



(21) 申请号 201810972316.5

A61K 35/768 (2015.01)

(22) 申请日 2018.08.24

A61P 35/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G07K 19/00 (2006.01)

申请公布号 CN 110856751 A

C12N 15/62 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.03.03

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

(73) 专利权人 杭州康万达医药科技有限公司

(56) 对比文件

地址 311121 浙江省杭州市余杭区仓前街道余杭塘路2959号4幢7层

WO 2017177204 A1, 2017.10.12

(72) 发明人 胡放 侯亚非 绳纪坡 谭贤魁

骆菲菲等. 基于肿瘤抗原特异性的T细胞免疫治疗. 生命科学. 2017, 第29卷(第9期), 第818页第3-4节, 第820页第6节.

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

王莉等. ER滞留信号肽对外源CTL表位进入胞内MHC-I类抗原呈递途径的促进作用. 免疫学杂志. 2006, 第22卷(第5期), 摘要.

专利代理师 王静 丁业平

王莉等. ER滞留信号肽对外源CTL表位进入胞内MHC-I类抗原呈递途径的促进作用. 免疫学杂志. 2006, 第22卷(第5期), 摘要.

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 35/761 (2015.01)

A61K 35/763 (2015.01)

审查员 赵文莉

权利要求书3页 说明书48页

序列表33页 附图17页

(54) 发明名称

包含核酸及TCR修饰的免疫细胞的治疗剂及其应用

(57) 摘要

涉及包含核酸及TCR修饰的免疫细胞的治疗剂及其应用。所述治疗剂包含含有第一活性成分的第一组合物和含有第二活性成分的第二组合物；该第一活性成分包括或含有用于导入肿瘤细胞和/或癌细胞的、具有标记性多肽编码序列的核酸；所述标记性多肽具有一个或多个抗原表位多肽的氨基酸序列，所述抗原表位多肽能够被MHC I类分子提呈在所述肿瘤细胞和/或癌细胞表面；该第二组合物包含位于第二可药用载体中的第二活性成分，该第二活性成分包含T细胞受体修饰的免疫细胞；所述的T细胞受体修饰的免疫细胞能够特异性识别并结合被所述MHC I类分子提呈的所述抗原表位多肽。本发明实现了协同治疗效果，为肿瘤治疗提供了一个新的途径。

1. 一种用于治疗肿瘤的治疗剂,包含:

(a) 第一组合物,其中该第一组合物包含位于第一可药用载体中的第一活性成分,该第一活性成分含有用于导入肿瘤细胞的、具有标记性多肽编码序列的核酸;所述标记性多肽具有4-8个相同的抗原表位多肽的氨基酸序列,所述抗原表位多肽能够被MHC I类分子提呈在所述肿瘤细胞表面,并且所述抗原表位多肽的氨基酸序列来源于肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原的氨基酸序列;和

(b) 第二组合物,其中该第二组合物包含位于第二可药用载体中的第二活性成分,该第二活性成分包含T细胞受体修饰的T细胞;所述的T细胞受体修饰的T细胞能够特异性识别并结合被所述MHC I类分子提呈的所述抗原表位多肽;

其中所述抗原表位多肽为氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的Her2/neu 369-377,并且所述核酸还具有HLA-A2蛋白编码序列。

2. 根据权利要求1所述的治疗剂,其中所述标记性多肽包括可操作地连接的、依次串联的以下氨基酸序列:N端信号肽的氨基酸序列、所述4-8个相同的抗原表位多肽的氨基酸序列,其中每两个相邻的所述抗原表位多肽的氨基酸序列之间由可切割性连接多肽的氨基酸序列连接。

3. 根据权利要求2所述的治疗剂,其中所述标记性多肽还包括C端内质网滞留信号的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1所述的治疗剂,其中所述HLA-A2蛋白编码序列与所述标记性多肽编码序列分别在各自的启动子控制之下,或者该HLA-A2蛋白编码序列与所述标记性多肽编码序列在同一启动子控制之下并且该HLA-A2蛋白编码序列通过可切割性连接多肽编码序列与所述标记性多肽编码序列可操作地连接。

5. 根据权利要求1所述的治疗剂,其中所述HLA-A2的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示。

6. 根据权利要求1所述的治疗剂,其中所述第一组合物和所述第二组合物各自独立地存在于所述治疗剂中而互不混合。

7. 根据权利要求1所述的治疗剂,其中所述核酸包括DNA或RNA;所述RNA包括由所述DNA转录的mRNA。

8. 根据权利要求1所述的治疗剂,其中所述第一活性成分为重组病毒,所述重组病毒的基因组具有所述标记性多肽编码序列;其中,所述重组病毒包括选择复制型重组溶瘤病毒或复制缺陷型重组病毒。

9. 根据权利要求8所述的治疗剂,其中所述复制缺陷型重组病毒来源于腺病毒、腺病毒相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒、痘病毒、流感病毒、甲病毒(Alphavirus)、或仙台病毒。

10. 根据权利要求8所述的治疗剂,其中所述复制缺陷型重组病毒为对5型腺病毒进行基因改造而得到的重组腺病毒,该重组腺病毒的基因组中缺失了E1基因,并且在所缺失的E1基因的位置包含所述标记性多肽编码序列。

11. 根据权利要求10所述的治疗剂,其中所述重组腺病毒在所缺失的E1基因的位置包含所述HLA-A2蛋白编码序列。

12. 根据权利要求8所述的治疗剂,其中所述选择复制型重组溶瘤病毒来源于具有溶瘤作用的经基因突变的病毒和具有溶瘤作用的野生型病毒。

13. 根据权利要求8所述的治疗剂,其中所述选择复制型重组溶瘤病毒来源于具有溶瘤

作用的腺病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、塞姆利基森林病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、逆转录病毒、呼肠孤病毒、塞内卡谷病毒、埃可型肠道病毒、柯萨奇病毒、新城疫病毒和马拉巴病毒。

14. 根据权利要求8所述的治疗剂,其中所述选择复制型重组溶瘤病毒为对5型腺病毒进行基因改造而得到的重组溶瘤腺病毒,该重组溶瘤腺病毒的基因组中缺失了E1B-55K基因和/或E1B-19K基因,并且所述重组溶瘤腺病毒的基因组中包含E1A基因编码序列。

15. 根据权利要求14所述的治疗剂,其中所述E1A基因编码序列是在外源启动子控制下的。

16. 根据权利要求8所述的治疗剂,其中所述选择复制型重组溶瘤病毒为对5型腺病毒进行基因改造而得到的重组溶瘤腺病毒,该重组溶瘤腺病毒的E1A基因被改变为使得所表达的E1A蛋白无法与pRb蛋白结合。

17. 根据权利要求16所述的治疗剂,其中所述E1A基因是在外源启动子控制下的。

18. 根据权利要求14或16所述的治疗剂,其中所述重组溶瘤腺病毒的E3基因全部或部分缺失。

19. 根据权利要求1所述的治疗剂,其中所述T细胞包括原始T细胞或NKT细胞。

20. 根据权利要求7所述的治疗剂,其中所述第一组合物包含治疗有效量的所述DNA、或治疗有效量的所述mRNA。

21. 根据权利要求8所述的治疗剂,其中所述第一组合物包含治疗有效量的所述重组病毒。

22. 根据权利要求1所述的治疗剂,其中所述第二组合物包含治疗有效量的所述的T细胞受体修饰的T细胞。

23. 根据权利要求1所述的治疗剂,其中所述治疗剂由所述第一组合物和所述第二组合物组成。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的治疗剂在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

25. 根据权利要求24所述的用途,其中所述肿瘤包括:乳腺癌,头颈部肿瘤,滑膜癌,肾癌,结缔组织癌,黑色素瘤,肺癌,食管癌,结肠癌,直肠癌,脑癌,肝癌,骨癌,绒毛膜癌,胃泌素瘤,嗜铬细胞瘤,催乳素瘤,肛门癌,胆管癌,膀胱癌,输尿管癌,神经胶质瘤,神经母细胞瘤,脑膜瘤,脊髓肿瘤,骨软骨瘤,软骨肉瘤,尤文氏肉瘤,原发部位不明癌,类癌,宫颈癌,胆囊癌,眼癌,前列腺癌,睾丸癌,皮肤鳞状细胞癌,间皮瘤,多尖端骨髓瘤,卵巢癌,胰腺内分泌瘤,胰高血糖素瘤,胰腺癌,阴茎癌,软组织肉瘤,视网膜母细胞瘤,小肠癌,胃癌,胸腺癌,滋养细胞癌,葡萄胎,子宫内膜癌,阴道癌,外阴癌,蕈样真菌病,胰岛素瘤,心脏癌,脑膜癌,血液癌,腹膜癌和胸膜癌。

26. 根据权利要求25所述的用途,其中所述脑癌为垂体癌;所述软组织肉瘤为纤维肉瘤或卡波西氏肉瘤;所述乳腺癌为佩吉特病。

27. 一种用于治疗肿瘤的具有协同作用的联合药物的药盒,包括:

第一容器,该第一容器装有根据权利要求1-23中任一项所述的治疗剂中的第一组合物;

第二容器,该第二容器装有根据权利要求1-23中任一项所述的治疗剂中的第二组合物,其中所述第一容器和所述第二容器是独立的;以及

载明给药时机和给药方式的说明书。

28. 根据权利要求27所述的药盒在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

29. 根据权利要求28所述的用途,其中所述肿瘤包括:乳腺癌,头颈部肿瘤,滑膜癌,肾癌,结缔组织癌,黑色素瘤,肺癌,食管癌,结肠癌,直肠癌,脑癌,肝癌,骨癌,绒毛膜癌,胃泌素瘤,嗜铬细胞瘤,催乳素瘤,肛门癌,胆管癌,膀胱癌,输尿管癌,神经胶质瘤,神经母细胞瘤,脑膜瘤,脊髓肿瘤,骨软骨瘤,软骨肉瘤,尤文氏肉瘤,原发部位不明癌,类癌,宫颈癌,胆囊癌,眼癌,前列腺癌,睾丸癌,皮肤鳞状细胞癌,间皮瘤,多尖端骨髓瘤,卵巢癌,胰腺内分泌瘤,胰高血糖素瘤,胰腺癌,阴茎癌,软组织肉瘤,视网膜母细胞瘤,小肠癌,胃癌,胸腺癌,滋养细胞癌,葡萄胎,子宫内膜癌,阴道癌,外阴癌,蕈样真菌病,胰岛素瘤,心脏癌,脑膜癌,血液癌,腹膜癌和胸膜癌。

30. 根据权利要求29所述的用途,其中所述脑癌为垂体癌;所述软组织肉瘤为纤维肉瘤或卡波西氏肉瘤;所述乳腺癌为佩吉特病。

包含核酸及TCR修饰的免疫细胞的治疗剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体而言,涉及包含核酸及TCR修饰的免疫细胞的治疗剂、标记性多肽、编码核酸、表达载体、溶瘤病毒、药盒及其应用。

背景技术

[0002] 随着针对CTLA-4和PD-1/PD-L1等免疫检查点抑制剂在临床试验中表现出显著的抗肿瘤疗效(参见文献“Cancer Cell 27,450-461(2015)”),以及以CAR-T(嵌合抗原受体-T细胞)为代表的过继T细胞疗法对B细胞型血液肿瘤所表现出的长期有效的治疗效果(参见文献“N Engl J Med 2017;377:2545-2554”),肿瘤免疫治疗已成为最具发展前景的领域之一,可望把恶性肿瘤转化成为可控制的慢性疾病,甚至可以治愈某些晚期癌症。肿瘤免疫治疗主要是通过激发内源的抗肿瘤T细胞功能,或过继转输体外培养的肿瘤特异性T细胞,以达到杀伤和清除体内癌细胞的疗效。早期的肿瘤疫苗是靶向来源于自身蛋白的肿瘤相关抗原(TAA),试图在体内诱导出特异性的抗肿瘤免疫反应,但大部分相关的临床试验均未成功(参见文献“Nat Rev Clin Oncol.2014Nov;11(11):630-2.”)。一个主要原因是针对这些肿瘤相关抗原的高亲和性T细胞在发育和分化过程中多数被胸腺的中枢耐受机制所清除,肿瘤疫苗即使在很强的佐剂帮助下,例如用成熟的树突状细胞提呈抗原,在体内所诱导出的特异性T细胞大多为不能识别肿瘤细胞的低亲和性T细胞(参见文献“J Immunol.2008Feb

[0003] 01;180(3):1526-34”)。为了克服这个障碍,靶向来源于基因突变的肿瘤新生抗原(neoantigen)个体化疫苗的开发是一个发展趋势,并在临床试验中看到初步疗效,但需要更多的临床试验进一步验证这类肿瘤疫苗的疗效(参见文献“Nat Rev Drug Discov.2018May30;17(6):393”;“Front Immunol.2017;8:1848”)。肿瘤免疫治疗的另外一个障碍是肿瘤在发生和发展过程中产生的免疫抑制微环境,肿瘤微环境(TME)对特异性T细胞的分化和增殖以及抗肿瘤功能产生较强的抑制作用(参见文献“Curr Opin Immunol.2016Apr;39:1-6”)。

[0004] 针对这些问题,一个有效的治疗策略是过继转输在体外获得的、可以有效识别肿瘤抗原的T细胞。这些T细胞来源于肿瘤组织的浸润T淋巴细胞(TILs),也可以是经抗原特异性T细胞受体(TCR)基因修饰后,能有效识别肿瘤抗原的外周血T细胞(TCR-T)。体外培养避免了肿瘤组织的抑制微环境并提供优化的培养条件,可以获得足够数量的抗肿瘤T细胞用于过继转输治疗(参见文献“Adv Immunol.2016;130:279-94”)。过继T细胞治疗包括基于嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor)的CAR-T疗法以及基于T细胞受体的TCR-T疗法。CAR-T主要靶向细胞表面表达的肿瘤抗原,尽管所识别的肿瘤抗原数量有限,靶向CD19的CAR-T针对血液肿瘤包括B细胞型白血病和淋巴瘤表现出了显著的临床疗效,并有产品获得FDA批准上市(参见文献“N Engl J Med.2017Oct 05;377(14):1313-1315”)。对于实体瘤的治疗,CAR-T尚未看到明确的临床疗效。TCR-T主要靶向被人类主要组织相容性抗原HLA分子所提呈的多肽抗原,表位多肽可以来源于细胞内蛋白以及细胞膜表面蛋白,靶抗原种类及数量大大多于CAR-T所识别的肿瘤抗原(参见文献“Int Immunol.201607;28(7):349-53”)。

TCR-T疗法被认为是针对实体瘤最具前景的免疫细胞基因疗法(参见文献“*Adv Immunol.* 2016;130:279-94”)。靶向NY-ESO-1抗原的TCR-T治疗实体肿瘤也在临床二期试验中看到明确的疗效(参见文献“*Front Immunol.* 2018;9:947”)。Her2/neu蛋白在多种上皮来源的癌细胞中过度表达,如乳腺癌,胃癌,大肠癌,卵巢癌,胰腺癌,肺癌,食管癌,膀胱癌,肾癌等(参见文献“*Trends in Molecular Med.* 2013;19:677”),使得Her2/neu成为免疫治疗的一个适当靶点。特异性识别Her2/neu抗原表位多肽(epitope peptide)369-377的T细胞可以从Her2/neu高表达的卵巢癌腹水中成功分离(参见文献“*J. Exp. Med.* 1995;181:2109-2117”)。靶向Her2/neu369-377多肽抗原的肿瘤疫苗进入临床试验,但临床三期却没达到延长病人生存期的预定目标(<http://www.onclive.com/web-exclusives/phase-iii-nelipepimuts-study-in-breast-cancer-halted-after-futility-review>)。过继转输经体外培养的、靶向Her2/neu抗原的CAR-T细胞作为第一个治疗实体瘤的CAR-T疗法进入临床试验,但由于产生强烈的细胞因子风暴(cytokine release syndrome, CRS)导致病人死亡而被终止(参见文献“*Nature Med.* 2016;22:26”)。严重的细胞因子风暴以及神经毒性是CAR-T治疗中常见的毒性反应(参见文献“*Blood.* 2016;127:3321”)。目前临床试验中的TCR-T疗法尚未出现如CAR-T疗法中所表现出的严重的细胞因子风暴毒性,靶向Her2/neu抗原的TCR-T治疗实体瘤可能会避免严重的细胞因子风暴。Her2/neu属于来自自身蛋白的肿瘤相关抗原,识别这类抗原的T细胞大多数被中枢耐受选择机制所清除,因此,从外周血中获得特异性识别肿瘤细胞的天然T细胞十分困难,所诱导的多肽特异性T细胞常常不能有效识别肿瘤细胞表面低水平表达的肿瘤相关抗原(参见文献“*Cancer Res.* 1998;58(21):4902-8”)。为了获得用于制备TCR-T并能有效识别肿瘤细胞的TCR,一般通过对TCR上的互补性决定区(complementarity determining regions, CDRs)进行基因点突变,或者通过从未经过中枢耐受机制筛选的人源化小鼠T细胞库中进行诱导以获得高亲和性的抗原特异性TCR(参见文献“*Front Immunol.* 2013;4:363”)。然而,基于这种策略所获得的高亲和性TCR所制备的TCR-T,在临床试验中产生了针对正常组织细胞的严重脱靶毒性反应(参见文献“*Sci Rep.* 2016 Jan 13;6:18851”)。另外,TCR-T所识别的靶点是细胞表面的HLA分子, β_2 -微球蛋白(beta2-Microglobulin)以及抗原多肽所形成的抗原复合物(其中HLA蛋白和 β_2 -微球蛋白配对形成MHC I类分子)。TCR-T的抗原识别能力不仅受HLA分子的限制,还与肿瘤细胞中HLA分子和肿瘤抗原的表达量,以及HLA抗原多肽提呈途径的完整性密切相关。然而肿瘤在发生发展过程常常发生肿瘤细胞的HLA分子表达量降低,或者胞浆中的HLA抗原提呈途径中相关分子的功能缺失,从而导致抗原多肽不能被HLA分子有效提呈到肿瘤细胞表面而被T细胞所识别(参见文献“*Cancer Gene Ther.* 2002 Dec;9(12):1043-55”)。这种HLA I类抗原提呈途径(即MHC I类抗原提呈途径)的缺失是肿瘤免疫逃避的一个机制,与肿瘤细胞中包括HLA、 β_2 -微球蛋白、TAP、tapasin、LMP、ERAP等抗原提呈分子的基因突变或表达异常有关,也可能与RAS、MYC、MOS和Her2/Neu等肿瘤转化分子的过度功能活化有关(参见文献“*Trends in Molecular Medicine.* 2013,19(11):677-681”)。另外,肿瘤组织的多样性也表现为肿瘤抗原表达的不均一性,低表达或不表达肿瘤抗原的肿瘤细胞就可能会逃避TCR-T的识别和杀伤,从而影响TCR-T的疗效(参见文献“*Trends Immunol.* 2016 06;37(6):349-351”)。

[0005] 因此,TCR-T疗法所面临的一个挑战是如何促使靶向肿瘤相关抗原的TCR-T有效识别和杀伤肿瘤细胞。

发明内容

[0006] 为解决上述现有技术中所存在的问题,本发明提供了治疗剂、标记性多肽、编码核酸、表达载体、溶瘤病毒、药盒及其应用。

[0007] 具体而言,本发明提供了:

[0008] (1) 一种用于治疗肿瘤和/或癌症的治疗剂,包含:

[0009] (a) 第一组合物,其中该第一组合物包含位于第一可药用载体中的第一活性成分,该第一活性成分包括或含有用于导入肿瘤细胞和/或癌细胞的、具有标记性多肽编码序列的核酸;所述标记性多肽具有一个或多个抗原表位多肽的氨基酸序列,所述抗原表位多肽能够被MHC I类分子提呈在所述肿瘤细胞和/或癌细胞表面;和

[0010] (b) 第二组合物,其中该第二组合物包含位于第二可药用载体中的第二活性成分,该第二活性成分包含T细胞受体修饰的免疫细胞;所述的T细胞受体修饰的免疫细胞能够特异性识别并结合被所述MHC I类分子提呈的所述抗原表位多肽。

[0011] (2) 根据(1)所述的治疗剂,其中所述抗原表位多肽的氨基酸序列来源于自然界存在的蛋白的氨基酸序列,或者为人工合成的自然界不存在的氨基酸序列;优选地,所述自然界存在的蛋白包括人源蛋白和除人以外的其它物种的蛋白。

[0012] (3) 根据(1)所述的治疗剂,其中所述抗原表位多肽的氨基酸序列来源于肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原的氨基酸序列。

[0013] (4) 根据(1)所述的治疗剂,其中所述标记性多肽包括可操作地连接的、依次串联的以下氨基酸序列:N端信号肽的氨基酸序列、一个或多个所述抗原表位多肽的氨基酸序列、可任选的C端内质网滞留信号的氨基酸序列,其中当所述标记性多肽包括多个所述抗原表位多肽的氨基酸序列时,每两个相邻的所述抗原表位多肽的氨基酸序列之间由可切割性连接多肽的氨基酸序列连接。

[0014] (5) 根据(4)所述的治疗剂,其中所述抗原表位多肽的氨基酸序列包括如SEQ ID NO:3所示的Her2/neu 369-377、NY-ESO-1157-165、NY-ESO-1 1-11、NY-ESO-1 53-62、NY-ESO-1 18-27、N-ras55-64、K-ras 224-232、K-ras 10-18、K-ras 10-19、H3.3K27M 26-35、SSX-2 41-49、MAGE-C2 336-344、MAGE-C2 191-200、MAGE-C2307-315、MAGE-C2 42-50、MAGE-A1 120-129、MAGE-A1 230-238、MAGE-A1 161-169、KK-LC-1 76-84、p53 99-107、HPV16-E6 29-38、HPV16-E7 11-19、HPV16-E7 11-19、EBV-LMP1 51-59、EBV-LMP1125-133。

[0015] (6) 根据(1)所述的治疗剂,其中所述核酸还具有HLA蛋白编码序列,其中该HLA蛋白编码序列与所述标记性多肽编码序列分别在各自的启动子控制之下,或者该HLA蛋白编码序列与所述标记性多肽编码序列在同一启动子控制之下并且该HLA蛋白编码序列通过可切割性连接多肽编码序列与所述标记性多肽编码序列可操作地连接。

[0016] (7) 根据(6)所述的治疗剂,其中所述HLA蛋白为HLA-A2蛋白,所述HLA-A2的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示。

[0017] (8) 根据(1)所述的治疗剂,其中所述第一组合物和所述第二组合物各自独立地存在于所述治疗剂中而互不混合。

[0018] (9) 根据(1)所述的治疗剂,其中所述核酸包括DNA或RNA;所述RNA包括由所述DNA转录的mRNA。

[0019] (10) 根据(1)所述的治疗剂,其中所述第一活性成分为重组病毒,所述重组病毒的

基因组具有所述标记性多肽编码序列和可任选的HLA蛋白编码序列；其中，所述重组病毒包括选择复制型重组溶瘤病毒或复制缺陷型重组病毒。

[0020] (11) 根据(10)所述的治疗剂，其中所述复制缺陷型重组病毒来源于腺病毒、腺病毒相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒、痘病毒、流感病毒、甲病毒(Alphavirus)、或仙台病毒。

[0021] (12) 根据(10)所述的治疗剂，其中所述复制缺陷型重组病毒为对5型腺病毒进行基因改造而得到的重组腺病毒，该重组腺病毒的基因组中缺失了E1基因，并且在所缺失的E1基因的位置包含所述标记性多肽编码序列和可任选的所述HLA蛋白编码序列。

[0022] (13) 根据(10)所述的治疗剂，其中所述选择复制型重组溶瘤病毒来源于具有溶瘤作用的经基因突变的病毒和具有溶瘤作用的野生型病毒；优选地，所述选择复制型重组溶瘤病毒来源于具有溶瘤作用的腺病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、塞姆利基森林病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、逆转录病毒、呼肠孤病毒、塞内卡谷病毒、埃可型肠道病毒、柯萨奇病毒、新城疫病毒和马拉巴病毒。

[0023] (14) 根据(10)所述的治疗剂，其中所述选择复制型重组溶瘤病毒为对5型腺病毒进行基因改造而得到的重组溶瘤腺病毒，该重组溶瘤腺病毒的基因组中缺失了E1B-55K基因和/或E1B-19K基因，并且所述重组溶瘤腺病毒的基因组中包含E1A基因编码序列；优选地，所述E1A基因编码序列是在外源启动子控制下的。

[0024] (15) 根据(10)或(14)所述的治疗剂，其中所述重组溶瘤病毒为对5型腺病毒进行基因改造而得到的重组溶瘤腺病毒，该重组溶瘤腺病毒的E1A基因被改变为使得所表达的E1A蛋白无法与pRb蛋白结合；优选地，所述E1A基因是在外源启动子控制下的。

[0025] (16) 根据(14)或(15)所述的治疗剂，其中所述重组溶瘤腺病毒的E3基因全部或部分缺失。

[0026] (17) 根据(1)所述的治疗剂，其中所述免疫细胞包括原始T细胞或其前体细胞，NKT细胞，或T细胞株。

[0027] (18) 根据(9)所述的治疗剂，其中所述第一组合物包含治疗有效量的所述DNA、或治疗有效量的所述mRNA。

[0028] (19) 根据(10)所述的治疗剂，其中所述第一组合物包含治疗有效量的所述重组病毒。

[0029] (20) 根据(1)所述的治疗剂，其中所述第二组合物包含治疗有效量的所述的T细胞受体修饰的免疫细胞。

[0030] (21) 根据(9)所述的治疗剂，其中所述DNA配制成通过瘤内注射给药；所述mRNA配制成通过瘤内注射给药。

[0031] (22) 根据(10)所述的治疗剂，其中所述重组病毒配制成通过瘤内注射给药、腹膜内给药、蛛网膜下腔内给药、或静脉给药。

[0032] (23) 根据(1)所述的治疗剂，其中所述免疫细胞配制成通过动脉、静脉、皮下、皮内、瘤内、淋巴管内、淋巴结内、蛛网膜下腔内、骨髓内、肌肉内或腹膜内给药。

[0033] (24) 根据(1)所述的治疗剂，其中所述治疗剂由所述第一组合物和所述第二组合物组成。

[0034] (25) 根据(1) - (24)中任一项所述的治疗剂在制备用于治疗肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

[0035] (26) 根据 (25) 所述的用途,其中所述肿瘤和/或癌症包括:乳腺癌,头颈部肿瘤,滑膜癌,肾癌,结缔组织癌,黑色素瘤,肺癌,食管癌,结肠癌,直肠癌,脑癌,肝癌,骨癌,绒毛膜癌,胃泌素瘤,嗜铬细胞瘤,催乳素瘤,von Hippel-Lindau病,Zollinger-Ellison综合征,肛门癌,胆管癌,膀胱癌,输尿管癌,神经胶质瘤,神经母细胞瘤,脑膜瘤,脊髓肿瘤,骨软骨瘤,软骨肉瘤,尤文氏肉瘤,原发部位不明癌,类癌,纤维肉瘤,佩吉特病,宫颈癌,胆囊癌,眼癌,卡波西氏肉瘤,前列腺癌,睾丸癌,皮肤鳞状细胞癌,间皮瘤,多尖端骨髓瘤,卵巢癌,胰腺内分泌瘤,胰高血糖素瘤,胰腺癌,阴茎癌,垂体癌,软组织肉瘤,视网膜母细胞瘤,小肠癌,胃癌,胸腺癌,滋养细胞癌,葡萄胎,子宫内膜癌,阴道癌,外阴癌,蕈样真菌病,胰岛素瘤,心脏癌,脑膜癌,血液癌,腹膜癌和胸膜癌。

[0036] (27) 一种标记性多肽,包括可操作地连接的依次串联的以下氨基酸序列:N端信号肽的氨基酸序列、一个或多个抗原表位多肽的氨基酸序列、可任选的C端内质网滞留信号的氨基酸序列,其中当所述标记性多肽包括多个所述抗原表位多肽的氨基酸序列时,每两个相邻的所述抗原表位多肽的氨基酸序列之间由可切割性连接多肽的氨基酸序列连接;优选地,所述可切割性连接多肽是furin酶切识别多肽。

[0037] (28) 根据 (27) 所述的标记性多肽,其中所述抗原表位多肽的氨基酸序列包括如SEQ ID NO:3所示的Her2/neu 369-377、NY-ESO-1157-165、NY-ESO-1 1-11、NY-ESO-1 53-62、NY-ESO-1 18-27、N-ras55-64、K-ras 224-232、K-ras 10-18、K-ras 10-19、H3.3K27M 26-35、SSX-2 41-49、MAGE-C2 336-344、MAGE-C2 191-200、MAGE-C2307-315、MAGE-C2 42-50、MAGE-A1 120-129、MAGE-A1 230-238、MAGE-A1 161-169、KK-LC-1 76-84、p53 99-107、HPV16-E6 29-38、HPV16-E7 11-19、HPV16-E7 11-19、EBV-LMP1 51-59、EBV-LMP1125-133。

[0038] (29) 根据 (27) 所述的标记性多肽,其中所述标记性多肽的氨基酸序列具有与如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:56、或SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列至少98%的一致性;优选的是,其中所述标记性多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:56、或SEQ ID NO:60所示。

[0039] (30) 一种分离的、具有根据 (27) - (29) 中任一项所述的标记性多肽的编码序列的核酸。

[0040] (31) 根据 (30) 所述的核酸,其中所述核酸还具有HLA蛋白编码序列,其中该HLA蛋白编码序列与所述标记性多肽编码序列分别在各自的启动子控制之下,或者该HLA蛋白编码序列与所述标记性多肽编码序列在同一启动子控制之下并且该HLA蛋白编码序列通过可切割性连接多肽编码序列与所述标记性多肽编码序列可操作地连接。

[0041] (32) 根据 (30) 所述的核酸,其中所述核酸包括DNA和mRNA。

[0042] (33) 根据 (32) 所述的核酸,其中所述核酸为DNA,其核苷酸序列如SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、或SEQ ID NO:61所示。

[0043] (34) 一种重组表达载体,含有根据 (30) - (33) 中任一项所述的核酸,和/或其互补序列。

[0044] (35) 一种分离的重组病毒,其中所述重组病毒的基因组具有根据 (30) - (33) 中任一项所述的核酸;并且,所述重组病毒包括选择复制型重组溶瘤病毒或复制缺陷型重组病毒。

[0045] (36) 根据 (35) 所述的重组病毒,其中所述复制缺陷型重组病毒来源于腺病毒、腺

病毒相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒、痘病毒、流感病毒、甲病毒(Alphavirus)、或仙台病毒。

[0046] (37) 根据(35)所述的重组病毒,其中所述复制缺陷型重组病毒为对5型腺病毒进行基因改造而得到的重组腺病毒,该重组腺病毒的基因组中缺失了E1基因,并且在所缺失的E1基因的位置包含所述标记性多肽编码序列和可任选的所述HLA蛋白编码序列。

[0047] (38) 根据(35)所述的重组病毒,其中所述重组病毒为选择复制型重组溶瘤病毒,并且所述选择复制型重组溶瘤病毒来源于具有溶瘤作用的经基因突变的病毒和具有溶瘤作用的野生型病毒;优选地,所述选择复制型重组溶瘤病毒来源于具有溶瘤作用的腺病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、塞姆利基森林病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、逆转录病毒、呼肠孤病毒、塞内卡谷病毒、埃可型肠道病毒、柯萨奇病毒、新城疫病毒和马拉巴病毒。

[0048] (39) 根据(35)所述的重组病毒,其中所述选择复制型重组溶瘤病毒为对5型腺病毒进行基因改造而得到的重组溶瘤腺病毒,该重组溶瘤腺病毒的基因组中缺失了E1B-55K和/或E1B-19K基因,并且所述重组溶瘤腺病毒的基因组中包含E1A基因编码序列;优选地,所述E1A基因编码序列是在外源启动子控制下的。

[0049] (40) 根据(35)或(39)所述的重组病毒,其中所述选择复制型重组溶瘤病毒为对5型腺病毒进行基因改造而得到的重组溶瘤腺病毒,该重组溶瘤腺病毒的E1A基因被改变为使得所表达的E1A蛋白无法与pRb蛋白结合;优选地,所述E1A基因是在外源启动子控制下的。

[0050] (41) 根据(39)或(40)所述的重组病毒,其中所述选择复制型重组溶瘤病毒的E3基因全部或部分缺失。

[0051] (42) 一种用于治疗肿瘤和/或癌症的具有协同作用的联合药物的药盒,包括:

[0052] 第一容器,该第一容器装有根据(1)-(24)中任一项所述的治疗剂中的第一组合物;

[0053] 第二容器,该第二容器装有根据(1)-(24)中任一项所述的治疗剂中的第二组合物,其中所述第一容器和所述第二容器是独立的;以及

[0054] 载明给药时机和给药方式的说明书。

[0055] (43) 根据(30)-(33)中任一项所述的核酸在制备用于治疗或预防肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

[0056] (44) 根据(34)所述的重组表达载体在制备用于治疗或预防肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

[0057] (45) 根据(35)-(41)中任一项所述的重组病毒在制备用于治疗或预防肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

[0058] (46) 根据(42)所述的药盒在制备用于治疗或预防肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

[0059] (47) 根据(43)-(46)中任一项所述的用途,其中所述肿瘤和/或癌症包括:乳腺癌,头颈部肿瘤,滑膜癌,肾癌,结缔组织癌,黑色素瘤,肺癌,食管癌,结肠癌,直肠癌,脑癌,肝癌,骨癌,绒毛膜癌,胃泌素瘤,嗜铬细胞瘤,催乳素瘤,von Hippel-Lindau病,Zollinger-Ellison综合征,肛门癌,胆管癌,膀胱癌,输尿管癌,神经胶质瘤,神经母细胞瘤,脑膜瘤,脊髓肿瘤,骨软骨瘤,软骨肉瘤,尤文氏肉瘤,原发部位不明癌,类癌,纤维肉瘤,佩吉特病,宫

颈癌,胆囊癌,眼癌,卡波西氏肉瘤,前列腺癌,睾丸癌,皮肤鳞状细胞癌,间皮瘤,多尖端骨髓瘤,卵巢癌,胰腺内分泌瘤,胰高血糖素瘤,胰腺癌,阴茎癌,垂体瘤,软组织肉瘤,视网膜母细胞瘤,小肠癌,胃癌,胸腺癌,滋养细胞瘤,葡萄胎,子宫内膜癌,阴道癌,外阴癌,蕈样真菌病,胰岛素瘤,心脏癌,脑膜癌,血液癌,腹膜癌和胸膜癌。

[0060] (48) 一种治疗肿瘤和/或癌症的方法,包括:

[0061] 对肿瘤和/或癌症患者施用根据(1)-(24)中任一项所述的治疗剂中的第一组合物;和

[0062] 对所述肿瘤和/或癌症患者施用根据(1)-(24)中任一项所述的治疗剂中的第二组合物。

[0063] (49) 根据(48)所述的方法,包括以下依次进行的步骤:

[0064] 1) 对所述肿瘤和/或癌症患者施用所述第一组合物;和

[0065] 2) 在施用所述第一组合物之后,对所述肿瘤和/或癌症患者施用所述的治疗剂中的第二组合物。

[0066] (50) 根据(48)所述的方法,其中所述肿瘤和/或癌症包括:乳腺癌,头颈部肿瘤,滑膜癌,肾癌,结缔组织癌,黑色素瘤,肺癌,食管癌,结肠癌,直肠癌,脑癌,肝癌,骨癌,绒毛膜癌,胃泌素瘤,嗜铬细胞瘤,催乳素瘤,von Hippel-Lindau病,Zollinger-Ellison综合征,肛门癌,胆管癌,膀胱癌,输尿管癌,神经胶质瘤,神经母细胞瘤,脑膜瘤,脊髓肿瘤,骨软骨瘤,软骨肉瘤,尤文氏肉瘤,原发部位不明癌,类癌,纤维肉瘤,佩吉特病,宫颈癌,胆囊癌,眼癌,卡波西氏肉瘤,前列腺癌,睾丸癌,皮肤鳞状细胞癌,间皮瘤,多尖端骨髓瘤,卵巢癌,胰腺内分泌瘤,胰高血糖素瘤,胰腺癌,阴茎癌,垂体瘤,软组织肉瘤,视网膜母细胞瘤,小肠癌,胃癌,胸腺癌,滋养细胞瘤,葡萄胎,子宫内膜癌,阴道癌,外阴癌,蕈样真菌病,胰岛素瘤,心脏癌,脑膜癌,血液癌,腹膜癌和胸膜癌。

[0067] 本发明与现有技术相比具有以下优点和积极效果:

[0068] 本发明为了提高TCR修饰的免疫细胞治疗肿瘤的效果,以及增加TCR修饰的免疫细胞治疗肿瘤的适用范围,提出了在肿瘤细胞内表达外源抗原表位肽和/或外源MHC I类分子,以显著加强肿瘤细胞表面的抗原表位肽/MHC I类分子复合物的数量,并采用特异性针对该抗原表位肽的TCR修饰的免疫细胞进行联合治疗的构思。当通过溶瘤病毒作为载体介导外源抗原表位肽和/或外源MHC I类分子在肿瘤细胞内的表达时,溶瘤病毒对肿瘤的杀伤与TCR修饰的免疫细胞对肿瘤的杀伤还能够产生协同治疗效果。

[0069] 具体而言,由于TCR修饰的免疫细胞(特别是TCR修饰的T细胞)所识别的是通过MHC I类抗原提呈途径所提呈的抗原表位肽/MHC I类分子复合物,因此仅通过常规的外源基因表达方式在肿瘤细胞内表达外源抗原,并不能显著加强抗原表位肽在肿瘤细胞表面的提呈,尤其当肿瘤细胞常常发生MHC I类抗原提呈途径的缺陷。为此,本发明首先设计了含有一个或多个抗原表位肽氨基酸序列的标记性多肽氨基酸序列,以及具有该标记性多肽的编码序列的核酸,使得所述核酸在转染肿瘤细胞和/或癌细胞后、或在将所述核酸插入病毒基因组并使所得到的重组病毒感染肿瘤细胞和/或癌细胞后,能够在细胞内表达标记性抗原表位多肽链,并通过氨基端的信号肽导入内质网(ER),进而被切割/加工成需要的抗原表位多肽片段,该抗原表位多肽片段能够被MHC I类分子最终提呈在肿瘤细胞和/或癌细胞表面,从而能够达到在肿瘤细胞表面显著加强抗原表位肽的提呈的效果,有效解决了肿瘤免

疫逃避机制所带来的抗原提呈途径缺陷所导致的抗原表达量低的问题。本发明还进一步地在所述核酸中插入HLA蛋白编码序列,以解决内源性HLA表达低下或缺失的问题。本发明还提出将包括或含有该标记性多肽的编码核酸的活性成分与识别抗原表位肽的T细胞受体修饰的免疫细胞联用,提高了T细胞受体修饰的免疫细胞对肿瘤细胞的识别敏感性,从而进一步提高了T细胞受体修饰的免疫细胞杀伤肿瘤细胞的能力。

[0070] 进一步地,本发明通过溶瘤病毒将所述标记性多肽和/或HLA蛋白编码核酸导入肿瘤细胞和/或癌细胞,在发挥溶瘤病毒杀伤肿瘤细胞和/或癌细胞的作用的同时,进一步增强了上述显著加强外源抗原表位肽在肿瘤细胞表面的提呈与T细胞受体修饰的免疫细胞联合所达到的协同治疗效果。另外,溶瘤病毒在杀伤肿瘤的同时还可以缓解肿瘤微环境的免疫抑制状态,提高T细胞受体修饰的免疫细胞的归巢;此外,T细胞受体修饰的免疫细胞还可以有效清除被溶瘤病毒感染后,不能完成复制周期并产生足够数量的子病毒而发生裂解的肿瘤细胞;由此实现了进一步的协同作用。此外,被溶瘤病毒裂解的肿瘤细胞所释放的抗原可进一步激活机体自身的抗肿瘤免疫,从而可实现比单独使用溶瘤病毒或T细胞受体修饰的免疫细胞更好的肿瘤杀伤效果,实现了协同治疗效果。

[0071] 本发明通过上述发明构思为肿瘤治疗提供了一个新的途径。

[0072] 定义

[0073] 在本发明中,词语“肿瘤”、“癌症”、“肿瘤细胞”、“癌细胞”涵盖本领域通常认为的含义。

[0074] 本文所用的词语“溶瘤病毒”是指能够选择性地在肿瘤细胞中复制并裂解肿瘤细胞的病毒。

[0075] 本文所用的词语“治疗有效量”是指功能药剂或药物组合物能够表现出可检测的治疗效果或抑制效果的量,或者起到抗肿瘤效果的量。所述效果可以通过本领域任何已知的检验方法检测。

[0076] 本文所用的词语“给药”或“施用”是指向受试者提供化合物、复合物或组合物(包括病毒和细胞)。

[0077] 本文所用的词语“患者”是指人或非人类生物。因此,本文所述的方法和组合物适用于人类疾病和兽类疾病。在一些实施方案中,患者患有肿瘤。在一些例子中,患者同时患有的一种或多种类型的癌症。

[0078] 本文所用的词语“协同效果”是指两种或多种药剂共同起到的效果,该效果大于其中各药剂的单独效果的总和。

[0079] 本文所用的术语“pfu”或“蚀斑形成单位”(plaque forming unit)是指:产生一个蚀斑的病毒量称为一个蚀斑形成单位(pfu)。

[0080] 本文所用的术语“VP”是指病毒颗粒的个数。

[0081] 本文所用的术语“VP/kg”是指病毒颗粒数/千克患者体重。

[0082] 本文所用的术语“TCID₅₀”是指半数组织培养感染剂量(median tissue culture infective dose),表示使半数组织培养物遭受感染,而发生细胞病变的病毒剂量。

[0083] 本文所用的术语“MOI”或“感染复数”(Multiplicity of infection)也即,病毒与细胞个数比,是指用以起始病毒感染的每个细胞感染病毒颗粒的粒数。 $MOI = \text{pfu}/\text{细胞}$,即细胞个数 $\times MOI = \text{总PFU}$ 。

附图说明

[0084] 图1示出本发明实施例1中从HLA-A2⁺正常供体PBMC(具体为#1PBMC)中诱导出的Her2/neu 369-377多肽(Her2-E75)特异性杀伤性T细胞的表型和功能检测结果。图1A为经过两轮Her2-E75抗原多肽体外刺激后,PBMC细胞经CD8-APC抗体和Her2-E75五聚体-PE染色后进行流式细胞分析的结果,右图是经多肽刺激的细胞,对CD8⁺五聚体⁺杀伤T细胞群进行FACS分选,以获得T细胞克隆。左图是没有多肽刺激的对照组细胞。横坐标表示CD8分子表达的荧光强度,纵坐标表示结合的Her2-E75五聚体的荧光强度。图1B为CD8⁺E75-四聚体⁺杀伤T细胞克隆经CD8-APC和Her2-E75四聚体-PE染色后流式细胞的表型分析,右图显示CD8⁺Her2四聚体⁺T细胞克隆Her2 CTL 6A5为纯化的Her2-E75多肽特异性CTL细胞克隆。左图是没有多肽刺激的对照组CTL细胞。横坐标表示CD8分子表达的荧光强度,纵坐标表示结合的Her2-E75四聚体的荧光强度。图1C示出所构建的携带Her2 TCR-6A5-mC基因的慢病毒载体(即“pCDH-EF1 α -Her2 TCR载体”)的主要功能片段。示出的片段表达EF-1 α 启动子所驱动的TCR基因,各TCR的 β 链和 α 链的不变区片段均为鼠源不变区片段,TCR的 β 链和 α 链被可切割性连接多肽的编码序列(furin-F2A)所链接。

[0085] 图2示出经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的外周血单个核细胞(PBMC)的表型和功能检测结果。图2A为编码Her2 TCR-6A5-mC的慢病毒载体转染来自两个不同供体的PBMC,经Her2-E75四聚体-PE和抗CD8-APC抗体染色后进行流式细胞分析的结果。首先根据细胞形态和大小分出淋巴细胞群,Her2-E75四聚体⁺细胞群为表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的细胞。横坐标表示CD8分子表达的荧光强度,纵坐标表示结合的Her2-E75四聚体的荧光强度。所示百分率为各阳性细胞群占分出的淋巴细胞数的比率。左图涉及一个供体所提供的外周血单个核细胞(#1PBMC),右图涉及另一个不同供体提供的PBMC(#2PBMC)。CD8⁺Her2-E75四聚体⁺细胞为表达Her2TCR-6A5-mC的杀伤性T细胞。CD8⁻Her2-E75四聚体⁺细胞可能为表达Her2 TCR-6A5-mC的CD4⁺辅助T细胞。图2B示出表达Her2TCR-6A5-mC的T细胞可以识别被T2细胞所提呈的Her2-E75多肽。经编码Her2 TCR-6A5-mC的慢病毒载体转染的两个不同供体PBMC分别与提呈不同浓度梯度Her2-E75多肽的T2细胞混合培养16小时,取细胞上清进行IFN- γ 的ELISA分析。对照组中靶细胞为提呈可以结合HLA-A2分子的EBV病毒抗原多肽LMP2 426-434的T2细胞(图中未显示)。图中“0.1 μ g/ml”表示提呈0.1 μ g/ml的Her2-E75多肽的T2细胞组,“0.01 μ g/ml”表示提呈0.01 μ g/ml的Her2-E75多肽的T2细胞组,“0.001 μ g/ml”表示提呈0.001 μ g/ml的Her2-E75多肽的T2细胞组,“0.0001 μ g/ml”表示提呈0.0001 μ g/ml的Her2-E75多肽的T2细胞组。纵坐标表示T细胞分泌的IFN- γ 的浓度。图2C示出T细胞功能的CD8抗体阻断试验结果。其中,经编码Her2 TCR-6A5-mC的慢病毒载体转染的#2PBMC与T2细胞提呈的Her2-E75抗原多肽共培养时加入抗人CD8抗体,检测T细胞分泌IFN- γ 的功能是否被抑制。图中“T2+Her2-E75”表示未加入抗人CD8抗体的、提呈0.1 μ g/ml的Her2-E75多肽的T2细胞组,“T2+Her2-E75+抗-CD8”表示加入抗人CD8抗体的、提呈0.1 μ g/ml的Her2-E75多肽的T2细胞组。横坐标表示不同实验组别,纵坐标表示T细胞分泌的IFN- γ 的浓度。“ns”表示两实验组无显著性差异。图2B和2C中各试验组和对照组均为复孔,结果显示为平均值 \pm SEM。

[0086] 图3示出经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的外周血单个核细胞(PBMC)识别肿瘤细胞株的功能检测结果。图3A示出不同肿瘤细胞株细胞表达HLA-A2和Her2/neu的情况。横坐标表示不同的人肿瘤细胞株。“Co1o205”和“HCT116”为结肠癌细胞;“MDA-MB-231”和

“MCF-7”为乳腺癌细胞;“PANC-1”为胰腺癌细胞;“U87MG”为神经胶质瘤细胞;“NCI-H446”为肺癌细胞。纵坐标“MFI”表示细胞经抗HLA-A2荧光抗体或抗Her2/neu荧光抗体染色后的荧光强度均值。白色条柱为Her2/neu在细胞表面的表达量,黑色条柱为HLA-A2在细胞表面的表达量。图3B示出编码Her2 TCR-6A5-mC TCR基因的慢病毒载体转染#2PBMC,与不同肿瘤细胞株细胞混合培养24小时后,取细胞上清进行IFN- γ 的ELISA分析结果。各试验组和对照组均为三孔,结果显示为平均值 \pm SME。横坐标示出不同靶细胞,纵坐标示出T细胞分泌的IFN- γ 的浓度。效靶比E:T为5:1。白色条柱示出效应细胞为未经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的对照外周血单个核细胞,黑色条柱示出效应细胞为经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的外周血单个核细胞。图3C、D、E、F、G、H、I、J、和K示出#2PBMC经编码Her2 TCR-6A5-mC TCR基因的慢病毒载体转染后,对不同肿瘤细胞株的杀伤活性。图3C-3G的杀伤活性是通过对活细胞计数获得的,图3H-3K的杀伤活性是MTT方法测定的,反应时间为24小时。其中,图3C和3H示出针对肿瘤细胞株MCF-7的结果、图3D示出针对肿瘤细胞株HCT116的结果、图3E示出针对肿瘤细胞株U87MG的结果、图3F示出针对肿瘤细胞株NCI-H446的结果、图3G示出针对肿瘤细胞株SKOV3的结果、图3I示出针对肿瘤细胞株PANC-1的结果、图3J示出针对肿瘤细胞株HEPG2的结果、图3K示出针对肿瘤细胞株HT-29的结果。各试验组和对照组均为三孔,结果显示为平均值 \pm SME。横坐标示出不同的效靶比E:T。纵坐标示出T细胞对靶细胞的杀伤率百分比数值。圆点形图注示出效应细胞为未经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的对照外周血单个核细胞,上三角图注示出效应细胞为经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的外周血单个核细胞。MTT杀伤实验中,另外一组为加紫杉醇10 μ M作为阳性对照(图3H-3K中示出为单独的下三角点)。

[0087] 图4示出经携带HLA-A2基因和Her2-E75微小基因的载体转染后的靶细胞可表达HLA-A2,所表达的Her2-E75多肽可与HLA-A2形成被Her2 TCR-6A5-mC TCR所识别的抗原复合物。图4A示出HLA-A2阴性Her2/neu阴性的293T细胞被能够表达HLA-A2基因和Her2-E75微小基因(C端不具有KDEL)的慢病毒质粒载体转染后,可激活转染Her2 TCR-6A5-mC TCR的PBMC。各试验组和对照组均为复孔,结果显示为平均值 \pm SME。横坐标示出作为靶细胞的293T细胞转染不同的基因载体。纵坐标表示T细胞分泌的IFN- γ 的浓度。效靶比E:T为10:1。图4B的上图示出所构建的携带HLA-A2和Her2-E75微小基因(C端不具有KDEL)的慢病毒载体(即“pCDH-EF1p-A2-PKGp-E75载体”)的主要功能片段。示出的片段表达EF-1 α 启动子所驱动的HLA-A2基因和PKG启动子所驱动的Her2-E75微小基因(C端不具有KDEL)。图4B的下图示出Her2-E75微小基因(C端不具有KDEL)的构成,由INSL5信号肽、8个Her2-E75抗原表位肽编码序列及其之间的furin酶切片段所组成。图4D示出所构建的携带HLA-A2和Her2-E75微小基因(C端具有KDEL)的重组腺病毒载体(即“Adeasy-A2E75载体”)的主要功能片段。腺病毒为E1基因和E3基因缺陷的5型腺病毒基因组。在E1区插入由CMV启动子所驱动的HLA-A2和Her2-E75微小基因及其之间的Furin-F2A连接片段所组成的表达元件。其中Her2-E75微小基因由INSL5信号肽、8个Her2-E75抗原表位肽编码序列及其之间的furin酶切片段、以及羧基端的内质网滞留信号肽KDEL所组成。图4C示出HLA-A2阴性细胞SKOV3感染图4D所示出的携带HLA-A2和Her2-E75微小基因(C端具有KDEL)的载体后可表达HLA-A2。横坐标示出SKOV3细胞感染不同的重组腺病毒。“Adeasy-A2E75”为表达HLA-A2和Her2-E75多肽的腺病毒;“Ad对照”为不携带HLA-A2和Her2-E75微小基因的对照腺病毒。纵坐标“HLA-A2⁺(MFI)”表示细

胞经抗HLA-A2荧光抗体染色后的荧光强度均值。“MOI”为病毒感染复数。

[0088] 图5示出携带HLA-A2基因和Her2 E75微小基因的复制缺陷型腺病毒感染肿瘤细胞后可增加Her2 TCR-6A5-mC TCR对不同靶细胞的识别敏感性。图5A示出表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的T细胞可被感染携带HLA-A2基因和Her2 E75微小基因的腺病毒的不同肿瘤细胞株细胞所激活,并分泌IFN- γ 。效应细胞为经携带Her2TCR-6A5-mC TCR基因的复制缺陷型慢病毒感染的外周血单个核细胞。靶细胞为HLA-A2阴性Her2/neu阳性的卵巢癌细胞SKOV3, HLA-A2阳性Her2/neu阳性的乳腺癌细胞MCF-7以及HLA-A2阴性Her2/neu阴性的小细胞肺癌细胞NCI-H446。横坐标示出作为靶细胞的不同肿瘤细胞株细胞经过不同处理。“Adeasy-A2E75”为单独感染携带HLA-A2基因和Her2 E75微小基因的复制缺陷型腺病毒的靶细胞;“PBMC对照”为靶细胞与未经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的对照外周血单个核细胞混合培养;“PBMC对照+Adeasy-A2E75”为靶细胞感染携带HLA-A2基因和Her2 E75微小基因的复制缺陷型腺病毒24小时后与未经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的对照外周血单个核细胞混合培养;“具有Her2 TCR-6A5的PBMC”为靶细胞与经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的外周血单个核细胞混合培养;“具有Her2 TCR-6A5的PBMC+Adeasy-A2E75”为靶细胞感染携带HLA-A2基因和Her2 E75微小基因的复制缺陷型腺病毒24小时后与经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的外周血单个核细胞混合培养。纵坐标示出T细胞分泌的IFN- γ 的浓度。效靶比E:T为5:1,腺病毒感染复数为MOI=10。“****”示出与单独使用表达HLA-A2和Her2 E75多肽的复制缺陷型腺病毒组比较,或者与单独使用表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞组相比较,二者联用组示出表达HLA-A2和Her2 E75多肽的复制缺陷型腺病毒可显著增加表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞对不同靶细胞的识别活性($p < 0.0001$),无论靶细胞自身是否表达HLA-A2和Her2/neu抗原。各试验组和对照组均为三孔,结果显示为平均值 \pm SME。图5B示出表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的T细胞可特异性杀伤感染携带HLA-A2基因和Her2 E75微小基因的腺病毒的肿瘤细胞株细胞。横坐标示出不同肿瘤细胞株细胞经不同处理作为靶细胞,与图5A的横坐标所示组别相同。效靶比E:T为8:1,腺病毒感染复数为MOI=10。纵坐标示出T细胞对靶细胞的杀伤率,杀伤率(Cytotoxicity)% = (初始靶细胞的活细胞数-培养终止时的靶细胞的活细胞数)/初始靶细胞的活细胞数 $\times 100$ 。“***”和“**”示出与单独使用表达HLA-A2和Her2 E75多肽的复制缺陷型腺病毒组比较,或者与单独使用表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞组相比较,二者联用组示出表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞对感染表达HLA-A2和Her2 E75多肽的腺病毒的靶细胞具有显著的特异性杀伤性。“***”表示 $p < 0.001$ ，“**”表示 $p < 0.01$ 。各试验组和对照组均为三孔,结果显示为平均值 \pm SME。

[0089] 图6示出携带Her2-E75微小基因的溶瘤腺病毒感染肿瘤细胞后都可增加Her2 TCR-6A5-mC TCR对表达HLA-A2的靶细胞的识别敏感性。图6A示出表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的T细胞可被感染携带Her2-E75微小基因的溶瘤腺病毒且表达HLA-A2的肿瘤细胞株细胞所激活,并分泌IFN- γ 。效应细胞为经携带Her2 TCR-6A5-mC TCR基因的慢病毒感染的外周血单个核细胞。靶细胞为HLA-A2阴性Her2/neu阳性的卵巢癌细胞SKOV3, HLA-A2阳性Her2/neu阳性的乳腺癌细胞MCF-7以及HLA-A2阴性Her2/neu阴性的小细胞肺癌细胞NCI-H446。横坐标示出作为靶细胞的不同肿瘤细胞株细胞经过不同处理。“Ad-E75”为单独感染携带Her2-E75微小基因的溶瘤腺病毒的靶细胞;“PBMC对照”为靶细胞与未经Her2 TCR-

6A5-mC TCR基因转染的对照外周血单个核细胞混合培养;“PBMC对照+Ad-E75”为靶细胞感染携带Her2-E75微小基因的溶瘤腺病毒24小时后与未经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的对照外周血单个核细胞混合培养;“具有Her2 TCR-6A5的PBMC”为靶细胞与经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的外周血单个核细胞混合培养;“具有Her2 TCR-6A5的PBMC+Ad-E75”为靶细胞感染携带Her2-E75微小基因的溶瘤腺病毒24小时后与经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的外周血单个核细胞混合培养。纵坐标示出T细胞分泌的IFN- γ 的浓度。效靶比E:T为5:1,腺病毒感染复数为MOI=10。“**”示出与单独使用表达Her2-E75多肽的溶瘤腺病毒组相比较,或者与单独使用表达Her2TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞组相比较,二者联用组示出表达Her2-E75多肽的溶瘤腺病毒可显著增加表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞对表达HLA-A2靶细胞的识别活性($p < 0.01$),其中靶细胞自身主要表达HLA-A2抗原。各试验组和对照组均为三孔,结果显示为平均值 \pm SME。图6B示出表达Her2TCR-6A5-mC TCR的T细胞可特异性杀伤感染携带Her2-E75微小基因的溶瘤腺病毒的肿瘤细胞株细胞。横坐标示出不同肿瘤细胞株细胞经不同处理作为靶细胞,与图6A的横坐标所示组别相同。纵坐标示出T细胞对靶细胞的杀伤率,杀伤率(Cytotoxicity)% = ((初始靶细胞的活细胞数-培养终止时的靶细胞的活细胞数)/初始靶细胞的活细胞数) \times 100。效靶比E:T为5:1,腺病毒感染复数为MOI=10。“**”和“***”示出与单独使用表达Her2-E75多肽的溶瘤腺病毒组相比较,或者与单独使用表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞组相比较,二者联用组示出表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞对感染表达Her2-E75多肽的溶瘤腺病毒的靶细胞具有显著的特异性杀伤性。“**”表示 $p < 0.01$ ，“***”表示 $p < 0.001$ 。各试验组和对照组均为三孔,结果显示为平均值 \pm SME。

[0090] 图7示出携带HLA-A2和Her2-E75微小基因的复制缺陷型腺病毒感染肿瘤细胞后都可增加Her2 TCR-6A5-mC TCR对不同靶细胞的识别敏感性。图7A和图7B是同一实验反应,图7A为上清液的因子水平检测,图7B为细胞相关杀伤计数检测。图7A示出表达Her2TCR-6A5-mC TCR的T细胞可被感染携带HLA-A2和Her2-E75微小基因的复制缺陷型腺病毒且表达HLA-A2的肿瘤细胞株细胞所激活,并分泌IFN- γ 。效应细胞为经携带Her2 TCR-6A5-mC TCR基因的慢病毒感染的外周血单个核细胞。靶细胞为HLA-A2阴性Her2/neu阳性的大细胞肺癌NCI-H460,HLA-A2阴性Her2/neu阳性的结肠癌细胞HT-29,HLA-A2阳性Her2/neu阴性的胶质瘤细胞U87MG。横坐标示出作为靶细胞的不同肿瘤细胞株细胞经过不同处理。“Adeasy-A2E75”为单独感染携带HLA-A2和Her2-E75微小基因的溶瘤腺病毒的靶细胞;“PBMC对照”为靶细胞与未经Her2TCR-6A5-mC TCR基因转染的对照外周血单个核细胞混合培养;“PBMC对照+Adeasy-A2E75”为靶细胞感染携带HLA-A2和Her2-E75微小基因的腺病毒24小时后与未经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的对照外周血单个核细胞混合培养;“具有Her2TCR-6A5的PBMC”为靶细胞与经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的外周血单个核细胞混合培养;“具有Her2 TCR-6A5的PBMC+Adeasy-A2E75”为靶细胞感染携带HLA-A2和Her2-E75微小基因的复制缺陷型腺病毒24小时后与经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的外周血单个核细胞混合培养。纵坐标示出T细胞分泌的IFN- γ 的浓度。效靶比E:T为10:1,腺病毒感染复数为MOI=10。“**”示出与单独使用表达HLA-A2和Her2-E75多肽的复制缺陷型腺病毒组相比较,或者与单独使用表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞组相比较,二者联用组示出表达HLA-A2和Her2-E75多肽的复制缺陷型腺病毒可显著增加表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外

周血单个核细胞对不同靶细胞的识别活性 ($p < 0.01$), 不论靶细胞自身是否表达HLA-A2和Her2/Neu抗原。各试验组和对照组均为三孔, 结果显示为平均值 \pm SME。图7B示出表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的T细胞可特异性杀伤感染携带HLA-A2和Her2-E75微小基因的复制缺陷型腺病毒的肿瘤细胞株细胞。横坐标示出不同肿瘤细胞株细胞经不同处理作为靶细胞。纵坐标示出T细胞对靶细胞的杀伤率, 杀伤率 (Cytotoxicity) % = ((初始靶细胞的活细胞数-培养终止时的靶细胞的活细胞数) / 初始靶细胞的活细胞数) \times 100。效靶比E:T为10:1, 腺病毒感染复数为MOI=10。“***”、“**”和“*”示出与单独使用表达HLA-A2和Her2-E75多肽的复制缺陷型腺病毒组相比较, 或者与单独使用表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞组相比较, 二者联用组示出表达Her2 TCR的外周血单个核细胞对感染表达HLA-A2和Her2-E75多肽的复制缺陷型腺病毒的靶细胞具有显著的特异性杀伤性。“***”表示 $p < 0.001$, “**”表示 $p < 0.01$, “*”表示 $p < 0.05$ 。各试验组和对照组均为三孔, 结果显示为平均值 \pm SME。图7C示出细胞的流式检测结果。横坐标示出靶细胞组别。纵坐标“HLA-A2⁺ (MFI)”表示细胞经抗HLA-A2荧光抗体染色后的荧光强度均值。携带Her2-E75微小基因和HLA-A2的溶瘤腺病毒Ad-E75A2和携带HLA-A2和Her2-E75微小基因的复制缺陷型腺病毒Adeasy-A2E75感染肿瘤细胞株可以使其HLA-A2表达升高, 促进其对TCR-T的敏感性。

[0091] 图8示出携带Her2-E75微小基因和HLA-A2的溶瘤腺病毒感染肿瘤细胞后都可增加Her2 TCR-6A5-mC TCR对不同靶细胞的识别敏感性。图8A和图8B是同一实验反应, 图8A为上清液的因子水平检测, 图8B为细胞相关杀伤计数检测。图8A示出表达Her2TCR-6A5-mC TCR的T细胞可被感染携带Her2-E75微小基因和HLA-A2的溶瘤腺病毒的不同肿瘤细胞株细胞所激活, 并分泌IFN- γ 。效应细胞为经携带Her2 TCR-6A5-mC TCR基因的慢病毒感染的外周血单个核细胞。靶细胞为HLA-A2阴性Her2/neu阳性的大细胞肺癌NCI-H460, HLA-A2阴性Her2/neu阳性的结肠癌细胞HT-29, HLA-A2阳性Her2/neu阴性的胶质细胞瘤细胞U87MG。横坐标示出作为靶细胞的不同肿瘤细胞株细胞经过不同处理。“Ad-E75A2”为单独感染携带Her2-E75微小基因和HLA-A2的溶瘤腺病毒的靶细胞; “PBMC对照”为靶细胞与未经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的对照外周血单个核细胞混合培养; “PBMC对照+Ad-E75A2”为靶细胞感染携带Her2-E75微小基因和HLA-A2的溶瘤腺病毒24小时后与未经Her2TCR-6A5-mC TCR基因转染的对照外周血单个核细胞混合培养; “具有Her2 TCR-6A5的PBMC”为靶细胞与经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的外周血单个核细胞混合培养; “具有Her2 TCR-6A5的PBMC+Ad-E75A2”为靶细胞感染携带Her2-E75微小基因和HLA-A2的溶瘤腺病毒24小时后与经Her2 TCR-6A5-mC TCR基因转染的外周血单个核细胞混合培养。纵坐标示出T细胞分泌的IFN- γ 的浓度。效靶比E:T为10:1, 腺病毒感染复数为MOI=10。“***”和“****”示出与单独使用表达Her2-E75多肽和HLA-A2的溶瘤腺病毒组相比较, 或者与单独使用表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞组相比较, 二者联用组示出表达Her2-E75多肽和HLA-A2的溶瘤腺病毒可显著增加表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞对不同靶细胞的识别活性, 不论靶细胞自身是否表达HLA-A2和Her2/Neu抗原。“***”表示 $p < 0.001$, “****”表示 $p < 0.0001$ 。各试验组和对照组均为三孔, 结果显示为平均值 \pm SME。图8B示出表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的T细胞可特异性杀伤感染携带Her2-E75微小基因和HLA-A2的溶瘤腺病毒的肿瘤细胞株细胞。横坐标示出不同肿瘤细胞株细胞经不同处理作为靶细胞。纵坐标示出T细胞对靶细胞的杀伤率, 杀伤率 (Cytotoxicity) % = ((初始靶细胞的活细胞数-培养终止时的

靶细胞的活细胞数) / 初始靶细胞的活细胞数) $\times 100$ 。效靶比E:T为10:1, 腺病毒感染复数为MOI=10。“**”和“*”示出与单独使用表达Her2-E75多肽和HLA-A2的溶瘤腺病毒组相比较, 或者与单独使用表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞组相比较, 二者联用组示出表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞对感染表达Her2-E75多肽和HLA-A2的溶瘤腺病毒的靶细胞具有显著的特异性杀伤性。“**”表示 $p \leq 0.01$, “*”表示 $p \leq 0.05$ 。各试验组和对照组均为三孔, 结果显示为平均值 \pm SME。

[0092] 图9示出本发明一个实施方案所构建的5型溶瘤腺病毒骨架载体pShuttle-MCS-CMV-E1A-SV40pA的主要结构的示意图。

[0093] 图10示出本发明一个实施方案所构建的单独表达标记性多肽的5型溶瘤腺病毒基因组DNA (即“OAd-E75”, 上图)、以及共表达标记性多肽与HLA-A2的5型溶瘤腺病毒基因组DNA (即“OAd-E75-A2”, 下图) 的主要结构的示意图。

具体实施方式

[0094] 以下通过具体实施方式的描述并参照附图对本发明作进一步说明, 但这并非是对本发明的限制, 本领域技术人员根据本发明的基本思想, 可以做出各种修改或改进, 但是只要不脱离本发明的基本思想, 均在本发明的范围之内。

[0095] 本发明的发明人针对过继免疫细胞疗法以及溶瘤病毒治疗肿瘤所面临的问题和困难, 通过理论研究和实验验证, 提出了显著加强外源抗原表位肽在肿瘤细胞表面的提呈以及采用特异性针对该抗原表位肽的TCR修饰的免疫细胞进行联合治疗的构思。通过该发明构思, 本发明有效解决了肿瘤免疫逃避机制所带来的抗原提呈途径缺陷所导致的抗原表达量低和/或HLA表达低下或缺失的问题, 提高了肿瘤细胞对T细胞受体修饰的免疫细胞的识别敏感性, 从而进一步提高了T细胞受体修饰的免疫细胞的归巢和杀伤肿瘤细胞的能力。另外, 本发明也扩大了基于TCR基因修饰的过继免疫细胞治疗肿瘤的适用范围, 避免HLA限制性所带来的使用范围较小的局限性。

[0096] 具体而言, 本发明提供了一种用于治疗肿瘤和/或癌症的治疗剂, 包含:

[0097] (a) 第一组合物, 其中该第一组合物包含位于第一可药用载体中的第一活性成分, 该第一活性成分包括或含有用于导入肿瘤细胞和/或癌细胞的、具有标记性多肽编码序列的核酸; 所述标记性多肽具有一个或多个抗原表位多肽的氨基酸序列, 所述抗原表位多肽能够被MHC I类分子提呈在所述肿瘤细胞和/或癌细胞表面; 和

[0098] (b) 第二组合物, 其中该第二组合物包含位于第二可药用载体中的第二活性成分, 该第二活性成分包含T细胞受体修饰的免疫细胞; 所述的T细胞受体修饰的免疫细胞能够特异性识别并结合被所述MHC I类分子提呈的所述抗原表位多肽。

[0099] 通常, 表达在细胞浆内的抗原蛋白可进入MHC I类抗原提呈途径, 经系列蛋白酶水解后, 形成的短肽 (含有抗原表位多肽) 通过内质网膜上的TAP分子转导进入内质网内, 并与其中的HLA蛋白和 β_2 -微球蛋白形成三聚体后被提呈在细胞表面 (其中HLA蛋白和 β_2 -微球蛋白配对形成MHC I类分子), 从而被免疫细胞识别。由于肿瘤细胞中常发生MHC I类抗原提呈途径的功能缺失, 导致细胞浆内表达的肿瘤抗原不能有效形成表位多肽或进入内质网并与HLA和 β_2 微球蛋白结合形成复合物。

[0100] 在本发明中, 通过将所述具有标记性多肽编码序列的核酸导入肿瘤细胞和/或癌

细胞,表达在肿瘤细胞和/或癌细胞内的外源标记性多肽可进入MHC I类抗原提呈途径,从而增加了肿瘤细胞表面HLA/抗原表位多肽复合物的表达量,由此增强了所述T细胞受体修饰的免疫细胞对肿瘤细胞和/或癌细胞的识别敏感性。

[0101] 所述抗原表位多肽的氨基酸序列可以来源于自然界存在的蛋白的氨基酸序列,或者为人工合成的自然界不存在的氨基酸序列。优选地,所述自然界存在的蛋白包括人源蛋白和除人以外的其它物种的蛋白。更优选地,所述抗原表位多肽的氨基酸序列来源于肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原的氨基酸序列。

[0102] “肿瘤相关抗原”通常指来源于自身的正常蛋白,但在肿瘤细胞中过度表达或异常表达,其包括癌胚抗原、肿瘤-睾丸抗原(CT抗原)等。

[0103] “肿瘤特异性抗原”通常指来源于自身的突变蛋白,或异体的与肿瘤发生和发展相关的病毒蛋白。

[0104] 在本发明中,有时将“肿瘤相关抗原”和“肿瘤特异性抗原”笼统地称为“肿瘤抗原”。

[0105] 所述肿瘤抗原可以是如癌症抗原性多肽数据库(Cancer Antigenic Peptide Database)(网址<https://caped.icp.ucl.ac.be>)中所述的肿瘤抗原。优选的是,所述肿瘤抗原可以是如下表1中所述的肿瘤抗原。还优选的是,所述肿瘤抗原可以是人Her2/neu、NY-ESO-1、N-ras、K-ras、H3.3K27M、SSX-2、MAGE-C2、MAGE-A1、KK-LC-1、p53。Her2/neu的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示。

[0106] 所述抗原表位多肽可以是能够被MHC I类分子提呈的具有8-11个氨基酸的肽段。所述抗原表位多肽可以是如癌症抗原性多肽数据库(Cancer Antigenic Peptide Database)(网址<https://caped.icp.ucl.ac.be>)中所述的抗原表位多肽。优选的是,所述抗原表位多肽可以是如下表1中所述的抗原表位多肽。在其它实施方案中,所述抗原表位多肽为与如下表1中所述的抗原表位多肽具有4-9个连续的相同氨基酸(例如,4、5、6、7、8或9个连续的相同氨基酸)的抗原表位多肽,并且这些多肽的长度为8-11个氨基酸。还优选的是,所述抗原表位多肽包括但不限于如SEQ ID NO:3所示的Her2/neu 369-377、SEQ ID NO:22所示的Her2/neu 373-382、NY-ESO-1 157-165、NY-ESO-1 1-11、NY-ESO-1 53-62、NY-ESO-1 18-27、N-ras 55-64、K-ras 224-232、K-ras 10-18、K-ras 10-19、H3.3K27M 26-35、SSX-2 41-49、MAGE-C2336-344、MAGE-C2 191-200、MAGE-C2 307-315、MAGE-C2 42-50、MAGE-A1 120-129、MAGE-A1 230-238、MAGE-A1 161-169、KK-LC-176-84、p53 99-107、HPV16-E6 29-38、HPV16-E7 11-19、HPV16-E7 11-19、EBV-LMP1 51-59、EBV-LMP1 125-133。

[0107] 表1优选的肿瘤抗原及抗原表位多肽表

[0108]

肿瘤抗原名称	HLA 分型	氨基酸序列位置
N-ras	A1	55-64
MART2	A1	446-455
MATN	A11	226-234
CDKN2A	A11	125-133
CDK12	A11	924-932
k-ras	A2	224-232
hsp70-2	A2	286-295
HAUS3	A2	154-162
GAS7	A2	141-150
CSNK1A1	A2	26-34
CLPP	A2	240-248
CDK4	A2	23-32
α -辅肌动蛋白-4	A2	118-127
β -连环蛋白	A24	29-37
SIRT2	A3	192-200
GPNMB	A3	179-188
EFTUD2	A3	668-677
MUM-3	A68	322-330
延伸因子 2	A68	581-589
CASP-8	B35	476-484
SNRPD1	B38	19-Oct
OS-9	B44	438-446
MUM-2	B44	123-133
MUM-1	B44	30-38
KIAA0205	B44	262-270

[0109]

NFYC	B52	275-282
RBAF600	B7	329-337
HSDL1	Cw14	20-27
MUM-2	Cw6	126-134
K-ras	Cw8	(10-18)
K-ras	Cw8	(10-19)
MAGE-A3	A1	168-176
MAGE-A1	A1	161-169
SSX-2	A2	41-49
NY-ESO-1/LAGE-2	A2	157-165
NY-ESO-1/LAGE-2	A2	(1-11)
MAGE-C2	A2	336-344
MAGE-C2	A2	191-200
MAGE-A10	A2	254-262
LAGE-1	A2	(1-11)
HERV-K-MEL	A2	(1-9)
GAGE-3,4,5,6,7	A29	(10-18)
NY-ESO-1/LAGE-2	A31	53-62
NY-ESO-1/LAGE-2	A31	(18-27)
LAGE-1	A31	(18-27)
MAGE-A6	A34	290-298
KK-LC-1	B15	76-84
MAGE-A6	B35	168-176
MAGE-A6	B37	127-136
MAGE-A3	B37	127-136
MAGE-A2	B37	127-136
MAGE-A1	B37	120-129
MAGE-C2	B44	307-315
MAGE-C2	B57	42-50

[0110]

MAGE-A6	Cw16	293-301
MAGE-A1	Cw16	230-238
BAGE-1	Cw16	(2-10)
GAGE-1,2,8	Cw6	(9-16)
MAGE-A12m	Cw7	170-178
酪氨酸酶	A1	243-251
酪氨酸酶	A1	146-156
酪氨酸酶	A2	(1-9)
酪氨酸酶	A2	369-377
Melan-A/MART-1	A2	32-40
Melan-A/MART-1	A2	26(27)-35
酪氨酸酶	A24	368-373 和 336-340e
酪氨酸酶	A24	206-214
酪氨酸酶	A26	90-98
TRP-2	A31	197-205
TRP-2	A33	197-205
酪氨酸酶	B35	312-320
酪氨酸酶	B35	309-320
Melan-A/MART-1	B35	26-35
酪氨酸酶	B38	388-397
酪氨酸酶	B44	192-200
Melan-A/MART-1	B45	24-33(34)
TRP-2	Cw8	387-395
MMP-2	A2	560-568
HER-2/neu	A2	369-377
CPSF	A2	1360-1369
CPSF	A2	250-258
CALCA	A2	16-25
PRAME	A24	301-309

	FGF5	A3	172-176 和 217-220
	p53	B46	99-107
	PBF	B55	499-510
	H3.3K27M	A2	26-35
[0111]	HPV16-E6		29-38
	HPV16-E7		11-19
	HPV16-E7		11-19
	EBV-LMP1		51-59
	EBV-LMP1		125-133

[0112] 在某些实施方案中,每个所述抗原表位多肽的两端具有柔性连接片段,作为细胞浆内蛋白水解酶的酶切位点,以释放出该抗原表位多肽。所述柔性连接片段包括GSGSR、AGSGSR和AGSGS。

[0113] 在某些实施方案中,所述标记性多肽在所述一个或多个抗原表位多肽氨基酸序列的氨基端具有可把该标记性多肽导入内质网的信号肽。信号肽的核心含有长段疏水性氨基酸,形成单个 α -螺旋。信号肽氨基端常以短的带正电荷的氨基酸序列开始,信号肽末端通常存在一段被信号肽酶识别和切割的氨基酸切割位点。所连接的外源多肽进入内质网后,信号肽被信号肽酶识别和切割,在内质网内释放出外源多肽。因此,携带信号肽的标记性多肽可以不通过MHC I类抗原提呈途径中的蛋白酶水解以及TAP分子的转运,即可直接进入内质网。所述信号肽可以由胰岛素样蛋白(INSL5)氨基端第1-22氨基酸所组成的信号肽(SEQ ID NO:28)。

[0114] 在所述标记性多肽具有多个所述抗原表位多肽的情况中,每两个所述抗原表位多肽可由可切割性连接多肽所连接。可切割性连接多肽包括furin酶切识别多肽,其具有可被Furin酶切割的标准的四氨基酸基序,即R-X-[KR]-R氨基酸序列(参见文献“Molecular Therapy2007;vol.15no.6,1153-1159”)。优选的是,所述可切割性连接多肽的氨基酸序列为R-R-K-R。所述标记性多肽被上述信号肽导入内质网后,由R-X-[KR]-R氨基酸序列连接的抗原表位多肽被内质网中的furin酶切割水解,释放出抗原表位多肽,与内质网中的HLA和 β_2 -微球蛋白形成抗原复合物。内质网内的氨肽酶和羧肽酶也可能参与抗原表位多肽的酶解和释放(参见文献“J Immunol.2009November 1;183(9):5526-5536”),因此,可切割性连接多肽还可以包括氨肽酶和羧肽酶酶切识别多肽。

[0115] 为了使被信号肽导入内质网的标记性多肽能够滞留在内质网腔内,以利于释放出抗原表位多肽并与HLA和 β_2 微球蛋白结合形成抗原复合物,在某些实施方案中,所述标记性多肽在所述一个或多个抗原表位多肽氨基酸序列的羧基端具有内质网滞留信号肽。可溶性多肽(即非跨膜蛋白)的内质网滞留信号(ER retention signal)的氨基酸序列是KDEL,ER膜蛋白的内质网滞留信号是KKXX(参见文献“Molecular Biology of the Cell.2003;14(3):889-902”)。在本发明中,所述标记性多肽是可溶性多肽。因此优选的是,所述内质网滞

留信号肽是由赖氨酸-天冬氨酸-谷氨酸-亮氨酸残基组成的K-D-E-L片段。

[0116] 在一个具体实施方案中,所述标记性多肽包括可操作地连接的、依次串联的以下氨基酸序列:N端信号肽的氨基酸序列、一个或多个所述抗原表位多肽的氨基酸序列、可任选的C端内质网滞留信号的氨基酸序列,其中当所述标记性多肽包括多个所述抗原表位多肽的氨基酸序列时,每两个相邻的所述抗原表位多肽的氨基酸序列之间由可切割性连接多肽的氨基酸序列连接;所述抗原表位多肽的氨基酸序列和可任选的C端内质网滞留信号的氨基酸序列可以由可切割性连接多肽的氨基酸序列连接。优选的是,所述标记性多肽包括所述C端内质网滞留信号的氨基酸序列。

[0117] 优选地,所述标记性多肽包括由可切割性连接多肽R-R-K-R所连接的n个所述抗原表位多肽(优选为Her2/neu 369-377表位多肽),其中n为大于等于1的整数,例如n=1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12…。优选的是,n为1-20之间的整数(例如,2-20之间的整数);还优选的是,n为1-10之间的整数(例如,2-10之间的整数);还优选的是,n=8。

[0118] 考虑到肿瘤细胞和/或癌细胞中的HLA蛋白也常出现表达缺陷,包括完全缺失,单倍型缺失或等位基因缺失,不同肿瘤类型缺失的范围从65%到90%不等(参见文献“Immunol Today.1997;18:89-95”),因此,在一个实施方案中,所述核酸还具有HLA蛋白编码序列,其中该HLA蛋白编码序列与所述标记性多肽编码序列分别在各自的启动子控制之下,或者该HLA蛋白编码序列与所述标记性多肽编码序列在同一启动子控制之下并且该HLA蛋白编码序列通过可切割性连接多肽编码序列与所述标记性多肽编码序列可操作地连接。优选的是,该HLA蛋白的表型与所述标记性多肽能够结合的HLA蛋白的表型一致。所述启动子可以是真核细胞启动子,包括持续表达启动子和可诱导表达启动子,包括(例如):PGK1启动子、EF-1 α 启动子、CMV启动子、SV40启动子、Ubc启动子、CAG启动子、TRE启动子、CaMKII α 启动子、人 β 肌动蛋白(human beta actin)启动子。

[0119] 这样,本发明进一步增加了肿瘤细胞表面MHC/抗原表位多肽复合物的表达量,从而增强了所述T细胞受体修饰的免疫细胞对肿瘤细胞的识别敏感性。

[0120] 进一步具体地,所述MHC蛋白是HLA I类蛋白。进一步具体地,所述HLA包括HLA-A、B、C。优选的是,所述HLA蛋白为HLA-A2蛋白,HLA-A2的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示。

[0121] 连接所述HLA蛋白与所述标记性多肽之间的所述可切割性连接多肽的例子是本领域已知的,例如2A多肽,2A多肽包括但不限于来自微小核糖核酸病毒的F2A多肽、以及来自其它病毒的相似的2A类多肽;还可以是Furin-F2A连接片段。

[0122] 优选地,在本发明的治疗剂中,所述第一组合物和所述第二组合物各自独立地存在于所述治疗剂中而互不混合。

[0123] 优选地,在本发明的治疗剂中,所述核酸包括DNA或RNA;所述RNA包括由所述DNA转录的mRNA。

[0124] 在一个实施方案中,所述第一活性成分为重组病毒,所述重组病毒的基因组具有标记性多肽编码序列和可任选的HLA蛋白编码序列;其中,所述重组病毒包括选择复制型重组溶瘤病毒或复制缺陷型重组病毒。

[0125] 所述复制缺陷型重组病毒是缺失一个或数个与病毒复制、增殖和病毒颗粒组装有关的必需功能基因的病毒载体,该病毒载体不能在正常细胞内复制形成子代病毒,但可以表达病毒自身或外源的基因产物。所述复制缺陷型重组病毒优选来源于腺病毒、腺病毒相

关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒、痘病毒、流感病毒、甲病毒(Alphavirus)、仙台病毒。

[0126] 优选地,所述复制缺陷型重组病毒为对5型腺病毒进行基因改造而得到的重组腺病毒,该重组腺病毒的基因组中缺失了E1基因,并且在所缺失的E1基因的位置插入有所述标记性多肽的编码序列和可任选的HLA蛋白编码序列。

[0127] 所述重组溶瘤病毒可以来源于具有溶瘤作用的经基因突变的病毒和具有溶瘤作用的野生型病毒。优选地,所述重组溶瘤病毒来源于具有溶瘤作用的腺病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、塞姆利基森林病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、逆转录病毒、呼肠孤病毒、塞内卡谷病毒、埃可型肠道病毒、柯萨奇病毒、新城疫病毒和马拉巴病毒。

[0128] 溶瘤病毒感染肿瘤细胞后选择性在肿瘤细胞中进行复制,通过子病毒的大量增殖从而裂解肿瘤细胞达到特异性杀伤肿瘤细胞的作用。释放的子病毒又可以选择性感染并裂解其它肿瘤细胞从而最大程度地清除肿瘤组织(参见文献“*Nat Biotechnol.*2012Jul10;30(7):658-70”)。肿瘤细胞中异常的RAS、TP53、RB1、PTEN、WNT等信号传导途径影响了细胞自身的抗病毒机制,使得病毒在肿瘤细胞中更容易复制,是形成肿瘤选择性的主要原因。由于正常细胞中抑制病毒复制的分子机制完整,感染正常细胞后溶瘤病毒不能有效复制和扩散,因而大大限制了对正常组织细胞的损害(参见文献“*Nat Rev Cancer.*2017 11;17(11):633”)。经过对病毒基因组的基因工程改造进一步增强了溶瘤病毒的肿瘤选择性,并且可以携带功能性外源基因以增强溶瘤病毒的抗肿瘤活性。除了本身的溶瘤作用外,溶瘤病毒还可以改变肿瘤组织的微环境,主要是通过诱导分泌细胞因子,吸引天然免疫细胞,释放肿瘤抗原,提供免疫危险信号等,从而增强肿瘤局部的抗肿瘤免疫反应(参见文献“*J.Clin.Invest.*2018;128,1258-1260”)。腺病毒作为载体是较早被研发的溶瘤病毒,基于E1B-55K和E3基因缺陷的Ad5型腺病毒H101是第一个批准上市的溶瘤病毒产品(参见文献“*Hum Gene Ther.*2018Feb;29(2):151-159”)。腺病毒的分子结构和生物特性的研究比较深入,使得腺病毒更容易通过基因工程改造成为溶瘤病毒。腺病毒的一些特点,包括其基因组改造后允许插入较大片段的外源基因;腺病毒基因组DNA不会整合到宿主基因组中;也不会导致人体细胞的恶变;可感染多数人类肿瘤细胞;以及稳定高滴度病毒颗粒的制备等,使得腺病毒更适合成为溶瘤病毒载体(参见文献“*Curr Opin Virol.*2016 12;21:9-15”)。溶瘤腺病毒的不同设计与其肿瘤选择性的不同机制有关,比如E1B-55K基因缺陷的Ad5型腺病毒感染具有p53功能的正常细胞后,在完成病毒复制周期前会诱导细胞凋亡,而在大约50%的由于基因突变而丧失p53功能的肿瘤细胞中则会完成复制并裂解细胞(参见文献“*Nat Med* 1998;4(9):1098-72”)。部分去除E1A基因的溶瘤腺病毒也会限制其在正常细胞中的复制,E1A的CR2区去除24个碱基后产生的缺陷蛋白(E1A Δ 24)会丧失其从E2F1/pRB复合体中释放出E2F1的功能,而游离的E2F1对启动下游复制至关重要。而肿瘤细胞中的pRB途径常有异常,因而产生大量游离的E2F1以保证病毒在肿瘤细胞中的选择复制(参见文献“*Cell* 2000;100(1):57-70”)。携带VA-RNA基因缺陷的溶瘤腺病毒的肿瘤选择性则依赖于肿瘤细胞中活化的RAS信号通路以及干扰素通路的不完整(参见文献“*Cancer Res.*2003;63(17):5544-50”)。溶瘤腺病毒的另外一种肿瘤选择性机制则是利用肿瘤特异性基因启动子来驱动腺病毒复制所必需的基因。例如用肝癌细胞中的甲胎蛋白启动子(参见文献“*Hum Gene Ther.*1999;10(10):1721-33”);前列腺癌细胞中的前列腺特异性抗原(PSA)启动子(参见文献“*Cancer Res.*1997;57(13):2559-63”),或者骨钙素(hOC)启动子(参见文献“*Cancer*

Res. 2002;62(11):3084-92”);或者MUC-1阳性乳腺癌中的DF3/MUC1启动子(参见文献“J Clin Invest. 2000;106(6):763-71”)等主要在特定肿瘤细胞中活化的启动子来驱动E1A缺陷腺病毒E1A的基因表达,以达到在这些肿瘤细胞中选择性复制的目的。如果利用其活性依赖于游离E2F1转录因子的启动子,比如插入能结合E2F1的回文序列的E2F1启动子,来驱动病毒复制所必需基因的表达,只有在富含游离E2F1的肿瘤细胞中才能有效表达病毒复制的下游分子而达到选择性裂解肿瘤细胞(参见文献“Mol Ther. 2007;15(9):1607-15”;“Cancer Cell. 2002;1(4):325-37”)。

[0129] 基因工程改造后的溶瘤腺病毒虽然增强了肿瘤细胞的选择性杀伤,但病毒的溶瘤能力要进一步加强才能提高其临床疗效。由于溶瘤病毒完成复制周期需要依赖宿主肿瘤细胞的细胞组分和特有的分子机制,而肿瘤的多样性决定了不同生长状态和性质的肿瘤细胞被溶瘤病毒感染后,有些肿瘤细胞不能完成复制周期并产生足够数量的子病毒以裂解细胞。另外,溶瘤腺病毒缺失E1B-55K后,可能会导致编码后期病毒蛋白的mRNA从细胞核中导出到细胞浆中进行蛋白翻译的过程发生障碍,从而影响病毒在肿瘤细胞中的复制(参见文献“Viruses. 2015Nov;7(11):5767-5779”)。这些因素都会限制溶瘤病毒在单独使用时的临床疗效。

[0130] 本发明的一个实施方案中通过溶瘤病毒将含有所述标记性多肽编码序列和可任选的HLA蛋白编码序列的核酸导入肿瘤细胞和/或癌细胞,在发挥溶瘤病毒杀伤肿瘤细胞和/或癌细胞的作用的同时,T细胞受体修饰的免疫细胞还可以有效清除被溶瘤病毒感染后,不能完成复制周期并产生足够数量的子病毒而发生裂解的肿瘤细胞,由此实现了协同作用。

[0131] 优选地,所述选择复制型重组溶瘤病毒为对5型腺病毒进行基因改造而得到的重组溶瘤腺病毒。在一个实施方案中,该重组溶瘤腺病毒的基因组中缺失了E1B-55K基因和/或E1B-19K基因(例如缺失了E1B-55K基因,或者缺失了E1B-55K基因和E1B-19K基因),并且所述重组溶瘤腺病毒的基因组中包含E1A基因编码序列;优选地,所述E1A基因编码序列是在外源启动子控制下的。

[0132] 在一个实施方案中,插入溶瘤腺病毒基因组中的所述标记性多肽的编码序列可以在腺病毒自身的E1B基因启动子、E1B TATA盒序列和E1B多聚腺苷酸添加信号序列的调控下在肿瘤细胞中表达。

[0133] 在另一个实施方案中,插入溶瘤病毒基因组中的所述标记性多肽的编码序列可以在真核细胞启动子的控制下,真核细胞启动子包括但不限于CMV启动子、EF1a启动子、SV40启动子、PGK1启动子、Ubc启动子、人 β -肌动蛋白启动子。

[0134] 所述重组溶瘤腺病毒的E1A基因可以被改变为使得所表达的E1A蛋白无法与pRb蛋白结合。在具体的实施方案中,所述重组溶瘤腺病毒基因组DNA中编码E1A蛋白CR2区域的核苷酸序列缺失了5型腺病毒基因组DNA第923-946位的24个核苷酸(溶瘤腺病毒E1A- δ 24),所编码的E1A蛋白的氨基酸序列缺失了L-T-C-H-E-A-G-F。该所缺失的氨基酸序列是E1A蛋白和Rb蛋白的结合区域,缺失这段氨基酸序列的E1A蛋白不能结合Rb蛋白,导致溶瘤腺病毒E1A- δ 24选择性地Rb/E2F1通路缺陷的肿瘤细胞中复制并裂解肿瘤细胞。

[0135] 优选地,所述重组溶瘤腺病毒的E1A基因是在组织特异性启动子或肿瘤特异性启动子控制下的。所述组织特异性启动子或肿瘤特异性启动子包括E2F-1启动子、端粒酶

hTERT启动子、酪氨酸酶启动子、前列腺特异性抗原启动子、甲胎蛋白启动子和COX-2启动子。优选的,所述肿瘤特异性启动子是E2F-1启动子(其核苷酸序列为SEQ ID NO:30)。在正常细胞中,由于E2F-1与pRb结合,E2F-1启动子所调控的E1A的表达被抑制。在肿瘤细胞中,由于pRb的缺失或过度磷酸化,“游离”E2F-1的水平增加,E2F-1启动子活化后驱动E1A的表达,并导致腺病毒在肿瘤细胞中选择性复制并裂解细胞。

[0136] 优选地,所述重组溶瘤腺病毒的E3基因全部或部分缺失。这样能够避免E3-19K蛋白对HLA I类抗原提呈途径的抑制作用,从而使外源导入的抗原表位多肽和内源肿瘤抗原可更有效地被提呈到肿瘤细胞表面。

[0137] 在某些实施方案中,所述腺病毒的结构蛋白和功能蛋白上缺失至少一个T细胞所识别的免疫显性的抗原表位。结构蛋白和功能蛋白包括E1A、E1B、六邻体、五邻体基底、纤维蛋白、衣壳蛋白IX、DNA聚合酶和单链DNA结合蛋白。在一个实施方案中,通过基因点突变去除病毒蛋白上T细胞所识别的免疫显性抗原表位(参见专利文献“W02016178167A1”)。

[0138] 在本发明所述的治疗剂中,被T细胞受体修饰的所述免疫细胞包括原始T细胞或其前体细胞,NKT细胞,或T细胞株。

[0139] 所述T细胞受体包括 α 链和 β 链中的至少一者,所述 α 链和 β 链均包含可变区和恒定区,所述T细胞受体能够特异性识别肿瘤细胞和/或癌细胞表面上的所述抗原表位多肽。

[0140] 优选地,所述 α 链的所述可变区的氨基酸序列具有与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列至少98%、优选至少98.5%、更优选至少99%的一致性,所述 β 链的所述可变区的氨基酸序列具有与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列至少98%、优选至少98.5%、更优选至少99%的一致性,只要不显著影响本发明的效果即可。还优选的是,所述 α 链的所述可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述 β 链的所述可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0141] TCR α 链和 β 链的可变区用于结合抗原多肽/主要组织相容性复合体(MHC I),分别包括三个超变区或称为互补决定区(complementarity determining regions,CDRs),即,CDR1、CDR2、CDR3。其中CDR3区域对特异性识别被MHC分子提呈的抗原多肽至关重要。TCR α 链是不同的V和J基因片段重组而成, β 链则是不同的V、D和J基因片段重组而成。特定基因片段重组结合所形成的相应CDR3区域,以及结合区域回文以及随机插入的核苷酸(palindromic and random nucleotide additions)形成了TCR对抗原多肽识别的特异性(参见文献“Immunobiology:The immune system in health and disease.5th edition,Chapter 4,The generation of Lymphocyte antigen receptors”)。所述MHC I类分子包括人HLA。所述HLA包括:HLA-A、B、C。

[0142] T细胞表达的外源TCR α 链和 β 链有可能和T细胞本身TCR的 α 链和 β 链发生错配,不仅会稀释正确配对的外源TCR的表达量,错配TCR的抗原特异性也不明确,因而有识别自身抗原的潜在危险,因此优选将TCR α 链和 β 链的恒定区修饰以减少或避免错配。

[0143] 在一个实施方案中,所述 α 链的所述恒定区和/或所述 β 链的所述恒定区来源于人;优选地,本发明发现所述 α 链的所述恒定区可以全部或部分地被来源于其它物种的同源序列所替换,并且/或者所述 β 链的所述恒定区可以全部或部分地被来源于其它物种的同源序列所替换。更优选地,所述其它物种为小鼠。

[0144] 所述替换可以增加细胞中TCR的表达量,并且可以进一步提高被该TCR修饰的细胞对Her2/neu抗原的特异性。

[0145] 所述 α 链的所述恒定区可以修饰有一个或多个二硫键,并且/或者所述 β 链的所述恒定区可以修饰有一个或多个二硫键,例如1个或2个。

[0146] 在具体的实施方式中,制备了两种不同方式修饰的TCR,一种方式是通过点突变在TCR恒定区增加一个二硫键,方法在文献“Cancer Res.2007Apr 15;67(8):3898-903.”中描述,其全文通过引用方式并入本文。Her2 TCR-1B5-mC是用小鼠TCR恒定区序列置换相应的人TCR恒定区序列,方法在文献“Eur.J.Immunol.2006 36:3052-3059”中描述,其全文通过引用方式并入本文。

[0147] 在具体的实施方案中,所述 α 链的氨基酸序列如SEQ ID NOs:4、5或6所示,所述 β 链的氨基酸序列如SEQ ID NOs:7、8或9所示。

[0148] 其中,对于氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的 α 链,其序列为原始的人源序列;对于氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的 α 链,其在恒定区修饰有1个二硫键;对于氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示的 α 链,其恒定区替换为鼠源恒定区。

[0149] 其中,对于氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示的 β 链,其序列为原始的人源序列;对于氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示的 β 链,其在恒定区修饰有1个二硫键;对于氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示的 β 链,其恒定区替换为鼠源恒定区。

[0150] 在一个具体实施方案中,所述TCR的 α 链的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示, β 链的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。在另一个具体实施方案中,所述TCR的 α 链的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示, β 链的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。在又一个具体实施方案中,所述TCR的 α 链的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示, β 链的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0151] 在本发明其它具体的实施方案中,所述TCR的 α 链具有在SEQ ID NOs:4、5或6所示氨基酸序列中替换、删除、和/或添加一个或多个氨基酸而得到的氨基酸序列;例如,所述 α 链具有与SEQ ID NOs:4、5或6所示氨基酸序列至少90%、优选至少95%、更优选至少99%的一致性。

[0152] 在本发明其它具体的实施方案中,所述TCR的 β 链具有在SEQ ID NOs:7、8或9所示氨基酸序列中替换、删除、和/或添加一个或多个氨基酸而得到的氨基酸序列;例如,所述 β 链具有与SEQ ID NOs:7、8或9所示氨基酸序列至少90%、优选至少95%、更优选至少99%的一致性。

[0153] 本发明的TCR的 α 链和/或 β 链还可以在末端(例如C末端)结合其它功能性序列,例如共刺激信号CD28、4-1BB和/或CD3zeta的功能区序列。

[0154] 本发明还涉及分离的、编码T细胞受体的核酸,包含所述T细胞受体的 α 链和 β 链中的至少一者的编码序列,所述 α 链编码序列和 β 链编码序列均包含可变区编码序列和恒定区编码序列,所述T细胞受体能够特异性识别肿瘤细胞和/或癌细胞表面上的所述抗原表位多肽。

[0155] 所述 α 链可变区编码序列编码的氨基酸序列具有与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列至少98%、优选至少98.5%、更优选至少99%的一致性,所述 β 链可变区编码序列编码的氨基酸序列具有与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列至少98%、优选至少98.5%、更优选至少99%的一致性,只要不显著影响本发明的效果即可。还优选的是,所述 α 链可变区编码序列编码如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,所述 β 链可变区编码序列编码如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0156] 所述核酸可以为DNA或RNA。

[0157] 优选地,所述 α 链可变区编码序列如SEQ ID NO:10所示,所述 β 链可变区编码序列如SEQ ID NO:11所示。

[0158] 在一个实施方案中,所述 α 链的所述恒定区和/或所述 β 链的所述恒定区来源于人;优选地,所述 α 链恒定区编码序列全部或部分地被来源于其它物种的同源序列所替换,并且/或者所述 β 链恒定区编码序列全部或部分地被来源于其它物种的同源序列所替换。更优选地,所述其它物种为小鼠。所述替换可以增加细胞中TCR的表达量,并且可以进一步提高被该TCR修饰的细胞对Her2/neu抗原的特异性。

[0159] 所述 α 链恒定区编码序列可以包含一个或多个二硫键的编码序列,并且/或者所述 β 链恒定区编码序列可以包含一个或多个二硫键的编码序列。

[0160] 在具体的实施方案中,所述 α 链编码序列如SEQ ID NOs:12、13或14所示,所述 β 链编码序列如SEQ ID NOs:15、16或17所示。

[0161] 其中,对于编码序列如SEQ ID NO:12所示的 α 链,其序列为原始的人源序列;对于编码序列如SEQ ID NO:13所示的 α 链,其在恒定区修饰有1个二硫键;对于编码序列如SEQ ID NO:14所示的 α 链,其恒定区替换为鼠源恒定区。

[0162] 其中,对于编码序列如SEQ ID NO:15所示的 β 链,其序列为原始的人源序列;对于编码序列如SEQ ID NO:16所示的 β 链,其在恒定区修饰有1个二硫键;对于编码序列如SEQ ID NO:17所示的 β 链,其恒定区替换为鼠源恒定区。

[0163] 在一个具体实施方案中,所述TCR的 α 链的编码序列如SEQ ID NO:12所示, β 链的编码序列如SEQ ID NO:15所示。在另一个具体实施方案中,所述TCR的 α 链的编码序列如SEQ ID NO:13所示, β 链的编码序列如SEQ ID NO:16所示。在又一个具体实施方案中,所述TCR的 α 链的编码序列如SEQ ID NO:14所示, β 链的编码序列如SEQ ID NO:17所示。

[0164] 在另外的实施方案中,所述 α 链编码序列和所述 β 链编码序列之间由可切割性连接多肽的编码序列连接,这样可以增加TCR在细胞内的表达。

[0165] 组成单链嵌合TCR的 α 链和 β 链也可如上文所述,恒定区(及其相应的编码序列)全部或部分地被来源于其它物种的同源序列所替换,并且/或者修饰有(编码)一个或多个二硫键。

[0166] 在具体的实施方案中,所述核酸的序列如SEQ ID NOs:18、19、或20所示。

[0167] 优选地,对所述核酸的核苷酸序列进行密码子优化以增加基因表达、蛋白翻译效率以及蛋白表达,从而增强TCR识别抗原的能力。密码子优化包括但不限于翻译启动区域的修饰、改变mRNA结构片段、以及使用编码同一氨基酸的不同密码子。

[0168] 在其它的实施方案中,可以对上述TCR编码核酸的序列进行突变,包括去除、插入和/或置换一个或多个氨基酸密码子,使得所表达的TCR识别抗原表位多肽的功能不变或者增强。例如,在一个实施方案中,进行保守氨基酸置换,包括对上述TCR α 链和/或 β 链的可变区中的一个氨基酸用结构和/或化学属性相似的另一个氨基酸进行置换。术语“相似的氨基酸”是指具有相似的极性、电负荷、可溶性、疏水性、亲水性等属性的氨基酸残基。突变后的TCR仍具有识别上述被靶细胞提呈的抗原表位多肽的生物活性。在另一个实施方案中,进行TCR成熟性(TCR maturation)修饰,即,包括对上述TCR α 链和/或 β 链的可变区中的互补决定区2(CDR2)和/或CDR3区域的氨基酸进行去除、插入和/或置换,从而改变TCR结合抗原表位

多肽的亲水性。

[0169] 本发明还涉及用于表达所述TCR的重组表达载体,其含有与启动子有效连接的根据本发明所述的编码T细胞受体的核酸(例如DNA),和/或其互补序列。

[0170] 优选地,在所述重组表达载体中,本发明所述的编码T细胞受体的DNA合适地与启动子、增强子、终止子和/或polyA信号序列有效连接。

[0171] 重组表达载体的上述作用元件的组合能够促进DNA的转录和翻译,并增强mRNA的稳定性。

[0172] 重组表达载体的基本骨架可以是任何已知的表达载体,包括质粒或病毒,病毒载体包括但不限于(例如)逆转录病毒载体(病毒原型为莫洛尼鼠白血病毒(MMLV))和慢病毒载体(病毒原型为人类免疫缺陷I型病毒(HIV))。表达本发明所述TCR的重组载体可以通过本领域常规的重组DNA技术来获得。

[0173] 在一个实施方案中,重组表达载体上的 α 链和 β 链基因的表达可以由两个不同的启动子所驱动,启动子包括各种已知的类型,例如强表达的、弱表达的、持续表达的、可诱导的、组织特异性的、和分化特异性的启动子。启动子可以是病毒来源的或者非病毒来源的(例如真核细胞启动子),例如CMV启动子、MSCV的LTR上的启动子、EF1- α 启动子、和PGK-1启动子、SV40启动子、Ubc启动子、CAG启动子、TRE启动子、CaMKIIa启动子、人 β 肌动蛋白启动子。两个启动子的驱动方向可以是同向也可以是反向的。

[0174] 在另一个实施方案中,重组表达载体上的 α 链和 β 链基因的表达可以由同一个启动子所驱动,例如编码单链嵌合T细胞受体的情况, α 链的核苷酸序列和 β 链的核苷酸序列由Furin-F2A多肽编码序列相连接。

[0175] 在另一些实施方案中,重组表达载体除了包含 α 链和 β 链基因外,还可以包含其它功能分子的编码序列。一个实施方案包括表达自发荧光蛋白(如GFP或其它荧光蛋白)以用于体内追踪成像。另一个实施方案包括表达可诱导的自杀基因系统,例如诱导表达单纯疱疹病毒-胸腺嘧啶核苷激酶(HSV-TK)蛋白,或者诱导表达Caspase 9(iCasp9)蛋白。表达这些“安全转换分子”(safety-switch)可以增加经本发明所述TCR基因修饰的细胞在体内使用的安全性(参见文献“Front.Pharmacol.,2014;5:1-8)。另一个实施方案包括表达趋化因子受体基因,例如CCR2,这些趋化因子受体可结合肿瘤组织中高表达的相应趋化因子配体,从而可以增加经本发明所述TCR基因修饰的细胞在肿瘤组织中的归巢。

[0176] 优选地,所述第一组合物包含治疗有效量的所述DNA、或治疗有效量的所述mRNA。

[0177] 还优选地,所述第一组合物包含治疗有效量的所述重组病毒。优选地,所述重组病毒为重组溶瘤腺病毒时,重组溶瘤腺病毒的施用剂量为 5×10^7 - 5×10^{12} vp/天,每天1-2次,连续施用1-7天。

[0178] 还优选地,所述第二组合物包含治疗有效量的所述的T细胞受体修饰的免疫细胞。优选地,包含每个疗程总剂量范围为 1×10^3 - 1×10^9 个细胞/Kg体重的所述T细胞受体修饰的免疫细胞。

[0179] 所述DNA可以配制成通过瘤内注射给药,例如,以质粒的形式直接肿瘤内注射,也可用脂质体包装后瘤内注射,也可连接到纳米颗粒上(如多聚L-赖氨酸、聚氨基酸、聚亚乙基胺(polyethyleneimine)和壳聚糖等聚合物)瘤内注射,也可瘤内注射后用电转方法加强转染率。所述mRNA也可以相似的方式配制成通过瘤内注射给药。

[0180] 所述重组病毒可以配制成通过瘤内注射给药、腹膜内给药、蛛网膜下腔内给药、或静脉给药。

[0181] 所述免疫细胞可以配制成通过动脉、静脉、皮下、皮内、瘤内、淋巴管内、淋巴结内、蛛网膜下腔内、骨髓内、肌肉内或腹膜内给药。

[0182] 优选地,所述治疗剂由所述第一组合物和所述第二组合物组成。

[0183] 本领域的技术人员可以理解,本发明的治疗剂还可包含合适的可药用的辅料,包括药用或生理载体、赋形剂、稀释剂(包括生理盐水、PBS溶液)、以及各种添加剂,包括糖类、脂类、多肽、氨基酸、抗氧化剂、佐剂、保鲜剂等。

[0184] 本发明还提供了所述的治疗剂在制备用于治疗肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

[0185] 所述肿瘤和/或癌症包括:头颈部肿瘤,滑膜癌,肾癌,结缔组织癌,黑色素瘤,肺癌,食管癌,结肠癌,直肠癌,脑癌,肝癌,骨癌,绒毛膜癌,胃泌素瘤,嗜铬细胞瘤,催乳素瘤,血液癌,神经瘤,von Hippel-Lindau病,Zollinger-Ellison综合征,肛门癌,胆管癌,膀胱癌,输尿管癌,神经胶质瘤,神经母细胞瘤,脑膜瘤,脊髓肿瘤,骨软骨瘤,软骨肉瘤,尤文氏肉瘤,原发部位不明癌,类癌,纤维肉瘤,乳腺癌,佩吉特病,宫颈癌,食道癌,胆囊癌,眼癌,卡波西氏肉瘤,前列腺癌,睾丸癌,皮肤癌,间皮瘤,多尖端骨髓瘤,卵巢癌,胰腺内分泌瘤,胰高血糖素瘤,胰腺癌,阴茎癌,垂体癌,软组织肉瘤,视网膜母细胞瘤,小肠癌,胃癌,胸腺癌,滋养细胞癌,葡萄胎,子宫内膜癌,阴道癌,外阴癌,蕈样真菌病,胰岛素瘤,心脏癌,脑膜癌,血液癌,腹膜癌和胸膜癌。所述肿瘤和/或癌症可以包括本身是HLA-A2阳性而Her2/neu阴性的、HLA-A2阴性而Her2/neu阳性的、HLA-A2和Her2/neu均为阳性的、或HLA-A2和Her2/neu均为阴性的。可以根据肿瘤和/或癌症患者的自身实际情况,为患者施用本发明范围内的治疗剂。

[0186] 本发明还提供了本发明上文所述的标记性多肽。

[0187] 优选地,所述标记性多肽的氨基酸序列具有与如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:56、或SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列至少98%的一致性、更优选至少98.5%、还优选至少99%的一致性。还优选地,所述标记性多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:56、或SEQ ID NO:60所示。

[0188] 本发明还提供了一种分离的、具有根据本发明所述的标记性多肽的编码序列的核酸。其中所述标记性多肽的氨基酸序列具有与如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:56、或SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列至少98%的一致性、更优选至少98.5%、还优选至少99%的一致性。所述核酸的各实施方案如上文所述。

[0189] 优选地,所述核酸为DNA,其核苷酸序列如SEQ ID NO:25(对应于不包括HLA-A2序列)、或SEQ ID NO:26(对应于包括HLA-A2的序列,其中HLA-A2在标记性多肽之前)、或SEQ ID NO:27(对应于包括HLA-A2的序列,其中HLA-A2在标记性多肽之后)、或SEQ ID NO:57、或SEQ ID NO:58、或SEQ ID NO:61所示。其对应的氨基酸序列如SEQ ID NO:24(对应于不包括HLA-A2序列)、或SEQ ID NO:31所示(对应于包括HLA-A2的序列,其中HLA-A2在标记性多肽之前)、或SEQ ID NO:32所示(对应于包括HLA-A2的序列,其中HLA-A2在标记性多肽之后)、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:36、或SEQ ID NO:60所示。

[0190] 本发明还提供了所述的核酸在制备用于治疗或预防肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

[0191] 本发明还提供了一种重组表达载体,含有根据本发明所述的核酸,和/或其互补序列。

[0192] 优选地,在所述重组表达载体中,本发明所述的核酸合适地与启动子、增强子、终止子和/或polyA信号序列有效连接。

[0193] 本发明的重组表达载体的上述作用元件的组合能够促进DNA的转录和翻译,并增强mRNA的稳定性。

[0194] 重组表达载体的基本骨架可以是任何已知的表达载体,包括质粒或病毒,病毒载体包括但不限于(例如)逆转录病毒载体(病毒原型为莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV))和慢病毒载体(病毒原型为人类免疫缺陷I型病毒(HIV))。表达本发明所述标记性多肽的重组载体可以通过本领域常规的重组DNA技术来获得。

[0195] 在一些实施方案中,所述重组表达载体的基本骨架是溶瘤腺病毒。所述启动子是内源的病毒基因启动子,例如E1A启动子、E1B启动子或E3启动子。在某些实施方案中,启动子是组织特异性或肿瘤特异性启动子。优选地,在一些实施方案中,启动子是SEQ ID NO:30所示的E2F-1启动子。

[0196] 在另一些实施方案中,重组表达载体除了包含本发明所述的核酸外,还可以包含其它功能分子的编码序列,例如报告基因,其可以用于鉴定细胞是否转染有重组表达载体,也可以用于测定蛋白质水平和活性,例如通过流式细胞分析、扩增/表达方法、免疫组织化学方法、FISH和脱落抗原测定、Southern印迹、蛋白质印迹或PCR技术。因此,测量细胞中蛋白质水平的方法通常是本领域已知的。

[0197] 本发明还提供了所述的重组表达载体在制备用于治疗或预防肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

[0198] 本发明还提供了一种分离的重组病毒,其中所述重组病毒的基因组具有根据本发明所述的核酸;并且,所述重组病毒包括选择复制型重组溶瘤病毒或复制缺陷型重组病毒。所述分离的重组病毒的各实施方案如上文所述。

[0199] 本发明还提供了所述的重组病毒在制备用于治疗或预防肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

[0200] 本发明还提供了一种用于治疗肿瘤和/或癌症的具有协同作用的联合药物的药盒,包括:

[0201] 第一容器,该第一容器装有根据本发明所述的治疗剂中的第一组合物;

[0202] 第二容器,该第二容器装有根据本发明所述的治疗剂中的第二组合物,其中所述第一容器和所述第二容器是独立的;以及

[0203] 载明给药时机和给药方式的说明书。

[0204] 本发明还提供了所述的药盒在制备用于治疗或预防肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

[0205] 所述肿瘤和/或癌症包括:头颈部肿瘤(包括鼻咽癌),滑膜癌,肾癌,结缔组织癌,黑色素瘤,肺癌,食管癌,结肠癌,直肠癌,脑癌,肝癌,骨癌,绒毛膜癌,胃泌素瘤,嗜铬细胞瘤,催乳素瘤,血液癌,神经瘤,von Hippel-Lindau病,Zollinger-Ellison综合征,肛门癌,胆管癌,膀胱癌,输尿管癌,神经胶质瘤,神经母细胞瘤,脑膜瘤,脊髓肿瘤,骨软骨瘤,软骨肉瘤,尤文氏肉瘤,原发部位不明癌,类癌,纤维肉瘤,乳腺癌,佩吉特病,宫颈癌,食道癌,胆

囊癌,眼癌,卡波西氏肉瘤,前列腺癌,睾丸癌,皮肤癌,间皮瘤,多尖端骨髓瘤,卵巢癌,胰腺内分泌瘤,胰高血糖素瘤,胰腺癌,阴茎癌,垂体癌,软组织肉瘤,视网膜母细胞瘤,小肠癌,胃癌,胸腺癌,滋养细胞瘤,葡萄胎,子宫内膜癌,阴道癌,外阴癌,蕈样真菌病,胰岛素瘤,心脏癌,脑膜癌,血液癌,腹膜癌和胸膜癌。所述肿瘤和/或癌症可以包括本身是HLA-A2阳性而Her2/neu阴性的、HLA-A2阴性而Her2/neu阳性的、HLA-A2和Her2/neu均为阳性的、或HLA-A2和Her2/neu均为阴性的。可以根据肿瘤和/或癌症患者的自身实际情况,为患者提供本发明范围内的药盒。

[0206] 本发明还提供了一种治疗肿瘤和/或癌症的方法,包括:

[0207] 对肿瘤和/或癌症患者施用根据本发明所述的治疗剂中的第一组合物;和

[0208] 对所述肿瘤和/或癌症患者施用根据本发明所述的治疗剂中的第二组合物。

[0209] 所述治疗剂中的第一组合物和第二组合物可以同时(例如,作为混合物同时瘤内注射)、分开但同时(例如,分别通过瘤内和静脉注射给药)或依次施用(例如,首先施用第一组合物,然后施用第二组合物;或者首先施用第二组合物,然后施用第一组合物)。

[0210] 优选地,所述方法包括以下依次进行的步骤:

[0211] 1) 对所述肿瘤和/或癌症患者首先施用所述第一组合物;和

[0212] 2) 在施用所述第一组合物之后,对所述肿瘤和/或癌症患者施用所述的治疗剂中的第二组合物。

[0213] 优选地,在首先施用所述第一组合物之后的第1-30天,对所述肿瘤和/或癌症患者施用所述的治疗剂中的第二组合物。

[0214] “在首先施用所述第一组合物之后的第1-30天,对所述肿瘤和/或癌症患者施用所述的治疗剂中的第二组合物”是指首次第二组合物的施用与首次第一组合物施用的时间间隔为1-30天(例如,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30天),或首次第二组合物的施用与在其之前最相邻一次的所述第一组合物施用的时间间隔为1-30天(例如,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30天)。优选地,首次第二组合物的施用与在其之前最相邻一次的所述第一组合物施用的时间间隔为3-14天(例如,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14天)。

[0215] 在本发明的一个优选实施方案中,第一组合物包含所述重组溶瘤腺病毒,所述重组溶瘤腺病毒的施用剂量为 5×10^7 - 5×10^{12} vp/天,每天1-2次,连续施用1-7天,或上述范围间的任何值。

[0216] 在本发明的一个优选实施方案中,所述T细胞受体修饰的免疫细胞的施用剂量为,每个疗程总剂量范围为 1×10^3 - 1×10^9 个细胞/Kg体重。优选地,1天施用1-3次,连续施用1-7天。

[0217] 在某些实施方案中,所述治疗肿瘤和/或癌症的方法还包括对患者施用其它用于治疗肿瘤和/或癌症的药物,和/或用于调节患者免疫系统的药物,以增强所述T细胞受体修饰的免疫细胞在体内的数量和功能。所述其它用于治疗肿瘤和/或癌症的药物包括但不限于:化疗药物,例如环磷酰胺、氟达拉滨(fludarabine);放疗药物;免疫抑制剂,例如环孢素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、麦考酚酯(mycophenolate)、FK50;抗体,例如抗CD3、IL-2、IL-6、IL-17、TNF α 的抗体。

[0218] 在某些实施方案中,所述治疗肿瘤和/或癌症的方法还包括对患者施用其它用于治疗肿瘤和/或癌症的药物,和/或用于调节患者免疫系统的药物,用于当所述T细胞受体修饰的免疫细胞产生严重毒副作用时,清除携带自杀基因的所述T细胞受体修饰的免疫细胞在体内的数量和功能。所述其它用于治疗肿瘤和/或癌症的药物包括但不限于:化学诱导二聚化(CID)药物、AP1903、磷酸化更昔洛韦(ganciclovir)、抗Cd20抗体、抗CMYC抗体、抗EGFR抗体。

[0219] 所述DNA可以配制成通过瘤内注射给药,例如,以质粒的形式直接肿瘤内注射,也可用脂质体包装后瘤内注射,也可连接到纳米颗粒上(如多聚L-赖氨酸、聚氨基酸、聚亚乙基亚胺(polyethyleneimine)和壳聚糖等聚合物)瘤内注射,也可瘤内注射后用电转方法加强转染率。所述mRNA也可以相似的方式配制成通过瘤内注射给药。

[0220] 所述重组病毒可以配制成通过瘤内注射给药、腹膜内给药、蛛网膜下腔内给药、或静脉给药。

[0221] 所述T细胞受体修饰的免疫细胞可以配制成通过动脉、静脉、皮下、皮内、瘤内、淋巴管内、淋巴结内、蛛网膜下腔内、骨髓内、肌肉内或腹膜内给药。

[0222] 所述肿瘤和/或癌症包括:头颈部肿瘤(包括鼻咽癌),滑膜癌,肾癌,结缔组织癌,黑色素瘤,肺癌,食管癌,结肠癌,直肠癌,脑癌,肝癌,骨癌,绒毛膜癌,胃泌素瘤,嗜铬细胞瘤,催乳素瘤,血液癌,神经瘤,von Hippel-Lindau病,Zollinger-Ellison综合征,肛门癌,胆管癌,膀胱癌,输尿管癌,神经胶质瘤,神经母细胞瘤,脑膜瘤,脊髓肿瘤,骨软骨瘤,软骨肉瘤,尤文氏肉瘤,原发部位不明癌,类癌,纤维肉瘤,乳腺癌,佩吉特病,宫颈癌,食道癌,胆囊癌,眼癌,卡波西氏肉瘤,前列腺癌,睾丸癌,皮肤癌,间皮瘤,多尖端骨髓瘤,卵巢癌,胰腺内分泌瘤,胰高血糖素瘤,胰腺癌,阴茎癌,垂体瘤,软组织肉瘤,视网膜母细胞瘤,小肠癌,胃癌,胸腺癌,滋养细胞瘤,葡萄胎,子宫内膜癌,阴道癌,外阴癌,蕈样真菌病,胰岛素瘤,心脏癌,脑膜癌,血液癌,腹膜癌和胸膜癌。所述肿瘤和/或癌症可以包括本身是HLA-A2阳性而Her2/neu阴性的、HLA-A2阴性而Her2/neu阳性的、HLA-A2和Her2/neu均为阳性的、或HLA-A2和Her2/neu均为阴性的。可以根据肿瘤和/或癌症患者的自身实际情况,为患者提供本发明范围内的方法。

[0223] 以下通过例子的方式进一步解释或说明本发明的内容,但这些例子不应被理解为本发明的保护范围的限制。

[0224] 例子

[0225] 除非特别说明,否则以下例子中所用实验方法均使用生物工程领域的常规实验流程、操作、材料和条件进行。

[0226] 以下除非特别说明,否则各试剂的百分浓度(%)均指该试剂的体积百分浓度(%(v/v))。

[0227] 材料和方法

[0228] 细胞株:用于制备慢病毒颗粒的细胞株为293T细胞(ATCC CRL-3216)。用于提呈抗原多肽的提呈细胞株为T2细胞(174xCEM.T2,ATCC CRL-1992)。用于检测功能的肿瘤细胞株为人结直肠癌colo205细胞(ATCC CCL-222)、HT-29细胞(HTB-38)和HCT116细胞(ATCC CCL-247)、人乳腺癌MDA-MB-231细胞(ATCC HTB-26)和MCF7细胞(ATCCHTB-22)、人卵巢癌SKOV3细胞(ATCC HTB-77)、人胰腺癌PANC-1细胞(ATCC CRL-1469)、人神经胶质细胞瘤U87MG细胞

(ATCC HTB-14)、人肝细胞癌HepG2细胞(ATCC HB-8065)、人非小细胞肺癌NCI-H460细胞(ATCC HTB177)、小细胞肺癌NCI-H446细胞(ATCC HTB-171)。细胞株用RPMI-1640完全培养基(Lonza, cat#12-115F)维持培养, RPMI-1640完全培养基中加入10%小牛血清FBS(ATCC 30-2020), 2mmol/L L-谷氨酸, 100 μ g/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素。

[0229] 外周血: 试验所用健康供者的人外周血制品均来自位于旧金山的Pacific血液中心(#1PBMC和#2PBMC分别为来自Apheresis法收集试剂盒的Trima残留细胞组分#R32334和#R33941)。

[0230] 台盼蓝染色法计数: 将细胞用PBS洗后, 用胰蛋白酶消化, 细胞悬浮在PBS中, 加入终浓度为0.04% (w/v) 的台盼蓝染液, 显微镜下计数, 死细胞会染成浅蓝色, 活细胞拒染。取活细胞数为最终数据。

[0231] 体外诱导Her2/neu 369-377特异性杀伤T细胞(CTL): 外周血经Ficoll-Paque Premium(Sigma-Aldrich公司, cat#GE-17-5442-02) 密度梯度离心($\times 400g$) 30分钟后获得单个核细胞(PBMC)。首先用荧光素FITC标记的抗HLA-A2抗体(Biolegend公司, cat#343303) 染色检测细胞的HLA-A2表型, 流式细胞分析(流式细胞仪为MACSQuant Analyzer 10(Miltenyi Biotec公司), 用Flowjo软件(Flowjo公司) 进行结果分析) 后提取阳性细胞的RNA, 逆转录为cDNA并克隆到载体上, 之后进行HLA基因测序分析, 确定细胞配型为HLA-A*0201。HLA-A2阳性的PBMC细胞培养在24-孔培养板的培养孔, 培养液为上述RPMI-1640完全培养基。每孔 2×10^6 /ml PBMC, 加入Her2/neu 369-377多肽(Her2-E75, 用Peptide2.0合成, 10 μ g/ml溶于DMSO), 终浓度为1 μ g/ml。置于5% CO₂、37 $^{\circ}$ C条件下的培养箱培养16-24小时后加入以下终浓度的细胞因子: 人IL-2(Peprotech公司, cat#200-02) 100IU/ml, 人IL-7(Peprotech公司, cat#200-07) 5ng/ml, 人IL-15(Peprotech公司, cat#200-15) 5ng/ml。培养10到14天, 对培养的T细胞进行抗原再刺激: 在24-孔板中每孔加入 10^6 个上述所得的培养细胞, 同时加入 2×10^6 个经25 μ g/ml 丝裂霉素C(Santa Cruz Biotechnology公司, cat#SC-3514) 处理2小时的HLA-A2阳性的PBMC细胞作为滋养细胞, 每孔加入终浓度为1 μ g/ml的Her2/neu 369-377多肽, 培养过夜后加入IL-2 100IU/ml, IL-7 5ng/ml, IL-15 5ng/ml(终浓度)。经两轮上述抗原刺激和再刺激后, 收集扩增的T细胞进行表型分析以及T细胞克隆。

[0232] 流式细胞分析及单细胞分离: 表达Her2/neu 369-377特异性TCR的T细胞表型是通过流式细胞来分析的。收集被检测的细胞置于1.5ml管(细胞数目约为 10^5 个), 用1ml DPBS溶液(2.7mM KCl, 1.5mM KH₂PO₄, 136.9mM NaCl, 8.9mM Na₂HPO₄ \cdot 7H₂O, pH 7.4) 洗一遍, 并重置于100 μ l含有1%小牛血清的DPBS中, 加入5 μ l 荧光素APC标记的抗人CD8抗体(Biolegend公司, cat#300912), 以及10 μ l 荧光素PE标记的Her2-E75/HLA-A2四聚体(Her2-E75四聚体, MBL International Co. 公司, cat#T01014) 或者Her2-E75/HLA-A2五聚体(Her2-E75五聚体, Proimmune公司, cat#F214-2A-D), 冰上孵育30分钟后用DPBS溶液洗两遍, 重悬于100 μ l PBS溶液(8mM Na₂HPO₄, 136mM NaCl, 2mM KH₂PO₄, 2.6mM KCl, pH7.2-7.4) 进行流式细胞分析。流式细胞仪为MACSQuant Analyzer10(Miltenyi Biotec公司), 用Flowjo软件(Flowjo公司) 进行结果分析。T细胞克隆是利用流式细胞分离仪(FACS sorter) 进行单细胞分离后培养获得。对Her2/neu369-377多肽抗原刺激过的PBMC用APC标记的抗人CD8抗体和PE标记的Her2-E75/HLA-A2五聚体染色, 然后进行流式细胞分离(型号: Sony cell sorter SH800)。单个CD8⁺Her2-E75/HLA-A2五聚体⁺细胞被分选到96-孔培养板的单个培养孔后, 加

入经25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 丝裂霉素C处理2小时的HLA-A2阳性的PBMC细胞,每孔 10^5 个细胞,加入1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Her2/neu 369-377多肽培养过夜后,加入含有IL-2 100IU/ml、IL-7 5ng/ml、IL-15 5ng/ml的RPMI-1640完全培养液。每3-4天换新鲜含有所述细胞因子的培养液,显微镜下观察是否有T细胞克隆生长。收集增殖的T细胞,按上述方法进行抗原再刺激以获得足够数量的细胞,进行表型或功能检测,以及提取RNA进行TCR基因的克隆。

[0233] T细胞功能检测:为了检测转染TCR基因的T细胞识别抗原表位多肽的能力,在96-孔板的每孔中加入 10^5 个转染TCR基因的T细胞以及 10^5 个T2细胞,在100 μl /每孔RPMI-1640完全培养基中进行混合培养,各试验组为复孔。再加入不同终浓度(分别为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和0.0001 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的Her2/neu 369-377多肽后置5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 条件下的孵育箱过夜培养。

[0234] 为了检测转染TCR基因的T细胞识别肿瘤细胞株的能力,根据不同效靶比在96-孔板的每孔中加入一定数量的转染TCR基因的PBMC细胞和肿瘤细胞作为靶细胞,培养24小时后,收集上清检测上清中分泌的 γ 干扰素。各试验组为复孔或三孔。抗体功能阻断试验中,细胞培养孔中同时加入10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 终浓度的抗人CD8抗体(Biolegend公司,cat#300912),细胞置于5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 条件下的孵育箱过夜培养。18-24小时收集细胞上清,并用人IFN- γ ELISA Read-set-Go试剂盒(eBioscience公司,cat#88-7316)或人IFN- γ DuoSet ELISA试剂盒(R&D Systems,cat#DY285B),按照厂家说明书,对上清中的IFN- γ 进行检测。

[0235] 为了检测转染TCR基因的T细胞杀伤肿瘤细胞的能力,在24-孔培养板中每孔加入靶细胞 1×10^4 培养24小时使靶细胞完全贴壁,去除悬浮细胞,根据设定的效靶比加入一定数量的转染TCR基因的T细胞。培养24小时后,去除悬浮细胞,并用胰酶消化收集贴壁细胞进行台盼蓝染色计数活细胞。杀伤率(Cytotoxicity) % = ((初始靶细胞的活细胞数-培养终止时的靶细胞的活细胞数) / 初始靶细胞的活细胞数) \times 100。各实验组为复孔或三孔,差异显著性用学生t-检验分析。

[0236] MTT计数法:

[0237] 胰酶消化对数生长期细胞,终止后离心收集,吹散均匀,制备单细胞悬液;用细胞培养液将细胞浓度调整至 $0.1 \sim 10 \times 10^4/\text{ml}$ (根据不同细胞生长状况调整接种细胞数),接种于96孔细胞培养板,培养体系为100 μl /孔,置于37 $^\circ\text{C}$,5% CO_2 培养箱培养过夜,使细胞完全贴壁,第二天达到70~80%;计数方式用计数板计数,同时用countstar计数仪来验证计数的正确性。取出96孔板,加入100 μl 预先配制的T细胞和TCR-T细胞悬液,加样前轻微涡旋,空白对照孔加100 μl 的相应细胞培养的无血清培养基;置于37 $^\circ\text{C}$,5% CO_2 培养箱分别培养24小时;于24h后取细胞,离心400g,10分钟后吸取180 μl 培养基放入新的96孔板中,留样用于后面ELISA检测上清IFN- γ 水平,检测步骤可参照检测说明书。注:上清可-80 $^\circ\text{C}$ 冻存以用于后续检测。每孔加入新的100 μl 完全培养基,每孔加入10 μl MTT溶液(5mg/ml,即0.5% MTT),继续培养4~6h;设立效应细胞对照组,在加入MTT 4小时后,300g离心5分钟,将染上MTT的效应细胞离心至板底以后,再弃去上清,再加入DMSO检测。每孔加入150 μl DMSO,置摇床上低速震荡10分钟,使结晶物充分溶解,在酶标仪上检测其在490nm处的吸光值。

[0238] 获得单克隆TCR基因:利用Zymo Quick-RNA Microprep试剂盒(Zymo Research公司,cat#R1050)从T细胞克隆提纯总RNA,以此为模板利用Smarter RACE 5' / 3' 试剂盒获得cDNA(美国Takara Bio公司,cat#634858)。用5' -CDS引物和TCR β 链3' 引物5' -

GCCTCTGGAATCCTTTCTCTTG-3' (SEQ ID NO:33)以及 α 链3'引物5'-TCAGCTGGACCACAGCCGCAG-3' (SEQ ID NO:34)进行PCR,扩增出TCR α 和 β 全序列基因片段,并分别克隆到pRACE载体(美国Takara Bio,cat#634858)上。转化感受态细菌Stellar(美国Takara Bio公司,cat#636763)并获得质粒后进行测序。

[0239] 重组TCR慢病毒表达载体的制备:用于表达TCR的病毒载体为复制缺陷型慢病毒载体,包括:表达GFP的慢病毒载体pCDH-EF1 α -MCS-(PGK-GFP),可购自System Biosciences公司(Cat#CD811A-1);以及不表达GFP的载体pCDH-EF1 α -MCS,通过采用本领域常规技术去除pCDH-EF1 α -MCS-(PGK-GFP)载体上的PGK启动子及GFP基因而得到。根据所获得的TCR基因序列,合成TCR β 链和 α 链以及之间可切割的F2A序列和Furin酶切片段的全基因序列,并链接到所述载体的EF-1 α 启动子下游的多克隆位点,插入TCR的转录顺序依次为TCR β 链(无终止密码子),Furin酶切片段,F2A片段,TCR α 链(方法参见文献“Gene Ther.2008Nov;15(21):1411-1423”)。表达GFP的载体是被反向的PGK启动子驱动的。不表达GFP的载体则是去除了PGK启动子以及GFP片段。

[0240] 重组TCR慢病毒颗粒的制备:TCR慢病毒颗粒是通过Lipofectaine 2000转染试剂(invitrogen,#11668019)转染293T/293FT细胞而获得的。依照厂家说明书准备293T/293FT细胞以及转染流程。转染在6孔培养板进行,首先用Opti-MEM 1培养液(Thermo Fisher公司,cat#51985091)制备转染质粒的脂质体混合溶液,依照厂家说明在250 μ l培养液中加入lipofectaine2000试剂6 μ l、以及TCR慢病毒载体质粒0.8 μ g和pCDH系统的病毒包装质粒1.8 μ g(SBI公司,cat#LV500A-1),混合孵育25分钟后加入293T/293FT细胞培养孔。5%CO₂、37 $^{\circ}$ C条件下培养16小时,换不含FBS的DMEM培养液(Thermo Fisher公司,cat#11965092),继续培养24小时和48小时后分别收集细胞上清,2000g离心10分钟后,用0.4 μ m过滤膜过滤,得到的病毒上清使用慢病毒浓缩液(GeneCopoeiaTM#LPR-LCS-01)按厂家说明书浓缩后用于感染细胞。

[0241] 重组TCR慢病毒转染人T细胞:冻存的原代PBMC细胞解冻后在RPMI-1640完全培养液中培养24小时,经Ficoll-Paque Premium密度梯度离心($\times 400g$)30分钟去除死细胞,置于用2 μ g/ml抗人CD3抗体(Biolegend公司,0KT3克隆cat#317303)和2 μ g/ml抗人CD28抗体(Biolegend公司,cat#302914)处理(其中每孔加入100 μ l含有上述CD3抗体和CD28抗体的DPBS溶液)24小时的24孔板培养孔中,细胞浓度为 2×10^6 /ml,也可以用Dynabead人T-CD3/CD8磁珠(Thermo Fisher公司,cat#11131D),按照厂家说明书对PBMC细胞进行刺激活化。培养24小时后收集细胞,加入100 μ l浓缩后TCR慢病毒颗粒(3×10^8 TU/ml)中置于24孔板的孔中,用含有IL-2100IU/ml、IL-7 5ng/ml、IL-15 5ng/ml的RPMI-1640完全培养液或X-VIVO15(Lonza#04-418Q)继续培养,每3天换新鲜含有上述细胞因子的培养液。也可以使用RestroNectin预处理的培养板(Takara公司,cat#T110A),按照厂家说明书用病毒感染活化的PBMC细胞。一般72小时后可进行表型和功能检测。转染T细胞株也依照上述步骤进行,如果病毒载体上带有GFP标记,一般转染后48小时即可在荧光显微镜下观察到GFP阳性细胞。

[0242] 制备例1:表达标记性多肽的重组慢病毒载体的制备。

[0243] 首先获得外源表达基因,HLA-A201基因片段是通过RT-PCR获得。从HLA-A201⁺PBMC细胞中提取RNA,使用Superscript RT-PCR试剂盒(Thermo Fisher公司,cat#12574018),并按照厂家说明书获得HLA-A201基因,测序确定为完整序列(其氨基酸序列如SEQ ID NO:29

所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:35所示)。所述标记性多肽的基因片段是通过DNA合成获得基因片段(Integrated DNA Technologies,gblocks Gene Fragments),包括:标记性多肽“E75×1”(C端不具有KDEL)(其氨基酸序列如SEQ ID NO:56所示,其核苷酸序列如SEQ ID NO:57所示);标记性多肽“E75×4”(C端不具有KDEL)(其氨基酸序列如SEQ ID NO:36所示,其核苷酸序列如SEQ ID NO:58所示);标记性多肽“E75×8”(C端不具有KDEL)(其氨基酸序列如SEQ ID NO:60所示,其核苷酸序列如SEQ ID NO:61所示)。慢病毒载体pCDH-EF1 α -MCS-(PGK-GFP)购自System Biosciences公司(Cat#CD811A-1)。通过采用本领域常规的基因克隆技术把HLA-A2基因片段插入到EF1 α 启动子下游的多克隆位点。质粒用Xcm-1酶切后去除GFP基因片段,通过采用本领域常规的基因克隆技术把合成的所述标记性多肽的基因片段分别插入到PGK启动子下游并置换GFP基因,并分别得到“pCDH-EF1p-A2-PKGp-E75×1”、“pCDH-EF1p-A2-PKGp-E75×4”和“pCDH-EF1p-A2-PKGp-E75×8”。各质粒测序结果均无误。

[0244] 将HLA-A2基因通过furin酶切序列和F2A序列和标记性多肽“E75×8”(C端具有KDEL)的编码序列相连接,形成A2-Her2E75序列片段(其核苷酸序列如SEQ ID NO:26所示)。采用In-fusion克隆试剂盒(Takara Bio,cat#638909)按照厂家说明书进行PCR,所用引物为5'-AGAGCTAGCGAATTCAACATGGCCGTCATG-3'(SEQ ID NO:37)和5'-TGATTGTCGACGCCCTTAAAGCTCGTCTTTAAGGAAG-3'(SEQ ID NO:38),高保真PCR扩增获得基因片段后,通过采用本领域常规的基因克隆技术把A2-Her2E75片段插入到慢病毒载体pCDH-EF1 α -MCS-(PGK-GFP)(购自System Biosciences公司,Cat#CD811A-1)的EF1 α 启动子下游的多基因克隆位点,得到CD811-EF1 α -A2-F2A-HerE75质粒。

[0245] 制备例2:表达标记性多肽/HLA-A2的复制缺陷型重组腺病毒的制备。

[0246] 1)表达标记性多肽/HLA-A2的复制缺陷型重组腺病毒载体的制备

[0247] 重组腺病毒主要参照AdEasy系统的制备方法进行制备(参见文献“Nature protocols 2007;2:1236-1247”)。首先获得外源表达基因,HLA-A201基因片段是通过RT-PCR获得。从HLA-A201⁺PBMC细胞中提取RNA,使用Superscript RT-PCR试剂盒(Thermo Fisher公司,cat#12574018),并按照厂家说明书获得HLA-A201基因,测序确定为完整序列。其它外源基因,例如Her2-E75微小基因,或串联的微小基因以及表达调控元件,是通过DNA合成获得基因片段(Integrated DNA Technologies,gblocks Gene Fragments),包括:标记性多肽“E75×8”(C端具有KDEL)(其氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示,其核苷酸序列如SEQ ID NO:59所示)。利用In-Fusion克隆技术将HLA-A2基因通过furin酶切序列和F2A序列和标记性多肽“E75×8”的编码序列,形成A2-Her2E75序列片段(其核苷酸序列如SEQ ID NO:26所示)。采用In-fusion克隆试剂盒(Takara Bio,cat#638909)按照厂家说明书进行PCR,所用引物为5'-TAGAGATCTGGTACCAACATGGCCGTCATGG-3'(SEQ ID NO:39)和5'-GGCTCGAGCGGCCGCTTAAAGCTCGTCTTTAAGGAAG-3'(SEQ ID NO:40),PCR扩增获得基因片段后,通过采用本领域常规的基因克隆技术把A2-Her2E75片段插入到pShuttle-CMV载体(Agilent technologies,cat#24007)的多基因克隆位点,得到pShuttle-CMV-A2E75-SV40pA。携带外源基因的pShuttle载体质粒纯化后,经Pme I酶(NEB Biolabs,cat#R0560s)酶切,纯化后按照厂家说明书用电转仪进行电转(Bio-Rad Gene Pulse)。在2mm比色皿中加入BJ5183-AD-1细菌菌株(Agilent technologies,cat#200157)和经Pme I酶切的携带外源基因的pShuttle载体质粒。在50 μ l菌株中加入质粒0.5 μ g,在2500v,2000hms以及25micro-FD条件

下进行电转。经含有50 μ g/ml卡那霉素的LB培养板培养过夜后,挑出菌落小量培养后获得质粒进行测序,确定是否有外源基因片段通过重组插入到腺病毒载体质粒中。测序结果无误。

[0248] 2) 表达标记性多肽/HLA-A2的复制缺陷型重组腺病毒颗粒的制备与感染

[0249] 病毒颗粒是通过Lipofectaine 3000转染试剂(Thermo Fisher公司,cat#L3000001)转染ADENO-X 293细胞(Takara,cat#632271)而获得的。在6-孔板中培养ADENO-X 293细胞至50-75%融合后进行转染。纯化的重组腺病毒质粒经Pac I(NEB Biolabs,cat#R0547s)酶切并纯化后,按照厂家说明书用Lipofectaine 3000转染细胞。24小时后更换新鲜DMEM培养液。10-14天开始出现细胞病变,表现为细胞呈斑落样悬浮。收集细胞悬浮于PBS溶液中,于干冰和37 $^{\circ}$ C水浴中冻融4次,离心后的上清为病毒初始制备,置于-80 $^{\circ}$ C保存。为了获得高滴度病毒,在T75培养皿(Corning,cat#430661)中培养ADENO-X 293细胞,至75%融合后加入30%-50%初始制备的病毒冻存液。3-5天出现细胞病变后,收集细胞按上述方法进行冻融以获得病毒悬液。病毒滴度是利用腺病毒滴度试剂盒(Takara,cat#632270)按照厂家说明书来进行测定。感染靶细胞时,用新鲜培养液重悬靶细胞,根据细胞数加入定量滴度的腺病毒,培养3-4天后检测外源基因的表达。结果显示外源基因表达为阳性。

[0250] 制备例3:表达标记性多肽的重组溶瘤腺病毒的制备及表达标记性多肽/HLA-A2的重组溶瘤腺病毒的制备。

[0251] 1) 5型溶瘤腺病毒载体的构建

[0252] 首先提取H101商品化溶瘤腺病毒(溶瘤腺病毒H101购自上海三维生物技术有限公司)的基因组DNA为模板,设计两条引物(P26:5'GGAAGATCTGGACTGAAAATGAG3'(SEQ ID NO:41)和P27:5'TGAGGTCAGATGTA ACCAAGATTA 3'(SEQ ID NO:42)),通过高保真PCR扩增5型腺病毒的E1A编码区,PCR产物大小为1173bp。将获得的PCR片段纯化后进行BglIII酶切回收并将其连接至pShuttle-CMV载体(购自Agilent technologies,cat#24007)上多克隆位点中的BglIII和EcoRV位点之间,获得pShuttle-E1A,对其中的E1A序列进行测序,确认无误。

[0253] 再次设计2条引物(P36:5'CGCGTCGACTACTGTAATAGTAATCAATTACG G3'(SEQ ID NO:43)和P37:5'GACGTCGACTAAGATACATTGATGAGTTTGGAC3')(SEQ ID NO:44),以载体pShuttle-E1A为模板通过高保真PCR扩增该载体上包括CMV启动子、E1A编码区和SV40polyA序列在内的2017bp的DNA片段。将获得的PCR片段纯化后进行SalI酶切回收并将其连接至pShuttle载体(购自Agilent公司,cat#240006)上多克隆位点中的SalI位点中,获得pShuttle-MCS-CMV-E1A-SV40polyA(图9),对其中的CMV-E1A-SV40polyA序列进行测序,确认无误。

[0254] 2) 表达Her2-E75微小基因(C端具有KDEL)和共表达Her2-E75微小基因(C端具有KDEL)与HLA-A2的溶瘤腺病毒的基因组DNA的制备

[0255] 在上述获得的5型溶瘤腺病毒骨架的基础上分别加入可以表达Her2-E75微小基因和共表达Her2-E75微小基因与HLA-A2的基因表达框,最后获得可以单独表达Her2-E75微小基因的5型溶瘤腺病毒基因组DNA("OAd-E75")和共表达Her2-E75微小基因与HLA-A2的两种5型溶瘤腺病毒基因组DNA("OAd-E75-A2")(见图10)。

[0256] 其中目的基因表达框包括EF-1 α 启动子、Her2-E75微小基因(或Her2-E75微小基因与HLA-A2)编码区序列和BGHpolyA序列三部分。获得上述两种片段后分别将其插入到5型溶瘤腺病毒骨架质粒pShuttle-MCS-CMV-E1A-SV40pA上的KpnI和XhoI位点中。BGHpolyA序列通过高保真PCR方法从pcDNA3.1质粒(购自Invitrogen公司)上扩增获得。获得BGHpolyA片

段后将其插入到5型溶瘤腺病毒骨架质粒pShuttle-MCS-CMV-E1A-SV40polyA上的HindIII位点中,得到pShuttle-EF1a-MCS-BGHpA-CMV-E1A-SV40pA质粒。

[0257] E75(即Her2-E75微小基因,本部分简称“E75”)和E75-HLAA2片段的克隆

[0258] E75片段的克隆

[0259] 设计2条引物(P105:5'CCGCTCGAGATGAAAGGTTCCATCTTCACATTG 3'(SEQ ID NO:45)和P106:5'CCGCTCGAGTTAAAGCTCGTCTTTAAGGAAGGC 3'(SEQ ID NO:46)),以制备例1得到的CD811-EF1a-A2-F2A-HerE75质粒为模板,利用上述引物进行高保真PCR,最终获得两侧包含XhoI酶切位点的E75片段,大小为399bp。将获得的PCR片段纯化后进行XhoI酶切回收并将其连接至pShuttle-EF1a-MCS-BGHpA-CMV-E1A-SV40pA载体上的XhoI位点中,获得pShuttle-EF1a-E75-BGHpA-CMV-E1A-SV40pA,对其中的E75序列进行测序,确认无误。

[0260] E75-HLAA2片段的克隆

[0261] 在本部分工作中的HLA-A2、Furin-F2A和E75序列均通过高保真PCR以CD811-EF1a-A2-F2A-HerE75质粒为模板扩增获得。为了将HLAA2调换到Furin-F2A连接片段后面,将E75调换到Furin-F2A连接片段前面,首先单独扩增HLAA2片段、Furin-F2A连接片段和E75片段,并且在扩增HLAA2片段时需要在其末端添加终止密码子,而E75片段需要去掉其末端的终止密码子,最后通过重叠延伸PCR的方法将三条片段按计划依次串联合并起来获得E75-Furin-F2A-HLAA2片段。首先设计5条引物(P107:5'TTCCGGATCGCTTGGCACGAAGCTCGTCTTTAAGGAAGG 3'(SEQ ID NO:47)、P108:5'CCTTCCTTAAAGACGAGCTTCGTGCCAAGCGATCCGGAA 3'(SEQ ID NO:48)、P109:5'CGGGCGCCATGACGGCCATGGGCCAGGGTTGGACTC 3'(SEQ ID NO:49)、P110:5'GAGTCCAACCCTGGGCCATGGCCGTCATGGGCCCC G 3'(SEQ ID NO:50)和P111:5'CTTCTCGAGTCACACTTACAAGCTGTGAGAG 3'(SEQ ID NO:51)),以CD811-EF1a-A2-F2A-HerE75质粒为模板,利用P105和P107两条引物进行高保真PCR扩增不包含终止密码子但包含部分Furin-F2A连接片段5'端重复序列的E75片段,片段大小为406bp;利用P108和P109两条引物进行高保真PCR扩增包含部分E75 3'端重复片段和部分HLA-A2 5'端重复片段的Furin-F2A连接片段,片段大小为136bp;利用P110和P111两条引物进行高保真PCR扩增包含部分Furin-F2A连接片段3'端重复片段的HLAA2片段,片段大小为1125bp;然后以E75和Furin-F2A连接片段的PCR产物为模板,利用P105和P109两条引物进行高保真PCR扩增E75-Furin-F2A片段,片段大小为503bp;再次以E75-Furin-F2A和HLAA2的PCR产物为模板,利用P105和P111两条引物进行高保真PCR扩增E75-Furin-F2A-HLAA2片段,片段大小为1587bp。将最终获得的E75-Furin-F2A-HLAA2的PCR片段纯化后进行XhoI酶切回收并将其连接至pShuttle-EF1a-MCS-BGHpA-CMV-E1A-SV40pA载体上的XhoI位点中,获得pShuttle-EF1a-E75-HLA-A2-BGHpA-CMV-E1A-SV40pA,对其中的E75-HLAA2片段进行测序,确认无误。

[0262] 3) 单表达Her2-E75微小基因(C端具有KDEL)和共表达Her2-E75微小基因(C端具有KDEL)与HLA-A2的溶瘤腺病毒基因组DNA的获得

[0263] 将上一步中获得的经过测序确认的pShuttle-EF1a-E75-BGHpA-CMV-E1A-SV40pA和pShuttle-EF1a-E75-HLA-A2-BGHpA-CMV-E1A-SV40pA质粒(各1 μ g)进行PmeI酶切,37 $^{\circ}$ C反应2-3hr后进行酚/氯仿抽提和乙醇/乙酸铵沉淀,70%乙醇漂洗三次后弃去上清,室温干燥3分钟后加入10 μ l洁净去离子水完全溶解线性化的DNA片段;随后各加入100 μ l BJ5183(含pAdEasy-1质粒)(购自Agilent公司)的超级感受态细菌进行轻柔混匀后置于冰上30分

钟,42℃孵育90秒后放回冰上继续孵育2分钟,每管中加入500 μ l LB培养基,37℃、150RPM振荡培养45分钟后将其涂布于卡那抗性的LB平板上,37℃过夜培养。第二天挑取LB平板上出现的较小克隆接种于4ml卡那抗性的LB培养基中,37℃、200RPM振荡培养过夜。第三天利用质粒小量提取试剂盒提取各管菌液的质粒DNA,首先对获得质粒DNA进行琼脂糖凝胶电泳分析舍弃明显偏小的质粒,将较大质粒进行PacI酶切分析,发生正确重组的pAdEasy质粒经PacI酶切后将产生4.5kb或3kb的一条较小片段。

[0264] 本部分共获得两个发生正确重组的质粒(PacI酶切后产生一条大小为4.5kb的较小条带):OAd-E75和OAd-E75A2,上述两个质粒包含可以用来包装表达Her2-E75或共表达HLA-A2和Her2-E75的5型溶瘤腺病毒。

[0265] 4) 单表达Her2-E75微小基因(C端具有KDEL)和共表达Her2-E75微小基因(C端具有KDEL)与HLA-A2的溶瘤腺病毒的包装、扩增与纯化

[0266] 腺病毒基因组DNA的线性化:分别将上一步中获得的2-3 μ g质粒DNA(OAd-E75和OAd-E75A2)进行完全的PacI酶切,37℃反应2-3小时后进行酚/氯仿抽提和乙醇乙酸铵沉淀,使用70%乙醇漂洗线性化DNA两次后室温干燥3分钟,溶解于10 μ l洁净去离子水中,使用该DNA直接进行AD293细胞的转染或将线性化DNA保存于-20℃备用。

[0267] 腺病毒的包装:腺病毒包装前一天将长势良好的AD293细胞接种于6孔板中,细胞密度以第二天进行转染实验时细胞覆盖率达到~70%为佳。使用Lipo2000或相似转染试剂将PacI线性化的DNA转染至AD293细胞中(转染试剂不必去除)。将转染DNA后的AD293细胞中放回CO₂培养箱中继续培养约14天左右,直至AD293细胞出现大面积的病变后浮起,代表腺病毒包装成功。吹打6孔板中病变的AD293细胞和病毒混合物使其完全浮起后收集至洁净离心管中,可短暂剧烈震荡细胞悬液使腺病毒尽可能多地从细胞中释放出来,该混合物可短暂保存于4℃和长期保存于-80℃。

[0268] 腺病毒的扩增:扩增前一天将长势良好的AD293接种于60mm培养皿中,第二天感染腺病毒时细胞覆盖率为80%左右。吸取约1ml从6孔板中收集的腺病毒混合物直接加入到接种有AD293的60mm的培养皿中,轻微震荡混匀后放回CO₂培养箱中继续培养,约2-3天后可见大部分细胞病变后浮起,同上吹打细胞收集全部的细胞悬液于洁净离心管中;接下来将收集的2ml病毒悬液加入到AD293细胞覆盖率为80%的10cm培养皿中,CO₂培养箱中继续培养约2-3天后可见大部分细胞病变浮起;收集10cm培养皿中的病毒悬液;同样吸取2ml病毒悬液加入到AD293细胞覆盖率为80%的10cm培养皿中,CO₂培养箱中继续培养约2-3天后可见大部分细胞病变浮起;收集15cm培养皿中的病毒悬液,此时细胞上清中的腺病毒滴度约达到10⁸PFU/ml。到此可使用15cm培养皿中的病毒悬液进行大量的腺病毒扩增,通常根据实验需要和病毒产量,需要扩增和收集40-80个15cm培养皿的细胞悬液后再进行腺病毒的CsCl密度梯度离心纯化。

[0269] 腺病毒的纯化:将上一步收集的病毒悬液离心后分为上清和细胞沉淀两部分。使用PEG8000/NaCl沉淀上清中的腺病毒,并重悬于10mM Tris·Cl(pH8.0)中;将细胞沉淀重悬于10mM Tris·Cl(pH8.0)中反复冻融3-5次,完全释放细胞中的腺病毒,再次离心细胞悬液,保留上清进行下面的CsCl密度梯度离心纯化。接下来分别用轻CsCl(1.2g/ml)和重CsCl(1.45g/ml)对获得的腺病毒悬液进行两次离心,用注射器吸取第二次离心后的Ad白色条带,最后用PD-10脱盐柱将溶解腺病毒的CsCl置换为腺病毒保存液(10mM Tris(pH7.4),1mM

MgCl₂, 10% Glycerol 过滤除菌后保存于4℃), 分装后保存于-80℃。

[0270] 腺病毒滴度的滴定: 腺病毒滴度的滴定是利用腺病毒滴度滴定试剂盒完成的。其基本原理为将腺病毒稀释到合适的滴度后感染AD293细胞, 48小时后检测细胞表面的Hexon蛋白的表达。通过计数规定面积内表达Hexon蛋白的细胞的数量来确定有活性的腺病毒的滴度(PFU/ml)。

[0271] 5) 腺病毒中HLAA2蛋白表达的检测

[0272] 选取HLAA2阴性的细胞株(SKOV3), 实验前一天接种细胞于24孔细胞培养板中。第二天按照不同的感染复数(MOI=5、10和20)将腺病毒OAd-E75和OAd-E75A2加入到接种细胞的孔中, 本实验中H101被用来作为阴性对照病毒。混匀后在CO₂培养箱中继续培养48小时后回收细胞, 按照常规FACS流程使用抗-HLAA2流式抗体孵育细胞后上机分析。最终确定HLA-A2在SKOV3细胞表面的表达情况, 结果呈阳性。

[0273] 实施例1: 从HLA-A2阳性的正常供体外周血诱导Her2/neu369-377多肽(Her2-E75表位多肽)特异性杀伤T细胞

[0274] 本实施例用1μg/ml的低浓度Her2/neu 369-377多肽经过两轮体外刺激从HLA-A2阳性的正常PBMC(#2)中诱导出多肽特异性杀伤T细胞, 并进行流式细胞分析及单细胞分离。具体方法如上文所述。结果如下:

[0275] 图1A右图显示, 0.024%的淋巴细胞为可结合Her2/neu369-377/HLA-A2五聚体(即Her2-E75五聚体)的CD8阳性杀伤性T细胞, 左图中没有经Her2多肽刺激的对照细胞没有出现CD8阳性五聚体阳性细胞。结果说明在自然T细胞库中, 识别Her2/neu 369-377抗原多肽的特异性T细胞数量很少。尽管数量少, 这群可识别Her2/neu 369-377多肽的T细胞仍可被清晰地区分出来。另外根据结合Her2-E75五聚体的荧光强度, 阳性细胞中又包含高亲和性T细胞和低亲和性T细胞。通过流式细胞分离出300个CD8阳性五聚体阳性细胞后进行单克隆培养, 经过两轮抗原多肽再刺激以及细胞因子扩增, 从这300个分离出的单个T细胞中获得一个增殖的T细胞克隆Her2 CTL克隆6A5(称为Her2 CTL 6A5)。图1B右图显示97.9%的CD8⁺CTL细胞可结合Her2/neu 369-377/HLA-A2四聚体(即Her2-E75四聚体), 显示此纯化的T细胞克隆没有混杂其他无关细胞。左图为不能结合Her2-E75四聚体的对照T细胞。

[0276] 实施例2: Her2/neu 369-377多肽特异性TCR全序列的获得

[0277] 本实施例直接从由实施例1得到的一定数量的Her2 CTL 6A5细胞提纯总RNA, 通过5'-RACE RT-PCR的方法获得配对的TCRα链和β链基因序列(即, 两条链可共同组成识别抗原多肽的功能性TCR), 其编码的TCR称为“Her2 TCR-6A5”。该TCR的α链的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示, 编码序列如SEQ ID NO:12所示, 并且该TCR的β链的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示, 编码序列如SEQ ID NO:15所示。此TCR存在于HLA-A2阳性正常人的外周T细胞库中, 不会对微量表达Her2/neu蛋白的正常细胞产生交叉反应而导致自身免疫反应。为了检测所获TCR的抗原特异性及其功能, TCRα链和β链序列被克隆到复制缺陷型慢病毒表达载体中。图1C显示所构建的TCR慢病毒载体结构片段示意图。TCRα链和β链的恒定区由人源序列替换为鼠源序列, 并由可切割性连接多肽连接。6A5 TCRα链和β链的表达由EF-1α启动子所驱动。此启动子属于真核细胞中高表达启动子, 而且不会受到甲基化等因素的影响而导致功能丧失, 适于外源基因在体内的长期表达。TCRα链和β链之间由F2A多肽序列所连接, TCRα链和β链基因可同时被转录, 通过核糖体跳跃方式(ribosome skipping)进行翻译, 从而使TCRα链

和 β 链多肽彼此分离。这样保证了TCR α 链和 β 链表达量的一致性,从而更有效率的组成TCR二聚体。TCR α 链和 β 链之间还链有furin酶切位点,用于去除 β 链羧基端的多余肽段。

[0278] 将由可切割性连接多肽链接的、恒定区由人源序列替换为鼠源序列的TCR β 链和 α 链的核苷酸序列(SEQ ID NO:20)(对应的TCR为Her2 TCR-6A5-mC,氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示)连接至上述载体,以得到Her2 TCR-6A5-mC重组慢病毒载体。Her2TCR-6A5-mC基因片段通过PCR扩增后,克隆到上述慢病毒载体(即pCDH-EF1 α -MCS)的EF1-启动子下游:携带鼠源恒定区序列的Her2TCR-6A5-mC的 β 片段是由5'引物5'-AGAGCTAGCGAATTCAACATGGGC TGCAGGCTGCTC-3'(SEQ ID NO:52)和3'引物5'-GGATCGCTTGGCACGTGAATCCTTTCTTTGACCAT AGCCAT-3'(SEQ ID NO:53)扩增而得;携带鼠源恒定区序列的Her2TCR-6A5-mC的 α 基因是由5'引物5'-TCCAACCCTGGGCCCATGCTCCTGTTGCTCATACCAGTG-3'

[0279] (SEQ ID NO:54)和3'引物5'-GTTGATTGTCGACGCCCTCAACTGGACCACAGCCT-3'(SEQ ID NO:55)扩增而得。PCR使用Q5高保真PCR试剂盒(NEB, cat#M0543S),反应条件为:98 $^{\circ}$ C 30秒后,进行25个循环:98 $^{\circ}$ C 10秒,65 $^{\circ}$ C 10秒,以及72 $^{\circ}$ C 3分钟。获得的TCR片段克隆到pCDH-EF1 α -MCS载体的EF1 α 启动子下游的MCS区域。

[0280] 将构建得到的重组TCR慢病毒表达载体按前述方法制备得到各自的重组TCR慢病毒颗粒。

[0281] 实施例3:正常外周血T细胞经Her2 TCR-6A5-mC重组慢病毒转染后表达可识别Her2/neu 369-377多肽的特异性TCR

[0282] 为了进一步验证本发明所获得的TCR能否在原代T细胞表达并具有识别Her2/neu抗原多肽的功能,用携带Her2 TCR-6A5-mC基因的重组慢病毒颗粒(Her2 TCR-6A5-mC重组慢病毒载体)转染经CD3/CD28抗体活化的、来自两个不同正常供体的外周血T细胞,14天后收集细胞进行Her2-E75四聚体染色。具体方法如上文所述。结果如下:

[0283] 图2A显示,两个供体外周血单个核细胞(分别为#1PBMC和#2PBMC)中均有淋巴细胞可以结合Her2-E75四聚体,说明这些细胞表达的Her2 TCR-6A5-mC可以特异性识别被HLA-A2提呈的Her2/neu抗原多肽。结果还显示,Her2-E75四聚体阳性细胞(即表达Her2 TCR-6A5-mC)中,CD8 $^{+}$ T杀伤细胞的阳性率和CD8 $^{-}$ 淋巴细胞的阳性率相近。CD8 $^{-}$ 的淋巴细胞很可能是CD4 $^{+}$ 的T辅助细胞,如果慢病毒感染CD8 $^{+}$ 和CD4 $^{+}$ T细胞的转染效率一样,说明CD4 $^{+}$ 细胞上的外源Her2/neu 369-377特异性TCR能有效结合Her2-E75四聚体。这也进一步说明转染的Her2 TCR-6A5-mC不需要CD8分子的辅助功能也能有效结合Her2/HLA-A2复合物,即Her2 TCR-6A5-mC识别被HLA-A2提呈的Her2/neu 369-377表位多肽是CD8非依赖型。表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的CD4细胞识别Her2抗原后分泌细胞因子,不仅可以辅助杀伤T细胞的功能及在体内的存活时间,也可以通过调节肿瘤微环境来诱导针对内源性肿瘤抗原的特异性T细胞,从而增强抗肿瘤免疫。

[0284] 在96-孔板的每孔中加入10e5个转染TCR的PBMC细胞,与不同浓度被T2细胞(每孔1 \times 10e5个)提呈的Her2/neu 369-377抗原多肽(Her2/neu 369-377抗原多肽从0.1 μ g/ml开始进行10倍稀释,从而得到终浓度为0.1 μ g/ml、0.01 μ g/ml、0.001 μ g/ml和0.0001 μ g/ml的不同组)混合培养后,检测上清中T细胞分泌的IFN- γ ,用以确定此表达TCR的PBMC细胞特异性识别Her2/neu 369-377多肽的功能。图2B显示,表达Her2 TCR-6A5-mC的PBMC可以被T2细胞提呈的Her2/neu 369-377抗原多肽所激活而分泌IFN- γ ,说明表达外源Her2TCR-6A5-mC的

原代T细胞可以特异性识别被HLA-A2分子提呈的Her2/neu 369-377多肽。识别抗原多肽的能力与外源TCR在T细胞上的表达量相关。两个不同供体PBMC转染Her2 TCR-6A5-mC后识别抗原多肽的最大半反应(half-maximum reaction, EC50)多肽浓度经曲线拟合推算分别为约1.6ng/ml和2.9ng/ml(IC50 Tool程序, <http://www.ic50.tk/>)。尽管此反应敏感度低于识别病毒抗原等外源抗原的高亲和性TCR的EC50(EC50约 $10e-10M$) (参见文献“CANCER RESEARCH 1998, 58:4902-4908”和“HUMAN GENE THERAPY 2014, 25:730-739”),但仍处于可识别常见肿瘤相关抗原的中高TCR亲和力范围之内(如文献“Eur J Immunol (2012) 42: 3174-9”所述)。

[0285] 图2C显示T细胞与T2细胞提呈的抗原多肽(T2+Her2-E75,即Her2/neu 369-377多肽)共培养时加入抗人CD8抗体后,T细胞分泌IFN- γ 的功能没有被显著抑制。这说明外源TCR识别Her2/neu369-377抗原多肽的功能不需要CD8分子的辅助作用,也显示本发明所述的Her2 TCR-6A5-mC TCR的识别功能是非CD8功能依赖型TCR。

[0286] 实施例4:正常外周血T细胞经Her2 TCR-6A5-mC重组慢病毒转染后表达的Her2/neu 369-377多肽特异性TCR可识别HLA-A2⁺Her2/neu⁺肿瘤细胞

[0287] 首先检测所选肿瘤细胞株表达HLA-A2和Her2/neu的情况。肿瘤细胞株包括结直肠癌Colo205和HCT116、乳腺癌MDA-MB-231和MCF-7、胰腺癌PANC-1、神经胶质瘤U87MG以及小细胞肺癌NCI-H446。肿瘤细胞经抗HLA-A2抗体(BD Biosciences, cat#561341)以及抗人CD340(erbB2)抗体(Biolegend, cat#324406)染色后进行流式细胞分析。图3A结果显示,Colo205、MDA-MB-231、MCF-7、HCT116、PANC-1均为HLA-A2⁺Her/neu⁺;U87MG为HLA-A2⁺,Her2/neu⁻;NCI-H446的HLA-A2和Her2/neu均为阴性。这些肿瘤细胞株不仅来源于不同组织,所表达的HLA-A2和Her2/neu也各异,其中U87MG和NCI-H446细胞可作为Her2 TCR-6A5-mC T细胞功能检测的阴性对照。

[0288] 在96-孔板的每孔中加入 $1 \times 10e4$ 个肿瘤细胞后,根据效靶比(5:1)在96-孔板的每孔中加入一定数量的转染Her2 TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞或没有转染Her2 TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞作为对照组。效靶比为5:1。T细胞与不同肿瘤细胞株混合培养,之后检测上清液中分泌的IFN- γ 。具体方法如上文所述。结果如下:

[0289] 图3B显示,表达Her2 TCR-6A5-mC的T细胞均可被HLA-A2⁺Her2/neu⁺的肿瘤细胞株所激活并分泌IFN- γ ,肿瘤细胞株包括结肠癌Colo205和HCT116、乳腺癌MDA-MB-231和MCF-7、胰腺癌PANC-1。而对照组HLA-A2⁺Her2/neu⁻的神经胶质瘤U87MG、以及HLA-A2⁻Her2/neu⁻的肺癌NCI-H446却不能激活转染Her2 TCR-6A5-mC的T细胞,说明Her2 TCR-6A5-mC TCR可以特异性识别肿瘤细胞表面被HLA-A2提呈的Her2/neu抗原。来源于同一供体PBMC、平行培养但没有转染Her2 TCR-6A5-mC的对照组T细胞不能被所列肿瘤细胞株所激活,说明对肿瘤细胞的反应不是非特异性的。结果也显示,Her2 TCR-6A5-mC T细胞识别HLA-A2提呈的Her2/neu抗原的能力与肿瘤细胞表面HLA-A2和Her2/neu分子的表达量不太相关。不同肿瘤细胞可能存在对T细胞不同的抑制作用,另一方面,细胞表面的表达量不一定反映出Her2/neu总的表达量,某些肿瘤细胞表达的Her2/neu主要存在于细胞胞浆内,这些抗原更容易被HLA-A2所提呈(参见文献“J Immunol 2006;177:5088-5097”)。

[0290] 在培养板中每孔加入靶细胞 $1 \times 10e4$,根据设定的效靶比(1:1、5:1、10:1、20:1、40:1)加入一定数量的转染TCR基因的PBMC细胞,24小时后测定T细胞对肿瘤细胞的杀伤活

性。图3C-K显示,与没有转染TCR的对照T细胞相比,表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的T细胞可以特异性识别和杀伤HLA-A2⁺Her2/neu⁺的肿瘤细胞株MCF-7,HCT116,PANC-1和HEPG-2。杀伤能力与Her2 TCR-6A5-mC T细胞的数量呈量效关系。而对照组HLA-A2⁺Her2/neu⁻的神经胶质瘤U87MG、HLA-A2⁻Her2/neu⁺的SKOV3和HT-29以及HLA-A2⁻Her2/neu⁻的肺癌NCI-H446却不能被Her2 TCR-6A5-mC T细胞特异性杀伤。结果也显示,当Her2 TCR-6A5-mC T细胞增加到一定数量时,对HLA-A2⁺Her2/neu⁺的肿瘤细胞表现出显著的特异性识别和杀伤功能,当效靶比低于10:1时,特异性杀伤功能并不明显,可能与肿瘤细胞表面被HLA-A2所提呈的Her2/neu表位多肽的数量有关。为了进一步增强Her2 TCR-6A5-mC T细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤敏感性,一个策略是增加肿瘤靶细胞表达HLA-A2和Her2/neu的数量。

[0291] 实施例5:转染表达HLA-A2和Her2/neu抗原表位多肽的基因载体可使靶细胞表达外源HLA-A2和Her2/neu表位多肽

[0292] 为了进一步增强Her2 TCR-6A5-mC T细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤敏感性,可以通过使肿瘤细胞表达外源Her2/neu抗原从而增加被HLA-A2所提呈的Her2/neu抗原表位来实现。由于肿瘤细胞常发生内源性HLA I类分子的表达低下或缺失,转染载体可以同时表达外源HLA-A2基因以增加HLA I类分子的表达量。另外,肿瘤细胞常出现HLA I类抗原提呈途径的功能缺陷。导致肿瘤抗原蛋白不能被有效降解成表位多肽并被HLA I类分子提呈到细胞表面。如果通过信号肽把表位多肽直接导入内质网内,可以不经过细胞浆内蛋白酶的降解以及TAP分子的转运功能,表位多肽可以直接和内质网内的HLA分子和β2微球蛋白形成复合物,并被提呈到肿瘤细胞表面。表达抗原表位多肽的微小基因(minigenes)可以通过Furin酶的酶切片段相连接,形成串联的多个抗原表位多肽的微小基因,进入内质网后被其中的furin酶释放出更多的表位多肽。在串联的表位多肽链末端加上内质网滞留信号KDEL片段,可避免表位多肽链被转输到下游分泌细胞器,从而增加形成HLA/多肽复合物的机会。

[0293] 按制备例1的方法制备得到3个慢病毒载体质粒:“pCDH-EF1p-A2-PKGp-E75×1”(携带HLA-A2编码序列和1个Her2-E75抗原表位多肽编码序列)、“pCDH-EF1p-A2-PKGp-E75×4”(携带HLA-A2编码序列和4个重复的Her2-E75抗原表位多肽编码序列)和“pCDH-EF1p-A2-PKGp-E75×8”(携带HLA-A2编码序列和8个重复的Her2-E75抗原表位多肽编码序列),统称为“pCDH-EF1p-A2-PKGp-E75载体”。图4B上图为含有HLA-A2和Her2/neu抗原表位多肽(Her2-E75)微小基因的慢病毒载体的总体结构示意图(pCDH-EF1p-A2-PKGp-E75载体)。HLA-A2被EF-1α启动子所驱动,抗原表位多肽(图中显示为Her2-E75)微小基因被PKG启动子所驱动。图4B下图为“pCDH-EF1p-A2-PKGp-E75×8”中Her2/neu抗原表位多肽微小基因的组成的示意图,显示为被Furin酶的酶切片段相连接的8个Her2-E75抗原表位多肽(Her2-E75×8微小基因)。

[0294] 用上述所构建的3个慢病毒质粒载体分别转染293T细胞,作为靶细胞检测Her2 TCR-6A5 T细胞的识别功能。293T细胞是人肾脏上皮细胞株,为HLA-A2阴性Her2/neu阴性。混合培养转染Her2TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞和分别转染pCDH-EF1p-A2-PKGp-E75的293T细胞,效靶比为10:1。24小时后收集上清检测IFN-γ的分泌。质粒pCDH-EF1p-A2-PKGp-E75上的抗原表位多肽微小基因的数目分别为1个,4个和8个(图中分别显示为293-A2-PKG-E75×1、293-A2-PKG-E75×4、293-A2-PKG-E75×8)。用没有转染质粒的293T细胞作为阴性对照组(图中显示为293对照),用T2细胞提呈Her2/neu 369-377抗原多肽0.1μg/ml作为阳性对

照组(图中显示为T2+Her2-E75)。图4A显示,Her2 TCR-6A5-mC T细胞可特异性识别转染表达HLA-A2和Her2/neu抗原表位多肽的质粒载体的293T细胞而分泌IFN- γ ,说明HLA-A2和Her2/neu 369-377表位多肽均被293T所表达,并以HLA/多肽复合物的方式提呈到细胞表面而被Her2 TCR-6A5-mC TCR所识别。另外,微小基因中表位多肽的数目越多,T细胞的识别活性也随之增强,说明细胞表面被提呈的HLA-A2/抗原表位多肽复合物的数量可以随着Her2/neu抗原表位多肽的表达增加而增加。

[0295] 为了使复制缺陷型腺病毒载体能够表达HLA-A2和Her2/neu抗原表位多肽,HLA-A2基因和Her2/neu抗原表位多肽微小基因(C端具有KDEL)被装载到5型腺病毒载体的E1区域。按照制备例2所述的方法制备得到复制缺陷型腺病毒Adeasy-A2-Her2 E75(简称为“Adeasy-A2E75”),其为一个表达HLA-A2和8个Her2/neu抗原表位多肽的复制缺陷型腺病毒,其载体示意图见图4D(Adeasy-A2E75载体)。此腺病毒载体来源于缺失E1区和E3区序列的5型腺病毒(参见文献“Nature Protocols 2007;2:1236-1247”)。HLA-A2基因和Her2/neu抗原表位多肽微小基因的表达由外源CMV启动子所驱动。HLA-A2基因和Her2/neu抗原表位多肽微小基因由可切割片段Furin酶识别片段和F2A片段所分割,这样一方面可保证HLA-A2和Her2/neu抗原表位多肽的表达量相近,外源基因核酸序列的长度也可保持在腺病毒基因组所允许装载的外源基因的大小范围之内。另外在串联的表位多肽链末端加上内质网滞留信号KDEL片段,以增加形成HLA/多肽复合物的机会。由于E3-19K蛋白抑制HLA的抗原提呈功能,缺失E3区序列的腺病毒感染细胞后不会干扰所表达的外源抗原表位多肽的提呈。

[0296] 为了验证复制缺陷型腺病毒载体Adeasy-A2-Her2 E75是否表达外源基因,用Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒颗粒感染卵巢癌细胞SKOV3。SKOV3细胞是HLA-A2阴性的,可通过检测SKOV3细胞表面HLA-A2的表达来确定Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒载体是否可以表达外源基因。在10cm培养皿中培养SKOV3细胞株,在其汇合度在80%左右时用胰酶消化液消化后再用培养基洗涤一次离心后用培养基McCony5A(Gibco#16600-082)重悬,铺板到24孔板中,每孔 1×10^5 ,每孔500 μ l培养基;经过24h后加入Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒,以0MOI、5MOI、10MOI、20MOI加入同体积的病毒配制液,再继续培养24h后,弃掉上清用胰酶消化后收获细胞,用100 μ l PBS重悬至1.5ml EP管中,每管加入2 μ l APC-抗人HLA-A2抗体(BD#561341),孵育30分钟后,用含1%BSA的PBS洗涤后进行流式上机检测,检测后用Flowjo软件进行分析。图4C显示,SKOV3细胞感染Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒后24小时就可表达HLA-A2,表达HLA-A2的量与感染病毒的滴度呈量效关系,而感染不表达外源基因的对照组腺病毒(图中显示为Ad对照)的SKOV3细胞不表达HLA-A2,说明携带HLA-A2基因和Her2/neu抗原表位多肽微小基因的腺病毒可有效表达外源HLA-A2分子。

[0297] 实施例6:用表达HLA-A2和Her2/neu抗原表位多肽微小基因的复制缺陷型腺病毒感染肿瘤细胞,可显著增强Her2 TCR-6A5-mC T细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤敏感性。

[0298] 为了进一步验证复制缺陷型腺病毒载体Adeasy-A2-Her2 E75感染肿瘤细胞后,是否增加细胞表面可被Her2 TCR-6A5-mC T细胞所识别的HLA-A2/Her2抗原表位多肽复合物的数量,从而增强T细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤敏感性,使肿瘤细胞株SKOV3、MCF-7和NCI-H446分别感染Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒,24小时之后与转染Her2 TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞混合并再共培养24小时,检测Her2 TCR-6A5-mC T细胞特异性分泌IFN- γ 和杀伤靶细胞的功能。

[0299] 图5A显示,肿瘤细胞感染Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒后可显著刺激Her2 TCR-6A5-mC T细胞特异性分泌IFN- γ 。感染肿瘤细胞的腺病毒感染复数MOI为10,与转染Her2 TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞共培养的效靶比为5:1。肿瘤细胞株为HLA-A2⁺Her2/neu⁺的MCF-7细胞,HLA-A2⁻Her2/neu⁺的SKOV3细胞和HLA-A2⁻Her2/neu⁻的NCI-H446细胞。结果显示,肿瘤细胞单独感染Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒后自身几乎不分泌 γ 干扰素(实验组“Adeasy-A2E75”)。转染Her2 TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞在低效靶比的情况下也不能有效识别HLA-A2⁺Her2/neu⁺的MCF-7细胞而分泌 γ 干扰素(实验组“具有Her2TCR-6A5的PBMC”)。针对SKOV3细胞,与对照PBMC相比(实验组“PBMC对照”),转染Her2 TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞(“具有Her2TCR-6A5的PBMC”)也不能特异性分泌 γ 干扰素。然而,当肿瘤细胞感染Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒,Her2TCR-6A5-mC T细胞对其的识别功能可显著增强,无论肿瘤细胞是否表达内源性HLA-A2和Her2/neu(实验组“具有Her2TCR-6A5的PBMC+Adeasy-A2E75”)。在各靶细胞组中,Her2 TCR-6A5-mC T细胞识别被Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒感染的肿瘤细胞的活性均显著高于未感染病毒的靶细胞的识别活性($p < 0.001$)。而Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒感染肿瘤细胞不能增加没有转染Her2TCR-6A5-mC TCR的对照PBMC细胞对肿瘤细胞的识别活性(实验组“PBMC对照”和“PBMC对照+Adeasy-A2E75”),说明腺病毒感染后分泌 γ 干扰素的增加是通过增强Her2 TCR-6A5-mC TCR对肿瘤细胞的识别活性而产生的。结果说明,Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒感染肿瘤细胞后,不仅使HLA-A2阴性细胞SKOV3和NCI-H446表达外源HLA-A2,还可以通过表达Her2/neu抗原表位多肽微小基因,增加肿瘤细胞表面被Her2 TCR-6A5-mC T细胞识别的HLA-A2/Her2/neu 369-377多肽复合物的数量,从而增强Her2 TCR-6A5-mC T细胞的识别敏感性。

[0300] 为了进一步验证复制缺陷型腺病毒载体Adeasy-A2-Her2 E75感染肿瘤细胞后,是否增加Her2 TCR-6A5-mC T细胞对靶细胞的杀伤功能,肿瘤细胞株SKOV3、MCF-7和NCI-H446分别感染Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒,24小时之后与转染Her2 TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞混合并再培养24小时,台盼蓝检测尚存活的贴壁活细胞的数量来确定T细胞对靶细胞的杀伤功能。感染肿瘤细胞的病毒感染复数MOI为10,混合培养的效靶比为8:1。

[0301] 图5B显示,Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒单独感染肿瘤细胞后,可导致大部分NCI-H446细胞死亡(靶细胞为NCI-H446的实验组Adeasy-A2E75)。这可能是由于E1/E3缺失的复制缺陷型腺病毒有时可导致某些细胞的凋亡,尤其当感染滴度较高时(参见文献“Gene Ther. 1999 Jun; 6(6):1054-63”)。图5A所示的感染腺病毒的NCI-H446细胞可以刺激与其混合培养的Her2 TCR-6A5-mC T细胞分泌 γ 干扰素,但由于这种靶细胞对Adeasy-A2-Her2 E75过于敏感,所以从图5B所示的试验结果中暂时无法确定靶细胞死亡是Her2 TCR-6A5-mC T细胞对感染腺病毒的靶细胞的杀伤还是腺病毒诱导的细胞凋亡(靶细胞为NCI-H446的实验组“具有Her2 TCR-6A5的PBMC+Adeasy-A2E75”)。然而,从图5B可以看出,本实验中靶细胞为MCF-7时,单用表达HLA-A2和Her2 E75多肽的复制缺陷型腺病毒的细胞杀伤率为约32.8%,单用表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞的细胞杀伤率为约30.9%,与单独施用一种药的细胞杀伤率相比,二者同时施用的细胞杀伤率提高,细胞杀伤率约为95.8%,显示出显著的协同效果。本实验中靶细胞为SKOV3时,单用表达HLA-A2和Her2 E75多肽的复制缺陷型腺病毒的细胞杀伤率为约29.7%,单用表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞的细胞杀伤率为约34.3%,与单独施用一种药的细胞杀伤率相比,二者同

时施用的细胞杀伤率提高,细胞杀伤率约为66%,也显示出显著的协同效果。

[0302] 这些结果显示,Her2 TCR-6A5-mC T细胞可特异性杀伤感染Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒的肿瘤细胞,无论肿瘤细胞是否表达内源性HLA-A2和Her2/neu抗原。如果表达HLA I类分子和肿瘤抗原表位多肽微小基因的腺病毒是溶瘤腺病毒,感染溶瘤病毒的肿瘤细胞不仅可被溶瘤病毒选择性杀伤,对于不能被溶瘤病毒有效裂解的肿瘤细胞,也可通过表达特定的外源肿瘤抗原表位多肽,被转染可识别特定肿瘤抗原表位的TCR的T细胞所识别和杀伤,这就是本发明所述的Adeasy-A2-Her2 E75腺病毒和Her2 TCR-6A5-mC T细胞联合应用以增强杀瘤功能的理论和试验基础。

[0303] 实施例7:用表达Her2/neu抗原表位多肽微小基因的溶瘤腺病毒感染肿瘤细胞,可显著增强Her2 TCR-6A5-mC T细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤敏感性。

[0304] 为了进一步验证单独表达Her2/neu抗原表位多肽微小基因的溶瘤腺病毒Ad-E75感染肿瘤细胞后,是否增加细胞表面可被Her2TCR-6A5-mC T细胞所识别的HLA-A2/Her2抗原表位多肽复合物的数量,从而增强T细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤敏感性,首先按照制备例3所述的方法制备表达Her2/neu抗原表位多肽微小基因(C端具有KDEL)的溶瘤腺病毒(OAd-E75,也称为“Ad-E75”)。在所述复制缺陷型腺病毒的E1区同时插入CMV启动子所驱动的Her2/neu抗原表位多肽微小基因,以及EF-1 α 启动子所驱动的腺病毒E1A基因。持续表达的E1A蛋白可使E1B缺失腺病毒在某些肿瘤细胞中选择性复制和增殖而产生溶瘤作用。使肿瘤细胞株MCF-7、SKOV3和NCI-H446分别感染Ad-E75溶瘤腺病毒,之后与转染Her2TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞共培养24小时,检测Her2TCR-6A5-mC T细胞特异性分泌IFN- γ 和杀伤靶细胞的功能。

[0305] 图6A显示,HLA-A2阳性肿瘤细胞MCF-7感染Ad-E75溶瘤腺病毒后可显著刺激Her2 TCR-6A5-mC T细胞特异性分泌IFN- γ ,而HLA-A2阴性细胞SKOV3和NCI-H446感染Ad-E75病毒后不能增加Her2 TCR-6A5-mC T细胞特异性识别的敏感性。感染肿瘤细胞的腺病毒感染复数MOI为10,与转染Her2 TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞共培养的效靶比为5:1。肿瘤细胞株为HLA-A2⁺Her2/neu⁺的MCF-7细胞,HLA-A2⁻Her2/neu⁺的SKOV3细胞和HLA-A2⁻Her2/neu⁻的NCI-H446细胞。结果显示,肿瘤细胞单独感染Ad-E75腺病毒后自身几乎不分泌 γ 干扰素(实验组“Ad-E75”)。转染Her2 TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞在低效靶比的情况下也不能有效识别MCF-7而分泌 γ 干扰素(“具有Her2TCR-6A5的PBMC”)。然而,当HLA-A2阳性肿瘤细胞感染Ad-E75溶瘤腺病毒,Her2 TCR-6A5-mC T细胞对其的识别功能可显著增强(实验组“具有Her2TCR-6A5的PBMC+Ad-E75”),Her2 TCR-6A5-mC T细胞识别被Ad-E75溶瘤腺病毒感染的肿瘤细胞的活性均显著高于未感染病毒的靶细胞的识别活性($p < 0.01$)。而Ad-E75溶瘤腺病毒感染肿瘤细胞不能增加没有转染Her2 TCR-6A5-mC TCR的对照PBMC细胞对肿瘤细胞的识别活性(实验组“PBMC对照”和“PBMC对照+Ad-E75”),说明腺病毒感染后分泌 γ 干扰素的增加是通过增强Her2 TCR-6A5-mC TCR对肿瘤细胞的识别活性而产生的。结果说明,Ad-E75溶瘤腺病毒感染肿瘤细胞后,可以通过表达Her2/neu抗原表位多肽微小基因,增加HLA-A2阳性肿瘤细胞表面被Her2 TCR-6A5-mC T细胞识别的HLA-A2/Her2/neu 369-377多肽复合物的数量,从而增强Her2TCR-6A5-mC T细胞的识别敏感性。HLA-A2阴性细胞SKOV3和NCI-H446感染Ad-E75溶瘤腺病毒后并不能增强细胞对Her2TCR-6A5-mC T细胞的识别敏感性,说明Her2/neu抗原表位多肽需要内源HLA-A2分子的提呈,进一步显示Her2 TCR-6A5-mC T细

胞对Her2/neu抗原表位的识别是HLA-A2限制的特异性识别。

[0306] 为了进一步验证溶瘤腺病毒Ad-E75感染肿瘤细胞后,是否增加Her2 TCR-6A5-mC T细胞对靶细胞的杀伤功能,肿瘤细胞株SKOV3、MCF-7和NCI-H446分别感染Ad-E75溶瘤腺病毒,24小时后与转染Her2 TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞混合并再培养24小时,台盼蓝检测尚存活的贴壁活细胞的数量来确定T细胞对靶细胞杀伤功能。感染肿瘤细胞的病毒感染复数MOI为10,混合培养的效靶比为5:1。

[0307] 图6B显示,Ad-E75溶瘤腺病毒单独感染肿瘤细胞后,可导致大部分SKOV3和NCI-H446细胞死亡(SKOV3、U87MG和NCI-H446的实验组“Ad-E75”)。说明Ad-E75对这些肿瘤细胞的溶瘤作用明显。本实验中靶细胞为MCF-7时,单用Ad-E75溶瘤腺病毒的细胞杀伤率为约20.9%,单用表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞的细胞杀伤率为约30.9%,与单独施用一种药的细胞杀伤率相比,二者同时施用的细胞杀伤率提高,细胞杀伤率约为85.4%,显示出显著的协同效果。由于其它靶细胞SKOV3、和NCI-H446对Ad-E75溶瘤腺病毒过于敏感,所以在该MOI条件下,当Her2 TCR-6A5-mC T细胞与这些感染Ad-E75的靶细胞混合培养时,所显示的杀伤功能与单独感染溶瘤腺病毒暂时无明显差别,说明杀伤活性主要是溶瘤病毒的溶瘤作用所导致。

[0308] 这些结果说明,Her2 TCR-6A5-mC T细胞可特异性识别被内源性HLA-A2所提呈的由溶瘤腺病毒所表达的Her2/neu抗原表位从而杀伤感染Ad-E75溶瘤腺病毒的肿瘤细胞。并且这些结果显示携带Her2/neu抗原表位多肽微小基因的溶瘤腺病毒感染肿瘤细胞后,可表达Her2/neu抗原表位多肽并被内源性HLA-A2分子提呈,从而增强T细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤敏感性。也表明,Her2 TCR-6A5-mC T细胞对靶细胞的杀伤功能和溶瘤病毒的溶瘤作用有一定的协同作用。

[0309] 实施例8:用同时表达Her2/neu抗原表位多肽微小基因和外源HLA-A2的溶瘤腺病毒感染肿瘤细胞,不仅可显著增强Her2TCR-6A5-mC T细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤敏感性,还可以识别HLA-A2阴性肿瘤细胞株。

[0310] 为了进一步验证同时表达Her2/neu抗原表位多肽微小基因和HLA-A2的溶瘤腺病毒载体Ad-E75A2感染肿瘤细胞后,是否增加细胞表面可被Her2 TCR-6A5-mC T细胞所识别的HLA-A2/Her2抗原表位多肽复合物的数量,从而增强T细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤敏感性,首先按照制备例3所述的方法制备表达Her2/neu抗原表位多肽微小基因(C端具有KDEL)和HLA-A2的溶瘤腺病毒(OAd-E75A2,也称为Ad-E75A2)。在实施例6中已显示,在Her2/neu抗原表位多肽微小基因上游插入由Furin-F2A链接片段连接的HLA-A2基因的复制缺陷型腺病毒(Adeasy-A2E75)感染靶细胞可表达HLA-A2和Her2/neu抗原表位,并显著增强Her2 TCR-6A5-mC T细胞对靶细胞的识别活性。本实施例所构建的溶瘤腺病毒来源于实施例7中所述溶瘤腺病毒,不同之处在于在Her2/neu抗原表位多肽微小基因下游插入由F2A链接片段连接的HLA-A2基因后构建成溶瘤腺病毒Ad-E75A2。使肿瘤细胞株HLA-A2阳性Her2阴性的U87MG、HLA-A2阴性Her2阳性的NCI-H460和HT-29细胞分别感染Adeasy-A2E75复制缺陷型腺病毒和Ad-E75A2溶瘤腺病毒,24小时之后与转染Her2TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞混合并再共培养24小时,检测Her2TCR-6A5-mC T细胞特异性分泌IFN- γ 和杀伤靶细胞的功能。

[0311] 首先检测携带HLA-A2基因的腺病毒感染肿瘤细胞株后是否表达外源HLA-A2。用Adeasy-A2E75和Ad-E75A2腺病毒分别感染U87MG、NCI-H460和HT-29细胞,没有感染腺病毒

的细胞为对照。病毒感染24小时后收集细胞并用HLA-A2抗体进行染色和流式细胞分析。图7C显示,U87MG表达内源HLA-A2,NCI-H460和HT-29不表达HLA-A2。复制缺陷型腺病毒Adeasy-A2E75和溶瘤腺病毒Ad-E75A2感染后均可增加细胞表面HLA-A2的表达。

[0312] 图7A显示,肿瘤细胞U87MG、NCI-H460和HT-29细胞感染复制缺陷型腺病毒Adeasy-A2E75后可显著刺激Her2 TCR-6A5-mC T细胞特异性分泌IFN- γ ,无论靶细胞是否表达内源HLA-A2或Her2抗原。这和实施例6中图5A所显示的针对其他靶细胞的识别活性相一致。感染肿瘤细胞的腺病毒感染复数MOI为10,与转染Her2TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞共培养的效靶比为10:1。肿瘤细胞株为HLA-A2⁺Her2/neu⁻的U87MG细胞,HLA-A2⁻Her2/neu⁺的NCI-H460和HT-29细胞。结果显示,肿瘤细胞单独感染Adeasy-A2E75复制缺陷型腺病毒后自身几乎不分泌 γ 干扰素(实验组“Adeasy-A2E75”)。转染Her2 TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞也不能有效识别靶细胞而分泌 γ 干扰素(实验组“具有Her2TCR-6A5的PBMC”)。然而,当肿瘤细胞感染Adeasy-A2E75腺病毒,Her2TCR-6A5-mC T细胞对其的识别功能可显著增强(实验组“具有Her2TCR-6A5的PBMC+Adeasy-A2E75”)。Her2 TCR-6A5-mC T细胞识别被Adeasy-A2E75腺病毒感染后的肿瘤细胞的活性均显著高于未感染病毒的靶细胞的识别活性($p \leq 0.01$),也显著高于单独感染复制缺陷型病毒的实验组。

[0313] 图8A显示,肿瘤细胞U87MG、NCI-H460和HT-29细胞感染溶瘤腺病毒Ad-E75A2后,虽然Her2 TCR-6A5-mC T细胞识别NCI-H460后分泌IFN- γ 的活性没有显著增强,与感染复制缺陷型Adeasy-A2E75病毒相比,对U87MG和HT-29的识别活性却更显著地增加(U87MG实验组“具有Her2 TCR-6A5的PBMC+Ad-E75A2”, $p \leq 0.001$;HT-29实验组“具有Her2 TCR-6A5的PBMC+Ad-E75A2”, $p \leq 0.0001$)。说明携带HLA-A2基因和Her2/neu抗原表位多肽微小基因的溶瘤腺病毒感染肿瘤细胞后可表达外源HLA-A2和Her2/neu抗原表位,从而使Her2 TCR-6A5-mC T细胞可识别HLA-A2阴性或Her2阴性的靶细胞。

[0314] 为了进一步验证溶瘤腺病毒载体Ad-E75A2感染肿瘤细胞后,是否增加Her2 TCR-6A5-mC T细胞对靶细胞的杀伤功能,肿瘤细胞株U87MG、NCI-H460和HT-29细胞分别感染复制缺陷型腺病毒Adeasy-A2E75和溶瘤腺病毒Ad-E75A2,24小时之后与转染Her2TCR-6A5-mC TCR的PBMC细胞混合并再培养24小时,台盼蓝检测T细胞对靶细胞杀伤功能。感染肿瘤细胞的病毒感染复数MOI为10,混合培养的效靶比为10:1。

[0315] 图7B和图8B显示,在所用的MOI条件下,单独感染复制缺陷型腺病毒Adeasy-A2E75和溶瘤腺病毒Ad-E75A2均显示出一定的溶瘤作用(图7B各实验组中“Adeasy-A2E75”和图8B中各实验组中“Ad-E75A2”)。而感染腺病毒后,可显著增强Her2 TCR-6A5-mC T细胞对靶细胞的杀伤功能。

[0316] 感染复制缺陷型腺病毒Adeasy-A2E75可增强Her2TCR-6A5-mC T细胞对所有靶细胞的杀伤功能,无论与单独感染腺病毒实验组(图7B各实验组“Adeasy-A2E75”;U87MG实验组 $p \leq 0.01$,NCI-H460实验组 $p \leq 0.05$,HT-29实验组 $p \leq 0.001$)相比,还是与单独使用Her2 TCR-6A5-mC T细胞的实验组(图7B中各实验组“具有Her2 TCR-6A5的PBMC”;U87MG实验组 $p \leq 0.001$,NCI-H460实验组 $p \leq 0.05$,HT-29实验组 $p \leq 0.001$)相比,Her2 TCR-6A5-mC T细胞对感染复制缺陷型腺病毒Adeasy-A2E75的靶细胞的杀伤功能显著增强。感染溶瘤腺病毒Ad-E75A2也可增强Her2 TCR-6A5-mC T细胞对靶细胞的杀伤功能。进一步而言,图7B所示实验中靶细胞为U87MG时,单用复制缺陷型腺病毒的细胞杀伤率为约9.8%,单用表达

Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞的细胞杀伤率为约8.8%，与单独施用一种药的细胞杀伤率相比，二者同时施用的细胞杀伤率提高，细胞杀伤率约为83.6%，显示出显著的协同效果。图7B所示实验中靶细胞为NCI-H460时，单用复制缺陷型腺病毒的细胞杀伤率为约5.4%，单用表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞的细胞杀伤率为约7%，与单独施用一种药的细胞杀伤率相比，二者同时施用的细胞杀伤率提高，细胞杀伤率约为33.4%，也显示出显著的协同效果。图7B所示实验中靶细胞为HT-29时，单用复制缺陷型腺病毒的细胞杀伤率为约8.4%，单用表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞的细胞杀伤率为约12.9%，与单独施用一种药的细胞杀伤率相比，二者同时施用的细胞杀伤率提高，细胞杀伤率约为74.2%，也显示出显著的协同效果。

[0317] 与单独感染溶瘤腺病毒实验组(图8B各实验组“Ad-E75A2”；U87MG实验组 $p < 0.01$ ，NCI-H460实验组 $p < 0.05$ ，HT-29实验组 $p < 0.01$)相比，Her2 TCR-6A5-mC T细胞对所有感染溶瘤腺病毒的靶细胞显示出显著的杀伤活性。与单独使用Her2 TCR-6A5-mC T细胞的实验组(图8B中各实验组“具有Her2 TCR-6A5的BPMC”；U87MG实验组 $p < 0.05$ ，HT-29实验组 $p < 0.01$)相比，Her2TCR-6A5-mC T细胞对感染溶瘤腺病毒的U87MG和HT-29细胞显示出显著的杀伤活性。进一步而言，图8B所示实验中靶细胞为U87MG时，单用溶瘤腺病毒的细胞杀伤率为约10.6%，单用表达Her2TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞的细胞杀伤率为约8.7%，与单独施用一种药的细胞杀伤率相比，二者同时施用的细胞杀伤率提高，细胞杀伤率约为38.4%，显示出显著的协同效果。图8B所示实验中靶细胞为HT-29时，单用溶瘤腺病毒的细胞杀伤率为约6.5%，单用表达Her2 TCR-6A5-mC TCR的外周血单个核细胞的细胞杀伤率为约9.8%，与单独施用一种药的细胞杀伤率相比，二者同时施用的细胞杀伤率提高，细胞杀伤率约为44.2%，也显示出显著的协同效果。

[0318] 可见，用同时表达Her2/neu抗原表位多肽微小基因和HLA-A2的溶瘤腺病毒载体感染肿瘤靶细胞后可显著增强Her2 TCR-6A5-mC T细胞的杀伤敏感性，无论靶细胞是否表达内源性HLA-A2和Her2抗原。联合使用所述溶瘤腺病毒和所述TCR-T细胞表现出了杀伤肿瘤细胞的协同效应。

[0319] 讨论：

[0320] 过继转输经肿瘤特异性TCR基因修饰的T细胞是治疗恶性实体瘤最有前景的免疫细胞疗法(TCR-T疗法)。如果TCR-T所靶向的肿瘤抗原是来源于自身蛋白的肿瘤相关抗原，TCR-T的特异性TCR的亲合性可能不足以识别被肿瘤细胞所提呈的微量HLA/抗原表位多肽复合物而对肿瘤细胞有效杀伤。另外，肿瘤微环境不仅可以造成肿瘤组织内的免疫抑制状态，还可以导致肿瘤细胞HLA I类分子的表达降低或缺失，肿瘤细胞内I类抗原提呈机制也可能出现缺陷，从而使肿瘤抗原表位不能被MHC I类分子有效提呈，这也限制了TCR-T识别和杀伤肿瘤细胞的功能。溶瘤病毒不仅可以选择性在肿瘤细胞内复制和裂解肿瘤细胞，还可以通过其自身免疫原性缓解肿瘤局部的免疫抑制状态。溶瘤病毒还可以作为基因载体，选择性地在肿瘤细胞内表达外源基因。如果通过溶瘤腺病毒选择性地在肿瘤细胞内表达HLA I类分子和肿瘤抗原表位多肽，则可以增加肿瘤细胞表面HLA I类分子和抗原表位多肽复合物的数量，从而增强TCR-T识别和杀伤肿瘤细胞的敏感性。另外，联合使用TCR-T以及表达HLA I类分子以及抗原表位多肽的溶瘤病毒，不仅表现出两者在特异性杀伤肿瘤细胞过程中的协同效应，还可以扩大TCR-T的应用范围。例如，表达本发明所述的Her2 TCR的TCR-T

单独使用时,因受HLA-A2限制,只能针对HLA-A2阳性Her2/neu阳性肿瘤患者。如果联合本发明所述的溶瘤腺病毒,通过选择性感染肿瘤细胞并表达外源性HLA-A2分子和Her2/neu抗原表位多肽,使得HLA-A2阴性的肿瘤,以及低表达甚至不表达Her2/neu抗原的肿瘤细胞均可成为基于Her2 TCR的TCR-T的靶细胞,可以避免过继TCR-T细胞治疗所面临的HLA限制的局限性,从而大大增加了TCR-T的应用范围。

[0321] 总之,本发明所述技术和方法,为联合应用过继转输经特异性TCR修饰的T细胞以及表达HLA I类分子和肿瘤抗原表位多肽的溶瘤病毒来治疗肿瘤提供了新的途径。

[0001] SEQUENCE LISTING
 [0002] <110> 合成免疫股份有限公司(Synimmune, Inc.)
 [0003] 杭州康万达医药科技有限公司
 [0004] <120> 包含核酸及TCR修饰的免疫细胞的治疗剂及其应用
 [0005] <130> FI-183579-59:52/C
 [0006] <160> 61
 [0007] <170> PatentIn version 3.5
 [0008] <210> 1
 [0009] <211> 132
 [0010] <212> PRT
 [0011] <213> 人(Homo sapiens)
 [0012] <400> 1
 [0013] Met Leu Leu Leu Leu Ile Pro Val Leu Gly Met Ile Phe Ala Leu Arg
 [0014] 1 5 10 15
 [0015] Asp Ala Arg Ala Gln Ser Val Ser Gln His Asn His His Val Ile Leu
 [0016] 20 25 30
 [0017] Ser Glu Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gly Cys Asn Tyr Ser Tyr Gly Gly
 [0018] 35 40 45
 [0019] Thr Val Asn Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Gly Gln His Leu Gln
 [0020] 50 55 60
 [0021] Leu Leu Leu Lys Tyr Phe Ser Gly Asp Pro Leu Val Lys Gly Ile Lys
 [0022] 65 70 75 80
 [0023] Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ile Lys Ser Lys Phe Ser Phe Asn Leu Arg
 [0024] 85 90 95
 [0025] Lys Pro Ser Val Gln Trp Ser Asp Thr Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val
 [0026] 100 105 110
 [0027] Asn Asp Asn Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
 [0028] 115 120 125
 [0029] Val Arg Ala Asn
 [0030] 130
 [0031] <210> 2
 [0032] <211> 133
 [0033] <212> PRT
 [0034] <213> 人(Homo sapiens)
 [0035] <400> 2
 [0036] Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 [0037] 1 5 10 15
 [0038] Val Pro Met Glu Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg His Leu Val Met
 [0039] 20 25 30
 [0040] Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Leu Gly His
 [0041] 35 40 45

[0042] Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys Lys Pro Leu Glu Leu
 [0043] 50 55 60
 [0044] Met Phe Val Tyr Ser Leu Glu Glu Arg Val Glu Asn Asn Ser Val Pro
 [0045] 65 70 75 80
 [0046] Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu Phe Leu His
 [0047] 85 90 95
 [0048] Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
 [0049] 100 105 110
 [0050] Ser Gln Glu Ala Gly Ser Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr
 [0051] 115 120 125
 [0052] Arg Leu Thr Val Leu
 [0053] 130
 [0054] <210> 3
 [0055] <211> 9
 [0056] <212> PRT
 [0057] <213> 人(Homo sapiens)
 [0058] <400> 3
 [0059] Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
 [0060] 1 5
 [0061] <210> 4
 [0062] <211> 272
 [0063] <212> PRT
 [0064] <213> 人(Homo sapiens)
 [0065] <400> 4
 [0066] Met Leu Leu Leu Leu Ile Pro Val Leu Gly Met Ile Phe Ala Leu Arg
 [0067] 1 5 10 15
 [0068] Asp Ala Arg Ala Gln Ser Val Ser Gln His Asn His His Val Ile Leu
 [0069] 20 25 30
 [0070] Ser Glu Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gly Cys Asn Tyr Ser Tyr Gly Gly
 [0071] 35 40 45
 [0072] Thr Val Asn Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Gly Gln His Leu Gln
 [0073] 50 55 60
 [0074] Leu Leu Leu Lys Tyr Phe Ser Gly Asp Pro Leu Val Lys Gly Ile Lys
 [0075] 65 70 75 80
 [0076] Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ile Lys Ser Lys Phe Ser Phe Asn Leu Arg
 [0077] 85 90 95
 [0078] Lys Pro Ser Val Gln Trp Ser Asp Thr Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val
 [0079] 100 105 110
 [0080] Asn Asp Asn Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
 [0081] 115 120 125
 [0082] Val Arg Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
 [0083] 130 135 140

[0084]	Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
[0085]	145 150 155 160
[0086]	Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
[0087]	165 170 175
[0088]	Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
[0089]	180 185 190
[0090]	Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
[0091]	195 200 205
[0092]	Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
[0093]	210 215 220
[0094]	Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
[0095]	225 230 235 240
[0096]	Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
[0097]	245 250 255
[0098]	Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0099]	260 265 270
[0100]	<210> 5
[0101]	<211> 272
[0102]	<212> PRT
[0103]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0104]	<400> 5
[0105]	Met Leu Leu Leu Leu Ile Pro Val Leu Gly Met Ile Phe Ala Leu Arg
[0106]	1 5 10 15
[0107]	Asp Ala Arg Ala Gln Ser Val Ser Gln His Asn His His Val Ile Leu
[0108]	20 25 30
[0109]	Ser Glu Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gly Cys Asn Tyr Ser Tyr Gly Gly
[0110]	35 40 45
[0111]	Thr Val Asn Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Gly Gln His Leu Gln
[0112]	50 55 60
[0113]	Leu Leu Leu Lys Tyr Phe Ser Gly Asp Pro Leu Val Lys Gly Ile Lys
[0114]	65 70 75 80
[0115]	Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ile Lys Ser Lys Phe Ser Phe Asn Leu Arg
[0116]	85 90 95
[0117]	Lys Pro Ser Val Gln Trp Ser Asp Thr Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val
[0118]	100 105 110
[0119]	Asn Asp Asn Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
[0120]	115 120 125
[0121]	Val Arg Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
[0122]	130 135 140
[0123]	Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
[0124]	145 150 155 160
[0125]	Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr

[0126]		165		170		175
[0127]	Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser					
[0128]		180		185		190
[0129]	Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe					
[0130]		195		200		205
[0131]	Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser					
[0132]		210		215		220
[0133]	Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn					
[0134]		225		230		235
[0135]	Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu					
[0136]		245		250		255
[0137]	Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser					
[0138]		260		265		270
[0139]	<210> 6					
[0140]	<211> 268					
[0141]	<212> PRT					
[0142]	<213> 人工序列(artificial sequence)					
[0143]	<400> 6					
[0144]	Met Leu Leu Leu Leu Ile Pro Val Leu Gly Met Ile Phe Ala Leu Arg					
[0145]	1	5		10		15
[0146]	Asp Ala Arg Ala Gln Ser Val Ser Gln His Asn His His Val Ile Leu					
[0147]		20		25		30
[0148]	Ser Glu Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gly Cys Asn Tyr Ser Tyr Gly Gly					
[0149]		35		40		45
[0150]	Thr Val Asn Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Gly Gln His Leu Gln					
[0151]		50		55		60
[0152]	Leu Leu Leu Lys Tyr Phe Ser Gly Asp Pro Leu Val Lys Gly Ile Lys					
[0153]	65	70		75		80
[0154]	Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ile Lys Ser Lys Phe Ser Phe Asn Leu Arg					
[0155]		85		90		95
[0156]	Lys Pro Ser Val Gln Trp Ser Asp Thr Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val					
[0157]		100		105		110
[0158]	Asn Asp Asn Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr					
[0159]		115		120		125
[0160]	Val Arg Ala Asn Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys					
[0161]		130		135		140
[0162]	Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp					
[0163]	145	150		155		160
[0164]	Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr					
[0165]		165		170		175
[0166]	Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly					
[0167]		180		185		190

[0168]	Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe
[0169]	195 200 205
[0170]	Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala
[0171]	210 215 220
[0172]	Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln
[0173]	225 230 235 240
[0174]	Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly
[0175]	245 250 255
[0176]	Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0177]	260 265
[0178]	<210> 7
[0179]	<211> 312
[0180]	<212> PRT
[0181]	<213> 人(Homo sapiens)
[0182]	<400> 7
[0183]	Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala
[0184]	1 5 10 15
[0185]	Val Pro Met Glu Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg His Leu Val Met
[0186]	20 25 30
[0187]	Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Leu Gly His
[0188]	35 40 45
[0189]	Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys Lys Pro Leu Glu Leu
[0190]	50 55 60
[0191]	Met Phe Val Tyr Ser Leu Glu Glu Arg Val Glu Asn Asn Ser Val Pro
[0192]	65 70 75 80
[0193]	Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu Phe Leu His
[0194]	85 90 95
[0195]	Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
[0196]	100 105 110
[0197]	Ser Gln Glu Ala Gly Ser Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr
[0198]	115 120 125
[0199]	Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val
[0200]	130 135 140
[0201]	Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala
[0202]	145 150 155 160
[0203]	Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu
[0204]	165 170 175
[0205]	Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp
[0206]	180 185 190
[0207]	Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys
[0208]	195 200 205
[0209]	Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg

[0210]	210	215	220
[0211]	Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp		
[0212]	225	230	235 240
[0213]	Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala		
[0214]		245	250 255
[0215]	Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln		
[0216]		260	265 270
[0217]	Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys		
[0218]		275	280 285
[0219]	Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met		
[0220]	290	295	300
[0221]	Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly		
[0222]	305	310	
[0223]	<210> 8		
[0224]	<211> 312		
[0225]	<212> PRT		
[0226]	<213> 人工序列(artificial sequence)		
[0227]	<400> 8		
[0228]	Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala		
[0229]	1	5	10 15
[0230]	Val Pro Met Glu Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg His Leu Val Met		
[0231]		20	25 30
[0232]	Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Leu Gly His		
[0233]		35	40 45
[0234]	Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys Lys Pro Leu Glu Leu		
[0235]		50	55 60
[0236]	Met Phe Val Tyr Ser Leu Glu Glu Arg Val Glu Asn Asn Ser Val Pro		
[0237]	65	70	75 80
[0238]	Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu Phe Leu His		
[0239]		85	90 95
[0240]	Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser		
[0241]		100	105 110
[0242]	Ser Gln Glu Ala Gly Ser Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr		
[0243]		115	120 125
[0244]	Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val		
[0245]		130	135 140
[0246]	Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala		
[0247]	145	150	155 160
[0248]	Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu		
[0249]		165	170 175
[0250]	Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp		
[0251]		180	185 190

[0252]	Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys
[0253]	195 200 205
[0254]	Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg
[0255]	210 215 220
[0256]	Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp
[0257]	225 230 235 240
[0258]	Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala
[0259]	245 250 255
[0260]	Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln
[0261]	260 265 270
[0262]	Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys
[0263]	275 280 285
[0264]	Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met
[0265]	290 295 300
[0266]	Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
[0267]	305 310
[0268]	<210> 9
[0269]	<211> 306
[0270]	<212> PRT
[0271]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0272]	<400> 9
[0273]	Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala
[0274]	1 5 10 15
[0275]	Val Pro Met Glu Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg His Leu Val Met
[0276]	20 25 30
[0277]	Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Leu Gly His
[0278]	35 40 45
[0279]	Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys Lys Pro Leu Glu Leu
[0280]	50 55 60
[0281]	Met Phe Val Tyr Ser Leu Glu Glu Arg Val Glu Asn Asn Ser Val Pro
[0282]	65 70 75 80
[0283]	Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu Phe Leu His
[0284]	85 90 95
[0285]	Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
[0286]	100 105 110
[0287]	Ser Gln Glu Ala Gly Ser Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr
[0288]	115 120 125
[0289]	Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val
[0290]	130 135 140
[0291]	Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala
[0292]	145 150 155 160
[0293]	Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu

[0294]		165		170		175
[0295]	Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp					
[0296]		180		185		190
[0297]	Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg					
[0298]		195		200		205
[0299]	Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg					
[0300]		210		215		220
[0301]	Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu					
[0302]		225		230		235
[0303]	Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly					
[0304]		245		250		255
[0305]	Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu					
[0306]		260		265		270
[0307]	Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr					
[0308]		275		280		285
[0309]	Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys					
[0310]		290		295		300
[0311]	Asn Ser					
[0312]	305					
[0313]	<210> 10					
[0314]	<211> 396					
[0315]	<212> DNA					
[0316]	<213> 人(Homo sapiens)					
[0317]	<400> 10					
[0318]	atgctcctgt tgctcatacc agtgcctggg atgatttttg ccctgagaga tgccagagcc 60					
[0319]	cagtctgtga gccagcataa ccaccagta attctctctg aagcagcctc actggagttg 120					
[0320]	ggatgcaact attcctatgg tggaactgtt aatctcttct ggtatgtcca gtaccctggt 180					
[0321]	caacaccttc agcttctcct caagtacttt tcaggggatc cactgggtaa aggcatacaag 240					
[0322]	ggctttgagg ctgaatttat aaagagtaaa ttctcttita atctgaggaa accctctgtg 300					
[0323]	cagtggagtg acacagctga gtacttctgt gccgtgaatg ataacgacta caagctcagc 360					
[0324]	tttgagccg gaaccacagt aactgtaaga gcaaac 396					
[0325]	<210> 11					
[0326]	<211> 399					
[0327]	<212> DNA					
[0328]	<213> 人(Homo sapiens)					
[0329]	<400> 11					
[0330]	atgggctgca ggctgctctg ctgtgcggtt ctctgtctcc tgggagcggg ccccatggaa 60					
[0331]	acgggagtta cgcagacacc aagacacctg gtcatgggaa tgacaaataa gaagtctttg 120					
[0332]	aaatgtgaac aacatctggg tcataacgct atgtattggt acaagcaaag tgctaagaag 180					
[0333]	ccactggagc tcatgtttgt ctacagtctt gaagaacggg ttgaaaacaa cagtgtgcca 240					
[0334]	agtcgcttct cacctgaatg cccaacagc tctcacttat tccttcacct acacacctg 300					
[0335]	cagccagaag actcggccct gtatctctgc gccagcagcc aagaagccgg ttctacaat 360					

[0336] gagcagttct tcgggccagg gacacggctc accgtgcta 399
 [0337] <210> 12
 [0338] <211> 819
 [0339] <212> DNA
 [0340] <213> 人(Homo sapiens)
 [0341] <400> 12
 [0342] atgctcctgt tgctcatacc agtgcctggg atgatttttg ccctgagaga tgccagagcc 60
 [0343] cagtctgtga gccagcataa ccaccacgta attctctctg aagcagcctc actggagttg 120
 [0344] ggatgcaact attcctatgg tggaactgtt aatctcttct ggtatgtcca gtaccctggt 180
 [0345] caacaccttc agcttctcct caagtacttt tcaggggatc cactggttaa aggcatacaag 240
 [0346] ggctttgagg ctgaatttat aaagagtaaa ttctccttta atctgaggaa accctctgtg 300
 [0347] cagtggagtg acacagctga gtacttctgt gccgtgaatg ataacgacta caagctcagc 360
 [0348] tttggagccg gaaccacagt aactgtaaga gcaaatatcc agaaccctga ccctgccctg 420
 [0349] taccagctga gagactctaa atccagtac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 480
 [0350] tctcaaacia atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaaccctg 540
 [0351] ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtct tggcctggag caacaaatct 600
 [0352] gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattatc cagaagacac cttcttcccc 660
 [0353] agcccagaaa gttcctgtga tgtcaagctg gtcgagaaaa gctttgaaac agatacgaac 720
 [0354] ctaaactttc aaaacctgtc agtgattggg ttccgaatcc tctcctgaa agtggccggg 780
 [0355] tttaatctgc tcatgacgct gcggctgtgg tccagctga 819
 [0356] <210> 13
 [0357] <211> 819
 [0358] <212> DNA
 [0359] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0360] <400> 13
 [0361] atgctcctgt tgctcatacc agtgcctggg atgatttttg ccctgagaga tgccagagcc 60
 [0362] cagtctgtga gccagcataa ccaccacgta attctctctg aagcagcctc actggagttg 120
 [0363] ggatgcaact attcctatgg tggaactgtt aatctcttct ggtatgtcca gtaccctggt 180
 [0364] caacaccttc agcttctcct caagtacttt tcaggggatc cactggttaa aggcatacaag 240
 [0365] ggctttgagg ctgaatttat aaagagtaaa ttctccttta atctgaggaa accctctgtg 300
 [0366] cagtggagtg acacagctga gtacttctgt gccgtgaatg ataacgacta caagctcagc 360
 [0367] tttggagccg gaaccacagt aactgtaaga gcaaatatcc agaaccctga ccctgccctg 420
 [0368] taccagctga gagactctaa atccagtac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 480
 [0369] tctcaaacia atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaatgcctg 540
 [0370] ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtct tggcctggag caacaaatct 600
 [0371] gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattatc cagaagacac cttcttcccc 660
 [0372] agcccagaaa gttcctgtga tgtcaagctg gtcgagaaaa gctttgaaac agatacgaac 720
 [0373] ctaaactttc aaaacctgtc agtgattggg ttccgaatcc tctcctgaa agtggccggg 780
 [0374] tttaatctgc tcatgacgct gcggctgtgg tccagctga 819
 [0375] <210> 14
 [0376] <211> 807
 [0377] <212> DNA

[0378]	<213> 人工序列(artificial sequence)	
[0379]	<400> 14	
[0380]	atgctcctgt tgctcatacc agtgcctggg atgatttttg cctgagaga tgccagagcc	60
[0381]	cagtctgtga gccagcataa ccaccacgta attctctctg aagcagcctc actggagttg	120
[0382]	ggatgcaact attcctatgg tggaaactgt aatctcttct ggtatgtcca gtaccctggt	180
[0383]	caacaccttc agcttctcct caagtacttt tcaggggatc cactggttaa aggcatacaag	240
[0384]	ggctttgagg ctgaatttat aaagagtaaa ttctccttta atctgaggaa accctctgtg	300
[0385]	cagtggagtg acacagctga gtacttctgt gccgtgaatg ataacgacta caagctcagc	360
[0386]	tttggagccg gaaccacagt aactgtaaga gcaaacatcc agaaccaga acctgctgtg	420
[0387]	taccagttaa aagatcctcg gtctcaggac agcacctct gcctgttcac cgactttgac	480
[0388]	tcccaaatca atgtgccgaa aaccatgga tctggaactg tcatcactga caaaactgtg	540
[0389]	ctggacatga aagctatgga ttccaagagc aatggggcca ttgcctggag caaccagaca	600
[0390]	agcttcacct gccaaagatat cttcaaagag accaacgcca cctaccccag ttcagacgtt	660
[0391]	ccctgtgatg ccacgtgac cgagaaaagc tttgaaacag atatgaacct aaactttcaa	720
[0392]	aacctgtcag ttatgggact ccgaatctc ctgctgaaag tagcgggatt taacctgctc	780
[0393]	atgacgctga ggctgtggtc cagttga	807
[0394]	<210> 15	
[0395]	<211> 939	
[0396]	<212> DNA	
[0397]	<213> 人(Homo sapiens)	
[0398]	<400> 15	
[0399]	atgggctgca ggctgctctg ctgtgcggtt ctctgtctcc tgggagcggc ccccatggaa	60
[0400]	acgggagtta cgagacacc aagacacctg gtcattggaa tgacaaataa gaagtctttg	120
[0401]	aatgtgaac aacatctggg tcataacgct atgtattggt acaagcaaag tgctaagaag	180
[0402]	ccactggagc tcatgtttgt ctacagtctt gaagaacggg ttgaaaacaa cagtgtgcca	240
[0403]	agtcgcttct cacctgaatg cccaacagc tctcacttat tcttcacct acacacctg	300
[0404]	cagccagaag actcggcct gtatctctgc gccagcagcc aagaagccgg ttcctacaat	360
[0405]	gagcagttct tcgggccagg gacacgctc accgtgctag aggacctgaa aaacgtgttc	420
[0406]	ccaccgagg tcgctgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctccacac ccaaaaggcc	480
[0407]	acactggtat gcctggccac aggttctac cccgaccagc tggagctgag ctggtgggtg	540
[0408]	aatgggaagg aggtgcacag tgggctcagc acagaccgc agccctcaa ggagcagccc	600
[0409]	gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgctga ggtctcggc caccttctgg	660
[0410]	cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac	720
[0411]	gagtggacc accgataggc caaacctgc acccagatcg tcagcggcga ggctggggt	780
[0412]	agagcagact gtggcttcac ctccgagtct taccagcaag ggtcctgtc tgccaccatc	840
[0413]	ctctatgaga tcttgctagg gaaggccacc ttgtatgccg tgctggctcag tgccctcgtg	900
[0414]	ctgatggcca tggtaagag aaaggattcc agaggctaa	939
[0415]	<210> 16	
[0416]	<211> 939	
[0417]	<212> DNA	
[0418]	<213> 人(Homo sapiens)	
[0419]	<400> 16	

[0420]	atgggctgca ggctgctctg ctgtgcggtt ctctgtctcc tgggagcggg ccccatggaa	60
[0421]	acgggagtta cgcagacacc aagacacctg gtcatgggaa tgacaaataa gaagtctttg	120
[0422]	aatgtgaac aacatctggg tcatacgtct atgtattggt acaagcaaag tgctaagaag	180
[0423]	ccactggagc tcatgtttgt ctacagtctt gaagaacggg ttgaaaacaa cagtgtgcca	240
[0424]	agtcgcttct cacctgaatg cccaacagc tctcacttat tccttcacct acacacctg	300
[0425]	cagccagaag actcggcctt gtatctctgc gccagcagcc aagaagccgg ttcctacaat	360
[0426]	gagcagttct tcgggccagg gacacggctc accgtgctag aggacctgaa aaacgtgttc	420
[0427]	ccaccgagg tcgctgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctccacac caaaaggcc	480
[0428]	acactggtat gcctggccac aggettctac cccgaccagc tggagctgag ctggtgggtg	540
[0429]	aatgggaagg aggtgcacag tggggtctgc acagaccgc agcccctcaa ggagcagccc	600
[0430]	gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgctga gggctctggc caccttctgg	660
[0431]	cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac	720
[0432]	gagtgaccac aggataggc caaacctgc acccagatcg tcagcgcga ggcctgggtg	780
[0433]	agagcagact gtggctcac ctccgagtct taccagcaag gggctctgct tgccaccatc	840
[0434]	ctctatgaga tcttctagg gaaggccacc ttgtatgccg tgctggctcag tgccctcgtg	900
[0435]	ctgatggcca tggtaagag aaaggattcc agaggctaa	939
[0436]	<210>	17
[0437]	<211>	921
[0438]	<212>	DNA
[0439]	<213>	人 (Homo sapiens)
[0440]	<400>	17
[0441]	atgggctgca ggctgctctg ctgtgcggtt ctctgtctcc tgggagcggg ccccatggaa	60
[0442]	acgggagtta cgcagacacc aagacacctg gtcatgggaa tgacaaataa gaagtctttg	120
[0443]	aatgtgaac aacatctggg tcatacgtct atgtattggt acaagcaaag tgctaagaag	180
[0444]	ccactggagc tcatgtttgt ctacagtctt gaagaacggg ttgaaaacaa cagtgtgcca	240
[0445]	agtcgcttct cacctgaatg cccaacagc tctcacttat tccttcacct acacacctg	300
[0446]	cagccagaag actcggcctt gtatctctgc gccagcagcc aagaagccgg ttcctacaat	360
[0447]	gagcagttct tcgggccagg gacacggctc accgtgctag aggatctgag aaatgtgact	420
[0448]	ccaccgaagg tctccttgtt tgagccatca aaagcagaga ttgcaaacaa acaaaagget	480
[0449]	accctcgtgt gcttggccag gggcttcttc cctgaccagc tggagctgag ctggtgggtg	540
[0450]	aatggcaagg aggtccacag tggggtcagc acggaccctc aggcctacaa ggagagcaat	600
[0451]	tatagctact gcctgagcag ccgctgagg gtctctgcta ctttctggca caatcctcgc	660
[0452]	aaccacttcc gctgccaagt gcagttccat gggctttcag aggaggacaa gtggccagag	720
[0453]	ggctcaccca aacctgtcac acagaacatc agtgcagagg cctggggccg agcagactgt	780
[0454]	gggattacct cagcatccta tcaacaaggg gtcttctctg ccaccatcct ctatgagatc	840
[0455]	ctgctaggga aagccacct gtatgtctgt cttgtcagta cactgggtgt gatggctatg	900
[0456]	gtcaaaagaa agaattcata a	921
[0457]	<210>	18
[0458]	<211>	1851
[0459]	<212>	DNA
[0460]	<213>	人工序列 (artificial sequence)
[0461]	<400>	18

[0462]	atgggctgca ggctgctctg ctgtgcggtt ctctgtctcc tgggagcggg ccccatggaa	60
[0463]	acgggagtta cgcagacacc aagacacctg gtcatgggaa tgacaaataa gaagtctttg	120
[0464]	aatgtgaac aacatctggg tcatacgtct atgtattggt acaagcaaag tgctaagaag	180
[0465]	ccactggagc tcatgtttgt ctacagtctt gaagaacggg ttgaaaacaa cagtgtgcca	240
[0466]	agtcgcttct cacctgaatg cccaacacg tctcacttat tccttcacct acacacctg	300
[0467]	cagccagaag actcggccct gtatctctgc gccagcagcc aagaagccgg ttcctacaat	360
[0468]	gagcagttct tcgggccagg gacacggctc accgtgctag aggacctgaa aaacgtgttc	420
[0469]	ccaccggagg tcgctgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctccacac caaaaggcc	480
[0470]	acactggtat gcctggccac aggettctac cccgaccacg tggagctgag ctggtgggtg	540
[0471]	aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acagaccgc agcccctcaa ggagcagccc	600
[0472]	gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgctga gggctcggc caccttctgg	660
[0473]	cagaacccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac	720
[0474]	gagtggacc accgataggc caaacccgtc acccagatcg tcagcggcga ggcctgggtg	780
[0475]	agagcagact gtggctcac ctccgagtct taccagcaag gggctctgtc tgccaccatc	840
[0476]	ctctatgaga tcttgctagg gaaggccacc ttgtatgccg tgctggctcag tgccctcgtg	900
[0477]	ctgatggcca tggctcaagag aaaggattcc agaggccgtg ccaagcgtc cggaaagcga	960
[0478]	gccctgtaa agcagacttt gaattttgac cttctcaagt tggcgggaga cgtcagttcc	1020
[0479]	aaccctgggc ccatgtctct gttgctcata ccagtgtctg gcatgatttt tgccctgaga	1080
[0480]	gatgccagag cccagtctgt gagccagcat aaccaccacg taattctctc tgaagcagcc	1140
[0481]	tactggagt tgggatgcaa ctattcctat ggtggaactg ttaattctct ctggtatgtc	1200
[0482]	cagtacctg gtcaacacct tcagctctc ctcaagtaact tttcagggga tccactggtt	1260
[0483]	aaagcatca agggcttga ggctgaattt ataaagagta aattctcctt taatctgagg	1320
[0484]	aaacctctg tgcagtggag tgacacagct gagtacttct gtgccgtgaa tgataacgac	1380
[0485]	tacaagctca gctttggagc cggaaccaca gtaactgtaa gagcaaatat ccagaacct	1440
[0486]	gacctgccg tgtaccagct gagagactct aaatccagtg acaagtctgt ctgcctattc	1500
[0487]	accgattttg attctcaaac aatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca	1560
[0488]	gacaaaaccg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg	1620
[0489]	agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac	1680
[0490]	accttcttcc ccagcccaga aagttctgt gatgtcaagc tggctcagaa aagctttgaa	1740
[0491]	acagatacga acctaaactt tcaaacctg tcagtattg ggttccgaat cctctctctg	1800
[0492]	aaagtggccg gtttaactc gctcatgacg ctgcggctgt ggtccagctg a	1851
[0493]	<210>	19
[0494]	<211>	1851
[0495]	<212>	DNA
[0496]	<213>	人工序列 (artificial sequence)
[0497]	<400>	19
[0498]	atgggctgca ggctgctctg ctgtgcggtt ctctgtctcc tgggagcggg ccccatggaa	60
[0499]	acgggagtta cgcagacacc aagacacctg gtcatgggaa tgacaaataa gaagtctttg	120
[0500]	aatgtgaac aacatctggg tcatacgtct atgtattggt acaagcaaag tgctaagaag	180
[0501]	ccactggagc tcatgtttgt ctacagtctt gaagaacggg ttgaaaacaa cagtgtgcca	240
[0502]	agtcgcttct cacctgaatg cccaacacg tctcacttat tccttcacct acacacctg	300
[0503]	cagccagaag actcggccct gtatctctgc gccagcagcc aagaagccgg ttcctacaat	360

[0504]	gagcagttct tgggcccagg gacacggctc accgtgctag aggacctgaa aaacgtgttc	420
[0505]	ccaccgagg tcgctgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac caaaaggcc	480
[0506]	acactggat gcttgccac aggttctac cccgaccac tggagctgag ctgggtgggtg	540
[0507]	aatgggaagg aggtgcacag tgggtctgc acagaccgc agcccctcaa ggagcagccc	600
[0508]	gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggctctggc caccttctgg	660
[0509]	cagaaccccc gcaaccactt ccgctgcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac	720
[0510]	gagtggacc aggatagggc caaacccgtc acccagatcg tcagcgccga ggctgggggt	780
[0511]	agagcagact gtggcttca ctcgagctc taccagcaag gggctctgc tgccaccatc	840
[0512]	ctctatgaga tcttgctagg gaaggccacc ttgtatgccg tgctggctcag tgccctcgtg	900
[0513]	ctgatggcca tggtaagag aaaggattcc agaggccgtg ccaagcgatc cggaagcgga	960
[0514]	gccctgtaa agcagacttt gaattttgac cttctcaagt tggcgggaga cgtcagatcc	1020
[0515]	aaccctgggc ccatgctct gttgctcata ccagtctgg ggatgatttt tgccctgaga	1080
[0516]	gatgccagag ccagctctgt gagccagcat aaccaccac taattctctc tgaagcagcc	1140
[0517]	tactggagt tgggatgcaa ctattcctat ggtggaactg ttaatctctt ctggatgctc	1200
[0518]	cagtaccctg gtcaacacct tcagcttctc ctcaagtact tttcagggga tccactggtt	1260
[0519]	aaagcatca agggcttga ggctgaattt ataaagagta aattctcctt taatctgagg	1320
[0520]	aaaccctctg tgcagtggag tgacacagct gactacttct gtgccgtgaa tgataacgac	1380
[0521]	tacaagctca gctttggagc cggaaccaca gtaactgtaa gagcaaatat ccagaaccct	1440
[0522]	gacctgccc tgtaccagct gagagactct aaatccagtg acaagtctgt ctgcctattc	1500
[0523]	accgattttg attctcaaac aaatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca	1560
[0524]	gacaaatgcg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgc tgtggcctgg	1620
[0525]	agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac	1680
[0526]	acctcttcc ccagcccaga aagttcctgt gatgtcaagc tggctcgagaa aagctttgaa	1740
[0527]	acagatacga acctaaactt tcaaacctg tcagtattg ggttccgaat cctctctctg	1800
[0528]	aaagtggccg ggtttaatct gctcatgacg ctgcgctgt ggtccagctg a	1851
[0529]	<210> 20	
[0530]	<211> 1821	
[0531]	<212> DNA	
[0532]	<213> 人工序列(artificial sequence)	
[0533]	<400> 20	
[0534]	atggctgca ggctgctctg ctgtgcggtt ctctgtctcc tgggagcggc ccccatgga	60
[0535]	acgggagtta cgcagacacc aagacacctg gtcattggaa tgacaaataa gaagtcttg	120
[0536]	aatgtgaac aacatctggg tcatacgtc atgtattggt acaagcaaag tgctaagaag	180
[0537]	ccactggagc tcatgtttgt ctacagtctt gaagaacggg ttgaaaacaa cagtgtgcca	240
[0538]	agtcgttct cacctgaatg cccaacagc tctcattat tccttcacct acacaccctg	300
[0539]	cagccagaag actcggcct gtatctctgc gccagcagc aagaagccgg ttcctacaat	360
[0540]	gagcagttct tgggcccagg gacacggctc accgtgctag aggatctgag aaatgtgact	420
[0541]	ccaccaagg tctccttgtt tgagccatca aaagcagaga ttgcaacaa acaaaaggt	480
[0542]	acctcgtgt gcttgccag gggcttctc cctgaccac tggagctgag ctgggtgggtg	540
[0543]	aatggcaagg aggtccacag tgggtcagc acggaccctc aggcctacaa ggagagcaat	600
[0544]	tatagctact gcctgagcag ccgctgagg gtctctgcta cttctggca caatcctcgc	660
[0545]	aaccacttcc gctgccaagt gcagttccat gggctttcag aggaggacaa gtggccagag	720

[0546] ggctcaccca aacctgtcac acagaacatc agtgcagagg cctggggccg agcagactgt 780
 [0547] gggattacct cagcatccta tcaacaaggg gtcttgtctg ccaccatcct ctatgagatc 840
 [0548] ctgctagga aagccacct gtatgtctg cttgtcagta cactgggtgt gatggctatg 900
 [0549] gtcaaaagaa agaattcacg tgccaagcga tccggaagcg gagcccctgt aaagcagact 960
 [0550] ttgaattttg accttctcaa gttggcgga gacgtcagat ccaaccctgg gcccatgctc 1020
 [0551] ctgttgctca taccagtgtt ggggatgatt tttgcctga gagatgccag agcccagtct 1080
 [0552] gtgagccagc ataaccacca cgtaattctc tctgaagcag cctcactgga gttgggatgc 1140
 [0553] aactattcct atggtggaac tgtaattctc ttctggtatg tccagtacc tggtcaacac 1200
 [0554] cttcagcttc tcctcaagta cttttcaggg gatccactgg ttaaaggcat caagggttt 1260
 [0555] gaggtgaat ttataagag taaattctcc tttaattctga ggaaaccctc tgtgcagtgg 1320
 [0556] agtgacacag ctgagtactt ctgtgccgtg aatgataacg actacaagct cagctttgga 1380
 [0557] gccggaacca cagtaactgt aagagcaaac atccagaacc cagaacctgc tgtgtaccag 1440
 [0558] ttaaaagatc ctcggtctca ggacagcacc ctctgctgt tcaccgactt tgactcccaa 1500
 [0559] atcaatgtgc cgaaaacct ggaatctgga acgttcatca ctgacaaaac tgtgctggac 1560
 [0560] atgaaagcta tggattccaa gagcaatggg gccattgcct ggagcaacca gacaagcttc 1620
 [0561] acctgccaag atatcttcaa agagaccaac gccacctacc ccagttcaga cgttcctgt 1680
 [0562] gatgccacgt tgaccgagaa aagctttgaa acagatatga acctaaactt tcaaaacctg 1740
 [0563] tcagttatgg gactccgaat cctcctgctg aaagtagcgg gatttaacct gctcatgacg 1800
 [0564] ctgaggctgt ggtccagttg a 1821
 [0565] <210> 21
 [0566] <211> 1255
 [0567] <212> PRT
 [0568] <213> 人(Homo sapiens)
 [0569] <400> 21
 [0570] Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 [0571] 1 5 10 15
 [0572] Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 [0573] 20 25 30
 [0574] Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 [0575] 35 40 45
 [0576] Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 [0577] 50 55 60
 [0578] Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 [0579] 65 70 75 80
 [0580] Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 [0581] 85 90 95
 [0582] Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 [0583] 100 105 110
 [0584] Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
 [0585] 115 120 125
 [0586] Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
 [0587] 130 135 140

[0588]	Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
[0589]	145 150 155 160
[0590]	Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
[0591]	165 170 175
[0592]	Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
[0593]	180 185 190
[0594]	His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
[0595]	195 200 205
[0596]	Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
[0597]	210 215 220
[0598]	Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
[0599]	225 230 235 240
[0600]	Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
[0601]	245 250 255
[0602]	His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
[0603]	260 265 270
[0604]	Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
[0605]	275 280 285
[0606]	Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
[0607]	290 295 300
[0608]	Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
[0609]	305 310 315 320
[0610]	Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
[0611]	325 330 335
[0612]	Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
[0613]	340 345 350
[0614]	Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
[0615]	355 360 365
[0616]	Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
[0617]	370 375 380
[0618]	Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
[0619]	385 390 395 400
[0620]	Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
[0621]	405 410 415
[0622]	Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
[0623]	420 425 430
[0624]	Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
[0625]	435 440 445
[0626]	Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
[0627]	450 455 460
[0628]	Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
[0629]	465 470 475 480

[0630]	Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
[0631]	485 490 495
[0632]	Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
[0633]	500 505 510
[0634]	Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
[0635]	515 520 525
[0636]	Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
[0637]	530 535 540
[0638]	Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
[0639]	545 550 555 560
[0640]	Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
[0641]	565 570 575
[0642]	Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
[0643]	580 585 590
[0644]	Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
[0645]	595 600 605
[0646]	Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
[0647]	610 615 620
[0648]	Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
[0649]	625 630 635 640
[0650]	Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
[0651]	645 650 655
[0652]	Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
[0653]	660 665 670
[0654]	Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
[0655]	675 680 685
[0656]	Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
[0657]	690 695 700
[0658]	Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
[0659]	705 710 715 720
[0660]	Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
[0661]	725 730 735
[0662]	Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
[0663]	740 745 750
[0664]	Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
[0665]	755 760 765
[0666]	Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
[0667]	770 775 780
[0668]	Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
[0669]	785 790 795 800
[0670]	Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
[0671]	805 810 815

[0672]	Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
[0673]	820 825 830
[0674]	Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
[0675]	835 840 845
[0676]	Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
[0677]	850 855 860
[0678]	Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
[0679]	865 870 875 880
[0680]	Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
[0681]	885 890 895
[0682]	Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
[0683]	900 905 910
[0684]	Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
[0685]	915 920 925
[0686]	Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
[0687]	930 935 940
[0688]	Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
[0689]	945 950 955 960
[0690]	Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
[0691]	965 970 975
[0692]	Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
[0693]	980 985 990
[0694]	Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
[0695]	995 1000 1005
[0696]	Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
[0697]	1010 1015 1020
[0698]	Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
[0699]	1025 1030 1035
[0700]	Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
[0701]	1040 1045 1050
[0702]	Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
[0703]	1055 1060 1065
[0704]	Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
[0705]	1070 1075 1080
[0706]	Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
[0707]	1085 1090 1095
[0708]	Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
[0709]	1100 1105 1110
[0710]	Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
[0711]	1115 1120 1125
[0712]	Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
[0713]	1130 1135 1140

[0714]	Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
[0715]	1145 1150 1155
[0716]	Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
[0717]	1160 1165 1170
[0718]	Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
[0719]	1175 1180 1185
[0720]	Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
[0721]	1190 1195 1200
[0722]	Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
[0723]	1205 1210 1215
[0724]	Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
[0725]	1220 1225 1230
[0726]	Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
[0727]	1235 1240 1245
[0728]	Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
[0729]	1250 1255
[0730]	<210> 22
[0731]	<211> 10
[0732]	<212> PRT
[0733]	<213> 人(Homo sapiens)
[0734]	<400> 22
[0735]	Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp
[0736]	1 5 10
[0737]	<210> 23
[0738]	<211> 606
[0739]	<212> PRT
[0740]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0741]	<400> 23
[0742]	Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala
[0743]	1 5 10 15
[0744]	Val Pro Met Glu Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg His Leu Val Met
[0745]	20 25 30
[0746]	Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Leu Gly His
[0747]	35 40 45
[0748]	Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys Lys Pro Leu Glu Leu
[0749]	50 55 60
[0750]	Met Phe Val Tyr Ser Leu Glu Glu Arg Val Glu Asn Asn Ser Val Pro
[0751]	65 70 75 80
[0752]	Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu Phe Leu His
[0753]	85 90 95
[0754]	Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
[0755]	100 105 110

[0756]	Ser Gln Glu Ala Gly Ser Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr
[0757]	115 120 125
[0758]	Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val
[0759]	130 135 140
[0760]	Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala
[0761]	145 150 155 160
[0762]	Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu
[0763]	165 170 175
[0764]	Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp
[0765]	180 185 190
[0766]	Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg
[0767]	195 200 205
[0768]	Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg
[0769]	210 215 220
[0770]	Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu
[0771]	225 230 235 240
[0772]	Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly
[0773]	245 250 255
[0774]	Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu
[0775]	260 265 270
[0776]	Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr
[0777]	275 280 285
[0778]	Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys
[0779]	290 295 300
[0780]	Asn Ser Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Pro Val Lys Gln Thr
[0781]	305 310 315 320
[0782]	Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro
[0783]	325 330 335
[0784]	Gly Pro Met Leu Leu Leu Leu Ile Pro Val Leu Gly Met Ile Phe Ala
[0785]	340 345 350
[0786]	Leu Arg Asp Ala Arg Ala Gln Ser Val Ser Gln His Asn His His Val
[0787]	355 360 365
[0788]	Ile Leu Ser Glu Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gly Cys Asn Tyr Ser Tyr
[0789]	370 375 380
[0790]	Gly Gly Thr Val Asn Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Gly Gln His
[0791]	385 390 395 400
[0792]	Leu Gln Leu Leu Leu Lys Tyr Phe Ser Gly Asp Pro Leu Val Lys Gly
[0793]	405 410 415
[0794]	Ile Lys Gly Phe Glu Ala Glu Phe Ile Lys Ser Lys Phe Ser Phe Asn
[0795]	420 425 430
[0796]	Leu Arg Lys Pro Ser Val Gln Trp Ser Asp Thr Ala Glu Tyr Phe Cys
[0797]	435 440 445

[0798]	Ala Val Asn Asp Asn Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr
[0799]	450 455 460
[0800]	Val Thr Val Arg Ala Asn Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln
[0801]	465 470 475 480
[0802]	Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp
[0803]	485 490 495
[0804]	Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe
[0805]	500 505 510
[0806]	Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser
[0807]	515 520 525
[0808]	Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp
[0809]	530 535 540
[0810]	Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys
[0811]	545 550 555 560
[0812]	Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn
[0813]	565 570 575
[0814]	Phe Gln Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val
[0815]	580 585 590
[0816]	Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0817]	595 600 605
[0818]	<210> 24
[0819]	<211> 126
[0820]	<212> PRT
[0821]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0822]	<400> 24
[0823]	Met Lys Gly Ser Ile Phe Thr Leu Phe Leu Phe Ser Val Leu Phe Ala
[0824]	1 5 10 15
[0825]	Ile Ser Glu Val Arg Ser Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg
[0826]	20 25 30
[0827]	Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg
[0828]	35 40 45
[0829]	Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe
[0830]	50 55 60
[0831]	Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu
[0832]	65 70 75 80
[0833]	Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
[0834]	85 90 95
[0835]	Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys
[0836]	100 105 110
[0837]	Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Lys Asp Glu Leu
[0838]	115 120 125
[0839]	<210> 25

[0840] <211> 378
[0841] <212> DNA
[0842] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0843] <400> 25
[0844] atgaaagggtt ccatcttcac attgtttttg ttctccgtat tgttcgaat cagcgaagtc 60
[0845] cgatcaaaaa tatttgggtc tctcgcattc ctccgcagaa agaggaaat cttcggtagt 120
[0846] ttggccttcc ttaggcgaaa gagaaagata ttggaagcc tggccttctt gcgacgcaa 180
[0847] cggaaaatct tcggctcact ggcattcttg aggagaaagc gcaaaatatt cgggtctttg 240
[0848] gcctttctgc gccggaagcg caagatcttc gggtccttgg ctttcttgag acgaaaacgc 300
[0849] aaaaatattg ggtctcttgc cttcctcagg cgaaagcga agattttcgg ttcccttgcc 360
[0850] ttcttaag acgagctt 378
[0851] <210> 26
[0852] <211> 1569
[0853] <212> DNA
[0854] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0855] <400> 26
[0856] atggccgtca tggcgccccg aaccctcgtc ctgctactct cgggggctct ggcctgacc 60
[0857] cagacctggg cgggctctca ctccatgagg tattttctca catccgtgtc ccggccccgc 120
[0858] cgcggggagc cccgcttcat cgcagtgggc tacgtggacg acacgcagtt cgtgcggttc 180
[0859] gacagcgacg ccgcgagcca gaggatggag ccgcgggcgc cgtggataga gcaggagggt 240
[0860] ccggagtatt gggacgggga gacacgaaa gtgaaggccc actcacagac tcaccgagtg 300
[0861] gacctgggga ccctgcgagg ctactacaac cagagcgagg ccggttctca caccgtccag 360
[0862] aggatgtatg gctgcgacgt ggggtcggac tggcgttcc tccgcgggta ccaccagtac 420
[0863] gcctacgacg gcaaggatta catgcacctg aaagaggacc tgcgctcttg gaccgggcg 480
[0864] gacatggcag ctacagaccac caagcacaag tgggagcgg cccatgtggt ggagcagttg 540
[0865] agagctacc tggagggcac gtgcgtggag tggctccga gatacctgga gaacgggaag 600
[0866] gagacgtgc agcgcacgga cgccccaaa acgcatatga ctcaccacgc tgtctctgac 660
[0867] catgaagcca ccctgagggt ctggccctg agcttctacc ctgcggagat cactgacc 720
[0868] tggcagcggg atggggagga ccagaccag gacacggagc tcgtggagac caggcctgca 780
[0869] ggggatgga cttccagaa gtggcggtg gtggtggtgc cttctggaca ggagcagaga 840
[0870] tacacctgcc atgtgcagca tgagggttg cccaagccc tcacctgag atgggagccg 900
[0871] tcttcccagc ccaccatccc catcgtgggc atcattgtct gcctggttct ctttggagct 960
[0872] gtgatcactg gagctgtggt cgctgtgtg atgtggagga ggaagagtc agatagaaaa 1020
[0873] ggagggagct actctcagc tgcaagcagt gacagtgcc agggctctga tgtgtctctc 1080
[0874] acagcttgta aagtgcgtgc caagcatcc ggaagcggag ccctgtaaa gcagactttg 1140
[0875] aattttgacc ttctcaagtt ggcgggagac gtcgagtcca accctgggc catgaaaggt 1200
[0876] tccatcttca cattgtttt gttctcgtta ttgttcgcaa tcagcgaagt ccgatcaaaa 1260
[0877] atatttgggt ctctgcatt cctccgcaga aagaggaaaa tcttcggtag tttggccttc 1320
[0878] cttagcgaa agagaaagat atttggaagc ctggccttcc tgcgacgcaa acgaaaatc 1380
[0879] ttggctcac tggcattctt gaggagaaag cgcaaaatatt cgggtctttt ggcctttctg 1440
[0880] cgccggaagc gcaagatctt cgggtccttg gctttcttga gacgaaaacg caaaatattt 1500
[0881] gggctctctt ccttctcag gcgaaagcgg aagattttcg gttcccttgc cttccttaaa 1560

[0882] gacgagctt 1569
 [0883] <210> 27
 [0884] <211> 1572
 [0885] <212> DNA
 [0886] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0887] <400> 27
 [0888] atgaaagggtt ccattctcac attgtttttg ttctccgtat tgttcgcaat cagcgaagtc 60
 [0889] cgatcaaaaa tatttgggtc tctcgattc ctccgcagaa agaggaaaat cttcggtagt 120
 [0890] ttggccttcc ttaggcgaaa gagaaagata tttggaagcc tggccttctt gcgacgcaaa 180
 [0891] cggaaaatct tcggctcact ggcattcttg aggagaaaagc gcaaaaatatt cgggtccttg 240
 [0892] gcctttctgc gccggaagcg caagatcttc gggctcttgg ctttcttgag acgaaaacgc 300
 [0893] aaaatatttg ggtctcttgc cttctcagg cgaaagcgga agattttcgg ttcccttgcc 360
 [0894] ttctctaaag acgagcttgc tgccaagcga tccggaagcg gagcccctgt aaagcagact 420
 [0895] ttgaattttg accttctcaa gttggcggga gacgtcgagt ccaaccctgg gcccatggcc 480
 [0896] gtcatggcgc cccgaaccct cgtcctgcta ctctcggggg ctctggccct gaccagacc 540
 [0897] tgggcgggct ctactccat gaggtatttc ttacatccg tgtcccggcc cggccgcggg 600
 [0898] gagccccgct tcatcgcagt gggctacgtg gacgacacgc agttcgtgcg gttcgacagc 660
 [0899] gacgccgca gccagaggat ggagccgagg gcgccgtgga tagagcagga gggctccggag 720
 [0900] tattgggacg gggagacacg gaaagtgaag gccactcac agactcaccg agtggacctg 780
 [0901] gggaccctgc gcggctacta caaccagacg gaggccggtt ctcacaccgt ccagaggatg 840
 [0902] tatggtgctg acgtggggtc ggactggcgc ttctccgcg ggtaccacca gtacgcctac 900
 [0903] gacggcaagg attacatcgc cctgaaagag gacctgcgct cttggaccgc ggcggacatg 960
 [0904] gcagctcaga ccaccaagca caagtgggag gcggcccatg tggcggagca gttgagagcc 1020
 [0905] tacctggagg gcacgtcgtt ggagtggctc cgcagatacc tggagaacgg gaaggagacg 1080
 [0906] ctgcagcga cggaccccc caaacgcat atgactcacc acgctgtctc tgaccatgaa 1140
 [0907] gccaccctga ggtgctgggc cctgagcttc taccctgcgg agatcacact gacctggcag 1200
 [0908] cgggatgggg aggaccagac ccaggacacg gagctcgtgg agaccaggcc tgcaggggat 1260
 [0909] ggaaccttcc agaagtgggc ggctgtggtg gtgcctcttg gacaggagca gagatacacc 1320
 [0910] tgccatgtgc agcatgaggg tttgcccagg cccctcacc tgagatggga gccgtcttcc 1380
 [0911] cagcccacca tccccatgtt gggcatcatt gctggcctgg ttctcttttg agctgtgatc 1440
 [0912] actggagctg tggctcgtgc tgtgatgtgg aggaggaaga gctcagatag aaaaggaggg 1500
 [0913] agctactctc aggctgcaag cagtgcagct gccagggct ctgatgtgtc tctcacagct 1560
 [0914] tgtaaagtgt ga 1572
 [0915] <210> 28
 [0916] <211> 22
 [0917] <212> PRT
 [0918] <213> 人(Homo sapiens)
 [0919] <400> 28
 [0920] Met Lys Gly Ser Ile Phe Thr Leu Phe Leu Phe Ser Val Leu Phe Ala
 [0921] 1 5 10 15
 [0922] Ile Ser Glu Val Arg Ser
 [0923] 20

[0924] <210> 29
 [0925] <211> 365
 [0926] <212> PRT
 [0927] <213> 人(Homo sapiens)
 [0928] <400> 29
 [0929] Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala
 [0930] 1 5 10 15
 [0931] Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
 [0932] 20 25 30
 [0933] Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
 [0934] 35 40 45
 [0935] Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala
 [0936] 50 55 60
 [0937] Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly
 [0938] 65 70 75 80
 [0939] Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln
 [0940] 85 90 95
 [0941] Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser
 [0942] 100 105 110
 [0943] Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly
 [0944] 115 120 125
 [0945] Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly
 [0946] 130 135 140
 [0947] Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala
 [0948] 145 150 155 160
 [0949] Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val
 [0950] 165 170 175
 [0951] Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu
 [0952] 180 185 190
 [0953] Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala
 [0954] 195 200 205
 [0955] Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr
 [0956] 210 215 220
 [0957] Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
 [0958] 225 230 235 240
 [0959] Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu
 [0960] 245 250 255
 [0961] Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val
 [0962] 260 265 270
 [0963] Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
 [0964] 275 280 285
 [0965] Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro

[0966]	290	295	300
[0967]	Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala		
[0968]	305	310	315
[0969]	Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser		
[0970]		325	330
[0971]	Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser		
[0972]		340	345
[0973]	Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val		350
[0974]		355	360
[0975]	<210> 30		
[0976]	<211> 264		
[0977]	<212> DNA		
[0978]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0979]	<400> 30		
[0980]	catccggaca aagcctgcgc ggcggccgcc ccgccattgg ccgtaccgcc ccgcgccgcc 60		
[0981]	gcccacatctc gccctcgcg gccgggtccg gcgcgttaaa gccaatagga accgccgccg 120		
[0982]	ttgttcccg t cagggccggg gcagccaatt gtggcggcgc tcggcggctc gtggctcttt 180		
[0983]	cgcgcaaaa aggatttggc gcgtaaaagt ggccgggact ttgcaggcag cggcggccgg 240		
[0984]	ggcggagcgg gatcggacc ctgc 264		
[0985]	<210> 31		
[0986]	<211> 523		
[0987]	<212> PRT		
[0988]	<213> 人工序列(artificial sequence)		
[0989]	<400> 31		
[0990]	Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala		
[0991]	1	5	10
[0992]	Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe		
[0993]		20	25
[0994]	Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala		30
[0995]		35	40
[0996]	Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala		45
[0997]		50	55
[0998]	Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly		60
[0999]		65	70
[1000]	Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln		75
[1001]		85	90
[1002]	Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser		95
[1003]		100	105
[1004]	Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly		110
[1005]		115	120
[1006]	Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly		125
[1007]		130	135
			140

[1008]	Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala
[1009]	145 150 155 160
[1010]	Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val
[1011]	165 170 175
[1012]	Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu
[1013]	180 185 190
[1014]	Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala
[1015]	195 200 205
[1016]	Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr
[1017]	210 215 220
[1018]	Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
[1019]	225 230 235 240
[1020]	Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu
[1021]	245 250 255
[1022]	Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val
[1023]	260 265 270
[1024]	Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
[1025]	275 280 285
[1026]	Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro
[1027]	290 295 300
[1028]	Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala
[1029]	305 310 315 320
[1030]	Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser
[1031]	325 330 335
[1032]	Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser
[1033]	340 345 350
[1034]	Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val Arg Ala Lys
[1035]	355 360 365
[1036]	Arg Ser Gly Ser Gly Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu
[1037]	370 375 380
[1038]	Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Lys Gly
[1039]	385 390 395 400
[1040]	Ser Ile Phe Thr Leu Phe Leu Phe Ser Val Leu Phe Ala Ile Ser Glu
[1041]	405 410 415
[1042]	Val Arg Ser Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg
[1043]	420 425 430
[1044]	Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe
[1045]	435 440 445
[1046]	Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu
[1047]	450 455 460
[1048]	Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
[1049]	465 470 475 480

[1050]	Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys
[1051]	485 490 495
[1052]	Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile
[1053]	500 505 510
[1054]	Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Lys Asp Glu Leu
[1055]	515 520
[1056]	<210> 32
[1057]	<211> 523
[1058]	<212> PRT
[1059]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[1060]	<400> 32
[1061]	Met Lys Gly Ser Ile Phe Thr Leu Phe Leu Phe Ser Val Leu Phe Ala
[1062]	1 5 10 15
[1063]	Ile Ser Glu Val Arg Ser Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg
[1064]	20 25 30
[1065]	Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg
[1066]	35 40 45
[1067]	Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe
[1068]	50 55 60
[1069]	Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu
[1070]	65 70 75 80
[1071]	Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
[1072]	85 90 95
[1073]	Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys
[1074]	100 105 110
[1075]	Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Lys Asp Glu Leu Arg Ala
[1076]	115 120 125
[1077]	Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp
[1078]	130 135 140
[1079]	Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Ala
[1080]	145 150 155 160
[1081]	Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala Leu Ala
[1082]	165 170 175
[1083]	Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr
[1084]	180 185 190
[1085]	Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly
[1086]	195 200 205
[1087]	Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser
[1088]	210 215 220
[1089]	Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu
[1090]	225 230 235 240
[1091]	Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His

[1092]		245		250		255
[1093]	Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala					
[1094]		260		265		270
[1095]	Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp					
[1096]		275		280		285
[1097]	Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp					
[1098]		290		295		300
[1099]	Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met					
[1100]		305		310		315
[1101]	Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu					
[1102]		325		330		335
[1103]	Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg					
[1104]		340		345		350
[1105]	Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys					
[1106]		355		360		365
[1107]	Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg					
[1108]		370		375		380
[1109]	Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln					
[1110]		385		390		395
[1111]	Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg					
[1112]		405		410		415
[1113]	Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro					
[1114]		420		425		430
[1115]	Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu					
[1116]		435		440		445
[1117]	Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile					
[1118]		450		455		460
[1119]	Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Val Ile					
[1120]		465		470		475
[1121]	Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser Ser Asp					
[1122]		485		490		495
[1123]	Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln					
[1124]		500		505		510
[1125]	Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val					
[1126]		515		520		
[1127]	<210> 33					
[1128]	<211> 22					
[1129]	<212> DNA					
[1130]	<213> 人工序列(artificial sequence)					
[1131]	<400> 33					
[1132]	gcctctggaa tcctttctct tg 22					
[1133]	<210> 34					

- [1134] <211> 21
 [1135] <212> DNA
 [1136] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [1137] <400> 34
 [1138] tcagctggac cacagccgca g 21
 [1139] <210> 35
 [1140] <211> 1098
 [1141] <212> DNA
 [1142] <213> 人(Homo sapiens)
 [1143] <400> 35
 [1144] atggcctgca tggcgccccg aaccctcgtc ctgctactct cgggggctct ggccctgacc 60
 [1145] cagacctggg cgggctctca ctccatgagg tattttctca catcctgttc cgggccccgc 120
 [1146] cgcggggagc cccgcttcat cgcagtgagg tacgtggacg acacgcagtt cgtgcggttc 180
 [1147] gacagcgacg ccgcgagcca gaggatggag ccgcgggcgc cgtggataga gcaggagggt 240
 [1148] ccggagtatt gggacgggga gacacggaaa gtgaaggccc actcacagac tcaccgagtg 300
 [1149] gacctgggga ccctgcgcgg ctactacaac cagagcgagg ccggttctca caccgtccag 360
 [1150] aggatgtatg gctgcgacgt ggggtcggac tggcgcttcc tccgcgggta ccaccagtac 420
 [1151] gcctacgacg gcaaggatta catgcacctg aaagaggacc tgcgctcttg gaccgcggcg 480
 [1152] gacatggcag ctacagaccac caagcacaag tgggaggcgg cccatgtggc ggagcagttg 540
 [1153] agagcctacc tggagggcac gtgcgtggag tggctccgca gatacctgga gaacgggaag 600
 [1154] gagacgctgc agcgcacgga ccccccaaa acgcatatga ctcaccacgc tgtctctgac 660
 [1155] catgaagcca ccctgaggtg ctgggccctg agcttctacc ctgcggagat cacactgacc 720
 [1156] tggcagcggg atggggagga ccagaccag gacacggagc tcgtggagac caggcctgca 780
 [1157] ggggatgga cttccagaa gtggcgcgct gtggtggtgc cttctggaca ggagcagaga 840
 [1158] tacacctgcc atgtgcagca tgagggtttg cccaagcccc tcacctgag atgggagccg 900
 [1159] tcttcccagc ccaccatccc catcgtgggc atcattgctg gcctggttct ctttggagct 960
 [1160] gtgatcactg gagctgtggt cgctgctgtg atgtggagga ggaagagctc agatagaaaa 1020
 [1161] ggaggagct actctcaggc tgcaagcagt gacagtgccc agggctctga tgtgtctctc 1080
 [1162] acagcttgta aagtgtga 1098
 [1163] <210> 36
 [1164] <211> 70
 [1165] <212> PRT
 [1166] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [1167] <400> 36
 [1168] Met Lys Gly Ser Ile Phe Thr Leu Phe Leu Phe Ser Val Leu Phe Ala
 [1169] 1 5 10 15
 [1170] Ile Ser Glu Val Arg Ser Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg
 [1171] 20 25 30
 [1172] Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg
 [1173] 35 40 45
 [1174] Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe
 [1175] 50 55 60

- [1176] Gly Ser Leu Ala Phe Leu
[1177] 65 70
[1178] <210> 37
[1179] <211> 30
[1180] <212> DNA
[1181] <213> 人工序列(artificial sequence)
[1182] <400> 37
[1183] agagctagcg aattcaacat ggccgtcatg 30
[1184] <210> 38
[1185] <211> 37
[1186] <212> DNA
[1187] <213> 人工序列(artificial sequence)
[1188] <400> 38
[1189] tgattgtcga cgccctaaa gctcgtcttt aaggaag 37
[1190] <210> 39
[1191] <211> 31
[1192] <212> DNA
[1193] <213> 人工序列(artificial sequence)
[1194] <400> 39
[1195] tagagatctg gtaccaacat ggccgtcatg g 31
[1196] <210> 40
[1197] <211> 37
[1198] <212> DNA
[1199] <213> 人工序列(artificial sequence)
[1200] <400> 40
[1201] ggctcgagcg gccgctaaa gctcgtcttt aaggaag 37
[1202] <210> 41
[1203] <211> 23
[1204] <212> DNA
[1205] <213> 人工序列(artificial sequence)
[1206] <400> 41
[1207] ggaagatctg gactgaaaat gag 23
[1208] <210> 42
[1209] <211> 24
[1210] <212> DNA
[1211] <213> 人工序列(artificial sequence)
[1212] <400> 42
[1213] tgaggtcaga tgtaaccaag atta 24
[1214] <210> 43
[1215] <211> 33
[1216] <212> DNA
[1217] <213> 人工序列(artificial sequence)

- [1218] <400> 43
[1219] cgcgtcgact actgtaatag taatcaatta cgg 33
[1220] <210> 44
[1221] <211> 33
[1222] <212> DNA
[1223] <213> 人工序列(artificial sequence)
[1224] <400> 44
[1225] gacgtcgact aagatacatt gatgagttg gac 33
[1226] <210> 45
[1227] <211> 33
[1228] <212> DNA
[1229] <213> 人工序列(artificial sequence)
[1230] <400> 45
[1231] ccgctcgaga tgaaaggttc catcttcaca ttg 33
[1232] <210> 46
[1233] <211> 33
[1234] <212> DNA
[1235] <213> 人工序列(artificial sequence)
[1236] <400> 46
[1237] ccgctcgagt taaagctcgt ctttaaggaa ggc 33
[1238] <210> 47
[1239] <211> 39
[1240] <212> DNA
[1241] <213> 人工序列(artificial sequence)
[1242] <400> 47
[1243] ttccgatcg cttggcacga agctcgtcctt taaggaagg 39
[1244] <210> 48
[1245] <211> 39
[1246] <212> DNA
[1247] <213> 人工序列(artificial sequence)
[1248] <400> 48
[1249] ccttccttaa agacgagctt cgtgccaagc gatccggaa 39
[1250] <210> 49
[1251] <211> 38
[1252] <212> DNA
[1253] <213> 人工序列(artificial sequence)
[1254] <400> 49
[1255] cggggcgcca tgacggccat gggcccaggg ttggactc 38
[1256] <210> 50
[1257] <211> 38
[1258] <212> DNA
[1259] <213> 人工序列(artificial sequence)

- [1260] <400> 50
- [1261] gagtccaacc ctgggccat ggccgtcatg gcgccccg 38
- [1262] <210> 51
- [1263] <211> 32
- [1264] <212> DNA
- [1265] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [1266] <400> 51
- [1267] cttctcgagt cacactttac aagctgtgag ag 32
- [1268] <210> 52
- [1269] <211> 36
- [1270] <212> DNA
- [1271] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [1272] <400> 52
- [1273] agagctagcg aattcaacat gggctgcagg ctgctc 36
- [1274] <210> 53
- [1275] <211> 42
- [1276] <212> DNA
- [1277] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [1278] <400> 53
- [1279] ggatcgcttg gcacgtgaat tctttctttt gaccatagcc at 42
- [1280] <210> 54
- [1281] <211> 39
- [1282] <212> DNA
- [1283] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [1284] <400> 54
- [1285] tccaaccctg ggcccatgct cctggtgctc ataccagtg 39
- [1286] <210> 55
- [1287] <211> 35
- [1288] <212> DNA
- [1289] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [1290] <400> 55
- [1291] gttgattgtc gacgccctca actggaccac agcct 35
- [1292] <210> 56
- [1293] <211> 31
- [1294] <212> PRT
- [1295] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [1296] <400> 56
- [1297] Met Lys Gly Ser Ile Phe Thr Leu Phe Leu Phe Ser Val Leu Phe Ala
- [1298] 1 5 10 15
- [1299] Ile Ser Glu Val Arg Ser Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
- [1300] 20 25 30
- [1301] <210> 57

- [1302] <211> 93
- [1303] <212> DNA
- [1304] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [1305] <400> 57
- [1306] atgaaagggtt ccattctcac attgtttttg ttctccgtat tgttcgcaat cagcgaagtc 60
- [1307] cgatcaaaaa tatttgggtc tctcgcatc ctc 93
- [1308] <210> 58
- [1309] <211> 210
- [1310] <212> DNA
- [1311] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [1312] <400> 58
- [1313] atgaaagggtt ccattctcac attgtttttg ttctccgtat tgttcgcaat cagcgaagtc 60
- [1314] cgatcaaaaa tatttgggtc tctcgcatc ctccgcagaa agaggaaaat cttcggtagt 120
- [1315] ttggccttcc ttaggcgaaa gagaaagata tttggaagcc tggccttct ggcacgaaa 180
- [1316] cggaaaatct tcggctcact ggcattcttg 210
- [1317] <210> 59
- [1318] <211> 378
- [1319] <212> DNA
- [1320] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [1321] <400> 59
- [1322] atgaaagggtt ccattctcac attgtttttg ttctccgtat tgttcgcaat cagcgaagtc 60
- [1323] cgatcaaaaa tatttgggtc tctcgcatc ctccgcagaa agaggaaaat cttcggtagt 120
- [1324] ttggccttcc ttaggcgaaa gagaaagata tttggaagcc tggccttct ggcacgaaa 180
- [1325] cggaaaatct tcggctcact ggcattcttg aggagaaagc gcaaaatatt cgggtctttg 240
- [1326] gcctttctgc gccggaagcg caagatctc gggctcttg ctttcttgag acgaaaacgc 300
- [1327] aaaatatttg ggtctctgc cttctcagg cgaaagcgga agattttcgg ttcccttgcc 360
- [1328] ttcttaaag acgagctt 378
- [1329] <210> 60
- [1330] <211> 122
- [1331] <212> PRT
- [1332] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [1333] <400> 60
- [1334] Met Lys Gly Ser Ile Phe Thr Leu Phe Leu Phe Ser Val Leu Phe Ala
- [1335] 1 5 10 15
- [1336] Ile Ser Glu Val Arg Ser Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg
- [1337] 20 25 30
- [1338] Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg
- [1339] 35 40 45
- [1340] Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe
- [1341] 50 55 60
- [1342] Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu
- [1343] 65 70 75 80

[1344] Ala Phe Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
 [1345] 85 90 95
 [1346] Arg Arg Lys Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Arg Arg Lys
 [1347] 100 105 110
 [1348] Arg Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
 [1349] 115 120
 [1350] <210> 61
 [1351] <211> 366
 [1352] <212> DNA
 [1353] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [1354] <400> 61
 [1355] atgaaagggtt ccattctcac attgtttttg ttctccgtat tgttcgcaat cagcgaagtc 60
 [1356] cgatcaaaaa tatttgggtc tctcgcattc ctccgcagaa agaggaaaat cttcggtagt 120
 [1357] ttggccttcc ttaggcgaaa gagaaagata tttggaagcc tggccttctt gcgacgcaa 180
 [1358] cggaaaatct tcggctcact ggcattcttg aggagaaagc gcaaaatatt cgggtctttg 240
 [1359] gcctttctgc gccggaagcg caagatcttc gggtccttgg ctttcttgag acgaaaacgc 300
 [1360] aaaatatttg ggtctcttgc cttcctcagg cgaaagcgga agattttcgg ttcccttgcc 360
 [1361] ttcctt 366

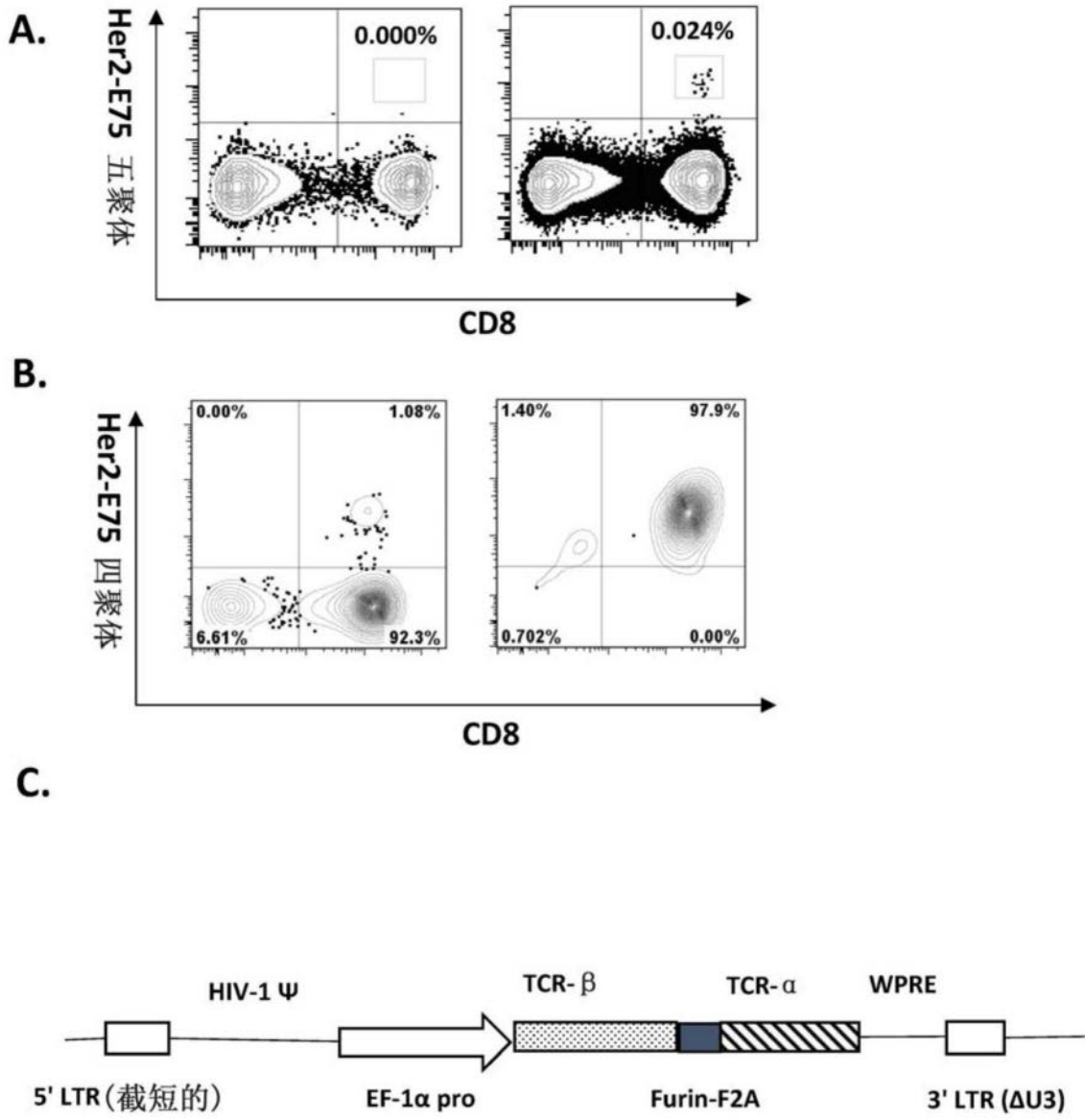
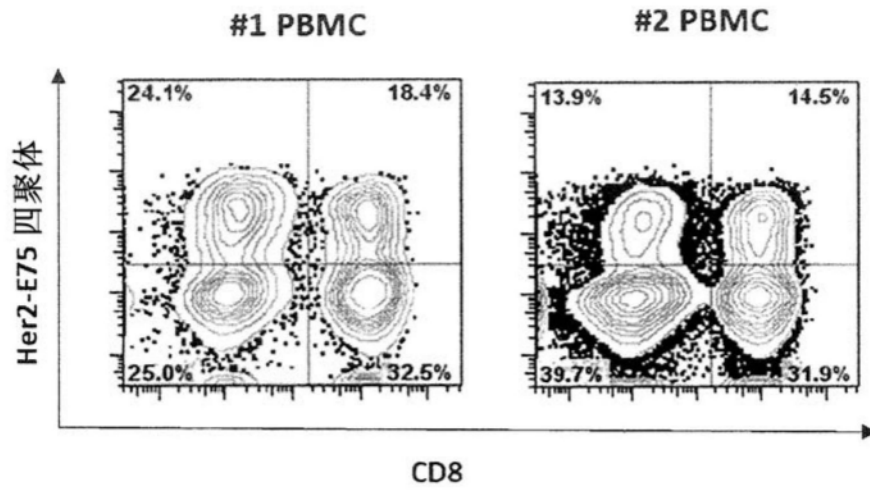
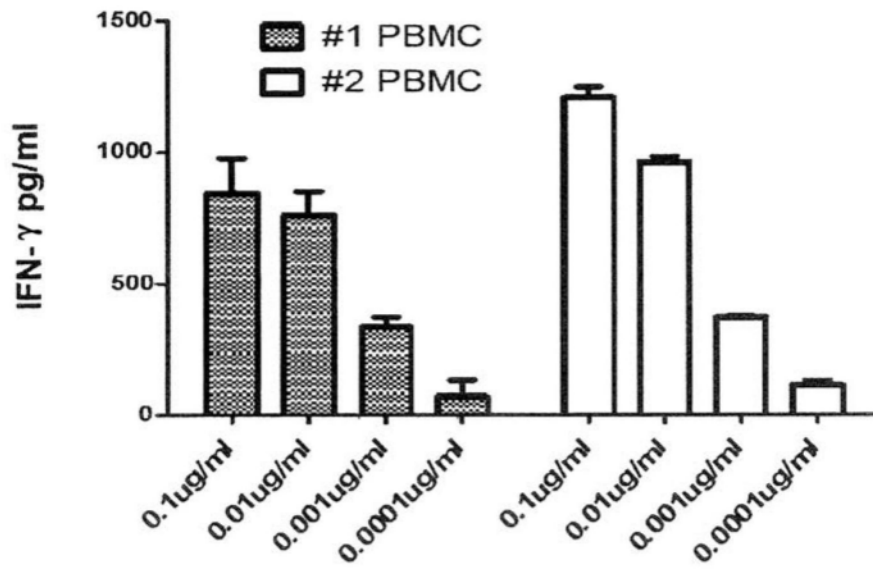


图1

A.



B.



C.

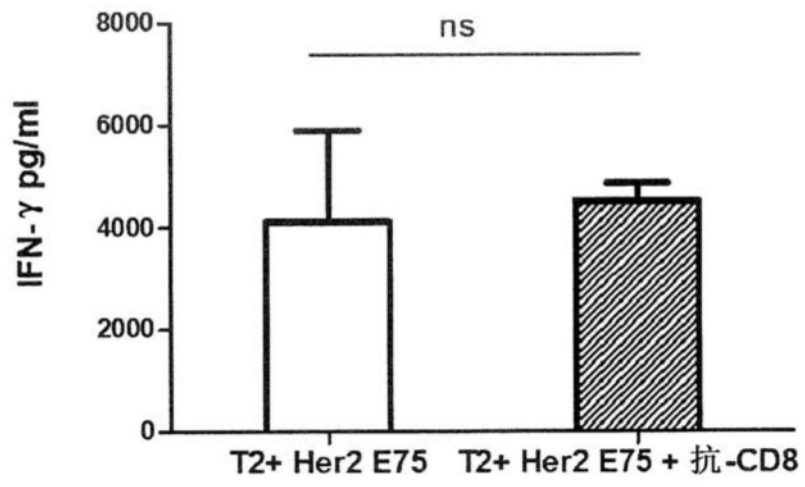
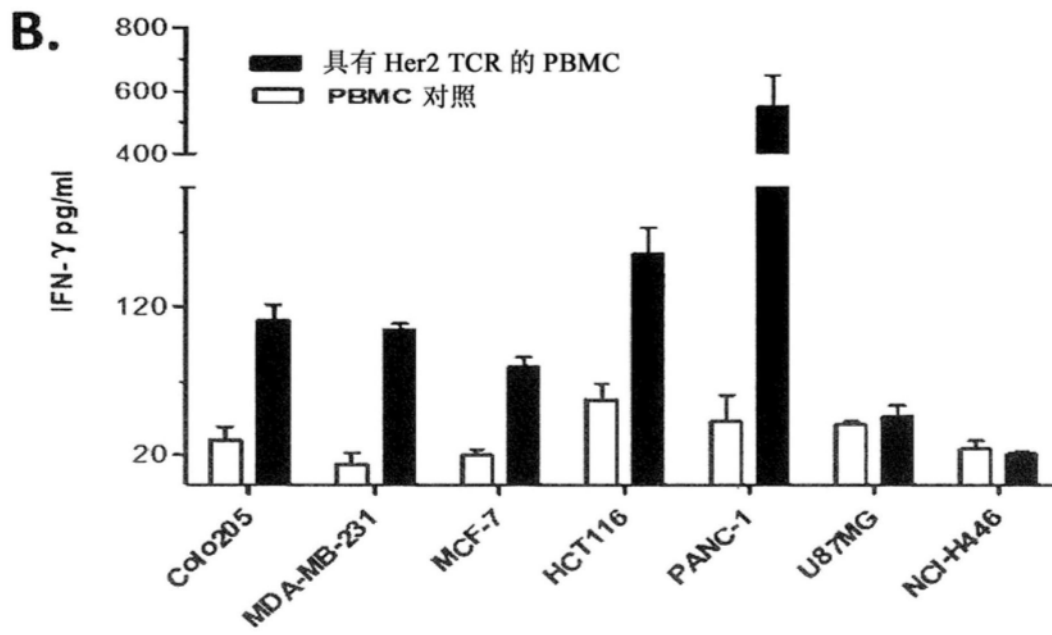
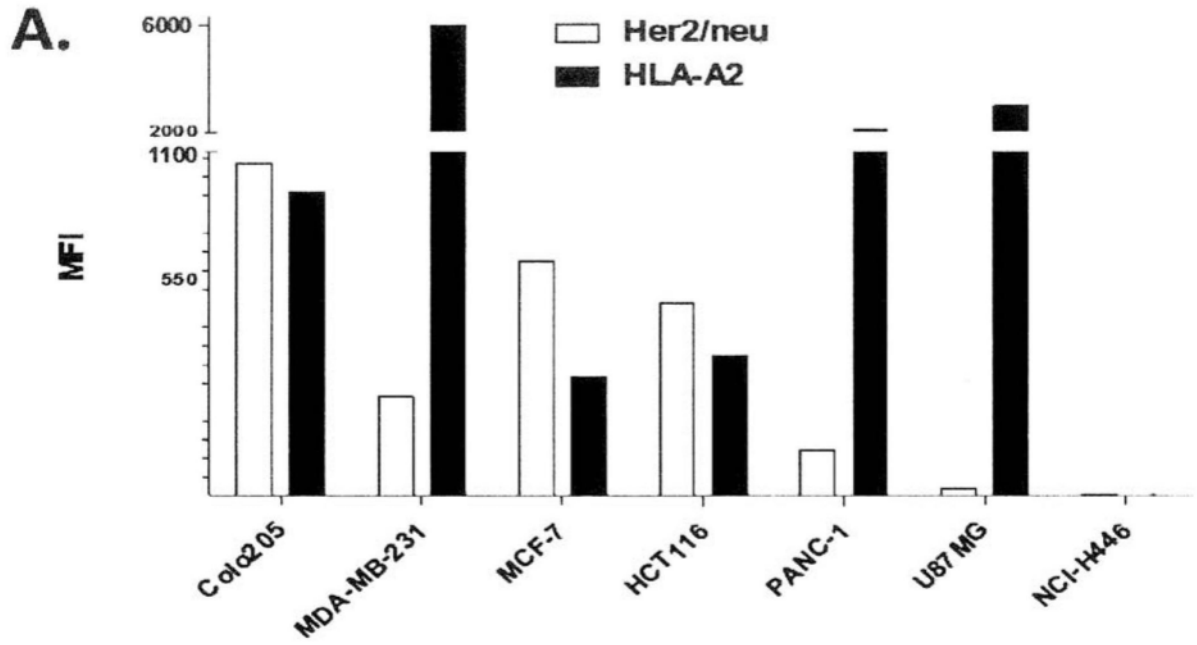
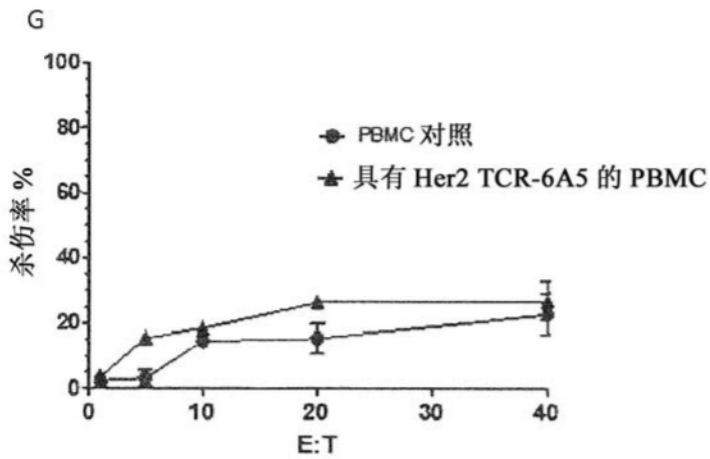
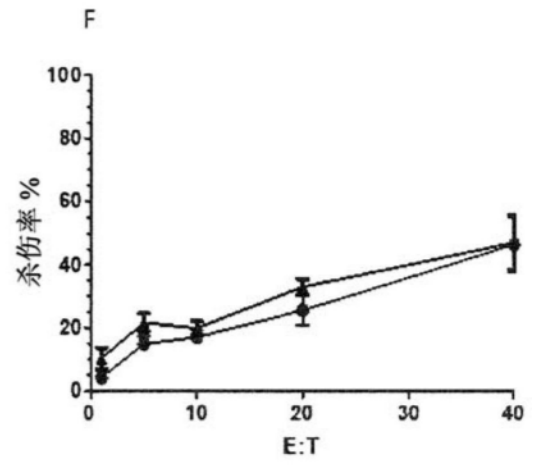
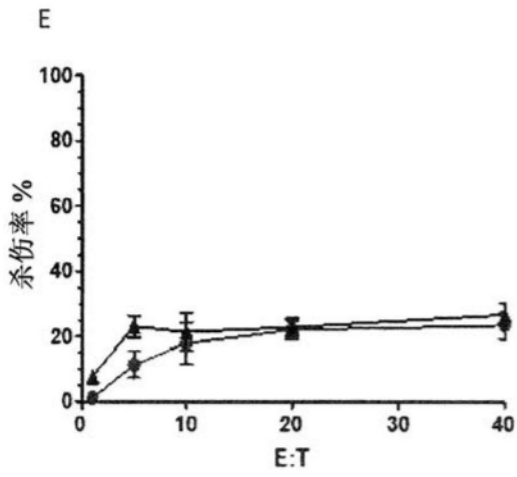
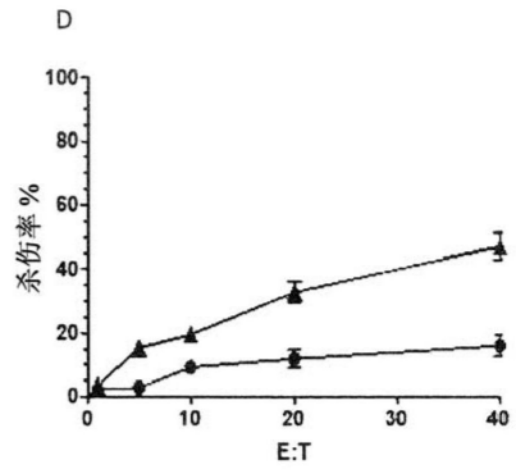
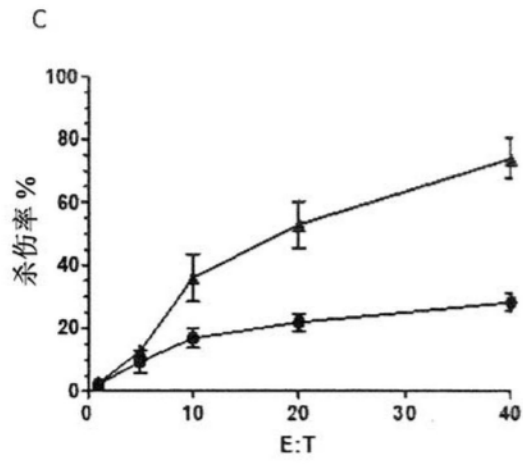


图2





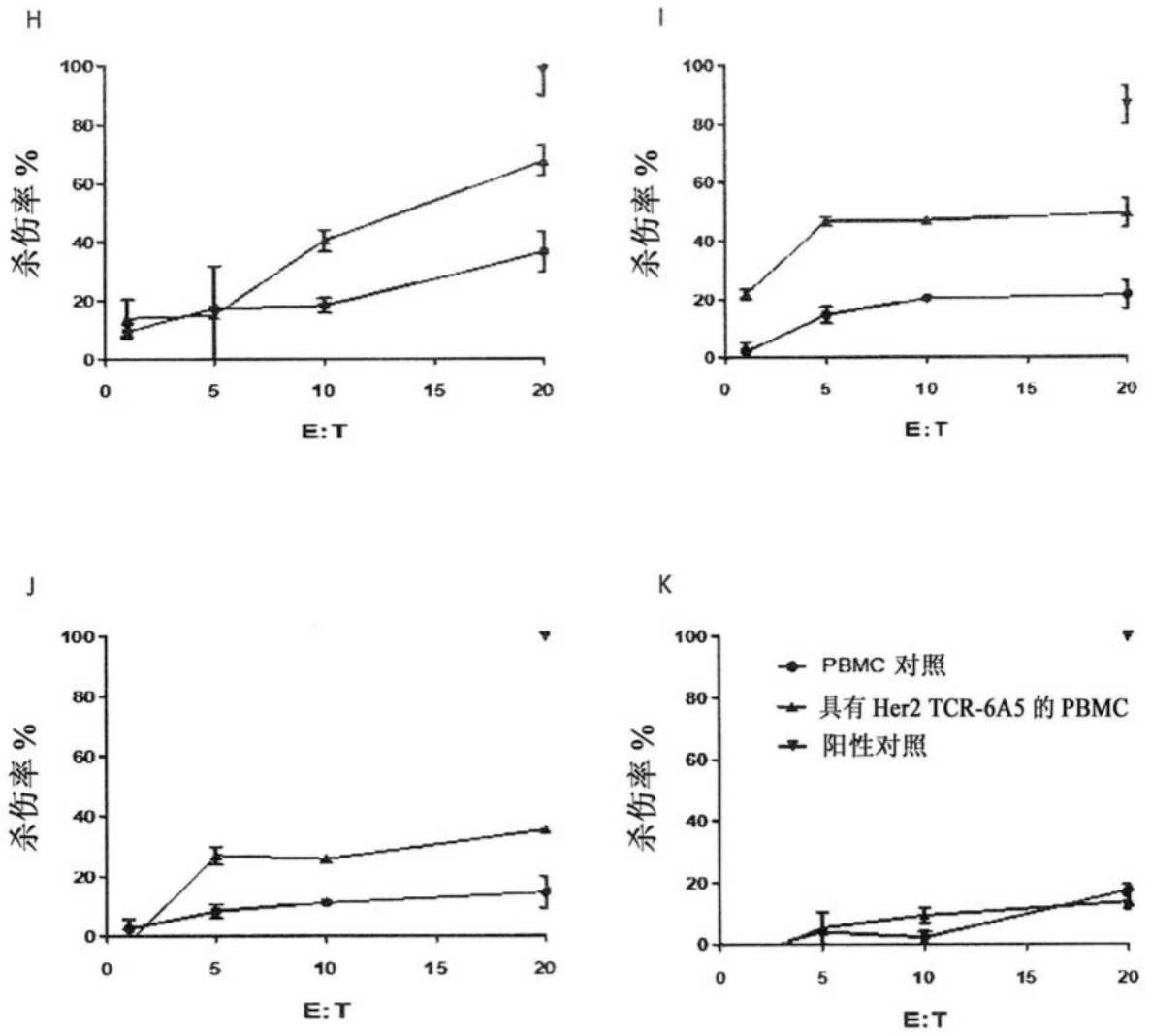
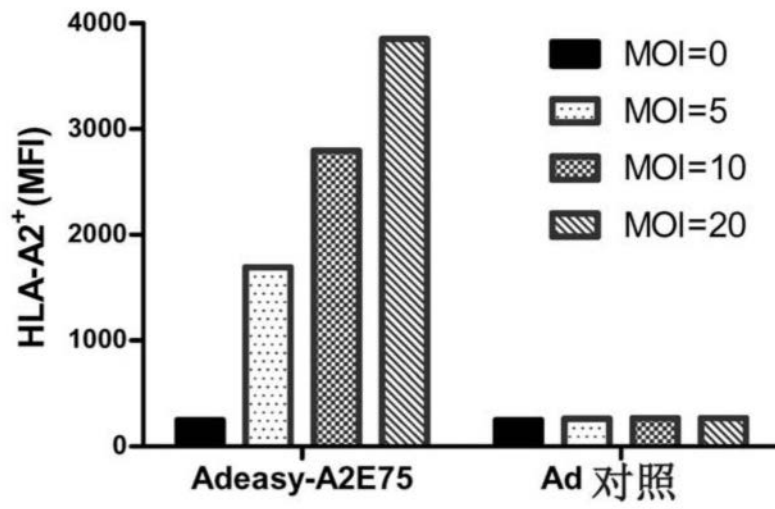


图3

C



D

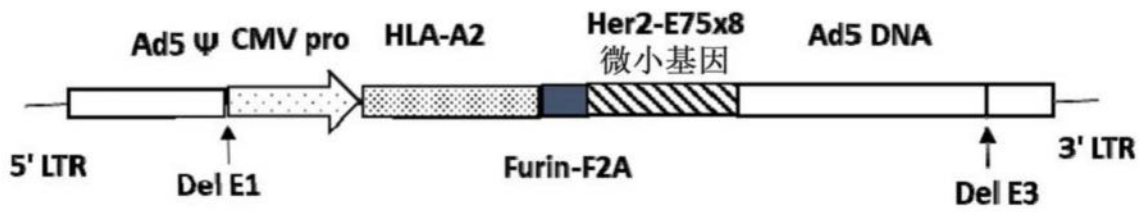
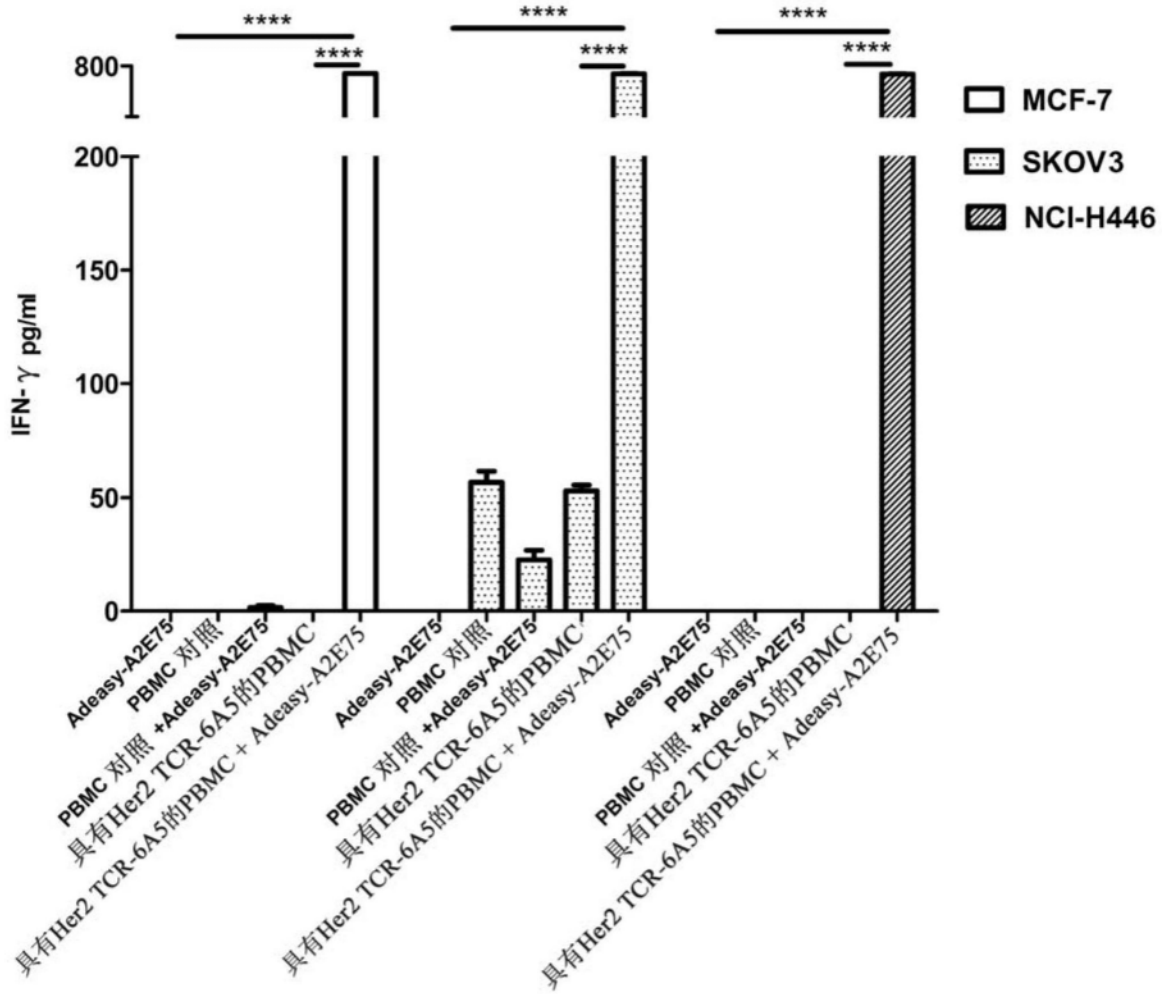


图4

A.



B

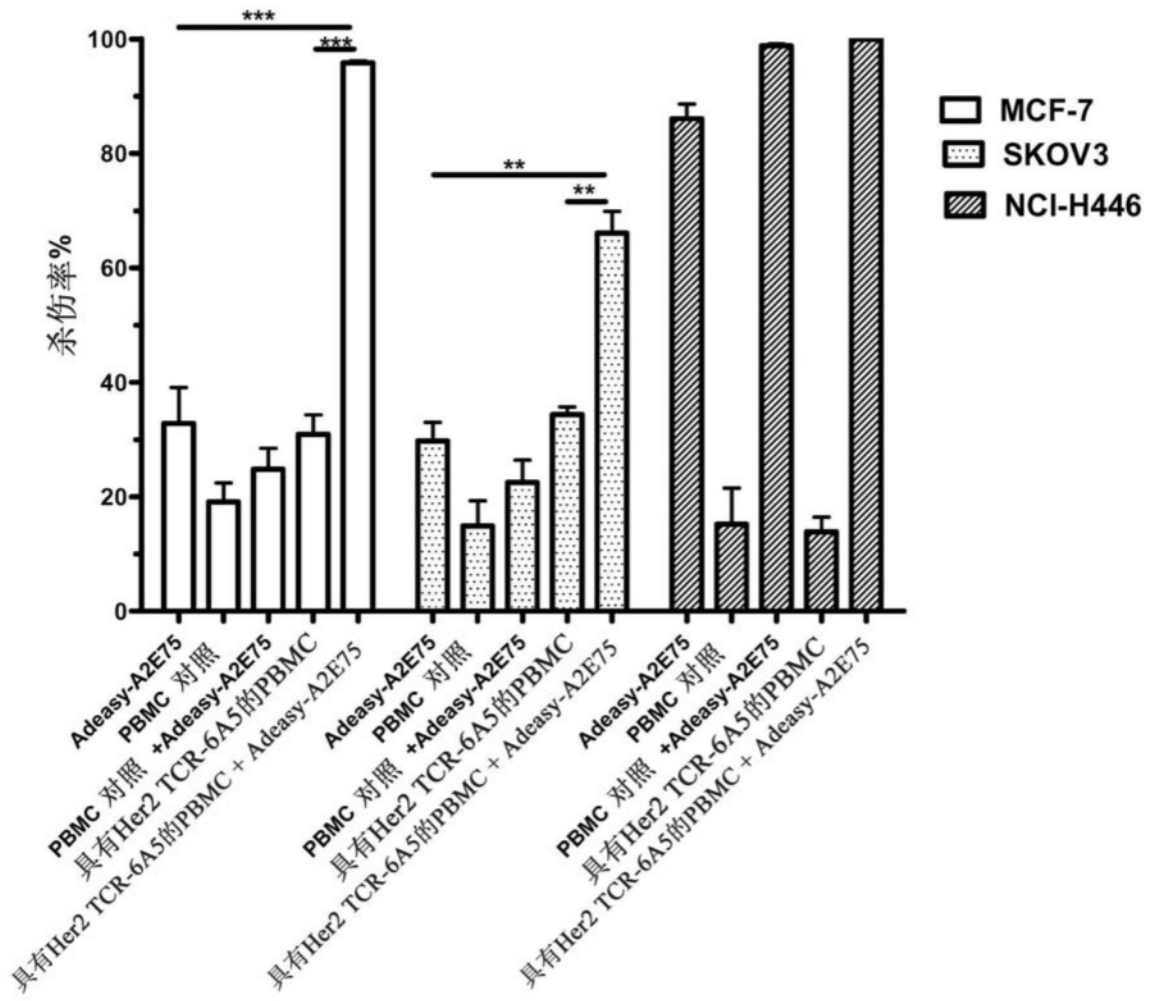
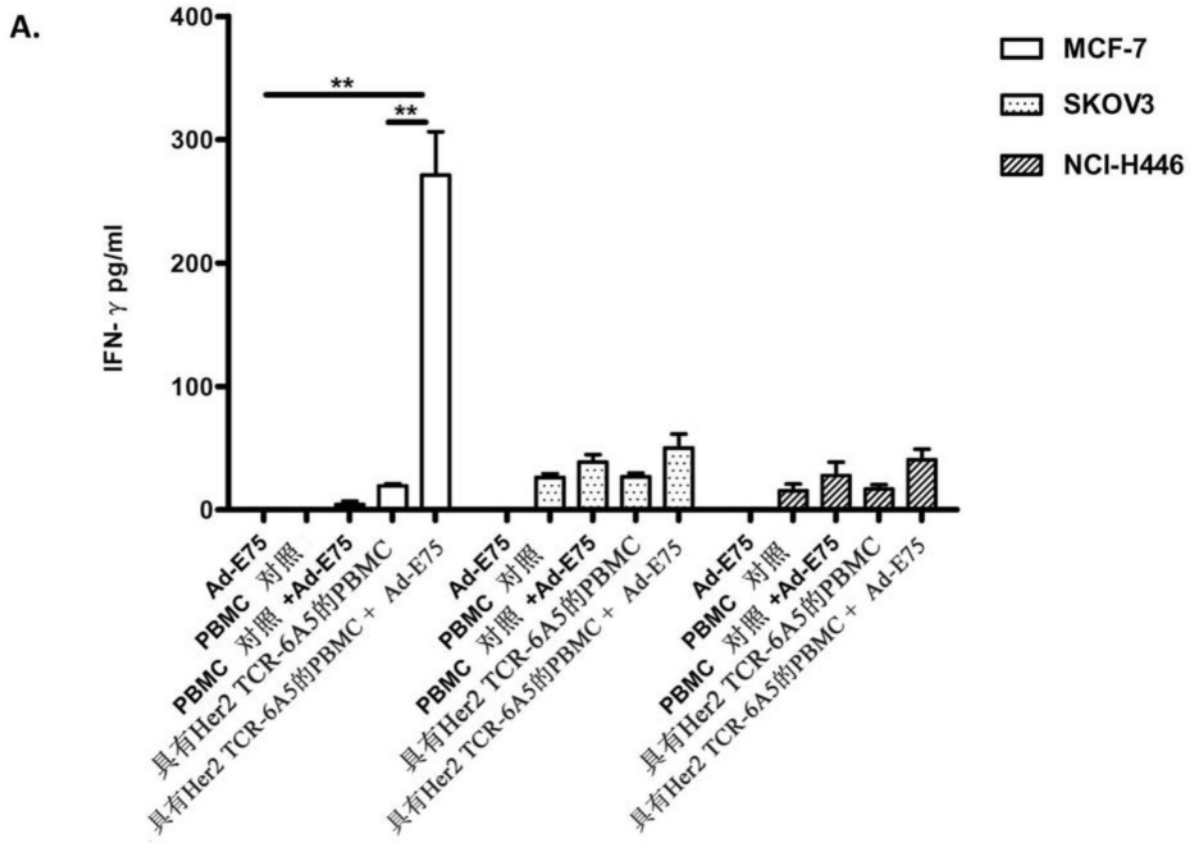


图5



B

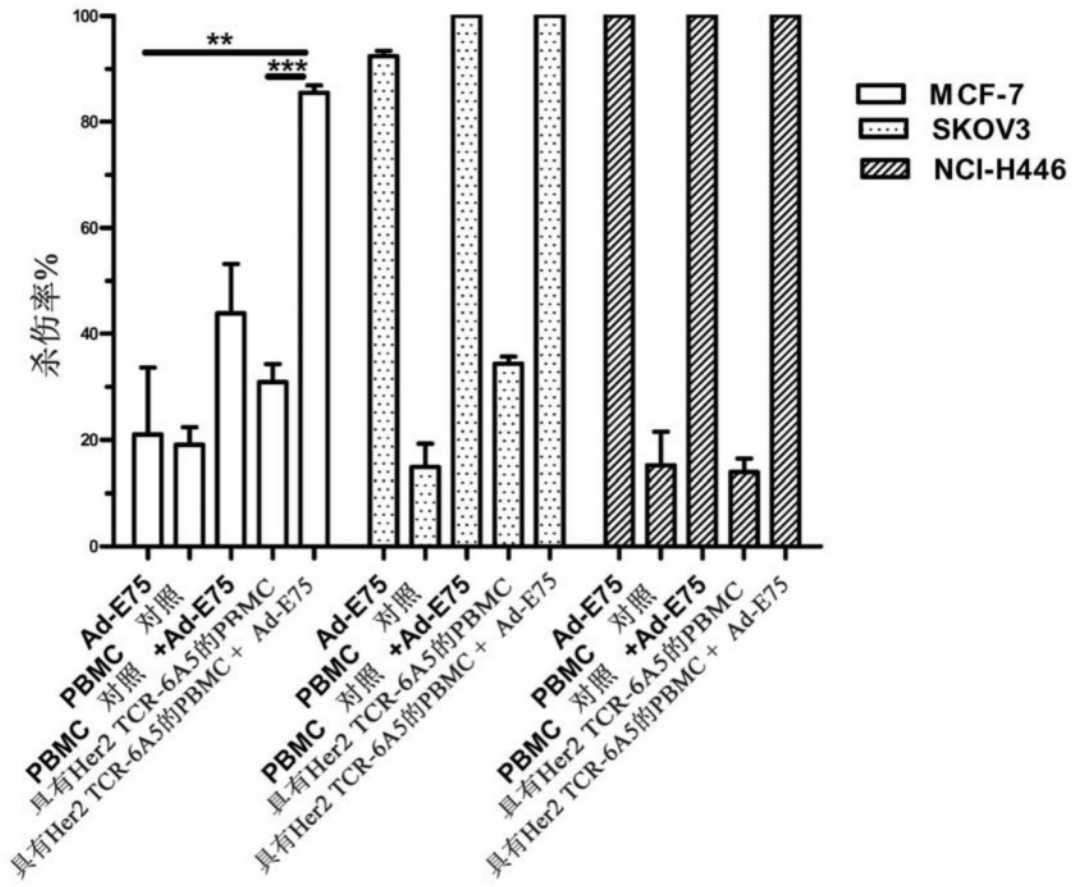
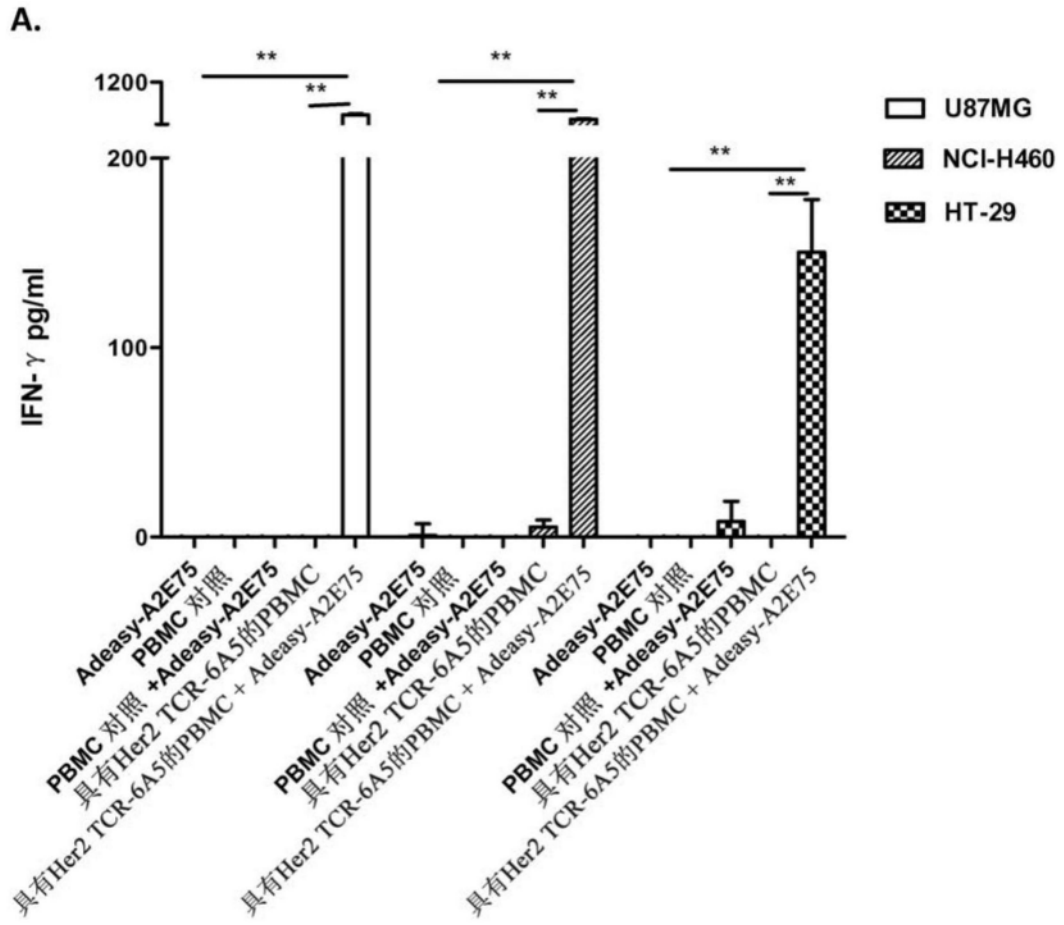


图6



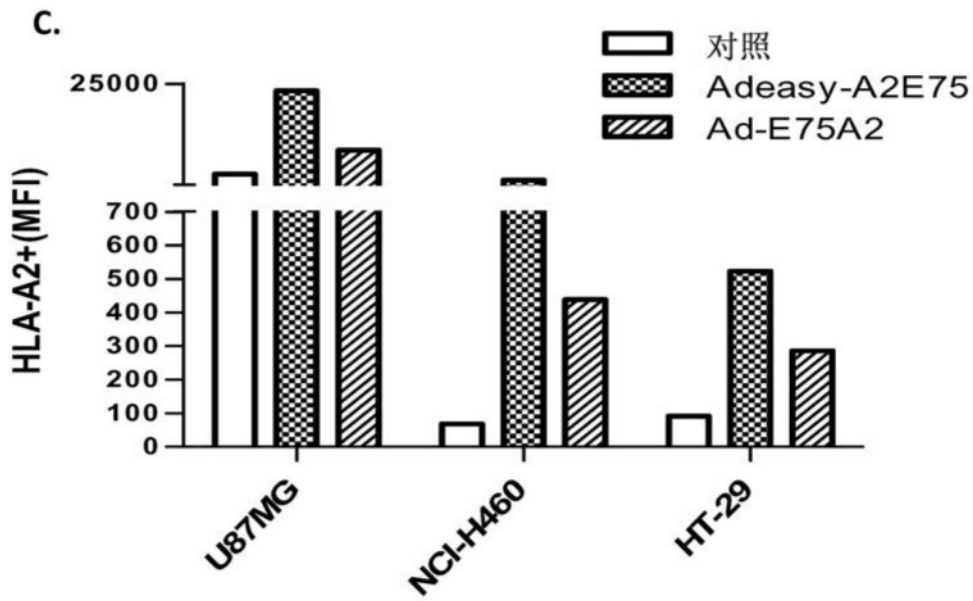
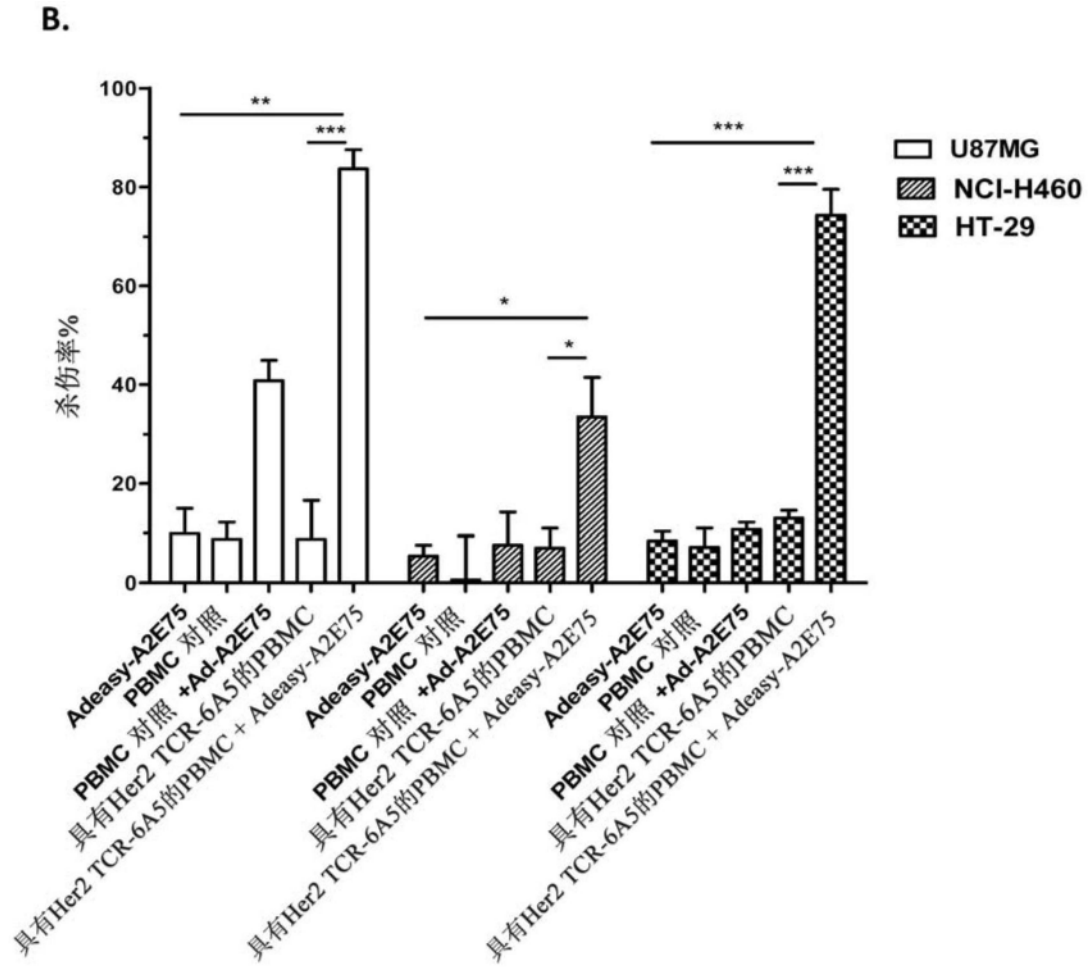
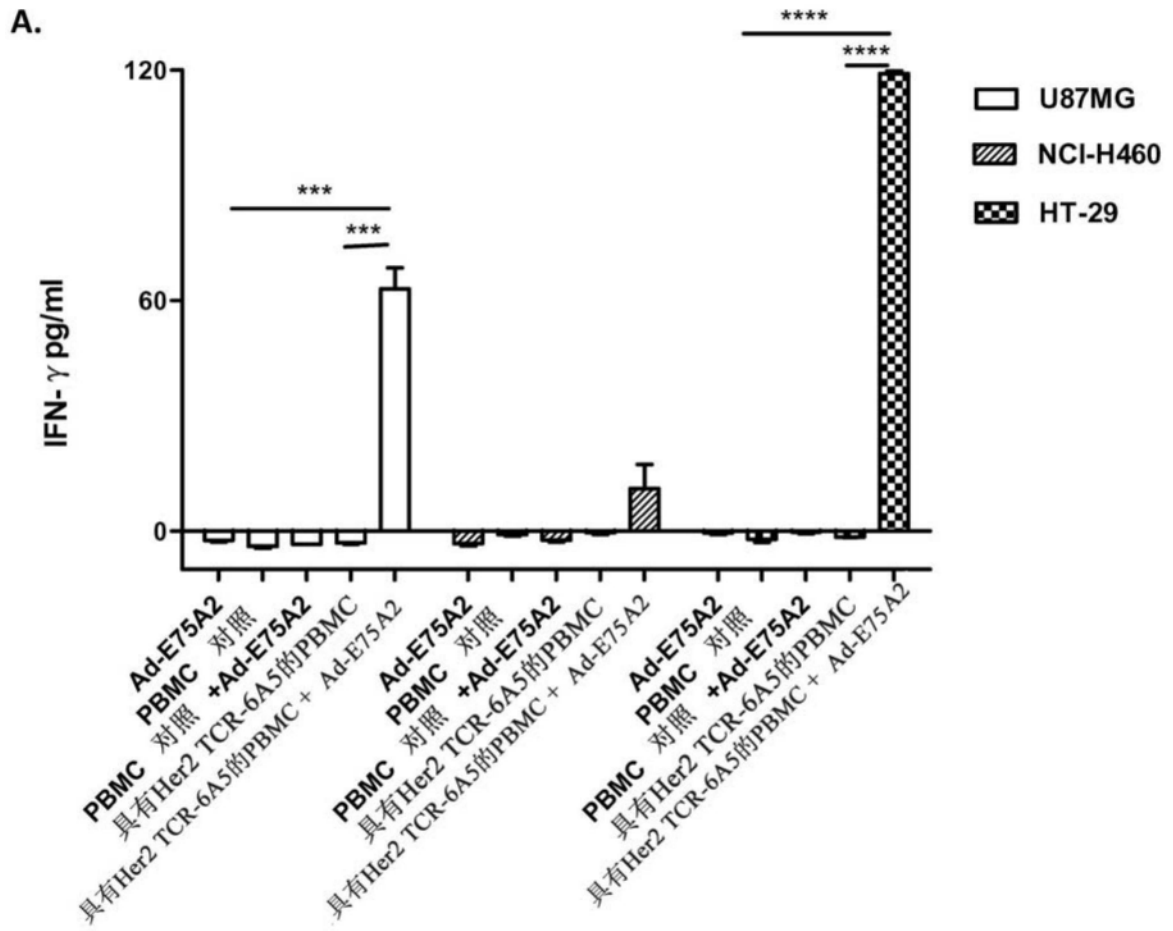


图7



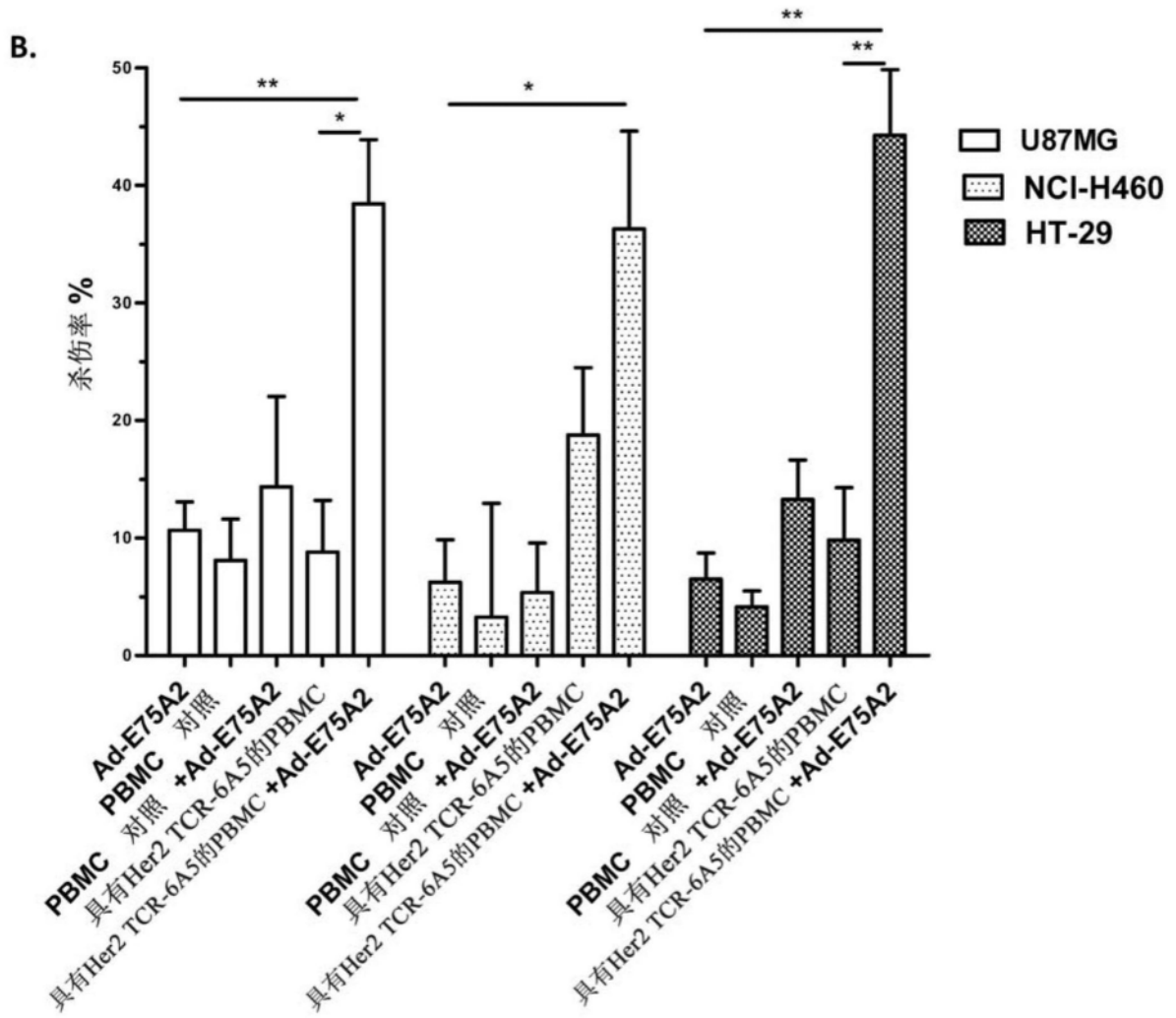


图8

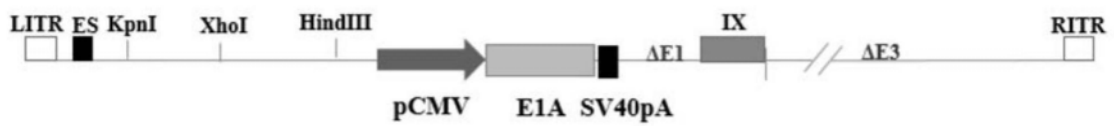


图9

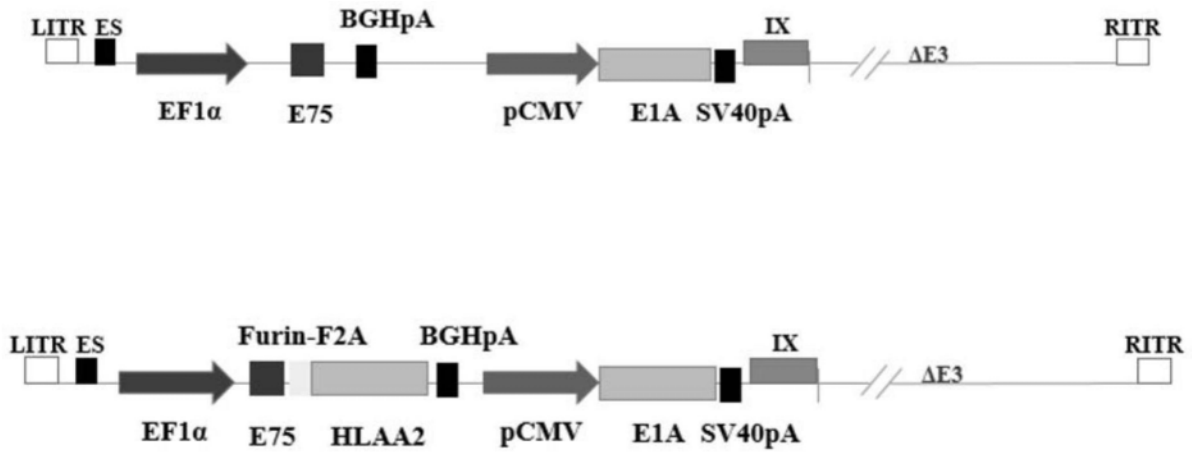


图10