



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117480253 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 30

(21) 申请号 202280041004.7

(22) 申请日 2022.06.08

(30) 优先权数据

63/209019 2021.06.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2022/055355 2022.06.08

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/259190 EN 2022.12.15

(71) 申请人 詹森生物科技公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 S·L·伊曼纽尔

T·J·鲁特科斯基

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 黄登高 彭昶

(51) Int.Cl.

C12N 9/64 (2006.01)

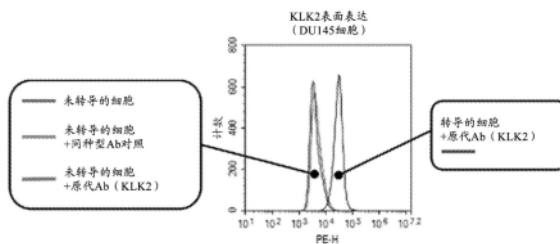
权利要求书3页 说明书27页
序列表16页 附图13页

(54) 发明名称

编码KLK2-GPI融合蛋白的核酸、重组细胞及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种编码激肽释放酶-2融合蛋白的重组核酸构建体。该激肽释放酶-2融合蛋白包含编码激肽释放酶-2 (KLK2) 的第一核苷酸序列和编码糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 附着序列的第二核苷酸序列,其中该编码GPI附着序列的核苷酸序列位于该编码KLK2的核苷酸序列的3'。还公开了载体、细胞制剂及其使用方法。



1. 一种编码激肽释放酶-2融合蛋白的重组核酸构建体,所述构建体包含:
编码激肽释放酶-2 (KLK2) 或其片段的第一核苷酸序列,和编码糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 附着序列的第二核苷酸序列,其中所述编码GPI附着序列的第二核苷酸序列位于所述编码激肽释放酶-2的第一核苷酸序列的3'。
2. 根据权利要求1所述的构建体,其中所述激肽释放酶-2是人激肽释放酶-2。
3. 根据权利要求1所述的构建体,其中所述第一核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其片段的激肽释放酶-2。
4. 根据权利要求1所述的构建体,其中所述编码激肽释放酶-2的第一核苷酸序列包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列或其片段。
5. 根据权利要求1所述的构建体,其中所述GPI附着序列来源于碱性磷酸酶。
6. 根据权利要求5所述的构建体,其中所述GPI附着序列来源于人胎盘碱性磷酸酶。
7. 根据权利要求5所述的构建体,其中所述第二核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或其片段的GPI附着序列。
8. 根据权利要求7所述的构建体,其中所述编码GPI附着序列的第二核苷酸序列包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的构建体,其中所述构建体的所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的激肽释放酶-2融合蛋白。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的构建体,其中所述构建体的所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列包含与SEQ ID NO:3的核苷酸序列具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。
11. 根据权利要求10所述的构建体,其中所述构建体包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列。
12. 根据权利要求1至10中任一项所述的构建体,所述构建体还包含:
位于所述编码激肽释放酶-2的第一核苷酸序列的5' 的启动子核苷酸序列。
13. 根据权利要求12所述的构建体,其中所述启动子核苷酸序列是哺乳动物启动子序列。
14. 根据权利要求13所述的构建体,其中所述启动子核苷酸序列是EF1 α 启动子核苷酸序列。
15. 一种载体,所述载体包含根据权利要求1至14中任一项所述的构建体。
16. 根据权利要求15所述的载体,其中所述载体是病毒载体。
17. 根据权利要求16所述的载体,其中所述病毒载体选自由以下组成的组:腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体、牛痘载体、逆转录病毒载体和单纯疱疹病毒载体。
18. 一种细胞,所述细胞包含根据权利要求1至14中任一项所述的重组构建体或根据权利要求15至17中任一项所述的载体。
19. 一种激肽释放酶-2融合蛋白,所述激肽释放酶-2融合蛋白由根据权利要求1至14中任一项所述的构建体或根据权利要求15至17中任一项所述的载体编码。
20. 根据权利要求19所述的激肽释放酶-2融合蛋白,其中所述融合蛋白包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。
21. 一种细胞制剂,其中所述制剂的细胞被修饰为在其表面表达重组激肽释放酶-2融

合蛋白,所述融合蛋白包含:

激肽释放酶-2多肽序列;

与所述激肽释放酶-2多肽序列在其C末端连接的糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着序列的一部分;和

与所述GPI附着序列的所述部分偶联的GPI锚定结构域。

22.根据权利要求21所述的制剂,其中所述激肽释放酶-2多肽序列是人激肽释放酶-2多肽序列。

23.根据权利要求21所述的制剂,其中所述激肽释放酶-2多肽序列包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其片段具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

24.根据权利要求23所述的制剂,其中所述激肽释放酶-2多肽序列包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其片段。

25.根据权利要求21至24中任一项所述的制剂,其中所述GPI附着序列的所述部分来源于碱性磷酸酶。

26.根据权利要求21至25中任一项所述的制剂,其中所述GPI附着序列的所述部分来源于人胎盘碱性磷酸酶。

27.根据权利要求21至26中任一项所述的制剂,其中所述GPI附着序列的所述部分包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的一部分。

28.根据权利要求21至27中任一项所述的制剂,其中所述激肽释放酶-2融合蛋白包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

29.根据权利要求28所述的制剂,其中所述激肽释放酶-2融合蛋白包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

30.根据权利要求21至29中任一项所述的制剂,其中所述制剂的细胞表达来自根据权利要求1至14中任一项所述的重组构建体或根据权利要求15至17中任一项所述的载体的所述激肽释放酶-2融合蛋白。

31.根据权利要求30所述的制剂,其中所述制剂的细胞包含稳定整合到其基因组中的所述重组构建体。

32.根据权利要求21至31中任一项所述的制剂,其中所述制剂的所述细胞是哺乳动物细胞。

33.根据权利要求21至32中任一项所述的制剂,其中所述制剂的细胞是人细胞。

34.根据权利要求21至32中任一项所述的制剂,其中所述制剂的细胞是啮齿动物细胞。

35.根据权利要求34所述的制剂,其中所述啮齿动物细胞是小鼠细胞。

36.根据权利要求21至35中任一项所述的制剂,其中所述细胞是前列腺细胞。

37.根据权利要求36所述的制剂,其中所述前列腺细胞是前列腺癌细胞。

38.根据权利要求21至37中任一项所述的制剂,其中所述制剂的细胞不表达内源激肽释放酶-2。

39.根据权利要求21至38中任一项所述的制剂,其中所述细胞制剂是细胞系。

40.一种非人动物,所述非人动物包含根据权利要求21至39中任一项所述的细胞制剂。

41.一种非人动物,所述非人动物包含在其表面表达重组激肽释放酶-2融合蛋白的细胞,所述融合蛋白包含:

- 激肽释放酶-2多肽序列；
与所述激肽释放酶-2多肽序列的C末端连接的糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 附着序列的一部分；和
与所述GPI附着序列的所述部分偶联的GPI锚定结构域。
42. 根据权利要求41所述的非人动物,其中所述非人动物的细胞用根据权利要求1至14中任一项所述的重组构建体或根据权利要求15至17所述的载体转导。
43. 根据权利要求41所述的非人动物,其中根据权利要求1至11中任一项所述的重组构建体被稳定地整合到所述非人动物的基因组中。
44. 根据权利要求41至43中任一项所述的非人动物,其中所述非人动物是啮齿动物。
45. 根据权利要求44所述的非人动物,其中所述啮齿动物是小鼠。
46. 一种鉴定结合激肽释放酶-2的药剂的方法,所述方法包括:
提供根据权利要求21至39中任一项所述的细胞制剂;
向所述细胞制剂施用候选药剂;以及
基于所述施用确定所述候选药剂是否结合激肽释放酶-2。
47. 一种鉴定结合激肽释放酶-2的药剂的方法,所述方法包括:
提供根据权利要求40至45中任一项所述的非人动物;
向所述非人动物施用候选药剂;以及
基于所述施用确定所述候选药剂是否结合激肽释放酶-2。
48. 根据权利要求46所述的方法,其中所述细胞制剂是癌细胞制剂。
49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述细胞制剂是前列腺癌细胞制剂。
50. 根据权利要求46至49中任一项所述的方法,其中所述候选药剂是候选激肽释放酶-2抑制剂。
51. 根据权利要求46至49中任一项所述的方法,其中所述候选药剂是抗激肽释放酶-2抗体。
52. 根据权利要求46至49中任一项所述的方法,其中所述候选药剂是激肽释放酶-2嵌合抗原受体 (CAR)。

编码KLK2-GPI融合蛋白的核酸、重组细胞及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年6月10日提交的美国临时申请序列号63/209,019的优先权,该临时申请的全部内容全文以引用方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] [0000.1]本申请包含序列表,该序列表已经以ASCII格式电子递交,并且据此全文以引用方式并入。创建于2022年4月21日的所述ASCII副本命名为JBI6578WOPCT1_SL.txt并且大小为33,873字节。

技术领域

[0005] 本发明涉及编码激肽释放酶-2融合蛋白的核酸构建体,以及载体、细胞制剂及其使用方法。

背景技术

[0006] 人激肽释放酶(KLK)家族由具有不同生物功能和组织分布的15种丝氨酸蛋白酶组成(Thorek等人,Thromb.Haemost.110(30):4840-92(2013))。激肽释放酶-2(KLK2)在正常前列腺、原发性前列腺癌和转移性去势抵抗性前列腺癌中高度且选择性地表达。其表达受雄激素调节并与雄激素受体表达密切相关。其组织特异性使其成为针对前列腺癌的治疗的有吸引力的靶标。然而,KLK2(也称为hK2,UniProt P20151)是具有催化活性的分泌性蛋白,其通常通过未知机制附着于前列腺肿瘤细胞表面。其在正常前列腺、原发性前列腺癌和转移性去势抵抗性前列腺癌中高度且选择性地表达,使得其成为针对前列腺癌的治疗的有吸引力的靶标。可商购获得的在细胞表面表达内源KLK2的前列腺肿瘤细胞是有限的。VCaP和LNCaP前列腺肿瘤细胞系表达可检测的细胞表面KLK2,尽管与原发肿瘤细胞相比水平非常低。缺乏合适的肿瘤细胞系使得难以鉴定和验证干预KLK2途径的潜在治疗剂。

[0007] 过去曾尝试过在KLK2阴性前列腺肿瘤细胞系DU145和PC3以及许多其他细胞系中过表达KLK2。然而,它们都不能产生具有KLK2表面表达的肿瘤细胞系,因为KLK2蛋白在细胞内表达或分泌到细胞外基质中(例如,CHO-K1、HEK293、NS0、LnCap)。

[0008] 本发明旨在克服现有技术中的这些和其他不足。

发明内容

[0009] 本公开的第一方面涉及一种编码激肽释放酶-2融合蛋白的重组核酸构建体。重组核酸构建体包含编码激肽释放酶-2(KLK2)的第一核苷酸序列和编码糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着序列的第二核苷酸序列,其中所述编码GPI附着序列的第二核苷酸序列位于编码激肽释放酶-2的第一核苷酸序列的3'。

[0010] 本公开的另一个方面涉及一种细胞制剂,其中所述制剂的细胞在其表面表达重组激肽释放酶-2融合蛋白。融合蛋白包含激肽释放酶-2多肽序列;与激肽释放酶-2多肽序列的C末端连接的糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着序列的一部分;和与GPI附着序列部分偶联的GPI

锚定结构域。

[0011] 本公开的另一个方面涉及非人动物,所述非人动物包含在其表面表达重组激肽释放酶-2融合蛋白的细胞。所述重组融合蛋白包含激肽释放酶-2多肽序列;与所述激肽释放酶-2多肽序列的C末端连接的糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着序列的一部分;和与所述GPI附着序列部分偶联的GPI锚定结构域。

[0012] 本公开的又一个方面涉及鉴定结合激肽释放酶-2的药剂的方法。该方法涉及提供根据本公开的细胞制剂;向所述细胞制剂施用候选药剂;以及基于所述施用确定所述候选药剂是否结合激肽释放酶-2。

[0013] 本公开的另一个方面涉及鉴定结合激肽释放酶-2的药剂的方法。该方法涉及提供根据本公开的非人动物;向所述非人动物施用候选药剂;以及基于所述施用确定所述候选药剂是否结合激肽释放酶-2。

[0014] 本公开包括通过产生具有人胎盘碱性磷酸酶(PLAP)的糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着序列的激肽释放酶-2融合蛋白来工程化细胞中激肽释放酶-2的表面表达的方法。所述蛋白在转染细胞中的表达由EF1 α 启动子驱动,并且所述激肽释放酶-2融合蛋白通过与所述GPI附着序列偶联的GPI锚定结构域锚定在细胞膜上。该方法可用于在不表达激肽释放酶-2的细胞中实现表面表达或在表达内源激肽释放酶-2的细胞中实现过表达。表达激肽释放酶-2的常规方法未能在细胞表面展示KLK2,仅产生细胞内或细胞外表达,或根本不表达。具有在表面工程化的KLK2的细胞可用于在释放测定或体外或体内实验系统中筛选和鉴定KLK2治疗剂(例如,细胞治疗产品、CD3重定向抗体、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)介导的抗体等)。

附图说明

[0015] 图1是显示用本文所述的KLK2-GPI融合构建体(“KLK2_GPI”)转导的DU145细胞中KLK2表面表达的直方图。细胞用同种型对照或直接与PE缀合的抗KLK2克隆KL2B1染色。

[0016] 图2A至图2C是显示hIgG1同种型对照Ab或抗KLK2特异性Ab对VCaP(图2A)、DU145亲本细胞(图2B)或DU145/KLK2_GPI肿瘤细胞(图2C)的结合的曲线图。

[0017] 图3A至图3C是显示hIgG1同种型对照Ab或抗KLK2-特异性Ab对PC3亲本细胞(图3A)、PC3/KLK2_GPI(图3B)或PC3/PSMA/KLK2_GPI肿瘤细胞(图3C)的结合的曲线图。

[0018] 图4A至图4C是显示针对VCaP(图4A)、DU145亲本细胞(图4B)或DU145/KLK2_GPI肿瘤细胞(图4C)的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的曲线图。将PB-NK细胞与肿瘤细胞以3:1的E:T比率共培养。在66小时后使用IncuCyte计数活肿瘤靶细胞的数量。将在测定结束时剩余的活肿瘤靶的数量针对仅肿瘤孔进行归一化,以产生活肿瘤靶%。

[0019] 图5A至图5B是显示针对PC3亲本细胞(图5A)或PC3/PSMA/KLK2_GPI肿瘤细胞(图5B)的ADCC的曲线图。在抗KLK2抗体或同种型对照抗体的存在下,以3:1的效应子:肿瘤(E:T)比率将PB-NK细胞与肿瘤细胞共培养。在66小时后使用IncuCyte计数活肿瘤靶细胞的数量。将在测定结束时剩余的活肿瘤靶的数量针对仅肿瘤孔进行归一化,以产生活肿瘤靶%。

[0020] 图6是显示KLK2 \times CD3双特异性抗体针对VCaP、LnCap/KLK2或DU145/KLK2_GPI肿瘤细胞的细胞毒性的曲线图。在抗KLK2抗体或同种型对照抗体的存在下,以3:1的E:T比率将原代T细胞与肿瘤细胞共培养。将增加浓度的KLK2 \times CD3双特异性Ab与肿瘤细胞和T细胞混合。在72小时后使用IncuCyte计数活肿瘤靶细胞的数量。将在测定结束时剩余的活肿瘤靶

的数量针对仅肿瘤孔进行归一化,以产生肿瘤裂解%。

[0021] 图7A至图7C是显示针对VCaP(图7A)、亲本DU145(图7B)或DU145/KLK2_GPI肿瘤细胞(图7C)的CAR-T介导的细胞毒性的曲线图。将未转导的(UTD)T细胞或KLK2 CAR转导的T细胞与肿瘤细胞以0.25:1的E:T比率共培养。在时间0开始每24小时使用IncuCyte计数活肿瘤靶细胞的数量。将在每个时间点剩余的活肿瘤靶的数量针对仅肿瘤孔进行归一化,以产生肿瘤活肿瘤靶%。

[0022] 图8A至图8B是显示体内应用DU145/KLK2_GPI和PC3/PSMA/KLK2_GPI肿瘤细胞的曲线图。(图8A) DU145/KLK2_GPI和PC3/PSMA/KLK2_GPI的生长动力学。在第0天植入 10×10^6 DU145/KLK2_GPI肿瘤细胞或 0.5×10^6 PC3/PSMA/KLK2_GPI肿瘤细胞。每3天或4天用卡尺测量肿瘤。(图8B) 抗KLK2 CAR T细胞在DU145/KLK2_GPI肿瘤模型中的功效。在肿瘤植入后第11天注射 10×10^6 KLK2 CAR T细胞。每3天或4天用卡尺测量肿瘤。KLK2 CAR T细胞抑制肿瘤进展并导致完全肿瘤消退。

[0023] 图9A至图9C显示了DU145+KLK2细胞如何可用于筛选CAR设计。将一组CAR设计(CAR-a至CAR-bb)转导到NK-101细胞中。这些设计都含有相同的对KLK2具有特异性的scFv结合结构域,随后是CD8a铰链区和各种不同的信号转导结构域模块。

[0024] 图10A至图10B显示了证明在用本文所述的KLK2-GPI融合构建体(“KLK2_GPI”)转导的LnCap细胞中KLK2表面表达的直方图。细胞用同种型对照或直接与PE缀合的抗KLK2克隆KL2B1染色。图10C是显示KLK2 CAR-NK介导的针对以各种E:T比率共培养的LnCap亲本(未转导的)细胞或LnCap+KLK2靶细胞的细胞毒性的曲线图。在时间0开始每4小时使用IncuCyte计数活肿瘤靶细胞的数量。将在每个时间点剩余的活肿瘤靶的数量针对仅肿瘤孔进行归一化,以产生剩余的活肿瘤靶%。对每个E:T比率测定166小时内活肿瘤靶%曲线的AUC,并作图为剂量-反应曲线。可从LnCap亲本细胞测定先天或非CAR特异性杀伤,而可在LnCap+KLK2靶细胞中评估KLK2 CAR特异性杀伤。

具体实施方式

[0025] 本公开的第一方面涉及一种编码激肽释放酶-2融合蛋白的重组核酸构建体。重组核酸构建体包含编码激肽释放酶-2(KLK2)或其片段的第一核苷酸序列和编码糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着序列的第二核苷酸序列,其中编码所述GPI附着序列的第二核苷酸序列位于编码激肽释放酶-2的第一核苷酸序列的3'。

[0026] 编码激肽释放酶-2的重组构建体的第一核苷酸序列可编码哺乳动物激肽释放酶-2多肽序列,例如,人、鼠、牛、犬、猫、绵羊、猪、熊或猿激肽释放酶-2多肽序列。

[0027] 在任何实施方案中,重组构建体的编码激肽释放酶-2的第一核苷酸序列编码人激肽释放酶-2(hKLK2)。如本文所述,人激肽释放酶-2(“hKLK2”或“hK2”)是一种前列腺特异性激肽释放酶(参见例如,Obiezu等人,“Human Tissue Kallikrein Gene Family: Applications in Cancer”,Cancer Letters 224(1):1-22(2005)和Nasser等人,“Human Tissue Kallikreins:Blood Levels and Response to Radiotherapy in Intermediate Risk Prostate Cancer”,Radiother.Oncol.124(3):427-432(2017),这些文献据此全文以引用方式并入)。

[0028] 在任何实施方案中,第一核苷酸序列编码包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其

功能片段具有80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列的人激肽释放酶-2。

[0029] MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWA
HCGGVLVHPQWVLTAAHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSF
PHPLYNMSLLKHQSLRPDEDSSHDLMMLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEP
ALGTTTCYASGWGSIEPEEFLRPRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFM
LCAGLWTGGKDTCCGGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYT

[0030] KVVHYRKWIKDTIAANPEF (信号序列以 双下划线显示) (SEQ ID NO: 4)。

[0031] 在任何实施方案中,第一核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其功能片段的人激肽释放酶-2。

[0032] 在任何实施方案中,编码激肽释放酶-2的第一核苷酸序列包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列或其任何部分具有80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的核苷酸序列。

ATGTGGGACCTGGTTCTCTCCATCGCCTTGTCTGTGGGGTGCACTGGT
GCCGTGCCCTCATCCAGTCTCGGATCGTGGGGGGCTGGGAGTGCGA
GAAGCACAGCCAGCCTTGGCAAGTGGCAGTGTACTCCCACGGTTGGG
CGCACTGCGGTGGCGTGCTGGTGCACCCACAATGGGTGCTCACCGCG
GCCACTGTCTGAAGAAGAATTCACAAGTCTGGCTGGGACGCCATAA
CCTGTTCGAACCTGAAGATACTGGGCAGCGCGTGCCGGTGTCCCATT
CTTCCCTCACCCATTGTACAACATGTCGCTGCTGAAGCACCAAGTCTTT
GAGGCCTGATGAGGACAGCTCCCATGACCTCATGCTGCTTAGACTCTC
[0033] GGAACCCGCAAAGATTACCGACGTCGTGAAAGTGCTTGGACTGCCGA
CGCAGGAACCCGCCTTGGGGACTACCTGTTATGCTTCCGGCTGGGGAT
CCATCGAGCCCGAAGAATTCCTGCGGCCGCGCAGCCTGCAGTGC GTG
TCCCTCCATCTGCTGTCAAACGATATGTGCGCCAGAGCCTACTCCGAA
AAGGTCACCGAGTTTATGCTGTGCGCCGACTGTGGACCGGGGAAA
GGACACTTGCGGCGGAGACAGCGGCGGCCCCCTGGTCTGCAACGGCG
TGCTGCAGGGAATTACCTCGTGGGGTCCAGAGCCGTGTGCGCTGCCTG
AAAAGCCCGCCGTGTACTAAGGTCGTGCACTACCGGAAGTGGATC
AAGGACACCATCGCCGCGAACCCGGAATTC (SEQ ID NO: 1)

[0034] 编码激肽释放酶-2的信号序列的核苷酸序列是SEQ ID NO:1中的 双下划线序列。因此,在任何实施方案中,编码激肽释放酶-2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1的核苷酸

序列。在任何实施方案中,编码激肽释放酶-2的核苷酸序列包含不含信号序列的SEQ ID NO:1的核苷酸序列。在任何实施方案中,编码激肽释放酶-2的核苷酸序列包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列的部分或片段。

[0035] 糖基磷脂酰肌醇(GPI)是一种复杂的糖脂,其作为许多细胞表面蛋白的膜锚定物,并且在真核生物中普遍存在。如本文所述,GPI锚定的蛋白的C末端通过磷酸乙醇胺桥与GPI锚定结构域连接。GPI锚定结构域包含高度保守的核心聚糖结构,该核心聚糖结构包含甘露糖(α 1-2)、甘露糖(α 1-6)、甘露糖(α 1-4)、葡糖胺(α 1-6)、肌醇(Paulick和Bertozi,“The Glycosylphosphatidylinositol Anchor:A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins”,*Biochemistry* 47(27):6991-7000(2008),该文献据此全文以引用方式)。磷脂尾部将GPI锚定物附着于细胞膜。核心聚糖可用各种侧链(包括例如,磷酸乙醇胺基团、甘露糖、半乳糖、唾液酸或其他糖)修饰。

[0036] 如本文所用,术语“糖基磷脂酰肌醇附着序列”或“GPI附着序列”是指以GPI锚定物对多肽序列进行共价修饰为信号的氨基酸序列。在任何实施方案中,GPI附着序列包含一段疏水氨基酸,该段疏水氨基酸在翻译后被切割并通过转酰胺基反应被GPI锚定物取代(参见例如,Kinoshita,T.,“Glycosylphosphatidylinositol(GPI)Anchors:Biochemistry and Cell Biology:Introduction to a Thematic Review Series”,*J.Lipid Res.*57(1):4-5(2016),该文献据此全文以引用方式并入)。

[0037] 如本文所述的编码激肽释放酶-2融合蛋白的重组核酸构建体包含编码GPI附着序列的第二核苷酸序列,其中编码GPI附着序列的核苷酸序列位于编码激肽释放酶-2的核苷酸序列的3'。合适的GPI附着序列包括但不限于在已知GPI锚定的蛋白中发现的附着序列。例如,GPI附着序列可以是碱性磷酸酶的GPI附着序列、5'-核苷酸酶的GPI附着序列、乙酰胆碱酯酶的GPI附着序列、二肽酶的GPI附着序列、LFA-3(CD58)的GPI附着序列、神经细胞粘附分子(NCAM)的GPI附着序列、衰变加速因子(DAF;CD55)的GPI附着序列、CD59的GPI附着序列、Thy-1(CD90)的GPI附着序列、CD14的GPI附着序列、癌胚抗原(CEA)的GPI附着序列、CD16b的GPI附着序列和叶酸结合蛋白的GPI附着序列(Paulick等人,“The Glycosylphosphatidylinositol Anchor:A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins”,*Biochemistry* 47(27):6991-7000(2008),该文献据此全文以引用方式并入)。表1提供了可由本文所述的重组构建体的第二核苷酸序列编码的各种示例性GPI附着序列。

[0038] 表1. 示例性GPI附着序列

GPI 锚定结构域蛋白*	附着序列**	SEQ ID NO:
人胎盘碱性磷酸酶 (PLAP)	TACDLAPPAGTTDAAHPGRSVVPALLPLLAGT LLLLETATAP	9
人胎盘碱性磷酸酶 (PLAP)	TTDAAHPGRSVVPALLPLLAGTLLLLETATAP	5
人衰变加速因子 (DAF; CD55)	HETTPNKGSGTTSSTTRLLSGHTCFTLTGLLGT LVTMGLLT	10
人肝配蛋白 A4 同工型 (EFNA4)	PGESGTSGWRGGDTPSPLCLLLLLLLLLLILRLLRI L	11
人肝配蛋白 A5 同工型 (EFNA5)	ESAEPSRGENAAQTPRIPSRLLAAILLFLAMLLT L	12
人叶酸受体 1 (FOLR1)	YAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS	13
人肝配蛋白 A1 同工型 (EFNA1)	PEVRVLHSIGHSAAPRLFPLAWTVLLLPLLLLQ TP	14
人边缘系统相关膜蛋白 (LSAMP)	SVRGINGSISLAVPLWLLAASLLCLLSKC	15
人网状蛋白 4 受体 (RTN4R)	DSEGS GALPSLTCSLTPLGLALVLWTVLGPC	16
人接触蛋白 1 (CNTN1)	VSQVKISGAPTLSPSLLGLLLPAFGILVYLEF	17
人肝配蛋白 A3 同工型 (EFNA3)	QVPKLEKSISGTSPKREHLPLAVGIAFFLMTFLA S	18
人肝配蛋白 A2 同工型 (EFNA2)	EAPEPIFTSNNSSSPGGCRLFLSTIPVLWTLGGS	19
CD24	TNATTKAAGGALQSTASLFVVSLSLHLYS	20

[0039]

[0040] *参见例如, Varki A, Cummings RD, Esko JD 等人编辑, Essentials of Glycobiology [Internet]. 第三版, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. doi:10.1101/glycobiology.3e.012 和 Galian 等人, “Efficient Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Modification of Membrane Proteins Requires a C-Terminal Anchoring Signal of Marginal Hydrophobicity”, J. Biol. Chem. 287 (20): 16399-16409 (2012), 这些文献据此全文以引用方式并入; **粗体氨基酸是 GPI 的附着位点 (该空间右侧的序列在加入锚定物时从蛋白质上裂解下来)。

[0041] 在任何实施方案中, 重组构建体的第二核苷酸序列编码 GPI 附着序列, 该 GPI 附着序列包含与 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列中的任一者具有 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0042] 其他已知的人 GPI 锚定结构域蛋白 (GPI 附着序列可来源于其) 包括但不限于: 黑素转铁蛋白、CD109、钙粘着蛋白 13 同工型 1 前蛋白、网状蛋白 4 受体样 1 前体、碳酸酐酶 4 前蛋白、神经三肽 (neurotrimin) 同工型 1 前体、间皮素同工型 2 前蛋白、CD48 抗原同工型 1 前体、精子顶体膜相关蛋白 4 前体、具有 Kazal 基序的人逆转诱导富含半胱氨酸的蛋白同工型 1 前

体、癌胚抗原相关细胞粘附分子8前体、UL16-结合蛋白2前蛋白原、淋巴细胞功能相关抗原3同工型、人诱饵受体、羧基肽酶M前体、外-ADP-核糖基转移酶3同工型a前体、GDNF家族受体 α -4同工型b前体、GDNF家族受体 α -3前蛋白、短缩蛋白核心蛋白同工型1前体、脑信号蛋白-7A同工型1前蛋白、CD177抗原前体、少突胶质细胞-髓磷脂糖蛋白前体、CD160抗原前体和内凝集素-1前体(参见例如,Pierleoni等人,“R-PredGPI:A GPI Anchor Predicto”,BMC Bioinformatics 9:392(2008),该文献据此全文以引用方式并入)。因此,如本文所述的重组构建体的第二核苷酸序列可编码来源于前述GPI锚定结构域蛋白中的任一者的GPI附着序列。

[0043] 在任何实施方案中,编码GPI附着序列的第二核苷酸序列编码来源于碱性磷酸酶的GPI附着序列。在任何实施方案中,编码GPI附着序列的第二核苷酸序列编码来源于人碱性磷酸酶(例如、胎盘碱性磷酸酶、生殖细胞碱性磷酸酶、肠型碱性磷酸酶或组织非特异性碱性磷酸酶)的GPI附着序列。

[0044] 在任何实施方案中,重组构建体的第二核苷酸序列编码人胎盘碱性磷酸酶GPI附着序列,该人胎盘碱性磷酸酶GPI附着序列包含与SEQ ID NO:5或其片段的氨基酸序列具有80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0045] TTDAAHPGRSVVPALLPLL LAGTLLLLLETATAP(SEQ ID NO: 5)。

[0046] 在任何实施方案中,重组构建体的第二核苷酸序列编码SEQ ID NO:5或其片段的人胎盘碱性磷酸酶GPI附着序列。

[0047] 在任何实施方案中,编码GPI附着序列的核苷酸序列来源于人胎盘碱性磷酸酶。例如,GPI附着序列可来源于人胎盘碱性磷酸酶(参见例如,GenBank登录号AAA51706.1、AAA51708.1或AAA51709.1)。在任何实施方案中,编码人胎盘碱性磷酸酶GPI附着序列的核苷酸序列包含与SEQ ID NO:2的核苷酸序列具有80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的核苷酸序列。ACCACTGATGCTGCCATCCTGGAAGGTCTGTGGTGCCTGCCTTGCTGCCTCTGCTGGC TGGCACTCTGCTGCTGCTGGAGACTGCCACTGCTCCC(SEQ ID NO:2)

[0048] 在任何实施方案中,构建体的第一核苷酸序列和第二核苷酸序列编码激肽释放酶-2融合蛋白,该激肽释放酶-2融合蛋白包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列,如下:

MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWA
HCGGVLVHPQWVL TAAHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSF
PHPLYNMSLLKHQSLRPDEDSSHDLM LRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEP
ALGTTCYASGWGSIPEEFLRPRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFM
LCAGLWTGGKDTCGGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYT
KVVHYRKWIKDTIAANPEFTTDAAHPGRSVVPALLPLLLAGTLLLLLETATA

P(KLK2的信号序列以双下划线显示;PLAP GPI附着序列以粗体显示;切割位点以粗体下划线显示)。在任何实施方案中,构建体的第一核苷酸序列和第二核苷酸序列编码激

肽释放酶-2融合蛋白,该激肽释放酶-2融合蛋白包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在任何实施方案中,构建体的第一核苷酸序列和第二核苷酸序列编码SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0049] 在任何实施方案中,重组核酸构建体的第一核苷酸序列和第二核苷酸序列包含与SEQ ID NO:3的核苷酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的核苷酸序列,如下:

ATGTGGGACCTGGTTCTCTCCATCGCCTTGTCTGTGGGGTGCACTGGT
GCCGTGCCCTCATCCAGTCTCGGATCGTGGGGGGCTGGGAGTGCGA
 GAAGCACAGCCAGCCTTGCAAGTGGCAGTGTACTCCCACGGTTGGG
 CGCACTGCGGTGGCGTGCTGGTGCACCCACAATGGGTGCTCACCGCG
 GCCCACTGTCTGAAGAAGAATTCACAAGTCTGGCTGGGACGCCATAA
 CCTGTTTCGAACCTGAAGATACTGGGCAGCGCGTGCCGGTGTCCCATT
 CTTCCCTCACCCATTGTACAACATGTCGCTGCTGAAGCACCAGTCTTT
 GAGGCCTGATGAGGACAGCTCCCATGACCTCATGCTGCTTAGACTCTC
 GGAACCCGCAAAGATTACCGACGTCGTGAAAGTGCTTGGACTGCCGA
 CGCAGGAACCCGCCTTGGGGACTACCTGTTATGCTTCCGGCTGGGGAT
 CCATCGAGCCCGAAGAATTCCTGCGGCCGCGCAGCCTGCAGTGCGTG
 TCCCTCCATCTGCTGTCAAACGATATGTGCGCCAGAGCCTACTCCGAA
 AAGGTCACCGAGTTTATGCTGTGCGCCGGACTGTGGACCGGGGGAAA
 GGACACTTGCGGCGGAGACAGCGGCGGCCCCCTGGTCTGCAACGGCG
 TGCTGCAGGGAATTACCTCGTGGGGTCCAGAGCCGTGTGCGCTGCCTG
 AAAAGCCCGCCGTGTACACTAAGGTCGTGCACTACCGGAAGTGGATC
 AAGGACACCATCGCCGCGAACCCGGAATTCACCACTGATGCTGCCCA
 TCCTGGAAGGTCTGTGGTGCCTGCCTTGCTGCCTCTGCTGGCTGGCAC

[0050] TCTGCTGCTGCTGGAGACTGCCACTGCTCCCTAATGA (编码KLK2信号序列的序列以双下划线显示;PLAP GPI附着序列编码序列以粗体显示;终止密码子以斜体显示)。在任何实施方案中,重组核酸构建体包含与SEQ ID NO:3的核苷酸序列具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。在任何实施方案中,重组核酸构建体包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列。

[0051] 本公开的重组核酸构建体是含有两种或更多种非天然一起存在的遗传元件的组合的核酸分子。每个重组核酸构建体可包含非天然存在的核苷酸序列,该核苷酸序列可以是线性DNA、环状DNA的形式,即,置于载体(例如,细菌载体、病毒载体、质粒载体)内,或整合到基因组中。因此,本公开的核酸构建体还可包含位于KLK2编码核苷酸序列的5'的启动子核苷酸序列。启动子是含有RNA聚合酶的结合位点并启动下游核酸序列的转录的DNA序列。因此,在任何实施方案中,本文所述的核酸构建体包含启动子核苷酸序列。

[0052] 启动子可以是组成型活性启动子(即,组成型处于活性或“开启”状态的启动子)、

诱导型启动子(即,其状态、活性或非活性状态由外部刺激(例如,特定温度、化合物或蛋白质的存在)控制的启动子)、空间限制启动子(即,转录控制元件、增强子等)(例如,组织特异性启动子、细胞类型特异性启动子等)或时间限制启动子(即,在生物过程的特定阶段,启动子处于“开启”状态或“关闭”状态)。

[0053] 合适的启动子可来源于病毒,因此可被称为病毒启动子,或者它们可来源于任何生物体,包括原核或真核生物体。合适的启动子可用于驱动任何RNA聚合酶(例如,RNA聚合酶I、RNA聚合酶II、RNA聚合酶III)的表达。启动子可以是病毒启动子。示例性启动子包括但不限于SV40早期启动子、小鼠乳房肿瘤病毒长末端重复(LTR)启动子、腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP)、单纯疱疹病毒(HSV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子(诸如CMV立即早期启动子区(CMVIE))、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、人U6小核启动子(U6)(Miyagishi等人,“U6 Promoter-Driven siRNAs with Four Uridine 3' Overhangs Efficiently Suppress Targeted Gene Expression in Mammalian Cells”,*Nat. Biotechnol.*20:497-500(2002),该文献据此全文以引用方式并入)、增强的U6启动子(例如,Xia等人,“An Enhanced U6 Promoter for Synthesis of Short Hairpin RNA”,*Nucleic Acids Res.*31(17):e100(2003),该文献据此全文以引用方式并入)、人H1启动子(“H1”)等。在任何实施方案中,启动子是噬菌体启动子,例如,已经被工程化为在哺乳动物细胞中表达的T7启动子。

[0054] 在任何实施方案中,启动子是真核RNA聚合酶启动子或其衍生物。示例性RNA聚合酶II启动子包括但不限于巨细胞病毒(“CMV”)、磷酸甘油酸激酶-1(“PGK-1”)和延伸因子1 α (“EF1 α ”)启动子。在另一个实施方案中,启动子是选自以下组成的组的真核RNA聚合酶III启动子:U6、H1、56、7SK以及它们的衍生物。

[0055] RNA聚合酶启动子可以是哺乳动物启动子。合适的哺乳动物启动子是本领域熟知的,包括但不限于人、鼠、牛、犬、猫、绵羊、猪、熊和猿启动子。

[0056] 在任何实施方案中,启动子核苷酸序列是延伸因子1 α (EF1 α)启动子核苷酸序列。示例性EF1 α 启动子核苷酸序列如以下SEQ ID NO:21所提供。另选地,合适的启动子核苷酸序列提供于下表2中。

[0057] 表2. 示例性启动子核苷酸序列

[0058]

启动子	序列	SEQ ID NO:
EF1a	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCAC AGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACC GGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACCTGGGAAAGTG ATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGA GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTT CGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTG TGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTG CGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCT TGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGA GGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTG AGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGG TGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTA GCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTTC TGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC TGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCC GTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGA GCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTG GCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGTCTCGCGCCGCCGTGTATCG CCCCGCCCTGGGCGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAGTT GCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGG GAGCTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCG GGTGAGTCAACCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTC AGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGT CCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGT CTTAGGTTGGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCC CACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCA CTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGG ATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT TTTTCTCCATTCAGGTGTCGTGA	21
CMV	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAG CCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG GCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCCATGACG TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC TTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTG	22

	<p>CCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACG CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCA TTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCG GTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACT CACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGG AGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAATG TCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGC GTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTG AACCGTCAGATC</p>	
<p>CAGG</p>	<p>ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTTCATTAGTTCAT AGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAA TGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGA CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGG ACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG CATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGG CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTTCGAG GTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCC TCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTT GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCC AGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAG GCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTC CGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCC CTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGGAGTCGCTGC GACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCCCGCCCTCGC GCCGCCCGCCCCGCTCTGACTGACCGCGTACTCCCACAG GTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTA GCGCTTGGTTTAAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCG TGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGGG GGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCCTGTGTGTGTGCGTGGGG AGCGCCGCGTGC GGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCG CTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGC GCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTGCCCGCGGGTGC GG GGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGC GGGGTGTG TGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCCGGTGC GGCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAG CACGGCCCCGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGG CGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGTGGCGGCAGGTG GGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCCGGGCCGGGAGG GCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGG CTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGT AATCGTGCAGAGGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATC TGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCCGCCACCCCCCTC TAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAG GAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCCCGCGCCGCGG TCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGA CGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGC</p>	<p>23</p>

[0059]

	TTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCA TGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGT GCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTTGGCAAAGAATTC	
[0060]	PGK1 TTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGG AGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACA CAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGT AGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCCTTCGCGCC ACTTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCSCCCCCGCCCC GCAGCTCGCGTCTGTCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCA CGTCTACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCA ATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAG CTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGT GGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGG CGGGCGCCCGAAGGTCCTCCGGAGGCCCGGCATTCTGCACG CTTCAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCCTCA TCTCCGGGCCTTTCGACCT	24
[0060]	SV40 CTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGG CTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCA GGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAAC CATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCC GCCAGTTCGCCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTT TTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCTGCCTCTGAGCT ATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCT TTTGCAAAAAGCT	25
[0060]	UBC GGTGCAGCGGCCTCCGCGCCGGTTTTTGGCGCCTCCCGCGG GCGCCCCCTCCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAA GGGCGCAGGAGCGTTCCTGATCCTTCCGCCCGGACGCTCAG GACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAGAACCCC AGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGAC TCTAGGGCACTGGTTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCCGA GGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGATCTC CGTGGGGCGGTGAACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCCG GGTGTGGCACAGCTAGTTCCGTCGCAGCCGGGATTTGGGTC GCGGTTCTTGTTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAG TTGCGGGCTGCTGGGCTGGCCGGGGCTTTCGTGGCCGCCGG GCCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTGTGGAGAGACCGCCAAG GGCTGTAGTCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCCCTGAACTGG GGGTTGGGGGAGCGCACAAAATGGCGGCTGTTCCCAGATC TTGAATGGAAGACGCTTGTAAGGCGGGCTGTGAGGTCGTTG AAACAAGGTGGGGGGCATGGTGGGCGGCAAGAACCCAAGG TCTTGAGGCCTTCGCTAATGCGGGAAAGCTCTTATTCGGGT GAGATGGGCTGGGGACCATCTGGGGACCCTGACGTGAAGT TTGTCACTGACTGGAGAACTCGGGTTTGTCTGCTGTTGCGG GGGCGGCAGTTATGCGGTGCCGTTGGGCAGTGCACCCGTAC CTTTGGGAGCGCGCGCCTCGTCGTGTCGTGACGTCACCCGTT CTGTTGGCTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGG TGTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGCAGGACGCAGGGTTCGG GCCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGACAGGCGCCGGACCTC	26
[0061]	TGGTGAGGGGAGGGATAAGTGAGGCGTCAGTTTCTTTGGTC GGTTTTATGTACCTATCTTCTTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTT TTGAACTATGCGCTCGGGGTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAG TTTTTTAGGCACCTTTTGAAATGTAATCATTTGGGTCAATAT GTAATTTTCAGTGTTAGACTAGTAAA	

[0062] 本公开的一些实施方案涉及包含如本文所述的重组核酸构建体的载体(即,编码激肽释放酶-2融合蛋白的重组核苷酸构建体,所述构建体包含:编码激肽释放酶-2(KLK2)的核苷酸序列和编码糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着序列的核苷酸序列,其中所述编码GPI附着序列的核苷酸序列位于编码KLK2的核苷酸序列的3')。如本文所用,术语载体意指任何遗传元件,诸如质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒、病毒体等,其在与适当的控制元件结合时能够复制,并且能够在细胞之间转移基因序列。因此,该术语包括克隆和表达载体,以及病毒载体。因此,在一些实施方案中,可将重组核酸构建体以正确的有义(5'至3')方向和正确的阅读框插入表达系统或载体中。载体可含有如本文所公开的激肽释放酶-2融合蛋白的转录和/或翻译所必需的元件。

[0063] 在一个实施方案中,载体是质粒。适于包含本文所公开的重组核酸构建体的多个载体是本领域技术人员已知的,并且许多载体是可商购获得的。以下载体以举例的方式提供;对于真核细胞:pcDNA3.1(+)、Tornado(Litke和Jaffrey,“Highly Efficient Expression of Circular RNA Aptamers in Cells Using Autocatalytic Transcripts”,*Nat. Biotechnol.* 37(6):667-675(2019),该文献据此全文以引用方式并入)、pXT1、pSG5(Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG和pSVLSV40(Pharmacia)。然而,可使用任何其他载体,只要其与细胞相容即可。

[0064] 在另一个实施方案中,载体是病毒载体。病毒载体可选自适于通过任何方式将本文所述的重组核酸构建体引入细胞以促进重组核酸构建体的表达的任何载体。合适的病毒载体包括但不限于基于以下的载体:牛痘病毒;脊髓灰质炎病毒;腺病毒(参见例如,以下PCT专利申请公开号:授予Gregory等人的W0 94/12649、授予Crystal等人的W0 93/03769、授予Haddada等人的W0 93/19191、授予Wilson等人的W0 94/28938、授予Gregory等人的W0 95/11984和授予Graham等人的W0 95/00655,这些专利申请据此全文以引用方式并入);腺相关病毒(参见例如,Flannery等人,“Efficient Photoreceptor-Targeted Gene Expression In Vivo by Recombinant Adeno-Associated Virus”,*PNAS* 94:6916-6921(1997);Bennett等人,“Real-Time, Noninvasive In Vivo Assessment of Adeno-Associated Virus-Mediated Retinal Transduction”,*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38:2857-2863(1997);Jomary等人,“Nonviral Ocular Gene Transfer”,*Gene Ther.* 4:683-690(1997);Rolling等人,“Evaluation of Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer into the Rat Retina by Clinical Fluorescence Photography”,*Hum. Gene Ther.* 10:641-648(1999);Ali等人,“Gene Transfer Into the Mouse Retina Mediated by an Adeno-Associated Viral Vector”,*Hum. Mol. Genet.* 5:591-594(1996);Samulski等人,“Helper-Free Stocks of Recombinant Adeno-Associated Viruses: Normal Integration Does not Require Viral Gene Expression”,*J. Vir.* 63:3822-3828(1989);Mendelson等人,“Expression and Rescue of a Nonselected Marker from an Integrated AAV Vector”,*Virol.* 166:154-165(1988);和Flotte等人,“Stable In Vivo Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator With an Adeno-Associated Virus Vector”,*PNAS* 90:10613-10617(1993),这些文献据此全文以引用方式并入);SV40;单纯疱疹病毒;人免疫缺陷病毒(参见例如,Miyoshi等人,“Stable and Efficient Gene Transfer into the Retina Using an HIV-Based Lentiviral

Vector”, PNAS 94:10319-10323 (1997), 该文献据此全文以引用方式并入) 的病毒载体; 逆转录病毒载体 (例如, 鼠白血病病毒、脾坏死病毒); 以及来源于逆转录病毒 (诸如劳斯肉瘤病毒、血红蛋白肉瘤病毒、禽类白血病病毒、慢病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增生肉瘤病毒和乳房肿瘤病毒等)。因此, 在一些实施方案中, 病毒载体选自由以下组成的组: 腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体、疫苗载体、逆转录病毒载体和单纯疱疹病毒载体。

[0065] 包含KLK2-GPI重组构建体的示例性病毒载体具有SEQ ID NO:7的序列, 如下:

[0066] ACGCGTGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAAC
[0067] GATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCAT
[0068] GCCGATTGGTGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGG
[0069] CAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCA
[0070] TTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACATAAACGGGTC
[0071] TCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGG
[0072] GAACCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCTTGAGTGCTTCAAGT
[0073] AGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAG
[0074] ACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGG
[0075] GACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGAC
[0076] TCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGGCGAGGGGCGGCGACTGG
[0077] TGAGTACGCCAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAGGGAGAGAGATGG
[0078] GTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATAAGATCGCGATGGG
[0079] AAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAAATATAAATTA
[0080] ACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGACGTTAATC
[0081] CTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAG
[0082] CTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAAGCTTAGATCATTATAT
[0083] AATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAA
[0084] AGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAA
[0085] AGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCACTGATCTTCAGACCTGGAG
[0086] GAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAA
[0087] GTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAG
[0088] AAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTG
[0089] TTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTC
[0090] AATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGC
[0091] AGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTG
[0092] TTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCT
[0093] GGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGG
[0094] GTTGCTCTGGAAAACCTATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGAATGCTA
[0095] GTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGG
[0096] ATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTC
[0097] CTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAAT
[0098] TATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAA

[0099] CAAATTGGCTGTGGTATATAAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCT
[0100] TGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGTCTACTTTCTATAGTGAATAGAG
[0101] TTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCC
[0102] CGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGA
[0103] GAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGT
[0104] ATCGGTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCA
[0105] GGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAG
[0106] AATTACAAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTTTCGATACTAGTGGA
[0107] TCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCA
[0108] CAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGCAATTGAACGGGTGCC
[0109] TAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTG
[0110] GCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGT
[0111] AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACA
[0112] GCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCC
[0113] TACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCTCC
[0114] CGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAA
[0115] GCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGAGCCTACC
[0116] TAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACT
[0117] CTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTG
[0118] TGACCGGCGCCTACTCTAGAGCCGCCACCATGTGGGACCTGGTTCTCT
[0119] CCATCGCCTTGTCTGTGGGGTGCAGTGGTGGCGTCCCCCTCATCCAGT
[0120] CTCGGATCGTGGGGGGCTGGGAGTGCAGAGAAGCACAGCCAGCCTTGG
[0121] CAAGTGGCAGTGTACTCCCACGGTTGGGCGCACTGCGGTGGCGTGCT
[0122] GGTGCACCCACAATGGGTGCTCACCGCGGCCACTGTCTGAAGAAGA
[0123] ATTCACAAGTCTGGCTGGGACGCCATAACCTGTTTCGAACCTGAAGATA
[0124] CTGGGCAGCGCGTGCCGGTGTCCATTCCCTCCCTCACCCATTGTACA
[0125] ACATGTCGCTGCTGAAGCACCAGTCTTTGAGGCCTGATGAGGACAGCT
[0126] CCCATGACCTCATGCTGCTTAGACTCTCGGAACCCGAAAAGATTACCG
[0127] ACGTCGTGAAAGTGCTTGGACTGCCGACGCAGGAACCCGCTTGGGG
[0128] ACTACCTGTTATGCTTCCGGCTGGGGATCCATCGAGCCCGAAGAATTC
[0129] CTGCGGCCGCGCAGCCTGCAGTGCCTGTCCCTCCATCTGCTGTCAAAC
[0130] GATATGTGCGCCAGAGCCTACTCCGAAAAGGTCACCGAGTTTATGCTG
[0131] TGCGCCGGACTGTGGACCGGGGAAAGGACACTTGCGGCGGAGACAG
[0132] CGGCGGCCCTGGTCTGCAACGGCGTGCTGCAGGGAATTACCTCGTG
[0133] GGGTCCAGAGCCGTGTGCGCTGCCTGAAAAGCCCGCCGTGTACTACTA
[0134] AGGTGCTGCACTACCGGAAGTGGATCAAGGACACCATCGCCGCGAAC
[0135] CCGGAATTCACCACTGATGCTGCCATCCTGGAAGGTCTGTGGTGCT
[0136] GCCTTGCTGCCTCTGCTGGCTGGCACTCTGCTGCTGCTGGAGACTGCC
[0137] ACTGCTCCCTAATGAGGATCCGCGGCCGCGCCCTCTCCCTCCCCCCC

[0138] CCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTT
[0139] TGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGG
[0140] GCCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTT
[0141] TCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTGCGTGAAGGA
[0142] AGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAAACAACGTCTGTAGCGAC
[0143] CCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCG
[0144] GCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCC
[0145] CAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCT
[0146] CTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTAC
[0147] CCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACAT
[0148] GTGTTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGG
[0149] GACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCAT
[0150] GCGCTCCGGAATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGG
[0151] CCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGACA
[0152] ATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGC
[0153] CCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTG
[0154] CAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCGCGACGGGCGTTCC
[0155] TTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGC
[0156] TGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTG
[0157] CTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGC
[0158] ATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATC
[0159] GCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAG
[0160] GATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTT
[0161] CGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGA
[0162] CCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCT
[0163] TTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATC
[0164] AGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGC
[0165] GAATGGGCTGACCGCTTCTCTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGAT
[0166] TCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGTCG
[0167] ACTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGG
[0168] TATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTA
[0169] ATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTC
[0170] CTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTT
[0171] GTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCC
[0172] ACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTC
[0173] GCTTTCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCCTT
[0174] GCCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTG
[0175] GTGTTGTGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTG
[0176] CCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCC

[0177] TCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCCGC
[0178] CTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTG
[0179] GGCCGCTCCCCGCTGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAG
[0180] CTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGG
[0181] CTAATTCCTCCCAACGAAGATAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGG
[0182] TCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTA
[0183] GGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCTTGAGTGCTTCAA
[0184] GTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTC
[0185] AGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGT
[0186] CATCTTATTATTAGTATTTATAACTTGCAAAGAAATGAATATCAGAG
[0187] AGTGAGAGGAACCTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGC
[0188] AATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCT
[0189] AGTTGTGGTTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCT
[0190] AGCTATCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAG
[0191] TTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCA
[0192] GAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGG
[0193] AGGCTTTTTTGAGGCCTAGACTTTTGCAGAGACCAAATTCGTAATCA
[0194] TGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACA
[0195] CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAAT
[0196] GAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCC
[0197] AGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGC
[0198] GCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTC
[0199] ACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCT
[0200] CACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGC
[0201] AGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGT
[0202] AAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGAC
[0203] GAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGAC
[0204] AGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCG
[0205] CTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTC
[0206] CCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTC
[0207] AGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
[0208] CCCGTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAG
[0209] TCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGG
[0210] TAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCT
[0211] TGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGT
[0212] ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC
[0213] TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTT
[0214] TGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCC
[0215] TTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACG

[0216] TTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGAT
[0217] CCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGA
[0218] GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTAT
[0219] CTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATAGTTGCTGACTCCCCGTC
[0220] GTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCT
[0221] GCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGC
[0222] AATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAA
[0223] CTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAG
[0224] TAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTA
[0225] CAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTTGGTATGGCTTCATTCAGCT
[0226] CCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCA
[0227] AAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGT
[0228] TGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTC
[0229] TTA CTGT CATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTC
[0230] AACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTG
[0231] CCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAA
[0232] AAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAA ACTCTCAAGG
[0233] ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCC
[0234] AACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCA
[0235] AAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC
[0236] GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCAT
[0237] TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTA
[0238] GAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGC
[0239] CACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAA
[0240] ATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGGTTTCGGTGATGACG
[0241] GTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGT
[0242] CTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGC
[0243] GGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGC
[0244] AGATTGTA CTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGA
[0245] TGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCT
[0246] GCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACG
[0247] CCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAA
[0248] CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTA AACGACGGCCAGTGCCAAGCTG (编码huKLK2_GPI
的pCDH Neo载体;SEQ ID NO:7)。

[0249] 本公开的另一个方面涉及由如本文所述的重组核酸构建体或包含根据本公开的重组核酸构建体的载体编码的激肽释放酶-2融合蛋白。

[0250] 因此,在任何实施方案中,根据本公开的激肽释放酶-2融合蛋白包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序

列,如下:

MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWA
HCGGVLVHPQWVLTA AHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRPVPSHSF
PHPLYNMSLLKHQSLRPDEDSSHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEP
ALGTTCYASGWGSIEPEEFLRPRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFM
LCAGLWTGGKDTCGGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYT
KVVHYRKWIKDTIAANPEFTTDA AHPGRSVVPALLPLL AGLTLLLETATA

[0251] **P** (KLK2的信号序列以双下划线显示;PLAP GPI附着序列以粗体显示;切割位点以粗体下划线显示)。在任何实施方案中,本文所公开的激肽释放酶-2融合蛋白包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在任何实施方案中,激肽释放酶-2融合蛋白包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0252] 如上文所述,糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着序列包含一段疏水氨基酸,该段疏水氨基酸在翻译后被切割并通过转酰胺基反应被GPI锚定物取代(参见例如,Kinoshita,T.,“Glycosylphosphatidylinositol(GPI) Anchors:Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series”,J.Lipid Res.57(1):4-5(2016),该文献据此全文以引用方式并入)。因此,在任何实施方案中,本文所述的GPI附着序列包含切割位点。根据此类实施方案,根据本公开的激肽释放酶-2融合蛋白不包含切割位点之后的氨基酸残基。例如,在一些实施方案中,当在体内表达时,激肽释放酶-2融合蛋白不包含SEQ ID NO:6的氨基酸残基267-295。

[0253] 在任何实施方案中,本公开蛋白的激肽释放酶-融合蛋白不包含融合蛋白的激肽释放酶部分的氨基末端信号序列。因此,在一些实施方案中,激肽释放酶-融合蛋白不包含SEQ ID NO:6的氨基酸残基1-17。

[0254] 在任何实施方案中,激肽释放酶-2融合蛋白包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。例如,激肽释放酶-2融合蛋白可具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在任何实施方案中,激肽释放酶-2融合蛋白具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0255] 本公开的另一个方面涉及细胞制剂,其中制剂的细胞被修饰为表达如本文所述的重组激肽释放酶-2融合构建体。将制剂的细胞修饰为在其表面表达重组激肽释放酶-2融合蛋白,其中激肽释放酶-2融合蛋白包含激肽释放酶-2多肽序列、与激肽释放酶-2多肽序列的C末端连接的糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着序列的一部分和与GPI附着序列部分偶联的GPI锚定结构域。

[0256] 如上文所详细描述,融合蛋白的激肽释放酶-2部分可包括任何哺乳动物激肽释放酶-2多肽序列,例如,人、鼠、牛、犬、猫、绵羊、猪、熊或猿激肽释放酶-2多肽序列。在任何实施方案中,融合蛋白的激肽释放酶-2部分包含人激肽释放酶-2蛋白或其多肽片段。例如,人激肽释放酶-2多肽序列可具有与SEQ ID NO:4的氨基酸序列或SEQ ID NO:4的氨基酸残基18-263具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0257] GPI附着序列的部分可来源于已知GPI锚定结构域蛋白的GPI附着序列。上文提供了示例性GPI锚定结构域蛋白和GPI附着序列。在任何实施方案中,GPI附着序列的部分来源于碱性磷酸酶,例如,人胎盘碱性磷酸酶。

[0258] 在任何实施方案中,GPI附着序列的部分是SEQ ID NO:5的氨基酸序列的一部分;或与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在任何实施方案中,如本文所述的激肽释放酶-2融合蛋白的GPI附着序列部分包含SEQ ID NO:5的氨基酸残基1-3。

[0259] 在任何实施方案中,将细胞制品修饰为表达重组激肽释放酶-2融合蛋白,该重组激肽释放酶-2融合蛋白具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列或SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。例如,制剂的细胞可在其表面表达激肽释放酶-2融合蛋白,该激肽释放酶-2融合蛋白包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列或SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0260] 在其他实施方案中,细胞制剂在其表面表达具有SEQ ID NO:6的序列或SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重组激肽释放酶-2融合蛋白,或用重组激肽释放酶-2融合蛋白修饰。

[0261] 表达的激肽释放酶-2融合蛋白还包含GPI锚定结构域。GPI锚定结构域通过翻译后在体内发生的GPI转酰胺酶反应与GPI附着序列偶联。附着的GPI锚定结构域包含乙醇胺-PO-6Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN α 1-6肌醇-1-PO-脂质的核心聚糖结构。

[0262] 如上文所述,制剂的细胞可表达来自根据本公开的重组核酸构建体(例如,线性构建体)或包含根据本公开的重组核酸构建体的载体的激肽释放酶-2融合蛋白。

[0263] 本文所述的重组核酸构建体和/或载体可通过转化,特别是转导、缀合、脂质转染、原生质体融合、动员、颗粒轰击、微注射、转染或电穿孔引入细胞。在任何实施方案中,用根据本公开的核酸构建体或根据本公开的载体稳定地转导制剂的细胞。在任何实施方案中,制剂的细胞包含稳定地整合在其基因组中的重组核酸构建体。

[0264] 在任何实施方案中,制剂的细胞是哺乳动物细胞。合适的哺乳动物细胞包括但不限于啮齿动物细胞(即,小鼠或大鼠细胞)、兔细胞、豚鼠细胞、猫细胞、犬细胞、猪细胞、马细胞、牛细胞、绵羊细胞、猴细胞、非人灵长类动物或人细胞。在任何实施方案中,制剂的细胞是人细胞。

[0265] 包含如本文所述的重组核酸构建体或载体的细胞的合适制剂包括处于其谱系的任何阶段(例如,全能、多能、多潜能或分化细胞)的原代、永生化或转化的胚胎细胞、胎儿细胞或成体细胞。其他合适的细胞制剂包括来自细胞系的细胞。

[0266] 在任何实施方案中,制剂的细胞是前列腺细胞,例如,原代前列腺细胞、原代前列腺癌细胞、前列腺癌细胞系或非肿瘤前列腺细胞系。

[0267] 合适的示例性非肿瘤前列腺细胞系包括但不限于pRNS-1-1、RWPE-1、BPH1和PIN细胞系(Cunningham和You,“In Vitro and In Vivo Model Systems Used in Prostate Cancer Research”,J.Biol.Methods 2(1):e17(2015),该文献据此全文以引用方式并入)。RWPE-1细胞用人乳头瘤病毒(HPV)18永生化,随后分离并增殖6周-7周,对AR/PSA mRNA/蛋白呈阳性,对雄激素敏感。从前列腺肥大或增生(BPH)组织中分离出BPH1细胞,该组织是通过经尿道切除从经历与BPH一致的尿路梗阻程序的患者获得的。BPH1细胞用SV40大T抗原永

生化,并且为AR/PSA阴性和WT p53阳性。从患有前列腺上皮内瘤形成(PIN)的患者分离PIN细胞,并用HPV 18永生化。

[0268] 在任何实施方案中,前列腺细胞是激素原初前列腺癌(PCa)细胞系。合适的激素原初PCa细胞系包括但不限于RWPE-2、LNCaP、LAPC-4、LAPC-9、VCaP、MDA PCa 2a/2b和LuCaP (Cunningham和You,“In Vitro and In Vivo Model Systems Used in Prostate Cancer Research”,*J.Biol.Methods*2(1):e17(2015),该文献据此全文以引用方式并入)。LNCaP细胞首先从在淋巴结中发现的人转移性前列腺腺癌中分离,并且是对AR和PSA mRNA/蛋白表达有响应的雄激素。VCaP细胞是在2001年首次分离的,是脊椎转移性病变的结果。VCaP细胞对野生型AR mRNA/蛋白的雄激素敏感性呈阳性,并表达PSA mRNA/蛋白、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、视网膜母细胞瘤(Rb)和p53(具有A248W突变)。MDA PCa 2a/2b细胞系来源于在晚期疾病阶段具有脊椎转移的单个患者,在小鼠中是对雄激素敏感的和致瘤的,表达AR mRNA/蛋白,并且表达PSA mRNA/蛋白。

[0269] 在任何实施方案中,前列腺癌细胞系是去势抗性细胞系。合适的去势抗性细胞系包括但不限于C4-2、C4-2B、22Rv1、ARCaP(MDA PCa 1)、PC3和DU145细胞系(Cunningham和You,“In Vitro and In Vivo Model Systems Used in Prostate Cancer Research”,*J.Biol.Methods* 2(1):e17(2015),该文献据此全文以引用方式并入)。PC3细胞是从脊椎转移性前列腺肿瘤中分离的,是激素非依赖性的,不表达雄激素受体(AR)或PSA mRNA/蛋白,并且表达具有密码子138中的C缺失的异常p53,导致169处的无意义密码子(导致杂合性丧失)。DU145细胞来源于脑转移,是激素非依赖性的,不表达雄激素受体(AR)mRNA/蛋白或PSA mRNA/蛋白,并且包含杂合P223L/V274F p53表达模式。

[0270] 在任何实施方案中,制剂的细胞不表达内源KLK2,即,细胞仅表达如本文所述的激肽释放酶-2融合蛋白。在任何实施方案中,制剂的细胞表达内源KLK2并表达如本文所述的激肽释放酶-2融合蛋白。

[0271] 本公开的另一个方面涉及包含在其表面表达重组激肽释放酶-2融合蛋白的细胞的非人动物,其中重组融合蛋白包含激肽释放酶-2多肽序列、与激肽释放酶-2多肽序列的C末端连接的糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着序列的一部分和与GPI附着序列部分偶联的GPI锚定结构域。

[0272] 在一个实施方案中,将表达重组激肽释放酶-2融合蛋白的细胞移植到非人动物中。在一个实施方案中,将表达重组激肽释放酶-2融合蛋白的细胞移植到啮齿动物中。在一个实施方案中,将表达重组激肽释放酶-2融合蛋白的细胞移植到小鼠中。在一个实施方案中,将表达重组激肽释放酶-2融合蛋白的人细胞移植到免疫失能的啮齿动物(例如,免疫失能的小鼠)中。在一个实施方案中,将表达重组激肽释放酶-2融合蛋白的小鼠细胞移植到同系小鼠中。

[0273] 在另一个实施方案中,编码激肽释放酶-2融合蛋白的重组核酸构建体被稳定地整合到非人动物的基因组中,以产生能够在其细胞的所有或某些亚型的表面表达激肽释放酶-2融合蛋白的转基因非人动物,如本文所述。

[0274] 可通过本领域技术人员熟知的任何标准方法将编码如上文所述的激肽释放酶-2融合蛋白的重组核酸构建体整合到非人动物的基因组中。可使用本领域已知的多种技术中的任一种技术将转基因引入动物,以产生转基因动物的首建系(参见例如,Hogan等人,

Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (冷泉港实验室, 1986); Hogan 等人, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (冷泉港实验室, 1994); 和以下美国专利号: 授予Lazzarini的5,602,299; 授予Krimpenfort的5,175,384; 授予Ginsburg的6,066,778; 和授予Sato等人的6,037,521, 这些文献据此全文以引用方式并入)。此类技术包括但不限于原核显微注射 (授予Wagner等人的美国专利号4,873,191, 该专利据此全文以引用方式并入); 逆转录病毒介导的基因转移到种系中 (Van der Putten等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:6148-6152(1985), 该文献据此全文以引用方式并入); 胚胎干细胞中的基因靶向 (Thompson等人, Cell 56:313-321(1989), 该文献据此全文以引用方式并入); 胚胎的电穿孔 (Lo等人, Mol.Cell.Biol.3:1803-1814(1983), 该文献据此全文以引用方式并入); 和精子介导的基因转移 (Lavitrano等人, Cell 57:717-723(1989), 该文献据此全文以引用方式并入)。

[0275] 在任何实施方案中, 不同发育阶段的胚胎细胞可用于引入转基因以生产转基因动物。根据胚胎细胞的发育阶段使用不同的方法。受精卵是用于微注射的良好靶标, 并且微注射受精卵的方法是众所周知的 (参见授予Wagner等人的美国专利号4,873,191, 该专利据此全文以引用方式并入)。使用受精卵作为基因转移的靶标的主要优点在于, 在大多数情况下, 注射的DNA将在第一次切割前掺入宿主基因组中 (Brinster等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:4438-4442(1985), 该文献据此全文以引用方式并入)。因此, 转基因非人动物的所有细胞将携带整合的转基因。

[0276] 本发明的转基因动物还可通过将靶向载体引入胚胎干 (ES) 细胞来产生。通过在合适的条件下培养植入前胚胎在体外获得ES细胞 (Evans等人, Nature 292:154-156(1981); Bradley等人, Nature 309:255-258(1984); Gossler等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:9065-9069(1986); 和Robertson等人, Nature 322:445-448(1986), 这些文献据此全文以引用方式并入)。使用本领域已知的多种方法, 包括电穿孔、磷酸钙共沉淀、原生质体或原生质体融合、脂转染和DEAE-葡聚糖介导的转染, 通过DNA转染可将转基因有效地引入ES细胞。也可通过逆转录病毒介导的转导或通过微注射将转基因引入ES细胞。此类转染的ES细胞随后可在导入囊胚期胚胎的囊胚腔后定殖于胚胎, 并促成所得嵌合动物的种系 (综述于Jaenisch, Science240:1468-1474(1988)中, 该文献据此全文以引用方式并入)。在将转染的ES细胞引入囊胚腔之前, 可对转染的ES细胞进行各种选择方案以富集已经整合了转基因的ES细胞, 如果转基因提供了这种选择的方式的话。

[0277] 此外, 逆转录病毒感染也可用于将转基因引入非人动物。发育中的非人胚胎可在体外培养至囊胚期。在此期间, 卵裂球可以是逆转录病毒感染的靶标 (Janenich, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73:1260-1264(1976), 该文献据此全文以引用方式并入)。用于引入转基因的病毒载体系统通常是携带该转基因的复制缺陷型逆转录病毒 (Jahner等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:6927-6931(1985); Van der Putten等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:6148-6152(1985))。通过在单层病毒生产细胞上培养卵裂球可容易且有效地获得转染。另选地, 可在后期进行感染。本领域已知的使用逆转录病毒或逆转录病毒载体产生转基因动物的其他方式涉及将逆转录病毒颗粒或生产逆转录病毒的丝裂霉素C处理的细胞微注射到受精卵或早期胚胎的卵周隙中 (授予Onions的WO 90/08832, 该专利据此全文以引用方式并入)。

[0278] 在任何实施方案中,转基因非人动物在其所有细胞的表面表达激肽释放酶-2融合蛋白。在任何实施方案中,转基因非人动物在其一些但不是所有细胞中表达激肽释放酶-2融合蛋白,即,融合蛋白的表达由置于转基因上游的细胞特异性启动子和/或增强子元件控制。在一个实施方案中,转基因非人动物仅在前列腺细胞中表达激肽释放酶-2融合蛋白。根据本公开的该实施方案,前列腺细胞特异性启动子序列与编码激肽释放酶-2融合蛋白的重组核酸构建体可操作地连接。合适的前列腺特异性启动子包括但不限于前列腺特异性抗原(PSA)启动子、probasin启动子、前列腺特异性膜抗原(PSMA)和小鼠乳房肿瘤病毒(MMTV LTR)启动子。适于在转基因动物中驱动转基因表达的表达或克隆构建体是本领域熟知的。表达构建体的其他组分包括强多腺苷酸化位点、合适的限制性内切酶位点和确保转录物被剪接的内含子。

[0279] 可将编码激肽释放酶-2融合蛋白的重组核酸构建体插入任何非人动物中。优选地,动物是啮齿动物,更优选地,动物是小鼠。通常用于产生转基因模型的合适的小鼠品系包括但不限于CD-1[®]裸鼠、NU/NU小鼠、BALB/C裸鼠、BALB/C小鼠、NIH-III小鼠、SCID[®]小鼠、远交SCID[®]小鼠、SCID Beige小鼠、C3H小鼠、C57BL/6小鼠、DBA/2小鼠、FVB小鼠、CB17小鼠、129小鼠、SJL小鼠、B6C3F1小鼠、BDF1小鼠、CDF1小鼠、CB6F1小鼠、CF-1小鼠、Swiss Webster小鼠、SKH1小鼠、PGP小鼠和B6SJL小鼠。

[0280] 在任何实施方案中,将编码激肽释放酶-2融合蛋白的重组核酸构建体引入非鼠哺乳动物,诸如绵羊、山羊、猪、犬、猫、猴、黑猩猩、仓鼠、兔、牛和豚鼠(参见例如, Kim等人, “Development of a Positive Method for Male Stem-cell Mediated Gene-transfer in Mouse and Pig”, Mol.Reprod.Dev.46(4):515-526(1997); Houdebine, “The Production of Pharmaceutical Proteins from the Milk of Transgenic Animals”, Reprod.Nutr.Dev.35(6):609-617(1995); Petters, “Transgenic Livestock as Genetic Models of Human Disease”, Reprod.Fertil.Dev.6(5):643-645(1994); Schnieke等人, “Human Factor IX Transgenic Sheep Produced by Transfer of Nuclei from Transfected Fetal Fibroblasts”, Science 278(5346):2130-2133(1997); Amoah和Gelaye, “Biotechnology Advances in Goat Reproduction”, J.Animal Science 75(2):578-585(1997), 这些文献据此全文以引用方式并入)。

[0281] 筛选并评价转基因动物,以选择具有其中激肽释放酶-2融合蛋白在所有细胞或细胞的子集(例如,特别是前列腺细胞)上表达的表型的那些动物。可使用例如DNA印迹分析或PCR技术进行初始筛选以分析动物细胞,从而验证转基因的整合已发生。转基因动物的细胞中转基因的mRNA表达水平也可使用包括但不限于从动物获得的组织样本的RNA印迹分析、原位杂交分析和逆转录酶-PCR(rt-PCR)的技术来评估。此外,激肽释放酶-2融合蛋白的表面表达可通过流式细胞术使用如本文所述的人特异性抗激肽释放酶-2抗体(例如,抗体KL2B1、KL2B53和KL2B30)来评价。

[0282] 本公开的另一个方面涉及鉴定激肽释放酶-2靶向治疗剂的方法。在任何实施方案中,治疗性激肽释放酶-2靶向剂是结合激肽释放酶-2以引起治疗终点(例如,诱导细胞死亡)的药剂。在任何实施方案中,治疗性激肽释放酶-2靶向剂是直接结合激肽释放酶-2或以其他方式与激肽释放酶-2相互作用以调节激肽释放酶-2表达、活性或功能的药剂。在任何实施方案中,治疗性激肽释放酶-2靶向剂是与激肽释放酶-2结合或以其他方式与激肽释放

酶-2相互作用以将活性剂递送至在其表面表达激肽释放酶-2的细胞的药剂。在任何实施方案中,治疗性激肽释放酶-2靶向剂是同时结合激肽释放酶-2和免疫细胞(例如,T淋巴细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、iPSC衍生的T细胞或iPSC衍生的NK细胞)以介导免疫细胞对在其表面表达激肽释放酶-2的细胞的杀伤的药剂。

[0283] 根据本公开的这一方面,鉴定激肽释放酶-2靶向剂的方法涉及提供如本文所述的细胞制剂,其中制剂的细胞在其表面表达激肽释放酶-2融合蛋白(例如,包含激肽释放酶-2多肽序列、与激肽释放酶-2多肽序列的C末端连接的糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着序列的一部分和与GPI附着序列部分偶联的GPI锚定结构域的融合蛋白)。该方法还涉及向细胞制剂施用候选激肽释放酶-2靶向剂,并基于所述施用确定候选药剂是否结合激肽释放酶-2或以其他方式修饰激肽释放酶-2表达、功能或活性。

[0284] 在任何实施方案中,该方法还涉及提供第二细胞制剂,其中第二制剂的细胞未被修饰为表达如本文所述的激肽释放酶-2融合蛋白。在被修饰为表达激肽释放酶-2融合蛋白的细胞制剂与不表达激肽释放酶-2融合蛋白的细胞制剂(即,对照细胞制剂)之间,用于确定候选药剂是否结合激肽释放酶-2或以其他方式修饰激肽释放酶-2的功能、表达或活性的终点的比较证明了候选药剂的激肽释放酶-2抗原特异性。在任何实施方案中,第二细胞制剂与被修饰为表达激肽释放酶-2融合蛋白的细胞制剂等基因。

[0285] 用于本文所述的方法的合适的细胞制剂在上文详细描述。在任何实施方案中,细胞制剂是癌细胞制剂。在任何实施方案中,细胞制剂是前列腺癌(PCa)细胞制剂。

[0286] 另选地,该方法涉及提供非人动物,该非人动物包含在其表面表达重组激肽释放酶-2融合蛋白的细胞。如上文所述,非人动物体的激肽释放酶-2融合蛋白包含激肽释放酶-2多肽序列、与激肽释放酶-2多肽序列的C末端连接的糖基磷脂酰肌醇(GPI)附着序列的一部分和与GPI附着序列部分偶联的GPI锚定结构域。该方法还涉及向非人动物施用候选激肽释放酶-2靶向治疗剂,并且基于所述施用确定候选药剂是否结合激肽释放酶-2。向非人动物施用候选激肽释放酶-2治疗剂可使用任何合适的方式进行,例如,通过胃肠外、局部、口服、静脉内、皮下、腹膜、鼻内或肿瘤内施用方式。

[0287] 在任何实施方案中,该方法还涉及提供不包含被修饰为表达如本文所述的激肽释放酶-2融合蛋白的细胞的第二非人动物。在包含被修饰为表达激肽释放酶-2融合蛋白的细胞制剂的非人动物与缺乏此类修饰的细胞的非人动物之间,用于确定候选药剂是否结合激肽释放酶-2或以其他方式修饰激肽释放酶-2的功能、表达或活性的终点的比较证明了候选药剂的激肽释放酶-2抗原特异性。在任何实施方案中,第二非人动物与包含被修饰为表达激肽释放酶-2融合蛋白的细胞的非人动物等基因。

[0288] 上文更详细地描述了根据本公开的合适的非人动物。

[0289] 根据这些方法,候选药剂是任何候选激肽释放酶-2靶向治疗剂。合适的候选靶向治疗剂包括但不限于任何化学或药物实体(例如,小分子激肽释放酶-2结合剂)、生物激肽释放酶-2结合分子(例如,激肽释放酶-2结合肽、抗激肽释放酶-2抗体、抗体片段、单体等)、激肽释放酶-2嵌合抗原受体(CAR)T或NK细胞治疗。

[0290] 在任何实施方案中,候选激肽释放酶-2靶向剂包括可检测标记(例如,药剂可以是直接或间接可检测的)。在一些情况下,候选激肽释放酶-2靶向剂是直接标记的(例如,药剂可包括直接可检测的加合物,诸如荧光加合物)。在一些情况下,候选药剂被间接标记(例

如,药剂可包括间接可检测的加合物,诸如生物素)。

[0291] 在任何实施方案中,确定候选激肽释放酶-2靶向剂是否结合激肽释放酶-2融合蛋白或以其他方式与激肽释放酶-2融合蛋白相互作用可通过测量与表达激肽释放酶-2融合蛋白的细胞结合的候选药剂的量来完成。测量与表达激肽释放酶-2融合蛋白的细胞结合的候选药剂的量可提供定性或定量结果。在任何实施方案中,可使用流式细胞术、ELISA或可定量测量存在于表达激肽释放酶-2融合蛋白的细胞或与表达激肽释放酶-2融合蛋白的细胞结合的候选药剂的量的任何其他方法进行测量。结合的候选药剂的量(水平)可与特定测定相关的任意单位(例如,荧光单位,例如,平均荧光强度(MFI))表示,或者可以具有限定单位(例如,分子数(例如,摩尔)、蛋白质分子数、药剂浓度等)的绝对值表示。另外,可将定量测量的量(水平)与参考值的量进行比较,以导出代表归一化测量的归一化值。

[0292] 在任何实施方案中,确定候选药剂是激肽释放酶-2靶向治疗剂还是以其他方式与激肽释放酶-2融合蛋白相互作用可通过测量下游治疗终点(例如,抗体依赖性细胞毒性或补体依赖性细胞毒性)来完成。测量细胞毒性、细胞死亡和/或细胞活力的方法是本领域技术人员熟知的。

[0293] 提供以下实施例以进一步描述本文所公开的实施方案中的一些。这些实施例旨在说明而非限制本发明所公开的实施方案。同样,本发明不限于本文所述的任何特定优选实施方案。实际上,在阅读本说明书后,本发明的许多修改和变型对于本领域的技术人员将是显而易见的,并且此类变型可在不脱离实质或范围内的本发明的情况下作出。因此,本发明仅受所附权利要求的条款以及这些权利要求所赋予的等同物的全部范围的限制。

[0294] 实施例

[0295] 实施例1-激肽释放酶-2融合蛋白的细胞表面表达

[0296] 将huKLK2_GPI基因成功地克隆到pCDH Neo载体的5`XbaI和3`BamHI限制性位点(SEQ ID NO:7)。对放大的质粒DNA进行序列确认。慢病毒在HEK293TN细胞中产生,并在含有TransDux™的完全培养基(EMEM+10%FBS+1×MEM-NEAA+1×丙酮酸钠)中转导到DU145细胞中。在1mg/ml遗传霉素中选择用KLK2-GPI基因转导的细胞并通过流式细胞术分析KLK2表面表达。使用与藻红蛋白(Janssen)缀合的KL2B1抗体评估KLK2的表面表达。表面表达也通过从R&D Systems采购的KLK2抗体(人激肽释放酶2抗体;克隆426723;R&D Systems;目录号MAB4104)随后是与藻红蛋白缀合的二级山羊抗小鼠检测抗体(Southern Biotech;目录号1030-09)进行评估。通过Janssen抗体(图1和表3)和R&D Systems抗体均在转导细胞的细胞表面检测到KLK2-GPI的表达。

[0297] 表3. 用KLK2抗体染色的DU145细胞中的荧光强度

样品	平均值	中值
未转导的DU145细胞	4,646	3,832
未转导的DU145细胞+同种型对照Ab	5,342	4,437
未转导的DU145细胞+KLK-PE Ab	5,329	4,456
转导的DU145细胞+KLK2-PE Ab(病毒稀释:1:2)	32,745	31,139
转导的DU145细胞+KLK2-PE Ab(病毒稀释:1:5)	33,432	31,836

[0299] 实施例2-DU145/KLK2_GPI和PC3/KLK2_GPI细胞系的评估

[0300] 如上述实施例1所述,将GPI锚定的KLK2工程化到DU145或PC3前列腺肿瘤细胞系

中。使用aKLK 2特异性抗体 (Ab) (克隆KL2B1、KL2B30或KL2B53) 通过流式细胞术确认KLK2细胞表面表达 (图2A至图2C)。KL2B1、KL2B30和KL2B53识别KLK2蛋白上的不同表位并显示对VCaP细胞的不同结合亲和力 (图2A)。相反, 这些Ab不识别不表达KLK2的亲本DU145或PC3肿瘤细胞 (图2B和图3A)。GPI锚定的KLK2的表达导致这些Ab与工程化的DU145/KLK2_GPI和PC3/KLK2_GPI肿瘤细胞结合 (图2C和图3B)。KLK2_GPI和PSMA的共表达也是可能的, 产生对KLK2和PSMA均为阳性的细胞系, 其可用于双重靶向治疗策略的验证 (图3C)。

[0301] 使用三种不同的治疗方式来评估DU145/KLK2_GPI和PC3/KLK2_GPI细胞系- (1) aKLK2抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、(2) KLK2 × CD3双特异性抗体和 (3) aKLK2 CAR-T细胞。

[0302] aKLK2介导的ADCC测定

[0303] 对于aKLK2介导的ADCC测定, 将健康供体外周血NK细胞 (PB-NK) 与VCaP、DU145或PC3前列腺肿瘤细胞在有或没有KLK2表达的情况下共培养 (图4A至图4C和图5A至图5B)。VCaP肿瘤细胞系是在细胞表面表达内源KLK2的唯一肿瘤系。这些肿瘤细胞可在hIgG1 Fc或低岩藻糖基化Fc (LF) 上存在aKLK2抗体的情况下被PB-NK裂解 (图4A)。同种型对照 (hIgG1 iso) 或沉默Fc上的aKLK2 (aKLK2 Silent) 不能介导针对VCaP细胞的ADCC。图4A至图4C中的结果进一步证明了hIgG1 Fc或LF上的aKLK2以剂量依赖性方式介导针对DU145/KLK2_GPI的ADCC, 但不针对不表达KLK2的DU145亲本细胞。低岩藻糖基化aKLK2 (aKLK2 LF) Ab比针对VCaP或DU145/KLK2_GPI的野生型人IgG1 Fc (aKLK2 hIgG1) 的相同抗体更有效, 表明相对于正常岩藻糖hIgG1, LF Ab增强ADCC。同种型对照 (hIgG1 iso) 或沉默Fc上的aKLK2 (aKLK2 Silent) 不能介导针对DU145/KLK2_GPI肿瘤细胞的ADCC。在PC3/KLK2_GPI前列腺肿瘤细胞中观察到类似的结果 (图5A至图5B)。这些发现证明了KLK2抗原定向杀伤肿瘤靶点以及等基因细胞系对的效用。由于在VCaP肿瘤细胞中敲除KLK2的多次尝试已经失败, 因此使用新的等基因细胞系对于通过KLK2靶向治疗证明KLK2抗原特异性应答是关键。

[0304] KLK2 × CD3双特异性Ab介导的杀伤测定

[0305] 对于KLK2 × CD3双特异性Ab介导的杀伤测定, 将健康供体外周血T细胞与VCaP、LnCap/KLK2或DU145/KLK2_GPI肿瘤细胞共培养 (图6)。KLK2 × CD3双特异性Ab诱导所有三种靶细胞的剂量依赖性裂解, 针对内源表达的VCaP细胞具有最高敏感性。针对DU145/KLK2_GPI肿瘤细胞的杀伤不如VCaP有效, 但两种细胞系之间的最大杀伤水平相似, 表明通过GPI锚定的KLK2被双特异性Ab识别。针对LnCap/KLK2的最大杀伤显著更低, 这可能是由于与VCaP和DU145/KLK2_GPI相比, LnCap上展示的KLK2的相对低的表达水平。KLK2在LnCap/KLK2细胞系中的表达不是GPI锚定物。这进一步证明了GPI锚定的KLK2是在细胞表面以高水平表达KLK2的有用工具。

[0306] CAR-T功能性评估

[0307] 对于CAR-T功能性评估, 将健康供体T细胞用KLK2 CAR转导并与VCaP、亲本DU145或DU145/KLK2_GPI共培养 (图7A至图7C)。尽管未转导的T细胞 (UTD) 由于同种异体识别而以中等水平杀死VCaP细胞, 但KLK2 CAR-T比未转导的T细胞更有效地杀死VCaP细胞, 证明了CAR介导的细胞毒性 (图7A)。此外, KLK2 CAR-T证明了针对DU145/KLK2_GPI而非亲本DU145肿瘤细胞的KLK2特异性细胞溶解 (图7B和图7C)。这些发现再次表明, GPI锚定的表达KLK2的前列腺细胞系是证明KLK2特异性的重要工具。它还进一步强调等基因肿瘤细胞通过KLK2靶向治

疗证明KLK2抗原特异性应答的重要性。

[0308] DU145+KLK2细胞可用于筛选CAR设计

[0309] 将稳定表达每种设计的NK-101细胞用针对CAR的结合结构域的抗体分选,使得表达CAR的细胞群体的纯度范围为86%-99%。这些效应子NK-101+CAR细胞以0.5:1的E:T比率与表达(图9A)或不表达(图9B)KLK2的DU145靶肿瘤细胞共培养。使用IncuCyte每2小时对每个孔中剩余的活肿瘤靶细胞的数量计数,持续5天,并针对仅肿瘤孔进行归一化,以产生活肿瘤靶细胞%。为了确定不是由CAR介导的先天杀伤的量,还测试了不表达KLK2的DU145亲本细胞。CAR特异性细胞毒性通过下式确定:CAR特异性细胞毒性 = $(AUC_{DU145亲本}) - (AUC_{DU145+KLK2})$, 并如(图9C)中那样作图。对照包括未转导的NK-101细胞以及表达非特异性CAR(NS CAR-c)的NK-101细胞,该非特异性CAR不与KLK2或靶细胞上的任何其他物质结合。

[0310] 虽然本文已经描绘和详述了优选的实施方案,但对于相关领域的技术人员将显而易见的是,可在不脱离本发明的实质的情况下进行各种修改、添加、取代等,并因此认为这些在如下权利要求中所定义的本发明的范围之内。

序列表

<110> 杨森生物科技公司(JANSSEN BIOTECH INC.)	
<120> 编码激肽释放酶-2融合蛋白的核酸构建体以及载体、细胞制剂及其使用方法	
<130> JBI6578WOPCT1	
<140>	
<141>	
<150> 63/209,019	
<151> 2021-06-10	
<160> 26	
<170> PatentIn 3.5版	
<210> 1	
<211> 789	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸	
<400> 1	
atgtgggacc tggttctctc catcgccttg tctgtggggt gcaactggtgc cgtgccccctc	60
atccagtctc ggatcgtggg gggctgggag tgcgagaagc acagccagcc ttggcaagtg	120
gcagtgtact cccacggttg ggcgcactgc ggtggcgctgc tgggtgcaccc acaatgggtg	180
ctcaccgcgg cccactgtct gaagaagaat tcacaagtct ggctgggacg ccataacctg	240
ttcgaacctg aagatactgg gcagcgcgtg ccggtgtccc attccttccc tcaccattg	300
tacaacatgt cgctgctgaa gcaccagtct ttgaggcctg atgaggacag ctcccatgac	360
ctcatgctgc ttagactctc ggaacccgca aagattaccg acgtcgtgaa agtgcttgga	420
ctgccgacgc aggaacccgc cttggggact acctgttatg cttccggctg gggatccatc	480
gagcccgaag aattcctgcg gccgcgcagc ctgcagtgcg tgtccctcca tctgctgtca	540
aacgatatgt gcgccagagc ctactccgaa aaggtcaccg agtttatgct gtgcgccgga	600
ctgtggaccg ggggaaagga cacttgcggc ggagacagcg gcggccccct ggtctgcaac	660
ggcgtgctgc agggaattac ctcgtgggggt ccagagccgt gtgcgctgcc tgaaaagccc	720
gccgtgtaca ctaaggtcgt gcactaccgg aagtggatca aggacacat cgccgcgaac	780
ccggaattc	789
<210> 2	
<211> 96	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成寡核苷酸	

<400> 2	
accactgatg ctgcccaccc tggaaggtct gtggtgcctg ccttgctgcc tctgctggct	60
ggcactctgc tgctgctgga gactgccact gctccc	96
<210> 3	
<211> 891	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸	
<400> 3	
atgtgggacc tggttctctc catcgcttg tctgtgggt gcactgggtgc cgtgcccctc	60
atccagtctc ggatcgtggg gggctgggag tgcgagaagc acagccagcc ttggcaagtg	120
gcagtgtact cccacggttg ggcgcaactgc ggtggcgtgc tggcgcacc acaatgggtg	180
ctcaccgcgg cccactgtct gaagaagaat tcacaagtct ggctgggacg ccataacctg	240
ttcgaacctg aagatactgg gcagcgcgtg ccggtgtccc attccttccc tcaccattg	300
tacaacatgt cgctgctgaa gcaccagtct ttgaggcctg atgaggacag ctcccatgac	360
ctcatgctgc ttagactctc ggaacccgca aagattaccg acgtcgtgaa agtgccttga	420
ctgccgacgc aggaacccgc cttggggact acctgttatg cttccggctg gggatccatc	480
gagcccgaag aattcctgcg gccgcgcagc ctgcagtgcg tgtccctcca tctgctgtca	540
aacgatatgt gcgccagagc ctactccgaa aaggtcaccg agtttatgct gtgcgccgga	600
ctgtggaccg ggggaaagga cacttgcggc ggagacagcg gcggccccct ggtctgcaac	660
ggcgtgctgc agggaaattac ctctgtgggt ccagagccgt gtgcgctgcc tgaagagccc	720
gccgtgtaca ctaaggtcgt gcactaccgg aagtggatca aggacacat cgccgcgaac	780
ccggaattca ccactgatgc tgcccatcct ggaaggtctg tggcgcctgc cttgctgcct	840
ctgctggctg gcactctgct gctgctggag actgccactg ctcctaata g a	891
<210> 4	
<211> 263	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成多肽	
<400> 4	
Met Trp Asp Leu Val Leu Ser Ile Ala Leu Ser Val Gly Cys Thr Gly	
1 5 10 15	
Ala Val Pro Leu Ile Gln Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu	
20 25 30	
Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Ala Val Tyr Ser His Gly Trp Ala	
35 40 45	
His Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala	

<211> 295
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成多肽
 <400> 6
 Met Trp Asp Leu Val Leu Ser Ile Ala Leu Ser Val Gly Cys Thr Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Pro Leu Ile Gln Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30
 Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Ala Val Tyr Ser His Gly Trp Ala
 35 40 45
 His Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60
 His Cys Leu Lys Lys Asn Ser Gln Val Trp Leu Gly Arg His Asn Leu
 65 70 75 80
 Phe Glu Pro Glu Asp Thr Gly Gln Arg Val Pro Val Ser His Ser Phe
 85 90 95
 Pro His Pro Leu Tyr Asn Met Ser Leu Leu Lys His Gln Ser Leu Arg
 100 105 110
 Pro Asp Glu Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
 115 120 125
 Pro Ala Lys Ile Thr Asp Val Val Lys Val Leu Gly Leu Pro Thr Gln
 130 135 140
 Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155 160
 Glu Pro Glu Glu Phe Leu Arg Pro Arg Ser Leu Gln Cys Val Ser Leu
 165 170 175
 His Leu Leu Ser Asn Asp Met Cys Ala Arg Ala Tyr Ser Glu Lys Val
 180 185 190
 Thr Glu Phe Met Leu Cys Ala Gly Leu Trp Thr Gly Gly Lys Asp Thr
 195 200 205
 Cys Gly Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln
 210 215 220
 Gly Ile Thr Ser Trp Gly Pro Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Lys Pro
 225 230 235 240
 Ala Val Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr
 245 250 255
 Ile Ala Ala Asn Pro Glu Phe Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Arg

	260	265	270	
	Ser Val Val Pro Ala Leu Leu Pro Leu Leu Ala Gly Thr Leu Leu Leu			
	275	280	285	
	Leu Glu Thr Ala Thr Ala Pro			
	290	295		
<210>	7			
<211>	8724			
<212>	DNA			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	人工序列的描述:合成多核苷酸			
<400>	7			
	acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca			60
	acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcattgccga ttggtggaag taaggtggtta			120
	cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga			180
	attgccgcat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacataa acgggtctct			240
	ctggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa			300
	gcctcaataa agcttgccctt gagtgcttca agtagtgtgt gcccgtctgt tgtgtgactc			360
	tggttaactag agatccctca gaccctttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcagtggcgc			420
	ccgaacaggg acttgaaagc gaaaggaaa ccagaggagc tctctcgacg caggactcgg			480
	cttgctgaag cgcgcacggc aagaggcag gggcggcagc tggtagtac gccaaaattt			540
	gactagcggg ggctagaggg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag			600
	aataagatcg cgatgggaaa aaattcggtt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt			660
	aaaacatata gtatgggcaa gcaggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctggt			720
	agaaacatca gaaggctgta gacaaact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg			780
	atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag			840
	gatagagata aaagacacca aggaagctt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag			900
	taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg			960
	acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag			1020
	caccaccaa ggcaaagaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag			1080
	ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgcagcg tcaatgacgc			1140
	tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtgea gcagcagaac aatttgctga			1200
	gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcattc aagcagctcc			1260
	aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctctcg gggatttggg			1320
	gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata			1380
	aatctctgga acagatttgg aatcacacga cctggatgga gtgggacaga gaaattaaca			1440
	attacacaag cttataacac tccttaattg aagaatcgca aaaccagcaa gaaaagaatg			1500
	aacaagaatt attggaatta gataaatggg caagtttgtg gaattggttt aacataacaa			1560
	attggctgtg gtatataaaa ttattcataa tgatagtagg aggcttggtta ggtttaagaa			1620

tagtttttgc	tgtactttct	atagtgaata	gagttaggca	gggatattca	ccattatcgt	1680
ttcagaccca	cctccaacc	ccgaggggac	ccgacaggcc	cgaaggaata	gaagaagaag	1740
gtggagagag	agacagagac	agatccattc	gattagtga	cggatctcga	cggtatcgg	1800
taacttttaa	aagaaaagg	gggattgggg	gttacagtgc	aggggaaaga	atagtagaca	1860
taatagcaac	agacatacaa	actaaagaat	tacaaaaaca	aattacaaaa	ttcaaaat	1920
ttcgatacta	gtggatctgc	gatcgctccg	gtgcccgtca	gtgggcagag	cgcacatcgc	1980
ccacagtccc	cgagaagttg	gggggagggg	tcggcaattg	aacgggtgcc	tagagaaggt	2040
ggcgcgggg	aaactgggaa	agtgatgtcg	tgtactggct	ccgcctttt	cccgaggg	2100
ggggagaacc	gtatataagt	gcagtagtcg	ccgtgaacgt	tctttttcgc	aacgggtttg	2160
ccgccagaac	acagctgaag	cttcgagggg	ctcgcattct	tccttcacgc	gcccgcgcgc	2220
ctacctgagg	ccgccatcca	cgccggttga	gtcgcgttct	gccgcctccc	gcctgtgggt	2280
cctcctgaac	tgcgtccgcc	gtctaggtaa	gtttaaagct	caggctcaga	ccgggccttt	2340
gtccggcgt	cccttggagc	ctacctagac	tcagccggt	ctccacgctt	tgcctgacct	2400
tgttgcctca	actctacgtc	tttgtttcgt	tttctgttct	gcgccgttac	agatccaagc	2460
tgtgaccggc	gcctactcta	gagccgccac	catgtgggac	ctggttctct	ccatcgcctt	2520
gtctgtgggg	tgcactgggt	ccgtgccct	catccagtct	cggatcgtgg	ggggctggga	2580
gtgcgagaag	cacagccagc	cttgcaagt	ggcagtgtac	tcccacggtt	gggcgactg	2640
cggtggcgtg	ctggtgcacc	cacaatgggt	gctcaccgcg	gcccactgtc	tgaagaagaa	2700
ttcacaagtc	tggctgggac	gccataacct	gttcgaacct	gaagatactg	ggcagcgcgt	2760
gccggtgtcc	cattccttcc	ctcaccatt	gtacaacatg	tcgctgctga	agcaccagtc	2820
tttgaggcct	gatgaggaca	gctccatga	cctcatgctg	cttagactct	cggaaccgc	2880
aaagattacc	gacgtcgtga	aagtgttgg	actgccgacg	caggaaccgc	ccttggggac	2940
tacctgttat	gcttccggt	gggatccat	cgagcccga	gaattcctgc	ggccgcgcag	3000
cctgcagtgc	gtgtccctcc	atctgctgtc	aaacgatatg	tgcgccagag	cctactccga	3060
aaaggtcacc	gagtttatgc	tgtgcgccgg	actgtggacc	gggggaaagg	acacttgcgg	3120
cggagacagc	ggcggcccc	tggctgcaa	cggcgtgctg	caggaatta	cctcgtgggg	3180
tccagagccg	tgtgcgctgc	ctgaaaagcc	cgccgtgtac	actaaggctg	tgcactaccg	3240
gaagtggatc	aaggacacca	tcgccgcgaa	cccgaattc	accactgatg	ctgcccattc	3300
tggaaggtct	gtggtgcctg	ccttgcctgc	tctgctggct	ggcactctgc	tgctgctgga	3360
gactgccact	gctccctaat	gaggatccgc	ggccgcgcc	ctctccctcc	cccccccta	3420
acgttactgg	ccgaagccgc	ttggaataag	gccggtgtgc	gtttgtctat	atgttat	3480
ccaccatatt	gccgtctttt	ggcaatgtga	ggcccggaa	acctggccct	gtcttcttga	3540
cgagcattcc	taggggtctt	tcccctctcg	caaaggaat	gcaaggtctg	ttgaatgtcg	3600
tgaaggaagc	agttcctctg	gaagcttctt	gaagacaaac	aacgtctgta	gcgacccttt	3660
gcaggcagcg	gaacccccca	cctggcgaca	ggtgcctctg	cggccaaaag	ccacgtgtat	3720
aagatacacc	tgcaaaggcg	gcacaacccc	agtgccacgt	tgtgagttgg	atagttgtgg	3780
aaagagtcaa	atggctctcc	tcaagcgtat	tcaacaagg	gctgaaggat	gcccagaagg	3840
tacccattg	tatgggatct	gatctggggc	ctcgggtcac	atgctttaca	tgtgttttagt	3900
cgaggttaaa	aaaacgtcta	ggccccccga	accacgggga	cgtggttttc	ctttgaaaa	3960

cacgatgata	atatggccac	aaccatggcg	tccggaatga	ttgaacaaga	tggattgcac	4020
gcaggttctc	cggccgcttg	ggtggagagg	ctattcggct	atgactgggc	acaacagaca	4080
atcggctgct	ctgatgccgc	cgtgttccgg	ctgtcagcgc	aggggcgccc	ggttcttttt	4140
gtcaagaccg	acctgtccgg	tgccctgaat	gaactgcagg	acgaggcagc	gcbgctatcg	4200
tggctggccg	cgacgggcgt	tccttgcgca	gctgtgctcg	acgttgtcac	tgaagcggga	4260
agggactggc	tgctattggg	cgaagtgccg	gggcaggatc	tcctgtcatc	tcaccttgct	4320
cctgccgaga	aagtatccat	catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	4380
gctacctgcc	cattcgacca	ccaagcga	catcgcacg	agcagcacg	tactcggatg	4440
gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	cgcgccagcc	4500
gaactgttcg	ccaggetcaa	ggcgcgcatg	cccgcaggcg	aggatctcgt	cgtgacctat	4560
ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatggtg	gaaaatggcc	gcttttctgg	attcatcgac	4620
tgtggccggc	tgggtgtggc	ggaccgctat	caggacatag	cgttggctac	ccgtgatatt	4680
gctgaagagc	ttggcggcga	atgggetgac	cgttctctcg	tgctttacgg	tatcgccgct	4740
cccgattcgc	agcgcacgcg	cttctatcgc	cttcttgacg	agttcttctg	agtcgactcg	4800
acaatcaacc	tctggattac	aaaatttgtg	aaagattgac	tggattctt	aactatgttg	4860
ctccttttac	gctatgtgga	tacgctgctt	taatgccttt	gtatcatgct	attgcttccc	4920
gtatggcttt	cattttctcc	tccttgata	aatcctgggt	gctgtctctt	tatgaggagt	4980
tgtggcccgt	tgtcaggcaa	cgtggcgtgg	tgtgactgt	gtttgctgac	gcaaccccc	5040
ctggttgggg	cattgccacc	acctgtcagc	tcctttccgg	gactttcgt	ttccccctcc	5100
ctattgccac	ggcggaaact	atcgccgcct	gccttgcccg	ctgctggaca	ggggctcggc	5160
tgttgggcac	tgacaattcc	gtgggtgtgt	cggggaaatc	atcgtccttt	ccttggctgc	5220
tcgcctgtgt	tgccacctgg	attctgcgcg	ggacgtcctt	ctgctacgtc	ccttcggccc	5280
tcaatccagc	ggaccttct	tcccgcggcc	tgtgcgggc	tctgcggcct	cttccgcgtc	5340
ttcgccttcg	ccctcagacg	agtcggatct	ccctttgggc	cgcctccccg	cctggtacct	5400
ttaagaccaa	tgacttacia	ggcagctgta	gatcttagcc	actttttaaa	agaaaagggg	5460
ggactggaag	ggctaattca	ctcccaacga	agataagatc	tgctttttgc	ttgtactggg	5520
tctctctggt	tagaccagat	ctgagcctgg	gagctctctg	gctaactagg	gaaccactg	5580
cttaagcctc	aataaagctt	gccttgagtg	ctcaagtag	tgtgtgcccg	tctgttgtgt	5640
gactctggta	actagagatc	cctcagacc	tttagtcag	tgtggaaaat	ctctagcagt	5700
agtagttcat	gtcatcttat	tattcagtat	ttataacttg	caaagaaatg	aatatcagag	5760
agtgagagga	acttgtttat	tgcagcttat	aatggttaca	aataaagcaa	tagcatcaca	5820
aatttcacaa	ataaagcatt	tttttcaactg	cattctagtt	gtggtttgc	caaactcatc	5880
aatgtatctt	atcatgtctg	gctctageta	tcccgcctt	aactccgcc	atcccgcctt	5940
taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	ccatggctg	actaattttt	tttatttatg	6000
cagaggccga	ggccgcctcg	gcctctgagc	tattccagaa	gtagtgagga	ggcttttttg	6060
gaggcctaga	cttttgacga	gaccaaattc	gtaatcatgt	catagctgtt	tcctgtgtga	6120
aattgttatc	cgctcacaat	tccacacaac	atacgagccg	gaagcataaa	gtgtaaagcc	6180
tgggggtgct	aatgagtgag	ctaactcaca	ttaattgcgt	tgcgctcact	gcccgttttc	6240
cagtcgggaa	acctgtcgtg	ccagctgcat	taatgaatcg	gccaacgcgc	ggggagaggc	6300

ggtttgcgta	ttgggcgctc	ttccgcttcc	tcgctcactg	actcgcctgcg	ctcggctcgtt	6360
cggctgcggc	gagcggatc	agctcactca	aaggcggtaa	tacggttatc	cacagaatca	6420
ggggataacg	caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	aaaaggccag	gaaccgtaaa	6480
aaggccgctg	tgctggcgtt	tttccatagg	ctccgcccc	ctgacgagca	tcacaaaaat	6540
cgacgctcaa	gtcagaggtg	gcgaaacccg	acaggactat	aaagatacca	ggcgtttccc	6600
cctggaagct	ccctcgtgcg	ctctcctggt	ccgaccctgc	cgcttaccgg	atacctgtcc	6660
gcctttctcc	cttcgggaag	cgtggcgtt	tctcatagct	cacgctgtag	gtatctcagt	6720
tcggtgtagg	tcgttcgctc	caagctgggc	tgtgtgcacg	aacccccctg	tcagccccgac	6780
cgctgcgcct	tatccggtaa	ctatcgtctt	gagtccaacc	cggtaagaca	cgacttatcg	6840
ccactggcag	cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	ggtatgtagg	cggtgctaca	6900
gagttcttga	agtgggtggc	taactacggc	tacactagaa	ggacagtatt	tggtatctgc	6960
gctctgctga	agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	gctcttgatc	cggcaaaaa	7020
accaccgctg	gtagcgggtg	tttttttgtt	tgcaagcagc	agattacgcg	cagaaaaaaa	7080
ggatctcaag	aagatccttt	gatcttttct	acggggtctg	acgctcagtg	gaacgaaaac	7140
tcacgttaag	ggattttggt	catgagatta	tcaaaaagga	tcttcaccta	gatcctttta	7200
aattaaanaat	gaagttttaa	atcaatctaa	agtatatatg	agtaaacttg	gtctgacagt	7260
taccaatgct	taatcagtga	ggcacctatc	tcagcgatct	gtctatttcg	ttcatccata	7320
gttgcctgac	tccccgtcgt	gtagataact	acgatacggg	agggcttacc	atctggcccc	7380
agtgctgcaa	tgataccgcg	agaccacgc	tcaccggctc	cagatttatc	agcaataaac	7440
cagccagccg	gaagggccga	gcgcagaagt	ggtcctgcaa	ctttatccgc	ctccatccag	7500
tctattaatt	gttgccggga	agctagagta	agtagttcgc	cagttaatag	tttgcgcaac	7560
gttggtgcca	ttgctacagg	catcgtggtg	tcacgctcgt	cgtttggtat	ggcttcattc	7620
agctccggtt	cccaacgatc	aaggcgagtt	acatgatccc	ccatgttgtg	caaaaaagcg	7680
gtagctcct	tcggtcctcc	gatcgttgtc	agaagtaagt	tgcccgagct	gtagctcctc	7740
atggttatgg	cagcactgca	taattctctt	actgtcatgc	catccgtaag	atgcttttct	7800
gtgactggtg	agtactcaac	caagtcattc	tgagaatagt	gtatgcggcg	accgagttgc	7860
tcttgccccg	cgtaatacag	ggataatacc	gcgccacata	gcagaacttt	aaaagtgctc	7920
atcattggaa	aacgttcttc	ggggcgaaaa	ctctcaagga	tcttaccgct	gtaggatcc	7980
agttcgatgt	aaccactcgc	tgcaccaaac	tgatcttcag	catcttttac	ttcaccagc	8040
gtttctgggt	gagcaaaaaac	aggaaggcaa	aatgccgcaa	aaaagggaat	aaggcgacaa	8100
cggaaatggt	gaatactcat	actcttctt	tttcaatatt	attgaagcat	ttatcagggt	8160
tattgtctca	tgagcggata	catatttgaa	tgtatttaga	aaaataaaca	aatagggggtt	8220
ccgcgcacat	ttccccgaaa	agtgccacct	gacgtetaag	aaaccattat	tatcatgaca	8280
ttaacctata	aaaaataggcg	tatcacgagg	ccctttcgtc	tcgcgcgttt	cggtgatgac	8340
ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccc	gagacggtca	cagcttgtct	gtaagcggat	8400
gccgggagca	gacaagcccc	tcaggcgcg	tcagcgggtg	ttggcgggtg	tcggggctgg	8460
cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	accatagcgc	gtgtgaaata	8520
ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	attcgccatt	caggctgcgc	8580
aactggtggg	aaggcgatc	ggtgcgggcc	tcttcgctat	tacgccagct	ggcgaaggg	8640

ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt tttcccagtc acgacgttgt 8700
 aaaacgacgg ccagtgccaa gctg 8724
 <210> 8
 <400> 8
 000
 <210> 9
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成多肽
 <400> 9
 Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His
 1 5 10 15
 Pro Gly Arg Ser Val Val Pro Ala Leu Leu Pro Leu Leu Ala Gly Thr
 20 25 30
 Leu Leu Leu Leu Glu Thr Ala Thr Ala Pro
 35 40
 <210> 10
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成多肽
 <400> 10
 His Glu Thr Thr Pro Asn Lys Gly Ser Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr
 1 5 10 15
 Arg Leu Leu Ser Gly His Thr Cys Phe Thr Leu Thr Gly Leu Leu Gly
 20 25 30
 Thr Leu Val Thr Met Gly Leu Leu Thr
 35 40
 <210> 11
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成多肽
 <400> 11
 Pro Gly Glu Ser Gly Thr Ser Gly Trp Arg Gly Gly Asp Thr Pro Ser

1 5 10 15
 Pro Leu Cys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Arg Leu Leu
 20 25 30

Arg Ile Leu
 35

<210> 12

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 12

Glu Ser Ala Glu Pro Ser Arg Gly Glu Asn Ala Ala Gln Thr Pro Arg
 1 5 10 15
 Ile Pro Ser Arg Leu Leu Ala Ile Leu Leu Phe Leu Leu Ala Met Leu
 20 25 30

Leu Thr Leu
 35

<210> 13

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 13

Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala Ala Trp Pro Phe
 1 5 10 15
 Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu Ser
 20 25

<210> 14

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 14

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

	20	25	30
Gln Thr Pro			
	35		
<210> 15			
<211> 29			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述:合成肽			
<400> 15			
Ser Val Arg Gly Ile Asn Gly Ser Ile Ser Leu Ala Val Pro Leu Trp			
1	5	10	15
Leu Leu Ala Ala Ser Leu Leu Cys Leu Leu Ser Lys Cys			
	20	25	
<210> 16			
<211> 31			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述:合成多肽			
<400> 16			
Asp Ser Glu Gly Ser Gly Ala Leu Pro Ser Leu Thr Cys Ser Leu Thr			
1	5	10	15
Pro Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Trp Thr Val Leu Gly Pro Cys			
	20	25	30
<210> 17			
<211> 32			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述:合成多肽			
<400> 17			
Val Ser Gln Val Lys Ile Ser Gly Ala Pro Thr Leu Ser Pro Ser Leu			
1	5	10	15
Leu Gly Leu Leu Leu Pro Ala Phe Gly Ile Leu Val Tyr Leu Glu Phe			
	20	25	30
<210> 18			
<211> 35			
<212> PRT			

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 18

Gln Val Pro Lys Leu Glu Lys Ser Ile Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg

1 5 10 15

Glu His Leu Pro Leu Ala Val Gly Ile Ala Phe Phe Leu Met Thr Phe

 20 25 30

Leu Ala Ser

35

<210> 19

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 19

Glu Ala Pro Glu Pro Ile Phe Thr Ser Asn Asn Ser Cys Ser Ser Pro

1 5 10 15

Gly Gly Cys Arg Leu Phe Leu Ser Thr Ile Pro Val Leu Trp Thr Leu

 20 25 30

Leu Gly Ser

35

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 20

Thr Asn Ala Thr Thr Lys Ala Ala Gly Gly Ala Leu Gln Ser Thr Ala

1 5 10 15

Ser Leu Phe Val Val Ser Leu Ser Leu Leu His Leu Tyr Ser

 20 25 30

<210> 21

<211> 1179

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸

<400> 21

ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg	60
ggaggggtcg gcaattgaac cgggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt	120
gatgtcgtgt actggctccg cttttttccc gaggggtggg gagaaccgta tataagtga	180
gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc	240
gtgtgtgggt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgcgt gccttgaatt	300
acttccacct ggctgcagta cgtgattctt gatccccgagc ttcgggttgg aagtgggtgg	360
gagagttcga ggccctgcgc ttaaggagcc cttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg	420
cctgggcgct ggggccgccc cgtgcgaatc tgggtggcacc ttcgcgcctg tctcgtctgt	480
ttcgataagt ctctagccat ttaaaatfff tgatgacctg ctgcgacgct ttttttctgg	540
caagatagtc ttgtaaatgc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc	600
gcgggcggcg acggggcccc tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga	660
gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct	720
ggtctcgcgc cgccgtgtat cgccccgcc tgggcggcaa ggctggcccc gtcggcacca	780
gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctg caggagctc aaaatggagg	840
acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcaccacac aaaggaaaag ggcctttccg	900
tcctcagccg tcgcttcatg tgactccacg gactaccggg cgccgtccag gcacctgat	960
tagttctcga gcttttgag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg	1020
gagtttccc acactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca cttgatgtaa	1080
ttctccttgg aatttgcct ttttgagttt ggatcttggc tcattctcaa gcctcagaca	1140
gtggttcaaa gtttttttct tccatttcag gtgtcgtga	1179

<210> 22

<211> 589

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸

<400> 22

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgc tggtgaccg cccaacgacc cccgccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcttggcatt atgcccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc ccattgacg caaatggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatc	589

<210> 23	
<211> 1718	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸	
<400> 23	
actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc	60
cgcgttacat aacttacggt aaatggcccc cctggctgac cgccaacga cccccccca	120
ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt	180
caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggeag tacatcaagt gtatcatatg	240
ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgctggca ttatgcccag	300
tacatgacct tatgggactt tcctaactgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt	360
accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc tteactctcc ccactcccc cccctccca	420
cccccaattt tgtatttatt tattttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg	480
gggggggggc gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg	540
agagggtcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt tatggcgagg	600
cggcggcggc ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc ggcgggggag tcgctgcgac	660
gctgccttcg ccccgctgcc cgctccgcc ccgctcgcg ccgcccgcc cggctctgac	720
tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctctccg ggctgtaatt	780
agcgtttggt ttaatgacgg cttgtttctt ttctgtgget gcgtgaaagc cttgaggggc	840
tccgggaggg ccctttgtgc ggggggagcg gctcgggggg tgctgcgtg tgtgtgtgcg	900
tggggagcgc cgcgtgcggc tccgcgctgc ccggcggctg tgagcgtgc ggcgcgggcg	960
cggggctttg tgcctccgc agtgtgcgcg aggggagcgc ggccgggggc ggtgccccgc	1020
ggtgcggggg gggctgcgag gggaacaaag gctgcgtgcg ggggtgtgtgc gtgggggggt	1080
gagcaggggg tgtgggcgcg tcggtcgggc tgcaaccccc cctgcacccc cctccccgag	1140
ttgctgagca cggcccggct tcgggtgcgg ggctccgtac gggcgctggc gcggggctcg	1200
ccgtgccggg cggggggtgg cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg ccgctcggg	1260
ccggggaggg ctcgggggag gggcgcggcg gccccggag cgccggcggc tgtcgaggcg	1320
cggcgagccg cagccattgc cttttatggt aatcgtgcga gagggcgcag ggacttcctt	1380
tgtcccaaat ctgtcggag ccgaaatctg ggaggcggc ccgcacccc tctagcgggc	1440
gcggggcgaa gcggtgcggc gccggcagga aggaaatggg cggggagggc cttcgtgcgt	1500
cgccgcgccg ccgtcccctt ctccctctcc agcctcgggg ctgtccgcgg ggggacggct	1560
gccttcgggg gggacggggc agggcggggg tcggttctg gcgtgtgacc ggcggctcta	1620
gagcctctgc taacctggt catgccttct tcttttctct acagctctg ggcaacgtgc	1680
tggttattgt gctgtctcat cattttgca aagaattc	1718
<210> 24	
<211> 511	
<212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸	
<400> 24	
ttctaccggg taggggaggc gcttttccca aggcagtctg gagcatgcgc tttagcagcc	60
ccgctgggca cttggcgcta cacaagtggc ctctggcctc gcacacattc cacatccacc	120
ggtaggcgcc aaccggctcc gttctttggt ggcccccttc cgccaccttc tactcctccc	180
ctagtcagga agttcccccc cgccccgcag ctcgcgctct gcaggacgtg acaaatggaa	240
gtagcacgtc tcaactagtct cgtgcagatg gacagaccg ctgagcaatg gaagcgggta	300
ggcctttggg gcagcggcca atagcagctt tgctccttcg ctttctgggc tcagaggctg	360
ggaaggggtg ggtccggggg cgggctcagg ggcgggctca ggggcggggc gggcgcccga	420
aggtcctccg gaggccccgc attctgcacg ctcaaaaagc gcacgtctgc cgcgctgttc	480
tcctcttctt catctccggg cctttcgacc t	511
<210> 25	
<211> 344	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸	
<400> 25	
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt	60
atgcaaagca tgcattcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca	120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccctca	180
actccgcccc tcccgccctt aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga	240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag	300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agct	344
<210> 26	
<211> 1177	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸	
<400> 26	
ggtgcagcgg cctccgcgcc gggttttggc gctcccgcg ggcgcccccc tctcacggc	60
gagcgtgcc acgtcagacg aagggcgcag gagcgttctt gatccttccg cccggacgt	120
caggacagcg gcccgtgct cataagactc ggcttagaa ccccagtatc agcagaagga	180
catttttagga cgggacttgg gtgactctag ggcactggtt ttctttccag agagcggaac	240
aggcgaggaa aagtagtccc ttctcggcga ttctgcggag ggatctccgt ggggcggtga	300
acgccgatga ttatataagg acgcgccggg tgtggcacag ctagtccctg cgcagccggg	360

at ttgggtcg cggttcttgt ttgtggatcg ctgtgatcgt cacttgggtga gttgcgggct	420
gctgggctgg ccggggcttt cgtggccgcc gggccgctcg gtgggacgga agcgtgtgga	480
gagaccgcca agggctgtag tctgggtccg cgagcaaggt tgccctgaac tgggggttgg	540
ggggagcgca caaatggcg gctgttccc agtcttgaat ggaagacgct tgtaaggcgg	600
gctgtgaggt cgttgaaaca aggtgggggg catggtgggc ggcaagaacc caaggtcttg	660
aggccttcgc taatgcggga aagctcttat tcgggtgaga tgggctgggg caccatctgg	720
ggaccctgac gtgaagt ttg tcaactgactg gagaactcgg gtttgcgtc tggttgcggg	780
ggcggcagtt atgcggtgcc gttgggcagt gcaccctac ctttgggagc gcgcgcctcg	840
tcgtgctgtg acgtcaccgg ttctgttggc ttataatgca ggggtggggcc acctgccggt	900
aggtgtgcgg taggctttc tccgtcgcag gacgcagggt tcgggcctag ggtaggctct	960
cctgaatcga caggcggcgg acctctggtg aggggagga taagtgaggc gtcagtttct	1020
ttggtcggtt ttatgtacct atcttcttaa gtagctgaag ctccggtttt gaactatgcg	1080
ctcggggttg gcgagtgtg tttgtgaagt ttttaggca cttttgaaa tgtaatcatt	1140
tgggtcaata tgtaattttc agtgtagac tagtaaa	1177

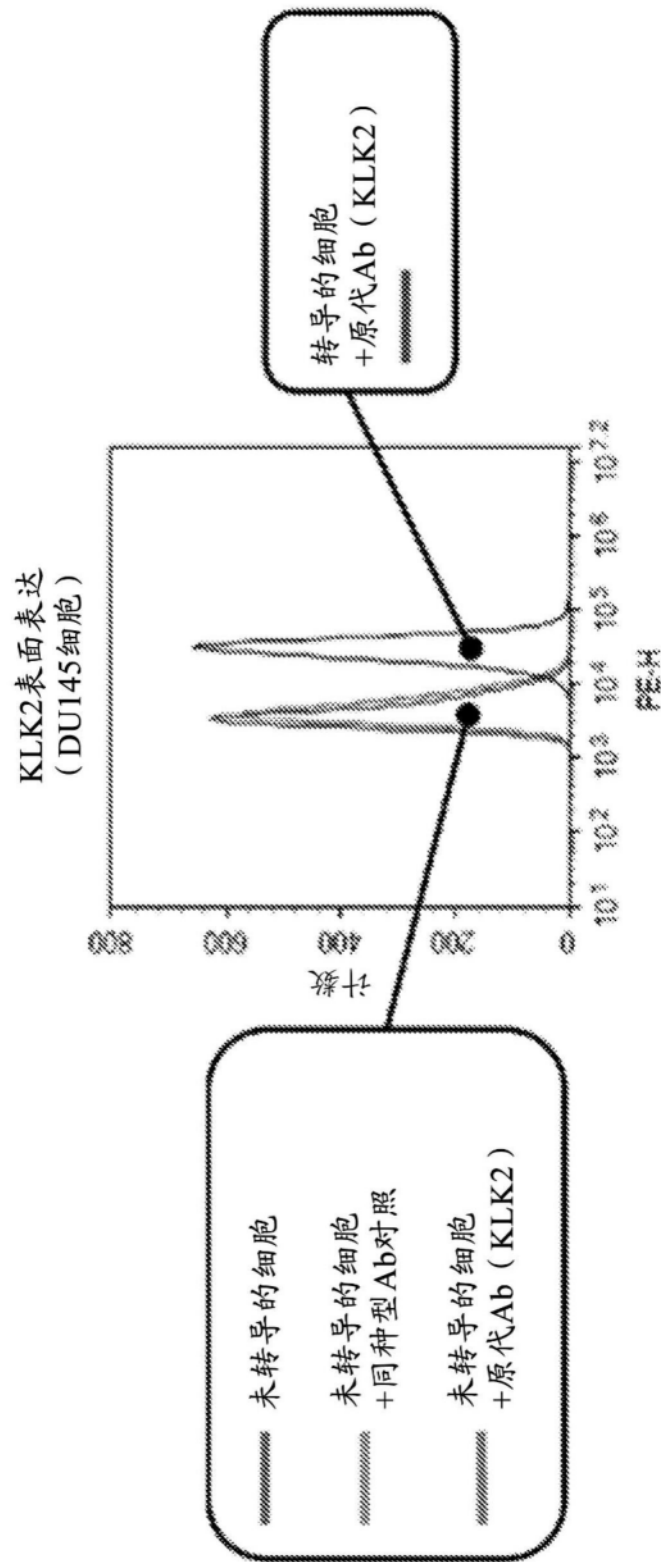


图1

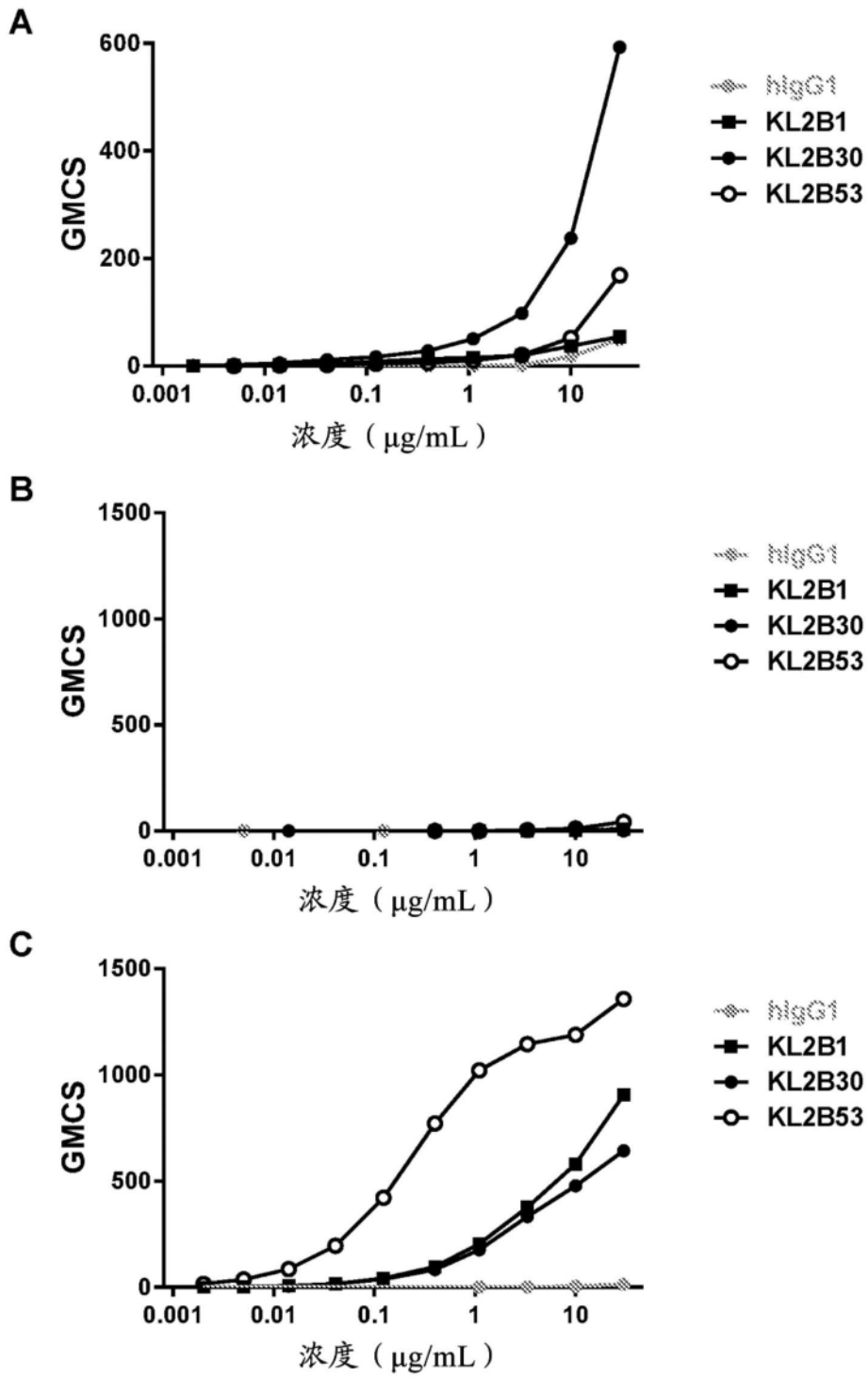


图2A-图2C

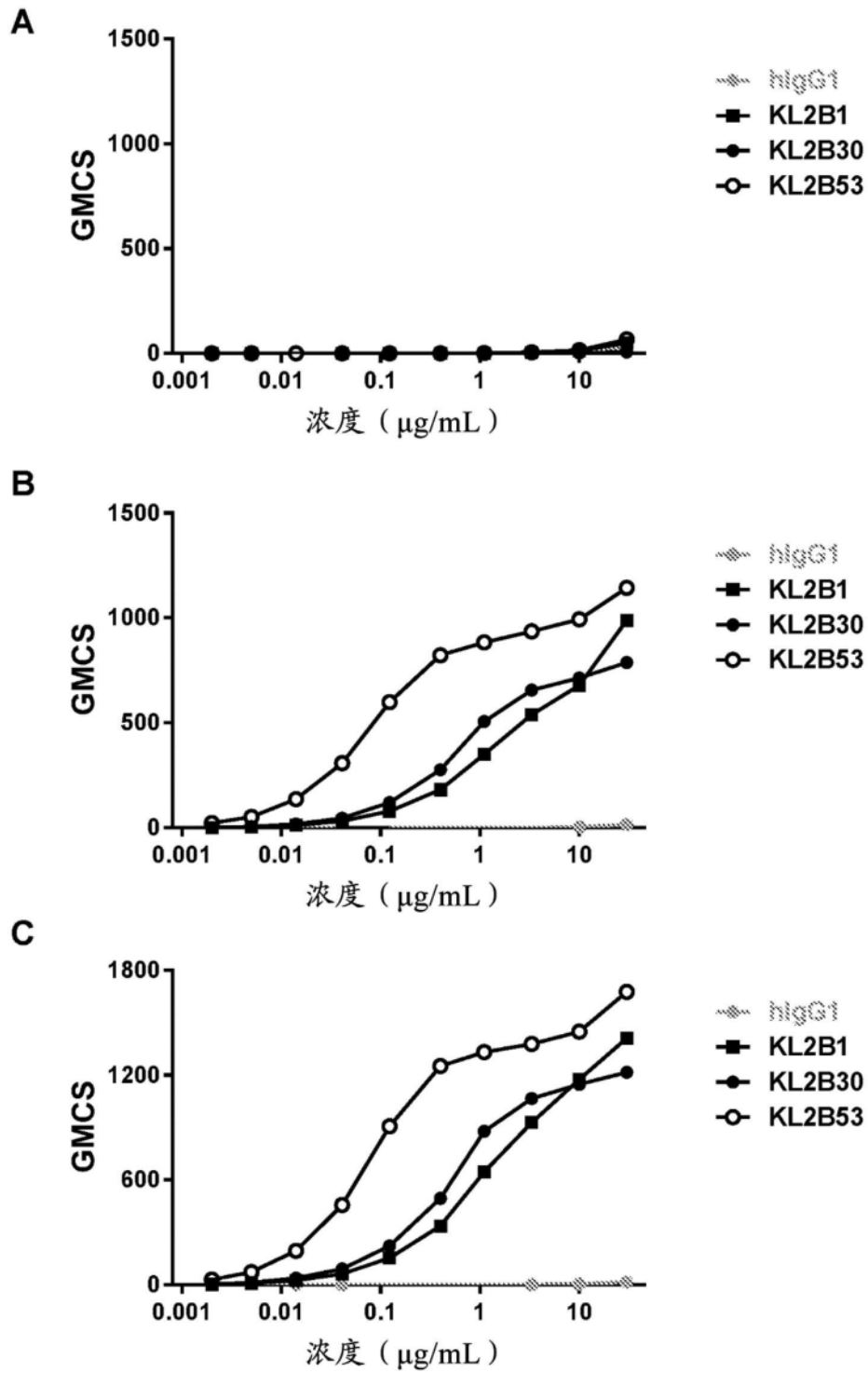


图3A-图3C

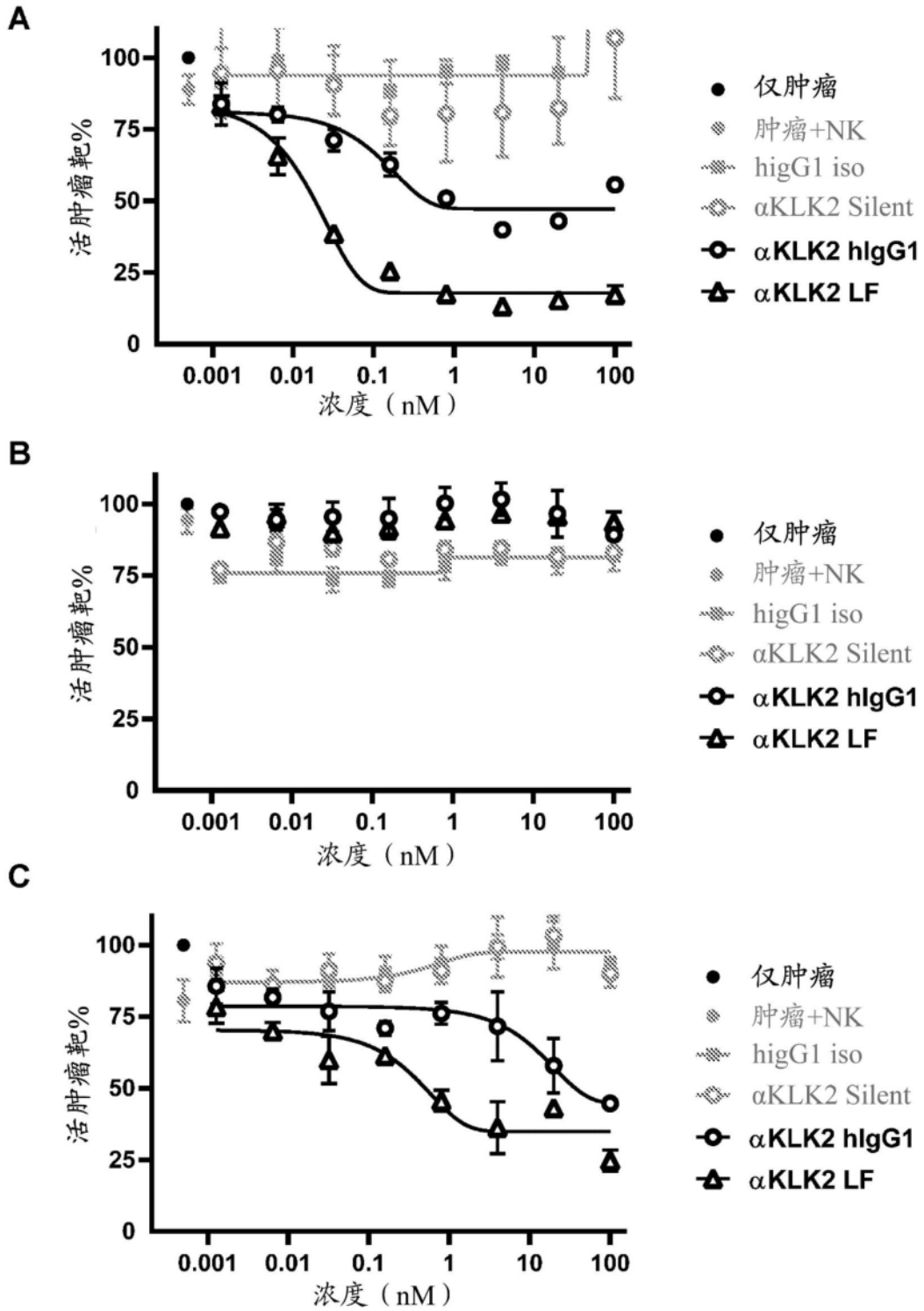
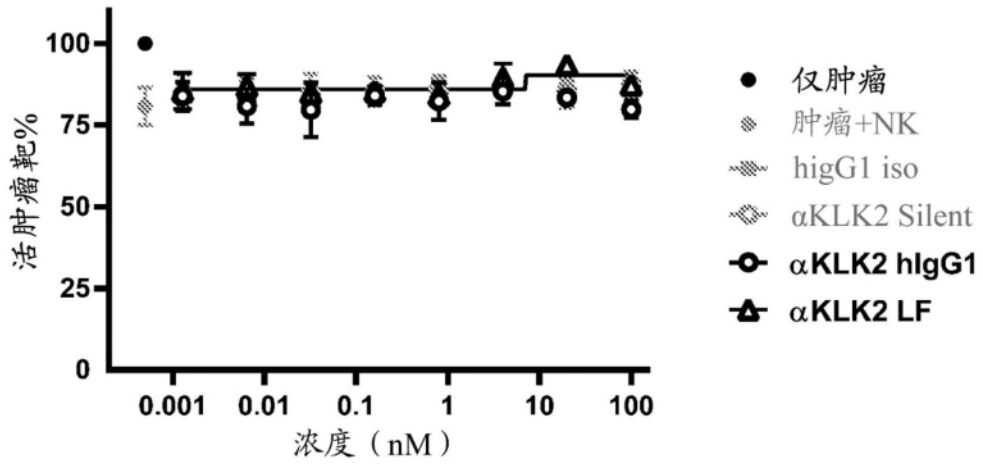


图4A-图4C

A



B

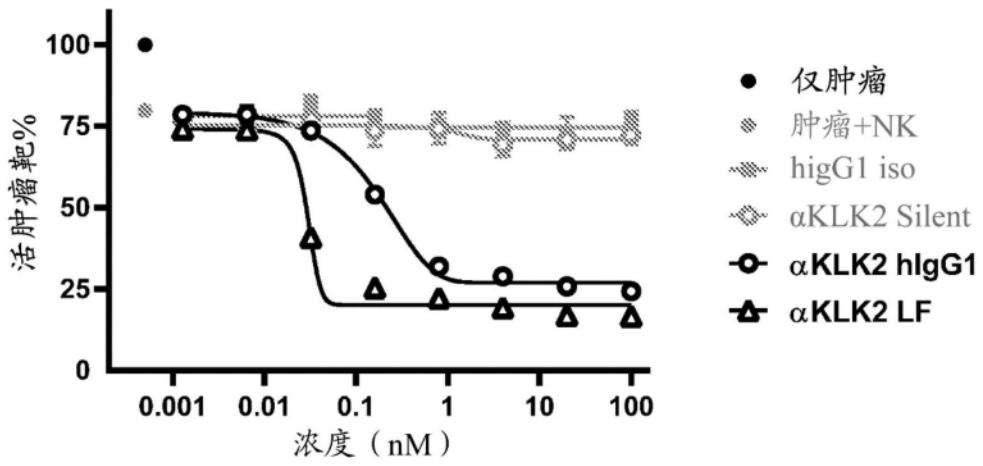


图5A-图5B

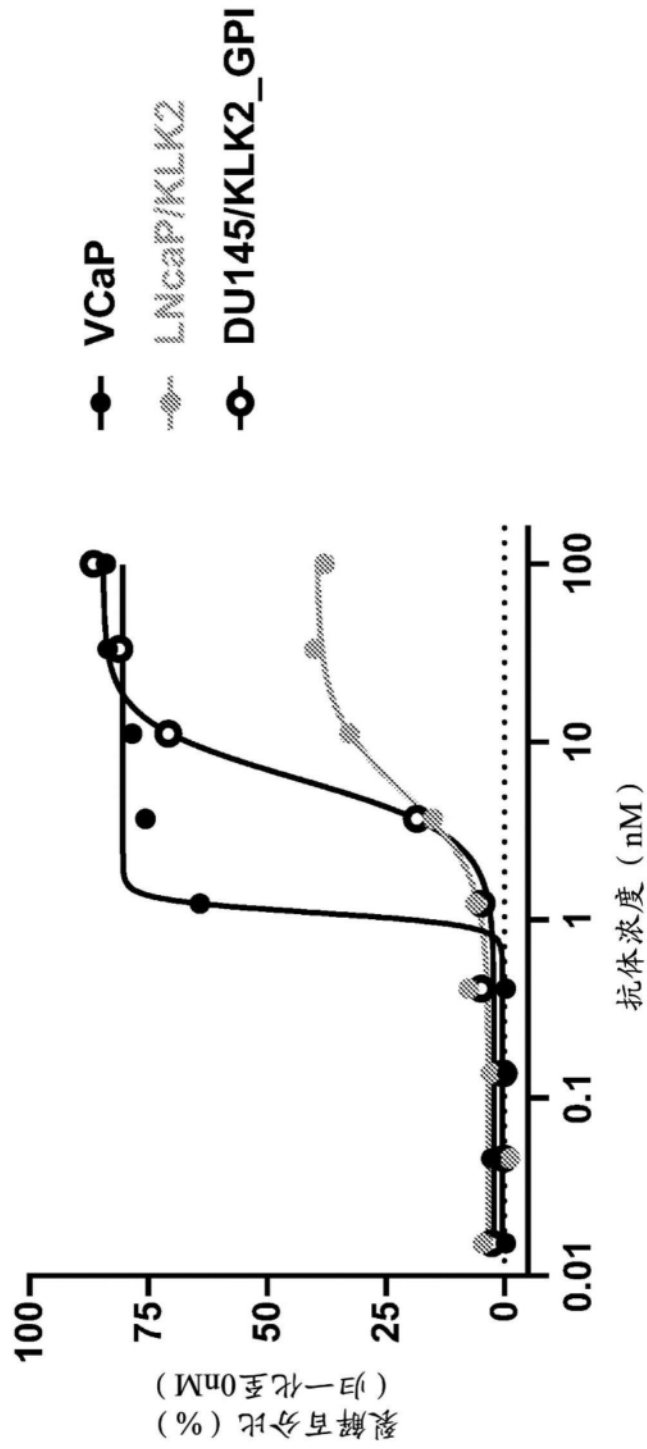


图6

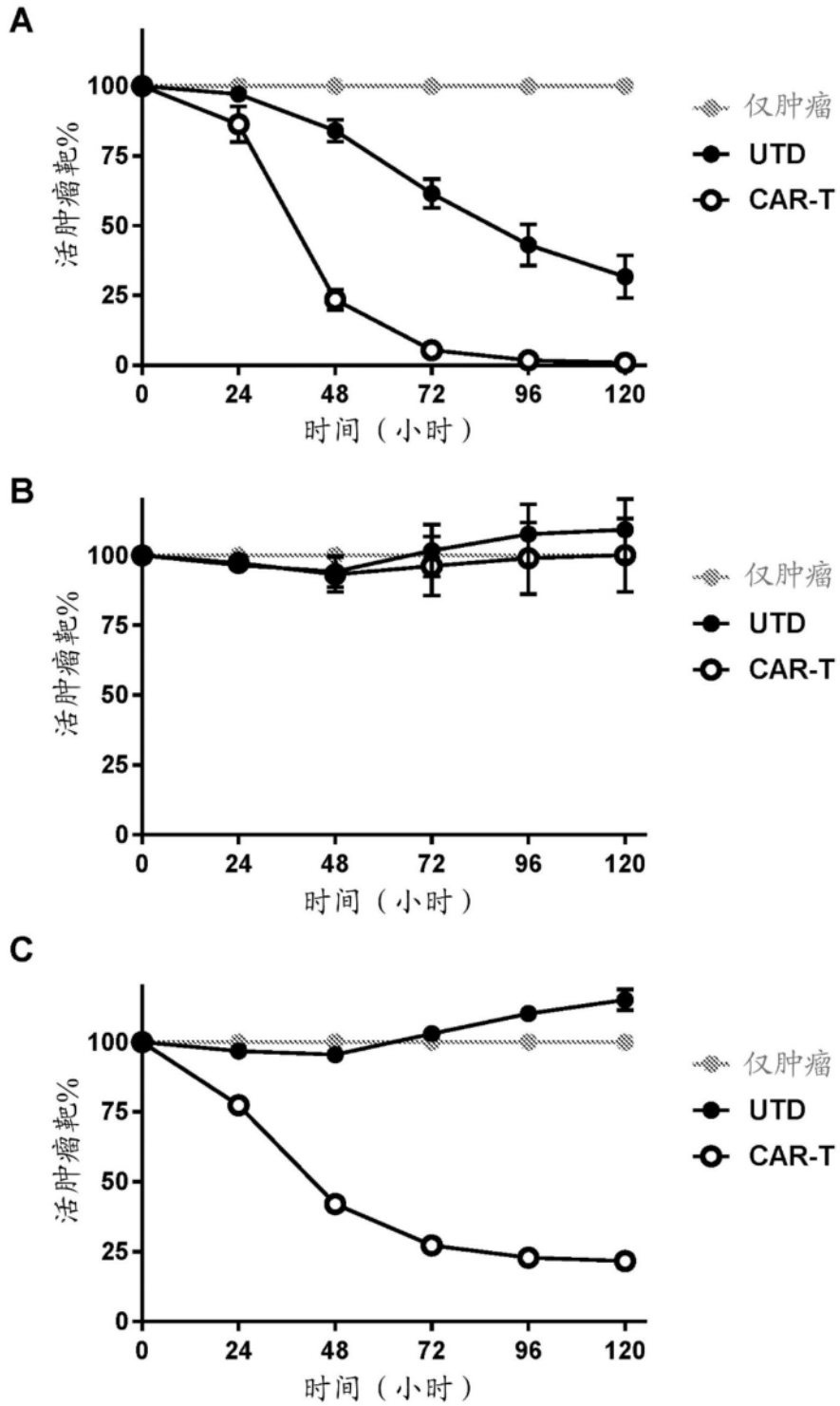


图7A-图7C

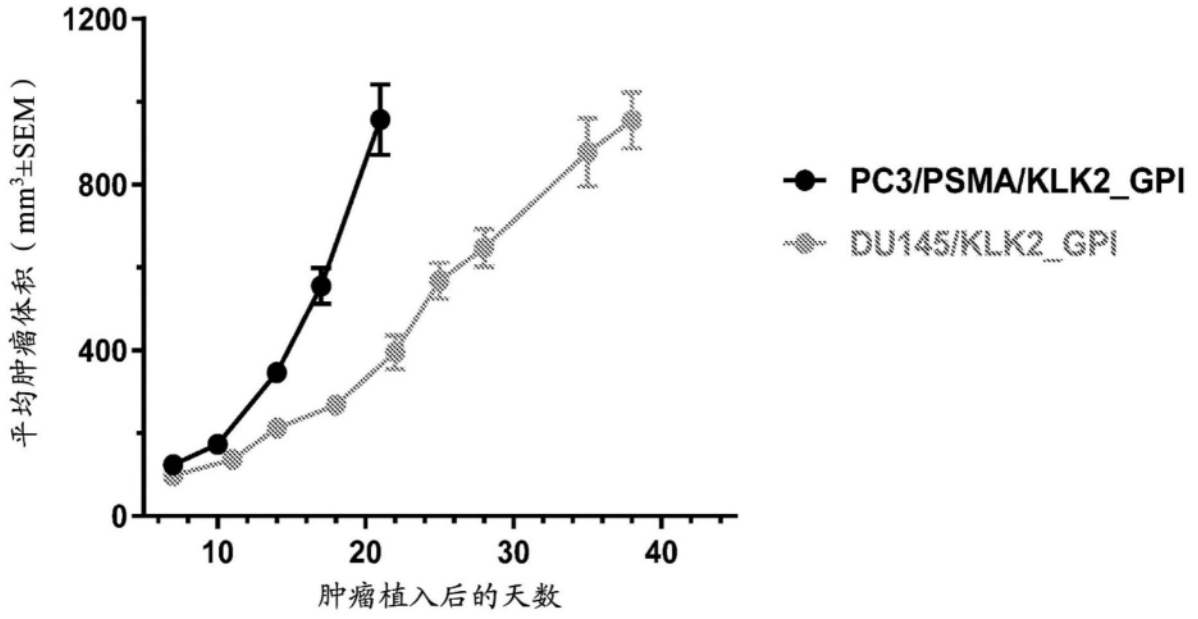


图8A

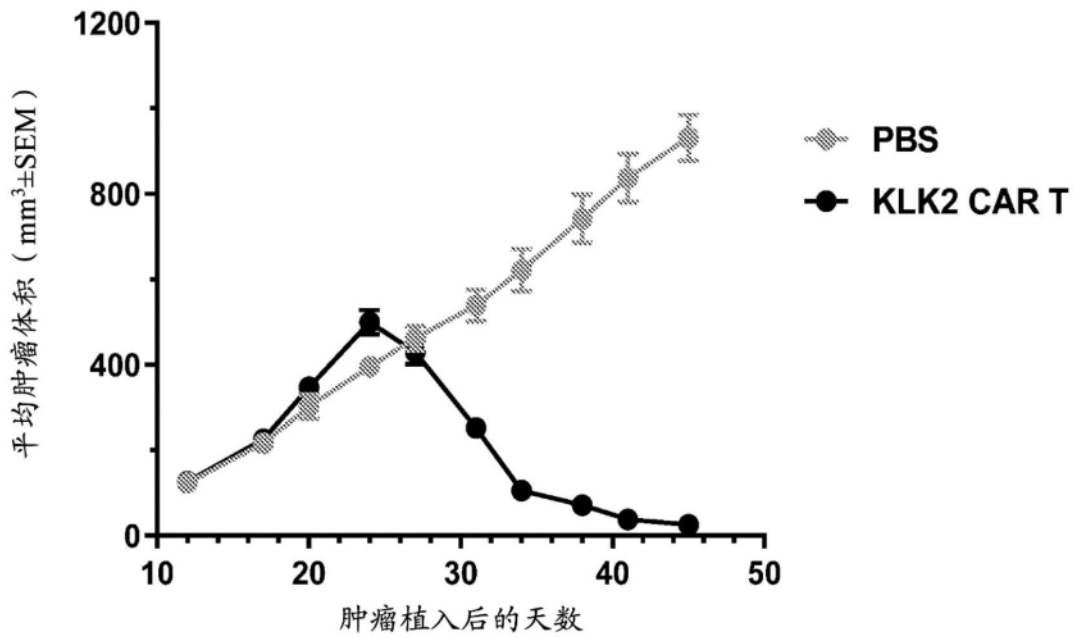


图8B

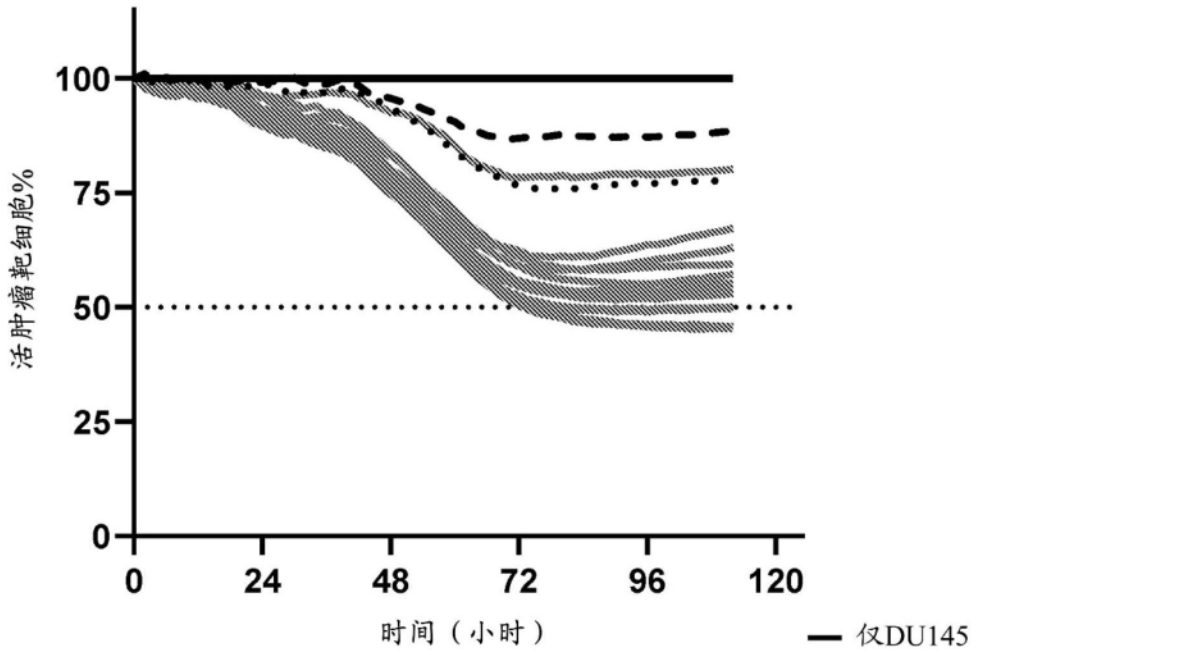


图9A

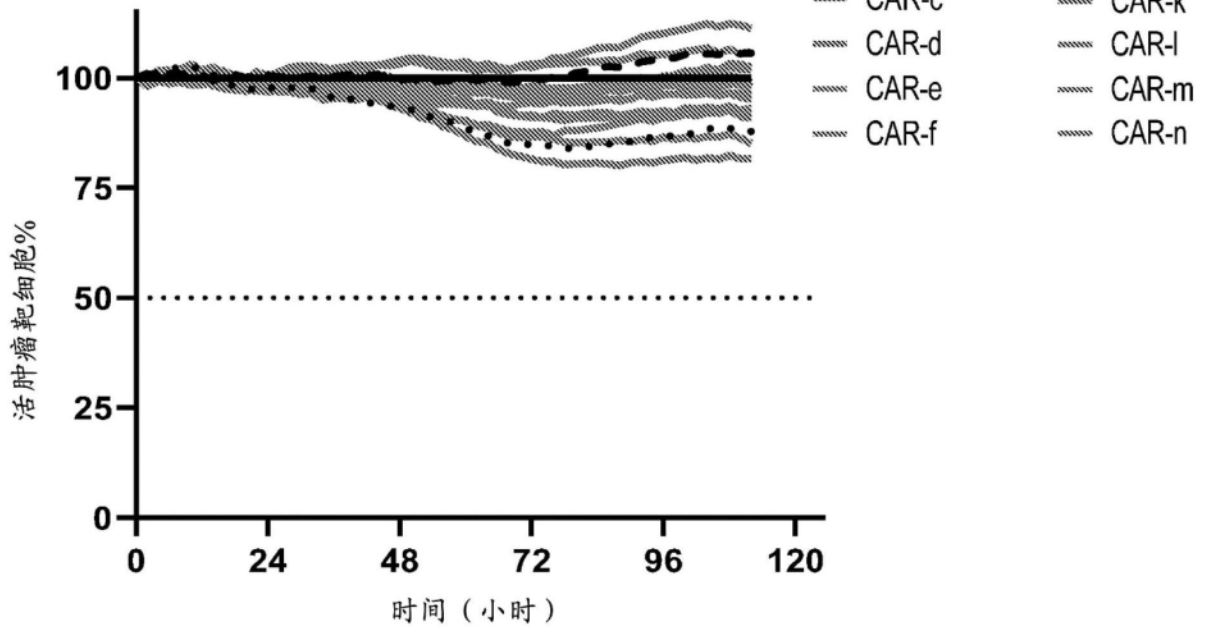


图9B

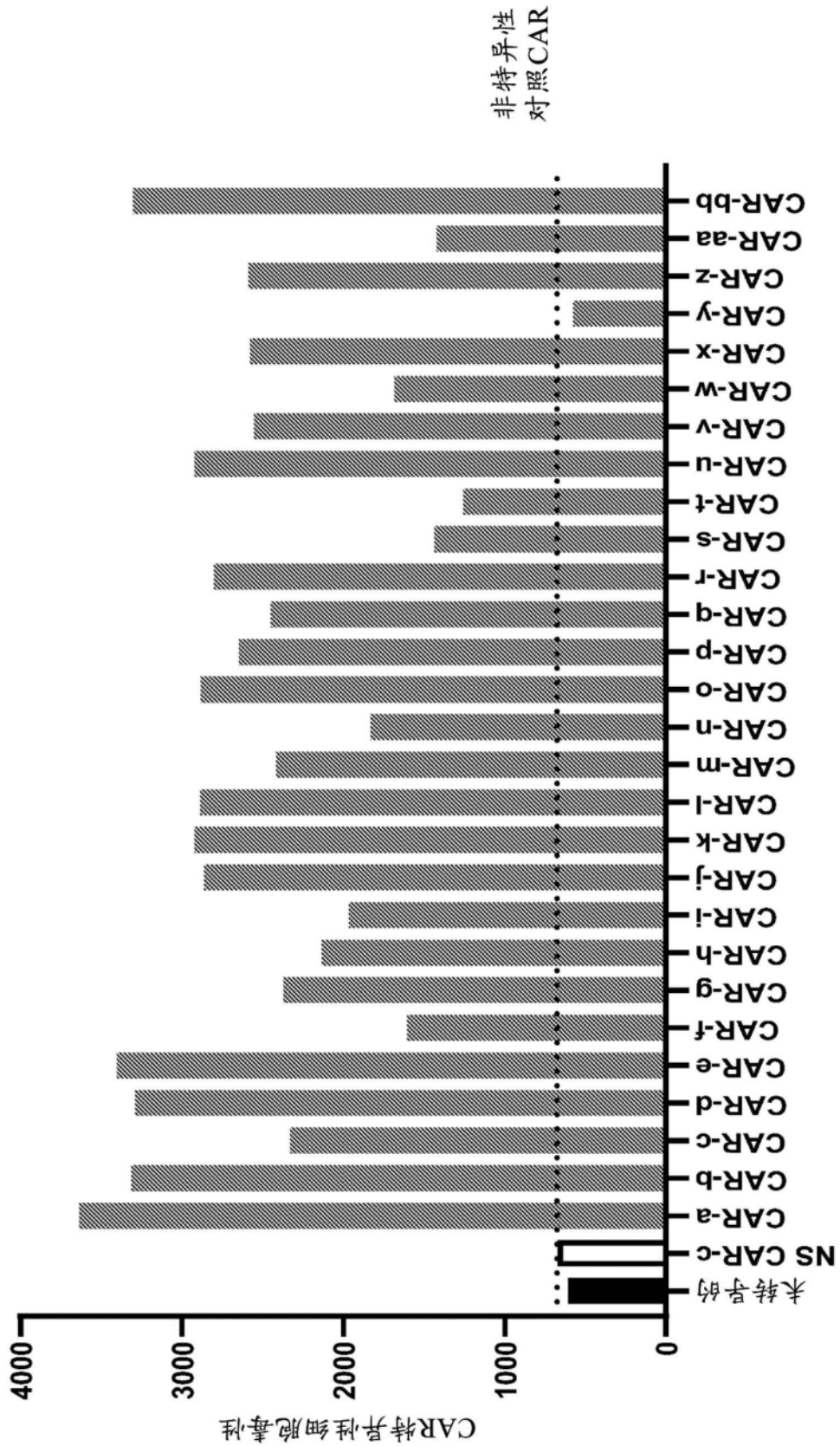


图9C

亲本LnCaP

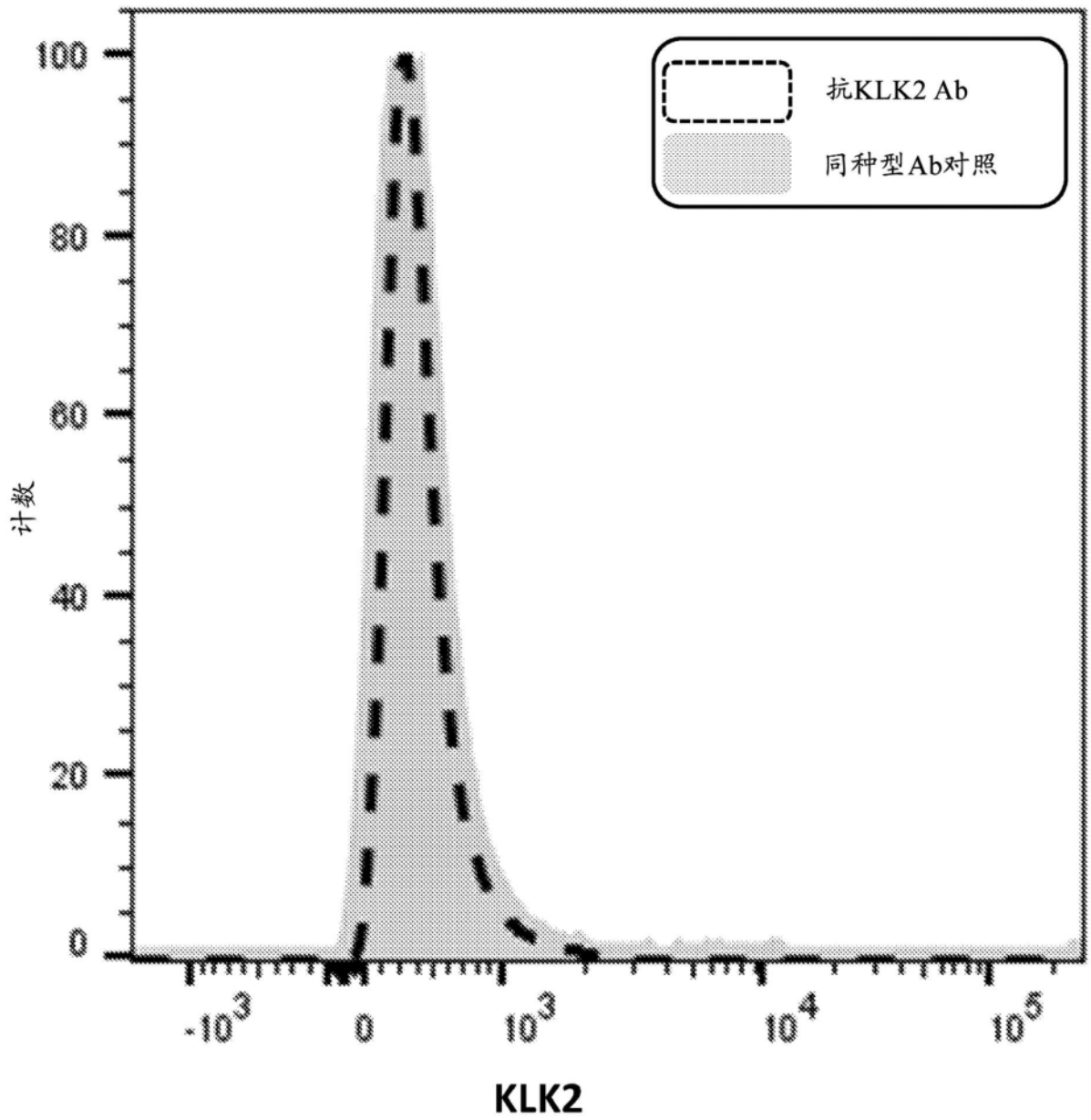


图10A

LnCaP/KLK2_GPI

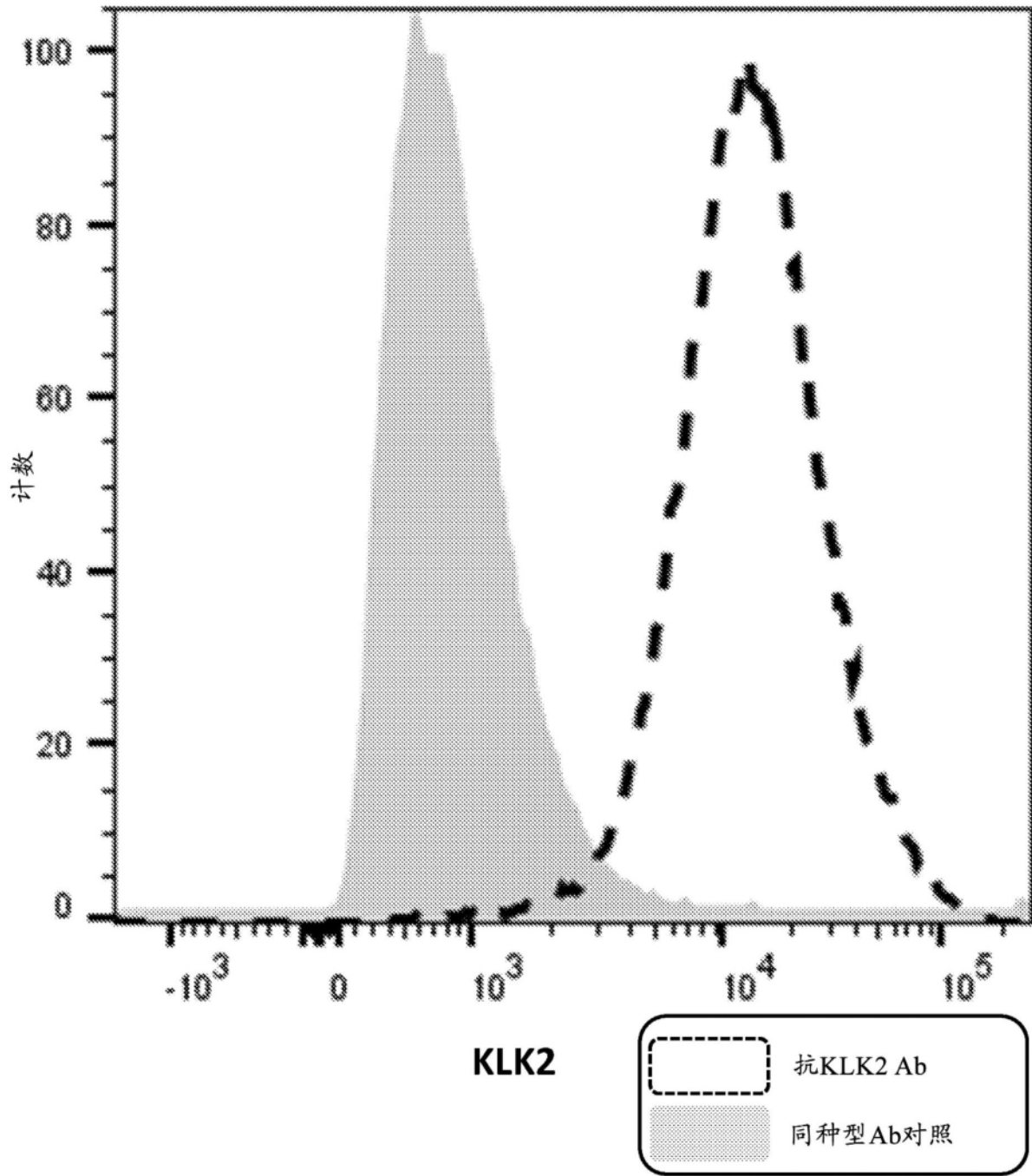


图10B

KLK2靶向的NK-CAR在有和没有LKL2表达的情况下针对LnCap细胞的细胞毒性

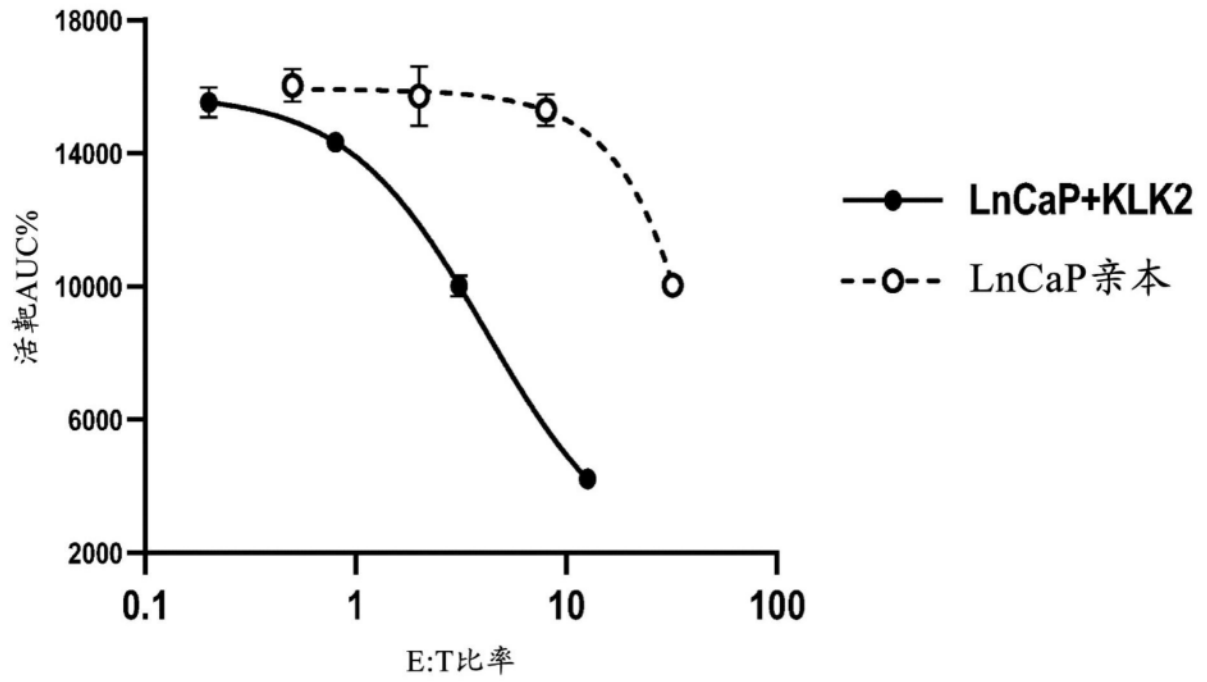


图10C