



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107709353 A

(43)申请公布日 2018.02.16

(21)申请号 201580074883.3

理查德·P·容汉斯

(22)申请日 2015.12.01

(74)专利代理机构 北京金思港知识产权代理有限公司 11349

(30)优先权数据

62/086,346 2014.12.02 US

代理人 邵毓琴 李晶

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.07.28

(51)Int.Cl.

C07K 14/47(2006.01)

G12N 9/10(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/063267 2015.12.01

A61K 48/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/089916 EN 2016.06.09

(71)申请人 普拉斯派克特查特凯尔RWMC有限责任公司

地址 美国罗得岛州

(72)发明人 沙德哈克·森古普塔
普拉卡什·桑帕斯

权利要求书3页 说明书36页
序列表33页 附图14页

(54)发明名称

治疗癌症的方法和组合物

(57)摘要

本文描述了涉及免疫细胞的组合物和方法，所述免疫细胞表达结合IL13受体 α -2(IL13R α 2)的嵌合抗原受体和O⁶-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(MGMT)蛋白质这两者。包含IL13嵌合抗原受体(IL13CAR)或其变体以及MGMT蛋白质或其变体的病毒颗粒用于转染诸如T细胞之类的免疫细胞，向转染的细胞赋予IL13R α 2靶向活性和对化疗剂替莫唑胺(TMZ)的耐药性。本文描述的组合物和方法在诸如治疗高度恶性胶质瘤之类的癌症治疗方面有用。

1. 嵌合核酸序列,其包含:
编码IL13CAR的第一核酸序列,IL13CAR包含:
结合IL13 α 2受体的IL13配体结构域(SEQ ID NO:44),
跨膜结构域,
包含CD3- ζ 信号传导结构域的细胞质结构域;以及
编码MGMT多肽的第二核酸序列,MGMT多肽选自:SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:43。
2. 如权利要求1所述的嵌合核酸序列,其中,IL13CAR还包含单个肽。
3. 如权利要求1或2所述的嵌合核酸序列,其中,IL13CAR还包含铰链区。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的嵌合核酸序列,其中,所述细胞质结构域还包含选自CD28、4-1BB(CD137)和OX40(CD134)的共刺激结构域。
5. 如权利要求4所述的嵌合核酸序列,其中,CD28共刺激结构域与SEQ ID NO:29具有至少90%的一致性。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的嵌合核酸序列,其中,CD3- ζ 信号传导结构域与SEQ ID NO:30具有至少90%的一致性。
7. 如权利要求1至5中任一项所述的嵌合核酸序列,其还包含编码自裂解连接体肽的第三核酸序列。
8. 如权利要求7所述的嵌合核酸序列,其中,所述第三核酸序列位于所述第一核酸和所述第二核酸之间。
9. 如权利要求1至8中任一项所述的嵌合核酸序列,其中,所述第一核酸还包含下述核酸序列,该核酸序列编码位于IL13结构域和铰链结构域之间、铰链结构域和跨膜结构域之间、跨膜结构域和CD28信号传导结构域之间或CD28信号传导结构域和CD3- ζ 信号传导结构域之间的二肽连接体。
10. 如权利要求1至9中任一项所述的嵌合核酸序列,其还包含编码位于CD3- ζ 信号传导结构域和自裂解肽之间的连接体肽的核酸序列。
11. 如权利要求1至10中任一项所述的嵌合核酸序列,其中,IL13配体结构域包含下述氨基酸序列,该氨基酸序列与选自SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37及其变体的序列具有至少90%的一致性。
12. 如权利要求1至10中任一项所述的嵌合核酸序列,其选自:SEQ ID NO:1核苷酸109至1839、SEQ ID NO:2核苷酸109至1839、以及SEQ ID NO:3核苷酸109至1839。
13. 包含SEQ ID NO:1(IL13CAR-P140KMGMT)、SEQ ID NO:2(IL-13(E13Y)CAR-P140KMGMT)、SEQ ID NO:3(IL-13(E13K R109K)CAR-P140KMGMT)或其组合的核酸序列。
14. 包含权利要求1至12中任一项所述的嵌合核酸序列的载体。
15. 如权利要求14所述的载体,其中,所述载体是病毒载体。
16. 如权利要求15所述的载体,其中,所述病毒载体是逆转录病毒载体。
17. 包含权利要求1至12中任一项所述的嵌合核酸序列的宿主细胞。
18. 如权利要求17所述的宿主细胞,其中,所述细胞是哺乳动物细胞。
19. 如权利要求17或18所述的宿主细胞,其中,所述细胞是T细胞。
20. 如权利要求17至19中任一项所述的宿主细胞,其中,所述细胞是自体细胞或人白细

胞抗原(HLA)-相合细胞。

21. 如权利要求17至20中任一项所述的宿主细胞,其中,所述细胞获自患有脑癌的一个或多个个体。

22. 宿主细胞,其包含:

编码IL13CAR的第一核酸序列,IL13CAR包含:

结合IL13 α 2受体的IL13配体结构域(SEQ ID NO:44),

跨膜结构域,

包含CD3- ζ 信号传导结构域的细胞质结构域;以及

编码MGMT多肽的第二核酸序列,MGMT多肽选自:SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:43。

23. 包含权利要求17至21中任一项所述的宿主细胞的药物组合物。

24. 药物组合物,其包含:

编码IL13CAR的第一核酸序列,IL13CAR包含:

结合IL13 α 2受体的IL13配体结构域(SEQ ID NO:44),

跨膜结构域,

包含CD3- ζ 信号传导结构域的细胞质结构域;以及

编码MGMT多肽的第二核酸序列,MGMT多肽选自:SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:43。

25. 用于生成表达IL13CAR蛋白质和MGMT蛋白质的哺乳动物细胞的方法,所述方法包括:

a) 将编码IL13CAR蛋白质和MGMT蛋白质的核酸序列引入至所述细胞,其中,IL13CAR蛋白质包含:结合IL13 α 2受体的IL13配体结构域(SEQ ID NO:44)、跨膜结构域、包含CD3- ζ 信号传导结构域的细胞质结构域;以及

b) 在由所述细胞表达IL13CAR蛋白质和MGMT蛋白质的条件下维持所述细胞。

26. 如权利要求25所述的方法,其中,所述核酸序列通过病毒载体引入至所述细胞。

27. 如权利要求26所述的方法,其中,所述病毒载体选自:逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或腺相关病毒载体。

28. 治疗有此需要的受治者体内的脑癌的方法,所述方法包括向所述受治者给药一种或多种表达由下列核酸序列编码的蛋白质的免疫细胞:

在N-端至C-端方向编码IL13CAR的第一核酸序列,IL13CAR包含:

结合IL13 α 2受体的IL13配体结构域(SEQ ID NO:44),

跨膜结构域,

包含CD3- ζ 信号传导结构域的细胞质结构域;以及

编码MGMT多肽的第二核酸序列,MGMT多肽选自:SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:43。

29. 如权利要求28所述的方法,其中,所述脑癌是高度恶性胶质瘤。

30. 如权利要求28或29所述的方法,其中,所述受治者正在接受DNA-甲基化化疗剂的治疗、已接受DNA-甲基化化疗剂的治疗或将要接受DNA-甲基化化疗剂的治疗。

31. 如权利要求30所述的方法,其中,所述DNA-甲基化化疗剂是TMZ。

32. 如权利要求30或31所述的方法,其中,所述DNA-甲基化化疗剂在给药一剂免疫细胞之前、给药一剂免疫细胞过程中或给药一剂免疫细胞之后给药。

治疗癌症的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年12月2日提交的美国临时申请US62/086,346的优先权权益,该美国临时申请的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列的交叉引用

[0004] “序列表”以txt文件的形式随本申请一同提交,该“序列表”于2015年11月30日生成,并且命名为“0962018010W0seqlist.txt”(69892字节),序列表的全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0005] 靶向免疫疗法近些年已成为治疗恶性肿瘤方面的有希望的研究领域并且获得了大量关注(Carpentier and Meng,2006,Curr Opin Oncol,18(6):631-636;Wainwright et al.,2012,Exp Opin Emerging Drugs;17(2):181-202)。最广泛研究的靶点之一是白介素-13受体 $\alpha 2$ (IL13R $\alpha 2$)(Thaci et al.,2014,Neuro-Oncol,16(10):1304-1324)。IL13R $\alpha 2$ 是白介素-13(IL13)的诱捕受体,缺乏在普遍存在的IL13R $\alpha 1$ 上存在的信号传导链,因此阻止了任何IL13-介导的下游信号传导通路(Arima et al.,2005,J Biol Chem,280(26):24915-24922)。已报道IL13R $\alpha 2$ 的表达的增加促进胶质瘤和其他肿瘤模型中的肿瘤恶化。IL13R $\alpha 2$ 的表达是胶质瘤恶性分级和预后不良患者存活率的预后标志物(Brown et al.,2013,PLoS ONE,8(10):Article ID e77769)。大约二十年前已发现了IL13R $\alpha 2$ 在MG上的选择性表达,从那时起IL13R $\alpha 2$ 在MG上的选择性表达已作为治疗靶点(Debinski et al.,1999,Clin Canc Res,5(5):985-990)。

[0006] 胶质母细胞瘤是成人体内最常见的原发性脑肿瘤。在美国,每年被诊断为患有恶性原发性脑肿瘤的18,000位患者中超过一半的患者患有多形性胶质母细胞瘤。多形性胶质母细胞瘤是退化发育的巨细胞瘤,具有高增殖指数,微血管增殖和局灶性坏死。多形性胶质母细胞瘤的指征和症状基于多种因素(尺寸、生长速度、肿瘤在脑内部的位置),并且多形性胶质母细胞瘤的指征和症状主要由头痛、痉挛、神经功能缺陷、精神状态的改变代表。多形性胶质母细胞瘤的预后仍然很差。大部分患者的存活时间少于2年。

[0007] 虽然采用目前的标准对胶质母细胞瘤(GBM)进行护理在存活率方面取得了很大的改善,所述目前的标准是手术、放疗和化疗的三重方案(Rolle et al.,2010,Neurosurgery Clin of North America,21(1):201-214;Ashby and Ryken,2006,Neurosurgical focus,20(4):E3),但是,大多数患者的预后仍然很差(Stupp et al,2009,Lancet Oncol,10(5):459-466;Omuro and DeAngelis,2013,JAMA,310(17):1842-1850)。治疗GBM的主要限制是肿瘤在脑内部的位置,其妨碍细胞毒性药剂跨过血脑屏障的递送(Ashby and Ryken,2006,Neurosurgical Focus,20(4):E3),以及强的免疫抑制环境(Rolle et al.,2012,Adv Exp Med Biol,746:53-76)和放化疗耐受的胶质瘤起始细胞(Bao et al,2006,Nature,444(7120):756-760;Frosina,Mol Canc Res,2009 7(7):989-999)。因此,本领域需要继续测试新的治疗策略以改善患者存活率、生活质量以及总体结果。

[0008] 因此,本文描述了用于更加有效地治疗恶性肿瘤细胞表达或过表达IL13R α 2的癌症(包括脑癌)的组合物和方法。

发明内容

[0009] 一方面,本文提供嵌合核酸序列,其中,嵌合核酸序列包括编码结合IL1R α 2受体(IL13R α 2)的IL13嵌合抗原受体(IL13CAR)的第一核酸和编码耐药性多肽的第二核酸,所述耐药性多肽是O⁶-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(MGMT)蛋白质。

[0010] 在一种实施方式中,IL13CAR包括IL13R α 2的配体。在另一实施方式中,所述配体是IL13。在又一实施方式中,所述配体是结合IL13R α 2的IL13的片段。在再一实施方式中,配体是选择性结合IL13R α 2的抗体可变结构域或其片段。

[0011] 在一种实施方式中,MGMT蛋白质包括P140K取代。

[0012] 在一种实施方式中,嵌合核酸序列包括编码IL13CAR的第一核酸序列和编码MGMT蛋白质的第二核酸序列。

[0013] 在一种实施方式中,所述编码IL13CAR的第一核酸序列是编码MGMT多肽的5'-第二核酸序列。在可选的实施方式中,所述编码IL13CAR的第一核酸序列是编码MGMT多肽的3'-第二核酸序列。

[0014] 在一种实施方式中,所述编码IL13CAR的第一核酸序列在5'-3'方向上包括:编码IL13R α 2配体结构域的核酸序列,编码跨膜(TM)结构域的核酸序列,以及编码包括CD3 ζ 信号传导结构域的细胞质结构域的核酸序列。在另一实施方式中,所述第一核酸序列还包括编码铰链区的核酸序列,其中,所述铰链区位于IL13配体结构域和TM结构域之间。在又一实施方式中,所述第一核酸序列还包括编码CD28共刺激结构域的核酸序列,其中,CD28共刺激结构域位于TM结构域和CD3 ζ 链之间。在再一实施方式中,所述第一核酸序列还包括编码信号序列的核酸,其中,所述信号序列位于IL13R α 2配体结构域的N-端。

[0015] 在一种实施方式中,铰链结构域是CD8铰链结构域。在另一实施方式中,CD8铰链结构域包括SEQ ID NO:27。

[0016] 在一种实施方式中,细胞质结构域还包括一个或多个共刺激结构域。在一种实施方式中,共刺激结构域是CD28共刺激结构域。在另一实施方式中,CD28共刺激结构域位于TM结构域和CD3- ζ 信号传导结构域之间。

[0017] 在一种实施方式中,细胞质结构域还包括一个或多个选自下列的共刺激结构域:OX-40共刺激结构域,HVEM共刺激结构域,41BB共刺激结构域,ICOS共刺激结构域,OX40共刺激结构域和CD27共刺激结构域。在一种实施方式中,另外的共刺激结构域位于CD28共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域之间。

[0018] 在一种实施方式中,信号序列是异质信号序列。在另一实施方式中,信号序列是IL13信号序列或其变体。在又一实施方式中,IL13信号序列包括SEQ ID NO:25。在再一实施方式中,编码信号序列的核酸序列包括SEQ ID NO:9。

[0019] 在一种实施方式中,IL13配体结合结构域包括成熟的IL13蛋白质(SEQ ID NO:26)。在另一实施方式中,IL13配体结合结构域由成熟的IL13的片段构成,其中,所述片段结合IL13R α 2蛋白质,该IL13R α 2蛋白质具有与成熟的IL13蛋白质(SEQ ID NO:26)的亲合性大致相同的亲和性。

[0020] 在一种实施方式中,编码IL13配体的核酸序列编码选自SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37的多肽。在另一实施方式中,编码成熟的IL13多肽的核酸序列包括选自SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35的核酸序列。

[0021] 在一种实施方式中,所述第一核酸在5' -3' 方向上包括:编码IL13配体结构域的选自SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35的核酸,编码TM结构域的包含SEQ ID NO:14或其变体的核酸,以及编码CD3- ζ 信号传导结构域的包含SEQ ID NO:18或其变体的核酸。在另一实施方式中,所述第一核酸还包含编码IL13信号序列的SEQ ID NO:9或其变体,其中,SEQ ID NO:9的序列是编码IL13配体结构域的核酸序列的上游。在另一实施方式中,所述第一核酸还包含编码CD8铰链结构域的SEQ ID NO:12或其变体。在又一实施方式中,所述第一核酸还包含编码CD28共刺激结构域的SEQ ID NO:16或其变体的核酸。

[0022] 在一种实施方式中,所述第一核酸在5' -3' 方向上包括:编码信号传导结构域的SEQ ID NO:9或其变体的核酸序列,编码IL13配体结构域的选自SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35的核酸,编码CD8铰链结构域的SEQ ID NO:12或其变体的核酸序列,编码TM结构域的包含SEQ ID NO:14或其变体的核酸,编码CD28共刺激结构域的SEQ ID NO:16或其变体的核酸,以及编码CD3 ζ 信号传导结构域的SEQ ID NO:18或其变体的核酸序列。

[0023] 在一种实施方式中,所述编码CAR的第一核酸序列还包括编码位于成熟IL13配体和CD8铰链结构域之间的连接体的核酸序列。在另一实施方式中,编码位于成熟IL13配体和CD8铰链结构域之间的连接体的核酸序列由SEQ ID NO:11构成。

[0024] 在一种实施方式中,所述编码CAR的第一核酸序列还包括编码位于SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:14之间的连接体的核酸序列。在另一实施方式中,编码位于SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:14之间的连接体的核酸序列由SEQ ID NO:13构成。

[0025] 在一种实施方式中,所述编码CAR的第一核酸序列还包括编码位于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16之间的连接体的核酸序列。在另一实施方式中,编码位于SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16之间的连接体的核酸序列由SEQ ID NO:15构成。

[0026] 在一种实施方式中,所述编码CAR的第一核酸序列还包括编码位于SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:18之间的连接体的核酸序列。在另一实施方式中,编码位于SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:18之间的连接体的核酸序列由SEQ ID NO:17构成。

[0027] 在一种实施方式中,所述编码MGMT蛋白质的第二核酸序列包括P140KMGMT (SEQ ID NO:22)。在另一实施方式中,所述编码MGMT蛋白质的第二核酸序列包括编码包含SEQ ID NO:33的蛋白质的核酸序列。

[0028] 在一种实施方式中,所述编码MGMT蛋白质的第二核酸序列包括选自G156A-MGMT (SEQ ID NO:38)、MGMT-2 (SEQ ID NO:39)、MGMT-3 (SEQ ID NO:40) 和MGMT-5 (SEQ ID NO:41) 的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述编码MGMT蛋白质的第二核酸序列包括编码包含G156A-MGMT (SEQ ID NO:38)、MGMT-2 (SEQ ID NO:39)、MGMT-3 (SEQ ID NO:40) 和MGMT-5 (SEQ ID NO:41) 的蛋白质的核酸序列。

[0029] 在一种实施方式中,所述编码MGMT蛋白质的第二核酸序列不包括SEQ ID NO:48。在另一实施方式中,所述编码MGMT蛋白质的第二核酸序列不包括SEQ ID NO:49。

[0030] 在一种实施方式中,嵌合核酸序列还包括编码自裂解肽的核酸序列。在另一实施方式中,编码所述自裂解肽的核酸序列包括SEQ ID NO:21。在又一实施方式中,所述自裂解

肽包括SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0031] 在一种实施方式中,嵌合核酸序列还包括Kozak序列。在另一实施方式中,Kozak序列包括SEQ ID NO:8。在又一实施方式中,Kozak序列位于编码IL13CAR和MGMT蛋白质的核酸序列的上游。在一种实施方式中,嵌合核酸序列还包括位于Kozak序列的上游的第一限制性内切酶位点。在另一实施方式中,Kozak序列的上游的限制性内切酶位点由SEQ ID NO:7构成。在一种实施方式中,所述嵌合核酸序列还包括位于编码IL13CAR和MGMT蛋白质的核酸序列的下游的第二内切酶位点。

[0032] 在一种实施方式中,嵌合核酸序列包括选自SEQ ID NO:1的核苷酸109-1836、SEQ ID NO:2的核苷酸109-1836和SEQ ID NO:3的核苷酸109-1836的核苷酸序列。在一种实施方式中,嵌合核酸序列包括选自SEQ ID NO:1的核苷酸13-1836、SEQ ID NO:2的核苷酸13-1836和SEQ ID NO:3的核苷酸13-1836的核苷酸序列。在一种实施方式中,嵌合核酸序列包括选自SEQ ID NO:1的核苷酸7-1842、SEQ ID NO:2的核苷酸7-1842和SEQ ID NO:3的核苷酸7-1842的核苷酸序列。在另一实施方式中,嵌合核酸序列包括选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的核苷酸序列。

[0033] 在一种实施方式中,所述嵌合核酸序列包括编码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的蛋白质的核苷酸序列。

[0034] 在一种实施方式中,IL13R α 2受体配体是以比野生型IL13 (SEQ ID NO:26) 的亲合性低5倍、10倍或100倍的亲合性与IL13R α 2结合的IL-13的变体或其片段。在可选的实施方式中,IL13R α 2受体配体是以比野生型IL13 (SEQ ID NO:26) 的亲合性高5倍、10倍或100倍的亲合性与IL13R α 2结合的IL13的变体或其片段。

[0035] 在一种实施方式中,IL13R α 2受体配体不等同于野生型IL13。在另一实施方式中,IL13R α 2受体配体不等同于SEQ ID NO:26。

[0036] 在一种实施方式中,当采用化疗药剂处理IL13-CAR-T转染的细胞时,与采用不表达耐药性多肽的化疗剂处理的细胞相比,P140KMGMT蛋白质有效增加表达耐药性多肽的细胞的体外和/或体内活力。

[0037] 在一种实施方式中,IL13R α 2受体配体不等同于野生型IL-13。在另一实施方式中,IL13R α 2受体配体不等同于SEQ ID NO:26。

[0038] 另一方面,本文提供了包括编码本文所述的IL13CAR和MGMT蛋白质的核酸序列的载体。

[0039] 在一种实施方式中,所述载体包括编码本文所述的IL13CAR、自裂解肽和MGMT蛋白质的单顺反子核酸序列。在另一实施方式中,所述自裂解肽包括2A肽。

[0040] 在可选的实施方式中,所述载体包括编码IL13CAR和MGMT蛋白质的多顺反子嵌合核酸序列。在另一实施方式中,所述编码IL13CAR和MGMT蛋白质的多顺反子嵌合核酸序列还包括位于编码IL13CAR的核酸序列和编码MGMT蛋白质的核酸序列之间的内部核糖体进入位点(IRES)。在又一实施方式中,所述编码IL13CAR和MGMT蛋白质的多顺反子嵌合核酸序列还包括位于编码IL13CAR的核酸序列和编码MGMT蛋白质的核酸序列之间的启动子。

[0041] 在一种实施方式中,所述载体是细菌质粒载体。在另一实施方式中,所述载体是表达载体。

[0042] 在一种实施方式中,所述载体是病毒载体。在另一实施方式中,所述病毒载体选

自:逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体。

[0043] 另一方面,本文提供由包括编码本文所述的嵌合抗原受体(CAR)和耐药性多肽的嵌合核酸序列的载体转染的细胞。

[0044] 在一种实施方式中,所述细胞选自:T细胞,NK细胞和NKT细胞。

[0045] 另一方面,本文提供在N-端至C-端方向上包括与本文所述的肿瘤抗原、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域结合的配体的重组多肽。

[0046] 在一种实施方式中,所述在N-端至C-端方向上包括与肿瘤抗原、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域结合的配体的重组多肽还包括位于CAR和耐药性多肽之间的自裂解肽。在另一实施方式中,所述耐药性多肽是CAR的N-端。在又一实施方式中,所述耐药性多肽是CAR的C端。

[0047] 另一方面,本文提供包括修饰的MGMT多肽的重组多肽,该修饰的MGMT多肽增加暴露于TMZ的细胞的活力,其中,所述细胞从基因上进行修饰以表达本文所述的CAR,并且,其中,所述细胞被给药于诊断为患有脑癌的患者。

[0048] 另一方面,本文提供包括本文所述的编码CAR的第一核酸和本文所述的编码MGMT蛋白质的第二核酸的组合物。

[0049] 在一种实施方式中,所述第一核酸编码CAR蛋白质,该CAR蛋白质包括本文所述的IL13配体结构域、本文所述的TM结构域和本文所述的包括CD3 ζ 信号传导结构域的细胞质结构域。在另一实施方式中,所述第一核酸还编码位于CAR蛋白质的IL13配体结合结构域的上游的信号序列。在又一实施方式中,所述第一核酸还编码本文所述的铰链区,其中,所述铰链区位于IL13配体结构域和CAR蛋白质的TM结构域之间。在再一实施方式中,所述第一核酸还编码位于TM结构域和CD3- ζ 信号传导结构域之间的CD28共刺激结构域。在又一实施方式中,所述第一核酸还编码另外的共刺激结构域。在另一实施方式中,所述第一核酸还包括位于编码CAR蛋白质的核酸的上游的Kozak序列。

[0050] 在一种实施方式中,所述第二核酸编码具有选自SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:43的氨基酸序列的MGMT蛋白质。

[0051] 在一种实施方式中,MGMT蛋白质不包括SEQ ID NO:49。

[0052] 在一种实施方式中,所述组合物包括嵌合核酸,该嵌合核酸包括所述第一核酸和所述第二核酸。

[0053] 在一种实施方式中,所述嵌合核酸还包括编码本文所述的自裂解连接体肽的核酸,其中,所述编码自裂解连接体肽的核酸位于所述第一核酸和所述第二核酸之间。

[0054] 在一种实施方式中,所述嵌合核酸还包括本文所述的内部核糖体进入位点(IRES),其中,IRES位于所述第一核酸和所述第二核酸之间。

[0055] 在一种实施方式中,嵌合核酸是双顺反子构建体,其包括位于编码CAR蛋白质的第一核酸的上游的第一启动子和位于编码MGMT蛋白质的第二核酸的上游的第二启动子。

[0056] 在一种实施方式中,所述组合物包括第一载体和第二载体,所述第一载体包括编码CAR蛋白质的第一核酸,所述第二载体包括编码MGMT蛋白质的第二核酸。在另一实施方式中,所述第一载体和所述第二载体均是质粒或表达载体。在又一实施方式中,所述第一载体和所述第二载体均为逆转录病毒颗粒。

[0057] 另一方面,本文提供包括编码本文所述的CAR的第一核酸和编码本文所述的MGMT

蛋白质的第二核酸的宿主细胞。在一种实施方式中,所述第一核酸编码CAR蛋白质,该CAR蛋白质包括本文所述的IL13配体结构域、本文所述的TM结构域和本文所述的包括CD3 ζ 信号传导结构域的细胞质结构域。在另一实施方式中,所述第一核酸还编码位于CAR蛋白质的IL13配体结合结构域的上游的信号序列。在又一实施方式中,所述第一核酸还编码本文所述的铰链区,其中,所述铰链区位于CAR蛋白质的IL13配体结构域和TM结构域之间。在再一实施方式中,所述第一核酸还编码位于TM结构域和CD3- ζ 信号传导结构域之间的CD28共刺激结构域。在再一实施方式中,所述第一核酸还编码另外的共刺激结构域。在另一实施方式中,所述第一核酸还包括位于编码CAR蛋白质的核酸的上游的Kozak序列。

[0058] 在一种实施方式中,所述第二核酸编码MGMT蛋白质,该MGMT蛋白质具有选自SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:43的氨基酸序列。在另一实施方式中,MGMT蛋白质不是SEQ ID NO:49。

[0059] 在一种实施方式中,所述宿主细胞包括嵌合核酸,该嵌合核酸包括所述第一核酸和所述第二核酸。

[0060] 在一种实施方式中,所述嵌合核酸还包括编码本文所述的自裂解连接体肽的核酸,其中,所述编码自裂解连接体肽的核酸位于所述第一核酸和所述第二核酸之间。

[0061] 在一种实施方式中,所述嵌合核酸还包括本文所述的内部核糖体进入位点(IRES),其中,IRES位于所述第一核酸和所述第二核酸之间。

[0062] 在一种实施方式中,所述嵌合核酸是双顺反子(dicistronic)构建体,其包括位于编码CAR蛋白质的第一核酸的上游的第一启动子和位于编码MGMT蛋白质的第二核酸的上游的第二启动子。

[0063] 在一种实施方式中,所述宿主细胞包括第一载体和第二载体,所述第一载体包括编码CAR蛋白质的第一核酸,所述第二载体包括编码MGMT蛋白质的第二核酸。在另一实施方式中,所述第一载体和所述第二载体均为本文所述的质粒或表达载体。在又一实施方式中,所述第一载体和所述第二载体均为本文所述的逆转录病毒颗粒。

[0064] 另一方面,本文提供包括重组多肽以及药学上可接受的赋形剂的组合物,其中,所述重组多肽在N-端至C-端方向上包括本文所述的信号序列、本文所述的IL13配体、本文所述的跨膜结构域、本文所述的细胞质信号传导结构域、本文所述的MGMT蛋白质。在另一实施方式中,所述重组多肽还包括本文所述的铰链结构域,其中,所述铰链结构域位于IL13配体结构域和跨膜结构域之间。在又一实施方式中,所述重组多肽还包括本文所述的自裂解肽,其中,所述自裂解多肽位于细胞质信号传导结构域和MGMT蛋白质之间。

[0065] 在一种实施方式中,所述组合物是药物组合物。

[0066] 另一方面,本文提供用于治疗诊断患有癌症的受治者的方法。

[0067] 在一种实施方式中,所述方法包括从所述受治者中获取细胞,采用编码本文所述的IL13CAR和本文所述的MGMT蛋白质的一种或多种核酸转导所述细胞,在由所述细胞表达所述核酸的条件下维持所述细胞,以及将治疗有效量的表达IL13CAR和MGMT蛋白质的细胞给药于患者。

[0068] 在一种实施方式中,引入至所述细胞包括使用包括编码IL13CAR的核酸的第一载体和包括编码MGMT蛋白质的核酸的第二载体。在另一实施方式中,引入至所述细胞包括使用包括编码IL13CAR和MGMT蛋白质的核酸的载体。

[0069] 在一种实施方式中,所述细胞被包括本文所述的IL13CAR-P140KMGMGT嵌合构建体的载体转导。

[0070] 在一种实施方式中,所述受治者是哺乳动物。在另一实施方式中,所述哺乳动物是灵长类、人类或鼠类。

[0071] 在一种实施方式中,使用选自逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或其组合的病毒载体将一种或多种核酸引入至所述细胞。

[0072] 在一种实施方式中,所述细胞是T细胞。

[0073] 在一种实施方式中,所述T细胞采用血浆分离术获得。

[0074] 在一种实施方式中,所述受治者已被诊断患有选自脑癌、乳腺癌、胰腺癌、头颈癌、卵巢癌和结肠直肠癌的癌症。在另一实施方式中,所述癌症已经转移。

[0075] 在一种实施方式中,所述受治者已被诊断患有高度恶性胶质瘤。在另一实施方式中,所述受治者已被诊断患有多形性胶质母细胞瘤(GMB)、间变性星形细胞瘤或儿童胶质瘤。

[0076] 在一种实施方式中,脑癌是胶质母细胞瘤。在另一实施方式中,脑癌是高度星形细胞瘤。

[0077] 在一种实施方式中,乳腺癌是基底样乳腺癌。

[0078] 在一种实施方式中,所述方法还包括采用一种或多种化疗剂治疗所述受治者。在另一实施方式中,所述方法包括采用替莫唑胺(TMZ)治疗所述受治者。

[0079] 在一种实施方式中,所述一种或多种化疗剂在给药一剂修饰的细胞之前、给药一剂修饰的细胞过程中和/或给药一剂修饰的细胞之后给药于所述受治者。

[0080] 在一种实施方式中,所述给药是颅内给药、髓内给药、皮内给药、皮下给药、局部给药或静脉内给药。

[0081] 另一方面,本文提供用于生成表达本文所述的IL13CAR-P140KMGMGT构建体的细胞的方法,该方法包括将编码IL13CAR-P140KMGMGT嵌合蛋白质的核酸序列引入至所述细胞,在由所述细胞表达IL13CAR-P140KMGMGT嵌合蛋白质的条件下维持所述细胞。

[0082] 在一种实施方式中,所述细胞是哺乳动物细胞。在另一实施方式中,所述哺乳动物细胞是人细胞、灵长类动物细胞或鼠类细胞。

[0083] 在一种实施方式中,所述细胞是T细胞。在另一实施方式中,所述细胞选自体细胞或人白细胞抗原(HLA)-相合细胞。

[0084] 在一种实施方式中,所述细胞获自被诊断为患有脑癌或恶性肿瘤的一个或多个受治者。

[0085] 另一方面,本文提供包括IL13CAR-P140KMGMGT构建体的细胞群。在另一实施方式中,所述细胞群中至少约50%、60%、70%、80%、90%或95%的细胞表达本文提供的IL13CAR-P140KMGMGT构建体。

[0086] 一方面,本发明涉及编码嵌合抗原受体(CAR)(具有嵌合抗原受体(CAR),包括嵌合抗原受体(CAR),基本由嵌合抗原受体(CAR)构成或由嵌合抗原受体(CAR)构成的(一种或多种)分离的核酸序列,所述嵌合抗原受体(CAR)包括T细胞受体(基本由T细胞受体构成,由T细胞受体构成),所述T细胞受体表达脑癌的一种或多种肿瘤抗原的一种或多种配体(例如,抗体)。在一些方面,CAR还表达用于治疗脑癌的一种或多种额外的药剂。

[0087] 另一方面,本发明涉及表达构建体,所述表达构建体包括编码CAR的一种或多种核酸序列(基本由编码CAR的一种或多种核酸序列构成,由编码CAR的一种或多种核酸序列构成),CAR包括表达脑癌的一种或多种肿瘤抗原(例如,癌症抗原结合结构域)的一种或多种配体(例如,抗体)的T细胞受体。在一些方面,CAR还表达用于治疗脑癌的一种或多种额外的药剂。

[0088] 另一方面,本发明涉及包含表达构建体(基本由表达构建体构成,由表达构建体构成)的宿主细胞,所述表达构建体包括编码包含T细胞受体的CAR的一种或多种核酸序列,所述T细胞受体表达脑癌的一种或多种肿瘤抗原的一种或多种配体(例如,抗体)。在一些方面,CAR还表达用于治疗脑癌的一种或多种额外的药剂。

[0089] 另一方面,本发明涉及生成表达CAR的细胞的方法,所述CAR包括T细胞受体(基本由T细胞受体构成,由T细胞受体构成),所述T细胞受体包括脑癌的一种或多种肿瘤抗原的一种或多种配体(例如,抗体)。在特定的方面,CAR还包括用于治疗脑癌的一种或多种额外的药剂。

[0090] 另一方面,本发明涉及包含T细胞受体(具有T细胞受体,基本由T细胞受体构成,由T细胞受体构成)的CAR多肽,所述T细胞受体包括脑癌的一种或多种肿瘤抗原的一种或多种配体(例如,抗体)。在特定的方面,CAR还包括用于治疗脑癌的一种或多种额外的药剂。

[0091] 另一方面,本发明涉及治疗有这种治疗需求的个体体内的脑癌的方法,所述方法包括给药一种或多种T细胞(基本由给药一种或多种T细胞构成,由给药一种或多种T细胞构成),所述一种或多种T细胞表达包含T细胞受体的CAR,所述T细胞受体表达脑癌的一种或多种肿瘤抗原的一种或多种配体(例如,抗体)。在一些方面,CAR还表达用于治疗脑癌的一种或多种额外的药剂。

[0092] 本发明还涉及包含本文提供的组合物的药物组合物。

附图说明

[0093] 通过下文对本发明的实施方式的更加具体的描述,如在附图中所举例说明的,上述内容将会变得明白。在附图中的不同的视图中,相同的附图标记指代相同的部分。附图不必按照比例,重点是举例说明本发明的实施方式。

[0094] 图1A提供了IL13E13K.R109K CAR核酸构建体的示意图。

[0095] 图1B提供了包含IL13E13K.R109K CAR的pMFG宿主质粒的质粒图谱。

[0096] 图2A提供了IL13E13K.R109K CAR-2A-P140KMGM的示意图。

[0097] 图2B提供了包含IL-13-CAR-2A-P140KMGM的pMFG宿主质粒的质粒图谱。

[0098] 图3A至图3C举例说明富集之前(图3A)和富集之后(图3B)由包含IL13CAR构建体和IL13CAR-2A-P140KMGM构建体的病毒转导的PG13细胞的FACS分析。图3C举例说明细胞溶解产物的western印迹分析。

[0099] 图4提供了显示由包含IL13CAR-2A-P140KMGM构建体的逆转录病毒转导的且暴露于TMZ的T细胞的活力的图。

[0100] 图5A和图5B举例说明由本文所述的IL13CAR-2A-MGMT构建体转染的细胞内的IL2(图5A)和IFN γ (图5B)的分泌。

[0101] 图6举例说明带有肿瘤的并且被给药本文所述的嵌合构建体和/或化疗剂的小鼠

的活力。

[0102] 图7A至图7B提供了IL13CAR-P140KMGMT构建体的嵌合核酸序列(图7A,SEQ ID NO:1)和氨基酸序列(图7B,SEQ ID NO:4)。

[0103] 图8A至图8B提供了IL13 (E13Y) CAR-P140KMGMT构建体的嵌合核酸序列(图8A,SEQ ID NO:2)和氨基酸序列(图8B,SEQ ID NO:5)。

[0104] 图9A至图9B提供了IL13 (E13K.R109K) CAR-P140KMGMT构建体的嵌合核酸序列(图9A,SEQ ID NO:3)和氨基酸序列(图9B,SEQ ID NO:6)。

具体实施方式

[0105] 本文描述了(一种或多种)嵌合抗原受体(CAR)的生成,该嵌合抗原受体包含通过基因工程修饰的T细胞受体,从而表达癌症的一种或多种肿瘤抗原的一种或多种配体(例如,抗体或细胞表面蛋白质的其他配体)。具体而言,本文描述的CAR蛋白质包括与在癌细胞表面上表达的蛋白质结合的配体结合结构域。优选地,肿瘤抗原不在未患病的细胞或正常细胞的表面上表达,或以比在癌细胞或其他患病的细胞上表达的水平低得多的水平在未患病的细胞或正常细胞上表达。修饰为表达得到的CAR的T细胞通过CAR的新的特异性重新定向以攻击表达由CAR识别的表面抗原(例如,受体)的肿瘤。本文还表现出,CAR可进一步包括用于治疗脑癌的一种或多种额外的药剂(例如,克服脑癌细胞对治疗的耐药性的药剂)。具体而言,本文所述的组合物和方法被设计为治疗其中恶性肿瘤细胞表达IL13 α 2受体(IL13R α 2)的脑癌。因此,使用表达并展示IL13R α 2的配体的CAR来举例说明本文公开的内容,例如,细胞因子白介素13(IL13)或选择性结合IL13R α 2的抗体的可变结构域。IL13CAR采用O(6)-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶(MGMT)基因表达。在一种实施方式中,MGMT基因被修饰为编码蛋白质,该蛋白质向宿主细胞(例如,T细胞)赋予替莫唑胺(TMZ,一种用于治疗脑癌的化疗剂)耐药性或提高宿主细胞(例如,T细胞)对替莫唑胺(TMZ)的耐药性。

[0106] 在一种优选的实施方式中,IL13CAR包括在位置13(相对于SEQ ID NO:26进行编号)突变以将谷氨酸改变为酪氨酸的IL13。在可选的优选实施方式中,IL13在位置13进行突变以将谷氨酸改变为赖氨酸并且在位置109进行突变以将精氨酸改变为赖氨酸(氨基酸位置13和位置109是相对于例如SEQ ID NO:26)。在一种实施方式中,IL13被突变,使得位置109的氨基酸从精氨酸变为赖氨酸。

[0107] 在一种优选的实施方式中,修饰的MGMT基因编码MGMT变体,该MGMT变体在本文中称为P140KMGMT(SEQ ID NO:33),其保护表达IL13CAR-P140KMGMT的T细胞不受采用诸如TMZ之类的甲基化剂进行治疗导致的细胞毒性的影响。

[0108] 在一种实施方式中,IL13CAR和P140KMGMT蛋白质通过单顺反子构建体表达,该构建体被转录为生成编码单一蛋白质的单一转录子,所述单一蛋白质在N-端至C-端方向上包括IL13CAR,自裂解肽(2A)和P140KMGMT。在翻译该融合蛋白之后,自裂解肽的裂解产生主要集中在细胞核和IL13CAR的P140KMGMT蛋白质,其中,IL13配体结构域在宿主细胞的表面上展示。然而,应当理解的是,IL13CAR和P140KMGMT蛋白质可通过独立的核酸表达。例如,编码IL12CAR和P140KMGMT蛋白质的核酸可位于分离的载体中,所述载体随后被引入至相同的细胞,或者编码IL12CAR和P140KMGMT蛋白质的核酸可被克隆至作为独立的单顺反子构建体(例如,具有它们自己的启动子的构建体)的单一载体中。

[0109] 在存在TMZ的条件下,与IL13CAR转导的不表达P140KMGMT的T细胞相比,由IL13CAR-2A-P140KMGMT构建体转导的T细胞更好地存活(例如,实施例6,图6)。因此,本文还公开了编码CAR和耐药性多肽(MGMT蛋白质)的核酸序列,一种或多种核酸或包含所述核酸的逆转录病毒载体,由一种或多种载体转染或转导的细胞,以及通过在修饰的T细胞中共表达修饰的MGMT基因提高暴露于诸如TMZ之类的化疗剂的基因修饰的T细胞的活力的方法。

[0110] 本文还涉及用于治疗诊断为患有癌症的受治者的方法,其中,所述癌症包括表达IL13R α 2的细胞。例如,诸如高度恶性胶质瘤之类的脑癌细胞和基底样乳腺癌细胞相对于相同组织的未患病的细胞或非癌细胞过表达IL13R α 2蛋白质。本发明要求保护的组合物在向受治者给药甲基化化疗剂和基因修饰的免疫细胞(例如,T细胞)这两者时特别有用,所述基因修饰的免疫细胞表达IL13CAR和修饰的MGMT基因。相对于仅采用化疗剂或基因修饰的T细胞进行治疗的受治者,本发明的方法可缩短治疗时间并且可更快更有效地实现胶质瘤消除。因此,一方面,本发明涉及编码用于T细胞的嵌合抗原受体(CAR)的(一种或多种)分离的核酸序列,所述T细胞表达癌症的一种或多种肿瘤抗原的一种或多种配体(例如,抗体)。在一些方面,T细胞还表达用于治疗脑癌的一种或多种额外的药剂。

[0111] 释义

[0112] 本文使用的“嵌合抗原受体(CAR)”是指包含一种或多种细胞外癌症抗原结合结构域,一种或多种跨膜结构域和一种或多种用于活化T细胞的细胞质信号传导结构域的分子,并且该分子对表达癌症配体(例如,癌症抗原)的细胞具有特异性。当将CAR引入至T细胞中时,CAR将重新定向T细胞的特异性。在特定的方面,CAR被表达为单个分子。

[0113] 本文使用的“癌症抗原结合结构域”是指结合由癌细胞表达的一种或多种抗原(一种或多种癌症抗原)的结构域。在特定的方面,所述癌症抗原结合结构域是特异性(选择性)结合癌症抗原并且不结合不被非癌细胞(例如,正常细胞,健康细胞,野生型细胞)表达的非特异性靶点的结合结构域。

[0114] 可使用多种癌症抗原结合结构域,并且可使用已知的方法生成或从商业来源获得多种癌症抗原结合结构域。癌症抗原结合结构域可以是例如核酸,肽(蛋白质),抗体,有机分子,合成的分子,等等。这些癌症抗原结合结构域例如可衍生自文库和/或获自天然来源。

[0115] 本文使用的术语“IL13CAR”包括包含本文所述的或本领域已知的IL13配体的CAR,包括但不限于:IL13的变体(包括,但不限于:IL13的功能片段(例如,可结合IL13R α 2的IL13的片段))以及诸如选择性结合IL13R α 2的免疫球蛋白结构域之类的其他IL13配体。类似地,本文使用的术语“MGMT”包括野生型MGMT和本文所描述的或本领域已知的任何MGMT变体。

[0116] 本文针对剂量或量所使用的术语“治疗有效”是指向有此需要的受治者给药之后足以产生期望的活性的化合物的量或药物组合物的量,所述药物组合物(例如,包含诸如T淋巴细胞和/或NK细胞之类的免疫细胞的组合物)包含本文公开的嵌合受体,并且还包括耐药性多肽。在本文公开的内容的范围内,术语“治疗有效”是指足以延缓表现、抑制恶化、减轻或缓解至少一种由本文公开的方法治疗的失调的症状的化合物或药物组合物的量。应当注意的是,当给药活性成分的组合时,组合的有效量可包括或不包括每个成分单独给药时的有效量。

[0117] 与本文公开的组合物联合使用的词组“药学上可接受的”是指生理学上可耐受的并且在向哺乳动物(例如,人类)给药时通常不会产生不良反应的分子实体和这些组合物的

其他成分。优选地,本文使用的术语“药学上可接受的”是指由联邦药监局或州政府批准的或在美国药典中列出的或其他通常识别的处方用于哺乳动物并且更加特别优选地用于人类。

[0118] 本文使用的术语“受治者”是指任何哺乳动物。在优选的实施方式中,所述受治者是人类。

[0119] 在其他方面,癌症抗原结合结构域是全部抗体或抗体的生物活性部分。本文使用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即,包含选择性结合抗原的抗原结合位点的分子。本文使用的“选择性结合”是指抗体能够结合样本中的抗原或其片段并且不能充分结合样本中的其他分子(例如,抗原)。免疫球蛋白分子的免疫活性部分的实例包括Fab片段(例如,F(ab),F(ab')₂),可变片段(例如,单链可变区(scFv),di-scFv,单结构域抗体片段(sdAb),双特异性片段(例如,双特异性T细胞衔接器(BiTE)))。这些片段可获自商业来源和/或通过例如采用诸如胃蛋白酶之类的酶处理抗体产生。

[0120] 抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体,其结合(例如,选择性结合)癌细胞表达的一种或多种抗原。本文使用的“多克隆抗体”是结合特异性抗原的一批抗体中的抗体,所述一批抗体中的每个抗体识别不同的表位。本文使用的“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指仅包含能够与一种或多种抗原的特定表位发生免疫反应的一类抗原结合位点的抗体分子群。因此,单克隆抗体组合物通常表现出对与其发生免疫反应的特定抗原具有单一结合亲和性。

[0121] 多克隆抗体可如上所述的通过采用一种或多种期望的癌症抗原(例如,IL13R α 2蛋白质的细胞外结构域)对合适的受治者进行免疫来制备。免疫的受治者体内的抗体滴度可通过标准技术(例如,酶联免疫吸附分析(ELISA))使用固定的多肽随时间进行监测。如果需要的话,针对癌症抗原的抗体分子可从哺乳动物中分离出来(例如,从组织、血液中分离出来)并且进一步通过已知的技术(例如,蛋白质A层析法)进行纯化,从而获得IgG片段。本领域普通技术人员能够制备选择性结合IL13R α 2蛋白质的细胞外结构域的多克隆抗体。

[0122] 在免疫之后的合适时间,例如,当抗体滴度最高时,抗体生成细胞可获自受治者并且通过标准技术用于制备单克隆抗体,所述标准技术例如,最初由Kohler和Milstein描述的杂交瘤技术(Nature 256:495-497(1975)),人B细胞杂交瘤技术(Kozbor et al., Immunol.Today 4:72(1983)),EBV-杂交瘤技术(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96(1985))或三源杂交瘤(trioma)技术。用于生成杂交瘤的技术是本领域熟知的(通常参见,Current Protocols in Immunology, Coligan et al., (eds.) John Wiley&Sons, Inc., New York, NY(1994))。简言之,将持续增殖细胞系(通常是骨髓瘤)融合至来自上述免疫原免疫的哺乳动物的淋巴细胞(通常是脾细胞)并且筛选得到的杂交瘤细胞的培养物上清液以识别产生结合本发明的多肽的单克隆抗体的杂交瘤。

[0123] 为了产生癌症抗原的单克隆抗体,可应用用于融合淋巴细胞和持续增殖细胞系的许多熟知的操作规程中的任何一种(参见,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))。而且,本领域

普通技术人员将会理解的是,这些方法的许多改良也是有用的。

[0124] 在用于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的一种可选方法中,癌症抗原的单克隆抗体可通过由多肽筛选重组组合免疫球蛋白文库(例如,抗体噬菌体展示文库)而被识别和分离,从而分离结合癌症抗原的免疫球蛋白文库成员。用于生成和筛选噬菌体展示文库的试剂盒是商售的(例如,Pharmacia重组噬菌体抗体系统,批号:27-9400-01;和Stratagene SurfZAP™噬菌体展示试剂盒,批号:240612)。此外,特别适用于生成和筛选抗体展示文库的方法和试剂的实例可在例如US5,223,409;WO 92/18619;WO 91/17271;WO 92/20791;WO 92/15679;WO 93/01288;WO 92/01047;WO 92/09690;WO 90/02809;Fuchs等人,Bio/Technology 9:1370-1372(1991);Hay等人,Hum.Antibod.Hybridomas 3:81-85(1992);Huse等人,Science 246:1275-1281(1989);以及Griffiths等人,EMBO J.12:725-734(1993)中找到。

[0125] 此外,包括人和非人部分的可使用标准重组DNA技术制备的诸如嵌合的和人源化的单克隆抗体之类的重组抗体在本发明的范围内。这些嵌合的和人源化的单克隆抗体可由本领域已知的重组DNA技术生成。

[0126] 上述用于生成多克隆抗体或单克隆抗体的常规方法中的任何一种可容易地应用于生成选择性结合IL13R α 2蛋白质的细胞外结构域单克隆抗体的方法中。得到的抗体或其片段的可变结构域随后可用于生成IL13配体结构域,该IL13配体结构域以与IL13配体结构域(SEQ ID NO:26)结合IL13R α 2蛋白质的亲和性相同的亲和性结合IL13R α 2蛋白质。

[0127] 本发明的构建体

[0128] 本发明至少部分基于表达对IL13R α 2具有特异性的CAR的免疫细胞,其中,所述细胞对诸如TMZ之类的化疗剂具有耐药性。

[0129] 在一些实施方式中,本发明提供编码对脑癌细胞具有选择性的CAR蛋白质和耐药性多肽这两者的核酸(本文中也称为嵌合核酸序列)。在优选的实施方式中,CAR蛋白质是IL13CAR并且耐药性多肽是MGMT蛋白质,该MGMT蛋白质能够赋予表达MGMT蛋白质的细胞TMZ耐药性。嵌合核酸序列可如本文所述的那样构建,从而编码IL13CAR蛋白质和MGMT耐药性蛋白质这两者。下文提供对IL13CAR蛋白质的结构域或序列区域和MGMT蛋白质的结构域或序列区域以及每个结构域或区域的非限定性实例的描述。IL13CAR蛋白质是线性嵌合(融合)蛋白质,其在N-端至C-端方向上包括:选择性结合患病细胞(例如脑癌细胞)上的IL13R α 2的IL13配体结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。在一些实施方式中,本文所述的IL13CAR蛋白质可包括位于IL13配体结构域的N端的信号结构域和/或位于配体结构域和跨膜结构域之间的铰链区。

[0130] 在一些实施方式中,包含1,2,3,4,5,6,7,8,9,10个氨基酸残基的短肽连接体被包括在IL13CAR中,以分离CAR蛋白质的区域或结构域(例如,信号序列,IL13配体结构域,铰链区,跨膜结构域,CD28共刺激结构域,CD3- ζ 信号传导结构域或另外的共刺激结构域)。应当理解的是,短肽连接体可存在于任何两个区域(结构域)之间,不论位于任何其他两个区域(结构域)之间的短肽连接体的存在或不存在。例如,小的肽连接体可存在于CAR中,其中,连接体使信号序列(如果存在的话)和IL13配体结构域分离,使IL13配体结构域和跨膜结构域分离,使IL13配体结构域和铰链区(如果存在的话)分离,使铰链区(如果存在的话)和跨膜结构域分离,使跨膜结构域和CD28共信号传导结构域(如果存在的话)分离,使CD28共信号

传导结构域(如果存在的话)和CD3 ζ 信号传导结构域分离,和/或使CD3- ζ 信号传导结构域和另外的共刺激结构域(如果存在的话)分离。肽连接体可以是由如下核酸序列编码的氨基酸,所述核酸序列包含限制性内切酶位点或如下其他特征,所述特征允许编码IL13CAR-自裂解肽-MGMT嵌合蛋白质的区域或结构域中的每个区域(单顺反子的情况)或结构域的核酸进行连接。这些结构域和连接体中的每一个在下文详细描述。

[0131] 一方面,癌症抗原结合结构域是肽或蛋白质(例如,结合在癌细胞表面上表达的抗原的配体;结合在癌细胞表面上表达的受体的配体)。在优选的实施方式中,受体是IL132 α 受体并且CAR被构建为包括选择性结合IL132 α 受体的配体。在特定的方面,癌症抗原结合结构域是白介素13(IL13)或具有一个或多个插入、缺失或点突变的IL-13的变体(例如,E13K IL13;R109K IL13和/或E13Y IL13)。可选地,癌症抗原结合结构域可以是选择性结合IL13R α 2的抗体或其片段(例如scFv片段)的可变结构域。

[0132] 下表1和表2分别提供了本文所述的可在本发明的组合物(例如嵌合核酸序列)和方法中使用的核酸和多肽的总结。在一种实施方式中,本发明包括包含表1所涉及的核酸序列的任何组合的嵌合核酸序列。在一种实施方式中,本发明包括编码表2所涉及的氨基酸序列的任何组合的嵌合核酸序列。

[0133] 表1

[0134] 核酸序列的序列标识符

[0135]	SEQ ID NO	描述	相对于SEQ ID NO:1 的核苷酸位置
--------	----------------------	-----------	----------------------------------

[0136]

1	IL13(WT)CAR-P140K 全长 (SEQ ID NO:1)	
2	IL13(E13Y)CAR-P140K全长 (SEQ ID NO:2)	
3	IL13(E13K.R109K)CAR-P140K全长(SEQ ID NO:3)	
7	限制性内切酶位点	1-6
8	Kozak 序列	7-12
9	IL13 信号序列	13-108
10	成熟的 IL13	109-450
11	二肽连接体-1	451-456
12	CD8 铰链区	457-591
13	二肽连接体-2	592-597
14	CD3 ζ 跨膜结构域	598-666
15	二肽连接体-3	667-672
16	CD28 共刺激结构域	673-804
17	二肽连接体-4	805-810
18	CD3 ζ 信号传导结构域	811-1140
19	终止密码子	1141-1143
20	5 氨基酸连接体/限制性位点/阅读框调节	1144-1158
21	自裂解肽	1159-1212
22	P140K MGMT 耐药性多肽	1213-1839
23	终止密码子	1840-1842
24	限制性内切酶位点	1843-1846
34	带有E13Y 突变的成熟IL13	109-450
35	带有E13KR109K的成熟IL13	109-450
48	MGMT 耐药性多肽P140	

[0137] 表2

[0138] 多肽序列的序列标识符

[0139]

SEQ ID NO	描述	相对于SEQ ID NO:4 的氨基酸位置
--------------	----	--------------------------

[0140]

4	IL13(WT)CAR-P140K 全长 (SEQ ID NO:4)	
5	IL13(E13Y)CAR-P140K 全长 (SEQ ID NO:5)	
6	IL13(E13K.R109K)CAR-P140K 全长 (SEQ ID NO:6)	
25	IL13CAR-P140K – IL13 信号序列	1-32
26	IL13CAR-P140K – wt 成熟 IL13	33-146
	二肽连接体-1	147-148
27	IL13CAR-P140K – CD8 铰链区	149-193
	二肽连接体-2	194-195
28	IL13CAR-P140K – CD3 ζ 跨膜结构域	196-218
	二肽连接体-3	219-220
29	IL13CAR-P140K – CD28 共刺激结构域	221-264
	二肽连接体-4	265-266
30	IL13CAR-P140K – CD3 ζ 信号传导结构域	267-376
31	5 氨基酸连接体/阅读框调节/限制性位点	377-381
32	IL13CAR-P140K – 2A 自裂解肽	382-399
33	IL13CAR-P140K – P140K MGMT 耐药性蛋白质	400-606
36	带有E13Y 突变的成熟IL13	33-146
37	带有E13KR109K的成熟IL13	33-146
38	G156A-MGMT	
39	MGMT-2	
40	MGMT-3	
41	MGMT-5	
43	MGMT (GenBank NP_002403-(P140K))	
44	IL13R α 2	
45	IL13(WT)CAR-P140K 全长 (SEQ ID NO:45)	
46	IL13(E13Y)CAR-P140K 全长 (SEQ ID NO:46)	
47	IL13(E13K.R109K)CAR-P140K 全长 (SEQ ID NO:47)	
49	MGMT P140	

[0141] 配体

[0142] IL13CAR配体(可选地,配体结构域)是选择性结合患病细胞表达的IL13受体(例如,IL13R α 2)的肽、多肽或蛋白质。患病细胞可以是肿瘤细胞或其他癌细胞或恶性肿瘤细胞,并且,可选地,患病细胞表达的蛋白质在本文中是指癌症抗原。在一些实施方式中,癌症抗原是不被健康组织细胞表达的或非常少(由mRNA表达分析确定的小于50%,40%,30%,

20%或10%)的健康组织细胞表达的蛋白质。在一种实施方式中,患病细胞是脑癌细胞,例如,胶质母细胞瘤细胞。在特定方面,癌症抗原结合结构域为结合(例如,特异性或选择性结合)IL-13R(例如,IL13R α 2,例如,GenBank Acc.No.NP_000631;SEQ ID NO:44)的全部抗体或抗体的生物活性部分。在其他方面,配体(癌症抗原结合结构域)是定向针对(结合,特异性或选择性结合)IL-13R(例如,IL13R α 2)的scFv。

[0143] 本领域已知多种由癌(例如,肿瘤)细胞表达的抗原。一方面,癌症抗原是脑肿瘤抗原,例如,在肿瘤表面上表达的脑肿瘤抗原。在特定的方面,脑肿瘤抗原由高度恶性胶质瘤表达(例如,胶质瘤/恶性脑肿瘤抗原)。高度恶性胶质瘤的具体实例包括多形性胶质母细胞瘤(GBM),间变性星形细胞瘤和儿童胶质瘤。由高度恶性胶质瘤的肿瘤细胞表达的抗原的具体实例包括EGFRvIII,EphA2,Her-2和IL-13R(例如,IL13R α 2)。

[0144] 一方面,本发明的方法和组合物靶定的癌症抗原是IL13受体 α -2(IL13R α 2),在GBM肿瘤上过表达但在正常脑组织中少量表达或不表达的多形性胶质母细胞瘤(GBM)相关蛋白(Thaci et al.,Neuro-Oncol,16(10):1304-1312(2014);Sengupta et al.,Biomed Res Int,2014:952128(2014))。一方面,IL13CAR表达或包含配体结构域,该配体结构域是结合IL13 α 2受体的诸如E13K IL13(SEQ ID NO:36)和/或R109K IL13(SEQ ID NO:37)之类的IL13和/或IL13突变体(Kong et al.,Clin Cancer Res,18(21):5949-5960(2012))。也已发现IL13R α 2蛋白质上调乳腺癌(Papageorgis et al.,2015,Breast Canc Res,17:98-112),包括头颈癌中的乳腺癌转移(Joshi et al.,2000,Cancer Res,60:1168-1172;Kawakami et al.,2003,9:6381-6388),并且IL13R α 2蛋白质还表现出促进胰腺癌、卵巢癌和结肠直肠癌的浸润和转移(Fujisawa et al.,2009,Int J Cancer,69:8678-8695;Barderas et al.,2012,Cancer Res,72:2780-2790)。因此,本文描述的组合物和方法在用于治疗诊断患有恶性肿瘤的受治者的方法中 useful,其中,恶性肿瘤的类型包括但不限于:脑癌,头颈癌,乳腺癌,胰腺癌,卵巢癌和结肠直肠癌。

[0145] 本领域普通技术人员可生成特异性结合IL13R α 2的配体。例如,进行常规实验,例如通过采用IL13R α 2的细胞外结构域免疫小鼠或通过噬菌体展示,生成选择性结合IL13R α 2的抗体。带有期望的选择性结合活性的抗体的可变结构域随后可用于产生单链可变结构域(scFv)。在一种实施方式中,与野生型IL13、IL13(E13Y)、IL13(R109K)或IL13(E13K.R109K)相同的亲和性选择性结合IL13R α 2的scFv可用作本文公开的IL13CAR构建体中的配体。

[0146] 在一种实施方式中,IL13CAR具有IL13配体结构域,该IL13配体结构域包括与SEQ ID NO:26具有至少90%,95%,96%,97%,98%,99%或99.5%一致性的多肽或其功能片段,其中:a)SEQ ID NO:26的位置13的氨基酸是谷氨酸;b)SEQ ID NO:26的位置13的氨基酸是酪氨酸;或c)SEQ ID NO:26的位置13的氨基酸是赖氨酸并且SEQ ID NO:26的位置109的氨基酸是精氨酸。在一种实施方式中,IL13CAR IL13配体结构域包括SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37或其功能片段。

[0147] 根据本文公开的内容的核酸编码上文所述的IL13多肽。在一种实施方式中,编码IL13多肽的核酸选自SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35。

[0148] IL13CAR还任选地包括允许对IL13CAR蛋白质进行加工并在宿主细胞表面进行展示的信号(前导)肽。在一种实施方式中,信号肽是配体蛋白质的天然生成的信号肽。例如,

配体结构域包括全长IL13蛋白质,该全长IL13蛋白质包括其信号序列(包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的信号序列或由SEQ ID NO:25的氨基酸序列构成的信号序列)。在一种实施方式中,信号序列包括与SEQ ID NO:25具有95%,96%,97%,98%,99%或99.5%的一致性的序列。根据本文公开的内容的核酸编码信号肽。在一种实施方式中,编码信号肽的核酸由SEQ ID NO:9构成。

[0149] 本领域普通技术人员会理解的是,可使用异质信号序列,其来自分泌的蛋白质或跨膜蛋白质的信号肽,所述分泌的蛋白质或跨膜蛋白质不是IL13。信号肽(信号序列)是膜结合多肽或分泌的多肽的必需部分,所述膜结合多肽或分泌的多肽是多肽膜转位所需要的并且在膜转位之后或膜转位过程中被加工。信号序列具有大约13和36个氨基酸的长度并且在氨基末端包含至少一个正残基。信号序列的中心是10至15个残基的强疏水部分并且由例如Nunnari, j., et al., Curr. Opin. Cell Biol. 4 (1992) 573-580和Gilmore, R., et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 674 (1992) 27-37进行描述。信号肽的一些实例包括但不限于:VHCAMP, CD40, CD40L或TNF-R的信号肽。信号肽被切割整合至靶细胞的膜。本发明还涉及可使用异质信号序列,例如,IgG样蛋白质的信号序列。

[0150] 铰链区

[0151] 本文公开的IL13CAR可包括间隔体区域,也称为铰链区或铰链结构域,其位于IL13配体结构域(抗原结合结构域)和跨膜结构域之间。本文公开的内容所涵盖的IL13CAR可包括或可不包括铰链区。本文描述的CAR的铰链区是如下肽序列,其通常是柔性的,足以允许抗原结合结构域定位于不同方向以促进抗原识别。如本领域技术人员所理解的,可确定其他合适的间隔体。例如,长度为2个氨基酸至10个氨基酸的短寡肽连接体或短多肽连接体,其可形成位于CAR的跨膜结构域和细胞质结构域之间的连接。铰链区的实例是来自免疫球蛋白的铰链区(例如,IgG1的铰链区),包括但不限于:来自免疫球蛋白样蛋白质或结构域的铰链区,免疫球蛋白的CH2CH3区域和CD3的部分。在一种实施方式中,铰链区包括来自CD8 α 链的Ig样结构域。

[0152] 在IL13CAR的一种实施方式中,铰链区包括SEQ ID NO:27的氨基酸序列或由SEQ ID NO:27的氨基酸序列构成。可选地,铰链区包括与SEQ ID NO:27具有95%,96%,97%,98%,99%或99.5%一致性的序列或由与SEQ ID NO:27具有95%,96%,97%,98%,99%或99.5%一致性的序列构成。根据本文公开的核酸编码铰链区。在一种实施方式中,编码铰链区的核酸包括SEQ ID NO:12。在一种实施方式中,编码IL13CAR的核酸包括与SEQ ID NO:12具有至少90%,95%,96%,97%,98%,99%或99.5%一致性的核酸。

[0153] 跨膜结构域

[0154] 如本文所述,CAR包括一种或多种跨膜结构域。通常,跨膜结构域是跨过膜的疏水区域(例如,疏水 α 螺旋)。可使用多种跨膜结构域中的任何一种。合适的跨膜结构域的实例包括但不限于:CD3(例如,CD3- ζ 跨膜结构域)或CD28跨膜结构域。跨膜结构域可衍生自天然来源或重组来源。在来源为天然来源的条件下,结构域衍生自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。一方面,每当CAR已结合靶点时,跨膜结构域能够将信号传导至细胞内结构域。本发明中具体使用的跨膜结构域可包括至少如下的跨膜结构域,例如T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链的跨膜结构域,CD28,CD3E,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154的跨膜结构域。

[0155] 在一种实施方式中,IL13CAR的跨膜结构域包括人CD3 ζ 链的至少一部分或由人CD3 ζ 链的至少一部分构成,例如,SEQ ID NO:28。在一种实施方式中,跨膜结构域包括下列序列或由下列序列构成,所述序列是与SEQ ID NO:28具有95%,96%,97%,98%,99%或99.5%一致性的序列。根据本文公开的内容的核酸编码跨膜结构域。在一种实施方式中,编码跨膜结构域的核酸包括SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14具有至少90%,95%,96%,97%,98%,99%或99.5%一致性的核酸。

[0156] 细胞质信号传导结构域

[0157] 如本文所述,IL13CAR具有结合抗原之后将活化信号和/或刺激信号传送至T细胞的细胞质结构域(例如,导致T细胞的活化,启动,扩增,持续和/或增加以及T细胞针对肿瘤抗原的响应(例如,细胞毒性所需的信号))。细胞质结构域包括一种或多种T细胞受体的信号传导结构域或一个或多个与T细胞受体相关的信号传导结构域(例如,共刺激结构域)和/或一种或多种T细胞受体的活化结构域或一种或多种与T细胞受体相关的活化结构域。合适的细胞质信号传导结构域的实例包括但不限于:包含免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)的CD3- ζ ,Fc ϵ RI γ ,CD28(例如,嵌合CD28),4-1BB(CD137),DAP10,OX40(CD134),CD4,CD27,CD244,可诱导T-cell共刺激物(ICOS),白细胞C-端SRC激酶(LCK),和CD137(例如,Sadelain et al.,Cancer Discov,3(4):388-398(2013);Lee et al.,Clin Cancer Res,18(10):2780-2790(2012))的那些细胞质信号传导结构域。一种或多种这些细胞质结构域的存在可通过使ZAP70、TNF受体相关因子1(TRAF1)、PI3K以及生长因子受体结合的蛋白质2(GRB2)与CAR的细胞质结构域中的元件相关联来启动通路,从而触发信号传导中间体和基因转录。

[0158] “共刺激结构域”或“共刺激信号传导结构域”是指包含共刺激分子的细胞内结构域的CAR的一部分。共刺激分子是细胞表面分子,其不同于在结合抗原之后提供T淋巴细胞的有效活化和T淋巴细胞的功能所需的另一信号的抗原受体或Fc受体。共刺激结构域经历构象改变,该改变通过例如CD3- ζ 信号传导结构域产生对细胞的活化信号。共刺激配体可包括但不限于:CD7,B7-1(CD80),B7-2(CD86),PD-L1,PD-L2,4-1BBL,OX40L,可诱导共刺激配体(ICOS-L),细胞间粘附分子(ICAM),CD30L,CD40,CD70,CD83,HLA-G,MICA,M 1CB,HVEM,淋巴瘤毒素 β 受体,3/ITR6,ILT3,ILT4,结合Toll配体受体的激动剂或抗体以及特异性结合B7-H3的配体。IL13CAR内的一种或多种共刺激结构域的内容物可提高表达IL13CAR的T细胞的效力和扩增。在一种实施方式中,共刺激结构域尤其还包括特异性结合存在于T细胞上的共刺激分子的抗体,例如但不限于:CD27,CD28,4-1BB,OX40,CD30,CD40,PD-1,ICOS,淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1),CD2,CD7,LTGHT,NG2C,B7-H3,特异性结合CD83的配体。

[0159] 对本领域技术人员而言明显的是,IL13CAR可具有任何数量的活化结构域和/或刺激结构域。信号传导结构域中的每一个通过肽键连接以形成IL13CAR构建体的细胞质结构域。一方面,IL13CAR具有活化结构域和刺激结构域。另一方面,IL13CAR具有一个、两个、三个、四个、五个等等活化结构域和一个、两个、三个、四个、五个等等刺激结构域。

[0160] 在一种实施方式中,本文公开的IL13CAR包括人CD28蛋白质和/或人CD3- ζ 链的信号传导结构域。在一种实施方式中,IL13CAR包括CD28和CD3- ζ 链信号传导结构域,其中,CD28共刺激结构域在CD3- ζ 信号传导结构域的N-端。本发明还涉及CAR细胞质结构域,其中,CD3- ζ 结构域在CD28共刺激结构域的N-端。如本文所述的,CD28共刺激结构域包括SEQ ID NO:29的序列。CD3- ζ 信号传导结构域包括SEQ ID NO:30的序列或由SEQ ID NO:30的序列构

成。根据本文公开内容的核酸编码CD28共刺激结构域。在一种实施方式中,编码CD28共刺激结构域的核酸由SEQ ID NO:16构成。根据本文公开内容的核酸编码CD3- ζ 信号传导结构域。在一种实施方式中,编码CD3- ζ 信号传导结构域的核酸由SEQ ID NO:18构成。这些信号传导结构域中的每一个可包含一个或多个缺失、插入或点突变(天然或人工),其中,每个结构域的信号传导功能与不包含一个或多个缺失、插入或点突变的蛋白质的信号传导功能大致相同。

[0161] 在一种实施方式中,IL13CAR的细胞质结构域由包含SEQ ID NO:1的核苷酸673-1140的核酸序列编码或由包含SEQ ID NO:1的核苷酸673-1143的核酸序列编码。在另一实施方式中,IL13CAR包含细胞质结构域,该细胞质结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸残基221-376。

[0162] 图1A举例说明了IL13CAR构建体的实施方式,其中,IL13配体是包含E13K取代和R109K取代的变体。

[0163] 耐药性多肽

[0164] 本发明公开的内容至少部分涉及既编码上文详细描述的对脑癌细胞具有选择性的CAR蛋白质又编码耐药性多肽的核酸,其中,CAR和耐药性多肽这两者的表达对于治疗癌症而言是有用的。例如,CAR和耐药性多肽可在下述细胞中表达,该细胞被给药至正在采用化疗剂和/或提高化疗剂的细胞毒性的药剂进行治疗的受治者。化疗剂的实例包括:通常用于治疗恶性胶质瘤(例如,多形性胶质母细胞瘤(GBM))的1,3-双(2-氯乙基)-1-亚硝基脒(BCNU或卡莫司汀),福莫司汀(fotemustine),洛莫司汀和替莫唑胺(TMZ)。一些化疗剂的细胞毒性作用涉及能够重新排布形成致死性链内交联的O⁶-甲基鸟嘌呤病变的形成。然而,这些甲基化试剂的有效性受到DNA修复蛋白质的肿瘤过表达的限制,该DNA修复蛋白质为O⁶-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(MGMT),其是从治疗后的细胞的DNA中除去细胞毒性O⁶-烷基鸟嘌呤加合物的蛋白质。因此,表达高水平MGMT的肿瘤细胞部分或完全耐受TMZ化疗的杀伤。防止甲基化试剂的效力降低的一种方式使患者接收TMZ化疗剂联合MGMT抑制剂(具体是O⁶-苄基鸟嘌呤)的治疗。然而,由于O⁶-苄基鸟嘌呤对造血细胞的毒性作用,因此,使O⁶-苄基鸟嘌呤的剂量受到限制。

[0165] 替莫唑胺(TMZ)是抗胶质瘤化疗药物,其对包括T细胞在内的造血细胞具有细胞毒性作用。FDA对TMZ的标准剂量进行了指导,因此,抗胶质瘤治疗中的不可避免的步骤是通过使T细胞的DNA进行甲基化而杀伤T细胞,这与TMZ破坏肿瘤细胞的方式非常相同(Sengupta et al., Clin Dev Immunol, 831090 (2012))。然而,野生型MGMT在细胞中的过表达或一种或多种MGMT突变体(例如,G156A,P140K)在细胞中的表达将保护该细胞不受诸如TMZ之类的甲基化试剂的影响(Woolford et al., J Gene Med, 8(1):29-31 (2006))。因此,由上述核酸编码的耐药性多肽是赋予TMZ耐受性的MGMT或MGMT变体。这些TMZ耐药性变体包括但不限于: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)和MGMT-5(SEQ ID NO:41)(Fontes et al., Mol Cancer Ther, 5(1):121-128)。全文所描述的MGMT变体(例如,P140K和G156A)中的氨基酸取代的指定位置是基于SEQ ID NO:33的序列的氨基酸位置。MGMT-2变体具有S152H,A154G,Y158H,G160S和L162V取代。MGMT-3变体具有C150Y,A154G,Y158F,L162P和K165R取代。MGMT-5变体具有N157T,Y158H和A170S取代。

[0166] 本文公开且使用的特别优选的构建体是P140K-MGMT变体。根据本发明公开的内容的核酸编码MGMT变体。在一种实施方式中,编码P140K-MGMT的核酸由SEQ ID NO:22构成。本发明还涉及编码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)的核酸,上述中的每一个可存在于IL13CAR-MGMT构建体中。本文还涉及包含SEQ ID NO:43的MGMT蛋白质序列 (GenBank登录号:NP_002403,其具有P140K点突变)和对应于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)的突变的任何点突变。

[0167] 由本文公开的嵌合核酸序列编码的MGMT或其变体位于编码IL13CAR蛋白质的核酸序列的一部分的下游或上游。在一种实施方式中,嵌合核酸序列是单顺反子的,其中,构建体包括单个启动子序列以驱动单个转录子的转录,这进而被翻译成稍后被裂解的单个蛋白质。这种单顺反子构建体的使用需要位于IL13CAR和MGMT蛋白质之间的自裂解元件。例如,当在宿主细胞中表达嵌合核酸序列时,嵌合核酸序列最初产生如下单个蛋白质,所述单个蛋白质在N-端至C-端方向上包括CAR (例如,上述IL13CAR)、自裂解肽以及本文所述的MGMT蛋白质或MGMT变体。该蛋白质随后被裂解,从而生成单个的CAR蛋白质和MGMT蛋白质。CAR蛋白质被加工并在细胞表面上展示,而MGMT蛋白质可被保留在细胞核内部。可选的构建体在N-端至C-端方向上包括MGMT蛋白质、自裂解蛋白质和CAR。

[0168] 在一种实施方式中,CAR和MGMT多肽部分被自裂解肽分离。自裂解序列的一个实例是2A元件,其包括来自口蹄疫病毒的2A序列。在示例性的实施方式中,自裂解序列包括SEQ ID NO:32的序列或由SEQ ID NO:32的序列构成。

[0169] 在可选的实施方式中,编码上述CAR和上述MGMT或其变体这两者的核酸序列是多顺反子的,其中,所述核酸序列包括编码CAR的核酸序列和编码MGMT或其变体的核酸序列,该核酸序列由诸如内部核糖体进入位点 (IRES) 之类的非蛋白质编码序列分离。可使用的IRES序列的实例包括但不限于:脑脊髓炎病毒 (EMCV) 的IRES元件,口蹄疫病毒 (FMDV) 的IRES元件,泰勒小鼠脑脊髓炎病毒 (TMEV) 的IRES元件,人鼻病毒 (HRV) 的IRES元件,可萨基病毒 (CSV) 的IRES元件,脊髓灰质炎病毒 (POLIO) 的IRES元件,甲肝病毒 (HAV) 的IRES元件,丙肝病毒 (HCV) 的IRES元件和瘟疫病毒 (例如,猪瘟病毒 (HOCV) 和牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)) 的IRES元件 (参见,例如,Le等人,Virus Genes 12:135-147,1996;和Le等人,Nuc.AcidsRes.25:362-369,1997,其全部内容通过引用并入本文)。

[0170] 多顺反子嵌合核酸的可选实施方式是第二启动子位于编码IL13CAR的核酸序列和编码MGMT或其变体的核酸序列之间的嵌合核酸。在该实施方式中,不存在编码自裂解肽的核酸序列。

[0171] 本发明还涉及编码IL13CAR和MGMT变体的核酸均位于单独的核酸载体内。即,本发明还涉及包括第一载体和第二载体的系统或试剂盒,所述第一载体包括编码本文所述的IL13CAR的核酸,所述第二载体编码本文所述的MGMT蛋白质。

[0172] 本领域技术人员将会理解的是,编码至少IL13CAR和MGMT蛋白质或其变体的核酸序列可进一步包括额外的成分以促进和/或提高宿主细胞中CAR和/或MGMT的表达和功能。例如,CAR可还包括 (一个或多个) 启动翻译的序列 (例如,Kozak序列和/或启动子序列) 以及用于同源性重组的序列 (逆转录病毒5' LTR;逆转录病毒3' LTR)。Kozak序列可在包括编码本文所述的IL13CAR-2A-MGMT构建体的核酸序列的嵌合核酸构建体中使用。

[0173] 根据本发明公开的内容使用的嵌合核酸序列通过在5'至3'方向上连接或结合下列元件而生成:Kozak序列,编码信号序列的核酸,编码IL13配体的核酸,编码铰链区的核酸,编码跨膜结构域的核酸,编码CD28共刺激(信号传导)结构域的核酸,编码CD3- ζ 信号传导结构域的核酸,编码自裂解肽(例如,2A肽)的核酸以及编码MGMT蛋白质的核酸,上述核酸中的每一个在上文中描述。嵌合核酸序列可通过合成包括并编码上述元件的单个序列而生成。可选地,上述元件中的每一个可使用本领域普通技术人员已知的方法独立地生成。例如,每个元件通过使用PCR进行扩增,其中,PCR被设计成根据需要在每个元件的5'端和3'端上生成限制性内切酶位点,并且,使用合适的内切酶对各个元件进行消化并将各个元件连接在一起以获得所需的构建体。因此,生成IL13CAR-P140KMGMT构建体的这种方法使得短连接体肽存在于各个元件之间。

[0174] 例如,编码2,3,4,5或6氨基酸的核酸可位于配体结构域和铰链区之间,铰链区和跨膜结构域之间,跨膜结构域和CD28共刺激结构域之间,CD28共刺激结构域和CD3- ζ 信号传导结构域之间,CD3- ζ 信号传导结构域和/或自裂解肽之间。

[0175] 在示例性的实施方式中,IL13CAR包括位于配体和铰链结构域之间的连接体,该连接体由两个氨基酸,脯氨酸-精氨酸构成。铰链区和跨膜结构域之间的连接体是谷氨酸-赖氨酸。跨膜结构域和CD28共刺激结构域之间的连接体是缬氨酸-苏氨酸。CD28共刺激结构域和CD3- ζ 信号传导结构域之间的连接体是苏氨酸-精氨酸。CD3- ζ 信号传导结构域和2A肽之间的连接体是谷氨酸-脯氨酸-丙氨酸-丙氨酸-丙氨酸。本发明涉及上述连接体中的每一个可独立于其他连接体存在于IL13CAR蛋白质中或者独立于其他连接体不存在于IL13CAR蛋白质中。

[0176] 因此,用于转染诸如T细胞之类的宿主细胞并且用于抑制或防止表达IL13R α 2且暴露于TMZ的细胞的生长的IL13CAR-P140KMGMT构建体的优选的实施方式包括但不限于:IL13(WT)CAR-P140KMGMT(SEQ ID NO:1的核苷酸序列;SEQ ID NO:4的氨基酸序列);IL13(E13Y)CAR-P140KMGMT(SEQ ID NO:2的核苷酸序列;SEQ ID NO:5的氨基酸序列);以及IL13(E13K.R109K)CAR-P140KMGMT(SEQ ID NO:3的核苷酸序列;SEQ ID NO:6氨基酸序列)。图2A提供了IL13(E13K.R109K)CAR-P140KMGMT构建体的示意图。这些IL13CAR-P140KMGMT构建体的其他实施方式包括但不限于:编码蛋白质IL13(WT)CAR-P140KMGMT(SEQ ID NO:45),IL13(E13Y)CAR-P140KMGMT(SEQ ID NO:46),和IL13(E13K.R109K)CAR-P140KMGMT(SEQ ID NO:47)的那些构建体。

[0177] 本领域技术人员将会理解的是,编码本文公开的信号肽、IL13配体、铰链区、跨膜结构域和CD28共刺激结构域、CD3- ζ 信号传导结构域、自裂解肽连接体和MGMT蛋白质或其变体的核酸序列中的每一个可在不影响所编码的蛋白质的条件下由于密码子简并而发生改变。而且,多肽序列也可例如通过保守氨基酸取代而发生改变,同时不显著影响明确描述的蛋白质的功能。因此,本发明还涉及本文所述的核苷酸序列中的每一个的变体,这样,本文公开的核酸序列包括与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:7-SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:34-SEQ ID NO:35中的每一个具有至少75%,80%,82%,85%,90%,92%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或99.5%一致性的序列。类似地,本文还涉及并公开了与SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:36-SEQ ID NO:41以及SEQ ID NO:43中的每一个具有至少75%,80%,82%,85%,90%,92%,94%,95%,96%,97%,

98%,99%或99.5%的一致性的多肽。

[0178] 出于优化比较目的,两个核苷酸或氨基酸序列的百分比一致性可通过序列比对进行确定(例如,可在第一序列的序列中引入空位)。对应位置的核苷酸或氨基酸随后进行比较,并且两个序列之间的百分比一致性是序列共享相同位置的数目的函数(即,一致性% = 相同位置的#/位置的总#x 100)。在一些实施方式中,出于比较目的而比对的氨基酸或核苷酸序列的长度是参比序列的长度的至少30%,40%,50%,60%,70%,80%,85%,90%,92%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%,例如,图7A (SEQ ID NO:1)、图7B (SEQ ID NO:4)、图8A (SEQ ID NO:2)、图8B (SEQ ID NO:5)、图9A (SEQ ID NO:3)和图9B (SEQ ID NO:6)中提供的那些序列。两个序列的实际比较可通过熟知的方法,例如,使用数学算法完成。这些数学算法的优选的非限定性的实例在Karlin等人的文章(Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:5873-5877 (1993))中描述。这种算法并入了BLASTN和BLASTX程序(2.2版本)中,BLASTN和BLASTX程序在Schaffer等人的文章(Nucleic Acids Res.,29:2994-3005 (2001))中描述。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可使用各个程序(例如,BLASTN)的默认参数。在一种实施方式中,所检索的数据库是非冗余(NR)数据库,并且序列比较参数可设定为:无过滤;Expect Value=10;Word Size=3;矩阵(Matrix)为BLOSUM62;并且Gap Cost:Existence=11,Extension=1。在另一实施方式中,在目标多肽或多核苷酸的全长上确定两个多肽或两个多核苷酸之间的百分比一致性。

[0179] 用于序列比较的数学算法的另一优选的非限定的实例是Myers和Miller的算法(CABIOS (1989))。这种算法并入ALIGN程序(2.0版本)中,其是GCG序列比对软件包(Accelrys, San Diego, California)的一部分。当使用用于比较氨基酸序列的ALIGN程序时,可使用PAM120权重余数表,缺口长度罚分12和缺口罚分4。序列分析的其他算法是本领域已知的并且包括Torellis和Robotti, Comput.的文章(Appl. Biosci., 10:3-5 (1994))中描述的ADVANCE和ADAM以及Pearson和Lipman的文章(Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 85:2444-8 (1988))中描述的FASTA。

[0180] 在另一实施方式中,两个氨基酸序列之间的百分比一致性可使用GCG软件包中的GAP程序,使用Blossom63矩阵或PAM250矩阵,缺口权重为12,10,8,6或4以及长度权重为2,3或4来完成。在又一实施方式中,两个核酸序列之间的百分比一致性可使用GCG软件包中的GAP程序,使用缺口权重为50和长度权重为3来完成。

[0181] 多肽之间的类似性通常由保守氨基酸取代来确定。这些取代是由类似特性的另一氨基酸取代多肽中的给定氨基酸的那些取代。保守取代可能是表型沉默的。通常看到的保守取代是脂肪族氨基酸Ala、Val、Leu和Ile中的一个代替另一个,羟基残基Ser和Thr的互换,酸性残基Asp和Glu的交换,酰胺基残基Asn和Gln之间的取代,碱性残基Lys和Arg的交换以及芳香族残基Phe和Tyr之间的代替。关于氨基酸改变可能是表型沉默的指导在Bowie et al., Science 247:1306-1310 (1990)中找到。

[0182] 变体多肽可通过一个或多个取代、缺失、插入、反向、融合和截断或者这些的任何组合而在氨基酸序列方面产生差异。进一步而言,变体多肽可以是完全功能性的(例如,能够感染细胞并产生子代病毒)或可在一种或多种活性方面缺乏功能(例如,能够产生子代病毒)。完全功能变体通常仅包含保守改变或在非关键残基或非关键区域包含改变。功能变体还可包含类似氨基酸的取代,这种取代不会产生功能上的改变或产生不显著的功能改变。

可选地,这种取代可在一定程度上对功能产生正面或负面的影响。非功能性变体通常包含一个或多个非保守氨基酸取代,缺失,插入,反向或截断或者包括在关键残基或关键区域中的取代,插入,反向或缺失。

[0183] 功能必需的氨基酸可通过本领域已知的方法识别,例如,定点突变或丙氨酸扫描突变(Cunningham et al., Science, 244:1081-1085 (1989))。后者的步骤在分子中的每个残基上引入单个丙氨酸突变(每个分子一个突变)。得到的突变分子随后进行体外生物活性检测。对于多肽活性而言关键的位点还可通过结构分析进行确定,例如,结晶、核磁共振或光亲和标记(参见,Smith et al., J. Mol. Biol., 224:899-904 (1992); 和de Vos et al. Science, 255:306-312 (1992))。

[0184] 本文进一步公开了包含基本上纯的多肽的组合物,所述基本上纯的多肽包括本文所述的IL13CAR蛋白质和本文所述的P140KMGM变体或由本文所述的IL13CAR蛋白质和本文所述的P140KMGM变体构成,该IL13CAR蛋白质为SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的氨基酸1-146的序列和优选地与SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的氨基酸1-146的序列具有至少75%,80%,82%,85%,90%,92%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列一致性的多肽,该P140KMGM变体为SEQ ID NO:1的氨基酸400-606的序列以及优选地与SEQ ID NO:1的氨基酸400-606的序列具有至少75%,80%,82%,85%,90%,92%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列一致性的多肽,上述序列一致性使用本文所述的BLAST程序以及本文所述的参数确定。在另一实施方式中,多肽的实例包括包含SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5和/或SEQ ID NO:6的基本上纯的多肽或包括由SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5和/或SEQ ID NO:6构成的基本上纯的多肽,以及优选地与SEQ ID NO:4具有至少75%,80%,82%,85%,90%,92%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列类似性的多肽,所述序列类似性使用本文所述的BLAST程序和参数确定。

[0185] 在特定的方面,本文公开的内容涉及由SEQ ID NO:1 (IL13 CAR-P140KMGM),SEQ ID NO:2 (IL-13 (E13Y) CAR-P140KMGM),SEQ ID NO:3 (IL-13 (E13K R109K) CAR-P140KMGM)或其组合编码的分离的多肽。在其它方面,本文公开的内容涉及包含SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:47或其组合的氨基酸序列的多肽(分离的多肽)。

[0186] 本发明还涉及包含T细胞受体的CAR多肽,所述T细胞受体包含脑癌的一种或多种肿瘤抗原的一种或多种配体(例如,抗体)。在特定的方面,CAR多肽还包含用于治疗脑癌的一种或多种额外的药剂。在其他方面,本发明涉及分离的多肽及其片段、衍生物和变体,以及由本文所述的核苷酸序列编码的多肽(例如,其他变体)。本文使用的术语“多肽”是指氨基酸的聚合物,并且不涉及特定长度,因此,肽、寡肽和蛋白质包括在多肽的定义范围内。

[0187] 多肽可使用已知的蛋白质合成方法合成。在一种实施方式中,多肽由重组DNA和重组蛋白质表达以及纯化技术生成。例如,编码多肽的核酸分子被克隆至表达载体,所述表达载体被引入宿主细胞内,在所述宿主细胞内表达所述多肽并且纯化和配制所需的蛋白质,用于包装和给药。

[0188] 本文使用的涉及多肽的“分离的”,“基本上纯的”或“基本上纯的且分离的”是指在从重组或非重组细胞中分离所述多肽时所述多肽基本不含其它物质,或化学合成所述多肽时所述多肽不含化学前体或其它化学药品。此外,多肽可加至细胞中通常不与其相关的另

一多肽中(例如,在融合蛋白中)并且仍然是“分离的”,“基本上纯的”或“基本上纯的且分离的”。例如,可使用本文所述的亲和性纯化技术以及本文所述的本领域技术人员已知的其他技术获得分离的、基本上纯的或基本上纯的且分离的多肽。

[0189] 本发明的多肽可被纯化为同质性的。然而,应当理解的是,其中多肽没有被纯化为同质性的制剂也是有用的。重要特性在于制剂允许多肽的期望的功能,甚至在存在显著量的其他成分时,制剂也允许多肽的期望的功能。因此,本发明包括各种不同的纯度。在一种实施方式中,“基本不含其他物质”包括含有少于约30%(按干重量计)的其他蛋白质(即,污染蛋白质),少于约20%的其他蛋白质,少于约10%的其他蛋白质,少于约5%的其他蛋白质,或少于约1%的其他蛋白质的多肽的制剂。

[0190] 当重组生成多肽时,所述多肽也可以是基本不含培养基的,即,培养基占少于约20%的多肽制剂体积,少于约10%的多肽制剂体积,或少于约5%的多肽制剂体积。“基本不含化学前体或其他化学药品”包括从多肽的合成中所涉及的化学前体或其他化学药品中分离出来的多肽的制剂。在一种实施方式中,“基本不含化学前体或其他化学药品”包括具有少于约30%(按干重量计)化学前体或其他化学药品,少于约20%化学前体或其他化学药品,少于约10%化学前体或其他化学药品,或者少于约5%化学前体或其他化学药品的多肽的制剂。

[0191] 在一种实施方式中,本发明的多肽包括由SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:5的核酸分子编码的氨基酸序列以及补体及其一部分。本发明的多肽还包括如下片段和序列变体,所述片段和序列变体与由包含SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列的核酸分子编码的多肽以及补体及其一部分具有实质的同源性。

[0192] 核酸表达构建体

[0193] 本发明公开的内容的另一方面属于核酸表达构建体或载体、逆转录病毒载体和/或逆转录病毒颗粒及其应用。本领域普通技术人员已知的重组DNA技术方法被用于设计和生成编码本文所述的IL13CAR、自裂解肽和MGMT变体的嵌合核酸序列。随后,嵌合核酸构建体被克隆至质粒载体以进行,例如,排序,从而确认构建体的序列。一旦确认了期望的序列,那么使用嵌合核酸构建体生成用于转染哺乳动物细胞的逆转录病毒颗粒。因此,包含本文所述的SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:3的核酸序列以及SEQ ID NO:7-SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:34和/或SEQ ID NO:34-SEQ ID NO:35的组合的嵌合构建体被克隆至这些质粒载体中,用于稍后包装进入逆转录病毒颗粒。在特定的方面,嵌合构建体和质粒载体包括包含上述SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3的一个或多个核酸序列。如实施例1所描述的,包含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)的质粒载体通过将本文所述的片段克隆至pUC57载体中随后克隆至pMFG载体中而产生,然后生成逆转录病毒颗粒(实施例2)。

[0194] 图1B举例说明包含IL13CAR构建体的质粒载体,其中尚未引入MGMT基因。图2B举例说明包含IL13CAR构建体并且还包含位于IL13CAR编码序列的下游的P140KMGMT编码序列的相同的质粒骨架。

[0195] 在可选的实施方式中,编码本文所述的IL13CAR的核酸被克隆至第一载体并且编码本文所述的MGMT蛋白质的核酸被克隆至第二载体。因此,本发明还描述了第一载体(质

粒,表达,病毒,逆转录病毒,慢病毒,腺病毒,等等)和第二载体(质粒,表达,病毒,逆转录病毒,慢病毒,腺病毒,等等),所述第一载体包含编码本文所述的IL13CAR的核酸,所述第二载体包含编码本文所述的MGMT蛋白质的核酸。

[0196] 合适的核酸构建体的实例包括质粒(例如,环状双链DNA环)和病毒载体(例如,逆转录病毒载体,慢病毒载体,腺病毒载体)。一些载体能够自动复制至宿主细胞中,将所述载体引入所述宿主细胞中(例如,具有复制的细菌源的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)在引入宿主细胞中之后被整合至宿主细胞基因组中,从而沿着宿主基因组进行复制。而且,一些载体(表达载体)能够将核酸的表达定向至它们可操作地连接的核酸。总体而言,重组DNA技术中的表达构建体通常是质粒形式。然而,本发明意在包括表达载体的这些其他形式,例如,提供等同功能的病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒,腺病毒和腺相关病毒)。

[0197] 本发明的优选的重组表达载体包括具有适于表达宿主细胞中的核酸分子的形式本发明的核酸分子。这意味着重组表达载体包括基于待用于表达的宿主细胞选择的一个或多个调控序列,所述调控序列可操作地连接至待表达的核酸序列。在重组表达载体中,“可操作地连接的”是指目标核苷酸序列以允许核苷酸序列表达的方式连接至调控序列(例如,当载体引入宿主细胞中时在体外转录/翻译系统中或在宿主细胞中)。术语“调节性序列”意在包括启动子,强化子和其他表达控制元件(例如,多聚腺苷酸信号)。这些调控序列在例如Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) 中描述。调控序列包括将核苷酸序列的连续表达定向在多种类型的宿主细胞中的那些调控序列和将核苷酸序列的表达仅定向在一些宿主细胞中的那些调控序列(例如,组织特异性调控序列)。

[0198] 本领域技术人员应当理解的是,表达载体的设计可取决于如下因素,例如,待转化的宿主细胞的选择和期望的多肽的表达水平。本发明的表达载体可被引入宿主细胞,从而产生多肽,包括由本文所述的核酸分子编码的融合多肽。

[0199] 本发明的重组表达载体可设计为用于本发明的多肽在原核细胞或真核细胞(例如,细菌细胞,例如,大肠杆菌细胞,昆虫细胞(使用杆状表达载体),酵母细胞或哺乳动物细胞(灵长类动物细胞(例如,人类细胞),鼠类细胞(例如,小鼠细胞),猫科动物细胞,犬类动物细胞,啮齿类动物细胞,羊细胞,牛细胞))中的表达。

[0200] 成功地生成包含嵌合核酸构建体的逆转录病毒颗粒以包含编码实施例1和实施例2所述的IL13 (E13K.R109K) CAR-P140KMGMT的嵌合核酸序列。实施例和说明书全文描述的方法结合本领域普通技术人员已知的方法可用于生成包含本文所述的任何嵌合核酸构建体的逆转录病毒颗粒。加工过程中的转染效率可通过由流式细胞仪测量IL13配体的细胞表面表达来监测。采用IL13CAR-P140KMGMT构建体转导的细胞可使用例如荧光活化的细胞分类器来富集。图3A和图3B显示了由IL13 (E13K.R109K) CAR-A2-P140KMGMT构建体转染的PG13细胞的富集。图3A显示了在采用亲嗜性逆转录病毒第一次转导之后表达IL13的细胞的相对数量(例如,4.0%)。图3B显示了在富集采用亲嗜性逆转录病毒转导的细胞之后表达IL13的细胞的相对数量(例如,96.6%)。使用常规方法进行细胞溶解产物的Western印迹分析,从而确定并测量宿主细胞表达的P140KMGMT蛋白质。如图3C所示,与图1A至图1B所示的未转导的细胞或由仅表达IL13CAR构建体的构建体转导的细胞相比,由IL13CAR-A2-P140KMGMT构建

体转导的细胞的富集会过表达P140KMGMT蛋白质。

[0201] 图1A和图2A提供了克隆至质粒载体的IL13 (E13K.R109K) CAR-P140KMGMT的示意图,而图1B和图2B显示了用于整合至宿主细胞基因组中的5' LTR和3' LTR的侧翼的嵌合体的线性描述。

[0202] 本文描述的核酸构建体被引入宿主哺乳动物细胞中,以赋予细胞肿瘤细胞杀伤功能和化疗药物耐药性,所述化疗药物是诸如TMZ之类的DNA甲基化药剂。使用例如实施例3所述的逆转录病毒载体完成将核酸引入至哺乳动物宿主细胞。瞬时或稳定转导哺乳动物细胞的逆转录病毒载体是本领域已知的并且在下文中描述了将其用于目前描述的蛋白质表达和治疗系统中。

[0203] 一些实施方式利用病毒载体通过本文所述的表达系统转导诸如T细胞之类的浆细胞。病毒载体的实例包括但不限于:MFG载体,基于腺病毒的载体,基于腺相关病毒(AAV)的载体,逆转录病毒载体,逆转录病毒-腺病毒载体和源自单纯性疱疹病毒(HSV)的载体。

[0204] 通常,最小逆转录病毒载体包括一些5' LTR和3' LTR序列,一种或多种目标基因(待目标细胞中表达),一个或多个启动子和用于包装RNA的顺式作用序列。可包括本文所述的本领域已知的其他调控序列。病毒载体通常被克隆至可被转染至包装细胞系中的质粒中并且通常还包括用于质粒在细菌中的复制的序列,所述包装细胞系例如真核细胞(例如,PG13小鼠纤维母细胞)。诸如逆转录病毒载体之类的一些病毒载体使用一个或多个异源性启动子,增强子或这两者。一些实施方式使用位于病毒载体的5' LTR和3' LTR序列之间的并且可操作地连接至目标基因的“内部”启动子/增强子。“功能关系”和“可操作地连接”是指,但不限于,基因相对于启动子和/或增强子位于准确的位置和方位上,这样,当启动子和/或增强子与合适的调控分子接触时,基因的表达将会受到影响。任何增强子/启动子组合可用于调节(例如,增加,降低)包装细胞系中的病毒RNA基因组的表达,调节感染的目标细胞中所选择的目标基因的表达,或这两者都调节。

[0205] 启动子是由DNA序列形成的表达控制元件,该DNA序列允许发生RNA聚合酶和转录的结合。启动子是位于所选择的目标基因(通常在约100bp至1000bp范围内)的起始密码子的上游(5')并且控制与其可操作地连接的编码多核苷酸序列的转录和翻译的未翻译的序列。启动子可以是可诱导的或组成性的。可诱导的启动子响应培养条件的一些改变(例如,温度的改变)在DNA的控制下通过DNA启动转录水平的增加。

[0206] 本领域已知多种启动子和用于将启动子可操作地连接至多核苷酸编码的序列的方法。天然启动子序列和许多异源性启动子可用于所选择的目标基因的定向表达。一些实施方式使用异源性启动子,因为相对于天然启动子,异源性启动子通常允许更好的转录并产生更高产量的期望的蛋白质。

[0207] 一些病毒载体包括顺式作用包装序列,从而促进将基因组病毒RNA并入病毒颗粒。实例包括psi-序列。这些顺式作用序列是本领域已知的。

[0208] 可使用本领域已知的任何合适的基因工程技术完成病毒载体的产生,包括但不限于:限制性内切酶消化,连接,转换,质粒纯化,PCT扩增以及DNA排序的标准技术,例如,下列文献中所描述的:Sambrook等人的文献(Molecular Cloning:A Laboratory Manual.Cold Spring Harbor Laboratory Press,N.Y.(1989)),Coffin等人的文献(Retroviruses.Cold Spring Harbor Laboratory Press,N.Y.(1997))和“RNA Viruses:A Practical

Approach”(Alan J.Cann,Ed.,Oxford University Press,(2000))。

[0209] 本领域已知任何多种可用于产生合适的逆转录病毒颗粒的方法,所述逆转录病毒的基因组包括病毒载体的RNA拷贝。作为一种方法,基于并入具有期望的靶细胞特异性的病毒颗粒中的病毒载体,病毒载体可引入包装病毒基因组RNA的包装细胞系中。所述包装细胞系通常提供反式病毒蛋白,该病毒蛋白是将病毒基因组RNA包装至病毒颗粒中并感染靶细胞所需的,包括结构空位蛋白质、酶p1蛋白和包膜糖蛋白。

[0210] 在一些实施方式中,包装细胞系可稳定地表达一些必需的或期望的病毒蛋白(例如,gag,pol)(参见,例如,美国专利US6,218,181)。在一些实施方式中,包装细胞系可被编码一些必需或期望病毒蛋白(例如,gag,pol)的质粒瞬时转染,包括本文所述的麻疹病毒糖蛋白序列。在一种示例性的实施方式中,包装细胞系稳定地表达gag和pol序列,并且细胞系随后被编码病毒载体的质粒和编码糖蛋白的质粒转染。下文介绍期望的质粒,例如通过超离心收集并因此加工病毒颗粒,从而得到病毒颗粒的浓缩母液。示例性的包装细胞系包括PG13(ATCC CRL-10686),293(ATCC CCL X),HeLa(ATCC CCL 2),D17(ATCC CCL 183),MDCK(ATCC CCL 34),BHK(ATCC CCL-10)和Cf2Th(ATCC CRL 1430)细胞系。

[0211] 宿主细胞

[0212] 本发明的另一方面关于已引入本发明的重组表达载体的宿主细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文中互换使用。应当理解的是,这些术语不仅仅涉及特定的受治者,而且还涉及这种细胞的子代或潜在的子代。因为可由于突变或环境影响而在后代中产生某些修饰,这些子代事实上可能不等同于母细胞,但是这些子代仍然包括在本文使用的术语的范围内。

[0213] 宿主细胞可以是任何原核细胞或真核细胞。例如,本发明的核酸分子可在细菌细胞(例如,大肠杆菌)、昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞中表达。一方面,宿主细胞是哺乳动物细胞(灵长类动物细胞(例如,人类细胞),鼠科动物细胞(例如,小鼠细胞),猫科动物细胞,犬类动物细胞,啮齿类动物细胞,羊细胞,牛细胞)。在特定的方面,哺乳动物细胞是免疫细胞。又一方面,哺乳动物细胞是T细胞。对于本领域技术人员而言其他合适的宿主细胞是明显的。

[0214] 就本文的目的而言,T细胞可以是任何T细胞,诸如培养的T细胞,例如,原始T细胞,或来自培养的T细胞系的T细胞(例如,Jurkat,SupT1,等等),或获自哺乳动物的T细胞。如果T细胞获自哺乳动物,那么T细胞可以自多种来源获得,包括但不限于:血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或体液。T细胞还可被富集或纯化。T细胞可以是人T细胞。T细胞可以是人体分离的T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞并且可以是任何发育阶段的T细胞,包括但不限于:CD4⁺/CD8⁺双正电荷T细胞、CD4⁺辅助T细胞(例如,Th1细胞和Th2细胞)、CD8⁺T细胞(例如,细胞毒性T细胞)、外周血单核细胞(PBMC)、外周血白细胞(PBL)、肿瘤浸润细胞、记忆T细胞、初始T细胞等等。T细胞可以是CD8⁺T细胞或CD4⁺T细胞。

[0215] 在一种实施方式中,本发明的组合物和方法中使用的宿主细胞是NK-92细胞(NK-92细胞系,ATCC保藏号:PTA-6672)。

[0216] 核酸构建体可通过常规转化或转染技术引入至原核细胞或真核细胞中。本文使用的术语“感染”,“转化”,“转导”和“转染”是指用于将外源性核酸分子(例如,DNA)引入至宿主细胞的本领域已知的多种技术,包括:磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、

脂质转染或电穿孔。用于转化或转染宿主细胞的合适的方法可在例如Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd Ed., CSHP, New York (1989) 和其他实验指南中找到。

[0217] 本发明的宿主细胞(例如培养基中的原核宿主细胞或真核宿主细胞)可用于生成(表达)本发明公开的一种或多种CAR。因此,本发明公开的内容还提供了使用本发明的宿主细胞生成CAR的方法。在一种实施方式中,所述方法包括在合适的培养基中培养本发明公开的宿主细胞(在所述宿主细胞中已引入了编码本发明公开的多肽的重组表达载体),从而生成一种或多种CAR。

[0218] 对于哺乳动物细胞的稳定转染而言,本领域已知的是,基于所使用的表达载体和转染技术,仅仅一小部分细胞可将外源性DNA整合至其基因组中。为了识别和选择这些整合素,编码可选择的标记物(例如,对于抗生素具有耐受性)的基因通常沿着目标基因被引入宿主细胞中。优选的可选择的标记物包括赋予耐药性的那些标记物,例如,G418、潮霉素或甲氨蝶呤。编码可选择的标记物的核酸分子可在与本发明的核酸分子相同的载体上被引入至宿主细胞或可在单独的载体上被引入至宿主细胞。由引入的核酸分子稳定转染的细胞可通过药物选择来识别(例如,已合并了可选择的标记物基因的细胞将会存活,而其他细胞死亡)。

[0219] 如本文举例说明的,本发明涉及免疫细胞,例如,但不限于,表达IL13CAR并且对暴露于化疗药剂替莫唑胺具有耐受性的T细胞。具体而言,本发明已显示出,在TMZ存在的情况下,由编码并表达上文详细描述IL13CAR (SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:6) 和P140KMGMT突变体 (SEQ ID NO:33) 的核酸序列转导的T细胞相对于表达仅表达IL13的CAR的T细胞具有更高的存活率。因此,在特定的方面,本发明涉及表达IL13和/或IL13的变体(例如,SEQ ID NO:4 (WT IL13 CAR), SEQ ID NO:5 (IL13E13YCAR) 或SEQ ID NO:6 (IL13E13K.R109KCR) 和/或R109K IL13CAR) 以及对细胞产生化学保护的MGMT突变体(例如,P140KMGMT突变体 (SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:38, SE ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41)) 的CAR。在一种实施方式中,细胞由IL13CAR-A2-MGMT构建体转导,其中,MGMT蛋白质不是野生型MGMT蛋白质 (SEQ ID NO:49)。

[0220] 宿主细胞的收获和转染

[0221] 采用嵌合抗原受体 (CAR) 工程化的、能够产生高度特异性肿瘤识别和杀伤的T细胞在获得了有希望的临床结果之后获得巨大关注 (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)。带有CAR基因的重编程T细胞为对接和溶解肿瘤细胞提供了独立于MHC的机理。可选地,这些修饰的T细胞被称为“设计T细胞 (designer T cells)”、“T-bodies”或“CAR-T细胞” (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)。

[0222] 另一方面,本发明公开的内容涉及用于生成表达CAR和MGMT蛋白质的细胞的方法,CAR包含T细胞受体,所述T细胞受体包含脑癌的一种或多种肿瘤抗原的一种或多种配体(例如,抗体),所述MGMT蛋白质增加由编码CAR和MGMT蛋白质的核酸转导的并且暴露于诸如TMZ之类的DNA甲基化药剂的细胞的活力。在特定方面,本发明公开的内容涉及生成表达CAR的

细胞的方法, CAR具有SEQ ID NO:4 (IL13 CAR-P140KMGMT)、SEQ ID NO:5 (IL-13 (E13Y) CAR-P140KMGMT)、SEQ ID NO:6 (IL-13 (E13K R109K) CAR-P140KMGMT) 或其组合的氨基酸序列。所述方法包括将包含SEQ ID NO:1 (IL13 (WT) CAR-P140KMGMT)、SEQ ID NO:2 (IL-13 (E13Y) CAR-P140KMGMT) 或SEQ ID NO:3 (IL-13 (E13K R109K) CAR-P140KMGMT) 的核酸序列引入细胞, 并且在由细胞表达CAR的条件下维持所述细胞, 从而生成表达下述嵌合抗原受体的细胞, 该嵌合抗原受体具有SEQ ID NO:4 (IL13 (WT) CAR-P140KMGMT)、SEQ ID NO:5 (IL-13 (E13Y) CAR-P140KMGMT)、SEQ ID NO:6 (IL-13 (E13K R109K) CAR-P140KMGMT) 或其组合的氨基酸序列。

[0223] 在特定的方面, 使用病毒载体 (例如, 逆转录病毒载体, 慢病毒载体, 腺病毒载体或其组合) 将核酸序列引入细胞中。另一方面, 细胞是哺乳动物细胞, 例如, 哺乳动物T细胞 (例如, 人T细胞或小鼠T细胞)。在特定的方面, 细胞是自体细胞或人白细胞抗原 (HLA) -相合细胞。再一方面, 细胞获自患有脑癌 (例如, 高度恶性胶质瘤, 例如, 多形性胶质母细胞瘤 (GBM), 间变性星形细胞瘤或儿童胶质瘤) 的一个或多个个体。

[0224] 因此, 其他方面涉及表达根据本发明公开的内容的至少一种CAR和耐药性多肽的重组T细胞。特别优选的转化宿主细胞是转基因T前体细胞或干细胞, 其特征在于, 所述转基因T前体细胞或干细胞包括根据本发明的核酸构建体。用于转化或转导宿主细胞和/或干细胞的方法是本领域技术人员熟知的, 并且例如, 包括电穿孔或微注射。特别优选的转化的宿主细胞是患者个性化T细胞, 其在提取之后, 由根据本发明公开的内容的核酸构建体转染。根据本发明公开的内容, 宿主细胞尤其可通过提取一个或多个细胞而获得, 优选地, 通过提取T细胞, 尤其是CD8⁺-T细胞而获得宿主细胞, 所述CD8⁺-T细胞随后被根据本发明公开内容的一种或多种核酸构建体离体转染或转导, 从而获得根据本发明公开内容的宿主细胞。

[0225] 在进行扩增和基因修饰之前, T细胞的来源获自受治者。术语“受治者”意在包括免疫反应可被诱发的生物体 (例如, 哺乳动物)。受治者的实例包括人和其他灵长类动物, 狗, 猫, 小鼠, 大鼠和转基因啮齿类动物。T细胞可自多种来源获得, 包括外周血单核细胞, 骨髓, 淋巴结组织, 脐带血, 胸腺组织, 感染部位的组织, 腹水, 胸腔积液, 脾脏组织和肿瘤。在本发明的一些方面, 可使用本领域可获得任何数量的T细胞。在本发明公开的内容的一些方面, 可使用本领域技术人员已知的任何技术 (例如, Ficol1™分离) 自从受治者采集到的血液单元获得T细胞。在一个优选的方面, 来自个体的循环血液的细胞可通过分离术获得。分离术产品通常包含包括T细胞在内的淋巴细胞, 单核细胞, 粒细胞, B细胞, 其他成核的白细胞, 红细胞以及血小板。一方面, 通过分离术收集的细胞可被洗涤以除去血浆碎片并将细胞放置于合适的缓冲液或培养基中用于下一加工步骤。在本发明的一个方面, 细胞由磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤。在可选的方面, 洗涤溶液缺少钙并且可以缺少镁或可以缺少许多或全部二价阳离子。在不存在钙的情况下, 最初的活化步骤可导致活化放大。如本领域普通技术人员易于理解的, 洗涤步骤可通过本领域技术人员已知的方法完成, 例如, 根据生产商的说明使用半自动“直流”离心机完成洗涤。在洗涤之后, 细胞可重悬于多种生物相容性缓冲液或其他带有缓冲剂或不带有缓冲剂的盐水溶液中。可选地, 可除去分离术 (apheresis) 样品的不想要的成分并且将细胞直接重悬于培养基中。

[0226] 一方面, T细胞通过溶解红细胞并且除去单核细胞从外周血淋巴细胞中分离出来, 例如, 通过PERCOLL™梯度离心或通过对流离心洗脱。T细胞的特定的亚群 (例如, CD3⁺, CD28

+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 和CD45RO+T细胞)可进一步通过阳性或阴性选择技术分离。本领域技术人员可意识到的是,在本发明中可使用多轮选择。在一些方面,理想的是,进行选择步骤并且在活化和扩增过程中使用“未选择的细胞”。“未选择的细胞”还可以经受进一步的多轮选择。

[0227] 可使用定向于对阴性选择的细胞唯一的表面标记物的抗体的组合完成通过阴性选择对T细胞群的富集。一种方法是通过负磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分类和/或选择,所述负磁性免疫粘附或流式细胞术使用定向于在阴性选择的细胞上存在的细胞表面标记物的单克隆抗体的混合物。例如,为了通过阴性选择富集CD4+细胞,单克隆抗体混合物通常包括CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR和CD8的抗体。在一些方面,理想的是富集或阳性选择调节性T细胞,该T细胞通常表达CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+和FoxP3+。可选地,在一些方面,T调节性细胞由抗-CD25结合珠或其他类似的选择方法除去。

[0228] T细胞的活化和扩增

[0229] 无论在对T细胞进行基因修饰以表达理想的CAR之前或之后,总体上可使用如下美国专利和美国专利申请公开中所描述的方法活化和扩增T细胞:US6,352,694;US6,534,055;US6,905,680;US6,692,964;US5,858,358;US6,887,466;US6,905,681;US7,144,575;US7,067,318;US7,172,869;US7,232,566;US7,175,843;US5,883,223;US6,905,874;US6,797,514;US6,867,041;以及US20060121005。

[0230] 一旦确立了转染或转导的T细胞能够通过期望的调节并在期望的水平上表达作为表面膜蛋白的IL13CAR,就可以确定嵌合受体在宿主细胞中是否具有用于所需的信号诱导的功能性。随后,转导的T细胞被重新引入或给药于受治者以活化受治者体内的抗肿瘤反应。

[0231] 药物组合物

[0232] 再一方面,本发明公开的内容涉及促进将本文所述的转导的T细胞给药于有此需要的受治者的药物组合物。根据本文公开的内容的转导的T细胞与合适的载体或稀释剂可制成药物组合物或可制成用于体内给药的合适的植入物,所述合适的载体或稀释剂进一步可以是药学上可接受的。制备这种组合物或植入物的方法已在本领域进行描述(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack, ed. (1980))。在合适的情况下,转导的T细胞被配制成半固体或液体形式的制剂,例如,胶囊、溶液、注射液、吸入剂或气溶胶,用于各自给药途径的常规方式。本领域已知的方式可用于防止或最小化组合物在到达靶组织或靶器官之前的释放和吸收,或确保组合物随时间释放。然而,理想的是使用不导致细胞表达嵌合受体的药学上可接受的形式。因此,理想的是,转导的T细胞可制成包含平衡盐溶液的药物组合物,所述平衡盐溶液优选地为Hanks平衡盐溶液或生理盐水。例如,采用生理学上可接受的载体或赋形剂配制组合物以制备药物组合物。载体和组合物可以是无菌的。制剂应当适于给药模式。

[0233] 合适的药学上可接受的载体包括但不限于:水,盐溶液(例如,NaCl),盐水,缓冲盐水,醇类,甘油,乙醇,阿拉伯树胶,植物油,苜蓿基醇,聚乙二醇,明胶,诸如乳糖之类的糖类,直链淀粉或淀粉,葡萄糖,硬脂酸镁,滑石,硅酸,粘性石蜡,芳香油,脂肪酸酯,羟甲基纤维素,聚乙烯吡咯烷酮,等等,以及它们的组合。如果需要的话,药物制剂可与不与活性化合物发生有害反应的辅剂混合,所述辅剂例如润滑剂,防腐剂,稳定剂,润湿剂,乳化剂,用于影

响渗透压的盐,缓冲剂,着色、调味和/或芳香物质,等等。

[0234] 如果需要的话,组合物还可包含微量润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。组合物可以是液体溶液,悬浮液,乳液,片剂,药丸,胶囊,持续释放剂型或粉剂。组合物可与传统粘合剂和诸如甘油三酯之类的载体一同被配制成栓剂。口服制剂可包括标准载体,例如,药物级别的甘露醇,乳糖,淀粉,硬脂酸镁,聚乙烯吡咯烷酮,糖精钠,纤维素,碳酸镁,等等。

[0235] 组合物可根据常规步骤配制成适于给药于人体的药物组合物。例如,用于静脉内给药的组合物通常是无菌等渗水性缓冲剂中的溶液。在必要的情况下,组合物还可包括增溶剂和缓解注射部位的疼痛的局部麻醉剂。总体而言,单独提供各个成分或各个成分以单位剂量的形式混合在一起,例如,作为密封包装内的干的冻干粉末或无水浓缩物,所述密封包装例如安瓶或显示活性化合物的量的小袋。在通过输注给药组合物的情况下,所述组合物可分散于含有无菌药用级水、盐水或葡萄糖/水的输注瓶中。在通过注射给药组合物的情况下,可提供用于注射的无菌水或盐水的安瓶,从而在给药之前可将各个成分混合。

[0236] 这些组合物的引入方法包括但不限于:颅内给药,髓内给药,皮内给药,肌肉内给药,腹膜内给药,眼内给药,静脉内给药,皮下给药,局部给药,口服给药和鼻内给药。其他合适的引入方法还可包括基因疗法(如下文描述的),可再充电或可生物降解的装置,颗粒加速装置(“基因枪”)和缓慢释放聚合装置。本发明的药物组合物还可作为与其他化合物的联合治疗的一部分给药。

[0237] 对于局部施用而言,可使用包含与局部施用相容的载体并且具有优选地大于水的动态粘度的非喷雾形式,粘性至半固体或固体形式。合适的制剂包括但不限于:溶液,悬浮液,乳液,霜剂,软膏,粉末,灌肠剂,乳剂,溶胶,擦剂,药膏,气溶胶,等等,如果需要的话,对这些制剂进行灭菌或与辅剂混合,所述辅剂例如,防腐剂,稳定剂,润湿剂,缓冲剂或用于影响渗透压的盐,等等。化合物可并入化妆品制剂中。对于局部施用而言,喷雾气溶胶制剂也是合适的,其中,活性成分优选地与固体或液体惰性载体物质结合包装在挤压瓶中或与加压挥发性物质混合(通常为气体推进剂,例如,加压气体)。

[0238] 本文描述的化合物可配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括由游离氨基形成的那些盐和由游离羧基形成的那些盐,所述由游离氨基形成的那些盐例如,源自盐酸,磷酸,醋酸,草酸,酒石酸等的那些盐,所述由游离羧基形成的那些盐例如,源自钠,钾,铵,钙,氢氧化铁,异丙基胺,三乙基胺,2-乙基氨基乙醇,组氨酸,普鲁卡因等的那些盐。

[0239] 试剂盒

[0240] 本文公开的内容还提供药物包装或试剂盒,所述药物包装或试剂盒包括填充有本文公开的药物组合物的成分中的一种或多种的一个或多个容器。任选地,这些容器可以关联有政府机构规定的形式的下述通知,该通知调节药物或生物产品的生产、使用或销售,该通知反映生产机构批准销售用于人类给药。所述包装或试剂盒可以贴有关于给药模式、药物给药顺序(例如,分开给药,顺序给药或同时给药)等的信息。所述包装或试剂盒还可包括提醒患者进行治疗的工具。所述包装或试剂盒可以是单个单位剂量的联合治疗或可以是多个单位剂量。具体而言,化合物可被分开,以任何组合混合在一起,存在于单个小瓶中或片剂中。优选地是,将化合物组装在泡罩包装中或其他分配工具中。对于本发明的目的而言,单位剂量是指依赖于每种化合物的单独的药效学的并且在标准时间过程中以FDA批准的剂量给药的剂量。

[0241] 治疗方法

[0242] 另一方面,本文公开的内容涉及治疗有此需要的个体体内的恶性肿瘤的方法,所述方法包括给药表达IL13CAR和MGMT蛋白质的一种或多种T细胞,IL13CAR包含IL13R α 2蛋白质的一种或多种配体(例如,抗体)。在特定的方面,本文公开的内容涉及治疗有此需要的个体体内的脑癌的方法,所述方法包括给药一种或多种T细胞,该一种或多种T细胞带有并表达编码如下蛋白质的核酸序列,所述蛋白质包含SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37(配体)、SEQ ID NO:28(TM)、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30(CD28和CD3- ζ 信号传导结构域),并且任选地还包含SEQ ID NO:27(铰链)。在另一实施方式中,核酸序列包含SEQ ID NO:1(IL13 CAR-P140KMGM T),SEQ ID NO:2(IL-13(E13Y) CAR-P140KMGM T),SEQ ID NO:3(IL-13(E13K R109K) CAR-P140KMGM T)或其组合。一方面,T细胞是自体T细胞或人白细胞抗原(HLA)-相合细胞。另一方面,脑癌是高度恶性胶质瘤,例如,高度恶性胶质瘤是多形性胶质母细胞瘤(GBM)、间质性星形细胞瘤或儿童胶质瘤。在一种实施方式中,本文公开的方法用于治疗与不利的IL13R α 2表达有关的癌症。

[0243] 已被证明具有过表达IL13R α 2的细胞的其他癌症包括但不限于:乳腺癌,胰腺癌,头颈癌,卵巢癌和结肠直肠癌。在另一实施方式中,癌症是已经转移的癌症。因此,本文还涉及通过向受治者给药一种或多种T细胞来治疗这些癌症中的一种或多种的方法,所述一种或多种T细胞由上述IL13CAR-MGMT构建体中的一种或多种转导。

[0244] 因为T细胞表达CAR并且表达突变的MGMT,该突变的MGMT产生针对MGMT过表达的耐药性的保护或产生针对MGMT变体(例如,P140K)的耐药性的保护,所以,治疗脑癌的方法可进一步包括向个体(脑癌患者)顺序或同时给药一种或多种化疗剂。换言之,修饰的T细胞在给药化疗剂之前,给药化疗剂过程中或给药化疗剂之后给药。化疗剂的实例包括替莫唑胺(TMZ),1,3-双(2-氯乙基)-1-亚硝基脲(BCNU或卡莫司汀),福莫司汀(fotemustine)和洛莫司汀。在特定的方面,一种或多种T细胞表达包含SEQ ID NO:1(IL13 CAR-P140KMGM T)、SEQ ID NO:2(IL-13(E13Y) CAR-P140KMGM T)、SEQ ID NO:3(IL-13(E13K R109K) CAR-P140KMGM T)或其组合的核酸序列并且将一种或多种化疗剂同时给药至个体。在特定的方面,个体是哺乳动物,例如,人类或其他灵长类动物,或者啮齿类动物,例如,小鼠或大鼠。

[0245] 下文实施例4和实施例5部分举例说明由编码并表达IL13CAR-MGMT嵌合体转导的T细胞的效力。实施例4显示了与由编码IL13CAR但不共表达P140KMGM T蛋白质的载体转导的T细胞相比,由编码IL13CAR-2A-P140KMGM T蛋白质的载体转导的分离的T细胞在暴露于TMZ时具有提高的耐药性(活力增强)(例如,参见图5)。因此,本文涉及增强由IL13CAR-MGMT构建体转导的免疫细胞的活力的方法,IL13CAR-MGMT构建体例如本文所述的构建体。在示例性的实施方式中,提供下述T细胞作为治疗诊断患有脑癌的受治者的方法,该T细胞由包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的核酸序列的逆转录病毒转导,所述受治者顺序或同时接受TMZ治疗。

[0246] 其他研究表明本文公开的IL13CAR-MGMT构建体还在修饰T细胞方面有效,所述T细胞可给药于受治者并且可提高受治者的存活率。如实施例5所示以及图6举例说明的,采用TMZ和下列T细胞治疗注射有U251MG胶质瘤细胞的小鼠,该T细胞由编码IL13CAR(不带有MGMT)的构建体转导或由IL13CAR-A2-P140KMGM T构建体转导。虽然在不存在P140KMGM T的条件下IL13CAR的表达使存活率相对于没有给药CAR T细胞而言得到提高,但是给药TMZ和由

编码IL13CAR-A2-P140KMGMT嵌合体的核酸序列转导的T细胞的动物具有最高的存活率(图6)。因此,本文涉及用于治疗诊断患有脑癌的受治者的方法,所述方法包括向受治者给药表达本文所述的IL13CAR-MGMT蛋白质的免疫细胞。

[0247] T细胞和/或化疗剂可使用任何合适的给药途径给药于个体。合适的给药途径的实例包括但不限于:颅内递送,髓内递送,皮内递送,肌肉内递送,腹膜内递送,眼内递送,静脉内递送,皮下递送,局部递送,口服和鼻内递送。

[0248] 一方面,所述方法还包括从所述个体获取一种或多种T细胞并且将本发明的嵌合核酸序列(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(E13KR109K) CAR-P140KMGMT)或其组合的核酸序列)引入至所述T细胞。自个体获取T细胞的方法是本领域已知的并且包括,例如,血浆分离术。在一些方面,CAR T细胞在实验室中生长(扩增),直至其数量,例如,为数十亿。扩增的CAR T细胞群随后可融合至患者体内。在融合之后,T细胞在患者体内繁殖并在其工程化受体的指导下识别并杀伤将抗原固定在其表面上的癌细胞。

[0249] 以治疗有效量(即,足以治疗疾病的量,例如,通过缓解与疾病有关的症状,预防或延缓疾病的发作,和/或减轻疾病症状的严重性或频率)给药表达本文所述的IL13CAR和突变的MGMT的宿主细胞。在治疗特定个体的失调或病症方面的治疗有效量取决于疾病的症状和严重性,并且可通过标准临床技术确定。此外,体外或体内分析可任选地用于帮助识别最优剂量范围。待在制剂中使用的精确剂量还取决于给药途径以及疾病或失调的严重性,并且应当根据执业医师的判断和每个患者的情况来决定。有效剂量可从剂量响应曲线进行外推得到,所述剂量响应曲线来自体外或动物模型测试系统。

[0250] 理想地,有效量或足够数量的分离的转染T细胞或修饰T细胞存在于组合物中并且被引入至受治者体内,从而建立长期、特异性、抗肿瘤的响应,以相对于不进行治疗的情况下减小肿瘤尺寸或消除肿瘤生长或再生长。理想地,在与不存在修饰的T细胞的相同条件相比,给药于受治者的修饰的T细胞的量使肿瘤尺寸减小10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,98%,或100%。

[0251] 因此,给药的修饰的T细胞的量应当考虑给药途径并且应当为引入足够数量的转导的T细胞以实现期望的治疗反应的量。而且,包括在本文所述的组合物中的每种活性药剂的量(例如,相对于待接触的每个细胞的量或相对于体重的量)可在不同的应用中而发生改变。总体而言,修饰的T细胞的浓度理想地应当足以在正在进行治疗的受治者体内提供约 1×10^6 个至约 1×10^9 个转导的T细胞,甚至更理想地,约 1×10^7 个至约 5×10^8 个转导T细胞,高于(例如,大于 5×10^8 个细胞)或低于(例如, 1×10^7 个细胞)上述任何合适的量也可使用。剂量方案可基于已为人知的基于细胞的疗法(参见,例如,Topalian and Rosenberg(1987) *Acta Haematol.* 78 Suppl 1:75-6;美国专利US4,690,915)或可使用可选的连续输注方案。

[0252] 实施例

[0253] 用于替莫唑胺-耐药性胶质母细胞瘤免疫疗法的IL13CAR-P140KMGMT

[0254] 实施例1.表达质粒构建

[0255] 如图1A和图1B的IL13(WT) CAR构建体举例说明的,将编码IL13(WT) CAR构建体的cDNA、编码IL13(E13Y) CAR构建体的cDNA和编码IL13(E13K.R109K) CAR构建体的cDNA插入MFG逆转录病毒载体的BamHI和NotI克隆位点,以生成宿主质粒IL13(WT) CAR-pMFG、IL13

(E13Y) CAR-pMFG和IL13 (E13K.R109K) CAR-pMFG质粒(参见,Kong et al., (Clin Cancer Res, 2012, 18 (21):5949-5960))。为了生成具有IL13CAR和P140K.MGMT cDNA序列的单顺反子转录子,通过Genscript USA (Piscataway, NJ) 合成具有5' NotI和3' EagI末端的2A-P140KMFG片段。将2.3Kb片段克隆至pUC57克隆载体,用于确定序列。一旦确定了序列,将en bloc转移至IL13CAR-pMFG逆转录病毒载体的3' NotI位点,从而生成IL13 (WT) CAR-2A-P140K.MGMT-pMFG、IL13 (E13Y) CAR-2A-P140K.MGMT-pMFG、和IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140K.MGMT-pMFG质粒中的每一个。图2A和图2B举例说明了IL13 (E13K.R109K) CAR和IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140K.MGMT构建体以及pMFG质粒构建体。

[0256] 实施例2. 逆转录病毒颗粒的产生

[0257] 使用“乒乓”方法生成下述MFG逆转录病毒颗粒,该MFG逆转录病毒颗粒包含编码实施例1所述的IL13 (E13K.R109K) CAR和IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMFG构建体的构建体。来自实施例1的每个宿主质粒首先被转染至phoenix-eco细胞以生成嗜亲性逆转录病毒。转染效率通过IL13表达的流式细胞术测量。保存培养物上清液并将其用于转导双嗜性编码病毒的小鼠成纤维细胞系PG13 (ATCC, Manassas, VA)。测试转导的PG13细胞的IL13并且通过荧光活化的细胞分类器富集IL13阳性细胞(图3A至图3B)。MGMT在IL13富集的细胞中的过表达还通过细胞溶解产物的western印迹分析测试(图3C)。

[0258] 如图3A和图3B所示,转导的细胞表达IL13并且被富集,从而大约97%的细胞表达IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMFG构建体。图3C进一步显示了P140KMFG在由IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMFG转染的细胞中的表达相对于在未转染的细胞或仅由IL13CAR构建体转染的细胞中的表达提高。

[0259] 富集的细胞在组织培养条件下扩增以收获含有高滴度编码CAR的双嗜性逆转录病毒的培养物上清液。

[0260] 实施例3. 人T细胞的基因修饰

[0261] 根据实施例2的方法生成的包含IL13 (E13K.R109K) CAR和IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMFG构建体的逆转录病毒颗粒用于转导人T细胞。从血液过滤器废弃物中分离人PBMC (Rhode Island Blood Center, Providence, RI)。在存在OKT3 (10 μ g/ml) 和IL2 (3000U/ml) 的条件下培养PBMC 36小时至48小时以富集T细胞群。在存在鱼精蛋白和IL2的条件下,在室温条件在重组人纤维蛋白片段包被的板中,采用含有培养物上清液的逆转录病毒离心转染富集的T细胞1小时。该步骤在随后的24小时内重复3次。3轮感染之后,使细胞在含有逆转录病毒的培养基中再生长24小时,随后转移至含有10%胎牛血清、抗生素和IL2的新鲜的RPMI-1640培养基中,用于进一步的实验。由IL13 (E13K.R109K) CAR (不含P140KMFG) 成功转导的T细胞和未转导的T细胞在全部实验中用作对照。如流式细胞术检测细胞表面上的IL13所测量的(数据未显示),由含有IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMFG构建体的逆转录病毒颗粒转染的大约20%至25%的T细胞对于IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMFG是阳性的。IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMFG的转导效率为约69.2%,其中,未转导的T细胞用作对照。

[0262] 实施例4. 转导的T细胞中的替莫唑胺耐药性

[0263] 由上文所述的IL13 (E13K.R109K) CAR(图1A) 或IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMFG(图2A) 转导的T细胞通过浓度增加的替莫唑胺(TMZ:0-1000 μ M) 分别孵育48小时。

每24小时更换培养基并且补充新鲜的TMZ。在用TMZ处理之后,通过台盼(Trypan)蓝排除法和Annexin V/7AAD染色法分析细胞的活力。通过流式细胞术测量Annexin V/7-AAD阴性细胞的频率,并且结果代表细胞活力。构建存活率曲线以外推活力和TMZ活性浓度。如图4所示,由IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT转导的T细胞在暴露于TMZ之后相对于IL13 (E13K.R109K) CAR转导的T细胞更好地存活。这个观察结果显示出:通过表达P140KMGMT的CAR对T细胞进行基因修饰会对修饰的T细胞产生化学保护。

[0264] 实施例5. IL13CAR-2A-P140KMGMT的功能特征

[0265] 转导的细胞的免疫调节功能也通过测量与胶质瘤细胞共培养时的转导的细胞分泌的细胞因子IL2和IFN γ 来分析。已被IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT逆转录病毒转导的T细胞在常规组织培养条件下(使用具有5%血清和IL2 (3000U/ml)的RPMI1640培养基和200 μ M TMZ)采用200 μ M TMZ或不采用200 μ M TMZ培养48小时至72小时。接下来,采用U251MG胶质瘤细胞培养细胞72小时(如本文关于U251MG共培养所描述的那样)。通过ELISA测试培养物上清液的细胞因子分泌。

[0266] 白介素-2 (IL2) 是T细胞活力和增殖的标记物,同时干扰素- γ (IFN γ) 是细胞毒性T细胞的功能的标记物。如图5A和图5B所示,转导的细胞在不存在TMZ或存在TMZ的条件下分泌IL2和IFN γ 这两者。而且,TMZ的存在不会显著降低转导细胞的细胞因子分泌。TMZ耐药性的T细胞能够在暴露于TMZ之后维持其正常的细胞毒性功能,这说明这些基因修饰确实使得这些细胞对TMZ诱导的白细胞减少性细胞毒性具有耐受性。

[0267] 实施例6. IL13CAR-2A-MGMT的体内效力

[0268] 在小鼠体内,使用如实施例2所述生成的病毒颗粒,测试IL13E13K.R109K-2A-P140KMGMT构建体的体内效力。向50只无胸腺裸鼠皮下(左侧)注射U251MG胶质瘤细胞(40只小鼠,I-IV组)或PBS(10只小鼠)。胶质瘤植入之后4天,三组小鼠(I组,II组和III组,10只小鼠/组)通过口服给药TMZ(通过口服管饲,64mg/kg/天)进行治疗持续4天。在胶质瘤植入后第5天,对已口服给药TMZ进行治疗的三组小鼠进行如下治疗:I组:肿瘤内注射IL13E13K.R109KCAR-2A-P140KMGMT构建体(TMZ耐药性);II组:肿瘤内注射不含MGMT的IL13IL13E13K.R109K构建体(TMZ敏感性);III组:仅采用PBS治疗(没有注射T细胞)。IV组没有接受T细胞治疗或TMZ治疗。监测小鼠可以看到的肿瘤尺寸、行为改变以及发病率,直至注射T细胞之后90天,这时根据IACUC限制的要求宰杀小鼠。

[0269] 根据小鼠实验结果绘制的存活率曲线显示,与由TMZ敏感性的不含MGMT的IL13 (E13K.R109K) CAR T细胞和TMZ治疗的II组动物的61天的中值存活期和14%的存活率相比,由IL13 (E13K.R109K) CAR-2A-P140KMGMT T细胞和TMZ治疗的带有肿瘤的小鼠(I组)具有73天的中值存活期和40%动物的存活率。没有接受治疗的带有肿瘤的小鼠(IV组)具有29天的中值存活期。没有接受T细胞只接受了口服TMZ治疗的III组带有肿瘤的动物表现出20%的存活率,但是也表现出仅36天的较低的中值存活期,这被认为是TMZ治疗的背景抗肿瘤效果(图9和图10)。该观察结果表明接受3G TMZ耐药性CAR的I组的动物在通过CAR免疫治疗和TMZ化疗的协同作用消除肿瘤方面最有效。

[0270] 本文引用的所有专利、公开申请和参考文献的教导的全部内容通过引用并入本文。

[0271] 虽然已参考本发明的实施方式对本发明进行了具体展示和描述,但是本领域技术

人员应当理解的是,在不背离所附的权利要求书涵盖的本发明的范围的条件下,可在形式和细节上作出各种不同的改变。

序列表

<110> 罗杰威廉姆斯医院 (Roger Williams Hospital)

<120> 治疗癌症的方法和组合物

<130> M12-7PN-KSYQ

<140> PCT/US2015/063267

<121> 一并提交

<150> US 62/086346

<151> 2014-12-02

<160> 49

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1848

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 1

```

ggatccgcca ccatgcatcc gtcctcaat cctctcctgt tggcactggg cctcatggcg 60
cttttgttga ccacggtcac tgctctcact tgccttggcg gctttgcctc cccaggecct 120
gtgcctccct ctacagccct caggagctc 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 acacaaaaat cgaggtggcc cagtttgtaa aggacctgct cttacattta 420
aagaaacttt ttcgcgaggg acagttcaac ctaggaagc ccaccacgac gccagcgccg 480
cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc tgtccctgcg cccagaggcg 540
tgccggccag cggcgggggg cgagtgac acgagggggc tggacttcgc ccaattgctc 600
tgctacctgc tggatggaat cctcttcac tatggtgtca ttctactgc cttgttctg 660
agagtgggta acttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg 720
aacatgactc cccgccgcc cgggccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca 780
cgcgacttcg cagcctatcg ctccacgcgt aagttcagca ggagcgcaga cgcccccgcg 840
taccagcagg gccagaacca gctctataac gagtcaatc 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 gcccttca tgcaggecct gcccctcgc 1140
taacagccag cggccgcaga gggcagagga agtcttctaa catgcggtga cgtggaggag 1200
aatccgggcc 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
 gtggggaaact attctggggg actggccgtg aaagaatggc tgctggctca cgagggacat 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> 合成构建体

<400> 2

ggatccgcca ccatgcatcc gctcctcaat cctctcctgt tggcactggg cctcatggcg 60
 cttttgttga ccacggteat tgctctcact tgcccttggcg gctttgcctc cccaggecct 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 cgaggtggcc cagtttgtaa aggacctgct cttacattta 420
 aagaaacttt ttcgcgaggg acagttcaac ctaggaagc ccaccacgac gccagcgccg 480
 cgaccacca caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc tgtccctgcg cccagaggcg 540
 tgccggccag cggcgggggg cgagtgac acgagggggc tggacttcgc ccaattgctc 600
 tgctacctgc tggatggaat cctcttcac tatggtgtca ttctcactgc cttgttctg 660
 agagtgggta acttctgggt gaggagtaag aggagcagc tcctgcacag tgactacatg 720
 aacatgactc cccgccgcc cgggccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca 780
 cgcgacttcg cagcctatcg ctccacgcgt aagtccagca ggagcgcaga cgcggcgcg 840
 taccagcagg gccagaacca gctctataac gagctcaatc taggacgaag agaggagtac 900
 gatgttttgg acaagagacg tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag 960
 aacctcagg aaggcctgta caatgaactg cagaaagata agatggcgga ggcctacagt 1020
 gagattggga tgaaaggcga gcgcccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt 1080
 ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac gcccttcaca tgcaggecct gcccctcgc 1140
 taacagccag cggccgcaga gggcagagga agtcttctaa catgcggtga cgtggaggag 1200
 aatccgggcc 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 aatttcccggt gcctgccctg caccatccag tgttccagca ggagagtttt 1500
 acaaggcagg tgctgtggaa gctgctgaaa gtggtgaagt tcggggaagt gatttcctac 1560
 cagcagctgg ctgctctggc tggaaacca aaagctgctc gggccgtggg aggagctatg 1620
 agaggcaatc cagtgaaaat cctgattccc tgccacaggg tgggtgttag ctccggagct 1680
 gtggggaaact attctggggg actggccgtg aaagaatggc tgctggctca cgaggacat 1740
 aggctgggaa agcctggcct gggaggggtct agtggactgg ctggagcttg gctgaaggga 1800
 gctggagcta cctcaggaag cccacctgcc ggccggaatt gacggccg 1848

<210> 3

<211> 1848

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

ggatccgcca ccatgcatcc gctcctcaat cctctcctgt tggcactggg cctcatggcg 60
 cttttgttga ccacggtcac tgctctcact tgcccttgcg gctttgcctc cccaggecct 120
 gtgcctccct ctacagccct caggaagctc attgaggagc tggtaacat caccagaac 180
 cagaaggctc cgctctgcaa tggcagcatg gatatggagca tcaacctgac agctggcatg 240
 tactgtgcag ccctggaatc cctgatcaac gtgtcaggct gcagtgccat cgagaagacc 300
 cagaggatgc tgagcggatt ctgcccgcac aaggtctcag ctgggcagtt ttccagcttg 360
 catgtccgag acacaaaaat cgagggtggc cagtttgtaa aggacctgct cttacattta 420
 aagaaacttt ttaaggaggg acagttcaac cctaggaagc ccaccacgac gccagcgccg 480
 cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc tgtccctgcg ccagaggcg 540
 tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac acgagggggc tggacttcgc ccaattgctc 600
 tgctacctgc tggatggaat cctcttcac tatggtgtca ttctcactgc cttgttcctg 660
 agagtgggta acttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg 720
 aacatgactc cccgccgccc cgggcccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca 780
 cgcgacttcg cagcctatcg ctccacgcgt aagttcagca ggagcgcaga cgcccccgcg 840
 taccagcagg gccagaacca gctctataac gagtcaatc taggacgaag agaggagtac 900
 gatgttttgg acaagagacg tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag 960
 aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg cagaaagata agatggcgga ggcctacagt 1020
 gagattggga tgaaaggcga gcgcccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt 1080
 ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac gcccttcaca tgcaggccct gccccctcgc 1140
 taacagccag cggccgcaga gggcagagga agtcttctaa catgcggtga cgtggaggag 1200
 aatcccggcc 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 aatttcccggt gcctgccctg caccatccag tgttccagca ggagagtttt 1500
acaaggcagg tgctgtggaa gctgctgaaa gtgggtgaagt tcggggaagt gatttcctac 1560
cagcagctgg ctgctctggc tggaaacceca aaagctgctc gggccgtggg aggagctatg 1620
agaggcaatc cagtgaatc cctgattccc tgccacaggg tgggtgtgtag ctccggagct 1680
gtgggggaact attctggggg actggccgtg aaagaatggc tgctggctca cgagggacat 1740
aggctgggaa agcctggcct gggagggtct agtggactgg ctggagcttg gctgaaggga 1800
gctggagcta cctcaggaag cccacctgcc ggccggaatt gacggccg 1848

<210> 4

<211> 606

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<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
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
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
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
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
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> 合成构建体		
<400> 5		
Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala		
1	5	10
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
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	

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
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
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> 合成构建体

<400> 7

ggatcc 6

<210> 8

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

gccacc 6

<210> 9
<211> 96
<212> DNA
<213> 智人
<400> 9
atgcatccgc tcctcaatcc tctcctgttg gcaactgggccc tcattggcgct tttgttgacc 60
acgggtcattg ctctcacttg ccttggcggc tttgcc 96
<210> 10
<211> 342
<212> DNA
<213> 智人
<400> 10
tccccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctcagggagc tcattgagga gctgggtcaac 60
atcaccacaga accagaaggc tccgctctgc aatggcagca tggatatggag catcaacctg 120
acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc 180
atcgagaaga cccagaggat gctgagcgga ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag 240
ttttccagct tgcattgtccg agacacacaaa atcgaggtgg cccagtttgt aaaggacctg 300
ctcttacatt taaagaaact ttttcgcgag ggacagttca ac 342
<210> 11
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 11
cctagg 6
<210> 12
<211> 135
<212> DNA
<213> 智人
<400> 12
aagcccacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcccacat cgcgtcgag 60
cccctgtccc tgcgcccaga ggcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg 120
gggctggact tcgcc 135
<210> 13
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成构建体

<400> 13

caattg 6

<210> 14

<211> 69

<212> DNA

<213> 智人

<400> 14

ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc atctatgggtg tcattctcac tgccttggtc 60

ctgagagtg 69

<210> 15

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 15

gttaac 6

<210> 16

<211> 132

<212> DNA

<213> 智人

<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> 合成构建体

<400> 17

acgcgt 6

<210> 18

<211> 330

<212> DNA

<213> 智人

<400> 18

aagttcagca ggagcgcaga cgccccgcg 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

<400> 19

taa 3

<210> 20

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 20

cagccagcgg ccgca 15

<210> 21

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 21

gagggcagag gaagtcttct aacatgcggt gacgtggagg agaatcccgg ccct 54

<210> 22

<211> 621

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 22

atggacaaag attgcgagat gaagcggacc aacttgact 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 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
agccccacctg ccggccggaa t 621

<210> 23

<211> 3

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 23

tga 3

<210> 24

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 24

cggccg 6

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<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

<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

<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

<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

<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

<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
65 70 75 80
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> 合成构建体

<400> 31

Gln Pro Ala Ala Ala

1 5

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<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> 合成构建体

<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> 合成构建体

<400> 34

```
tccccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctcaggtacc tcattgagga gctggtcaac 60
atcaccacaga accagaaggc tccgctctgc aatggcagca tggataggag catcaacctg 120
acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc 180
atcgagaaga cccagaggat gctgagcgga ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag 240
ttttccagct tgcattgtccg agacacacaaa atcgaggtgg cccagtttgt aaaggacctg 300
ctcttacatt taaagaaact ttttcgcgag ggacagttca ac 342
```

<210> 35

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 35

```
tccccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctcaggaagc tcattgagga gctggtcaac 60
atcaccacaga accagaaggc tccgctctgc aatggcagca tggataggag catcaacctg 120
acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc 180
atcgagaaga cccagaggat gctgagcgga ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag 240
ttttccagct tgcattgtccg agacacacaaa atcgaggtgg cccagtttgt aaaggacctg 300
ctcttacatt taaagaaact ttttaaggag ggacagttca ac 342
```

<210> 36

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<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
```


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
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
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> 合成构建体

<400> 39

Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu		
1	5	10
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 His Gly	Gly Val Gly Asn	His Ser Ser
145	150	155	160
Gly Val 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> 40			
<211> 207			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 40			
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 Tyr Ser Ser Gly Gly Val Gly Asn Phe Ser Gly		
145	150	155
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> 合成构建体		
<400> 41		
Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu		
1	5	10
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
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
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> 合成构建体					
<400> 42					
ccatgg 6					
<210> 43					
<211> 238					
<212> PRT					
<213> 智人					
<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					
<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
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
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> 合成构建体		
<400> 45		
Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala		
1	5	10
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> 合成构建体

<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
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
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
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> 合成构建体

<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> 合成构建体

<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 cgttacttc catcagcctg aagccatcga ggaatttccc 240
gtgcctgccc tgcaccatcc agtggtccag caggagagtt ttacaaggca ggtgctgtgg 300
aagctgctga aagtggtgaa gttcggggaa gtgatttctt accagcagct ggctgctctg 360
gctggaaacc caaaagctgc tcgggccgtg ggaggagcta tgagaggcaa tccagtgcc 420
atcctgattc cctgccacag ggtggtgtgt agctccggag ctgtggggaa ctattctggg 480
ggactggccg tgaaagaatg gctgctggct cagcaggac ataggctggg aaagcctggc 540
ctgggagggg ctagtggact ggctggagct tggctgaagg gagctggagc tacctcagga 600
agccacctg ccggccggaa t 621
```

<210> 49

<211> 207

<212> PRT

<213> 智人

<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
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

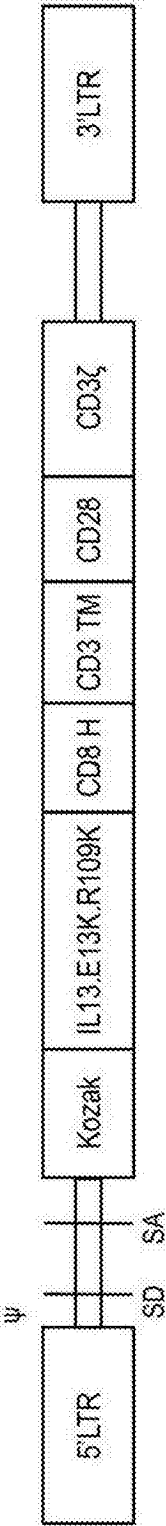


图1A

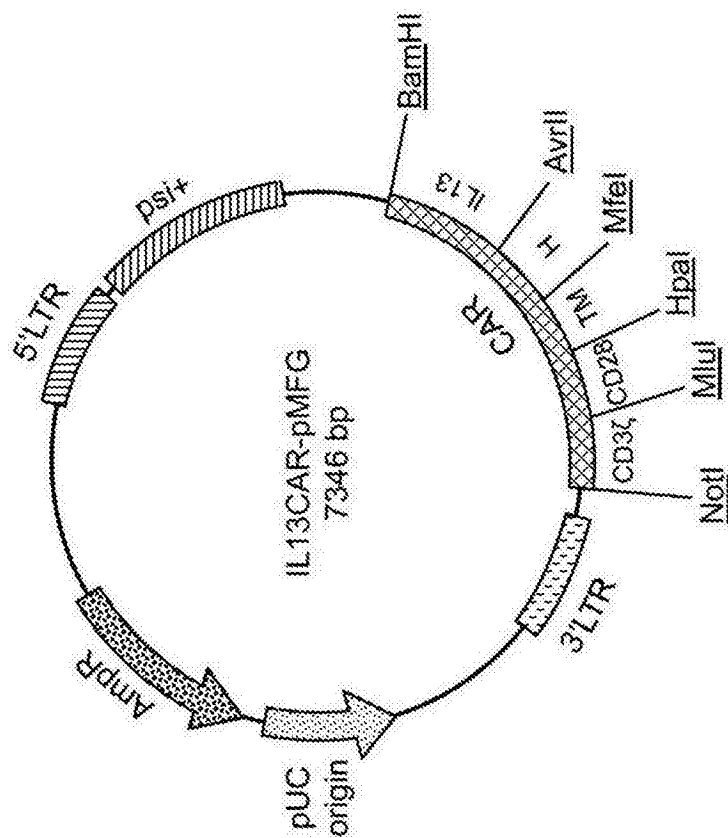


图1B

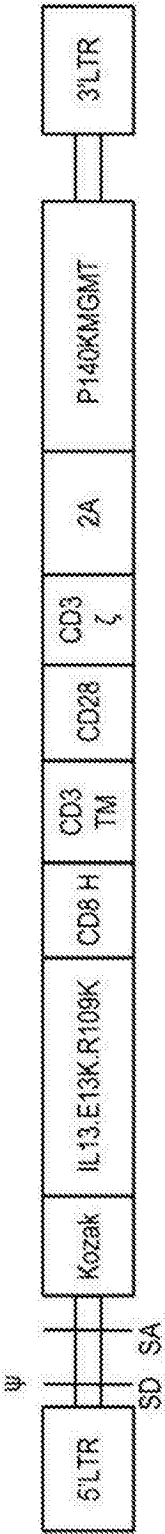


图2A

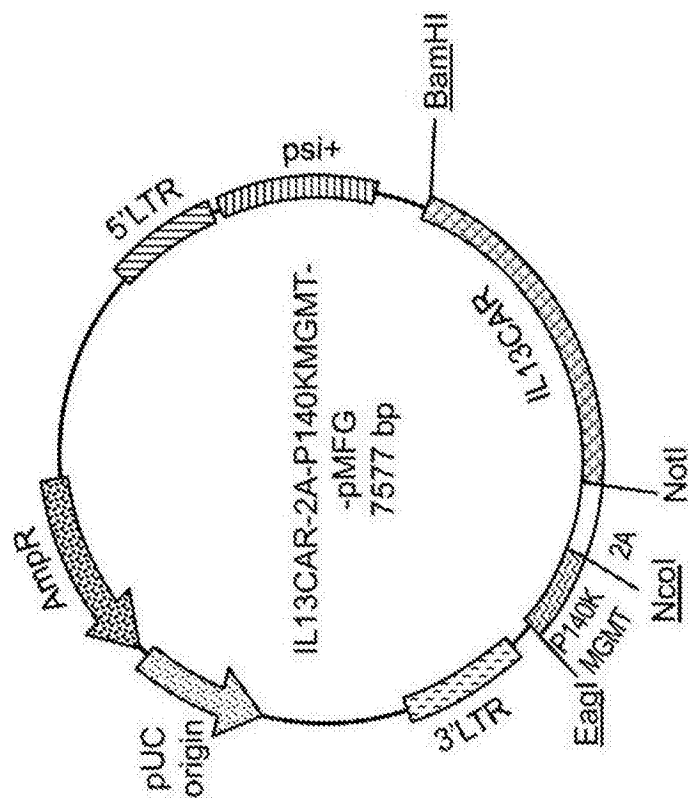


图2B

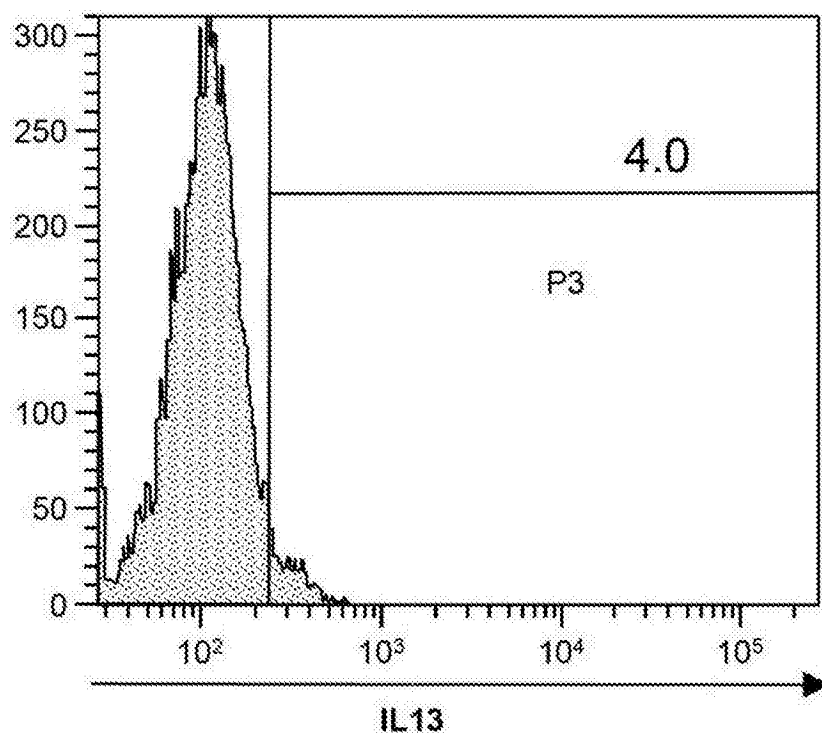


图3A

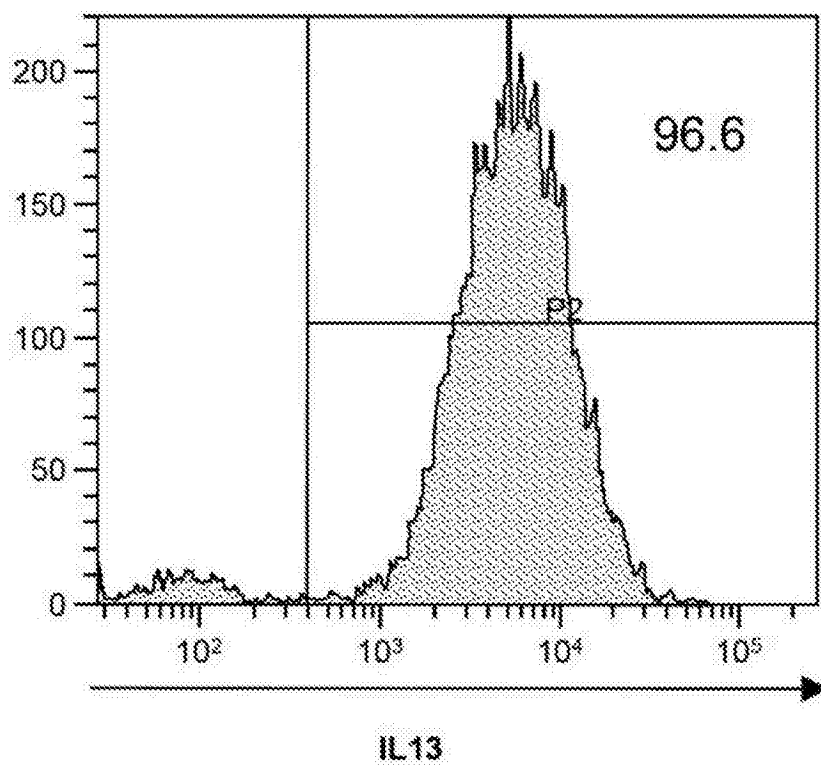


图3B

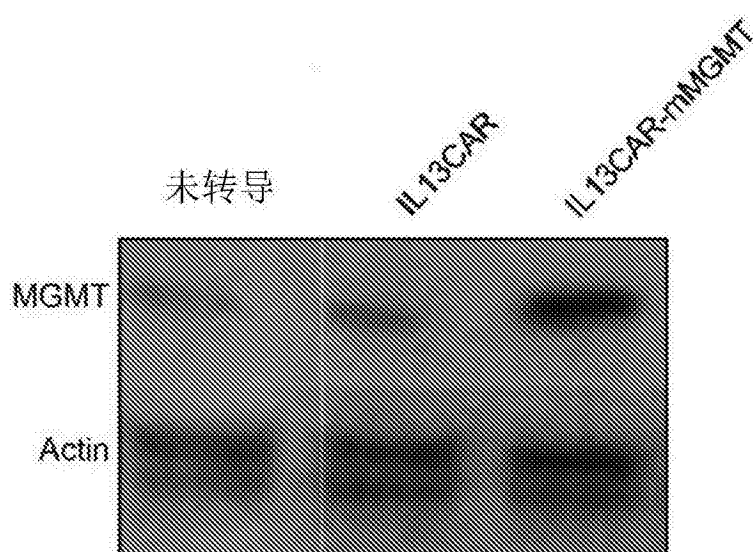


图3C

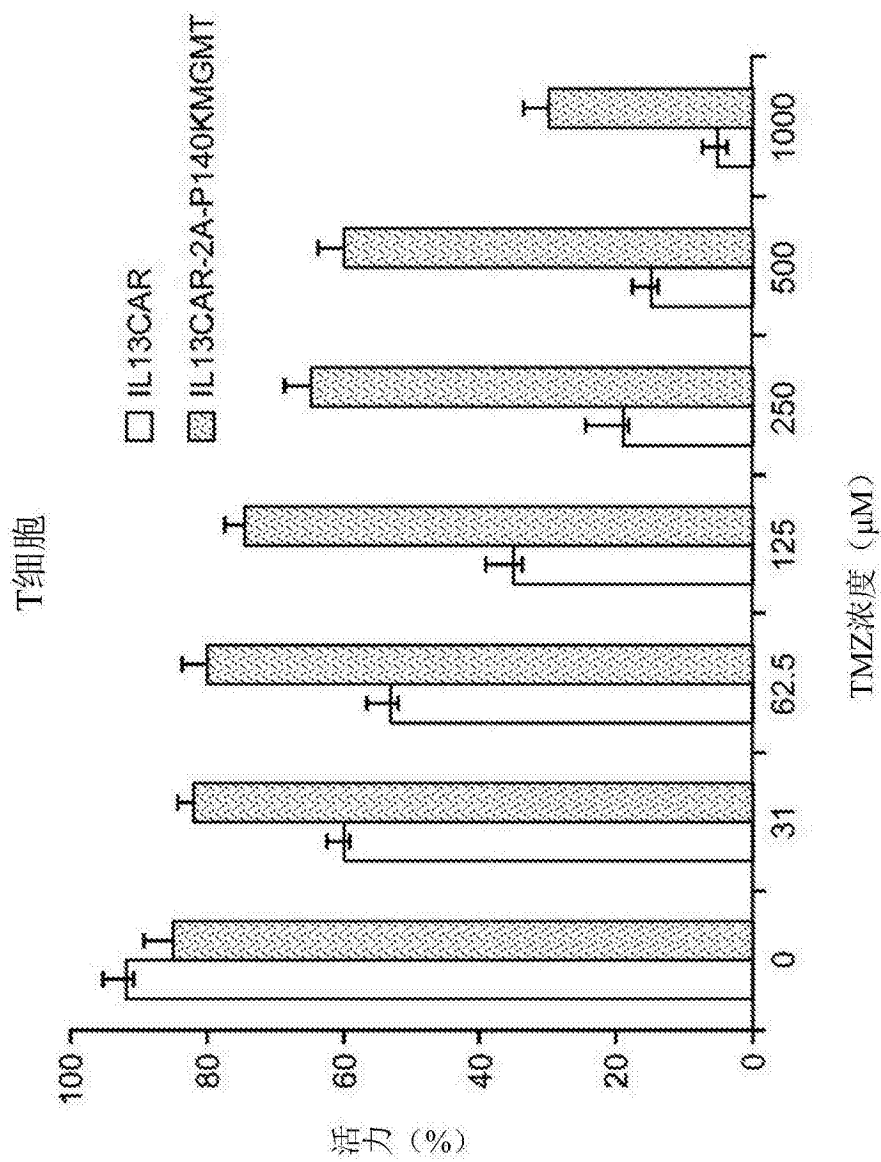


图4

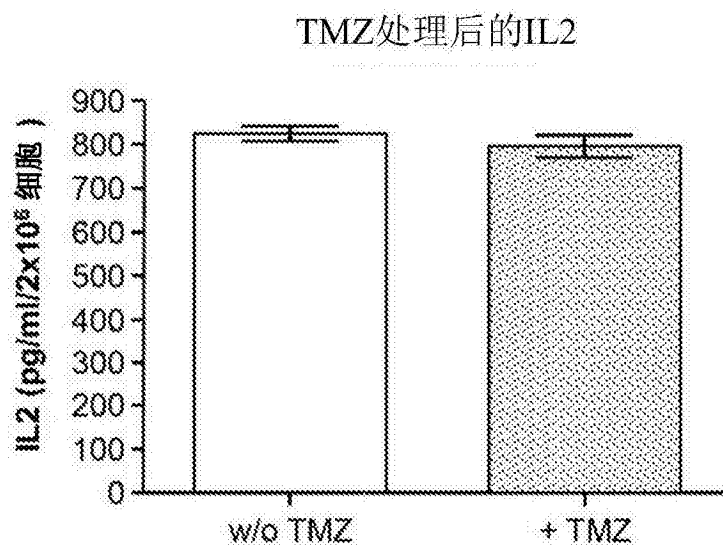


图5A

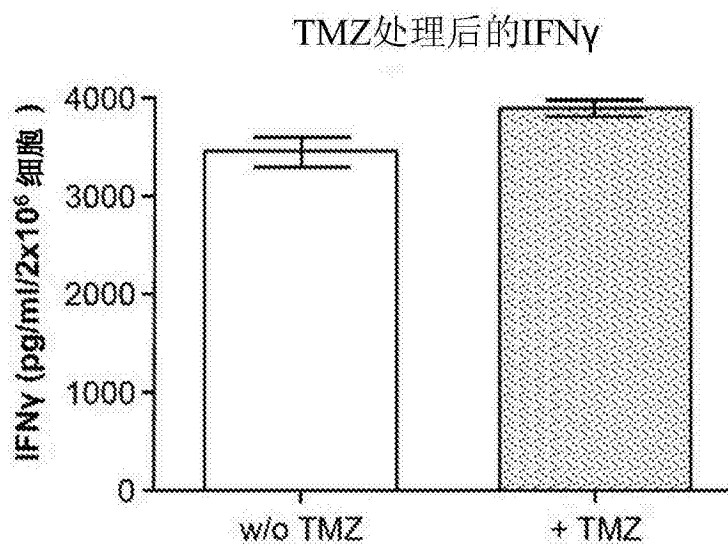


图5B

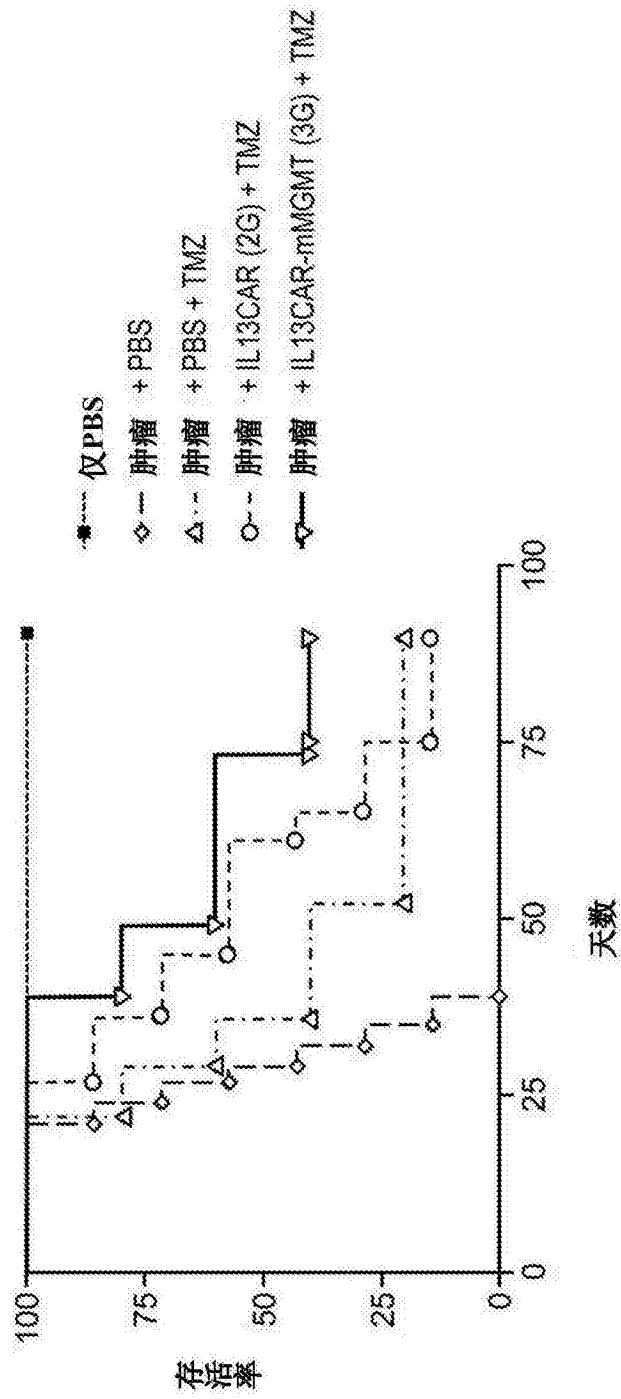


图6

IL13CAR-P140KMGMT的DNA序列 SEQ ID NO:1

GGA TCC	GCC ACC	ATG	CAT CCG CTC CTC AAT CCT CTC CTG TTG GCA	信号
CTG GGC CTC ATG GCG CTT	TTG TTG ACC ACG GTC ATT GCT CTC ACT			
TGC CTT GGC GGC TTT GCG	TCC CCA GGC CCT GTG CCT CCC TCT ACA			
GCC CTC AGG GAG CTC ATT GAG GAG CTG GTC AAC ATC ACC CAG AAC				
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				
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			
ATT CTC ACT GCC TTG TTC CTG AGA GTG	GTT AAC	TTC TGG GTG AGG AGT		
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				
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				
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 CCG 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				
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			

信号

IL13(WT)

铰链

TM

CD28

CD3ζ

A2

P140K
MGMT

图7A

IL13CAR-P140KMGMT的肽序列 SEQ ID NO:4

MHPLLNPLLLALGLMALLTTVIALTCLGGFA	SPGPVPPSTALRELIEELVNITONQKAPL	IL13			
CNGSMVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRM LSGFCPHKVSAGQFSSLHVR					
DTKIEVAQFVKDLLHLKKLFREGQFN	PRKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC	铰链			
RPAAGGAVHTRGLDFAQL	LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV	VMFWVRSKRSRLLHSDYM	TW/CD28		
NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	TRKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLR		CD3ζ		
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGK					
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	STOP	QPAAA	EGRGSLTTCGDVEENPGP	M	A2
DKDCMKRTTLDSP LGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPL					P140K
MQCTAWLNAYFHQPEAIEFFVPALHHPVFQQESFTRQVLWKLLKVVKFGEVISYQQL					MGMT
AALAGNPKAARAVGGAMRGNPV	K	LIPCHRVVCSSGAVGNYSGLAVKEWLLAHEGH			
RLGKPGLGGSSGLAGAWLKGAGATSGSP	PAGRN	STOP			

图7B

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

GGA TCC GCC ACC ATG CAT CCG CTC CTC AAT CCT CTC CTG TTG GCA	信号
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	铰链
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	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 CCG ACC ACA CTG GAC TCC CCC	P140KMGMT
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	

图8A

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

MHPLLNP LLLALGLMALLTTVIALTCLGGFA	SPGPVPPSTALRYLIEELVNITQNKAPL	IL13	
CNGSMVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRM LSGFCPHKVSAGQFSSLHVR		(E13y)	
DTKIEVAQFVKD LLLHLKKLFREGQFN	PR KPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC	铰链	
RPAAGGAVHTRGLDFA	QL LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV	VN FWVRSKRSRLLHSDYM	TM/CD28
NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	TR KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR		CD3ζ
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGK			
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	STOP QP AAA EGRGSLT CGDVEENPGP	M	A2
DKDCMKRTTLDSP LGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPL			P140K
MQCTAWLNAYFHQPEAIEEFVPALHHPVFQQESFTRQVLWKLKVKVKGFEVISYQQL			MGMT
AALAGNPKAARAVGGAMRGNPV	K ILIPCHRVVCSGAVGNYSGLAVKEWLLAHEGH		
RLGKPG LGGSSGLAGAWLKGAGATSGSP	PAGRN STOP		

图8B

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

GGA TCC GCC ACC ATG CAT CCG CTC CTC AAT CCT CTC CTG TTG GCA	信号
CTG GGC CTC ATG GCG CTT TTG TTG ACC ACG GTC ATT GCT CTC ACT	
TGC CTT GGC GGC TTT GCG 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
CAG AAG GCT CCG CTC TGC AAT GGC AGC ATG GTA TGG AGC ATC AAC	(E13K R109K)
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	铰链
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 GCG	
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 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
CTG GGC AAA CTG GAG CTG TCT GGC TGT GAA CAG GGG CTG CAC GAG ATC	MGMT
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 CCG CCG	

图9A

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

MHPLLNP LLLALGLMALLTTVIALTCLGGFA	SPGPVPPSTALRKIEELVNITQNQKAPL	IL13
CNGSMVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQRM	LSGFQPHKVSAGQFSSLHVR	(E13K R109K)
DTKIEVAQFVKDLLHLKFLKEGQFN	PRIKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC	铰链
RPAAGGAVHTRGLDFA	QLLCYLLDGILFIYGVILTALFLRV	VNFWVRSKRSRLLHSDYM
NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	TRIKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR	CD3ζ
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK		
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	STOPQF AAAEGRGSLLTCGDVEENPGP	M A2
DKDCMKRTTLDSP LGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPL		P140K
MQCTAWLNAYFHQPEAIEEFVPALHHPVFQQESFTRQVLWKLKVVKFGEVISYQQL		MGMT
AALAGNPKAARAVGGAMRGNPV	KILIPCHRVCSSGAVGNYSGLAVKEWLLAHEGH	
RLGKPGLGSSGLAGAWLKGAGATSGSPAGRN	STOP	

图9B