



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115806625 A
(43) 申请公布日 2023. 03. 17

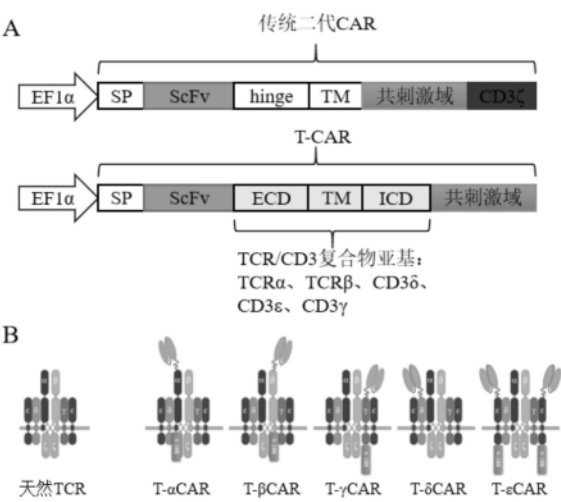
(21) 申请号 202111082994.2
(22) 申请日 2021.09.15
(71) 申请人 广州百暨基因科技有限公司
地址 510700 广东省广州市黄埔区经济技术
开发区科学城开源大道206号第3层
(72) 发明人 李光超 罗敏 周兆
(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限
公司 44224
专利代理师 林青中

(51) Int.Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书10页
序列表4页 附图3页

(54) 发明名称
T细胞限定表达的嵌合抗原受体及其应用

(57) 摘要
本发明涉及生物医药领域,具体而言,涉及一种T细胞限定表达的嵌合抗原受体及其应用。该嵌合抗原受体包括抗原结合域、连接域以及共刺激域;所述连接域包括TCR α 、TCR β 、CD3 δ 、CD3 ϵ 以及CD3 γ 亚基或其功能片段中的至少一种,其跨膜连接所述抗原结合域与所述共刺激域。



1. 嵌合抗原受体,其包括抗原结合域、连接域以及共刺激域;

所述连接域包括TCR α 、TCR β 、CD3 δ 、CD3 ϵ 以及CD3 γ 亚基或其功能片段中的至少一种,其跨膜连接所述抗原结合域与所述共刺激域。

2. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,所述共刺激域包括CD28、4-1BB、OX40、ICOS、CD27、CD40-MyD88、DAP12、DAP10、2B4中的一种,或其任何组合中的任一种;

优选4-1BB,且氨基酸序列为SEQ ID NO:1所示。

3. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,所述抗原识别域特异性识别并结合如下抗原分子中的至少一种:

α -甲胎蛋白、 α -辅肌动蛋白-4、A3、对A33抗体具有特异性的抗原、ART-4、B7、B7H3、Ba733、BAFF-R、BAGE、BCMA、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、碳酸酐酶IX、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD56、CD59、CD64、CD66a/b/c/e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD117、CD123、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CD319、CD371、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CLL1、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、结肠特异性抗原p(CSAp)、CEA、CEACAM-6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、纤维母细胞生长因子、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- β 、GPCR5D、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)和它的亚单位、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导性因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子1、Ig κ 、IL1RAP、Lewis Y、LMP1、KC4抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子、MAGE、MAGE-3、MART1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MMG49、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、NKG2D、胰腺癌粘蛋白、PD-L1、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PlGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、ROR1、T101、SAGE、S100、存活素、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL受体、TNF- α 、Tn抗原、汤姆逊-弗雷登里希抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标志物、bc1-2、bc1-6、Kras、致癌基因标志物和致癌基因产物。

4. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,所述抗原识别域为B7H3的单链抗体,优选其氨基酸序列为SEQ ID NO:2所示;和/或;

所述抗原识别域为CLL1的单链抗体,优选其氨基酸序列为SEQ ID NO:3所示。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的嵌合抗原受体,所述CD3 ϵ 氨基酸序列为SEQ ID NO:4所示;

和/或;

所述CD3 γ 氨基酸序列为SEQ ID NO:5所示。

6. 根据权利要求1~4任一项所述的嵌合抗原受体,所述抗原结合域的N端还设置有信号肽。

7. 分离的核酸,其表达得到权利要求1~6任一项所述的嵌合抗原受体。

8. 含有权利要求7所述核酸的载体。

9. T细胞, 其特征在于, 含有权利要求7所述的核酸或权利要求8所述的载体, 或细胞膜表面表达有权利要求1~6任一项所述的嵌合抗原受体。

10. 根据权利要求9所述的T细胞, 其特征在于, 所述T细胞为辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、MAIT细胞、 $\gamma\delta$ T细胞中的任一种。

11. 药用组合物, 其特征在于, 包含权利要求9或10所述的T细胞。

12. 权利要求9或10所述的T细胞在制备用于预防和/或肿瘤的药物中的应用。

T细胞限定表达的嵌合抗原受体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体而言,涉及一种T细胞限定表达的嵌合抗原受体及其应用。

背景技术

[0002] T细胞是脊椎动物免疫系统中的一个重要成员,在病毒感染、癌症和自我免疫过程中发挥重要的作用。T细胞通过其细胞膜上的T细胞受体(TCR)识别抗原肽/主要组织相容性复合物(MHC)而介导免疫反应。大多数成熟T细胞(约95%)的TCR由通过二硫键相连的 α 和 β 两条异二聚体肽链组成,TCR α/β 的可变区(V α 和V β)负责识别抗原信号,TCR α/β 与含有 γ/ϵ 、 δ/ϵ' 和 ζ/ζ' 六个亚基进行信号传递的共受体CD3组成TCR-CD3受体复合物,该复合物决定着T细胞的发育、激活以及对病原的免疫反应。TCR-CD3复合物中的八个亚基均为I型跨膜蛋白,TCR α 和TCR β 都包含一个胞外域(ECD)、一个近膜连接肽(CP)、一个跨膜域和一个非常短的胞内段。同样的,每个CD3的亚基CD3 γ , δ ,和 ϵ 包含一个胞外免疫球蛋白域、一个短的CP、一个跨膜域和一个胞内域(只有一个ITAM),CD3 ζ 有一个非常短的胞外域、一个跨膜域和一个胞内域(有3个ITAM)。

[0003] 细胞表面多蛋白复合物在内质网(ER)中合成,在这里它们进行了整合和组装。TCR-CD3复合物便是典型的多蛋白复合物,其组装发生在ER膜上,然后转运至高尔基体进行进一步的加工修饰,最后转运至细胞膜上;其中ER在TCR-CD3复合物的质量控制上发挥十分重要的作用。未组装的TCR α 和TCR β 会滞留在内质网(ER)中,在相当短的时间内就会降解。研究发现,含有TCR α 跨膜域和TCR β 跨膜域的嵌合蛋白在ER中的生命周期非常短, $t_{1/2}$ 只有10-15min;即使是二硫键连接的TCR $\alpha\beta$ 二聚体或者未组装的TCR α 其在ER中也会很快降解, $t_{1/2}$ 也只有35-45min。未组装的亚基会被转运至蛋白酶体中进行降解。TCR-CD3的组装是通过ECD、CP和跨膜区介导的,并且严格遵守下面的三个规则:1) TCR $\alpha\beta$ 首先结合CD3 $\delta\epsilon$,2) 然后CD3 $\gamma\epsilon$ 加入这个中间体复合物,3) 最后CD3 $\zeta\zeta'$ 并入形成完整的TCR-CD3复合物。没有CD3 $\zeta\zeta'$,前述部分组装的TCR-CD3复合物会很快内化。研究发现,完整的TCR-CD3复合物表达于细胞膜上需要其所有亚基的共同参与。

[0004] T细胞的完全活化需要三种信号:1) 肽/MHC通过TCR提供的第一刺激信号,2) 共刺激配体通过共刺激受体提供的第二刺激信号,3) 细胞因子提供的第三刺激信号。TCR和肽/MHC的结合会引发Lck磷酸化CD3 ζ 胞内ITAM,然后ZAP-70会结合至CD3 ζ 磷酸化酪氨酸上,自我磷酸化而完成活化。活化的ZAP-70接下来会磷酸化各种接合体分子上的酪氨酸,比如LAT。磷酸化的LAT会激活许多下游涉及转录因子的信号通路,比如转录因子AP-1、NF- κ B和NFAT。这些下游的信号事件会使T细胞激活、增殖、产生细胞因子和发挥效应功能。

[0005] CAR-T,即嵌合抗原受体-T细胞,是在T细胞膜表面表达一种人造的工程化受体,从而赋予T细胞一定的效应功能。纵观CAR-T的发展史,第一代CAR-T只有CD3 ζ 链;第二代CAR-T添加了CD28或4-1BB等共刺激结构域,比如Kymriah和Yescarta;第三代CAR-T同时添加了CD28和4-1BB等两个共刺激结构域;第四代CAR-T在第二代的基础上添加了共表达的细胞因

子,比如IL-12等;第五代CAR-T同样基于第二代,添加了激活其它信号通路的共刺激结构域,比如IL2-2R β 胞内结合STAT3/5的结构域。上述5代不同设计的CAR-T,虽然都是工程化组合不同信号分子结构域的结构,但仍局限在直接利用原始结构域的范畴内。现实中的CAR-T细胞在生产和应用过程中或多或少的会出现以下几点问题:1) 细胞耗竭,2) 发生细胞因子释放综合征,3) 细胞体内存续时间短等。而这些问题在人体天然的T细胞免疫过程中很少会出现,因此,基于这些观察提出了本发明。

发明内容

[0006] 本发明的第一目的在于提供一种嵌合抗原受体,其包括抗原结合域、连接域以及共刺激域;

[0007] 所述连接域包括TCR α 、TCR β 、CD3 δ 、CD3 ϵ 以及CD3 γ 亚基或其功能片段中的至少一种,其跨膜连接所述抗原结合域与所述共刺激域。

[0008] 本发明的第二目的在于提供一种分离的核酸,其表达得到如上所述的嵌合抗原受体。

[0009] 本发明的第三目的在于提供含有如上所述核酸的载体。

[0010] 本发明的第四目的在于提供一种T细胞,其含有如上所述的核酸或载体,或细胞膜表面如上所述的嵌合抗原受体。

[0011] 本发明的第五目的在于提供一种药用组合物,其包含如上所述的T细胞。

[0012] 本发明的第六目的在于提供一种如上所述的T细胞在制备用于预防和/或肿瘤的药物中的应用。

[0013] 本发明的有益效果为:

[0014] 1) 因该结构需要和其他TCR-CD3亚基组装才能在T细胞膜上表达,可实现仅在T细胞表达而不在其他细胞中表达,达到T细胞限定表达的特性;

[0015] 2) 该CAR结构可利用TCR本身的信号转导结构域(Signaling Domain)传递杀伤信号,该信号的下游信号通路与天然的TCR-抗原肽/MHC所引发的信号通路更加相似。因此,理论上该结构具有更弱的强直信号,不易耗竭,更低的CRS风险,更安全的潜在优势。

[0016] 3) 该CAR提供了共刺激域,可使T细胞更好的激活。

附图说明

[0017] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0018] 图1为本发明一个实施例中各种T-CAR的设计示意图;A.传统二代CAR和T-CAR设计时的结构差异;B.T-CAR理论上的分子结构;

[0019] 图2为本发明一个实施例中T-CAR组细胞的增殖情况;

[0020] 图3为本发明一个实施例中T-H26B6- γ CAR T细胞和T-H27H4- ϵ CAR T细胞CAR的表达阳性率检测;

[0021] 图4为本发明一个实施例中T-H26B6- γ CAR和T-H27H4- ϵ CAR在RPMI8226和HEK293t

细胞中的表达情况;

[0022] 图5为本发明一个实施例中各种效应细胞对靶细胞的杀伤作用;A.不同效靶比时效应细胞对Siha细胞的杀伤作用;B.不同效靶比时效应细胞对U937细胞的杀伤作用;

[0023] 图6为本发明一个实施例中各种效应细胞对靶细胞杀伤时细胞因子IFN- γ 的分泌情况;A.效应细胞对Siha细胞的杀伤子IFN- γ 的分泌情况;B.效应细胞对U937细胞的杀伤子IFN- γ 的分泌情况。

具体实施方式

[0024] 现将详细地提供本发明实施方式的参考,其一个或多个实例描述于下文。提供每一实例作为解释而非限制本发明。实际上,对本领域技术人员而言,显而易见的是,可以对本发明进行多种修改和变化而不背离本发明的范围或精神。例如,作为一个实施方式的部分而说明或描述的特征可以用于另一实施方式中,来产生更进一步的实施方式。

[0025] 除非另有说明,用于披露本发明的所有术语(包括技术和科学术语)的意义与本发明所属领域普通技术人员所通常理解的相同。通过进一步的指导,随后的定义用于更好地理解本发明的教导。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0026] 本发明中所使用的术语“含有”、“包含”和“包括”是同义词,其是包容性或开放式的,不排除额外的、未被引述的成员、元素或方法步骤。

[0027] 本发明中用端点表示的数值范围包括该范围内所包含的所有数值及分数,以及所引述的端点。

[0028] 本发明涉及一种嵌合抗原受体,其包括抗原结合域、连接域以及共刺激域;

[0029] 所述连接域包括TCR α 、TCR β 、CD3 δ 、CD3 ϵ 以及CD3 γ 亚基或其功能片段中的至少一种,其跨膜连接所述抗原结合域与所述共刺激域。

[0030] 本发明提供了一种新型的CAR结构,该结构限定表达于T细胞中。利用该CAR构建的CAR-T细胞的杀伤功能不弱于传统的二代CAR T细胞,并且分泌更少的细胞因子,可以有效避免或者减弱炎症因子风暴等副作用。

[0031] 在一些实施方式中,所述连接域能够实现TCR本身的信号转导结构域传递杀伤信号的功能。

[0032] 可用的片段例如下述片段全长或其部分片段:

[0033] TRAC:UniProtKB,P01848,140aa;

[0034] //IQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN
KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS//

[0035] TRBC1:UniProtKB,P01850,176aa;

[0036] //DLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP
ALNDSRYCLSSRLRVSATFWQPNRHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGV
SATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMLAMVKKRKF//

[0037] TRBC2:UniProtKB,A0A5B9,178aa;

[0038] //DLKNVFPKVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP

ALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRG//

[0039] CD3 δ :GenBank accession number,NP_000723,171aa;

[0040] //MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK//

[0041] CD3 ϵ :GenBank accession number,NP_000724,207aa;

[0042] //MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNI GGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDMSVATIVIVDICITG LLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDYEPKRGQRDLYSGLNQRRRI//

[0043] CD3 γ :GenBank accession number,NP_000064,182aa;

[0044] //MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLT EDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGV RQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN//

[0045] 如本文所用,“嵌合抗原受体(CAR)”是指包含能够结合抗原的胞外结构域、衍生自不同于衍生胞外结构域的多肽的多肽的跨膜结构域和至少一个胞内结构域的融合蛋白。“嵌合抗原受体(CAR)”有时称为“嵌合受体”、“T-body”或“嵌合免疫受体(CIR)”。“能够结合抗原的胞外结构域”是指可结合特定抗原的任何寡肽或多肽。“胞内结构域”是指已知在细胞中作为传输信号以引起生物过程的活化或抑制的结构域起作用的任何寡肽或多肽。

[0046] 如本文所用,所述嵌合抗原受体中所包含的“区”或者“域”是指多肽中的一个区,其可以独立于其它区而折叠成为特定结构。这些“区”或者“域”可以是鼠源或其他动物源性的序列,优选为人源序列。

[0047] 如本文所用,“抗原识别域”是指能够特异性识别并结合抗原的域,包括但不限于:单链可变片段,羊驼抗体,配体等组成的的单一或串联结构,分别识别单一或两个抗原靶标。“单链可变片段(sc-Fv)”是指衍生自抗体的单链多肽,其保留结合抗原的能力。sc-Fv的实例包括经重组DNA技术形成的抗体多肽并且其中免疫球蛋白重链(H链)和轻链(L链)片段的Fv区经由间隔序列连接。制备sc-Fv的多种方法是已知的,包括描述于以下文献的方法:美国专利号4694778;Science,第242卷,第423-442页(1988);Nature,第334卷,第54454页(1989);和Science,第242卷,第1038-1041页(1988)。

[0048] 在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体不含有铰链区,例如CD8 α 的hinge区。

[0049] 在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体不含有CD28跨膜区。

[0050] 在一些实施方式中,所述共刺激域包括CD28、4-1BB、OX40、ICOS、CD27、CD40-MyD88、DAP12、DAP10、2B4中的一种,或其任何组合中的任一种;

[0051] 在一些实施方式中,所述共刺激域为4-1BB,且氨基酸序列为SEQ ID NO:1(KRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL)所示。

[0052] 在一些实施方式中,抗原识别域区特异性识别肿瘤抗原。“肿瘤抗原”是指具有抗原性的生物分子,新近认识到其表达与细胞癌化相关。检测,例如,肿瘤抗原的免疫学检测可用于区分癌化细胞及其母细胞。本发明中的肿瘤抗原包括肿瘤特异性抗原(仅在肿瘤细胞中存在、而在其它正常细胞中不存在的抗原)和肿瘤相关抗原(也存在于其它器官和组织

或异质和同种异体的正常细胞中的抗原,或在发育和分化过程中表达的抗原)。在一些实施方式中,所述肿瘤为血液瘤或者实体瘤,在一些实施方式中,实体瘤包括:骨、骨连接、肌肉、肺、气管、心脏、脾脏、动脉、静脉、毛细血管、淋巴结、淋巴管、淋巴液、口腔、咽、食管、胃、十二指肠、小肠、结肠、直肠、肛门、阑尾、肝、胆、胰腺、腮腺、舌下腺、泌尿肾、输尿管、膀胱、尿道、卵巢、输卵管、子宫、阴道、外阴部、阴囊、睾丸、输精管、阴茎、眼、耳、鼻、舌、皮肤、脑、脑干、延髓、脊髓、脑脊液、神经、甲状腺、甲状旁腺、肾上腺、垂体、松果体、胰岛、胸腺、性腺、舌下腺以及腮腺中任一处病变生成的肿瘤。特别地,优选预期的肿瘤可被靶向,例如胆管癌、乳腺癌、子宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓源性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、头颈部癌、霍奇金氏淋巴瘤、肺癌、甲状腺髓样癌、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肾癌、卵巢癌、胰腺癌、神经胶质瘤、黑素瘤、肝癌、前列腺癌和尿路膀胱癌。

[0053] 在一些实施方式中,所述抗原识别域特异性识别并结合如下抗原分子中的至少一种:

[0054] α -甲胎蛋白、 α -辅肌动蛋白-4、A3、对A33抗体具有特异性的抗原、ART-4、B7、B7H3、Ba 733、BAFF-R、BAGE、BCMA、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、碳酸酐酶IX、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD56、CD59、CD64、CD66a/b/c/e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD117、CD123、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CD319、CD371、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CLL1、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、结肠特异性抗原p (CSAp)、CEA、CEACAM-6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、纤维母细胞生长因子、F1t-1、F1t-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- β 、GPCR5D、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)和它的亚单位、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导性因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子1、Ig κ 、IL1RAP、Lewis Y、LMP1、KC4抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子、MAGE、MAGE-3、MART1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MMG49、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、NKG2D、胰腺癌粘蛋白、PD-L1、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PlGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、ROR1、T101、SAGE、S100、存活素、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL受体、TNF- α 、Tn抗原、汤姆逊-弗雷登里希抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标志物、bc1-2、bc1-6、Kras、致癌基因标志物和致癌基因产物。

[0055] 在一些实施方式中,所述抗原识别域为B7H3的单链抗体,优选其氨基酸序列为SEQ ID NO:2 (EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMQWYQQKPG LAPRLLIYDTSKLTSGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIKRTVGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWIGGINPNTGGTTYNQKFNGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYC TRPYRDDGGFHWYFDVWGQGLTVTVSS)所示。

[0056] 在一些实施方式中,所述抗原识别域为CLL1的单链抗体,优选其氨基酸序列为SEQ ID NO:3 (DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSDNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRF

SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYTYPTYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGA
SVKVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQRLEWMGRINPYNGAASHNQKFKDRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA
VYYCARGWDYDGGYYAMDYWGQGTLLVTVSS) 所示。

[0057] 在一些实施方式中,所述CD3 ϵ 氨基酸序列为SEQ ID NO:4 (DGNEEMGGITQTPYKVSIS
GTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDLHLSEKFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRAR
VCENCMEMDVMVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRKAQKAPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPPVPNPDPYEPIRK
GQRDLYSGLNQRRI) 所示。

[0058] 在一些实施方式中,所述CD3 γ 氨基酸序列为SEQ ID NO:5 (QSIKGNHLVKVYDYQEDG
SVLLTCDAAEKNTWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATIS
GFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN) 所示。

[0059] 在一些实施方式中,所述抗原结合域与所述连接域直接通过连接肽相连,例如SEQ
ID NO:6 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG)。

[0060] 在一些实施方式中,所述抗原结合域的N端还设置有信号肽。

[0061] 可用的信号肽例如:

Signal peptide sequence	GenBank accession number	Protein
MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC		Vk 11012-02 信号肽序列; IgG kappa light chain
MALPVTALLPLALLHAARP		CD8a
MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP		GM-CSF
[0062] MKWVTFISLLFLSSAYS	NP_000468	Serum albumin preproprotein (Albumin(HSA))
MDWTWRVFCLLAVTPGAHP	AAA52897	Immunoglobulin heavy chain
MAWSPLFTLITHCAGSWA	AAA59018	Immunoglobulin light chain
MPLLLLPLWAGALA		CD33 signal peptide
MYRMQLLSIALSLALVTNS		Human IL-2
MALWMRLPLLALLALWGPDPAAA		Human insulin

[0063] 此外,还有:

[0064] Human OSM:MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASM

[0065] VSV-G:MKCLLYLAFLFIGVNC

[0066] Mouse Ig Kappa:METDTLLLWVLLWVPGSTGD

[0067] Human IgG2 H:MGWSCIIILFLVATATGVHS

[0068] BM40:MRAWIFFLLCLAGRALA

[0069] Human Chymotrypsinogen:MAFLWLLSCWALLGTTFG

[0070] Human trypsinogen-2:MNLLLILTFVAAAVA

[0071] Human IL-2:MYRMQLLSIALSLALVTNS

[0072] Gaussia luc:MGVKVLFALICIAVAEA

[0073] Albumin (HSA):MKWVTFISLLFLSSAYS

[0074] Influenza Haemagglutinin:MKTIIALSYIFCLVLG

[0075] Human insulin:MALWMRLPLLALLALWGPDPAAA

[0076] Silkworm Fibroin LC:MKPIFLVLLVVTSAAYA

[0077] 应当理解,本发明所涉及的“区”或者“域”或“功能片段”,或其他的多肽(例如连接肽和信号肽),可以选自与它们各自所对应的示例序列,例如SEQ ID NO:1~5中的任一项的氨基酸序列,或与之具有至少约80%同一性、至少约90%同一性、至少约95%同一性、至少约96%同一性、至少约97%同一性、至少约98%同一性或至少约99%同一性的序列,且保留相应所需功能的实质上相似的序列。

[0078] 实质上相似的序列亦保留多肽的所需活性。通常视为保守置换的置换是在脂肪族氨基酸Ala、Val、Leu和Ile中的彼此置换、羟基残基Ser和Thr的互换、酸性残基Asp和Glu的交换、酰胺残基Asn和Gln之间的置换、碱性残基Lys和Arg的交换以及芳香残基Phe、Tyr间的置换。进一步的,实质上相似的序列还包括与所需功能差异不大的经过修饰的序列,这些修饰例如磷酸化、糖基化、泛素化等。

[0079] 本发明还涉及分离的核酸,其表达得到如上所述的嵌合抗原受体。

[0080] 本发明还涉及含有如上所述核酸的载体。

[0081] 术语“载体(vector)”是指,可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时,载体称为表达载体。载体可以通过转化,转导或者转染导入宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的,包括但不限于:质粒;噬菌粒;柯斯质粒;人工染色体,例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC);噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于,逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。在一些实施方式中,本发明所述载体中包含基因工程中常用的调控元件,例如增强子、启动子、内部核糖体进入位点(IRES)和其他表达控制元件(例如转录终止信号,或者多腺苷酸化信号和多聚U序列等)。

[0082] 载体也可以为组合物,例如,可以将不同区段的不同核酸位于不同载体上。

[0083] 在本公开的一些具体的实施方式中,所述载体选自逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺病毒相关病毒载体或CRISPR/CAS质粒。

[0084] 本发明还涉及T细胞,其含有如上所述的核酸或如上所述的载体,或细胞膜表面表达有如上所述的嵌合抗原受体。

[0085] 在一些实施方式汇总,所述T细胞为辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、MAIT细胞、 $\gamma\delta$ T细胞中的任一种。

[0086] 根据本发明的再一方面,还涉及药用组合物,包含如上所述的T细胞。

[0087] 所述药物组合物还可以包括药学上可接受的载剂。如本文所用,“药学上可接受的载剂”包括当与活性组分组合时允许所述组分保持生物学活性并且与受试者的免疫系统不发生反应的任何材料。实例包括但不限于标准药物载剂(诸如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(诸如油/水乳液))和各种类型的润湿剂中的任一者。用于气雾剂或肠胃外施用的示例性稀释剂是磷酸盐缓冲盐水(PBS)或生理(0.9%)盐水。包含此类载剂的组合物通过熟知的常规方法来配制(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,A.Gennaro编,Mack PublishingCo.,Easton,PA,1990;和Remington,The Science and Practice of Pharmacy,第21版,Mack Publishing,2005)。

[0088] 根据本发明的再一方面,还涉及如上所述的T细胞在制备用于预防和/或肿瘤的药

物中的应用。

[0089] 根据本发明的再一方面,还涉及如上所述的宿主细胞在制备用于预防和/或治疗的药物中的应用。

[0090] 根据本发明的再一方面,还涉及一种治疗有需要的患者的肿瘤的方法,该方法包括向该患者施用治疗有效量的如上所述的宿主细胞或药用组合物。

[0091] “患者”是哺乳动物,哺乳动物包括但不限于人、猴子、猪和其他农场动物、运动动物、宠物、灵长类动物、马、狗、猫、啮齿动物(包括小鼠、大鼠、豚鼠)等。

[0092] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。

[0093] 实施例1T-CAR嵌合抗原受体的设计及慢病毒表达载体的构建

[0094] 本实施例采用抗CLL1和抗B7H3抗体的单链抗体(scFv)作为抗原结合域,结合信号肽、TCR/CD3复合物的各个亚基、不同的共刺激域,构建靶向CLL1或者B7H3的新型T细胞限定表达的嵌合抗原受体T-CAR,常见的共刺激域包括4-1BB、CD28、DAP10等。示意图如图1所示。获得TCR-CD3复合物各个亚基的氨基酸序列后,在广州艾基生物技术有限公司进行全基因合成,连接ScFv和共刺激域,并构建至慢病毒表达载体中。

[0095] 本实施例中所采用的H27H4-CD3 ϵ -bb,其氨基酸序列为:

[0096] //MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSDNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYTYPTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMHVVRQAPGQRLEWMGRINPYNGAASHNQKFKDRV TITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGWDYDGGYYAMDYWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDGNE EMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRG SKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDPYEPIRKGQRDLYSGLNQRRIKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL//

[0097] H26B6-CD3 γ -bb,其氨基酸序列为:

[0098] //MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMQWYQQKPGKLAPRLLIYDTSKLTSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGKVEIKRTVGGGGSGGGSGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTMHVVRQAPGQGLEWIGGINPNTGGTTYNQKFNVRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRYPYRDDGGFHWYFDVWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLSNAKDPGRMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL//

[0099] 实施例2:慢病毒包装

[0100] 分别对实施例中的慢病毒表达载体进行慢病毒包装,采用四质粒系统,具体步骤如下:

[0101] (1) 四质粒系统分别表达慢病毒载体包装所需的gag/pol、Rev、VSV-G及本发明构建的T-CAR表达载体:将四质粒进行瞬时转染293T细胞,DNA含量为2 μ g/mL;

[0102] (2) 将上述质粒与PEI转染试剂混合,加入至一定体积的无血清的DMEM中,混匀后放置15分钟,将上述混合液加入至铺有293T细胞的细胞的T75培养瓶中,轻轻混匀,于37℃、5%CO₂细胞培养箱培养6h;

[0103] (3) 6h后更换新鲜培养基,继续进行培养,并且加入10mM的丁酸钠溶液,72小时后

收集慢病毒的培养上清进行纯化检测。

[0104] (4) 使用慢病毒滴度ELISA检测试剂盒(北京博奥龙,BF06203)进行病毒滴度的检测。

[0105] 实施例3:慢病毒感染T细胞

[0106] 每位志愿者采10ml的全血,将外周血与生理盐水1:1进行稀释,在离心管内加入Ficoll,缓缓加入稀释后的外周血,1500rpm离心30min轻轻吸取PBMC层移入另一离心管内;用生理盐水洗涤PBMC多次,使用CD3分选磁珠(美天施)分选CD3⁺ T细胞,转入X-VIVO培养基(300IU/mL的IL-2)中进行培养,PBMC分离后,以珠胞比=1:1的比例加入CD3-CD28刺激磁珠进行刺激(Thermo),48h后进行病毒感染。

[0107] 利用RetroNectin提高慢病毒对T细胞的感染效率,将30μg的RetroNectin,包被于6孔板内,放于37℃细胞培养箱2h;吸取RetroNectin,利用含2.5%BSA的Hank's溶液封闭包被后的6孔板,放于37℃细胞培养箱0.5h;吸取封闭液,利用含2%Hepes的Hank's溶液洗涤6孔板,加入X-VIVO培养基,加入适量的慢病毒溶液,2000g离心2h;弃上清,加入 1×10^6 的T细胞,1000g离心10min,于37℃、5%CO₂和一定湿度的细胞培养箱内培养,第二日重复上述过程。第7天去除磁珠。每两天进行一次计数并更换含300IU/mL的X-VIVO,并且将细胞浓度维持 0.5×10^6 - 1×10^6 /mL,连续培养至病毒感染后第7天。用美国Countstar IC1000自动细胞计数仪计数,评估T-CAR T细胞的扩增情况。

[0108] 从图2中可以看出,病毒感染没有对T细胞的增殖造成负面的影响,甚至T-CAR组细胞的增殖速度比对照的细胞增殖速度还要快一些。

[0109] 实施例4:T-CAR在T细胞中的表达

[0110] 我们制备了T-H26B6-γCAR T细胞(靶向B7H3)和T-H27H4-εCAR T细胞(靶向CLL1),在病毒感染后的第5天和第7天分别取样进行检测。

[0111] 首先300g离心5min收集细胞,用含1%BSA的PBS洗一遍细胞,然后分别用含2.5ug/mL CLL1-Fc蛋白(ACRO)和B7H3-Fc蛋白(ACRO)的溶液与细胞在室温孵育40min,接着用含1%BSA的PBS洗一遍细胞,然后用Goat-pAb-to Hu IgG(PE)二抗溶液室温避光孵育40min,用含1%BSA的PBS洗一遍细胞,然后用200uL PBS重悬细胞,最后进行流式检测T-CAR的表达情况。

[0112] 从图3中可以看出,2种T-CAR均可高表达于原代T细胞膜上。在病毒感染后的第5天(day 5),T-H26B6-γCAR的阳性率为82.1%,T-H27H4-εCAR的阳性率为82.7%;在Day7,T-H26B6-γCAR的阳性率为78.9%,T-H27H4-εCAR的阳性率为82.2%。这些结果说明2种T-CAR均可稳定的表达于原代T细胞。

[0113] 实施例5:T-CAR在非T细胞中的表达

[0114] 为了证明T-CAR在非T细胞中无法表达,本发明将T-H26B6-γCAR慢病毒载体和T-H27H4-εCAR慢病毒载体对RPMI8226细胞(人多发性骨髓瘤细胞,属于B细胞)和HEK 293t细胞(人胚胎肾细胞)进行感染,感染后第5天收集细胞进行流式检测。首先胰酶消化细胞,300g离心5min去除上清,用含1%BSA的PBS洗一遍细胞,然后分别用含2.5ug/mL CLL1-Fc蛋白(ACRO)和B7H3-Fc蛋白(ACRO)的溶液与细胞在室温孵育40min,接着用含1%BSA的PBS洗一遍细胞,然后用Goat-pAb-to Hu IgG(PE)二抗溶液室温避光孵育40min,用含1%BSA的PBS洗一遍细胞,然后用200uL PBS重悬细胞,最后进行流式检测T-CAR的表达情况,检测结

果如图4所示。

[0115] 从图中可以看出,RPMI 8226细胞和HEK 293t细胞均没有表达T-H26B6- γ CAR和T-H27H4- ϵ CAR。

[0116] 实施例6:T-CAR T细胞在体外的杀伤功能

[0117] 将稳定表达荧光素酶的靶细胞SiHa-luc和U937-luc接种至黑色不透明96孔板中,2万个细胞/孔,然后以效靶比=3:1和10:1的比例分别接种效应细胞至孔中,效应细胞包括Control T细胞、T-H26B6- γ CAR T细胞、T-H27H4- ϵ CAR T细胞、H26B6-CAR T细胞和H27H4-CAR T细胞。接种后培养箱中共孵育4-6h,加入等体积的荧光素酶底物(Promega),室温避光孵育5min后,于多功能酶标仪上进行检测。根据公式计算杀伤率: $\% = (1 - \text{RLU}_{\text{实验组}} / \text{RLU}_{\text{Target only组}}) \times 100\%$ 。

[0118] 从图5中可以看出,T-CAR T对靶细胞的杀伤作用不弱于传统的二代CAR T细胞。T-CAR T细胞和传统CAR T细胞都能够特异性的杀伤靶细胞。

[0119] 实施例7:T-CAR T的细胞因子释放功能

[0120] 将稳定表达荧光素酶的靶细胞SiHa-luc和U937-luc接种至圆底96孔板中,2万个细胞/孔,然后以3:1和10:1的效靶比分别接种效应细胞至孔中,效应细胞包括Control T细胞、T-H26B6- γ CAR T细胞、T-H27H4- ϵ CAR T细胞、H26B6-CAR T细胞和H27H4-CAR T细胞。接种后培养箱中共孵育24h,500g离心15min,收集上清进行ELISA检测IFN- γ 的含量,根据IFN- γ 检测试剂盒(4A bio)的说明书处理,最后于多功能酶标仪上进行检测。

[0121] 从图6中可以看出,T-CAR T细胞和传统的CAR T细胞均可特异性的分泌IFN- γ 杀伤靶细胞。另外,T-CAR T细胞相对于传统CAR T细胞分泌的IFN- γ 的量更少。

[0122] 结合实施例6的结果,T-CAR T在杀伤作用不弱于传统CAR T的情况下,其分泌的IFN- γ 量更少;这说明T-CAR T具有更低的CRS风险。

[0123] 综上所述,本发明提供了一种新型的CAR结构,该结构限定表达于T细胞中。利用该CAR构建的CAR-T细胞的杀伤功能不弱于传统的二代CAR T细胞,并且分泌更少的细胞因子。

[0124] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0125] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准,说明书及附图可以用于解释权利要求的内容。

序列表

<110> 广州百暨基因科技有限公司

<120> T细胞限定表达的嵌合抗原受体及其应用

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 1

Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met
1				5					10					15	
Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe
			20					25					30		
Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu						
			35				40								

<210> 2

<211> 247

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 2

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

130	135	140
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp		
145	150	155
Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn		
165	170	175
Pro Asn Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Asn Gly Arg Val		
180	185	190
Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser		
195	200	205
Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Tyr		
210	215	220
Arg Asp Asp Gly Gly Phe His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly		
225	230	235
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
245		
<210> 3		
<211> 250		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<400> 3		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser		
20	25	30
Asp Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys		
35	40	45
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
50	55	60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
65	70	75
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln		
85	90	95
Tyr Tyr Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
100	105	110
Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
115	120	125
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
130	135	140
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr		

145	150	155	160
His Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met			
	165	170	175
Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ala Ala Ser His Asn Gln Lys Phe			
	180	185	190
Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr			
	195	200	205
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	210	215	220
Ala Arg Gly Trp Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp			
225	230	235	240
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	245	250	
<210> 4			
<211> 185			
<212> PRT			
<213> artificial sequence			
<400> 4			
Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys Val			
1	5	10	15
Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro Gly			
	20	25	30
Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp Glu			
	35	40	45
Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys Glu			
	50	55	60
Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly			
65	70	75	80
Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val			
	85	90	95
Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met Ser Val Ala Thr Ile Val			
	100	105	110
Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr			
	115	120	125
Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala			
	130	135	140
Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro			
145	150	155	160
Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu			

	165	170	175
Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile			
	180	185	
<210> 5			
<211> 160			
<212> PRT			
<213> artificial sequence			
<400> 5			
Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys Val Tyr Asp Tyr Gln Glu			
1	5	10	15
Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala Glu Ala Lys Asn Ile Thr			
	20	25	30
Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe Leu Thr Glu Asp Lys Lys			
	35	40	45
Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp Pro Arg Gly Met Tyr Gln			
	50	55	60
Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro Leu Gln Val Tyr Tyr Arg			
65	70	75	80
Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala Ala Thr Ile Ser Gly Phe			
	85	90	95
Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val Leu Ala Val Gly Val Tyr			
	100	105	110
Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln Ser Arg Ala Ser Asp Lys			
	115	120	125
Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg			
	130	135	140
Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gln Leu Arg Arg Asn			
145	150	155	160
<210> 6			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> artificial sequence			
<400> 6			
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr			
1	5	10	15
Lys Gly			

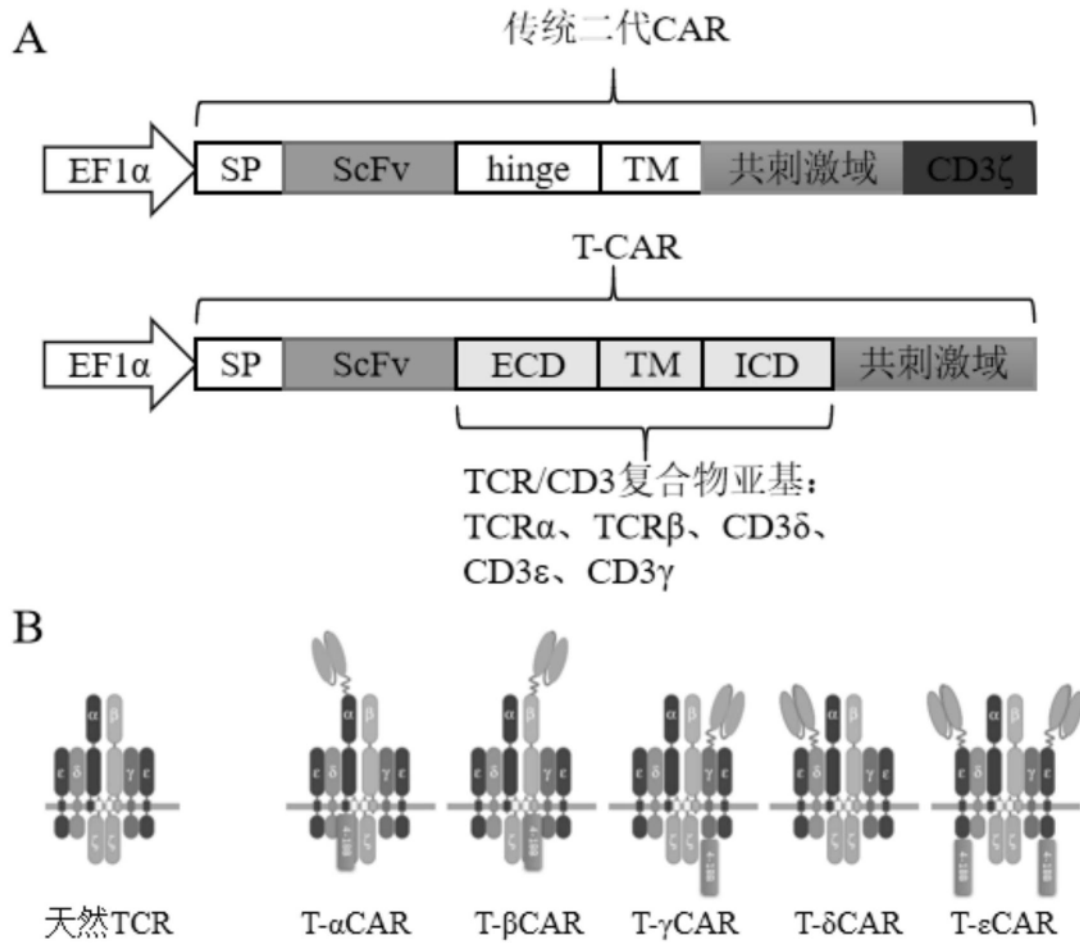


图1

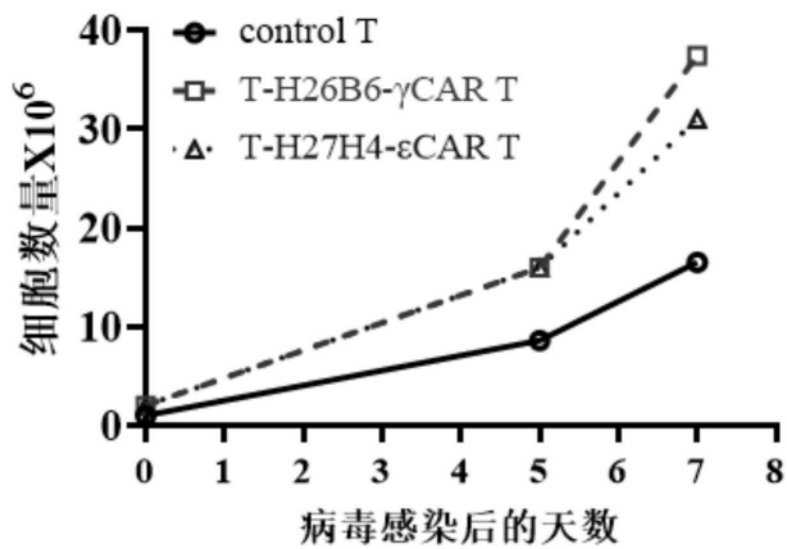


图2

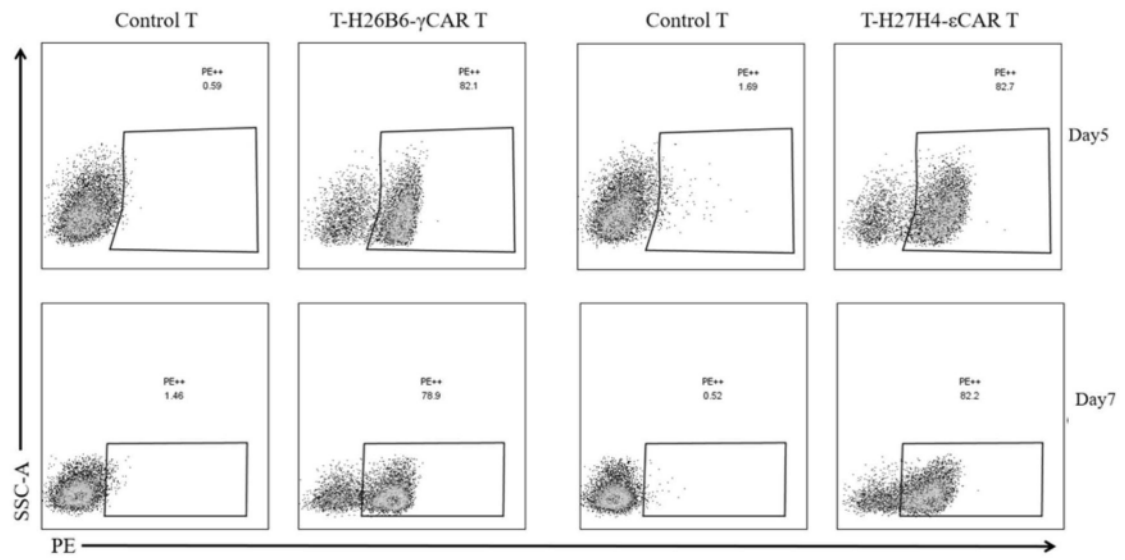


图3

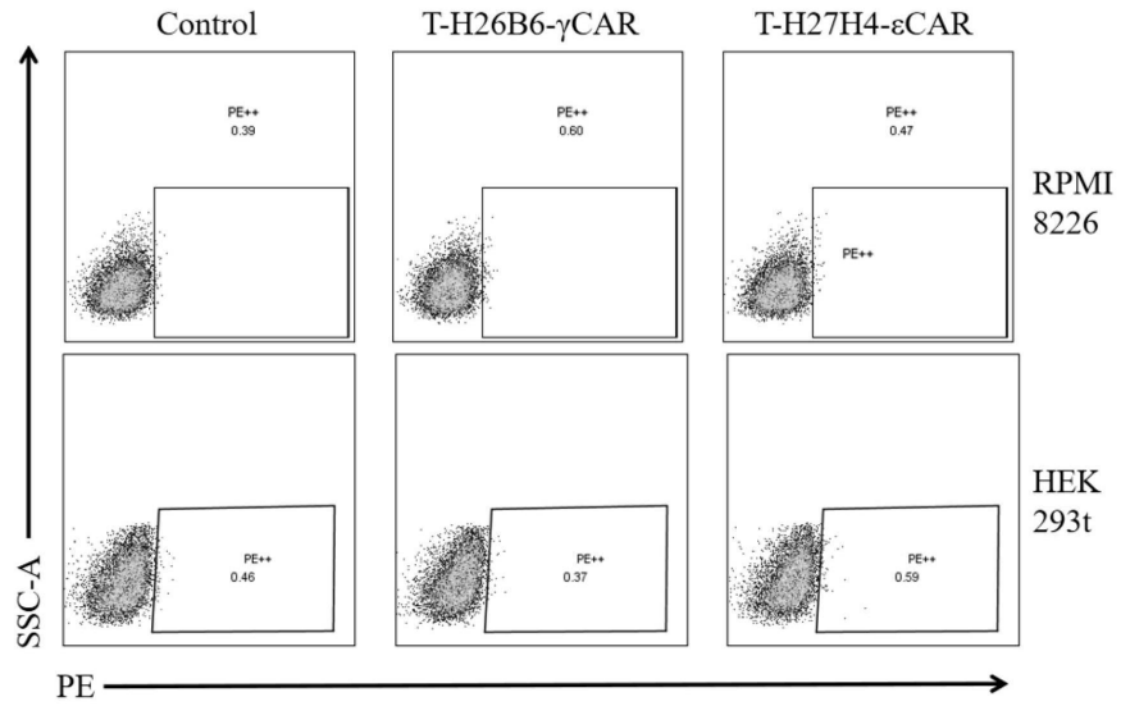


图4

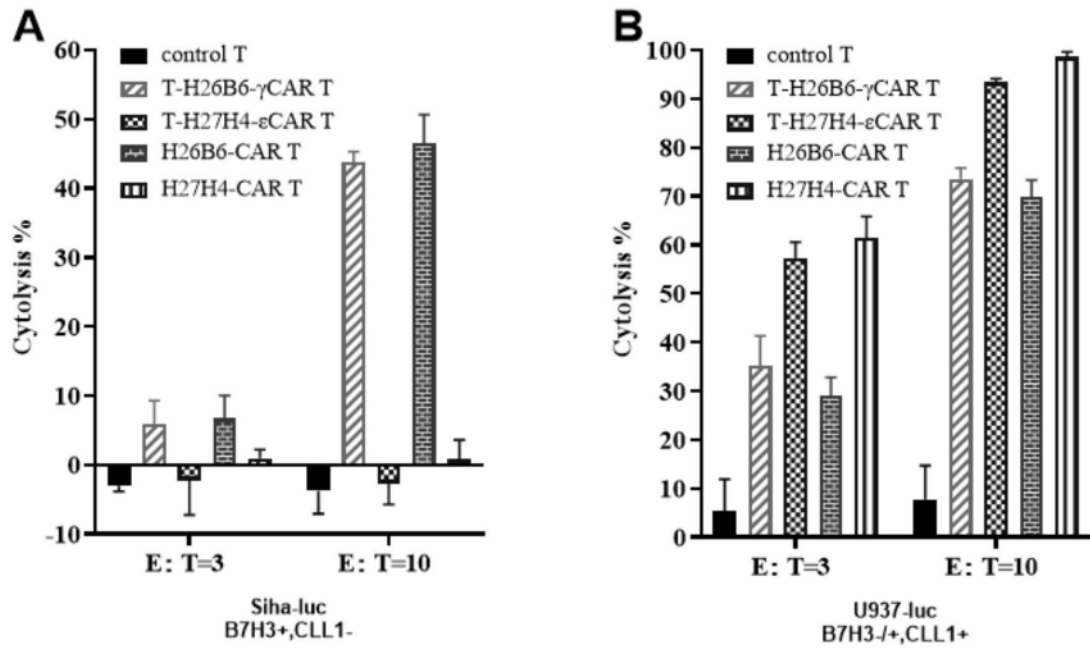


图5

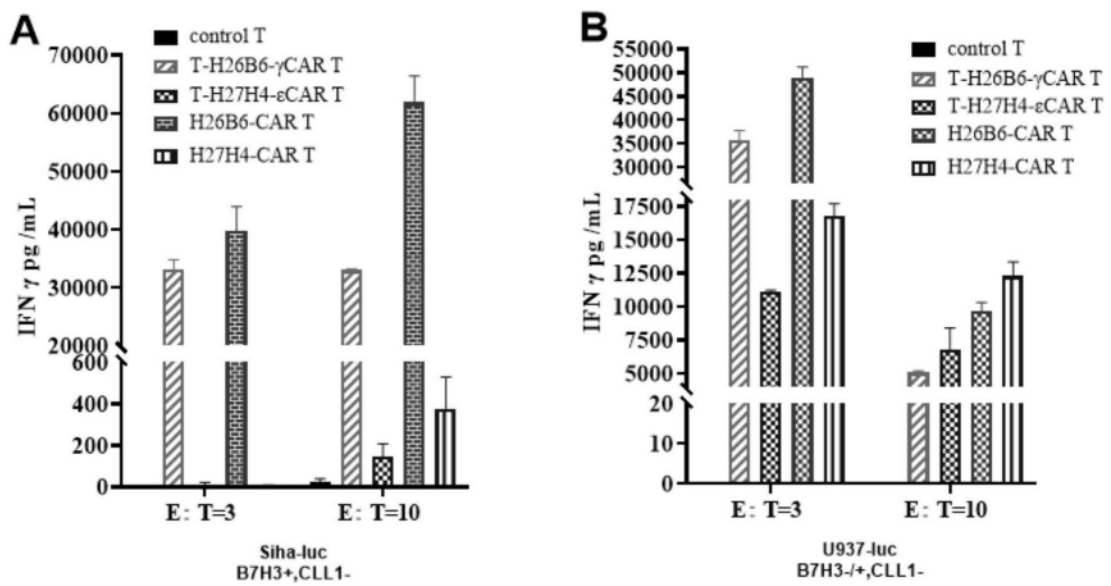


图6