



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115697356 A

(43) 申请公布日 2023. 02. 03

(21) 申请号 202180035729.0

(22) 申请日 2021.03.18

(30) 优先权数据

62/991,479 2020.03.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.11.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/023023 2021.03.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/188828 EN 2021.09.23

(71) 申请人 达纳-法伯癌症研究公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 K·伍切普芬宁 S·库马尔

R·E·泰

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 张莉 黄革生

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

G12N 5/09 (2006.01)

G12N 9/10 (2006.01)

权利要求书5页 说明书83页

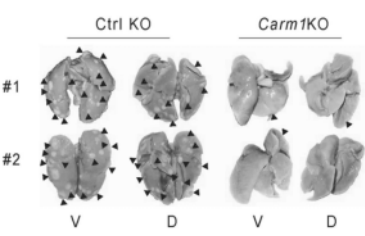
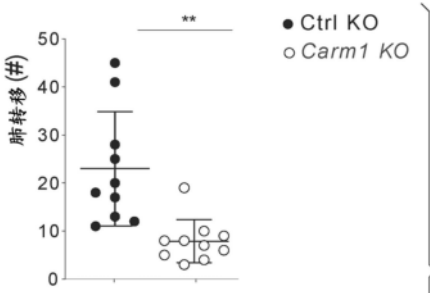
序列表47页 附图112页

(54) 发明名称

通过抑制CARM1治疗癌症的方法

(57) 摘要

本公开提供治疗患有癌症的个体的方法。该方法包括降低该个体的细胞中Carm1基因和/或Carm1效应基因的表达,和/或降低该个体的细胞中Carm1蛋白和/或Carm1效应蛋白的活性。该癌症对免疫治疗和/或检查点阻断治疗具有耐药性。



1. 治疗患有癌症的个体的方法,其包括:
 - a) 降低该个体的细胞中Carm1基因和/或Carm1效应基因的表达;和/或
 - b) 降低该个体的细胞中Carm1蛋白和/或Carm1效应蛋白的活性;其中该癌症对免疫治疗和/或检查点阻断治疗具有耐药性。
2. 权利要求1的方法,其中Carm1效应基因是Tdrd3基因,Carm1效应蛋白是Tdrd 3蛋白。
3. 权利要求1的方法,其中Carm1效应基因是Med12基因,Carm1效应蛋白是Med12蛋白。
4. 权利要求1-3中任一项的方法,其中该降低步骤包括对该个体施用抑制剂,其中该抑制剂抑制该个体中Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。
5. 权利要求4的方法,其中该抑制剂选自多核苷酸、多肽、抗体、小分子、蛋白降解剂及其组合。
6. 权利要求4或5的方法,其中该抑制剂包括EZM2302或TP-064。
7. 权利要求5的方法,其中该蛋白降解剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂和/或Med12蛋白降解剂。
8. 权利要求7的方法,其中该蛋白降解剂包括Carm1蛋白降解剂。
9. 权利要求1-5中任一项的方法,其中该降低步骤包括通过shRNA介导的mRNA敲减或基因失活来沉默该个体中的Carm1基因或Carm1效应基因。
10. 权利要求1-5中任一项的方法,其中该降低步骤包括修饰Carm1基因或Carm1效应基因以减少Carm1基因或Carm1效应基因的表达。
11. 权利要求10的方法,其中该修饰步骤包括通过CRISPR/Cas系统修饰Carm1基因或Carm1效应基因。
12. 权利要求1-11中任一项的方法,其中该细胞是免疫细胞。
13. 权利要求12的方法,其中该免疫细胞是免疫效应细胞,其中,所述Carm1基因或Carm1效应基因的表达降低和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性降低,增强该免疫效应细胞的细胞毒性功能和/或减少该免疫效应细胞的衰竭。
14. 权利要求12或13的方法,其中该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。
15. 权利要求1-11中任一项的方法,其中该细胞是癌细胞。
16. 权利要求15的方法,其中该癌细胞生长减慢、转移活性降低、对CD8 T细胞杀伤的敏感性增强、干扰素反应基因的表达增加、具有DNA损伤反应或其组合。
17. 权利要求16的方法,其中该干扰素反应基因是IFN α / γ 途径基因和/或p53途径基因。
18. 权利要求1-17中任一项的方法,其中该表达或活性在个体的免疫细胞和癌细胞中都降低。
19. 权利要求1-18中任一项的方法,其进一步包括:

对该个体施用对癌症具有肿瘤特异性且其中的Carm1基因或Carm1效应基因表达降低和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白活性降低的免疫细胞。
20. 权利要求19的方法,其中该免疫细胞基本上不表达Carm1基因或Carm1效应基因。

21. 权利要求19或20的方法,其中该免疫细胞是CAR T细胞。
22. 权利要求1-21中任一项的方法,其中该个体的癌细胞过量表达Carm1。
23. 权利要求1-22中任一项的方法,其中该癌症是黑色素瘤、癌瘤、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病、肾癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、胶质瘤、食道癌或肝癌。
24. 权利要求1-23中任一项的方法,其中该癌症对使用CTLA-4、PD-L1、TIM-3、LAG3、TIGIT或PD-1抗体阻断疗法的检查点阻断治疗具有耐药性。
25. 权利要求24的方法,其中检查点阻断剂选自纳武单抗、帕博利珠单抗、伊匹单抗、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、西米普利单抗及其组合。
26. 权利要求1-25中任一项的方法,其进一步包括:
对该个体施用药学有效量的用于治疗该个体中癌症的第二治疗剂。
27. 权利要求26的方法,其中该第二治疗剂选自化疗剂、免疫治疗剂、检查点阻断剂、毒素、放射性标记、siRNA、癌症疫苗、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、CAR T细胞、细胞因子及其组合。
28. 权利要求26或27的方法,其中该第二治疗剂是抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体或抗LAG3抗体。
29. 治疗个体中癌症的方法,其包括:
降低该个体的细胞中Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。
30. 权利要求29的方法,其进一步包括:
对该个体施用药学有效量的用于治疗该个体中癌症的第二治疗剂。
31. 权利要求30的方法,其中该第二治疗剂选自化疗剂、免疫治疗剂、检查点阻断剂、毒素、放射性标记、siRNA、癌症疫苗、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、CAR T细胞、细胞因子及其组合。
32. 权利要求30或31的方法,其中该第二治疗剂是抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体或抗LAG3抗体。
33. 权利要求30-32中任一项的方法,其中该降低步骤包括对该个体施用抑制剂,其中该抑制剂抑制该个体中Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。
34. 权利要求30-32中任一项的方法,其中该降低步骤包括通过shRNA介导的mRNA敲减或基因失活来沉默该个体中的Carm1基因或Carm1效应基因。
35. 权利要求30-32中任一项的方法,其中该降低步骤包括修饰Carm1基因或Carm1效应基因以减少Carm1基因或Carm1效应基因的表达。
36. 权利要求35的方法,其中该修饰步骤包括通过CRISPR/Cas系统修饰Carm1基因或Carm1效应基因。
37. 权利要求30-32中任一项的方法,其中该降低步骤包括降解Carm1蛋白或Carm1效应蛋白。
38. 使癌细胞对免疫效应细胞敏感的方法,其包括:
通过一种或多种抑制剂抑制癌细胞中Carm1基因或蛋白或Carm1效应基因或蛋白的表

达和/或活性,其中该抑制使该癌细胞对免疫效应细胞敏感。

39. 权利要求38的方法,其中该抑制剂包括多核苷酸、多肽、肽、抗体、小分子、蛋白降解剂或其组合。

40. 权利要求38或39的方法,其中该抑制剂包括EZM2302或TP-064。

41. 权利要求38或39的方法,其中该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂和/或Med12蛋白降解剂。

42. 权利要求41的方法,其中该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂。

43. 权利要求38-42中任一项的方法,其中该Carm1效应基因或蛋白是Tdrd3基因或蛋白。

44. 权利要求38-42中任一项的方法,其中该Carm1效应基因或蛋白是Med12基因或蛋白。

45. 权利要求38-44中任一项的方法,其中该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。

46. 提高免疫效应细胞的抗肿瘤功能的方法,其包括:

降低该免疫效应细胞中Carm1基因或蛋白或Carm1效应基因或蛋白的表达和/或活性,从而提高该免疫效应细胞的抗肿瘤功能。

47. 权利要求46的方法,其中该Carm1效应基因或蛋白是Tdrd3基因或蛋白。

48. 权利要求46的方法,其中该Carm1效应基因或蛋白是Med12基因或蛋白。

49. 权利要求46-48中任一项的方法,其中该降低步骤包括通过一种或多种抑制剂抑制该免疫效应细胞中Carm1基因或蛋白或Carm1效应基因或蛋白的表达和/或活性。

50. 权利要求49的方法,其中该抑制剂包括多核苷酸、多肽、肽、抗体、小分子、蛋白降解剂、遗传改造细胞或其组合。

51. 权利要求49的方法,其中该抑制剂包括EZM2302或TP-064。

52. 权利要求49或50的方法,其中该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂和/或Med12蛋白降解剂。

53. 权利要求49或50的方法,其中该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂。

54. 权利要求46-48中任一项的方法,其中通过shRNA介导的mRNA敲减或基因失活来降低Carm1基因或蛋白或Carm1效应基因或蛋白的表达和/或活性。

55. 权利要求46-48中任一项的方法,其中该降低步骤包括修饰该免疫效应细胞以减少或去除该免疫效应细胞中的CARM1基因或CARM1效应基因。

56. 权利要求55的方法,其中该修饰步骤包括通过CRISPR/Cas系统修饰Carm1基因或Carm1效应基因。

57. 权利要求46-48中任一项的方法,其中该降低步骤包括沉默该免疫效应细胞中的Carm1基因或Carm1效应基因。

58. 权利要求46-48中任一项的方法,其中该降低步骤包括降解该免疫效应细胞中的Carm1蛋白或Carm1效应蛋白。

59. 权利要求46-58中任一项的方法,其中该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞

和CD4 T细胞。

60. 权利要求59的方法,其中该CD8 T细胞表达较高水平的CD69、CD45.1、颗粒酶B、IFN γ 、Ki67或其组合。

61. 免疫效应细胞,其中该免疫细胞具有Carm1基因/蛋白或Carm1效应基因/蛋白抑制剂,其中该抑制剂抑制该Carm1或Carm1效应基因的表达和/或该Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

62. 权利要求61的免疫效应细胞,其中该Carm1效应基因是Tdrd3基因,该Carm1效应蛋白是Tdrd 3蛋白。

63. 权利要求61的免疫效应细胞,其中该Carm1效应基因是Med12基因,该Carm1效应蛋白是Med12蛋白。

64. 权利要求61-63中任一项的免疫效应细胞,其基本上不表达Carm1基因或Carm1效应基因。

65. 权利要求61-64中任一项的免疫效应细胞,其中该抑制剂选自多核苷酸、多肽、抗体、小分子、蛋白降解剂及其组合。

66. 权利要求61-65中任一项的免疫效应细胞,其中该抑制剂包括EZM2302或TP-064。

67. 权利要求61-65中任一项的免疫效应细胞,其中该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂和/或Med12蛋白降解剂。

68. 权利要求67的免疫效应细胞,其中该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂。

69. 权利要求61-68中任一项的免疫效应细胞,其中该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。

70. 权利要求61-69中任一项的免疫效应细胞,其中该免疫效应细胞是肿瘤特异性的。

71. 权利要求61-70中任一项的免疫效应细胞,其中该免疫效应细胞表达肿瘤特异性T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)。

72. 权利要求61-70中任一项的免疫效应细胞,其中该免疫效应细胞进一步包含嵌合抗原受体(CAR),其中该CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和刺激结构域。

73. 权利要求72的免疫效应细胞,其中该抗原结合结构域结合肿瘤抗原或病原体抗原。

74. 权利要求73的免疫效应细胞,其中该肿瘤抗原选自存在于癌细胞中的抗原、癌细胞、癌细胞片段、肿瘤抗原、 α -galcer、抗CD3、抗CD28、抗IgM、抗CD40、病原体、减毒病原体及其部分。

75. 权利要求73的免疫效应细胞,其中该肿瘤抗原与黑色素瘤、癌瘤、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病、肾癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、胶质瘤、食道癌或肝癌相关。

76. 权利要求73或74的免疫效应细胞,其中该肿瘤抗原与实体瘤或淋巴瘤相关。

77. 权利要求72-75中任一项的免疫效应细胞,其中该抗原结合结构域是抗体的抗原结合片段。

78. 组合物,其包含权利要求61-77中任一项的免疫效应细胞和可药用载体。

79. 权利要求78的组合物,其进一步包含第二治疗剂。

80. 权利要求79的组合物,其中该第二治疗剂选自化疗剂、免疫治疗剂、检查点阻断剂、

毒素、放射性标记、siRNA、癌症疫苗、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、CAR T细胞、细胞因子及其组合。

81. 权利要求79的组合物, 其中该第二治疗剂是抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体或抗LAG3抗体。

82. 权利要求78-81中任一项的组合物, 其中该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)、自然杀伤T细胞 (NKT)、细胞毒性T淋巴细胞 (CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。

83. 治疗个体中癌症的方法, 其包括:

对患有癌症的个体施用权利要求61-77中任一项的免疫效应细胞或权利要求78的组合物。

84. 权利要求83的方法, 其中该免疫效应细胞是自体的。

85. 权利要求83或84的方法, 其中该免疫效应细胞对该个体的癌细胞是特异的。

86. 权利要求83-85中任一项的方法, 其进一步包括对患有癌症的个体施用第二治疗剂或包含第二治疗剂和可药用载体的组合物。

87. 权利要求86的方法, 其中该第二治疗剂选自化疗剂、免疫治疗剂、检查点阻断剂、毒素、放射性标记、siRNA、癌症疫苗、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、CAR T细胞、细胞因子及其组合。

88. 权利要求86的方法, 其中该第二治疗剂是抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体或抗LAG3抗体。

通过抑制CARM1治疗癌症的方法

[0001] 政府支持

[0002] 本公开是在由美国国立卫生研究院授予的基金号R01 CA238039和P01 CA163222下由政府支持进行。政府在本公开中具有某些权利。

[0003] 相关申请

[0004] 本申请要求2020年3月18日提交的美国临时申请序列号62/991479的优先权,在此以其整体引入作为参考。

[0005] 参考附录[CD ROM/序列列表]

[0006] 本申请通过EFS Web以电子方式提交,包括以电子方式提交的文本文件格式的序列列表。该文本文件包含标题为“14293_1000_Seq_Listing_ST25”的序列列表,创建于2021年3月18日,大小为122324字节。此文本文件中所含的序列列表是说明书的一部分,在此以其整体引入作为参考。

技术领域

[0007] 本公开涉及治疗癌症的方法,尤其是治疗对药物治疗如免疫治疗、化疗、放疗和/或检查点阻断治疗具有耐药性的癌症的方法。具体而言,本公开涉及用于治疗癌症的方法,尤其是通过抑制免疫细胞、癌细胞或两者中Carm1基因、Tdrd3基因、Med12基因和/或其他Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白、Tdrd3蛋白、Med12蛋白和/或其他Carm1效应蛋白的活性来治疗对药物治疗如免疫治疗、化疗、放疗和/或检查点阻断治疗具有耐药性的癌症的方法。

背景技术

[0008] 已开发了许多癌症药物,其可以例如通过诱导DNA损伤或抑制细胞增殖所需的关键信号传递途径来诱导肿瘤细胞凋亡(Bouwman P,Jonkers J.The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance.Nat Rev Cancer 2012;12(9):587-98doi10.1038/nrc3342)。虽然这类药物可以诱导实质性肿瘤缩小,但由于耐药肿瘤细胞的生长,复发是一个主要挑战。免疫系统可以潜在靶向残留疾病,但许多这些肿瘤细胞靶向药物也会损害免疫细胞存活/功能或造血系统的免疫细胞产生。例如,化疗药物不仅杀伤正在分裂的肿瘤细胞,而且还杀伤快速分裂的造血前体细胞和免疫细胞(Naito Y,Saito K,Shiiba K,Ohuchi A,Saigenji K,Nagura H等CD8+T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer.Cancer Res 1998;58(16):3491-4;Sato E,Olson SH,Ahn J,Bundy B,Nishikawa H,Qian F等Intraepithelial CD8+tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer.Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102(51):18538-43)。

[0009] 化疗诱导的DNA损伤可诱导肿瘤细胞内先天免疫途径的激活,包括cGAS-STING途

径(Chen Q,Sun L,Chen ZJ.Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing.Nat Immunol 2016;17(10):1142-9)。cGAS酶由胞溶质双链DNA激活,导致环二核苷酸cGAMP的合成,cGAMP激活STING受体,从而通过IRF3转录因子诱导强大的1型干扰素反应。重要的是,1型干扰素还诱导树突细胞成熟,这是T细胞介导免疫的关键步骤(Hervas-Stubbs S,Perez-Gracia JL,Rouzaut A,Sanmamed MF,Le Bon A,Melero I.Direct effects of type I interferons on cells of the immune system.Clin Cancer Res 2011;17(9):2619-27)。一些化疗药物正与免疫治疗剂联合使用。例如,最近FDA批准将白蛋白结合型紫杉醇(nab-paclitaxel)和PD-L1阻断性mAb联合用于治疗转移性三阴性乳腺癌(TNBC),但与白蛋白结合型紫杉醇单一治疗相比,只有一小部分治疗患者从这种联合方案受益(Schmid P,Chui SY,Emens LA.Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer.Reply.N Engl J Med 2019;380(10):987-8)。开发增强而不是损害免疫功能的肿瘤细胞靶向药物很重要。

[0010] 发明概述

[0011] 在一些实施方案中,本公开提供治疗患有癌症的个体的方法。在一些实施方案中,该方法包括降低个体的细胞中Carm1基因和/或Carm1效应基因的表达;和/或降低个体的细胞中Carm1蛋白和/或Carm1效应蛋白的活性。在一些实施方案中,所述癌症对免疫治疗和/或检查点阻断治疗具有耐药性。

[0012] 在一些实施方案中,该Carm1效应基因是Tdrd3基因,该Carm1效应蛋白是Tdrd3蛋白。在一些实施方案中,该Carm1效应基因是Med12基因,该Carm1效应蛋白是Med12蛋白。

[0013] 在一些实施方案中,该降低步骤包括对该个体施用抑制剂。该抑制剂抑制个体中Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0014] 在一些实施方案中,该抑制剂选自多核苷酸、多肽、抗体、小分子、蛋白降解剂及其组合。在一些实施方案中,该抑制剂包括EZM2302或TP-064。在一些实施方案中,该蛋白降解剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂和/或Med12蛋白降解剂。在一些实施方案中,该蛋白降解剂包括Carm1蛋白降解剂。

[0015] 在一些实施方案中,该降低步骤包括通过shRNA介导的mRNA敲减或基因失活来沉默个体中的Carm1基因或Carm1效应基因。

[0016] 在一些实施方案中,该降低步骤包括修饰Carm1基因或Carm1效应基因以减少Carm1基因或Carm1效应基因的表达。在一些实施方案中,该修饰步骤包括通过CRISPR/Cas系统修饰Carm1基因或Carm1效应基因。

[0017] 在一些实施方案中,所述细胞是免疫细胞。

[0018] 在一些实施方案中,所述免疫细胞是免疫效应细胞,其中Carm1基因或Carm1效应基因的表达减少和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性降低增强该免疫效应细胞的细胞毒性功能和/或减少该免疫效应细胞的衰竭。在一些实施方案中,该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。

[0019] 在一些实施方案中,所述细胞是癌细胞。

[0020] 在一些实施方案中,癌细胞表现出生长减慢、转移活性降低、对CD8 T细胞杀伤的敏感性增强、干扰素反应基因(例如IFN α/γ 途径基因、p53途径基因等)的表达增加、具有

DNA损伤反应,或其组合。在一些实施方案中,干扰素反应基因是IFN α / γ 途径基因和/或p53途径基因。

[0021] 在一些实施方案中,所述表达或活性在个体的免疫细胞和癌细胞中都降低。

[0022] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用免疫细胞,所述免疫细胞对癌症具有肿瘤特异性,且具有降低的Carm1基因或Carm1效应基因表达和/或降低的Carm1蛋白或Carm1效应蛋白活性。

[0023] 在一些实施方案中,所述免疫细胞基本上不表达Carm1基因或Carm1效应基因。

[0024] 在一些实施方案中,所述免疫细胞是CAR T细胞。

[0025] 在一些实施方案中,个体的癌细胞过量表达Carm1。

[0026] 在一些实施方案中,所述癌症是黑色素瘤、癌瘤 (carcinoma)、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病、肾癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、胶质瘤、食道癌或肝癌。

[0027] 在一些实施方案中,所述癌症对使用CTLA-4、PD-L1、TIM-3、LAG3、TIGIT或PD-1抗体阻断疗法的检查点阻断治疗具有耐药性。在一些实施方案中,所述检查点阻断选自纳武单抗 (Nivolumab)、帕博利珠单抗 (Pembrolizumab)、伊匹单抗 (Ipilimumab)、阿替利珠单抗 (Atezolizumab)、阿维鲁单抗 (Avelumab)、德瓦鲁单抗 (Durvalumab)、西米普利单抗 (Cemiplimab) 及其组合。

[0028] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用药学有效量的用于治疗该个体中癌症的第二治疗剂。

[0029] 在一些实施方案中,该第二治疗剂选自化疗剂、免疫治疗剂、检查点阻断剂、毒素、放射性标记、siRNA、癌症疫苗、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、CAR T细胞、细胞因子及其组合。在一些实施方案中,该第二治疗剂是抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体或抗LAG3抗体。

[0030] 在一些其他实施方案中,本公开提供治疗个体中癌症的方法。该方法包括降低该个体的细胞中Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0031] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用药学有效量的用于治疗该个体中癌症的第二治疗剂。

[0032] 在一些实施方案中,该第二治疗剂选自化疗剂、免疫治疗剂、检查点阻断剂、毒素、放射性标记、siRNA、癌症疫苗、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、CAR T细胞、细胞因子及其组合。在一些实施方案中,该第二治疗剂是抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体或抗LAG3抗体。

[0033] 在一些实施方案中,该降低步骤包括对该个体施用抑制剂,其中该抑制剂抑制个体中Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0034] 在一些实施方案中,该降低步骤包括通过shRNA介导的mRNA敲减或基因失活来沉默个体中的Carm1基因或Carm1效应基因。

[0035] 在一些实施方案中,该降低步骤包括修饰Carm1基因或Carm1效应基因以减少Carm1基因或Carm1效应基因的表达。在一些实施方案中,该修饰步骤包括通过CRISPR/Cas系统修饰Carm1基因或Carm1效应基因。

[0036] 在一些实施方案中,该降低步骤包括降解Carm1蛋白或Carm1效应蛋白。

[0037] 还在一些实施方案中,本公开提供增加癌细胞对免疫效应细胞的敏感性的方法。该方法包括通过一种或多种抑制剂来抑制癌细胞中Carm1基因或蛋白或Carm1效应基因或蛋白的表达和/或活性,其中所述抑制使癌细胞对免疫细胞的敏感性增加。

[0038] 在一些实施方案中,所述抑制剂包括多核苷酸、多肽、肽、抗体、小分子、蛋白降解剂或其组合。在一些实施方案中,所述抑制剂包括EZM2302或TP-064。

[0039] 在一些实施方案中,所述抑制剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂和/或Med12蛋白降解剂。在一些实施方案中,所述抑制剂包括Carm1蛋白降解剂。

[0040] 在一些实施方案中,所述Carm1效应基因或蛋白是Tdrd3基因或蛋白。在一些实施方案中,所述Carm1效应基因或蛋白是Med12基因或蛋白。

[0041] 在一些实施方案中,免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。

[0042] 还在一些实施方案中,本公开提供提高免疫效应细胞的抗肿瘤功能的方法。该方法包括降低该免疫效应细胞中Carm1基因或蛋白或Carm1效应基因或蛋白的表达和/或活性,从而提高该免疫效应细胞的抗肿瘤功能。

[0043] 在一些实施方案中,Carm1效应基因或蛋白是Tdrd3基因或蛋白。在一些实施方案中,Carm1效应基因或蛋白是Med12基因或蛋白。

[0044] 在一些实施方案中,该降低步骤包括通过一种或多种抑制剂来抑制免疫细胞中Carm1基因或蛋白或Carm1效应基因或蛋白的表达和/或活性。

[0045] 在一些实施方案中,该抑制剂包括多核苷酸、多肽、肽、抗体、小分子、蛋白降解剂、遗传改造细胞或其组合。在一些实施方案中,该抑制剂包括EZM2302或TP-064。

[0046] 在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂和/或Med12蛋白降解剂。在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂。

[0047] 在一些实施方案中,通过shRNA介导的mRNA敲减或基因失活来降低Carm1基因或蛋白或Carm1效应基因或蛋白的表达和/或活性。

[0048] 在一些实施方案中,该降低步骤包括修饰免疫效应细胞以减少或去除该免疫效应细胞中的CARM1基因或CARM1效应基因。在一些实施方案中,该修饰步骤包括通过CRISPR/Cas系统修饰Carm1基因或Carm1效应基因。

[0049] 在一些实施方案中,该降低步骤包括沉默免疫效应细胞中的CARM1基因或CARM1效应基因。

[0050] 在一些实施方案中,该降低步骤包括降解免疫效应细胞中的Carm1蛋白或Carm1效应蛋白。

[0051] 在一些实施方案中,所述免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。在一些实施方案中,所述CD8 T细胞表达较高水平的CD69、CD45.1、颗粒酶B、IFN γ 、Ki67或其组合。

[0052] 在一些实施方案中,本公开提供免疫效应细胞。该免疫细胞具有Carm1基因/蛋白或Carm1效应基因/蛋白的抑制剂。该抑制剂抑制Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0053] 在一些实施方案中,该Carm1效应基因是Tdrd3基因,该Carm1效应蛋白是Tdrd3蛋白。在一些实施方案中,该Carm1效应基因是Med12基因,该Carm1效应蛋白是Med12蛋白。

[0054] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞基本上不表达Carm1基因或Carm1效应基因。

[0055] 在一些实施方案中,该抑制剂选自多核苷酸、多肽、抗体、小分子、蛋白降解剂及其组合。在一些实施方案中,该抑制剂包括EZM2302或TP-064。

[0056] 在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂和/或Med12蛋白降解剂。在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂。

[0057] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。

[0058] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞是肿瘤特异性的。

[0059] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞表达肿瘤特异性T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)。

[0060] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞进一步包含嵌合抗原受体(CAR),其中该CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和刺激结构域。

[0061] 在一些实施方案中,该抗原结合结构域结合肿瘤抗原或病原体抗原。

[0062] 在一些实施方案中,该肿瘤抗原选自存在于癌细胞中的抗原、癌细胞、癌细胞片段、肿瘤抗原、 α -galcer、抗CD3、抗CD28、抗IgM、抗CD40、病原体、减毒病原体及其部分。

[0063] 在一些实施方案中,该肿瘤抗原与黑色素瘤、癌瘤、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病、肾癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、胶质瘤、食道癌或肝癌相关。

[0064] 在一些实施方案中,该肿瘤抗原与实体瘤或淋巴瘤相关。

[0065] 在一些实施方案中,该抗原结合结构域是抗体的抗原结合片段。

[0066] 还在一些实施方案中,本公开提供包含本文所述免疫效应细胞和可药用载体的组合物。在一些实施方案中,该免疫效应细胞具有Carm1基因/蛋白或Carm1效应基因/蛋白的抑制剂。该抑制剂抑制Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0067] 在一些实施方案中,该组合物进一步包含第二治疗剂。

[0068] 在一些实施方案中,该第二治疗剂选自化疗剂、免疫治疗剂、检查点阻断剂、毒素、放射性标记、siRNA、癌症疫苗、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、CAR T细胞、细胞因子及其组合。

[0069] 在一些实施方案中,该第二治疗剂是抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体或抗LAG3抗体。

[0070] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。

[0071] 还在一些实施方案中,本公开提供治疗个体中癌症的方法。该方法包括对患有癌症的个体施用本文所述的免疫效应细胞或本文所述的组合物。

[0072] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞具有Carm1基因/蛋白或Carm1效应基因/蛋白

的抑制剂。该抑制剂抑制Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0073] 在一些实施方案中,该组合物包含本文所述的免疫效应细胞和可药用载体。在一些实施方案中,该免疫效应细胞具有Carm1基因/蛋白或Carm1效应基因/蛋白的抑制剂。该抑制剂抑制Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0074] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞是自体的。

[0075] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞对个体的癌细胞具有特异性。

[0076] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括对患有癌症的个体施用第二治疗剂或包含第二治疗剂和可药用载体的组合物。

[0077] 在一些实施方案中,该第二治疗剂选自化疗剂、免疫治疗剂、检查点阻断剂、毒素、放射性标记、siRNA、癌症疫苗、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、CAR T细胞、细胞因子及其组合。

[0078] 在一些实施方案中,该第二治疗剂是抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体或抗LAG3抗体。

[0079] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。本文描述了用于本公开的方法和材料;也可以使用本领域已知的其他适宜的方法和材料。这些材料、方法和实例仅是举例说明性的,并非旨在限制。本文中提到的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献均以其整体引入作为参考。这些出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献的公开内容在此以其整体引入作为参考,以更全面地描述截至本文描述和所要求的本公开日期之前为本领域技术人员已知的本领域技术状况。在有冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0080] 本公开的其他特征和优势将从以下发明详述和附图以及权利要求书显而易见。

[0081] 附图简述

[0082] 本专利或申请文件至少包含一幅彩色图。本专利或专利申请公开的彩色图的复印件可以由专利局根据请求并在支付必要费用后提供。

[0083] 图1A说明Carm1是肿瘤特异性T细胞中的表观遗传抑制剂,显示了用于在体内发现抑制肿瘤中CD8 T细胞累积的表观遗传调节因子的实验设计。

[0084] 图1B说明Carm1是肿瘤特异性T细胞中的表观遗传抑制剂,显示了对肿瘤特异性CD8T细胞中表观遗传gRNA文库的体内CRISPR筛选。比较肿瘤(实验部位)和脾脏(对照器官)中CD8 T细胞中的gRNA定量(log2倍数变化)。主要实验基因和阳性对照基因分别以红色和蓝色突出显示。

[0085] 图1C说明Carm1是肿瘤特异性T细胞中的表观遗传抑制剂,显示了体内CRISPR筛选数据的MAGeCK分析(基于模型的全基因组CRISPR-Cas9敲除分析);MAGeCK评分提供了基因效应强度的综合读取值。

[0086] 图1D说明Carm1是肿瘤特异性T细胞中的表观遗传抑制剂,显示了用Carm1-KO和对照-KO OT-I CD8 T细胞进行的T细胞细胞毒性测定。用Cas9蛋白和结合的gRNA通过电穿孔编辑CD8 T细胞,并在含有IL-15+IL-7的T细胞培养基中培养5天。T细胞与B16F10-OVA-ZsGreen肿瘤细胞按所示效靶比(E:T)共培养(n=8-10/每种条件下的重复);24小时后,用Celigo图像细胞仪计数活的GFP阳性肿瘤细胞。数据代表三次实验,并显示为平均值±

SEM。**** $p < 0.0001$ ，非配对双侧Mann-Whitney检验。

[0087] 图1E说明Carm1是肿瘤特异性T细胞中的表观遗传抑制剂，显示了过继转移的Carm1-KO或对照-KO OT-I CD45.1 CD8 T细胞的抗肿瘤活性。皮下植入B16-OVA-ZsGreen肿瘤细胞(0.1×10^6)。肿瘤细胞接种后第7天，通过尾静脉注射转移经编辑的CD8 T细胞(1×10^6)。记录肿瘤大小； $n =$ 每组8-10只小鼠。

[0088] 图1F说明Carm1是肿瘤特异性T细胞中的表观遗传抑制剂，显示了图1E中所示实验的过继T细胞移植后7天的肿瘤重量。

[0089] 图1G说明Carm1是肿瘤特异性T细胞中的表观遗传抑制剂，显示了在过继转移经编辑的OT-I CD45.1 CD8 T细胞($n = 10$ 只小鼠/组)后，对肿瘤浸润Carm1-KO或对照-KO CD8 T细胞的流式细胞术分析，其中以CD45.1和CD8 T细胞标志物进行设门。定量CD8 T细胞的浸润和效应物(颗粒酶B、IFN γ)的表达以及增殖(Ki-67)标志物。

[0090] 图2A说明CD8 T细胞中的Carm1抑制增强其抗肿瘤功能，显示了与B16F10-Ova肿瘤细胞共培养24小时的Carm1-KO或对照-KO OT-I CD8 T细胞中差异表达基因的RNA-Seq分析(每种条件下四个生物学重复)。颜色代码表示差异基因表达的Z分数。

[0091] 图2B说明CD8 T细胞中的Carm1抑制增强其抗肿瘤功能，显示了Carm1-KO和对照-KO OT-I CD8 T细胞之间所有差异表达基因的火山图。将统计显著性($\log_{10}$ 调整的P值)对基因表达水平的 $\log_2$ 倍数变化(Carm1-KO/对照-KO细胞)作图。

[0092] 图2C说明CD8 T细胞中的Carm1抑制增强其抗肿瘤功能，显示了Carm1-KO和对照-KO CD8 T细胞中Tcf7、Myb、Bcl6、Btg2、Itgae、Havcr2和Klrg1 mRNA水平的RT-qPCR分析(用两种不同的gRNA靶向Carm1，一式三份测量)。

[0093] 图2D说明CD8 T细胞中的Carm1抑制增强其抗肿瘤功能，显示了Carm1-KO相对于对照-KO T细胞中显著上调/下调的途径的基因本体(GO)分析。

[0094] 图2E说明CD8 T细胞中的Carm1抑制增强其抗肿瘤功能，显示了过继转移经编辑的OT-I CD45.1 CD8 T细胞($n = 10$ 只小鼠/组)后的肿瘤浸润Carm1-KO或对照-KO CD8 T细胞，其中以CD45.1和CD8 T标志物设门。定量具有高Bcl2蛋白水平的Tcf7+T细胞和Tcf7+CD8T细胞。

[0095] 图2F说明CD8 T细胞中的Carm1抑制增强其抗肿瘤功能，显示了对高Bcl2的肿瘤浸润Carm1-KO或对照-KO CD8 T细胞的定量。

[0096] 图2G、2H和2I说明CD8 T细胞中的Carm1抑制增强其抗肿瘤功能，显示了过继转移经编辑的OT-I CD45.1 CD8 T细胞($n = 8$ 只小鼠/组)后16或24天分析肿瘤浸润Carm1-KO或对照-KO CD8 T细胞，其中以CD45.1和CD8 T细胞标志物设门。定量CD8 T活化标志物(CD69)(图2G)和T细胞衰竭标志物(图2H-2I)。在图2A-2I中，所示数据代表两次实验。对于所有小鼠都存活用于肿瘤测量的时间点，用双因素方差分析来确定统计显著性。所示图给出总结为平均值 $\pm$ S.D.的数据，并通过非配对双侧Mann-Whitney检验进行分析，**** $P < 0.0001$ ；*** $P < 0.001$ ；** $P < 0.01$ ；* $P < 0.05$ 。

[0097] 图3A说明肿瘤细胞中Carm1基因的失活引发肿瘤免疫，显示了在来自癌细胞系百科全书(CCLE)的1208个不同癌细胞系的不同组中Carm1 mRNA水平。根据癌症类型对肿瘤细胞系进行分组。

[0098] 图3B说明肿瘤细胞中Carm1基因的失活引发肿瘤免疫，显示了靶向肿瘤细胞中的

Carm1来研究对T细胞介导的肿瘤免疫的影响的策略。

[0099] 图3C说明肿瘤细胞中的Carm1基因失活引发肿瘤免疫,显示了在用由Cas9蛋白和结合的gRNA(对照,Carm1)组成的RNP电穿孔后,B16F10黑色素瘤细胞中Carm1蛋白的Western印迹分析;评价了两种不同的对照和Carm1 gRNA。

[0100] 图3D说明肿瘤细胞中的Carm1基因失活引发肿瘤免疫,显示了Carm1-KO和对照-KO B16F10肿瘤的生长(左)和荷瘤小鼠的存活(右)。小鼠(n=8-10只/组)用CD8耗竭抗体或同种型对照抗体处理。用第二Carm1 gRNA确认了此体内表型(图10A)。

[0101] 图3E说明肿瘤细胞中的Carm1基因失活引发肿瘤免疫,显示了T细胞缺陷小鼠中Carm1-KO肿瘤的生长。将Carm1-KO和对照-KO B16F10肿瘤细胞(0.2×10^6)植入免疫活性或免疫缺陷(Tcra KO)小鼠(n=8-10只/组);记录肿瘤生长(左)和存活(右)。

[0102] 图3F说明肿瘤细胞中的Carm1基因失活引发肿瘤免疫,显示了Carm1-KO或对照-KO 4T1肿瘤细胞在植入乳腺脂肪垫后的生长(n=8-10只小鼠/组);记录肿瘤生长(左)和存活(右)。

[0103] 图3G说明肿瘤细胞中的Carm1基因失活引发肿瘤免疫,显示了对Carm1-KO或对照-KO 4T1肿瘤在免疫活性小鼠中形成的自发肺转移的定量。肺转移的代表性图像(V,腹侧;D,背侧)(右)。

[0104] 图3H说明肿瘤细胞中的Carm1基因失活引发肿瘤免疫,显示了植入Carm1-KO和对照-KO MC38肿瘤细胞后的肿瘤生长(左)和存活(右)(n=8-10只小鼠/组)。

[0105] 图3I说明肿瘤细胞中的Carm1基因失活引发肿瘤免疫,显示了用Carm1-KO或对照-KO B16F10-OVA-ZsGreen肿瘤细胞进行的T细胞细胞毒性测定。肿瘤细胞与OT-I CD8 T细胞按所示效靶比(E:T)共培养24小时(n=8-10个重复/条件)。

[0106] 图3J说明肿瘤细胞中的Carm1基因失活引发肿瘤免疫,显示了(如图3I所示)CD8 T细胞诱导的肿瘤细胞凋亡(Carm1-KO或对照-KO B16F10-OVA-ZsGreen细胞),其中用Caspase-3/7染料在不同的E:T比进行测量(n=8-10个重复/组)。

[0107] 图3K说明肿瘤细胞中的Carm1基因失活引发肿瘤免疫,显示了CARM1抑制剂增加肿瘤细胞对T细胞的敏感性。用CARM1抑制剂(EZM2302, $0.1 \mu\text{M}$)预处理B16F10-OVA-ZsGreen肿瘤细胞24小时。溶媒或抑制剂处理的肿瘤细胞与OT-I CD8 T细胞按所示E:T比共培养(n=7-8个重复/条件)。

[0108] 图3L说明肿瘤细胞中的Carm1基因失活引发肿瘤免疫,显示了用表达NY-ESO-1TCR的人CD8 T细胞和人BT549 TNBC进行的T细胞细胞毒性测定。用CARM1抑制剂(EZM2302, $0.1 \mu\text{M}$)预处理肿瘤细胞24小时(n=7-10个重复/组);共培养24小时后,对存活的肿瘤细胞数量进行定量。在图3A-3L中,用双因素方差分析来确定在所有小鼠都存活的时间点上肿瘤测量结果的统计显著性。通过Log-rank (Mantel-Cox) 检验计算每个处理组中小鼠存活的统计显著性。条形图代表总结为平均值 $\pm$ S.E.M的数据,并通过非配对双侧Mann-Whitney检验进行分析。所示数据代表三次实验。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$, ns(不显著)。

[0109] 图4A说明Carm1缺陷肿瘤细胞中的先天免疫激活,显示Carm1-KO和对照-KO B16F10肿瘤细胞中差异表达基因的RNA-seq分析(n=3/组)。数据代表两次独立实验。

[0110] 图4B说明Carm1缺陷肿瘤细胞中的先天免疫激活,显示与对照-KO B16F10肿瘤细

胞相比,Carm1-KO中显著上调/下调的基因的基因本体(GO)分析。

[0111] 图4C说明Carm1缺陷肿瘤细胞中的先天免疫激活,显示代表Carm1-KO肿瘤和CD8⁺T细胞中重叠的差异表达基因数量的维恩图。

[0112] 图4D说明Carm1缺陷肿瘤细胞中的先天免疫激活,显示与对照-KO B16F10细胞相比,通过RT-qPCR验证Carm1-KO中的干扰素诱导基因(ISG)(n=3/组)。

[0113] 图4E说明Carm1缺陷肿瘤细胞中的先天免疫激活,显示用Carm1抑制剂EZM2302(0.1-1 μ M)或溶剂对照处理B16F10细胞7天后ISG mRNA水平的RT-qPCR分析(n=3/组)。

[0114] 图4F说明Carm1缺陷肿瘤细胞中的先天免疫激活,显示通过RT-qPCR分析对照-KO、Carm1-KO、cGAS-KO和Carm1/cGAS双KO(dKO) B16F10细胞中选定ISG的表达(n=3/组)。

[0115] 图4G说明Carm1缺陷肿瘤细胞中的先天免疫激活,显示用对照-KO、Carm1-KO、cGAS-KO和Carm1/cGAS dKO B16F10细胞进行的T细胞细胞毒性测定。肿瘤细胞与OT-ICD8⁺T细胞按所示E:T比共培养24小时(n=7-10个重复/条件);用Celigo图像细胞仪计数活的GFP阳性肿瘤细胞。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。***p<0.001,非配对双侧Mann-Whitney检验。

[0116] 图4H-4I说明Carm1缺陷肿瘤细胞中的先天免疫激活,显示基于 γ H2AX(图4H)和RAD51(图4I)Ab标记,Carm1-KO相对于对照-KO B16F10肿瘤细胞中的dsDNA损伤。 γ H2AX或RAD51抗体标记(红色)的代表性免疫荧光图像(左);细胞核用DAPI标记。 γ H2AX或RAD51病灶/细胞核数量的定量(右)。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。***p<0.001,非配对双侧Mann-Whitney检验。比例尺—10 μ M。

[0117] 图4J说明Carm1缺陷肿瘤细胞中的先天免疫激活,显示在Carm1-KO和对照-KO B16F10肿瘤细胞中微核的检测。DNA用DAPI标记;微核阳性细胞的代表性图像(左)和定量(右)。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。**p<0.01,非配对双侧Mann-Whitney检验。比例尺—10 μ M。

[0118] 图4K说明Carm1缺陷肿瘤细胞中的先天免疫激活,显示对Carm1-KO相对于对照-KO CD8⁺T细胞中dsDNA损伤的分析。使用前述CRISPR-Cas9编辑7天后平板接种OT-I CD8⁺T细胞,并进行CD8 α 、 γ H2AX和DAPI染色。CD8 α 抗体标记(红色)、 γ H2AX抗体标记(绿色)的代表性免疫荧光图像;细胞核用DAPI染色(蓝色)。比例尺—20 μ M。图4D-4J中所示的数据代表三次独立实验。条形图代表总结为平均值 $\pm$ S.E.M.的数据,并通过非配对双侧Mann-Whitney检验进行分析。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001,ns(不显著)。所有qPCR数据的误差条代表每组三个重复的SD。

[0119] 图5A说明Carm1抑制克服对检查点阻断的耐受性,显示用CTLA-4或同种型对照抗体治疗Carm1-KO或对照-KO B16F10肿瘤(n=8只小鼠/组)。显示荷瘤小鼠的肿瘤生长(左)和存活(右)。将具有可比肿瘤体积($\sim$ 50mm³)的小鼠随机分入不同治疗组。

[0120] 图5B说明Carm1抑制克服对检查点阻断的耐受性,显示用Carm1抑制剂(EZM2302)或溶媒对照联合CTLA-4或同种型对照抗体治疗B16F10肿瘤(n=8只小鼠/组)。EZM2302(150mg/kg b.i.d.)口服施用2周(第7-21天)。

[0121] 图5C说明Carm1抑制克服对检查点阻断的耐受性,显示用抗CTLA-4或同种型对照抗体治疗Carm1-KO或对照-KO 4T1肿瘤(n=8只小鼠/组)。

[0122] 图5D说明Carm1抑制克服对检查点阻断的耐受性,显示由按C中所述治疗的4T1肿瘤形成的自发肺转移的数量变化(左)和肺转移的代表性图像(右)(n=8只小鼠/组)。

[0123] 图5E说明Carm1抑制克服对检查点阻断的耐受性,显示(肿瘤细胞植入后第18天)

用CTLA-4或同种型对照抗体治疗后Carm1-KO和对照-KO B16F10肿瘤(n=8只小鼠/组)中肿瘤浸润CD8⁺ T细胞的定量。代表性流式细胞图(左)以及以CD3⁺细胞百分比和每克肿瘤为单位的CD8⁺ T细胞定量(分别为中间和右侧)。

[0124] 图5F-5G说明Carm1抑制克服对检查点阻断的耐受性,显示对图5E所述实验中PD-1阳性和PD-1/Tim-3双阳性肿瘤浸润CD8⁺ T细胞的定量。

[0125] 图5H-5I说明Carm1抑制克服对检查点阻断的耐受性,显示H-I。对图5E所述实验中每克肿瘤中表达效应标志物(GZMB和IFN γ)的CD8⁺ T细胞、迁移性交叉呈递DC(CD45⁺/CD3⁻/F4/80⁻/CD11c⁺/MHC-II^{high}/CD103⁺/CD11b⁻)和NK细胞(CD45⁺/CD3⁻/CD49b⁺)的定量。在图5A-5I中,所示数据代表两次实验。对于所有小鼠均存活用于肿瘤测量的时间点,使用双因素方差分析来确定统计显著性。采用Log-rank (Mantel-Cox) 检验来确定小鼠存活的统计显著性。条形图代表总结为平均值 $\pm$ S.E.M.的数据,并通过非配对双侧Mann-Whitney检验进行分析,****P<0.0001;***P<0.001;**P<0.01;*P<0.05;n.s.,不显著。

[0126] 图6A说明Tdrd3和Med12是Carm1的下游效应物,显示通过RT-qPCR比较对照-KO、Tdrd3-KO、cGAS-KO和Tdrd3/cGAS dKO B16F10细胞中的ISG表达(n=3/组)。

[0127] 图6B说明Tdrd3和Med12是Carm1的下游效应物,显示通过RT-qPCR比较对照-KO、Med12-KO、cGAS-KO和Med12/cGAS dKO B16F10细胞中的ISG表达(n=3/组)。

[0128] 图6C说明Tdrd3和Med12是Carm1的下游效应物,显示通过 γ H2AX抗体染色(红色病灶;DAPI标记细胞核)进行的对照-KO、Carm1-KO、Tdrd3-KO和Med12-KO B16F10肿瘤细胞中dsDNA损伤的免疫荧光分析(左)。重新显示图4中对照-KO和Carm1-KO的图像,以与其他KO肿瘤细胞系比较。定量每个细胞系的 γ H2AX病灶/细胞核数量(右)。比例尺—10 μ M。

[0129] 图6D说明Tdrd3和Med12是Carm1的下游效应物,显示用DAPI作为DNA染料进行的对照-KO、Carm1-KO、Tdrd3-KO和Med12-KO B16F10肿瘤细胞中微核的分析。具有微核的细胞的代表性图像(左)和所述细胞的百分比定量(右)。比例尺—10 μ M。

[0130] 图6E说明Tdrd3和Med12是Carm1的下游效应物,显示携带对照-KO和Tdrd3-KO B16F10肿瘤的小鼠的肿瘤生长和存活。用CD8⁺ T细胞耗竭抗体或同种型对照抗体治疗小鼠(n=8-10只/组)。

[0131] 图6F说明Tdrd3和Med12是Carm1的下游效应物,显示免疫活性和T细胞缺陷(Tcra KO)小鼠中对照-KO和Tdrd3-KO B16F10肿瘤的肿瘤生长和存活(n=8-10只/组)。

[0132] 图6G说明Tdrd3和Med12是Carm1的下游效应物,显示抗CTLA-4或同种型对照抗体治疗的携带Tdrd3-KO或对照-KO B16F10肿瘤的小鼠的肿瘤生长和存活(n=8只小鼠/组)。

[0133] 图6H说明Tdrd3和Med12是Carm1的下游效应物,显示Carm1对Med12的精氨酸甲基化。从对照-KO、Carm1-KO或Tdrd3-KO B16F10肿瘤细胞的核提取物免疫沉淀Med12蛋白,然后用对精氨酸残基的不对称二甲基化特异的抗体进行Western印迹检测(ADMA,左)。用针对所示蛋白的抗体对来自相同细胞系的核提取物进行Western印迹分析(右)。

[0134] 图6I说明Tdrd3和Med12是Carm1的下游效应物,显示Carm1对Med12与组蛋白H3相互作用的影响。从对照-KO或Carm1-KO B16F10肿瘤细胞免疫沉淀Med12蛋白,然后用组蛋白H3抗体进行Western印迹检测。显示免疫沉淀样品中组蛋白H3的输入水平(中间);定量相对于总组蛋白H3归一化的结合到Med12的组蛋白H3(底部)。图表显示提出的生化相互作用(右)。在图6A-6I中,对于所有小鼠都存活用于肿瘤测量的时间点,用双因素方差分析来确

定统计显著性。通过Log-rank (Mantel-Cox) 检验计算每个治疗组中小鼠存活的统计显著性。条形图代表总结为平均值 $\pm$ S.E.M.的数据,并通过非配对双侧Mann-Whitney检验进行分析。数据代表三次(A-H)和两次(I)实验,* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,**** $p<0.0001$,ns(不显著)。

[0135] 图7A说明CARM1在人癌症中的相关性,显示对1208个人癌细胞系(癌细胞系百科全书,CCLE)的不同分组进行的所示途径的分析。对称小提琴图说明使用中位表达水平对CARM1高和低细胞系进行的分层。

[0136] 图7B说明CARM1在人癌症中的相关性,显示对人癌症类型的TCGA RNA-seq数据的分析。CARM1 mRNA水平与所示途径的相关性。图中显示针对肿瘤纯度调整后所示途径在不同癌症类型中的Spearman相关性和估计的统计显著性。每个点代表TCGA中的一种癌症类型。

[0137] 图7C说明CARM1在人癌症中的相关性,显示皮肤黑色素瘤(SKCM,N=442名患者)和肺鳞状细胞癌(LUSC,N=363名患者)数据集(TCGA PanCancer Atlas)中CARM1高肿瘤细胞中显著上调/下调的基因的基因本体(GO)分析。

[0138] 图7D说明CARM1在人癌症中的相关性,显示对来自三个人癌症群组(GSE123813:基底细胞癌;GSE103322:头颈癌;GSE116256:AML)的恶性细胞的scRNA-seq数据的分析。显示DNA修复和p53途径得分。使用中位表达水平,按CARM1高表达组和低表达组进行数据分层。使用双侧非配对Mann-Whitney检验进行统计比较。

[0139] 图7E说明CARM1在人癌症中的相关性,显示在用PD-1或PD-L1 mAb治疗的癌症患者中CARM1 mRNA水平与ICB(免疫检查点阻断)反应之间的相关性。针对具有低(<中位数)MED12 mRNA水平的肿瘤,显示该分析。在具有高(>中位数)MED12 mRNA水平的肿瘤中,CARM1 mRNA水平与ICB反应不相关。通过Mann-Whitney U检验推断p值。

[0140] 图8A说明CARM1鉴定为肿瘤浸润T细胞和肿瘤细胞中的治疗靶标,显示用关注的表观遗传gRNA文库进行的验证筛选。该文库包含来自初步筛选的前31个基因和两个阳性对照基因(Pdcd1和Cblb)的gRNA;加入186个gRNA作为对照。用慢病毒gRNA文库转导OT-I T细胞,并将其注射到具有皮下B16F10-OVA肿瘤的小鼠体内。在T细胞转移后的第10天,对从肿瘤(实验器官)和脾脏(对照器官)分离的T细胞的gRNA表现进行定量。图表显示肿瘤和脾脏中gRNA表现的log2倍数差异(X轴)和所示基因的统计显著性(Y轴)。

[0141] 图8B说明CARM1鉴定为肿瘤浸润T细胞和肿瘤细胞中的治疗靶标,显示对通过CRISPR进行的CD8 T细胞中CARM1-KO的验证。来自KO细胞的测序基因组DNA的TIDE分析(通过分解跟踪插入/缺失)显示97.8%的编辑效率。

[0142] 图8C说明CARM1鉴定为肿瘤浸润T细胞和肿瘤细胞中的治疗靶标,显示用对照或CARM1 gRNA(2种不同的CARM1 gRNA,每组4个技术重复)编辑的OT-I CD8 T细胞中CARM1蛋白的western印迹分析。用由Cas9蛋白和结合的gRNA组成的RNP电穿孔CD8 T细胞;电穿孔后第7天分析Carm1蛋白水平。

[0143] 图8D说明CARM1鉴定为肿瘤浸润T细胞和肿瘤细胞中的治疗靶标,显示用CARM1-KO(CARM1 gRNA#1)和对照-KO OT-I CD8 T细胞进行的T细胞细胞毒性测定。T细胞与B16F10-OVA-ZsGreen肿瘤细胞按所示效靶比(E:T)共培养($n=7-10$ /每种条件下重复);48小时后,用Celigo图像细胞仪计数活的GFP阳性肿瘤细胞。数据代表三次实验,并显示为平均值 $\pm$

SEM。**** $p < 0.0001$ ，非配对双侧Mann-Whitney检验。

[0144] 图8E-8F说明CARM1鉴定为肿瘤浸润T细胞和肿瘤细胞中的治疗靶标，显示用CARM1-KO (CARM1 gRNA#2) 和对照-KO OT-I CD8 T细胞进行的T细胞细胞毒性测定。24小时(图8E) 和48小时(图8F) 后，使用Celigo图像细胞仪计数活的GFP阳性肿瘤细胞。

[0145] 图8G-8H说明CARM1鉴定为肿瘤浸润T细胞和肿瘤细胞中的治疗靶标，显示与肿瘤细胞共培养后，用gRNA#1 (图8G)、gRNA#2 (图8H) 产生的CARM1-KO CD8 T细胞以及对照-KO OT-I CD8 T细胞的流式细胞术分析。经编辑的T细胞与B16-OVA-ZsGreen肿瘤细胞按1:2的比例共培养24小时，然后进行所示标志物的流式细胞术分析。数据代表两次实验，并显示为平均值 $\pm$ SEM，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ ，非配对双侧Mann-Whitney检验。

[0146] 图8I说明CARM1鉴定为肿瘤浸润T细胞和肿瘤细胞中的治疗靶标，显示检查对照-KO或CARM1-KO CD8 T细胞的抗原依赖性增殖的测定。用对照或Carm1 gRNA (gRNA#1或#2) 编辑OT-I CD8 T细胞，并在IL-15和IL-7的存在下培养5天。然后将T细胞与B16-OVA-ZsGreen细胞按5:1 (E:T) 的比例共培养4天，并通过流式细胞术评估CTV稀释物。数据总结为平均值 $\pm$ S.E.M.，并通过非配对双侧Mann-Whitney检验进行分析。** $p < 0.01$ ，**** $p < 0.0001$ 。

[0147] 图9A说明CD8 T细胞中Carm1的失活增强其抗肿瘤功能，显示过继转移Carm1-KO (使用gRNA#1产生) 或对照-KO OT-I CD45.1 CD8 T细胞后，具有B16F10-Ova黑色素瘤的小鼠的存活。

[0148] 图9B说明CD8 T细胞中Carm1的失活增强其抗肿瘤功能，显示过继转移Carm1-KO或对照-KO OT-I CD45.1 CD8 T细胞后肿瘤浸润CD45.1 CD8 T细胞的代表性流式图。对活/单个/CD45+细胞设置门控。

[0149] 图9C说明CD8 T细胞中Carm1的失活增强其抗肿瘤功能，显示过继转移的Carm1-KO (使用gRNA#2产生) 或对照-KO OT-I CD45.1 CD8 T细胞的抗肿瘤活性。皮下植入B16-OVA-ZsGreen肿瘤细胞 (0.1×10^6)。肿瘤细胞接种后第7天，通过尾静脉注射转移经编辑的CD8 T细胞 (1×10^6)。记录肿瘤大小； $n =$ 每组8-10只小鼠。

[0150] 图9D说明CD8 T细胞中Carm1的失活增强其抗肿瘤功能，显示过继转移Carm1-KO (使用gRNA#2产生) 或对照-KO OT-I CD45.1 CD8 T细胞后，具有B16F10-Ova黑色素瘤的小鼠的存活。

[0151] 图9E说明CD8 T细胞中Carm1的失活增强其抗肿瘤功能，显示集落形成测定 (500个输入细胞/孔，6孔板5天) 中Carm1-KO和对照-KO B16F10黑色素瘤细胞 (左) 以及4T1乳腺癌细胞 (右) 的生长。针对每个条件，显示每个组集落数量的定量和集落平板的代表性图像。数据代表两次独立实验。

[0152] 图10A说明靶向Carm1在人和小鼠肿瘤细胞中诱导I型干扰素反应，显示Carm1-KO (Carm1 gRNA#2) 和对照-KO B16F10肿瘤的生长 (左) 和荷瘤小鼠的存活 (右)。小鼠 ($n = 8-10$ /组) 用CD8耗竭抗体或同种型对照抗体治疗。

[0153] 图10B说明靶向Carm1在人和小鼠肿瘤细胞中诱导I型干扰素反应，显示Carm1-KO和对照-KO B16F10肿瘤细胞中差异表达的ISG的热图 ($n = 3$ /组)，之前发现这些ISG与人黑色素瘤的免疫治疗反应相关 (Benci等, 2019)。数据代表两次独立实验。

[0154] 图10C说明靶向Carm1在人和小鼠肿瘤细胞中诱导I型干扰素反应，显示Carm1-KO和对照-KO B16F10肿瘤细胞中差异表达的p53途径基因的热图 ($n = 3$ /组)。数据代表两次独

立实验。

[0155] 图10D说明靶向Carm1在人和小鼠肿瘤细胞中诱导I型干扰素反应,显示用Carm1抑制剂EZM2302 (0-1 μ M) 处理7天的B16F10细胞中所示ISG的RT-qPCR分析 (n=3/组)。

[0156] 图10E说明靶向Carm1在人和小鼠肿瘤细胞中诱导I型干扰素反应,显示验证CARM1抑制剂 (EZM2302) 在人肿瘤细胞中的活性的western印迹分析。BAF155是充分验证的CARM1的靶标。SKBR3、MDA-MB-157和MDA-MB-436细胞用EZM2302 (0.1 μ M) 或溶剂对照处理24小时。用对二甲基化BAF155蛋白 (me2BAF155)、总BAF155蛋白和 β -肌动蛋白 (上样对照) 特异的Ab探测Western印迹。

[0157] 图10F说明靶向Carm1在人和小鼠肿瘤细胞中诱导I型干扰素反应,显示对用CARM1抑制剂 (EZM2302) 处理的人肿瘤细胞中的ISG的分析。RT-qPCR分析在用溶媒或CARM1抑制剂 (2 μ M) 处理7天的人SKBR3、MDA-MB-157和MDA-MB-436细胞中选定的ISG和IFN (n=3/组)。

[0158] 图10G说明靶向Carm1在人和小鼠肿瘤细胞中诱导I型干扰素反应,显示与对照-KO B16F10细胞相比,Carm1-KO B16F10细胞对IFN γ 处理的反应性。用IFN γ (0、2或5ng/ml) 过夜处理细胞,并通过RT-qPCR分析ISG的mRNA水平 (n=3/组)。

[0159] 图10H说明靶向Carm1在人和小鼠肿瘤细胞中诱导I型干扰素反应,显示与对照-KO4T1细胞相比,Carm1-KO 4T1细胞对IFN γ 处理的反应性。用IFN γ (0、2或5ng/ml) 过夜处理细胞,并通过RT-qPCR分析ISG的mRNA水平 (n=3/组)。

[0160] 图11A说明靶向Carm1增强肿瘤细胞对IFN γ 的敏感性,显示Carm1-KO和对照-KO B16F10细胞中IFN γ 信号传导的分析。用IFN γ 刺激B16F10细胞0-5分钟,并通过Western印迹分析磷酸化STAT1 (pSTAT1) 以及总STAT1、STAT2和 β -肌动蛋白的水平。针对pSTAT1,显示同一印迹的长曝光 (5分钟) 和短曝光 (1分钟) (左)。右图显示使用ImageJ对来自三个单独实验的pSTAT1印迹进行定量。

[0161] 图11B说明靶向Carm1增强肿瘤细胞对IFN γ 的敏感性,显示Carm1-KO和对照-KO B16F10细胞在IFN γ 存在下的细胞增殖的分析。在补充IFN γ 的完全培养基中培养等数量的GFP+B16F10细胞4天,每天用Celigo图像细胞仪计数GFP+活细胞 (n=4/组)。

[0162] 图11C说明靶向Carm1增强肿瘤细胞对IFN γ 的敏感性,显示+/- IFN γ 处理的Carm1-KO和对照-KO B16F10细胞的H2-K^b表达分析。

[0163] 图11D说明靶向Carm1增强肿瘤细胞对IFN γ 的敏感性,显示+/- IFN γ 处理的Carm1-KO和对照-KO B16F10细胞的PD-L1表达分析。

[0164] 图11E说明靶向Carm1增强肿瘤细胞对IFN γ 的敏感性,显示在对照-KO、Carm1-KO、Ifnar1-KO和Ifnar/Carm1 dKO B16F10细胞中用所示浓度的IFN γ 刺激后,所示ISG的RT-qPCR分析 (n=3/组)。

[0165] 图12A说明Carm1失活在人和鼠肿瘤细胞中诱导cGAS介导的I型干扰素反应,显示用Mavs或对照gRNA编辑的Carm1-KO B16F10细胞中的Mavs蛋白水平。显示用相同gRNA编辑的不同细胞系的重复。显示 β -肌动蛋白作为上样对照。

[0166] 图12B说明Carm1失活在人和鼠肿瘤细胞中诱导cGAS介导的I型干扰素反应,显示对照、Carm1-KO、Mavs-KO和Carm1/Mavs dKO B16F10细胞中选定ISG和IFN的RT-qPCR分析 (n=3/组)。

[0167] 图12C说明Carm1失活在人和鼠肿瘤细胞中诱导cGAS介导的I型干扰素反应,显示

用cGAS或对照gRNA编辑的Carm1-KO B16F10细胞中的cGAS蛋白水平。显示用相同Cgas gRNA编辑的不同细胞系的重复。显示 β -肌动蛋白作为上样对照。

[0168] 图12D说明Carm1失活在人和鼠肿瘤细胞中诱导cGAS介导的I型干扰素反应,显示对照、Carm1-KO、cGAS-KO和Carm1/cGAS dKO B16F10细胞中选定ISG的RT-qPCR分析($n=3$ /组)。

[0169] 图12E说明Carm1失活在人和鼠肿瘤细胞中诱导cGAS介导的I型干扰素反应,显示Carm1-KO和对照-KO B16F10细胞中微核的分析。用HA表位标记的Cgas cDNA转导肿瘤细胞;由相同的慢病毒载体在IRES下游表达ZsGreen。HA表位标记的cGAS(紫色)和DAPI(蓝色)的代表性免疫荧光;DAPI标记用于鉴定细胞核和微核。比例尺—10 μ M。

[0170] 图12F说明Carm1失活在人和鼠肿瘤细胞中诱导cGAS介导的I型干扰素反应,显示CARM1抑制剂(EZM2302)和溶媒(5%葡萄糖)处理的B16F10肿瘤细胞中基于 γ H2AX抗体标记的dsDNA损伤。 γ H2AX抗体标记(紫色)的代表性免疫荧光图像(左);DAPI标记细胞核。 γ H2AX病灶/细胞核数量的定量(右)。数据显示为平均值 $\pm$ SEM,*** $p<0.001$,非配对双侧Mann-Whitney检验。比例尺—10 μ M。

[0171] 图12G说明Carm1失活在人和鼠肿瘤细胞中诱导cGAS介导的I型干扰素反应,显示用两种不同的对照gRNA(LacZ对照gRNA,基因间gRNA)编辑后,具有 γ H2AX病灶的B16F10肿瘤细胞百分比的定量。

[0172] 图12H说明Carm1失活在人和鼠肿瘤细胞中诱导cGAS介导的I型干扰素反应,显示未编辑(WT)及用两种不同的对照gRNA(LacZ,基因间)编辑后的B16F10细胞中ISG的RT-qPCR分析。编辑后>7天分析ISG水平。图12B、12D、12F和12G中显示总结为平均值 $\pm$ S.D.的数据,并通过非配对双侧Mann-Whitney检验进行分析。数据代表三次实验,* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,ns(不显著)。

[0173] 图13A说明Carm1失活使耐药肿瘤对CTLA-4或PD-1mAb治疗敏感,显示用PD-1或同种型对照抗体治疗Carm1-KO或对照-KO B16F10肿瘤($n=8$ 只小鼠/组)。显示肿瘤生长(左)和荷瘤小鼠的存活(右)。

[0174] 图13B说明Carm1失活使耐药肿瘤对CTLA-4或PD-1mAb治疗敏感,显示用抗CTLA4或对照mAb治疗后Carm1-KO和对照-KO B16F10肿瘤中CD4⁺T细胞的定量(每克肿瘤中的数量), $n=8$ /组。

[0175] 图13C说明Carm1失活使耐药肿瘤对CTLA-4或PD-1mAb治疗敏感,显示抗CTLA4或对照mAb治疗后Carm1-KO和对照-KO B16F10肿瘤中肿瘤内穿孔素⁺CD8⁺(左)和IL2⁺CD8⁺(右)T细胞的(每克肿瘤中)数量, $n=8$ /组。

[0176] 图13D说明Carm1失活使耐药肿瘤对CTLA-4或PD-1mAb治疗敏感,显示计算的每克肿瘤的瘤内巨噬细胞(活的、单个、CD45⁺CD3⁻F4/80⁺) (左)和树突细胞(DC)(活的,单个,CD45⁺CD3⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII^{hi}) (中)的数量。髓源性抑制因子(MDSC)的定量(CD45⁺/CD3⁻/F4/80⁻/Gr1⁺,以CD3⁻细胞的百分比表示)(右)。抗CTLA4或对照mAb治疗后,分析Carm1-KO和对照-KO B16肿瘤中的髓样细胞, $n=8$ /组。

[0177] 图13E说明Carm1失活使耐药肿瘤对CTLA-4或PD-1mAb治疗敏感,显示抗CTLA4或对照mAb治疗后Carm1-KO和对照-KO肿瘤的分析。等高线图显示CD4和CD8阳性瘤内T细胞的百分比(左)。所示治疗组CD8⁺T细胞百分比(中间)和数量(右侧)的定量。

[0178] 图13F说明Carm1失活使耐药肿瘤对CTLA-4或PD-1mAb治疗敏感,显示4T1肿瘤模型中所示治疗组的CD4+T细胞的定量(每克肿瘤中的数量)。

[0179] 图13G说明Carm1失活使耐药肿瘤对CTLA-4或PD-1mAb治疗敏感,显示4T1肿瘤模型中所示治疗组的CD25+瘤内CD8+T细胞的定量。

[0180] 图13H说明Carm1失活使耐药肿瘤对CTLA-4或PD-1mAb治疗敏感,显示4T1肿瘤模型中所示治疗组的CD69+瘤内CD8+T细胞的定量。

[0181] 图13I说明Carm1失活使耐药肿瘤对CTLA-4或PD-1mAb治疗敏感,显示4T1肿瘤模型中所示治疗组的IFN γ (左)、穿孔素(中)和TNF α (右)阳性瘤内CD8+T细胞的定量。在图13A-13I中,所显示的数据代表每组8只小鼠的两次独立实验。未去除异常值。条形图代表总结为平均值 $\pm$ S.E.M的数据,并通过非配对双侧Mann-Whitney检验进行分析,*** $P<0.0001$;*** $P<0.001$;** $P<0.01$;* $P<0.05$;n.s.,不显著。

[0182] 图14A说明Carm1抑制剂(EZM2302)在C57B1/6小鼠模型中的潜在毒性评价,显示用于评估Carm1抑制剂潜在毒性的主要器官组织病理学评价。将性别和年龄匹配的C57B1/6小鼠随机分为两组,通过经口灌胃法每天两次用CARM1抑制剂(150mg/kg)或溶媒治疗14天。采集主要器官,包括心脏、脾脏、肾脏、肝脏、肺和小肠,进行病理学评估。显示来自溶媒或Carm1抑制剂治疗小鼠的组织病理学图像(H&E染色)的代表性图像($n=8$ /组)。比例尺=50 μ M。

[0183] 图14B说明Carm1抑制剂(EZM2302)在C57B1/6小鼠模型中的潜在毒性评价,显示通过经口灌胃每天两次用CARM1抑制剂(150mg/kg)或溶媒治疗14天的性别和年龄匹配的C57B1/6小鼠的体重分析($n=8$ /组)。

[0184] 图15A说明CARM1抑制剂单一治疗或联合治疗诱导的肿瘤微环境的变化,显示用CARM1抑制剂或溶媒对照治疗具有B16F10黑色素瘤的小鼠。小鼠还按所示接受同种型对照、CTLA-4或PD-1mAb($n=5$ 只小鼠/组)。左侧显示所示组的活/单个/CD45+/CD3+细胞门控的CD8 T细胞的代表性流式图。所示治疗组的CD8 T细胞的定量,显示为CD3+T细胞的百分比(中)或每克肿瘤中的数量(右)。

[0185] 图15B说明CARM1抑制剂单一治疗或联合治疗诱导的肿瘤微环境的变化,显示所示治疗组每克肿瘤中瘤内颗粒酶B+CD8+T细胞的数量($n=5$ 只小鼠/组)。左侧显示代表性流式图。

[0186] 图15C说明CARM1抑制剂单一治疗或联合治疗诱导的肿瘤微环境的变化,显示所示治疗组每克肿瘤中瘤内IL2+CD8+T细胞的数量($n=5$ 只小鼠/组)。

[0187] 图15D说明CARM1抑制剂单一治疗或联合治疗诱导的肿瘤微环境的变化,显示所示治疗组每克肿瘤中瘤内IFN γ +CD8+T细胞的数量($n=5$ 只小鼠/组)。左侧显示代表性流式图。

[0188] 图15E说明CARM1抑制剂单一治疗或联合治疗诱导的肿瘤微环境的变化,显示所示治疗组每克肿瘤中瘤内穿孔素+CD8+T细胞的数量($n=5$ 只小鼠/组)。

[0189] 图15F说明CARM1抑制剂单一治疗或联合治疗诱导的肿瘤微环境的变化,显示所示治疗组瘤内PD1+CD8+T细胞(定量为CD8+T细胞的百分比)的分析($n=5$ 只小鼠/组)。显示代表性流式图(左)以及通过CD8 T细胞的百分比(中)或MFI(右)定量的PD-1表达。

[0190] 图16A说明CARM1抑制剂单一治疗或联合治疗诱导的肿瘤微环境的变化,显示用

CARM1抑制剂或溶媒对照治疗具有B16F10黑色素瘤的小鼠。小鼠还按所示接受同种型对照、CTLA-4或PD-1mAb (n=5只小鼠/组)。所示治疗组的CD4+T细胞的定量(每克肿瘤中的数量)。

[0191] 图16B说明CARM1抑制剂单一治疗或联合治疗诱导的肿瘤微环境的变化,显示所示治疗组的IFN γ +细胞的定量(作为CD4+T细胞的百分比)。

[0192] 图16C说明CARM1抑制剂单一治疗或联合治疗诱导的肿瘤微环境的变化,显示所示治疗组的FoxP3+Treg细胞的定量(作为CD4+T细胞的百分比)。

[0193] 图16D说明CARM1抑制剂单一治疗或联合治疗诱导的肿瘤微环境的变化,显示所示治疗组的CD8/FoxP3 Treg比例的定量。

[0194] 图16E说明CARM1抑制剂单一治疗或联合治疗诱导的肿瘤微环境的变化,显示计算的每克肿瘤中瘤内NK细胞(左)、树突细胞(活的、单个、CD45+CD3-F4/80-CD11c+MHCII^{hi}) (中)和巨噬细胞(活的,单个,CD45+CD3-F4/80+) (右)的数量。

[0195] 图17A说明用多西环素诱导型启动子重建Carm1基因表达逆转Carm1敲除表型,显示使用在多西环素(DOX)诱导型启动子控制下驱动Carm1 cDNA表达的慢病毒载体转导Carm1-KO B16F10细胞。显示针对DOX-Carm1或空载体转导的肿瘤细胞分选GFP+细胞后的代表性流式图。

[0196] 图17B说明用多西环素诱导型启动子重建Carm1基因表达逆转Carm1敲除表型,显示在所示细胞群体中DOX诱导7天后Carm1蛋白表达的western印迹验证。显示Gapdh作为上样对照。

[0197] 图17C说明用多西环素诱导型启动子重建Carm1基因表达逆转Carm1敲除表型,显示选定ISG的RT-qPCR分析。表达DOX诱导型Carm1 cDNA的Carm1-KO细胞用多西环素(0、100或500ng/ml)处理7天,然后用IFN γ (0、1或5ng/ml)过夜处理(n=3/组)。包括未用IFN γ 处理的对照-KO细胞用于比较。

[0198] 图17D说明用多西环素诱导型启动子重建Carm1基因表达逆转Carm1敲除表型,显示在以下条件下比较B16F10黑色素瘤的生长:用空载体转导的对照-KO肿瘤细胞、用空载体转导的Carm1-KO肿瘤细胞和用DOX-Carm1载体转导的Carm1-KO肿瘤细胞。对于这些组中的每一组,小鼠在肿瘤细胞注射后喂食常规饮食或含多西环素的饮食(625ppm,Envigo Teclad),直至实验终点(18天)。

[0199] 图18A说明用多西环素诱导型启动子重建Carm1基因表达逆转肿瘤微环境中的有利变化,显示将转导了空慢病毒载体的对照-KO B16F10肿瘤细胞或表达DOX-Carm1 cDNA的Carm1-KO肿瘤细胞植入C57B1/6小鼠。具有任一种肿瘤细胞的小鼠在肿瘤细胞注射后喂食常规饮食或含多西环素的饮食(625ppm,Envigo Teclad),直至实验终点(18天)。对所示治疗组的CD8和CD4 T细胞浸润进行分析(n=5只小鼠/组)。等高线图显示CD4+和CD8+瘤内T细胞的百分比(左)。总结图显示每克肿瘤中CD8和CD4 T细胞数量的定量(右)。

[0200] 图18B说明用多西环素诱导型启动子重建Carm1基因表达逆转肿瘤微环境中的有利变化,显示所示治疗组的PD-1+瘤内CD8+T细胞的定量(右)。等高线图(左)显示CD8+PD-1+阳性瘤内T细胞的百分比,n=5/组。

[0201] 图18C说明用多西环素诱导型启动子重建Carm1基因表达逆转肿瘤微环境中的有利变化,显示所示治疗组的CD25+瘤内CD8+T细胞的定量(右)。等高线图(左)显示CD25阳性的CD8+T细胞百分比,n=5/组。

[0202] 图18D说明用多西环素诱导型启动子重建Carm1基因表达逆转肿瘤微环境中的有利变化,显示对瘤内cDC1细胞的表征。等高线图显示CD103+CD11b-cDC1的百分比(对活的、单个、CD45+CD3-F4/80-CD11c+MHCII^{hi}设置门控)(左)。总结图将cDC1(CD103+CD11b-)细胞的百分比显示为总DC的百分比(右),n=5/组。

[0203] 图19A说明Tdrd3和Med12基因失活导致与Carm1基因失活相似的表型,显示用Tdrd3或对照(Ctrl) gRNA编辑的B16F10细胞中的Tdrd3蛋白水平。显示用相同gRNA编辑的不同细胞系的重复。用红色突出显示的细胞系进行实验。

[0204] 图19B说明Tdrd3和Med12基因失活导致与Carm1基因失活相似的表型,显示用Med12或对照gRNA编辑的B16F10细胞中的Med12蛋白水平。显示用相同gRNA编辑的不同细胞系的重复。

[0205] 图19C说明Tdrd3和Med12基因失活导致与Carm1基因失活相似的表型,显示Tdrd3-KO和对照-KO B16F10细胞中选定ISG和IFN的RT-qPCR分析(n=4/组)。

[0206] 图19D说明Tdrd3和Med12基因失活导致与Carm1基因失活相似的表型,显示Med12-KO和对照-KO B16F10细胞中选定ISG和IFN的转录物的RT-qPCR分析(n=4/组)。

[0207] 图19E说明Tdrd3和Med12基因失活导致与Carm1基因失活相似的表型,显示Tdrd3-KO和对照-KO B16F10细胞对IFN γ 刺激的反应。用所示浓度的IFN γ 过夜刺激后,选定ISG和IFN的转录物的RT-qPCR分析(n=4/组)。

[0208] 图19F说明Tdrd3和Med12基因失活导致与Carm1基因失活相似的表型,显示Med12-KO和对照-KO B16F10细胞对IFN γ 刺激的反应。用所示浓度的IFN γ 过夜刺激后,选定ISG和IFN的转录物的RT-qPCR分析(n=4/组)。

[0209] 图19G-19I说明Tdrd3和Med12基因失活导致与Carm1基因失活相似的表型,显示B16F10细胞中Top3b(图19G)、Top1(图19H)和Med13(图19I)编辑的western印迹验证。对所示细胞系中的选定ISG和IFN进行RT-qPCR分析(底部)(n=4/组)。在图19A-19I中,所示数据代表4个重复/组的两次独立实验。用Mann-Whitney检验来确定显著性,***P<0.001;**P<0.01;*P<0.05;n.s.,不显著。

[0210] 图20A说明Carm1-KO肿瘤细胞中的转录变化,显示来自对照-KO、Carm1-KO或Tdrd3-KO B16F10细胞的核裂解物的western印迹分析。用对RNA Pol II的磷酸化(p-Ser2 CTD和p-Ser5)或非磷酸化(总)C端结构域(CTD)特异的抗体探测来自所示细胞系的等量核蛋白提取物。用Lamin A/C作为上样对照(左)。通过将p-Ser2 CTD对总CTD水平归一化来估计磷酸化RNA Pol II的分数(右)。所示数据代表三次实验。

[0211] 图20B说明Carm1-KO肿瘤细胞中的转录变化,显示Carm1-KO(红色)和对照-KO(蓝色)细胞中表达蛋白的编码基因的转录起始位点(TSS)500bp内归一化P-Ser2 Pol II与总Pol II mNET-Seq信号的比例。阴影区域表示95%置信区间。

[0212] 图20C说明Carm1-KO肿瘤细胞中的转录变化,显示的箱形图表示Carm1-KO(红色)和对照-KO(蓝色)细胞中TSS的500bp内P-Ser2 Pol II与总Pol II mNET-Seq读段数的比例。

[0213] 图20D说明Carm1-KO肿瘤细胞中的转录变化,显示的维恩图展示了Carm1-KO相对于对照-KO B16F10细胞中归一化P-Ser2 RNA Pol II读段增加的基因(显示为mNETSeq,蓝色)与表达更高的基因(显示为RNA-Seq,红色)之间的重叠。

[0214] 图20E说明Carm1-KO肿瘤细胞中的转录变化,显示与对照-KO B16F10细胞相比,Carm1-KO B16F10细胞中归一化P-Ser2 RNA Pol II读段增加的基因(全部2837个mNETSeq基因,蓝色)的GSEA分析的靠前富集路径(左)。mNETSeq和RNASeq之间275个重叠基因的GSEA分析(右)。

[0215] 图20F说明Carm1-KO肿瘤细胞中的转录变化,显示Carm1-KO肿瘤细胞中差异剪接基因的途径分析。用 $\log_2(FC)$ 大于2倍和调整 p 值 <0.05 作为统计阈值,用DESeq2进行差异剪接分析。使用String Database鉴定富集的基因本体。外显子获得和丢失的数量在内嵌图中显示。

[0216] 图20G说明Carm1-KO肿瘤细胞中的转录变化,显示DRIPseq (DNA-RNA免疫沉淀分析)的metaplot,代表Carm1-KO和对照-KO细胞中平均归一化峰值计数的 $\log_2$ 倍数变化。

[0217] 图21A说明CARM1在人癌症中的表达,显示对人癌症类型的TCGA RNA-seq数据的分析。CARM1 mRNA水平与所示途径的相关性。图中显示,针对肿瘤纯度调整后,所示途径在不同癌症类型中的Spearman相关性和估计的统计显著性。每个点代表TCGA中的一种癌症类型。

[0218] 图21B说明CARM1在人癌症中的表达,显示对来自三个人癌症群组 (GSE123813:基底细胞癌;GSE103322:头颈癌;GSE116256:AML) 的恶性细胞的scRNA-seq数据的分析。显示IFN- γ 反应、IFN- α 反应和APC (抗原呈递细胞浸润) 途径得分。使用中位表达水平,将数据按CARM1高表达组和低表达组进行分层。使用双侧非配对Mann-Whitney检验进行统计比较。

[0219] 图21C说明CARM1在人癌症中的表达,显示CARM1 mRNA水平与转移性黑色素瘤(SKCM)、膀胱尿路上皮癌(BLCA)、低级别胶质瘤(LGG)、肉瘤(SARC)、肾透明细胞癌(KIRC)、间皮瘤(MESO)中的存活的相关性。分析了总计12个TCGA数据集。使用TIMER2.0进行统计分析;图中显示了CARM1 mRNA水平与存活相关的所有癌症类型。

[0220] 图22A-22B说明针对CARM1 mRNA表达与DNA修复以及抗原呈递途径之间的相关性进行的人肿瘤细胞的单细胞分析,显示针对CARM1 mRNA表达与DNA修复途径标志基因(msigdb/hallmark:DNA Repair) (图22A) 以及抗原处理和呈递途径(KEGG:https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04612) (图22B) 之间的相关性,研究了恶性细胞的单细胞RNA-seq数据。显示以下人scRNA-seq数据集的数据:ALL (急性成淋巴细胞白血病)、AML (急性髓性白血病)、MM (多发性骨髓瘤) 和NSCLC (非小细胞肺癌)。

[0221] 图23A说明临床试验中的ICB反应和免疫相关途径的CARM1-KO基因表达标签分析,显示入选评价PD-1或PD-L1阻断mAb临床试验中的所示ICB(免疫检查点阻断)群组的反应患者和非反应患者的CARM1-KO基因标签水平。在每个亚组中,通过比较CARM1-KO基因标签高组和低组,评价了ICB反应的预测能力。通过Mann-Whitney U检验推断 p 值。 $*p$ 值 <0.1 ;NS (不显著)。Ipi (伊匹单抗)。

[0222] 图23B说明临床试验中的ICB反应和免疫相关途径的CARM1-KO基因表达标签分析,显示人癌症类型的TCGA RNA-seq数据集中CARM1-KO标签的分析。CARM1-KO标签与所示免疫相关途径的相关性。图中显示,针对肿瘤纯度调整后,所示途径在不同癌症类型中的Spearman相关性和估计的统计显著性。每个点代表TCGA中的一种癌症类型。

[0223] 发明详述

[0224] 本文提供一个或多个优选实施方案的详细描述。然而,应理解,本公开可以以多种

形式实施。因此,本文所公开的具体细节不应解释为限制性的,而是解释为权利要求书的基础以及指导本领域技术人员以任何适当方式应用本公开的代表性基础。

[0225] 定义

[0226] 除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指代物。在权利要求书和/或说明书中与术语“包含”结合使用时,词语“一”或“一个”的使用可以意指“一个”,但也与“一个或多个”、“至少一个”和“一个或一个以上”的含义一致。

[0227] 除非另有明确说明,否则在本文中使用“例如”、“如”和“包括”等短语时,应理解为紧随其后的是“但不限于”。类似地,将“实例”、“示例”等理解为非限制性的。

[0228] 术语“基本上”允许偏离描述,条件是所述偏离不会对预期目的产生负面影响。即使没有明确述及“基本上”一词,描述性术语也应理解为被术语“基本上”修饰。

[0229] 本文所用的术语“约”在本文中用来指大约、大致、左右或在区域内。在术语“约”与数值范围结合使用时,它通过将边界延伸到所示数值的上方和下方来修饰该范围。

[0230] 术语“核酸”或“多核苷酸”指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其单链或双链形式的聚合物。除非明确限制,该术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,其中所述核酸具有与参考核酸相似的结合性质,并且以类似于天然核苷酸的方式代谢。除非另有说明,具体的核酸序列还暗含其保守修饰变体(例如简并密码子取代)、等位基因、直向同源基因、SNP和互补序列以及明确指示的序列。具体而言,简并密码子取代可以通过产生这样的序列来达到,其中用混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代一个或多个选定(或所有)密码子的第三个位置来产生所述序列(Batzer等,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);和Rossolini等,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0231] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换地用于指氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0232] 术语“氨基酸”是指天然存在和合成的氨基酸,以及功能类似于天然存在的氨基酸的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及随后修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即与氢、羧基、氨基和R基团结合的 α -碳,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物具有经修饰的R基团(例如正亮氨酸)或经修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有不同于氨基酸的一般化学结构的结构,但功能类似于天然存在的氨基酸的化合物。

[0233] “保守修饰变体”适用于氨基酸和核酸序列。对于具体核酸序列,保守修饰变体是指编码相同或基本相同的氨基酸序列的核酸,或者如果核酸不编码氨基酸序列,则是指基本相同的序列。由于遗传密码的简并性,任何给定的蛋白质均可以由多个功能相同的核酸编码。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在规定丙氨酸的每个密码子位置,密码子可以改变为所描述的任何相应密码子,而不改变所编码的多肽。这种核酸变异是“沉默变异”,其是保守修饰变异中的一种。本文中编码多肽的每个核酸序列也描述了该核酸的每种可能的沉默变异。技术人员将认识到,核酸中的每个密码子(AUG和TGG除外,AUG通常是甲硫氨酸的唯一密码子,TGG通常是色氨酸的唯一密码子)都可以修饰以产生

功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异都暗含在每个描述的序列中。

[0234] 对于氨基酸序列,技术人员将认识到,在核酸、肽、多肽或蛋白质序列中的各种取代、缺失或添加,当在所编码的序列中改变、添加或删除单个氨基酸或一小部分氨基酸时,如果所述改变导致氨基酸被替代为化学上相似的氨基酸,则其是“保守修饰变体”。提供功能相似氨基酸的保守取代表为本领域公知。这类保守修饰变体是对多态性变体、种间同源物和等位基因的补充而不是排除。以下八组各包含相互为保守取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见例如 Creighton, Proteins (1984))。

[0235] “序列同一性百分比”是通过在比较窗中比较两个最佳比对的序列来确定的,其中为达到两个序列的最佳比对,与不包含添加或缺失的参考序列(例如多肽)相比,比较窗中的多核苷酸序列部分可以包含添加或缺失(即空位)。可以如下计算序列同一性百分比:确定两个序列中存在相同核酸碱基或氨基酸残基的位置数以得到匹配位置数,将匹配位置数除以比较窗中的位置总数,将结果乘以100,得到序列同一性百分比。

[0236] 在两个或多个核酸或多肽序列的情况下,术语“相同”或百分比“同一性”是指两个或多个序列或子序列是相同序列。在比较窗或指定区域内进行比较和比对以获得最大对应时,使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查进行测量,如果两个序列具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即,在指定区域内,或在未指定的情况下,在参考序列的整个序列内,至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性),则两个序列“基本相同”。本公开提供分别与本文示例的多肽或多核苷酸基本相同的多肽或多核苷酸。该同一性可以存在于长度至少约为15、25或50个核苷酸的区域,或更优选长度为100至500或1000或更多个核苷酸的区域,或参考序列的全长上。对于氨基酸序列,同一性或基本同一性可以存在于长度至少为5、10、15或20个氨基酸、可选地至少约25、30、35、40、50、75或100个氨基酸、可选地至少约150、200或250个氨基酸的区域、或参考序列的全长上。对于较短的氨基酸序列,例如20个或更少氨基酸的氨基酸序列,根据本文定义的保守取代,在一个或两个氨基酸残基被保守取代时,存在基本同一性。

[0237] 对于序列比较,通常一个序列充当参考序列,将测试序列与之相比较。在使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,也可以指定备选参数。然后,序列比较算法根据程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。

[0238] 本文中所用的“比较窗”包括具有选自20至600个、通常约50至200个、更通常约100个至约150个的任何连续位置数的区段,在所述区段中,一个序列可以与具有相同连续位置数的参考序列在两个序列最佳比对后进行比较。用于比较的序列比对方法为本领域公知。用于比较的最佳序列比对可以例如通过Smith和Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c的局部同源性算法、通过Needleman和Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443的同源性比对算法、通过Pearson和Lipman (1988) Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 85:2444的相似性搜索方法、通过这些算法的计算机执行(Wisconsin Genetics Software Package中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)或通过手动比对和目

视检查(Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology(1995supplement))来进行。

[0239] 适合用于确定百分比序列同一性和序列相似性的两个算法实例是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul等(1977)Nuc.Acids Res.25:3389-3402和Altschul等(1990)J.Mol.Biol.215:403-410中。用于执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得。此算法首先涉及:在查询序列中鉴定长度为W的短字符串来鉴定高得分序列对(HSP),其中在与数据库序列中相同长度的字符串比对时,该短字符串匹配或满足某个正值阈值得分T。T称为邻近字符串得分阈值(Altschul等,上引文)。这些初始邻近字符串命中物充当种子启动搜索以查找包含它们的更长HSP。字符串命中物沿着每个序列向两个方向延伸,只要累积比对得分可以增加即可。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励分数;始终>0)和N(不匹配残基的惩罚分数;始终<0)计算累积得分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积得分。当发生以下情况时,字符串命中物在每个方向上的延伸停止:累计比对得分从其最大达到值下降了数量X;由于一个或多个负得分残基比对的累积,累积得分为零或以下;或者到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)默认使用字符串长度(W) 11、期望值(E) 10、M=5、N=-4以及双链比较。对于氨基酸序列,BLASTP程序默认使用字符串长度3、期望值(E) 10、以及BLOSUM62评分矩阵(参见H Henikoff and Henikoff (1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915)比对(B) 50、期望值(E) 10、M=5、N=-4和双链比较。

[0240] BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见例如Karlin和Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877)。BLAST算法提供的一种相似性量度是最小和概率(P(N)),它指示了两个核苷酸或氨基酸序列之间因偶然而发生匹配的概率。例如,如果测试核酸与参考核酸比较的最小和概率小于约0.2、更优选小于约0.01、最优选小于约0.001,则认为该核酸与参考序列相似。

[0241] 两个核酸序列或多肽基本相同的一个指示是,第一核酸编码的多肽与抗第二核酸编码的多肽产生的抗体产生免疫交叉反应,如下文所述。因此,例如在一个多肽和第二多肽仅因保守取代而不同时,这两个肽通常是基本相同的。两个核酸序列基本相同的另一个指示是,两个分子或其互补链在严格条件下相互杂交,如下文所述。两个核酸序列基本相同的另一个指示是,可以使用相同的引物来扩增该序列。

[0242] 术语“个体”、“患者”和“个人”可互换地指哺乳动物,例如人或非人灵长类哺乳动物。哺乳动物也可以是实验室哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠。在一些实施方案中,哺乳动物可以是农业哺乳动物(例如马、羊、牛、猪、骆驼)或家养哺乳动物(例如犬、猫)。

[0243] 本文中,与任何疾病或病症相关的术语“治疗”,在一个实施方案中,是指改善该疾病或病症(即减缓或阻止或减少该疾病或其至少一种临床症状的发展)。在另一个实施方案中,“治疗”指减轻或改善至少一个身体参数,包括患者可能未能识别的身体参数。还在另一个实施方案中,“治疗”指调节疾病或病症,无论是在身体上(例如稳定可识别症状)还是在生理上(例如稳定身体参数)或两者兼而有之。还在另一个实施方案中,“治疗”指预防或延迟疾病或病症的发生、发展或进展。

[0244] 术语“癌症”和“癌性”可以指或描述哺乳动物的生理病状,其特征通常在于细胞生

长失调。

[0245] 本文中,“癌症”指人类癌症和癌瘤、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病等,包括实体癌和淋巴瘤、肾癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、胶质瘤、食道癌和肝癌(包括肝细胞癌)、淋巴瘤,包括B型急性淋巴母细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(例如伯基特淋巴瘤、小细胞淋巴瘤和大细胞淋巴瘤)和霍奇金淋巴瘤、白血病(包括AML、ALL和CML)和多发性骨髓瘤。

[0246] 以单数或复数形式使用的术语“癌症细胞”或“癌细胞”可以指这样的细胞,其经历了恶性转化,从而对宿主生物体而言其为病理性的。恶性转化是一个单步骤或多步骤过程,其部分涉及细胞遗传组成和/或表达谱的改变。恶性转化可自发发生,也可通过诸如药物或化学处理、辐射、与其他细胞融合、病毒感染、或特定基因的激活或失活等事件或事件组合而发生。恶性转化可在体内或体外发生,必要时可通过实验诱导。

[0247] 本文所用的术语“Carm1效应物”指属于Carm1途径的一部分的基因或蛋白质。例如,Carm1效应物可以是由Carm1甲基化的蛋白质(如Med12)或表达这种蛋白质的基因,或识别Carm1甲基化的蛋白质(如Tdrd3)或表达这种蛋白质的基因。在一些实施方案中,Carm1效应物可以是介体复合物(Mediator complex)的成分。

[0248] 在应用于细胞时,术语“接触”和“暴露”在本文中用于描述将治疗构建体和化疗剂或放疗剂递送到目标细胞或置于与目标细胞直接毗邻的过程。为了达到细胞杀伤或停滞,两种活性剂以有效杀死细胞或防止其分裂的组合量递送到细胞。

[0249] 本文所用的术语“改造”细胞或宿主细胞,如“遗传改造细胞”,可以指已引入外源核酸序列(例如载体)的细胞。因此,重组细胞或改造细胞与不含重组引入的核酸的天然细胞是可以区分的。在本公开的实施方案中,宿主细胞是T细胞,包括细胞毒性T细胞(也称为TC、细胞毒性T淋巴细胞、CTL、T杀伤细胞、细胞溶解性T细胞、CD8+T细胞或杀伤T细胞);本公开进一步包括NK细胞和NKT细胞。在一些实施方案中,遗传改造细胞可以包括CAR T细胞或武装CAR T细胞。参见例如PCT/US2015/067225。

[0250] 术语“抑制”可以指任何程度的抑制、减少、减弱或压制,并且对于这些目的,不限于仅完全抑制。因此,任何程度的部分抑制或相对减少都旨在包括在术语“抑制”的范围内。例如,术语抑制可以指与对照样品相比,抑制生物活性或过程、或抑制病症、症状或疾病,约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%或100%。术语“抑制”可以指抑制、减少、减弱或压制给定的生物活性或过程,如基因表达或蛋白质活性。术语“抑制”也可以指抑制、减少、减弱或压制给定的病症、症状或疾病。例如,本公开的实施方案可以抑制肿瘤生长(即减少肿瘤生长)。术语“抑制”可以与术语“压制”、“减少”等互换使用。

[0251] “抑制剂”指可以抑制或减少蛋白质的表达或活性的任何活性剂。例如,与对照样品相比,抑制剂可以抑制或减少CARM1蛋白的活性或降解CARM1蛋白约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%或100%。在另一个实例中,与对照样品相比,抑制剂可以抑制或减少Carm1效应蛋白的活性或降解Carm1效应蛋白(如Med 12或Tdrd3蛋白),约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%或100%。术语“活性剂”或“化合物”可以互换使用。在一些实施方案中,与对照样品相比,抑制剂可以抑制或减少Carm1基因的表达,约10%、约20%、约30%、约40%、约

50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%或100%。在一些实施方案中,与对照样品相比,抑制剂可以抑制或减少Carm1效应基因(如Med12或Tdrd3等)的表达,约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%或100%。

[0252] 本文中,由RNA干扰诱导的“基因沉默”指使细胞中目标基因的mRNA水平相对于不引入RNA干扰的情况下细胞中的mRNA水平减少至少约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%、约100%。在一个优选实施方案中,mRNA水平减少至少约70%、约80%、约90%、约95%、约99%、约100%。

[0253] “RNA干扰(RNAi)”是这样的过程,其中通过与目标基因具有相同或高度相似序列的RNA的表达或引入,导致从目标基因转录的信使RNA(mRNA)的序列特异性降解或PTGS,从而抑制目标基因的表达。这一过程在植物、无脊椎动物和哺乳动物细胞中已有描述。RNAi也可以通过引入核酸分子(例如合成的siRNA或RNA干扰剂)来起始,以抑制或沉默目标基因的表达。本文中,“抑制目标基因表达”或“抑制标志物基因表达”包括,目标基因(例如本公开的标志物基因)或目标基因编码的蛋白质(例如本公开的标志物蛋白)的表达或蛋白质活性或水平的任何减少。与未被RNA干扰剂靶向的目标基因的表达或目标基因编码的蛋白质的活性或水平相比,该减少可以是至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%或更多。

[0254] “短干扰RNA”(siRNA)在本文中也称为“小干扰RNA”,定义为抑制目标基因表达的活性剂。其是用于诱导RNAi的效应分子,通过RNA诱导的沉默复合物(RISC)导致转录后基因沉默。除了可以化学合成的siRNA外,还可以利用潜在效应分子形式的多种其他系统用于转录后基因沉默,包括短发夹RNA(shRNA)、长dsRNA、短时序RNA和微RNA(miRNA)。这些效应分子或者加工成siRNA,如在shRNA的情况下,或者直接辅助基因沉默,如在miRNA的情况下。因此,本公开涵盖用shRNA以及任何其他适宜形式的RNA来通过RNAi实现转录后基因沉默。使用shRNA比使用化学合成的siRNA具有优势,即,目标基因的抑制通常是长期和稳定的。siRNA可以化学合成,可以通过体外转录产生,或者可以在宿主细胞内从所表达的shRNA产生。

[0255] 术语“小分子”可以指合成或见于自然界中的非肽、非低聚的有机化合物。本文中所用的小分子可以指“天然产物样”化合物,然而,术语“小分子”并不限于“天然产物样”化合物。相反,小分子的特征通常在于,它具有以下一个或多个特征,包括具有几个碳碳键、具有多个立体中心、具有多个官能团以及具有至少两种不同类型的官能团,但出于本发明的目的,此特征并不旨在构成限制。

[0256] 术语“患有癌症的个体”可以指经测试发现具有癌细胞的个体。词语“患有”和“诊断患有”可以互换使用。

[0257] 术语“治疗有效量”可以指在根据个体疾病或病症的性质和严重程度对该个体施用后将具有期望治疗效果的量,例如,将治愈、预防、抑制或至少部分阻止或部分防止目标疾病或病症的量。在一些实施方案中,术语“治疗有效量”或“有效量”可以指治疗剂在单独或与其他治疗剂组合对细胞、组织或个体施用时有效预防或改善疾病或病症(如检查点阻断抗性癌症)或疾病或病症进展的量。治疗有效剂量还指足以导致症状改善的治疗剂的量,例如,相关医学病况的治疗、愈合、预防或改善,或这类病况的治疗率、愈合率、预防率或改善率提高。在应用于单独施用的单个活性成分时,治疗有效剂量指该成分单独的量。在应用

于联合用药时,治疗有效剂量指产生治疗效果的活性成分的组合量,无论是联合施用、顺序施用还是同时施用。

[0258] 在本文中使用时,术语“实体瘤”可以指组织的异常生长或异常肿块,通常不包含装有液体的泡或区域。实体瘤可以是良性(非癌性)或恶性。不同类型的实体瘤可以以形成它们的细胞的类型来命名。实体瘤的实例有肉瘤、癌瘤和淋巴瘤。白血病(血液癌症)通常不形成实体瘤(国家癌症研究所,癌症术语词典)。

[0259] CARM1

[0260] 几种癌症药物激活肿瘤细胞的先天免疫途径,但不幸的是会损害抗肿瘤免疫功能。令人惊讶地发现,抑制表观遗传酶Carm1在细胞毒性T细胞和肿瘤细胞中都引发了有益的作用。Carm1失活可以增强T细胞和肿瘤细胞中的转录,但具有不同的细胞后果。细胞毒性T细胞中的Carm1失活,增强T细胞的活化状态和抗肿瘤功能。相反,肿瘤细胞中的Carm1抑制,导致累积R环、基因组损伤和激活cGAS-STING途径。Med12(介体复合物的调节成分)的失活可以引发相同的肿瘤细胞表型,由此将Carm1与转录调节联系起来。Carm1抑制不仅诱导有效的T细胞介导的肿瘤免疫,且增强耐药性、高侵袭性肿瘤细胞对检查点阻断的敏感性。因此,Carm1-Med12途径提供了增强抗肿瘤免疫同时使耐药肿瘤细胞对免疫攻击敏感的机会。

[0261] 在一些实施方案中,对肿瘤浸润T细胞进行了基因筛查,发现CARM1基因的失活增强了T细胞的抗肿瘤功能。有趣的是,CARM1在此筛选中排名第一,得分高于编码PD-1抑制受体的基因。功能验证证明,此基因失活提高了T细胞介导的针对肿瘤细胞的细胞毒性。因此,CARM1是增强细胞毒性T细胞的抗肿瘤功能的一个有意义的靶点。

[0262] 此外,使肿瘤细胞中的CARM1基因失活,发现CARM1缺陷的肿瘤细胞引起了T细胞介导的实质性抗肿瘤免疫反应。即使在PD-I或PD-1加CTLA-4抗体检查点阻断难治的肿瘤模型中,CARM1的失活也引发了此类抗肿瘤免疫反应。已显示,可用的CARM1小分子抑制剂同样在免疫疗法难治性模型中具有显著的治疗活性。机制研究表明,CARM1失活可以在肿瘤细胞中诱导先天免疫反应(1型干扰素信号传导)。这种先天免疫反应在编码胞质DNA传感器cGAS的基因失活时丧失。因此,CARM1失活可以导致肿瘤细胞的DNA损伤反应,影响造成肿瘤细胞中先天免疫反应失活的胞质DNA。靶向CARM1是对PD-I或CTLA-4抗体检查点阻断无反应的癌症的一种新的治疗策略。

[0263] 在一些实施方案中,本发明涉及精氨酸甲基转移酶Carm1,其在组蛋白H3和其他染色质相关蛋白中引入精氨酸残基的不对称甲基化。不对称甲基化是指一种高度特异的修饰,其中两个甲基附着到精氨酸侧链的两个氮原子之一上(Wysocka J,Allis CD,Coonrod S.Histone arginine methylation and its dynamic regulation.Frontiers in bioscience:a journal and virtual library2006;11:344-55)。CARM1充当核激素受体和其他转录因子的转录共激活物。它由p160蛋白家族成员募集到染色质,p160蛋白家族成员还募集p300/CBP组蛋白乙酰转移酶。募集后,CARM1通过甲基化p160、p300/CBP和组蛋白H3(残基H3R17和H3R26)中的精氨酸残基,增强该共激活复合物的活性(Daujat S,Bauer UM,Shah V,Turner B,Berger S,Kouzarides T.Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3.Curr Biol 2002;12(24):2090-7;Chen D,Ma H,Hong H,Koh SS,Huang SM,Schurter BT等Regulation of transcription by a protein

methyltransferase. *Science* 1999;284(5423):2174-7;Chen D,Huang SM,Stallcup MR.Synergistic,p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(52):40810-6)。据报道,CARM1 mRNA在许多人癌症类型中过量表达,在乳腺癌和前列腺癌中,它是雌激素 α 和雄激素受体转录的共激活物(Kim YR, Lee BK, Park RY, Nguyen NT, Bae JA, Kwon DD等Differential CARM1 expression in prostate and colorectal cancers. *BMC Cancer* 2010;10:197;Al-Dhaheri M, Wu J, Skliris GP, Li J, Higashimoto K, Wang Y等CARM1 is an important determinant of ER α -dependent breast cancer cell differentiation and proliferation in breast cancer cells. *Cancer Res* 2011;71(6):2118-28)。

[0264] 使用体内CRISPR/Cas9筛选发现,T细胞中Carm1基因的失活增强了其抗肿瘤功能,并增加了已知为持续免疫所必需的肿瘤浸润记忆样T细胞池。最近的研究证明,只有在微环境中存在足够数量的肿瘤特异性记忆样细胞时,效应T细胞群体才会在肿瘤中得以维持(Jansen CS, Prokhnevskaya N, Master VA, Sanda MG, Carlisle JW, Bilen MA等An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. *Nature* 2019;576(7787):465-70;Siddiqui I, Schaeuble K, Chennupati V, Fuertes Marraco SA, Calderon-Copete S, Pais Ferreira D等Intratumoral Tcf1(+)PD-1(+)CD8(+)T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity* 2019;50(1):195-211)。肿瘤细胞中Carm1的失活引发了与CD8 T细胞和树突细胞的肿瘤浸润大幅增加相关的有效T细胞依赖性免疫攻击。这些数据表明,靶向Carm1通过增加耐药肿瘤对免疫攻击的敏感性和增强抗肿瘤T细胞功能来诱导有效的肿瘤免疫。

[0265] 在一些实施方案中,本公开提供用于对检查点阻断耐药的肿瘤进行免疫治疗的一种新方法。许多人类癌症对PD-1和/或CTLA-4抗体无反应,这些耐药肿瘤通常缺乏CD8 T细胞的显著浸润(“冷”肿瘤)(Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* 2013;14(10):1014-22)。不受限于理论,这类肿瘤的免疫原性不足以引发可通过检查点阻断来增强的自发T细胞反应。引发肿瘤特异性细胞毒性T细胞反应需要将交叉呈递树突细胞(cDC1)募集入肿瘤,然后激活树突细胞并使其迁移到肿瘤引流淋巴结中,在其中引发幼稚CD8 T细胞(Wculek SK, Cueto FJ, Mujal AM, Melero I, Krummel MF, Sancho D. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2020;20(1):7-24)。这些细胞事件需要激活先天免疫信号,该先天免疫信号诱导产生关键的趋化因子和细胞因子,包括激活树突细胞的1型干扰素。本公开证实,表观遗传调节因子Carm1的抑制可以克服阻碍有效癌症免疫治疗的该屏障。有意义的是,肿瘤细胞或T细胞中的Carm1抑制都对T细胞介导的肿瘤免疫具有重要的有益作用。肿瘤细胞中Carm1的失活诱导了1型干扰素反应,导致肿瘤浸润CD8 T细胞、NK细胞和树突细胞的数量显著增加。此外,这些肿瘤浸润CD8 T细胞显示出较高的功能性和较低的衰竭标志物表达。T细胞中Carm1的失活导致保留了大量抗肿瘤功能增强的肿瘤浸润记忆样CD8 T细胞。这些发现具有惊人的意义,因为T细胞衰竭和肿瘤浸润记忆群体的丧失被认为是保护性肿瘤免疫的主要障碍。本公开提供大量证据,证明此途径与人类癌

症相关。TCGA数据分析证明,在广泛的人类癌症类型,包括迄今为止很大程度上对检查点阻断耐药的人类癌症中,CARM1 mRNA具有高水平。CARM1 mRNA水平与关键免疫途径(包括MHC I类抗原呈递、1型干扰素和IFN γ 途径)的基因表达标签呈负相关。这些人类数据与之前的公布一致,这些公布显示,1型基因表达标签与T细胞炎症(‘热’)肿瘤相关而不与非T细胞炎症(‘冷’)肿瘤相关(Gajewski TF,Schreiber H,Fu YX.Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment.Nat Immunol 2013;14(10):1014-22)。

[0266] 令人惊讶地发现,Carm1的抑制在T细胞和肿瘤细胞中引起了如此不同的反应。不受限于理论,T细胞中Carm1的失活大大增加了肿瘤中CD8 T细胞的累积。比较Carm1-KO与对照-KO T细胞的RNA-seq分析表明,Carm1失活减少了末端效应细胞分化(减少Klrg1的表达),所述末端效应细胞分化已知损害T细胞介导的肿瘤免疫。相反,Carm1-KO T细胞表达更高水平的对记忆T细胞分化、自我更新和持久性至关重要的转录因子,包括Tcf7和Myb (Raghu D,Xue HH,Mielke LA.Control of Lymphocyte Fate,Infection,and Tumor Immunity by TCF-1.Trends in immunology 2019;40(12):1149-62)。最近对人黑色素瘤中CD8 T细胞的单细胞RNA-seq分析证明,CD8 T细胞中更高的TCF7表达,预示了接受检查点阻断治疗的患者的阳性结果(Sade-Feldman M,Yizhak K,Bjorgaard SL,Ray JP,de Boer CG,Jenkins RW等Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma.Cell2018;175(4):998-1013)。Carm1-KO T细胞中表达更高水平的Myb,Myb编码一种转录因子,该转录因子通过转录激活Tcf7和抑制Zeb2,促进记忆T细胞形成。先前研究显示,Myb过量表达可以增强CD8 T细胞记忆形成、多功能性,并促进保护性抗肿瘤免疫(Gautam S,Fioravanti J,Zhu W,Le Gall JB,Brohawn P,Lacey NE等The transcription factor c-Myb regulates CD8(+)T cell stemness and antitumor immunity.Nat Immunol 2019;20(3):337-49)。这些数据与Carm1是促进肿瘤浸润T细胞终末分化的共转录激活物的假设一致。

[0267] 相反,肿瘤细胞中Carm1、Tdrd3和Med12的失活导致了1型干扰素反应的诱导,增强肿瘤对T细胞介导的攻击的敏感性。这种1型干扰素反应伴随着DNA损伤、微核形成和cGAS-STING激活。这些发现与之前的发现——CARM1与BRCA1和p53协同诱导细胞周期抑制因子p21^{CIP1} (CDKN1A) 表达——一致(21)。尽管存在双链DNA断裂,但细胞周期进展,这可导致有丝分裂期间染色体错误分离,并形成激活cGAS-STING途径的微核(Harding SM,Benci JL,Irianto J,Discher DE,Minn AJ,Greenberg RA.Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei.Nature 2017;548(7668):466-70)。有趣的是,尽管在触发T细胞受体后T细胞可以快速增殖,但在T细胞中没有观察到DNA损伤。考虑了肿瘤细胞中的DNA损伤表型由基因R-loop的累积引起的可能性,但DRIP-seq并未证明Carm1-KO与对照-KO肿瘤细胞相比具有增加的R-loop形成。许多涉及DNA损伤反应的基因是肿瘤抑制因子,由于突变或表观遗传机制而在肿瘤细胞中失活。不受限于理论,推测肿瘤细胞中的Carm1失活通过干扰p53诱导的细胞周期进展抑制来放大预先存在的DNA损伤。这一推测可以解释为什么Carm1抑制在肿瘤细胞中但不在T细胞中诱导cGAS-STING激活。

[0268] 一些化疗药物可以诱导肿瘤细胞中的cGAS STING途径激活,但靶向细胞周期对造血前体细胞和增殖中的肿瘤特异性T细胞有害。此外,已开发了许多通过瘤内注射递送的小

分子STING激动剂(Corrales L,Glickman LH,McWhirter SM,Kanne DB,Sivick KE,Katibah GE等Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity.Cell reports 2015;11(7):1018-30)。本公开中提供的方法通过使肿瘤细胞对T细胞敏感和提高细胞毒性T细胞的持久性,在对检查点阻断耐药的转移性疾病的情况下可以尤其相关。在B16F10黑色素瘤和4T1 TNBC模型中,肿瘤细胞中Carm1基因的失活结合CTLA-4阻断诱导了实质性存活益处。重要的是,在甚至对PD-1和CTLA-4mAb组合耐药的B16F10黑色素瘤模型中,Carm1小分子抑制剂也与CTLA-4阻断mAb显示出了协同作用。这种抑制剂大大增加了CD8 T细胞、NK细胞和交叉呈递树突细胞对肿瘤的浸润。这些数据为在抵抗当前免疫疗法的人类癌症中靶向CARM1提供了依据。这种方法不仅可用于此处所述的检查点阻断治疗,还可用于T细胞作为关键效应细胞的其他免疫治疗方法,包括基于新抗原的癌症疫苗和用于实体瘤适应症的CAR T细胞治疗。在过继T细胞治疗中,CARM1抑制不仅可以使耐药实体瘤对细胞毒性T细胞敏感,还可以增强T细胞记忆和持久性,这对于此类细胞治疗的持续临床益处至关重要(Busch DH,Frassle SP,Sommermeier D,Buchholz VR,Riddell SR.Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy.Semin Immunol 2016;28(1):28-34)。

[0269] 许多癌症药物激活肿瘤细胞中的先天免疫途径,但不幸的是也会损害抗肿瘤免疫功能。在一些实施方案中,本公开提供,通过抑制表观遗传酶和共转录激活物Carm1,在细胞毒性T细胞和肿瘤细胞中引发有益的抗肿瘤活性。在T细胞中,Carm1失活实质性增强其抗肿瘤功能,并使持续抗肿瘤免疫所需的记忆样群体得到保存。在肿瘤细胞中,Carm1失活则诱导有效的I型干扰素反应,使耐药肿瘤对细胞毒性T细胞敏感。Carm1缺陷性肿瘤中存在数量实质性增加的树突细胞、CD8 T细胞和NK细胞,且浸润性CD8 T细胞表达低水平的衰竭标志物。用小分子靶向Carm1引发有效的抗肿瘤免疫,并使耐药肿瘤对检查点阻断敏感。因此,靶向这种共转录调节因子,提供了增强免疫功能同时使耐药肿瘤细胞对免疫攻击敏感的机会。

[0270] 癌症免疫治疗的耐药性仍然是一个重大挑战。靶向CARM1通过增强T细胞功能性和保存肿瘤中的记忆样T细胞群体,允许对耐药肿瘤进行免疫治疗。CARM1抑制还可以通过诱导肿瘤细胞固有的I型干扰素反应来使耐药肿瘤细胞对免疫攻击敏感。

[0271] 通过抑制Carm1治疗癌症的方法

[0272] 在一些实施方案中,本公开提供治疗患有癌症的个体的方法。在一些实施方案中,该方法包括降低该个体的细胞中Carm1基因和/或Carm1效应基因的表达;和/或降低个体的细胞中Carm1蛋白和/或Carm1效应蛋白的活性。在一些实施方案中,该癌症对免疫治疗和/或检查点阻断治疗具有耐药性。在一些实施方案中,该癌症对药物治疗如免疫治疗、化疗、放疗和/或检查点阻断治疗具有耐药性。

[0273] 在一些实施方案中,该Carm1效应基因是Tdrd3基因,该Carm1效应蛋白是Tdrd3蛋白。在一些实施方案中,该Carm1效应基因是Med12基因,该Carm1效应蛋白是Med12蛋白。

[0274] 在一些实施方案中,该方法包括降低该个体中Carm1基因和Carm1效应基因二者的表达。在一些实施方案中,该方法包括降低该个体中Carm1蛋白和Carm1效应蛋白二者的活性。

[0275] 在一些实施方案中,上述降低步骤包括对该个体施用抑制剂,其中该抑制剂抑制

该个体中Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0276] 在一些实施方案中,该抑制剂选自多核苷酸、多肽、抗体、小分子、蛋白降解剂及其组合。在一些其他实施方案中,该抑制剂包括任何CARM1抑制剂或CARM1效应物抑制剂,如EZM2302、TP-064、CARM1降解剂或其组合。在一些实施方案中,该抑制剂包括EZM2302或TP-064。

[0277] 在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂,Med12蛋白降解剂、Carm1效应蛋白降解剂或其组合。在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂。

[0278] 在一些实施方案中,上述降低步骤包括通过shRNA介导的mRNA敲减或基因失活来沉默该个体中的Carm1基因或Carm1效应基因。

[0279] 在一些实施方案中,本文所述的降低步骤包括修饰Carm1基因或Carm1效应基因以减少Carm1基因或Carm1效应基因的表达。在一些实施方案中,该修饰步骤包括通过CRISPR/Cas系统修饰Carm1基因或Carm1效应基因。

[0280] 在本文所述的一些实施方案中,在该个体的免疫细胞中所述表达或活性降低。在一些实施方案中,该免疫细胞是免疫效应细胞。在一些实施方案中,Carm1基因或Carm1效应基因的表达降低和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性降低,增强该免疫效应细胞的细胞毒性功能和/或降低该免疫效应细胞的衰竭。在一些实施方案中,该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。

[0281] 在一些实施方案中,在该个体的癌细胞中所述表达或活性降低。在一些实施方案中,在该个体的免疫细胞和癌细胞中所述表达或活性都降低。

[0282] 在一些实施方案中,癌细胞减缓生长、降低转移活性、增强对CD8 T细胞杀伤的敏感性、增加干扰素反应基因的表达、具有DNA损伤反应,或其组合。在一些实施方案中,干扰素反应基因是IFN α / γ 途径基因和/或p53途径基因。

[0283] 在一些实施方案中,上述降低步骤包括降解CARM1蛋白和/或CARM1效应蛋白。

[0284] 在一些实施方案中,该治疗癌症的方法进一步包括对个体施用Carm1基因或Carm1效应基因的表达降低和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性降低,以增强该免疫效应细胞的细胞毒性功能和减少其衰竭。

[0285] 在一些实施方案中,该免疫细胞基本上不表达Carm1基因或Carm1效应基因。在一些实施方案中,该免疫细胞是CAR T细胞。

[0286] 在一些实施方案中,该个体的癌细胞过量表达Carm1。在一些实施方案中,该癌症是黑色素瘤、癌瘤、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病、肾癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、胶质瘤、食道癌或肝癌。

[0287] 在一些实施方案中,癌症对使用CTLA-4、PD-L1、TIM-3、LAG3、TIGIT或PD-1抗体阻断治疗的检查点阻断疗法具有抗性。在一些实施方案中,检查点阻断选自纳武单抗、帕博利珠单抗、伊匹单抗、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、西米普利单抗、及其组合。

[0288] 在一些实施方案中,该方法进一步包括对个体施用药学有效量的用于治疗该个体中癌症的第二治疗剂。

[0289] 在一些实施方案中,该第二治疗剂选自化疗剂、免疫治疗剂、检查点阻断剂、毒素、

放射性标记、siRNA、癌症疫苗、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、CAR T细胞、细胞因子及其组合。在一些实施方案中，该第二治疗剂是抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体或抗LAG3抗体。

[0290] 根据本公开的另一方面，治疗个体中癌症的方法包括降低该个体的细胞中Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0291] 在一些实施方案中，该方法进一步包括对个体施用药学有效量的用于治疗该个体中癌症的第二治疗剂。

[0292] 在一些实施方案中，该第二治疗剂选自化疗剂、免疫治疗剂、检查点阻断剂、毒素、放射性标记、siRNA、癌症疫苗、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、CAR T细胞、细胞因子及其组合。在一些实施方案中，该第二治疗剂是检查点阻断剂。在一些实施方案中，该检查点阻断选自纳武单抗、帕博利珠单抗、伊匹单抗、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、西米普利单抗及其组合。在一些实施方案中，该第二治疗剂是CAR T细胞。

[0293] 在一些实施方案中，该第二治疗剂是抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体、或抗LAG3抗体。在一些实施方案中，该第二治疗剂是抗PD1抗体。在一些实施方案中，该第二治疗剂是抗CTLA-4抗体。在一些实施方案中，该第二治疗剂是PD-1抑制剂。在一些实施方案中，该第二治疗剂是CTLA-4抑制剂。

[0294] 在一些实施方案中，该Carm1效应基因是Tdrd3基因，该Carm1效应蛋白是Tdrd3蛋白。在一些实施方案中，该Carm1效应基因是Med12基因，该Carm1效应蛋白是Med12蛋白。

[0295] 在一些实施方案中，该方法包括降低该个体中Carm1基因和Carm1效应基因二者的表达。在一些实施方案中，该方法包括降低该个体中Carm1蛋白和Carm1效应蛋白二者的活性。

[0296] 在一些实施方案中，本文所述的降低步骤包括对该个体施用抑制剂，其中该抑制剂抑制该个体中Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0297] 在一些实施方案中，该抑制剂选自多核苷酸、多肽、抗体、小分子、蛋白降解剂及其组合。在一些其他实施方案中，其中该抑制剂包括任何CARM1抑制剂或CARM1效应物抑制剂，如EZM2302、TP-064、CARM1降解剂或其组合。

[0298] 在一些实施方案中，该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂，Med12蛋白降解剂、Carm1效应蛋白抑制剂或其组合。在一些实施方案中，该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂。

[0299] 在一些实施方案中，本文所述的降低步骤包括通过shRNA介导的mRNA敲减或基因失活来沉默该个体中的Carm1基因或Carm1效应基因。

[0300] 在一些实施方案中，本文所述的降低步骤包括修饰Carm1基因或Carm1效应基因以减少Carm1基因或Carm1效应基因的表达。在一些实施方案中，该修饰步骤包括通过CRISPR/Cas系统修饰Carm1基因或Carm1效应基因。

[0301] 在一些实施方案中，本文所述的降低步骤包括降解Carm1蛋白或Carm1效应蛋白。

[0302] 在本文所述的一些实施方案中，该个体的免疫细胞中所述表达或活性降低。在一些实施方案中，该免疫细胞是免疫效应细胞。在一些实施方案中，Carm1基因或Carm1效应基因的表达降低和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性降低，增强该免疫效应细胞的细胞

毒性功能并减少其衰竭。在一些实施方案中,该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。

[0303] 在一些实施方案中,该个体的癌细胞中所述表达或活性降低。在一些实施方案中,该个体的免疫细胞和癌细胞中的所述表达或活性都降低。

[0304] 在一些实施方案中,该治疗癌症的方法进一步包括,对该个体施用对癌症具有肿瘤特异性且其中的Carm1基因或Carm1效应基因表达降低和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白活性降低的免疫细胞。

[0305] 在一些实施方案中,该免疫细胞基本上不表达Carm1基因或Carm1效应基因。在一些实施方案中,该个体的癌细胞过量表达Carm1。在一些实施方案中,该癌症是黑色素瘤、癌瘤、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病、肾癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、胶质瘤、食道癌或肝癌。

[0306] 根据本公开的另一方面,使癌细胞对免疫细胞敏感的方法包括,通过一种或多种抑制剂,抑制癌细胞中Carm1基因或蛋白或Carm1效应基因或蛋白的表达和/或活性,其中该抑制使该癌细胞对免疫细胞敏感。

[0307] 在一些实施方案中,该抑制剂包括多核苷酸、多肽、肽、抗体、小分子、蛋白降解剂或其组合。

[0308] 在一些其他实施方案中,该抑制剂包括任何CARM1抑制剂或CARM1效应物抑制剂,如EZM2302、TP-064、CARM1降解剂或其组合。在一些实施方案中,该抑制剂包括EZM2302或TP-064。

[0309] 在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂,Med12蛋白降解剂、Carm1效应蛋白降解剂或其组合。在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂。

[0310] 在一些实施方案中,该Carm1效应基因或蛋白是Tdrd3基因或蛋白。在一些实施方案中,该Carm1效应基因或蛋白是Med12基因或蛋白。

[0311] 在一些实施方案中,该免疫细胞是细胞毒性T细胞。

[0312] 通过抑制免疫效应细胞中的Carm1来治疗癌症的方法

[0313] 根据本公开的另一方面,本文提供提高免疫效应细胞的抗肿瘤功能的方法。在一些实施方案中,该方法包括降低该免疫效应细胞中Carm1基因或蛋白或Carm1效应基因或蛋白的表达和/或活性,从而提高该免疫效应细胞的抗肿瘤功能。

[0314] 在一些实施方案中,该Carm1效应基因或蛋白是Tdrd3基因或蛋白。在一些实施方案中,该Carm1效应基因或蛋白是Med12基因或蛋白。

[0315] 在一些实施方案中,本文所述的方法包括降低免疫效应细胞中Carm1基因和Carm1效应基因二者的表达。在一些实施方案中,本文所述的方法包括降低免疫效应细胞中Carm1蛋白和Carm1效应蛋白二者的活性。

[0316] 在一些实施方案中,上述降低步骤包括通过一种或多种抑制剂抑制该免疫效应细胞中Carm1基因或蛋白或Carm1效应基因或蛋白的表达和/或活性。在一些实施方案中,该抑制剂包括多核苷酸、多肽、肽、抗体、小分子、蛋白降解剂、遗传改造细胞或其组合。在一些其他实施方案中,该抑制剂包括任何CARM1抑制剂或CARM1效应蛋白抑制剂,如EZM2302、TP-

064、CARM1降解剂或其组合。在一些实施方案中,该抑制剂包括EZM2302或TP-064。

[0317] 在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂,Med12蛋白降解剂、Carm1效应蛋白降解剂或其组合。在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂。

[0318] 在一些实施方案中,通过shRNA介导的mRNA敲减或基因失活来降低Carm1基因或蛋白或Carm1效应基因或蛋白的表达和/或活性。

[0319] 在一些实施方案中,该降低步骤包括修饰该免疫效应细胞以减少或去除该免疫效应细胞中的CARM1基因或Carm1效应基因。在一些实施方案中,该修饰步骤包括通过CRISPR/Cas系统修饰Carm1基因或Carm1效应基因。

[0320] 在一些实施方案中,该降低步骤包括沉默该免疫效应细胞中的CARM1基因或CARM1效应基因。

[0321] 在一些实施方案中,该降低步骤包括降解该免疫效应细胞中的Carm1蛋白或Carm1效应蛋白。

[0322] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞是T细胞。在一些实施方案中,该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。在一些实施方案中,该免疫效应细胞是细胞毒性T细胞。在一些实施方案中,该免疫效应细胞是自然杀伤T细胞。在一些实施方案中,该CD8 T细胞表达更高水平的CD69、CD45.1、颗粒酶B、IFN γ 、Ki67或其组合。

[0323] 包含Carm1抑制剂的免疫效应细胞

[0324] 根据本公开的另一方面,本文提供具有Carm1基因/蛋白或Carm1效应基因/蛋白的抑制剂的免疫效应细胞,其中该抑制剂抑制该免疫效应细胞中Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0325] 在一些实施方案中,该Carm1效应基因是Tdrd3基因,该Carm1效应蛋白是Tdrd3蛋白。在一些实施方案中,该Carm1效应基因是Med12基因,该Carm1效应蛋白是Med12蛋白。

[0326] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞基本上不表达Carm1基因或Carm1效应基因。

[0327] 在一些实施方案中,该抑制剂选自多核苷酸、多肽、抗体、小分子、蛋白降解剂及其组合。在一些其他实施方案中,其中该抑制剂包括任何CARM1抑制剂或CARM1效应蛋白抑制剂,如EZM2302、TP-064、CARM1降解剂或其组合。在一些实施方案中,该抑制剂包括EZM2302或TP-064。

[0328] 在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂,Med12蛋白降解剂、Carm1效应蛋白降解剂或其组合。在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂。

[0329] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞中CARM1基因和CARM1效应基因二者的表达都降低。在一些实施方案中,该免疫效应细胞中CARM1蛋白和CARM1效应蛋白二者的活性都降低。

[0330] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞是T细胞。在一些实施方案中,该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。在一些实施方案中,该免疫效应细胞是细胞毒性T细胞。在一些实施方案中,该免疫效应细胞是自然杀伤T细胞。

[0331] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞是肿瘤特异性的。在一些实施方案中,该免疫效应细胞表达肿瘤特异性T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)。

[0332] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞进一步包含嵌合抗原受体(CAR),其中该CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和刺激结构域。在一些实施方案中,该抗原结合结构域结合肿瘤抗原或病原体抗原。

[0333] 在一些实施方案中,该肿瘤抗原选自存在于癌细胞中的抗原、癌细胞、癌细胞片段、肿瘤抗原、 α -galcer、抗CD3、抗CD28、抗IgM、抗CD40、病原体、减毒病原体及其部分。在一些实施方案中,该肿瘤抗原是癌细胞、癌细胞片段或肿瘤抗原。

[0334] 在一些实施方案中,该肿瘤抗原与黑色素瘤、癌瘤、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病、肾癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、胶质瘤、食道癌或肝癌相关。

[0335] 在一些实施方案中,该肿瘤抗原与实体瘤或淋巴瘤相关。

[0336] 在一些实施方案中,该抗原结合结构域是抗体的抗原结合片段。

[0337] 根据本发明的另一方面,本文提供包含本文所述免疫效应细胞和可药用载体的组合物。

[0338] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞具有Carm1基因/蛋白或Carm1效应基因/蛋白的抑制剂。该抑制剂抑制Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0339] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞基本上不表达Carm1基因或Carm1效应基因。

[0340] 在一些实施方案中,该抑制剂选自多核苷酸、多肽、抗体、小分子、蛋白降解剂及其组合。在一些其他实施方案中,其中该抑制剂包括任何CARM1抑制剂或CARM1效应蛋白抑制剂,如EZM2302、TP-064、CARM1降解剂或其组合。在一些实施方案中,该抑制剂包括EZM2302或TP-064。

[0341] 在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂、Tdrd3蛋白降解剂、Med12蛋白降解剂、CARM1效应蛋白降解剂或其组合。在一些实施方案中,该抑制剂包括Carm1蛋白降解剂。

[0342] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞中CARM1基因和CARM1效应基因二者的表达降低。在一些实施方案中,该免疫效应细胞中CARM1蛋白和CARM1效应蛋白二者的活性降低。

[0343] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞是T细胞。在一些实施方案中,该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。在一些实施方案中,该免疫效应细胞是细胞毒性T细胞。在一些实施方案中,该免疫效应细胞是自然杀伤T细胞。

[0344] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞是肿瘤特异性的。在一些实施方案中,该免疫效应细胞表达肿瘤特异性T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)。

[0345] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞进一步包含嵌合抗原受体(CAR),其中该CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和刺激结构域。在一些实施方案中,该抗原结合结构域结合肿瘤抗原或病原体抗原。

[0346] 在一些实施方案中,该肿瘤抗原选自存在于癌细胞中的抗原、癌细胞、癌细胞片段、肿瘤抗原、 α -galcer、抗CD3、抗CD28、抗IgM、抗CD40、病原体、减毒病原体及其部分。在一

些实施方案中,该肿瘤抗原是癌细胞、癌细胞片段或肿瘤抗原。

[0347] 在一些实施方案中,该肿瘤抗原与黑色素瘤、癌瘤、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病、肾癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、胶质瘤、食道癌或肝癌相关。

[0348] 在一些实施方案中,该肿瘤抗原与实体瘤或淋巴瘤相关。

[0349] 在一些实施方案中,该抗原结合结构域是抗体的抗原结合片段。

[0350] 在一些实施方案中,该组合物进一步包含第二治疗剂。在一些实施方案中,该第二治疗剂选自化疗剂、免疫治疗剂、检查点阻断剂、毒素、放射性标记、siRNA、癌症疫苗、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、CAR T细胞、细胞因子及其组合。在一些实施方案中,该第二治疗剂是检查点阻断剂。在一些实施方案中,该第二治疗剂是CAR T细胞。

[0351] 在一些实施方案中,该第二治疗剂是抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体、或抗LAG3抗体。在一些实施方案中,该第二治疗剂是抗PD1抗体。在一些实施方案中,该第二治疗剂是抗CTLA-4抗体。在一些实施方案中,该第二治疗剂是PD-1抑制剂。在一些实施方案中,该第二治疗剂是CTLA-4抑制剂。

[0352] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞是T细胞。在一些实施方案中,该免疫效应细胞选自细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、树突细胞、CD8 T细胞和CD4 T细胞。在一些实施方案中,该免疫效应细胞是细胞毒性T细胞。在一些实施方案中,该免疫效应细胞是自然杀伤T细胞。

[0353] 利用免疫效应细胞治疗癌症的方法

[0354] 根据本公开的另一方面,本文提供治疗个体中癌症的方法。在一些实施方案中,该方法包括对患有癌症的个体施用本文所述的免疫效应细胞或组合物。

[0355] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞具有Carm1基因/蛋白或Carm1效应基因/蛋白的抑制剂。该抑制剂抑制Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0356] 在一些实施方案中,该组合物包含本文所述免疫效应细胞和可药用载体。在一些实施方案中,该免疫效应细胞具有Carm1基因/蛋白或Carm1效应基因/蛋白的抑制剂。该抑制剂抑制Carm1基因或Carm1效应基因的表达和/或Carm1蛋白或Carm1效应蛋白的活性。

[0357] 在一些实施方案中,该免疫效应细胞是自体的。在一些实施方案中,该免疫效应细胞对个体的癌细胞具有特异性。

[0358] 在一些实施方案中,该方法进一步包括对患有癌症的个体施用第二治疗剂或包含第二治疗剂和可药用载体的组合物。

[0359] 在一些实施方案中,该第二治疗剂选自化疗剂、免疫治疗剂、检查点阻断剂、毒素、放射性标记、siRNA、癌症疫苗、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、CAR T细胞、细胞因子及其组合。在一些实施方案中,该第二治疗剂是检查点阻断剂。在一些实施方案中,该第二治疗剂是CAR T细胞。

[0360] 在一些实施方案中,该第二治疗剂是抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗TIM-3抗体、或抗LAG3抗体。在一些实施方案中,该第二治疗剂是抗PD1抗体。在一些实施方案中,该第二治疗剂是抗CTLA-4抗体。在一些实施方案中,该第二治疗剂是PD-1抑制剂。在一些实施方案中,该第二治疗剂是CTLA-4抑制剂。

[0361] 在一些实施方案中,该癌症是癌瘤、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病等,包括实体癌和淋巴瘤、肾癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、胶质瘤、食道癌和肝癌(包括肝细胞癌)、淋巴瘤,包括B型急性淋巴母细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(例如伯基特淋巴瘤、小细胞淋巴瘤和大细胞淋巴瘤)和霍奇金淋巴瘤,白血病(包括AML、ALL和CML)和多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,该癌症是黑色素瘤。在一些实施方案中,该癌症是浆细胞恶性肿瘤,例如多发性骨髓瘤(MM)或浆细胞癌前病变。在一些实施方案中,个体已诊断患有癌症或易患癌症。

[0362] 在一些情况下,根据预防或治疗个体所患疾病或病症的需要,治疗方法可以包括单次施用、多次施用和反复施用。在一些情况下,治疗方法可以包括在治疗前、治疗期间和/或治疗后评估个体的疾病水平。在一些情况下,治疗可以继续,直到检测到个体的疾病水平下降。

[0363] 施用后,可对个体进行评价,以检测、评估或确定其疾病水平。在一些情况下,治疗可以继续,直到检测到个体的疾病水平发生变化(例如降低)。

[0364] 在患者病况改善(例如,个体疾病水平改变(例如降低))后,根据需要,可以施用本公开的化合物、组合物或组合的维持剂量。随后,作为症状的函数,施用的剂量或频率或二者可以降低到保持该改善状态的水平。然而,在疾病症状复发时,患者可能需要长期的间断治疗。

[0365] 将本文所公开的任何方法和任何组合物与一种或多种治疗剂组合,也在本公开的范围。治疗剂包括但不限于小分子、肽、抗体、核酶、反义寡核苷酸、化疗剂和辐射。

[0366] 将本文所公开的任何方法和任何组合物与常规癌症治疗和多种药物组合,以通过降低常规治疗的剂量/毒性和/或提高常规治疗的敏感性来增强此类治疗的疗效,也在本公开的范围之内。一种常规治疗是使用放射治疗。另一种常规治疗是使用化疗药物,其可分为:烷化剂、抗代谢药、蒽环类、植物生物碱、拓扑异构酶抑制剂和抗肿瘤剂。所有这些药物都以某种方式影响细胞分裂或DNA合成和功能。其他常规癌症治疗是不直接干扰DNA的活性剂。与本公开组合的此类活性剂的实例可以包括,例如,阻断参与癌细胞生长的特定酶的“小分子”药物。单克隆抗体、癌症疫苗、血管生成抑制剂和基因治疗,由于也干扰癌细胞的生长,因此是也可以与本文所公开的组合物和方法组合的靶向治疗。

[0367] 癌细胞的一个常见特征是倾向于以不受宿主控制的方式生长。通过成熟的技术,尤其是组织学检查,可以很容易地将原发性癌细胞(即从恶性转化部位附近获得的细胞)与非癌细胞区分开来。本文中,癌细胞的定义不仅包括原发性癌细胞,还包括源自癌细胞祖先的任何细胞。这包括转移的癌细胞、体外培养物和源自癌细胞的细胞系。

[0368] 在一些实施方案中,该抑制剂导致蛋白质降解,从而抑制或降低蛋白质的活性。例如,可以使用导致蛋白质降解的小分子降解剂,实现抑制剂靶向,从而抑制或降低该蛋白质的活性。

[0369] 在一些实施方案中,该抑制剂抑制蛋白质的表达,如使用shRNA或通过基因失活(如使用CRISPR/Cas系统)来实现所述抑制。

[0370] 在一些实施方案中,该抑制剂可以是CARM1抑制剂。

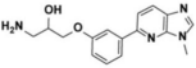
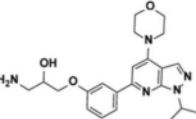
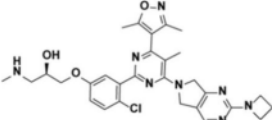
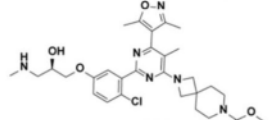
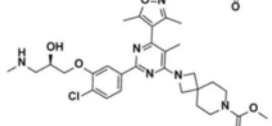
[0371] 在一些实施方案中,该CARM1抑制剂是小分子。

[0372] 小分子通常具有小于10kD、通常小于2kD、优选小于1kD的分子量。小分子包括但不

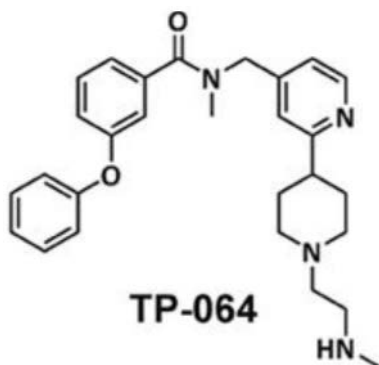
限于无机分子、有机分子、含无机成分的有机分子、含有放射性原子的分子、合成分子、肽模拟物和抗体模拟物。由于小分子治疗剂可以更好地渗透到细胞中,因此相比大分子,其可以对分解具有较低的敏感性和较低的引发免疫反应的能力。

[0373] 例如,下文表1和表2中显示几种CARM1抑制剂。参见Drew,A.E.,Moradei,O.,Jacques,S.L.等,Identification of a CARM1 Inhibitor with Potent In Vitro and In Vivo Activity in Preclinical Models of Multiple Myeloma,Scientific Reports,7,17993(2017);Nakayama K.等,TP-064,A Potent And Selective Small Molecule Inhibitor Of PRMT4 For Multiple Myeloma,Oncotarget,2018,9,18480-18493页,二者在此引入作为参考。

[0374] 表1

#	结构	CARM1 生化 IC ₅₀ (nM)	CARM1 ICW IC ₅₀ (μM)
1		2,300	>20
2		46	19
3	EPZ025654 GSK35336023 	3	.011
	EZM2302 GSK3359088 	6	0.055
		>1000	>6.5

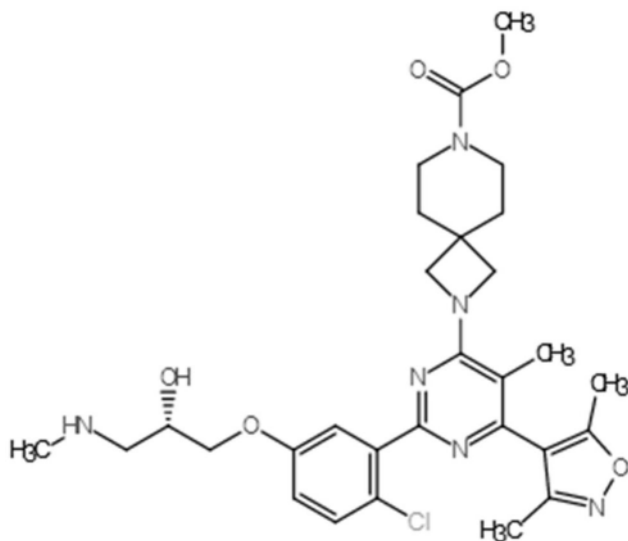
[0376] 表2



[0378] CARM1抑制剂可以是EZM2302(GSK3359088)。EZM2302是CARM1酶活性的一种有效的选择性抑制剂,在体外和体内都显示抗增殖作用,在生化测定中对组蛋白甲基转移酶具有

广泛的选择性 ($IC_{50}=6nm$)。

[0379]



[0380] EZM2302

[0381] 分子量:585.09

[0382] 分子式: $C_{29}H_{37}ClN_6O_5$

[0383] 用EZM2302处理恶性黑色素瘤细胞系,导致PABP1和SMB甲基化的抑制和细胞停滞, IC_{50} 值在纳摩尔范围内。EZM2302口服给药在恶性黑色素瘤异种移植模型中展示了剂量依赖性的体内CARM1抑制活性和抗肿瘤活性。EZM2302 (GSK3359088) 是CARM1酶活性的一种有效的选择性抑制剂,在体外和体内都显示抗增殖作用,在生化测定 ($IC_{50}=6nm$) 中对组蛋白甲基转移酶具有广泛的选择性。

[0384] 例如,亚微摩尔水平的EZM2302可以抑制肿瘤细胞中的CARM1活性。此外,研究了Carm1抑制剂EZM2302处理后B16F10细胞中干扰素刺激的基因表达。具体而言,EZM2302处理在B16F10细胞中诱导了模拟Carm1表型的遗传切除的ISG表达上调。在按150mg/kg/天经口管饲对B16F10荷瘤小鼠施用时,EZM2302也显著抑制B16F10肿瘤生长。

[0385] CARM1抑制剂可以是精氨酸甲基转移酶抑制剂TP-064。TP-064是人CARM1的一种有效的选择性和细胞活性化学探针。TP-064抑制CARM1的甲基转移酶活性,其对CARM1的效力(半最大抑制浓度, $IC_{50}<10nM$) 和选择性高于其他CARM家族蛋白。

[0386] 本领域技术人员将认识到,CARM1基因/蛋白和/或CARM1效应基因/蛋白的其他小分子抑制剂可以用于本文提供的方法中。例如,CARM1的其他小分子抑制剂可以与EZM2302互换使用。

[0387] 因此,本公开的一些方面可以包括对个体施用包含治疗有效量的小分子抑制剂的组合物。

[0388] 在一些实施方案中,该抑制剂的治疗有效量为至少约0.1mg/kg体重、至少约0.25mg/kg体重、至少约0.5mg/kg体重、至少约0.75mg/kg体重、至少约1mg/kg体重、至少约2mg/kg体重、至少约3mg/kg体重、至少约4mg/kg体重、至少约5mg/kg体重、至少约6mg/kg体重、至少约7mg/kg体重、至少约8mg/kg体重、至少约9mg/kg体重、至少约10mg/kg体重、至少约15mg/kg体重、至少约20mg/kg体重、至少约25mg/kg体重、至少约30mg/kg体重、至少约40mg/kg体重、至少约50mg/kg体重、至少约75mg/kg体重、至少约100mg/kg体重、至少约

200mg/kg体重、至少约250mg/kg体重、至少约300mg/kg体重、至少约350mg/kg体重、至少约400mg/kg体重、至少约450mg/kg体重、至少约500mg/kg体重、至少约550mg/kg体重、至少约600mg/kg体重、至少约650mg/kg体重、至少约700mg/kg体重、至少约750mg/kg体重、至少约800mg/kg体重、至少约900mg/kg体重或至少约1000mg/kg体重。

[0389] 抑制剂或包含抑制剂的组合物可以对个体施用一次(例如,作为单个注射剂、推注剂或贮库剂)。备选地,可以在一段时间,如约2天至约28天、或约7天至约10天、或约7天至约15天内,每天一次、每天两次或每天两次以上,对有需要的个体施用。也可以每天一次、每天两次或每天两次以上对个体施用一段时间,每年1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、12次,或其组合。

[0390] 剂量可以取决于已知因素而变化,如活性成分的药效学特征及其施用方式和途径;活性成分的施用时间;接受者的年龄、性别、健康状况和体重;症状的性质和程度;并行治疗的种类、治疗频率和期望效果;以及排泄速率。

[0391] 治疗有效剂量可以取决于本领域普通技术人员已知的许多因素。例如,取决于正在治疗的个体或样品的性质、体型大小和状况,进一步取决于施用组合物的途径(如适用)和执行者所期望的效果,剂量可以变化。这些量可由技术人员容易地确定。

[0392] 含有Tudor结构域的蛋白质3(TDRD3)是基于其能够通过其Tudor结构域识别甲基化精氨酸基序的能力而鉴定的一种模块化蛋白质。TDRD3定位于胞质应激颗粒,这是癌细胞中可以在化疗药物治疗后促进存活的一种结构。TDRD3调节乳腺癌细胞的细胞增殖和侵袭。癌细胞中TDRD3的耗竭,抑制体内肿瘤形成和肺转移。此外,TDRD3调节与促进乳腺癌肿瘤发生和疾病进展相关的许多关键基因的表达。参见Morettin,Alan等“Tudor domain containing protein 3promotes tumorigenesis and invasive capacity of breast cancer cells.”Scientific reports 7.1(2017):5153。

[0393] TDRD3的基因失活可以模拟CARM1失活表型。因此,本公开的一些实施方案中提到的抑制剂也可以包括TDRD3抑制剂。在一些实施方案中,该抑制剂可以抑制TDRD3的激活和/或活性,和/或可以降解TDRD3蛋白。例如,该抑制剂可以是结合TDRD3的活性部位并抑制TDRD3的激活和/或活性的小分子抑制剂,或是TDRD3的小分子降解剂。

[0394] 本公开的一些方面涉及治疗患有癌症的个体的方法。在一个实施方案中,该方法包括,对该个体施用包含一种或多种抑制剂和可药用赋形剂的组合物,其中该抑制剂抑制CARM1、TDRD3或其组合的表达和/或活性。

[0395] 可以使用任何适宜的方法诊断癌症,包括但不限于,活组织检查、x射线检查、血液检测和本公开的诊断方法。

[0396] 在本公开的一些实施方案中,癌症可以包括实体瘤。

[0397] 在其他实施方案中,癌症可包括血液系统恶性肿瘤,如开始于骨髓中的造血干细胞和祖细胞的癌症。例如,血液系统恶性肿瘤可以包括白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。

[0398] 涉及本公开的多个方面的癌症的非限制性实例包括,但不限于,癌瘤、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌,腺癌(例如肺腺癌)、鳞癌(例如肺鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠道癌、胃癌(gastric cancer)、胃癌(stomach cancer)、黑色素瘤、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝脏肿瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、

前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝恶性上皮肿瘤 (hepatic carcinoma) 和各种类型的头颈癌。其他实例包括Carm1过量表达的癌症。在示例性实施方案中,该癌症是乳腺癌。在另一示例性实施方案中,该癌症是前列腺癌。例如,CARM1是分别驱动这些肿瘤的生长的雌激素和雄激素受体的共激活物。

[0399] 本公开的一些实施方案也适用于在一个或多个肿瘤抑制基因中具有突变的癌症,其非限制性实例包括p53、腺瘤性结肠息肉病基因 (APC)、视网膜母细胞瘤相关蛋白 (RB)、Von-Hippel-Lindau (VHL)、BRCA1和BRCA2突变。

[0400] p53是一种转录因子,调节几个胞内途径,包括涉及细胞存活、DNA修复、凋亡和衰老的途径。p53响应许多刺激如电离辐射、基因毒性损伤和氧化应激,而保持DNA的完整性。p53在癌症中经常发生突变。参见例如Perri, Francesco, Salvatore Pisconti和Giuseppina Della Vittoria Scarpatti. "P53 mutations and cancer: a tight linkage." *Annals of translational medicine* 4.24 (2016)。人癌症中的大多数p53突变是错义突变,导致产生全长突变体p53蛋白。事实上,只有10-15%的TP53突变被定义为“破坏性突变”,即导致无活性或截短蛋白的突变,而剩余的85-90%通常导致功能蛋白的合成。错义突变常簇集在TP53基因的4-9外显子中,其对应于代表p53 DNA结合结构域的该基因的特定序列。因此,错义p53突变能够改变其一般的转录因子功能。有趣的是,几项研究证明,许多突变p53蛋白不仅失去了其肿瘤抑制功能,而且获得了新的致癌功能。这种现象称为“突变p53的功能获得”。更特别的,突变p53可以与通常和野生型p53配偶的蛋白质相互作用。这种新的结合造成其抗癌活性的丧失,并且取而代之地,它们被破坏并发挥致癌促进剂的作用。

[0401] 在一些实施方案中,癌症的特征在于编码CARM1的基因、编码Tdrd3的基因或其组合的过量表达。

[0402] 在一些实施方案中,癌症的特征在于TGF- β 激活增加或DNA修复途径(如p53信号传导途径)突变。

[0403] 肿瘤细胞对化疗剂和放疗剂的耐药性是临床肿瘤学的一个主要问题。当前癌症研究的一个目标是,通过将化疗和放疗与其他治疗联合来提高它的疗效。本公开考虑,抑制剂(如CARM1抑制剂或Tdrd3抑制剂)可以类似地与化疗、放疗或免疫治疗干预、以及促凋亡剂或细胞周期调节剂结合使用。

[0404] 备选地,本公开的治疗可以在其他活性剂治疗之前或之后进行,之间的间隔时间从几分钟到几周不等。在将另外的活性剂和本公开分开应用于个体的实施方案中,通常将确保在每次递送之间不会隔开一段很长的时间,从而允许所述的活性剂和本发明治疗仍然能够对癌细胞发挥有利的组合效应。在这种情况下,可以设想,可以在彼此的约12-24小时内、更优选地在彼此的约6-12小时内,使癌细胞接触两种治疗形式。但是,在一些情况下,如果各施用之间相隔几天(例如2、3、4、5、6或7天)到几周(例如1、2、3、4、5、6、7或8周),则可以显著地延长用于治疗的该时间段。

[0405] 预期治疗周期将根据需要重复。还可以设想,多种标准治疗以及手术干预可以与本发明的细胞治疗联合应用。

[0406] 本公开的一些方面也涉及治疗耐药癌症的方法。耐药癌症也可以被称为治疗“难治性”(即,抵抗性)癌症。在一个实施方案中,“耐药癌症”可以指获得对抗癌治疗(如免疫治

疗和/或化疗)的耐药性的癌细胞。癌细胞可以通过一系列机制获得对治疗的耐药性,包括药物靶标的突变或过量表达、药物的失活、或药物从细胞的清除。在初始治疗反应后复发的肿瘤,可以对多种药物耐药(即,多药物耐药性)。在常规耐药性观点中,肿瘤群体中的一个或多个细胞可以获得赋予耐药性的基因改变。因此,耐药性的原因包括例如:a)一些未被治疗杀死的细胞发生突变(改变),变得耐药。一旦其扩增,则可以有比治疗敏感性细胞更多的耐药细胞;b)基因扩增。癌细胞可以产生数百个拷贝的特定基因。此基因触发蛋白质的过量产生,从而使得抗癌药物无效;c)癌细胞可以以与药物进入细胞的速度一样快的速度将其泵出细胞;d)癌细胞可以因跨细胞壁转运药物的蛋白质停止工作,而停止药物摄入;e)癌细胞可以学会如何修复由一些抗癌药物引起的DNA断裂;f)癌细胞可以形成使药物失活的机制。因此,对所用抗癌活性剂的耐药性是恶性病症治疗失败的主要原因,激发肿瘤变得耐药。耐药性是癌症治疗失败的主要原因。

[0407] 在一个实施方案中,“耐药癌症”指如上文所述的耐受药物的癌症。在另一个实施方案中,“耐药癌症”指获得对任何治疗(如化疗、免疫治疗、放射治疗或生物治疗)的耐药性的癌细胞。

[0408] 例如,由于其在晚期恶性肿瘤中的显著临床结果,在过去十年中,免疫检查点阻断剂,如针对程序性死亡1(PD-1)及其配体(PD-L1)的抑制剂,受到广泛关注。然而,原发性耐药性和获得性耐药性成为主要障碍之一,极大地限制了PD-1/PD-L1阻断疗法的长期疗效和广泛应用。参见Bai,Jie等“Regulation of PD-1/PD-L1 pathway and resistance to PD-1/PD-L1blockade.”*Oncotarget* 8.66(2017):110693。

[0409] 类似地,与常规抗癌治疗相比,阻断免疫检查点受体CTLA-4的抗体(如伊匹单抗)在许多研究中导致患者存活增加。参见Seidel,Judith A.,Atsushi Otsuka和Kenji Kabashima.“Anti-PD-1and anti-CTLA-4therapies in cancer:mechanisms of action, efficacy,and limitations.”*Frontiers in oncology* 8(2018):86。然而,与PD-1一样,患者最终复发并发展为肿瘤进展。

[0410] 检查点抑制剂治疗引起的选择压力,可以导致能够通过新的途径逃逸免疫介导的识别和删除的肿瘤细胞。例如,来自抗PD-1疗法难治性患者的肿瘤细胞,可以通过丢失IFN- γ 反应元件或MHC I类,而获得使其不易受T细胞介导的杀伤作用影响的突变。抗PD-1或抗CTLA-4治疗也可以导致其他抑制性受体的上调。

[0411] 即使在检查点阻断剂(如PD-1或PD-1加CTLA-4抗体)难治的肿瘤模型中,CARM1基因/蛋白和/或CARM1效应基因/蛋白的失活或表达降低,也可以引发抗肿瘤免疫反应。在一些实施方案中,B16F10黑色素瘤模型和4T1乳腺癌模型均为检查点阻断剂难治性的。因此,靶向CARM1基因/蛋白和/或CARM1效应基因/蛋白,是用于难治性(或耐药性)癌症的一种治疗策略,所述难治性癌症包括那些对检查点阻断剂如PD1或CTLA-4抗体不产生反应的癌症。

[0412] 在一些实施方案中,对个体施用抑制剂,如CARM1抑制剂。根据本公开,抑制剂的施用可以以任何方便的方式进行,包括气溶胶吸入、注射、吞服、输注、植入或移植。本文所述的组合物可以皮下、皮内、瘤内、结节内、髓内、肌内、静脉注射或淋巴内注射或腹腔内对患者施用。在一个实施方案中,本公开的组合物优选通过静脉注射施用。

[0413] 虽然个人需要不同,但确定给定组合物对具体疾病或病症的最佳有效量范围,是本领域技术人员能力范围之事。有效量是指提供治疗或预防益处的量。所施用的剂量将取

决于接受者的年龄、健康状况和体重、并行治疗的种类(如存在的话)、治疗的频率和期望效果的性质。

[0414] 实施方案还可以包括这样的抗癌治疗,其包含一种或多种抗癌症疗法的组合。例如,该一种或多种疗法可以选自:抗体治疗(例如抗PD1抗体,如纳武单抗或帕博利珠单抗,抗CTLA-4抗体,如伊匹单抗,或二者)、癌症疫苗、过继T细胞治疗(例如CAR T细胞、TCR T细胞)、化疗、细胞因子治疗、毒素、放射性标记、siRNA、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、细胞因子、树突细胞治疗、基因治疗、激素治疗、激光治疗和放射治疗。因此,实施方案可以包括对个体施用至少一种其他治疗剂(即第二抑制剂和/或抗癌剂)。在一些实施方案中,肿瘤中Carm1的失活与检查点阻断治疗(即抗PD1)协同作用。

[0415] 此外,一些实施方案包括癌症分层方法。术语“分层”指,将患者分为比其他患者更可能(或更不可能)从基于CARM1、Med12和/或TDRD3抑制剂的抗癌治疗中受益的患者。因此,可以使用本公开的方法,根据患者对CARM1抑制剂、Med12抑制剂和/或TDRD3抑制剂治疗的敏感性,对癌症患者进行分层。

[0416] 特别地,可从CARM1抑制剂、Med12抑制剂和/或TDRD3抑制剂抗癌治疗中“受益的患者”,是该抑制剂具有疗效的可能性更高的患者。(a) 癌症和/或癌症患者可能具有或不具有良好反应的该可能性,取决于癌症中CARM1、Med12或TDRD3是否过量表达。此外,(a) 癌症和/或癌症患者可能具有或不具有良好反应的该可能性,也可取决于癌症是否对检查点阻断具有耐药性。

[0417] 相应地,不可能从CARM1抑制剂、Med12抑制剂和/或TDRD3抑制剂抗癌治疗中“受益的患者”,是该抑制剂具有疗效的可能性不高的患者。

[0418] 本发明的各方面还涉及增加癌细胞对免疫效应细胞(例如细胞毒性T细胞)的敏感性的方法。

[0419] 在一个实施方案中,该方法包括通过使癌细胞与一种或多种抑制剂接触来抑制CARM1、Med12、Tdrd3中的一种或多种在癌细胞中的表达和/或活性,其中抑制CARM1、Med12、Tdrd3中的一种或多种在癌细胞中的表达和/或活性,使癌细胞对免疫效应细胞(例如细胞毒性T细胞)的敏感性增强。

[0420] 本发明的其他方面涉及提高免疫效应细胞(例如细胞毒性T细胞)的抗肿瘤功能的方法。

[0421] 在一个实施方案中,该方法包括,降低CARM1、Med12、Tdrd3中的一种或多种在免疫效应细胞(例如细胞毒性T细胞)中的表达和/或活性,其中通过一种或多种抑制剂抑制CARM1、Med12、Tdrd3中的一种或多种的表达和/或活性,并且其中降低CARM1、Med12、Tdrd3中的一种或多种在T细胞中的表达和/或活性提高免疫效应细胞(例如细胞毒性T细胞)的抗肿瘤功能。

[0422] 本公开的其他方面涉及减少个体中肿瘤生长的方法。

[0423] 在一个实施方案中,该方法包括,对个体施用包含一种或多种抑制剂和可药用赋形剂的组合物,其中该抑制剂抑制CARM1、Med12、Tdrd3中的一种或多种在肿瘤细胞和/或免疫效应细胞(例如细胞毒性T细胞)中的表达和/或活性;其中CARM1、Med12、Tdrd3中的一种或多种在肿瘤细胞和/或免疫效应细胞(例如细胞毒性T细胞)中的表达和/或活性的抑制导致个体中肿瘤生长的抑制。

[0424] 肿瘤生长可以指哺乳动物中的细胞增殖、侵袭、血管发生或转移。本领域技术人员将认识到,本领域存在指示肿瘤生长的多种技术,例如肿瘤体积、肿瘤大小、细胞数量等。

[0425] 在一个实施方案中,肿瘤体积是肿瘤生长的指示。在一些实施方案中,B16黑色素瘤细胞中的CARM1敲除,抑制肿瘤体内生长,如肿瘤体积减小所指示。同样,B16-Ova细胞中的CARM1基因敲除也抑制肿瘤生长,且小分子抑制剂抑制CARM1在B16F10荷瘤小鼠中抑制肿瘤生长。

[0426] 本文所述的任何治疗应用都可以应用于需要这种治疗的任何个体,包括例如哺乳动物,如小鼠、大鼠、狗、猫、牛、马、兔、猴、猪、绵羊、山羊或人。在一些实施方案中,该个体是小鼠、大鼠或人。在一些实施方案中,该个体是小鼠。在一些实施方案中,该个体是大鼠。在一些实施方案中,该个体是人。

[0427] 治疗组合物

[0428] 如本文所述,本公开的一些方面涉及对个体施用组合物以预防或治疗癌症,例如防止肿瘤生长和/或防止肿瘤转移。

[0429] 在一些实施方案中,该组合物可以包含抑制剂和可药用载体。根据本公开,可药用载体可以包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途为本领域公知。可以使用与活性化合物相容的任何常规介质或试剂。补充活性化合物也可并入组合物中。

[0430] 可药用载体的非限制性实例包括固体或液体填充剂、稀释剂和封装物质,包括但不限于乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、苯甲酸甲酯、苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油。

[0431] 本公开的药物组合物可以配制为与其预期施用途径相容。施用途径的实例包括胃肠外施用,例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如吸入)、经皮(局部)、经粘膜和直肠给药。用于胃肠外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可以包含以下成分:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲剂,如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及渗透压调节剂,如氯化钠或葡萄糖。pH值可以用酸或碱调节,如盐酸或氢氧化钠。胃肠外制剂可以密封在玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。剂量可以取决于已知因素而变,如活性成分的药效学特征及其施用方式和途径;施用活性成分的时间;接受者的年龄、性别、健康状况和体重;症状的性质和程度;并行治疗的种类、治疗的频率和期望的效果;以及排泄速率。

[0432] 适用于注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(水溶性)或分散液以及用于临时制备无菌注射液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用,适宜的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EM™ (BASF, Parsippany, N.J.) 或磷酸缓冲盐溶液(PBS)。在所有情况下,组合物必须无菌,并且流动性应便于注射。它必须在制造和储存条件下保持稳定,并且必须防止细菌和真菌等微生物的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其例如含有水、乙醇、可药用多元醇,如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇及其适宜的混合物。例如,可以通过使用诸如卵磷脂的包衣、在分散液的情况下通过保持所需的粒径以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。可以通过多种抗菌剂和抗真菌剂来防止微生物的作用,例如,对羟基苯甲酸酯、

氯丁醇、苯酚、抗坏血酸和硫柳汞。在许多情况下,在组合物中包括等渗剂(例如糖,多元醇如甘露醇、山梨醇,氯化钠)是有用的。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包含延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来达到。

[0433] 无菌注射液可通过根据需要将所需量的化合物与本文列举的一种或多种成分掺入适当的溶剂,然后进行除菌过滤来制备。通常,分散体是通过将活性化合物掺入无菌运载体来制备,所述无菌运载体含有基本分散介质和此处列举的所需其他成分。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况下,有用的制备方法实例包括真空干燥和冷冻干燥,可以从其先前无菌过滤的溶液,产生活性成分加任何附加成分的粉末。

[0434] 口服组合物通常包含惰性稀释剂或可食用载体。它们可以封装在明胶胶囊中或压缩为片剂。为了口服治疗施用的目的,活性化合物可掺入赋形剂并以片剂、锭剂或胶囊剂的形式使用。还可以使用流体载体制备口服组合物用作漱口液,其中流体载体中的化合物经口应用,并漱口、排出或吞咽。

[0435] 药学相容性结合剂和/或助剂材料可以作为组合物的一部分包括在内。片剂、药丸、胶囊剂、锭剂等可含有以下任何成分或类似性质的化合物:黏合剂,如微晶纤维素、黄芪胶或明胶;赋形剂,如淀粉或乳糖;崩解剂,如海藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂,如硬脂酸镁或甾醇酯(sterotes);助流剂,如胶体二氧化硅;甜味剂,如蔗糖或糖精;或调味剂,如薄荷、水杨酸甲酯或橙味料。

[0436] 全身施用也可以通过经黏膜或经皮手段。对于经黏膜或经皮施用,在制剂中使用适合于待渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂为本领域公知,并且包括,对于经黏膜施用,例如洗涤剂、胆盐和梭链孢酸衍生物。经黏膜施用可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂来达到。对于经皮施用,将活性化合物配制为本领域公知的软膏、药膏、凝胶或乳膏。

[0437] 治疗有效剂量可以取决于本领域普通技术人员已知的许多因素。例如,取决于正在治疗的个体或样品的性质、体型大小和状况,进一步取决于施用组合物的途径(如适用)和执行者所需求的效果,剂量可以变化。这些量可由技术人员容易地确定。

[0438] 抑制剂可并入适于施用的药物组合物中。此类组合物可包含抑制剂和可药用载体。因此,在一些实施方案中,本公开的化合物存在于药物组合物中。

[0439] 实施方案还可以包括组合组合物,即组合物包含两种或多种预防和/或治疗癌症的活性剂。术语“组合”可以指在一种剂量单位形式中的固定组合,也可以指用于联合施用的成套药盒,其中化合物和组合伙伴(例如另一种药物,也称为“治疗剂”或“共施用剂”(co-agent))可以同时独立施用或在时间间隔内分开施用,尤其是在这些时间间隔允许组合伙伴显示出协作,例如协同效应时。本文中使用的术语“共同施用”或“联合施用”等意在涵盖,对有需要的单个个体(例如患者)施用选定的组合伙伴,并且意在包括其中活性剂并非必然通过相同的施用途径或同时施用的治疗方案。本文所用的术语“药物组合”是指,通过混合或组合一种以上活性成分而产生的产品,包括活性成分的固定和非固定组合。术语“固定组合”是指,活性成分,例如化合物和组合伙伴,以单个实体或剂量的形式,同时对患者施用。术语“非固定组合”是指,活性成分,例如化合物和组合伙伴,作为分开的实体,同时、并行或是顺次对患者施用而无具体时间限制,其中这种施用对患者体内提供两种化合物的治疗有效水平。后者也适用于鸡尾酒疗法,例如,施用三种或更多种活性成分。

[0440] 例如,该组合组合物可以包含抑制剂和至少一种其他治疗剂(即第二抑制剂和/或

抗癌剂)。例如,该一种其他治疗剂可以是毒素、化疗剂、放射性标记、siRNA、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞或细胞因子。

[0441] 在一些实施方案中,该至少一种其他治疗剂选自:化疗剂、免疫治疗剂、检查点阻断剂、毒素、放射性标记、siRNA、癌症疫苗、小分子、肽、抗体、遗传改造细胞、细胞因子及其组合。在示例性实施方案中,该至少一种其他治疗剂可以包含检查点抑制剂,如靶向个体免疫系统的调节因子的抑制剂。

[0442] 个体的免疫系统保护个体对抗疾病,包括癌症。发挥此作用的一类主要的免疫细胞称为T细胞。T细胞上有启动免疫反应的蛋白质和关闭免疫反应的其他蛋白质。这些蛋白质称为检查点。一些检查点蛋白质发挥作用以告诉T细胞活化。但是,如果T细胞活跃时间过长,或者对不应该发生的事情作出反应,则它们就会开始破坏健康的细胞和组织。因此,其他检查点发挥作用以告诉T细胞关闭。一些癌细胞产生高水平的蛋白质,该蛋白质可以在T细胞应攻击癌细胞时关闭T细胞。通过抑制免疫系统,癌细胞导致T细胞不再识别和杀死癌细胞。在一个示例性实施方案中,该至少一种其他治疗剂可以是T细胞。在另一示例性实施方案中,该至少一种其他治疗剂可以是CAR T细胞。

[0443] 阻断检查点蛋白质的活性剂称为检查点抑制剂。这些活性剂可以阻止癌细胞上的蛋白质抑制个体的免疫系统。这将导致免疫系统重新开启,使T细胞能够发现并攻击癌细胞。

[0444] 关键检查点蛋白质包括CTLA-4 (见于T细胞上)、PD-1 (见于T细胞上) 和PD-L1 (见于癌细胞上)。因此,本公开的一些方面可以包括,对个体施用包含检查点抑制剂,如检查点抑制抗体的组合物。例如,该抗体可以是抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-L1抗体或其组合 (参见表3) :

[0445] 表3-检查点抑制剂

[0446]	抗体名称	靶标	
	纳武单抗	PD-1	全人单克隆 IgG4 抗体
	帕博利珠单抗	PD-1	人源化 IgG4 抗体
	伊匹单抗	CTLA-4	人抗体
	阿替利珠单抗	PD-L1	人源化 IgG1 抗体
	阿维鲁单抗	PD-L1	全人单克隆抗体
	德瓦鲁单抗	PD-L1	人 IgG1 单克隆抗体
	西米普利单抗	PD-1	人抗体
[0447]	参见例如 He, Yayi 等 OncoTargets and therapy 11 (2018): 7005	TIM-3	TIM-3 在 T 细胞衰竭中发挥重
	要作用		
	参见例如 Andrews, Lawrence P.等 Immunological reviews 276.1 (2017): 80-96	LAG3	LAG3 在 T 细胞衰竭中发挥作用
[0447]	Solomon, Benjamin L.和 Ignacio Garrido-Laguna. Cancer Immunology, Immunotherapy 67.11 (2018): 1659-1667	TIGIT	TIGIT 在免疫监视中发挥作用, 并调节 T 细胞介导的免疫

[0448] 本领域技术人员将认识到,任何检查点抑制剂都可以用于在本文所述的实施方案中。在一些实施方案中,Carm1失活和检查点阻断疗法抗PD-1抗体的联合治疗,产生对肿瘤生长抑制的协同作用。在其他实施方案中,Carm1失活和检查点阻断疗法抗CTLA-4抗体的联合治疗,产生对肿瘤生长抑制的协同作用。

[0449] 该抑制剂和该一种或多种其他治疗剂可称为抗癌剂。“抗癌”剂能够负面影响个体中的癌症,例如,通过杀死癌细胞、诱导癌细胞凋亡、降低癌细胞的生长速率、减少转移的发生率或数量、减小肿瘤大小、抑制肿瘤生长、减少肿瘤或癌细胞的血液供应、促进针对癌细胞或肿瘤的免疫反应、预防或抑制癌症的进展、或延长癌症个体的寿命。更一般地,这些其他组合物将以有效杀死或抑制细胞增殖的组合物提供。这一过程可涉及同时使癌细胞与表达构建体和活性剂或多种因子接触。这可以通过使细胞与包含这两种活性剂的单一组合物或药物制剂接触或者通过同时使细胞与两种不同的组合物或制剂接触来达到,其中一种组合物包含表达构建体,另一种组合物包含第二活性剂。

[0450] 在某些实施方案中,本公开的组合物和方法还可以包括基于化学和辐射治疗的各种联合。例如,联合化疗可以包括,例如,白蛋白结合型紫杉醇(abraxane)、六甲密胺、多西他赛、赫赛汀、甲氨蝶呤、米托蒽醌(novantrone)、诺雷得(zoladex)、顺铂(CDDP)、卡铂、甲基苄肼、二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥、苯丁酸氮芥、白消安、硝基脲、更生霉素、柔红霉素、阿霉素、博莱霉素、plicomycin、丝裂霉素、依托泊苷(VP16)、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合剂、紫杉醇、吉西他滨、诺维本、法尼基蛋白转移酶抑制剂、反铂、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春花碱和甲氨蝶呤、或上述物质的任何类似物或衍生变体,以及它们的组合。

[0451] 在一些具体实施方案中,针对个体的化疗与本文所述的方法结合使用,例如在施用本文所述方法之前、期间和/或之后。

[0452] 导致DNA损伤并广泛使用的其他因素包括,通常所称的 γ 射线、X射线和/或放射性同位素定向递送到肿瘤细胞。还考虑了其他形式的DNA损伤因素,如微波和紫外线照射。很可能所有这些因素都会对DNA、DNA前体、DNA复制和修复、以及染色体的组装和维持造成广泛的损伤。X射线的剂量范围从长期(3至4周)50至200伦琴的日剂量,到单剂量2000至6000伦琴。放射性同位素的剂量范围差别很大,取决于同位素的半衰期、放射的强度和类型以及肿瘤细胞的摄取。

[0453] 免疫治疗通常依赖于用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏细胞。例如,免疫效应物可以是对肿瘤细胞表面的某些标志物特异的抗体。抗体本身可以作为治疗的效应物,或者它可以招募其他细胞来实际实现细胞杀伤。抗体也可与药物或毒素(化疗剂、放射性核素、蓖麻毒素A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合,仅作为靶向剂。备选地,该效应物可以是携带表面分子的淋巴细胞,该表面分子直接或间接与肿瘤细胞靶标相互作用。效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0454] 因此,除了本文所述本发明治疗之外的免疫治疗可以与本发明的治疗结合作为联合治疗的一部分。下文讨论联合治疗的一般方法。通常,肿瘤细胞必须具有某个易于靶向的标志物,即在大多数其他细胞上不存在的标志物。存在许多肿瘤标记物,其中任何一种都可以适合在本公开中用于靶向。常见的肿瘤标记物包括PD-1、PD-L1、CTLA4、癌胚抗原、前列腺特异性抗原、泌尿系统肿瘤相关抗原、胎儿抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液

酸化Lewis抗原、MucA、MucB、PLAP、雌激素受体、层粘连蛋白受体、erb B和p155。

[0455] 还在另一个实施方案中,该第二治疗是基因治疗,其中在本公开的临床实施方案之前、之后或同时施用治疗性多核苷酸。本公开涵盖各种表达产物,包括细胞增殖诱导剂、细胞增殖抑制剂或程序性细胞死亡调节剂。

[0456] 约60%的癌症患者将接受某种类型的手术,包括预防性、诊断性或分期性、治疗性和姑息性手术。治疗性手术是一种可与其他治疗结合使用的癌症疗法,例如本公开的治疗、化疗、放疗、激素治疗、基因治疗、免疫治疗和/或替代治疗。

[0457] 治疗性手术包括切除,其中物理去除、切除和/或破坏全部或部分癌组织。肿瘤切除是指物理去除至少部分肿瘤。除了肿瘤切除外,手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电子手术和控制手术(莫氏手术)。进一步设想,本公开可与表面癌、癌前病变或附带数量的正常组织的去除结合使用。

[0458] 切除部分或全部癌细胞、组织或肿瘤后,体内可以形成空洞。治疗可以通过将其他抗癌治疗灌注、直接注射或局部应用于该区域来达到。这种治疗可以反复进行,例如,每1、2、3、4、5、6或7天,或每1、2、3、4和5周,或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月进行。这些治疗也可以有不同的剂量。

[0459] 考虑其他活性剂可与本公开结合使用,以提高治疗的疗效。这些其他活性剂包括免疫调节剂、影响细胞表面受体上调和GAP连接的药物、细胞抑制剂和分化剂、细胞黏附抑制剂或提高过度增殖细胞对凋亡诱导剂的敏感性的活性剂。免疫调节剂包括肿瘤坏死因子;干扰素 α 、 β 和 γ ;IL-2和其他细胞因子;F42K和其他细胞因子类似物;或MIP-1、MIP-1 β 、MCP-1、RANTES和其他趋化因子。进一步可以考虑,上调细胞表面受体或其配体(如Fas/Fas配体、DR4或DR5/TRAIL),通过对过度增殖细胞建立自分泌或旁分泌效应,增强本公开的凋亡诱导能力。通过提高GAP连接的数量来增加细胞间信号传导,将增加对邻近过度增殖细胞群体的抗过度增殖作用。在其他实施方案中,细胞抑制剂或分化剂可与本公开结合使用,以提高治疗的抗过度增殖功效。考虑用细胞黏附抑制剂来提高本公开的功效。细胞黏附抑制剂的实例有黏着斑激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀。进一步考虑,提高过度增殖细胞对凋亡的敏感性的其他活性剂,如抗体c225,可以与本公开组合使用,以提高治疗效果。

[0460] 试剂盒

[0461] 本公开的一些方面还涵盖试剂盒,如用于治疗和/或诊断癌症的试剂盒。

[0462] 在一个实施方案中,该试剂盒可包含本文所述的一种或多种组合物,如抑制剂。

[0463] 例如,该试剂盒可以包含一种或多种用于检测样品中CARM1、Med12、TDRD3或其他蛋白质水平的试剂。该一种或多种试剂可以固定在固体支持物上。该固体支持物结构组成的非限制性实例包括塑料、纸板、玻璃、有机玻璃、锡、纸或其组合。该固体支持物还可以包括量杆、勺子、铲勺、滤纸或拭子。

[0464] 所述试剂可以包括能够检测生物样品中的癌症或肿瘤细胞的标记化合物或试剂(例如scFv或单克隆抗体);用于确定样品中基因表达量的工具;以及将样品中的基因表达量与标准(例如对照样品或阈值)进行比较的工具。在一些实施方案中,该标准是非癌细胞或其细胞提取物。该化合物或试剂可包装在合适的容器中。该试剂盒还可以包括用该试剂盒检测样品中癌症的说明书。

[0465] 在实施方案中,该试剂盒还可以包括用于扩增从编码多肽的基因转录的mRNA的引

物和/或用于检验该引物的对照样品。例如,该对照样品可以包含与引物杂交的核酸。

[0466] 该试剂盒还可以包括样品收集装置,如用于收集生物流体或肿瘤活检物的装置。

[0467] 在一个实施方案中,该试剂盒可以包括容器,所述容器包含所述一种或多种试剂和可选的信息材料。该信息材料可以是描述性、指导性、营销性材料、或其他出于诊断目的使用本文所述方法和/或活性剂有关的信息材料。在一个实施方案中,该试剂盒还包括一种或多种抗癌治疗剂。

[0468] 该试剂盒的信息材料的形式不受限制。在一个实施方案中,该信息材料可以包括关于试剂盒组件的生产信息,如分子量、浓度、有效期、批次或生产地点信息等。在一个实施方案中,该信息材料涉及使用试剂盒组件的方法。该信息可以多种格式提供,包括印刷文本、计算机可读材料、视频记录或音频记录、或提供实质性材料的链接或地址的信息。

[0469] 该试剂盒可以包括其他成分,如溶剂或缓冲剂、稳定剂或防腐剂。可选地,该试剂盒可包括可以以任何形式提供的治疗剂,例如液体、干燥或冻干形式,优选基本纯的和/或无菌的形式。在液体溶液中提供试剂时,该液体溶液优选为水性溶液。在以干燥形式提供试剂时,通常通过加入合适的溶剂进行复溶。溶剂(例如无菌水或缓冲液)可以可选地提供在试剂盒中。

[0470] 免疫效应细胞

[0471] 在一些实施方案中,本公开提供表达至少一种抗原识别受体的免疫效应细胞,包括T细胞、细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、调节性(CD4) T细胞和自然杀伤(NKT)细胞。在任何方面,该免疫效应细胞表达至少一种肿瘤特异性抗原识别受体。在一些方面,使用肿瘤细胞抗原特异性T细胞、NKT细胞、TIL、CTL细胞或其他免疫效应细胞。免疫效应细胞的非限制性实例包括T细胞,例如 $\alpha\beta$ -TCR+T细胞(例如CD8+T细胞或CD4+T细胞)、 $\gamma\delta$ -TCR+T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞(NKT)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和CD4 T细胞。

[0472] 在一些实施方案中,本文公开的免疫效应细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。

[0473] 抗体

[0474] 在一些实施方案中,本文公开的抑制剂是抗体,如拮抗性抗体,或其抗原结合片段。例如,该抑制剂可以是CARM1抗体、Med12抗体、TDRD3抗体,或其抗原结合片段。

[0475] 本公开的抗体结合特异于本发明的CARM1、Med12或TDRD3蛋白、亚基、片段、部分或其任何组合的至少一个特定表位。该表位可包含抗体结合区,该抗体结合区包含CARM1、Med12或TDRD3的氨基酸序列的至少一部分(例如SEQ ID NO:1-9),该表位优选由该序列的至少1-5个氨基酸组成。该抗体可包括或源自任何哺乳动物,例如但不限于人、小鼠、兔、大鼠、啮齿动物、灵长类动物或其任何组合,等。

[0476] 本文所述的抗CARM1、抗Med12或抗TDRD3抗体具有至少一种活性,例如但不限于,抑制CARM1、Med12或TDRD3活性。因此,可以按照已知方法,针对相应的活性,例如但不限于人CARM1、Med12或TDRD3的至少一种生物学活性,筛选抗CARM1抗体、抗Med12抗体或抗TDRD3抗体。

[0477] 本文中,“抗体”、“抗体部分”或“抗体片段”和/或“抗体变体”等包括任何含蛋白质或多肽的分子,所述分子包含免疫球蛋白分子的至少一部分,例如但不限于,重链或轻链的至少一个互补决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框

架区或其任何部分。抗体可选地进一步影响特定的配体,例如但不限于,抗体在体外、原位和/或体内调节、减少、增加、拮抗、激动、缓和、减轻、阻断、抑制、废除和/或干扰至少一种 CARM1、Med12或TDRD3活性或结合。作为非限制性实例,适宜的本发明抗CARM1抗体、特定部分或变体,可以结合本发明的至少一种CARM1蛋白或多肽、或其特定部分、变体或结构域。适宜的抗CARM1抗体、特定部分或变体也可以可选地影响至少一种CARM1活性或功能,例如但不限于CARM1信号发放、CARM1活性、CARM1产生和/或合成。

[0478] “抗体”是指,包含四聚体结构单元的免疫球蛋白家族分子。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对都有一条“轻”链(约25kD)和一条“重”链(约50-70kD),通过二硫键连接。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,它们转而分别定义了免疫球蛋白的类型,IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。抗体可以是任何同种型/类型(例如IgG、IgM、IgA、IgD和IgE)或任何亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2)。

[0479] 术语“抗体”还旨在包括抗体、其消化片段、特定部分和变体,包括模拟抗体或其特定片段或部分的结构和/或功能的抗体模拟物或抗体部分,包括单链抗体及其片段。功能性片段包括与哺乳动物CARM1、Med12或TDRD3结合的抗原结合片段。例如,本发明涵盖能够与CARM1,Med12或TDRD3或其部分结合的抗体片段,包括但不限于Fab(例如通过木瓜蛋白酶消化)、Fab' (例如通过胃蛋白酶消化和部分还原)和F(ab')₂(例如通过胃蛋白酶消化)、facb(例如通过纤溶酶消化)、pFc' (例如通过胃蛋白酶或纤溶酶消化)、Fd(例如通过胃蛋白酶消化、部分还原和重新聚集)、Fv或scFv(例如通过分子生物学技术)片段(参见例如Colligan, Immunology, 上引文)。

[0480] 轻链和重链都分为结构和功能同源区域。术语“恒定”和“可变”在结构和功能上使用。每条链的N端定义了主要负责抗原识别的约100到110个或更多个氨基酸的可变(V)区或结构域。术语可变轻链(VL)和可变重链(VH)分别指轻链和重链的这些区域。VH和VL配对在一起形成单个抗原结合部位。除了V区外,重链和轻链都包含恒定(C)区或结构域。免疫球蛋白C区的分泌形式由三个C结构域(CH1、CH2、CH3、可选的CH4(C μ))和铰链区组成。免疫球蛋白C区的膜结合形式还有膜结构域和细胞内结构域。每条轻链在N端具有VL,之后是位于另一端的恒定结构域(C)。轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要的生物学特性,如分泌、跨胎盘移动、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域随着它们距离抗体的抗原结合部位或氨基端越远,而具有增加的编号。N端是可变区,C端是恒定区;CH3和CL结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基端结构域。VL与VH对齐,CL与重链的第一恒定结构域(CH1)对齐。本文中,“抗体”包括常规抗体结构和抗体变体。因此,在这个概念的范围内有全长抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体及其片段。

[0481] 抗体可以是完整免疫球蛋白链、或各种通过肽酶消化产生的良好表征的抗体片段。本文中所用的术语“抗体片段”是指抗体的一个或多个部分,其保留与抗原表位特异性相互作用(例如,结合、空间位阻、稳定化/去稳定化、空间分布)的能力。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区中的二硫键下方消化抗体以产生F(ab)'₂,F(ab)'₂是Fab'的二聚体,Fab'本身是通过二硫键连接到VH-CH1的轻链。F(ab)'₂可以在温和条件下还原,以断开铰链区中的二硫键,从而将F(ab)'₂二聚体转化为Fab'单体。Fab'单体本质上是具有部分铰链区的Fab(Paul, Fundamental Immunology第3版(1993))。虽然多种抗体片段是根据完整抗体的消化

来定义的,但技术人员将理解,这类片段可以通过化学方法或通过使用重组DNA方法从头合成。本文所用的“抗体片段”指抗体的一个或多个部分,其通过修饰完整抗体产生,或使用重组DNA方法从头合成,保留结合特异性和功能活性。抗体片段的实例包括Fv片段、单链抗体(ScFv)、Fab、Fab'、Fd(Vh和CH1结构域)、dAb(Vh和分离的CDR);具有相同结合特异性的这些片段的多聚体形式(例如F(ab')₂)。

[0482] 如本领域所知和/或如本文所述,可通过酶促裂解、合成或重组技术来产生此类片段。抗体也可以使用如下抗体基因以多种截短形式产生,在所述基因中在天然终止位点上游引入了一个或多个终止密码子。例如,编码F(ab')₂重链部分的组合基因可以设计为包括编码重链的CH1结构域和/或铰链区的DNA序列。抗体的多个部分可以通过常规技术化学连接在一起,或者可以使用基因工程技术制备为一个连续的蛋白质。

[0483] 上下文中使用的“Fab”结构域包含重链可变结构域、恒定区CH1结构域、轻链可变结构域和轻链恒定区CL结构域。这些结构域的相互作用通过CH1和CL结构域之间的二硫键稳定化。在一些实施方案中,Fab的重链结构域从N端到C端的顺序为VH-CH,Fab的轻链结构域从N端至C端的顺序为VL-CL。在一些实施方案中,Fab的重链结构域从N端到C端的顺序为CH-VH,Fab的轻链结构域的顺序为CL-VL。虽然Fab片段过去是通过完整免疫球蛋白的木瓜蛋白酶消化鉴定的,但在本公开中,“Fab”典型地可以通过任何方法重组产生。每个Fab片段对于抗原结合而言都是单价的,即它具有单个抗原结合部位。

[0484] “互补决定结构域”或“互补决定区”(“CDR”)可互换,指VL和VH的高变区。CDR是抗体链的目标蛋白结合部位,对这种目标蛋白具有特异性。每个人VL或VH中有三个CDR(CDR1-3,从N端开始依次编号),约占可变结构域的15-20%。CDR在结构上与目标蛋白的表位互补,因此直接负责结合特异性。VL或VH的剩余区段(所谓的构架区(FR))显示较小的氨基酸序列变异(Kuby,Immunology,第4版,第4章W.H.Freeman&Co.,New York,2000)。

[0485] CDR和构架区的位置可以使用本领域公知的定义来确定,例如Kabat、Chothia和AbM(参见例如Kabat等1991Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242,Johnson等,Nucleic Acids Res.,29:205-206(2001);Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.,196:901-917(1987);Chothia等,Nature,342:877-883(1989);Chothia等,J.Mol.Biol.,227:799-817(1992);Al-Lazikani等,J.Mol.Biol.,273:927-748(1997))。抗原结合部位的定义还描述于以下文献中:Ruiz等,Nucleic Acids Res.,28:219-221(2000);Lefranc,M.P.,Nucleic Acids Res.,29:207-209(2001);(ImMunoGenTics(IMGt) numbering)Lefranc,M.-P.,The Immunologist,7,132-136(1999);Lefranc,M.-P.等,Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(2003);MacCallum等,J.Mol.Biol.,262:732-745(1996);Martin等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:9268-9272(1989);Martin等,Methods Enzymol.,203:121-153(1991);Rees等,In Sternberg M.J.E.(编辑),Protein Structure Prediction,Oxford University Press,Oxford,141-172(1996)。

[0486] 根据Kabat,VH中的CDR氨基酸残基编号为31-35(HCDR1)、50-65(HCDR 2)和95-102(HCDR3);VL中的CDR氨基酸残基编号为24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。在Chothia下,VH中的CDR氨基酸编号为26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和95-102(HCDR 3);VL中的氨基酸残基编号为26-32(LCDR1)、50-52(LCDR 2)和91-96(LCDR3)。结合Kabat和Chothia

的CDR定义,CDR在人VH中由氨基酸残基26-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR 2) 和95-102 (HCDR3) 组成,在人VL中由氨基酸残基24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和89-97 (LCDR3) 组成。

[0487] 本文所用的“抗体可变轻链”或“抗体可变重链”分别指包含VL或VH的多肽。内源性VL由基因区段V(可变)和J(连接)编码,内源性VH由V、D(多样性)和J编码。VL或VH中的每个都包括CDR以及构架区(FR)。术语“可变区”或“V区”可互换地指包含FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的重链或轻链。V区可以是天然存在的、重组的或合成的。在本申请中,抗体轻链和/或抗体重链有时可以统称为“抗体链”。

[0488] 本文中,免疫球蛋白重链的C端部分(包含例如CH2和CH3结构域)是“Fc”结构域。本文所用的“Fc区”指抗体的恒定区,不包括第一恒定区(CH1)免疫球蛋白结构域。Fc指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域、IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域、以及这些结构域N端的柔性铰链。对于IgA和IgM,Fc可以包括J链。对于IgG,Fc包括免疫球蛋白结构域CH2和CH3以及CH1和CL之间的铰链。本领域理解,Fc区的边界可以不同,然而,人IgG重链Fc区通常定义为包含残基C226或P230至其羧基端,其中使用根据Kabat等(1991,NIH Publication 91-3242,National Technical Information Service, Springfield,Va.)中的EU索引进行编号。“Fc区”可以指分离的该区域,或存在于抗体或抗体片段中的该区域。“Fc区”包括Fc区的天然存在的等位基因变体,例如在CH2和CH3区中的变体,包括例如调节效应子功能的修饰。Fc区还包括不导致生物学功能改变的变体。例如,从免疫球蛋白Fc区的N端或C端缺失一个或多个氨基酸而不实质性丧失生物学功能。例如,在某些实施方案中,修饰、替换或去除C末端赖氨酸。在具体实施方案中,改变或去除Fc区中的一个或多个C端残基。在某些实施方案中,缺失Fc中的一个或多个C端残基(例如末端赖氨酸)。在某些其他实施方案中,用备选氨基酸取代Fc中的一个或多个C端残基(例如替换末端赖氨酸)。这类变体可以根据本领域已知的一般规则选择,以便对活性的影响最小(参见例如Bowie等,Science 247:306-1310,1990)。Fc结构域是免疫球蛋白(Ig)中负责细胞受体(如FcR)识别及补体激活蛋白C1q结合的部分。CH2外显子的5'部分中编码的下铰链区为抗体与FcR受体的结合提供柔性。

[0489] “嵌合抗体”是这样的抗体分子,其中(a)改变、替换或交换恒定区或其部分,使得抗原结合部位(可变区)与不同或改变类型、效应子功能和/或物种的恒定区连接,或与赋予嵌合抗体新特性的完全不同的分子连接,例如酶、毒素、激素、生长因子和药物;或(b)用具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换可变区或其部分。

[0490] “人源化”抗体是保留非人抗体的反应性(例如结合特异性、活性)同时在人中的免疫原性较低的抗体。例如,这可以通过保留非人CDR区并用人对对应物替换抗体的剩余部分来达到(参见例如Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984);Morrison和Oi,Adv.Immunol.,44:65-92(1988);Verhoeyen等,Science,239:1534-1536(1988);Padlan,Molec.Immun.,28:489-498(1991);Padlan,Molec.Immun.,31(3):169-217(1994))。

[0491] “人抗体”包括具有可变区的抗体,其中构架区和CDR区均源自人来源的序列。此外,如果抗体包含恒定区,则恒定区也源自人序列,例如,人种系序列或人种系序列的突变形式,或包含源自人构架序列分析的共有构架序列的抗体,如Knappik等,J.Mol.Biol.296:57-86,2000中所述。人抗体可以包括不由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或

位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变,或促进稳定性或制造的保守取代)。

[0492] 术语“相应的人种系序列”指编码人可变区氨基酸序列或子序列的核酸序列,其中,与由人种系免疫球蛋白可变区序列编码的所有其他已知的可变区氨基酸序列相比,该可变区氨基酸序列或子序列与参考可变区氨基酸序列或子序列具有最高确定的氨基酸序列同一性。相应的人种系序列也可以指,与所有其他评价的可变区氨基酸序列相比,与参考可变区氨基酸序列或子序列具有最高氨基酸序列同一性的人可变区氨基酸序列或子序列。相应的人种系序列可以是仅构架区、仅互补决定区、构架区和互补决定区、可变区段(如上文所定义)、或包含可变区的序列或子序列的其他组合。可以使用本文所述的方法来确定序列同一性,例如,使用BLAST、ALIGN或本领域已知的其他比对算法来比对两个序列。相应的人种系核酸或氨基酸序列可以与参考可变区核酸或氨基酸序列具有至少约90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。

[0493] 本文所用的术语“价”指多肽中潜在靶标结合部位的数量。每个靶标结合部位都特异性结合一个靶标分子或靶标分子上的一个特异性部位。在多肽包含一个以上的靶标结合部位时,每个靶标结合部位可以特异性结合相同或不同的分子(例如,可以结合不同的分子,例如不同的抗原,或同一分子上的不同表位)。例如,常规抗体具有两个结合部位,是二价的;“三价”和“四价”指抗体分子中分别存在三个结合部位和四个结合部位。

[0494] 在用于描述靶标(例如蛋白质)和抗体之间的相互作用的情况中,短语“特异性结合”指可以在蛋白质和其他生物制品的异质群体中(例如在生物样品中,例如血液、血清、血浆或组织样品中)决定靶标存在的结合反应。因此,在某些指定条件下,具有特定结合特异性的抗体与特定靶标的结合至少是背景的两倍,并且不以显著的量实质性结合样品中存在的其他靶标。在一个实施方案中,在指定条件下,具有特定结合特异性的抗体与特定抗原的结合至少是背景的十(10)倍,并且不以显著的量实质性结合样品中存在的其他靶标。在这类条件下,与抗体的特异性结合,可能需要针对抗体对特定蛋白质的特异性来选择抗体。可以使用多种型式来选择与特定目标抗原蛋白质特异性反应的抗体。例如,固相ELISA免疫测定常用于选择与蛋白质发生特异性免疫反应的抗体(可用于确定特异性免疫反应性的免疫测定型式和条件的描述,参见例如Harlow&Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998))。通常,特异性或选择性结合反应将产生至少两倍于背景信号的信号,更通常是至少10至100倍于背景。

[0495] 术语“平衡解离常数(KD,M)”指解离速率常数(k_d, time^{-1})除以结合速率常数($k_a, \text{time}^{-1}, \text{M}^{-1}$)。平衡解离常数可以使用本领域的任何已知方法测量。抗体通常将具有小于约 10^{-7} 或 10^{-8}M 、例如小于约 10^{-9}M 或 10^{-10}M 、在一些实施方案中小于约 10^{-11}M 、 10^{-12}M 或 10^{-13}M 的平衡解离常数。

[0496] 本发明的至少一种抗体结合特异于本文所述的CARM1、Med12或TDRD3蛋白、亚基、片段、部分或其任何组合的至少一个特定表位(例如SEQ ID NO:1-9)。如本文所述,该至少一个表位可以包含至少一个抗体结合区,该抗体结合区包含如下蛋白质序列的至少一部分,所述蛋白质序列对应于来自本文所述人CARM1、Med12或TDRD3的受体结合区的肽序列,其中该表位优选由所述蛋白质的至少一个胞外部分、可溶性部分、亲水部分、外部部分或胞质部分组成。

[0497] 通常,本发明的人抗体或抗原结合片段将包含抗原结合区,该抗原结合区包含至

少一个人互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR3) 或至少一个重链可变区的变体、以及至少一个人互补决定区 (CDR1、CDR2和CDR4) 或至少一个轻链可变区的变体。

[0498] 用于本发明的方法和组合物中的抗CARM1、抗Med12或抗TDRD3抗体可以可选地具有如下特征：与CARM1、Med12或TDRD3蛋白高亲和力结合，并且可选地和优选地具有低毒性。尤其是，这样的本发明抗体、特定片段或变体在本发明中是有用的，其中各单个成分，如可变区、恒定区和构架区，单独地和/或集合地，可选地和优选地，具有低免疫原性。可用于本发明中的抗体可选地具有如下特征：其能够长期治疗患者，具有可测量的症状缓解和低和/或可接受的毒性。低或可接受的免疫原性和/或高亲和力，以及其他适宜的特性，可促成达到治疗结果。“低免疫原性”在本文中定义为，在所治疗的小于约75%、或优选小于约50%的患者中产生显著的HAHA、HACA或HAMA反应，和/或在所治疗的患者中产生低滴度(用双抗原酶免疫测定法，测量到小于约300、优选小于约100的滴度) (Elliott等, Lancet 344:1125-1127 (1994)，在此整体引入作为参考)。

[0499] 在另一方面，本发明涉及如本文所述的人抗体和抗原结合片段，其通过有机部分的共价附着进行修饰。这种修饰可以产生具有改进的药代动力学特性(例如提高的体内血清半衰期)的抗体或抗原结合片段。有机部分可以是线性或支链亲水性聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。单独或共价键合到亲水性聚合物的脂质分子如二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺部分是有用的。在具体实施方案中，亲水性聚合物基团可以具有约800至约120000道尔顿的分子量，并且可以是聚烷二醇(例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG))、糖类聚合物、氨基酸聚合物或聚乙烯吡咯烷酮，并且脂肪酸或脂肪酸酯基团可以包含约8至约40个碳原子。

[0500] 本发明的修饰抗体和抗原结合片段可包含直接或间接共价键合到抗体的一个或多个有机部分。键合到本发明的抗体或抗原结合片段的每个有机部分可以独立地是亲水性聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。本文所用的术语“脂肪酸”包括单羧酸和双羧酸。本文使用的术语“亲水性聚合物基团”指在水中比在辛烷中更易溶解的有机聚合物。例如，聚赖氨酸在水中比在辛烷中更易溶解。因此，本发明涵盖通过共价附着聚赖氨酸修饰的抗体。适合用于修饰本发明抗体的亲水性聚合物可以是线性或分支的，并且包括例如聚烷二醇(例如PEG、单甲氧基聚乙二醇(mPEG)、PPG等)、糖类(例如葡聚糖、纤维素、寡糖、多糖等)、亲水性氨基酸的聚合物(例如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等)、聚烷烃氧化物(例如聚乙烯氧化物、聚丙烯氧化物等)和聚乙烯吡咯烷酮。优选地，修饰本发明抗体的亲水性聚合物作为分开的分子实体具有约800至约150000道尔顿的分子量。例如，可以使用PEG₅₀₀₀和PEG₂₀₀₀₀，其中下标是聚合物的平均分子量，单位为道尔顿。亲水性聚合物基团可以用1至6个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代。用脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水性聚合物可以通过采用适宜的方法来制备。例如，可以将包含胺基的聚合物偶联到脂肪酸或脂肪酸酯的羧酸上，并且可以将脂肪酸或脂肪酸酯上的活化羧酸(例如用N,N-羰基二咪唑活化)偶联到聚合物的羟基上。

[0501] 适合用于修饰本发明抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的，或者可以包含一个或多个不饱和单元。适合用于修饰本发明抗体的脂肪酸包括，例如，正十二酸(C12，月桂酸)、正十四酸(C14，肉豆蔻酸)、正十八酸(C18，硬脂酸)、正二十酸(C20，花生酸)、正二十二酸(C22，山嵛酸)、正三十酸(C30)、正四十酸(C40)、顺式- Δ^9 -十八酸(C18，油酸)、全顺式- $\Delta^{5,8,11,14}$ -二十碳四烯酸(C20，花生四烯酸)、辛二酸、十四烷二酸、十八烷二酸和二十二

烷二酸等。适宜的脂肪酸酯包括含有线性或支链低级烷基的二羧酸的单酯。低级烷基可包含1至约12个,优选1至约6个碳原子。

[0502] 可使用适宜的方法,制备经修饰的人抗体和抗原结合片段,如通过与一种或多种修饰剂反应。本文所用的术语“修饰剂”是指包含活化基团的适宜有机基团(例如亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)。“活化基团”是化学部分或官能团,其可在适当条件下与第二化学基团反应,从而在修饰剂和第二化学基团之间形成共价键。例如,胺反应性活化基团包括亲电基团,如甲苯磺酸、甲磺酸、卤素(氯、溴、氟、碘)、N-羟基琥珀酰亚胺酯(HS)等。可与硫醇反应的活化基团包括,例如,马来酰亚胺、碘乙酰基、丙烯酰基、吡啶二硫化物、5-巯基-2-硝基苯甲酸硫醇(TNB-硫醇)等。醛官能团可与含胺或酰肼的分子偶联,叠氮基可与三价磷基团反应形成氨基磷酸酯连接或磷酰亚胺连接。本领域已知将活化基团引入分子的适宜方法(参见例如Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, Calif. (1996))。活化基团可直接键合到有机基团(例如亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯),或通过接头部分键合,例如二价C1-C12基团,其中可用氧、氮或硫等杂原子替换一个或多个碳原子。适宜的接头部分包括,例如,四甘醇、-(CH₂)₃-、-NH-(CH₂)₆-NH-、-(CH₂)₂-NH-和-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-NH-。例如,包含接头部分的修饰剂可通过如下方式制备:在1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)存在下使单-Boc-烷基二胺(例如,单-Boc-乙二胺、单-Boc-己二胺)与脂肪酸反应,以在游离胺和脂肪酸的羧酸之间形成酰胺键。可通过用三氟乙酸(TFA)处理从产物去除Boc保护基以暴露伯胺,其可与所述另一羧酸偶联,或可与马来酸酐反应,所得产物环化以生成脂肪酸的活化马来酰亚胺基衍生物(参见例如Thompson等, WO 92/16221, 其全部教导在此引入作为参考)。

[0503] 本发明的修饰抗体可通过使人抗体或抗原结合片段与修饰剂反应来产生。例如,有机部分可以通过使用胺反应性修饰剂,例如PEG的NHS酯,以非位点特异性的方式键合到抗体。还可以通过还原抗体或抗原结合片段的二硫键(例如链内二硫键)来制备修饰人抗体或抗原结合片段。然后,还原抗体或抗原结合片段可与硫醇反应性修饰剂反应以产生本发明的修饰抗体。可使用合适的方法,如反向蛋白水解(reverse proteolysis)(Fisch等, *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen等, *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran等, *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh等, *Bioorg. Chem.*, 24(1):59-68 (1996); Capellas等, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)),以及Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)中所述的方法,制备包含键合到本发明抗体的特异性位点的有机部分的修饰人抗体和抗原结合片段。

[0504] 本发明的单克隆抗体可以通过传统免疫和杂交瘤技术产生。用包含本发明多肽的人CARM1、Med12或TDRD3抗原组合物免疫小鼠后,回收来自免疫动物的脾细胞或淋巴结组织的淋巴细胞,并通过与骨髓瘤细胞融合或通过Epstein-Barr (EB) 病毒转化而永生化。通过筛选表达所希望的抗体的克隆,获得单克隆抗体。虽然经常用小鼠作为测试模型,但考虑任何哺乳动物个体,包括人个体或抗体生产细胞,都可以按照本发明的方法进行操作,以作为产生哺乳动物,包括人和杂交细胞系的基础。用于直接从表达抗体的B细胞克隆抗体分子的重组DNA的技术在本发明的范围之内。这类B细胞可以通过荧光激活细胞分选仪分离出来。

[0505] 虽然通常产生小鼠单克隆抗体,但本发明并不局限于此。对于治疗应用,希望得到人抗体或人源化抗体。这类抗体可以通过使用人杂交瘤或通过产生人源化抗体获得。通过

用人抗体基因的相应区段替换非人抗体的特定区段,可以开发出人源化抗体。此方法保留了亲本抗体轻链和重链可变区的大部分或全部CDR区,并在很大程度上用人序列替换构架区(EP专利号184187;EP专利号171496;EP专利号173494和W0专利号86/01533)。人单克隆抗体也在转基因小鼠中产生,该转基因小鼠在其基因组中包含编码人抗体的基因或基因区段(美国专利号6162963;W0专利号93/12227;美国专利号58775397;美国专利号5874299;美国专利号5814318;美国专利号5789650;美国专利号5770429;美国专利号5661016;美国专利号5625126;美国专利号5569825;美国专利号5545806;和W0专利号91/10741)。

[0506] 人单克隆抗体也可以使用噬菌体展示、核糖体展示或相关筛选或选择技术,从体外或体内产生的重组抗体文库获得。A.Knappik等人(美国专利号6291158;美国专利号6291159;美国专利号6291160和美国专利号6291161)公开了用于产生主要为人来源的抗体库的流程实例。B.Krebs等人(美国专利号5955341;美国专利号5759817;美国专利号5658727;美国专利号6235469;美国专利号5969108;美国专利号5886793)公开了从此类文库选择针对特定抗原靶标的人抗体的方法实例。

[0507] 本发明的至少一种抗CARM1、抗Med12或抗TDRD3抗体可以可选地通过本领域公知的细胞系、混合细胞系、永生化细胞或永生化细胞的克隆群体产生。参见例如Ausubel等编辑,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.,NY,N.Y.(1987-2001);Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989);Harlow和Lane,antibodies,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989);Colligan等编辑,Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,Inc.,NY(1994-2001);Colligan等,Current Protocols in Protein Science,John Wiley&Sons,NY,N.Y.,(1997-2001),每篇文献在此引入作为参考。

[0508] 可以针对本文所述的适当免疫原性抗原,如本文所述分离的和/或合成的CARM1、Med12或TDRD3、其变体或部分(包括合成分子,如合成多肽),产生对人CARM1、Med12或TDRD3(如本文所述)、其变体或片段具有特异性的人抗体。其他特异性抗体或一般性哺乳动物抗体也可以类似地产生。免疫原性抗原的制备和单克隆抗体的产生可以使用任何适宜的技术进行。

[0509] 在一种方法中,通过使适宜的永生细胞系(例如骨髓瘤细胞系,如但不限于Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1、L.5、>243、P3X63Ag8.653、Sp2 SA3、Sp2 MAI、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U937、MLA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A等、杂交骨髓瘤、其融合产物、从其衍生的任何细胞或融合细胞、或本领域已知的任何其他适宜的细胞系(其可见于例如ATCC))与产生抗体的细胞(如但不限于,分离或克隆的脾细胞、外周血细胞、淋巴细胞、扁桃体细胞或其他含免疫细胞或B细胞的细胞、或表达重链或轻链恒定或可变或构架或CDR序列的任何其他细胞,其中所述重链或轻链恒定或可变或构架或CDR序列可以是内源或异源核酸分子,可以是重组的或内源性的、病毒、细菌、藻类、原核生物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼类、哺乳动物、啮齿动物、马、羊、山羊、绵羊、灵长类、真核生物的、基因组DNA、cDNA、rDNA、线粒体DNA或RNA、叶绿体DNA或RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链、双链或三链、杂交等形式,或其任何组合)融合来产生杂交瘤。参见例如Ausubel,上文和Colligan,Immunology,上文,第2章,在此整体引入作为参考。

[0510] 也可以从用目的抗原免疫的人或其他适宜的动物的外周血或优选脾脏或淋巴结

获得产生抗体的细胞。也可以用任何其他适宜的宿主细胞来表达编码本发明的抗体、指定片段或其变体的异源或内源核酸。融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可以使用选择性培养条件或其他适宜的已知方法分离,并通过有限稀释或细胞分选或其他已知方法克隆。可以通过适宜的测定(如ELISA)来选择产生具有所希望的特异性的抗体的细胞。

[0511] 可以使用其他适宜的产生或分离具有必需特异性的抗体的方法,其包括但不限于,从多肽或蛋白质展示文库选择重组抗体的方法(例如但不限于噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA等展示文库;例如,可获自Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, Del.; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; BioInvent, Lund, Sweden; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, Calif.; Ixsys), 参见例如EP368684、PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; 美国系列号08/350260(1994年5月12日); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); W090/14443; W090/14424; W090/14430; PCT/US94/1234; W092/18619; W096/07754; (Scripps); W096/13583、W097/08320 (MorphoSys); W095/16027 (BioInvent); W088/06630; W090/3809 (Dyax); 美国专利号4704692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); W089/06283; EP 371998; EP550400; (Xoma); EP 229046; PCT/US91/07149 (Ixsys); 或随机产生肽或蛋白质—美国专利号5723323、5763192、5814476、5817483、5824514、5976862、W0 86/05803、EP 590689 (Ixsys, 现为Applied Molecular Evolution (AME), 每个专利均在此整体引入作为参考); 或通过免疫本领域已知和/或本文所述能够产生人抗体库的转基因动物(例如SCID小鼠, Nguyen等, Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu等, Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996); Eren等, Immunol. 93:154-161 (1998), 每篇文献及相关专利和申请在此整体引入作为参考)。此类技术包括但不限于, 核糖体展示 (Hanes等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (1997年5月); Hanes等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (1998年11月)); 单细胞抗体生产技术(例如选定淋巴细胞抗体法(“SLAM”) (美国专利号5627052, Wen等, J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); 凝胶微滴和流式细胞术 (Powell等, Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, Mass.; Gray等, J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny等, Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); B细胞选择 (Steenbakkers等, Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994); Jonak等, Progress Biotech, 第5卷, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck编辑, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988))。

[0512] 也可以使用用于工程化或人源化非人抗体或人抗体的方法, 该方法为本领域公知。通常, 人源化或工程化抗体具有来自非人来源的一个或多个氨基酸残基, 例如但不限于小鼠、大鼠、兔、非人灵长类或其他哺乳动物。人氨基酸残基通常称为“输入”残基, 其通常取自具有已知人序列的“输入”可变、恒定或其他结构域。已知的人Ig序列公开在例如:

[0513] www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi;

[0514] www.atcc.org/phage/hdb.html;

[0515] www.sciquest.com/;

[0516] www.abcam.com/;

- [0517] www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;
- [0518] www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html;
- [0519] www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html;
- [0520] www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;
- [0521] www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
- [0522] www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/;
- [0523] www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;
- [0524] www.antibodyresource.com/;
- [0525] mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html.www.immunologylink.com;
- [0526] pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html;
- [0527] www.biotech.ufl.edu/~hcl/;
- [0528] www.pebio.com/pa/340913/340913.html;
- [0529] www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
- [0530] www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html;
- [0531] www.biodesign.com/table.asp;
- [0532] www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html;
- [0533] www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html;
- [0534] www.isac-net.org/sites_geo.html;
- [0535] aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html;
- [0536] baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html;
- [0537] www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;
- [0538] www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;
- [0539] www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;
- [0540] imgt.cnusc.fr:8104/;
- [0541] www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html;
- [0542] antibody.bath.ac.uk/;
- [0543] abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
- [0544] www.unizh.ch/~honegger/AH0seminar/Slide01.html;
- [0545] www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;
- [0546] www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
- [0547] www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html;
- [0548] www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
- [0549] www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
- [0550] www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;
- [0551] www.jerini.de/fr_products.htm;
- [0552] www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), 每个均在此整体引入作为参考。
- [0553] 如本领域已知, 此类输入序列可用于降低免疫原性, 或降低、增强或修改结合、亲和力和结合速率、解离速率、亲合力、特异性、半衰期或任何其他适宜的特征。通常, 保持部分

或全部的非人或人CDR序列,并使用人或其他氨基酸替换可变和恒定区的非人序列。抗体也可以可选地进行人源化,保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性。为了达到这一目标,可以可选地通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型来分析亲本序列和多种概念性人源化产品的方法,来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常可得,并且是本领域技术人员所熟悉的。计算机程序可用于说明和展示所选择的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构。对这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。通过这种方式,可以从共有序列和输入序列选择和组合FR残基,使得达到所希望的抗体特征,如提高对目标抗原的亲和力。一般而言,CDR残基直接且最实质性地参与影响抗原结合。本发明抗体的人源化或改造可以使用任何已知方法进行,例如但不限于Winter (Jones等, *Nature* 321:522 (1986); Riechmann等, *Nature* 332:323 (1988); Verhoeyen等, *Science* 239:1534 (1988)); Sims等, *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987); Carter等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285 (1992); Presta等, *J. Immunol.* 151:2623 (1993); 美国专利号5723323、5976862、5824514、5817483、5814476、5763192、5723323、5766886、5714352、6204023、6180370、5693762、5530101、5585089、5225539和4816567; PCT/:US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/55939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755; W090/14443、W090/144024、W090/12430和EP 229246中所述的那些,每篇文献(包括其中引用的参考文献)在此整体引入作为参考。

[0554] 抗CARM1、抗Med12或抗TDRD3抗体也可以可选地通过免疫本文所述和/或本领域已知能够产生人抗体库的转基因动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠、非人灵长类等)来产生。可以从此类动物分离产生人抗CARM1、抗Med13或抗TDRD3抗体的细胞,并使用适宜的方法(如本文所述的方法)使其永生化。

[0555] 可以通过已知方法产生能够生产与人抗原结合的人抗体库的转基因小鼠(例如但不限于授权给Lonberg等的美国专利号5770428、5569825、5545806、5625126、5625825、5633425、5661016和5789650; Jakobovits等的W0 98/50433; Jakobovits等的W0 98/24893; Lonberg等的W0 98/24884; Lonberg等的W0 97/13852; Lonberg等的W0 94/25585; Kucherlapate等的W0 96/34096; Kucherlapate等的EP 0463 151B1; Kucherlapate等的EP 0710 719A1; Surani等的美国专利号5545807; Bruggemann等的W0 90/04036; Bruggemann等的EP 0438474B1; Lonberg等的EP 0814 259A2; Lonberg等的GB 2 272 440 A; Lonberg等 *Nature* 368:856-859 (1994); Taylor等, *Int. Immunol.* 6 (4) 579-591 (1994); Green等, *Nature Genetics* 7:13-21 (1994); Mendez等, *Nature Genetics* 15:146-156 (1997); Taylor等, *Nucleic Acids Research* 20 (23):6287-6295 (1992); Tuailon等, *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (8) 3720-3724 (1993); Lonberg等, *Int Rev Immunol* 13 (1):65-93 (1995) 以及 Fishwald等, *Nat Biotechnol* 14 (7):845-851 (1996), 每篇文献在此整体引入作为参考)。通常,这些小鼠包含至少一个转基因,该转基因包含来自至少一个人免疫球蛋白基因座的DNA,该DNA在功能上发生了重排,或者可以进行功能重排。可以破坏或删除这种小鼠体内的内源免疫球蛋白基因座,以消除动物产生由内源基因编码的抗体的能力。

[0556] 利用肽展示文库可以方便地筛选与相似的蛋白质或片段特异结合的抗体。此方法涉及筛选大量肽以寻找具有所希望的功能或结构的个体成员。肽展示文库的抗体筛选为本

领域公知。所展示的肽序列长度可以是3至5000个或更多个氨基酸,经常长度为5-100个氨基酸,通常长度为约8至25个氨基酸。除了用于产生肽文库的直接化学合成法外,还描述了几种重组DNA法。一种方法涉及在噬菌体或细胞表面展示肽序列。每个噬菌体或细胞都包含编码所展示的具体肽序列的核苷酸序列。PCT专利公开号91/17271、91/18980、91/19818和93/08278中描述了这类方法。用于产生肽文库的其他系统具有体外化学合成法和重组法二者的方面。参见PCT专利公开号92/05258、92/14843和96/19256。还参见美国专利号5658754和5643768。肽展示文库、载体和筛选试剂盒可从Invitrogen (Carlsbad, Calif.) 和Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK) 等供应商处购得。参见例如转让给Enzon的美国专利号4704692、4939666、4946778、5260203、5455030、5518889、5534621、5656730、5763733、5767260、5856456;转让给Dyax的5223409、5403484、5571698、5837500;转让给Affymax的5427908、5580717;转让给Cambridge antibody Technologies的5885793;转让给Genentech的5750373;转让给Xoma的5618920、5595898、5576195、5698435、5693493和5698417;Colligan, 上文;Ausubel, 上文;或Sambrook, 上文, 上述专利和公开中的每一个均在此整体引入作为参考。

[0557] 本发明的抗体也可以通过对其乳汁中产生抗体的转基因动物或哺乳动物(如山羊、牛、马、绵羊等)施用至少一种抗CARM1、抗Med12或抗TDRD3抗体编码核酸,以在奶中制备。可以使用已知的方法提供此类动物。参见,例如但不限于美国专利号5827690;5849992;4873316;5849992;5994616;5565362;5304489等,每个专利在此整体引入作为参考。

[0558] 本发明的抗体还可以通过如下方式制备:使用至少一种抗CARM1、抗Med12或抗TDRD3抗体编码核酸,提供转基因植物和培养的植物细胞(例如但不限于烟草和玉米),以在植物部分中或在来自其的培养细胞中产生所述抗体、指定部分或变体。作为一个非限制性实例,表达重组蛋白的转基因烟草叶片已成功用于提供大量重组蛋白,例如使用诱导型启动子。参见例如Cramer等, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 240:95-118 (1999) 及其中引用的参考文献。此外,转基因玉米已用于在商业生产水平表达哺乳动物蛋白质,其生物学活性等同于在其他重组系统中产生或从天然来源纯化的蛋白质。参见例如Hood等, Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999) 及其中引用的参考文献。也已从包括烟草种子和马铃薯块茎的转基因植物种子大量产生抗体,包括抗体片段,如单链抗体(scFv)。参见例如Conrad等, Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998) 及其中引用的参考文献。因此,本发明的抗体也可以根据已知方法用转基因植物产生。还参见例如Fischer等, Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (1999年10月);Ma等, Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995);Ma等, Plant Physiol. 109:341-6 (1995);Whitelam等, Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 (1994);以及其中引用的参考文献。上述参考文献中的每一篇在此整体引入作为参考。

[0559] 本发明的抗体可以以宽范围的亲和力(KD)结合人CARM1、Med12或TDRD3。在优选实施方案中,本发明的至少一种人mAb可以可选地以高亲和力结合人CARM1、Med12或TDRD3。例如,人mAb可以以等于或小于约 10^{-7} M、例如但不限于0.1-9.9(或其中的任何范围或值) $\times 10^{-7}$ 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 或其中的任何范围或值的KD结合人CARM1、Med12或TDRD3。

[0560] 抗体对抗原的亲和力或亲合力可以使用任何适宜的方法进行实验测定。(参见例

如Berzofsky等,“Antibody-Antigen Interactions,”In Fundamental Immunology,Paul, W.E.编辑,Raven Press:New York,N.Y. (1984);Kuby,Janis Immunology,W.H.Freeman and Company:New York,N.Y. (1992);以及本文所述的方法)。如果在不同条件(例如盐浓度、pH)下测量,特定抗体-抗原相互作用的测量亲和力可以有所不同。因此,亲和力和其他抗原结合参数(例如KD、Ka、Kd)的测量优选使用抗体和抗原的标准溶液以及标准缓冲液(例如本文所述的缓冲液)进行。

[0561] 可通过众所周知的方法从重组细胞培养物回收和纯化抗CARM1、抗Med12或抗TDRD3抗体,包括但不限于蛋白A纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。高效液相色谱(“HPLC”)也可用于纯化。参见例如Colligan,Current Protocols in Immunology或Current Protocols in Protein Science,John Wiley&Sons, NY,N.Y., (1997-2001),例如第1、4、6、8、9、10章,每个均在此整体引入作为参考。

[0562] 本发明的抗体包括天然纯化的产物、化学合成过程的产物以及通过重组技术从真核宿主(包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)产生的产物。取决于重组生产过程中使用的宿主,本发明的抗体可以是糖基化的或可以是非糖基化的,优选糖基化的。许多标准实验室手册中都描述了这类方法,如Sambrook,上文,第17.37-17.42节;Ausubel,上文,第10、12、13、16、18和20章;Colligan,Protein Science,上文,第12-14章,均在此整体引入作为参考。

[0563] 典型的哺乳动物表达载体包含至少一个启动子元件(其介导mRNA转录的启动)、抗体编码序列以及转录终止和转录物多聚腺苷化所需的信号。其他元件包括增强子、Kozak序列和RNA剪接供体和受体位点侧翼的间插序列。可以用来自SV40的早期和晚期启动子、来自逆转录病毒(如GAS-6、HTLVI、HIVI)的长末端重复序列(LTRS)以及巨细胞病毒(CMV)的早期启动子达到高效转录。然而,也可以使用细胞元件(例如人肌动蛋白启动子)。适合用于实施本发明的表达载体包括例如载体pIRESneo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSN或pLNCX (Clontech Labs, Palo Alto, Calif.)、pcDNA3.1(+/-)、pcDNA/Zeo(+/-)或pcDNA3.1/Hygro(+/-) (Invitrogen)、PSVL和PMSG (Pharmacia, Uppsala, Sweden)、pGAS-6cat (ATCC 37152)、pSV2dhfr (ATCC 37146)和pBC12MI (ATCC 67109)。可以使用的哺乳动物宿主细胞包括人Hela 293、H9和Jurkat细胞、小鼠NIH3T3和C127细胞、Cos 1、Cos7和CV 1、鹌鹑QC1-3细胞、小鼠L细胞和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0564] 备选地,基因可以在含有整合到染色体中的该基因的稳定细胞系中表达。与诸如dhfr、gpt、新霉素或潮霉素的选择标记共同转染,允许鉴定和分离转染的细胞。

[0565] 转染的基因也可以扩增,以表达大量编码的抗体。DHFR(二氢叶酸还原酶)标记用于开发携带数百甚至数千个目的基因拷贝的细胞系。另一个有用的选择标记是谷氨酰胺合酶(GS) (Murphy等,Biochem. J. 227:277-279 (1991);Bebbington等,Bio/Technology 10:169-175 (1992))。利用这些标记,在选择性培养基中生长哺乳动物细胞,并选择抗性最高的细胞。这些细胞系包含整合到染色体中的扩增基因。中国仓鼠卵巢(CHO)和NS0细胞通常用于产生抗体。

[0566] 表达载体pC1和pC4包含劳氏肉瘤病毒的强启动子(LTR) (Cullen等, Molec. Cell. Biol. 5:438-447 (1985))加CMV增强子的片段(Boshart等, Cell 41:521-530

(1985))。多克隆位点,例如限制性内切酶切割位点BamHI、XbaI和Asp718便于克隆目的基因。载体中还包含大鼠前胰岛素原基因的3'内含子、多聚腺苷酸化和终止信号。

[0567] RNA干扰

[0568] 最近在生物医学研究中最重要发现之一是RNA干扰(RNAi)途径,它被细胞用来调节许多基因的活性。RNAi的原理为鉴定治疗靶标开辟了许多新的可能性。RNA干扰(RNAi)是基因组范围、高通量分析基因功能的有效工具。术语“RNA干扰”(RNAi)也称为转录后基因沉默(PTGS),指其中RNA分子抑制基因表达的生物学过程。本文所用的“RNA干扰剂”定义为通过RNA干扰作用(RNAi)干扰或抑制目标基因(例如本公开的目标基因)表达的任何活性剂。此类RNA干扰剂包括但不限于核酸分子,包括与目标基因(例如本公开的目标基因)或其片段同源的RNA分子、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA),以及通过RNA干扰作用(RNAi)干扰或抑制目标基因表达的小分子。

[0569] 在一个实施方案中,siRNA是一种小发夹(也称为茎环)RNA(shRNA)。这些shRNA由短的(例如19-25个核苷酸)反义链、随后的5-9个核苷酸的环和互补的有义链组成。备选地,有义链可以先于核苷酸环结构,反义链可以紧随其后。这些shRNA可以包含在质粒、逆转录病毒和慢病毒中。

[0570] CRISPR

[0571] “CRISPR”意指一组规律成簇间隔短回文重复,或包含这样一组重复的系统。本文所用的“Cas”指CRISPR相关蛋白。“CRISPR/Cas”系统指从CRISPR和Cas衍生的系统,其可用于沉默、增强或突变CARM1或CARM1效应基因。

[0572] 天然存在的CRISPR/Cas系统见于约40%的测序真细菌基因组和90%的测序古细菌基因组中(Grissa等2007.BMC Bioinformatics 8:172)。此系统是一类原核生物免疫系统,赋予对外来遗传元件如质粒和噬菌体等的抗性,并提供一种获得性免疫形式(Barrangou等2007.Science 315:1709-1712;Marragini等2008Science 322:1843-1845)。

[0573] CRISPR/Cas系统已改进用于真核生物(如小鼠或灵长类)的基因编辑(沉默、增强或改变特定基因)(Wiedenheft等2012.Nature 482:331-8)。这是通过将包含专门设计的CRISPR和一个或多个适宜的Cas的质粒引入真核细胞来实现的。

[0574] CRISPR序列有时称为CRISPR基因座,包含交替重复序列和间隔序列。在天然存在的CRISPR中,间隔序列通常包含细菌以外的序列,如质粒或噬菌体序列;在CRISPR/Cas系统中,间隔序列源自CARM1或CARM1效应基因序列。重复序列通常显示某种二分对称性,可以形成二级结构如发夹,并且可以是或不是回文。

[0575] 来自CRISPR基因座的RNA可以组成性表达并由Cas蛋白加工为小RNA。这些经过加工的RNA包含侧翼为重复序列的间隔序列。这些RNA引导其他Cas蛋白在RNA或DNA水平沉默外源遗传元件(Horvath等2010.Science 327:167-170;Makarova等2006Biology Direct1:7)。因此,间隔序列可以作为RNA分子的模板,类似于siRNA(Pennisi 2013.Science 341:833-836)。

[0576] 由于这些天然存在于许多不同类型的细菌中,CRISPR的精确排列以及Cas基因及其产物的结构、功能和数量因物种有所不同(Haft等2005PLoS Comput.Biol.1:e60;Kunin等2007.Genome Biol.8:R61;Mojica等2005.J.Mol.Evol.60:174-182;Bolotin等2005.Microbiol.151:2551-2561;Pourcel等2005.Microbiol.151:653-663;和Stern等

2010.Trends.Genet.28:335-340)。例如,Cse (Cas亚型,大肠杆菌)蛋白(例如CasA)形成功能复合体Cascade,将CRISPR RNA转录物加工为Cascade保留的间隔序列-重复序列单元(Brouns等2008.Science321:960-964)。在其他原核生物中,Cas6加工CRISPR转录物。大肠杆菌中基于CRISPR的噬菌体失活需要Cascade和Cas3,而不需要Cas1或Cas2。激烈热球菌(*Pyrococcus furiosus*)和其他原核生物中的Cmr (Cas-RAMP模块)蛋白与小CRISPR RNA形成能够识别和切割互补靶标RNA的功能复合物。更简单的CRISPR系统依赖于蛋白Cas9,这是一种具有两个活性切割位点的核酸酶,每个切割位点用于双螺旋的一条链。组合Cas9和改进的CRISPR基因座RNA,可用于基因编辑系统(Pennisi 2013.Science 341:833-836)。

[0577] 因此,CRISPR/Cas系统可用于编辑CARM1或CARM1效应基因(添加或缺失碱基对),例如修复受损的CARM1或CARM1效应基因(例如,如果CARM1或CARM1效应基因的损伤导致CARM1或CARM1效应基因的高或低翻译后修饰、产生、表达、水平、稳定性或活性),或引入提前终止,从而减少过量表达的CARM1或CARM1效应基因的表达。备选地,CRISPR/Cas系统可以像RNA干扰一样使用,以可逆的方式关闭CARM1或CARM1效应基因。例如,在哺乳动物细胞中,RNA可以引导Cas蛋白到CARM1或CARM1效应基因启动子,在空间上阻断RNA聚合酶。

[0578] 可以使用本领域已知的技术,例如美国专利申请号13/842859(作为US 20140068797公开)中所述的技术,产生抑制CARM1或CARM1效应基因的人工CRISPR系统。这种CARM1或CARM1效应基因抑制性CRISPR系统可以包括引导RNA(gRNA),该引导RNA包含CARM1或CARM1效应基因靶向结构域(即,与CARM1或CARM1效应基因DNA链互补的核苷酸序列)以及与RNA指导核酸酶(例如cpf1或Cas分子,例如Cas9分子)相互作用的第二结构域。

[0579] 在一些实施方案中,RNA指导核酸酶(例如cpf1或Cas分子,例如Cas9分子)与靶核酸相互作用并切割靶核酸的能力依赖于原间隔序列邻接基序(PAM)。PAM序列是靶核酸中的序列。在一些实施方案中,靶核酸的切割发生在PAM序列的上游。来自不同细菌物种的RNA指导核酸酶分子(例如cpf1或Cas分子,例如Cas9分子)可以识别不同的序列基序(例如PAM序列)。除了识别不同的PAM序列外,来自不同物种的RNA指导核酸酶(例如cpf1或Cas分子,例如Cas9分子)可通过gRNA分子定向到不同的靶序列(例如,与PAM序列相邻例如紧邻上游的靶序列),该gRNA分子包含能够与所述靶序列杂交的靶向结构域和结合该RNA指导核酸酶(例如cpf1或Cas分子,例如Cas9分子)的tracr序列。

[0580] 在一些实施方案中,CRISPR系统包含gRNA分子和来自化脓链球菌(*S.pyogenes*)的Cas9分子。化脓链球菌的Cas9分子识别序列基序NGG,并指导在该序列上游1至10,例如3至5个碱基对的位置切割靶核酸序列。与基于化脓链球菌的CRISPR系统一起使用的gRNA分子可以包含CARM1或CARM1效应基因靶向序列、以及已知与化脓链球菌相互作用的tracr序列(参见例如Mali等,SCIENCE 2013;339(6121):823-826)。

[0581] 在一些实施方案中,CRISPR系统包含gRNA分子和来自嗜热链球菌(*S.thermophilus*)的Cas9分子。嗜热链球菌的Cas9分子识别序列基序NGGNG和NNAGAAW(W=A或T),并指导在这些序列上游1至10,例如3至5个碱基对的位置切割核心靶核酸序列。与基于嗜热链球菌的CRISPR系统一起使用的gRNA分子可以包含CARM1或CARM1效应基因靶向序列、以及已知与嗜热链球菌相互作用的tracr序列(参见例如Horvath等,SCIENCE 2010;327(5962):167-170和Deveau等,J BACTERIOL 2008;190(4):1390-1400)。

[0582] 在一些实施方案中,CRISPR系统包含gRNA分子和来自金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)

的Cas9分子。金黄色葡萄球菌的Cas9分子识别序列基序NNGRR (R=A或G), 并指导在该序列上游1至10, 例如3至5个碱基对的位置切割靶核酸序列。与基于金黄色葡萄球菌的CRISPR系统一起使用的gRNA分子可以包含CARM1或CARM1效应基因靶向序列、以及已知与金黄色葡萄球菌相互作用的tracr序列(参见例如Ran F.等, NATURE, 第520卷, 2015, 186-191页)。

[0583] 在一些实施方案中, CRISPR系统包含gRNA分子和RNA指导核酸酶, 例如cpf1分子, 例如来自毛螺菌科(Lachnospiraceae)细菌的cpf1分子或来自氨基酸球菌属物种(Acidaminococcus sp.)的cpf1-分子。cpf1分子, 例如来自毛螺菌科细菌的cpf1分子或来自氨基酸球菌属物种的cpf1-分子, 识别序列基序TTN(其中N=A、T、G或C)或优选TTTN(其中N=A、T、G或C), 并指导在该PAM序列上游1-25个碱基对的位置, 例如在与该PAM相同的链上位于PAM序列上游18-19个碱基对的位置及在与PAM相反的链上位于PAM序列上游23个碱基对的位置, 切割靶核酸序列, 产生黏性末端断裂。与基于cpf1的CRISPR系统(例如利用来自毛螺菌科细菌或氨基酸球菌属物种的cpf1分子的那些系统)一起使用的gRNA分子, 可以包含CARM1或CARM1效应基因靶向序列以及与cpf1相互作用的tracr序列(参见例如Zetsche B.等, CELL, 第163卷:3, 2015年10月, 759-771)。

[0584] 核酸和氨基酸组成

[0585] 本文提供人CARM1和CARM1效应基因(如MED12和TDRD3)的核酸序列(SEQ IDNO:10-16)。表4提供人CARM1和CARM1效应基因(如MED12和TDRD3)的氨基酸序列列表。

[0586] 表4

[0587]

基因	人氨基酸序列
CARM1 同种型 1 (SEQ ID NO. 1)	MAAAAAAVGPGAGGAGSAVPGGAGPCATVSVFPGARLLTIGDANGEIQRHAEQQALRLE VRAGPDSAGIALYSHEDVCVFKCSVSRETECSRVGKQSFITLGCNSVLIQFATPNDFCSFY NILKTCRGHTLERSVFSERTEESSAVQYFQFYGYLSQQQNMMDYVRTGTYQRAILQNHT DFKDKIVLDVGCGSGILSFFAAQAGARKIYAVEASTMAQHAENVLVKSNNLTDRIVVIPGKV EEVSLPEQVDIISEPMGYMLFNERMLESYLHAKKYLKPSGNMFPTIGDVHLAPFTDEQLY MEQFTKANFWYQPSFHGVDLSALRGA AVDEYFRQP VVDTFDIRILMAKSVKYTVNFLEA KEGDLHRIEIPFKFHMLHSGLVHGLAFWFDVAFIGSIMTVWLSTAPTEPLTHWYQVRCLFQ SPLFAKAGDTLSGTCLLIANKRQSYDISIVAQVDQGTGSKSSNLLDLKNPFFRYTGTTSPPPP GSHYTSPSENMWNTGSTYNLSSGMAVAGMPTAYDLSSVIASGSSVGHNNLIPLGSSGAQG SGGGSTSAHYAVNSQFTMGGPAISMASPMSIPTNTMHYGS (SEQ ID NO. 1)
CARM1 同种型 2 (SEQ ID NO. 2)	MAAAAAAVGPGAGGAGSAVPGGAGPCATVSVFPGARLLTIGDANGEIQRHAEQQALRLE VRAGPDSAGIALYSHEDVCVFKCSVSRETECSRVGKQSFITLGCNSVLIQFATPNDFCSFY NILKTCRGHTLERSVFSERTEESSAVQYFQFYGYLSQQQNMMDYVRTGTYQRAILQNHT DFKDKIVLDVGCGSGILSFFAAQAGARKIYAVEASTMAQHAENVLVKSNNLTDRIVVIPGKV EEVSLPEQVDIISEPMGYMLFNERMLESYLHAKKYLKPSGNMFPTIGDVHLAPFTDEQLY MEQFTKANFWYQPSFHGVDLSALRGA AVDEYFRQP VVDTFDIRILMAKSVKYTVNFLEA KEGDLHSACLASPAATALCLPG (SEQ ID NO. 2)
CARM1 同种型 3 (SEQ ID NO. 3)	MAAAAAAVGPGAGGAGSAVPGGAGPCATVSVFPGARLLTIGDANGEIQRHAEQQALRLE VRAGPDSAGIALYSHEDVCVFKCSVSRETECSRVGKQSFITLGCNSVLIQFATPNDFCSFY NILKTCRGHTLERSVFSERTEESSAVQYFQFYGYLSQQQNMMDYVRTGTYQRAILQNHT DFKDKIVLDVGCGSGILSFFAAQAGARKIYAVEASTMAQHAENVLVKSNNLTDRIVVIPGKV EEVSLPEQVDIISEPMGYMLFNERMLESYLHAKKYLKPSGNMFPTIGDVHLAPFTDEQLY MEQFTKANFWYQPSFHGVDLSALRGA AVDEYFRQP VVDTFDIRILMAKSVKYTVNFLEA KEGDLHRIEIPFKFHMLHSGLVHGLAFWFDVAFIGSIMTVWLSTAPTEPLTHWYQVRCLFQ SPLFAKAGDTLSGTCLLIANKRQSYDISIVAQVDQGTGSKSSNLLDLKNPFFRYTGTTSPPPP GSHYTSPSENMWNTGSTYNLSSGMAVAGMPTAYDLSSVIASGSSVGHNNLIPLANTGIVN HTHSRMGSIMSTGIVQGSSGAQSGGGGSTSAHYAVNSQFTMGGPAISMASPMSIPTNTMH YGS (SEQ ID NO. 3)
TDRD3 同种型 1 (SEQ ID NO. 4)	MLRLQMTDGHISCTAVEFSYMSKISLNTPPGTVKLSGIVDIKNGFLLNDSNTTVLGGEV EHLIEKWELQRSLSKHNRNIGTEGGPPFPVFGQKCVSHVQVDSRELDRLKTLQVTMPV KPTNDNDEFKQRTAAIAEVAKSKEKTFGGGGGGARSNLNMNAAGNRNREVLQKEKST KSEKHEGVYRELVDEKALKHITEMGFSKEASRQALMDNGNLEAALNVLLTSNKQKPV MGPPLRGRGKGRGRIRSEDEEDLGNARPSAPSTLFDLFESKMGTNLNVEEPKSPQQLHQG QYRSSNTEQNGVKDNNHLRHPPRNDTRQPRNEKPPRFQRDSQNSKSVLEGSGLPRNRGSE RPSTSSVSEVWAEDRIKCDRPPYSRYDRTKDTSYPLGSQHSQSDGAFKKRDNSMQSRSGKGPS FAEAKENPLPQGSVDYNNQKRGKRESQTSIPDYFYDRKSQTINNEAFSGIKIEKHFNVTND YQNPVRSNSFIGVPNGEVEMPLKGRRIGPIKAGPVTAVPCDDKIFYNSGPKRRSGPIKPEKI LESSIPMEYAKMWKPGDECFAFYWEDNKFYRAEVEALHSSGMTAVVKFIDYGNVEEVL SNIKPIQTEAWEEEGTYDQTFLEFRGGDGQPRRSTRPTQQFYQPPRARN (SEQ ID NO. 4)
TDRD3 同种型 2 (SEQ ID NO. 5)	MLRLQMTDGHISCTAVEFSYMSKISLNTPPGTVKLSGIVDIKNGFLLNDSNTTVLGGEV EHLIEKWELQRSLSKHNRNIGTEGGPPFPVFGQKCVSHVQVDSRELDRLKTLQVTMPVK PTNDNDEFKQRTAAIAEVAKSKEKTFGGGGGGARSNLNMNAAGNRNREVLQKEKSTK SEKHEGVYRELVDEKALKHITEMGFSKEASRQALMDNGNLEAALNVLLTSNKQKPV MGPPLRGRGKGRGRIRSEDEEDLGNARPSAPSTLFDLFESKMGTNLNVEEPKSPQQLHQG QYRSSNTEQNGVKDNNHLRHPPRNDTRQPRNEKPPRFQRDSQNSKSVLEGSGLPRNRGSE RPSTSSVSEVWAEDRIKCDRPPYSRYDRTKDTSYPLGSQHSQSDGAFKKRDNSMQSRSGKGPS FAEAKENPLPQGSVDYNNQKRGKRESQTSIPDYFYDRKSQTINNEAFSGIKIEKHFNVTND YQNPVRSNSFIGVPNGEVEMPLKGRRIGPIKAGPVTAVPCDDKIFYNSGPKRRSGPIKPEKI

[0588]

	LESSIPMEYAKMWKPGDECFALYWEDNKFYRAEVEALHSSGMTAVVKFIDYGNVEEVLL SNIKPIQTEAWEEEGTYDQTFEFRGGDQPRRSTRPTQQFYQPPRARN (SEQ ID NO. 5)
TDRD3 同种型 3 (SEQ ID NO. 6)	MAQVAGAALSQAGWYLSDEGIEACTSSDPKVNVDIILALNTDLRTIGKKFLPSDINSBK VEKLEGPCVLQIQKIRNVAAPKDNEESQAAPRMLRLQMTDGHISCTAVEFSYMSKISLNT PGTKVKLSGIVDIKNGFLLNDSNTTVLGGEVEHLIEKWELQRSLSKHNRSNIGTEGGPPP FVPFGQKCVSHVQVDSRELDRLQVTMPVKPTNDNDEFKQRTAAIAEVAKSKEKTF GGGGGGARSNLNMNAAGNRNREVLQKEKSTKSEKHEGVYRELVEKALKHITEMGFS KEASRQALMDNGNLEAALNVLLTSNKQKPVMPPLRGRGKGRGRIRSEDEEDLGNARP SAPSTLDFLESKMGTNLNVEEPKSPQQLHQGQYRSSNTEQNGVKDNNHLRHPNRDTR QPRNEKPPRFQRDSQNSKSVLESGPLPRNRGSRPSTSSVSEVWAEDRIKCDRPSRYDRT KDTSYPLGSQHSQDGAFFKRDNSMQSRSGKGPSFAEAKENPLPQGSVDYNNQKRGKRESQ TSIPDYFYDRKSQTINNEAFSGIKIEKHFVNNTDYQNPVRSNSFIGVNPGEVEMPLKGRRI PIKPAGPVTAVPCDDKIFYNSGPKRRSGPIKPEKILESSIPMEYAKMWKPGDECFALYWEDN KFYRAEVEALHSSGMTAVVKFIDYGNVEEVLLSNIKPIQTEAWEEEGTYDQTFEFRGGD QPRRSTRPTQQFYQPPRARN (SEQ ID NO. 6)
MED1 同 种型 1 (MED12 SEQ ID NO. 7)	MAAFGILSYEHRPLKRPLRGPPDVYPQDPKQKEDELTAALNVKQGFNNQPAVSGDEHGS AKNVSFNPAKISSNFSSIIAEKLRCLNTLPDTRGRKPQVNQKDNFWLVTARSQSAINTWFTDLA GTKPLTQLAKKVPIFSKKEEVFGYLAQYTPVPMRAAWLIKMTCAYYAAISETKVKKRHV DPFMEWTQIITKYLWEQLQKMAEYYRPGPAGSGGCGSTIGPLPHDVEVAIRQWDYTEKLA MFMFQDGMGLDRHEFLTWVLECFEKIRPGEDELLKLLPLLLRYSGEFVQSAYLSRRLAYF CTRRLALQLDGVSSHSHVISAQSTSTLPTTAPAPQPTSTPSTPFDLLMCPQHRPLVFLS CILQTILLCCPSALVWHYSLTDSRIKTGSPDLHLPIAPSNLPMPEGNSAFTQQVRAKLREIEQ QIKERGQAVEVRWSFDKCKEATAGFTIGRVLHTLEVLDSSHFSERSDFSNSLDSLNRIFGLG PSKDGHEISSDDDAVVSLLCEWAVSCKRSGRHRAMVVAKLLEKRAEIEAERCGESEAAD EKGSIASGSLSAPSAPIFQDVLQFLDTQAPMLTDPRSESEVEFFNLVLLFCELIRHDFVFSH NMYTCTLISRGLAFGAPGRPPSPFDDPADDPEHKEAEGSSSSKLEDPLGESMDIDPSSS VLFEDMEKPDFSLFSPTMPCEGKGSPEKPDVEKEVKPPPKEKIEGLTGLVLDQPRHVQY ATHFPIQEECSHECNQRLVVLFGVGKQRDDARHAIKKITKDILKVLNRKGTAEQDQLAP IVPLNPGDLTFLGGEDGQRRRRNRPEAFPTAEDIFAKFQHLSHYDQHQTAVQSRNVLEQI TSFALGMSYHLPLVQHVFIFDLMEYSLSISGLIDFAIQLLNELSVVEAELLKSSDLVGSYT TSLCLCIVAVLRHYHACLILNQDQMAQVFEGLCGVVKHGMNRSQGSSAERCILAYLYDLY TSCSHLKNKFGELFSDFCSKVKNITYCNVEPSESNNMRWAPEFMIDTLENPAHTFTYTGLG KSLSENANRYSFVCNALMHVCVGHHDPRVDNDAILCAELTGYCKSLSAEWLGVLKALC CSSNNGTCGFNDLLCNVDVSDLSFHDSLATFVAILIARQCILLLEDLIRCAAIPSLNNAACSE QDSEPGARLTCRILLHLFKTPQLNPCQSDGNKPTVGIRSSCDRHLLAASQNRIVDGAFAVL KAVFVLGDAELKGSQFTVTGGTEELPEEEGGGSGGRRQGGRRNISVETASLDVYAKYVLR SICQEWVGERCLSLCEDSNLDQDPVLSSAQARLMQLICYPHRLDNDGEDENPQRQRI KRILQNLQWTMRQSSLELQLMIKQTPNNEMNSLLENIAKATIEVFQQAETGSSSGSTAS NMPSSSKTKPVLSSLSERSGVWLVAPLIAKLPTSVQGHVLAAGEELEKQHLGSSSRKER DRQKQKSMSSLSQQPFLSLVLTCLKGQDEQREGLTSLYSQVHVQIVNNWRDDQYLDCK PKQLMHEALKRLNLVGGMFDTVQRSTQQTTEWAMLLLEIISGTVDMQSNNELFTTVLD MLSVLINGTLAADMSSISQGSMEENKRAYMNLAKKLQKELGERQSDLEKVRQLPLPK QTRDVITCEPQGLIDTKGNKIAGFDSIFKKEGLQVSTKQKISPWDLFEGLKPSAPLSWGW FGTVRVDRRVARGEEQQRLLLYHTLRLPRPRAYYLEPLPLPPEDEEPPAPTLLPEKKAPEP PKTDKPGAAPPSTEERKKKSTKGKKRSQPATKTEDYGMGPGRSGPYGVTVPDILLHHPNP GSITHLNYRQGSIGLYTQNPPLPAGGPRVDPRPVRPLPMQKLPTPTYPGVLPPTMTGVM GLEPSSYKTSVYRQQQPAVPQGGRLRQQLQSSQGMGLQSSVHQMTPESSSYGLQTSQGYT PYVSHVGLQHTGPAGTMVPPSYSSQPYQSTHPSTNPTLVDPTRLHQQRPSGYVHQAPT YGHGLTSTQRFHQTLQTPMISTMTPMASQGVQAGVRSSTAILPEQQQQQQQQQQQQQ QQQQQQQQQQQYHIRQQQQQQQILRQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQHQQQQ QQQAAPPQPQPSQPQFQRQGLQQTQQQQQTAALVRQLQQQLSNTQPQPSNIFGRY

[0589]

	(SEQ ID NO. 7)
MED12 同种型 2 (MED12 SEQ ID NO. 8)	MAAFGILSYEHRPLKRPRLGPPDVYPQDPKQKEDELTA LVKQGFNNQPAVSGDEHGS AKNVSFNP AKISSNFSSIIAEKLR CNTLPDTGRRKPQVNQKDNFWLVTARSQSAINTWFTDLA GTKPLTQLAKKVPIFSKKEEVFGYLAKYTVPMRAAWLIKMTCA YAAISETKVKKRHVDPFMEWTQIITKYLWEQLQKMAEYRPGPAGSGGCGSTIGPLPHDVEVAIRQWDYTEKLA MFMFQDGMGLDRHEFLT WVLECFEKIRPGEDELLKLLPLLLRYSGEFVQSAYLSRRLAYF CTRRLALQLDGVSSHSHVISAQSTSTLPTTPAPQPPTSSTPSTPFS DLLMCPQHRPLVFGLS CILQTILLCCPSALVWHYSLTDSRIKTGSPLDHLPIAPSNLPMPEGNSAFTQQVRAKLREIEQ QIKERGQAVEVRWSFDKCKEATAGFTIGRVLHTLEVLD SHSFERSDFSNSLDSL CNRIFGLG PSKDGHEISSDDDAVVSLLCEWAVSCKRSGRHRAMV VAKLLEKRAEIEAERCGESEAAD EKGSIASGSLSAPSAPIFQDVLLQFLDTQAPMLTDP RSESEERVEFFNLVLLFCELIRHDFVSH NMYTCTLISRGD LAFGAPGRPPSPFDDPADDPEHKEAEGSSSSKLEDPGLSE SMDIDPSSSVLFEDMEKPDFSLFSPTMPCEGKGSPSPEKPDVEKEVK PPPKEKIEGTLGVLYDQPRHVQY ATHFPIQEECSHECNQRLVVLFVGVGKQRDDARHAIKKITK DILKVLNRKGTAE TDQLAPIVPLNPGDLTFLGGEDGQKRRRNRPEAFPTAEDIFAKFQHL SHYDQHQVTAQVSRNVLEQI TSFALGMSYHLPLVQHVQFIFDLMEYSL SISGLIDFAIQLLNELSVVEAELLKSSDLVGSYT TSLCLCIVAVLRHYHACLILNQDMAQVFEGLCGVVKHGMNRSDGSSAERCILAYLYDLY TSCSHLKNKFGELFSDFC SKVKNTIYCNVEPSES NMRWAPEFMIDTLENPA AHTFTYTGLG KSLSEN PANRYSFVCNALMHVCVGHHD PDRVNDIAILCAELTGYCKSL SAEWLGVLKALC CSSNNGTCGFNDLLCNVDVSDLSFHD SLATFVAILIARQC LLEDLIRCA AIPSLNNAACSE QDSEPGARLT CRILLHLFKTPQLNPCQSDGNKPTVGIRSSCDRHLLAASQNRIVDGA VFAVLKAVFVLGDAELKGS GFTVTGTEELPEEEGGGSGGRRQGGRRNISVETASLDVYAKYVLR SICQGEWVGERCLKSLCEDSN DLQDPVLSSAQARLMQLICYPHRLLDNEDGENPQRQRI KRILQNL DQWTMRQSSLELQLMIKQTPNNEMNSLLENIAKATIEVFQQAETGSSSGSTAS NMPSSSKTKPVLSSLSERSGVWLVAPLIAKLPTS VQGHVLKAAGEELEKQHLGSSSRKER DRQKQKSMSLLSQPFSLVLTCLKGQDEQREGLLTS SLYSQVHQIVNNWRDDQYLD DCKPKQLMHEALKRLNLVGGMFDTVQRSTQQTTEWAMLLLEIIISGT VDMQSNNELFTTVLD MLSVLINGTLAADMSSISQGSMEENKRAYMNLAKKLQKELGERQSDSLEKVRQLLPLPK QTRDVITCEPQGLIDTKGNKIAGFDSIFKKEGLQVSTKQKIS PDLFEGLKPSAPLSWGWF GTVRVDRRVARGEEQQRLLLYHTLRRPRAYYLEPLPLPEDEEPPAPT LLEPEKKAPEPKTDKPGAAPPSTEERKKKSTKGKKRSQ PATKTEDYGMGPGRSGPYGVTVPD LLHHPNP KSITHLN YRQSGISGLYTQNPPLPAGGPRVDPYRPVRLPMQKLPT RPTYPGVLP TTMTGVMGLEPSSYKTSVYRQQQPAVPQGQRLRQQLQAKIQSQGMLGQSSVHQMT PSSSYGLQTSQG YTPYVSHVGLQQHTGPAGTMVPPSYSSQPYQSTHPS TNPTLVDPTRHLQQRPSGYVHQQA PTYGHGLTSTQRF SHQTLQQTTPMISTMT PMSAQGVQAGV RSTAILPEQQQQQQQQQQQ QQQQQQQQQQQQQYHIRQQQQQQILRQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ QQQQQAAPPQPQPSQPQFQRQGLQQTQQQQQTAALVRQLQQQLSNTQPQ PSTNIFGRY (SEQ ID NO. 8)
MED12 同种型 3 (MED12 SEQ ID NO. 9)	MAAFGILSYEHRPLKRPRLGPPDVYPQDPKQKEDELTA LVKQGFNNQPAVSGDEHGS AKNVSFNP AKISSNFSSIIAEKLR CNTLPDTGRRKPQVNQKDNFWLVTARSQSAINTWFTDLA GTKPLTQLAKKVPIFSKKEEVFGYLAKYTVPMRAAWLIKMTCA YAAISETKVKKRHVDPFMEWTQIITKYLWEQLQKMAEYRPGPAGSGGCGSTIGPLPHDVEVAIRQWDYTEKLA MFMFQDGMGLDRHEFLT WVLECFEKIRPGEDELLKLLPLLLRYSGEFVQSAYLSRRLAYF CTRRLALQLDGVSSHSHVISAQSTSTLPTTPAPQPPTSSTPSTPFS DLLMCPQHRPLVFGLS CILQTILLCCPSALVWHYSLTDSRIKTGSPLDHLPIAPSNLPMPEGNSAFTQQVRAKLREIEQ QIKERGQAVEVRWSFDKCKEATAGFTIGRVLHTLEVLD SHSFERSDFSNSLDSL CNRIFGLG PSKDGHEISSDDDAVVSLLCEWAVSCKRSGRHRAMV VAKLLEKRAEIEAERCGESEAAD EKGSIASGSLSAPSAPIFQDVLLQFLDTQAPMLTDP RSESEERVEFFNLVLLFCELIRHDFVSH NMYTCTLISRGD LAFGAPGRPPSPFDDPADDPEHKEAEGSSSSKLEDPGLSE SMDIDPSSSVLFEDMEKPDFSLFSPTMPCEGKGSPSPEKPDVEKEVK PPPKEKIEGTLGVLYDQPRHVQY ATHFPIQEECSHECNQRLVVLFVGVGKQRDDARHAIKKITK DILKVLNRKGTAE TDQLAPIVPLNPGDLTFLGGEDGQKRRRNRPEAFPTAEDIFAKFQHL SHYDQHQVTAQVSRNVLEQI

[0590]

TSFALGMSYHLPLVQHVFIFDLMEYSLSSISGLIDFAIQLLNELSVVEAELLKSSDLVGSYT
 TSLCLCIVAVLRHYHACLILNQDQMAQVFEGLCGVVKHGMNRSBGSSAERCILAYLYDLY
 TSCSHLKNKFGELFSDFC SKVKN TIYCNVEPSES NMRWAPEFMIDTLENPA AHFTY TGLG
 KSLSEN PANRYSFVCNALMHVCVGHHD PDRVNDIAILCAELTGYCKSLSAEWLGVLKALC
 CSSNNGTCGFNDLLCNVDVSDLSFHDSLATFVAILIARQCLLLEDLIRCAAIPSLNNAACSE
 QDSEPGARLT CRILLHLFKTPQLNPCQSDGNKPTVGIRSSCDRHLLAASQNRIVDGAVFAVL
 KAVFVLGDAELKSGSFTVTGGTEELPEEEGGGSGGRRQGGRNISVETASLDVYAKYVLR
 SICQEWVGERCLKSLCEDSNLDQDVLSSAQRLMQLICYPHRLLDNEDGENPQRQRI
 KRILQNLQDWTMRQSSLELQLMIKQTPNNEMNSLLENIAKATIEVFQQAETGSSSGSTAS
 NMPSSSKTKPVLSSSLERSGVWLVAPLIAKLPTSVQGHVKAAGEELEKQHLGSSSRKER
 DRQKQKSMSLLSQPFSLVLTCLKGQDEQREGLTSLYSQVHQIVNNWRDDQYLD DCK
 PKQLMHEALKRLRLNLVGGMFDTVQRSTQQTTEWAMLLLEIIISGTVDMQSNNELFTTVLD
 MLSVLINGTLAADMSSISQGSMEENKRAYMNLAKKLQKELGERQSDSLEKVRQLPLPK
 QTRDVITCEPQGLIDTKGNKIAFGDSIFKKEGLQVSTKQKISPWDLFEGLKPSAPLSWGW
 FGTVRVDRRVARGEEQQRLLLYHHLRPRPRAYYLEPLPLPPEDEEPPAPTLLPEKKAPEP
 PKTDKPGAAPPSTEERKKKSTKGKKRSQPATKTEDYGMGPGRSGPYGVTVPPDLLHHPNP
 GSITHLNYRQGSIGLYTQNQPLPAGGPRVDPYRPVRLPMQKLPTRPTYPGVLPPTMTGVM
 GLEPSSYKTSVYRQQPAVPQGGRLRQQLQSQGMLGQSSVHQMT PSSSYGLQTSQGYTP
 YVSHVGLQQHTGPAGTMVPPSYSSQPYQSTHPSTNPTLVDPTRHLQQRPSGYVHQAPT
 GHGLTSTQRFSHTLQQTTPMISTMTMPMSAQGVQAGVRSTAILPEQQQQQQQQQQQQQQQ
 QQQQQQQQQQYHIRQQQQQQILRQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQHQQQQQ
 QQAAPPQPQPSQPQFQRQGLQQTQQQQQTAALVRQLQQQLSNTQPQPSTNIFGRY (SEQ
 ID NO. 9)

[0591] 嵌合抗原受体

[0592] 在一些情况下,本公开提供包含针对肿瘤细胞抗原的抗原结合结构域的嵌合抗原受体(CAR)。CAR是一种人工构建的包含识别肿瘤细胞抗原的胞外部分(例如抗体的抗原结合结构域(scFv))、源自T细胞受体的胞质信号传导结构域和共刺激结构域的杂合蛋白或多肽。(Kalos M等,Sci Transl Med.2011年8月10日;3(95))。Kalos等人描述了靶向CD19的CAR T细胞的产生,并证明了CAR修饰的T细胞在慢性淋巴细胞白血病患者中介导有效的抗肿瘤作用。CAR的特征包括其利用单克隆抗体的抗原结合特性,以非MHC限制性方式将T细胞特异性和反应性重定向到选定靶标的能力。CAR修饰的T细胞具有在体内复制和长期持续存在的潜力,允许持久的肿瘤控制而无需反复输注抗体。(Kalos M等,Sci Transl Med.2011年8月10日;3(95))。非MHC限制性抗原识别赋予表达CAR的T细胞独立于抗原加工识别抗原的能力,从而绕过肿瘤逃逸的主要机制。此外,当在T细胞中表达时,CAR有利地不与内源T细胞受体(TCR)α和β链二聚化。W02014/201021、W02012/079000和W02012/099999以及Milone等2009Mol. Ther. 17:1453中详细描述了CAR修饰的T细胞,其在此引入作为参考。

[0593] CAR将识别所靶向的抗原的分子的结合部位(即“抗原结合结构域”)与负责启动导致淋巴细胞激活的信号转导的常规免疫受体的一个或多个结构域(例如“刺激结构域”或“信号发放结构域”)结合。

[0594] 在一些实施方案中,所使用的结合部分源自对所靶向的肿瘤抗原具有高亲和力的单克隆抗体(mAb)的Fab(抗原结合)片段的结构。由于Fab是两个基因的产物,相应的序列通常通过短接头片段组合,该短接头片段允许重链折叠在轻链衍生肽上形成为其天然构型,产生单链片段可变(scFv)区。

[0595] Fv或(scFv)抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单条多肽链中。通常,Fv多肽还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成抗原结合所需的结构。

[0596] 在一些实施方案中,所使用的结合部分衍生自源自T细胞受体和共刺激分子的胞质信号传导结构域。

[0597] 在一些实施方案中,CAR的信号传导部分通常包含TCR/CD3复合物的 ζ 链、或不太常见地,免疫球蛋白受体Fc ϵ RI的 γ 链或CD3 ϵ 链的胞内结构域,其中跨膜区源自同一分子。

[0598] 在一些方面,CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域、刺激结构域和共刺激结构域。本公开的其他实施方案提供相关核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体、抗体或其抗原结合部分、以及与本公开的CAR相关的药物组合物。

[0599] 在一个方面,抗原结合结构域结合肿瘤细胞抗原。本文所用的术语“肿瘤细胞抗原”或“肿瘤抗原”指,由肿瘤表达的能够诱导免疫反应的任何多肽。肿瘤抗原的非限制性实例包括,例如,前列腺特异性膜抗原(PSMA)、癌胚抗原(CEA)、CD19、CD20、CD22、ROR1、间皮素、CD333/IL3Ra、c-Met、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1TCR、ERBB2、BIRC5、CEACAM5、WDR46、BAGE、CSAG2、DCT、MAGED4、GAGE1、GAGE2、GAGE3、GAGE4、GAGE5、GAGE6、GAGE7、GAGE8、IL13RA2、MAGEA1、MAGEA2、MAGEA3、MAGEA4、MAGEA6、MAGEA9、MAGEA10、MAGEA12、MAGEB1、MAGEB2、MAGEC2、TP53、TYR、TYRP1、SAGE1、SYCP1、SSX2、SSX4、KRAS、PRAME、NRAS、ACTN4、CTNNB1、CASP8、CDC27、CDK4、EEF2、FN1、HSPA1B、LPGAT1、ME1、HHAT、TRAPPC1、MUM3、MYO1B、PAPOLG、OS9、PTPRK、TPI1、ADFP、AFP、AIM2、ANXA2、ART4、CLCA2、CPSF1、PPIB、EPHA2、EPHA3、FGF5、CA9、TERT、MGAT5、CEL、F4.2、CAN、ETV6、BIRC7、CSF1、OGT、MUC1、MUC2、MUM1、CTAG1A、CTAG2、CTAG、MRPL28、FOLH1、RAGE、SFMBT1、KAAG1、SART1、TSPYL1、SART3、SOX10、TRG、WT1、TACSTD1、SILV、SCGB2A2、MC1R、MLANA、GPR143、OCA2、KLK3、SUPT7L、ARTC1、BRAF、CASP5、CDKN2A、UBXD5、EFTUD2、GPNMB、NFYC、PRDX5、ZUBR1、SIRT2、SNRPD1、HERV-K-MEL、CXorf61、CCDC110、VENTXP1、SPA17、KLK4、ANKRD30A、RAB38、CCND1、CYP1B1、MDM2、MMP2、ZNF395、RNF43、SCRN1、STEAP1、707-AP、TGFB2、PXDNL、AKAP13、PRTN3、PSCA、RHAMM、ACPP、ACRBP、LCK、RCVRN、RPS2、RPL10A、SLC45A3、BCL2L1、DKK1、ENAH、CSPG4、RGS5、BCR、BCR-ABL、ABL-BCR、DEK、DEK-CAN、ETV6-AML1、LDLR-FUT、NPM1-ALK1、PML-RARA、SYT-SSX1、SYT-SSX2、FLT3、ABL1、AML1、LDLR、FUT1、NPM1、ALK、PML1、RARA、SYT、SSX1、MSLN、UBE2V1、HNRPL、WHSC2、EIF4EBP1、WNK2、OAS3、BCL-2、MCL1、CTSH、ABCC3、BST2、MFGE8、TPBG、FMOD、XAGE1、RPSA、COTL1、CALR3、PA2G4、EZH2、FMNL1、HPSE、APC、UBE2A、BCAP31、TOP2A、TOP2B、ITGB8、RPA1、ABI2、CCNI、CDC2、SEPT2、STAT1、LRP1、ADAM17、JUP、DDR1、ITPR2、HMOX1、TPM4、BAAT、DNAJC8、TAPBP、LGALS3BP、PAGE4、PAK2、CDKN1A、PTHLH、SOX2、SOX11、TRPM8、TYMS、ATIC、PGK1、SOX4、TOR3A、TRGC2、BTBD2、SLBP、EGFR、IER3、TTK、LY6K、IGF2BP3、GPC3、SLC35A4、HSMD、H3F3A、ALDH1A1、MFI2、MMP14、SDCBP、PARP12、MET、CCNB1、PAX3-FKHR、PAX3、FOXO1、XBP1、SYND1、ETV5、HSPA1A、HMHA1、TRIM68及其任何组合。

[0600] 表达CAR的T细胞通常称为CAR T细胞。表达CAR的T细胞在本文中称为CAR T细胞或CAR修饰的T细胞。在一些实施方案中,可对细胞进行遗传修饰以在其表面稳定表达抗体结合结构域,从而赋予对各种癌细胞的新抗原特异性。在一些情况下,对T细胞进行遗传修饰以稳定表达CAR,该CAR将特异性抗体的抗原识别结构域与胞内刺激结构域(例如信号传导结构域)结合。因此,除了抗原结合结构域外,CAR还可以包含TCR/CD3复合物 ζ 链、免疫球蛋白受体Fc ϵ RI26、27的 γ 链或CD3 ϵ 链的胞内结构域,CAR也可以包含来自相同分子或其他I型跨膜蛋白(如CD4、CD8和CD28)的跨膜区。

[0601] 在一个实施方案中,本公开的CAR包含具有抗原识别结构域的胞外结构域、跨膜结构域和胞质结构域。

[0602] 在一个实施方案中,使用与CAR中的结构域之一天然相关的跨膜结构域。在另一个实施方案中,胞质结构域可设计为包含刺激结构域和共刺激结构域。

[0603] CAR可以包含共刺激分子如CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、Lck、ICOS或DAP10的胞质内部分。

[0604] 本公开还涉及过继细胞治疗 (ACT) 的策略。ACT是一种对患者施用治疗性淋巴细胞来治疗癌症的方法。这种方法需要离体产生肿瘤特异性T细胞淋巴细胞,并将其输注给患者。除了淋巴细胞输注外,还可以以其他方式对宿主进行操作,以支持T细胞的摄取及其免疫反应,例如,(用放射或化学治疗)对宿主进行预处理并施用淋巴细胞生长因子(如IL-2)。用于产生这种肿瘤特异性淋巴细胞的一种方法涉及抗原特异性T细胞的扩增。在一些实施方案中,抗原可以是存在于癌细胞中的抗原、癌细胞、癌症细胞片段、肿瘤抗原、 α -galcer、抗CD3、抗CD28、抗IgM、抗CD40、病原体、减毒病原体或其部分。

[0605] 在一个实施方案中,本公开涉及,产生具有如本文所述降低的Carm1基因表达和/或Carm1蛋白活性以及靶向肿瘤抗原的期望CAR的T细胞。可通过将编码所希望的CAR的载体(例如质粒、慢病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体)引入细胞来产生修饰的T细胞。在另一个实施方案中,T细胞包含抑制Carm1基因表达和/或Carm1蛋白活性的一种或多种抑制剂以及所希望的针对肿瘤抗原的CAR。修饰的T细胞能够在体内复制,导致长期持续存在,从而可以导致肿瘤控制。

[0606] 在一个方面,本公开提供治疗癌症的方法,其包括施用能够沉默抑制T细胞功能的基因的组合物。在一个实施方案中,该方法涉及施用具有降低的Carm1基因表达和/或Carm1蛋白活性以及所希望的针对肿瘤抗原的CAR的T细胞。

[0607] 应理解,虽然已经结合详细描述对本公开进行了描述,但上述描述旨在举例说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围定义。其他方面、优势和修改在以下权利要求书的范围之内。

[0608] 将在以下实施例中进一步描述本发明,这些实施例不限制权利要求书中描述的本发明的范围。

实施例

[0609] 实施例1.发现Carm1是肿瘤浸润T细胞的负调节因子

[0610] 进行了肿瘤特异性T细胞的体内CRISPR/Cas9筛选,以发现抗肿瘤免疫的负调节因子。利用慢病毒载体将靶向表观遗传调节因子的gRNA文库递送入CD8⁺ T细胞。这些T细胞来源于Cas9和OT-I T细胞受体 (TCR) 转基因小鼠,从而产生具有确定抗原特异性的基因编辑T细胞文库(图1A)。使用三个gRNA库(5个gRNA/基因加上100个阴性对照gRNA)评价了总计426个代表经注释的表观遗传调节因子的基因。将经编辑的T细胞转移至具有皮下B16F10黑色素瘤的免疫活性小鼠,该黑色素瘤表达所述OT-I TCR识别的Ova抗原。靶向关键负调节因子,增强了肿瘤内的T细胞增殖/存活,从而导致相应gRNA的富集。10天后,通过对分离自肿瘤或对照器官(脾脏)的T细胞中的gRNA盒进行深度测序,定量了gRNA的表现。靶阳性对照基因Pdcd1和Cblb(分别编码PD-1和Cbl-b蛋白)的gRNA,在三个库的每一个中,都是最靠前

的富集gRNA,证明可以可重复地鉴定出关键负调节因子(图1B-1C)。初步筛选中最靠前的命中物是Carm1基因,该基因编码精氨酸甲基转移酶,该酶在组蛋白H3(H3R17和H3R26残基)和其他核蛋白中引入不对称二甲基化。这种作用是Carm1特有的,未见于编码其他精氨酸甲基转移酶的基因:虽然靶向Carm1的gRNA相对于脾脏在肿瘤浸润T细胞中富集,但靶向Prmt1、Prmt2、Prmt5和Prmt6的gRNA耗竭;此外,未观察到靶向Prmt3、Prmt7和Prmt8的gRNA富集。用代表31个最靠前的候选基因、两个阳性对照基因(Pdcd1和Cblb)和一组对照gRNA的靶向gRNA文库,验证了这些结果。在此验证筛选中Carm1再次被鉴定为最靠前的命中物(图8A)。

[0611] 通过用由Cas9蛋白和结合的gRNA组成的核糖核蛋白复合物(RNP)电穿孔OT-I T细胞,产生了Carm1-KO T细胞用于功能性实验。如使用两种不同的gRNA编辑后通过基因组DNA测序和Carm1蛋白丢失所证实的,这种瞬时编辑程序是有效的(图8B-8C)。细胞毒性测定证明,与对照编辑T细胞相比,Carm1-KO T细胞在杀伤B16F10-Ova黑色素瘤细胞方面更有效(图1D和图8D-8F)。与B16F10-Ova肿瘤细胞共培养后,与对照-KO T细胞相比,Carm1-KO细胞表达更高水平的CD69激活标记、颗粒酶B细胞毒性蛋白以及细胞因子IL-2、IFN γ 和TNF α (图8G-8H),并显示增强的抗原诱导增殖(图8I)。这些数据证明,Carm1是肿瘤特异性T细胞的负调节因子。

[0612] 实施例2.CD8 T细胞中的Carm1抑制增强其抗肿瘤功能

[0613] 发现与对照-KO CD8 T细胞相比,Carm1-KO T细胞赋予更有效的针对B16F10-OVA肿瘤的抗肿瘤免疫(图1E-1F和图9A)。流式细胞术分析显示,与对照-KO CD45.1+CD8+T细胞相比,Carm1-KO T细胞的肿瘤浸润大大增强,包括表达效应分子颗粒酶B和IFN γ 以及增殖标志物Ki67的T细胞的累积增加(图1G和图9B)。使用第二gRNA确认了Carm1-KO T细胞的抗肿瘤免疫增强(图9C-9D)。

[0614] 编辑后7天,将OT-I CD8 T细胞与B16F10-Ova肿瘤细胞共培养24小时。RNA-seq分析证明,与对照T细胞相比,Carm1-KO中的基因表达显著变化,包括1143个基因的上调和1199个基因的下调(图2A-2B)。上调的基因编码介导T细胞招募到肿瘤中的趋化因子受体(Cxcr3)和维持记忆T细胞群体所需的关键基因(转录因子Tcf7、Myb、Bcl6;表面受体Itgae和Cd27)。下调的基因包括与终末分化(Klrg1)、细胞因子信号传导抑制(Socs1、Socs3)和肿瘤内T细胞功能障碍(Egr2)相关的基因。为了验证RNA-seq结果,使用两种不同的gRNA进行qPCR分析,发现与对照-KO CD8 T细胞相比,Carm1-KO T细胞中的Tcf7、Myb、Bcl6和Itgae(与T细胞记忆相关)上调,而Carm1-KO T细胞中的Klrg1(与终末分化相关)和Havcr2(与功能障碍相关)下调(图2C)。

[0615] 基因集富集分析(GSEA)表明,对于与对照T细胞相比在Carm1-KO中过量表达的基因,靠前的途径有“T细胞激活”、“有丝分裂核分裂”、“Foxo信号传导”途径和“白细胞介导的细胞毒性调节”。下调的途径涉及RNA生物学、蛋白质翻译和DNA修复(图2D)。通过GSEA鉴定出的Foxo信号传导途径中的基因包括Bcl6和Il17r,这两个基因都在T细胞记忆中发挥重要作用。大部分肿瘤浸润Carm1-KO CD8 T细胞为Tcf7蛋白阳性,还具有高水平Bcl-2,这与Carm1-KO T细胞相比对照-KO T细胞具有增加的记忆样细胞池是一致的(图2E)。此外,与对照-KO CD8 T细胞相比,Carm1-KO的肿瘤浸润Bcl-2^{hi}细胞数量显著更高(图2F)。通过在T细胞转移后早期(d16)和晚期(d24)研究肿瘤浸润Carm1-KO和对照-KO CD8 T细胞,研究了T细胞的持久性。在这两个时间点,显著更大的Carm1-KO CD8 T细胞群体表达CD69激活标志物

(图2G)。相反,只有一小部分Carm1-KO T细胞共同表达PD-1和Tim-3抑制性受体或CD39,这是衰竭T细胞的标志物(图2H-2I)。这些数据表明,靶向CD8 T细胞中的Carm1增强了其抗肿瘤功能,并使大量表达记忆标志物的肿瘤浸润T细胞群体得以维持。

[0616] 实施例3.肿瘤细胞中Carm1基因的失活引发肿瘤免疫

[0617] 对1208种人癌细胞系(癌细胞系百科全书,CCLE)的RNA-seq数据分析显示,CARM1在各种各样的人癌细胞系中高水平表达(图3A)。因此,我们通过在检查点阻断耐药性小鼠癌细胞系(包括B16F10黑色素瘤和4T1乳腺癌模型)中失活Carm1基因,研究了Carm1在肿瘤细胞中的作用(图3B-3C)。B16F10和4T1细胞的体外增殖和存活未受Carm1基因失活的影响,但与对照-KO肿瘤细胞相比,Carm1-KO肿瘤细胞的体内生长大大减少(图9E、图3D和图10A)。重要的是,CD8 T细胞的耗竭恢复了Carm1-KO B16F10细胞的体内生长,这表明肿瘤细胞中的Carm1失活引发了有效的T细胞介导的肿瘤免疫(图3D和图10A)。通过比较免疫活性野生型小鼠和T细胞缺陷型T细胞受体 α (Tcr α) KO小鼠中的B16F10肿瘤生长,验证了这一结论(图3E)。三阴性乳腺癌(TNBC) 4T1模型和MC38结肠癌模型中的Carm1基因失活,也显著减缓了肿瘤生长,并赋予了生存益处(图3F-3H)。重要的是,与对照-KO 4T1肿瘤细胞相比,原位植入Carm1-KO后,自发肺转移的数量显著减少(图3G)。

[0618] 接下来,使用基于成像的T细胞细胞毒性测定,检查了Carm1基因的失活是否增加了肿瘤细胞对CD8 T细胞杀伤的敏感性。事实上,Carm1-KO B16F10-Ova肿瘤细胞比对照-KO肿瘤细胞,对T细胞介导的细胞毒性显著更敏感,如通过对存活的活ZsGreen+肿瘤细胞或caspase 3/7细胞死亡报告分子标记的死亡肿瘤细胞进行定量所展示(图3I-3J)。报道了一种CARM1的高亲和力小分子抑制剂(EZM2302) (Drew AE, Moradei O, Jacques SL, Rioux N, Boriack-Sjodin AP, Allain C等 Identification of a CARM1 Inhibitor with Potent In Vitro and In Vivo Activity in Preclinical Models of Multiple Myeloma. Sci Rep 2017;7(1):17993)。用EZM2302预处理B16F10-Ova肿瘤细胞也使其对CD8 T细胞敏感(图3K)。这种CARM1抑制剂还使人TNBC细胞系对细胞毒性T细胞敏感。BT549 TNBC细胞与表达TCR的人CD8 T细胞共培养,其中所述TCR对HLA-A2:01呈递的NY-ESO-1肽是特异的。用CARM1抑制剂(EZM2302)预处理这些肿瘤细胞,增强了CD8 T细胞介导的细胞毒性(图3L)。这些数据证明,肿瘤细胞中的Carm1基因失活诱导了有效的T细胞介导的免疫,Carm1缺陷型肿瘤细胞对T细胞介导的细胞毒性更敏感。

[0619] 实施例4. Carm1缺陷型肿瘤细胞中的先天免疫激活

[0620] RNA-seq分析表明,与对照-KO B16F10肿瘤细胞相比,Carm1-KO B16F10肿瘤细胞的转录组发生了显著变化。具体而言,我们观察到,Carm1-KO与对照-KO肿瘤细胞相比,许多干扰素反应基因的表达增加,尽管这些肿瘤细胞未曾接触过外源1型干扰素或IFN γ (图4A、图10B)。基因集富集分析(GSEA)也显示,Carm1-KO肿瘤细胞中IFN α / γ 和p53途径的转录激活(图4B、图10C)。在人黑色素瘤中,发现较高的1型干扰素基因表达特征与CD8 T细胞浸润增加相关(Gajewski TF, Fuertes MB, Woo SR. Innate immune sensing of cancer: clues from an identified role for type I IFNs. Cancer Immunol Immunother 2012;61(8):1343-7)。重要的是,肿瘤细胞与T细胞相比,由Carm1基因失活而差异表达的基因之间几乎没有重叠(图4C)。尤其是,p53途径和干扰素 α / γ 反应途径仅在Carm1-KO肿瘤细胞中转录激活,而在Carm1-KO T细胞中不转录激活。使用两个Carm1靶向gRNA通过RT-qPCR进行的验证

证明,Carm1-KO与对照-KO肿瘤细胞相比,多个干扰素刺激基因(ISG)(包括Irf7、CC15、Cxcl10、Ifit1、Oas1和Tap1)以高两到七倍的水平表达(图4D)。重要的是,用CARM1抑制剂EZM2302预处理B16F10细胞,也显著提高这些ISG的mRNA水平(图4E,图10D)。EZM2302也在人乳腺癌和黑色素瘤的癌细胞系中诱导了相似的ISG集的表达(图10E-10F)。

[0621] 1型干扰素和IFN γ 诱导的基因集基本重叠,由激活的T细胞分泌的IFN γ 是保护性肿瘤免疫必需的细胞因子(Dunn GP,Ikeda H,Bruce AT,Koebel C,Uppaluri R,Bui J等 Interferon-gamma and cancer immunoediting. Immunol Res 2005;32(1-3):231-45)。因此,研究了肿瘤细胞中Carm1基因的失活是否增强其对IFN γ 的转录反应。事实上,对于测试的所有ISG,与对照-KO肿瘤细胞相比,Carm1-KO B16F10和4T1细胞都对IFN γ 显示了增强的转录反应(图10G-10H)。Carm1-KO与对照-KO B16F10细胞相比,IFN γ 刺激也诱导了更高水平的STAT1磷酸化,尽管这两个细胞系之间的总STAT1和STAT2蛋白水平相似(图11A)。与对照-KO细胞相比,IFN γ 更显著地抑制了Carm1-KO肿瘤细胞的增殖(图11B)。Carm1-KO肿瘤细胞在没有IFN γ 的情况下和在IFN γ 刺激后均表达了较高水平的MHC I类蛋白(H2-K^b) ;IFN γ 刺激后,Carm1-KO与对照-KO肿瘤细胞相比,PD-L1水平略高(图11C-11D)。在Carm1-KO肿瘤细胞中Ifnar1基因失活时,Carm1-KO肿瘤细胞对IFN γ 的增强转录反应减弱,这意味着在此过程中1型干扰素信号传导增强(图11E)。这些数据表明,Carm1-KO肿瘤细胞显示了对IFN γ (由激活的T细胞分泌的重要细胞因子)的反应性增强。

[0622] 接下来,研究了在Carm1-KO肿瘤细胞中鉴定的干扰素基因表达标签需要何种先天免疫传感器。Mavs基因(编码双链RNA传感器Rig-I和Mda-5的必需衔接蛋白)的失活对ISG的表达没有影响(图12A-12B)。形成鲜明对比的是,Cgas基因的失活大大降低了ISG的mRNA水平,表明cGAS酶是Carm1-KO肿瘤细胞中激活的先天免疫途径中的一个关键元件(图4F和图12C-12D)。还测试了cGAS的激活是否可以解释Carm1-KO肿瘤细胞对细胞毒性T细胞的敏感性增强。事实上,Carm1-KO肿瘤细胞对CD8⁺ T细胞高度敏感,而Carm1-KO肿瘤细胞中Cgas的失活使得其对细胞毒性T细胞表现出明显更高的耐受性(图4G)。Cgas失活(不失活Carm1)也使得B16F10-Ova肿瘤细胞比野生型B16F10-Ova细胞对T细胞更耐受。这些数据表明,Carm1-KO与对照-KO肿瘤细胞相比对细胞毒性T细胞的增强敏感性需要功能性cGAS-STING途径,而对照-KO瘤细胞中cGAS-STING途径的较低激活水平与T细胞介导的杀伤相关。

[0623] 这些结果强烈表明,Carm1失活在肿瘤细胞中诱导了DNA损伤反应。DNA损伤诱导组蛋白H2AX的快速磷酸化(γ H2AX),由此可以灵敏地读出双链DNA(dsDNA)的断裂(Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. Nucleic Acids Res 2008;36(17):5678-94)。免疫荧光分析显示,相当一部分Carm1-KO B16F10细胞具有 γ H2AX抗体标记的多个细胞核病灶,而此类病灶仅在一小部分对照-KO肿瘤细胞中被检测到(图4H)。通过用对另一个dsDNA断裂标志物RAD51特异的抗体标记,确认了这一结论(图4I)。dsDNA断裂可在有丝分裂过程中诱导染色体错误分离和胞质微核形成(Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallles J, Crott JW, Parry J等 Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. Mutagenesis 2011;26(1):125-32)。此类微核往往具有脆弱的核膜,导致其dsDNA暴露于cGAS(Mackenzie KJ, Carroll P, Martin CA, Murina O, Fluteau A, Simpson

DJ等cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature* 2017;548(7668):461-5)。Carm1-KO与对照-KO肿瘤细胞相比,在显著更高百分比的细胞中检测到DAPI+微核(图4J)。当在肿瘤细胞中表达cGAS的表位标签形式时,这些胞质DAPI+微核的一个亚组为cGAS阳性(图12E)。CARM1抑制剂处理也在B16F10黑色素瘤细胞中诱导了 γ H2AX病灶累积(图12F)。使用靶向小鼠基因组中基因间区域的gRNA,我们确认了基于CRISPR/Cas9的基因编辑(分析前>1周)未导致实质性dsDNA损伤或ISG表达(图12G-12H)。这些结果证明,由于cGAS-STING途径的激活,Carm1基因的失活在肿瘤细胞内诱导了先天免疫激活。先前研究显示,CARM1和p300与BRCA1和p53协作诱导细胞周期抑制剂p21^{CIP1}(CDKN1A)表达(Lee YH,Bedford MT,Stallcup MR.Regulated recruitment of tumor suppressor BRCA1 to the p21 gene by coactivator methylation. *Genes Dev* 2011;25(2):176-88)。DNA损伤后细胞周期抑制失败可导致有丝分裂期间染色体分离、微核形成和cGAS激活(Bakhoun SF,Cantley LC.The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment. *Cell* 2018;174(6):1347-60)。

[0624] 有趣的是,与肿瘤细胞不同,Carm1清除并未在CD8 T细胞中诱导dsDNA损伤(图4K)。此外,与肿瘤细胞相比,Carm1失活在T细胞中导致了不同的基因表达变化(图4C,图2A-2C),这表明与肿瘤细胞(DNA损伤和cGAS-STING信号传导的诱导)相比,Carm1在T细胞中诱导了细胞类型特异性后果(功能增强,记忆样细胞库保存)。

[0625] 实施例5.Carm1抑制克服对检查点阻断的耐药性

[0626] 许多对CTLA-4或PD-1mAb检查点阻断耐药的人肿瘤类型具有差的CD8 T细胞浸润(“冷肿瘤”)。CD8 T细胞浸润差与缺乏1型干扰素基因表达特征有关(Gao J,Shi LZ,Zhao H,Chen J,Xiong L,He Q等Loss of IFN-gamma Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4Therapy. *Cell* 2016;167(2):397-404;Thorsson V,Gibbs DL,Brown SD,Wolf D,Bortone DS,Ou Yang TH等The Immune Landscape of Cancer. *Immunity* 2019;51(2):411-2)。推测CARM1抑制剂治疗可以通过增强肿瘤特异性T细胞的功能以及提高肿瘤细胞对细胞毒性T细胞的敏感性而在检查点阻断耐药的肿瘤中有效。B16F10黑色素瘤对使用CTLA-4或PD-1mAb的单一治疗,甚至是使用两种检查点抗体的联合治疗都具有耐药性(Curran MA,Montalvo W,Yagita H,Allison JP.PD-1and CTLA-4combination blockade expands infiltrating Tcells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(9):4275-80)。用CTLA-4或PD1阻断剂治疗Carm1-KO肿瘤实质性降低肿瘤生长,并赋予了显著的生存益处(图5A和图13A)。重要的是,小分子介导的Carm1抑制(EZM2302)也使B16F10黑色素瘤对CTLA-4mAb检查点阻断具有敏感性,并导致了显著的生存益处(图5B)。该抑制剂按150mg/kg的剂量施用,但由于该化合物的可获得性限制,针对此应用的药物剂量优化不可行。此抑制剂之前仅在免疫缺陷小鼠模型中进行过评估,并显示适度减缓人多发性骨髓瘤细胞系(RPMI-8226)的体内生长。TNBC的高转移性4T1模型也对CTLA-4阻断具有耐受性。与其他三个实验组相比,Carm1基因失活使4T1肿瘤对CTLA-4阻断敏感,并赋予了显著的生存益处(图5C)。与所有其他治疗组相比,CTLA-4mAb治疗的Carm1-KO 4T1肿瘤小鼠还显示了自发肺转移数量的实质性减少(图5D)。

[0627] 对Carm1-KO B16F10肿瘤的分析显示,浸润CD8 T细胞的数量显著增加,表达抑制

性PD-1和Tim-3抑制性受体的CD8⁺ T细胞的百分比显著降低(图5E-5G)。相比之下,所有治疗组的肿瘤浸润CD4⁺ T细胞数量(按每克肿瘤计算)相似,尽管由于CD8⁺ T细胞的累积显著增加,Carm1-KO与对照-KO肿瘤相比,CD4⁺ T细胞在总T细胞池中的百分比较低(图13B,图5E)。与其他三个实验组相比,CTLA-4mAb治疗进一步增强了CD8⁺ T细胞对Carm1-KO B16F10肿瘤的浸润,并降低了PD-1和Tim-3抑制性受体双阳性的CD8⁺ T细胞的百分比(图5E-5G)。此外,Carm1-KO与对照-KO CTLA-4治疗的肿瘤相比,实质性更大百分比的CD8⁺ T细胞为关键功能性标志物(包括颗粒酶B和IFN γ)阳性的(图5H和图13C)。与用任一mAb治疗的对照-KO肿瘤相比,Carm1-KO肿瘤(用对照或CTLA-4mAb治疗)也被更大量的树突细胞,包括交叉呈递cDC1细胞,以及NK细胞浸润(图5I,图13D)。在Carm1-KO4T1肿瘤中,尤其是在用CTLA-4mAb治疗后,观察到了类似的变化(图13E-13I)。这些数据证明,肿瘤细胞固有的Carm1基因失活诱导了肿瘤微环境的多种显著变化,包括CD8⁺ T细胞、NK细胞和树突细胞的浸润增强。此外,CD8⁺ T细胞表达实质性更低水平的PD-1和Tim-3抑制性受体,这与T细胞耗竭水平降低一致。

[0628] 还研究了CARM1抑制剂治疗对肿瘤免疫微环境的影响,包括单一治疗以及与PD-1或CTLA-4mAb的联合治疗(图14、15和16)。在此CARM1抑制剂的毒性研究中,在主要器官的综合分析或体重减轻方面,在CARM1抑制剂和溶剂对照治疗组之间未观察到组织学变化(图14A-14B)。CD8⁺ T细胞浸润在CARM1抑制剂单一治疗后显著增加,在抑制剂与PD-1或CTLA-4mAb联合使用时甚至更高(图15A)。相反,与同种型对照抗体组相比,CD8⁺ T细胞浸润在PD-1或CTLA-4单一治疗后未增加。我们还在所有三个CARM1抑制剂治疗组中观察到表达颗粒酶B、IL-2、IFN γ 和穿孔素的CD8⁺ T细胞(每克肿瘤)数量显著增加(图15B-15E)。相反,与溶媒对照组相比,CARM1抑制剂治疗组中CD8⁺ T细胞的PD-1表达降低(图15F)。CARM1抑制剂治疗并未改变肿瘤浸润CD4⁺ T细胞或FoxP3⁺ Tregs的数量。然而,由于CD8⁺ T细胞浸润增加,所有三个Carm1治疗组中的CD8/FoxP3⁺ Treg比率实质性增加(图16A-16D)。有趣的是,在所有三个CARM1抑制剂治疗组中,肿瘤浸润NK细胞也都增加,在CARM1抑制剂与PD-1或CTLA-4mAb联合使用时最高。在CARM1抑制剂与PD-1或CTLA-4mAb联合使用时,cDC1细胞增加,但在任何治疗组中均未检测到巨噬细胞数量的变化(图16E)。这些数据证明,小分子介导的Carm1抑制诱导了肿瘤免疫微环境的重大有利变化,尤其是对于CD8⁺ T细胞、NK细胞和cDC1。在CARM1抑制剂与PD-1或CTLA-4mAb联合使用时,这些有利变化进一步增强。

[0629] 为了检查重新在肿瘤细胞中表达Carm1是否逆转Carm1失活诱导的表型,我们将多西环素(Dox)诱导型启动子控制下的Carm1 cDNA引入Carm1-KO B16F10肿瘤细胞(图17A-17B)。Dox处理抑制了Carm1-KO细胞中IFN γ 诱导型基因的mRNA水平,与我们的发现——对照-KO肿瘤显示比Carm1-KO肿瘤细胞低的IFN γ 反应性——相一致(图17C和10G-H)。空载体转导的对照-KO B16F10肿瘤细胞显示快速生长,无论小鼠是用溶媒还是Dox治疗(图17D)。正如预期的那样,用Carm1载体转导但用溶媒治疗的Carm1-KO肿瘤细胞生长缓慢,其动力学与用空载体转导的Carm1-KO肿瘤细胞相似。相反,Dox治疗实质性加速了Carm1载体转导的Carm1-KO肿瘤细胞的生长。重要的是,Dox诱导的Carm1在Carm1-KO肿瘤细胞中的重新表达,也逆转了肿瘤微环境的关键方面,包括显著程度的CD8⁺ T细胞浸润、CD8⁺ T细胞的更低PD-1表达水平、以及增加的cDC1浸润(图18A-18D)。

[0630] 实施例6. Tdrd3和Med12是Carm1途径的效应分子

[0631] Carm1在由含Tudor结构域的蛋白质Tdrd3识别的组蛋白尾部放置H3R17me2a和

H3R26me2a甲基精氨酸标志物 (Yang Y, Lu Y, Espejo A, Wu J, Xu W, Liang S等) TDRD3 is an effector molecule for arginine-methylated histone marks. *Molecular cell* 2010; 40 (6) :1016-23)。Carm1还甲基化许多其他核蛋白,包括Med12,Med12是介体复合物调节臂的成分 (Cheng D, Vemulapalli V, Lu Y, Shen J, Aoyagi S, Fry CJ等) CARM1 methylates MED12 to regulate its RNA-binding ability. *Life Sci Alliance* 2018;1 (5) :e201800117)。我们发现,B16F10细胞中Tdrd3或Med12基因的失活提高了多种ISG的mRNA水平,类似于Carm1的失活 (图6A-6B,图19A-19D)。此外,在Tdrd3-KO或Med12-KO B16F10细胞中还失活Cgas基因时,这种ISG基因表达特征丢失 (图6A-6B)。与Carm1清除相似,Tdrd3或Med12失活导致了对IFN γ 的敏感性更高,并导致IFN γ 诱导的ISG表达增强 (图19E-19F)。除了Med13-KO肿瘤细胞中ISG的某些上调,编码其他Tdrd3或Med12相关蛋白的基因 (Top3b、Top1和Med13) 的失活并未导致ISG mRNA水平的实质性提高 (图19G-19I)。B16F10肿瘤细胞中Tdrd3或Med12基因的失活也导致了 γ H2AX阳性核病灶和胞质微核的累积,如上文针对Carm1-KO B16F10细胞所述 (图6C-6D)。最后,发现Tdrd3-KO肿瘤的生长实质性减弱,并且此表型同样是依赖于CD8⁺ T细胞的 (图6E-6F)。CTLA-4mAb治疗进一步抑制了Tdrd3-KO肿瘤细胞的生长,并导致大部分小鼠存活 (图6G)。

[0632] 生化研究显示,Med12确实是Carm1的直接靶标。在从对照-KO B16F10细胞免疫沉淀Med12时,通过Western印迹分析可以很容易地检测到Med12精氨酸残基的不对称甲基化 (图6H),这与之前将Med12鉴定为Carm1靶标的报道一致 (Cheng D, Vemulapalli V, Lu Y, Shen J, Aoyagi S, Fry CJ, et al. CARM1 methylates MED12 to regulate its RNA-binding ability. *Life Sci Alliance* 2018;1 (5) :e201800117)。Med12精氨酸残基的不对称甲基化在Carm1-KO B16F10肿瘤细胞 (但非Tdrd3-KO肿瘤细胞,如预期的那样) 中不存在。此外,从核裂解物免疫沉淀Med12显示,Carm1-KO与对照-KO细胞相比,更少的组蛋白H3与Med12结合,表明Carm1促进Med12招募至组蛋白H3 (图6I)。这些结果证明,Tdrd3和Med12基因的失活导致了与Carm1基因失活相似的免疫介导表型。

[0633] 进一步研究了Carm1-KO与对照-KO肿瘤细胞相比,RNA Pol II介导的转录是否发生改变。RNA Pol II的C端结构域 (CTD) 的Western印迹分析显示,Carm1-KO与对照-KO细胞相比,核裂解物中的Ser2 (p-Ser2,转录延长的标志) (Buratowski S. Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell* 2009;36 (4) :541-6) 和Ser5的磷酸化增加 (图20A)。使用哺乳动物天然延伸转录测序 (mNET-Seq) 系统地研究了Pol II磷酸化 (Nojima T, Gomes T, Carmo-Fonseca M, Proudfoot NJ. Mammalian NET-seq analysis defines nascent RNA profiles and associated RNA processing genome-wide. *Nat Protoc* 2016;11 (3) :413-28)。Carm1基因失活增加了基因的直接启动子区域周围p-Ser2 CTD Pol II标签相对总Pol II标签的归一化读段密度 (图20B-20C)。此外,Carm1-KO与对照-KO细胞相比,约25%的上调基因与较高的归一化RNA Pol II pSer2状态相关 (图20D)。对这些重叠基因的GSEA分析显示p53途径的富集,与图4中提供的数据一致 (图20E)。这些数据为Carm1缺陷肿瘤细胞的转录调节改变提供证据,这与Med12被鉴定为Carm1的靶标是一致的。此外,在Carm1-KO肿瘤细胞中发现选择性剪接基因的丰度增加 (638个基因中外显子获得,708个基因中外显子丢失)。使用这些选择性剪接基因进行的途径分析,将DNA修复、转录调节和染色质组织鉴定为Carm1-KO肿瘤细胞中靠前的富集途径 (图20F)。共转录R-loop结构与基因

组不稳定性有关,并被认为通过TDRD3和TOP3B解决(Yang Y,McBride KM,Hensley S,Lu Y,Chedin F,Bedford MT.Arginine methylation facilitates the recruitment of TOP3B to chromatin to prevent R loop accumulation.Molecular cell 2014;53(3):484-97)。用基于S9.6的DNA:RNA免疫沉淀法(DRIP-seq)(Sanz LA,Chedin F.High-resolution, strand-specific R-loop mapping via S9.6-based DNA-RNA immunoprecipitation and high-throughput sequencing.Nat Protoc 2019;14(6):1734-55),确定R-loop是否由于Carm1-KO而增加。未观察到R-loop增加的显著趋势(图20G),说明基因区域上的共转录R-loop不是在Carm1-KO细胞中观察到的基因组不稳定性的来源。

[0634] 实施例7.CARM1在人癌症中的相关性

[0635] 接下来研究了CARM1在人癌症中的相关性,包括CARM1在肿瘤细胞中的潜在作用。研究发现,在CARM1 mRNA水平高的人癌细胞系相比于CARM1 mRNA水平低的人癌细胞系中,许多重要途径的基因标签被下调,包括p53、MHC I类抗原呈递和干扰素相关途径(图7A)。这些结果表明,CARM1通过抑制重要的免疫途径,也在人肿瘤细胞中发挥重要作用。

[0636] 对癌症基因组图谱(TCGA)RNA-seq数据集的分析表明,CARM1可以调节人癌症中的免疫反应。在许多癌症类型中,CARM1 mRNA水平与T细胞和APC浸润肿瘤的基因特征以及对IFN γ 和IFN α 的反应呈负相关(图7B、图21A)。此外,CARM1 mRNA水平与免疫抑制性髓源性抑制细胞(MDSC)浸润肿瘤的基因特征呈正相关。为了更好地理解CARM1表达在人肿瘤中的作用,对以上研究的两种癌症类型[TCGA皮肤黑色素瘤(SKCM)和肺鳞状细胞癌(LUSC)]进行了差异调节途径分析。相对于低CARM1 mRNA水平的肿瘤,具有高CARM1 mRNA水平的肿瘤显示干扰素 γ 和 α 反应途径下调,而与Myc靶标V1/V2和G2M检查点相关的途径上调(图7C)。

[0637] 来自TCGA的RNA-seq数据允许分析大量肿瘤,但缺乏单细胞分辨率。因此,还研究了来自多种癌症类型的独立人肿瘤scRNA-seq数据集中的恶性细胞群体。我们再次发现,高CARM1 mRNA水平与p53和DNA修复途径以及关键免疫途径(APC浸润和对IFN α /IFN γ 的反应)负相关;高CARM1 mRNA水平还与许多人癌症类型的生存率降低相关(图7D、21B-21C和22A-22B)。

[0638] 还检查了临床免疫检查点阻断(ICB)数据集中的CARM1基因表达,分析了16个临床试验数据集。CARM1的低表达本身与ICB反应不相关。鉴于MED12是CARM1的下游靶标,研究了MED12和CARM1 mRNA水平在对PD-1途径抑制的反应中的作用:首先根据MED12mRNA水平分开群组,然后检查MED12低(<中位数)和MED12高(>中位数)群组中CARM1 mRNA水平的相关性。在四个临床群组中,发现ICB反应者与无反应者相比,MED12和CARM1的表达水平都显著更低(两项黑色素瘤中的PD-1阻断试验,一项肾癌中的PD-L1阻断试验,一项胶质母细胞瘤中的PD-1阻断试验)(图7E)。此外,在四个临床群组中,较高水平的Carm1-KO基因表达标签与ICB反应性相关;此标签获自Carm1-KO相对于对照-KO B16F10肿瘤细胞的RNA-seq分析(图23A)。在TCGA RNA-seq数据集中,此Carm1-KO标签与CTL浸润、抗原加工和呈递以及干扰素 γ 反应的基因标签呈正相关(图23B)。这些数据提供证据,证明CARM1表达与人癌症中的主要免疫途径相关。

[0639] 方法

[0640] 细胞系

[0641] B16F10、4T1、MC38亲本细胞系购自美国典型培养物保藏中心(American Type

Culture Collection, ATCC)。B16-OVA-ZsGreen细胞通过用驱动鸡卵清蛋白N端截短变体(亚克隆自pcDNA3 deltaOVA, Addgene质粒#6459525)表达的pHAGE表达载体对亲本细胞系进行慢病毒转导而产生。将zsGreen+细胞分选至建立细胞系的纯度。针对zsGreent的表达和OVA肽SIINFEKL与H2-K^b复合在细胞表面的呈递,对B16-OVA-zsGreen细胞进行了验证。此外,还针对其激活OT-I CD8 T细胞的能力测试了这些细胞。合成小鼠Carm1 cDNA,并利用来自IDT的gBlocks™将其克隆到pINDUCER21-ORF-EG (Addgene质粒#46948)中,以产生Dox-Carm1构建体。根据GFP表达,对空载体或Dox-Carm1转导的B16F10对照-KO或Carm1-KO细胞进行分选纯化。通过Western印迹确认了Dox诱导型Carm1蛋白表达。B16F10和4T1细胞分别在补充10%FBS和1%青霉素/链霉素的DMEM和RPMI培养基中培养。MC38细胞在补充10%胎牛血清(FBS)、100IU/ml青霉素/链霉素、5mM非必需氨基酸、5mM丙酮酸钠和5mM HEPES的DMEM培养基中于37℃、5% CO₂下培养。使用ATCC通用支原体检测试剂盒验证细胞系是否存在支原体污染。

[0642] 小鼠

[0643] 所有实验均使用6-8周龄雄性小鼠。WT C57BL/6小鼠(JAX stock#000664)、Balb/c (JAX stock#000651)和Tcr α -KO小鼠(JAX stock#002116)购自Jackson Laboratory。OT-I (JAX stock#003831)与CD45.1同基因品系(JAX#002014)杂交。OT-I Cas9双转基因小鼠通过使OT-I小鼠(JAX stock#003831)与携带Rosa26靶向敲入的化脓链球菌Cas9 (JAX储备#024858)的小鼠(具有组成性Cas9表达)杂交产生。根据Jackson Labs公布的基因分型流程验证了Cas9转基因的存在。在所有实验之前,所有购买的小鼠在Dana-Farber癌症研究所动物资源机构(Dana-Farber Cancer Institute Animal Resource Facility)适应居住条件一周。每种小鼠品系的集群都保存在同一动物机构中。小鼠安置在无病原体的条件下,并符合Dana-Farber癌症研究所动物常设委员会(Dana-Farber Cancer Institute standing committee on Animals)和国家卫生研究院(National Institutes of Health)的动物护理指南。动物方案获得DFCI IACUC批准。

[0644] 在肿瘤浸润CD8 T细胞中的体内CRISPR/Cas9筛选

[0645] A. 表观遗传Grna文库的克隆和病毒产生

[0646] 对于初步筛选,我们构建了三个gRNA序列慢病毒质粒文库,靶向总计426个编码表观遗传调节因子的基因。每个文库包含靶向142个候选基因的五个独特gRNA序列。此外,包含先前被证实抑制肿瘤中CD8 T细胞累积的六个基因的靶向gRNA作为阳性对照(Pdcd1、Ctla4、Cblb、Egr2、Smad2和Ppp2r2d)。我们还包括100个gRNA序列作为阴性对照。将这些gRNA文库克隆到驱动Thy1.1表面标志物表达的慢病毒质粒载体pLKO-gRNA-Thy1.1中。为此,通过用Thy1.1编码序列替换eGFP来修饰pLKO.3G载体(Addgene质粒#14748)。然后将gRNA文库克隆到所产生的慢病毒表达载体中。

[0647] 对于验证筛选,通过靶向从初步筛选的最靠前命中物中选择的31个基因以及作为阳性对照基因的Pdcd1和Cblb(6个gRNA/基因),构建了新的gRNA文库(Genetic Perturbation Platform, Broad Institute)。作为阴性对照,加入了186个gRNA(93个非靶向gRNA加上93个基因间gRNA)。

[0648] 为了产生用于转导合并的gRNA文库的慢病毒,针对每个162cm²的HEK293 T细胞的组织培养瓶,产生以下转染混合物:7 μ g含有慢病毒gRNA序列文库的pLKO-gRNA-Thy1.1质粒

制备物、7 μ g pCMV-DR.9.1和0.7 μ g pCMCV-VSV-G,于700 μ l OPTI-MEM无血清培养基(Gibco)加42 μ l TransiT-293转染试剂(Mirus)中。将该转染混合物添加到162cm²组织培养瓶中的低代次HEK293T细胞(80-90%汇合)中,然后孵育过夜。第二天,去除培养基,并用20ml补充了20%FCS的RPMI替换。在转导后48小时和72小时收集病毒上清液(每个162cm²培养瓶总计2x 20ml上清液),通过0.45 μ m过滤器(ThermoFisher),并通过在112000x g下超速离心来浓缩。通过用少量等分浓缩制备物试样的系列稀释液转导HEK293T细胞,并通过流式细胞术测量Thy1.1阳性HEK细胞的百分比,来测定病毒滴度。

[0649] B. OT-I Cas9 CD8 T细胞的转导

[0650] 将来自OT-I Cas9小鼠的脾脏和外周淋巴结(腹股沟、腋窝和颈部淋巴结)用70 μ m细胞滤网在完全RPMI培养基[含有10% FBS+1x GlutaMaxTM(Gibco)、100U/ml青霉素-链霉素、1mM丙酮酸钠、20mM HEPES和50 μ M 2-巯基乙醇]中机械解离。按照制造商的说明用EasySepTM小鼠CD8+T细胞分离试剂盒(Stemcell Technologies)从单细胞悬液分离OT-I Cas9CD8 T细胞($\geq 97\%$ 纯度)。T细胞在补充100ng/ml IL-15(Biolegend)和5ng/ml IL-7(Bioregend)的完全RPMI培养基中培养48小时。然后,使用retronectin包被(Takara Bio)的24孔非组织培养处理板(2x 10⁶个细胞/孔),通过旋转感染浓缩慢病毒制备物(MOI=15),用慢病毒gRNA文库转导T细胞。旋转感染在32 $^{\circ}$ C下、在病毒制备物加补充5 μ g/ml鱼精蛋白硫酸盐(Sigma-Aldrich)的完全RPMI培养基的1ml总体积中2000rpm进行1.5-2小时。细胞转导后在补充50ng/ml IL-15和2.5ng/ml IL-7(Biolegend)的完全RPMI培养基中培养72小时,然后使用EasySepTM小鼠CD90.1正选择试剂盒(StemCell Technologies)进行Thy1.1⁺细胞的磁富集;这种方法使Thy1.1⁺细胞纯度达到 $\geq 93\%$ 。

[0651] C. 肿瘤浸润Cd8 T细胞的体内筛选

[0652] 将gRNA转导的Thy1.1⁺OT-I Cas9 CD8 T细胞(5x10⁶)静脉注射到具有B16-OVA-ZsGreen肿瘤(≥ 25 mm²肿瘤面积)的10-12只C57BL/6小鼠体内。T细胞转移后第10天,分离肿瘤和脾脏用于回收所转移的Thy1.1⁺CD8 T细胞。在具有“37C_m_TDK_1”程序的GentleMACS解离仪(Miltenyi Biotec)上使用GentleMACS-C管(Milteniy-Biotec),并使用在RPMI培养基(无其他补充剂)中含有1mg/ml胶原酶D(Sigma-Aldrich)、20U/ml DNase I(Sigma Aldrich)和100 μ g/ml V型透明质酸酶(Sigma Aldrich)的酶混合物,解离肿瘤。然后将肿瘤细胞悬浮液以50 $\times$ g离心5分钟,并收集上清液。使用70 μ m细胞滤网机械解离脾脏,然后按照制造商的说明用EasySepTM小鼠CD8+T细胞分离试剂盒(Stemcell Technologies)分离总CD8 T细胞。使用配备70 μ m喷嘴和“Yield”纯度罩的FACS Aria IIIu细胞分选仪(BD),从肿瘤和脾脏悬浮液分选活的Thy1.1⁺TCR β ⁺CD8⁺CD4⁻单细胞,以确保事件的完整收集。细胞沉淀用冷PBS洗涤一次,按照制造商的悬浮细胞方案用Zymogen Quick-gDNA Microprep试剂盒提取基因组DNA。

[0653] D. gRNA文库的测序和gRNA表现的定量

[0654] 对分离自肿瘤浸润OT-I Thy1.1⁺CD8 T细胞的基因组DNA进行gRNA盒的PCR扩增,用麻省理工学院和哈佛大学布罗德研究所(Cambridge, MA)的遗传扰动平台进行gRNA表现的Illumina测序。PCR扩增和Illumina测序流程详见

[0655] <https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/resources/protocols>.

[0656] 使用MaGeCK(基于模型的全基因组CRISPR-Cas9敲除分析)(Li W, Xu H, Xiao T,

Cong L, Love MI, Zhang F等MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *Genome Biol* 2014;15(12): 554) 进行数据分析。为了发现候选基因,通过比较上述肿瘤(实验)和脾脏(对照)条件,将归一化的gRNA计数表加载到MaGeCK中。根据所有gRNA的平均log2倍数变化(LFC)和错误发现率(FDR),确定靠前的基因。

[0657] 测定经编辑的T细胞和肿瘤细胞

[0658] 肿瘤细胞中的基因编辑

[0659] 通过用由Cas9蛋白和结合的gRNA组成的核糖核蛋白复合物(RNP)电穿孔来编辑细胞。将20 μ M gRNA(使用布罗德研究所的基因组扰动平台设计)与Cas9蛋白(获自加州大学伯克利分校)按等摩尔比混合。使用SF细胞系96孔核转染试剂盒,对每个核转染反应的10⁵个肿瘤细胞进行核转染,以进行肿瘤细胞中的基因编辑。通过DNA测序和随后的TIDE分析以及Western印迹分析,确定基因编辑效率。

[0660] 经编辑的T细胞过继转移到荷瘤小鼠体内

[0661] 使用P3原代细胞96孔核转染试剂盒(Lonza),用由Cas9蛋白(20 μ M)和结合的gRNA(20 μ M)组成的RNP进行电穿孔,以进行OT-I CD45.1 CD8 T细胞的编辑(每个电穿孔条件2x10⁶个细胞)。编辑新鲜分离的幼稚OT-I CD45.1+CD8 T细胞,然后与CD3+CD28+Dynabeads(Invitrogen)在完全RPMI培养基[含有1%青霉素/链霉素(Life Technologies 15140122)、50 μ M β -巯基乙醇(Life Technologies 21985023)和1% L-谷氨酰胺(Life Technologies 25030081)的RPMI 1640培养基(Life Technologies 11875119),补充10% FBS(Life Technologies 10437028)和2ng/ml IL-2+2.5ng/ml IL-7+50ng/ml IL-15]中培养24小时。然后去除Dynabeads,将细胞在含有2.5ng/mL IL-7+50ng/mL IL-15的新鲜培养基中再培养五天。通过Western印迹分析确认Carm1 gRNA的编辑效率。然后将Carm1或对照编辑的T细胞(100 μ L PBS中的1x10⁶个细胞)过继转移到具有B16-OVA-ZsGreen肿瘤的C57BL/6小鼠。另外一组小鼠注射100 μ L PBS(无T细胞对照)。每三天用数字卡尺测量肿瘤大小。

[0662] 表达NY-ESO-1特异性TCR的原代人CD8 T细胞的产生

[0663] 通过Ficoll密度梯度离心从健康供体的白细胞单采样品(布莱根妇女医院血库)分离外周血单个核细胞(PBMC)。按照制造商的说明,使用CD8 Dynabeads(StemCell#19053)从PBMC纯化CD8 T细胞。用 α CD3/ α CD28磁珠(Life Technologies#1132D,磁珠与T细胞的比例为1:2)激活分离的CD8细胞48小时,并在30U/mL人IL-2存在下培养一周。通过旋转感染用慢病毒转导扩增的CD8 T细胞,以引入NY-ESO-1TCR。用0.8ml 15 μ g/ml Retroconnectin(Takara;Kyoto,Japan)4 $^{\circ}$ C过夜包被非组织培养物处理的24孔板。在室温下用无菌2% BSA封闭孔15分钟,然后用PBS轻轻洗涤一次。接下来,按15倍感染复数(MOI)将慢病毒加到retroconnectin包被平板的孔中,并在2000x g、32 $^{\circ}$ C下旋转平板2.5小时。然后小心倒出微孔中的上清液,并用0.5ml PBS轻轻洗涤孔。将0.5x 10⁶个T细胞转移到在含有30U/ml IL-2的RPMI-1640培养基中包含10 μ g/ml鱼精蛋白硫酸盐(Sigma-Aldrich)的孔中,并培养三天。用FACS分离NY-ESO-1TCR+T细胞至纯度>90%,并用Dynabeads和IL-2(30U/ml)扩增。

[0664] T细胞细胞毒性测定

[0665] 使用Celigo图像细胞仪(Nexcelom)研究CD8 T细胞对荧光肿瘤细胞的杀伤。用PBS洗涤Carm1-KO或对照-KO B16-OVA-ZsGreen细胞,并在平底96孔板中每孔加入5000个肿瘤

细胞(8-10个重复/组)。OT-I CD8 T细胞按不同的效靶比加入。共培养24或48小时后,去除培养基,并用PBS洗涤孔,以去除死亡肿瘤细胞和CD8 T细胞。然后使用Celigo图像细胞仪对活的贴壁肿瘤细胞进行计数。作为替代方法,根据Caspase 3/7激活,对凋亡肿瘤细胞进行计数。在肿瘤细胞与T细胞共培养12、24或48小时后,将Caspase-3/7试剂(Essen Bioscience)直接添加到培养基(0.5 μ M终浓度),并使用图像细胞仪对阳性肿瘤细胞进行计数。

[0666] 使用NY-ESO-1转导的人CD8 T细胞以及呈HLA-A02*01阳性且内源表达NY-ESO-1抗原的BT549人三阴性乳腺癌细胞,进行了使用人肿瘤细胞的T细胞细胞毒性测定。BT549细胞与表达NY-ESO-1TCR的人CD8 T细胞按递增的效靶比(E:T)共培养12-72小时。通过流式细胞术定量细胞毒性。所有体外细胞毒性测定均在人或小鼠T细胞培养基(不添加IL-2)中进行。

[0667] RNA提取和RT-qPCR

[0668] 按照制造商的方案,使用RNeasy Mini Kit(Qiagen)提取总RNA。提取的RNA(1 μ g)按照制造商的方案(ThermoFisher),使用含ezDNase酶的SuperScript IV VIL0母混合物,转录为cDNA。稀释cDNA样品并用于实时定量PCR(RT-qPCR)。Taqman母混合物(ThermoFisher)和基因特异性引物用于PCR扩增,使用QuantStudio 6Flex实时PCR系统(ThermoFisher)进行检测。将RT-qPCR数据相对于GAPDH和HPRT(管家基因)进行归一化,并表示为测试样品与对照样品相比基因表达的倍数变化。

[0669] 蛋白质提取和免疫印迹

[0670] 通过在补充了Halt蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(ThermoFisher)的RIPA缓冲液[20mM Tris-HCl(pH 7.5)、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、1% NP-40、1%脱氧胆酸钠、2.5mM焦磷酸钠、1mM β -甘油磷酸、1mM Na₃VO₄、1 μ g/ml亮抑酶肽]中,对细胞进行裂解和超声处理,来制备全细胞提取物。使用Bradford蛋白测定法(Bio-Rad)测定蛋白质浓度。蛋白质样品(20 μ g)使用4-12% NuPAGE Novex Bis-Tris迷你凝胶(ThermoFisher)通过SDS-PAGE进行分离,并转移到PVDF膜(Bio-Rad)上。在含5%封闭剂粉末(Bio-Rad)和0.2%吐温的PBS中封闭印迹,然后与一抗过夜孵育。在与第二检测试剂孵育和随后洗涤后,在Western Lightening Plus ECL底物(PerkinElmer)中孵育印迹。使用ChemiDoc MP系统(Bio-Rad Laboratories)捕获发光。

[0671] 肿瘤细胞集落形成测定

[0672] 将B16F10、4T1和MC38细胞进行胰蛋白酶消化并转移到新鲜培养基中,计数并适当稀释,按500个细胞/孔的密度接种到6孔板中。使细胞生长5-6天,第3天添加新鲜培养基。用PBS洗涤细胞,并用结晶紫溶液(0.5%w/v结晶紫粉末、80%v/v H₂O和20%v/v甲醇)染色。根据用户手册,使用ImageJ软件定量集落数量和集落面积。

[0673] 免疫荧光成像

[0674] 细胞培养在玻璃盖玻片上,用PBS洗涤,并在室温下在含4%多聚甲醛的PBS中固定20分钟。细胞在0.2% Triton X-100中通透15分钟,然后用含10%血清的封闭剂(ThermoFisher)封闭30分钟。然后将盖玻片与一抗在4℃下在加湿室中孵育过夜,然后与二抗孵育1小时。一抗和二抗稀释在封闭缓冲液中,所有孵育均在室温下进行。使用含DAPI的Prolong Gold Antifade Mounting Medium(ThermoFisher)封固盖玻片。使用Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V3Digital CMOS相机和配有Plan Apo Lambda 60x/1.400il Ph3 DM物镜的

Nikon Ti-E Motorized Microscope 2000U显微镜进行成像。用Nikon Elements Acquisition Software捕获图像。所有评分均在盲法条件下进行。进行了三次独立实验,每组三个生物学重复。

[0675] 肿瘤细胞中微核的定量

[0676] 用DAPI对肿瘤细胞进行染色,并使用Plan Apo λ 100x/1.450i1 DIC物镜,使用Nikon Ti倒置显微镜,测定胞质微核阳性细胞的百分比。微核定义为在原始细胞核形态正常的细胞中与原始细胞核分开的离散DNA聚集体。分析中排除了出现凋亡的细胞。所有评分均在盲法条件下进行。进行了三次独立实验,每组三个生物学重复(每个重复,计数>100个细胞)。

[0677] 小鼠肿瘤模型

[0678] 4-6周龄雌性BALB/c (Jackson Laboratory#000651) 或C57BL/6J (Jackson Laboratory#000664) 小鼠购自The Jackson Laboratory。B16F10或MC38肿瘤细胞 (2×10^5) 于50 μ L PBS中皮下注射入同基因C57BL/6J小鼠中。4T1 TNBC细胞 (1×10^5) 于100 μ L补充Matrigel的PBS中原位注射入同基因BALB/c小鼠的乳腺脂肪垫。将具有相似肿瘤负担的小鼠随机分入治疗组。在第-1天、第0天以及然后在肿瘤接种后每3天,IP注射100 μ L PBS中的100 μ gCD8 β mAb (Bio X Cell, 克隆号53-5.8#BE0223), 来达到BALB/c和C57BL/6J小鼠中CD8T细胞的耗竭。用接受PBS中相同剂量的同种型对照mAb (Bio X Cell, 克隆HRPN#BE0088) 的小鼠作为对照。用CD8 mAb (Biolegend#100741) 标记来自脾脏的CD8 T细胞, 然后进行流式细胞术分析 (BD Fortessa, BD Biosciences), 确认CD8 T细胞耗竭。施用CD8 β 抗体后24小时内以及在实验终点, CD8 T细胞显著耗竭。

[0679] 对于检查点阻断实验, 对荷瘤小鼠施用抗CTLA4 mAb (克隆9H10, #BP0131, 100 μ g/注射) 或相应的同型型对照抗体 (多克隆叙利亚仓鼠IgG, 100 μ g/小鼠)。备选地, 小鼠从肿瘤接种后第7天开始、然后每3天接受抗PD1 (克隆29F.1A12, #BE0273, 200 μ g/注射) 或大鼠IgG2a同种型对照Ab抗三硝基苯酚 (克隆: 2A3, 200 μ g/注射)。每个实验的具体终点如图例所示。

[0680] 对于CARM1抑制剂实验, 小鼠每天两次通过经口灌胃接受CARM1抑制剂EZM2302 (100 μ L中的150mg/kg剂量) 或溶媒 (5%葡萄糖)。由于化合物的可用量有限, 抑制剂治疗进行了14天。

[0681] 4T1转移测定

[0682] 将Carm1-KO或对照-KO 4T1细胞 (10^5 个细胞) 注射到6周龄BALB/c小鼠的乳腺脂肪垫中。三周后, 用PBS洗涤肺组织三次, 并在Bouin溶液 (每个肺10mL) 中固定4-5天。在体视显微镜 (Leica) 下计数可见的转移性结节。

[0683] 多西环素诱导的Carm1体内表达

[0684] 对携带Carm1-KO B16F10肿瘤细胞 (用Dox-Carm1或空载体构建体转导) 的C57BL/6小鼠, 喂食含多西环素的饮食 (625ppm, Envigo Teclad), 直到实验终点 (18天)。接受常规饲料的小鼠作为对照。在实验终点通过Western印迹确认了Carm1在肿瘤内的表达。

[0685] 肿瘤浸润免疫细胞的流式细胞术分析

[0686] 肿瘤细胞接种后第18天切出肿瘤, 并使用无菌手术刀在无血清RPMI 1640培养基 (ThermoFisher#11875093) 中切成小块。在GentleMACSTM解离仪 (Miltenyi Biotec#130-

093-235) 上用GentleMACS-C或M管在1mg/ml IV型胶原酶(Sigma-Aldrich#C5138)、20单位/ml IV型DNase(Sigma-Aldrich#D5205)、0.1mg/ml V型透明质酸酶(Sigma-Aldrich#H6254)中解离组织,然后在37℃下孵育20分钟。使所得细胞悬浮液通过70 μ m过滤器,并通过300 x g离心5分钟沉淀。为了去除红细胞,添加ACK裂解缓冲液(3x体积)45-60秒,然后加入2体积的RPMI,以终止红细胞裂解。将来自合并上清液的沉淀细胞(>300x g或1500rpm,5分钟)重悬在适当的缓冲液中进行肿瘤的流式细胞术分析。

[0687] 单细胞悬液用5 μ g/mL的Fc受体阻断性抗小鼠CD16/CD32抗体(克隆2.4G2, BD PharMingen)在4℃染色5分钟,然后在100 μ L体积中用抗体混合物在4℃染色表面蛋白30分钟。然后用PBS洗涤细胞两次,用LIVE/DEAD固定死细胞染色试剂盒(Molecular Probes)在4℃染色15分钟,并用染色缓冲液(补充1% BSA和2mM EDTA的PBS)洗涤两次。最后,通过在4℃在BD Cytofix固定缓冲液(BD Biosciences)中孵育30分钟来固定细胞。使用BD LSR Fortessa X-20细胞分析仪和BD FACSDiva软件8.0版,分析样品。对于细胞内染色,用表面标记物对细胞进行染色,在Fix/Perm缓冲液(eBioscience)中固定15分钟,在通透缓冲液(eBiosciency)中洗涤两次,并用通透缓冲液中靶向胞内蛋白质的一抗在4℃染色30分钟。在FlowJo 10上进行数据分析。

[0688] 整体RNA-seq分析

[0689] 用Carm1或对照gRNA编辑B16F10肿瘤细胞或OT-I CD8 T细胞,通过Western印迹分析确认Carm1蛋白表达的缺失。按照制造商的方案,使用RNeasy Plus迷你试剂盒(Qiagen#74134),使用三个生物学重复来提取总RNA。使用安捷伦BioAnalyzer 2000仪器检查RNA质量。用完整性数值大于9.5的RNA进行后续分析。RNA-seq分析由GeneWiz进行。用标准mRNA文库制备TruSeq RNA样品制备试剂盒v2(Illumina)进行文库制备。通过Qubit(Invitrogen)定量文库的DNA浓度,并混合等量的DNA进行测序。在Illumina NextSeq 500仪器上,对编辑后的肿瘤细胞进行单端75bp测序,而对编辑后的CD8 T细胞进行配对端150bp测序。用RSEM(Li B,Dewey CN.RSEM:accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome.BMC Bioinformatics 2011;12:323)进行基因计数定量。在Carm1-KO肿瘤中,我们从肿瘤Carm1-KO RNA-seq研究得到了一系列基因,在所述研究中在Carm1-KO组和对照组之间进行了差异表达研究(DES)。利用“abs(log2FC)>0.05&FDR<0.05&TMP>1”的截断值,我们获得了146个上调基因和18个下调基因。总之,这164个基因代表了“Carm1敲除”或“Carm1抑制”的基因标签,因此所得到的基因标签在Carm1缺陷细胞中富集。差异表达基因的统计通过DESeq2(Love MI,Huber W,Anders S.Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.Genome Biol 2014;15(12):550)计算。采用log2FC>1、FDR<0.05和平均TPM>1的标准来钓出CD8 T细胞KO分析的显著差异表达基因,并将FDR<0.01的标准用于肿瘤细胞KO实验。

[0690] 哺乳动物天然延伸转录测序(mNET-Seq)

[0691] 样品按照之前的建议进行处理(Nojima T,Gomes T,Carmo-Fonseca M,Proudfoot NJ.Mammalian NET-seq analysis defines nascent RNA profiles and associated RNA processing genome-wide.Nat Protoc 2016;11(3):413-28)。简言之,每个实验条件下的三组8x10⁶个细胞分别处理,并在MNase处理后合并。蛋白G Dynabeads(ThermoFisher, 10004D)与以下抗体偶联:RNAPII Ser2-P(Abcam,兔多抗#5095,5 μ g/IP)、RNAPII CTD(克隆

8WG16, Biolegend#664912, 5 μ g/IP)。用NEBNext小RNA-seq文库制备试剂盒(#E7300S)进行文库合成。在文库制备前,使用安捷伦RNA6000Pico试剂盒(#5067-1513)评估样品质量。样品按照制造商的下一代测序(NGS)方案进行处理,但大小选择步骤除外,该步骤按之前所述进行(29)。我们选择了150-250bp的条码片段,其对应于23bp-123bp的RNA片段。使用PE75流动池,在Illumina Nextseq500平台上,对样品进行测序。如前所述(Nojima T, Gomes T, Carmo-Fonseca M, Proudfoot NJ. Mammalian NET-seq analysis defines nascent RNA profiles and associated RNA processing genome-wide. *Nat Protoc* 2016;11(3):413-28),分析由Dana Farber癌症研究所的分子生物学核心机构进行。

[0692] 计算分析

[0693] mNET-Seq数据分析

[0694] mNET-Seq读段的处理如(Nojima T, Gomes T, Grosso ARF, Kimura H, Dye MJ, Dhir S等Mammalian NET-Seq Reveals Genome-wide Nascent Transcription Coupled to RNA Processing. *Cell* 2015;161(3):526-40)中所述。简言之,使用软件工具Cutadapt(1.18版)去除衔接序列,并使用TopHat(2.1.1版)将修剪后的读段与小鼠基因组(mm10)比对。鉴定了每个一致的读段对中的第二读段5'端的位置和链性(strandness),并用于进一步分析。R编码环境(r-project.org)用于计算读段频率并进行统计分析。

[0695] 癌细胞系百科全书(CCLE)分析

[0696] 为了评价人癌细胞系中的CARM1表达及其与不同分子表型的相关性,我们收集并整理了来自Depmap的1208个细胞系的RNA-seq和突变图谱(Ghandi M, Huang FW, Jane-Valbuena J, Kryukov GV, Lo CC, McDonald ER, 3rd等Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature* 2019;569(7757):503-8)。为了研究CARM1表达与生物标志物和途径之间的相关性,我们以生物标志物和途径得分作为输出变量、CARM1 mRNA水平作为输入变量、并以癌症类型用于调整,拟合了线性回归模型。返回并报告了每个生物标志物和途径的经调整后p值。

[0697] TCGA数据分析

[0698] 从TCGA数据库(Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KR, Ozenberger BA, Ellrott K等The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* 2013;45(10):1113-20)收集了具有患者生存期和肿瘤基因表达谱的癌症数据集。在临床信息可用时,我们将乳腺癌数据集,分为腔内A、腔内B、HER-2阳性和基底型的PAM50(微阵列50预测分析)亚型(Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T等Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27(8):1160-7)。已知每个PAM50亚型都有不同的基因组学特征(Hoadley KA, Yau C, Wolf DM, Cherniack AD, Tamborero D, Ng S等Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. *Cell* 2014;158(4):929-44)和细胞毒性T细胞浸润程度(Miyan M, Schmidt-Mende J, Kiessling R, Poschke I, de Boniface J. Differential tumor infiltration by T-cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer. *J Transl Med* 2016;14(1):227)。在所有TCGA癌症中,黑色素瘤根据原发和转移部位进行注释;头颈癌(HNSC)对应于其HPV状态进行注释。在两个数据集都可用时,比较癌组织和匹配的正常组

织之间的CARM1表达水平。对于每个样品,将转录组图谱进行了 $\log_2(1+TPM)$ 转换。我们通过分位数归一化来标准化患者的对数标度转录组数据,并通过扣除所有样品的平均值来进一步正态化每个基因的表达,其中零值表示平均表达。通过Spearman相关性评估了CARM1表达和途径得分之间的相关性。为了进一步评估癌症中CARM1表达的临床相关性,我们使用Cox回归模型检查了CARM1表达和MED12是否与多种癌症类型中的生存益处相关。

[0699] 人单细胞RNA-seq数据分析

[0700] 以单细胞分辨率评估了人恶性细胞中的CARM1表达。检索并处理了来自基底细胞癌(GSE123813) (3551个细胞) (Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH, 2nd, Treacy D, Trombetta JJ等Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 2016;352(6282):189-96)、头颈鳞状细胞癌(GSE103322) (2488个细胞) (Zhang Z, Liu R, Jin R, Fan Y, Li T, Shuai Y等Integrating Clinical and Genetic Analysis of Perineural Invasion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol* 2019;9:434)、急性髓性白血病(GSE116256) (12489个细胞) (van Galen P, Hovestadt V, Wadsworth Ii MH, Hughes TK, Griffin GK, Battaglia S等Single-Cell RNA-Seq Reveals AML Hierarchies Relevant to Disease Progression and Immunity. *Cell* 2019;176(6):1265-81.e24)、急性成淋巴细胞白血病(GSE132509) (21370细胞)、多发性骨髓瘤(GSE141299) (16840个细胞)、非小细胞肺癌(GSE143423) (9237个细胞)的人恶性细胞scRNA-seq数据。对于每个收集的数据集,统一进行质量控制、聚类 and 细胞类型注释。注释的恶性细胞通过intraCNV (Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H等Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 2014;344(6190):1396-401) 根据其拷贝数变异进行确认。使用Seurat软件包中的AddModuleCore模块得出单细胞数据的途径得分 (Butler A, Hoffman P, Smibert P, Papalexi E, Satija R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nature biotechnology* 2018;36(5):411-20)。采用双侧非配对Mann-Whitney检验和Spearman相关性进行统计比较。

[0701] 基因本体和途径富集分析

[0702] 使用Metascape (Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O等Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 2019;10(1):1523) 或GSEA/mSigDB (Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdottir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* 2015;1(6):417-25) 进行基因本体和途径富集。对于我们研究中的整体肿瘤Carm1敲除,选择差异表达基因进行途径富集研究。途径标签基因获自GSEA/mSigDB标志基因集汇编。在整体RNA数据中,每个数据集中,使用平均归一化mRNA表达,计算途径标签分数。针对CCLE、TCGA和scRNA-seq数据中途径标签的表达模式,计算Spearman相关性。在TCGA数据中两个数据均可用时,用估计的纯度得分调整相关性。

[0703] 统计分析

[0704] 使用R3.6和GraphPad Prism 6软件进行统计分析。每个实验按所示进行2-3次。按

所示用非配对Student t检验、双因素方差分析或非配对双侧Mann-Whitney检验进行两组间的比较,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$,**** $p < 0.0001$,ns(不显著)。对于体内研究,样本量被确定为效应量的函数((平均值差异)/(SD)=2.0),用于双样本t检验比较,其中采取显著性水平5%,效力90%,以及双侧t检验。使用正态概率图确认正态分布(GraphPad Prism6.0,GraphPad Software,San Diego,CA),评估组内和组间方差。使用Student t检验比较各组的平均值。采用多重比较,以双因素方差分析,分析原发性肿瘤随时间的生长情况。为了比较小鼠存活曲线,使用了Log-rank (Mantel-Cox) 检验。所有p值都是双侧的,在0.05水平上评估统计显著性。

[0705] 数据和材料可得性

[0706] 本研究期间产生的所有转录组学数据(RNA-seq,mNET-seq和DRIP-seq))均保存在NCBI GEO(Gene Expression Omnibus),检索号为GSE144917、GSE149139和GSE148905。

[0707] 等同方案

[0708] 使用不超出常规的实验,本领域技术人员将认识到或能够确定本文所述具体物质和程序的许多等同方案。这些等同方案被视为在本发明的范围内,并为权利要求书所涵盖。

序列表

<110> 达纳-法伯癌症研究公司 (Dana Farber Cancer Institute)

<120> 通过抑制CARM1治疗癌症的方法

<130> 14293-1000

<150> US 62/991,479

<151> 2019-03-18

<160> 16

<170> PatentIn 版本3.5

<210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

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

```

195	200	205
Lys Ile Tyr Ala Val Glu Ala Ser Thr Met Ala Gln His Ala Glu Val		
210	215	220
Leu Val Lys Ser Asn Asn Leu Thr Asp Arg Ile Val Val Ile Pro Gly		
225	230	235
Lys Val Glu Glu Val Ser Leu Pro Glu Gln Val Asp Ile Ile Ile Ser		
245	250	255
Glu Pro Met Gly Tyr Met Leu Phe Asn Glu Arg Met Leu Glu Ser Tyr		
260	265	270
Leu His Ala Lys Lys Tyr Leu Lys Pro Ser Gly Asn Met Phe Pro Thr		
275	280	285
Ile Gly Asp Val His Leu Ala Pro Phe Thr Asp Glu Gln Leu Tyr Met		
290	295	300
Glu Gln Phe Thr Lys Ala Asn Phe Trp Tyr Gln Pro Ser Phe His Gly		
305	310	315
Val Asp Leu Ser Ala Leu Arg Gly Ala Ala Val Asp Glu Tyr Phe Arg		
325	330	335
Gln Pro Val Val Asp Thr Phe Asp Ile Arg Ile Leu Met Ala Lys Ser		
340	345	350
Val Lys Tyr Thr Val Asn Phe Leu Glu Ala Lys Glu Gly Asp Leu His		
355	360	365
Arg Ile Glu Ile Pro Phe Lys Phe His Met Leu His Ser Gly Leu Val		
370	375	380
His Gly Leu Ala Phe Trp Phe Asp Val Ala Phe Ile Gly Ser Ile Met		
385	390	395
Thr Val Trp Leu Ser Thr Ala Pro Thr Glu Pro Leu Thr His Trp Tyr		
405	410	415
Gln Val Arg Cys Leu Phe Gln Ser Pro Leu Phe Ala Lys Ala Gly Asp		
420	425	430
Thr Leu Ser Gly Thr Cys Leu Leu Ile Ala Asn Lys Arg Gln Ser Tyr		
435	440	445
Asp Ile Ser Ile Val Ala Gln Val Asp Gln Thr Gly Ser Lys Ser Ser		
450	455	460
Asn Leu Leu Asp Leu Lys Asn Pro Phe Phe Arg Tyr Thr Gly Thr Thr		
465	470	475
Pro Ser Pro Pro Pro Gly Ser His Tyr Thr Ser Pro Ser Glu Asn Met		
485	490	495
Trp Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Gly Met Ala Val Ala		
500	505	510

Gly Met Pro Thr Ala Tyr Asp Leu Ser Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser
 515 520 525
 Ser Val Gly His Asn Asn Leu Ile Pro Leu Gly Ser Ser Gly Ala Gln
 530 535 540
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Ser Ala His Tyr Ala Val Asn Ser Gln
 545 550 555 560
 Phe Thr Met Gly Gly Pro Ala Ile Ser Met Ala Ser Pro Met Ser Ile
 565 570 575
 Pro Thr Asn Thr Met His Tyr Gly Ser
 580 585
 <210> 2
 <211> 384
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 2
 Met Ala Ala Ala Ala Ala Val Gly Pro Gly Ala Gly Gly Ala Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Val Pro Gly Gly Ala Gly Pro Cys Ala Thr Val Ser Val Phe
 20 25 30
 Pro Gly Ala Arg Leu Leu Thr Ile Gly Asp Ala Asn Gly Glu Ile Gln
 35 40 45
 Arg His Ala Glu Gln Gln Ala Leu Arg Leu Glu Val Arg Ala Gly Pro
 50 55 60
 Asp Ser Ala Gly Ile Ala Leu Tyr Ser His Glu Asp Val Cys Val Phe
 65 70 75 80
 Lys Cys Ser Val Ser Arg Glu Thr Glu Cys Ser Arg Val Gly Lys Gln
 85 90 95
 Ser Phe Ile Ile Thr Leu Gly Cys Asn Ser Val Leu Ile Gln Phe Ala
 100 105 110
 Thr Pro Asn Asp Phe Cys Ser Phe Tyr Asn Ile Leu Lys Thr Cys Arg
 115 120 125
 Gly His Thr Leu Glu Arg Ser Val Phe Ser Glu Arg Thr Glu Glu Ser
 130 135 140
 Ser Ala Val Gln Tyr Phe Gln Phe Tyr Gly Tyr Leu Ser Gln Gln Gln
 145 150 155 160
 Asn Met Met Gln Asp Tyr Val Arg Thr Gly Thr Tyr Gln Arg Ala Ile
 165 170 175
 Leu Gln Asn His Thr Asp Phe Lys Asp Lys Ile Val Leu Asp Val Gly
 180 185 190

Cys Gly Ser Gly Ile Leu Ser Phe Phe Ala Ala Gln Ala Gly Ala Arg			
195	200	205	
Lys Ile Tyr Ala Val Glu Ala Ser Thr Met Ala Gln His Ala Glu Val			
210	215	220	
Leu Val Lys Ser Asn Asn Leu Thr Asp Arg Ile Val Val Ile Pro Gly			
225	230	235	240
Lys Val Glu Glu Val Ser Leu Pro Glu Gln Val Asp Ile Ile Ile Ser			
	245	250	255
Glu Pro Met Gly Tyr Met Leu Phe Asn Glu Arg Met Leu Glu Ser Tyr			
	260	265	270
Leu His Ala Lys Lys Tyr Leu Lys Pro Ser Gly Asn Met Phe Pro Thr			
	275	280	285
Ile Gly Asp Val His Leu Ala Pro Phe Thr Asp Glu Gln Leu Tyr Met			
290	295	300	
Glu Gln Phe Thr Lys Ala Asn Phe Trp Tyr Gln Pro Ser Phe His Gly			
305	310	315	320
Val Asp Leu Ser Ala Leu Arg Gly Ala Ala Val Asp Glu Tyr Phe Arg			
	325	330	335
Gln Pro Val Val Asp Thr Phe Asp Ile Arg Ile Leu Met Ala Lys Ser			
	340	345	350
Val Lys Tyr Thr Val Asn Phe Leu Glu Ala Lys Glu Gly Asp Leu His			
	355	360	365
Ser Ala Cys Leu Ala Ser Pro Ala Ala Thr Ala Leu Cys Leu Pro Gly			
370	375	380	
<210>	3		
<211>	608		
<212>	PRT		
<213>	智人(Homo sapiens)		
<400>	3		
Met Ala Ala Ala Ala Ala Val Gly Pro Gly Ala Gly Gly Ala Gly			
1	5	10	15
Ser Ala Val Pro Gly Gly Ala Gly Pro Cys Ala Thr Val Ser Val Phe			
	20	25	30
Pro Gly Ala Arg Leu Leu Thr Ile Gly Asp Ala Asn Gly Glu Ile Gln			
	35	40	45
Arg His Ala Glu Gln Gln Ala Leu Arg Leu Glu Val Arg Ala Gly Pro			
	50	55	60
Asp Ser Ala Gly Ile Ala Leu Tyr Ser His Glu Asp Val Cys Val Phe			
65	70	75	80

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

385	390	395	400
Thr Val Trp Leu Ser Thr Ala Pro Thr Glu Pro Leu Thr His Trp Tyr			
	405	410	415
Gln Val Arg Cys Leu Phe Gln Ser Pro Leu Phe Ala Lys Ala Gly Asp			
	420	425	430
Thr Leu Ser Gly Thr Cys Leu Leu Ile Ala Asn Lys Arg Gln Ser Tyr			
	435	440	445
Asp Ile Ser Ile Val Ala Gln Val Asp Gln Thr Gly Ser Lys Ser Ser			
	450	455	460
Asn Leu Leu Asp Leu Lys Asn Pro Phe Phe Arg Tyr Thr Gly Thr Thr			
465	470	475	480
Pro Ser Pro Pro Pro Gly Ser His Tyr Thr Ser Pro Ser Glu Asn Met			
	485	490	495
Trp Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Gly Met Ala Val Ala			
	500	505	510
Gly Met Pro Thr Ala Tyr Asp Leu Ser Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser			
	515	520	525
Ser Val Gly His Asn Asn Leu Ile Pro Leu Ala Asn Thr Gly Ile Val			
	530	535	540
Asn His Thr His Ser Arg Met Gly Ser Ile Met Ser Thr Gly Ile Val			
545	550	555	560
Gln Gly Ser Ser Gly Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Ser Ala			
	565	570	575
His Tyr Ala Val Asn Ser Gln Phe Thr Met Gly Gly Pro Ala Ile Ser			
	580	585	590
Met Ala Ser Pro Met Ser Ile Pro Thr Asn Thr Met His Tyr Gly Ser			
	595	600	605
<210> 4			
<211> 651			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 4			
Met Leu Arg Leu Gln Met Thr Asp Gly His Ile Ser Cys Thr Ala Val			
1	5	10	15
Glu Phe Ser Tyr Met Ser Lys Ile Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Thr			
	20	25	30
Lys Val Lys Leu Ser Gly Ile Val Asp Ile Lys Asn Gly Phe Leu Leu			
	35	40	45
Leu Asn Asp Ser Asn Thr Thr Val Leu Gly Gly Glu Val Glu His Leu			

50	55	60
Ile Glu Lys Trp Glu Leu Gln Arg Ser Leu Ser Lys His Asn Arg Ser		
65	70	75
Asn Ile Gly Thr Glu Gly Gly Pro Pro Pro Phe Val Pro Phe Gly Gln		80
85	90	95
Lys Cys Val Ser His Val Gln Val Asp Ser Arg Glu Leu Asp Arg Arg		
100	105	110
Lys Thr Leu Gln Val Thr Met Pro Val Lys Pro Thr Asn Asp Asn Asp		
115	120	125
Glu Phe Glu Lys Gln Arg Thr Ala Ala Ile Ala Glu Val Ala Lys Ser		
130	135	140
Lys Glu Thr Lys Thr Phe Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Arg Ser Asn		
145	150	155
Leu Asn Met Asn Ala Ala Gly Asn Arg Asn Arg Glu Val Leu Gln Lys		
165	170	175
Glu Lys Ser Thr Lys Ser Glu Gly Lys His Glu Gly Val Tyr Arg Glu		
180	185	190
Leu Val Asp Glu Lys Ala Leu Lys His Ile Thr Glu Met Gly Phe Ser		
195	200	205
Lys Glu Ala Ser Arg Gln Ala Leu Met Asp Asn Gly Asn Asn Leu Glu		
210	215	220
Ala Ala Leu Asn Val Leu Leu Thr Ser Asn Lys Gln Lys Pro Val Met		
225	230	235
Gly Pro Pro Leu Arg Gly Arg Gly Lys Gly Arg Gly Arg Ile Arg Ser		
245	250	255
Glu Asp Glu Glu Asp Leu Gly Asn Ala Arg Pro Ser Ala Pro Ser Thr		
260	265	270
Leu Phe Asp Phe Leu Glu Ser Lys Met Gly Thr Leu Asn Val Glu Glu		
275	280	285
Pro Lys Ser Gln Pro Gln Gln Leu His Gln Gly Gln Tyr Arg Ser Ser		
290	295	300
Asn Thr Glu Gln Asn Gly Val Lys Asp Asn Asn His Leu Arg His Pro		
305	310	315
Pro Arg Asn Asp Thr Arg Gln Pro Arg Asn Glu Lys Pro Pro Arg Phe		
325	330	335
Gln Arg Asp Ser Gln Asn Ser Lys Ser Val Leu Glu Gly Ser Gly Leu		
340	345	350
Pro Arg Asn Arg Gly Ser Glu Arg Pro Ser Thr Ser Ser Val Ser Glu		
355	360	365

Val Trp Ala Glu Asp Arg Ile Lys Cys Asp Arg Pro Tyr Ser Arg Tyr		
370	375	380
Asp Arg Thr Lys Asp Thr Ser Tyr Pro Leu Gly Ser Gln His Ser Asp		
385	390	395 400
Gly Ala Phe Lys Lys Arg Asp Asn Ser Met Gln Ser Arg Ser Gly Lys		
405	410	415
Gly Pro Ser Phe Ala Glu Ala Lys Glu Asn Pro Leu Pro Gln Gly Ser		
420	425	430
Val Asp Tyr Asn Asn Gln Lys Arg Gly Lys Arg Glu Ser Gln Thr Ser		
435	440	445
Ile Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp Arg Lys Ser Gln Thr Ile Asn Asn Glu		
450	455	460
Ala Phe Ser Gly Ile Lys Ile Glu Lys His Phe Asn Val Asn Thr Asp		
465	470	475 480
Tyr Gln Asn Pro Val Arg Ser Asn Ser Phe Ile Gly Val Pro Asn Gly		
485	490	495
Glu Val Glu Met Pro Leu Lys Gly Arg Arg Ile Gly Pro Ile Lys Pro		
500	505	510
Ala Gly Pro Val Thr Ala Val Pro Cys Asp Asp Lys Ile Phe Tyr Asn		
515	520	525
Ser Gly Pro Lys Arg Arg Ser Gly Pro Ile Lys Pro Glu Lys Ile Leu		
530	535	540
Glu Ser Ser Ile Pro Met Glu Tyr Ala Lys Met Trp Lys Pro Gly Asp		
545	550	555 560
Glu Cys Phe Ala Leu Tyr Trp Glu Asp Asn Lys Phe Tyr Arg Ala Glu		
565	570	575
Val Glu Ala Leu His Ser Ser Gly Met Thr Ala Val Val Lys Phe Ile		
580	585	590
Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Glu Val Leu Leu Ser Asn Ile Lys Pro Ile		
595	600	605
Gln Thr Glu Ala Trp Glu Glu Glu Gly Thr Tyr Asp Gln Thr Leu Glu		
610	615	620
Phe Arg Arg Gly Gly Asp Gly Gln Pro Arg Arg Ser Thr Arg Pro Thr		
625	630	635 640
Gln Gln Phe Tyr Gln Pro Pro Arg Ala Arg Asn		
645	650	

<210> 5

<211> 650

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5

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

290	295	300
Thr Glu Gln Asn Gly Val	Lys Asp Asn Asn His	Leu Arg His Pro Pro
305	310	315 320
Arg Asn Asp Thr Arg	Gln Pro Arg Asn Glu Lys	Pro Pro Arg Phe Gln
325	330	335
Arg Asp Ser Gln Asn Ser	Lys Ser Val Leu Glu Gly	Ser Gly Leu Pro
340	345	350
Arg Asn Arg Gly Ser Glu	Arg Pro Ser Thr Ser	Ser Val Ser Glu Val
355	360	365
Trp Ala Glu Asp Arg Ile	Lys Cys Asp Arg Pro	Tyr Ser Arg Tyr Asp
370	375	380
Arg Thr Lys Asp Thr Ser	Tyr Pro Leu Gly Ser	Gln His Ser Asp Gly
385	390	395 400
Ala Phe Lys Lys Arg Asp	Asn Ser Met Gln Ser	Arg Ser Gly Lys Gly
405	410	415
Pro Ser Phe Ala Glu Ala	Lys Glu Asn Pro Leu	Pro Gln Gly Ser Val
420	425	430
Asp Tyr Asn Asn Gln Lys	Arg Gly Lys Arg Glu	Ser Gln Thr Ser Ile
435	440	445
Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp	Arg Lys Ser Gln Thr	Ile Asn Asn Glu Ala
450	455	460
Phe Ser Gly Ile Lys Ile	Glu Lys His Phe Asn	Val Asn Thr Asp Tyr
465	470	475 480
Gln Asn Pro Val Arg Ser	Asn Ser Phe Ile Gly	Val Pro Asn Gly Glu
485	490	495
Val Glu Met Pro Leu Lys	Gly Arg Arg Ile Gly	Pro Ile Lys Pro Ala
500	505	510
Gly Pro Val Thr Ala Val	Pro Cys Asp Asp Lys	Ile Phe Tyr Asn Ser
515	520	525
Gly Pro Lys Arg Arg Ser	Gly Pro Ile Lys Pro	Glu Lys Ile Leu Glu
530	535	540
Ser Ser Ile Pro Met Glu	Tyr Ala Lys Met Trp	Lys Pro Gly Asp Glu
545	550	555 560
Cys Phe Ala Leu Tyr Trp	Glu Asp Asn Lys Phe	Tyr Arg Ala Glu Val
565	570	575
Glu Ala Leu His Ser Ser	Gly Met Thr Ala Val	Val Lys Phe Ile Asp
580	585	590
Tyr Gly Asn Tyr Glu Glu	Val Leu Leu Ser Asn	Ile Lys Pro Ile Gln
595	600	605

Thr Glu Ala Trp Glu Glu Glu Gly Thr Tyr Asp Gln Thr Leu Glu Phe
 610 615 620
 Arg Arg Gly Gly Asp Gly Gln Pro Arg Arg Ser Thr Arg Pro Thr Gln
 625 630 635 640
 Gln Phe Tyr Gln Pro Pro Arg Ala Arg Asn
 645 650
 <210> 6
 <211> 744
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 6
 Met Ala Gln Val Ala Gly Ala Ala Leu Ser Gln Ala Gly Trp Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ser Asp Glu Gly Ile Glu Ala Cys Thr Ser Ser Pro Asp Lys Val Asn
 20 25 30
 Val Asn Asp Ile Ile Leu Ile Ala Leu Asn Thr Asp Leu Arg Thr Ile
 35 40 45
 Gly Lys Lys Phe Leu Pro Ser Asp Ile Asn Ser Gly Lys Val Glu Lys
 50 55 60
 Leu Glu Gly Pro Cys Val Leu Gln Ile Gln Lys Ile Arg Asn Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Pro Lys Asp Asn Glu Glu Ser Gln Ala Ala Pro Arg Met Leu Arg
 85 90 95
 Leu Gln Met Thr Asp Gly His Ile Ser Cys Thr Ala Val Glu Phe Ser
 100 105 110
 Tyr Met Ser Lys Ile Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Thr Lys Val Lys
 115 120 125
 Leu Ser Gly Ile Val Asp Ile Lys Asn Gly Phe Leu Leu Leu Asn Asp
 130 135 140
 Ser Asn Thr Thr Val Leu Gly Gly Glu Val Glu His Leu Ile Glu Lys
 145 150 155 160
 Trp Glu Leu Gln Arg Ser Leu Ser Lys His Asn Arg Ser Asn Ile Gly
 165 170 175
 Thr Glu Gly Gly Pro Pro Pro Phe Val Pro Phe Gly Gln Lys Cys Val
 180 185 190
 Ser His Val Gln Val Asp Ser Arg Glu Leu Asp Arg Arg Lys Thr Leu
 195 200 205
 Gln Val Thr Met Pro Val Lys Pro Thr Asn Asp Asn Asp Glu Phe Glu
 210 215 220

Lys	Gln	Arg	Thr	Ala	Ala	Ile	Ala	Glu	Val	Ala	Lys	Ser	Lys	Glu	Thr
225						230				235					240
Lys	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Arg	Ser	Asn	Leu	Asn	Met
			245						250					255	
Asn	Ala	Ala	Gly	Asn	Arg	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	Gln	Lys	Glu	Lys	Ser
			260					265					270		
Thr	Lys	Ser	Glu	Gly	Lys	His	Glu	Gly	Val	Tyr	Arg	Glu	Leu	Val	Asp
		275					280					285			
Glu	Lys	Ala	Leu	Lys	His	Ile	Thr	Glu	Met	Gly	Phe	Ser	Lys	Glu	Ala
	290					295					300				
Ser	Arg	Gln	Ala	Leu	Met	Asp	Asn	Gly	Asn	Asn	Leu	Glu	Ala	Ala	Leu
305					310					315					320
Asn	Val	Leu	Leu	Thr	Ser	Asn	Lys	Gln	Lys	Pro	Val	Met	Gly	Pro	Pro
			325					330					335		
Leu	Arg	Gly	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Gly	Arg	Ile	Arg	Ser	Glu	Asp	Glu
		340						345					350		
Glu	Asp	Leu	Gly	Asn	Ala	Arg	Pro	Ser	Ala	Pro	Ser	Thr	Leu	Phe	Asp
	355						360					365			
Phe	Leu	Glu	Ser	Lys	Met	Gly	Thr	Leu	Asn	Val	Glu	Glu	Pro	Lys	Ser
	370					375					380				
Gln	Pro	Gln	Gln	Leu	His	Gln	Gly	Gln	Tyr	Arg	Ser	Ser	Asn	Thr	Glu
385					390					395					400
Gln	Asn	Gly	Val	Lys	Asp	Asn	Asn	His	Leu	Arg	His	Pro	Pro	Arg	Asn
			405					410					415		
Asp	Thr	Arg	Gln	Pro	Arg	Asn	Glu	Lys	Pro	Pro	Arg	Phe	Gln	Arg	Asp
		420						425				430			
Ser	Gln	Asn	Ser	Lys	Ser	Val	Leu	Glu	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	Arg	Asn
	435					440						445			
Arg	Gly	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Val	Ser	Glu	Val	Trp	Ala
	450					455				460					
Glu	Asp	Arg	Ile	Lys	Cys	Asp	Arg	Pro	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Asp	Arg	Thr
465					470					475					480
Lys	Asp	Thr	Ser	Tyr	Pro	Leu	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Asp	Gly	Ala	Phe
			485					490				495			
Lys	Lys	Arg	Asp	Asn	Ser	Met	Gln	Ser	Arg	Ser	Gly	Lys	Gly	Pro	Ser
		500						505				510			
Phe	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Asn	Pro	Leu	Pro	Gln	Gly	Ser	Val	Asp	Tyr
	515						520				525				
Asn	Asn	Gln	Lys	Arg	Gly	Lys	Arg	Glu	Ser	Gln	Thr	Ser	Ile	Pro	Asp

530	535	540
Tyr Phe Tyr Asp Arg Lys Ser Gln Thr Ile Asn Asn Glu Ala Phe Ser		
545	550	555
Gly Ile Lys Ile Glu Lys His Phe Asn Val Asn Thr Asp Tyr Gln Asn		
565	570	575
Pro Val Arg Ser Asn Ser Phe Ile Gly Val Pro Asn Gly Glu Val Glu		
580	585	590
Met Pro Leu Lys Gly Arg Arg Ile Gly Pro Ile Lys Pro Ala Gly Pro		
595	600	605
Val Thr Ala Val Pro Cys Asp Asp Lys Ile Phe Tyr Asn Ser Gly Pro		
610	615	620
Lys Arg Arg Ser Gly Pro Ile Lys Pro Glu Lys Ile Leu Glu Ser Ser		
625	630	635
Ile Pro Met Glu Tyr Ala Lys Met Trp Lys Pro Gly Asp Glu Cys Phe		
645	650	655
Ala Leu Tyr Trp Glu Asp Asn Lys Phe Tyr Arg Ala Glu Val Glu Ala		
660	665	670
Leu His Ser Ser Gly Met Thr Ala Val Val Lys Phe Ile Asp Tyr Gly		
675	680	685
Asn Tyr Glu Glu Val Leu Leu Ser Asn Ile Lys Pro Ile Gln Thr Glu		
690	695	700
Ala Trp Glu Glu Glu Gly Thr Tyr Asp Gln Thr Leu Glu Phe Arg Arg		
705	710	715
Gly Gly Asp Gly Gln Pro Arg Arg Ser Thr Arg Pro Thr Gln Gln Phe		
725	730	735
Tyr Gln Pro Pro Arg Ala Arg Asn		
740		
<210> 7		
<211> 2177		
<212> PRT		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 7		
Met Ala Ala Phe Gly Ile Leu Ser Tyr Glu His Arg Pro Leu Lys Arg		
1	5	10
Pro Arg Leu Gly Pro Pro Asp Val Tyr Pro Gln Asp Pro Lys Gln Lys		
20	25	30
Glu Asp Glu Leu Thr Ala Leu Asn Val Lys Gln Gly Phe Asn Asn Gln		
35	40	45
Pro Ala Val Ser Gly Asp Glu His Gly Ser Ala Lys Asn Val Ser Phe		

50	55	60
Asn Pro Ala Lys Ile Ser Ser Asn Phe Ser Ser Ile Ile Ala Glu Lys		
65	70	75
Leu Arg Cys Asn Thr Leu Pro Asp Thr Gly Arg Arg Lys Pro Gln Val		80
	85	90
Asn Gln Lys Asp Asn Phe Trp Leu Val Thr Ala Arg Ser Gln Ser Ala		95
	100	105
Ile Asn Thr Trp Phe Thr Asp Leu Ala Gly Thr Lys Pro Leu Thr Gln		110
	115	120
Leu Ala Lys Lys Val Pro Ile Phe Ser Lys Lys Glu Glu Val Phe Gly		125
	130	135
Tyr Leu Ala Lys Tyr Thr Val Pro Val Met Arg Ala Ala Trp Leu Ile		140
145	150	155
Lys Met Thr Cys Ala Tyr Tyr Ala Ala Ile Ser Glu Thr Lys Val Lys		160
	165	170
Lys Arg His Val Asp Pro Phe Met Glu Trp Thr Gln Ile Ile Thr Lys		175
	180	185
Tyr Leu Trp Glu Gln Leu Gln Lys Met Ala Glu Tyr Tyr Arg Pro Gly		190
	195	200
Pro Ala Gly Ser Gly Gly Cys Gly Ser Thr Ile Gly Pro Leu Pro His		205
	210	215
Asp Val Glu Val Ala Ile Arg Gln Trp Asp Tyr Thr Glu Lys Leu Ala		220
225	230	235
Met Phe Met Phe Gln Asp Gly Met Leu Asp Arg His Glu Phe Leu Thr		240
	245	250
Trp Val Leu Glu Cys Phe Glu Lys Ile Arg Pro Gly Glu Asp Glu Leu		255
	260	265
Leu Lys Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Arg Tyr Ser Gly Glu Phe Val		270
	275	280
Gln Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Arg Leu Ala Tyr Phe Cys Thr Arg Arg		285
	290	295
Leu Ala Leu Gln Leu Asp Gly Val Ser Ser His Ser Ser His Val Ile		300
305	310	315
Ser Ala Gln Ser Thr Ser Thr Leu Pro Thr Thr Pro Ala Pro Gln Pro		320
	325	330
Pro Thr Ser Ser Thr Pro Ser Thr Pro Phe Ser Asp Leu Leu Met Cys		335
	340	345
Pro Gln His Arg Pro Leu Val Phe Gly Leu Ser Cys Ile Leu Gln Thr		350
	355	360
		365

Ile	Leu	Leu	Cys	Cys	Pro	Ser	Ala	Leu	Val	Trp	His	Tyr	Ser	Leu	Thr
370						375					380				
Asp	Ser	Arg	Ile	Lys	Thr	Gly	Ser	Pro	Leu	Asp	His	Leu	Pro	Ile	Ala
385					390					395					400
Pro	Ser	Asn	Leu	Pro	Met	Pro	Glu	Gly	Asn	Ser	Ala	Phe	Thr	Gln	Gln
				405					410					415	
Val	Arg	Ala	Lys	Leu	Arg	Glu	Ile	Glu	Gln	Gln	Ile	Lys	Glu	Arg	Gly
			420					425					430		
Gln	Ala	Val	Glu	Val	Arg	Trp	Ser	Phe	Asp	Lys	Cys	Gln	Glu	Ala	Thr
		435					440					445			
Ala	Gly	Phe	Thr	Ile	Gly	Arg	Val	Leu	His	Thr	Leu	Glu	Val	Leu	Asp
	450					455					460				
Ser	His	Ser	Phe	Glu	Arg	Ser	Asp	Phe	Ser	Asn	Ser	Leu	Asp	Ser	Leu
465					470					475					480
Cys	Asn	Arg	Ile	Phe	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Lys	Asp	Gly	His	Glu	Ile
				485					490					495	
Ser	Ser	Asp	Asp	Asp	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Leu	Cys	Glu	Trp	Ala	Val
			500					505					510		
Ser	Cys	Lys	Arg	Ser	Gly	Arg	His	Arg	Ala	Met	Val	Val	Ala	Lys	Leu
		515					520						525		
Leu	Glu	Lys	Arg	Gln	Ala	Glu	Ile	Glu	Ala	Glu	Arg	Cys	Gly	Glu	Ser
	530					535					540				
Glu	Ala	Ala	Asp	Glu	Lys	Gly	Ser	Ile	Ala	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ala
545					550					555					560
Pro	Ser	Ala	Pro	Ile	Phe	Gln	Asp	Val	Leu	Leu	Gln	Phe	Leu	Asp	Thr
				565					570					575	
Gln	Ala	Pro	Met	Leu	Thr	Asp	Pro	Arg	Ser	Glu	Ser	Glu	Arg	Val	Glu
			580					585					590		
Phe	Phe	Asn	Leu	Val	Leu	Leu	Phe	Cys	Glu	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Val
		595					600					605			
Phe	Ser	His	Asn	Met	Tyr	Thr	Cys	Thr	Leu	Ile	Ser	Arg	Gly	Asp	Leu
	610					615					620				
Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Arg	Pro	Pro	Ser	Pro	Phe	Asp	Asp	Pro
625					630					635					640
Ala	Asp	Asp	Pro	Glu	His	Lys	Glu	Ala	Glu	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys
				645					650				655		
Leu	Glu	Asp	Pro	Gly	Leu	Ser	Glu	Ser	Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Ser	Ser
			660					665				670			
Ser	Val	Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Glu	Lys	Pro	Asp	Phe	Ser	Leu	Phe	Ser

675	680	685
Pro Thr Met Pro Cys Glu Gly Lys Gly Ser Pro Ser Pro Glu Lys Pro		
690	695	700
Asp Val Glu Lys Glu Val Lys Pro Pro Pro Lys Glu Lys Ile Glu Gly		
705	710	715
Thr Leu Gly Val Leu Tyr Asp Gln Pro Arg His Val Gln Tyr Ala Thr		
725	730	735
His Phe Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ser Cys Ser His Glu Cys Asn Gln		
740	745	750
Arg Leu Val Val Leu Phe Gly Val Gly Lys Gln Arg Asp Asp Ala Arg		
755	760	765
His Ala Ile Lys Lys Ile Thr Lys Asp Ile Leu Lys Val Leu Asn Arg		
770	775	780
Lys Gly Thr Ala Glu Thr Asp Gln Leu Ala Pro Ile Val Pro Leu Asn		
785	790	795
Pro Gly Asp Leu Thr Phe Leu Gly Gly Glu Asp Gly Gln Lys Arg Arg		
805	810	815
Arg Asn Arg Pro Glu Ala Phe Pro Thr Ala Glu Asp Ile Phe Ala Lys		
820	825	830
Phe Gln His Leu Ser His Tyr Asp Gln His Gln Val Thr Ala Gln Val		
835	840	845
Ser Arg Asn Val Leu Glu Gln Ile Thr Ser Phe Ala Leu Gly Met Ser		
850	855	860
Tyr His Leu Pro Leu Val Gln His Val Gln Phe Ile Phe Asp Leu Met		
865	870	875
Glu Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu Ile Asp Phe Ala Ile Gln Leu		
885	890	895
Leu Asn Glu Leu Ser Val Val Glu Ala Glu Leu Leu Leu Lys Ser Ser		
900	905	910
Asp Leu Val Gly Ser Tyr Thr Thr Ser Leu Cys Leu Cys Ile Val Ala		
915	920	925
Val Leu Arg His Tyr His Ala Cys Leu Ile Leu Asn Gln Asp Gln Met		
930	935	940
Ala Gln Val Phe Glu Gly Leu Cys Gly Val Val Lys His Gly Met Asn		
945	950	955
Arg Ser Asp Gly Ser Ser Ala Glu Arg Cys Ile Leu Ala Tyr Leu Tyr		
965	970	975
Asp Leu Tyr Thr Ser Cys Ser His Leu Lys Asn Lys Phe Gly Glu Leu		
980	985	990

Phe	Ser	Asp	Phe	Cys	Ser	Lys	Val	Lys	Asn	Thr	Ile	Tyr	Cys	Asn	Val
995				1000				1005							
Glu	Pro	Ser	Glu	Ser	Asn	Met	Arg	Trp	Ala	Pro	Glu	Phe	Met	Ile	
1010				1015				1020							
Asp	Thr	Leu	Glu	Asn	Pro	Ala	Ala	His	Thr	Phe	Thr	Tyr	Thr	Gly	
1025				1030				1035							
Leu	Gly	Lys	Ser	Leu	Ser	Glu	Asn	Pro	Ala	Asn	Arg	Tyr	Ser	Phe	
1040				1045				1050							
Val	Cys	Asn	Ala	Leu	Met	His	Val	Cys	Val	Gly	His	His	Asp	Pro	
1055				1060				1065							
Asp	Arg	Val	Asn	Asp	Ile	Ala	Ile	Leu	Cys	Ala	Glu	Leu	Thr	Gly	
1070				1075				1080							
Tyr	Cys	Lys	Ser	Leu	Ser	Ala	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Leu	Lys	Ala	
1085				1090				1095							
Leu	Cys	Cys	Ser	Ser	Asn	Asn	Gly	Thr	Cys	Gly	Phe	Asn	Asp	Leu	
1100				1105				1110							
Leu	Cys	Asn	Val	Asp	Val	Ser	Asp	Leu	Ser	Phe	His	Asp	Ser	Leu	
1115				1120				1125							
Ala	Thr	Phe	Val	Ala	Ile	Leu	Ile	Ala	Arg	Gln	Cys	Leu	Leu	Leu	
1130				1135				1140							
Glu	Asp	Leu	Ile	Arg	Cys	Ala	Ala	Ile	Pro	Ser	Leu	Leu	Asn	Ala	
1145				1150				1155							
Ala	Cys	Ser	Glu	Gln	Asp	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Arg	Leu	Thr	Cys	
1160				1165				1170							
Arg	Ile	Leu	Leu	His	Leu	Phe	Lys	Thr	Pro	Gln	Leu	Asn	Pro	Cys	
1175				1180				1185							
Gln	Ser	Asp	Gly	Asn	Lys	Pro	Thr	Val	Gly	Ile	Arg	Ser	Ser	Cys	
1190				1195				1200							
Asp	Arg	His	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser	Gln	Asn	Arg	Ile	Val	Asp	Gly	
1205				1210				1215							
Ala	Val	Phe	Ala	Val	Leu	Lys	Ala	Val	Phe	Val	Leu	Gly	Asp	Ala	
1220				1225				1230							
Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe	Thr	Val	Thr	Gly	Gly	Thr	Glu	Glu	
1235				1240				1245							
Leu	Pro	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Arg	Arg	Gln	
1250				1255				1260							
Gly	Gly	Arg	Asn	Ile	Ser	Val	Glu	Thr	Ala	Ser	Leu	Asp	Val	Tyr	
1265				1270				1275							
Ala	Lys	Tyr	Val	Leu	Arg	Ser	Ile	Cys	Gln	Gln	Glu	Trp	Val	Gly	

1280	1285	1290
Glu Arg Cys Leu Lys Ser	Leu Cys Glu Asp Ser	Asn Asp Leu Gln
1295	1300	1305
Asp Pro Val Leu Ser Ser	Ala Gln Ala Gln Arg	Leu Met Gln Leu
1310	1315	1320
Ile Cys Tyr Pro His Arg	Leu Leu Asp Asn Glu	Asp Gly Glu Asn
1325	1330	1335
Pro Gln Arg Gln Arg Ile	Lys Arg Ile Leu Gln	Asn Leu Asp Gln
1340	1345	1350
Trp Thr Met Arg Gln Ser	Ser Leu Glu Leu Gln	Leu Met Ile Lys
1355	1360	1365
Gln Thr Pro Asn Asn Glu	Met Asn Ser Leu Leu	Glu Asn Ile Ala
1370	1375	1380
Lys Ala Thr Ile Glu Val	Phe Gln Gln Ser Ala	Glu Thr Gly Ser
1385	1390	1395
Ser Ser Gly Ser Thr Ala	Ser Asn Met Pro Ser	Ser Ser Lys Thr
1400	1405	1410
Lys Pro Val Leu Ser Ser	Leu Glu Arg Ser Gly	Val Trp Leu Val
1415	1420	1425
Ala Pro Leu Ile Ala Lys	Leu Pro Thr Ser Val	Gln Gly His Val
1430	1435	1440
Leu Lys Ala Ala Gly Glu	Glu Leu Glu Lys Gly	Gln His Leu Gly
1445	1450	1455
Ser Ser Ser Arg Lys Glu	Arg Asp Arg Gln Lys	Gln Lys Ser Met
1460	1465	1470
Ser Leu Leu Ser Gln Gln	Pro Phe Leu Ser Leu	Val Leu Thr Cys
1475	1480	1485
Leu Lys Gly Gln Asp Glu	Gln Arg Glu Gly Leu	Leu Thr Ser Leu
1490	1495	1500
Tyr Ser Gln Val His Gln	Ile Val Asn Asn Trp	Arg Asp Asp Gln
1505	1510	1515
Tyr Leu Asp Asp Cys Lys	Pro Lys Gln Leu Met	His Glu Ala Leu
1520	1525	1530
Lys Leu Arg Leu Asn Leu	Val Gly Gly Met Phe	Asp Thr Val Gln
1535	1540	1545
Arg Ser Thr Gln Gln Thr	Thr Glu Trp Ala Met	Leu Leu Leu Glu
1550	1555	1560
Ile Ile Ile Ser Gly Thr	Val Asp Met Gln Ser	Asn Asn Glu Leu
1565	1570	1575

Phe Thr Thr Val Leu Asp Met	Leu Ser Val Leu Ile Asn Gly Thr
1580	1585 1590
Leu Ala Ala Asp Met Ser Ser	Ile Ser Gln Gly Ser Met Glu Glu
1595	1600 1605
Asn Lys Arg Ala Tyr Met Asn	Leu Ala Lys Lys Leu Gln Lys Glu
1610	1615 1620
Leu Gly Glu Arg Gln Ser Asp	Ser Leu Glu Lys Val Arg Gln Leu
1625	1630 1635
Leu Pro Leu Pro Lys Gln Thr	Arg Asp Val Ile Thr Cys Glu Pro
1640	1645 1650
Gln Gly Ser Leu Ile Asp Thr	Lys Gly Asn Lys Ile Ala Gly Phe
1655	1660 1665
Asp Ser Ile Phe Lys Lys Glu	Gly Leu Gln Val Ser Thr Lys Gln
1670	1675 1680
Lys Ile Ser Pro Trp Asp Leu	Phe Glu Gly Leu Lys Pro Ser Ala
1685	1690 1695
Pro Leu Ser Trp Gly Trp Phe	Gly Thr Val Arg Val Asp Arg Arg
1700	1705 1710
Val Ala Arg Gly Glu Glu Gln	Gln Arg Leu Leu Leu Tyr His Thr
1715	1720 1725
His Leu Arg Pro Arg Pro Arg	Ala Tyr Tyr Leu Glu Pro Leu Pro
1730	1735 1740
Leu Pro Pro Glu Asp Glu Glu	Pro Pro Ala Pro Thr Leu Leu Glu
1745	1750 1755
Pro Glu Lys Lys Ala Pro Glu	Pro Pro Lys Thr Asp Lys Pro Gly
1760	1765 1770
Ala Ala Pro Pro Ser Thr Glu	Glu Arg Lys Lys Lys Ser Thr Lys
1775	1780 1785
Gly Lys Lys Arg Ser Gln Pro	Ala Thr Lys Thr Glu Asp Tyr Gly
1790	1795 1800
Met Gly Pro Gly Arg Ser Gly	Pro Tyr Gly Val Thr Val Pro Pro
1805	1810 1815
Asp Leu Leu His His Pro Asn	Pro Gly Ser Ile Thr His Leu Asn
1820	1825 1830
Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Gly	Leu Tyr Thr Gln Asn Gln Pro Leu
1835	1840 1845
Pro Ala Gly Gly Pro Arg Val	Asp Pro Tyr Arg Pro Val Arg Leu
1850	1855 1860
Pro Met Gln Lys Leu Pro Thr	Arg Pro Thr Tyr Pro Gly Val Leu

1865	1870	1875
Pro Thr Thr Met Thr Gly Val	Met Gly Leu Glu	Pro Ser Ser Tyr
1880	1885	1890
Lys Thr Ser Val Tyr Arg Gln	Gln Gln Pro Ala Val	Pro Gln Gly
1895	1900	1905
Gln Arg Leu Arg Gln Gln Leu	Gln Gln Ser Gln Gly	Met Leu Gly
1910	1915	1920
Gln Ser Ser Val His Gln Met	Thr Pro Ser Ser Ser	Tyr Gly Leu
1925	1930	1935
Gln Thr Ser Gln Gly Tyr Thr	Pro Tyr Val Ser His	Val Gly Leu
1940	1945	1950
Gln Gln His Thr Gly Pro Ala	Gly Thr Met Val Pro	Pro Ser Tyr
1955	1960	1965
Ser Ser Gln Pro Tyr Gln Ser	Thr His Pro Ser Thr	Asn Pro Thr
1970	1975	1980
Leu Val Asp Pro Thr Arg His	Leu Gln Gln Arg Pro	Ser Gly Tyr
1985	1990	1995
Val His Gln Gln Ala Pro Thr	Tyr Gly His Gly Leu	Thr Ser Thr
2000	2005	2010
Gln Arg Phe Ser His Gln Thr	Leu Gln Gln Thr Pro	Met Ile Ser
2015	2020	2025
Thr Met Thr Pro Met Ser Ala	Gln Gly Val Gln Ala	Gly Val Arg
2030	2035	2040
Ser Thr Ala Ile Leu Pro Glu	Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln
2045	2050	2055
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln
2060	2065	2070
Gln Gln Gln Tyr His Ile Arg	Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Ile Leu
2075	2080	2085
Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln
2090	2095	2100
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln Gln Gln	His Gln Gln
2105	2110	2115
Gln Gln Gln Gln Gln Ala Ala	Pro Pro Gln Pro Gln	Pro Gln Ser
2120	2125	2130
Gln Pro Gln Phe Gln Arg Gln	Gly Leu Gln Gln Thr	Gln Gln Gln
2135	2140	2145
Gln Gln Thr Ala Ala Leu Val	Arg Gln Leu Gln Gln	Gln Leu Ser
2150	2155	2160

Asn Thr	Gln Pro	Gln Pro	Ser	Thr Asn	Ile Phe	Gly	Arg Tyr
2165			2170			2175	
<210>	8						
<211>	2180						
<212>	PRT						
<213>	智人 (Homo sapiens)						
<400>	8						
Met Ala	Ala Phe	Gly Ile	Leu Ser	Tyr Glu	His Arg	Pro Leu	Lys Arg
1		5		10		15	
Pro Arg	Leu Gly	Pro Pro	Asp Val	Tyr Pro	Gln Asp	Pro Lys	Gln Lys
	20		25		30		
Glu Asp	Glu Leu	Thr Ala	Leu Asn	Val Lys	Gln Gly	Phe Asn	Asn Gln
	35		40		45		
Pro Ala	Val Ser	Gly Asp	Glu His	Gly Ser	Ala Lys	Asn Val	Ser Phe
	50		55		60		
Asn Pro	Ala Lys	Ile Ser	Ser Asn	Phe Ser	Ser Ile	Ile Ala	Glu Lys
65		70		75		80	
Leu Arg	Cys Asn	Thr Leu	Pro Asp	Thr Gly	Arg Arg	Lys Pro	Gln Val
	85		90		95		
Asn Gln	Lys Asp	Asn Phe	Trp Leu	Val Thr	Ala Arg	Ser Gln	Ser Ala
	100		105		110		
Ile Asn	Thr Trp	Phe Thr	Asp Leu	Ala Gly	Thr Lys	Pro Leu	Thr Gln
	115		120		125		
Leu Ala	Lys Lys	Val Pro	Ile Phe	Ser Lys	Lys Glu	Glu Val	Phe Gly
	130		135		140		
Tyr Leu	Ala Lys	Tyr Thr	Val Pro	Val Met	Arg Ala	Ala Trp	Leu Ile
145		150		155		160	
Lys Met	Thr Cys	Ala Tyr	Tyr Ala	Ala Ile	Ser Glu	Thr Lys	Val Lys
	165		170		175		
Lys Arg	His Val	Asp Pro	Phe Met	Glu Trp	Thr Gln	Ile Ile	Thr Lys
	180		185		190		
Tyr Leu	Trp Glu	Gln Leu	Gln Lys	Met Ala	Glu Tyr	Tyr Arg	Pro Gly
	195		200		205		
Pro Ala	Gly Ser	Gly Gly	Cys Gly	Ser Thr	Ile Gly	Pro Leu	Pro His
	210		215		220		
Asp Val	Glu Val	Ala Ile	Arg Gln	Trp Asp	Tyr Thr	Glu Lys	Leu Ala
225		230		235		240	
Met Phe	Met Phe	Gln Asp	Gly Met	Leu Asp	Arg His	Glu Phe	Leu Thr
	245		250		255		

Trp Val Leu Glu Cys Phe Glu Lys Ile Arg Pro Gly Glu Asp Glu Leu			
260	265	270	
Leu Lys Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Arg Tyr Ser Gly Glu Phe Val			
275	280	285	
Gln Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Arg Leu Ala Tyr Phe Cys Thr Arg Arg			
290	295	300	
Leu Ala Leu Gln Leu Asp Gly Val Ser Ser His Ser Ser His Val Ile			
305	310	315	320
Ser Ala Gln Ser Thr Ser Thr Leu Pro Thr Thr Pro Ala Pro Gln Pro			
	325	330	335
Pro Thr Ser Ser Thr Pro Ser Thr Pro Phe Ser Asp Leu Leu Met Cys			
	340	345	350
Pro Gln His Arg Pro Leu Val Phe Gly Leu Ser Cys Ile Leu Gln Thr			
	355	360	365
Ile Leu Leu Cys Cys Pro Ser Ala Leu Val Trp His Tyr Ser Leu Thr			
370	375	380	
Asp Ser Arg Ile Lys Thr Gly Ser Pro Leu Asp His Leu Pro Ile Ala			
385	390	395	400
Pro Ser Asn Leu Pro Met Pro Glu Gly Asn Ser Ala Phe Thr Gln Gln			
	405	410	415
Val Arg Ala Lys Leu Arg Glu Ile Glu Gln Gln Ile Lys Glu Arg Gly			
	420	425	430
Gln Ala Val Glu Val Arg Trp Ser Phe Asp Lys Cys Gln Glu Ala Thr			
	435	440	445
Ala Gly Phe Thr Ile Gly Arg Val Leu His Thr Leu Glu Val Leu Asp			
	450	455	460
Ser His Ser Phe Glu Arg Ser Asp Phe Ser Asn Ser Leu Asp Ser Leu			
465	470	475	480
Cys Asn Arg Ile Phe Gly Leu Gly Pro Ser Lys Asp Gly His Glu Ile			
	485	490	495
Ser Ser Asp Asp Asp Ala Val Val Ser Leu Leu Cys Glu Trp Ala Val			
	500	505	510
Ser Cys Lys Arg Ser Gly Arg His Arg Ala Met Val Val Ala Lys Leu			
	515	520	525
Leu Glu Lys Arg Gln Ala Glu Ile Glu Ala Glu Arg Cys Gly Glu Ser			
	530	535	540
Glu Ala Ala Asp Glu Lys Gly Ser Ile Ala Ser Gly Ser Leu Ser Ala			
545	550	555	560
Pro Ser Ala Pro Ile Phe Gln Asp Val Leu Leu Gln Phe Leu Asp Thr			

	565		570		575
Gln Ala Pro Met Leu Thr Asp Pro Arg Ser Glu Ser Glu Arg Val Glu					
	580		585		590
Phe Phe Asn Leu Val Leu Leu Phe Cys Glu Leu Ile Arg His Asp Val					
	595		600		605
Phe Ser His Asn Met Tyr Thr Cys Thr Leu Ile Ser Arg Gly Asp Leu					
	610		615		620
Ala Phe Gly Ala Pro Gly Pro Arg Pro Pro Ser Pro Phe Asp Asp Pro					
625		630		635	640
Ala Asp Asp Pro Glu His Lys Glu Ala Glu Gly Ser Ser Ser Ser Lys					
	645		650		655
Leu Glu Asp Pro Gly Leu Ser Glu Ser Met Asp Ile Asp Pro Ser Ser					
	660		665		670
Ser Val Leu Phe Glu Asp Met Glu Lys Pro Asp Phe Ser Leu Phe Ser					
	675		680		685
Pro Thr Met Pro Cys Glu Gly Lys Gly Ser Pro Ser Pro Glu Lys Pro					
	690		695		700
Asp Val Glu Lys Glu Val Lys Pro Pro Pro Lys Glu Lys Ile Glu Gly					
705		710		715	720
Thr Leu Gly Val Leu Tyr Asp Gln Pro Arg His Val Gln Tyr Ala Thr					
	725		730		735
His Phe Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ser Cys Ser His Glu Cys Asn Gln					
	740		745		750
Arg Leu Val Val Leu Phe Gly Val Gly Lys Gln Arg Asp Asp Ala Arg					
	755		760		765
His Ala Ile Lys Lys Ile Thr Lys Asp Ile Leu Lys Val Leu Asn Arg					
	770		775		780
Lys Gly Thr Ala Glu Thr Asp Gln Leu Ala Pro Ile Val Pro Leu Asn					
785		790		795	800
Pro Gly Asp Leu Thr Phe Leu Gly Gly Glu Asp Gly Gln Lys Arg Arg					
	805		810		815
Arg Asn Arg Pro Glu Ala Phe Pro Thr Ala Glu Asp Ile Phe Ala Lys					
	820		825		830
Phe Gln His Leu Ser His Tyr Asp Gln His Gln Val Thr Ala Gln Val					
	835		840		845
Ser Arg Asn Val Leu Glu Gln Ile Thr Ser Phe Ala Leu Gly Met Ser					
	850		855		860
Tyr His Leu Pro Leu Val Gln His Val Gln Phe Ile Phe Asp Leu Met					
865		870		875	880

Glu Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu Ile Asp Phe Ala Ile Gln Leu		
885	890	895
Leu Asn Glu Leu Ser Val Val Glu Ala Glu Leu Leu Lys Ser Ser		
900	905	910
Asp Leu Val Gly Ser Tyr Thr Thr Ser Leu Cys Leu Cys Ile Val Ala		
915	920	925
Val Leu Arg His Tyr His Ala Cys Leu Ile Leu Asn Gln Asp Gln Met		
930	935	940
Ala Gln Val Phe Glu Gly Leu Cys Gly Val Val Lys His Gly Met Asn		
945	950	955
Arg Ser Asp Gly Ser Ser Ala Glu Arg Cys Ile Leu Ala Tyr Leu Tyr		
965	970	975
Asp Leu Tyr Thr Ser Cys Ser His Leu Lys Asn Lys Phe Gly Glu Leu		
980	985	990
Phe Ser Asp Phe Cys Ser Lys Val Lys Asn Thr Ile Tyr Cys Asn Val		
995	1000	1005
Glu Pro Ser Glu Ser Asn Met Arg Trp Ala Pro Glu Phe Met Ile		
1010	1015	1020
Asp Thr Leu Glu Asn Pro Ala Ala His Thr Phe Thr Tyr Thr Gly		
1025	1030	1035
Leu Gly Lys Ser Leu Ser Glu Asn Pro Ala Asn Arg Tyr Ser Phe		
1040	1045	1050
Val Cys Asn Ala Leu Met His Val Cys Val Gly His His Asp Pro		
1055	1060	1065
Asp Arg Val Asn Asp Ile Ala Ile Leu Cys Ala Glu Leu Thr Gly		
1070	1075	1080
Tyr Cys Lys Ser Leu Ser Ala Glu Trp Leu Gly Val Leu Lys Ala		
1085	1090	1095
Leu Cys Cys Ser Ser Asn Asn Gly Thr Cys Gly Phe Asn Asp Leu		
1100	1105	1110
Leu Cys Asn Val Asp Val Ser Asp Leu Ser Phe His Asp Ser Leu		
1115	1120	1125
Ala Thr Phe Val Ala Ile Leu Ile Ala Arg Gln Cys Leu Leu Leu		
1130	1135	1140
Glu Asp Leu Ile Arg Cys Ala Ala Ile Pro Ser Leu Leu Asn Ala		
1145	1150	1155
Ala Cys Ser Glu Gln Asp Ser Glu Pro Gly Ala Arg Leu Thr Cys		
1160	1165	1170
Arg Ile Leu Leu His Leu Phe Lys Thr Pro Gln Leu Asn Pro Cys		

1175	1180	1185
Gln Ser Asp Gly Asn Lys Pro Thr Val Gly Ile Arg Ser Ser Cys		
1190	1195	1200
Asp Arg His Leu Leu Ala Ala Ser Gln Asn Arg Ile Val Asp Gly		
1205	1210	1215
Ala Val Phe Ala Val Leu Lys Ala Val Phe Val Leu Gly Asp Ala		
1220	1225	1230
Glu Leu Lys Gly Ser Gly Phe Thr Val Thr Gly Gly Thr Glu Glu		
1235	1240	1245
Leu Pro Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Arg Arg Gln		
1250	1255	1260
Gly Gly Arg Asn Ile Ser Val Glu Thr Ala Ser Leu Asp Val Tyr		
1265	1270	1275
Ala Lys Tyr Val Leu Arg Ser Ile Cys Gln Gln Glu Trp Val Gly		
1280	1285	1290
Glu Arg Cys Leu Lys Ser Leu Cys Glu Asp Ser Asn Asp Leu Gln		
1295	1300	1305
Asp Pro Val Leu Ser Ser Ala Gln Ala Gln Arg Leu Met Gln Leu		
1310	1315	1320
Ile Cys Tyr Pro His Arg Leu Leu Asp Asn Glu Asp Gly Glu Asn		
1325	1330	1335
Pro Gln Arg Gln Arg Ile Lys Arg Ile Leu Gln Asn Leu Asp Gln		
1340	1345	1350
Trp Thr Met Arg Gln Ser Ser Leu Glu Leu Gln Leu Met Ile Lys		
1355	1360	1365
Gln Thr Pro Asn Asn Glu Met Asn Ser Leu Leu Glu Asn Ile Ala		
1370	1375	1380
Lys Ala Thr Ile Glu Val Phe Gln Gln Ser Ala Glu Thr Gly Ser		
1385	1390	1395
Ser Ser Gly Ser Thr Ala Ser Asn Met Pro Ser Ser Ser Lys Thr		
1400	1405	1410
Lys Pro Val Leu Ser Ser Leu Glu Arg Ser Gly Val Trp Leu Val		
1415	1420	1425
Ala Pro Leu Ile Ala Lys Leu Pro Thr Ser Val Gln Gly His Val		
1430	1435	1440
Leu Lys Ala Ala Gly Glu Glu Leu Glu Lys Gly Gln His Leu Gly		
1445	1450	1455
Ser Ser Ser Arg Lys Glu Arg Asp Arg Gln Lys Gln Lys Ser Met		
1460	1465	1470

Ser Leu	Leu Ser	Gln Gln	Pro	Phe Leu	Ser Leu	Val	Leu Thr	Cys	
1475			1480			1485			
Leu Lys	Gly Gln	Asp Glu	Gln	Arg Glu	Gly Leu	Leu	Thr Ser	Leu	
1490			1495			1500			
Tyr Ser	Gln Val	His Gln	Ile	Val Asn	Asn Trp	Arg	Asp Asp	Gln	
1505			1510			1515			
Tyr Leu	Asp Asp	Cys Lys	Pro	Lys Gln	Leu Met	His	Glu Ala	Leu	
1520			1525			1530			
Lys Leu	Arg Leu	Asn Leu	Val	Gly Gly	Met Phe	Asp	Thr Val	Gln	
1535			1540			1545			
Arg Ser	Thr Gln	Gln Thr	Thr	Glu Trp	Ala Met	Leu	Leu Leu	Glu	
1550			1555			1560			
Ile Ile	Ile Ser	Gly Thr	Val	Asp Met	Gln Ser	Asn	Asn Glu	Leu	
1565			1570			1575			
Phe Thr	Thr Val	Leu Asp	Met	Leu Ser	Val Leu	Ile	Asn Gly	Thr	
1580			1585			1590			
Leu Ala	Ala Asp	Met Ser	Ser	Ile Ser	Gln Gly	Ser	Met Glu	Glu	
1595			1600			1605			
Asn Lys	Arg Ala	Tyr Met	Asn	Leu Ala	Lys Lys	Leu	Gln Lys	Glu	
1610			1615			1620			
Leu Gly	Glu Arg	Gln Ser	Asp	Ser Leu	Glu Lys	Val	Arg Gln	Leu	
1625			1630			1635			
Leu Pro	Leu Pro	Lys Gln	Thr	Arg Asp	Val Ile	Thr	Cys Glu	Pro	
1640			1645			1650			
Gln Gly	Ser Leu	Ile Asp	Thr	Lys Gly	Asn Lys	Ile	Ala Gly	Phe	
1655			1660			1665			
Asp Ser	Ile Phe	Lys Lys	Glu	Gly Leu	Gln Val	Ser	Thr Lys	Gln	
1670			1675			1680			
Lys Ile	Ser Pro	Trp Asp	Leu	Phe Glu	Gly Leu	Lys	Pro Ser	Ala	
1685			1690			1695			
Pro Leu	Ser Trp	Gly Trp	Phe	Gly Thr	Val Arg	Val	Asp Arg	Arg	
1700			1705			1710			
Val Ala	Arg Gly	Glu Glu	Gln	Gln Arg	Leu Leu	Leu	Tyr His	Thr	
1715			1720			1725			
His Leu	Arg Pro	Arg Pro	Arg	Ala Tyr	Tyr Leu	Glu	Pro Leu	Pro	
1730			1735			1740			
Leu Pro	Pro Glu	Asp Glu	Glu	Pro Pro	Ala Pro	Thr	Leu Leu	Glu	
1745			1750			1755			
Pro Glu	Lys Lys	Ala Pro	Glu	Pro Pro	Lys Thr	Asp	Lys Pro	Gly	

1760	1765	1770
Ala Ala Pro Pro Ser Thr Glu	Glu Arg Lys Lys Lys	Ser Thr Lys
1775	1780	1785
Gly Lys Lys Arg Ser Gln Pro	Ala Thr Lys Thr Glu	Asp Tyr Gly
1790	1795	1800
Met Gly Pro Gly Arg Ser Gly	Pro Tyr Gly Val Thr	Val Pro Pro
1805	1810	1815
Asp Leu Leu His His Pro Asn	Pro Gly Ser Ile Thr	His Leu Asn
1820	1825	1830
Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Gly	Leu Tyr Thr Gln Asn	Gln Pro Leu
1835	1840	1845
Pro Ala Gly Gly Pro Arg Val	Asp Pro Tyr Arg Pro	Val Arg Leu
1850	1855	1860
Pro Met Gln Lys Leu Pro Thr	Arg Pro Thr Tyr Pro	Gly Val Leu
1865	1870	1875
Pro Thr Thr Met Thr Gly Val	Met Gly Leu Glu Pro	Ser Ser Tyr
1880	1885	1890
Lys Thr Ser Val Tyr Arg Gln	Gln Gln Pro Ala Val	Pro Gln Gly
1895	1900	1905
Gln Arg Leu Arg Gln Gln Leu	Gln Ala Lys Ile Gln	Ser Gln Gly
1910	1915	1920
Met Leu Gly Gln Ser Ser Val	His Gln Met Thr Pro	Ser Ser Ser
1925	1930	1935
Tyr Gly Leu Gln Thr Ser Gln	Gly Tyr Thr Pro Tyr	Val Ser His
1940	1945	1950
Val Gly Leu Gln Gln His Thr	Gly Pro Ala Gly Thr	Met Val Pro
1955	1960	1965
Pro Ser Tyr Ser Ser Gln Pro	Tyr Gln Ser Thr His	Pro Ser Thr
1970	1975	1980
Asn Pro Thr Leu Val Asp Pro	Thr Arg His Leu Gln	Gln Arg Pro
1985	1990	1995
Ser Gly Tyr Val His Gln Gln	Ala Pro Thr Tyr Gly	His Gly Leu
2000	2005	2010
Thr Ser Thr Gln Arg Phe Ser	His Gln Thr Leu Gln	Gln Thr Pro
2015	2020	2025
Met Ile Ser Thr Met Thr Pro	Met Ser Ala Gln Gly	Val Gln Ala
2030	2035	2040
Gly Val Arg Ser Thr Ala Ile	Leu Pro Glu Gln Gln	Gln Gln Gln
2045	2050	2055

Gln Gln	Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln
2060	2065	2070	
Gln Gln	Gln Gln Gln Gln Tyr	His Ile Arg Gln Gln	Gln Gln Gln
2075	2080	2085	
Gln Ile	Leu Arg Gln Gln Gln	Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln
2090	2095	2100	
Gln Gln	Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln
2105	2110	2115	
His Gln	Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Ala Ala Pro Pro	Gln Pro Gln
2120	2125	2130	
Pro Gln	Ser Gln Pro Gln Phe	Gln Arg Gln Gly Leu	Gln Gln Thr
2135	2140	2145	
Gln Gln	Gln Gln Gln Thr Ala	Ala Leu Val Arg Gln	Leu Gln Gln
2150	2155	2160	
Gln Leu	Ser Asn Thr Gln Pro	Gln Pro Ser Thr Asn	Ile Phe Gly
2165	2170	2175	
Arg Tyr			
2180			
<210>	9		
<211>	2176		
<212>	PRT		
<213>	智人 (Homo sapiens)		
<400>	9		
Met Ala Ala Phe Gly Ile Leu Ser Tyr Glu His Arg Pro Leu Lys Arg			
1	5	10	15
Pro Arg Leu Gly Pro Pro Asp Val Tyr Pro Gln Asp Pro Lys Gln Lys			
20	25	30	
Glu Asp Glu Leu Thr Ala Leu Asn Val Lys Gln Gly Phe Asn Asn Gln			
35	40	45	
Pro Ala Val Ser Gly Asp Glu His Gly Ser Ala Lys Asn Val Ser Phe			
50	55	60	
Asn Pro Ala Lys Ile Ser Ser Asn Phe Ser Ser Ile Ile Ala Glu Lys			
65	70	75	80
Leu Arg Cys Asn Thr Leu Pro Asp Thr Gly Arg Arg Lys Pro Gln Val			
85	90	95	
Asn Gln Lys Asp Asn Phe Trp Leu Val Thr Ala Arg Ser Gln Ser Ala			
100	105	110	
Ile Asn Thr Trp Phe Thr Asp Leu Ala Gly Thr Lys Pro Leu Thr Gln			
115	120	125	

Leu	Ala	Lys	Lys	Val	Pro	Ile	Phe	Ser	Lys	Lys	Glu	Glu	Val	Phe	Gly
130						135					140				
Tyr	Leu	Ala	Lys	Tyr	Thr	Val	Pro	Val	Met	Arg	Ala	Ala	Trp	Leu	Ile
145					150					155					160
Lys	Met	Thr	Cys	Ala	Tyr	Tyr	Ala	Ala	Ile	Ser	Glu	Thr	Lys	Val	Lys
			165						170					175	
Lys	Arg	His	Val	Asp	Pro	Phe	Met	Glu	Trp	Thr	Gln	Ile	Ile	Thr	Lys
		180						185					190		
Tyr	Leu	Trp	Glu	Gln	Leu	Gln	Lys	Met	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Gly
	195						200					205			
Pro	Ala	Gly	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Ser	Thr	Ile	Gly	Pro	Leu	Pro	His
	210					215					220				
Asp	Val	Glu	Val	Ala	Ile	Arg	Gln	Trp	Asp	Tyr	Thr	Glu	Lys	Leu	Ala
225					230					235					240
Met	Phe	Met	Phe	Gln	Asp	Gly	Met	Leu	Asp	Arg	His	Glu	Phe	Leu	Thr
			245						250					255	
Trp	Val	Leu	Glu	Cys	Phe	Glu	Lys	Ile	Arg	Pro	Gly	Glu	Asp	Glu	Leu
		260						265					270		
Leu	Lys	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Arg	Tyr	Ser	Gly	Glu	Phe	Val
	275						280					285			
Gln	Ser	Ala	Tyr	Leu	Ser	Arg	Arg	Leu	Ala	Tyr	Phe	Cys	Thr	Arg	Arg
	290					295					300				
Leu	Ala	Leu	Gln	Leu	Asp	Gly	Val	Ser	Ser	His	Ser	Ser	His	Val	Ile
305					310					315					320
Ser	Ala	Gln	Ser	Thr	Ser	Thr	Leu	Pro	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Gln	Pro
			325						330				335		
Pro	Thr	Ser	Ser	Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Phe	Ser	Asp	Leu	Leu	Met	Cys
	340						345						350		
Pro	Gln	His	Arg	Pro	Leu	Val	Phe	Gly	Leu	Ser	Cys	Ile	Leu	Gln	Thr
	355					360					365				
Ile	Leu	Leu	Cys	Cys	Pro	Ser	Ala	Leu	Val	Trp	His	Tyr	Ser	Leu	Thr
	370					375				380					
Asp	Ser	Arg	Ile	Lys	Thr	Gly	Ser	Pro	Leu	Asp	His	Leu	Pro	Ile	Ala
385					390					395					400
Pro	Ser	Asn	Leu	Pro	Met	Pro	Glu	Gly	Asn	Ser	Ala	Phe	Thr	Gln	Gln
			405						410					415	
Val	Arg	Ala	Lys	Leu	Arg	Glu	Ile	Glu	Gln	Gln	Ile	Lys	Glu	Arg	Gly
		420						425					430		
Gln	Ala	Val	Glu	Val	Arg	Trp	Ser	Phe	Asp	Lys	Cys	Gln	Glu	Ala	Thr

435	440	445
Ala Gly Phe Thr Ile Gly Arg Val Leu His Thr Leu Glu Val Leu Asp		
450	455	460
Ser His Ser Phe Glu Arg Ser Asp Phe Ser Asn Ser Leu Asp Ser Leu		
465	470	475
Cys Asn Arg Ile Phe Gly Leu Gly Pro Ser Lys Asp Gly His Glu Ile		480
485	490	495
Ser Ser Asp Asp Asp Ala Val Val Ser Leu Leu Cys Glu Trp Ala Val		
500	505	510
Ser Cys Lys Arg Ser Gly Arg His Arg Ala Met Val Val Ala Lys Leu		
515	520	525
Leu Glu Lys Arg Gln Ala Glu Ile Glu Ala Glu Arg Cys Gly Glu Ser		
530	535	540
Glu Ala Ala Asp Glu Lys Gly Ser Ile Ala Ser Gly Ser Leu Ser Ala		
545	550	555
Pro Ser Ala Pro Ile Phe Gln Asp Val Leu Leu Gln Phe Leu Asp Thr		
565	570	575
Gln Ala Pro Met Leu Thr Asp Pro Arg Ser Glu Ser Glu Arg Val Glu		
580	585	590
Phe Phe Asn Leu Val Leu Leu Phe Cys Glu Leu Ile Arg His Asp Val		
595	600	605
Phe Ser His Asn Met Tyr Thr Cys Thr Leu Ile Ser Arg Gly Asp Leu		
610	615	620
Ala Phe Gly Ala Pro Gly Pro Arg Pro Pro Ser Pro Phe Asp Asp Pro		
625	630	635
Ala Asp Asp Pro Glu His Lys Glu Ala Glu Gly Ser Ser Ser Ser Lys		
645	650	655
Leu Glu Asp Pro Gly Leu Ser Glu Ser Met Asp Ile Asp Pro Ser Ser		
660	665	670
Ser Val Leu Phe Glu Asp Met Glu Lys Pro Asp Phe Ser Leu Phe Ser		
675	680	685
Pro Thr Met Pro Cys Glu Gly Lys Gly Ser Pro Ser Pro Glu Lys Pro		
690	695	700
Asp Val Glu Lys Glu Val Lys Pro Pro Pro Lys Glu Lys Ile Glu Gly		
705	710	715
Thr Leu Gly Val Leu Tyr Asp Gln Pro Arg His Val Gln Tyr Ala Thr		720
725	730	735
His Phe Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ser Cys Ser His Glu Cys Asn Gln		
740	745	750

Arg Leu Val Val Leu Phe Gly Val Gly Lys Gln Arg Asp Asp Ala Arg		
755	760	765
His Ala Ile Lys Lys Ile Thr Lys Asp Ile Leu Lys Val Leu Asn Arg		
770	775	780
Lys Gly Thr Ala Glu Thr Asp Gln Leu Ala Pro Ile Val Pro Leu Asn		
785	790	795
Pro Gly Asp Leu Thr Phe Leu Gly Gly Glu Asp Gly Gln Lys Arg Arg		
	805	810
Arg Asn Arg Pro Glu Ala Phe Pro Thr Ala Glu Asp Ile Phe Ala Lys		
	820	825
Phe Gln His Leu Ser His Tyr Asp Gln His Gln Val Thr Ala Gln Val		
	835	840
Ser Arg Asn Val Leu Glu Gln Ile Thr Ser Phe Ala Leu Gly Met Ser		
	850	855
Tyr His Leu Pro Leu Val Gln His Val Gln Phe Ile Phe Asp Leu Met		
865	870	875
Glu Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu Ile Asp Phe Ala Ile Gln Leu		
	885	890
Leu Asn Glu Leu Ser Val Val Glu Ala Glu Leu Leu Leu Lys Ser Ser		
	900	905
Asp Leu Val Gly Ser Tyr Thr Thr Ser Leu Cys Leu Cys Ile Val Ala		
	915	920
Val Leu Arg His Tyr His Ala Cys Leu Ile Leu Asn Gln Asp Gln Met		
	930	935
Ala Gln Val Phe Glu Gly Leu Cys Gly Val Val Lys His Gly Met Asn		
945	950	955
Arg Ser Asp Gly Ser Ser Ala Glu Arg Cys Ile Leu Ala Tyr Leu Tyr		
	965	970
Asp Leu Tyr Thr Ser Cys Ser His Leu Lys Asn Lys Phe Gly Glu Leu		
	980	985
Phe Ser Asp Phe Cys Ser Lys Val Lys Asn Thr Ile Tyr Cys Asn Val		
	995	1000
Glu Pro Ser Glu Ser Asn Met Arg Trp Ala Pro Glu Phe Met Ile		
1010	1015	1020
Asp Thr Leu Glu Asn Pro Ala Ala His Thr Phe Thr Tyr Thr Gly		
1025	1030	1035
Leu Gly Lys Ser Leu Ser Glu Asn Pro Ala Asn Arg Tyr Ser Phe		
1040	1045	1050
Val Cys Asn Ala Leu Met His Val Cys Val Gly His His Asp Pro		

1055	1060	1065
Asp Arg Val Asn Asp Ile Ala	Ile Leu Cys Ala Glu	Leu Thr Gly
1070	1075	1080
Tyr Cys Lys Ser Leu Ser Ala	Glu Trp Leu Gly Val	Leu Lys Ala
1085	1090	1095
Leu Cys Cys Ser Ser Asn Asn	Gly Thr Cys Gly Phe	Asn Asp Leu
1100	1105	1110
Leu Cys Asn Val Asp Val Ser	Asp Leu Ser Phe His	Asp Ser Leu
1115	1120	1125
Ala Thr Phe Val Ala Ile Leu	Ile Ala Arg Gln Cys	Leu Leu Leu
1130	1135	1140
Glu Asp Leu Ile Arg Cys Ala	Ala Ile Pro Ser Leu	Leu Asn Ala
1145	1150	1155
Ala Cys Ser Glu Gln Asp Ser	Glu Pro Gly Ala Arg	Leu Thr Cys
1160	1165	1170
Arg Ile Leu Leu His Leu Phe	Lys Thr Pro Gln Leu	Asn Pro Cys
1175	1180	1185
Gln Ser Asp Gly Asn Lys Pro	Thr Val Gly Ile Arg	Ser Ser Cys
1190	1195	1200
Asp Arg His Leu Leu Ala Ala	Ser Gln Asn Arg Ile	Val Asp Gly
1205	1210	1215
Ala Val Phe Ala Val Leu Lys	Ala Val Phe Val Leu	Gly Asp Ala
1220	1225	1230
Glu Leu Lys Gly Ser Gly Phe	Thr Val Thr Gly Gly	Thr Glu Glu
1235	1240	1245
Leu Pro Glu Glu Glu Gly Gly	Gly Gly Ser Gly Gly	Arg Arg Gln
1250	1255	1260
Gly Gly Arg Asn Ile Ser Val	Glu Thr Ala Ser Leu	Asp Val Tyr
1265	1270	1275
Ala Lys Tyr Val Leu Arg Ser	Ile Cys Gln Gln Glu	Trp Val Gly
1280	1285	1290
Glu Arg Cys Leu Lys Ser Leu	Cys Glu Asp Ser Asn	Asp Leu Gln
1295	1300	1305
Asp Pro Val Leu Ser Ser Ala	Gln Ala Gln Arg Leu	Met Gln Leu
1310	1315	1320
Ile Cys Tyr Pro His Arg Leu	Leu Asp Asn Glu Asp	Gly Glu Asn
1325	1330	1335
Pro Gln Arg Gln Arg Ile Lys	Arg Ile Leu Gln Asn	Leu Asp Gln
1340	1345	1350

Trp Thr	Met Arg Gln Ser Ser	Leu Glu Leu Gln Leu	Met Ile Lys
1355	1360	1365	
Gln Thr	Pro Asn Asn Glu Met	Asn Ser Leu Leu Glu	Asn Ile Ala
1370	1375	1380	
Lys Ala	Thr Ile Glu Val Phe	Gln Gln Ser Ala Glu	Thr Gly Ser
1385	1390	1395	
Ser Ser	Gly Ser Thr Ala Ser	Asn Met Pro Ser Ser	Ser Lys Thr
1400	1405	1410	
Lys Pro	Val Leu Ser Ser Leu	Glu Arg Ser Gly Val	Trp Leu Val
1415	1420	1425	
Ala Pro	Leu Ile Ala Lys Leu	Pro Thr Ser Val Gln	Gly His Val
1430	1435	1440	
Leu Lys	Ala Ala Gly Glu Glu	Leu Glu Lys Gly Gln	His Leu Gly
1445	1450	1455	
Ser Ser	Ser Arg Lys Glu Arg	Asp Arg Gln Lys Gln	Lys Ser Met
1460	1465	1470	
Ser Leu	Leu Ser Gln Gln Pro	Phe Leu Ser Leu Val	Leu Thr Cys
1475	1480	1485	
Leu Lys	Gly Gln Asp Glu Gln	Arg Glu Gly Leu Leu	Thr Ser Leu
1490	1495	1500	
Tyr Ser	Gln Val His Gln Ile	Val Asn Asn Trp Arg	Asp Asp Gln
1505	1510	1515	
Tyr Leu	Asp Asp Cys Lys Pro	Lys Gln Leu Met His	Glu Ala Leu
1520	1525	1530	
Lys Leu	Arg Leu Asn Leu Val	Gly Gly Met Phe Asp	Thr Val Gln
1535	1540	1545	
Arg Ser	Thr Gln Gln Thr Thr	Glu Trp Ala Met Leu	Leu Leu Glu
1550	1555	1560	
Ile Ile	Ile Ser Gly Thr Val	Asp Met Gln Ser Asn	Asn Glu Leu
1565	1570	1575	
Phe Thr	Thr Val Leu Asp Met	Leu Ser Val Leu Ile	Asn Gly Thr
1580	1585	1590	
Leu Ala	Ala Asp Met Ser Ser	Ile Ser Gln Gly Ser	Met Glu Glu
1595	1600	1605	
Asn Lys	Arg Ala Tyr Met Asn	Leu Ala Lys Lys Leu	Gln Lys Glu
1610	1615	1620	
Leu Gly	Glu Arg Gln Ser Asp	Ser Leu Glu Lys Val	Arg Gln Leu
1625	1630	1635	
Leu Pro	Leu Pro Lys Gln Thr	Arg Asp Val Ile Thr	Cys Glu Pro

1640	1645	1650
Gln Gly Ser Leu Ile Asp Thr	Lys Gly Asn Lys Ile	Ala Gly Phe
1655	1660	1665
Asp Ser Ile Phe Lys Lys Glu	Gly Leu Gln Val Ser	Thr Lys Gln
1670	1675	1680
Lys Ile Ser Pro Trp Asp Leu	Phe Glu Gly Leu Lys	Pro Ser Ala
1685	1690	1695
Pro Leu Ser Trp Gly Trp Phe	Gly Thr Val Arg Val	Asp Arg Arg
1700	1705	1710
Val Ala Arg Gly Glu Glu Gln	Gln Arg Leu Leu Leu	Tyr His Thr
1715	1720	1725
His Leu Arg Pro Arg Pro Arg	Ala Tyr Tyr Leu Glu	Pro Leu Pro
1730	1735	1740
Leu Pro Pro Glu Asp Glu Glu	Pro Pro Ala Pro Thr	Leu Leu Glu
1745	1750	1755
Pro Glu Lys Lys Ala Pro Glu	Pro Pro Lys Thr Asp	Lys Pro Gly
1760	1765	1770
Ala Ala Pro Pro Ser Thr Glu	Glu Arg Lys Lys Lys	Ser Thr Lys
1775	1780	1785
Gly Lys Lys Arg Ser Gln Pro	Ala Thr Lys Thr Glu	Asp Tyr Gly
1790	1795	1800
Met Gly Pro Gly Arg Ser Gly	Pro Tyr Gly Val Thr	Val Pro Pro
1805	1810	1815
Asp Leu Leu His His Pro Asn	Pro Gly Ser Ile Thr	His Leu Asn
1820	1825	1830
Tyr Arg Gln Gly Ser Ile Gly	Leu Tyr Thr Gln Asn	Gln Pro Leu
1835	1840	1845
Pro Ala Gly Gly Pro Arg Val	Asp Pro Tyr Arg Pro	Val Arg Leu
1850	1855	1860
Pro Met Gln Lys Leu Pro Thr	Arg Pro Thr Tyr Pro	Gly Val Leu
1865	1870	1875
Pro Thr Thr Met Thr Gly Val	Met Gly Leu Glu Pro	Ser Ser Tyr
1880	1885	1890
Lys Thr Ser Val Tyr Arg Gln	Gln Gln Pro Ala Val	Pro Gln Gly
1895	1900	1905
Gln Arg Leu Arg Gln Gln Leu	Gln Ser Gln Gly Met	Leu Gly Gln
1910	1915	1920
Ser Ser Val His Gln Met Thr	Pro Ser Ser Ser Tyr	Gly Leu Gln
1925	1930	1935

Thr Ser Gln Gly Tyr Thr Pro Tyr Val Ser His Val Gly Leu Gln	
1940	1945 1950
Gln His Thr Gly Pro Ala Gly Thr Met Val Pro Pro Ser Tyr Ser	
1955	1960 1965
Ser Gln Pro Tyr Gln Ser Thr His Pro Ser Thr Asn Pro Thr Leu	
1970	1975 1980
Val Asp Pro Thr Arg His Leu Gln Gln Arg Pro Ser Gly Tyr Val	
1985	1990 1995
His Gln Gln Ala Pro Thr Tyr Gly His Gly Leu Thr Ser Thr Gln	
2000	2005 2010
Arg Phe Ser His Gln Thr Leu Gln Gln Thr Pro Met Ile Ser Thr	
2015	2020 2025
Met Thr Pro Met Ser Ala Gln Gly Val Gln Ala Gly Val Arg Ser	
2030	2035 2040
Thr Ala Ile Leu Pro Glu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln	
2045	2050 2055
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln	
2060	2065 2070
Gln Gln Tyr His Ile Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ile Leu Arg	
2075	2080 2085
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln	
2090	2095 2100
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Gln Gln Gln	
2105	2110 2115
Gln Gln Gln Gln Ala Ala Pro Pro Gln Pro Gln Pro Gln Ser Gln	
2120	2125 2130
Pro Gln Phe Gln Arg Gln Gly Leu Gln Gln Thr Gln Gln Gln Gln	
2135	2140 2145
Gln Thr Ala Ala Leu Val Arg Gln Leu Gln Gln Gln Leu Ser Asn	
2150	2155 2160
Thr Gln Pro Gln Pro Ser Thr Asn Ile Phe Gly Arg Tyr	
2165	2170 2175

<210> 10

<211> 3295

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10

ctcggcctgc acggcggctg cggcggcggt agcggcagcg gcggcggcgg cggcggcggc 60

ggcggcggcg gcggcggcgg cggcggcagc ggcgcgggcc tgggcccggg cgcagcggcg 120

gcggcggcgg	ggcctggagc	cggatctaag	atggcagcgg	cggcggcggc	ggtggggccg	180
ggcgcgggcg	gcgcggggtc	ggcgggtccc	ggcggcgcgg	ggccctgcgc	taccgtgtcg	240
gtgttccccg	gcgcccgcct	cctcaccatc	ggcgacgcga	acggcgagat	ccagcggcac	300
gcggagcagc	aggcgctgcg	cctcgagggt	cgcgccggcc	cggactcggc	gggcatcgcc	360
ctctacagcc	atgaagatgt	gtgtgtcttt	aagtgtctag	tgtcccgaga	gacagagtgc	420
agccgtgtgg	gcaagcagtc	cttcatcatc	accctgggct	gcaacagcgt	cctcatccag	480
ttcgccacac	ccaacgattt	ctgttccttc	tacaacatcc	tgaaaacctg	ccggggccac	540
accctggagc	ggtctgtgtt	cagcgagcgg	acggaggagt	cttctgccgt	gcagtacttc	600
cagttttatg	gctacctgtc	ccagcagcag	aacatgatgc	aggactacgt	gcggacaggc	660
acctaccagc	gcgccatcct	gcaaaaccac	accgacttca	aggacaagat	cgttcttgat	720
gttggtgtg	gctctgggat	cctgtcgttt	tttgccgccc	aagctggagc	acggaaaatc	780
tacgcggtgg	aggccagcac	catggcccag	cacgctgagg	tcttggtgaa	gagtaacaac	840
ctgacggacc	gcatcgtggt	catcccgggc	aaggtggagg	aggtgtcact	ccccgagcag	900
gtggacatca	tcatctcgga	gccccatggc	tacatgctct	tcaacgagcg	catgctggag	960
agctacctcc	acgccaagaa	gtacctgaag	cccagcggaa	acatgtttcc	taccattggt	1020
gacgtccacc	ttgcaccctt	cacggatgaa	cagctctaca	tggagcagtt	caccaaggcc	1080
aacttctggt	accagccatc	tttccatgga	gtggacctgt	cggccctccg	aggtgccgcg	1140
gtggatgagt	atttccggca	gcctgtggtg	gacacatttg	acatccgat	cctgatggcc	1200
aagtctgtca	agtacacggt	gaacttctta	gaagccaaag	aaggagattt	gcacaggata	1260
gaaatcccat	tcaaattcca	catgctgcat	tcagggtcgg	tccacggcct	ggctttcttg	1320
tttgacgttg	ctttcatcgg	ctccataatg	accgtgtggc	tgtccacagc	cccacagag	1380
cccctgaccc	actggtacca	ggtgcggtgc	ctgttccagt	caccactgtt	cgccaaggca	1440
ggggacacgc	tctcagggac	atgtctgctt	attgccaaca	aaagacagag	ctacgacatc	1500
agtattgtgg	cccagggtga	ccagaccggc	tccaagtcca	gtaacctcct	ggatctgaaa	1560
aaccccttct	ttagatacac	gggcacaacg	ccctacccc	cacccggctc	ccactacaca	1620
tctccctcgg	aaaacatgtg	gaacacgggc	agcacctaca	acctcagcag	cgggatggcc	1680
gtggcaggga	tgccgaccgc	ctatgacttg	agcagtgtta	ttgccagtgg	ctccagcgtg	1740
ggccacaaca	acctgattcc	tttagccaac	acggggattg	tcaatcacac	ccactcccgg	1800
atgggctcca	taatgagcac	ggggattgtc	caagggtcct	ccggcgccca	gggcagtgggt	1860
ggtggcagca	cgagtgccca	ctatgcagtc	aacagccagt	tcacatggg	cggccccgcc	1920
atctccatgg	cgtcgccccat	gtccatccc	accaacacca	tgcactacgg	gagctagggg	1980
cccgccccgc	ggactgacag	caccaggaaa	ccaaatgatg	tccttgcccc	ccgccccgc	2040
cgggcggctt	tcccccttgt	actggagaag	ctcgaacacc	cggtcacagc	tctctttgct	2100
atgggaactg	ggacactttt	ttacacgatg	ttgccgccgt	ccccacccta	acccccacct	2160
cccgccccctg	agcgtgtgtc	gctgccatat	tttacacaaa	atcatgttgt	gggagccctc	2220
gtccccccctc	ctgcccgtc	tacctgacc	tgggttgtc	atctgctgga	acaggcgcca	2280
tggggcctgc	cagccctgcc	tgccaggtcc	cttagcacct	gtccccctgc	ctgtctccag	2340
tgggaaggta	gcctggccag	gcggggcctc	cccttcgacg	accaggcctc	ggtcacaacg	2400
gacgtgacat	gctgcttttt	ttaattttat	ttttttatga	aaagaaccag	tgtcaatccg	2460

cagacctct	gtgaagccag	gccggccggg	ccgagccagc	agccccctctc	cctagactca	2520
gaggcgccgc	ggggaggggt	ggccccgcg	aggcttcagg	ggccccctcc	ccaccaaagg	2580
gttcacctca	cacttgaatg	tacaaccac	cccactgtcg	ggaaggcctc	cgctctcggc	2640
ccctgcctct	tgctgctgtc	ctgtccccga	gccctgcag	gtcccccccc	gccccccac	2700
tcaagagtta	gagcagggtg	ctgcaggcct	tgggcccga	gggaaggcca	ctgccggcca	2760
cttggggcag	acacagacac	ctcaaggatc	tgtcacggaa	ggcgtccttt	ttcctttag	2820
ctaacgttag	gcctgagtag	ctcccccca	tcctttaga	cgctccagtc	cctactactg	2880
tgacggcatt	tccatccctc	ccctgcccgg	gaagggacct	tgcagggacc	tctccctcca	2940
aaaaaagaaa	aaaaaagaaa	gaaagaaaa	ataaatgagg	aaacgtgttg	cagcacaggc	3000
agttttcttc	tccttctgct	cccctgtttc	tcatacccc	aaactcagat	gctggagctc	3060
aggcccgccg	tgtgtgcacc	caggcaggag	cgggcgctgt	ccaggctggg	ccgccccctt	3120
ggctctccct	cctgttccag	gggagccata	ggagggaaag	caggtggccc	gggggggata	3180
tgggggcccc	agccctgtcc	caaagctccc	tgctcggtg	cccctcgccc	gcctttatat	3240
aaattctctg	aatcaccttt	gcatagaaaa	taaaagtgtt	tgctttgtaa	gaaaa	3295
<210> 11						
<211> 3226						
<212> DNA						
<213> 智人(Homo sapiens)						
<400> 11						
ctcggcctgc	acggcggctg	cggcggcggt	agcggcagcg	gcggcggcgg	cggcggcggc	60
ggcggcggcg	gcggcggcgg	cggcggcagc	ggcggcggcc	tgggcccggg	cgcagcggcg	120
gcggcggcgg	ggcctggagc	cggatctaag	atggcagcgg	cggcggcggc	ggtggggccg	180
ggcgcggggc	gcgcggggtc	ggcgggtccc	ggcggcggcg	ggccctgcgc	taccgtgtcg	240
gtgttccccg	gcgcccgcct	cctcaccatc	ggcgacgcga	acggcgagat	ccagcggcac	300
gcggagcagc	aggcgctgcg	cctcgagggt	cgcgccggcc	cggactcggc	gggcatcgcc	360
ctctacagcc	atgaagatgt	gtgtgtcttt	aagtgtcag	tgtcccgaga	gacagagtgc	420
agccgtgtgg	gcaagcagtc	cttcatcatc	accctgggct	gcaacagcgt	cctcatccag	480
ttcgccacac	ccaacgattt	ctgttccttc	tacaacatcc	tgaaaacctg	ccggggccac	540
accctggagc	ggtctgtgtt	cagcgagcgg	acggaggagt	cttctgccgt	gcagtacttc	600
cagtttttatg	gtacctgtc	ccagcagcag	aacatgatgc	aggactacgt	gcggacaggc	660
acctaccagc	gcgccatcct	gcaaaaccac	accgacttca	aggacaagat	cgttcttgat	720
gttggtgtg	gctctgggat	cctgtcgttt	tttgccgcc	aagctggagc	acggaaaatc	780
tacgcggtgg	aggccagcac	catggcccag	cacgtgagg	tcttggtgaa	gagtaacaac	840
ctgacggacc	gcatcgtggt	catcccgggc	aaggtggagg	aggtgtcact	ccccgagcag	900
gtggacatca	tcatctcgga	gccccatggc	tacatgctct	tcaacgagcg	catgctggag	960
agctacctcc	acgccaagaa	gtacctgaag	cccagcggaa	acatgtttcc	taccattggt	1020
gacgtccacc	ttgcaccctt	cacggatgaa	cagctctaca	tggagcagtt	caccaaggcc	1080
aacttctggt	accagccatc	tttccatgga	gtggacctgt	cggccctccg	aggtgccgcg	1140
gtggatgagt	atttccggca	gcctgtggtg	gacacatttg	acatccgat	cctgatggcc	1200

aagtctgtca agtacacggt gaacttctta gaagccaaag aaggagattt gcacaggata	1260
gaaatcccat tcaaattcca catgctgcat tcagggtctgg tccacggcct ggctttctgg	1320
tttgacgttg ctttcatcgg ctccataatg accgtgtggc tgtccacagc cccgacagag	1380
cccctgaccc actggtacca ggtgcggtgc ctgttccagt caccactgtt cgccaaggca	1440
ggggacacgc tctcaggac atgtctgctt attgccaaca aaagacagag ctacgacatc	1500
agtattgtgg ccaggtgga ccagaccggc tccaagtcca gtaacctcct ggatctgaaa	1560
aaccccttct ttagatacac gggcacaacg ccctacccc caccggctc ccactacaca	1620
tctccctcgg aaaacatgtg gaacacgggc agcacctaca acctcagcag cgggatggcc	1680
gtggcaggga tgccgaccgc ctatgacttg agcagtgtta ttgccagtgg ctccagcgtg	1740
ggccacaaca acctgattcc tttagggtcc tccggcgccc agggcagtgg tgggtggcagc	1800
acgagtgtccc actatgcagt caacagccag ttcacatgg gcggccccgc catctccatg	1860
gcgtcgccca tgtccatccc gaccaacacc atgcactacg ggagctaggg gcccgccccg	1920
cggactgaca gcaccaggaa accaaatgat gtccctgccc gccgcccccg ccgggcggct	1980
ttcccccttg tactggagaa gctcgaacac ccggtcacag ctctctttgc tatgggaact	2040
gggacacttt ttacacgat gttgccgccc tccccacct aacccccacc tcccggccct	2100
gagcgtgtgt cgctgccata ttttacacaa aatcatgttg tgggagccct cgtccccct	2160
cctgcccgtc ctaccctgac ctgggcttgt catctgctgg aacaggcgcc atggggcctg	2220
ccagccctgc ctgccaggtc ccttagcacc tgtccccctg cctgtctcca gtgggaaggt	2280
agcctggcca ggccgggcct ccccttcgac gaccaggcct cggtcacaac ggacgtgaca	2340
tgtctgtttt tttaatttta ttttttatg aaaagaacca gtgtcaatcc gcagaccctc	2400
tgtgaagcca ggccggccgg gccgagccag cagccctct ccctagactc agaggcgccg	2460
cggggagggg tggccccgcc gaggttcag gggccccctc cccaccaaag ggttcacctc	2520
acacttgaat gtacaacca cccactgtc gggaaggcct ccgtcctcgg cccctgcctc	2580
ttgctgctgt cctgtccccg agcccctgca ggtccccccc cgcccccca ctcaagagtt	2640
agagcagggt gctgcaggcc ttggggcccg aggggaaggcc actgccggcc acttggggca	2700
gacacagaca cctcaaggat ctgtcacgga aggcgtcctt tttccttgta gctaacgtta	2760
ggcctgagta gctccccctc atcctttag acgtccagt ccctactact gtgacggcat	2820
ttccatccct cccctgcccg ggaagggacc ttgcagggac ctctccctcc aaaaaagaa	2880
aaaaagaaaa agaaagaaaa aataaatgag gaaacgtgtt gcagcacagg cagttttctt	2940
ctccttctgc tcccctgttt ctcatacccc caaactcaga tgctggagct caggccccgc	3000
gtgtgtgcac ccaggcagga gcgggcgctg tccaggtggc gccgccccct tggctctccc	3060
tcctgttcca ggggagccat aggagggaag gcaggtggcc cgggggggat atggggggcc	3120
cagccctgtc ccaaagctcc ctgctcggt gcccctgcc cgctttata taaattctct	3180
gaatcacctt tgcatagaaa ataaaagtgt ttgctttgta agaaaa	3226
<210> 12	
<211> 3020	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 12	

gagtaccgag	ttccaccgct	gtgcgaggtg	tggcgttcag	gacccccgaa	tgggaaactt	60
caggatcttg	ggagagggcc	catgcgggga	cggtgggagc	cgcagggtga	gctcctcgtg	120
gaaacgtgga	cgggacgggc	cccttcctga	tgccgggctt	cgaaatgaag	atgtgtgtgt	180
ctttaagtgc	tcagtgtccc	gagagacaga	gtgcagccgt	gtgggcaagc	agtccttcat	240
catcaccttg	ggctgcaaca	gcgtcctcat	ccagttcgcc	acaccaacg	atttctgttc	300
cttctacaac	atcctgaaaa	cctgccgggg	ccacaccctg	gagcgggtctg	tgttcagcga	360
gcggacggag	gagtcttctg	ccgtgcagta	cttccagttt	tatggctacc	tgtcccagca	420
gcagaacatg	atgcaggact	acgtgcggac	aggcacctac	cagcgcgcca	tcctgcaaaa	480
ccacaccgac	ttcaaggaca	agatcgttct	tgatgttggc	tgtggctctg	ggatcctgtc	540
gttttttgcc	gcccagctg	gagcacggaa	aatctacgcg	gtggaggcca	gcacatggc	600
ccagcacgct	gaggctcttg	tgaagagtaa	caacctgacg	gaccgcatcg	tggtcatccc	660
gggcaaggtg	gaggaggtgt	cactccccga	gcaggtggac	atcatcatct	cggagcccat	720
gggctacatg	ctcttcaacg	agcgcgtgct	ggagagctac	ctccacgcca	agaagtacct	780
gaagcccagc	ggaaacatgt	ttcctacat	tggtgacgtc	caccttgca	ccttcacgga	840
tgaacagctc	tacatggagc	agttcaccaa	ggccaacttc	tggtagcagc	catctttcca	900
tggagtggac	ctgtcggccc	tccgaggtgc	cgcggtggat	gagtatttcc	ggcagcctgt	960
ggtggacaca	tttgacatcc	ggatcctgat	ggccaagtct	gtcaagtaca	cggatgaactt	1020
cttagaagcc	aaagaaggag	atttgacacg	gatagaaatc	ccattcaa	tccacatgct	1080
gcattcaggg	ctggtccacg	gcctggcttt	ctggtttgac	gttgctttca	tcggctccat	1140
aatgaccgtg	tggctgtcca	cagccccgac	agagcccctg	accactgg	accaggtgcg	1200
gtgcctgttc	cagtcaccac	tgttcgcca	ggcaggggac	acgtctcag	ggacatgtct	1260
gcttattgcc	aacaaaagac	agagctacga	catcagtatt	gtggcccagg	tggaccagac	1320
cggctccaag	tccagtaacc	tcctggatct	gaaaaacccc	ttcttttagat	acacgggcac	1380
aacgcccctca	ccccacccg	gctcccacta	cacatctccc	tcggaaaaca	tgtggaacac	1440
gggcagcacc	tacaacctca	gcagcgggat	ggcctgggca	gggatgccga	ccgcctatga	1500
cttgagcagt	gttattgcca	gtggctccag	cgtggggccac	aacaacctga	ttccttttagg	1560
gtcctccggc	gcccagggca	gtggtggtgg	cagcacgagt	gcccactatg	cagtcaacag	1620
ccagttcacc	atgggcggcc	ccgccatctc	catggcgctc	cccatgtcca	tcccgaacaa	1680
cacatgcac	tacgggagct	aggggcccgc	cccgcggact	gacagcacca	ggaaacacaaa	1740
tgatgtccct	gcccgcggcc	cccgcggggc	ggctttcccc	cttgtagctg	agaagctcga	1800
acacccggtc	acagctctct	ttgctatggg	aactgggaca	cttttttaca	cgatgttgcc	1860
gccgtcccca	ccctaacccc	cacctcccgg	ccctgagcgt	gtgtcgctgc	catattttac	1920
acaaaatcat	gttgtgggag	ccctcgctcc	ccctcctgcc	cgctctaccc	tgacctgggc	1980
ttgtcatctg	ctggaacagg	cgccatgggg	cctgccagcc	ctgcctgcca	ggtcccttag	2040
cacctgtccc	cctgcctgtc	tccagtggga	aggtagcctg	gccaggcggg	gcctcccctt	2100
cgacgaccag	gcctcggtca	caacggacgt	gacatgctgc	ttttttta	tttatttttt	2160
tatgaaaaga	accagtgtca	atccgcagac	cctctgtgaa	gccaggccgg	ccgggccgag	2220
ccagcagccc	ctctccctag	actcagaggc	gccgcgggga	ggggtggccc	cgccgaggct	2280
tcaggggccc	cctccccacc	aaagggttca	cctcacactt	gaatgtacaa	cccacccac	2340

tgtcgggaag	gcctccgtcc	tcggcccctg	cctcttgctg	ctgtcctgtc	cccagacccc	2400
tgcaggtccc	ccccgcccc	cccactcaag	agttagagca	ggtggctgca	ggccttgggc	2460
ccggaggga	ggccactgcc	ggccacttgg	ggcagacaca	gacacctcaa	ggatctgtca	2520
cggaaggcgt	cctttttcct	tgtagctaac	gttaggcctg	agtagctccc	ctccatcctt	2580
gtagacgctc	cagtccctac	tactgtgacg	gcatttccat	ccctcccctg	cccgggaagg	2640
gaccttgtag	ggacctctcc	ctccaaaaaa	agaaaaaaag	aaaaagaaag	aaaaaataaa	2700
tgaggaaacg	tgttgtagca	caggcagttt	tcttctcctt	ctgctcccct	gtttctcata	2760
ccccaaaact	cagatgctgg	agctcaggcc	cgccgtgtgt	gcacccaggc	aggagcgggc	2820
gctgtccagg	ctgggccgcc	cccttggttc	tccctcctgt	tccaggggag	ccataggagg	2880
gaaagcaggt	ggcccggggg	ggatatgggg	gccccagccc	tgtcccaaag	ctccctgctc	2940
ggctgcccct	cgcccgccct	tatataaatt	ctctgaatca	cctttgcata	gaaaataaaa	3000
gtgtttgctt	tgtaagaaaa					3020

<210> 13

<211> 2645

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13

actgagcatg	cccagttgca	gagccgacca	gaggagtttt	ttcttttctt	ttcttttttt	60
ttttttaagg	gggggggtct	caagtaggag	gcctcccat	cacccccacc	ccagcccccc	120
accacccccg	gcctaagcag	ctaccatggc	ccaggtggcc	ggcgcggcgt	tgtcccaggc	180
gggttggtat	ctttcagatg	aaggcattga	agcttgcaca	agctctccag	acaaagtcaa	240
tgtaaataac	atcatcctga	ttgctctcaa	tacagatctg	agaacaattg	gcaagaaatt	300
cctccccagt	gacatcaata	gtggaaaggt	agaaaagctc	gaaggtccat	gtgttttgca	360
aattcaaaaa	attcgcaatg	ttgctgcacc	aaaggataat	gaagaatctc	aggctgcacc	420
aaggatgctg	cgattacaga	tgactgatgg	tcatataagt	tgacacagcag	tagaatttag	480
ttatatgtca	aaaaataagc	tgaacacacc	acctggaact	aaagttaagc	tctcaggcat	540
tggtgacata	aaaaatggat	tcctgctctt	gaatgactct	aacaccacag	ttcttggtgg	600
tgaagtggaa	caccttattg	agaaatggga	gttacagaga	agcttatcaa	aacacaatag	660
aagcaatatt	ggaactgaag	gtggaccacc	gccttttgtg	ccttttggac	agaagtgtgt	720
atctcatgtc	caagtggata	gcagagaact	tgatcgaaga	aaaacattgc	aagttacaat	780
gcctgtcaaa	cctacaaaatg	ataatgatga	atttgaaaag	caaaggacgg	ctgctattgc	840
tgaagttgca	aagagcaagg	aaaccaagac	atttgaggga	ggtggtggtg	gtgctagaag	900
taatctcaat	atgaatgctg	ctggtaaccg	aaataggga	gttttacaga	aagaaaagtc	960
aaccaaatca	gagggaatac	atgaaggtgt	ctatagagaa	ctggttgatg	agaaagctct	1020
gaagcacata	acggaaatgg	gcttcagtaa	ggaagcatcg	aggcaagctc	ttatggataa	1080
tggaacaac	ttagaagcag	cactgaacgt	acttcttaca	agcaataaac	agaaacctgt	1140
tatgggtcct	cctctgagag	gtagaggaaa	aggcaggggg	cgaataagat	ctgaagatga	1200
agaggacctg	ggaaatgcaa	ggccatcagc	accaagcaca	ttatttgatt	tcttggaatc	1260
taaaatggga	actttgaatg	tggaagaacc	taaatcacag	ccacagcagc	ttcatcaggg	1320

acaatacaga	tcatcaaata	ctgagcaaaa	tggagtaaaa	gataataatc	atctgagaca	1380
tcctcctcga	aatgatacca	ggcagccaag	aaatgaaaaa	cgcctcgtt	ttcaaagaga	1440
ctcccaaaat	tcaaagtcag	ttttagaagg	cagtggatta	cctagaaata	gaggttctga	1500
aagaccaagt	acttcttcag	tatctgaagt	atgggctgaa	gacagaatca	aatgtgatag	1560
accgtattct	agatatgaca	gaactaaaga	tacttcatat	cctttagggt	ctcagcatag	1620
tgatgggtgct	tttaaaaaaa	gagataactc	tatgcaaagc	agatcaggaa	aaggtccctc	1680
ctttgcagag	gcaaaaagaaa	atccacttcc	tcaaggatct	gtagattata	ataatcaaaa	1740
acgtggaaaa	agagaaaagcc	aaacatctat	tcctgattat	ttttatgaca	ggaaatcaca	1800
aacaataaat	aatgaagctt	tcagtgggtat	aaaaattgaa	aaacatttta	atgtaaatac	1860
tgattatcag	aatccagttc	gaagtaatag	tttcattgggt	gttccaaatg	gagaagtaga	1920
aatgccactg	aaaggaagac	gaataggacc	tattaagcca	gcaggacctg	tcacagctgt	1980
accctgtgat	gataaaatat	tttacaatag	tgggcecaaa	cgaagatctg	ggccaattaa	2040
gccagaaaaa	atactagaat	catctattcc	tatggagtat	gcaaaaatgt	ggaaacctgg	2100
agatgaatgt	tttgcacttt	attgggaaga	caacaagttt	taccgggcag	aagttgaagc	2160
cctccattct	tcgggtatga	cagcagttgt	taaattcatt	gactacggaa	actatgaaga	2220
ggtgctactg	agcaatatca	agcccattca	aacagaggca	tgggaggaag	aaggcaccta	2280
cgatcaaact	ctggagttcc	gtaggggagg	tgatggccag	ccaagacgat	ccactcggcc	2340
aacccaacag	ttttaccaac	caccccgggc	tcggaactaa	taggaaaaga	ctctttgtga	2400
agaaacgagc	cagtgactga	aacaccctgg	tggaaacctg	ttgacagacc	ttccactttc	2460
tcttcagaat	aagtagctgt	ggtggatatt	attatttgaa	gaaagaaaaa	acagatttta	2520
gggtggaaaa	aacagtcaac	tcacacaaag	aatggaaaaa	aatactgagt	taaattaagc	2580
aaataccttt	tacaagtga	aggaagaatt	tttcttctgc	cgtaataaaa	accattgtgc	2640
tatta						2645

<210> 14

<211> 3032

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 14

acccaccctg	cgccccagcc	ctctacagcg	cgggcgaagg	gcatcggcgg	ggaagcggct	60
gtggttgcca	gatctggcag	tacagagcca	aggtggcagg	gccgcgctag	gacacggatg	120
gtcccagggg	gagggcaaca	ggaaaaacaa	gactgacac	aactgcccc	tttccccatg	180
tcccctaaaa	gcaggttttc	ttgggctgac	cagggcattt	tactgtgggt	gtccgactgg	240
ggcaactcga	tctgcccgcg	gggactcaaa	aaagcttgag	ctgcattttt	tctttgcgtc	300
cgggcggacc	aaaaggcgag	gtgaaggga	cgagtgttta	taagaaagta	aacttttgtg	360
cagaatgggc	tggggacacc	tctgagtttt	gctgcccga	acgtgacctt	tttagcgcgg	420
tcctggacgc	gttccctcgc	agccaaccgc	tcagtctcct	caggccttat	cctgcctctt	480
ctgaggtggc	cgcctgtggg	cgctgcaaac	gccacacttt	tgctctacga	agaacctcct	540
cgcgactttc	caaggtatct	ttcagatgaa	ggcattgaag	cttgacaaag	ctctccagac	600
aaagtcaatg	taaatgacat	catcctgatt	gctctcaata	tctgagaaca	attggcaaga	660

aattcctccc	cagtgacatc	aatagtggaa	aggtagaaaa	gctcgaaggt	ccatgtgttt	720
tgcaaattca	aaaaattcgc	aatgttgctg	caccaaagga	taatgaagaa	tctcaggctg	780
caccaaggat	gctgcgatta	cagatgactg	atggtcatat	aagttgcaca	gcagtagaat	840
ttagtatat	gtcaaaaaata	agcctgaaca	caccacctgg	aactaaagtt	aagctctcag	900
gcattgttga	cataaaaaat	ggattcctgc	tcttgaatga	ctctaaccac	acagttcttg	960
gtggtgaagt	ggaacacctt	attgagaaat	gggagttaca	gagaagctta	tcaaaacaca	1020
atagaagcaa	tattggaact	gaaggtggac	caccgccttt	tgtgcctttt	ggacagaagt	1080
gtgtatctca	tgtccaagtg	gatagcagag	aacttgatcg	aagaaaaaca	ttgcaagtta	1140
caatgcctgt	caaacctaca	aatgataatg	atgaatttga	aaagcaaagg	acggctgcta	1200
ttgctgaagt	tgcaaagagc	aaggaaacca	agacatttgg	aggaggtgg	ggtggtgcta	1260
gaagtaatct	caatatgaat	gctgctggta	accgaaatag	ggaagtttta	cagaaagaaa	1320
agtcaaccaa	atcagaggga	aaacatgaag	gtgtctatag	agaactggtt	gatgagaaag	1380
ctctgaagca	cataacggaa	atgggcttca	gtaaggaagc	atcgaggcaa	gctcttatgg	1440
ataatggcaa	caacttagaa	gcagcactga	acgtacttct	tacaagcaat	aaacagaaac	1500
ctgttatggg	tcctcctctg	agaggtagag	gaaaaggcag	ggggcgaata	agatctgaag	1560
atgaagagga	cctgggaaat	gcaaggccat	cagcaccaag	cacattattt	gatttcttgg	1620
aatctaaaat	gggaactttg	aatgtggaag	aacctaaatc	acagccacag	cagcttcac	1680
agggacaata	cagatcatca	aatactgagc	aaaatggagt	aaaagataat	aatcatctga	1740
gacatcctcc	tcgaaatgat	accaggcagc	caagaaatga	aaaaccgcct	cgttttcaaa	1800
gagactccca	aaattcaaag	tcagttttag	aaggcagtgg	attacctaga	aatagaggtt	1860
ctgaaagacc	aagtacttct	tcagtatctg	aagtatgggc	tgaagacaga	atcaaagtgt	1920
atagaccgta	ttctagatat	gacagaacta	aagatacttc	atatccttta	ggttctcagc	1980
atagtgatgg	tgctttttaa	aaaagagata	actctatgca	aagcagatca	ggaaaaggtc	2040
cctcctttgc	agaggcaaaa	gaaaatccac	ttcctcaagg	atctgtagat	tataataatc	2100
aaaaacgtgg	aaaaagagaa	agccaaacat	ctattcctga	ttatttttat	gacaggaaat	2160
cacaaacaat	aaataatgaa	gctttcagt	gtataaaaa	tgaaaaacat	tttaatgtaa	2220
atactgatta	tcagaatcca	gttcgaagta	atagtttcat	tggtgttcca	aatggagaag	2280
tagaaatgcc	actgaaagga	agacgaatag	gacctattaa	gccagcagga	cctgtcacag	2340
ctgtaccctg	tgatgataaa	atattttaca	atagtgggcc	caaacgaaga	tctgggcca	2400
ttaagccaga	aaaaatacta	gaatcatcta	ttcctatgga	gtatgcaaaa	atgtggaaac	2460
ctggagatga	atgttttgca	ctttattggg	aagacaacaa	gttttaccgg	gcagaagttg	2520
aagccctcca	ttcttcgggt	atgacagcag	ttgttaaatt	cattgactac	ggaaactatg	2580
aagaggtgct	actgagcaat	atcaagccca	ttcaaacaga	ggcatgggag	gaagaaggca	2640
cctacgatca	aactctggag	ttccgtaggg	gaggtgatgg	ccagccaaga	cgatccactc	2700
ggccaacca	acagttttac	caaccacccc	gggctcggaa	ctaataggaa	aagtagactc	2760
tttgtgaaga	aacgagccag	tgactgaaac	accctggtgg	aaacctgttg	acagaccttc	2820
cactttctct	tcagaataag	tagctgtggt	ggatattatt	atttgaagaa	agaaaaaaca	2880
gatttttaggg	tggaaaaaac	agtcaactca	cacaaagaat	ggaaaaaaat	actgagttaa	2940
attaagcaaa	taccttttac	aagtgaagag	aagaattttt	cttctgccgt	caataaaacc	3000

attgtgctat tattgtttta aaaaaaaaaa aa	3032
<210> 15	
<211> 3032	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 15	
acccaccctg cgccccagcc ctctacagcg cgggcgaagg gcatcggcgg ggaagcggct	60
gtggttgcca gatctggcag tacagagcca aggtggcagg gccgcgctag gacacggatg	120
gtcccagggg gagggcaaca ggaanaacaa gcaactgacac aactgcccc tttcccatg	180
tcccctaaaa gcaggttttc ttgggctgac cagggcattt tcaactgtgg gtccgactgg	240
ggcaactcga tctgccccgc gggactcaaa aaagcttgag ctgcattttt tctttgcgtc	300
cgggcggacc aaaaggcgag gtgaaggga cgagtgttta taagaaagta aacttttgtg	360
cagaatgggc tggggacacc tctgagtttt gctgcccga acgtgacctt tttagcgcgg	420
tcttgacgc gttccctcgc agccaacccg tcagtctcct caggccttat cctgcctct	480
ctgaggtggc cgctgtggg cgctgcaaac gccacattt tgctctacga agaactcct	540
cgcgactttc caaggtatct ttcagatgaa ggcattgaag cttgcacaag ctctccagac	600
aaagtcaatg taaatgacat catcctgatt gctctcaata tctgagaaca attggcaaga	660
aattcctccc cagtgcacatc aatagtggaa aggtagaaaa gctcgaagg ccatgtgttt	720
tgcaaattca aaaaattcgc aatgttgctg caccaaagga taatgaagaa tctcaggctg	780
caccaaggat gctgcgatta cagatgactg atggtcatat aagttgcaca gcagtagaat	840
ttagtatat gtcaaaaata agcctgaaca caccacctgg aactaaagtt aagctctcag	900
gcattgttga cataaaaaat ggattcctgc tcttgaatga ctctaacc accagttcttg	960
gtggtgaagt ggaacacctt attgagaaat gggagttaca gagaagctta tcaaacaca	1020
atagaagcaa tattggaact gaaggtggac caccgccttt tgtgcctttt ggacagaagt	1080
gtgtatctca tgtccaagtg gatagcagag aacttgatcg aagaaaaaca ttgcaagtta	1140
caatgcctgt caaacctaca aatgataatg atgaatttga aaagcaaagg acggctgcta	1200
ttgctgaagt tgcaaaagac aaggaaacca agacatttgg aggaggtggg ggtggtgcta	1260
gaagtaatat caatatgaat gctgctggta accgaaatag ggaagtttta cagaaagaaa	1320
agtcaaccaa atcagaggga aaacatgaag gtgtctatag agaactgggt gatgagaaag	1380
ctctgaagca cataacggaa atgggcttca gtaaggaagc atcgaggcaa gctcttatgg	1440
ataatggcaa caacttagaa gcagcactga acgtacttct tacaagcaat aaacagaaac	1500
ctgttatggg tcctcctctg agaggtagag gaaaaggcag ggggcgaata agatctgaag	1560
atgaagagga cctgggaaat gcaaggccat cagcaccaag cacattattt gatttcttgg	1620
aatctaaaaat gggaactttg aatgtggaag aacctaaatc acagccacag cagcttcac	1680
agggacaata cagatcatca aatactgagc aaaatggagt aaaagataat aatcatctga	1740
gacatcctcc tcgaaatgat accaggcagc caagaaatga aaaaccgcct cgttttcaaa	1800
gagactccca aaattcaaag tcagttttag aaggcagtgg attacctaga aatagaggtt	1860
ctgaaagacc aagtacttct tcagtatctg aagtatgggc tgaagacaga atcaaatgtg	1920
atagaccgta ttctagatat gacagaacta aagatacttc atatccttta gtttctcagc	1980

atagtgatgg	tgctttttaa	aaaagagata	actctatgca	aagcagatca	ggaaaaggtc	2040
cctcctttgc	agaggcaaaa	gaaaatccac	ttcctcaagg	atctgtagat	tataataatc	2100
aaaaacgtgg	aaaaagagaa	agccaaacat	ctattcctga	ttatTTTTat	gacaggaaat	2160
cacaaacaat	aaataatgaa	gctttcagtg	gtataaaaaat	tgaaaaacat	tttaatgtaa	2220
atactgatta	tcagaatcca	gttcgaagta	atagtttcat	tggtgttcca	aatggagaag	2280
tagaaatgcc	actgaaagga	agacgaatag	gacctattaa	gccagcagga	cctgtcacag	2340
ctgtaccctg	tgatgataaa	atattttaca	atagtggggc	caaacgaaga	tctgggccaa	2400
ttaagccaga	aaaaataacta	gaatcatcta	ttcctatgga	gtatgcaaaa	atgtggaaac	2460
ctggagatga	atgttttgca	ctttattggg	aagacaacaa	gttttaccgg	gcagaagttg	2520
aagccctcca	ttcttcgggt	atgacagcag	ttgttaaatt	cattgactac	ggaaactatg	2580
aagaggtgct	actgagcaat	atcaagccca	ttcaaacaga	ggcatgggag	gaagaaggca	2640
cctacgatca	aactctggag	ttccgtaggg	gaggtgatgg	ccagccaaga	cgatccactc	2700
ggccaaccca	acagttttac	caaccacccc	gggctcggaa	ctaataggaa	aagtagactc	2760
tttgtgaaga	aacgagccag	tgactgaaac	accctggtgg	aaacctgttg	acagaccttc	2820
cactttctct	tcagaataag	tagctgtggt	ggatattatt	atttgaagaa	agaaaaaaca	2880
gatttttaggg	tggaaaaaac	agtcaactca	cacaaagaat	ggaaaaaat	actgagttaa	2940
attaagcaaa	taccttttac	aagtgaaggg	aagaattttt	cttctgccgt	caataaaacc	3000
attgtgctat	tattgtttta	aaaaaaaaaa	aa			3032

<210> 16

<211> 6925

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 16

agtttccggc	aatggctcag	agtttctaac	gtgccccctt	gttgtctctc	ggccgccgtc	60
ctctcaacca	ccgccccctt	tttcggctcc	ctctccccct	tcccgttccc	ccagtcagcc	120
tggccctgct	ggtgcctccg	gcgctacggg	ctgggcaaga	tggcggcctt	cgggatcttg	180
agctacgaac	accggccccct	gaagcggccg	cggtcggggc	ctcccgatgt	ttaccctcag	240
gaccccaaac	agaaggagga	tgaactgacg	gccttgaatg	taaaacaagg	tttcaataac	300
cagcctgctg	tctctgggga	tgagcatggc	agtccaaga	acgtcagctt	caatcctgcc	360
aagatcagtt	ccaacttcag	cagcattatt	gcagagaaat	tacgttgtaa	tacccttctt	420
gacactggtc	gcaggaagcc	ccaagtgaac	cagaaggata	acttctggct	ggtgactgca	480
cgatcccaga	gtgccattaa	cacttggttc	actgacttgg	ctggcaccaa	gccactcacg	540
caactagcca	aaaagggtccc	cattttcagt	aagaaggaag	aggtgttttg	gtacttagcc	600
aaatacacag	tgctgtgat	gcgggctgcc	tggtcatta	agatgacctg	tgctacttat	660
gcagcaatct	ctgagaccaa	ggttaagaag	agacatgttg	accctttcat	ggaatggact	720
cagatcatca	ccaagtactt	atgggagcag	ttacagaaga	tggctgaata	ctaccggcca	780
gggcctgcag	gaagtggggg	ctgtggttcc	acgatagggc	ccttgcccca	tgatgtagag	840
gtggcaatcc	ggcagtggga	ttacaccgag	aagctggcca	tgttcatgtt	tcaggatgga	900
atgctggaca	gacatgagtt	cctgacctgg	gtgcttgagt	gttttgagaa	gatccgcctt	960

ggagaggatg	aattgcttaa	actgctgctg	cctctgcttc	tccgatactc	tggggaattt	1020
gttcagtctg	catacctgtc	ccgccggctt	gcctacttct	gtacacggag	actggccctg	1080
cagctggatg	gtgtgagcag	tcactcatct	catgttatat	ctgctcagtc	aacaagcacg	1140
ctacccacca	ccccgtctcc	tcagcccca	actagcagca	caccctcgac	tccctttagt	1200
gacctgctta	tgtgccctca	gcaccggccc	ctggtttttg	gcctcagctg	tatcctacag	1260
accatcctcc	tgtgctgtcc	tagtgccttg	gtttggcact	actcactgac	tgatagcaga	1320
attaagaccg	gctcaccact	tgaccacttg	cctattgccc	cgtccaacct	gcccattgcca	1380
gagggtaaca	gtgccttcac	tcagcaggtc	cgtgcaaagt	tgcgggagat	cgagcagcag	1440
atcaaggagc	ggggacaggc	agttgaagtt	cgctggctct	tcgataaatg	ccaggaagct	1500
actgcaggct	tcaccattgg	acgggtactt	catacttttg	aagtgcaggga	cagccatagt	1560
tttgaacgct	ctgacttcag	caactctctt	gactcccttt	gtaaccgaat	ctttggattg	1620
ggacctagca	aggatgggca	tgagatctcc	tcagatgatg	atgctgtggt	gtcattgcta	1680
tgtgaatggg	ctgtcagctg	caagcgttct	ggtcggcatc	gtgctatggt	ggtagccaag	1740
ctcctggaga	agagacaggc	ggagattgag	gctgagcgtt	gtggagaatc	agaagccgca	1800
gatgagaagg	gttccatcgc	ctctggtctc	ctttctgctc	ccagtgtctc	cattttccag	1860
gatgtcctcc	tgcagtttct	ggatacacag	gctcccatgc	tgacggaccc	tcgaagttag	1920
agtgagcggg	tggaaattctt	taacttagta	ctgctgttct	gtgaactgat	tcgacatgat	1980
gttttctccc	acaacatgta	tacttgcact	ctcatctccc	gaggggacct	tgcttttgga	2040
gccccgtgtc	cccgccctcc	ctctcccttt	gatgatcctg	ccgatgaccc	agagcacaag	2100
gaggctgaag	gcagcagcag	cagcaagctg	gaagatccag	ggctctcaga	atctatggac	2160
attgacccta	gttccagtgt	tctctttgag	gacatggaga	agcctgattt	ctcattgttc	2220
tccccacta	tgccctgtga	ggggaagggc	agtccatccc	ctgagaagcc	agatgtcgag	2280
aaggagggtga	agccccacc	caaggagaag	attgaaggga	cccttggggg	tctttacgac	2340
cagccacgac	acgtgcagta	cgccacccat	tttcccatcc	cccaggagga	gtcatgcagc	2400
catgagtga	accagcgggt	ggctgtactg	tttgggggtg	gaaagcagcg	agatgatgcc	2460
cgccatgcca	tcaagaaaat	caccaaggat	atcttgaagg	ttctgaaccg	caaagggaca	2520
gcagaaactg	accagcttgc	tcctattgtg	cctctgaatc	ctggagacct	gacattctta	2580
ggtggggagg	atgggcagaa	gcggcgacgc	aaccggcctg	aagccttccc	cactgctgaa	2640
gatatctttg	ctaagtcca	gcaccttcca	cattatgacc	aacaccaggt	cacggctcag	2700
gtctcccga	atgttctgga	gcagatcacg	agctttgccc	ttggcatgtc	ataccacttg	2760
cctctgggtc	agcatgtgca	gttcatcttc	gacctcatgg	aatattcact	cagcatcagt	2820
ggcctcatcg	actttgccat	tcagctgctg	aatgaactga	gtgtagttag	ggctgagctg	2880
cttctcaaat	cctcggatct	ggtgggcagc	tacactacta	gcctgtgcct	gtgcatcgtg	2940
gctgtcctgc	ggcactatca	tgctgcctc	atcctcaacc	aggaccagat	ggcacaggtc	3000
tttgaggggc	tgtgtggcgt	cgtgaagcat	gggatgaacc	ggtccgatgg	ctcctctgca	3060
gagcgtgta	tccttgctta	tctctatgat	ctgtacacct	cctgtagcca	tttaaagaac	3120
aaatttgggg	agctcttcag	cgacttttgc	tcaaaggtag	agaacacat	ctactgcaac	3180
gtggagccat	cggaatcaaa	tatgcgctgg	gcacctgagt	tcattgatcga	cactctagag	3240
aacctgcag	ctcacacctt	cacctacacg	gggctaggca	agagtcttag	tgagaacctt	3300

gctaaccgct	acagctttgt	ctgcaatgcc	cttatgcacg	tctgtgtggg	gcaccatgat	3360
cccgataggg	tgaatgacat	cgcaatcctg	tgtgcagagc	tgaccggcta	ttgcaagtca	3420
ctgagtgacg	aatggctagg	agtgccttaag	gccttgtgct	gctcctctaa	caatggcact	3480
tgtggtttca	acgatctcct	ctgcaatggt	gatgtcagtg	acctatcttt	tcatgactcg	3540
ctggctactt	ttgttgccat	cctcatcgct	cggcagtggt	tgctcctgga	agatctgatt	3600
cgctgtgctg	ccatcccctt	actccttaat	gctgcttgta	gtgaacagga	ctctgagcca	3660
ggggcccggc	ttacctgccg	catcctcctt	caccttttca	agacaccgca	gctcaatcct	3720
tgccagtctg	atggaaacaa	gcctacagta	ggaatccgct	cctcctgcga	ccgccacctg	3780
ctggctgcct	cccagaaccg	catcgtggat	ggagccgtgt	ttgctgttct	caaggctgtg	3840
tttgtacttg	gggatgcgga	actgaaaggt	tcaggcttca	ctgtgacagg	aggaacagaa	3900
gaacttccag	aggaggaggg	aggaggtggc	agtgggtggc	ggaggcaggg	tggccgcaac	3960
atctctgtgg	agacagccag	tctggatgtc	tatgccaagt	acgtgctgcg	cagcatctgc	4020
caacaggaat	gggtaggaga	acgttgccct	aagtctctgt	gtgaggacag	caatgacctg	4080
caagaccag	tgttgagtag	tgcccaggcg	cagcgccctc	tgcagctcat	ttgctatcca	4140
catcgactgc	tggacaatga	ggatggggaa	aacccccagc	ggcagcgcat	aaagcgcat	4200
ctccagaact	tggaccagt	gacctatgcg	cagtcttctt	tggagctgca	gctcatgac	4260
aagcagaccc	ctaacaatga	gatgaactcc	ctcttgagga	acatcgccaa	ggccacaatc	4320
gaggttttcc	aacagtcagc	agagacaggg	tcattcttctg	gaagtactgc	aagcaacatg	4380
cccagcagca	gcaagaccaa	gcctgtgctc	agctctctag	agcgctctgg	tgtatggctg	4440
gtggccccc	tcatgtctaa	actgcccacc	tcagtccagg	gacatgtgtt	aaaggctgct	4500
ggggaagaat	tggagaaggg	tcagcacctg	ggttctctct	cacgcaaaga	acgtgatcga	4560
caaaagcaga	agagcatgtc	cctattgagc	cagcagccct	tcttatcgct	ggtgctaaca	4620
tgtctgaaag	ggcaggatga	acaacgcgag	ggactcctta	cctccctcta	cagccaggtg	4680
caccagattg	tgaataattg	gcgagatgac	cagtacttag	atgattgcaa	accaaagcag	4740
cttatgcatg	aggcactcaa	actgcggctc	aacctgggtg	ggggcatgtt	tgacacgggtg	4800
cagcgagca	cccagcagac	cacggagtgg	gccatgctcc	tcctggagat	catcatcagc	4860
ggcactgtcg	acatgcagtc	caacaatgag	ctcttcaacta	ctgtgttgga	catgctgagc	4920
gtgctcatca	atgggacatt	ggctgcagac	atgtctagca	tctcgcaagg	tagcatggag	4980
gaaaacaagc	gtgcatacat	gaacctggcg	aagaagttgc	agaaggagtt	gggggagcgc	5040
cagtcagaca	gtctggaaaa	ggttcgccag	ctgctgccac	tgcccaagca	gacccgagat	5100
gtcatcacgt	gtgagccaca	gggctccctt	atcgatacca	agggcaacaa	gattgctggc	5160
ttcgattcca	tcttcaagaa	ggagggtcta	caggtttcca	ccaaacagaa	gatctcgccc	5220
tgggatcttt	ttgaggggtt	gaagccgtca	gcaccactct	cttggggctg	gtttggaaca	5280
gtccgagtg	accggcgagt	ggctcgagga	gaggagcagc	agcggttgct	gctctaccac	5340
acacacctga	ggccccggcc	ccgcgcctat	tacctggagc	caactgccact	gccccagaa	5400
gatgaggagc	cgctgctcc	tacctgcta	gagcctgaga	aaaaggctcc	agagcccccc	5460
aaaactgaca	aaccgggggc	tgtccaccc	agtactgagg	aacgcaagaa	gaagtccacc	5520
aagggaaga	aacgcagcca	gccagctacc	aagacagagg	actatggaat	ggggccgggt	5580
cggagcggcc	cttatggtgt	gacagtgcct	ccggacctcc	tgcaccaccc	aaacctggt	5640

tctataacac	accttaacta	caggcaaggc	tccataggcc	tgtacacca	gaaccagcca	5700
ctacctgcag	gtggccctcg	tgtggacca	taccgtcctg	tgcgcttacc	aatgcagaag	5760
ctgcccaccc	gaccaactta	ccctggagtg	ctgcccacaa	ccatgactgg	cgatcatgggt	5820
ttagaaccct	cctcttataa	gacctctgtg	taccggcagc	agcaacctgc	ggtgccccaa	5880
ggacagcgcc	ttcgccaaca	gctccagcag	agtcagggca	tgttgggaca	gtcatctgtc	5940
catcagatga	ctcccagctc	ttcctacggt	ttgcagactt	cccagggcta	tactccttat	6000
gtttctcatg	tgggattgca	gcaacacaca	ggccctgcag	gtaccatggt	gccccccagc	6060
tactccagcc	agccttacca	gagcaccac	ccttctacca	atcctactct	tgtagatcct	6120
acccgccacc	tgcaacagcg	gcccagtggc	tatgtgcacc	agcaggcccc	cacctatgga	6180
catggactga	cctccactca	aaggttttca	caccagacac	tgcagcagac	acccatgata	6240
agtaccatga	ctccaatgag	tgcccagggc	gtccaggcag	gcgtccgttc	aacagccatc	6300
ctacctgagc	agcagcagca	gcagcaacag	cagcaacagc	aacagcagca	gcagcagcaa	6360
cagcaacagc	agcagcagca	gcagcagtac	cacatccggc	agcagcagca	gcagcagatc	6420
ctgcggcagc	agcagcaaca	gcaacagcag	cagcagcagc	agcagcaaca	gcaacagcag	6480
cagcagcaac	agcaacaaca	gcaacaccag	cagcaacagc	agcaacaggc	ggctcctccc	6540
caaccccagc	cccagtccca	gccccagttc	cagcgccagg	ggcttcagca	gacccagcag	6600
cagcaacaga	cagcagcttt	ggtccggcaa	cttcaacaac	agctctctaa	tacccagcca	6660
cagcccagta	ccaacatatt	tggacgctac	tgagccacct	ggaggaactg	cttgtgcact	6720
ggatgtggcc	ccaccctttc	ctcttaattc	ccaatcccat	tcctgggcta	gcaccagtag	6780
tggttggggc	cctcccctca	ggctccattt	ttaataagtt	tttagtattt	ttgttaatgt	6840
gaggcattga	gctgttgggt	tttgtatatt	atttatatag	agaccccaga	gctgttgcac	6900
ccaatacaca	gagcttcttt	gcaaaa				6925



图1A

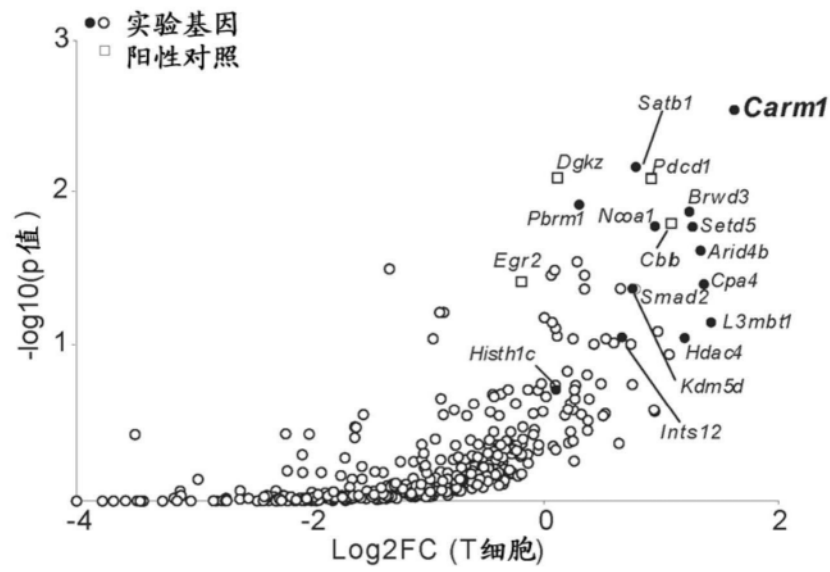


图1B

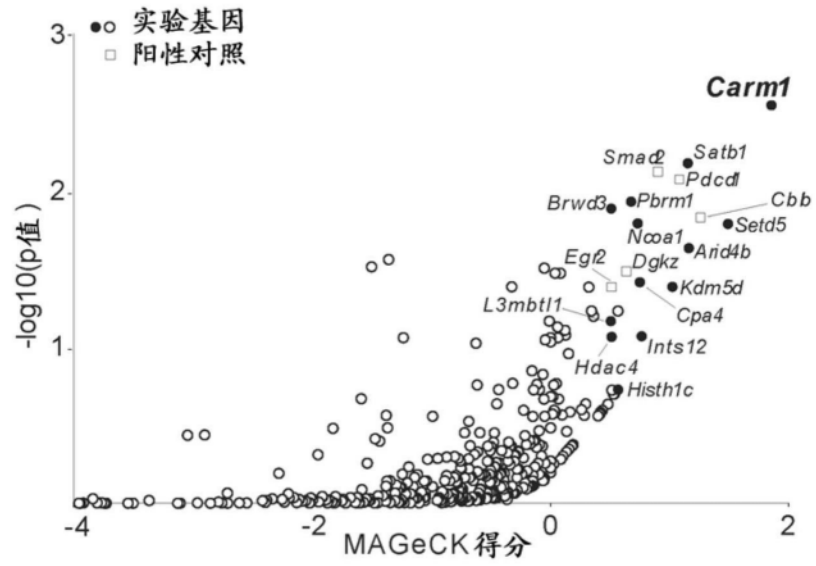


图1C

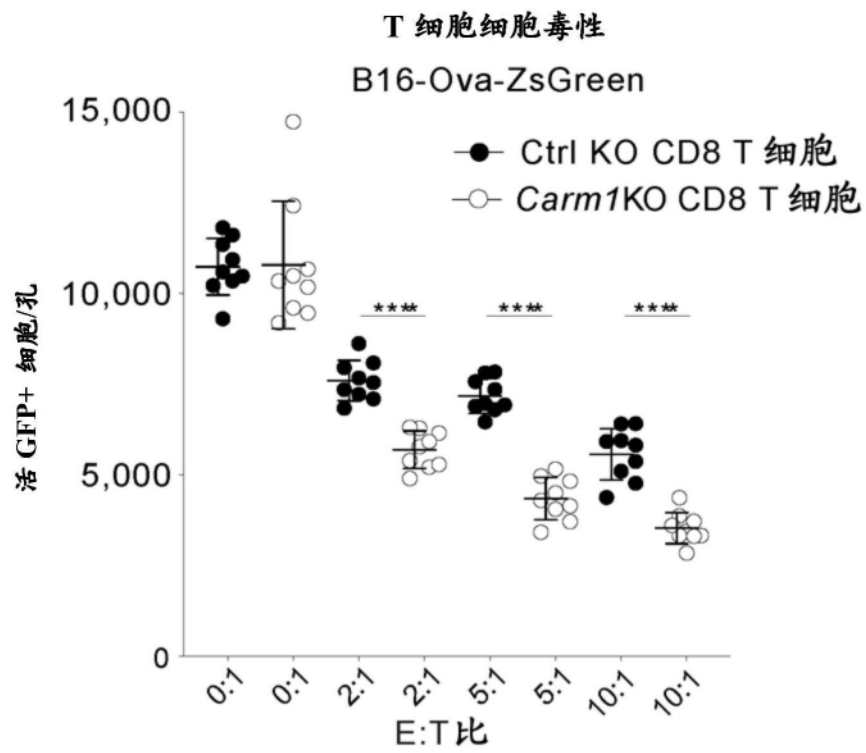


图1D

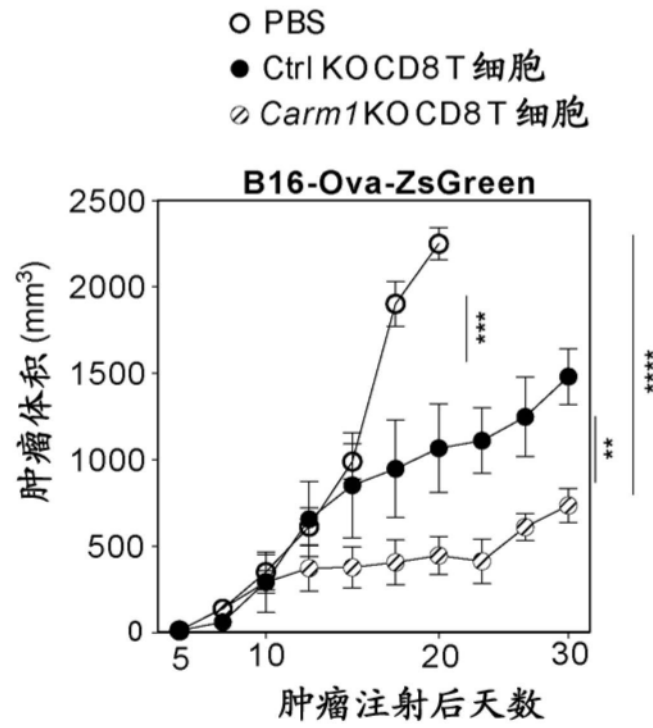


图1E

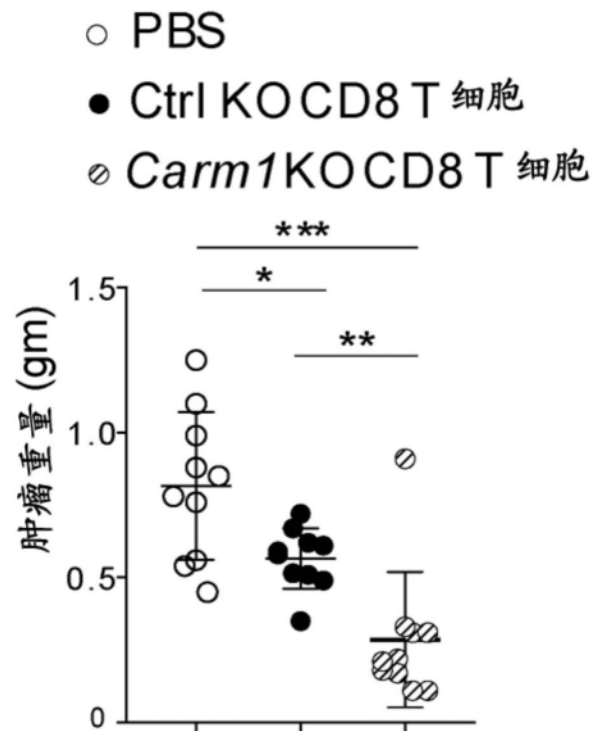


图1F

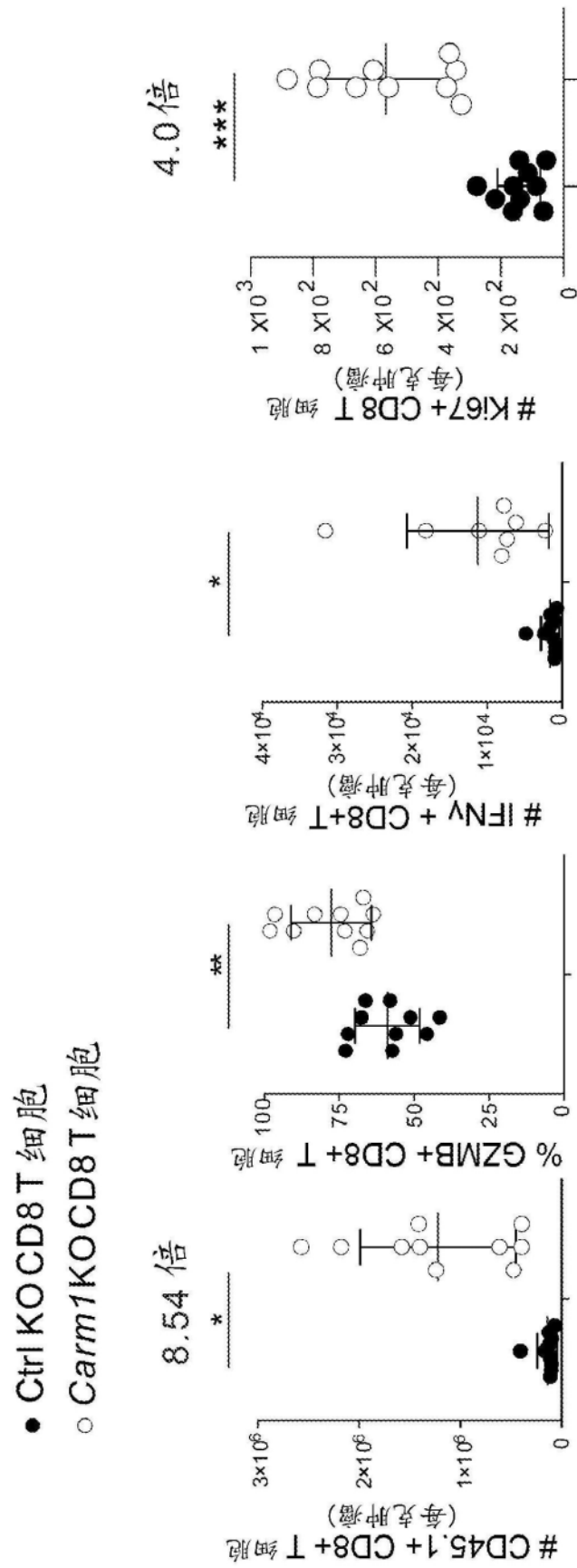


图1G

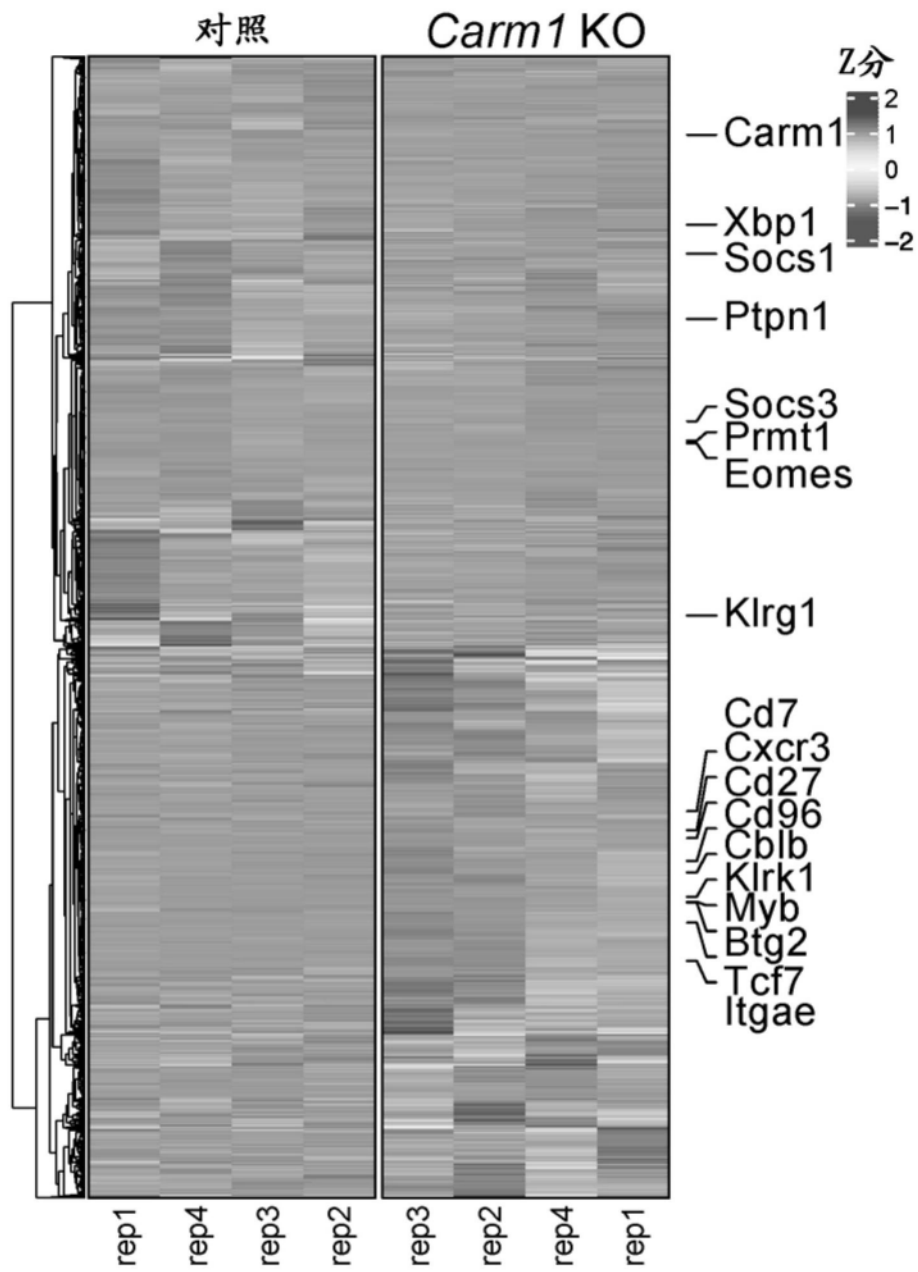


图2A

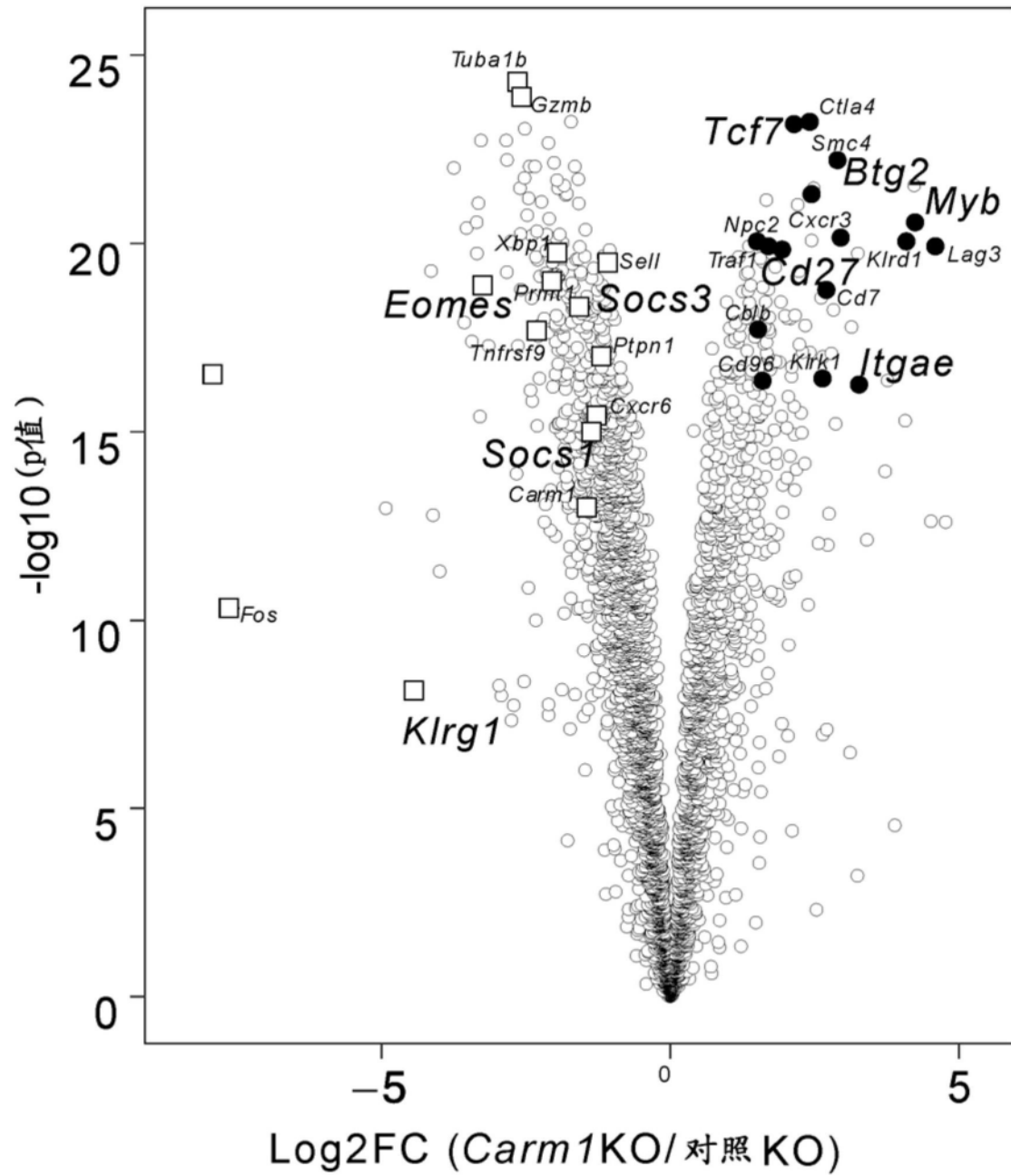


图2B

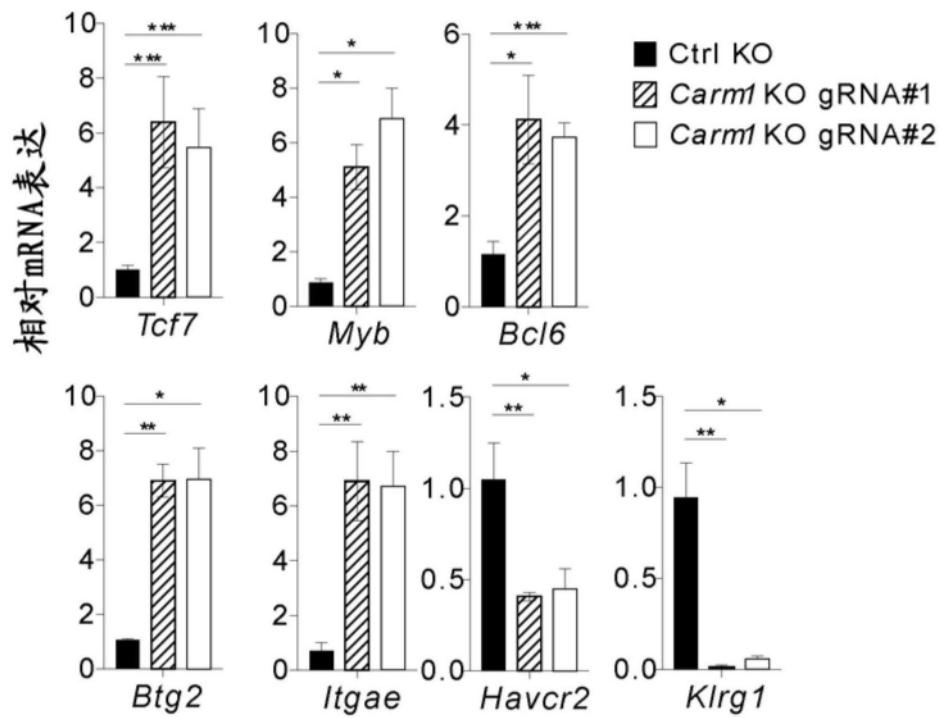


图2C

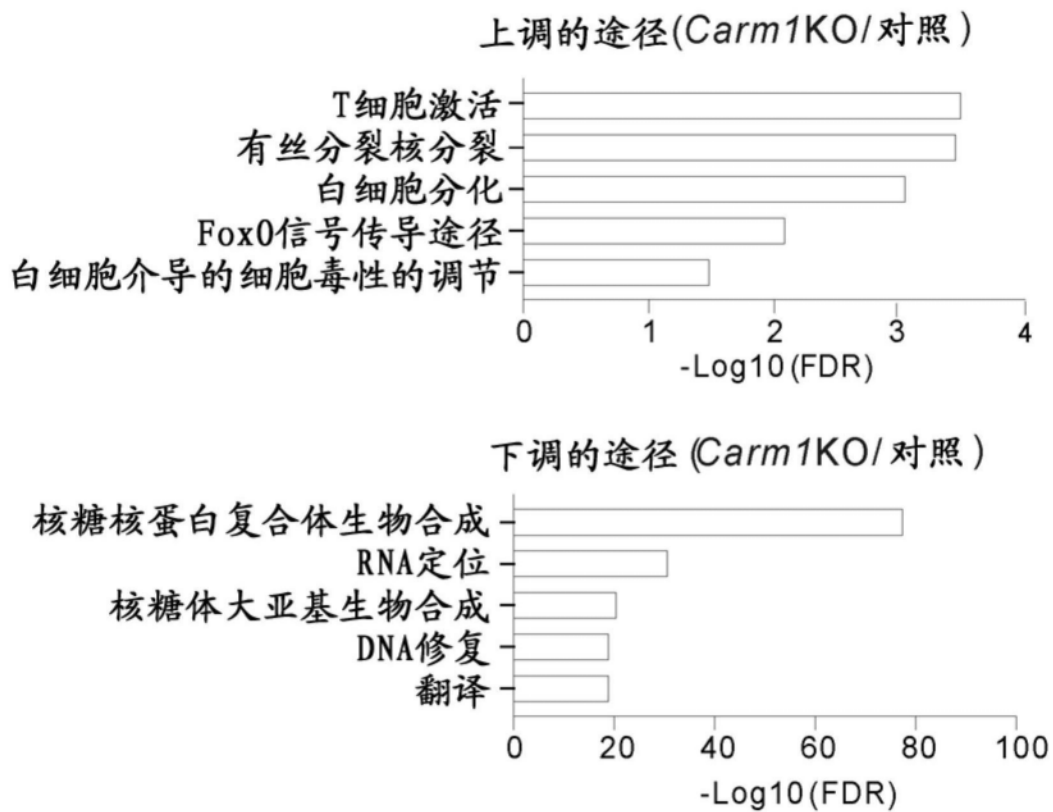


图2D

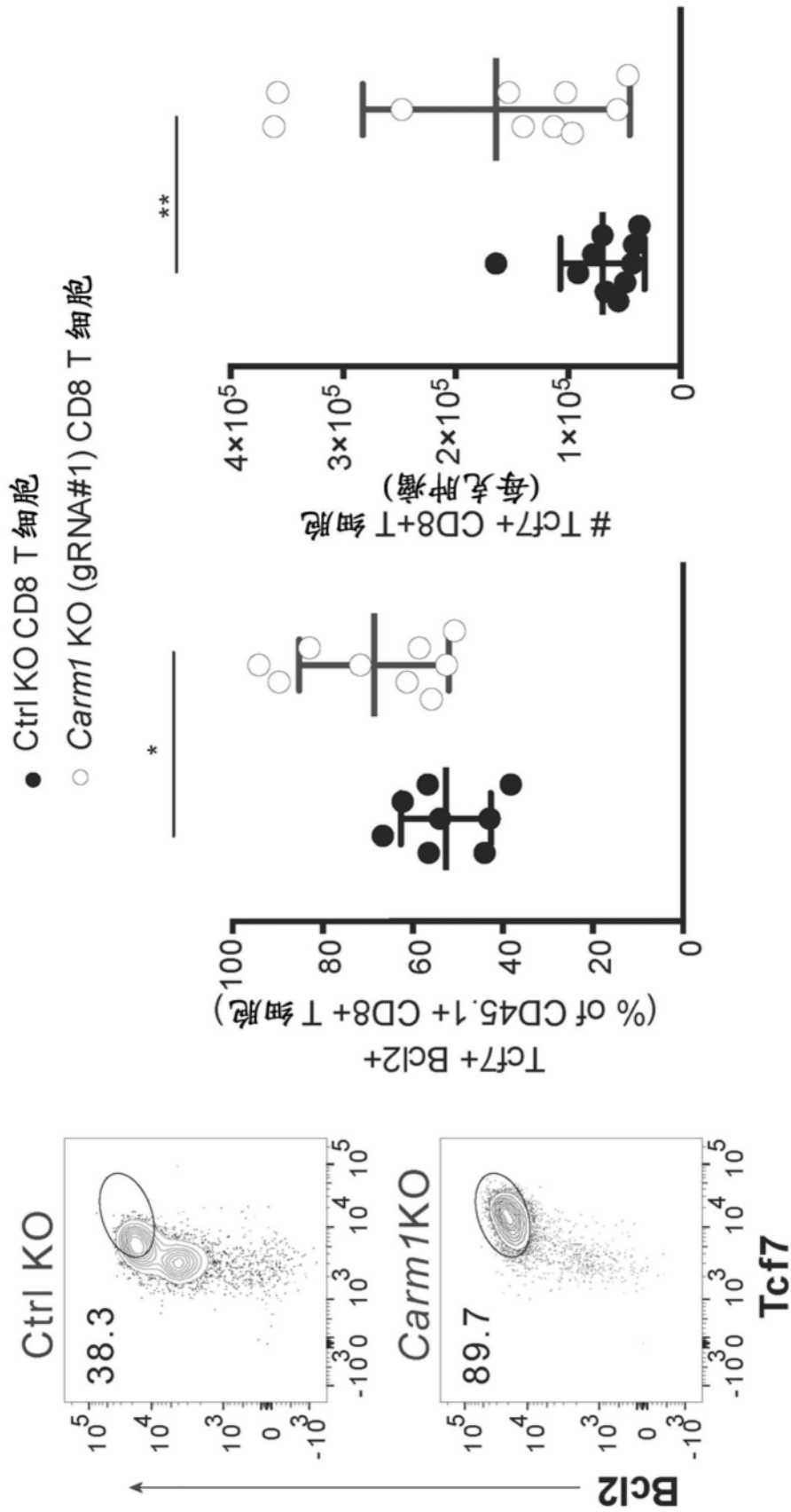


图2E

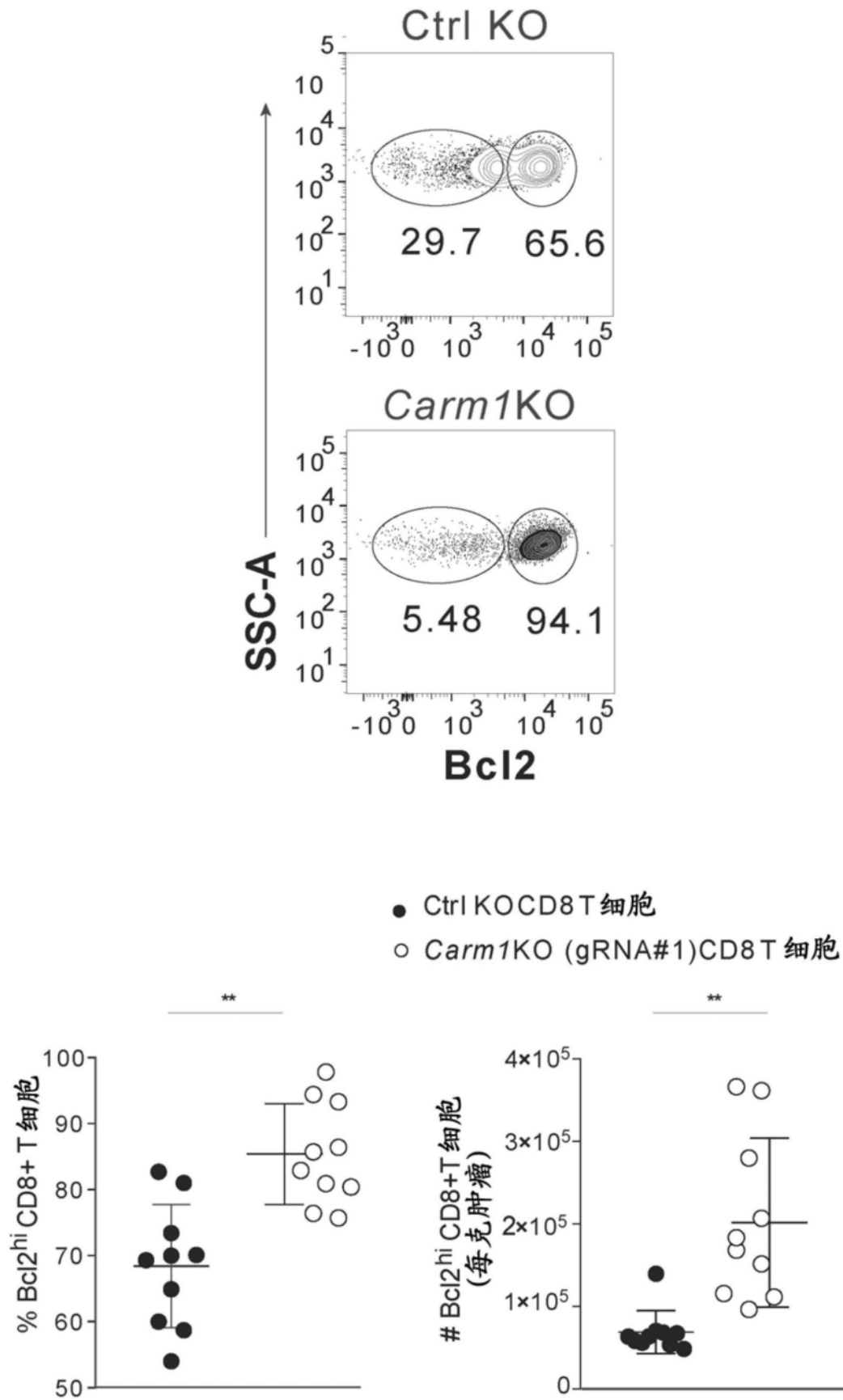


图2F

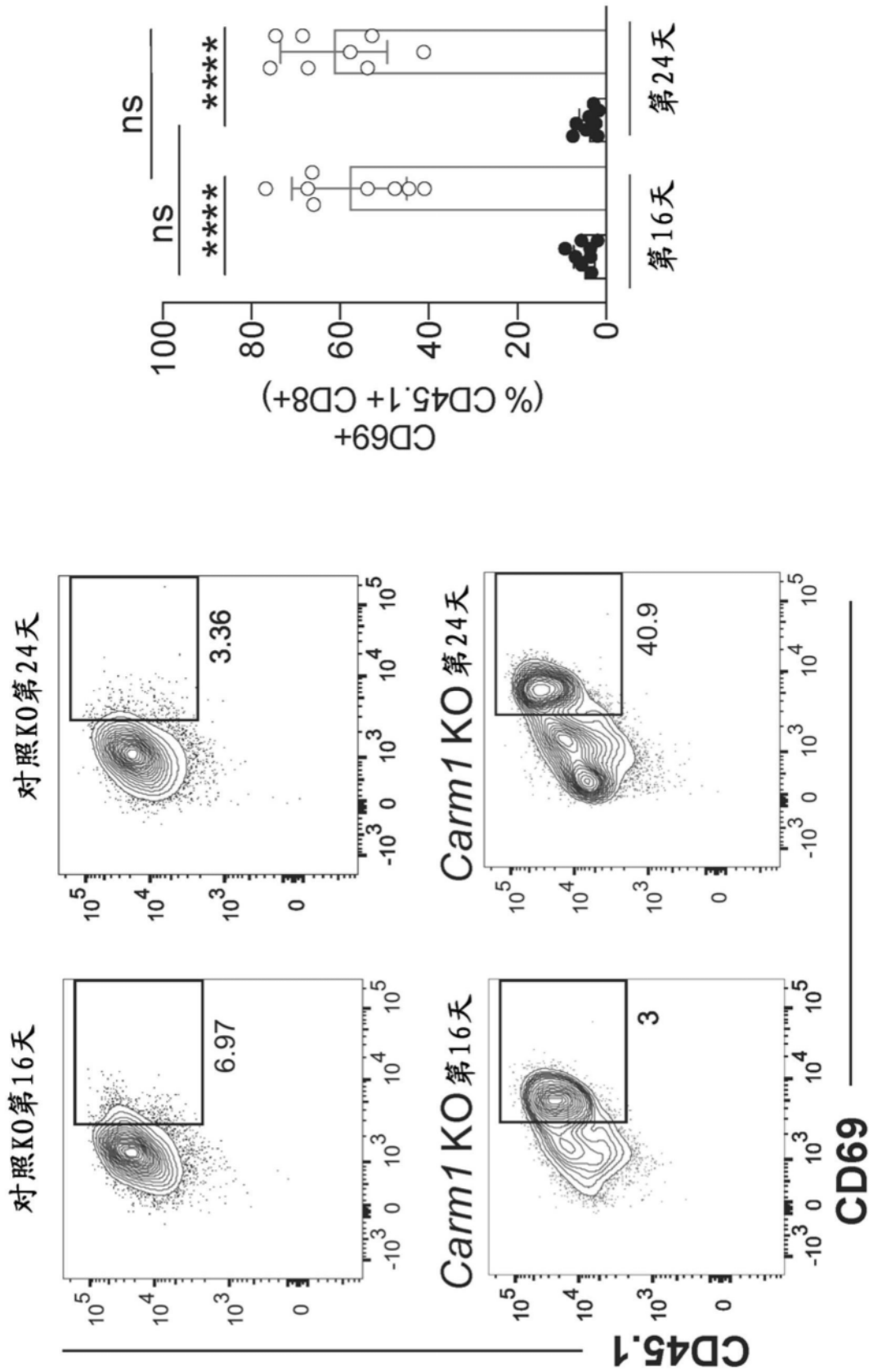


图2G

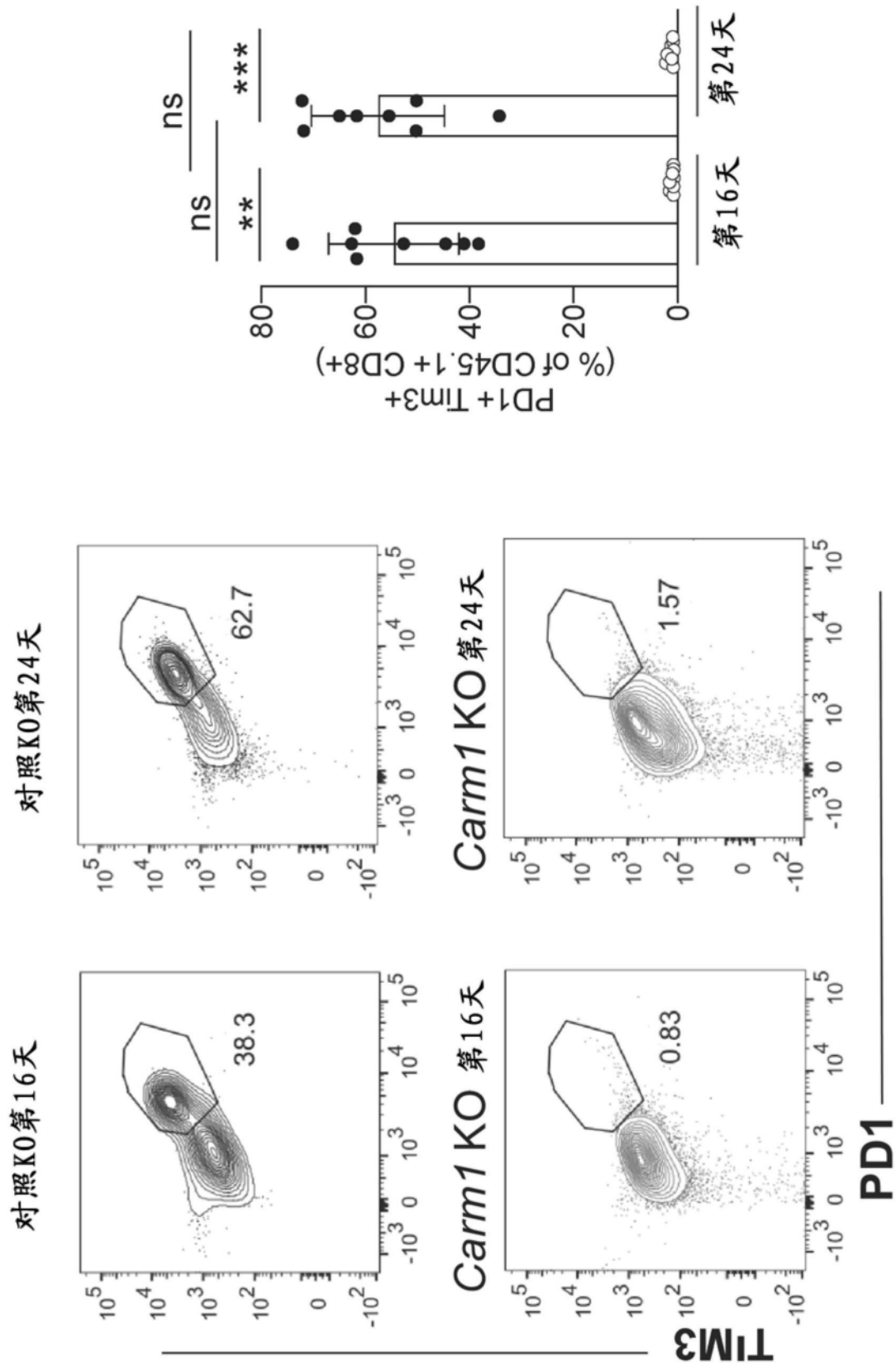


图2H

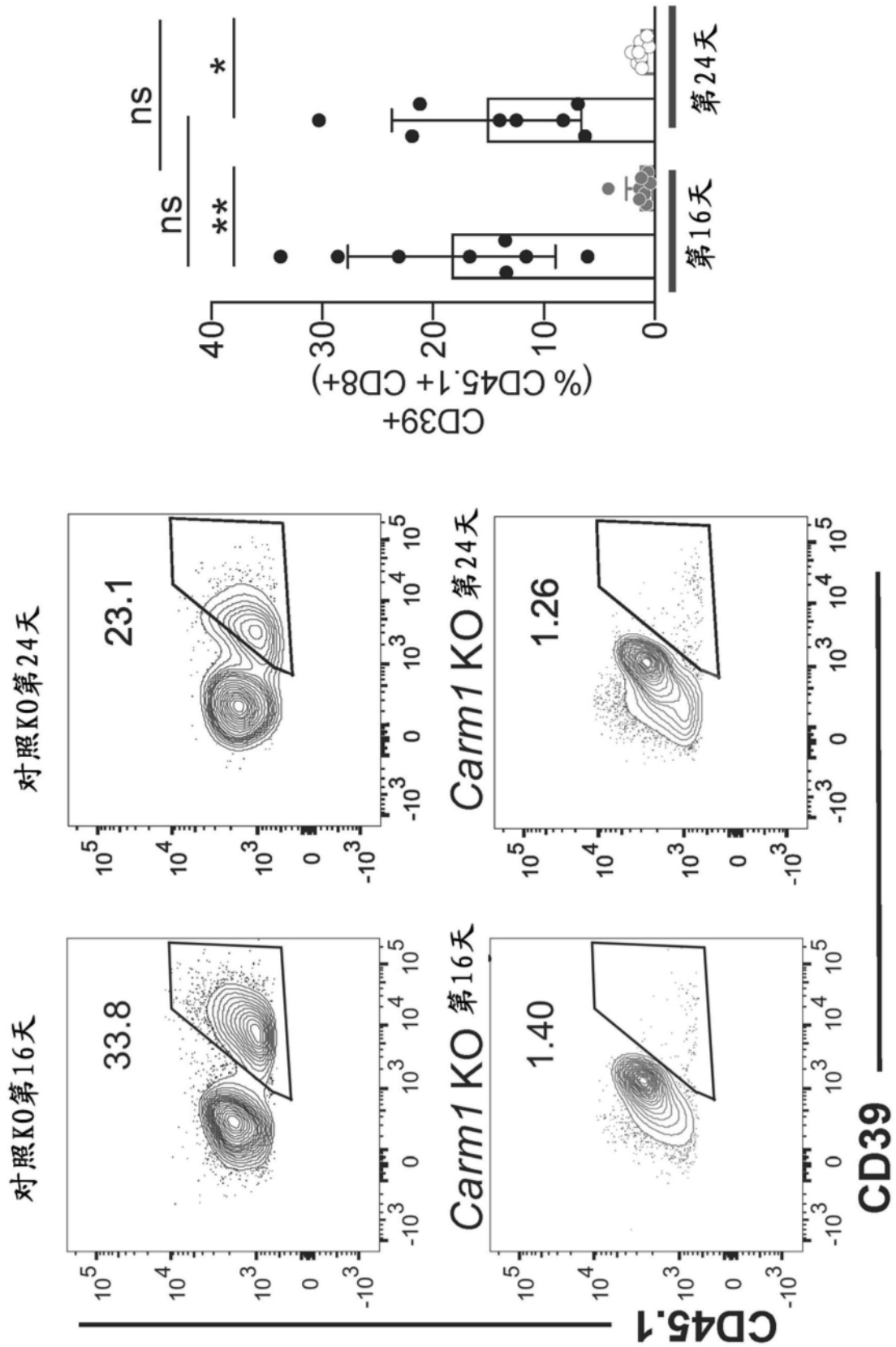


图2I

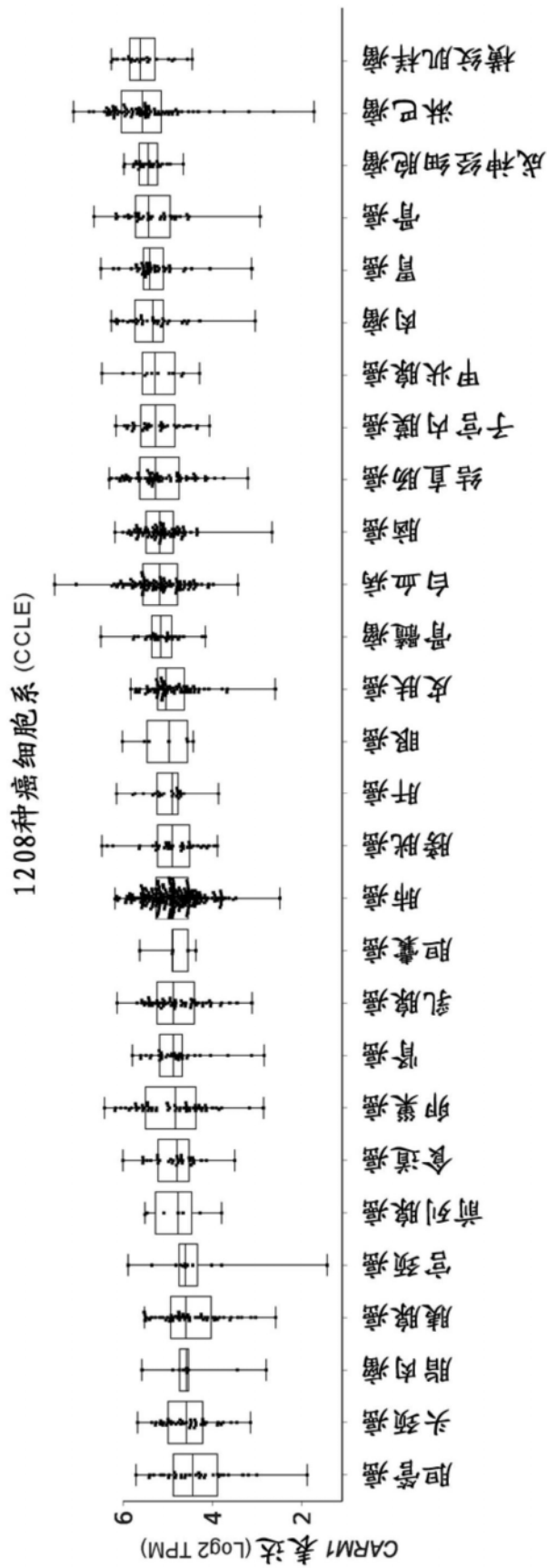


图3A

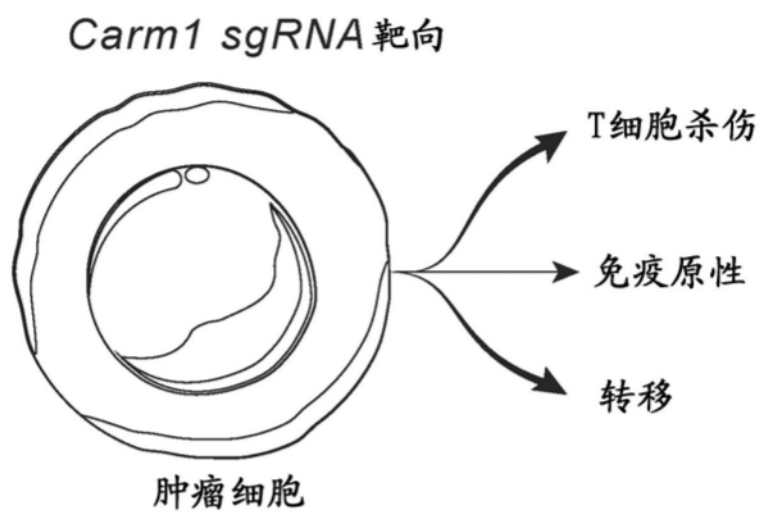


图3B

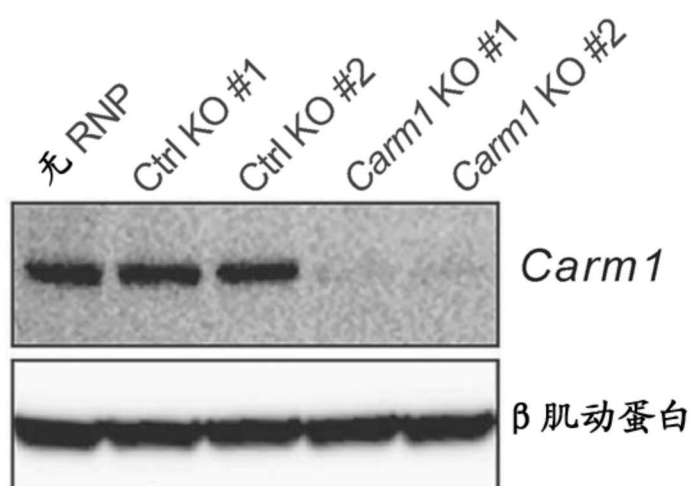


图3C

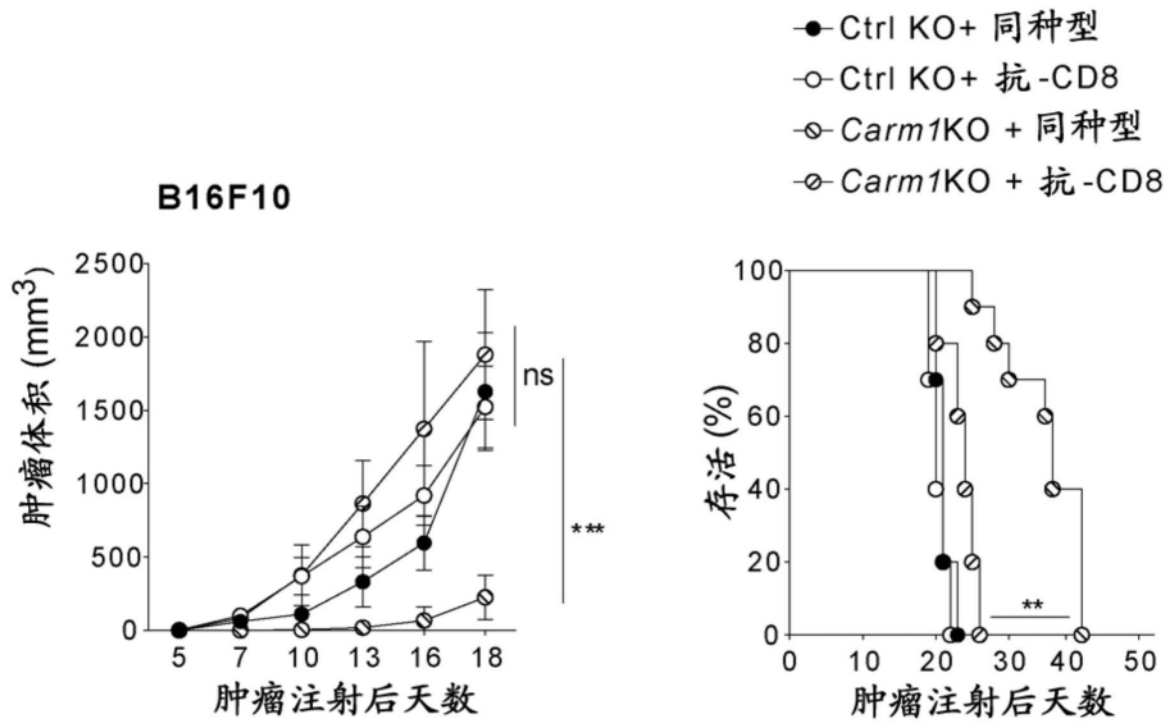


图3D

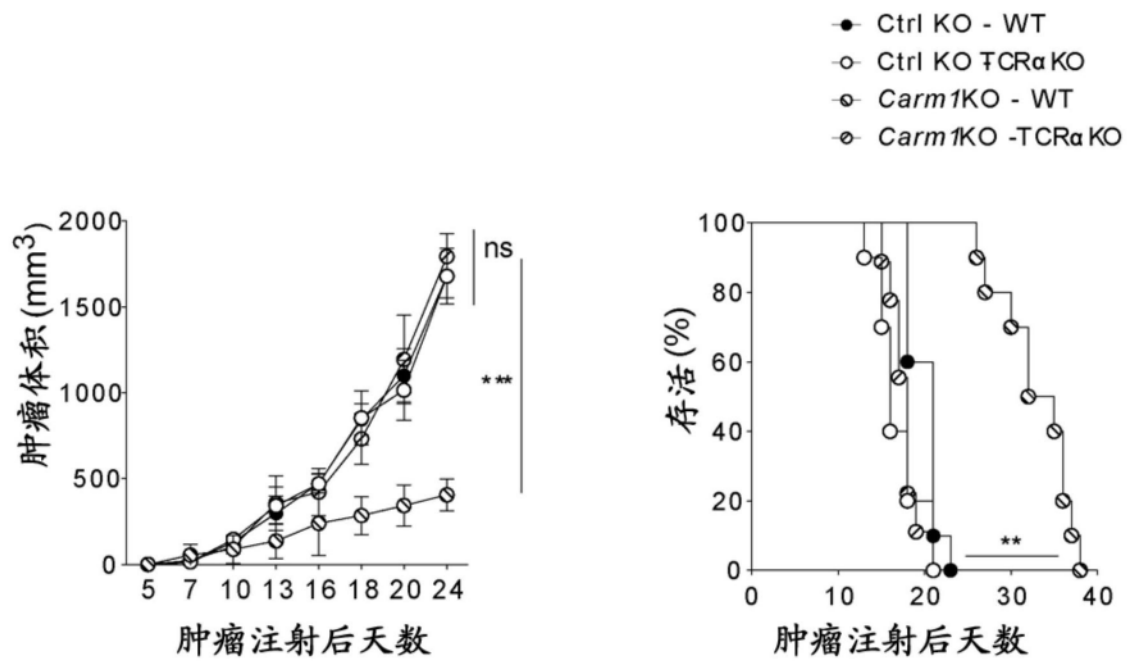


图3E

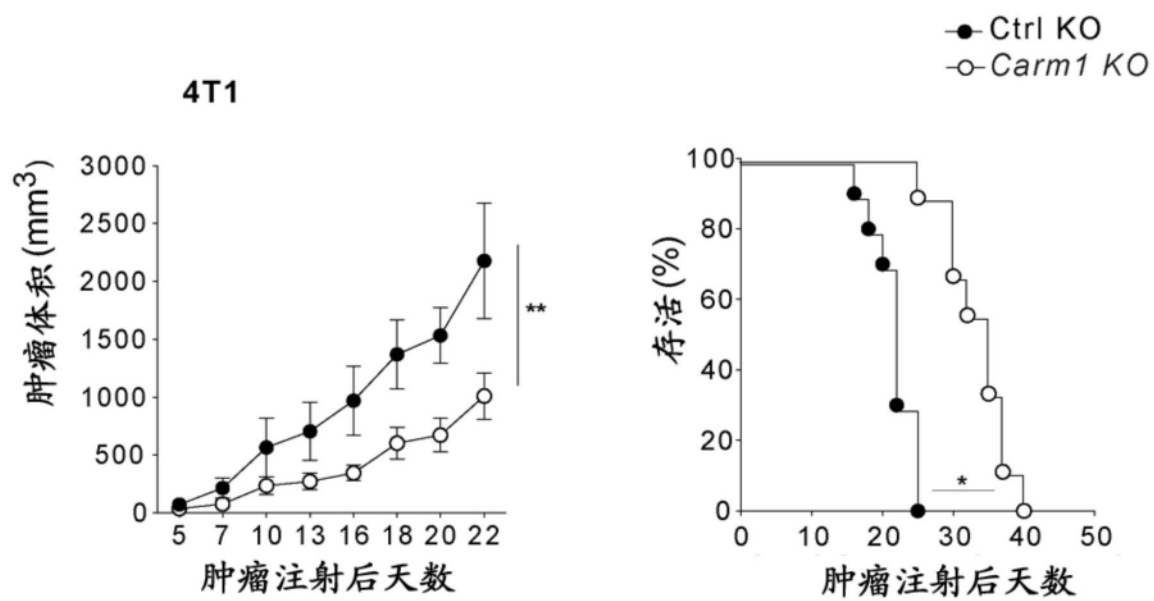


图3F

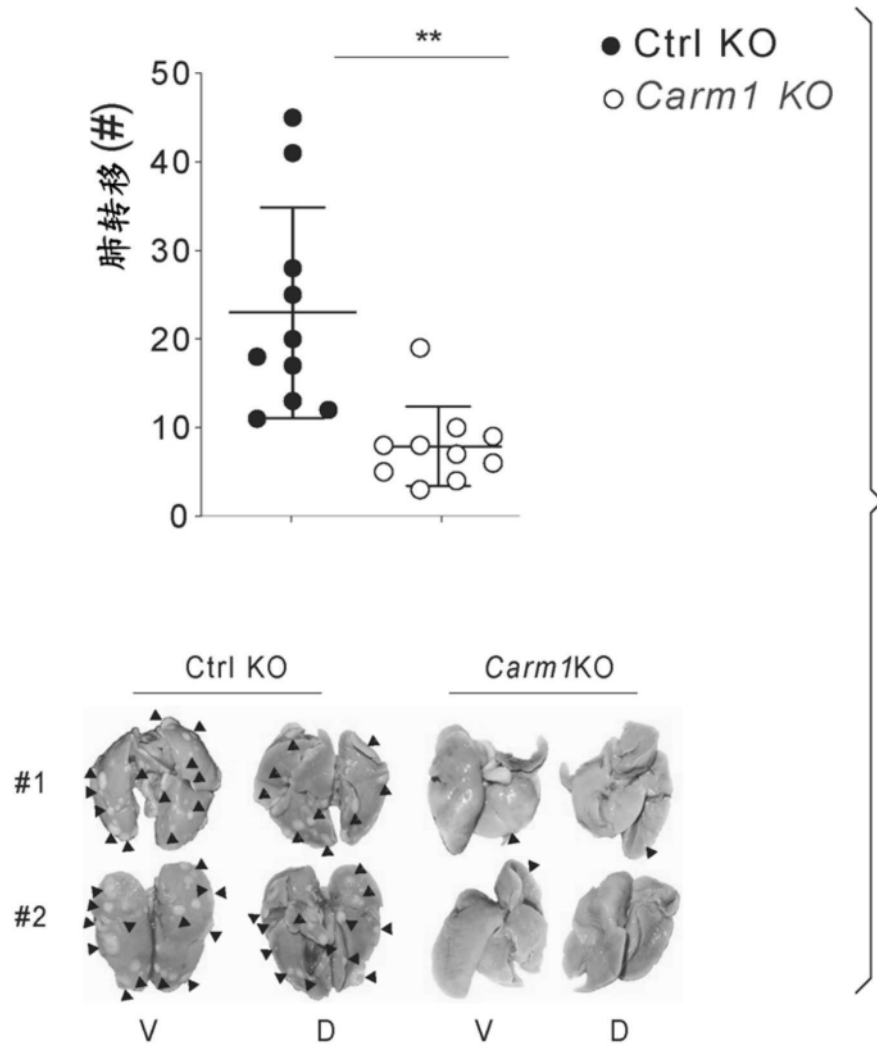


图3G

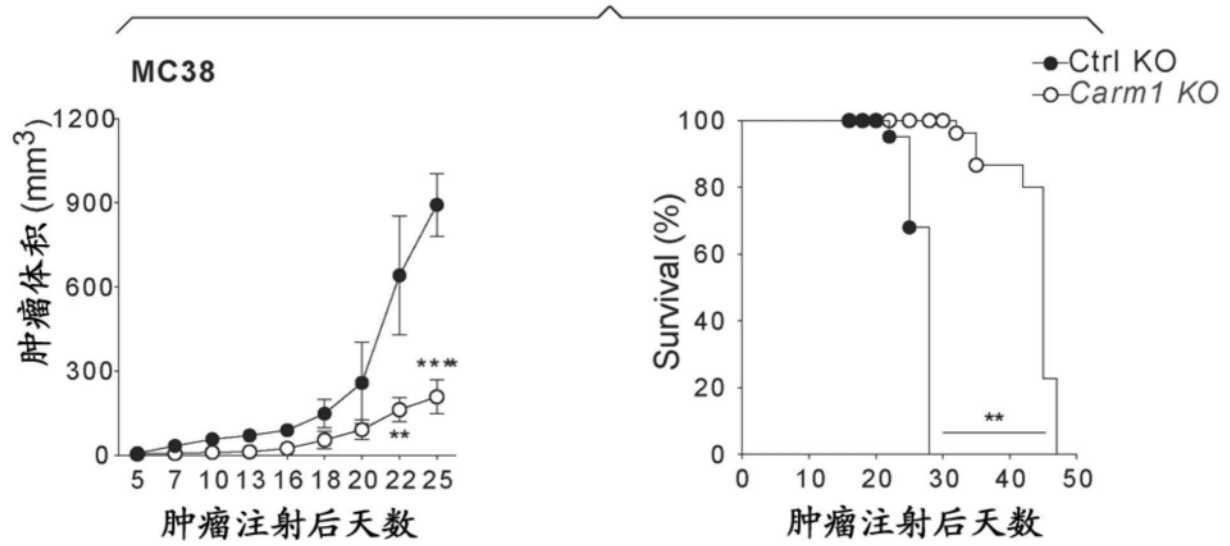


图3H

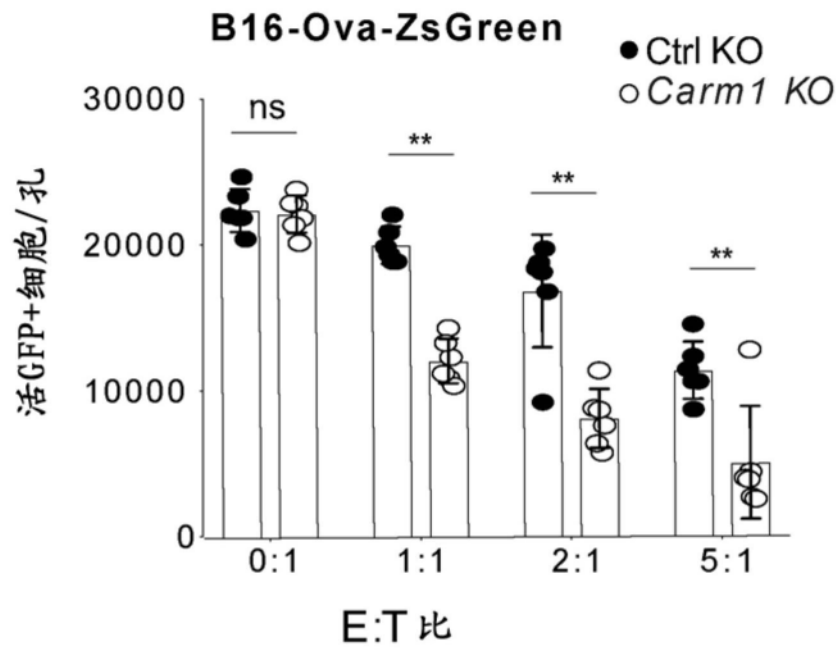


图3I

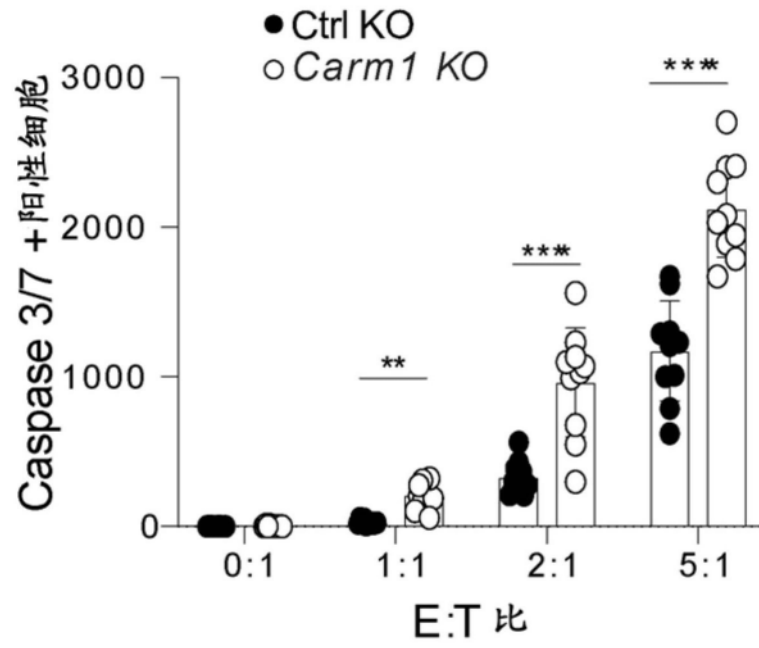


图3J

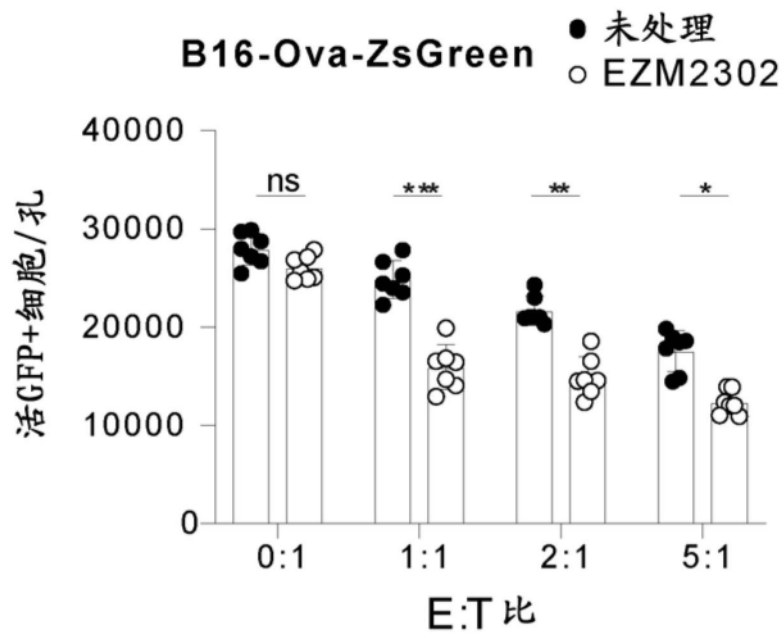


图3K

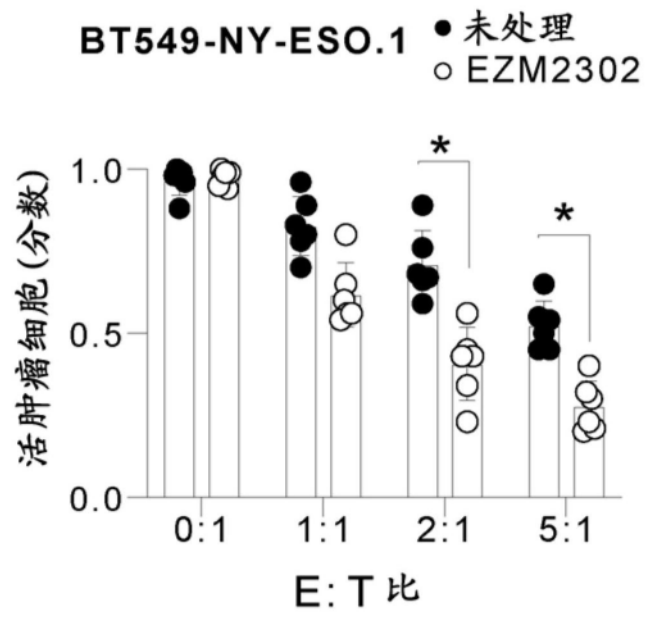


图3L

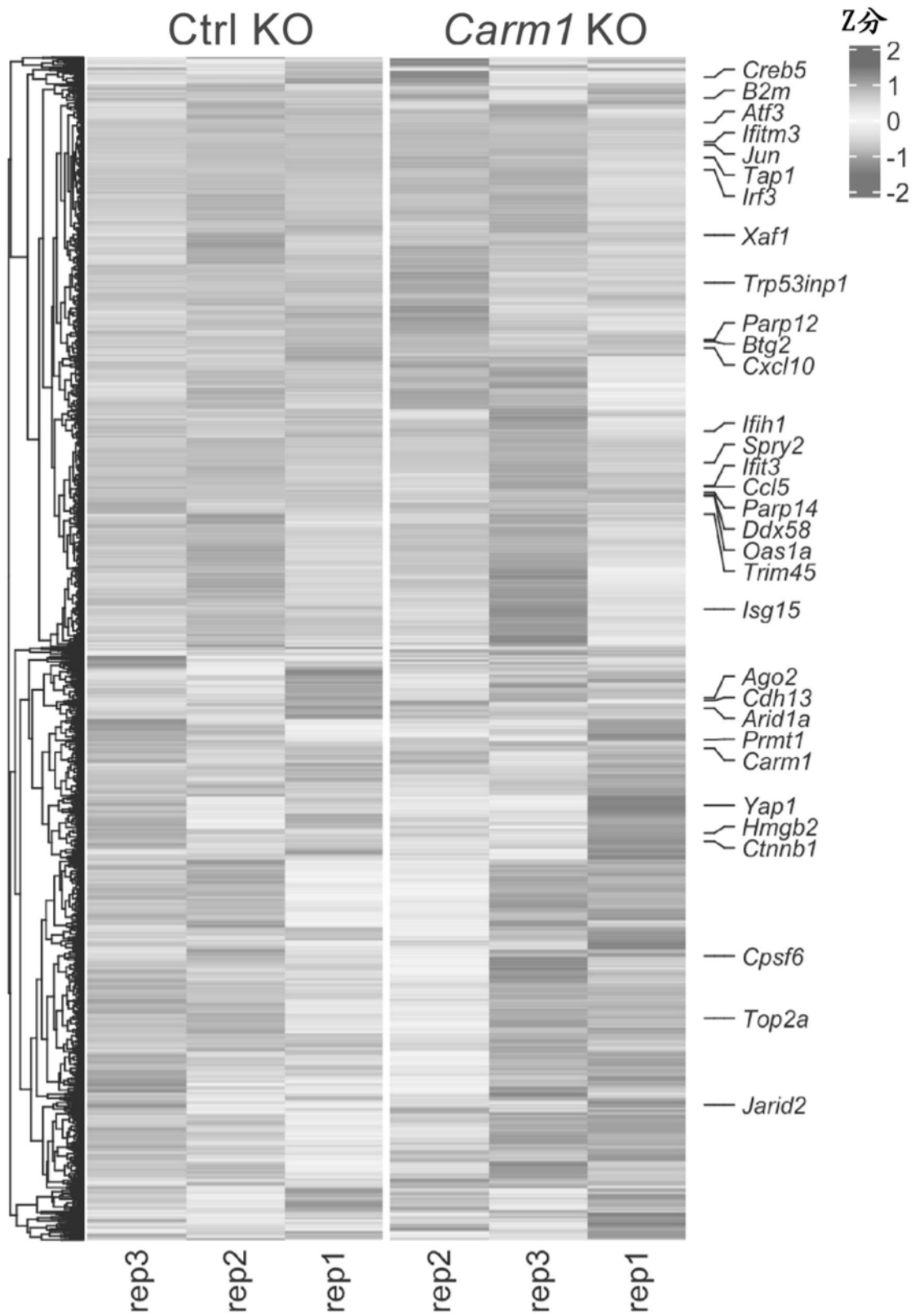


图4A

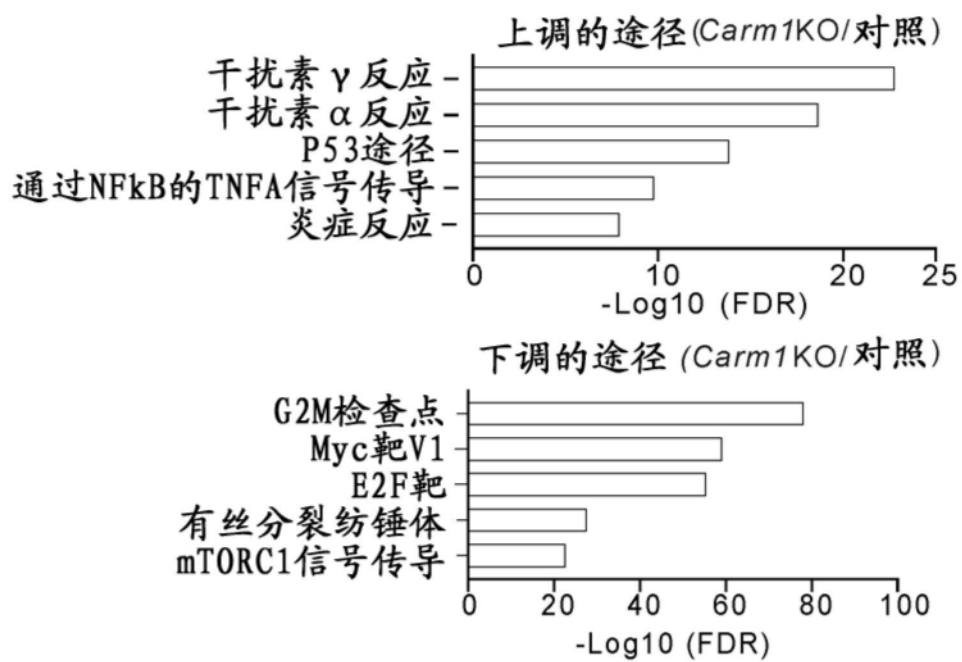


图4B

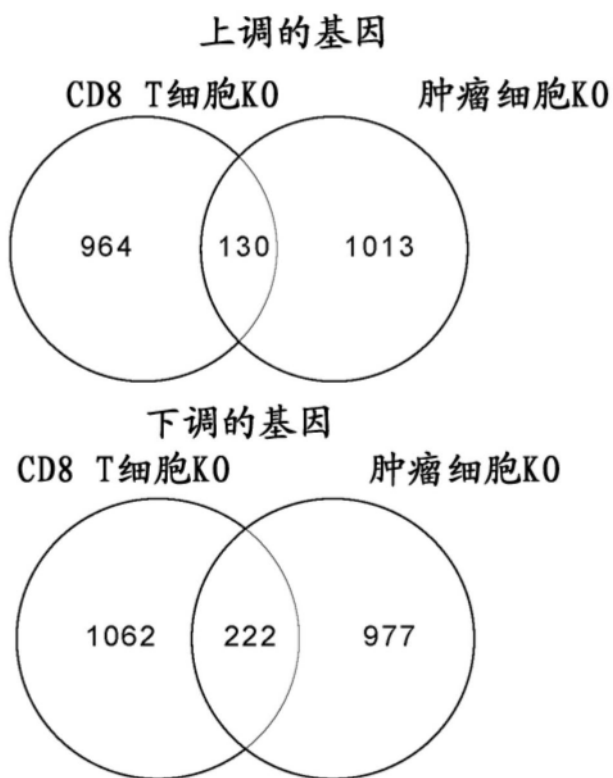


图4C

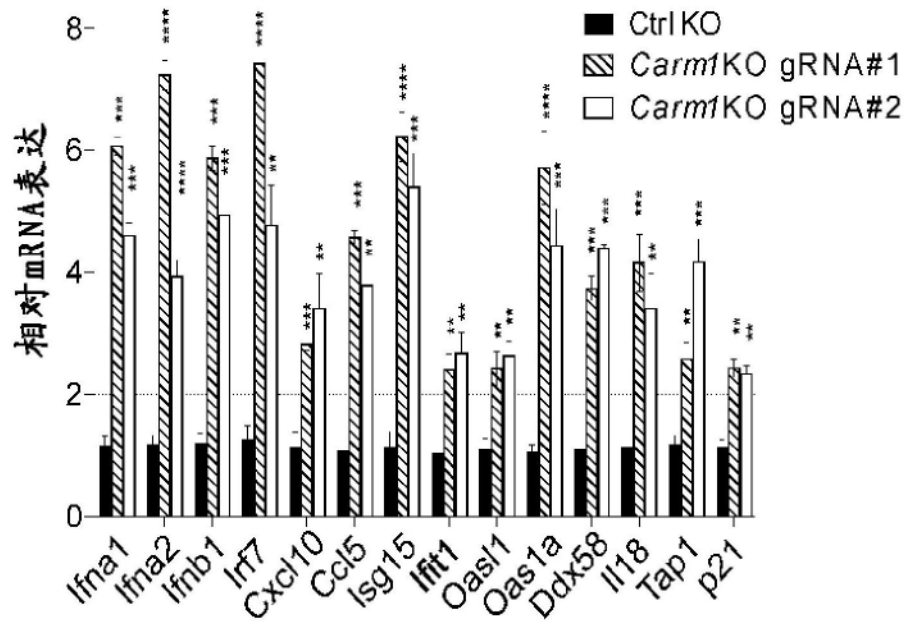


图4D

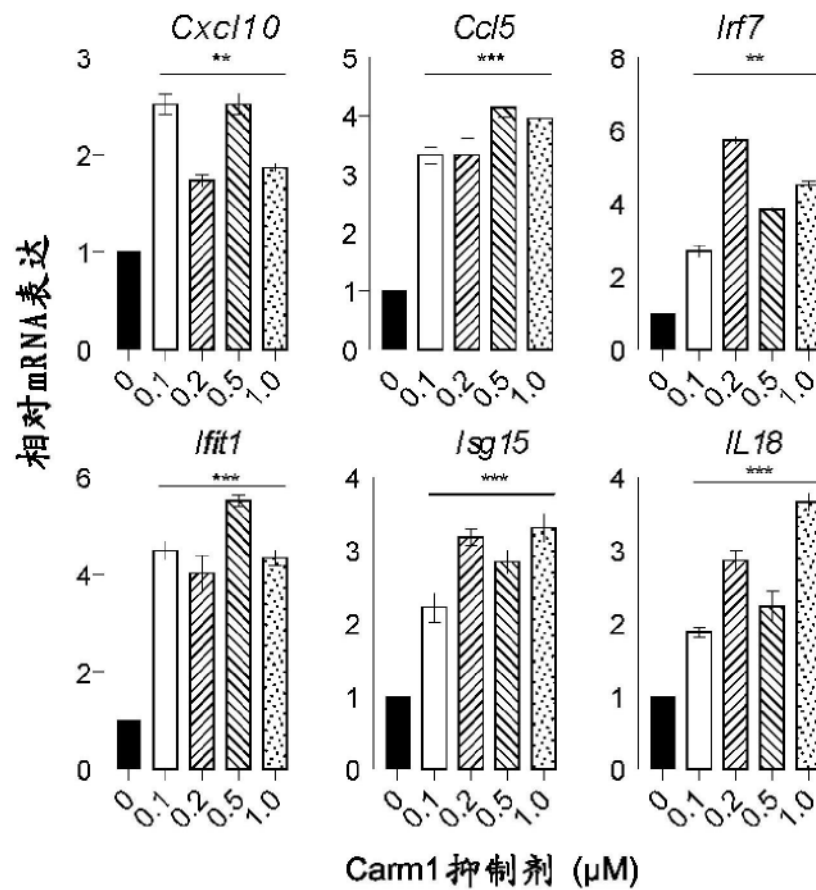


图4E

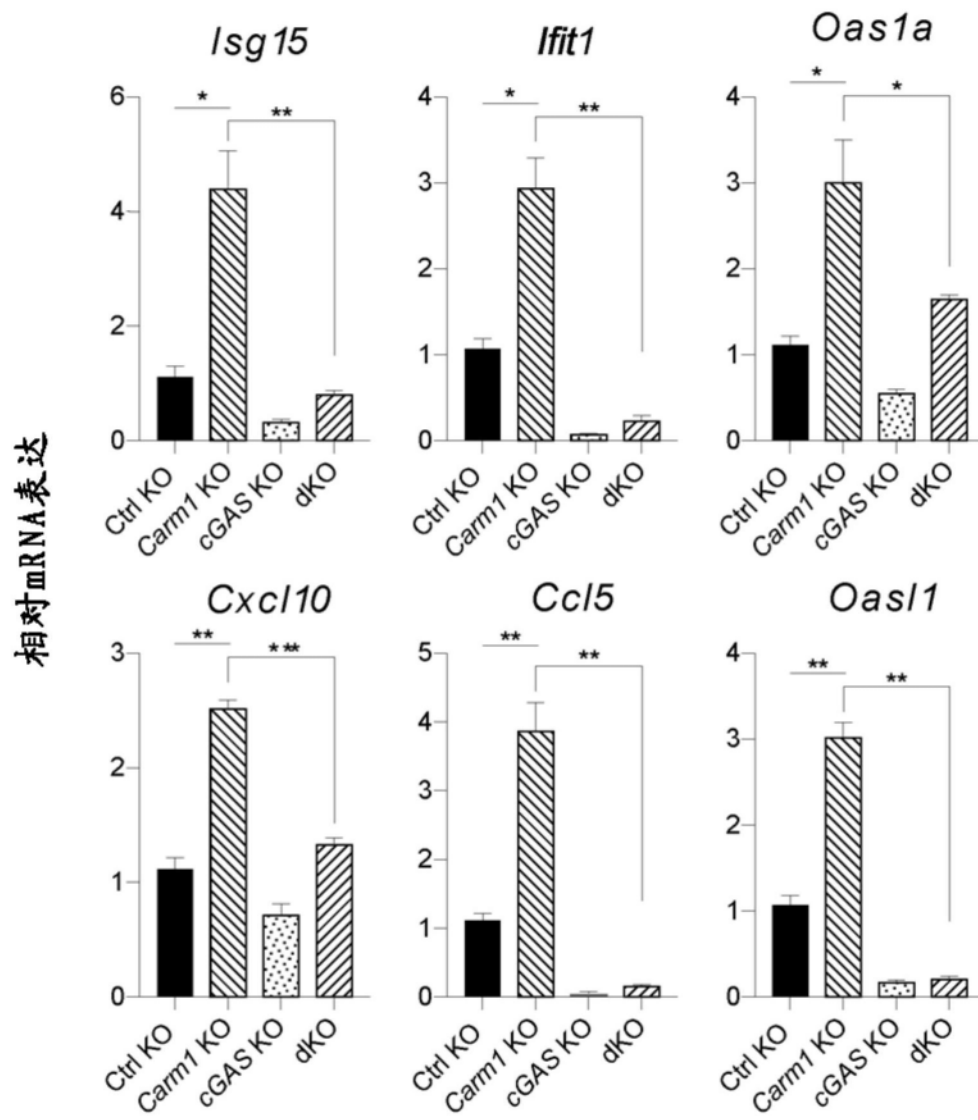


图4F

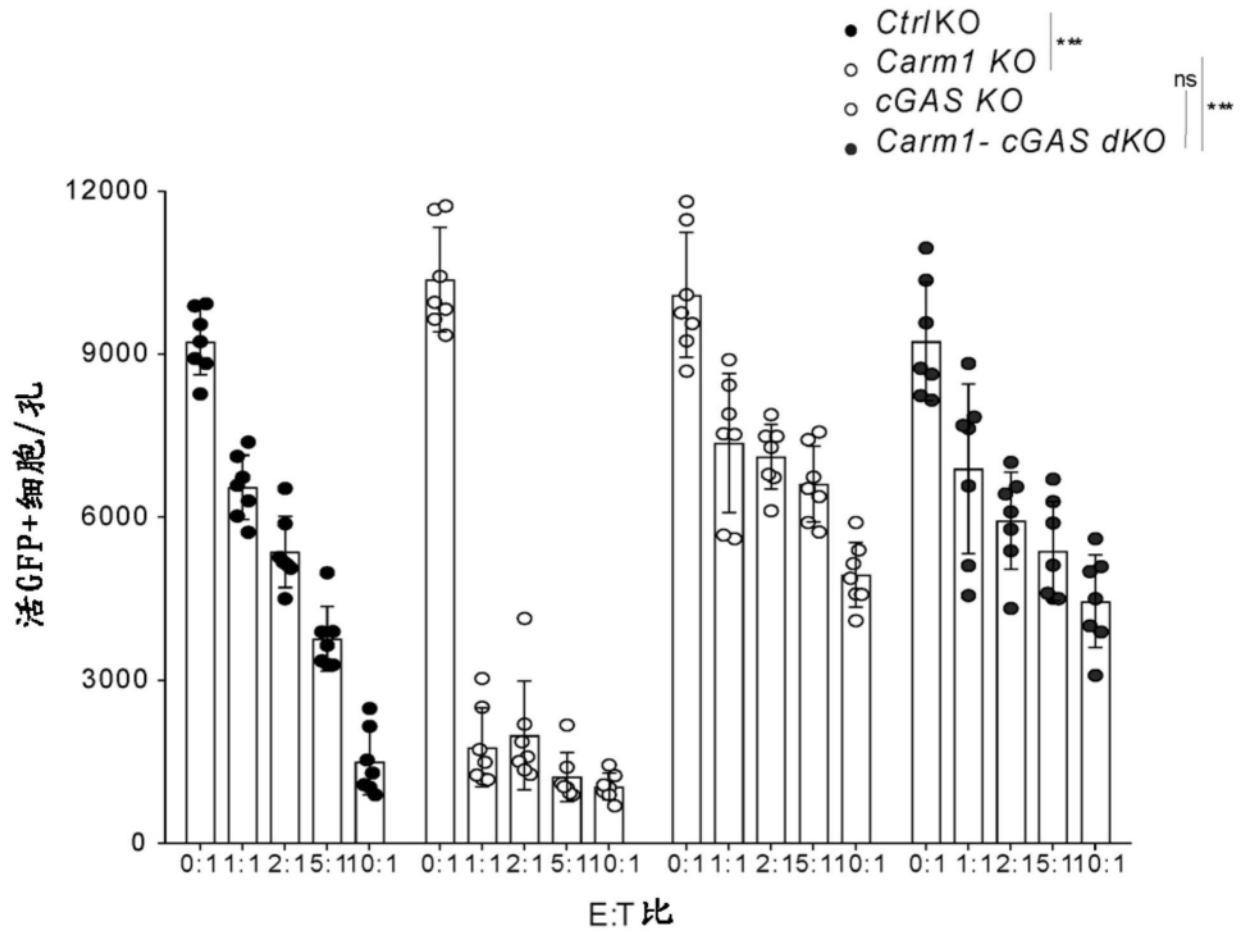


图4G

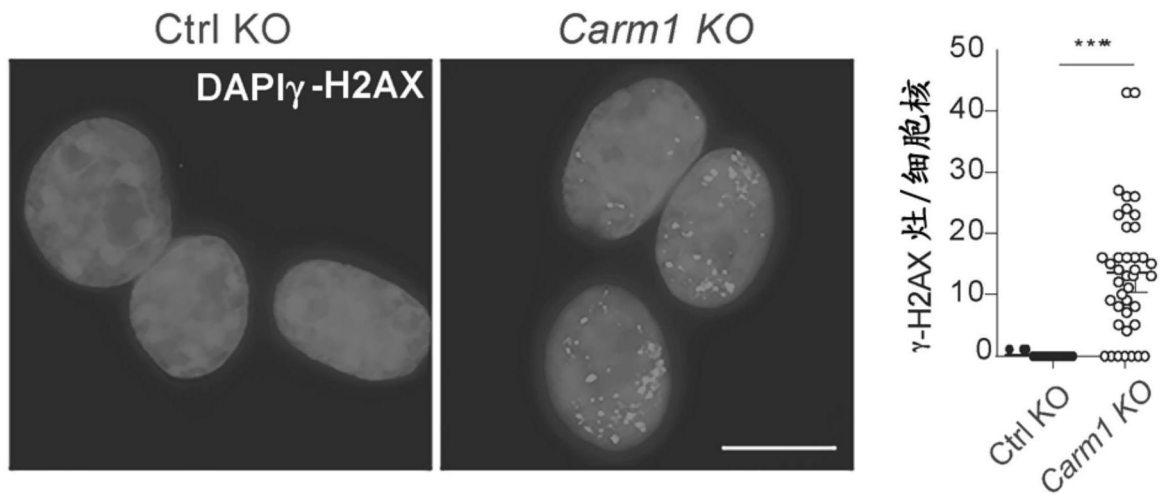


图4H

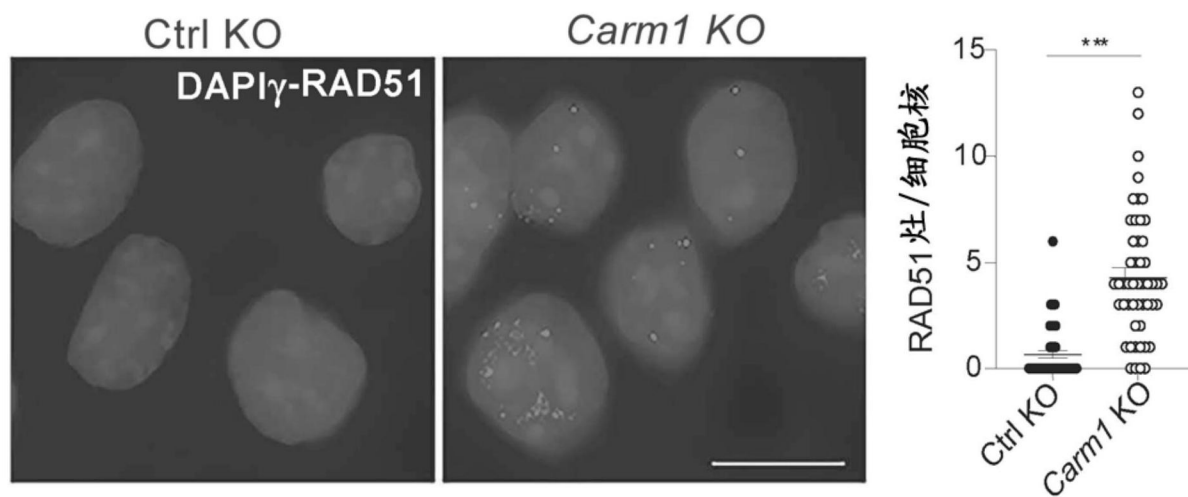


图4I

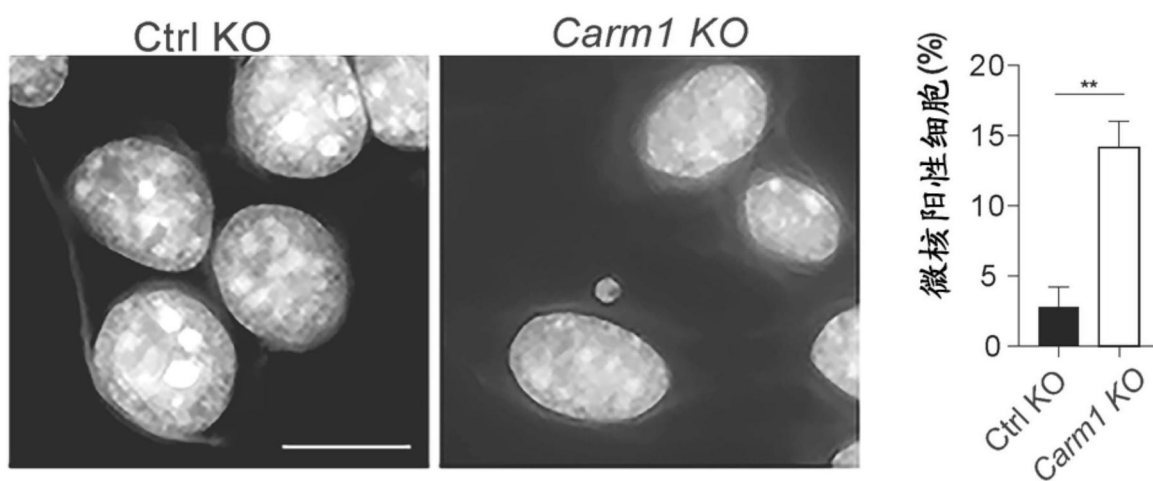


图4J

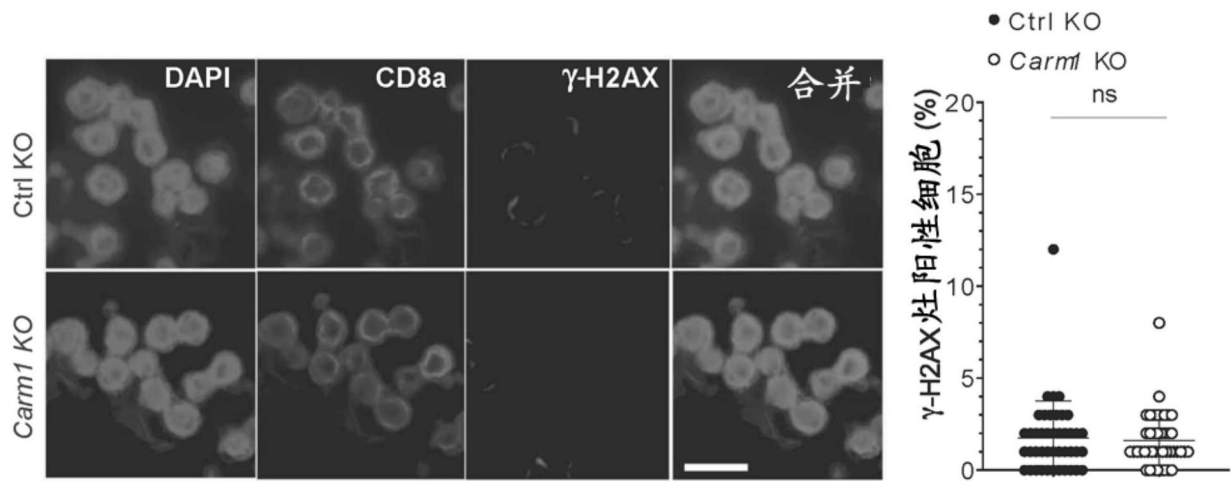


图4K

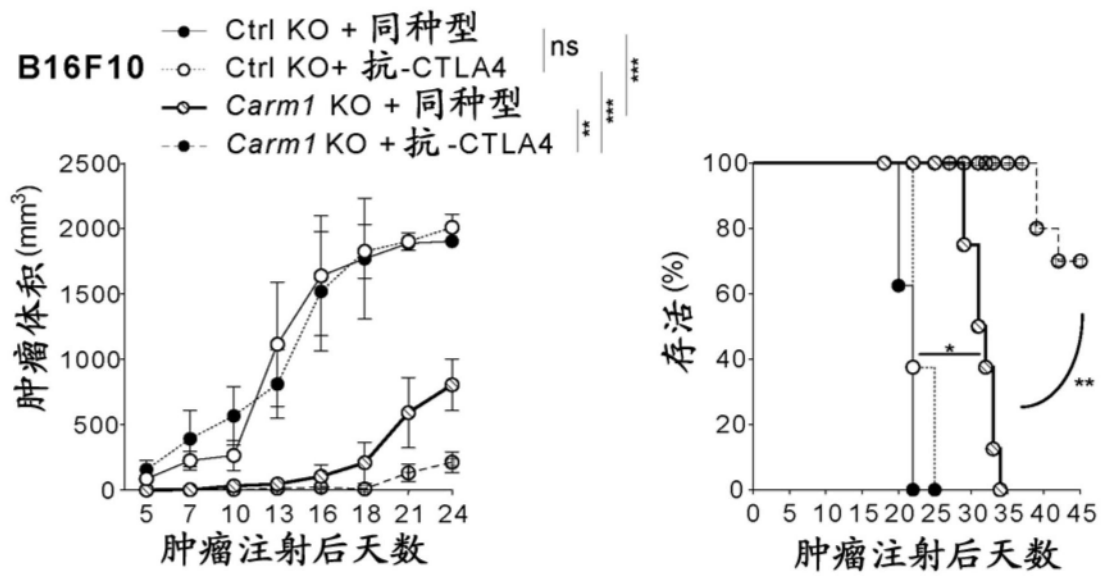


图5A

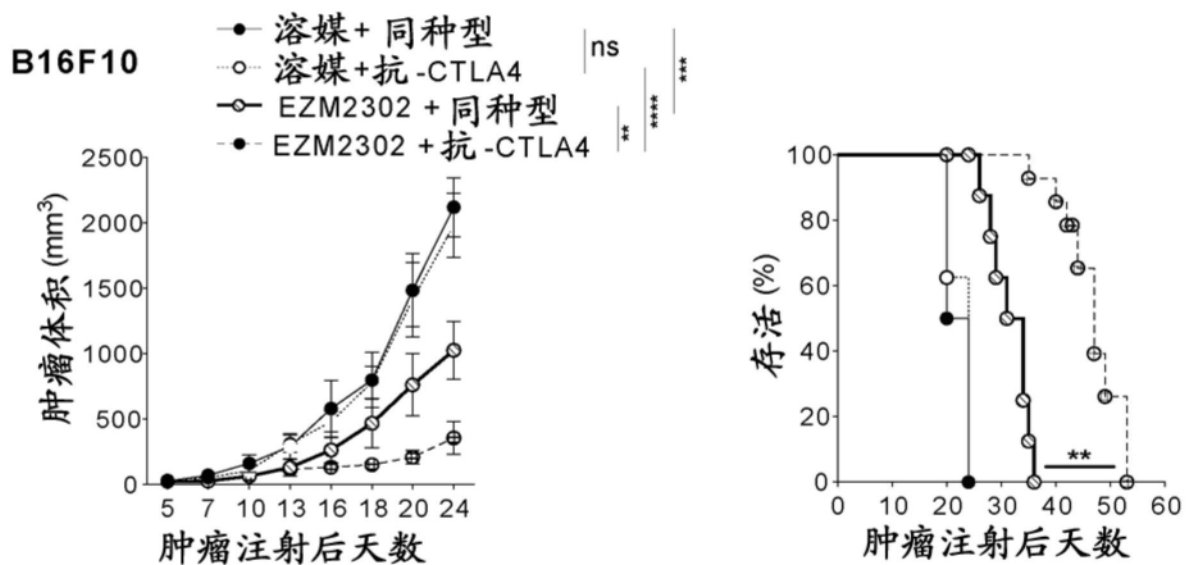


图5B

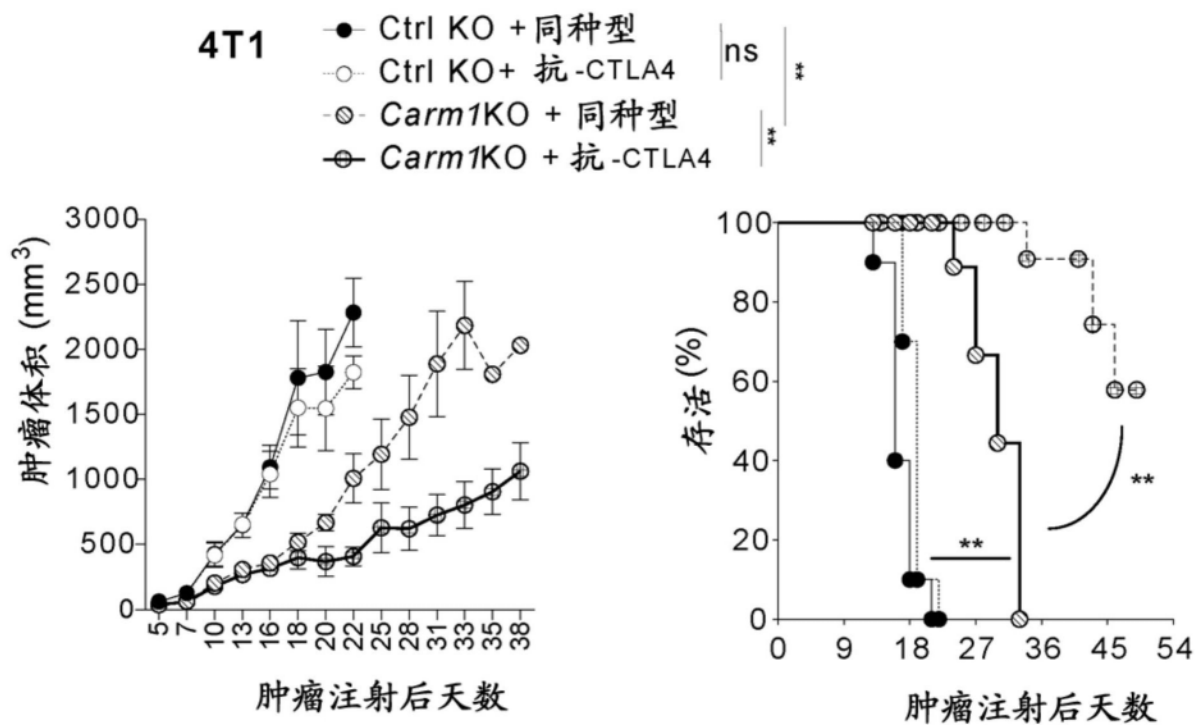


图5C

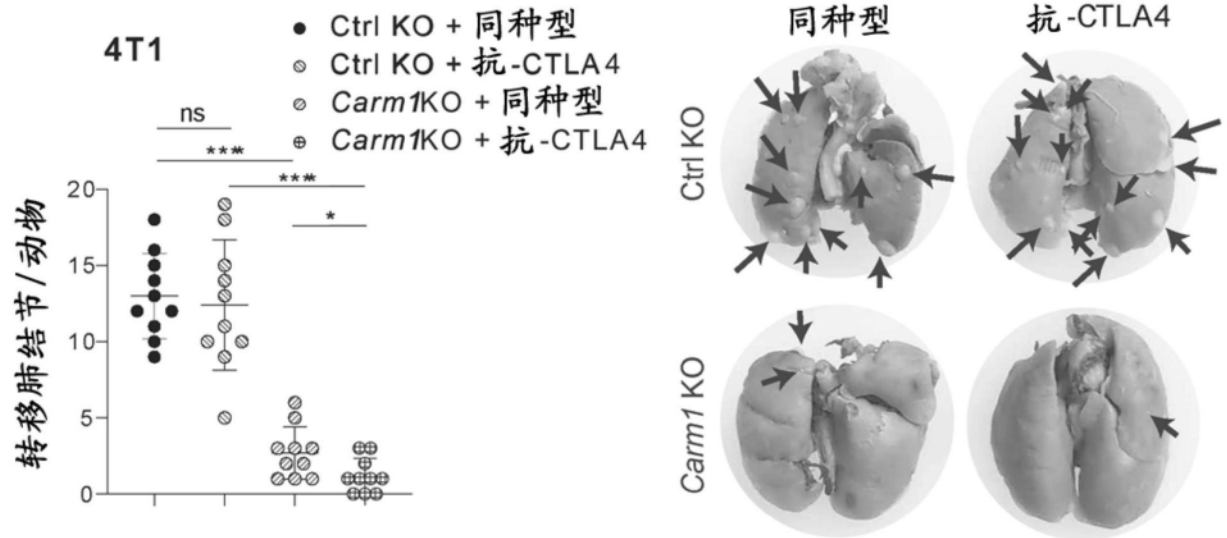


图5D

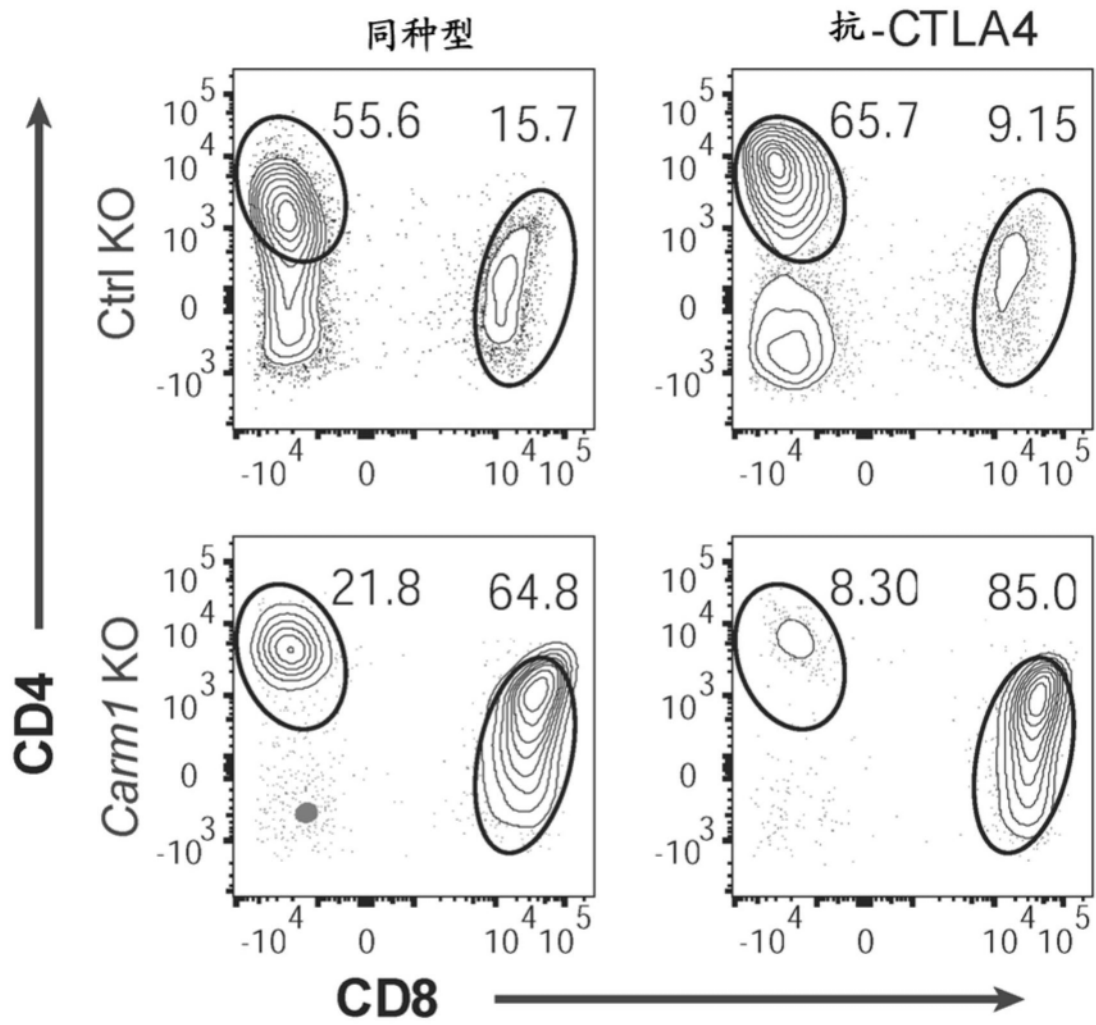


图5E

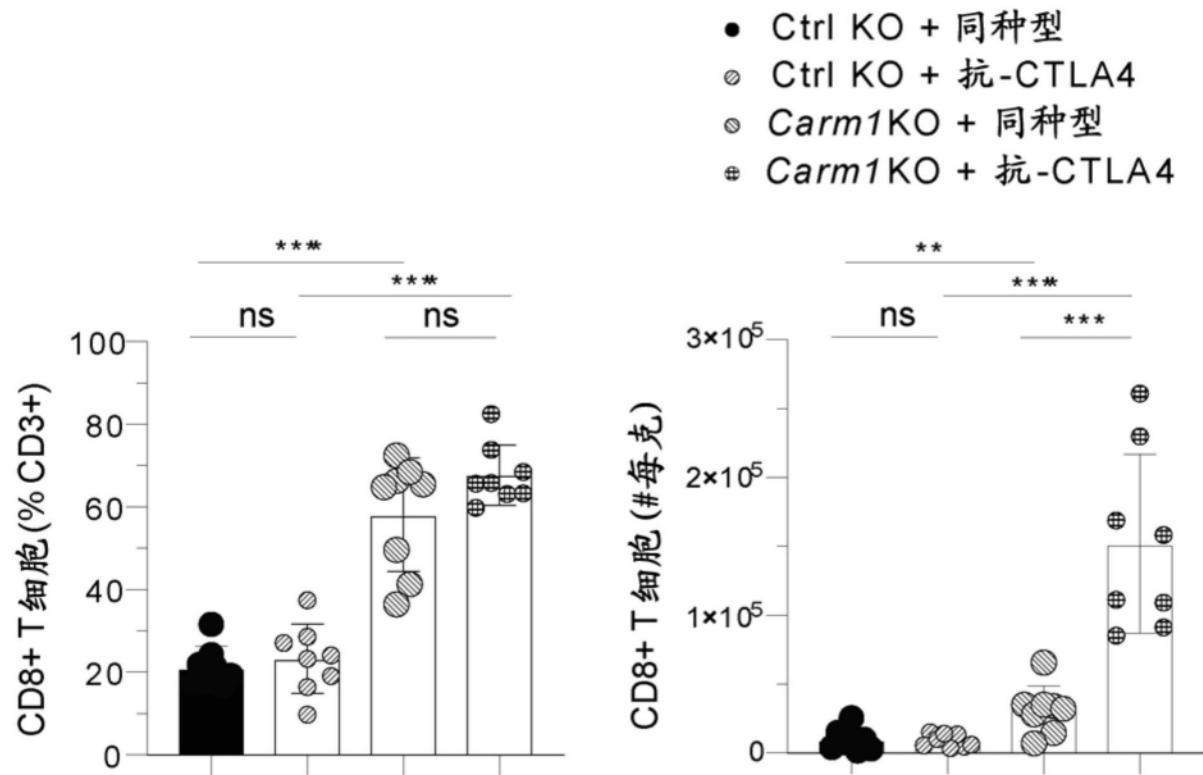


图5E续

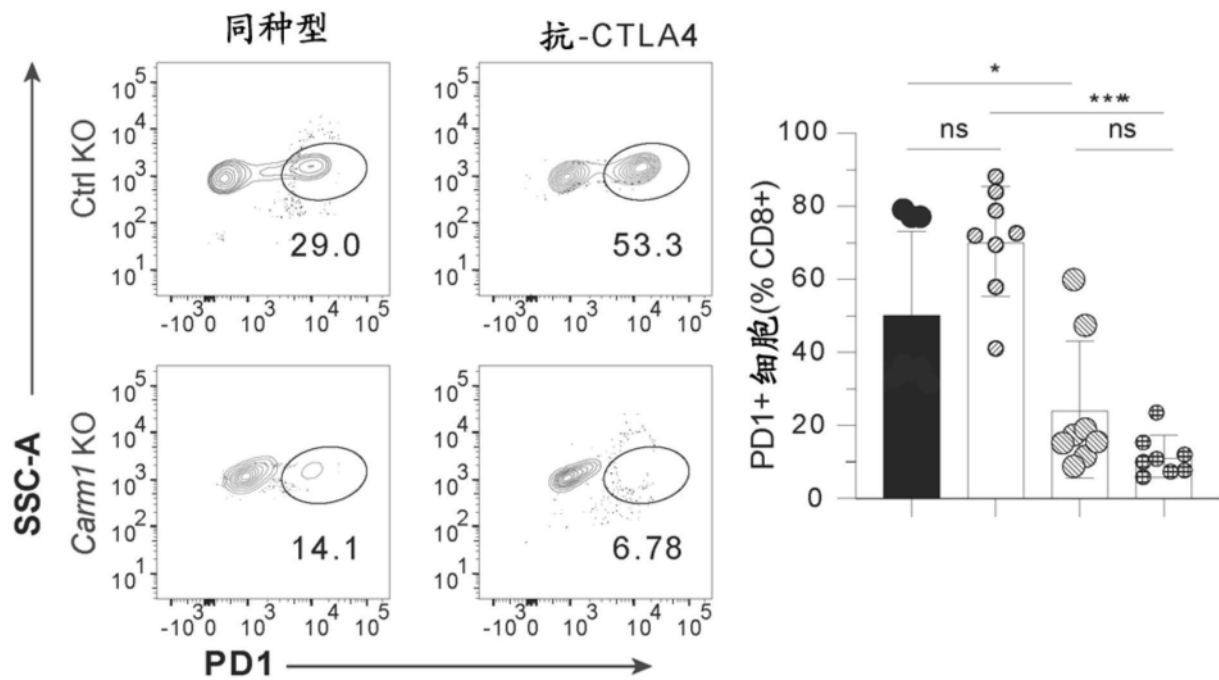


图5F

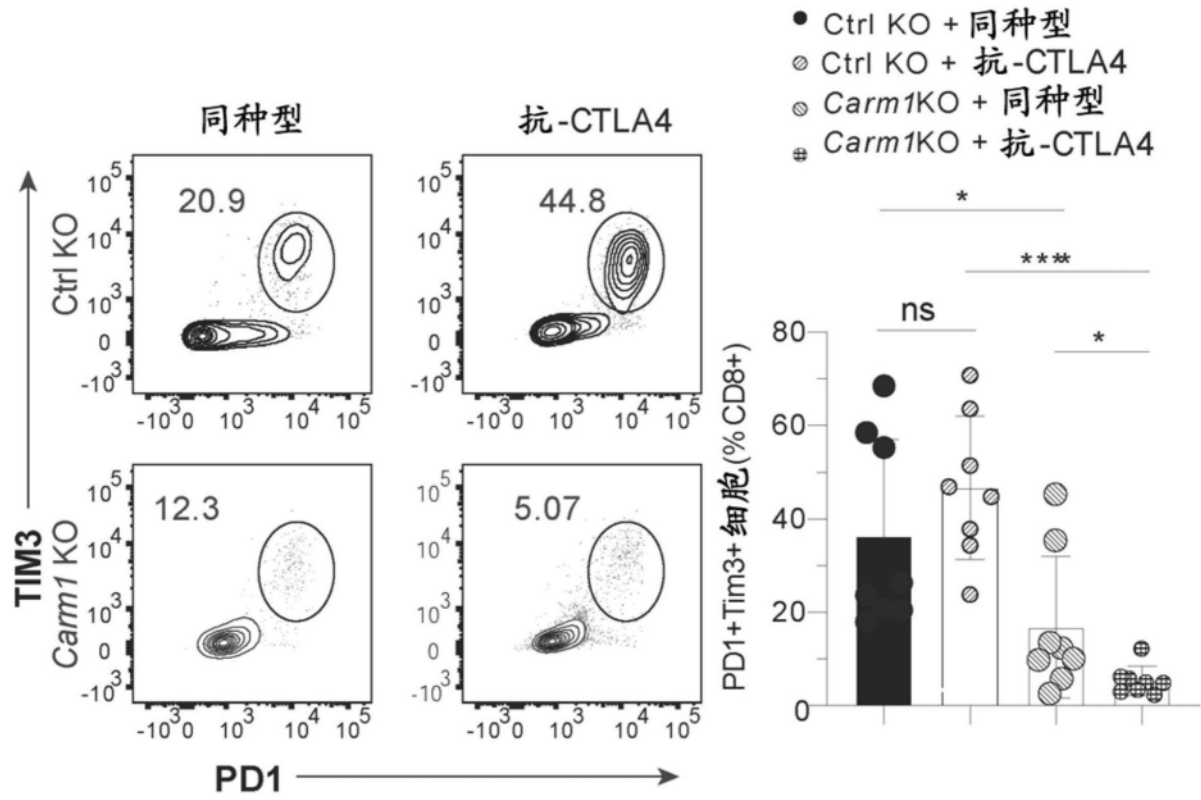


图5G

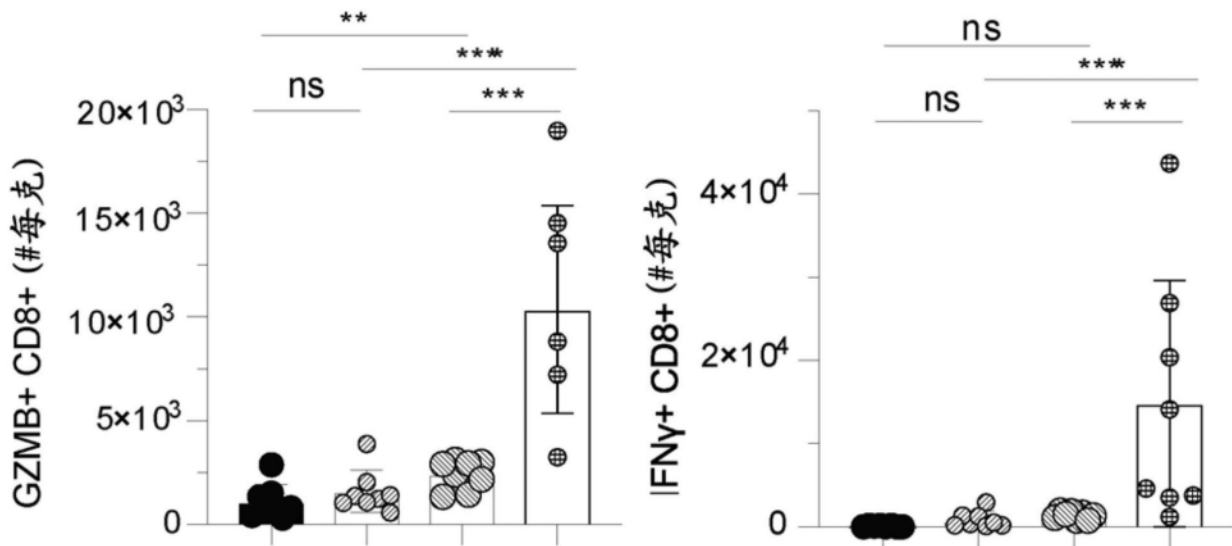


图5H

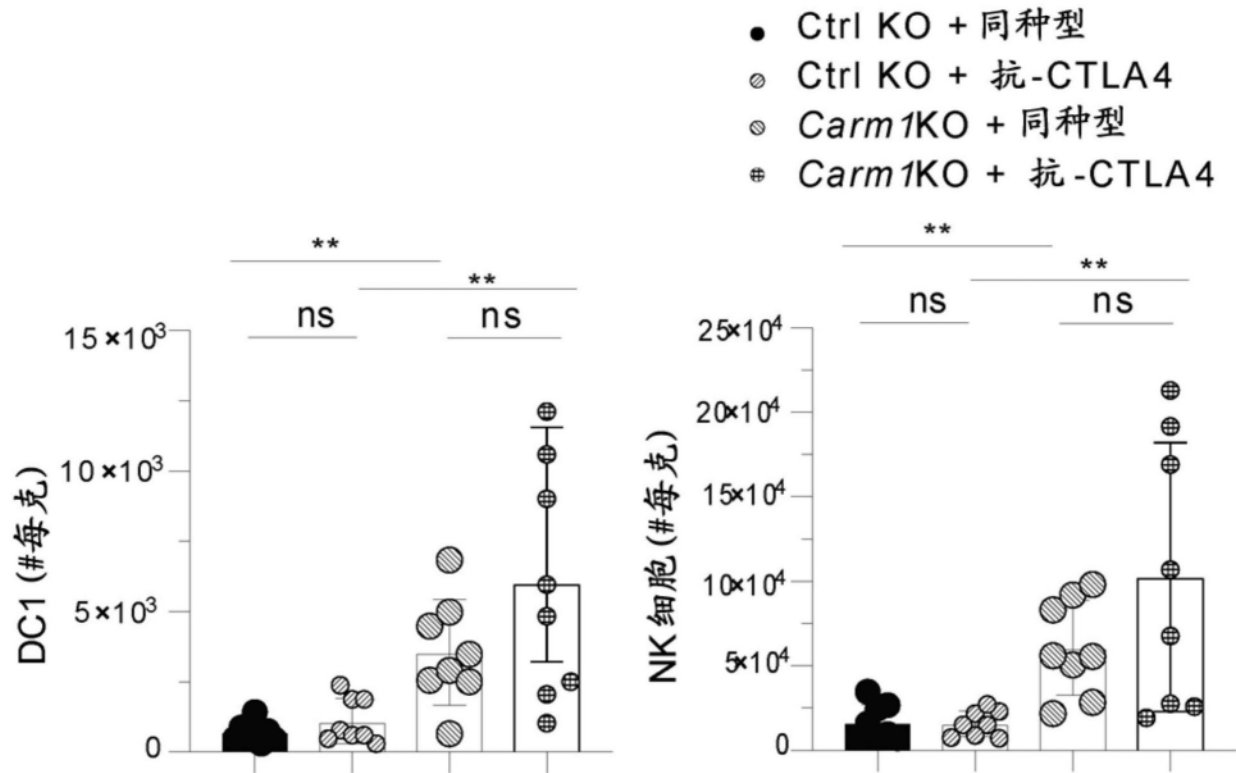


图5I

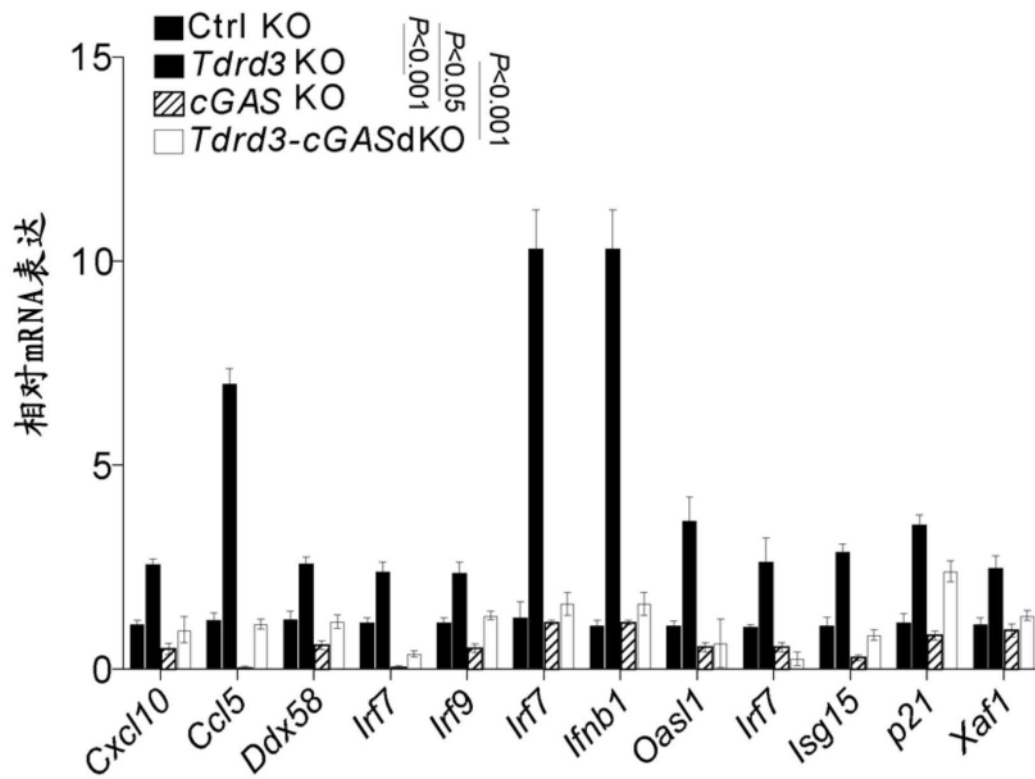


图6A

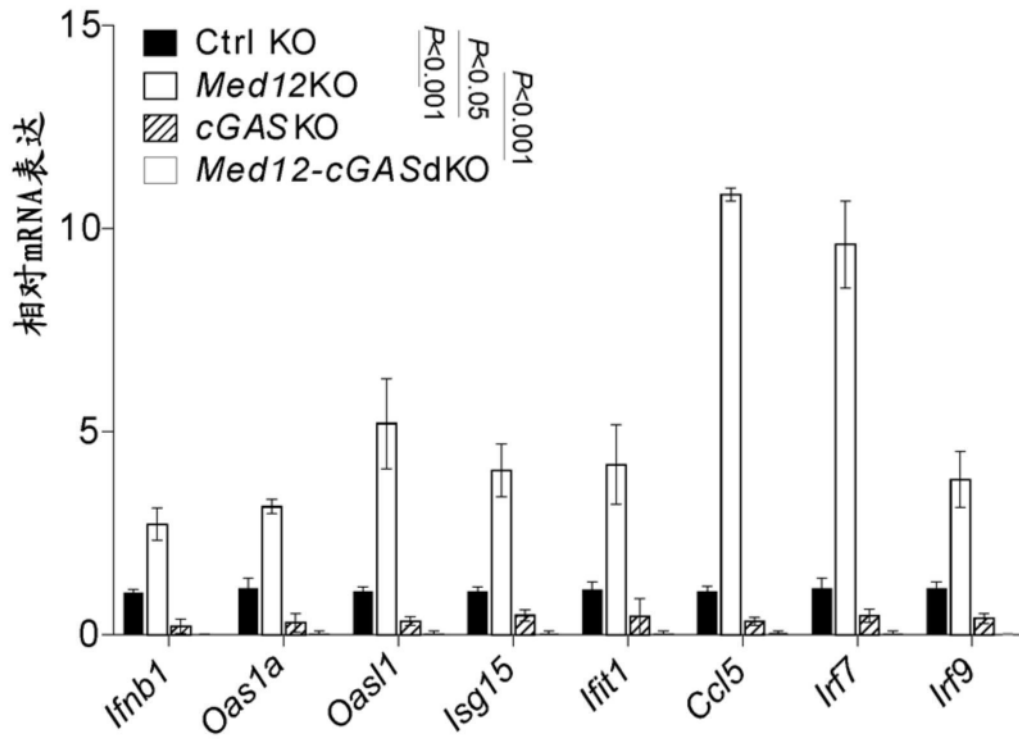


图6B

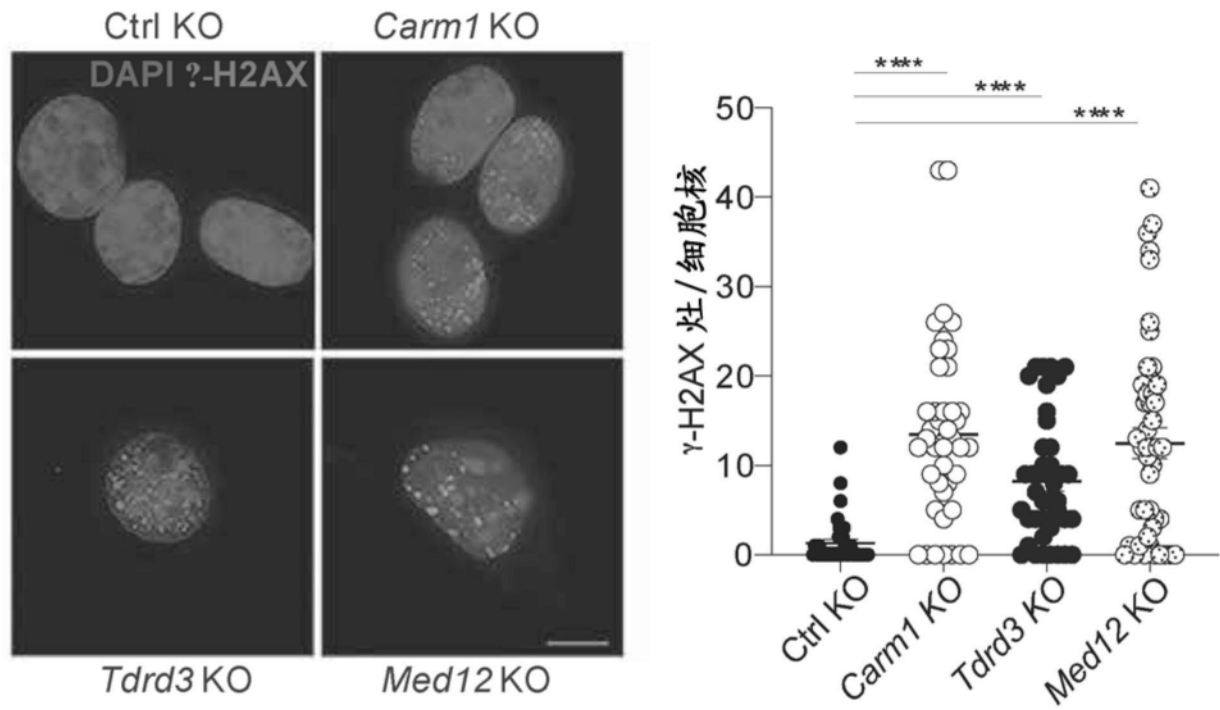


图6C

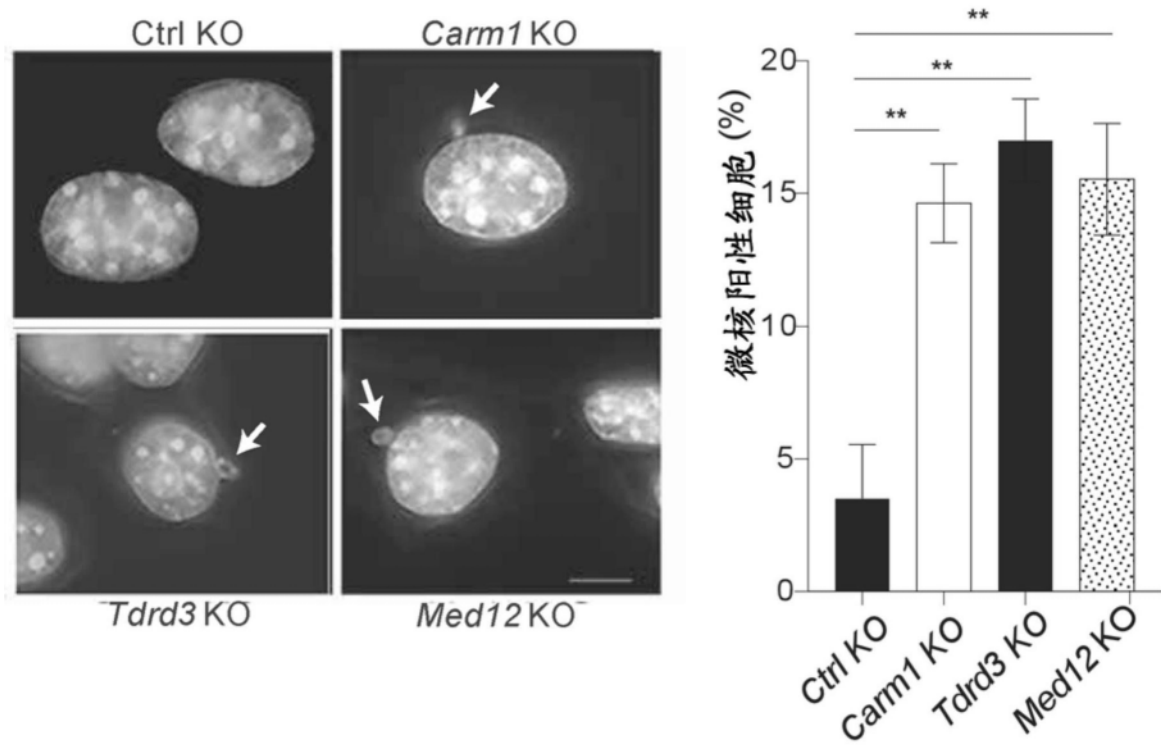


图6D

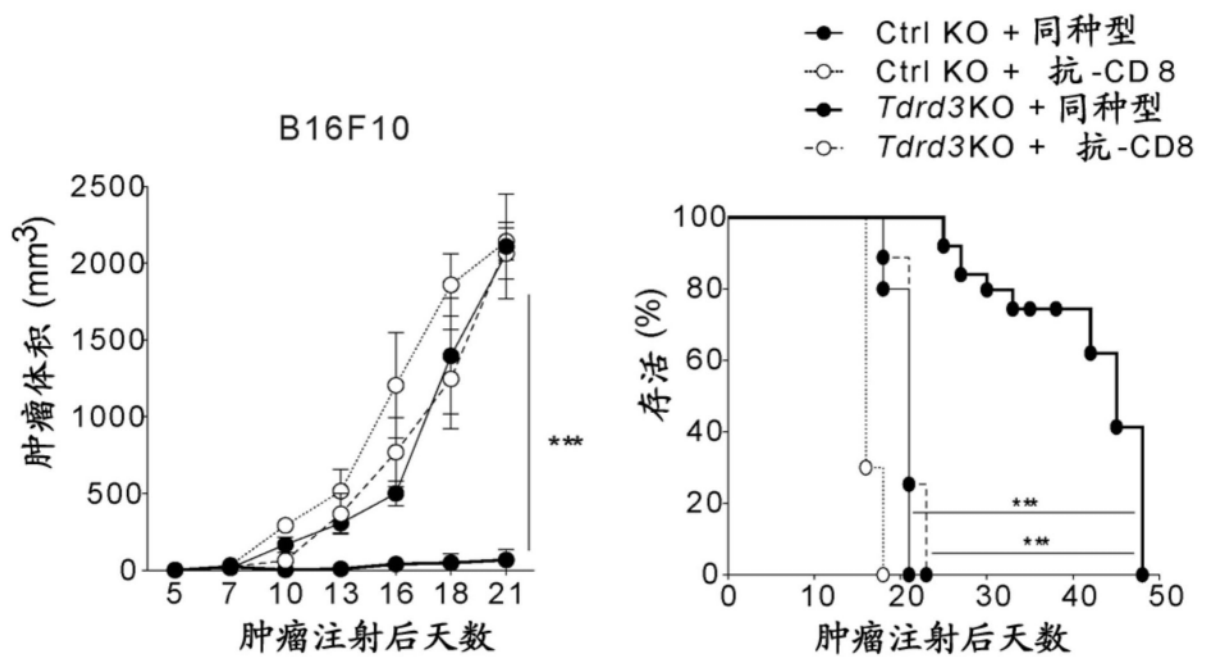


图6E

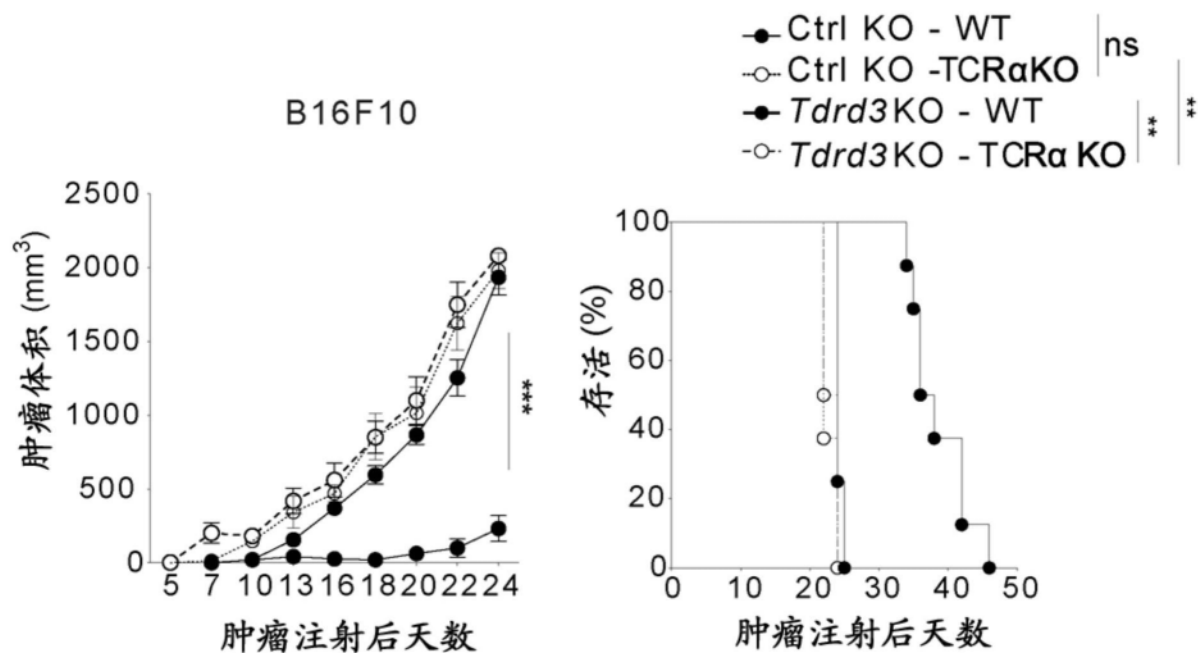


图6F

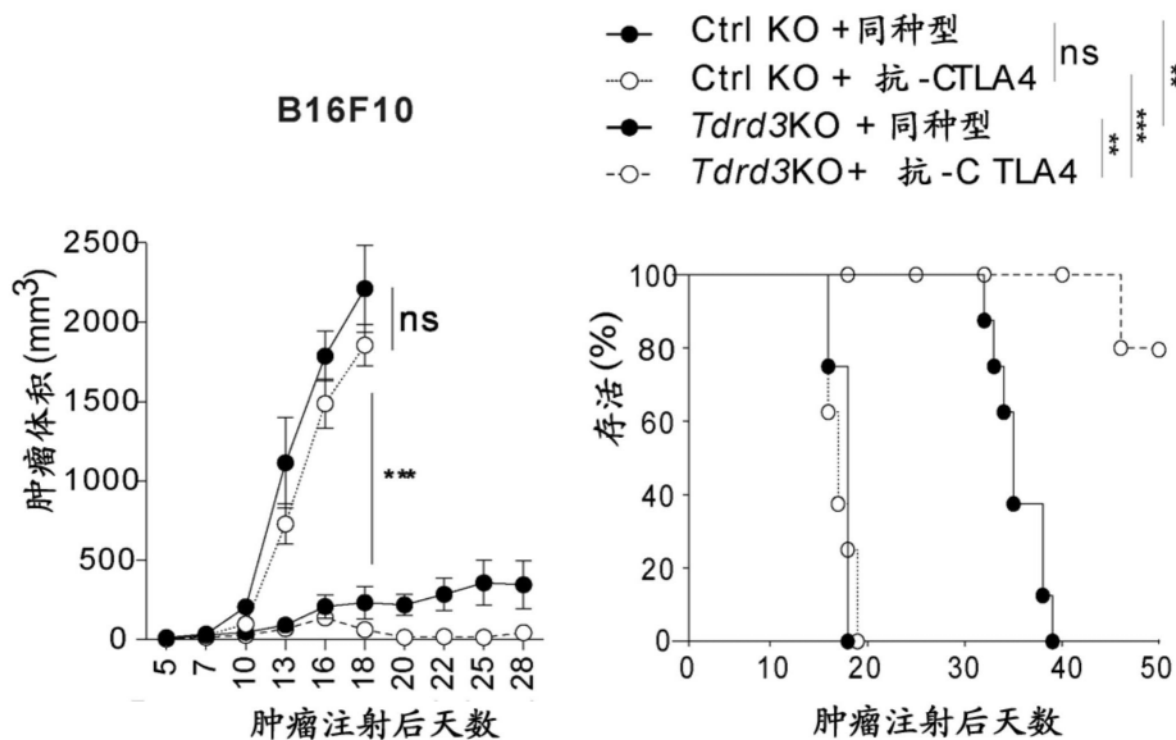


图6G

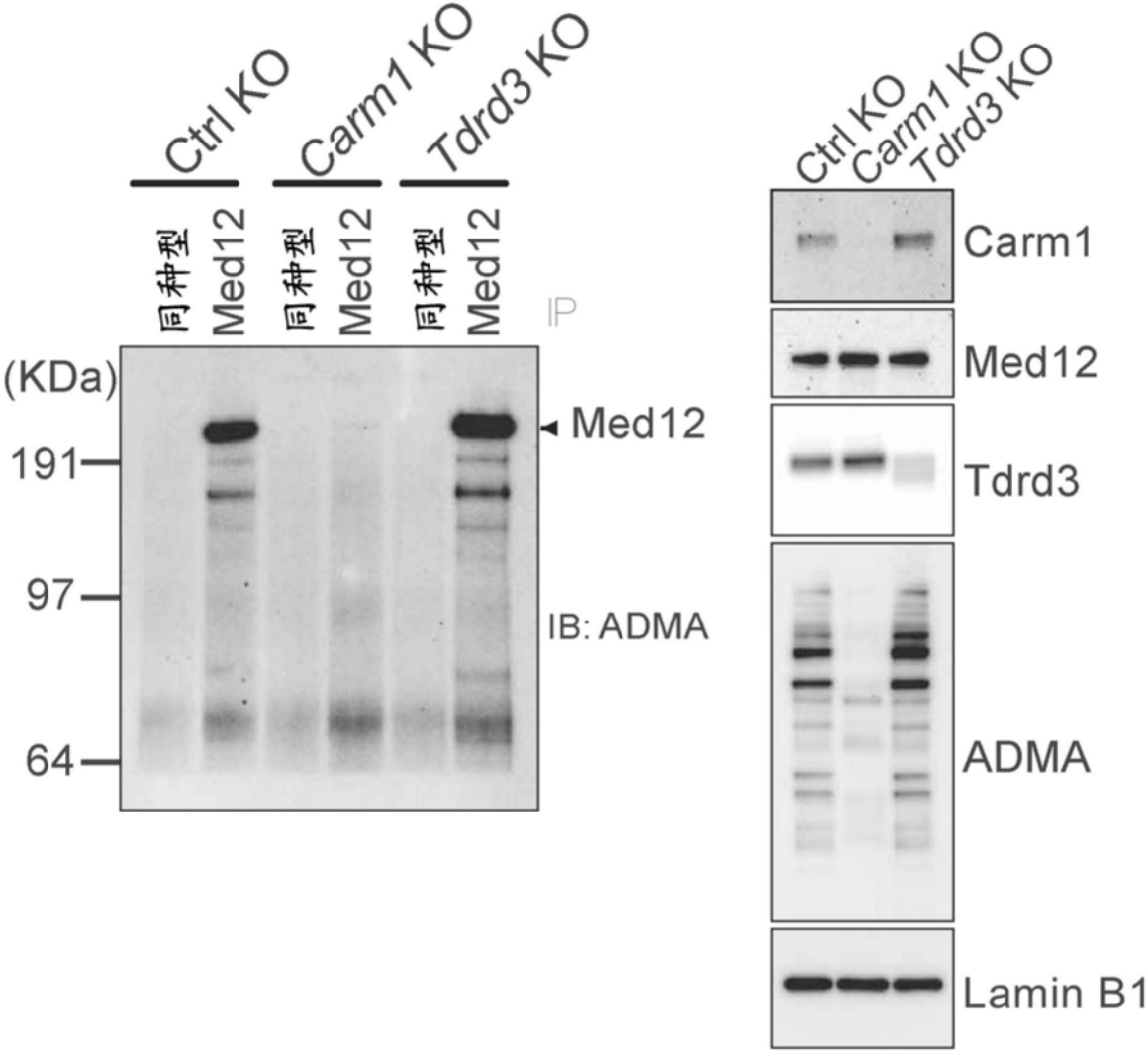


图6H

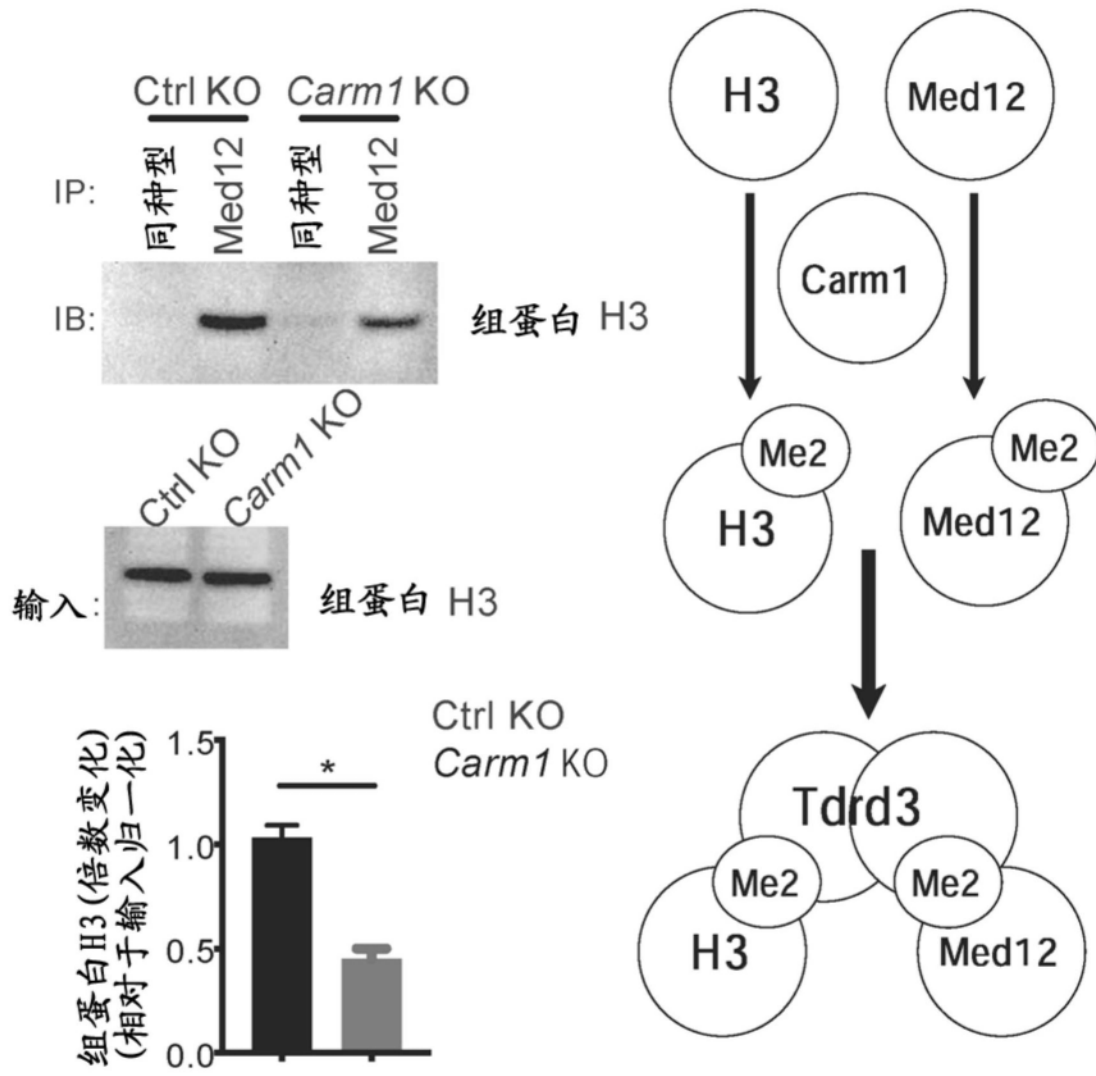


图6I

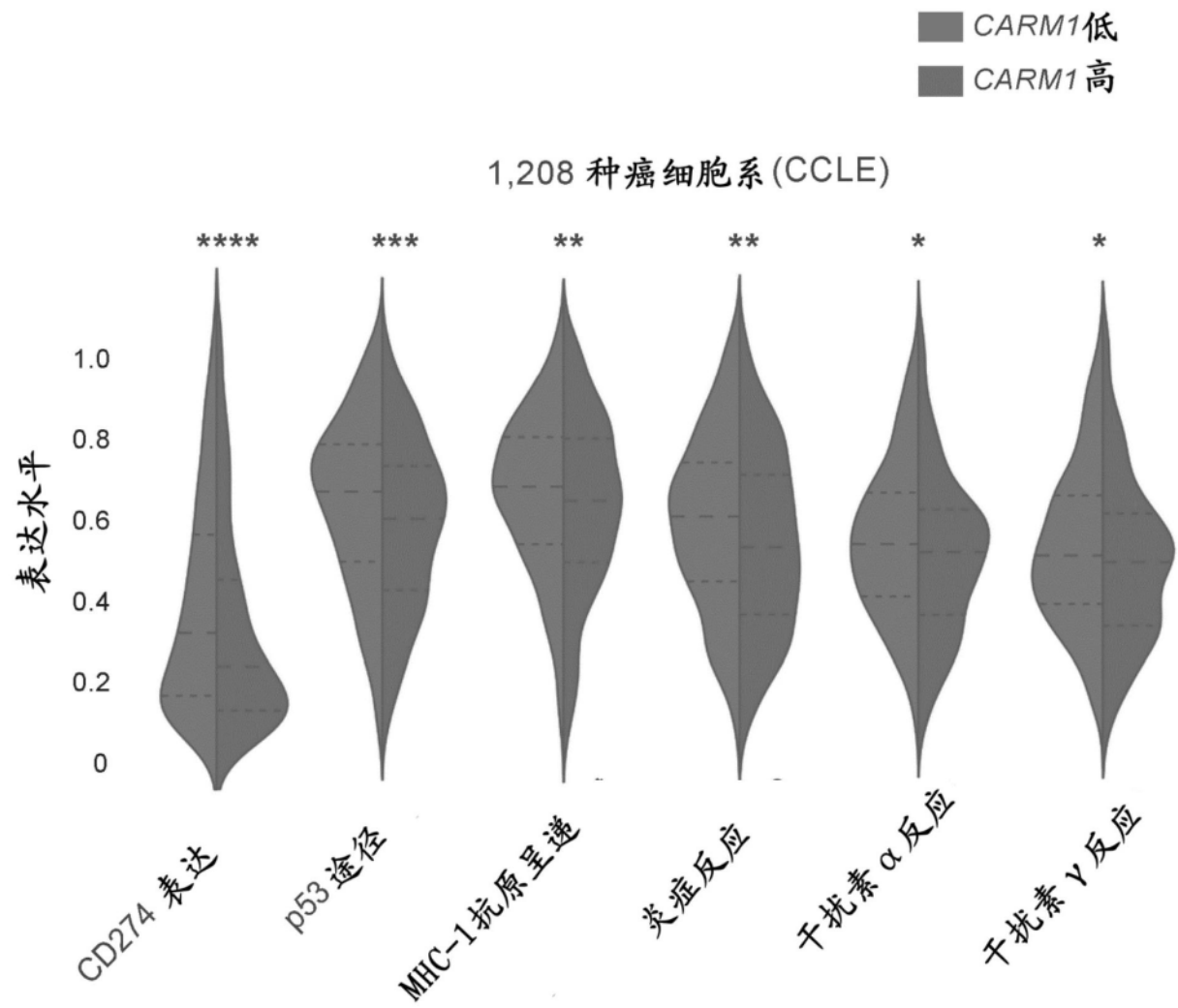


图7A

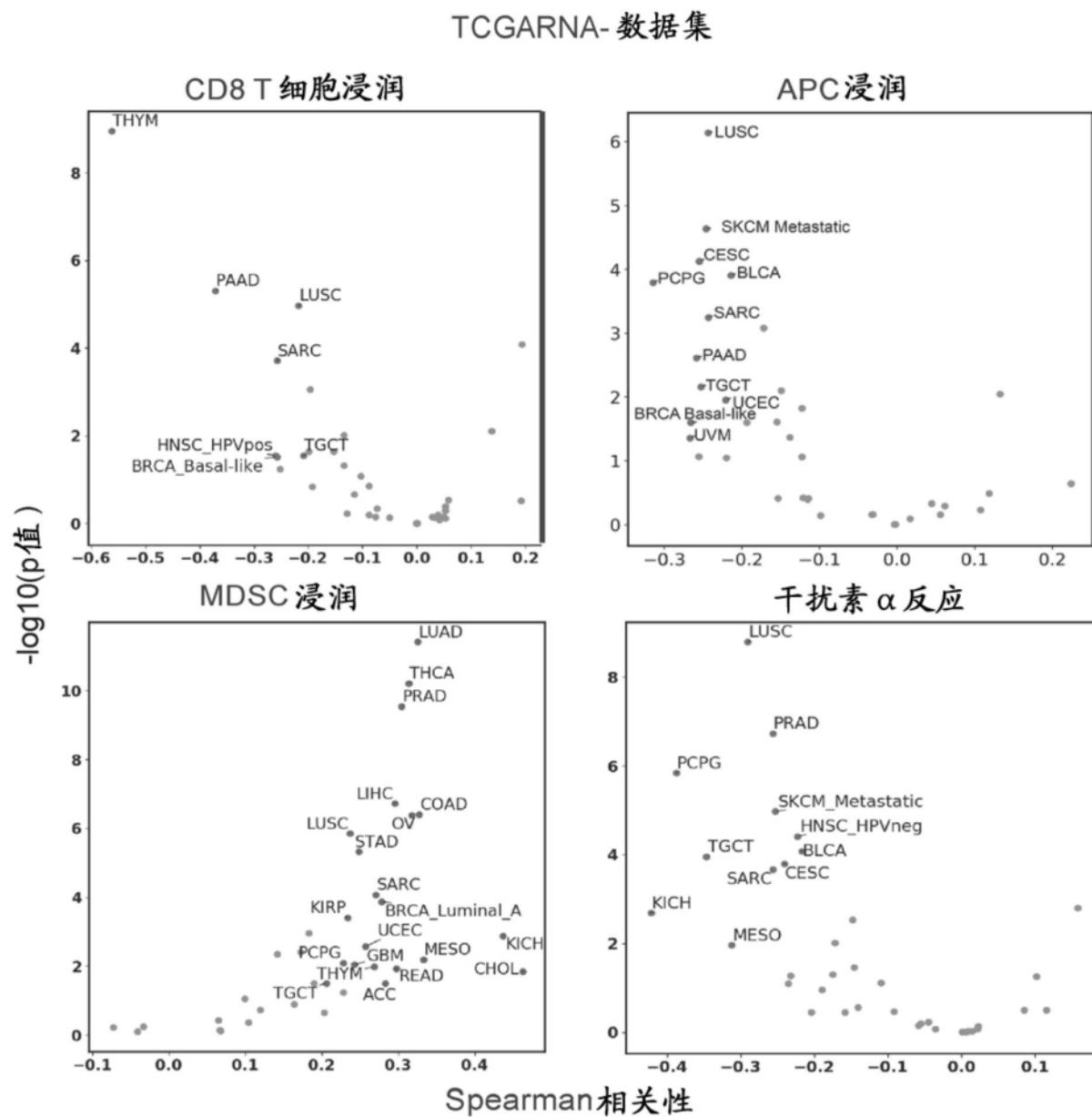


图7B

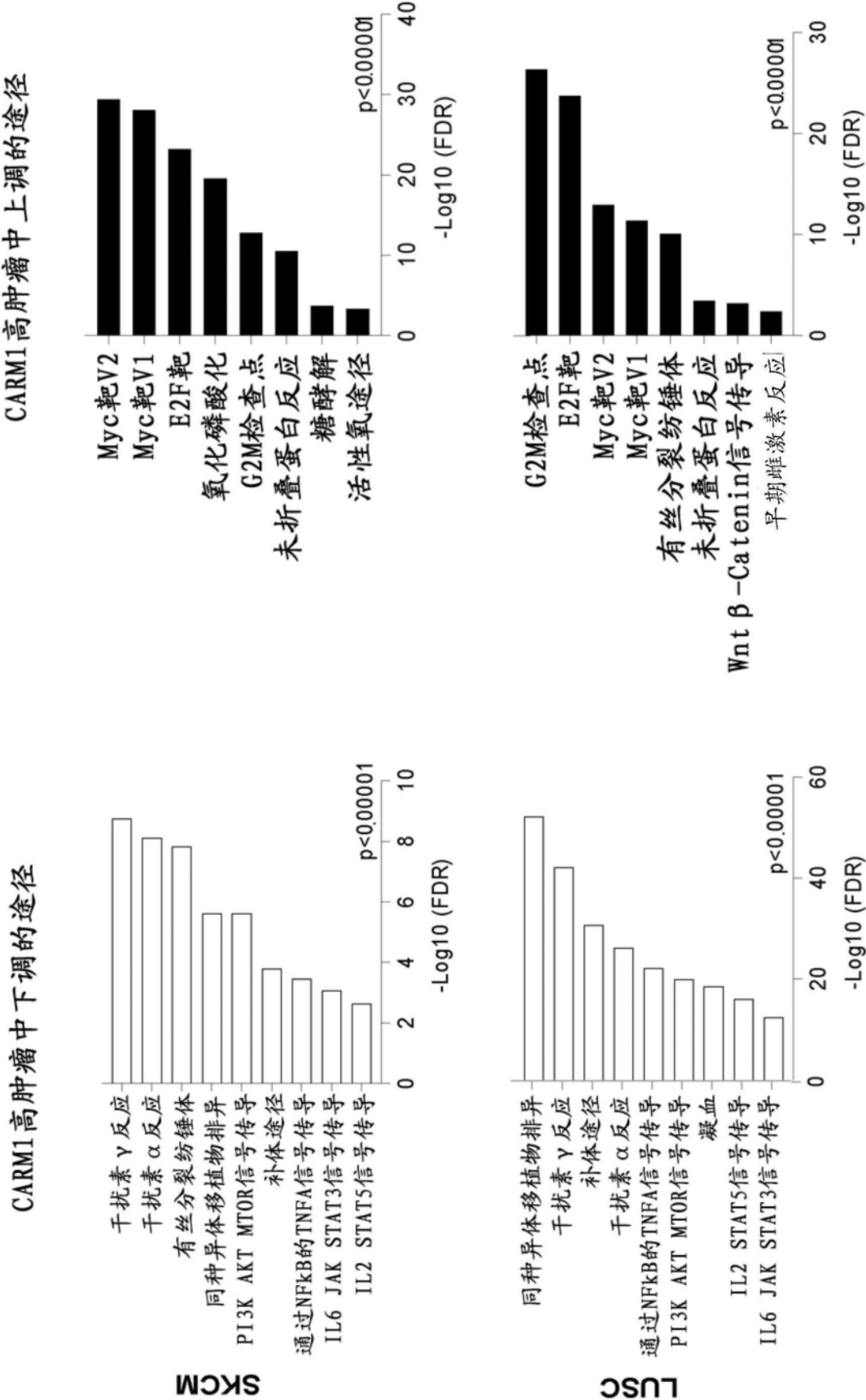


图7C

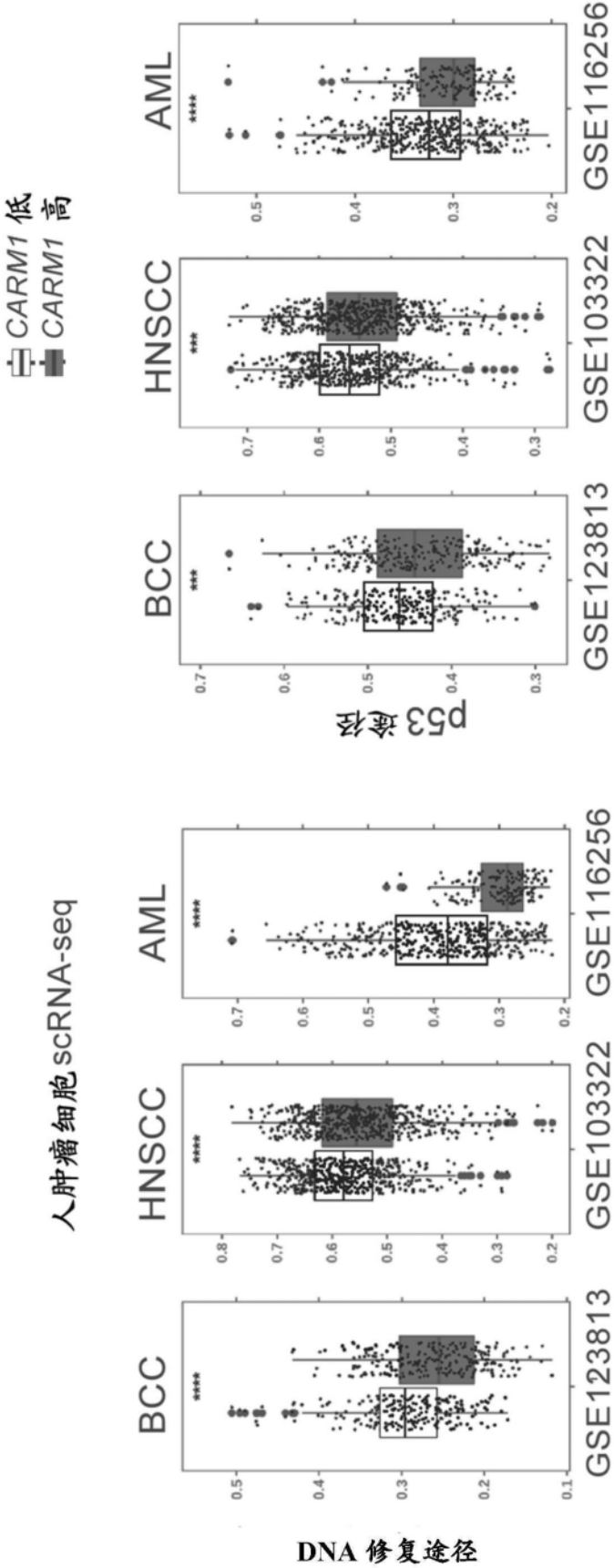


图7D

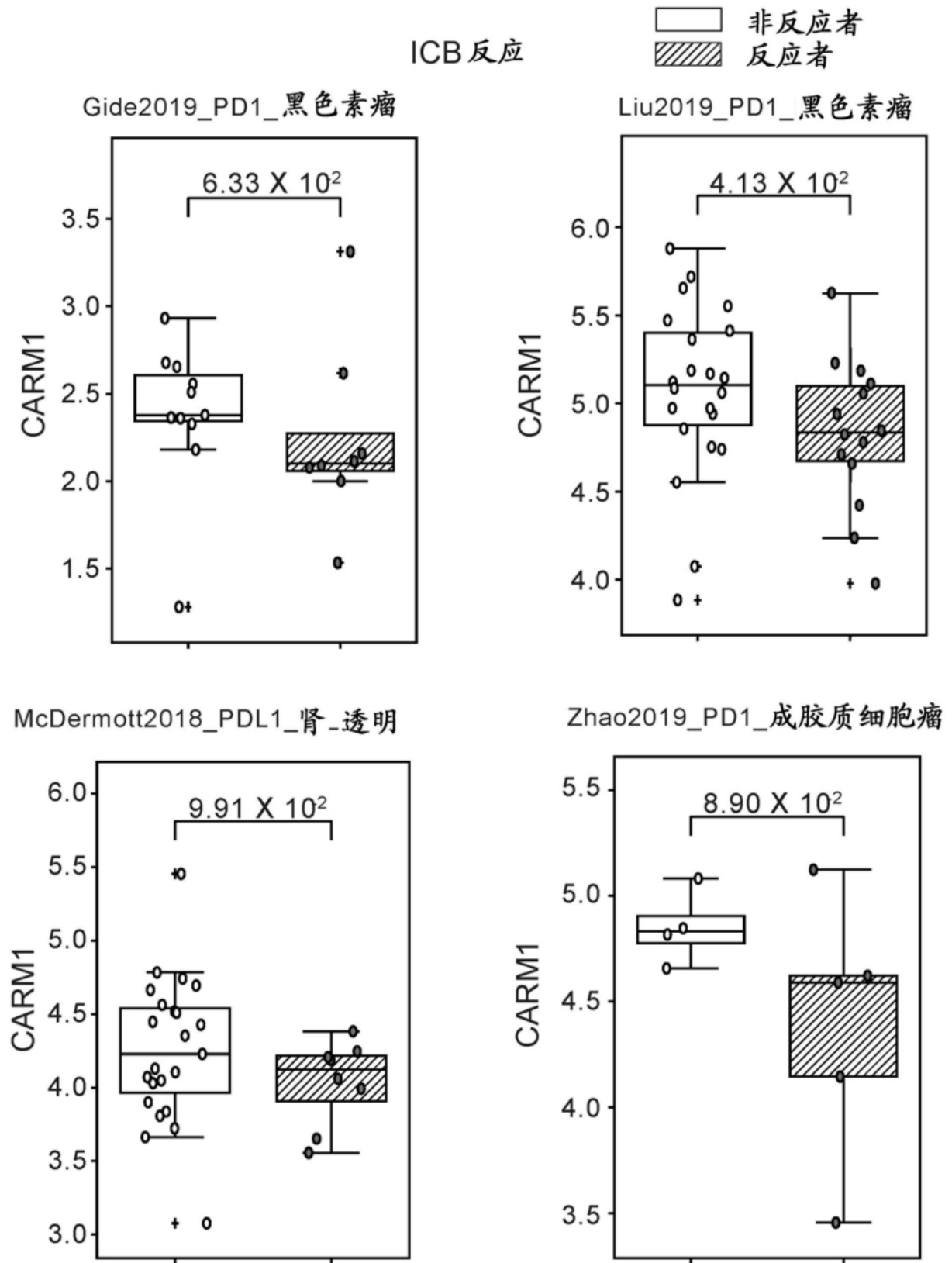


图7E

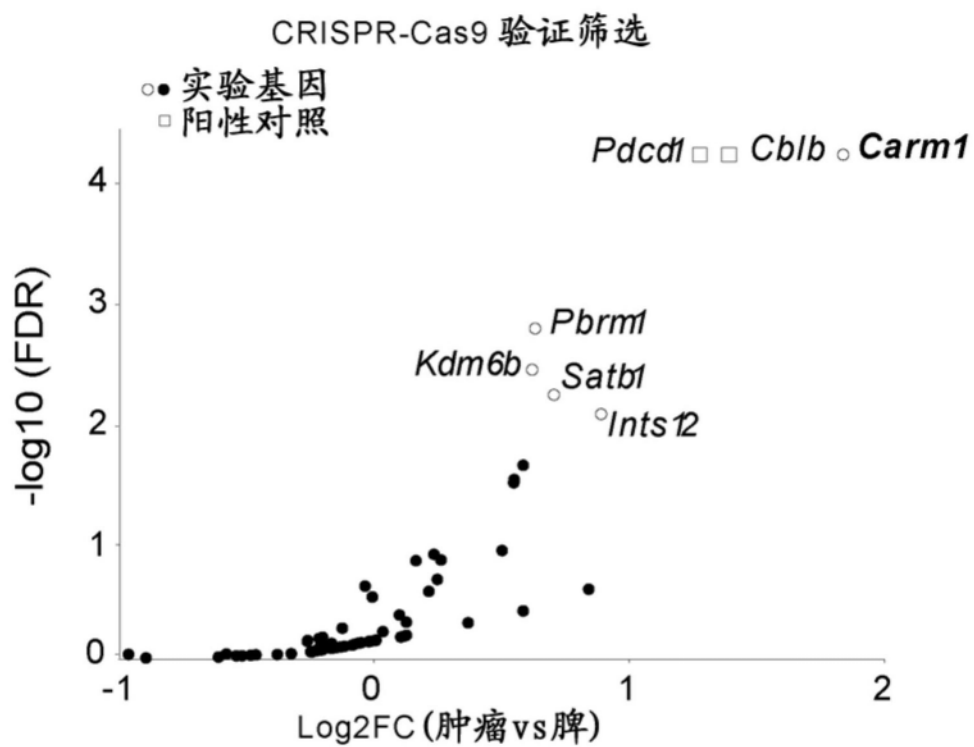


图8A

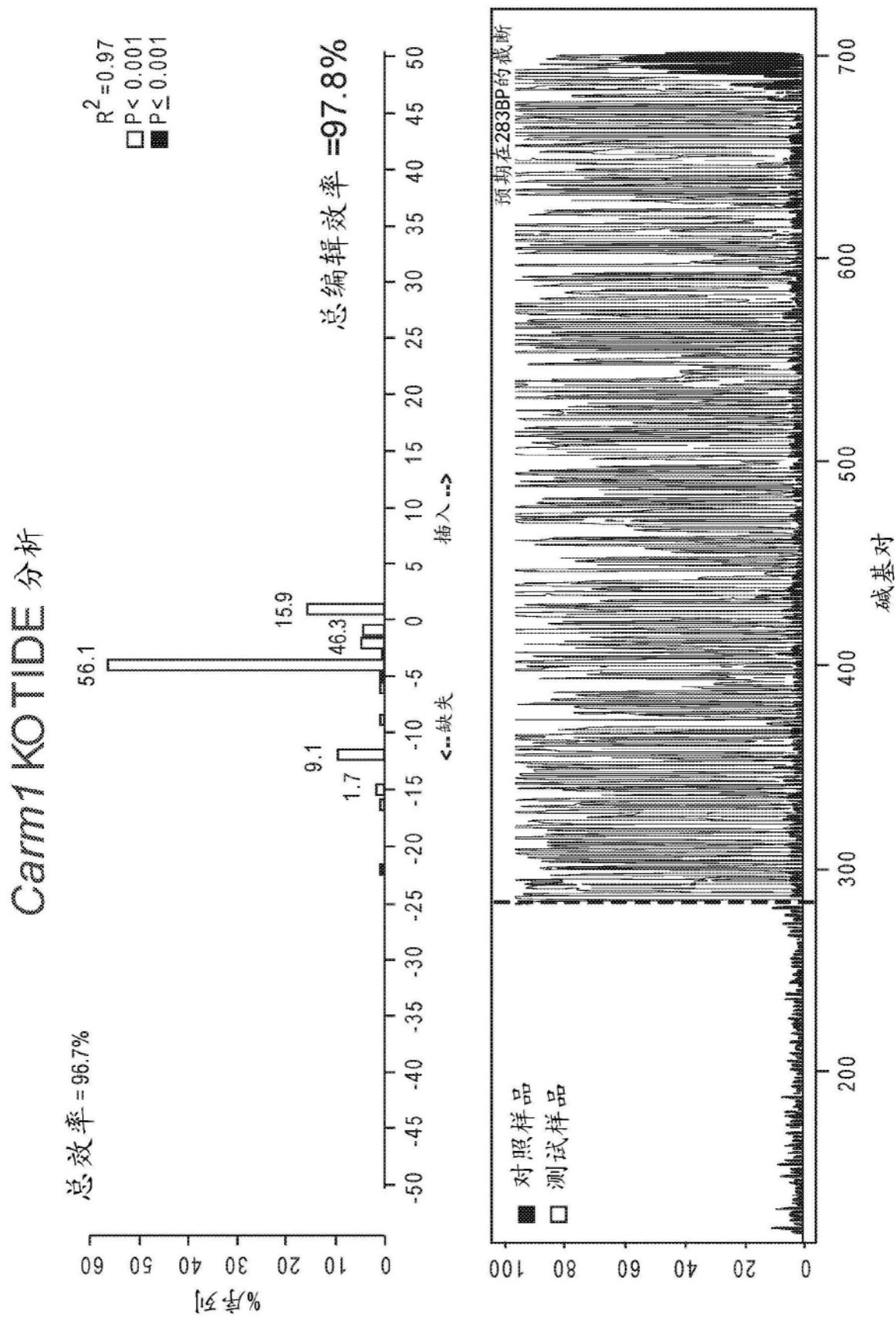


图8B

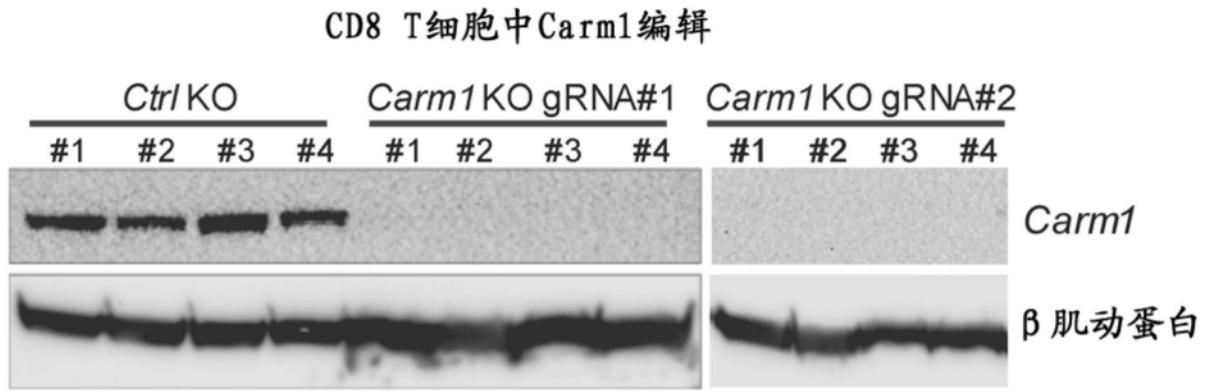


图8C

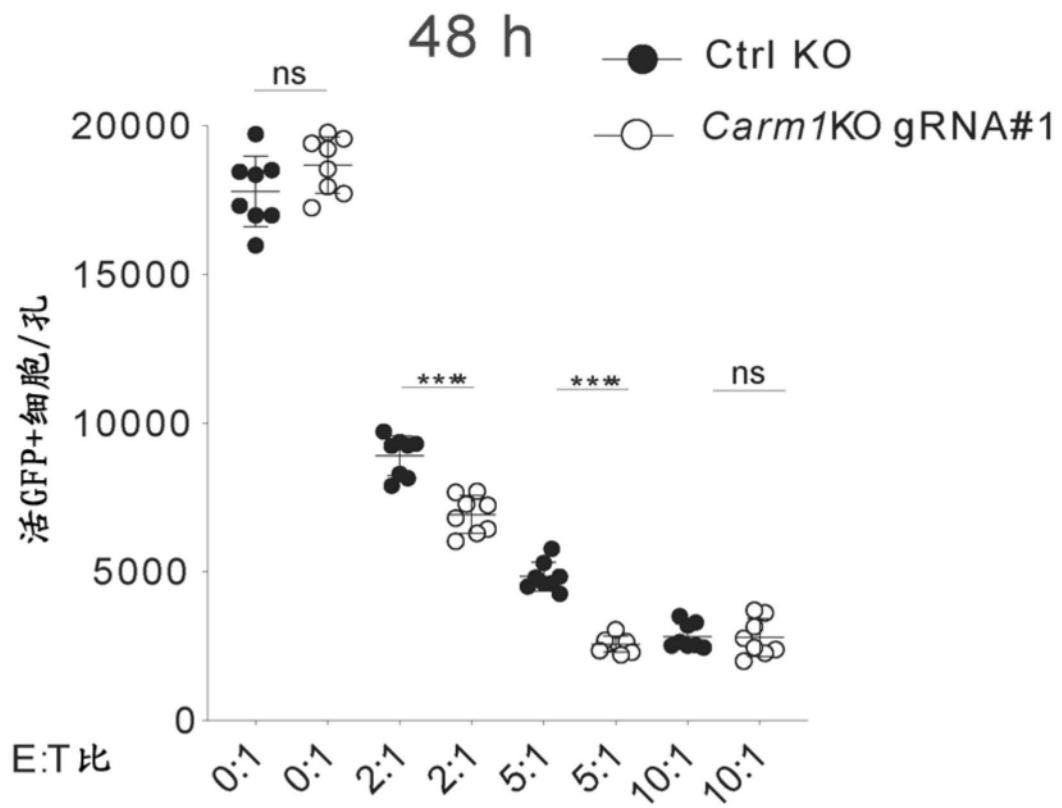


图8D

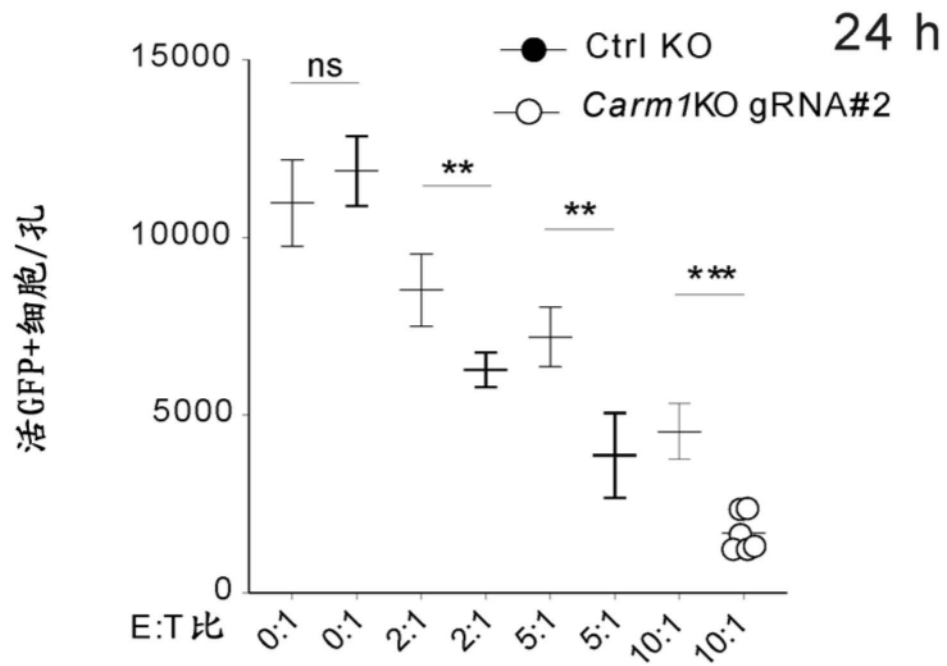


图8E

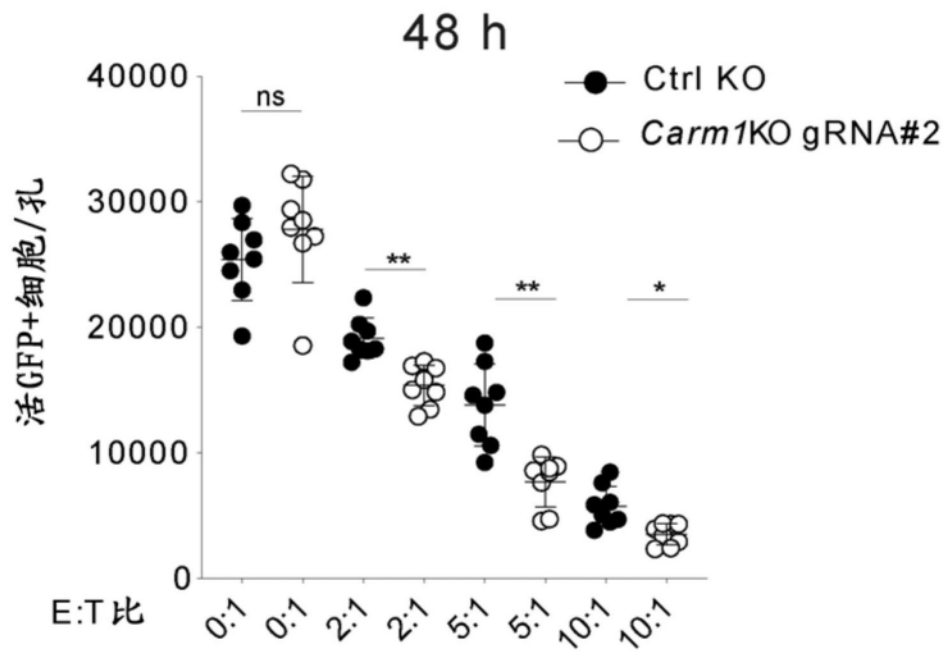


图8F

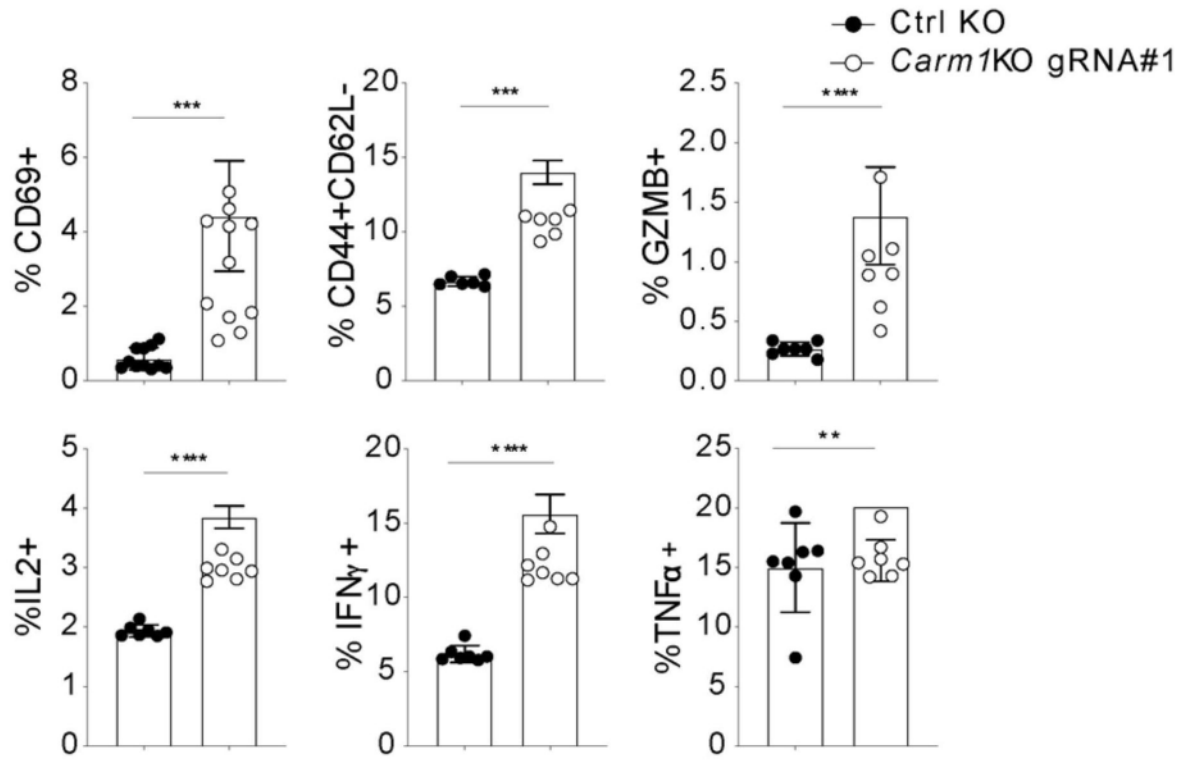


图8G

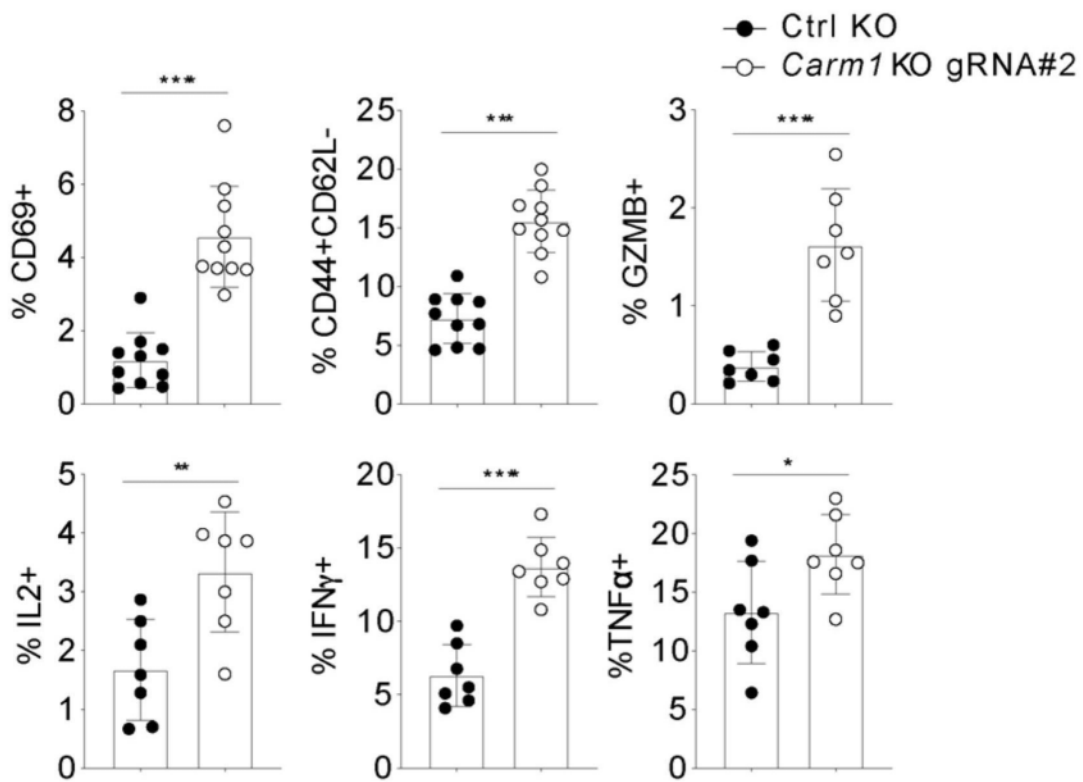


图8H

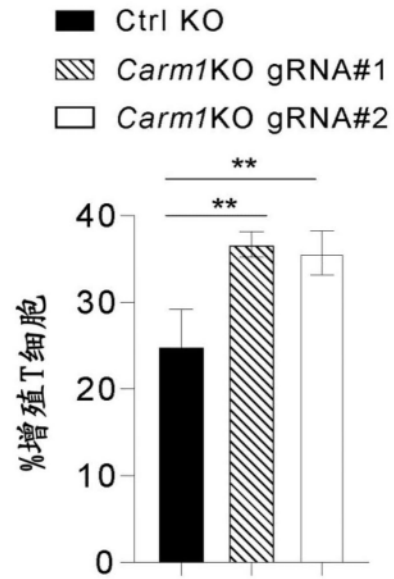


图8I

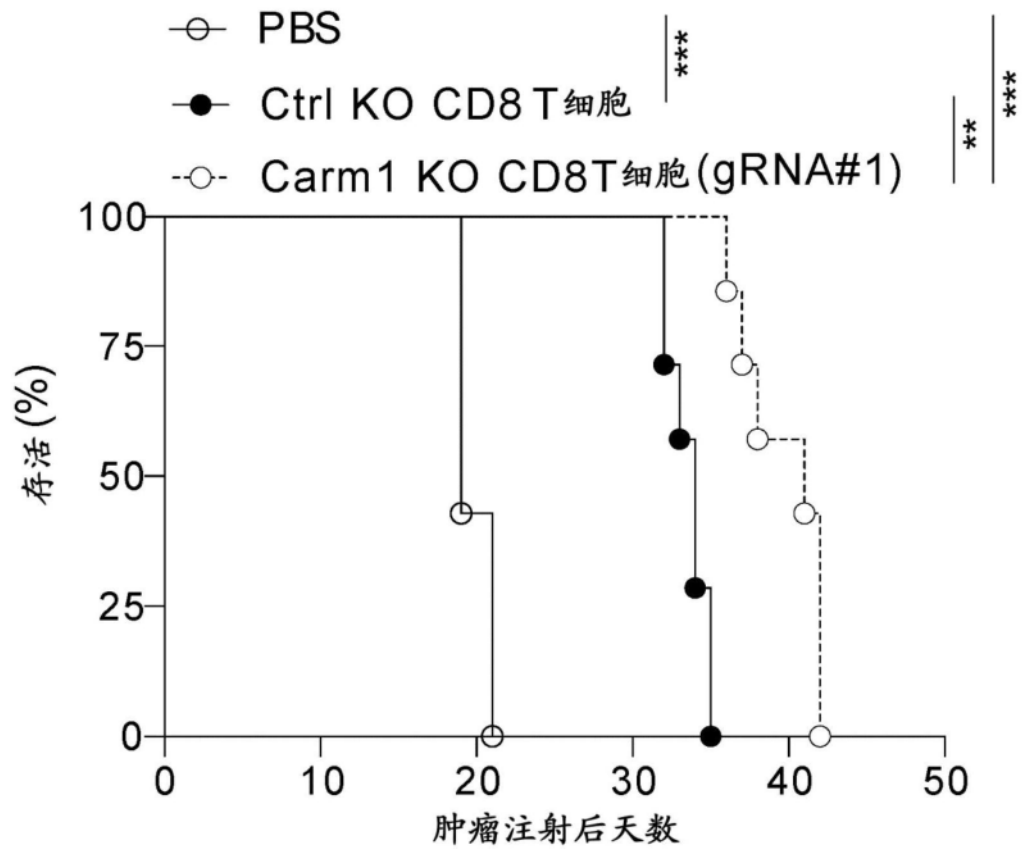


图9A

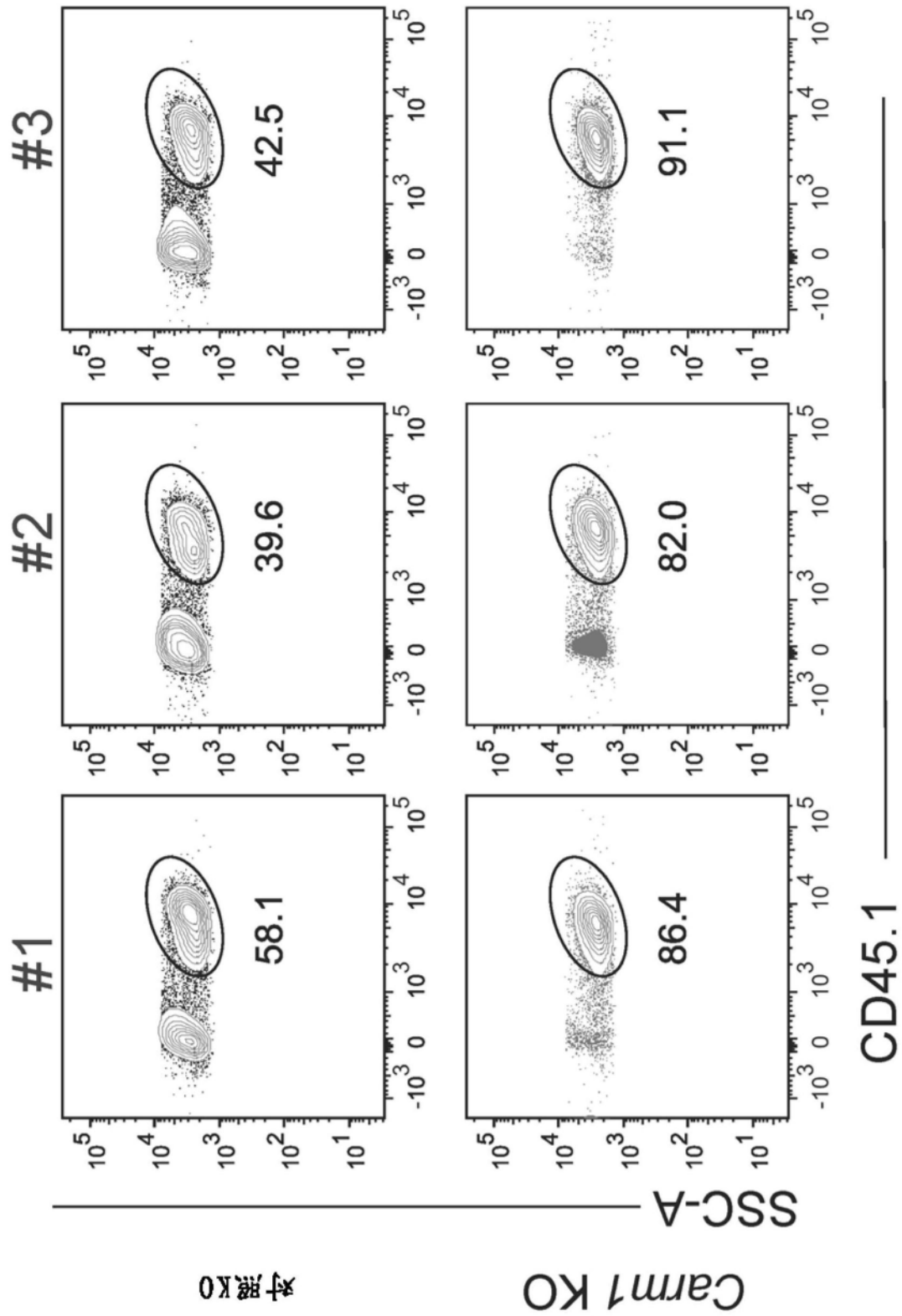


图9B

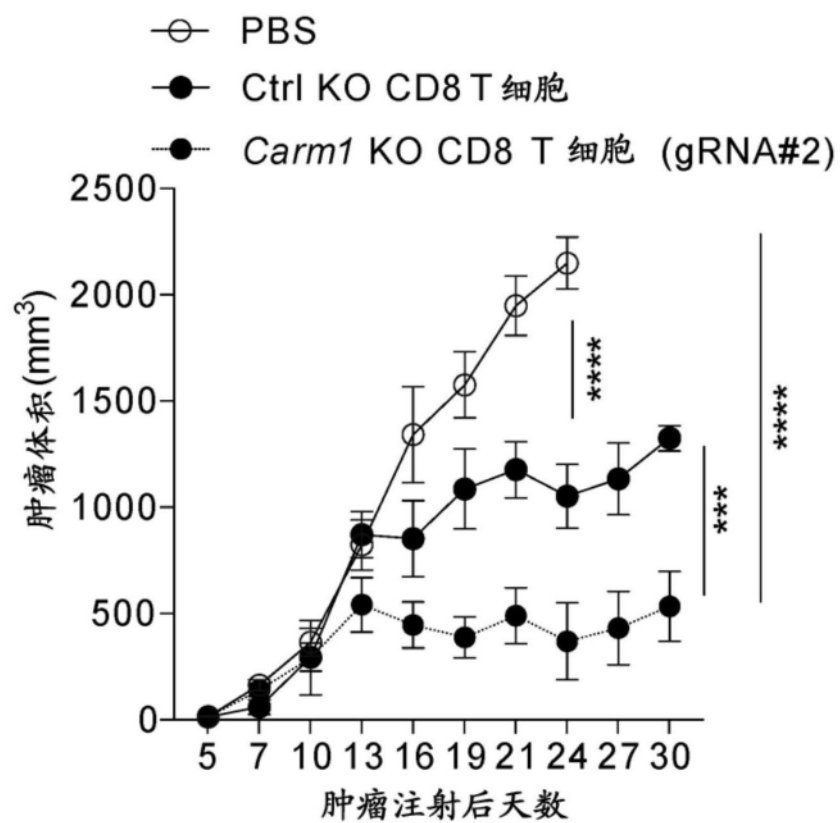


图9C

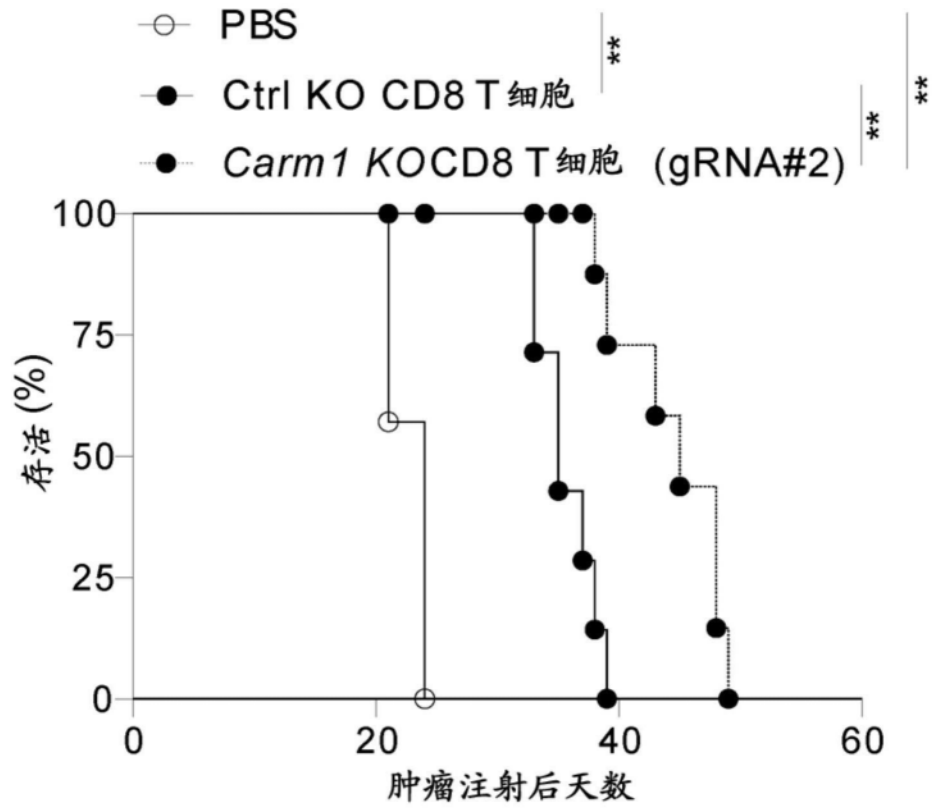


图9D

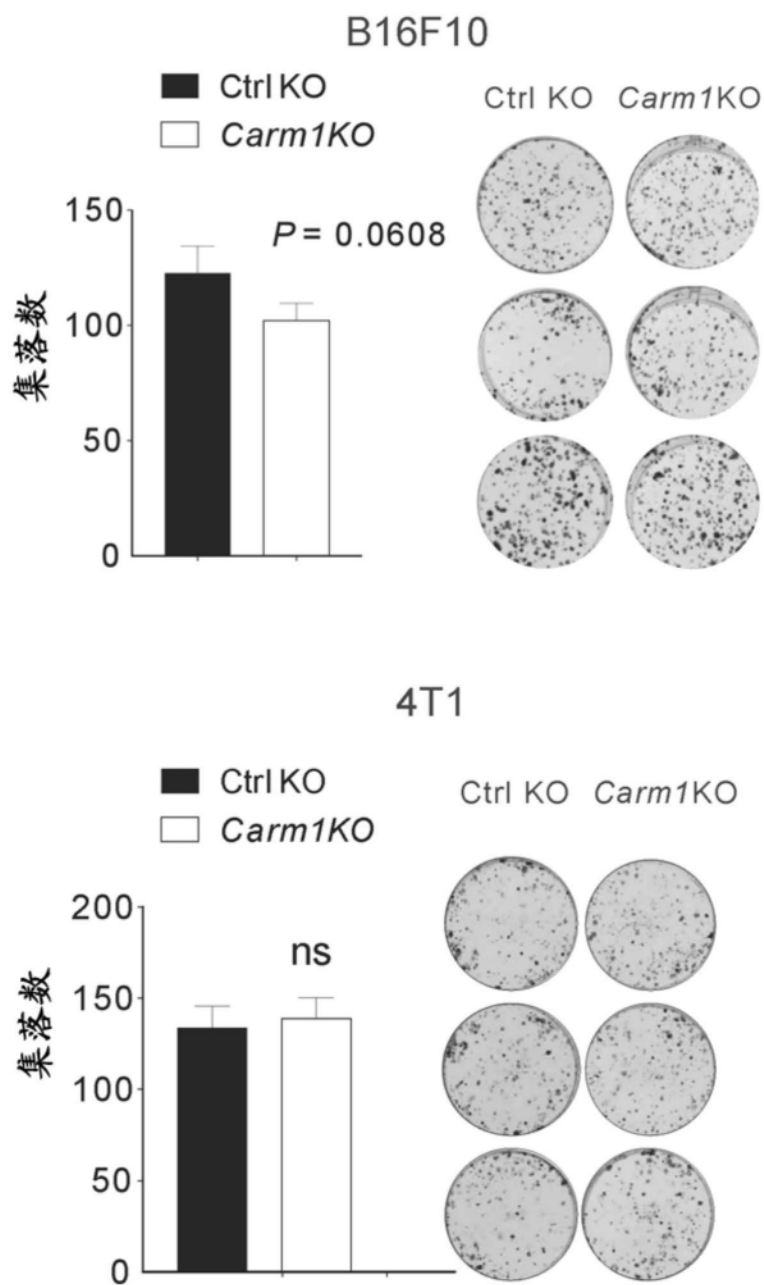


图9E

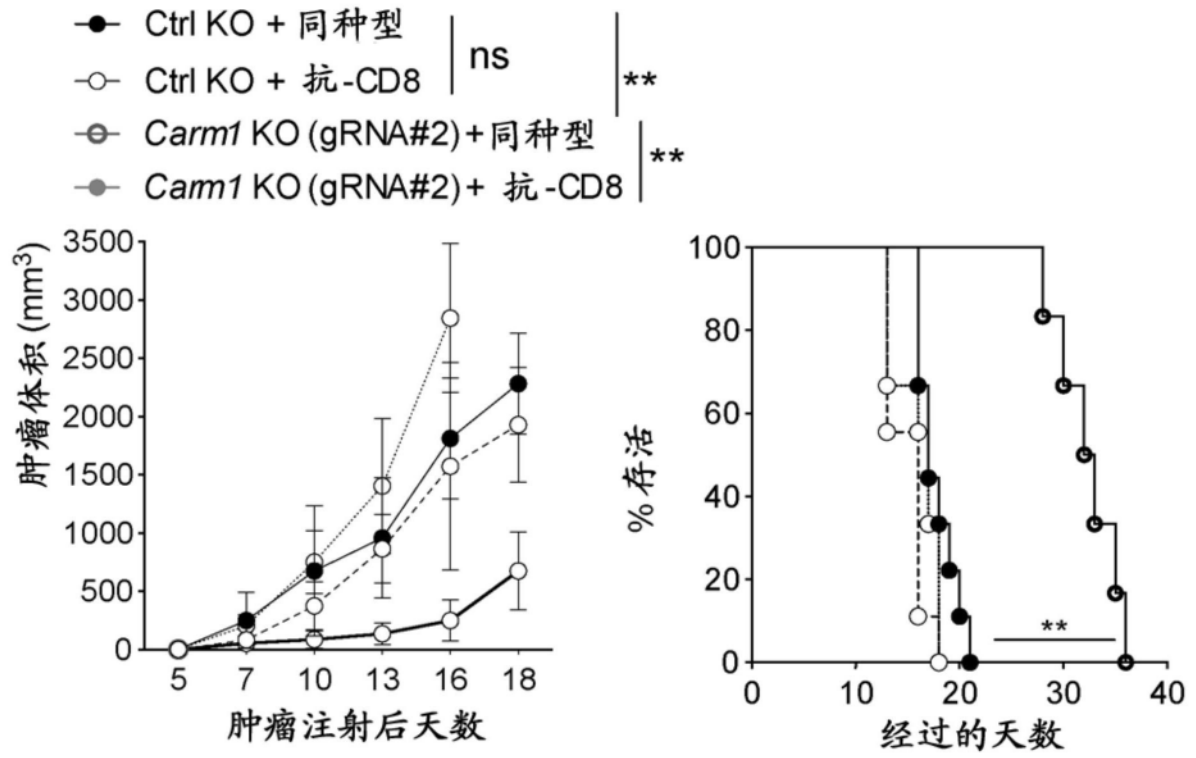


图10A

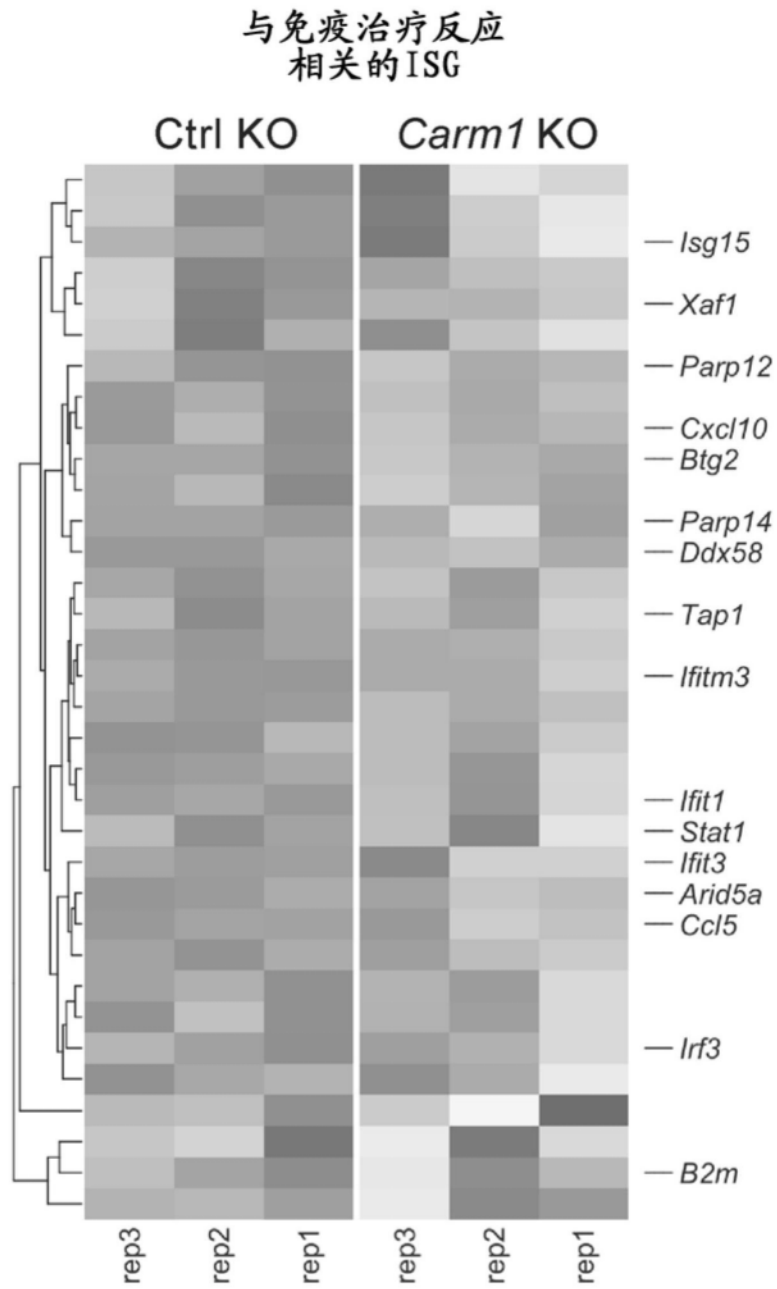


图10B

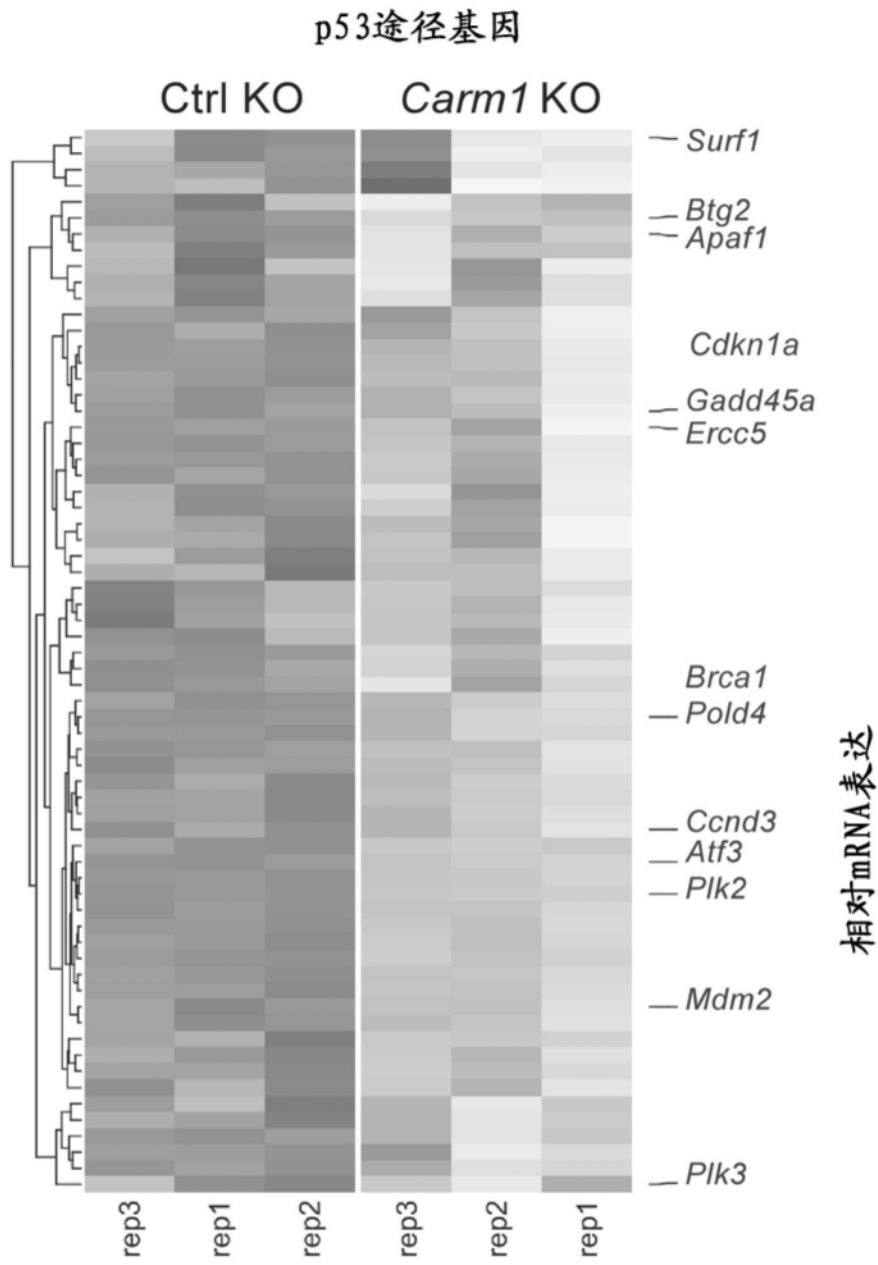


图10C

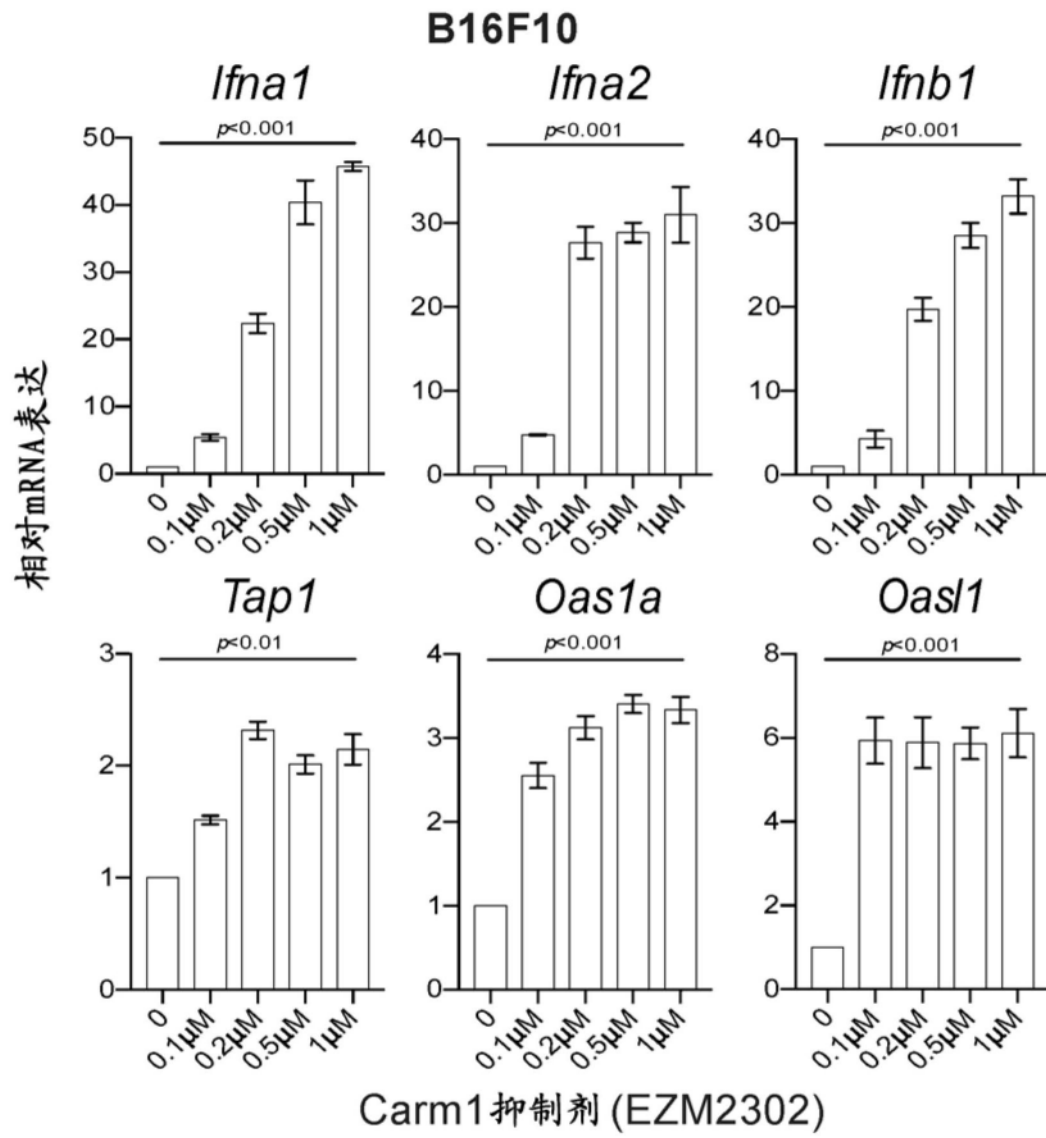


图10D

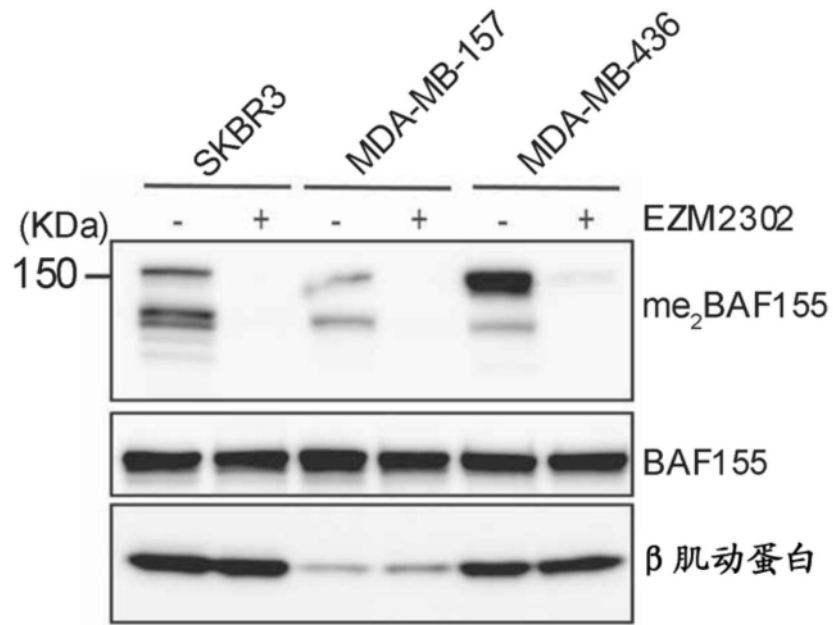


图10E

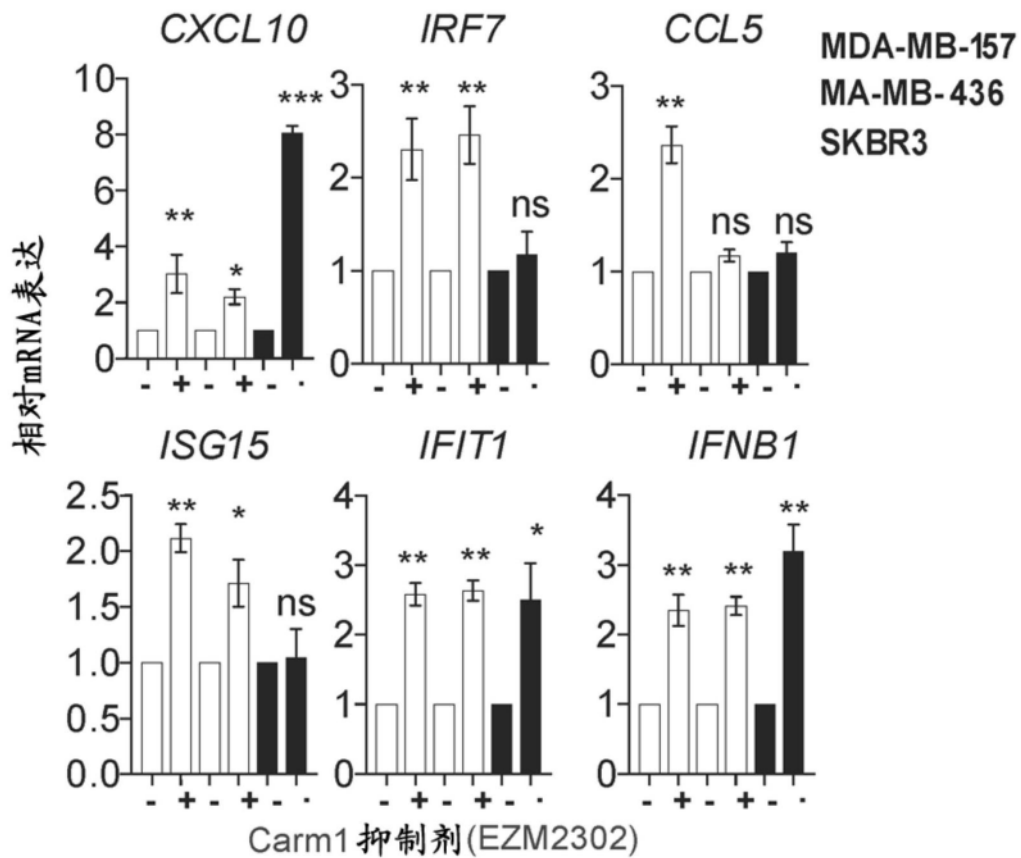


图10F

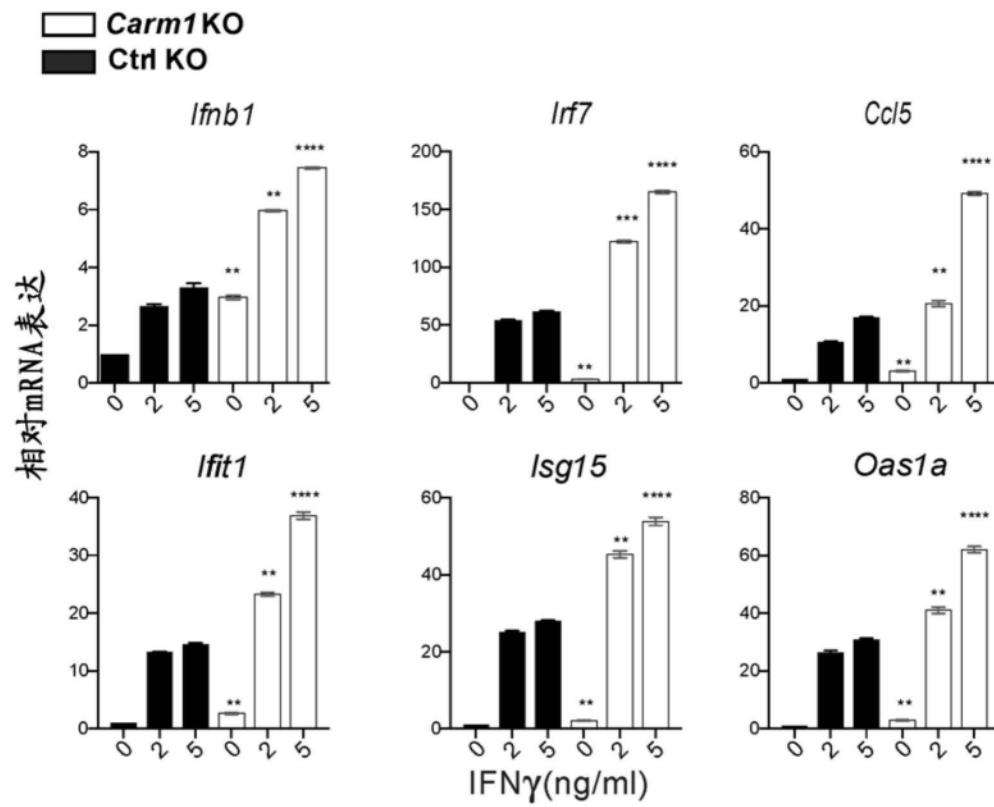


图10G

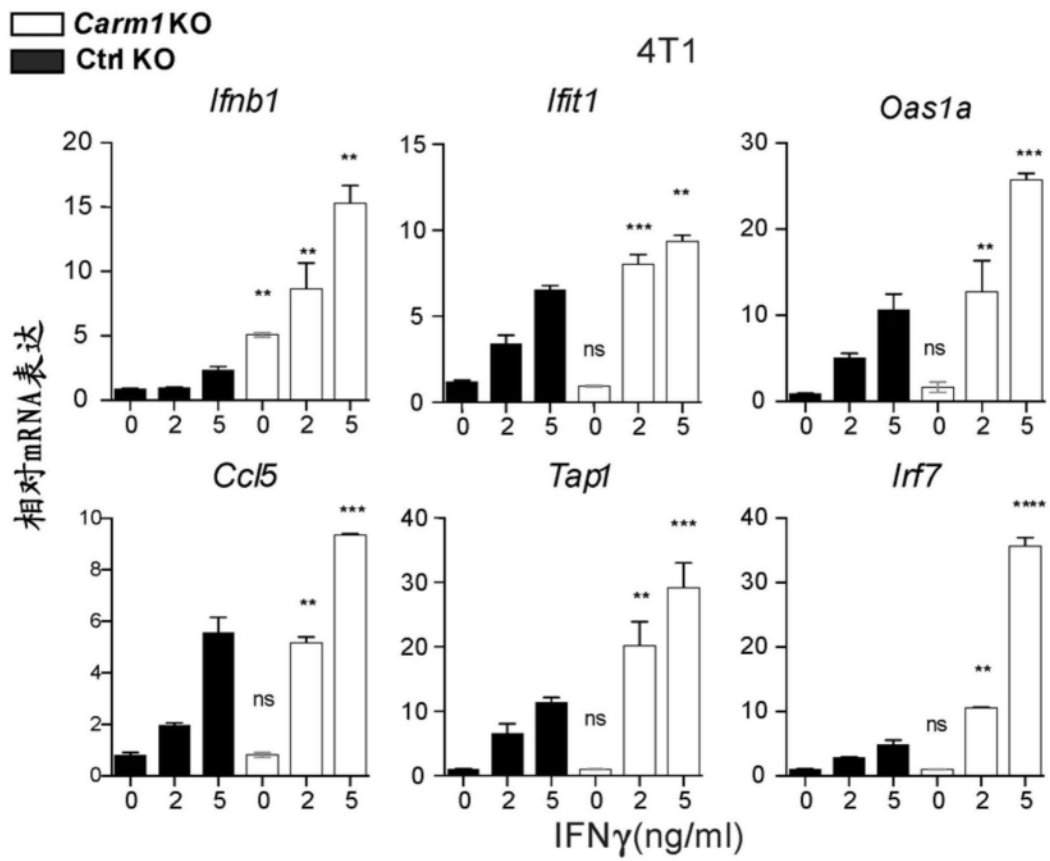


图10H

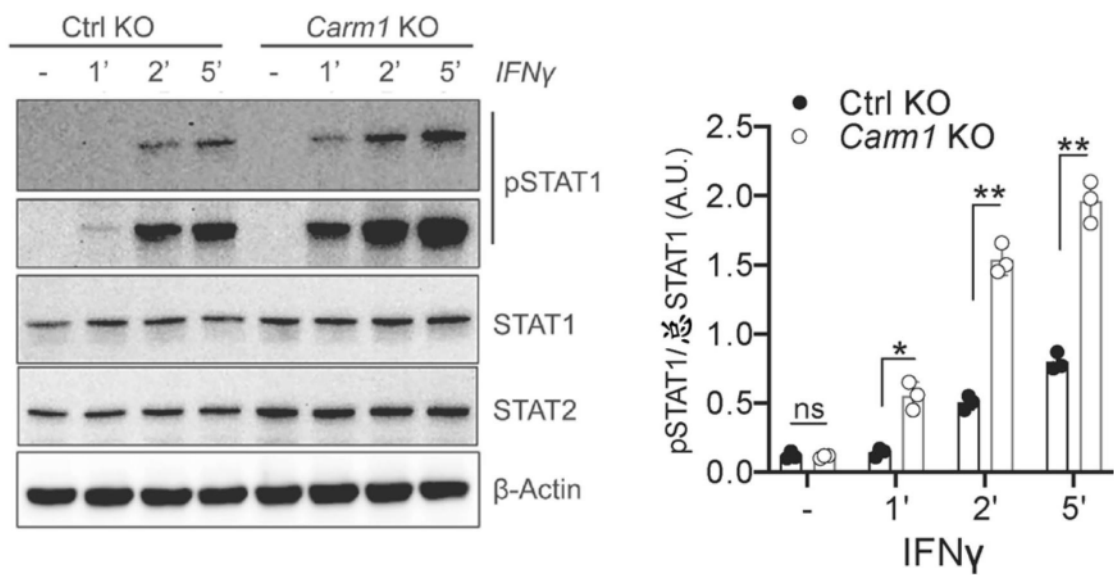


图11A

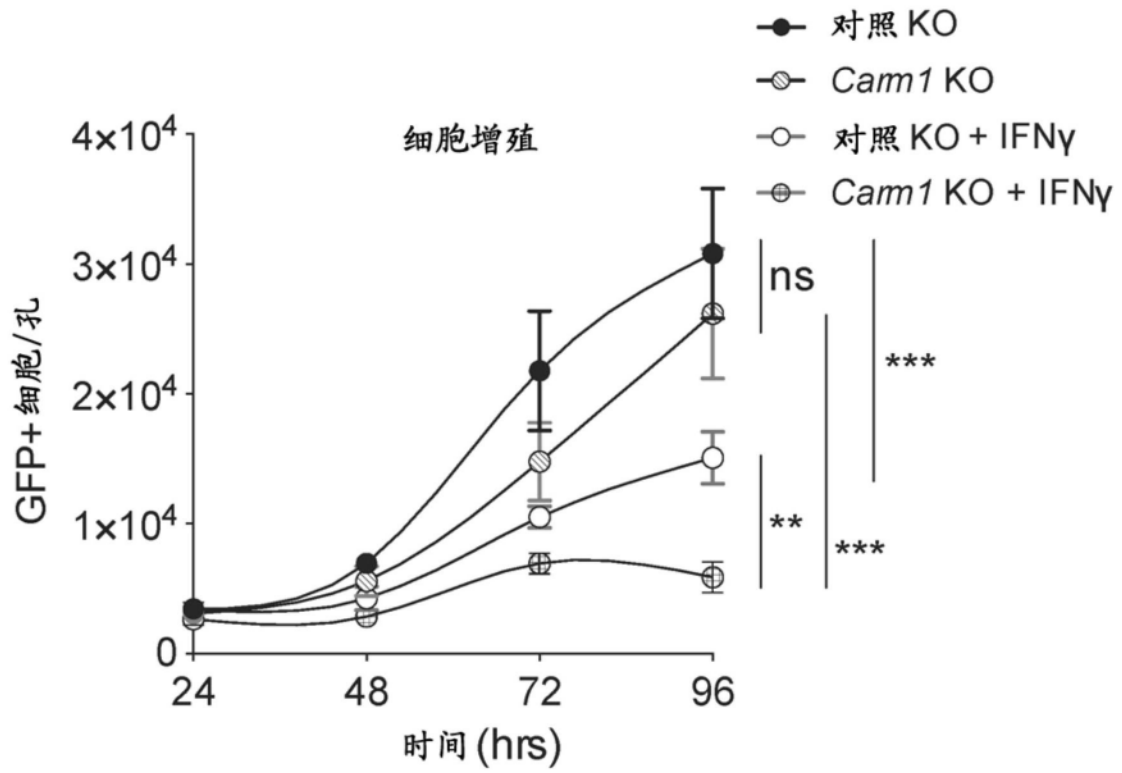


图11B

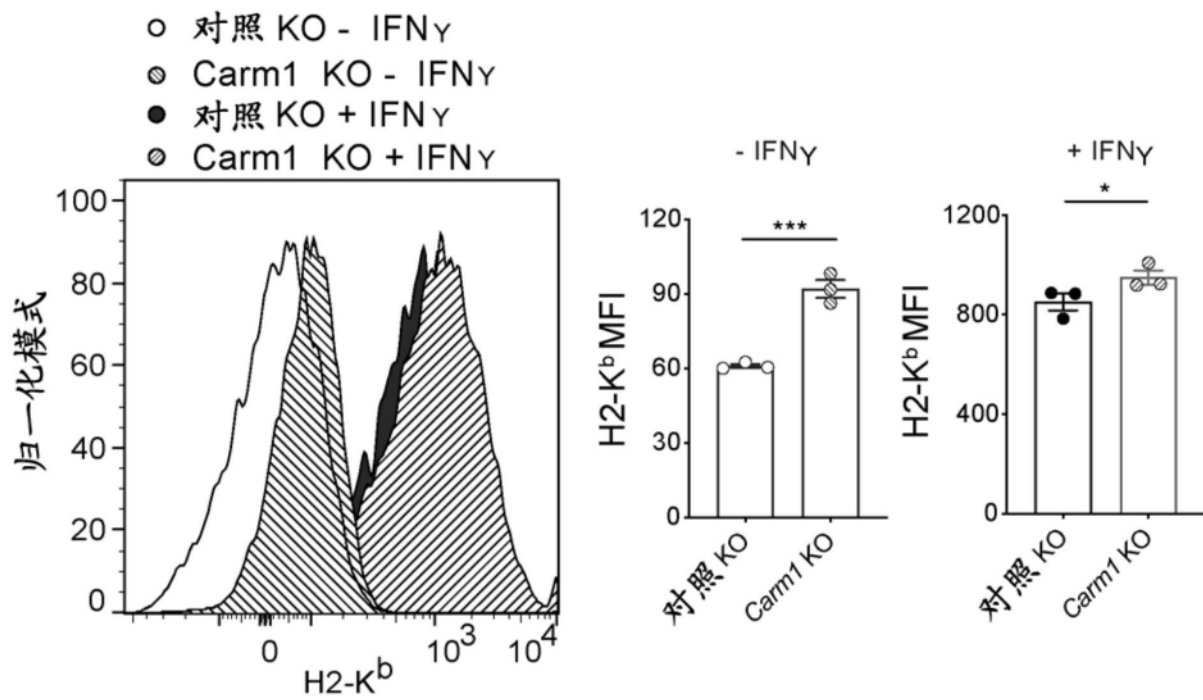


图11C

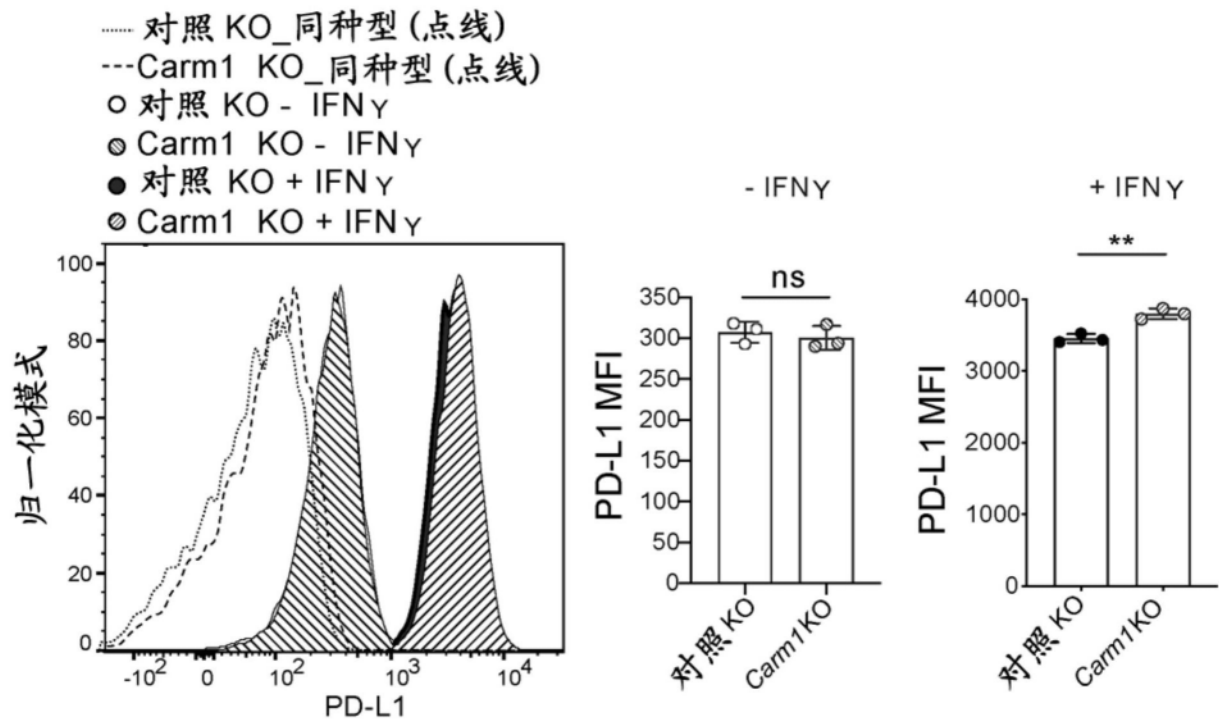


图11D

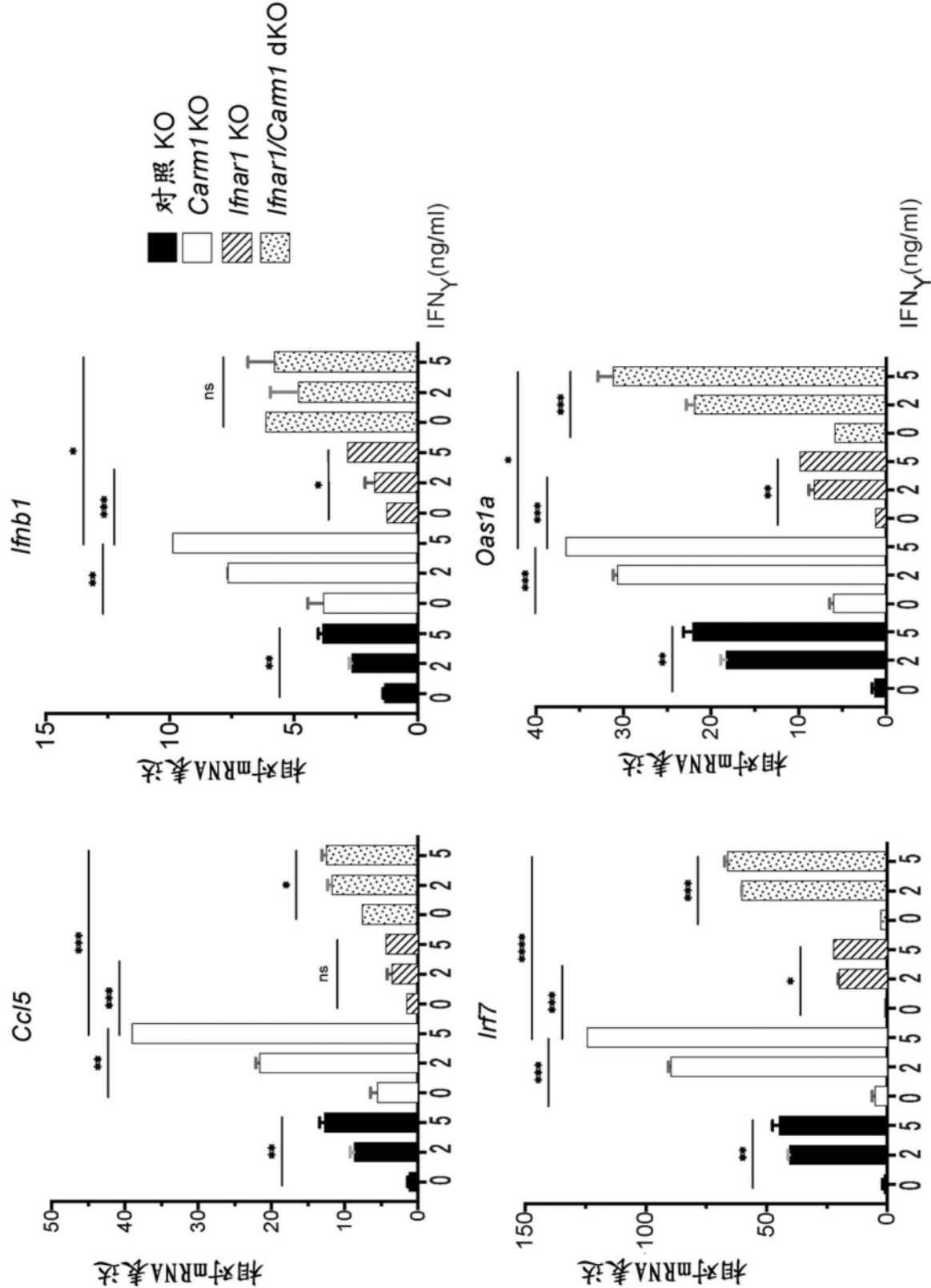


图11E

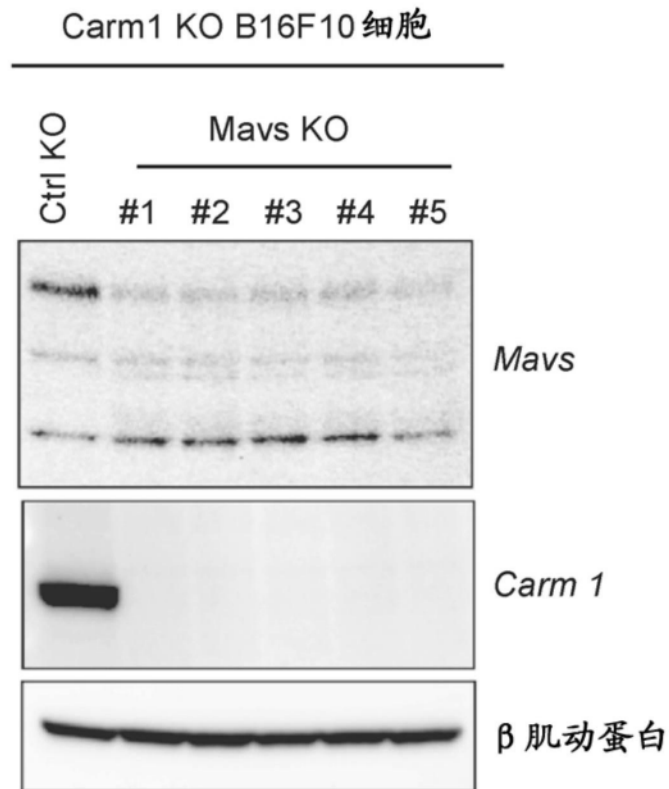


图12A

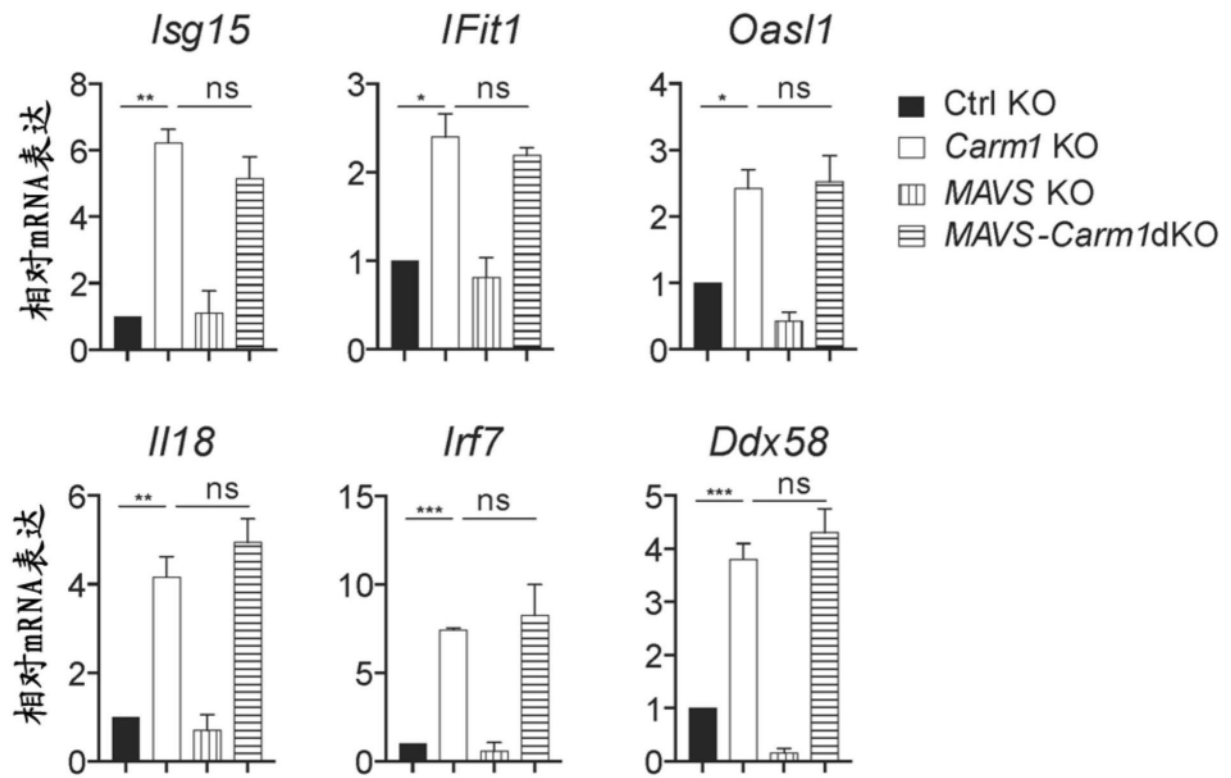


图12B

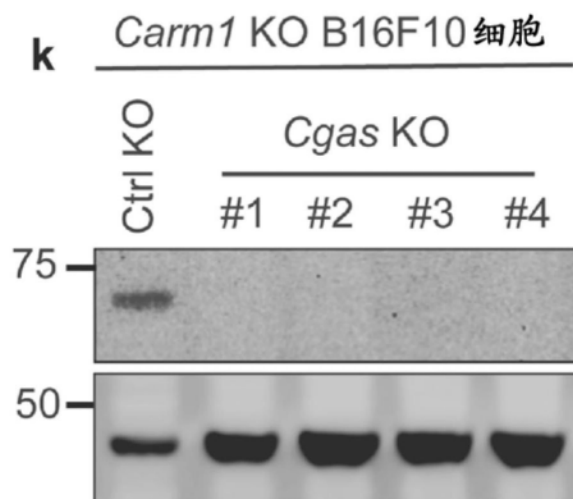


图12C

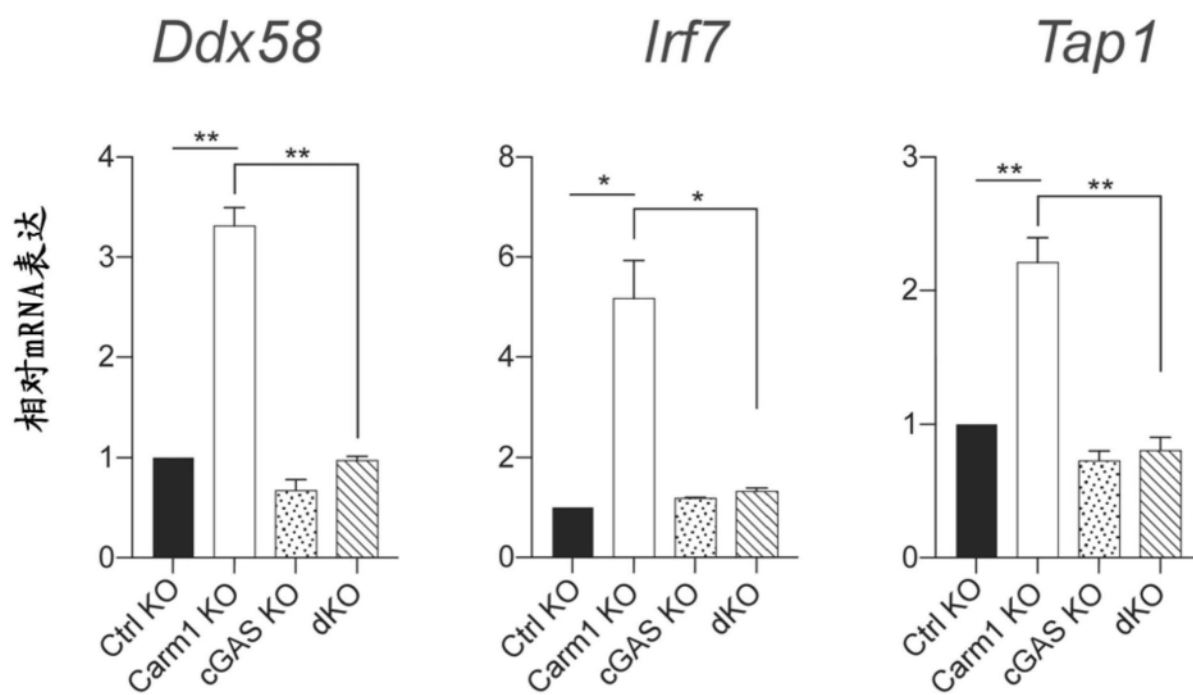


图12D

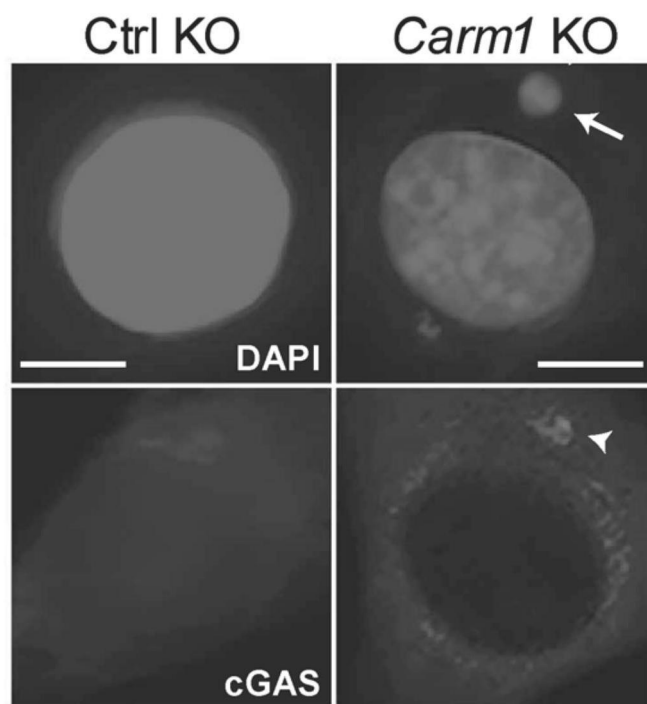


图12E

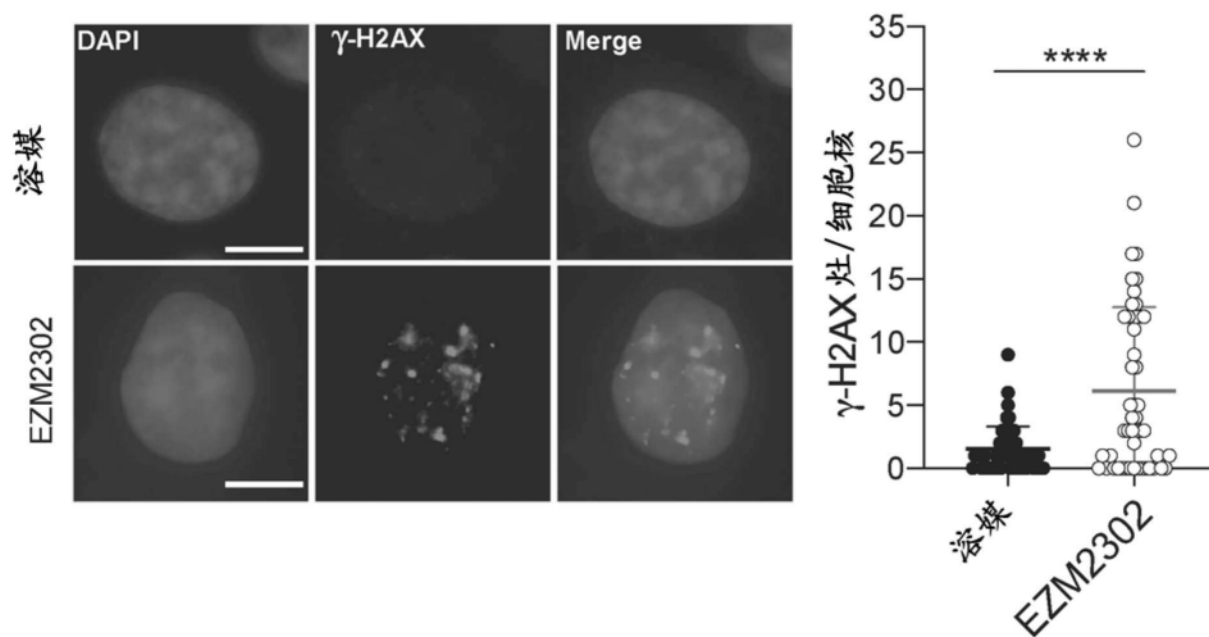


图12F

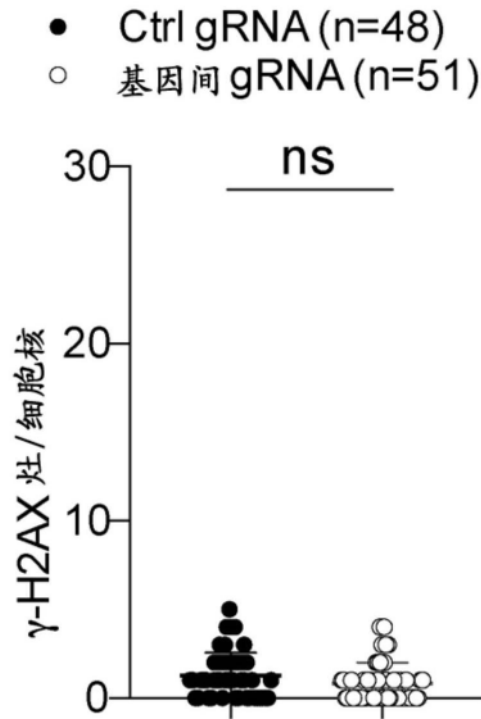


图12G

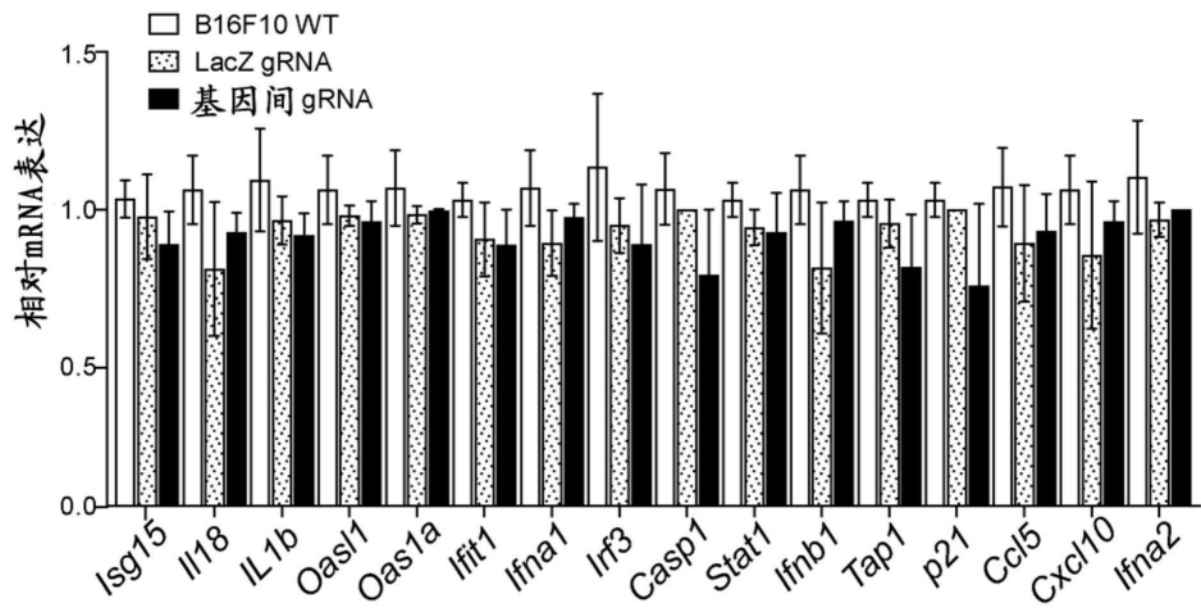


图12H

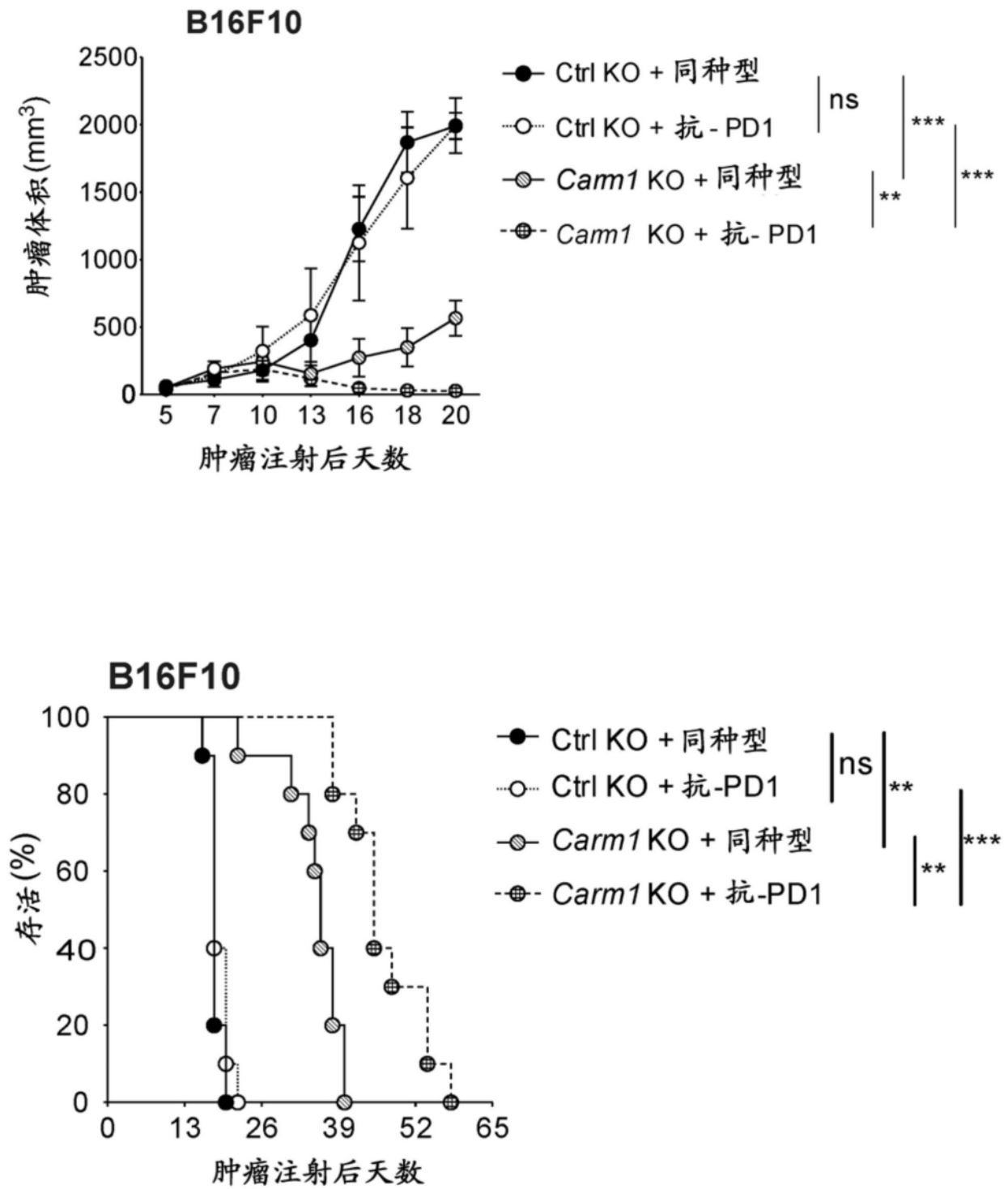


图13A

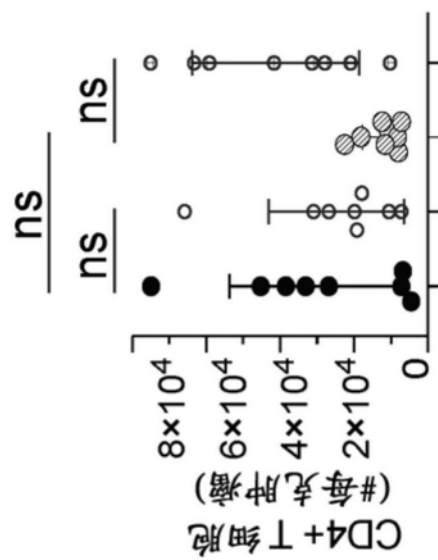


图13B

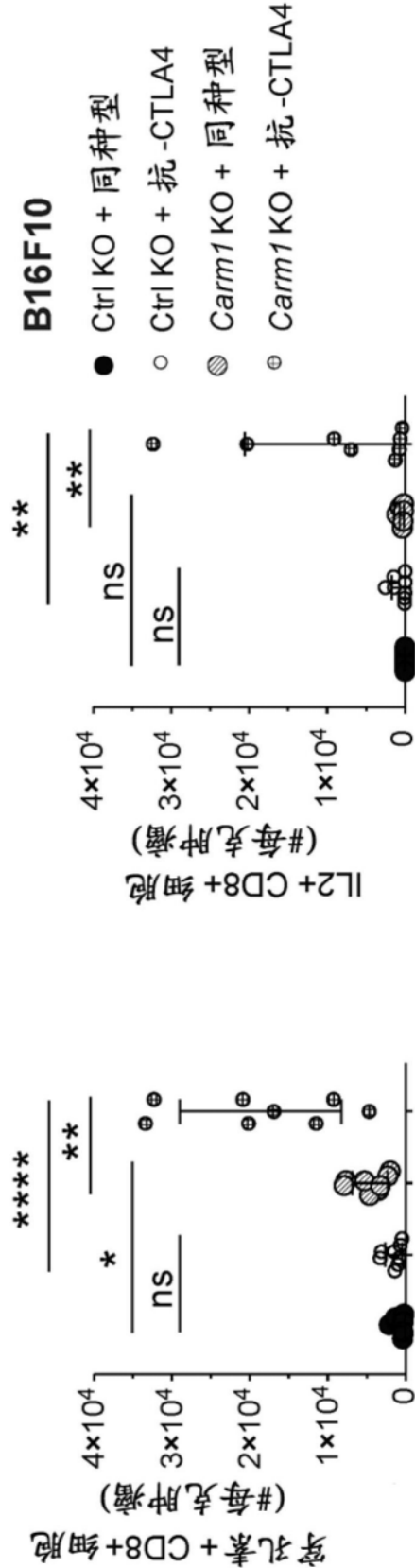


图13C

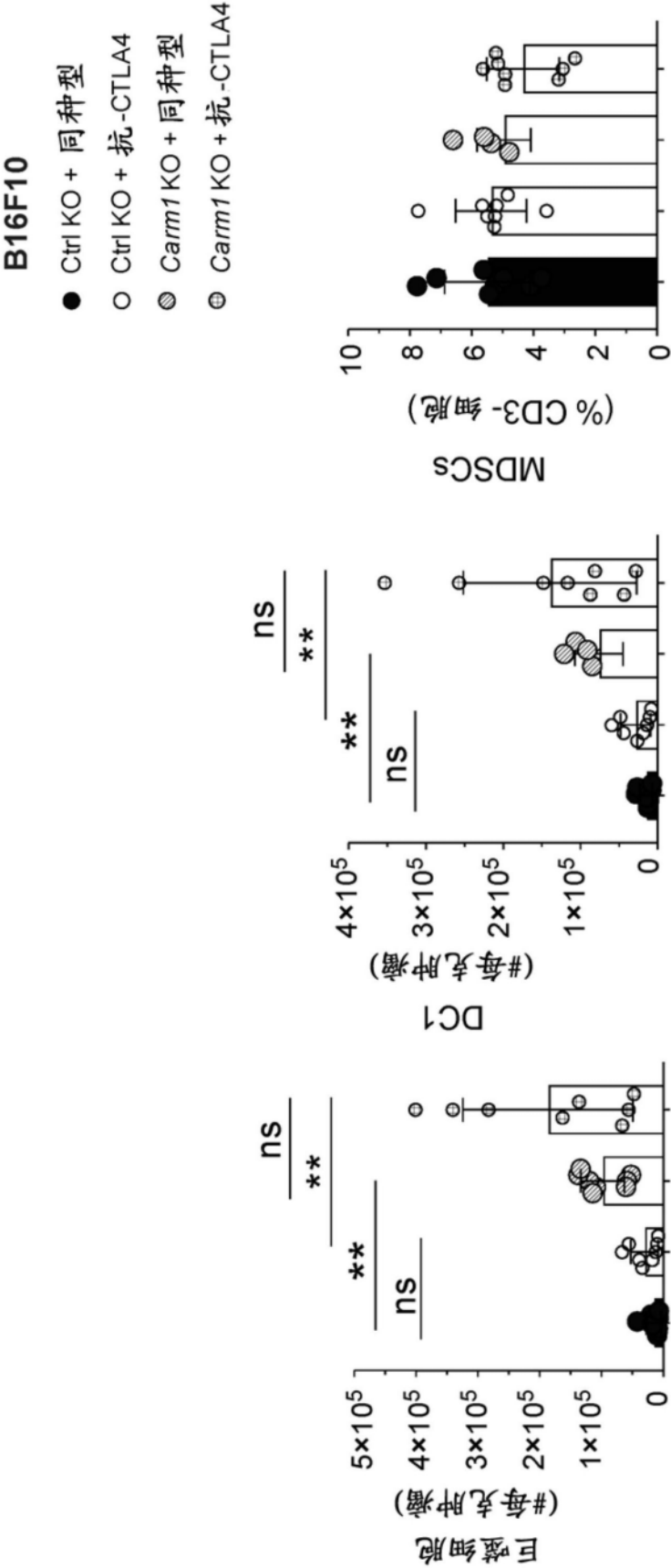


图13D

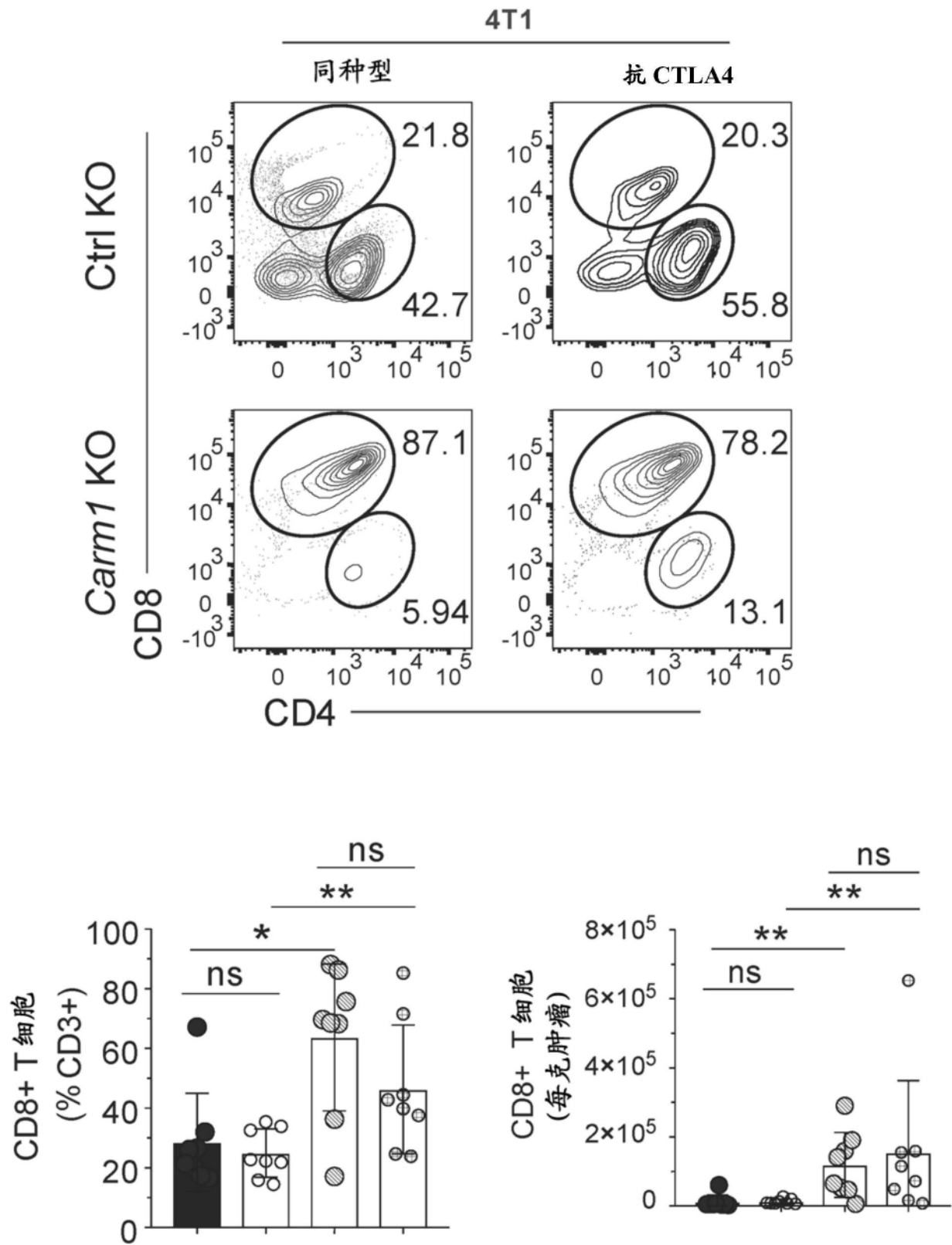


图13E

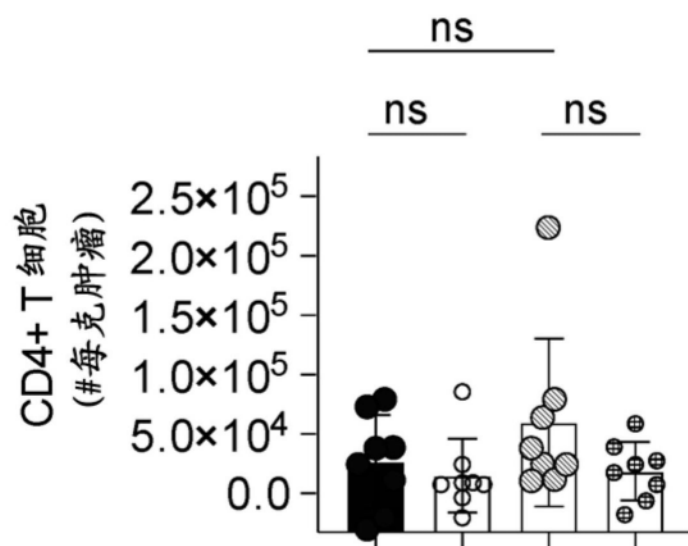


图13F

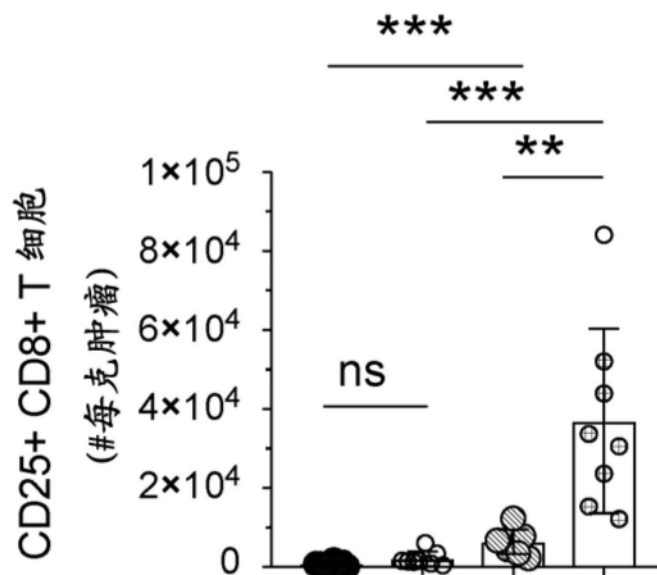


图13G

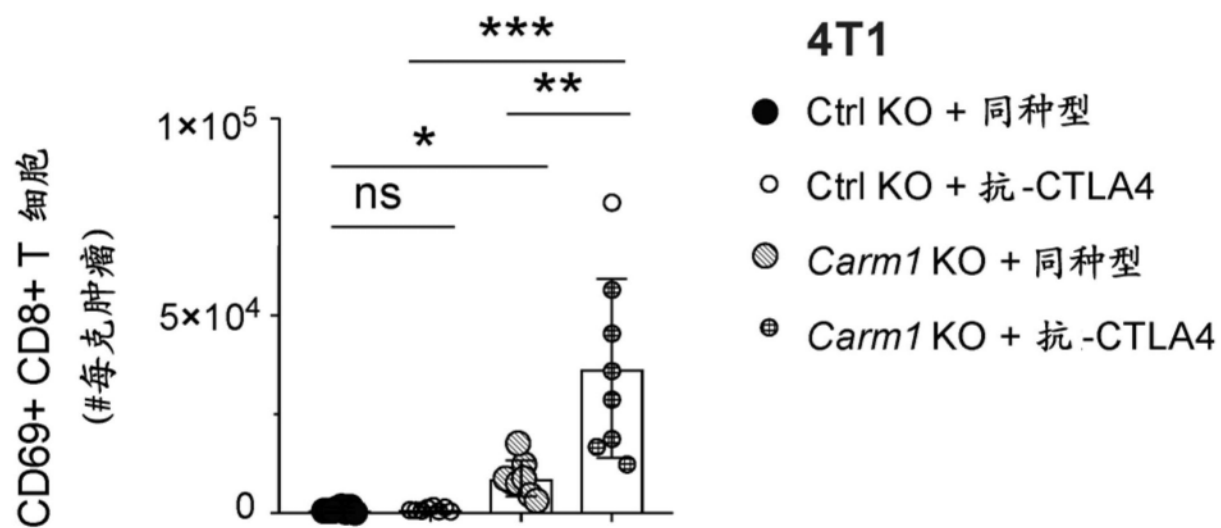


图13H

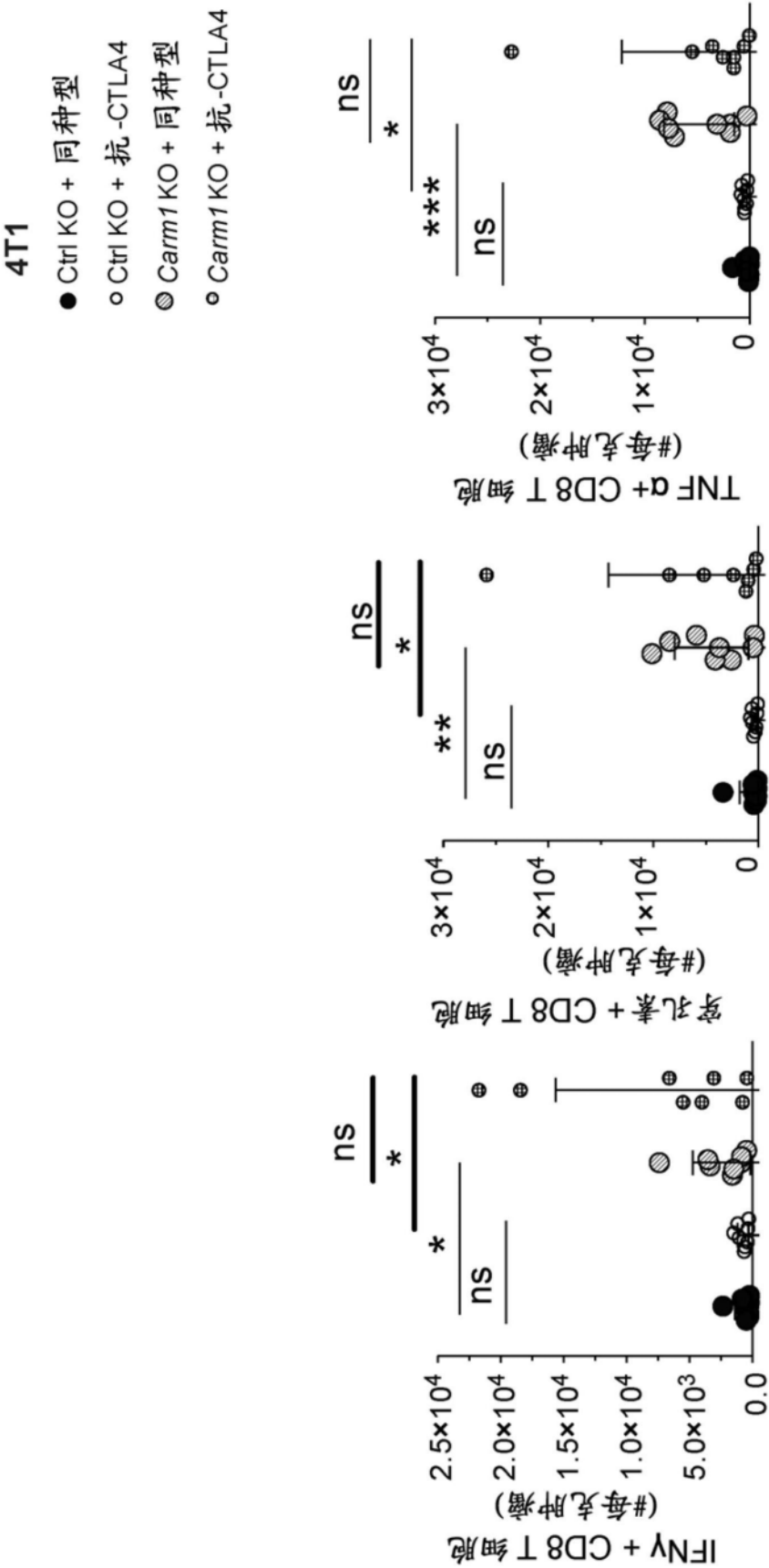


图13I

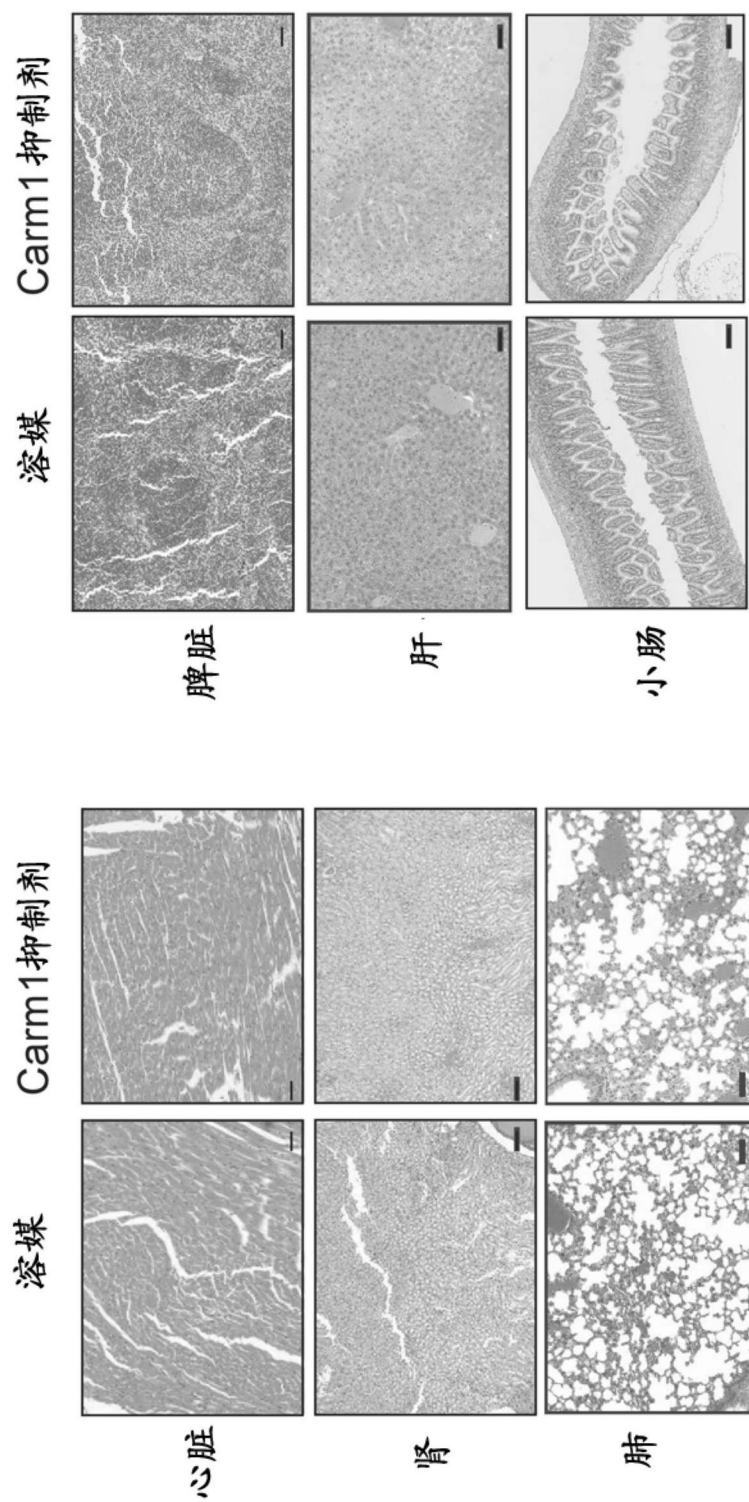


图14A

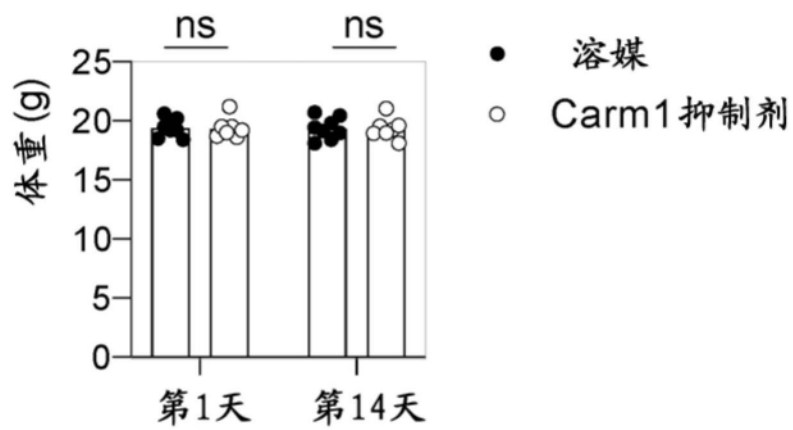
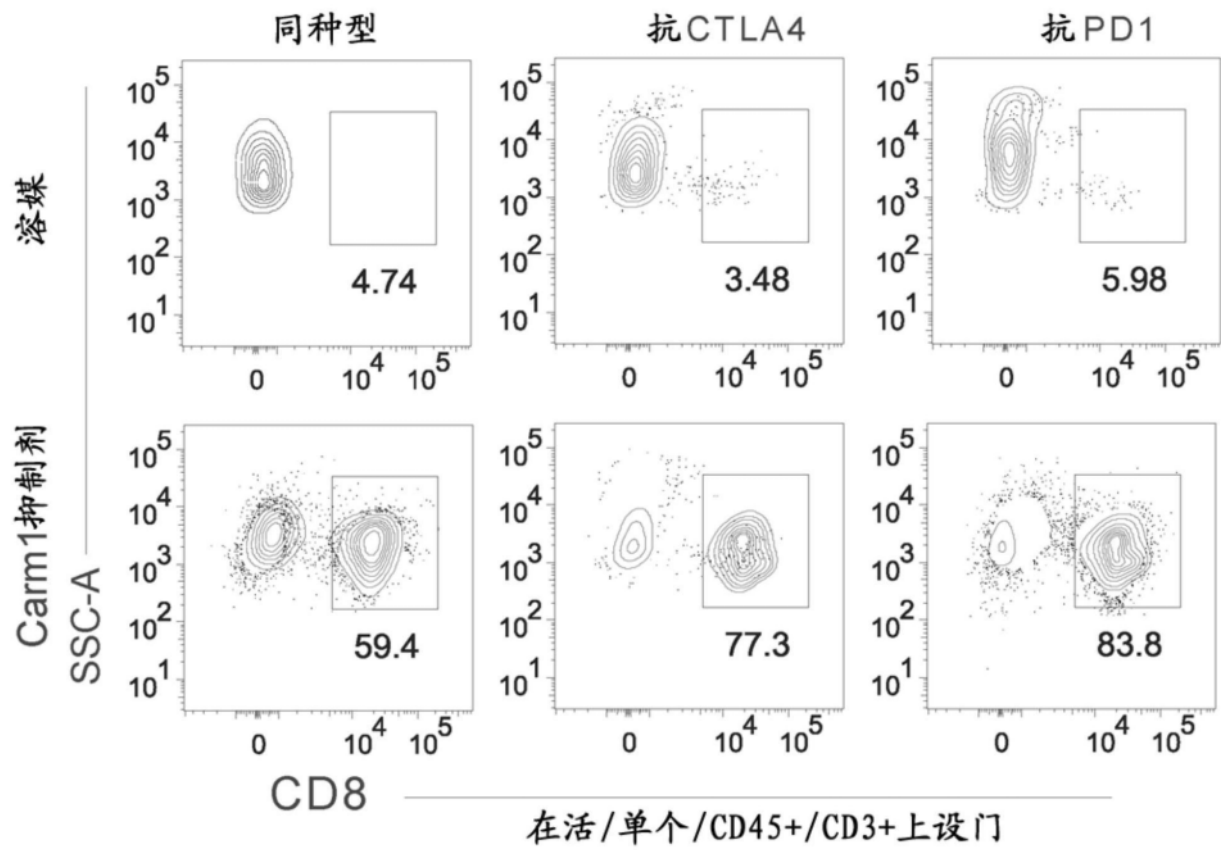


图14B



- 溶媒 + 同种型
- 抗-CTLA4 + 溶媒
- 抗-PD1 + 溶媒
- Carm1抑制剂+ 同种型
- ⊗ Carm1抑制剂+ 抗-CTLA4
- ⊗ Carm1抑制剂+ 抗-PD1

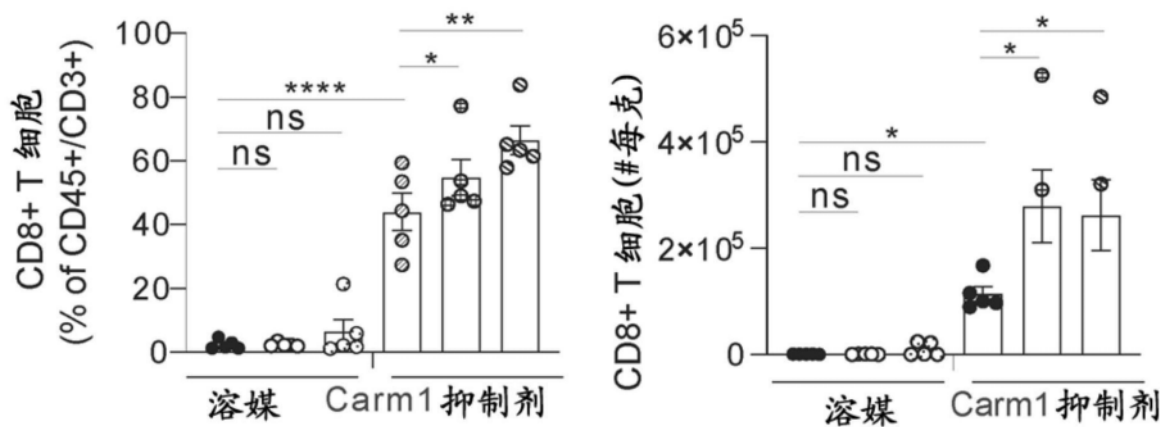


图15A

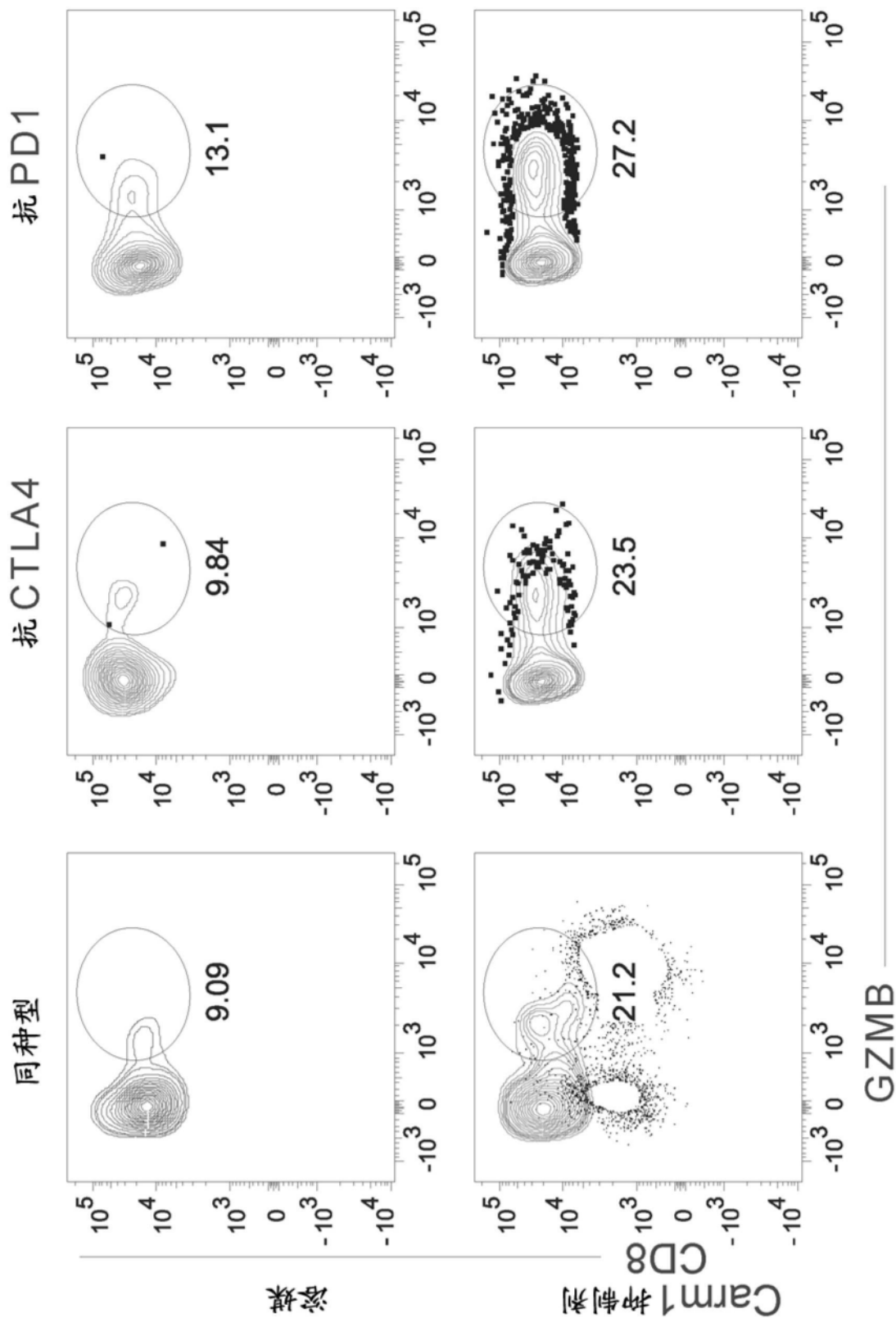


图15B

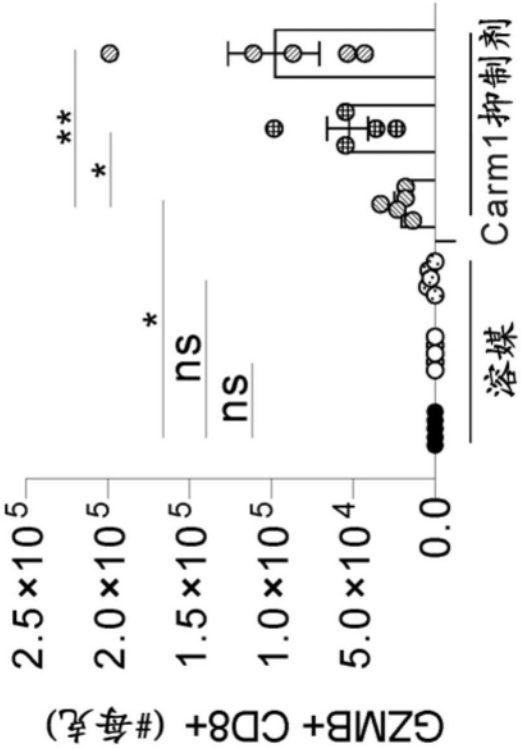


图15B续

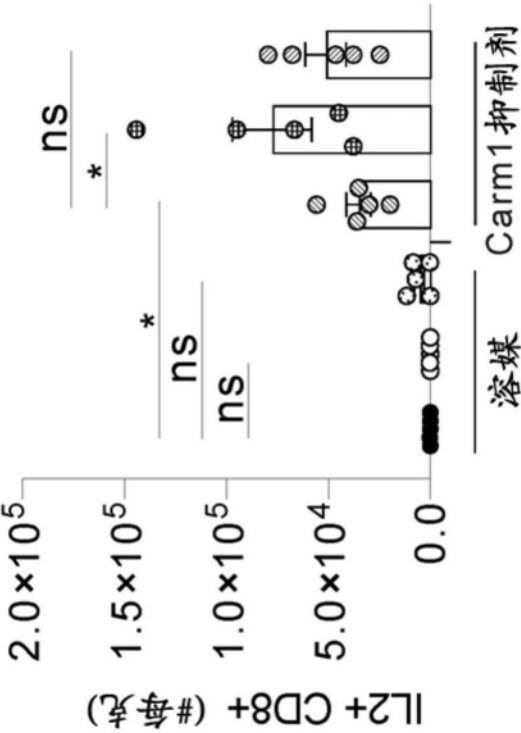


图15C

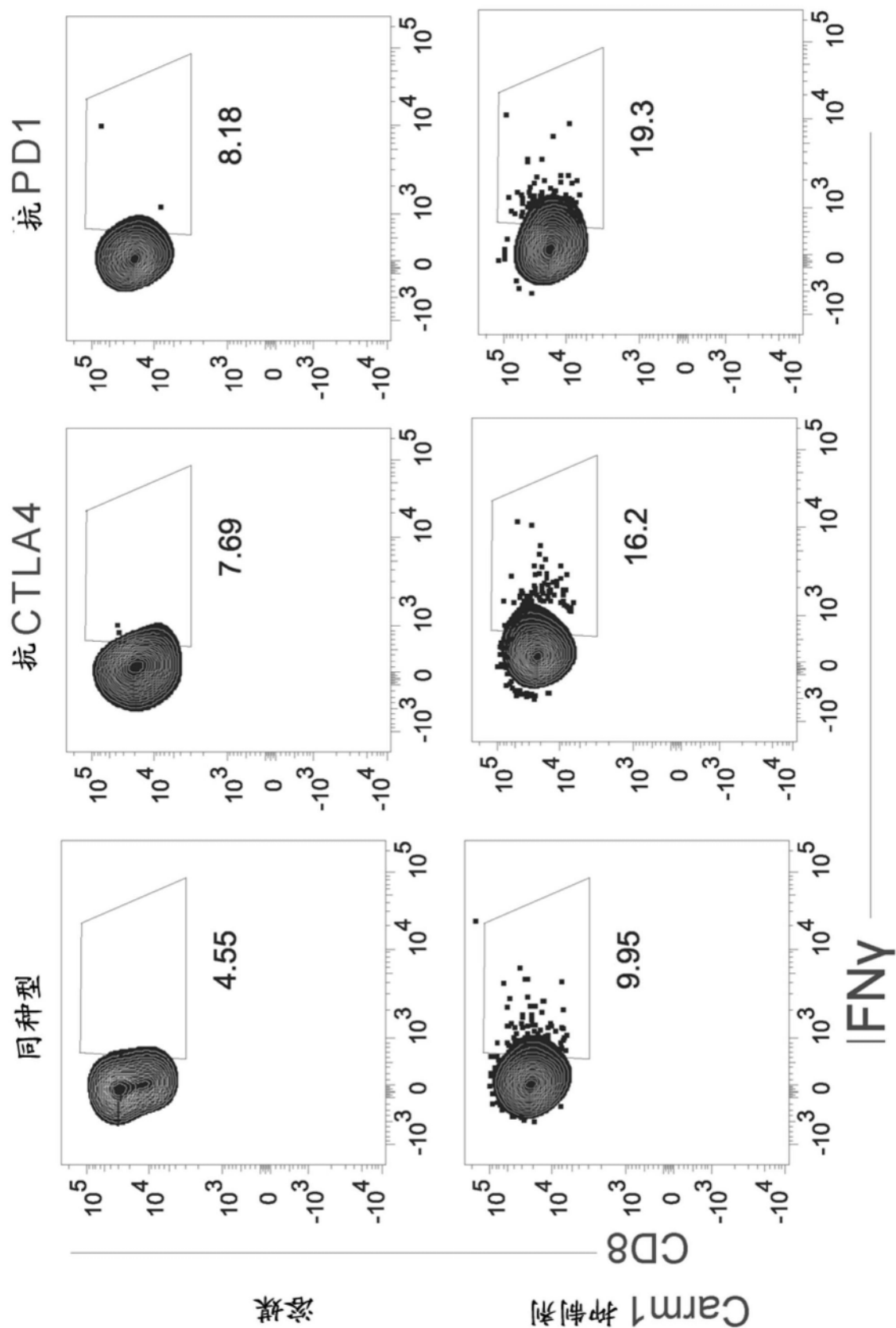


图15D

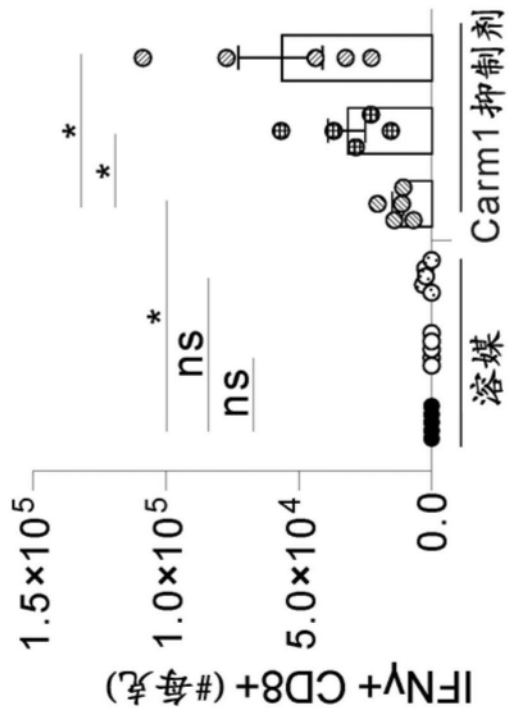


图15D续

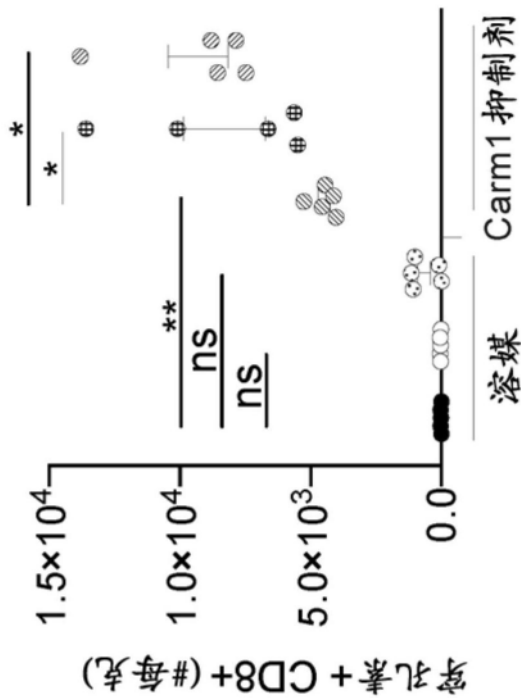


图15E

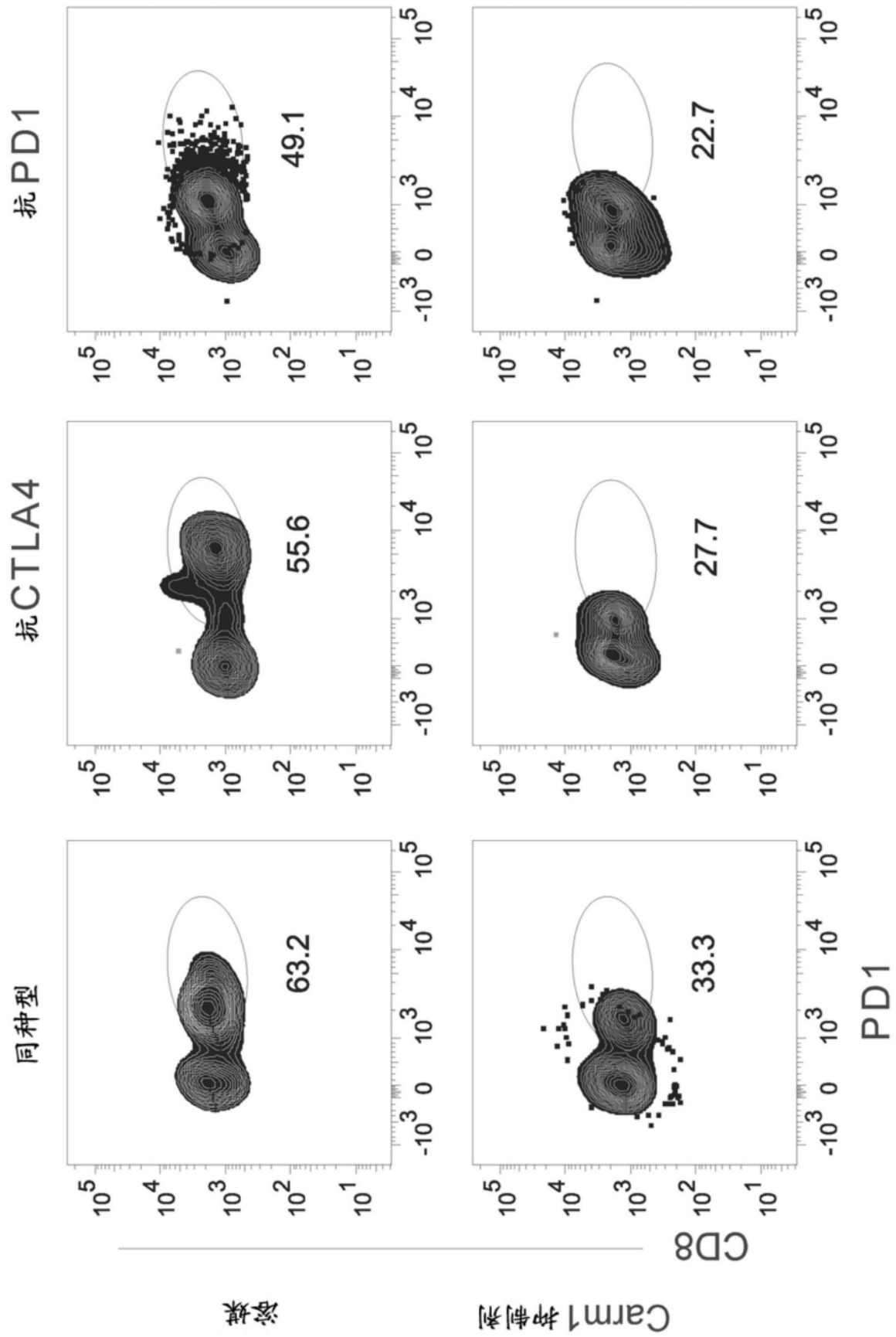


图15F

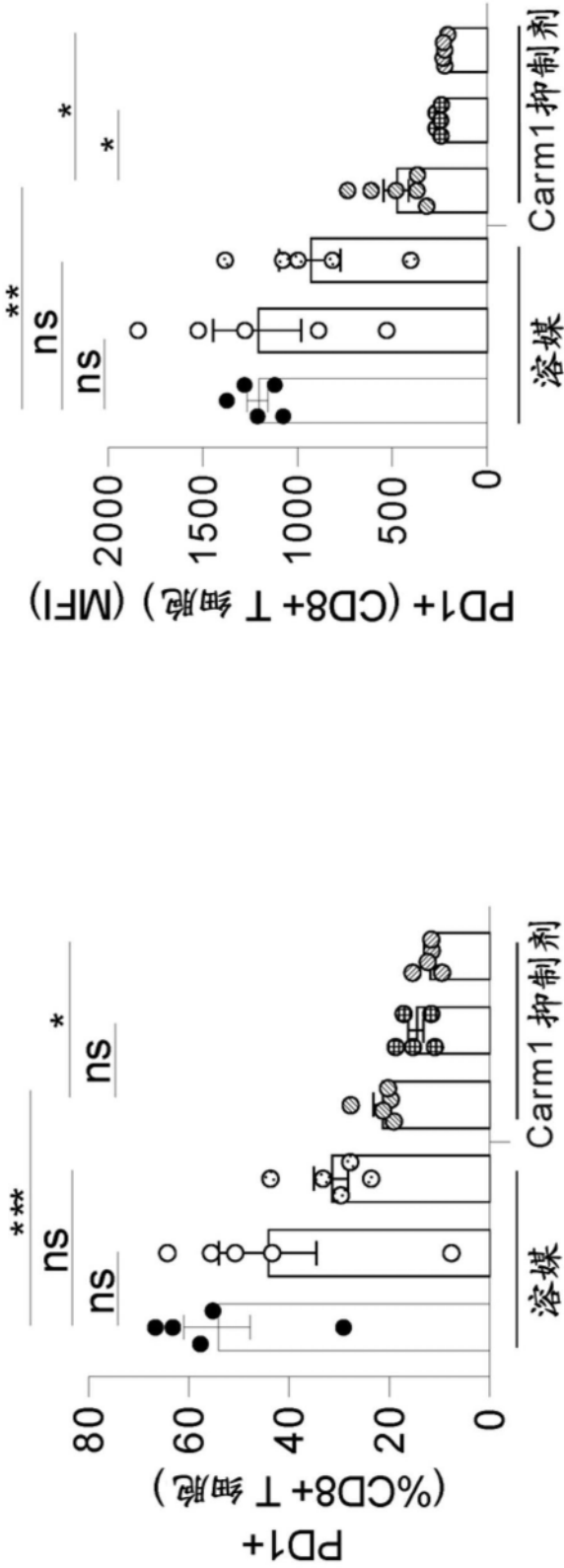


图15F续

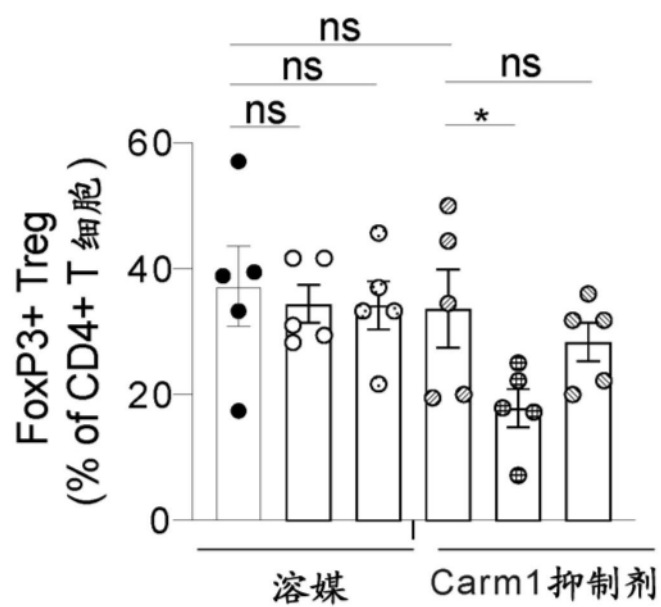


图16C

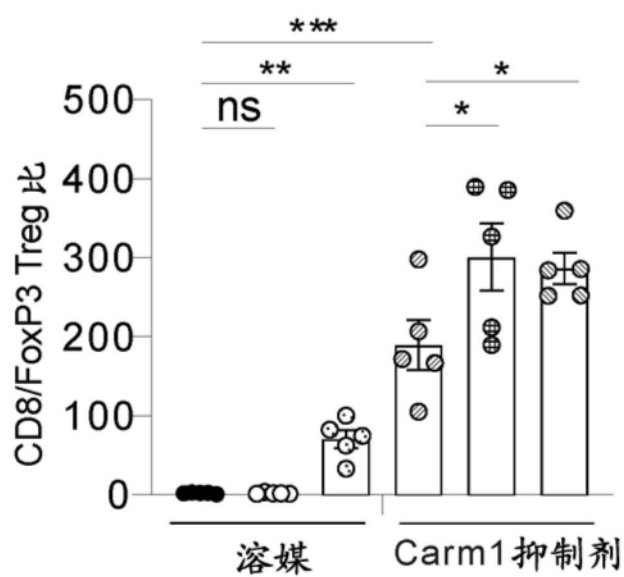


图16D

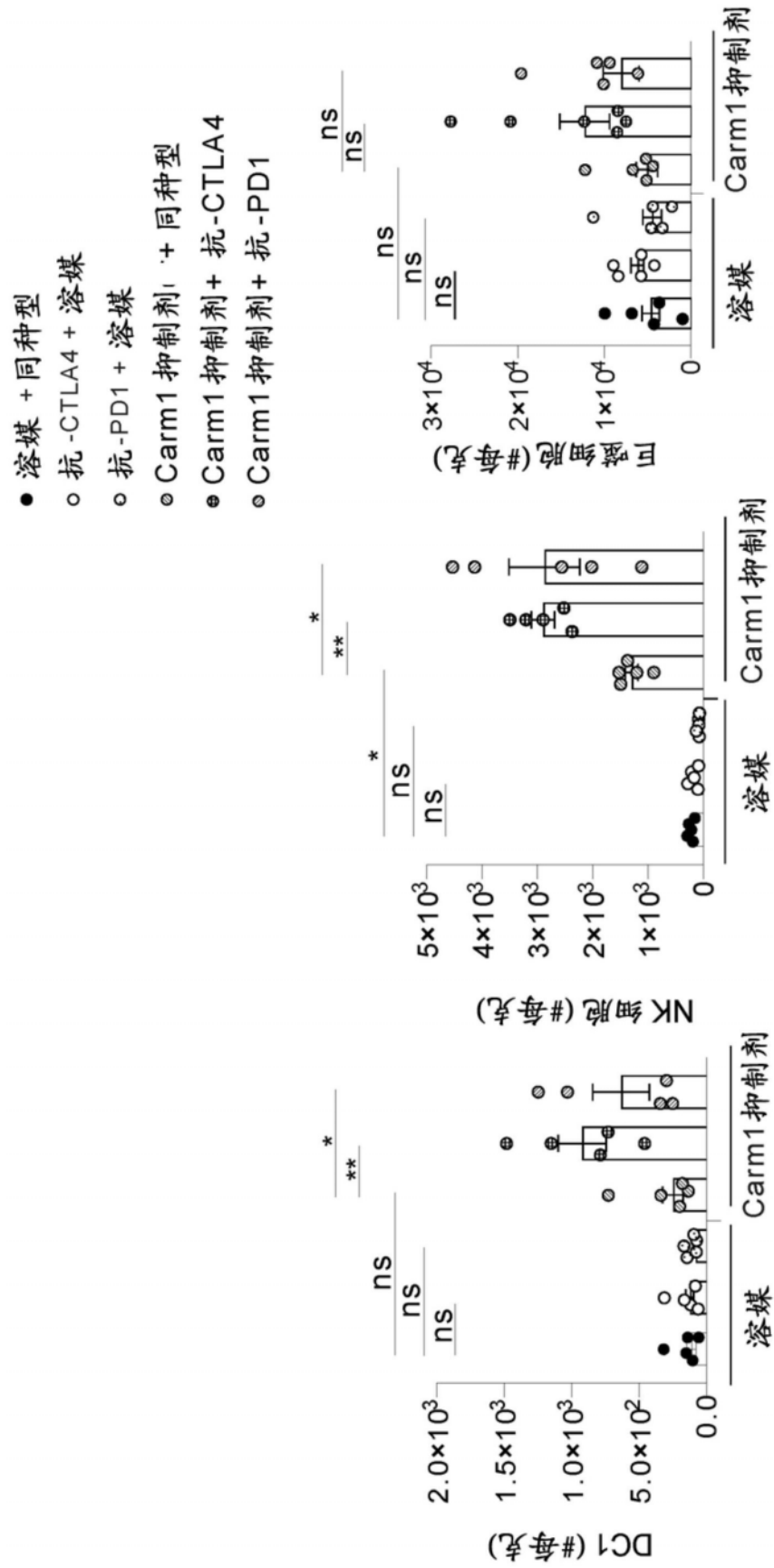


图16E

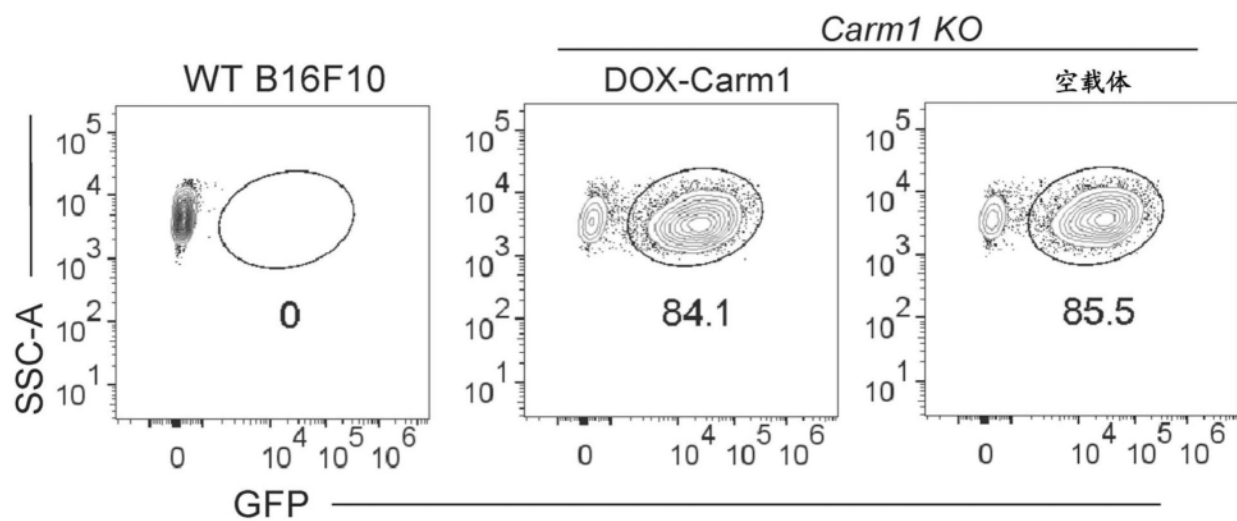


图17A

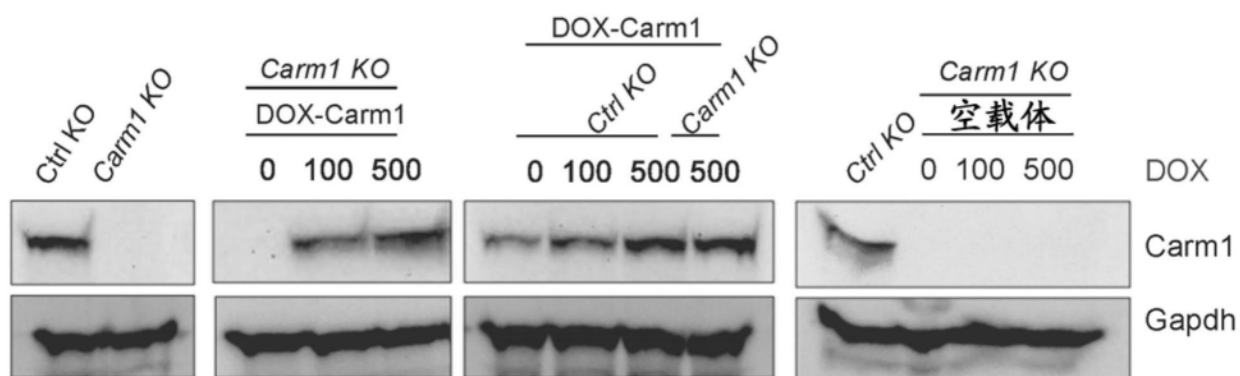


图17B

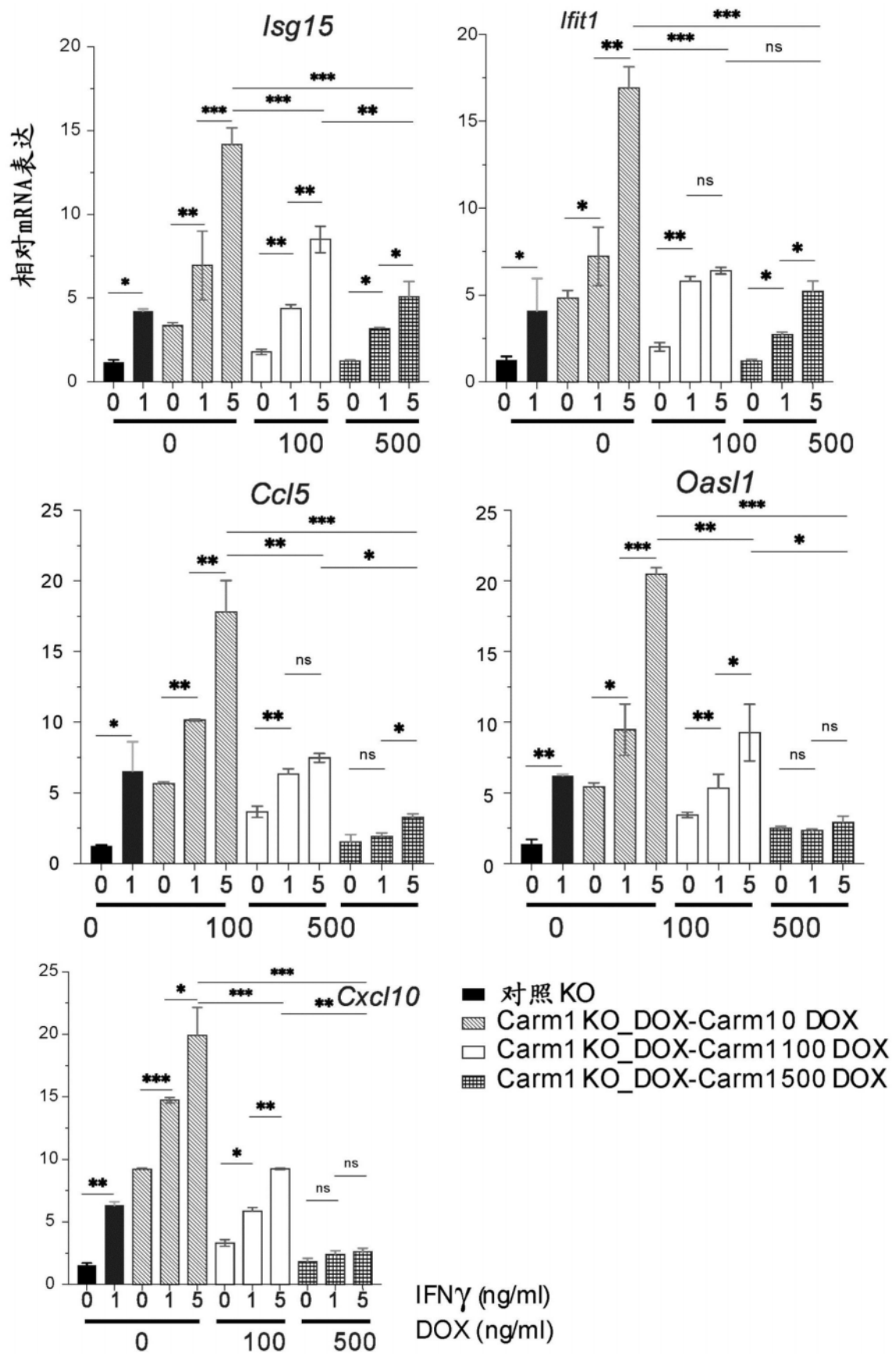


图17C

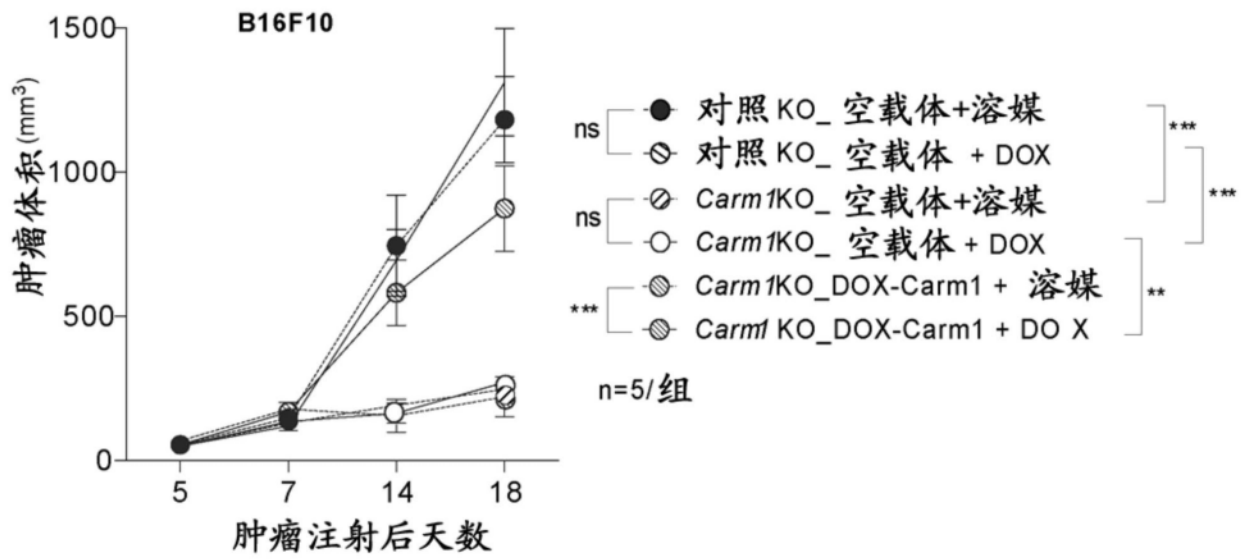


图17D

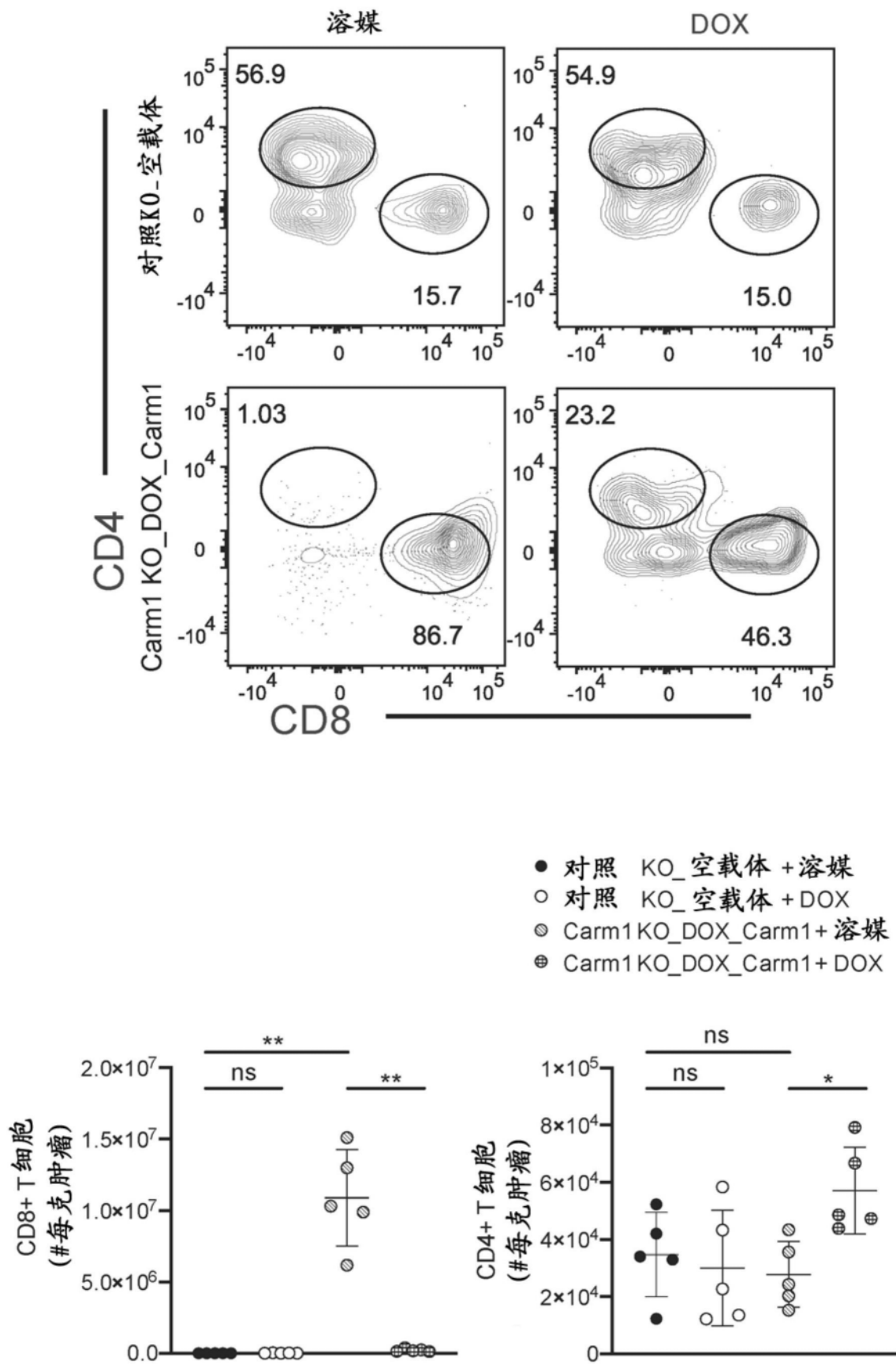
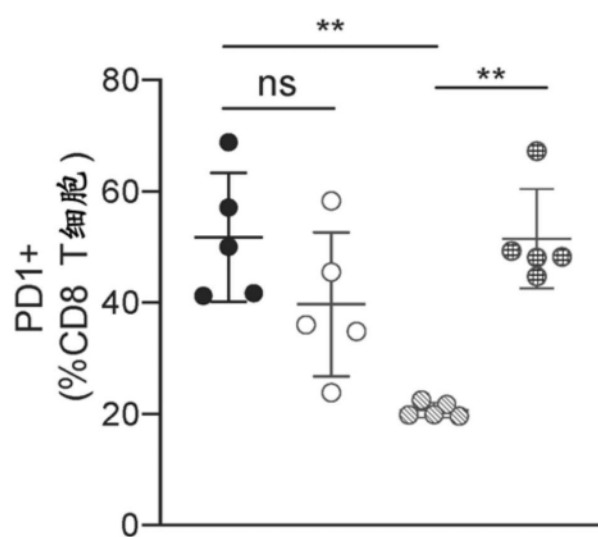


图18A



227

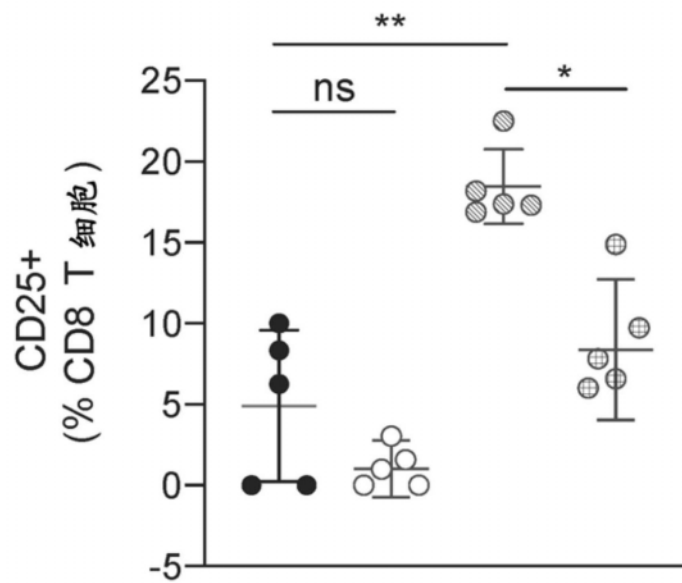
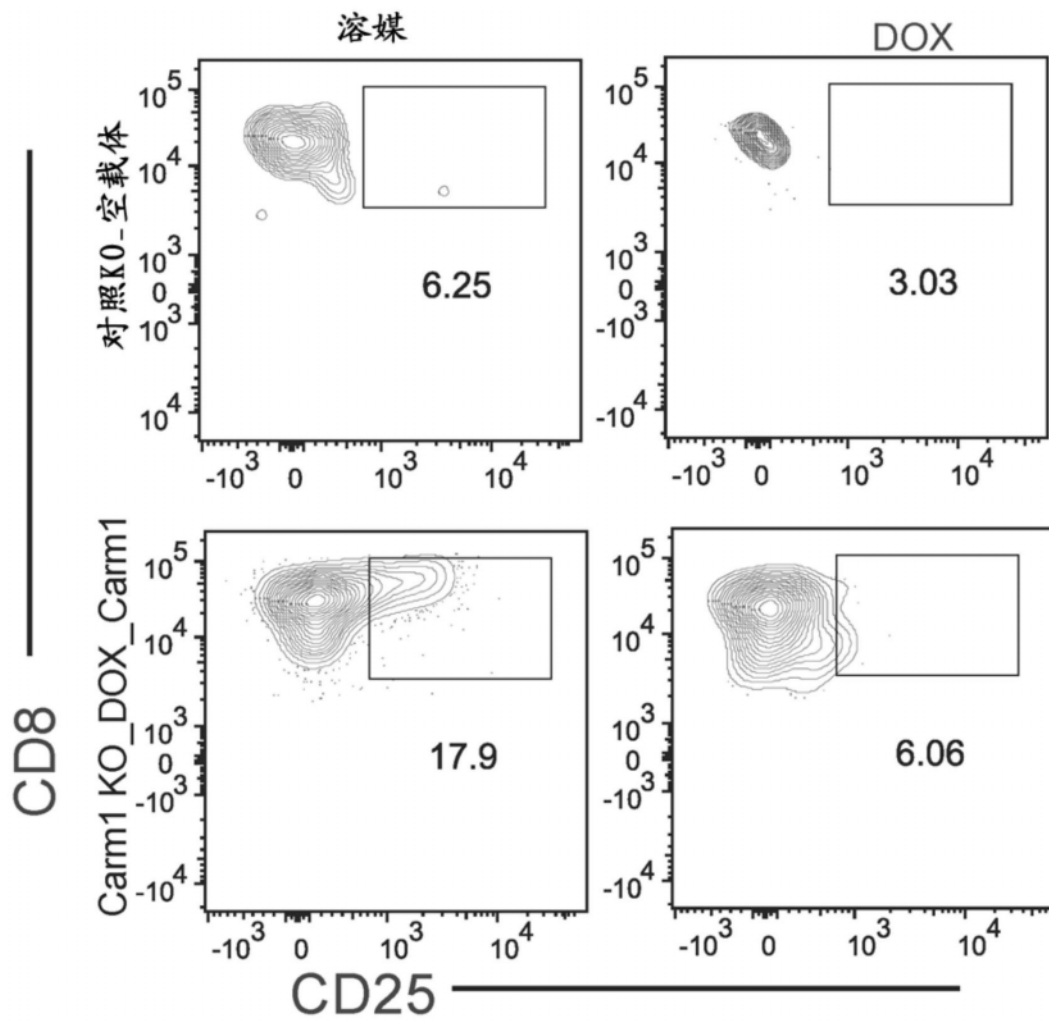


图18C

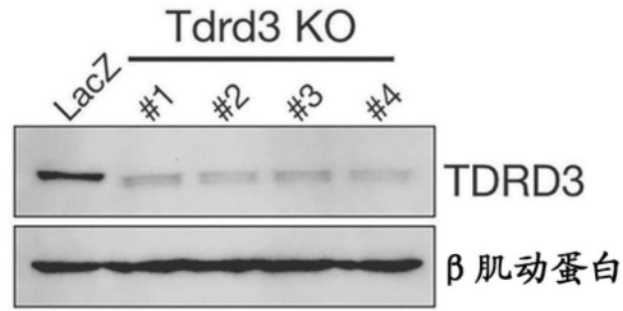


图19A

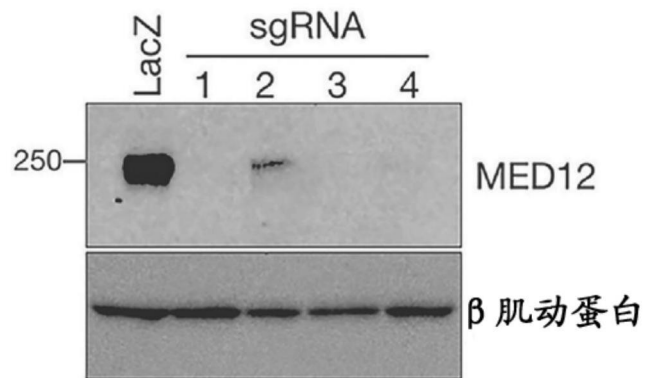


图19B

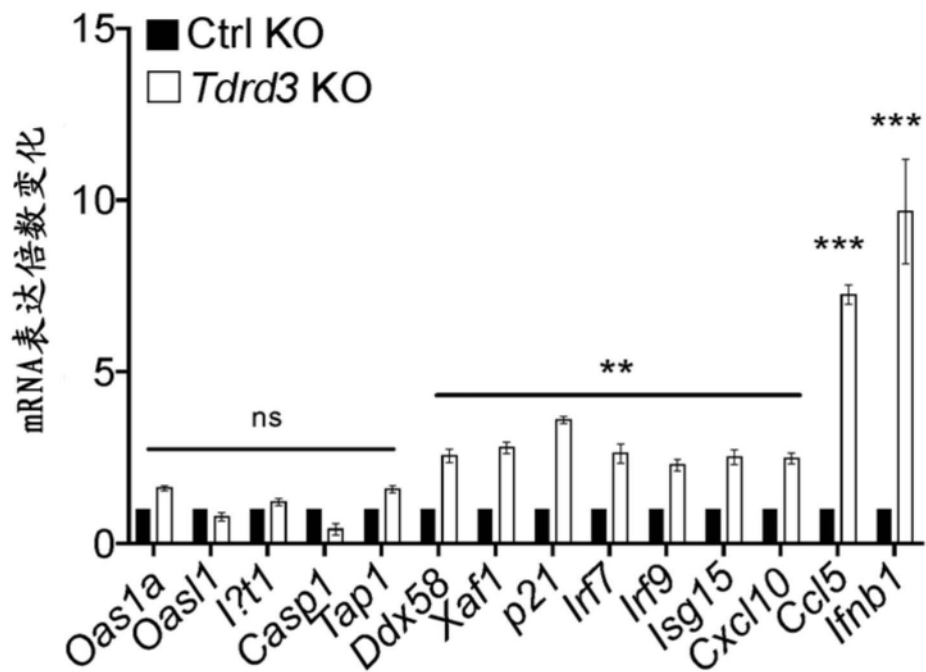


图19C

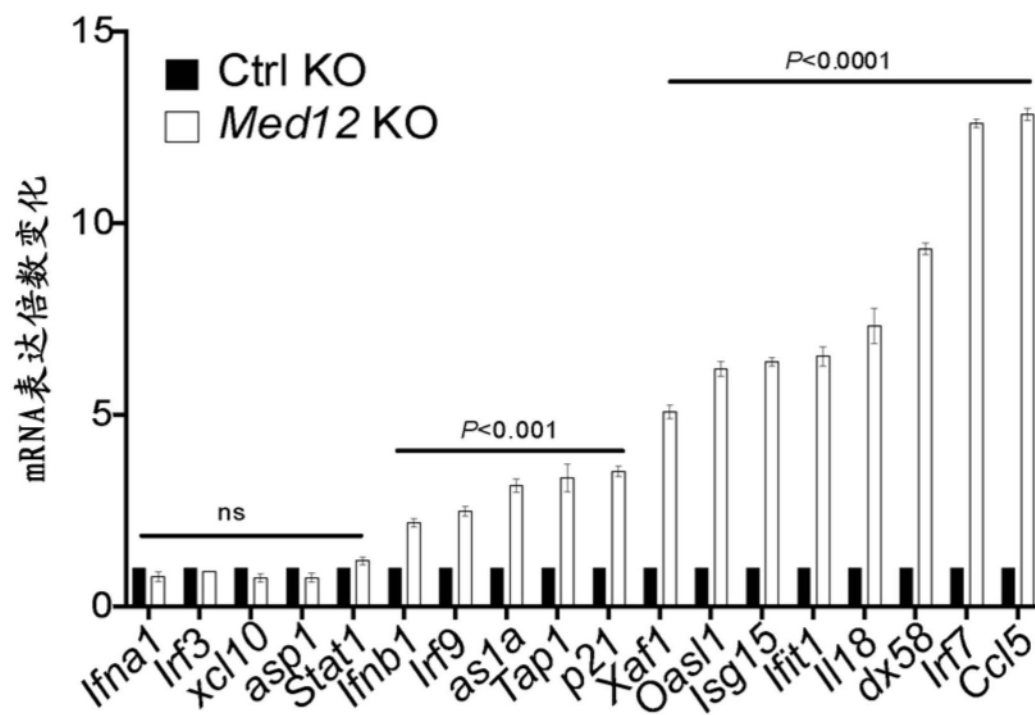


图19D

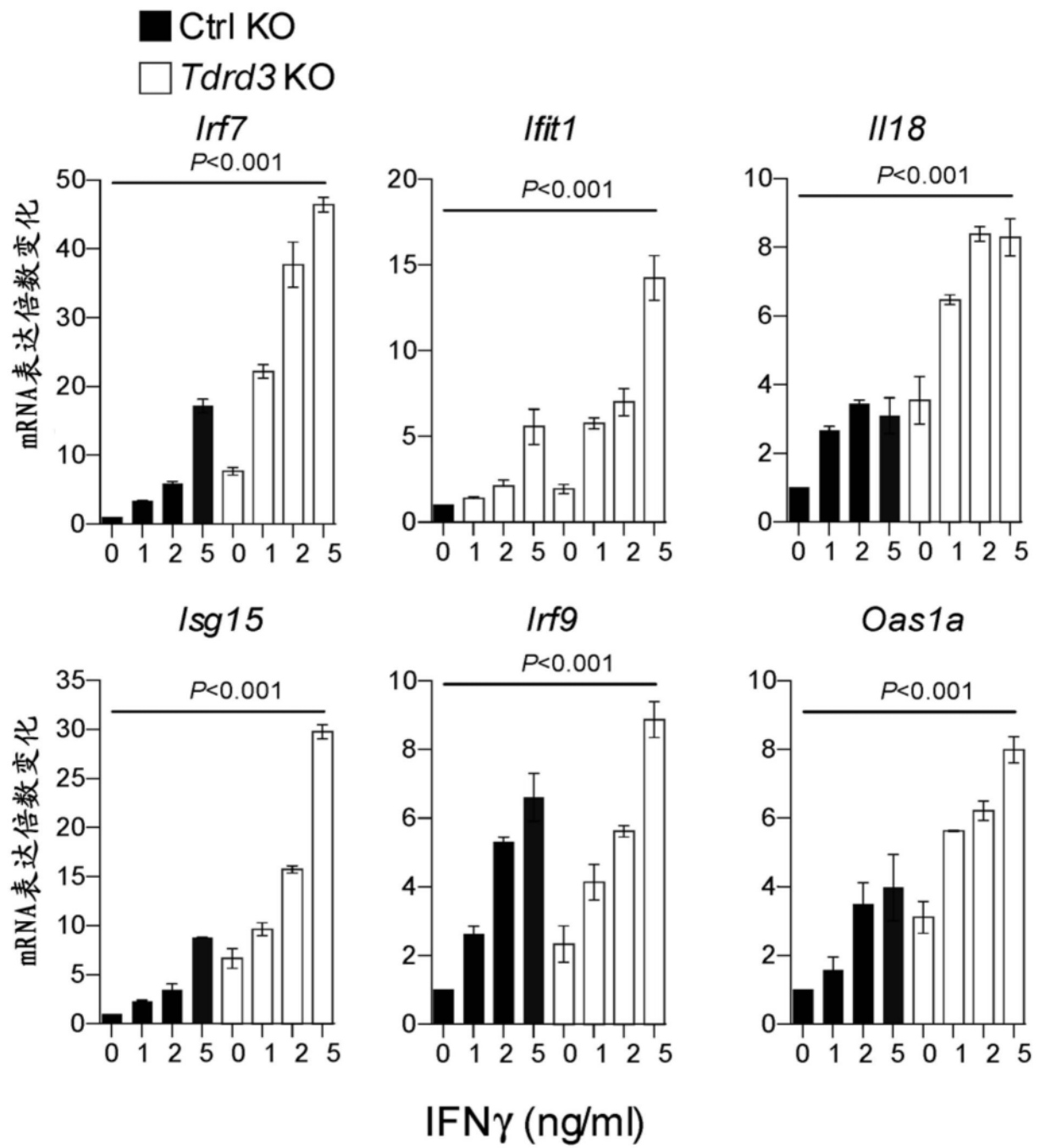


图19E

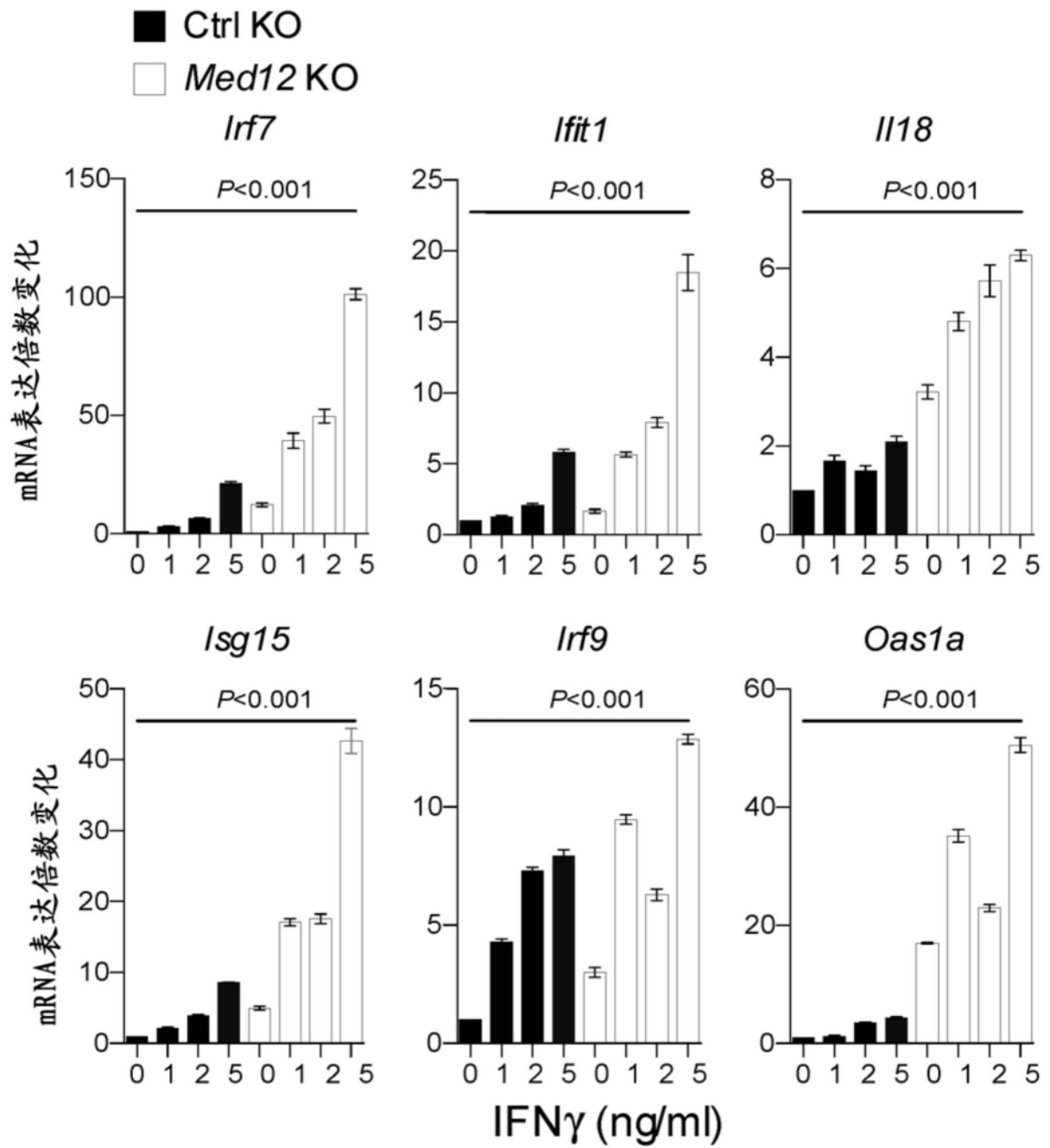


图19F

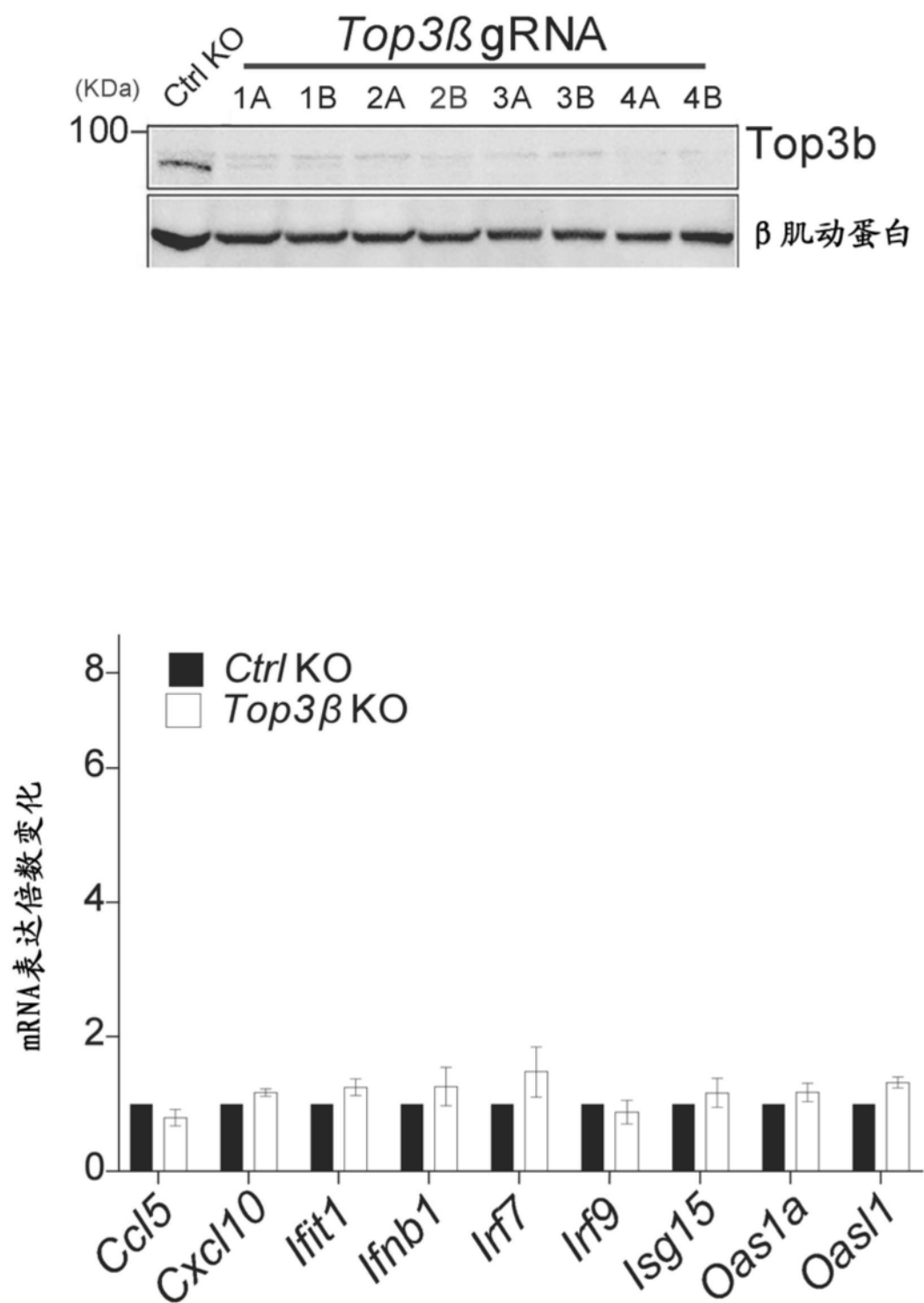


图19G

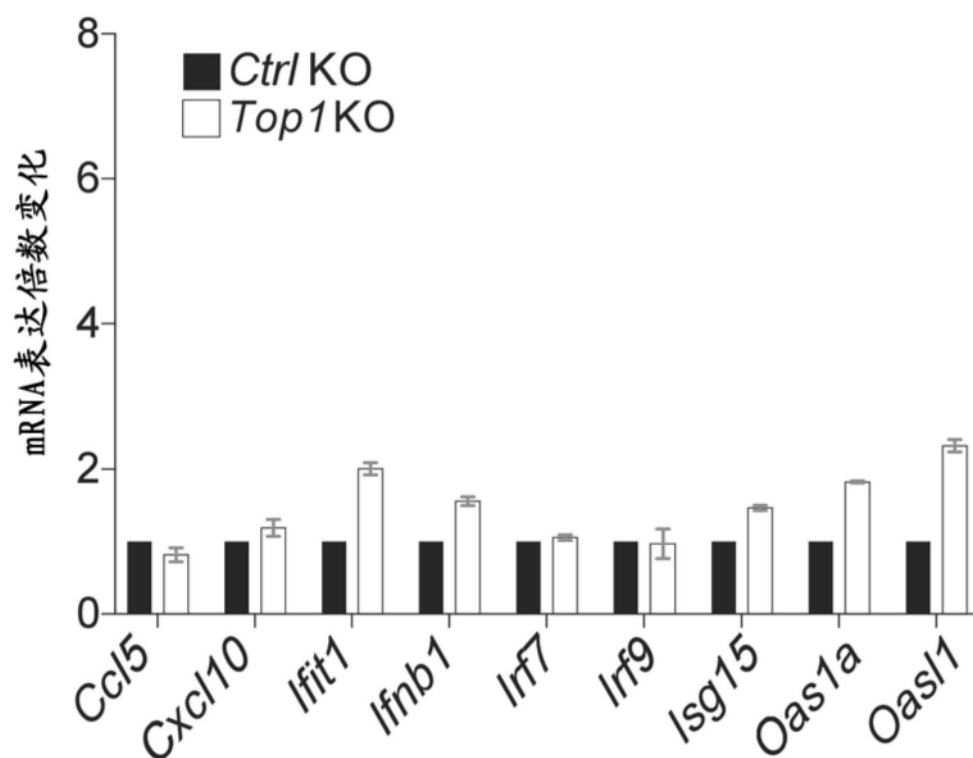
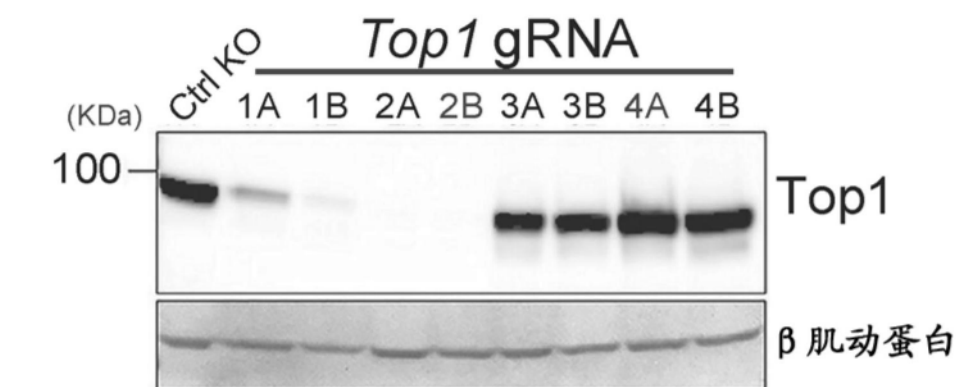


图19H

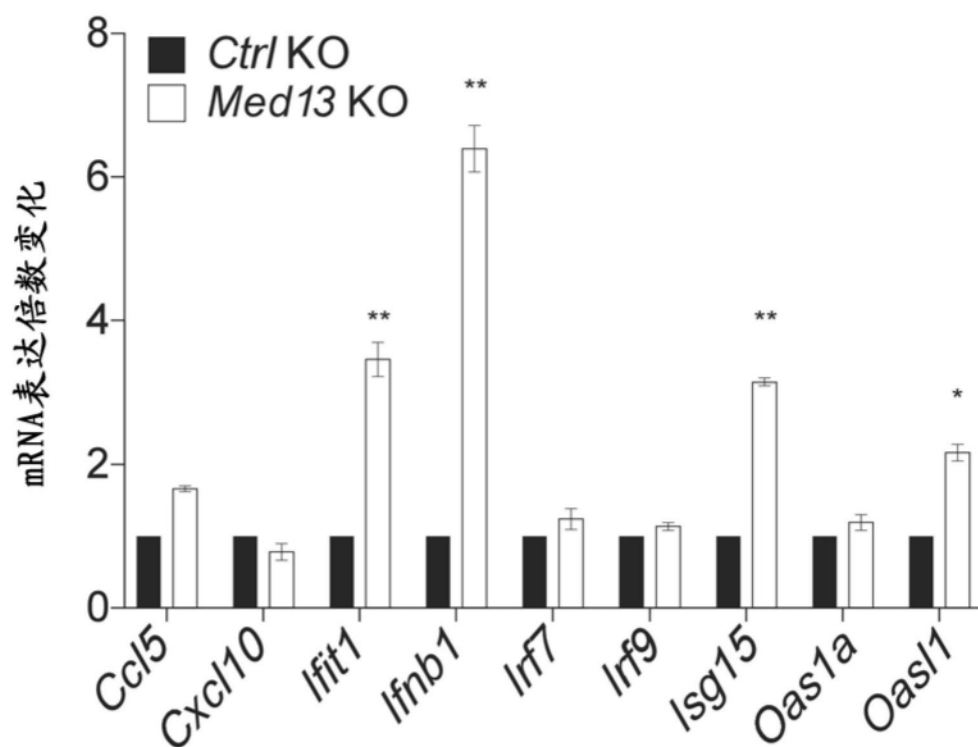
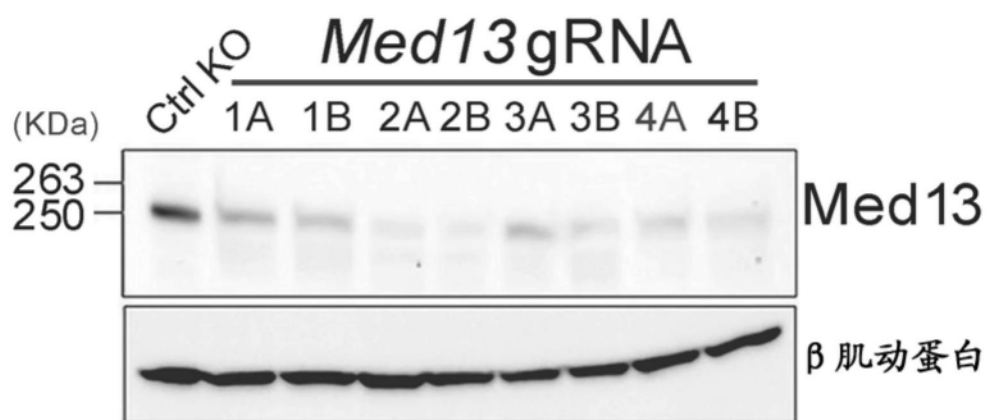


图19I

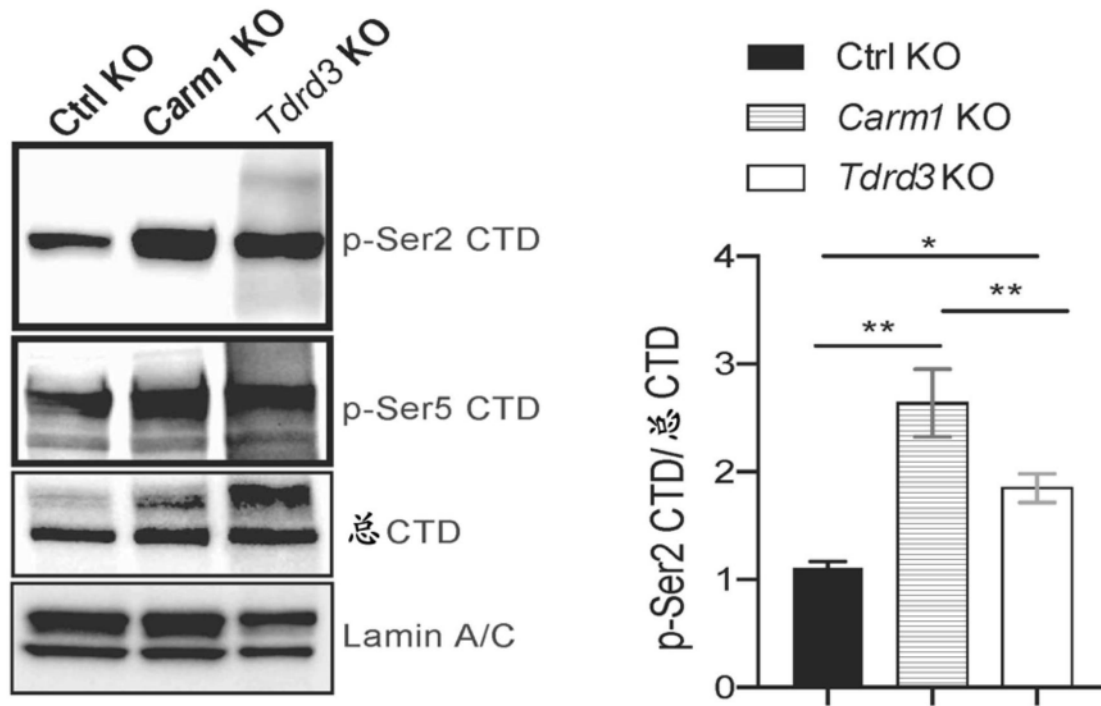


图20A

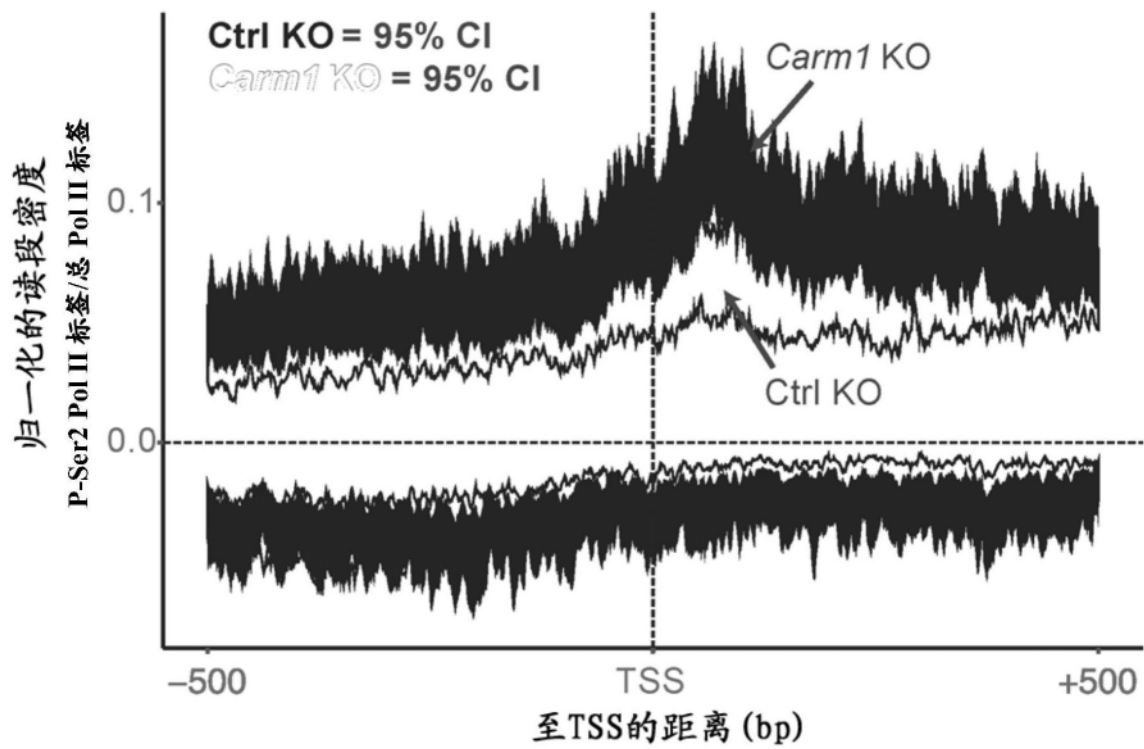


图20B

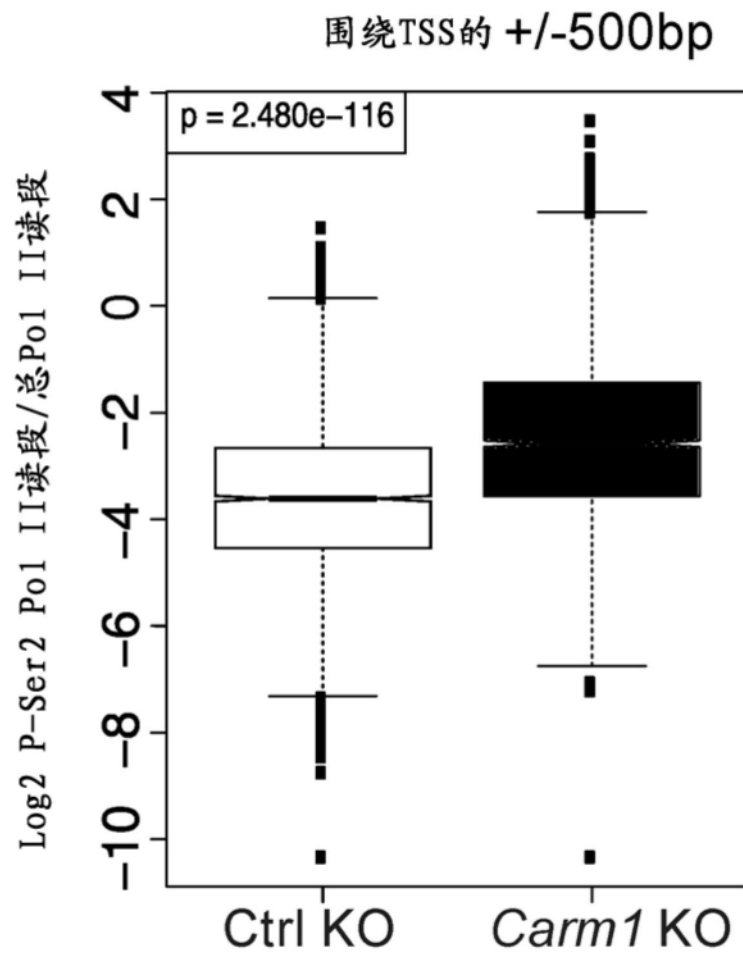


图20C

Carm1 KO中富集的基因

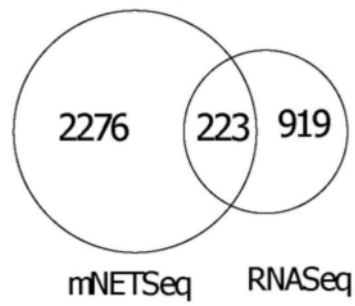


图20D

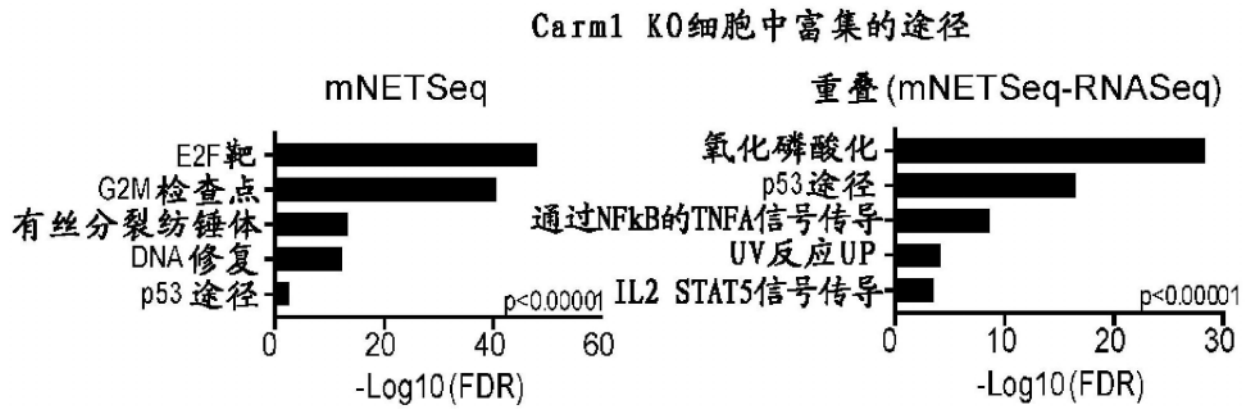


图20E

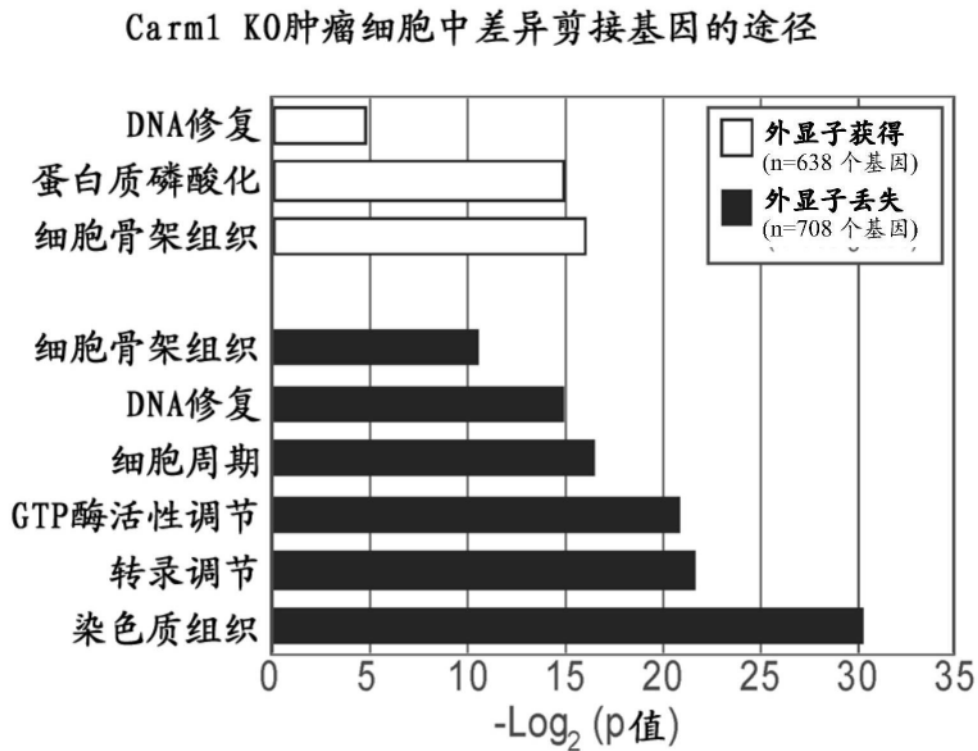


图20F

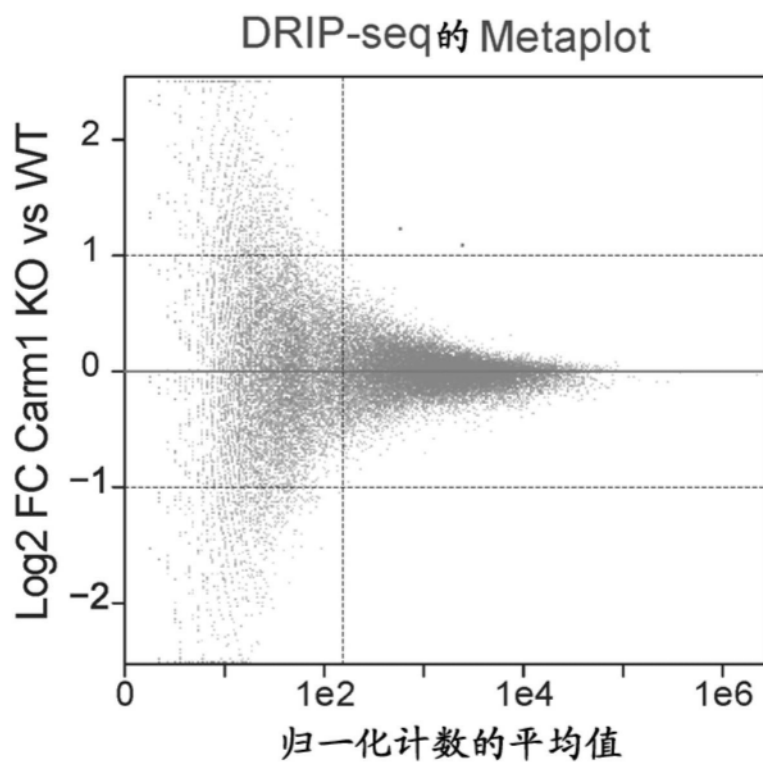


图20G

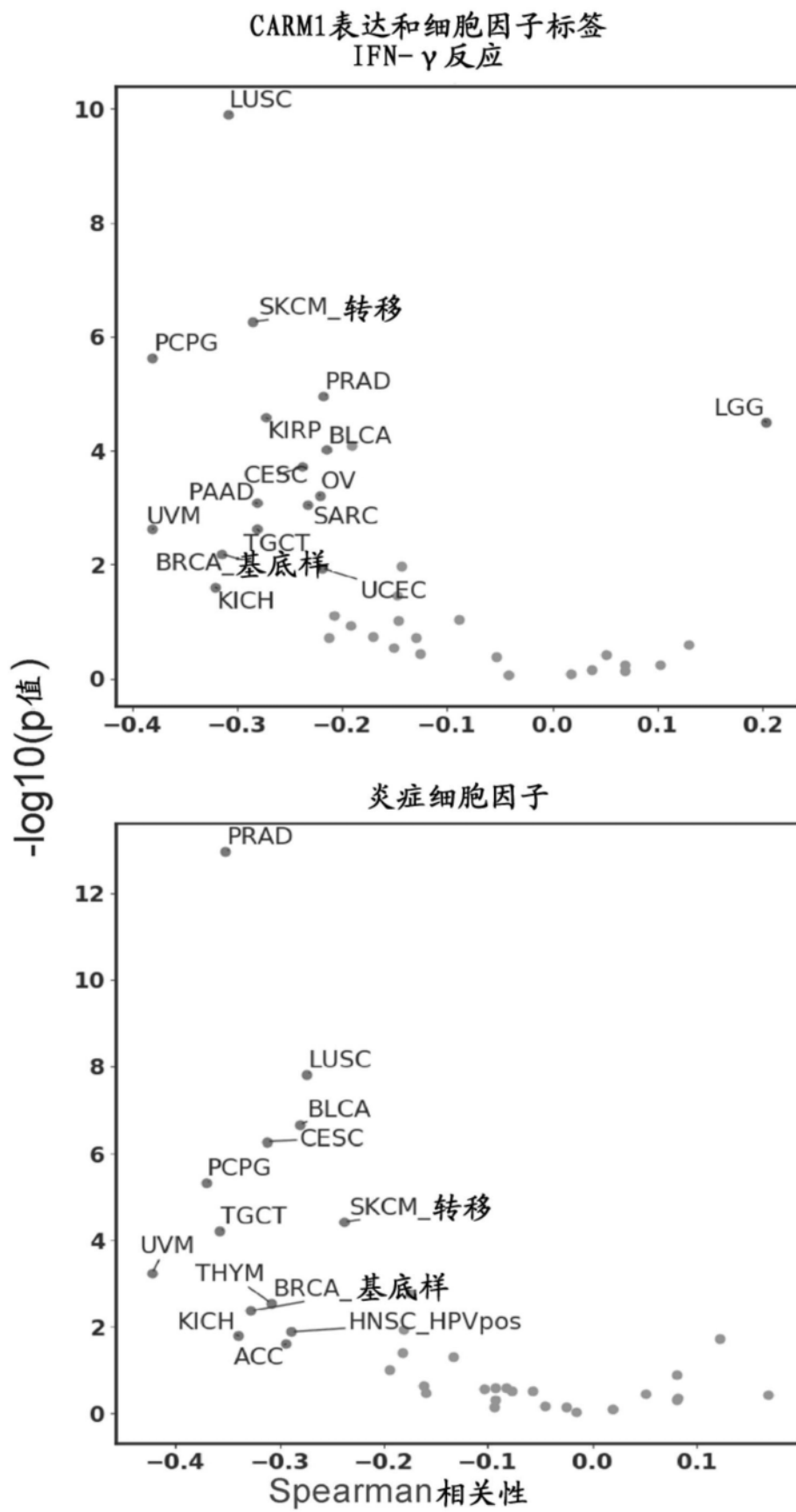


图21A

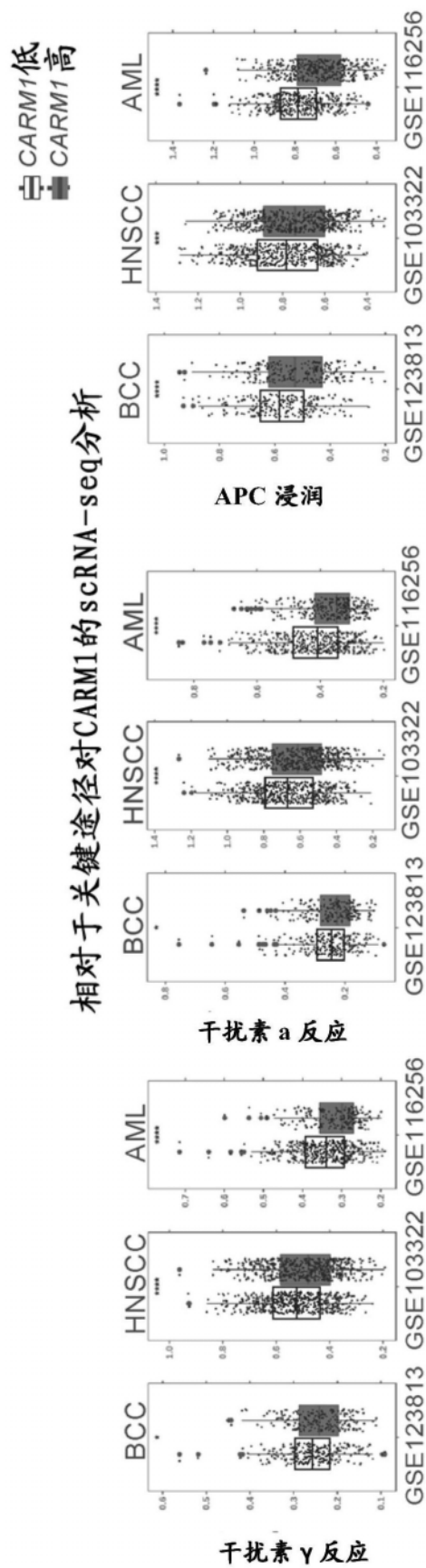


图21B

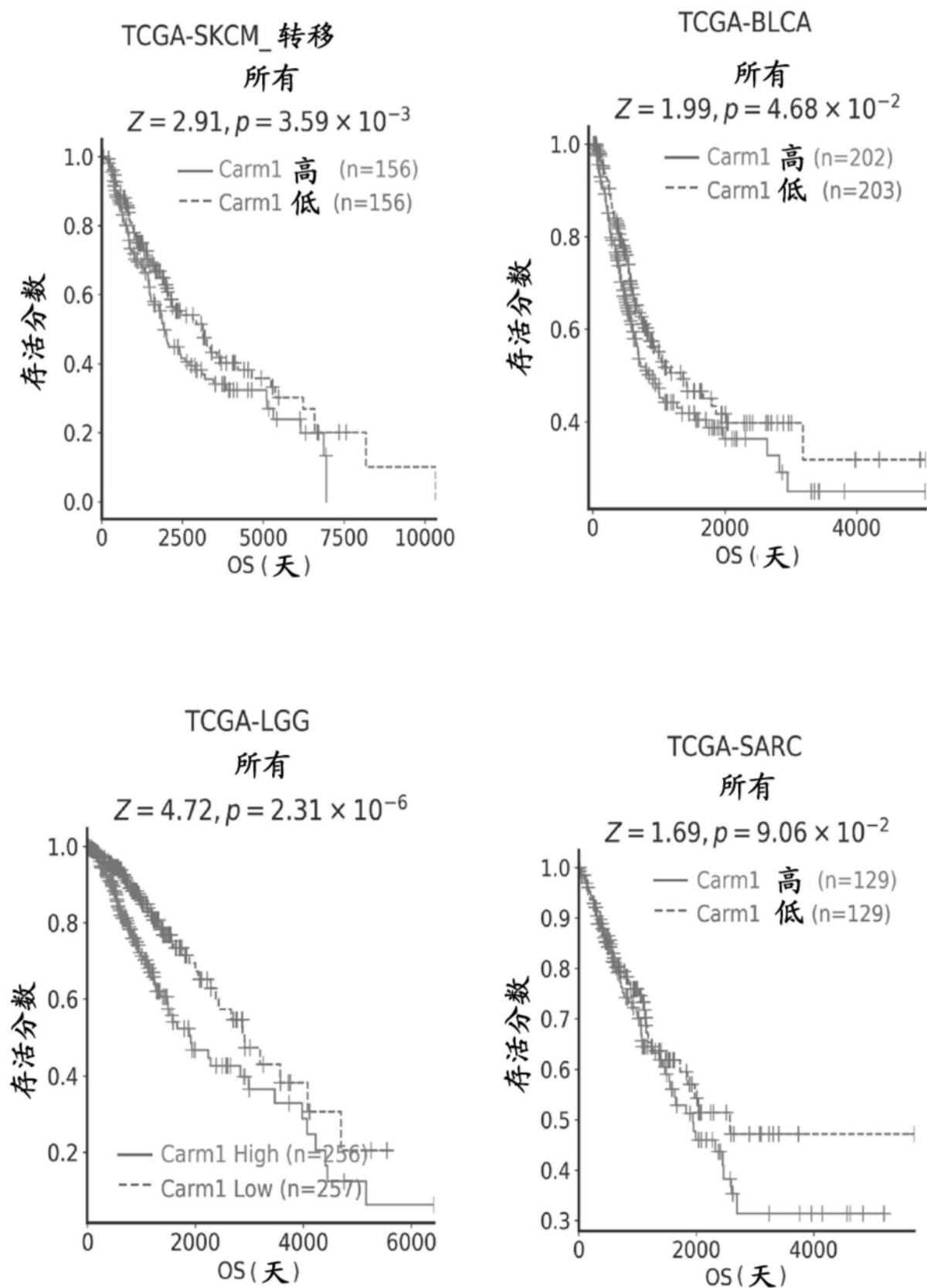


图21C

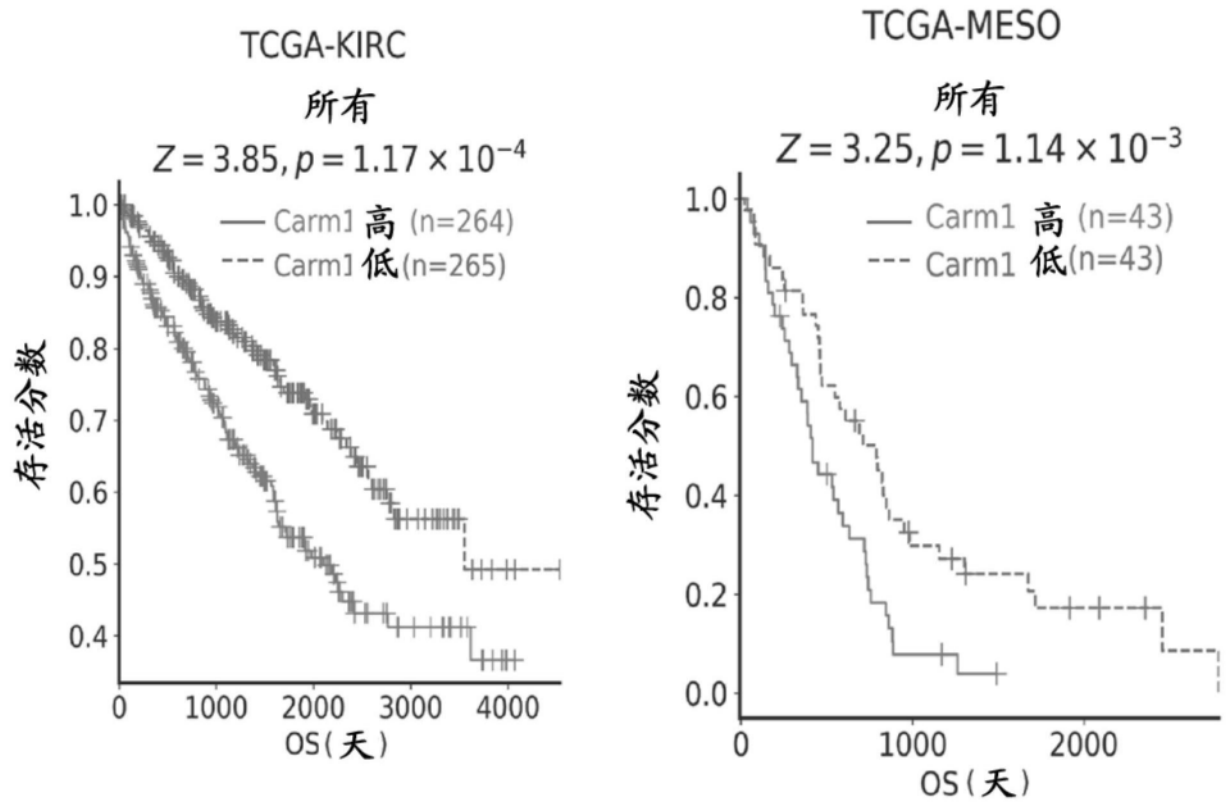


图21C续

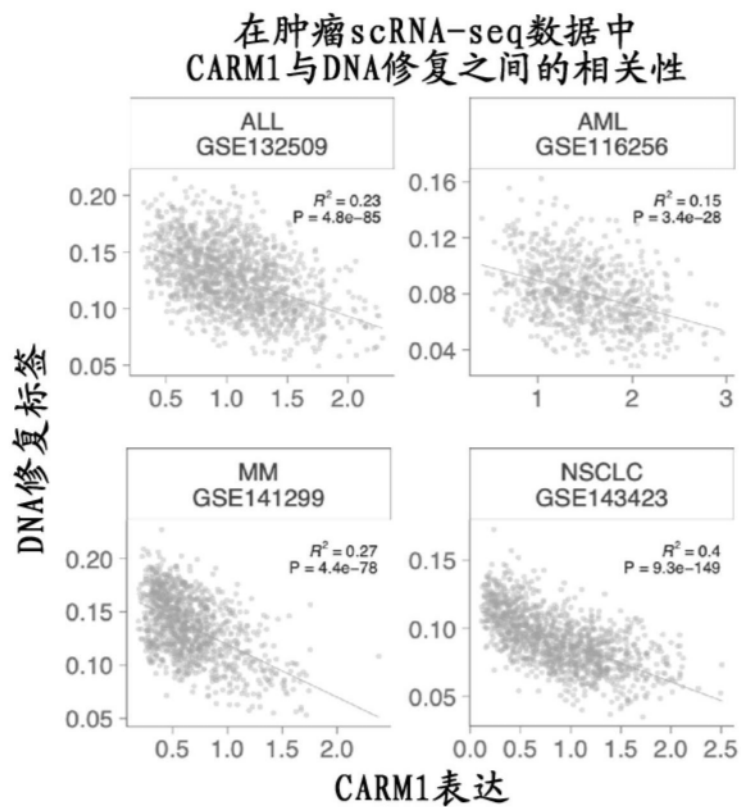


图22A

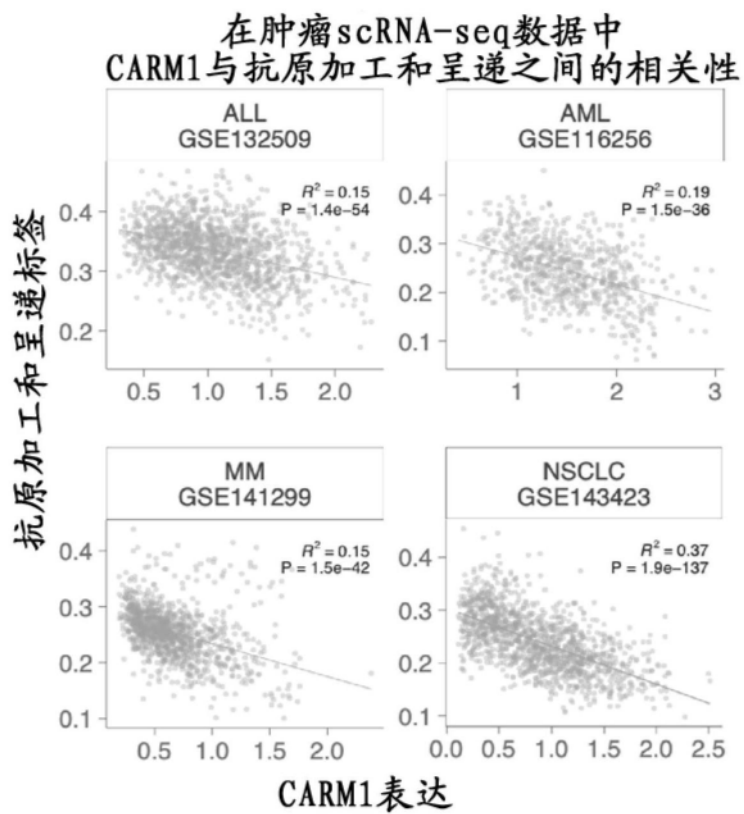


图22B

- 非反应者
- 反应者

CARM1 KO标签应用于临床试验数据集

Mariathasan2018_PDL1-膀胱-mUC Riaz2017_PD1-黑色素瘤-Ipi.Prog

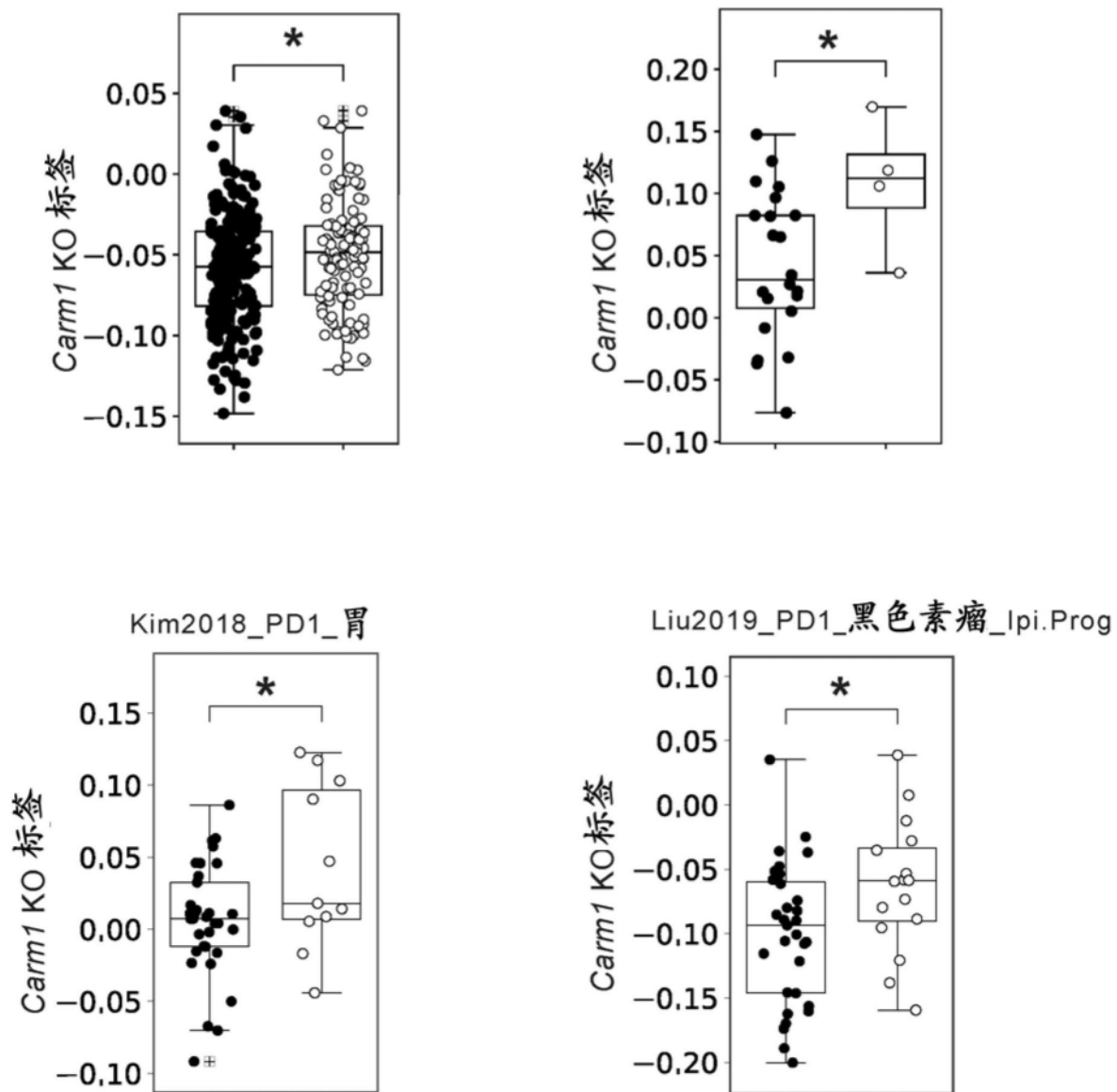


图23A

CARM1 KO标签应用于TCGA数据集

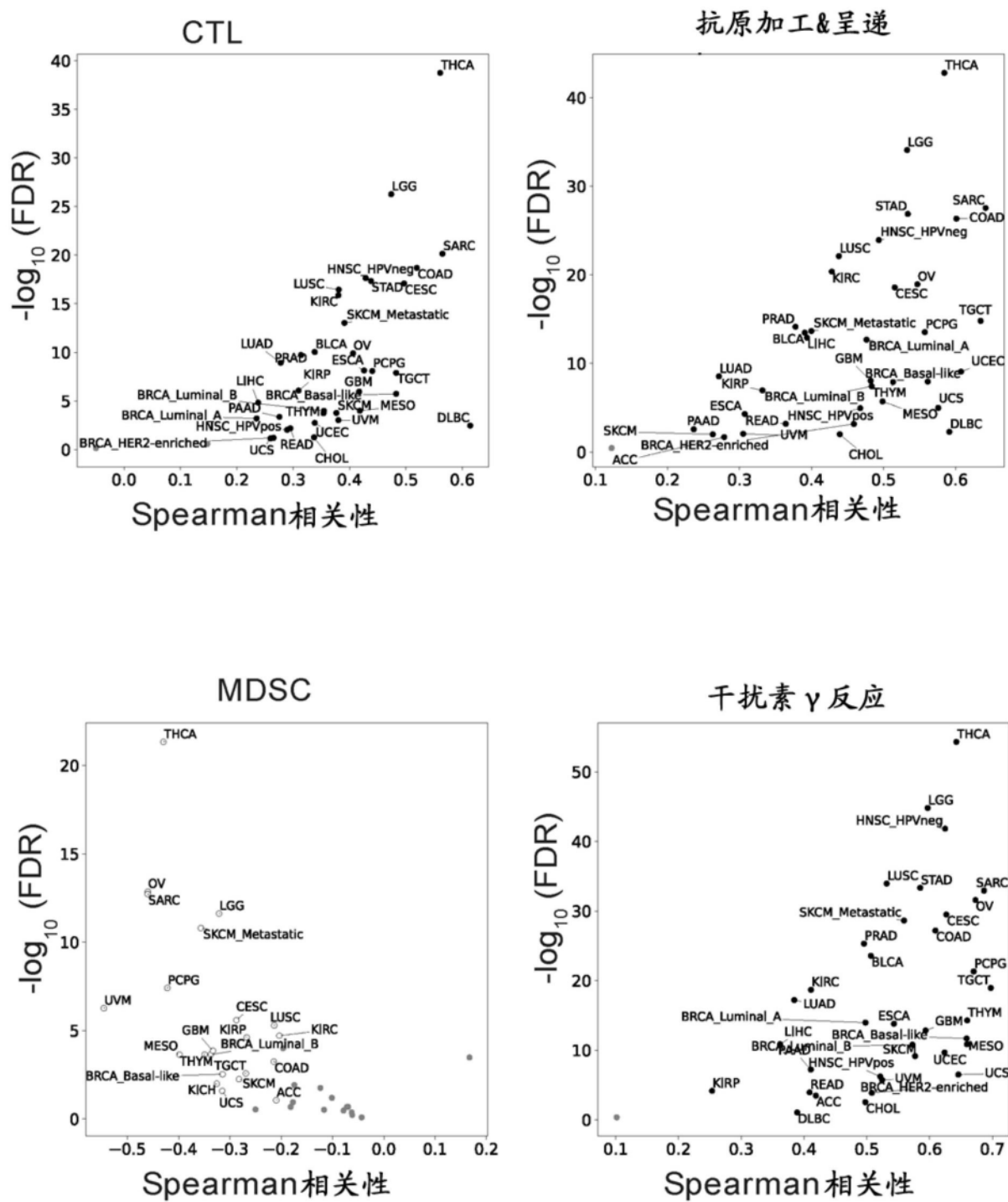


图23B