



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201636425 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：104140317

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 02 日

(51)Int. Cl.：

C12N15/12 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

C12N15/86 (2006.01)

C12N5/10 (2006.01)

C07K14/47 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2014/12/02

美國

62/086,346

(71)申請人：羅傑威廉斯醫院(美國) ROGER WILLIAMS HOSPITAL (US)

美國

(72)發明人：勝古塔 薩德哈克 SENGUPTA, SADHAK (IN)；薩姆帕斯 普拉克許 SAMPATH, PRAKASH (US)；瓊漢斯 理查 JUNGHANS, RICHARD P. (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：32 項 圖式數：9 共 153 頁

(54)名稱

治療癌症之方法和組成物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING CANCER

(57)摘要

本發明描述與免疫細胞相關之組成物及方法，該等免疫細胞表現與該 IL13 受體 α -2(IL13R α 2)結合之嵌合抗原受體及 O⁶-甲基鳥嘌呤 DNA 甲基轉移酶(MGMT)蛋白兩者。含有 IL13 嵌合抗原受體(IL13CAR)或其變異體及 MGMT 蛋白或其變異體之病毒顆粒係用於轉染免疫細胞(諸如 T 細胞)，藉以將 IL13R α 2 標靶活性及對化學治療劑替莫唑胺(temozolomide, TMZ)之抗性兩者授予該等經轉染之細胞。本發明所指述之組成物及方法可用於癌症治療，諸如治療高度惡性神經膠質瘤。

Described are compositions and methods relating to immune cells which express both a chimeric antigen receptor which binds to the IL13 receptor α -2 (IL13R α 2) and a O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) protein. Viral particles containing an IL13 chimeric antigen receptor (IL13CAR) or variant thereof and an MGMT protein or variant thereof are used to transfect immune cells such as T cells, imparting to the transfected cells both IL13R α 2-targeting activity and resistance to the chemotherapeutic agent temozolomide (TMZ). The compositions and methods described are useful for cancer therapy such as the treatment of a high-grade malignant glioma.

指定代表圖：

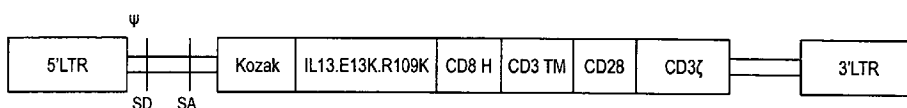


圖 1A

發明摘要

※申請案號：104140317

※申請日：104 年 12 月 02 日

※IPC 分類：

C12N 15/13, 15/86 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/95 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

治療癌症之方法和組成物

Methods and compositions for treating cancer

【中文】

本發明描述與免疫細胞相關之組成物及方法，該等免疫細胞表現與該 IL13 受體 α -2 (IL13R α 2) 結合之嵌合抗原受體及 O⁶-甲基鳥嘌呤 DNA 甲基轉移酶 (MGMT) 蛋白兩者。含有 IL13 嵌合抗原受體 (IL13CAR) 或其變異體及 MGMT 蛋白或其變異體之病毒顆粒係用於轉染免疫細胞 (諸如 T 細胞)，藉以將 IL13R α 2 標靶活性及對化學治療劑替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 之抗性兩者授予該等經轉染之細胞。本發明所指述之組成物及方法可用於癌症治療，諸如治療高度惡性神經膠質瘤。

【 英文 】

Described are compositions and methods relating to immune cells which express both a chimeric antigen receptor which binds to the IL13 receptor α -2 (IL13R α 2) and a O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) protein. Viral particles containing an IL13 chimeric antigen receptor (IL13CAR) or variant thereof and an MGMT protein or variant thereof are used to transfect immune cells such as T cells, imparting to the transfected cells both IL13R α 2-targeting activity and resistance to the chemotherapeutic agent temozolomide (TMZ). The compositions and methods described are useful for cancer therapy such as the treatment of a high-grade malignant glioma.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1A)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

治療癌症之方法和組成物

Methods and compositions for treating cancer

相關申請案的交互參照

[0001] 本申請案主張美國臨時專利申請案號 62/086,346 (2014 年 12 月 2 日提出申請) 之優先權，其以參照方式整體納入本文。

序列表的交互參照

[0002] 「序列表」係以純文字檔之形式隨附本申請案提出，該檔建立於 2015 年 11 月 30 日，檔名為「0962018010WOseqlist.txt」(69892 位元)，其內容以參照方式整體納入本文。

【技術領域】

[0003] 本發明關於治療癌症之方法和組成物。

【先前技術】

[0004] 標靶免疫療法已成為惡性病的治療中具有前景的研究領域，近年來已獲得廣大關注 (Carpentier and Meng, 2006, Curr Opin Oncol, 18 (6) : 631-636;

Wainwright et al., 2012, *Exp Opin Emerging Drugs*; 17 (2) : 181-202) 。最廣為研究的標靶之一係介白素-13 受體 $\alpha 2$ (IL13R $\alpha 2$) (Thaci et al., 2014, *Neuro-Oncol*, 16 (10) : 1304-1324) 。IL13R $\alpha 2$ 係介白素-13 (IL13) 之誘餌受器，其缺乏遍在 IL13R $\alpha 1$ 上所存在之傳訊鏈，因此防止任何由 IL13 所媒介之下游傳訊途徑 (Arima et al., 2005, *J Biol Chem*, 280 (26) : 24915-24922) 。IL13R $\alpha 2$ 之增加表現已被報導會促進神經膠質瘤及其他腫瘤模型中之腫瘤惡化。IL13R $\alpha 2$ 表現係神經膠質瘤惡性程度及病患存活不佳之預後標誌 (Brown et al., 2013, *PLoS ONE*, 8 (10) : Article ID e77769) 。其在 MG 上之選擇性表現在幾乎二十年前被發現，從那時開始就成為治療標靶 (Debinski et al., 1999, *Clin Canc Res*, 5 (5) : 985-990) 。

[0005] 神經膠母細胞瘤係成人最常見的原發性腦瘤。在美國每年經診斷罹患惡性原發性腦瘤的 18,000 名病患中，有超過一半為多形性神經膠質母細胞瘤。多形性神經膠質母細胞瘤係退行性、高度細胞性腫瘤，其具有高增生指數、微血管增生及局部壞死。徵候及症狀取決於許多因素（腦中腫瘤之大小、生長速度、位置），主要表現出頭痛、痙攣、神經性缺乏（neurological deficit）、心智狀態改變。多形性神經膠質母細胞瘤之預後維持不佳。對大部分病患而言，存活時間不到 2 年。

[0006] 雖然現行對於神經膠母細胞瘤（GBM）之標

準治療已獲得逐漸改善之存活，即手術、放射治療及化學治療的三重療法（Rolle et al., 2010, Neurosurgery Clin of North America, 21（1）：201-214; Ashby and Ryken, 2006, Neurosurgical focus, 20（4）：E3），但是大多數病患的預後仍維持不佳（Stupp et al, 2009, Lancet Oncol, 10（5）：459-466; Omuro and DeAngelis, 2013, JAMA, 310（17）：1842-1850）。治療 GBM 的主要限制在於腫瘤在腦中的位置，阻礙細胞毒性劑遞送穿越血腦障礙（Ashby and Ryken, 2006, Neurosurgical Focus, 20（4）：E3），加上強烈免疫抑制環境（Rolle et al., 2012, Adv Exp Med Biol, 746：53-76）及具化療抗性與放療抗性之神經膠質瘤起始細胞（Bao et al, 2006, Nature, 444（7120）：756-760; Frosina, Mol Canc Res, 2009 7（7）：989-999）。因此，新穎策略係經不斷測試以改善病患存活、生活品質及整體結果。

[0007] 因此，本發明描述更有效治療癌症之組成物及方法，其中該癌症的惡性細胞表現或過度表現 IL13R α 2，包括腦癌。

【發明內容】

[0008] 在一態樣中，提供一種嵌合核酸序列，其中該嵌合核酸序列包含：編碼 IL13 嵌合抗原受體（IL13CAR）之第一核酸，該 IL13CAR 與 IL1R α 2 受體（IL13R α 2）結合，及編碼藥物抗性多肽之第二核酸，該

藥物抗性多肽係 O⁶-甲基鳥嘌呤 DNA 甲基轉移酶 (MGMT) 蛋白。

[0009] 在一實施態樣中，該 IL13CAR 包含 IL13R α 2 之配體。在另一實施態樣中，該配體係 IL13。在又另一實施態樣中，該配體係與 IL13R α 2 結合之 IL13 片段。在仍另一實施態樣中，該配體係與 IL13R α 2 選擇性結合之抗體可變結構域或其片段。

[0010] 在一實施態樣中，該 MGMT 蛋白包含 P140K 取代。

[0011] 在一實施態樣中，該嵌合核酸序列包含：編碼該 IL13CAR 之第一核酸序列及編碼該 MGMT 蛋白之第二核酸序列。

[0012] 在一實施態樣中，編碼該 IL13CAR 之第一核酸序列係位於編碼該 MGMT 多肽之第二核酸序列之 5' 端。在一替代性實施態樣中，編碼該 IL13CAR 之第一核酸序列係位於編碼該 MGMT 多肽之第二核酸序列之 3' 端。

[0013] 在一實施態樣中，編碼該 IL13CAR 之第一核酸序列自 5' 至 3' 方向包含：編碼 IL13R α 2 配體結構域之核酸序列、編碼跨膜 (TM) 結構域之核酸序列及編碼細胞質結構域之核酸序列，該細胞質結構域包含 CD3 ζ 傳訊結構域。在另一實施態樣中，該第一核酸序列另包含編碼絞鏈區之核酸序列，其中該絞鏈區位於該 IL13 配體結構域與該 TM 結構域之間。在仍另一實施態樣中，該第一核

酸序列另包含編碼 CD28 共刺激結構域之核酸序列，其中該 CD28 共刺激結構域係位於該 TM 結構域與該 CD3- ζ 鏈之間。在仍另一實施態樣中，該第一核酸序列另包含編碼信號序列之核酸，其中該信號序列係位於該 IL13R α 2 配體結構域之 N 端。

[0014] 在一實施態樣中，該絞鏈結構域係 CD8 絞鏈結構域。在另一實施態樣中，該 CD8 絞鏈結構域包含 SEQ ID NO：27。

[0015] 在一實施態樣中，該細胞質結構域另包含一或多種共刺激結構域。在一實施態樣中，該共刺激結構域係 CD28 共刺激結構域。在另一實施態樣中，該 CD28 共刺激結構域係位於該 TM 結構域與該 CD3- ζ 傳訊結構域之間。

[0016] 在一實施態樣中，該細胞質結構域另包含一或多種選自 OX-40 共刺激結構域、HVEM 共刺激結構域、41BB 共刺激結構域、ICOS 共刺激結構域、OX40 共刺激結構域及 CD27 共刺激結構域之共刺激結構域。在一實施態樣中，該額外共刺激結構域係位於 CD28 共刺激結構域與 CD3- ζ 傳訊結構域之間。

[0017] 在一實施態樣中，該信號序列係異源性信號序列。在另一實施態樣中，該信號序列係 IL13 信號序列或其變異體。在仍另一實施態樣中，該 IL13 信號序列包含 SEQ ID NO：25。在又另一實施態樣中，編碼該信號序列之核酸序列包含 SEQ ID NO：9。

[0018] 在一實施態樣中，該 IL13 配體結合結構域包含該成熟 IL13 蛋白（SEQ ID NO：26）。在另一實施態樣中，該 IL13 配體結合結構域係由該成熟 IL13 之片段組成，其中該片段以大約和該成熟 IL13 蛋白（SEQ ID NO：26）相同之親和性與該 IL13R α 2 蛋白結合。

[0019] 在一實施態樣中，編碼該 IL13 配體之核酸序列編碼選自 SEQ ID NO：26、SEQ ID NO：36 及 SEQ ID NO：37 之多肽。在另一實施態樣中，編碼該成熟 IL13 多肽之核酸序列包含選自 SEQ ID NO：10、SEQ ID NO：34 及 SEQ ID NO：35 之核酸序列。

[0020] 在一實施態樣中，該第一核酸自 5'至 3'方向包含：編碼該 IL13 配體結構域之選自 SEQ ID NO：10、SEQ ID NO：34 或 SEQ ID NO：35 之核酸；包含編碼該 TM 結構域之 SEQ ID NO：14 或其變異體之核酸；及包含編碼該 CD3- ζ 傳訊結構域之 SEQ ID NO：18 或其變異體之核酸。在另一實施態樣中，該第一核酸另包含編碼該 IL13 信號序列之 SEQ ID NO：9 或其變異體，其中該 SEQ ID NO：9 之序列係位於編碼該 IL13 配體結構域之核酸序列上游。在另一實施態樣中，該第一核酸另包含編碼該 CD8 絞鏈結構域之 SEQ ID NO：12 或其變異體。在仍另一實施態樣中，該第一核酸另包含編碼該 CD28 共刺激結構域之 SEQ ID NO：16 或其變異體之核酸。

[0021] 在一實施態樣中，該第一核酸自 5'至 3'方向包含：編碼該傳訊結構域之 SEQ ID NO：9 或其變異體之

核酸序列；編碼該 IL13 配體結構域之選自 SEQ ID NO：10、SEQ ID NO：34 或 SEQ ID NO：35 之核酸；編碼該 CD8 絞鏈結構域之 SEQ ID NO：12 或其變異體之核酸序列；包含編碼該 TM 結構域之 SEQ ID NO：14 或其變異體之核酸；編碼該 CD28 共刺激結構域之 SEQ ID NO：16 或其變異體之核酸；及編碼該 CD3- ζ 傳訊結構域之 SEQ ID NO：18 或其變異體之核酸序列。

[0022] 在一實施態樣中，編碼該 CAR 之第一核酸序列另包含編碼該成熟 IL13 配體與該 CD8 絞鏈結構域之間的連接子之核酸序列。在另一實施態樣中，編碼該成熟 IL13 配體與該 CD8 絞鏈結構域之間的連接子之核酸序列係由 SEQ ID NO：11 組成。

[0023] 在一實施態樣中，編碼該 CAR 之第一核酸序列另包含編碼 SEQ ID NO：12 與 SEQ ID NO：14 之間的連接子之核酸序列。在另一實施態樣中，編碼 SEQ ID NO：12 與 SEQ ID NO：14 之間的連接子之核酸序列係由 SEQ ID NO：13 組成。

[0024] 在一實施態樣中，編碼該 CAR 之第一核酸序列另包含編碼 SEQ ID NO：14 與 SEQ ID NO：16 之間的連接子之核酸序列。在另一實施態樣中，編碼 SEQ ID NO：14 與 SEQ ID NO：16 之間的連接子之核酸序列係由 SEQ ID NO：15 組成。

[0025] 在一實施態樣中，編碼該 CAR 之第一核酸序列另包含編碼 SEQ ID NO：16 與 SEQ ID NO：18 之間的

連接子之核酸序列。在另一實施態樣中，編碼 SEQ ID NO：16 與 SEQ ID NO：18 之間的連接子之核酸序列係由 SEQ ID NO：17 組成。

[0026] 在一實施態樣中，編碼該 MGMT 蛋白之第二核酸序列包含 P140KMGMT (SEQ ID NO：22)。在另一實施態樣中，編碼該 MGMT 蛋白之第二核酸序列包含編碼包含 SEQ ID NO：33 之蛋白之核酸序列。

[0027] 在一實施態樣中，編碼該 MGMT 蛋白之第二核酸序列包含選自 G156A-MGMT (SEQ ID NO：38)、MGMT-2 (SEQ ID NO：39)、MGMT-3 (SEQ ID NO：40) 及 MGMT-5 (SEQ ID NO：41) 之胺基酸序列。在另一實施態樣中，編碼該 MGMT 蛋白之第二核酸序列包含編碼包含 G156A-MGMT (SEQ ID NO：38)、MGMT-2 (SEQ ID NO：39)、MGMT-3 (SEQ ID NO：40) 及 MGMT-5 (SEQ ID NO：41) 之蛋白的核酸序列。

[0028] 在一實施態樣中，編碼該 MGMT 蛋白之第二核酸序列不包含 SEQ ID NO：48。在另一實施態樣中，該第二核酸序列編碼不包含 SEQ ID NO：49 之 MGMT 蛋白。

[0029] 在一實施態樣中，該嵌合核酸序列另包含編碼自我切割肽之核酸序列。在另一實施態樣中，編碼該自我切割肽之核酸序列包含 SEQ ID NO：21。在仍另一實施態樣中，該自我切割肽包含 SEQ ID NO：32 之胺基酸序列。

[0030] 在一實施態樣中，該嵌合核酸序列另包含 Kozak 序列。在另一實施態樣中，該 Kozak 序列包含 SEQ ID NO：8。在仍另一實施態樣中，該 Kozak 序列係位於編碼該 IL13CAR 及該 MGMT 蛋白之核酸序列上游。在一實施態樣中，該嵌合核酸序列另包含在該 Kozak 序列上游之第一限制內核酸酶位點。在另一實施態樣中，在該 Kozak 序列上游之限制內核酸酶位點係由 SEQ ID NO：7 組成。在一實施態樣中，該嵌合核酸序列另包含在該編碼 IL13CAR 及 MGMT 蛋白之核酸序列下游的第二內核酸酶位點。

[0031] 在一實施態樣中，該嵌合核酸序列包含選自 SEQ ID NO：1 之核苷酸 109 至 1836、SEQ ID NO：2 之核苷酸 109 至 1836 及 SEQ ID NO：3 之核苷酸 109 至 1836 的核苷酸序列。在一實施態樣中，該嵌合核酸序列包含選自 SEQ ID NO：1 之核苷酸 13 至 1836、SEQ ID NO：2 之核苷酸 13 至 1836 及 SEQ ID NO：3 之核苷酸 13 至 1836 的核苷酸序列。在一實施態樣中，該嵌合核酸序列包含選自 SEQ ID NO：1 之核苷酸 7 至 1842、SEQ ID NO：2 之核苷酸 7 至 1842 及 SEQ ID NO：3 之核苷酸 7 至 1842 的核苷酸序列。在另一實施態樣中，該嵌合核酸序列包含選自 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2 及 SEQ ID NO：3 之核苷酸序列。

[0032] 在一實施態樣中，該嵌合核酸序列包含編碼 SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5、SEQ ID NO：6、SEQ ID

NO：45、SEQ ID NO：46 或 SEQ ID NO：47 之蛋白的核苷酸序列。

[0033] 在一實施態樣中，該 IL13Ra2 受體配體係 IL-13 或其片段之變異體，其以相較於野生型 IL13（SEQ ID NO：26）約 5 倍、10 倍或 100 倍較小之親和性與 IL13Ra2 結合。在一替代性實施態樣中，該 IL13Ra2 受體配體係 IL13 或其片段之變異體，其以相較於野生型 IL13（SEQ ID NO：26）約 5 倍、10 倍或 100 倍較高之親和性與 IL13Ra2 結合。

[0034] 在一實施態樣中，該 IL13Ra2 受體配體與野生型 IL-13 並不完全相同。在另一實施態樣中，IL13Ra2 受體配體與 SEQ ID NO：26 並不完全相同。

[0035] 在一實施態樣中，當經 IL13-CAR-T 轉染之細胞係經化學治療劑處理時，相較於經該化學治療劑處理但不表現該藥物抗性多肽之細胞，P140KMGMT 蛋白有效增加試管內及／或活體內表現該藥物抗性多肽之細胞的存活性。

[0036] 在一實施態樣中，該 IL13Ra2 受體配體與野生型 IL-13 並不完全相同。在另一實施態樣中，IL13Ra2 受體配體與 SEQ ID NO：26 並不完全相同。

[0037] 在另一態樣中，提供一種包含編碼如本文所述之 IL13CAR 及 MGMT 蛋白之核酸序列的載體。

[0038] 在一實施態樣中，該載體包含編碼如本文所述之 IL13CAR、自我切割肽及 MGMT 蛋白之單順反子核

酸序列。在另一實施態樣中，該自我切割肽包含 2A 肽。

[0039] 在一替代性實施態樣中，該載體包含編碼 IL13CAR 及 MGMT 蛋白之多順反子嵌合核酸序列。在另一實施態樣中，編碼該 IL13CAR 及該 MGMT 蛋白之多順反子嵌合核酸序列另包含位於編碼該 IL13CAR 之核酸序列與編碼該 MGMT 蛋白之核酸序列之間的內部核糖體進入位點（IRES）。在仍另一實施態樣中，編碼該 IL13CAR 及該 MGMT 蛋白之多順反子嵌合核酸序列另包含位於編碼該 IL13CAR 之核酸序列與編碼該 MGMT 蛋白之核酸序列之間的啟動子。

[0040] 在一實施態樣中，該載體係細菌質體載體。在另一實施態樣中，該載體係表現載體。

[0041] 在一實施態樣中，該載體係病毒載體。在另一實施態樣中，該病毒載體係選自反轉錄病毒載體、慢病毒載體、腺病毒載體或腺病毒相關病毒載體。

[0042] 在另一態樣中，提供一種經載體轉染之細胞，該載體包含編碼如本文所述之嵌合抗原受體（CAR）及藥物抗性多肽之嵌合核酸序列。

[0043] 在一實施態樣中，該細胞係選自 T 細胞、NK 細胞及 NKT 細胞。

[0044] 在另一實施態樣中，提供一種重組多肽，該重組多肽自 N 端至 C 端方向包含如本文所述之與腫瘤抗原結合之配體、跨膜結構域及細胞質傳訊結構域。

[0045] 在一實施態樣中，該自 N 端至 C 端方向包含

與腫瘤抗原結合之配體、跨膜結構域及細胞質傳訊結構域之重組多肽另包含位於該 CAR 與藥物抗性多肽之間的自我切割肽。在另一實施態樣中，該藥物抗性多肽係位於該 CAR 之 N 端。在仍另一實施態樣中，該藥物抗性多肽係位於該 CAR 之 C 端。

[0046] 在另一態樣中，提供一種包含經修飾 MGMT 多肽之重組多肽，該經修飾 MGMT 多肽增加暴露至 TMZ 之細胞的存活性，其中該細胞係經基因修飾以表現如本文所述之 CAR 且其中該細胞係經投予至經診斷罹患腦癌之病患。

[0047] 在另一態樣中，提供一種組成物，該組成物包含：編碼如本文所述之 CAR 之第一核酸及編碼如本文所述之 MGMT 蛋白之第二核酸。

[0048] 在一實施態樣中，該第一核酸編碼 CAR 蛋白，該 CAR 蛋白包含：如本文所述之 IL13 配體結構域、如本文所述之 TM 結構域及如本文所述之包含 CD3- ζ 傳訊結構域之細胞質結構域。在另一實施態樣中，該第一核酸另編碼位於該 CAR 蛋白之 IL13 配體結合結構域上游的信號序列。在仍另一實施態樣中，該第一核酸另編碼如本文所述之絞鏈區，其中該絞鏈區係位於該 CAR 蛋白之 IL13 配體結構域與 TM 結構域之間。在又另一實施態樣中，該第一核酸另編碼 CD28 共刺激結構域，該 CD28 共刺激結構域係位於該 TM 結構域與該 CD3- ζ 傳訊結構域之間。在仍另一實施態樣中，該第一核酸另編碼額外共刺激結構

域。在另一實施態樣中，該第一核酸另包含位於編碼該 CAR 蛋白之核酸上游的 Kozak 序列。

[0049] 在一實施態樣中，該第二核酸編碼 MGMT 蛋白，該 MGMT 蛋白具有選自 SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：38、SEQ ID NO：39、SEQ ID NO：40、SEQ ID NO：41 及 SEQ ID NO：43 之胺基酸序列。

[0050] 在一實施態樣中，該 MGMT 蛋白不包含 SEQ ID NO：49。

[0051] 在一實施態樣中，該組成物包含嵌合核酸，該嵌合核酸包含該第一核酸及該第二核酸。

[0052] 在一實施態樣中，該嵌合核酸另包含編碼如本文所述之自我切割連接子肽之核酸，其中該編碼自我切割連接子肽之核酸係位於該第一核酸與該第二核酸之間。

[0053] 在一實施態樣中，該嵌合核酸另包含如本文所述之內部核糖體進入位點（IRES），其中該 IRES 係位於該第一核酸與該第二核酸之間。

[0054] 在一實施態樣中，該嵌合核酸係雙順反子建構體，該建構體包含在編碼該 CAR 蛋白之第一核酸上游的第一啟動子及編碼該 MGMT 蛋白之第二核酸上游之第二啟動子。

[0055] 在一實施態樣中，該組成物包含第一載體及第二載體，該第一載體包含編碼該 CAR 蛋白之第一核酸，且該第二載體包含編碼該 MGMT 蛋白之第二核酸。在另一實施態樣中，該第一及第二載體各為質體或表現載

體。在又另一實施態樣中，該第一及第二載體各為反轉錄病毒顆粒。

[0056] 在另一態樣中，提供一種宿主細胞，該宿主細胞包含：編碼如本文所述之 CAR 之第一核酸及編碼如本文所述之 MGMT 蛋白之第二核酸。在一實施態樣中，該第一核酸編碼 CAR 蛋白，該 CAR 蛋白包含：如本文所述之 IL13 配體結構域、如本文所述之 TM 結構域及如本文所述之包含 CD3- ζ 傳訊結構域之細胞質結構域。在另一實施態樣中，該第一核酸另編碼位於該 CAR 蛋白之 IL13 配體結合結構域上游的信號序列。在仍另一實施態樣中，該第一核酸另編碼如本文所述之絞鏈區，其中該絞鏈區係位於該 CAR 蛋白之 IL13 配體結構域與 TM 結構域之間。在又另一實施態樣中，該第一核酸另編碼 CD28 共刺激結構域，該 CD28 共刺激結構域係位於該 TM 結構域與該 CD3- ζ 傳訊結構域之間。在仍另一實施態樣中，該第一核酸另編碼額外共刺激結構域。在另一實施態樣中，該第一核酸另包含位於編碼該 CAR 蛋白之核酸上游的 Kozak 序列。

[0057] 在一實施態樣中，該第二核酸編碼 MGMT 蛋白，該 MGMT 蛋白具有選自 SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：38、SEQ ID NO：39、SEQ ID NO：40、SEQ ID NO：41 及 SEQ ID NO：43 之胺基酸序列。在另一實施態樣中，該 MGMT 蛋白不是 SEQ ID NO：49。

[0058] 在一實施態樣中，該宿主細胞包含嵌合核

酸，該嵌合核酸包含該第一核酸及該第二核酸。

[0059] 在一實施態樣中，該嵌合核酸另包含編碼如本文所述之自我切割連接子肽之核酸，其中該編碼自我切割連接子肽之核酸係位於該第一核酸與該第二核酸之間。

[0060] 在一實施態樣中，該嵌合核酸另包含如本文所述之內部核糖體進入位點（IRES），其中該 IRES 係位於該第一核酸與該第二核酸之間。

[0061] 在一實施態樣中，該嵌合核酸係雙順反子建構體，該建構體包含在編碼該 CAR 蛋白之第一核酸上游的第一啟動子及編碼該 MGMT 蛋白之第二核酸上游之第二啟動子。

[0062] 在一實施態樣中，該宿主細胞包含第一載體及第二載體，該第一載體包含編碼該 CAR 蛋白之第一核酸，且該第二載體包含編碼該 MGMT 蛋白之第二核酸。在另一實施態樣中，該第一及第二載體各為如本文所述之質體或表現載體。在又另一實施態樣中，該第一及第二載體各為如本文所述之反轉錄病毒顆粒。

[0063] 在另一態樣中，提供一種包含重組多肽之組成物，其中該重組多肽自 N 端至 C 端方向包含：如本文所述之信號序列、如本文所述之 IL13 配體、如本文所述之跨膜結構域、如本文所述之細胞質傳訊結構域、如本文所述之 MGMT 蛋白及醫藥上可接受之賦形劑。在另一實施態樣中，該重組多肽另包含如本文所述之絞鏈結構域，其中該絞鏈結構域係位於該 IL13 配體結構域與該 TM 結

構域之間。在仍另一實施態樣中，該重組多肽另包含如本文所述之自我切割肽，其中該自我切割肽係位於該細胞質傳訊結構域與該 MGMT 蛋白之間。

[0064] 在一實施態樣中，該組成物係醫藥組成物。

[0065] 在另一態樣中，提供一種治療經診斷罹患癌症個體之方法。

[0066] 在一實施態樣中，該方法包含：自該個體獲得細胞、以一或多種編碼如本文所述之 IL13CAR 及如本文所述之 MGMT 蛋白的核酸轉導該細胞、將該細胞維持於其中該核酸係經該細胞表現之條件下、及對該病患投予治療有效數目之表現該等 IL13CAR 及 MGMT 蛋白之細胞。

[0067] 在一實施態樣中，該導入該細胞中包含使用包含編碼該 IL13CAR 之核酸的第一載體及包含編碼該 MGMT 蛋白之核酸的第二載體。在另一實施態樣中，該導入該細胞中包含使用包含編碼該 IL13CAR 及該 MGMT 蛋白之核酸的載體。

[0068] 在一實施態樣中，該細胞係經載體轉導，該載體包含如本文所述之 IL13CAR-P140KMGMT 嵌合建構體。

[0069] 在一實施態樣中，該個體係哺乳動物。在另一實施態樣中，該哺乳動物係靈長動物、人或小鼠。

[0070] 在一實施態樣中，該一或多種核酸係使用病毒載體導入該細胞，該病毒載體選自反轉錄病毒載體、慢

病毒載體、腺病毒載體或彼等之組合。

[0071] 在一實施態樣中，該細胞係 T 細胞。

[0072] 在一實施態樣中，該 T 細胞係使用血漿清除術獲得。

[0073] 在一實施態樣中，該個體經診斷罹患選自腦癌、乳癌、胰臟癌、頭頸癌、卵巢癌及結直腸癌之癌症。在另一實施態樣中，該癌症已經轉移。

[0074] 在一實施態樣中，該個體經診斷罹患高度惡性神經膠質瘤。在另一實施態樣中，該個體經診斷罹患多形性神經膠質母細胞瘤（GMB）、退行性星狀細胞瘤或兒童神經膠質瘤。

[0075] 在一實施態樣中，該腦癌係神經膠母細胞瘤。在另一實施態樣中，該腦癌係高度惡性星狀細胞瘤。

[0076] 在一實施態樣中，該乳癌係基底樣乳癌。

[0077] 在一實施態樣中，該方法另包含以一或多種化學治療劑治療該個體。在另一實施態樣中，該方法包含以替莫唑胺（temozolomide, TMZ）治療該個體。

[0078] 在一實施態樣中，該一或多種化學治療劑係在對該個體投予該經修飾細胞劑量之前、期間及/或之後投予。

[0079] 在一實施態樣中，該投予係顱內、髓內、皮內、皮下、局部或靜脈內。

[0080] 在另一態樣中，提供一種用於產製表現如本文所述之 IL13CAR-P140KMGMT 建構體的細胞之方法，

該方法包含：將編碼該 IL13CAR-P140KMGMT 嵌合蛋白之核酸序列導入該細胞、將該細胞維持於其中該 IL13CAR-P140KMGMT 嵌合蛋白係經該細胞表現之條件下。

[0081] 在一實施態樣中，該細胞係哺乳動物細胞。在另一實施態樣中，該哺乳動物細胞係人細胞、靈長動物細胞或小鼠細胞。

[0082] 在一實施態樣中，該細胞係 T 細胞。在另一實施態樣中，該細胞係自體細胞或人白血球抗原（HLA）相符細胞。

[0083] 在一實施態樣中，該細胞係得自一或多個經診斷罹患腦癌或惡性病之個體。

[0084] 在另一態樣中，提供一種包含該 IL13CAR-P140KMGMT 建構體之細胞族群。在另一實施態樣中，所提供的是該細胞族群中至少約 50%、60%、70%、80%、90%或 95%之細胞表現該 IL13CAR-P140KMGMT 建構體。

[0085] 在一態樣中，本發明係關於（一或多種）經分離之核酸序列，該經分離之核酸序列編碼（具有；包含；基本上由下列組成；由下列組成）：嵌合抗原受體（CAR），該 CAR 包含（基本上由下列組成；由下列組成）：表現一或多種針對腦癌之一或多種腫瘤抗原之配體（例如，抗體）的 T 細胞受體。在一些態樣中，該 CAR 另表現一或多種可用於治療腦癌之額外劑。

[0086] 在另一態樣中，本發明係關於一種表現建構

體，該表現建構體包含（基本上由下列組成；由下列組成）：一或多種編碼 CAR 之核酸序列，該 CAR 包含表現一或多種針對腦癌之一或多種腫瘤抗原（例如，癌抗原結合結構域）之配體（例如，抗體）的 T 細胞受體。在一些態樣中，該 CAR 另表現一或多種可用於治療腦癌之額外劑。

[0087] 在另一態樣中，本發明係關於一種宿主細胞，該宿主細胞包含（基本上由下列組成；由下列組成）：含有一或多種編碼 CAR 之核酸序列的表現建構體，該 CAR 包含表現一或多種針對腦癌之一或多種腫瘤抗原之配體（例如，抗體）的 T 細胞受體。在一些態樣中，該 CAR 另表現一或多種可用於治療腦癌之額外劑。

[0088] 在另一態樣中，本發明係關於一種產製表現 CAR 之細胞的方法，該 CAR 包含（基本上由下列組成；由下列組成）：包含一或多種針對腦癌之一或多種腫瘤抗原之配體（例如，抗體）的 T 細胞受體。在一特定態樣中，該 CAR 另包含一或多種可用於治療腦癌之額外劑。

[0089] 在另一態樣中，本發明係關於一種 CAR 多肽，該 CAR 多肽包含（具有；基本上由下列組成；由下列組成）：包含一或多種針對腦癌之一或多種腫瘤抗原之配體（例如，抗體）的 T 細胞受體。在一特定態樣中，該 CAR 多肽另包含一或多種可用於治療腦癌之額外劑。

[0090] 在另一態樣中，本發明係關於一種治療有治療需要之個體的腦癌之方法，該方法包含（基本上由下列

組成；由下列組成）：投予一或多種表現 CAR 之 T 細胞，該 CAR 包含表現一或多種針對腦癌之一或多種腫瘤抗原之配體（例如，抗體）的 T 細胞受體。在一些態樣中，該 CAR 另表現一或多種可用於治療腦癌之額外劑。

[0091] 本發明亦關於包含本文所提供之組成物的醫藥組成物。

【圖式簡單說明】

[0092] 上述將可自下列本發明之例示實施態樣更具體的說明而顯見，如隨附圖式所繪示，其中類似標示符號係指不同視圖中的相同部分。圖式不需按比例繪製，而是在說明本發明之實施態樣時加以強調。

[0093] 圖 1A 提供 IL13 CAR-MGMT 核酸建構體之示意圖。

[0094] 圖 1B 提供包含 IL13CAR 之 pMFG 宿主質體的質體地圖。

[0095] 圖 2A 提供 IL13.E13KR109K CAR-2A-P140KMGMT 之示意圖。

[0096] 圖 2B 提供包含 IL-13-CAR-2A-P140KMGMT 之 pMFG 宿主質體的質體地圖。

[0097] 圖 3A 至 3B 顯示經含有 IL13CAR-2A-P140KMGMT 建構體之病毒轉導的 PG13 細胞，在富集之前（圖 3A）及富集之後（圖 3B）的 FACS 分析。圖 3C 顯示 IL13 富集細胞中之 MGMT 過度表現亦藉由細胞溶解

物之西方墨點分析測試。

[0098] 圖 4 提供顯示經包含 IL13CAR-2A-P140KMGMT 建構體之反轉錄病毒轉導且暴露至 TMZ 的 T 細胞存活性之圖。

[0099] 圖 5A 及 5B 顯示經如本文所述之 IL13CAR-2A-MGMT 建構體轉染之細胞中的 IL2 (圖 5A) 及 IFN γ (圖 5B) 部分。

[0100] 圖 6 顯示獲得腫瘤且經投予如本文所述之嵌合性建構體及／或化學治療劑之小鼠的存活性。

[0101] 圖 7A 至 7B 提供 IL13CAR-P140KMGMT 建構體之嵌合核酸序列 (圖 7A; SEQ ID NO: 1) 及胺基酸序列 (圖 7B; SEQ ID NO: 4)。

[0102] 圖 8A 至 8B 提供 IL13 (E13Y) CAR-P140KMGMT 建構體之嵌合核酸序列 (圖 8A; SEQ ID NO: 2) 及胺基酸序列 (圖 8B; SEQ ID NO: 5)。

[0103] 圖 9A 至 9B 提供 IL13 (E13K.R109K) CAR-P140KMGMT 建構體之嵌合核酸序列 (圖 9A; SEQ ID NO: 3) 及胺基酸序列 (圖 9B; SEQ ID NO: 6)。

【實施方式】

[0104] 本文描述 (一或多種) 嵌合抗原受體 (CAR) 之產製, 該等 CAR 包含經基因工程化修飾以表現對癌症之一或多種腫瘤抗原的一或多種配體 (例如, 抗體或其他對細胞表面蛋白之配體) 之 T 細胞受體。具體而

言，本文所述之 CAR 蛋白包括配體結合結構域，該配體結合結構域與癌細胞表面上表現之蛋白結合。較佳地，腫瘤抗原並不表現於非罹病或正常細胞之表面上，或以遠低於其在癌症或其他罹病細胞上之表現量的量表現於非罹病或正常細胞上。經修飾以表現該所產生之 CAR 的 T 細胞係藉由該 CAR 之新特異性而經重新導向，以攻擊表現該 CAR 所辨識之表面抗原（例如受體）的腫瘤。本文亦顯示該 CAR 可另包含一或多種可用於治療腦癌之額外劑（例如，克服腦癌細胞對治療之抗藥性的劑）。具體而言，本文所述之組成物及方法係經設計以治療其中的惡性細胞表現 IL13 α 2 受體（IL13R α 2）之腦癌。因此，本揭示係利用表現及展示 IL13R α 2 之配體，諸如細胞介素介白素 13（IL13）或與 IL13R α 2 選擇性結合之抗體的可變結構域之 CAR 於本文中例示。IL13CAR 係與 O（6）-甲基鳥嘌呤-DNA-甲基轉移酶（MGMT）基因一起表現。在一實施態樣中，MGMT 基因係經修飾以編碼授予或增強宿主細胞（例如 T 細胞）對替莫唑胺（TMZ，一種用於治療腦癌之化學治療劑）之抗性的蛋白。

[0105] 在一較佳實施態樣中，IL13CAR 包含其中位置 13（相對於 SEQ ID NO：26 之編號）之麩胺酸係經突變成為酪胺酸之 IL13。在一替代性較佳實施態樣中，IL13 之位置 13 的麩胺酸係經突變成為離胺酸且位置 109 之精胺酸成為離胺酸（胺基酸位置 13 及 109 係相對於例如 SEQ ID NO：26）。在一實施態樣中，IL13 係經突變以使

得位置 109 之胺基酸從精胺酸改變成離胺酸。

[0106] 在一較佳實施態樣中，該經修飾之 MGMT 基因編碼在本文中稱為 P140KMGMT (SEQ ID NO: 33) 之 MGMT 變異體，其保護 IL13CAR-P140KMGMT 表現性 T 細胞免受甲基化藥劑諸如 TMZ 治療所造成之細胞毒殺作用。

[0107] 在一實施態樣中，該 IL13CAR 及 P140KMGMT 蛋白係自單順反子建構體表現，該單順反子建構體係經轉錄以產生編碼單一蛋白之單一轉錄物，該單一蛋白自 N 端至 C 端方向包含：IL13CAR、自我切割肽 (2A) 及 P140KMGMT。在轉譯此融合蛋白之後，該自我切割肽之切割導致主要位於細胞核之 P140KMGMT 蛋白及 IL13CAR，其中該 IL13 配體結構域係展示於該宿主細胞之表面。然而，應了解該等 IL13CAR 及 P140KMGMT 蛋白可自個別核酸表現。舉例來說，編碼該等 IL12CAR 及 P140KMGMT 蛋白之核酸可存在於分開載體中，該等分開載體接著經導入相同細胞中，或彼等可經選殖至單一載體為個別單順反子建構體（例如，各具有彼等自己的啟動子）。

[0108] 在 TMZ 存在下，經 IL13CAR-2A-P140KMGMT 建構體轉導之 T 細胞的存活優於經不表現 P140KMGMT 之 IL13CAR 轉導的 T 細胞（例如，實例 6；圖 6）。因此，本文中亦揭示編碼 CAR 及藥物抗性多肽（MGMT 蛋白）之核酸序列、一或多種核酸或包含該等核

酸之反轉錄病毒載體、經該一或多種載體轉染或轉導之細胞，以及藉由在經基因修飾之 T 細胞中共表現經修飾之 MGMT 基因，以增進該經修飾之 T 細胞經暴露至化學治療劑諸如 TMZ 時之存活性的方法。

[0109] 亦設想用於治療經診斷罹患癌症之個體的方法，其中該癌症包括表現 IL13R α 2 之細胞。舉例來說，腦癌諸如高度惡性神經膠質瘤及基底樣乳癌細胞相對於該相同組織的非罹病或非癌性細胞過度表現該 IL13R α 2 蛋白。所請求的組成物在當個體係經投予甲基化化學治療劑及經基因修飾之免疫細胞（例如 T 細胞）兩者時特別有用，該經基因修飾之免疫細胞表現 IL13CAR 及經修飾之 MGMT 基因兩者。此方法可減少治療時間且相較於僅以化學治療劑或經基因修飾 T 細胞治療之個體，可更快且更有效地達成神經膠質瘤消失。因此在一態樣中，本發明係關於（一或多種）經分離之核酸序列，該經分離之核酸序列編碼嵌合抗原受體（CAR），以用於表現一或多種針對癌症之一或多種腫瘤抗原之配體（例如，抗體）的 T 細胞。在一些態樣中，該 T 細胞另表現一或多種可用於治療腦癌之額外劑。

[0110]

定義

[0111] 本文所使用之「嵌合抗原受體（CAR）」係指一種包含一或多個胞外癌抗原結合結構域、一或多個跨膜結構域及一或多個用於活化 T 細胞之細胞質傳訊結構域

的分子，且其對於表現癌配體（例如癌抗原）之細胞具有特異性。當導入 T 細胞中時，CAR 重新導向該 T 細胞之特異性。在一特定態樣中，CAR 係表現為單一分子。

[0112] 如本文中所使用，「癌抗原結合結構域」係指與一或多種由癌細胞所表現之抗原（一或多種癌抗原）結合之結構域。在一特定態樣中，癌抗原結合結構域係與癌抗原特異性（選擇性）結合且不與不是由非癌細胞（例如，正常細胞、健康細胞、野生型細胞）所表現之非特異性標靶結合之結合結構域。

[0113] 各種癌抗原結合結構域可被使用，且可利用已知方法產製或自商業來源獲得。癌抗原結合結構域可為例如核酸、肽（蛋白）、抗體、有機分子、合成分子及類似物。該等癌抗原結合結構域可為例如衍生自庫（libraries）及／或獲自天然來源。

[0114] 本文所使用之用語「IL13CAR」包含含有如本文所述或為該領域所熟知之 IL13 配體的 CAR，IL13 配體包括但不限於 IL13 之變異體（包括但不限於 IL13 之功能性片段（例如可與 IL13R α 2 結合之 IL13 的片段）），及其他 IL13 配體諸如與 IL13R α 2 選擇性結合之免疫球蛋白結構域。類似地，本文所使用之用語「MGMT」包含野生型 MGMT 及任何如本文所述或為該領域所熟知之 MGMT 變異體。

[0115] 本文所使用之用於劑量或量的用語「治療有效」係指在投予至有需要之個體時，足以導致所欲活性之

包含本發明之嵌合受體且另包含藥物抗性多肽之化合物或醫藥組成物（例如包含免疫細胞諸如 T 淋巴細胞及/或 NK 細胞之組成物）的量。在本發明之範疇中，用語「治療有效」係指足以延緩藉由本發明之方法所治療之疾患的表徵、停止該疾患之進展、緩解或緩和該疾患至少一種症狀的化合物或醫藥組成物之量。應注意當活性成分之組合係經投予時，該組合之有效量可能包括或不包括各成分單獨投予時之有效量。

[0116] 與本發明之組成物一起使用之用語「醫藥上可接受」係指該等組成物之分子實體及其他成分為生理上可耐受且當投予至哺乳動物（例如人）通常不會產生非所欲之反應。較佳地，本文中所使用之用語「醫藥上可接受」係指由美國聯邦主管機關或州政府核准，或列於美國藥典或其他公認藥典可供用於哺乳動物及特別是人。

[0117] 此處之用語「個體」係指任何哺乳動物。在較佳之實施態樣中，該個體係人。

[0118] 在其他態樣中，該癌抗原結合結構域係抗體之全部或生物活性部分。此處所使用之用語「抗體」係指免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子之免疫活性部分，即包含與抗原選擇性結合之抗原結合部位之分子。如本文中所使用，「選擇性結合」係指抗體可與樣本中之抗原或其片段結合，且無法與其他分子（例如抗原）實質上結合之能力。免疫球蛋白分子之免疫活性部分之實例包括 Fab 片段（例如 $F(ab)$ 、 $F(ab')_2$ ）、可變片段（例如單鏈可變

(scFv)、雙 scFv、單結構域抗體片段(sdAb)、雙特異性片段(例如雙特異性 T 細胞接合劑(BiTE))。該等片段可自商業來源及/或藉由產製獲得,例如以酶諸如胃蛋白酶處理抗體。

[0119] 該抗體可為與一或多種由癌細胞表現之抗原結合(例如選擇性結合)之多株或單株抗體。如本文中所使用,「多株抗體」係來自與特定抗原結合且各自辨識不同表位之抗體集合中的抗體。如本文中所使用,「單株抗體」或「單株抗體組成物」係指僅包含一種能夠與一或多種抗原之特定表位免疫反應之抗原結合部位物種的抗體分子族群。單株抗體組成物因此通常展示對於特定抗原之單一結合親和性,該特定抗原與其起免疫反應。

[0120] 多株抗體可如上述藉由以一或多種所欲癌抗原諸如 IL13R α 2 蛋白之胞外域免疫適當個體來製備。經免疫個體中之抗體力價可藉由標準技術在不同時間監測,諸如使用固定多肽之酶連接免疫吸附測定(ELISA)。若為所欲,可自哺乳動物(例如自組織、血液)分離以癌抗原為目標之抗體分子,且藉由廣為週知之技術進一步純化,諸如進行蛋白 A 層析以獲得 IgG 部分。該領域之一般技藝人士將能製備與 IL13R α 2 蛋白之胞外域選擇性結合之多株抗體。

[0121] 在免疫後之適當時間,例如當抗體力價為最高時,可自該個體獲得抗體產製細胞,且藉由標準技術用於製備單株抗體,諸如最初由 Kohler and Milstein, Nature

256 : 495-497 (1975) 描述之雜交瘤技術、人 B 細胞雜交瘤技術 (Kozbor et al., Immunol. Today 4 : 72 (1983))、EBV 雜交瘤技術 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)) 或三源雜交瘤技術。用於產製雜交瘤之技術係廣為週知 (一般見 Current Protocols in Immunology, Coligan et al., (eds.) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY (1994))。簡言之，永生化細胞系 (通常為骨髓瘤) 係與來自經上述免疫原免疫之哺乳動物的淋巴細胞 (通常為脾細胞) 融合，所得雜交瘤細胞之培養上清液係經篩選，以識別出產製與本發明之多肽結合之單株抗體的雜交瘤。

[0122] 許多用於融合淋巴細胞與永生化細胞系之廣為週知方法中的任一者可被使用，以達產製對抗癌抗原之單株抗體的目的 (見例如 Current Protocols in Immunology, *supra*; Galfre et al., Nature, 266 : 55052 (1977); R.H.Kenneth, in Monoclonal Antibodies : A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); and Lerner, Yale J. Biol.Med.54 : 387-402 (1981))。另外，該領域之一般技藝人士將理解該等方法的許多變異亦可被使用。

[0123] 在製備單株抗體分泌雜交瘤之一替代方法中，藉由用多肽篩選重組組合式免疫球蛋白庫 (例如抗體噬菌體展示庫)，以分離與癌抗原結合之免疫球蛋白庫成

員，可識別及分離出抗該癌抗原之單株抗體。用於產製及篩選噬菌體展示庫之套組可自市面購得（例如 Pharmacia 重組噬菌體抗體系統，目錄編號 27-9400-01；及 Stratagene SurfZAPTM 噬菌體展示套組，目錄編號 240612）。此外，特別適合用於產製及篩選抗體展示庫之方法及試劑實例可見於例如美國專利第 5,223,409 號；PCT 公開號 WO 92/18619；PCT 公開號 WO 91/17271；PCT 公開號 WO 92/20791；PCT 公開號 WO 92/15679；PCT 公開號 WO 93/01288；PCT 公開號 WO 92/01047；PCT 公開號 WO 92/09690；PCT 公開號 WO 90/02809；Fuchs et al., Bio/Technology 9 : 1370-1372 (1991)；Hay et al., Hum. Antibod. Hybridomas 3 : 81-85 (1992)；Huse et al., Science 246 : 1275-1281 (1989)；及 Griffiths et al., EMBO J. 12 : 725-734 (1993)。

[0124] 此外，可利用標準重組 DNA 技術製備之重組抗體，諸如包含人及非人部分二者之嵌合及人化單株抗體，係屬於本發明之範疇。該等嵌合及人化單株抗體可利用該領域已知之重組 DNA 技術產製。

[0125] 任何上述之產製多株抗體或單株抗體的例行方法可被輕易應用於產製與 IL13R α 2 蛋白之胞外域選擇性結合之單株抗體之方法。所得抗體之可變結構域或其片段接著可被用於產製 IL13 配體結構域，該 IL13 配體結構域以大約相同於 IL13 配體結構域 (SEQ ID NO : 26) 結合 IL13R α 2 蛋白之親和性的親和性與 IL13R α 2 蛋白結合。

[0126]

本發明之建構體

[0127] 本發明至少一部分係基於表現對 IL13R α 2 具有特異性之 CAR 的免疫細胞，其中該細胞對化學治療劑諸如 TMZ 具有抗性。

[0128] 在某些實施態樣中，本發明提供編碼對腦癌細胞具選擇性之 CAR 蛋白及藥物抗性多肽兩者的核酸（在本文中亦稱為嵌合核酸序列）。在較佳之實施態樣中，該 CAR 蛋白係 IL13CAR 且該藥物抗性多肽係 MGMT 蛋白，該 MGMT 蛋白能夠授予 TMZ 抗性給表現其之細胞。嵌合核酸序列可如本文所述之建構，以編碼 IL13CAR 蛋白及 MGMT 藥物抗性蛋白兩者。以下提供對於該 IL13CAR 蛋白及該 MGMT 蛋白之結構域或序列區域的說明，及各結構域或區域的非限制性實例。IL13CAR 蛋白係一種線性嵌合（融合）蛋白，其自 N 端至 C 端方向包含：與罹病細胞諸如腦癌細胞上之 IL13R2 α 選擇性結合之 IL13 配體結構域、跨膜結構域、及胞內傳訊結構域。在某些實施態樣中，本文所述之 IL13CAR 蛋白可包含位於該 IL13 配體結構域之 N 端的信號結構域，及／或位於該配體結構域與該跨膜結構域之間的絞鏈區。

[0129] 在某些實施態樣中，包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個胺基酸殘基之短肽連接子係包括於該 IL13CAR 中，以分開該 CAR 蛋白之區域或結構域（例如信號序列、IL13 配體結構域、絞鏈區、跨膜結構域、

CD28 共刺激結構域、CD3- ζ 傳訊結構域、或額外的共刺激結構域)。應了解該短肽連接子可存在於任二個區域(結構域)之間，且與任二個其他區域(結構域)之間存在或不存在短肽連接子無關。舉例來說，小型肽連接子可存在於 CAR 中，其中該連接子分開該信號序列(若存在的話)與該 IL13 配體結構域、該 IL13 配體結構域與該跨膜結構域、該 IL13 配體結構域與該絞鏈區(若存在的話)、該絞鏈區(若存在的話)與該跨膜結構域、該跨膜結構域與該 CD28 共刺激結構域(若存在的話)、該 CD28 共刺激結構域(若存在的話)與該 CD3- ζ 傳訊結構域、該跨膜結構域與該 CD3 ζ 傳訊結構域、及/或該 CD3- ζ 傳訊結構域與該額外的共刺激結構域(若存在的話)。該等肽連接子可為由包含限制內核酸酶位點或其他特徵之核酸序列所編碼的胺基酸，該其他特徵允許編碼 IL13CAR-自我切割肽-MGMT 嵌合蛋白之各個區域或各個結構域(若為單順反子建構體)的核酸得以接合。這些結構域及連接子之各者係如下更詳細地說明。

[0130] 在一態樣中，該癌抗原結合結構域係肽或蛋白(例如，與癌細胞表面上所表現之抗原結合之配體；與癌細胞表面上所表現之受體結合之配體)。在較佳之實施態樣中，該受體係 IL13 2α 受體且該 CAR 係經建構以包含與該 IL13 2α 受體選擇性結合之配體。在一特定態樣中，該癌抗原結合結構域係介白素 13 (IL13) 或具有一或多個插入、刪除或點突變之 IL-13 變異體(例如 E13K

IL13 ; R109K IL13 ; 及 / 或 E13Y IL13) 。該癌抗原結合結構域可替代性地為抗體之可變結構域其與 IL13R α 2 選擇性結合之片段，諸如 scFv 片段。

[0131] 下表 1 及 2 分別提供本文所述之核酸及多肽之摘要，彼等可用於本發明之組成物（例如，嵌合核酸序列）及方法中。在一實施態樣中，本發明包括包含表 1 所示之核酸序列的任何組合之嵌合核酸序列。在一實施態樣中，本發明包括編碼表 2 所示之胺基酸序列的任何組合之嵌合核酸序列。

表 1
核酸序列之序列識別號

SEQ ID NO	說明	相對於 SEQ ID NO：1 之核苷酸位置
1	IL13 (WT) CAR-P140K 全長 (SEQ ID NO：1)	
2	IL13 (E13Y) CAR-P140K 全長 (SEQ ID NO：2)	
3	IL13 (E13K.R109K) CAR-P140K 全長 (SEQ ID NO：3)	
7	限制內核酸酶位點	1-6
8	Kozak 序列	7-12
9	IL13 信號序列	13-108
10	成熟 IL13	109-450
11	二肽連接子 -1	451-456
12	CD8 絞鏈區	457-591
13	二肽連接子 -2	592-597
14	CD3 ζ 跨膜結構域	598-666
15	二肽連接子 -3	667-672
16	CD28 共刺激結構域	673-804
17	二肽連接子 -4	805-810
18	CD3 ζ 傳訊結構域	811-1140
19	終止密碼子	1141-1143
20	5 個胺基酸連接子/限制位點/閱讀框調整	1144-1158
21	自我切割肽	1159-1212
22	P140K MGMT 藥物抗性多肽	1213-1839
23	終止密碼子	1840-1842
24	限制內核酸酶位點	1843-1846
34	具有 E13Y 突變之成熟 IL13	109-450

35	具有 E13KR109K 之成熟 IL13	109-450
48	MGMT 藥物抗性多肽 (P140)	

表 2
多肽序列之序列識別號

SEQ ID NO	說明	相對於 SEQ ID NO：4 之胺基酸位置
4	IL13 (WT) CAR-P140K 全長 (SEQ ID NO：4)	
5	IL13 (E13Y) CAR-P140K 全長 (SEQ ID NO：5)	
6	IL13 (E13K.R109K) CAR-P140K 全長 (SEQ ID NO：6)	
25	IL13CAR-P140K - IL13 信號序列	1-32
26	IL13CAR-P140K -野生型成熟 IL13	33-146
	二肽連接子-1	147-148
27	IL13CAR-P140K - CD8 絞鏈區	149-193
	二肽連接子-2	194-195
28	IL13CAR-P140K - CD3 ζ 跨膜結構域	196-218
	二肽連接子-3	219-220
29	IL13CAR-P140K - CD28 共刺激結構域	221-264
	二肽連接子-4	265-266
30	IL13CAR-P140K - CD3 ζ 傳訊結構域	267-376
31	5 個胺基酸連接子/閱讀框調整及限制位點	377-381
32	IL13CAR-P140K - 2A 自我切割肽	382-399
33	IL13CAR-P140K - P140K MGMT 藥物抗性多肽	400-606
36	具有 E13Y 突變之成熟 IL13	33-146
37	具有 E13KR109K 之成熟 IL13	33-146
38	G156A-MGMT	
39	MGMT-2	
40	MGMT-3	
41	MGMT-5	
43	MGMT (GenBank NP_002403- (P140K))	
44	IL13Rα2	
45	IL13 (WT) CAR-P140K 全長 (SEQ ID NO：45)	
46	IL13 (E13Y) CAR-P140K 全長	

	(SEQ ID NO : 46)	
47	IL13 (E13K.R109K) CAR- P140K 全長 (SEQ ID NO : 47)	
49	MGMT P140	

[0132]

配體

[0133] IL13CAR 配體（或稱為配體結構域）係與罹病細胞所表現之 IL13 受體例如 IL13R α 2 選擇性結合之肽、多肽或蛋白。罹病細胞可為腫瘤細胞或其他癌性或惡性細胞，且由罹病細胞表現之蛋白在本文中選擇性地稱為癌抗原。在一些實施態樣中，癌抗原係一種不會由或很少（少於 50%、40%、30%、20%或 10%，如 mRNA 表現分析）由健康組織細胞表現之蛋白。在一實施態樣中，罹病細胞係腦癌細胞諸如神經膠母細胞瘤細胞。在一特定態樣中，癌抗原結合結構域係與 IL-13R（例如，IL13R α 2，例如 GenBank 編號 NP_000631；SEQ ID NO：44）結合（例如，特異性或選擇性結合）之抗體的全部或其生物活性部分。在其他態樣中，配體（癌抗原結合結構域）係靶向（結合至；特異性或選擇性結合至）IL-13R（例如，IL13R α 2）之 scFv。

[0134] 各種由癌症（例如腫瘤）細胞表現之抗原係該領域已知。在一態樣中，癌抗原係例如表現在腫瘤表面上之腦腫瘤抗原。在一特定態樣中，腦腫瘤抗原係由高度惡性神經膠質瘤表現（例如神經膠質瘤／惡性腦腫瘤抗原）。高度惡性神經膠質瘤之具體實例包括多形性神經膠質母細胞瘤（GBM）、退行性星狀細胞瘤及兒童神經膠質瘤。由高度惡性神經膠質瘤之腫瘤細胞所表現之抗原的具體實例包括 EGFRvIII、EphA2、Her-2 及 IL-13R（例如

IL13R α 2) 。

[0135] 在一態樣中，由本發明之方法及所組成物所靶向之癌抗原係 IL13 受體 α -2 (IL13R α 2)，其係過度表現於多形性神經膠質母細胞瘤 (GBM) 腫瘤上，但很少或不表現於正常腦組織中之 GBM 相關蛋白 (Thaci *et al.*, *Neuro-Onco*, 16 (10) : 1304-1312 (2014) ; Sengupta *et al.*, *Biomed Res Int*, 2014 : 952128 (2014))。在一態樣中，IL13CAR 所表現或包含之配體結構域係與 IL13 α 2 受體結合之 IL13 及／或 IL13 突變，諸如 E13K IL13 (SEQ ID NO : 36) 及／或 R109K IL13 (SEQ ID NO : 37) (Kong *et al.*, *Clin Cancer Res*, 18 (21) : 5949-5960 (2012))。研究亦發現 IL13R α 2 蛋白在乳癌包括乳癌轉移 (Papageorgis *et al.*, 2015, *Breast Canc Res*, 17 : 98-112) 及頭頸癌 (Joshi *et al.*, 2000, *Cancer Res*, 60 : 1168-1172; Kawakami *et al.*, 2003, 9 : 6381-6388) 中係經上調，且亦促進胰癌、卵巢癌及結直腸癌之侵犯及轉移 (Fujisawa *et al.*, 2009, *Int J Cancer*, 69 : 8678-8695; Barderas *et al.*, 2012, *Cancer Res*, 72 : 2780-2790) 。因此，本文所述之組成物及方法可用於治療經診斷罹患惡性病之個體之方法中，其中惡性病之種類包括但不限於腦癌、頭頸癌、乳癌、胰癌、卵巢癌及結直腸癌。

[0136] 該領域之一般技藝人士可產製與 IL13R α 2 特異性結合之配體。舉例來說，進行例行實驗以產製與 IL13R α 2 選擇性結合之抗體，諸如經由使用 IL13R α 2 之胞

外域來免疫小鼠或使用噬菌體展示技術。具有所欲選擇性結合活性之抗體的可變結構域接著可被用來生產單鏈可變結構域 (scFv)。在一實施態樣中，以和野生型 IL13、IL13 (E13Y)、IL13 (R109K) 或 IL13 (E13K.R109K) 相同之親和性與 IL13R α 2 選擇性結合之 scFv，可用來作為如本文所揭示之 IL13CAR 建構體中之配體。

[0137] 在一實施態樣中，該 IL13CAR 具有 IL13 配體結構域，其包含與 SEQ ID NO：26 具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.5% 一致性之 IL13 多肽，或其功能性片段，其中：a) SEQ ID NO：26 之位置 13 的胺基酸係麩胺酸；b) SEQ ID NO：26 之位置 13 的胺基酸係酪胺酸；或 c) SEQ ID NO：26 之位置 13 的胺基酸係離胺酸且 SEQ ID NO：26 之位置 109 的胺基酸係精胺酸。在一實施態樣中，該 IL13CAR IL13 配體結構域包含 SEQ ID NO：26、SEQ ID NO：36、或 SEQ ID NO：37、或其功能性片段。

[0138] 本發明之核酸編碼如上述之 IL13 多肽。在一實施態樣中，編碼該 IL13 多肽之核酸係選自 SEQ ID NO：10、SEQ ID NO：34 及 SEQ ID NO：35。

[0139] 該 IL13CAR 可任意選擇地另包含信號（前導）肽，其允許該 IL13CAR 蛋白在宿主細胞表面上被處理及展示。在一實施態樣中，該信號肽係該配體蛋白之天然發生信號肽。舉例來說，該配體結構域包含包括其信號序列之全長 IL13 蛋白（信號序列包含 SEQ ID NO：25 之

胺基酸序列或係由 SEQ ID NO：25 之胺基酸序列組成）。在一實施態樣中，該信號序列包含與 SEQ ID NO：25 具有 95%、96%、97%、98%、99%或 99.5%一致性之序列。本發明之核酸編碼該信號肽。在一實施態樣中，編碼該信號肽之核酸係由 SEQ ID NO：9 組成。

[0140] 該領域之一般技藝人士了解可使用異源性信號序列，即來自非 IL13 之分泌性或跨膜蛋白之信號肽。信號肽（信號序列）係膜結合性或分泌性多肽不可或缺之部分，其為多肽之膜轉位所需，且其在膜轉位後或膜轉位期間被處理。信號序列具有約 13 及 36 個胺基酸之長度，且含有至少一個胺基端正電性殘基。信號序列之中心係 10 至 15 個殘基之強疏水性部分，且係描述於例如 Nunnari, j., et al., Curr. Opin. Cell Biol. 4 (1992) 573-580 及 Gilmore, R., et al, Ann. N.Y. Acad. Sci. 674 (1992) 27-37。信號肽之一些實例包括但不限於 VHCAMP、CD40、CD40L 或 TNF-R 之信號肽。信號肽在整合至目標細胞之細胞膜中時係經切割脫離。亦考慮的是可使用異源性信號序列，諸如 IgG 樣蛋白之信號序列。

[0141]

絞鏈區

[0142] 如本文所揭示之 IL13CAR 可包含間隔子區（又稱為絞鏈區或絞鏈域），其係位於該 IL13 配體結構域（抗原結合結構域）與該跨膜結構域之間。本發明所涵蓋之 IL13CAR 可包含或不包含絞鏈區。本文所述之 CAR

的絞鏈區係肽序列，其通常可彎折到足以允許抗原結合結構域朝向不同方向以促進抗原辨識。如同該領域之技藝人士所了解的，可決定使用其他適當之間隔子。舉例來說，短寡肽或多肽連接子（例如介於 2 至 10 個胺基酸長度）可形成該 CAR 之跨膜結構域與細胞質區之間的鏈接。絞鏈區之實例係來自免疫球蛋白之絞鏈區（例如 IgG1 之絞鏈區），包括但不限於來自免疫球蛋白樣蛋白或結構域之絞鏈區、免疫球蛋白之 CH₂CH₃ 區、及 CD3 之部分。在一實施態樣中，該絞鏈區包含來自 CD8 α 鏈之 Ig 樣結構域。

[0143] 在一實施態樣中，該絞鏈區包含 SEQ ID NO：27 之胺基酸序列或係由 SEQ ID NO：27 之胺基酸序列組成。或者，該絞鏈區包含與 SEQ ID NO：27 具有 95%、96%、97%、98%、99% 或 99.5% 一致性之序列或係由與 SEQ ID NO：27 具有 95%、96%、97%、98%、99% 或 99.5% 一致性之序列組成。本發明之核酸編碼該絞鏈區。在一實施態樣中，編碼該絞鏈區之核酸包含 SEQ ID NO：12。在一實施態樣中，編碼該 IL13CAR 之核酸包含與 SEQ ID NO：12 具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.5% 一致性之核酸。

[0144]

跨膜結構域

[0145] 如本文所述，該 CAR 包含一或多種跨膜結構域。一般而言，該跨膜結構域係橫跨細胞膜之疏水性區

(例如疏水性 α 螺旋)。任何各種跨膜結構域皆可使用。適當跨膜結構域之實例包括但不限於 CD3 (例如 CD3- ζ 跨膜結構域) 或 CD28 跨膜結構域。該跨膜結構域可衍生自天然或重組來源。當來源係天然時，該結構域可衍生自任何膜結合性或跨膜蛋白。在一態樣中，只要該 CAR 與目標結合，該跨膜結構域即可傳訊至胞內結構域。本發明中具有特定用途之跨膜結構域可包括例如 T 細胞受體之 α 、 β 或 ζ 鏈、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154 之至少跨膜區。

[0146] 在一實施態樣中，該 IL13CAR 之跨膜結構域包含人 CD3 ζ 鏈之至少一部分或係由人 CD3 ζ 鏈之至少一部分組成例如 SEQ ID NO: 28。在一實施態樣中，該跨膜結構域包含與 SEQ ID NO: 28 具有 95%、96%、97%、98%、99% 或 99.5% 一致性之序列或係由與 SEQ ID NO: 28 具有 95%、96%、97%、98%、99% 或 99.5% 一致性之序列組成。本發明之核酸編碼該跨膜結構域。在一實施態樣中，編碼該跨膜結構域之核酸包含 SEQ ID NO: 14，或與 SEQ ID NO: 14 具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.5% 一致性之核酸。

[0147]

細胞質傳訊結構域

[0148] 如本文所述，該 IL13CAR 具有細胞質結構域，其在抗原結合後傳遞活化及／或刺激信號至 T 細胞

(例如導致 T 細胞之活化、起始、擴張、留存 (persistence) 及／或擴增以及對抗腫瘤抗原之 T 細胞反應 (例如細胞毒性所需之信號))。細胞質結構域包含 T 細胞受體之一或多種傳訊結構域 (例如共刺激結構域) 及／或一或多種活化結構域，或與 T 細胞受體有關之一或多種傳訊結構域 (例如共刺激結構域) 及／或一或多種活化結構域。適當細胞質傳訊結構域之實例包括但不限於 CD3- ζ (CD3-zeta) (其包含免疫受體酪胺酸基底活化模體 (ITAM))、Fc ϵ RI γ 、CD28 (例如嵌合性 CD28)、4-1BB (CD137)、DAP10、OX40 (CD134)、CD4、CD27、CD244、誘導性 T 細胞共刺激子 (ICOS)、白血球 C 端 SRC 激酶 (LCK)、及 CD137 (例如 Sadelain *et al.*, *Cancer Discov*, 3 (4) : 388-398 (2013) ; Lee *et al.*, *Clin Cancer Res*, 18 (10) : 2780-2790 (2012))。該一或多種這些細胞質結構域之存在可藉由 ZAP70、TNF 受體相關因子 1 (TRAF1)、PI3K 及生長因子受體結合蛋白 2 (GRB2) 與 CAR 之細胞質結構域中之元件的相連來起始途徑，導致引發傳訊中間物及基因轉錄。

[0149] 「共刺激結構域」或「共刺激傳訊結構域」係指包含共刺激分子之胞內結構域之 CAR 部分。共刺激分子係非抗原受體或 Fc 受體之細胞表面分子，其提供 T 淋巴細胞與抗原結合時有效活化及功能所需的第二信號。共刺激結構域經歷構形變化，導致活化信號經由例如 CD3- ζ 傳訊結構域至細胞。共刺激配體可包括但不限於

CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激配體 (ICOS-L)、細胞間黏附分子 (ICAM、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M 1CB、HVEM、淋巴毒素 β 受體、3/TR6、ILT3、ILT4、與 Toll 配體受體結合之協同劑或抗體以及與 B7-H3 特異性結合之配體。在 IL13CAR 內包括一或多種共刺激結構域可增進表現 IL13CAR 之 T 細胞的療效及擴張。在一實施態樣中，共刺激結構域亦包含尤其是與存在 T 細胞上之共刺激分子特異性結合之抗體，諸如但不限於 CD27、CD28、4-IBB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴細胞功能相關抗原 -1 (LFA-1)、CD2、CD7、LTGHT、NKG2C、B7-H3、與 CD83 特異性結合之配體。

[0150] 如該領域之技藝人士所顯而易見的，該 IL13CAR 可具有任何數量之活化結構域及／或刺激結構域各傳訊結構域係經由肽鍵連接以形成 IL13CAR 建構體之細胞質結構域。在一態樣中，該 IL13CAR 具有活化結構域及刺激結構域。在另一態樣中，該 IL13CAR 具有一、二、三、四、五、等個活化結構域及一、二、三、四、五、等個刺激結構域。

[0151] 在一實施態樣中，本發明之 IL13CAR 包含人 CD28 蛋白及／或人 CD3- ζ 鏈之傳訊結構域。在一實施態樣中，IL13CAR 包含 CD28 及 CD3- ζ 鏈傳訊結構域兩者，其中該 CD28 共刺激結構域係位於該 CD3- ζ 傳訊結構域之

N 端。亦考慮的是其中該 CD3- ζ 結構域係位於該 CD28 共刺激結構域之 N 端之 CAR 細胞質結構域。如本文所述，該 CD28 共刺激結構域包含 SEQ ID NO：29 之序列。該 CD3- ζ 傳訊結構域包含 SEQ ID NO：30 之序列或係由 SEQ ID NO：30 之序列組成。本發明之核酸編碼該 CD28 共刺激結構域。在一實施態樣中，編碼該 CD28 共刺激結構域之核酸係由 SEQ ID NO：16 組成。本發明之核酸編碼該 CD3- ζ 傳訊結構域。在一實施態樣中，編碼該 CD3- ζ 傳訊結構域之核酸係由 SEQ ID NO：18 組成。這些傳訊結構域中之各者可包含一或多個刪除、插入、或點突變（天然或人工），其中各結構域之傳訊功能係與不包含該一或多個刪除、插入、或點突變之蛋白的傳訊功能大約相同。

[0152] 在一實施態樣中，該 IL13CAR 之細胞質結構域係由包含 SEQ ID NO：1 之核苷酸 673 至 1140 或 SEQ ID NO：1 之核苷酸 673 至 1143 的核酸序列編碼。在另一實施態樣中，該 IL13CAR 包含含有 SEQ ID NO：4 之胺基酸殘基 221 至 376 的細胞質結構域。

[0153] 圖 1A 說明 IL13CAR 建構體之一實施態樣，其中該 IL13 配體係含有 E13K 及 R109K 取代之變異體。

[0154]

藥物抗性多肽

[0155] 本發明至少部分係關於編碼如上詳述之對腦癌細胞具選擇性之 CAR 蛋白及藥物抗性多肽兩者之核

酸，其中該 CAR 及該藥物抗性多肽兩者之表現可用於治療癌症。舉例來說，該 CAR 及藥物抗性多肽可在經投予至個體的細胞中表現，該個體係經化學治療劑及／或增強化學治療劑之細胞毒殺性的藥劑治療。化學治療劑之實例包括經常用於治療惡性神經膠質瘤（例如多形性神經膠質母細胞瘤（GBM））之 1,3-雙（2-氯乙基）-1-亞硝基脲（BCNU 或卡氮芥（carmustine））、福莫司汀（fotemustine）、羅氮芥（lomustine）、及替莫唑胺（Temozolomide, TMZ）。一些化學治療劑之細胞毒性作用涉及形成 O⁶-甲基鳥嘌呤病灶，其可重新排列以形成致死性股內交聯。然而，這些甲基化劑之有效性受限於腫瘤過度表現 DNA 修復蛋白 O⁶-甲基鳥嘌呤 DNA 甲基轉移酶（MGMT），這是一種將細胞毒性 O⁶-烷基鳥嘌呤加成物自經處理細胞之 DNA 移除的蛋白。表現高量 MGMT 之腫瘤細胞因此部分地或完全地對 TMZ 化學療法之殺滅作用有抗性。一種防止甲基化劑療效減少之手段係以 MGMT 抑制劑特別是 O⁶-苄基鳥嘌呤治療接受 TMZ 化學療法之個體。然而，O⁶-苄基鳥嘌呤之投藥因為其對造血細胞的毒性效應而受限。

[0156] 替莫唑胺（TMZ）係抗神經膠質瘤化學治療藥物，其具有對造血細胞包括 T 細胞的細胞毒性效應。如 FDA 所指示且因此為抗神經膠質瘤治療中不可避免的步驟，TMZ 之標準劑量藉由甲基化 T 細胞之 DNA 而殺死彼等，其作用方式非常類似於 TMZ 摧毀腫瘤細胞之方式

(*Sengupta et al., Clin Dev Immunol*, 831090 (2012)) 。然而，研究顯示細胞中過度表現野生型 MGMT 或表現一或多種 MGMT 突變 (例如 G156A ; P140K) 將授予該細胞對抗甲基化劑諸如 TMZ 之保護 (*Woolford et al., J Gene Med*, 8 (1) : 29-31 (2006)) 。因此，由上述核酸編碼之藥物抗性多肽係 MGMT 或授予對 TMZ 之抗性的 MGMT 變異體。這些 TMZ 抗性變異體包括但不限於 P140K-MGMT (SEQ ID NO : 33) 、 P140K-MGMT (SEQ ID NO : 43) 、 G156A-MGMT (SEQ ID NO : 38) 、 MGMT-2 (SEQ ID NO : 39) 、 MGMT-3 (SEQ ID NO : 40) 及 MGMT-5 (SEQ ID NO : 41) (*Fontes et al., Mol Cancer Ther*, 5 (1) : 121-128) 。本文通篇中所指示之 MGMT 變異體中胺基酸取代的位置 (position) (位置 (location)) (例如 P140K 及 G156A) 係基於 SEQ ID NO : 33 之序列的胺基酸位置。MGMT-2 變異體具有下列取代 : S152H 、 A154G 、 Y158H 、 G160S 及 L162V 。MGMT-3 變異體具有下列取代 : C150Y 、 A154G 、 Y158F 、 L162P 及 K165R 。MGMT-5 變異體具有下列取代 : N157T 、 Y158H 及 A170S 。

[0157] 特別較佳地用於本文所揭示及使用之建構體的是 P140K-MGMT 變異體。本發明之核酸編碼該 MGMT 變異體。在一實施態樣中，編碼 P140K-MGMT 之核酸係由 SEQ ID NO : 22 組成。亦考慮的是編碼 G156A-MGMT (SEQ ID NO : 38) 、 MGMT-2 (SEQ ID NO : 39) 、

MGMT-3 (SEQ ID NO: 40) 或 MGMT-5 (SEQ ID NO: 41) 之核酸，彼等之各者可存在於 IL13CAR-MGMT 建構體中。亦考慮的是包含 SEQ ID NO: 43 (GenBank 編號 NP_002403，具有 P140K 點突變) 及任何對應 G156A-MGMT (SEQ ID NO: 38)、MGMT-2 (SEQ ID NO: 39)、MGMT-3 (SEQ ID NO: 40) 或 MGMT-5 (SEQ ID NO: 41) 之突變的點突變之 MGMT 蛋白序列。

[0158] 由本文所揭示之嵌合核酸序列編碼之 MGMT 或其變異體可位於該編碼 IL13CAR 蛋白之核酸序列之部分的下流或上游。在一實施態樣中，此嵌合核酸序列係單順反子，其中該建構體包含單一啟動子序列以驅動單一轉錄物之轉錄，該單一轉錄物因此係經轉譯成稍後經切割之單一蛋白。使用此單順反子建構體需要位於該等 IL13CAR 與 MGMT 蛋白之間的自我切割元件。舉例來說，該嵌合核酸序列表現於宿主細胞中時，最初產生自 N 端至 C 端方向包含 CAR (例如上述之 IL13 CAR)、自我切割肽、及如本文所述之 MGMT 蛋白或 MGMT 變異體之單一蛋白。此蛋白接著經切割以產生個別 CAR 及 MGMT 蛋白。該 CAR 蛋白係經處理及展示於該細胞表面上，而該 MGMT 蛋白可保留於該細胞核內。替代性建構體自 N 端至 C 端方向包含 MGMT 蛋白、自我切割蛋白及 CAR。

[0159] 在一實施態樣中，該等 CAR 及 MGMT 多肽部分係經自我切割肽分開。自我切割序列之一實例係 2A 元件，其包括來自口蹄疫病毒之 2A 序列。在一例示性實施

態樣中，該自我切割序列包含 SEQ ID NO：32 之序列或係由 SEQ ID NO：32 之序列組成。

[0160] 在一替代性實施態樣中，編碼如上述之 CAR 及如上述之 MGMT 或其變異體兩者之核酸序列係多順反子，其中其包含經非蛋白編碼序列諸如內部核糖體進入位點（IRES）分開之編碼該 CAR 之核酸序列及編碼 MGMT 或其變異體之核酸序列。可使用之 IRES 序列之實例包括但不限於腦脊髓炎病毒（EMCV）、口蹄疫病毒（FMDV）、Theiler 氏鼠腦脊髓炎病毒（TMEV）、人鼻病毒（HRV）、柯沙奇病毒（coxsackievirus, CSV）、脊髓灰質炎病毒（POLIO）、A 型肝炎病毒（HAV）、C 型肝炎病毒（HCV）、及瘟疫病毒（例如豬霍亂病毒（HOCV）及牛病毒性下痢病毒（BVDV））之 IRES 元件（見例如 Le et al., *Virus Genes* 12：135-147, 1996；及 Le et al., *Nuc. Acids Res.* 25：362-369, 1997，各文獻以參照方式整體納入此處）。

[0161] 多順反子嵌合核酸之替代性實施態樣係其中第二啟動子係位於編碼該 IL13CAR 之核酸序列與編碼該 MGMT 或其變異體之核酸序列之間的多順反子嵌合核酸。在此實施態樣中，編碼自我切割肽之核酸序列並不存在。

[0162] 亦考慮的是編碼該等 IL13CAR 及 MGMT 變異體之核酸各自位於個別的核酸載體內。也就是說，亦考慮一種系統或套組，其包含含有編碼如本文所述之 IL13CAR 的核酸之第一載體以及編碼如本文所述之 MGMT 蛋白之

第二載體。

[0163] 如該領域之技藝人士所將理解的是，編碼至少該等 IL13CAR 及 MGMT 蛋白或彼等之變異體的核酸序列可另包含額外組分，以促進及／或增強該等 CAR 及／或 MGMT 於宿主細胞中之表現及功能。舉例來說，該 CAR 可另包含（一或多種）起始轉譯之序列（例如 Kozak 序列及／或啟動子序列）以及用於同源重組之序列（反轉錄病毒 5'LTR；反轉錄病毒 3'LTR）。Kozak 序列可用於包含編碼如本文所述之 IL13CAR-2A-MGMT 建構體的核酸序列之嵌合核酸建構體中。

[0164] 可用於本發明之嵌合核酸序列係藉由將下列元件以 5'至 3'之方向接合或連接在一起來產製：Kozak 序列、編碼信號序列之核酸、編碼 IL13 配體之核酸、編碼絞鏈區之核酸、編碼跨膜結構域之核酸、編碼 CD28 共刺激（傳訊）結構域之核酸、編碼 CD3- ζ 傳訊結構域之核酸、編碼自我切割肽（例如 2A 肽）之核酸、以及編碼 MGMT 蛋白之核酸，以上各者皆如上述說明。該嵌合核酸序列可藉由合成包括及編碼上述元件之單一序列來產製。或者，上述元件各者可使用該領域之技藝人士所熟知之方法個別產製。舉例來說，各元件係使用 PCR 擴增，其中該 PCR 係經設計以在各元件之 5'及 3'端視需要產製限制內核酸酶位點，且該等個別元件係利用適當內核酸酶消化及接合在一起以獲得所欲之建構體。由此方法所產製之 IL13CAR-P140KMGMT 建構體將有短連接子肽存在於個別

元件之間。

[0165] 舉例來說，可有編碼 2、3、4、5 或 6 個胺基酸之核酸位於配體結構域與絞鏈區之間、絞鏈區與跨膜結構域之間、跨膜結構域與 CD28 共刺激結構域之間、CD28 共刺激結構域與 CD3- ζ 傳訊結構域之間、CD3- ζ 傳訊結構域及／或自我切割肽之間。

[0166] 在一例示性實施態樣中，該 IL13CAR 在配體與絞鏈結構域之間包含由 2 個胺基酸脯胺酸-精胺酸所組成之連接子。在絞鏈區與跨膜結構域之間的連接子係麩醯胺酸-離胺酸。在跨膜結構域與 CD28 共刺激結構域之間的連接子係纈胺酸-蘇胺酸。在 CD28 共刺激結構域與 CD3- ζ 傳訊結構域之間的連接子係蘇胺酸-精胺酸。在 CD3- ζ 傳訊結構域與 2A 肽之間的連接子係麩醯胺酸-脯胺酸-丙胺酸-丙胺酸-丙胺酸。所考慮的是上述連接子各者可與他者無關地存在或不存在於該 IL13 CAR 蛋白中。

[0167] 因此，用於轉染宿主細胞諸如 T 細胞且用於抑制或防止表現 IL13R α 2 且暴露至 TMZ 之細胞的生長之 IL13CAR-P140KMGMT 建構體的較佳實施態樣，包括但不限於 IL13 (WT) CAR-P140KMGMT (SEQ ID NO: 1 之核苷酸序列；SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列)；IL13 (E13Y) CAR-P140KMGMT (SEQ ID NO: 2 之核苷酸序列；SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列)；以及 IL13 (E13K.R109K) CAR-P140KMGMT (SEQ ID NO: 3 之核苷酸序列；SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列)。圖 2A 提供

IL13 (E13K.R109K) CAR-P140KMGMT 建構體之示意圖。這些 IL13CAR-P140KMGMT 建構體之額外實施態樣包括但不限於編碼蛋白 IL13 (WT) CAR-P140KMGMT (SEQ ID NO : 45) 、 IL13 (E13Y) CAR-P140KMGMT (SEQ ID NO : 46) 、 及 IL13 (E13K.R109K) CAR-P140KMGMT (SEQ ID NO : 47) 之建構體。

[0168] 該領域之技藝人士將理解的是，編碼如本文所述之信號肽、IL13 配體、絞鏈區、跨膜結構域及 CD28 共刺激結構域、CD3- ζ 傳訊結構域、自我切割肽連接子及 MGMT 蛋白或其變異體的核酸序列之各者可因密碼子簡併而有所不同，但不影響所編碼之蛋白。再者，該等多肽序列亦可諸如透過保守性胺基酸取代而有所不同，但不顯著影響該等經明示說明之蛋白的功能。因此，本文中亦考慮的是本文所述之核苷酸序列各者之變異體，以使本發明之核酸序列包含與 SEQ ID NO : 1 至 3、7 至 24 及 34 至 35 各者具有至少 75%、80%、82%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 99.5%一致性之序列。類似地，本文中亦考慮且揭示的是與 SEQ ID NO : 4 至 6、25 至 33 及 36 至 41 及 43 各者具有至少 75%、80%、82%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 99.5%一致性之多肽。

[0169] 二個核苷酸或胺基酸序列之一致性百分比可藉由排比序列以達最佳比較目的來判定（例如缺口可被導

入第一序列之序列中)。接著比較對應位置之核苷酸或胺基酸，且該二個序列之間的一致性百分比取決於該等序列所共享之一致位置的數目（即一致性百分比=一致位置數目/位置總數 x 100）。在某些實施態樣中，經排比以供比較目的之胺基酸或核苷酸序列的長度係參考序列長度之至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%，參考序列例如該些提供於圖 7A (SEQ ID NO: 1)、7B (SEQ ID NO: 4)、8A (SEQ ID NO: 2)、8B (SEQ ID NO: 5)、9A (SEQ ID NO: 3) 及 9B (SEQ ID NO: 6) 中之序列。二個序列之實際比較可藉由廣為周知之方法完成，例如使用數學運算法。該數學演算法之較佳非限制性實例係描述於 Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877 (1993)。該演算法被加入 BLASTN 及 BLASTX 程式 (版本 2.2) 中，如 Schaffer et al., *Nucleic Acids Res.*, 29: 2994-3005 (2001) 中所述。當利用 BLAST 及 Gapped BLAST 程式時，個別程式 (例如 BLASTN) 之預設參數可被使用。在一實施態樣中，所搜尋之資料庫係非冗餘 (NR) 資料庫，且用於序列比較之參數可設定為：無過濾器；預期數值 (Expect value) 為 10；序列長度 (Word Size) 為 3；矩陣 (Matrix) 係 BLOSUM62；及缺口罰分 (Gap Costs) 存在 (Existence) 為 11，延長 (Extension) 為 1。在另一實施態樣中，二個多肽或二個多核苷酸之間的一致性百分比係於受到關注之

多肽或多核苷酸的全長決定。

[0170] 用於比較序列之數學演算法的另一較佳非限制性實例係 Myers and Miller, CABIOS (1989) 之演算法。該演算法係併入 ALIGN 程式 (版本 2.0), 其係 GCG 序列排比套裝軟體 (Accelrys, San Diego, California) 之一部分。當利用 ALIGN 程式比較胺基酸序列時, 可使用 PAM120 加權殘基表、缺口長度罰分 12、及缺口罰分 4。其他序列分析演算法係該領域所知, 包括如 Torellis and Robotti, Comput. Appl. Biosci., 10: 3-5 (1994) 中所述之 ADVANCE 及 ADAM; 及如 Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 85: 2444-8 (1988) 中所述之 FASTA。

[0171] 在另一實施態樣中, 二個胺基酸序列之間的一致性百分比可利用 GCG 套裝軟體中之 GAP 程式完成, 使用 Blossom 63 矩陣或 PAM250 矩陣任一者, 及 12、10、8、6 或 4 之缺口加權及 2、3 或 4 之長度加權。在又另一實施態樣中, 二個核酸序列之間的一致性百分比可利用 GCG 套裝軟體中之 GAP 程式完成, 使用 50 之缺口加權及 3 之長度加權。

[0172] 多肽之間的類似性通常係藉由保守性胺基酸取代決定。該等取代係指將多肽中之給定胺基酸以具有類似特徵之另一胺基酸取代。保守性取代可能是表型靜默的。通常被視為保守性取代者係在脂族胺基酸 Ala、Val、Leu 及 Ile 之間以一個替換另一個; 係羥基殘基 Ser 及 Thr

之互相交換；係酸性殘基 Asp 及 Glu 之交換；係醯胺殘基 Asn 及 Gln 之間的取代；係鹼性殘基 Lys 及 Arg 之交換；及芳族殘基 Phe 及 Tyr 之間的替換。有關哪一個胺基酸改變可能是表型靜默者之指南可見 Bowie et al., Science 247: 1306-1310 (1990)。

[0173] 變異體多肽可在胺基酸序列上有一或多個取代、刪除、插入、倒位、融合及截短之差異或任何上述之組合。另外，變異體多肽可具有完全功能性（例如感染細胞及產生後代病毒之能力）或可缺乏一或多種活性之功能（例如產生後代病毒之能力）。完全功能性變異體通常僅含有保守性變異或在非關鍵殘基或非關鍵區域中之變異。功能性變異體亦可含有導致功能無改變或非顯著改變之類似胺基酸之取代。或者，該等取代可正面地或負面地影響功能至某種程度。非功能性變異體一般而言含有一或多種非保守性胺基酸取代、刪除、插入、倒位、或截短、或在關鍵殘基或關鍵區域之取代、插入、倒位、或刪除。

[0174] 功能必要性胺基酸可藉由該領域已知之方法識別，諸如定點突變形成或丙胺酸掃描突變形成（Cunningham et al., Science, 244: 1081-1085 (1989)）。該後項程序在各個分子殘基中導入單一丙胺酸突變（每分子一個突變）。所形成之突變分子接著於活體外進行生物活性之測試。影響多肽活性之關鍵位點亦可藉由結構分析加以測定，諸如結晶化、核磁共振、或光親和性標示（見 Smith et al., J. Mol. Biol., 224: 899-904

(1992) ； 及 de Vos et al. Science, 255 : 306-312 (1992) 。

[0175] 本文另揭示包含實質上純的多肽之組成物，該多肽包含 IL13CAR 蛋白及 P140KMGMT 變異體或係由 IL13CAR 蛋白及 P140KMGMT 變異體組成，該 IL13CAR 蛋白如本文所述為 SEQ ID NO：4、5 或 6 之胺基酸 1 至 146 之序列及與 SEQ ID NO：4、5 或 6 之胺基酸 1 至 146 之序列具有較佳地至少 75%、80%、82%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性之多肽，且該 P140KMGMT 變異體如本文所述為 SEQ ID NO：1 之胺基酸 400 至 606 之序列及與 SEQ ID NO：1 之胺基酸 400 至 606 之序列具有較佳地至少 75%、80%、82%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列一致性之多肽，該序列一致性係使用 BLAST 程式及如本文所述之參數加以測定。在另一實施態樣中，多肽之實例包括包含 SEQ ID NOs：4、5 及／或 6 或係由 SEQ ID NOs：4、5 及／或 6 組成之實質上純的多肽；以及與 SEQ ID NO：4 具有較佳地至少 75%、80%、82%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列類似性之多肽，該序列類似性係使用 BLAST 程式及如本文所述之參數加以測定。

[0176] 在特定態樣中，本發明係關於一種經分離之由 SEQ ID NO：1 (IL13 CAR-P140KMGMT) 、 SEQ ID NO：2 (IL-13 (E13Y) CAR-P140KMGMT) 、 SEQ ID

NO：3（IL-13（E13K R109K）CAR-P140KMGMT）或彼等之組合所編碼之多肽。在其他態樣中，本發明係關於一種包含 SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5、SEQ ID NO：6、SEQ ID NO：45、SEQ ID NO：46、SEQ ID NO：47 或彼等之組合之胺基酸序列的多肽（經分離之多肽）。

[0177] 亦考慮一種 CAR 多肽，該 CAR 多肽包含 T 細胞受體，該 T 細胞受體包含一或多種針對腦癌之一或多種腫瘤抗原的配體（例如抗體）。在一特定態樣中，該 CAR 多肽另包含一或多種可用於治療腦癌之額外劑。在其他態樣中，本發明係關於經分離之多肽、其片段、衍生物、及變異體，以及由本文所述之核苷酸序列所編碼之多肽（例如其他變異體）。如本文中所使用，用語「多肽」係指胺基酸之聚合物且不限定特定長度；因此，肽、寡肽及蛋白均包括在多肽之定義中。

[0178] 該等多肽可利用已知之蛋白合成方法加以合成。在一實施態樣中，該多肽係藉由重組 DNA 及重組蛋白表現及純化技術來生產。舉例來說，編碼該多肽之核酸分子係經選殖至表現載體，該表現載體係經導入宿主細胞，該多肽係於該宿主細胞中表現，且該所欲蛋白係經純化及調製以供包裝及投予。

[0179] 如本文中所使用，當多肽實質上不含物質、當多肽係自重組或非重組細胞分離時、或當多肽經化學合成而不含化學前體或其他化學物時，該多肽被稱為「經分離」、「實質上純的」或「實質上純的且經分離」。此

外，多肽可與另一通常在細胞中不與之相連的多肽相連（例如呈「融合蛋白」）且仍為「經分離」、「實質上純的」或「實質上純的且經分離」。經分離、實質上純的或實質上純的且經分離之多肽可利用例如本文所述之親和性純化技術，以及其他本文所述且為該領域之技藝人士所知之技術獲得。

[0180] 本發明之多肽可經純化至均質狀態。然而應了解其中多肽未經純化至均質狀態之製劑亦可使用。關鍵特徵在於該製劑允許該多肽之所欲功能，即使存在有可觀量之其他組分。因此，本發明涵蓋各種程度之純度。在一實施態樣中，用語「實質上不含物質」包括具有少於 30%（乾重量計）其他蛋白（即污染蛋白）、少於約 20%其他蛋白、少於約 10%其他蛋白、少於約 5%、或少於約 1%其他蛋白之多肽製劑。

[0181] 當多肽係經重組產製，其亦可實質上不含培養基，意即培養基佔該多肽製劑少於約 20%、少於約 10%、或少於約 5%之體積。用語「實質上不含化學前體或其他化學物」包括其中多肽係與涉及其合成之化學前體或其他化學物分開之多肽製劑。在一實施態樣中，用語「實質上不含化學前體或其他化學物」包括具有少於約 30%（乾重量）之化學前體或其他化學物、少於約 20%之化學前體或其他化學物、少於約 10%之化學前體或其他化學物、或少於約 5%之化學前體或其他化學物之多肽製劑。

[0182] 在一實施態樣中，本發明之多肽包含由 SEQ ID NO：1、3 及／或 5 之核酸分子及彼等之互補物及部分所編碼之胺基酸序列。本發明之多肽亦涵蓋與由包含 SEQ ID NO：1、3 及／或 5 之核苷酸序列及彼等之互補物及部分的核酸分子所編碼之多肽具有實質上同源性之片段及序列變異體。

[0183]

核酸表現建構體

[0184] 本發明之另一態樣關於核酸表現建構體或載體、反轉錄病毒載體及／或反轉錄病毒顆粒及彼等之用途。一般技藝人士已知之重組 DNA 技術方法係用於設計及產製編碼如本文所詳述之 IL13CAR、自我切割肽及 MGMT 變異體之嵌合核酸序列。該嵌合核酸建構體接著係經轉殖至質體載體，以允許例如定序以證實該建構體之序列。一旦所欲序列係經證實，該嵌合核酸建構體被用於生產反轉錄病毒顆粒以用於轉染哺乳動物細胞。因此，包含如本文所述之 SEQ ID NO：1 至 3 之核酸序列及 SEQ ID NO：7 至 24、34 及／或 34 至 35 之組合的嵌合性建構體係經選殖至該等質體載體以供後續包裝至反轉錄病毒顆粒。在一特定態樣中，該等嵌合建構體及質體載體包含一或多種包含如上述之 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2 及／或 SEQ ID NO：3 核酸序列。含有 IL13 (WT) CAR-P140KMGMT 序列 (SEQ ID NO：1)、IL13 (E13Y) CAR-P140KMGMT (SEQ ID NO：2)、或 IL13

(E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT 序列 (SEQ ID NO: 3) 之質體載體係藉由將本文所述片段選殖至 pUC57 載體接著選殖至 pMFG 載體如實例 1 所述產製，然後用於生產反轉錄病毒顆粒 (實例 2) 。

[0185] 圖 1B 說明包含 IL13CAR 建構體之質體載體，其中 MGMT 基因尚未被導入。圖 2B 說明含有 IL13CAR 建構體且在該 IL13CAR 編碼序列下游亦含有 P140KMGMT 編碼序列之相同質體骨架。

[0186] 在一替代性實施態樣中，編碼如本文所述之 IL13CAR 之核酸係經選殖至第一載體，且編碼如本文所述之 MGMT 蛋白之核酸係經選殖至第二載體。因此，本發明亦描述包含編碼如本文所述之 IL13CAR 之核酸的第一載體 (質體、表現、病毒、反轉錄病毒、慢病毒、腺病毒等) 以及包含編碼如本文所述之 MGMT 蛋白之核酸的第二載體 (質體、表現、病毒、反轉錄病毒、慢病毒、腺病毒等) 。

[0187] 適當核酸建構體之實例包括質體 (環狀雙股 DNA 圈環) 及病毒載體 (反轉錄病毒載體、慢病毒載體、腺病毒載體) 。某些載體可在彼等所被導入之宿主細胞內自主複製 (例如具有細菌性複製起點之細菌性載體及附加型哺乳動物載體) 。其它載體 (例如非附加型哺乳動物載體) 在被導入宿主細胞時可被整合至該宿主細胞之基因組中，藉以與該宿主基因組一起複製。另外，某些載體、表現載體能引導彼等可操作地連接之核酸的表現。一

般來說，重組 DNA 技術中之表現建構體通常呈質體之形式。然而，本發明意圖包括該等具有相同功能之其他形式的表現載體，諸如病毒載體（例如複製缺陷型反轉錄病毒、腺病毒及腺病毒相關病毒）。

[0188] 本發明之較佳重組表現載體所包含之本發明之核酸分子呈現適合在宿主細胞中表現該核酸分子之形式。這表示該等重組表現載體包括一或多種根據將用於表現之宿主細胞來選擇之調節序列，該調節序列係可操作地連接至將被表現之核酸序列。在重組表現載體內，「可操作地連接」係意圖表示受到關注之核苷酸序列係以允許該核苷酸序列表現之方式與該（等）調節序列連接（例如當該載體被導入宿主細胞中時，於試管內轉錄/轉譯系統中或於該宿主細胞中）。用語「調節序列」係意圖包括啟動子、增強子及其他表現控制元件（例如聚腺苷酸化信號）。該等調節序列係描述於例如 Goeddel, *Gene Expression Technology : Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)。調節序列包括該些引導核苷酸序列在許多類型之宿主細胞中組成性表現之調節序列，以及該些引導核苷酸序列僅在某些宿主細胞中表現之調節序列（例如組織特異性調節序列）。

[0189] 該領域之技藝人士將了解，表現載體之設計可視諸如將被轉形之宿主細胞之選擇及所欲多肽之表現量等因子而定。本發明之表現載體可被導入宿主細胞中，以藉此生產如本文所述之核酸分子所編碼之多肽包括融合多

肽。

[0190] 本發明之重組表現載體可經設計以在原核或真核細胞中表現本發明之多肽，例如細菌細胞諸如大腸桿菌（*E. coli*）、昆蟲細胞（使用桿狀病毒（*baculovirus*）表現載體）、酵母菌細胞或哺乳動物細胞（靈長動物（例如人）、鼠（例如小鼠）、貓、犬、嚙齒動物、綿羊、牛細胞）。

[0191] 生產含有嵌合核酸建構體之反轉錄病毒係經成功地產製，以包含編碼 IL13（E13K.R109K）CAR-P140KMGMT 之嵌合核酸序列，如實例 1 及 2 所述。實例及說明書中所描述之方法加上該領域之技藝人士所知之方法，可被用於生產含有任何如本文所述之嵌合核酸建構體之反轉錄病毒顆粒。過程中之轉染效率可藉由流式細胞分析測量細胞表面所表現之 IL13 配體加以監測。經 IL13CAR-P140KMGMT 建構體轉導之細胞可例如利用螢光激活細胞分選器加以富集。圖 3A 及 3B 顯示經 IL13（E13K.R109K）CAR-A2-P140KMGMT 建構體轉染之 PG13 細胞的富集。圖 3A 顯示在經親嗜性反轉錄病毒第一次轉導之後，表現 IL13 之細胞的相對數目（例如 4.0%）。圖 3B 顯示在富集經親嗜性反轉錄病毒轉導之細胞後，表現 IL13 之細胞的相對數目（例如 96.6%）。細胞溶解物之西方墨點分析可利用例行方法進行，以證實及測量由宿主細胞所表現之 P140KMGMT 蛋白。如圖 3C 所示，相較於未經轉導之細胞或經如圖 1A 至 1B 所繪示之

僅表現 IL13CAR 建構體的建構體轉導之細胞，富集經 IL13CAR-A2-P140KMGMT 建構體轉導之細胞過度表現 P140KMGMT 蛋白。

[0192] 圖 1A 及 2A 提供經選殖至質體載體中之 IL13 (E13K.R109K) CAR-P140KMGMT 的示意圖，而圖 1B 及 2B 則以線性圖顯示側接 5' LTR 及 3'LTR 以供整合至宿主細胞基因組中之嵌合體。

[0193] 本文所述之核酸建構體係經導入宿主哺乳動物細胞中，以授予該細胞腫瘤細胞殺滅功能及抗 DNA 甲基化劑諸如 TMZ 之化學治療劑抗性兩者。將核酸導入哺乳動物宿主細胞中係利用例如反轉錄病毒載體完成，例如於實例 3 中所述。用於過渡性或穩定性轉導哺乳動物細胞之反轉錄病毒載體係該領域所廣為週知且描述於下如彼等用於本發明所述之蛋白表現及治療系統中。

[0194] 某些實施態樣採用病毒載體以將本文所述之表現系統轉導漿細胞諸如 T 細胞。病毒載體之實例包括但不限於 MFG 載體、腺病毒基底載體、腺病毒相關病毒 (AAV) 基底載體、反轉錄病毒載體、反轉錄病毒-腺病毒載體、及衍生自單純疱疹病毒 (HSV) 之載體。

[0195] 一般而言，最簡單之反轉錄病毒載體包含某些 5'LTR 及 3'LTR 序列、一或多種受到關注之基因（將於目標細胞中表現者）、一或多種啟動子、及用於包裝 RNA 之順式作用序列。如本文所述且該領域已知之其他調節序列可被包括。病毒載體一般係經選殖至可經轉染至

包裝細胞系諸如真核細胞（例如 PG13 小鼠纖維母細胞）之質體中，且一般亦包含使質體於細菌中複製之有用序列。某些病毒載體諸如反轉錄病毒載體採用一或多種異源性啟動子、增強子或兩者。某些實施態樣採用「內部」啟動子/增強子，其係位於病毒載體之 5' LTR 與 3' LTR 序列之間且係與受到關注之基因可操作地連接。「功能性關係」及「可操作地連接」係指但不限指該基因相對於啟動子及/或增強子係位處正確的位置及方向，以使得當該啟動子及/或增強子係與適當之調節分子接觸時，將致使該基因之表現。可使用任何調節（例如增加、降低）病毒 RNA 基因組於包裝細胞系中之表現、調節受到關注之選定基因於經感染之目標細胞中之表現、或兩者之增強子/啟動子組合。

[0196] 啟動子係由 DNA 序列形成之表現控制元件，其允許 RNA 聚合酶之結合及轉錄之發生。啟動子係位於受到關注之選定基因（一般在約 100 至 1000 bp 內）的起始密碼子上游（5'）之非轉譯序列，且控制彼等所可操作地連接之編碼多核苷酸序列的轉錄及轉譯。啟動子可為誘導性或組成性。誘導性啟動子因應培養條件之一些改變，諸如溫度改變，而起始在彼等控制下之 DNA 的轉錄量增加。

[0197] 各種啟動子以及用於可操作地連接該啟動子至多核苷酸編碼序列之方法皆為該領域所知。天然啟動子序列及許多異源性啟動子二者皆可被用於引導受到關注之

選定基因的表現。某些實施態樣採用異源性啟動子，因為相較於天然啟動子，彼等大抵允許所欲蛋白之較高轉錄及較高產量。

[0198] 某些病毒載體包含順式作用包裝序列，以促進基因組病毒 RNA 納入病毒顆粒之中。實例包括 psi 序列。該等順式作用序列係該領域已知。

[0199] 病毒載體之產製可利用該領域已知之任何適當基因工程技術完成，包括但不限於限制內核酸酶消化、接合、轉形、質體純化、PCR 擴增、及 DNA 定序之標準技術，例如 Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989))、Coffin et al. (Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1997)) 及 "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)) 中所述。

[0200] 任何種類之該領域已知之方法可被用於生產基因組包含該病毒載體之 RNA 副本的適當反轉錄病毒顆粒。其中的一個方法是將病毒載體導入包裝細胞系中，該包裝細胞系根據該病毒載體，將該病毒基因組 RNA 包裝成具有所欲目標細胞特異性之病毒顆粒。包裝細胞系一般反式 (in trans) 提供將病毒基因組 RNA 包裝成病毒顆粒及感染目標細胞所需之病毒蛋白，包括結構性 gag 蛋白、酶性 pol 蛋白、及封套糖蛋白。

[0201] 在某些實施態樣中，包裝細胞系可穩定表現

某些必須或所欲之病毒蛋白（例如 gag、pol）（見例如美國專利第 6,218,181 號）。在某些實施態樣中，包裝細胞系可經編碼某些必須或所欲之病毒蛋白（例如 gag、pol、糖蛋白）的質體過渡性轉染，包括本文所述之麻疹病毒糖蛋白序列。在一例示性實施態樣中，包裝細胞系穩定表現 gag 及 pol 序列，且該細胞系接著經編碼該病毒載體之質體及編碼該糖蛋白之質體轉染。在將所欲質體導入之後，病毒顆粒係經適當收集及處理，諸如進行超離心以形成病毒顆粒之濃縮原液。例示性包裝細胞系包括 PG13（ATCC CRL-10686）、293（ATCC CCL X）、HeLa（ATCC CCL 2）、D17（ATCC CCL 183）、MDCK（ATCC CCL 34）、BHK（ATCC CCL-10）及 Cf2Th（ATCC CRL 1430）細胞系。

[0202]

宿主細胞

[0203] 本發明之另一態樣係關於其中已經導入本發明之重組表現載體的宿主細胞。用語「宿主細胞」及「重組宿主細胞」在本文中可互相交換使用。應了解的是，該等用語不僅指述該特定主題細胞但亦指該細胞之後代或潛在後代。由於後繼世代可能因為突變或環境影響而發生某些修飾，因此該後代事實上可能不與親代細胞完全相同，但仍包括在本文所使用之用語之範圍內。

[0204] 宿主細胞可為任何原核或真核細胞。舉例來說，本發明之核酸分子可於細菌細胞（例如大腸桿菌（E.

coli))、昆蟲細胞、酵母菌、或哺乳動物細胞中表現。在一態樣中，該宿主細胞係哺乳動物細胞（靈長動物（例如人）、鼠（例如小鼠）、貓、犬、嚙齒動物、綿羊、牛細胞）。在一特定態樣中，該哺乳動物細胞係免疫細胞。在又另一態樣中，該哺乳動物細胞係 T 細胞。其他合適之宿主細胞對於該領域之技藝人士係為明顯可知。

[0205] 為了本文之目的，該 T 細胞可為任何 T 細胞，諸如經培養之 T 細胞，例如初代 T 細胞，或來自經培養之 T 細胞系之 T 細胞，例如 Jurkat、SupT1 等，或自哺乳動物獲得之 T 細胞。若自哺乳動物獲得，該 T 細胞可自數種來源獲得，包括但不限於血液、骨髓、淋巴結、胸腺、或其他組織或液體。T 細胞亦可經富集或經純化。T 細胞可為人 T 細胞。T 細胞可為自人分離之 T 細胞。T 細胞可為任何種類之 T 細胞且可為任何發育階段，包括但不限於 $CD4^+/CD8^+$ 雙陽性 T 細胞、 $CD4^+$ 輔助 T 細胞，例如 Th_1 及 Th_2 細胞、 $CD8^+$ T 細胞（例如細胞毒性 T 細胞）、周邊血液單核細胞（PBMC）、周邊血液白血球（PBL）、腫瘤浸潤細胞、記憶 T 細胞、初始 T 細胞（naive T cell）、及類似者。T 細胞可為 $CD8^+$ T 細胞或 $CD4^+$ T 細胞。

[0206] 在一實施態樣中，用於本發明之組成物及方法中之宿主細胞係 NK-92 細胞（NK-92 細胞系，ATCC 編號 PTA-6672）。

[0207] 核酸建構體可經由習用之轉形或轉染技術導

入原核或真核細胞。如本文中所使用，用語「感染」、「轉形」、「轉導」及「轉染」係意圖指述各種該領域已知之將外來核酸分子（例如 DNA）導入宿主細胞中之技術，包括磷酸鈣或氯化鈣共沈澱、DEAE-葡聚糖媒介之轉染、脂質體轉染、或電穿孔。用於轉形或轉染宿主細胞之適當方法可見於例如 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd Ed., CSHP, New York (1989) 及其他實驗室手冊。

[0208] 本發明之宿主細胞諸如培養中之原核或真核宿主細胞可被用於生產（表現）一或多種本發明之 CAR。因此，本發明另提供使用本發明之宿主細胞生產 CAR 之方法。在一實施態樣中，該方法包含於適當培養基中培養本發明之宿主細胞（其中已導入編碼本發明之多肽之重組表現載體），以使該一或多種 CAR 係經生產（例如表現於該宿主細胞之表面上）。

[0209] 在穩定轉染哺乳動物細胞方面，已知取決於所使用之表現載體及轉染技術，僅一小部分之細胞可將外來 DNA 整合至彼等之基因組中。為了識別及選擇這些整合體，通常將編碼可選標誌之基因（例如抗生素抗性）伴隨受到關注之基因一起導入宿主細胞中。較佳之可選標誌包括該些授予對藥物諸如 G418、潮黴素、或甲胺喋呤（methotrexate）之抗性的可選標誌。編碼可選標誌之核酸分子可在和本發明之核酸分子所在之相同載體上導入宿主細胞中，或可在不同載體上導入。經該導入核酸分子穩

定轉染之細胞可藉由藥物選擇來識別（例如納入該可選標誌基因之細胞將存活，而其他細胞則死亡）。

[0210] 如本文所例示，所考慮的是表現 IL13CAR 且對暴露至化學治療劑替莫唑胺（temozolomide）具抗性之免疫細胞，諸如但不限於 T 細胞。具體而言，在 TMZ 存在下，本文顯示如上所詳述之經編碼且表現 IL13CAR（SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5 或 SEQ ID NO：6）及 P140KMGMT 突變（SEQ ID NO：33）之核酸序列轉導的 T 細胞，相較於表現僅表現 IL13 之 CAR 的 T 細胞具有較高之存活率。因此，在一特定態樣中，本發明係關於表現 IL13 及/或 IL13 之變異體（例如 SEQ ID NO：4（WT IL13 CAR）、SEQ ID NO：5（IL13E13YCAR）或 SEQ ID NO：6（IL13E13K.R109KCR）及/或 R109K IL13CAR）及化學保護細胞之 MGMT 突變（例如 P140KMGMT 突變（SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：38、SEQ ID NO：39、SEQ ID NO：40、SEQ ID NO：41））的 CAR。在一實施態樣中，該細胞係經 IL13CAR-A2-MGMT 建構體轉導，其中該 MGMT 蛋白不是野生型 MGMT 蛋白（SEQ ID NO：49）。

[0211]

收集及轉染宿主 T 細胞

[0212] 經嵌合抗原受體（CAR）工程化以致使高度特異性腫瘤辨識及殺滅的 T 細胞，在獲得具前景之臨床結果後已受到大量關注（Grupp et al., 2013, N Eng J Med,

368 : 1509-1518; Porter et al., 2011, N Eng J Med, 365 : 725-733; Sadelain et al., 2009, Curr Opin Immunol, 21 : 215-223) 。經 CAR 基因重新編程之 T 細胞提供用於對接 (docking with) 及溶解腫瘤細胞之 MHC 依賴性機轉。該等經改質之 T 細胞又名「設計師 T 細胞 (designer T cell)」、「T 小體 (T-bodies)」或「CAR-T 細胞」(Ma et al., 2002, Cancer Chemotherapy & Biological Response Modifiers : Elsevier Science, pp. 319-345; Park et al., 2011, Trends Biotech, 29 : 550-557; Ma et al., 2014, Prostate, 74 : 286-296) 。

[0213] 在另一態樣中，本揭示係關於一種產製表現 CAR 及 MGMT 蛋白之細胞的方法，該 CAR 包含 T 細胞受體，該 T 細胞受體包含一或多種針對腦癌之一或多種抗原的配體（例如抗體），該 MGMT 蛋白增加經編碼該 CAR 及 MGMT 蛋白之核酸轉導且經暴露至 DNA 甲基化劑諸如 TMZ 之細胞的存活性。在一特定態樣中，本發明係關於一種產製表現 CAR 之細胞的方法，該 CAR 具有 SEQ ID NO : 4 (IL13 CAR-P140KMGM T)、SEQ ID NO : 5 (IL-13 (E13Y) CAR-P140KMGM T)、SEQ ID NO : 6 (IL-13 (E13K R109K) CAR-P140KMGM T) 或彼等之組合之胺基酸序列。該方法包含將包含 SEQ ID NO : 1 (IL13 (WT) CAR-P140KMGM T)、SEQ ID NO : 2 (IL-13 (E13Y) CAR-P140KMGM T) 或 SEQ ID NO : 3 (IL-13 (E13K R109K) CAR-P140KMGM T) 之核酸序列導入該

細胞中；以及將該細胞維持在該 CAR 係經該細胞表現之條件下，藉以產製表現具有 SEQ ID NO：4（IL13（WT）CAR-P140KMGMT）、SEQ ID NO：5（IL-13（E13Y）CAR-P140KMGMT）、SEQ ID NO：6（IL-13（E13KR109K）CAR-P140KMGMT）或彼等之組合之胺基酸序列的嵌合抗原受體之細胞。

[0214] 在一特定態樣中，該核酸序列係使用病毒載體（例如反轉錄病毒載體、慢病毒載體、腺病毒載體或彼等之組合）導入該細胞中。在另一態樣中，該細胞係哺乳動物細胞，諸如哺乳動物 T 細胞（例如人 T 細胞或小鼠 T 細胞）。在一特定態樣中，該細胞係自體細胞或人白血球抗原（HLA）相符細胞。在又另一態樣中，該細胞係得自一或多個具有腦癌之個體（例如高度惡性神經膠質瘤，諸如多形性神經膠質母細胞瘤（GBM）、退行性星狀細胞瘤或兒童神經膠質瘤）。

[0215] 因此，一額外態樣係關於表現本發明之至少一種 CAR 及藥物抗性多肽之重組 T 細胞。特別較佳之經轉形宿主細胞係基因轉殖 T 前體細胞或幹細胞，其特徵在於包含本發明之核酸建構體。用於轉形或轉導宿主細胞及/或幹細胞之方法係該領域之技藝人士所廣為週知，且舉例來說包括電穿孔或顯微注射。一種特別較佳之經轉形宿主細胞係病患獨特（patient-unique）T 細胞，其為在萃取之後經本發明之核酸建構體轉染。根據本發明，特別是宿主細胞可藉由萃取一或數種細胞獲得，較佳地 T 細胞特別

是 $CD8^+$ -T 細胞後續係經一或多種本發明之核酸建構體活體外轉染或轉導，以藉此獲得本發明之宿主細胞。

[0216] 在擴張及基因修飾之前，T 細胞來源係得自個體。用語「個體」係意圖包括可經誘發免疫反應之活有機體（例如哺乳動物）。個體之實例包括人及其他靈長動物、犬、貓、小鼠、大鼠、及基因轉殖嚙齒動物物種。T 細胞可自數種來源獲得，包括周邊血液單核細胞、骨髓、淋巴結組織、臍帶血、胸腺組織、感染部位之組織、腹水、胸膜滲液、脾臟組織及腫瘤。在本發明之某些態樣中，任何數量之該領域可取得之 T 細胞系皆可被使用。在本發明之某些態樣中，T 細胞可自一單位收集自個體之血液，使用該領域之技藝人士所知之任何數量之技術諸如 Ficoll™ 分離獲得。在一較佳之態樣中，來自個體之循環血液中的細胞係藉由血球分離獲得。該血球分離產物一般含有淋巴細胞包括 T 細胞、單核球、顆粒球、B 細胞、其他有核白血球、紅血球、及血小板。在一態樣中，藉由血球分離所收集之細胞可經清洗以去除血漿部分且將細胞放置於適當緩衝液或培養基以供進行後續處理步驟。在本發明之一態樣中，細胞係經磷酸鹽緩衝鹽水（PBS）清洗。在一替代性態樣中，該清洗溶液缺乏鈣，且可能缺乏鎂或可能缺乏許多若非所有二價陽離子。在缺乏鈣下之初步活化步驟可導致放大活化。如同該領域之技藝人士將輕易瞭解的，清洗步驟可藉由該領域之技藝人士已知之方法進行，諸如根據製造商指示使用半自動化「流經（flow-

through) 」離心。在清洗後，細胞可經重懸於各種生物相容性緩衝液，或其他有或無緩衝液之鹽水溶液。或者，血球分離樣本之非所欲組分可經移除且將細胞直接重懸於培養基中。

[0217] 在一態樣中，T 細胞係自周邊血液淋巴細胞分離，其可藉由例如離心通過 PERCOLL™ 梯度或藉由逆流離心淘析以溶解紅血球並除盡單核球。T 細胞之特定亞群諸如 CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、及 CD45RO⁺T 細胞可藉由陽性或陰性選擇技術進一步分離。該領域之技藝人士將明瞭，多次選擇亦可用於本發明之情況中。在某些態樣中，所欲的是進行選擇程序並且在活化及擴張過程中使用「未經選擇之」細胞。「未經選擇之」細胞亦可經進一步選擇之處理。

[0218] 藉由陰性選擇來富集 T 細胞族群，可利用針對陰性選擇細胞所特有之表面標誌之抗體組合來完成。一種方法係經由陰性磁免疫黏附或流式細胞分析之細胞分選及/或選擇，使用針對陰性選擇細胞之細胞表面標誌的單株抗體之雞尾酒進行。舉例來說，要藉由陰性選擇富集 CD4⁺細胞，則單株抗體雞尾酒一般來說包括針對 CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、及 CD8 之抗體。在某些態樣中，所欲的是富集或陽性選擇通常表現 CD4⁺、CD25⁺、CD62Lhi、GITR⁺、及 FoxP3⁺之調節 T 細胞。或者，在某些態樣中，T 調節細胞係藉由抗 CD25 共軛珠或其他類似選擇方法除盡。

[0219]

T 細胞之活化及表現

[0220] 不論是在 T 細胞經基因修飾以表現所欲 CAR 之前或之後，該等 T 細胞大致上可使用如例如下列所述之方法進行活化及擴增：美國專利第 6,352,694 號；第 6,534,055 號；第 6,905,680 號；第 6,692,964 號；第 5,858,358 號；第 6,887,466 號；第 6,905,681 號；第 7,144,575 號；第 7,067,318 號；第 7,172,869 號；第 7,232,566 號；第 7,175,843 號；第 5,883,223 號；第 6,905,874 號；第 6,797,514 號；第 6,867,041 號；及美國專利申請案公開號 20060121005。

[0221] 一旦建立該經轉染或轉導之 T 細胞能夠表現該 IL13CAR 為表面膜蛋白且具有所欲調節及所欲量，可決定該嵌合受體是否能在宿主細胞中發揮功能以提供所欲之信號誘導。因此，該經轉導之 T 細胞被重新導入或投予至該個體以在該個體中活化抗腫瘤反應。

[0222]

醫藥組成物

[0223] 在又另一態樣中，本發明係關於用於促進如本文所述之經轉導 T 細胞投予至有需要之個體之醫藥組成物。本發明之經轉導 T 細胞可與適當載劑或稀釋劑一起製成醫藥組成物或製成適用於活體內投予之植入物，該等載劑或稀釋劑進一步可為醫藥上可接受的。製造該組成物或植入物之手段已於該領域中說明（見例如 Remington's

Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack, ed. (1980)) 。
 當適當時，該經轉導之 T 細胞可以平常方式經調製成半固體或液體形式之製劑，諸如膠囊、溶液、注射劑、吸入劑、或氣霧劑，以用於彼等之個別投予途徑。該領域已知之手段可被利用以預防或減少組成物在達到目標組織或器官前的釋放及吸收，或是確保該組成物的定時釋放 (timed-release) 。然而所欲的是，使用不會讓該等細胞無法表現該嵌合受體之醫藥上可接受之形式。因此，所欲的是該經轉導 T 細胞可被製成含有平衡鹽溶液較佳地漢氏 (Hanks') 平衡鹽溶液或生理鹽水之醫藥組成物。舉例來說，該等組成物可與生理上可接受之載劑或賦形劑一起調製以製備醫藥組成物。該載劑及組成物可為無菌。調製劑應適合投予模式。

[0224] 適當之醫藥上可接受之載劑包括但不限於水、鹽溶液 (例如 NaCl) 、鹽水、緩衝鹽水、醇、甘油、乙醇、阿拉伯膠、植物油、苧醇、聚乙二醇、明膠、碳水化合物諸如乳糖、直鏈澱粉 (amylose) 或澱粉、葡萄糖、硬脂酸鎂、滑石、矽酸、黏性石蠟、香料油、脂肪酸酯、羥基甲基纖維素、聚乙烯基吡咯烷酮等、以及彼等之組合。若為所欲，該等醫藥製劑可與輔助劑一起混合，例如潤滑劑、保存劑、穩定劑、潤濕劑、乳化劑、用於影響滲透壓之鹽、緩衝劑、著色劑、風味劑及/或芳族物質及不會有害地與活性化合物反應之類似物。

[0225] 需要時，該組成物亦可包含少量之潤濕劑或

乳化劑或 pH 緩衝劑。該組成物可為液體溶液、懸浮液、乳劑、錠劑、丸劑、膠囊、持續釋放調製劑、或粉劑。該組成物可與慣用結合劑及載劑諸如三酸甘油脂被調製成栓劑。口服調製劑可包括標準載劑諸如醫藥級之甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、聚乙烷基吡咯烷酮、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂等。

[0226] 該組成物可根據例行程序調製為適用於對人類投予之醫藥組成物。舉例來說，用於靜脈投予之組成物通常係無菌等張水性緩衝液之溶液。當需要時，該組成物亦可包括助溶劑及局部麻醉劑以紓解注射部位之疼痛。大抵，該等成份係分開地或混合在一起地提供為單位劑量形式，例如於密封容器諸如顯示活性化合物之量的安瓿或小袋中之冷凍乾燥散劑或無水濃縮物。當該組成物係藉由輸注投予時，其可以包含無菌醫藥級水、鹽水或葡萄糖/水之輸注瓶分配。當該組成物係藉由注射投予時，可提供無菌注射用水或鹽水之安瓿以使該等成份可在投予前混合。

[0227] 導入該些組成物之方法包括但不限於顱內、髓內、皮內、肌肉內、腹膜內、眼內、靜脈內、皮下、局部、經口及鼻內。其他適當導入方法亦可包括基因療法（如下述）、可充電或可生物降解裝置、粒子加速裝置（「基因槍」）及緩慢釋放聚合裝置。本發明之醫藥組成物亦可作為與其他化合物之組合療法的一部分投予。

[0228] 以局部施用而言，可採用包含與局部施用相容之載劑且具有動態黏度較佳地大於水之非噴霧形式、黏

性至半固體或固體形式。適當調製劑包括但不限於溶液、懸浮液、乳劑、乳膏、軟膏、粉劑、灌腸劑、乳液、溶膠、擦劑、藥膏、氣霧劑等，其若有需要係經滅菌與輔助劑混合，輔助劑例如保存劑、穩定劑、潤濕劑、緩衝劑、或用於影響滲透壓之鹽等。該化合物可納入美容調製劑中。在局部施用方面，亦適合的是可噴霧之氣霧製劑，其中該活性成分（較佳地與固體或液體惰性載劑材料組合）係包裝於擠壓瓶或與加壓揮發劑（通常為氣體推進劑，例如加壓空氣）混合。

[0229] 本文所述之化合物可經調製為中性或鹽形式。醫藥上可接受之鹽包括該些形成具有游離胺基之鹽，諸如該些衍生自鹽酸、磷酸、醋酸、草酸、酒石酸等之鹽，及該些形成具有游離羧基之鹽，諸如該些衍生自鈉、鉀、銨、鈣、氫氧化鐵、異丙基胺、三乙胺、2-乙基胺基乙醇、組胺酸、普魯卡因（procaine）等之鹽。

[0230]

套組

[0231] 本發明亦提供一種醫藥包裝或套組，其包含一或多個裝填本發明之醫藥組成物的一或多種成分之容器。可選地與該（等）容器相關的可為主管機關規範藥品或生物藥品製造、使用或販售之指定形式標示，該標示反映主管機關核准製造、使用或販售以供人類使用。該包裝或套組可標示關於投藥模式、藥物投予序列（例如分開、依序或同時）或類似之資訊。包裝或套組亦可包括提醒病

患用藥之手段。包裝或套組可為組合療法之單一單位劑量，或其可為複數個單位劑量。特別是，化合物可分開地或以任何組合混合在一起地存在於單一小瓶或錠劑中。包裝於泡殼包裝或其他分配手段中之化合物係較佳。就本發明之目的而言，單位劑量係意圖表示一種依據各化合物之個別藥效動力學且以 FDA 核准劑量於標準時程投予之劑量。

[0232]

治療方法

[0233] 在另一態樣中，本發明係關於一種治療有治療需要之個體的惡性病之方法，該方法包含投予一或多種表現 IL13CAR 及 MGMT 蛋白之 T 細胞，該 IL13CAR 包含一或多種針對 IL13R α 2 蛋白之配體（例如抗體）。在一特定態樣中，本發明係關於一種治療有治療需要之個體的腦癌之方法，該方法包含投予一或多種 T 細胞，該一或多種 T 細胞獲得及表現編碼包含 SEQ ID NO：26、SEQ ID NO：36 或 SEQ ID NO：37（配體）、SEQ ID NO：28（TM）、SEQ ID NOS：29 及 30（CD28 及 CD3- ζ 傳訊結構域）及可選地另包含 SEQ ID NO：27（絞鏈）之蛋白的核酸序列。在另一實施態樣中，該核酸序列包含 SEQ ID NO：1（IL13 CAR-P140KMGMT）、SEQ ID NO：2（IL-13（E13Y）CAR-P140KMGMT）、SEQ ID NO：3（IL-13（E13K R109K）CAR-P140KMGMT）或彼等之組合。在一態樣中，該等 T 細胞係自體 T 細胞或人白血球抗原

(HLA) 相符細胞。在另一態樣中，該腦癌係高度惡性神經膠質瘤諸如高度惡性神經膠質瘤係多形性神經膠質母細胞瘤 (GBM)、退行性星狀細胞瘤或兒童神經膠質瘤。在一實施態樣中，本文所揭示之方法可用於治療與有害 IL13R α 2 表現有關之癌症。

[0234] 其他經證實具有過度表現 IL13R α 2 之細胞的癌症包括但不限於乳癌、胰癌、頭頸癌、卵巢癌及結直腸癌。在另一實施態樣中，該癌症係已經轉移之癌症。因此，亦考慮的是用於治療一或多種這些癌症之方法，該等方法藉由投予一或多種經如上述之一或多種 IL13CAR-MGMT 建構體轉導之 T 細胞至個體。

[0235] 由於 T 細胞表現 CAR 及表現突變 MGMT，該突變 MGMT 授予對 MGMT 過度表現或 MGMT 變異體 (例如 P140K) 之藥物抗性的保護作用，因此該治療腦癌之方法可進一步包含對個體 (腦癌病患) 連續或同時投予一或多種化學治療劑。換言之，該經修飾之 T 細胞係於投予該化學治療劑之前、期間或之後投予。化學治療劑之實例包括替莫唑胺 (temozolomide, TMZ)、1,3-雙 (2-氯乙基)-1-亞硝基脲 (BCNU 或卡氮芥 (carmustine))、福莫司汀 (fotemustine) 及羅氮芥 (lomustine)。在一特定態樣中，該一或多種 T 細胞表現包含 SEQ ID NO: 1 (IL13CAR-P140KMGMT)、SEQ ID NO: 2 (IL-13 (E13Y)CAR-P140KMGMT)、SEQ ID NO: 3 (IL-13 (E13KR109K)CAR-P140KMGMT) 或其組合之核酸序列，且該

一或多種化學治療劑係同時投予至該個體。在一特定態樣中，該個體係哺乳動物諸如人或其他靈長動物，或啮齒動物諸如小鼠或大鼠。

[0236] 經編碼及表現 IL13CAR-MGMT 嵌合體之建構體轉導之 T 細胞的療效係於以下實例 4 及實例 5 中部分說明。實例 4 顯示經分離之經編碼該 IL13CAR-2A-P140KMGMT 蛋白之載體轉導之 T 細胞暴露至 TMZ 時，相較於經編碼該 IL13CAR 但未共表現該 P140KMGMT 蛋白之載體轉導之 T 細胞具有增加之抗性（增加存活性）（例如見圖 5）。因此，所設想的是一種用於增加經諸如本文所述之 IL13CAR-MGMT 建構體轉導之免疫細胞的存活性之方法。在一例示性實施態樣中，經包含 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2 或 SEQ ID NO：3 之核酸序列的反轉錄病毒轉導之 T 細胞係經提供，以作為一種用於治療經診斷罹患腦癌且連續或同時接受 TMZ 治療之個體的方法。

[0237] 額外研究顯示本文揭示之 IL13CAR-MGMT 建構體亦可有效改質 T 細胞，該等 T 細胞可經投予至個體且可增加個體之存活。如實例 5 及圖 6 所示，經 U251MG 神經膠質瘤細胞注射之小鼠係以 TMZ 及編碼 IL13CAR（但無 MGMT）之建構體或 IL13CAR-A2-P140KMGMT 建構體轉導之 T 細胞治療。雖然在 P140KMGMT 不存在下之 IL13CAR 表現相較於不投予 CAR T 細胞增加存活性，但投予 TMZ 加上經編碼 IL13CAR-A2-P140KMGMT 嵌合體

之核酸序列轉導之 T 細胞的動物具有最高存活率（圖 6）。因此，本文考慮的是一種用於治療經診斷罹患腦癌之個體的方法，該方法包含對該個體投予表現如本文所述之 IL13CAR-MGMT 蛋白之免疫細胞。

[0238] T 細胞及/或化學治療劑可利用任何適當投予途徑投予至個體。適當投予途徑之實例包括但不限於顱內、髓內、皮內、肌肉內、腹膜內、眼內、靜脈內、皮下、局部、經口及鼻內遞送。

[0239] 在一態樣中，該方法另包含自該個體獲得一或多種 T 細胞及導入本發明之嵌合核酸序列，例如包含 SEQ ID NO：1（IL13 CAR-P140KMGMT）、SEQ ID NO：2（IL-13（E13Y）CAR-P140KMGMT）、SEQ ID NO：3（IL-13（E13K R109K）CAR-P140KMGMT）或彼等之組合的核酸序列至該等 T 細胞。自個體獲得 T 細胞之方法係該領域已知且包括例如血漿清除術。在一些態樣中，該等 CAR T 細胞係於實驗室中生長（擴增）直到彼等之數量達到例如數十億。該經擴增之 CAR T 細胞族群接著可被輸注至該病患。在輸注之後，該等 T 細胞在病患體內倍增，且經由彼等之工程化受體的引導，進行辨識及殺滅表面上具有該抗原之癌細胞。

[0240] 表現本文所述之 IL13CAR 及突變 MGMT 的宿主細胞係以治療有效量投予（即足以治療疾病之量，諸如改善與疾病有關之症狀、預防或延緩疾病之發生、及/或亦降低疾病症狀的嚴重性或頻率）。在治療特定個體之病

狀或病況上將為治療有效之量將取決於症狀及疾病的嚴重性，且可藉由標準臨床技術決定。此外，可能可選地採用試管內或活體內測定以協助識別最佳劑量範圍。調製劑中將採用之確實劑量亦將取決於投予途徑及疾病或病況之嚴重性，且應根據臨床醫師的判斷及每位病患的情況來決定。有效劑量可由試管內或動物模型測試系統所衍生之劑量反應曲線外插求得。

[0241] 所欲的是，有效量或足夠數量之該經分離之經轉染或改質 T 細胞係存在於組成物中，且經導入個體以使得長期、特異性、抗腫瘤反應得以建立，以減小若未進行該治療時將導致之腫瘤大小或消除若未進行該治療時將導致之腫瘤生長或重新生長。所欲的是，經投予至該個體之經改質 T 細胞之量造成腫瘤大小相較於其中該經改質 T 細胞不存在但其他皆相同情況中的腫瘤大小減少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、或 100%。

[0242] 因此，經投予之經改質 T 細胞的量應考慮投予途徑，且應使得足夠數量之經轉導 T 細胞將被導入以達到所欲之治療反應。另外，本文所述之組成物中所包括的各種活性劑之量（例如依所欲接觸的各細胞計算之量或依某個體重計算之量）在不同應用中可有所差異。一般來說，所欲之經改質 T 細胞之濃度應足以提供該經治療之個體至少約 1×10^6 至約 1×10^9 個經轉導 T 細胞，甚至更為所欲的是約 1×10^7 至約 5×10^8 個經轉導 T 細胞，雖然任

何更多（例如高於 5×10^8 個細胞）或更少（例如低於 1×10^7 個細胞）之適當量皆可被使用。投藥計畫可根據發展成熟之細胞基底療法建立（見例如 Topalian and Rosenberg (1987) *Acta Haematol.* 78 Suppl 1: 75-6；美國專利第 4,690,915 號）或可採用輪替連續輸注策略。

實例

IL13CAR-P140KMGMT 用於替莫唑胺（temozolomide）抗藥性神經膠母細胞瘤免疫療法

實例 1：表現質體建構

[0243] 編碼 IL13 (WT) CAR 建構體之 cDNA、編碼 IL13 (E13Y) CAR 建構體之 cDNA 及編碼 IL13 (E13K.R109K) CAR 建構體之 cDNA 係經插入 MFG 反轉錄病毒載體之 BamHI 及 NotI 選殖位點，如圖 1A 及 1B 中之 IL13 (WT) CAR 建構體所示，以產製宿主質體 IL13 (WT) CAR-pMFG、IL13 (E13Y) CAR-pMFG 及 IL13 (E13K.R109K) CAR-pMFG 質體。（見 Kong et al., (*Clin Cancer Res*, 2012, 18 (21) : 5949-5960)）。為了產製具有 IL13CAR 及 P140K.MGMT 兩種 cDNA 序列之單順反子轉錄物，Genscript USA (Piscataway, NJ) 合成有 5' *NotI* 端及 3' *EagI* 端之 2A-P140KMGMT 片段。該 2.3 Kb 片段係經選殖至 pUC57 選殖載體以確認該序列。一經確認之後，該片段係經完整轉移 (transferred en

bloc) 至該 IL13CAR-pMFG 反轉錄病毒載體之 3' NotI 位點以產製下列各者：IL13 (WT) CAR-2A-P140K.MGMT-pMFG、IL13 (E13Y) CAR-2A-P140K.MGMT-pMFG、及 IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140K.MGMT-pMFG 質體。圖 2A 及 2B 顯示 IL13 (E13K.R109K) CAR 及 IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140K.MGMT 建構體及 pMFG 質體建構體。

實例 2：反轉錄病毒顆粒之產製

[0244] 含有如實例 1 所述之編碼 IL13 (E13K.R109K) CAR 及 IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT 建構體之建構體的 MFG 反轉錄病毒顆粒係使用「乒乓 (ping-pong)」法產製。來自實例 1 之各宿主質體首先經轉染至 phoenix-eco 細胞以產製親嗜性 (ecotropic) 反轉錄病毒。轉染效率係藉由流式細胞分析 IL13 表現加以測量。培養上清液係經儲存及用於轉導雙嗜性 (amphotropic) 病毒編碼性小鼠纖維母細胞細胞系 PG13 (ATCC, Manassas, VA)。測試經轉導之 PG13 細胞的 IL13，且 IL13 陽性細胞係藉由螢光激活細胞分選器富集 (圖 3A 至 3B)。IL13 富集細胞中之 MGMT 過度表現亦藉由細胞溶解物之西方墨點分析測試 (圖 3C)。

[0245] 如圖 3A 及 3B 所示，經轉導之細胞表現 IL13，且經富集以使得約 97% 之細胞表現 IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT 建構體。圖 3C 另

顯示相較於未經轉染之細胞或經僅 IL13CAR 建構體轉染之細胞，經 IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT 轉染之細胞中 P140KMGMT 的表現增加。

[0246] 富集細胞係於組織培養條件下擴增，以收集含有高力價 CAR 編碼性雙嗜性反轉錄病毒之培養上清液。

實例 3：人 T 細胞之基因修飾

[0247] 包含根據實例 2 之方法所產製的 IL13 (E13K.R109K) CAR 及 IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT 建構體之反轉錄病毒顆粒係用於轉導人 T 細胞。人 PBMC 係自血液過濾器丟棄物分離 (Rhode Island Blood Center, Providence, RI)。PBMC 係於 OKT3 (10 µg/ml) 及 IL2 (3000 U/ml) 存在下培養 36 至 48 h 以富集 T 細胞族群。富集 T 細胞係於魚精蛋白及 IL2 存在下，在室溫下於反粘連蛋白 (retroectin) 包覆板上與含有反轉錄病毒之培養上清液進行離心感染 (spinfect) 1 小時。此步驟在後續 24 h 中重複 3 次。在經 3 次感染後，允許細胞在含反轉錄病毒之培養基中生長另外 24 小時，接著轉移至含有 10% 胎牛血清、抗生素及 IL2 之新鮮 RPMI-1640 培養基中以供未來實驗使用。經 IL13 (E13K.R109K) CAR (不含 P140KMGMT) 成功轉導之 T 細胞以及未經轉導之 T 細胞係作為對照組用於所有實驗中。大致上，20 至 25% 經含有 IL13 (E13K.R109K) CAR-

2A-P140KMGMT 建構體之反轉錄病毒顆粒轉染之 T 細胞係呈 IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT 陽性，如流式細胞分析偵測細胞表面上之 IL13 所測量（資料未顯示）。IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT 之轉導效率係約 69.2%，其中未經轉導之 T 細胞係用來作為對照。

實例 4：經轉導 T 細胞中之替莫唑胺 (temozolomide) 抗藥性

[0248] 如上述經 IL13 (E13K.R109K) CAR (圖 1A) 或 IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT (圖 2A) 轉導之 T 細胞係以漸增濃度之替莫唑胺 (TMZ; 0 至 1000 μ M) 分開培養 48 小時。每 24 小時更換一次培養基並補充新鮮 TMZ。經 TMZ 處理之後，細胞存活性係藉由台盼藍排除原則以及膜聯蛋白 V (Annexin V) /7AAD 染色方法分析。膜聯蛋白 V/7-AAD 陰性細胞之頻率係藉由流式細胞分析測量，其結果代表細胞存活性。存活曲線係經建構以外插求出 TMZ 活性之存活性及濃度。如圖 4 所示，在暴露至 TMZ 後，經 IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT 轉導之 T 細胞的存活優於經 IL13 (E13K.R109K) CAR 轉導之 T 細胞。此觀察顯示以 P140KMGMT 表現性 CAR 基因修飾 T 細胞對該經修飾之 T 細胞提供化學保護作用。

實例 5：IL13CAR-2A-P140KMGMT 之功能特徵

[0249] 經轉導細胞之免疫調節功能亦藉由測量當與神經膠質瘤細胞共培養時，由該等經轉導細胞所分泌之細胞介素 IL2 及 IFN γ 加以分析。已經 IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT 反轉錄病毒轉導之 T 細胞係於正常組織培養條件下（使用 RPMI1640 培養基含有 5%血清及 IL2 (3000 U/ml) 及 200 μ M TMZ），在有或無 200 μ M 之 TMZ 下培養 48 至 72 小時。接下來，細胞係與 U251MG 神經膠質瘤細胞培養 72 小時（如本文所述之 U251MG 共培養）。藉由 ELISA 測試培養上清液之細胞介素分泌。

[0250] 介白素 2 (IL2) 係 T 細胞存活及增生之標誌，而干擾素 γ (IFN γ) 係細胞毒性 T 細胞功能之標誌。如圖 5A 及 5B 所示，經轉導細胞在 TMZ 存在或不存在下分泌 IL2 及 IFN γ 兩者。而且，TMZ 之存在不顯著降低該等經轉導細胞分泌任一種細胞介素。TMZ 抗性 T 細胞在暴露至 TMZ 後能夠維持彼等之正常細胞毒性功能，表示這些基因修飾確實提供這些細胞對 TMZ 誘導之白血球減少性細胞毒殺作用的抗性。

實例 6：IL13CAR-2A-MGMT 之活體內療效

[0251] IL13E13K.R109K-2A-P140KMGMT 建構體之活體內療效係使用如實例 2 所述而產製之病毒顆粒於小鼠中測試。五十隻無胸腺裸鼠係經皮下注射（左側腹）U251MG 神經膠質瘤細胞（40 隻小鼠；第 I 至 IV 組）或

PBS (10 隻小鼠)。在神經膠質瘤植入後四天，3 組小鼠 (第 I、II 及 III 組，10 隻小鼠／組) 係以 TMZ 經口治療 (64 mg/kg/天經口餵食管) 共 4 天。在神經膠質瘤植入後第 5 天，已接受 TMZ 經口治療之 3 組小鼠係經如下治療：第 I 組：腫瘤內注射 IL13E13K.R109KCAR-2A-P140KMGMT 建構體 (TMZ 抗性)；第 II 組：不含 MGMT 之 IL13 IL13E13K.R109K 建構體 (TMZ 敏感性)；第 III 組：僅以 PBS 治療 (不注射 T 細胞)。第 IV 組不接受 T 細胞或 TMZ 治療。監測小鼠之目視腫瘤生長、行為改變、及發病率直到注射 T 細胞後第 90 天，此時按照 IACUC 規定將小鼠犧牲。

[0252] 依照小鼠實驗之結果所繪製之存活曲線顯示，經 IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT T 細胞及 TMZ 治療 (第 I 組) 之荷瘤小鼠具有 73 天之中位存活期且 40% 的動物存活，相較之下，經不含 MGMT 之 TMZ 敏感性 IL13 (E13K.R109K) CAR T 細胞及 TMZ 治療的第 II 組動物為 61 天及 14% 存活。未接受治療 (第 IV 組) 之荷瘤小鼠具有 29 天之中位存活期。未接受 T 細胞但僅以 TMZ 口服治療之第 III 組荷瘤動物顯示 20% 存活率，但亦顯示僅 36 天之較低中位存活時間，此被視為 TMZ 治療之背景抗腫瘤作用 (圖 9 及 10)。此觀察顯示接受 3G TMZ 抗性 CAR 之第 I 組動物藉由 CAR 免疫療法與 TMZ 化學療法之協同作用最有效地消除腫瘤。

[0253] 本文引用之所有專利、公開申請案及參考文

獻之教示係以參照方式整體納入本文。

[0254] 雖然本發明已藉由彼之例示實施態樣具體顯示及說明，該領域之技藝人士將了解的是，可在其中進行各種形式及細節之改變而不背離該隨附請求項所包含之本發明之範圍。

序 列 表

<110> 羅傑威廉斯醫院 (Roger Williams Hospital)

<120> 治療癌症之方法和組成物

<140> TW 104140317

<141> 2015-12-02

<150> US 61/086346

<151> 2014-12-02

<160> 49

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 1848

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成建構體

<400> 1

ggatccgcca ccatgcatcc gtcctcaat cctctcctgt tggcactggg cctcatggcg	60
cttttgttga ccacggtcac tgctctcact tgccttggcg gctttgcctc cccaggccct	120
gtgcctccct ctacagccct caggagctc attgaggagc tgggtcaacat caccagaac	180
cagaaggctc cgctctgcaa tggcagcatg gtatggagca tcaacctgac agctggcatg	240
tactgtgcag ccctggaatc cctgatcaac gtgtcaggct gcagtgccat cgagaagacc	300
cagaggatgc tgagcggatt ctgccgcac aaggtctcag ctgggcagtt ttccagcttg	360
catgtccgag acacccaaat cgaggtggcc cagtttgtaa aggacctgct cttacattta	420
aagaaacttt ttcgcgaggg acagttcaac cctaggaagc ccaccacgac gccagcgccg	480
cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc tgtccctgcg cccagaggcg	540
tgccggccag cggcgggggg cgagtgac acgagggggc tggacttcgc ccaattgctc	600
tgctacctgc tggatggaat cctcttcac tatggtgtca ttctcactgc cttgttccctg	660
agagtgggta acttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg	720
aacatgactc cccgccgcc cgggcccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca	780

cgcgacttcg cagcctatcg ctccacgcgt aagttcagca ggagcgcaga cgccccgcg	840
taccagcagg gccagaacca gctctataac gagtcaatc taggacgaag agaggagtac	900
gatgttttgg acaagagacg tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag	960
aaccttcagg aaggcctgta caatgaactg cagaaagata agatggcgga ggcctacagt	1020
gagattggga tgaaaggcga gcgccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt	1080
ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac gcccttcaca tgcaggccct gccccctgc	1140
taacagccag cggccgcaga gggcagagga agtcttctaa catgcggtga cgtggaggag	1200
aatcccgcc ctccatggat ggacaaagat tgcgagatga agcggaccac actggactcc	1260
ccccctgggca aactggagct gtctggctgt gaacaggggc tgcacgagat caaactgctg	1320
ggaaagggca ctagcgccgc tgatgctgtg gaagtgccag ctccagctgc tgtgctggga	1380
ggacctgagc cactgatgca gtgcaccgcc tggctgaacg cttacttcca tcagcctgaa	1440
gccatcgagg aatttcccg tgcctgccctg caccatccag tgttccagca ggagagtttt	1500
acaaggcagg tgctgtggaa gctgctgaaa gtggtgaagt tcggggaagt gatttcctac	1560
cagcagctgg ctgctctggc tggaaaccca aaagctgctc gggccgtggg aggagctatg	1620
agaggcaatc cagtgaaaat cctgattccc tgccacaggg tgggtgtgtag ctccggagct	1680
gtggggaact attctggggg actggccgtg aaagaatggc tgctggctca cgaggacat	1740
aggctgggaa agcctggcct gggagggtct agtggactgg ctggagcttg gctgaaggga	1800
gctggagcta cctcaggaag cccacctgcc ggccggaatt gacggccg	1848

<210> 2
<211> 1848
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 2	
ggatccgcca ccatgcatcc gtcctcaat cctctcctgt tggcactggg cctcatggcg	60
cttttgttga ccacggtcac tgctctcact tgccctggcg gctttgcctc cccaggccct	120
gtgcctccct ctacagccct caggtacctc attgaggagc tggtaacat caccagaac	180
cagaaggctc cgctctgcaa tggcagcatg gtatggagca tcaacctgac agctggcatg	240
tactgtgcag ccctggaatc cctgatcaac gtgtcaggct gcagtgccat cgagaagacc	300

cagaggatgc tgagcggatt ctgcccgcac aaggtctcag ctgggcagtt ttccagcttg	360
catgtccgag acaccaaaat cgagggtggcc cagtttgtaa aggacctgct cttacattta	420
aagaaacttt ttcgcgaggg acagttcaac cctaggaagc ccaccacgac gccagcgccg	480
cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc tgtccctgcg cccagaggcg	540
tgccggccag cggcgggggg cgcagtgac acgagggggc tggacttcgc ccaattgctc	600
tgctacctgc tggatggaat cctcttcac tatggtgtca ttctactgc cttgttcctg	660
agagtgggta acttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg	720
aacatgactc cccgccgccc cgggcccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca	780
cgcgacttcg cagcctatcg ctccacgcgt aagttcagca ggagcgcaga cgcggcgcg	840
taccagcagg gccagaacca gctctataac gagctcaatc taggacgaag agaggagtac	900
gatgttttgg acaagagacg tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag	960
aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg cagaaagata agatggcgga ggcctacagt	1020
gagattggga tgaaaggcga gcgccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt	1080
ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac gcccttcaca tgcaggccct gccccctgc	1140
taacagccag cggccgcaga gggcagagga agtcttctaa catgcggtga cgtggaggag	1200
aatcccgcc ctccatggat ggacaaagat tgcgagatga agcggaccac actggactcc	1260
cccctgggca aactggagct gtctggctgt gaacaggggc tgcacgagat caaactgctg	1320
ggaaagggca ctagcgccgc tgatgctgtg gaagtgccag ctccagctgc tgtgctggga	1380
ggacctgagc cactgatgca gtgcaccgcc tggctgaacg cttacttcca tcagcctgaa	1440
gccatcgagg aatttccgt gcctgccctg caccatccag tgttccagca ggagagtttt	1500
acaaggcagg tgctgtggaa gctgctgaaa gtggtgaagt tcggggaagt gatttcciac	1560
cagcagctgg ctgctctggc tggaaacca aaagctgctc gggccgtggg aggagctatg	1620
agaggcaatc cagtgaaaat cctgattccc tgccacaggg tgggtgtgtag ctccggagct	1680
gtggggaact attctggggg actggccgtg aaagaatggc tgctggctca cgagggacat	1740
aggctgggaa agcctggcct gggagggtct agtggactgg ctggagcttg gctgaaggga	1800
gctggagcta cctcaggaag cccacctgcc ggccggaatt gacggccg	1848

<210> 3

<211> 1848
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 3	
ggatccgccca ccatgcatcc gctcctcaat cctctcctgt tggcactggg cctcatggcg	60
cttttgttga ccacggtcac tgctctcact tgccttggcg gctttgcctc cccaggccct	120
gtgcctccct ctacagccct caggaagctc attgaggagc tggcacaacat caccagaac	180
cagaaggctc cgctctgcaa tggcagcatg gtatggagca tcaacctgac agctggcatg	240
tactgtgcag ccctggaatc cctgatcaac gtgtcaggct gcagtccat cgagaagacc	300
cagaggatgc tgagcggatt ctgcccgcac aaggtctcag ctgggcagtt ttccagcttg	360
catgtccgag acacaaaaat cgaggctggc cagtttgtaa aggacctgct cttacattta	420
aagaaacttt ttaaggaggg acagttcaac cctaggaagc ccaccacgac gccagcgccg	480
cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc tgtccctgcg cccagaggcg	540
tgccggccag cggcgggggg cgcagtgac acgagggggc tggacttcgc ccaattgctc	600
tgctacctgc tggatggaat cctcttcac tatggtgtca ttctcactgc cttgttcctg	660
agagtgggta acttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg	720
aacatgactc cccgccgcc cgggcccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca	780
cgcgacttcg cagcctatcg ctccacgcgt aagttcagca ggagcgcaga cgcggcgcg	840
taccagcagg gccagaacca gctctataac gagctcaatc taggacgaag agaggagtac	900
gatgttttgg acaagagacg tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag	960
aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg cagaaagata agatggcgga ggcctacagt	1020
gagattggga tgaaaggcga gcgccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt	1080
ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac gcccttcaca tgcaggccct gccccctcgc	1140
taacagccag cggccgcaga gggcagagga agtcttctaa catgcggtga cgtggaggag	1200
aatccccggc ctccatggat ggacaaagat tgcgagatga agcggaccac actggactcc	1260
cccctgggca aactggagct gtctggctgt gaacaggggc tgcacgagat caaactgctg	1320
ggaaagggca ctagcgccgc tgatgctgtg gaagtgccag ctccagctgc tgtgctggga	1380
ggacctgagc cactgatgca gtgcaccgcc tggctgaacg cttacttcca tcagcctgaa	1440

gccatcgagg aatttcccgt gcctgccctg caccatccag tgttccagca ggagagtttt 1500
acaaggcagg tgctgtggaa gctgctgaaa gtggtgaagt tcggggaagt gatttcctac 1560
cagcagctgg ctgctctggc tggaaaccca aaagctgctc gggccgtggg aggagctatg 1620
agaggcaatc cagtgaaaat cctgattccc tgccacaggg tgggtgtgtag ctccggagct 1680
gtgggggaact attctggggg actggccgtg aaagaatggc tgctggctca cgagggacat 1740
aggctgggaa agcctggcct gggaggggtct agtggactgg ctggagcttg gctgaaggga 1800
gctggagcta cctcaggaag cccacctgcc ggccggaatt gacggccg 1848

<210> 4
<211> 606
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 4

Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
20 25 30

Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu
35 40 45

Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
50 55 60

Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
65 70 75 80

Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
85 90 95

Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
100 105 110

Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe

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

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
340 345 350

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
355 360 365

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gln Pro Ala Ala Ala Glu Gly Arg
370 375 380

Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met
385 390 395 400

Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly
405 410 415

Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu
420 425 430

Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala Pro
435 440 445

Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr Ala Trp
450 455 460

Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val
465 470 475 480

Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln
485 490 495

Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser
500 505 510

Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Lys Ala Ala Arg Ala
515 520 525

Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Lys Ile Leu Ile Pro Cys
530 535 540

His Arg Val Val Cys Ser Ser Gly Ala Val Gly Asn Tyr Ser Gly Gly
545 550 555 560

Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly
565 570 575

Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp Leu Lys
580 585 590

Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn
595 600 605

<210> 5
<211> 606
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 5

Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
20 25 30

Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Tyr Leu Ile Glu
35 40 45

Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
50 55 60

Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
65 70 75 80

Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
85 90 95

Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
100 105 110

Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
115 120 125

Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln
130 135 140

Phe Asn Pro Arg Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
145 150 155 160

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
165 170 175

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
180 185 190

Ala Gln Leu Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly
195 200 205

Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Val Thr Phe Trp Val Arg
210 215 220

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
225 230 235 240

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
245 250 255

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Thr Arg Lys Phe Ser Arg Ser Ala
260 265 270

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
275 280 285

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
290 295 300

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
305 310 315 320

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
325 330 335

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
340 345 350

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
355 360 365

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gln Pro Ala Ala Ala Glu Gly Arg
370 375 380

Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met
385 390 395 400

Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly
405 410 415

Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu
420 425 430

Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala Pro
435 440 445

Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr Ala Trp
450 455 460

Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val
465 470 475 480

Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln
485 490 495

Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser
500 505 510

Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Lys Ala Ala Arg Ala
515 520 525

Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Lys Ile Leu Ile Pro Cys
530 535 540

His Arg Val Val Cys Ser Ser Gly Ala Val Gly Asn Tyr Ser Gly Gly
545 550 555 560

Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly
565 570 575

Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp Leu Lys
580 585 590

Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn
595 600 605

<210> 6
<211> 606
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 6

Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
20 25 30

Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Lys Leu Ile Glu
35 40 45

Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
50 55 60

Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
65 70 75 80

Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
85 90 95

Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
100 105 110

Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
115 120 125

Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Lys Glu Gly Gln
130 135 140

Phe Asn Pro Arg Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
145 150 155 160

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
165 170 175

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
180 185 190

Ala Gln Leu Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly
195 200 205

Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Val Thr Phe Trp Val Arg
210 215 220

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
225 230 235 240

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
245 250 255

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Thr Arg Lys Phe Ser Arg Ser Ala
260 265 270

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
275 280 285

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
290 295 300

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
305 310 315 320

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
325 330 335

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
340 345 350

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
355 360 365

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gln Pro Ala Ala Ala Glu Gly Arg
370 375 380

Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met
385 390 395 400

Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly
405 410 415

Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu
420 425 430

Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala Pro
435 440 445

Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr Ala Trp
450 455 460

Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val
465 470 475 480

Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln
485 490 495

Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser
500 505 510

Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Lys Ala Ala Arg Ala
515 520 525

Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Lys Ile Leu Ile Pro Cys
530 535 540

His Arg Val Val Cys Ser Ser Gly Ala Val Gly Asn Tyr Ser Gly Gly
545 550 555 560

Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly
565 570 575

Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp Leu Lys

	580	585	590	
	Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn			
	595	600	605	
<210>	7			
<211>	6			
<212>	DNA			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	合成建構體			
<400>	7			
ggatcc				6
<210>	8			
<211>	6			
<212>	DNA			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	合成建構體			
<400>	8			
gccacc				6
<210>	9			
<211>	96			
<212>	DNA			
<213>	智人 (Homo sapiens)			
<400>	9			
atgcatccgc tcctcaatcc tctcctgttg gcactgggcc tcatggcgct tttgttgacc				60
acggtcattg ctctcacttg ccttggcggc tttgcc				96
<210>	10			
<211>	342			
<212>	DNA			
<213>	智人 (Homo sapiens)			
<400>	10			
tccccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctccaggagc tcattgagga gctgggtcaac				60
atcaccacaga accagaaggc tccgctctgc aatggcagca tggatatggag catcaacctg				120
acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc				180
atcgagaaga cccagaggat gctgagcgga ttctgcccgc acaaggctctc agctgggcag				240

ttttccagct tgcatgtccg agacaccaaa atcgaggtgg cccagtittgt aaaggacctg 300
ctcttacatt taaagaaact ttttcgcgag ggacagttca ac 342

<210> 11
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 11
cctagg 6

<210> 12
<211> 135
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 12
aagcccacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag 60
ccccgtgtccc tgcgcccaga ggcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgagcgt gcacacgagg 120
gggctggact tcgcc 135

<210> 13
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 13
caattg 6

<210> 14
<211> 69
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 14
ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc atctatggtg tcattctcac tgccttgttc 60
ctgagagtg 69

<210> 15

<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成建構體	
<400>	15	
gttaac		6
<210>	16	
<211>	132	
<212>	DNA	
<213>	智人 (Homo sapiens)	
<400>	16	
ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa catgactccc		60
cgccgccccg ggcccacccg caagcattac cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca		120
gcctatcgct cc		132
<210>	17	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成建構體	
<400>	17	
acgcgt		6
<210>	18	
<211>	330	
<212>	DNA	
<213>	智人 (Homo sapiens)	
<400>	18	
aagttcagca ggagcgcaga cgcccccgcg taccagcagg gccagaacca gctctataac		60
gagctcaatc taggacgaag agaggagtac gatgttttgg acaagagacg tggccgggac		120
cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg		180
cagaaagata agatggcgga ggcctacagt gagattggga tgaaaggcga gcgccggagg		240
ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac		300
gcccttcaca tgcaggccct gccccctcgc		330

<210>	19	
<211>	3	
<212>	DNA	
<213>	智人 (Homo sapiens)	
<400>	19	
taa		3
<210>	20	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成建構體	
<400>	20	
cagccagcgg ccgca		15
<210>	21	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成建構體	
<400>	21	
gagggcagag gaagtcttct aacatgcggt gacgtggagg agaatcccgg ccct		54
<210>	22	
<211>	621	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成建構體	
<400>	22	
atggacaaag attgcgagat gaagcggacc aacttgact cccccctggg caaactggag		60
ctgtctggct gtgaacaggg gctgcacgag atcaaactgc tgggaaaggg cactagcgcc		120
gctgatgctg tggaagtgcc agctccagct gctgtgctgg gaggacctga gccactgatg		180
cagtcaccg cctggctgaa cgcttacttc catcagcctg aagccatcga ggaatttccc		240
gtgcctgccc tgcaccatcc agtgttccag caggagagtt ttacaaggca ggtgctgtgg		300
aagctgctga aagtggtgaa gttcggggaa gtgatttcct accagcagct ggctgctctg		360
gctggaaacc caaaagctgc tcgggccgtg ggaggagcta tgagaggcaa tccagtgaaa		420

atcctgattc cctgccacag ggtggtgtgt agctccggag ctgtggggaa ctattctggg 480
ggactggccg tgaaagaatg gctgctggct cacgaggac ataggctggg aaagcctggc 540
ctgggagggt ctagtggact ggctggagct tggctgaagg gagctggagc tacctcagga 600
agcccacctg ccggccggaa t 621

<210> 23
<211> 3
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 23
tga 3

<210> 24
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 24
cggccg 6

<210> 25
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 25
Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
1 5 10 15
Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
20 25 30

<210> 26
<211> 114
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 26

Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu
1 5 10 15

Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
20 25 30

Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
35 40 45

Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
50 55 60

Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
65 70 75 80

Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
85 90 95

Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln
100 105 110

Phe Asn

<210> 27
<211> 45
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 27

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
20 25 30

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
35 40 45

<210> 28
<211> 23
<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 28

Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu
1 5 10 15

Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val
20

<210> 29

<211> 44

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 29

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
1 5 10 15

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
20 25 30

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 30

<211> 110

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 30

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
1 5 10 15

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
20 25 30

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
35 40 45

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
50 55 60

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

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
85 90 95

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210>	31
<211>	5
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 31

Gln Pro Ala Ala Ala
1 5

<210>	32
<211>	18
<212>	PRT
<213>	人工序列

<223> 合成建構體

<400> 32

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
1 5 10 15

Gly Pro

<210>	33
<211>	207
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 33

Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu
1 5 10 15

Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys
20 25 30

Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala
35 40 45

Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr Ala
50 55 60

Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro
65 70 75 80

Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg
85 90 95

Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile
100 105 110

Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Lys Ala Ala Arg
115 120 125

Ala Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Lys Ile Leu Ile Pro
130 135 140

Cys His Arg Val Val Cys Ser Ser Gly Ala Val Gly Asn Tyr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu
165 170 175

Gly Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp Leu
180 185 190

Lys Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn
195 200 205

<210> 34
<211> 342
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 34
tccccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctcaggtacc tcattgagga gctggtcaac 60
atcaccacaga accagaaggc tccgctctgc aatggcagca tggatatggag catcaacctg 120
acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc 180
atcgagaaga cccagaggat gctgagcgga ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag 240
ttttccagct tgcatgtccg agacaccaa atcgaggtgg cccagtttgt aaaggacctg 300
ctcttacatt taaagaaact ttttcgagag ggacagttca ac 342

<210> 35
<211> 342
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 35
tccccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctcaggaagc tcattgagga gctggtcaac 60
atcaccacaga accagaaggc tccgctctgc aatggcagca tggatatggag catcaacctg 120
acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc 180
atcgagaaga cccagaggat gctgagcgga ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag 240
ttttccagct tgcatgtccg agacaccaa atcgaggtgg cccagtttgt aaaggacctg 300
ctcttacatt taaagaaact ttttaaggag ggacagttca ac 342

<210> 36
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 36
Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Tyr Leu Ile Glu
1 5 10 15
Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
20 25 30

Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
35 40 45

Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
50 55 60

Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
65 70 75 80

Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
85 90 95

Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln
100 105 110

Phe Asn

<210> 37
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 37

Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Lys Leu Ile Glu
1 5 10 15

Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
20 25 30

Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
35 40 45

Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
50 55 60

Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
65 70 75 80

Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
85 90 95

Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Lys Glu Gly Gln
100 105 110

Phe Asn

<210> 38
<211> 207
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 38

Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu
1 5 10 15

Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys
20 25 30

Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala
35 40 45

Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr Ala
50 55 60

Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro
65 70 75 80

Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg
85 90 95

Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile
100 105 110

Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Lys Ala Ala Arg
115 120 125

Ala Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro
130 135 140

Cys His Arg Val Val Cys Ser Ser Gly Ala Val Ala Asn Tyr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu
165 170 175

Gly Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp Leu
180 185 190

Lys Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn
195 200 205

<210> 39
<211> 207
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 39

Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu
1 5 10 15

Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys
20 25 30

Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala
35 40 45

Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr Ala
50 55 60

Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro
65 70 75 80

Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg
85 90 95

Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile

100

105

110

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

115120125

Ala Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro

130135140

Cys His Arg Val Val Cys Ser His Gly Gly Val Gly Asn His Ser Ser

145150155160

Gly Val Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu

165170175

Gly Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp Leu

180185190

Lys Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn

195200205

<210> 40

<211> 207

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成建構體

<400> 40

Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu

151015

Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys

202530

Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala

354045

Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr Ala

505560

Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro

65707580

Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg
85 90 95

Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile
100 105 110

Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Lys Ala Ala Arg
115 120 125

Ala Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro
130 135 140

Cys His Arg Val Val Tyr Ser Ser Gly Gly Val Gly Asn Phe Ser Gly
145 150 155 160

Gly Pro Ala Val Arg Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu
165 170 175

Gly Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp Leu
180 185 190

Lys Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn
195 200 205

<210> 41
<211> 207
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 41

Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu
1 5 10 15

Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys
20 25 30

Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala
35 40 45

Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr Ala
50 55 60

Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro
65 70 75 80

Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg
85 90 95

Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile
100 105 110

Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Lys Ala Ala Arg
115 120 125

Ala Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro
130 135 140

Cys His Arg Val Val Cys Ser Ser Gly Ala Val Gly Thr His Ser Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ser His Glu Gly His Arg Leu
165 170 175

Gly Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp Leu
180 185 190

Lys Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn
195 200 205

<210> 42
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 42
ccatgg

6

<210> 43
<211> 238

<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 43

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

Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp Leu Lys
210 215 220

Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn
225 230 235

<210> 44
<211> 380
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 44

Met Ala Phe Val Cys Leu Ala Ile Gly Cys Leu Tyr Thr Phe Leu Ile
1 5 10 15

Ser Thr Thr Phe Gly Cys Thr Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ile Lys Val
20 25 30

Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr
35 40 45

Leu Tyr Leu Gln Trp Gln Pro Pro Leu Ser Leu Asp His Phe Lys Glu
50 55 60

Cys Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ser Glu Thr
65 70 75 80

Trp Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His Tyr Lys Asp Gly Phe Asp
85 90 95

Leu Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His Thr Leu Leu Pro Trp Gln
100 105 110

Cys Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser Trp Ala Glu Thr Thr Tyr
115 120 125

Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp
130 135 140

Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly
145 150 155 160

Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu
165 170 175

Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly
180 185 190

Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys
195 200 205

Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg
210 215 220

Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro
225 230 235 240

Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu
245 250 255

Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr
260 265 270

Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val
275 280 285

Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu
290 295 300

Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly
305 310 315 320

Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu
325 330 335

Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu
340 345 350

Ile Leu Val Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr
355 360 365

Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr

370 375 380

<210> 45
<211> 608
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 45

Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
20 25 30

Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu
35 40 45

Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
50 55 60

Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
65 70 75 80

Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
85 90 95

Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
100 105 110

Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
115 120 125

Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln
130 135 140

Phe Asn Pro Arg Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
145 150 155 160

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
165 170 175

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
180 185 190

Ala Gln Leu Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly
195 200 205

Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Val Thr Phe Trp Val Arg
210 215 220

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
225 230 235 240

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
245 250 255

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Thr Arg Lys Phe Ser Arg Ser Ala
260 265 270

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
275 280 285

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
290 295 300

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
305 310 315 320

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
325 330 335

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
340 345 350

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
355 360 365

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gln Pro Ala Ala Ala Glu Gly Arg
370 375 380

Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Pro

385		390		395		400
Trp Met Asp Lys	Asp Cys Glu Met Lys	Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro				
	405	410			415	
Leu Gly Lys Leu	Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile					
	420	425			430	
Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr	Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro					
	435	440			445	
Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr						
	450	455			460	
Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe						
	465	470			475	480
Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr						
	485	490			495	
Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val						
	500	505			510	
Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Lys Ala Ala						
	515	520			525	
Arg Ala Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Lys Ile Leu Ile						
	530	535			540	
Pro Cys His Arg Val Val Cys Ser Ser Gly Ala Val Gly Asn Tyr Ser						
	545	550			555	560
Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg						
	565	570			575	
Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp						
	580	585			590	
Leu Lys Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn						
	595	600			605	

<210> 46
<211> 608
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 46

Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
20 25 30

Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Tyr Leu Ile Glu
35 40 45

Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
50 55 60

Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
65 70 75 80

Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
85 90 95

Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
100 105 110

Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
115 120 125

Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln
130 135 140

Phe Asn Pro Arg Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
145 150 155 160

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
165 170 175

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe

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

Trp Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
405 410 415

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
420 425 430

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
435 440 445

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr
450 455 460

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
465 470 475 480

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
485 490 495

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
500 505 510

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Lys Ala Ala
515 520 525

Arg Ala Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Lys Ile Leu Ile
530 535 540

Pro Cys His Arg Val Val Cys Ser Ser Gly Ala Val Gly Asn Tyr Ser
545 550 555 560

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
565 570 575

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp
580 585 590

Leu Lys Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn
595 600 605

<210> 47
<211> 608
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成建構體

<400> 47

Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
20 25 30

Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Lys Leu Ile Glu
35 40 45

Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
50 55 60

Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
65 70 75 80

Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
85 90 95

Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
100 105 110

Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
115 120 125

Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Lys Glu Gly Gln
130 135 140

Phe Asn Pro Arg Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
145 150 155 160

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
165 170 175

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
180 185 190

Ala Gln Leu Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly
195 200 205

Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Val Thr Phe Trp Val Arg
210 215 220

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
225 230 235 240

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
245 250 255

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Thr Arg Lys Phe Ser Arg Ser Ala
260 265 270

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
275 280 285

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
290 295 300

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
305 310 315 320

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
325 330 335

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
340 345 350

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
355 360 365

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gln Pro Ala Ala Ala Glu Gly Arg
370 375 380

Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Pro
385 390 395 400

Trp Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
405 410 415

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
420 425 430

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
435 440 445

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr
450 455 460

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
465 470 475 480

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
485 490 495

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
500 505 510

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Lys Ala Ala
515 520 525

Arg Ala Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Lys Ile Leu Ile
530 535 540

Pro Cys His Arg Val Val Cys Ser Ser Gly Ala Val Gly Asn Tyr Ser
545 550 555 560

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
565 570 575

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp
580 585 590

Leu Lys Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn
595 600 605

- <210> 48
- <211> 621
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>

<223> 合成建構體

<400> 48
atggacaaag attgcgagat gaagcggacc aactggact cccccctggg caaactggag 60
ctgtctggct gtgaacaggg gctgcacgag atcaaactgc tgggaaaggg cactagcgcc 120
gctgatgctg tggaagtgcc agctccagct gctgtgctgg gaggacctga gccactgatg 180
cagtgcaccg cctggctgaa cgcttacttc catcagcctg aagccatcga ggaatttccc 240
gtgcctgccc tgcaccatcc agtggtccag caggagagtt ttacaaggca ggtgctgtgg 300
aagctgctga aagtggtgaa gttcggggaa gtgatttcct accagcagct ggctgctctg 360
gctggaaacc caaaagctgc tcgggccgtg ggaggagcta tgagaggcaa tccagtgcc 420
atcctgattc cctgccacag ggtgggtgtg agctccggag ctgtggggaa ctattctggg 480
ggactggccg tgaaagaatg gctgctggct cactgaggac ataggctggg aaagcctggc 540
ctgggagggg ctagtggact ggctggagct tggctgaagg gagctggagc tacctcagga 600
agcccacctg ccggccggaa t 621

<210> 49
<211> 207
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 49
Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu
1 5 10 15
Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys
20 25 30
Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala
35 40 45
Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr Ala
50 55 60
Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro
65 70 75 80
Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg
85 90 95

Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile
100 105 110

Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Lys Ala Ala Arg
115 120 125

Ala Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro
130 135 140

Cys His Arg Val Val Cys Ser Ser Gly Ala Val Gly Asn Tyr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu
165 170 175

Gly Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp Leu
180 185 190

Lys Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn
195 200 205

申請專利範圍

1. 一種嵌合核酸序列，其包含
編碼 IL13CAR 之第一核酸序列，該 IL13CAR 包含
與 IL13 α 2 受體（SEQ ID NO：44）結合之 IL13
配體結構域，
跨膜結構域，
包含 CD3- ζ 傳訊結構域之細胞質結構域；及
編碼 MGMT 多肽之第二核酸序列，該 MGMT 多肽選
自 SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：38、SEQ ID NO：39、
SEQ ID NO：40、SEQ ID NO：41 及 SEQ ID NO：43。
2. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合核酸序列，其中該
IL13CAR 另包含信號肽。
3. 如申請專利範圍第 2 項之嵌合核酸序列，其中該
IL13CAR 另包含絞鏈區。
4. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合核酸序列，其中該
細胞質結構域另包含選自 CD28、4-1BB（CD137）及
OX40（CD134）之共刺激結構域。
5. 如申請專利範圍第 4 項之嵌合核酸序列，其中該
CD28 共刺激結構域與 SEQ ID NO：29 具有至少 90%一致
性。
6. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之嵌合核酸
序列，其中該 CD3- ζ 傳訊結構域與 SEQ ID NO：30 具有
至少 90%一致性。
7. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之嵌合核酸

序列，其另包含編碼自我切割連接子肽之第三核酸序列。

8. 如申請專利範圍第 7 項之嵌合核酸序列，其中該第三核酸序列係位於該第一核酸與該第二核酸之間。

9. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之嵌合核酸序列，其中該第一核酸序列另包含編碼二肽連接子之核酸序列，該二肽連接子係位於該 IL13 配體結構域與該絞鏈結構域之間、該絞鏈結構域與該跨膜結構域之間、該跨膜結構域與該 CD28 傳訊結構域之間、或該 CD28 傳訊結構域與該 CD3- ζ 傳訊結構域之間。

10. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之嵌合核酸序列，其另包含編碼位於該 CD3- ζ 傳訊結構域與該自我切割肽之間的連接子肽之核酸序列。

11. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之嵌合核酸序列，其中該 IL13 配體結構域包含與選自 SEQ ID NO：26、SEQ ID NO：36、SEQ ID NO：37 及彼等之變異體之序列具有至少 90%一致性之胺基酸序列。

12. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之嵌合核酸序列，其選自 SEQ ID NO：1 核苷酸 109 至 1839、SEQ ID NO：2 核苷酸 109 至 1839 及 SEQ ID NO：3 核苷酸 109 至 1839。

13. 一種核酸序列，其包含 SEQ ID NO：1 (IL13 CAR-P140KMGMT)、SEQ ID NO：2 (IL-13 (E13Y) CAR-P140KMGMT)、SEQ ID NO：3 (IL-13 (E13K R109K) CAR-P140KMGMT) 或彼等之組合。

14. 一種載體，其包含如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之嵌合核酸序列。

15. 如申請專利範圍第 14 項之載體，其中該載體係病毒載體。

16. 如申請專利範圍第 15 項之載體，其中該病毒載體係反轉錄病毒載體。

17. 一種宿主細胞，其包含如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之嵌合核酸序列。

18. 如申請專利範圍第 17 項之宿主細胞，其中該細胞係哺乳動物細胞。

19. 如申請專利範圍第 18 項之宿主細胞，其中該細胞係 T 細胞。

20. 如申請專利範圍第 17 至 19 項中任一項之宿主細胞，其中該細胞係自體細胞或人白血球抗原（HLA）相符細胞。

21. 如申請專利範圍第 17 至 19 項中任一項之宿主細胞，其中該細胞係得自一或多個患有腦癌之個體。

22. 一種宿主細胞，其包含
編碼 IL13CAR 之第一核酸序列，該 IL13CAR 包含
與 IL13 α 2 受體（SEQ ID NO：44）結合之 IL13
配體結構域，

跨膜結構域，

包含 CD3- ζ 傳訊結構域之細胞質結構域；及

編碼 MGMT 多肽之第二核酸序列，該 MGMT 多肽選

自 SEQ ID NO : 33、SEQ ID NO : 38、SEQ ID NO : 39、
SEQ ID NO : 40、SEQ ID NO : 41 及 SEQ ID NO : 43。

23. 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 17
至 22 項中任一項之宿主細胞。

24. 一種醫藥組成物，其包含
編碼 IL13CAR 之第一核酸序列，該 IL13CAR 包含
與 IL13 α 2 受體 (SEQ ID NO : 44) 結合之 IL13
配體結構域，

跨膜結構域，

包含 CD3- ζ 傳訊結構域之細胞質結構域；及

編碼 MGMT 多肽之第二核酸序列，該 MGMT 多肽選
自 SEQ ID NO : 33、SEQ ID NO : 38、SEQ ID NO : 39、
SEQ ID NO : 40、SEQ ID NO : 41 及 SEQ ID NO : 43。

25. 一種用於產製哺乳動物細胞之方法，該哺乳動物
細胞表現 IL13CAR 蛋白及 MGMT 蛋白，該方法包含：

a) 將編碼該 IL13CAR 蛋白及該 MGMT 蛋白之核酸
序列導入該細胞中，其中該 IL13CAR 蛋白包含與 IL13 α 2
受體 (SEQ ID NO : 44) 結合之 IL13 配體結構域、跨膜
結構域及包含 CD3- ζ 傳訊結構域之細胞質結構域；及

b) 使該細胞維持在其中該 IL13CAR 蛋白及該 MGMT
蛋白係經該細胞表現之條件下。

26. 如申請專利範圍第 25 項之方法，其中該核酸序
列係經使用病毒載體導入該細胞。

27. 如申請專利範圍第 26 項之方法，其中該病毒載

體係選自反轉錄病毒載體、慢病毒載體、腺病毒載體或腺病毒相關病毒載體。

28. 一種一或多種免疫細胞於製備供治療個體之腦癌的藥物之用途，其中該一或多種免疫細胞表現由下列編碼之蛋白：

以 N 端至 C 端方向編碼 IL13CAR 之第一核酸序列，該 IL13CAR 包含

與 IL13 α 2 受體 (SEQ ID NO: 44) 結合之 IL13 配體結構域，

跨膜結構域，及

包含 CD3- ζ 傳訊結構域之細胞質結構域；及

編碼 MGMT 多肽之第二核酸序列，該 MGMT 多肽選自 SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41 及 SEQ ID NO: 43。

29. 如申請專利範圍第 28 項之用途，其中該腦癌係高度惡性神經膠質瘤。

30. 如申請專利範圍第 28 或 29 項之用途，其中該個體正在接受、曾經接受或將要接受 DNA 甲基化化學治療劑治療。

31. 如申請專利範圍第 30 項之用途，其中該 DNA 甲基化化學治療劑係 TMZ。

32. 如申請專利範圍第 30 項之用途，其中該 DNA 甲基化化學治療劑係在投予該免疫細胞劑量之前、期間或之後投予。

圖 式

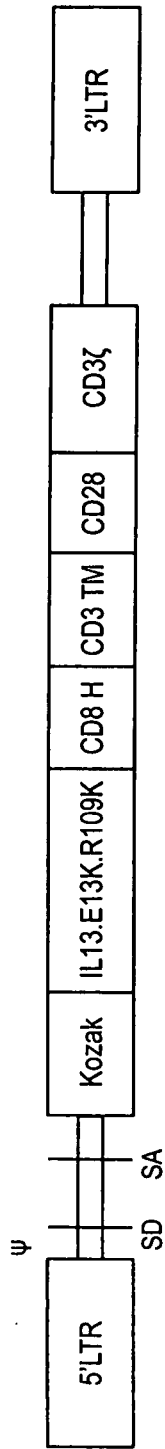


圖 1A

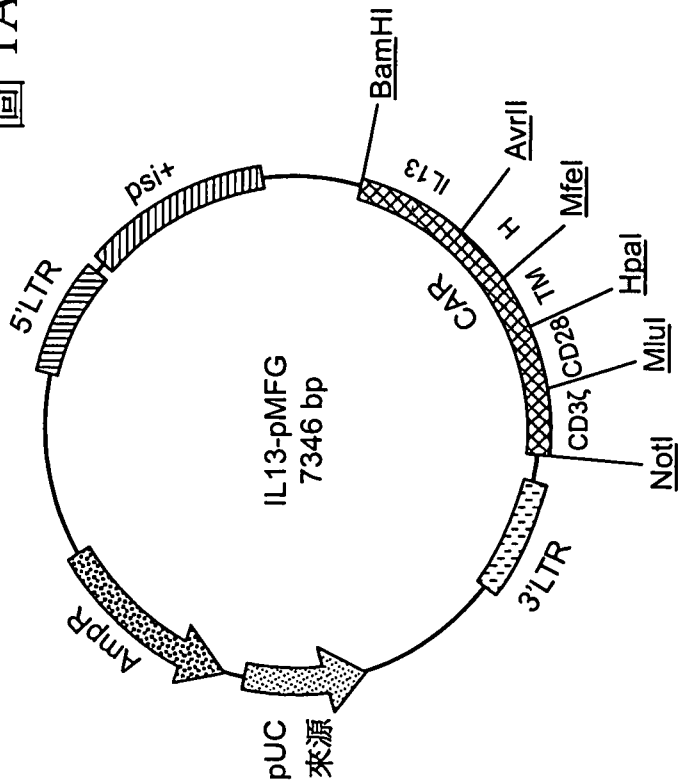


圖 1B

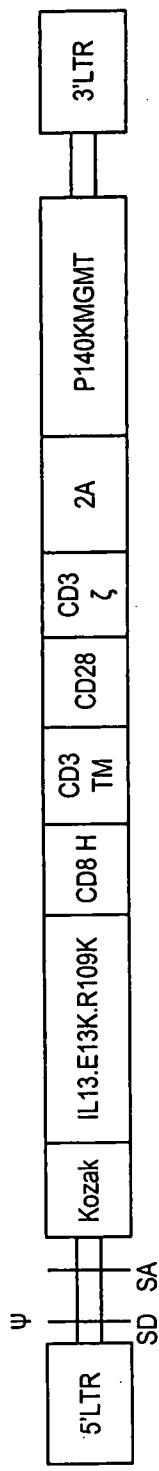


圖 2A

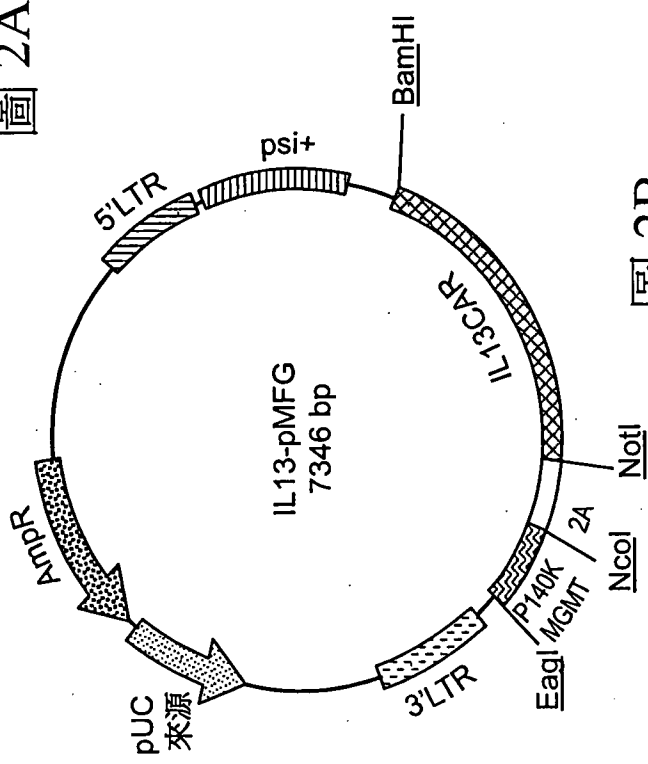


圖 2B

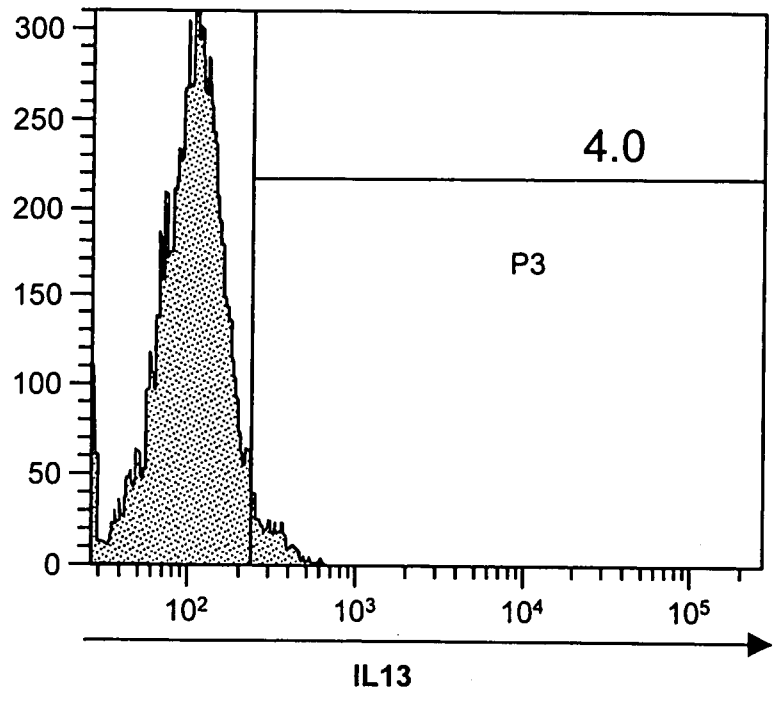


圖 3A

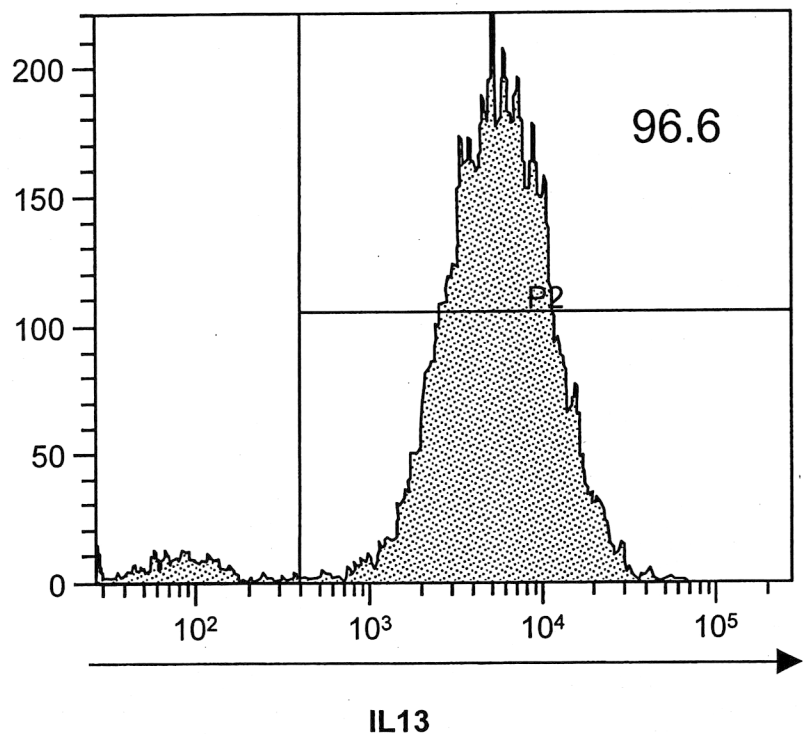


圖 3B

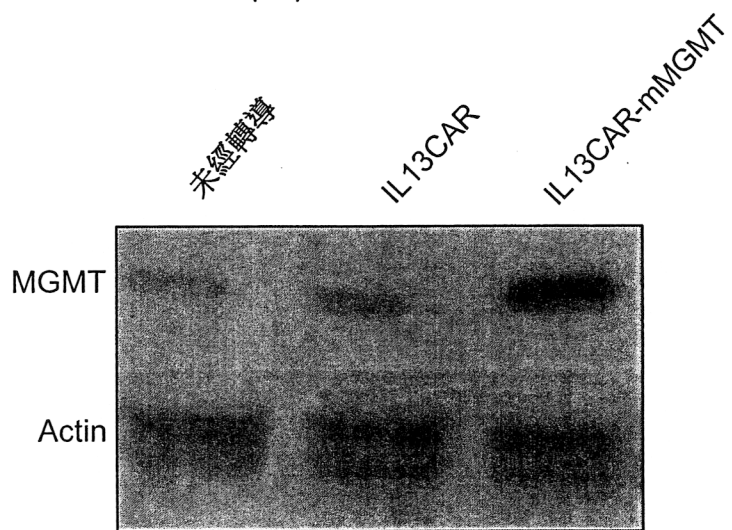


圖 3C

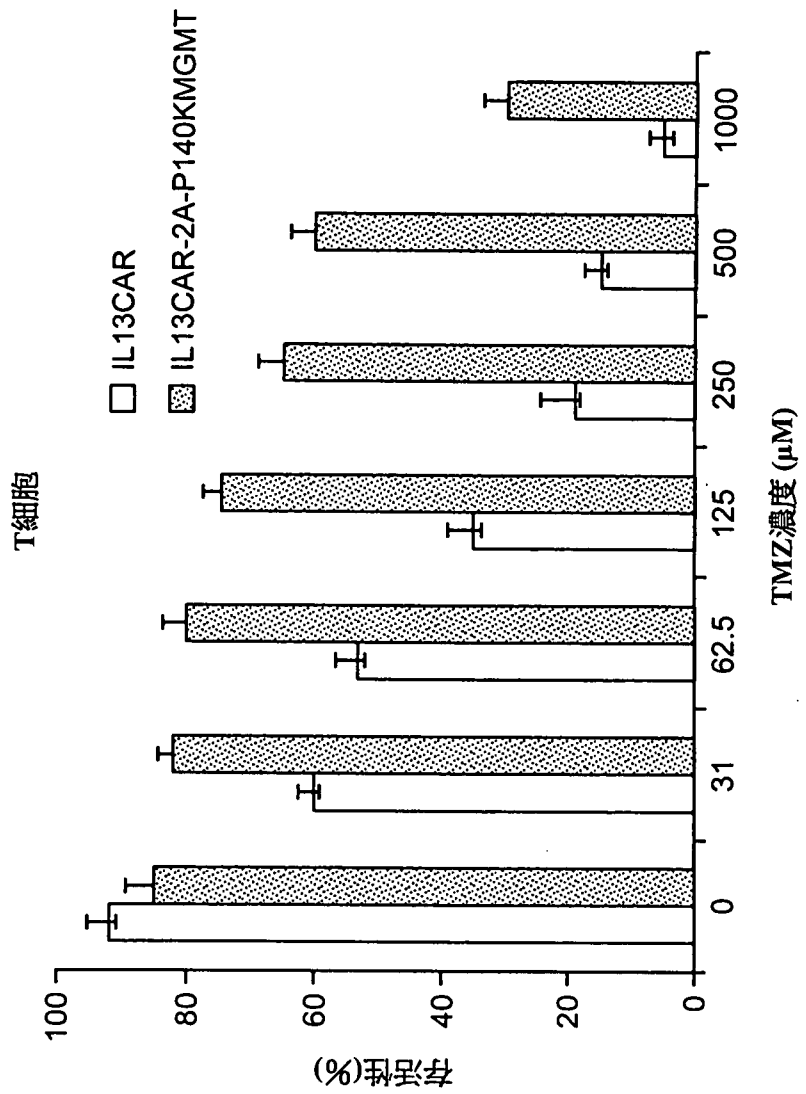


圖 4

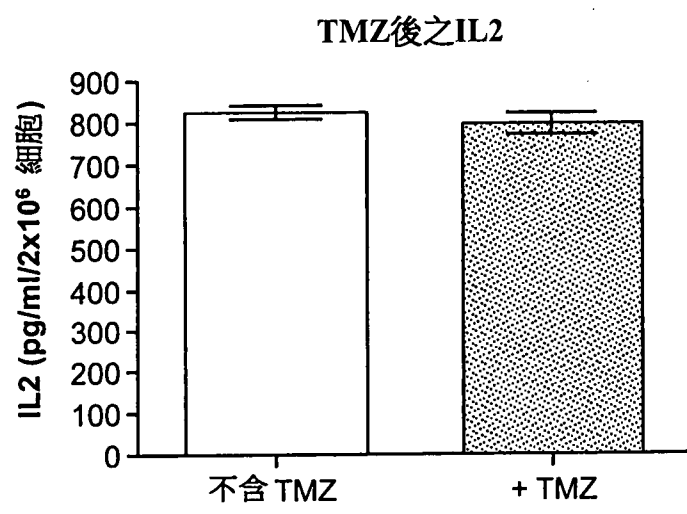


圖 5A

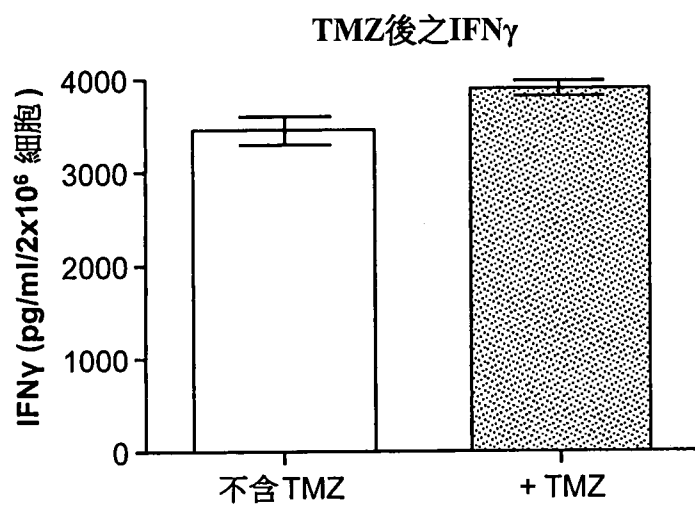


圖 5B

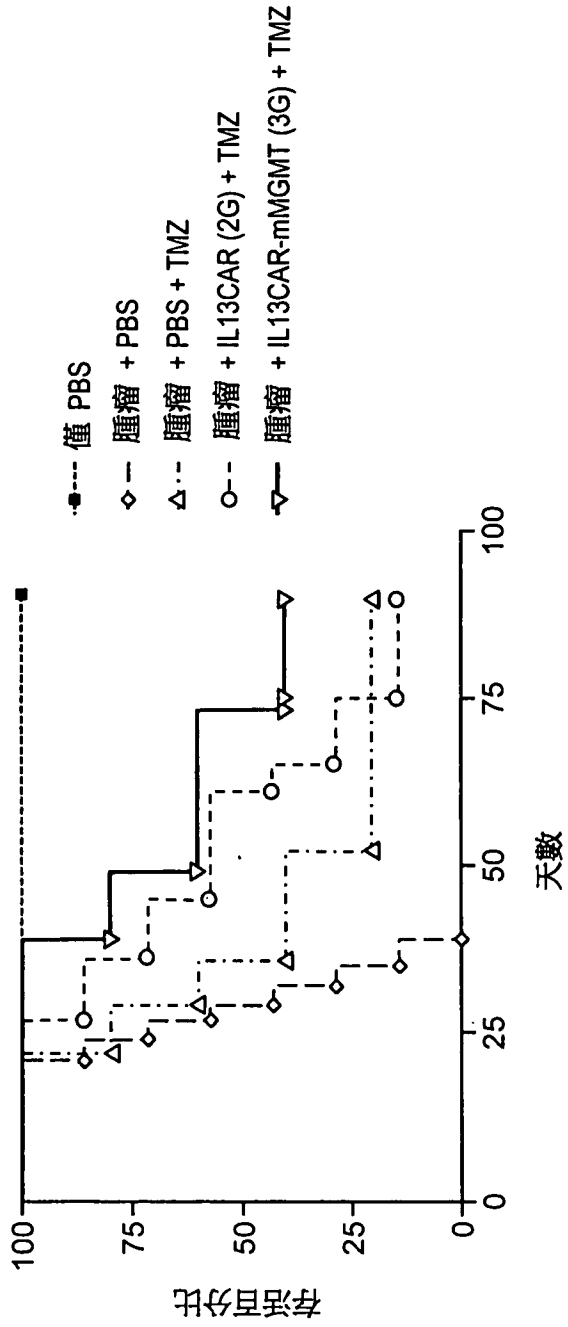


圖 6

IL13CAR-P140KMGMT之DNA序列SEQ ID NO: 1

GGA TCC	GCC ACC	ATG	CAT CCG CTC CTC AAT CCT CTC CTG TTG GCA	信號
CTG GGC CTC ATG GCG CTT TTG TTG ACC ACG GTC ATT GCT CTC ACT				
TGC CTT GGC GGC TTT GCC		TCC CCA GGC CCT GTG CCT CCC TCT ACA		
GCC CTC AGG GAG CTC ATT GAG GAG CTG GTC AAC ATC ACC CAG AAC				IL13(WT)
CAG AAG GCT CCG CTC TGC AAT GGC AGC ATG GTA TGG AGC ATC AAC				
CTG ACA GCT GGC ATG TAC TGT GCA GCC CTG GAA TCC CTG ATC AAC				
GTG TCA GGC TGC AGT GCC ATC GAG AAG ACC CAG AGG ATG CTG AGC				
GGA TTC TGC CCG CAC AAG GTC TCA GCT GGG CAG TTT TCC AGC TTG				
CAT GTC CGA GAC ACC AAA ATC GAG GTG GCC CAG TTT GTA AAG GAC				
CTG CTC TTA CAT TTA AAG AAA CTT TTT CGC GAG GGA CAG TTC AAC				
CCT AGG	AAG CCC ACC ACG ACG CCA GCG CCG CGA CCA CCA ACA CCG GCG			絞鏈
CCC ACC ATC GCG TCG CAG CCC CTG TCC CTG CGC CCA GAG GCG TGC CGG				
CCA GCG GCG GGG GGC GCA GTG CAC ACG AGG GGG CTG GAC TTC GCC				
CAA TTG	CTC TGC TAC CTG CTG GAT GGA ATC CTC TTC ATC TAT GGT GTC			TM
ATT CTC ACT GCC TTG TTC CTG AGA GTG		GTT AAC	TTC TGG GTG AGG AGT	CD28
AAG AGG AGC AGG CTC CTG CAC AGT GAC TAC ATG AAC ATG ACT CCC CGC				
CGC CCC GGG CCC ACC CGC AAG CAT TAC CAG CCC TAT GCC CCA CCA CGC				
GAC TTC GCA GCC TAT CGC		TCC ACG	CGT AAG TTC AGC AGG AGC GCA GAC	
GCC CCC GCG TAC CAG CAG GGC CAG AAC CAG CTC TAT AAC GAG CTC AAT				CD3ζ
CTA GGA CGA AGA GAG GAG TAC GAT GTT TTG GAC AAG AGA CGT GGC CGG				
GAC CCT GAG ATG GGG GGA AAG CCG AGA AGG AAG AAC CCT CAG GAA GGC				
CTG TAC AAT GAA CTG CAG AAA GAT AAG ATG GCG GAG GCC TAC AGT GAG				
ATT GGG ATG AAA GGC GAG CGC CGG AGG GGC AAG GGG CAC GAT GGC CTT				
TAC CAG GGT CTC AGT ACA GCC ACC AAG GAC ACC TAC GAC GCC CTT CAC				
ATG CAG GCC CTG CCC CCT CGC				A2
TAA		CAG CCA	GCG GCC GC	
GGA AGT CTT CTA ACA TGC GGT GAC GTG GAG GAG AAT CCC GGC CCT		CCA		
TGG	ATG	GAC AAA GAT TGC GAG ATG AAG CGG ACC ACA CTG GAC TCC CCC		
CTG GGC AAA CTG GAG CTG TCT GGC TGT GAA CAG GGG CTG CAC GAG ATC				
AAA CTG CTG GGA AAG GGC ACT AGC GCC GCT GAT GCT GTG GAA GTG CCA				
GCT CCA GCT GCT GTG CTG GGA GGA CCT GAG CCA CTG ATG CAG TGC ACC				
GCC TGG CTG AAC GCT TAC TTC CAT CAG CCT GAA GCC ATC GAG GAA TTT				
CCC GTG CCT GCC CTG CAC CAT CCA GTG TTC CAG CAG GAG AGT TTT ACA				
AGG CAG GTG CTG TGG AAG CTG CTG AAA GTG GTG AAG TTC GGG GAA GTG				P140K MGMT
ATT TCC TAC CAG CAG CTG GCT GCT CTG GCT GGA AAC CCA AAA GCT GCT				
CGG GCC GTG GGA GGA GCT ATG AGA GGC AAT CCA GTG				
AAA		ATC CTG ATT		
CCC TGC CAC AGG GTG GTG TGT AGC TCC GGA GCT GTG GGG AAC TAT TCT				
GGG GGA CTG GCC GTG AAA GAA TGG CTG CTG GCT CAC GAG GGA CAT AGG				
CTG GGA AAG CCT GGC CTG GGA GGG TCT AGT GGA CTG GCT GGA GCT TGG				
CTG AAG GGA GCT GGA GCT ACC TCA GGA AGC CCA CCT GCC GGC CGG AAT				
TGA	CGG CCG			

圖 7A

IL13CAR-P140KMGMT之肽序列SEQ ID NO: 4

MHPLLNPLLLALGLMALLTTVIALTCLGGFA	SPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPL	IL13
CNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRM	LSGFCPHKVSAGQFSSLHVR	
DTKIEVAQFVKDLLHLKKLFREGQFN	PRKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC	絞鏈
RPAAGGAVHTRGLDFA	QLLCYLLDGILFIYGVILTALFLRV	TM/CD28
VNFWVRSKRSRLLHSDYM	NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD3ζ
TRKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR	REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK	
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	STOPQPAAA	A2
EGRGSLLTCGDVEENPGP	M	
DKDCEMKRTTLDSPLGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPL	MQCTAWLNAYFHQPEAIEFPVPALHHPVFQQESFTRQVLWKLLKVVKFGEVISYQQL	P140KMGMT
AALAGNPKAARAVGGAMRGNPV	KILIPCHRVVCSSGAVGNYSGLAVKEWLLAHEGH	
RLGKPGLGGSSGLAGAWLKGAGATSGSPAGRN	STOP	

圖 7B

IL13 (E13Y) CAR-P140KMGMT之DNA序列SEQ ID NO: 2

GGA TCC	GCC ACC	ATG	CAT CCG CTC CTC AAT CCT CTC CTG TTG GCA	信號	
CTG GGC CTC ATG GCG CTT	TTG TTG ACC ACG GTC ATT GCT CTC ACT				
TGC CTT GGC GGC TTT GCC	TCC CCA GGC CCT GTG CCT CCC TCT ACA				
GCC CTC AGG TAC CTC ATT GAG GAG CTG GTC AAC ATC ACC CAG AAC				IL13(E13y)	
CAG AAG GCT CCG CTC TGC AAT GGC AGC ATG GTA TGG AGC ATC AAC					
CTG ACA GCT GGC ATG TAC TGT GCA GCC CTG GAA TCC CTG ATC AAC					
GTG TCA GGC TGC AGT GCC ATC GAG AAG ACC CAG AGG ATG CTG AGC					
GGA TTC TGC CCG CAC AAG GTC TCA GCT GGG CAG TTT TCC AGC TTG					
CAT GTC CGA GAC ACC AAA ATC GAG GTG GCC CAG TTT GTA AAG GAC					
CTG CTC TTA CAT TTA AAG AAA CTT TTT CGC GAG GGA CAG TTC AAC					
CCT AGG	AAG CCC ACC ACG ACG CCA GCG CCG CGA CCA CCA ACA CCG GCG				
CCC ACC ATC GCG TCG CAG CCC CTG TCC CTG CGC CCA GAG GCG TGC CGG				絞鏈	
CCA GCG GCG GGG GGC GCA GTG CAC ACG AGG GGG CTG GAC TTC GCC					
CAA TTG	CTC TGC TAC CTG CTG GAT GGA ATC CTC TTC ATC TAT GGT GTC			TM	
ATT CTC ACT GCC TTG TTC CTG AGA GTG	GTT AAC	TTC TGG GTG AGG AGT		CD28	
AAG AGG AGC AGG CTC CTG CAC AGT GAC TAC ATG AAC ATG ACT CCC CGC					
CGC CCC GGG CCC ACC CGC AAG CAT TAC CAG CCC TAT GCC CCA CCA CGC				CD3ζ	
GAC TTC GCA GCC TAT CGC	TCC ACG	CGT AAG TTC AGC AGG AGC GCA GAC			
GCC CCC GCG TAC CAG CAG GGC CAG AAC CAG CTC TAT AAC GAG CTC AAT					
CTA GGA CGA AGA GAG GAG TAC GAT GTT TTG GAC AAG AGA CGT GGC CGG					
GAC CCT GAG ATG GGG GGA AAG CCG AGA AGG AAG AAC CCT CAG GAA GGC					
CTG TAC AAT GAA CTG CAG AAA GAT AAG ATG GCG GAG GCC TAC AGT GAG					
ATT GGG ATG AAA GGC GAG CGC CGG AGG GGC AAG GGG CAC GAT GGC CTT					
TAC CAG GGT CTC AGT ACA GCC ACC AAG GAC ACC TAC GAC GCC CTT CAC					
ATG CAG GCC CTG CCC CCT CGC	TAA	CAG CCA	GCG GCC GC	A	A2
GGA AGT CTT CTA ACA TGC GGT GAC GTG GAG GAG AAT CCC GGC CCT	CCA				
TGG	ATG	GAC AAA GAT TGC GAG ATG AAG CGG ACC ACA CTG GAC TCC CCC			P140K MGMT
CTG GGC AAA CTG GAG CTG TCT GGC TGT GAA CAG GGG CTG CAC GAG ATC					
AAA CTG CTG GGA AAG GGC ACT AGC GCC GCT GAT GCT GTG GAA GTG CCA					
GCT CCA GCT GCT GTG CTG GGA GGA CCT GAG CCA CTG ATG CAG TGC ACC					
GCC TGG CTG AAC GCT TAC TTC CAT CAG CCT GAA GCC ATC GAG GAA TTT					
CCC GTG CCT GCC CTG CAC CAT CCA GTG TTC CAG CAG GAG AGT TTT ACA					
AGG CAG GTG CTG TGG AAG CTG CTG AAA GTG GTG AAG TTC GGG GAA GTG					
ATT TCC TAC CAG CAG CTG GCT GCT CTG GCT GGA AAC CCA AAA GCT GCT					
CGG GCC GTG GGA GGA GCT ATG AGA GGC AAT CCA GTG	AAA	ATC CTG ATT			
CCC TGC CAC AGG GTG GTG TGT AGC TCC GGA GCT GTG GGG AAC TAT TCT					
GGG GGA CTG GCC GTG AAA GAA TGG CTG CTG GCT CAC GAG GGA CAT AGG					
CTG GGA AAG CCT GGC CTG GGA GGG TCT AGT GGA CTG GCT GGA GCT TGG					
CTG AAG GGA GCT GGA GCT ACC TCA GGA AGC CCA CCT GCC GGC CGG AAT					
TGA	CGG CCG				

圖 8A

IL13 (E13Y) CAR-P140KMGMT之肽序列SEQ ID NO: 5

MHPLLNPLLLALGLMALLTTVIALTCLGGFA	SPGPVPPSTALRYLIEELVNITQNQKAPL	IL13
CNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVR		(E13y)
DTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFREGQFN	PRKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC	絞鏈
RPAAGGAVHTRGLDFA	QLCYLLDGILFIYGVILTALFLRV	TM/CD28
VNFWVRSKRSRLHSDYM		
NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	TRKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR	CD3ζ
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK		
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	STOPQPAAAEGRGSLLTCGDVEENPGP	MA2
M		
DKDCEMKRTTLDSPLGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPL		P140K
MQCTAWLNAYFHQPEAIEEFPVPALHHPVFQQESFTRQVLWKLLKVKFGEVISYQQL		MGMT
AALAGNPKAARAVGGAMRGNPV	KILIPCHRVVCSSGAVGNYSGLAVKEWLLAHEGH	
RLGKPGLGGSSGLAGAWLKGAGATSGSPAGRN	STOP	

圖 8B

IL13 (E13K.R109K) CAR-P140KMGMT之DNA序列SEQ ID NO: 3

GGA TCC GCC ACC ATG CAT CCG CTC CTC AAT CCT CTC CTG TTG GCA	信號
CTG GGC CTC ATG GCG CTT TTG TTG ACC ACG GTC ATT GCT CTC ACT	
TGC CTT GGC GGC TTT GCC TCC CCA GGC CCT GTG CCT CCC TCT ACA	
GCC CTC AGG AAG CTC ATT GAG GAG CTG GTC AAC ATC ACC CAG AAC	IL13 (E13K R109K)
CAG AAG GCT CCG CTC TGC AAT GGC AGC ATG GTA TGG AGC ATC AAC	
CTG ACA GCT GGC ATG TAC TGT GCA GCC CTG GAA TCC CTG ATC AAC	
GTG TCA GGC TGC AGT GCC ATC GAG AAG ACC CAG AGG ATG CTG AGC	
GGA TTC TGC CCG CAC AAG GTC TCA GCT GGG CAG TTT TCC AGC TTG	
CAT GTC CGA GAC ACC AAA ATC GAG GTG GCC CAG TTT GTA AAG GAC	
CTG CTC TTA CAT TTA AAG AAA CTT TTT AAG GAG GGA CAG TTC AAC	
CCT AGG AAG CCC ACC ACG ACG CCA GCG CCG CGA CCA CCA ACA CCG GCG	絞鏈
CCC ACC ATC GCG TCG CAG CCC CTG TCC CTG CGC CCA GAG GCG TGC CGG	
CCA GCG GCG GGG GGC GCA GTG CAC ACG AGG GGG CTG GAC TTC GCC	TM
CAA TTG CTC TGC TAC CTG CTG GAT GGA ATC CTC TTC ATC TAT GGT GTC	
ATT CTC ACT GCC TTG TTC CTG AGA GTG GTT AAC TTC TGG GTG AGG AGT	CD28
AAG AGG AGC AGG CTC CTG CAC AGT GAC TAC ATG AAC ATG ACT CCC CGC	
CGC CCC GGG CCC ACC CGC AAG CAT TAC CAG CCC TAT GCC CCA CCA CGC	
GAC TTC GCA GCC TAT CGC TCC ACG CGT AAG TTC AGC AGG AGC GCA GAC	CD3ζ
GCC CCC GCG TAC CAG CAG GGC CAG AAC CAG CTC TAT AAC GAG CTC AAT	
CTA GGA CGA AGA GAG GAG TAC GAT GTT TTG GAC AAG AGA CGT GGC CGG	
GAC CCT GAG ATG GGG GGA AAG CCG AGA AGG AAG AAC CCT CAG GAA GGC	
CTG TAC AAT GAA CTG CAG AAA GAT AAG ATG GCG GAG GCC TAC AGT GAG	
ATT GGG ATG AAA GGC GAG CGC CGG AGG GGC AAG GGG CAC GAT GGC CTT	
TAC CAG GGT CTC AGT ACA GCC ACC AAG GAC ACC TAC GAC GCC CTT CAC	
ATG CAG GCC CTG CCC CCT CGC TAA CAG CCA GCG GCC GC A GAG GGC AGA	A2
GGA AGT CTT CTA ACA TGC GGT GAC GTG GAG GAG AAT CCC GGC CCT CCA	
TGG ATG GAC AAA GAT TGC GAG ATG AAG CGG ACC ACA CTG GAC TCC CCC	P140K MGMT
CTG GGC AAA CTG GAG CTG TCT GGC TGT GAA CAG GGG CTG CAC GAG ATC	
AAA CTG CTG GGA AAG GGC ACT AGC GCC GCT GAT GCT GTG GAA GTG CCA	
GCT CCA GCT GCT GTG CTG GGA GGA CCT GAG CCA CTG ATG CAG TGC ACC	
GCC TGG CTG AAC GCT TAC TTC CAT CAG CCT GAA GCC ATC GAG GAA TTT	
CCC GTG CCT GCC CTG CAC CAT CCA GTG TTC CAG CAG GAG AGT TTT ACA	
AGG CAG GTG CTG TGG AAG CTG CTG AAA GTG GTG AAG TTC GGG GAA GTG	
ATT TCC TAC CAG CAG CTG GCT GCT CTG GCT GGA AAC CCA AAA GCT GCT	
CGG GCC GTG GGA GGA GCT ATG AGA GGC AAT CCA GTG AAA ATC CTG ATT	
CCC TGC CAC AGG GTG GTG TGT AGC TCC GGA GCT GTG GGG AAC TAT TCT	
GGG GGA CTG GCC GTG AAA GAA TGG CTG CTG GCT CAC GAG GGA CAT AGG	
CTG GGA AAG CCT GGC CTG GGA GGG TCT AGT GGA CTG GCT GGA GCT TGG	
CTG AAG GGA GCT GGA GCT ACC TCA GGA AGC CCA CCT GCC GGC CGG AAT	
TGA CGG CCG	

圖 9A

IL13 (E13K.R109K) CAR-P140KMGMT之肽序列SEQ ID NO: 6

MHPLLNPLLLALGLMALLTTVIALTCLGGFA	SPGPVPPSTALRKIEELVNITQNQKAPL	IL13
CNGSMVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVR		(E13K R109K)
DTKIEVAQFVKDLLHLKKLFKEGQFN	PRKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC	絞鏈
RPAAGGAVHTRGLDFA	QLLCYLLDGILFIYGVILTALFLRV	TM/CD28
NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	TRKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR	CD3ζ
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK		
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	STOPQPIAAAEGRGSLLTCGDVEENPGP	A2
DKDCEMKRTTLDSPLGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPL		P140K
MQCTAWLNAYFHQPEAIEEFVVPALHHPVFQQESFTRQVLWLLKVVKFGEVISYQQL		MGMT
AALAGNPKAARAVGGAMRGNPV	KILIPCHRVVCSGAVGNYSGLAVKEWLLAHEGH	
RLGKPGLGGSSGLAGAWLKGAGATSGSPAGRN	STOP	

圖 9B