



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110295186 A

(43)申请公布日 2019.10.01

(21)申请号 201910555422.8

A61K 39/00(2006.01)

(22)申请日 2013.03.15

A61P 35/00(2006.01)

(30)优先权数据

61/622,600 2012.04.11 US

(62)分案原申请数据

201380027676.3 2013.03.15

(71)申请人 美国卫生和人力服务部

地址 美国马里兰州

(72)发明人 詹姆斯·诺布尔·科亨德费尔

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

C12N 15/62(2006.01)

权利要求书2页 说明书23页

C12N 5/10(2006.01)

序列表19页 附图12页

(54)发明名称

靶向B-细胞成熟抗原的嵌合抗原受体

(57)摘要

本发明提供了一种分离的且纯化的核酸序列,其编码针对B-细胞成熟抗原(BCMA)的嵌合抗原受体(CAR)。本发明还提供了表达CAR的宿主细胞,诸如T-细胞或自然杀伤(NK)细胞,和用于破坏多发性骨髓瘤细胞的方法。

1. 分离的或纯化的编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸序列, 其中所述CAR包含来自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中任一项所示的氨基酸序列的 (i) 重链互补决定区 (CDR) 1、(ii) 重链 CDR2、(iii) 重链CDR3、(iv) 轻链CDR1、(v) 轻链CDR2和(vi) 轻链CDR3, 并且其中所述CAR的氨基酸序列与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中的任一项具有至少95%的同一性。

2. 根据权利要求1所述的分离的或纯化的核酸序列, 其包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的核酸序列。

3. 分离的或纯化的CAR, 其由权利要求1或2所述的核酸序列编码。

4. 分离的或纯化的CAR, 其由权利要求1所述的核酸序列编码。

5. 分离的或纯化的CAR, 其由权利要求2所述的核酸序列编码。

6. 根据权利要求3所述的分离的或纯化的CAR, 其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

7. 根据权利要求3所述的分离的或纯化的CAR, 其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

8. 根据权利要求3所述的分离的或纯化的CAR, 其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

9. 根据权利要求3所述的分离的或纯化的CAR, 其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

10. 根据权利要求3所述的分离的或纯化的CAR, 其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

11. 载体, 其包含权利要求1或2所述的分离的或纯化的核酸序列。

12. 分离的宿主细胞, 其表达权利要求1或2所述的核酸序列。

13. 根据权利要求12所述的分离的宿主细胞, 其表达包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CAR。

14. 根据权利要求12所述的分离的宿主细胞, 其为T-细胞。

15. 根据权利要求12所述的分离的宿主细胞, 其为自然杀伤 (NK) 细胞。

16. 破坏癌细胞的方法, 所述方法包括: 使表达BCMA的癌细胞与包含权利要求1或2所述的分离的或纯化的核酸序列的T细胞或NK细胞接触, 由此产生CAR, 且所述CAR结合所述癌细胞上的BCMA, 并破坏所述癌细胞, 其中所述癌细胞在体外, 并且所述癌细胞是多发性骨髓瘤细胞。

17. 破坏癌细胞的方法, 所述方法包括: 使表达BCMA的癌细胞与包含权利要求11所述的载体的T细胞或NK细胞接触, 由此产生CAR, 且所述CAR结合所述癌细胞上的BCMA, 并破坏所述癌细胞, 其中所述癌细胞在体外, 并且所述癌细胞是多发性骨髓瘤细胞。

18. 破坏癌细胞的方法, 所述方法包括: 使表达BCMA的癌细胞与一个或多个权利要求14所述的分离的T-细胞接触, 由此产生CAR, 且所述CAR结合所述癌细胞上的BCMA, 并破坏所述癌细胞, 其中所述癌细胞在体外, 并且所述癌细胞是多发性骨髓瘤细胞。

19. 破坏癌细胞的方法, 所述方法包括: 使表达BCMA的癌细胞与一个或多个权利要求15所述的分离的NK细胞接触, 由此产生CAR, 且所述CAR结合所述癌细胞上的BCMA, 并破坏所述癌细胞, 其中所述癌细胞在体外, 并且所述癌细胞是多发性骨髓瘤细胞。

20. 权利要求1或2所述的核酸序列在制备用于破坏癌细胞的药物中的用途, 其中所述癌细胞是多发性骨髓瘤细胞。

21. 权利要求11所述的载体在制备用于破坏癌细胞的药物中的用途, 其中所述癌细胞是多发性骨髓瘤细胞。

22. 一个或多个权利要求14所述的分离的T-细胞在制备用于破坏癌细胞的药物中的用途,其中所述癌细胞是多发性骨髓瘤细胞。

23. 一个或多个权利要求15所述的分离的NK细胞在制备用于破坏癌细胞的药物中的用途,其中所述癌细胞是多发性骨髓瘤细胞。

24. 产生表达嵌合抗原受体的宿主细胞的方法,所述方法包括将权利要求1或2所述的分离的或纯化的核酸序列引入体外宿主细胞,其中所述宿主细胞是T细胞或NK细胞。

25. 产生表达嵌合抗原受体的宿主细胞的方法,所述方法包括将权利要求11所述的载体引入体外宿主细胞,其中所述宿主细胞是T细胞或NK细胞。

靶向B-细胞成熟抗原的嵌合抗原受体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2012年4月11日提交的美国临时专利申请号 61/622,600的权益，其通过引用整体并入本文。

[0003] 电子递交的材料通过引用并入

[0004] 通过引用整体并入本文的是，与本文一起提交并如下标识的计算机 可读的核苷酸/氨基酸序列表：一个42,589字节的ASCII (文本) 文件，名 称为“712361_ST25.TXT”，创建于2013年3月14日。

[0005] 关于在政府资助的研究或开发中完成的发明的权利声明

[0006] 本申请是由国立卫生研究院国家癌症研究所在项目号ZIABC011417 的政府资助下完成的。政府享有本申请的某些权利。

[0007] 发明背景

[0008] 多发性骨髓瘤 (MM) 是以克隆浆细胞的积累为特征的恶性肿瘤 (参 见，例如，Palumbo等人, New England J. Med., 364 (11) : 1046–1060 (2011), 和Lonial等人, Clinical Cancer Res., 17 (6) : 1264–1277 (2011))。MM的当 前疗法经常造成缓解，但是几乎所有的患者最终会复发和死亡 (参见，例 如，Lonial等人，出处同上，和Rajkumar, Nature Rev. Clinical Oncol., 8 (8) : 479–491 (2011))。已经证实，同种异体造血干细胞移植会诱导免疫介 导的骨髓瘤细胞的消除；但是，该方案的毒性较高，且鲜有患者被治愈 (参 见，例如，Lonial等人，出处同上，和Salit等人, Clin. Lymphoma, Myeloma, and Leukemia, 11 (3) : 247–252 (2011))。当前，MM尚不存在临床上有效的、FDA批准的单克隆抗体或自体T-细胞疗法 (参见，例如，Richardson等人, British J. Haematology, 154 (6) : 745–754 (2011), 和Yi, Cancer Journal, 15 (6) : 502–510 (2009))。

[0009] 经过遗传修饰以识别恶性肿瘤相关抗原的T-细胞的过继转移正在显 示出作为治疗癌症的新方案的希望 (参见，例如，Morgan等人, Science, 314 (5796) : 126–129 (2006); Brenner等人, Current Opinion in Immunology, 22 (2) : 251–257 (2010); Rosenberg等人, Nature Reviews Cancer, 8 (4) : 299–308 (2008), Kershaw等人, Nature Reviews Immunology, 5 (12) : 928–940 (2005); 和Pule等人, Nature Medicine, 14 (11) : 1264–1270 (2008))。可以将 T-细胞遗传修饰成表达嵌合抗原受体 (CAR)，所述嵌合抗原受体是包含抗原识别部分和T-细胞活化结构域的融合蛋白 (参见，例如，Kershaw等人，出处同上，Eshhar 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 (2) : 720–724 (1993), 和Sadelain等人, Curr. Opin. Immunol., 21 (2) : 215–223 (2009))。

[0010] 就B-细胞谱系恶性肿瘤而言，在开发利用抗-CD19CAR的过继性 T-细胞方案中已经取得了广泛的进展 (参见，例如，Jensen等人, Biology of Blood and Marrow Transplantation, 16 : 1245–1256 (2010); Kochenderfer 等人, Blood, 116 (20) : 4099–4102 (2010); Porter等人, The New England Journal of Medicine, 365 (8) : 725–733 (2011); Savoldo等人, Journal of Clinical Investigation, 121 (5) : 1822–1826 (2011), Cooper等人, Blood, 101 (4) : 1637–1644 (2003); Brentjens等人, Nature Medicine, 9 (3) : 279–286

(2003); 和Kalos等人, Science Translational Medicine, 3(95):95ra73(2011))。过继转移的、抗-CD19-CAR转导的T-细胞已经治愈了小鼠中的白血病和淋巴瘤(参见,例如, Cheadle等人, Journal of Immunology, 184(4):1885-1896 (2010); Brentjens等人, Clinical Cancer Research, 13(18Pt 1):5426-5435 (2007); 和Kochenderfer等人, Blood, 116(19):3875-3886(2010))。在早期临床试验中,过继转移的、用抗-CD19CAR转导的T-细胞会根除白血病和淋巴瘤患者中的正常和恶性B-细胞(参见,例如, Kochenderfer等人, Blood, 116(20):4099-4102(2010); Porter等人, 出处同上, Brentjens等人, Blood, 118(18):4817-4828(2011); 和Kochenderfer等人, Blood, 2011年12月8日(印刷之前的电子出版物(2012))。但是, CD19仅罕见地在多发性骨髓瘤的恶性浆细胞上表达(参见,例如, Gupta等人, Amer. J. Clin. Pathology, 132(5):728-732(2009); 和Lin等人, Amer. J. Clin. Pathology, 121(4):482-488(2004))。

[0011] 因而, 仍然需要可以用在治疗多发性骨髓瘤的方法中的组合物。本发明提供了这样的组合物和方法。

发明内容

[0012] 本发明提供了一种分离的或纯化的编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列, 其中所述CAR包含抗原识别部分和T-细胞活化部分, 且其中所述抗原识别部分是针对B-细胞成熟抗原(BCMA)。

附图说明

[0013] 图1A和1B的图描绘的实验数据解释了跨多种人细胞类型的BCMA的表达模式, 如使用定量PCR所确定的。将结果表示为每 10^5 肌动蛋白cDNA拷贝的BCMA cDNA拷贝的数目。

[0014] 图2A-2L的图描绘的实验数据解释了, 细胞表面BCMA表达在多发 性骨髓瘤细胞系上检测到, 但是没有在其它类型的细胞上检测到, 如在 实施例1中所述。对于所有图, 实线代表用抗-BCMA抗体染色, 且虚线 代表用同种型匹配的对照抗体染色。所有图均为在活细胞上门控的。

[0015] 图3A的简图描绘了一种编码抗-BCMA CAR的核酸构建体。从N-端至C-端, 抗-BCMA CAR包括: 抗-BCMA scFv、CD8 α 分子的铰链和 跨膜区域、CD28分子的细胞质部分和CD3 ζ 分子的细胞质部分。

[0016] 图3B-3D的图描绘的实验数据解释了, 抗-bcma1 CAR、抗-bcma2 CAR和SP6 CAR(在实施例2中描述)在T-细胞的表面上表达。在未转导的(UT)细胞上发生微小抗-Fab染色。所述图为在CD3⁺淋巴细胞上门控的。图上的数字是每个象限中的细胞的百分比。

[0017] 图4A-4C的图描绘的实验数据解释了, 表达抗-BCMA CAR的T-细胞以BCMA-特异性的方式将T-细胞脱粒, 如在实施例3中所述。所述图 为在活CD3⁺淋巴细胞上门控的。图上的数字是每个象限中的细胞的百分比。

[0018] 图5A-5D的图描绘的实验数据解释了, 表达抗-BCMA CAR的T-细胞以BCMA-特异性的方式将T-细胞脱粒, 如在实施例3中所述。所述图 为在活CD3⁺淋巴细胞上门控的。图上的数字是每个象限中的细胞的百分比。

[0019] 图6A-6C的图描绘的实验数据解释了, 表达抗-BCMA CAR的T-细胞以BCMA-特异性

的方式产生细胞因子IFN γ 、IL-2和TNF,如在实施例3中所述。所述图为在活CD3⁺淋巴细胞上设门的。图上的数字是每个象限中的细胞的百分比。

[0020] 图7A的图描绘的实验数据解释了,表达抗-bcma2 CAR的T-细胞特异性地响应于BCMA而增殖。图7B的图描绘的实验数据解释了,表达 SP6CAR的T-细胞没有特异性地响应于BCMA而增殖。

[0021] 图7C和7D的图描绘的实验数据解释了,得自供体A的表达抗-bcma2 CAR的T-细胞在4小时细胞毒性测定中在不同的效应物:靶细胞比率下特异性地杀死了多发性骨髓瘤细胞系H929(图6C)和RPMI8226(图6D)。用阴性对照SP6 CAR转导的T-细胞在所有效应物:靶标比率下诱导了低得多的细胞毒性水平。对于所有效应物:靶标比率,一式两份地确定细胞毒性,并将结果表示为平均值 $\pm$ 平均值标准误差。

[0022] 图8A的图描绘的实验数据解释了,BCMA在得自骨髓瘤患者3的原发性骨髓多发性骨髓瘤细胞的表面上表达,如在实施例5中所述。该图为在CD38^高CD56⁺浆细胞(它们构成骨髓细胞的40%)上设门的。

[0023] 图8B的图描绘的实验数据解释了,得自供体C的用抗-bcma2 CAR 转导的同种异体T-细胞在与骨髓瘤患者3的未操作的骨髓细胞共培养以后产生IFN γ ,如在实施例5中所述。图7B也表明,得自同一同种异体 供体的、表达抗-bcma2 CAR的T-细胞当与得自骨髓瘤患者3的外周血单核细胞(PBMC)一起培养时产生了少得多的IFN γ 。另外,得自供体C的、表达SP6 CAR的T-细胞没有特异性地识别骨髓瘤患者3的骨髓。

[0024] 图8C的图描绘的实验数据解释了,从骨髓瘤患者1切除的浆细胞瘤含有93%的浆细胞,且这些原代浆细胞表达BCMA,如通过针对BCMA 的流式细胞计量术(实线)和同种型匹配的对照染色(虚线)揭示的。该图为在浆细胞上设门的。

[0025] 图8D的图描绘的实验数据解释了,得自骨髓瘤患者1的、表达抗 -bcma2 CAR的T-细胞特异性地响应于自体浆细胞瘤细胞而产生IFN γ 。

[0026] 图8E的图描绘的实验数据解释了,得自骨髓瘤患者1的、表达抗-bcma2 CAR的T-细胞在低效应物:靶标比率下特异性地杀死了自体浆细胞瘤细胞。相反,得自骨髓瘤患者1的、表达SP6 CAR的T-细胞表现出对自体浆细胞瘤细胞的低细胞毒性水平。对于所有的效应物:靶标比率,一式两份地确定细胞毒性,并将结果表示为平均值 $\pm$ 平均值标准误差。

[0027] 图9A的图描绘的实验数据解释了,用抗-bcma2 CAR转导的T-细胞可以破坏在小鼠中建立的多发性骨髓瘤肿瘤。图9B的图描绘了用表达抗 -bcma2 CAR的T-细胞治疗的荷瘤小鼠相对于对照的存活。

[0028] 发明的详细描述

[0029] 本发明提供了一种分离的或纯化的编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含抗原识别部分和T-细胞活化部分。嵌合抗原受体(CAR)是人工构建的杂合蛋白或多肽,其含有与T-细胞信号传导或T-细胞活化结构域连接的抗体(例如,单链可变片段(scFv))的抗原结合结构域。CAR具有利用单克隆抗体的抗原结合性质以非-MHC限制的方式将T-细胞特异性和反应性重新指向选定靶标的能力。非-MHC限制的抗原识别会给表达CAR的T-细胞提供不依赖于抗原加工而识别抗原的能力,由此绕过肿瘤逃逸的主要机制。此外,当在T-细胞中表达时,CAR有利地不会与内源性T-细胞受体(TCR) α 和 β 链二聚化。

[0030] “核酸序列”意图包括DNA或RNA的聚合物(即,多核苷酸),其可以是单链的或双链

的,且其可以含有非天然的或改变的核苷酸。本文中使用的术语“核酸”和“多核苷酸”表示任意长度的核苷酸的聚合形式,无论是核糖核苷酸(RNA)还是脱氧核糖核苷酸(DNA)。这些术语表示分子的一级结构,且因而包括双链和单链DNA、以及双链和单链RNA。该术语包括作为等同物的、从核苷酸类似物和经修饰的多核苷酸(例如、但不限于甲基化的和/或加帽的多核苷酸)产生的RNA或DNA的类似物。

[0031] “分离的”是指从其天然环境取出核酸。“纯化的”是指,给定的核酸的纯度已经增加,其中“纯度”是相对术语,而不是“绝对纯度”,所述给定的核酸是已经从自然界中取出的核酸(包括基因组DNA和mRNA)或在实验室条件下合成的(包括cDNA)和/或扩增的核酸。但是,应当理解,核酸和蛋白可以用稀释剂或佐剂配制,且仍然为了实用目的而分离。例如,当用于引入细胞中时,通常将核酸与可接受的载体或稀释剂混合。

[0032] 本发明核酸序列编码这样的CAR:其包含针对B-细胞成熟抗原(BCMA,也被称作CD269)的抗原识别部分。BCMA是肿瘤坏死因子受体超家族的一个成员(参见,例如,Thompson等人,J.Exp.Medicine,192(1):129-135(2000),和Mackay等人,Annu.Rev.Immunol.,21:231-264(2003))。BCMA结合B-细胞活化因子(BAFF)和诱导增殖的配体(APRIL)(参见,例如,Mackay等人,出处同上,和Kallied等人,Immunological Reviews,204:43-54(2005))。在非恶性细胞中,已经报道BCMA主要在浆细胞和成熟B-细胞的子集中表达(参见,例如,Laabi等人,EMBO J.,11(11):3897-3904(1992);Laabi等人,Nucleic Acids Res.,22(7):1147-1154(1994);Kallied等人,出处同上;O'Connor等人,J.Exp.Medicine,199(1):91-97(2004);和Ng等人,J.Immunol.,173(2):807-817(2004))。BCMA缺陷型小鼠是健康的,且具有正常数目的B-细胞,但是长寿浆细胞的存活是受损的(参见,例如,O'Connor等人,出处同上;Xu等人,Mol.Cell.Biol.,21(12):4067-4074(2001);和Schiemann等人,Science,293(5537):2111-2114(2001))。几个研究人员已经在多发性骨髓瘤细胞中普遍地检测出BCMA RNA,且已经在得自多发性骨髓瘤患者的浆细胞的表面上检测出BCMA蛋白(参见,例如,Novak等人,Blood,103(2):689-694(2004);Neri等人,Clinical Cancer Research,13(19):5903-5909(2007);Bellucci等人,Blood,105(10):3945-3950(2005);和Moreaux等人,Blood,103(8):3148-3157(2004))。

[0033] 本发明核酸序列编码包含抗原识别部分的CAR,所述抗原识别部分含有针对BCMA的单克隆抗体或其抗原结合部分。本文中使用的术语“单克隆抗体”表示这样的抗体:其由B-细胞的单一克隆产生,并结合相同表位。相比之下,“多克隆抗体”表示这样的抗体群:其由不同的B-细胞产生,且结合相同抗原的不同表位。由本发明核酸序列编码的CAR的抗原识别部分可以是完整抗体或抗体片段。完整抗体通常由4条多肽组成:两条相同的重(H)链多肽拷贝和两条相同的轻(L)链多肽拷贝。每条重链含有一个N端可变(V_H)区和三个C端恒定(CH₁、CH₂和CH₃)区,并且每条轻链含有一个N端可变(V_L)区和一个C端恒定(C_L)区。每对轻链和重链的可变区形成抗体的抗原结合位点。V_H和V_L区具有相同的基本结构,每个区域包含四个框架区,所述框架区的序列是相对保守的。所述框架区通过三个互补性决定区(CDR)相连。所述三个CDR(被称作CDR1、CDR2和CDR3)形成抗体的“高变区”,其负责抗原结合。

[0034] 术语“抗体的片段”、“抗体片段”、“抗体的功能片段”和“抗原结合部分”在本文中互换地用于表示抗体的一个或多个片段或部分,其保留特异性地结合抗原的能力(通常,

参见,Holliger等人,Nat.Biotech.,23(9): 1126-1129(2005))。由本发明核酸序列编码的CAR的抗原识别部分可以 含有任意结合BCMA的抗体片段。所述抗体片段理想地包含例如一个或多个CDR、可变区(或其部分)、恒定区(或其部分)或它们的组合。抗体片段的例子包括,但不限于:(i) Fab片段,其是由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,其是包含两个在铰链区通过二硫键连接的Fab片段的二价片段;(iii) Fv片段,其由抗体的单个臂的V_L和 V_H结构域组成;(iv) 单链Fv(scFv),其是由Fv片段的两个结构域(即,V_L和V_H)通过合成接头连接组成的单价分子,所述合成接头能够使所述两个结构域合成为单条多肽链(参见,例如,Bird等人,Science,242: 423-426(1988);Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85:5879-5883 (1988);和Osborn等人,Nat.Biotechnol.,16: 778(1998));和(v) 双体,其 为多肽链的二聚体,其中每条多肽链包含通过肽接头连接至V_L的V_H,所述肽接头因为太短而不允许在同一多肽链上的V_H与V_L之间配对,由此驱动在不同V_H-V_L多肽链上的互补结构域之间配对,以产生具有两个 功能性抗原结合位点的二聚体分子。抗体片段是本领域已知的,且更详细地描述在例如美国专利申请公开2009/0093024 A1中。在优选的实施方案中,由本发明核酸序列编码的CAR的抗原识别部分包含抗-BCMA单链Fv(scFv)。

[0035] 单克隆抗体的抗原结合部分或片段可以是任意大小,只要该部分会 结合BCMA。在这方面,针对BCMA的单克隆抗体(在本文中也称作为“抗-BCMA单克隆抗体”)的抗原结合部分或片段理想地包含约5至18(例如,约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或前述值中的任意2个限定的范围)个氨基酸。

[0036] 在一个实施方案中,本发明核酸序列编码这样的抗原识别部分:其 包含抗-BCMA单克隆抗体的可变区。在这方面,所述抗原识别部分包含 抗-BCMA单克隆抗体的轻链可变区、重链可变区、或轻链可变区和重链 可变区二者。优选地,由本发明核酸序列编码的CAR的抗原识别部分包 含抗-BCMA单克隆抗体的轻链可变区和重链可变区。结合BCMA的重 链和轻链单克隆抗体氨基酸序列公开在例如国际专利申请公开WO 2010/104949中。

[0037] 在另一个实施方案中,本发明核酸序列编码包含信号序列的CAR。所述信号序列可以位于抗原识别部分的氨基端(例如,抗-BCMA抗体的可 变区)。所述信号序列可以包含任意合适的信号序列。在一个实施方案中,所述信号序列是人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)受体序列或 CD8 α 信号序列。

[0038] 在另一个实施方案中,所述CAR包含铰链序列。本领域普通技术人 员会明白,铰链序列是促进抗体柔性的短氨基酸序列(参见,例如,Woof 等人,Nat.Rev.Immunol.,4(2): 89-99(2004))。所述铰链序列可以位于抗 原识别部分(例如,抗-BCMA scFv)和T-细胞活化部分之间。所述铰链序 列可以是任意合适的分子衍生出或得到的任意合适的序列。在一个实 施方案中,例如,所述铰链序列源自人CD8 α 分子或CD28分子。

[0039] 本发明核酸序列编码包含T-细胞活化部分的CAR。T-细胞活化部分 可以是任意合适分子衍生出或得到的任意合适部分。例如,在一个实 施方案中,所述T-细胞活化部分包含跨膜结构域。所述跨膜结构域可以 是从本领域已知的任意分子衍生出或得到的任意跨膜结构域。例如,所 述跨膜结构域可以从CD8 α 分子或CD28分子得到或衍生出。CD8是充 当T-细胞受体(TCR)的共受体的跨膜糖蛋白,并且主要在细胞毒性T-细 胞的表面上表达。CD8的最常见形式作为由CD8 α 和CD8 β 链组成的二 聚体存在。CD28在T-细胞上表达,并提供

T-细胞活化所需的共刺激性信号。CD28是CD80 (B7.1) 和CD86 (B7.2) 的受体。在优选的实施方案中, 所述CD8 α 和CD28是人的。

[0040] 除了跨膜结构域以外, 所述T-细胞活化部分还包含细胞内的(即, 细胞质的)T-细胞信号传导结构域。细胞内T-细胞信号传导结构域可以得自或源自CD28分子、CD3 ζ (ζ) 分子或其修饰形式、人Fc受体 γ (FcR γ) 链、CD27分子、OX40分子、4-1BB分子或本领域已知的其它细胞内信号传导分子。如以上所讨论的, CD28是在T-细胞共刺激中至关重要的T-细胞标志物。CD3 ζ 与TCR结合以产生信号, 且含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAMs)。4-1BB(也被称作CD137) 将有效的共刺激信号传送至T-细胞, 从而促进T淋巴细胞的分化和增强其长期存活。在优选的实施方案中, 所述CD28、CD3 ζ 、4-1BB、OX40和CD27是人的。

[0041] 由本发明核酸序列编码的CAR的T-细胞活化结构域可以包含前述跨膜结构域中的任一个与前述细胞间T-细胞信号传导结构域中的任意一个或多个的任意组合。例如, 本发明核酸序列可以编码这样的CAR: 其包含CD28跨膜结构域以及CD28和CD3 ζ 的细胞内T-细胞信号传导结构域。可替换地, 例如, 本发明核酸序列可以编码这样的CAR: 其包含CD8 α 跨膜结构域以及CD28、CD3 ζ 、Fc受体 γ (FcR γ) 链和/或4-1BB的细胞内T-细胞信号传导结构域。

[0042] 在一个实施方案中, 本发明核酸序列编码这样的CAR: 从5'至3', 其包含粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体(GM-CSF受体) 信号序列、抗-BCMA scFv、人CD8 α 分子的铰链和跨膜区域、人CD28分子的细胞质T-细胞信号传导结构域和人CD3 ζ 分子的T-细胞信号传导结构域。在另一个实施方案中, 本发明核酸序列编码这样的CAR: 从5'至3', 其包含人CD8 α 信号序列、抗-BCMA scFv、人CD8 α 分子的铰链和跨膜区域、人CD28分子的细胞质T-细胞信号传导结构域和人CD3 ζ 分子的T-细胞信号传导结构域。在另一个实施方案中, 本发明核酸序列编码这样的CAR: 从5'至3', 其包含人CD8 α 信号序列、抗-BCMA scFv、人CD8 α 分子的铰链和跨膜区域、人4-1BB分子的细胞质T-细胞信号传导结构域和/或人OX40分子的细胞质T-细胞信号传导结构域和人CD3 ζ 分子的T-细胞信号传导结构域。例如, 本发明核酸序列包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的核酸序列或由其组成。

[0043] 本发明还提供了分离的或纯化的由本发明核酸序列编码的嵌合抗原受体(CAR)。

[0044] 本发明核酸序列可以编码任意长度的CAR, 即, 所述CAR可以包含任意数目的氨基酸, 前提条件是, 所述CAR保留它的生物学活性, 例如, 特异性地结合抗原、检测哺乳动物中的患病细胞、或治疗或预防哺乳动物中的疾病等的的能力。例如, 所述CAR可以包含50或更多(例如, 60或更多、100或更多或500或更多) 个氨基酸, 但是小于1,000(例如, 900或更少、800或更少、700或更少或600或更少) 个氨基酸。优选地, 所述CAR是约50至约700个氨基酸(例如, 约70个、约80个、约90个、约150个、约200个、约300个、约400个、约550个或约650个氨基酸)、约100个至约500个氨基酸(例如, 约125个、约175个、约225个、约250个、约275个、约325个、约350个、约375个、约425个、约450个或约475个氨基酸)、或由前述值中的任意两个限定的范围。

[0045] 在本发明的范围内包括编码本文中描述的CAR的功能部分的核酸序列。当结合CAR使用时, 术语“功能部分”表示本发明的CAR的任何部分或片段, 所述部分或片段保留其来源CAR(亲本CAR) 的生物学活性。功能部分包括, 例如, 这样的CAR部分: 其保留识别靶细胞或者检测、治疗或预防疾病的能力, 达到与亲本CAR相似的程度、相同的程度或更高的

程度。关于编码亲本CAR的核酸序列,编码CAR的功能部分的核酸序列可以编码这样的蛋白:其包含亲本CAR的例如约10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或更多。

[0046] 本发明核酸序列可以编码这样的CAR功能部分:其含有位于所述部分的氨基或羧基端或者两端的额外氨基酸,所述额外氨基酸不存在于亲本CAR的氨基酸序列中。理想地,所述额外氨基酸不干扰所述功能部分的生物学功能,例如,识别靶细胞、检测癌症、治疗或预防癌症等。更理想的是,与亲本CAR的生物学活性相比,所述额外氨基酸增强所述CAR的生物学活性。

[0047] 本发明还提供了编码前述CAR的功能变体的核酸序列。本文中使用术语“功能变体”表示与由本发明核酸序列编码的CAR具有基本或显著序列同一性或相似性的CAR、多肽或蛋白,所述功能变体保留所述功能变体作为其变体的CAR的生物学活性。功能变体包括,例如,这样的本文所述的CAR(亲本CAR)的变体:所述变体保留识别靶细胞的能力,达到与亲本CAR相似的程度、相同的程度或更高的程度。关于编码亲本CAR的核酸序列,编码所述CAR的功能变体的核酸序列可以与编码亲本CAR的核酸序列具有例如约10%同一性、约25%同一性、约30%同一性、约50%同一性、约65%同一性、约80%同一性、约90%同一性、约95%同一性、或约99%同一性。

[0048] 功能变体可以,例如,包含由本发明核酸序列编码的CAR的氨基酸序列,其具有至少一个保守的氨基酸置换。短语“保守氨基酸置换”或“保守突变”表示,将一个氨基酸替换为另一个具有共同性质的氨基酸。定义各个氨基酸之间的共同性质的一种有用方式是,分析同源生物的对应该蛋白之间的归一化氨基酸变化频率(Schulz, G.E. 和 Schirmer, R.H., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979))。根据这样的分析,可以定义氨基酸组,其中在组内的氨基酸优先彼此交换,且因此在它们对总蛋白结构的影响方面彼此最相似(Schulz, G.E. 和 Schirmer, R.H., 出处同上)。保守突变的例子包括在上述亚组内的氨基酸的氨基酸置换,例如,用赖氨酸置换精氨酸,反之亦然,使得可以维持正电荷;用谷氨酸置换天冬氨酸,反之亦然,使得可以维持负电荷;用丝氨酸置换苏氨酸,使得可以维持游离-OH;和用谷氨酰胺置换天冬酰胺,使得可以维持游离-NH₂。

[0049] 可替换地或额外地,所述功能变体可以包含具有至少一个非保守氨基酸置换的亲本CAR的氨基酸序列。“非保守突变”涉及不同组之间的氨基酸置换,例如,用赖氨酸置换色氨酸,或用苯丙氨酸置换丝氨酸等。在该情况下,优选的是,所述非保守氨基酸置换不会干扰或抑制所述功能变体的生物学活性。所述非保守氨基酸置换可能增强所述功能变体的生物学活性,使得所述功能变体的生物学活性与亲本CAR相比增加。

[0050] 本发明核酸序列可以编码这样的CAR(包括其功能部分和功能变体):其包含合成的氨基酸以替代一个或多个天然存在的氨基酸。这样的合成的氨基酸是本领域已知的,且包括,例如,氨基环己烷羧酸、正亮氨酸、 α -氨基正癸酸、高丝氨酸、S-乙酰基氨基甲基-半胱氨酸、反式-3-和反式-4-羟脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、 β -苯基丝氨酸 β -羟基苯丙氨酸、苯基甘氨酸、 α -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、吡啶啉-2-甲酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸单酰胺、N'-苄基-N'-甲基-赖氨酸、N',N'-二苄基-赖氨酸、6-羟赖氨酸、鸟氨酸、 α -氨基环戊烷羧酸、 α -氨基环己烷羧酸、 α -氨基环庚烷羧酸、 α -(2-氨基-2-降莰烷)-甲酸、 α , γ -二氨基丁酸、 α , β -二氨基丙酸、高苯丙氨酸和 α -叔丁基甘氨酸。

[0051] 本发明核酸序列可以编码这样的CAR (包括其功能部分和功能变体): 其被糖基化、酰胺化、羧酸酯化、磷酸化、酯化、N-酰化、环化(例如经由二硫键), 或转化成酸加成盐, 和/或任选地二聚化或聚合、或缀合。

[0052] 在优选的实施方案中, 本发明核酸序列编码这样的CAR: 其包含 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列 或者由所述氨基酸序列组成。

[0053] 使用本领域已知的方法, 可以制备本发明核酸序列。例如, 使用标准重组DNA方法, 可以重组产生核酸序列、多肽和蛋白(参见, 例如, Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; 和Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons, NY, 1994)。此外, 可以从诸如植物、细菌、昆虫或哺乳动物(例如, 大鼠、人等)等来源分离和/或纯化合成制备的编码CAR 的核酸序列。分离和纯化的方法是本领域众所周知的。可替换地, 可以商业地合成本文描述的核酸序列。在这方面, 本发明核酸序列可以是合成的、重组的、分离的和/或纯化的。

[0054] 本发明还提供了一种载体, 其包含编码本发明的CAR的核酸序列。所述载体可以是, 例如, 质粒、粘粒、病毒载体(例如, 逆转录病毒或腺病毒)或噬菌体。合适的载体和载体制备方法是本领域众所周知的(参见, 例如, Sambrook等人, 出处同上, 和Ausubel等人, 出处同上)。

[0055] 除了编码CAR的本发明核酸序列以外, 所述载体优选地包含表达控制序列, 诸如启动子、增强子、聚腺苷酰化信号、转录终止子、内核糖体进入位点(IRES)等, 其提供所述核酸序列在宿主细胞中的表达。示例性的表达控制序列是本领域已知的, 且描述在, 例如, Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, 第185卷, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 中

[0056] 得自多种不同来源的大量启动子(包括组成型、诱导型和阻抑型启动子)是本领域众所周知的。启动子的代表性来源包括, 例如病毒、哺乳动物、昆虫、植物、酵母和细菌, 并且得自这些来源的合适启动子是容易得到的, 或者可以基于公众可得到的序列(例如从保藏机构诸如 ATCC以及其它商业或个体来源)合成地制备。启动子可以是单向的(即, 在一个方向起始转录)或双向的(即, 在3' 或5' 方向起始转录)。启动子的非限制性例子包括例如T7细菌表达系统、pBAD(araA)细菌表达系统、巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子和RSV启动子。诱导型启动子包括例如Tet系统(美国专利5,464,758和5,814,618)、蜕皮激素可诱导的系统(No等人, Proc.Natl.Acad.Sci., 93:3346-3351(1996))、T-REX™系统(Invitrogen, Carlsbad, CA)、LACSWITCH™系统(Stratagene, San Diego, CA)和Cre-ERT他莫昔芬可诱导的重组酶系统(Indra等人, Nuc. Acid.Res., 27:4324-4327(1999); Nuc.Acid.Res., 28:e99(2000); 美国专利7,112,715; 和Kramer&Fussenegger, Methods Mol.Biol., 308:123-144 (2005))。

[0057] 本文中使用的术语“增强子”表示这样的DNA序列: 其增加例如它所可操作地连接的核酸序列的转录。增强子可以位于核酸序列编码区的数千碱基以外, 并且可以介导调控因子的结合、DNA甲基化的类型、或DNA结构的改变。得自多种不同来源的大量增强子是本领域众所周知的, 且可以作为克隆的多核苷酸得到或在克隆的多核苷酸内(得自, 例如保

藏机构诸如ATCC以及其它商业或个体来源)。许多包含启动子(如常用的CMV启动子)的多核苷酸也包含增强子序列。增强子可以位于编码序列的上游、内部或下游。术语“Ig增强子”表示从位于免疫球蛋白(Ig)基因座内的增强子区域衍生出的增强子元件(这样的增强子包括例如重链(μ) 5' 增强子、轻链(κ) 5' 增强子、 κ 和 μ 内含子增强子和3' 增强子)(通常参见Paul W.E.(编), *Fundamental Immunology*, 第3版, Raven Press, New York(1993), 第353-363页; 和美国专利5,885,827)。

[0058] 载体还可以包含“选择性标记基因”。本文中使用的术语“选择性标记基因”表示这样的核酸序列: 其在有对应选择剂存在下允许表达所述核酸序列的细胞被特异性选择或抑制。合适的选择性标记基因是本领域已知的, 且描述于, 例如, 国际专利申请公开W0 1992/08796和W0 1994/28143; Wigler等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:3567(1980); O'Hare等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527(1981); Mulligan&Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072(1981); Colberre-Garapin等人, *J. Mol. Biol.*, 150: 1(1981); Santerre等人, *Gene*, 30:147(1984); Kent等人, *Science*, 237: 901-903(1987); Wigler等人, *Cell*, 11:223(1977); Szybalska&Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:2026(1962); Lowy等人, *Cell*, 22:817(1980); 和美国专利5,122,464和5,770,359。

[0059] 在某些实施方案中, 所述载体是“附加型表达载体”或“附加体”, 其在有适当的选择压力存在下能够在宿主细胞中复制, 并且作为染色体外DNA片段存在于宿主细胞中(参见, 例如, Conese等人, *Gene Therapy*, 11: 1735-1742(2004))。代表性的商购可得的附加型表达载体包括、但不限于: 利用爱泼斯坦-巴尔核抗原1(EBNA1)和爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)复制起点(oriP)的附加型质粒。得自Invitrogen(Carlsbad, CA)的载体pREP4、pCEP4、pREP7和pcDNA3.1以及得自Stratagene(La Jolla, CA)的pBK-CMV代表使用T-抗原和SV40复制起点替代EBNA1和oriP的附加型载体的非限制性例子。

[0060] 其它合适的载体包括整合表达载体, 其可以随机整合进宿主细胞的DNA中, 或者可能包括能够实现表达载体与宿主细胞的染色体之间的特异性重组的重组位点。这样的整合表达载体可以利用宿主细胞染色体的内源性表达控制序列来实现期望蛋白的表达。以位点特异性方式整合的载体的例子包括, 例如, 得自Invitrogen(Carlsbad, CA)的flp-in系统的组件(例如, pcDNATM5/FRT), 或cre-lox系统, 诸如可见于得自Stratagene(La Jolla, CA)的pExchange-6核心载体。随机整合进宿主细胞染色体中的载体的例子包括, 例如得自Invitrogen(Carlsbad, CA)的pcDNA3.1(在没有T-抗原存在下引入)和得自Promega(Madison, WI)的pCI或pFN10A(ACT) FLEXITM。

[0061] 还可以使用病毒载体。代表性的病毒表达载体包括, 但不限于, 基于腺病毒的载体(例如, 基于腺病毒的Per.C6系统, 其可得自Crucell, Inc. (Leiden, 荷兰), 基于慢病毒的载体(例如, 基于慢病毒的pLP1, 其得自Life Technologies(Carlsbad, CA)), 和逆转录病毒载体(例如, 得自Stratagene(La Jolla, CA)的pFB-ERV和pCFB-EGSH)。在优选的实施方案中, 所述病毒载体是慢病毒载体。

[0062] 可以将包含编码CAR的本发明核酸的载体引入能够表达由其编码的CAR的宿主细胞中, 所述宿主细胞包括任意合适的原核或真核细胞。优选的宿主细胞是这样的宿主细胞: 其可以容易地且稳定地生长, 具有相当快速的生长速率, 具有确定地表征的表达系统, 并且可以被容易地和有效地转化或转染。

[0063] 本文中使用的术语“宿主细胞”表示可以含有表达载体的任何类型的细胞。所述宿主细胞可以是真核细胞,例如,植物、动物、真菌或藻类,或者可以是原核细胞,例如,细菌或原生动物。所述宿主细胞可以是培养的细胞或原代细胞,即,直接分离自生物体(例如人)的细胞。所述宿主细胞可以是粘附细胞或悬浮细胞,即,在混悬液中生长的细胞。合适的宿主细胞是本领域已知的,并且包括,例如,DH5 α 大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞等。为了扩增或复制重组表达载体的目的,所述宿主细胞可以是原核细胞,例如,DH5 α 细胞。为了制备重组CAR的目的,所述宿主细胞可以是哺乳动物细胞。所述宿主细胞优选地是人细胞。所述宿主细胞可以是任何细胞类型,可以源自任何类型的组织,并且可以处于任何发育阶段。在一个实施方案中,所述宿主细胞可以是外周血淋巴细胞(PBL)、外周血单核细胞(PBMC)或自然杀伤(NK)细胞。优选地,所述宿主细胞是自然杀伤(NK)细胞。更优选地,所述宿主细胞是T-细胞。用于选择合适的哺乳动物宿主细胞的方法和用于转化、培养、繁殖、筛选和纯化细胞的方法是本领域已知的。

[0064] 本发明提供了一种分离的宿主细胞,其表达编码本文描述的CAR的本发明核酸序列。在一个实施方案中,所述宿主细胞是T-细胞。本发明的T-细胞可以是任意T-细胞,诸如培养的T-细胞,例如,原代T-细胞,或者得自培养的T-细胞系的T-细胞,或得自哺乳动物的T-细胞。如果得自哺乳动物,T-细胞可以得自众多来源,包括、但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其它组织或流体。T-细胞也可以被富集或纯化。T-细胞优选地是人T-细胞(例如,分离自人)。T-细胞可以处于任何发育阶段,包括、但不限于,CD4⁺/CD8⁺双阳性的T-细胞、CD4⁺辅助性T-细胞,例如,Th₁和Th₂细胞、CD8⁺T-细胞(例如,细胞毒性的T-细胞)、肿瘤浸润细胞、记忆T-细胞、原初T-细胞等。在一个实施方案中,T-细胞是CD8⁺T-细胞或CD4⁺T-细胞。T-细胞系可得自,例如,美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC, 马纳萨斯, VA)和德国微生物和细胞培养物保藏中心(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ),且包括,例如, Jurkat细胞(ATCC TIB-152)、Sup-T1细胞(ATCC CRL-1942)、RPMI 8402细胞(DSMZ ACC-290)、Karpas 45细胞(DSMZ ACC-545)、及其衍生物。

[0065] 在另一个实施方案中,所述宿主细胞是自然杀伤(NK)细胞。NK细胞是在先天性免疫系统中起作用的一类细胞毒性的淋巴细胞。NK细胞被定义为大颗粒淋巴细胞,且构成从共同淋巴祖细胞(其也产生B和T淋巴细胞)分化成的第三类细胞(参见,例如, Immunobiology, 第5版, Janeway 等人, eds., Garland Publishing, New York, NY (2001))。NK细胞在骨髓、淋巴结、脾、扁桃体和胸腺中分化并成熟。成熟以后, NK细胞作为具有特征性的细胞毒性颗粒的大淋巴细胞进入循环中。NK细胞能够识别和杀死一些异常细胞,例如,一些肿瘤细胞和病毒感染的细胞,并且被认为在对抗细胞内病原体的先天性免疫防御中是重要的。如上面结合T-细胞所述, NK细胞可以是任意NK细胞,诸如培养的NK细胞,例如,原代NK细胞,或得自培养的NK细胞系的NK细胞,或得自哺乳动物的NK细胞。如果得自哺乳动物, NK细胞可以得自众多来源,包括、但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其它组织或流体。NK细胞也可以被富集或纯化。NK细胞优选地是人NK细胞(例如,分离自人)。NK细胞系可得自,例如,美国典型培养物保藏中心(ATCC, 马纳萨斯, VA),且包括,例如, NK-92细胞(ATCC CRL-2407)、NK92MI细胞(ATCC CRL-2408)、及其衍生物。

[0066] 通过“转染”、“转化”或“转导”,可以将编码CAR的本发明核酸序列引入细胞中。本

文中使用的“转染”、“转化”或“转导”表示,使用物理或化学方法,将一个或多个外源多核苷酸引入宿主细胞中。许多转染技术是本领域已知的,且包括,例如,磷酸钙DNA共沉淀(参见,例如,Murray E.J.(编),Methods in Molecular Biology,第7卷,Gene Transfer and Expression Protocols,Humana Press(1991));DEAE-葡聚糖;电穿孔;阳离子脂质体介导的转染;钨颗粒促进的微粒轰击(Johnston,Nature,346: 776-777(1990));和磷酸锆DNA共沉淀(Brash等人,Mol.Cell Biol.,7: 2031-2034(1987))。使传染性颗粒在合适的包装细胞(其中的许多是商购可得的)中生长以后,可以将噬菌体或病毒载体引入宿主细胞中。

[0067] 不受特定理论或机制的约束,据信,通过引起针对BCMA的抗原特异性的应答,由本发明核酸序列编码的CAR会提供下述一项或多项:靶向和破坏表达BCMA的癌细胞,减少或消除癌细胞,促进免疫细胞向肿瘤部位的渗透,和增强/延长抗癌应答。因而,本发明提供了一种破坏多发性骨髓瘤细胞的方法,所述方法包括:使一个或多个前述分离的T-细胞或自然杀伤细胞与表达BCMA的多发性骨髓瘤细胞群体接触,由此产生CAR,其结合多发性骨髓瘤细胞上的BCMA,并且破坏所述多发性骨髓瘤细胞。如本文所讨论的,多发性骨髓瘤(也被称作浆细胞性骨髓瘤或卡勒氏病)是浆细胞的癌症,其为通常引起抗体产生的白血细胞类型(Raab等人,Lancet,374:324-329(2009))。多发性骨髓瘤每年影响1-4/100,000的人。该疾病在男性中更常见,并且由于仍然未知的原因,在非洲裔美国人中的发病率是在高加索美国人中的2倍。多发性骨髓瘤是最少见的血液学恶性肿瘤(14%),占有所有癌症的1%(Raab等人,出处同上)。多发性骨髓瘤的治疗通常涉及高剂量化学疗法和随后的造血干细胞移植(同种异体的或自体的);但是,高复发率在已经接受这样的治疗的多发性骨髓瘤患者中是常见的。如以上所讨论的,多发性骨髓瘤细胞高度表达BCMA(参见,例如,Novak等人,出处同上;Neri等人,出处同上;Bellucci等人,出处同上;和Moreaux等人,出处同上)。

[0068] 可以使一个或多个分离的T-细胞(其表达编码本文描述的抗-BCMA CAR的本发明核酸序列)离体、在体内或在体外与表达BCMA的多发性骨髓瘤细胞群体接触。“离体”表示在生物体以外的人工环境中在细胞或组织内部或表面上进行的方法,所述人工环境具有天然条件的最小改变。相反,术语“体内”表示在活生物体内部进行的方法,所述活生物体处于它们的正常完整状态,而“体外”方法使用生物体的组分进行,所述组分已经从它的通常生物学背景中分离。本发明的方法优选地涉及离体和体内组分。在这点上,例如,可以将上述的分离的T-细胞在表达编码抗-BCMA CAR的本发明核酸序列的条件下离体培养,然后直接转移进受多发性骨髓瘤影响的哺乳动物(优选人)中。这样的细胞转移方法在本领域中被称为“过继性细胞转移(ACT)”,其中免疫衍生的细胞被动地转移进新受体宿主中,以将供体免疫衍生的细胞的功能性转移给新宿主。用于治疗不同类型的癌症(包括血液学癌症诸如骨髓瘤)的过继性细胞转移方法是本领域已知的,且公开在,例如,Gattinoni等人,Nat.Rev.Immunol.,6(5): 383-393(2006);June,CH,J.Clin.Invest.,117(6):1466-76(2007);Rapoport等人,Blood,117(3):788-797(2011);和Barber等人,Gene Therapy,18: 509-516(2011))中。

[0069] 本发明还提供了一种破坏霍奇金淋巴瘤细胞的方法。霍奇金淋巴瘤(以前被称作霍奇金病)是一种免疫系统的癌症,其特征在于被称作Reed-Sternberg细胞的多核细胞类型的存在。霍奇金淋巴瘤的2种主要类型包括经典的霍奇金淋巴瘤和结节性淋巴细胞占优

势的霍奇金淋巴瘤。目前用辐射疗法、化学疗法或造血干细胞移植来治疗霍奇金淋巴瘤，治疗的选择取决于患者的年龄和性别，以及疾病的阶段、体积和组织学亚型。已经在霍奇金淋巴瘤细胞的表面上检测到BCMA表达（参见，例如，Chiu等人，Blood, 109 (2) : 729-739 (2007)）。

[0070] 当将T-细胞或NK细胞施用给哺乳动物时，所述细胞对于所述哺乳动物而言可以是同种异体的或自体的。在“自体”施用方法中，将细胞（例如，形成血液的干细胞或淋巴细胞）从哺乳动物取出，储存（并任选地修饰），并返回该相同哺乳动物。在“同种异体”施用方法中，哺乳动物从遗传上类似的、但是不同的供体接受细胞（例如，形成血液的干细胞或淋巴细胞）。优选地，所述细胞对于所述哺乳动物而言是自体的。

[0071] 理想地将T-细胞或NK细胞以组合物（诸如药物组合物）的形式施用给人。可替换地，可以将编码CAR的本发明核酸序列或包含编码CAR的核酸序列的载体配制在组合物（诸如药物组合物）中，并施用给人。本发明的药物组合物可以包含表达本发明的CAR的T-细胞或NK细胞的群体。除了本发明核酸序列或表达本发明的CAR的宿主细胞以外，所述药物组合物可以包含其它药学活性剂或药物，诸如化学治疗剂，例如，天门冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱、长春新碱等。在优选的实施方案中，所述药物组合物包含表达本发明的CAR的分离的T-细胞或NK细胞，更优选表达本发明的CAR的T-细胞或NK细胞的群体。

[0072] 本发明的T-细胞或NK细胞可以以盐（例如，药学上可接受的盐）的形式提供。合适的药学上可接受的酸加成盐包括源自无机酸（诸如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸和硫酸）和有机酸（诸如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、羟乙酸、葡萄糖酸、琥珀酸和芳基磺酸，例如，对甲苯磺酸）的那些盐。

[0073] 载体的选择将部分地取决于特定的本发明核酸序列、载体或表达CAR的宿主细胞、以及用于施用本发明核酸序列、载体或表达CAR的宿主细胞的特定方法。因此，存在本发明的药物组合物的多种合适制剂。例如，所述药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可以包括，例如，对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。可以任选地使用2种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以总组合物的约0.0001重量%至约2重量%的量存在。

[0074] 另外，在所述组合物中可以使用缓冲剂。合适的缓冲剂包括，例如，柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾、和多种其它酸和盐。可以任选地使用2种或更多种缓冲剂的混合物。所述缓冲剂或其混合物通常以总组合物的约0.001重量%至约4重量%的量存在。

[0075] 用于制备可施用的（例如，可胃肠外施用的）组合物的方法是本领域技术人员已知的，且更详细地描述在，例如，Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 第21版（2005年5月1日）。

[0076] 可以将组合物（其包含编码CAR的本发明核酸序列或表达CAR的宿主细胞）配制为包合络合物（诸如环糊精包合络合物）或脂质体。脂质体可以用于将宿主细胞（例如，T-细胞或NK细胞）或本发明核酸序列靶向特定组织。脂质体也可以用于增加本发明核酸序列的半衰期。许多方法可用于制备脂质体，诸如在例如下述文献中描述的那些：Szoka等人，Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980)，和美国专利4,235,871、4,501,728、4,837,028和5,019,369。

[0077] 所述组合物可以采用限时释放、延迟释放和持续释放递送系统,使得本发明的组合物的递送提前发生,且具有足够的时间以造成要治疗的部位的致敏。许多类型的释放递送系统是本领域普通技术人员可得到的和已知的。这样的系统可以避免所述组合物的重复施用,由此增加受试者和医师的便利,且可以特别适合用于本发明的某些组合物实施方案。

[0078] 所述组合物理想地包含可有效地治疗或预防多发性骨髓瘤或霍奇金淋巴瘤的量的表达编码CAR的本发明核酸序列的宿主细胞、或包含本发明核酸序列的载体。本文中使用的术语“治疗”等表示,获得期望的药理学和/或生理学效应。优选地,所述效应是治疗性的,即所述效应部分地或完全地治愈疾病和/或可归因于疾病的不利症状。为此目的,本发明的方法包括施用“治疗有效量”的组合物,所述组合物包含表达编码CAR的本发明核酸序列的宿主细胞、或包含本发明核酸序列的载体。“治疗有效量”表示在必要的剂量和时间段内有效地达到期望治疗结果的量。治疗有效量可以根据诸如以下因素而变化:个体的疾病状态、年龄、性别和重量,以及CAR在个体中引起期望应答的能力。例如,本发明的CAR的治疗有效量是结合多发性骨髓瘤细胞上的BCMA并破坏它们的量。

[0079] 可替换地,所述药理学和/或生理学效应可以是预防性的,即该效应完全地或部分地预防疾病或其症状。在这方面,本发明的方法包括:给易患多发性骨髓瘤或霍奇金淋巴瘤的哺乳动物施用“预防有效量”的组合物,所述组合物包含表达编码CAR的本发明核酸序列的宿主细胞、或包含本发明核酸序列的载体。“预防有效量”表示在必要的剂量和时间段内有效地达到期望预防结果(例如,预防疾病发作)的量。

[0080] 施用给哺乳动物(例如,人)的宿主细胞的典型量可以是,例如,在100万至1000亿个细胞的范围内;但是,低于或高于该示例性范围的量是在本发明范围内。例如,本发明的宿主细胞的每日剂量可以是约100万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞、或由前述值中的任意两个限定的范围),优选约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞、或由前述值中的任意两个限定的范围),更优选约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞、或由前述值中的任意两个限定的范围)。

[0081] 通过定期评估接受治疗的患者,可以监测治疗或预防效力。对于持续若干天或更久的重复给药而言,根据情况,重复所述治疗直至疾病症状得到期望的抑制。但是,其它剂量方案可能是有用的,且在本发明的范围内。通过所述组合物的单次推注施用,通过所述组合物的多次推注施用,或通过所述组合物的连续输注施用,可以递送期望的剂量。

[0082] 使用标准施用技术,可以给哺乳动物施用所述组合物,所述组合物包含表达本发明的编码CAR的核酸序列的宿主细胞、或包含本发明的编码CAR的核酸序列的载体,所述标准施用技术包括口服的、静脉内的、腹膜内的、皮下的、肺的、透皮的、肌肉内的、鼻内的、含服的、舌下的、或栓剂施用。所述组合物优选地适合于胃肠外施用。本文中使用的术语“胃肠外”包括静脉内、肌肉内、皮下、直肠、阴道和腹膜内施用。更优选地,通过静脉内、腹膜内

或皮下注射,利用外周全身递送将所述组合物施用给哺乳动物。

[0083] 可以将所述组合物(其包含表达本发明的编码CAR的核酸序列的宿主细胞、或包含本发明的编码CAR的核酸序列的载体)与一种或多种其它治疗剂一起施用,所述其它治疗剂可以共同施用给哺乳动物。“共同施用”是指,在时间上足够接近地施用一种或多种其它治疗剂以及包含本发明的宿主细胞或本发明的载体的组合物,使得本发明的CAR可以增强一种或多种其它治疗剂的作用,或反之亦然。在这点上,可以首先施用包含本发明的宿主细胞或本发明的载体的组合物,然后可以施用一种或多种其它治疗剂,或反之亦然。可替换地,可以同时施用包含本发明的宿主细胞或本发明的载体的组合物以及一种或多种其它治疗剂。可以与包含本发明的宿主细胞或本发明的载体的组合物共同施用的治疗剂的一个例子是IL-2。

[0084] 将所述组合物(其包含表达本发明的编码CAR的核酸序列的宿主细胞、或包含本发明的编码CAR的核酸序列的载体)施用给哺乳动物(例如,人)以后,通过本领域已知的任意合适方法,可以测量CAR的生物学活性。根据本发明的方法,所述CAR结合多发性骨髓瘤细胞上的BCMA,并破坏所述多发性骨髓瘤细胞。使用本领域已知的任意合适方法,包括例如ELISA和流式细胞计量术,可以测定所述CAR与多发性骨髓瘤细胞的面上的BCMA的结合。使用本领域已知的任意合适方法,诸如在例如以下文献中描述的细胞毒性测定,可以测量CAR的破坏多发性骨髓瘤细胞的能力:Kochenderfer等人,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009),和Herman等人,J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)。通过测定某些细胞因子(诸如CD107a、IFN γ 、IL-2和TNF)的表达,也可以测量CAR的生物学活性。

[0085] 本领域普通技术人员会容易地认识到,可以以任意数目的方式修饰本发明的编码CAR的核酸序列,从而通过所述修饰增加CAR的治疗或预防效力。例如,可以将CAR直接地或通过接头间接地缀合至靶向部分。将化合物(例如,CAR)与靶向部分缀合的实践是本领域已知的。参见,例如,Wadwa等人,J.Drug Targeting 3:111(1995)和美国专利5,087,616。

[0086] 下述实施例进一步举例说明本发明,但是,当然不应该解释为以任何方式限制本发明的范围。

[0087] 实施例1

[0088] 本实施例证实了BCMA在人细胞中的表达模式。

[0089] 使用BCMA-特异性的引物和探针集合(Life Technologies,Carlsbad,CA),对一组cDNA样品进行定量聚合酶链式反应(qPCR),所述cDNA样品得自人主要组织qPCR Panel II(Origine Technologies,Rockville,MD)中所含的宽范围的正常组织。分析得自浆细胞瘤的细胞的cDNA作为阳性对照,所述浆细胞瘤从患有晚期多发性骨髓瘤的患者切除。用RNeasy 微型试剂盒(Qiagen,Inc.,Valencia,CA)从浆细胞瘤细胞提取RNA,并使用标准方法合成cDNA。通过在载体DNA中稀释编码全长BCMA cDNA的质粒(Origine Technologies,Rockville,MD),建立BCMA qPCR的标准曲线。所述qPCR准确地检测每个反应 10^2 - 10^9 个BCMA拷贝的拷贝数。用Taqman β -肌动蛋白引物和探针试剂盒(Life Technologies,Carlsbad,CA),定量相同组织中的 β -肌动蛋白cDNA拷贝的数目。通过扩增 β -肌动蛋白质粒的系列稀释物,建立 β -肌动蛋白标准曲线。在Roche LightCycler480机器(Roche Applied Sciences,Indianapolis,IN)上进行所有qPCR反应。

[0090] qPCR分析的结果显示在图1A和1B中。如通过流式细胞计量术确定的,93%的得自浆细胞瘤样品的细胞为浆细胞。浆细胞瘤样品中的 BCMA表达显著高于任意其它组织中的 BCMA表达。在几种血液学组织 (诸如外周血单核细胞 (PBMC)、骨髓、脾、淋巴结和扁桃体) 中检测到 BCMA cDNA。在大多数胃肠器官 (诸如十二指肠、直肠和胃) 中检测到 低水平的BCMA cDNA。胃肠器官中的BCMA表达可能是存在于肠相关的淋巴样组织 (诸如固有层和派伊尔斑) 中的浆细胞和B-细胞的结果 (参见,例如,Brandtzaeg, Immunological Investigations, 39 (4-5): 303-355 (2010))。也在睾丸和气管中检测到低水平的BCMA cDNA。在气管中检测到的低水平的BCMA cDNA可能是由于浆细胞在气管固有层中的存在 (参见,例如,Soutar, Thorax, 31 (2): 158-166 (1976))。

[0091] 使用流式细胞计量术 (参见图2A-2L) 进一步表征了BCMA在不同细胞类型的表面上的表达,所述细胞类型包括多发性骨髓瘤细胞系H929、U266和RPMI8226。多发性骨髓瘤细胞系H929、U266和RPMI8226都表达细胞表面BCMA。相反,肉瘤细胞系TC71、T-细胞白血病系 CCRF-CEM和肾细胞系293T-17不表达细胞表面BCMA。原代CD34⁺造血细胞、原代小气道上皮细胞、原代支气管上皮细胞和原代肠上皮细胞 都缺乏细胞表面BCMA表达。

[0092] 本实施例的结果证实,BCMA在多发性骨髓瘤细胞的表面上表达,并且它在正常组织中具有受限的表达模式。

[0093] 实施例2

[0094] 本实施例描述了编码抗-BCMA嵌合抗原受体 (CAR) 的本发明核酸序列的构建。

[0095] 从国际专利申请公开WO 2010/104949 (Kalled等人) 得到被命名为 “C12A3.2” 和 “C11D5.3” 的2种小鼠-抗-人-BCMA抗体的抗体序列。使用 这些抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列,设计具有下述通式结构的单链可变片段 (scFv):

[0096] 轻链可变区-接头-重链可变区。

[0097] 所述接头具有下述氨基酸序列:GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:7) (参见,例如,Cooper等人,Blood, 101 (4): 1637-1644 (2003))。

[0098] 设计了编码2种嵌合抗原受体的DNA序列,其中的每一种从5' 至3' 含有下述元件: CD8 α 信号序列、前述抗-BCMA scFv、人CD8 α 分子的 铰链和跨膜区域、CD28分子的细胞质部分和CD3 ζ 分子的细胞质部分。这些编码CAR的核酸序列的示意图描绘在图3A中。并入得自 C12A3.2 和C11D5.3的可变区的CAR分别被命名为抗-bcma1和抗-bcma2。

[0099] 设计了编码5种其它嵌合抗原受体 (基于上述的抗-bcma2 CAR) 的 DNA序列,其中的每一种含有不同的信号序列和T-细胞活化结构域。在这方面,8ss-抗-bcma2 CAR从5' 至3' 含有下述元件:CD8 α 信号序列、scFv、人CD8 α 分子的铰链和跨膜区域、CD28分子的细胞质部分和CD3 ζ 分子的细胞质部分。G-抗-bcma2 CAR从5' 至3' 含有下述元件:人GM-CSF 受体信号序列、scFv、人CD8 α 分子的铰链和跨膜区域、CD28分子的细胞质部分和CD3 ζ 分子的细胞质部分。抗-bcma2-BB CAR从5' 至3' 含有下述元件:CD8 α 信号序列、scFv、人CD8 α 分子的铰链和跨膜区域、4-1BB 分子的细胞质部分和CD3 ζ 分子的细胞质部分。抗-bcma2-OX40CAR从5' 至3' 含有下述元件:CD8 α 信号序列、scFv、人CD8 α 分子的铰链和跨膜区域、OX40分子的细胞质部分 (参见,例如,Latza等人,European Journal of Immunology, 24: 677-683 (1994)) 和CD3 ζ 分子的细胞质部分。抗-bcma2-BBOX40从5' 至3' 含有下述元件:CD8 α 信号序列、scFv、人CD8 α 分子的铰链和跨膜区域、4-1BB分子的细胞质部分、OX40分子的细胞质区

域和CD3 ζ 分子的细胞质部分。在表1描绘了存在于7种CAR序列中的每一种内的元件。

[0100] 表1

[0101]

CAR	SEQ ID NO (氨基酸)	信号序列	铰链和跨膜区域	细胞内的 T-细胞信号转导结构域
抗-bcma1	4	人 CD8 α	人 CD8 α	CD28 CD3 ζ
抗-bcma2	5	人 CD8 α	人 CD8 α	CD28 CD3 ζ
G-抗-bcma2	8	GM-CSF 受体	人 CD8 α	CD28 CD3 ζ
8ss-抗-bcma2	9	人 CD8 α	人 CD8 α	CD28 CD3 ζ
抗-bcma2-BB	10	人 CD8 α	人 CD8 α	4-1BB CD3 ζ
抗-bcma2-OX40	11	人 CD8 α	人 CD8 α	OX40 CD3 ζ
抗-bcma2-BBOX40	12	人 CD8 α	人 CD8 α	4-1BB OX40 CD3 ζ

[0102] 从公众可得到的国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库,得到用于 CD8 α 、CD28、CD3 ζ 、4-1BB (CD137) 和OX40 (CD134) 的序列。

[0103] 使用本领域已知的方法,诸如在例如以下文献中描述的那些方法,制备编码CAR的核酸序列:Kochenderfer等人,J.Immunology,32 (7): 689-702 (2009),和Zhao等人,J.Immunology,183 (9):5563-5574 (2009)。将编码每种CAR的核酸序列进行密码子优化,并使用GeneArt™技术 (Life Technologies,Carlsbad,CA) 用适当的限制位点进行合成。

[0104] 将编码抗-bcma1和抗-bcma2 CAR的序列连接进命名为pRRLSIN.cPPT.MSCV.coDMF5.oPRE的慢病毒载体质粒中(参见,例如,Yang等人,J.Immunotherapy,33 (6):648-658 (2010))。使用标准方法,用编码CAR的核酸序列替代该载体的coDMF5部分。两种得到的抗-BCMA CAR载体被称作pRRLSIN.cPPT.MSCV.抗-bcma1.oPRE和pRRLSIN.cPPT.MSCV.抗-bcma2.oPRE。还构建了阴性对照CAR,其含有识别半抗原2,4,6-三硝基苯基的SP6scFv(参见,例如,Gross等人,Proc. Natl.Acad.Sci.USA,86 (24):10024-10028 (1989))。该CAR被称作SP6。将该SP6 CAR克隆进与抗-BCMA CAR相同的慢病毒载体中,并且其含有与抗-bcma1和抗-bcma2相同的信号转导结构域。通过Yang等人(出处同上)描述的方案产生上清液,其含有编码每种CAR的慢病毒。具体地,用下述质粒转染293T-17细胞(ATCC CRL-11268):pMDG(编码水疱性口炎病毒包膜蛋白)、pMDLg/pRRE(编码HIV Gag和Pol蛋白)、pRSV-Rev(编码RSV Rev蛋白)和编码抗-bcma CAR的质粒(参见,例如,Yang等人,出处同上)。

[0105] 使用标准方法,诸如在例如以下文献中描述的那些方法,将编码G-抗-bcma2、8ss-抗-bcma2、抗-bcma2-BB、抗-bcma2-OX40和抗-bcma2-BBOX40CAR的序列各自连接进被命名为MSGV(基于小鼠干细胞病毒的剪接-gag载体)的 γ 逆转录病毒载体质粒中: Hughes等人,Human Gene Therapy,16:457-472 (2005)。制备编码CAR的 γ 逆转录病毒质粒以后,如在Kochenderfer等人,J.Immunotherapy,32 (7):689-702 (2009)中所述,通过基于293的

包装细胞的瞬时转染,产生具有RD114包膜的不能复制的逆转录病毒。

[0106] 使用编码上述CAR的不能复制的慢病毒和逆转录病毒转导人T-细胞。对于抗-bcma1和抗-bcma2,在含有5%人AB血清(Valley Biomedical, Winchester,VA)和300国际单位(IU)/mL白介素-2(Novartis Diagnostics, Emeryville,CA)的AIM VTM培养基(Life Technologies, Carlsbad,CA)中,如前所述培养T-细胞(参见,例如,Kochenderfer等人, J.Immunotherapy, 32(7):689-702(2009)),并用抗-CD3单克隆抗体OKT3(Ortho-Biotech, Horsham,PA)刺激。开始培养以后36小时,将活化的T-细胞悬浮于含有硫酸鱼精蛋白和300IU/mL的IL-2的慢病毒上清液中。将细胞在1200xg离心1小时。然后将T-细胞在37℃培养3小时。然后用RPMI培养基(Mediatech, Inc., 马纳萨斯,VA)+10%胎牛血清(Life Technologies, Carlsbad,CA)和IL-2将上清液1:1稀释。将T-细胞在稀释的上清液中培养过夜,然后返回AIM VTM培养基(Life Technologies, Carlsbad,CA)+含有IL-2的5%人AB血清中培养。将T-细胞用生物素-标记的多克隆山羊抗-小鼠-F(ab)₂抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)染色,以检测抗-BCMA CAR。观察到抗-bcma1 CAR、抗-bcma2 CAR和SP6 CAR在转导的T-细胞上的高水平的细胞表面表达,如在图3B-3D中所示。

[0107] 对于G-抗-bcma2、8ss-抗-bcma2、抗-bcma2-BB、抗-bcma2-0X40和抗-bcma2-BBOX40CAR,以 1×10^6 个细胞/mL的浓度将外周血单核细胞悬浮于T-细胞培养基中,所述T-细胞培养基含有50ng/mL的抗-CD3单克隆抗体OKT3(Ortho,Bridgewater,NJ)和300IU/mL的IL-2。以11 μg/mL的浓度将RETRONECTINTM多肽(Takara Bio Inc., Shiga,日本)(其为结合病毒和细胞表面蛋白的人纤连蛋白片段的重组多肽)溶解在磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液中,并将2mL在PBS溶液中的RETRONECTINTM多肽加入未用组织培养物包被的6孔板(BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey)的每个孔中。将平板在室温(RT)温育2小时。温育以后,吸去RETRONECTINTM溶液,并将2mL由汉克平衡盐溶液(HBSS)+2%牛血清白蛋白(BSA)组成的封闭溶液加入每个RETRONECTINTM-包被的孔中。将平板在室温(RT)温育30分钟。吸去封闭溶液,并用HBSS+2.5%(4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸)的溶液(HEPES)冲洗孔。将逆转录病毒上清液快速融化,并在T-细胞培养基中1:1稀释,然后将2mL经稀释的上清液加入每个RETRONECTINTM-包被的孔中。加入上清液以后,将平板在32℃在2000xg离心2小时。然后从孔吸去上清液,并将 2×10^6 个T-细胞(其已经用OKT3抗体和IL-2培养了2天)加入每个孔中。当将T-细胞加入逆转录病毒包被的平板中时,所述T-细胞以 0.5×10^6 个细胞/mL的浓度悬浮于T-细胞培养基+300IU/mL的IL-2中。将T-细胞加入每个孔中以后,将平板在1000xg离心10分钟。将平板在37℃温育过夜。次日重复转导。温育18-24小时以后,将T-细胞从平板取出,并以 0.5×10^6 个细胞/mL的浓度悬浮于含有300IU/mL的IL-2的新鲜T-细胞培养基中,并在37℃和5%CO₂下培养。观察到抗-bcma2-BBOX40、抗-bcma2-BB和8ss-抗-bcma2在转导的T-细胞上的高水平的细胞表面表达。

[0108] 本实施例的结果证实了产生本发明的编码CAR的核酸序列的方法和在T-细胞表面上表达CAR的方法。

[0109] 实施例3

[0110] 本实施例描述了用于确定本发明的CAR对BCMA的特异性的一系列实验。

[0111] 细胞

[0112] NCI-H929、U266和RPMI8226都是得自ATCC的BCMA+多发性骨髓瘤细胞系(分别为ATCC No.CRL-9068、TIB-196和CCL-155)。A549(ATCC No.CCL-185)是BCMA-阴性的肺癌细胞系。TC71是BCMA-阴性的肉瘤细胞系。CCRF-CEM是BCMA-阴性的T-细胞系(ATCC No.CCL-119)。BCMA-K562是已经用编码全长BCMA的核酸序列转导的K562细胞(ATCC No.CCL-243)。NGFR-K562是已经用编码低亲和力神经生长因子的基因转导的K562细胞(参见,例如,Kochenderfer 等人,J.Immunotherapy.,32(7):689-702(2009))。使用得自3位患有多发性骨髓瘤的患者(即,骨髓瘤患者1至3)的外周血淋巴细胞(PBL),还使用得自3位其它受试者的PBL:供体A、供体B和供体C。供体A至C都患有黑素瘤。CD34+原代细胞得自3位正常的健康供体。浆细胞瘤细胞样品得自骨髓瘤患者1,且骨髓样品得自骨髓瘤患者3。上述的所有人样品得自在国立癌症研究所(National Cancer Institute)进行的IRB-批准的临床试验中招募的患者。下述原代人上皮细胞得自Lonza,Inc.(巴塞尔,瑞士):小气道上皮细胞、支气管上皮细胞和肠上皮细胞。

[0113] 干扰素- γ 和TNF ELISA

[0114] 在96孔圆底板(Corning Life Sciences,Lowell,MA)的孔中,在AIM VTM培养基(Life Technologies,Carlsbad,CA)+5%人血清中,将BCMA-阳性的或BCMA-阴性的细胞与CAR-转导的T-细胞一式两份地组合。将平板在37°C温育18-20小时。温育以后,使用标准方法(Pierce,Rockford,IL)进行IFN γ 和TNF的ELISA。

[0115] 用抗-bcma1或抗-bcma2 CAR转导的T-细胞当与表达BCMA的细胞系BCMA-K562一起培养过夜时,产生大量IFN γ ,但是CAR-转导的T-细胞当与阴性对照细胞系NGFR-K562一起培养时,仅产生背景水平的IFN γ ,如在表2中所示(所有单位是pg/mL IFN γ)。

[0116] 表2

[0117]

	表达 BCMA 的靶标**				BCMA-阴性的靶标				单独 T-细 胞
	BCMA-K562	H929	RPMI-8226	NGFR-K562	CCRF-CEM	A549	TC71	293T	
效应细胞*									
抗-bcma1	15392	11306	5335	76	76	52	65	54	112
抗-bcma2	25474	23120	10587	62	67	32	31	28	41
SP6	32	60	149	27	28	21	361	73	27
未转导	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	12	<12
单独靶标	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	13	

[0118] *效应细胞是得自多发性骨髓瘤患者(骨髓瘤患者2)的T-细胞。将T-细胞用指定的CAR转导或未转导。

[0119] **将指定的靶细胞与效应细胞组合进行过夜温育,并进行IFN γ ELISA。

[0120] 当将T-细胞和靶细胞共培养过夜时,表达8ss-抗-bcma2、抗-bcma2-BB和抗-bcma2-0X40 CAR的T-细胞特异性地响应于BCMA+靶细胞产生了IFN γ ,如在表3中所示(所有单位是pg/mL IFN γ)。

[0121] 表3

[0122]

	BCMA-阳性的靶标		BCMA-阴性的靶标			<u>单独的 T- 细胞</u>
	<u>BCMA-K562</u>	<u>RPMI-8226</u>	<u>NGFR-K562</u>	<u>CCRF-CEM</u>	<u>A549</u>	
<u>效应细胞</u>						
抗-bcma2-OX40	17704	4875	42	44	24	40
抗-bcma2-BB	25304	8838	404	602	350	706
8ss-抗-bcma2	9671	2168	100	120	49	171
未转导	<12	57	15	17	<12	20

[0123] 用抗-BCMA CAR转导的T-细胞当与表达BCMA的多发性骨髓瘤细胞系一起培养过夜时,产生了大量IFN γ 。相反,抗-BCMA CAR当与多种BCMA-阴性的细胞系一起培养时,产生了极低量的IFN γ 。与用抗-bcma1 CAR转导的T-细胞相比,用抗-bcma2 CAR及其变体(即,8ss-抗-bcma2、抗-bcma2-BB和抗-bcma2-OX40)转导的T-细胞当与BCMA-阳性的细胞一起培养时产生了更多的IFN γ ,且当与BCMA-阴性的细胞一起培养时产生了更少的IFN γ 。

[0124] 当将T-细胞和靶细胞共培养过夜时,用抗-bcma2 CAR变体转导的T-细胞特异性地响应于BCMA+靶细胞产生了TNF,如在表4中所示(所有单位是pg/mL肿瘤坏死因子(TNF))。

[0125] 表4

[0126]

	BCMA-阳性的靶标		BCMA-阴性的靶标			单独的 T-细胞
	BCMA-K562	RPMI-8226	NGFR-K562	CCRF-CEM	A549	
<u>效应细胞</u>						
抗-bcma2-OX40	4913	3406	<40	47	<40	74
抗-bcma2-BB	6295	2723	56	164	89	252
8ss-抗-bcma2	5340	1354	<40	121	<40	191
未转导	<40	<40	47	<40	<40	<40

[0127] 因为用抗-bcma2 CAR及其变体转导的T-细胞与用抗-bcma1 CAR转导的T-细胞相比表现出对表达BCMA的细胞稍微更强的且更特异性的识别,所以在下述实验中仅使用抗-bcma2 CAR和抗-bcma2 CAR变体。

[0128] CD107a测定

[0129] 在2个单独的管子中制备了2种T-细胞群体。一个管子含有BCMA-K562细胞,另一个管子含有NGFR-K562细胞。两个管子还含有用抗-bcma2 CAR和抗-bcma2 CAR变体转导的T-细胞、1mL AIM VTM培养基(Life Technologies,Carlsbad,CA)+5%人血清、滴定浓度的抗-CD107a抗体(eBioscience,Inc.,San Diego,CA;克隆eBioH4A3)和1 μ L Golgi Stop(BD Biosciences,Franklin Lakes,NJ)。将所有管子在37 $^{\circ}$ C温育4小时,然后针对CD3、CD4和CD8的表达进行染色。

[0130] 得自3个不同受试者的CAR-转导的T-细胞特异性地响应于表达BCMA的靶细胞的刺激而上调CD107a(参见图4A-4C)。这指示T-细胞的BCMA-特异性的脱粒的发生,所述脱粒是穿孔蛋白介导的细胞毒性的先决条件(参见,例如,Rubio等人,Nature Medicine,9(11):1377-1382(2003))。另外,当在体外用靶细胞刺激时,表达抗-bcma2 CAR变体8ss-

抗-bcma2、抗-bcma2-BB、抗-bcma2-0X40的T-细胞以BCMA-特异性的方式脱粒,如在图5A-5D中所示。

[0131] 细胞内细胞因子染色测定 (ICCS)

[0132] 如上所述在2个单独的管子中制备BCMA-K562细胞群体和 NGFR-K562细胞群体。2个管子还含有得自骨髓瘤患者2的用抗-bcma2 CAR转导的T-细胞、1mL AIM V培养基 (Life Technologies, Carlsbad, CA) +5%人血清和1μL Golgi Stop (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)。将所有的管子在37℃温育6小时。将细胞用抗-CD3、抗-CD4和抗-CD8抗体进行表面染色。将细胞渗透化处理,并按照Cytofix/Cytoperm试剂盒 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 的说明书,针对IFN γ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, 克隆B27)、IL-2 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, 克隆MQ1-17H12) 和TNF (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, 克隆 MAb11) 进行细胞内染色。

[0133] 在用表达BCMA的靶细胞刺激6小时以后,得自骨髓瘤患者2的用抗-bcma2 CAR转导的T-细胞大群体以BCMA-特异性的方式特异性地产生了细胞因子IFN γ 、IL-2和TNF,如在图6A-6C中所示。

[0134] 增殖测定

[0135] 评估了用抗-bcma2 CAR转导的T-细胞在用表达BCMA的靶细胞刺激时增殖的能力。具体地,将 0.5×10^6 个经照射的BCMA-K562细胞或 0.5×10^6 个经照射的NGFR-K562细胞与总共 1×10^6 个已经用抗-bcma2 CAR或SP6 CAR转导的T-细胞共培养。如在Mannering等人, J. Immunological Methods, 283 (1-2): 173-183 (2003) 中所述,将T-细胞用羧基 荧光素二乙酸酯琥珀酰亚胺基酯 (CFSE) (Life Technologies, Carlsbad, CA) 标记。在共培养物中使用的培养基是AIM VTM培养基 (Life Technologies, Carlsbad, CA) +5%人AB血清。将IL-2加入培养基中。起始以后4天,通过用锥虫蓝进行死细胞排除,计数每种共培养物中的活细胞。然后通过用多克隆生物素-标记的山羊-抗-人BCMA抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN)、继之以抗生蛋白链菌素 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)、抗-CD38抗体 (eBioscience, Inc., San Diego, CA) 和抗-CD56抗体 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 对T-细胞染色,进行流式细胞计量术。使用FlowJo软件 (Tree Star, Inc., Ashland, OR) 进行流式细胞计量术数据分析。

[0136] 相对于与阴性对照NGFR-K562细胞一起培养时,表达抗-bcma2 CAR 的T-细胞当与BCMA-K562细胞一起培养时表现出更大的CFSE稀释度,如在图7A中所示。这些结果指示,用抗-bcma2 CAR转导的T-细胞在用表达BCMA的靶细胞刺激时特异性地增殖。相反,当将表达SP6 CAR 的T-细胞与BCMA-K562靶细胞或NGFR-K562靶细胞一起培养时,CFSE 稀释没有显著差异 (参见图7B),这证实了表达SP6 CAR的T-细胞缺乏 BCMA-特异性的增殖。

[0137] 在增殖测定开始时,将 0.8×10^6 个表达抗-bcma2 CAR的T-细胞与 BCMA-K562细胞或NGFR-K562细胞一起培养。培养4天以后, 2.7×10^6 个表达抗-bcma2 CAR的T-细胞存在于含有BCMA-K562细胞的培养物中,而仅 0.6×10^6 个表达抗-bcma2 CAR的T-细胞存在于含有NGFR-K562 细胞的培养物中。表达抗-bcma2 CAR的T-细胞的绝对数目的这种 BCMA-特异性的增加指示,这些T-细胞响应于BCMA而增殖。

[0138] 本实施例的结果证实,表达本发明的CAR的T-细胞表现出BCMA-特异性的细胞因子产生、脱粒和增殖。

[0139] 实施例4

[0140] 本实施例证实,表达本发明的抗-BCMA CAR的T-细胞能够破坏多发性骨髓瘤细胞系。

[0141] 进行细胞毒性测定,以确定实施例2和3中描述的抗-bcma2 CAR转导的T-细胞是否破坏表达BCMA的多发性骨髓瘤(MM)细胞系。具体地,使用在例如以下文献中描述的测定,将表达BCMA的靶细胞(即,多发性骨髓瘤细胞系H929和RPMI8226)的存活与阴性对照CCRF-CEM细胞的存活进行对比,从而测量靶细胞的细胞毒性:Kochenderfer等人,J. Immunotherapy,32(7):689-702(2009),和Hermans等人,J. Immunological Methods,285(1):25-40(2004)。

[0142] 在相同管子中,将大约50,000个表达BCMA的靶细胞和50,000个 CCRF-CEM细胞与不同数目的CAR-转导的T-细胞组合。将CCRF-CEM 阴性对照细胞用荧光染料5-(和-6)-(((4-氯甲基)苯甲酰基)氨基)四甲基罗丹明(CMTMR)(Life Technologies,Carlsbad,CA)标记,并将表达BCMA的靶细胞用CFSE标记。在所有实验中,将用抗-bcma2 CAR转导的效应T-细胞的细胞毒性与得自相同受试者的用SP6 CAR转导的阴性对照效应T-细胞的细胞毒性进行对比。一式两份地以下述T-细胞:靶细胞比率在无 菌的5mL试管(BD Biosciences, Franklin Lakes,NJ)中建立共培养物:20.0:1、7:1、2:1和0.7:1。将培养物在37°C温育4小时。温育以后,立即加入7-氨基-放线菌素D(7AAD;BD Biosciences, Franklin Lakes,NJ)。针对每种T-细胞/靶细胞共培养物,确定表达BCMA的活靶细胞和活 CCRF-CEM阴性对照细胞的百分比。

[0143] 对于每种T-细胞/靶细胞共培养物,通过将表达BCMA的细胞的百分比除以CCRF-CEM阴性对照细胞的百分比,确定表达BCMA的靶细胞相对于CCRF-CEM阴性对照细胞的存活百分比。通过将每种T-细胞/靶细胞共培养物中的表达BCMA的靶细胞的存活百分比除以仅含有表达BCMA的靶细胞和CCRF-CEM阴性对照细胞而不含效应T-细胞的管子中的表达BCMA的靶细胞的百分比:CCRF-CEM阴性对照细胞的百分比的比率,计算经校正的表达BCMA的靶细胞的存活百分比。该校正是解释起始细胞数目的变化和自发靶细胞死亡所必需的。如下计算细胞毒性:

[0144] 表达BCMA的靶细胞的细胞毒性百分比=100-经校正的表达BCMA的靶细胞的存活百分比

[0145] 细胞毒性测定的结果显示在图7C和7D中。用抗-bcma2 CAR转导的T-细胞特异性地杀死了表达BCMA的多发性骨髓瘤细胞系H929和RPMI8226。相反,用SP6 CAR转导的T-细胞表现出对这些细胞系低得多的细胞毒性水平。

[0146] 本实施例的结果证实,编码抗-BCMA CAR的本发明核酸序列可以用在破坏多发性骨髓瘤细胞系的方法中。

[0147] 实施例5

[0148] 本实施例证实,表达本发明的抗-BCMA CAR的T-细胞能够破坏原代多发性骨髓瘤细胞。

[0149] 使用上述的方法,针对BCMA表达、以及BCMA-特异性的细胞因子产生、脱粒和增殖,评价了在实施例2中描述的原代多发性骨髓瘤细胞。

[0150] 在4个原代多发性骨髓瘤样品上、以及在得自骨髓瘤患者3的原发性骨髓多发性

骨髓瘤细胞上,检测了细胞表面BCMA表达(参见图8A)。表达BCMA的浆细胞占得自骨髓瘤患者3的骨髓样品中的细胞的40%。在与骨髓瘤患者3的未操作的骨髓细胞共培养以后,得自供体C的用抗-bcma2 CAR转导的同种异体T-细胞产生了IFN γ ,如在图8B中所示。得自相同同种异体供体的抗-bcma2 CAR-转导的T-细胞当与得自骨髓瘤患者3的外周血单核细胞(PBMC)一起培养时,产生了少得多的IFN γ 。另外,得自供体C的SP6-CAR-转导的T-细胞没有特异性地识别骨髓瘤患者3的骨髓。以前已经报道,正常的PBMC不含有表达BCMA的细胞(参见,例如,Ng等人,J. Immunology, 173 (2):807-817 (2004))。为了证实该观察结果,通过流式细胞计量术评估了患者3的PBMC的BCMA表达。除了占PBMC的大约0.75%的CD56+CD38^高细胞的小群体以外,患者3的PBMC不含有表达BCMA的细胞。该群体可能由循环的多发性骨髓瘤细胞组成。

[0151] 从骨髓瘤患者1切除的浆细胞瘤包含93%的浆细胞,且这些原代浆细胞表达BCMA,如在图8C中所示。当与骨髓瘤患者1的同种异体的、未操作的浆细胞瘤细胞一起培养时,得自骨髓瘤患者2的T-细胞产生了IFN γ 。当与得自骨髓瘤患者1的PBMC一起培养时,得自骨髓瘤患者2的T-细胞没有产生显著量的IFN γ 。用SP6 CAR转导的得自骨髓瘤患者2的T-细胞当与得自骨髓瘤患者1的浆细胞瘤细胞或PBMC一起培养时,没有产生显著量的IFN γ 。如通过流式细胞计量术测量的,骨髓瘤患者1的PBMC没有表达BCMA。

[0152] 成功地培养了骨髓瘤患者1(其已经接受8个先前的骨髓瘤治疗循环)的T-细胞,并用编码抗-bcma2 CAR的慢病毒载体转导。开始培养以后8天,在65%的T-细胞上检测到抗-bcma2 CAR的表达。得自骨髓瘤患者1的表达抗-bcma2 CAR的T-细胞特异性地响应于自体浆细胞瘤细胞而产生IFN γ (图8D)。得自骨髓瘤患者1的表达SP6 CAR的T-细胞没有识别自体浆细胞瘤细胞。表达抗-bcma2 CAR的T-细胞和表达SP6 CAR的T-细胞没有识别自体PBMC。得自骨髓瘤患者1的表达抗-bcma2 CAR的T-细胞也在低效应物:靶标比率特异性地杀死了自体浆细胞瘤细胞。相反,得自骨髓瘤患者1的表达SP6 CAR的T-细胞对自体浆细胞瘤细胞表现出低水平的细胞毒性(图8E)。

[0153] 本实施例的结果证实,本发明的抗-BCMA CAR能够用在破坏原代多发性骨髓瘤细胞的方法中。

[0154] 实施例6

[0155] 本实施例证实,表达本发明的抗-BCMA CAR的T-细胞能够破坏在 小鼠中建立的肿瘤。

[0156] 给免疫缺陷的NSG小鼠(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, Jackson Laboratory)真皮内注射 8×10^6 个RPMI8226细胞。允许肿瘤生长17-19天,然后给小鼠静脉内输注 8×10^6 个用抗-bcma2 CAR或SP6 CAR转导的人T-细胞。每3天用测径器测量肿瘤。将最长长度乘以与所述最长长度垂直的长度,得到以mm²计的肿瘤大小(面积)。当最长长度达到15mm时,将小鼠处死。动物研究得到国立癌症研究所动物护理和使用委员会(National Cancer Institute Animal Care and Use Committee)批准。

[0157] 本实施例的结果显示在图9A和9B中。在第6天左右,用抗-bcma2-转导的T-细胞治疗的小鼠表现出肿瘤大小的减小,并在第15天根除肿瘤。另外,所有用抗-bcma2-转导的T-细胞治疗的小鼠存活至T-细胞输注后30天。

[0158] 本实施例的结果证实,本发明的抗-BCMA CAR能够破坏体内多发性骨髓瘤细胞。

[0159] 在本文中引用的所有参考文献(包括出版物、专利申请和专利)特此通过引用并入,达到与个别地且明确地指出每篇参考文献通过引用并入并且在本文中完全阐述相同的程度。

[0160] 术语“一个”和“一种”和“所述”和类似指示物在描述本发明的上下文中(特别是在下述权利要求中)的应用应当解释为覆盖单数和复数,除非在本文中另外指出或与上下文明显矛盾。除非另外指出,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应当解释为末端开放的术语(即,意指“包括、但不限于”)。除非在本文中另外指出,否则本文中数值范围的列举仅意图充当个别地提及落入该范围内的每个单独值的速记方法,且每个单独值如同在本文中个别地阐述一样并入说明书中。可以以任意合适的次序执行本文描述的所有方法,除非在本文中另外指出或以其它方式与上下文明显矛盾。本文提供的任意和所有实施例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用,仅仅意图更好地阐释本发明,且不构成对本发明范围的限制,除非另有声明。在说明书中的语言不应解释为,指示任何没有声明的要素是实践本发明所必需的。

[0161] 本文描述了本发明的优选实施方案,包括本发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。本领域普通技术人员在阅读前述描述以后,那些优选实施方案的变化可以变得显而易见。发明人预见到技术人员会根据需要采用这样的变体,并且本发明的发明人会以不同于本文具体描述的方式实现。因此,本发明包括适用法律允许的、所附权利要求阐明的主题的所有改进方案和等同方案。此外,本发明包括上述元件以其所有可能变化的任意组合,除非本文另外指明或者以其它方式与上下文明显矛盾。

序列表

<110> 美国卫生和人力服务部 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES)

<120> 靶向B-细胞成熟抗原的嵌合抗原受体

<130> 712361

<150> US 61/622,600

<151> 2012-04-11

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1512

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的

<400> 1

atggccctgc ctgtgacagc tctgtctgtg cccctggccc tgctgctcca tgccgccaga	60
cccgacatcg tgctgacca gagcccccc agcctggcca tgtctctggg caagagagcc	120
accatcagct gccgggccag cgagagcgtg accatcctgg gcagccacct gatctactgg	180
tatcagcaga agcctggcca gccccccacc ctgtgatcc agctggctag caatgtgcag	240
accggcgtgc ccgccagatt cagcggcagc ggcagcagaa ccgacttcac cctgaccatc	300
gaccccgctgg aagaggacga cgtggccgtg tactactgcc tgcagagccg gaccatcccc	360
cggacctttg gcggagggaac aaagctggaa atcaaggga gcaccagcgg ctccggcaag	420
cctggctctg gcgagggcag cacaaggga cagattcagc tgggtgcagag cggccctgag	480
ctgaagaaac ccggcgagac agtgaagatc agctgcaagg cctccggcta caccttcgg	540
cactacagca tgaactgggt gaaacaggcc cctggcaagg gcctgaagtg gatgggccgg	600
atcaacaccg agagcggcgt gcccatctac gccgacgact tcaagggcag attgccttc	660
agcgtggaaa ccagcgccag caccgcctac ctggtgatca acaacctgaa ggacgaggat	720
accgccagct acttctgcag caacgactac ctgtacagcc tggacttctg gggccagggc	780
accgccctga ccgtgtccag cttcgtgcct gtgttctgc ccgccaagcc caccaccacc	840
cctgccccta gacctccac ccagcccca acaatcgcca gccagcctct gtccctgcgg	900
cccgaagcct gtagacctgc tgccggcgga gccgtgcaca ccagaggcct ggatttcgcc	960
tgcgacatct acatctgggc ccctctggcc ggcacctgtg gcgtgctgct gctgagcctg	1020
gtgatcacc tgtactgcaa ccaccggaac agaagcaagc ggagccggct gctgcacagc	1080
gactacatga acatgacccc aagacggcct ggccccacc ggaagcacta ccagccttac	1140
gccccctcca gagacttcgc cgcctaccgg tccagagtga agttcagcag atccgccgac	1200

gccccctgcct accagcaggg acagaaccag ctgtacaacg agctgaacct gggcagacgg	1260
gaagagtacg acgtgctgga caagcggaga ggccgggacc ccgagatggg cggaagagccc	1320
agacggaaga acccccagga aggcctgtat aacgaactgc agaaagacaa gatggccgag	1380
gcctacagcg agatcggcat gaagggcgag cggaggcgcg gcaagggccca cgatggcctg	1440
taccagggcc tgagcaccgc caccaaggac acctacgacg ccctgcacat gcaggccctg	1500
ccccccagat ga	1512
<210> 2	
<211> 1512	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<221>	
<222>	
<223> 合成的	
<400> 2	
atggccctgc ctgtgacagc tctgtcctc cctctggccc tgctgctcca tgccgccaga	60
cccgacatcg tgctgaccca gagccccccc agcctggcca tgtctctggg caagagagcc	120
accatcagct gccgggccag cgagagcgtg accatcctgg gcagccacct gatccactgg	180
tatcagcaga agccccggcca gccccccacc ctgtctgatcc agctcgccag caatgtgcag	240
accggcgtgc ccgccagatt cagcggcagc ggcagcagaa ccgacttcac cctgaccatc	300
gaccccgctgg aagaggacga cgtggccgtg tactactgcc tgcagagccg gaccatcccc	360
cggacctttg gcggaggcac caaactggaa atcaagggca gcaccagcgg ctccggcaag	420
cctggctctg gcgagggcag cacaaggga cagattcagc tgggtgcagag cggccctgag	480
ctgaagaaac ccggcgagac agtgaagatc agctgcaagg cctccggcta caccttcacc	540
gactacagca tcaactgggt gaaaagagcc cctggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg	600
atcaacaccg agacaagaga gcccgcctac gcctacgact tccggggcag attcgccttc	660
agcctggaaa ccagcgccag caccgcctac ctgcagatca acaacctgaa gtacaggac	720
accgccacct acttttgcgc cctggactac agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
accagcgtga ccgtgtccag cttcgtgccc gtgttctgc ccgccaaacc taccaccacc	840
cctgccccta gacctccac ccagcccca acaatcgcca gccagcctct gtctctgcgg	900
cccgaagcct gtagacctgc tgccggcgga gccgtgcaca ccagaggcct ggacttcgcc	960
tgcgacatct acatctgggc ccctctggcc ggcacctgtg gcgtgctgct gctgagcctg	1020
gtgatcaccg tgactgcaa ccaccggaac agaagcaagc ggagccggct gctgcacagc	1080
gactacatga acatgacccc aagacggcct ggccccacc ggaagcacta ccagccttac	1140
gccccctcca gagacttcgc cgcctaccgg tccagagtga agttcagcag atccgccgac	1200
gccccctgcct accagcaggg acagaaccag ctgtacaacg agctgaacct gggcagacgg	1260
gaagagtacg acgtgctgga caagcggaga ggccgggacc ccgagatggg cggaagagccc	1320
agacggaaga acccccagga aggcctgtat aacgaactgc agaaagacaa gatggccgag	1380
gcctacagcg agatcggcat gaagggcgag cggaggcgcg gcaagggccca cgatggcctg	1440

taccagggcc	tgagcaccgc	caccaaggac	acctacgacg	ccctgcacat	gcaggccctg	1500
ccccccagat	ga					1512
<210>	3					
<211>	1512					
<212>	DNA					
<213>	人工序列(Artificial Sequence)					
<220>						
<221>						
<222>						
<223>	合成的					
<400>	3					
atggctctgc	ctgtgacagc	tctgtctgtg	cctctggccc	tgctgctgca	tgccgccaga	60
cctgatatcg	tgctgaccca	gagccctccc	agcctggcca	tgtctctggg	caagagagcc	120
accatcagct	gcagagccag	cgagagcgtg	accatcctgg	gcagccacct	gatctactgg	180
tatcagcaga	agccccggcca	gccccccaca	ctgctgattc	agctggcctc	caatgtgcag	240
accggcgtgc	cagccagatt	ttccggcagc	ggcagcagaa	ccgacttcac	cctgaccatc	300
gaccccgtag	aagaggacga	cgtggccgtg	tactactgcc	tgagagcag	aaccatcccc	360
cggacctttg	gcggaggcac	caagctggaa	atcaagggca	gcaccagcgg	ctccggcaag	420
cctggatctg	gcgagggatc	taccaaggga	cagatccagc	tggtgcagag	cggccctgag	480
ctgaagaaac	ccggcgagac	agtgaagatc	tcctgcaagg	ccagcggcta	caccttcacc	540
cactacagca	tgaactgggt	caagcaggcc	cctggcaagg	gcctgaagtg	gatgggccgg	600
atcaacaccg	agacaggcga	gcccctgtac	gccgacgact	ttaagggcag	attcgccttc	660
agcctggaaa	ccagcgccag	caccgcctac	ctcgtgatca	acaacctgaa	gaacgaggac	720
accgccacct	ttttctgctc	caacgactac	ctgtacagct	gcgactactg	gggccagggc	780
accaccctga	cagtgtctag	cttcgtgccc	gtgttcctgc	ccgccaagcc	tacaacaacc	840
cctgccccta	gacctccac	cccagcccct	acaattgcct	ctcagcctct	gagcctgagg	900
cccgaggctt	gtagaccagc	tgctggcgga	gccgtgcaca	ccagaggact	ggatttcgcc	960
tgcgacatct	acatctgggc	ccctctggcc	ggcacctgtg	gcgtgctgct	gctgagcctg	1020
gtgatcaccc	tgtactgcaa	ccaccggaac	agaagcaagc	ggagccggct	gctgcacagc	1080
gactacatga	acatgacccc	aagacggcct	ggccccaccc	ggaagcacta	ccagccttac	1140
gccccctcca	gagacttcgc	cgcctaccgg	tccagagtga	agttcagcag	atccgccgac	1200
gccccctgcct	accagcaggg	acagaaccag	ctgtacaacg	agctgaacct	gggcagacgg	1260
gaagagtacg	acgtgctgga	caagcggaga	ggccgggacc	ccgagatggg	cggaaagccc	1320
agacggaaga	acccccagga	aggcctgtat	aacgaactgc	agaaagacaa	gatggccgag	1380
gcctacagcg	agatcggcac	gaagggcgag	cggaggcgcg	gcaagggcca	cgatggcctg	1440
taccagggcc	tgagcaccgc	caccaaggac	acctacgacg	ccctgcacat	gcaggccctg	1500
ccccccagat	ga					1512
<210>	4					
<211>	503					

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的

<400> 4

```

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

```

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

<210> 5

<211> 503

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的

<400> 5

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

290	295	300
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala		
305	310	315
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu		320
	325	330
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser		335
	340	345
Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg		350
	355	360
Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg		365
370	375	380
Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp		
385	390	395
Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn		400
	405	410
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg		415
	420	425
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly		430
435	440	445
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu		
450	455	460
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu		
465	470	475
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His		480
	485	490
		495
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
500		
<210> 6		
<211> 503		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<221>		
<222>		
<223> 合成的		
<400> 6		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu		15

20	25	30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg	Ala Thr Ile Ser Cys Arg	Ala Ser Glu
35	40	45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His	Leu Ile Tyr Trp Tyr	Gln Gln Lys
50	55	60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu	Ile Gln Leu Ala Ser Asn	Val Gln
65	70	75
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser	Gly Ser Gly Ser Arg Thr	Asp Phe
85	90	95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu	Glu Asp Asp Val Ala Val	Tyr Tyr
100	105	110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro	Arg Thr Phe Gly Gly Gly	Thr Lys
115	120	125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser	Gly Ser Gly Lys Pro Gly	Ser Gly
130	135	140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile	Gln Leu Val Gln Ser Gly	Pro Glu
145	150	155
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val	Lys Ile Ser Cys Lys Ala	Ser Gly
165	170	175
Tyr Thr Phe Thr His Tyr Ser Met	Asn Trp Val Lys Gln Ala	Pro Gly
180	185	190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Arg	Ile Asn Thr Glu Thr Gly	Glu Pro
195	200	205
Leu Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly	Arg Phe Ala Phe Ser Leu	Glu Thr
210	215	220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Val	Ile Asn Asn Leu Lys Asn	Glu Asp
225	230	235
Thr Ala Thr Phe Phe Cys Ser Asn	Asp Tyr Leu Tyr Ser Cys	Asp Tyr
245	250	255
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr	Val Ser Ser Phe Val Pro	Val Phe
260	265	270
Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr	Pro Ala Pro Arg Pro Pro	Thr Pro
275	280	285
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro	Leu Ser Leu Arg Pro Glu	Ala Cys
290	295	300
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val	His Thr Arg Gly Leu Asp	Phe Ala
305	310	315
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro	Leu Ala Gly Thr Cys Gly	Val Leu
325	330	335

Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser
 340 345 350
 Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
 355 360 365
 Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
 370 375 380
 Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 385 390 395 400
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 405 410 415
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 420 425 430
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 435 440 445
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 450 455 460
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 465 470 475 480
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 485 490 495
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500

<210> 7
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <221>
 <222>
 <223> 合成的
 <400> 7

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15

Lys Gly
 <210> 8
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>

<221>

<222>

<223> 合成的

<400> 8

```

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

```

275	280	285
Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg		
290	295	300
Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly		
305	310	315
Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr		
325	330	335
Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His		
340	345	350
Arg Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn		
355	360	365
Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr		
370	375	380
Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser		
385	390	395
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
405	410	415
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
420	425	430
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
435	440	445
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
450	455	460
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly		
465	470	475
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		
485	490	495
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
500	505	

<210> 9

<211> 506

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的

<400> 9

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1													5													10													15
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Pro	Ser	Leu																								
				20								25								30																			
Ala	Met	Ser	Leu	Gly	Lys	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu																								
				35								40								45																			
Ser	Val	Thr	Ile	Leu	Gly	Ser	His	Leu	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys																								
				50								55								60																			
Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Ile	Gln	Leu	Ala	Ser	Asn	Val	Gln																								
65					70								75								80																		
Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Phe																								
				85								90								95																			
Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Pro	Val	Glu	Glu	Asp	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr																								
				100								105								110																			
Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Thr	Ile	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys																								
				115								120								125																			
Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly																								
				130								135								140																			
Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu																								
145					150								155								160																		
Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly																								
				165								170								175																			
Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly																								
				180								185								190																			
Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro																								
				195								200								205																			
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr																								
				210								215								220																			
Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Tyr	Glu	Asp																								
225					230								235								240																		
Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr																								
				245								250								255																			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Phe	Val																								
				260								265								270																			
Pro	Val	Phe	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro																								
				275								280								285																			
Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro																								
				290								295								300																			
Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu																								
305					310								315								320																		

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys		
325	330	335
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg		
340	345	350
Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met		
355	360	365
Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala		
370	375	380
Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg		
385	390	395
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn		
405	410	415
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg		
420	425	430
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro		
435	440	445
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala		
450	455	460
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His		
465	470	475
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp		
485	490	495
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
500	505	

<210> 10

<211> 512

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的

<400> 10

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

Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys		
50	55	60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln		
65	70	75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe		
	85	90 95
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr		
	100	105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys		
	115	120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly		
	130	135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu		
145	150	155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly		
	165	170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly		
	180	185 190
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro		
	195	200 205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr		
	210	215 220
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp		
225	230	235 240
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr		
	245	250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val		
	260	265 270
Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro		
	275	280 285
Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro		
	290	295 300
Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu		
305	310	315 320
Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys		
	325	330 335
Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg		
	340	345 350
Asn Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile		

355	360	365
Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg	Pro Val Gln Thr Thr	Gln Glu Glu Asp
370	375	380
Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro	Glu Glu Glu Gly Gly Cys	Glu Leu
385	390	395
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser	Ala Asp Ala Pro Ala Tyr	Gln Gln Gly
405	410	415
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu	Leu Asn Leu Gly Arg Arg	Glu Glu Tyr
420	425	430
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg	Gly Arg Asp Pro Glu Met	Gly Gly Lys
435	440	445
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln	Glu Gly Leu Tyr Asn Glu	Leu Gln Lys
450	455	460
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr	Ser Glu Ile Gly Met Lys	Gly Glu Arg
465	470	475
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp	Gly Leu Tyr Gln Gly Leu	Ser Thr Ala
485	490	495
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala	Leu His Met Gln Ala Leu	Pro Pro Arg
500	505	510
<210>	11	
<211>	502	
<212>	PRT	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<221>		
<222>		
<223>	合成的	
<400>	11	
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala	Leu Leu Leu Pro Leu Ala	Leu Leu Leu
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile	Val Leu Thr Gln Ser Pro	Pro Ser Leu
20	25	30
Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg	Ala Thr Ile Ser Cys Arg	Ala Ser Glu
35	40	45
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser	His Leu Ile His Trp Tyr	Gln Gln Lys
50	55	60
Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu	Leu Ile Gln Leu Ala Ser	Asn Val Gln
65	70	75
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe	Ser Gly Ser Gly Ser Arg	Thr Asp Phe

				85					90					95			
Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Pro	Val	Glu	Glu	Asp	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr		
				100					105					110			
Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Thr	Ile	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys		
				115					120					125			
Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly		
				130					135					140			
Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu		
145									150					155			160
Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly		
				165					170					175			
Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly		
				180					185					190			
Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro		
				195					200					205			
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr		
				210					215					220			
Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Tyr	Glu	Asp		
225									230					235			240
Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr		
				245					250					255			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Phe	Val		
				260					265					270			
Pro	Val	Phe	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro		
				275					280					285			
Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro		
				290					295					300			
Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu		
305									310					315			320
Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys		
				325					330					335			
Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Asn	His	Arg		
				340					345					350			
Asn	Arg	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly		
				355					360					365			
Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	Gln	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Ala	His		
				370					375					380			
Ser	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala		
385									390					395			400

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 405 410 415
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 420 425 430
 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 435 440 445
 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 450 455 460
 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 465 470 475 480
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 485 490 495
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500

<210> 12

<211> 549

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 合成的

<400> 12

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu
 20 25 30
 Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
 35 40 45
 Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln
 65 70 75 80
 Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly
130						135						140			
Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu
145						150						160			
Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
			165						170			175			
Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly
			180						185			190			
Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro
195						200						205			
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr
210						215						220			
Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Tyr	Glu	Asp
225						230						240			
Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
			245						250			255			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Phe	Val
			260						265			270			
Pro	Val	Phe	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro
275						280						285			
Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro
290						295						300			
Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu
305						310						320			
Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys
			325						330			335			
Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Asn	His	Arg
			340						345			350			
Asn	Arg	Phe	Ser	Val	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile
355						360						365			
Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp
370						375						380			
Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu
385						390						400			
Arg	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly	Gly
			405						410			415			
Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	Gln	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Ala	His	Ser
			420						425			430			
Thr	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro

435	440	445
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly		
450	455	460
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro		
465	470	475
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr		
485	490	495
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly		
500	505	510
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln		
515	520	525
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln		
530	535	540
Ala Leu Pro Pro Arg		
545		

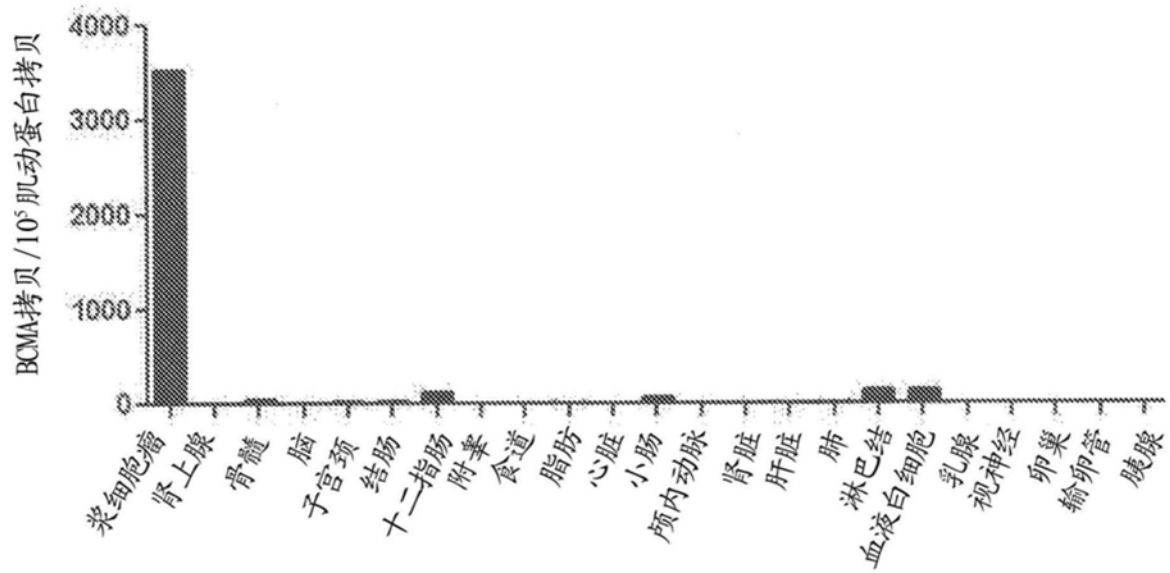


图1A

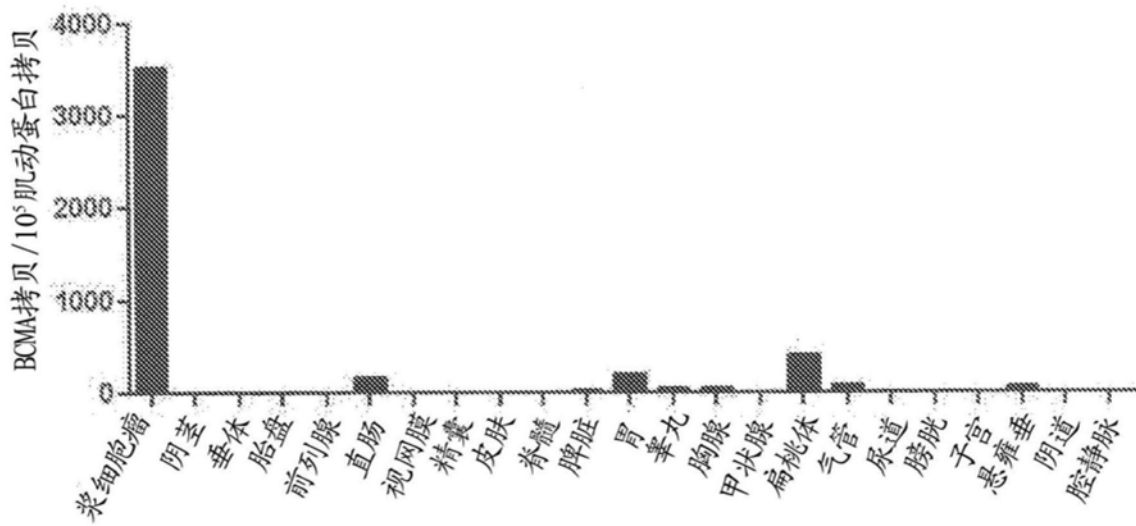


图1B

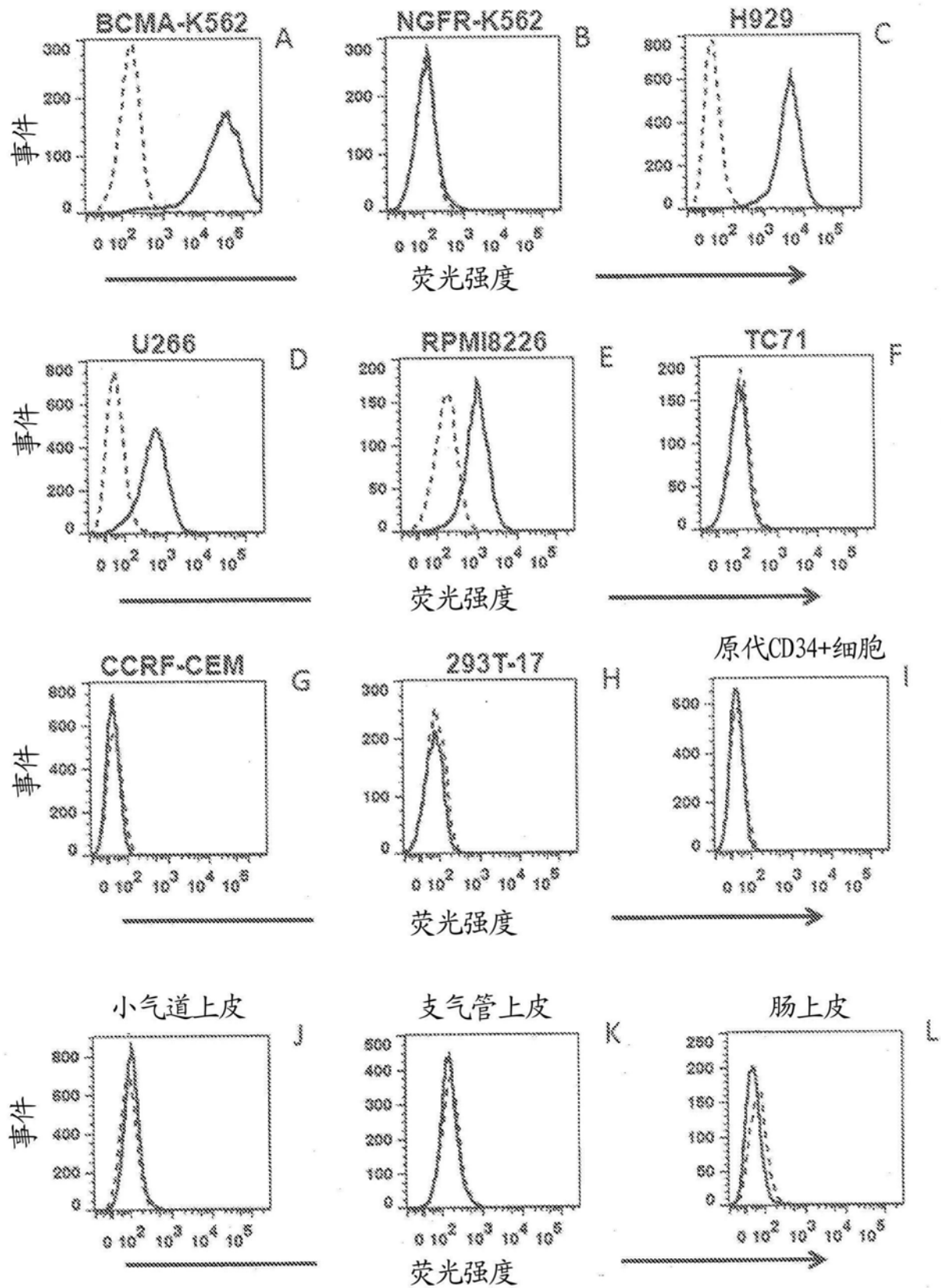


图2

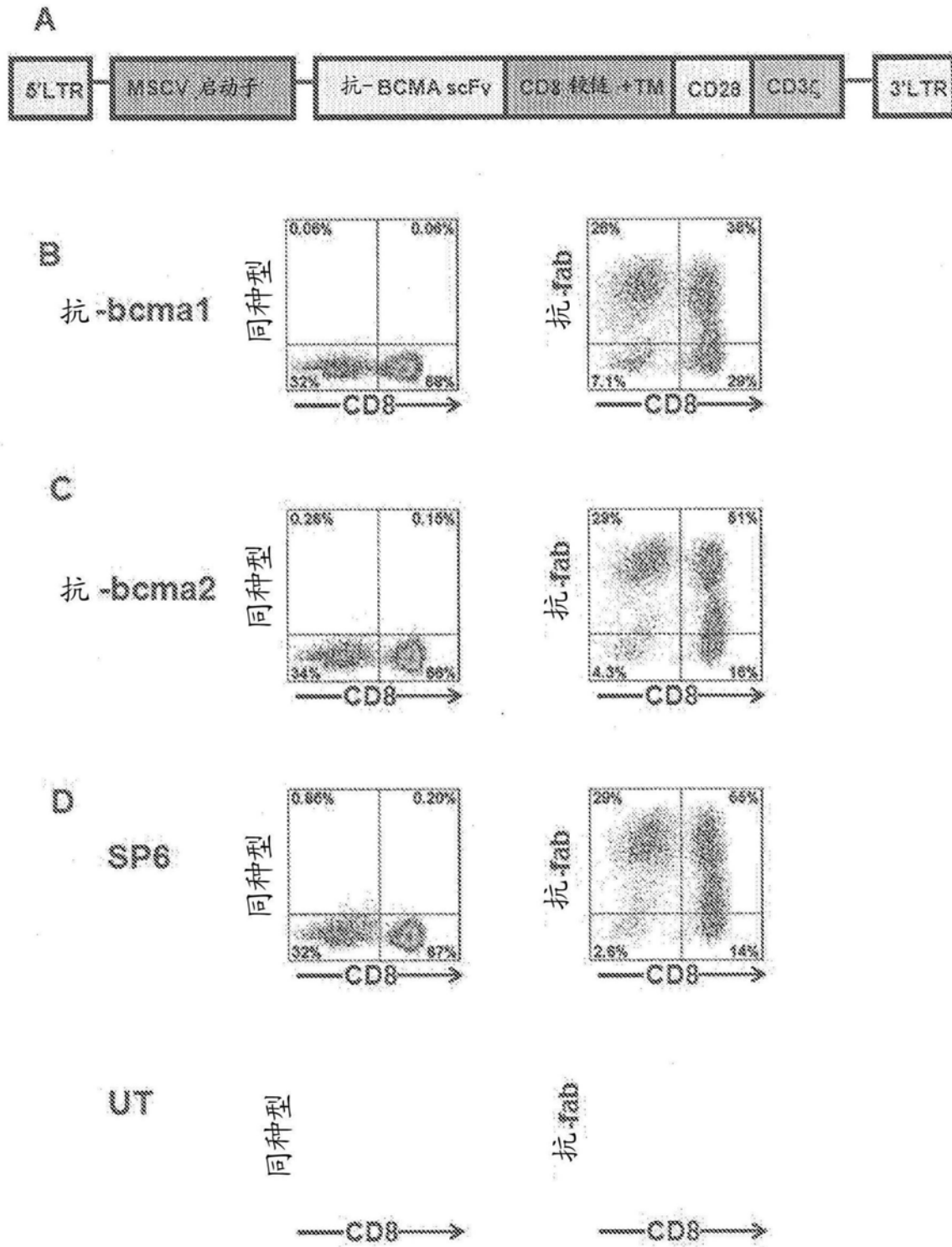


图3

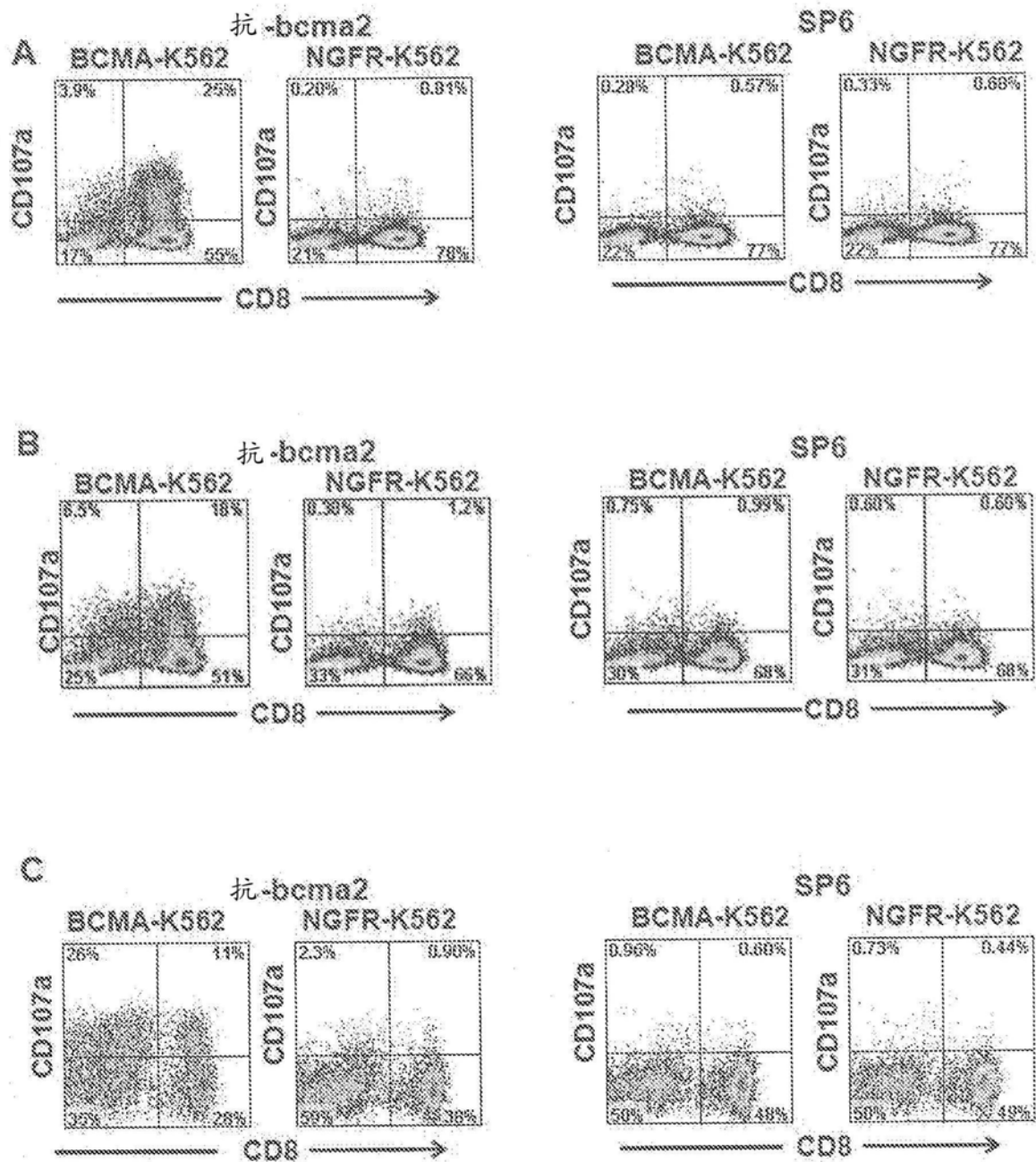


图4

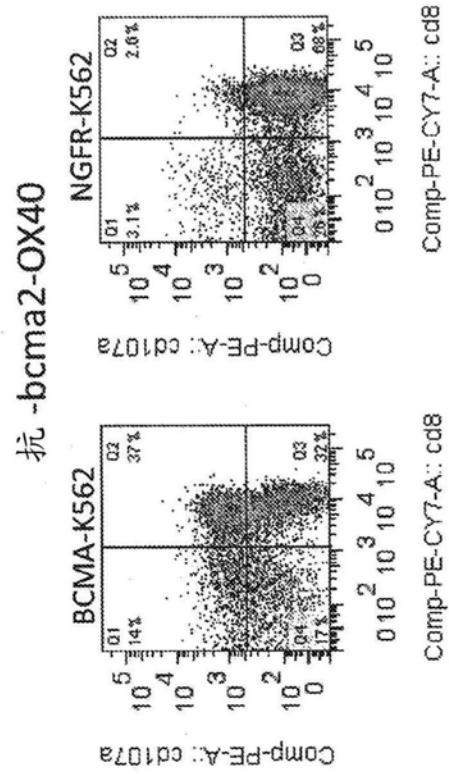


图5A

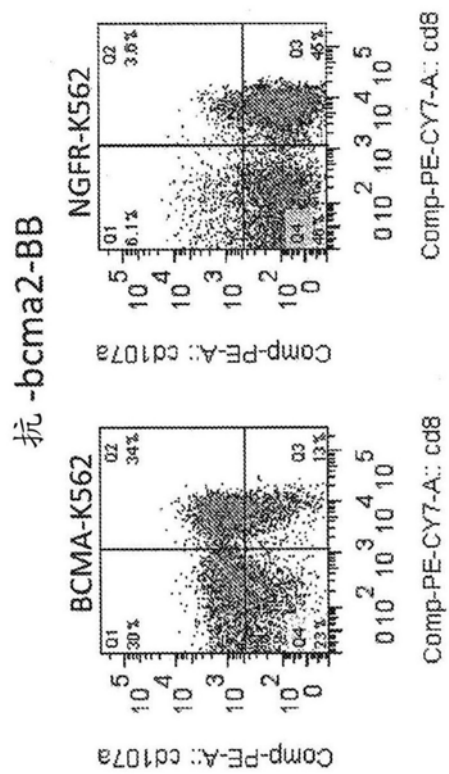


图5B

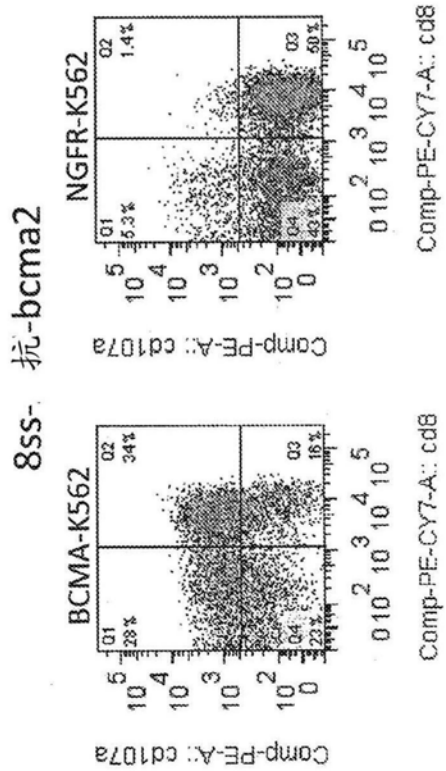


图5C

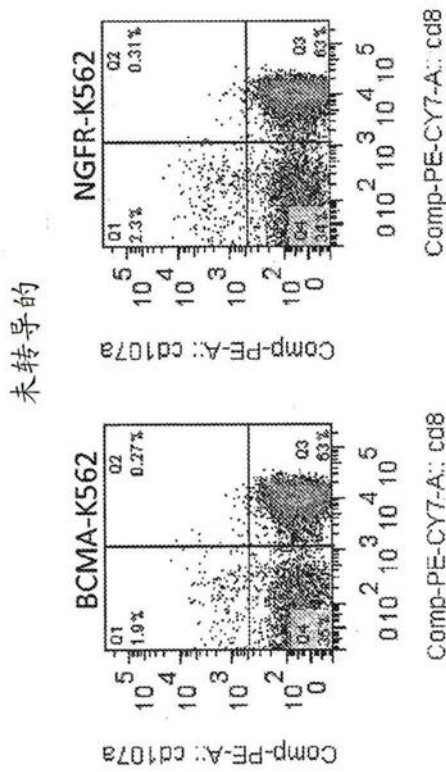


图5D

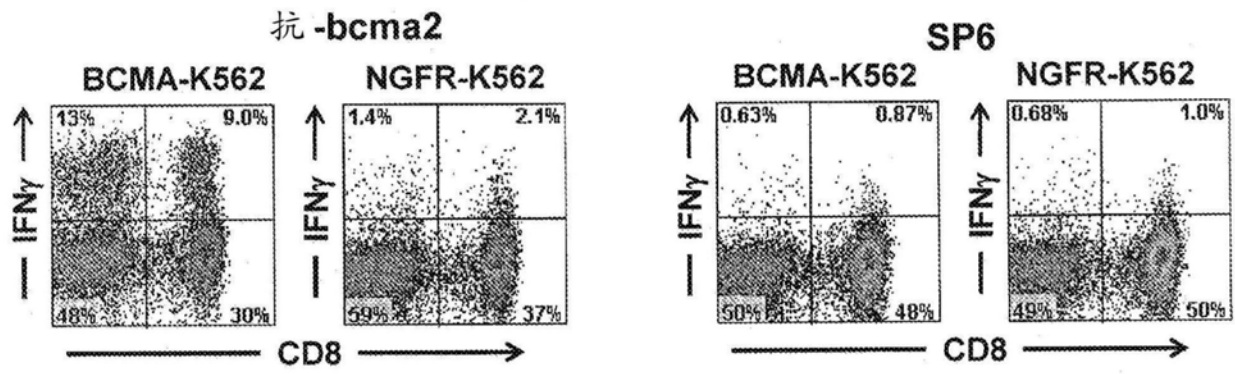


图6A

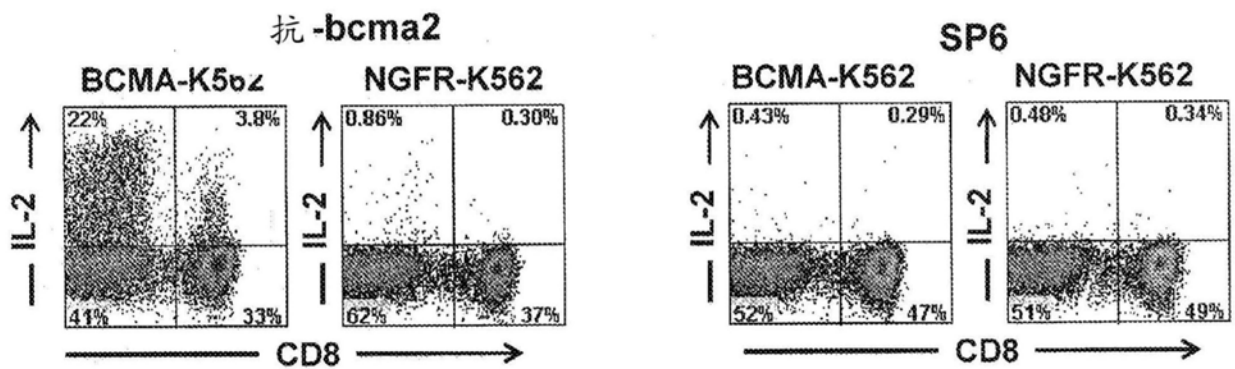


图6B

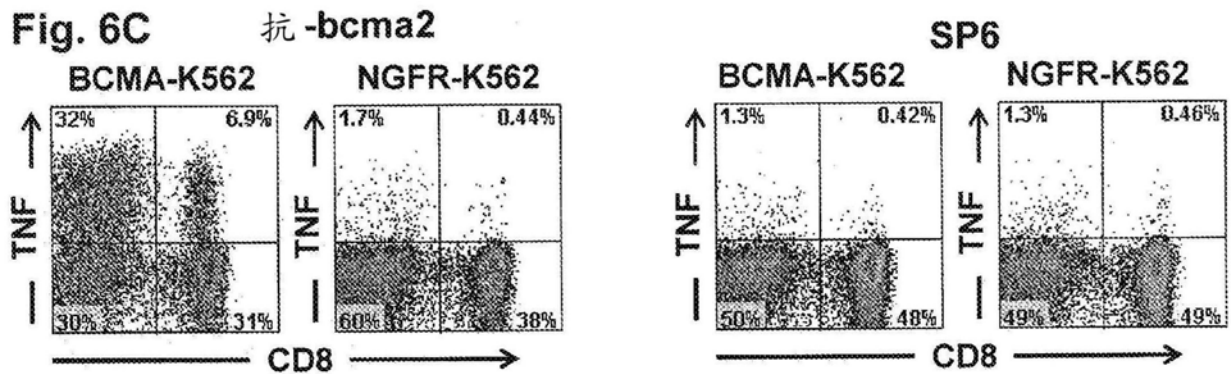


图6C

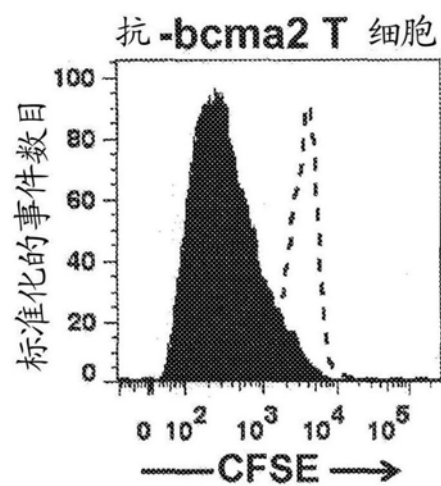


图7A

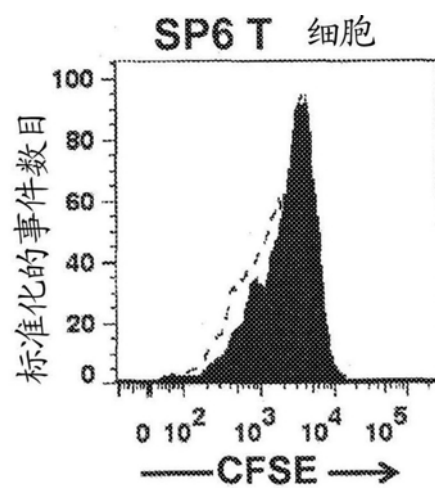


图7B

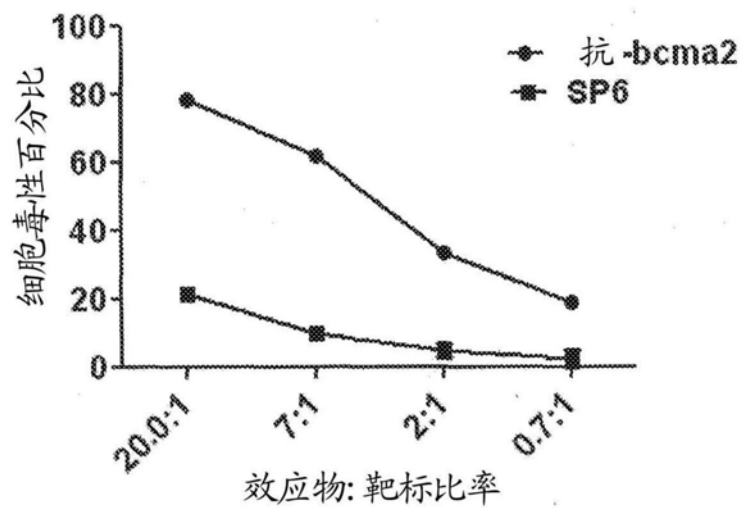


图7C

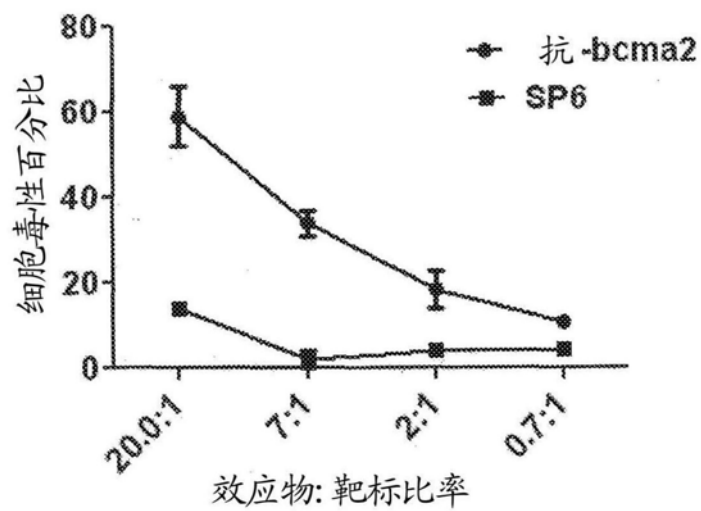


图7D

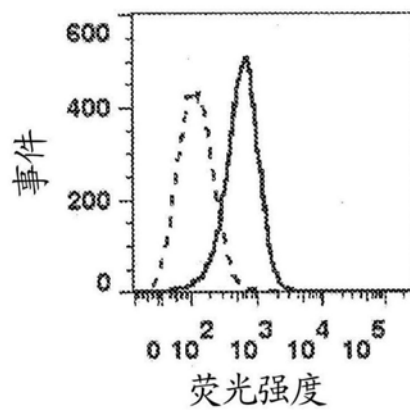


图8A

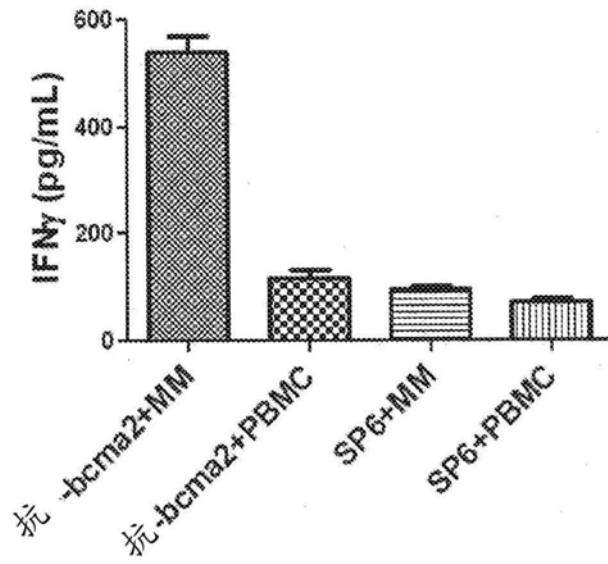


图8B

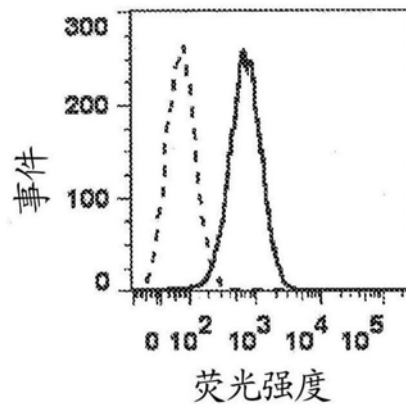


图8C

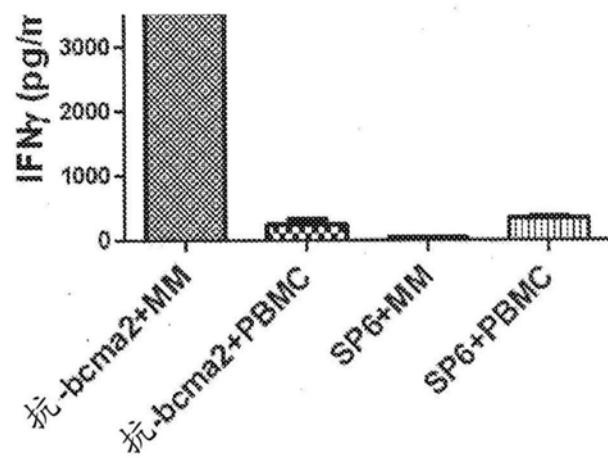


图8D

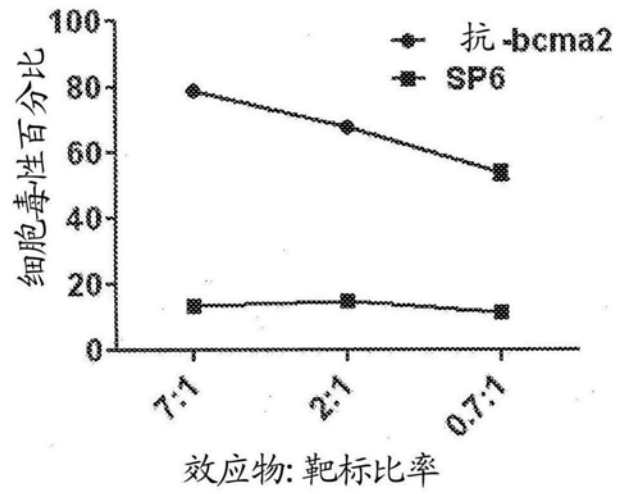


图8E

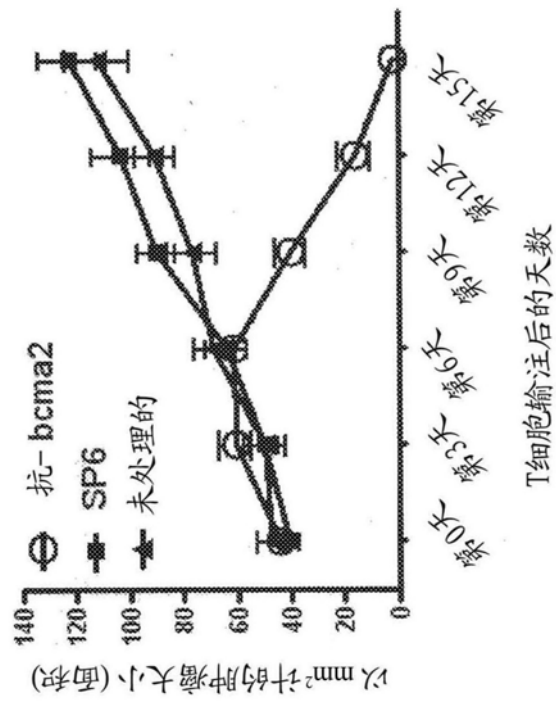


图9A

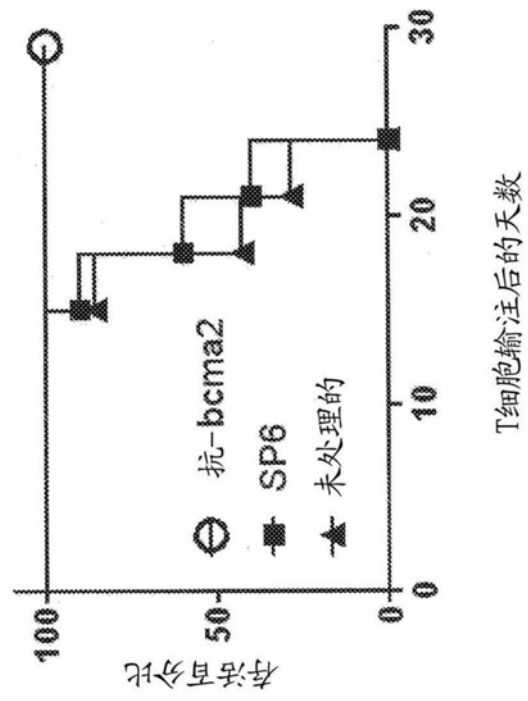


图9B