



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114929752 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 19

(21) 申请号 202080084817.5

(22) 申请日 2020.10.08

(30) 优先权数据

62/912,223 2019.10.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2020/051346 2020.10.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/068068 EN 2021.04.15

(71) 申请人 省卫生服务机构

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

申请人 维多利亚大学工业合作股份有限公司

(72) 发明人 B. 奈尔森 M. 富勒 M.J. 布朗格

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 涂滔

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

权利要求书15页 说明书63页

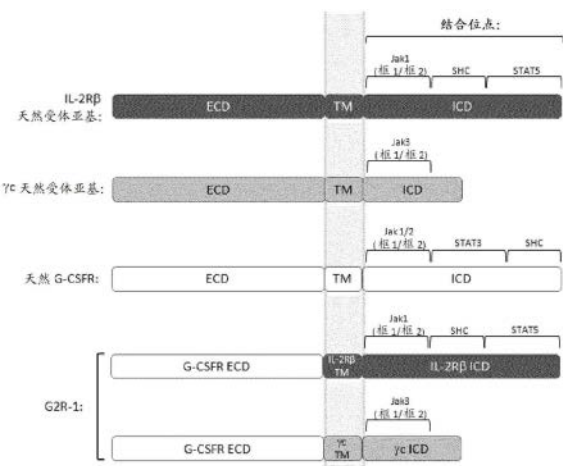
序列表32页 附图30页

(54) 发明名称

嵌合细胞因子受体

(57) 摘要

本文描述了嵌合受体,其包含各种多亚基细胞因子受体的G-CSFR胞外结构域和胞内结构域,所述嵌合受体用于选择性活化所关注细胞中的细胞因子信号传导。在某些方面,表达本文所述的嵌合受体的细胞中细胞因子信号传导的选择性活化包括特异性刺激过继转移细胞的能力。



1. 一种嵌合受体,其包含:

(a) 可操作地连接至第二结构域的G-CSFR (粒细胞集落刺激因子受体) 的胞外结构域(ECD);所述第二结构域包含

(b) 选自由IL-2R (白介素-2受体)、IL-7R (白介素-7受体)、IL-12R (白介素-12受体) 和IL-21R (白介素-21受体) 组成的组的多亚基细胞因子受体的胞内结构域(ICD) 的至少一部分,并且任选地,所述IL-2R选自由IL-2R β 和IL-2R γ c组成的组,并且任选地,所述第二结构域包含IL-2R β 、IL-7R α 、IL-12R β_2 或IL-21R的C端区的至少一部分;

其中所述细胞因子受体的所述ICD的至少一部分包含来自细胞因子受体的胞内结构域的至少一个信号传导分子结合位点,并且任选地,

所述至少一个信号传导分子结合位点选自由以下组成的组:G-CSFR的STAT3结合位点;gp130的STAT3结合位点;gp130的SHP-2结合位点;IL-2R β 的SHC结合位点;IL-2R β 的STAT5结合位点;IL-2R β 的STAT3结合位点;IL-2R β 的STAT1结合位点;IL-7R α 的STAT5结合位点;IL-7R α 的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K) 结合位点;IL-12R β_2 的STAT4结合位点;IL-12R β_2 的STAT5结合位点;IL-12R β_2 的STAT3结合位点;IL-21R的STAT5结合位点;IL-21R的STAT3结合位点;和IL-21R的STAT1结合位点;

并且任选地,所述ICD包含选自由G-CSFR和gp130组成的组的蛋白质的框1区和框2区;

并且任选地,所述嵌合受体包含第三结构域,所述第三结构域包含选自由G-CSFR、gp130 (糖蛋白130) 和IL-2R β 组成的组的蛋白质的跨膜结构域的至少一部分,并且任选地,所述跨膜结构域是野生型跨膜结构域。

2. 一种嵌合受体,其包含:

可操作地连接至第二结构域的G-CSFR的ECD;所述第二结构域包含:

(i)

(a) gp130的跨膜结构域;

(b) gp130的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β 的C端区;或者

(ii)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β 的C端区;或者

(iii)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-12R β_2 的C端区;或者

(iv)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-21R的C端区;或者

(v)

(a) IL-2R β + γ c的跨膜结构域;

(b) IL-2RB+ γ c的框1区和框2区;和

(c) IL-2RB+ γ c的C端区;或者

(vi)

(a) G-CSFR的跨膜结构域

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-7R α 的C端区。

3. 如权利要求1所述的嵌合受体,其中所述活化的嵌合受体形成同二聚体,并且任选地,

所述嵌合受体的所述活化引起选自由表达所述嵌合受体的细胞的增殖、活力和活性增强组成的组的细胞反应,并且任选地,所述嵌合受体在与G-CSF接触时被活化,并且任选地,

所述G-CSF是野生型G-CSF,并且任选地,

所述G-CSFR的所述胞外结构域是野生型胞外结构域。

4. 如权利要求2所述的嵌合受体,其中所述活化的嵌合受体形成同二聚体,并且任选地,

所述嵌合受体的所述活化引起选自由表达所述嵌合受体的细胞的增殖、活力和活性增强组成的组的细胞反应,并且任选地,

所述嵌合受体在与G-CSF接触时被活化,并且任选地,

所述G-CSF是野生型G-CSF,并且任选地,

所述G-CSFR的所述胞外结构域是野生型胞外结构域。

5. 如权利要求1所述的嵌合受体,其中所述嵌合受体在细胞中表达,并且所述细胞任选地是免疫细胞,并且任选地,

T细胞,并且任选地,

NK细胞,并且任选地,

NKT细胞,并且任选地,

B细胞,并且任选地,

浆细胞,并且任选地,

巨噬细胞,并且任选地,

树突细胞,并且任选地,

所述细胞是干细胞,并且任选地,

所述细胞是原代细胞,并且任选地,

所述细胞是人细胞。

6. 如权利要求2所述的嵌合受体,其中所述嵌合受体在细胞中表达,并且所述细胞任选地是

T细胞,并且任选地,

NK细胞,并且任选地,

NKT细胞,并且任选地,

B细胞,并且任选地,

浆细胞,并且任选地,

巨噬细胞,并且任选地,

树突细胞,并且任选地,
所述细胞是干细胞,并且任选地,
所述细胞是原代细胞,并且任选地,
所述细胞是人细胞。

7. 如权利要求3所述的嵌合受体,其中所述嵌合受体在细胞中表达,并且所述细胞任选地是

T细胞,并且任选地,
NK细胞,并且任选地,
NKT细胞,并且任选地,
B细胞,并且任选地,
浆细胞,并且任选地,
巨噬细胞,并且任选地,
树突细胞,并且任选地,
所述细胞是干细胞,并且任选地,
所述细胞是原代细胞,并且任选地,
所述细胞是人细胞。

8. 如权利要求4所述的嵌合受体,其中所述嵌合受体在细胞中表达,并且所述细胞任选地是

T细胞,并且任选地,
NK细胞,并且任选地,
NKT细胞,并且任选地,
B细胞,并且任选地,
浆细胞,并且任选地,
巨噬细胞,并且任选地,
树突细胞,并且任选地,
所述细胞是干细胞,并且任选地,
所述细胞是原代细胞,并且任选地,
所述细胞是人细胞。

9. 如权利要求1所述的嵌合受体,其中所述ICD包含:

(a) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分;或者

(b) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分;或者

(c) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分;或者

(d) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分;或者

(e) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分;或者

(f) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分;或者

(g) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分;或者

(h) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γ c的ICD的至少一部分。

10. 如权利要求2所述的嵌合受体,其中所述ICD包含:

(a) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分;或者

(b) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分;或者

(c) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分;或者

(d) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分;或者

(e) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分;或者

(f) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分;或者

(g) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分;或者

(h) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γ c的ICD的至少一部分。

11. 如权利要求1所述的嵌合受体,其中所述跨膜结构域包含由以下示出的序列:

(a) SEQ ID NO.8;或

(b) SEQ ID NO.9;或

(c) SEQ ID NO.10;或

(d) SEQ ID NO.11。

12. 如权利要求2所述的嵌合受体,其中所述跨膜结构域包含由以下示出的序列:

(a) SEQ ID NO.8;或

(b) SEQ ID NO.9;或

(c) SEQ ID NO.10;或

(d) SEQ ID NO.11。

13. 一种核酸,其编码嵌合受体;其中所述嵌合受体包含:

(a) 可操作地连接至第二结构域的G-CSFR(粒细胞集落刺激因子受体)的胞外结构域(ECD);所述第二结构域包含

(b) 选自由IL-2R(白介素-2受体)、IL-7R(白介素-7受体)、IL-12R(白介素-12受体)和IL-21R(白介素-21受体)组成的组的多亚基细胞因子受体的胞内结构域(ICD)的至少一部分,并且任选地,

所述IL-2R选自由IL-2R β 和IL-2R γ c组成的组,并且任选地,

所述第二结构域包含IL-2R β 、IL-7R α 、IL-12R β_2 或IL-21R的C端区的至少一部分;其中

所述细胞因子受体的所述ICD的至少一部分包含来自细胞因子受体的胞内结构域的至少一个信号传导分子结合位点,并且任选地,

所述ICD包含选自由以下组成的组的至少一个信号传导分子结合位点:G-CSFR的STAT3结合位点;gp130的STAT3结合位点;gp130的SHP-2结合位点;IL-2R β 的SHC结合位点;IL-2R β 的STAT5结合位点;IL-2R β 的STAT3结合位点;IL-2R β 的STAT1结合位点;IL-7R α 的STAT5结合位点;IL-7R α 的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)结合位点;IL-12R β_2 的STAT4结合位点;IL-12R β_2 的STAT5结合位点;IL-12R β_2 的STAT3结合位点;IL-21R的STAT5结合位点;IL-21R的STAT3结合位点;和IL-21R的STAT1结合位点;

并且任选地,所述ICD包含选自由G-CSFR和gp130组成的组的蛋白质的框1区和框2区;

并且任选地,所述嵌合受体包含第三结构域,所述第三结构域包含选自由G-CSFR、

gp130(糖蛋白130)和IL-2R β 组成的组的蛋白质的跨膜结构域的至少一部分,并且任选地,所述跨膜结构域是野生型跨膜结构域。

14. 如权利要求13所述的核酸,其中所述G-CSFR的所述ECD由SEQ ID NO.5或6中示出的核酸序列编码。

15. 如权利要求13所述的核酸,其包含:

(a) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分的序列;或者

(b) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

(c) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分的序列;或者

(d) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分的序列;或者

(e) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分的序列;或者

(f) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分的序列;或者

(g) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

(h) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γ c的ICD的至少一部分的序列。

16. 如权利要求14所述的核酸,其包含:

(a) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分的序列;或者

(b) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

(c) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分的序列;或者

(d) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分的序列;或者

(e) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分的序列;或者

(f) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分的序列;或者

(g) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

(h) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γ c的ICD的至少一部分的序列。

17. 一种表达载体,其包含权利要求13-16中任一项所述的核酸。

18. 如权利要求17所述的表达载体,其中所述载体选自由以下组成的组:逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和质粒。

19. 一种核酸,其编码嵌合受体;其中所述嵌合受体包含:

可操作地连接至第二结构域的G-CSFR的ECD;所述第二结构域包含:

(i)

(a) gp130的跨膜结构域;

(b) gp130的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β 的C端区;或者

(ii)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β 的C端区;或者

(iii)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-12R β_2 的C端区;或者

(iv)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-21R的C端区;或者

(v)

(a) IL-2R β + γ_c 的跨膜结构域;

(b) IL-2R β + γ_c 的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β + γ_c 的C端区;或者

(vi)

(a) G-CSFR的跨膜结构域

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-7R α 的C端区。

20. 如权利要求19所述的核酸,其中所述G-CSFR的所述ECD 由SEQ ID NO.5或6中示出的核酸序列编码。

21. 如权利要求19所述的核酸,其包含:

(a) 编码具有氨基序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分的序列;或者

(b) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

(c) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分的序列;或者

(d) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分的序列;或者

(e) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分的序列;或者

(f) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分的序列;或者

(g) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

(h) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γ_c 的ICD的至少一部分的序列。

22. 如权利要求20所述的核酸,其包含:

(a) 编码具有氨基序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分的序列;或者

(b) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

(c) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分的序列;或者

(d) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分的序列;或者

(e) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分的序列;或者

(f) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分的序列;或者

(g) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

(h) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γ c的ICD的至少一部分的序列。

23. 一种表达载体,其包含权利要求19-22中任一项所述的核酸。

24. 如权利要求23所述的表达载体,其中所述载体选自由以下组成的组:逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和质粒。

25. 一种细胞,其包含编码嵌合受体的核酸;其中所述嵌合受体包含:

(a) 可操作地连接至第二结构域的G-CSFR (粒细胞集落刺激因子受体) 可操作地连接的受体的胞外结构域 (ECD);所述第二结构域包含

(b) 选自由IL-2R (白介素-2受体)、IL-7R (白介素-7受体)、IL-12R (白介素-12受体) 和IL-21R (白介素-21受体) 组成的组的多亚基细胞因子受体的胞内结构域 (ICD) 的至少一部分,并且任选地,

所述IL-2R选自由IL-2R β 和IL-2R γ c组成的组,并且任选地,

所述第二结构域包含IL-2R β 、IL-7R α 、IL-12R β_2 或IL-21R的C端区的至少一部分;其中

所述细胞因子受体的所述ICD的至少一部分包含来自细胞因子受体的胞内结构域的至少一个信号传导分子结合位点,并且任选地,

所述ICD包含选自由以下组成的组的至少一个信号传导分子结合位点:G-CSFR的STAT3结合位点;gp130的STAT3结合位点;gp130的SHP-2结合位点;IL-2R β 的SHC结合位点;IL-2R β 的STAT5结合位点;IL-2R β 的STAT3结合位点;IL-2R β 的STAT1结合位点;IL-7R α 的STAT5结合位点;IL-7R α 的磷脂酰肌醇3-激酶 (PI3K) 结合位点;IL-12R β_2 的STAT4结合位点;IL-12R β_2 的STAT5结合位点;IL-12R β_2 的STAT3结合位点;IL-21R的STAT5结合位点;IL-21R的STAT3结合位点;和IL-21R的STAT1结合位点;

并且任选地,所述ICD包含选自由G-CSFR和gp130组成的组的蛋白质的框1区和框2区;

并且任选地,所述嵌合受体包含第三结构域,所述第三结构域包含选自由G-CSFR、gp130 (糖蛋白130) 和IL-2R β 组成的组的蛋白质的跨膜结构域的至少一部分,并且任选地,

所述跨膜结构域是野生型跨膜结构域;并且任选地,

所述细胞是免疫细胞,并且任选地,

T细胞,并且任选地,

NK细胞,并且任选地,

NKT细胞,并且任选地,

B细胞,并且任选地,

浆细胞,并且任选地,

巨噬细胞,并且任选地,

树突细胞,并且任选地,

所述细胞是干细胞,并且任选地,

所述细胞是原代细胞,并且任选地,

所述细胞是人细胞。

26. 一种细胞,其包含编码嵌合受体的核酸;其中所述嵌合受体包含:可操作地连接至第二结构域的G-CSFR的ECD;所述第二结构域包含:

(i)

(a) gp130的跨膜结构域;

(b) gp130的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β 的C端区;或者

(ii)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β 的C端区;或者

(iii)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-12R β_2 的C端区;或者

(iv)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-21R的C端区;或者

(v)

(a) IL-2R β + γ c的跨膜结构域;

(b) IL-2R β + γ c的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β + γ c的C端区;或者

(vi)

(a) G-CSFR的跨膜结构域

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-7R α 的C端区;并且任选地,

所述细胞是免疫细胞;并且任选地,

T细胞,并且任选地,

NK细胞,并且任选地,

NKT细胞,并且任选地,

B细胞,并且任选地,

浆细胞,并且任选地,

巨噬细胞,并且任选地,

树突细胞,并且任选地,

所述细胞是干细胞,并且任选地,

所述细胞是原代细胞,并且任选地,

所述细胞是人细胞。

27. 如权利要求25或26所述的细胞,其中所述G-CSFR的所述ECD由SEQ ID NO.5或6中示出的核酸序列编码。

28. 如权利要求27所述的细胞,其中所述核酸包含:

(a) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分的序列;或者

(b) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

(c) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分的序列;或者

(d) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分的序列;或者

(e) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分的序列;或者

(f) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分的序列;或者

(g) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

(h) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2RG的ICD的至少一部分的序列。

29. 一种细胞,其包含权利要求17、18、23或24所述的表达载体,并且任选地,

所述细胞是免疫细胞,并且任选地,

T细胞,并且任选地,

NK细胞,并且任选地,

NKT细胞,并且任选地,

B细胞,并且任选地,

浆细胞,并且任选地,

巨噬细胞,并且任选地,

树突细胞,并且任选地,

所述细胞是干细胞,并且任选地,

所述细胞是原代细胞,并且任选地,

所述细胞是人细胞。

30. 一种细胞,其包含权利要求1所述的嵌合受体,并且任选地,

所述细胞是免疫细胞,并且任选地,

T细胞,并且任选地,

NK细胞,并且任选地,

NKT细胞,并且任选地,

B细胞,并且任选地,

浆细胞,并且任选地,

巨噬细胞,并且任选地,

树突细胞,并且任选地,

所述细胞是干细胞,并且任选地,

所述细胞是原代细胞,并且任选地,

所述细胞是人细胞。

31. 一种细胞,其包含权利要求2所述的嵌合受体,并且任选地,

所述细胞是免疫细胞,并且任选地,

T细胞,并且任选地,

NK细胞,并且任选地,
NKT细胞,并且任选地,
B细胞,并且任选地,
浆细胞,并且任选地,
巨噬细胞,并且任选地,
树突细胞,并且任选地,
所述细胞是干细胞,并且任选地,
所述细胞是原代细胞,并且任选地,
所述细胞是人细胞。

32. 一种选择性活化在细胞表面上表达的嵌合受体的方法,其包括:

使嵌合受体与选择性活化所述嵌合受体的G-CSF接触;其中所述嵌合受体包含:

(a) 可操作地连接至第二结构域的G-CSFR (粒细胞集落刺激因子受体) 的胞外结构域(ECD);所述第二结构域包含

(b) 选自由IL-2R(白介素-2受体)、IL-7R(白介素-7受体)、IL-12R(白介素-12受体)和IL-21R(白介素-21受体)组成的组的多亚基细胞因子受体的胞内结构域(ICD)的至少一部分,并且任选地,

所述IL-2R选自由IL-2R β 和IL-2R γ c组成的组,并且任选地,

所述第二结构域包含IL-2R β 、IL-7R α 、IL-12R β_2 或IL-21R的C端区的至少一部分;其中

所述细胞因子受体的所述ICD的至少一部分包含来自细胞因子受体的胞内结构域的至少一个信号传导分子结合位点,并且任选地,

所述至少一个信号传导分子结合位点选自由以下组成的组:G-CSFR的STAT3结合位点;gp130的STAT3结合位点;gp130的SHP-2结合位点;IL-2R β 的SHC结合位点;IL-2R β 的STAT5结合位点;IL-2R β 的STAT3结合位点;IL-2R β 的STAT1结合位点;IL-7R α 的STAT5结合位点;IL-7R α 的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)结合位点;IL-12R β_2 的STAT4结合位点;IL-12R β_2 的STAT5结合位点;IL-12R β_2 的STAT3结合位点;IL-21R的STAT5结合位点;IL-21R的STAT3结合位点;和IL-21R的STAT1结合位点,并且任选地

所述ICD包含选自由G-CSFR和gp130组成的组的蛋白质的框1区和框2区;

并且任选地,所述嵌合受体包含第三结构域,所述第三结构域包含选自由G-CSFR、gp130(糖蛋白130)和IL-2R β 组成的组的蛋白质的跨膜结构域的至少一部分,并且任选地,

所述跨膜结构域是野生型跨膜结构域。

33. 一种选择性活化在细胞表面上表达的嵌合受体的方法,其包括:

使嵌合受体与选择性活化所述嵌合受体的G-CSF接触;其中所述嵌合受体包含

可操作地连接至第二结构域的G-CSFR的ECD;所述第二结构域包含:

(i)

(a) gp130的跨膜结构域;

(b) gp130的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β 的C端区;或者

(ii)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β 的C端区;或者

(iii)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-12R β_2 的C端区;或者

(iv)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-21R的C端区;或者

(v)

(a) IL-2R β + γ c的跨膜结构域;

(b) IL-2R β + γ c的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β + γ c的C端区;或者

(vi)

(a) G-CSFR的跨膜结构域

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-7R α 的C端区。

34. 如权利要求32或33所述的方法,其中所述活化的嵌合受体形成同二聚体,并且任选地,

所述嵌合受体的所述活化引起选自由表达所述嵌合受体的细胞的增殖、活力和活性增强组成的组的细胞反应,并且任选地,所述嵌合受体在与G-CSF接触时被活化,并且任选地,

所述G-CSF是野生型G-CSF,并且任选地,

所述G-CSFR的所述胞外结构域是野生型胞外结构域;其中

所述嵌合受体在细胞中表达,并且所述细胞任选地是,

免疫细胞,并且任选地,

T细胞,并且任选地,

NK细胞,并且任选地,

NKT细胞,并且任选地,

B细胞,并且任选地,

浆细胞,并且任选地,

巨噬细胞,并且任选地,

树突细胞,并且任选地,

所述细胞是干细胞,并且任选地,

所述细胞是原代细胞,并且任选地,

所述细胞是人细胞。

35. 如权利要求34所述的方法,其中所述嵌合受体包含

(a) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分;或者

(b) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分;或者
(c) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分;或者
(d) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分;或者
(e) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分;或者

(f) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分;或者
(g) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分;或者
(h) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γ c的ICD的至少一部分;并且其中所述跨膜结构域包含由以下示出的序列:

(a) SEQ ID NO.8;或
(b) SEQ ID NO.9;或
(c) SEQ ID NO.10;或
(d) SEQ ID NO.11。

36. 一种在细胞中产生嵌合受体的方法,其包括:

将权利要求13-16或19-22中任一项所述的核酸或如权利要求17、18、23或24中任一项所述的表达载体引入到所述细胞中;并且任选地,所述方法包括基因编辑;并且任选地,

所述细胞是免疫细胞;并且任选地,

T细胞,并且任选地,

NK细胞,并且任选地,

NKT细胞,并且任选地,

B细胞,并且任选地,

浆细胞,并且任选地,

巨噬细胞,并且任选地,

树突细胞,并且任选地,

所述细胞是干细胞,并且任选地,

所述细胞是原代细胞,并且任选地,

所述细胞是人细胞。

37. 一种治疗有需要的受试者的方法,其包括:

向所述受试者输注表达嵌合受体的细胞,并施用结合所述嵌合受体的细胞因子;其中所述嵌合受体包含:

(a) 可操作地连接至第二结构域的G-CSFR (粒细胞集落刺激因子受体) 的胞外结构域(ECD);所述第二结构域包含

(b) 选自由IL-2R(白介素-2受体)、IL-7R(白介素-7受体)、IL-12R(白介素-12受体)和IL-21R(白介素-21受体)组成的组的多亚基细胞因子受体的胞内结构域(ICD)的至少一部分;并且任选地,

所述IL-2R选自由IL-2R β 和IL-2R γ c组成的组;并且任选地,

所述第二结构域包含IL-2R β 、IL-7R α 、IL-12R β_2 或IL-21R的C端区的至少一部分;其中

所述细胞因子受体的所述ICD的至少一部分包含来自细胞因子受体的胞内结构域的至少一个信号传导分子结合位点;并且任选地,

所述ICD包含选自由以下组成的组的至少一个信号传导分子结合位点:G-CSFR的STAT3结合位点;gp130的STAT3结合位点;gp130的SHP-2结合位点;IL-2R β 的SHC结合位点;IL-2R β 的STAT5结合位点;IL-2R β 的STAT3结合位点;IL-2R β 的STAT1结合位点;IL-7R α 的STAT5结合位点;IL-7R α 的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)结合位点;IL-12R β_2 的STAT4结合位点;IL-12R β_2 的STAT5结合位点;IL-12R β_2 的STAT3结合位点;IL-21R的STAT5结合位点;IL-21R的STAT3结合位点;和IL-21R的STAT1结合位点;

并且任选地,所述ICD包含选自由G-CSFR和gp130组成的组的蛋白质的框1区和框2区;

并且任选地,所述嵌合受体包含包含第三结构域,所述第三结构域包含选自由G-CSFR、gp130(糖蛋白130)和IL-2R β 组成的组的蛋白质的跨膜结构域的至少一部分,并且任选地,所述跨膜结构域是野生型跨膜结构域。

38. 一种治疗有需要的受试者的方法,其包括:

向所述受试者输注表达嵌合受体的细胞,并施用结合所述嵌合受体的细胞因子;其中所述嵌合受体包含:

可操作地连接至第二结构域的G-CSFR的ECD;所述第二结构域包含:

(i)

(a) gp130的跨膜结构域;

(b) gp130的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β 的C端区;或者

(ii)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β 的C端区;或者

(iii)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-12R β_2 的C端区;或者

(iv)

(a) G-CSFR的跨膜结构域;

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-21R的C端区;或者

(v)

(a) IL-2R β + γ c的跨膜结构域;

(b) IL-2R β + γ c的框1区和框2区;和

(c) IL-2R β + γ c的C端区;或者

(vi)

(a) G-CSFR的跨膜结构域

(b) G-CSFR的框1区和框2区;和

(c) IL-7R α 的C端区。

39. 如权利要求37或38所述的方法,其中所述活化的嵌合受体形成同二聚体;并且任选

地,

所述嵌合受体的所述活化引起选自由表达所述嵌合受体的细胞的增殖、活力和活性增强组成的组的细胞反应,并且任选地,所述嵌合受体在与G-CSF接触时被活化,并且任选地,

所述G-CSF是野生型G-CSF;并且任选地,

所述G-CSFR的所述胞外结构域是野生型胞外结构域;其中

所述嵌合受体在细胞中表达;并且任选地,

所述细胞是免疫细胞,并且任选地,

T细胞,并且任选地,

NK细胞,并且任选地,

NKT细胞,并且任选地,

B细胞,并且任选地,

浆细胞,并且任选地,

巨噬细胞,并且任选地,

树突细胞,并且任选地,

所述细胞是干细胞,并且任选地,

所述细胞是原代细胞,并且任选地,

所述细胞是人细胞。

40. 如权利要求39所述的方法,其中所述嵌合受体任选地包含:

(a) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分;或者

(b) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分;或者

(c) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分;或者

(d) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分;或者

(e) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分;或者

(f) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分;或者

(g) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分;或者

(h) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γ c的ICD的至少一部分;并且其中

所述跨膜结构域包含由以下示出的序列:

(a) SEQ ID NO.8;或

(b) SEQ ID NO.9;或

(c) SEQ ID NO.10;或

(d) SEQ ID NO.11。

41. 如权利要求37或38所述的方法,其中所述方法用于治疗癌症。

42. 如权利要求37或38所述的方法,其中所述方法用于治疗自身免疫疾病。

43. 如权利要求37或38所述的方法,其中所述方法用于治疗炎症性病症。

44. 如权利要求37或38所述的方法,其中所述方法用于预防或治疗移植物排斥。

45. 如权利要求37或38所述的方法,其中所述方法用于治疗感染疾病。

46. 如权利要求37或38所述的方法;其还包括施用至少一种另外的活性剂;并且任选

地,所述另外的活性剂是另外的细胞因子。

47.如权利要求37中任一项所述的方法,其中所述方法包括:

i) 分离含有免疫细胞的样品;(ii) 用编码所述嵌合细胞因子受体的核酸序列转导或转染所述免疫细胞;(iii) 向所述受试者施用或输注来自(ii)的所述免疫细胞;以及(iv) 使所述免疫细胞与结合所述嵌合受体的所述细胞因子接触。

48.如权利要求38中任一项所述的方法,其中所述方法包括:

i) 分离含有免疫细胞的样品;(ii) 用编码所述嵌合细胞因子受体的核酸序列转导或转染所述免疫细胞;(iii) 向所述受试者施用或输注来自(ii)的所述免疫细胞;以及(iv) 使所述免疫细胞与结合所述嵌合受体的所述细胞因子接触。

49.如权利要求47或48所述的方法,其中在向所述受试者施用或输注所述细胞之前,所述受试者已经历免疫耗竭治疗。

50.如权利要求47或48所述的方法,其中所述含有免疫细胞的样品分离自将施用或输注所述细胞的所述受试者。

51.如权利要求47或48所述的方法,其中在向所述受试者施用或输注所述细胞之前,使所述免疫细胞与所述细胞因子体外接触。

52.如权利要求46或47所述的方法,其中使所述免疫细胞与结合所述嵌合受体的所述细胞因子接触足够的时间以活化来自所述嵌合受体的信号传导。

53.一种用于治疗有需要的受试者的试剂盒,其包括:

编码权利要求1-12中任一项所述的嵌合受体的细胞,

并且任选地,所述细胞是免疫细胞;以及

使用说明书;

并且任选地,所述试剂盒包括结合所述嵌合受体的细胞因子。

54.一种用于产生在细胞上表达的嵌合受体的试剂盒,其包括:

编码权利要求1-12中任一项所述的嵌合受体的表达载体,以及

使用说明书;

并且任选地,所述试剂盒包括结合所述嵌合受体的细胞因子。

55.一种用于产生在细胞上表达的嵌合受体的试剂盒,其包括:

包含编码权利要求1-12中任一项所述的嵌合受体的表达载体的细胞,并且任选地,

所述细胞是细菌细胞,以及

使用说明书;

并且任选地,所述试剂盒包括结合所述嵌合受体的细胞因子。

嵌合细胞因子受体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年10月8日提交的美国临时申请号62/912,223的优先权,所述申请据此以引用的方式整体并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已通过EFS-Web提交并且据此以引用的方式整体并入的序列表。所述ASCII副本在2020年10月7日创建,被命名为IKE001W0_SL.txt,并且大小为60,383字节。

背景技术

技术领域

[0005] 本文描述了嵌合细胞因子受体,其包含各种多亚基细胞因子受体的G-CSFR(粒细胞集落刺激因子受体)胞外结构域和胞内结构域,所述嵌合细胞因子受体用于选择性活化所关注细胞中的细胞因子信号传导。具体而言,本公开描述了新的嵌合细胞因子受体,其包括多亚基细胞内信号传导结构域,以将特定的细胞因子样信号递送到所关注细胞。本公开还包括用于过继细胞转移(ACT)的方法、细胞和试剂盒,其包含表达嵌合细胞因子受体的细胞和/或编码嵌合细胞因子受体和/或结合所述嵌合细胞因子受体的细胞因子的表达载体。

[0006] 相关技术描述

[0007] 接受基于细胞的免疫疗法治疗的患者通常接受白介素-2(IL-2)形式的细胞因子疗法。IL-2疗法对这些患者是有益的,因为它向过继转移的免疫细胞(例如,T淋巴细胞或NK淋巴细胞)提供了增殖、生存力和效应功能的信号,这提高了它们的功效。然而,由于IL-2对宿主免疫细胞的作用,接受IL-2疗法的患者可能经历显著且严重的毒性。因此,临床上需要变体细胞因子受体和产生表达变体细胞因子受体的细胞的方法,所述细胞能够响应于施用的细胞因子而特异性地经历活化、增殖和其它免疫功能,以减少或消除剂量限制性毒性,并减少或消除在免疫细胞输注前对淋巴消耗化学疗法的需要。

发明内容

[0008] 在某些实施方案中,本文描述了嵌合受体,其包含:

[0009] (a)可操作地连接至第二结构域的G-CSFR(粒细胞集落刺激因子受体)的胞外结构域(ECD);所述第二结构域包含

[0010] (b)选自由以下组成的组的多亚基细胞因子受体的胞内结构域(ICD)的至少一部分:IL-2R(白介素-2受体)、IL-7R(白介素-7受体)、IL-12R(白介素-12受体)和IL-21R(白介素-21受体),并且任选地,所述IL-2R选自由IL-2R β 和IL-2R γ c组成的组,并且任选地,所述第二结构域包含IL-2R β 、IL-7R α 、IL-12R β_2 或IL-21R的C端区的至少一部分;其中所述细胞因子受体的ICD的至少一部分包含来自细胞因子受体的胞内结构域的至少一个信号传导分子结合位点,并且任选地,所述至少一个信号传导分子结合位点选自由以下组成的组:G-CSFR的STAT3结合位点;gp130的STAT3结合位点;gp130的SHP-2结合位点;IL-2R β 的SHC结合

位点; IL-2R β 的STAT5结合位点; IL-2R β 的STAT3结合位点; IL-2R β 的STAT1结合位点; IL-7R α 的STAT5结合位点; IL-7R α 的磷脂酰肌醇3-激酶 (PI3K) 结合位点; IL-12R β_2 的STAT4结合位点; IL-12R β_2 的STAT5结合位点; IL-12R β_2 的STAT3结合位点; IL-21R的STAT5结合位点; IL-21R的STAT3结合位点; 和IL-21R的STAT1结合位点; 并且任选地, 所述ICD包含选自由G-CSFR和gp130组成的组的蛋白质的框1区和框2区; 并且任选地, 嵌合受体包含第三结构域, 所述第三结构域包含选自由G-CSFR、gp130 (糖蛋白130) 和IL-2R β 组成的组的蛋白质的跨膜结构域的至少一部分, 并且任选地, 所述跨膜结构域是野生型跨膜结构域。

[0011] 在某些方面, 本文描述了嵌合受体, 其包含: 可操作地连接至第二结构域的G-CSFR的ECD; 所述第二结构域包含:

[0012] (i)

[0013] (a) gp130的跨膜结构域;

[0014] (b) gp130的框1区和框2区; 和

[0015] (c) IL-2R β 的C端区; 或者

[0016] (ii)

[0017] (a) G-CSFR的跨膜结构域;

[0018] (b) G-CSFR的框1区和框2区; 和

[0019] (c) IL-2R β 的C端区; 或者

[0020] (iii)

[0021] (a) G-CSFR的跨膜结构域;

[0022] (b) G-CSFR的框1区和框2区; 和

[0023] (c) IL-12R β_2 的C端区; 或者

[0024] (iv)

[0025] (a) G-CSFR的跨膜结构域;

[0026] (b) G-CSFR的框1区和框2区; 和

[0027] (c) IL-21R的C端区; 或者

[0028] (v)

[0029] (a) IL-2R β + γ c的跨膜结构域;

[0030] (b) IL-2R β + γ c的框1区和框2区; 和

[0031] (c) IL-2R β + γ c的C端区; 或者

[0032] (vi)

[0033] (a) G-CSFR的跨膜结构域

[0034] (b) G-CSFR的框1区和框2区; 和

[0035] (c) IL-7R α 的C端区。

[0036] 在某些实施方案中, 活化的嵌合受体形成同二聚体, 并且任选地, 嵌合受体的活化引起选自由以下组成的组的细胞反应: 表达所述嵌合受体的细胞的增殖、活力和活性增强, 并且任选地, 嵌合受体在与G-CSF接触时活化, 并且任选地, G-CSF是野生型G-CSF, 并且任选地, G-CSFR的胞外结构域是野生型胞外结构域。在某些实施方案中, 活化的嵌合受体形成同二聚体, 并且任选地, 嵌合受体的活化引起选自由以下组成的组的细胞反应: 表达所述嵌合受体的细胞的增殖、活力和活性增强, 并且任选地, 嵌合受体在与G-CSF接触时活化, 并且任

选地, G-CSF是野生型G-CSF, 并且任选地, G-CSFR的胞外结构域是野生型胞外结构域。

[0037] 在某些实施方案中, 嵌合受体在细胞中表达, 并且任选地是免疫细胞, 并且任选地是T细胞, 并且任选地是NK细胞, 并且任选地是NKT细胞, 并且任选地是B细胞, 并且任选地是浆细胞, 并且任选地是巨噬细胞, 并且任选地是树突细胞, 所述细胞是干细胞, 并且任选地, 并且任选地, 所述细胞是原代细胞, 并且任选地, 所述细胞是人细胞。

[0038] 在某些实施方案中, 所述ICD包含: (a) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分; 或者 (b) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分; 或者 (c) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分; 或者 (d) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分; 或者 (e) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分; 或者 (f) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分; 或者 (g) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R的ICD的至少一部分; 或者 (h) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2RG的ICD的至少一部分。

[0039] 在某些实施方案中, 所述跨膜结构域包含由以下示出的序列:

[0040] (a) SEQ ID NO.8; 或者 (b) SEQ ID NO.9; 或者 (c) SEQ ID NO.10; 或者 (d) SEQ ID NO.11。

[0041] 在某些方面, 本文描述了一种编码嵌合受体的核酸; 其中所述嵌合受体包含: (a) 可操作地连接至第二结构域的G-CSFR (粒细胞集落刺激因子受体) 的胞外结构域 (ECD); 所述第二结构域包含 (b) 选自由以下组成的组的多亚基细胞因子受体的胞内结构域 (ICD) 的至少一部分: IL-2R (白介素-2受体)、IL-7R (白介素-7受体)、IL-12R (白介素-12受体) 和IL-21R (白介素-21受体), 并且任选地, 所述IL-2R选自由IL-2R β 和IL-2R γ c组成的组, 并且任选地, 所述第二结构域包含IL-2R β 、IL-7R α 、IL-12R β_2 或IL-21R的C端区的至少一部分; 其中所述细胞因子受体的ICD的至少一部分包含来自细胞因子受体的胞内结构域的至少一个信号传导分子结合位点, 并且任选地, 所述ICD包含选自由以下组成的组的至少一个信号传导分子结合位点: G-CSFR的STAT3结合位点; gp130的STAT3结合位点; gp130的SHP-2结合位点; IL-2R β 的SHC结合位点; IL-2R β 的STAT5结合位点; IL-2R β 的STAT3结合位点; IL-2R β 的STAT1结合位点; IL-7R α 的STAT5结合位点; IL-7R α 的磷脂酰肌醇3-激酶 (PI3K) 结合位点; IL-12R β_2 的STAT4结合位点; IL-12R β_2 的STAT5结合位点; IL-12R β_2 的STAT3结合位点; IL-21R的STAT5结合位点; IL-21R的STAT3结合位点; 和IL-21R的STAT1结合位点; 并且任选地, 所述ICD包含选自由G-CSFR和gp130组成的组的蛋白质的框1区和框2区; 并且任选地, 嵌合受体包含第三结构域, 所述第三结构域包含选自由G-CSFR、gp130 (糖蛋白130) 和IL-2R β 组成的组的蛋白质的跨膜结构域的至少一部分, 并且任选地, 所述跨膜结构域是野生型跨膜结构域。在某些实施方案中, G-CSFR的ECD由SEQ ID NO.5或6示出的核酸序列编码。在某些实施方案中, 所述核酸包含:

[0042] (a) 编码具有氨基序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分的序列; 或者

[0043] (b) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列; 或者

[0044] (c) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分的序列; 或者

[0045] (d) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分的序列;或者

[0046] (e) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分的序列;或者

[0047] (f) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分的序列;或者

[0048] (g) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

[0049] (h) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γ c的ICD的至少一部分的序列。

[0050] 在某些实施方案中,本公开描述了一种包含编码本文所述的嵌合受体的核酸的表达载体。在某些实施方案中,所述载体选自由以下组成的组:逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和质粒。

[0051] 在某些方面,本文描述了一种编码嵌合受体的核酸;其中所述嵌合受体包含:可操作地连接至第二结构域的G-CSFR的ECD;所述第二结构域包含:

[0052] (i)

[0053] (a) gp130的跨膜结构域;

[0054] (b) gp130的框1区和框2区;和

[0055] (c) IL-2R β 的C端区;或者

[0056] (ii)

[0057] (a) G-CSFR的跨膜结构域;

[0058] (b) G-CSFR的框1区和框2区;和

[0059] (c) IL-2R β 的C端区;或者

[0060] (iii)

[0061] (a) G-CSFR的跨膜结构域;

[0062] (b) G-CSFR的框1区和框2区;和

[0063] (c) IL-12R β_2 的C端区;或者

[0064] (iv)

[0065] (a) G-CSFR的跨膜结构域;

[0066] (b) G-CSFR的框1区和框2区;和

[0067] (c) IL-21R的C端区;或者

[0068] (v)

[0069] (a) IL-2R β + γ c的跨膜结构域;

[0070] (b) IL-2R β + γ c的框1区和框2区;和

[0071] (c) IL-2R β + γ c的C端区;或者

[0072] (vi)

[0073] (a) G-CSFR的跨膜结构域

[0074] (b) G-CSFR的框1区和框2区;和

[0075] (c) IL-7R α 的C端区。

[0076] 在某些实施方案中,G-CSFR的ECD由SEQ ID NO.5或6示出的核酸序列编码。在某些实施方案中,所述核酸包含:

[0077] (a) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分的序列;或者

[0078] (b) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

[0079] (c) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分的序列;或者

[0080] (d) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分的序列;或者

[0081] (e) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分的序列;或者

[0082] (f) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分的序列;或者

[0083] (g) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

[0084] (h) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γ c的ICD的至少一部分的序列。

[0085] 在某些方面,本文描述了一种包含本文所述的核酸的表达载体。在某些实施方案中,所述载体选自由以下组成的组:逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和质粒。

[0086] 在某些方面,本文描述了一种细胞,所述细胞包含编码嵌合受体的核酸;其中所述嵌合受体包含:

[0087] (a) 可操作地连接至第二结构域的G-CSFR(粒细胞集落刺激因子受体)可操作地连接的受体)的胞外结构域(ECD);所述第二结构域包含

[0088] (b) 选自由以下组成的组的多亚基细胞因子受体的胞内结构域(ICD)的至少一部分:IL-2R(白介素-2受体)、IL-7R(白介素-7受体)、IL-12R(白介素-12受体)和IL-21R(白介素-21受体),并且任选地,所述IL-2R选自由IL-2R β 和IL-2R γ c组成的组,并且任选地,所述第二结构域包含IL-2R β 、IL-7R α 、IL-12R β_2 或IL-21R的C端区的至少一部分;其中所述细胞因子受体的ICD的至少一部分包含来自细胞因子受体的胞内结构域的至少一个信号传导分子结合位点,并且任选地,所述ICD包含选自由以下组成的组的至少一个信号传导分子结合位点:G-CSFR的STAT3结合位点;gp130的STAT3结合位点;gp130的SHP-2结合位点;IL-2R β 的SHC结合位点;IL-2R β 的STAT5结合位点;IL-2R β 的STAT3结合位点;IL-2R β 的STAT1结合位点;IL-7R α 的STAT5结合位点;IL-7R α 的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)结合位点;IL-12R β_2 的STAT4结合位点;IL-12R β_2 的STAT5结合位点;IL-12R β_2 的STAT3结合位点;IL-21R的STAT5结合位点;IL-21R的STAT3结合位点;和IL-21R的STAT1结合位点;并且任选地,所述ICD包含选自由G-CSFR和gp130组成的组的蛋白质的框1区和框2区;并且任选地,嵌合受体包含第三结构域,所述第三结构域包含选自由G-CSFR、gp130(糖蛋白130)和IL-2R β 组成的组的蛋白质的跨膜结构域的至少一部分,并且任选地,所述跨膜结构域是野生型跨膜结构域;并且任选地,

[0089] 所述细胞任选地是免疫细胞,并且任选地是T细胞,并且任选地是NK细胞,并且任选地是NKT细胞,并且任选地是B细胞,并且任选地是浆细胞,并且任选地是巨噬细胞,并且任选地是树突细胞,并且任选地,所述细胞是干细胞,并且任选地,所述细胞是原代细胞,并且任选地,所述细胞是人细胞。

[0090] 在某些方面,本文描述了一种包含编码嵌合受体的核酸的细胞;其中所述嵌合受

体包含：可操作地连接至第二结构域的G-CSFR的ECD；所述第二结构域包含：

[0091] (i)

[0092] (a) gp130的跨膜结构域；

[0093] (b) gp130的框1区和框2区；和

[0094] (c) IL-2R β 的C端区；或者

[0095] (ii)

[0096] (a) G-CSFR的跨膜结构域；

[0097] (b) G-CSFR的框1区和框2区；和

[0098] (c) IL-2R β 的C端区；或者

[0099] (iii)

[0100] (a) G-CSFR的跨膜结构域；

[0101] (b) G-CSFR的框1区和框2区；和

[0102] (c) IL-12R β_2 的C端区；或者

[0103] (iv)

[0104] (a) G-CSFR的跨膜结构域；

[0105] (b) G-CSFR的框1区和框2区；和

[0106] (c) IL-21R的C端区；或者

[0107] (v)

[0108] (a) IL-2R β + γ c的跨膜结构域；

[0109] (b) IL-2R β + γ c的框1区和框2区；和

[0110] (c) IL-2R β + γ c的C端区；或者

[0111] (vi)

[0112] (a) G-CSFR的跨膜结构域

[0113] (b) G-CSFR的框1区和框2区；和

[0114] (c) IL-7R α 的C端区；并且任选地，

[0115] 所述细胞任选地是免疫细胞；并且任选地，并且任选地是T细胞，并且任选地是NK细胞，并且任选地是NKT细胞，并且任选地是B细胞，并且任选地是浆细胞，并且任选地是巨噬细胞，并且任选地是树突细胞，所述细胞是干细胞，并且任选地，并且任选地，所述细胞是原代细胞，并且任选地，所述细胞是人细胞。

[0116] 在某些实施方案中，G-CSFR的ECD由细胞中包含的具有SEQ ID NO.5或6示出的序列的核酸编码。在某些实施方案中，细胞包含的核酸包含：

[0117] (a) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分的序列；或者

[0118] (b) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列；或者

[0119] (c) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分的序列；或者

[0120] (d) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分的序列；或者

[0121] (e) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的

ICD的至少一部分的序列;或者

[0122] (f) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分的序列;或者

[0123] (g) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分的序列;或者

[0124] (h) 编码具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γ c的ICD的至少一部分的序列。

[0125] 在某些方面,本文描述了一种包含本文描述的表达载体的细胞,并且任选地,所述细胞是免疫细胞,并且任选地是T细胞或NK细胞。在某些方面,本文描述了一种包含如权利要求1所述的嵌合受体的细胞,并且任选地是免疫细胞中的细胞,并且任选地是T细胞,并且任选地是NK细胞,并且任选地是NKT细胞,并且任选地是B细胞,并且任选地是浆细胞,并且任选地是巨噬细胞,并且任选地是树突细胞,并且任选地,所述细胞是干细胞,并且任选地,所述细胞是原代细胞,并且任选地,所述细胞是人细胞。

[0126] 在某些方面,本文描述了包含本文所述的嵌合受体的细胞,并且任选地是免疫细胞中的细胞,并且任选地是T细胞,并且任选地是NK细胞,并且任选地是NKT细胞,并且任选地是B细胞,并且任选地是浆细胞,并且任选地是巨噬细胞,并且任选地是树突细胞,并且任选地,所述细胞是干细胞,并且任选地,所述细胞是原代细胞,并且任选地,所述细胞是人细胞。

[0127] 在某些方面,本文描述了一种选择性活化在细胞表面上表达的嵌合受体的方法,其包括:使嵌合受体与选择性活化嵌合受体的G-CSF接触;其中所述嵌合受体包含:(a)可操作地连接至第二结构域的G-CSFR(粒细胞集落刺激因子受体)的胞外结构域(ECD);所述第二结构域包含(b)选自由以下组成的组的多亚基细胞因子受体的胞内结构域(ICD)的至少一部分:IL-2R(白介素-2受体)、IL-7R(白介素-7受体)、IL-12R(白介素-12受体)和IL-21R(白介素-21受体),并且任选地,所述IL-2R选自由IL-2R β 和IL-2R γ c组成的组,并且任选地,所述第二结构域包含IL-2R β 、IL-7R α 、IL-12R β_2 或IL-21R的C端区的至少一部分;其中所述细胞因子受体的ICD的至少一部分包含来自细胞因子受体的胞内结构域的至少一个信号传导分子结合位点,并且任选地,所述至少一个信号传导分子结合位点选自由以下组成的组:G-CSFR的STAT3结合位点;gp130的STAT3结合位点;gp130的SHP-2结合位点;IL-2R β 的SHC结合位点;IL-2R β 的STAT5结合位点;IL-2R β 的STAT3结合位点;IL-2R β 的STAT1结合位点;IL-7R α 的STAT5结合位点;IL-7R α 的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)结合位点;IL-12R β_2 的STAT4结合位点;IL-12R β_2 的STAT5结合位点;IL-12R β_2 的STAT3结合位点;IL-21R的STAT5结合位点;IL-21R的STAT3结合位点;和IL-21R的STAT1结合位点,并且任选地,所述ICD包含选自由G-CSFR和gp130组成的组的蛋白质的框1区和框2区;并且任选地,嵌合受体包含第三结构域,所述第三结构域包含选自由G-CSFR、gp130(糖蛋白130)和IL-2R β 组成的组的蛋白质的跨膜结构域的至少一部分,并且任选地,所述跨膜结构域是野生型跨膜结构域。

[0128] 在某些方面,本文描述了一种选择性活化在细胞表面上表达的嵌合受体的方法,其包括:使嵌合受体与选择性活化嵌合受体的G-CSF接触;其中所述嵌合受体包含可操作地连接至第二结构域的G-CSFR的ECD;所述第二结构域包含:

[0129] (i)

[0130] (a) gp130的跨膜结构域;

[0131] (b) gp130的框1区和框2区;和

- [0132] (c) IL-2R β 的C端区;或者
- [0133] (ii)
- [0134] (a) G-CSFR的跨膜结构域;
- [0135] (b) G-CSFR的框1区和框2区;和
- [0136] (c) IL-2R β 的C端区;或者
- [0137] (iii)
- [0138] (a) G-CSFR的跨膜结构域;
- [0139] (b) G-CSFR的框1区和框2区;和
- [0140] (c) IL-12R β_2 的C端区;或者
- [0141] (iv)
- [0142] (a) G-CSFR的跨膜结构域;
- [0143] (b) G-CSFR的框1区和框2区;和
- [0144] (c) IL-21R的C端区;或者
- [0145] (v)
- [0146] (a) IL-2R β + γ c的跨膜结构域;
- [0147] (b) IL-2R β + γ c的框1区和框2区;和
- [0148] (c) IL-2R β + γ c的C端区;或者
- [0149] (vi)
- [0150] (a) G-CSFR的跨膜结构域
- [0151] (b) G-CSFR的框1区和框2区;和
- [0152] (c) IL-7R α 的C端区。

[0153] 在本文所述的方法的某些实施方案中,活化的嵌合受体形成同二聚体,并且任选地,嵌合受体的活化引起选自以下组成的组的细胞反应:表达所述嵌合受体的细胞的增殖、活力和活性增强;并且任选地,所述嵌合受体在与G-CSF接触时被活化,并且任选地,所述G-CSF是野生型G-CSF,并且任选地,所述G-CSFR的胞外结构域是野生型胞外结构域;其中嵌合受体在细胞中表达,并且任选地是免疫细胞,并且任选地是T细胞,并且任选地是NK细胞,并且任选地是NKT细胞,并且任选地是B细胞,并且任选地是浆细胞,并且任选地是巨噬细胞,并且任选地是树突细胞,并且任选地,所述细胞是干细胞,并且任选地,所述细胞是原代细胞,并且任选地,所述细胞是人细胞。

[0154] 在本文所述的方法的某些实施方案中,所述嵌合受体包含

- [0155] (a) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分;或者
- [0156] (b) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分;或者
- [0157] (c) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分;或者
- [0158] (d) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分;或者
- [0159] (e) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分;或者
- [0160] (f) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分;或者
- [0161] (g) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分;或者

[0162] (h) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γ c的ICD的至少一部分;并且其中跨膜结构域包含由以下示出的序列:(a) SEQ ID NO.8;或者

[0163] (b) SEQ ID NO.9;或者(c) SEQ ID NO.10;或者(d) SEQ ID NO.11。

[0164] 在某些方面,本文描述了一种在细胞中产生嵌合受体的方法,其包括:将如权利要求13-16或19-22中任一项所述的核酸或如权利要求17、18、23或24中任一项所述的表达载体引入到细胞中;并且任选地,所述方法包括基因编辑;并且任选地,所述细胞是免疫细胞,并且任选地是T细胞,并且任选地是NK细胞,并且任选地是NKT细胞,并且任选地是B细胞,并且任选地是浆细胞,并且任选地是巨噬细胞,并且任选地是树突细胞,并且任选地,所述细胞是干细胞,并且任选地,所述细胞是原代细胞,并且任选地,所述细胞是人细胞。

[0165] 在某些实施方案中,本文描述了一种治疗有需要的受试者的方法,其包括:向所述受试者输注表达嵌合受体的细胞,并施用结合所述嵌合受体的细胞因子;其中所述嵌合受体包含:

[0166] (a) 可操作地连接至第二结构域的G-CSFR(粒细胞集落刺激因子受体)的胞外结构域(ECD);所述第二结构域包含

[0167] (b) 选自由以下组成的组的多亚基细胞因子受体的胞内结构域(ICD)的至少一部分:IL-2R(白介素-2受体)、IL-7R(白介素-7受体)、IL-12R(白介素-12受体)和IL-21R(白介素-21受体),并且任选地,所述IL-2R选自由IL-2R β 和IL-2R γ c组成的组,并且任选地,所述第二结构域包含IL-2R β 、IL-7R α 、IL-12R β_2 或IL-21R的C端区的至少一部分;其中所述细胞因子受体的ICD的至少一部分包含来自细胞因子受体的胞内结构域的至少一个信号传导分子结合位点,并且任选地,所述ICD包含选自由以下组成的组的至少一个信号传导分子结合位点:G-CSFR的STAT3结合位点;gp130的STAT3结合位点;gp130的SHP-2结合位点;IL-2R β 的SHC结合位点;IL-2R β 的STAT5结合位点;IL-2R β 的STAT3结合位点;IL-2R β 的STAT1结合位点;IL-7R α 的STAT5结合位点;IL-7R α 的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)结合位点;IL-12R β_2 的STAT4结合位点;IL-12R β_2 的STAT5结合位点;IL-12R β_2 的STAT3结合位点;IL-21R的STAT5结合位点;IL-21R的STAT3结合位点;和IL-21R的STAT1结合位点;并且任选地,所述ICD包含选自由G-CSFR和gp130组成的组的蛋白质的框1区和框2区;并且任选地,嵌合受体包含包含第三结构域,所述第三结构域包含选自由G-CSFR、gp130(糖蛋白130)和IL-2R β 组成的组的蛋白质的跨膜结构域的至少一部分,并且任选地,所述跨膜结构域是野生型跨膜结构域。

[0168] 在某些方面,本文描述了一种治疗有需要的受试者的方法,其包括:向所述受试者输注表达嵌合受体的细胞,并施用结合所述嵌合受体的细胞因子;其中所述嵌合受体包含:可操作地连接至第二结构域的G-CSFR的ECD;所述第二结构域包含:

[0169] (i)

[0170] (a) gp130的跨膜结构域;

[0171] (b) gp130的框1区和框2区;和

[0172] (c) IL-2R β 的C端区;或者

[0173] (ii)

[0174] (a) G-CSFR的跨膜结构域;

[0175] (b) G-CSFR的框1区和框2区;和

[0176] (c) IL-2R β 的C端区;或者

- [0177] (iii)
- [0178] (a) G-CSFR的跨膜结构域;
- [0179] (b) G-CSFR的框1区和框2区;和
- [0180] (c) IL-12R β_2 的C端区;或者
- [0181] (iv)
- [0182] (a) G-CSFR的跨膜结构域;
- [0183] (b) G-CSFR的框1区和框2区;和
- [0184] (c) IL-21R的C端区;或者
- [0185] (v)
- [0186] (a) IL-2R $\beta + \gamma c$ 的跨膜结构域;
- [0187] (b) IL-2R $\beta + \gamma c$ 的框1区和框2区;和
- [0188] (c) IL-2R $\beta + \gamma c$ 的C端区;或者
- [0189] (vi)
- [0190] (a) G-CSFR的跨膜结构域
- [0191] (b) G-CSFR的框1区和框2区;和
- [0192] (c) IL-7R α 的C端区。

[0193] 在所述方法的某些实施方案中,活化的嵌合受体形成同二聚体;并且任选地,所述嵌合受体的活化引起选自以下组成的组的细胞反应:表达所述嵌合受体的细胞的增殖、活力和活性增强;并且任选地,嵌合受体在与G-CSF接触时被活化;并且任选地,G-CSF为野生型G-CSF;并且任选地,G-CSFR的胞外结构域是野生型胞外结构域;其中嵌合受体在细胞中表达;并且任选地,所述细胞是免疫细胞,并且任选地是T细胞,并且任选地是NK细胞,并且任选地是NKT细胞,并且任选地是B细胞,并且任选地是浆细胞,并且任选地是巨噬细胞,并且任选地是树突细胞,并且任选地,所述细胞是干细胞,并且任选地,所述细胞是原代细胞,并且任选地,所述细胞是人细胞。在某些实施方案中,嵌合受体任选地包含:

- [0194] (a) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分;或者
- [0195] (b) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.41的IL-7R α 的ICD的至少一部分;或者
- [0196] (c) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分;或者
- [0197] (d) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或26的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分;或者
- [0198] (e) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分;或者
- [0199] (f) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分;或者
- [0200] (g) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.43的IL-7R α 的ICD的至少一部分;或者
- [0201] (h) 具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γc 的ICD的至少一部分;并且其中跨膜结构域包含由以下示出的序列:(a) SEQ ID NO.8;或者(b) SEQ ID NO.9;或者(c) SEQ ID NO.10;或者(d) SEQ ID NO.11。

[0202] 在某些实施方案中,本文所述的方法用于治疗癌症。在某些实施方案中,所述方法用于治疗自身免疫性疾病。在某些实施方案中,所述方法用于治疗炎症性病症。在某些实施方案中,所述方法用于预防或治疗移植排斥。在某些实施方案中,所述方法用于治疗感染疾

病。在某些实施方案中,所述方法还包括施用至少一种另外的活性剂;并且任选地,另外的活性剂是另外的细胞因子。

[0203] 在某些实施方案中,本文所述的方法包括:i)分离含有免疫细胞的样品;(ii)用编码嵌合细胞因子受体的核酸序列转导或转染免疫细胞;(iii)向所述受试者施用或输注所述免疫细胞;以及(iv)使免疫细胞与结合嵌合受体的细胞因子接触。在某些实施方案中,在向受试者施用或输注所述细胞之前,受试者已经历免疫耗竭治疗。在某些实施方案中,所述含有免疫细胞的样品分离自将施用或输注所述细胞的受试者。在某些实施方案中,在向受试者施用或输注所述细胞之前,使所述免疫细胞与细胞因子体外接触。在某些实施方案中,使免疫细胞与结合嵌合受体的细胞因子接触足够的时间以活化来自嵌合受体的信号传导。

[0204] 本文描述了一种用于治疗有需要的受试者的试剂盒,其包括:编码本文描述的嵌合受体的细胞,并且任选地,所述细胞是免疫细胞;和使用说明书;并且任选地,所述试剂盒包括结合嵌合受体的细胞因子。本文描述了一种用于产生在细胞上表达的嵌合受体的试剂盒,其包括:编码本文所述的嵌合受体的表达载体和使用说明书;并且任选地,所述试剂盒包括结合嵌合受体的细胞因子。

[0205] 本文描述了一种用于产生在细胞上表达的嵌合受体的试剂盒,其包括:包含编码本文所述的嵌合受体的表达载体的细胞,并且任选地,所述细胞是细菌细胞;以及使用说明书;并且任选地,所述试剂盒包括结合嵌合受体的细胞因子。

附图说明

[0206] 参考以下描述和附图将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优点,其中:

[0207] 图1是天然IL-2R β 、IL-2R γ c和G-CSFR亚基以及G2R-1受体亚基设计的示意图。

[0208] 图2呈现了示出了32D-IL-2R β 细胞(其是稳定表达人IL-2R β 亚基的32D细胞系)的扩增(细胞数量的倍数变化)的图表,所述细胞表达所指示的G-CSFR嵌合受体亚基并且用WT G-CSF、IL-2刺激或未用细胞因子刺激。将G/ γ c在其N端用Myc表位标记(Myc/G/ γ c),并且将G/IL-2R β 在其N端用Flag表位标记(Flag/G/IL-2R β);这些表位标签有助于通过流式细胞术进行检测,并且不会影响受体的功能。此外,B-D中的下图示出了在每种培养条件下表达G-CSFR ECD(%G-CSFR+)的细胞的百分比。正方形表示用IL-2刺激的细胞。三角形表示用G-CSF刺激的细胞。圆圈表示未用细胞因子刺激的细胞。

[0209] 图3呈现了示出表达仅Flag-标记的G/IL-2R β 亚基、仅Myc-标记的G/ γ c亚基或全长G-CSFR的人T细胞的扩增(细胞数量的倍数变化)的图表。A-D) PBMC来源的T细胞;E-H) 肿瘤相关淋巴细胞(TAL)。正方形表示用IL-2刺激的细胞。三角形表示用G-CSF刺激的细胞。圆圈表示未用细胞因子刺激的细胞。

[0210] 图4是天然受体和嵌合受体的示意图,其示出JAK、STAT、Shc、SHP-2和PI3K结合位点。阴影方案包括来自图1的受体。

[0211] 图5是嵌合受体的示意图,其示出Jak、STAT、Shc、SHP-2和PI3K结合位点。阴影方案包括来自图1和4的受体。

[0212] 图6是含有G2R-2cDNA插入物的慢病毒质粒的图。

[0213] 图7呈现示出用G2R-2转导的细胞中通过流式细胞术评估的G-CSFR ECD表达的图表。A) 32D-IL-2R β 细胞系;B) PBMC来源的人T细胞和人肿瘤相关淋巴细胞(TAL)。

[0214] 图8呈现示出与未转导细胞相比表达G2R-2的细胞的扩增(细胞数量的倍数变化)的图表。A) 人PBMC来源的T细胞;B、C) 来自两次独立实验的人肿瘤相关淋巴细胞(TAL)。正方形表示用IL-2刺激的细胞。三角形表示用G-CSF刺激的细胞。圆圈表示未用细胞因子刺激的细胞。

[0215] 图9呈现示出与未转导细胞相比表达G2R-2的CD4-或CD8-选择的人肿瘤相关淋巴细胞的扩增(细胞数量的倍数变化)的图表。A) 未转导的CD4-选择的细胞;B) 未转导的CD8-选择的细胞;C) 用G2R-2转导的CD4-选择的细胞;D) 用G2R-2转导的CD8-选择的细胞。灰色虚线表示用IL-2刺激的细胞。黑色实线表示用G-CSF刺激的细胞。灰色虚线表示未用细胞因子刺激的细胞。

[0216] 图10呈现示出表达G2R-2的CD4+或CD8+肿瘤相关淋巴细胞的扩增(细胞数量的倍数变化)的图表。正如所示,使细胞最初在G-CSF或IL-2中扩增。然后将细胞铺板在IL-2、G-CSF或仅培养基中。灰色实线表示用IL-2刺激的细胞。黑色实线表示用G-CSF刺激的细胞。浅灰色虚线表示在IL-2中扩增并然后仅用培养基刺激的细胞。深灰色虚线表示在G-CSF中扩增并然后仅用培养基刺激的细胞。

[0217] 图11呈现示出在G-CSF或IL-2中扩增后表达G2R-2嵌合受体构建体的CD4-或CD8-选择的肿瘤相关淋巴细胞(TAL)相对于未转导细胞的免疫表型(通过流式细胞术)的图表。A) 示出CD4+、CD8+或CD3-CD56+细胞表面表型的活细胞的百分比。B) 示出基于CD45RA和CCR7表达的所指示细胞表面表型的活CD8+细胞的百分比。

[0218] 图12呈现示出BrdU掺入测定结果的图表,以评估表达G2R-2的原代人T细胞相对于未转导细胞的增殖。正如所示,在测定之前,通过在IL-2或G-CSF中培养来选择T细胞。A) 肿瘤相关淋巴细胞;B) PBMC来源的T细胞。

[0219] 图13呈现示出BrdU掺入测定结果的图表,以评估表达G2R-2或单链G/IL-2R β (G2R-1的组分)的原代鼠T细胞相对于模拟(mock)转导细胞的增殖。A) 转导效率,如通过在所指示细胞因子中培养后表达G-CSFR ECD的细胞百分比(通过流式细胞术)所反映;B) 所有活细胞中响应于所指示细胞因子的BrdU掺入百分比;C) 表达G-CSFR ECD的细胞(G-CSFR+细胞)的BrdU掺入百分比。在测定之前,将所有细胞在IL-2中扩增3天。正方形表示用IL-2刺激的细胞。三角形表示用G-CSF刺激的细胞。圆圈表示未用细胞因子刺激的细胞。

[0220] 图14呈现蛋白质印迹,以检测表达G2R-2的人原代T细胞相对于未转导细胞中的所指示细胞因子信号传导事件。 β -肌动蛋白、总Akt和组蛋白H3充当蛋白质负载对照。A、B) 肿瘤相关淋巴细胞(TAL);C) PBMC来源的T细胞。

[0221] 图15呈现蛋白质印迹,以检测表达G2R-2或单链G/IL-2R β (来自G2R-1)的原代鼠T细胞相对于模拟转导细胞中的所指示细胞因子信号传导事件。箭头指示特定的磷酸-Jak2条带;其他较大条带被推测是第一抗磷酸-Jak2抗体与磷酸-Jak1交叉反应的结果。 β -肌动蛋白和组蛋白H3充当蛋白质负载对照。

[0222] 图16是示出BrdU掺入测定结果的图表,以评估表达所指示嵌合受体的32D-IL-2R β 细胞(或未转导细胞)响应于未用细胞因子刺激、用IL-2(300IU/mL)、WT G-CSF(30ng/mL)或130G-CSF(30ng/mL)的刺激的细胞周期进展。

[0223] 图17呈现示出BrdU掺入测定结果的图表,以评估响应于未用细胞因子刺激、用IL-2或WT、130、304或307细胞因子的刺激而表达所指示嵌合受体的原代鼠T细胞(或未转导细

胞)的细胞周期进展。A和B表示实验重复。

[0224] 图18呈现蛋白质印迹,以检测表达所指示嵌合受体亚基的32D-IL-2R β 细胞(或未转导细胞)响应于未用细胞因子刺激、用IL-2、WT G-CSF或130G-CSF的刺激的所指示细胞因子信号传导事件。 β -肌动蛋白和组蛋白H3充当蛋白质负载对照。

[0225] 图19呈现A)蛋白质印迹,以检测表达所指示嵌合受体亚基的原代鼠T细胞响应于未用细胞因子刺激、用IL-2、WT G-CSF、130G-CSF或304G-CSF的刺激的所指示细胞因子信号传导事件。 β -肌动蛋白和组蛋白H3充当蛋白质负载对照。B)图A中所用的细胞的转导效率,如通过流式细胞术用对人G-CSF受体的胞外结构域具有特异性的抗体所评估。

[0226] 图20呈现示出通过流式细胞术在用所指示嵌合受体构建体转导的原代人肿瘤相关淋巴细胞(TAL)中得到的G-CSFR ECD表达的图。对活的CD3⁺、CD56⁻细胞针对CD8或CD4设门,并示出每个群体的G-CSFR ECD表达。

[0227] 图21呈现示出表达G2R-3的原代人肿瘤相关淋巴细胞(TAL)相对于未转导细胞的扩增、增殖和信号传导的图表和图像。A)示出T细胞扩增测定结果的图表,其中细胞用G2R-3编码慢病毒转导,洗涤,并重新铺板在IL-2(300IU/ml)、野生型G-CSF(100ng/ml)或无细胞因子中。每3-4天对活细胞进行计数。正方形表示用IL-2刺激的细胞。三角形表示用G-CSF刺激的细胞。圆圈表示未用细胞因子刺激的细胞。B)蛋白质印迹,评估细胞内信号传导事件。从扩增测定中收获细胞,并用IL-2(300IU/ml)或野生型G-CSF(100ng/ml)刺激。箭头指示在125kDa处的特定磷酸-Jak2条带;较大条带被推测是第一抗磷酸-Jak2抗体与磷酸-Jak1交叉反应的结果。 β -肌动蛋白和组蛋白H3充当蛋白质负载对照。C)示出BrdU掺入测定结果的图表,以评估T细胞增殖。从扩增测定中收获细胞,将其洗涤,并重新铺板在IL-2(300IU/ml)、野生型G-CSF(100ng/ml)或无细胞因子中。

[0228] 图22呈现示出表达具有WT ECD的G2R-3的原代人PBMC来源的T细胞相对于未转导细胞的倍数扩增和G-CSFR ECD表达的图表。A)示出T细胞扩增测定结果的图表,其中细胞用编码G2R-3的慢病毒转导。在第1天,向培养物中添加WT G-CSF(100ng/ml)或不添加细胞因子(仅培养基)。此后,至第21天,用含有WT G-CSF或无细胞因子的培养基补充细胞。在扩增第21天,将细胞洗涤并重新铺板在WT G-CSF(100ng/mL)、IL-7(20ng/mL)和IL-15(20ng/mL)或无细胞因子中。每2-4天对活细胞进行计数。正方形表示用G-CSF刺激的细胞。三角形表示用G-CSF刺激,并在第21天重新铺板在IL-7和IL-15中的细胞。圆圈表示未用细胞因子刺激的细胞。菱形表示用G-CSF刺激,并且在第21天重新铺板在仅培养基中的细胞。B)示出G-CSFR ECD的表达的图表,如在扩增第21天或第42天通过流式细胞术所测定。

[0229] 图23呈现示出表达G2R-3的原代人PBMC来源的T细胞相对于未转导细胞的细胞内信号传导和免疫表型的图表。A)蛋白质印迹,以评估细胞内信号传导事件。从扩增测定中收获细胞,并用IL-2(300IU/ml)或野生型G-CSF(100ng/ml)刺激。 β -肌动蛋白充当蛋白质负载对照。B、C)代表性流式细胞术图 and 图表,其示出在扩增第42天通过流式细胞术评估的表达G2R-3的细胞相对于未转导细胞的免疫表型。

[0230] 图24呈现示出表达具有304或307ECD的G2R-3的原代人PBMC来源的T细胞相对于未转导细胞的扩增倍数的图表。A)示出T细胞扩增测定结果的图表,其中细胞用编码G2R-3 304ECD的慢病毒转导。B)示出T细胞扩增测定结果的图表,其中细胞用编码G2R-3 307ECD的慢病毒转导。C)示出未转导细胞的T细胞扩增测定结果的图表。正如所示,在第2天向培养物

中添加IL-2 (300IU/mL)、304G-CSF (100ng/mL)、307G-CSF (100ng/mL) 或不添加细胞因子(仅培养基),且此后每两天补充一次。每3-4天对活细胞进行计数。菱形表示用304G-CSF刺激的细胞。正方形表示用307G-CSF刺激的细胞。三角形表示用IL-2刺激的细胞。倒三角形表示未用细胞因子刺激的细胞。

[0231] 图25呈现示出BrdU掺入测定结果的图表,以评估表达具有304或307ECD的G2R-3的原代人PBMC来源的T细胞相对于未转导细胞的增殖。用编码G2R-3 304ECD或307ECD的慢病毒转导细胞,并在304或307G-CSF (100ng/mL) 中扩增。使未转导细胞在IL-2 (300IU/mL) 中扩增。在扩增第12天洗涤细胞,并重新铺板在IL-2 (300IU/mL)、130G-CSF (100ng/mL)、304G-CSF (100ng/mL)、307G-CSF (100ng/mL) 或无细胞因子中。

[0232] 图26呈现示出通过流式细胞术在用所指示嵌合受体构建体转导的原代鼠T细胞中得到的G-CSFR ECD表达的图表。

[0233] 图27示出在表达G21R-1或G21R-2的原代PBMC来源的人T细胞中G-CSF诱导的STAT3磷酸化(通过流式细胞术检测)。将细胞细分(即设门)为G-CSFR阳性(上图)或G-CSFR阴性(下图)群体。

[0234] 图28呈现示出在表达G21R-1或G12R-1的原代鼠T细胞中G-CSF诱导的生化信号传导事件的图表和图像。A) 示出用G21R-1转导并未用细胞因子刺激、用IL-21或G-CSF刺激的CD4⁺或CD8⁺细胞中STAT3(通过流式细胞术检测)的磷酸化的图表。B) 示出在没有用细胞因子(黑色圆圈)、用IL-21(正方形)或WT G-CSF(灰色圆圈)刺激后磷酸-STAT3染色呈阳性的细胞百分比的图表。对活细胞针对CD8或CD4设门,并示出每个群体的磷酸-STAT3-阳性细胞百分比。C) 蛋白质印迹,以评估表达G21R-1或G12R-1并用IL-21、IL-12或WT G-CSF刺激的细胞中的所指示细胞因子信号传导事件。 β -肌动蛋白和组蛋白H3充当蛋白质负载对照。

[0235] 图29呈现示出表达G2R-2、G2R-3、G7R-1、G21/7R-1和G27/2R-1的原代鼠T细胞或模拟转导T细胞中的增殖、G-CSFR ECD表达和WT G-CSF诱导的细胞内信号传导事件的图表和图像。A、B) 示出BrdU掺入测定结果的图表,以评估T细胞增殖。收获细胞,将其洗涤,并重新铺板在IL-2 (300IU/mL)、野生型G-CSF (100ng/mL) 或无细胞因子中。图A和B是独立的实验重复。C) 示出通过流式细胞术在用所指示嵌合受体构建体转导的原代鼠T细胞中得到的G-CSFR ECD表达的图表。D) 蛋白质印迹,以评估表达G2R-2、G2R-3、G7R-1、G21/7R-1和G27/2R-1的细胞或模拟转导T细胞中的所指示细胞因子信号传导事件。用IL-2 (300IU/mL)、IL-7 (10ng/mL)、IL-21 (10ng/mL)、IL-27 (50ng/mL) 或G-CSF (100ng/mL) 刺激细胞。 β -肌动蛋白和组蛋白H3充当蛋白质负载对照。图30呈现示出表达G21/2R-1、G12/2R-1和21/12/2R-1的原代鼠T细胞或模拟转导T细胞的增殖、G-CSFR ECD表达和G-CSF诱导的生化信号传导事件的图表和图像。A、B) 示出BrdU掺入测定结果的图表,以评估T细胞增殖。收获细胞,将其洗涤,并重新铺板在IL-2 (300IU/mL)、野生型G-CSF (100ng/mL) 或无细胞因子中。图A和B是独立的实验重复。C) 示出通过流式细胞术在用所指示嵌合受体构建体转导的原代鼠T细胞中得到的G-CSFR ECD表达的图表。D) 蛋白质印迹,以评估表达G21/2R-1、G12/2R-1和21/12/2R-1的细胞或模拟转导T细胞中的所指示细胞因子信号传导事件。用IL-2 (300IU/mL)、IL-21 (10ng/mL)、IL-12 (10ng/mL) 或G-CSF (100ng/mL) 刺激细胞。 β -肌动蛋白和组蛋白H3充当蛋白质负载对照。

[0236] 图30呈现示出表达G21/2R-1、G12/2R-1和21/12/2R-1的原代鼠T细胞或模拟转导T

细胞的增殖、G-CSFR ECD表达和G-CSF诱导的生化信号传导事件的图表和图像。A、B) 示出BrdU掺入测定结果的图表,以评估T细胞增殖。收获细胞,将其洗涤,并重新铺板在IL-2 (300IU/ml)、野生型G-CSF (100ng/ml) 或无细胞因子中。图A和B是实验重复。C) 示出通过流式细胞术在用所指示嵌合受体构建体转导的原代鼠T细胞中得到的G-CSFR ECD表达的图表。D) 蛋白质印迹,以评估表达G21/2R-1、G12/2R-1和21/12/2R-1的细胞或模拟转导T细胞中的所指示细胞因子信号传导事件。用IL-2 (300IU/mL)、IL-21 (10ng/mL)、IL-12 (10ng/mL) 或G-CSF (100ng/mL) 刺激细胞。 β -肌动蛋白和组蛋白H3充当蛋白质负载对照。

[0237] 图31呈现示出表达具有134ECD的G12/2R-1的原代人PBMC来源的T细胞相对于未转导细胞的扩增倍数和G-CSFR ECD表达的图表。A) 示出T细胞扩增测定结果的图表,其中用编码G12/2R-1_134-ECD的慢病毒转导细胞并在IL-2 (300IU/mL)、130G-CSF (100ng/ml) 或培养基中扩增。每4-5天对活细胞进行计数。正方形表示未用细胞因子刺激的细胞。三角形表示用130G-CSF刺激的细胞。菱形表示用IL-2刺激的细胞。B) 示出T细胞扩增测定结果的图表,其中细胞如在图A中被转导。在扩增第19天,洗涤细胞,在IL-2、130G-CSF或仅培养基中重新铺板。每4-5天对活细胞进行计数。正方形表示未用细胞因子刺激的细胞。浅灰色菱形表示用130G-CSF刺激的细胞。深灰色菱形表示用IL-2刺激的细胞。浅灰色倒置三角形表示最初用IL-2刺激且然后在第19天重新铺板在仅培养基中的细胞。深灰色三角形表示最初用130G-CSF刺激且然后在第19天重新铺板在仅培养基中的细胞。C) 示出G-CSFR ECD的表达的图表,如在扩增第4天或第16天通过流式细胞术所测定。

[0238] 图32呈现示出表达具有134ECD的G12/2R-1的原代人PBMC来源的T细胞相对于未转导细胞的增殖和免疫表型的图表。A) 示出BrdU掺入测定结果的图表,以评估T细胞增殖。将细胞收获、洗涤并重新铺板在IL-2 (300IU/ml)、IL-2+IL-12 (分别为300IU/ml和10ng/mL)、130G-CSF (300ng/ml) 或仅培养基中。B、C) 代表性流式细胞术图和图表,其示出在扩增第16天通过流式细胞术评估的表达具有134ECD的G12/2R-1的细胞相对于未转导细胞的免疫表型。

[0239] 图33呈现示出表达具有304ECD的G12/2R-1的原代人PBMC来源的T细胞相对于未转导细胞的扩增倍数和增殖的图表。A) 示出T细胞扩增测定结果的图表,其中用编码G12/2R-1_134-ECD的慢病毒转导细胞,并在IL-2 (300IU/mL)、130G-CSF (100ng/ml)、304G-CSF (100ng/ml) 或仅培养基中扩增。在IL-2、130G-CSF、304G-CSF或仅培养基中培养未转导细胞。每3-4天对活细胞进行计数。倒三角形表示未用细胞因子刺激的细胞。三角形表示用IL-2刺激的细胞。圆圈表示用130G-CSF刺激的细胞。菱形表示用304G-CSF刺激的细胞。B) 在第12天从扩增测定中收获细胞,并洗涤并重新铺板在IL-2 (300IU/ml)、130G-CSF (300ng/ml)、304G-CSF (100ng/ml)、307G-CSF (100ng/ml) 或仅培养基中。

[0240] 图34呈现蛋白质印迹,以检测在表达具有304ECD的G2R-3、具有304ECD的G12/2R-1的原代PBMC来源的T细胞或未转导T细胞中的所指示细胞因子信号传导事件。从扩增测定中收获细胞,并如所示用304G-CSF (100ng/mL)、IL-2 (300IU/mL)、IL-2和IL-12 (10ng/mL) 或仅培养基刺激。 β 肌动蛋白和组蛋白H3充当蛋白质负载对照。

具体实施方式

[0241] 简言之,并如下文更详细描述,本文描述了嵌合受体,其包含各种多亚基细胞因

子受体的G-CSFR胞外结构域和胞内结构域,所述嵌合受体用于选择性活化所关注细胞中的细胞因子信号传导。在某些方面,表达本文所述的嵌合受体的细胞中细胞因子信号传导的选择性活化包括特异性刺激过继转移细胞的能力。因此,本文描述了新的方法和物质组合物,其具有改善用于多种疾病适应症的基于细胞的疗法的潜力。

[0242] 定义

[0243] 除非另有规定,否则如下文所阐述的对权利要求书和说明书中使用的术语进行定义。

[0244] 术语“治疗”是指在治疗疾病状态(例如癌症疾病状态)时的任何治疗方面有益的结果,包括其预防、其严重性或进展减轻、其缓解或其治愈。

[0245] 术语“体内”是指在活生物体中发生的过程。

[0246] 如本文所用,术语“哺乳动物”包括人和非人,并且包括但不限于人、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、鼠类、牛、马和猪。

[0247] 术语“足够的量”是指足以产生所需效果的量,例如足以选择性地活化在细胞上表达的受体的量。

[0248] 术语“治疗有效量”是有效改善疾病症状的量。

[0249] 术语“野生型”是指多肽的天然氨基酸序列或编码本文所述多肽的基因的天然核酸序列。蛋白质或基因的野生型序列是该蛋白质或基因的物种的多肽或基因的最常见序列。

[0250] 如本文所用,术语“嵌合受体”是指经工程化以具有至少一个结构域(例如,ECD、ICD、TMD或C端区)的至少一部分的跨膜受体,所述至少一个结构域源自一种或多种不同跨膜蛋白或受体的序列。

[0251] 术语“可操作地连接”是指核酸或氨基酸序列被置于分别与另一种核酸或氨基酸序列的功能性关系中。通常,“可操作地连接”意指所连接的核酸序列或氨基酸序列是连续的,并且在分泌前导序列的情况下是连续的并且处于阅读相中。

[0252] 如本文所用,术语“胞外结构域”(ECD)是指当在细胞表面上表达时位于质膜外部的受体(例如,G-CSFR)的结构域。在某些实施方案中,G-CSFR的ECD包含SEQ ID 2或7的至少一部分。

[0253] 如本文所用,术语“胞内结构域”(ICD)是指当受体在细胞表面上表达时位于细胞内的受体的结构域。

[0254] 如本文所用,术语“跨膜结构域”(TMD或TM)是指当受体在细胞表面上表达时位于质膜内的细胞表面受体的结构域或区。

[0255] 术语“细胞因子”是指与细胞因子受体结合并且在与细胞上表达的细胞因子受体结合并活化后可诱导细胞信号传导的小蛋白质(约5-20kDa)。细胞因子的实例包括但不限于:白介素、淋巴因子、集落刺激因子和趋化因子。

[0256] 术语“细胞因子受体”是指与细胞因子结合的受体,包括1型和2型细胞因子受体。细胞因子受体包括但不限于:IL-2R(白介素-2受体)、IL-7R(白介素-7受体)、IL-12R(白介素-12受体)和IL-21R(白介素-21受体)。

[0257] 术语“G-CSFR”是指粒细胞集落刺激因子受体。G-CSFR也可以称为:GCSFR、G-CSF受体、集落刺激因子3受体、CSF3R、CD114抗原或SCN7。人G-CSFR由Ensembl识别号为

ENSG00000119535的基因编码。人G-CSFR由与GeneBank登录号NM_156039.3相对应的cDNA序列编码。

[0258] 术语“G-CSF”是指粒细胞集落刺激因子。G-CSF也可以称为集落刺激因子3和CSF3。人G-CSF由Ensembl识别号为ENSG00000108342的基因编码。人G-CSF由与GeneBank登录号KP271008.1相对应的cDNA序列编码。

[0259] 术语“至少一部分”是指本文所述的SEQ ID NO的连续核苷酸或氨基酸长度的大于50%、大于75%、大于80%、大于90%、大于95%、大于99%。本文所述的结构域或结合位点(例如,ECD、ICD、跨膜区、C端区或信号传导分子结合位点)的至少一部分可以与本文所述的SEQ IDNO具有大于50%、大于75%、大于80%、大于90%、大于95%、大于99%的同一性。

[0260] 术语“信号传导分子结合位点”是指细胞因子受体胞内结构域的核苷酸或氨基酸序列,其为细胞因子受体与下游信号传导分子的结合所必需的或增加细胞因子受体与下游信号分子的结合。

[0261] 术语“框1”区或“框2”区是指ICD上充当酪氨酸激酶Jak1、Jak2、Jak3或Tyk2结合位点的区域。框1区可包含与表2中列出的框1序列具有大于50%同一性的氨基酸序列。

[0262] 术语“C端区”指细胞因子受体的羧基端区,其包括嵌合受体的至少一个信号传导分子结合位点。

[0263] 术语“正交”或“正交细胞因子-受体对”是指通过氨基酸改变成如下情况来进行修饰的基因工程化蛋白质对:(a)缺乏与天然细胞因子或同源受体的结合;和(b)特异性结合对应工程化(正交)配体或受体。

[0264] 如本文所用,术语“正交受体”指正交细胞因子-受体对的基因工程化受体。

[0265] 如本文所用,术语“正交细胞因子”或“正交G-CSF”指正交细胞因子-受体对的基因工程化细胞因子。

[0266] 如本文所用,“不结合(do not bind)”、“不结合(does not bind)”或“不能结合”是指没有可检测的结合或结合不明显,即具有远低于天然配体的结合亲和力。

[0267] 可以“选择性活化嵌合受体”的细胞因子是指与天然(野生型)细胞因子受体相比,优先结合嵌合受体并活化嵌合受体的细胞因子。在某些方面,细胞因子选择性活化嵌合受体,所述嵌合受体是正交细胞因子-受体对的正交对应物。在某些方面,细胞因子是野生型细胞因子,并且它选择性地活化在细胞上表达的嵌合受体,而细胞因子的天然野生型受体不在细胞中表达。

[0268] 术语“免疫细胞”是指已知起到支持生物体的免疫系统(包括先天免疫反应和适应性免疫反应)的功能的任何细胞,并且包括但不限于淋巴细胞(例如,B细胞、浆细胞和T细胞)、自然杀伤细胞(NK细胞)、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、中性粒细胞和粒细胞。免疫细胞包括干细胞、未成熟免疫细胞和分化细胞。免疫细胞还包括任何细胞亚群,无论在生物体中多么罕见或丰富。在某些实施方案中,通过携带免疫细胞类型和亚群体的已知标志物(例如,细胞表面标志物)来鉴定免疫细胞。

[0269] 如本文所用,术语“活性增强”是指在细胞上表达的变体受体在用变体细胞因子刺激时活性增加,其中所述活性是在用天然细胞因子刺激时对于天然受体观察到的活性。

[0270] 术语“T细胞”是指哺乳动物免疫效应细胞,其特征可以在于CD3和/或T细胞抗原受体的表达,所述细胞可以被工程化以表达直系同源细胞因子受体。在一些实施方案中,所述

T细胞选自原初CD8⁺ T细胞、细胞毒性CD8⁺ T细胞、原初CD4⁺ T细胞、辅助性T细胞,例如T_H2、T_H9、T_H11、T_H22、T_{FH};调节性T细胞,例如T_R1、天然T_{Reg}、诱导型T_{Reg};记忆T细胞,例如中央记忆T细胞、效应记忆T细胞、NKT细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。

[0271] 本申请中使用的缩写包括以下: ECD (胞外结构域)、ICD (胞内结构域)、TMD或TM (跨膜结构域)、G-CSFR (粒细胞集落刺激因子受体)、G-CSF (粒细胞集落刺激因子)、IL-2R (白介素-2受体)、IL-12R (白介素12受体)、IL-21R (白介素-21受体) 和IL-7R (白介素-7受体) 以及NK细胞 (自然杀伤细胞)。IL-2R γ 在本文中也可以被称为: IL-2RG、IL-2Rgc、 γ c或IL-2R γ c。

[0272] “JAK”也可以称为Janus激酶。JAK是通过Jak-STAT途径转导细胞因子介导的信号细胞内非受体酪氨酸激酶家族,并且包括JAK1、JAK2、JAK3和TYK2。人JAK1由Ensembl识别号为ENSG00000162434的基因编码。人JAK1由对应于GeneBank登录号NM_002227的cDNA序列编码。人JAK2由具有Ensembl识别号ENSG00000096968的基因编码。人JAK2由与GeneBank登录号NM_001322194相对应的cDNA序列编码。人JAK3由Ensembl识别号为ENSG00000105639的基因编码。人JAK3由与GeneBank登录号NM_000215相对应的cDNA序列编码。人TYK2由Ensembl识别号为ENSG00000105397的基因编码。人TYK2由与GeneBank登录号NM_001385197相对应的cDNA序列编码。

[0273] STAT也可以称为信号转导及转录活化蛋白。STAT是7个STAT蛋白STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B和STAT6的家族。人STAT1由Ensembl识别号为ENSG00000115415的基因编码。人STAT1由与GeneBank登录号NM_007315相对应的cDNA序列编码。人STAT2由Ensembl识别号为ENSG00000170581的基因编码。人STAT2由与GeneBank登录号NM_005419相对应的cDNA序列编码。人STAT3由Ensembl识别号为ENSG00000168610的基因编码。人STAT3由与GeneBank登录号NM_139276相对应的cDNA序列编码。人STAT4由Ensembl识别号为ENSG00000138378的基因编码。人STAT4由与GeneBank登录号NM_003151相对应的cDNA序列编码。人STAT5A由Ensembl识别号为ENSG00000126561的基因编码。人STAT5A由与GeneBank登录号NM_003152相对应的cDNA序列编码。人STAT5B由Ensembl识别号为ENSG00000173757的基因编码。人STAT5B由与GeneBank登录号NM_012448相对应的cDNA序列编码。人STAT6由Ensembl识别号为ENSG00000166888的基因编码。人STAT6由与GeneBank登录号NM_003153相对应的cDNA序列编码。

[0274] SHC也可以称为含有转化蛋白的Src同源2结构域。Shc是三个同种型的家族,并且包括p66Shc、p52Shc和p46Shc、SHC1、SHC2和SHC3。人SHC1由Ensembl识别号为ENSG00000160691的基因编码。人SHC1由与GeneBank登录号NM_183001相对应的cDNA序列编码。人SHC2由Ensembl识别号为ENSG00000129946的基因编码。人SHC2由与GeneBank登录号NM_012435相对应的cDNA序列编码。人SHC3由Ensembl识别号为ENSG00000148082的基因编码。人SHC3由与GeneBank登录号NM_016848相对应的cDNA序列编码。

[0275] SHP-2也可以称为蛋白酪氨酸磷酸酶非受体类型11 (PTPN11) 和蛋白酪氨酸磷酸酶1D (PTP-1D)。人SHP-2由Ensembl识别号为ENSG00000179295的基因编码。人SHP-2由与GeneBank登录号NM_001330437相对应的cDNA序列编码。

[0276] PI3K也可以称为磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶。PI3K的催化亚基可以称为PIK3CA。人PIK3CA由Ensembl识别号为ENSG00000121879的基因编码。人PIK3CA由与

GeneBank登录号NM_006218相对应的cDNA序列编码。

[0277] 必须注意的是,除非上下文另外明确规定,否则如说明书和随附权利要求中所用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”包括复数个指示物。

[0278] 在提供数值范围的情况下,应理解,还明确公开了该范围的上下限之间的各中间值,其中除非上下文另外明确地规定,下限精确到十分位。所述范围中的任何所述值或中间值与该所述范围中的任何其它所述值或中间值之间的每个较小的范围都涵盖在本发明内。这些较小范围的上限或下限可独立地包括或不包括在该范围内,并且任一个限值、没有限值或两个限值都包括在该较小范围内的每个范围也涵盖在本发明内,并受限于所述范围中的任何明确排除的限值。当所明示范围包括所述极限中的一个或两个时,排除那些所包括的极限中的一个或两个的范围也包含于本发明中。

[0279] 嵌合细胞因子受体设计

[0280] 在某些实施方案中,本文描述了嵌合细胞因子受体,其包含可操作地连接至第二结构域的G-CSFR(粒细胞集落刺激因子受体)的胞外结构域(ECD);所述第二结构域包含多亚基细胞因子受体(例如IL-2R)的胞内结构域(ICD)的至少一部分。在某些方面,嵌合细胞因子受体包含来自表1A和表1B的ICD的一部分。在某些方面,嵌合细胞因子受体包含选自表1A和表1B的跨膜结构域。在某些方面,嵌合细胞因子受体ICD包含来自表1A、表1B和表2的框1区和框2区。在某些方面,嵌合细胞因子受体包含至少一个来自1A表、1B表和表2的信号传导分子结合位点。

[0281] 在某些方面,本文所述的嵌合受体包含与本文所述的ECD SEQ ID NO. 共享至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%氨基酸或核酸序列同一性的ECD结构域。在某些方面,嵌合受体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO.5或核酸序列SEQ ID NO.6或7的G-CSFR的ECD。在某些方面,嵌合受体包含G-CSFR的ECD,其中ECD包含至少一个氨基酸取代。在某些方面,G-CSFR的ECD包含至少一种选自由R41E、R141E和R167D组成的组的氨基酸取代。

[0282] 在某些方面,本文所述的嵌合受体包含与本文所述的TMD SEQ ID NO. 共享至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%氨基酸或核酸序列同一性的跨膜结构域(TMD)。在某些方面,嵌合受体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO.9或核酸序列SEQ ID NO.13的gp130的TMD。在某些方面,嵌合受体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO.8或核酸序列SEQ ID NO.12的G-CSFR的TMD。

[0283] 在某些方面,本文所述的嵌合受体包含与本文所述的ICD SEQ ID NO. 共享至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%氨基酸或核酸序列同一性的细胞因子受体的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO.16、19、21、29、31、33、35、37或39的IL-2R β 的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含具有核酸序列SEQ ID NO.44、47、49、57、59、61、63、65或67的IL-2R β 的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO.41或核酸序列SEQ ID NO.69的IL-7R α 的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO.43或核酸序列SEQ ID NO.71的IL-7R的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO.35或45的IL-21R的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含具有核酸序列SEQ ID NO.25或27的IL-21R的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含

具有氨基酸序列SEQ ID NO.23、32或36的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含具有核酸序列SEQ ID NO.51、60或64的IL-12R β_2 的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO.20、22、24、26、28、30、34、40或42的G-CSFR的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含具有核酸序列SEQ ID NO.48、50、52、54、56、58、62、68或70的G-CSFR的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO.18或38的gp130的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含具有核酸序列SEQ ID NO.46或66的gp130的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO.17的IL-2R γ (即,IL-2RG、IL-2Rgc、 γ c或IL-2R γ c)的ICD的至少一部分。在某些方面,嵌合受体包含具有核酸序列SEQ ID NO.45的IL-2R γ (即,IL-2RG、IL-2Rgc、 γ c或IL-2R γ c)的ICD的至少一部分。

[0284] 在某些方面,本文所述的ICD的至少一部分包含至少一个信号传导分子结合位点。在某些方面,所述至少一个信号传导分子结合位点是G-CSFR的STAT3结合位点;gp130的STAT3结合位点;gp130的SHP-2结合位点;IL-2R β 的Shc结合位点;IL-2R β 的STAT5结合位点;IL-2R β 的STAT3结合位点;IL-2R β 的STAT1结合位点;IL-7R α 的STAT5结合位点;IL-7R α 的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)结合位点;IL-12R β_2 的STAT5结合位点;IL-12R β_2 的STAT4结合位点;IL-12R β_2 的STAT3结合位点;IL-21R的STAT5结合位点;IL-21R的STAT3结合位点;和IL-21R的STAT1结合位点。在某些方面,所述至少一个信号传导分子结合位点包含还含有表2中列出的氨基酸的序列。

[0285] 在某些方面,本文所述的ICD的至少一部分包含gp130或G-CSFR的框1区和框区。在某些方面,框1区包含表2中列出的氨基酸序列。在某些方面,框1区包含与表2中列出的框1序列具有大于50%同一性的氨基酸序列。

[0286] 在某些方面,如在图1、4和5的嵌合受体设计中所示,本文所述的嵌合受体包含G-CSFR ECD结构域、跨膜结构域(TMD)和以N端至C端顺序排列的一个ICD的至少一部分。

[0287] 在某些方面,本文所述的嵌合受体包含表3-6中每一个所公开的序列的N端至C端顺序的氨基酸序列。在某些方面,本文所述的嵌合受体的序列包含表3-6中每一个所公开的序列的5'至3'顺序的核酸序列。在某些方面,嵌合细胞因子受体与表3-6中每一个所公开的氨基酸序列的N端至C端顺序的氨基酸序列共享至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%氨基酸同一性。在某些方面,嵌合细胞因子受体与表3-6中每一个所公开的核酸序列的5'至3'顺序的核酸序列共享至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%核酸同一性。

[0288] 表1A:嵌合细胞因子受体

[0289]

名称	ECD	TMD	框 1/2	ICD	STAT 位点	其他位点
G2R-1	G-CSFR	IL-2R β + γ c	IL-2R β + γ c	IL-2R β + γ c	5, 5	Shc
G2R-2	G-CSFR	gp130	gp130	IL-2R β	5, 5	Shc
G2R-3	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	IL-2R β	5, 5	Shc
G21R-1	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	IL-21R	3	
G21R-2	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	IL-21R	3	未知
G12R-1	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	IL-12R β_2	4	

[0290] 表1B:嵌合细胞因子受体。

[0291]

名称	ECD	TMD	框 1/2	ICD	STAT 位点	其他位点
G21/2R-1	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR, IL-2R β	3, 5, 5	Shc
G12/2R-1	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	来自 IL-12R β_2 的 STAT4 位点 置换来自 IL-2R β 的 STAT5 位点	4, 5	Shc
G21/12/2R-1	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	含有来自 G-CSFR ICD 的 STAT3 位点; 来自 IL-12R β_2 的 STAT4 位点置换来自 IL-2R β 的 STAT5 位点	3, 4, 5	Shc

[0292]

G27/2R-1	G-CSFR	gp130	gp130	gp130 + IL-2R β	3, 5, 5	SHP-2, Shc
G7R-1	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	IL-7R α	5	PI3K

[0293] 表2

[0294]	天然 ICD	框 1(来源)	SEQ ID NO:	Shc	SHP-2	STAT 5	STAT4	STAT 3	STAT 1	PI3K
	G-CSFR	LWPSVDP PA (Q99062)	74	不适用	不适用	不适用	不适用	Y704	不适用	不适用
	gp130	IWPNVDP PS (P40189)	75	不适用	Y759	不适用	不适用	Y767	不适用	不适用
	IL-2R β	LKCNTDP PS (P14784)	76	Y338	不适用	Y392, Y510	不适用	Y392, Y510	Y392, Y510	不适用
	IL-21R	KIWA VPS PE (Q9HBE5)	77	不适用	不适用	不适用	不适用	Y510	Y510	不适用
	IL-12R β_2	CSREIPDP A (Q99665)	78	不适用	不适用	Y800	Y800	Y800	不适用	不适用
	IL-7R α	VWPSLPD HK (P16871)	79	不适用	不适用	Y449	不适用	不适用	不适用	Y449

[0295] 嵌合细胞因子受体的配体

[0296] 本文描述了特异性结合本文所述的嵌合受体的配体。在某些方面,配体是野生型配体。在某些方面,配体是正交细胞因子(即,变体细胞因子),其与嵌合受体的结合亲和力高于与野生型受体的结合亲和力。在某些方面,配体是野生型G-CSF。在某些方面,配体是具有一个或多个氨基酸取代的G-CSF,例如一个或多个选自由E46R、L108K和D112R组成的组的氨基酸取代。

[0297] 在正交细胞因子与细胞表面上的正交嵌合受体结合时,嵌合受体活化通过天然细胞元件转导的信号传导,以提供模拟该天然反应的生物活性,但其对经工程化以表达正交嵌合受体的细胞是特异性的。正交嵌合受体不结合内源性对应细胞因子,包括正交细胞因子的天然对应物,而正交细胞因子不结合任何内源性受体,包括嵌合受体的天然对应物。在某些实施方案中,与天然细胞因子与天然细胞因子受体的结合相比,正交细胞因子结合天然受体的亲和力显著降低。在某些实施方案中,正交细胞因子对天然受体的亲和力是天然细胞因子对天然细胞因子受体的亲和力的小于10倍、小于100倍、小于1,000倍或小于10,000倍。在某些实施方案中,正交细胞因子以以下 K_D 结合天然受体:大于 $1 \times 10^{-4}M$ 、 $1 \times 10^{-5}M$ 、大于 $1 \times 10^{-6}M$;大于 $1 \times 10^{-7}M$ 、大于 $1 \times 10^{-8}M$ 或大于 $1 \times 10^{-9}M$ 。在某些实施方案中,与天然细胞因子受体与天然细胞因子的结合相比,正交细胞因子受体以显著降低的亲和力结合天然细胞因子。在某些实施方案中,正交细胞因子受体与天然细胞因子受体的结合为天然细胞因子与天然细胞因子受体的结合的小于10倍、小于100倍、小于1,000倍或小于10,000倍。在某些实施方案中,正交细胞因子受体以以下 K_D 结合天然细胞因子:大于 $1 \times 10^{-4}M$ 、 $1 \times 10^{-5}M$ 、大于 $1 \times 10^{-6}M$;大于 $1 \times 10^{-7}M$ 、大于 $1 \times 10^{-8}M$ 、或大于 $1 \times 10^{-9}M$ 。在某些实施方案中,正交细胞因子对正交嵌合受体的亲和力可与天然细胞因子对天然受体的亲和力相当,例如具有的亲和力为天然细胞因子受体对亲和力的至少约1%、至少约5%、至少约10%、至少约25%、至少约50%、至少约75%、至少约100%,并且可以更高,例如天然细胞因子对天然受体的亲和力的2倍、3倍、4

倍、5倍、10倍或更多倍。

[0298] 亲和力可以通过本领域技术人员熟知的任何数量的测定来确定。例如,可以通过竞争性结合实验来确定亲和力,所述竞争性结合实验在存在各种浓度的未标记配体的情况下使用单一浓度的标记配体来测量受体的结合。通常,未标记配体的浓度在至少六个数量级上变化。通过竞争结合实验,可以确定 IC_{50} 。如本文所用,“ IC_{50} ”是指受体和标记配体之间的缔合受到50%抑制所需的未标记配体的浓度。 IC_{50} 是配体-受体结合亲和力的指标。低 IC_{50} 表示高亲和力,而高 IC_{50} 表示低亲和力。

[0299] 正交配体与细胞表面上表达的嵌合细胞因子受体的结合,可能会或可能不会影响细胞因子受体的功能(与天然细胞因子受体活性相比);天然活性并非在所有情况下都需要或期望。在某些实施方案中,正交配体与嵌合细胞因子受体的结合将诱导天然细胞因子信号传导的一个或多个方面。在某些实施方案中,正交细胞因子与在细胞表面上表达的嵌合细胞因子受体的结合引起选自以下组成的组的细胞反应:增殖、活力和活性增强。

[0300] 编码嵌合细胞因子受体的核酸

[0301] 本公开中包括编码本文所述的嵌合细胞因子受体中的任一种的核酸。本文描述了表达载体或表达载体试剂的剂盒,其包含编码本文所述的一种或多种嵌合细胞因子受体的一种或多种核酸序列。

[0302] 将编码嵌合细胞因子受体的核酸插入可复制载体中进行表达。这种载体可用于将核酸序列引入到宿主细胞中,使得其表达本文所述的嵌合细胞因子受体。许多此类载体是可用的。载体组分通常包括但不限于以下一种或多种:复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。载体包括病毒载体、质粒载体、整合载体等。载体可以是例如逆转录病毒载体、腺病毒载体、慢病毒载体、基于转座子的载体或合成mRNA。载体可能能够转染或转导T细胞、NK细胞或任何其他免疫或非免疫细胞。

[0303] 嵌合细胞因子受体不仅可以直接重组产生,而且可以作为与异源多肽(例如信号序列或在成熟蛋白或多肽的N端具有特定切割位点的其他多肽)的融合多肽产生。通常,信号序列可以是载体的组分,或者它也可以是插入到载体中的编码序列的一部分。所选异源信号序列优选地为由宿主细胞识别并加工(即被信号肽酶切割)的序列。在哺乳动物细胞表达中,可以使用天然信号序列,或者其他哺乳动物信号序列可以是合适的,例如来自相同或相关物种的分泌多肽的信号序列以及病毒分泌前导序列。在某些方面,信号序列是核酸序列SEQ ID NO.6或氨基酸序列SEQ ID NO.1。

[0304] 编码嵌合细胞因子受体的表达载体

[0305] 表达载体通常包含选择基因,也称为可选择标记。该基因编码在选择性培养基中生长的转化宿主细胞的存活或生长所必需的蛋白质。未用含有选择基因的载体转化的宿主细胞将无法在培养基中存活。典型的选择基因编码如下蛋白,所述蛋白(a)赋予对抗生素或其它毒素,例如氨苄青霉素、新霉素、氨甲喋呤或四环素的抗性,(b)弥补营养缺陷,或(c)提供从复合培养基中无法获得的关键营养物质。

[0306] 表达载体包含被宿主生物识别并可操作地连接至直向同源蛋白质编码序列的启动子。启动子是位于结构基因的起始密码子上游(5')的非翻译序列(通常在约100至1000bp内),其控制它们可操作地连接的特定核酸序列的转录和翻译。此类启动子通常分为诱导型和组成型两类。诱导型启动子是在其控制下响应于培养条件的某些变化(例如,营养物的存

在或不存在或温度变化)来启动由DNA转录的水平升高的启动子。由多种潜在宿主细胞识别的大量启动子是众所周知的。

[0307] 可以例如通过启动子对哺乳动物宿主细胞中载体的转录进行控制,条件是此类启动子与宿主细胞系统相容,所述启动子获自病毒如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(例如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒(例如鼠类干细胞病毒)、乙型肝炎病毒,并且最优选猿猴病毒40(SV40)的基因组;来自异源哺乳动物的启动子,例如肌动蛋白启动子、PGK(磷酸甘油酸激酶)或免疫球蛋白启动子;来自热休克启动子。SV40病毒的早期和晚期启动子可以还包含SV40病毒复制起始点的SV40限制性片段的形式方便地获得。

[0308] 通常通过将增强子序列插入载体中来增加由高等真核细胞进行的转录。增强子是DNA的顺式作用元件,通常约10至300bp,其作用于启动子以增加其转录。增强子是相对定向且位置独立的,在内含子内以及编码序列本身中发现在转录单元的5'和3'处。已知许多来自哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、胎蛋白和胰岛素)的增强子序列。然而,通常使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括位于复制起始点后侧(late side)的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起始点后侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子。增强子可剪接入表达载体中编码序列的5'位或3'位,但是优选位于启动子的5'位点。

[0309] 真核宿主细胞中使用的表达载体还将含有终止转录和稳定mRNA所需的序列。此类序列通常可得自真核或病毒DNA或cDNA的5'(有时为3')非翻译区。包含上文列出的组分中的一个或多个的合适载体的构建采用标准技术。

[0310] 在某些方面,本文公开了编码本文公开的嵌合受体的慢病毒载体。在某些方面,慢病毒载体包含HIV-1 5' LTR和3' LTR。在某些方面,慢病毒载体包含EF1a启动子。在某些方面,慢病毒载体包含SV40 poly a终止子序列。在某些方面,慢病毒载体是图6的载体。在某些方面,载体是psPAX2、Addgene® 12260、pCMV-VSV-G或 Addgene® 8454。

[0311] 本文描述了核酸和多肽序列。在一些实施方案中,还描述了与本文所述序列具有高序列同一性(例如95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性)的核酸和多肽序列。在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“同一性”百分比是指具有指定百分比的当针对最大对应而进行比较和比对时为相同的核苷酸或氨基酸残基的两个或更多个序列或子序列,如使用下文描述的序列比较算法之一(例如,BLASTP和BLASTN或其他技术人员可用的算法)或通过视觉检查来测量。根据应用,“同一性”百分比可以存在于所比较的序列的区上,例如,存在于功能结构域上,或者可替代地存在于待比较的两个序列的全长上。

[0312] 对于序列比较,通常一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机中,必要时指定子序列坐标,并且指定序列算法程序参数。序列比较算法然后基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0313] 例如,用于比较的最佳序列比对可以通过Smith&Waterman,Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)的局部同源性算法;通过Needleman&Wunsch,J. Mol. Biol. 48:443 (1970)的同源性比对算法;通过Pearson&Lipman,Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)的相似性搜索方法;通过这些算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. 中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA);或通过目视检查(一般参见Ausubel等人,下文)来进行。

[0314] 适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的一个实例是Altschul等人, J.Mol.Biol.215:403-410 (1990) 中描述的BLAST算法。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(www.ncbi.nlm.nih.gov/) 公开获得。

[0315] 表达嵌合受体的细胞

[0316] 本文还描述了表达嵌合受体的细胞。宿主细胞(包括工程化免疫细胞)可以用上述表达载体转染或转导以用于细胞因子或嵌合细胞因子表达。

[0317] 本发明提供了一种细胞,其包含一种或多种嵌合细胞因子受体。细胞可包含编码本文所述的嵌合细胞因子受体的核酸或载体。本公开还提供了产生表达嵌合细胞因子受体的细胞的方法。在某些方面,通过将本文所述的核酸或表达载体引入到细胞中来产生细胞。可以通过任何方法将细胞引入到核酸或表达载体中,所述方法包括但不限于病毒载体的转染、转导、转座或基因编辑。可以使用本领域已知的任何基因编辑技术,包括但不限于包括聚集的规则间隔的短回文重复序列(CRISPR-Cas) 系统、锌指核酸酶、基于转录活化因子样效应子的核酸酶和大范围核酸酶的技术。

[0318] 宿主细胞可以是体内的任何细胞。在某些实施方案中,细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,细胞是T细胞,包括但不限于原初CD8⁺T细胞、细胞毒性CD8⁺ T细胞、原初CD4⁺ T细胞、辅助性T细胞,例如T_H1、T_H2、T_H9、T_H11、T_H22、T_{FH};调节性T细胞,例如T_R1、天然T_{Reg}、诱导型T_{Reg};记忆T细胞,例如中央记忆T细胞、效应记忆T细胞、NKT细胞、 γ δ T细胞;等。在某些实施方案中,细胞是B细胞,包括但不限于原初B细胞、生发中心B细胞、记忆B细胞、细胞毒性B细胞、产生细胞因子的B细胞、调节性B细胞(Breg)、中心母细胞、中心细胞、抗体分泌细胞、浆细胞等。在某些实施方案中,细胞是先天性淋巴样细胞,包括但不限于NK细胞等。在某些实施方案中,细胞是髓样细胞,包括但不限于巨噬细胞、树突细胞、髓样来源的抑制细胞等。

[0319] 在某些实施方案中,细胞是干细胞,包括但不限于造血干细胞、间充质干细胞、神经干细胞等。

[0320] 在一些实施方案中,在转移到受试者中之前,细胞在离体程序中被遗传修饰。细胞可以单位剂量提供以用于治疗,并且可以相对于预期的接受者是同种异体的、自体的等。

[0321] T细胞或T淋巴细胞是在细胞介导的免疫中起核心作用的一种类型的淋巴细胞。通过在细胞表面上存在T细胞受体(TCR),可以将它们与其他淋巴细胞(例如B细胞和自然杀伤细胞(NK细胞)) 区分开。T细胞有多种类型,如下所汇总。

[0322] 在某些方面,本文所述的表达嵌合细胞因子受体的细胞是辅助性T辅助细胞(Th细胞)。Th细胞在免疫过程中协助其他白细胞,包括使B细胞成熟为浆细胞和记忆B细胞以及活化细胞毒性T细胞和巨噬细胞。Th细胞通常在其表面上表达CD4。当Th细胞被抗原呈递细胞(APC) 表面上的MHC II类分子呈递肽抗原时,它们会被活化。这些细胞可以分化为几种亚型之一,包括Th1、Th2、Th17、Th9或Tfh,它们分泌不同的细胞因子以促进不同类型的免疫反应。

[0323] 在某些方面,本文所述的表达嵌合细胞因子受体的细胞是溶细胞性T细胞(TC细胞或CTL)。CTL破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞,并且也参与移植排斥。CTL通常在其表面上表达CD8。这些细胞通过与同存在于所有健康有核细胞表面上的MHC I类缔合的抗原结合来识别其靶标。

[0324] 在某些方面,本文所述的表达嵌合细胞因子受体的细胞是记忆T细胞。记忆T细胞

是在感染消退后长期存在的一小组抗原特异性T细胞。它们在重新暴露于其同源抗原后迅速扩增为大量效应T细胞,从而为免疫系统提供针对过去感染的“记忆”。记忆T细胞包括至少三种亚型:中央记忆T细胞(TCM细胞)和两种类型的效应记忆T细胞(TEM细胞和TEMRA细胞)。记忆细胞可以是CD4⁺或CD8⁺。记忆T细胞通常表达细胞表面蛋白CD45RO。

[0325] 在某些方面,本文所述的表达嵌合细胞因子受体的细胞是调节性T细胞(Treg细胞)。Treg细胞以前被称为抑制性T细胞,对维持免疫耐受至关重要。它们的主要作用是在免疫反应结束时关闭T细胞介导的免疫,并抑制逃避胸腺中阴性选择过程的自身反应性T细胞。已经描述了两个主要类别的CD4⁺ Treg细胞:天然存在的Treg细胞和适应性(或诱导性)Treg细胞。天然存在的Treg细胞(也称为CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg细胞)出现在胸腺中,并与发育中的T细胞和已被TSLP活化的髓样(CD11c⁺)和浆细胞样(CD123⁺)树突细胞之间的相互作用有关。Treg细胞可以通过存在称为FoxP3的细胞内分子来与其他T细胞区分开。

[0326] 在某些方面,本文所述的表达嵌合细胞因子受体的细胞是肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)或肿瘤相关淋巴细胞(TAL)。在某些方面,TIL/TAL包括CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、自然杀伤(NK)细胞及其组合。

[0327] 在某些实施方案中,本文所述的T细胞是嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞),其已被基因工程化以产生用于免疫疗法的人工T细胞受体。在某些方面,CAR-T细胞来源于患者自身血液中的T细胞(即,自体)。在某些方面,CAR-T细胞来源于供体的T细胞(即,同种异体)。

[0328] 在某些实施方案中,本文所述的T细胞是工程化T细胞受体(eTCR-T细胞),其已经被基因工程化以产生用于免疫疗法的特定T细胞受体。在某些方面,eTCR-T细胞来源于患者自身血液中的T细胞(即自体)。在某些方面,eTCR-T细胞来源于供体的T细胞(即,同种异体)。

[0329] 在某些方面,本文所述的表达嵌合细胞因子受体的细胞是自然杀伤细胞(NK细胞)。NK细胞形成先天免疫系统的一部分。NK细胞以MHC独立性方式对来自病毒感染细胞的先天信号提供快速反应。NK细胞(属于先天淋巴样细胞组)被定义为大颗粒淋巴细胞(LGL),并构成第三种由产生B淋巴细胞和T淋巴细胞的普通淋巴祖细胞分化的细胞。已知NK细胞在骨髓、淋巴结、脾脏、扁桃体和胸腺中分化并成熟,然后进入循环。

[0330] 在某些方面,本文所述的表达嵌合细胞因子受体的细胞是B细胞。B细胞包括但不限于原初B细胞、生发中心B细胞、记忆B细胞、细胞毒性B细胞、产生细胞因子的B细胞、调节性B细胞(Breg)、中心母细胞、中心细胞、抗体分泌细胞、浆细胞等。

[0331] 在某些方面,本文所述的表达嵌合细胞因子受体的细胞是髓样细胞,包括但不限于巨噬细胞、树突细胞、髓样抑制细胞等。

[0332] 本文所述的表达变体受体或变体细胞因子的细胞可以是任何细胞类型。在某些方面,本文所述的表达嵌合受体或细胞因子的细胞是造血系统的细胞。免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)可以由患者本身的外周血(第1方)离体产生,或者在从供体外周血(第2方)进行造血干细胞移植的情况下产生,或由来自未联系的供体(第3方)的外周血产生。或者,免疫细胞可以来源于诱导型祖细胞或胚胎祖细胞向免疫细胞的离体分化。或者,可以使用保留其效应功能并可用作治疗剂的永生化免疫细胞系(例如,保持其裂解功能的T细胞或NK细胞系;保留其抗体产生功能的血浆细胞系;或保留其吞噬和抗原呈递功能的树突细胞系或巨噬细胞)。在所有这些实施方案中,表达嵌合细胞因子受体的细胞是通过多种方法之一引入

编码每种嵌合细胞因子受体的DNA或RNA来产生的,所述多种方法包括用病毒载体转导或用DNA或RNA转染。

[0333] 细胞可以是来源于受试者并被离体工程化以表达嵌合细胞因子受体和/或细胞因子的免疫细胞。免疫细胞可以来自外周血单核细胞(PBMC)样品。免疫细胞可以在用编码提供根据本发明第一方面的嵌合细胞因子受体的分子的核酸转导之前被活化和/或扩增,例如通过用抗CD3单克隆抗体处理。本发明的免疫细胞可以通过以下方式制备:(i)从受试者或上文列出的其他来源分离含免疫细胞的样品;和(ii)用编码嵌合细胞因子受体的一种或多种核酸序列转导或转染免疫细胞。

[0334] 可以在常规营养培养基中培养细胞,这些培养基在适当时改变以诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因。哺乳动物宿主细胞可以在多种培养基中培养。市售的培养基,例如Ham's F10 (Sigma)、最小必需培养基((MEM), (Sigma))、RPMI 1640 (Sigma)以及达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ((DMEM), Sigma),适于培养宿主细胞。这些培养基中的任何一种可根据需要用激素和/或其它生长因子(例如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(例如氯化钠、钙、镁及磷酸盐)、缓冲液(例如HEPES)、核苷(例如腺嘌呤核苷和胸腺嘧啶核苷)、抗生素、微量元素以及葡萄糖或等量的能量源进行补充。还可以包括本领域技术人员已知的适当浓度的任何其他必要的补充剂。培养条件,诸如温度、pH等,是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些条件,并且对于普通技术人员而言将是显而易见的。

[0335] 然后,免疫细胞可以例如通过基于抗体的抗原结合结构域的表达进行选择来纯化。在某些实施方案中,通过表达可选择标记(例如,蛋白质、荧光标记或表位标签)或通过本领域已知用于选择、分离和/或纯化细胞的任何方法来选择细胞。

[0336] 试剂盒

[0337] 本公开还描述了用于产生表达本文所述的嵌合细胞因子受体中的至少一种的细胞的试剂盒。在某些实施方案中,试剂盒包括编码至少一种嵌合细胞因子受体的至少一种表达载体和使用说明书。在某些方面,试剂盒还包括药物制剂中的至少一种细胞因子或编码与本文所述的嵌合细胞因子受体中的至少一种结合的细胞因子的表达载体。在某些实施方案中,试剂盒包括如下细胞,所述细胞包含编码本文所述的嵌合受体的表达载体。

[0338] 在某些实施方案中,试剂盒包括如下细胞,所述细胞包含编码本文所述的变体受体的表达载体。在某些实施方案中,试剂盒包括如下细胞,所述细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)/工程化T细胞受体(eTCR)等(例如,工程化非天然TCR受体)的表达载体。在某些实施方案中,试剂盒包括编码嵌合抗原受体(CAR)/工程化T细胞受体(eTCR)等的表达载体。在某些实施方案中,试剂盒包括编码本文所述的变体受体和嵌合抗原受体(CAR)/工程化T细胞受体(eTCR)等的表达载体。

[0339] 在某些方面,本文所述的试剂盒还包括正交细胞因子。在某些方面,试剂盒还包括药物制剂中的至少一种细胞因子。在某些实施方案中,试剂盒还包括至少一种另外的细胞因子。在某些实施方案中,组分以剂型、液体或固体形式以任何方便包装提供。

[0340] 可以提供另外的试剂用于如本文所述提供的细胞或产生的细胞的生长、选择和制备。例如,试剂盒可以包括用于细胞培养的组分、生长因子、分化剂、用于转染或转导的试剂等。

[0341] 在某些实施方案中,除了上述组分之外,试剂盒还可以包括使用说明书。说明书可以以任何方便的形式提供。例如,说明书可以作为印刷信息、在试剂盒的包装中、在包装插页中等提供。说明书还可以作为其上记录有信息的计算机可读介质提供。此外,可以在可用于访问信息的网站地址上提供说明书。

[0342] 选择性活化嵌合受体的方法

[0343] 本公开提供了用于选择性活化在细胞表面上表达的嵌合细胞因子受体的方法,所述方法包括使本文所述的嵌合细胞因子受体与选择性活化嵌合受体的细胞因子接触。在某些方面,选择性活化嵌合受体的细胞因子是G-CSF。G-CSF可以是野生型G-CSF或包含赋予与天然(野生型)细胞因子受体相比G-CSF与嵌合受体的优先结合和活化的一个或多个突变的G-CSF。

[0344] 在某些方面,通过细胞因子与嵌合受体的结合而选择性活化嵌合受体导致受体的同二聚化、受体的异二聚化或其组合。在某些方面,嵌合细胞因子受体的活化导致下游信号传导分子的活化。在某些方面,下游信号传导分子的活化包括活化刺激细胞的细胞周期进程、增殖、活力和/或功能活性的细胞信号传导途径。在某些方面,活化的信号传导途径或分子是但不限于Jak1、Jak2、Jak3、STAT1、STAT2、STAT3、Shc、ERK1/2和Akt。在某些方面,在施用结合受体的细胞因子后,嵌合细胞因子受体的活化导致细胞增殖增加。在某些方面,增殖程度是在用IL-2刺激细胞时观察到的增殖的1-1,000倍、1-100倍、1-50倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、1-1.5倍或0.1-10倍。

[0345] 使用表达变体细胞因子受体的干细胞的方法

[0346] 本发明提供了一种用于治疗 and/或预防病症或疾病的方法,其包括施用表达本文所述的嵌合细胞因子受体和/或正交细胞因子的干细胞的步骤。在某些实施方案中,表达本文所述的变体细胞因子受体和/或变体细胞因子的干细胞用于再生医学、细胞/组织/器官移植、组织重建或组织修复。

[0347] 过继细胞转移方法

[0348] 本发明提供了一种用于治疗 and/或预防疾病的方法,其包括向受试者施用表达本文所述的嵌合细胞因子受体的细胞(例如,在如下所述的药物组合物中)的步骤。

[0349] 用于治疗 and/或预防疾病的方法涉及本文所述的细胞,例如T细胞、NK细胞或表达嵌合细胞因子受体的任何其他免疫或非免疫细胞的治疗用途。可以向患有现有疾病或病症的受试者施用细胞,以减轻、减少或改善与所述疾病相关的至少一种症状和/或减缓、减少或阻断所述疾病的进展。预防疾病的方法涉及本发明的细胞的预防性使用。此类细胞可以施用于尚未感染疾病和/或未表现出疾病的任何症状的受试者,以预防或损害疾病的原因或减少或防止与疾病相关的至少一种症状的发展。受试者可能有所述疾病的易感性,或被认为有发展所述疾病的风险。

[0350] 在一些实施方案中,本发明的组合物、方法和试剂盒用于增强免疫反应。在一些实施方案中,免疫反应针对期望通过全身施用细胞因子(例如肌内、腹膜内、静脉内等)来消耗或调节靶细胞(例如癌细胞、感染细胞、参与自身免疫性疾病的免疫细胞等)的病症。

[0351] 在某些方面,用于治疗 and/或预防疾病的方法可包括以下步骤:(i) 分离含免疫细胞的样品;(ii) 用核酸序列或载体(例如表达嵌合细胞因子受体)转导或转染此类细胞;(iii) 向受试者施用或输注来自(ii)的细胞;和(iv) 施用刺激输注细胞的细胞因子。在某些

方面,在向受试者施用或输注所述细胞之前,受试者已经历免疫耗竭治疗。在某些方面,在向受试者施用或输注所述细胞之前,受试者尚未经历免疫耗竭治疗。在某些方面,在向受试者施用或输注细胞之前,受试者已经历在不使用本文所述的嵌合受体的情况下严重性降低的免疫耗竭治疗。

[0352] 含免疫细胞的样品可以从受试者或其他来源分离,例如如上所述。免疫细胞可以从受试者本身的外周血(第1方)中分离,或者在从供体外周血(第2方)进行造血干细胞移植的情况下产生,或由来自未联系的供体(第3方)的外周血产生。免疫细胞也可以从肿瘤组织或体内其他组织中分离出来。

[0353] 在一些实施方案中,使免疫细胞与正交细胞因子在体内接触,即,其中免疫细胞被转移至接受者,并且向接受者施用有效剂量的正交细胞因子并且允许所述正交细胞因子在其天然位置(例如在淋巴结等)接触所述免疫细胞。在一些实施方案中,所述接触在体外进行。当细胞在体外与正交细胞因子接触时,将细胞因子以足以活化来自受体的信号传导的剂量和时间段添加至细胞,所述信号传导可以利用天然细胞机制的方面,例如辅助蛋白、共受体等。活化的细胞可用于任何目的,包括但不限于与抗原特异性测定、细胞因子谱分析和体内递送有关的实验目的。

[0354] 在某些方面,向受试者施用治疗有效数量的细胞。在某些方面,在多个不同的情形下向受试者施用或输注表达嵌合细胞因子受体的细胞。在某些实施方案中,施用至少 1×10^6 个细胞/kg、至少 1×10^7 个细胞/kg、至少 1×10^8 个细胞/kg、至少 1×10^9 个细胞/kg、至少 1×10^{10} 个细胞/kg或更多,有时受限于在收集过程中获得的细胞,例如T细胞的数量。转染的细胞可以任何生理上可接受的介质(通常是血管内)输注至受试者,尽管它们也可以引入任何其他方便的位点,在所述位点细胞可以找到适合生长的位点。

[0355] 在某些方面,本文所述的方法包括向受试者施用治疗有效量的细胞因子。在某些方面,在多个不同的情形下向受试者施用细胞因子。在某些方面,施用的细胞因子的量是足以实现治疗上期望的结果(例如,减轻受试者的疾病症状)的量。在某些方面,施用的细胞因子的量是足以刺激本文所述的表达嵌合细胞因子受体的细胞的细胞周期进程、增殖、活力和/或功能活性的量。在某些方面,细胞因子以实现治疗上期望的结果所必需的剂量和/或持续时间施用。在某些方面,细胞因子以足以刺激本文所述的表达嵌合细胞因子受体的细胞的细胞周期进展、增殖、活力和/或功能活性的剂量和/或持续时间施用。剂量和频率可能因剂;施用模式;细胞因子的性质;等而变化。本领域技术人员将理解,此类准则将针对个情况进行调整。对于局部施用(例如鼻内、吸入等)、对于全身给药(例如肌内、腹膜内、血管内等),也可以改变剂量。

[0356] 过继细胞转移的适应症

[0357] 本公开提供了一种表达本文所述的嵌合细胞因子受体的细胞,其用于治疗 and/或预防疾病。本发明还涉及表达本文所述的嵌合细胞因子受体的细胞在制造用于治疗 and/或预防疾病的药物中的用途。

[0358] 通过本发明的方法治疗和/或预防的疾病可以是癌性疾病,例如但不限于胆管癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、结肠癌、子宫内膜癌、血液系统恶性肿瘤、肾癌(肾细胞)、白血病、淋巴瘤、肺癌、黑素瘤、非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤和甲状腺癌。

[0359] 待治疗和/或预防的疾病可以是自身免疫性疾病。自身免疫性疾病的特征是T淋巴

细胞和B淋巴细胞或其他免疫细胞类型异常靶向自身蛋白、多肽、肽和/或其他自身分子,从而导致体内器官、组织或细胞类型(例如,胰腺、脑、甲状腺或胃肠道)损伤和或障碍,以引起疾病的临床表现。自身免疫性疾病包括影响特定组织的疾病以及可以影响多个组织的疾病,这可部分取决于反应是针对局限于特定组织的抗原还是针对广泛分布在体内的抗原。自身免疫性疾病包括但不限于1型糖尿病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、自身免疫性甲状腺疾病和格雷夫斯病(Graves' disease)。

[0360] 待治疗和/或预防的疾病可以是炎症性病症,例如心脏纤维化。通常,炎症性病症或疾患通常会导致免疫系统攻击人体自身的细胞或组织,并可能导致异常炎症,从而导致慢性疼痛、发红、肿胀、僵硬和对正常组织的损害。炎症性病症的特征在于炎症或由炎症引起,并且包括但不限于乳糜泻、血管炎、狼疮、慢性阻塞性肺病(COPD)、肠易激性疾病、动脉粥样硬化、关节炎、肌炎、硬皮病、痛风、干燥综合征(Sjorgren's syndrome)、强直性脊柱炎、抗磷脂抗体综合征和牛皮癣。

[0361] 在某些实施方案中,本文所述的嵌合细胞因子受体用于预防和治疗移植排斥。在某些方面,要治疗和/或预防的疾病是同种异体移植排斥。在某些方面,同种异体移植排斥是急性同种异体移植排斥。

[0362] 在某些实施方案中,所述方法用于治疗感染疾病。

[0363] 待治疗和/或预防的疾病可涉及将细胞、组织、器官或其他解剖结构移植到受影响的个体。细胞、组织、器官或其他解剖结构可以来自同一个体(自体或“自体”移植)或来自不同个体(同种异体或“异体”移植)。细胞、组织、器官或其他解剖结构也可以使用体外方法产生,包括细胞克隆、诱导细胞分化或用合成生物材料制造。

[0364] 治疗可以与其他活性剂组合,所述其他活性剂例如但不限于抗生素、抗癌剂、抗病毒剂和其他免疫调节剂(例如,针对程序性细胞死亡蛋白-1[PD-1]途径的抗体或针对细胞毒性T淋巴细胞相关性抗原-4[CTLA-4]的抗体)。还可以包括其他细胞因子,例如,干扰素 γ 、肿瘤坏死因子 α 、白介素12等。

[0365] 本发明的药物组合物

[0366] 本发明还涉及药物组合物,其包含表达本文所述的嵌合细胞因子受体和/或本文所述的细胞因子的多个细胞。本发明的细胞和细胞因子可以配制成药物组合物。除细胞因子或表达嵌合细胞因子受体的细胞中的一种或多种之外,这些组合物还可包含药学上可接受的赋形剂、载剂、缓冲剂、稳定剂或为本领域技术人员所熟知的其他物质。所述物质应是无毒的,并且不应干扰活性成分的功效。药物组合物可以任选地包含一种或多种另外的药物活性多肽和/或化合物。这种制剂可以是例如适用于静脉内输注的形式。

[0367] 对于待给予个体的细胞因子和表达本文所述的嵌合受体的细胞,优选的是以足以显示对个体有益的“治疗有效量”进行施用。当足以显示对个体有益时,也可以施用“预防有效量”。细胞因子的实际量或施用的细胞数量以及施用的速率和时间过程将取决于所治疗疾病的性质和严重性。对治疗的指定例如关于剂量的决定等在普通从业者和其他医师的职责范围内,并且通常考虑待治疗的疾患、单个患者的状况、递送部位、施用方法以及为从业者所知的其他因素。以上提及的技术和方案的实例可见于Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol, A. (编),1980中。

[0368] 视待治疗的疾患而定,组合物可单独施用,或与其他治疗进行组合,同时或依序加

以施用。

[0369] 实施例

[0370] 以下是用于进行本发明的特定实施方案的实施例。实施例仅出于说明性目的而提供,并且不意图以任何方式限制本发明的范围。已努力确保关于所用数值(例如数量、温度等)的准确性,但当然应允许一些实验误差和偏差。

[0371] 除非另外指明,否则本发明的实施将利用本领域的技术范围内的蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术、细胞培养、过继细胞转移和药理学的常规方法。此类技术在文献中充分说明。参见,例如T.E.Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H.Freeman and Company, 1993); A.L.Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., 本期新增); Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版, 1989); *Methods In Enzymology* (S.Colowick和N.Kaplan编, Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 第18版 (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey和Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 第3版。(Plenum Press) 第A和B卷 (1992)。

[0372] 方法

[0373] 原代细胞和细胞系: 在含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的DMEM中培养慢病毒包装细胞系HEK293T/17 (ATCC)。先前通过将人IL-2R β 亚基稳定转染到BAF3细胞系中来产生BAF3-IL-2R β 细胞, 并且使所述细胞在含有10%胎牛血清、青霉素、链霉素和100IU/ml人IL-2 (hIL-2) (**PROLEUKIN**[®], Novartis Pharmaceuticals Canada) 的RPMI-1640中生长。先前通过将人IL-2R β 亚基稳定转染到32D细胞系中来产生32D-IL-2R β 细胞, 并且使所述细胞在含有10%胎牛血清、青霉素、链霉素和300IU/ml hIL-2或所示其他细胞因子的RPMI-1640中生长。使人PBMC来源的T细胞 (Hemacare) 在含有3%人AB血清 (Sigma-Aldrich, H4522) 和300IU/ml hIL-2或所示其他细胞因子的TexMACS[™]培养基 (Miltenyi Biotec, 130-097-196) 中生长。通过在T细胞培养基中培养原发性腹水样品14天来产生人肿瘤相关淋巴细胞 (TAL), 所述T细胞培养基是以下各项的50:50混合物: 1) 含有10%胎牛血清、50uM β -巯基乙醇、10mM HEPES、2mM L-谷氨酰胺、青霉素、链霉素的RPMI-1640; 和2) 含有最终浓度为3000IU/ml hIL-2的AIM V[™]培养基 (ThermoFisher, 12055083)。在这种高剂量IL-2扩增之后, 将TAL在含有300IU/ml hIL-2或所示其他细胞因子的T细胞培养基中培养。将逆转录病毒包装细胞系Platinum-E (Cell Biolabs, RV-101) 在含有10%FBS、青霉素/链霉素、嘌呤霉素 (1mcg/ml) 和杀稻瘟菌素 (10mcg/ml) 的DMEM中培养。

[0374] 慢病毒产生和32D-IL-2R β 细胞的转导: 将嵌合受体构建体克隆到慢病毒转移质粒中, 并通过桑格测序 (Sanger sequencing) 验证所得序列。使用磷酸钙转染方法如下将转移质粒和慢病毒包装质粒共转染到HEK293T/17细胞中: 将细胞铺板过夜, 并在转染前2-4小时更换培养基。将质粒DNA和水在聚丙烯管中混合, 并逐滴添加CaCl₂ (0.25M)。孵育2至5分钟后, 通过与2x HEPES缓冲盐水 (0.28M NaCl、1.5mM Na₂HPO₄、0.1M HEPES) 1:1混合来沉淀DNA。将沉淀的DNA混合物添加到细胞上, 将其在37℃、5%CO₂下孵育过夜。第二天更换HEK293T/17培养基, 并将细胞再孵育24小时。第二天早上, 从板上收集细胞上清液, 短暂离心以除去碎片, 并通过0.45微米过滤器过滤上清液。在Beckman Optima L-XP超速离心机中使用SW-32Ti转子以25,000rpm将上清液旋转90分钟。除去上清液并将沉淀重悬浮在合适体

积的Opti-MEM培养基中。通过将病毒连续稀释液添加到BAF3-IL-2R β 细胞上来确定病毒效价。在转导后48-72小时,将细胞与抗人G-CSFR APC缀合抗体(1:50;Miltenyi Biotec,130-097-308)和Fixable Viability Dye eFluorTM450(1:1000,eBioscienceTM,65-0863-14)一起在4℃下孵育15分钟,洗涤,并在Cytex Aurora或BD FACS Calibur流式细胞仪上进行分析。使用通过该方法确定的估计效价,以感染复数(MOI)为0.5用编码嵌合受体构建体的慢病毒上清液转导32D-IL-2R β 细胞系。通过向细胞中添加相关量的病毒上清液、孵育24小时并随后替换培养基来进行转导。转导后3-4天,如上所述通过流式细胞术测定人G-CSFR的表达。

[0375] 人原代T细胞的慢病毒转导:为了转导PBMC来源的T细胞和TAL,根据制造商的指南,将细胞解冻并在人T细胞TransActTM(Miltenyi Biotec,130-111-160)存在下铺板。活化后24小时,以MOI为0.125-0.5添加慢病毒上清液。活化48小时后,将细胞分到新鲜培养基,去除残留的病毒和活化试剂。转导后两至四天,如上所述通过流式细胞术测定转导效率。对于其中分别测定CD4⁺和CD8⁺级分的转导效率的实验,利用针对人G-CSFR、CD4(1:50,Alexa Fluor[®]700缀合物,BioLegend,300526)、CD8(1:50,PerCP缀合物,BioLegend,301030)、CD3(1:50,Brilliant Violet 510TM缀合物,BioLegend,300448)和CD56(1:50,Brilliant Violet 711TM缀合物,BioLegend,318336)的抗体以及Fixable Viability Dye eFluorTM450(1:1000)。

[0376] 人T细胞和32D-IL-2R β 扩增测定:将表达上文产生的所示嵌合受体构建体的人原代T细胞或32-IL-2R β 细胞在PBS中洗涤三次,并在新鲜培养基中重新铺板,或使其培养基逐渐更换,正如所示。将完全培养基更换为含有野生型人G-CSF(内部产生或NEUPOGEN[®], Amgen Canada)、突变G-CSF(内部产生)、hIL-2或无细胞因子。每3-5天,通过台盼蓝排除测定细胞活力和密度,并相对于起始细胞数计算扩增倍数。如上所述,通过流式细胞术评估G-CSFR表达。

[0377] CD4⁺和CD8⁺人TAL扩增测定:为了检查TAL的CD4⁺和CD8⁺级分的扩增,将离体腹水样品解冻,并使用人CD4⁺ T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec,130-096-533)和人CD8⁺ T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec,130-096-495)来富集CD4⁺和CD8⁺级分。在含细胞因子的培养基中扩增后,通过流式细胞术使用以下各者来评估细胞的免疫表型:针对人G-CSFR、CD4(1:50,Alexa Fluor[®]700缀合物,BioLegend,300526)、CD8(1:50,PerCP缀合物,BioLegend,301030)、CD3(1:50,Brilliant Violet 510TM缀合物,BioLegend,300448)和CD56(1:50,Brilliant Violet 711TM缀合物,BioLegend,318336)的抗体以及Fixable Viability Dye eFluorTM450(1:1000)。

[0378] 原代人T细胞免疫表型测定:在含细胞因子的培养基中扩增后,通过流式细胞术利用以下各者评估T细胞的免疫表型:针对G-CSFR、CD4(1:100,Alexa Fluor[®]700缀合物,BioLegend,300526;或PE缀合物,eBioscienceTM,12-0048-42;或Brilliant Violet 570TM缀合物,BioLegend,317445)、CD8(1:100,PerCP缀合物,BioLegend,301030)、CD3(1:100,Brilliant Violet 510TM或Brilliant Violet 750TM缀合物,BioLegend,300448或344845)、CD56(1:100,Brilliant Violet 711TM缀合物,BioLegend,318336)、CCR7(1:50,APC/FireTM750缀合物,BioLegend,353246)、CD62L(1:33,PE/DazzleTM594缀合物,

Biolegend,304842)、CD45RA(1:33,FITC缀合物,Biolegend,304148)、CD45RO(1:25,PerCP-eFluor®710缀合物,eBioscience™,46-0457-42)、CD95(1:33,PE-Cyanine7缀合物,eBioscience™,25-0959-42)的抗体以及Fixable Viability Dye eFluor™450或5106(1:1000)。

[0379] 逆转录病毒转导:通过限制性内切核酸酶克隆来改变pMIG转移质粒(质粒#9044,Addgene)以去除IRES-GFP(BglIII至PacI位点),并引入编码定制多克隆位点的退火引物。将嵌合受体构建体克隆到定制转移质粒中,并通过桑格测序(Sanger sequencing)验证所得序列。如上所述,使用磷酸钙转染方法将转移质粒转染到Platinum-E细胞中。转染后24小时,将培养基更换为5ml新鲜的完全培养基。转染后48小时,从板中收集细胞上清液,并通过0.45微米过滤器过滤。向上清液中添加溴化己二甲铵(1.6mcg/ml,Sigma-Aldrich)和鼠IL-2(2ng/ml,Peprtech)。如下所述,使用该纯化的逆转录病毒上清液来转导鼠淋巴细胞。

[0380] 在收集逆转录病毒上清液前48小时,将24孔粘附板用未缀合的抗鼠CD3(5mcg/ml,BD Biosciences,553058)和抗鼠CD28(1mcg/ml,BD Biosciences,553294)抗体包被,在PBS中稀释,并储存在4摄氏度下。在收集逆转录病毒上清液前24小时,根据维多利亚大学动物护理委员会(University of Victoria Animal Care Committee)批准的动物使用方案对C57Bl/6J小鼠(内部产生)实施安乐死。如下收获脾脏并分离鼠T细胞:手动分离脾脏并通过100微米过滤器过滤。通过在室温下在ACK裂解缓冲液(Gibco,A1049201)中孵育五分钟,然后在含血清的培养基中洗涤一次来将红细胞裂解。使用特定的基于珠粒的分离试剂盒(Miltenyi Biotec,分别为130-104-075或130-095-130)分离CD8a-阳性或Pan-T细胞。将细胞添加到用抗CD3和抗CD28抗体包被的板中的鼠T细胞扩增培养基(含有10%FBS、青霉素/链霉素、0.05mMβ-巯基乙醇和2ng/ml鼠IL-2(Peprtech,212-12))或300IU/mL人IL-2(Proleukin)的RPMI-1640))中并在37摄氏度、5%CO₂下孵育24小时。在转导当天,用上文产生的逆转录病毒上清液替换大约一半的培养基。将细胞用逆转录病毒上清液在30摄氏度下以1000g旋转转染(spinfected)90分钟。将板返回到培养箱中0-4小时,然后用新鲜的T细胞扩增培养基替换大约一半的培养基。如上所述,在24小时后重复逆转录病毒转导,总共进行两次转导。最终转导后24小时,将T细胞分到6孔板,并从抗体刺激中去除。

[0381] 转导后48-72小时,通过流式细胞术评估转导效率,以如上所述检测人G-CSFR,CD4(Alexa Fluor 532缀合物,eBioscience™,58-0042-82)、CD8a(PerCP-eFluor 710缀合物,eBioscience™,46-0081-82)和Fixable Viability Dye eFluor™450(1:1000稀释)。

[0382] BrdU掺入测定:将如上所述产生的人原代T细胞、32D-IL-2Rβ细胞或鼠原代T细胞在PBS中洗涤三次,并在含有以下相关测定细胞因子的新鲜培养基中重新铺板48小时:无细胞因子、hIL-2(300IU/ml)、野生型或工程化G-CSF(以在单个实验中指示的浓度)。BrdU测定程序遵循BD Pharmingen™ APC BrdU Flow试剂盒(BD Biosciences,557892)的说明书手册,并添加以下内容:将细胞与BrdU和Fixable Viability Dye eFluor™450(1:5000)在37摄氏度下共同孵育30分钟至4小时。使用Cytex Aurora仪器进行流式细胞术。为了特异性评估表达嵌合受体的鼠T细胞的增殖,在固定之前,在冰上对人G-CSFR(1:20稀释),CD4(1:50稀释)和CD8(1:50稀释)进行15分钟额外染色。

[0383] 蛋白质印迹:将如上所述产生的人原代T细胞、32D-IL-2Rβ细胞或鼠原代T细胞在PBS中洗涤三次,并在不含细胞因子的培养基中放置16-20小时。在37摄氏度下,未用细胞因

子刺激细胞、用IL-2 (300IU/ml)、野生型G-CSF (以在单个实验中指示的浓度) 或G-CSF₁₃₇ (30ng/ml) 刺激细胞20分钟。将细胞在含有10mM HEPES pH7.9、1mM MgCl₂、0.05mM EGTA、0.5mM EDTA pH 8.0、1mM DTT和1x Pierce蛋白酶和磷酸酶抑制剂小型片剂(A32961)的缓冲液中洗涤一次。将细胞在冰上在上述洗涤缓冲液中裂解10分钟,其中添加0.2%NP-40 (Sigma)。将裂解物在4摄氏度下以13,000rpm离心10分钟,并收集上清液(细胞质级分)。将沉淀(含有核蛋白)重悬浮于上述洗涤缓冲液中,其中添加0.42M NaCl和20%甘油。将核在冰上孵育30分钟,频繁涡旋,并在4摄氏度下以13,000rpm离心20分钟后收集上清液(核部分)。将细胞质和核级分还原(70摄氏度)10分钟,并在NuPAGE™4-12%Bis-Tris蛋白质凝胶上运行。将凝胶转移到硝酸纤维素膜上(在20V下在Trans-Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell中60min),干燥并在TBS中的Odyssey®封闭缓冲液(927-50000)中封闭1h。在4摄氏度下在含有0.1%Tween20的TBS中的Odyssey®封闭缓冲液中将印迹与一抗(1:1000)一起孵育过夜。所用的一抗获自Cell Signaling Technologies:磷酸-Jak1 (Tyr1034/1035) (D7N4Z) 兔mAb#74129、磷酸-Jak2 (Tyr1007/1008) #3771、磷酸-Jak3 (Tyr980/981) (D44E3) 兔mAb#5031、磷酸-p70 S6激酶 (Thr421/Ser424) 抗体#9204、磷酸-Shc (Tyr239/240) 抗体#2434、磷酸-Akt (Ser473) (D9E) XP®兔mAb#4060、磷酸-S6核糖体蛋白 (Ser235/236) 抗体#2211、磷酸-p44/42MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) 抗体#9101、β-肌动蛋白 (13E5) 兔mAb#4970、磷酸-STAT1 (Tyr701) (58D6) 兔mAb#9167、磷酸-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP®兔mAb#9145、磷酸-STAT4 (Tyr693) 抗体#5267、磷酸-STAT5 (Tyr694) (C11C5) 兔mAb#9359和组蛋白H3 (96C10) 小鼠mAb#3638。将印迹在含有0.1%Tween20的TBS中洗涤三次,并在室温下将其与二抗(1:10,000)在含有0.1%Tween20的TBS缓冲液中孵育30-60分钟。从Cell Signaling Technologies获得的二抗是抗小鼠IgG (H+L) (DyLight™800 4X PEG缀合物) #5257和抗兔IgG (H+L) (DyLight™800 4X PEG缀合物) #5151。将印迹洗涤并暴露在LI-COR Odyssey成像仪上。

[0384] 检测磷酸化蛋白质的流式细胞术:将如上所述产生的人原代T细胞、32D-IL-2Rβ细胞或鼠原代T细胞在PBS中洗涤三次,并在不含细胞因子的培养基中放置16-20小时。在Fixable Viability Dye eFluor™450 (1:1000) 和所示抗G-CSFR (1:20)、抗CD4 (1:50) 和抗CD8a (1:50) 存在下,在37摄氏度下,未用细胞因子刺激细胞、用IL-2 (300IU/ml) 或野生型G-CSF (100ng/ml) 刺激细胞20分钟。使细胞沉淀并在室温下用BD Phosflow™固定缓冲液I (BD Biosciences, 557870) 固定15分钟。洗涤细胞,然后在冰上用BD Phosflow™透化缓冲液III (BD Biosciences, 558050) 透化15分钟。将细胞洗涤两次,并重新悬浮于含有20ul BD Phosflow™PE小鼠抗-Stat3 (pY705) (BD Biosciences, 612569) 或PE小鼠IgG2aκ同型对照 (BD Biosciences, 558595) 的缓冲液中。洗涤细胞,并使用Cytex Aurora仪器进行流式细胞术。

[0385] 实施例1:表达G2R-1、仅G-CSFR/IL-2Rβ亚基、仅myc标记的G-CSFR/γC亚基或全长G-CSFR的人T细胞的扩增。

[0386] 用编码图1所示嵌合受体构建体的慢病毒转导PBMC来源的T细胞或肿瘤相关淋巴细胞 (TAL), 并将细胞洗涤并重新铺板在所指示的细胞因子中。每3-4天计数细胞。将G/γc在其N端用Myc表位标记 (Myc/G/γc), 并且将G/IL-2Rβ在其N端用Flag表位标记 (Flag/G/

IL-2R β) ;这些表位标签有助于通过流式细胞术进行检测,并且不会影响受体的功能。正如预期,所有T细胞培养物均显示出响应于阳性对照细胞因子IL-2 (300IU/ml) 的增殖。用G-CSF (100ng/ml) 刺激后,仅观察到PMBC来源的T细胞和表达G2R-1嵌合细胞因子受体的TAL的增殖(图3)。注意,慢病毒转导效率小于100%,使得小于100%的T细胞表达所指示的嵌合细胞因子受体,这可能解释了由G2R-1介导的增殖速率相对于IL-2更低的原因。类似地,在表达G-CSFR嵌合受体亚基G2R-1和G2R-2并用G-CSF刺激的32D-IL-2R β 细胞(稳定表达人IL-2R β 亚基)中观察到增殖增加(图2)。与T细胞相反,仅表达G/IL-2R β 嵌合受体亚基的32D-IL-2R β 细胞在响应G-CSF时增殖(图2);在仅表达G/ γ c嵌合受体亚基的32D-IL-2R β 细胞中未见G-CSF诱导的增殖(图2)。

[0387] 这些结果表明G-CSF能够刺激PMBC来源的T细胞和表达G2R-1嵌合受体的TAL以及表达G/IL-2R β ,G2R-1和G2R-2嵌合受体的32D-IL-2R β 细胞的增殖和活力。

[0388] 实施例2:G-CSFRECD在用G/IL-2R β 、G2R-1和G2R-2转导的细胞的表面上表达。

[0389] 在用编码G2R-2嵌合细胞因子受体的慢病毒载体转导后,对32D-IL-2R β 细胞系、PBMC来源的人T细胞和人肿瘤相关淋巴细胞进行流式细胞术(在图4和6中示意性示出),以确定细胞是否在细胞表面表达G-CSFR ECD。在所有转导的细胞类型中均检测到G-CSFR阳性细胞(图7)。在单独的实验中,通过流式细胞术测得,表达G/IL-2R β ,G2R-1和G2R-2嵌合受体的32D-IL-2R β 细胞对G-CSFR ECD呈阳性(图2B-2D中的下图)。

[0390] 这些结果表明G/IL-2R β ,G2R-1和G2R-2嵌合受体在细胞表面上表达。

[0391] 实施例3:与未转导细胞相比,表达G2R-2的细胞的扩增

[0392] 将人PBMC来源的T细胞和人肿瘤相关淋巴细胞用G2R-2受体构建体进行慢病毒转导(图4和6),洗涤,并与所指示的细胞因子重新铺板。在某些实验中,也通过用TransAct试剂刺激而定期重新活化T细胞。每3-4天对活细胞进行计数。用G-CSF (100ng/ml) 刺激之后在表达G2R-2嵌合受体的细胞中但不在未转导细胞中,观察到PMBC来源的T细胞(图8A)和肿瘤相关淋巴细胞(图8B、8C中的两次独立实验)的增殖。

[0393] 这些结果表明G-CSF诱导的G2R-2嵌合受体的活化足以诱导免疫细胞的增殖和活力。

[0394] 实施例4:与未转导细胞相比,表达G2R-2的CD4选择或CD8选择的人肿瘤相关淋巴细胞的扩增和免疫表型

[0395] 将CD4选择的和CD8选择的人T细胞用编码G2R-2的慢病毒载体转导(图6),或如所指示保持未转导。将细胞洗涤并用指示的细胞因子重新铺板并每3-4天计数一次。在用G-CSF (100ng/ml) 或IL-2 (300IU/ml) 刺激后观察到表达G2R-2的CD4选择或CD8选择的TAL的增殖,但在不存在添加的细胞因子(仅培养基)的情况下未观察到(图9和10)。在图9中,每条线表示来自5个患者样品之一的结果。

[0396] 通过流式细胞术进行的免疫表型分析表明,在G-CSF或IL-2中培养的T细胞保留其CD4⁺或CD8⁺同一性(图11A),缺乏NK细胞表型(CD3-CD56⁺) (图11A),并且在这些培养条件下表现出CD45RA-CCR7-T效应记忆(T_{EM}) 表型(图11B)。

[0397] 进行BrdU测定以确认在用G-CSF刺激后表达G2R-2的T细胞的细胞周期进程增加(图12)。正如所示,在测定之前,通过在IL-2或G-CSF中培养来选择T细胞。评估了肿瘤相关淋巴细胞(图12A)和PBMC来源的T细胞(图12B)。

[0398] 这些结果表明,G-CSF可以通过活化嵌合细胞因子受体G2R-2来选择性地活化细胞周期进程和原代人TAL的长期扩增。这些结果还表明,通过形成同二聚体活化G2R-2嵌合受体足以活化TAL中的细胞因子样信号传导和增殖。此外,表达G2R-2的TAL仍依赖于细胞因子,因为它们在撤除G-CSF时经历细胞死亡,类似于对IL-2撤除的反应。在G-CSF中培养的TAL与在IL-2中培养的TAL保持相似的免疫表型。

[0399] 实施例5:表达G2R-2的原代鼠T细胞响应于G-CSF而增殖。

[0400] 进行BrdU掺入测定以评估在用G-CSF刺激时表达G2R-2或单链G/IL-2R β (G2R-1的组分)的原代鼠T细胞相对于模拟转导细胞的增殖。在测定之前,将所有细胞在IL-2中扩增3天。通过流式细胞术证实G2R-2或G/IL-2R β 的细胞表面表达(图13A)。正如所示,然后将细胞铺板在IL-2 (300IU/ml)、野生型G-CSF (100ng/ml) 或无细胞因子中。在表达G2R-2的细胞中观察到在用G-CSF刺激后增加的细胞周期进程高于未转导细胞或表达单链G/IL-2R β (的细胞中(图13B、13C)。图B和图C分别示出了所有活细胞或G-CSFR+细胞的结果。

[0401] 这些结果表明,响应于G-CSF诱导的同二聚化,G2R-2嵌合受体比单链G/IL-2R β 受体更有效地活化鼠T细胞中的细胞因子样信号传导和增殖。

[0402] 实施例6:在表达G2R-2的人原代T细胞中响应于G-CSF或IL-2而活化细胞因子相关的细胞内信号传导事件

[0403] 为了证实与IL-2相似,嵌合细胞因子受体确实能够活化细胞因子信号传导,评估了细胞因子受体活化各种信号传导分子的能力。使表达G2R-2的肿瘤相关淋巴细胞和PBMC来源的T细胞先前在G-CSF中扩增,而未转导细胞先前在IL-2中扩增。将细胞洗涤,然后用IL-2 (300IU/ml)、野生型G-CSF (100ng/ml) 或无细胞因子刺激,并且使用针对所指示的信号传导分子的抗体对细胞裂解物进行蛋白质印迹(图14)。图A和图B示出了TAL的结果,并且图C示出了PBMC来源的T细胞的结果。表达G2R-2的T细胞在用G-CSF刺激时活化IL-2相关信号传导分子,其程度与IL-2刺激未转导细胞或转导细胞后可见的活化相似,但预期的例外是G-CSF诱导Jak2磷酸化,而IL-2诱导Jak3磷酸化。

[0404] 这些结果证实,G2R-2嵌合受体能够在用G-CSF刺激时活化IL-2受体样细胞因子受体信号传导。

[0405] 实施例7:在表达G2R-2的鼠原代T细胞中响应于G-CSF而活化细胞因子信号传导。

[0406] 为了评估嵌合细胞因子受体G2R-2或单链G/IL-2R β (来自G2R-1) 是否能够活化细胞因子信号传导,通过对表达G2R-2或G/IL-2R β 的鼠原代T细胞相对于模拟转导细胞的细胞裂解物进行蛋白质印迹来评估这些细胞因子受体活化各种信号传导分子的能力。在测定之前,将所有细胞在IL-2中扩增3天。然后洗涤细胞并用IL-2 (300IU/ml)、野生型G-CSF (100ng/ml) 或无细胞因子刺激细胞。表达G2R-2的细胞在用G-CSF刺激时活化IL-2相关信号传导分子,其程度与IL-2刺激未转导细胞或转导细胞后可见的活化相似,但预期的例外是G-CSF诱导Jak2磷酸化,而IL-2诱导Jak3磷酸化(图15)。相反,G/IL-2R β 在暴露于G-CSF时不会活化细胞因子信号传导。

[0407] 这些结果在原代鼠T细胞中证实,在G-CSF刺激后,G2R-2嵌合受体能够通过同二聚化活化IL-2受体样细胞因子受体信号传导,而单独的单链G/IL-2R β 不能通过响应于G-CSF的同二聚化来活化细胞因子信号传导。

[0408] 实施例8:嵌合受体的表达在用正交G-CSF刺激后导致32D-IL-2R β 细胞和原代鼠T

细胞的增殖。

[0409] 为了确定表达嵌合细胞因子受体的细胞是否可以响应于正交版本的G-CSF而被选择性活化,用包含野生型G-CSFR ECD (G2R-1WT ECD、G2R-2WT ECD) 的嵌合受体G2R-1和G2R-2以及包含携带氨基酸取代R41E、R141E和R167D的G-CSFR ECD (G2R-1 134ECD、G2R-2 134ECD) 的嵌合受体G2R-1和G2R-2转导32D-IL-2R β 细胞或原代鼠T细胞。用IL-2、野生型G-CSF或正交G-CSF (130G-CSF) 刺激细胞,所述正交G-CSF能够结合G2R-1 134ECD和G2R-2 134ECD,但与野生型G-CSFR的结合显著降低。进行BrdU掺入测定以评估细胞在细胞因子刺激下促进细胞周期进程的能力(图16)。表达G2R-2 134ECD的32D-IL-2R β 细胞在用130G-CSF (包含氨基酸取代E46R、L108K和D112R;30ng/ml) 刺激后显示出细胞周期进程,但在用野生型G-CSF (30ng/ml) 刺激后未经历细胞周期进程。通过在“十字形(criss-cross)”增殖测定中刺激原代鼠T细胞,进一步证明了工程化细胞因子:受体ECD对的正交性质,其中将表达具有WT、130、134、304或307ECD的G2R-3的细胞(图4)用WT、130、304或307细胞因子(100ng/ml)刺激(图17)。130ECD具有氨基酸取代:R41E和R167D。304ECD具有氨基酸取代:R41E、E93K和R167D;而304细胞因子具有氨基酸取代:E46R、L108K、D112R和R147E。307ECD具有氨基酸取代:R41E、D197K、D200K和R288E;而307细胞因子具有氨基酸取代:S12E、K16D、E19K和E46R。图17中的图A和图B表示独立的实验重复。

[0410] 这些结果表明,表达正交嵌合细胞因子受体的细胞能够在用正交G-CSF刺激后选择性活化和细胞周期进程。

[0411] 实施例9:在表达正交嵌合细胞因子受体的32D-IL2R β 细胞和原代人T细胞中活化细胞内信号传导,并用正交G-CSF刺激。

[0412] 为了确定表达嵌合细胞因子受体的细胞是否可以响应于正交版本的G-CSF而选择性活化细胞内细胞因子信号传导事件,用包含野生型G-CSFR ECD (G2R-1WT ECD和G2R-2WT ECD) 的嵌合受体G2R-1和G2R-2以及包含携带氨基酸取代R41E、R141E和R167D的G-CSFR ECD (G2R-1 134ECD、G2R-2 134ECD) 的嵌合受体G2R-1和G2R-2转导32D-IL-2R β 细胞。用IL-2 (300IU/ml)、野生型G-CSF (30ng/ml) 或正交G-CSF (130G-CSF-E46R_L108K_D112R;30ng/ml) 刺激细胞,所述正交G-CSF能够结合G2R-1 134ECD、G2R-2 134ECD,但与野生型G-CSFR的结合显著降低。对细胞裂解物进行蛋白质印迹,以评估细胞在暴露于细胞因子后活化细胞因子信号传导的能力(图18)。表达G2R-2 134ECD的细胞在用130G-CSF而不是野生型G-CSF刺激后显示出细胞因子信号传导的证据。此外,表达G2R-2WT ECD的细胞在用130G-CSF刺激后不能活化细胞因子信号传导。

[0413] 通过对原代鼠T细胞进行蛋白质印迹分析,进一步证明了工程化细胞因子:受体对的正交性质,其中将表达具有WT、134或304ECD (R41E_E93K_R167D) 的G2R-3的细胞用WT、130或304G-CSF (E46R_L108K_D112R_R147E;100ng/ml) 刺激并测量所指示的信号传导事件(图19A)。IL-2 (300IU/ml) 和IL-12 (10ng/ml) 用作对照细胞因子。表达G2R-3WT ECD的细胞在用IL-2、IL-12或WT G-CSF刺激后显示出细胞因子信号传导的证据。表达G2R-3 134ECD的细胞在用IL-2、IL-12或130G-CSF刺激后显示出细胞因子信号传导的证据。表达G2R-3 304ECD的细胞在用IL-2、IL-12或304G-CSF刺激后显示出细胞因子信号传导的证据。

[0414] G2R-3的三种ECD变体的细胞表面表达通过流式细胞术证实(图19B)。

[0415] 这些结果表明,表达正交嵌合细胞因子受体的细胞能够在用正交G-CSF刺激后选

择性活化细胞内细胞因子信号传导事件。

[0416] 实施例10:G2R-3的表达导致原代人T细胞的扩增、细胞周期进程和细胞因子相关的细胞内信号传导和免疫表型

[0417] 为了确定G2R-3嵌合受体在原代人T细胞中用G-CSF刺激后是否可以促进细胞因子信号相关事件,用编码G2R-3的慢病毒载体转导TAL。进行T细胞扩增测定以测试在用IL-2 (300IU/ml)、野生型G-CSF (100ng/ml) 或无细胞因子刺激时细胞的增殖。每3-4天对活细胞进行计数。与其未转导对应物相反,表达G2R-3的原代TAL在培养物中响应于G-CSF而扩增(图21A)。

[0418] 为了确定在用G-CSF刺激后细胞因子信号传导事件是否被活化,对细胞裂解物进行蛋白质印迹以评估细胞内信号传导。从扩增测定中收获细胞,将其洗涤,并用IL-2 (300IU/ml) 或野生型G-CSF (100ng/ml) 刺激。表达G2R-3的原代TAL表现出响应于G-CSF的IL-2相关性信号传导事件,但预期的例外是G-CSF诱导Jak2磷酸化,而IL-2诱导Jak3磷酸化(图21B)。

[0419] 进行BrdU掺入测定以评估用G-CSF刺激后的细胞周期进程。从扩增测定中收获细胞,将其洗涤,并重新铺板在IL-2 (300IU/ml)、野生型G-CSF (100ng/ml) 或无细胞因子中。表达G2R-3的原代TAL显示出响应于G-CSF的细胞周期进展(图21C)。

[0420] 使用原代PBMC来源的人T细胞也证明了G-CSF诱导的表达G2R-3的细胞的扩增(图22)。表达G2R-3WT ECD的细胞响应于WT G-CSF而扩增,而不是仅培养基(图22A)。为了证明细胞对外源性细胞因子的持续依赖性,在培养第21天,将来自G-CSF扩增条件的细胞洗涤并重新铺板在WT G-CSF (100ng/mL)、IL-7 (20ng/mL) + IL-15 (20ng/mL) 或仅培养基中。仅在G-CSF或IL-7+IL-15存在下重新铺板的细胞随时间保持存活。

[0421] 如通过流式细胞术评估的,G-CSFR ECD的表达在扩增第21-42天之间在CD4⁺和CD8⁺ T细胞上均保持稳定(图22B)。

[0422] 通过蛋白质印迹证实,表达G2R-3的原代PBMC来源的T细胞显示出响应于G-CSF的IL-2相关信号传导事件(图23A)。

[0423] 对在WT G-CSF相对于IL-7+IL-15中扩增42天的原代PBMC来源的T细胞进行基于流式细胞术的免疫表型分析。表达G2R-3WT ECD并在G-CSF中培养的细胞保留与在IL-7+IL-15中培养的未转导细胞相似的表型,主要具有CD62L⁺、CD45RO⁺表型,这指示干细胞样记忆T细胞表型(T_{SCM}) (图23B、23C)。同样,中央记忆(T_{CM})、效应记忆(T_{EM})和终末分化(T_{TE}) T细胞的分数也相似。

[0424] 这些结果证实,G2R-3嵌合细胞因子受体能够活化细胞因子信号传导事件并促进原代细胞中的细胞周期进展和扩增。表达G2R-3并在G-CSF中长期扩增的T细胞的免疫表型与在IL-7+IL-15中扩增的未转导细胞相似。

[0425] 实施例11:正交G-CSF诱导在表达具有正交ECD的G2R-3的原代人T细胞中的扩增和增殖

[0426] 评估了具有304 (R41E_E93K_R167D) 或307 (R41E_D197K_D200K_R288E) ECD的嵌合细胞因子受体G2R-3是否能够诱导响应于用正交配体130、304或307 (S12E_K16D_E19K_E46R) G-CSF的刺激增殖和扩增,用编码G2R-3 304ECD或G2R-3 307 (R41E_D197K_D200K_R288E) ECD的慢病毒载体转导原代PBMC来源的人T细胞。进行T细胞生长测定,以评估当用

IL-2 (300IU/ml)、304G-CSF (100ng/ml)、307G-CSF (100ng/ml) 或无细胞因子培养时细胞的扩增倍数。每3-4天对活细胞进行计数。表达G2R-3 304ECD的T细胞在培养物中响应于IL-2或304G-CSF而扩增(图24A)。表达G2R-3 307ECD的T细胞在培养物中响应于IL-2或307G-CSF而扩增(图24B)。未转导的T细胞仅响应于IL-2而扩增(图24C)。

[0427] 进行BrdU掺入测定以评估在十字形设计中用130、304和307G-CSF刺激后的细胞周期进程。从扩增测定中收获细胞,将其洗涤,并重新铺板在IL-2 (300IU/ml)、130G-CSF (100ng/ml)、304G-CSF (100ng/ml)、307G-CSF (100ng/ml) 或无细胞因子中。表达G2R-3 304ECD的原代人T细胞表现出响应于130或304G-CSF,而不是响应于307G-CSF的细胞周期进程(图25)。表达G2R-3 307ECD的T细胞表现出响应于307G-CSF,而不是响应于130或304G-CSF的细胞周期进程。所有T细胞均显示出响应于IL-2的细胞周期进程。

[0428] 结果表明,嵌合受体G2R-3 304ECD和G2R-3 307ECD能够分别在用正交304或307G-CSF刺激后诱导原代人CD4⁺和CD8⁺ T细胞的选择性细胞周期进程和扩增。此外,130G-CSF可以刺激表达G2R-3 304ECD,而不是G2R-3 307ECD的细胞增殖。

[0429] 实施例12:G-CSFR ECD在用G21R-1、G21R-2、G12R-1和G2R-3嵌合受体构建体转导的原代人肿瘤相关淋巴细胞(TAL)表面上表达

[0430] 为了评估嵌合细胞因子受体构建体是否可以在原代人肿瘤相关淋巴细胞(TAL)的表面上表达,用编码G21R-1、G21R-2、G12R-1和G2R-3嵌合受体的慢病毒载体转导TAL,并且通过流式细胞术测试细胞在细胞表面上的G-CSFR ECD表达(图20)。对于所有四种嵌合细胞因子受体设计,均检测到G-CSFR ECD阳性细胞。

[0431] 这些结果表明,G21R-1、G21R-2、G12R-1和G2R-3嵌合受体能够在原代细胞表面上表达。这些结果还表明G-CSFR ECD嵌合受体设计在原代细胞表面上表达。

[0432] 实施例13:G-CSFR ECD在用G12R-1和G21R-1嵌合受体构建体转导的原代鼠T细胞表面上表达

[0433] 为了确定G12R-1和G21R-1嵌合受体是否能够在原代T细胞的表面上表达,用编码G12R-1和G21R-1嵌合受体的逆转录病毒载体转导原代鼠T细胞,并通过流式细胞术分析(图26)。

[0434] 结果表明,G-CSFR ECD在用编码G12R-1和G21R-1的逆转录病毒载体转导的原代鼠CD4⁺和CD8⁺ T细胞表面上表达。

[0435] 实施例14:G-CSF在表达G21R-1或G21R-2的原代PBMC来源的人T细胞中诱导细胞因子信号传导事件

[0436] 为了确定G21R-1和G21R-2构建体是否能够在原代细胞中诱导细胞因子信号传导事件,用编码G21R-1或G21R-2嵌合细胞因子受体的慢病毒载体转导原代PBMC来源的人T细胞。用磷酸-STAT3 (p-STAT3) 特异性抗体对细胞进行细胞内染色,并通过流式细胞术评估以确定STAT3磷酸化的程度,即STAT3活化的量度(图27)。在用G-CSF (100ng/ml) 刺激后,在用G21R-1或G21R-2转导的G-CSFR阳性细胞亚群中表达磷酸化STAT3的细胞数量增加。相反,G-CSFR阴性(即不表达)细胞在用G-CSF刺激后不表现出磷酸化STAT3的增加,但在用IL-21刺激后表现出增加。

[0437] 这些结果表明,G21R-1和G21R-2嵌合细胞因子受体能够在原代人T细胞中用G-CSF刺激后活化IL-21相关细胞因子信号传导事件。

[0438] 实施例15:G-CSF在表达G21R-1或G-12R-1的原代鼠T细胞中诱导细胞内信号传导事件

[0439] 为了确定嵌合细胞因子受体G21R-1是否能够活化细胞因子信号传导事件,用编码G21R-1的逆转录病毒载体转导原代鼠T细胞,并通过流式细胞术评估,以在用G-CSF刺激后检测磷酸化STAT3。对活细胞针对CD8或CD4设门,并测定CD8和CD4细胞群在未用细胞因子刺激、用IL-21 (1ng/ml) 或G-CSF (100ng/ml) 刺激后磷酸-STAT3染色呈阳性的细胞百分比。在用G-CSF刺激后,表达G21R-1的细胞(但未转导细胞)显示出磷酸化STAT3的量增加(图28A和28B)。

[0440] 进行蛋白质印迹,以评估表达G21R-1或G12R-1的细胞在用G-CSF刺激后的细胞内细胞因子信号传导。正如预期,表达G21R-1并用G-CSF刺激的细胞显示STAT3的磷酸化增加,其中磷酸-STAT4和磷酸-STAT5略有增加(图28C)。也正如预期,在表达G12R-1的细胞中,发现响应于G-CSF的STAT4的强磷酸化。G-CSF在模拟转导细胞中未诱导任何信号传导事件。(应注意,在G12R-1组中,阳性对照(hIL-12 10ng/ml)似乎未诱导任何信号传导事件;这可能是由于人IL-12与鼠IL-12R的结合较差。)

[0441] 结果表明,在用G-CSF刺激后,G21R-1和G12R-1能够在原代鼠T细胞中诱导细胞因子信号传导事件。

[0442] 实施例16:G-CSF诱导表达G2R-2、G2R-3、G7R-1、G21/7R-1、G27/2R-1、G21/2R-1、G12/2R-1或G21/12/2R-1的原代鼠T细胞的增殖和细胞内信号传导事件

[0443] 为了评估由嵌合细胞因子受体介导的细胞因子信号传导事件和细胞增殖,用编码G2R-2、G2R-3、G7R-1、G21/7R-1、G27/2R-1、G21/2R-1、G12/2R-1或G21/12/2R-1的逆转录病毒载体转导原代鼠T细胞。进行BrdU掺入测定以评估用G-CSF刺激后的细胞周期进程。收获细胞,将其洗涤,并重新铺板在IL-2 (300IU/ml)、野生型G-CSF (100ng/ml) 或无细胞因子中。在表达G2R-2、G2R-3、G7R-1、G21/7R-1或G27/2R-1 (图29A、图29B) 或G21/2R-1、G12/2R-1或G21/12/2R-1 (图30A、图30B) 的原代鼠T细胞中观察到G-CSF诱导的细胞周期进程。G-CSFR ECD的表达也可通过流式细胞术检测到(图29C、图30C)。

[0444] 通过蛋白质印迹,在表达所指示的嵌合细胞因子受体的细胞中,而非在模拟转导的细胞中,观察到响应于G-CSF (100ng/ml) 的多个细胞因子信号传导事件(图29D、图30D)。通常,观察到的细胞因子信号传导事件是基于掺入到各种ICD设计中的信号传导结构域所预期的(图4和图5)。作为一个实例,G7R-1嵌合受体诱导STAT5的磷酸化(图29D),这预期是由于来自IL-7R α 的STAT5结合位点的掺入(图4)。作为第二实例,G21/2R-1嵌合受体诱导STAT3的磷酸化(图30D),这预期是由于来自G-CSFR的STAT3结合位点的掺入(图5)。作为第三实例,G12/2R-1嵌合受体诱导STAT4的磷酸化,这预期是由于来自IL-12R β 2的STAT4结合位点的掺入(图5)。其他嵌合细胞因子受体显示出其他模式的细胞内信号传导事件。

[0445] 结果表明,G2R-2、G2R-3、G7R-1、G21/7R-1、G27/2R-1、G21/2R-1、G12/2R-1和G21/12/2R-1能够在用G-CSF刺激后诱导原代鼠T细胞的细胞因子信号传导事件和增殖。此外,可以通过将不同的信号传导结构域并入到嵌合受体的ICD中来产生不同模式的细胞内信号传导事件。

[0446] 实施例17:正交G-CSF诱导表达具有正交ECD的G12/2R-1的原代人T细胞的扩增、增殖、细胞因子相关细胞内信号传导和免疫表型

[0447] 为了确定具有134ECD的嵌合细胞因子受体G12/2R-1是否能够响应于用正交配体130G-CSF的刺激而诱导增殖和扩增,用编码G12/2R-1 134ECD的慢病毒载体转导原代PBMC来源的人T细胞。当用IL-2 (300IU/ml)、130G-CSF (100ng/ml) 或无细胞因子培养时,进行T细胞生长测定,以评估细胞的扩增倍数。每4-5天对活细胞进行计数。表达G12/2R-1 134ECD的原代人T细胞在培养物中响应于IL-2或130G-CSF而扩增(图31A),但在仅培养基中表现出有限的瞬时扩增。

[0448] 在该实验的第19天,将已在130G-CSF或IL-2中扩增的T细胞洗涤三次,重新铺板在IL-2、130G-CSF或仅培养基中。在仅培养基中,T细胞显示出活力降低和数量下降(图31B)。相反,重新铺板在IL-2或G-CSF 130中的T细胞显示出持续的活力和稳定的数量。

[0449] 通过流式细胞术使用针对G-CSF受体的抗体检测到的G12/2R-1134ECD的表达在第4天至第16天之间在通过用130G-CSF刺激而扩增的CD4⁺和CD8⁺ T细胞上增加(图31C)。进行BrdU掺入测定以评估用130G-CSF刺激后的细胞周期进程。

[0450] 为了通过BrdU测定评估细胞周期进程,从扩增测定中收获细胞,将其洗涤,并重新铺板在IL-2 (300IU/ml)、IL-2和IL-12 (10ng/mL)、130G-CSF (300ng/ml) 或无细胞因子中。表达G12/2R-1 134ECD的原代人T细胞显示出响应于130G-CSF、IL-2或IL-2+IL-12的细胞周期进程,而未转导细胞仅响应于IL-2或IL-2+IL-12(图32A)。

[0451] 在16天培养期之后,通过流式细胞术使用针对CD62L和CD45RO的抗体进行免疫表型分析,以比较在130G-CSF中扩增的表达G12/2R-1 134ECD的T细胞与在IL-2中扩增的未转导细胞。这两个T细胞群显示出相似比例的干细胞样记忆(T_{SCM})、中央记忆(T_{CM})、效应记忆(T_{EM})和终末分化(T_{TE})表型(图32B、图32C)。

[0452] 用具有304ECD(与134ECD相对)的嵌合细胞因子受体G12/2R-1进行类似的实验。用编码G12/2R-1 304ECD的慢病毒载体转导原代PBMC来源的人T细胞。进行T细胞生长测定,以评估当用IL-2 (300IU/ml)、130G-CSF (100ng/ml)、304G-CSF (100ng/mL) 或仅培养基培养时细胞的扩增倍数。每4-5天对活细胞进行计数。表达具有304ECD的G12/2R-1的T细胞可以在IL-2、130G-CSF或304G-CSF的存在下扩增,但在仅培养基中不扩增,而未转导细胞仅可响应于IL-2而扩增(图33A)。

[0453] 为了通过BrdU测定评估细胞周期进程,从扩增测定中收获表达G12/2R-1 304ECD的先前在130G-CSF或304G-CSF中扩增的T细胞,将其洗涤,并重新铺板在IL-2 (300IU/ml)、130G-CSF (100ng/ml)、304G-CSF (100ng/mL)、307G-CSF (100ng/mL) 或仅培养基中。表达G12/2R-1 304ECD的T细胞表现出响应于130或304G-CSF,但不响应于307G-CSF或仅培养基的细胞周期进程(图33B)。

[0454] 结果表明,G12/2R-1 134ECD能够在用130G-CSF刺激后诱导原代人CD4⁺和CD8⁺ T细胞的细胞周期进程和扩增。表达G12/2R-1134ECD并用130G-CSF扩增的细胞的T细胞记忆表型类似于用IL-2扩增的未转导细胞。此外,G12/2R-1 304ECD能够在用130或304G-CSF刺激后但不响应于307G-CSF而诱导T细胞的选择性细胞周期进程和扩增。

[0455] 实施例18:正交G-CSF在表达具有正交ECD的G2R-3或G12/2R-1的原代人T细胞中诱导不同的细胞内信号传导事件

[0456] 为了评估细胞内信号传导事件,用编码G2R-3 304ECD或G12/2R-1 304ECD的慢病毒载体转导原代PBMC来源的人T细胞。进行蛋白质印迹,以评估在用304G-CSF (100ng/mL)、

IL-2 (300IU/mL)、IL-2和IL-12 (10ng/mL) 或仅培养基刺激后表达G2R-3 304ECD或G12/2R-1 304ECD的细胞或未转导细胞中的细胞内细胞因子信号传导。在转导和未转导T细胞中,响应于用IL-2+IL-12或仅IL-2的刺激,检测到STAT5的强磷酸化(图34)。响应于用IL-2+IL-12两者的刺激,检测到STAT4的强磷酸化,但响应于用仅IL-2刺激,仅检测到STAT4的弱磷酸化。在表达G2R-3 304ECD的细胞中,响应于用304G-CSF的刺激,检测到STAT4的弱磷酸化和STAT5的强磷酸化,这类似于响应于仅IL-2所观察到的模式。在表达G12/2R-1 304ECD的细胞中,响应于用304G-CSF的刺激,检测到STAT4和STAT5的强磷酸化,这类似于响应于IL-2+IL-12所观察到的模式。未转导T细胞显示对304G-CSF无反应。

[0457] 结果表明,具有304ECD的G12/2R-1能够诱导细胞因子信号传导事件,包括响应于用304G-CSF的刺激的STAT4和STAT5的强磷酸化。用304G-CSF刺激后,在表达G2R-3 304ECD的细胞中观察到不同的信号传导事件模式,包括STAT5而非STAT4的强磷酸化。

[0458] 尽管本发明已参考优选实施方案和各种替代性实施方案进行特定显示和描述,但相关领域技术人员将了解可在不脱离本发明的精神和范围下在其中进行各种形式和细节变化。

[0459] 在本说明书的主体内引用的所有参考文献、授权专利和专利申请都据此出于所有目的以引用的方式整体在此并入。

[0460] 表3:信号肽。信号肽由以下之一组成:

[0461]	结构域	Uniprot ID	多肽序列	SEQ ID NO.
	G-CSFR(信号肽)	Q99062	MARLGNCSLTWAALIILLPGSLE	1
	GM-CSFR-α(信号肽)	P15509	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	2
	结构域	Genbank 登录号	核酸序列	
	G-CSFR(信号肽, 天然序列)	NP_000751	ATGGCAAGGCTGGGAAACTGCAGCCTGACTTGGGCTGCCCTGATCATCCTGCTGCTCCCCGGAAGTCTGGAG	3
	GM-CSFR-α(信号肽, 天然序列)	NP_034100	ATGCTGCTGCTAGTGACCTCCCTGCTGCTCTGTGAGCTGCCTCACCCGGCGTTCCTGCTGATTC	4
[0462]	天然序列)		CT	

[0463] 表4:野生型G-CSFR胞外结构域(ECD):G-CSFR ECD由以下之一组成:

[0464]

结构域	Uniprot ID	多肽序列	SEQ ID NO.
G-CSFR(EC D)	Q99062	ECGHISVSAPIVHLGDPITASCI KQNCSHLDPEPQILWRLGAEL QPGGRQQRLSDGTQESIITLPH LNHTQAFLSCCLNWGNSLQIL DQVELRAGYPPAIPHNLSCLM NLTTSSLICQWEPGPETHLPTS FTLKSFKSRGNCQTQGDSILDC VPKDGQSHCCIPRKHLLLYQN MGIWVQAENALGTSMSPQLC LDPMDVVKLEPPMLRTMDPSP EAAPPQAGCLQLCWEPWQPG LHINQKCELRHKPQRGEASWA LVGPLPLEALQYELCGLLPAT AYTLQIRCIRWPLPGHWSWDS PSLELRTTERAPTURLDTWWR QRQLDPRTVQLFWKVPLEED SGRIQGYVVSWRPSGQAGAIL PLCNTTELSCTFHLPSEAQEV LVAYNSAGTSRPTPVVFSES PALTRLHAMARDPHSLWVGW EPPNPWPQGYVIEWWGLGPPSA SNSNKTWRMEQNGRATGFL KENIRPFQLYEIIVTPLYQDTM GPSQHVVAYSQEMAPSHAPEL HLKHIGKTWAQLEWVPEPPEL GKSPLTHYTIFWTNAQNSFS AILNASSRGFVLHGLEPASLYH IHLMAASQAGATNSTVLTMT LTPEGSELH	5
结构域	Genbank 登录号	核酸序列	
G-CSFR(EC D, 天然序)	NP_000751	GAGTGCGGGCACATCAGTGT CTCAGCCCCCATCGTCCACCT	6

[0465]

列)	GGGGGATCCCATCACAGCCT CCTGCATCATCAAGCAGAAC TGCAGCCATCTGGACCCGGA GCCACAGATTCTGTGGAGAC TGGGAGCAGAGCTTCAGCCC GGGGGCAGGCAGCAGCGTCT GTCTGATGGGACCCAGGAAT CTATCATCACCTGCCCCACC TCAACCACACTCAGGCCTTTC TCTCCTGCTGCCTGAACTGGG GCAACAGCCTGCAGATCCTG GACCAGGTTGAGCTGCGCGC AGGCTACCCTCCAGCCATAC CCCACAACCTCTCCTGCCTCA TGAACCTCACAACCAGCAGC CTCATCTGCCAGTGGGAGCC AGGACCTGAGACCCACCTAC CCACCAGCTTCACTCTGAAG AGTTTCAAGAGCCGGGGCAA CTGTCAGACCCAAGGGGACT CCATCCTGGACTGCGTGCCC AAGGACGGGCAGAGCCACTG CTGCATCCCACGCAAACACC TGCTGTTGTACCAGAATATG GGCATCTGGGTGCAGGCAGA GAATGCGCTGGGGACCAGCA TGTCCCCACAACCTGTGTCTTG ATCCCATGGATGTTGTGAAA CTGGAGCCCCCATGCTGCG GACCATGGACCCAGCCCTG AAGCGGCCCCTCCCCAGGCA GGCTGCCTACAGCTGTGCTG GGAGCCATGGCAGCCAGGCC TGCACATAAATCAGAAGTGT GAGCTGCGCCACAAGCCGCA GCGTGGAGAAGCCAGCTGGG CACTGGTGGGCCCCCTCCCCT TGGAGGCCCTTCAGTATGAG CTCTGCGGGCTCCTCCCAGCC ACGGCCTACACCCTGCAGAT ACGCTGCATCCGCTGGCCCCCT GCCTGGCCACTGGAGCGACT GGAGCCCCAGCCTGGAGCTG
----	---

[0466]

		AGAACTACCGAACGGGCCCC CACTGTCAGACTGGACACAT GGTGGCGGCAGAGGCAGCTG GACCCCAGGACAGTGCAGCT GTTCTGGAAGCCAGTGCCCC TGGAGGAAGACAGCGGACGG ATCCAAGGTTATGTGGTTTCT TGGAGACCCTCAGGCCAGGC TGGGGCCATCCTGCCCCCTCTG CAACACCACAGAGCTCAGCT GCACCTTCCACCTGCCTTCAG AAGCCCAGGAGGTGGCCCTT GTGGCCTATAACTCAGCCGG GACCTCTCGTCCCCTCCGGT GGTCTTCTCAGAAAGCAGAG GCCCAGCTCTGACCAGACTC CATGCCATGGCCCGAGACCC TCACAGCCTCTGGGTAGGCT GGGAGCCCCCAATCCATGG CCTCAGGGCTATGTGATTGA GTGGGGCCTGGGCCCCCCCCA GCGCGAGCAATAGCAACAAG ACCTGGAGGATGGAACAGAA TGGGAGAGCCACGGGGTTTC TGCTGAAGGAGAACATCAGG CCCTTTCAGCTCTATGAGATC ATCGTGACTCCCTTGTACCAG GACACCATGGGACCCTCCCA GCATGTCTATGCCTACTCTCA AGAAATGGCTCCCTCCCATG CCCCAGAGCTGCATCTAAAG CACATTGGCAAGACCTGGGC ACAGCTGGAGTGGGTGCCTG AGCCCCCTGAGCTGGGGAAG AGCCCCCTTACCCACTACACC ATCTTCTGGACCAACGCTCA GAACCAGTCCTTCTCCGCCAT CCTGAATGCCTCCTCCCGTGG CTTTGTCCTCCATGGCCTGGA GCCCCGCCAGTCTGTATCACAT CCACCTCATGGCTGCCAGCC AGGCTGGGGCCACCAACAGT ACAGTCCTCACCTGATGAC	
--	--	--	--

[0467]

		CTTGACCCCAGAGGGGTCGG AGCTACAC	
G-CSFR(EC D, 4 个密码 子被更改)		GAGTGCGGGCACATCAGTGT CTCAGCCCCCATCGTCCACCT GGGGGATCCCATCACAGCCT CCTGCATCATCAAGCAGAAC TGCAGCCATCTGGACCCGGA GCCACAGATTCTGTGGAGAC TGGGAGCAGAGCTTCAGCCC GGGGGCAGGCAGCAGCGTCT GTCTGATGGGACCCAGGAAT CTATCATCACCTGCCCCACC TCAACCACACTCAGGCCTTTC TCTCCTGCTGCCTGAACTGGG GCAACAGCCTGCAGATCCTG GACCAGGTTGAGCTGCGCGC AGGCTACCCTCCAGCCATAC CCCACAACCTCTCCTGCCTCA TGAACCTCACAACCAGCAGC CTCATCTGCCAGTGGGAGCC AGGACCTGAGACCCACCTAC CCACCAGCTTCACTCTGAAG AGTTTCAAGAGCCGGGGCAA CTGTCAGACCCAAGGGGACT CCATCCTGGACTGCGTGCCC AAGGACGGGCAGAGCCACTG CTGCATCCCACGCAAACACC TGCTGTTGTACCAGAATATG GGCATCTGGGTGCAGGCAGA GAATGCGCTGGGGACCAGCA TGTCCCCACAACCTGTGTCTTG ATCCCATGGATGTTGTGAAA CTGGAGCCCCCATGCTGCG GACCATGGACCCCAGCCCTG AAGCGGCCCCCTCCCCAGGCA GGCTGCCTACAGCTGTGCTG GGAGCCATGGCAGCCAGGCC TGCACATAAATCAGAAGTGT GAGCTGCGCCACAAGCCGCA GCGTGGAGAAGCCAGCTGGG CACTGGTGGGCCCCCTCCCCT TGGAGGCCCTTCAGTATGAG CTCTGCGGGCTCCTCCCAGCC	7

[0468]

ACGGCCTACACCCTGCAGAT ACGCTGCATCCGCTGGCCCCCT GCCTGGCCACTGGAGCGACT GGAGCCCCAGCCTGGAGCTG AGAACTACCGAACGGGCCCC CACTGTCAGACTGGACACAT GGTGGCGGCAGAGGCAGCTG GACCCCAGGACAGTGCAGCT GTTCTGGAAGCCAGTGCCCC TGGAGGAAGACAGCGGACGC ATCCAAGGTTATGTGGTTTCT TGGAGACCCTCAGGCCAGGC TGGGGCCATCCTGCCCCCTCTG CAACACCACAGAGCTCAGCT GCACCTTCCACCTGCCTTCAG AAGCCCAGGAGGTGGCCCTT GTGGCCTATAACTCAGCCGG GACCTCTCGCCCCACCCCGGT GGTCTTCTCAGAAAGCAGAG GCCCAGCTCTGACCAGACTC CATGCCATGGCCCGAGACCC TCACAGCCTCTGGGTAGGCT GGGAGCCCCCCAATCCATGG CCTCAGGGCTATGTGATTGA GTGGGGCCTGGGCCCCCCCCA GCGCGAGCAATAGCAACAAG ACCTGGAGGATGGAACAGAA TGGGAGAGCCACGGGGTTTC TGCTGAAGGAGAACATCAGG CCCTTTCAGCTCTATGAGATC ATCGTGACTCCCTTGTACCAG GACACCATGGGACCCTCCCA GCATGTCTATGCCTACTCTCA AGAAATGGCTCCCTCCCATG CCCCAGAGCTGCATCTAAAG CACATTGGCAAGACCTGGGC ACAGCTGGAGTGGGTGCCTG AGCCCCCTGAGCTGGGGAAG AGCCCCCTTACCCACTACACC ATCTTCTGGACCAACGCTCA GAACCAGTCCTTCTCCGCCAT CCTGAATGCATCCTCCCGTGG CTTTGTCCTCCATGGCCTGGA

[0469]

		GCCCGCCAGTCTGTATCACAT CCACCTCATGGCTGCCAGCC AGGCTGGGGGCCACCAACAGT ACAGTCCTCACCTGATGAC CTTGACCCCAGAGGGGTCGG AGCTACAC	
--	--	---	--

[0470] 表5:跨膜结构域(TM)。TM由以下之一组成:

[0471]

结构域	Uniprot ID	多肽序列	SEQ ID NO.
G-CSFR(TM)	Q99062	IILGLFGLLLLLTCLCGTAWLCC	8
gp130 (TM)	P40189	AIVVPVCLAFLLTLLGVLFCE	9
IL-2Rb (TM)	P14784	IPWLGHLLVGLSGAFGFILVYLLI	10
IL-2RG (TM)	P31785	VVISVGSMGLIISLLCVYFWL	11
结构域	Genbank 登录号	核酸序列	
G-CSFR(TM)	NP_000751	ATCATCCTGGGCCTGTTTCGGCCT CCTGCTGTTGCTCACCTGCCTCTG TGGAAGTGCCTGGCTCTGTTGC	12
gp130 (TM)	NM_002184	GCCATAGTCGTGCCTGTTTGCTT AGCATTCCTATTGACAACTCTTCT GGGAGTGCTGTTCTGCTTT	13
IL-2Rb (TM)	NM_000878	ATTCCGTGGCTCGGCCACCTCCT CGTGGGTCTCAGCGGGGCTTTTG GCTTCATCATCTTAGTGTACTTGC TGATC	14
IL-2RG (TM)	NP_000197	GTGGTTATCTCTGTTGGCTCCATG GGATTGATTATCAGCCTTCTCTGT GTGTATTTCTGGCTG	15

[0472] 表6:胞内结构域(ICD)。ICD由以下之一组成:

[0473]

结构域	Uniprot ID	多肽序列	SEQ ID NO.
IL-2Rb(ICD, G2R-1)	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPS KFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPF PSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDK VTQLLLQQDKVPEPASLSSNHS LTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEA CQVYFTYDPYSEEDPDEGVAG APTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTF PSRDDLLLFSPSLGGPSPPSTAP GGSGAGEERMPPSLQERVPRD	16

[0474]

		WDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPP PELVREAGEEVPDAGPREGVS FPWSRPPGQGEFRALNARLPLN TDAYLSLQELQGQDPTHLV*	
IL-2RG(IC D, G2R-1)	P31785	ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHG NFSASGVSGLAESLQPDYSE RLCLVSEIPPKGGALGEGPGASP CNQHSPYWAPPCYTLKPET*	17
gp130(ICD, G2R-2)	P40189	NKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIA QWSPHTPPRHNFNSKDQMYS GNFTDVSVEIEANDKKPFPE LKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGG SSCMSSSRPSIS	18
IL-2Rb(IC D, G2R-2)	P14784	ASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHL PDALEIEACQVYFTYDPYSEEDP DEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGE DDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGG PSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQ ERVPRDWDWPQPLGPPTPGVPDL VDFQPPPELVREAGEEVPDAG PREGVSFPWSRPPGQGEFRALN ARLPLNTDAYLSLQELQGQDPT HLV*	19
G-CSFR(IC D, G2R-3)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGS WVPTIMEEDAFQLPGLGTTPITK LTVLEEDEKKPVPWESH	20
IL-2Rb(IC D, G2R-3)	P14784	SSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDA LEIEACQVYFTYDPYSEEDPDE GVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDD AYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPS PPSTAPGGSGAGEERMPPSLQE RVPRDWDWPQPLGPPTPGVPDLV DFQPPPELVREAGEEVPDAGP REGVSFPWSRPPGQGEFRALNA RLPLNTDAYLSLQELQGQDPT HLV*	21
G-CSFR(IC D, G12R-1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGS WVPTIMEEDAFQLPGLGTTPITK LTVLEEDEKKPVPWESHNSSET	22

[0475]

IL-12Rb2(I CD, G12R-1)	Q99665	AGDLPTHGTYLPSNIDDLPSHE APLADSLEELEPQHISLSVFPSSS LHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDS LML*	23
G-CSFR(IC D, G21R-1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGS WVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK LTVLEEDEKKPVPWESHNSSET	24
IL-21R(IC D, G21R-1)	Q9HBE5	SPGDEGPFRSYLRQWVVIPPLS SPGPQAS*	25
G-CSFR(IC D, G21R-2)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGS WVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK LTVLEEDEKKPVPWESHN	26
IL-21R(IC D, G21R-2)	Q9HBE5	QNSGGSAYSEERDRPYGLVSD TVTDLDAEGPCTWPCSCEDDG YPALDLDAGLEPSPGLEDPLD AGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPL GSLDLRLKPPLADGEDWAGGL PWGGRSPGGVSESEAGSPLAGL DMDTFDSGFVGSDCSSPVECDF TSPGDEGPFRSYLRQWVVIPPL SSGPQAS*	27
G-CSFR(IC D, G21/2R-1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGS WVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK LTVLEEDEKKPVPWESHNSSET CGLPTLVQTYVLQGDPAVSTQ PQSQ	28
IL-2Rb(IC D, G21/2R- 1)	P14784	SSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDA LEIEACQVYFTYDPYSEEDPDE GVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDD AYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPS PPSTAPGGSGAGEERMPPSLQE RVPRDWDQPPLGPPTPGVPDLV DFQPPPELVLEAGEEVPDAGP REGVSFPWSRPPGQGEFRALNA RLPLNTDAYLSLQELQGQDPTH LV*	29

[0476]

G-CSFR(IC D, G12/2R- 1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGS WVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK LTVLEEDEKKPVPWESH	30
IL-2Rb(IC D, G12/2R- 1)	P14784	SSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDA LEIEACQVYFTYDPYSEEDP	31
IL-12Rb2(I CD, G12/2R-1)	Q99665	AGDLPTHGTYLPSNIDDLPS	32
IL-2Rb(IC D, G12/2R- 1)	P14784	GGPSPPSTAPGGSGAGEERMPP SLQERVPRDWDQPPLGPPTPGV PDLVDFQPPPELVLEAGEEVP DAGPREGVSFPWSRPPGQGEFR ALNARLPLNTDAYLSLQELQGQ DPTHLV*	33
G-CSFR(IC D, G21/12/2R- 1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGS WVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK LTVLEEDEKKPVPWESHNSSET CGLPTLVQTYVLQGDPRVSTQ PQSQ	34
IL-2Rb(IC D, G21/12/ 2R-1)	P14784	SSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDA LEIEACQVYFTYDPYSEEDP	35
IL-12Rb2(I CD, G21/12/2R- 1)	Q99665	AGDLPTHGTYLPSNIDDLPS	36
IL-2Rb(IC D, G21/12/ 2R-1)	P14784	GGPSPPSTAPGGSGAGEERMPP SLQERVPRDWDQPPLGPPTPGV PDLVDFQPPPELVLEAGEEVP DAGPREGVSFPWSRPPGQGEFR ALNARLPLNTDAYLSLQELQGQ DPTHLV*	37
gp130(ICD, G27/2R-1)	P40189	NKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIA QWSPHTPPRHNFNFSKDQMYSD GNFTDVSVEIEANDKKPFPE LKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGG SSCMSSSRPSISSSDENESSQNTS STVQYSTVVHSGYRHQVPSVQ	38

[0477]

		VFSR	
IL-2Rb(IC D, G27/2R- 1)	P14784	ASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHL PDALEIEACQVYFTYDPYSEEDP DEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGE DDAYCTFSPSRDDLLLFSPSLLGG PSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQ ERVPRDWDQPPLGPPTPGVPDL VDFQPPPELVREAGEEVPDAG PREGVSFPWSRPPGQGEFRALN ARLPLNTDAYLSLQELQGQDPT HLV*	39
G-CSFR(IC D, G7R-1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGS WVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK LTVLEEDEKKPVPWESH	40
IL-7Ra(IC D, G7R-1)	P16871	SGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNST LPPFSLQSGILTLNPVAQGQPIL TSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ*	41
G-CSFR(IC D, G21/7R-1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGS WVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK LTVLEEDEKKPVPWESHNSSET CGLPTLVQTYVLQGDPRVSTQ PQSQ	42
IL7R(ICD, G21/7R-1)	P16871	SSSRSLDCRESGKNGPHVYQDL LLSLGTTNSTLPPFSLQSGILTL NPVAQGQPILTSLSNQEEAYV TMSSFYQNNQ*	43
结构域	Genbank 登录号	核酸序列	
IL-2RB(IC D, G2R-1)	NM_000 878	AACTGCAGGAACACCGGGCCA TGGCTGAAGAAGGTCCTGAAG TGTAACACCCCAGACCCCTCG AAGTTCTTTTCCCAGCTGAGCT CAGAGCATGGAGGAGACGTCC AGAAGTGGCTCTCTTCGCCCT TCCCCTCATCGTCCTTCAGCCC TGGCGGCCTGGCACCTGAGAT CTCGCCACTAGAAGTGCTGGA GAGGGACAAGGTGACGCAGC TGCTCCTGCAGCAGGACAAGG TGCCTGAGCCCGCATCCTTAA GCAGCAACCACTCGCTGACCA	44

[0478]

		GCTGCTTCACCAACCAGGGTT ACTTCTTCTTCCACCTCCCGGA TGCCTTGGAGATAGAGGCCTG CCAGGTGTACTTTACTTACGA CCCCTACTCAGAGGAAGACCC TGATGAGGGTGTGGCCGGGGC ACCCACAGGGTCTTCCCCCA ACCCCTGCAGCCTCTGTCAGG GGAGGACGACGCCTACTGCAC CTTCCCCTCCAGGGATGACCT GCTGCTCTTCTCCCCCAGTCTC CTCGGTGGCCCCAGCCCCCA AGCACTGCCCCTGGGGGCAGT GGGGCCGGTGAAGAGAGGAT GCCCCCTTCTTTGCAAGAAAG AGTCCCCAGAGACTGGGACCC CCAGCCCCTGGGGCCTCCCAC CCCAGGAGTCCCAGACCTGGT GGATTTTCAGCCACCCCCTGA GCTGGTGCTGCGAGAGGCTGG GGAGGAGGTCCCTGACGCTGG CCCCAGGGAGGGAGTCAGTTT CCCCTGGTCCAGGCCTCCTGG GCAGGGGGAGTTCAGGGCCCT TAATGCTCGCCTGCCCCTGAA CACTGATGCCTACTTGTCCCTC CAAGA ACTCCAGGGTCAGGAC CCA ACTCACTTGGTGTAG	
IL-2RG(IC D, G2R-1)	NP_000 197	GAACGGACGATGCCCCGAATT CCCACCCTGAAGAACCTAGAG GATCTTGTTACTGAATACCAC GGGA ACTTTTCGGCCTGGAGT GGTGTGTCTAAGGGACTGGCT GAGAGTCTGCAGCCAGACTAC AGTGAACGACTCTGCCTCGTC AGTGAGATTCCCCCAAAGGA GGGGCCCTTGGGGAGGGGCCT GGGGCCTCCCCATGCAACCAG CATAGCCCCTACTGGGCCCCC CCATGTTACACCCTAAAGCCT GAAACCTGA	45
gp130(ICD, G2R-1)	NM_002 184	AATAAGCGAGACCTAATTAAA AAACACATCTGGCCTAATGTT	46

G2R-2)		CCAGATCCTTCAAAGAGTCAT ATTGCCCAGTGGTCACCTCAC ACTCCTCCAAGGCACAATTTT AATTCAAAAGATCAAATGTAT TCAGATGGCAATTTCACTGAT GTAAGTGTGTGGAAATAGAA GCAAATGACAAAAAGCCTTTT CCAGAAGATCTGAAATCATTG GACCTGTTCAAAAAGGAAAAA ATTAATACTGAAGGACACAGC AGTGGTATTGGGGGGTCTTCA TGTATGTCATCTTCTAGGCCA AGCATTTCT	
IL-2Rb(IC D, G2R-2)	NM_000 878	GCATCCTTAAGCAGCAACCAC TCGCTGACCAGCTGCTTCACC AACCAGGGTTACTTCTTCTTCC ACCTCCCGGATGCCTTGGAGA TAGAGGCCTGCCAGGTGTACT TACTTACGACCCCTACTCAG AGGAAGACCCTGATGAGGGTG TGGCCGGGGCACCCACAGGGT CTTCCCCCAACCCCTGCAGC CTCTGTCAGGGGAGGACGACG CCTACTGCACCTTCCCCTCCAG GGATGACCTGCTGCTCTTCTCC CCCAGTCTCCTCGGTGGCCCC AGCCCCCAAGCACTGCCCCCT GGGGGCAGTGGGGCCGGTGA AGAGAGGATGCCCCCTTCTTT GCAAGAAAGAGTCCCCAGAG ACTGGGACCCCCAGCCCCTGG GGCCTCCCACCCCAGGAGTCC CAGACCTGGTGGATTTTCAGC CACCCCCTGAGCTGGTGCTGC GAGAGGCTGGGGAGGAGGTC CCTGACGCTGGCCCCAGGGAG GGAGTCAGTTTCCCCTGGTCC AGGCCTCCTGGGCAGGGGGAG TTCAGGGCCCTTAATGCTCGC CTGCCCCTGAACACTGATGCC TACTTGTCCCTCCAAGAACTC CAGGGTCAGGACCCAACCTCAC TTGGTGTAG	47

[0479]

[0480]

G-CSFR(IC D, G2R-3)	NP_000 751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCC CTCTGGCCAAGTGTCCCAGAC CCAGCTCACAGCAGCCTGGGC TCCTGGGTGCCCACAATCATG GAGGAGGATGCCTTCCAGCTG CCCGGCCTTGGCACGCCACCC ATCACCAAGCTCACAGTGCTG GAGGAGGATGAAAAGAAGCC GGTGCCCTGGGAGTCCCAT	48
IL-2Rb(IC D, G2R-3)	NM_000 878	AGCAGCAACCACTCGCTGACC AGCTGCTTCACCAACCAGGGT TACTTCTTCTTCCACCTCCCGG ATGCCTTGGAGATAGAGGCCT GCCAGGTGTACTTTACTTACG ACCCCTACTCAGAGGAAGACC CTGATGAGGGTGTGGCCGGGG CACCCACAGGGTCTTCCCCC AACCCCTGCAGCCTCTGTCAG GGGAGGACGACGCCTACTGCA CCTTCCCCTCCAGGGATGACC TGCTGCTCTTCTCCCCCAGTCT CCTCGGTGGCCCCAGCCCCC AAGCACTGCCCCCTGGGGGCAG TGGGGCCGGTGAAGAGAGGA TGCCCCCTTCTTTGCAAGAAA GAGTCCCCAGAGACTGGGACC CCCAGCCCCTGGGGCCTCCCA CCCCAGGAGTCCCAGACCTGG TGGATTTTCAGCCACCCCCTG AGCTGGTGCTGCGAGAGGCTG GGGAGGAGGTCCCTGACGCTG GCCCCAGGGAGGGAGTCAGTT TCCCCTGGTCCAGGCCTCCTG GGCAGGGGGAGTTCAGGGCCC TTAATGCTCGCCTGCCCCTGA ACACTGATGCCTACTTGTCCCT CCAAGAACTCCAGGGTCAGGA CCCAACTCACTTGGTGTAG	49
G-CSFR(IC D, G12R-1)	NP_000 751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCC CTCTGGCCAAGTGTCCCAGAC CCAGCTCACAGCAGCCTGGGC TCCTGGGTGCCCACAATCATG GAGGAGGATGCCTTCCAGCTG	50

[0481]

		CCCGGCCTTGGCACGCCACCC ATCACCAAGCTCACAGTGCTG GAGGAGGATGAAAAGAAGCC GGTGCCCTGGGAGTCCCATAA CAGCTCAGAGACC	
IL-12Rb2(I CD, G12R-1)	NP_001 550	GCAGGTGACCTTCCCACCCAT GATGGCTACTTACCCTCCAAC ATAGATGACCTCCCCTCACAT GAGGCACCTCTCGCTGACTCT CTGGAAGAACTGGAGCCTCAG CACATCTCCCTTTCTGTTTTCC CCTCAAGTTCTCTTCACCCACT CACCTTCTCCTGTGGTGATAA GCTGACTCTGGATCAGTTAAA GATGAGGTGTGACTCCCTCAT GCTCTGA	51
G-CSFR(IC D, G21R-1)	NP_000 751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCC CTCTGGCCAAGTGTCCCAGAC CCAGCTCACAGCAGCCTGGGC TCCTGGGTGCCCAACAATCATG GAGGAGGATGCCTTCCAGCTG CCCGGCCTTGGCACGCCACCC ATCACCAAGCTCACAGTGCTG GAGGAGGATGAAAAGAAGCC GGTGCCCTGGGAGTCCCATAA CAGCTCAGAGACC	52
IL-21R(IC D, G21R-1)	NP_068 570 (1 个密 码子被 更改)	AGCCCTGGGGACGAAGGACCC CCCCGGAGCTACCTCCGCCAG TGGGTGGTCATTCTCCGCCA CTTTCGAGCCCTGGACCCAG GCCAGCTAA	53
G-CSFR(IC D, G21R-2)	NP_000 751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCC CTCTGGCCAAGTGTCCCAGAC CCAGCTCACAGCAGCCTGGGC TCCTGGGTGCCCAACAATCATG GAGGAGGATGCCTTCCAGCTG CCCGGCCTTGGCACGCCACCC ATCACCAAGCTCACAGTGCTG GAGGAGGATGAAAAGAAGCC GGTGCCCTGGGAGTCCCATAA C	54

[0482]

IL-21R(IC D, G21R-2)	NP_068 570 (1 个密 码子被 更改)	CAGAACTCGGGGGGCTCAGCT TACAGTGAGGAGAGGGATCG GCCATACGGCCTGGTGTCCAT TGACACAGTGACTGTGCTAGA TGCAGAGGGGGCCATGCACCTG GCCCTGCAGCTGTGAGGATGA CGGCTACCCAGCCCTGGACCT GGATGCTGGCCTGGAGCCCAG CCCAGGCCTAGAGGACCCACT CTTGATGCAGGGACCACAGT CCTGTCCTGTGGCTGTGTCTCA GCTGGCAGCCCTGGGCTAGGA GGGCCCCTGGGAAGCCTCCTG GACAGACTAAAGCCACCCCTT GCAGATGGGGAGGACTGGGCT GGGGGACTGCCCTGGGGTGGC CGGTCACCTGGAGGGGTCTCA GAGAGTGAGGCGGGCTCACCC CTGGCCGGCCTGGATATGGAC ACGTTTGACAGTGGCTTTGTG GGCTCTGACTGCAGCAGCCCT GTGGAGTGTGACTTCACCAGC CCTGGGGACGAAGGACCCCCC CGGAGCTACCTCCGCCAGTGG GTGGTCATTCTCCGCCACTTT CGAGCCCTGGACCCCAGGCCA GC	55
G-CSFR(IC D, G21/2R-1)	NP_000 751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCC CTCTGGCCAAGTGTCCCAGAC CCAGCTCACAGCAGCCTGGGC TCCTGGGTGCCCACAATCATG GAGGAGGATGCCTTCCAGCTG CCCGGCCTTGGCACGCCACCC ATCACCAAGCTCACAGTGCTG GAGGAGGATGAAAAGAAGCC GGTGCCCTGGGAGTCCCATAA CAGCTCAGAGACCTGTGGCCT CCCCACTCTGGTCCAGACCTA TGTGCTCCAGGGGGACCCAAG AGCAGTTTCCACCCAGCCCCA ATCCCAG	56
IL-2Rb(IC	NM_000 878	AGCAGCAACCACTCGCTGACC AGCTGCTTCACCAACCAGGGT	57

[0483]

D, G21/2R-1)		TACTTCTTCTTCCACCTCCCGG ATGCCTTGGAGATAGAGGCCT GCCAGGTGTACTTTACTTACG ACCCCTACTCAGAGGAAGACC CTGATGAGGGTGTGGCCGGGG CACCCACAGGGTCTTCCCCC AACCCCTGCAGCCTCTGTCAG GGGAGGACGACGCCTACTGCA CCTTCCCCTCCAGGGATGACC TGCTGCTCTTCTCCCCCAGTCT CCTCGGTGGCCCCAGCCCCC AAGCACTGCCCCTGGGGGCAG TGGGGCCGGTGAAGAGAGGA TGCCCCCTTCTTTGCAAGAAA GAGTCCCCAGAGACTGGGACC CCCAGCCCCTGGGGCCTCCCA CCCCAGGAGTCCCAGACCTGG TGGATTTTCAGCCACCCCCTG AGCTGGTGCTGCGAGAGGCTG GGGAGGAGGTCCCTGACGCTG GCCCCAGGGAGGGAGTCAGTT TCCCCTGGTCCAGGCCTCCTG GGCAGGGGGAGTTCAGGGCCC TTAATGCTCGCCTGCCCCTGA AACTGATGCCTACTTGTCCCT CCAAGAACTCCAGGGTCAGGA CCCAACTCACTTGGTG TAG	
G-CSFR(IC D, G12/2R-1)	NP_000 751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCC CTCTGGCCAAGTGTCCCAGAC CCAGCTCACAGCAGCCTGGGC TCCTGGGTGCCCACAATCATG GAGGAGGATGCCTTCCAGCTG CCCGGCCTTGGCACGCCACCC ATCACCAAGCTCACAGTGCTG GAGGAGGATGAAAAGAAGCC GGTGCCCTGGGAGTCCCAT	58
IL-2Rb(IC D, G12/2R-1)	NM_000 878	AGCAGCAACCACTCGCTGACC AGCTGCTTCACCAACCAGGGT TACTTCTTCTTCCACCTCCCGG ATGCCTTGGAGATAGAGGCCT GCCAGGTGTACTTTACTTACG ACCCCTACTCAGAGGAAGACC CT	59

[0484]

IL-12Rb2(I CD, G12/2R-1)	NP_001 550	GCAGGTGACCTTCCCACCCAT GATGGCTACTTACCCTCCAAC ATAGATGACCTCCCCTCA	60
IL-2Rb(IC D, G12/2R- 1)	NM_000 878	GGTGGCCCCAGCCCCCAAGC ACTGCCCCTGGGGGCAGTGGG GCCGGTGAAGAGAGGATGCCC CCTTCTTTGCAAGAAAGAGTC CCCAGAGACTGGGACCCCCAG CCCCTGGGGCCTCCCACCCCA GGAGTCCCAGACCTGGTGGAT TTTCAGCCACCCCCTGAGCTG GTGCTGCGAGAGGCTGGGGAG GAGGTCCCTGACGCTGGCCCC AGGGAGGGAGTCAGTTTCCCC TGGTCCAGGCCTCCTGGGCAG GGGGAGTTCAGGGCCCTTAAT GCTCGCCTGCCCCTGAACACT GATGCCTACTTGTCCCTCCAA GAACTCCAGGGTCAGGACCCA ACTCACTTGGTGTAG	61
G-CSFR(IC D, G21/12/2R- 1)	NP_000 751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCC CTCTGGCCAAGTGTCCCAGAC CCAGCTCACAGCAGCCTGGGC TCCTGGGTGCCCAACAATCATG GAGGAGGATGCCTTCCAGCTG CCCGGCCTTGGCACGCCACCC ATCACCAAGCTCACAGTGCTG GAGGAGGATGAAAAGAAGCC GGTGCCCTGGGAGTCCCATAA CAGCTCAGAGACCTGTGGCCT CCCCACTCTGGTCCAGACCTA TGTGCTCCAGGGGGACCCAAG AGCAGTTTCCACCCAGCCCCA ATCCCAG	62
IL-2Rb(ICD , G21/12/2R- 1)	NM_000 878	AGCAGCAACCACTCGCTGACC AGCTGCTTCACCAACCAGGGT TACTTCTTCTTCCACCTCCCGG ATGCCTTGGAGATAGAGGCCT GCCAGGTGTACTTTACTTACG ACCCCTACTCAGAGGAAGACC CT	63
IL-12Rb2(I	NP_001	GCAGGTGACCTTCCCACCCAT	64

[0485]

CD, G21/12/2R-1)	550	GATGGCTACTTACCCTCCAAC ATAGATGACCTCCCCTCA	
IL-2Rb(IC D, G21/12/ 2R-1)	NM_000 878	GGTGGCCCCAGCCCCCAAGC ACTGCCCCTGGGGGCAGTGGG GCCGGTGAAGAGAGGATGCCC CCTTCTTTGCAAGAAAGAGTC CCCAGAGACTGGGACCCCCAG CCCCTGGGGCCTCCCACCCCA GGAGTCCCAGACCTGGTGGAT TTTCAGCCACCCCCTGAGCTG GTGCTGCGAGAGGCTGGGGAG GAGGTCCCTGACGCTGGCCCC AGGGAGGGAGTCAGTTTCCCC TGGTCCAGGCCTCCTGGGCAG GGGGAGTTCAGGGCCCTTAAT GCTCGCCTGCCCCTGAACACT GATGCCTACTTGTCCCTCCAA GAACTCCAGGGTCAGGACCCA ACTCACTTGGTGTAG	65
gp130(ICD, G27/2R-1)	NM_002 184 (3 个密 码子被 更改)	AATAAGCGAGACCTAATTAAA AAACACATCTGGCCTAATGTT CCAGATCCTTCAAAGAGTCAT ATTGCCCAGTGGTCACCTCAC ACTCCTCCAAGGCACAATTTC AATTCAAAGGATCAAATGTAT TCAGATGGCAATTTCACTGAT GTAAGTGTTGTGGAAATAGAA GCAAATGACAAAAAGCCTTTT CCAGAAGATCTGAAATCATTG GACCTGTTCAAAAAGGAAAAA ATTAATACTGAAGGACACAGC AGTGGTATTGGGGGGTCTTCA TGTATGTCATCTTCTAGGCCA AGCATTTCTAGCAGTGATGAA AATGAATCTTCACAAAACACT TCGAGCACTGTCCAGTATTCT ACCGTGGTACACAGTGGCTAC AGACACCAAGTTCCGTCAGTC CAAGTCTTCTCAAGA	66
IL-2Rb(IC D, G27/2R-	NM_000 878(2 个	GCATCCTTAAGCAGCAACCAC TCGCTGACCAGCTGCTTCACC	67

[0486]

1)	密码子 被更改)	AACCAGGGTTACTTCTTCTTCC ACCTCCCGGATGCCTTGGAGA TAGAGGCCTGCCAGGTGTACT TACTTACGACCCCTACTCAG AGGAAGACCCTGATGAGGGTG TGGCCGGGGCACCCACAGGGT CTTCCCCCAACCCCTGCAGC CTCTGTCAGGGGAGGACGACG CCTACTGCACCTTCCCCTCCAG GGATGACCTGCTGCTCTTCTCC CCCAGTCTCCTCGGTGGCCCC AGCCCCCAAGCACTGCCCCCT GGGGGCAGTGGGGCCGGTGA AGAGAGGATGCCCCCTTCTTT GCAAGAAAGAGTCCCCAGAG ACTGGGACCCCCAGCCCCTGG GGCCTCCCACCCCAGGAGTCC CAGACCTGGTGGATTTTCAGC CACCCCCTGAGCTGGTGCTGC GAGAGGCTGGGGAGGAGGTC CCTGACGCTGGCCCCAGGGAG GGAGTCAGTTTCCCCTGGTCC AGGCCTCCTGGGCAGGGGGAG TTCAGGGCCCTTAATGCTCGC CTGCCCCTGAACACTGATGCC TACTTGTCCCTCCAAGAACTC CAGGGTCAGGACCCAACAC TTGGTGTAG	
G-CSFR(IC D, G7R-1)	NP_000 751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCC CTCTGGCCAAGTGTCCCAGAC CCAGCTCACAGCAGCCTGGGC TCCTGGGTGCCACAATCATG GAGGAGGATGCCTTCCAGCTG CCCGGCCTTGGCACGCCACCC ATCACCAAGCTCACAGTGCTG GAGGAGGATGAAAAGAAGCC GGTGCCCTGGGAGTCCCAT	68
IL-7Ra(IC D, G7R-1)	NP_002 176	AGTGGCAAGAATGGGCCTCAT GTGTACCAGGACCTCCTGCTT AGCCTTGGGACTACAAACAGC ACGCTGCCCCCTCCATTTTCTC TCCAATCTGGAATCCTGACAT TGAACCCAGTTGCTCAGGGTC	69

[0487]

		AGCCCATTTCTTACTTCCCTGGG ATCAAATCAAGAAGAAGCATA TGTCACCATGTCCAGCTTCTAC CAAAACCAGTGA	
G-CSFR(IC D, G21/7R-1)	NP_000 751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCC CTCTGGCCAAGTGTCCCAGAC CCAGCTCACAGCAGCCTGGGC TCCTGGGTGCCCACAATCATG GAGGAGGATGCCTTCCAGCTG CCCGGCCTTGGCACGCCACCC ATCACCAAGCTCACAGTGCTG GAGGAGGATGAAAAGAAGCC GGTGCCCTGGGAGTCCCATAA CAGCTCAGAGACCTGTGGCCT CCCCACTCTGGTCCAGACCTA TGTGCTCCAGGGGGACCCAAG AGCAGTTTCCACCCAGCCCCA ATCCCAG	70
IL7R(ICD, G21/7R-1)	NP_002 176	TCCTCTTCCAGGTCCCTAGACT GCAGGGAGAGTGGCAAGAAT GGGCCTCATGTGTACCAGGAC CTCCTGCTTAGCCTTGGGACT ACAAACAGCACGCTGCCCCCT CCATTTTCTCTCCAATCTGGAA TCCTGACATTGAACCCAGTTG CTCAGGGTCAGCCCATTCTTA CTTCCCTGGGATCAAATCAAG AAGAAGCATATGTCACCATGT CCAGCTTCTACCAAAACCAGT GA	71

[0488] 表7 G-CSF序列

[0489]

名称	Uniprot ID	多肽序列	SEQ ID NO.
人 G-CSF	AOA0B4U5E3	TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLKATYKLCHPEELVLL GHSLGIPWAPLSSCP SQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPEL GPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAF QRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP	72
在大肠杆菌中重组产生的人 G-CSF		MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLKATYKLCHPEELV LLGHSLGIPWAPLSSCP SQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPE LGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAF QRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP	80
名称	Genbank 登录号	核酸序列	

[0490]

人 G-CSF	NM_172220	AGCCCGGAGC CTGCAGCCCA GCCCCACCCA GACCCATGGC TGGACCTGCC ACCCAGAGCC CCATGAAGCT GATGGCCCTG CAGCTGCTGC TGTGGCACAG TGCACCTCTGG ACAGTGCAGG AAGCCACCCC CCTGGGCCCT GCCAGCTCCC TGCCCCAGAG CTTCCTGCTC AAGTGCTTAG AGCAAGTGAG GAAGATCCAG GCGGATGGCG CAGCGCTCCA GGAGAAGCTG GTGAGTGAGG CAGGCTGCTT GAGCCAACTC CATAGCGGCC TTTTCTCTTA CCAGGGGCTC CTGCAGGCC TGGGAAGGGAT CTCCCCGAG TTGGGTCCCA CCTTGGACAC ACTGCAGCTG GACGTCGCCG ACTTTGCCAC CACCATCTGG CAGCAGATGG AAGAACTGGG AATGGCCCTT GCCCTGCAGC CCACCCAGGG TGCCATGCCG GCCTTCGCCT CTGCTTTCCA GCGCCGGGCA GGAGGGGTCC TGGTTGCCTC CCATCTGCAG AGCTTCCTGG AGGTGTCTGA CCGCGTTCTA CGCCACCTTG CCCAGCCCTG AGCCAAGCCC TCCCCATCCC ATGTATTTAT CTCTATTTAA TATTTATGTC TATTTAAGCC TCATATTTAA AGACAGGGAA GAGCAGAACG GAGCCCCAGG CCTCTGTGTC CTTCCTTGCA TTTCTGAGTT TCATTCTCCT GCCTGTAGCA GTGAGAAAAA GCTCCTGTCC TCCCATCCCC TGGACTGGGA GGTAGATAGG TAAATACCAA GTATTTATTA CTATGACTGC TCCCAGCCCC TGGCTCTGCA ATGGGCACTG GGATGAGCCG CTGTGAGCCC CTGGTCCTGA GGGTCCCCAC CTGGGACCTT TGAGAGTATC AGGTCTCCCA CGTGGGAGAC AAGAAATCCC TGTTTAATAT TTAAACAGCA GTGTTCCTCA TCTGGGTCTT TGCACCCCTC ACTCTGGCCT CAGCCGACTG CACAGCGGCC CCTGCATCCC CTTGGCTGTG AGGCCCTTG ACAAGCAGAG GTGGCCAGAG CTGGGAGGCA TGGCCCTGGG GTCCACGAA TTTGCTGGGG AATCTCGTTT TTCTTCTTAA GACTTTTGGG ACATGGTTTG ACTCCCGAAC ATCACCAGAC CGTCTCCTGT TTTTCTGGGT GGCCTCGGGA CACCTGCCCT GCCCCACGA GGGTCAGGAC TGTGACTCTT TTTAGGGCCA GGCAGGTGCC TGGACATTTG CCTTGCTGGA CGGGGACTGG GGATGTGGGA GGGAGCAGAC AGGAGGAATC ATGTCAGGCC TGTGTGTGAA AGGAAGCTCC ACTGTCACCC TCCACCTCTT CACCCCCAC TCACCAAGTGT CCCCTCCACT GTCACATTGT AACTGAACCT CAGGATAATA AAGTGTTTGC CTCCA	73
---------	-----------	---	----

序列表

<110> 省卫生服务机构

维多利亚大学工业合作股份有限公司

<120> 嵌合细胞因子受体

<130> IKE-001W0

<140>

<141>

<150> 62/912,223

<151> 2019-10-08

<160> 80

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

Met Ala Arg Leu Gly Asn Cys Ser Leu Thr Trp Ala Ala Leu Ile Ile

1 5 10 15

Leu Leu Leu Pro Gly Ser Leu Glu

20

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 3

<211> 72

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

atggcaaggc tgggaaactg cagcctgact tgggctgccc tgatcatcct gctgctcccc 60

ggaagtcttg ag 72

<210> 4

<211> 66

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 4

atgctgctgc tagtgacctc cctgctgctc tgtgagctgc ctcacccggc gttcctgctg 60
attcct 66

<210> 5

<211> 603

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5

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

225	230	235	240
Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp Ala			
	245	250	255
Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys Gly			
	260	265	270
Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp			
	275	280	285
Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg			
	290	295	300
Thr Thr Glu Arg Ala Pro Thr Val Arg Leu Asp Thr Trp Trp Arg Gln			
305	310	315	320
Arg Gln Leu Asp Pro Arg Thr Val Gln Leu Phe Trp Lys Pro Val Pro			
	325	330	335
Leu Glu Glu Asp Ser Gly Arg Ile Gln Gly Tyr Val Val Ser Trp Arg			
	340	345	350
Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ile Leu Pro Leu Cys Asn Thr Thr Glu			
	355	360	365
Leu Ser Cys Thr Phe His Leu Pro Ser Glu Ala Gln Glu Val Ala Leu			
	370	375	380
Val Ala Tyr Asn Ser Ala Gly Thr Ser Arg Pro Thr Pro Val Val Phe			
385	390	395	400
Ser Glu Ser Arg Gly Pro Ala Leu Thr Arg Leu His Ala Met Ala Arg			
	405	410	415
Asp Pro His Ser Leu Trp Val Gly Trp Glu Pro Pro Asn Pro Trp Pro			
	420	425	430
Gln Gly Tyr Val Ile Glu Trp Gly Leu Gly Pro Pro Ser Ala Ser Asn			
	435	440	445
Ser Asn Lys Thr Trp Arg Met Glu Gln Asn Gly Arg Ala Thr Gly Phe			
	450	455	460
Leu Leu Lys Glu Asn Ile Arg Pro Phe Gln Leu Tyr Glu Ile Ile Val			
465	470	475	480
Thr Pro Leu Tyr Gln Asp Thr Met Gly Pro Ser Gln His Val Tyr Ala			
	485	490	495
Tyr Ser Gln Glu Met Ala Pro Ser His Ala Pro Glu Leu His Leu Lys			
	500	505	510
His Ile Gly Lys Thr Trp Ala Gln Leu Glu Trp Val Pro Glu Pro Pro			
	515	520	525
Glu Leu Gly Lys Ser Pro Leu Thr His Tyr Thr Ile Phe Trp Thr Asn			
	530	535	540

83

ctggagtggg tgcctgagcc ccctgagctg gggaagagcc cccttaccca ctacaccatc 1620
ttctggacca acgctcagaa ccagtccttc tccgccatcc tgaatgcctc ctcccgtggc 1680
tttgtcctcc atggcctgga gcccgccagt ctgtatcaca tccacctcat ggctgccagc 1740
caggctgggg ccaccaacag tacagtcctc accctgatga ccttgacccc agaggggtcg 1800
gagctacac 1809

<210> 7

<211> 1809

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列描述:合成多核苷酸

<400> 7

gagtgcgggc acatcagtgt ctcagccccc atcgtccacc tgggggatcc catcacagcc 60
tcctgcatca tcaagcagaa ctgcagccat ctggaccggg agccacagat tctgtggaga 120
ctgggagcag agcttcagcc cgggggcagg cagcagcgtc tgtctgatgg gaccaggaa 180
tctatcatca ccctgcccc cctcaaccac actcaggcct ttctctcctg ctgcctgaac 240
tggggcaaca gcctgcagat cctggaccag gttgagctgc gcgcaggcta ccctccagcc 300
ataccccaca acctctcctg cctcatgaac ctcaacaacc gcagcctcat ctgccagtgg 360
gagccaggac ctgagaccca cctaccacc agcttcactc tgaagagttt caagagccgg 420
ggcaactgtc agacccaagg ggactccatc ctggactgcg tgcccaagga cgggcagagc 480
cactgctgca tcccacgcaa acacctgctg ttgtaccaga atatgggcat ctgggtgcag 540
gcagagaatg cgctggggac cagcatgtcc ccacaactgt gtcttgatcc catggatgtt 600
gtgaaactgg agccccccat gctgcggacc atggaccca gccctgaagc ggccccctcc 660
caggcaggct gcctacagct gtgctgggag ccatggcagc caggcctgca cataaatcag 720
aagtgtgagc tgcgccacaa gccgcagcgt ggagaagcca gctgggcact ggtgggcccc 780
ctcccccttg aggcccttca gtatgagctc tgcgggctcc tcccagccac ggcctacacc 840
ctgcagatac gctgcatccg ctggccccctg cctggccact ggagcgactg gagccccagc 900
ctggagctga gaactaccga acgggcccc actgtcagac tggacacatg gtggcggcag 960
aggcagctgg accccaggac agtgcagctg ttctggaagc cagtgccctt ggaggaagac 1020
agcggacgca tccaaggtta tgttggtttct tggagacctt caggccaggc tggggccatc 1080
ctgccccctt gcaacaccac agagctcagc tgcaccttcc acctgccttc agaagcccag 1140
gaggtggccc ttgtggccta taactcagcc gggacctctc gccccacccc ggtggtcttc 1200
tcagaaagca gagggccagc tctgaccaga ctccatgcca tggcccagaga ccctcacagc 1260
ctctgggtag gctgggagcc ccccaatcca tggcctcagg gctatgtgat tgagtggggc 1320
ctgggcccc ccagcgcgag caatagcaac aagacctgga ggatggaaca gaatgggaga 1380
gccacggggt ttctgctgaa ggagaacatc aggcccttct agctctatga gatcatcgtg 1440
actcccttgt accaggacac catgggacct tcccagcatg tctatgccta ctctcaagaa 1500
atggctccct cccatgcccc agagctgcat ctaaagcaca ttggcaagac ctgggcacag 1560
ctggagtggg tgcctgagcc ccctgagctg gggaagagcc cccttaccca ctacaccatc 1620

ttctggacca acgctcagaa ccagtccttc tccgcatcc tgaatgcac ctcccgtggc 1680
tttgtcctcc atggcctgga gcccgcagc ctgtatcaca tccacctcat ggctgccagc 1740
caggctgggg ccaccaacag tacagtcctc accctgatga ccttgacccc agagggtcg 1800
gagctacac 1809

<210> 8

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 8

Ile Ile Leu Gly Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Leu Thr Cys Leu Cys

1 5 10 15

Gly Thr Ala Trp Leu Cys Cys

20

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9

Ala Ile Val Val Pro Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu

1 5 10 15

Gly Val Leu Phe Cys Phe

20

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10

Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly Leu Ser Gly Ala Phe Gly

1 5 10 15

Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile

20

25

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 11

Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys

1 5 10 15

Val Tyr Phe Trp Leu

20

<210> 12

<211> 69

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12

atcatcctgg gcctgttcgg cctcctgctg ttgctcacct gcctctgtgg aactgcctgg 60
ctctgttgc 69

<210> 13

<211> 66

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13

gccatagtcg tgcctgtttg cttagcattc ctattgacaa ctcttctggg agtgctgttc 60
tgctttt 66

<210> 14

<211> 75

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 14

attccgtggc tcggccacct cctcgtgggt ctacgcgggg cttttggctt catcatctta 60
gtgtacttgc tgatc 75

<210> 15

<211> 63

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 15

gtggttatct ctgttggctc catgggattg attatcagcc ttctctgtgt gtatttctgg 60
ctg 63

<210> 16

<211> 286

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 16

Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn

1 5 10 15

Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly

20 25 30

Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe

35					40					45						
Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Ile	Ser	Pro	Leu	Glu	Val	Leu	Glu	
50					55					60						
Arg	Asp	Lys	Val	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Gln	Gln	Asp	Lys	Val	Pro	Glu	
65					70					75					80	
Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	His	Ser	Leu	Thr	Ser	Cys	Phe	Thr	Asn	
85					90					95						
Gln	Gly	Tyr	Phe	Phe	Phe	His	Leu	Pro	Asp	Ala	Leu	Glu	Ile	Glu	Ala	
100					105					110						
Cys	Gln	Val	Tyr	Phe	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Ser	Glu	Glu	Asp	Pro	Asp	
115					120					125						
Glu	Gly	Val	Ala	Gly	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	Ser	Pro	Gln	Pro	Leu	Gln	
130					135					140						
Pro	Leu	Ser	Gly	Glu	Asp	Asp	Ala	Tyr	Cys	Thr	Phe	Pro	Ser	Arg	Asp	
145					150					155					160	
Asp	Leu	Leu	Leu	Phe	Ser	Pro	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	
165					170					175						
Ser	Thr	Ala	Pro	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Glu	Glu	Arg	Met	Pro	Pro	
180					185					190						
Ser	Leu	Gln	Glu	Arg	Val	Pro	Arg	Asp	Trp	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	
195					200					205						
Pro	Pro	Thr	Pro	Gly	Val	Pro	Asp	Leu	Val	Asp	Phe	Gln	Pro	Pro	Pro	
210					215					220						
Glu	Leu	Val	Leu	Arg	Glu	Ala	Gly	Glu	Glu	Val	Pro	Asp	Ala	Gly	Pro	
225					230					235					240	
Arg	Glu	Gly	Val	Ser	Phe	Pro	Trp	Ser	Arg	Pro	Pro	Gly	Gln	Gly	Glu	
245					250					255						
Phe	Arg	Ala	Leu	Asn	Ala	Arg	Leu	Pro	Leu	Asn	Thr	Asp	Ala	Tyr	Leu	
260					265					270						
Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Gln	Gly	Gln	Asp	Pro	Thr	His	Leu	Val			
275					280					285						
<210> 17																
<211> 86																
<212> PRT																
<213> 智人(Homo sapiens)																
<400> 17																
Glu	Arg	Thr	Met	Pro	Arg	Ile	Pro	Thr	Leu	Lys	Asn	Leu	Glu	Asp	Leu	
1				5				10				15				
Val	Thr	Glu	Tyr	His	Gly	Asn	Phe	Ser	Ala	Trp	Ser	Gly	Val	Ser	Lys	

	20		25		30										
Gly	Leu	Ala	Glu	Ser	Leu	Gln	Pro	Asp	Tyr	Ser	Glu	Arg	Leu	Cys	Leu
	35		40		45										
Val	Ser	Glu	Ile	Pro	Pro	Lys	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Glu	Gly	Pro	Gly
	50		55		60										
Ala	Ser	Pro	Cys	Asn	Gln	His	Ser	Pro	Tyr	Trp	Ala	Pro	Pro	Cys	Tyr
65			70		75									80	
Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Thr										
	85														

<210> 18

<211> 101

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 18

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

<210> 19

<211> 205

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 19

Ala	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	His	Ser	Leu	Thr	Ser	Cys	Phe	Thr	Asn	Gln
1			5					10					15		
Gly	Tyr	Phe	Phe	Phe	His	Leu	Pro	Asp	Ala	Leu	Glu	Ile	Glu	Ala	Cys
		20			25			30							
Gln	Val	Tyr	Phe	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Ser	Glu	Glu	Asp	Pro	Asp	Glu
	35		40		45										

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

<210> 20

<211> 62

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 20

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala
 1 5 10 15
 His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala
 20 25 30
 Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val
 35 40 45
 Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His
 50 55 60

<210> 21

<211> 202

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 21

Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe

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

<210> 22

<211> 67

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 22

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala			
1	5	10	15
His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala			
20	25	30	
Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val			
35	40	45	
Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser			
50	55	60	
Ser Glu Thr			

65

<210> 23

<211> 72

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 23

Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr Leu Pro Ser Asn Ile Asp

1

5

10

15

Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala Asp Ser Leu Glu Glu Leu

20

25

30

Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe Pro Ser Ser Ser Leu His

35

40

45

Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu Thr Leu Asp Gln Leu Lys

50

55

60

Met Arg Cys Asp Ser Leu Met Leu

65

70

<210> 24

<211> 67

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 24

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala

1

5

10

15

His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala

20

25

30

Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val

35

40

45

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser

50

55

60

Ser Glu Thr

65

<210> 25

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 25

Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val

1

5

10

15

Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser

20	25	30
<210> 26		
<211> 63		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 26		
Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala		
1 5 10 15		
His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala		
20 25 30		
Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val		
35 40 45		
Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn		
50 55 60		
<210> 27		
<211> 183		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 27		
Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr		
1 5 10 15		
Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala Glu Gly Pro		
20 25 30		
Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Leu Asp		
35 40 45		
Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp Pro Leu Leu		
50 55 60		
Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Ala Gly Ser		
65 70 75 80		
Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Lys Pro		
85 90 95		
Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro Trp Gly Gly		
100 105 110		
Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Leu Ala		
115 120 125		
Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly Ser Asp Cys		
130 135 140		
Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro		
145 150 155 160		

Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser
 165 170 175

Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
 180

<210> 28

<211> 93

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 28

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala
 1 5 10 15

His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala
 20 25 30

Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val
 35 40 45

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser
 50 55 60

Ser Glu Thr Cys Gly Leu Pro Thr Leu Val Gln Thr Tyr Val Leu Gln
 65 70 75 80

Gly Asp Pro Arg Ala Val Ser Thr Gln Pro Gln Ser Gln
 85 90

<210> 29

<211> 202

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 29

Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe
 1 5 10 15

Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys Gln Val Tyr
 20 25 30

Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu Gly Val Ala
 35 40 45

Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro Leu Ser Gly
 50 55 60

Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp Leu Leu Leu
 65 70 75 80

Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr Ala Pro
 85 90 95

Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser Leu Gln Glu

100					105					110						
Arg	Val	Pro	Arg	Asp	Trp	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Thr	Pro	
115					120					125						
Gly	Val	Pro	Asp	Leu	Val	Asp	Phe	Gln	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Val	Leu	
130					135					140						
Arg	Glu	Ala	Gly	Glu	Glu	Val	Pro	Asp	Ala	Gly	Pro	Arg	Glu	Gly	Val	
145					150					155					160	
Ser	Phe	Pro	Trp	Ser	Arg	Pro	Pro	Gly	Gln	Gly	Glu	Phe	Arg	Ala	Leu	
165					170					175						
Asn	Ala	Arg	Leu	Pro	Leu	Asn	Thr	Asp	Ala	Tyr	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	
180					185					190						
Leu	Gln	Gly	Gln	Asp	Pro	Thr	His	Leu	Val							
195					200											
<210> 30																
<211> 62																
<212> PRT																
<213> 智人 (Homo sapiens)																
<400> 30																
Ser	Pro	Asn	Arg	Lys	Asn	Pro	Leu	Trp	Pro	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Ala	
1				5				10				15				
His	Ser	Ser	Leu	Gly	Ser	Trp	Val	Pro	Thr	Ile	Met	Glu	Glu	Asp	Ala	
20					25					30						
Phe	Gln	Leu	Pro	Gly	Leu	Gly	Thr	Pro	Pro	Ile	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	
35					40					45						
Leu	Glu	Glu	Asp	Glu	Lys	Lys	Pro	Val	Pro	Trp	Glu	Ser	His			
50					55					60						
<210> 31																
<211> 43																
<212> PRT																
<213> 智人 (Homo sapiens)																
<400> 31																
Ser	Ser	Asn	His	Ser	Leu	Thr	Ser	Cys	Phe	Thr	Asn	Gln	Gly	Tyr	Phe	
1				5				10				15				
Phe	Phe	His	Leu	Pro	Asp	Ala	Leu	Glu	Ile	Glu	Ala	Cys	Gln	Val	Tyr	
20					25					30						
Phe	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Ser	Glu	Glu	Asp	Pro						
35					40											
<210> 32																
<211> 20																

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 32

Ala	Gly	Asp	Leu	Pro	Thr	His	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Ser	Asn	Ile	Asp
1				5					10					15	
Asp	Leu	Pro	Ser												
				20											

<210> 33

<211> 116

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 33

Gly	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly
1				5					10					15	
Glu	Glu	Arg	Met	Pro	Pro	Ser	Leu	Gln	Glu	Arg	Val	Pro	Arg	Asp	Trp
			20					25					30		
Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Thr	Pro	Gly	Val	Pro	Asp	Leu	Val
			35					40					45		
Asp	Phe	Gln	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Val	Leu	Arg	Glu	Ala	Gly	Glu	Glu
			50				55				60				
Val	Pro	Asp	Ala	Gly	Pro	Arg	Glu	Gly	Val	Ser	Phe	Pro	Trp	Ser	Arg
65					70				75					80	
Pro	Pro	Gly	Gln	Gly	Glu	Phe	Arg	Ala	Leu	Asn	Ala	Arg	Leu	Pro	Leu
				85					90					95	
Asn	Thr	Asp	Ala	Tyr	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Gln	Gly	Gln	Asp	Pro
			100					105					110		
Thr	His	Leu	Val												
			115												

<210> 34

<211> 93

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 34

Ser	Pro	Asn	Arg	Lys	Asn	Pro	Leu	Trp	Pro	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Ala
1				5					10					15	
His	Ser	Ser	Leu	Gly	Ser	Trp	Val	Pro	Thr	Ile	Met	Glu	Glu	Asp	Ala
			20					25					30		
Phe	Gln	Leu	Pro	Gly	Leu	Gly	Thr	Pro	Pro	Ile	Thr	Lys	Leu	Thr	Val
			35				40						45		

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser
 50 55 60
 Ser Glu Thr Cys Gly Leu Pro Thr Leu Val Gln Thr Tyr Val Leu Gln
 65 70 75 80
 Gly Asp Pro Arg Ala Val Ser Thr Gln Pro Gln Ser Gln
 85 90

<210> 35

<211> 43

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 35

Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe
 1 5 10 15
 Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys Gln Val Tyr
 20 25 30
 Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro
 35 40

<210> 36

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 36

Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr Leu Pro Ser Asn Ile Asp
 1 5 10 15
 Asp Leu Pro Ser
 20

<210> 37

<211> 116

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 37

Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp
 20 25 30
 Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val
 35 40 45
 Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu
 50 55 60

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 41

Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly

20 25 30

Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser

35 40 45

Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr

50 55 60

Gln Asn Gln

65

<210> 42

<211> 93

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 42

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala

1 5 10 15

His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala

20 25 30

Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val

35 40 45

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser

50 55 60

Ser Glu Thr Cys Gly Leu Pro Thr Leu Val Gln Thr Tyr Val Leu Gln

65 70 75 80

Gly Asp Pro Arg Ala Val Ser Thr Gln Pro Gln Ser Gln

85 90

<210> 43

<211> 77

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 43

Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro

1 5 10 15

His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr

20 25 30

Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro

35	40	45
Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu		
50	55	60
Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln		
65	70	75
<210> 44		
<211> 861		
<212> DNA		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 44		
aactgcagga acaccgggcc atggtctgaag aaggtctctga agtgtaacac cccagacccc 60		
tcgaagttct tttcccagct gagctcagag catggaggag acgtccagaa gtggctctct 120		
tcgcccttcc cctcatcgtc cttcagccct ggcggcctgg cacctgagat ctgccacta 180		
gaagtgctgg agagggacaa ggtgacgcag ctgctcctgc agcaggacaa ggtgcctgag 240		
ccgcatacct taagcagcaa ccactcgctg accagctgct tcaccaacca gggttacttc 300		
ttcttccacc tcccggatgc cttggagata gaggcctgcc aggtgtactt tacttacgac 360		
ccctactcag aggaagaccc tgatgagggt gtggccgggg caccacagg gtcttcccc 420		
caaccctgc agcctctgtc aggggaggac gacgcctact gcaccttccc ctccagggat 480		
gacctgctgc tcttctcccc cagtctcctc ggtggcccca gcccccaag cactgcccct 540		
gggggcagtg gggccggtga agagaggatg ccccttctt tgcaagaaag agtccccaga 600		
gactgggacc cccagcccct ggggcctccc acccaggag tcccagacct ggtggatttt 660		
cagccacccc ctgagctggt gctgcgagag gctggggagg aggtccctga cgctggcccc 720		
agggaggagg tcagtttccc ctggtccagg cctcctgggc agggggagtt cagggccctt 780		
aatgctcgcc tgcccctgaa cactgatgcc tacttgtccc tccaagaact ccagggtcag 840		
gacccaactc acttgggtga g 861		
<210> 45		
<211> 261		
<212> DNA		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 45		
gaacggacga tgccccgaat tcccacctg aagaacctag aggatcttgt tactgaatac 60		
cacgggaact tttcggcctg gagtggtgtg tctaaggac tggctgagag tctgcagcca 120		
gactacagtg aacgactctg cctcgtcagt gagattcccc caaaaggagg ggcccttggg 180		
gaggggcctg gggcctcccc atgcaaccag catagccct actgggcccc cccatgttac 240		
accctaaagc ctgaaacctg a 261		
<210> 46		
<211> 303		
<212> DNA		
<213> 智人 (Homo sapiens)		

<400> 46

aataagcgag acctaattaa aaaacacatc tggcctaatag ttccagatcc ttcaaagagt 60
catattgccc agtgggtcacc tcacactcct ccaaggcaca attttaattc aaaagatcaa 120
atgtatttcag atggcaatct cactgatgta agtggtgtgg aaatagaagc aaatgacaaa 180
aagccttttc cagaagatct gaaatcattg gacctgttca aaaaggaaaa aattaatact 240
gaaggacaca gcagtgggtat tgggggggtct tcatgtatgt catcttctag gccaaagcatt 300
tct 303

<210> 47

<211> 618

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 47

gcataccttaa gcagcaacca ctgctgacc agctgcttca ccaaccaggg ttactttctt 60
ttccacctcc cggatgcctt ggagatagag gcctgccagg tgtactttac ttacgacccc 120
tactcagagg aagaccctga tgagggtgtg gccggggcac ccacagggtc ttccccccaa 180
cccctgcagc ctctgtcagg ggaggacgac gcctactgca ctttcccctc cagggatgac 240
ctgctgctct tctccccag tctcctcggt ggccccagcc cccaagcac tgcccctggg 300
ggcagtgggg ccggtgaaga gaggatgccc ctttctttgc aagaaagagt cccagagac 360
tgggaccccc agccccctgg gcctcccacc ccaggagtcc cagacctggt ggattttcag 420
ccacccccctg agctgggtgct gcgagaggct ggggaggagg tccctgacgc tggccccagg 480
gaggagtgca gtttccccctg gtccaggcct cctgggcagg gggagttcag ggcccttaat 540
gctcgccctgc cctgaacac tgatgcctac ttgtccctcc aagaactcca gggtcaggac 600
ccaactcact tgggtgtag 618

<210> 48

<211> 186

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 48

agcccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60
ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttc agctgcccg ctttggcacg 120
ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180
tcccat 186

<210> 49

<211> 609

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 49

agcagcaacc actcgctgac cagctgcttc accaaccagg gttacttctt cttccacctc 60
ccggatgcct tggagataga ggcctgccag gtgtacttta cttacgaccc ctactcagag 120

gaagaccctg atgaggggtgt ggccggggca cccacagggt cttccccca acccctgcag 180
cctctgtcag gggaggacga cgcctactgc accttccct ccagggatga cctgctgctc 240
ttctccccca gtctcctcgg tggccccagc cccccaagca ctgcccctgg gggcagtggg 300
gccggtgaag agaggatgcc cctttctttg caagaaagag tccccagaga ctgggacccc 360
cagccccctgg ggccctccac cccaggagtc ccagacctgg tggattttca gccaccccct 420
gagctggtgc tgcgagaggc tggggaggag gtccctgacg ctggccccag ggagggagtc 480
agtttccctt ggtccaggcc tcctgggcag ggggagtta gggcccttaa tgctgcctg 540
cccctgaaca ctgatgccta cttgtccctc caagaactcc agggtcagga cccaactcac 600
ttggtgtag 609

<210> 50

<211> 201

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 50

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtccag acccagctca cagcagcctg 60
ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttc agctgcccg ccttggcacg 120
ccaccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180
tcccataaca gctcagagac c 201

<210> 51

<211> 219

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 51

gcaggtgacc ttcccacca tgatggctac ttacctcca acatagatga cctcccctca 60
catgaggcac ctctcgctga ctctctggaa gaactggagc ctcagcacat ctccctttct 120
gttttccctt caagttctct tcaccactc acctctcct gtggtgataa gctgactctg 180
gatcagttaa agatgaggtg tgactccctc atgctctga 219

<210> 52

<211> 201

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 52

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtccag acccagctca cagcagcctg 60
ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttc agctgcccg ccttggcacg 120
ccaccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180
tcccataaca gctcagagac c 201

<210> 53

<211> 93

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列描述:合成寡核苷酸

<400> 53

agccctgggg acgaaggacc cccccggagc tacctccgcc agtgggtggt cattcctccg 60
ccactttcga gccctggacc ccaggccagc taa 93

<210> 54

<211> 189

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 54

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60
ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120
ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180
tcccataac 189

<210> 55

<211> 549

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列描述:合成多核苷酸

<400> 55

cagaactcgg ggggctcagc ttacagttag gagagggatc ggccatacgg cctggtgtcc 60
attgacacag tgactgtgct agatgcagag gggccatgca cctggccctg cagctgtgag 120
gatgacggct acccagccct ggacctggat gctggcctgg agcccagccc aggcctagag 180
gacccactct tggatgcagg gaccacagtc ctgtcctgtg gctgtgtctc agctggcagc 240
cctgggctag gagggcccct gggaagcctc ctggacagac taaagccacc ccttgcatat 300
ggggaggact gggctggggg actgccctgg ggtggccggt cacctggagg ggtctcagag 360
agtgaggcgg gctcaccctt ggccggcctg gatatggaca cgtttgacag tggctttgtg 420
ggctctgact gcagcagccc tgtggagtgt gacttcacca gccctgggga cgaaggaccc 480
ccccggagct acctccgcca gtgggtggtc attcctccgc cactttcgag ccctggaccc 540
caggccagc 549

<210> 56

<211> 279

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 56

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60
ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120

ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180
tcccataaca gctcagagac ctgtggcctc cccactctgg tccagaccta tgtgtctccag 240
ggggacccaa gagcagtttc caccagcccc caatcccag 279

<210> 57

<211> 609

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 57

agcagcaacc actcgctgac cagctgcttc accaaccagg gttacttctt cttccacctc 60
ccggatgcct tggagataga ggctgccag gtgtacttta cttacgacct ctactcagag 120
gaagaccctg atgagggtgt ggccggggca cccacagggt cttcccccca acccctgcag 180
cctctgtcag gggaggacga cgctaactgc acctccccct ccagggatga cctgctgctc 240
ttctccccca gtctcctcgg tggccccagc cccccaagca ctgcccctgg gggcagtggg 300
gccggtgaag agaggatgcc cccttctttg caagaaagag tccccagaga ctgggacccc 360
cagccccctgg ggctcccccac cccaggagtc ccagacctgg tggattttca gccacccccct 420
gagctgggtgc tgcgagaggc tggggaggag gtccctgacg ctggccccag ggagggagtc 480
agtttccccct ggtccaggcc tcctgggcag ggggagtta gggcccttaa tgctgcctg 540
cccctgaaca ctgatgccta cttgtccctc caagaactcc agggtcagga cccaactcac 600
ttgggtgtag 609

<210> 58

<211> 186

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 58

agcccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtccag acccagctca cagcagcctg 60
ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120
ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180
tcccat 186

<210> 59

<211> 129

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 59

agcagcaacc actcgctgac cagctgcttc accaaccagg gttacttctt cttccacctc 60
ccggatgcct tggagataga ggctgccag gtgtacttta cttacgacct ctactcagag 120
gaagaccct 129

<210> 60

<211> 60

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 60

gcaggtgacc ttcccaccca tgatggctac ttaccctcca acatagatga cctcccctca 60

<210> 61

<211> 351

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 61

ggtggcccca gcccccaag cactgcccct gggggcagtg gggccggtga agagaggatg 60
cccccttctt tgcaagaaag agtccccaga gactgggacc cccagcccct ggggcctccc 120
accccaggag tcccagacct ggtggatttt cagccacccc ctgagctggt gctgcgagag 180
gctggggagg aggtccctga cgtgggcccc agggaggagag tcagtttccc ctggtccagg 240
cctcctgggc agggggagtt cagggccett aatgctcgcc tgcccctgaa cactgatgcc 300
tacttgtccc tccaagaact ccagggtcag gacccaactc acttggtgta g 351

<210> 62

<211> 279

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 62

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60
ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120
ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180
tcccataaca gctcagagac ctgtggcctc cccactctgg tccagaccta tgtgtccag 240
ggggacccaa gagcagtttc caccagccc caatcccag 279

<210> 63

<211> 129

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 63

agcagcaacc actcgctgac cagctgcttc accaaccagg gttacttctt cttccacctc 60
ccggatgcct tggagataga ggctgccag gtgtacttta cttacgacct ctactcagag 120
gaagaccct 129

<210> 64

<211> 60

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 64

gcaggtgacc ttcccaccca tgatggctac ttaccctcca acatagatga cctcccctca 60

<210> 65

<211> 351

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 65

```
ggtggcccca gcccccaag cactgcccct gggggcagt gggccggtga agagaggatg 60
cccccttctt tgcaagaaag agtccccaga gactgggacc cccagcccct ggggcctccc 120
accccaggag tcccagacct ggtggatttt cagccacccc ctgagctggt gctgcgagag 180
gctggggagg aggtccctga cgctggcccc agggaggagag tcagtttccc ctggtccagg 240
cctcctgggc agggggagtt cagggccctt aatgctcgcc tgcccctgaa cactgatgcc 300
tacttgtccc tccaagaact ccagggtcag gacccaactc acttggtgta g 351
```

<210> 66

<211> 414

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列描述:合成多核苷酸

<400> 66

```
aataagcgag acctaattaa aaaacacatc tggcctaatag ttccagatcc ttcaaagagt 60
catattgccc agtggtcacc tcacactcct ccaaggcaca atttcaattc aaaggatcaa 120
atgtattcag atggcaattt cactgatgta agtgttgtgg aaatagaagc aaatgacaaa 180
aagccttttc cagaagatct gaaatcattg gacctgttca aaaaggaaaa aattaatact 240
gaaggacaca gcagtgggat tgggggggtct tcatgtatgt catcttctag gccaagcatt 300
tctagcagtg atgaaaatga atcttcacaa aacacttcga gcactgtcca gtattctacc 360
gtggtacaca gtggctacag acaccaagtt ccgtcagtc aagtcttctc aaga 414
```

<210> 67

<211> 618

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列描述:合成多核苷酸

<400> 67

```
gcataccttaa gcagcaacca ctctctgacc agctgcttca ccaaccaggg ttactttcttc 60
ttccacctcc cggatgcctt ggagatagag gcctgccagg tgtactttac ttacgacccc 120
tactcagagg aagaccctga tgagggtgtg gccggggcac ccacagggtc ttccccccaa 180
cccctgcagc ctctgtcagg ggaggacgac gcctactgca ccttcccctc cagggatgac 240
ctgctgctct tctccccag tctcctcggt ggccccagcc cccaagcac tgcccctggg 300
ggcagtgggg ccggtgaaga gaggatgcc cttctttgc aagaaagagt cccagagac 360
tgggaccccc agcccctggg gcctcccacc ccaggagtcc cagacctggt ggattttcag 420
ccaccccctg agctggtgct gcgagaggct ggggaggagg tccctgacgc tggccccagg 480
```

gagggagtca gtttcccctg gtccaggcct cctgggcagg gggagttcag ggcccttaat 540
gctcgccctgc ccctgaacac tgatgcctac ttgtccctcc aagaactcca gggtcaggac 600
ccaactcact tgggtgtag 618

<210> 68

<211> 186

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 68

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60
ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120
ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggg gccctgggag 180
tcccat 186

<210> 69

<211> 204

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 69

agtggcaaga atgggcctca tgtgtaccag gacctcctgc ttagccttgg gactacaaac 60
agcacgtgc cccctccatt ttctctccaa tctggaatcc tgacattgaa ccagttgct 120
cagggtcagc ccattcttac ttccctggga tcaaatcaag aagaagcata tgtcaccatg 180
tccagcttct accaaaacca gtga 204

<210> 70

<211> 279

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 70

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60
ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120
ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggg gccctgggag 180
tcccataaca gctcagagac ctgtggcctc cccactctgg tccagaccta tgtgtctccag 240
ggggacccaa gagcagtttc caccagccc caatcccag 279

<210> 71

<211> 234

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 71

tcctcttcca ggtccctaga ctgcaggag agtggcaaga atgggcctca tgtgtaccag 60
gacctcctgc ttagccttgg gactacaaac agcacgtgc cccctccatt ttctctccaa 120
tctggaatcc tgacattgaa ccagttgct cagggtcagc ccattcttac ttccctggga 180

tcaaatcaag aagaagcata tgtcaccatg tccagcttct accaaaacca gtga 234

<210> 72

<211> 174

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 72

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val

35 40 45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys

50 55 60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser

65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser

85 90 95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp

100 105 110

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro

115 120 125

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe

130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe

145 150 155 160

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

165 170

<210> 73

<211> 1405

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 73

agcccgagc ctgcagccca gcccaccca gacccatggc tggacctgcc acccagagcc 60

ccatgaagct gatggccctg cagctgtctg tgtggcacag tgcactctgg acagtgcagg 120

aagccacccc cctggggcct gccagctccc tgccccagag cttctctgctc aagtgtcttag 180

agcaagtgag gaagatccag ggcgatggcg cagcgtcca ggagaagctg gtgagtgagg 240

caggctgctt gagccaactc catagcggcc ttttctctta ccaggggctc ctgcaggccc 300

tggaagggat ctccccgag ttgggtccca ccttgacac actgcagctg gacgtcgccg 360

actttgccac caccatctgg cagcagatgg aagaactggg aatggcccct gccctgcage 420
 ccacccaggg tgccatgccg gccttcgcct ctgctttcca gcgccgggca ggaggggtcc 480
 tggttgcctc ccatctgcag agcttcctgg aggtgtcgta ccgcgttcta cgccaccttg 540
 cccagccctg agccaagccc tccccatccc atgtatttat ctctatttaa tatttatgtc 600
 tatttaagcc tcatatttaa agacagggaa gagcagaacg gagccccagg cctctgtgtc 660
 cttccctgca tttctgagtt tcatttcctt gcctgtagca gtgagaaaaa gtcctgtgcc 720
 tcccatcccc tggactggga ggtagatagg taaataccaa gtatttatta ctatgactgc 780
 tccccagccc tggctctgca atgggcaactg ggatgagccg ctgtgagccc ctggctcctga 840
 gggccccac ctgggaccct tgagagtatc aggtctccca cgtgggagac aagaaatccc 900
 tgtttaatat ttaaacagca gtgttcccca tctgggtcct tgcaccctc actctggcct 960
 cagccgactg cacagcggcc cctgcatccc cttggctgtg aggcccttg acaagcagag 1020
 gtggccagag ctgggaggca tggccctggg gtcccacgaa tttgctgggg aatctcgttt 1080
 ttcttcttaa gacttttggg acatggtttg actcccgaac atcaccgacg cgtctcctgt 1140
 ttttctgggt ggccctcgga cacctgccct gccccacga gggtcaggac tgtgactctt 1200
 tttagggcca ggcagtgcc tggacatttg cttgtctgga cggggactgg ggatgtggga 1260
 gggagcagac aggaggaatc atgtcaggcc tgttgttgaa aggaagctcc actgtcacc 1320
 tccacctctt cccccccac tcaccagtgt cccctccact gtcacattgt aactgaactt 1380
 caggataata aagtgtttgc ctcca 1405

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 74

Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 75

Ile Trp Pro Asn Val Pro Asp Pro Ser

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 76

Leu Lys Cys Asn Thr Pro Asp Pro Ser

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 77

Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 78

Cys Ser Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala

1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 79

Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys

1 5

<210> 80

<211> 175

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列描述:合成多肽

<400> 80

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu

1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu

20 25 30

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu

35 40 45

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser

50 55 60

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His

65 70 75 80

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile

				85					90					95		
Ser	Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Val	Ala	
				100					105					110		
Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Ile	Trp	Gln	Gln	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Ala	
				115					120					125		
Pro	Ala	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met	Pro	Ala	Phe	Ala	Ser	Ala	
				130					135					140		
Phe	Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gln	Ser	
				145										150		
														155		
Phe	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	His	Leu	Ala	Gln	Pro		
				165										170		
														175		

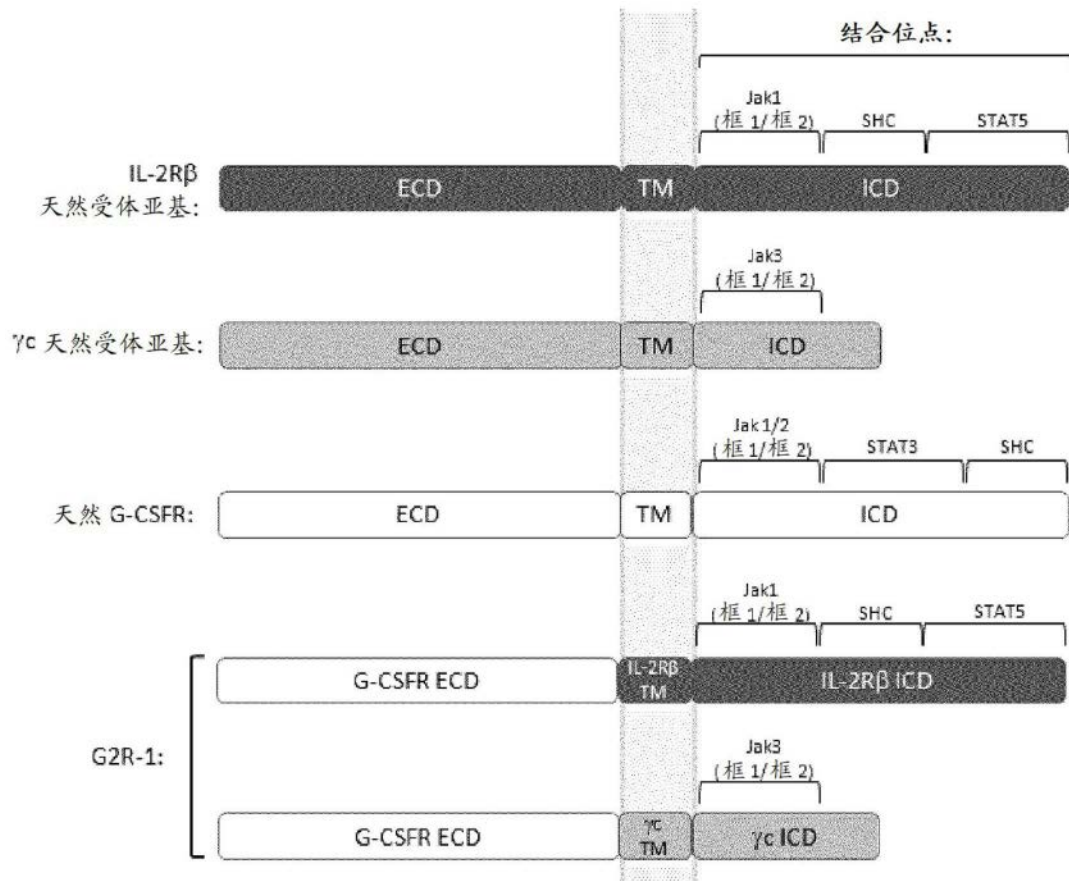


图1

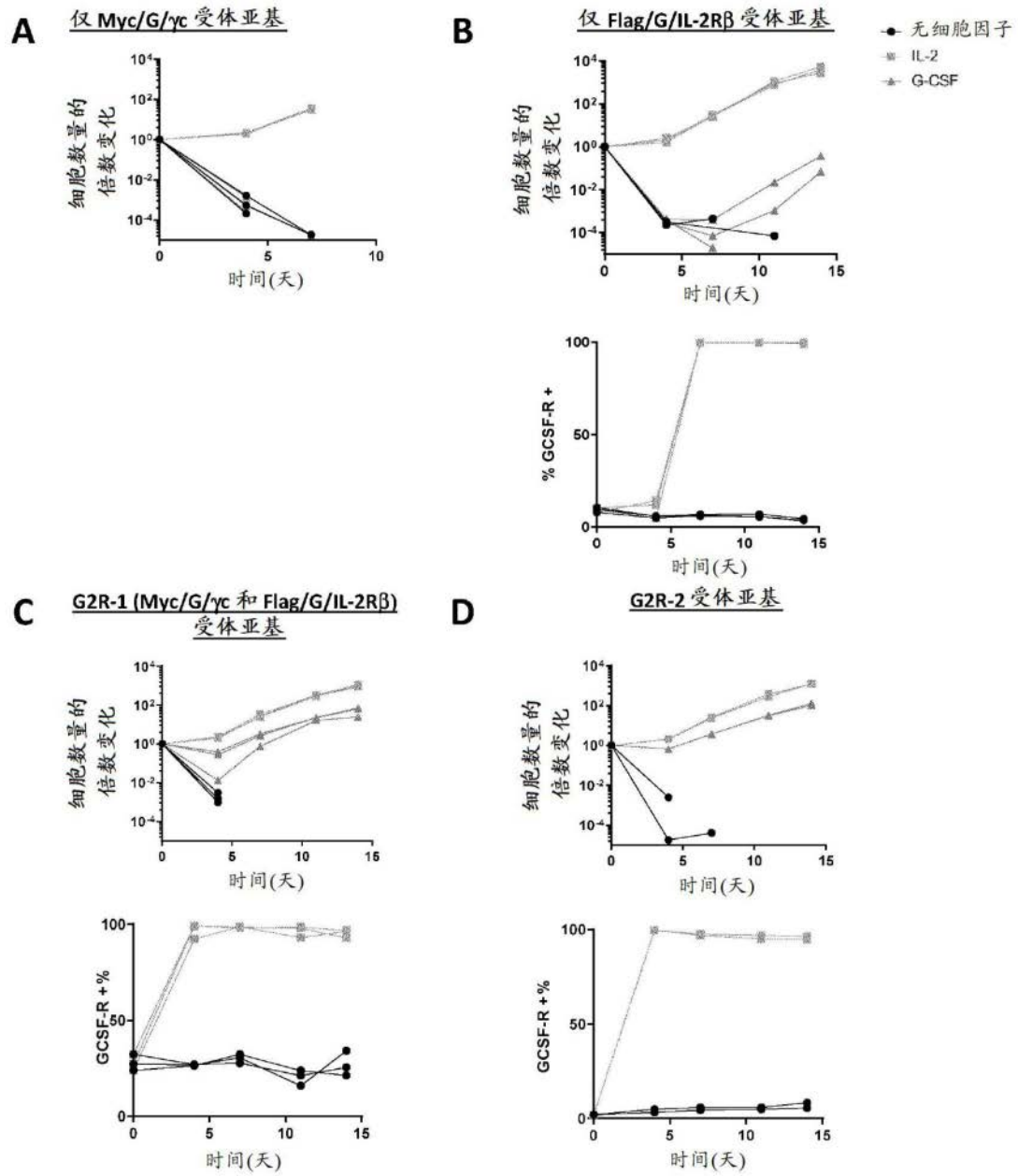


图2

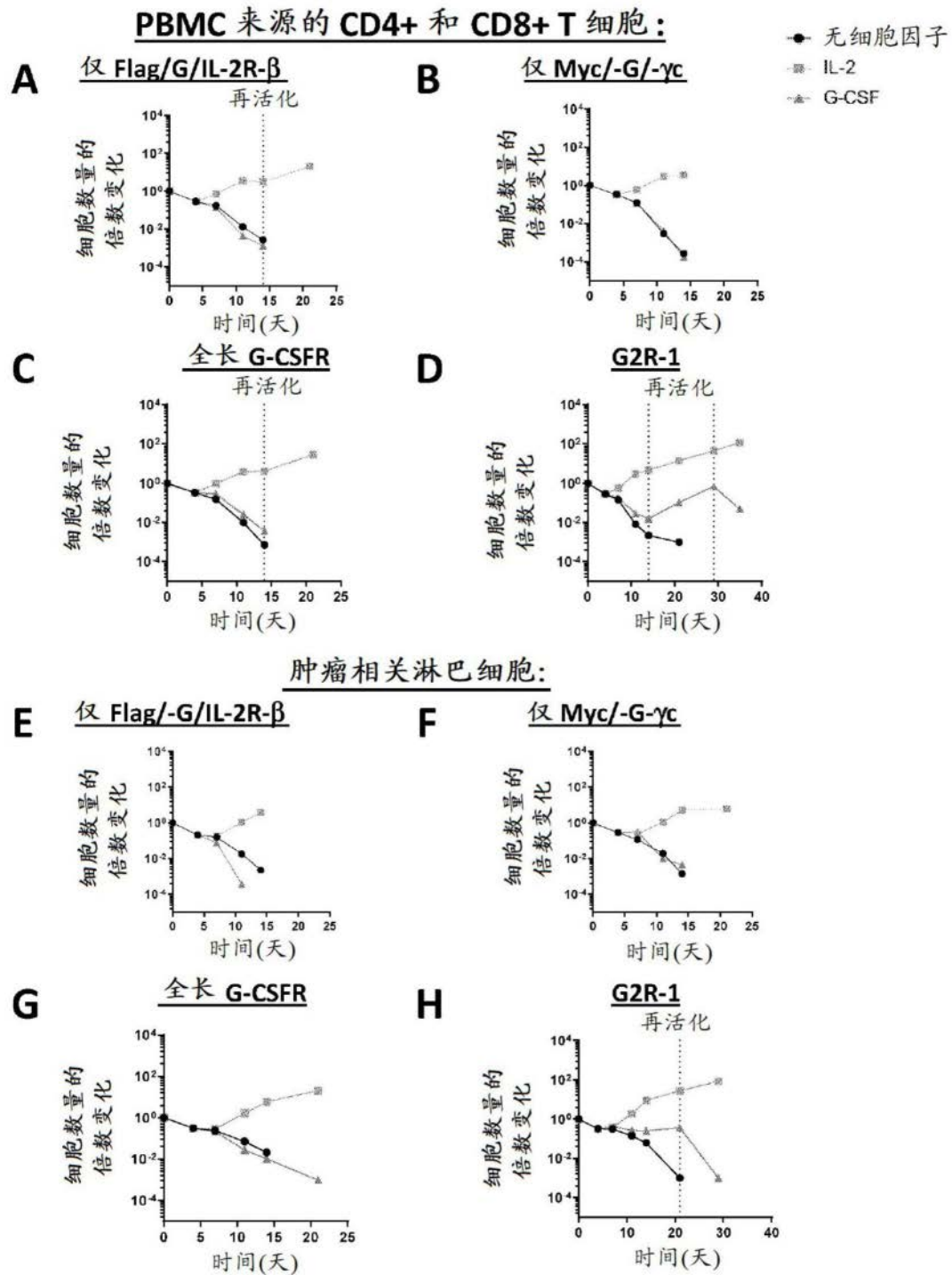


图3

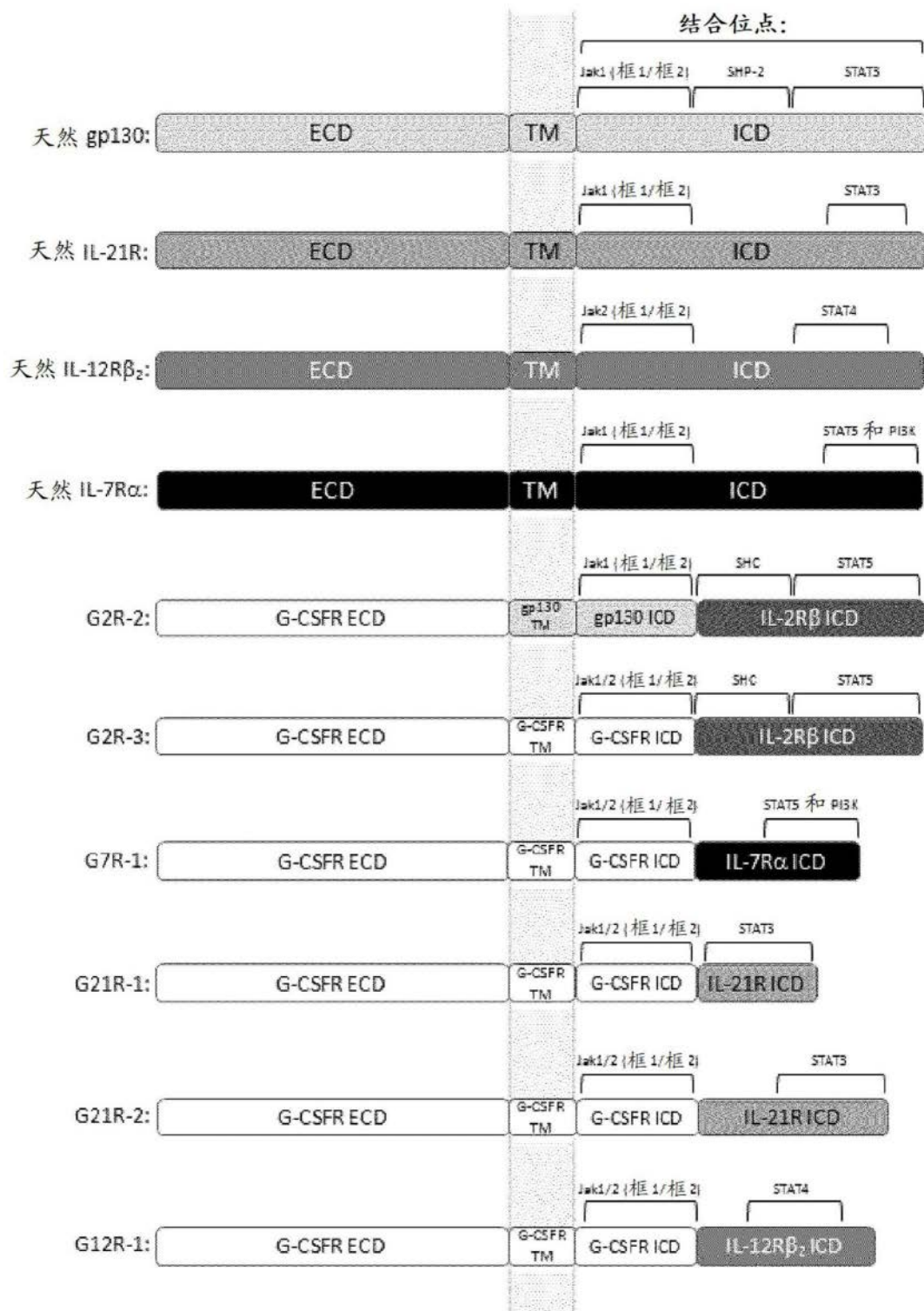


图4

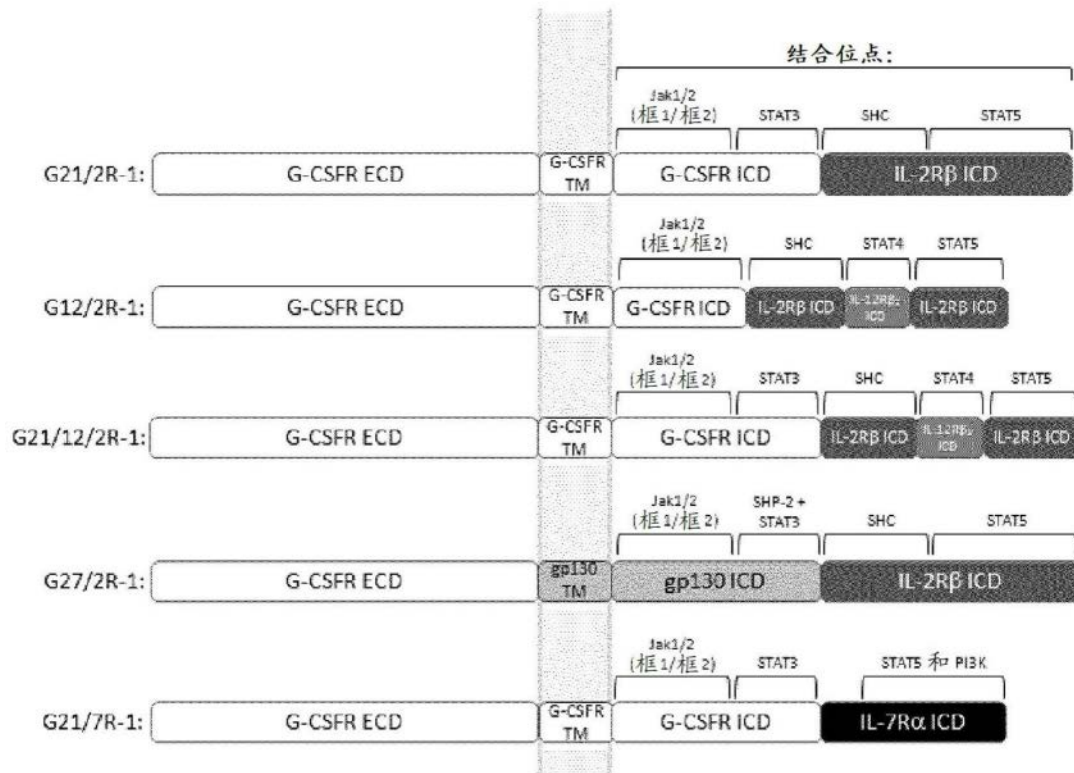


图5

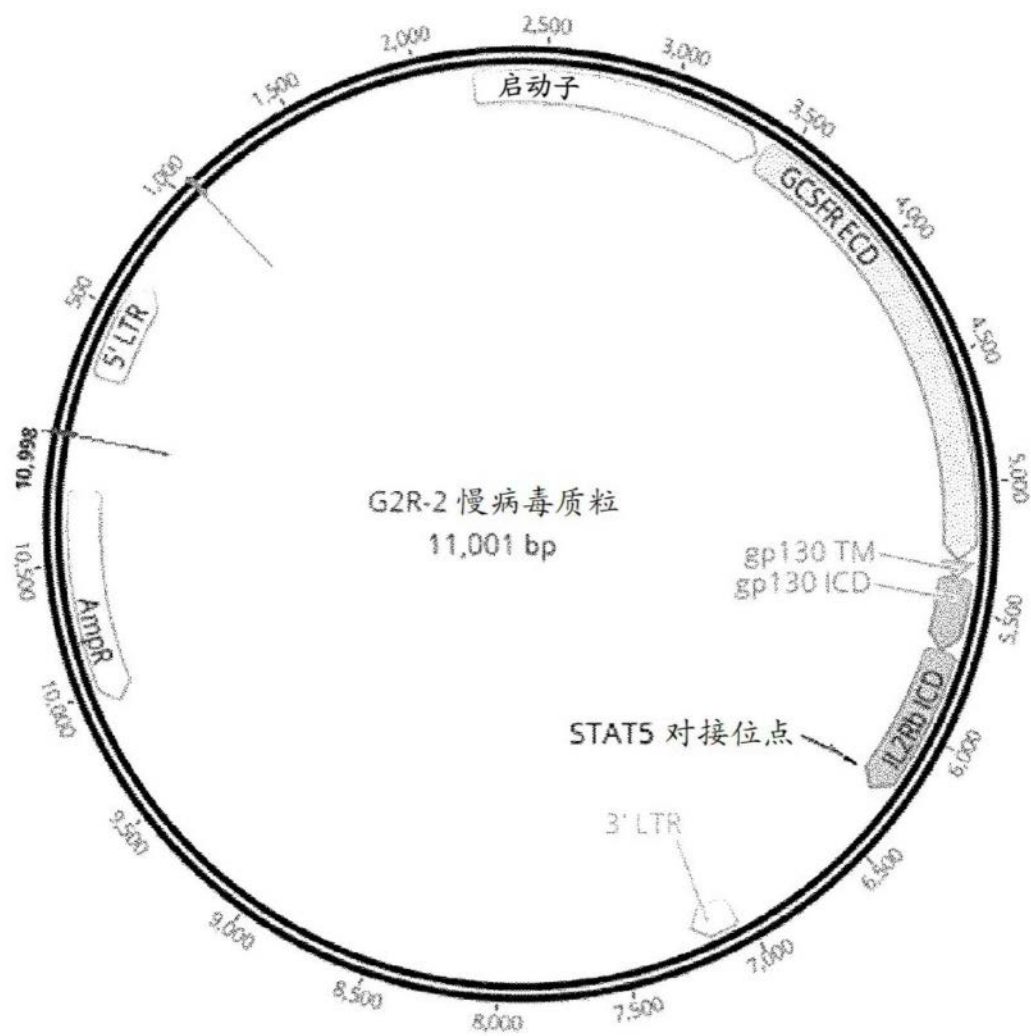


图6

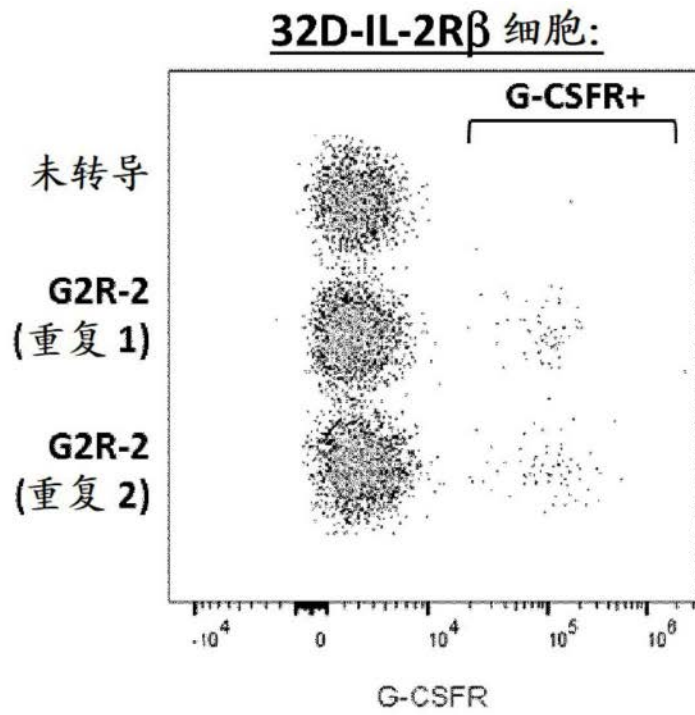
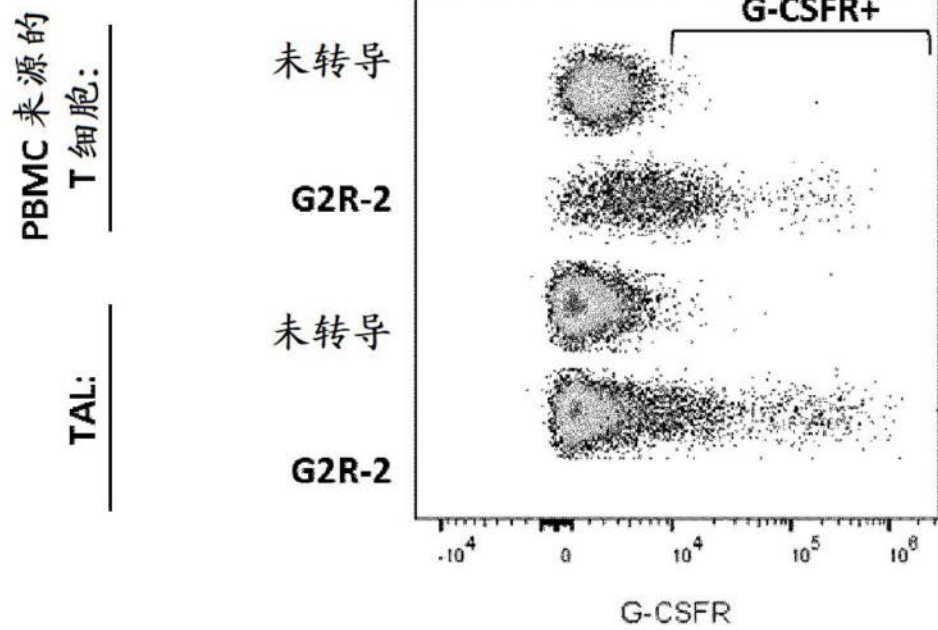
A**B**

图7

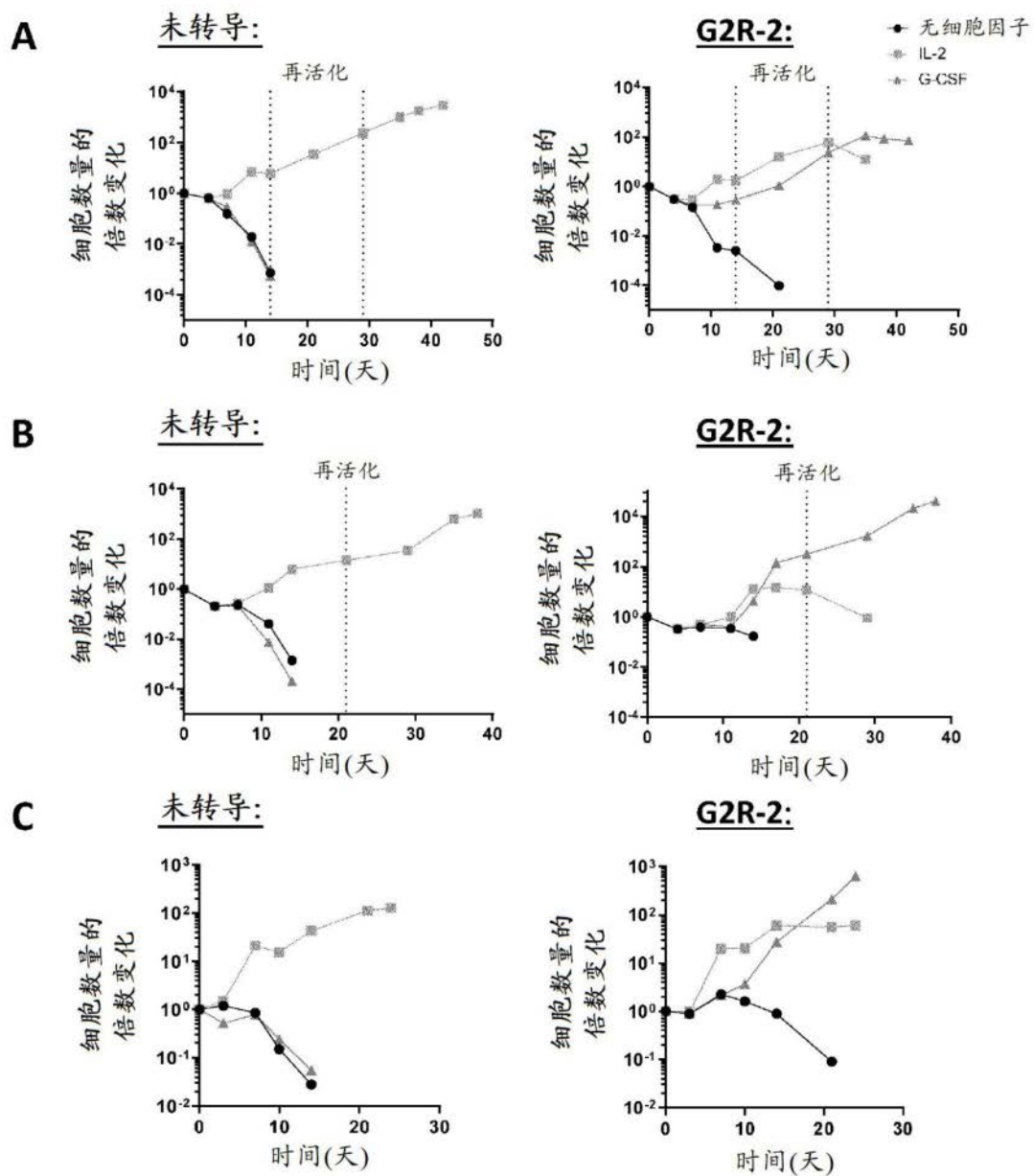


图8

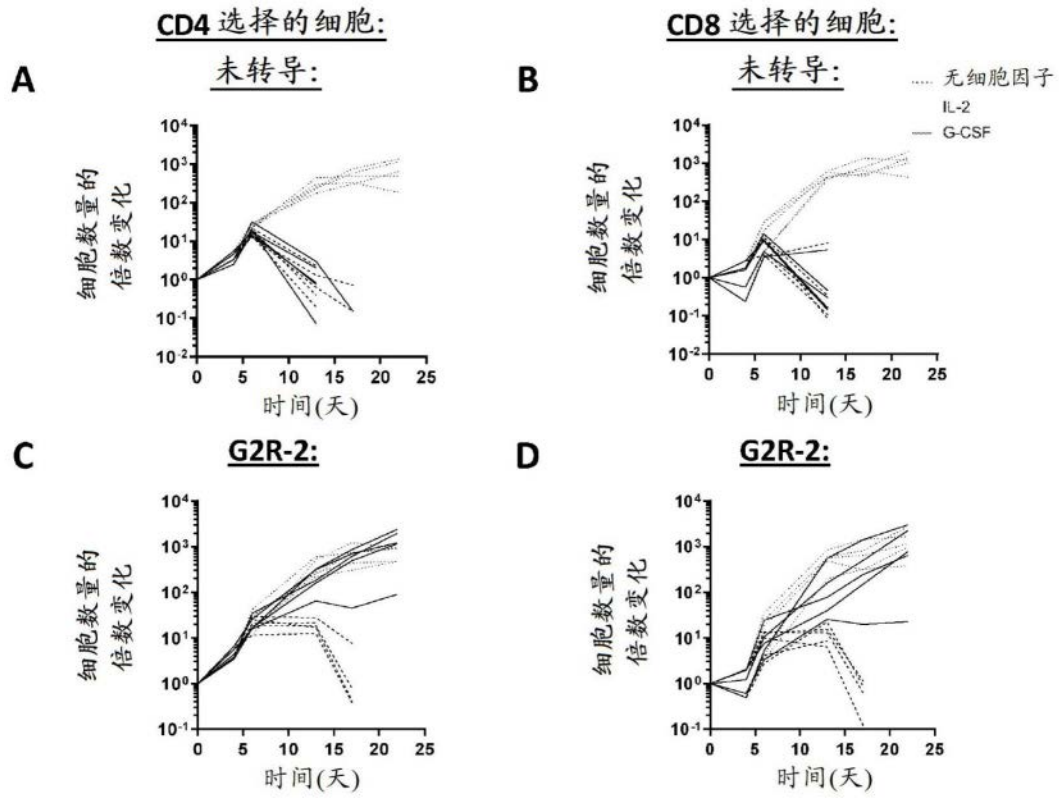


图9

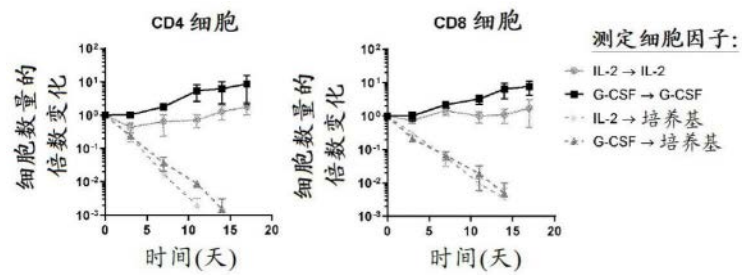


图10

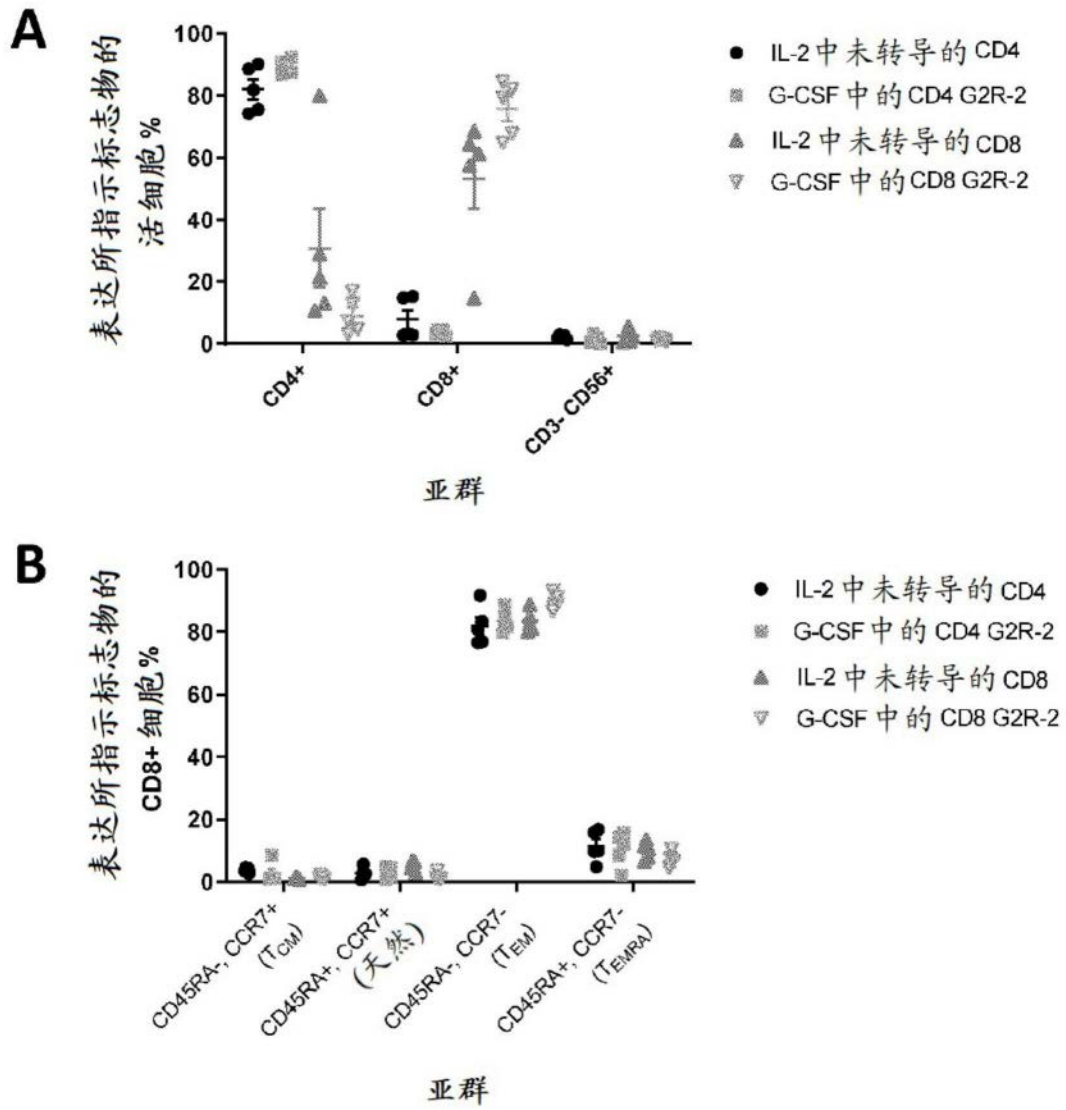


图11

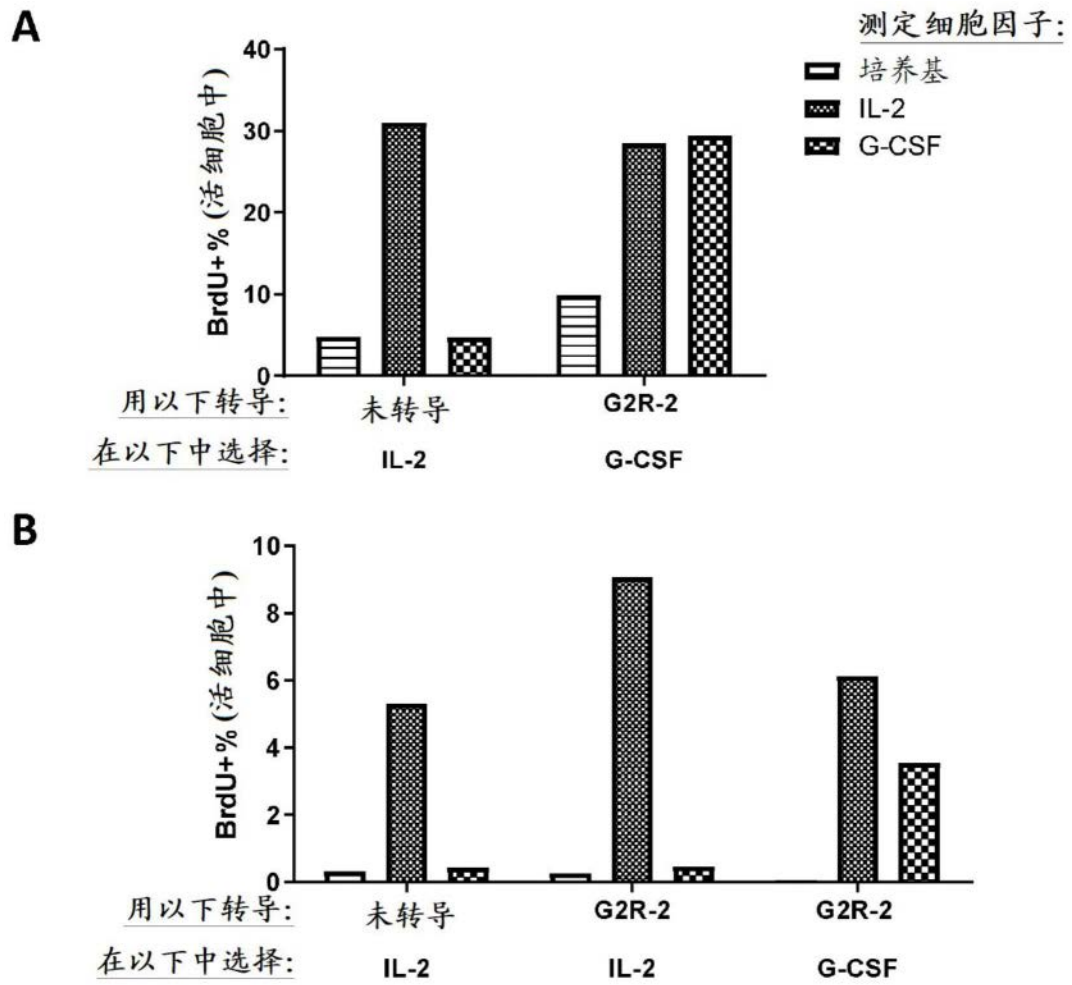


图12

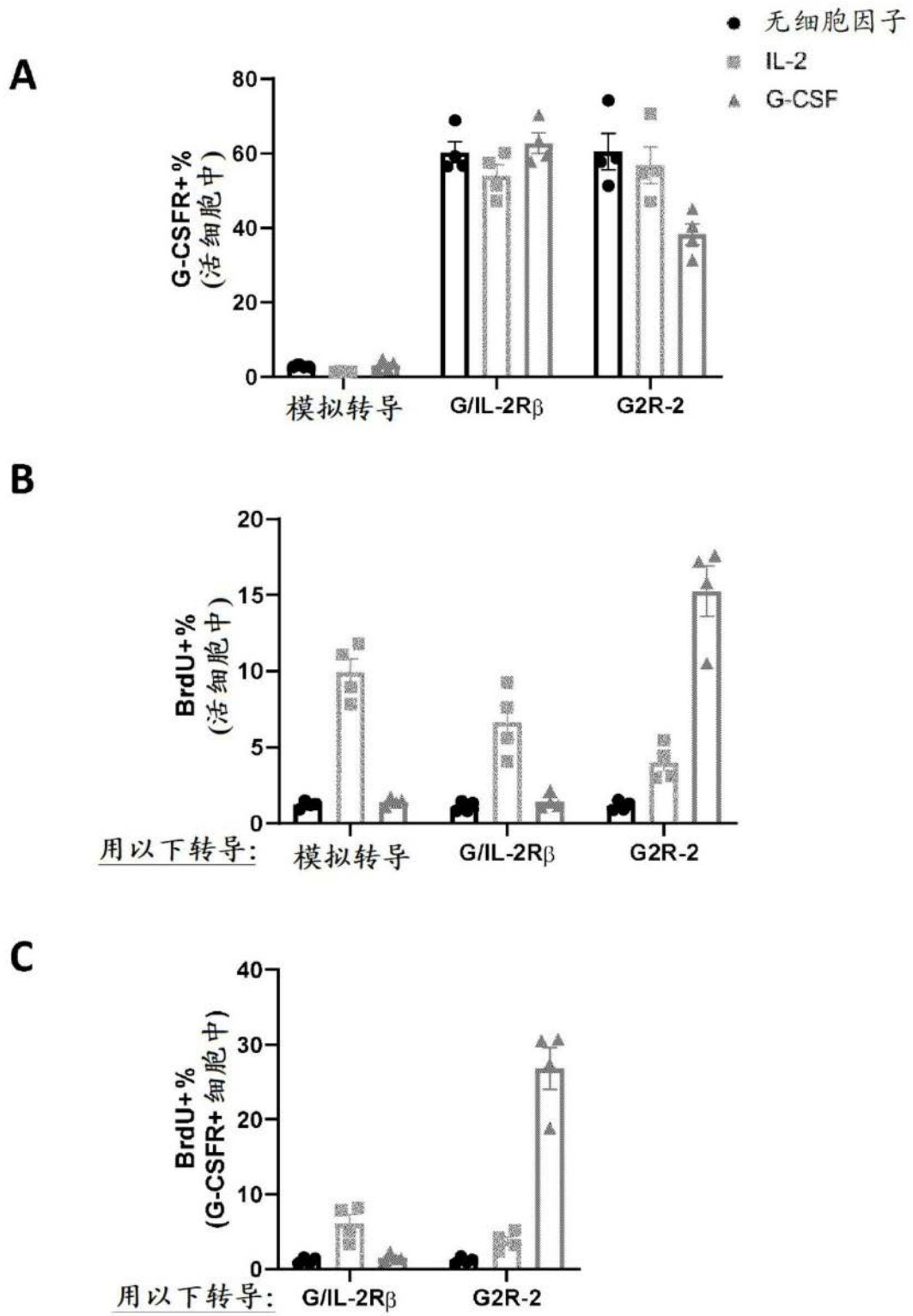


图13

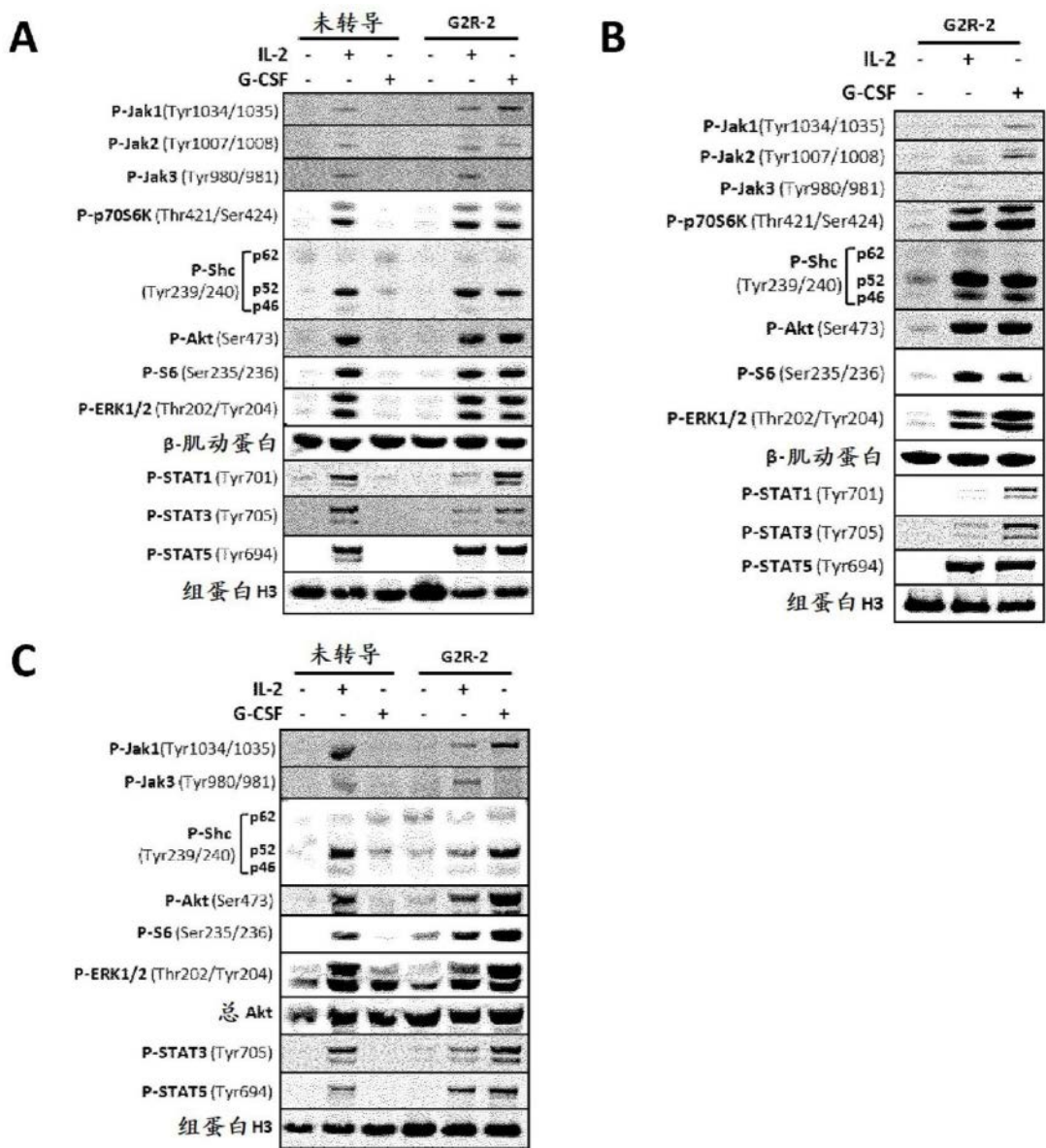


图14

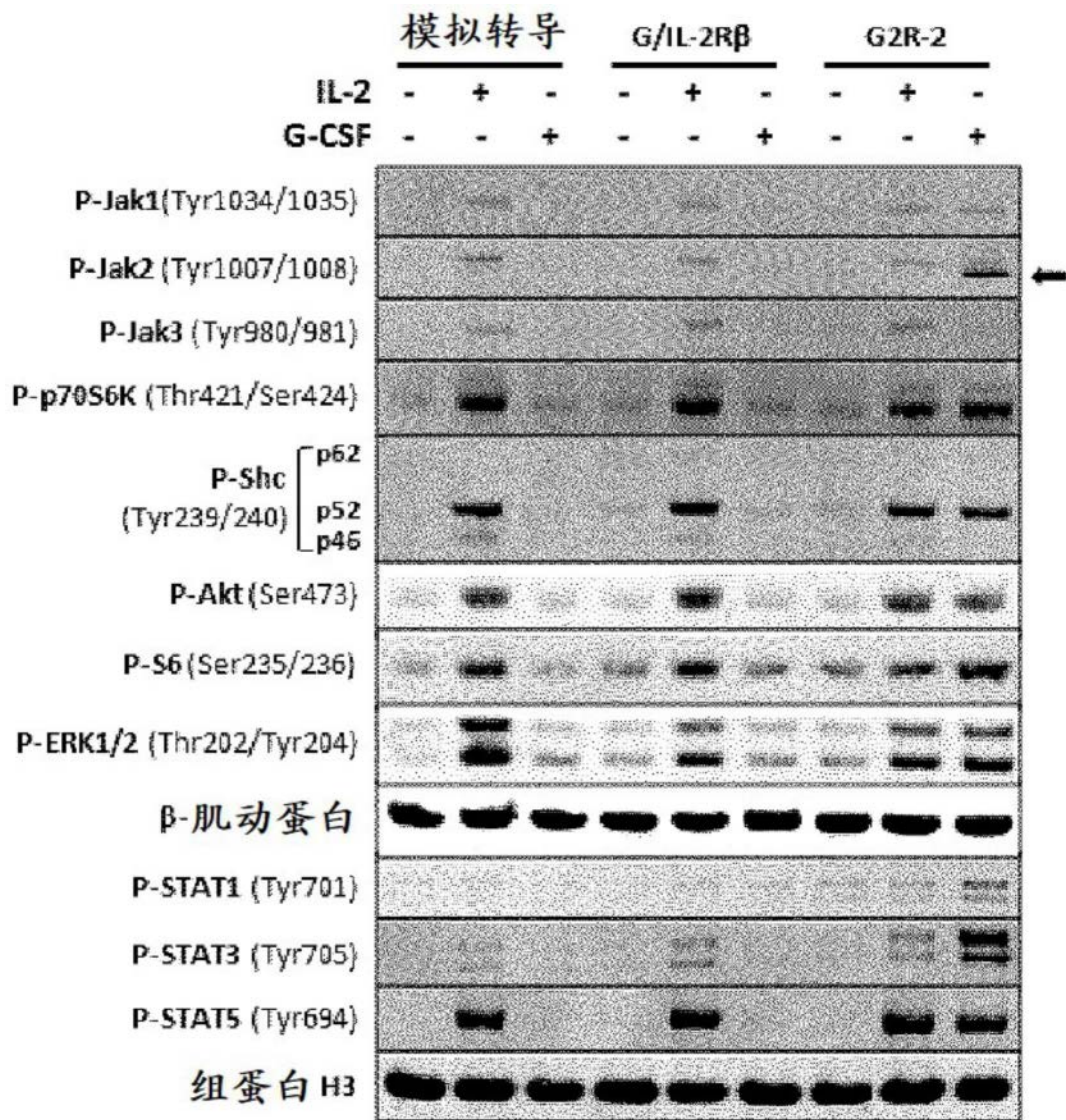


图15

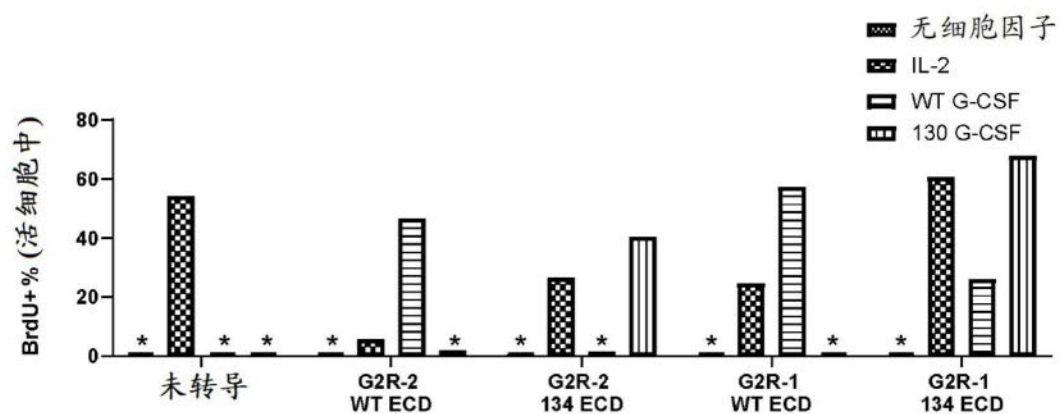


图16

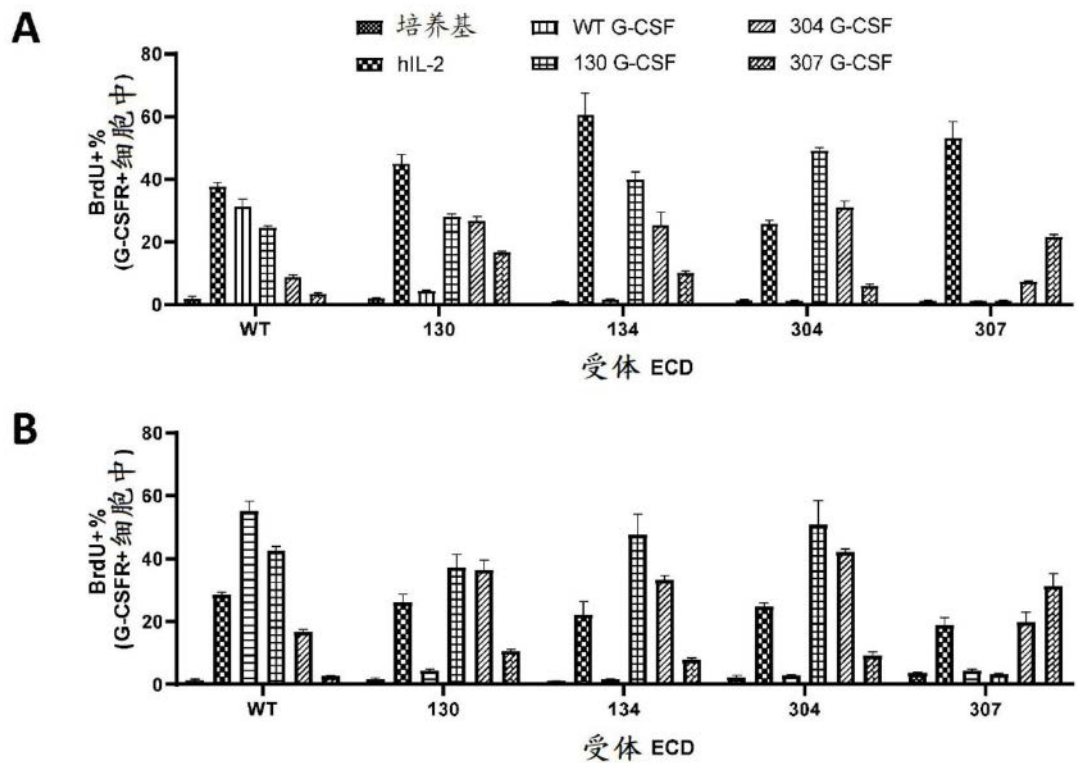


图17

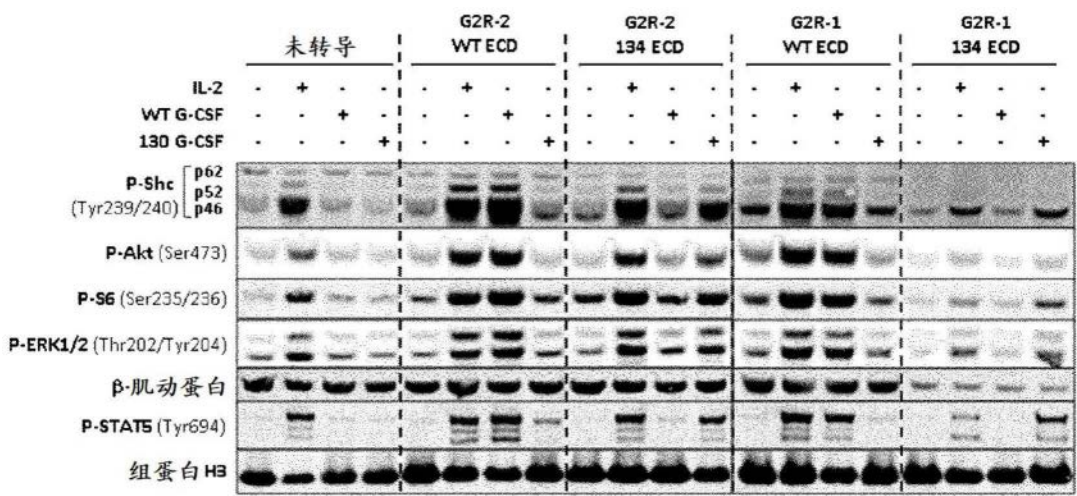


图18

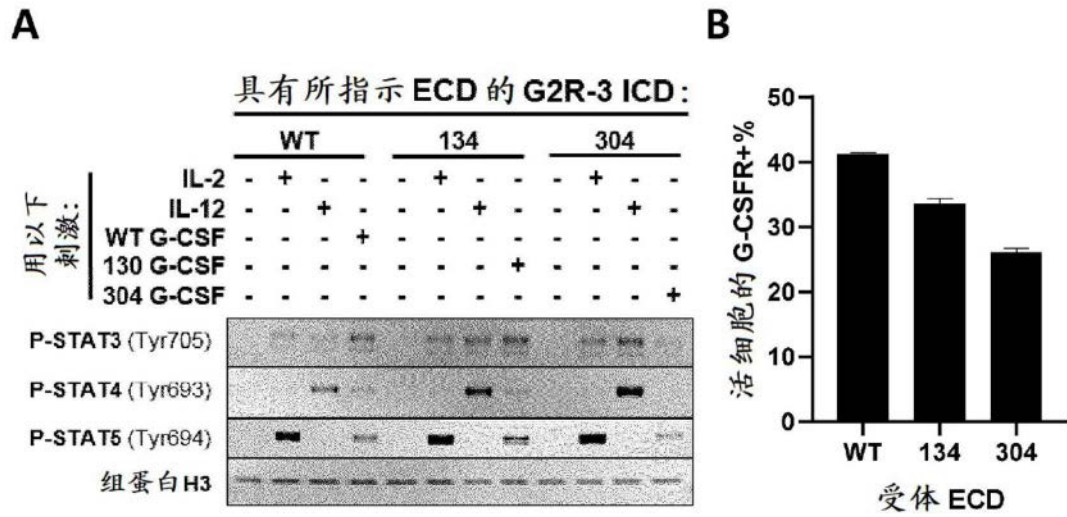


图19

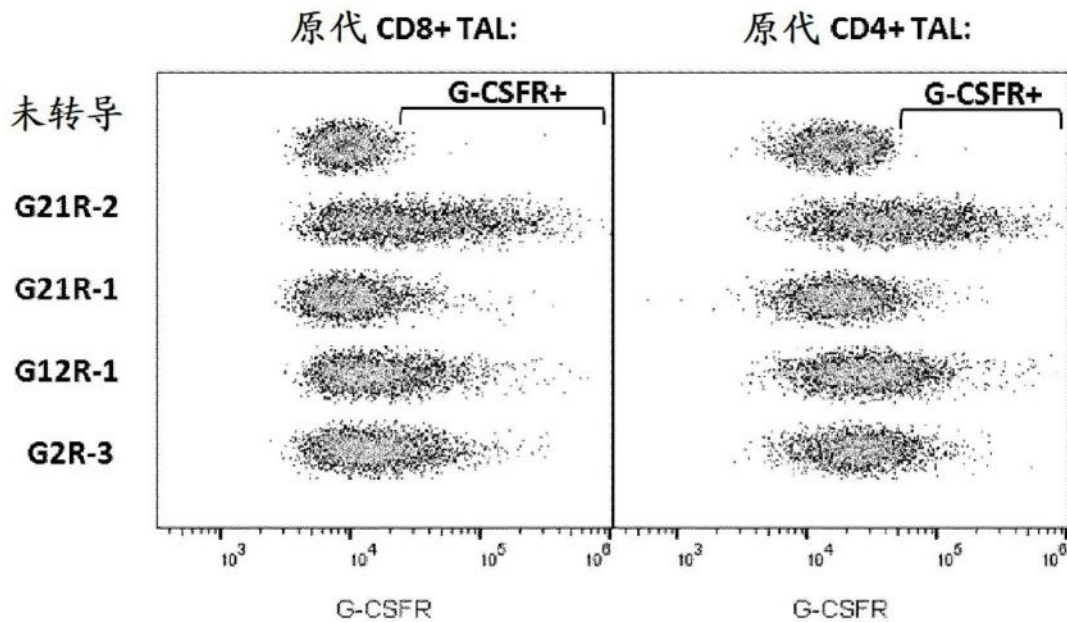


图20

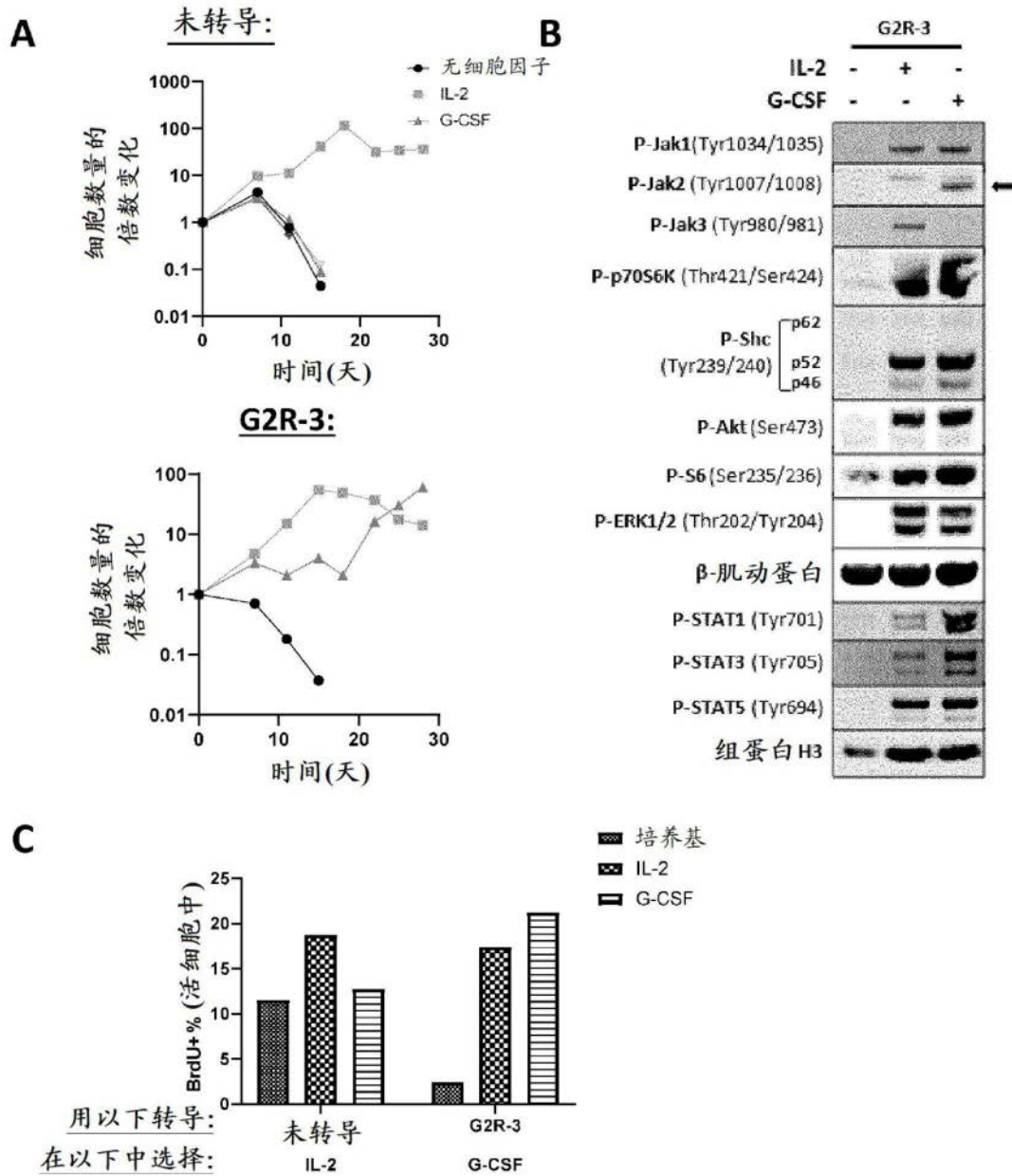


图21

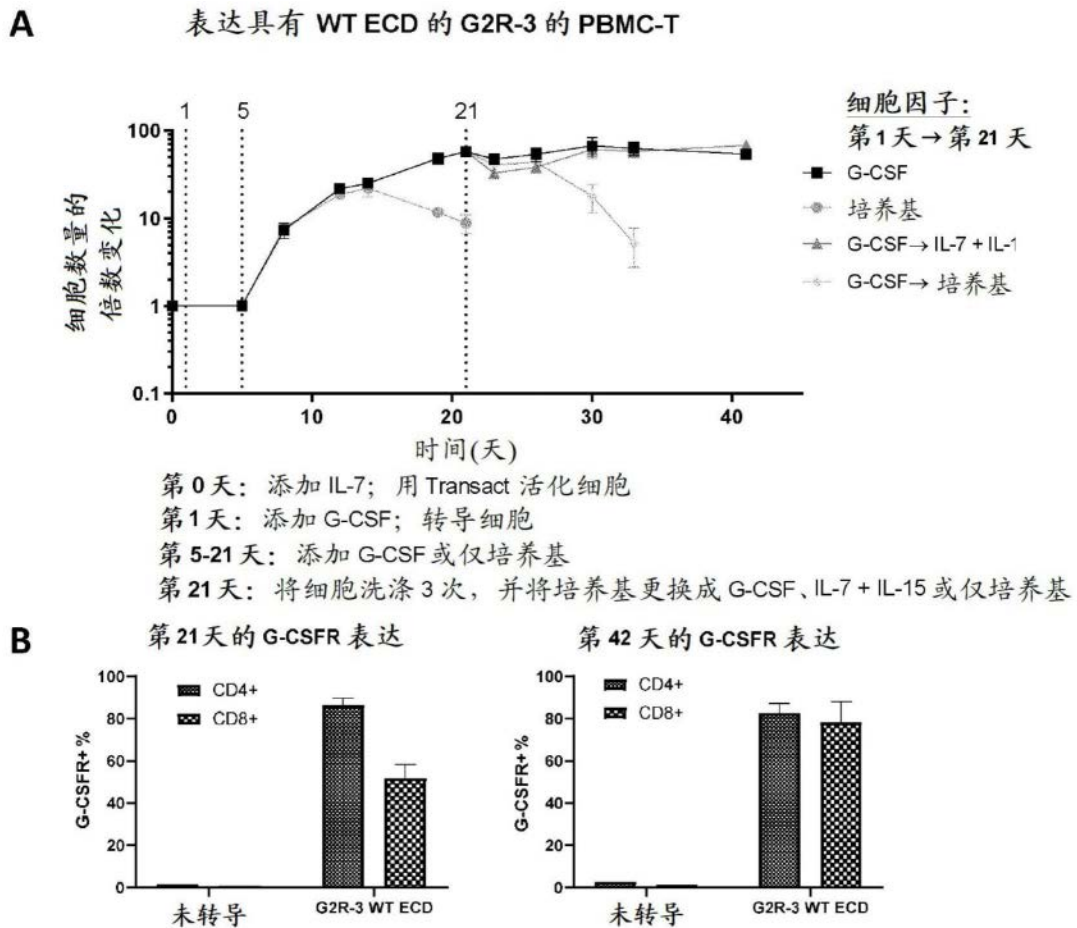


图22

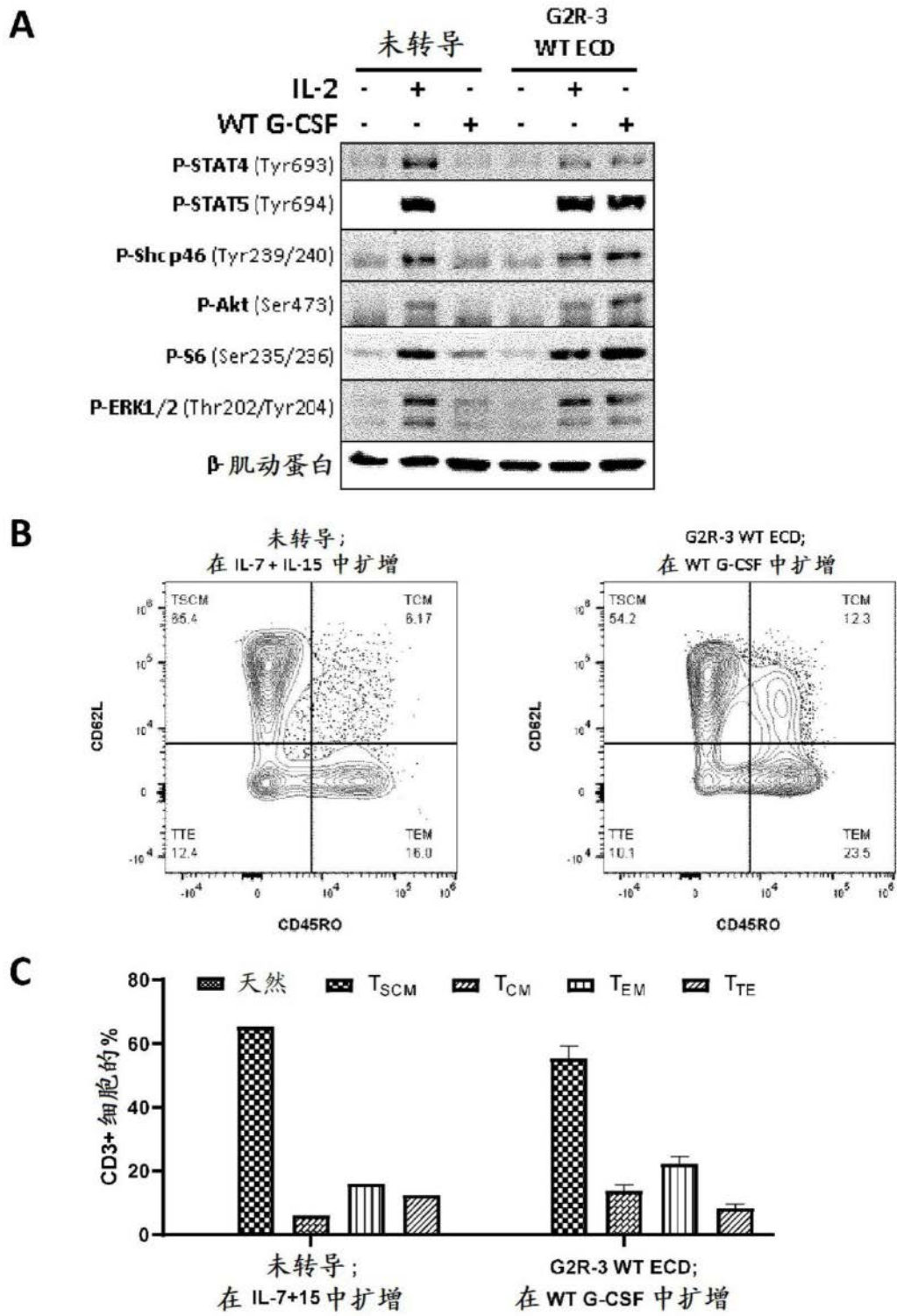


图23

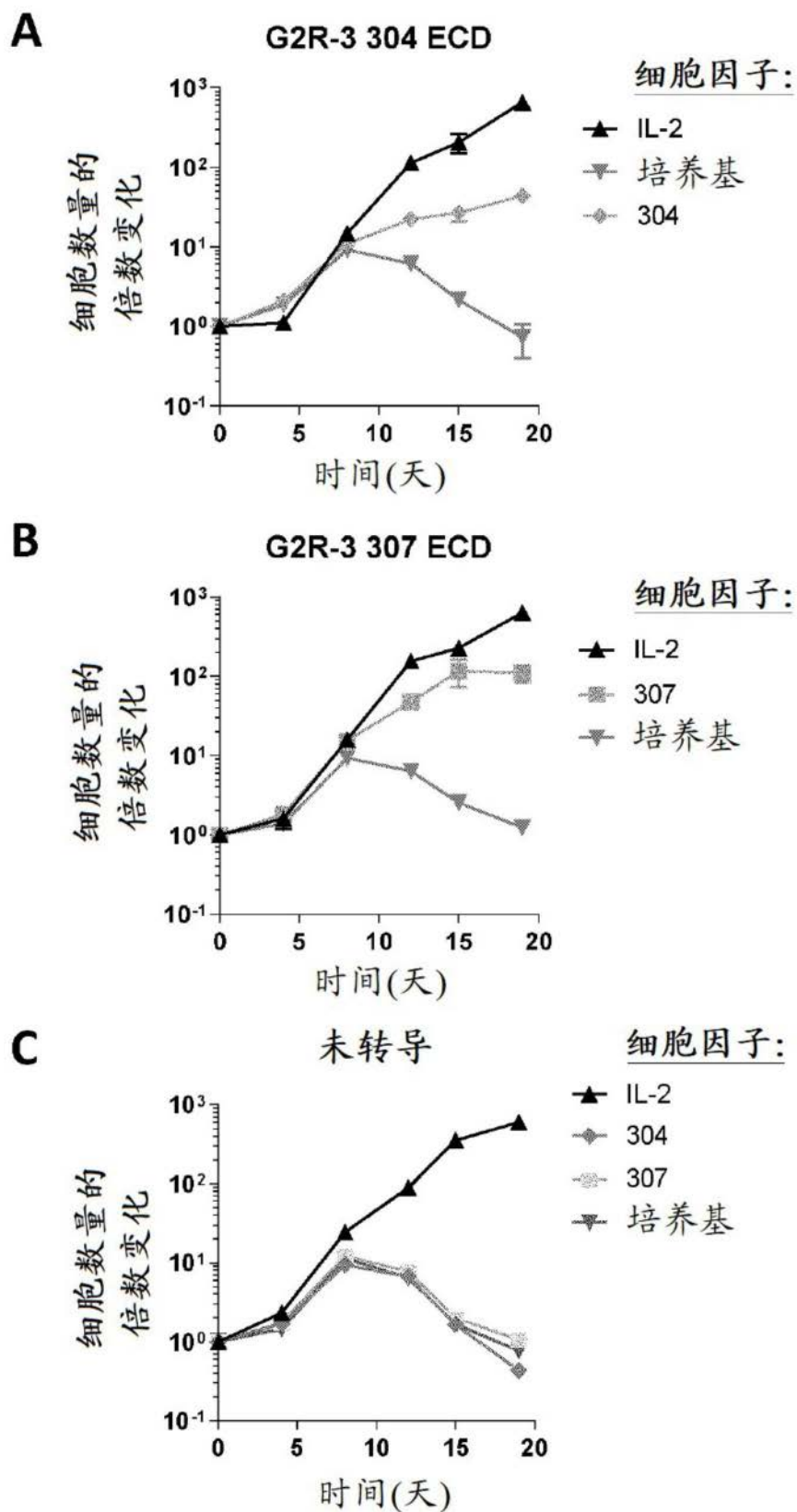


图24

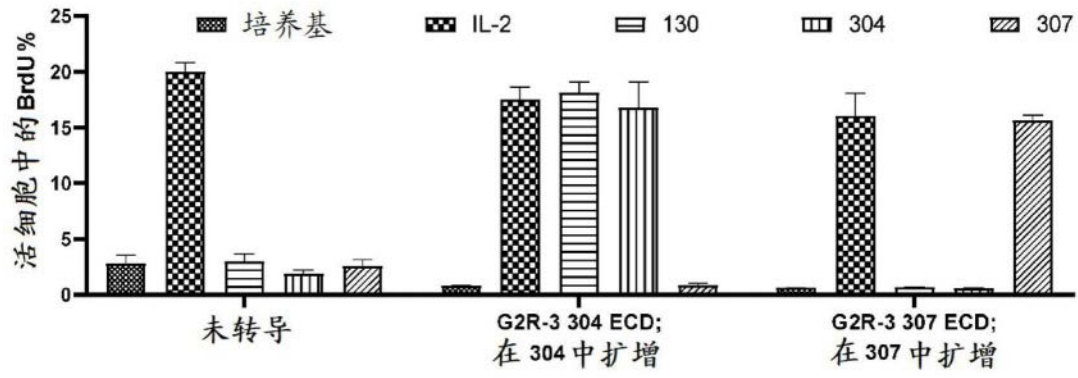


图25

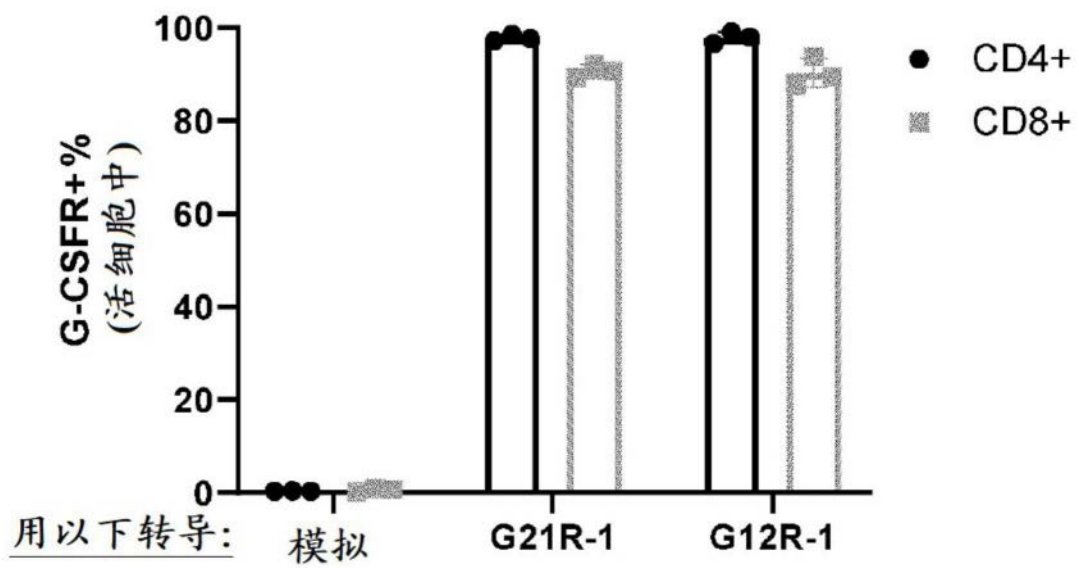


图26

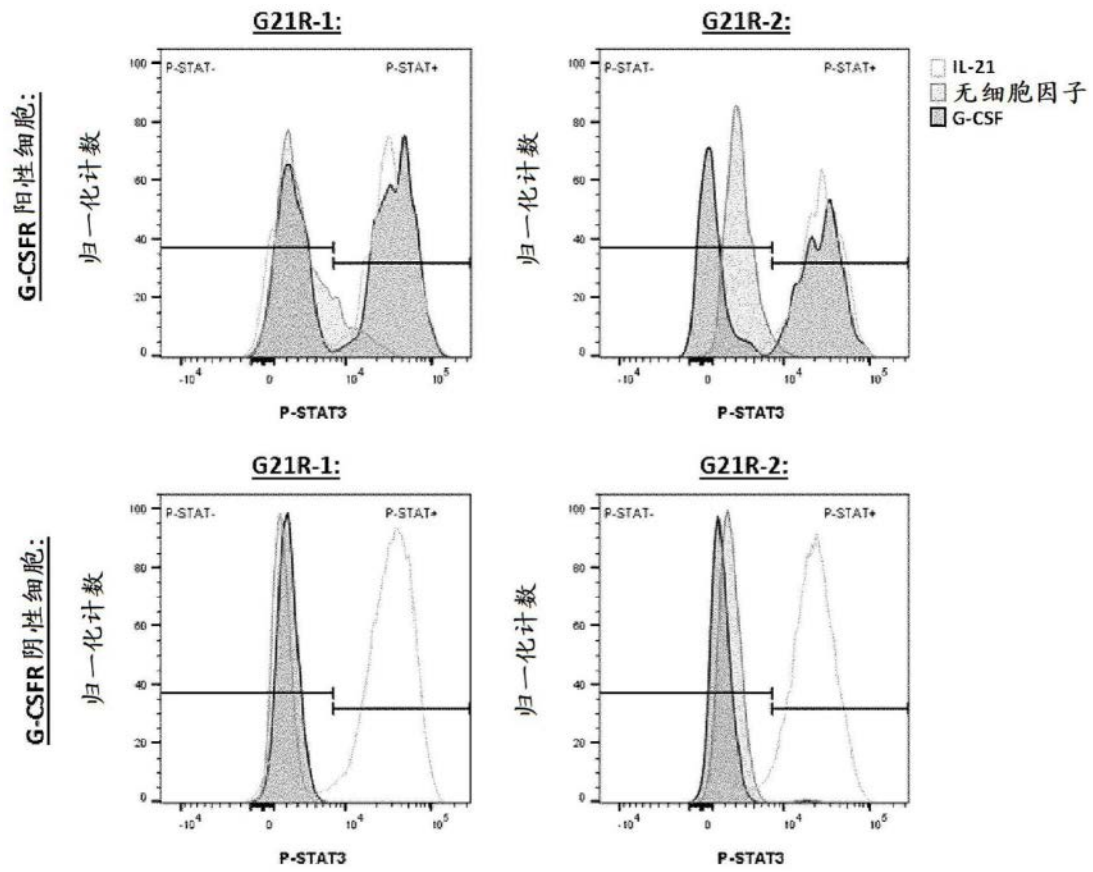


图27

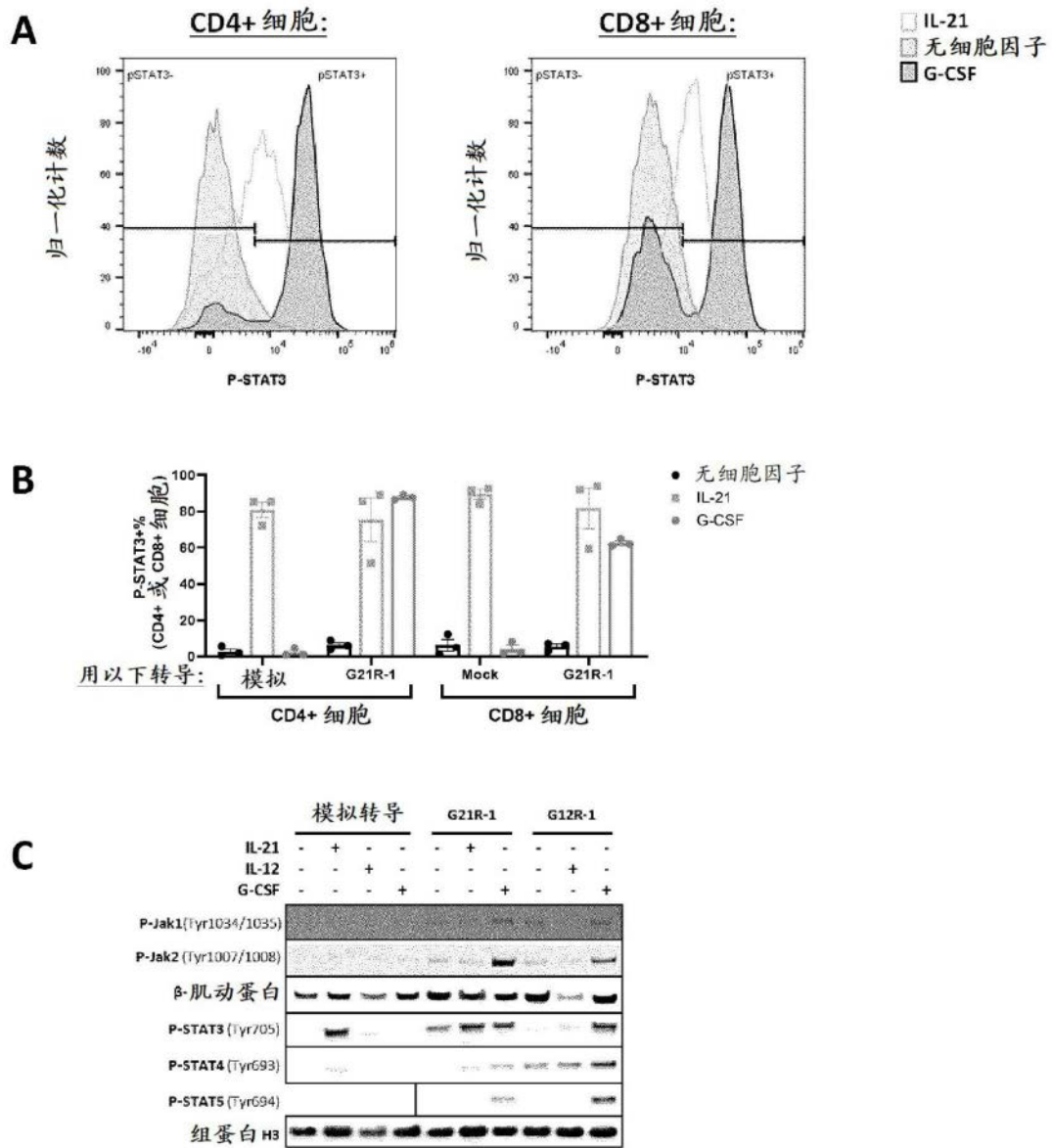


图28

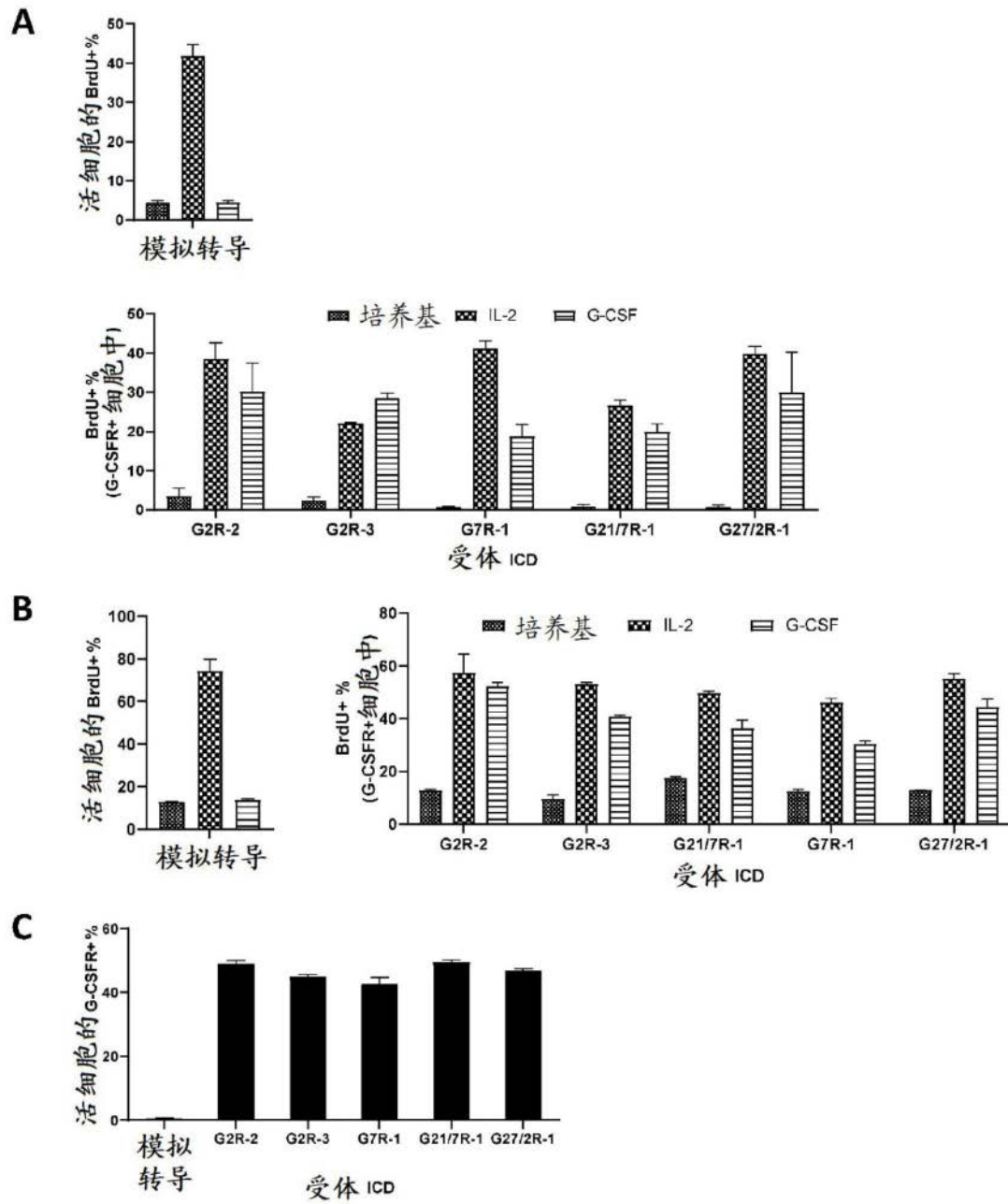


图29

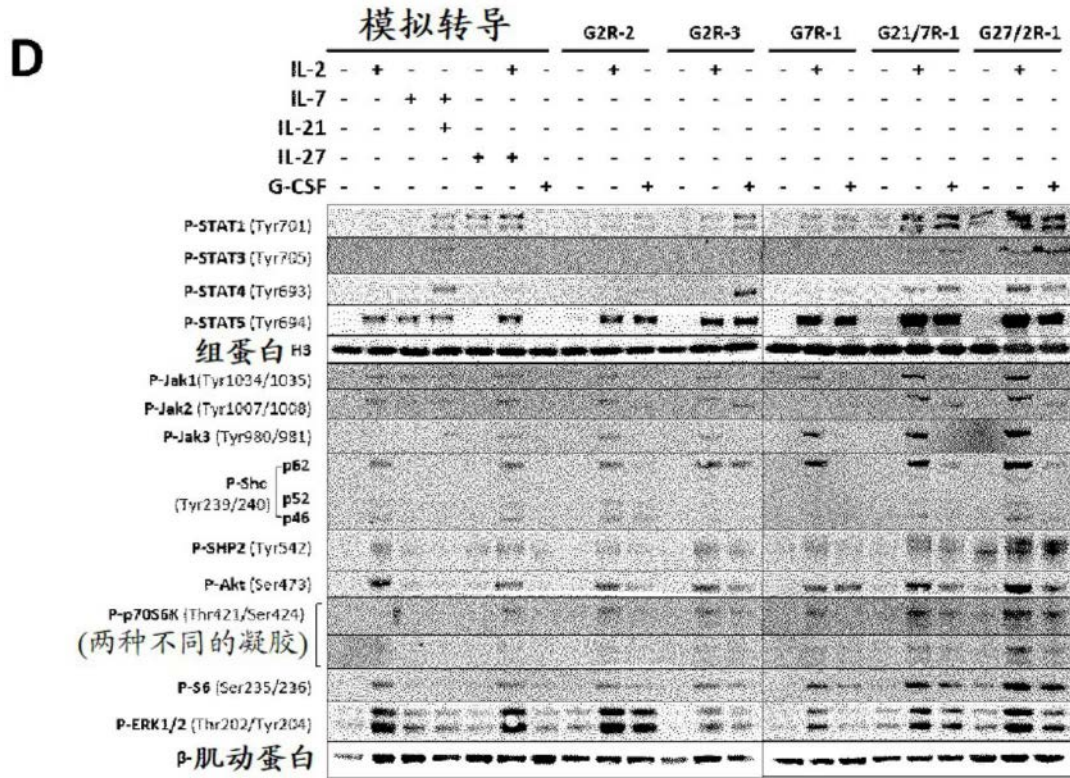


图29续

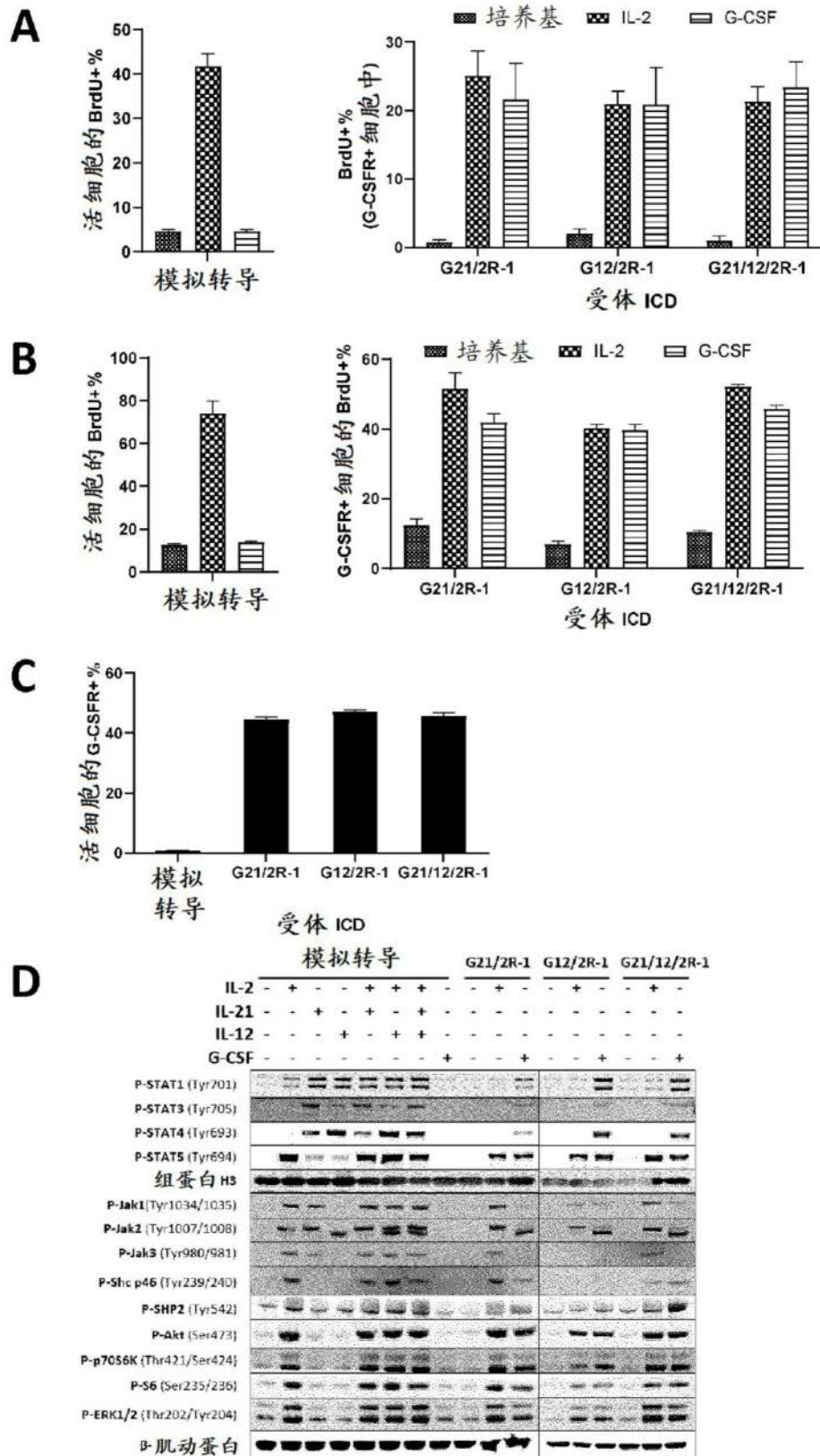


图30

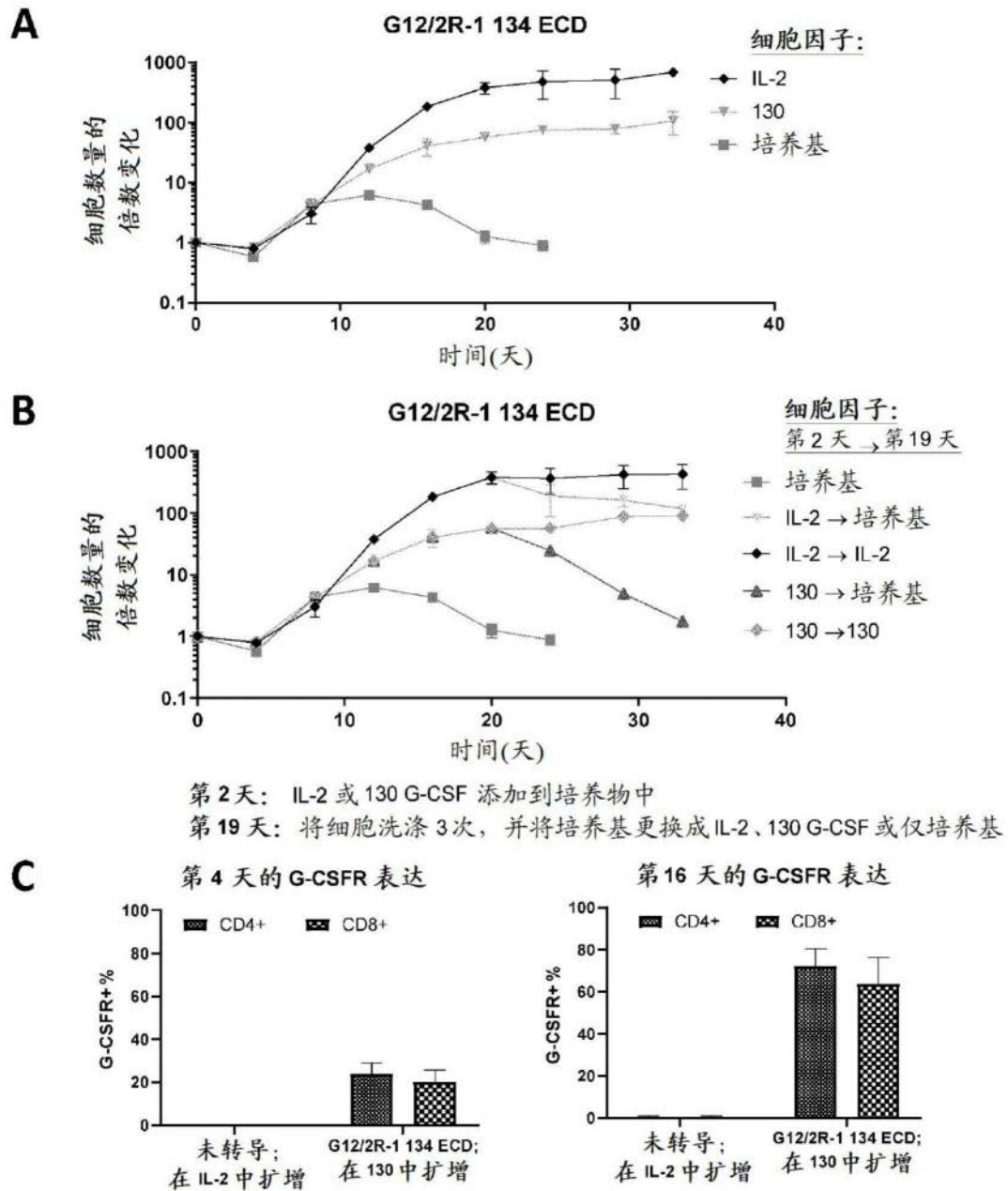


图31

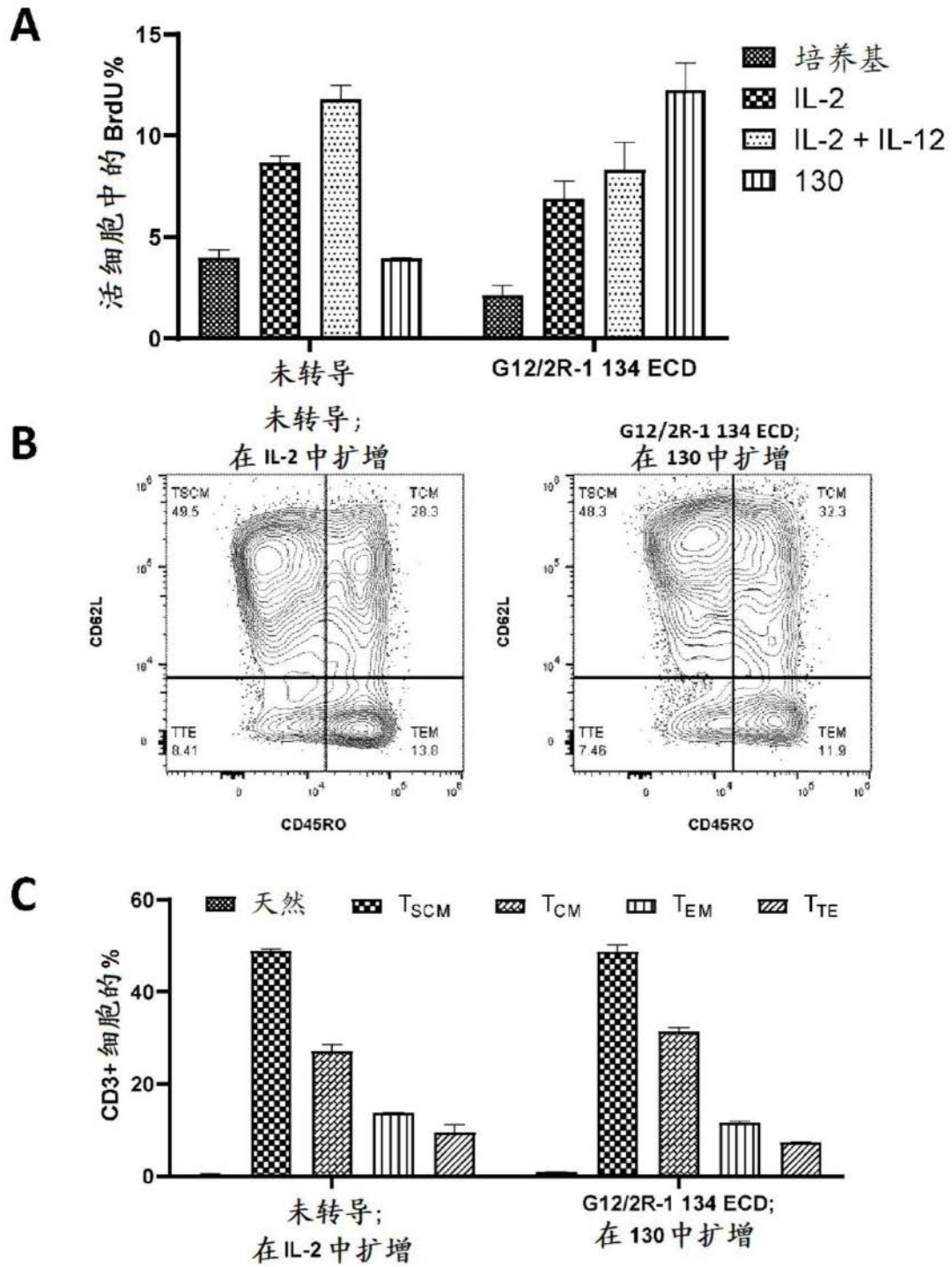


图32

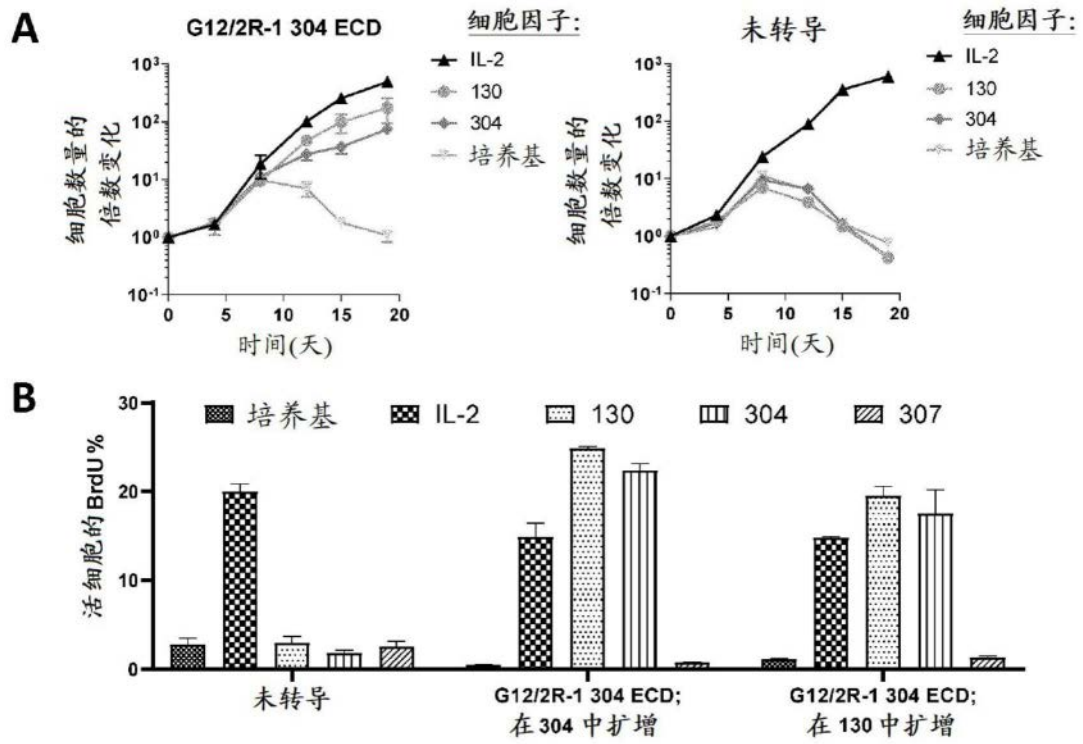


图33

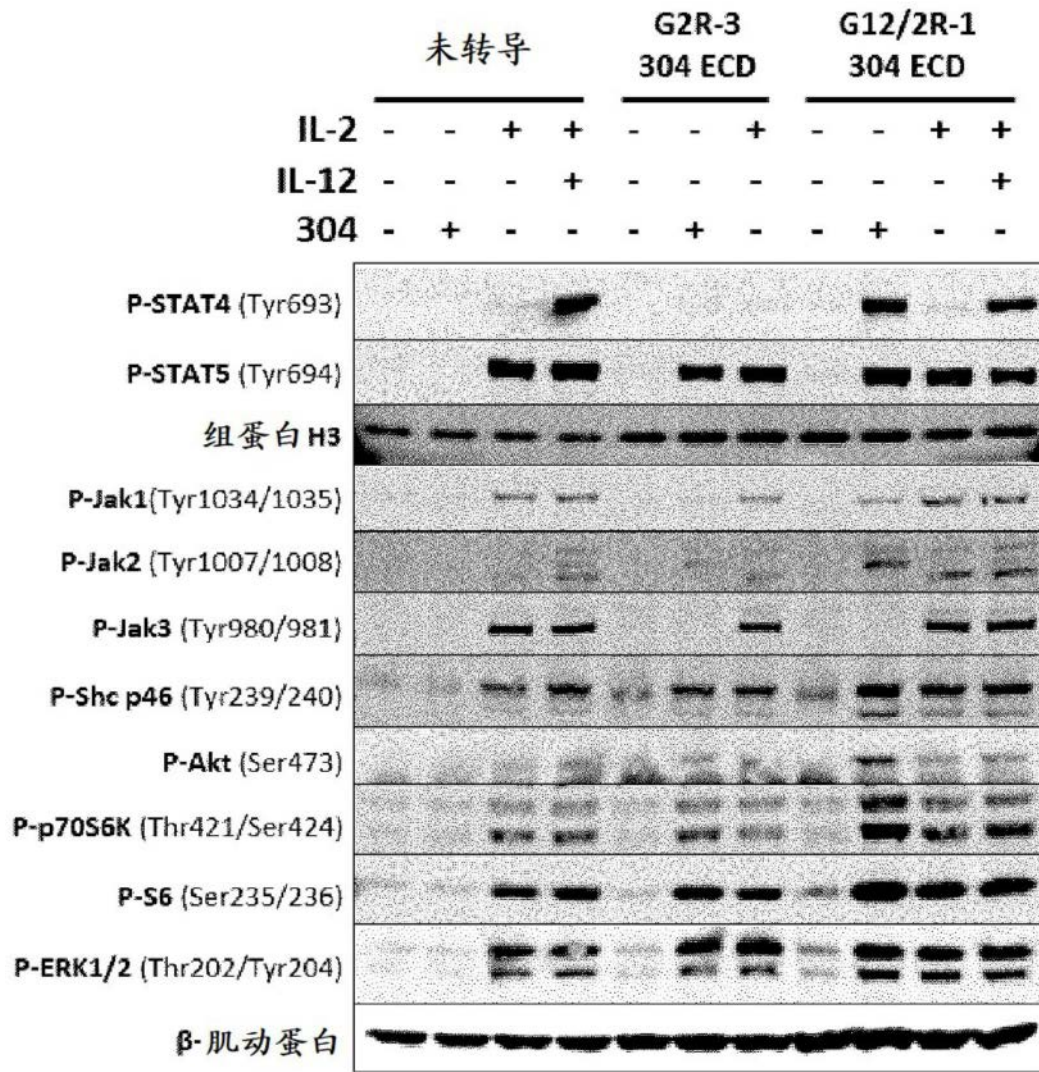


图34