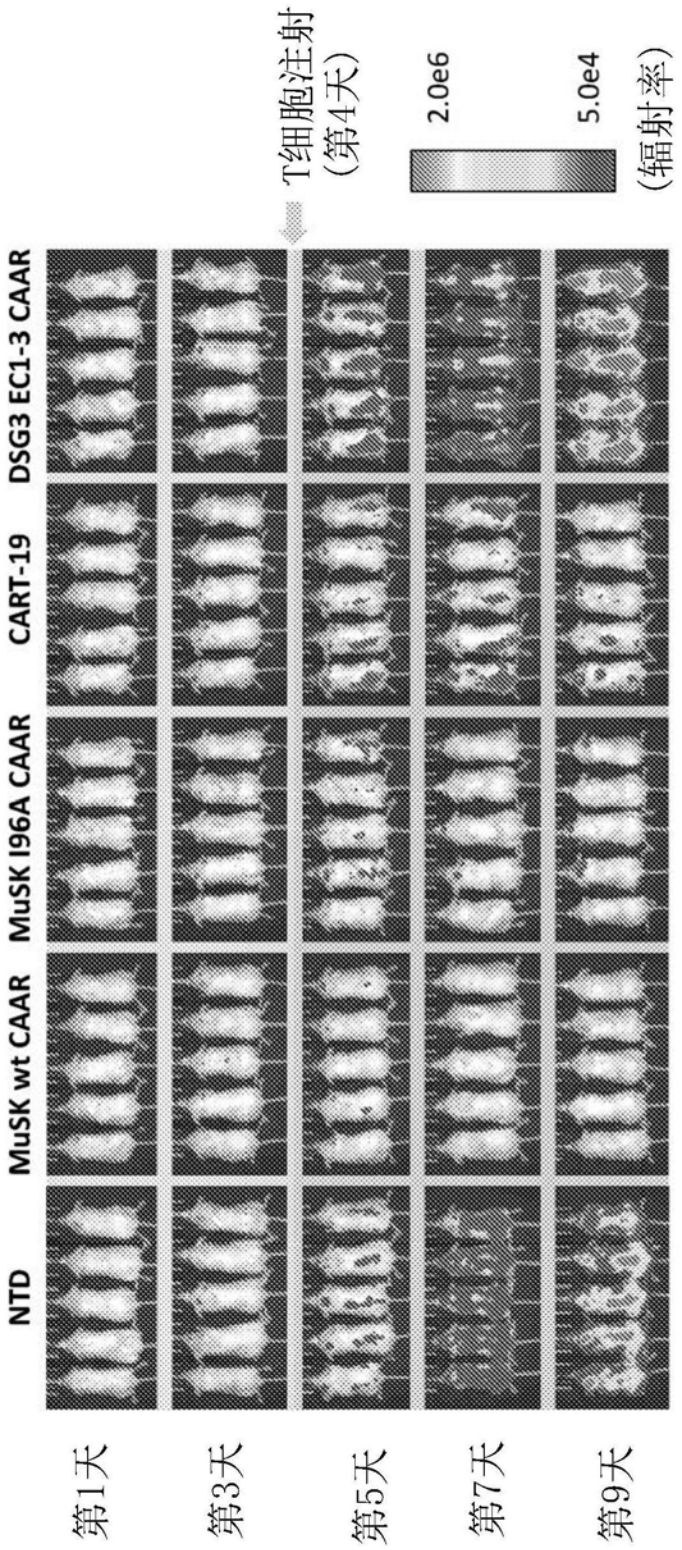

NTD
MuSK wt CAAR
MuSK I96A CAAR
CART-19
DSG3 EC1-3 CAAR
T细胞注射
(第4天)
2.0e6
5.0e4
(辐射率)
第1天
第3天
第5天
第7天
第9天

图12A

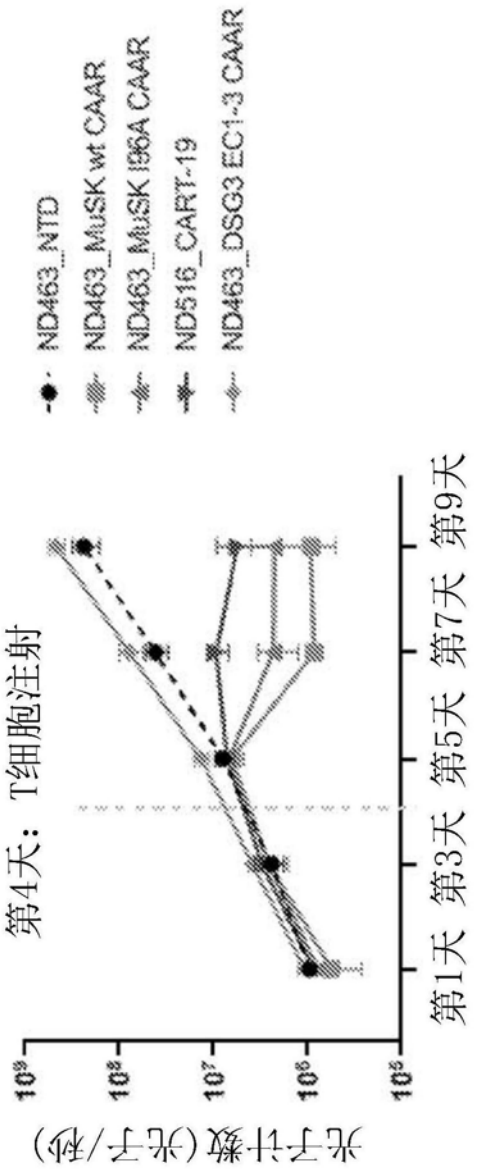

ND463_NTD
ND463_MuSK wt CAAR
ND463_MuSK I96A CAAR
ND516_CART-19
ND463_DSG3 EC1-3 CAAR
第4天：T细胞注射
第1天 第3天 第5天 第7天 第9天
光子计数(光子/秒)
10⁹
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵

图12B

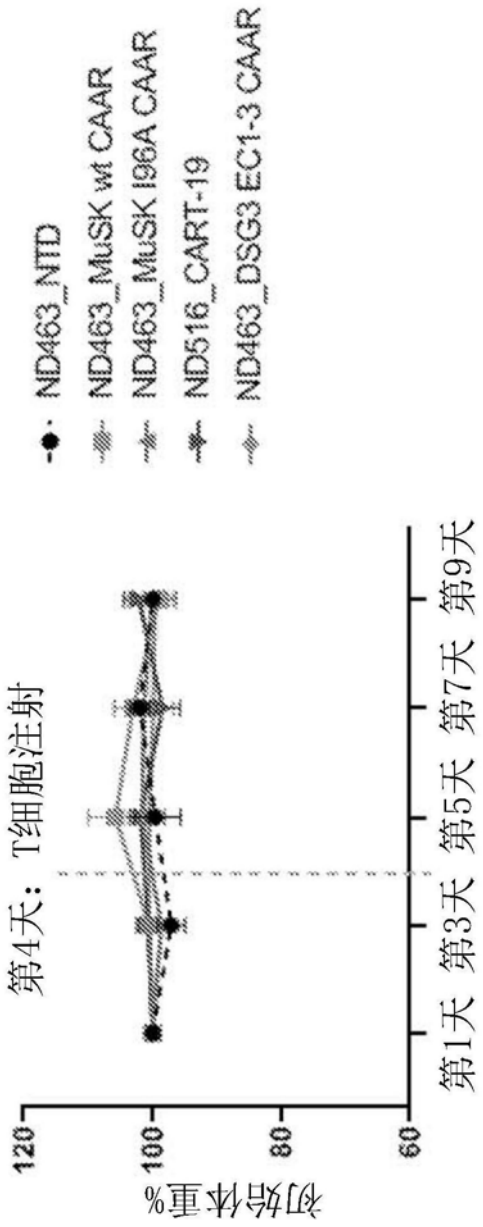

ND463_NTD
ND463_MuSK wt CAAR
ND463_MuSK I96A CAAR
ND516_CART-19
ND463_DSG3 EC1-3 CAAR
第4天：T细胞注射
初始体重%
120
100
80
60
第1天
第3天
第5天
第7天
第9天

图13A

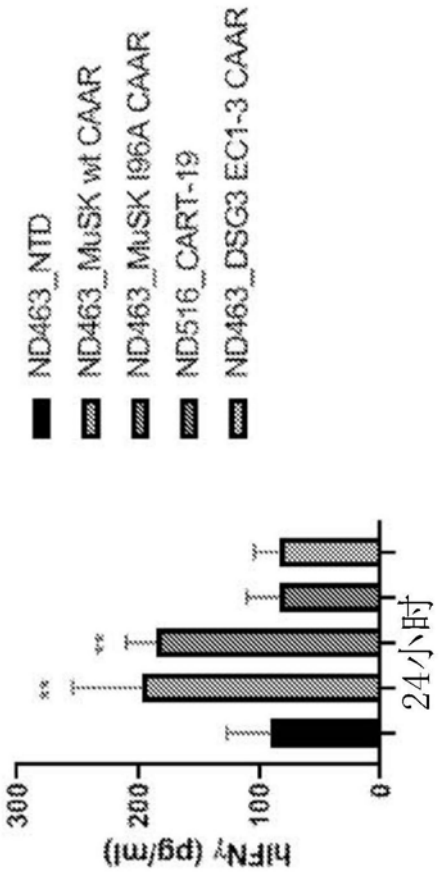

ND463_NTD
ND463_MuSK wt CAAR
ND463_MuSK I96A CAAR
ND516_CART-19
ND463_DSG3 EC1-3 CAAR
hIFNγ (pg/ml)
300
200
100
0
**
**
24小时

图13B

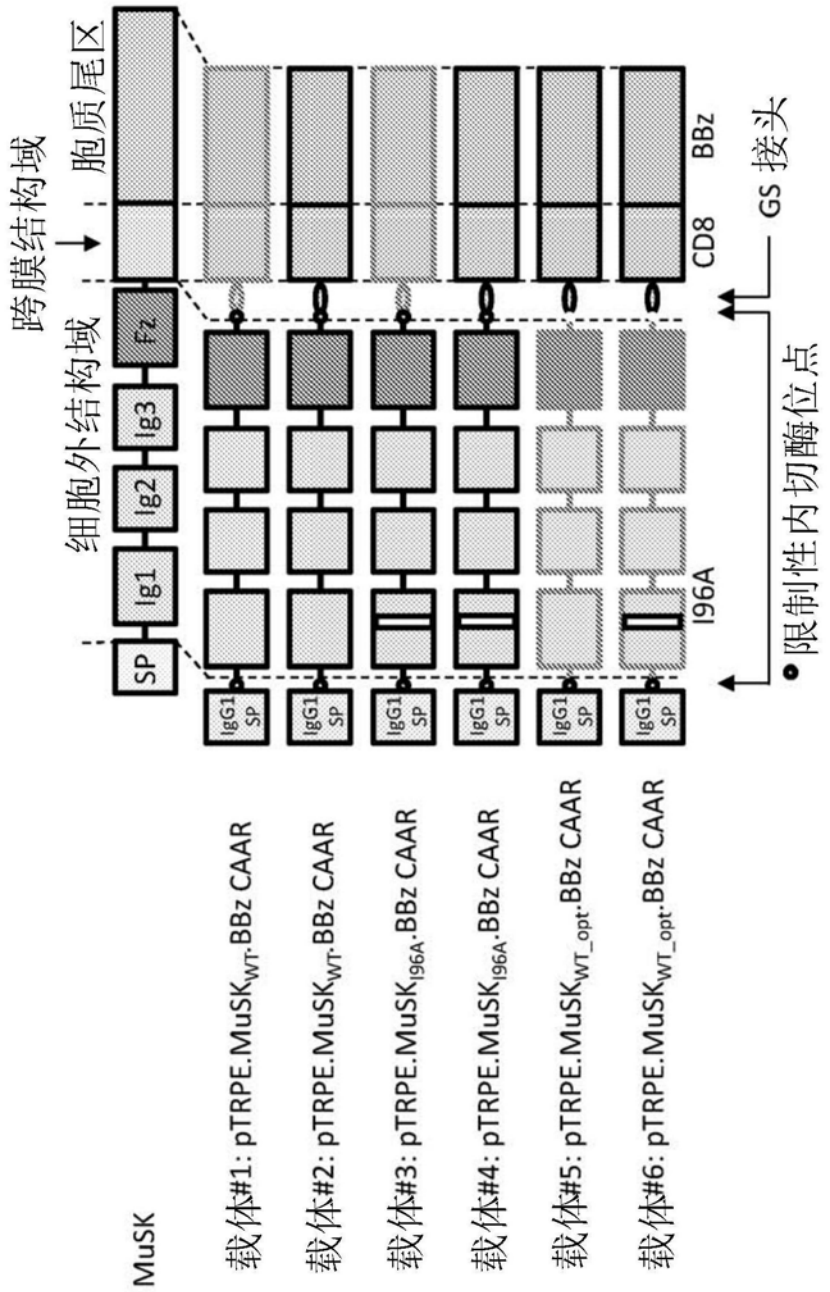

跨膜结构域
胞质尾区
细胞外结构域
SP
Ig1
Ig2
Ig3
Fz
IgG1 SP
CD8
BBz
GS 接头
I96A
限制性内切酶位点
MuSK
载体#1: pTRPE.MuSK$_{WT}$.BBz CAAR
载体#2: pTRPE.MuSK$_{WT}$.BBz CAAR
载体#3: pTRPE.MuSK$_{I96A}$.BBz CAAR
载体#4: pTRPE.MuSK$_{I96A}$.BBz CAAR
载体#5: pTRPE.MuSK$_{WT_opt}$.BBz CAAR
载体#6: pTRPE.MuSK$_{WT_opt}$.BBz CAAR

图14

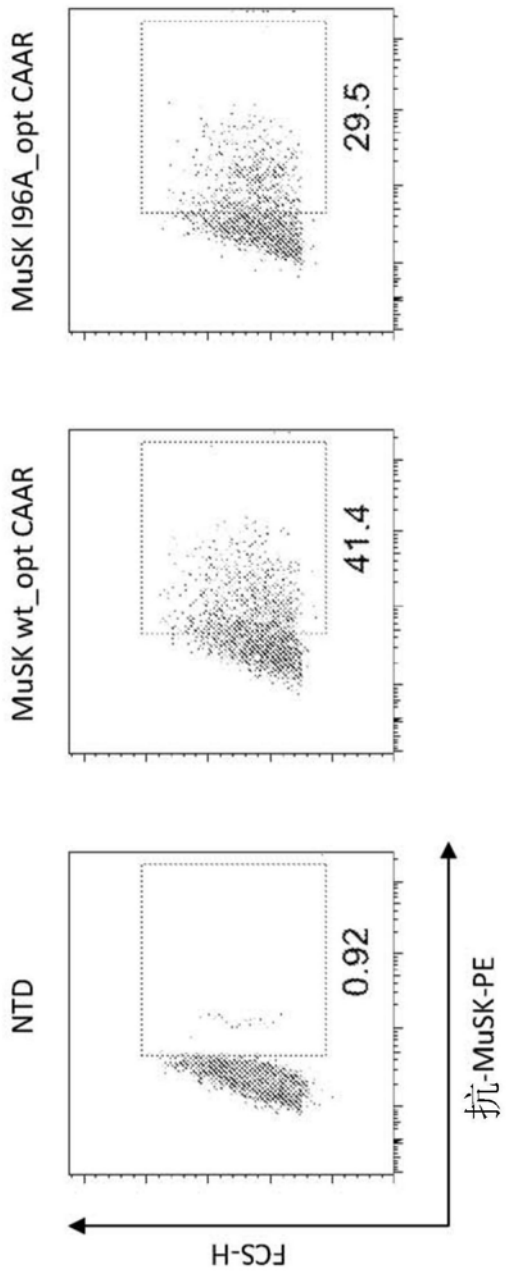

MuSK I96A_opt CAAR
29.5
MuSK wt_opt CAAR
41.4
NTD
0.92
抗-MuSK-PE
FCS-H

图15

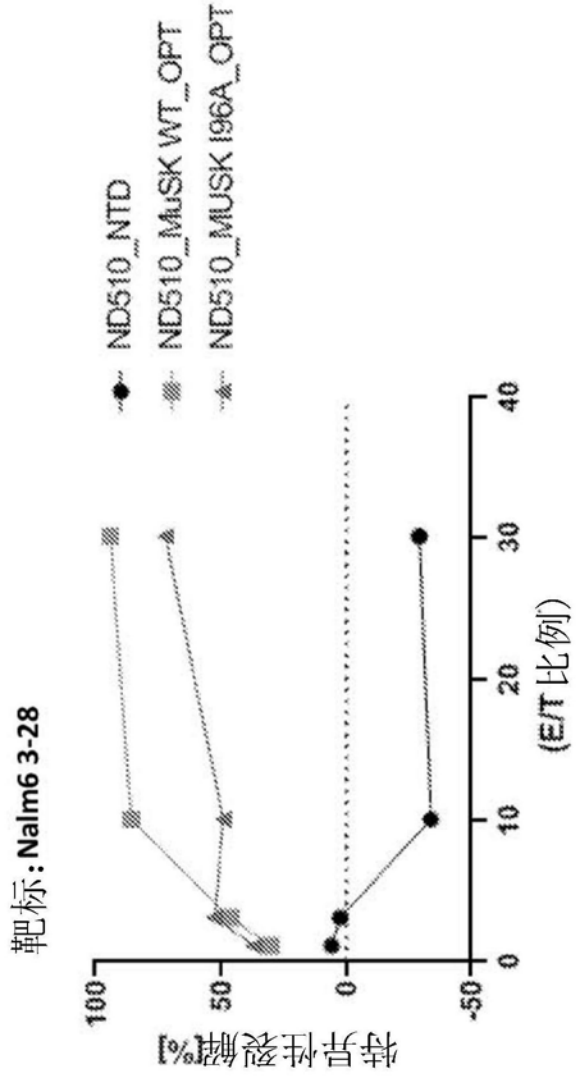

ND510_NTD
ND510_MuSK WT_OPT
ND510_MUSK I96A_OPT
靶标：Nalm6 3-28
特异性裂解[%]
100
50
0
-50
0
10
20
30
40
(E/T比例)

图16