



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112481283 A

(43) 申请公布日 2021.03.12

(21) 申请号 202011387472.9

(22) 申请日 2015.07.21

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2014/082589 2014.07.21 CN

PCT/CN2014/090504 2014.11.06 CN

(62) 分案原申请数据

201580050572.3 2015.07.21

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

申请人 宾夕法尼亚大学托管会

(72) 发明人 J·布罗格顿 H·艾伯斯巴赫

S·吉尔 D·格拉斯 T·胡贝尔

J·雅斯库 S·肯德利安

J·曼尼克 M·C·米伦 L·墨菲

C·理查森 R·辛格 宋慧娟

吴期隆 张继全

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 胡志君 黄革生

(51) Int.Cl.

G12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

G12N 15/867 (2006.01)

G12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

权利要求书6页 说明书189页

序列表188页 附图69页

(54) 发明名称

使用CD33嵌合抗原受体治疗癌症

(57) 摘要

本公开提供了治疗与表达CD33相关的疾病的组合物和方法。本公开还涉及对CD33特异的嵌合抗原受体(CAR)、编码其的载体和包含CD33 CAR的重组T细胞。本公开还包括施用表达CAR的基因修饰T细胞的方法,所述CAR包含CD33结合结构域。

1. 编码嵌合抗原受体 (CAR) 的分离的核酸分子, 其中CAR包含人CD33结合结构域、跨膜结构域和胞内信号结构域, 并且其中所述CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何CD33重链结合结构域氨基酸序列的重链互补决定区1 (HC CDR1)、重链互补决定区2 (HC CDR2) 和重链互补决定区3 (HC CDR3)。

2. 根据权利要求1所述的分离的核酸分子, 其中所述人CD33结合结构域还包含表2或表9中列出的任何CD33重链结合结构域氨基酸序列的轻链互补决定区1 (LC CDR1)、轻链互补决定区2 (LC CDR2) 和轻链互补决定区3 (LC CDR3)。

3. 根据权利要求2所述的分离的核酸分子, 其中所述LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3是表11、13或4中列出的LC CDR序列。

4. 根据权利要求1-3所述的分离的核酸分子, 其中所述HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3是表10、12或3中列出的HC CDR序列。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的分离的核酸分子, 其编码CAR, 所述CAR包含:

(i) 表2或表9中列出的任何轻链可变区的氨基酸序列;

(ii) 具有表2或表9中提供的任何轻链可变区的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于30、20或10个修饰的氨基酸序列; 或

(iii) 与表2或表9中提供的任何轻链可变区的氨基酸序列具有95-99%同一性的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的分离的核酸分子, 其编码CAR, 所述CAR包含:

(i) 表2或表9中列出的任何重链可变区的氨基酸序列;

(ii) 具有表2或表9中提供的任何重链可变区的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于30、20或10个修饰的氨基酸序列; 或

(iii) 与表2或表9中提供的任何重链可变区的氨基酸序列具有95-99%同一性的氨基酸序列。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的分离的核酸分子, 其编码包含表2或表9中列出的任何轻链可变区的氨基酸序列和表2或表9中列出的任何重链可变区的氨基酸序列的CAR。

8. 根据任一前述权利要求所述的分离的核酸分子, 其中编码的CD33结合结构域包含:

(i) 选自SEQ ID NO:39-47、57-65、66-74或262-268的氨基酸序列;

(ii) 具有对SEQ ID NO:39-47、57-65、66-74或262-268中任一者的至少一个、两个或三个修饰、但不多于30、20或10个修饰的氨基酸序列; 或

(iii) 与SEQ ID NO:39-47、57-65、66-74或262-268中任一者具有95-99%同一性的氨基酸序列。

9. 根据任一前述权利要求所述的分离的核酸分子, 其中CD33结合结构域包含选自SEQ ID NO:255-261的核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。

10. 根据任一前述权利要求所述的分离的核酸分子, 其中编码的CAR包括跨膜结构域, 所述跨膜结构域包含选自以下蛋白质的跨膜结构域: T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154。

11. 根据任一前述权利要求所述的分离的核酸分子, 其中:

(i) 编码的跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列、包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6

的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;或

(ii) 编码跨膜结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:17的序列或与其具有95-99%同一性的序列。

12. 根据任一前述权利要求所述的分离的核酸分子,其中编码的CD33结合结构域通过铰链区连接至跨膜结构域。

13. 根据权利要求12所述的核酸分子,其中:

(i) 编码的铰链区包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或与其具有95-99%同一性的序列;或

(ii) 编码铰链区的核酸序列包含SEQ ID NO:13的核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。

14. 根据任一前述权利要求所述的分离的核酸分子,其中编码的共刺激结构域是从选自以下的蛋白质获得的功能性信号结构域:MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、淋巴细胞活化信号分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、4-1BB (CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a和与CD83特异性结合的配体。

15. 根据权利要求14所述的分离的核酸分子,其中编码的共刺激结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列、或具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

16. 根据权利要求14所述的分离的核酸分子,其中编码共刺激结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:18的核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。

17. 根据任一前述权利要求所述的分离的核酸分子,其中编码的胞内信号结构域包含4-1BB的功能性信号结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号结构域。

18. 根据任一前述权利要求所述的分离的核酸分子,其中编码的胞内信号结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列;具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

19. 根据任一前述权利要求所述的分离的核酸分子,其中编码的胞内信号结构域包含SEQ ID NO:7的序列和SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列,其中包含胞内信号结构域的序列在相同读框中并作为单条多肽链表达。

20. 根据任一前述权利要求所述的分离的核酸分子,其中编码胞内信号结构域的核酸

序列包含SEQ ID NO:18的序列或与其具有95-99%同一性的序列、和/或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21的序列或与其具有95-99%同一性的序列。

21. 根据任一前述权利要求所述的分离的核酸分子,还包含编码SEQ ID NO:1的氨基酸序列的前导序列。

22. 根据任一前述权利要求所述的分离的核酸分子,其编码CAR,所述CAR包含:

(i) 任一SEQ ID NO:48-56的氨基酸序列;

(ii) 具有对任一SEQ ID NO:48-56的至少一个、两个或三个修饰、但不多于30、20或10个修饰的氨基酸序列;或

(iii) 与任一SEQ ID NO:48-56具有95-99%同一性的氨基酸序列。

23. 根据任一前述权利要求所述的分离的核酸分子,包含任一SEQ ID NO:75-83的核苷酸序列或与任一SEQ ID NO:75-83具有95-99%同一性的核苷酸序列。

24. 分离的多肽分子,其由权利要求1-23中任一项所述的核酸分子编码。

25. 分离的嵌合抗原受体 (CAR) 多肽,其中CAR包含抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括人CD33结合结构域、跨膜结构域和包含共刺激结构域和/或初级信号结构域的胞内信号结构域,并且其中所述CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何CD33重链结合结构域氨基酸序列的重链互补决定区1 (HC CDR1)、重链互补决定区2 (HC CDR2) 和重链互补决定区3 (HC CDR3)。

26. 根据权利要求25所述的分离的CAR多肽,其中所述人CD33结合结构域还包含表2或表9中列出的任何CD33重链结合结构域氨基酸序列的轻链互补决定区1 (LC CDR1)、轻链互补决定区2 (LC CDR2) 和轻链互补决定区3 (LC CDR3)。

27. 根据权利要求26所述的分离的CAR多肽,其中所述LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3是表11、13或4中列出的LC CDR序列。

28. 根据权利要求25-27所述的分离的CAR多肽,其中所述HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3是表10、12或3中列出的HC CDR序列。

29. 根据权利要求25-28中任一项所述的分离的CAR多肽,其包含:

(i) 表2或表9中列出的任何轻链可变区的氨基酸序列;

(ii) 具有表2或表9中提供的任何轻链可变区的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于30、20或10个修饰的氨基酸序列;或

(iii) 与表2或表9中提供的任何轻链可变区的氨基酸序列具有95-99%同一性的氨基酸序列。

30. 根据权利要求25-29中任一项所述的分离的CAR多肽,其包含:

(i) 表2或表9中列出的任何重链可变区的氨基酸序列;

(ii) 具有表2或表9中提供的任何重链可变区的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于30、20或10个修饰的氨基酸序列;或

(iii) 与表2或表9中提供的任何重链可变区的氨基酸序列具有95-99%同一性的氨基酸序列。

31. 根据权利要求25-30中任一项所述的分离的CAR多肽,其包含表2或表9中列出的任何轻链可变区的氨基酸序列和表2或表9中列出的任何重链可变区的氨基酸序列。

32. 根据权利要求25-31中任一项所述的分离的CAR多肽,其包含:

- (i) 选自SEQ ID NO:39-47、57-65、66-74和262-268的任一氨基酸序列；
- (ii) 具有对任一SEQ ID NO:39-47、57-65、66-74或262-268的至少一个、两个或三个修饰、但不多于30、20或10个修饰的氨基酸序列；或
- (iii) 与任一SEQ ID NO:39-47、57-65、66-74或262-268具有95-99%同一性的氨基酸序列。

33. 根据权利要求25-32中任一项所述的分离的CAR多肽，其中跨膜结构域包含来自选自以下蛋白质的跨膜结构域：T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154。

34. 根据权利要求25-33中任一项所述的分离的CAR多肽，其中：

- (i) 跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列，
- (ii) 氨基酸序列包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰，或
- (iii) 与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

35. 根据权利要求25-34中任一项所述的分离的CAR多肽，其中CD33结合结构域通过铰链区连接至跨膜结构域。

36. 根据权利要求35所述的分离的CAR多肽，其中铰链区包含SEQ ID NO:2或与其具有95-99%同一性的序列。

37. 根据权利要求25-36中任一项所述的分离的CAR多肽，其中共刺激结构域是从选自以下的蛋白质获得的功能性信号结构域：MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、淋巴细胞活化信号分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、4-1BB (CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a和与CD83特异性结合的配体。

38. 根据权利要求25-37中任一项所述的分离的CAR多肽，其中共刺激结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列、或具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

39. 根据权利要求25-37中任一项所述的分离的CAR多肽，其中胞内信号结构域包含4-1BB的功能性信号结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号结构域。

40. 根据权利要求25-39中任一项所述的分离的CAR多肽，其中胞内信号结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列；具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列；或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9

或SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

41. 根据权利要求25-40中任一项所述的分离的CAR多肽,其中胞内信号结构域包含SEQ ID NO:7的序列和SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列,其中包含胞内信号结构域的序列在相同读框中并作为单条多肽链表达。

42. 根据权利要求25-41中任一项所述的分离的CAR多肽,还包含了包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的前导序列。

43. 根据权利要求25-42中任一项所述的分离的CAR多肽,其包含:

(i) 任一SEQ ID NO:48-56的氨基酸序列;

(ii) 具有对任一SEQ ID NO:48-56的至少一个、两个或三个修饰、但不多于30、20或10个修饰的氨基酸序列;或

(iii) 与任一SEQ ID NO:48-56具有95-99%同一性的氨基酸序列。

44. 载体,其包含编码任一前述权利要求所述的CAR或CD33结合结构域的核酸分子,其中载体选自DNA载体、RNA载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。

45. 根据权利要求44所述的载体,还包含了包含SEQ ID NO:11的序列的EF-1启动子。

46. 细胞,例如,免疫效应细胞,其包含权利要求1-23中任一项所述的核酸、权利要求24-43中任一项所述的CAR多肽、或权利要求44或45所述的载体。

47. 制造细胞例如免疫效应细胞的方法,包括用权利要求44或45所述的载体转导免疫效应细胞。

48. 产生RNA工程化细胞群体的方法,包括将体外转录的RNA或合成的RNA引入细胞中,其中RNA包含编码任一前述权利要求所述的CAR多肽的核酸。

49. 在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫的方法,包括向哺乳动物施用有效量的细胞,例如,免疫效应细胞群体,所述细胞包含权利要求1-23中任一项所述的CAR核酸或权利要求24-43中任一项所述的CAR多肽。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中细胞是自体T细胞或同种异体T细胞。

51. 治疗患有与表达CD33相关的疾病的哺乳动物的方法,包括向哺乳动物施用有效量的细胞,例如,免疫效应细胞群体,所述细胞包含权利要求1-23中任一项所述的CAR核酸或权利要求24-43中任一项所述的CAR多肽。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中与表达CD33相关的疾病是:

(i) 癌症或恶性肿瘤或选自脊髓发育不良、脊髓发育不良综合征或白血病前期中一者或多者的癌前期病状,或

(ii) 与表达CD33相关的非癌症相关适应症。

53. 根据权利要求51或52所述的方法,其中疾病是血液学癌。

54. 根据权利要求51-53中任一项所述的方法,其中所述疾病是急性白血病,所述急性白血病选自急性髓样白血病(AML);脊髓发育不良综合征;骨髓增生性肿瘤;慢性髓样白血病(CML);或母细胞性浆细胞样树状细胞肿瘤中的一种或多种或它们的组合。

55. 根据权利要求51-54中任一项所述的方法,其中细胞,例如,免疫效应细胞群体,与以下一种或多种药剂组合施用:

(i) 增加包含CAR核酸或CAR多肽的细胞的功效的药剂;

(ii) 减轻与施用包含CAR核酸或CAR多肽的细胞相关的一种或多种副作用的药剂;或

(iii) 治疗与CD33相关的疾病的药剂。

56. 根据权利要求1-23中任一项所述的分离的核酸分子、根据权利要求24-43中任一项所述的分离的CAR多肽分子、根据权利要求44或45所述的载体、或根据权利要求46所述的细胞,用作药物。

57. 根据权利要求1-23中任一项所述的分离的核酸分子、根据权利要求24-43中任一项所述的分离的CAR多肽分子、根据权利要求44或45所述的载体、或根据权利要求46所述的细胞,用于治疗与表达CD33相关的疾病。

58. 根据权利要求49所述的细胞,例如,免疫效应细胞群体,其还表达抑制性分子,所述抑制性分子包含了包含抑制性分子的至少一部分的第一多肽,所述第一多肽与包含来自胞内信号结构域的正向信号的第二多肽缔合。

59. 根据权利要求58所述的细胞,其中抑制性分子包含了包含PD1的至少一部分的第一多肽和包含共刺激结构域和初级信号结构域的第二多肽。

60. 根据权利要求55所述的方法,其中药剂是mTOR抑制剂并且向受试者施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂,例如,RAD001或雷帕霉素。

61. 根据权利要求60所述的方法,其中将mTOR抑制剂施用足够的时间量,所述时间量足以在受试者的外周血中或在分离自受试者的T细胞制备物中减少PD-1阳性T细胞比例、增加PD-1阴性T细胞比例或增加PD-1阴性T细胞/PD-1阳性T细胞的比率。

62. 在细胞移植之前整备受试者的方法,包括向受试者施用有效量的细胞,所述细胞包含权利要求1-23中任一项所述的CAR核酸分子或权利要求24-43中任一项所述的CAR多肽。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中细胞移植是干细胞移植例如造血干细胞移植、或是骨髓移植。

64. 根据权利要求62或63所述的方法,其中在细胞移植之前整备受试者包括在受试者中减少表达CD33的细胞例如表达CD33的正常细胞或表达CD33的癌细胞的数目。

使用CD33嵌合抗原受体治疗癌症

[0001] 本申请是中国专利申请201580050572.3的分案申请,原申请的申请日是2015年7月21日,发明名称是“使用CD33嵌合抗原受体治疗癌症”。

[0002] 本申请要求2014年7月21日的PCT申请号PCT/CN2014/082589和2014年11月6日的PCT申请号PCT/CN2014/090504的优先权。这些申请的完整内容通过引用的方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经通过电子方式以ASCII格式提交并因而通过引用的方式完整并入的序列表。2015年7月15日创建的所述ASCII副本命名为N2067-7047W03_SL.txt并且大小为323,686比特。

技术领域

[0005] 本发明总体上涉及经工程化以表达嵌合抗原受体(CAR)的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)的用途,用于治疗与表达分化抗原簇33蛋白(CD33)相关的疾病。

[0006] 发明背景

[0007] 大多数急性髓样白血病(AML)患者使用标准疗法是不可治愈的(Mrozek等人,2012,J Clin Oncol,30:4515-23)并且那些复发性或难治性AML(RR-AML)患者具有特别不良的预后(Kern等人,2003,Blood 2003,101:64-70;Wheatley等人,1999,Br J Haematol,107:69-79)。

[0008] 遗传工程可以向T细胞赋予针对选择目标的特异性。T细胞可以用编码抗体单链可变片段(scFv)连同信号传导分子的遗传物质转导,因而利用互补决定区(CDR)以非MHC限制方式识别细胞表面抗原。这些细胞称作嵌合抗原受体(CAR)T细胞。靶向多种恶性肿瘤中至少20种不同表面分子的临床前尝试和临床尝试已经显示某种活性,然而这些尝试经常受输注的CAR T细胞产物的持久性低劣限制(Sadelain等人,2009,Curr Opin Immunol 2009,21:215-23)。在晚期慢性淋巴样白血病(CLL)和急性淋巴样白血病(ALL)患者中采用抗CD19重定向型T细胞时取得的最近成功(Porter等人,2011,N Engl J Med,365:725-33;Kalos等人,2011,Science Transl Med,3:95ra73;Grupp和Kalos,2013,N Engl J Med,368:1509-18)显示,这些细胞可以在单次输注后根除巨大肿瘤负荷,缓解作用迄今持续长达3年,从而强调了CAR T细胞疗法的巨大潜力。已经存在动物模型中靶向AML的少数临床前尝试(Marin等人,2010,Haematologica,95:2144-52;Tettamanti等人,2013,Br J Haematol,161:389-401)。一项最近公开的小型临床试验显示,产生T细胞并将其输注至侵袭性恶性肿瘤患者是可行的(Ritchie等人,2013,Mol Ther,2013 Nov;21(11):2122-9)。除基因修饰的T细胞上的嵌合抗原受体识别和摧毁靶向细胞的能力外,成功的治疗性T细胞疗法需要具有增殖和随时间推移持续存在的能力和进一步监测白血病细胞逃逸的能力。不定的T细胞质量,无论这是否因失能、抑制或衰竭所致,可影响CAR转化的T细胞的表现。熟练执业者此时对T细胞质量的变异性仅具备有限的控制措施。为了有效,CAR转化的患者T细胞需要持续存在并维持响应于CAR的抗原而增殖的能力。已经显示来自ALL患者的T细胞可以用包含鼠scFv的CART19做到这一点(参见,例如,Grupp等人,NEJM 368:1509-1518(2013))。

[0009] 发明概述

[0010] 在第一方面,本发明表征了一种编码嵌合抗原受体(CAR)的分离核酸分子,其中CAR包含了包括CD33结合结构域(例如,人或人源化CD33结合结构域)的抗体或抗体片段、跨膜结构域和胞内信号结构域(例如,包含共刺激结构域和/或初级信号结构域的胞内信号结构域)。在一个实施方案中,CAR包含了包括本文所述的CD33结合结构域(例如,本文所述的人或人源化CD33结合结构域)的抗体或抗体片段、本文所述的跨膜结构域和本文所述的胞内信号结构域(例如,包含共刺激结构域和/或初级信号结构域的胞内信号结构域)。

[0011] 在一个实施方案中,编码的CD33结合结构域包含本文所述的CD33结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)、和/或本文所述的CD33结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如,包含一个或多个(例如,全部三个)LC CDR和一个或多个(例如,全部三个)HC CDR的CD33结合结构域。在一个实施方案中,编码的CD33结合结构域(例如,人或人源化CD33结合结构域)包含本文(例如,表2或表9中)所述的轻链可变区和/或本文(例如,表2或表9中)所述的重链可变区。在一个实施方案中,编码的CD33结合结构域是包含表2或表9的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,编码的CD33结合结构域(例如,scFv)包含轻链可变区,所述轻链可变区包含下述氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少一个、两个或三个在表2或表9中提供的轻链可变区的氨基酸序列的修饰(例如置换,例如保守性置换),但不多于30、20或10个修饰(例如置换,例如保守性置换),或与表2或表9的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,所述重链可变区包含下述氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少一个、两个或三个在表2或表9中提供的重链可变区的氨基酸序列的修饰(例如置换,例如保守性置换),但不多于30、20或10个修饰(例如置换,例如保守性置换),或与表2或表9的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0012] 在其他实施方案中,编码的CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何CD33重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在实施方案中,CD33结合结构域还包含LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。在实施方案中,CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何CD33轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。

[0013] 在一些实施方案中,编码的CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何CD33轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3中的一者、两者或全部以及表2或表9中列出的任何CD33重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3中的一者、两者或全部。

[0014] 在一个实施方案中,编码的CD33结合结构域包含选自SEQ ID NO:39-47、57-65、66-74或262-268的氨基酸序列。在一个实施方案中,编码的CD33结合结构域(例如,scFv)包含了具有SEQ ID NO:39-47、57-65、66-74或262-268的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如置换,例如保守性置换)、但不多于30、20或10个修饰(例如置换,例如保守性置换)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:39-47、57-65、66-74或262-268的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在另一个实施方案中,编码的CD33结合结构域包含重链可变区,所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:57-65的氨基酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。在另一个实施方案中,编码的CD33结合结构域包含轻链可变区,所述轻链可变区包含选自SEQ

ID NO:66-74的氨基酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,核酸分子包含选自SEQ ID NO:255-261的核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0015] 在一个实施方案中,编码的CD33结合结构域包括(Gly4-Ser)_n接头,其中n是1、2、3、4、5或6、优选地3或4(SEQ ID NO:26)。scFv的轻链可变区和重链可变区可以例如处于以下任何取向:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0016] 在一个实施方案中,编码的CAR包括跨膜结构域,所述跨膜结构域包含蛋白质(例如,本文所述的蛋白质,例如选自T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154的蛋白质)的跨膜结构域。在一个实施方案中,编码的跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的序列。在一个实施方案中,编码的跨膜结构域包含了包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码跨膜结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:17的序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0017] 在一个实施方案中,编码的CD33结合结构域通过铰链区(例如,本文所述的铰链区)连接至跨膜结构域。在一个实施方案中,编码的铰链区包含SEQ ID NO:2或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码铰链区的核酸序列包含SEQ ID NO:13的序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0018] 在一个实施方案中,分离的核酸分子还包含编码共刺激结构域(例如,本文所述的共刺激结构域)的序列。在实施方案中,胞内信号结构域包含共刺激结构域。在实施方案中,胞内信号结构域包含初级信号结构域。在实施方案中,胞内信号结构域包含共刺激结构域和初级信号结构域。

[0019] 在一个实施方案中,编码的共刺激结构域是从例如本文所述的蛋白质,例如选自以下的蛋白质获得的功能性信号结构域:MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、淋巴细胞活化信号分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a和与CD83特异性结合的配体。在实施方案中,编码的共刺激结构域包含4-1BB、CD27、CD28或ICOS。

[0020] 在一个实施方案中,编码的4-1BB共刺激结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一个实施方案中,编码的共刺激结构域包含了具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码共刺激结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:18的核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。在另一个实施方案中,编码的

CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列。在一个实施方案中,编码的共刺激结构域包含了具有SEQ ID NO:379的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:379的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码CD28共刺激结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:380的核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。在另一个实施方案中,编码的CD27共刺激结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一个实施方案中,编码的共刺激结构域包含了具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码CD27共刺激结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。在另一个实施方案中,编码的ICOS共刺激结构域包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列。在一个实施方案中,编码的ICOS共刺激结构域包含了具有SEQ ID NO:381的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:381的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码ICOS共刺激结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:382的核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0021] 在实施方案中,编码的初级信号结构域包含CD3 ζ 的功能性信号结构域。在实施方案中,CD3 ζ 的功能性信号结构域包含SEQ ID NO:9(突变体CD3 ζ)或SEQ ID NO:10(野生型人CD3 ζ)的氨基酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0022] 在一个实施方案中,编码的胞内信号结构域包含4-1BB的功能性信号结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号结构域。在一个实施方案中,编码的4-1BB胞内信号结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的CD3 ζ 氨基酸序列。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含了具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列中至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码的胞内信号结构域包含SEQ ID NO:7的序列和SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列,其中包含胞内信号结构域的序列在相同读框中并作为单条多肽链表达。在一个实施方案中,编码4-1BB胞内信号结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:18的核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列、和/或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21的CD3 ζ 核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0023] 在一个实施方案中,编码的胞内信号结构域包含CD27的功能性信号结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号结构域。在一个实施方案中,编码的CD27胞内信号结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的CD3 ζ 氨基酸序列。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含了具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列中至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码的胞内信号结构域包含SEQ ID NO:8的序列和SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列,其中包含胞内信号结构域的序列在相同读框中并作为单条多肽链表达。在一个实施方案中,编码CD27胞内信号结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列、和/或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21的CD3 ζ 核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0024] 在一个实施方案中,编码的胞内信号结构域包含CD28的功能性信号结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号结构域。在一个实施方案中,编码的CD28胞内信号结构域包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的CD3 ζ 氨基酸序列。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含了具有SEQ ID NO:379的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列中至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:379的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码的胞内信号结构域包含SEQ ID NO:379的序列和SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列,其中包含胞内信号结构域的序列在相同读框中并作为单条多肽链表达。在一个实施方案中,编码CD28胞内信号结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:380的核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列、和/或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21的CD3 ζ 核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0025] 在一个实施方案中,编码的胞内信号结构域包含ICOS的功能性信号结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号结构域。在一个实施方案中,编码的ICOS胞内信号结构域包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的CD3 ζ 氨基酸序列。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含了具有SEQ ID NO:381的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列中至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:381的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码的胞内信号结构域包含SEQ ID NO:381的序列和SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列,其中包含胞内信号结构域的序列在相同读框中并作为单条多肽链表达。在一个实施方案中,编码ICOS胞内信号结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:382的核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列、和/或SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21的CD3 ζ 核苷酸序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0026] 在另一个方面,本发明涉及编码CAR构建体的分离核酸分子,所述CAR构建体包含前导序列,例如,本文所述的前导序列,例如,SEQ ID NO:1的氨基酸序列;本文所述的CD33结合结构域,例如,包含本文所述的LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3的CD33结合结构域(例如,表2或表9中描述的人或人源化CD33结合结构域),或与其具有95-99%同一性的序列;本文所述的铰链区,例如,SEQ ID NO:2的氨基酸序列;本文所述的跨膜结构域,例如,具有SEQ ID NO:6的序列;和胞内信号结构域,例如,本文所述的胞内信号结构域。在一个实施方案中,编码的胞内信号结构域包含共刺激结构域,例如,本文所述的共刺激结构域(例如,具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的4-1BB共刺激结构域或具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CD27共刺激结构域),和/或初级信号结构域,例如,本文所述的初级信号结构域,(例如,具有SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列的CD3 ζ 刺激结构域)。在一个实施方案中,编码CAR构建体的分离核酸分子包括由SEQ ID NO:1的核酸序列编码的前导序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0027] 在一个实施方案中,分离的核酸分子包含这样的核酸(例如,由其组成),所述核酸编码SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56的CAR氨基酸序列;或具有SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56的氨基酸序列的一个、两个或三个修饰(例如置换,例

如保守性置换)、但不多于30、20或10个修饰(例如置换,例如保守性置换)的氨基酸;或与SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56的氨基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0028] 在一个实施方案中,分离的核酸分子包含SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83的核酸序列或与SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:83的核酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核酸序列(例如,由其组成)。

[0029] 在一个方面,本发明涉及编码CD33结合结构域分离核酸分子,其中CD33结合结构域包含本文所述的CD33结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和/或轻链互补决定区3(LC CDR3)、以及本文所述的CD33结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如,包含一个或多个(例如,全部三个)LC CDR和一个或多个(例如,全部三个)HC CDR的人或人源化CD33结合结构域。

[0030] 在其他实施方案中,编码的CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何CD33重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在实施方案中,CD33结合结构域还包含LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。在实施方案中,CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何CD33轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。

[0031] 在一些实施方案中,编码的CD33结合结构域包含了表2或表9中列出的任何CD33轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3中的一者、两者或全部以及表2或表9中列出的任何CD33重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3中的一者、两者或全部。

[0032] 在一个实施方案中,编码的CD33结合结构域包含本文所述的轻链可变区(例如,SEQ ID NO:66、67、68、69、70、71、72、73或74)和/或本文所述的重链可变区(例如,SEQ ID NO:57、58、59、60、61、62、63、64或65)。在一个实施方案中,编码的CD33结合结构域是包含SEQ ID NO:39、40、41、42、43、44、45、46或47的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,CD33结合结构域(例如,scFv)包含:轻链可变区,所述轻链可变区包含下述氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少一个、两个或三个在SEQ ID NO:66、67、68、69、70、71、72、73或74中提供的轻链可变区的氨基酸序列的修饰(例如置换,例如保守性置换),但不多于30、20或10个修饰(例如置换,例如保守性置换),或包含与SEQ ID NO:66、67、68、69、70、71、72、73或74的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,所述重链可变区包含下述氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少一个、两个或三个在SEQ ID NO:57、58、59、60、61、62、63、64或65中提供的重链可变区的氨基酸序列的修饰(例如置换,例如保守性置换),但不多于30、20或10个修饰(例如置换,例如保守性置换),或包含与SEQ ID NO:57、58、59、60、61、62、63、64或65的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,CD33结合结构域包含选自SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:47的序列或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码的CD33结合结构域是scFv,并且包含本文

(例如,表2中)所述的氨基酸序列的轻链可变区经接头(例如,本文所述的接头)与包含本文(例如,表2中)所述的氨基酸序列的重链可变区连接。在一个实施方案中,编码的CD33结合结构域包括(Gly4-Ser)_n接头,其中n是1、2、3、4、5或6、优选地4(SEQ ID NO:26)。scFv的轻链可变区和重链可变区可以例如处于以下任何取向:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0033] 在另一个方面,本发明涉及由核酸分子编码的分离的CD33结合结构域(例如,多肽、抗体或其片段)分子。在一个实施方案中,分离的CD33结合结构域包含选自SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56的序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0034] 在另一个方面,本发明涉及分离的嵌合抗原受体(CAR)分子(例如,多肽),其包含CD33结合结构域(例如,与CD33特异性结合的人或人源化抗体或抗体片段)、跨膜结构域和胞内信号结构域(例如,包含共刺激结构域和/或初级信号结构域的胞内信号结构域)。在一个实施方案中,该CAR包含抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括本文所述的CD33结合结构域(例如,如本文所述的与CD33特异性结合的人或人源化抗体或抗体片段)、本文所述的跨膜结构域和本文所述的胞内信号结构域(例如,包含本文所述的共刺激结构域和/或初级信号结构域的胞内信号结构域)。

[0035] 在一个实施方案中,CD33结合结构域包含本文所述的CD33结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)、以及本文所述的CD33结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和/或重链互补决定区3(HC CDR3),例如,包含一个或多个(例如,全部三个)LC CDR和一个或多个(例如,全部三个)HC CDR的CD33结合结构域。在一个实施方案中,CD33结合结构域包含本文(例如,表2中)所述的轻链可变区和/或本文(例如,表2或表9中)所述的重链可变区。在一个实施方案中,CD33结合结构域是包含表2或表9中列出的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,CD33结合结构域(例如,scFv)包含:轻链可变区,所述轻链可变区包含下述氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少一个、两个或三个在表2或表9中提供的轻链可变区的氨基酸序列的修饰(例如置换,例如保守性置换),但不多于30、20或10个修饰(例如置换,例如保守性置换),或与表2或表9中提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,所述重链可变区包含下述氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少一个、两个或三个在表2或表9中提供的重链可变区的氨基酸序列的修饰(例如置换,例如保守性置换),但不多于30、20或10个修饰(例如置换,例如保守性置换),或与表2或表9中提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0036] 在其他实施方案中,CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何CD33重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在实施方案中,CD33结合结构域还包含LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。在实施方案中,CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何CD33轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。

[0037] 在一些实施方案中,CD33结合结构域包含了表2或表9中列出的任何CD33轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3中的一者、两者或全部以及表2或表9中列出的任何CD33重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3中的一者、两者或

全部。

[0038] 在一个实施方案中,CD33结合结构域包含选自SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:57-74或SEQ ID NO:262-268的序列;或相对于前述序列任一者具有至少一个、两个或三个修饰(例如置换,例如保守性置换)、但不多于30、20或10个修饰(例如置换,例如保守性置换)的氨基酸序列;或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,CD33结合结构域是scFv,并且包含本文(例如,表2或表9中)所述的氨基酸序列的轻链可变区经接头(例如,本文所述的接头)与包含本文(例如,表2或表9中)所述的氨基酸序列的重链可变区连接。在一个实施方案中,CD33结合结构域包括(Gly4-Ser)_n接头,其中n是1、2、3、4、5或6、优选地4(SEQ ID NO:26)。scFv的轻链可变区和重链可变区可以例如处于以下任何取向:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0039] 在一个实施方案中,分离的CAR分子包含蛋白质(例如本文所述的蛋白质,例如选自T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154)的跨膜结构域。在一个实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的序列。在一个实施方案中,跨膜结构域包含了具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如置换,例如保守性置换)、但不多于20、10或5个修饰(例如置换,例如保守性置换)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0040] 在一个实施方案中,CD33结合结构域通过铰链区(例如,本文所述的铰链区)连接至跨膜结构域。在一个实施方案中,编码的铰链区包含SEQ ID NO:2或与其具有95-99%同一性的序列。

[0041] 在一个实施方案中,分离的CAR分子还包含了编码共刺激结构域(例如,本文所述的共刺激结构域)的序列。

[0042] 在实施方案中,分离的CAR分子的胞内信号结构域包含共刺激结构域。在实施方案中,分离的CAR分子的胞内信号结构域包含初级信号结构域。在实施方案中,分离的CAR分子的胞内信号结构域包含共刺激结构域和初级信号结构域。

[0043] 在一个实施方案中,共刺激结构域包含蛋白质的功能性信号结构域,所述蛋白质选自:MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、淋巴细胞活化信号分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a和与CD83特异性结合的配体。

[0044] 在一个实施方案中,4-1BB的共刺激结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一

个实施方案中,共刺激结构域包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如置换,例如保守性置换)、但不多于20、10或5个修饰(例如置换,例如保守性置换)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在另一个实施方案中,CD28的共刺激结构域包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列。在一个实施方案中,该共刺激结构域包含了具有SEQ ID NO:379的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:379的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在另一个实施方案中,CD27共刺激结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一个实施方案中,该共刺激结构域包含了具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在另一个实施方案中,ICOS的共刺激结构域包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列。在一个实施方案中,该共刺激结构域包含了具有SEQ ID NO:381的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:381的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0045] 在实施方案中,初级信号结构域包含CD3 ζ 的功能性信号结构域。在实施方案中,CD3 ζ 的功能性信号结构域包含SEQ ID NO:9(突变体CD3 ζ)或SEQ ID NO:10(野生型人CD3 ζ)或与其具有95-99%同一性的序列。

[0046] 在一个实施方案中,胞内信号结构域包含4-1BB的功能性信号结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号结构域。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列至少一个、两个或三个修饰(例如置换,例如保守性置换)、但不多于20、10或5个修饰(例如置换,例如保守性置换)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列,其中包含胞内信号结构域的序列在相同读框中并作为单条多肽链表达。

[0047] 在一个实施方案中,胞内信号结构域包含CD27的功能性信号结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号结构域。在一个实施方案中,CD27胞内信号结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的CD3 ζ 氨基酸序列。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列中至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含SEQ ID NO:8的序列和SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列,其中包含胞内信号结构域的序列在相同读框中并作为单条多肽链表达。

[0048] 在一个实施方案中,胞内信号结构域包含CD28的功能性信号结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号结构域。在一个实施方案中,编码的CD28胞内信号结构域包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的CD3 ζ 氨基酸序列。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含具有SEQ ID NO:379的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列中至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:379的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有95-99%同

一性的序列。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含SEQ ID NO:379的序列和SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列,其中包含胞内信号结构域的序列在相同读框中并作为单条多肽链表达。

[0049] 在一个实施方案中,胞内信号结构域包含ICOS的功能性信号结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号结构域。在一个实施方案中,ICOS胞内信号结构域包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的CD3 ζ 氨基酸序列。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含具有SEQ ID NO:381的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列中至少一个、两个或三个修饰、但不多于20、10或5个修饰的氨基酸序列或与SEQ ID NO:381的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码的胞内信号结构域包含SEQ ID NO:381的序列和SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列,其中包含胞内信号结构域的序列在相同读框中并作为单条多肽链表达。

[0050] 在一个实施方案中,分离的CAR分子还包含前导序列(例如,本文所述的前导序列)。在一个实施方案中,前导序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0051] 在另一个方面,本发明涉及分离的CAR分子,所述分离的CAR分子包含前导序列,例如,本文所述的前导序列(例如,SEQ ID NO:1的前导序列)或与其具有95-99%同一性的前导序列;本文所述的CD33结合结构域,例如,包含本文所述的LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3的CD33结合结构域,例如,表2中描述的CD33结合结构域,或与其具有95-99%同一性的序列的CD33结合结构域;铰链区,例如,本文所述的铰链区,例如,SEQ ID NO:2的铰链区,或与其具有95-99%同一性的铰链区;跨膜结构域,例如,本文所述的跨膜结构域,例如,具有SEQ ID NO:6的序列或与其具有95-99%同一性的序列的跨膜结构域;胞内信号结构域,例如,本文所述的胞内信号结构域(例如,包含共刺激结构域和/或初级信号结构域的胞内信号结构域)。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含共刺激结构域,例如,本文所述的共刺激结构域,例如,具有SEQ ID NO:7的序列或与其具有95-99%同一性的4-1BB共刺激结构域,和/或初级信号结构域(例如,本文所述的初级信号结构域,例如,具有SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列或与其具有95-99%同一性的CD3 ζ 刺激结构域)。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含共刺激结构域,例如,本文所述的共刺激结构域,例如,具有SEQ ID NO:7的序列的4-1BB共刺激结构域,和/或初级信号结构域(例如,本文所述的初级信号结构域,例如,具有SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列的CD3 ζ 刺激结构域)。

[0052] 在一个实施方案中,分离的CAR分子包含(例如,由以下组成)SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55,或SEQ ID NO:56的氨基酸序列或与SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56的氨基酸序列具有至少1、2、3、4、5、10、15、20或30个修饰(例如置换,例如保守性置换)、但不多于60、50或40个修饰(例如置换,例如保守性置换)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56的氨基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0053] 在一个方面,本发明涉及CD33结合结构域,所述CD33结合结构域包含本文所述的CD33结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)、和/或本文所述的CD33结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如,包含一个或多个(例如,全部三个)LC CDR和一个或多个(例如,全部三个)HC CDR的CD33结合结构域。

[0054] 在其他实施方案中,CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何CD33重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在实施方案中,CD33结合结构域还包含LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。在实施方案中,CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何CD33轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。

[0055] 在一些实施方案中,CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何CD33轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3中的一者、两者或全部以及表2或表9中列出的任何CD33重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3中的一者、两者或全部。

[0056] 在一个实施方案中,CD33结合结构域包含本文所述的轻链可变区(例如,SEQ ID NO:66、67、68、69、70、71、72、73或74)和/或本文所述的重链可变区(例如,SEQ ID NO:57、58、59、60、61、62、63、64或65)。在一个实施方案中,CD33结合结构域是包含SEQ ID NO:39、40、41、42、43、44、45、46或47的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,CD33结合结构域(例如,scFv)包含:轻链可变区,所述轻链可变区包含下述氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少一个、两个或三个在SEQ ID NO:66、67、68、69、70、71、72、73或74中提供的轻链可变区的氨基酸序列的修饰(例如置换,例如保守性置换),但不多于30、20或10个修饰(例如置换,例如保守性置换),或与SEQ ID NO:66、67、68、69、70、71、72、73或74中的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,所述重链可变区包含下述氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少一个、两个或三个在SEQ ID NO:57、58、59、60、61、62、63、64或65中提供的重链可变区的氨基酸序列的修饰(例如置换,例如保守性置换),但不多于30、20或10个修饰(例如置换,例如保守性置换),或与SEQ ID NO:57、58、59、60、61、62、63、64或65的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,CD33结合结构域包含选自SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:47的序列或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,CD33结合结构域是scFv,并且包含本文(例如,表2或表9中)所述的氨基酸序列的轻链可变区经接头(例如,本文所述的接头)与包含本文(例如,表2或表9中)所述的氨基酸序列的重链可变区连接。在一个实施方案中,CD33结合结构域包括(Gly4-Ser)_n接头,其中n是1、2、3、4、5或6、优选地4(SEQ ID NO:26)。scFv的轻链可变区和重链可变区可以例如处于以下任何取向:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0057] 在另一个方面,本发明涉及一种载体,所述载体包含本文所述的核酸分子,例如,编码本文所述的CAR的核酸分子。在一个实施方案中,载体选自DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。

[0058] 在一个实施方案中,该载体是慢病毒载体。在一个实施方案中,载体还包含启动

子。在一个实施方案中,启动子是EF-1启动子。在一个实施方案中,EF-1启动子包含SEQ ID NO:11的序列。在另一个实施方案中,启动子是PGK启动子,例如,如本文所述的截短的PGK启动子。

[0059] 在一个实施方案中,载体是体外转录的载体,例如,转录本文所述的核酸分子的RNA的载体。在一个实施方案中,载体中的核酸序列还包含聚腺苷酸尾,例如,本文所述的聚腺苷酸尾,例如,包含约150个腺苷碱基的聚腺苷酸尾(SEQ ID NO:377)。在一个实施方案中,载体中的核酸序列还包含3' UTR,例如,本文所述的3' UTR,例如,包含至少一个衍生自人 β -球蛋白的3' UTR的重复序列的3' UTR。在一个实施方案中,载体中的核酸序列还包含启动子,例如,T2A启动子。

[0060] 在另一个方面,本发明涉及一种细胞,所述细胞包含本文所述的载体。在一个实施方案中,细胞是本文所述的细胞,例如,免疫效应细胞,例如,人T细胞,例如,本文所述的人T细胞,或人NK细胞,例如,本文所述的人NK细胞。在一个实施方案中,人T细胞是CD8⁺ T细胞。

[0061] 在一个实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞还可以表达另一种物质,例如,增强表达CAR的细胞活性的物质。例如,在一个实施方案中,该物质可以是对抑制性分子抑制的物质。抑制性分子的例子包括PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR β ,例如,如本文所述。在一个实施方案中,对抑制性分子抑制的物质包含第一多肽(例如,抑制性分子),所述第一多肽与提供正向信号给细胞的第二多肽(例如,本文所述的胞内信号结构域)缔合。在一个实施方案中,该物质包含例如抑制性分子如PD1、PD-L1、PD-L2、LAG3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、CTLA4、VISTA、CD160、BTLA、LAIR1、TIM3、2B4、TGFR β 、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TIGIT或这些分子中任一者的片段(例如,这些分子中任一者的胞外结构域的至少一部分)的第一多肽和作为本文所述的胞内信号结构域(例如,包含共刺激结构域(例如,如本文所述的41BB、CD27或CD28)和/或初级信号结构域(例如,本文所述的CD3 ζ 信号结构域)的第二多肽。在一个实施方案中,该物质包含PD1或其片段(例如,PD1的胞外结构域的至少一部分)的第一多肽和本文所述的胞内信号结构域(例如,本文所述的CD28信号结构域和/或本文所述的CD3 ζ 信号结构域)的第二多肽。

[0062] 在另一个方面,本发明涉及一种制备细胞的方法,所述方法包括用包含编码CAR(例如,本文所述的CAR)的核酸的载体转导本文所述的细胞,例如,本文所述的免疫效应细胞,例如,本文所述的T细胞或NK细胞。

[0063] 本发明还提供一种产生瞬时表达外源RNA的RNA工程化细胞(例如,本文所述的细胞,例如,免疫效应细胞,例如,T细胞或NK细胞)群体的方法。该方法包括将体外转录的RNA或合成的RNA引入细胞中,其中RNA包含编码本文所述的CAR分子的核酸。

[0064] 在另一个方面,本发明涉及一种在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫的方法,所述方法包括向哺乳动物施用有效量的表达CAR分子的细胞,例如,表达本文所述的CAR分子的细胞。在一个实施方案中,细胞是自体免疫效应细胞,例如,T细胞或NK细胞。在一个实施方案中,细胞是同种异体免疫效应细胞,例如,T细胞或NK细胞。在一个实施方案中,哺乳动物是人,例如,血液学癌患者。

[0065] 在另一个方面,本发明涉及一种治疗患有与表达CD33相关的疾病(例如,增生性疾病、癌前期病状和与表达CD33相关的非癌症相关适应症)的哺乳动物的方法,所述方法包括向哺乳动物施用有效量的表达CAR分子(例如,本文所述的CAR分子)的细胞。在一个实施方案中,哺乳动物是人,例如,血液学癌患者。

[0066] 在一个实施方案中,疾病是本文所述的疾病。在一个实施方案中,与表达CD33相关的疾病是选自增生性疾病如癌症或恶性肿瘤或癌前期病状如脊髓发育不良、脊髓发育不良综合征或白血病前期,或是与表达CD33相关的非癌症相关适应症。在一个实施方案中,疾病是血液学癌,所述血液学癌选自一种或多种急性白血病,包括但不限于急性髓样白血病(AML);脊髓发育不良综合征;骨髓增生性肿瘤;慢性髓样白血病(CML);母细胞性浆细胞样树状细胞肿瘤;并且包括但不限于与表达CD33相关的疾病,包括但不限于表达CD33的非典型和/或非经典癌症、恶性肿瘤、癌前期病状或增生性疾病;及其组合。在一个实施方案中,表达CAR分子(例如,本文所述的CAR分子)的细胞与增加表达CAR分子的细胞的功效的物质(例如,本文所述的物质)组合施用。

[0067] 在另一个方面,本发明涉及一种在细胞移植之前整备受试者的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的包含本文公开的CAR分子的细胞。在一个实施方案中,细胞移植是干细胞移植。干细胞移植是造血干细胞移植或骨髓移植。在一个实施方案中,细胞移植是同种异体或自体的。

[0068] 在一个实施方案中,在细胞移植之前整备受试者包括减少受试者中表达CD33的细胞的数目。受试者中表达CD33的细胞是表达CD33的正常细胞或表达CD33的癌细胞,并且在一些情况下,受试者中的这种整备在细胞移植之前减少表达CD33的正常细胞和表达CD33的癌细胞。

[0069] 在一个实施方案中,表达CAR分子(例如,本文所述的CAR分子)的细胞与免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂组合施用。尽管不希望受理论约束,据信用免疫增强性低剂量(例如,不足以完全抑制免疫系统,但足以改善免疫功能的剂量)治疗伴有PD-1阳性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)减少或PD-1阴性细胞增加。可以通过与表达PD-1配体(例如,PD-L1或PD-L2)的细胞结合,耗竭PD-1阳性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞),但不耗竭PD-1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)。

[0070] 在一个实施方案中,这种方法可以用来优化本文所述的CAR细胞在受试者中的表现。尽管不希望受理论约束,据信在一个实施方案中,改善了内源性未修饰的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)的表现。尽管不希望受理论约束,据信在一个实施方案中,改善了表达CD33 CAR的细胞的表现。在其他实施方案中,可以通过与下述量的mTOR抑制剂接触,离体处理已经工程化或将会工程化以表达CAR的细胞(例如,免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)),所述量增加PD1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)的数目或增加PD1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)的比率。

[0071] 在一个实施方案中,在施用本文所述的表达CAR的细胞(例如,免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞))之前,启动免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂(例如,变构抑制剂(例如,RAD001)或催化性抑制剂)的施用。在一个实施方案中,在足够时间的mTOR抑制剂或充分给予mTOR抑制剂后施用CAR细胞,从而PD1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)的水平或PD1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细

胞)的比率已经至少瞬时增加。在一个实施方案中,在足够时间或在充分给予免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂后收获待工程化以表达CAR的细胞,例如,免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞),从而受试者中的或从受试者收获的PD1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞)的水平或PD1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)的比率已经至少瞬时增加。

[0072] 在一个实施方案中,本发明提供mTOR抑制剂用于治疗受试者,其中所述mTOR抑制剂增强所述受试者的免疫应答,并且其中所述受试者已经接受、正在接受或将要接受表达如本文所述的CD33 CAR的免疫效应细胞。

[0073] 在一个实施方案中,表达CAR分子(例如,本文所述的CAR分子)的细胞与改善一种或多种副作用的物质(例如,本文所述的物质)组合施用,其中所述副作用与施用表达CAR分子的细胞相关。

[0074] 在一个实施方案中,表达CAR分子(例如,本文所述的CAR分子)的细胞与治疗CD33相关疾病的物质(例如,本文所述的物质)组合施用。在某些实施方案中,与CD33相关的疾病是增生性疾病如癌症或恶性肿瘤或癌前期病状如脊髓发育不良、脊髓发育不良综合征或白血病前期,或是与表达CD33相关的非癌症相关适应症。

[0075] 在某些实施方案中,与CD33相关的疾病是血液学癌,所述血液学癌选自一种或多种急性白血病,包括但不限于急性髓样白血病(AML);脊髓发育不良综合征;骨髓增生性肿瘤;慢性髓样白血病(CML);母细胞性浆细胞样树状细胞肿瘤;并且包括但不限于与表达CD33相关的疾病,包括但不限于表达CD33的非典型和/或非经典癌症、恶性肿瘤、癌前期病状或增生性疾病;及其组合。

[0076] 在一些实施方案中,本文所述的CD33 CAR靶向表达CD33的细胞。在实施方案中,本文所述的CD33CAR靶向MDS母细胞。在一些实施方案中,MDS母细胞包含5q缺失(de1(5q))。在实施方案中,本文所述的表达CD33 CAR的细胞用来治疗患有MDS的受试者。在实施方案中,本文所述的表达CD33 CAR的细胞用来治疗患有与分离的de1(5q)相关的MDS的受试者。

[0077] 在实施方案中,本文所述的CD33 CAR靶向MDSC,例如,患有癌症(例如,多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病、或实体恶性肿瘤如卵巢癌、结肠癌或乳腺癌)的受试者中的MDSC。在实施方案中,MDSC为谱系阴性(LIN⁻)、HLA-DR阴性、和CD33阳性。在一些实施方案中,本文所述的表达CD33 CAR的细胞靶向MDS母细胞和MDSC。在实施方案中,本文所述的表达CD33 CAR的细胞用来治疗多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)或实体恶性肿瘤如卵巢癌、结肠癌或乳腺癌。

[0078] 在另一个方面,本发明涉及用作药物的编码本发明CAR的分离核酸分子、本发明CAR的分离多肽分子、包含本发明CAR的载体,和包含本发明CAR的细胞,例如,如本文所述。

[0079] 在另一个方面,本发明涉及用于治疗表达CD33的疾病(例如,如本文所述的表达CD33的疾病)的编码本发明CAR的分离核酸分子、本发明CAR的分离多肽分子、包含本发明CAR的载体和包含本发明CAR的细胞,例如,如本文所述。

[0080] 前述组合物和方法的额外特征和实施方案包括以下一者或多者:

[0081] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子(例如,如本文所述的CD33 CAR核酸或CD33 CAR多肽),或如本文所述的CD33结合结构域,包括表3中提供的1、2或3个来自重链可变区的CDR(例如,HC CDR1、HC CDR2和/或HC CDR3);和/或表4中提供的1、2或3个来自CAR33-1、CAR33-

2、CAR33-3、CAR33-4、CAR33-5、CAR33-6、CAR33-7、CAR33-8、CAR33-9的轻链可变区的CDR(例如,LC CDR1、LC CDR2和/或LC CDR3);或与前述任何序列基本上同一(例如,95-99%同一,或多至5、4、3、2或1个氨基酸变化,例如,置换(例如,保守性置换))的序列。

[0082] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子(例如,如本文所述的CD33 CAR核酸或CD33 CAR多肽),或如本文所述的抗CD33抗原结合结构域,包括表10中提供的1、2或3个来自重链可变区的CDR(例如,HC CDR1、HC CDR2和/或HC CDR3);和/或表11中提供的1、2或3个来自CAR33-1、CAR33-2、CAR33-3、CAR33-4、CAR33-5、CAR33-6、CAR33-7、CAR33-8、CAR33-9的轻链可变区的CDR(例如,LC CDR1、LC CDR2和/或LC CDR3);或与前述任何序列基本上同一(例如,95-99%同一,或多至5、4、3、2或1个氨基酸变化,例如,置换(例如,保守性置换))的序列。

[0083] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子或抗CD33抗原结合结构域包括表12中提供的1、2或3个来自重链可变区的CDR(例如,HCDR1、HCDR2和/或HCDR3);和/或表13中提供的1、2或3个来自CAR33-1、CAR33-2、CAR33-3、CAR33-4、CAR33-5、CAR33-6、CAR33-7、CAR33-8、CAR33-9的轻链可变区的CDR(例如,LC CDR1、LC CDR2和/或LC CDR3);或与前述任何序列基本上同一(例如,95-99%同一,或多至5、4、3、2或1个氨基酸变化,例如,置换(例如,保守性置换))的序列。

[0084] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子或抗CD33抗原结合结构域包括

[0085] (i) 表2或表9中列出的任何CD33轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3,或表4、表9、表11或表13中的LC CDR;和/或

[0086] (ii) 表2或表9中列出的任何CD33重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3,或表3、表9、表10或表12中的HC CDR。

[0087] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子(例如,如本文所述的CD33 CAR核酸或CD33 CAR多肽)或如本文所述的抗CD33抗原结合结构域包括:

[0088] (1) 选自以下之一的三个轻链(LC) CDR:

[0089] (i) CAR33-1的SEQ ID NO:111的LC CDR1、SEQ ID NO:120的LC CDR2和SEQ ID NO:129的LC CDR3;

[0090] (ii) CAR33-2的SEQ ID NO:112的LC CDR1、SEQ ID NO:121的LC CDR2和SEQ ID NO:130的LC CDR3;

[0091] (iii) CAR33-3的SEQ ID NO:113的LC CDR1、SEQ ID NO:122的LC CDR2和SEQ ID NO:131的LC CDR3;

[0092] (iv) CAR33-4的SEQ ID NO:114的LC CDR1、SEQ ID NO:123的LC CDR2和SEQ ID NO:132的LC CDR3;

[0093] (iv) CAR33-5的SEQ ID NO:115的LC CDR1、SEQ ID NO:124的LC CDR2和SEQ ID NO:133的LC CDR3;

[0094] (vi) CAR33-6的SEQ ID NO:116的LC CDR1、SEQ ID NO:125的LC CDR2和SEQ ID NO:134的LC CDR3;

[0095] (vii) CAR33-7的SEQ ID NO:117的LC CDR1、SEQ ID NO:126的LC CDR2和SEQ ID NO:135的LC CDR3;

[0096] (viii) CAR33-8的SEQ ID NO:118的LC CDR1、SEQ ID NO:127的LC CDR2和SEQ ID NO:136的LC CDR3;或

[0097] (ix) CAR33-9的SEQ ID NO:119的LC CDR1、SEQ ID NO:128的LC CDR2和SEQ ID NO:137的LC CDR3;和/或

[0098] (2) 选自以下之一的三个重链 (HC) CDR:

[0099] (i) CAR33-1的SEQ ID NO:84的HC CDR1、SEQ ID NO:93的HC CDR2和SEQ ID NO:102的HCCDR3;

[0100] (ii) CAR33-2的SEQ ID NO:85的HC CDR1、SEQ ID NO:94的HC CDR2和SEQ ID NO:103的HCCDR3;

[0101] (iii) CAR33-3的SEQ ID NO:86的HC CDR1、SEQ ID NO:95的HC CDR2和SEQ ID NO:104的HCCDR3;

[0102] (iv) CAR33-4的SEQ ID NO:87的HC CDR1、SEQ ID NO:96的HC CDR2和SEQ ID NO:105的HCCDR3;

[0103] (v) CAR33-5的SEQ ID NO:88的HC CDR1、SEQ ID NO:97的HC CDR2和SEQ ID NO:106的HCCDR3;

[0104] (vi) CAR33-6的SEQ ID NO:89的HC CDR1、SEQ ID NO:98的HC CDR2和SEQ ID NO:107的HCCDR3;

[0105] (vii) CAR33-7的SEQ ID NO:90的HC CDR1、SEQ ID NO:99的HC CDR2和SEQ ID NO:108的HCCDR3;

[0106] (viii) CAR33-8的SEQ ID NO:91的HC CDR1、SEQ ID NO:100的HC CDR2和SEQ ID NO:109的HCCDR3;或

[0107] (ix) CAR33-9的SEQ ID NO:92的HC CDR1、SEQ ID NO:101的HC CDR2和SEQ ID NO:110的HCCDR3.

[0108] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子(例如,如本文所述的CD33 CAR核酸或CD33 CAR多肽)或如本文所述的抗CD33抗原结合结构域包括:

[0109] (1) 选自以下之一的三个轻链 (LC) CDR:

[0110] (i) CAR33-1的SEQ ID NO:296的LC CDR1、SEQ ID NO:305的LC CDR2和SEQ ID NO:314的LCCDR3;

[0111] (ii) CAR33-2的SEQ ID NO:297的LC CDR1、SEQ ID NO:306的LC CDR2和SEQ ID NO:315的LCCDR3;

[0112] (iii) CAR33-3的SEQ ID NO:298的LC CDR1、SEQ ID NO:307的LC CDR2和SEQ ID NO:316的LCCDR3;

[0113] (iv) CAR33-4的SEQ ID NO:299的LC CDR1、SEQ ID NO:308的LC CDR2和SEQ ID NO:317的LCCDR3;

[0114] (v) CAR33-5的SEQ ID NO:300的LC CDR1、SEQ ID NO:309的LC CDR2和SEQ ID NO:318的LCCDR3;

[0115] (vi) CAR33-6的SEQ ID NO:301的LC CDR1、SEQ ID NO:310的LC CDR2和SEQ ID NO:319的LCCDR3;

[0116] (vii) CAR33-7的SEQ ID NO:302的LC CDR1、SEQ ID NO:311的LC CDR2和SEQ ID NO:320的LCCDR3;

[0117] (viii) CAR33-8的SEQ ID NO:303的LC CDR1、SEQ ID NO:312的LC CDR2和SEQ ID

NO:321的LCCDR3;或

[0118] (ix) CAR33-9的SEQ ID NO:304的LC CDR1、SEQ ID NO:313的LC CDR2和SEQ ID NO:322的LCCDR3;和/或

[0119] (2) 选自以下之一的三个重链 (HC) CDR:

[0120] (i) CAR33-1的SEQ ID NO:269的HC CDR1、SEQ ID NO:278的HC CDR2和SEQ ID NO:287的HCCDR3;

[0121] (ii) CAR33-2的SEQ ID NO:270的HC CDR1、SEQ ID NO:279的HC CDR2和SEQ ID NO:288的HCCDR3;

[0122] (iii) CAR33-3的SEQ ID NO:271的HC CDR1、SEQ ID NO:280的HC CDR2和SEQ ID NO:289的HCCDR3;

[0123] (iv) CAR33-4的SEQ ID NO:272的HC CDR1、SEQ ID NO:281的HC CDR2和SEQ ID NO:290的HCCDR3;

[0124] (iv) CAR33-5的SEQ ID NO:273的HC CDR1、SEQ ID NO:282的HC CDR2和SEQ ID NO:291的HCCDR3;

[0125] (vi) CAR33-6的SEQ ID NO:274的HC CDR1、SEQ ID NO:283的HC CDR2和SEQ ID NO:292的HCCDR3;

[0126] (vii) CAR33-7的SEQ ID NO:275的HC CDR1、SEQ ID NO:284的HC CDR2和SEQ ID NO:293的HCCDR3;

[0127] (viii) CAR33-8的SEQ ID NO:276的HC CDR1、SEQ ID NO:285的HC CDR2和SEQ ID NO:294的HCCDR3;或

[0128] (ix) CAR33-9的SEQ ID NO:277的HC CDR1、SEQ ID NO:286的HC CDR2和SEQ ID NO:295的HCCDR3.

[0129] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子(例如,如本文所述的CD33 CAR核酸或CD33 CAR多肽)或如本文所述的抗CD33抗原结合结构域包括:

[0130] (1) 选自以下之一的三个轻链 (LC) CDR:

[0131] (i) CAR33-1的SEQ ID NO:350的LC CDR1、SEQ ID NO:359的LC CDR2和SEQ ID NO:368的LC CDR3;

[0132] (ii) CAR33-2的SEQ ID NO:351的LC CDR1、SEQ ID NO:360的LC CDR2和SEQ ID NO:369的LC CDR3;

[0133] (iii) CAR33-3的SEQ ID NO:352的LC CDR1、SEQ ID NO:361的LC CDR2和SEQ ID NO:370的LC CDR3;

[0134] (iv) CAR33-4的SEQ ID NO:353的LC CDR1、SEQ ID NO:362的LC CDR2和SEQ ID NO:371的LC CDR3;

[0135] (iv) CAR33-5的SEQ ID NO:354的LC CDR1、SEQ ID NO:363的LC CDR2和SEQ ID NO:372的LC CDR3;

[0136] (vi) CAR33-6的SEQ ID NO:355的LC CDR1、SEQ ID NO:364的LC CDR2和SEQ ID NO:373的LC CDR3;

[0137] (vii) CAR33-7的SEQ ID NO:356的LC CDR1、SEQ ID NO:365的LC CDR2和SEQ ID NO:374的LC CDR3;

[0138] (viii) CAR33-8的SEQ ID NO:357的LC CDR1、SEQ ID NO:366的LC CDR2和SEQ ID NO:375的LC CDR3;或

[0139] (ix) CAR33-9的SEQ ID NO:358的LC CDR1、SEQ ID NO:367的LC CDR2和SEQ ID NO:376的LC CDR3;和/或

[0140] (2) 选自以下之一的三个重链(HC) CDR:

[0141] (i) CAR33-1的SEQ ID NO:323的HC CDR1、SEQ ID NO:332的HC CDR2和SEQ ID NO:341的HC CDR3;

[0142] (ii) CAR33-2的SEQ ID NO:324的HC CDR1、SEQ ID NO:333的HC CDR2和SEQ ID NO:342的HC CDR3;

[0143] (iii) CAR33-3的SEQ ID NO:325的HC CDR1、SEQ ID NO:334的HC CDR2和SEQ ID NO:343的HC CDR3;

[0144] (iv) CAR33-4的SEQ ID NO:326的HC CDR1、SEQ ID NO:335的HC CDR2和SEQ ID NO:344的HC CDR3;

[0145] (v) CAR33-5的SEQ ID NO:327的HC CDR1、SEQ ID NO:336的HC CDR2和SEQ ID NO:345的HC CDR3;

[0146] (vi) CAR33-6的SEQ ID NO:328的HC CDR1、SEQ ID NO:337的HC CDR2和SEQ ID NO:346的HC CDR3;

[0147] (vii) CAR33-7的SEQ ID NO:329的HC CDR1、SEQ ID NO:338的HC CDR2和SEQ ID NO:347的HC CDR3;

[0148] (viii) CAR33-8的SEQ ID NO:330的HC CDR1、SEQ ID NO:339的HC CDR2和SEQ ID NO:348的HC CDR3;或

[0149] (ix) CAR33-9的SEQ ID NO:331的HC CDR1、SEQ ID NO:340的HC CDR2和SEQ ID NO:349的HC CDR3.

[0150] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子(例如,如本文所述的CD33 CAR核酸或CD33 CAR多肽)或如本文所述的抗CD33抗原结合结构域包括:2213scFv氨基酸序列(SEQ ID NO:142)或编码2213scFv的核苷酸序列(SEQ ID NO:141)或其抗原结合结构域(例如,其VH、VL或一个或多个CDR)。

[0151] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子(例如,如本文所述的CD33 CAR核酸或CD33 CAR多肽)或如本文所述的抗CD33抗原结合结构域包括:my96 scFv氨基酸序列(SEQ ID NO:147)或其抗原结合结构域(例如,其VH、VL或一个或多个CDR)。

[0152] 除非另外限定,否则本文中所用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。尽管与本文所述的那些方法和材料相似或等同的方法和材料可以用于实施或检验本发明,然而现在描述合适的方法和材料。本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用的方式完整地并入。此外,所述材料、方法和例子仅是说明性的并且不意在是限制性的。标题、副标题或编号或字母编号的要素,例如,(a)、b)、(i)等,仅为了易于阅读而展示。使用本文件中的标题或编号或字母编号的要素不要求步骤或要素按字母顺序进行并且该步骤或要素必然地彼此独立。本发明的其他特征、目的和优点将从本说明书及附图并且从权利要求书中显而易见。

[0153] 附图简述

[0154] 结合以下附图一起阅读时,将更好地理解本发明优选实施方案的以下详细描述。出于说明本发明的目的,图中显示了目前优选的实施方案。然而,应当理解本发明不限于图中所示实施方案的精确安排和手段。

[0155] 图1是显示CD33在许多原发性AML患者样品中的大部分母细胞上表达的图像(使用标准侧向散射^低CD45^暗特征对AML母细胞设门);n=每组35-46。

[0156] 图2A、图2B、和图2C是显示CD33在来自骨髓发育不良综合征患者的骨髓中表达的图和流式细胞术图谱。图2A显示MDS患者的CD34⁺ CD38⁻造血干细胞区室中表达CD33的细胞的百分数。图2B显示MDS患者中含有髓样祖细胞的CD34⁺ CD38⁺区室中表达CD33的细胞的百分数。图2C是显示CD34⁺ CD38⁻区室中来自MDS患者的平均荧光强度的直方图。

[0157] 图3显示用于实施例1中的CAR构建体的示意图。全部都是使用41BB和CD3 ζ 信号传导的第二代CAR。CART33的scFv衍生自克隆MY9-6。

[0158] 图4是显示CART33的体外活性的图像。CART33介导的T细胞脱颗粒:将CAR33转导和未转导的T细胞与CD33⁺细胞系MOLM14和对照ALL细胞系NALM6在CD28、CD49d和莫能菌素存在下温育4小时。通过流式细胞术测量CD107a脱颗粒。在MOLM14存在下,鼠CART33构建体和人源化CART33构建体的表达均激发特异性脱颗粒(P<0.001)。

[0159] 图5是显示CART33的体外活性的图像。细胞因子产生:表达人源化和鼠CART33的T细胞与MOLM14温育后均产生细胞因子。将T细胞与CD33⁺细胞系MOLM14和对照细胞系NALM6温育4小时。随后将细胞固定、透化和针对胞内肿瘤坏死因子 α 和干扰素 γ 染色。随后通过流式细胞术分析样品。

[0160] 图6是显示CART33的体外活性的图像。表达CAR123的T细胞和表达CAR33的T细胞的增殖:人源化CART33和鼠CART33响应于MOLM14增殖。将T细胞用CFSE标记并且在对照条件下或与MOLM14温育120小时,并且通过流式细胞术测量CFSE稀释物作为增殖的标志物。

[0161] 图7A和图7B是显示CART33的体外活性的两张图。CAR123-T细胞、人源化CAR33-T细胞和表达鼠CART33的T细胞的特异性杀伤:将T细胞与MOLM14或T细胞ALL细胞系Jurkat(对照)温育24小时。在低E:T比率,与鼠CART33相比,huCART33导致显著更多的特异性杀伤。在图7B中,CART33-Jurkat由三角形代表,CART33-MOLM14由倒三角形代表并且CART123-MOLM14由方块代表。

[0162] 图8是显示CART33(IgG4铰链)和CART33(CD8铰链)具有等同体外活性的图像。脱颗粒测定法:将CART33(IgG4铰链)、CART33(CD8铰链)、CART123和未转导的T细胞与CD33⁺细胞系MOLM14温育并且通过流式细胞术测量CD107a脱颗粒。两种CART33构建体在MOLM14存在下均发生特异性脱颗粒。

[0163] 图9是显示CART33(IgG4铰链)和CART33(CD8铰链)具有等同体外活性的图像。细胞因子产生:与MOLM14细胞系温育后,CAR33构建体和CAR123均特异性诱导细胞因子产生。将T细胞在CD28、CD49d和莫能菌素存在下与MOLM14温育4小时。随后将细胞收获、固定、透化和针对肿瘤坏死 α 、MIP1 α 和干扰素 γ 染色。随后通过流式细胞术测量产生细胞因子的细胞的百分数。

[0164] 图10是显示CART33(IgG4铰链)和CART33(CD8铰链)具有等同体外活性的图像。未转导的对照、表达CAR33(IgG4铰链)(即,CAR33-IgG4H)的T细胞、表达CAR33(CD8铰链)(即,CAR33-CD8H)的T细胞或表达CAR123的T细胞响应于MOLM14而增殖。T细胞用CFSE标记并且与

MOLM14温育120小时。

[0165] 图11是显示CART33-CD8H、CART33-IgG4H和CART123的体内抗肿瘤作用比较的示意图。对NOD-SCID-共同 γ 链敲除(NSG)小鼠静脉内注射 1×10^6 个AML细胞系MOLM14并且在6天后对植入成像。在第7日,将小鼠用表达CAR33(IgG4铰链)、CAR33(CD8铰链)、CAR123的T细胞或对照载体(未转导的细胞)处理。注射的T细胞的总数是 2×10^6 i.v.。每周连续成像跟踪小鼠以评估肿瘤负荷。

[0166] 图12是显示CART33-CD8H、CART33-IgG4H和CART123T细胞的等效体内抗肿瘤作用的图像。依据生物发光成像(BLI)显示随时间推移的肿瘤负荷;数据来自一个实验(n=每组5只),图11中显示4个独立小鼠实验的代表。

[0167] 图13是显示比较CART33和CART123体内根除原发性AML的示意图。将原发性AML样品以 5×10^6 个细胞静脉内注射入细胞因子IL3/GM-CSF/SCF转基因的NSG小鼠(NSGS小鼠)。在2-4周后通过眶后采血证实植入并且随后将小鼠用CART33、CART123或对照载体(未转导的细胞)处理。注射的T细胞的总数是 1×10^5 i.v.。一系列眶后采血跟踪小鼠以评估AML负荷。

[0168] 图14是显示CART33和CART123在体内产生等同的原发性AML根除作用的图像。在基线、第14日和第+70日分析来自经未转导的(UTD)、CART33或CART123处理的小鼠的外周血。在用CART33或CART123处理的小鼠中未检出根据图13中描述的实验设置的AML。

[0169] 图15是显示CART33和CART123在体内产生等同的原发性AML根除作用的图像。在图13描述的实验设置中来自小鼠的从所示的不同时间点处眶后采血以母细胞/u1测量的疾病负荷的总结。

[0170] 图16是显示CART33和CART123在体内产生等同的原发性AML根除作用的图像。根据图13中描述的实验设置,用CART33、CART123或UTD处理的小鼠的存活(用CART33或CART123处理与UTD比较时, $p < 0.001$)。

[0171] 图17是显示测试CART33细胞的造血干细胞毒性的设置的示意图。实验方案:在注射衍生自胎肝的人CD34+细胞后6-8周,对人源化免疫系统(HIS)小鼠眶后采血以证实人细胞的植入。将小鼠随后用CART33或UTD(各 1×10^6 个细胞)处理并且每周连续眶后采血。随后在第28日使小鼠安乐死并且收获及分析器官。

[0172] 图18是显示CART33细胞的造血干细胞毒性的图像。在图17中所示的实验完成时从第28日起,通过流式细胞术分析(通过眶后采血)的外周血。与未转导的T细胞处理相比,CART33处理导致外周骨髓样细胞和单核细胞显著减少。

[0173] 图19是显示CART33细胞的造血干细胞毒性的图像。来自图17所示实验中CART33、UTD处理或未处理的小鼠(n=5)的第28日外周血分析的汇总统计。CART33对单核细胞和CD33⁺髓系细胞产生显著毒性,同时B细胞和血小板相对稀少。

[0174] 图20是显示CART33细胞的造血干细胞毒性的图像。来自图17中所示实验的小鼠第28日时依据流式细胞术分析骨髓的绘图。CART33处理导致对单个、huCD45暗、谱系阴性设门的髓样祖细胞(CD34⁺ CD38⁺)和造血干细胞(CD34⁺ CD38⁻)明显减少。

[0175] 图21是显示CART33细胞的造血干细胞毒性的图像。来自图17中所示实验的小鼠的股骨的切片取自UTD T细胞或CART33细胞处理后第28日的小鼠。通过IHC进行huCD45和CD34染色。在对照T细胞和CART33之间没有huCD45的差异,不过这两个组均显示较少的huCD45染色,或许与同种异体人-抗人效应一致。CART33处理的小鼠中存在CD34⁺细胞的特异性减少。

结果代表两个实验。

[0176] 图22是显示测试CART33和CART123的体内造血毒性的设置的示意图。实验方案；NSGS小鼠接受腹腔内施用白消安,随后次日接受来自正常供体的 2×10^6 个T细胞耗竭的骨髓细胞。在4周后通过外周血的流式细胞分析证实植入,并且随后用 1×10^6 个自体T细胞处理小鼠,所述自体T细胞用CART33、CART123或UTD处理。随后在第7日和第14日借助眶后采血追踪小鼠并且在第14日使其安乐死供尸体剖检。

[0177] 图23是显示CART33和CART123在体内产生等同造血毒性的图像。显示了来自图22中所示实验的小鼠第28日时依据流式细胞术分析骨髓的代表性绘图。CART33和CART123处理导致对huCD45暗,Lin-设门的髓样祖细胞(CD34+ CD38+)和造血干细胞(CD34+ CD38-)显著减少。结果代表两个实验。

[0178] 图24是显示CART33和CART123是细胞毒性骨髓发育不良综合征(MDS)骨髓细胞的图像。来自MDS患者的CD34富集的BM与UTD、CART33(IgG4铰链)、CART33(CD8铰链)或CART123温育。在CART33或CART123处理的样品中CD45暗CD34+细胞减少。

[0179] 图25是表达鼠CART33的载体的示意图。

[0180] 图26是表达人源化CART33的载体的示意图。

[0181] 图27是描述Jurkat T细胞系上scFv的细胞表面表达的图像,所述细胞系含有受NFAT调节型启动子驱动的萤光素酶报道分子(称作JNL细胞)。将JNL细胞用慢病毒载体转导,所述慢病毒载体表达编码GFP的cDNA、与CD19结合的scFv或编码针对hsCD33产生的scFv的cDNA。通过将细胞与Fc-加标签的重组hsCD33温育,随后与缀合至藻红蛋白的Fc-特异性第二抗体温育,检测各个scFv在JNL上的细胞表面表达。

[0182] 图28A、图28B、图28C和图28D是显示靶向hsCD33的各个scFv在JNL细胞中激发NFAT活性的能力的图像。将表达针对hsCD33的scFv的JNL细胞与MOLM13或MOLP8细胞系共培养,所述细胞系分别表达hsCD33或缺少hsCD33细胞表面表达(图28A;hsCD33,绿实线;同种型对照,灰色短划线和阴影区域)。图28B描述在MOLM13细胞(实线)或MOLP8细胞(短划线)存在下表达靶向hsCD33的scFv的JNL细胞的活化。表达各个scFv的JNL细胞按不同效应子(即JNL细胞)对靶(即MOLM13或MOLP8)比率铺种并且在温育后24小时在EnVision仪上使用Bright-Glo™萤光素酶测定法分析相对萤光素酶单位(RLU)的表达。图28C是图28B的一个形式,其描述在MOLM13存在下JNL细胞的活化。图28D是图28B的一个形式,其描述在MOLP8存在下JNL细胞的活化。

[0183] 图29A和图29B是一组描述供体衍生的原代T细胞中靶向hsCD33的scFv的活性的图像。描述了scFv在慢病毒载体转导的人原代T细胞的细胞表面上的表达,所述慢病毒载体表达靶向hsCD33的scFv。通过将细胞与重组的Fc-加标签hsCD33和如图27中所述的缀合至藻红蛋白的Fc-特异性第二抗体温育,检测scFv的表达。

[0184] 图30A和图30B是描述T细胞的增殖活性的图像,所述T细胞表达靶向CD33的scFv。将T细胞用CFSE标记并且在MOLM13(图30A,黑实线)、MOLP8(图30A,空心白色棒)的存在下共培养或单独培养(图30A,加阴影棒)以评估UTD原代T细胞或表达靶向hsCD33的scFv的细胞的增殖能力。此外,通过测量与MOLM13细胞、MOLP8细胞共培养的或单独的CFSE标记T细胞的中位荧光强度(MFI),评估原代T细胞中的抗原驱动型细胞分裂,所述CFSE标记T细胞表达scFv克隆CD33-2、-3、-4、-5、-6和-9(图30B)。

[0185] 图31是描述T细胞的溶细胞活性的图像,所述T细胞表达靶向CD33的scFv。为了评估溶细胞活性,将25,000个MOLM13细胞按不同的效应子(即T细胞)对靶(即MOLM13)比率连同表达各个scFv的原代T细胞一起铺种并且通过培养4天后计数CFSE标记的MOLM13细胞的绝对数目,分析MOLM13杀伤作用的程度。

[0186] 图32是依据流式细胞术描述T细胞的交叉反应性的图像,所述T细胞表达靶向CD33的针对食蟹猴CD33(cyCD33)的scFv。将用慢病毒载体转导的JNL细胞与重组的加Fc标签hsCD33(点线)或cyCD33(实线)温育,随后与缀合至藻红蛋白的Fc-特异性第二抗体温育,所述慢病毒载体表达针对hsCD33的scFv。

[0187] 图33A和图33B描述了电穿孔后来自正常供体的T细胞中mRNA CAR33的表达。图33A是在所示的时间点显示T细胞群体中CAR33表达的一系列流式细胞术图谱。将表达CAR33的细胞(加框表示)的百分数定量并且在图谱中显示。图33B是CAR33表达百分数的图示。

[0188] 图34A和图34B比较了慢病毒转导的CAR33与mRNA电穿孔的CAR33的表达。图34A显示4天范围内慢病毒转导的CAR33(CART33LV)在所示时间的稳定表达。图34B显示4天范围内mRNA电穿孔的CAR33(CART33RNA)在所示时间的瞬时表达。CAR33的表达由x-轴上的平均荧光强度(MFI)代表,并且总细胞数目在y-轴上代表。

[0189] 图35A、图35B、图35C和图35D是比较慢病毒转导或mRNA电穿孔后表达CD33的T细胞的溶细胞活性的图示。实验在T细胞电穿孔后1天(图35A)、2天(图35B)、3天(图35C)和4天(图35D)重复。将CART33细胞按x-轴上所示的E:T(效应子对靶)比率与CD33阳性细胞系MOLM14和对照套细胞淋巴瘤细胞系JEKO温育。y-轴中显示在每个比率的杀伤百分数。

[0190] 图36A和图36B是比较在慢病毒转导或mRNA电穿孔后表达CD33的T细胞随时间推移的溶细胞活性的图示。图36A显示与RNA CAR33细胞相比,与MOLM14细胞按E:T(效应子:靶)比率2:1温育4天时慢病毒转导的CAR33细胞的特异性杀伤作用。图36B显示与RNA CAR33细胞相比,与MOLM14细胞按E:T(效应子:靶)比率1:1温育4天时慢病毒转导的CAR33细胞的特异性杀伤作用。

[0191] 图37A、图37B、图37C和图37D显示,CART33细胞响应于CD33+细胞系MOLM14或对原发性AML样品展示出稳健的体外效应子功能。图示代表四次独立实验。图37A显示CD107a脱颗粒。在CD49d、CD28共刺激分子和莫能菌素存在下,将CART33、CART123和未转导的T细胞(UTD)与CD33+/CD123+细胞系MOLM14、作为阳性非特异性T细胞刺激物的PMA/离子霉素和对照T细胞ALL细胞系Jurkat温育。在4小时温育后,通过流式细胞术测量CD107a脱颗粒。图37B显示表达CD33的细胞的特异性杀伤作用。将CART33、CART123和UTD与MOLM14-luc或Jurkat-luc按如所示的不同E:T比率温育24小时并且随后作为残余活细胞的度量,进行生物发光成像。黑色/实线(方块)表示与MOLM14温育的CART123;蓝色/点线(向下指的三角形/实心三角形)表示与MOLM14温育的CART33;并且红色/短划线(向上指的三角形/空心三角形)表示与Jurkat温育的CART33。图37C和图37D显示CART33细胞响应于表达CD33的细胞而增殖。T细胞用CFSE标记并且与MOLM14、作为阳性非特异性T细胞刺激物的PMA/IONO、作为阴性对照的Jurkat或AML样品温育120小时。与Jurkat相比,响应于MOLM14增殖的T细胞的数目显著更高并且与CART33可比较。

[0192] 图38A、图38B和图38C显示CART33细胞响应于表达CD33的细胞MOLM14而产生细胞因子。将CART33、CART123和UTD细胞与MOLM14、PMA/离子霉素和Jurkat温育4小时。随后将细

胞固定和透化,针对5种不同的细胞因子(肿瘤坏死因子 α 、干扰素 γ 、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、巨噬细胞炎性蛋白1b和白介素-2)染色,并且进行流式细胞计数分析。大部分CART33细胞响应于MOLM14而产生多于一种细胞因子(图38A),类似于它们对PMA/离子霉素(阳性对照,图38B)的反应。图38C显示CART33中响应于MOLM14的IL-2、IFN- γ 、GM-CSF和TNF- α 产生比CART123显著更高。将CART33、CART123和UTD细胞与MOLM14、Jurkat和PMA/离子霉素温育24小时。随后收获上清液并进行30-plex Luminex测定法。图39中示出其余细胞因子的水平。

[0193] 图39是显示比较CART33细胞和CART123细胞响应于MOLM14产生细胞因子的系列图。将CART33、CART123和UTD细胞与MOLM14、Jurkat和PMA/离子霉素温育24小时。随后收获上清液并对所示的细胞因子进行30-plex Luminex测定法。

[0194] 图40显示表达CD33的MOLM14细胞的体外特异性杀伤作用。将CART123、CART33(CD8铰链)和CART33(IgG4铰链)与MOLM14按所示的E:T比率温育并且通过生物发光成像评估杀伤作用。在较低的E:T比率,CART33(IgG4铰链)产生比CART33(CD8铰链)更特异的杀伤作用。

[0195] 图41A、图41B和图41C显示骨髓增生异常综合症(MDS)中的抗肿瘤活性。图41A是显示来自MDS患者响应于骨髓细胞的特异性CD107a脱颗粒的图。图41B是显示具有5q缺失的MDS克隆的特异性杀伤的一组图像。图41C是显示如通过FISH确定的处理后剩余的5q缺失克隆定量的图。与UTD组和未处理组相比较时,在CART33处理的组中存在5q-克隆百分数的显著减少。

[0196] 图42A、图42B、图42C显示CART33处理和来自MOLM14植入的异种移植物的存活结果。图11中示出了实验性方案。在图42A中,依据生物发光成像(BLI)随时间推移对肿瘤负荷定量,数据来自一个实验(n =每组5只),每只小鼠由一条线代表。图42B显示三次独立实验的复合存活。与UTD处理相比时,用CART33处理产生显著的存活优势。图42C是来自一个实验的代表性生物发光图像。

[0197] 图43A和图43B显示CART33处理导致MOLM14植入的异种移植物中白血病负荷的剂量依赖性减少。图43A是显示实施例6中所述实验设置的示意图。图43B显示不同组中随时间推移如通过生物发光成像(BLI)所测量的肿瘤负荷的定量。

[0198] 图44是显示在图11中显示的实验设置下不同组中随时间推移如通过生物发光成像(BLI)所测量的肿瘤负荷的图。

[0199] 图45显示RNA-CART33和化疗的组合导致MOLM14植入的异种移植物中白血病负荷进一步减少。

[0200] 图46A和图46B显示对用于体内实验的MOLM14和原发性AML样品上的CD33和CD123的抗体结合能力。使用QUANTUM SIMPLY CELLULAR试剂盒(Bangs Laboratories, Inc)实施测定法。将样品在流动缓冲液中洗涤并且随后用缀合至PE的所示抗体(CD33或CD123)染色。试剂盒中提供的五种不同微球体也用相同的抗体染色。将靶的平均荧光强度与五种微球体比较并且随后根据制造商的方案计算抗体结合能力值。图46A显示对MOLM14的CD33和CD123的抗体结合能力,而图46B显示对这些实验中所用的原发性样品的CD33和CD123的抗体结合能力。

[0201] 图47是显示当暴露于PL21、HL-60或MOLP8靶细胞时依据各种T细胞—CART-33T细胞(CD33-1至CD33-9,或Upenn)、CART-CD19T细胞(CD19)或未转导的T细胞(细胞)的细胞计

数的增殖图。

[0202] 图48A是显示按多种效应子对T细胞比率暴露于各种CART-33T细胞(CD33-1至CD33-9,或Upenn)、CART-CD19T细胞(CD19)或未转导的T细胞(细胞)时HL-60-Luc靶细胞裂解的百分数图。图48B是显示按多种效应子对T细胞比率暴露于各种CART-33T细胞(CD33-1至CD33-9,或Upenn)、CART-CD19T细胞(CD19)或未转导的T细胞(细胞)时PL21/Luc靶细胞裂解的百分数图。图48C是显示按多种效应子对T细胞比率暴露于各种CART-33T细胞(CD33-1至CD33-9,或Upenn)、CART-CD19T细胞(CD19)或未转导的T细胞(细胞)时U87/Luc靶细胞裂解的百分数图。

[0203] 图49是显示当暴露于PL21、HL60或MOLP8靶细胞时,由各种CART-33T细胞(CD33-1至CD33-9,或Upenn)、CART-CD19T细胞(CD19)或未转导的T细胞(细胞)产生的细胞因子(人干扰素- γ (IFN- γ)、人白介素-2 (IL-2) 和人肿瘤坏死因子(TNF))的浓度图。

[0204] 图50A是显示对MDSC的设门策略的流式细胞术绘图。图50B是显示来自正常供体(ND BM)或来自脊髓发育不良综合征(MDS)患者(MDS BM)的骨髓中谱系阴性、HLA-DR阴性、CD33+ (LIN-HLDR-CD33+) 细胞的百分数的图。图50C是显示与恶性MDS群体(MDS)和正常供体群体(ND-BM)相比,MDSC群体(MDSC)中依据平均荧光强度(MFI)测量的CD33水平的图。

[0205] 图51A是显示来自CART33的脱颗粒程度(CD107a水平)和细胞因子产生(GM-CSF、IL-2、TNF- α)的一组流式细胞术绘图。在y-轴上显示CD107a脱颗粒和细胞因子产生,并且x-轴上显示抗CD33CAR。在左侧显示阴性对照(Jurkat)并且在右侧显示MDSC。图51B是显示CART33针对各种靶—Jurkat、PMA/离子霉素(PMA/IONO)、MDS(非MDSC)和MDSC的脱颗粒和细胞因子产量定量的图。

[0206] 图52A-图52D显示单个载体上的各种布局,例如,其中U6调节的shRNA位于EF1 α 调节的CAR编码元件上游或下游。在图52A和图52B绘制的示例性构建体中,通过处于相同方向的U6和EF1 α 启动子发生转录。在图52C和图52D绘制的示例性构建体中,通过处于不同方向的U6和EF1 α 启动子发生转录。在图52E中,shRNA(和相应U6启动子)在第一载体上,并且CAR(和相应的EF1 α 启动子)在第二载体上。

[0207] 图53描述了两个示例性RCAR布局的结构。抗原结合构件包含抗原结合结构域、跨膜结构域和开关结构域。胞内结合构件包含开关结构域、共刺激信号结构域和初级信号结构域。这两个布局显示,本文所述的第一和第二开关结构域可以相对于抗原结合构件和胞内结合构件处于不同取向。本文进一步描述了其他RCAR布局。

[0208] 图54显示在细胞培养系统中通过低剂量RAD001增强表达CAR的转导的T细胞增殖。将CART与NALM-6细胞在不同浓度的RAD001存在下共培养。在共培养4天后评估CAR-阳性CD3-阳性T细胞(黑色)和总T细胞(灰色)的数目。

[0209] 图55描述了每日按0.3、1、3和10mg/kg (mpk) 给予RAD001或给予运载体时NALM6-luc细胞的肿瘤生长量值。圆圈表示运载体;方块表示RAD001的10mg/kg剂量;三角形表示RAD001的3mg/kg剂量,倒三角形表示RAD001的1mg/kg剂量;并且菱形表示RAD001的0.3mg/kg剂量。

[0210] 图56A和图56B显示药代动力学曲线,所述曲线显示携有NALM6肿瘤的NSG小鼠的血液中的RAD001量。图56A显示首剂RAD001后的第0日PK。图56B显示末剂RAD001后的第14日PK。菱形表示RAD001的10mg/kg剂量;方块表示RAD001的1mg/kg剂量;三角形表示RAD001的

3mg/kg剂量;并且x'表示RAD001的10mg/kg剂量。

[0211] 图57A和图57B显示在给予或不给予RAD001的情况下,人源化CD19 CAR T细胞的体内增殖。每日低剂量的RAD001 (0.003mg/kg) 导致CAR T细胞增殖增强,高于huCAR19增殖的正常水平。图57A显示CD4⁺ CAR T细胞;图57B显示CD8⁺ CAR T细胞。圆圈表示PBS;方块表示huCTL019;三角形表示RAD001为3mg/kg的huCTL019;倒三角形表示RAD001为0.3mg/kg的huCTL019;菱形表示RAD001为0.03mg/kg的huCTL019;并且圆圈表示RAD001为0.003mg/kg的huCTL019。

[0212] 图58是显示HL-60-luc异种移植物AML疾病进展的图。蓝色圆圈:用100u1 PBS经尾静脉处理的小鼠;红色方块:用CD19 CAR T细胞处理的小鼠;绿色三角形:用CD33-1 CAR转导的T细胞处理的小鼠;紫色倒三角形:用CD33-2CAR转导的T细胞处理的小鼠;橙色菱形:用CD33-4CAR转导的T细胞处理的小鼠;黑色方块:用CD33-5CAR转导的T细胞处理的小鼠;棕色三角形:用CD33-6CAR转导的T细胞处理的小鼠;暗蓝色圆圈:用CD33-7CAR转导的T细胞处理的小鼠;和暗紫色倒三角形:用CD33-9 CAR转导的T细胞处理的小鼠。

[0213] 发明详述

[0214] 定义

[0215] 除非另外规定,否则本文中使用的全部术语及科学术语具有与本发明相关领域的技术人员通常理解相同意义。

[0216] 术语“一个”和“一种”指该冠词的一个或多个(即,指至少一个)的语法对象。例如,“一个要素”意指一个要素或多个要素。

[0217] 当指可度量值如数量、时间持续期等时,术语“约”意在涵盖距指定值±20%的变动或在一些情况下±10%的变动或在一些情况下±5%的变动或在一些情况下±1%的变动或在一些情况下±0.1%的变动,因为这类变动适于开展所公开的方法。

[0218] 术语“嵌合抗原受体”或备选地“CAR”指至少包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞质信号结构域(本文也称作“胞内信号结构域”)的重组多肽构建体,所述胞质信号结构域包含从如下文定义的刺激分子衍生的功能性信号结构域。在一些实施方案中,CAR多肽构建体中的结构域处于相同的多肽链中,例如,包含嵌合融合蛋白。在一些实施方案中,CAR多肽构建体中的结构域彼此不邻接,例如,处于不同的多肽链中,例如,如在如本文所述的RCAR中提供。

[0219] 在一个方面,CAR的刺激分子是与T细胞受体复合物缔合的 ζ 链。在一个方面,胞质信号结构域包含初级信号结构域(例如,CD3- ζ 的初级信号结构域)。在一个方面,胞质信号结构域还包含从至少一种如下文定义的共刺激分子衍生的一个或多个功能性信号结构域。在一个方面,共刺激分子选自4-1BB(即,CD137)、CD27、ICOS和/或CD28。在一个方面,CAR包含这样的嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和胞内信号结构域,所述胞内信号结构域包含从刺激分子衍生的功能性信号结构域。在一个方面,CAR包含这样的嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和胞内信号结构域,所述胞内信号结构域包含从共刺激分子衍生的功能性信号结构域和从刺激分子衍生的功能性信号结构域。在一个方面,CAR包含这样的嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和胞内信号结构域,所述胞内信号结构域包含两个从一种或多种共刺激分子衍生的功能性信号结构域和从刺激分子衍生的功能性信

号结构域。在一个方面, CAR包含这样的嵌合融合蛋白, 所述嵌合融合蛋白包含胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和胞内信号结构域, 所述胞内信号传导结构域包含至少两个从一种或多种共刺激分子衍生的功能性信号结构域和从刺激分子衍生的功能性信号结构域。在一个方面, CAR在CAR融合蛋白的氨基端(N-ter)包含任选的前导序列。在一个方面, CAR还在胞外抗原识别结构域的N末端包含前导序列, 其中前导序列任选地在细胞加工和CAR定位至细胞膜期间从抗原识别结构域(例如, scFv)切下。

[0220] 包含抗原结合结构域(例如, scFv、单结构域抗体或TCR(例如, TCR α 结合结构域或TCR β 结合结构域))的CAR也称作XCAR, 所述抗原结合结构域靶向特异性肿瘤标志物X, 其中X可以是如本文所述的肿瘤标志物。例如, 包含靶向CD33的抗原结合结构域的CAR称作CD33 CAR。该CAR可以在任何细胞(例如, 如本文所述的免疫效应细胞(例如, T细胞或NK细胞))中表达。

[0221] 术语“信号结构域”指蛋白质的功能性部分, 所述的功能性部分通过在细胞内部传输信息而发挥以下作用: 通过产生第二信使或通过响应于这类信使作为效应子发挥功能, 借助定义的信号传导途径调节细胞活性。

[0222] 如本文所用, 术语“CD33”指分化抗原簇33蛋白, 所述蛋白质是在白血病细胞上以及髓系正常前体细胞上可检出的抗原决定簇。可以在公共数据库(如GenBank、UniProt和Swiss-Prot)中找到人和鼠氨基酸序列和核酸序列。例如, 人CD33的氨基酸序列可以作为UniProt/Swiss-Prot登录号P20138找到, 并且编码人CD33的核苷酸序列可以按登录号NM_001772.3找到。在一个方面, CAR的抗原结合部分识别并结合在CD33蛋白或其片段的胞外结构域内部的表位。在一个方面, CD33蛋白在癌细胞上表达。如本文所用, “CD33”包括这样的蛋白质, 所述蛋白质包含全长野生型CD33的突变(例如, 点突变)、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0223] 如本文所用, 术语“抗体”指衍生自与抗原特异性结合的免疫球蛋白分子的蛋白质或多肽序列。抗体可以是多克隆或单克隆、多链或单链或完整的免疫球蛋白并且可以衍生自天然来源或衍生自重组来源。抗体可以是免疫球蛋白分子的四聚体。

[0224] 术语“抗体片段”指完整抗体或其重组变体的至少一个部分, 并且指足以引起抗体片段对靶(如抗原)的识别和特异性结合的抗原结合结构域, 例如, 完整抗体的抗原确定性可变区。抗体片段的例子包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、scFv抗体片段、线性抗体、单结构域抗体如sdAb(VL或VH)、驼类(camelid)VHH结构域、和从抗体片段形成的多特异性分子, 如包含在铰链区由二硫键连接的两个或多个(例如, 两个)Fab片段的双价片段, 或所连接抗体的两个或多个(例如, 两个)分离的CDR或其他表位结合片段。也可以将抗体片段并入单结构域抗体、大抗体(maxibody)、微型抗体、纳米体、胞内抗体、双体抗体、三体抗体、四体抗体、v-NAR和双-scFv(参见, 例如, Hollinger和Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23:1126-1136, 2005)。也可以将抗体片段移植至基于多肽如纤连蛋白III型(Fn3)的支架中(参见美国专利号6,703,199, 其描述纤连蛋白多肽微型抗体)。

[0225] 术语“scFv”指一种融合蛋白, 其包含至少一个包含轻链可变区的抗体片段和至少一个包含重链可变区的抗体片段, 其中轻链可变区和重链可变区借助柔性短多肽接头连续地连接, 并且能够表达为单链多肽, 并且其中scFv保留衍生它的完整抗体的特异性。除非另外指出, 否则如本文所用, scFv可以具有按任何顺序(例如, 相对于多肽的N末端和C末端)的

VL可变区和VH可变区,scFv可以包含VL-接头-VH或可以包含VH-接头-VL。

[0226] 如本文所用,术语“互补决定区”或“CDR”指在抗体可变区内部赋予抗原特异性和结合亲和力的氨基酸序列。例如,在每个重链可变区中存在三种CDR (HCDR1、HCDR2和HCDR3) 并且在每个轻链可变区中存在三种CDR (LCDR1、LCDR2和LCDR3)。可以使用多种熟知方案的任一者确定给定CDR的精确氨基酸序列界限,所述熟知方案包括由Kabat等人(1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD (“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948 (“Chothia”编号方案)描述的那些;或它们的组合。根据Kabat编号方案,在一些实施方案中,将重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为31-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2)和95-102 (HCDR3);并且将在轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2)和89-97 (LCDR3)。根据Chothia编号方案,在一些实施方案中,将VH中的CDR氨基酸编号为26-32 (HCDR1)、52-56 (HCDR2)和95-102 (HCDR3);并且将VL中的CDR氨基酸残基编号为26-32 (LCDR1)、50-52 (LCDR2)和91-96 (LCDR3)。在组合的Kabat和Chothia编号方案中,在一些实施方案中,CDR对应于作为Kabat CDR、Chothia CDR或二者的部分的氨基酸残基。例如,在一些实施方案中,CDR对应于VH(例如,哺乳动物VH,例如,人VH)中的氨基酸残基26-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2)和99-102 (HCDR3)以及VL(例如,哺乳动物VL,例如,人VL)中的氨基酸残基24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2)和89-97 (LCDR3)。

[0227] 包含抗体或其抗体片段的本发明CAR组合物的部分可以例如以多种形式存在,其中将抗原结合结构域表示为多肽链的部分,例如包括单结构域抗体片段(sdAb)、单链抗体(scFv),或例如人源化或人抗体(Harlow等人,1999,引自:Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Harlow等人,1989,引自:Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,New York;Houston等人,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Bird等人,1988,Science 242:423-426)。在一个方面,本发明CAR组合物的抗原结合结构域包含抗体片段。在又一个方面,CAR包含了包含scFv的抗体片段。

[0228] 如本文所用,术语“结合结构域”或“抗体分子”指包含至少一个免疫球蛋白可变结构域序列的蛋白质,例如,免疫球蛋白链或其片段。术语“结合结构域”或“抗体分子”涵盖抗体和抗体片段。在一个实施方案中,抗体分子是多特异性抗体分子,例如,它包含多个免疫球蛋白可变结构域序列,其中多个免疫球蛋白可变结构域序列的第一免疫球蛋白可变结构域序列具有针对第一表位的结合特异性并且多个免疫球蛋白可变结构域序列的第二免疫球蛋白可变结构域序列具有针对第二表位的结合特异性。在一个实施方案中,多特异性抗体分子是双特异性抗体分子。双特异性抗体对不多于两种抗原具有特异性。双特异性抗体分子以针对第一表位具有结合特异性的第一免疫球蛋白可变结构域序列和针对第二表位具有结合特异性的第二免疫球蛋白可变结构域序列为特征。

[0229] 术语“抗体重链”指以其天然存在构象在抗体分子中存在的两种类型多肽链中的较大者,其在正常情况下决定抗体所属的类别。

[0230] 术语“抗体轻链”指以其天然存在构象在抗体分子中存在的两种类型多肽链中的较小者。 κ 轻链和 λ 轻链指两个主要的抗体轻链同种型。

[0231] 术语“重组抗体”指使用重组DNA技术生成的抗体,例如,通过噬菌体或酵母表达系统表达的抗体。本术语应当还解释为意指已经通过合成编码抗体并且表达抗体蛋白的DNA分子或通过合成特定抗体的氨基酸序列而产生的抗体,其中已经使用本领域可获得的和熟知的重组DNA或氨基酸序列技术获得DNA或氨基酸序列。

[0232] 术语“抗原”或“Ag”指激发免疫应答的分子。这种免疫应答可以涉及抗体产生、或特异性免疫活性细胞的活化、或这两者。技术人员将会理解,任何大分子,实际上包括全部蛋白质或肽,均能充当抗原。另外,抗原可以衍生自重组DNA或基因组DNA。技术人员将会理解,包含编码蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因此编码如本文所用本术语那样的“抗原”,其中所述蛋白质激发免疫应答。另外,本领域技术人员将会理解,抗原不必完全由基因的全长核苷酸序列编码。轻易显而易见的是,本发明包括但不限于使用多于一种基因的部分核苷酸序列并且这些核苷酸序列按多种组合布置以编码激发所需免疫应答的多肽。另外,技术人员将会理解,抗原完全不必要由“基因”编码。轻易显而易见的是,抗原可以合成生成或可以衍生自生物样品、或除多肽外还可能是大分子。这种生物样品可以包括但不限于具有其他生物学组分的组织样品、肿瘤样品、细胞或流体。

[0233] 术语“抗肿瘤作用”指可以通过多种手段展示的生物学效果,包括但不限于,例如,肿瘤体积减小、肿瘤细胞数目减少、转移灶数目减少、预期寿命增加、肿瘤细胞增殖减少、肿瘤细胞存活减少或与癌状况相关的多种生理症状改善。“抗肿瘤作用”也可以通过本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体防止肿瘤在首发位置出现的能力展示。

[0234] 术语“抗癌作用”指可以通过多种手段展示的生物学效果,包括但不限于,例如,肿瘤体积减小、癌细胞数目减少、转移灶数目减少、预期寿命增加、癌细胞增殖减少、癌细胞存活减少或与癌状况相关的多种生理症状改善。“抗癌作用”也可以通过肽、多核苷酸、细胞和抗体防止癌在首发位置出现的能力展示。术语“抗肿瘤作用”指可以通过多种手段展示的生物学效果,包括但不限于,例如,肿瘤体积减小、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。

[0235] 术语“自体的”指这样的任何物质,所述物质从稍后将向个体再次引入所述物质的相同个体衍生。

[0236] 术语“同种异体的”指这样的任何物质,所述物质从与引入所述物质的个体相同的物种的不同动物衍生。当一个或多个基因座处的基因不相同,两位或更多位个体据称彼此是同种异体的。在一些方面,来自相同物种的个体的同种异物物质可以在遗传上足够地不相似以发生抗原性相互作用。

[0237] 术语“异种的”指从不同物种的动物衍生的移植物。

[0238] 如本文所用的术语“单采”指本领域认可的体外方法,借助所述方法,供体或患者的血液从供体或患者取出并且穿过这样的装置,所述装置分离选择的特定组分并将剩余部分返回供体或患者的循环,例如,通过再输血。因此,在“单采样品”的语境中,指使用单采血液成分术获得的样品。

[0239] 术语“组合”指在一个剂量单位形式中的固定组合或联合施用,其中本发明的化合物和组合配偶体(例如另一种如下解释的药物,也称作“治疗药”或“辅药”)可以在相同时间独立地施用或在各时间区间内部分别施用,特别地其中这些时间区间允许联合配偶物显示合作性例如协同效应。单一组分可以在试剂盒中包装或独立包装。可以将组分中一者或两

者(例如,粉末或液体)在施用之前重构或稀释到所需的剂量。如本文中所述的术语“共施用”或“组合施用”等意在涵盖施用选择的组合配偶体至有需要它的单一受试者(例如患者),并且是意在包括其中药物不必然地通过相同施用途径或同时施用的治疗方案。如本文所述的术语“药物组合”意指因混合或合并多于一种有效成分产生的产品并且包括有效成分的固定组合和非固定组合。术语“固定组合”意指有效成分,例如本发明的化合物和组合配偶体,均以单一实体或剂量同时地施用至患者。术语“非固定组合”意指有效成分,例如本发明的化合物和组合配偶体,均作为独立实体同时、同步或无特定时间限制下依次施用至患者,其中这类施用在患者身体内提供治疗有效水平的两种化合物。后者还适用于鸡尾酒治疗,例如施用三种或更多种有效成分。

[0240] 术语“癌症”指异常细胞快速且失控生长为特征的疾病。癌细胞可以局部地或通过血流和淋巴系统扩散到身体其他部分。本文中描述了多种癌症的例子并且它们包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。术语“肿瘤”和“癌症”在本文中互换地使用,例如,两种术语涵盖实体瘤和液体肿瘤,例如,弥散型或循环型肿瘤。如本文所用,术语“癌症”或“肿瘤”包括恶变前以及恶性癌症和肿瘤。

[0241] “从……衍生”如该术语在本文中那样,表示第一分子和第二分子之间的关系。它通常指在第一分子和第二分子之间的结构相似性并且不暗示或不包括对衍生自第二分子的第一分子的过程限制或来源限制。例如,在衍生自CD3 ζ 分子的胞内信号结构域情况下,胞内信号结构域保留足够的CD3 ζ 结构,从而具有需要的功能,即,在适宜条件下产生信号的能力。它不暗示或不包括限制产生胞内信号结构域的特定过程,例如,它不意指,为了提供胞内信号结构域,必须始于CD3 ζ 序列并删除不想要的序列,或赋予突变,以实现胞内信号结构域。

[0242] 如本文所用的短语“与表达CD33相关的疾病”包括但不限于与表达CD33(例如,野生型或突变CD33)的细胞相关的疾病或与表达或表达CD33(例如,野生型或突变CD33)的细胞相关的病状,包括例如增生性疾病,如癌症或恶性肿瘤或癌前期疾病如脊髓发育不良、脊髓发育不良综合征或白血病前期;或与表达CD33(例如,野生型或突变CD33)的细胞相关的非癌症相关适应症。为避免疑问,与表达CD33相关的疾病可以包括与下述细胞相关的病状,所述细胞目前不表达CD33,例如,因为CD33表达已经下调,例如,原因在于用靶向CD33的分子(例如,本文所述的CD33抑制剂)治疗,但以往表达过CD33。在一个方面,与CD33(例如,野生型或突变CD33)表达相关的癌症是血液学癌。在一个方面,血液学癌包括但不限于急性髓样白血病(AML)、脊髓发育不良和脊髓发育不良综合征、骨髓纤维化和骨髓增生性肿瘤、急性淋巴样白血病(ALL)、多毛细胞白血病、幼淋巴细胞白血病、慢性髓样白血病(CML)、母细胞性浆细胞样树状细胞肿瘤等。与CD33(例如,野生型或突变CD33)表达相关的疾病包括但不限于例如,与CD33(例如,野生型或突变CD33)表达相关的非典型和/或非经典癌症、恶性肿瘤、癌前期病状或增生性疾病。也可以包括与CD33表达(例如,野生型或突变CD33)相关的非癌症相关适应症。在实施方案中,与表达CD33相关的非癌症相关适应症包括但不限于,例如,自身免疫疾病(例如,狼疮)、炎性疾病(过敏和哮喘)和移植。在一些实施方案中,表达肿瘤抗原的细胞表达或在任何时间表达过编码肿瘤抗原的mRNA。在一个实施方案中,表达肿瘤抗原的细胞产生肿瘤抗原蛋白(例如,野生型或突变体),并且肿瘤抗原蛋白可以按正

常水平或减低的水平存在。在一个实施方案中,表达肿瘤抗原的细胞在一个时间点产生可检测水平的肿瘤抗原蛋白并且随后基本上不产生可检测的肿瘤抗原蛋白。

[0243] 术语“保守序列修饰”指未显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体或抗体片段的结合特征的氨基酸修饰。这类保守修饰包括氨基酸置换、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术,如位点定向诱变和PCR介导的诱变向本发明的抗体或抗体片段引入修饰。保守性置换是氨基酸残基由具有相似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸置换。已经在本领域中定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸)、 β -侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因而,可以将本发明CAR内部的一个或多个氨基酸残基替换为来自相同侧链家族的其他氨基酸残基,并且可以使用本文所述的功能测定法测试改变的CAR。

[0244] 术语“刺激”指由刺激分子(例如,TCR/CD3复合体)与其相应配体的结合所诱导的初次应答,所述初次应答因而介导信号转导事件,如,但不限于借助TCR/CD3复合体的信号转导。刺激可以介导某些分子改变的表达,如下调TGF- β 和/或细胞骨架结构的再组织等。

[0245] 术语“刺激分子”指由提供初级胞质信号传导序列的T细胞表达的分子,所述的初级胞质信号传导序列在T细胞信号传导途径的至少某个方面以刺激性方式调节TCR复合体的初级活化。在一个方面,初级信号例如通过TCR/CD3复合体与载有肽的MHC分子的结合引发并且导致介导T细胞反应,包括但不限于增殖、活化、分化等。以刺激性方式发挥作用的初级胞质信号传导序列(也称作“初级信号结构域”)可以含有称作基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号传导基序。含有在本发明中特别有用的ITAM的初级胞质信号传导序列的例子包括但不限于衍生自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(也称作“ICOS”)、Fc ϵ RI和CD66d、DAP10和DAP12的那些。在本发明的具体CAR中,本发明的任一种或多种CARs中的胞内信号结构域包含胞内信号传导序列,例如,CD3- ζ 的初级信号传导序列。在本发明的具体CAR中,CD3- ζ 的初级信号传导序列是作为SEQ ID NO:9提供的序列或来自非人类物种(例如,小鼠、啮齿类、猴、猿等)的等价残基。在本发明的具体CAR中,CD3- ζ 的初级信号传导序列是在SEQ ID NO:10中提供的序列或来自非人类物种(例如,小鼠、啮齿类、猴、猿等)的等价残基。

[0246] 术语“抗原呈递细胞”或“APC”指在其表面上呈递与主要组织相容性复合体(MHC)复合的外来抗原的免疫系统细胞如佐细胞(例如,B细胞、树状细胞等)。T细胞可以使用其T细胞受体(TCR)识别这些复合物。APC加工抗原并将它们呈递至T细胞。

[0247] 如本文中那样,术语“胞内信号结构域”指分子的胞内部分。在实施方案中,胞内信号结构域转导效应子功能信号并且指导细胞执行特化功能。尽管可以使用完整的胞内信号结构域,但在许多情况下不需要使用完整链。使用胞内信号结构域的截短部分到这样的程度,从而可以使用这种截短的部分替代完整链,只要它传导效应子功能信号即可。术语“胞内信号结构域”因此意在包括胞内信号结构域的足以传导效应子功能信号的任何截短部分。胞内信号结构域可以产生信号,所述信号促进含有CAR的细胞(例如,CART细胞或表达CAR的NK细胞)的免疫效应子功能。(例如,在CART细胞或表达CAR的NK细胞中的)免疫效应子

功能的例子包括溶细胞活性和辅助活性,包括分泌细胞因子。

[0248] 在一个实施方案中,胞内信号结构域可以包含初级胞内信号结构域。示例性初级胞内信号结构域包括从应答初级刺激或抗原依赖性刺激的分子衍生的那些。在一个实施方案中,胞内信号结构域可以包含共刺激胞内信号结构域。示例性共刺激胞内信号结构域包括从应答共刺激信号或抗原非依赖性刺激的分子衍生的那些。例如,在表达CAR的免疫效应细胞(例如,CART细胞或表达CAR的NK细胞)的情况下,初级胞内信号结构域可以包含T细胞受体的胞质序列,并且共刺激胞内信号结构域可以包含来自共同受体或共刺激分子的胞质序列。

[0249] 初级胞内信号结构域可以包含称作基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号传导基序。含有ITAM的初级胞质信号传导序列的例子包括但不限于衍生自CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(也称作“ICOS”)、Fc ϵ RI和CD66d、DAP10和DAP12的那些。

[0250] 术语“ ζ ”或备选地“ ζ 链”、“CD3- ζ ”或“TCR- ζ ”定义为作为GenBan登录号BAG36664.1提供的蛋白质或来自非人类物种(例如,小鼠、啮齿类、猴、猿等)的等价残基,并且“ ζ 刺激结构域”或备选地“CD3- ζ 刺激结构域”或“TCR- ζ 刺激结构域”定义为来自 ζ 链胞质结构域的氨基酸残基,所述氨基酸残基足以在功能上传播T细胞活化必需的初始信号。在一个方面, ζ 的胞质结构域包含GenBank登录号BAG36664.1的残基52至残基164或作为其功能直向同源物的来自非人类物种(例如,小鼠、啮齿类、猴、猿等)的等价残基。在一个方面,“ ζ 刺激结构域”或“CD3- ζ 刺激结构域”是作为SEQ ID NO:9提供的序列。在一个方面,“ ζ 刺激结构域”或“CD3- ζ 刺激结构域”是作为SEQ ID NO:10提供的序列。

[0251] 术语“共刺激分子”指T细胞上与共刺激配体特异性结合,因而由T细胞介导共刺激反应(如但不限于增殖)的相应结合配偶体。共刺激分子是高效免疫应答要求的除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。共刺激分子包括但不限于:MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、淋巴细胞活化信号分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a和与CD83特异性结合的配体。

[0252] 共刺激胞内信号结构域指共刺激分子的胞内部分。

[0253] 胞内信号结构域可以包含衍生它的分子的完整胞内部分或完整天然胞内信号结构域或其功能性片段。

[0254] 术语“4-1BB”指TNFR超家族成员,所述成员具有作为GenBank登录号AAA62478.2提供的氨基酸序列或来自非人类物种(例如,小鼠、啮齿类、猴、猿等)的等价残基;并且“4-1BB共刺激结构域”定义为GenBank登录号AAA62478.2的氨基酸残基214-255或来自非人类物种

(例如,小鼠、啮齿类、猴、猿等)的等价残基。在一个方面,“4-1BB共刺激结构域”是作为SEQ ID NO:7提供的序列或来自非人类物种(例如,小鼠、啮齿类、猴、猿等)的等价残基。

[0255] 如该术语在本文中那样,术语“免疫效应细胞”指参与免疫应答,例如参与促进免疫效应子反应的细胞。免疫效应细胞的例子包括T细胞,例如, α/β T细胞和 γ/δ T细胞、B细胞、天然杀伤(NK)细胞、天然杀伤T(NKT)细胞、肥大细胞、和髓细胞衍生的吞噬细胞。

[0256] 如该术语在本文中那样,“免疫效应子功能或免疫效应子反应”指例如免疫效应细胞的增强或促进免疫攻击靶细胞的功能或应答。例如,免疫效应子功能或应答指促进杀伤靶细胞或抑制靶细胞生长或增殖的T细胞或NK细胞特性。在T细胞的情况下,初级刺激和共刺激是免疫效应子功能或应答的例子。

[0257] 术语“效应子功能”指细胞的特化功能。T细胞的效应子功能例如可以是溶细胞活性或辅助活性,包括分泌细胞因子。

[0258] 术语“编码”指多核苷酸如基因、cDNA或mRNA中特定核苷酸序列在生物学过程中充当合成具有定义的核苷酸序列(例如,rRNA、tRNA和mRNA)或定义的氨基酸序列的其他聚合物和大分子的模板的内在特性和因其产生的生物学特性。因此,如果与该基因相对应的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生某蛋白质,则基因、cDNA或RNA编码该蛋白质。其核苷酸序列与mRNA序列相同并且通常在序列表中提供的编码链和作为基因或cDNA转录的模板使用的非编码链均可以称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其他产物。

[0259] 除非另外说明,“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此作为简并形式并编码相同氨基酸序列的全部核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的“核苷酸序列”还可以包括内含子到这样的程度,从而编码蛋白质的核苷酸序列可以在某个形式中含有内含子。

[0260] 术语“有效量”或“治疗有效量”在本文中互换地使用并且指化合物、制剂、材料或组合物如本文所述那样有效实现特定生物学结果的量。

[0261] 术语“内源”指来自生物、细胞、组织或系统或在其内部产生的任何物质。

[0262] 术语“外源”指从生物、细胞、组织或系统外部引入或在其外部产生的任何物质。

[0263] 术语“表达”指受启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0264] 术语“转移载体”指物质组合物,所述物质组合物包含分离的核酸并且可以用来向细胞的内部递送分离的核酸。众多载体是本领域已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲型化合物缔合的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“转移载体”包括自主复制型质粒或病毒。该术语还应当解释成进一步包括促进核酸转移入细胞中的非质粒和非病毒化合物,例如,聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒转移载体的例子包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0265] 术语“表达载体”指一种包含重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列有效连接的表达控制序列。表达载体包含用于表达的足够顺式作用元件;其他表达用元件可以由宿主细胞或在体外表达系统中供应。表达载体包括本领域已知的全部那些表达载体,包括并入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸露或含于脂质体中)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0266] 术语“慢病毒”指逆转录病毒科(Retroviridae)的一个属。慢病毒在逆转录病毒当中的独特之处在于能够感染非分裂性细胞;它们可以递送显著量的遗传信息至宿主细胞的DNA,从而它们是基因递送载体的最高效方法之一。HIV、SIV和FIV均是慢病毒的例子。

[0267] 术语“慢病毒载体”指从慢病毒基因组的至少一部分衍生的载体,尤其包括如Milone等人,Mol. Ther. 17 (8) :1453-1464 (2009)中提供的自我失活慢病毒载体。可以在临床使用的慢病毒载体的其他例子例如包括但不限于来自Oxford BioMedica的LENTIVECTOR®基因递送技术、来自Lentigen的LENTIMAX™载体系统等。非临床类型的慢病毒载体也是可获得的并且是本领域技术人员已知的。

[0268] 术语“同源的”或“同一性”指两个聚合物分子之间(例如,在两个核酸分子(如,两个DNA分子或两个RNA分子之间)或在两个多肽分子之间)的亚单位序列同一性。当这两个分子中的亚单位位置被相同单体性亚单位占据时,例如,若两个DNA分子的每个分子中的某位置被腺嘌呤占据,则它们在该位置是同源或同一的。两个序列之间的同一性直接随匹配位置或同源位置的数目而变化,例如,如果两个序列中一半位置(例如长度为10个亚单位的聚合物中的5个位置)是同源的,则这两个序列是50%同源的;如果90%的位置(例如10个位置中9个位置)是匹配或同源的,则这两个序列是90%同源的。

[0269] 非人类(例如,小鼠)抗体的“人源化”形式是含有从非人免疫球蛋白衍生的最少序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如抗体的Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或其他抗原结合子序列)。对大部分情况而言,人源化抗体及其抗体片段是这样的人免疫球蛋白(受者抗体或抗体片段),其中来自所述受者的互补决定区(CDR)中的残基替换为来自非人类物种(供者抗体)如小鼠、大鼠或兔的具有所需特异性、亲和力和能力的CDR中的残基。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv构架区(FR)残基被相应的非人残基替换。另外,人源化抗体/抗体片段可以包含既不在受者抗体中又不在输入的CDR或构架序列中存在的残基。这些修饰可以进一步修正并优化抗体或抗体片段性能。通常,人源化抗体或其抗体片段基本上包含至少1个、并且一般2个可变结构域的全部,其中全部或基本上全部的CDR区与非人类免疫球蛋白的那些CDR区对应并且全部或显著部分的FR区是人免疫球蛋白序列的那些FR区。人源化抗体或抗体片段还可以包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。对于进一步细节,参见Jones等人,Nature, 321:522-525,1986;Reichmann等人,Nature, 332:323-329,1988;Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596,1992。

[0270] “完全人(fully human)”指免疫球蛋白,如抗体或抗体片段,其中整个分子是人来源的或由与抗体或免疫球蛋白的人类形式相同的氨基酸序列组成。

[0271] 术语“分离的”意指从天然状态改变或取出。例如,天然存在于活动物中的核酸或肽不是“分离的”,但是部分或完全与其天然状态的共存物质分离的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以按基本上纯化的形式存在,或可以存在于非天然环境(例如宿主细胞)中。

[0272] 在本发明的上下文中,对常见的核酸碱基使用以下缩写。“A”指腺苷,“C”指胞嘧啶,“G”指鸟苷,“T”指胸苷和“U”指尿苷。

[0273] 术语“有效连接”或“转录性控制”指调节序列和异源核酸序列之间导致异源核酸序列表达的功能性连接。例如,当第一核酸序列置于与第二核酸序列的功能性关系中时,第一核酸序列与第二核酸序列有效连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子与编码序列有效连接。有效连接的DNA序列可以彼此邻接并且例如在需要连接两个蛋白质编码区的情况下,处于相同的可读框中。

[0274] 术语免疫原性组合物的“肠胃外”施用例如包括皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌内

(i.m.)或胸骨内注射、瘤内或输注技术。

[0275] 术语“核酸”或“多核苷酸”指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其单链形式或双链形式的聚合物。除非特别限制,否则该术语包括含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,所述核酸具有与参考核酸相似的结合特性并且以与天然存在核苷酸相似的方式代谢。除非另外说明,特定核酸序列也内在包括其保守方式修饰的变体(例如简并密码子置换)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列,以及明确指出的序列。具体而言,可以通过产生其中一个或多个选择的(或全部)密码子的第三位置用混合型碱基和/或脱氧肌苷残基置换的序列,实现简并密码子置换(Batzer等人,Nucleic Acid Res.19:5081,(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.260:2605-2608,(1985);和Rossolini等人,Mol.Cell.Probes 8:91-98,(1994))。

[0276] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”互换使用并且指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸并且不限制可以构成蛋白质或肽的序列的最大氨基酸数。多肽包括包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用,本术语指短链,例如,所述短链还常见地在本领域称为肽、寡肽和寡聚体,并且还指较长链,所述较长链通常在本领域称为蛋白质,所述蛋白质存在许多类型。“多肽”例如包括多肽的生物学活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等等。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

[0277] 术语“启动子”指由细胞合成装置或引入的合成装置识别、为启动多核苷酸序列特异性转录所需要的DNA序列。

[0278] 术语“启动子/调节序列”指表达与启动子/调节序列有效连接的基因产物所需要的核酸序列。在一些情况下,这个序列可以是核心启动子序列,并且在其他情况下,这个序列还可以包括对表达基因产物所需要的增强子序列和其他调节元件。启动子/调节序列可以例如是以组织特异性方式表达基因产物的那种。

[0279] 术语“组成型”启动子指与编码或规定基因产物的多核苷酸有效连接时,引起基因产物在细胞中在细胞的大部分或全部生理状况下产生的核苷酸序列。

[0280] 术语“诱导型”启动子指与编码或规定基因产物的多核苷酸有效连接时,引起基因产物在细胞中基本上仅当细胞中存在对应于该启动子的诱导物时才产生的核苷酸序列。

[0281] 术语“组织特异性”启动子指与基因编码或规定的多核苷酸有效连接时,引起基因产物在细胞中基本上只有细胞是与该启动子相对应的组织型的细胞才产生的核苷酸序列。

[0282] 术语“癌相关抗原”或“肿瘤抗原”可互换地指这样的分子(一般是蛋白质、糖或脂质),所述分子在癌细胞表面上完整表达或作为片段表达(例如,MHC/肽)并且可用于偏好地导引药剂至癌细胞。在一些实施方案中,肿瘤抗原是由正常细胞和癌细胞均表达的标志物,例如,谱系标志物,例如,B细胞上的CD19。在一些实施方案中,肿瘤抗原是与正常细胞相比在癌细胞中过量表达(例如,与正常细胞相比1倍过量表达、2倍过量表达、3倍或更多倍过量表达)的细胞表面分子。在一些实施方案中,肿瘤抗原是在癌细胞中不适宜合成的细胞表面分子,例如,与正常细胞上表达的分子相比含有缺失、添加或突变的分子。在一些实施方案中,肿瘤抗原将在癌细胞表面上完整地或作为片段(例如,MHC/肽)排他性表达并且在正常细胞表面上不合成或不表达。在一些实施方案中,本发明的CAR包括了包含与MHC呈递的肽结合的抗原结合结构域(例如,抗体或抗体片段)的CAR。通常地,衍生自内源蛋白的肽充填

主要组织相容性复合物 (MHC) I类分子的凹陷,并且由CD8⁺ T淋巴细胞上的T细胞受体 (TCR) 识别。MHC I类复合物由全部有核细胞组成型表达。在癌中,病毒特异性和/或肿瘤特异性肽/MHC复合物代表独特类别的免疫疗法用细胞表面靶。已经描述了在人白细胞抗原 (HLA) - A1或HLA-A2的背景下靶向从病毒或肿瘤抗原衍生的肽的TCR样抗体 (参见,例如,Sastry等人,J Virol.2011 85 (5) :1935-1942;Sergeeva等人,Blood,2011 117 (16) :4262-4272;Verma等人,J Immunol 2010 184 (4) :2156-2165;Willemsen等人,Gene Ther 2001 8 (21) :1601-1608;Dao等人,Sci Transl Med 2013 5 (176) :176ra33;Tassev等人,Cancer Gene Ther 2012 19 (2) :84-100)。例如,可以从筛选文库,如人scFv噬菌体展示文库鉴定TCR样抗体。

[0283] 术语“肿瘤支持抗原”或“癌支持抗原”可互换地指在细胞的表面上表达的分子 (一般是蛋白质、糖或脂质),所述细胞本身是非癌性的,但例如通过促进癌细胞生长或存活 (例如,抵抗免疫细胞) 支持癌细胞。示例性的这种类型细胞包括间质细胞和髓样衍生的阻抑细胞 (MDSC)。肿瘤支持抗原本身不需要在支持肿瘤细胞方面发挥作用,只要抗原存在于支持癌细胞的细胞上。

[0284] 如scFv的上下文中所用的术语“柔性多肽接头”或“接头”指由氨基酸如甘氨酸和/或丝氨酸残基组成的肽接头,其中单独或组合使用所述残基以将可变重链区和可变轻链区连接在一起。在一个实施方案中,柔性多肽接头是Gly/Ser接头并且包含氨基酸序列 (Gly-Gly-Gly-Ser)_n (SEQ ID NO:38),其中n是等于或大于1的正整数。例如,n=1,n=2,n=3,n=4,n=5和n=6,n=7,n=8,n=9及n=10。在一个实施方案中,柔性多肽接头包括但不限于 (Gly₄Ser)₄ (SEQ ID NO:27) 或 (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO:28)。在另一个实施方案中,接头包括 (Gly₂Ser)、(GlySer) 或 (Gly₃Ser) (SEQ ID NO:29) 的多个重复。本发明的范围内还包括通过引用的方式并入本文的WO 2012/138475中描述的接头。

[0285] 如本文所用,5'帽 (也称作RNA帽、RNA 7-甲基鸟苷帽或RNA m⁷G帽) 是紧接在转录起始后添加至真核信使RNA“前端”或5'末端的修饰的鸟嘌呤核苷酸。5'帽由与第一个转录的核苷酸连接的端基组成。其存在对核糖体识别并保护免遭RNA酶作用至关重要。帽添加与转录偶联并且以共转录方式出现,从而每一者影响另一者。在转录起始后不久,正在合成的mRNA的5'末端被结合于RNA聚合酶的帽合成复合物结合。这种酶促复合物催化mRNA加帽需要的化学反应。合成过程作为多步骤生物化学反应推进。可以修饰加帽部分以调节mRNA的功能,如其稳定性或翻译效率。

[0286] 如本文所用,“体外转录的RNA”指已经在体外合成的RNA,优选地mRNA。通常,体外转录的RNA从体外转录载体产生。体外转录载体包含用来产生体外转录的RNA的模板。

[0287] 如本文所用,“聚腺苷酸”是通过多聚腺苷化与mRNA连接的一系列腺苷。在瞬时表达构建体的优选实施方案中,聚腺苷酸数在50和5000之间 (SEQ ID NO:30)、优选地大于64、更优选地大于100、最优选地大于300或400。可以化学或酶促地修饰聚腺苷酸序列以调节mRNA功能如定位、稳定性或翻译效率。

[0288] 如本文所用,“多聚腺苷化”指聚腺苷酰基部分或其修饰变体与信使RNA分子的共价连接。在真核生物中,大部分信使RNA (mRNA) 分子在3'末端聚腺苷酸化。3'聚腺苷酸尾是通过酶 (聚腺苷酸聚合酶) 的作用添加至前mRNA的长腺嘌呤核苷酸序列 (经常几百个)。在高等真核生物中,聚腺苷酸尾添加到含有特定序列 (多聚腺苷化信号) 的转录物上。聚腺苷酸

尾和与之结合的蛋白质协助保护mRNA免遭核酸外切酶降解。多聚腺苷化还对转录终止、mRNA从胞核输出和翻译重要。多聚腺苷化在DNA转录成RNA后立即在胞核中发生,但额外地还可以稍后在细胞质中发生。在转录已经终止后,通过与RNA聚合酶结合的核酸内切酶复合体的作用而切割mRNA链。剪切位点通常以剪切位点附近存在碱基序列AAUAAA为特征。在已经剪切mRNA后,腺苷残基添加至剪切位点处的游离3'末端。

[0289] 如本文所用,“瞬时”指非整合的转基因表达数小时、数天或数周时间,其中表达时间段小于如果基因在宿主细胞中整合至基因组中或含于稳定质粒复制子内部时该基因表达的时间段。

[0290] 如本文所用,术语“治疗”、“疗法”和“治疗着”指减少或减轻增殖性疾病的进展、严重程度和/或持续时间或改善增殖性疾病的一种或多种症状(优选地,一种或多种可察觉症状),其原因在于施用一种或多种疗法(例如,一个或多个治疗药,如本发明的CAR)。在具体实施方案中,术语“治疗”、“疗法”和“治疗着”指改善增殖性疾病的至少一个可度量的身体参数,如肿瘤生长,所述身体参数不必然地由患者可辨识。在其他实施方案中,术语“治疗”、“疗法”和“治疗着”指在身体上(例如通过稳定可察觉症状)、生理上(例如通过稳定身体参数)或这两方抑制增殖性疾病的进展。在其他实施方案中,术语“治疗”、“疗法”和“治疗着”指减少或稳定肿瘤尺寸或癌细胞计数。

[0291] 术语“信号转导途径”指在从细胞一个部分传播信号至细胞的另一个部分中发挥作用的多种信号转导分子之间的生物化学关系。短语“细胞表面受体”包括能够接收信号和跨细胞膜传输信号的分子和分子复合物。

[0292] 术语“受试者”意在包括其中可以激发免疫应答的活生物(例如,哺乳动物、人)。

[0293] 术语“基本上纯化的”细胞指基本上不含其他细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞还指已经与其天然存在状态下通常与之结合的其他细胞类型分离的细胞。在一些情况下,基本上纯化的细胞群体指均一的细胞群体。在其他情况下,这个术语单纯地指已经与其天然状态下天然与它们结合的细胞分离的细胞。在一些方面,细胞是体外培养的。在其他方面,细胞不是体外培养的。

[0294] 如本文所用的术语“治疗性”意指治疗。通过获得减少、抑制、缓解或根除疾病状态来获得治疗效果。

[0295] 如本文所用的术语“预防”意指预防或保护性治疗疾病或疾病状态。

[0296] 在本发明的上下文中,“肿瘤抗原”或“过度增殖性疾病抗原”或“与过度增殖性疾病相关的抗原”指具体过度增殖性疾病共有的抗原。在某些方面,本发明的过度增殖性疾病抗原衍生自癌,所述癌包括但不限于原发性或转移性黑素瘤、胸腺瘤、淋巴瘤、肉瘤、肺癌、肝癌、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、白血病、子宫癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌和腺癌如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌等。

[0297] 术语“转染”或“转化”或“转导”指借以将外源核酸转移或引入宿主细胞的过程。“转染”或“转化”或“转导的”细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。细胞包括原代主题细胞和其后代。

[0298] 术语“特异性结合”指识别样品中存在的相应结合配偶体(例如,T细胞上存在的刺激分子和/或共刺激分子)蛋白质并与其结合的抗体或配体、但是所述抗体或配体基本上不识别或结合样品中其他分子。

[0299] 如本文所用,“可调节的嵌合抗原受体 (RCAR)”指一组多肽,最简单的实施方案中一般指两种多肽,在免疫效应细胞中时,所述多肽为细胞提供针对靶细胞(一般是癌细胞)的特异性及提供胞内信号生成。在一些实施方案中,RCAR至少包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞质信号结构域(本文也称作“胞内信号结构域”),所述胞质信号结构域包含从如本文在CAR分子背景下定义的刺激分子和/或共刺激分子衍生的功能性信号结构域。在一些实施方案中,RCAR中的该组多肽彼此不邻接,例如,处于不同的多肽链中。在一些实施方案中,RCAR包括二聚化开关,其中存在二聚化分子时,所述二聚化开关可以使多肽彼此偶联,例如,可以使抗原结合结构域与胞内信号结构域偶联。在一些实施方案中,RCAR在如本文所述的细胞(例如,免疫效应细胞)(例如,表达RCAR的细胞(本文也称作“RCARX细胞”)中表达。在一个实施方案中,RCARX细胞是T细胞并且称作RCART细胞。在一个实施方案中,RCARX细胞是NK细胞并且称作RCARN细胞。RCAR可以为表达RCAR的细胞提供针对靶细胞(一般是癌细胞)的特异性及提供可调节性胞内信号生成或增殖,所述多肽可以优化表达RCAR的细胞的免疫效应子特性。在实施方案中,RCAR细胞至少部分地依赖抗原结合结构域以提供针对靶细胞的特异性,所述靶细胞包含抗原结合结构域结合的抗原。

[0300] 如该术语在本文中那样,“膜锚定物”或“膜束缚结构域”指足以锚定胞外或胞内结构域至质膜的多肽或部分,例如,肉豆蔻酰基。

[0301] 如该术语在本文中那样,例如指RCAR时,“开关结构域”指存在二聚化分子时与另一个开关结构域缔合的实体,一般是基于多肽的实体。缔合导致与第一开关结构域连接(例如,融合)的第一实体和与第二开关结构域连接(例如,融合)的第二实体功能性偶联。第一开关结构域和第二开关结构域统称为二聚化开关。在实施方案中,第一开关结构域和第二开关结构域彼此相同,例如,它们是具有相同一级氨基酸序列的多肽并统称为同二聚化开关。在实施方案中,第一开关结构域和第二开关结构域彼此不同,例如,它们是具有不同一级氨基酸序列的多肽并统称为异二聚化开关。在实施方案中,开关是胞内的。在实施方案中,开关是胞外的。在实施方案中,开关结构域是基于多肽(例如,基于FKBP或FRB)的实体,并且二聚化分子是小分子,例如,雷帕霉素类似物(rapalogue)。在实施方案中,开关结构域是基于多肽的实体,例如,结合myc肽的scFv,并且二聚化分子是多肽、其片段、或多肽多聚体,例如,myc配体或一个或多个myc scFv结合的myc配体多聚体。在实施方案中,开关结构域是基于多肽的实体,例如,myc受体,并且二聚化分子是抗体或其片段,例如,myc抗体。

[0302] 如该术语在本文中那样,例如谈及RCAR时,“二聚化分子”指促进第一开关结构域与第二开关结构域缔合的实体。在实施方案中,二聚化分子不天然地出现在受试者中或不以将导致明显二聚化的浓度出现。在实施方案中,二聚化分子是小分子,例如,雷帕霉素或雷帕霉素类似物,例如RAD001。

[0303] 术语“生物等效的”指为产生与参比化合物的参比剂量或参比量(例如,RAD001)产生的效果等同的效果所需要的除参比化合物(例如,RAD001)之外的药物量。在一个实施方案中,效果是mTOR抑制水平,例如,如通过P70S6激酶抑制作用所测量,例如,如在体内或体外测定法中评价,例如,如通过本文所述的测定法(例如,Boulay测定法)所测量、或通过蛋白质印迹法测量磷酸化S6水平。在一个实施方案中,效果是PD-1阳性/PD-1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)的比率改变,如通过细胞分选法所测量。在一个实施方案中,mTOR

抑制剂的生物等效量或剂量是实现与参比化合物的参比剂量或参比量相同的P70S6激酶抑制水平的量或剂量。在一个实施方案中,mTOR抑制剂的生物等效量或剂量是实现与参比化合物的参比剂量或参比量相同的PD-1阳性/PD-1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)比率改变水平的量或剂量。

[0304] 联系mTOR抑制剂(例如,变构性mTOR抑制剂,例如,RAD001或雷帕霉素、或催化性mTOR抑制剂)使用时,术语“免疫增强性低剂量”指(例如,如通过抑制P70S6激酶活性所测量)部分地但非完全抑制mTOR活性的mTOR抑制剂剂量。本文中讨论了用于(例如,通过抑制P70S6激酶)评价mTOR活性的方法。该剂量不足以导致完全的免疫抑制,但是足以增强免疫应答。在一个实施方案中,mTOR抑制剂的免疫增强性低剂量导致PD-1阳性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)的数目减少和/或PD-1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)的数目增加、或PD-1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)/PD-1阳性免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)的比率增加。

[0305] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂的免疫增强性低剂量导致原初T细胞的数目增加。在一个实施方案中,mTOR抑制剂的免疫增强性低剂量导致以下一种或多种情况:

[0306] 以下一种或多种标记物的表达增加:例如,在记忆T细胞(例如,记忆T细胞前体)上的CD62L^高、CD127^高、CD27⁺和BCL2;

[0307] 例如记忆T细胞(例如,记忆T细胞前体)上KLRG1的表达减少;和

[0308] 记忆T细胞前体的数目增加,所述记忆T细胞前体例如是具有以下特征的任一个特征或组合特征的细胞:CD62L^高增加、CD127^高增加、CD27⁺增加、KLRG1减少和BCL2增加;

[0309] 其中例如,如与未处理的受试者相比,上文描述的任何变化出现,例如,至少暂时出现。

[0310] 如本文所用的“难治性”,指不响应于治疗的疾病,例如,癌症。在实施方案中,难治性癌症可以在治疗开始前或在治疗开始时抵抗治疗。在其他实施方案中,难治性癌症可以在治疗期间变得耐药。难治性癌症也称作耐药性癌症。

[0311] 如本文所用的“复发的”或“复发”指在改善或反应阶段后,例如,在某疗法(例如,癌疗法)的既往治疗后,疾病(例如,癌症)或疾病(如癌症)的体征和症状复现。例如,反应性阶段可以涉及癌细胞水平降到某个阈值以下,例如,低于20%、1%、10%、5%、4%、3%、2%或1%。再出现可以涉及癌细胞水平升高到某个阈值以上,例如,高于20%、1%、10%、5%、4%、3%、2%或1%。

[0312] 范围:在本公开各处,本发明的多个方面可以按范围样式展示。应当理解,以范围样式描述仅出于方便和简洁目的并且不应当解释为刚性限制本发明的范围。因此,范围的描述应当视为具有具体公开的全部可能子范围以及该范围内部的各个数值。例如,范围如从1至6的描述应当视为具有具体公开的如下子范围,如从1至3、从1至4、从1至5、从2至4、从2至6、从3至6等,以及该范围内部的各个数值,例如,1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。作为另一个例子,范围(如95-99%同一性)包括具有95%、96%、97%、98%或99%同一性的范围,并且包括子范围如96-99%、96-98%、96-97%、97-99%、97-98%和98-99%同一性。无论范围的宽度多大,这均适用。

[0313] 发明详述

[0314] 本文中提供了使用CD33嵌合抗原受体(CAR)治疗或预防疾病(如癌症)的物质组合

物和使用方法。

[0315] 在一个方面,本发明提供众多嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含经工程化与CD33蛋白或其片段特异性结合的抗体或抗体片段。在一个方面,本发明提供经工程化以表达CAR的细胞(例如,免疫效应细胞,例如,T细胞或NK细胞),其中细胞(例如,“CART”)显示出抗肿瘤特性。在一个方面,细胞用CAR转化并且CAR或至少部分CAR在细胞表面上表达。在一些实施方案中,细胞(例如,免疫效应细胞,例如,T细胞或NK细胞)用编码CAR的病毒载体转导。在一些实施方案中,病毒载体是逆转录病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。在一些此类实施方案中,细胞可以稳定表达CAR。在另一个实施方案中,细胞(例如,免疫效应细胞,例如,T细胞或NK细胞)用编码CAR的核酸例如mRNA、cDNA、DNA转染。在一些此类实施方案中,细胞可以瞬时表达CAR。

[0316] 在一个方面,CAR的CD33结合结构域(例如,人或人源化CD33结合结构域)是scFv抗体片段。在一个方面,这类抗体片段是有功能的,因为它们保留等价的结合亲和力,例如,它们以可比的功效结合相同的抗原,它们是例如具有相同重链可变区和轻链可变区的IgG抗体。在一个方面,这类抗体片段是有功能的,因为它们提供生物学应答,所述生物学应答可以包括但不限于激活免疫应答、抑制源自其靶抗原的信号转导、抑制激酶活性等,如技术人员将会理解。

[0317] 在一些方面,本发明的抗体并入嵌合抗原受体(CAR)中。在一个方面,CAR包含本文中作为SEQ ID NOS:48-56提供的多肽序列。

[0318] 在一个方面,本发明CAR的CD33结合结构域(例如,人源化或人CD33结合结构域)部分由其序列已经过密码子优化以便在哺乳动物细胞中表达的转基因编码。在一个方面,本发明的完整CAR构建体由其整个序列已经过密码子优化以便在哺乳动物细胞中表达的转基因编码。密码子优化指以下发现:编码性DNA中同义密码子(即,编码相同氨基酸的密码子)出现的频率在不同物种中偏倚。这种密码子简并性允许相同多肽由多种核苷酸序列编码。多种密码子优化方法是本领域已知的,并且包括例如至少在美国专利号5,786,464和6,114,148中公开的方法。

[0319] 在一个方面,人CD33结合结构域包含在SEQ ID NO:39-47中提供的scFv部分。在一个方面,人CD33结合结构域包含在SEQ ID NO:39中提供的scFv部分。在一个方面,人CD33结合结构域包含在SEQ ID NO:40中提供的scFv部分。在一个方面,人CD33结合结构域包含在SEQ ID NO:41中提供的scFv部分。在一个方面,人CD33结合结构域包含在SEQ ID NO:42中提供的scFv部分。在一个方面,人CD33结合结构域包含在SEQ ID NO:43中提供的scFv部分。在一个方面,人CD33结合结构域包含在SEQ ID NO:44中提供的scFv部分。在一个方面,人CD33结合结构域包含在SEQ ID NO:45中提供的scFv部分。在一个方面,人CD33结合结构域包含在SEQ ID NO:46中提供的scFv部分。在一个方面,人CD33结合结构域包含在SEQ ID NO:47中提供的scFv部分。在一个方面,本发明的CAR将特异性抗体的抗原结合结构域与胞内信号传导分子组合。例如,在一些方面,胞内信号传导分子包括但不限于CD3- ζ 链、4-1BB和CD28信号传导模块及其组合。在一个方面,抗原结合结构域与CD33结合。在一个方面,CD33 CAR包含选自在SEQ ID NO:48-56的一者或多者中提供的序列的CAR。在一个方面,CD33 CAR包含在SEQ ID NO:48中提供的序列。在一个方面,CD33 CAR包含在SEQ ID NO:49中提供的序列。在一个方面,CD33 CAR包含在SEQ ID NO:50中提供的序列。在一个方面,

CD33 CAR包含在SEQ ID NO:51中提供的序列。在一个方面,CD33 CAR包含在SEQ ID NO:52中提供的序列。在一个方面,CD33 CAR包含在SEQ ID NO:53中提供的序列。在一个方面,CD33 CAR包含在SEQ ID NO:54中提供的序列。在一个方面,CD33CAR包含在SEQ ID NO:55中提供的序列。在一个方面,CD33 CAR包含在SEQ ID NO:56中提供的序列。

[0320] 另外,本发明提供CD33 CAR组合物和它们在治疗涉及表达CD33的细胞或组织的癌症或任何恶性肿瘤或自身免疫疾病连同其他疾病的药物或方法中的用途。

[0321] 在一个方面,本发明CAR可以用来根除表达CD33的正常细胞,因而适于作为细胞移植或其他合适疗法之前的细胞整备疗法使用。细胞移植包括干细胞移植,例如造血干细胞移植和骨髓移植。细胞移植是同种异体或自体的。在实施方案中,本发明CAR在细胞移植或其他合适疗法之前根除表达CD33的正常细胞或表达CD33的癌细胞,或这两者。在一个方面,表达CD33的正常细胞是表达CD33的髓样祖先细胞并且细胞移植是干细胞移植。

[0322] 在一个方面,本发明提供经工程化以表达本发明嵌合抗原受体的细胞(例如,免疫效应细胞,例如,T细胞或NK细胞,例如,CART),其中细胞(例如,免疫效应细胞,例如,T细胞或NK细胞,例如,“CART”)显示出抗肿瘤特性。因此,本发明提供了包含CD33结合结构域并经工程化入细胞(例如,免疫效应细胞,例如,T细胞或NK细胞)中的CD33-CAR和它们用于过继疗法的方法。

[0323] 在一个方面,CAR的抗原结合结构域包含人CD33抗体或抗体片段。在一个方面,CAR的抗原结合结构域包含人源化CD33抗体或抗体片段。在一个方面,CAR的抗原结合结构域包含了包含scFv的人CD33抗体片段。在一个方面,CAR的抗原结合结构域是人CD33scFv。在一个方面,CAR的抗原结合结构域包含了包含scFv的人源化CD33抗体片段。在一个方面,CAR的抗原结合结构域是人源化CD33scFv。

[0324] 在一个方面,CD33-CAR包含至少一个胞内结构域,例如,本文所述的胞内结构域,例如,选自CD137(4-1BB)信号结构域、CD28信号结构域、CD3 ζ 信号结构域及其任意组合的胞内结构域。在一个方面,CD33-CAR包含来自除CD137(4-1BB)或CD28之外的一个或多个共刺激分子的至少一个胞内信号结构域。

[0325] 嵌合抗原受体(CAR)

[0326] 本发明也提供了CAR(例如,CAR多肽),所述CAR包含CD33结合结构域(例如,如本文所述的CD33结合结构域)、跨膜结构域和胞内信号结构域,并且其中所述CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何重链结合结构域氨基酸序列的重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。CAR的CD33结合结构域还可以包含表2或表9中列出的任何重链结合结构域氨基酸序列的轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)。

[0327] 本发明还提供核酸分子,所述核酸分子编码如本文所述的CAR,例如,编码包含(例如,如本文所述的)CD33结合结构域、跨膜结构域和胞内信号结构域的CAR,并且其中所述CD33结合结构域包含表2或表9中列出的任何重链结合结构域氨基酸序列的重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。在一个实施方案中,编码的CAR CD33结合结构域还可以包含表2或表9中列出的任何抗BMCA重链结合结构域氨基酸序列的轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)。

[0328] 在具体方面,本发明的CAR构建体包含了选自SEQ ID NO:39-47的人scFv结构域,其中scFv可以前置有如SEQ ID NO:1中提供的任选前导序列并后跟有如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中提供的任选铰链序列、如SEQ ID NO:6中提供的跨膜区、包括SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的胞内信号结构域和包括SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的CD3 ζ 序列,例如,其中各结构域彼此邻接并处于相同的可读框以形成单个融合蛋白。本发明中还包括这样的核苷酸序列,所述核苷酸序列编码选自SEQ ID NO:39-47的人scFv片段每一者的多肽。本发明中还包括这样的核苷酸序列,所述核苷酸序列编码选自SEQ ID NO:39-47的人scFv片段每一者和SEQ ID NO:1、2和6-9结构域每一者的多肽,外加所编码的本发明CD33 CAR。

[0329] 在一个方面,示例性CD33 CAR构建体包含任选的前导序列、胞外抗原结合结构域、铰链、跨膜结构域和胞内刺激结构域。在一个方面,示例性CD33 CAR构建体包含任选的前导序列、胞外抗原结合结构域、铰链、跨膜结构域、胞内共刺激结构域和胞内刺激结构域。将含有本发明人源化scFv结构域的特定CD33CAR构建体作为SEQ ID NO:138提供。

[0330] 在一些实施方案中,本文还将全长CD33 CAR序列作为SEQ ID NO:48-56提供,如表2中所示。

[0331] 将示例性前导序列作为SEQ ID NO:1提供。将示例性铰链/间隔序列作为SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5提供。将示例性跨膜结构域序列作为SEQ ID NO:6提供。将4-1BB蛋白的胞内信号结构域的示例性序列作为SEQ ID NO:7提供。将CD27的胞内信号结构域的示例性序列作为SEQ ID NO:8提供。将示例性CD3 ζ 结构域序列作为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10提供。

[0332] 在一个方面,本发明涵盖一种重组核酸构建体,其包含编码CAR的核酸分子,其中核酸分子包含编码(例如,本文所述的)CD33结合结构域的核酸序列,例如,所述核酸序列与编码胞内信号结构域的核酸序列邻接并处于与之相同的可读框内。在一个方面,人CD33结合结构域选自SEQ ID NO:39-47的一者或多者。在一个方面,人CD33结合结构域是SEQ ID NO:39。在一个方面,人CD33结合结构域是SEQ ID NO:40。在一个方面,人CD33结合结构域是SEQ ID NO:41。在一个方面,人CD33结合结构域是SEQ ID NO:42。在一个方面,人CD33结合结构域是SEQ ID NO:43。在一个方面,人CD33结合结构域是SEQ ID NO:44。在一个方面,人CD33结合结构域是SEQ ID NO:45。在一个方面,人CD33结合结构域是SEQ ID NO:46。在一个方面,人CD33结合结构域是SEQ ID NO:47。

[0333] 在一个方面,本发明涵盖一种重组核酸构建体,其包含编码CAR的核酸分子,其中核酸分子包含编码CD33结合结构域的核酸序列,例如其中该序列与编码胞内信号结构域的核酸序列邻接并处于与之相同的可读框内。可以在CAR中使用的示例性胞内信号结构域包括但不限于例如CD3- ζ 、CD28、4-1BB等中的一个或多个胞内信号结构域。在一些情况下,CAR可以包含CD3- ζ 、CD28、4-1BB等的任何组合。

[0334] 在一个方面,本发明CAR构建体的核酸序列选自SEQ ID NO:75-83的一者或多者。在一个方面,CAR构建体的核酸序列包含SEQ ID NO:75(例如,由其组成)。在一个方面,CAR构建体的核酸序列包含SEQ ID NO:76(例如,由其组成)。在一个方面,CAR构建体的核酸序列包含SEQ ID NO:77(例如,由其组成)。在一个方面,CAR构建体的核酸序列包含SEQ ID NO:78(例如,由其组成)。在一个方面,CAR构建体的核酸序列包含SEQ ID NO:79(例如,由其组

成)。在一个方面,CAR构建体的核酸序列包含SEQ ID NO:80(例如,由其组成)。在一个方面,CAR构建体的核酸序列包含SEQ ID NO:81(例如,由其组成)。在一个方面,CAR构建体的核酸序列包含SEQ ID NO:82(例如,由其组成)。在一个方面,CAR构建体的核酸序列包含SEQ ID NO:83(例如,由其组成)。

[0335] 可以使用本领域已知的重组方法获得编码所需分子的核酸序列,如,例如通过从表达该基因的细胞筛选文库、通过从已知包括该基因的载体衍生该基因、或通过使用标准技术从含有该基因的细胞和组织直接分离。备选地,可以合成地产生目的核酸,而非克隆。本发明包括表达可以直接转导入细胞中的CAR的逆转录病毒载体构建体和慢病毒载体构建体。

[0336] 本发明还包括可以直接转染至细胞中的RNA构建体。一种产生用于转染的mRNA的方法涉及用专门设计的引物体外转录(IVT)模板,随后添加聚腺苷酸,以产生含有3'和5'非翻译序列(“UTR”)、5'帽和/或内部核糖体进入位点(IRES)、待表达核酸和长度一般为50-2000个碱基的聚腺苷酸化尾(SEQ ID NO:35)的构建体。如此产生的RNA可以高效地转染不同种类的细胞。在一个实施方案中,模板包括CAR的序列。在一个实施方案中,将RNA CAR载体通过电穿孔转导至细胞中。

[0337] 抗原结合结构域

[0338] 本发明的CAR包含靶特异性结合元件。部分的选择取决于定义靶细胞表面的配体的类型和数目。例如,可以选择抗原结合结构域以识别充当靶细胞上与具体疾病状态相关的细胞表面标记物的抗原。

[0339] 在一个方面,可以通过将特异性结合所需抗原的抗原结合结构域工程化入CAR中,将CAR介导的T细胞反应指向目的抗原。

[0340] 在一个方面,本发明的CAR包含与CD33特异性结合的结合结构域。在一个方面,本发明CAR包含与人CD33特异性结合的抗原结合结构域。

[0341] 抗原结合结构域可以是与抗原结合的任何蛋白质,所述蛋白质包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体及其功能性片段,包括但不限于单一结构域抗体,如驼类衍生型纳米体的重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)和可变结构域(VHH),以及本领域已知的作为抗原结合结构域发挥作用的备选支架,如重组纤连蛋白结构域等。在一些情况下,从将会最终使用CAR的相同物种衍生有益于抗原结合结构域。例如,对于人类中使用,包含抗体或抗体片段的抗原结合结构域的人残基或人源化残基可能有益于CAR的抗原结合结构域。

[0342] 在一些情况下,从将会最终使用CAR的相同物种衍生有益于抗原结合结构域。例如,对于人类中使用,包含抗体或抗体片段的抗原结合结构域的人残基或人源化残基可能有益于CAR的抗原结合结构域。因此,在一个方面,抗原结合结构域包含人抗体或抗体片段。在一个实施方案中,人CD33结合结构域包含本文所述的人CD33结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)、和/或本文所述的人CD33结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如,包含一个或多个(例如,全部三个)LC CDR和一个或多个(例如,全部三个)HC CDR的人CD33结合结构域。在一个实施方案中,人CD33结合结构域包含本文所述的人CD33结合结构域的

一个或多个(例如,全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如,人CD33结合结构域具有两个可变重链区域,各自包含本文所述的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在一个实施方案中,人CD33结合结构域包含本文(例如,表4中)所述的人轻链可变区和/或本文(例如,表3中)所述的人重链可变区。在一个实施方案中,人CD33结合结构域包含本文(例如,表3中)所述的人重链可变区,例如本文(例如,表3中)所述的至少两个人重链可变区。在一个实施方案中,CD33结合结构域是包括表3-4的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,CD33结合结构域(例如,scFv)包含轻链可变区,所述轻链可变区包含下述氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少一个、两个或三个在表4中提供的轻链可变区的氨基酸序列的修饰(例如置换,例如保守性置换),但不多于30、20或10个修饰(例如置换,例如保守性置换),或包含与表5的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,所述重链可变区包含下述氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少一个、两个或三个在表4中提供的重链可变区的氨基酸序列的修饰(例如置换,例如保守性置换),但不多于30、20或10个修饰(例如置换,例如保守性置换),或包含与表3的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,人CD33结合结构域包含选自SEQ ID NO:39-47的序列或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,人CD33结合结构域是scFv,并且包含本文(例如,表4中)所述的氨基酸序列的轻链可变区经接头(例如,本文所述的接头)与包含本文(例如,表3中)所述的氨基酸序列的重链可变区连接。在一个实施方案中,人CD33结合结构域包括(Gly4-Ser)_n接头,其中n是1、2、3、4、5或6、优选地3或4(SEQ ID NO:26)。scFv的轻链可变区和重链可变区可以例如处于以下任何取向:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0343] 在一个方面,抗原结合结构域包含人源化抗体或抗体片段。在一个实施方案中,人源化CD33结合结构域包含本文所述的CD33结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)、和/或本文所述的CD33结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如,包含一个或多个(例如,全部三个)LC CDR和一个或多个(例如,全部三个)HC CDR的人源化CD33结合结构域。在一个实施方案中,人源化CD33结合结构域包括(Gly4-Ser)_n接头,其中n是1、2、3、4、5或6、优选地3或4(SEQ ID NO:26)。scFv的轻链可变区和重链可变区可以例如处于以下任何取向:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0344] 在一个方面,包括人源化CD33结合结构域的CD33 CAR包含SEQ ID NO:143。在一些方面,非人类抗体是人源化的,其中修饰抗体的特定序列或区域以增加与人类中天然产生的抗体或其片段的相似性。在一个方面,抗原结合结构域是人源化的。与本文所述的CART使用的人源化CD33抗体的例子包括hp67.6或吉妥珠单抗(Gemtuzumab),如WO 2012123755中所述。

[0345] 可以使用本领域已知的多种技术产生人源化抗体,所述技术包括但不限于CDR移植(参见,例如,欧洲专利号EP 239,400;国际公开号WO 91/09967;和美国专利号5,225,539、5,530,101和5,585,089,每份文献通过引用的方式完整并入本文)、镶饰或表面重塑(参见,例如,欧洲专利号EP 592,106和EP 519,596;Padlan,1991,Molecular Immunology, 28(4/5):489-498;Studnicka等人,1994,Protein Engineering,7(6):805-814;和Roguska

等人,1994,PNAS,91:969-973,每份文献通过引用的方式完整并入本文)、链改组(参见,例如,美国专利号5,565,332,所述文献通过引用的方式完整并入本文)和在例如以下文献中公开的技术:美国专利申请公开号US 2005/0042664、美国专利申请公开号US 2005/0048617、美国专利号6,407,213、美国专利号5,766,886、国际公开号W0 9317105、Tan等人, *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002)、Caldas等人, *Protein Eng.*, 13 (5) :353-60 (2000)、Morea等人, *Methods*, 20 (3) :267-79 (2000)、Baca等人, *J. Biol. Chem.*, 272 (16) :10678-84 (1997)、Roguska等人, *Protein Eng.*, 9 (10) :895-904 (1996)、Couto等人, *Cancer Res.*, 55 (23Supp) :5973s-5977s (1995)、Couto等人, *Cancer Res.*, 55 (8) :1717-22 (1995)、Sandhu J S, *Gene*, 150 (2) :409-10 (1994) 和Pedersen等人, *J. Mol. Biol.*, 235 (3) :959-73 (1994), 每份文献通过引用的方式完整并入本文。经常地, 构架区中的构架残基将用来自CDR供体抗体的相应残基置换以改变、例如改善抗原结合。这些构架置换由本领域熟知的方法鉴定, 例如, 通过将CDR和构架残基的相互作用建模以鉴定对抗原结合重要的构架残基并且进行序列比较以鉴定特定位置处的不寻常构架残基。(参见, 例如, Queen等人, 美国专利号5,585,089; 和Riechmann等人, 1988, *Nature*, 332:323, 所述文献通过引用的方式完整并入本文)。

[0346] 人源化抗体或抗体片段具有留在其中的来自非人类来源的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基经常称作“输入”残基, 它们一般取自“输入”可变结构域。如本文中提供, 人源化抗体或抗体片段包含来自非人类免疫球蛋白分子和构架区的一个或多个CDR, 其中包含构架的氨基酸残基完全或大部分衍生自人种系。用于抗体或抗体片段人源化的多项技术是本领域熟知并且可以基本上按照Winter和合作者(Jones等人, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann等人, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等人, *Science*, 239:1534-1536 (1988))的方法, 通过用啮齿类的多个CDR序列或一个CDR序列置换相应的人抗体序列进行, 即, CDR移植法(EP 239,400; PCT公开号W0 91/09967; 和美国专利号4,816,567; 6,331,415; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 6,548,640, 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文)。在这类人源化抗体和抗体片段中, 基本上小于完整人可变结构域的区域已经由来自非人类物种的相应序列置换。人源化抗体往往是其中一些CDR残基并且可能地一些FR残基由来自啮齿动物抗体中类似位点的残基置换的人抗体。抗体和抗体片段的人源化也可以通过镶饰或表面重塑(EP 592,106; EP519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28 (4/5) :489-498; Studnicka等人, *Protein Engineering*, 7 (6) :805-814 (1994); 和Roguska等人, *PNAS*, 91:969-973 (1994))或链改组(美国专利号5,565,332)实现, 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。

[0347] 选择待用于产生人源化抗体的人可变结构域(轻链和重链可变结构域)用于降低抗原性。根据所谓“最佳配合”方法, 针对已知的人可变结构域序列的完整文库筛选啮齿动物抗体的可变结构域的序列。随后鉴定到与啮齿类序列最接近的人类序列并且接受它作为用于人源化抗体的人构架区(FR)(Sims等人, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia等人, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987), 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文)。另一种方法使用从具有特定亚组轻链或重链的全部人类抗体的共有序列中衍生的特定构架。相同的框架可以用于几种不同的人源化抗体(参见, 例如, Nicholson等人, *Mol. Immun.* 34 (16-17) :1157-1165 (1997); Carter等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta等人, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993), 所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文)。在一些实

实施方案中,重链可变区的构架区(例如,全部四个构架区)衍生自VH4_4-59种系序列。在一个实施方案中,构架区可以包含一个、两个、三个、四个或五个修饰,例如,置换,例如来自相应鼠序列(例如,SEQ ID NO:138)处的氨基酸。在一个实施方案中,轻链可变区的构架区(例如,全部四个构架区)衍生自VK3_1.25种系序列。在一个实施方案中,构架区可以包含一个、两个、三个、四个或五个修饰,例如,置换,例如来自相应鼠序列(例如,SEQ ID NO:138)处的氨基酸。

[0348] 在一些方面,包含抗体片段的本发明CAR组合物的部分是人源化的,保留对靶抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性。根据本发明的一个方面,使用亲本序列和人源化序列的三维模型,通过分析亲本序列和多种构思性人源化产物的方法,制备人源化抗体和抗体片段。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的并且是本领域技术人员熟悉的。说明并展示所选择候选免疫球蛋白序列的可能三维构象性结构的计算机程序是可获得的。对这些展示结果的检验允许分析残基在候选免疫球蛋白序列发挥作用中的可能角色,例如,分析影响候选免疫球蛋白结合靶抗原的能力的残基。以这种方式,可以从受体序列和输入序列选出并且组合FR残基,从而实现想要的抗体或抗体片段特征,如对靶抗原的亲和力增加。通常,CDR残基直接并且最基本上参与影响抗原结合作用。

[0349] 人源化抗体或抗体片段可以保留与(例如,在本发明中的)原始抗体相似的抗原特异性,结合人CD33或其片段的能力。在一些实施方案中,人源化抗体或抗体片段可以具有改善的与人CD33或其片段结合的亲和力和/或特异性。

[0350] 在一个方面,抗原结合结构域部分包含选自SEQ ID NO:39-47的一个或多个序列。在一个方面,包括人CD33结合结构域的CD33 CAR选自这样的—个或多个序列,所述序列选自SEQ ID NO:48-56。

[0351] 在一个方面,CD33结合结构域以抗体或抗体片段的特定功能特征或特性表征。例如,在一个方面,本发明CAR组合物的包含抗原结合结构域的部分特异性结合人CD33或其片段。在一个方面,本发明涉及包含抗体或抗体片段的抗原结合结构域,其中抗体结合结构域与CD33蛋白或其片段特异性结合,其中抗体或抗体片段包含了包括SEQ ID NO:48-56的氨基酸序列的可变轻链和/或可变重链。在一个方面,抗原结合结构域包含选自SEQ ID NO:39-47的scFv的氨基酸序列。在某些方面,scFv与前导序列邻接并处于与之相同的可读框内。在一个方面,前导序列是作为SEQ ID NO:1提供的多肽序列。

[0352] 在一个方面,CD33结合结构域是片段,例如,单链可变片段(scFv)。在一个方面,CD33结合结构域是Fv、Fab、(Fab')₂、或双功能(例如双特异性)杂合抗体(例如,Lanzavecchia等人,Eur.J.Immunol.17,105(1987))。在一个方面,本发明的抗体及其片段以野生型的或增强的亲和力结合CD33蛋白质或其片段。

[0353] 在一些情况下,人scFv可以从展示文库衍生。展示文库是一组实体;每种实体包括可及的多肽组分和编码或鉴定多肽组分的可回收组分。多肽组分如此变动,从而代表不同的氨基酸序列。多肽组分可以是任何长度,例如从三个氨基酸至超过300个氨基酸。展示文库实体可以包括多于一种多肽组分,例如,Fab的两条多肽链。在一个示例性实施方案中,展示文库可以用来鉴定人CD33结合结构域。在选择时,将每个文库成员的多肽组分用CD33或其片段探测,并且如果多肽组分与CD33结合,则鉴定到展示文库成员,一般通过在支持物上停留来鉴定。

[0354] 从支持物回收留下的展示文库成员并分析。分析可以包括扩增和在相似或不相似条件下后续选择。例如,可以交替正向选择和负向选择。分析还可以包括测定多肽组分(即,CD33结合结构域)的氨基酸序列和纯化多肽组分供详细表征。

[0355] 多种模式可以用于展示文库。例子包括噬菌体展示。在噬菌体展示中,蛋白质组分一般与噬菌体外壳蛋白共价连接。因翻译编码与外壳蛋白融合的蛋白质组分的核酸产生键接。键接可以包括因抑制终止密码子而并入的柔性肽接头、蛋白酶位点或氨基酸。噬菌体展示例如在美国5,223,409;Smith(1985) *Science* 228:1315-1317;WO 92/18619;WO 91/17271;WO 92/20791;WO 92/15679;WO 93/01288;WO 92/01047;WO 92/09690;WO 90/02809;de Haard等人(1999) *J. Biol. Chem* 274:18218-30;Hoogenboom等人(1998) *Immunotechnology* 4:1-20;Hoogenboom等人(2000) *Immunol Today* 2:371-8和Hoet等人(2005) *Nat Biotechnol.* 23(3) 344-8中描述。可以培育展示蛋白质组分的噬菌体并且使用噬菌体标准制备方法(例如PEG沉淀法)从生长培养基收获之。在选择各个展示噬菌体后,编码所选择蛋白质组分的核酸可以在扩增后从所选择的噬菌体感染的细胞分离或从噬菌体自身分离。可以挑出单集落或蚀斑,分离核酸并测序。

[0356] 其他展示模式包括基于细胞的展示(参见,例如,WO 03/029456)、蛋白质-核酸融合(参见,例如,US6,207,446)、核糖体展示(参见,例如,Mattheakis等人,(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9022和Hanes等人,(2000) *Nat Biotechnol.* 18:1287-92;Hanes等人,(2000) *Methods Enzymol.* 328:404-30;和Schaffitzel等人,(1999) *J Immunol Methods.* 231(1-2):119-35)和大肠杆菌周质展示((2005Nov 22;PMID:16337958)。

[0357] 在一些情况下,可以根据方法本领域已知的方法制备scFv(参见,例如,Bird等人,(1988) *Science* 242:423-426和Huston等人,(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。可以通过使用柔性多肽接头将VH区和VL区连接在一起产生scFv分子。ScFv分子包含长度和/或氨基酸组成优化的接头(例如,Ser-Gly接头)。接头长度可以大大影响scFv的可变区怎样折叠和相互作用。实际上,如果使用短多肽接头(例如,在5-10个氨基酸之间),则防止链内折叠。还需要链间折叠以使这两个可变区一起形成有功能的表位结合位点。关于接头取向和大小的例子,参见,例如,Hollinger等人,1993 *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448、美国专利公开号2005/0100543、2005/0175606、2007/0014794,和PCT公开号WO 2006/020258和WO 2007/024715,所述文献通过引用的方式并入本文。

[0358] scFv可以在其VL区和VH区之间包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50个或更多个氨基酸残基的接头。接头序列可以包含任何天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,接头序列包含氨基酸甘氨酸和丝氨酸。在另一个实施方案中,接头序列包含成组的甘氨酸和丝氨酸重复序列如(Gly₄Ser)_n,其中n是等于或大于1的正整数(SEQ ID NO:25)。在一个实施方案中,接头可以是(Gly₄Ser)₄(SEQ ID NO:27)或(Gly₄Ser)₃(SEQ ID NO:28)。接头长度的变异性可以保留或增强活性,在活性研究中产生优越功效。

[0359] 示例性人CD33 CAR构建体和抗原结合结构域

[0360] 本文中公开的示例性CD33 CAR构建体包含scFv(例如,如本文表2和9中公开的人scFv,任选地前置有任选的前导序列(例如,示例性前导氨基酸序列和核苷酸序列分别是SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:12)。在本文表2中提供人scFv片段的序列(SEQ ID NO:39-83,包

含任选的前导序列)。在本文表9中提供无前导序列的人scFv片段的序列(核苷酸序列为SEQ ID NO:255-261,和氨基酸序列为SEQ ID NO:262-268)。CD33 CAR构建体还可以包括任选的铰链结构域,例如,CD8铰链结构域(例如,包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由SEQ ID NO:1的核酸序列编码);跨膜结构域,例如,CD8跨膜结构域(例如,包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或由SEQ ID NO:17的核苷酸序列编码);胞内结构域,例如,4-1BB胞内结构域(例如,包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列或由SEQ ID NO:18的核苷酸序列编码);和功能性信号结构域,例如,CD3 ζ 结构域(例如,包括SEQ ID NO:9或10的氨基酸序列,或由SEQ ID NO:20或21的核苷酸序列编码)。在某些实施方案中,各结构域邻接并处于相同的可读框内,以形成单一融合蛋白。在其他实施方案中,各结构域处于分离的多肽中,例如,如处于如本文所述的RCAR分子中。

[0361] 在某些实施方案中,全长CD33 CAR分子包括表2中提供的CAR33-1、CAR33-2、CAR33-3、CAR33-4、CAR33-5、CAR33-6、CAR33-7、CAR33-8、CAR33-9的氨基酸序列或与其基本上同一(例如,95-99%)的序列或由表2中提供的CAR33-1、CAR33-2、CAR33-3、CAR33-4、CAR33-5、CAR33-6、CAR33-7、CAR33-8、CAR33-9的核苷酸序列或与其基本上同一(例如,95-99%)的序列编码。

[0362] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子或抗CD33抗原结合结构域包括表2中提供的CAR33-1、CAR33-2、CAR33-3、CAR33-4、CAR33-5、CAR33-6、CAR33-7、CAR33-8、CAR33-9的scFv氨基酸序列(具有或没有前导序列);或包括表9中提供的CAR33-1、CAR33-2、CAR33-4、CAR33-5、CAR33-6、CAR33-7、CAR33-9的scFv氨基酸序列,或由表9中提供的CAR33-1、CAR33-2、CAR33-4、CAR33-5、CAR33-6、CAR33-7、CAR33-9的核苷酸序列编码,或包含与前述任何序列基本上同一(例如,95-99%同一,或多至20、15、10、8、6、5、4、3、2或1个氨基酸变化,例如,置换(例如,保守性置换))的序列或其编码。

[0363] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子或抗CD33抗原结合结构域包括表2中提供的CAR33-1、CAR33-2、CAR33-3、CAR33-4、CAR33-5、CAR33-6、CAR33-7、CAR33-8、CAR33-9的重链可变区和/或轻链可变区或与前述任何序列基本上同一(例如,95-99%同一,或多至20、15、10、8、6、5、4、3、2或1个氨基酸变化,例如,置换(例如,保守性置换))的序列。

[0364] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子或抗CD33抗原结合结构域包括表3中提供的1、2或3个来自重链可变区的CDR(例如,HC CDR1,HC CDR2和/或HC CDR3);和/或表4中提供的1、2或3个来自CAR33-1、CAR33-2、CAR33-3、CAR33-4、CAR33-5、CAR33-6、CAR33-7、CAR33-8、CAR33-9的轻链可变区的CDR(例如,LC CDR1、LC CDR2和/或LC CDR3);或与上述任何序列基本上同一(例如,95-99%同一,或多至5、4、3、2或1个氨基酸变化,例如,置换(例如,保守性置换))的序列。

[0365] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子或抗CD33抗原结合结构域包括表10中提供的1、2或3个来自重链可变区的CDR(例如,HC CDR1,HC CDR2和/或HC CDR3);和/或表11中提供的1、2或3个来自CAR33-1、CAR33-2、CAR33-3、CAR33-4、CAR33-5、CAR33-6、CAR33-7、CAR33-8、CAR33-9的轻链可变区的CDR(例如,LC CDR1、LC CDR2和/或LC CDR3);或与上述任何序列基本上同一(例如,95-99%同一,或多至5、4、3、2或1个氨基酸变化,例如,置换(例如,保守性置换))的序列。

[0366] 在某些实施方案中,CD33 CAR分子或抗CD33抗原结合结构域包括表12中提供的1、

2或3个来自重链可变区(例如,HC CDR1,HC CDR2和/或HC CDR3)的CDR;和/或表13中提供的1、2或3个来自CAR33-1、CAR33-2、CAR33-3、CAR33-4、CAR33-5、CAR33-6、CAR33-7、CAR33-8、CAR33-9的轻链可变区(例如,LCDR1、LCDR2和/或LCDR3);或与上述任何序列基本上同一(例如,95-99%同一,或多至5、4、3、2或1个氨基酸变化,例如,置换(例如,保守性置换))的序列。

[0367] 对于重链可变结构域,在表3中显示scFv结构域的人CDR序列,并且对于轻链可变结构域,在表4中显示scFv结构域的人CDR序列。“ID”代表每个CDR的相应SEQ ID NO。在表3和表4中提供的CDR依据Kabat和Chothia编号方案的联合编号。

[0368] 表3. 重链可变结构域CDR

[0369]

候选物	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
CAR33-1	GYSFTSYWIG	84	I IYPGDS DTRYSPSFQG	93	LGGSLPDYGM DV	102
CAR33-2	GYIFTNYYVH	85	I ISPSGG SPTYAQLQG	94	ESRLRGNRLGLQSSIFDH	103
CAR33-3	GFTFSSYAMS	86	AISGSGG STYYADSVKG	95	EDTIRGPNYYYYYGM DV	104
CAR33-4	GYSFTSYWIG	87	I IYPGDS DTRYSPSFQG	96	GGYS DYDYFDF	105
CAR33-5	GFTFDDYAMH	88	VIWPDGG QKYYGDSVKG	97	HFNAWDY	106
CAR33-6	GFTFSIFAMH	89	TISYDGS NAFYADSVEG	98	AGDGGYDV FDS	107
CAR33-7	GFTFSSYAMS	90	AISGSGG STYYADSVKG	99	ETDYYGSGTFDY	108
CAR33-8	GYMFTDFFIH	91	WINPNSG VTKYAQKFQG	100	WYSSGWYGIANI	109
CAR33-9	GYSFTNYWIG	92	I IYPGDS DTRYSPSFQG	101	HGPSSWGEFDY	110

[0370] 表4. 轻链可变结构域CDR

[0371]

候选物	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
CAR33-1	RSSQSLLHSNGYNYLD	111	LGSNRAS	120	MQALQTLIT	129
CAR33-2	QASQDINNHLN	112	DTSNLEI	121	QQYENLPLT	130
CAR33-3	RASQDIDTWLA	113	AASN LQG	122	QQASIFPPT	131
CAR33-4	RSSQSLLHSNGYNYLD	114	LGSNRAS	123	MQALQTPFT	132
CAR33-5	QASQGISQFLN	115	DASNLEP	124	QQYDDLPLT	133
CAR33-6	RSSQSLLHSNGYNYLD	116	LGSNRAS	125	MQALQTPT	134
CAR33-7	RASQGIGIYLA	117	GASTLQS	126	QQSNNFPPT	135
CAR33-8	QASHDISNYLH	118	DASNLET	127	QQSDDLPH T	136
CAR33-9	RASQSISSYLN	119	AASSLQS	128	QQSYSTPLT	137

[0372] 表10:根据Kabat编号方案的重链可变结构域CDR(Kabat等人(1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)

[0373]

候选物	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
141643-CAR33-1	SYWIG	269	I IYPGDS DTRYSPSFQG	278	LGGSLPDYGM DV	287
141644-CAR33-2	NYYVH	270	I ISPSGG SPTYAQLQG	279	ESRLRGNRLGLQSSIFDH	288
141645-CAR33-3	SYAMS	271	AISGSGG STYYADSVKG	280	EDTIRGPNYYYYYGM DV	289
141646-CAR33-4	SYWIG	272	I IYPGDS DTRYSPSFQG	281	GGYS DYDYFDF	290
141647-CAR33-5	DYAMH	273	VIWPDGG QKYYGDSVKG	282	HFNAWDY	291

141648-CAR33-6	IFAMH	274	TISYDGSNAFYADSVEG	283	AGDGGYDVFDS	292
141649-CAR33-7	SYAMS	275	AISGSGGSTYYADSVKG	284	ETDYYGSGTFDY	293
141650-CAR33-8	DFFIH	276	WINPNSGVTKYAQKFQG	285	WYSSGWYGIANI	294
141651-CAR33-9	NYWIG	277	IYPGSDTRYSPSFQG	286	HGPSSWGEFDY	295

[0374] 表11:根据Kabat编号方案的轻链可变结构域CDR (Kabat等人(1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)

[0375]

候选物	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
141643-CAR33-1	RSSQSLLSNGYNYLD	296	LGSNRAS	305	MQALQTLIT	314
141644-CAR33-2	QASQDINNHLN	297	DTSNLEI	306	QQYENLPLT	315
141645-CAR33-3	RASQDIDTWLA	298	AASNLQG	307	QQASIFPPT	316
141646-CAR33-4	RSSQSLLSNGYNYLD	299	LGSNRAS	308	MQALQTPFT	317
141647-CAR33-5	QASQGISQFLN	300	DASNLEP	309	QQYDDLPLT	318
141648-CAR33-6	RSSQSLLSNGYNYLD	301	LGSNRAS	310	MQALQTPT	319
141649-CAR33-7	RASQGIGIYLA	302	GASTLQS	311	QQSNNFPPT	320
141650-CAR33-8	QASHDISNYLH	303	DASNLET	312	QQSDDLPH	321
141651-CAR33-9	RASQSISSYLN	304	AASSLQS	313	QQSYSTPLT	322

[0376] 表12:根据Chothia编号方案的重链可变结构域CDR (Al-Lazikani等人, (1997) JMB 273, 927-948)

[0377]

候选物	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
141643-CAR33-1	GYSFTSY	323	YPGDSD	332	LGGSLPDYGM DV	341
141644-CAR33-2	GYIFTNY	324	SPSGGS	333	ESRLRGNRLGLQSSIFDH	342
141645-CAR33-3	GFTFSSY	325	SGSGGS	334	EDTIRGPNYYYYGMDV	343
141646-CAR33-4	GYSFTSY	326	YPGDSD	335	GGYSDYDYDF	344
141647-CAR33-5	GFTFDDY	327	WPDGGQ	336	HFNAWDY	345
141648-CAR33-6	GFTFSIF	328	SYDGSN	337	AGDGGYDVFDS	346
141649-CAR33-7	GFTFSSY	329	SGSGGS	338	ETDYYGSGTFDY	347
141650-CAR33-8	GYMFTDF	330	NPNSGV	339	WYSSGWYGIANI	348
141651-CAR33-9	GYSFTNY	331	YPGDSD	340	HGPSSWGEFDY	349

[0378] 表13:根据Chothia编号方案的轻链可变结构域CDR (Al-Lazikani等人, (1997) JMB 273, 927-948)

[0379]

候选物	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
141643-CAR33-1	SQSLLSNGYNY	350	LGS	359	ALQTLI	368
141644-CAR33-2	SQDINNHLN	351	DTS	360	YENLPL	369
141645-CAR33-3	SQDIDTW	352	AAS	361	ASIFPP	370
141646-CAR33-4	SQSLLSNGYNY	353	LGS	362	ALQTPF	371
141647-CAR33-5	SQGISQF	354	DAS	363	YDDLPL	372
141648-CAR33-6	SQSLLSNGYNY	355	LGS	364	ALQTP	373

141649-CAR33-7	SQGIGIY	356	GAS	365	SNNFPP	374
141650-CAR33-8	SHDISNY	357	DAS	366	SDDLPH	375
141651-CAR33-9	SQSISSY	358	AAS	367	SYSTPL	376

[0380] 在某些实施方案中,本文所述的CAR分子(例如,CAR核酸或CAR多肽)或CD33结合结构域包括:

[0381] (1) 选自以下之一的一个、两个或三个轻链(LC)CDR:

[0382] (i) CAR33-1的SEQ ID NO:111的LC CDR1、SEQ ID NO:120的LC CDR2和SEQ ID NO:129的LC CDR3;

[0383] (ii) CAR33-2的SEQ ID NO:112的LC CDR1、SEQ ID NO:121的LC CDR2和SEQ ID NO:130的LC CDR3;

[0384] (iii) CAR33-3的SEQ ID NO:113的LC CDR1、SEQ ID NO:122的LC CDR2和SEQ ID NO:131的LC CDR3;

[0385] (iv) CAR33-4的SEQ ID NO:114的LC CDR1、SEQ ID NO:123的LC CDR2和SEQ ID NO:132的LC CDR3;

[0386] (v) CAR33-5的SEQ ID NO:115的LC CDR1、SEQ ID NO:124的LC CDR2和SEQ ID NO:133的LC CDR3;

[0387] (vi) CAR33-6的SEQ ID NO:116的LC CDR1、SEQ ID NO:125的LC CDR2和SEQ ID NO:134的LC CDR3;

[0388] (vii) CAR33-7的SEQ ID NO:117的LC CDR1、SEQ ID NO:126的LC CDR2和SEQ ID NO:135的LC CDR3;

[0389] (viii) CAR33-8的SEQ ID NO:118的LC CDR1、SEQ ID NO:127的LC CDR2和SEQ ID NO:136的LC CDR3;或

[0390] (ix) CAR33-9的SEQ ID NO:119的LC CDR1、SEQ ID NO:128的LC CDR2和SEQ ID NO:137的LC CDR3;和/或

[0391] (2) 来自以下之一的一个、两个或三个重链(HC)CDR:

[0392] (i) CAR33-1的SEQ ID NO:84的HC CDR1、SEQ ID NO:93的HC CDR2和SEQ ID NO:102的HC CDR3;

[0393] (ii) CAR33-2的SEQ ID NO:85的HC CDR1、SEQ ID NO:94的HC CDR2和SEQ ID NO:103的HC CDR3;

[0394] (iii) CAR33-3的SEQ ID NO:86的HC CDR1、SEQ ID NO:95的HC CDR2和SEQ ID NO:104的HC CDR3;

[0395] (iv) CAR33-4的SEQ ID NO:87的HC CDR1、SEQ ID NO:96的HC CDR2和SEQ ID NO:105的HC CDR3;

[0396] (v) CAR33-5的SEQ ID NO:88的HC CDR1、SEQ ID NO:97的HC CDR2和SEQ ID NO:106的HC CDR3;

[0397] (vi) CAR33-6的SEQ ID NO:89的HC CDR1、SEQ ID NO:98的HC CDR2和SEQ ID NO:107的HC CDR3;

[0398] (vii) CAR33-7的SEQ ID NO:90的HC CDR1、SEQ ID NO:99的HC CDR2和SEQ ID NO:108的HC CDR3;

- [0399] (viii) CAR33-8的SEQ ID NO:91的HC CDR1、SEQ ID NO:100的HC CDR2和SEQ ID NO:109的HC CDR3;或
- [0400] (ix) CAR33-9的SEQ ID NO:92的HC CDR1、SEQ ID NO:101的HC CDR2和SEQ ID NO:110的HC CDR3。
- [0401] 在某些实施方案中,本文所述的CAR分子(例如,CAR核酸或CAR多肽)包括:
- [0402] (1)选自以下之一的一个、两个或三个轻链(LC)CDR:
- [0403] (i) CAR33-1的SEQ ID NO:296的LC CDR1、SEQ ID NO:305的LC CDR2和SEQ ID NO:314的LC CDR3;
- [0404] (ii) CAR33-2的SEQ ID NO:297的LC CDR1、SEQ ID NO:306的LC CDR2和SEQ ID NO:315的LC CDR3;
- [0405] (iii) CAR33-3的SEQ ID NO:298的LC CDR1、SEQ ID NO:307的LC CDR2和SEQ ID NO:316的LC CDR3;
- [0406] (iv) CAR33-4的SEQ ID NO:299的LC CDR1、SEQ ID NO:308的LC CDR2和SEQ ID NO:317的LC CDR3;
- [0407] (iv) CAR33-5的SEQ ID NO:300的LC CDR1、SEQ ID NO:309的LC CDR2和SEQ ID NO:318的LC CDR3;
- [0408] (vi) CAR33-6的SEQ ID NO:301的LC CDR1、SEQ ID NO:310的LC CDR2和SEQ ID NO:319的LC CDR3;
- [0409] (vii) CAR33-7的SEQ ID NO:302的LC CDR1、SEQ ID NO:311的LC CDR2和SEQ ID NO:320的LC CDR3;
- [0410] (viii) CAR33-8的SEQ ID NO:303的LC CDR1、SEQ ID NO:312的LC CDR2和SEQ ID NO:321的LC CDR3;或
- [0411] (ix) CAR33-9的SEQ ID NO:304的LC CDR1、SEQ ID NO:313的LC CDR2和SEQ ID NO:322的LC CDR3;和/或
- [0412] (2)选自以下之一的一个、两个或三个重链(HC)CDR:
- [0413] (i) CAR33-1的SEQ ID NO:269的HC CDR1、SEQ ID NO:278的HC CDR2和SEQ ID NO:287的HC CDR3;
- [0414] (ii) CAR33-2的SEQ ID NO:270的HC CDR1、SEQ ID NO:279的HC CDR2和SEQ ID NO:288的HC CDR3;
- [0415] (iii) CAR33-3的SEQ ID NO:271的HC CDR1、SEQ ID NO:280的HC CDR2和SEQ ID NO:289的HC CDR3;
- [0416] (iv) CAR33-4的SEQ ID NO:272的HC CDR1、SEQ ID NO:281的HC CDR2和SEQ ID NO:290的HC CDR3;
- [0417] (iv) CAR33-5的SEQ ID NO:273的HC CDR1、SEQ ID NO:282的HC CDR2和SEQ ID NO:291的HC CDR3;
- [0418] (vi) CAR33-6的SEQ ID NO:274的HC CDR1、SEQ ID NO:283的HC CDR2和SEQ ID NO:292的HC CDR3;
- [0419] (vii) CAR33-7的SEQ ID NO:275的HC CDR1、SEQ ID NO:284的HC CDR2和SEQ ID NO:293的HC CDR3;

- [0420] (viii) CAR33-8的SEQ ID NO:276的HC CDR1、SEQ ID NO:285的HC CDR2和SEQ ID NO:294的HC CDR3;或
- [0421] (ix) CAR33-9的SEQ ID NO:277的HC CDR1、SEQ ID NO:286的HC CDR2和SEQ ID NO:295的HC CDR3.
- [0422] 在某些实施方案中,本文所述的CAR分子(例如,CAR核酸或CAR多肽)包括:
- [0423] (1)选自以下之一的一个、两个或三个轻链(LC)CDR:
- [0424] (i) CAR33-1的SEQ ID NO:350的LC CDR1、SEQ ID NO:359的LC CDR2和SEQ ID NO:368的LC CDR3;
- [0425] (ii) CAR33-2的SEQ ID NO:351的LC CDR1、SEQ ID NO:360的LC CDR2和SEQ ID NO:369的LC CDR3;
- [0426] (iii) CAR33-3的SEQ ID NO:352的LC CDR1、SEQ ID NO:361的LC CDR2和SEQ ID NO:370的LC CDR3;
- [0427] (iv) CAR33-4的SEQ ID NO:353的LC CDR1、SEQ ID NO:362的LC CDR2和SEQ ID NO:371的LC CDR3;
- [0428] (iv) CAR33-5的SEQ ID NO:354的LC CDR1、SEQ ID NO:363的LC CDR2和SEQ ID NO:372的LC CDR3;
- [0429] (vi) CAR33-6的SEQ ID NO:355的LC CDR1、SEQ ID NO:364的LC CDR2和SEQ ID NO:373的LC CDR3;
- [0430] (vii) CAR33-7的SEQ ID NO:356的LC CDR1、SEQ ID NO:365的LC CDR2和SEQ ID NO:374的LC CDR3;
- [0431] (viii) CAR33-8的SEQ ID NO:357的LC CDR1、SEQ ID NO:366的LC CDR2和SEQ ID NO:375的LC CDR3;或
- [0432] (ix) CAR33-9的SEQ ID NO:358的LC CDR1、SEQ ID NO:367的LC CDR2和SEQ ID NO:376的LC CDR3;和/或
- [0433] (2)选自以下之一的一个、两个或三个重链(HC)CDR:
- [0434] (i) CAR33-1的SEQ ID NO:323的HC CDR1、SEQ ID NO:332的HC CDR2和SEQ ID NO:341的HC CDR3;
- [0435] (ii) CAR33-2的SEQ ID NO:324的HC CDR1、SEQ ID NO:333的HC CDR2和SEQ ID NO:342的HC CDR3;
- [0436] (iii) CAR33-3的SEQ ID NO:325的HC CDR1、SEQ ID NO:334的HC CDR2和SEQ ID NO:343的HC CDR3;
- [0437] (iv) CAR33-4的SEQ ID NO:326的HC CDR1、SEQ ID NO:335的HC CDR2和SEQ ID NO:344的HC CDR3;
- [0438] (iv) CAR33-5的SEQ ID NO:327的HC CDR1、SEQ ID NO:336的HC CDR2和SEQ ID NO:345的HC CDR3;
- [0439] (vi) CAR33-6的SEQ ID NO:328的HC CDR1、SEQ ID NO:337的HC CDR2和SEQ ID NO:346的HC CDR3;
- [0440] (vii) CAR33-7的SEQ ID NO:329的HC CDR1、SEQ ID NO:338的HC CDR2和SEQ ID NO:347的HC CDR3;

[0441] (viii) CAR33-8的SEQ ID NO:330的HC CDR1、SEQ ID NO:339的HC CDR2和SEQ ID NO:348的HC CDR3;或

[0442] (ix) CAR33-9的SEQ ID NO:331的HC CDR1、SEQ ID NO:340的HC CDR2和SEQ ID NO:349的HC CDR3.

[0443] 在实施方案中,生成完全人抗CD33单链可变片段(scFv)并与胞内CD3 ζ 链和4-1BB的胞内共刺激结构域一起克隆入慢病毒表达载体。表1中描述示例性完全人抗CD33scFv的名称。

	构建体 ID	CAR 别名
	141643	CD33-1
	141644	CD33-2
[0444]	141645	CD33-3
	141646	CD33-4
	141647	CD33-5
	141648	CD33-6
	141649	CD33-7
[0445]	141650	CD33-8
	141651	CD33-9

[0446] 在实施方案中,VL结构域和VH结构域在scFv中出现的顺序变动(即,VL-VH、或VH-VL取向),并且其中3个或4个拷贝的“G4S”(SEQ ID NO:25)亚单位(其中每个亚单位包含序列GGGGS(SEQ ID NO:25)(例如,(G4S)₃(SEQ ID NO:28)或(G4S)₄(SEQ ID NO:27))连接可变结构域以产生scFv结构域的完整性,如表3中所示。

[0447] 在本文表2中提供人scFv片段的示例性序列(SEQ ID NO:39-83,包含任选的前导序列)。应当指出,本发明也涵盖无前导序列(例如,无SEQ ID NO:1的氨基酸序列或SEQ ID NO:12的核苷酸序列)的SEQ ID NO:39-83的scFv片段。在本文表9中提供无前导序列的人scFv片段的示例性序列(核苷酸序列为SEQ ID NO:255-261,和氨基酸序列为SEQ ID NO:262-268)。

[0448] 前导序列(氨基酸序列)(SEQ ID NO:1)

[0449] MALPVTALLLPLALLLHAARP

[0450] 前导序列(核酸序列)(SEQ ID NO:12)

[0451] ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCC

[0452] CD8铰链(氨基酸序列)(SEQ ID NO:2)

[0453] TTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

[0454] CD8铰链(核酸序列)(SEQ ID NO:13)

[0455] ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

[0456] CD8跨膜区(氨基酸序列)(SEQ ID NO:6)

[0457] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

[0458] CD8跨膜(核酸序列)(SEQ ID NO:17)

[0459] ATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTAC

TGC

- [0460] 4-1BB胞内结构域(氨基酸序列)(SEQ ID NO:7)
- [0461] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
- [0462] 4-1BB胞内结构域(核酸序列)(SEQ ID NO:18)
- [0463] AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAA
GAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
- [0464] CD28胞内结构域(氨基酸序列)(SEQ ID NO:379)
- [0465] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:379)
- [0466] CD28胞内结构域(核苷酸序列)(SEQ ID NO:380)
- [0467] AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCAC
CCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:380)
- [0468] ICOS胞内结构域(氨基酸序列)(SEQ ID NO:381)
- [0469] T K K K Y S S S V H D P N G E Y M F M R A V N T A K K S R L T D V T L
(SEQ ID NO:381)
- [0470] ICOS胞内结构域(核苷酸序列)(SEQ ID NO:382)
- [0471] ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAA
CACAGCCAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA (SEQ ID NO:382)
- [0472] CD3 ζ 结构域(氨基酸序列)(SEQ ID NO:9)
- [0473] RVKFSRSADAPAYKQGQNLQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR
- [0474] CD3 ζ (核酸序列)(SEQ ID NO:20)
- [0475] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG
CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCC
GAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG
GGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACC
TACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
- [0476] CD3 ζ 结构域(氨基酸序列;NCBI参考序列NM_000734.3)(SEQ ID NO:10)
- [0477] RVKFSRSADAPAYQQGQNLQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR
- [0478] CD3 ζ (核酸序列;NCBI参考序列NM_000734.3); (SEQ ID NO:21)
- [0479] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
- [0480] AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
- [0481] TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
- [0482] AGAACCTCAGGAAGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
- [0483] AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGC
- [0484] ACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
- [0485] CCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
- [0486] IgG4铰链(氨基酸序列)(SEQ ID NO:36)
- [0487] ESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSLGKM

[0488] IgG4铰链(核苷酸序列)(SEQ ID NO:37)

[0489] GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTC
CCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGG
AGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAA
TACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCG
GGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGA
AGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCC
CCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAA
CGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCA
AGATG

[0490] 在实施方案中,这些克隆在衍生自CD3 ζ 链的共刺激结构域的信号结构域中含有Q/K残基变化。

[0491] 表2:人CD33 CAR构建体

[0492]

名称	SEQ ID	序列
141643 CAR33-1 全长 - nt	75	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCAAGTGCAACTC GTCCAGTCCGGTGCAGAAGTCAAGAAGCCAGGAGAATCACTCAAGATTAGCTGCAAAGGCAGCGGCTACTCCTTC ACTTCTACTTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGAAAGGGACTGGAGTGGATGGGAATCATCTACCCCTGGC GATAGCGACACCAGATACTCCCGAGCTTCAAGGCCAAGTGACCATTTCGGCCGACAAGTCGATCTCCACCGCG TATCTGCAGTGGAGCTCACTGAAGGCTTCGGACACCGCCATGTACTACTGTGCCCGGCTGGGGGAAGCCTGCC GATTACGGAATGGAGCTGTGGGGCCAGGGAACCATGGTCACTGTGTCTCCGCCCTCCGGGGTGGAGGCTCCGGT GGAGGGGGTCCGGTGGTGGAGGATCAGAAATGTGCTGACCCAGTCTCCGCTGTCTTGCCTGTGACCCCGGGC GAACCCGCAAGCATCTCTGCCGTCGTCGAGTCCCTGCTTCACTCCAACGGCTACAACCTACCTCGATTGGTAC CTCCAGAAGCCTGGACAGAGCCACAGCTTGTGATCTACCTGGGCTCGAACCGGGCCTCAGGAGTGCCGGACAGG TTCTCCGGCTCCGGTGGGAAACCGACTTCAAGTGAAGATCTCCCGCTGGAGGCCGAGGACGTGGCGTGTAC TATTGCATGCAGGCGCTGCAGACCCTTATTACATTCGGACAGGGACTAAGTTCGATATCAAGACCCTACCCCA GCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCC GCAGCTGGTGGGGCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGT ACTTGGGGTCTGCTGCTTCACTCGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGGTGGAAAGACTGCTGTACATC TTTAAGCAACCCCTTATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTCCCAGAGGAG GAGGAAGCGGCTGCAACTGCGCGTAAATTCAGCCGACGCGAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGAAC CAGCTCTACAACGAACCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGACCCA GAAATGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCA GAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGAGAAGGCCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTC AGCACCCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
141643 CAR33-1 全长 - aa	48	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWMGIIYYPG DSDTRYSPSFQGVVITISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYCARLGGSLPDYGMVWGQTMVTVSSASGGGGSG GGSGGGGSEIVLTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSRASGVPDR FSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGVYCMQALQTLITFGQGTKVDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGVAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSGRFPPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR
141643 CAR33-1 scFv - aa	39	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWMGIIYYPG DSDTRYSPSFQGVVITISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYCARLGGSLPDYGMVWGQTMVTVSSASGGGGSG GGSGGGGSEIVLTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSRASGVPDR

[0493]

		FSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCMQALQTLITFGQGTVKDIK
141643 CAR33-1 VH- aa	57	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS DTRYSPSFGQVITISADKS ISTAYLQWSSLKASDTAMYICARLGGSLPDYGM DVWGQGTMTVTVSS
141643 CAR33-1 VL - aa	66	EIVLTQSPFLSLPVTPEGPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTD FTLTKISRVEAEDVGVYYCMQALQTLITFGQGTVKDIK
141644 CAR33-2 全长 - nt	76	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCCTCGGCCCAAGTCCAACCTC GTCCAATCAGGAGCTGAAGTCAAGAAGCCTGGAGCATCCGTGAGAGTGTCTGTAAAGCCTCCGGCTACATCTTC ACCAACTACTACGTGCACTGGGTGACAGAGCCCGGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGAATCATTTCCCCCTCC GGCGGATCGCCTACTTACGCGCAACGGCTGACGGCCCGGTGACCATGACTCGGGATCTCTCCACTTCAACCGTG TACATGGAAGTGTCCAGCCTTACATCGGAGGATACTGCCGTGTACTTCTGCCGAGGGAGTCCCGCTGAGGGGC AACCGCCTCGGGCTGACAGTCAAGCATCTTCGATCACTGGGGCCAGGGCACCTCGTACCGTGTCCAGCGCCTCG GGGGAGGAGGCTCCGGGGCGGAGGTTCCGGCGGTGGTGGATCTGACATTCGCATGACTCAGTCCCACCTTCA CTGTCCGCTAGCGTGGGGACCGGTGACGATTCCGTGCCAAGCCAGCCAGGACATCAACAACCATCTGAACTGG TATCAGCAGAAGCCCGAAAGGCCCCGACGCTGTGATCTACGACACCTCGAATTCGGAGATCGCGGTGCCATCC CGGTCTCCGGTTCGGGAAGCGGAACCGACTTTACCCTGACTATCTCTCTTCAACCCGAGGACATTTGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACGAAAACCTTCCCCTGACCTTCCGGGGTGGAAACCAAGTGGAGATCAAGACCACTACC CCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGCTTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGGAGGCATGTAGA CCCGCAGCTGGTGGGGCGGTGCATACCCGGGGTCTTACTTCCGCTGCATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCT GGTACTTGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGGGAAGAGCTGCTGTAC ATCTTTAAGCAACCCTTACAGGCCTGTGACACTCAAGAGGAGGACGGGTGTCATGCCGGTTCACAGAG GAGGAGGAAGCGGCTGCAACTGCGGTGAAATTCAGCCGACCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAG AACCAGCTCTACAACGAACCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGACGGGAC CCAGAAATGGCGGGAAGCCCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATG GCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAAACGAGAAGAGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGA CTCAGCACCCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
141644 CAR33-2 全长 - aa	49	MALPVTALLLPLALLHARPQVQLVQSGAEVKKPGASVRVSKASGYIFTNYYVHWVRQAPGQGLEWMGIISPS GGSPTYAQLRQGRVTMTRDLSTSTVYMESSLTSEDVAVYFCARESRLRGNRLGLQSSIFDHWGQGLTVTVSSAS GGGGSGGGSGGGSDIRMTQSPPLSASVGDVRTIPQASQDINNHLNHWYQKPKGAPQLLIYDTSNLEIGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDIAIYYCQQYENLPLTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCVGLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPE EEEGGCELRVKFSRSDAPAYKQGNQLYNELNLRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQLPPR
141644 CAR33-2 scFv - aa	40	MALPVTALLLPLALLHARPQVQLVQSGAEVKKPGASVRVSKASGYIFTNYYVHWVRQAPGQGLEWMGIISPS GGSPTYAQLRQGRVTMTRDLSTSTVYMESSLTSEDVAVYFCARESRLRGNRLGLQSSIFDHWGQGLTVTVSSAS GGGGSGGGSGGGSDIRMTQSPPLSASVGDVRTIPQASQDINNHLNHWYQKPKGAPQLLIYDTSNLEIGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDIAIYYCQQYENLPLTFGGGTKVEIK

[0494]

141644 CAR33-2 VH - aa	58	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYIFTNYYVHWVRQAPGQGLEWMGIISPSSGSPFYAQLRQGRVTMTRDLS TSTVYMEISSLTSEDVAVYFCARESRLRGNRLGLQSSIIFDHWGQGTLLVTVSS
141644 CAR33-2 VL - aa	67	DIRMTQSPPSLSASVGDVRTIIPCQASQDINNHLNWIYQKPKAPQLLIYDTSNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDIATYYCQYENLPLTFGGGTKVEIK
141645 CAR33-3 全长 - nt	77	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCAAGTGCAATTG GTGCAGTCAGGAGGAGGATTGGTGAACCCGGAGGATCGCTGAGACTGTCATGTGCTGCCAGCGGGTTCACATTC TCCTCTACGCAATGTCCTGGGTCCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCTCGGGGTG GGCGGCTCCACCTATTACGCTGACTCCGTGAAGGGACGCTTCACCATTAGCAGAGATAACTCCAAGAACACCCCTC TACCTCCAAATGAACAGCCTTAGGGCTGAGGACACCGCCGCTCTATTACTGCGCCAAGGAGGACACGATCCGGGGA CCTAACTACTATTACTACGGAATGGATGCTGCGGGCCAGGTTACACTGTGACCGTGTCTCGGCCCTCGGGAGGC GGAGGATCAGGGGTGGTGGCTCTGGGGGGGGTGGCAGCGAAACTACTCTGACCCAGTCCCCCTCATCCGTGTCA GCGTCCGTGGCGATCGGGTGTGATCACTTGCCGGGCTCCCAAGACATCGACACCTGGCTCGCGTGTGATACAG CTGAAGCCAGGAAAGGCCCTAAGTCTGATGTACGACGCTCCAATCTGCAAGGAGGGTGCCTCCCGCTTT TCCGGGTCCGGCAGCGAAACCGACTTCACTTCTGACTATCTCGAGCTCCAGCCGGAGGATTTCCGCCACTACTAC TGCCAGCAGGCTCCATCTTCCCGCGACTTTCGGTGGCGGAACCAAGTTCGACATTAAGACCACTACCCAGCA CCGAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTCGTCCGGAGGATGTAGACCCGCA GCTGGTGGGGCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACT TGCGGGTCTGCTGCTTCTACTCGTATCACTCTTACTGTAAGCGGGTGGGAAGAAGTGTGTACATCTTT AAGCAACCTTTCATGAGGCTGTGCAGACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCGGTTCCAGAGGAGGAG GAAGCGGCTGCGAAGTGCAGTAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCTACAAGCAGGGGAGAACCCAG CTCTACAAGCAACTCAATCTTGGTCGGAGAGGAGTACGACGCTGCGACAAGCGGAGAGGACGGACCCAGAA ATGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAA GCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGAGAAAGGCAAAGGCCACGACCGACTGTACCAGGACTCAGC ACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTTTCACATGCAGCCCTGCGCCCTCGG
141645 CAR33-3 全长 - aa	50	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEDTIRGPNYYYYGMDVWGQGTFTVTVSSASGG GGSGGGGGGGSETTLTQSPSSVSASVGDVRSITCRASQDIDTWLAWYQLKPKAPKLLMYAASNLQGGVPSRF SGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYCQASIFPPTFGGGTKVDIKTTTPAPRPPPTPAITIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGDCSRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR
141645 CAR33-3 scFv - aa	41	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEDTIRGPNYYYYGMDVWGQGTFTVTVSSASGG GGSGGGGGGGSETTLTQSPSSVSASVGDVRSITCRASQDIDTWLAWYQLKPKAPKLLMYAASNLQGGVPSRF SGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYCQASIFPPTFGGGTKVDIK
141645	59	QVQLVQSGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN

[0495]

CAR33-3 VH – aa		KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEDTIRGPNYYYYGMDVWVGQGTTVTSS
141645 CAR33-3 VL – aa	68	ETTLTQSPSSVSASVGDVRSITCRASQDIDTWLAWYQLKPGKAPKLLMYAASNLQGGVPSRFSGSGSGTDFILTI SSLQPEDFATYYCQASIFPPTFGGGTKVDIK
141646 CAR33-4 全长 – nt	78	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCAAGTGCAGCTC GTCCAATCCGGTGCAGAAGTGAAGAAGCCGCGGAATCCCTGAAGATCATGCAAAGGCTCGGGATACAGCTTC ACCTCATAATTGGATTGGATGGGTGAGACAGATGCCAGAAAGGGTCTGGAGTGGATGGGAATCATCTACCCGGGA GACAGCGATACCCGGTACTCCCGGAGCTCCAGGGACAGGTCACCATCTCGGCCGACAAGTCCATTACTACTGCC TACTTGCAATGGTCTCGCTGCGCGCCTCCGATAGCGCCATGTACTACTGCGCGAGAGGGCTACTCCGACTAC GACTACTACTCGATTCTGGGACAGGGGACTCGTACTGTGTCTCCGCTCGGGTGGCGCGGCTCGGGT GGAGGAGGAAGCGGAGGGGGAGGCTCCGAAATTGTGATGACCCAGTCAACCCCTGTCGCTCCCTGTACTCCTGGG GAACCGCCTCCATCTCTGCGCGAGCTCACAGAGCTGCTGCACCTCAACGGATACAACACTCCATCGATTGGTAC CTTCAGAAGCCCGCCAGTCCGCCAGCTGCTGATCTACCTGGGGTCCAACCGGGTACGCGGCTGCCGAGCCG TTCTCGGTTCCGGGTCGGAACCGACTTCACGCTGAAATCTCCAGGTTGGAGCCGAGGACGTGGGAGTGTAT TACTGTATGACAGCCCTGCAAAACCCCTTACCTTTGGCGGGGCAACCAAGTTCGAGATTAAGACCATAACCCA GCACCGAGGCCACCCACCCGGCTCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCTCCGCTCGGAGGCATGTAGACCC GCAGCTGGTGGGCGCTGCATACCCGGGCTTACTTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGT ACTTGGCGGGTCTGCTGCTTCACTCGTACTACTTACTGTAAGCGGGTCCGGAAGAAGTCTGTACTATC TTTAAGCAACCCCTTACTGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTTTCATGCCGGTCCAGAGGAG GAGGAAGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGCAGAAC CAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGAGCTGTGGACAAGCGGAGGAGCGGGACCCA GAAATGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCA GAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGAGAAGAGGCAAGGCCACGACGACTGTACCAGGGACTC AGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
141646 CAR33-4 全长 – aa	51	MALPVTALLLPLALLHAARPQVLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWMMGIIPG DSDTRYSPSFQGVITISADKSITTAAYLQWSSLRASDSAMYCARGGYSYDYDFWQGTTLTVSSASGGGGSG GGSGGGGSEIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDR FSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQALQTPFTFGGKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMGERRRGKHGDLQGLSTATKDTYDALHMQLPPR
141646 CAR33-4 scFv – aa	42	MALPVTALLLPLALLHAARPQVLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWMMGIIPG DSDTRYSPSFQGVITISADKSITTAAYLQWSSLRASDSAMYCARGGYSYDYDFWQGTTLTVSSASGGGGSG GGSGGGGSEIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDR FSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQALQTPFTFGGKVEIK
141646 CAR33-4	60	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWMMGIIPGSDSDTRYSPSFQGVITISADKS ITTAAYLQWSSLRASDSAMYCARGGYSYDYDFWQGTTLTVSS

[0496]

VH - aa		
141646 CAR33-4 VL - aa	69	EIVMTQSPLSLPVTPEGPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSSTD FTLKI SRVEAEDVGVYICMQLQTPFTFGGGTKVEIK
141647 CAR33-5 全长 - nt	79	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCAAGTGAACCTC GTCCAAAGCGGTGGAGATCTCGCCAGCCCGGAAGATCCCTTAGACTCTCATGTGCCGCCAGCGGGTTACCTTC GACGACTACGCTATGCATTTGGTGGCGCCAGGCCCCCGGGAAGGGACTGGAATGGTGGCCGTGATTTGGCCGGAC GGCGGACAGAAGTACTACGGAGACAGCGTAAAGGGCGGTTACCGGTGTCGAGGGACAACCCGAAGAATACCTTC TACCTTCAAATGAACTCCCTGCGCGCCGAGGACACCGCGATCTACTACTGCGTGCACCCTTTAACGCATGGGAT TACTGGGACAGGGACTCTGGTCACTGTGTCTCCGCTCTGGCGCGGAGGTTCCGGCGGTGGTGGTCCGGT GGAGGAGGATCGGACATCCAGTACCCAGTCCCTTCTCACTGTCGGCGTACGTGGGAGGCCGGTCACTATC ACGTGCCAGGCATCCAGGGCATTTCCAGTTCTGAACTGGTTCCAGCAGAAGCCCGAAAGGCCCTAAGCTG TTGATTTCCGATGTAGCAACCTGGAACCCGGCGTCCCGTACGGTTCAGCGGCTCCGGGTCCGGGACCGACTTC ACCTTCACCATCACTAACCTCCAACCGGAGGACATCGCCACCTATTACTGCCAGCAGTACGATGATCTGCCACTG ACTTTCGGCGGCGAACAAGTCAAGTCAAGACTACCCAGCAGCAGGACCCACCCGGCTCCTACC ATCGCCTCCAGCCTCTGTCTCCGTCGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGCGCTGCATACCCGGGT CTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGCGGCTCTGCTGCTTCTACTCGTG ATCACTCTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTAAAGCAACCTTCATGAGGCTGTGCAG ACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCCAATGCGCGTAAA TTCAGCCGACGCGAGATGCTCCAGCTACAAGCAGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAATCAATCTTGGTCCG AGAGAGGAGTACGACGTCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGAAGCCGCGCAGAAGAAT CCCCAAGAGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGTGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGG GAACGAGAAGAGCAAGGCCACGACGACTGTACCAGGACTCAGACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCT CTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
141647 CAR33-5 全长 - aa	52	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGGDLAQPGRSRLRSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVAWIWPD GGQKYYGDSVKGRFTVSRDNPKNLYLQMNLSRAEDTAIYYCVRHFNAWDYWGQGLTVTVSSASGGGSGGGGSG GGGSDIQLTQSPSSLSAYVGRVITTCQASQGISQFLNWFQKPKKAPKLLISDASNLEPGVPSRFSGSGSTDF TFTITNLQPEDIATYYCQYDDLPLTFGGGKVEIKTTTPAPRPTTPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAFLAGTCVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FRSADAPAYKQGNQLYNEINLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKHDGLYQGLSTATKDYDALHMQLPPR
141647 CAR33-5 scFv- aa	43	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGGDLAQPGRSRLRSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVAWIWPD GGQKYYGDSVKGRFTVSRDNPKNLYLQMNLSRAEDTAIYYCVRHFNAWDYWGQGLTVTVSSASGGGSGGGGSG GGGSDIQLTQSPSSLSAYVGRVITTCQASQGISQFLNWFQKPKKAPKLLISDASNLEPGVPSRFSGSGSTDF TFTITNLQPEDIATYYCQYDDLPLTFGGGKVEIK
141647 CAR33-5 VH - aa	61	QVQLVQSGGDLAQPGRSRLRSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVAWIWPDGGQKYYGDSVKGRFTVSRDNP KNLYLQMNLSRAEDTAIYYCVRHFNAWDYWGQGLTVTVSS

[0497]

141647 CAR33-5 VL – aa	70	DIQLTQSPSSLSAYVGGRRVTITCQASQGISQFLNWFQKPKGKAPKLLISDASNLEPGVPSRFSGSGSGTDFTTI TNLQPEDIATYYCQYDDLPLTFGGGKVEIK
141648 CAR33-6 全长 - nt	80	ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCCGTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCAAGTGCAACTC GTCCAATCCGGTGGTGGTGTGTCGCAACCAGGAAAGTCTCTTCGCCTCTCATGGCTGCCAGCGGATTACCGTTT TCCATCTTCGCTATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCGGGAAAGGGACTGGAATGGGTGGCAACCATTTTCATACGAT GGATCAAACGCGTCTACGCCGACTCCGTGGAAGGAAGTTTACCATCTCGAGAGACAACCTCAAGGACTCGCTG TATCTGCAAATGGACTCCCTGCGCCCTGAGGATACCGCCGCTACTACTGCTGAAGCCGGCAGCGGGGATAC GACGTGTTGATTCGTGGGGCCAGGAACTCTGGTACCCTGTCAGCGGAGCGGGGAGGGGATCGGGTGGT GGAGGGTCCGGGGAGGAGGCTCCGAGATCGTGATGACTCAGTCGCGCTCTCCCTCCCGTACCCCGGAGAG CCAGCTAGCATTTTCATGTCGGAGCTCCAGTCCCTGCTGCCTCAACGGCTACAATTACCTGGATTGGTACTTG CAGAAGCTGGGCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACTCGGCTCGAACAGAGCTCCGGCGTGCCGGACCGGTTT TCCGGGAGCGGCAGCGCACCGATTTCACCTTGAAAAATCTCCCGCTGGAAGCCGAGGAGCTGGCGGTGACTAT TGATGCAGGCCCTGCAGACTCCACCTTCGGCCCGGAACTAAGGTCGACATCAAGACCCTACCCAGCACCG AGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGCT GGTGGGGCGTGATACCCGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGC GGGGTCTGCTGCTTCACTCGTATCCTTTACTGTAAGCGCGTGGGAAGAAGTCTGTACATCTTTAAG CAACCCTTATGAGCCTGTGCAGACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCAGAGGAGGAGGAA GGCGGCTGCGAAGTCCGCTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCTACAAGCAGGGGAGGAGGAGGAA TACAACGAAGTCAATCTTGGTCGAGAGAGGAGTACGACGCTGGACAAGCGGAGAGGAGCGGACCCAGAAATG GGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGCCAGAACCC TATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACC GCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
141648 CAR33-6 全长 – aa	53	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVLVQSGGGVVQPGKSLRLSACAASGFTFSIFAMHWVRQAPGKLEWVATISYD GSNAFYADSVEGRFTISRDNKDSLQMDSLRPEDTAVYYCVKAGDGGYDVFDSWGQGLVTVSSASGGGGSGG GGSGGGSEIVMTQSPSLPVTPEGPASISCRSSQSLHNSGNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGNSRASGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQALQTPTFGPGTKVDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
141648 CAR33-6 scFv – aa	44	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVLVQSGGGVVQPGKSLRLSACAASGFTFSIFAMHWVRQAPGKLEWVATISYD GSNAFYADSVEGRFTISRDNKDSLQMDSLRPEDTAVYYCVKAGDGGYDVFDSWGQGLVTVSSASGGGGSGG GGSGGGSEIVMTQSPSLPVTPEGPASISCRSSQSLHNSGNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGNSRASGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQALQTPTFGPGTKVDIK
141648 CAR33-6 VH – aa	62	QVQLVQSGGGVVQPGKSLRLSACAASGFTFSIFAMHWVRQAPGKLEWVATISYDGSNAFYADSVEGRFTISRDN KDSLQMDSLRPEDTAVYYCVKAGDGGYDVFDSWGQGLVTVSS
141648	71	EIVMTQSPSLPVTPEGPASISCRSSQSLHNSGNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGNSRASGVPDRFSGSGGTD

[0498]

CAR33-6 VL – aa		FTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPTFGPGTKVDIK
141649 CAR33-7 全长 - nt	81	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCGAAGTGCAATTG GTGGAATCTGGAGGAGGATTGGTGCAACCTGGAGGATCTCTGAGACTGTCATGTGCCGCCACGGCTTCACATTT TCCTCCTACGCGATGTCATGGTCCGCCAGGCACCGGGAAAGACTGGAATGGGTGTCGCCCATTTCCGGATCG GGAGGCTCGACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGAAGATTCACTATCTCCCGGATAAATCCAAGAATACTCTG TATCTCCAAATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGATACTGCGGTGTACTACTGCGCTAAGGAAACCGACTACTACGGC TCAGAACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCTCGTGACCGTGTCTCGGCCCTCCGGCCGGGAGGTTCCGGG GGGGCGGTTCCGGGGAGGGGGCAGGACATCCAGATGACCCAGTCCCAAGTCCCTTTCCGCGTCCGTGGGA GATCGCGTGACCATTTCTGTCCGGGTAGCCAGGGCATCGGTATCTATCTTTCGCTGTACCAGCAGCGGAGCGGA AAGCCGCCAGCTGCTGATCCACGGCCCTCAACTCTGCAATCCGGGGTCCCGAGCCGGTTCAGCGGTAGCGGG TCGGGTACCGACTTTACCTGACTATCTCTCCCTCCAACCGAGGACTTCGCCTCTACTGGTGCAGCAGTCC AACAACTTCCCTCCACCTTCGGCCAGGGAACGAAGTTCGAGATTAAGACCATAACCCAGCAGCCAGGCCC ACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCTCCGTCGCTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGC GTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTCGGGGTCTG CTGCTTCTACTCGTGATCACTCTTACTGTAAAGCGCGTCCGGAAGAAGTCTGTACATCTTAAAGCAACCTTC ATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCGGTTCCAGAGGAGGAGAAGCGGCTGC GAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGACGCGAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGAACCGACTCTACAACGAA CTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGCGGGAAG CCGCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAGGATAAGATGCCAGAAGCTTATAGCGAG ATTGGTATGAAAGGGGACGAGAAAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAG GACACCTATGACGCTCTTACATGACGGCCCTGCCGCTCGG
141649 CAR33-7 全长 – aa	54	MALPVTALLLPLALLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKETDYYGSGTFDYWGQGLTVTVSSASGGGGSG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVITISCRASQIGIYLAWYQQRSGKPPQLLIHGASTLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFASYWCQQSNFPPTFGQGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPSLSRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGDCSRFPPEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDYDALHMQLPPR
141649 CAR33-7 scFv – aa	45	MALPVTALLLPLALLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKETDYYGSGTFDYWGQGLTVTVSSASGGGGSG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVITISCRASQIGIYLAWYQQRSGKPPQLLIHGASTLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFASYWCQQSNFPPTFGQGTKEIK
141649 CAR33-7 VH – aa	63	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKETDYYGSGTFDYWGQGLTVTVSS
141649 CAR33-7	72	DIQMTQSPSSLSASVGRVITISCRASQIGIYLAWYQQRSGKPPQLLIHGASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFASYWCQQSNFPPTFGQGTKEIK

[0499]

VL – aa		
141650 CAR33-8 全长 - nt	82	ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCAAGTCCAACCTC GTCCAGTCCGGTGCAGAAGTCAAGAAGCCAGGAGCCTCCGTGAGAGTGTCTGCAAGCGTCCGGCTACATGTTC ACCGACTTTTTCATTCACTGGGTGCGCCAGGCGCCCGGACAGGGTCTGGAGTGGATGGGGTGGATCAACCCCTAAC TCCGGCGTGACTAAATACGCCAGAAAGTTCAGGGCCCGGTGACCATGACCCGGAACTAGCATCTCCACCGCC TACATGGAAGTGCATCCCTCCGGTCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCACCTGGTACAGCAGCGGTTGG TACGGCATCGCGAACATTTGGGACAGGGGACTATGGTCACCGTGTATCCGCCCTCCGGGGAGGAGGGTCCGGC GGCGGAGGTTCTGGAGGAGCGGCTCGGACATCCAGTTGACGCAGAGCCCTCGTCTGAGCGCTCCGTGGGC GACAGAGTACCATTACCTGTCAAGCTTCCCATGATATCTCGAACTACCTCCACTGGTATCAGCAGAAGCCGGGA AAGGCTCCCAAGTGTGATCTACGACGCCCTCCAATCTGGAAACCGGAGTCCCGAGCCGGTTCCTGGATCAGGG AGCGGCACTGACTTCCCTGACAAATAGGTCGCTGCAGCCGGAGGATGTGGCAGCTACTACTGCCAACAGTCA GACGACCTTCTCACACTTTCCGACAAGGGACTAAGGTCGACATCAAGACCTACCCAGCAGCGAGGCCACCC ACCCCGGCTCCATCCATCGCCTCCAGCCCTGTCTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCCGAGCTGGTGGGGC GTGCATACCCGGGCTTTGACTTCGCCTGCATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGGGGCTCTG CTGCTTCACTCGTGTACTCTTTACTGTAAGCGCGTCCGGAAGAAGTGTGTACATCTTTAAGCAACCTTC ATGAGGCTGTGCAGACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTCCAGAGGAGGAGGAAGCGCGCTGC GAACTGCGGTGAAATCAGCCGACGCGAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGAACAGCTCTACAACGAA CTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGCGGGAAAG CCGCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAG ATTGGTATGAAAGGGGACCGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGACTCAGCAGCCCAACGAA GACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
141650 CAR33-8 全长 – aa	55	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVRVSKASGYMFTDFFIHWVRQAPGQGLEWMGWINPN SGVTKYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCATWYSSGWYGIANIWGQTMVTVSSASGGGGSG GGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGRVITTCQASHDISNYLHWYQKPKAPKLLIYDASNLETGVPSRFTGSG SGTDFTLTIRSLQPEDVAAYCQQSDDLPHFTFGQGTKVDIKTTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLRREYDVLKRRGRDPEMGGKPRRNPQEGLYNELQDKMAEAYSE IGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR
141650 CAR33-8 scFv – aa	46	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVRVSKASGYMFTDFFIHWVRQAPGQGLEWMGWINPN SGVTKYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCATWYSSGWYGIANIWGQTMVTVSSASGGGGSG GGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGRVITTCQASHDISNYLHWYQKPKAPKLLIYDASNLETGVPSRFTGSG SGTDFTLTIRSLQPEDVAAYCQQSDDLPHFTFGQGTKVDIK
141650 CAR33-8 VH – aa	64	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSKASGYMFTDFFIHWVRQAPGQGLEWMGWINPN SGVTKYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCATWYSSGWYGIANIWGQTMVTVSS
141650 CAR33-8 VL – aa	73	DIQLTQSPSSLSASVGRVITTCQASHDISNYLHWYQKPKAPKLLIYDASNLETGVPSRFTGSGSGTDFTLTI RSLQPEDVAAYCQQSDDLPHFTFGQGTKVDIK

[0500]

<p>141651 CAR33-9 全长 - nt</p>	<p>83</p>	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCGGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCAAGTGCAACTC GTCCAGTCCGGTGCAGAAAGTAAAAAGCCAGGAGAAAGCCTCAAGATCAGCTGCAAGGGATCTGGGTACAGCTTC ACCAACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGAAAGGGACTGGAGTGGATGGGCATTATCTACCCTGGG GACTCCGACACCCGGTATTCGCCGAGCTTCCAAGGACAGGTACCATCTCCGCCGATAAGTCGATTAGCACTGCG TACTTGCAGTGGTCAAGCCTGAAGGCCCTCGGACACCGCCATGTACTACTGCGGAGACACGGGCCCTCGTCTGG GGCGAATTGACTACTGGGGCCAGGGAACGCTTGTGACCGTGTCTCCGCTCCGGGGTGGAGGATCAGGAGGA GGAGGCTCCGGTGGTGGCGGTAGCGACATCCGGCTGACTCAGTCCCTTCTCTACTCTCCGCCCTCCGTGGGGGAC CGCGTGACCATTACCTGTCCGGCATCACAGTCCATCAGCTCATACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCGGGGAAG GCCCCGAACTCCTGATCTACGCCGCTTCTCCCTGCAATCCGGCGTCCCTCGAGGTTCTCCGGCTCCGGCTCG GGAACCGATTACTCTGACAATTAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACCTACTACTGCCAGCAGTCTTAC TCGACTCCGCTGACTTTCGGCGGGGAAACCAAGGTCGACATCAAGACCATACTCCAGCACCAGGCCACCCACC CCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTG CATACCCGGGCTTGGACTTCCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGGGGCTCTGCTG CTTCTACTCGTATCACTCTTTACTGTAAAGCGCGTCCGGAAGAAGTGTGTACATCTTTAAGCAACCCCTCATG AGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCGGTTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAA CTGCGCGTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG AATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG CGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATT GGTATGAAAGGGGAAACGAGAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGAC ACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG</p>
<p>141651 CAR33-9 全长 - aa</p>	<p>56</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKLEWMGI IYPG DSDTRYSPSFQGVITISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARHGPPSSWGEFDYWGGTLVTVSSASGGGSGG GGSGGGSDIRLTQSPSSLSASVGRVITICRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGGGTVKVDIKTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYKQQNQLYELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
<p>141651 CAR33-9 scFv - aa</p>	<p>47</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKLEWMGI IYPG DSDTRYSPSFQGVITISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARHGPPSSWGEFDYWGGTLVTVSSASGGGSGG GGSGGGSDIRLTQSPSSLSASVGRVITICRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGGGTVKVDIK</p>
<p>141651 CAR33-9 VH - aa</p>	<p>65</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKLEWMGI IYPGSDSDTRYSPSFQGVITISADKS ISTAYLQWSSLKASDTAMYICARHGPPSSWGEFDYWGGTLVTVSS</p>
<p>141651 CAR33-9 VL - aa</p>	<p>74</p>	<p>DIRLTQSPSSLSASVGRVITICRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT SSLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGGGTVKVDIK</p>

[0501] 表9. 人CD33 CAR scFv序列

[0502]

名称	SEQ ID	序列
141643 (CD33-1) scFv – nt	255	CAAGTGCAACTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAGTCAAGAAGCCAGGAGAATCACCAAGATTAGCTGCAAAGGCAGCGG CTACTCCTTCACTTCCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGAAAGGGACTGGAGTGGATGGGAATCATCT ACCCTGGCGATAGCGACACCAGATACTCCCGAGCTTCAAGGCCAAGTGACCATTTCCGGCCGACAAGTCGATCTCC ACCGCGTATCTGCAGTGGAGCTCACTGAAGGCTTCGGACACCGCCATGTACTACTGTGCCCGGCTGGGGGAAGCCT GCCCGATTACGGAATGGAGTGTGGGGCCAGGGAACCATGGTCACTGTGTCCGCCCTCCGGGGTGGAGGCTCCG GTGGAGGGGGTCCGGTGGTGGAGGATCAGAAATTGTGTGACCCAGTCTCCGCTGTCTTGCCTGTGACCCGGGC GAACCCGCAAGCATCTCCTGCCGGTGTGCGAGTCCCTGCTTCACTCCAACGGCTACAACCTACCTCGATTGGTACCT CCAGAAGCCTGGACAGACCCACAGCTTGTGATCTACCTGGGCTCGAACCGGGCTCAGGAGTGGCCGACAGGTCTCT CCGGCTCCGGTCCGGAACCGACTTCACGCTGAAGATCTCCCGCTGGAGGCCAGGACGTGGCGGTGACTATTGTC ATGCAGGCGCTGCAGACCCTTATTACATTCGGACAGGGGACTAAGGTCGATATCAAG
141643 (CD33-1) scFv – aa	262	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPKGLWMMGIIYPGDSDRYSPSPFQGVITISADKSI TAYLQWSSLKASDTAMYICARLGGSLPDYGMVWVQGTMTVVSASGGGGSGGGSGGGSEIVLQSPFLSLPVT EPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGVYYC MQALQTLITFGQGTKVDIK
141644(CD3 3-2) scFv – nt	256	CAAGTCCAACCTCGTCCAATCAGGAGCTGAAGTCAAGAAGCCTGGAGCATCCGTGAGAGTGTCTGTAAAGCCTCCGG CTACATCTTCAACCACTACTACGTGCCTGGTGCAGACAGGCCCGGGCCAGGGACTGGAAATGGATGGGAATCATTT CCCCGTCCGGCGGATCGCTACTTACCGCAACGGCTGCAGGGCCGCGTACCATGACTCGGGATCTCTCCACTTCA ACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTTACATCGGAGGATACTGCCGTGTACTTCTCGCGAGGGAGTCCCGGCTGAG GGGCAACCGCCTCGGGTGCAGTCAAGCATCTTCGATCACTGGGGCCAGGGCACCTCGTGACCGTGTCCAGCGCCT CGGGGGGAGGAGCTCCGGGGCGGAGTTCCGGCGGTGGTGGATCTGACATTCGATGACTCAGTCCCACCTTCA CTGTCCGCTAGCGTGGGGACCGCGTGCAGATTCCGTGCCAAGCCAGCCAGGACATCAACAACCATCTGAAGTGGTA TCAGCAGAAGCCCGAAAGGCCCGCAGCTGCTGATCTACGACACCTCGAATCTGGAGATCGGGCTGCCATCCCGGT TCTCCGGTTCGGGAAGCGGAACCGACTTACCTGACTATCTCTCTTCAACCCGAGGACATTGCCACCTACTAC TGCCAGCAGTACGAAAACCTTCCCTGACCTTCGGGGTGGAAACCAAAGTGGAGATCAAG
141644(CD3 3-2) scFv – aa	263	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSKASGYIFTNYYVHWVRQAPGQGLEWMMGIIISPSGGSPTYAQLRQGRVTMTRDLSTS TVYMESSLTSEDVAVYFCARESRLRNLRLQSSIFDHWGQGLVTVVSASGGGGSGGGSGGGSDIRMTQSPPS LSASVGDRTVIPCQASQDINHLNHWYQKPKGKAPQLLIYDTSNLEIGVPSRFSGSGSDFTLTISSLPEDIATYY CQQYENLPLTFGGGTKVEIK
141646(CD3 3-4) scFv – nt	257	CAAGTGCAGCTCGTCCAATCCGGTGCAGAAGTGAAGAAGCCTGGCGAATCCCTGAAGATCTCATGCAAAGGCTCGGG ATACAGCTTCACTCATATTGGATTGGATGGGTGAGACAGATGCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGATGGGAATCATCT ACCCGGGAGACAGGATACCCGGTACTCCCGAGCTTCCAGGGACAGGTACCATCTCGGCCGACAAGTCCATTACT ACTGCCTACTTGCAAATGGTCCCTCGCTGCGCGCCTCCGATAGCCCATGTACTACTGCGCGAGAGGCGGCTACTCCGA CTACGACTACTACTTCGATTTCTGGGGACAGGGGACACTCGTACTGTGTCCGCCGTCCGGTGGCGGCGCTCGG GTGGAGGAGGAAGCGAGGGGGAGGCTCCGAAATTGTGATGACCCAGTCAACCCCTGTGCTCCCTGTGACTCCTGGG

[0503]

		GAACCGGCCTCCATCTCCTGCCGGAGCTCACAGAGCCTGCTGCACTCCAACGGATACAACCTACCTCGATTGGTACCT TCAGAAGCCCGGCCAGTCGCCCCAGCTGCTGATCTACCTGGGGTCCAACCGGGCTAGCGGCGTGGCGGACCCTTCT CCGGTTCGGGTCTGGAACCGACTTCACGCTGAAAATCTCCAGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGAGTGTATTACTGT ATGCAGGCCCTGCAAACCCCTTCACCTTTGGCGGGGCACCAAGGTCGAGATTAAG
141646(CD3 3-4) scFv – aa	264	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYFSTSYWIGWVRQMPGKGLEWMMGIIYPGDSDFRYSPSPFQQVTVISADKSI TAYLQWSSLRASDSAMYYCARGGYSYDYDFWQGLVTVVSSASGGGGSGGGSGGGSEIVMTQSPSLPVT EPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCMQALQTPFTFGGKVEIK
141647(CD3 3-5) scFv – nt	258	CAAGTGCAACTCGTCCAAGCGGTGGAGATCTCGCCAGCCCGAAGATCCCTTAGACTCTCATGTGCCCGCAGCGG GTTACCTTCGACGACTACGCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCGGGGAAGGGACTGGAATGGGTGGCCGTGATTT GGCCGACGGCGGACAGAAGTACTACGGAGACAGCGTGAAGGGCGGTTACCGTGTGAGGGACAACCCGAAGAAT ACCTCTACCTTCAAATGAATCCCTGCGCGCGGAGGACACCGCATCTACTACTGCTGCGCCACTTTAACGCATG GGATTACTGGGACAGGGACTCTGGTCACTGTCTCCGCTCTGCGCGCGGAGGTTCCGGCGGTGGTGGCTCCG GTGGAGGAGGATCGGACATCCAGCTGACCCAGTCCCTTCTCACTGTGCGGCTACGTGGGAGGCGGGTCACTATC ACGTGCCAGGCATCCAGGGCATTCCAGTTCCTGAATGGTTCAGCAGAAGCCCGAAAGGCCCTTAAGCTGTT GATTTCCGATGCTAGCAACCTGGAACCCGGCGTCCGCTCACGGTTCAGCGGCTCCGGTCCGGCACCAGCTTACCT TCACCATCACTAACCTCCAACCGGAGGACATCGCCACCTATTACTGCCAGCAGTACGATGATCTGCCACTGACTTTC GGCGCGGAACCAAGTCAAAATCAAG
141647(CD3 3-5) scFv – aa	265	QVQLVQSGGDLAQPGRSLRLSAAAGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVAVIWPDGGQKYIGDSVKGRTVSRDNPKN TLYLQMNLSLRAEDTAIYCVRFHNAWDYWGQGLVTVVSSASGGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPSSLSAYVGRVTT TCQASQGISQFLNWFQKPGKAPKLLISDASNLEPGVPSRFSGSGSGTDFTFITNLQPEDIATYCYQQYDDLPLTF GGGKVEIK
141648(CD3 3-6) scFv – nt	259	CAAGTGCAACTCGTCCAATCCGGTGGTGTGCTGCAACCAGGAAAGTCTCTTCGCTCTCATGCGTGCCAGCGG ATTCAGTFTTTCATCTTCGCTATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCGGGAAAGGGACTGGAATGGGTGGCAACCATTT CATACGATGGATCAAACGCTTCTACGCCACTCCGTGGAAGGAAGGTTACCATCTCGAGAGACAACCCAAGGAC TCGCTGTATCTGCAATGGACTCCCTGCGCCCTGAGGATACCGCCGCTACTACTGCGTGAAGGCCGGCAGCGGGG ATACGACGTGTTGATTCGTTGGGGCAGGAACTCTGGTCAACGTGTCAGCGGAGCGGGGAGGCGGATCGGGTG GTGGAGGGTCCGGGGAGGAGGCTCCGAGATCGTGTGACTCAGTCGCCGCTCTCCCTCCCGTGACCCCGGAGAG CCAGCTAGCATTTCAATGTCGGAGCTCCAGTCCCTGCTGCACTCCAACGGCTACAATTACCTGGATTGGTACTTGCA GAAGCCTGGGACAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCTCGGCTCGAACAGAGCCTCCGGCGTGGCGGACCAGGTTTCCG GGAGCGGACGGCACCATTTCACCTTGAATACTCCCGCTGGAAGCCGAGGACGTGGCGGTGTACTATTGCATG CAGGCCCTGCAGACTCCACCTTCGGCCCGGAACTAAGGTCGACATCAAG
141648(CD3 3-6) scFv – aa	266	QVQLVQSGGGVVQPGKSLRLSAAAGFTFSIFAMHWVRQAPGKLEWVATISYDGSNAFYADSVEGRFTISRDNKSD SLYLQMDSLRPEDTAVYIVCVKAGDGGYDVFDSWQGLVTVVSSASGGGGSGGGSGGGSEIVMTQSPSLPVT PGE PASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCMQALQTPFTFGPGTKVDIK

[0504]

<p>141649(CD3 3-7) scFv - nt</p>	<p>260</p>	<p>GAAGTGCAATTGGTGGAAATCTGGAGGAGGATGGTGCACCTGGAGGATCTCTGAGACTGTTCATGTGCCGCCAGCGG CTTCACATTTTCTCTCTACGCGATGTCATGGTCCGCCAGGCACCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATTT CGGGATCGGGAGGCTCGACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGAAGATTACATATCTCCCGGATAACTCCAAGAAT ACTCTGTATCTCAAATGAACCTCCCTGAGGGCCGAGGATACTGCGGTGTACTACTGCGCTAAGGAAACCGACTACTA CGGCTCAGGAACCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCTCGTGACCGTGTCTCCGGCTCCCGCGCGGAGGTTCCGG GGGGGGCGGTTCCGGGGGAGGGGGCAGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCAAGCTCCCTTTCCGCGTCCGTGGGA GATCGCGTGACCATTTCTGTGCCGGCTAGCCAGGGCATCGGTATCTATCTTTCGCTGGTACCAGCAGCGGAGCGGAAA GCCGCCCCAGCTGCTGATCCAGGCGCTCAACTCTGCAATCCGGGTCCCAAGCGGTTACGCGGTAGCGGGTCCGG GTACCGACTTTACCTGACTATCTCTCCCTCCCAACCGGAGGACTTCGCCTCTACTGGTGCAGCAGTCCAACAAC TTCCTCCACCTTCGGCCAGGGAACGAAGTTCGAGATTAAG</p>
<p>141649(CD3 3-7) scFv - aa</p>	<p>267</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYADSVKGRFTISRDNKSN TLYLQMNLSRAEDTAVVYCAKETDYVGSFTFDYWGQTLVTVSSASGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASVSG DRVITSCRASQIGIYLAWYQQRSGKPPQLLIHGASTLQSGVPSRFSGSGSDTDFLTITISLQPEDFASYWCQQSNN FPPTFGQGTKVEIK</p>
<p>141651(CD3 3-9) scFv - nt</p>	<p>261</p>	<p>CAAGTGCAACTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAGTGA AAAAGCCAGGAGAAAAGCCCAAGATCAGCTGCAAGGGATCTGG GTACAGCTTCCACCACTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGGACTGGAGTGGATGGGCATTATCT ACCCTGGGGACTCCGACACCCGGTATTTCCCGAGCTTCCAAGGACAGGTACCATCTCCGCCGATAAGTCGATTAGC ACTGCGTACTTGCAGTGGTCAAGCCTGAAGCCTCGGACACCGCCATGTACTACTGCGCGAGACACGGCCCTCGTC CTGGGGCGAATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACGCTTGTGACCGTGTCTCCGCTCCGGGGTGGAGGATCAGGAG GAGGAGGCTCCGGTGGTGGCGGTAGCGACATCCGGCTGACTCAGTCCCTTCTCCTACTCTCCGCTCCGTGGGGGAC CGCGTGACCATTACCTGTCCGGCATCACAGTCCATCAGCTCATACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCGGGGAAGGC CCCGAACTCCTGATCTACGCCGCTCTCTCCCTGCAATCCGGCGTGCCTCGAGGTTCTCCGGCTCCGGCTCGGGAA CCGATTTCACTCTGACAATTAGCAGCTGCAGCCTGAGGATTTTCGCTACCTACTACTGCCAGCAGTCTACTCGACT CCGCTGACTTTCCGGCGGGGAACCAAGTTCGACATCAAG</p>
<p>141651(CD3 3-9) scFv - aa</p>	<p>268</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKLEWMIYIPGDSDRYSPSPFQGVITISADKSI TAYLQWSSLKASDTAMYICARHGPSWGEFDYWGQTLVTVSSASGGGGSGGGSGGGSDIRLTQSPSSLASVGD RVITICRASQSISSYLNWYQQRPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDTDFLTITISLQPEDFATYYCQSYST PLTFGGGTKVDIK</p>

[0505] 在实施方案中,将CAR scFv片段克隆至慢病毒载体中以便在单个编码性可读框中并使用表达用启动子(例如,EF1 α 启动子)(SEQ ID NO:11),产生全长CAR构建体。

[0506] SEQ ID NO:11EF1 α 启动子

[0507] CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCACTGAGGCGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAG
GGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTATGTCGTGTACTGGCTCCGC
CTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGC
CGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTT
GAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGG
CCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCGCTCGTGCTTGAGTTGAGGCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCCGCGTGCGAAT
CTGGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGA
CGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGTTTTTGGGGCCCG
GGCGGCGACGGGGCCCGTCCGCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGCCACCGAGAATCGG

ACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGG
 CAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA
 TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGT
 CGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGT
 CTTTAGGTTGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCT
 TGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGT
 GGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA

[0508] Gly/Ser (SEQ ID NO:25)

[0509] GGGGS

[0510] Gly/Ser (SEQ ID NO:26) :

[0511] 这个序列可以包含1-6个“Gly Gly Gly Gly Ser”重复单元

[0512] GGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS

[0513] Gly/Ser (SEQ ID NO:27)

[0514] GGGSGGGGS GGGSGGGGS

[0515] Gly/Ser (SEQ ID NO:28)

[0516] GGGSGGGGS GGGGS

[0517] Gly/Ser (SEQ ID NO:29)

[0518] GGGGS

[0519] PolyA: (A)₅₀₀₀ (SEQ ID NO:30)

[0520] 这个序列可以包含50-5000个腺嘌呤。

[0521] PolyA: (T)₁₀₀ (SEQ ID NO:31)

[0522] PolyA: (T)₅₀₀₀ (SEQ ID NO:32)

[0523] 这个序列可以包含50-5000个胸腺嘧啶。

[0524] PolyA: (A)₅₀₀₀ (SEQ ID NO:33)

[0525] 这个序列可以包含100-5000个腺嘌呤。

[0526] PolyA: (A)₄₀₀ (SEQ ID NO:34)

[0527] PolyA: (A)₂₀₀₀ (SEQ ID NO:35)

[0528] Gly/Ser (SEQ ID NO:38) :这个序列可以包含1-10个“Gly Gly Gly Ser”重复单元

[0529] GGGSGGGSGG GSGGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGGS

[0530] 实施例3中提供CAR分子或其抗体片段的额外例子。公开了鼠形式和人源化形式的抗CD33抗体2213。例如,实施例3提供以下:2213鼠抗CD33IgG4的核苷酸序列 (SEQ ID NO:138); 2213 CAR核苷酸序列 (SEQ ID NO:139); 2213 CAR氨基酸序列 (SEQ ID NO:140); 2213scFv核苷酸序列 (SEQ ID NO:141); 和2213scFv氨基酸序列 (SEQ ID NO:142); 2218人源化抗CD33IgG4H核苷酸序列 (SEQ ID NO:143)。

[0531] 实施例3中公开的其他实施方案包括先前作为米罗他 (Mylotarg) 销售的吉妥珠单抗奥唑米星 (Gemtuzumab ozogamicin) 的CAR分子和抗CD33抗体片段 (例如,本文以“人源化my96”所述的人源化形式)。在实施例3和SEQ ID NO:145中描述了带有41BB和CD3 ζ 信号结构域的吉妥珠单抗奥唑米星 (靶向CD33的免疫缀合物) 的抗CD33scFv的氨基酸序列。将人源化my96的相应核苷酸序列描述为SEQ ID NO:144。本文中将人源化my96核苷酸序列以SEQ

ID NO:146提供,并且氨基酸序列是SEQ ID NO:147。

[0532] 在一个实施方案中,本文中所述的CD33 CAR和CD33 CART包含这样的抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含重链可变结构域的一个或多个(例如,一个、两个或三个)CDR和/或轻链可变结构域的一个或多个(例如,一个、两个或三个)CDR,或由GenBank参考号AM402974.1编码的scFv序列的VH或VL(参见,Wang等人Mol. Ther.,第23卷:1,第184-191页(2015),所述文献因而通过引用的方式并入)。

[0533] 可以将CAR scFv片段克隆至慢病毒载体中以及在单个编码性可读框中并使用表达用EF1 α 启动子(SEQ ID NO:11),产生全长CAR构建体。

[0534] CAR构建体可以包括具有以下一个或多个序列的Gly/Ser接头:GGGGS(SEQ ID NO:25);包含1-6个"Gly Gly Gly Gly Ser"重复单元,例如GGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS(SEQ ID NO:26);GGGSGGGGS GGGSGGGGS(SEQ ID NO:27);GGGSGGGGS GGGGS(SEQ ID NO:28);GGGS(SEQ ID NO:29);或包含1-10个"Gly Gly Gly Ser"重复单元,例如GGGSGGGSGG GSGGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:38)。在实施方案中,CAR构建体包含聚腺苷酸序列,例如,包含50-5000个或100-5000个腺嘌呤的序列(例如,SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35),或包含50-5000个胸腺嘧啶的序列(例如,SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32)。备选地,CAR构建体可以例如包括接头,所述接头包括序列GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:383)

[0535] 双特异性CAR

[0536] 在一个实施方案中,多特异性抗体分子是双特异性抗体分子。双特异性抗体对不多于两种抗原具有特异性。双特异性抗体分子以针对第一表位具有结合特异性的第一免疫球蛋白可变结构域序列和针对第二表位具有结合特异性的第二免疫球蛋白可变结构域序列为特征。在一个实施方案中,第一和第二表位在相同抗原(例如,相同蛋白质(或多聚体蛋白的亚基))上。在一个实施方案中,第一和第二表位重叠。在一个实施方案中,第一和第二表位不重叠。在一个实施方案中,第一和第二表位在不同抗原(例如,不同蛋白质(或多聚体蛋白的不同亚基))上。在一个实施方案中,双特异性抗体分子包含针对第一表位具有结合特异性的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序以及针对第二表位具有结合特异性的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列。在一个实施方案中双特异性抗体分子包含针对第一表位具有结合特异性的半部分抗体和针对第二表位具有结合特异性的半部分抗体。在一个实施方案中双特异性抗体分子包含针对第一表位具有结合特异性的半部分抗体或其片段和针对第二表位具有结合特异性的半部分抗体或其片段。在一个实施方案中双特异性抗体分子包含针对第一表位具有结合特异性的scFv或其片段和针对第二表位具有结合特异性的scFv或其片段。

[0537] 在某些实施方案中,抗体分子是多特异性(例如,双特异性或三特异性)抗体分子。产生双特异性或异二聚抗体分子的方案是本领域已知的;包括但不限于,例如,"结在扣中"方案,例如在US 5731168中描述;静电导引Fc配对,例如,如WO 09/089004、WO 06/106905和WO 2010/129304中所述;链交换工程化的结构域(SEED)异二聚体形成,例如,如WO 07/110205中所述;Fab臂交换,例如,如WO 08/119353、WO 2011/131746和WO 2013/060867中所述;双抗体缀合物,例如,使用具有胺反应基团和巯基反应基团的异双官能试剂,通过抗体交联以产生双特异性结构,例如,如US 4433059中所述;通过以下方式产生的双特异性抗

体决定簇：借助两条重链之间二硫键的还原和氧化循环重组来自不同抗体的半部分抗体（重链-轻链对或Fab），例如，如US 4444878中所述；三功能抗体，例如，通过巯基反应基团交联的三个Fab片段，例如，如US 5273743中所述；生物合成的结合蛋白，例如，通过C末端尾部、优选地通过二硫键或胺反应性化学交联作用交联的一对scFvs，例如，如US 5534254中所述；双功能抗体，例如，通过已经替换恒定结构域的亮氨酸拉链（例如，c-fos和c-jun）二聚化的具有不同结合特异性的Fab片段，例如，如US 5582996中所述；双特异性和寡特异性单价和寡价受体，例如，经一种抗体的CH1区和另一种抗体的VH区（一般具有缔合的轻链）之间的多肽间隔序列连接的两种抗体（两个Fab片段）的VH-CH1区域，例如，如US 5591828中所述；双特异性DNA-抗体缀合物，例如，通过双链DNA片段交联抗体或Fab片段，例如，如US 5635602中所述；双特异性融合蛋白，例如，在两个scFv和完整恒定区域之间具有亲水螺旋肽接头的含有两个scFv的表达构建体，例如，如US 5637481中所述；多价和多特异性结合蛋白，例如，多肽的二聚体，所述多肽具有第一结构域连同Ig重链可变区的结合区和第二结构域连同Ig轻链可变区的结合区，总体上称作双体抗体（还涵盖产生双特异性、三特异性或四特异性分子的高级结构），例如，如US 583724中所述；VL链和VH链连接的迷你抗体构建体，所述VL链和VH链还借助肽间隔序列连接至抗体铰链区和CH3区，所述迷你抗体构建体可以二聚化以形成双特异性/多价分子，例如，如US 5837821中所述；在任一个方向与短肽接头（例如，5或10个氨基酸）连接或根本没有接头的VH结构域和VL结构域，所述VH结构域和VL结构域可以形成二聚体以形成双特异性双体抗体；三聚体和四聚体，例如，如US 5844094中所述；一系列通过肽键以可交联基团在C末端连接的VH结构域（或家族成员中的VL结构域），所述结构域进一步与VL结构域缔合以形成一系列FV（或scFv），例如，如US 5864019中所述；和将VH结构域和VL结构域均通过肽接头连接的单一链结合多肽借助非共价交联或化学交联并入多价结构以使用scFv或双体抗体类型样式，形成例如同源双价、异源双价、三价和四价结构，例如，如US 5869620中所述。额外的示例性多特异性和双特异性分子和产生这些分子的方法存在于例如以下申请中：US 5910573、US 5932448、US 5959083、US 5989830、US 6005079、US 6239259、US 6294353、US 6333396、US 6476198、US 6511663、US 6670453、US 6743896、US 6809185、US 6833441、US 7129330、US 7183076、US 7521056、US 7527787、US 7534866、US 7612181、US 2002004587 A1、US 2002076406 A1、US 2002103345 A1、US 2003207346 A1、US 2003211078 A1、US 2004219643 A1、US 2004220388 A1、US 2004242847 A1、US 2005003403 A1、US 2005004352 A1、US 2005069552 A1、US 2005079170 A1、US 2005100543 A1、US 2005136049 A1、US 2005136051 A1、US 2005163782 A1、US 2005266425 A1、US 2006083747 A1、US 2006120960 A1、US 2006204493 A1、US 2006263367 A1、US 2007004909 A1、US 2007087381 A1、US 2007128150 A1、US 2007141049 A1、US 2007154901 A1、US 2007274985 A1、US 2008050370 A1、US 2008069820 A1、US 2008152645 A1、US 2008171855 A1、US 2008241884 A1、US 2008254512 A1、US 2008260738 A1、US 2009130106 A1、US 2009148905 A1、US 2009155275 A1、US 2009162359 A1、US 2009162360 A1、US 2009175851 A1、US 2009175867 A1、US 2009232811 A1、US 2009234105 A1、US 2009263392 A1、US 2009274649 A1、EP 346087A2、WO 0006605 A2、WO 02072635 A2、WO 04081051 A1、WO 06020258 A2、WO 2007044887 A2、WO 2007095338 A2、WO 2007137760

A2、WO 2008119353 A1、WO 2009021754 A2、WO 2009068630 A1、WO 9103493 A1、WO 9323537 A1、WO 9409131 A1、WO 9412625 A2、WO 9509917 A1、WO 9637621 A2、WO 9964460 A1。上文所提及申请的内容是通过引用的方式完整地并入本文。

[0538] 在双特异性抗体分子的每个抗体或抗体片段(例如, scFv)内部, VH可以是在VL的上游或下游。在一些实施方案中, 上游抗体或抗体片段(例如, scFv)按照其VH (VH₁) 位于其VL (VL₁) 上游时布置并且下游抗体或抗体片段(例如, scFv)按照其VL (VL₂) 位于其VH (VH₂) 上游时布置, 从而总体双特异性抗体分子具有布局VH₁-VL₁-VL₂-VH₂。在其他实施方案中, 上游抗体或抗体片段(例如, scFv)按照其VL (VL₁) 位于其VH (VH₁) 上游时布置并且下游抗体或抗体片段(例如, scFv)按照其VH (VH₂) 位于其VL (VL₂) 上游时布置, 从而总体双特异性抗体分子具有布局VL₁-VH₁-VH₂-VL₂。任选地, 接头布置在两个抗体或抗体片段(例如, scFv)之间, 例如, 如果将构建体布置为VH₁-VL₁-VL₂-VH₂, 则布置在VL₁和VL₂之间, 或如果将构建体布置为VL₁-VH₁-VH₂-VL₂, 则布置在VH₁和VH₂之间。接头可以是如本文所述的接头, 例如, (Gly₄-Ser)_n接头, 其中n是1、2、3、4、5或6、优选地4 (SEQ ID NO:26)。通常, 在两个scFv之间的接头应当足够长, 以避免两个scFv的结构域之间错误配对。任选地, 接头布置在第一scFv的VL和VH之间。任选地, 接头布置在第二scFv的VL和VH之间。在具有多个接头的构建体中, 任何两个或更多个接头可以是相同或不同的。因此, 在一些实施方案中, 双特异性CAR在如本文所述的布局中包含VL、VH和任选地一个或多个接头。

[0539] 在一个方面, 双特异性抗体分子以第一免疫球蛋白可变结构域序列(例如, scFv)和第二免疫球蛋白可变结构域序列为特征, 所述的第一免疫球蛋白可变结构域序列对CD33具有结合特异性, 例如包含如本文所述(例如, 如表2或表9中所述)的scFv, 或包含来自本文所述的CD33scFv的轻链CDR和/或重链CDR, 所述第二免疫球蛋白可变结构域序列对不同抗原上的第二表位具有结合特异性。在一些方面, 第二免疫球蛋白可变结构域序列对AML细胞上表达的抗原(例如, 除CD33之外的抗原)具有结合特异性。例如, 第二免疫球蛋白可变结构域序列对CD123具有结合特异性。作为另一个例子, 第二免疫球蛋白可变结构域序列对CLL-1具有结合特异性。作为另一个例子, 第二免疫球蛋白可变结构域序列对CD34具有结合特异性。作为另一个例子, 第二免疫球蛋白可变结构域序列对FLT3具有结合特异性。例如, 第二免疫球蛋白可变结构域序列对叶酸受体β具有结合特异性。在一些方面, 第二免疫球蛋白可变结构域序列对B细胞上表达的抗原(例如, CD19、CD20、CD22或ROR1)具有结合特异性。

[0540] 嵌合TCR

[0541] 在一个方面, 可以将本发明的CD33抗体和抗体片段(例如, 在表2和表9中公开的那些)移植到T细胞受体(“TCR”)链(例如, TCRα或TCRβ链)的一个或多个恒定结构域, 以产生与CD33特异性结合的嵌合TCR。不受理论约束, 认为一旦结合抗原, 嵌合TCR将通过TCR复合体发送信号。例如, 可以将如本文中公开的CD33scFv移植至恒定结构域, 例如, TCR链(例如, TCRα链和/或TCRβ链)的胞外恒定结构域、跨膜结构域和胞质结构域的至少一部分。作为另一个例子, CD33抗体片段, 例如, 如本文所述的VL结构域, 可以移植至TCRα链的恒定结构域, 并且CD33抗体片段, 例如, 如本文所述的VH结构域, 可以移植至TCRβ链的恒定结构域(或备选地, VL结构域可以移植至TCRβ链的恒定结构域并且VH结构域可以移植至TCRα链)。作为另一个例子, CD33抗体或抗体片段的CDR(例如, 如表3、表4、表10、表11、表12或表13中所述的CD33抗体或抗体片段的CDR)可以移植至TCRα和/或β链中, 以产生与CD33特异性结合的嵌合

TCR。例如,本文公开的LCDR可以移植至TCR α 链的可变结构域中并且本文公开的HCDR可以移植至TCR β 链的可变结构域,或反之亦然。这类嵌合TCR可以通过本领域已知的方法产生(例如,Willemsen RA等人,Gene Therapy 2000;7:1369-1377;Zhang T等人,Cancer Gene Ther 2004;11:487-496;Aggen等人,Gene Ther.2012Apr;19(4):365-74)。

[0542] 跨膜结构域

[0543] 就跨膜结构域而言,在多种实施方案中,CAR可以设计成包含与CAR的胞外结构域连接的跨膜结构域。跨膜结构域可以包括一个或多个与跨膜区毗邻的额外氨基酸,例如,一个或多个与衍生跨膜区的蛋白质的胞外区相关的氨基酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个直至15个胞外区氨基酸)和/或一个或多个与衍生跨膜蛋白的蛋白质的胞内区相关的氨基酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个至多15个胞内区氨基酸)。在一个方面,跨膜结构域是与所用CAR的其他结构域之一缔合的结构域。在一些情况下,可以选择或通过氨基酸置换修饰跨膜结构域,以避免这类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,例如,以最大限度减少与受体复合体的其他构件的相互作用。在一个方面,跨膜结构域能够与表达CAR的细胞(例如,CART细胞)表面上的另一个CAR同二聚化。在一个不同方面,可以修饰或置换跨膜结构域的氨基酸序列,从而最小化与表达CAR的相同细胞(例如,CART)中存在的天然结合配偶体的结合结构域相互作用。

[0544] 跨膜结构域可以衍生自天然来源或重组来源。在来源是天然的情况下,结构域可以衍生自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在一个方面,每当CAR已经与靶结合时,跨膜结构域就能够向胞内结构域发送信号。在本发明中特别有用的跨膜结构域可以包含例如以下蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8(例如,CD8 α ,CD8 β)、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。在一些实施方案中,跨膜结构域可以包括至少例如以下蛋白质的跨膜区:KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKG2D、NKG2C。

[0545] 在一些情况下,跨膜结构域可以借助铰链(例如,来自人蛋白质的铰链)与CAR的胞外区连接(例如,CAR的抗原结合结构域)。例如,在一个实施方案中,铰链可以是人Ig(免疫球蛋白)铰链,例如,IgG4铰链区,或CD8铰链区。在一个实施方案中,铰链或间隔序列包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列(例如,由其组成)。在一个方面,跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的跨膜结构域(例如,由其组成)。

[0546] 在一个方面,铰链或间隔序列包含IgG4铰链。例如,在一个实施方案中,铰链或间隔序列包含具有以下氨基酸序列的铰链:

[0547] ESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ

KSLSLSLGKM (SEQ ID NO:3)。在一些实施方案中, 铰链或间隔序列包含由以下核苷酸序列编码的铰链:

[0548] GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTT
CCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTG
TCCCAGGAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCC
GGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
GGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAG
CCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCC
TGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGACAACACTACAAGAC
CACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAG
GAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGT
CCCTGGGCAAGATG (SEQ ID NO:14)。

[0549] 在一个方面, 铰链或间隔序列包含 IgD 铰链。例如, 在一个实施方案中, 铰链或间隔序列包含具有以下氨基酸序列的铰链:

[0550] RWPEPKAQASSVPTAQPPQAEGLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSTHTQ
PLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWN
AGTSVTCTLNHPSPQRLMALREPAAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTS
GFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHEDESRTLLNASRSLEVSIVTDH (SEQ ID NO:4)。

在一些实施方案中, 铰链或间隔序列包含由以下核苷酸序列编码的铰链:

[0551] AGGTGGCCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCCTACTGCACAGCCCCAGGCAGAAGGCAG
CCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAA
GAGAAAGAAGAACAGGAAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATC
TCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTCTGGGCTCTGACCT
GAAGGATGCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGAAAGGTACCCACAGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGC
CATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTCA
CATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGT
TAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGC
TTTAGCCCGCCAAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCC
GGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCCAGCACCACCTAGCCCCCA
GCCAGCCACATACCTGTGTTGTGCCATGAAGATAGCAGGACCCTGTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTT
TCCTACGTGACTGACCATT (SEQ ID NO:15)。

[0552] 在一个方面, 跨膜结构域可以是重组的, 在这种情况下, 它将包含优势疏水的残基如亮氨酸和缬氨酸。在一个方面, 苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸三联体可以在重组跨膜结构域的每个末端存在。

[0553] 任选地, 2和10个氨基酸长度之间的短寡肽接头或多肽接头可以在CAR的跨膜结构域和胞质区域之间形成链接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供特别合适的接头。例如, 在一个方面, 接头包含GGGSGGGGS的氨基酸序列 (SEQ ID NO:5)。在一些实施方案中, 接头由GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGTTCC的核苷酸序列 (SEQ ID NO:16) 编码。

[0554] 在一个方面, 铰链或间隔序列包含KIR2DS2铰链。

[0555] 胞质结构域

[0556] 本发明CAR的胞质结构域或区域包括胞内信号结构域。胞内信号结构域能够活化已经引入CAR的免疫细胞的至少一个正常效应子功能。

[0557] 用于本发明CAR中的胞内信号结构域的例子包括协同发挥作用以在抗原受体接合后启动信号转导的T细胞受体 (TCR) 和共受体的胞质序列, 以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何重组序列。

[0558] 已知仅通过TCR生成的信号不足以完全活化T细胞并且还需要次级和/或共刺激信号。因此, 据称T细胞活化可以由两类不同的胞质信号传导序列介导: 通过TCR启动抗原依赖性初级活化的那些序列 (初级胞内信号结构域) 和以抗原非依赖性方式发挥作用以提供次级或共刺激信号的那些序列 (次级胞质结构域, 例如, 共刺激结构域)。

[0559] 初级信号结构域以刺激性方式或以抑制性方式调节TCR复合物的初级活化。以刺激性方式发挥作用的初级胞内信号结构域可以含有称作基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号传导基序。

[0560] 含有在本发明中特别有用的ITAM的初级胞内信号传导序列的例子包括TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278 (也称作“ICOS”)、Fc ϵ RI、DAP10、DAP12和CD66d的那些。在一个实施方案中, 本发明的CAR包含胞内信号结构域, 例如, CD3- ζ 的初级信号结构域。

[0561] 在一个实施方案中, 初级信号结构域包含修饰的ITAM结构域, 例如, 如与天然ITAM结构域相比活性改变 (例如, 增加或减少) 的突变ITAM结构域。在一个实施方案中, 初级信号结构域包含了含有修饰的ITAM的初级胞内信号结构域, 例如, 含有优化和/或截短的ITAM的初级胞内信号结构域。在一个实施方案中, 初级信号结构域包含一个、两个、三个、四个或更多个ITAM基序。

[0562] 含有在本发明中特别有用的初级胞内信号结构域的其他例子包括DAP10、DAP12和CD32的那些分子。

[0563] CAR的胞内信号结构域可以本身包含初级信号结构域, 例如, CD3- ζ 信号结构域, 或它可以与本发明CAR背景下有用的任何其他所需的胞内信号结构域组合。例如, CAR的胞内信号结构域可以包含初级信号结构域 (例如, CD3- ζ 链部分) 和共刺激信号结构域。共刺激信号结构域指包含共刺激分子的胞内结构域的CAR部分。共刺激分子是除抗原受体或其配体之外淋巴细胞对抗原作出有效反应所需要的细胞表面分子。这类分子的例子包括MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、淋巴细胞活化信号分子 (SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、4-1BB (CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a和与CD83特异性

结合的配体。例如,CD27共刺激作用已经证实在体外增强人CART细胞的扩充、效应子功能和存活并且在体内增进人T细胞留存和抗肿瘤活性(Song等人,Blood.2012;119(3):696-706)。

[0564] 在本发明CAR的胞质部分内部的胞内信号传导序列可以彼此按随机顺序或指定顺序连接。任选地,例如2个和10个氨基酸(例如,2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)长度之间的短寡肽接头或多肽接头可以在胞内信号传导序列之间形成链接。在一个实施方案中,甘氨酸-丝氨酸双联体可以用作合适的接头。在一个实施方案中,单个氨基酸,例如,丙氨酸、甘氨酸,可以用作合适的接头。

[0565] 在一个方面,胞内信号结构域设计成包含两个或更多个(例如,2、3、4、5或更多个)共刺激信号结构域。在一个实施方案中,两个或更多个(例如,2、3、4、5或更多个)共刺激信号结构域由接头分子(例如,本文所述的接头分子)分开。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含两个共刺激信号结构域。在一些实施方案中,接头分子是甘氨酸残基。在一些实施方案中,接头是丙氨酸残基。

[0566] 在一个方面,胞内信号结构域设计成包含CD3- ζ 的信号结构域和CD28的信号结构域。在一个方面,胞内信号结构域设计成包含CD3- ζ 的信号结构域和4-1BB的信号结构域。在一个方面,4-1BB的信号结构域是SEQ ID NO:7的信号结构域。在一个方面,CD3- ζ 的信号结构域是SEQ ID NO:9(突变CD3- ζ)或SEQ ID NO:10(野生型人CD3- ζ)的信号结构域。

[0567] 在一个方面,胞内信号结构域设计成包含CD3- ζ 的信号结构域和CD27的信号结构域。在一个方面,CD27的信号结构域包含QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKP EPACSP的氨基酸序列(SEQ ID NO:8)。

[0568] 在一个方面,CD27的信号结构域由AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATG AACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCT ATCGCTCC的核酸序列(SEQ ID NO:19)编码。

[0569] 在一个方面,胞内信号结构域设计成包含CD3- ζ 的信号结构域和CD28的信号结构域。在一个方面,CD28的信号结构域包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列。在一个方面,CD28的信号结构域由SEQ ID NO:380的核酸序列编码。

[0570] 在一个方面,胞内信号结构域设计成包含CD3- ζ 的信号结构域和ICOS的信号结构域。在一个方面,CD28的信号结构域包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列。在一个方面,ICOS的信号结构域由SEQ ID NO:382的核酸序列编码。

[0571] 在一个方面,本文所述的表达CAR的细胞还可以包含例如针对相同靶(CD33)或不同靶(例如,CD123、CLL-1、CD34、FLT3,或叶酸受体 β)的第二CAR,例如,包括不同抗原结合结构域的第二CAR。在一个实施方案中,第二CAR包括针对急性髓样白血病细胞上表达的靶(例如,CD123、CLL-1、CD34、FLT3或叶酸受体 β)的抗原结合结构域。在一个实施方案中,表达CAR的细胞包含第一CAR,所述第一CAR靶向第一抗原并且包括了具有共刺激信号结构域但没有初级信号结构域的胞内信号结构域,和第二CAR,所述第二CAR靶向第二个不同的抗原并且包括了具有初级信号结构域但没有共刺激信号结构域的胞内信号结构域。尽管不希望受理论约束,将共刺激信号结构域(例如,4-1BB、CD28、CD27、ICOS或OX-40)安置到第一CAR上,并将初级信号结构域(例如,CD3 ζ)安置在第二CAR上能限制CAR的活性至表达两种靶的细胞。在一个实施方案中,表达CAR的细胞包含第一CD33 CAR,所述第一CD33 CAR包括CD33结合结

构域、跨膜结构域和共刺激结构域,和第二CAR,所述第二CAR靶向除CD33之外的抗原(例如,AML细胞上表达的抗原,例如,CD123、CLL-1、CD34、FLT3或叶酸受体B)并包括抗原结合结构域、跨膜结构域和初级信号结构域。在另一个实施方案中,表达CAR的细胞包含第一CD33 CAR,所述第一CD33 CAR包括CD33结合结构域、跨膜结构域和初级信号结构域,和第二CAR,所述第二CAR靶向除CD33之外的抗原(例如,AML细胞上表达的抗原,例如,CD123、CLL-1、CD34、FLT3或叶酸受体B)并包括针对该抗原的抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激信号结构域。

[0572] 在一个实施方案中,表达CAR的细胞包含本文所述的CD33 CAR和抑制性CAR。在一个实施方案中,抑制性CAR包含这样的抗原结合结构域,所述抗原结合结构域结合正常细胞上存在、但癌细胞上不存在的抗原,例如,也表达CD33的正常细胞。在一个实施方案中,抑制性CAR包含抑制性分子的抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。例如,抑制性CAR的胞内结构域可以是PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如、CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFRB的胞内结构域。

[0573] 在一个实施方案中,当表达CAR的细胞包含两种或更多种不同CAR时,不同CAR的抗原结合结构域可以是这样的,从而抗原结合结构域彼此不相互作用。例如,表达第一和第二CAR的细胞可以具有第一CAR的抗原结合结构域,例如,作为不与第二CAR的抗原结合结构域形成缔合的片段(例如,scFv),例如,第二CAR的抗原结合结构域是VHH。

[0574] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含单结构域抗原结合(SDAB)分子,包括其互补决定区是单结构域多肽组成部分的分子。例子包括但不限于重链可变结构域、天然缺少轻链的结合分子、衍生自常规四链抗体的单结构域、工程化结构域和除衍生自抗体的那些之外的单结构域支架。SDAB分子可以是现有技术的任何分子,或将来的任何单结构域分子。SDAB分子可以衍生自任何物种,包括但不限于小鼠、人、骆驼、羊驼、七鳃鳗、鱼、鲨鱼、山羊、兔和牛。这个术语还包括来自骆驼属(Camelidae)和鲨鱼之外的物种中的天然存在的单结构域抗体分子。

[0575] 在一个方面,SDAB分子可以衍生自鱼类中存在的免疫球蛋白的可变区,如,例如,从鲨鱼血清中存在的称作新抗原受体(NAR)的免疫球蛋白同种型衍生的那种可变区。产生从NAR可变区衍生的单结构域分子(“IgNAR”)的方法在WO 03/014161和Streltsov(2005) Protein Sci.14:2901-2909中描述。

[0576] 根据另一个方面,SDAB分子是天然存在的单结构域抗原结合分子,称作缺少轻链的重链。这类单结构域分子例如在WO 9404678和Hamers-Casterman,C.等人,(1993) Nature 363:446-448中公开。出于清晰原因,从天然缺少轻链的重链分子衍生的这种可变结构域在本文中称作VHH或纳米体以将它与四链免疫球蛋白的常规VH区分。这种VHH分子可以衍生自骆驼属(Camelidae)物种,例如骆驼、羊驼、单峰驼、驼羊和原驼。除骆驼属之外的其他物种可以产生天然缺少轻链的重链分子;这类VHH处于本发明的范围内。

[0577] SDAB分子可以是重组的、CDR移植的、人源化、骆驼化、去免疫化和/或在体外生成(例如,通过噬菌体展示法选择)。

[0578] 也已经发现,具有多个膜嵌入型嵌合受体的细胞可以是不想要的,所述嵌合膜嵌

入型受体包含在受体的抗原结合结构域之间相互作用的抗原结合结构域,例如,原因在于它抑制一个或多个抗原结合结构域与其相应抗原结合的能力。因此,本文公开了具有第一和第二非天然存在的膜嵌入型嵌合受体的细胞,所述膜嵌入型嵌合受体包含使这类相互作用最小化的抗原结合结构域。本文还公开了编码第一和第二非天然存在的膜嵌入型嵌合受体的核酸,所述膜嵌入型嵌合受体包含使这类相互作用最小化的抗原结合结构域。以及产生和使用这类细胞和核酸的方法。在一个实施方案中,所述第一和所述第二非天然存在的膜嵌入型嵌合受体之一的抗原结合结构域包含scFv,并且另一者包含单一VH结构域,例如,驼类、鲨鱼或七鳃鳗单一VH结构域,或从人或小鼠序列衍生的单一VH结构域。

[0579] 在一些实施方案中,要求保护的发明包含第一和第二CAR,其中所述第一CAR和所述第二CAR之一的抗原结合结构域不包含可变轻链结构域和可变重链结构域。在一些实施方案中,所述第一CAR和所述第二CAR之一的抗原结合结构域是scFv,并且另一者不是scFv。在一些实施方案中,所述第一CAR和所述第二CAR之一的抗原结合结构域包含单一VH结构域,例如,驼类、鲨鱼或七鳃鳗单一VH结构域,或从人或小鼠序列衍生的单一VH结构域。在一些实施方案中,所述第一CAR和所述第二CAR之一的抗原结合结构域包含纳米体。在一些实施方案中,所述第一CAR和所述第二CAR之一的抗原结合结构域包含驼类VHH结构域。

[0580] 在一些实施方案中,所述第一CAR和所述第二CAR之一的抗原结合结构域包含scFv,并且另一者包含单一VH结构域,例如,驼类、鲨鱼或七鳃鳗单一VH结构域,或从人或小鼠序列衍生的单一VH结构域。在一些实施方案中,所述第一CAR和所述第二CAR之一的抗原结合结构域包含scFv,并且另一者包含纳米体。在一些实施方案中,所述第一CAR和所述第二CAR之一的抗原结合结构域包含scFv,并且另一者包含驼类VHH结构域。

[0581] 在一些实施方案中,当在细胞表面上存在时,所述第一CAR的抗原结合结构域与其相应抗原的结合基本上不因所述第二CAR的存在而降低。在一些实施方案中,所述第一CAR的抗原结合结构域与其相应抗原在所述第二CAR存在的结合是所述第一CAR的抗原结合结构域与其相应抗原在所述第二CAR不存在下的结合的85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0582] 在一些实施方案中,当在细胞表面上存在时,所述第一CAR的抗原结合结构域和所述第二CAR的抗原结合结构域彼此比二种抗原结合结构域均为scFv抗原结合结构域时缔合更小。在一些实施方案中,所述第一CAR的抗原结合结构域和所述第二CAR的抗原结合结构域彼此比二种抗原结合结构域均为scFv抗原结合结构域时缔合小85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0583] 在另一个方面,本文所述的表达CAR的细胞还可以表达另一种物质,例如,增强表达CAR的细胞活性的物质。例如,在一个实施方案中,该物质可以是对抑制性分子抑制的物质。在一些实施方案中,抑制性分子(例如,PD1)可以降低表达CAR的细胞发动免疫效应子反应的能力。抑制性分子的例子包括PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIG、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR β 。在一个实施方案中,对抑制性分子抑制的物质例如是本文所述的分子,例如,是这样的物质,所述物质包含第一多肽(例如,抑制性分子),所述第一多肽与提供正向信号给细胞的第二多肽(例如,本文所述的胞内信号结构域)缔合。在一个实施方案中,该物质包含

例如抑制性分子如PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR β 或这些分子中任一者的片段(例如,这些分子中任一者的胞外结构域的至少一部分)的第一多肽和作为本文所述的胞内信号结构域(例如,包含共刺激结构域(例如,如本文所述的41BB、CD27、ICOS或CD28)和/或初级信号结构域(例如,本文所述的CD3 ζ 信号结构域)的第二多肽。在一个实施方案中,该物质包含PD1或其片段(例如,PD1的胞外结构域的至少一部分)的第一多肽和本文所述的胞内信号结构域(例如,本文所述的CD28信号结构域和/或本文所述的CD3 ζ 信号结构域)的第二多肽。在实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞包含转换开关共刺激受体,例如,如通过引用的方式完整并入本文的W02013/019615中所述。PD1是受体CD28家族的抑制性成员,所述家族还包括CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA。PD-1在活化的B细胞、T细胞和髓样细胞上表达(Agata等人,1996Int.Immunol 8:765-75)。已经显示与PD1结合时,PD1、PD-L1和PD-L2的两种配体下调T细胞活化(Freeman等人,2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman等人,2001 Nat Immunol 2:261-8;Carter等人,2002Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1在人类癌症中丰富(Dong等人,2003 J Mol Med 81:281-7;Blank等人,2005 Cancer Immunol.Immunother 54:307-314;Konishi等人,2004 Clin Cancer Res 10:5094)。可以通过抑制PD1与PD-L1的局部相互作用,逆转免疫抑制作用。

[0584] 在一个实施方案中,该物质包含抑制性分子(例如,程序性死亡1(PD1))的胞外结构域(ECD),可以与跨膜结构域和胞内信号结构域如41BB和CD3 ζ 融合(本文也称作PD1 CAR)。在一个实施方案中,与本文所述的CD33 CAR组合使用时,PD1 CAR改善表达CAR的细胞(例如,T细胞或NK细胞)的持久性。在一个实施方案中,CAR是PD1 CAR,其包含如SEQ ID NO:24中加下划线所示的PD1胞外结构域。在一个实施方案中,PD1 CAR包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

[0585] Malpvtalllplalllhaarppgwflsdprpwnpptfspallvvtgednatftcsfsntsesfvlnw
yrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvrtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylclgaislapkaqikeslraelr
vtterraevptahpspsprpagqfqtltvtppaprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyi
waplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsrsadapayk
qgqnqlynelnlgrreeydvldkrrrdpemggkprrrnpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdgly
qglstatkdydalhmqalppr(SEQ ID NO:24)。

[0586] 在一个实施方案中,PD1 CAR包含下文提供的氨基酸序列(SEQ ID NO:22)。

[0587] pgwflsdprpwnpptfspallvvtgednatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsq
pgqdcfrvrtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylclgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpag
qfqtltvtppaprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyck
rgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydv
ldkrrrdpemggkprrrnpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
(SEQ ID NO:22)。

[0588] 在一个实施方案中,该物质包含编码PD1 CAR的核酸序列(例如,本文所述的PD1 CAR)。在一个实施方案中,下文显示PD1 CAR的核酸序列,下文在SEQ ID NO:23中将PD1ECD加下划线

[0589] atggccctccctgtcactgccctgcttctccccctcgcactcctgctccacgccgctagaccaccggg
atggtttctggactctccggatcgcccgtggaatcccccaaccttctcaccggcactcttggttgactgagggc
gataatgcgaccttcacgtgctcgttctccaacacctccgaatcattcgtgctgaactggtaccgcatgagcccgt
caaaccagaccgacaagctcgccgctttccggaagatcggtcgcaaccgggacaggattgtcggttccgcgtgac
tcaactgccgaatggcagagacttccacatgagcgtggtccgcgctaggcgaaacgactccgggacctacctgtgc
ggagccatctcgtggcgcctaaggcccaaatcaaagagagcttgaggccgaactgagagtgaccgagcgcagag
ctgaggtgccaactgcacatccatccccatcgccctcgccctgcggggcagtttcagacctggtcaccgacctcc
ggcggcgcgcccaccgactccggcccaactatcgcgagccagccccctgtcgtgaggccggaagcatgccgcct
gccgccggaggtgctgtgcatacccgggattggacttcgcatgcgacatctacatttgggtcctctcgcggaa
cttggtggcgtgctccttctgtccttggtcatcacctgtactgcaagcggggtcgaaaaagcttctgtacatttt
caagcagcccttcatgaggccggtgcaaaccaccaggaggaggacggttgctcctgccggttccccgaagaggaa
gaaggaggttgcgagctgcgctgaagtctccggagcgcgcgacgccccgcctataagcaggccagaaccagc
tgtacaacgaactgaacctgggacggcggaagagtaagatgtgctggacaagcggcggcgggacccccgaaat
ggcggggaagcctagaagaaagaacctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaagatggccgagggc
tactccgaaattgggatgaaggagagcggcgaggggaaaggggcacgacggcctgtaccaaggactgtccaccg
ccaccaaggacacatacagatgccctgcacatgcaggcccttccccctcgc (SEQ ID NO:23)。

[0590] 在另一个方面,本发明提供表达CAR的细胞(例如,CART细胞或表达CAR的NK细胞)的群体。在一些实施方案中,表达CAR的细胞群体包含表达不同CAR的细胞的混合物。例如,在一个实施方案中,表达CAR的细胞(例如,CART细胞或表达CAR的NK细胞)的群体可以包含表达具有本文所述的CD33结合结构域的CAR的第一细胞和表达具有不同CD33结合结构域(例如,与在第一细胞表达的CAR中的CD33结合结构域不同的本文所述的CD33结合结构域)的CAR的第二细胞。作为另一个例子,表达CAR的细胞的群体可以包括表达下述CAR的第一细胞,所述CAR包括(例如,如本文所述的)CD33结合结构域,和表达下述CAR的第二细胞,所述CAR包括针对除CD33以外的靶(例如,CD123、CD34、CLL-1、FLT3或叶酸受体 β)的抗原结合结构域。在一个实施方案中,表达CAR的细胞的群体包括例如表达下述CAR的第一细胞,所述CAR包含初级胞内信号结构域,和表达下述CAR的第二细胞,所述CAR包含次级信号结构域,例如,共刺激信号结构域。

[0591] 在另一个方面,本发明提供细胞群体,其中,群体中的至少一个细胞表达具有本文所述的CD33结合结构域的CAR,和表达另一种物质(例如,增强表达CAR的细胞活性的物质)的第二细胞。例如,在一个实施方案中,该物质可以是对抑制性分子抑制的物质。在一些实施方案中,抑制性分子例如可以降低表达CAR的细胞发动免疫效应子反应的能力。抑制性分子的例子包括PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIG、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGF β 。在一个实施方案中,例如在本文中描述了对抑制性分子抑制的物质,所述物质包含第一多肽(例如,抑制性分子),所述第一多肽与提供正向信号给细胞的第二多肽(例如,本文所述的胞内信号结构域)缔合。在一个实施方案中,该物质包含例如抑制性分子如PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、

KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR β 或这些分子中任一者的片段(例如,这些分子中任一者的胞外结构域的至少一部分)的第一多肽和作为本文所述的胞内信号结构域(例如,包含共刺激结构域(例如,如本文所述的41BB、CD27、ICOS或CD28)和/或初级信号结构域(例如,本文所述的CD3 ζ 信号结构域)的第二多肽。在一个实施方案中,该物质包含PD1或其片段(例如,PD1的胞外结构域的至少一部分)的第一多肽和本文所述的胞内信号结构域(例如,本文所述的CD28信号结构域和/或本文所述的CD3 ζ 信号结构域)的第二多肽。

[0592] 在一个方面,本发明提供多种方法,所述方法包括施用与另一个物质(例如,激酶抑制剂,如本文所述的激酶抑制剂)组合的表达CAR的细胞(例如,CART细胞或表达CAR的NK细胞)的群体,例如,表达不同CAR的细胞的混合物。在另一个方面,本发明提供了这样的方法,所述方法施用与另一个物质(例如,激酶抑制剂,如本文所述的激酶抑制剂)组合的细胞群体,其中该群体中的至少一个细胞表达具有如本文所述的抗癌相关性抗原结合结构域的CAR,和表达另一种物质(例如,增强表达CAR的细胞活性的物质)的第二细胞。

[0593] 天然杀伤细胞受体(NKR) CAR

[0594] 在一个实施方案中,本文所述的CAR分子包含天然杀伤细胞受体(NKR)的一种或多种组分,因而形成NKR-CAR。NKR组分可以是来自以下任何天然杀伤细胞受体的跨膜结构域、铰链结构域或胞质结构域:杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR),例如KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、DIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3、KIR2DP1和KIR3DP1;天然细胞毒性受体(NCR),例如,NKp30、NKp44、NKp46;免疫细胞受体的信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM)家族,例如,CD48、CD229、2B4、CD84、NTB-A、CRA、BLAME和CD2F-10;Fc受体(FcR),例如,CD16、和CD64;和Ly49受体,例如,LY49A、LY49 C。本文所述的NKR-CAR分子可以与衔接子分子或胞内信号结构域(例如,DAP12)相互作用。国际公开号W02014/145252中描述了包含NKR组分的CAR分子的示例性布局 and 序列,所述文献的内容因而通过引用的方式完整并入。

[0595] 调节嵌合抗原受体的策略

[0596] 存在可以调节CAR活性的许多方式。在一些实施方案中,其中CAR活性可以控制的可调节性CAR(RCAR)是优化CAR疗法的安全性和疗效需要的。例如,使用例如与二聚化结构域融合的胱天蛋白酶诱导凋亡(参见,例如,Di等人,N Engl.J.Med.2011 Nov.3;365(18):1673-1683)可以用作本发明CAR治疗中的安全开关。在另一个例子中,当施用导致胱天蛋白酶-9激活和细胞凋亡的二聚化药物(例如,rimiducid(也称作AP1903(Bellicum Pharmaceuticals)或AP20187(Ariad))时,表达CAR的细胞也可以表达诱导型胱天蛋白酶-9(iCaspase-9)分子。iCaspase-9分子含有在CID存在下介导二聚化的二聚化过程化学诱导物(CID)结构域。这导致表达CAR的细胞诱导性耗竭和选择性耗竭。在一些情况下,iCaspase-9分子由独立于CAR编码载体的核酸分子编码。在一些情况下,iCaspase-9分子由与CAR编码载体相同的核酸分子编码。iCaspase-9可以提供安全开关以避免表达CAR的细胞的任何毒性。参见,例如,Song等人,Cancer Gene Ther.2008;15(10):667-75;临床试验识别号NCT02107963;和Di Stasi等人,N.Engl.J.Med.2011;365:1673-83。

[0597] 调节本发明CAR疗法的备选策略包括利用小分子或抗体,所述小分子或抗体失活或关闭CAR活性,例如,通过消除表达CAR的细胞,例如,通过诱导抗体依赖的细胞介导细胞毒性(ADCC)实施。例如,本文所述的表达CAR的细胞还可以表达由能够诱导细胞死亡(例如,

ADCC或补体诱导的细胞死亡)的分子识别的抗原。例如,本文所述的表达CAR的细胞还可以表达能够被抗体或抗体片段靶向的受体。这类受体的例子包括EPCAM、VEGFR、整联蛋白(例如,整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha I3/4\beta 3$ 、 $\alpha 4\beta 7$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 αv)、TNF受体超家族成员(例如,TRAIL-R1、TRAIL-R2)、PDGF受体、干扰素受体、叶酸受体、GPNMB、ICAM-1、HLA-DR、CEA、CA-125、MUC1、TAG-72、IL-6受体、5T4、GD2、GDB、CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/basigin、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7和EGFR及其截短形式(例如,保留一个或多个胞外表位但缺少胞质结构域内部一个或多个区域的形式)。例如,本文所述的表达CAR的细胞还可以表达截短的表皮生长因子受体(EGFR),所述截短的表皮生长因子受体缺少信号传导能力,但是保留由能够诱导ADCC的分子(例如,西妥昔单抗(ERBITUX®))识别的表位,从而西妥昔单抗的施用引起ADCC和表达CAR的细胞后续耗竭(参见,例如,WO 2011/056894,和Jonnalagadd等人, *Gene Ther.* 2013; 20 (8) 853-860)。另一种策略包括在本文所述的表达CAR的细胞中表达合并来自CD32抗原和CD20抗原的靶表位的高度紧凑型标志物/自杀基因,所述的高度紧凑型标志物/自杀基因表达物结合利妥昔单抗,导致表达CAR的细胞选择性耗竭,例如,通过ADCC做到(参见,例如,Philip等人, *Blood.* 2014; 124 (8) 1277-1287)。用于耗竭本文所述的表达CAR的细胞的其他方法包括施用CAMPATH®,一种选择性结合并靶向成熟淋巴细胞(例如,表达CAR的细胞)以破坏(例如,通过诱导ADCC进行破坏)的单克隆抗CD52抗体。在其他实施方案中,可以使用CAR配体(例如,抗独特型抗体)选择性地靶向表达CAR的细胞。在一些实施方案中,抗独特型抗体可以造成效应细胞活性,例如ADCC或ADC活性,因而减少表达CAR的细胞的数目。在其他实施方案中,CAR配体,例如,抗独特型抗体,可以偶联至诱导细胞杀伤的物质(例如,毒素),因而减少表达CAR的细胞的数目。备选地,CAR分子本身可以如此设置,从而可以调节活性,例如,开启和关闭,如下文描述。

[0598] 在一些实施方案中,RCAR包含一组多肽,在最简单的实施方案中一般两种多肽,其中本文所述的标准CAR的组件(例如,抗原结合结构域和胞内信号结构域)分配在分离的多肽或构件上。在一些实施方案中,该组多肽包括二聚化开关,其中存在二聚化分子时,所述二聚化开关可以使多肽彼此偶联,例如,可以使抗原结合结构域与胞内信号结构域偶联。本文中及国际公开号WO 2015/090229中提供对这类调节型CAR的额外描述和示例性布局,所述文献因而通过引用的方式完整地并入。

[0599] 在一个实施方案中,RCAR包含两种多肽或构件:1) 包含胞内信号结构域(例如,本文所述的初级胞内信号结构域)和第一开关结构域的胞内信号传导构件;2) 包含如本文所述的(例如靶向本文所述的肿瘤抗原的)抗原结合结构域和第二开关结构域的抗原结合构件。任选地,RCAR包含本文所述的跨膜结构域。在一个实施方案中,可以在胞内信号传导构件上、抗原结合构件上或在这两者上设置跨膜结构域。(除非另外说明,否则本文中描述RCAR的构件或元件时,该顺序可以是如所提供的那样,但是也可以包括其他顺序)。换言之,在一个实施方案中,顺序如文本中所述那样,但是在其他实施方案中,顺序可以是不同的。例如,在跨膜区一侧上的各元件顺序可以与例子不同,例如,开关结构域相对于胞内信号结构域的安置可以是不同的,例如,反向的。

[0600] 在一个实施方案中,第一开关结构域和第二开关结构域可以形成胞内或胞外二聚

化开关。在一个实施方案中，二聚化开关可以是同二聚化开关，例如，其中第一开关结构域和第二开关结构域是相同的，或异二聚化开关，例如，其中第一开关结构域和第二开关结构域彼此不同。

[0601] 在实施方案中，RCAR可以包含“多重开关”。多重开关可以包含异二聚化开关结构域或同二聚化开关结构域。多重开关在第一构件（例如，抗原结合构件）和第二构件（例如，胞内信号传导构件）上独立地包含多个例如，2、3、4、5、6、7、8、9、或10个开关结构域。在一个实施方案中，第一构件可以包含多个第一开关结构域，例如，基于FKBP的开关结构域，并且第二构件可以包含多个第二开关结构域，例如，基于FRB的开关结构域。在一个实施方案中，第一构件可以包含第一开关结构域和第二开关结构域，例如，基于FKBP的开关结构域和基于FRB的开关结构域，并且第二构件可以包含第一开关结构域和第二开关结构域，例如，基于FKBP的开关结构域和基于FRB的开关结构域。

[0602] 在一个实施方案中，胞内信号传导构件包含一个或多个胞内信号结构域（例如，初级胞内信号结构域和一个或多个共刺激信号结构域）。

[0603] 在一个实施方案中，抗原结合构件可以包含一个或多个胞内信号结构域，例如，一个或多个共刺激信号结构域。在一个实施方案中，抗原结合构件包含多个，例如，2个或3个本文所述的共刺激信号结构域，例如，选自4-1BB、CD28、CD27、ICOS和OX40的共刺激信号结构域，并且在多个实施方案中，不包含初级胞内信号结构域。在一个实施方案中，抗原结合构件从胞外至胞内方向包含以下共刺激信号结构域：4-1BB-CD27；41BB-CD27；CD27-4-1BB；4-1BB-CD28；CD28-4-1BB；OX40-CD28；CD28-OX40；CD28-4-1BB；或4-1BB-CD28。在这类实施方案中，胞内结合构件包含CD3 ζ 结构域。在这样一个实施方案中，RCAR包含(1) 抗原结合构件，所述抗原结合构件包含抗原结合结构域、跨膜结构域和两个共刺激结构域和第一开关结构域；和(2) 胞内信号结构域，所述胞内信号结构域包含跨膜结构域或膜束缚结构域和至少一个初级胞内信号结构域和第二开关结构域。

[0604] 一个实施方案提供其中抗原结合构件未束缚于CAR细胞表面的RCAR。这允许具有胞内信号传导构件的细胞在不用编码抗原结合构件的序列转化细胞的情况下便利地与一个或多个抗原结合结构域配对。在这类实施方案中，RCAR包含：1) 胞内信号传导构件，所述胞内信号传导构件包含：第一开关结构域、跨膜结构域、胞内信号结构域（例如，初级胞内信号结构域）和第一开关结构域；和2) 抗原结合构件，所述抗原结合构件包含：抗原结合结构域和第二开关结构域，其中抗原结合构件不包含跨膜结构域或膜束缚结构域并且任选地不包含胞内信号结构域。在一些实施方案中，RCAR还可以包含3) 第二抗原结合构件，所述第二抗原结合构件包含第二抗原结合结构域，例如，结合被抗原结合结构域结合的不同抗原的第二抗原结合结构域；和第二开关结构域。

[0605] 本文中还提供其中抗原结合构件包含双特异性激活和靶向能力的RCAR。在这个实施方案中，抗原结合构件可以包含多个，例如，2、3、4、或5个抗原结合结构域，例如，scFv，其中每种抗原结合结构域结合至靶抗原，例如不同的抗原或相同的抗原，例如，相同抗原上的相同或不同表位。在一个实施方案中，多个抗原结合结构域串联，并且任选地，接头或铰链区布置在每个抗原结合结构域之间。本文中描述了合适的接头和铰链区。

[0606] 一个实施方案提供了具有允许增殖变换的布局的RCAR。在这个实施方案中，该RCAR包含：1) 胞内信号传导构件，所述胞内信号传导构件包含：任选地，跨膜结构域或膜束

缚结构域；一种或多种（例如，选自4-1BB、CD28、CD27、ICOS和OX40的）共刺激信号结构域，以及开关结构域；和2）抗原结合构件，所述抗原结合构件包含：抗原结合结构域、跨膜结构域和初级胞内信号结构域（例如，CD3 ζ 结构域），其中抗原结合构件不包含开关结构域或不包含与胞内信号传导构件上开关结构域二聚化的开关结构域。在一个实施方案中，抗原结合构件不包含共刺激信号结构域。在一个实施方案中，胞内信号传导构件包含来自同二聚化开关的开关结构域。在一个实施方案中，胞内信号传导构件包含异二聚化开关的第一开关结构域，并且RCAR包含第二胞内信号传导构件，所述第二胞内信号传导构件包含异二聚化开关的第二开关结构域。在这类实施方案中，第二胞内信号传导构件包含与胞内信号传导构件相同的胞内信号结构域。在一个实施方案中，二聚化开关是胞内的。在一个实施方案中，二聚化开关是胞外的。

[0607] 在本文描述的任何RCAR布局中，第一开关结构域和第二开关结构域包含如本文所述的基于FKBP-FRB的开关。

[0608] 本文中还提供包含本文所述的RCAR的细胞。经工程化以表达RCAR的任何细胞可以用作RCARX细胞。在一个实施方案中，RCARX细胞是T细胞并且称作RCART细胞。在一个实施方案中，RCARX细胞是NK细胞并且称作RCARN细胞。

[0609] 本文中还提供包含编码RCAR的序列的核酸和载体。编码RCAR的多种元件的序列可以设置在相同的核酸分子上，例如，相同的质粒或载体，例如，病毒载体，例如，慢病毒载体。在一个实施方案中，(i) 编码抗原结合构件的序列和(ii) 编码胞内信号传导构件的序列可以存在于相同的核酸（例如，载体）上。可以例如通过使用独立的启动子，或通过使用双顺反子转录产物（通过切割单一翻译产物或通过翻译两种独立的蛋白质产物，所述双顺反子转录产物可以导致产生两种蛋白质）实现相应蛋白质的产生。在一个实施方案中，编码可切割肽的序列（例如，P2A或F2A序列）布置在(i)和(ii)之间。在一个实施方案中，编码IRES（例如，EMCV或EV71IRES）的序列布置在(i)和(ii)之间。在这些实施方案中，(i)和(ii)转录为单个RNA。在一个实施方案中，第一启动子与(i)有效连接并且第二启动子与(ii)有效连接，从而(i)和(ii)转录为独立的mRNA。

[0610] 备选地，编码RCAR的多种元件的序列可以设置在不同的核酸分子上，例如，不同的质粒或载体，例如，病毒载体，例如，慢病毒载体。例如，(i) 编码抗原结合构件的序列可以存在于第一核酸（例如，第一载体）上，并且(ii) 编码胞内信号传导构件的序列可以存在于第二核酸（例如，第二载体）上。

[0611] 二聚化开关

[0612] 二聚化开关可以是非共价或共价的。在非共价二聚化开关中，二聚化分子促进各开关结构域之间的非共价相互作用。在共价二聚化开关中，二聚化分子促进各开关结构域之间的共价相互作用。

[0613] 在一个实施方案中，RCAR包含基于FKBP/FRAP或基于FKBP/FRB的二聚化开关。FKBP12（FKBP、或FK506结合蛋白）是充当天然产物免疫抑制药物雷帕霉素的初始胞内靶的丰富胞质蛋白。雷帕霉素与FKBP结合并且与大PI3K同源物FRAP（RAFT、mTOR）结合。FRB是FRAP的93氨基酸部分，所述部分足以结合FKBP-雷帕霉素复合物（Chen, J., Zheng, X.F., Brown, E.J.和Schreiber, S.L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and

characterization of a critical serine residue. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 4947-51)。

[0614] 在实施方案中,基于FKBP/FRAP(例如,基于FKBP/FRB)的开关可以使用二聚化分子,例如,雷帕霉素或雷帕霉素类似物。

[0615] FKBP的氨基酸序列如下:

[0616] D V P D Y A S L G G P S S P K K K R K V S R G V Q V E T I S P G D G R
T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R D R N K P F K F M L G K
Q E V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I
P P H A T L V F D V E L L K L E T S Y (SEQ ID NO:148)。

[0617] 在实施方案中,FKBP开关结构域可以包含具有在雷帕霉素或雷帕霉素类似物存在下与FRB或其片段或类似物结合的能力的FKBP片段,例如,SEQ ID NO:148的加下划线部分,其是:

[0618] V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F
D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T
I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E T S (SEQ ID
NO:149)。

[0619] FRB的氨基酸序列如下:

[0620] ILWHEMWHEG LEEASRLYFG ERNVKGMFEV LEPLHAMMER GPQTLKETSF NQAYGRDLME
AQEWCRKYMK SGNVKDLTQA WDLYYHVFRR ISK (SEQ ID NO:150)

[0621] 如该术语在本文中所用那样,“基于FKBP/FRAP(例如,基于FKBP/FRB)的开关”指包含第一开关结构域和第二开关结构域的二聚化开关,所述第一开关结构域包含了具有在雷帕霉素或雷帕霉素类似物(例如,RAD001)存在下与FRB或其片段或类似物结合的能力的FKBP片段或其类似物并且与SEQ ID NO:148或149的FKBP序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或差异不多于30、25、20、15、10、5、4、3、2或1个氨基酸残基;所述第二开关结构域包含了具有在雷帕霉素或雷帕霉素类似物存在下与FRB或其片段或类似物结合的能力的FRB片段或其类似物并且与SEQ ID NO:150的FRB序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或差异不多于30、25、20、15、10、5、4、3、2或1个氨基酸残基。在一个实施方案中,本文所述的RCAR包含一个包含在SEQ ID NO:148(或SEQ ID NO:149)中公开的氨基酸残基的开关结构域和一个包含在SEQ ID NO:150中公开的氨基酸残基的开关结构域。

[0622] 在实施方案中,FKBP/FRB二聚化开关包含修饰的FRB开关结构域,所述修饰的FRB开关结构域显示出改变(例如,增强)基于FRB的开关结构域(例如,修饰的FRB开关结构域、基于FKBP的开关结构域)和二聚化分子(例如,雷帕霉素或雷帕霉素类似物,例如,RAD001)之间的复合物形成。在一个实施方案中,修饰的FRB开关结构域包含一个或多个突变,例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个选自氨基酸位置L2031、E2032、S2035、R2036、F2039、G2040、T2098、W2101、D2102、Y2105和F2108处的突变,其中野生型氨基酸突变成任何其他天然存在的氨基酸。在一个实施方案中,突变FRB包含在E2032处的突变,其中E2032突变成苯丙氨酸(E2032F)、甲硫氨酸(E2032M)、精氨酸(E2032R)、缬氨酸(E2032V)、酪氨酸(E2032Y)、异亮氨酸(E2032I)(例如,SEQ ID NO:151)或亮氨酸(E2032L)(例如,SEQ ID NO:152)。在一

个实施方案中,突变FRB包含在T2098处的突变,其中T2098突变成苯丙氨酸(T2098F)或亮氨酸(T2098L),例如,SEQ ID NO:153。在一个实施方案中,突变FRB包含在E2032处和T2098处的突变,其中E2032突变成任何氨基酸并且其中T2098突变成任何氨基酸,例如,SEQ ID NO:154。在一个实施方案中,突变FRB包含E2032I和T2098L突变,例如,SEQ ID NO:155。在一个实施方案中,突变FRB包含E2032L和T2098L突变,例如,SEQ ID NO:156。

[0623] 表6. 具有增加的二聚化分子亲和力的示例性突变FRB。

FRB 突变体	氨基酸序列	SEQ ID NO:
[0624] E2032I 突变体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQ EWCRCYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	151
E2032L 突变体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQ EWCRCYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	152
T2098L 突变体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQ EWCRCYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	153
[0625] E2032, T2098 突变体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQ EWCRCYMKSGNVKDLXQAWDLYYHVFRISKTS	154
E2032I, T2098L 突变体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQ EWCRCYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	155
E2032L, T2098L 突变体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQ EWCRCYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	156

[0626] 其他合适的二聚化开关包括基于GyrB-GyrB的二聚化开关、基于赤霉素的二聚化开关、标签/结合物二聚化开关和halo-标签/snap-标签二聚化开关。按照本文提供的指南,这类开关和有关的二聚化分子将是普通技术人员显而易见的。

[0627] 二聚化分子

[0628] 开关结构域之间的缔合由二聚化分子引发。在二聚化分子存在下,开关结构域之间的相互作用或缔合允许与第一开关结构域缔合(例如,融合)的多肽和与第二开关结构域缔合(例如,融合)的多肽之间的信号转导。在非限制水平的二聚化分子存在下,信号转导增加了1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、5、10、50、100倍,例如,如本文所述的系统中测量。

[0629] 雷帕霉素和雷帕霉素类似物(有时称作雷帕类似物),例如RAD001,可以用作本文所述的基于FKBP/FRB的二聚化开关中的二聚化分子。在一个实施方案中二聚化分子可以选自雷帕霉素(西罗莫司(sirolimus))、RAD001(依维莫司)、佐他莫司(zotarolimus)、坦罗莫司、AP-23573(地磷莫司)、百奥莫司(biolimus)和AP21967。适合随基于FKBP/FRB的二聚化开关使用的额外雷帕霉素类似物进一步在名为“联合疗法”的部分中或在名为“与免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂联用”的子部分中描述。

[0630] 分裂的CAR(split CAR)

[0631] 在一些实施方案中,表达CAR的细胞使用分裂的CAR。出版物WO 2014/055442和WO 2014/055657中更详细地描述了分裂的CAR方案,所述文献通过引用的方式并入本文。简而言之,分裂的CAR系统包含细胞,所述细胞表达具有第一抗原结合结构域和共刺激结构域

(例如,41BB)的第一CAR,并且细胞还表达具有第二抗原结合结构域和胞内信号结构域(例如,CD3 ζ)的第二CAR。当细胞遇到第一抗原时,共刺激结构域被激活并且细胞增殖。当细胞遇到第二抗原时,胞内信号结构域被激活并且细胞杀伤活性开启。因此,表达CAR的细胞仅在两种抗原存在下完全活化。在实施方案中,第一抗原结合结构域识别CD33,例如,包含本文所述的抗原结合结构域,并且第二抗原结合结构域识别急性髓样白血病细胞上表达的抗原,例如,CD123、CLL-1、CD34、FLT3或叶酸受体 β 。在实施方案中,第一抗原结合结构域识别CD33,例如,包含本文所述的抗原结合结构域,并且第二抗原结合结构域识别B细胞上表达的抗原,例如,CD19、CD20,CD22或ROR1。

[0632] 稳定性和突变

[0633] CD33结合结构域(例如,scFv分子(例如,可溶性scFv))的稳定性可以参经常规对照scFv分子或全长抗体的生物物理特性(例如,热稳定性)来评价。在一个实施方案中,人scFv在所述测定法中具有比对照结合分子(例如常规scFv分子)高约0.1、约0.25、约0.5、约0.75、约1、约1.25、约1.5、约1.75、约2、约2.5、约3、约3.5、约4、约4.5、约5、约5.5、约6、约6.5、约7、约7.5、约8、约8.5、约9、约9.5、约10摄氏度、约11摄氏度、约12摄氏度、约13摄氏度、约14摄氏度或约15摄氏度的热稳定性。

[0634] 随后将CD33结合结构域(例如,scFv)的改善的热稳定性赋予整个CAR33构建体,导致CAR33构建体的治疗性特性改善。与常规抗体相比,可以改善CD33结合结构域(例如,scFv)的热稳定性至少约2°C或3°C。在一个实施方案中,与常规抗体相比,CD33结合结构域(例如,scFv)具有1°C的热稳定性改善。在另一个实施方案中,与常规抗体相比,CD33结合结构域(例如,scFv)具有2°C的热稳定性改善。在另一个实施方案中,与常规抗体相比,scFv具有4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15°C改善的热稳定性。可以例如在本文公开的scFv分子和全长抗体之间进行比较。可以使用本领域已知的方法测量热稳定性。例如,在一个实施方案中,可以测量T_m。下文更详细地描述用于测量T_m的方法和确定蛋白质稳定性的其他方法。

[0635] scFv中的突变改变scFv的稳定性并且改善scFv和CAR33构建体的总体稳定性。使用测量如T_m、温度变性和温度聚集,测定人源化或人scFv的稳定性。

[0636] 可以使用实施例中描述的测定法确定突变scFv的结合能力。

[0637] 在一个实施方案中,CD33结合结构域(例如,scFv)包含至少一个突变,从而突变的scFv赋予CAR33构建体改善的稳定性。在另一个实施方案中,CD33结合结构域(例如,scFv)包含源自人源化过程的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个突变,从而突变的scFv赋予CAR33构建体改善的稳定性。

[0638] 评价蛋白质稳定性的方法

[0639] 可以例如使用下文描述的方法,评估抗原结合结构域的稳定性。这类方法允许确定多个热解折叠转变,其中最不稳定的结构域首先解折叠或限制协同解折叠的多结构域单元(例如,显示单一解折叠转变的多结构域蛋白质)的总体稳定阈值。可以按许多额外的方式鉴定最不稳定的结构域。可以进行诱变以探测哪个结构域限制总体稳定性。另外,可以在这样的条件下借助DSC或其他光谱方法确定多结构域蛋白质的蛋白酶抗性,其中已知最不稳定结构域内在解折叠(Fontana等人,(1997) *Fold. Des.*, 2:R17-26;Dimasi等人,(2009) *J. Mol. Biol.* 393:672-692)。一旦鉴定到最不稳定的结构域,可以使用编码这种结构域(或其部分)的序列作为所述方法中的测试序列。

[0640] a) 热稳定性

[0641] 可以使用本领域已知的许多非限制性生物物理或生物化学技术分析组合物的热稳定性。在某些实施方案中,通过分析光谱法评价热稳定性。

[0642] 一个示例性分析光谱方法是差示扫描量热法(DSC)。DSC采用对伴随大多蛋白质或蛋白质结构域解折叠的热吸收敏感的量热器(见,例如Sanchez-Ruiz等人,Biochemistry, 27:1648-52,1988)。为了确定蛋白质的热稳定性,将蛋白质的样品插入量热器中并将温度升高直至Fab或scFv解折叠。蛋白质解折叠的温度表示总体蛋白质稳定性。

[0643] 另一个示例性分析光谱法方法是圆二色性(CD)光谱法。CD光谱法测量组合物随温度增加而变化的光学活性。圆二色性(CD)光谱法测量相对于右旋偏振光而言左旋偏振光吸收的差异,所述差异因结构非对称性所致。无序或解折叠的结构产生与有序或折叠的结构非常不同的CD光谱。CD光谱反映蛋白质对增加温度的变性效应的灵敏度并且因此表示蛋白质的热稳定性(见van Mierlo和Steemsma,J.Biotechnol.,79(3):281-98,2000)。

[0644] 用于测量热稳定性的另一个示例性分析光谱方法是荧光发射光谱法(见上文van Mierlo和Steemsma)。用于测量热稳定性的又一个示例性分析光谱方法是核磁共振(NMR)光谱(见,例如上文van Mierlo和Steemsma)。

[0645] 可以按生物化学方式测量组合物的热稳定性。用于评估热稳定性的示例性生物化学方法是热攻击测定法。在“热攻击测定法”中,组合物经受一系列升高的温度持续一段时间段。例如,在一个实施方案中,受试scFv分子或包含scFv分子的分子经受一系列增加的温度持续例如1-1.5小时。随后通过有关的生物化学测定法分析蛋白质的活性。例如,如果该蛋白质是结合蛋白(例如scFv或含有scFv的多肽),则可以通过功能性或定量性ELISA确定结合蛋白的结合活性。

[0646] 这种测定法可以按高通量样式进行并且实施例中公开了使用大肠杆菌和高通量筛选的那些。可以使用本领域已知的方法产生CD33结合结构域(例如,scFv变体)的文库。可以诱导CD33结合结构域(例如,scFv)表达并且可以对CD33结合结构域(例如,scFv)进行热攻击。可以对攻击的受试样品测定结合作用,并且可以将那些稳定的CD33结合结构域(例如,scFv)放大并进一步表征。

[0647] 通过使用前述任一项技术(例如分析光谱技术)测量组合物的熔解温度(T_m),评价热稳定性。熔解温度是在热转变曲线中点处的温度,在此温度处组合物的50%分子处于折叠状态(参见,例如,Dimasi等人,(2009)J.Mol Biol.393:672-692)。在一个实施方案中,CD33结合结构域(例如,scFv)的 T_m 值是约40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C、50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、85°C、86°C、87°C、88°C、89°C、90°C、91°C、92°C、93°C、94°C、95°C、96°C、97°C、98°C、99°C、100°C。在一个实施方案中,IgG的 T_m 值是约40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C、50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C、66°C、67°C、68°C、69°C、70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C、80°C、81°C、82°C、83°C、84°C、85°C、86°C、87°C、88°C、89°C、90°C、91°C、92°C、93°C、94°C、95°C、96°C、97°C、98°C、99°C、100°C。在一个实施方案中,多价抗体的 T_m 值是约40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48

℃、49℃、50℃、51℃、52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃、95℃、96℃、97℃、98℃、99℃、100℃。

[0648] 还通过使用分析性量热技术(例如DSC)测量组合物的比热或热容(C_p)评价热稳定性。组合物的比热是为升高1摩尔水的温度1℃所需要的能量(例如以kcal/mol为单位)。大的 C_p 是变性或无活性蛋白质组合物的标志。通过确定组合物在其热转变之前和之后的比热来测量组合物的热容(ΔC_p)变化。还可以通过测量或确定热动力稳定性的其他参数(包括解折叠Gibbs自由能(ΔG)、解折叠焓(ΔH)或解折叠熵(ΔS))评价热稳定性。一种或多种上述生物化学测定法(例如热攻击测定法)用来确定50%组合物保留其活性(例如结合活性)的温度(即 T_c 值)。

[0649] 此外,与未突变的CD33结合结构域(例如,scFv)相比,对CD33结合结构域(例如,scFv)的突变改变CD33结合结构域(例如,scFv)的热稳定性。当人源化或人CD33结合结构域(例如,scFv)并入CAR33构建体时,CD33结合结构域(例如,人源化或人scFv)向整个CD33 CAR构建体赋予热稳定性。在一个实施方案中,CD33结合结构域(例如,scFv)包含向CD33结合结构域(例如,scFv)赋予热稳定性的单突变。在另一个实施方案中,CD33结合结构域(例如,scFv)包含向CD33结合结构域(例如,scFv)赋予热稳定性的多突变。在一个实施方案中,CD33结合结构域(例如,scFv)中的多突变对CD33结合结构域(例如,scFv)的热稳定性具有相加效应。

[0650] b) 聚集%

[0651] 可以通过测量其聚集倾向性确定组合物的稳定性。可以通过许多非限制性生物化学或生物物理技术测量聚集。例如,可以使用色谱(例如大小排阻色谱(SEC))评价组合物的聚集。SEC基于大小分离分子。柱用高分子凝胶的半固态珠填充,所述高分子凝胶允许离子和小分子进入其内部,但是不允许大实体进入其内部。将蛋白质组合物施加至柱顶部时,紧凑的折叠蛋白质(即未聚集的蛋白质)分布遍及蛋白质大聚集物可用的较大溶剂体积。因此,大聚集物更快速地移动穿过该柱,并且以这种方式,混合物可以分离或分级成为其组分。当每种级分从凝胶洗脱时,可以分别对其定量(例如通过光散射)。因此,可以通过比较级分的浓度与施加至凝胶的蛋白质的总浓度确定组合物的聚集%。稳定组合物作为基本上单一级分从柱洗脱并且作为基本上单一峰出现在洗脱曲线或色谱图中。

[0652] c) 结合亲和力

[0653] 可以通过确定其靶结合亲和力评估组合物的稳定性。用于确定结合亲和力的广泛类型方法是本领域已知的。一种用于确定结合亲和力的示例性方法采用表面等离子体共振。表面等离子体共振是允许通过(例如使用BIAcore系统(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.))检测生物传感器基质内部蛋白质浓度的改变来分析实时生物特异性相互作用的光学现象。关于进一步的描述,参见Jonsson, U. 等人, (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jonsson, U., i (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnson, B. 等人, (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131以及Johnson, B. 等人, (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277。

[0654] 在一个方面,CAR的抗原结合结构域包含与本文所述的抗原结合结构域氨基酸序

列同源的氨基酸序列,并且抗原结合结构域保留本文所述的CD33抗体片段的所需功能特性。在一个具体方面中,本发明的CAR组合物包含抗体片段。在又一个方面,该抗体片段包含scFv。

[0655] 在多个方面,可以通过修饰在一个或两个可变区(例如,VH和/或VL)内部,例如,一种或多种CDR区内部和/或一个或多个构架区内部的一个或多个氨基酸,将CAR的抗原结合结构域工程化。在一个具体方面中,本发明的CAR组合物包含抗体片段。在又一个方面,该抗体片段包含scFv。

[0656] 本领域普通技术人员将理解,本发明的抗体或抗体片段还可以如此修饰,从而它们在氨基酸序列方面变动(例如,不同于野生型),但是在所需的活性方面不变动。例如,可以对蛋白质进行导致“非必需”氨基酸残基处氨基酸置换的额外核苷酸置换。例如,可以将分子中的非必需氨基酸残基替换为来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基。在另一个实施方案中,可以将一个氨基酸片段替换为结构上相似的片段,所述的片段在侧链家族成员的顺序和组成方面中不同,例如,可以进行保守性置换,其中将氨基酸残基替换为具有相似侧链的氨基酸残基。

[0657] 本领域中已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族,所述侧链包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、 β 分枝侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0658] 在两个或更多个核酸序列或多肽序列的上下文中,同一性百分数指相同的两个或更多个序列。如果在比较窗口或指定区域范围内为最大对应性而进行比较和比对时,如使用以下序列比较算法之一或通过手工比对和目视审查所测量,两个序列具有指定百分数的相同氨基酸残基或核苷酸(例如,在指定区域范围内或当未指定时在整个序列范围内60%同一性,任选地70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性),则这两个序列是“基本上同一的”。任选地,同一性存在于长度至少约50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域内,或更优选地在长度100到500或1000或更多个核苷酸(或20、50、200或更多个氨基酸)的区域内。

[0659] 对于序列比较,一般地一个序列充当与受试序列比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将受试序列和参考序列输入计算机,如果需要,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或可以指定备选参数。基于程序参数,序列比较算法随后相对于参考序列计算受试序列的序列同一性百分数。用于比对序列以比较的方法是本领域熟知的。用于比较的最佳序列比对可以按如下方式进行,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化执行(Wisconsin Genetics软件包, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)或通过手工比对和目视审查(见,例如, Brent等人, (2003) Current Protocols in Molecular Biology)。

[0660] 适用于确定序列同一性和序列相似性百分数的两个算法例子是BLAST算法和BLAST 2.0算法,它们分别在Altschul等人,(1977)Nuc.Acids Res.25:3389-3402;和Altschul等人,(1990)J.Mol.Biol.215:403-410(1990)中描述。用于进行BLAST分析的软件是通过国家生物技术信息中心可公开获得的。

[0661] 还可以使用PAM120权重余数表、空位长度罚分12,空位罚分4),利用已经并入ALIGN程序(2.0版)的E.Meyers和W.Miller算法,(1988)Comput.Appl.Biosci.4:11-17)确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。此外,可以使用已经集成至GCG软件包的GAP程序中的Needlema和Wunsch(1970)J.Mol.Biol.48:444-453)算法(在www.gcg.com可获得),使用Blossom 62矩阵或PAM250矩阵和空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6,确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。

[0662] 在一个方面,本发明构思了产生功能上等价分子的起始抗体或片段(例如,scFv)氨基酸序列修饰。例如,可以修饰CAR中包含的CD33结合结构域(例如,scFv)的VH或VL,以保留与CD33结合结构域(例如,scFv)的起始VH或VL构架区至少约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性。本发明构思了修饰完整CAR构建体,例如,在CAR构建体的多个结构域的一种或多种氨基酸序列中修饰,旨在产生功能上等价的分子。可以修饰CAR构建体以保留起始CAR构建体的至少约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。

[0663] RNA转染

[0664] 本文公开了用于产生体外转录的RNA CAR的方法。本发明还包括可以直接转染至细胞中的编码CAR的RNA构建体。一种产生用于转染的mRNA的方法可以涉及用专门设计的引物体外转录(IVT)模板,随后添加聚腺苷酸,以产生含有3'和5'非翻译序列("UTR")、5'帽和/或内部核糖体进入位点(IRES)、待表达核酸和聚腺苷酸化尾的构建体,长度一般为50-2000个碱基(SEQ ID NO:35)。如此产生的RNA可以高效地转染不同种类的细胞。在一个方面,模板包括用于CAR的序列。

[0665] 在一个方面,CD33 CAR由信使RNA(mRNA)编码。在一个方面,将编码CD33 CAR的mRNA引入免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞),以产生表达CAR的细胞(例如,CART细胞或表达CAR的NK细胞)。

[0666] 在一个实施方案中,可以将体外转录的RNA CAR作为瞬时转染的形式引入细胞。使用聚合酶链反应(PCR)生成的模板,通过体外转录产生RNA。来自任何来源的目的DNA可以直接通过PCR转化成模板,以使用适宜引物和RNA聚合酶,体外合成mRNA。DNA的来源可以例如是基因组DNA、质粒DNA、噬菌体DNA、cDNA、合成的DNA序列或任何其他适宜的DNA来源。用于体外转录的目的模板是本发明的CAR。例如,用于RNA CAR的模板包含胞外区,所述胞外区包含抗肿瘤抗体的单链可变结构域;铰链区、跨膜结构域(例如,CD8a的跨膜结构域);和包括胞内信号结构域(例如,包含CD3- ζ 的信号结构域和4-1BB的信号结构域)的胞质区。

[0667] 在一个实施方案中,待用于PCR的DNA含有可读框。DNA可以来自源于生物基因组的天然存在的DNA序列。在一个实施方案中,核酸可以包括5'非翻译区和/或3'非翻译区(UTR)的一些或全部。核酸可以包括外显子和内含子。在一个实施方案中,待用于PCR的DNA是人类

核酸序列。在另一个实施方案中,待用于PCR的DNA是人类核酸序列,包括5'UTR和3'UTR。DNA可以备选地是正常情况下在天然存在的生物中不表达的人工DNA序列。示例性人工DNA序列是含有各基因部分的人工DNA序列,其中所述的各基因部分连接在一起以形成编码融合蛋白的可读框。连接在一起各DNA部分可以来自单种生物或来自多于一种生物。

[0668] PCR用来产生模板以便体外转录用于转染的mRNA。用于开展PCR的方法是本领域熟知的。用于PCR中的引物设计成具有与待用作PCR模板的DNA的区域基本上互补的区域。如本文所用,“基本上互补”,指其中引物序列中的大部分或全部碱基互补或一个或多个碱基是非互补或错配的核苷酸序列。基本上互补的序列能够在用于PCR的复性条件下与预期的DNA靶复性或杂交。引物可以设计成与DNA模板的任何部分基本上互补。例如,引物可以设计成扩增正常情况下在细胞中转录的核酸部分(可读框),包括5'和3'UTR。引物也可以设计成扩增编码特定目的结构域的核酸部分。在一个实施方案中,引物是设计成扩增人cDNA的编码区,包括全部或部分的5'和3'UTR。用于PCR的引物可以通过本领域熟知的合成方法产生。“正向引物”是这样的引物,其含有与DNA模板上待扩增的DNA序列上游的核苷酸基本上互补的核苷酸区域。“上游”在本文中用来指相对于编码链的对待扩增的DNA序列而言5'的位置。“反向引物”是这样的引物,其含有与DNA模板上待扩增的DNA序列下游的双链DNA模板基本上互补的核苷酸区域。“下游”在本文中用来指相对于编码链的对待扩增的DNA序列而言3'的位置。

[0669] 用于PCR的任何DNA聚合酶可以用在本文中公开的方法中。从众多来源可商业获得试剂和聚合酶。

[0670] 也可以使用具有促进稳定性和/或翻译效率的能力的化学结构物。RNA优选地具有5'UTR和3'UTR。在一个实施方案中,5'UTR长度在1个和3000个核苷酸之间。待添加至编码区的5'UTR和3'UTR序列的长度可以通过不同方法改变,所述方法包括但不限于设计与UTR的不同区域复性的PCR用引物。使用这种方法,本领域普通技术人员可以调节为转染转录的RNA后实现最佳翻译效率所需要的5'UTR和3'UTR长度。

[0671] 5'UTR和3'UTR可以是目的核酸的天然存在的、内源5'UTR和3'UTR。备选地,相对于目的核酸并非内源的UTR序列可以通过将该UTR序列并入正向引物和反向引物中或通过对模板的任何其他修饰进行添加。使用相对于目的核酸并非内源的UTR序列可以用于调节RNA的稳定性和/或翻译效率。例如,已知3'UTR序列中的AU丰富元件可以降低mRNA的稳定性。因此,基于本领域熟知的UTR特性,可以选择或设计3'UTR以增加转录的RNA的稳定性。

[0672] 在一个实施方案中,5'UTR可以含有内源核酸的Kozak序列。备选地,当通过如上文所述的PCR添加相对于目的核酸并非内源的5'UTR时,可以通过添加5'UTR序列再设计共有Kozak序列。Kozak序列可以增加某些RNA转录物的翻译效率、但似乎不是令全部RNA有效翻译需要的。本领域已知许多mRNA需要Kozak序列。在其他实施方案中,5'UTR可以是其RNA基因组在细胞中稳定的RNA病毒的5'UTR。在其他实施方案中,多种核苷酸类似物可以用于3'或5'UTR中,以阻碍核酸外切酶降解mRNA。

[0673] 为了能够在不需要基因克隆的情况下从DNA模板合成RNA,转录启动子应当在待转录序列上游与DNA模板连接。当作为RNA聚合酶启动子发挥作用的序列添加至正向引物的5'末端时,RNA聚合酶启动子并入待转录的可读框上游的PCR产物中。在一个优选的实施方案中,启动子是T7聚合酶启动子,如本文他处描述。其他有用的启动子包括但不限于T3RNA聚

合酶启动子和SP6RNA聚合酶启动子。T7、T3和SP6启动子的共有核苷酸序列是本领域已知的。

[0674] 在一个优选实施方案中,mRNA在5'末端和3'聚腺苷酸尾均具有决定在细胞中核糖体结合、翻译起始和mRNA稳定性的帽。在环状DNA模板,例如,质粒DNA上,RNA聚合酶产生不适于真核细胞中表达的长连环体产物。在3'UTR末端线性化的质粒DNA的转录产生在真核转染中并非有效的大小正常的mRNA,即便转录后它发生聚腺苷酸化。

[0675] 在线性DNA模板上,噬菌体T7RNA聚合酶可以越过模板的最后碱基延伸转录物的3'末端(Schenborn和Mierendorf,Nuc Acids Res.,13:6223-36(1985);Nacheva和Berzal-Herranz,Eur.J.Biochem.,270:1485-65(2003))。

[0676] 整合polyA/T片段至DNA模板中的常规方法是分子克隆。但是,整合入质粒DNA的polyA/T序列可能造成质粒不稳定性,这是为何从细菌细胞获得的质粒DNA模板经常遭受缺失和其他畸变的高度污染的原因。这使得克隆方法不仅繁琐和费时,而且经常不可靠。这是为何迫切需要以下方法的原因:允许在不进行高度希望的克隆情况下构建带polyA/T 3'片段的DNA模板。

[0677] 通过使用含有聚胸苷酸尾(如100T尾(SEQ ID NO:31)(大小可以是50-5000T(SEQ ID NO:32))的反向引物或在PCR后通过任何其他方法(包括但不限于DNA连接或体外重组),可以在PCR期间产生转录用DNA模板的polyA/T区段。聚腺苷酸尾还向RNA提供稳定性并减少它们的降解。通常,聚腺苷酸尾的长度与转录的RNA的稳定性正相关。在一个实施方案中,聚腺苷酸尾在100个和5000个腺苷之间(SEQ ID NO:33))。

[0678] RNA的聚腺苷酸尾可以在体外转录后利用聚腺苷酸聚合酶(如大肠杆菌聚腺苷酸聚合酶(E-PAP))进一步延长。在一个实施方案中,聚腺苷酸尾的长度从100个核苷酸增加至300个和400个核苷酸之间(SEQ ID NO:34)导致RNA的翻译效率增加约两倍。另外,接合不同化学基团至3'末端可以增加mRNA稳定性。这种接合可以含有修饰/人工的核苷酸、适配体和其他化合物。例如,ATP类似物可以使用聚腺苷酸聚合酶并入聚腺苷酸尾中。ATP类似物还可以增加RNA的稳定性。

[0679] 5'帽也向RNA分子提供稳定性。在一个优选实施方案中,通过本文所公开的方法产生的RNA包括5'帽。使用本领域已知和本文所述的技术提供5'帽(Cougot等人,Trends in Biochem.Sci.,29:436-444(2001);Stepinski等人,RNA,7:1468-95(2001);Elango等人,Biochim.Biophys.Res.Commun.,330:958-966(2005))。

[0680] 通过本文所公开的方法产生的RNA还可以含有内部核糖体进入位点(IRES)序列。IRES序列可以是任何病毒序列、染色体序列或人工设计的序列,所述序列启动帽非依赖性核糖体结合至mRNA并促进翻译的起始。可以包含适于细胞电穿孔的任何溶质,所述溶质可以含有促进细胞通透性和生存力的因子,如糖、肽、脂质、蛋白质、抗氧化剂和表面活性剂。

[0681] 可以使用众多不同方法的任一者,将RNA引入靶细胞中,例如包括但不限于以下的市售方法:电穿孔法(Amaxa Nucleofector-II(Amaxa Biosystems,Cologne,德国))、(ECM 830(BTX)(Harvard Instruments,Boston,Mass.))或Gene Pulser II(BioRad,Denver,Colo.)、Multiporator(Eppendorf,Hamburg德国)、使用脂转染的阳离子脂质体介导转染法、聚合物包囊化法、肽介导的转染法或生物射弹粒子递送系统如“基因枪”(参见,例如,Nishikawa等人,Hum Gene Ther.,12(8):861-70(2001))。

[0682] 非病毒递送方法

[0683] 在一些方面,可以用非病毒方法来递送编码本文所述的CAR的核酸至细胞或组织或受试者中。

[0684] 在一些实施方案中,非病毒方法包括利用转座子(也称作转座元件)。在一些实施方案中,转座子是可以将本身插入基因组中的某位置处的一段DNA,例如,能够自我复制并将其拷贝插入基因组中的一段DNA或可以从较长核酸剪切出来并插入基因组中的另一个位置的一段DNA。例如,转座子包含由反向重复序列组成的DNA序列,所述反向重复序列在用于换位的基因旁侧分布。

[0685] 使用转座子递送核酸的示例性方法包括睡美人转座子系统(SBTS)和piggyBac(PB)转座子系统。参见,例如,Aronovich等人,Hum.Mol.Genet.20.R1(2011):R14-20;Singh等人,Cancer Res.15(2008):2961-2971;Huang等人,Mol.Ther.16(2008):580-589;Grabundzija等人,Mol.Ther.18(2010):1200-1209;Kebriaei等人,Blood.122.21(2013):166;Williams.Molecular Therapy 16.9(2008):1515-16;Bell等人,Nat.Protoc.2.12(2007):3153-65;和Ding等人,Cell.122.3(2005):473-83,所述文献均通过引用的方式并入本文。

[0686] SBTS包括两个组分:1)含有转基因的转座子和2)转座酶来源。转座酶可以令转座子从载体质粒(或其他供体DNA)转置到靶DNA,如宿主细胞染色体/基因组。例如,转座酶与载体质粒/供体DNA结合,从质粒切下转座子(包含转基因)并将它插入宿主细胞的基因组中。参见,例如,Aronovich等人,上文。

[0687] 示例性转座子包括基于pT2的转座子。参见,例如,Grabundzija等人,Nucleic Acids Res.41.3(2013):1829-47;和Singh等人,Cancer Res.68.8(2008):2961-2971,所述文献均通过引用的方式并入本文。示例性转座酶包括Tc1/水手型转座酶,例如,SB10转座酶或SB11转座酶(可以例如从巨细胞病毒启动子表达的过度活跃性转座酶)。参见,例如,Aronovich等人;Kebriaei等人;和Grabundzija等人,所述文献均通过引用的方式并入本文。

[0688] 使用SBTS允许有效整合和表达转基因,例如,编码本文所述CAR的核酸。本文中提供例如使用转座子系统如SBTS,产生稳定表达本文所述CAR的细胞(例如,T细胞或NK细胞)的方法。

[0689] 根据本文所述的方法,在一些实施方案中,将一种或多种含有SBTS组分的核酸(例如,质粒)递送至细胞(例如,T细胞或NK细胞)。例如,通过标准核酸(例如,质粒DNA)递送方法(例如,本文所述的方法,例如,电穿孔法、转染法或脂转染法)递送核酸。在一些实施方案中,核酸含有包含转基因(例如,编码本文所述CAR的核酸)的转座子。在一些实施方案中,核酸含有包含转基因(例如,编码本文所述CAR的核酸)的转座子以及编码转座酶的核酸序列。在其他实施方案中,提供具有两种核酸的系统(例如,双质粒系统),例如,其中第一质粒含有包含转基因的转座子和第二质粒含有编码转座酶的核酸序列。例如,将第一核酸和第二核酸共递送入宿主细胞中。

[0690] 在一些实施方案中,通过使用采取SBTS的基因插入法和采取核酸酶(例如,锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应核酸酶(TALEN)、CRISPR/Cas系统或工程化大范围核酸酶(meganucleases)、再工程化的归巢核酸内切酶)的遗传编辑法的组合,生成表达本文所述

CAR的细胞(例如,T细胞或NK细胞)。

[0691] 在一些实施方案中,非病毒递送方法的使用允许再编程细胞(例如,T细胞或NK细胞)和直接输注细胞至受试者中。非病毒载体的优点包括但不限于便利和成本相对低地产生满足患者群体、储存期间稳定性和缺少免疫原性所要求的足够量。

[0692] 编码CAR的核酸构建体

[0693] 本发明还提供编码一种或多种本文所述的CAR构建体的核酸分子。在一个方面,核酸分子作为信使RNA转录物提供。在一个方面,核酸分子作为DNA构建体提供。

[0694] 因此,在一个方面,本发明涉及编码嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸分子,其中CAR包含CD33结合结构域(例如,人源化或人CD33结合结构域)、跨膜结构域和胞内信号结构域,所述胞内信号结构域包含刺激结构域(例如,共刺激信号结构域)和/或初级信号结构域(例如, ζ 链)。在一个实施方案中,CD33结合结构域是本文所述的CD33结合结构域,例如,包含选自SEQ ID NO:39-47的序列或与其具有95-99%同一性的序列的CD33结合结构域。在一个实施方案中,跨膜结构域是蛋白质的跨膜结构域,所述蛋白质例如在本文描述,例如,选自T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154。在一个实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的序列或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,CD33结合结构域通过铰链区(例如,本文所述的铰链区)连接至跨膜结构域。在一个实施方案中,铰链区包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,分离的核酸分子还包含编码共刺激结构域的序列。在一个实施方案中,共刺激结构域是蛋白质的功能性信号结构域,所述蛋白质例如在本文描述,例如,选自:MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、淋巴细胞活化信号分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a和与CD83特异性结合的配体。在一个实施方案中,共刺激结构域包含SEQ ID NO:7的序列或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含4-1BB的功能性信号结构域和CD3 ζ 的功能性信号结构域。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的序列或与其具有95-99%同一性的序列和SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列或与其具有95-99%同一性的序列,其中包含胞内信号结构域的序列在相同读框中并作为单条多肽链表达。

[0695] 在另一个方面,本发明涉及编码CAR构建体的分离的核酸分子,所述CAR构建体包含SEQ ID NO:1的前导序列、具有选自SEQ ID NO:39-47的序列(或与其具有95-99%同一性的序列)的scFv结构域、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5(或与其

具有95-99%同一性的序列)的铰链区、具有SEQ ID NO:6的序列(或与其具有95-99%同一性的序列)的跨膜结构域、具有SEQ ID NO:7的序列的4-1BB共刺激结构域或具有SEQ ID NO:8的序列(或与其具有95-99%同一性的序列)的CD27共刺激结构域或具有SEQ ID NO:379的序列(或与其具有95-99%同一性的序列)的CD28共刺激结构域或具有SEQ ID NO:381的序列(或与其具有95-99%同一性的序列)的ICOS共刺激结构域,和具有SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列(或与其具有95-99%同一性的序列)的CD3 ζ 刺激结构域。

[0696] 在另一个方面,本发明涉及由该核酸分子编码的分离的多肽分子。在一个实施方案中,分离的多肽分子包含选自SEQ ID NO:48-56的序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0697] 在另一个方面,本发明涉及编码嵌合抗原受体(CAR)分子的核酸分子,所述嵌合抗原受体分子包含CD33结合结构域、跨膜结构域和包含刺激结构域的胞内信号结构域,并且其中所述CD33结合结构域包含选自SEQ ID NO:75-83的序列或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码的CAR分子还包含编码共刺激结构域的序列。在一个实施方案中,共刺激结构域是蛋白质的功能性信号结构域,所述蛋白质选自:MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、淋巴细胞活化信号分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a和与CD83特异性结合的配体。在一个实施方案中,共刺激结构域包含SEQ ID NO:7的序列。在一个实施方案中,跨膜结构域是蛋白质的跨膜结构域、所述蛋白质选自T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIR2DS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11和CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2R β 、IL2R γ (共同 γ)、IL7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、NKG2D、NKG2C、DNAM1(CD226)、SLAMF4、(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR和PAG/Cbp。

[0698] 在一个实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的序列。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含4-1BB的功能性信号结构域和 ζ 的功能性信号结构域。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含SEQ ID NO:7的序列和SEQ ID NO:9的序列,其中包含胞内信号结构域的序列在相同读框中并作为单条多肽链表达。在一个实施方案中,CD33结合结构域通

过铰链区连接至跨膜结构域。在一个实施方案中,铰链区包含SEQ ID NO:2。在一个实施方案中,铰链区包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5。

[0699] 在另一个方面,本发明涉及编码的CAR分子,所述CAR分子包含SEQ ID NO:1的前导序列、具有选自SEQ ID NO:39-47的序列或与其具有95-99%同一性的序列的scFv结构域、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的铰链区、具有SEQ ID NO:6的序列的跨膜结构域、具有SEQ ID NO:7的序列的4-1BB共刺激结构域或具有SEQ ID NO:8的序列的CD27共刺激结构域,和具有SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列的CD3 ζ 刺激结构域。在一个实施方案中,编码的CAR分子包含选自SEQ ID NO:48-56的序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0700] 可以使用本领域已知的重组方法获得编码所需分子的核酸序列,如,例如通过从表达该基因的细胞筛选文库、通过从已知包括该基因的载体衍生该基因、或通过使用标准技术从含有该基因的细胞和组织直接分离。备选地,可以合成地产生目的基因,而非克隆地产生。

[0701] 本发明还提供插入了本发明DNA的载体。衍生自逆转录病毒(如慢病毒)的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因的长期、稳定整合和其在子代细胞中增殖。慢病毒载体具有胜过衍生自癌-逆转录病毒(如鼠白血病病毒)的载体的附加优点,因为它们可以转导非增殖性细胞,如肝细胞。它们还具有附加的低免疫原性优点。逆转录病毒载体也可以例如是 γ 逆转录病毒载体。 γ 逆转录病毒载体可以例如包含启动子、包装信号(ψ)、引物结合位点(PBS)、一个或多个(例如,两个)长末端重复序列(LTR)和目的转基因,例如,编码CAR的基因。 γ 逆转录病毒载体可以缺少病毒结构性基因如gag、pol和env。示例性 γ 逆转录病毒载体包括鼠白血病病毒(MLV)、脾病灶形成病毒(SFFV)和骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)和从它们衍生的载体。其他 γ 逆转录病毒载体例如在Tobias Maetzig等人,“Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application” Viruses. 2011 Jun; 3(6):677-713中描述。

[0702] 在另一个实施方案中,包含编码本发明所需的CAR的核酸的载体是腺病毒载体(A5/35)。在另一个实施方案中,可以使用转座子如睡美人、crisper、CAS9和锌指核酸酶完成编码CAR的核酸的表达。参见下文June等人,2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716,所述文献通过引用的方式并入本文。

[0703] 简言之,一般通过将编码CAR多肽或其部分的核酸有效连接至启动子并将构建体并入表达载体中,实现编码CAR的天然或合成的核酸的表达。载体可以适合在真核生物中复制和整合。常见的克隆载体含有用于调节所需核酸序列的表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。

[0704] 使用标准基因递送方案,本发明的表达构建体也可以用于核酸免疫和基因治疗。用于基因递送的方法是本领域已知的。参见,例如,美国专利号5,399,346、5,580,859、5,589,466,所述文献通过引用的方式完整并入本文。在另一个实施方案中,本发明提供基因治疗载体。

[0705] 可以将核酸克隆入众多类型的载体中。例如,可以将核酸克隆入包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒的载体中。有兴趣的特定载体包括表达载体、复制载体、探针生成载体和测序载体。

[0706] 另外,可以将表达载体以病毒载体的形式向细胞提供。病毒载体技术是本领域熟知的并且例如在Sambrook等人,2012,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,第1-4卷,Cold Spring Harbor Press, NY)中及在其他病毒学和分子生物学手册中描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常,合适的载体含有在至少一种生物中有功能的复制起点、启动子序列、便利的限制性核酸内切酶位点和一种或多种选择标记(例如,WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0707] 已经开发了众多基于病毒的系统用于转移基因至哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒提供了用于基因递送系统的便利平台。可以使用本领域已知的技术,将选择的基因插入载体并且包装在逆转录病毒粒子中。随后可以分离重组病毒并将其在体内或离体递送至受试者的细胞。众多逆转录病毒系统是本领域已知的。在一些实施方案中,使用腺病毒载体。众多腺病毒载体是本领域已知的。在一个实施方案中,使用慢病毒载体。

[0708] 额外的启动子元件(例如,增强子)调节转录起始的频率。一般地,这些位于起始位点上游30-110bp的区域内,不过已经显示众多启动子也在起始位点下游含有功能性元件。启动子元件之间的间距往往灵活,从而当各元件反转或相对于彼此移动时,启动子功能保留。在胸苷激酶(tk)启动子中,在活性开始下降前,启动子元件之间的间距可以增加至相隔50bp。取决于启动子,各个元件似乎可以协同或独立地发挥作用以激活转录。示例性启动子包括CMV IE基因启动子、EF-1 α 启动子、遍在蛋白C启动子或磷酸甘油激酶(PGK)启动子。

[0709] 能够在哺乳动物T细胞中表达CAR转基因的启动子的例子是EF1 α 启动子。天然EF1 α 启动子驱动延伸因子-1复合体的 α 亚基表达,所述 α 亚基负责酶促递送氨酰基tRNA至核糖体。已经在哺乳动物表达质粒中广泛使用EF1 α 启动子并且已经显示有效驱动从克隆至慢病毒载体中的转基因表达CAR。参见,例如,Milone等人,Mol. Ther. 17 (8) :1453-1464 (2009)。在一个方面,EF1 α 启动子包含作为SEQ ID NO:11提供的序列。

[0710] 启动子的另一个例子是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。这个启动子序列是能够驱动与之有效连接的任何多核苷酸序列高水平表达的组成型强启动子序列。但是,也可以使用其他组成型启动子序列,所述其他组成型启动子序列包括但不限于猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、鸟类白血病毒启动子、Epstein-Barr病毒立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子以及人基因启动子,如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、延伸因子-1 α 启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。另外,本发明不应当限于使用组成型启动子。还构思了诱导型启动子作为本发明的部分。诱导型启动子的使用提供了一种分子开关,所述分子开关能够在需要这类表达时启动与之有效连接的多核苷酸序列表达或在不需要这类表达时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0711] 启动子的另一个例子是磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子。在实施方案中,可能需要截短的PGK启动子(例如,与野生型PGK启动子序列相比时具有一个或多个例如1、2、5、10、100、200、300或400个核苷酸缺失的PGK启动子)。下文提供示例性PGK启动子的核苷酸序列。

[0712] WT PGK启动子

[0713] ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTC
TTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGC

CGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGGACGGTAACGAG
GGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGGCGCTTGGCG
TTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCGGGTGTCCCATCGCCGCTTCTAGGCCCA
CTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCGCGGGCAGCAGCAAAGGGCCTTGGTGCGGGTCTCG
TCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCCGACGGAACCTTTTCCGCGTTGGGGTTGGGGCACCATAAGCT

[0714] (SEQ ID NO:384)

[0715] 示例性截短的PGK启动子:

[0716] PGK100: ACCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTC
CGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCAGGTGTGATGGCGGGGTG

[0717] (SEQ ID NO:385)

[0718] PGK200:

[0719] ACCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTC
TTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCAGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGC
CGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGGACGGTAACG

[0720] (SEQ ID NO:386)

[0721] PGK300:

[0722] ACCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTC
TTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCAGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGC
CGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGGACGGTAACGAG
GGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGGCGCTTGGCG
TTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCG

[0723] (SEQ ID NO:387)

[0724] PGK400:

[0725] ACCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTC
TTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCAGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGC
CGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGGACGGTAACGAG
GGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGGCGCTTGGCG
TTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCGGGTGTCCCATCGCCGCTTCTAGGCCCA
CTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCG

[0726] (SEQ ID NO:388)

[0727] 载体还可以例如包括促进分泌的信号序列、多聚腺苷化信号和转录终止子(例如,来自牛生长激素(BGH)基因)、允许附加体型复制和在原核生物中复制的元件(例如SV40复制起点和ColE1或本领域已知的其他元件)和/或允许选择的元件(例如,氨苄青霉素耐药基因和/或zeocin标记)。

[0728] 为了评估CAR多肽或其部分的表达,待引入细胞中的表达载体还可以含有选择标记基因或报道基因或这两者以促进从寻求用病毒载体转染或感染的细胞群体鉴定和选择出现表达的细胞。在其他方面,选择标记可以在独立的DNA片段上携带并且在共转染法中使用。选择标记和报道基因可以旁侧分布有能够在宿主细胞中实现表达的适宜调节序列。有用的选择标记例如包括抗生素耐药性基因,如neo等。

[0729] 报道基因用于鉴定潜在转染的细胞和评价调节序列的功能。通常,报道基因是这样的基因,所述基因不存在于接受生物或组织中或不由接受生物或组织表达并且编码其表达由某种轻易可检测特性(例如,酶活性)展示的多肽。在DNA已经引入接受细胞之后的合适时间测定报道基因的表达。合适的报道基因可以包括编码萤光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰基转移酶、分泌型碱性磷酸酶的基因或绿色荧光蛋白基因(例如,Ui-Tei等人,2000FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是熟知的并且可以使用已知技术制备或商业地获得。通常,将显示最高报道基因表达水平的具有最少5'侧翼区的构建体鉴定为启动子。这类启动子区可以与报道基因连接并用来评价多种物质调节启动子驱动型转录的能力。

[0730] 在一个实施方案中,载体还可以包含编码第二CAR的核酸。在一个实施方案中,第二CAR包括针对急性髓样白血病细胞上表达的靶(例如,CD123、CD34、CLL-1、FLT3或叶酸受体 β)的抗原结合结构域。在一个实施方案中,载体包含编码第一CAR的核酸序列,所述第一CAR特异性结合第一抗原并且包括了具有共刺激信号结构域但没有初级信号结构域的胞内信号结构域,和编码第二CAR的核酸序列,所述第二CAR特异性结合第二个不同的抗原并且包括了具有初级信号结构域但没有共刺激信号结构域的胞内信号结构域。在一个实施方案中,载体包含编码第一CD33 CAR的核酸,所述第一CD33 CAR包括CD33结合结构域、跨膜结构域和共刺激结构域,和编码第二CAR的核酸,所述第二CAR特异性结合除CD33之外的抗原(例如,AML细胞上表达的抗原,例如,CD123、CD34、CLL-1、FLT3或叶酸受体 β)并包括抗原结合结构域、跨膜结构域和初级信号结构域。在另一个实施方案中,载体包含编码第一CD33 CAR的核酸,所述第一CD33 CAR包括CD33结合结构域、跨膜结构域和初级信号结构域,和编码第二CAR的核酸,所述第二CAR特异性结合除CD33之外的抗原(例如,AML细胞上表达的抗原,例如,CD123、CD34、CLL-1、FLT3或叶酸受体 β)并包括针对该抗原的抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激信号结构域。

[0731] 在一个实施方案中,载体包含编码本文所述的CD33 CAR的核酸和编码抑制性CAR的核酸。在一个实施方案中,抑制性CAR包含这样的抗原结合结构域,所述抗原结合结构域结合正常细胞上存在、但癌细胞上不存在的抗原,例如,还表达CD33的正常细胞。在一个实施方案中,抑制性CAR包含抑制性分子的抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。例如,抑制性CAR的胞内结构域可以是PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR β 的胞内结构域。

[0732] 在实施方案中,载体可以包含两个或更多个核酸序列,所述核酸序列编码一种CAR,例如,本文所述的CD33 CAR,和第二CAR,例如,抑制性CAR或与除CD33之外的抗原(例如,AML细胞上表达的抗原,例如,CD123、CLL-1、CD34、FLT3或叶酸受体 β)特异性结合的CAR。在这类实施方案中,编码CAR的两个或更多个核酸序列由单一核酸分子在相同可读框中编码并且作为单条多肽链编码。在这个方面,两个或更多个CAR,可以例如由一个或多个肽剪切位点(例如,自剪切位点或胞内蛋白酶的底物)分隔。肽剪切位点的例子包括以下序列,其中GSG残基是任选的:

[0733] T2A: (GSG)E G R G S L L T C G D V E E N P G P (SEQ ID NO:389)

[0734] P2A: (GSG) A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (SEQ ID NO:390)

[0735] E2A: (GSG) Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (SEQ ID NO:391)

[0736] F2A: (GSG) V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (SEQ ID NO:392)

[0737] 向细胞引入基因并表达基因的方法是本领域已知的。在表达载体的情况下,载体可以通过本领域的任何方法轻易地引入宿主细胞(例如,哺乳动物细胞、细菌细胞、酵母细胞或昆虫细胞)中。例如,表达载体可以通过物理手段、化学手段或生物学手段转移至宿主细胞中。

[0738] 用于引入多核苷酸至宿主细胞中的物理方法包括磷酸钙沉淀法、脂转染法、粒子轰击法、微量注射法、电穿孔法等。用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域熟知的。参见,例如,Sambrook等人,2012,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,第1-4卷,Cold Spring Harbor Press,NY)。用于引入多核苷酸至宿主细胞中的优选方法是磷酸钙转染法。

[0739] 用于引入目的多核苷酸至宿主细胞中的生物学方法包括使用DNA载体和RNA载体。病毒载体和尤其逆转录病毒载体已经变成使用最广泛的将基因插入哺乳动物(例如,人)细胞的方法。其他病毒载体可以衍生自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺相关病毒等。参见,例如,美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0740] 用于引入多核苷酸至宿主细胞中的化学手段包括胶态分散体系,如大分子复合物、纳米囊、微球、珠和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内递送运载体的示例性胶态体系是脂质体(例如,人工膜囊泡)。现有定向递送核酸的其他方法是可获得的,如用靶向的纳米粒子或其他合适的亚微米尺度递送系统递送多核苷酸。

[0741] 在利用非病毒递送系统的情况下,示例性递送运载体是脂质体。构思了使用脂质制剂以引入核酸至宿主细胞中(体外,离体或体内)。在另一个方面,核酸可以与脂质结合。与脂质结合的核酸可以包封于脂质体的水质内部、散布在脂质体的脂质双层内部、借助与脂质体和寡核苷酸均结合的连接分子与脂质体连接、包埋于脂质体中、与脂质体复合、分散于含有脂质的溶液中、与脂质混合、与脂质组合、作为混悬液含于脂质中、含于胶束中或与胶束复合或与脂质结合。与脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体缔合的组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如,它们可以双层结构存在、作为胶束存在或以“塌陷”结构存在。它们还可以简单地散布在b溶液中,可能形成大小或形状不均一的聚集物。脂质是脂肪性物质,其可以是天然存在的脂质或合成的脂质。例如,脂质包括天然出现在细胞质中的脂肪滴以及含有长链脂族烃及其衍生物如脂肪酸、醇类、胺、氨基醇类和醛的化合物类。

[0742] 适合使用的脂质可以从商业来源获得。例如,二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)可以从Sigma,St.Louis,MO获得;二鲸蜡醇磷酸酯(“DCP”)可以从K&K Laboratories获得(Plainview,NY);胆固醇(“Choi”)可以从Calbiochem-Behring获得;二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)和其他脂质可以从Avanti Polar Lipids,Inc.(Birmingham,AL.)获得。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的母液可以贮存在约-20℃。使用氯仿作为唯一溶剂,因为它比甲醇更易蒸发。“脂质体”是类属术语,其涵盖通过产生封闭的脂质双层或聚集物所形成的多种单一和多层脂质载体。脂质体可以表征作为具有磷脂双层膜和内部水介质的囊泡结构。多层脂质体具有水介质分隔的多个脂质层。当磷脂在过量水溶液中悬浮时,它们自发形成。脂质

组分在形成封闭结构前发生自我重排并在脂质双层之间夹带水和溶解的溶质 (Ghosh等人, 1991 *Glycobiology* 5:505-10)。但是,还涵盖在溶液中具有与正常囊泡结构不同的结构的组合物。例如,脂质可以采取胶束结构或仅作为脂质分子的非均匀聚集物存在。还构思了脂质转染胺 (lipofectamine) -核酸复合物。

[0743] 无论该方法是否用来引入外源核酸至宿主细胞中或使细胞暴露于本发明的抑制剂,为了证实宿主细胞中重组DNA序列的存在,可以进行多种测定法。这类测定法例如包括本领域技术人员熟知的“分子生物学测定法”,如DNA印迹和RNA印迹法、RT-PCR和PCR;“生物化学”测定法,如检测特定肽的存在或不存在,例如,通过免疫手段 (ELISA法和蛋白质印迹法) 或通过本文所述测定法鉴定属于本发明范围内的物质。

[0744] 本发明还提供一种载体,所述载体包含编码CAR的核酸分子。在一个方面,可以将CAR载体直接转导入细胞,例如,免疫效应细胞,例如,T细胞或NK细胞。在一个方面,载体是克隆载体或表达载体,例如,载体,包括但不限于一种或多种质粒 (例如,表达质粒、克隆载体、微环、微载体、双微小染色体)、逆转录病毒载体构建体和慢病毒载体构建体。在一个方面,载体能够在哺乳动物T细胞中表达CAR构建体。在一个方面,哺乳动物T细胞是人T细胞。

[0745] 细胞来源

[0746] 在扩充和基因修饰或其他修饰之前,细胞来源 (例如,免疫效应细胞,例如,T细胞或NK细胞) 从受试者获得。术语“受试者”意在包括可以激发免疫应答的活生物 (例如,哺乳动物)。受试者的例子包括人、犬、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。可以从众多来源获得T细胞,包括外周血单个核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。

[0747] 在本发明的某些方面,可以使用本领域可获得的任何数目的免疫效应细胞 (例如,T细胞或NK细胞) 系。在本发明的某些方面,可以使用技术人员已知的任何种类的技术 (如Ficoll™分离法),从采集自受试者的血液成分中获得T细胞。在一个优选的方面,通过单采血液成分术获得来自个体循环血液的细胞。单采产物一般含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核的白细胞、红细胞和血小板。在一个方面,可以洗涤通过单采血液成分术采集的细胞,以除去血浆级分并且以在用于后续加工步骤的适宜缓冲液或培养基中放置细胞。在本发明的一个方面,用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤细胞。在一个备选方面,洗涤液缺少钙并且可以缺少镁或可以缺少许多 (若非全部) 二价阳离子。

[0748] 在钙不存在情况下的初始活化步骤可以导致放大的活化。如本领域普通技术人员将轻易领会,可以通过本领域技术人员已知的方法,如根据制造商说明通过使用半自动化“通流”离心机 (例如,Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate、或Haemonetics Cell Saver 5),完成洗涤步骤。在洗涤后,细胞可以重悬于多种生物相容缓冲液中,如,例如,无Ca、无Mg的PBS、PlasmaLyte A或含有或没有缓冲剂的其他盐水溶液。备选地,可以移除单采样品的不想要组分并且将细胞直接重悬于培养基中。

[0749] 认识到本申请的方法可以利用包含5%或更少 (例如2%) 人AB血清的培养基条件,并且利用已知的培养基条件和组合,例如,在Smith等人,“Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement”*Clinical&Translational Immunology* (2015) 4,e31;doi:10.1038/cti.2014.31中描述的那些。

[0750] 在一个方面,通过裂解红细胞和耗竭单核细胞,例如,通过经PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘析,从外周血淋巴细胞分离T细胞。

[0751] 可以通过正向或负向选择技术进一步分离特定的T细胞亚群,如CD3+、CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+和CD45RO+T细胞。例如,在一个方面,通过与抗CD3/抗CD28(例如,3x28)缀合的珠(如DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T)温育一段足够正向选择所需T细胞的时间,分离T细胞。在一个方面,该时间段是约30分钟。在又一个方面,该时间段范围从30分钟至36小时或更长和二者之间的全部整数值。在又一个方面,该时间段是至少1、2、3、4、5或6小时。在又一个优选的方面,该时间段是10至24小时。在一个方面,温育时间时段是24小时。较长的温育时间可以用来在其中如与其他细胞类型相比存在少量T细胞的任何情况下分离T细胞,如用于从肿瘤组织或从免疫受损个体分离肿瘤浸润型淋巴细胞(TIL)。另外,使用较长的温育时间可以增加捕获CD8+ T细胞的效率。因此,通过简单地缩短或延长该时间,允许T细胞与CD3/CD28珠结合和/或通过增加或减少珠对T细胞的比率(如本文进一步所述那样),可以在培养伊始或在培养过程期间的其他时间点偏好地选择T细胞亚群。额外地,通过增加或减少珠或其他表面上抗CD3和/或抗CD28抗体的比率,可以在培养伊始或在其他所需的时间点偏好地选择T细胞亚群。技术人员将认识到,也可以在本发明的背景下使用多轮选择。在某些方面,可能想要在活化和扩充过程中执行选择程序并且使用“未选择的”细胞。“未选择的”细胞也可以接受进一步轮次的选择。

[0752] 可以用抗体的组合,通过负选择过程完成T细胞群体的富集,其中所述抗体针对负向选择的细胞独有的表面标记物。一种方法是借助负向磁力免疫粘附法或流式细胞术分选和/或选择细胞,所述负向磁力免疫粘附法或流式细胞术使用针对负向选择的细胞上存在的细胞表面标记物的单克隆抗体混合物。例如,为了通过负向选择富集CD4+细胞,单克隆抗体混合物一般包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些方面,可能想要富集或正向选择一般表达CD4+、CD25+、CD62Lhi、GITR+和FoxP3+的调节性T细胞。备选地,在某些方面,通过抗CD25缀合的珠或其他相似的选择方法耗竭调节性T细胞。

[0753] 本文所述的方法可以包括例如使用(例如,本文所述的)负选择技术,选择特定免疫效应细胞(例如,T细胞)亚群,所述亚群是调节性T细胞耗竭的群体、CD25+耗竭的细胞。优选地,调节性T细胞耗竭的细胞群体含有少于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞。

[0754] 在一个实施方案中,使用抗CD25抗体或其片段或CD25结合配体(IL-2)从群体移除调节性T细胞,例如,CD25+ T细胞。在一个实施方案中,抗CD25抗体或其片段或CD25-结合配体与基材(例如,珠)缀合、或包被在基材(例如,珠)上。在一个实施方案中,抗CD25抗体或其片段与如本文所述的基材缀合。

[0755] 在一个实施方案中,使用来自Miltenyi™的CD25耗竭试剂从群体移除调节性T细胞,例如,CD25+ T细胞。在一个实施方案中,细胞对CD25耗竭试剂的比率是1e7个细胞对20uL、或1e7个细胞对15uL、或1e7个细胞对10uL、或1e7个细胞对5uL、或1e7个细胞对2.5uL、或1e7个细胞对1.25uL试剂。在一个实施方案中,例如,对于耗竭调节性T细胞,例如,CD25+而言,使用大于500百万个细胞/ml。在又一个方面,使用600、700、800、或900百万个细胞/ml的细胞浓度。

[0756] 在一个实施方案中,待耗竭的免疫效应细胞群体包括约 6×10^9 个CD25+ T细胞。在

其他方面,待耗竭的免疫效应细胞群体包括约 1×10^9 个至 1×10^{10} 个CD25⁺ T细胞和二者之间任何整数值的CD25⁺ T细胞。在一个实施方案中,所产生的调节性T细胞耗竭群体具有 2×10^9 个调节性T细胞,例如,CD25⁺细胞、或更少(例如, 1×10^9 、 5×10^8 、 1×10^8 、 5×10^7 、 1×10^7 个或更少CD25⁺细胞)。

[0757] 在一个实施方案中,使用具有耗竭管路套件,例如,管路162-01的CliniMAC系统,从群体移除调节性T细胞,例如,CD25⁺细胞。在一个实施方案中,CliniMAC系统在耗竭设定(如,例如,DEPLETION2.1)上运行。

[0758] 不希望受具体理论约束,在单采血液成分术之前或在产生表达CAR的细胞产物期间降低受试者中免疫细胞的负向调节物水平(例如,减少不想要的免疫细胞(例如, T_{REG} 细胞)的数目)可以降低受试者复发风险。例如,耗竭 T_{REG} 细胞的方法是本领域已知的。减少 T_{REG} 细胞的方法包括但不限于环磷酰胺、抗GITR抗体(本文所述的抗GITR抗体)、CD25耗竭、及其组合。

[0759] 在一些实施方案中,生产方法包括在产生表达CAR的细胞之前(例如,耗竭)减少 T_{REG} 细胞的数目。例如,生产方法包括使样品(例如,单采样品)与抗GITR抗体和/或抗CD25抗体(或其片段、或CD25-结合配体)接触,例如,以在产生表达CAR的细胞(例如,T细胞、NK细胞)产品之前耗竭 T_{REG} 细胞。

[0760] 在一个实施方案中,在采集细胞以产生表达CAR的细胞产品之前,将受试者用减少 T_{REG} 细胞的一种或多种疗法预处理,因而相对于表达CAR的细胞治疗,降低受试者复发风险。在一个实施方案中,减少 T_{REG} 细胞的方法包括但不限于向受试者施用以下一种或多种:环磷酰胺、抗GITR抗体、CD25耗竭或其组合。施用环磷酰胺、抗GITR抗体、CD25耗竭或其组合中一者或多者可以在输注表达CAR的细胞产品之前、其期间或之后进行。

[0761] 在一个实施方案中,在采集细胞以产生表达CAR的细胞产品之前,将受试者用环磷酰胺预处理,因而相对于表达CAR的细胞治疗,降低受试者复发风险。在一个实施方案中,在采集细胞以产生表达CAR的细胞产品之前,将受试者用抗GITR抗体预处理,因而相对于表达CAR的细胞治疗,降低受试者复发风险。

[0762] 在一个实施方案中,待移除的细胞群体既不是调节性T细胞,也不是肿瘤细胞,而是不利影响CART细胞的扩充和/或功能的细胞,例如,表达CD14、CD11b、CD33、CD15或由潜在免疫抑制性细胞表达的其他标记的细胞。在一个实施方案中,构思了将这类细胞与调节性T细胞和/或肿瘤细胞同时、或在所述耗竭后或按另一个顺序移除。

[0763] 本文所述的方法可以包括多于一个选择步骤,例如,多于一个耗竭步骤。可以例如用抗体的组合,通过负选择过程完成T细胞群体的富集,其中所述抗体针对负向选择的细胞独有的表面标记物。一种方法是借助负向磁力免疫粘附法或流式细胞术分选和/或选择细胞,所述负向磁力免疫粘附法或流式细胞术使用针对负向选择的细胞上存在的细胞表面标记物的单克隆抗体混合物。例如,为了通过负向选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物可以包含针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。

[0764] 本文所述的方法还可以包括从表达肿瘤抗原(例如,不包含CD25的肿瘤抗原,例如,CD19、CD30、CD38、CD123、CD20、CD14或CD11b)的群体移除细胞,旨在因而提供适于表达CAR(例如,本文所述的CAR)的调节性T细胞耗竭(例如,CD25⁺耗竭的细胞和肿瘤抗原耗竭的细胞)的群体。在一个实施方案中,将表达肿瘤抗原的细胞与调节性T细胞(例如,CD25⁺细

胞)同时移除。例如,抗CD25抗体或其片段和抗肿瘤抗原抗体或其片段可以连接至能用来移除细胞的相同基材(例如,珠),或抗CD25抗体或其片段或者抗肿瘤抗原抗体或其片段可以连接至分立的珠,其混合物可以用来移除细胞。在其他实施方案中,移除调节性T细胞(例如,CD25+细胞)和移除表达肿瘤抗原的细胞是依次进行的,并且可以例如按任何顺序进行。

[0765] 还提供这些方法,所述方法包括从群体移除表达检查点抑制蛋白(例如,本文所述的检查点抑制蛋白)的细胞,例如,PD1+细胞、LAG3+细胞和TIM3+细胞中的一者或多者,因而提供调节性T细胞耗竭(例如,CD25+耗竭的细胞)和检查点抑制蛋白耗竭的细胞(例如,PD1+、LAG3+和/或TIM3+耗竭的细胞)的群体。示例性检查点抑制物的例子包括PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGF β 。在一个实施方案中,将表达检查点抑制蛋白的细胞与调节性T细胞(例如,CD25+细胞)同时移除。例如,抗CD25抗体或其片段和抗检查点抑制蛋白抗体或其片段可以连接至可以用来移除细胞的相同珠,或抗CD25抗体或其片段或者抗检查点抑制蛋白抗体或其片段可以连接至分立的珠,其混合物可以用来移除细胞。在其他实施方案中,移除调节性T细胞(例如,CD25+细胞)和移除表达检查点抑制蛋白的细胞是依次进行的,并且可以例如按任何顺序进行。

[0766] 在一个实施方案中,可以选择表达以下一者或多者的T细胞群体:IFN- γ 、TNF α 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、粒酶B和穿孔素、或其他适宜的分子,例如,其他细胞因子。可以例如通过PCT公开号WO 2013/126712中描述的方法,确定用于筛选细胞表达的方法。

[0767] 为了通过正向或负向选择分离所需的细胞群体,细胞和表面(例如粒子,如珠)的浓度可以变动。在某些方面,可能想要明显减少其中珠和细胞混合在一起的体积(例如,增加细胞浓度)以确保细胞和珠最大限度接触。例如,在一个方面,使用20亿个细胞/ml的浓度。在一个方面,使用10亿个细胞/ml的浓度。在又一个方面,使用大于1亿个细胞/ml。在又一个方面,使用1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5千万个细胞/ml的细胞浓度。在又一个方面,使用75、80、85、90、95或100百万个细胞/ml细胞浓度。在其他方面,可以使用1.25亿或1.5亿个细胞/ml的浓度。

[0768] 使用高浓度可以导致增加的细胞产量、细胞活化和细胞扩充。另外,使用高细胞浓度允许更高效地捕获可能微弱表达目的靶抗原的细胞(如CD28阴性T细胞)、或来自其中存在许多肿瘤细胞的样品(例如,白血病血液、肿瘤组织等)中的细胞。这类细胞群体可能具有治疗价值并且将希望获得。例如,使用高浓度的细胞允许更高效地选择正常情况下具有更弱CD28表达的CD8+ T细胞。

[0769] 在一个相关方面,可能想要使用较低的细胞浓度。通过大幅度稀释T细胞和表面(例如,粒子如珠)的混合物,粒子和细胞之间的相互作用最小化。这选出表达高量待与粒子结合的所需抗原的细胞。例如,CD4+T细胞表达较高水平的CD28并且在稀释的浓度比CD8+ T细胞更高效地被捕获。在一个方面,使用的细胞浓度是 5×10^6 /ml。在其他方面,所用的浓度可以是约 1×10^5 /ml至 1×10^6 /ml和其间的任何整数。

[0770] 在其他方面,可以将细胞在2-10 $^{\circ}$ C或在室温在摇床上按不同的速度温育长度不同的时间。

[0771] 用于刺激的T细胞也可以在洗涤步骤后冷冻。不希望受理论约束,通过移除细胞群体中的粒细胞和一定程度移除单核细胞,冷冻和后续解冻步骤提供更均匀的产物。在移除血浆和血小板的洗涤步骤后,细胞可以悬浮于冷冻液中。尽管许多冷冻液和参数是本领域已知的并且将用于这种环境下,一种方法涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或含有10%葡聚糖40和5%右旋糖、20%人血清白蛋白和7.5%DMSO、或31.25%Plasmalyte-A、31.25%右旋糖5%、0.45%NaCl、10%葡聚糖40和5%右旋糖、20%人血清白蛋白和7.5%DMSO的培养基或例如含有Hespan和PlasmaLyte A的其他合适的无细胞培养基,细胞随后以1°/分钟的速率冷冻至-80°C并且存储在液氮储罐的蒸气相中。也可以使用其他受控冷冻方法,以及立即在-20°C或在液氮中不受控冷冻。

[0772] 在某些方面,将冻存的细胞如本文所述那样解冻和洗涤并允许在室温静置1小时,之后使用本发明的方法激活。

[0773] 在本发明上下文中还构思了,在可能需要如本文所述的已扩充细胞时之前的某个时间段从受试者采集血液样品或单采产品。就此而论,待扩充的细胞来源可以在需要的任何时间点采集,并且所需的细胞(如免疫效应细胞,例如,T细胞或NK细胞)可以分离并冷冻供稍后用于将从细胞疗法(例如,T细胞疗法)获益的任何种类的疾病或病状(如本文所述的那些)的细胞疗法(例如,T细胞疗法)中。在一个方面,血液样品或单采物取自总体上健康的受试者。在某些方面,血液样品或单采物取自总体上健康的受试者,所述受试者面临形成疾病的风险、但是尚未形成疾病,并且将目的细胞分离并冷冻供稍后使用。在某些方面,可以将免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)扩充、冷冻并在稍后时间使用。在某些方面,样品从诊断如本文所述的特定疾病后不久、但在任何治疗之前的患者采集。在又一个方面,在任何数目的相关治疗模式之前,从受试者的血液样品或单采物分离细胞,所述的治疗模式包括但不限于药物治疗,如那他珠单抗、依法珠单抗、抗病毒药、化疗、辐射、免疫抑制剂如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸盐和FK506、抗体、或其他免疫清除剂如CAMPATH、抗CD3抗体、环磷氮芥、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228和照射。

[0774] 在本发明的又一个方面,在留给受试者有功能的T细胞的治疗后马上从患者获得T细胞。在这个方面,已经观察到在某些癌症治疗、尤其用损伤免疫系统的药物治疗后,在治疗后不久在患者正常情况下将从治疗中恢复的时间期间,获得的T细胞的质量可能就其离体扩充能力而言最佳或改善。同样地,在使用本文所述的方法离体操作后,这些细胞可以处于移植和体内扩充增强的优选状态。因此,在本发明上下文中构思了,在这个恢复期期间采集血细胞,包括T细胞、树状细胞或造血谱系的其他细胞。另外,在某些方面,动员(例如,用GM-CSF动员)和整备方案可以用来在受试者中产生这样的条件,其中有利于特定细胞类型再增殖、再循环、再生和/或扩充,特别在治疗后的限定时间窗口期间有利。示意性的细胞类型包括T细胞、B细胞、树状细胞和免疫系统的其他细胞。

[0775] 在一个实施方案中,表达CAR分子(例如,本文所述的CAR分子)的免疫效应细胞从已经接受免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂的受试者获得。在一个实施方案中,在足够时间的mTOR抑制剂后或在充分给予免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂后收获待工程化以表达CAR的免疫效应细胞(例如,T细胞)群体,从而受试者中的或从受试者收获的PD1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞)的水平或PD1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(例如,T细胞)的比率已经至少瞬时增加。

[0776] 在其他实施方案中,可以通过与下述量的mTOR抑制剂接触,离体处理已经工程化或将会工程化以表达CAR的免疫效应细胞(例如,T细胞)群体,所述量增加PD1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞)数目或增加PD1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(例如,T细胞)的比率。

[0777] 在一个实施方案中,T细胞群体是二酰甘油激酶(DGK)缺陷的。DGK缺陷性细胞包括不表达DGK RNA或蛋白质或具有降低或抑制的DGK活性的细胞。可以通过遗传方法产生DGK缺陷性细胞,例如,施用减少或阻止DGK表达的RNA干扰剂(例如,siRNA、shRNA、miRNA)。备选地,可以通过用本文所述的DGK抑制剂处理,产生DGK缺陷性细胞。

[0778] 在一个实施方案中,T细胞群体是Ikaros缺陷的。Ikaros缺陷性细胞包括不表达Ikaros RNA或蛋白质或具有降低或抑制的Ikaros活性的细胞,可以通过遗传方法产生Ikaros缺陷性细胞,例如,施用减少或阻止Ikaros表达的RNA干扰剂(例如,siRNA、shRNA、miRNA)。备选地,可以通过用Ikaros抑制剂(例如,来那度胺)处理,产生Ikaros缺陷性细胞。

[0779] 在实施方案中,T细胞群体是DGK缺陷的和Ikaros缺陷的,例如,不表达DGK和Ikaros、或具有减少或抑制的DGK活性和Ikaros活性。这类DGK和Ikaros缺陷性细胞可以通过本文所述的任何方法产生。

[0780] 在一个实施方案中,从受试者获得NK细胞。在另一个实施方案中,NK细胞是NK细胞系,例如,NK-92细胞系(Conkwest)。

[0781] 同种异体CAR

[0782] 在本文所述的实施方案中,免疫效应细胞可以是同种异体免疫效应细胞,例如,T细胞或NK细胞。例如,细胞可以是同种异体T细胞,例如,缺少功能性T细胞受体(TCR)和/或人白细胞抗原(HLA)(例如,HLA I类和/或HLA II类)表达的同种异体T细胞。

[0783] 缺少功能性TCR的T细胞可以例如经工程化,从而它在其表面上不表达任何功能性TCR;经工程化,从而它不表达构成功能性TCR的一个或多个亚基(例如,经工程化,从而它不表达或显示出减少表达的TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、TCR ϵ 和/或TCR ζ);或经工程化,从而它在其表面上产生非常少的功能性TCR。备选地,T细胞可以表达大幅度受损的TCR,例如,通过表达突变或截短形式的一个或多个TCR亚基。术语“大幅度受损的TCR”意指这种TCR将不在宿主中激发不良免疫反应。

[0784] 本文所述的T细胞例如可以经工程化,从而它不在其表面上表达功能性HLA。例如,本文所述的T细胞可以经工程化,从而HLA(例如,HLA I类和/或HLA II类)的细胞表面表达下调。在一些方面,可以通过减少或消除 β -2微球蛋白(B2M)表达实现HLA的下调。

[0785] 在一些实施方案中,T细胞可以缺少功能性TCR和功能性HLA,例如,HLA I类和/或HLA II类。

[0786] 可以通过任何合适的手段(包括敲除或敲低TCR或HLA的一个或多个亚基),获得缺少功能性TCR和/或HLA表达的修饰的T细胞。例如,T细胞可以包括使用siRNA、shRNA、成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)或锌指核酸内切酶(ZFN)敲低的TCR和/或HLA。

[0787] 在一些实施方案中,同种异体细胞可以是不表达或以低水平表达抑制性分子的细胞,例如通过本文所述的任何方法工程化的细胞。例如,细胞可以是不表达或以低水平表达抑制性分子的细胞,例如,可以降低表达CAR的细胞发动免疫效应子反应的能力的细胞。抑

制性分子的例子包括PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM (例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIG、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR β 。对抑制性分子的抑制 (例如,通过在DNA、RNA或蛋白质水平抑制) 可以优化表达CAR的细胞性能。在实施方案中,可以使用抑制性核酸,例如,抑制性核酸,例如,dsRNA,例如,siRNA或shRNA、成簇规律间隔的短回文重复序列 (CRISPR)、转录激活物样效应子核酸酶 (TALEN) 或锌指核酸内切酶 (ZFN), 例如,如本文所述。

[0788] 抑制TCR或HLA的siRNA和shRNA

[0789] 在一些实施方案中,可以在T细胞中使用siRNA或shRNA抑制TCR表达和/或HLA表达,所述的siRNA或shRNA靶向编码TCR和/或HLA和/或本文所述的抑制性分子 (例如,PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM (例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR β) 的核酸。

[0790] 可以使用任何常规表达系统 (例如,如慢病毒表达系统) 实现在T细胞中表达siRNA和shRNA。

[0791] 下调TCR的组分表达的示例性shRNA例如在美国公开号2012/0321667中描述。下调HLA I类基因和/或HLA II类基因表达的示例性siRNA和shRNA例如在美国公开号US 2007/0036773中描述。

[0792] 抑制TCR或HLA的CRISPR

[0793] 如本文所用的“CRISPR”或“针对TCR和/或HLA的CRISPR”或“抑制TCR和/或HLA的CRISPR”指一组成簇规律间隔的短回文重复序列或一个包括这种重复序列组的系统。如本文所用,“Cas”指CRISPR相关蛋白。CRISPR/Cas”系统指衍生自CRISPR和Cas的系统,所述系统可以用来沉默或突变TCR和/或HLA基因和/或本文所述的抑制性分子 (例如,PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM (例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR β)。

[0794] 在大约40%测序的真细菌基因组和90%测序的古细菌中找到了天然存在的CRISPR/Cas系统。Grissa等人(2007) BMC Bioinformatics 8:172。这种系统是一个类型的原核免疫系统,其赋予对外来遗传元件如质粒和噬菌体的抵抗性并提供一种形式的获得免疫力。Barrangou等人(2007) Science 315:1709-1712;Marragini等人(2008) Science 322:1843-1845。

[0795] 已经修饰CRISPR/Cas系统用于真核生物如小鼠或灵长类中的基因编辑 (沉默、增强或改变特定基因)。Wiedenheft等人(2012) Nature 482:331-8。通过向真核细胞引入含有特别设计的CRISPR和一个或多个适宜Cas的质粒,实现这一点。

[0796] CRISPR序列,有时称作CRISPR基因座,包含交替的重复序列和间隔序列。在天然存在的CRISPR中,间隔序列通常包含相对于细菌为外来的序列如质粒或噬菌体序列;在TCR和/或HLA CRISPR/Cas系统中,间隔序列衍生自TCR或HLA基因序列。

[0797] 来自CRISPR基因座的RNA组成型表达并由Cas蛋白加工成小RNA。这些包含旁侧分布有重复序列的间隔序列。RNA引导其他Cas蛋白在RNA或DNA水平沉默外源性遗传元件。

Horvath等人(2010) *Science* 327:167-170;Makarova等人(2006) *Biology Direct* 1:7。间隔序列因此充当RNA分子的模板,类似于siRNA。Pennisi(2013) *Science* 341:833-836。

[0798] 由于这些天然出现在许多不同类型的细菌中,CRISPR的确切布局和Cas基因及产物的结构、功能和数目或多或少地在物种之间不同。Haft等人(2005) *PLoS Comput. Biol.* 1:e60;Kunin等人(2007) *Genome Biol.* 8:R61;Mojica等人(2005) *J. Mol. Evol.* 60:174-182;Bolotin等人(2005) *Microbiol.* 151:2551-2561;Pourcel等人(2005) *Microbiol.* 151:653-663;和Stern等人(2010) *Trends. Genet.* 28:335-340。例如,Cse (Cas亚型,大肠杆菌)蛋白(例如,CasA)形成将CRISPR RNA转录物加工成Cascade保留的间隔序列-重复单元的功能复合体Cascade。Brouns等人(2008) *Science* 321:960-964。在其他原核生物中,Cas6加工CRISPR转录物。在大肠杆菌中基于CRISPR的噬菌体失活需要Cascade和Cas3,但不需要Cas1或Cas2。激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)和其他原核生物中的Cmr (Cas RAMP模块)蛋白与识别并切割互补靶RNA的小CRISPR RNA形成功能性复合体。更简单的CRISPR系统依赖于Cas9蛋白,所述蛋白是具有两个有效剪切位点(双螺旋的每条链各一个)的核酸酶。Cas9和修饰的CRISPR基因座RNA组合可以用于编辑基因的系统。Pennisi(2013) *Science* 341:833-836。

[0799] CRISPR/Cas系统因此可以用来编辑TCR和/或HLA基因(添加或缺失碱基对)、或引起过早停止,这因此减少TCR和/或HLA的表达。CRISPR/Cas系统可以备选地如同RNA干扰那样使用,以可逆方式关闭TCR和/或HLA基因。在哺乳动物细胞中,例如,RNA可以引导Cas蛋白质至TCR和/或HLA启动子,在空间上阻断RNA聚合酶。

[0800] 使用本领域已知的技术,可以生成抑制TCR和/或HLA的人工CRISPR/Cas系统,例如,美国公开号20140068797和Cong(2013) *Science* 339:819-823中描述的那种。也可以生成本领域已知的抑制TCR和/或HLA的其他人工CRISPR/Cas系统,例如,在Tsai(2014) *Nature Biotechnol.*, 32:6 569-576;美国专利号8,871,445;8,865,406;8,795,965;8,771,945和8,697,359中描述的那种。

[0801] 抑制TCR和/或HLA的TALEN

[0802] “TALEN”或“针对HLA和/或TCR的TALEN”或“抑制HLA和/或TCR的TALEN”指转录激活物样效应核酸酶,一种可以用来编辑HLA和/或TCR基因和/或本文所述的抑制性分子(例如,PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR β)的人工核酸酶。

[0803] 通过TAL效应子DNA结合结构域融合于DNA切割结构域,人工产生TALEN。转录激活物样效应(TALEs)可以经工程化以结合任何目的DNA序列,包括HLA或TCR基因的一部分。通过工程化的TALE与DNA切割结构域组合,可以产生对任何目的DNA序列(包括HLA或TCR序列)特异的限制性酶。随后可以将这些酶引入细胞中,在那里,它们可以用于基因组编辑。Boch(2011) *Nature Biotech.* 29:135-6;和Boch等人(2009) *Science* 326:1509-12;Moscou等人(2009) *Science* 326:3501。

[0804] TALE是黄单胞菌属(*Xanthomonas*)细菌分泌的蛋白质。DNA结合结构域含有重复的高度保守的33-34氨基酸序列,第12和第13氨基酸例外。这两个位置高度可变,显示与特异性核苷酸识别的强相关性。它们因此可以经工程化以结合至目的DNA序列。

[0805] 为了产生TALEN,将TALE蛋白与核酸酶(N)融合,所述核酸酶是野生型或突变型FokI核酸内切酶。已经对FokI产生几种突变以便其用于TALEN中;这些突变例如改善切割特异性或活性。Cermak等人(2011)Nucl.Acids Res.39:e82;Miller等人(2011)Nature Biotech.29:143-8;Hockemeyer等人(2011)Nature Biotech.29:731-734;Wood等人(2011)Science 333:307;Doyon等人(2010)Nature Methods 8:74-79;Szczepek等人(2007)Nature Biotech.25:786-793;和Guo等人(2010)J.Mol.Biol.200:96。

[0806] FokI结构域作为二聚体发挥作用,因而需要取向和间距正确的对靶基因组中位点具有独特DNA结合结构域的两个构建体。TALE DNA结合结构域和FokI切割结构域之间的氨基酸残基数和两个独立TALEN结合位点之间的碱基数目似乎均是实现高水平活性的重要参数。Miller等人,(2011)Nature Biotech.29:143-8。

[0807] HLA或TCR TALEN可以在细胞内部使用以产生双链断口(DSB)。如果修复机制借助非同源末端接合不当地修复断口,则可以在断口位点处引入突变。例如,不当修复可以引入移码突变。备选地,可以将外来DNA随TALEN一起引入细胞中;取决于外来DNA的序列和染色体序列,这种方法可以用来纠正HLA或TCR基因中的缺陷或向wt HLA或TCR基因中引入这种缺陷,因此减少HLA或TCR的表达。

[0808] 可以使用本领域已知的任何方法(包括使用模块化组件的多种方案),构建对HLA或TCR中的序列特异的TALEN。Zhang等人(2011)Nature Biotech.29:149-53;Geibler等人(2011)PLoS ONE 6:e19509。

[0809] 抑制HLA和/或TCR的锌指核酸酶

[0810] “ZFN”或“锌指核酸酶”或“针对HLA和/或TCR的ZFN”或“抑制HLA和/或TCR的ZFN”指锌指核酸酶,它是一种可以用来编辑HLA和/或TCR基因和/或本文所述的抑制性分子(例如,PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFRB)的人工核酸酶。

[0811] 如同TALEN,ZFN包含与DNA结合结构域融合的FokI核酸酶结构域(或其衍生物)。在ZFN的情况下,DNA结合结构域包含一个或多个锌指。Carroll等人(2011)Genetics Society of America 188:773-782;和Kim等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:1156-1160。

[0812] 锌指是由一个或多个锌离子稳定化的小蛋白结构性基序。锌指可以例如包含Cys₂His₂,并且可以识别大约3bp序列。可以组合特异性已知的多种锌指以产生识别约6、9、12、15或18bp序列的多指状物多肽。多种选择和模块化装配技术可用于产生识别特定序列的锌指(及其组合),包括噬菌体展示、酵母单杂交系统、细菌单杂交和双杂交系统和哺乳动物细胞。

[0813] 如同TALEN,ZFN必须二聚化以切割DNA。因此,需要一对ZFN以靶向非回文性DNA位点。两个独立ZFN必须结合DNA的对侧链,其核酸酶恰当地间隔分开。Bitinaite等人,(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA95:10570-5。

[0814] 还如同TALEN,ZFN可以在DNA中产生双链断口,后者若如果不当地修复则可以产生移码突变、导致细胞中HLA和/或TCR的表达和量减少。ZFN也可以随同源重组一起用于在HLA或TCR基因中突变。

[0815] 可以使用本领域已知的任何方法,构建对HLA/或TCR中的序列特异的ZFN。参见,例

如,Provasi (2011) Nature Med.18:807-815;Torikai (2013) Blood 122:1341-1349; Cathomen等人 (2008) Mol. Ther. 16:1200-7;Guo等人 (2010) J.Mol.Biol. 400:96;美国专利公开2011/0158957;和美国专利公开2012/0060230。

[0816] 端粒酶表达

[0817] 尽管不希望受任何具体理论约束,在一些实施方案中,治疗性T细胞在患者中具有短期留存,原因在于T细胞中端粒缩短;因此,用端粒酶基因转染可以延长T细胞的端粒并改善T细胞在患者中的持久性。参见Carl June,“Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic”,Journal of Clinical Investigation,117:1466-1476 (2007)。因此,在一个实施方案中,免疫效应细胞(例如,T细胞)异位表达端粒酶亚基,例如,端粒酶的催化性亚基(例如,TERT,例如,hTERT)。在一些方面,本公开提供一种产生表达CAR的细胞的方法,包括使细胞与编码端粒酶亚基(例如,端粒酶的催化性亚基(例如,TERT,例如,hTERT))的核酸接触。细胞可以在接触编码CAR的构建体之前、与之同时或之后与该核酸接触。

[0818] 在一个方面,本公开以一种产生免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)群体的方法为特征。在一个实施方案中,该方法包括:提供免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)群体、使免疫效应细胞群体与编码CAR的核酸接触;和使免疫效应细胞群体与编码端粒酶亚基(例如,hTERT)的核酸在允许CAR和端粒酶表达的条件下接触。

[0819] 在一个实施方案中,编码端粒酶亚基的核酸是DNA。在一个实施方案中,编码端粒酶亚基的核酸包含能够驱动端粒酶亚基表达的启动子。

[0820] 在一个实施方案中,hTERT具有如下的GenBank蛋白质IDAAC51724.1的氨基酸序列(Meyerson等人,“hEST2,the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene,Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization”Cell第90卷,第4期,1997年8月22日,第785-795页):

[0821] MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPAA
PSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRV
GDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRGGERAWNHSVREAGVPLGLPAPG
ARRRGGASRSRSLPLPKRPRRGAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGSPDRGFCVVSPPARPAEEATSLEGALSGTRHSH
PSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWM
PGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQSVAPEEEDTDPRL
VQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRGCWLRRSP
GVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLSFFYVTETTFQKNRLLFFYRKS VWSKLSIGIRQHLKRVQLRE
LSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFVSNYERARRPGLL
GASVLGLDDIHRARWTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPNQTYCVRRYAVVQKAAH
GHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQC
QGIPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTV
VNFVPEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFVLRRL
KCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSL
GAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGLSLRTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAANPALPSDFKTILD
(SEQ ID NO:157)

[0822] 在一个实施方案中,hTERT具有与SEQ ID NO:157的序列至少80%、85%、90%、

95%、96%、97%、98%或99%同一的序列。在一个实施方案中,hTERT具有SEQ ID NO:157的序列。在一个实施方案中,hTERT在N末端、C末端或这两者处包含缺失(例如,不多于5、10、15、20、或30个氨基酸的缺失)。在一个实施方案中,hTERT在N末端、C末端或这两者处包含转基因氨基酸序列(例如,不多于5、10、15、20、或30个氨基酸的转基因氨基酸序列)。

[0823] 在一个实施方案中,hTERT由如下的GenBank登录号AF018167的核酸序列(Meyerson等人,“hEST2,the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene,Is Up-Regulated in Tumor Cells and duringImmortalization”Cell第90卷,第4期,1997年8月22日,第785-795页)编码:

```
[0824] 1 caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc
[0825] 61 cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgcgct ccctgctgcg cagccactac cgcgaggtgc
[0826] 121 tgccgctggc cacgttcgtg cggcgctgg ggccccaggg ctggcggtg gtgcagcgcg
[0827] 181 gggaccggc ggctttccgc gcgctggtg cccagtgcct ggtgtgcgtg ccctgggacg
[0828] 241 cacggccgcc ccccgccgcc cctccttcc gccaggtgtc ctgcctgaag gagctggtgg
[0829] 301 cccgagtgt gcagaggctg tgcgagcgcg gcgcgaagaa cgtgctggcc ttcggcttcg
[0830] 361 cgctgctgga cggggccccg gggggcccc cccaggcctt caccaccagc gtgcgcagct
[0831] 421 acctgccccaa cacggtgacc gacgcactgc gggggagcgg ggcgtggggg ctgctgttgc
[0832] 481 gccgcgtggg cgacgacgtg ctggttcacc tgctggcagc ctgcgcgctc tttgtgctgg
[0833] 541 tggctcccag ctgcgcctac caggtgtgcg ggccgccgct gtaccagctc ggcgctgcca
[0834] 601 ctcaggcccc gccccgccca cacgctagtg gacccccgaag gcgtctggga tgcgaacggg
[0835] 661 cctggaacca tagcgtcagg gaggccgggg tccccctggg cctgccagcc ccgggtgcga
[0836] 721 ggaggcgcgg gggcagtgcc agccgaagtc tgccgttgcc caagaggccc aggcgtggcg
[0837] 781 ctgcccctga gccggagcgg acgcccgttg ggcaggggtc ctgggccccac ccgggcagga
[0838] 841 cgcgtggacc gagtgaccgt ggtttctgtg tgggtgcacc tgccagacc gccgaagaag
[0839] 901 ccacctttt ggagggtgcg ctctctggca cgcgccactc ccacccatcc gtgggccgcc
[0840] 961 agcaccacgc gggcccccca tccacatcgc ggccaccacg tccctgggac acgccttgc
[0841] 1021 ccccggtgta cgccgagacc aagcacttcc tctactcctc aggcgacaag
gagcagctgc
[0842] 1081 ggccctcctt cctactcagc tctctgaggc ccagcctgac tggcgtcgg
aggctcgtgg
[0843] 1141 agaccatctt tctgggttcc aggccctgga tgccagggac tccccgcagg
ttgccccgcc
[0844] 1201 tgccccagcg ctactggcaa atgcggcccc tgtttctgga gctgcttggg
aaccacgcgc
[0845] 1261 agtgccccta cggggtgctc ctcaagacgc actgcccgtc gcgagctgcg
gtcaccag
[0846] 1321 cagccggtgt ctgtgcccgg gagaagcccc agggctctgt ggcggcccc
gaggaggagg
[0847] 1381 acacagacc ccgtcgcctg gtgcagctgc tccgccagca cagcagcccc
tggcaggtgt
```

[0848] 1441 acggcttcgt gcgggcctgc ctgcgccggc tggtgccccc aggcctctgg
ggctccaggc

[0849] 1501 acaacgaacg ccgcttcctc aggaacacca agaagtcat ctccctgggg
aagcatgcca

[0850] 1561 agctctcgct gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtgcg gggctgcgct
tggtgcgca

[0851] 1621 ggagcccagg ggttggtgtg gttccggccg cagagcaccg tctgctgag
gagatcctgg

[0852] 1681 ccaagttcct gcactggctg atgagtgtgt acgtcgtcga gctgctcagg
tctttctttt

[0853] 1741 atgtcacgga gaccacgttt caaaagaaca ggctcttttt ctaccggaag
agtgtctgga

[0854] 1801 gcaagttgca aagcattgga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg
cgggagctgt

[0855] 1861 cggaagcaga ggtcaggcag catcgggaag ccaggcccgc cctgctgacg
tccagactcc

[0856] 1921 gcttcatccc caagcctgac gggctgcggc cgattgtgaa catggactac
gtcgtgggag

[0857] 1981 ccagaacggt ccgcagagaa aagagggccg agcgtctcac ctcgagggtg
aaggcactgt

[0858] 2041 tcagcgtgct caactacgag cgggcgcggc gccccggcct cctggggcgcc
tctgtgctgg

[0859] 2101 gcctggacga tatccacagg gcctggcgca cttcgtgct gcgtgtgagg
gcccaggacc

[0860] 2161 cgccgcctga gctgtacttt gtcaaggtgg atgtgacggg cgcgtacgac
accatcccc

[0861] 2221 aggacaggct cacggaggtc atcgccagca tcatcaaacc ccagaacacg
tactgctgctg

[0862] 2281 gtcggtatgc cgtggtccag aaggccgccc atgggcacgt ccgcaaggcc
ttcaagagcc

[0863] 2341 acgtctctac cttgacagac ctccagccgt acatgcgaca gttcgtggct
cacctgcagg

[0864] 2401 agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctctctcctg
aatgaggcca

[0865] 2461 gcagtggcct cttegacgtc ttctacgct tcatgtgcca ccacgccgtg
cgcatcaggg

[0866] 2521 gcaagtcceta cgtccagtgc caggggatcc cgcagggctc catcctctcc
acgtgctct

[0867] 2581 gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg

cgggacgggc

[0868] 2641 tgctcctgcg tttggtggat gatttcttgt tggtagacacc tcacctcacc
cacgcgaaaa

[0869] 2701 ccttcctcag gaccctggtc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgcgtgggtg
aacttgcgga

[0870] 2761 agacagtggg gaacttcctt gtagaagacg aggccctggg tggcacggct
tttgttcaga

[0871] 2821 tgccggccca cggcctattc ccctgggtgcg gcctgctgct ggatacccgg
accctggagg

[0872] 2881 tgcagagcga ctactccagc tatgcccggg cctccateag agccagtctc
accttcaacc

[0873] 2941 gcggcttcaa ggctgggagg aacatgctgc gcaaacctctt tggggctcttg
cggctgaagt

[0874] 3001 gtcacagcct gtttctggat ttgcaggatga acagcctcca gacgggtgtgc
accaacatct

[0875] 3061 acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgcatg tgtgctgcag
ctcccatttc

[0876] 3121 atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tcttgccgct catctctgac
acggcctccc

[0877] 3181 tctgctactc catcctgaaa gccagaacg cagggatgtc gctggggggcc
aagggcgccc

[0878] 3241 ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc
ctgctcaagc

[0879] 3301 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tcttgggggtc actcaggaca
gcccagacgc

[0880] 3361 agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgcctt ggaggccgca
gccaaccg

[0881] 3421 cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc acccgcccac
agccaggccc

[0882] 3481 agagcagaca ccagcagccc tgtagcgcg ggctctactg cccaggagg
gaggggcggc

[0883] 3541 ccacaccag gcccgaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgtttg
gccgaggcct

[0884] 3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc
agccaagggc

[0885] 3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcaact tccccacagg ctggcgctcg
gctccacccc

[0886] 3721 agggccagct tttcctcacc aggagcccgg cttccactcc ccacatagga
atagtccatc

[0887] 3781 cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tgccctcctt tgccttccac
ccccaccatc

[0888] 3841 caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctgggaa tttggagtga
ccaaaggtgt

[0889] 3901 gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt
caaattgggg

[0890] 3961 ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga
aaaaaaaaaa

[0891] 4021 aaaaaaa (SEQ ID NO:158)

[0892] 在一个实施方案中,hTERT由下述核酸编码,所述核酸具有与SEQ ID NO:158的序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列。在一个实施方案中,hTERT由SEQ ID NO:158的核酸编码。

[0893] 活化和扩充T细胞

[0894] 可以通常使用如在例如以下文献中所述的方法活化和扩充T细胞:美国专利6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;和美国专利申请公开号20060121005。

[0895] 通常,可以通过与下述表面接触,扩充本发明的T细胞,所述表面已经与刺激CD3/TCR复合物相关的信号的物质和刺激T细胞表面上共刺激分子的配体连接。特别地,可以如本文所述那样,如通过接触于固定在表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段或抗CD2抗体,或通过接触于蛋白激酶C激活物(例如,草苔虫内酯)连同钙离子载体,刺激T细胞群体。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用结合辅助分子的配体。例如,T细胞群体可以在适于刺激T细胞增殖的条件下与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞增殖,可以使用抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的例子包括9.3、B-T3、XR-CD28 (Diaclone, Besançon, France),可以如本领域共知的其他方法那样使用(Berg等人, Transplant Proc.30(8):3975-3977,1998;Haanen等人,J.Exp.Med.190(9):13191328,1999;Garland等人,J.Immunol Meth.227(1-2):53-63,1999)。

[0896] 在某些方面,T细胞的初级刺激信号和共刺激信号可以由不同方案提供。例如,提供每种信号的物质可以处于溶液中或与表面偶联。与表面偶联时,物质可以与相同表面(即,处于“顺式”形式)偶联或与分立的表面偶联(即,处于“反式”形式)。备选地,一个物质可以与表面偶联并且另一种物质处于溶液中。在一个方面,提供共刺激信号的物质与细胞表面结合并且提供初级激活信号的物质处于溶液中或与表面偶联。在某些方面,两种物质均可以处于溶液中。在一个方面,物质可以处于可溶性形式,并且随后交联至表面,如表达将会与该物质结合的Fc受体或抗体或其他结合物的细胞。在这个方面,本发明构思了用于活化和扩充T细胞的人工抗原呈递细胞(aAPC),参见例如,美国专利申请公开号20040101519和20060034810。

[0897] 在一个方面,两种物质固定在珠上,其中它们固定在相同的珠上、即,“顺式”,或固定至分立的珠上、即,“反式”。例如,提供初级活化信号的物质是抗CD3抗体或其抗原结合片段并且提供共刺激信号的物质是抗CD28抗体或其抗原结合片段;并且两种物质均以等价的

分子数量共同固定至相同珠上。在一个方面,对于CD4⁺ T细胞扩充和T细胞生长,使用与珠结合的每种抗体的1:1比率。在本发明的某些方面,如此使用与珠结合的抗CD3:CD28抗体的比率,从而如与使用比率1:1时观察到的扩充相比,观察到T细胞扩充增加。在一个特定方面中,如与使用比率1:1时观察到的扩充相比,观察到约1倍至约3倍的增加。在一个方面,与珠结合的CD3:CD28抗体的比率是从100:1至1:100和其间的全部整数值。在本发明的一个方面,比抗CD3抗体更多的抗CD28抗体与粒子结合,即,CD3:CD28的比率小于1。在本发明的某些方面,与珠结合的抗CD28抗体对抗CD3抗体的比率大于2:1。在一个特定的方面,使用1:100与珠结合的CD3:CD28抗体比率。在一个方面,使用1:75与珠结合的CD3:CD28抗体比率。在又一个方面,使用1:50与珠结合的CD3:CD28抗体比率。在一个方面,使用1:30与珠结合的CD3:CD28抗体比率。在一个优选的方面,使用1:10与珠结合的CD3:CD28抗体比率。在一个方面,使用1:3与珠结合的CD3:CD28抗体比率。在又一个方面,使用3:1与珠结合的CD3:CD28抗体比率。

[0898] 粒子对细胞比率1:500至500:1和其间的任何整数值可以用来刺激T细胞或其他靶细胞。如本领域普通技术人员可以轻易地领会,粒子对细胞的比率可以取决于相对于靶细胞的粒度。例如,小规格珠仅能结合一些细胞,而较大的珠能结合许多细胞。在某些方面,细胞对粒子的比率范围从1:100至100:1和其间的任何整数值,并且在其他方面中,该比率包含1:9至9:1和其间的任何整数值、也可以用来刺激T细胞。导致T细胞刺激的抗CD3偶联粒子和抗CD28偶联粒子对T细胞的比率可以如上文所示变动,然而某些优选的值包括1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1和15:1,一个优选的比率是每个T细胞至少1:1粒子。在一个方面,使用1:1或更小的粒子对细胞比率。在一个特定方面,优选的粒子:细胞比率是1:5。在其他方面,粒子:细胞比率可以根据刺激的日期变动。例如,在一个方面,粒子:细胞比率在第1天是1:1至10:1,并且此后每日或每隔1日添加额外粒子至细胞持续多达10天,按1:1至1:10的最终比率(基于添加日时的细胞计数)添加。在一个特定方面,粒子:细胞比率在第1刺激日是1:1并且在第三刺激日和第五刺激日调节至1:5。在一个方面,基于每日或每隔1日添加粒子至第1刺激日时最终比率1:1,并且在第三刺激日和第五刺激日添加粒子至最终比率1:5。在一个方面,粒子:细胞比率在第1刺激日是2:1并且在第三刺激日和第五刺激日调节至1:10。在一个方面,基于每日或每隔1日添加粒子至第1刺激日时最终比率1:1,并且在第三刺激日和第五刺激日添加粒子至最终比率1:10。本领域技术人员将理解,多种其他比率可以在本发明中适用。特别地,比率将根据粒度和细胞尺寸和类型变动。在一个方面,使用的最常见比率在第1天接近1:1、2:1和3:1。

[0899] 在本发明的其他方面,将细胞(如T细胞)与物质包被的珠组合,随后分离珠和细胞,并且随后培养细胞。在备选方面,在培养之前,不分离物质包被的珠和细胞,而是在一起培养。在又一个方面,首先通过应用某种力(如磁力)浓缩珠和细胞、导致细胞表面标记物的连接增加,因而诱导细胞刺激作用。

[0900] 例如,可以通过使得与抗CD3和抗CD28连接的顺磁珠(3x28珠)接触T细胞,连接细胞表面蛋白。在一个方面,将细胞(例如,10⁴个至10⁹个T细胞)和珠(例如,DYNABEADS[®]M-450 CD3/CD28 T顺磁珠按比率1:1)在缓冲液例如PBS(不含二价阳离子如钙和镁)中合并。再次,本领域普通技术人员可以轻易地领会,可以使用任何细胞浓度。例如,靶细胞可能在

样品中非常稀少并仅占样品的0.01%或整个样品(即,100%)可能包含目的靶细胞。因此,任何细胞数目均属于本发明上下文的范围内。在某些方面,可能想要明显减少粒子和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞浓度)以确保细胞和粒子最大限度接触。例如,在一个方面,使用约100亿个细胞/ml、90亿/ml、80亿/ml、70亿/ml、60亿/ml、50亿/ml、或20亿个细胞/ml的浓度。在一个方面,使用大于1亿个细胞/ml。在又一个方面,使用1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5千万个细胞/ml的细胞浓度。在又一个方面,使用75、80、85、90、95或100百万个细胞/ml细胞浓度。在其他方面,可以使用1.25亿或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可以导致增加的细胞产量、细胞活化和细胞扩充。另外,使用高细胞浓度允许更高效地捕获可能微弱表达目的靶抗原的细胞,如CD28阴性T细胞。在某些方面,这类细胞群体可能具有治疗价值并且将希望获得。例如,使用高浓度的细胞允许更高效地选择正常情况下具有较弱CD28表达的CD8⁺ T细胞。

[0901] 在一个实施方案中,扩充用编码CAR(例如,本文所述的CAR)的核酸转导的细胞,例如,通过本文所述的方法扩充。在一个实施方案中,将细胞在培养下扩充几小时(例如,约2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、18、21小时)至约14天(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天)。在一个实施方案中,将细胞扩充4至9天时间。在一个实施方案中,将细胞扩充8天或更短(例如,7、6或5天)时间。在一个实施方案中,将细胞(例如,本文所述的CD33 CAR细胞)在培养下扩充5天并且所产生的细胞比相同培养条件下培养扩充9天的相同细胞更有效力。效力可以例如由多种T细胞功能例如增殖、靶细胞杀伤作用、细胞因子产生、活化、移行、或其组合定义。在一个实施方案中,与相同培养条件下培养扩充9天的相同细胞相比,在培养下扩充5天的细胞(例如,本文所述的CD33 CAR细胞)显示在抗原刺激时细胞倍增作用增长至少1、2、3或4倍。在一个实施方案中,将表达本文所述的CD33 CAR的细胞在培养下扩充5天,并且与相同培养条件下培养扩充9天的相同细胞相比,所产生的细胞显示出更高的促炎细胞因子产量,例如,更高的IFN- γ 水平和/或GM-CSF水平。在一个实施方案中,与相同培养条件下培养扩充9天的相同细胞相比,在培养下扩充5天的细胞(例如,本文所述的CD33 CAR细胞)显示以pg/ml计的促炎细胞因子产量(例如,IFN- γ 水平和/或GM-CSF水平)增长至少1、2、3、4、10倍或更多。

[0902] 在本发明的一个方面,可以将混合物培养几小时(约3小时)至约14天或期间的任何小时整数值。在一个方面,可以将混合物培养21天。在本发明的一个方面,将珠和T细胞在一起培养约8天。在一个方面,将珠和T细胞在一起培养2-3天。也可能需要几轮刺激,从而T细胞培养时间可以是60天或更长。适于T细胞培养的条件包括适宜的培养基(例如,极限基本培养基或RPMI培养基1640或X-vivo15, (Lonza)),所述培养基可以含有增殖和生存力必需的因子,包括血清(例如,胎牛血清或人血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 和TNF- α 或技术人员已知的用于细胞生长的任何其他添加物。用于细胞生长的其他添加物包括但不限于表面活性剂、血浆蛋白粉(plasmanate)和还原剂如N-乙酰-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可以包括RPMI1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo15和X-Vivo20、Optimizer,连同添加的氨基酸、丙酮酸钠和维生素,无血清或补充有足以生长和扩充T细胞的适宜量的血清(或血浆)或限定的成组激素和/或某种量的细胞因子。抗生素,例如,青霉素和链霉素仅包含于实验性培养物中,不包含于待输注入受试者的细胞培养物中。将靶细胞在支持生长所必需的条件下维持,例如,

适宜的温度(例如,37°C)和气氛(例如,空气外加5%CO₂)。

[0903] 在一个实施方案中,将细胞在适宜的培养基(例如,本文所述的培养基)中扩充,所述培养基包括导致细胞在14天扩充时间内增加至少200倍(例如,200倍、250倍、300倍、350倍)(例如,如通过本文所述的方法(如流式细胞术)所测量)的一种或多种白介素。在一个实施方案中,将细胞在IL-15和/或IL-7(例如,IL-15和IL-7)存在下扩充。

[0904] 在实施方案中,本文所述的方法(例如,生产表达CAR的细胞的方法)包括例如使用抗CD25抗体或其片段或CD25结合配体、IL-2,从细胞群体移除调节性T细胞,例如,CD25⁺ T细胞。本文中描述了从细胞群体移除调节性T细胞(例如,CD25⁺ T细胞)的方法。在实施方案中,方法(例如,生产方法)还包括:使细胞群体(例如,其中调节性T细胞(如CD25⁺ T细胞)已经耗竭的细胞群体;或先前已经接触过抗CD25抗体、其片段或CD25结合配体的细胞群体)与IL-15和/或IL-7接触。例如,将细胞群体(例如,先前已经接触过抗CD25抗体、其片段或CD25结合配体的细胞群体)在IL-15和/或IL-7存在下扩充。

[0905] 在一些实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞与组合物在产生表达CAR的细胞期间(例如,离体)接触,所述组合物包含白介素-15(IL-15)多肽、白介素-15受体 α (IL-15Ra)多肽或IL-15多肽和IL-15Ra多肽(例如,hetIL-15)的组合。在实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞与包含IL-15多肽的组合物在产生表达CAR的细胞期间(例如,离体)接触。在实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞与包含IL-15多肽和IL-15Ra多肽二者组合的组合物在产生表达CAR的细胞期间(例如,离体)接触。在实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞与包含hetIL-15的组合物在产生表达CAR的细胞期间(例如,离体)接触。

[0906] 在一个实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞与包含hetIL-15的组合物在离体扩充期间接触。在一个实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞与包含IL-15多肽的组合物在离体扩充期间接触。在一个实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞与包含IL-15多肽和IL-15Ra多肽二者的组合物在离体扩充期间接触。在一个实施方案中,接触过程导致淋巴细亚群(例如,CD8⁺ T细胞)存活和增殖。

[0907] 已经暴露于变动的刺激时间的T细胞可以显示出不同的特征。例如,常见的血液或单采外周血单个核细胞产物具有比细胞毒T细胞或阻抑T细胞群体(TC、CD8⁺)更大的辅助T细胞群体(TH、CD4⁺)。通过刺激CD3和CD28受体离体扩充T细胞产生了约第8-9天之前由TH细胞优势组成的T细胞群体,而约第8-9天之后,T细胞群体包含增加的更大的TC细胞群体。因此,取决于治疗目的,向受试者输注优势包含TH细胞的T细胞群体可能是有利的。类似地,如果已经分离TC细胞的抗原特异性亚群,可能有益的是更大程度地扩充这个亚群。

[0908] 另外,除CD4和CD8标记物之外,其他表型标记物也显著地变动,但是在细胞扩充过程期间大多可重复地变动。因此,这种重现性使得为特定目的而调整活化的T细胞产物的能力成为可能。

[0909] 一旦构建了CD33 CAR,则各种测定法可以用来评价分子的活性,如但不限于抗原刺激后扩充T细胞的能力、在再次刺激不存在的情况下维持T细胞扩充的能力和适宜的体外模型和动物模型中的抗癌活性。下文进一步详细描述评价CD33 CAR的作用的测定法。

[0910] 原代T细胞中CAR表达的蛋白质印迹分析可以用来检测单体和二聚体的存在。参见,例如,Milone等人,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。非常简要地,将表达CAR的T细胞(CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞的1:1混合物)在体外扩充多于10天,随后裂解和在

还原条件下进行SDS-PAGE。使用针对TCR- ζ 链的抗体,通过蛋白质印迹法检测含有全长TCR- ζ 胞质结构域和内源TCR- ζ 链的CAR。相同T细胞亚群用于非还原性条件下的SDS-PAGE分析以允许评价共价二聚体形成。

[0911] 可以通过流式细胞术测量在抗原刺激后CAR⁺ T细胞的体外扩充。例如,CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞的混合物用 α CD3/ α CD28aAPC刺激,随后用在待分析的启动子控制下表达GFP的慢病毒载体转导。示例性启动子包括CMV IE基因启动子、EF-1 α 启动子、遍在蛋白C启动子或磷酸甘油激酶(PGK)启动子。在培养第6日通过流式细胞术评价CD4⁺和/或CD8⁺ T细胞亚群中的GFP荧光。参见,例如,Milone等人,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。备选地,CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞的混合物在第0天用 α CD3/ α CD28包被的磁珠刺激并且使用双顺反子慢病毒载体在第1天用CAR转导,其中所述双顺反子慢病毒载体使用2A核糖体跳跃序列表达CAR连同eGFP。在洗涤后,将培养物用CD19⁺ K562细胞(K562-CD19)、野生型K562细胞(K562野生型)或表达hCD32和4-1BBL的K562细胞在抗CD3和抗CD28抗体(K562-BBL-3/28)存在下再刺激。每隔1日按100IU/ml添加外源IL-2至培养物。使用基于珠的计数法,通过流式细胞术计数GFP⁺ T细胞。参见,例如,Milone等人,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。可以使用抗CD123T细胞(参见,例如,Gill等人,Blood 2014;123:2343)或用抗CD33 CAR T细胞进行相似的测定法。

[0912] 也可以测量在再次刺激不存在的情况下维持的CAR⁺ T细胞扩充。参见,例如,Milone等人,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。简而言之,在第0天用 α CD3/ α CD28包被的磁珠刺激并在第1天用所示CAR转导后,在培养第8天使用库尔特粒度分析仪III粒子计数器Nexcelom Cellometer Vision或Millipore Scepter测量平均T细胞容积(f1)。

[0913] 也可以用动物模型来测量CART活性。例如,可以使用在免疫缺陷性小鼠中利用人CD19特异性CAR⁺T细胞处理原代人前B ALL的异种移植模型。参见,例如,Milone等人,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。非常简短地,在建立ALL后,将小鼠随机分配至治疗组。将不同数目的 α CD19- ζ 工程化T细胞和 α CD19-BB- ζ 工程化T细胞按1:1比率共注射至携带B-ALL的NOD-SCID- $\gamma^{-/-}$ 小鼠中。在注射T细胞后的多个时间评价来自小鼠的脾DNA中 α CD19- ζ 载体和 α CD19-BB- ζ 载体的拷贝数。按每周一次间隔评估动物的白血病。在用 α CD19- ζ CAR⁺ T细胞或模拟转导的T细胞注射的小鼠中测量外周血CD19⁺B-ALL母细胞计数。使用对数秩检验,比较各组的生存曲线。此外,也可以分析NOD-SCID- $\gamma^{-/-}$ 小鼠中注射T细胞后4周的外周血CD4⁺和CD8⁺ T细胞绝对计数。对小鼠注射白血病细胞并且3周后注射经工程化以通过双顺反子慢病毒载体表达CAR的T细胞,所述双顺反子慢病毒载体编码与eGFP连接的CAR。通过注射之前与模拟转导的细胞混合,将T细胞对45-50%输入的GFP⁺ T细胞归一化,并且通过流式细胞术证实。按1周间隔评估动物的白血病。使用对数秩检验,比较各CAR⁺ T细胞组的生存曲线。可以用CD33 CART进行相似实验。

[0914] 可以评价剂量依赖性CAR治疗反应。参见,例如,Milone等人,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。例如,在第21日注射了CAR T细胞、等价数目的模拟转导的T细胞或未注射过T细胞的小鼠中建立白血病后35-70天,获得外周血。来自每个组的小鼠随机采血以测定外周血CD19⁺ALL母细胞计数并且随后在第35和第49日杀死。在第57和第70天评价剩余动物。可以用CD33 CART进行相似实验。

[0915] 先前已经描述了细胞增殖和细胞因子产生的评估,例如,在Milone等人,

Molecular Therapy 17 (8):1453-1464 (2009) 处描述。简而言之,在微量滴定板中通过将洗涤的T细胞与表达CD19 (K19) 的K562细胞或表达CD32和CD137的K562细胞 (KT32-BBL) 按T细胞:K562最终比率2:1混合,评估CAR介导的增殖。K562细胞在使用之前用 γ -辐射照射。将抗CD3 (克隆OKT3) 单克隆抗体和抗CD28 (克隆9.3) 单克隆抗体添加至培养物,以KT32-BBL细胞充当刺激T细胞增殖的阳性对照,因为这些信号支持CD8⁺ T细胞离体长期扩充。如制造商所描述那样使用CountBright™荧光珠 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和流式细胞术,计数培养物中的T细胞。使用T细胞依据GFP表达鉴定CAR⁺ T细胞,其中所述T细胞用表达eGFP-2A连接的CAR的慢病毒载体工程化。对于不表达GFP的CAR⁺ T细胞,用生物素酰化的重组CD33蛋白和第二抗生物素蛋白-PE缀合物检测CAR⁺ T细胞。还同时用特异性单克隆抗体 (BD Biosciences) 检测T细胞上的CD4⁺表达和CD8⁺表达。根据制造商的说明,使用人TH1/TH2细胞因子细胞计数珠阵列试剂盒 (BD Biosciences, San Diego, CA), 或者使用Luminex30-plex试剂盒 (Invitrogen), 对再次刺激后24小时收集的上清液进行细胞因子测量。使用BD Fortess流式细胞仪评估荧光并且根据制造商的说明分析数据。可以用CD33 CART进行相似实验。

[0916] 可以由标准⁵¹Cr-释放测定法评估细胞毒性。参见,例如, Milone等人, Molecular Therapy 17 (8):1453-1464 (2009)。简而言之,将靶细胞 (K562系和原代前B-ALL细胞) 在37°C用⁵¹Cr (作为NaCrO₄, New England Nuclear, Boston, MA) 加载2小时伴以频繁搅拌,在完全RPMI中洗涤2次并置于至微量滴定板中。在孔中,将效应T细胞与靶细胞在完全RPMI中按不同的效应细胞:靶细胞比率 (E:T) 混合。还制备仅含有培养基 (自发释放, SR) 或1% triton-X100去垢剂溶液 (完全释放, TR) 的额外孔。在37°C温育4小时后,从每个孔收获上清液。随后使用 γ 粒子计数器 (Packard Instrument Co., Waltham, MA) 测量释放的⁵¹Cr。每条件按至少三次重复进行并且使用下式计算裂解百分数:裂解% = (ER-SR) / (TR-SR), 其中ER代表每种实验条件的⁵¹Cr平均释放。

[0917] 可以用成像技术来评价携瘤动物模型中CAR的特异性转运和增殖。已经描述了此类测定法,例如,在Barrett等人, Human Gene Therapy 22:1575-1586 (2011) 中描述。简而言之,对NOD/SCID/ γ c^{-/-} (NSG) 小鼠静脉内注射NaIm-6细胞,7天后,以CAR构建体电穿孔后4小时,静脉内注射T细胞。T细胞用表达萤火虫萤光素酶的慢病毒构建体稳定转染并且对小鼠的生物发光成像。备选地,可以如下测量NaIm-6异种移植模型中单次注射CAR⁺ T细胞的治疗功效和特异性:对NSG小鼠注射经转导以稳定表达萤火虫萤光素酶的NaIm-6,7天后,随后单次尾静脉注射以CD33 CAR电穿孔的T细胞。在注射后的各种时间点对动物成像。例如,可以在第5日 (处理前2天) 和第8日 (CAR⁺PBL后24小时) 生成代表性小鼠中萤火虫萤光素酶阳性白血病的光子密度热图。其他测定法,包括在本文实施例部分中描述的那些以及本领域已知的那些,也可以用来评价本发明CD33 CAR构建体。

[0918] 备选地或联合本文所公开的方法,公开了涉及使用CAR配体的以下一项或多项的方法和组合物:检测和/或定量表达CAR的细胞 (例如,体外或体内 (例如,临床监测));免疫细胞扩充和/或活化;和/或CAR-特异性选择。在一个示例性实施方案中,CAR配体是与CAR分子结合的抗体,例如,与CAR的胞外抗原结合结构域结合的抗体 (例如,与抗原结合结构域结合的抗体,例如,抗独特型抗体;或与胞外结合结构域的恒定区结合的抗体)。在其他实施方案中,CAR配体是CAR抗原分子 (例如,如本文所述的CAR抗原分子)。

[0919] 在一个方面,公开了一种用于检测和/或定量表达CAR的细胞的方法。例如,CAR配体可以用来在体外或在体内检测和/或定量表达CAR的细胞(例如,临床监测患者中表达CAR的细胞或向患者给药)。该方法包括:

[0920] 提供CAR配体(任选地,标记的CAR配体,例如,包括标签、珠、放射性或荧光标记物的CAR配体);

[0921] 获得表达CAR的细胞(例如,获得含有表达CAR的细胞的样品,如制造样品或临床样品);

[0922] 使表达CAR的细胞与CAR配体在发生结合的条件下接触,因而检测存在的表达CAR的细胞的水平(例如,量)。可以使用标准技术如FACS、ELISA等,检测表达CAR的细胞与CAR配体的结合。

[0923] 在另一个方面,公开了一种扩充和/或活化细胞(例如,免疫效应细胞)的方法。该方法包括:

[0924] 提供表达CAR的细胞(例如,第一表达CAR的细胞或瞬时表达CAR的细胞);

[0925] 使所述表达CAR的细胞与CAR配体(例如,如本文所述的CAR配体)在其中发生免疫细胞扩充和/或增殖的条件下接触,因而产生活化和/或扩充的细胞群体。

[0926] 在某些实施方案中,CAR配体在(例如,固定至或接合至)底物(例如,非天然存在的底物)上存在。在一些实施方案中,底物是非细胞底物。非细胞底物可以是选自例如平板(例如,微量滴定板)、膜(例如,硝酸纤维素膜)、基质、芯片或珠的固相支持物。在实施方案中,CAR配体在底物中(例如,在底物表面上)存在。CAR配体可以共价或非共价地固定、连接或接合(例如,交联)至底物。在一个实施方案中,CAR配体连接(例如,共价连接至)珠。在前述实施方案中,可以在体外或离体扩充免疫细胞群体。这种方法可以还包括在CAR分子的配体存在下培养免疫细胞群体,例如,使用本文所述的任何方法培养。

[0927] 在其他实施方案中,扩充和/或活化细胞的方法还包括添加第二种刺激分子,例如,CD28。例如,CAR配体和第二种刺激分子可以固定至底物,例如,一个或多个珠,因而提供增加的细胞扩充和/或活化。

[0928] 在又一个方面,提供一种用于选择或富集表达CAR的细胞的方法。该方法包括使表达CAR的细胞与如本文所述的CAR配体接触;并且基于CAR配体的结合作用选择细胞。

[0929] 在另外的其他实施方案中,提供一种用于耗竭、减少和/或杀伤表达CAR的细胞的方法。该方法包括使表达CAR的细胞与如本文所述的CAR配体接触;并且基于CAR配体的结合作用靶向细胞,因而减少表达CAR的细胞的数目和/或杀伤表达CAR的细胞。在一个实施方案中,CAR配体偶联至毒性物质(例如,毒素或细胞消融药物)。在另一个实施方案中,抗独特型抗体可以造成效应细胞活性,例如,ADCC或ADC活性。

[0930] 可以在本文所公开的方法中使用的示例性抗CAR抗体例如在WO 2014/190273中并由Jen等人,“Chimeric Antigen Receptor (CAR) -Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials”,PLOS March 2013 8:3 e57838描述,所述文献的内容通过引用的方式并入。在一个实施方案中,抗独特型抗体分子识别抗CD19抗体分子,例如,抗CD19scFv。例如,抗独特型抗体分子可以竞争与Jena等人,PLOS March 2013 8:3 e57838中描述的CD19-特异性CAR mAb克隆第136.20.1号结合;可以具有与CD19-特异性CAR mAb克隆第136.20.1号相同的CDR(例如使用Kabat定义、Chothia定义或

Kabat定义和Chothia定义的组合时,VH CDR1、VH CDR2、CHCDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3中一者或多者(例如,全部));可以具有如CD19-特异性CAR mAb克隆第136.20.1号那样的一个或多个(例如,2个)可变区,或可以包含CD19-特异性CAR mAb克隆第136.20.1号。在一些实施方案中,根据Jena等人中描述的一种方法制备抗独特型抗体。在另一个实施方案中,抗独特型抗体分子是在W0 2014/190273中描述的抗独特型抗体分子。在一些实施方案中,抗独特型抗体分子具有与W0 2014/190273的抗体分子如136.20.1相同的CDR(例如,VH CDR1、VH CDR2、CHCDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3中一者或多者(例如,全部));可以具有W0 2014/190273的抗体分子的一个或多个(例如,2个)可变区,或可以包含W0 2014/190273的抗体分子如136.20.1。在其他实施方案中,抗CAR抗体与(例如,如W0 2014/190273中所述的)CAR分子的胞外结合结构域的恒定区结合。在一些实施方案中,抗CAR抗体与CAR分子的胞外结合结构域的恒定区(例如,重链恒定区(例如,CH2-CH3铰链区)或轻链恒定区)结合。例如,在一些实施方案中,抗CAR抗体竞争与W02014/190273中描述的2D3单克隆抗体结合,具有与2D3相同的CDR(例如,VH CDR1、VH CDR2、CHCDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3中一者或多者(例如,全部)),或具有2D3的一个或多个(例如,2个)可变区,或包含如W0 2014/190273中所述的2D3。

[0931] 在一些方面和实施方案中,本文的组合物和方法针对特定T细胞亚群而优化,例如,如2014年7月31日提交的美国系列号62/031,699中所述,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。在一些实施方案中,与对照T细胞(例如,表达相同构建体的不同类型(例如,CD8⁺或CD4⁺)的T细胞)相比,优化的T细胞亚群显示增强的持久性。

[0932] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞包含本文所述的CAR,所述CAR包含适于CD4⁺ T细胞(例如,针对其而优化,例如,在其中导致增强的持久性)的胞内信号结构域,例如,ICOS结构域。在一些实施方案中,CD8⁺ T细胞包含本文所述的CAR,所述CAR包含适于CD8⁺ T细胞(例如,针对其而优化,例如,导致其增强的持久性)的胞内信号结构域,例如,4-1BB结构域、CD28结构域或除ICOS结构域之外的另一种共刺激结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR包含本文所述的抗原结合结构域,例如,包含靶向CD33的抗原结合结构域的CAR,例如,表2的CAR或具有SEQ ID NO:140的氨基酸序列的CAR,或包含SEQ ID NO:147的氨基酸序列的抗原结合结构域。

[0933] 在一个方面,本文中描述了一种治疗受试者(例如,患有癌症的受试者)的方法。该方法包括向所述受试者施用有效量的:

[0934] 1) 包含CAR的CD4⁺ T细胞(CAR^{CD4+})

[0935] 所述CAR包含:

[0936] 抗原结合结构域,例如,本文所述的抗原结合结构域,例如,靶向CD33的抗原结合结构域,例如,表2或表9的抗原结合结构域,或包含SEQ ID NO:140或147的氨基酸序列的抗原结合结构域;

[0937] 跨膜结构域;和

[0938] 胞内信号结构域,例如,第一共刺激结构域,例如,ICOS结构域;和

[0939] 2) 包含CAR的CD8⁺ T细胞(CAR^{CD8+}),所述CAR包含:

[0940] 抗原结合结构域,例如,本文所述的抗原结合结构域,例如,靶向CD33的抗原结合结构域,例如,表2或表9的抗原结合结构域,或包含SEQ ID NO:140或147的氨基酸序列的抗

原结合结构域;

[0941] 跨膜结构域;和

[0942] 胞内信号结构域,例如,第二种共刺激结构域,例如,4-1BB结构域、CD28结构域、或除ICOS结构域之外的另一种共刺激结构域;

[0943] 其中CAR^{CD4+}和CAR^{CD8+}彼此不同。

[0944] 任选地,该方法还包括施用:

[0945] 3) 包含CAR的第二种CD8⁺T细胞(第二CAR^{CD8+}),所述CAR包含:

[0946] 抗原结合结构域,例如,本文所述的抗原结合结构域,例如,与CD33特异性结合的抗原结合结构域,例如,表2或表9的抗原结合结构域,或包含SEQ ID NO:140或147的氨基酸序列的抗原结合结构域;

[0947] 跨膜结构域;和

[0948] 胞内信号结构域,其中第二CAR^{CD8+}包含在CAR^{CD8+}上不存在的胞内信号结构域,例如,共刺激信号结构域,并且任选地,不包含ICOS信号结构域。

[0949] 治疗性应用

[0950] CD33相关疾病和/或病症

[0951] 本发明特别地提供了用于治疗与表达CD33相关的疾病或与表达CD33的细胞相关的病状,例如,包括增生性疾病如癌症或恶性肿瘤或癌前期病状如脊髓发育不良、脊髓发育不良综合征或白血病前期;或与表达CD33的细胞相关的非癌症相关适应症的组合物和方法,在一个方面,与表达CD33相关的癌症是血液学癌。在一个方面,血液学癌包括但不限于AML、脊髓发育不良综合征、ALL、慢性髓样白血病、母细胞性浆细胞样树状细胞肿瘤、骨髓增生性肿瘤等。另外,与表达CD33相关的其他疾病例如包括但不限于与表达CD33相关的非典型和/或非经典癌症、恶性肿瘤、癌前期病状或增生性疾病。也可以包括与表达CD33相关的非癌症相关适应症。

[0952] 在一个方面,本发明提供用于治疗与表达CD33相关的疾病的方法。在一个方面,本发明提供用于治疗其中部分肿瘤为CD33阴性且部分肿瘤为CD33阳性的疾病的方法。例如,本发明的CAR可用于治疗已经就与CD33表达升高相关的疾病而接受治疗的受试者,其中已经就与CD33水平升高而接受治疗的受试者显示出与CD33水平升高相关的疾病。在实施方案中,本发明的CAR可用于治疗已经就与CD33表达相关的疾病而接受治疗的受试者,其中已经接受与CD33表达相关的治疗的受试者显示出与CD33表达相关的疾病。

[0953] 在一个方面,本发明涉及一种载体,所述载体包含与启动子有效连接的CD33 CAR,用于在哺乳动物免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)中表达。在一个方面,本发明提供表达CD33 CAR的重组免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)用于治疗表达CD33的肿瘤,其中表达CD33 CAR的重组免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)称作表达CD33 CAR的细胞(例如,CD33 CART或表达CD33 CAR的NK细胞)。在一个方面,本发明表达CAR的细胞(例如,CD33 CART或表达CD33 CAR的NK细胞)能够使肿瘤细胞与本发明的至少一种在其表面上表达的CD33 CAR如此接触,从而表达CAR的细胞(例如,CD33 CART或表达CD33 CAR的NK细胞)靶向肿瘤细胞并且抑制肿瘤的生长。

[0954] 在一个方面,本发明涉及一种抑制表达CD33的肿瘤细胞生长的方法,所述方法包括使肿瘤细胞与本发明的表达CD33 CAR的细胞(例如,CD33 CART或表达CD33 CAR的NK细

胞)如此接触,从而表达CAR的细胞(例如,CD33 CAR或表达CD33 CAR的NK细胞)响应于抗原而活化并靶向癌细胞,其中抑制肿瘤的生长。

[0955] 在一个方面,本发明涉及一种治疗受试者中癌症的方法。该方法包括向受试者如此施用本发明的表达CD33 CAR的细胞(例如,CD33 CAR或表达CD33 CAR的NK细胞),从而治疗受试者中的癌症。通过本发明的表达CD33 CAR的细胞(例如,CD33 CAR或表达CD33 CAR的NK细胞)可治疗的癌症的例子是与表达CD33相关的癌症。通过本发明的表达CD33 CAR的细胞(例如,CD33 CAR或表达CD33 CAR的NK细胞)可治疗的癌症的例子包括但不限于AML、脊髓发育不良综合征、慢性髓样白血病和其他骨髓增生性肿瘤、或母细胞性浆细胞样树状细胞肿瘤等。

[0956] 本发明包括一个类型的细胞疗法,其中免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)经基因修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)并且将表达CAR的细胞(例如,CD33 CAR或表达CD33 CAR的NK细胞)输注至有需求的接受者。输注的细胞能够杀伤接受者中的肿瘤细胞。不同于抗体疗法,CAR修饰的细胞(例如,T细胞或NK细胞)能够在体内复制,产生可以导致持久肿瘤控制的长期持久性。在多个方面,在施用细胞(例如,T细胞或NK细胞)至患者后,向患者施用的细胞(例如,T细胞或NK细胞)或其后代持续存在于患者中至少4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、2年、3年、4年或5年。

[0957] 本发明还包括一个类型的细胞疗法,其中免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)经修饰(由体外转录的RNA修饰)以瞬时表达嵌合抗原受体(CAR)并且将免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)输注至有需求的接受者。输注的细胞能够杀伤接受者中的肿瘤细胞。因此,在多个方面,在施用免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)至患者后,向患者施用的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)存在少于1个月,例如,3周、2周、1周。

[0958] 不希望受任何具体理论约束,由CAR修饰的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)激发的抗肿瘤免疫应答可以是主动或被动免疫应答、或备选地可以归因于直接vs.间接免疫应答。在一个方面,CAR转导的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)显示出响应于表达CD33的人癌细胞的特异性促炎细胞因子分泌和强力溶细胞活性,抵抗可溶性CD33抑制,介导旁观者杀伤作用并介导已建立的人肿瘤消退。例如,在表达CD33的肿瘤的内部不均一视野内部抗原较少的肿瘤细胞可能易遭CD33重定向的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)的间接破坏,其中所述CD33重定向的免疫效应细胞事先已经针对毗邻的抗原阳性癌细胞反应。

[0959] 在一个方面,本发明的全人CAR修饰的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)可以在哺乳动物中用于离体免疫和/或体内治疗的一种疫苗。在一个方面,哺乳动物是人。

[0960] 对于离体免疫,在施用细胞至哺乳动物之前在体外进行至少一种以下操作:i)扩充细胞、ii)引入编码CAR的核酸至细胞或iii)冷冻保存细胞。

[0961] 离体程序是本领域熟知的并且在下文更充分地讨论。简而言之,将细胞从哺乳动物(例如,人)分离并用本文公开的表达CAR的载体进行基因修饰(即,在体外转导或转染)。可以将CAR修饰的细胞施用至哺乳动物接受者以提供治疗益处。哺乳动物接受者可以是人并且CAR修饰的细胞可以相对于接受者是自体的。备选地,细胞可以相对于接受者是同种异体、同基因的或异种的。

[0962] 离体扩充造血干细胞和祖先细胞的方法在通过引用的方式并入本文的美国专利号5,199,942中描述,可以应用于本发明的细胞。其他合适的方法是本领域已知的,因此,本发明不限于离体扩充细胞的任何具体方法。简而言之,T细胞的离体培养和扩充包括:(1)从外周血收获物或骨髓外植体采集来自哺乳动物的CD34+造血干细胞和祖先细胞;和(2)离体扩充这类细胞。除美国专利号5,199,942中描述的细胞生长因子之外,其他因子如flt3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体也可以用于细胞的培养和扩充。

[0963] 就离体免疫而言除使用基于细胞的疫苗之外,本发明还提供用于体内免疫以激发患者中针对抗原的免疫应答的组合物和方法。

[0964] 通常,如本文所述的细胞活化和扩充可以用于治疗和预防在免疫受损的个体中出现的疾病。特别地,本发明的CAR修饰的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)用于治疗与表达CD33相关的疾病、病症和病状。在某些方面,本发明的细胞用于治疗面临形成与表达CD33相关的疾病、病症和病状的风险的患者。因此,本发明提供用于治疗或预防与表达CD33相关的疾病、病症和病状的方法,所述方法包括向有需求的受试者施用治疗有效量的本发明的CAR修饰的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)。

[0965] 在一个方面,本发明表达CAR的细胞(例如,CART细胞或表达CAR的NK细胞)可以用来治疗增生性疾病如癌症或恶性肿瘤或癌前期病状如脊髓发育不良、脊髓发育不良综合征或白血病前期。在一个方面,与表达CD33相关的癌症是血液学癌、白血病前期、过度增殖性疾病、增生或异型增生,其以细胞异常生长为特征。

[0966] 在一个方面,本发明表达CAR的细胞(例如,CART细胞或表达CAR的NK细胞)用来治疗癌症,其中癌症是血液学癌。血液学癌疾病是多种类型侵袭血液、骨髓和淋巴系统的癌症如白血病和恶性淋巴细胞增生性疾病。

[0967] 在一个方面,本发明的组合物和表达CAR的细胞(例如,CART细胞或表达CAR的NK细胞)特别地可用于治疗髓样白血病、AML及其亚型、慢性髓样白血病(CML)和脊髓发育不良综合征(MDS)。

[0968] 白血病可以划分成急性白血病和慢性白血病。急性白血病可以进一步划分为急性髓细胞白血病(AML)和急性淋巴样白血病(ALL)。慢性白血病包括慢性髓性白血病(CML)和慢性淋巴样白血病(CLL)。其他相关的疾病包括脊髓发育不良综合征(MDS,以前称作“白血病前期”),其是依据髓样血细胞无效产生(或异型增生(dysplasia))而统一的血液学疾病的多样性集合,和转化成AML的风险。

[0969] 淋巴瘤是一组从淋巴细胞形成的血细胞肿瘤。示例性淋巴瘤包括非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。

[0970] 在AML中,异常分化的长寿命髓样祖先细胞的恶变和失控增殖导致高循环数目的不成熟血液形式和恶性细胞替换正常骨髓。症状包括疲乏、脸色苍白、易淤紫和出血、发热和感染;白血病浸润的症状存在于仅约5%患者中(经常作为皮肤表现)。检测外周血涂片和骨髓具有诊断意义。现有治疗包括实现缓解的诱导化疗和避免复发的缓解后化疗(伴以或不伴以干细胞移植)。

[0971] AML具有彼此通过形态、免疫表型和细胞化学区分的众多亚型。基于优势细胞类型,描述了五个类型,包括髓样型、髓样单核细胞型、单核细胞型、红细胞样型和巨核细胞型。

[0972] 缓解诱导率是50%至85%。长期无疾病生存期据报道在20%至40%患者中出现并且在用于干细胞移植治疗的较年轻患者中增加至40%至50%。

[0973] 预后因素有助于确定治疗方案和强度;通常对具有强烈不良预后特征的患者给予更强烈形式的疗法,原因是认为潜在益处证明治疗毒性增加有理。最重要的预后因素是白血病细胞核型;有利的核型包括t(15;17)、t(8;21)和inv16(p13;q22)。不利因素包括递增的年龄、先前骨髓发育不良期、继发性白血病、WBC计数高和不存在Auer小体(Auer rods)。

[0974] 初始疗法尝试诱导缓解并且与ALL差异最大,因为AML对更少的药物做出反应。基础诱导治疗方案包括阿糖胞苷连续静脉内输注或大剂量5至7天;在这个时间期间静脉给予佐柔比星或伊达比星3天。一些方案包括6-硫鸟嘌呤、依托泊苷、长春新碱和泼尼松,但是不清楚它们的贡献。治疗通常导致明显的骨髓抑制,伴随感染或出血;在骨髓恢复之前存在明显的延迟时间。在这个时间期间,细心的预防性和支持性护理至关重要。

[0975] 慢性骨髓性(或髓样)白血病(CML)也称作慢性粒细胞白血病,并且表征为一种白细胞癌。常见的CML治疗方案包括Bcr-Abl酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼(GLEEVEC®)、达沙替尼和尼洛替尼。Bcr-Abl酪氨酸激酶抑制剂特别可用于具有费城染色体易位的CML患者。

[0976] 骨髓发育异常综合征(MDS)是以杂乱和无效的造血或血液产生为特征的血液学医学疾病。因此,血液形成细胞的数目和质量不可逆地下降。一些MDS患者可能形成重度贫血,而其他患者无症状。MDS的分类方案是本领域已知的,具有指定特定血细胞类型(例如,成髓细胞、单核细胞和红细胞前体)的比率或频率的标准。MDS包括难治性贫血、难治性贫血伴环形铁粒幼红细胞(ring sideroblast)、难治性贫血伴过量母细胞、难治性贫血伴转化下的过量母细胞、慢性骨髓-单核细胞白血病(CML)。

[0977] MDS的治疗随症状的严重程度变动。针对出现重度症状的患者的激进治疗形式包括骨髓移植和采用血液制品支持(例如,输血)和造血生长因子(例如,促红细胞生成素)的支持疗法。其他药物频繁地用来治疗MDS:5-氮杂胞苷、地西他滨和来那度胺。在一些情况下,也可以施用铁螯合剂去铁胺(Desferal®)和地拉罗司(EXJADE®)。

[0978] 在另一个实施方案中,本发明表达CAR的细胞(例如,CART细胞或表达CAR的NK细胞)用来治疗伴白血病干细胞的癌症或白血病。例如,白血病干细胞是CD34⁺/CD38⁻白血病细胞。

[0979] 本发明尤其提供了用于治疗癌症的组合物和方法。在一个方面,癌症是血液学癌,包括但不限于白血病(如急性髓细胞白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴样白血病、慢性淋巴样白血病和骨髓发育不良综合征)和恶性淋巴细胞增生性疾病,包括淋巴瘤(如多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、Burkitt淋巴瘤和小细胞-滤泡淋巴瘤和大细胞-滤泡淋巴瘤)。

[0980] 在一个方面,本发明表达CAR的细胞(例如,CART细胞或表达CAR的NK细胞)可以用来治疗其他癌症和恶性肿瘤,如,但不限于,例如,急性白血病,包括但不限于例如B细胞急性淋巴样白血病("BALL")、T细胞急性淋巴样白血病("TALL")、急性淋巴样白血病(ALL);一种或多种慢性白血病,包括但不限于,例如,慢性髓性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL);额外的血液学癌或血液学疾病,包括但不限于,例如,B细胞幼淋巴细胞白血病、母细胞性浆细胞样树状细胞肿瘤、Burkitt淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡淋巴瘤、多毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡淋巴瘤、恶性淋巴细胞增生性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良和骨髓发育不良综合征、非霍奇金淋巴

瘤、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树状细胞肿瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症和作为依据髓样血细胞无效产生(或发育异常)联合的多样性血液学疾病集合的“白血病前期”等。本发明的CAR修饰的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)可以单独施用或作为药物组合物与稀释剂和/或与其他组分如IL-2或其他细胞因子或细胞群体组合施用。

[0981] 本发明还提供用于抑制表达CD33的细胞群体增殖或减少表达CD33的细胞群体的方法,所述方法包括:使包含表达CD33的细胞的细胞群体与结合至表达CD33的细胞的本发明表达CD33 CAR的细胞(例如,CD33 CAR T细胞或表达CD33 CAR的NK细胞)接触。在一个具体方面,本发明提供用于抑制表达CD33的癌细胞群体增殖或减少表达CD33的癌细胞群体的方法,所述方法包括:使包含表达CD33的癌细胞的细胞群体与结合至表达CD33的细胞的本发明表达CD33 CAR的细胞(例如,CD33 CAR T细胞或表达CD33 CAR的NK细胞)接触。在一个方面,本发明提供用于抑制表达CD33的癌细胞群体增殖或减少表达CD33的癌细胞群体的方法,所述方法包括:使包含表达CD33的癌细胞的细胞群体与结合至表达CD33的细胞的本发明表达CD33 CAR的细胞(例如,CD33 CAR T细胞或表达CD33 CAR的NK细胞)接触。在某些方面,在患有髓样白血病或与表达CD33的细胞相关的另一种癌的受试者或前述癌的动物模型中,相对于阴性对照,本发明的表达CD33 CAR的细胞(例如,CD33 CART细胞或表达CD33 CAR的NK细胞)减少细胞和/或癌细胞的量、数目、数量或百分数至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少65%、至少75%、至少85%、至少95%、或至少99%。在一个方面,受试者是人。

[0982] 本发明还提供用于预防、治疗和/或管理与表达CD33的细胞相关的疾病(例如,表达CD33的血液学癌或非典型癌)的方法,所述方法包括:向有需求的受试者施用与表达CD33的细胞结合的本发明表达CD33 CAR的细胞(例如,CD33 CART细胞或表达CD33 CAR的NK细胞)。在一个方面,受试者是人。与表达CD33的细胞相关的病症的非限制性例子包括自身免疫疾病(如狼疮)、炎症性疾病(如变态反应和哮喘)和癌症(如表达CD33的血液学癌或非典型癌)。

[0983] 本发明还提供用于预防、治疗和/或管理与表达CD33的细胞相关的疾病的方法,所述方法包括:向有需求的受试者施用与表达CD33的细胞结合的本发明表达CD33 CAR的细胞(例如,CD33 CART细胞或表达CD33 CAR的NK细胞)。在一个方面,受试者是人。

[0984] 本发明提供用于防止与表达CD33的细胞相关的癌复发的方法,所述方法包括:向有需求的受试者施用与表达CD33的细胞结合的本发明表达CD33 CAR的细胞(例如,CD33 CART细胞或表达CD33 CAR的NK细胞)。在一个方面,该方法包括与有效量的另一种治疗组合向有需求的受试者施用有效量的本文所述的表达抗CD33的细胞(例如,CD33 CART细胞或表达CD33 CAR的NK细胞),所述细胞与表达CD33的细胞结合。

[0985] 联合疗法

[0986] 本文所述的表达CAR的细胞可以与其他已知药物和疗法组合使用。如本文所用,“组合”施用意指,在受试者罹患病症期间向受试者递送两种或更多种不同治疗,例如,在受试者已经诊断患有该病症后并且在该病症已经治愈或消除或治疗已经出于其他原因而停止之前,递送两种或更多种治疗。在一些实施方案中,当开始递送第二治疗时,一种治疗的递送仍然正在进行,从而就施用而言存在重叠。这有时在本文中称作“同时”或“同步递送”。在其他实施方案中,一种治疗的递送在开始递送第二种治疗前结束。在任一种情况的一些

实施方案中,治疗因为联合施用而更有效。例如,第二治疗是更有效的,例如,在第二治疗较少时观察到等价作用,或第二治疗减少症状到更大程度,大于如果第二治疗在第一治疗不存在时施用所见的程度、或采用第一治疗时观察到类似的情况。在一些实施方案中,如此递送,从而与该病症相关的症状或其他参数的减少大于一种治疗在另一种治疗不存在下递送情况下将会观察到的减少。两种治疗药的效果可以部分相加、完全相加或超过相加。递送可以是这样的,从而当递送第二治疗药时,仍然可检测第一治疗药的效果。

[0987] 本文所述的表达CAR的细胞和至少一种额外的治疗药可以在相同的组合物中或在分立的组合物中同时施用或依次施用。对于依次施用,本文所述的表达CAR的细胞可以首先施用并且额外的药物可以接着施用,或施用顺序可以相反。

[0988] CAR疗法和/或其他治疗药、操作或模式可以在活动性疾病时间期间或在缓解或活动度更小的疾病时间期间施用。CAR疗法可以在其他治疗前、与该治疗同时、治疗后或在疾病缓解期间施用。

[0989] 当组合施用时,CAR疗法和额外的药物(例如,第二或第三药物)或前者全部可以按这样的量或剂量施用,所述量或剂量高于、低于或等于单独(例如,作为单药疗法)使用的每种药物的量或剂量。在某些实施方案中,CAR疗法、额外的药物(例如,第二或第三药物)或前者全部的施用量或剂量比单独(例如,作为单药疗法)使用的每种药物的量或剂量低(例如,低至少20%、至少30%、至少40%或至少50%)。在其他实施方案中,产生所需作用(例如,治疗癌症)的CAR治疗、额外药物(例如,第二或第三药物)或前者全部的量或剂量比实现相同治疗作用所需要的单独(例如,作为单药疗法)使用的每种药物的量或剂量低(例如,低至少20%、至少30%、至少40%或至少50%)。

[0990] 在其他方面,本文所述的表达CAR的细胞可以用在治疗方案中与手术、化疗、辐射、免疫抑制剂,如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸盐和FK506、抗体、或其他免疫清除剂如CAMPATH、抗CD3抗体或其他抗体治疗药、细胞毒素、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228、细胞因子和照射、肽疫苗(如Izumoto等人,2008J Neurosurg 108:963-971中描述的那种)组合使用。

[0991] 在某些情况下,本发明的化合物与其他治疗药如其他抗癌药、抗过敏药、抗恶心药(或镇吐药)、镇痛药、细胞保护药及其组合来组合。

[0992] 在一个实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞可以与化疗药组合使用。示例性化疗药包括蒽环类(例如,多柔比星(例如,脂质体多柔比星))、长春碱类生物碱(例如,长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨)、烷基化剂(例如,环磷酰胺、达卡巴嗪、美法仑、异环磷酰胺、替莫唑胺)、免疫细胞抗体(例如,alemtuzamab、吉妥珠单抗、利妥昔单抗、奥法木单抗(ofatumumab)、托西莫单抗(tositumomab)、贝伦妥单抗(brentuximab))、抗代谢物(包括例如叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂(例如,氟达拉滨))、mTOR抑制剂、TNFR糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)激动剂;蛋白酶体抑制剂(例如,阿克拉霉素A、胶霉毒素或硼替佐米)、免疫调节剂如沙立度胺或沙利度胺衍生物(例如,来那度胺)。

[0993] 考虑用于联合疗法的一般化疗药包括白消安(Myleran®)、白消安注射剂(Busulfex®)、克拉立滨(Leustatin®)、环磷酰胺(Cytosan®或Neosar®)、阿糖胞苷、嘧啶阿糖甙(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂质体注射剂(DepoCyt®)、盐酸佐柔比星(Cerubidine®)、枸橼酸佐柔比星脂质体注射剂

(DaunoXome®)、地塞米松、盐酸多柔比星(Adriamycin®、Rubex®)、依托泊苷(Vepesid®)、磷酸氟达拉滨(Fludara®)、羟基脲(Hydra®)、伊达比星(Idamycin®)、米托蒽醌(米托蒽醌)、吉妥珠单抗奥唑米星(Gemtuzumab ozogamicin)(mylotarg®)。

[0994] 在实施方案中,考虑用于联合疗法的一般化疗药包括阿那曲唑(Arimidex®)、比卡鲁胺(Casodex®)、硫酸博来霉素(Blenoxane®)、白消安(Myleran®)、白消安注射剂(Busulfex®)、卡培他滨(Xeloda®)、N4-戊氧羰基-5-脱氧-5-氟胞苷、卡铂(Paraplatin®)、卡莫司汀(BiCNU®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、顺铂(Platinol®)、克拉立滨(Leustatin®)、环磷酰胺(Cytoxan®或Neosar®)、阿糖胞苷、嘧啶阿糖甙(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂质体注射剂(DepoCyt®)、达卡巴嗪(DTIC-Dome®)、更生霉素(dactinomycin)(放线菌素D,Cosmegen)、盐酸佐柔比星(Cerubidine®)、柠檬酸佐柔比星脂质体注射剂(DaunoXome®)、地塞米松、多西紫杉醇(Taxotere®)、盐酸多柔比星(阿霉素®, Rubex®)、依托泊苷(Vepesid®)、磷酸氟达拉滨(Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®、Efudex®)、氟他胺(Eulexin®)、替扎他滨(tezacitibine)、吉西他滨(difluorodeoxycitidine)、羟基脲(Hydra®)、伊达比星(Idamycin®)、异环磷酰胺(IFEX®)、伊立替康(Camptosar®)、L-天冬酰胺酶(ELSPAR®)、甲酰四氢叶酸钙、美法仑(Alkeran®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、甲氨蝶呤(Folex®)、米托蒽醌(米托蒽醌)、米罗他(mylotarg)、紫杉醇(Taxol®)、phoenix(钇90/MX-DTPA)、喷司他丁、聚苯丙生20连同卡莫司汀植入物(Gliadel®)、柠檬酸他莫昔芬(Nolvadex®)、替尼泊苷(Vumon®)、6-巯鸟嘌呤、塞替派、替拉扎明(Tirazone®)、注射用盐酸拓扑替康(Hycamptin®)、长春碱(Velban®)、长春新碱(Oncovin®)和长春瑞滨(Navelbine®)。

[0995] 与本发明化合物组合的特别意义的抗癌药包括:蒽环类;烷基化剂;抗代谢物;抑制钙依赖性磷酸酶钙调神经磷酸酶或p70S6激酶FK506)或抑制p70S6激酶的药物;mTOR抑制剂;免疫调节剂;蒽环类;长春花生物碱类;蛋白酶体抑制剂;GITR激动剂;蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;CDK激酶抑制剂;BTK抑制剂;MKN激酶抑制剂;DGK激酶抑制剂;或溶瘤性病毒。

[0996] 示例性抗代谢物包括但不限于嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂):甲氨蝶呤(Rheumatrex®、Trexall®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®、Efudex®、Fluoroplex®)、氟尿苷(FUDF®)、阿糖胞苷(Cytosar-U®、Tarabine PFS)、6-巯基嘌呤(Puri-Nethol®)、6-巯鸟嘌呤(硫鸟嘌呤Tabloid®)、磷酸氟达拉滨(Fludara®)、喷司他丁(Nipent®)、培美曲塞(Alimta®)、雷替曲塞(Tomudex®)、克拉屈滨(Leustatin®)、氯法拉滨(Clofarex®、Clolar®)、阿扎胞苷(Vidaza®)、地西他滨和吉西他滨(Gemzar®)。优选的抗代谢物包括阿糖胞苷、氯法拉滨和氟达拉滨。

[0997] 示例性烷基化剂包括但不限于氮芥类、环乙亚胺衍生物类、烷基磺酸酯类、亚硝基脲类和三氮烯类):尿嘧啶氮芥(Aminouracil Mustard®、Chlorethaminacil®、Demethylodopan®、Desmethylodopan®、Haemanthamine®、Nordopan®、尿嘧啶氮芥、Uracillost®、Uracilmostaza®、Uramustin®、乌拉莫司汀®)、chlormethine(Mustargen®)、环磷酰胺(Cytoxan®、Neosar®、Clafen®、Endoxan®、Procytox®、Revimmune™)、异环磷酰胺(Mitoxana®)、美法仑(Alkeran®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、哌泊溴烷(Amedel®、Vercyte®)、三亚乙基蜜胺(Hemel®、Hexalen®、Hexastat®)、三乙烯硫代磷酰胺、替莫唑胺(Temodar®)、塞替派(Thioplex®)、白消安(Busilvex®、Myleran®)、卡莫司汀(BiCNU®)、罗莫

司汀(CeeNU®)、链佐星(Zanosar®)和达卡巴嗪(DTIC-Dome®)。额外的示例性烷基化剂包括但不限于奥沙利铂(Eloxatin®);替莫唑胺(Temodar®和Temodal®);更生霉素(dactinomycin)(也称作放线菌素-D、Cosmegen®);美法仑(也称作L-PAM、L-沙可来新和苯丙氨酸氮芥、Alkeran®);六甲蜜胺(Altretamine)(也称作六甲基三聚氰胺(HMM)、Hexalen®);卡莫司汀(BiCNU®);苯达莫司汀(Treanda®);白消安(Busulfex®和Myleran®);卡铂(Paraplatin®);罗莫司汀(也称作CCNU、CeeNU®);顺铂(也称作CDDP、Platinol®和Platinol®-AQ);苯丁酸氮芥(Leukeran®);环磷酰胺(Cytoxan®和Neosar®);达卡巴嗪(也称作DTIC、DIC和咪唑甲酰胺、DTIC-Dome®);六甲蜜胺(Altretamine)(也称作六甲基三聚氰胺(HMM)、Hexalen®);异环磷酰胺>Ifex®);Prednumustine;丙卡巴肼(Matulane®);二氯甲二乙胺(也称作氮芥、氮氯嗪和盐酸氮芥、Mustargen®);链佐星(Zanosar®);塞替派(也称作thiophosphoamide、TESPA和TSPA、Thioplex®);环磷酰胺(Endoxan®、Cytoxan®、Neosar®、Procytox®、Revimmune®);和苯达莫司汀HCl(Treanda®)。

[0998] 在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与氟达拉滨、环磷酰胺和/或利妥昔单抗组合施用至受试者。在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗(FCR)组合施用至受试者。在实施方案中,受试者患有CLL。例如,受试者第17染色体短臂中具有缺失(del(17p))(例如,在白血病细胞中)。在其他实例中,受试者没有del(17p)。在实施方案中,受试者包含在免疫球蛋白重链可变区(IgV_H)基因中包含突变的白血病细胞。在其他实施方案中,受试者不包含在免疫球蛋白重链可变区(IgV_H)基因中包含突变的白血病细胞。在实施方案中,氟达拉滨按以下剂量施用:约10-50mg/m²(例如,约10-15、15-20、20-25、25-30、30-35、35-40、40-45或45-50mg/m²),例如,静脉内施用。在实施方案中,环磷酰胺按以下剂量施用:约200-300mg/m²(例如,约200-225、225-250、250-275、或275-300mg/m²),例如,静脉内施用。在实施方案中,利妥昔单抗按以下剂量施用:约400-600mg/m²(例如,400-450、450-500、500-550或550-600mg/m²),例如,静脉内施用。

[0999] 在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与苯达莫司汀和利妥昔单抗组合施用至受试者。在实施方案中,受试者患有CLL。例如,受试者第17染色体短臂中具有缺失(del(17p))(例如,在白血病细胞中)。在其他实例中,受试者没有del(17p)。在实施方案中,受试者包含在免疫球蛋白重链可变区(IgV_H)基因中包含突变的白血病细胞。在其他实施方案中,受试者不包含在免疫球蛋白重链可变区(IgV_H)基因中包含突变的白血病细胞。在实施方案中,苯达莫司汀按以下剂量施用:约70-110mg/m²(例如,70-80、80-90、90-100或100-110mg/m²),例如,静脉内施用。在实施方案中,利妥昔单抗按以下剂量施用:约400-600mg/m²(例如,400-450、450-500、500-550或550-600mg/m²),例如,静脉内施用。

[1000] 在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与利妥昔单抗、环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和/或皮质类固醇(例如,泼尼松)组合施用至受试者。在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与利妥昔单抗、环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松(R-CHOP)组合施用至受试者。在实施方案中,受试者患有弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在实施方案中,受试者具有非大型局限阶段DLBCL(例如,包括患有小于7cm大小/直径的肿瘤)。在实施方案中,受试者用与R-CHOP组合的照射治疗。例如,向受试者施用R-CHOP(例如,1-6个周期,例如,1、2、3、4、5或6个周期的R-CHOP),随后照射。在一些情况下,在照射后向受试者施用R-

CHOP (例如, 1-6个周期, 例如, 1、2、3、4、5或6个周期的R-CHOP)。

[1001] 在实施方案中, 将本文所述的表达CAR的细胞与依托泊苷、泼尼松、长春新碱、环磷酰胺、多柔比星和/或利妥昔单抗组合施用至受试者。在实施方案中, 将本文所述的表达CAR的细胞与依托泊苷、泼尼松、长春新碱、环磷酰胺、多柔比星和利妥昔单抗 (EPOCH-R) 组合施用至受试者。在实施方案中, 将本文所述的表达CAR的细胞与调整剂量的EPOCH-R (DA-EPOCH-R) 组合施用至受试者。在实施方案中, 受试者患有B细胞淋巴瘤, 例如, Myc-重排的侵袭性B细胞淋巴瘤。

[1002] 在实施方案中, 将本文所述的表达CAR的细胞与利妥昔单抗和/或来那度胺组合施用至受试者。来那度胺 ((RS)-3-(4-氨基-1-氧代1,3-二氢-2H-异吲哚-2-基) 哌啶-2,6-二酮) 是免疫调节剂。在实施方案中, 将本文所述的表达CAR的细胞与利妥昔单抗和来那度胺组合施用至受试者。在实施方案中, 受试者患有滤泡淋巴瘤 (FL) 或套细胞淋巴瘤 (MCL)。在实施方案中, 受试者患有FL并且先前尚未用癌疗法治疗过。在实施方案中, 来那度胺按以下剂量施用: 约10-20mg (例如, 10-15或15-20mg), 例如, 每日一次。在实施方案中, 利妥昔单抗按以下剂量施用: 约350-550mg/m² (例如, 350-375、375-400、400-425、425-450、450-475、或475-500mg/m²), 例如, 静脉内施用。

[1003] 示例性mTOR抑制剂例如包括坦罗莫司; 地磷莫司 (正式地称作deferolimus, (1R, 2R, 4S)-4-[(2R)-2-[(1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28Z, 30S, 32S, 35R)-1,18-二羟-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-五氧代-11,36-二氧杂-4-氮杂三环并[30.3.1.0^{4,9}]三十七碳-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧环己基二甲基次膦酸酯, 也称作AP23573和MK8669, 并且在PCT公开号WO 03/064383中描述); 依维莫司 (Afinitor® 或RAD001); 雷帕霉素 (AY22989, Sirolimus®); Simapimod (CAS164301-51-3); emsirolimus, (5-{2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧苯基) 甲醇 (AZD8055); 2-氨基-8-[反-4-(2-羟乙氧基) 环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮 (PF04691502, CAS1013101-36-4); 和N²-[1,4-二氧待-[4-(4-氧代-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2基) 吗啉鎓-4-基]甲氧基]丁基]-L-精氨酸甘氨酸-L-α-天冬氨酸-L-丝氨酸 (SEQ ID NO:378), 内盐 (SF1126, CAS936487-67-1) 和XL765。

[1004] 示例性免疫调节剂例如包括阿夫土珠单抗 (afutuzumab) (从Roche®可获得); PEG化非格司亭 (Neulasta®); 来那度胺 (CC-5013、雷利米得 (Revlimid®); 沙立度胺 (Thalomid®)、actimid (CC4047); 和IRX-2 (包含白介素1、白介素2和干扰素γ的人细胞因子的混合物, CAS951209-71-5, 从IRX Therapeutics可获得)。

[1005] 示例性蒽环类例如包括多柔比星 (阿霉素和Rubex®); 博来霉素 (lenoxane®); 佐柔比星 (盐酸佐柔比星、柔红霉素和盐酸红比霉素 (rubidomycin)、Cerubidine®); 脂质体佐柔比星 (柠檬酸佐柔比星脂质体、DaunoXome®); 米托蒽醌 (DHAD、Novantrone®); 表柔比星 (Ellence™); 伊达比星 (Idamycin®、Idamycin PFS®); 丝裂霉素C (Mutamycin®); 格尔德霉素; 除莠霉素; 近灰霉素 (ravidomycin); 和去乙酰近灰霉素 (desacetyl ravidomycin)。

[1006] 示例性长春碱类生物碱例如包括酒石酸长春瑞滨 (Navelbine®)、长春新碱 (Oncovin®) 和长春地辛 (Eldisine®); 长春碱 (也称作硫酸长春碱、长春花碱和VLB、Alkaban-AQ® 和Velban®); 和长春瑞滨 (Navelbine®)。

[1007] 示例性蛋白酶体抑制剂包括硼替佐米(Velcade®);卡非佐米(PX-171-007、(S)-4-甲基-N-((S)-1-(((S)-4-甲基-1-((R)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-1-氧代戊-2-基)氨基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基)-2-((S)-2-(2-吗啉代)-4-苯基丁酰氨基)-戊酰胺);marizomib(NPI-0052);枸橼酸艾沙佐米(ixazomib citrate)(MLN-9708);delanzomib(CEP-18770);和0-甲基-N-[(2-甲基-5-噻唑基)羰基]-L-丝氨酰-0-甲基-N-[(1S)-2-[(2R)-2-甲基-2-环氧乙烷基]-2-氧代-1-(苯基甲基)乙基]-L-丝氨酰胺(ONX-0912)。

[1008] 在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与贝伦妥单抗(brentuximab)组合施用至受试者。贝伦妥单抗是抗CD30抗体和单甲基澳瑞司他汀E的抗体-药物缀合物。在实施方案中,受试者患有霍奇金淋巴瘤(HL),例如,复发性或难治性HL。在实施方案中,受试者包含CD30+HL。在实施方案中,受试者已经接受过自体干细胞移植(ASCT)。在实施方案中,受试者尚未接受ASCT。在实施方案中,贝伦妥单抗按以下剂量施用:约1-3mg/kg(例如,约1-1.5、1.5-2、2-2.5、或2.5-3mg/kg),例如,静脉内施用,例如,每3周施用一次。

[1009] 在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与贝伦妥单抗和达卡巴嗪组合或与贝伦妥单抗和苯达莫司汀组合施用至受试者。达卡巴嗪是化学名称为5-(3,3-二甲基-1-三氮烯基)咪唑-4-甲酰胺的烷基化剂。苯达莫司汀是化学名称为4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基苯并咪唑-2-基]丁酸的烷基化剂。在实施方案中,受试者患有霍奇金淋巴瘤(HL)。在实施方案中,受试者先前尚未用癌疗法治疗过。在实施方案中,受试者是至少60岁,例如,60、65、70、75、80、85岁或更老。在实施方案中,达卡巴嗪按以下剂量施用:约300-450mg/m²(例如,约300-325、325-350、350-375、375-400、400-425或425-450mg/m²),例如,静脉内施用。在实施方案中,苯达莫司汀按以下剂量施用:约75-125mg/m²(例如,75-100或100-125mg/m²,例如,约90mg/m²),例如,静脉内施用。在实施方案中,贝伦妥单抗按以下剂量施用:约1-3mg/kg(例如,约1-1.5、1.5-2、2-2.5、或2.5-3mg/kg),例如,静脉内施用,例如,每3周施用一次。

[1010] 在一些实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与CD20抑制剂,例如,抗CD20抗体(例如,抗CD20特异性抗体或双特异性抗体)或其片段组合施用至受试者。示例性抗CD20抗体包括但不限于利妥昔单抗、奥法木单抗、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、维妥珠单抗、obinutuzumab、TRU-015(Trubion Pharmaceuticals)、ocaratumumab和Pro131921(Genentech)。参见,例如,Lim等人,Haematologica.95.1(2010):135-43。

[1011] 在一些实施方案中,抗CD20抗体包含利妥昔单抗。利妥昔单抗是与CD20结合和造成CD20表达细胞的细胞裂解的嵌合小鼠/人单克隆抗体IgG1 κ ,例如,如www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s53111b1.pdf中所述。在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与利妥昔单抗组合施用至受试者。在实施方案中,受试者患有CLL或SLL。

[1012] 在一些实施方案中,将利妥昔单抗静脉内施用,例如,作为静脉内输注施用。例如,每次输注提供约500-2000mg(例如,约500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800、800-850、850-900、900-950、950-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1300、1300-1400、1400-1500、1500-1600、1600-1700、1700-1800、1800-1900、或1900-2000mg)利妥昔单抗。在一些实施方案中,利妥昔单抗按以下剂量施用:150mg/m²至750mg/m²,例如,约150-175mg/m²、175-200mg/m²、200-225mg/m²、225-250mg/m²、250-300mg/m²、300-325mg/m²、325-350mg/m²、

m^2 、350-375mg/ m^2 、375-400mg/ m^2 、400-425mg/ m^2 、425-450mg/ m^2 、450-475mg/ m^2 、475-500mg/ m^2 、500-525mg/ m^2 、525-550mg/ m^2 、550-575mg/ m^2 、575-600mg/ m^2 、600-625mg/ m^2 、625-650mg/ m^2 、650-675mg/ m^2 或675-700mg/ m^2 ，其中 m^2 表示受试者的体表面积。在一些实施方案中，利妥昔单抗按至少4天（例如，4、7、14、21、28、35天或更长）的给药间隔施用。例如，利妥昔单抗按至少0.5周（例如，0.5、1、2、3、4、5、6、7、8周或更长）的给药间隔施用。在一些实施方案中，利妥昔单抗按本文所述的剂量和给药间隔施用一段时间，例如，至少2周，例如，至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20周或更长时间。例如，利妥昔单抗按本文所述的剂量和给药间隔施用每个治疗周期总计至少4个剂量（例如，每个治疗周期至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16个或更多个剂量）。

[1013] 在一些实施方案中，抗CD20抗体包含奥法木单抗。奥法木单抗是分子量大约149kDa的抗CD20IgG1 κ 人单克隆抗体。例如，奥法木单抗使用转基因小鼠和杂交瘤技术生成并且从重组鼠细胞系(NS0)表达及纯化。参见，例如，www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/1253261b1.pdf；和临床试验识别号NCT01363128、NCT01515176、NCT01626352和NCT01397591。在实施方案中，将本文所述的表达CAR的细胞与奥法木单抗组合施用至受试者。在实施方案中，受试者患有CLL或SLL。

[1014] 在一些实施方案中，将奥法木单抗作为静脉内输注施用。例如，每次输注提供约150-3000mg（例如，约150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800、800-850、850-900、900-950、950-1000、1000-1200、1200-1400、1400-1600、1600-1800、1800-2000、2000-2200、2200-2400、2400-2600、2600-2800或2800-3000mg）奥法木单抗。在实施方案中，奥法木单抗按起始剂量约300mg、随后2000mg施用，例如，施用约11个剂量，例如，施用24周。在一些实施方案中，奥法木单抗按至少4天（例如，4、7、14、21、28、35天或更长）的给药间隔施用。例如，奥法木单抗按以下给药间隔施用：至少1周，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、26、28、20、22、24、26、28、30周或更长时间。在一些实施方案中，奥法木单抗按本文所述的剂量和给药间隔施用一段时间，例如，至少1周，例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、40、50、60周或更长时间，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月或更长时间，或1、2、3、4、5年或更长时间。例如，奥法木单抗按本文所述的剂量和给药间隔施用每个治疗周期总计至少2个剂量（例如，每个治疗周期至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20个或更多个剂量）。

[1015] 在一些情况下，抗CD20抗体包含奥瑞珠单抗。奥瑞珠单抗是人源化抗CD20单克隆抗体，例如，如临床试验识别号NCT00077870、NCT01412333、NCT00779220、NCT00673920、NCT01194570和Kappos等人，*Lancet*. 19. 378 (2011) : 1779-87中所述。

[1016] 在一些情况下，抗CD20抗体包含维妥珠单抗。维妥珠单抗是针对CD20的人源化单克隆抗体。参见，例如，临床试验识别号NCT00547066、NCT00546793、NCT01101581和Goldenberg等人，*Leuk Lymphoma*. 51 (5) (2010) : 747-55。

[1017] 在一些情况下，抗CD20抗体包含GA101。GA101（也称作obinutuzumab或R05072759）是人源化和糖工程化的抗CD20单克隆抗体。参见，例如，Robak. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 10. 6 (2009) : 588-96 : 588-96；临床试验识别号：NCT01995669、NCT01889797、NCT02229422和NCT01414205；和www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/

125486s0001b1.pdf。

[1018] 在一些情况下,抗CD20抗体包含AME-133v。AME-133v(也称作LY2469298或ocaratumzumab)是针对的CD20的人源化IgG1单克隆抗体,与利妥昔单抗相比,所述单克隆抗体具有增加的Fc γ RIIIa受体亲和力和增强的抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)活性。参见,例如,Robak等人,BioDrugs 25.1(2011):13-25;和Forero-Torres等人,Clin Cancer Res.18.5(2012):1395-403。

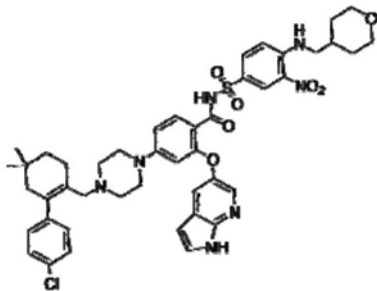
[1019] 在一些情况下,抗CD20抗体包含PR0131921。PR0131921是与利妥昔单抗相比,经工程化以具有更好的Fc γ RIIIa结合作用和增强的ADCC的人源化抗CD20单克隆抗体。参见,例如,Robak等人,BioDrugs25.1(2011):13-25;和Casulo等人,Clin Immunol.154.1(2014):37-46;和临床试验识别号NCT00452127。

[1020] 在一些情况下,抗CD20抗体包含TRU-015。TRU-015是从针对CD20的抗体的结构域衍生的抗CD20融合蛋白。TRU-015比单克隆抗体小,但是保留Fc介导的效应子功能。参见,例如,Robak等人,BioDrugs25.1(2011):13-25。TRU-015含有与人IgG1铰链连接的抗CD20单链可变片段(scFv)、CH2和CH3结构域,但是缺少CH1结构域和CL结构域。

[1021] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD20抗体缀合于或结合至治疗药,例如,本文所述的化疗药(例如,环磷氮芥、氟达拉滨、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、去甲基化剂、肽疫苗、抗肿瘤抗生素、酪氨酸激酶抑制剂、烷基化剂、抗微管或抗有丝分裂剂)、抗过敏药、抗恶心药(或镇吐药)、止疼药或细胞保护药。

[1022] 在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与B细胞淋巴瘤2(BCL-2)抑制剂(例如,venetoclax,也称作ABT-199或GDC-0199)和/或利妥昔单抗组合施用至受试者。在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与venetoclax和利妥昔单抗组合施用至受试者。Venetoclax是抑制抗凋亡蛋白BCL-2的小分子。下文显示venetoclax(4-(4-{[2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯-1-基]甲基}哌嗪-1-基)-N-({3-硝基-4-[(四氢-2H-吡喃-4-基甲基)氨基]苯基}磺酰基)-2-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-5-基氧)苯甲酰胺)的结构。

[1023]



[1024] 在实施方案中,受试者患有CLL。在实施方案中,受试者患有复发性CLL,例如,先前已经向受试者施用癌疗法。在实施方案中,venetoclax按以下剂量施用:约15-600mg(例如,15-20、20-50、50-75、75-100、100-200、200-300、300-400、400-500或500-600mg),例如,每日一次施用。在实施方案中,利妥昔单抗按以下剂量施用:约350-550mg/m²(例如,350-375、375-400、400-425、425-450、450-475、或475-500mg/m²),例如,静脉内施用,例如,每月一次施用。

[1025] 在一些实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与溶瘤性病毒组合施用。在实施方案中,溶瘤性病毒能够在癌细胞中选择性复制并且触发癌细胞死亡或延缓其生长。在一些情况下,溶瘤性病毒对非癌细胞无影响或影响最小。溶瘤性病毒包括但不限于溶瘤性腺

病毒、溶瘤性单纯疱疹病毒、溶瘤性逆转录病毒、溶瘤性细小病毒、溶瘤性痘苗病毒、溶瘤性辛德比斯病毒、溶瘤性流感病毒、或溶瘤性RNA病毒(例如,溶瘤性呼肠孤病毒、溶瘤性新城疫病毒(NDV),溶瘤性麻疹病毒或溶瘤性水泡性口炎病毒(VSV))。

[1026] 在一些实施方案中,溶瘤性病毒是US2010/0178684A1中描述的病毒,例如,重组溶瘤性病毒,所述文献通过引用的方式完整并入本文。在一些实施方案中,重组溶瘤性病毒包含编码免疫应答或炎症反应的抑制剂的核酸序列(例如,异源核酸序列),例如,如US2010/0178684A1中所述,所述文献通过引用的方式完整并入本文。在实施方案中,重组溶瘤性病毒,例如,溶瘤性NDV,包含促凋亡蛋白(例如,凋亡素)、细胞因子(例如,GM-CSF、干扰素- γ 、白介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α)、免疫球蛋白(例如,针对ED-B纤连蛋白的抗体)、肿瘤相关抗原、双特异性衔接头蛋白(例如,针对NDV HN蛋白和T细胞共刺激受体如CD3或CD28的双特异性抗体或抗体片段;或人IL-2和针对NDV HN蛋白的单链抗体之间的融合蛋白)。参见,例如,Zamarin等人,Future Microbiol. 7.3(2012):347-67,所述文献通过引用的方式完整并入本文。在一些实施方案中,溶瘤性病毒是US 8591881 B2、US 2012/0122185 A1或US 2014/0271677 A1中描述的嵌合溶瘤性NDV,所述文献各自通过引用的方式完整地并入本文。

[1027] 在一些实施方案中,溶瘤性病毒包含条件复制型腺病毒(CRA),其设计成完全在癌细胞中复制。参见,例如,Alemanly等人,Nature Biotechnol. 18(2000):723-27。在一些实施方案中,溶瘤性腺病毒包含在Alemany等人的第725页上的表1中描述的那种,所述文献通过引用的方式完整并入本文。

[1028] 示例性溶瘤性病毒包括但不限于以下病毒:

[1029] 组B溶瘤性腺病毒(ColoAd1)(PsiOxus Therapeutics Ltd.)(参见,例如,临床试验识别号:NCT02053220);

[1030] ONCOS-102(以前称为CGTG-102),其是包含粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的腺病毒(Oncos Therapeutics)(参见,例如,临床试验识别号:NCT01598129);

[1031] VCN-01,其是编码人PH20透明质酸酶的基因修饰型溶瘤性人腺病毒(VCN Biosciences,S.L.)(参见,例如,临床试验识别号:NCT02045602和NCT02045589);

[1032] 条件复制型腺病毒ICOVIR-5,其是从野生型人腺病毒血清型5(Had5)衍生病毒,已经被修饰成在癌细胞中选择性复制,具有失调的视网膜母细胞瘤/E2F途径(Institut Català d'Oncologia)(参见,例如,临床试验识别号:NCT01864759);

[1033] Celyvir,其包含经溶瘤性腺病毒ICOVIR5感染的骨髓衍生的自体间充质干细胞(MSC)(Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain/Ramon Alemany)(参见,例如,临床试验识别号:NCT01844661);

[1034] CG0070,其是条件复制型溶瘤性血清型5腺病毒(Ad5),其中人E2F-1启动子驱动必需E1 α 病毒基因的表达,因而限制病毒复制和对Rb途径-缺陷肿瘤细胞的细胞毒性(Cold Genesys, Inc.)(参见,例如,临床试验识别号:NCT02143804);或

[1035] DNX-2401(以前称为 Δ -24-RGD),其是这样的腺病毒,所述腺病毒已经过工程化以在视网膜母细胞瘤(Rb)途径缺陷性细胞中选择性复制并更高效地感染表达某些RGD结合性整联蛋白的细胞(Clinica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/DNAtrix, Inc.)(参见,例如,临床试验识别号:NCT01956734)。

[1036] 在一些实施方案中,将本文所述的溶瘤性病毒通过注射,例如皮下、动脉内、静脉内、肌内、鞘内或腹膜内注射施用。在实施方案中,将本文所述的溶瘤性病毒按瘤内、经皮、经粘膜、口服、鼻内方式或通过肺施用法施用。

[1037] 在一个实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与减少Treg细胞群体的分子组合施用至受试者。减少Treg细胞数目(例如,耗竭Treg细胞)的方法是本领域已知的并且包括例如CD25耗竭法、施用环磷酰胺、调节GITR功能。不希望受理论约束,认为在单采血液成分术之前或在施用本文所述的表达CAR的细胞之前,减少受试者中Treg细胞的数目减少了肿瘤微环境中不想要的免疫细胞(例如,Treg)的数目并降低受试者的复发风险。在一个实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与靶向GITR和/或调节GITR功能的分子组合施用至受试者,其中所述靶向GITR和/或调节GITR功能的分子是例如GITR激动剂和/或耗竭调节性T细胞(Treg)的GITR抗体。在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与环磷酰胺组合施用至受试者。在一个实施方案中,将GITR结合分子和/或调节GITR功能的分子(例如,GITR激动剂和/或耗竭Treg的GITR抗体)在施用表达CAR的细胞之前施用。例如,在一个实施方案中,GITR激动剂可以在细胞的单采血液成分术之前施用。在实施方案中,将环磷酰胺在施用(例如,输注或回输)表达CAR的细胞之前或在细胞的单采血液成分术之前施用至受试者。在实施方案中,将环磷酰胺和抗GITR抗体在施用(例如,输注或回输)表达CAR的细胞之前或在细胞的单采血液成分术之前施用至受试者。在一个实施方案中,受试者患有癌症(例如,实体癌或血液学癌如ALL或CLL)。在一个实施方案中,受试者患有CLL。在实施方案中,受试者患有ALL。在实施方案中,受试者患有实体癌,例如,本文所述的实体癌。示例性GITR激动物例如包括GITR融合蛋白和抗GITR抗体(例如,双价抗GITR抗体),如,例如,以下文献中描述的GITR融合蛋白;美国专利号6,111,090、欧洲专利号090505B1、美国专利号8,586,023、PCT公开号WO 2010/003118和2011/090754,或例如以下文献中描述的抗GITR抗体:美国专利号7,025,962、欧洲专利号1947183B1、美国专利号7,812,135、美国专利号8,388,967、美国专利号8,591,886、欧洲专利号EP 1866339、PCT公开号WO 2011/028683、PCT公开号WO 2013/039954、PCT公开号WO 2005/007190、PCT公开号WO 2007/133822、PCT公开号WO 2005/055808、PCT公开号WO 99/40196、PCT公开号WO 2001/03720、PCT公开号WO 99/20758、PCT公开号WO 2006/083289、PCT公开号WO 2005/115451、美国专利号7,618,632和PCT公开号WO 2011/051726。

[1038] 在一个实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞与mTOR抑制剂(例如,本文所述的mTOR抑制剂,例如,rapalog如依维莫司)组合施用至受试者。在一个实施方案中,将mTOR抑制剂在表达CAR的细胞之前施用。例如,在一个实施方案中,mTOR抑制剂可以在细胞的单采血液成分术之前施用。

[1039] 在一个实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与GITR激动剂(例如,本文所述的GITR激动剂)组合施用至受试者。在一个实施方案中,将GITR激动剂在表达CAR的细胞之前施用。例如,在一个实施方案中,GITR激动剂可以在细胞的单采血液成分术之前施用。

[1040] 在一个实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂(例如,本文所述的蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂)组合施用至受试者。在一个实施方案中,蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂是SHP-1抑制剂,例如,本文所述的SHP-1抑制剂,如,例如,葡萄糖酸铈盐。在一个实施方案中,蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂是SHP-2抑制剂。

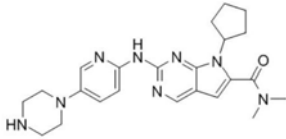
[1041] 在一个实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞可以与激酶抑制剂组合使用。在一个实施方案中,激酶抑制剂是CDK4抑制剂(例如,本文所述的CDK4抑制剂,例如,CD4/6抑制剂,如,例如,6-乙酰基-8-环戊基-5-甲基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-酮盐酸盐(也称作帕布昔利布或PD0332991)。在一个实施方案中,激酶抑制剂是BTK抑制剂,例如,本文所述的BTK抑制剂,如,例如,依鲁替尼。在一个实施方案中,激酶抑制剂是mTOR抑制剂,例如,本文所述的mTOR抑制剂,如,例如,雷帕霉素、雷帕霉素类似物、OSI-027。mTOR抑制剂可以例如是mTORC1抑制剂和/或mTORC2抑制剂,例如,本文所述的mTORC1抑制剂和/或mTORC2抑制剂。在一个实施方案中,激酶抑制剂是MNK抑制剂,例如,本文所述的MNK抑制剂,如,例如,4-氨基-5-(4-氟苯胺基)-吡啶并[3,4-d]嘧啶。MNK抑制剂可以例如是MNK1a、MNK1b、MNK2a和/或MNK2b抑制剂。在一个实施方案中,激酶抑制剂是本文所述的双联PI3K/mTOR抑制剂,如,例如,PF-04695102。在一个实施方案中,激酶抑制剂是DGK抑制剂,例如,本文所述的DGK抑制剂,如,例如,DGKinh1 (D5919) 或DGKinh2 (D5794)。

[1042] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是选自以下的CDK4抑制剂:aloesine A;夫拉平度(flavopiridol)或HMR-1275、2-(2-氯苯基)-5,7-二羟基-8-[(3S,4R)-3-羟-1-甲基-4-哌啶基]-4-色烯酮;克里唑替尼(PF-02341066);2-(2-氯苯基)-5,7-二羟基-8-[(2R,3S)-2-(羟甲基)-1-甲基-3-吡咯烷基]-4H-1-苯并吡喃-4-酮,盐酸盐(P276-00);1-甲基-5-[[2-[5-(三氟甲基)-1H-咪唑-2-基]-4-吡啶基]氧]-N-[4-(三氟甲基)苯基]-1H-苯并咪唑-2-胺(RAF265);indisulam(E7070);roscovitine(CYC202);palbociclib(PD0332991);dinaciclib(SCH727965);N-[5-[[5-(叔丁基咪唑-2-基)甲基]硫代]噻唑-2-基]哌啶-4-甲酰胺(BMS387032);4-[[9-氯-7-(2,6-二氟苯基)-5H-嘧啶并[5,4-d][2]苯并吡啶-2-基]氨基]-苯甲酸(MLN8054);5-[3-(4,6-二氟-1H-苯并咪唑-2-基)-1H-吡啶-5-基]-N-乙基-4-甲基-3-吡啶甲胺(AG-024322);4-(2,6-二氯苯甲酰氨基)-1H-吡啶-3-羧酸N-(哌啶-4-基)酰胺(AT7519);4-[2-甲基-1-(1-甲基乙基)-1H-咪唑-5-基]-N-[4-(甲磺酰基)苯基]-2-嘧啶胺(AZD5438)和XL281(BMS908662)。

[1043] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是CDK4抑制剂,例如,帕布昔利布(palbociclib)(PD0332991),并且帕布昔利布以约50mg、60mg、70mg、75mg、80mg、90mg、100mg、105mg、110mg、115mg、120mg、125mg、130mg、135mg(例如,75mg、100mg或125mg)的剂量每日施用一段时间,例如,每日施用持续28天周期的14-21天,或每日施用持续21天周期的7-12天。在一个实施方案中,施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个周期的帕布昔利布。

[1044] 在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4或6抑制剂(例如,本文所述的CDK4抑制剂或CDK6抑制剂)组合施用至受试者。在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与CDK4/6抑制剂(例如,靶向CDK4和CDK6二者的抑制剂)(例如,本文所述的CDK4/6抑制剂)组合施用至受试者。在一个实施方案中,受试者患有MCL。MCL是对目前可用疗法响应不良(即,基本上不可治愈)的侵袭性癌症。在许多MCL病例中,细胞周期蛋白D1(CDK4/6的调节蛋白)在MCL细胞中表达(例如,归因于涉及免疫球蛋白基因和细胞周期蛋白D1基因的染色体易位)。因此,在不受理论约束的情况下,认为MCL细胞对CDK4/6抑制作用高度敏感,特异性高(即,对正常免疫细胞的影响最小)。CDK4/6抑制剂单独具有治疗MCL的一些功效,但是仅实现部分缓解,复发率高。示例性CDK4/6抑制剂是下文显示其结构的LEE011(也称作ribociclib)。

[1045]

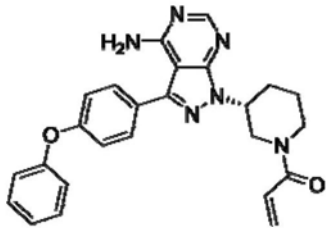


[1046] 不受理论约束,认为联合CDK4/6抑制剂(例如,本文所述的LEE011或其他CDK4/6抑制剂)施用本文所述的表达CAR的细胞可以实现更高的反应性,例如,与仅施用CDK4/6抑制剂相比,例如,缓解率更高和/或复发率更低。

[1047] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是选自以下的BTK抑制剂:依鲁替尼(PCI-32765);GDC-0834;RN-486;CGI-560;CGI-1764;HM-71224;CC-292;ONO-4059;CNX-774;和LFM-A13。在一个优选实施方案中,BTK抑制剂不减少或不抑制白介素-2诱导型激酶(ITK)的激酶活性,并且选自GDC-0834;RN-486;CGI-560;CGI-1764;HM-71224;CC-292;ONO-4059;CNX-774;和LFM-A13。

[1048] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是BTK抑制剂,例如,依鲁替尼(PCI-32765)。在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与BTK抑制剂(例如,依鲁替尼)组合施用至受试者。在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与依鲁替尼(也称作PCI-32765)组合施用至受试者。下文显示依鲁替尼(1-[(3R)-3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]丙-2-烯-1-酮)的结构。

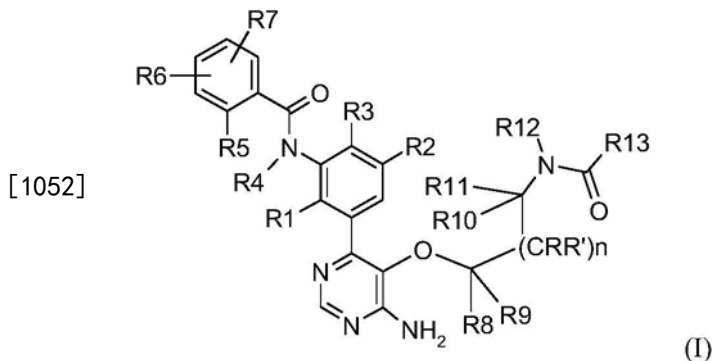
[1049]



[1050] 在实施方案中,受试者患有CLL、套细胞淋巴瘤(MCL)或小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)。例如,受试者第17染色体短臂中具有缺失(del(17p)) (例如,在白血病细胞中)。在其他实例中,受试者没有del(17p)。在实施方案中,受试者患有复发的CLL或SLL,例如,先前已经向受试者施用过一种癌疗法(例如,先前施用过一次、两次、三次或四次既往癌疗法)。在实施方案中,受试者患有难治性CLL或SLL。在其他实施方案中,受试者患有滤泡淋巴瘤,例如,复发性或难治性滤泡淋巴瘤。在实施方案中,依鲁替尼按以下剂量施用:约300-600mg/天(例如,约300-350、350-400、400-450、450-500、500-550或550-600mg/天,例如,约420mg/天或约560mg/天),例如,口服施用。在实施方案中,依鲁替尼以约250mg、300mg、350mg、400mg、420mg、440mg、460mg、480mg、500mg、520mg、540mg、560mg、580mg、600mg(例如,250mg、420mg或560mg)的剂量每日施用一段时间,例如,每日施用持续21天周期,或每日施用持续28天周期。在一个实施方案中,施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个周期的依鲁替尼。在一些实施方案中,依鲁替尼与利妥昔单抗组合施用。参见,例如,Burger等人,(2013) Ibrutinib In Combination With Rituximab(iR) Is Well Tolerated and Induces a High Rate Of Durable Remissions In Patients With High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL):New,Updated Results Of a Phase II Trial In 40 Patients,摘要675,在第55届ASH Annual Meeting and Exposition,New Orleans,LA 7-10 Dec提供。不受理论约束,认为添加依鲁替尼增强了T细胞增殖性反应并且可以将T细胞从辅助T-2(Th2)表型转变成辅助T-1(Th1)表型。Th1和Th2是辅助T细胞表型,其中Th1与Th2

指导不同的免疫应答途径。Th1表型与促炎反应相关，例如，用于杀伤细胞，如胞内病原体/病毒或癌细胞，或使自身免疫反应永续。Th2表型与嗜酸性粒细胞积累和抗炎反应相关。

[1051] 在本文方法、用途和组合物的一些实施方案中，BTK抑制剂是国际申请W0/2015/079417中描述的BTK抑制剂，所述文献通过引用的方式完整并入本文。例如，在一些实施方案中，BTK抑制剂是一种式(I)化合物或其可药用盐；



[1053] 其中，

[1054] R1是氢、任选地被羟基取代的C1-C6烷基；

[1055] R2是氢或卤素；

[1056] R3是氢或卤素；

[1057] R4是氢；

[1058] R5是氢或卤素；

[1059] 或R4和R5彼此连接并代表键、-CH₂-、-CH₂-CH₂-、-CH=CH-、-CH=CH-CH₂-；-CH₂-CH=CH-；或-CH₂-CH₂-CH₂-；

[1060] R6和R7彼此独立地代表H、任选地被羟基取代的C1-C6烷基、任选地被卤素或羟基取代的C3-C6环烷基或卤素；

[1061] R8、R9、R、R'，R10和R11彼此独立地代表H或任选地被C1-C6烷氧基取代的C1-C6烷基；或R8、R9、R、R'、R10和R11的任意两者连同与它们结合的碳原子可以形成3-6元饱和碳环；

[1062] R12是氢或任选地被卤素或C1-C6烷氧基取代的C1-C6烷基；

[1063] 或R12和以下任一者：R8、R9、R、R'、R10或R11连同与它们结合的原子可以形成4、5、6或7元氮杂环，所述环可以任选地被卤素、氰基、羟基、C1-C6烷基或C1-C6烷氧基取代；

[1064] n是0或1；并且

[1065] R13是任选地被C1-C6烷基、C1-C6烷氧基或N,N-二-C1-C6烷基氨基取代的C2-C6链烯基；任选地被C1-C6烷基或C1-C6烷氧基取代的C2-C6炔基；或任选地被C1-C6烷基取代的氧化C2-C6烯(C2-C6 alkylene oxide)。

[1066] 在一些实施方案中，式I的BTK抑制剂选自：N-(3-(5-((1-丙烯酰氧吡啶-3-基)氧)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺；((E)-N-(3-(6-氨基-5-((1-(丁-2-烯酰)吡啶-3-基)氧)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺；N-(3-(6-氨基-5-((1-丙炔酰吡啶-3-基)氧)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺；N-(3-(6-氨基-5-((1-(丁-2-炔酰吡啶-3-基)氧)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺；N-(3-(5-((1-丙烯酰氧哌啶-4-基)氧)-6-氨基

基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-甲基丙烯酰氨基)乙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(E)-N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-甲基丁-2-烯氨基)乙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-甲基丙炔氨基)乙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(E)-N-(3-(6-氨基-5-(2-(4-甲氧基-N-甲基丁-2-烯氨基)乙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-甲基丁-2-炔氨基)乙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(2-((4-氨基-6-(3-(4-环丙基-2-氟苯甲酰胺)-5-氟-2-甲基苯基)嘧啶-5-基)氧)乙基)-N-甲基环氧乙烷-2-甲酰胺;N-(2-((4-氨基-6-(3-(6-环丙基-8-氟-1-氧代异喹啉-2(1H)-基)苯基)嘧啶-5-基)氧)乙基)-N-甲基丙烯酰胺;N-(3-(5-(2-丙烯酰胺乙氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-乙基丙烯酰胺)乙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-(2-氟乙基)丙烯酰胺)乙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(5-((1-丙烯酰胺环丙基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(5-(2-丙烯酰胺丙氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(6-氨基-5-(2-(丁-2-炔氨基)丙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-甲基丙烯酰氨基)丙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-甲基丁-2-炔氨基)丙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(3-(N-甲基丙烯酰氨基)丙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(5-((1-丙烯酰氧吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(6-氨基-5-((1-(丁-2-炔酰吡咯烷-2-基)甲氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-2-(3-(5-((1-丙烯酰氧吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-(羟甲基)苯基)-6-环丙基-3,4-二氢异喹啉-1(2H)-酮;N-(2-((4-氨基-6-(3-(6-环丙基-1-氧代-3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)-5-氟-2-(羟甲基)苯基)嘧啶-5-基)氧)乙基)-N-甲基丙烯酰胺;N-(3-(5-(((2S,4R)-1-丙烯酰氧-4-甲氧基吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(((2S,4R)-1-(丁-2-炔酰-4-甲氧基吡咯烷-2-基)甲氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;2-(3-(5-(((2S,4R)-1-丙烯酰氧-4-甲氧基吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-(羟甲基)苯基)-6-环丙基-3,4-二氢异喹啉-1(2H)-酮;N-(3-(5-(((2S,4S)-1-丙烯酰氧-4-甲氧基吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(((2S,4S)-1-(丁-2-炔酰-4-甲氧基吡咯烷-2-基)甲氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(5-(((2S,4R)-1-丙烯酰氧-4-氟吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(((2S,4R)-1-(丁-2-炔酰-4-氟吡咯烷-2-基)甲氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(5-((1-丙烯酰氧吡啶-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(6-氨基-5-((1-丙炔酰吡啶-2-基)甲氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲

基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;((S)-2-(3-(5-((1-丙烯酰氧吡啶-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-(羟甲基)苯基)-6-环丙基-3,4-二氢异喹啉-1(2H)-酮;((R)-N-(3-(5-((1-丙烯酰氧吡啶-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;((R)-N-(3-(5-((1-丙烯酰氧吡啶-3-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(5-(((2R,3S)-1-丙烯酰氧-3-甲氧基吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(5-(((2S,4R)-1-丙烯酰氧-4-氰吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;或N-(3-(5-(((2S,4S)-1-丙烯酰氧-4-氰吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺。

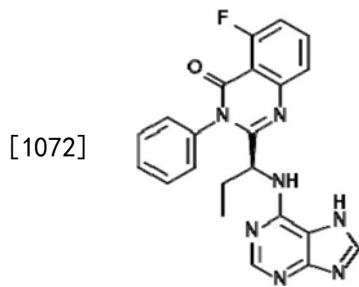
[1067] 除非另外提供,否则上文在描述式I的BTK抑制剂中所用的化学术语根据如国际申请W0/2015/079417中所述的其意思使用,所述文献通过引用的方式完整并入本文。

[1068] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是选自以下的mTOR抑制剂:坦罗莫司;地磷莫司((1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-二羟-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-五氧代-11,36-二氧杂-4-氮杂三环并[30.3.1.0^{4,9}]三十七碳-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧环己基二甲基次膦酸酯,也称作AP23573和MK8669;依维莫司(RAD001);雷帕霉素(AY22989);塞马莫德(simapimod);(5-{2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧苯基)甲醇(AZD8055);2-氨基-8-[反-4-(2-羟乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(PF04691502);和IN²-[1,4-二氧代-4-[[4-(4-氧代-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2-基)吗啉鎓-4-基]]甲氧基]丁基]-L-精氨酸甘氨酸-L-α-天冬氨酸L-丝氨酸-(SEQ ID NO:378),内盐(SF1126);和XL765。

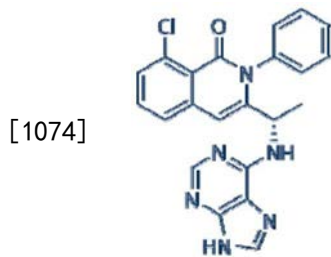
[1069] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是mTOR抑制剂,例如,雷帕霉素,并且雷帕霉素以约3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg(例如,6mg)的剂量每日施用一段时间,例如,每日施用持续21天周期,或每日施用持续28天周期。在一个实施方案中,施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个周期的雷帕霉素。在一个实施方案中,激酶抑制剂是mTOR抑制剂,例如,依维莫司,并且依维莫司以约2mg、2.5mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、11mg、12mg、13mg、14mg、15mg(例如,10mg)的剂量每日施用一段时间,例如,每日施用持续28天周期。在一个实施方案中,施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个周期的依维莫司。

[1070] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是选自以下的MNK抑制剂:CGP052088;4-氨基-3-(对-氟苯基氨基)-吡啶并[3,4-d]嘧啶(CGP57380);尾孢酰胺;ETC-1780445-2;和4-氨基-5-(4-氟苯胺基)-吡啶并[3,4-d]嘧啶。

[1071] 在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂(例如,本文所述的PI3K抑制剂,例如,吉利德(idelalisib)或duvelisib)和/或利妥昔单抗组合施用至受试者。在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与吉利德和利妥昔单抗组合施用至受试者。在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与duvelisib和利妥昔单抗组合施用至受试者。吉利德(也称作GS-1101或CAL-101;Gilead)是阻断PI3Kδ同工型的小分子。下文显示吉利德(5-氟-3-苯基-2-[(1S)-1-(7H-嘌呤-6-基氨基)丙基]-4(3H)-喹唑啉酮)的结构。



[1073] Duvelisib (也称为IPI-145; Infinity Pharmaceuticals and Abbvie) 是阻断PI3K- δ , γ 的小分子。下文显示duvelisib的结构 (8-氯-2-苯基-3-[(1S)-1-(9H-嘌呤-6-基氨基)乙基]-1(2H)-异喹啉酮)。



[1075] 在实施方案中,受试者患有CLL。在实施方案中,受试者患有复发的CLL,例如,先前已经向受试者施用过癌疗法(例如,先前施用过抗CD20抗体或先前施用过依鲁替尼)。例如,受试者在第17染色体短臂中具有缺失(del(17p))(例如,在白血病细胞中)。在其他实例中,受试者没有del(17p)。在实施方案中,受试者包含在免疫球蛋白重链可变区(IgV_H)基因中包含突变的白血病细胞。在其他实施方案中,受试者不包含在免疫球蛋白重链可变区(IgV_H)基因中包含突变的白血病细胞。在实施方案中,受试者在第11染色体长臂中具有缺失(del(11q))。在其他实施方案中,受试者没有del(11q)。在实施方案中,吉利德按以下剂量施用:约100-400mg(例如,100-125、125-150、150-175、175-200、200-225、225-250、250-275、275-300、325-350、350-375、或375-400mg),例如,BID施用。在实施方案中,duvelisib按以下剂量施用:约15-100mg(例如,约15-25、25-50、50-75、或75-100mg),例如,一日2次施用。在实施方案中,利妥昔单抗按以下剂量施用:约350-550mg/m²(例如,350-375、375-400、400-425、425-450、450-475、或475-500mg/m²),例如,静脉内施用。

[1076] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是选自以下的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)和mTOR双重抑制剂:2-氨基-8-[反-4-(2-羟乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(PF-04691502);N-[4-[[4-(二甲基氨基)-1-哌啶基]羰基]苯基]-N'-[4-(4,6-二-4-吗啉基-1,3,5-三嗪-2-基)苯基]脲(PF-05212384,PKI-587);2-甲基-2-[4-[3-甲基-2-氧代-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氢-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]苯基]丙腈(BEZ-235);apitolisib(GDC-0980,RG7422);2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺(GSK2126458);8-(6-甲氧基-3-基)-3-甲基-1-(4-(哌嗪-1-基)-3-(三氟甲基)苯基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮马来酸(NVP-BGT226);3-[4-(4-吗啉基吡啶并[3',2':4,5]呋喃并[3,2-d]嘧啶-2-基)酚(PI-103);5-(9-异丙基-8-甲基-2-吗啉代-9H-嘌呤-6-基)嘧啶-2-胺(VS-5584,SB2343);和N-[2-[(3,5-二甲氧苯基)氨基]喹啉-3-基]-4-[(4-甲基-3-甲氧苯基)羰基]氨基苯磺酰胺(XL765)。

[1077] 在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂组

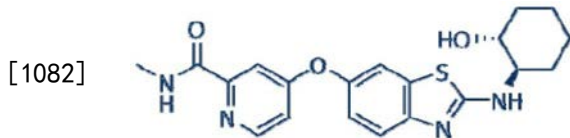
合施用至受试者。示例性ALK激酶抑制剂包括但不限于克里唑替尼 (Pfizer)、色瑞替尼 (Novartis)、艾乐替尼 (alectinib) (Chugai)、brigatinib (也称作AP26113; Ariad)、entrectinib (Ignyta)、PF-06463922 (Pfizer)、TSR-011 (Tesaro) (参见, 例如, 临床试验识别号NCT02048488)、CEP-37440 (Teva) 和X-396 (Xcovery)。在一些实施方案中, 受试者患有实体癌, 例如, 本文所述的实体癌, 例如, 肺癌。

[1078] 克里唑替尼的化学名称是3-[(1R)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙氧基]-5-(1-哌啶-4-基吡唑-4-基)吡啶-2-胺。色瑞替尼的化学名称是5-氯-N²-[2-异丙氧基-5-甲基-4-(4-哌啶基)苯基]-N⁴-[2-(异丙基磺酰基)苯基]-2,4-嘧啶二胺。艾乐替尼的化学名称是9-乙基-6,6-二甲基-8-(4-吗啉代哌啶-1-基)-11-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[b]吡啶-3-甲腈。brigatinib的化学名称是5-氯-N²-{4-[4-(二甲基氨基)-1-哌啶基]-2-甲氧苯基}-N⁴-[2-(二甲基氧磷基)苯基]-2,4-嘧啶。entrectinib的化学名称是N-(5-(3,5-二氟苄基)-1H-吡啶-3-基)-4-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)苯甲酰胺。PF-06463922的化学名称是(10R)-7-氨基-12-氟-2,10,16-三甲基-15-氧代-10,15,16,17-四氢-2H-8,4-(甲桥)吡啶并[4,3-h][2,5,11]-苯并噻二氮杂十四(烷)环-3-甲腈。CEP-37440的化学结构是(S)-2-((5-氯-2-((6-(4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基)-1-甲氧基)-6,7,8,9-四氢-5H-苯并[7]环庚烯-2-基)氨基)嘧啶-4-基)氨基)-N-甲基苯甲酰胺。X-396的化学名称是(R)-6-氨基-5-(1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙氧基)-N-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)吡啶-3-甲酰胺。

[1079] 也可以使用抑制钙依赖性磷酸酶钙调磷酸酶的药物(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导重要的p70S6激酶的药物(雷帕霉素)(Liu等人, Cell 66:807-815, 1991; Henderson等人, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer等人, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993)。在又一个方面, 本发明的细胞组合物可以连同骨髓移植、使用化疗药如氟达拉滨的T细胞消融疗法、外照射放射疗法(XRT)、环磷酰胺和/或抗体如OKT3或CAMPATH一起(例如, 在其之前、同时或在其后)施用至受试者。在一个方面, 将本发明的细胞组合物在B细胞消融疗法如与CD20反应的药物(例如, Rituxan)后施用。例如, 在一个实施方案中, 受试者可以接受高剂量化疗标准治疗, 随后进行外周血干细胞移植。在某些实施方案中, 在移植后, 受试者接受扩充的本发明免疫细胞输注。在一个额外的实施方案中, 将扩充的细胞在手术前或在之后施用。

[1080] 在实施方案中, 将本文所述的表达CAR的细胞与吡唑胺2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂组合施用至受试者。IDO是催化氨基酸L-色氨酸降解成犬尿氨酸的酶。许多癌过量表达IDO, 例如, 前列腺癌、结直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、胃癌、卵巢癌、头癌和肺癌。pDC、巨噬细胞和树状细胞(DC)可以表达IDO。不受理论约束, 认为(例如, IDO催化的)L-色氨酸减少通过诱导T细胞失能和凋亡而产生免疫抑制环境。因此, 在不受理论约束的情况下, 认为IDO抑制剂可以增强本文所述的表达CAR的细胞的效能, 例如, 通过减少对表达CAR的免疫细胞的抑制或减少其死亡。在实施方案中, 受试者患有实体癌, 例如, 本文所述的实体癌, 例如, 前列腺癌、结直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、胃癌、卵巢癌、头癌或肺癌。示例性IDO抑制剂包括但不限于1-甲基-色氨酸、indoximod (NewLink Genetics) (参见, 例如, 临床试验识别号NCT01191216; NCT01792050) 和INCB024360 (Incyte Corp.) (参见, 例如, 临床试验识别号NCT01604889; NCT01685255)

[1081] 在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与髓样衍生的阻抑细胞的调节物(MDSC)组合施用至受试者。MDSC在许多实体瘤的周围及其肿瘤部位积累。这些细胞抑制T细胞反应,因而妨碍表达CAR的细胞疗法的效能。不受理论约束,认为施用MDSC调节物增强本文所述的表达CAR的细胞的效能。在一个实施方案中,受试者患有实体瘤,例如,本文所述的实体瘤,例如,胶质母细胞瘤。示例性MDSC调节物包括但不限于MCS110和BLZ945。MCS110是针对巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)的单克隆抗体(mAb)。参见,例如,临床试验识别号NCT00757757。BLZ945是集落刺激因子1受体(CSF1R)的小分子抑制剂。参见,例如,Pyonteck等人,Nat.Med.19(2013):1264-72。下文显示BLZ945的结构。



[1083] 在实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与CD19 CAR细胞(例如,CTL019,例如,如W02012/079000中所述,所述文献通过引用的方式并入本文)组合施用至受试者。在实施方案中,受试者患有急性髓样白血病(AML),例如,CD19阳性AML或CD19阴性AML。在实施方案中,受试者患有CD19+淋巴瘤,例如,CD19+非霍奇金淋巴瘤(NHL)、CD19+FL或CD19+DLBCL。在实施方案中,受试者患有复发性或难治性CD19+淋巴瘤。在实施方案中,将耗竭淋巴细胞的化疗在施用CD19 CAR细胞之前、与之同时或在其之后施用至受试者。在一个例子中,将耗竭淋巴细胞的化疗在施用CD19 CAR细胞之前施用至受试者。例如,在CD19 CAR细胞输注之前1-4天(例如,1、2、3或4天)结束耗竭淋巴细胞的化疗。在实施方案中,例如,如本文所述,施用多剂量的CD19 CAR细胞。例如,单剂量包含约 5×10^8 个CD19 CAR细胞。在实施方案中,将耗竭淋巴细胞的化疗在施用本文所述的表达CAR的细胞(例如,表达非CD19 CAR的细胞)之前、与之同时或在其之后施用至受试者。在实施方案中,将CD19 CAR在施用表达非CD19 CAR的细胞(例如,本文所述的表达非CD19 CAR的细胞)之前、与之同时或在其之后施用至受试者。

[1084] 在一些实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与表达CD19 CAR的细胞(例如,CTL019,例如,如W02012/079000中所述的CTL019)组合施用至受试者,所述文献通过引用的方式并入本文,以治疗与表达CD33相关的疾病,例如,本文所述的癌症。不受理论约束,认为将表达CD19 CAR的细胞与表达CAR的细胞组合施用,通过靶向早期谱系癌细胞(例如,癌干细胞)、调节免疫应答、耗竭调节性B细胞和/或改善肿瘤微环境,改善了本文所述的表达CAR的细胞的功效。例如,表达CD19 CAR的细胞靶向表达早期谱系标志物的癌细胞(例如,癌干细胞)和表达CD19的细胞,同时本文所述的表达CAR的细胞靶向癌细胞表达晚期谱系标志物,例如,CD33。这种预整备方案可以改善本文所述的表达CAR的细胞的功效。在实施方案中,将表达CD19 CAR的细胞在施用本文所述的表达CAR的细胞之前、与之同时或在其之后施用。

[1085] 在实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞还表达靶向CD19的CAR,例如,CD19 CAR。在一个实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞和CD19 CAR施用至受试者,以治疗本文所述的癌症,例如,AML。在一个实施方案中,一种或二种CAR分子的布局包含初级胞内信号结构域和共刺激信号结构域。在另一个实施方案中,一种或二种CAR分子的布局包含初级胞内信号结构域和两个或更多个(例如,2、3、4或5或更多个)共刺激信号结构域。在这类实

实施方案中,本文所述的CAR分子和CD19 CAR可以具有相同或不同的初级胞内信号结构域,相同或不同的共刺激信号结构域,或相同数目的或不同数目的共刺激信号结构域。备选地,将本文所述的CAR和CD19 CAR设置为分裂的CAR,其中一个CAR分子包含抗原结合结构域和共刺激结构域(例如,4-1BB),而另一个CAR分子包含抗原结合结构域和初级胞内信号结构域(例如,CD3 ζ)。

[1086] 在一些实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞与白介素-15(IL-15)多肽、白介素-15受体 α (IL-15Ra)多肽或IL-15多肽和IL-15Ra多肽(例如,hetIL-15(Admune Therapeutics,LLC))二者的组合进行组合施用至受试者。hetIL-15是IL-15和IL-15Ra的异二聚非共价复合物。hetIL-15例如在美国8,124,084、美国2012/0177598、美国2009/0082299、美国2012/0141413和美国2011/0081311中描述,所述文献通过引用的方式并入本文。在实施方案中,皮下施用het-IL-15。在实施方案中,受试者患有癌症,例如,实体癌,例如,黑素瘤或结肠癌。在实施方案中,受试者患有转移性癌症。

[1087] 在实施方案中,向患有本文所述的疾病(例如,血液学疾病,例如,AML或MDS)的受试者施用与药物(例如细胞毒药物或化疗药、生物治疗药(例如,抗体,例如,单克隆抗体或细胞治疗药)或抑制剂(例如,激酶抑制剂))组合的本文所述的表达CAR的细胞。在实施方案中,向受试者施用与细胞毒药物(例如,CPX-351(Celator Pharmaceuticals)、阿糖胞苷、佐柔比星、vosaroxin(Sunesis Pharmaceuticals)、sapacitabine(Cyclacel Pharmaceuticals)、伊达比星、或米托蒽醌)组合的本文所述的表达CAR的细胞。CPX-351是按5:1摩尔比包含阿糖胞苷和佐柔比星的脂质体制剂。在实施方案中,向受试者施用与低甲基化药物(例如,DNA甲基转移酶抑制剂,例如,阿扎胞苷或地西他滨)组合的本文所述的表达CAR的细胞。在实施方案中,向受试者施用与生物治疗药(例如,抗体或细胞治疗药,例如,225Ac-林妥珠单抗(lintuzumab)(Actimab-A;Actinium Pharmaceuticals)、IPH2102(Innate Pharma/Bristol Myers Squibb)、SGN-CD33A(Seattle Genetics)或吉妥珠单抗奥唑米星(Mylotarg;Pfizer))组合的本文所述的表达CAR的细胞。SGN-CD33A是包含与抗CD33抗体连接的吡咯并苯二氮卓二聚体的抗体-药物缀合物(ADC)。Actimab-A是用铜标记的抗CD33抗体(林妥珠单抗(lintuzumab))。IPH2102是靶向杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的单克隆抗体。在实施方案中,向受试者施用与FLT3抑制剂(例如,索拉非尼(Bayer)、米哚妥林(midostaurin)(Novartis)、奎扎替尼(quizartinib)(Daiichi Sankyo)、crenolanib(Arog Pharmaceuticals)、PLX3397(Daiichi Sankyo)、AKN-028(Akinion Pharmaceuticals)或ASP2215(Astellas))组合的本文所述的表达CAR的细胞。在实施方案中,向受试者施用与异柠檬酸脱氢酶(IDH)抑制剂(例如,AG-221(Celgene/Agios)或AG-120(Agios/Celgene))组合的本文所述的表达CAR的细胞。在实施方案中,向受试者施用与细胞周期调节物(例如,polo样激酶1(P1k1)的抑制剂,例如,volasertib(Boehringer Ingelheim);或细胞周期蛋白依赖性激酶9(Cdk9)的抑制剂(例如,阿伏西地(Tolero Pharmaceuticals/Sanofi Aventis))组合的本文所述的表达CAR的细胞。在实施方案中,向受试者施用与B细胞受体信号传导网络抑制剂(例如,B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)的抑制剂,例如,venetoclax(Abbvie/Roche);或Bruton酪氨酸激酶(Btk)的抑制剂,例如,依鲁替尼(Pharmacocyclics/Johnson&Johnson Janssen Pharmaceutical))组合的本文所述的表达CAR的细胞。在实施方案中,向受试者施用与M1氨基肽酶抑制剂(例如,tosedostat(CTI

BioPharma/Vernalis));组蛋白脱乙酰基酶(HDAC)抑制剂(例如,pracinostat(MEI Pharma));多重激酶抑制剂(例如,rigosertib(Onconova Therapeutics/Baxter/SymBio));或肽CXCR4反向激动剂(例如,BL-8040(BioLineRx))组合的本文所述的表达CAR的细胞。在实施方案中,向受试者施用与靶向除CD33之外抗原(例如,CLL、BCMA、CD123、CD19、FLT-3或叶酸受体 β)的表达CAR的细胞组合的靶向CD33的表达CAR的细胞。

[1088] 在另一个实施方案中,受试者在移植细胞(例如,同种异体干细胞移植)前接受本发明CART33细胞组合物的输注。在一个优选的实施方案中,CART33细胞瞬时表达CAR33,例如,通过mRNA抗CD33 CAR的电穿孔,由此在输注供体干细胞之前终止CAR33的表达以避免植入失败。

[1089] 一些患者可能在施用期间或之后对本发明的化合物和/或其他抗癌药出现过敏反应;因此,经常施用抗过敏药以最大限度减少过敏反应的风险。合适的抗过敏药包括皮质类固醇类,如地塞米松(例如,Decadron®)、倍氯米松(例如,Beclovent®)、氢化可的松(也称作可的松、氢化可的松琥珀酸钠、氢化可的松磷酸钠,并且以商品名称Ala-Cort®、磷酸氢化可的松,Solu-Cortef®;Hydrocort Acetate®和Lanacort®出售)、泼尼松龙(prednisolone)(以商品名称Delta-Cortel®、Orapred®、Pediapred®和Prelone®出售)、泼尼松(以商品名称Deltasone®、Liquid Red®、Meticorten®和Orasone®出售)、甲基泼尼松龙(也称作6-甲基泼尼松龙、醋酸甲泼尼龙、甲泼尼龙琥珀酸钠,以商品名称Duralone®、Medralone®、Medrol®、M-Prednisol®和Solu-Medrol®出售);抗组胺药,如苯海拉明(例如,Benadryl®)、安泰乐和赛庚啶;及支气管扩张药,如 β -肾上腺素能药受体激动剂、沙丁胺醇(albuterol)(例如,Proventil®)以及特布他林(Brethine®)。

[1090] 一些患者可能在施用本发明化合物和/或其他抗癌药期间和之后出现恶心;因此,使用镇吐药防止恶心(反胃)和呕吐。合适的镇吐药包括阿瑞吡坦(Emend®)、昂丹司琼(Zofran®)、HCl 格拉司琼(Kytril®)、劳拉西泮(Ativan®)、地塞米松(Decadron®)、乙二磺酸(Compazine®)、卡索匹坦(Rezonic®和Zunrisa®)及其组合。

[1091] 在治疗阶段期间,经常开具减轻疼痛体验的药物以令患者更舒适。经常使用常见的非处方镇痛药,如Tylenol®。然而、阿片类镇痛药物如氢可酮/扑热息痛(paracetamol)或氢可酮/对乙酰氨基酚(例如,Vicodin®)、吗啡(例如,Astramorph®或Avinza®)、羟考酮(例如,OxyContin®或Percocet®)、盐酸羟吗啡酮(Opana®)和芬太尼(例如,Duragesic®)也可用于中度或重度疼痛。

[1092] 为了努力保护正常细胞免受治疗毒性并限制器官毒性,细胞保护药(如神经保护药,自由基清除剂,心脏保护剂(cardioprotectors),葱环类溢出中和剂,营养剂等)可以作为辅助疗法使用。合适的细胞保护药包括氨磷汀(Ethyol®)、谷氨酰胺、地美司钠(dimesna)(Tavocept®)、美司钠(mesna)(Mesnex®)、右雷佐生(Zincard®或Totect®)、扎利罗登(Xapрила®)和亚叶酸(leucovorin)(也称作钙亚叶酸(leucovorin)、嗜橙菌因子和亚叶酸)。

[1093] 通过代码、通用名或商标标识的活性化合物的结构可以取自标准概要“默克索引”实际版或取自数据库,例如国际专利(例如IMS World Publications)。

[1094] 可以与本发明化合物组合使用的上文提到的化合物可以如本领域(如上文援引的

文件中)所述那样制备并作施用。

[1095] 在一个实施方案中,本发明提供了包含本发明的至少一种化合物(例如,本发明化合物)或其可药用盐连同适于单独或与其他抗癌药一起施用至人类或动物受试者的可药用载体的药物组合物。

[1096] 在一个实施方案中,本发明提供治疗患有细胞增生性疾病,如癌症的人类或动物受试者的方法。本发明提供治疗需要这种治疗的人或动物受试者的方法,所述方法包括向受试者单独或与其他抗癌药一起施用治疗有效量的本发明的化合物(例如,本发明化合物)或其可药用盐。

[1097] 特别地,各组合物将作为联合疗法配制在一起施用或分别地施用。

[1098] 在联合疗法中,本发明的化合物和其他抗癌药可以同时、同步或无特定时间限制下依次施用,其中这类施用在患者身体内提供治疗有效水平的两种化合物。

[1099] 在一个优选的实施方案中,本发明的化合物和其他抗癌药通常以任何顺序通过输注或口服依次施用。给药方案可以取决于疾病阶段、患者的身体健康状况、各个药物的安全特征和各个药物的耐受性以及施用该组合的主治医生和医疗执业者熟知的其他标准。本发明的化合物和其他抗癌药可以彼此间隔数分钟、数小时、数天或甚至数周施用,这取决于正在用于治疗的特定周期。此外,该周期可能包括在治疗周期期间将一种药物比另一种更经常地施用及每次施用药物时以不同剂量施用。

[1100] 在本发明的另一个方面,提供试剂盒,所述试剂盒包括本发明的一种或多种化合物和如本文中公开的组合配偶体。代表性试剂盒包括(a)本发明的化合物或其可药用盐,(b)至少一种组合配偶体,例如,如上文所示,因而这类试剂盒可以包含包装插页或其他标示,包括施用说明。

[1101] 本发明的化合物也可以与已知的治疗方法组合用来例如有助于施用激素或尤其放疗。本发明的化合物尤其可以作为放射增敏剂使用,特别用于治疗对放疗法显示低劣敏感性的肿瘤。

[1102] 在一个实施方案中,可以向受试者施用减少或改善与施用表达CAR的细胞相关的副作用的药物。与施用表达CAR的细胞相关的副作用包括但不限于CRS和嗜血细胞性淋巴组织细胞增多症(HLH),又称作巨噬细胞活化综合征(MAS)。CRS的症状包括高热、恶心、瞬时低血压、缺氧等。CRS可以包括临床体征和症状如发热、疲乏、厌食、肌痛、关节痛、恶心、呕吐和头痛。CRS可以包括临床皮肤体征和症状如皮疹。CRS可以包括胃肠道临床体征和症状如恶心、呕吐和腹泻。CRS可以包括呼吸系统临床体征和症状如呼吸急促和低血氧症。CRS可以包括心血管临床体征和症状,如心动过速、脉压加宽、低血压、心输出量增加(早期)和心输出量可能削弱(晚期)。CRS可以包括凝血临床体征和症状,如升高的d-二聚体、低纤维蛋白原血症,伴以或不伴以出血。CRS可以包括肾临床体征和症状如氮质血症。CRS可以包括肝临床体征和症状,如转氨酶升高和高胆红素血症。CRS可以包括神经系统临床体征和症状,如头痛、精神状态改变、意识模糊、谵妄、找词困难或明显失语症、幻觉、颤抖、辨距障碍、步态改变和发作。

[1103] 因此,本文所述的方法可以包括施用本文所述的表达CAR的细胞至受试者并且进一步施用一种或多种药物以管理因表达CAR的细胞治疗产生的可溶性因子水平升高。在一个实施方案中,受试者中升高的可溶性因子是IFN- γ 、TNF α 、IL-2和IL-6中的一者或多者。

在一个实施方案中,受试者中升高的因子是IL-1、GM-CSF、IL-10、IL-8、IL-5和fraktalkine中的一者或多者。因此,施用以治疗这种副作用的药物可以是中和这些可溶性因子中一者或多者的药物。在一个实施方案中,中和这些可溶性形式的一者或多者的药物是抗体或抗体片段。这类药物的例子包括但不限于类固醇(例如,皮质类固醇)、TNF α 的抑制剂和IL-6的抑制剂。TNF α 抑制剂的例子是抗TNF α 抗体分子,如,英夫单抗(infliximab)、阿达木单抗(adalimumab)、聚乙二醇赛妥珠单抗(certolizumab pegol)和戈利木单抗(golimumab)。TNF α 抑制剂的另一个例子是融合蛋白如entanercept。TNF α 的小分子抑制剂包括但不限于黄嘌呤衍生物(例如己酮可可碱)和安非他酮。IL-6抑制剂的例子是抗IL-6抗体分子如托珠单抗(tocilizumab)(toc)、sarilumab、elsilimomab、CNT0328、ALD518/BMS-945429、CNT0136、CPSI-2364、CDP6038、VX30、ARGX-109、FE301和FM101。在一个实施方案中,抗IL-6抗体分子是托珠单抗。基于IL-1R的抑制剂的例子是阿那白滞素。

[1104] 在一些实施方案中,向受试者施用皮质类固醇,如,例如,甲基泼尼松龙、氢化可的松等。

[1105] 在一些实施方案中,向受试者施用血管加压剂,如,例如,去甲肾上腺素、多巴胺、去氧肾上腺素、肾上腺素、加压素或其组合。

[1106] 在一个实施方案中,可以向受试者施用退热药。在一个实施方案中,可以向受试者施用镇痛药。

[1107] 在一个实施方案中,可以向受试者施用增强表达CAR的细胞的活性的物质。例如,在一个实施方案中,药物可以是抑制抑制性分子的药物,例如,药物是检查点抑制物。在一些实施方案中,抑制性分子(例如,程序性死亡1(PD1))可以降低表达CAR的细胞发动免疫效应子反应的能力。抑制性分子的例子包括PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR β 。对抑制性分子的抑制(例如,通过在DNA、RNA或蛋白质水平抑制)可以优化表达CAR的细胞性能。在实施方案中,例如,如本文所述,抑制性核酸(例如,抑制性核酸,例如,dsRNA,例如,siRNA或shRNA)、成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)或锌指核酸内切酶(ZFN)可以用来在表达CAR的细胞中抑制抑制性分子的表达。在一个实施方案中,抑制剂是shRNA。在一个实施方案中,抑制表达CAR的细胞内部的抑制性分子。在这些实施方案中,对抑制性分子表达抑制的dsRNA分子与编码CAR的组分(例如,全部组分)的核酸连接。

[1108] 在一个实施方案中,编码dsRNA分子(其抑制调节或调控(例如,抑制)T细胞功能的分子表达)的核酸分子有效连接至启动子,例如,H1-或U6-衍生的启动子,从而抑制调节或调控(例如,抑制)T细胞功能的分子表达的dsRNA分子表达,例如,在表达CAR的细胞内部表达。参见,例如Tiscornia G.,“Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA,”第3章,引自Gene Transfer:Delivery and Expression of DNA and RNA(编者Friedmann和Rossi).Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,USA,2007;Brummelkamp TR等人,(2002)Science 296:550-553;Miyagishi M等人,(2002)Nat.Biotechnol.19:497-500。在一个实施方案中,编码dsRNA分子(其抑制调节或调控(例如,抑制)T细胞功能的分子表达)的核酸分子存在于相同的载体(例如,慢病毒载体)上,所

述载体包含编码CAR组分(例如,其全部组分)的核酸分子。在这种实施方案中,编码dsRNA分子(其抑制调节或调控(例如,抑制)T细胞功能的分子表达)的核酸分子相对于编码CAR组分(例如,其全部组分)的核酸的5'或3'位于载体(例如,慢病毒载体)上。编码dsRNA分子(其抑制调节或调控(例如,抑制)T细胞功能的分子表达)的核酸分子可以按照编码CAR组分(例如,其全部组分)的核酸相同或不同的方向转录。在一个实施方案中,编码dsRNA分子(其抑制调节或调控(例如,抑制)T细胞功能的分子表达)的核酸分子存在于除包含编码CAR组分(例如,其全部组分)的核酸分子的载体之外的载体上。在一个实施方案中,编码dsRNA分子(其抑制调节或调控(例如,抑制)T细胞功能的分子表达)的核酸分子在表达CAR的细胞内部瞬时表达。在一个实施方案中,编码dsRNA分子(其抑制调节或调控(例如,抑制)T细胞功能的分子表达)的核酸分子是稳定整合入表达CAR的细胞的基因组中。图52A-52E描述了载体的例子,所述载体表达CAR组分(例如,其全部组分)和抑制调节或调控(例如,抑制)T细胞功能的分子表达的dsRNA分子。

[1109] 下文提供可用于抑制调节或调控(例如,抑制)T细胞功能的分子表达的dsRNA分子的例子,其中调节或调控(例如,抑制)T细胞功能的分子是PD-1。

[1110] 在下表7中提供PDCD1 (PD1) RNAi剂(从小鼠PDCD1基因序列NM_008798.2中其位置衍生)的名称,以及代表DNA序列的SEQ ID NO:159-206。该表中有义(S)序列和反义(AS)序列均作为19聚序列和21聚序列呈现。还指出,位置(PoS,例如,176)从小鼠PDCD1基因序列NM_008798.2中的位置编号衍生。SEQ ID NO以12个组显示,所述组对应于“有义19”SEQ ID NO:159-170;“有义21”SEQ ID NO:171-182;“反义21”SEQ ID NO:183-194;“反义19”SEQ ID NO:195-206。

[1111] 表7. 小鼠PDCD1 (PD1) shRNA序列

NM_008798.2 上的位置	靶区域	有义19	有义21	反义21	反义19
176	CDS	GGAGGTCCCTCA CCTTCTA(SEQ ID NO: 159)	CTGGAGGTCCCTC ACCTTCTA (SEQ ID NO: 171)	TAGAAGGTGAGG GACCTCCAG (SEQ ID NO: 183)	TAGAAGGTGAGG GACCTCC(SEQ ID NO: 195)
260	CDS	CGGAGGATCTTA	GTCGGAGGATCT	TTCAGCATAAGA	TTCAGCATAAGA

[1113]

		TGCTGAA(SEQ ID NO: 160)	TATGCTGAA (SEQ ID NO: 172)	TCCTCCGAC (SEQ ID NO: 184)	TCCTCCG (SEQ ID NO: 196)
359	CDS	CCCCTTCCAGAT CATAACA (SEQ ID NO: 161)	TGCCCGCTTCCAG ATCATAACA (SEQ ID NO: 173)	TGTATGATCTGGA AGCGGGCA (SEQ ID NO: 185)	TGTATGATCTGGA AGCGGG (SEQ ID NO: 197)
528	CDS	GGAGACCTCAAC AAGATAT(SEQ ID NO: 162)	CTGGAGACCTCA ACAAGATAT (SEQ ID NO: 174)	ATATCTTGTGAG GTCTCCAG (SEQ ID NO: 186)	ATATCTTGTGAG GTCTCC (SEQ ID NO: 198)
581	CDS	AAGGCATGGTCA TTGGTAT (SEQ ID NO: 163)	TCAAGGCATGGT CATTGGTAT (SEQ ID NO: 175)	ATACCAATGACC ATGCCTGA (SEQ ID NO: 187)	ATACCAATGACC ATGCCTT (SEQ ID NO: 199)
584	CDS	GCATGGTCATTG GTATCAT(SEQ ID NO: 164)	AGGCATGGTCAT TGGTATCAT (SEQ ID NO: 176)	ATGATACCAATG ACCATGCCT (SEQ ID NO: 188)	ATGATACCAATG ACCATGC (SEQ ID NO: 200)
588	CDS	GGTCATTGGTATC ATGAGT(SEQ ID NO: 165)	ATGGTCATTGGTA TCATGAGT (SEQ ID NO: 177)	ATGGTCATTGGTA TCATGAGT (SEQ ID NO: 189)	ATGGTCATTGGTA TCATGA(SEQ ID NO: 201)
609	CDS	CCTAGTGGGTATC CCTGTA(SEQ ID NO: 166)	GCCCTAGTGGGT ATCCCTGTA (SEQ ID NO: 178)	GCCCTAGTGGGT ATCCCTGTA (SEQ ID NO: 190)	GCCCTAGTGGGT ATCCCTG (SEQ ID NO: 202)
919	CDS	GAGGATGGACAT TGTTCTT (SEQ ID NO: 167)	ATGAGGATGGAC ATTGTTCTT (SEQ ID NO: 179)	ATGAGGATGGAC ATTGTTCTT (SEQ ID NO: 191)	ATGAGGATGGAC ATTGTTT (SEQ ID NO: 203)
1021	3'UTR	GCATGCAGGCTA CAGTTCA(SEQ ID NO: 168)	GAGCATGCAGGC TACAGTTCA (SEQ ID NO: 180)	GAGCATGCAGGC TACAGTTCA (SEQ ID NO: 192)	GAGCATGCAGGC TACAGTT (SEQ ID NO: 204)
1097	3'UTR	CCAGCACATGCA CTGTTGA(SEQ ID NO: 169)	TTCCAGCACATGC ACTGTTGA (SEQ ID NO: 181)	TTCCAGCACATGC ACTGTTGA (SEQ ID NO: 193)	TTCCAGCACATGC ACTGTT (SEQ ID NO: 205)
1101	3'UTR	CACATGCACTGTT GAGTGA(SEQ ID NO: 170)	AGCACATGCACT GTTGAGTGA (SEQ ID NO: 182)	AGCACATGCACT GTTGAGTGA (SEQ ID NO: 194)	AGCACATGCACT GTTGAGT (SEQ ID NO: 206)

[1114] 在下表8中提供PDCD1 (PD1) RNAi剂(衍生自它们在人PDCD1基因序列中的位置)的名称,以及代表DNA序列的SEQ ID NO:207-254。有义(S)序列和反义(AS)序列均作为19聚序列和21聚序列呈现。SEQ ID NO以12个组显示,所述组对应于“有义19”SEQ ID NO:207-218;“有义21”SEQ ID NO:219-230;“反义21”SEQ ID NO:231-242;“反义19”SEQ ID NO:243-254。

[1115] 表8. 人PDCD1 (PD1) shRNA序列

[1116]

NM_0050 18.2上的 位置	靶区域	有义19	反义19	有义21	反义21
145	CDS	GGCCAGGATGGT TCTTAGA(SEQ ID NO: 207)	TCTAAGAACCAT CCTGGCC (SEQ ID NO: 219)	GCGGCCAGGATG GTTCTTAGA (SEQ ID NO: 231)	TCTAAGAACCAT CCTGGCCGC (SEQ ID NO: 243)
271	CDS	GCTTCGTGCTAAA CTGGTA (SEQ ID NO: 208)	TACCAGTTTAGCA CGAAGC (SEQ ID NO: 220)	GAGCTTCGTGCTA AACTGGTA (SEQ ID NO: 232)	TACCAGTTTAGCA CGAAGCTC (SEQ ID NO: 244)
393	CDS	GGGCGTGA CTTC CACATGA (SEQ ID NO: 209)	TCATGTGGAAGT CACGCC (SEQ ID NO: 221)	ACGGGCGTGA CT TCCACATGA (SEQ ID NO: 233)	TCATGTGGAAGT CACGCCCGT (SEQ ID NO: 245)
1497	3'UTR	CAGGCCTAGAGA AGTTTCA (SEQ ID NO: 210)	TGAAACTTCTCTA GGCCTG (SEQ ID NO: 222)	TGCAGGCCTAGA GAAGTTTCA (SEQ ID NO: 234)	TGAAACTTCTCTA GGCCTGCA (SEQ ID NO: 246)
1863	3'UTR	CTTGGAACCCATT CCTGAA (SEQ ID NO: 211)	TTCAGGAATGGG TTCCAAG (SEQ ID NO: 223)	TCCTTGGAACCCA TTCCTGAA (SEQ ID NO: 235)	TTCAGGAATGGG TTCCAAGGA (SEQ ID NO: 247)
1866	3'UTR	GGAACCCATTCTT GAAATT (SEQ ID NO: 212)	AATTTAGGAAT GGGTTC (SEQ ID NO: 224)	TTGGAACCCATT CTGAAATT (SEQ ID NO: 236)	AATTTAGGAAT GGGTTC (SEQ ID NO: 248)
1867	3'UTR	GAACCCATTCTTG AAATTA (SEQ ID NO: 213)	TAATTTAGGAAT GGGTTC (SEQ ID NO: 225)	TGGAACCCATTCC TGAAATTA (SEQ ID NO: 237)	TAATTTAGGAAT GGGTTC (SEQ ID NO: 249)
1868	3'UTR	AACCCATTCTGTA AATTAT (SEQ ID NO: 214)	ATAATTTAGGA ATGGGT (SEQ ID NO: 226)	GGAACCCATTCTT GAAATTAT (SEQ ID NO: 238)	ATAATTTAGGA ATGGGTTC (SEQ ID NO: 250)
1869	3'UTR	ACCCATTCTTGAA ATTATT (SEQ ID NO: 215)	AATAATTTAGG AATGGGT (SEQ ID NO: 227)	GAACCCATTCTTG AAATTATT (SEQ ID NO: 239)	AATAATTTAGG AATGGGTTC (SEQ ID NO: 251)
1870	3'UTR	CCCATTCTGAAA TTATTT (SEQ ID NO: 216)	AAATAATTTAG GAATGGG (SEQ ID NO: 228)	AACCCATTCTGTA AATTATTT (SEQ ID NO: 240)	AAATAATTTAG GAATGGGT (SEQ ID NO: 252)
2079	3'UTR	CTGTGGTTCTATT ATATTA (SEQ ID NO: 217)	TAATATAATAGA ACCACAG (SEQ ID NO: 229)	CCCTGTGGTTCTA TTATATTA (SEQ ID NO: 241)	TAATATAATAGA ACCACAGG (SEQ ID NO: 253)
2109	3'UTR	AAATATGAGAGC	TTAGCATGCTCTC	TTAAATATGAGA	TTAGCATGCTCTC
		ATGCTAA (SEQ ID NO: 218)	ATATTT (SEQ ID NO: 230)	GCATGCTAA (SEQ ID NO: 242)	ATATTTAA (SEQ ID NO: 254)

[1117]

[1118] 在一个实施方案中,抑制性信号的抑制剂可以例如是与抑制性分子结合的抗体或抗体片段。例如,抑制剂可以是与PD1、PD-L1、PD-L2或CTLA4结合的抗体或抗体片段(例如,

伊匹木单抗(也称作MDX-010和MDX-101并且作为Yervoy®销售;Bristol-Myers Squibb;曲美木单抗(tremelimumab)(从Pfizer可获得的IgG2单克隆抗体,以前称作ticilimumab、CP-675206))。在一个实施方案中,抑制剂是与TIM3结合的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,抑制剂是与LAG3结合的抗体或抗体片段。在实施方案中,增强表达CAR的细胞活性的药物(例如,抑制性分子的抑制剂)与同种异体CAR(例如,本文所述(例如,在本文的“同种异体CAR”部分中描述)的同种异体CAR)组合施用。

[1119] PD1是受体CD28家族的抑制性成员,所述家族还包括CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA。PD1在活化的B细胞、T细胞和髓样细胞上表达(Agata等人,1996Int. Immunol 8:765-75)。已经显示与PD1结合时,PD1的两种配体PD-L1和PD-L2下调T细胞活化(Freeman等人,2000 J Exp Med 192:1027-34;Latchman等人,2001 Nat Immunol 2:261-8;Carter等人,2002Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1在人类癌症中丰富(Dong等人,2003 J Mol Med 81:281-7;Blank等人,2005 Cancer Immunol.Immunother 54:307-314;Konishi等人,2004 Clin Cancer Res 10:5094)。可以通过抑制PD1与PD-L1的局部相互作用,逆转免疫抑制。PD1、PD-L1和PD-L2的抗体、抗体片段和其他抑制剂是本领域可获得的并且可以与本文所述的CD33 CAR组合使用。例如,纳武单抗(nivolumab)(也称作BMS-936558或MDX1106;Bristol-Myers Squibb)是特异性阻断PD1的全人IgG4单克隆抗体。与PD1特异性结合的纳武单抗(克隆5C4)和其他人单克隆抗体在US 8,008,449和WO 2006/121168中公开。Pidilizumab(CT-011;Cure Tech)是与WO 2009/101611中公开的与PD1Pidilizumab和其他人源化抗PD1单克隆抗体结合的人源化IgG1k单克隆抗体。Lambrolizumab(也称作MK03475;Merck)是与PD1结合的人源化IgG4单克隆抗体。Lambrolizumab和其他人源化抗PD1抗体在US 8,354,509和WO 2009/114335中公开。MDPL3280A(Genentech/Roche)是与PD-L1结合的人Fc优化IgG1单克隆抗体。针对PD-L1的MDPL3280A和其他人单克隆抗体在美国专利号7,943,743和美国公开号20120039906中公开。其他抗PD-L1结合剂包括YW243.55.S70(重链可变区和轻链可变区在WO 2010/077634的SEQ ID NO:20和21中显示)和MDX-1 105(也称作BMS-936559和例如WO 2007/005874中公开的抗PD-L1结合物)。AMP-224(B7-DCIg;Amplimmune;例如,在WO 2010/027827和WO 2011/066342中公开)是阻断PD1和B7-H1之间相互作用的PD-L2Fc融合可溶性受体。其他抗PD-1抗体包括AMP514(Amplimmune)等,例如,US 8,609,089、US 2010028330和/或US 20120114649中公开的抗PD1抗体。

[1120] TIM3(T细胞免疫球蛋白-3)也负向调节T细胞功能,特别在IFN- γ 分泌的CD4+辅助T细胞1和CD8+ T细胞毒性1细胞中,并且在T细胞耗竭中发挥至关重要的作用。抑制TIM3和其配体(例如,半乳糖凝集素-9(Ga19)、磷脂酰丝氨酸(PS)和HMGB1)之间的相互作用可以增加免疫应答。TIM3和其配体的抗体、抗体片段和其他抑制剂是本领域可获得的并且可以与本文所述的CD19 CAR组合使用。例如,靶向TIM3的抗体、抗体片段、小分子或肽抑制剂与TIM3的IgV结构域结合以抑制与其配体的相互作用。抑制TIM3的抗体和肽在WO 2013/006490和US 20100247521中公开。其他抗TIM3抗体包括RMT3-23的人源化形式(Ngiow等人,2011, Cancer Res, 71:3540-3551中公开)和克隆8B.2C12(Monney等人,2002,Nature, 415:536-541中公开)。抑制TIM3和PD-1的双特异性抗体在US 20130156774中公开。

[1121] 在其他实施方案中,增强表达CAR的细胞活性的物质是CEACAM抑制剂(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5抑制剂)。在一个实施方案中,CEACAM的抑制剂是抗

CEACAM抗体分子。示例性抗CEACAM-1抗体在WO 2010/125571、WO 2013/082366、WO 2014/059251和WO 2014/022332中描述,例如,单克隆抗体34B1、26H7和5F4;或其重组形式,例如,如US 2004/0047858、US7,132,255和WO 99/052552中所述。在其他实施方案中,抗CEACAM抗体与CEACAM-5结合,如Zheng等人,PLoS One.2010 Sep 2;5(9).pii:e12529(DOI:10.1371/journal.pone.0021146)中所述,或与CEACAM-1和CEACAM-5交叉反应,例如,如WO 2013/054331和US 2014/0271618中所述。

[1122] 不希望受理论约束,认为癌胚抗原细胞黏附分子(CEACAM)(如CEACAM-1和CEACAM-5)至少部分地介导对抗肿瘤免疫应答的抑制(参见,例如,Markel等人,J Immunol.2002 Mar 15;168(6):2803-10;Markel等人,J Immunol.2006Nov 1;177(9):6062-71;Markel等人,Immunology.2009 Feb;126(2):186-200;Markel等人,Cancer Immunol Immunother.2010 Feb;59(2):215-30;Ortenberg等人,Mol Cancer Ther.2012 Jun;11(6):1300-10;Stern等人,J Immunol.2005 Jun 1;174(11):6692-701;Zheng等人,PLoS One.2010 Sep 2;5(9).pii:e12529)。例如,已经将CEACAM-1描述为TIM-3的异嗜性配体及在TIM-3介导的T细胞耐受性和耗竭中发挥作用(参见,例如,WO 2014/022332;Huang等人,(2014)Nature doi:10.1038/nature13848)。在实施方案中,共同阻断CEACAM-1和TIM-3已经显示在异种移植结直肠癌模型中增强抗肿瘤免疫应答(参见,例如,WO 2014/022332;Huang等人,(2014),上文)。在其他实施方案中,共同阻断CEACAM-1和PD-1降低T细胞耐受性,例如,如WO 2014/059251中所述那样。因此,CEACAM抑制剂可以与本文所述的其他免疫调节剂(例如,抗PD-1和/或抗TIM-3抑制物)一起使用,以增强针对癌(例如,黑素瘤、肺癌(例如,NSCLC)、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌以及如本文所述的其他癌)的免疫应答。

[1123] LAG3(淋巴细胞活化基因-3或CD223)是在活化的T细胞和B细胞上表达的细胞表面分子,其中已经显示所述细胞表面分子在CD8⁺ T细胞耗竭中发挥作用。LAG3和其配体的抗体、抗体片段和其他抑制剂是本领域可获得的并且可以与本文所述的CD19 CAR组合使用。例如,BMS-986016(Bristol-Myers Squibb)是靶向LAG3的单克隆抗体。IMP701(Immutep)是拮抗剂LAG3抗体并且IMP731(Immutep和GlaxoSmithKline)是耗竭性LAG3抗体。其他LAG3抑制剂包括IMP321(Immutep),所述IMP321是LAG3的可溶性部分和与MHC II类分子结合并激活抗原呈递细胞(APC)的Ig的重组融合蛋白。其他抗体例如在WO 2010/019570中公开。

[1124] 在一些实施方案中,增强表达CAR的细胞活性的物质可以例如是包含第一结构域和第二结构域的融合蛋白,其中第一结构域是抑制性分子或其片段,并且第二结构域是与正向信号相关的多肽,例如,包含如本文所述的胞内信号结构域的多肽。在一些实施方案中,与正向信号相关的多肽可以包括CD28、CD27、ICOS的共刺激结构域,例如,CD28、CD27和/或ICOS的胞内信号结构域和/或(例如,本文所述的)(例如,CD3 ζ)的初级信号结构域。在一个实施方案中,融合蛋白是由表达CAR的相同细胞表达。在另一个实施方案中,融合蛋白由不表达CD33 CAR的细胞(例如,T细胞)表达。

[1125] 在一个实施方案中,增强本文所述的表达CAR的细胞活性的物质是miR-17-92。

[1126] 在一个实施方案中,增强本文所述的表达CAR的细胞活性的物质是细胞因子。细胞因子具有与T细胞扩充、分化、存活和稳态相关的重要功能。可以对接受本文所述的表达CAR的细胞的受试者施用的细胞因子包括:IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-18和IL-21或其组合。在优选的实施方案中,施用的细胞因子是IL-7、IL-15、或IL-21或其组合。细胞因子可以

施用一天一次或超过一天一次,例如,一天2次、一天3次、或一天4次。可以将细胞因子施用多于一天,例如将细胞因子施用2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周或4周。例如,将细胞因子一天一次施用7天。

[1127] 在实施方案中,细胞因子与表达CAR的T细胞组合施用。细胞因子可以与表达CAR的T细胞同时或同步施用,例如,在同一天施用。细胞因子可以配制在与表达CAR的T细胞相同的药物组合物中,或可以配制在分离的药物组合物中。备选地,细胞因子可以在施用表达CAR的T细胞后不久施用,例如,在施用表达CAR的T细胞后1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天施用。在细胞因子按进行超过一天的给药方案施用的实施方案中,细胞因子给药方案的第1天可以在施用表达CAR的T细胞的同一天、或细胞因子给药方案的第1天可以是在施用表达CAR的T细胞后的1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天。在一个实施方案中,在第1天,将表达CAR的T细胞施用至受试者并且在第2天,将细胞因子一天一次施用接下来的7天。在一个优选实施方案中,与表达CAR的T细胞组合施用的细胞因子是IL-7、IL-15或IL-21。

[1128] 在其他实施方案中,将细胞因子在施用表达CAR的细胞后一段时间施用,例如,在施用表达CAR的细胞后至少2周、3周、4周、6周、8周、10周、12周、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、或1年或更长时间施用。在一个实施方案中,将细胞因子在评估受试者对表达CAR的细胞的反应后施用。例如,根据本文所述的剂量和治疗方案,向受试者施用表达CAR的细胞。在施用表达CAR的细胞后2周、3周、4周、6周、8周、10周、12周、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、或1年或更长时间,使用本文所述的任何方法,评估受试者对表达CAR的细胞疗法的反应,包括对肿瘤生长的抑制、减少循环的肿瘤细胞、或肿瘤消退。可以向针对表达CAR的细胞疗法未显示出足够反应的受试者施用细胞因子。施用细胞因子至针对表达CAR的细胞疗法具有次优反应的受试者改善了表达CAR的细胞的功效或抗癌活性。在一个优选实施方案中,在施用表达CAR的细胞后施用的细胞因子是IL-7。

[1129] 与免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂组合

[1130] 本文所述的方法使用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂,例如,变构性mTOR抑制剂,包含雷帕霉素类似物如RAD001。施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂(例如,该剂量不足以完全抑制免疫系统,但足以改善免疫功能)可以优化受试者中免疫效应细胞(例如,T细胞或表达CAR的细胞)的性能。美国专利申请号2015/01240036中描述了用于测量mTOR抑制作用的方法、剂量、治疗方案和合适的药物组合物,所述文献因而通过引用的方式并入。

[1131] 在一个实施方案中,施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂可以导致以下一个或多个结果:

[1132] i) PD-1阳性免疫效应细胞数目减少;

[1133] ii) PD-1阴性免疫效应细胞数目增加;

[1134] iii) PD-1阴性免疫效应细胞/PD-1阳性免疫效应细胞的比率增加;

[1135] iv) 原初T细胞数目增加;

[1136] v) 以下一种或多种标记物的表达增加:例如,在记忆T细胞(例如,记忆T细胞前体)上的CD62L^高、CD127^高、CD27⁺和BCL2;

[1137] vi) 记忆T细胞(例如,记忆T细胞前体)上KLRG1的表达减少;或

[1138] vii) 记忆T细胞前体的数目增加,所述记忆T细胞前体例如是具有以下特征的任一

个或其组合的细胞:CD62L^高增加、CD127^高增加、CD27⁺增加、KLRG1减少和BCL2增加;

[1139] 并且其中例如,如与未治疗的受试者相比,前述任一项例如i)、ii)、iii)、iv)、v)、vi)、或vii)的变化出现,例如,至少暂时出现。

[1140] 在另一个实施方案中,例如,如与未处理的表达CAR的细胞或未治疗的受试者相比,施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂导致(例如,在培养物中或在受试者中)表达CAR的细胞的增殖或持久性增加或延长。在实施方案中,增加的增殖或持久性与表达CAR的细胞的数目增加相关。实施例8和9中描述了用于测量增加或延长的增殖的方法。在另一个实施方案中,例如,如与未处理的表达CAR的细胞或未治疗的受试者相比,施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂导致(例如,在培养物中或在受试者中)表达CAR的细胞增加癌细胞杀伤作用。在实施方案中,增加的癌细胞杀伤作用与肿瘤体积缩减相关。实施例6中描述了用于测量增加的癌细胞杀伤作用的方法。

[1141] 在一个实施方案中,表达CAR分子(例如,本文所述的CAR分子)的细胞与免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂(例如,变构性mTOR抑制剂,例如,RAD001或催化性mTOR抑制剂)组合施用。例如,施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂可以在施用本文所述的表达CAR的细胞之前启动;在施用本文所述的表达CAR的细胞之前完成;与施用本文所述的表达CAR的细胞同时启动;与施用本文所述的表达CAR的细胞重叠;或在施用本文所述的表达CAR的细胞后继续。

[1142] 备选地或额外地,施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂可以优化待工程化以表达本文所述的CAR分子的免疫效应细胞。在这类实施方案中,从受试者收获待工程化以表达本文所述的CAR分子的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)之前,启动或完成了免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂(例如,变构抑制剂(例如,RAD001)或催化性抑制剂)的施用。

[1143] 在另一个实施方案中,待工程化以表达本文所述的CAR分子的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞),例如,从受试者收获后,或表达CAR的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞),例如,在施用至受试者之前,可以在存在免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂时培养。

[1144] 在一个实施方案中,向受试者施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂包括例如,每周一次,例如,在速释剂型中施用0.1至20、0.5至10、2.5至7.5、3至6或约5mg RAD001,或其生物等效剂量。在一个实施方案中,向受试者施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂包括例如每周一次,例如,在缓释剂型中施用0.3至60、1.5至30、7.5至22.5、9至18或约15mg RAD001,或其生物等效剂量。

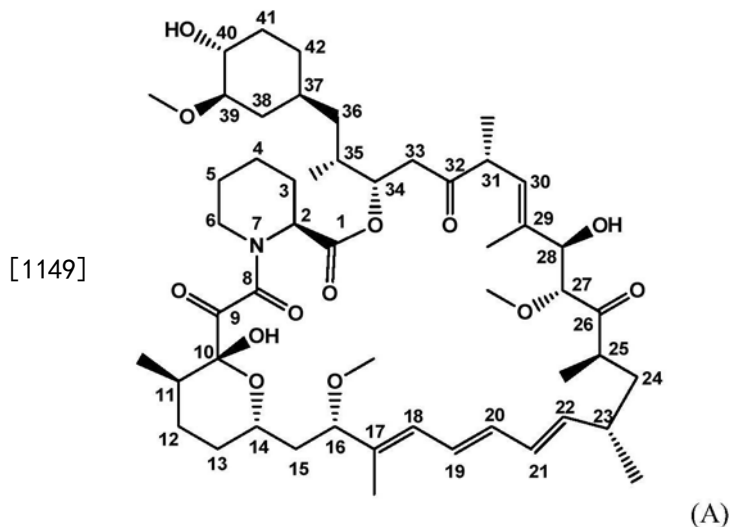
[1145] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂的剂量与至少5%但是不多于90%、至少10%但是不多于90%、至少15%但是不多于90%、至少20%但是不多于90%、至少30%但是不多于90%、至少40%但是不多于90%、至少50%但是不多于90%、至少60%但是不多于90%、至少70%但是不多于90%、至少5%但是不多于80%、至少10%但是不多于80%、至少15%但是不多于80%、至少20%但是不多于80%、至少30%但是不多于80%、至少40%但是不多于80%、至少50%但是不多于80%、至少60%但是不多于80%、至少5%但是不多于70%、至少10%但是不多于70%、至少15%但是不多于70%、至少20%但是不多于70%、至少30%但是不多于70%、至少40%但是不多于70%、至少50%但是不多于70%、至少5%但是不多于60%、至少10%但是不多于60%、至少15%但是不多于60%、至少20%但是不多于60%、至少30%但是不多于60%、至少40%但是不多于60%、至少5%但是不多于50%、至少10%但

是不多于50%、至少15%但是不多于50%、至少20%但是不多于50%、至少30%但是不多于50%、至少40%但是不多于50%、至少5%但是不多于40%、至少10%但是不多于40%、至少15%但是不多于40%、至少20%但是不多于40%、至少30%但是不多于40%、至少35%但是不多于40%、至少5%但是不多于30%、至少10%但是不多于30%、至少15%但是不多于30%、至少20%但是不多于30%、或至少25%但是不多于30%的mTOR抑制作用相关或提供这种mTOR抑制作用。

[1146] mTOR抑制作用的程度可以表述为或对应于P70S6激酶抑制作用的程度,例如,mTOR抑制作用的程度可以通过P70S6激酶活性下降的水平(例如,通过P70S6激酶底物的磷酸化下降)来确定。可以通过多种方法评价mTOR抑制作用的水平,如通过Boulay测定法测量P70S6激酶活性,如美国专利申请号2015/01240036中描述,所述文献因而通过引用的方式并入,或如美国专利号7,727,950中描述,所述文献因而通过引用的方式并入;通过蛋白质印迹法测量磷酸化S6的水平;或评价PD1阴性免疫效应细胞对PD1阳性免疫效应细胞比率的变化。

[1147] 如本文所用,术语“mTOR抑制剂”指在细胞中抑制mTOR激酶的化合物或配体、或其可药用盐。在一个实施方案中,mTOR抑制剂是变构抑制剂。变构性mTOR抑制剂包括中性三环状化合物雷帕霉素(西罗莫司(sirolimus))、雷帕霉素相关化合物,所述雷帕霉素相关化合物是与雷帕霉素具有结构和功能相似性的化合物,例如包括雷帕霉素衍生物、雷帕霉素类似物(也称作雷帕类似物)和抑制mTOR活性的其他大环内酯类化合物。在一个实施方案中,mTOR抑制剂是催化性抑制剂。

[1148] 雷帕霉素是吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)产生的已知大环内酯类抗生素,其具有式A中所示的结构。



[1150] 参见,例如,McAlpine, J.B., 等人, *J. Antibiotics* (1991) 44:688; Schreiber, S.L. 等人, *J. Am. Chem. Soc.* (1991) 113:7433; 美国专利号3,929,992。存在针对雷帕霉素提出的多个编号方案。为避免混淆,当本文中命名特定雷帕霉素类似物时,参考使用式A编号方案的雷帕霉素给出名称。

[1151] 可用于本发明中的雷帕霉素类似物例如是O-取代的类似物,其中雷帕霉素的环己基环上的羟基由其中R₁是羟烷基、羟烷氧基烷基、酰氨基烷基或氨基烷基的OR₁替换;例如,如US 5,665,772和WO 94/09010中所述的RAD001,也称作依维莫司,所述每篇文献的内容通过

引用的方式并入。

[1152] 其他合适的雷帕霉素类似物包括在26-或28-位置处取代的那些。雷帕霉素类似物可以是上文提到的类似物的差向异构体,特别地,在位置40、28或26取代的类似物的差向异构体,并且可以任选地进一步氢化,例如,如US6,015,815、WO 95/14023和WO 99/15530中所述,所述文献的内容通过引用的方式并入,例如ABT578,也称作佐他莫司或在US 7,091,213、WO 98/02441和WO 01/14387中描述的雷帕霉素类似物,所述文献的内容通过引用的方式并入,例如,AP23573,也称作地磷莫司。

[1153] 来自US 5,665,772的适用于本发明中的雷帕霉素类似物的例子包括但不限于40-0-苄基-雷帕霉素、40-0-(4'-羟甲基)苄基-雷帕霉素、40-0-[4'-(1,2-二羟乙基)]苄基-雷帕霉素、40-0-烯丙基-雷帕霉素、40-0-[3'-(2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4(S)-基)-丙-2'-烯-1'-基]-雷帕霉素、(2'E,4'S)-40-0-(4',5'-二羟戊-2'-烯-1'-基)-雷帕霉素、40-0-(2-羟)乙氧羰基甲基-雷帕霉素、40-0-(2-羟)乙基-雷帕霉素、40-0-(3-羟)丙基-雷帕霉素、40-0-(6-羟)己基-雷帕霉素、40-0-[2-(2-羟)乙氧基]乙基-雷帕霉素、40-0-[(3S)-2,2-二甲基二氧戊环-3-基]甲基-雷帕霉素、40-0-[(2S)-2,3-二羟丙-1-基]-雷帕霉素、40-0-(2-乙酰氧)乙基-雷帕霉素、40-0-(2-尼克酰基氧)乙基-雷帕霉素、40-0-[2-(N-吗啉代)乙酰氧]乙基-雷帕霉素、40-0-(2-N-咪唑基乙酰氧)乙基-雷帕霉素、40-0-[2-(N-甲基-N'-哌嗪基)乙酰氧]乙基-雷帕霉素、39-0-去甲基-39,40-0,0-亚乙基-雷帕霉素、(26R)-26-二氢-40-0-(2-羟)乙基-雷帕霉素、40-0-(2-氨基乙基)-雷帕霉素、40-0-(2-乙酰氨基乙基)-雷帕霉素、40-0-(2-尼克酰胺基乙基)氨基甲酸-雷帕霉素、40-0-(2-(N-甲基咪唑-2'-基)乙氧羰基酰胺基)乙基-雷帕霉素、40-0-(2-乙氧羰基氨基乙基)-雷帕霉素、40-0-(2-甲苯基亚磺酰氨基乙基)-雷帕霉素和40-0-[2-(4',5'-二羰乙氧基-1',2',3'-三唑-1'-基)-乙基]-雷帕霉素。

[1154] 可用于本发明中的其他雷帕霉素类似物是这些类似物,其中雷帕霉素的环己基环上的羟基和/或在28位置处的羟基替换为羟基酯基团,例如,US RE44,768中存在的雷帕霉素类似物,例如坦罗莫司。

[1155] 可用于前述发明中的其他雷帕霉素类似物包括那些类似物,其中在16位置处的甲氧基替换为另一个取代基,优选地(任选地羟基取代的)炔氧基、苄基、邻甲氧苄基或氯苄基和/或其中删除在39位置处的甲氧基连同39碳,从而雷帕霉素的环己基环变成缺少39位置甲氧基的环戊基环;例如,如WO 95/16691和W096/41807中所述,所述文献的内容通过引用的方式并入本文作为参考。可以进一步修饰类似物,从而在雷帕霉素的40位置处的羟基被烷基化和/或32-羰基被还原。

[1156] 来自WO 95/16691的雷帕霉素类似物包括但不限于16-去甲氧基-16-(戊-2-炔基)氧-雷帕霉素、16-去甲氧基-16-(丁-2-炔基)氧-雷帕霉素、16-去甲氧基-16-(炔丙基)氧-雷帕霉素、16-去甲氧基-16-(4-羟-丁-2-炔基)氧-雷帕霉素、16-去甲氧基-16-苄氧基-40-0-(2-羟乙基)-雷帕霉素、16-去甲氧基-16-苄氧基-雷帕霉素、16-去甲氧基-16-邻-甲氧苄基-雷帕霉素、16-去甲氧基-40-0-(2-甲氧乙基)-16-戊-2-炔基)氧-雷帕霉素、39-去甲氧基-40-去氧-39-甲酰基-42-去甲-雷帕霉素、39-去甲氧基-40-去氧-39-羟甲基-42-去甲-雷帕霉素、39-去甲氧基-40-去氧-39-羧基-42-去甲-雷帕霉素、39-去甲氧基-40-去氧-39-(4-甲基-哌嗪-1-基)羰基-42-去甲-雷帕霉素、39-去甲氧基-40-去氧-39-(吗啉-4-基)羰

基-42-去甲-雷帕霉素、39-去甲氧基-40-去氧-39-[N-甲基,N-(2-吡啶-2-基-乙基)]氨甲酰基-42-去甲-雷帕霉素和39-去甲氧基-40-去氧-39-(对甲苯磺酰脲甲基)-42-去甲-雷帕霉素。

[1157] 来自WO 96/41807的雷帕霉素类似物包括但不限于32-去氧-雷帕霉素、16-0-戊-2-炔基-32-去氧-雷帕霉素、16-0-戊-2-炔基-32-去氧-40-0-(2-羟-乙基)-雷帕霉素、16-0-戊-2-炔基-32-(S)-二氢-40-0-(2-羟乙基)-雷帕霉素、32(S)-二氢-40-0-(2-甲氧基)乙基-雷帕霉素和32(S)-二氢-40-0-(2-羟乙基)-雷帕霉素。

[1158] 另一个合适的雷帕霉素类似物是如US 2005/0101624中所述的啞他莫司(umirrolimus),所述文献的内容通过引用的方式并入。

[1159] RAD001,另外称作依维莫司(Afinitor®),具有化学名称(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-二羟-12-{(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-(2-羟乙氧基)-3-甲氧基环己基]-1-甲基乙基}-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-11,36-二氧杂-4-氮杂-三环并[30.3.1.0^{4,9}]三十七碳-16,24,26,28-四烯-2,3,10,14,20-五酮,如US 5,665,772和WO 94/09010中所述,所述每篇文献的内容是通过引用的方式并入。

[1160] 变构性mTOR抑制剂的其他例子包括西罗莫司(sirolimus)(雷帕霉素、AY-22989)、40-[3-羟-2-(羟甲基)-2-甲基丙酸酯]-雷帕霉素(也称作坦罗莫司或CCI-779)和地磷莫司(AP-23573/MK-8669)。变构性mTOR抑制剂的其他例子包括啞他莫司(ABT578)和啞他莫司。

[1161] 备选地或额外地,已经发现ATP-竞争性催化性mTOR抑制剂直接靶向mTOR激酶结构域并靶向mTORC1和mTORC2二者。也有比这类变构性mTOR抑制剂如雷帕霉素更有效的mTORC1抑制剂,因为它们调节雷帕霉素耐药性mTORC1输出,如4EBP1-T37/46磷酸化和帽依赖性翻译。

[1162] 催化性抑制剂包括:BEZ235或2-甲基-2-[4-(3-甲基-2-氧代-8-喹啉-3-基-2,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)-苯基]-丙腈或单甲苯磺酸盐形式(BEZ235的合成在WO 2006/122806中描述;CCG168(另外称作AZD-8055,Chresta,C.M.等人,Cancer Res,2010,70(1),288-298);其具有化学名称{5-[2,4-双-((S)-3-甲基-吗啉-4-基)-吡啶并[2,3d]嘧啶-7-基]-2-甲氧基-苯基}-甲醇;3-[2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基]-N-甲基苯甲酰胺(WO 09104019);3-(2-氨基苯并[d]咪唑-5-基)-1-异丙基-1H-吡唑[3,4-d]嘧啶-4-胺(WO 10051043和WO 2013023184);A N-(3-(N-(3-((3,5-二甲氧苯基)氨基)喹啉-2-基)氨磺酰)苯基)-3-甲氧基-4-甲基苯甲酰胺(WO 07044729和WO 12006552);PKI-587(Venkatesan,A.M.,J.Med.Chem.,2010,53,2636-2645),其具有化学名称1-[4-[4-(二甲基氨基)哌啶-1-羰基]苯基]-3-[4-(4,6-二吗啉代-1,3,5-三嗪-2-基)苯基]脲;GSK-2126458(ACS Med.Chem.Lett.,2010,1,39-43),其具有化学名称2,4-二氟-N-{2-甲氧基-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺;5-(9-异丙基-8-甲基-2-吗啉代-9H-嘌呤-6-基)嘧啶-2-胺(WO10114484);和(E)-N-(8-(6-氨基-5-(三氟甲基)吡啶-3-基)-1-(6-(2-氰丙-2-基)吡啶-3-基)-3-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-亚基)单氰胺(WO 12007926)。

[1163] 催化性mTOR抑制剂的其他例子包括8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮(WO 2006/122806)和Ku-

0063794 (Garcia-Martinez JM等人, Biochem J., 2009, 421 (1), 29-42)。Ku-0063794是雷帕霉素的哺乳动物靶(mTOR)的特异性抑制剂。WYE-354是催化性mTOR抑制剂的另一个例子(Yu K等人, (2009). Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. Cancer Res. 69 (15): 6232-6240)。

[1164] 根据本发明可用的mTOR抑制剂还包括前述任一者的前药、衍生物、可药用盐或其类似物。

[1165] 可以配制mTOR抑制剂,如RAD001,以基于本文所述的特定剂量,基于本领域充分建立的方法递送。特别地,美国专利号6,004,973(通过引用的方式并入本文)提供了随本文所述的mTOR抑制剂可用的制剂的例子。

[1166] 评价CAR有效性或样品适宜性的方法和生物标志物

[1167] 在另一个方面,本发明表征了一种评价或监测表达CAR的细胞疗法(例如,CD33 CAR疗法)在受试者(例如,患有癌症(例如,血液学癌)的受试者)中的有效性或CAR疗法(例如,CD33 CAR疗法)的样品(例如,单采样品)适宜性的方法。该方法包括获得CAR疗法有效性或样品适宜性的值,其中所述值表示表达CAR的细胞疗法的有效性或适宜性。

[1168] 在实施方案中,CAR疗法有效性或样品适宜性的值包括测量以下一项、两项、三项、四项、五项、六项或更多项(全部项):

[1169] (i) 样品(例如,单采样品或生产的表达CAR的细胞产物样品)中以下一者、两者、三者或更多者(例如,全部)的水平或活性:静息型 T_{EFF} 细胞、静息型 T_{REG} 细胞、较年轻的T细胞(例如,较年轻的CD4细胞或CD8细胞、或 γ/δ T细胞)或早期记忆T细胞或它们的组合;

[1170] (ii) 样品(例如,单采样品或生产的表达CAR的细胞产物样品)中以下一者、两者、三者或更多者(例如,全部)的水平或活性:活化型 T_{EFF} 细胞、活化型 T_{REG} 细胞、较年老的T细胞(例如,较年老的CD4细胞或CD8细胞)或晚期记忆T细胞或其组合;

[1171] (iii) 样品(例如,单采样品或生产的表达CAR的细胞产物样品)中免疫细胞耗竭标志物,例如,一种、两种或更多种免疫检查点抑制物(例如,PD-1、PD-L1、TIM-3和/或LAG-3)的水平或活性。在一个实施方案中,免疫细胞具有耗竭表型,例如,共表达至少两个耗竭标志物,例如,共表达PD-1和TIM-3。在其他实施方案中,免疫细胞具有耗竭表型,例如,共表达至少两个耗竭标志物,例如,共表达PD-1和LAG-3。

[1172] (iii) 样品(例如,单采样品或生产的表达CAR的细胞产物样品)中CD27和/或CD45RO⁻(例如,CD27⁺ CD45RO⁻)免疫效应细胞例如在CD4⁺或CD8⁺ T细胞群体中的水平或活性;

[1173] (v) 1、2、3、4、5、10、20或更多种选自CCL20、IL-17a和/或IL-6、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3、CD57、CD27、CD122、CD62L、KLRG1的生物标记物的水平或活性;;

[1174] (vi) 表达CAR的细胞产物样品(例如,表达CAR33的细胞产物样品)中的细胞因子水平或活性(例如,细胞因子库的质量);或

[1175] (vii) 生产的表达CAR的细胞产物样品中表达CAR的细胞的转导效率。

[1176] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中,表达CAR的细胞疗法包含多个表达CAR的免疫效应细胞(例如,群体),例如,多个T细胞或NK细胞(例如,群体),或其组合。在一个实施方案中,表达CAR的细胞疗法是CD33 CAR疗法。

[1177] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, (i) - (vii) 中一者或多者的测量从获自受试者的单采样品获得。可以在输注或回输之前评价单采样品。

[1178] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, (i) - (vii) 中一者或多者的测量从生产的表达CAR的细胞产物样品(例如, 表达CD33 CAR的细胞产物样品)获得。可以在输注或回输之前评价生产的表达CAR的细胞产物。

[1179] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, 在接受表达CAR的细胞疗法之前、接受期间或接受之后评价受试者。

[1180] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, (i) - (vii) 中一者或多者的测量评价了一种或多种基因表达、流式细胞术或蛋白质表达的特征。

[1181] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, 该方法还包括基于(i) - (vii) 中一者或多者的测量, 将受试者鉴定为反应者、非反应者、复发者或非复发者。

[1182] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, 如与非反应者相比, 反应者(例如, 完全反应者)具有或经鉴定为具有GZMK、PPF1BP2或原初T细胞中一者、两者或更多者(全部)的更高水平或活性。

[1183] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, 如与反应者相比, 非反应者具有或经鉴定为具有IL22、IL-2RA、IL-21、IRF8、IL8、CCL17、CCL22、效应T细胞或调节性T细胞中一者、两者、三者、四者、五者、六者、七者、或更多者(例如, 全部)的更高水平或活性。

[1184] 在一个实施方案中, 复发者是这样的患者, 所述患者与非复发者相比具有或经鉴定为具有增加的以下一个或多个(例如, 2、3、4个或全部)基因表达水平: MIR199A1、MIR1203、uc021ovp、ITM2C和HLA-DQB1和/或与非复发者相比具有或经鉴定为具有减少的以下一个或多个(例如, 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11个或全部)基因表达水平: PPIAL4D、TTY10、TXLNG2P、MIR4650-1、KDM5D、USP9Y、PRKY、RPS4Y2、RPS4Y1、NCRNA00185、SULT1E1和EIF1AY。

[1185] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, 与参比值(例如, 非反应者CD8⁺ T细胞百分数)相比, 完全反应者具有或经鉴定为具有更大(例如, 统计显著更大)的CD8⁺ T细胞百分数。

[1186] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, 与参比值(例如, 非反应者CD27⁺ CD45RO⁻免疫效应细胞数目)相比, 完全反应者具有或经鉴定为具有例如在CD8⁺群体中更大的CD27⁺ CD45RO⁻免疫效应细胞百分数。

[1187] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, 与参比值(例如, 非反应者CD4⁺ T细胞百分数)相比, 完全反应者或部分反应者具有或经鉴定为具有更大(例如, 统计显著更大)的CD4⁺ T细胞百分数。

[1188] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, 与参比值(例如, 非反应者的静息型T_{EFF}细胞、静息型T_{REG}细胞、较年轻的T细胞(例如, 较年轻的CD4细胞或CD8细胞)或早期记忆T细胞数目)相比, 完全反应者具有或经鉴定为具有以下一者、两者、三者或更多者(例如, 全部)的更大百分数: 静息型T_{EFF}细胞、静息型T_{REG}细胞、较年轻的T细胞(例如, 较年轻的CD4细胞或CD8细胞、或 γ/δ T细胞)或早期记忆T细胞或它们的组合;

[1189] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, 与参比值(例如, 反应者的活化型T_{EFF}细胞、活化型T_{REG}细胞、较年老的T细胞(例如, 较年老的CD4细胞或CD8细胞)或晚期记忆T细胞数目)相比, 非反应者具有或经鉴定为具有以下一者、两者、三者或更多者(例如, 全部)

的更大百分数:活化型 T_{EFF} 细胞、活化型 T_{REG} 细胞、较年老的T细胞(例如,较年老的CD4细胞或CD8细胞)或晚期记忆T细胞或它们的组合。

[1190] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中,非反应者具有或经鉴定为具有更大百分数的免疫细胞耗竭标志物,例如,一种、两种或更多种免疫检查点抑制物(例如,PD-1、PD-L1、TIM-3和/或LAG-3)。在一个实施方案中,与来自反应者的表达PD-1或LAG-3的免疫效应细胞的百分数相比,非反应者具有或经鉴定为具有更大的表达PD-1,PD-L1,或LAG-3的免疫效应细胞(例如,CD4+ T细胞和/或CD8+ T细胞)(例如,表达CAR的CD4+细胞和/或CD8+ T细胞)的百分数。

[1191] 在一个实施方案中,非反应者具有或经鉴定为具有更大的具有耗竭表型的免疫细胞(例如,共表达至少两种耗竭标志物(例如,共表达PD-1、PD-L1和/或TIM-3)的免疫细胞)的百分数。在其他实施方案中,非反应者具有或经鉴定为具有更大的具有耗竭表型的免疫细胞(例如,共表达至少两种耗竭标志物(例如,共表达PD-1和LAG-3)的免疫细胞)的百分数。

[1192] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中,与表达CAR的细胞疗法的反应者(例如,完全反应者)相比,非反应者在表达CAR的细胞群体(例如,CD33 CAR+细胞群体)中具有或经鉴定为具有更大的PD-1/PD-L1+/LAG-3+细胞百分数。

[1193] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中,部分反应者在表达CAR的细胞群体(例如,CD33 CAR+细胞群体)中具有或经鉴定为具有比反应者更高的PD-1/PD-L1+/LAG-3+细胞百分数。

[1194] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中,非反应者在表达CAR的细胞群体(例如,CD33 CAR+细胞群体)中具有或经鉴定为具有PD1/PD-L1+ CAR+耗竭表型和LAG3的共表达。

[1195] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中,与反应者(例如,完全反应者)相比,非反应者在表达CAR的细胞群体(例如,CD33 CAR+细胞群体)中具有或经鉴定为具有更大的PD-1/PD-L1+/TIM-3+细胞百分数。

[1196] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中,部分反应者在表达CAR的细胞群体(例如,CD33 CAR+细胞群体)中具有或经鉴定为具有比反应者更高的PD-1/PD-L1+/TIM-3+细胞百分数。

[1197] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中,单样品中存在的CD8+ CD27+ CD45RO-T细胞是受试者对表达CAR的细胞疗法(例如,CD33 CAR疗法)反应的阳性预测指标。

[1198] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中,单样品中PD1+ CAR+和LAG3+或TIM3+ T细胞的高百分数是受试者对表达CAR的细胞疗法(例如,CD33 CAR疗法)反应的不良预后预测指标。

[1199] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中,反应者(例如,完全或部分反应者)具有以下一项、两项、三项或更多项(或全部项)特征:

[1200] (i) 与参比值(例如,非反应者CD27+免疫效应细胞数目)相比,具有更大的CD27+免疫效应细胞数目;

[1201] (ii) 与参比值(例如,非反应者CD8+ T细胞数目)相比,具有更大的CD8+ T细胞数目;

[1202] (iii) 与参比值相比 (例如, 非反应者的表达一种或多种检查点抑制物的免疫细胞数目), 具有较低数目的表达一种或多种检查点抑制物 (例如, 选自PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3或KLRG-1, 或它们的组合的检查点抑制物) 的免疫细胞; 或

[1203] (iv) 与参比值 (例如, 非反应者的静息型 T_{EFF} 细胞、静息型 T_{REG} 细胞、原初CD4细胞、未刺激的记忆细胞或早期记忆T细胞数目) 相比, 具有以下一者、两者、三者或更多者 (例如, 全部) 的更大百分数: 静息型 T_{EFF} 细胞、静息型 T_{REG} 细胞、原初CD4细胞、未刺激的记忆细胞或早期记忆T细胞或其组合。

[1204] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, (vi) 的细胞因子水平或活性选自细胞因子CCL20/MIP3a、IL17A、IL6、GM-CSF、IFN γ 、IL10、IL13、IL2、IL21、IL4、IL5、IL9或TNF α 或其组合中的一者、两者、三者、四者、五者、六者、七者、八者或更多者 (例如, 全部)。细胞因子可以选自IL-17a、CCL20、IL2、IL6或TNF α 中的一者、两者、三者、四者或更多者 (例如, 全部)。在一个实施方案中, 增加的细胞因子水平或活性选自IL-17a和CCL20中的一者或两者, 表示反应性增加或复发减少。

[1205] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, 在(vii) 中15%或更高的转导效率表示反应性增加或复发减少。

[1206] 在本文所公开的任何方法的一些实施方案中, 在(vii) 中小于15%的转导效率表示反应性减少或复发增加。

[1207] 在实施方案中, 可以根据临床标准进一步评价借助本文方法鉴定的反应者、非反应者、复发者或非复发者。例如, 完全反应者具有或经鉴定为对治疗显示出完全反应 (例如, 完全缓解) 的患有疾病 (例如, 癌症) 的受试者。如本文所述, 可以例如使用NCCN指南[®]或Cheson等人, J Clin Oncol 17:1244(1999) 和Cheson等人, “Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma”, J Clin Oncol 25:579-586(2007) (所述两份文献均通过引用的方式完整并入本文), 鉴定完全反应。部分反应者具有或经鉴定为对治疗显示出部分反应 (例如, 部分缓解) 的患有疾病 (例如, 癌症) 的受试者。可以例如, 使用NCCN指南[®]或如本文所述的Cheson标准鉴定部分反应。非反应者具有或经鉴定为患有对治疗不显示出反应的患有疾病 (例如, 癌症) 的受试者, 例如, 该患者具有稳定病情或进行性病情。可以例如, 使用NCCN指南[®]或如本文所述的Cheson标准鉴定非反应者。

[1208] 备选地或与本文所公开的方法组合时, 响应于所述值, 进行以下一项、两项、三项、四项或更多项:

[1209] 例如向反应者或非复发者实施表达CAR的细胞疗法;

[1210] 实施改变的表达CAR的细胞疗法给药;

[1211] 改变表达CAR的细胞疗法的方案或时间过程;

[1212] 例如向非反应者或部分反应者施用与表达CAR的细胞疗法 (例如, 检查点抑制物, 例如, 本文所述的检查点抑制物) 组合的额外药剂;

[1213] 向非反应者或部分反应者实施在表达CAR的细胞疗法治疗之前增加受试者中较年轻的T细胞数目的疗法;

[1214] 例如, 针对鉴定为非反应者或部分反应者的受试者, 调整表达CAR的细胞疗法的生产工艺, 例如, 在引入编码CAR的核酸之前富集较年轻的T细胞, 或增加转导效率;

[1215] 例如, 针对非反应者或部分反应者或复发者, 实施替代疗法; 或

[1216] 如果受试者是或经鉴定为非反应者或复发者,减少 T_{REG} 细胞群体和/或 T_{REG} 基因特征标识,例如,通过一种或多种CD25耗竭,施用环磷酰胺、抗GITR抗体或其组合做到。

[1217] 在某些实施方案中,用抗GITR抗体预治疗受试者。在某个实施方案中,在输注或回输之前用抗GITR抗体治疗受试者。

[1218] 生物聚合物递送方法

[1219] 在一些实施方案中,一种或多种如本文中公开的表达CAR的细胞可以通过生物聚合物支架,例如,生物聚合物植入物施用或递送至受试者。生物聚合物支架可以支持或增强本文所述的表达CAR的细胞的递送、扩充和/或分散。生物聚合物支架包含可以是天然存在或合成的生物相容性(例如,基本上不诱导炎性反应或免疫应答)和/或生物可降解性聚合物。

[1220] 合适的生物聚合物的例子包括但不限于单独或按任何浓度和以任何比率与任何其他聚合物组分组合的琼脂、琼脂糖、藻酸盐、藻酸盐/磷酸钙粘固剂(CPC)、 β -半乳糖苷酶(β -GAL)、(1,2,3,4,6-五乙酰 α -D-半乳糖)、纤维素、壳多糖、壳聚糖、胶原蛋白、弹性蛋白、明胶、透明质酸胶原蛋白、羟基磷灰石、聚(3-羟丁酸酯-共-3-羟-己酸酯)(PHBHHx)、聚(丙交酯)、聚(己内酯)(PCL)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)、聚环氧乙烷(PEO)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚环氧丙烷(PPO)、聚乙烯醇(PVA)、丝、大豆蛋白和大豆蛋白分离物。可以用促进黏附或移行促进的分子(例如,与淋巴细胞的胶原蛋白受体结合的胶原蛋白拟似肽和/或增强待递送细胞的递送、扩充或功能(例如,抗癌活性)的刺激分子)增强或修饰生物聚合物。生物聚合物支架可以是可注射物,例如,凝胶或半固体,或固态组合物。

[1221] 在一些实施方案中,将本文所述的表达CAR的细胞铺种到生物聚合物支架上,之后递送至受试者。在实施方案中,生物聚合物支架还包含本文所述的一种或多种额外治疗药(例如,另一表达CAR的细胞、抗体、或小分子)或增强表达CAR的细胞活性的物质,例如,掺入支架的生物聚合物或与支架的生物聚合物缀合。在实施方案中,将生物聚合物支架在肿瘤处或在足以介导抗肿瘤作用的肿瘤附近注射(例如,瘤内注射)或手术植入。生物聚合物组合物和用于递送它们的方法的额外例子在Stephan等人,Nature Biotechnology,2015,33:97-101;和WO 2014/110591中描述。

[1222] 药物组合物和治疗

[1223] 本发明的药物组合物可以包含与一种或多种药学或生理学可接受载体、稀释剂或赋形剂组合的如本文所述的表达CAR的细胞,例如,多种表达CAR的细胞。这类组合物可以包含缓冲液如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;糖如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。在一个方面,配制本发明的组合物以便静脉内施用。

[1224] 本发明的药物组合物可以按适于待治疗(或预防)疾病的方式施用。施用的量和频率将由这类因素决定,如患者的状况和患者疾病的类型和严重性,不过适宜的剂量可以通过临床试验确定。

[1225] 在一个实施方案中,药物组合物基本上不含(例如,不存在)可检测水平的杂质,例如,所述杂质选自内毒素、支原体(Mycoplasma)、有复制能力的慢病毒(RCL)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残余抗CD3/抗CD28包被的珠、小鼠抗体、汇集的人血清、牛血清白蛋白、牛血清、培养基组分、载体包装细胞或质粒组分、细菌和真菌。在一个实施方案中,细菌是选自以

下的至少一种:粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*)、白假丝酵母 (*Candida albicans*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 和化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) A群。

[1226] 当指出“免疫有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本发明组合物的精确量可以由医师在考虑年龄、体重、肿瘤尺寸、感染或转移程度和患者(受试者)状况的个体差异时确定。通常可以声称,本文所述的包含T细胞的药物组合物可以按 10^4 至 10^9 个细胞/kg体重,在一些情况下 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重(包括这些范围内的全部整数)的剂量施用。也可以按这些剂量施用T细胞组合物多次。细胞可以通过使用免疫疗法中公知的输注技术施用(参见,例如,Rosenberg等人, *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988)。

[1227] 在某些方面,可以需要施用活化的T细胞至受试者并且随后接着回抽血液(或进行单采血液成分术),根据本发明活化来自其中的T细胞并向患者回输这些活化和扩充的T细胞。这个过程可以每数周实施多次。在某些方面,可以活化来自10cc至400cc抽血的T细胞。在某些方面,活化来自20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc抽血的T细胞。

[1228] 施用主题组合物可以按任何便利方式实施,包括气溶胶吸入、注射、摄入、输血、植入或移植。本文所述的组合物可以经动脉、皮下、真皮内、瘤内、淋巴结内、髓内、肌内、通过静脉内(i.v.)注射、或腹腔内施用至患者。在一个方面,通过真皮内或皮下注射向患者施用本发明的T细胞组合物。在一个方面,通过静脉内注射施用本发明表达CAR的细胞(例如,T细胞或NK细胞)组合物。可以将表达CAR的细胞(例如,T细胞或NK细胞)的组合物直接注射至肿瘤、淋巴结或感染部位中。

[1229] 在一个特定的示例性方面,受试者可以接受白细胞去除术,其中将白细胞收集、富集或离体耗竭以选择和/或分离目的细胞,例如,免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)。可以通过本领域已知的方法扩充和处理这些免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)分离物,从而可以引入本发明的一个或多个CAR构建体,因而产生本发明表达CAR的细胞(例如,CAR T细胞或表达CAR的NK细胞)。有需求的受试者可以随后接受高剂量化疗的标准治疗,接着进行外周血干细胞移植。在某些方面,在移植后或与移植同时地,受试者接受扩充的本发明表达CAR的细胞(例如,T细胞或NK细胞)的输注。在一个额外的方面,将扩充的细胞在手术前或在之后施用。

[1230] 在实施方案中,对受试者进行淋巴细胞耗竭,例如,在施用表达本文所述的CAR(例如,本文所述的结合CD33的CAR)的一个或多个细胞之前。在实施方案中,淋巴细胞耗竭包括施用以下一者或多者:美法仑、环磷氮芥(cytosan)、环磷酰胺和氟达拉滨。

[1231] 待施用至患者的上述疗法的剂量将随正在治疗的病症的确切性质和治疗的接受者变动。可以根据本领域接受的惯例进行人类施用剂量的放大。对于成年患者,CAMPATH的剂量例如通常将在1至约100mg范围内,通常每日施用1天和30天之间的时间。优选的每日剂量是1至10mg每日,不过在一些情况下,使用多至每日40mg的更大剂量(美国专利号6,120,766中所述)。

[1232] 在一个实施方案中,将CAR引入免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)中,例如,使

用体外转录引入,并且受试者(例如,人)接受初始施用本发明的CAR免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)以及一次或多次后续施用本发明的CAR免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞),其中一次或多次后续施用是先前施用后少于15天,例如,14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天施用。在一个实施方案中,将本发明的CAR免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)每周多于一次施用至受试者(例如,人),例如,将本发明CAR免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)每周2、3或4次实施施用。在一个实施方案中,受试者(例如,人类受试者)每周接受CAR免疫效应细胞(例如,T细胞,NK细胞)的多于一次施用(例如,每周2、3或4次施用)(本文也称作一个周期),随后一周不施用CAR免疫效应细胞(例如,T细胞,NK细胞),并且随后将CAR免疫效应细胞(例如,T细胞,NK细胞)的一次或多次额外施用(例如,每周多于一次施用CAR免疫效应细胞(例如,T细胞,NK细胞))施用至受试者。在另一个实施方案中,受试者(例如,人类受试者)接受多于一个周期的CAR免疫效应细胞(例如,T细胞,NK细胞)并且每个周期之间的时间少于10、9、8、7、6、5、4或3天。在一个实施方案中,CAR免疫效应细胞(例如,T细胞,NK细胞)每周每隔1日施用,施用3次。在一个实施方案中,将本发明的CAR免疫效应细胞(例如,T细胞,NK细胞)施用至少两、三、四、五、六、七、八或更多周。

[1233] 在一个方面,使用慢病毒载体(如慢病毒)生成表达CD33 CAR的细胞(例如,CD33 CART或表达CD33CAR的NK细胞)。以这种方式生成的表达CAR的细胞(例如,CART或表达CAR的NK细胞)将具有稳定的CAR表达。

[1234] 在一个方面,使用病毒载体(如 γ 逆转录病毒载体,例如,本文所述的 γ 逆转录病毒载体)生成表达CAR的细胞,例如,CART。使用这些载体生成的CART可以具有稳定的CAR表达。

[1235] 在一个方面,表达CAR的细胞(例如,CART或表达CAR的NK细胞)在转导后瞬时表达CAR载体4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15天。可以通过递送RNA CAR载体实现CAR的瞬时表达。在一个方面,将CAR RNA通过电穿孔法转导入细胞(例如,T细胞或NK细胞)中。

[1236] 使用瞬时表达CAR的细胞(例如,CART或表达CAR的NK细胞)(尤其用携带鼠scFv的表达CAR的细胞(例如,CART或表达CAR的NK细胞))治疗的患者中可出现的潜在问题是多次治疗后的变态反应。

[1237] 在不受这个理论约束的情况下,认为这种变态反应可能由患者形成抗CAR体液应答(即,具有抗IgE同种型的抗CAR抗体)引起。认为当存在10至14天抗原暴露间断期的情况下,产生抗体的患者细胞发生从(不引起变态反应的)IgG同种型至IgE同种型的类别转换。

[1238] 如果患者在短暂CAR疗法(如由RNA转导产生的那些)过程期间面临产生抗CAR抗体反应的高风险,表达CAR的细胞(例如,CART或表达CAR的NK细胞)输注间断期不应当持续超过10至14天。

实施例

[1239] 通过参考以下实验实施例进一步详述本发明。除非另外说明,否则仅出于说明目的提供这些实施例并且它们不意在起到限制作用。因此,本发明无论如何不应当解释为受以下实施例限制,反而应当解释为涵盖因本文提供的教授内容变得显而易见的任何和全部变型。

[1240] 在不进一步描述的情况下,认为使用前文描述和以下示意性实施例,本领域普通

技术人员可以制得并利用本发明的化合物并实施要求保护的方法。以下工作实施例具体地指出本发明的多个方面并且不得解释为以任何方式限制本公开的剩余部分。

[1241] 实施例1:人源化CAR构建体

[1242] 在AML患者的原发性专有样品中通过流式细胞术,使用市售抗体(克隆HIM3-4, eBioscience;或克隆WM53, Biolegend)测量CD33水平。本文提供的结果说明CD33在许多原发性AML患者样品中表达(使用标准侧向散射^低CD45^嗜特征对AML母细胞设门);n=每组35-46个)。

[1243] 图3中显示该实施例中所用CAR构建体的示意图。全部都是使用41BB和CD3 ζ 信号传导的第二代CAR。CART33的scFv衍生自克隆MY9-6。

[1244] CART33的体外活性

[1245] 本文所述的实验测量了CART33介导的T细胞脱颗粒。将CART33转导的T细胞和UTD T细胞与CD33⁺细胞系MOLM14和对照ALL细胞系NALM6温育并且通过流式细胞术测量CD107a脱颗粒。在MOLM14存在下,鼠CART33构建体和人源化CART33构建体的表达均激发特异性脱颗粒(P<0.001)(图4)。

[1246] 本文所述的实验测量了响应于CART33的细胞因子产生。表达人源化和鼠CART33的T细胞与MOLM14温育后均产生细胞因子(图5)。通过流式细胞术测量胞内肿瘤坏死因子 α 和干扰素 γ 。

[1247] 本文所述的实验测量了表达CART123的T细胞和表达CART33的T细胞的增殖。测量响应于MOLM14的人源化CART33和鼠CART33增殖。图6中显示结果。T细胞用CFSE标记并且在对照条件下或者与MOLM14温育120小时。未增殖的T细胞保留CFSE表达的单一明亮峰(依据FITC通道中的绿色荧光),而CART细胞的增殖具有多于一个CFSE峰和低于基线的表达。

[1248] 本文所述的实验测量了对表达CART123的T细胞、人源化CART33的T细胞和鼠CART33的T细胞的特异性杀伤。将T细胞与MOLM14或NALM6(对照)温育24小时。在低E:T比率,与鼠CART33相比,huCART33的表达导致显著更多的特异性杀伤(图7)。在CFSE-标记肿瘤细胞(例如Cao等人,Cytometry Part A 2010;7&A:534-545)后或通过将CART细胞与表达荧光素酶的靶细胞按多种效应子对靶比率温育直至20小时,随后对靶细胞的光子发射进行光学成像,使用基于流式细胞术的测定法,测量杀伤作用。在后一种测定法中,活的靶细胞数目与发射的光子的数目正相关。

[1249] 与仅用T细胞介质、PMA/离子霉素、MOLM14或NALM6(对照细胞系)温育24小时后,使用30-plex Luminex试剂盒(Invitrogen)测定表达人源化CART33、鼠CART33、CART123的T细胞的细胞因子谱(图8)。

[1250] CART33(IgG4铰链)和CART33(CD8铰链)具有等价的体外活性

[1251] 本文所述的实验测量脱颗粒。将CART33(IgG4铰链)、CART33(CD8铰链)、CART123和未转导的T细胞与CD33⁺细胞系MOLM14温育并且通过流式细胞术测量CD107a脱颗粒。本文展示的结果显示,两种CART33构建体在MOLM14存在下均发生特异性脱颗粒(图8)。

[1252] 本文所述的实验测量了细胞因子产生。与MOLM14细胞系温育后,CART33构建体和CART123均特异性诱导细胞因子产生(图9)。通过流式细胞术测量胞内肿瘤坏死 α 、MIP1a和干扰素 γ 。

[1253] 本文所述的实验测量了未转导的对照、表达CART33(IgG4铰链)的T细胞、表达

CART33 (CD8铰链)的T细胞或表达CART123的T细胞响应于MOLM14而增殖(图10)。T细胞用CFSE标记并且与MOLM14温育120小时。通过CFSE稀释测量增殖。未增殖的T细胞经CFSE鲜亮染色并显示单峰。将一次细胞分裂视为两个峰,两次细胞分裂视为三个峰等。

[1254] CART33-CD8H、CART33-IgG4H和CART123的等价体内抗肿瘤作用

[1255] 为了比较CART33-CD8H、CART33-IgG4H和CART123的体内抗肿瘤作用,对NOD-SCID-共同 γ 链敲除(NSG)小鼠静脉内注射 1×10^6 个AML细胞系MOLM14并且在6天后针对植入成像。在第7日,将小鼠用表达CART33(IgG4铰链)、CART33(CD8铰链)、CART123的T细胞或对照运载体(未转导的细胞)处理。注射的T细胞的总数是 2×10^6 IV。每周连续成像跟踪小鼠以评估肿瘤负荷(图11)。

[1256] 通过生物发光成像(BLI)获得肿瘤负荷随时间推移的数据。数据来自一个实验($n =$ 每组5只),图12中显示4个独立小鼠实验的代表。本文提供的结果展示了CART33-CD8H、CART33-IgG4H和CART123T细胞的等价体内抗肿瘤作用。

[1257] CART33和CART123在体内产生等价的原发性AML根除作用

[1258] 为了比较CART33和CART123的原发性AML体内根除作用,将原发性AML样品以 5×10^6 个细胞静脉内注射人细胞因子IL3/GM-CSF/SCF转基因的NSG小鼠(NSGS小鼠)。在2-4周后通过眶后采血证实植入并且随后将小鼠用CART33、CART123或对照运载体(未转导的细胞)处理。注射的T细胞的总数是 1×10^5 i.v.。一系列眶后采血跟踪小鼠以评估AML负荷(图13)。

[1259] 在基线、第14日和第+70日进行来自UTD、CART33或CART123处理的小鼠的外周血分析(图14)。使用标准技术,从麻醉小鼠的眶后窦获得血液。随后在1ml ACK裂解缓冲液中裂解标准体积50-60 μ l的血液。随后使用荧光标记的抗体对血液染色并且使用流式细胞术检测AML或CART细胞的存在。在CART33或CART123处理的小鼠中未检出AML。

[1260] 在不同时间点借助来自眶后采血的母细胞/ μ l测量疾病负荷(图15)。

[1261] 测量了用CART33、CART123或UTD(CART33或CART123与UTD比较时, $p < 0.001$)处理的小鼠的存活(图16)。本文提供的结果展示了CART33和CART123在体内产生等价的原发性AML根除作用。

[1262] CART33细胞的造血干细胞毒性

[1263] 为了确定CART33细胞的造血干细胞毒性,在注射衍生自胎肝的人CD34+细胞后6-8周,对人源化免疫系统(HIS)小鼠眶后采血以证实人细胞的植入。将小鼠随后用CART33或UTD(各 1×10^6 个细胞)处理并且每周连续眶后采血。随后在第28日使小鼠安乐死并且收获及分析器官(图17)。

[1264] 实验完成时从第28日起,通过流式细胞术(借助眶后采血)进行外周血分析(图18)。来自CART33处理、UTD或未处理($n = 5$)的小鼠的第28日外周血分析的统计分析结果显示,CART33对单核细胞和CD33⁺髓系细胞产生显著毒性,同时B细胞和血小板稀少(图19)。在第28日借助流式细胞术的骨髓分析结果显示,CART33处理导致对单个、huCD45暗、谱系阴性设门的髓样祖细胞(CD34⁺ CD38⁺)及造血干细胞(CD34⁺CD38⁻)明显减少(图20)。

[1265] 股骨的切片取自UTD T细胞或CART33细胞处理后第28日时的小鼠。通过IHC进行huCD45和CD34染色(图21)。在对照T细胞和CART33之间没有huCD45的差异,不过这两个组均显示较少的huCD45染色,这可能与同种异体人-抗人效应一致。CART33处理的小鼠中存在CD34+细胞的特异性减少。结果代表两个实验。

[1266] CART33和CART123在体内产生等价的造血毒性

[1267] 为了确定CART33和CART123的体内造血毒性,NSGS小鼠接受腹膜内施用白消安,随后次日接受来自正常供体的 2×10^6 个T细胞耗竭的骨髓细胞。在4周后通过外周血的流式细胞分析证实植入,并且随后用 1×10^6 个自体T细胞处理小鼠,所述自体T细胞用CART33、CART123或UTD处理。随后在第7日和第14日借助眶后采血追踪小鼠并且在第14日使其安乐死供尸体剖检(图22)。

[1268] 在第28日通过流式细胞术进行骨髓分析。CART33和CART123处理导致对huCD45暗, Lin⁻设门的髓样祖细胞(CD34⁺ CD38⁺)及造血干细胞(CD34⁺CD38⁻)明显减少。结果代表两个实验(图23)。本文提供的结果提示CART33和CART123在体内产生等价的造血毒性。

[1269] 来自MDS患者的CD34富集的BM与UTD、CART33(IgG4铰链)、CART33(CD8铰链)或CART123温育。在CART33或CART123处理的样品中CD45暗CD34⁺细胞显著减少(图24)。本文提供的结果展示了CART33和CART123是细胞毒性脊髓发育不良综合征(MDS)骨髓细胞。

[1270] 在实施例5-6中描述了检查人源化CART33活性的额外实验。

[1271] 实施例2:CAR构建体

[1272] 生成完全人抗CD33单链可变片段(scFv)并连同胞内CD3 ζ 链和胞内共刺激结构域4-1BB一起克隆入慢病毒表达载体,并给予表1中描述的名称(这在发明详述中显示)。

[1273] VL结构域和VH结构域在scFv中出现的顺序变动(即,VL-VH、或VH-VL取向),并且其中3个或4个拷贝的“G4S”(SEQ ID NO:25)亚单位(其中每个亚单位包含序列GGGG(S) (SEQ ID NO:25)(例如,(G4S)₃(SEQ ID NO:28)或(G4S)₄(SEQ ID NO:27))连接可变结构域以产生scFv结构域的完整性,如表3中所示。

[1274] 在本文表2中提供人scFv片段的序列(SEQ ID NO:39-83,包括任选的前导序列)(在发明详述中)。在发明详述的表9中本文提供无前导序列的人scFv片段的序列(核苷酸序列为SEQ ID NO:255-261,和氨基酸序列为SEQ ID NO:262-268)。

[1275] 这些克隆均在衍生自CD3 ζ 链的共刺激结构域的信号结构域中含有Q/K残基变化。CAR scFv片段随后克隆至慢病毒载体中以在单个编码性可读框中并使用表达用EF1 α 启动子(SEQ ID NO:11),产生全长CAR构建体。

[1276] 在发明详述中列出CAR构建体的序列及其结构域序列。如实施例4中所述实施人CAR构建体的分析。

[1277] 实施例3:人源化CART序列

[1278] 2213鼠抗CD33IgG4核苷酸序列(SEQ ID NO:138)

[1279] GTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAG AACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAG CAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGA TGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAA CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAA CCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA ACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAG GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGC GGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAAC

TATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTT
ACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAAT
CTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTC
TTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGC
CGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTA
GTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC
AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGC
GGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAG
CGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAAC
AGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTTCGCCACCTCTGAC
TTGAGCGTGCATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGCCTTTTTACGG
TTCTTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC
CGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG
AGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGAC
TGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGTCACTATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTAT
GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG
CCAAGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTGCAAGCTTAATGTAGTCTTATGCAATACTCT
TGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAGCACCGTGCATGCCGATTG
GTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGA
ATTGCCGATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACATAAACGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCT
GAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTA
GTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGAAAATCTCTAG
CAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAAGCGAAAAGGAAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGA
AGCGCGCACGGCAAGAGGGCAGGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGA
GAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGG
GGAAAGAAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGCAGTTAATCCTGGCCT
GTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTCAGACAGGATCAGAAGAACTTA
GATCATTATATAATACAGTAGCAACCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTA
GACAAGATAGAGGAAGAGCAAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAG
GAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCC
ACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGG
AGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGC
AGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAG
CTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAGATACTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGAAAA
ACTCATTTCACCACTGCTGTGCCTTGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGA
CCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGAAAACCAG
CAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTAACATAACAAATTG
GCTGTGGTATATAAATTAATTCATAATGATAGTAGGAGCTTGGTAGGTTAAGAATAGTTTTTGTGTACTTTCTA
TAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGG

CCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTA
TCGATTAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTC
ATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAA
TTAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTACCAGTACTACAGTTAAGGCCG
CTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGA
ATAAAGAATTAAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTA
TTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAAC
AGACATACAAATAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAG
ATCCAGTTTGGCTGCATACGCGTCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCG
AGAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTC
GTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTT
TCGCAACGGGTTTGGCCGAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATG
GCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGG
TGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTTGTAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGG
CCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTT
GATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCG
GTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGCGGGGCTGCGAGCGCG
GCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGCTGTATCG
CCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCT
GCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGTAGTCAACACACAAAGGAAAAGGGCCTT
TCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACTGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGTGCT
TTTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACACTGAGTGGGTGGAGACT
GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCT
CAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAGCTAGCTCTAGAGCCACCATGGCCC
TGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCCGGATCCAACATCATGCTGACC
CAGAGCCCTAGCAGCCTGGCCGTGCTGCGGCGAGAAAAGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTCTT
CAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGG
CCAGCACCAGAGAAAAGCGGCGTGCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGC
AGCGTGCAGAGCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCGGAGGCACCAA
GCTGGAATCAAGAGAGGCGGCGGAGGCTCAGGCGGAGGCGGATCTAGTGGCGGAGGATCTCAGGTGCAGCTGCAGC
AGCCAGGCGCCGAGGTGCTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGATGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGC
TACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGA
CATCAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGC
TGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGACTACTGCGCCAGAGAAGTGGGCTGCGGTACTTCGATGTGTGG
GGAGCCGGCACCAACCGTGACCGTGTATCTTCCGAGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGGCCTGCCCC
CGAGTTCTGGGCGGACCCAGCGTGTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCG
AGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGT
GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAAGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAA

CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAG
AACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCA
GCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCG
TGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC
CAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATGATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCT
CCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGA
GACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCT
AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAA
GGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAAGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTG
GTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCC
CGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAG
GCAACGTGGCGTGGTGTGACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGCTCC
TTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGGCCGCTGCTGGACA
GGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTG
TGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCTTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCC
GCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCC
GCCTCCCCGCTGGAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTT
TAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTC
TCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCT
TGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCGCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAG
TCAGTGTGAAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTCAGTATTTATAACTTGCAAAGAAATGAAT
ATCAGAGAGTGAGAGGAACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAA
ATAAAGCATTTTTTTTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAG
CTATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAG
GCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGCTAGGGACGTACC
CAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTG
GCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGAT
CGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGT
GGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTC
TCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAGCTCTAAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGG
CACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCC
TTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGACTCTTGTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCT
ATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTCCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAAC
GCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGT
TTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAA
AAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCTTATCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTG

CTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGG

[1280] 2213 CAR核苷酸序列 (SEQ ID NO:139)

[1281] ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCCGGATCC
AACATCATGCTGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGGCCGTGTCTGCCGGCAGAAAAGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAG
CCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAAGC
TGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTCTGGCACC GACTTC
ACCCTGACAATCAGCAGCGTGAGAGCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTT
TGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGAGAGGCGGCGGAGGCTCAGGCGGAGGCGGATCTAGTGGCGGAGGATCTC
AGGTGCAGCTGCAGCAGCCAGGCGCGGAGGTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGATGTCTGCAAGGCCAGCGGC
TACACCTTACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTA
CCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCA
CCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGTGC GGCTGCGG
TACTTCGATGTGTGGGGAGCCGGCACCACCGTGACCGTGCATCTTCCGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCC
CCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCTTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCACCCCAAGCCAAGGACACCCTGATGA
TCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGTGGTGTG
CGTGTGACCGTGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCA
GCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAA
GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGT
ACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTG
CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATGATCTACATC

[1282] TGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCCTTCTCCTGTCACTGTTATCACCCCTTACTGCAAACGG
GGCAGAAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTG
TAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG
CGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAG
AGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCA
GAAAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCC
TTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[1283] 2213 CAR氨基酸序列 (SEQ ID NO:140)

[1284] MALPVTALLLPLALLLHAARPGSNIMLTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIP
GQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISSVQSEDLAIYYCHQYLSRFTGGGTKLEIKRGGGSGGGGS
SGGGSQVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGIYPGNDIISYNQKFKGKATLTA
DKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWAGTTVTVSSGESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKP
KDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGMIIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[1285] 2213scFv核苷酸序列(SEQ ID NO:141)

[1286] ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCCGGATCC
AACATCATGCTGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGGCCGTGTCTGCCGGCAGAAAAGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAG
CCAGAGCGTGTCTTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAAGC
TGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAAGCGGCGTGCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTCTGGCACC GACTTC
ACCCTGACAATCAGCAGCGTGAGAGCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTT
TGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGAGAGGCGGCGGAGGCTCAGGCGGAGGCGGATCTAGTGGCGGAGGATCTC
AGGTGCAGCTGCAGCAGCCAGGCGCCGAGGTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGC
TACACCTTACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTA
CCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCA
CCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGTGC GGCTGCGG
TACTTCGATGTGTGGGGAGCCGGCACCACCGTGACCGTGT CATCT

[1287] 2213scFv氨基酸序列(SEQ ID NO:142)

[1288] MALPVTALLLPLALLLHAARPGSNIMLTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIP
GQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTLISSVQSEDLAIYYCHQYLSRFTFGGGTKLEIKRGGGSGGGGS
SGGGSQVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGIYPGNDI SYNQKFKGKATLTA
DKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGAGTTVTVSS

[1289] 2218人源化抗CD33IgG4H核苷酸序列(SEQ ID NO:143)

[1290] GTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAG
AACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAG
CAACTCGGTCGCCCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGA
TGCCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAA
CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAA
CCGGAGCTGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA
ACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCGAG
GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGC
GGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAAC
TATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTT
ACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAAT
CTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCTAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTC
TTGAGATCCTTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGC
CGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTA
GTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC
AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGC
GGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAG
CGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAAC
AGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGAC
TTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGCCTTTTTACGG
TTCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC

CGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG
AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGGTTTCCCGAC
TGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTAT
GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG
CCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTGCAAGCTTAATGTAGTCTTATGCAATACTCT
TGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTG
GTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGA
ATTGCCGATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACATAAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCT
GAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTA
GTGTGTGCCCCGCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGAAAAATCTCTAG
CAGTGGCGCCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAAGGAAAACAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGA
AGCGCGCACGGCAAGAGGGCAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGA
GAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGG
GGAAAGAAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTTAATCCTGGCCT
GTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTA
GATCATTATATAATACAGTAGCAACCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTA
GACAAGATAGAGGAAGAGCAAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAG
GAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCC
ACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTGGGTTCTTGGG
AGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGC
AGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAG
CTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAA
ACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGA
CCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATCACTCCTAATTGAAGAATCGCAAAACCAG
CAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTAACATAACAAATTG
GCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAAGAATAGTTTTTGTGTACTTTCTA
TAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGG
CCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTA
TCGATTAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTC
ATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCTCTTAAAA
TTAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTACCAGTACTACAGTTAAGGCCGC
CTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGA
ATAAAGAATTAAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTA
TTCATCCACAATTTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAAC
AGACATACAAATAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAG
ATCCAGTTTGGCTGCATACGCGTCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCG
AGAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTC
GTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTT
TCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATG

GCCCTTGCCTGCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGG
TGGGAGAGTTTCGAGGCCCTTGCCTTAAGGAGCCCCCTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCCTGGCCTGGGCGCTGGG
CCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTT
GATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCG
GTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGCGGGCCTGCGAGCGCG
GCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCG
CCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGTGCAGCACAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCT
GCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAAGTCAACACACAAAGAAAAGGGCCTT
TCCGTCTCAGCCGCTCGCTTCATGTGACTCCACTGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGTGCT
TTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACT
GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTTCTCTTGGAAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTTATTCT
CAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGAGCTAGCTCTAGAGCCACCATGGCCC
TGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCCGGATCCGAGATCGTGCTGACA
CAGAGCCCTGGAAGCCTGGCCGTGTCTCTGGCGAGCGGTGACAATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTCTT
CAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGG
CCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCGATAGATTCACCGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGC
AGCGTGCAGCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCGACCTTTGGCCAGGGCACCAA
GCTGGAAATCAAGAGAGGCGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGATCTAGTGGCGGAGGATCTCAGGTGCAGCTGCAGC
AGCCTGGCGCCGAGGTGCTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGATGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGC
TACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGCAACGACGA
CATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGC
TGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGACTACTGCGCCAGAGAAGTGGGCTGCGGTACTTTCGATGTGTGG
GGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGCATCTTCCGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCC
CGAGTTCTGGGCGGACCCAGCGTGTCTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCG
AGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGT
GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAAGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAA
CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAG
AACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCA
GCCCGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCG
TGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC
CAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATGATCTACATCTGGGCGCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCT
CCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGA
GACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCT
AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAA
GGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAAGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTG

GTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCC
CGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAG
GCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCC
TTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCCGCTGCTGGACA
GGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTGCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTG
TGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTCCC
GCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCC
GCCTCCCCGCTGGAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTT
TAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTC
TCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCT
TGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCGCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAG
TCAGTGTGAAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTCAGTATTTATAACTTGCAAAGAAATGAAT
ATCAGAGAGTGAGAGGAACCTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAA
ATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAG
CTATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAG
GCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGCTAGGGACGTACC
CAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTG
GCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGAT
CGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGT
GGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTC
TCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGG
CACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCC
TTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCT
ATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAAC
GCGAATTTTAACAAAAATATTAACGCTTACAATTTAGTGCCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGT
TTATTTTTCTAAATACATTCAAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAA
AAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTG
CTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGG

[1291] 人源化my96 (L2H) IgG4H BBz NT (SEQ ID NO:144)

[1292] ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCCGGATCC
GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGAAGCCTGGCCGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACAATGAGCTGCAAGAGCAG
CCAGAGCGTGTTCCTTTCAGCAGCTCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGAC
TGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTCTGGCACCAGCTTC
ACCCTGACAATCAGCAGCGTGACGCCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTT
TGGCCAGGGCACCAAGCTGGAATCAAGAGAGGCGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGATCTAGTGGCGGAGGATCTC
AGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAGGTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGATGTCTGCAAGGCCAGCGGC
TACACCTTACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTA
CCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCA
CCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGTGC GGCTGCGG

TACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTTCATCTTCCGGAGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCC
CCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGA
TCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGTGGTGTG
CGTGCTGACCGTGTGCTGACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCA
GCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAA
GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGT
ACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTG
CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATGATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGAC
TTGTGGGGTCCCTTCTCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCA
AACAAACATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAA
GGAGGATGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTA
TAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGG
GAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT
GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAA
GGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[1293] 人源化_{my96} (L2H) IgG4H BBz AA (SEQ ID NO:145)

[1294] MALPVTALLLPLALLLHAARPGSEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIP
GQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSRFTGQGTKLEIKRGGGSGGGGS
SGGGSQVQLQQPGAQVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGIYPGNDDISYNQKFKQKATLTA
DKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTITVTVSSGESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKMIYIWAPLAGTCVLLSLVITLYCKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGR
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[1295] 人源化_{my96} (L2H) scFv nt (SEQ ID NO:146)

[1296] GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGAAGCCTGGCCGTGCTCCTGGCGAGCGCGTGACAATGAGCTGC
AAGAGCAGCCAGAGCGTGTCTTTCAGCAGCTCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAG
CCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAAGCGGCGTGCCGATAGATTCACCGCAGCGGCTCTGGCA
CCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCGTGCAGCCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGC
CGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAATCAAGAGAGGCGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGATCTAGTGGCGG
AGGATCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCGGAGGTCTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGATGCTCTGCAAGG
CCAGCGGCTACACCTTACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGA
GTGATCTACCCCGGAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTC
TAGCACCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGACTACTGCGCCAGAGAAGTGC
GGCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTTCATCT

[1297] 人源化_{my96} (L2H) scFv AA (SEQ ID NO:147)

[1298] EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFT
GSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGKLEIKRGGGGSGGGSSGGGSQVQLQQPGAIEVVKPGASV
KMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGIYPGNDDISYNQKFGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYY
CAREVRLRYFDVWGQGTITVTVSS

[1299] 实施例4:人CAR构建体

[1300] 为了描述scFv在Jurkat T细胞系(其含有受NFAT调节型启动子驱动的萤光素酶报道分子(称作JNL细胞))上的细胞表面表达,将JNL细胞用慢病毒载体转导,所述慢病毒载体表达编码GFP的cDNA、与CD19结合的scFv或编码针对CD33产生的scFv的cDNA(图27)。通过将细胞与Fc-加标签的重组hsCD33温育,随后与缀合至藻红蛋白的Fc-特异性第二抗体温育,检测各个scFv在JNL上的细胞表面表达。观察到相对于表达GFP或靶向CD19的scFv的JNL细胞,克隆CD33-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7和-9按可评估的水平与hsCD33结合,所述JNL细胞充当这个测定法的阴性对照。还观察到CD33-8缺少与hsCD33或蛋白质L(结合免疫球蛋白轻链的细菌细胞表面蛋白)的可评估结合作用(数据未显示)。本文展示的数据表明,克隆CD33-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7和-9编码结合hsCD33的scFv。

[1301] 对靶向hsCD33的各个scFv评价其在JNL细胞中激发NFAT活性的能力(图28)。将表达针对hsCD33的scFv的JNL细胞与MOLM13或MOLP8细胞系共培养,所述细胞系分别表达hsCD33或缺少hsCD33细胞表面表达(图28A;hsCD33,绿实线;同种型对照,灰色短划线和阴影区域)。图28B描述在MOLM13细胞(实线)或MOLP8细胞(短划线)存在下表达靶向hsCD33的scFv的JNL细胞的活化。表达各个scFv的JNL细胞按不同效应子(即JNL细胞)对靶(即MOLM13或MOLP8)比率铺种并且在温育后24小时在EnVision仪上使用Bright-Glo™萤光素酶测定法分析相对萤光素酶单位(RLU)的表达。观察到在MOLM13存在下相对于MOLP8或表达GFP的JNL细胞,scFv克隆CD33-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-9和基于与人CD33抗原结合的单克隆抗体Mylotarg的序列的scFv(CD33-UPenn)能够触发NFAT依赖性萤光素酶活性,尽管程度是变化的。

[1302] 在供体衍生的原代T细胞中进一步评估靶向hsCD33的scFv的活性(图29A和图29B)。使用标准方案通过负向选择从健康供体PBMC分离原初T细胞并且使用Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28 Invitrogen试剂盒活化。在刺激后24小时之后,将T细胞用表达靶向hsCD33的各个scFv的慢病毒转导并且在培养下扩充额外的9天。对T细胞培养物分析其发生细胞扩充并以抗原依赖性和抗原非依赖性方式激发溶细胞活性的能力。图29A和图29B中描述了scFv在慢病毒载体转导的人原代T细胞的细胞表面上的表达,所述慢病毒载体表达靶向hsCD33的scFv。如图27中所述的通过将细胞与Fc-加标签的重组hsCD33和缀合至藻红蛋白的Fc-特异性第二抗体温育,检测scFv的表达。与图27中的前述结果一致,相对于表达GFP的缺少结合hsCD33的能力的T细胞,scFv克隆CD33-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7和-9按可评估水平在与hsCD33结合的原代T细胞中表达。因此,scFv克隆CD33-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7和-9可以用来工程化原代T细胞以靶向人CD33抗原。

[1303] 将T细胞用CFSE标记并且在MOLM13(图30A,黑实线)、MOLP8(图30A,空心白色棒)的存在下共培养或单独培养(图30A,加阴影棒)以评估UTD原代T细胞或表达靶向hsCD33的scFv的细胞的增殖能力。观察到表达scFv克隆CD33-2、-3、-4、-5、-6和-9的T细胞能够以抗原依赖性方式扩充,如与UTD或CD33阴性的MOLP8细胞相比,在表达CD33的MOLM13细胞存在

下T细胞的绝对数目增加所佐证(图30A)。此外,通过测量与MOLM13细胞、MOLP8细胞共培养的和单独的CFSE标记T细胞的中位荧光强度(MFI),评估原代T细胞中的抗原驱动型细胞分裂,所述CFSE标记T细胞表达scFv克隆CD33-2、-3、-4、-5、-6和-9(图30B)。与前述的T细胞扩充增加一致(图30A),观察到与UTD细胞或MOLP8细胞相比,与MOLM13共培养的T细胞中CFSE水平减弱(图30B)。对scFv⁺或scFv⁻的T细胞设门时,发现与MOLM13共培养时,表达scFv的T细胞相对于其scFv⁻对应物具有削弱的CFSE水平。然而,在MOLP8细胞上共培养的scFv⁺T细胞或scFv⁻T细胞之间CFSE水平相似(图30B),这表示响应于抗原识别的增殖增加。本文展示的结果还与scFv克隆CD33-2、-3、-4、-5、-6和-9在CD33存在下激发scFv依赖性JNL细胞活化的能力一致(图28B)。因此,scFv克隆CD33-2、-3、-4、-5、-6和-9可以用来以CD33依赖性方式活化原代T细胞的增殖。

[1304] 另外,对CART-CD33T细胞测试其响应暴露于靶细胞上的抗原而增殖的能力。靶细胞包括PL-21、HL60和Molp8细胞。在分析当日(第0日),将靶细胞计数并按3e6个细胞/ml转移至50ml管的6mL T细胞培养基中。将靶细胞在冰上按10,000rad照射。在照射后,将靶细胞在T细胞培养基中洗涤2次,计数并且在冰上的T细胞培养基中重悬至5e5个细胞/ml。将冷冻的已转导T细胞解冻,在10mL T细胞完全培养基中洗涤,在300g离心10min并且温和地在室温重悬于3mL T细胞完全培养基中。随后将T细胞在细胞计数器中计数并在10mL培养基中重悬至2.5e6/ml。在96孔U型底平板中,将25,000个照射的靶细胞和25,000个转导的CAR T细胞(1:1比率)合并在一式二份孔中。在独立的孔中,添加75,000个抗CD3/CD28珠至100μl培养基中的25,000转导T细胞,以产生1:3细胞对珠比率作为阳性对照;在另一个孔中,仅添加100μl培养基至25,000个转导的T细胞作为仅含培养基的对照。将细胞在37°C,5%CO₂温育4天。在第4日,收获细胞并且通过抽吸合并重复培养物并且转移至U型底平板上的相同孔中,以使用蛋白质L或重组人CD33蛋白染色用于CD4、CD8和CAR的FACS。在染色后,将细胞重悬于120μl MACS+0.5%BSA缓冲液中并且添加20μl/孔Countbright珠至每个孔。将增殖测定为用来计数2500个珠的时间段内检出的FACS阳性细胞数目(图47)。当暴露于HL-60靶细胞时,测试的CART-CD33T细胞(例如,衍生自scFv克隆CD33-1、-2、-4、-5、-6、-7、-9和人源化My96(称作“Upenn”)增殖程度比未转导的细胞或CART-CD19T细胞更大。当暴露于PL21靶细胞时,CART-CD33T细胞(例如,衍生自scFv克隆CD33-1、-2、-4、-5、-6、-7、-9和人源化My96(称作“Upenn”)增殖程度比未转导的细胞更大并且增殖程度大致等于或大于CART-CD19T细胞。当暴露于不表达CD33靶的MOLP8细胞时,CART-CD33T细胞增殖的程度大致与未转导的细胞或CART-CD19T细胞相同或较之略大。

[1305] 为了评估溶细胞活性,将25,000个MOLM13细胞按不同的效应子(即T细胞)对靶(即MOLM13)比率与表达各个scFv的原代T细胞一起铺种并且通过培养4天后计数CFSE标记的MOLM13细胞的绝对数目,分析MOLM13杀伤的程度(图31)。观察到scFv克隆CD33-2、-3、-4、-5、-6和-9能够诱导靶细胞裂解,尽管程度各异。因此,scFv克隆CD33-2、-3、-4、-5、-6和-9可以用来工程化原代T细胞以直接靶向并杀伤表达CD33的靶细胞。

[1306] T细胞杀伤作用指向表达CD33的PL21和稳定表达萤光素酶的HL-60急性髓细胞白血病细胞系。使用不表达CD33的U87细胞作为对照并且使用未转导的T细胞(UTD)确定非特异性背景杀伤水平。将CART-CD33的溶细胞活性测量为效应子:靶细胞比率10:1和T细胞2倍递减稀释度的滴定,其中效应子定义为表达抗CD33嵌合受体的T细胞。通过混合适宜数目的

T细胞与恒定数目的靶细胞,启动该测定法。在20小时后,使用Bright-Glo™荧光素酶测定法在EnVision仪上测量荧光素酶信号。比较这些杀伤曲线,滴定效应细胞的量显示表达CD33的那些细胞被摧毁(图48A、图48B和图48C)。用任何携带人scFv的CAR-CD33细胞转导的来自相同供体的T细胞能够选择性杀伤CD33+靶,虽然活性差异明显,这可能转换成临床活性差异。

[1307] 对CART-CD33细胞测试其响应于抗原而产生细胞因子的能力。将细胞解冻并允许过夜恢复。使用未转导的T细胞(UTD)作为背景T细胞效应的非特异性对照。这些T细胞针对HL-60、PL21或MOLP8细胞。该测定法测试2.5:1的效应子:靶比率,其中效应子定义为表达抗CD33 CAR的T细胞。在混合细胞后,该测定法进行16小时,此时取出培养基以使用检测人细胞因子的CBA-Flex试剂盒,分析细胞因子IFN- γ 、TNF- α 和IL-2。当CART-CD33T细胞与内源表达CD33的癌细胞培养时,全部CD33-CART均响应于表达靶的细胞产生细胞因子(图49)。各种CD33-CART克隆针对低表达CD33的靶细胞的反应性之间的差异可以转换成用这些构建体转导的CART细胞的更好临床效果。

[1308] 最后,通过如图32中所示的流式细胞术评估scFv对食蟹猴CD33(cyCD33)的交叉反应性。将用慢病毒载体转导的JNL细胞与加Fc标签的重组hsCD33(红线)或cyCD33(蓝线)温育,随后与缀合至藻红蛋白的Fc-特异性第二抗体温育,所述慢病毒载体表达针对hsCD33的scFv。尽管scFv克隆CD33-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-9和CD33-UPenn能够结合hsCD33,但我们注意到,仅scFv克隆CD33-5似乎与hsCD33和cyCD33均发生交叉反应(图32)。

[1309] 实施例5:表征RNA电穿孔的CART33细胞

[1310] 比较慢病毒转导或RNA电穿孔的T细胞中的CAR33表达

[1311] 通过体外转录产生mRNA抗CD33 CAR,所述抗CD33 CAR包含人源化抗CD33scFv和IgG4铰链,例如,SEQ ID NO:145。从正常供体分离T细胞并用CAR33mRNA电穿孔。在电穿孔后,将细胞用CD3/CD28珠刺激并培养扩充。在电穿孔后8小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、或7天通过流式细胞术测量和定量CAR33表达(图33A)。来自这个实验的结果显示对CAR33的RNA电穿孔导致CAR33在供体T细胞中表达至少7天。表达在电穿孔后直至第4天最高(例如,大于60%)(图33B)。CAR33表达从电穿孔后第5-7天减少。

[1312] 来自RNA电穿孔的CAR33表达与来自慢病毒转导的CAR33稳定表达比较。使用标准方法,用包含CAR33的慢病毒构建体(如图26的载体)转导供体T细胞。通过流式细胞分析法测量CAR33表达并通过平均荧光强度(MFI)定量。对于慢病毒转导的CART33细胞(图34A)和对于RNA转染的CART33细胞(图34B),在电穿孔或转导后8小时、1天、2天、3天和4天评估CAR33表达。在图34的直方图左侧的灰色峰表示缺少CAR33表达,而增加的CAR33表达向图的右侧增长。慢病毒转导引起CAR33在T细胞中稳定表达,其中CAR33表达水平从转导后8小时至4天保持不变。与之相反,RNA电穿孔引起CAR33在T细胞中瞬时表达。具体地说,CAR33表达在电穿孔后8小时至1天最高,并且CAR33表达从电穿孔后2天至4天减少。

[1313] 体外细胞毒活性

[1314] 为了评估RNA电穿孔的和慢病毒转导的CART33细胞的特异性杀伤活性,将CART33细胞按不同的效应子(CART33细胞)对靶(CD33阳性或阴性细胞)比率与表达CD33的靶细胞(如急性髓样白血病细胞系MOLM14)或CD33-阴性对照细胞(如套细胞淋巴瘤细胞系JEKO)温育24小时。效应物对靶比率为0:1、0.125:1、0.25:1、0.5:1、1:1和2:1。实验在T细胞电穿孔/

转导后1天、2天、3天和4天后的不同时间点重复。电穿孔后1天, RNA电穿孔的CART33细胞显示特异性杀伤作用, 始于E:T比率0.125:1 (图35A)。在CART33细胞电穿孔后2天 (图35B)、3天 (图35C) 和4天 (图35D) 观察到CAR33阳性MOLM14细胞的特异性杀伤作用, 然而特异性杀伤作用的E:T比率随时间推移增加, 显示特异性杀伤作用的短暂性质。慢病毒转导的CART33细胞从1天至4天甚至在较低的E:T比率也显示出强力的特异性杀伤活性。

[1315] 当结果以不同方式展示, 在电穿孔后第1天至第4天之间比较一个特定E:T比率的比活性时, 数据显示当E:T比率处于2:1 (图36A) 或1:1 (图36B) 时, RNA电穿孔的CART33细胞的特异性杀伤作用在电穿孔后随时间推移降低。这些结果展示了RNA电穿孔的CART33细胞的特异性杀伤作用的短暂性质。与之相反, 慢病毒转导的CAR T细胞从转导1-4天后显示出稳定的特异性杀伤水平。

[1316] 实施例6: 人源化CART33对人AML和MDS显示出强力的临床前活性

[1317] 第二代CAR自带有4-1BB和CD3 ζ 信号结构域的吉妥珠单抗奥唑米星 (靶向CD33的免疫缀合物) 的抗CD33scFv (在实施例3中描述; 和SEQ ID NO:145) 构建。这里, 描述了第二代CAR33的临床前活性并且与先前开发的靶向CD123的CAR (CAR123) 比较。结果显示, CART33能够根除人急性髓样淋巴瘤和脊髓发育不良综合征CD34⁺细胞, 同时在小鼠异种移植中导致明显的脊髓毒性。因此, 还生成瞬时表达的mRNA修饰的CART33, 其待用于将来的研究和临床试验中。

[1318] 本实施例中使用以下材料和方法:

[1319] CART细胞的产生

[1320] 通过将衍生自吉妥珠单抗奥唑米星的轻链至重链方向的人源化抗人CD33scFv (克隆my96) 克隆入之前描述的鼠CART19质粒载体, 产生pTRPE抗CD33-41BB-CD3 ζ (CAR33) 质粒DNA。²⁵使用抗CD4和抗CD8微珠 (Miltenyi), 从白细胞分离群 (leukapheresis packs) 正向选出正常供体T细胞, 按1:1比率混合在一起并且使用抗CD3/CD28Dynabeads (Invitrogen, 在培养第1天添加) 连同低剂量IL-2, 在体外扩充。将T细胞用慢病毒上清液在刺激后当日按感染复数 (MOI) 3转导, 所述慢病毒上清液来自pTRPEmy96-CD33-41BB-CD3 ζ 质粒转染的293T细胞。在第6日移除抗CD3/CD28Dynabeads并且将T细胞在T细胞培养基 (补充5%人血清、青霉素、链霉素和Glutamax的X-vivo15培养基) 中培养扩充直至15天并且随后冷冻用于将来的实验。在全部实验之前, 将T细胞在37°C解冻并静置过夜。先前描述了CART123细胞的产生 (Gill等人, 2014, Blood, 123:2343-54)。

[1321] 细胞

[1322] MOLM14细胞系从ATCC获得并且在R10培养基 (补充有10%胎牛血清、青霉素和链霉素的RPMI培养基) 中维持。MOLM14-萤光素酶-GFP细胞用于一些实验中。去识别的原发性人AML和MDS骨髓试样从宾夕法尼亚大学干细胞和异种移植核心机构获得。对于全部功能研究, 将AML细胞在分析前至少12小时解冻并在37°C静置过夜。使用MACSQuant柱 (Miltenyi), 通过正向选择, 针对CD34⁺细胞富集MDS骨髓样品。

[1323] 流式细胞分析

[1324] 抗人抗体购自Biolegend、eBioscience或Becton Dickinson。从体外培养物或从动物分离细胞, 在补充有2%胎牛血清的PBS中洗涤1次并且在冰上在阻断Fc受体后染色。为了细胞数目定量, 根据制造商的说明使用Countbright珠 (Invitrogen)。在全部分析中, 基

于前向与侧向散射特征对目的群体设门,随后进行单峰设门,并且使用Live Dead Aqua (Invitrogen)对活细胞设门。通过用来自Jackson Immunoresearch的Alexa Fluor647缀合的山羊抗小鼠F(ab')₂抗体染色,检测抗CD33 CAR的表面表达。在四色激光Fortessa分析仪(Becton-Dickinson)进行流式细胞术。

[1325] T细胞功能测定法

[1326] 1. T细胞脱颗粒测定法

[1327] 如先前所描述那样进行脱颗粒测定法。²⁶将T细胞与靶细胞按1:5比率温育。温育时添加CD107a、CD28、CD49d和莫能菌素。在4小时后,收获细胞并对CAR表达、CD3、和Live Dead染色。将细胞固定并透化,并且随后进行胞内细胞因子染色。

[1328] 2. 增殖测定法:

[1329] 将T细胞洗涤并以 1×10^7 /ml重悬于100ul PBS中并用100ul CFSE 2.5μM(Life Technologies)在37摄氏度染色5分钟。反应随后用冷的R10猝灭并将细胞洗涤3次。以100Gy的剂量照射靶。T细胞与照射的靶细胞按1:1比率温育120小时。随后收获细胞,对CD3、CAR和Live Dead aqua染色,并且添加Countbright珠(Invitrogen),之后进行流式细胞分析。

[1330] 3. 细胞毒测定法

[1331] 如先前所描述的那样,使用萤光素酶+MOLM14细胞或CFSE标记的原发性AML样品用于细胞毒性测定法(Cao等人,2010,Cytometry A,77:534-545)。简言之,将靶与效应T细胞按所示的比率温育4小时或16小时。通过在Xenogen IVIS-200光谱照相机上生物发光成像或通过流式细胞术,计算杀伤作用。对于后者,在分析前收获细胞并且添加Countbright珠和7-AAD。剩余的活靶细胞是CFSE+7-AAD⁻。对于MDS,如所示,将T细胞与CD34⁻富集的骨髓按1:1比率温育4小时或24小时,并且随后通过流式细胞术或通过荧光原位杂交(使用针对MDS样品中特异性染色体畸形的探针)测量细胞毒性。

[1332] 4. 细胞因子测量:

[1333] 如所示,将效应细胞和靶细胞按1:1比率在T细胞培养基中温育24小时或72小时。收获上清液并根据制造商的方案(Invitrogen),通过30-plex Luminex阵列分析。

[1334] 体内实验

[1335] NOD-SCID-γ链^{-/-}(NSG)小鼠和人IL-3、干细胞因子和GM-CSF(NSG-S)转基因的NSG小鼠最初从Jackson Labs获得。全部实验均按照宾夕法尼亚大学研究机构动物护理和使用委员会批准的方案进行。所利用的异种移植模型方案在相关附图和结果部分中详细讨论。将细胞(MOLM14、原代细胞或T细胞)在200μl PBS中按所示浓度注射至小鼠尾静脉中。使用Xenogen IVIS-200光谱照相机,进行生物发光成像。通过将胎肝CD34⁺细胞注入新生NSG小鼠,产生人源化免疫系统(HIS)小鼠,并且这些小鼠在大约8周龄使用。

[1336] 产生mRNA经修饰的CART33

[1337] 如先前公开,将来自pTRPE抗CD33-41BB-CD3z质粒的CAR构建体亚克隆入pDA载体28中。使用mMESSAGEmMachine®T7 ULTRA转录试剂盒(Ambion),进行体外转录。使用RNeasy微量试剂盒(Qiagen),纯化RNA。将RNA-CAR33如先前所描述那样电穿孔入T细胞。使用ECM830Electro Square Wave Porator(Harvard Apparatus BTX)进行电穿孔。

[1338] 组织学和免疫组织化学

[1339] 将福尔马林固定的、石蜡包埋的来自小鼠股骨的切片用苏木精和伊红染色,用针

对人CD45和人CD34的mAb复染并用Nikon显微镜捕获。

[1340] 结果:

[1341] 作为AML中靶的CD33和CART33构建体

[1342] 为了验证CD33作为AML中免疫治疗的靶的临床相关性,首先评估CD33在AML中的表达水平并且发现它在几乎全部原发性AML样品中(图1)以及来自MDS患者的骨髓(图2A、图2B、和图2C)中的大部分AML母细胞上表达。为了评估CART33的潜在脱靶毒性,对30份抗CD33抗体(LSBio)染色的正常组织进行组织免疫组织化学。CD33在骨髓的髓样谱系上和肝、肺和肾的常驻性巨噬细胞上表达(图21)。为了测试CAR33的功效,设计了从源自吉妥珠单抗奥唑米星(Gemtuzumab ozogamicin)克隆my96的鼠和人源化scFv衍生的四个构建体。两个构建体使用IgG4铰链并且两个构建体使用CD8铰链(图3)。

[1343] CART33对AML细胞系、原发性AML样品和MDS显示强力的体外活性

[1344] 在体外测试四种不同CART33构建体的活性并与CART123比较(Gill等人,2014, Blood, 123:2343-2354)。人源化CART33始终如一地优于鼠CART33(参见实施例1)并且因此对两个人源化CAR33构建体进行全部后续研究。使用MOLM14细胞系作为模型肿瘤(MOLM14表达CD33和CD123)。CART33与MOLM14的温育导致明显的脱颗粒(图37A)、低效应子:靶比率时强力的细胞毒性(图37B)、广泛增殖(图37C和图37D)和相比与对照T细胞白血病细胞系Jurkat温育而言显著较高的稳健细胞因子产生(图38A、图38B、图38C和图39)。与MOLM14温育后,大部分的CART33以类似于PMA/离子霉素的强力非特异性刺激的模式产生两种或更多种细胞因子/细胞(图38A和图38B)。这种功能已经与优越的体内活性相关(Carpenito等人,2009,Proc Natl Acad Sci USA,106:3360-3365)。另外,CART33细胞产生比CART123细胞更多的细胞因子(图38C)并且还产生针对原发性AML样品的明显体外活性。与具有CD8铰链的CART33相比,具有IgG4铰链的CART33产生优越的细胞毒性(图8、图9、图10和图40)。

[1345] 还测试了CART33在MDS中的体外活性。来自MDS患者的骨髓样品进行CD34富集(约85%纯度)并且随后与CART33细胞、CART123细胞或未转导的对照T细胞(UTD)按E:T比率1:5在CD49d、CD28共刺激和莫能菌素存在下温育4小时。通过流式细胞术测量CD107a脱颗粒,并且将脱颗粒百分数定量。图41B和图41C显示具有5q缺失的MDS克隆的特异性杀伤作用。来自具有MDS和5q缺失的患者的CD34富集型骨髓样品与CART33、UTD细胞按1:1E:T比率温育或不作处理4小时。随后收获样品并针对5q-进行FISH(图41B)。CART33在MDS中显示明显的体外活性。这通过CART33响应于CD34富集型MDS样品出现特异性脱颗粒(图41A)、CART33与CD34富集型MDS样品温育24小时后(1:1效应子:靶比率,图24)的特异性杀伤和温育4小时后恶性克隆特异性减少(通过FISH测量)(图41B和图41C)而显而易见。

[1346] 下表中总结来自上述体外测定法的结果。

[1347] 表5. 与CART123和未转导的对照T细胞相比,CART33的体外活性

T 细胞效应子功能		CART33*	UTD
脱颗粒%(与 MOLM14 温育 4 小时)		98%	1.3%
特异性裂解%(E:T 0.625:1)		65.7%	30%
基于 CFSE 的增殖(与 MOLM14 温育 5 天)		91.6%	3%
[1348] 与 MOLM14 温育 24 小时, 细胞因子产生 (中位数, pg/ml)	IL6	22.65	5.73
	GM-CSF	13248	16.9
	MIP-1b	8180	9.15
	INF-g	24989	0.35
	IL-2	9300	0.39

[1349] *与UTD相比时,全部p值均<0.05

[1350] CART33在MOLM14植入的异种移植物中导致白血病负荷减少和存活优势

[1351] 为了测试CART33的体内活性,对NSG小鼠注射萤光素酶+MOLM14(图11)。在通过生物发光成像确认植入后,小鼠按不同剂量水平接受CART33或未转导的T细胞对照(UTD)的单次注射。随后借助连续成像追踪小鼠并且使用生物发光对疾病负荷定量。将小鼠用对照T细胞处理,小鼠迅速屈从于疾病,而用CART33处理的小鼠显示疾病的显著减轻和存活优势(图42A、图42B和图42C)。另外,CART33处理的小鼠中检测剂量反应。如图43A的示意图中所示,对NOD-SCID- γ 链敲除(NSG)小鼠静脉内注射 1×10^6 个AML细胞系MOLM14并且在6天后针对植入成像。将小鼠用CART33 5×10^6 、CART33 2×10^6 、CART33 1×10^6 或未转导的T细胞对照 5×10^6 处理。每周连续成像跟踪小鼠以评估AML负荷。在CART33处理的小鼠中观察到剂量依赖性反应(图43A和图43B),并且与具有CD8铰链的CAR33相比,观察到具有IgG4铰链的CART33的优越抗白血病活性(图44)。对于全部后续实验,仅使用具有IgG4铰链的CART33。

[1352] CART33导致原发性AML异种移植物中白血病的根除并导致长期无疾病存活

[1353] 原发性白血病细胞比长期增殖的细胞系可能更多的克隆非均一性并且更充分代表人类疾病。因此,评价CART33在原发性AML异种移植物中的功效。对NSG-S小鼠注射表达CD33和CD123的原发性AML样品。在外周血中对疾病负荷定量并分析存活(图13)。植入定义为>1%循环型huCD45+细胞并且一般在注射白血病细胞后2-4周实现。这些小鼠随后用单次注射CART33细胞、(通过尾静脉注射 1×10^5 个)CART123细胞或UTD细胞处理。白血病在注射CART33或CART123的4周内根除(图14和图15)并且展示了长期无疾病存活(图16)。

[1354] CART33导致预期的造血干细胞及髓样祖细胞毒性

[1355] 由于已知CD33在髓样祖细胞上表达,尽管与白血病细胞相比水平较低,所以研究了CART33对正常造血的影响。两个不同模型用来评估CART33的造血毒性。对出生后植入人胎儿CD34+细胞的人源化免疫系统(HIS)小鼠采血以证实植入,并且随后用CART33细胞、CART123细胞或未转导的T细胞处理(图17)。小鼠每周采血持续4周。随后使小鼠安乐死并且从这些小鼠采集骨髓和脾供分析。如基于CD33在髓系上表达所预期,与未转导的T细胞处理

的小鼠相比,这些小鼠出现外周骨髓样细胞(包括单核细胞)减少(图22)。通过流式细胞术(图20)或免疫组织化学(图21)分析处理后4周的骨髓显示,CD34⁺ CD38⁻造血干细胞和CD34⁺CD38⁺髓样祖细胞减少。HIS模型偏向B-细胞系并且从而使用更为髓样偏向的第二个模型。这里,将来自正常成年供体的骨髓耗竭T细胞并注入白消安整备的NSG-S小鼠。通过用相关的慢病毒转导来自骨髓供体的外周血T细胞,产生自体CART33、CART123或UTD。在证实植入这些小鼠后,将它们用自体CART33、CART123或UTD处理并且随后每周眶后采血,总计4周(图22)。随后使小鼠安乐死并且收获及分析组织。类似于HIS异种移植物,我们观察到外周骨髓样细胞和单核细胞以及CD34⁺骨髓区室减少。

[1356] 瞬时RNA修饰的“生物可降解”CART33导致强力但是短暂的抗白血病活性

[1357] 由于CD33在正常造血细胞和组织常驻性巨噬细胞上表达(图1和2),重要的是在临床应用之前验证安全性机理。因此,开发了RNA修饰的CART33。用RNA修饰的CAR-33对T细胞的电穿孔导致高水平CAR表达,其历经7天逐渐削弱(图33A、图33B和图34,并如实施例9中所述)。与慢病毒转导的CART33(LV-CART33)相比时,RNA修饰的CART33具有相似、但短暂的体外活性。MOLM14与RNA-CART33的温育产生在E:T比率1:1和2:1时与LV-CART33可比较的特异性细胞毒性,并且其在电穿孔后随时间降低(图35,和如实施例9中所述)。

[1358] 测试了RNA-CART33与体内化疗的组合。将植入MOLM14的NSG小鼠用环磷酰胺(60mg/kg I.P)三个剂量加RNA-CART33的组合或环磷酰胺加 10×10^6 个UTD细胞的组合处理,以三个剂量静脉内给予(图45)。具体而言,对NSG小鼠注射MOLM14-luc(1×10^6 个静脉内注射)并且四天后成像以证实植入。随后将小鼠随机分组以接受RNA-CART33联合环磷酰胺或未转导的T细胞联合环磷酰胺(60mg/kg I.P)。如果 10×10^6 静脉内按三个不同剂量在第5、9、16日给予,则T细胞按一个剂量给予。环磷酰胺在第8日和第14日给予。与对照小鼠相比,环磷酰胺和RNA修饰的CART33的组合导致白血病控制改善。

[1359] 讨论

[1360] 在这个例子中,检测CART33在AML中的临床前活性和安全性,并且开发了瞬时表达的CART33并且将其作为在难治性AML患者中使用避免毒性的方式进行验证。这是CART33活性的首个充分的临床前报告,该报告包括并入多个小鼠模型的全面存活和毒性数据以及RNA修饰的CART33的抗白血病活性。CART33对AML细胞系和原发性AML样品显示出强力效应子功能,包括在低E:T比率时的特异性杀伤、脱颗粒、深刻的增殖和稳健的细胞因子产生,并且按1:1比率仅温育4小时后还有效减少MDS克隆。

[1361] 用CART33处理还导致单次输注后MOLM14异种移植物和原发性AML异种移植物中根除AML和存活优势。在两个不同的人源化小鼠模型中观察到用CART33的预期髓样造血毒性。因为潜在骨髓毒性和顾虑CD33在常驻性组织巨噬细胞上表达,所以开发了RNA修饰的CART33,并且显示强力但短暂的体外活性。还通过联用RNA-CART33和化疗显示抗白血病作用。

[1362] 本文中和实施例1中所述的实验还显示,对于CART33,使用IgG4铰链优于使用CD8铰链。IgG4分子明显不同于CD8分子。它含有3倍多的氨基酸,这些氨基酸可能导致更灵活的铰链区。

[1363] 基于CD33在白血病祖细胞以及髓样祖细胞上表达,预计了在这些临床前研究中用CART33观察到的造血毒性和髓样祖细胞减少以及外周血细胞减少症。

[1364] 伴随使用CART33的脱靶毒性潜力要求在临床试验中并入瞬时表达的而非永久表达的抗CD33疗法。RNA修饰的CAR已经用于临床前模型中 (Barrett等人, 2013, Hum Gene Ther, 24:717-727; 和Barrett等人, 2011, Hum Gene Ther, 22:1575-1586), 并且实体瘤患者中RNA修饰的抗间皮素CAR T细胞I期试验已经显示这种方法安全和可行 (Beatty等人, 2014, Cancer Immunol Res, 2:112-120)。因此, 开发RNA修饰的CART33作为一种瞬时表达“生物可降解”CAR以缓和CART33的可能脱靶毒性的方式。

[1365] 由于最近更大的临床试验显示在低风险和中等风险疾病中当G0与化疗组合时具有存活优势 (Hill等人, 2014, Lancet Oncol., 15:986-996), 测试了多次输注RNA修饰的CART33与化疗组合在AML小鼠异种移植中的功效 (图45)。这种组合导致更深和更长的反应并导致这些小鼠的存活优势。

[1366] 这些观察结果凸显RNA修饰的CART33的几种潜在翻译性应用。这可以在不能接受同种异体干细胞移植以令其符合移植资格的复发难治性AML患者中单独使用或与化疗组合使用。此外, RNA修饰的CART33可以并入同种异体干细胞移植之前的整备方案中。一旦已经在患者中展示这种方法的安全性和可行性, 未来策略可以包括具有“闭”开关的慢病毒CART33。另外, CART33和CART123均有效对抗AML的这些研究结果在组合性靶向细胞疗法中开辟了新的治疗视野。

[1367] 实施例7: 在癌症中使用对抗髓样衍生型抑制细胞 (MDSC) 的嵌合抗原受体T细胞疗法

[1368] 最近数据显示, 骨髓发育不良综合征 (MDS) 骨髓微环境含有表达CD33的髓样衍生抑制细胞 (MDSC) 群体, 所述群体通过分泌促进无效造血作用的细胞因子以及免疫抑制, 在MDS的发病机制中发挥重要作用 (Chen等人, J.Clin.Investig. 23 (2013): 21-223)。Chen等人描述了MDSC通过CD33-S100A9相互作用在诱导骨髓发育不良中发挥作用。这个实施例描述了确定是否可以使用抗CD33 CAR T细胞疗法靶向MDSC的实验。本文所述的结果显示, 可以用单一抗CD33 CAR T细胞产品同时靶向异常MDS克隆及其支持性MDSC群体。

[1369] 在4份MDS标本和3份正常骨髓标本中的MDSC作表型分型 (图50A、图50B和图50C)。为了表型分型, 使用以下设门策略, 进行流式细胞术: MDSC定义为MDS骨髓样品中的谱系阴性 (LIN⁻)、HLA-DR阴性、CD33阳性细胞 (图50A)。与正常骨髓 (ND-BM) 相比, MDSC在发育不良性骨髓 (MDS-BM) 中更丰富 (图50B)。此外, MDSC群体中的CD33平均荧光强度 (MFI) 与恶性MDS群体中的CD33 MFI是可比较的并且显著高于来自ND-BM的huCD45+LIN⁻群体中的CD33 MFI (图50C)。因此, MDSC中的CD33表达与恶性MDS群体中的CD33表达是可比较的, 并且显著地高于正常骨髓中的CD33表达。通过定量来自CART33细胞的CD107a脱颗粒和细胞因子产生的程度, 评估CART33针对MDS母细胞及针对来自MDS骨髓的MDSC发动反应的能力。将CART33与阴性对照 (Jurkat细胞)、阳性对照 (PMA和离子霉素)、分选的MDS CD34⁺或来自MDS骨髓的分选的MDSC温育4小时。使用CAR33-UPenn构建体 (衍生自吉妥珠单抗奥唑米星的抗CD33scFv), 发现MDS CD34⁺细胞和MDSC在CART33中诱导广泛等同的反应 (图51A和图51B)。这些结果表明, 具有较低亲和力的CART-33可以对MDSC具有差异性活性。

[1370] MDSC也在多种其他恶性肿瘤抵抗免疫攻击中发挥作用, 所述其他恶性肿瘤包括慢性淋巴细胞白血病 (CLL) (其中MDSC称作保育样细胞), 以及实体恶性肿瘤如卵巢癌、乳腺癌和结肠癌 (Di Mitri等人, Nature 515.7525 (2014): 134-137; Gabrilovich等人,

Nat.Reviews Immunol.12.4(2012):253-68;和Kim等人,Proc.Acad.Sci.U.S.A.111.32(2014):1-6)。这些结果显示,可以用CART33单独或与其他免疫疗法组合地靶向MDSC。

[1371] 实施例8:低剂量RAD001在细胞培养模型中刺激CART增殖

[1372] 通过将表达CART的细胞与靶细胞在不同浓度的RAD001存在下共培养,评价低剂量RAD001对CAR T细胞体外增殖的影响。

[1373] 材料和方法

[1374] 产生CAR转导的T细胞

[1375] 人源化抗人CD19 CAR (huCART19) 慢病毒转移载体用来产生包装入VSVg假型化慢病毒粒子的基因组材料。人源化抗人CD19 CAR (huCART19) 的氨基酸序列和核苷酸序列是在2014年3月15日提交的PCT公开WO 2014/153270中描述的CAR1, ID104875,并且在其中称为SEQ ID NO:85和31。

[1376] 将慢病毒转移载体DNA与三种包装组分VSVg env、gag/pol和rev连同脂质转染试剂混合,以转染Lenti-X 293T细胞。在24小时和30小时后更换培养基,此后收集含有病毒的培养基、过滤并贮存在-80℃。通过转导借助负向磁性选择健康供体血液或Leukopak所获得的新鲜或冷冻的原初T细胞,产生CART。通过与抗CD3/抗CD28珠温育24小时,活化T细胞,此后,添加病毒上清液或浓缩的病毒(MOI分别为2或10)至培养物。允许修饰的T细胞扩充约10天。在第7日和第9日之间,通过流式细胞分析测定已转导细胞(在细胞表面上表达CAR)的百分数和CAR表达水平(相对荧光强度,几何平均数)。减慢的生长速率和T细胞大小接近约350fL的组合确定了T细胞的状态,其待冷冻供以后分析。

[1377] 评价CART的增殖

[1378] 为了评价CART的功能,将T细胞解冻并计数,并且借助细胞计数器评估生存力。使用未转导的T细胞(UTD),将每份培养物中的CAR阳性细胞的数目归一化。用RAD001的滴定(始于50nM)检测RAD001对CART的影响。全部共培养实验中所用的靶细胞系是NALM-6,一种表达CD19并经转导以表达萤光素酶的人前B细胞急性淋巴母细胞性白血病(ALL)细胞系。

[1379] 为了测量CART的增殖,将T细胞与靶细胞按比率1:1培养。当细胞对CD3、CD4、CD8和CAR表达染色时,将测定法进行4天。使用计数珠作为参比,通过流式细胞术评估T细胞数目。

[1380] 结果

[1381] 在4天共培养测定法中检测CART细胞的增殖能力。在CAR转导的T细胞和未转导的T细胞与NALM-6培养后,评估CAR阳性CD3阳性T细胞数目(深色棒)和总CD3阳性T细胞数目(浅色棒)(图54)。huCART19细胞在小于0.016nM RAD001存在下培养时扩充,并且在较高浓度的该化合物时扩充程度较低。重要地,在0.0032nM和0.016nM RAD001时,增殖均高于不添加RAD001时观察到的增殖。未转导的T细胞(UTD)未显示可检测的扩充。

[1382] 实施例9:低剂量RAD001刺激CART体内扩充

[1383] 这个实施例评价了用不同浓度RAD001下huCAR19细胞体内增殖的能力。

[1384] 材料与方法:

[1385] NALM6-luc细胞:从复发性ALL患者的外周血开发NALM6人急性淋巴母细胞性白血病(ALL)细胞系。细胞随后用萤火虫萤光素酶加标签。这些悬浮细胞生长在补充有10%热灭活胎牛血清的RPMI中。

[1386] 小鼠:从Jackson Laboratory接收6周龄NSG(NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Wjl}/SzJ)小

鼠(原种编号005557)。

[1387] 肿瘤植入:将NALM6-luc细胞在补充有10%热灭活胎牛血清的RPMI中体外生长和扩充。随后将细胞转移至15ml锥形管并用冷的无菌PBS洗涤两次。随后计数NALM6-luc细胞并且以 10×10^6 个细胞/毫升PBS的浓度重悬。将细胞置于冰上并且立即(在1小时内)植入小鼠中。将NALM6-luc细胞在100 μ l体积中经尾静脉静脉内注射,总计 1×10^6 个细胞/小鼠。

[1388] CAR T细胞给药:在肿瘤植入后7天,对小鼠施用 5×10^6 个CAR T细胞。将细胞在37摄氏度水浴中部分解冻并且随后通过添加1ml冷无菌PBS至含有细胞的管,完全解冻。将解冻的细胞转移至15ml falcon管并用PBS调节至终体积10ml。将细胞以1000rpm洗涤2次,每次10分钟,并且随后在血细胞计数板上计数。随后将T细胞以 50×10^6 个CAR T细胞/ml冷PBS的浓度重悬并且保持在冰上直至给予小鼠。对小鼠经尾静脉作静脉内注射100 μ l CAR T细胞,每只小鼠的剂量为 5×10^6 个CAR T细胞。用100 μ l仅PBS (PBS) 或人源化CD19 CAR T细胞处理8只小鼠/组。

[1389] RAD001给药:配制等同于1mg RAD001的浓缩微乳剂50mg并且随后在给药时重悬于D5W(水中右旋糖5%)中。对小鼠每日用200 μ l所需剂量的RAD001口服给药(通过经口灌胃)。

[1390] PK分析:对小鼠每日用RAD001给药,始于肿瘤植入后7天。给药组如下:0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg。在第0日和第14日在首剂和末剂RAD001后在以下时间点对小鼠放血供PK分析:15分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、8小时、12小时和24小时。

[1391] 结果:

[1392] 在携带NALM6-luc肿瘤的NSG小鼠中检测RAD001的扩充和药代动力学。单一RAD001每日口服给药并未影响NALM6-luc肿瘤生长(图55)。RAD001的药代动力学分析显示,它在携瘤小鼠的血液中相当稳定(图56A和图56B)。第0日和第14日PK分析均显示,以检测的最低剂量(0.3mg/kg)给药,甚至在给药后24小时,血液中的RAD001浓度高于10nm。

[1393] 基于这些剂量,huCAR19 CAR T细胞伴随或不伴随RAD001给药以确定这些细胞的增殖能力。基于给药后24小时的血液中RAD001的水平,使用的最高剂量是3mg/kg。由于RAD001浓度在末剂RAD001后24小时高于10nM,在CAR T细胞的体内研究中使用几个较低剂量的RAD001。在启动RAD001每日口服给药之前1天,静脉内给予CAR T细胞。通过FACS监测小鼠的T细胞扩充。

[1394] RAD001最低剂量显示增强的CAR T细胞增殖(图57)。采用CD4⁺ CAR T细胞时,这种增强的增殖比CD8⁺ CAR T细胞更明显和更为延长。然而,采用CD8⁺ CAR T细胞时,可以在CAR T细胞给药后的早期时间点见到增强的增殖。

[1395] 实施例10:CD33 CAR转导的T细胞的体内抗肿瘤活性

[1396] HL-60是从一名36岁高加索人种女性AML患者的外周血分离的人急性早幼粒细胞白血病细胞系,并且可以在免疫受损小鼠中作为异种移植物培育。这种异种移植物模拟骨髓中如人类中所见的疾病,从而建立借以检测各疗法对骨中AML的功效的模型。这些小鼠可以用来检测对急性髓样(或早幼粒细胞)白血病细胞上存在的细胞标志物(如CD33 (Siglec-3))特异的嵌合抗原受体(CAR) T细胞的功效。

[1397] 将HL-60细胞用萤火虫萤光素酶报道基因标记并且用于急性髓样白血病(AML)的NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)小鼠同位模型中,以检测对CD33特异的CAR T细胞的功效。

[1398] 在HL-60细胞上检测CD33表达,并且这些细胞在体外测定法中用来观察CD33特异性CAR T细胞识别和响应于靶的能力。在体内,HL-60细胞经尾静脉以静脉内方式植入时生长,并主要限于骨髓生长。在肿瘤细胞植入后1周,疾病充分转移至骨并且开始以指数速率生长。不进行治疗时,小鼠将在肿瘤植入后4-6周开始显示临床症状和后肢麻痹。在这个体内模型中检测来自体外筛选的几个CD33scFv克隆。

[1399] 材料与方法:

[1400] HL-60细胞系:从急性早幼粒细胞白血病患者的外周血开发出HL-60人AML细胞系。细胞随后用萤火虫萤光素酶加标签。这些悬浮细胞生长在补充有10%热灭活胎牛血清的RPMI中。

[1401] 小鼠:从Jackson Laboratory接收6周龄NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tmlWjl}/SzJ) 小鼠(原种编号005557)。

[1402] 肿瘤植入:将HL-60-luc细胞在补充有10%热灭活胎牛血清的RPMI中生长和扩充。随后将细胞转移至50ml锥形管并用冷的无菌PBS洗涤两次。随后计数HL-60-luc细胞并且以 10×10^6 个细胞/毫升PBS的浓度重悬。将细胞置于冰上并且立即(在1小时内)植入小鼠中。将HL-60-luc细胞在100 μ l体积中经尾静脉静脉内注射,总计 1×10^6 个细胞/小鼠。

[1403] CAR T细胞给药:在肿瘤植入后14天对小鼠施用 5×10^6 个CAR⁺ T细胞。植入的细胞在小鼠中缓慢生长;截至14天,它们已经开始增加肿瘤生长速率。将细胞在37摄氏度水浴中部分解冻并且随后通过添加1ml冷无菌PBS至含有细胞的管,完全解冻。将解冻的细胞转移至15ml falcon管并用PBS调节至终体积10ml。将细胞以1000rpm洗涤2次,每次10分钟,并且随后在血细胞计数板上计数。将CAR T细胞对CAR转导归一化,从而每个组具有相同的CAR⁺ T细胞百分数。随后将 5×10^6 个CAR⁺ T细胞以 50×10^6 个CAR⁺ T细胞/ml冷PBS的浓度重悬并且保持在冰上直至给予小鼠。对小鼠经尾静脉作静脉内注射100 μ l CAR T细胞,每只小鼠的剂量为 5×10^6 个CAR⁺ T细胞。

[1404] 每组八只小鼠用100 μ l单独的PBS (PBS)、CD19-CAR对照T细胞(CD19)、CD33-1(克隆1) CAR T细胞、CD33-2(克隆2) CAR T细胞、CD33-4(克隆4) CAR T细胞、CD33-5(克隆5) CAR T细胞、CD33-6(克隆6) CAR T细胞、CD33-7(克隆7) CAR T细胞和CD33-9(克隆9) CAR T细胞处理。T细胞均从相同的人供体平行制备。

[1405] 动物监测:每日监测小鼠的健康状态,包括每周二次测量体重。体重变化百分数计算为 $(BW_{\text{当前的}} - BW_{\text{初始的}}) / (BW_{\text{初始的}}) \times 100\%$ 。通过生物发光成像每周二次监测肿瘤负荷。对小鼠作腹腔内注射D-萤光素,10分钟后麻醉小鼠并用Xenogen对其成像。通过计算肿瘤细胞的生物发光(光子/秒),计算疾病负荷。

[1406] 结果:

[1407] 在人急性髓细胞白血病(AML)HL-60模型中评价7种CD33 CAR的抗肿瘤活性并且与针对CD19的CAR T细胞直接比较。在第0天植入肿瘤后,将小鼠随机分组至各治疗组并在第7天用 5×10^6 个CAR⁺ T细胞静脉内治疗。监测AML疾病负荷和动物健康直至动物实现终点。在CAR T细胞给药后第22日(肿瘤植入后29天),当通过成像,对照组中的疾病负荷近乎最大发光时,将对照PBS组和CD19 CAR T细胞组中的小鼠安乐死。在CAR T细胞给药后第29日(肿瘤植入后36天),当CD33-1、CD33-2、CD33-7、和CD33-9 CAR T细胞疗法组中的疾病负荷已经达到令对照组安乐死的发光时,将这些组中的小鼠安乐死。在CD33-4、CD33-5和CD33-6CAR T

细胞疗法组中的小鼠显示疾病负荷后期下降。

[1408] 图58中显示这项研究的生物发光成像结果。肿瘤细胞的平均生物发光(+/-SEM)显示完整动物中的疾病负荷。这显示为ROI(目的区域)的光子/秒(p/s),所述ROI是整只小鼠。未接受任何T细胞的PBS治疗组在静脉内植入的NSG小鼠中展示了基线HL-60肿瘤生长动力学。CD19处理组接受对HL-60细胞无特异性的对照CAR T细胞,所述对照CAR T细胞发生与CD33 CAR T细胞相同的体外扩充过程。这些细胞在这个肿瘤模型中充当T细胞对照以显示T细胞的非特异性反应。在整个实验期间PBS治疗组和CD19 CAR T细胞治疗组均展示肿瘤连续进展。在注射 5×10^6 个CAR T细胞后,全部CD33 CAR T细胞均延迟病情进展,尽管这些克隆似乎分成两个具差异性反应的组。

[1409] 在这个功效研究中,在携带人AML异种移植物的NSG小鼠模型中评估CD33 CAR转导的T细胞的抗肿瘤活性。这些研究显示,HL-60-1uc模型在NSG小鼠中重演了人AML并且能够被CD33 CAR T细胞靶向(图58)。对CD33特异的CAR T细胞处理后的NSG小鼠中HL-60-1uc人AML异种移植物的生长显示了疾病进展延迟(图58)。这项研究显示,7种CD33 CAR能够在AML异种移植模型中发挥抗肿瘤反应(图58)。

[1410] 等同物

[1411] 本文引用的每份和每项专利、专利申请和出版物的公开内容因此通过引用的方式完整并入本文。尽管本发明已经参考具体方面公开,但显而易见本发明的其他方面和变型可以由本领域其他技术人员构思,而不脱离本发明的真实精神和范围。所附权利要求意在解释成包括全部此类方面和等同变型。

序列表

- <110> 诺华股份有限公司
 宾夕法尼亚大学托管会
- <120> 使用CD33嵌合抗原受体治疗癌症
- <130> N2067-7047W03
- <140> PCT/US2015/041390
- <141> 2015-07-21
- <150> PCT/CN2014/090504
- <151> 2014-11-06
- <150> PCT/CN2014/082589
- <151> 2014-07-21
- <160> 392
- <170> PatentIn版本3.5
- <210> 1
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> 来源
- <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
- <400> 1
- Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
- His Ala Ala Arg Pro
 20
- <210> 2
- <211> 45
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> 来源
- <223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"
- <400> 2
- Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15
- Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30
- Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

35	40	45
<210> 3		
<211> 230		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"		
<400> 3		
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe		
1	5	10
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
	20	25
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
	35	40
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
	50	55
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser		
65	70	75
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
	85	90
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser		
	100	105
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
	115	120
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
	130	135
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
145	150	155
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
	165	170
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu		
	180	185
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
	195	200
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
	210	215
Leu Ser Leu Gly Lys Met		220
225	230	

<210> 4
<211> 282
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"
<400> 4
Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
1 5 10 15
Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
 20 25 30
Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys
 35 40 45
Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
 50 55 60
Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln
65 70 75 80
Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly
 85 90 95
Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val
 100 105 110
Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly
 115 120 125
Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn
 130 135 140
Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
145 150 155 160
Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys
 165 170 175
Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
 180 185 190
Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
 195 200 205
Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
 210 215 220
Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
225 230 235 240
Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40

<210> 8

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 8

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro
 1 5 10 15

Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr
 20 25 30

Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
 35 40 45

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 9

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 10

<211> 112
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)
 <400> 10
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 11

<211> 1184

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 11

cgtgaggctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gccacagtc cccgagaagt 60
 tggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg 120
 aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggg tgggggagaa ccgtatataa 180
 gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacggggtt tgccgccaga acacaggtaa 240
 gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggcctt tgcgtgcctt 300
 gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360
 ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagecccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420
 cctggcctgg gcgctggggc cgccgctgac gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480
 ctgctttcga taagtctcta gccatttaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt 540
 tctggcaaga tagtcttcta aatgcggggc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600
 gggccgcggg cggcgacggg gcccgctgct cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660
 tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg gtagtctca agctggcccg cctgctctgg 720
 tgccctggcct cgcgccgccc tgtatcggcc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780

caccagttgc gtagcgga agatggccgc ttcccggccc tgctgcagg agctcaaaat	840
ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct	900
ttccgtcctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccc tccaggcacc	960
tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg	1020
cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga	1080
tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc	1140
agacagtgg tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgct gtga	1184
<210> 12	
<211> 63	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 12	
atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga	60
ccc	63
<210> 13	
<211> 135	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"	
<400> 13	
accacgacgc cagcgcgagc accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg	60
tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg	120
gacttcgcct gtgat	135
<210> 14	
<211> 690	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"	
<400> 14	
gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcct gggcggaccc	60
agcgtgttcc tgttcccc caagcccaag gacacctga tgatcagccg gacccccgag	120
gtgacctgtg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggacccc aggtccagtt caactgtac	180

gtggacggcg tggaggtgca caacgccaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc	240
acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa	300
tacaagtgta aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag	360
gccaaaggcc agcctcggga gccccagggtg tacaccctgc cccctagcca agaggagatg	420
accaagaacc aggtgtccct gacctgctg gtgaagggt tctaccccag cgacatcgcc	480
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg	540
gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag	600
gagggcaacg tctttagctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag	660
aagagcctga gcctgtccct gggcaagatg	690
<210> 15	
<211> 847	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"	
<400> 15	
aggtggcccc aaagtcccaa ggcccaggca tctagtgttc ctactgcaca gccccaggca	60
gaaggcagcc tagccaaagc tactactgca cctgccacta cgcgcaatac tggccgtggc	120
ggggaggaga agaaaaagga gaaagagaaa gaagaacagg aagagaggga gaccaagacc	180
cctgaatgtc catcccatac ccagccgctg ggcgtctatc tcttgactcc cgcagtacag	240
gacttgtggc ttagagataa ggccaccttt acatgtttcg tegtgggctc tgacctgaag	300
gatgcccatt tgacttggga ggttgccgga aaggtacca cagggggggt tgaggaaggg	360
ttgctggagc gccattccaa tggctctcag agccagcact caagactcac ctttccgaga	420
tccctgtgga acgcccggac ctctgtcaca tgtactctaa atcctcctag cctgccccca	480
cagcgtctga tggcccttag agagccagcc gccaggcac cagttaagct tagcctgaat	540
ctgctcgcca gtagtgatcc cccagaggcc gccagctggc tcttatgca agtgtccggc	600
tttagccgc ccaacatctt gctcatgtgg ctggaggacc agcgagaagt gaacaccagc	660
ggcttcgctc cagcccggcc cccaccccag ccgggttcta ccacattctg gcctggagt	720
gtcttaaggg tcccagcacc acctagcccc cagccagcca catacacctg tgttgtgtcc	780
catgaagata gcaggaccct gctaaatgct tctaggagtc tggaggtttc ctacgtgact	840
gaccatt	847
<210> 16	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	

<400> 16	
ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc	30
<210> 17	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 17	
atctacatct gggcgccett ggccgggact tgtggggtec ttctcctgtc actggttacc	60
accctttact gc	72
<210> 18	
<211> 126	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"	
<400> 18	
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaacaac catttatgag accagtacaa	60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggaggatgt	120
gaactg	126
<210> 19	
<211> 123	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"	
<400> 19	
aggagtaaga ggagcagget cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc	60
gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gcccaccac gcgacttcgc agcctatcgc	120
tcc	123
<210> 20	
<211> 336	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 20

```
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcc gaaccagctc      60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc      120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat      180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc      240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc      300
tacgacgcc ttcacatgca ggcctgccc cctcgc      336
```

<210> 21

<211> 336

<212> DNA

<213> 人

<400> 21

```
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcc gaaccagctc      60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc      120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat      180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc      240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc      300
tacgacgcc ttcacatgca ggcctgccc cctcgc      336
```

<210> 22

<211> 373

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 22

```
Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1           5           10           15
Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
           20           25           30
Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
           35           40           45
Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
           50           55           60
Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65           70           75           80
Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
```

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

<210> 23

<211> 1182

<212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"
 <400> 23
 atggccctcc ctgtcactgc cctgtcttc cccctcgcac tcctgctcca cgccgctaga 60
 ccaccgcat ggtttctgga ctctccgat cgcccggtga atcccccaac cttctcaccg 120
 gcaactcttg ttgtgactga gggcgataat ggcacttca cgtgctcgtt ctccaacacc 180
 tccgaatcat tcgtgctgaa ctggtaccgc atgagcccg caaacagac cgacaagctc 240
 gcccggtttc cggaagatcg gtcgcaaccg ggacaggatt gtcggttccg cgtgactcaa 300
 ctgccgaatg gcagagactt ccacatgagc gtggtccgcg ctaggcgaaa cgactccggg 360
 acctacctgt gcggagccat ctctctggcg cctaaggccc aatcaaaga gagcttgagg 420
 gccgaactga gaggtagcca gcgcagagct gaggtgcaa ctgcacatcc atccccatcg 480
 cctcggcctg cggggcagtt tcagaccctg gtcacgacca ctccggcgcc gcgcccaccg 540
 actccggccc caactatcgc gagccagccc ctgtcgtgga ggccggaagc atgccgcctt 600
 gcccgccggag gtgctgtgca taccggggga ttggaattcg catgcgacat ctacatttgg 660
 gctcctctcg ccggaacttg tggcgtgctc cttctgtccc tggatcac cctgtactgc 720
 aagcggggtc ggaaaaagct tctgtacatt ttcaagcagc cttcatgag gcccggtgcaa 780
 accaccagcagg aggaggacgg ttgctcctgc cggttccccg aagaggaaga aggaggttgc 840
 gagctgcgcg tgaagtctc ccggagcgcc gacgccccg cctataagca gggccagaac 900
 cagctgtaca acgaactgaa cctgggacgg cgggaagagt acgatgtgct ggacaagcgg 960
 cgcggccggg accccgaaat gggcgggaag cctagaagaa agaaccctca ggaaggcctg 1020
 tataacgagc tgcagaagga caagatggcc gaggcctact ccgaaattgg gatgaaggga 1080
 gagcggcggg ggggaaaggg gcacgacggc ctgtaccaag gactgtccac cgccaccaag 1140
 gacacatacg atgccctgca catgcaggcc cttccccctc gc 1182

<210> 24

<211> 394

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 24

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro
 20 25 30
 Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly

35	40	45
Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe		
50	55	60
Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu		
65	70	75
Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe		
85	90	95
Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val		
100	105	110
Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser		
115	120	125
Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg		
130	135	140
Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser		
145	150	155
Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Thr Thr Thr Pro Ala		
165	170	175
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser		
180	185	190
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr		
195	200	205
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala		
210	215	220
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys		
225	230	235
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met		
245	250	255
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe		
260	265	270
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg		
275	280	285
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn		
290	295	300
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg		
305	310	315
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro		
325	330	335
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala		
340	345	350

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 355 360 365
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 370 375 380
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 385 390

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 26

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (30)

<223> /注解="这个序列可以包含1-6个'Gly Gly Gly Gly Ser'重复单元,其中可以不存在一些位点"

<220>

<221> 来源

<223> /注解="参见递交的说明书中详细描述替代和优选的实施方案"

<400> 26

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 27
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser
 20
 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 28
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 29
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 29
 Gly Gly Gly Ser
 1
 <210> 30
 <211> 5000
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"
 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(5000)

<223> /注解="这个序列可以包含50-5,000个核苷酸,其中可以不存在一些位点"

<220>

<221> 来源

<223> /注解="参见递交的说明书中详细描述替代和优选的实施方案"

<400> 30

aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	300
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	360
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	420
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	480
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	540
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	600
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	660
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	720
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	780
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	840
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	900
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	960
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1020
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1080
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1140
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1200
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1260
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1320
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1380
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1440
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1500
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1560
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1620
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1680
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1740
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1800
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1860
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1920

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4320
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4380
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4440
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4500
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4560
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4620
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4680
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4740
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4800
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4860
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4920
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4980
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5000

<210> 31

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 31

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 60

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 100

<210> 32

<211> 5000

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (5000)

<223> /注解="这个序列可以包含50-5,000个核苷酸,其中可以不存在一些位点"

<220>

<221> 来源

<223> /注解="参见递交的说明书中详细描述替代和优选的实施方案"

<400> 32

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 60

tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4800
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4860
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4920
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4980
tttttttttt	tttttttttt					5000

- <210> 33
- <211> 5000
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> 来源
- <223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1) .. (5000)
- <223> /注解="这个序列可以包含100-5,000个核苷酸,其中可以不存在一些位点"
- <220>
- <221> 来源
- <223> /注解="参见递交的说明书中详细描述替代和优选的实施方案"
- <400> 33

aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	60
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	120
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	180
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	240
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	300
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	360
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	420
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	480
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	540
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	600
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	660
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	720
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	780
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	840
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	900
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	960
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1020
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1080
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1140

aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	3540
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	3600
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	3660
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	3720
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	3780
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	3840
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	3900
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	3960
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4020
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4080
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4140
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4200
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4260
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4320
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4380
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4440
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4500
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4560
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4620
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4680
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4740
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4800
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4860
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4920
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	4980
aaaaaaaaa aaaaaaaaa	5000
<210> 34	
<211> 400	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的 多核苷酸"	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1) .. (400)	
<223> /注解="这个序列可以包含100-400个核苷酸,其中可以不存在一些位点"	
<220>	

<221> 来源
 <223> /注解="参见递交的说明书中详细描述替代和优选的实施方案"
 <400> 34
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 400
 <210> 35
 <211> 2000
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (2000)
 <223> /注解="这个序列可以包含50-2,000个核苷酸，
 其中可以不存在一些位点"
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="参见递交的说明书中详细描述替代和优选的实施方案"
 <400> 35
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 420
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 480
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 540
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 600
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 720
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 780

aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	840
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	900
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	960
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1020
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1080
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1140
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1200
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1260
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1320
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1380
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1440
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1500
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1560
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1620
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1680
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1740
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1800
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1860
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1920
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1980
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa					2000

<210> 36

<211> 230

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 36

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu			
	85	90	95
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser			
	100	105	110
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			
	115	120	125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln			
	130	135	140
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala			
145	150	155	160
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr			
	165	170	175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu			
	180	185	190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser			
	195	200	205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser			
	210	215	220

Leu Ser Leu Gly Lys Met
225 230

<210> 37

<211> 690

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 37

gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcct gggcggaccc	60
agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgag	120
gtgacctgtg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggacccc aggtccagtt caactggtac	180
gtggacggcg tggagtgca caacgccaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc	240
acctaccggg tgggtgccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa	300
tacaagtgta aggtgtccaa caaggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag	360
gccaagggcc agcctcggga gccccagtg tacaccctgc cccctagcca agaggagatg	420
accaagaacc aggtgtccct gacctgctg gtgaagggt tctaccccag cgacatgcc	480
gtggagtggg agagcaacgg ccagccccgag aacaactaca agaccacccc cctgtgctg	540
gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag	600
gagggcaacg tctttagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag	660

aagagcctga gcctgtccct gggcaagatg 690

<210> 38

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (40)

<223> /注解="这个序列可以包含1-10个 'Gly Gly Gly Ser'重复单元,其中可以不
存在一些位点"

<220>

<221> 来源

<223> /注解="参见递交的说明书中详细描述替代和优选的实施方案"

<400> 38

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 35 40

<210> 39

<211> 271

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 39

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
 20 25 30

Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr
 35 40 45

Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys
 50 55 60

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

<210> 40

<211> 272

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 40

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
 20 25 30

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

<210> 41

<211> 270

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 41

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Asp Thr Ile Arg Gly Pro Asn Tyr
 115 120 125
 Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 130 135 140
 Ser Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala
 165 170 175
 Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile
 180 185 190
 Asp Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 195 200 205
 Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg
 210 215 220
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ile Ser Ser
 225 230 235 240
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ser Ile
 245 250 255
 Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 260 265 270
 <210> 42
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多肽"

<400> 42

```

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

```

<210> 43

245	250	255
Lys Val Glu Ile Lys		
260		
<210> 44		
<211> 269		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"		
<400> 44		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1 5 10 15		
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val		
20 25 30		
Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe		
35 40 45		
Thr Phe Ser Ile Phe Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
50 55 60		
Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Ala Phe		
65 70 75 80		
Tyr Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser		
85 90 95		
Lys Asp Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr		
100 105 110		
Ala Val Tyr Tyr Cys Val Lys Ala Gly Asp Gly Gly Tyr Asp Val Phe		
115 120 125		
Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly		
130 135 140		
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile		
145 150 155 160		
Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro		
165 170 175		
Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly		
180 185 190		
Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln		
195 200 205		
Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg		
210 215 220		

Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Lys Pro Pro Gln Leu Leu Ile His
 195 200 205

Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 210 215 220

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 225 230 235 240

Asp Phe Ala Ser Tyr Trp Cys Gln Gln Ser Asn Asn Phe Pro Pro Thr
 245 250 255

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 260 265

<210> 46
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的
 多肽"
 <400> 46

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
 20 25 30

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 35 40 45

Met Phe Thr Asp Phe Phe Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Val Thr Lys
 65 70 75 80

Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser
 85 90 95

Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Gly Ile
 115 120 125

Ala Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 145 150 155 160

Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 165 170 175
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser His Asp Ile Ser Asn Tyr Leu
 180 185 190
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 195 200 205
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser
 210 215 220
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Gln Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Val Ala Ala Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Asp Leu Pro His Thr
 245 250 255
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 260 265

<210> 47

<211> 265

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
 多肽"

<400> 47

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

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 145 150 155 160
 Arg Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 165 170 175
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 180 185 190
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
 195 200 205
 Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 225 230 235 240
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe
 245 250 255
 Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 260 265

<210> 48

<211> 494

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多肽"

<400> 48

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

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

	405		410		415
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg					
	420		425		430
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys					
	435		440		445
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg					
	450		455		460
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys					
465		470		475	480
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg					
	485		490		
<210> 49					
<211> 495					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<221> 来源					
<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"					
<400> 49					
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu					
1	5		10		15
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val					
	20		25		30
Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr					
	35		40		45
Ile Phe Thr Asn Tyr Tyr Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln					
	50		55		60
Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Pro Thr					
65		70		75	80
Tyr Ala Gln Arg Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Leu Ser					
	85		90		95
Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr					
	100		105		110
Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Ser Arg Leu Arg Gly Asn Arg Leu					
	115		120		125
Gly Leu Gln Ser Ser Ile Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val					
	130		135		140
Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser					

145		150		155		160
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu						
		165		170		175
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Pro Cys Gln Ala Ser Gln						
		180		185		190
Asp Ile Asn Asn His Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala						
		195		200		205
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Glu Ile Gly Val Pro						
		210		215		220
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile						
225		230		235		240
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr						
		245		250		255
Glu Asn Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys						
		260		265		270
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala						
		275		280		285
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly						
		290		295		300
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile						
305		310		315		320
Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val						
		325		330		335
Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe						
		340		345		350
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly						
		355		360		365
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg						
		370		375		380
Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln						
385		390		395		400
Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp						
		405		410		415
Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro						
		420		425		430
Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp						
		435		440		445
Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg						
		450		455		460

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 465 470 475 480
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490 495
 <210> 50
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的
 多肽"
 <400> 50
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Asp Thr Ile Arg Gly Pro Asn Tyr
 115 120 125
 Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 130 135 140
 Ser Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala
 165 170 175
 Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile
 180 185 190
 Asp Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 195 200 205

Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg
 210 215 220
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ile Ser Ser
 225 230 235 240
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ser Ile
 245 250 255
 Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Thr Thr
 260 265 270
 Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
 275 280 285
 Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
 290 295 300
 Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala
 305 310 315 320
 Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
 325 330 335
 Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
 340 345 350
 Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
 355 360 365
 Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 370 375 380
 Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln
 385 390 395 400
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 405 410 415
 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 420 425 430
 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 435 440 445
 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 450 455 460
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 465 470 475 480
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

<210> 51

<211> 494

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 51

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

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

<210> 52

<211> 484

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 52

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

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

Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys
 325 330 335
 Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
 340 345 350
 Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly
 355 360 365
 Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
 370 375 380
 Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
 385 390 395 400
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
 405 410 415
 Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
 420 425 430
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 435 440 445
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 450 455 460
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 465 470 475 480
 Leu Pro Pro Arg
 <210> 53
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述: 合成的
 多肽"
 <400> 53
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val
 20 25 30
 Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Thr Phe Ser Ile Phe Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Ala Phe

65		70		75		80									
Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
		85		90		95									
Lys	Asp	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr
		100		105		110									
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Lys	Ala	Gly	Asp	Gly	Gly	Tyr	Asp	Val	Phe
		115		120		125									
Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly
		130		135		140									
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile
		145		150		155		160							
Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro
		165		170		175									
Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly
		180		185		190									
Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln
		195		200		205									
Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg
		210		215		220									
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg
		225		230		235		240							
Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ala	Leu	Gln
		245		250		255									
Thr	Pro	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr
		260		265		270									
Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro
		275		280		285									
Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val
		290		295		300									
His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro
		305		310		315		320							
Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu
		325		330		335									
Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro
		340		345		350									
Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys
		355		360		365									
Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe
		370		375		380									

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu																			
385						390						395							400
Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp																			
						405						410							415
Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys																			
						420						425							430
Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala																			
						435													445
Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys																			
						450													460
Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr																			
465						470													480
Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg																			
						485													490
<210>	54																		
<211>	489																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<221>	来源																		
<223>	/注解="人工序列的描述: 合成的多肽"																		
<400>	54																		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu																			
1						5													15
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu																			
						20													30
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe																			
						35													45
Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys																			
						50													60
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr																			
65						70													80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser																			
						85													95
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr																			
						100													110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Thr Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr																			
						115													125

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

435 440 445
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 450 455 460
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 465 470 475 480
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485
 <210> 55
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的
 多肽"
 <400> 55
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
 20 25 30
 Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 35 40 45
 Met Phe Thr Asp Phe Phe Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Val Thr Lys
 65 70 75 80
 Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser
 85 90 95
 Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Gly Ile
 115 120 125
 Ala Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 145 150 155 160
 Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 165 170 175
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser His Asp Ile Ser Asn Tyr Leu

	180		185		190														
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr				
	195						200					205							
Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser				
	210						215					220							
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Arg	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu				
225							230					235			240				
Asp	Val	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asp	Asp	Leu	Pro	His	Thr				
							245					250			255				
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro				
							260					265			270				
Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu				
							275					280			285				
Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg				
							290					295			300				
Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly				
305							310					315			320				
Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys				
							325					330			335				
Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg				
							340					345			350				
Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro				
							355					360			365				
Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser				
							370					375			380				
Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu				
385							390					395			400				
Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg				
							405					410			415				
Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln				
							420					425			430				
Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr				
							435					440			445				
Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp				
							450					455			460				
Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala				
465							470					475			480				
Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg											
							485												

<210> 56
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"
 <400> 56
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
 20 25 30
 Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr
 35 40 45
 Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg
 65 70 75 80
 Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser
 85 90 95
 Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr
 100 105 110
 Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Pro Ser Ser Trp Gly Glu Phe
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 145 150 155 160
 Arg Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 165 170 175
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 180 185 190
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
 195 200 205
 Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 225 230 235 240

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

<210> 57

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的

Ala Arg Glu Ser Arg Leu Arg Gly Asn Arg Leu Gly Leu Gln Ser Ser
 100 105 110

Ile Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 59

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
 多肽"

<400> 59

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Glu Asp Thr Ile Arg Gly Pro Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 60

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
 多肽"

<400> 60

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

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

<210> 61

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 61

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

115

<210> 62

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多肽"

<400> 62

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

<210> 63

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多肽"

<400> 63

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		

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

<210> 64

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
 多肽"

<400> 64

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

<210> 65

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 65

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

<210> 66

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 66

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40				45				
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro

50	55	60																
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile			
65					70					75				80				
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ala			
				85					90					95				
Leu	Gln	Thr	Leu	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys			
			100					105						110				

<210> 67

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 67

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

<210> 68

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 68

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

<210> 69

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述: 合成的
多肽"

<400> 69

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

<210> 70

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 70

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

<210> 71

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 71

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5						10					15
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
				20						25					30
Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
				35						40					45
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
				50						55					60
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile

65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala			
	85	90	95
Leu Gln Thr Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys			
	100	105	110

<210> 72

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 72

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

<210> 73

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 73

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15

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

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
 多肽"

<400> 74

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

<210> 75

<211> 1482

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多核苷酸"

<400> 75

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
ccccaaagtgc aactcgtcca gtccggtgca gaagtcaaga agccaggaga atcactcaag	120
attagctgca aaggcagcgg ctactccttc acttctact ggatcggctg ggtgcccag	180
atgcccggaa agggactgga gtggatggga atcatctacc ctggcgatag cgacaccaga	240
tactccccga gctttcaagg ccaagtgacc atttcggccg acaagtcgat ctccaccgcg	300
tatctgcagt ggagctcact gaaggttcg gacaccgcca tgtactactg tgcccggctg	360
gggggaagcc tgcccgatta cggaatggac gtgtggggcc agggaacat ggtcactgtg	420
tctccgcct ccgggggtgg aggtccgggt ggaggggggt ccggtggtgg aggatcagaa	480
attgtgctga ccagctctcc gctgtccttg cctgtgacc cgggcgaacc cgcaagcatc	540
tctgccggt cgtcgcagtc cctgcttcac tccaacggct acaactacct cgattggtac	600
ctccagaagc ctggacagag cccacagctg ttgatctacc tgggctcga cgggcctca	660
ggagtgccgg acaggttctc cggtccggg tcgggaaccg acttcacgct gaagatctcc	720
cgcggtggagg ccgaggacgt gggcgtgtac tattgcatgc aggcgctgca gacccttatt	780
acattcggac aggggactaa ggtcgatata aagaccacta cccagcacc gaggccacc	840
accccggctc ctaccatcgc ctcccagcct ctgtccctgc gtccggaggc atgtagacc	900
gcagctggtg gggccgtgca taccgggggt cttgacttcg cctgcgatata ctacatttg	960
gcccctctgg ctggtacttg cggggtcctg ctgctttcac tcgtgatcac tctttactgt	1020
aagcgcggtc ggaagaagct gctgtacatc ttaagcaac ccttcatgag gcctgtgcag	1080
actactcaag aggaggacgg ctgttcatgc cggttccag aggaggagga aggcggctgc	1140
gaactgcgcg taaaattcag ccgcagcga gatgctccag cctacaagca ggggcagaac	1200
cagctctaca acgaactcaa tcttggtcgg agagaggagt acgacgtgct ggacaagcgg	1260
agaggacggg acccagaaat gggcgggaag ccgcgcagaa agaatcccca agagggcctg	1320
tacaacgagc tccaaaagga taagatggca gaagcctata gcgagattgg tatgaaagg	1380
gaacgcagaa gaggcaaagg ccacgacgga ctgtaccagg gactcagcac cgccaccaag	1440
gacacctatg acgctcttca catgcaggcc ctgccgctc gg	1482

<210> 76

<211> 1485

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多核苷酸"

<400> 76

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
ccccaaagtcc aactcgtcca atcaggagct gaagtcaaga agcctggagc atccgtgaga	120
gtgtcctgta aagcctccgg ctacatcttc accaactact acgtgcaactg ggtcagacag	180
gccccgggcc agggactgga atggatggga atcatttccc cgtccggcgg atcgcctact	240
tacgcgcaac ggctgcaggg ccgctgacc atgactcggg atctctccac ttcaaccgtg	300
tacatggaac tgtccagcct tacatcggag gatactgccg tgtacttctg cgcgagggag	360
tcccggctga ggggcaaccg cctcgggctg cagtcaagca tcttcgatca ctggggccag	420
ggcaccctcg tgaccgtgtc cagcgcctcg gggggaggag gctccggggg cggaggttcg	480
ggcggtggtg gatctgacat tcgcatgact cagtccccac cttactgtc cgctagcgtg	540
ggggaccgcg tgacgattcc gtgccaagcc agccaggaca tcaacaacca tctgaactgg	600
tatcagcaga agccccgaaa ggccccgcag ctgctgatct acgacacctc gaatctggag	660
atcggcgtgc catccccggtt ctccggttcg ggaagcggaa ccgactttac cctgactatc	720
tcctccttgc aacccgagga cattgccacc tactactgcc agcagtacga aaaccttccc	780
ctgaccttcg ggggtggaac caaagtggag atcaagacca ctaccccagc accgaggcca	840
cccaccccgg ctctaccat cgctcccag cctctgtccc tgcgtccgga ggcattgtaga	900
cccgcagctg gtggggccgt gcatacccgg ggtcttgact tcgctgcga tatctacatt	960
tgggcccctc tggctggtac ttgcggggtc ctgctgcttt cactcgtgat cactctttac	1020
tgtaagcgcg gtcggaagaa gctgctgtac atctttaagc aaccttcat gaggcctgtg	1080
cagactactc aagaggagga cggctgttca tgccggttcc cagaggagga ggaaggcggc	1140
tgcgaactgc gcgtgaaatt cagccgcagc gcagatgctc cagcctacaa gcaggggcag	1200
aaccagctct acaacgaact caatcttggc cggagagagg agtacgacgt gctggacaag	1260
cggagaggac gggaccacaga aatgggcggg aagccgcgca gaaagaatcc ccaagagggc	1320
ctgtacaacg agctccaaaa ggataagatg gcagaagcct atagcgagat tggtatgaaa	1380
ggggaacgca gaagaggcaa aggccacgac ggactgtacc agggactcag caccgccacc	1440
aaggacacct atgacgctct tcacatgcag gcctgcccgc ctcgg	1485
<210> 77	
<211> 1479	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的 多核苷酸"	
<400> 77	
atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
ccccaaagtgc aattggtgca gtcaggagga ggattggtgc aaccggagg atcgtgaga	120
ctgtcatgtg ctgccagcgg gttcacattc tcctctacg caatgtctg ggtccgccag	180
gcgccgggca aaggactgga atgggtgtcc gccatctcgg ggtcgggcgg ctccacctat	240
tacgtgact ccgtgaaggg acgcttcacc attagcagag ataactcaa gaacacctc	300

tacctcaaaa tgaacagcct tagggctgag gacaccgccc tctattactg cgccaaggag	360
gacacgatcc ggggacctaa ctactattac tacggaatgg atgtctgggg ccagggtacc	420
actgtgaccg tgtcctcggc ctccggaggc ggaggatcag ggggtggtgg ctctgggggg	480
ggtggcagcg aaactactct gaccagtc ccctcatccg tgtcagcgtc cgtgggcat	540
cgggtgtcga tcaactgccg ggccctccaa gacatcgaca cctggctcgc gtggtaccag	600
ctgaagccag gaaaggcccc taagctgctg atgtacgcag cctccaatct gcaaggagg	660
gtgccctccc gcttttccgg gtccggcagc ggaaccgact tcattctgac tatctcgagc	720
ctccagccgg aggatttcgc cacctactac tgccagcagg cctccatctt cccgccgact	780
ttcgggtggcg gaaccaaggt cgacattaag accactacc cagcaccgag gccaccacc	840
ccggtccta ccatcgctc ccagcctctg tcctgctgc cggaggcatg tagaccgca	900
gctggtgggg ccgtgcatac ccggggtctt gacttcgct gcgatatcta catttgggcc	960
cctctggctg gtacttgccg ggtcctgctg ctttactcg tgatcactct ttactgtaag	1020
cgcggtcggg agaagctgct gtacatctt aagcaacct tcatgaggcc tgtgcagact	1080
actcaagagg aggacgctg ttcattgccg ttcccagagg aggaggaagg cggctgcgaa	1140
ctgcgcgtga aattcagccg cagcgcagat gctccagcct acaagcaggg gcagaaccag	1200
ctctacaacg aactcaatct tggctcggaga gaggagtac acgtgctgga caagcggaga	1260
ggacgggacc cagaaaatggg cgggaagccg cgcagaaaga atccccaaga gggcctgtac	1320
aacgagctcc aaaaggataa gatggcagaa gcctatagcg agattggtat gaaaggggaa	1380
cgcagaagag gcaaaggcca cgacggactg taccagggac tcagcaccgc caccaaggac	1440
acctatgacg ctcttcacat gcaggccctg ccgctcgg	1479

<210> 78

<211> 1482

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多核苷酸"

<400> 78

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
ccccaaagtgc agctcgtcca atccggtgca gaagtgaaga agcctggcga atccctgaag	120
atctcatgca aaggctcggg atacagctt acctcatatt ggattggatg ggtcagacag	180
atgccaggaa aggtcttggg gtggatggga atcatctacc cgggagacag cgatacccg	240
tactccccga gcttccaggg acaggtcacc atctcggccg acaagtccat tactactgcc	300
tacttgcaat ggtcctcgtc gcgcgcctcc gatagcgcca tgtactactg cgcgagagge	360
ggctactccg actacgacta ctacttcgat ttctggggac aggggacact cgtgactgtg	420
tcctcccggt cgggtggcgg cggtcgggt ggaggaggaa gcggagggg aggctccgaa	480
attgtgatga cccagtcacc cctgtcgtc cctgtgactc ctggggaacc ggcctccatc	540
tcctgccgga gctcacagag cctgctgcac tccaacggat acaactacct cgattggtac	600

cttcagaagc ccggccagtc gccccagctg ctgatctacc tggggtccaa ccgggctagc 660
 ggcgtgccgg accgcttctc cggttccggg tctggaaccg acttcacgct gaaaatctcc 720
 aggggtggagg ccgaggacgt gggagtgtat tactgtatgc aggccctgca aacccccttc 780
 acctttggcg ggggcaccaa ggtcgagatt aagaccacta ccccagcacc gaggccacce 840
 accccggctc ctaccatcgc ctcccagcct ctgtccctgc gtccggaggc atgtagacc 900
 gcagctgggtg gggccgtgca taccgggggt ctgacttcg cctgcgatat ctacatttgg 960
 gccctcttgg ctggtacttg cggggtcctg ctgctttcac tctgtatcac tctttactgt 1020
 aagcgcggtc ggaagaagct gctgtacatc ttaagcaac cttcatgag gcctgtgcag 1080
 actactcaag aggaggacgg ctgttcatgc cggttccag aggaggagga aggcggctgc 1140
 gaactgcgcg taaaattcag ccgcagcgca gatgctccag cctacaagca ggggcagaac 1200
 cagctctaca acgaactcaa tcttggtcgg agagaggagt acgacgtgct ggacaagcgg 1260
 agaggacggg acccagaaat gggcgggaag ccgcgcagaa agaatcccca agagggcctg 1320
 tacaacgagc tccaaaagga taagatggca gaagcctata gcgagattgg tatgaaaggg 1380
 gaacgcagaa gaggcaaagg ccacgacgga ctgtaccagg gactcagcac cgccaccaag 1440
 gacacctatg acgctcttca catgcaggcc ctgccgctc gg 1482

<210> 79

<211> 1452

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多核苷酸"

<400> 79

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60
 cccaagtgc aactcgtcca aagcgggtga gatctcgccc agcccggaag atcccttaga 120
 ctctcatgtg ccgccagcgg gttcacctc gacgactacg ctatgcattg ggtgcgccag 180
 gccccgggga agggactgga atgggtggcc gtgatttggc cggacggcgg acagaagtac 240
 tacggagaca gcgtgaaaagg gcggttcacc gtgtcgaggg acaaccgaa gaatacctc 300
 taccttcaaa tgaactcctt gcgcgcccag gacaccgca tctactactg cgtgcgccac 360
 tttaacgcat gggattactg gggacagggg actctggtea ctgtgtcctc gcctctggc 420
 ggcggaggtt ccggcgggtg tggtccgggt ggaggaggat cggacatcca gctgaccag 480
 tccccttctt cactgtcggc gtacgtggga ggccgggtca ctatcacgtg ccaggcatcc 540
 cagggcattt ccagttcctt gaactggttc cagcagaagc ccgaaaggc ccctaagctg 600
 ttgatttccg atgctagcaa cctggaaccg ggcgtgccgt cacggttcag cggctccggg 660
 tcgggcaccg acttcacctt caccatcaact aacctccaac cggaggacat cgccacctat 720
 tactgccagc agtacgatga tctgccactg actttcggcg gcggaaccaa ggtcgaaatc 780
 aagaccacta ccccagcacc gaggccacc accccggctc ctaccatcgc ctcccagcct 840
 ctgtccctgc gtccggaggc atgtagacc gcagctgggt gggccgtgca taccgggggt 900

cttgacttcg cctgcgatat ctacatttgg gccctctctg ctggtacttg cggggtcctg	960
ctgctttcac tcgtgatcac tctttactgt aagcgcggtc ggaagaagct gctgtacatc	1020
tttaagcaac cttcatgag gcctgtgcag actactcaag aggaggacgg ctgttcatgc	1080
cggttcccag aggaggagga aggcggctgc gaactgcgcg tgaattcag ccgcagcgca	1140
gatgctccag cctacaagca ggggcagaac cagctctaca acgaactcaa tcttggtcgg	1200
agagaggagt acgacgtgct ggacaagcgg agaggacggg accagaaat gggcgggaag	1260
ccgcgcagaa agaatcccca agaggcctg tacaacgagc tccaaaagga taagatggca	1320
gaagcctata gcgagattgg tatgaaaggg gaacgcagaa gaggcaaagg ccacgacgga	1380
ctgtaccagg gactcagcac cgccaccaag gacacctatg acgctcttca catgcaggcc	1440
ctgcccctc gg	1452
<210> 80	
<211> 1476	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的 多核苷酸"	
<400> 80	
atggccctcc ctgtaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
ccccaaagtgc aactcgtcca atccggtggt ggtgtcgtgc aaccaggaaa gtctcttcgc	120
ctctcatgcg ctgccagcgg attcacgttt tccatcttcg ctatgactg ggtgcggcag	180
gccccgggaa agggactgga atgggtggca accatttcat acgatggatc aaacgcgttc	240
tacgccgact ccgtggaagg aaggttcacc atctcgagag acaactcaa ggactcgctg	300
tatctgcaaa tggactccct gcgccctgag gataccgccg tctactactg cgtgaaggcc	360
ggcgacgggg gatacgacgt gttcgattcg tggggccagg gaactctggt caccgtgtcc	420
agcgcgagcg ggggagcgg atcgggtggt ggagggtccg ggggaggagg ctccgagatc	480
gtgatgactc agtcgccgt ctccctccc gtgaccccc gagagccagc tagcatttca	540
tgtcggagct ccagtcctt gctgactcc aacggtaca attacctgga ttggtacttg	600
cagaagcctg ggcagagccc tcagctgctg atctacctg gctcgaacag agcctccggc	660
gtgccggacc ggttttccgg gagcggcagc ggcaccgatt tcacctgaa aatctcccgc	720
gtggaagccg aggacgtggg cgtgtactat tgcatgcagg cctgcagac tcccacctc	780
ggccccggaa ctaaggtcga catcaagacc actaccccag caccgaggcc acccaccg	840
gctcctacca tcgcctccca gcctctgtcc ctgcgtccgg aggcattgtag accgcagct	900
ggtggggccg tgcatacccg gggctctgac ttgcctgctg atatctacat ttgggcccct	960
ctggctggta cttgcggggt cctgctgctt tcaactctga tcaactcttta ctgtaagcgc	1020
ggtcgggaaga agctgctgta catctttaag caaccctca tgaggcctgt gcagactact	1080
caagaggagg acggctgttc atgccggtc ccagaggagg aggaaggcgg ctgcgaactg	1140
cgcgtgaaat tcagccgcag cgcagatgct ccagcctaca agcaggggca gaaccagctc	1200

tacaacgaac tcaatcttgg tcggagagag gactacgacg tgctggacaa gcggagagga	1260
cgggacccag aatgggagg gaagccgagc agaaagaatc cccaagaggg cctgtacaac	1320
gagctccaaa aggataagat ggcagaagcc tatagcgaga ttggtatgaa aggggaacgc	1380
agaagaggca aaggccacga cggactgtac cagggactca gcaccgccac caaggacacc	1440
tatgacgctc ttcacatgca ggccctgccg cctcgg	1476
<210> 81	
<211> 1467	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的 多核苷酸"	
<400> 81	
atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
cccgaagtgc aattggtgga atctggagga ggattggtgc aacctggagg atctctgaga	120
ctgtcatgtg ccgccagcgg cttcacattt tctctctacg cgatgtcatg ggtccgccag	180
gcaccgggga aaggactgga atgggtgtcc gccatttcgg gatcgggagg ctcgacctac	240
tacgccgaca gcgtgaaggg aagattcact atctcccggg ataactcaa gaatactctg	300
tatctccaaa tgaactccct gagggccgag gatactgccg tgtactactg cgctaaggaa	360
accgactact acggctcagg aaccttcgac tactggggcc agggcacctt cgtgaccgtg	420
tctctggcct ccggcggcgg aggttcgggg gggggcggtt ccgggggagg gggcagcgac	480
atccagatga cccagtcccc aagctccctt tccgctccg tgggagatcg cgtgaccatt	540
tcgtgccggg ctagccaggg catcggatc tatcttgctt ggtaccagca gcggagcgga	600
aagccgcccc agctgctgat ccacggcgc tcaactctgc aatccggggg cccagccgg	660
ttcagcggta gcgggtcggg taccgacttt acctgacta tctctccct ccaaccggag	720
gacttcgcct cctactggtg ccagcagtcc aacaacttc ctcccactt cggccaggga	780
acgaaggtcg agattaagac cactaccca gcaccaggc caccacccc ggctcctacc	840
atcgccctcc agcctctgtc cctgcgtccg gagcatgta gaccgcagc tgggtggggc	900
gtgcataccc ggggtcttga cttcgcctgc gatatctaca tttgggcccc tctggctggt	960
acttgccggg tctgctgctt ttcaactctg atcaactttt actgtaagcg cggtcggaag	1020
aagctgctgt acatctttaa gcaaccctt atgaggctg tgcagactac tcaagaggag	1080
gacggctgtt catgccggtt cccagaggag gaggaaggcg gctgcgaact gcgcgtgaaa	1140
ttcagccgca gcgcagatgc tccagcctac aagcaggggc agaaccagct ctacaacgaa	1200
ctcaatcttg gtcggagaga ggagtacgac gtgctggaca agcggagagg acgggaccca	1260
gaaatgggag ggaagccgag cagaaagaat cccaagagg gcctgtacaa cgagctccaa	1320
aaggataaga tggcagaagc ctatagcgag attggtatga aagggaacg cagaagaggc	1380
aaaggccacg acggactgta ccagggactc agcaccgcca ccaaggacac ctatgacgct	1440
cttcacatgc aggcctgcc gcctcgg	1467

<210> 82	
<211> 1467	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的 多核苷酸"	
<400> 82	
atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
ccccaaagtcc aactcgtcca gtccggtgca gaagtcaaga agccaggagc ctccgtgaga	120
gtgtcgtgca aagcgtccgg ctacatgttc accgactttt tcattcactg ggtgcgccag	180
gcgccccggac agggctctgga gtggatgggg tggatcaacc ctaactccgg cgtgactaaa	240
tacgcccaga agttccaggg ccgctgacc atgaccgga aactagcat ctccaccgcc	300
tacatggaac tgtcatcctt ccggtccgag gataccgccg tgtactactg cgccacctgg	360
tacagcagcg gttggtacgg catcgcgaac atttggggac aggggactat ggtcaccgtg	420
tcatccgcct ccgggggagg agggctccggc ggcggaggtt ctggaggagg cggctcggac	480
atccagttga cgcagagccc ctctcgtctg agcgcctccg tgggcgacag agtgaccatt	540
acctgtcaag cttcccatga tatctcgaac tacctccact ggtatcagca gaagccggga	600
aaggctccca agctgctgat ctacgacgcc tccaatctgg aaaccggagt gccgagccgg	660
ttcactggat cagggagcgg cactgacttc acctgacaa ttaggtcgct gcagccggag	720
gatgtggcag cctactactg ccaacagtca gacgacctc ctacacttt cggacaaggg	780
actaaggctc acatcaagac cactaccca gcaccgagc caccacccc ggctcctacc	840
atcgccctcc agcctctgtc cctgctccg gagcatgta gaccgcagc tgggtggggcc	900
gtgcatacc ggggtcttga cttcgcctgc gatatctaca tttgggcccc tctggctggt	960
acttgcgggg tcttctgctt ttcactctg atcactcttt actgtaagcg cggtcggag	1020
aagctgctgt acatctttaa gcaaccctc atgaggcctg tgcagactac tcaagaggag	1080
gacggctggt catgccggtt ccagaggag gaggaaggc gctgcgaact gcgctgaaa	1140
ttcagccgca gcgcagatgc tccagcctac aagcaggggc agaaccagct ctacaacgaa	1200
ctcaatcttg gtcggagaga ggagtacgac gtgctggaca agcggagagg acgggaccca	1260
gaaatgggcg ggaagccgcg cagaaagaat cccaagagg gcctgtacaa cgagctccaa	1320
aaggataaga tggcagaagc ctatagcgag attggtatga aagggaacg cagaagaggc	1380
aaaggccacg acggactgta ccagggactc agcaccgcca ccaaggacac ctatgacgct	1440
cttcacatgc aggccctgcc gcctcgg	1467
<210> 83	
<211> 1464	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多核苷酸"

<400> 83

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
ccccaaagtgc aactcgtcca gtccgggtgca gaagtgaana agccaggaga aagcctcaag	120
atcagctgca agggatctgg gtacagcttc accaactact ggatcggctg ggtgcgccag	180
atgcccggaa agggactgga gtggatgggc attatctacc ctggggactc cgacaccg	240
tattccccga gcttccaagg acaggtcacc atctccgccg ataagtcgat tagcactg	300
tacttgcagt ggtcaagcct gaaggcctcg gacaccgcca tgtactactg cgcgagacac	360
gggccctcgt cctggggcga atttgactac tggggccagg gaacgcttgt gaccgtgtcg	420
tccgcgtccg ggggtggagg atcaggagga ggaggctccg gtggtggcgg tagcgacatc	480
cggtcgtcgc agtccccctc ctcaactctc gcctccgtgg gggaccgctg gaccattacc	540
tgctcgggcat cacagtccat cagctcatac ctgaactggt atcagcagaa gccggggaag	600
gccccgaaac tctgatcta cgccgctcc tccttgaat ccggcgtgcc ctcgaggttc	660
tccggctccg gctcgggaac cgatttact ctgacaatta gcagcctgca gcctgaggat	720
ttcgtacct actactgcca gcagtctac tcgactccgc tgactttcgg cgggggaacc	780
aaggctgaca tcaagaccac taccagca ccgaggccac ccaccccgcc tctaccatc	840
gcctcccagc ctctgtccct gcgtccggag gcatgtagac ccgcagctgg tggggccgtg	900
catacccggg gtcttgactt cgcttgcgat atctacattt gggcccctct ggctggtact	960
tgccgggtcc tgctgcttc actcgtgat actctttact gtaagcgcgg tcggaagaag	1020
ctgctgtaca tctttaagca acccttcatg aggctgtgc agactactca agaggaggac	1080
ggctgttcat gccggttccc agaggaggag gaaggcggct gcgaactgcg cgtgaaattc	1140
agccgcagcg cagatgctcc agcctacaag caggggcaga accagctcta caacgaactc	1200
aatcttggtc ggagagagga gtacgacgtg ctggacaagc ggagaggacg ggaccagaa	1260
atgggcggga agccgcgcag aaagaatccc caagagggcc tgtacaacga gctccaaaag	1320
gataagatgg cagaagccta tagcgagatt ggtatgaaag ggaacgcag aagaggcaaa	1380
ggccacgacg gactgtacca gggactcagc accgccacca aggacaccta tgacgctctt	1440
cacatgcagg ccctgccgcc tcgg	1464

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
肽"

<400> 84

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly

1	5	10
<210> 85		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"		
<400> 85		
Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Tyr Val His		
1	5	10
<210> 86		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"		
<400> 86		
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser		
1	5	10
<210> 87		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"		
<400> 87		
Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly		
1	5	10
<210> 88		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"		

<400> 88
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His
1 5 10

<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 89
Gly Phe Thr Phe Ser Ile Phe Ala Met His
1 5 10

<210> 90
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 90
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10

<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 91
Gly Tyr Met Phe Thr Asp Phe Phe Ile His
1 5 10

<210> 92
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 92

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 93

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 93

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 94

Ile Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Pro Thr Tyr Ala Gln Arg Leu Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 95

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 96

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 96

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 97

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 97

Val Ile Trp Pro Asp Gly Gly Gln Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 98

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 98

Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Ala Phe Tyr Ala Asp Ser Val Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 99

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 99

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 100

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 100

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Val Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 101

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 101

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 102

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 102

Leu Gly Gly Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 103

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 103

Glu Ser Arg Leu Arg Gly Asn Arg Leu Gly Leu Gln Ser Ser Ile Phe
1 5 10 15

Asp His

<210> 104

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 104

Glu Asp Thr Ile Arg Gly Pro Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 105

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 105

Gly Gly Tyr Ser Asp Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 106

His Phe Asn Ala Trp Asp Tyr
1 5

<210> 107

<211> 11

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 107
 Ala Gly Asp Gly Gly Tyr Asp Val Phe Asp Ser
 1 5 10
 <210> 108
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 108
 Glu Thr Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 109
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 109
 Trp Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Gly Ile Ala Asn Ile
 1 5 10
 <210> 110
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 110
 His Gly Pro Ser Ser Trp Gly Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 111

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 111

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 112

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 112

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn His Leu Asn

1 5 10

<210> 113

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 113

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asp Thr Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 114

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 114

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 115

Gln Ala Ser Gln Gly Ile Ser Gln Phe Leu Asn

1 5 10

<210> 116

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 116

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 117

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Ile Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 118

Gln Ala Ser His Asp Ile Ser Asn Tyr Leu His

1	5	10
<210> 119		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"		
<400> 119		
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn		
1	5	10
<210> 120		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"		
<400> 120		
Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser		
1	5	
<210> 121		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"		
<400> 121		
Asp Thr Ser Asn Leu Glu Ile		
1	5	
<210> 122		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"		
<400> 122		

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Gly

1 5

<210> 123

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 123

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 124

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 124

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Pro

1 5

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 125

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 126
Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5
<210> 127
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 127
Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5
<210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 128
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5
<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 129
Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Ile Thr
1 5
<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<210> 134
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 134
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Thr
1 5
<210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 135
Gln Gln Ser Asn Asn Phe Pro Pro Thr
1 5
<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 136
Gln Gln Ser Asp Asp Leu Pro His Thr
1 5
<210> 137
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 137

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 138

<211> 9742

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 138

gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	taagatcctt	gagagttttc	60
gccccgaaga	acgttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	tctgctatgt	ggcgcggtat	120
tatcccgtat	tgacgccggg	caagagcaac	tcggtcgccg	catacactat	tctcagaatg	180
acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	ggatggcatg	acagtaagag	240
aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataaactgc	ggccaactta	cttctgacaa	300
cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	catgggggat	catgtaactc	360
gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	aaacgacgag	cgtgacacca	420
cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaactatt	aactggcgaa	ctacttactc	480
tagcttcccg	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcgga	taaagttgca	ggaccacttc	540
tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	atctggagcc	ggtgagcgtg	600
ggtctcgcgg	tatcattgca	gcaactgggc	cagatggtaa	gccctcccgt	atcgtagtta	660
tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	tagacagatc	gctgagatag	720
gtgcctcact	gattaagcat	tgtaactgt	cagaccaagt	ttactcatat	atactttaga	780
ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	gaagatcctt	tttgataatc	840
tcatgaccaa	aatcccctaa	cgtgagtttt	cgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	900
agatcaaagg	atcttcttga	gatecttttt	ttctgcgcgt	aatctgctgc	ttgcaaacaa	960
aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttggt	tgccggatca	agagctacca	actctttttc	1020
cgaaggtaac	tggttcagc	agagcgcaga	taccaaatac	tgttcttcta	gtgtagccgt	1080
agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	atacctcgct	ctgctaatec	1140
tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	gactcaagac	1200
gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	gggttcgtgc	acacagccca	1260
gcttgagcgc	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	gcgtgagcta	tgagaaagcg	1320
ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	aagcggcagg	gtcggaacag	1380
gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	cctgtcgggt	1440
ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatfff	tgtgatgctc	gtcagggggg	cggagcctat	1500

ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	cttttgctgg	ccttttgctc	1560
acatgttctt	tcttgcgta	tcccctgatt	ctgtggataa	ccgtattacc	gcctttgagt	1620
gagctgatac	cgctcgcgc	agccgaacga	ccgagcgcag	cgagtcagtg	agcgaggaag	1680
cggaagagcg	ccaatacgc	aaaccgcctc	tccccgcgcg	ttggccgatt	cattaatgca	1740
gctggcacga	caggtttccc	gactggaaag	cgggcagtga	gcgcaacgca	attaatgtga	1800
gtagctcac	tcattaggca	ccccaggctt	tacactttat	gcttccggct	cgatgtttgt	1860
gtggaattgt	gagcggataa	caatttcaca	caggaaacag	ctatgacat	gattacgcca	1920
agcgcgcaat	taaccctcac	taaagggaac	aaaagctgga	gctgcaagct	taatgtagtc	1980
ttatgcaata	ctctttagt	cttgcaacat	ggtaacgatg	agttagcaac	atgccttaca	2040
aggagagaaa	aagcaccgtg	catgccgatt	ggtggaagta	aggtggtacg	atcgtgcctt	2100
attaggaagg	caacagacgg	gtctgacatg	gattggacga	accactgaat	tgccgcattg	2160
cagagatatt	gtatttaagt	gcctagctcg	atacataaac	gggtctctct	ggttagacca	2220
gatctgagcc	tgggagctct	ctggctaact	agggaaacca	ctgcttaagc	ctcaataaag	2280
cttgccctga	gtgcttcaag	tagtgtgtgc	ccgtctgttg	tgtgactctg	gtaactagag	2340
atcccctcaga	cccttttagt	cagtgtggaa	aatctctagc	agtggcgccc	gaacagggac	2400
ttgaaagcga	aagggaaacc	agaggagctc	tctcgacgca	ggactcggct	tgctgaagcg	2460
cgcacggcaa	gaggcgaggg	gcgcgactg	gtgagtacgc	caaaaatfff	gactagcgga	2520
ggctagaagg	agagagatgg	gtgcgagagc	gtcagtatta	agcgggggag	aattagatcg	2580
cgatgggaaa	aaattcggtt	aaggccaggg	ggaaagaaaa	aatataaatt	aaaacatata	2640
gtatgggcaa	gcagggagct	agaacgattc	gcagttaatc	ctggcctggt	agaacatca	2700
gaaggctgta	gacaaatact	gggacagcta	caaccatccc	ttcagacagg	atcagaagaa	2760
cttagatcat	tatataatac	agtagcaacc	ctctattgtg	tgcatcaaag	gatagagata	2820
aaagacacca	aggaagcttt	agacaagata	gaggaagagc	aaaacaaaag	taagaccacc	2880
gcacagcaag	cggccgctga	tcttcagacc	tggaggagga	gatatgaggg	acaattggag	2940
aagtgaatta	tataaatata	aagtagtaaa	aattgaacca	ttaggagtag	caccaccaa	3000
ggcaaagaga	agagtgggtc	agagagaaaa	aagagcagtg	ggaataggag	ctttgttctt	3060
tgggttcttg	ggagcagcag	gaagcactat	ggcgcagcgc	tcaatgacgc	tgacggtaca	3120
ggccagacaa	ttattgtctg	gtatagtgca	gcagcagaac	aatttgctga	gggctattga	3180
ggcgaacag	catctgttgc	aactcacagt	ctggggcatc	aagcagctcc	aggcaagaat	3240
cctggctgtg	gaaagatacc	taaaggatca	acagctcctg	gggatttggg	gttgctctgg	3300
aaaactcatt	tgcaccactg	ctgtgccttg	gaatgctagt	tggagtaata	aatctctgga	3360
acagatttgg	aatcacacga	cctggatgga	gtgggacaga	gaaattaaca	attacacaag	3420
cttaatacac	tccttaattg	aagaatcgca	aaaccagcaa	gaaaagaatg	aacaagaatt	3480
attggaatta	gataaatggg	caagtttgtg	gaattggttt	aacataacaa	attggctgtg	3540
gtatataaaa	ttattcataa	tgatagtagg	aggcttggtg	ggtttaagaa	tagtttttgc	3600
tgtaactttct	atagtgaata	gagttaggca	gggatattca	ccattatcgt	ttcagaccca	3660
cctccaacc	ccgaggggac	ccgacaggcc	cgaaggaata	gaagaagaag	gtggagagag	3720
agacagagac	agatccattc	gattagtgaa	cggatctcga	cggtatcgat	tagactgtag	3780
cccaggaata	tggcagctag	attgtacaca	tttagaagga	aaagttatct	tggtagcagt	3840

tcatgtagcc	agtggatata	tagaagcaga	agtaattcca	gcagagacag	ggcaagaaac	3900
agcatacttc	ctcttaaaat	tagcaggaag	atggccagta	aaaacagtac	atacagacaa	3960
tggcagcaat	ttcaccagta	ctacagttaa	ggccgcctgt	tgggtggcgg	ggatcaagca	4020
ggaatttggc	attccctaca	atcccaaaag	tcaaggagta	atagaatcta	tgaataaaga	4080
attaaagaaa	attatagcac	aggtaagaga	tcaggctgaa	catcttaaga	cagcagtaca	4140
aatggcagta	ttcatccaca	atnttaaaag	aaaagggggg	attggggggg	acagtgcagg	4200
ggaaagaata	gtagacataa	tagcaacaga	catacaaact	aaagaattac	aaaaacaaat	4260
tacaaaaatt	caaaaatttc	gggtttatta	cagggacagc	agagatccag	tttggctgca	4320
tacgcgtcgt	gaggctccgg	tgcccgtcag	tgggcagagc	gcacatcgcc	cacagtcccc	4380
gagaagttgg	ggggaggggt	cggcaattga	accggtgcct	agagaagggt	gcgcggggta	4440
aactgggaaa	gtgatgtcgt	gtactggctc	cgcttttttc	ccgaggggtg	gggagaaccg	4500
tatataagtg	cagtagtcgc	cgtgaacgtt	ctttttcgca	acgggtttgc	cgccagaaca	4560
caghtaagtg	ccgtgtgtgg	ttcccgcggg	cctggcctct	ttacgggtta	tggcccttgc	4620
gtgccttgaa	ttacttccac	ctggctgcag	tacgtgatc	ttgatcccga	gcttcggggt	4680
ggaagtgggt	gggagagttc	gaggccttgc	gcttaaggag	ccccttcgcc	tcgtgcttga	4740
gttgaggcct	ggcctgggcg	ctggggccgc	cgctgtcgaa	tctggtggca	ccttcgcgcc	4800
tgtctcgctg	ctttcgataa	gtctctagcc	atntaaaatt	tttgatgacc	tgctgcgacg	4860
ctttttttct	ggcaagatag	tcttgtaa	gcgggccaag	atctgcacac	tggtatttcg	4920
gtttttgggg	ccgcgggcgg	cgacggggcc	cgtgcgtccc	agcgcacatg	ttcggcgagg	4980
cggggcctgc	gagcgcggcc	accgagaatc	ggacgggggt	agtctcaagc	tggccggcct	5040
gctctgggtg	ctggcctcgc	gccgccgtgt	atcgccccgc	cctgggcggc	aaggctggcc	5100
cggtcggcac	cagttgcgtg	agcggaaaga	tggccgcttc	ccggccctgc	tgcaaggagc	5160
tcaaaatgga	ggacgcggcg	ctcgggagag	cgggcgggtg	agtcaccac	acaagggaaa	5220
agggcctttc	cgctctcagc	cgctcgttca	tgtgactcca	ctgagtaccg	ggcgccttcc	5280
aggcacctcg	attagttctc	gtgcttttgg	agtacgtcgt	ctttaggttg	gggggagggg	5340
ttttatgcga	tggagtttcc	ccacactgag	tgggtggaga	ctgaagttag	gccagcttgg	5400
cacttgatgt	aattctcctt	ggaatttgcc	ctttttgagt	ttgatcttgg	gttcattctc	5460
aagcctcaga	cagtgggttca	aagttttttt	cttccatttc	aggtgtcgtg	agctagctct	5520
agagccacca	tggccctgcc	tgtgacagcc	ctgctgctgc	ctctggctct	gctgctgcat	5580
gccgctagac	ccggatecaa	catcatgctg	accagagcc	ctagcagcct	ggcctgtctt	5640
gccggcgaga	aagtgacat	gagctgcaag	agcagccaga	gcgtgttctt	cagcagctcc	5700
cagaagaact	acctggcctg	gtatcagcag	atccccggcc	agagcccaa	gctgctgac	5760
tactgggcca	gcaccagaga	aagcggcgtg	cccgatagat	tcaccggcag	cggctctggc	5820
accgacttca	ccctgacaat	cagcagcgtg	cagagcgagg	acctggccat	ctactactgc	5880
caccagtacc	tgagcagccg	gacctttggc	ggaggacca	agctggaaat	caagagaggc	5940
ggcggaggct	caggcggagg	cggatctagt	ggcggaggat	ctcaggtgca	gctgcagcag	6000
ccaggcggcg	aggtcgtgaa	acctggcgcc	tctgtgaaga	tgtcctgcaa	ggccagcggc	6060
tacaccttca	ccagctacta	catccactgg	atcaagcaga	cccctggaca	ggcctggaa	6120
tgggtgggag	tgatctaccc	cggcaacgac	gacatcagct	acaaccagaa	gttcaagggc	6180

aaggccaccc	tgaccgccga	caagtctagc	accaccgcct	acatgcagct	gtccagcctg	6240
accagcgagg	acagcgccgt	gtactactgc	gccagagaag	tgcggctgcg	gtacttcgat	6300
gtgtggggag	ccggcaccac	cgtgaccgtg	tcatcttccg	gagagagcaa	gtacggccct	6360
ccctgcccc	cttgccctgc	ccccgagttc	ctgggcggac	ccagcgtgtt	cctgttcccc	6420
cccaagccca	aggacaccct	gatgatcagc	cggacccccg	aggtgacctg	tgtggtggtg	6480
gacgtgtccc	aggaggaccc	cgaggtccag	ttcaactggt	acgtggacgg	cgtggaggtg	6540
cacaacgcca	agaccaagcc	ccgggaggag	cagttcaata	gcacctaccg	ggtggtgtcc	6600
gtgctgaccg	tgctgcacca	ggactggctg	aacggcaagg	aatacaagtg	taaggtgtcc	6660
aacaagggcc	tgcccagcag	catcgagaaa	accatcagca	aggccaaggg	ccagcctcgg	6720
gagccccagg	tgtacaccct	gccccctagc	caagaggaga	tgaccaagaa	ccaggtgtcc	6780
ctgacctgcc	tggtgaaggg	cttctacccc	agcgacatcg	ccgtggagtg	ggagagcaac	6840
ggccagcccc	agaacaacta	caagaccacc	ccccctgtgc	tggacagcga	cggcagcttc	6900
ttcctgtaca	gccggctgac	cgtggacaag	agccggtggc	aggagggcaa	cgtcttttagc	6960
tgctccgtga	tgcacgaggc	cctgcacaac	cactacaccc	agaagagcct	gagcctgtcc	7020
ctgggcaaga	tgatctacat	ctgggcgccc	ttggccggga	cttgtggggt	ccttctcctg	7080
tactgggtta	tcacccttta	ctgcaaacgg	ggcagaaaga	aactcctgta	tatattcaaa	7140
caaccattta	tgagaccagt	acaaactact	caagaggaag	atggctgtag	ctgccgattt	7200
ccagaagaag	aagaaggagg	atgtgaactg	agagtgaagt	tcagcaggag	cgcagacgcc	7260
cccgcgtaca	agcagggccca	gaaccagctc	tataacgagc	tcaatctagg	acgaagagag	7320
gagtacgatg	ttttggacaa	gagacgtggc	cgggaccctg	agatgggggg	aaagccgaga	7380
aggaagaacc	ctcaggaagg	cctgtacaat	gaactgcaga	aagataagat	ggcggaggcc	7440
tacagtgaga	ttgggatgaa	aggcgagcgc	cggaggggca	aggggcacga	tggcctttac	7500
cagggctca	gtacagccac	caaggacacc	tacgacgccc	ttcatatgca	ggccctgccc	7560
cctcgctaag	tcgacaatca	acctctggat	tacaaaattt	gtgaaagatt	gactggtatt	7620
cttaactatg	ttgctccttt	tacgctatgt	ggatacgtcg	ctttaatgcc	tttgtatcat	7680
gctattgctt	cccgtatggc	tttcattttc	tctccttgt	ataaatcctg	gttgctgtct	7740
ctttatgagg	agttgtggcc	cgttgtcagg	caactggcgc	tgggtgtcac	tgtgtttgct	7800
gacgcaaccc	ccactggttg	gggcattgcc	accacctgtc	agctcctttc	cgggactttc	7860
gctttcccc	tcctatttgc	cacggcgga	ctcatcgccg	cctgccttgc	ccgctgctgg	7920
acaggggctc	ggctgttggg	cactgacaat	tccgtggtgt	tgtcggggaa	gctgacgtcc	7980
tttccttggc	tgctcgctg	tgttgccacc	tggattctgc	gcgggacgtc	cttctgctac	8040
gtcccctcgg	ccctcaatcc	agcggacctt	ccttcccgcg	gctgctgcc	ggctctgcgg	8100
cctcttccgc	gtcttcgctt	tcgccctcag	acgagtcgga	tctccccttg	ggccgcctcc	8160
ccgcctggaa	ttcgagctcg	gtacctttaa	gaccaatgac	ttacaaggca	gctgtagatc	8220
ttagccactt	tttaaaagaa	aaggggggac	tggaagggtc	aattcactcc	caacgaagac	8280
aagatctgct	ttttgcttgt	actgggtctc	tctggttaga	ccagatctga	gcctgggagc	8340
tctctggcta	actagggaac	ccactgctta	agcctcaata	aagcttgctt	tgagtgtctc	8400
aagtagtgtg	tgcccgtctg	ttgtgtgact	ctggttaacta	gagatccctc	agaccctttt	8460
agtcagtgtg	gaaaatctct	agcagtagta	gttcatgtca	tcttattatt	cagtatttat	8520

aacttgcaaa gaaatgaata tcagagagtg agaggaactt gtttattgca gcttataatg	8580
gttacaaata aagcaatagc atcaciaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt	8640
ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggctc tagctatccc	8700
gcccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgcccatt ggctgactaa ttttttttat	8760
ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt	8820
ttttggaggc ctagctaggg acgtacccaa ttcgcctat agtgagtcgt attacgcgcg	8880
ctcaactggc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgta cccaacttaa	8940
tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga	9000
tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc	9060
attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt	9120
agcgcgccgt cctttcgett tcttccctc ctttctgcgc acgttcgcgc gctttccccc	9180
tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gtcccgattt agtgctttac ggcacctega	9240
ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt	9300
ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg	9360
aacaacactc aaccctatct cggctctatc ttttgattta taagggattt tgccgatttc	9420
ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat	9480
attaacgctt acaatttagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt	9540
ttatTTTTct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg	9600
cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttattt	9660
ccctTTTTtg cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta	9720
aaagatgctg aagatcagtt gg	9742

<210> 139

<211> 2037

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多核苷酸"

<400> 139

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga	60
cccgatcca acatcatgct gaccagagc ctagcagcc tggccgtgtc tgccggcgag	120
aaagtgacca tgagctgcaa gagcagccag agcgtgttct tcagcagctc ccagaagaac	180
tacctggcct ggtatcagca gatccccggc cagagcccca agctgctgat ctactgggcc	240
agcaccagag aaagcggcgt gcccgataga ttcaccggca gcggctctgg caccgacttc	300
accctgacaa tcagcagcgt gcagagcgag gacctggcca tctactactg ccaccagtac	360
ctgagcagcc ggacctttgg cggaggcacc aagctggaaa tcaagagagg cggcggaggc	420
tcaggcggag gcggatctag tggcggagga tctcaggtgc agctgcagca gccaggcgc	480
gaggctgtga aacctggcgc ctctgtgaag atgtctgca agccagcgg ctacaccttc	540

accagctact acatccactg gatcaagcag acccctggac agggcctgga atgggtggga	600
gtgatctacc cgggcaacga cgacatcagc tacaaccaga agttcaaggg caaggccacc	660
ctgaccgccg acaagtctag caccaccgcc tacatgcagc tgtccagcct gaccagcgag	720
gacagcgccg tgtactactg cgccagagaa gtgcggctgc ggtacttcca tgtgtgggga	780
gccggcacca ccgtgaccgt gtcattctcc ggagagagca agtacggccc tccctgcccc	840
ccttgcccctg cccccgagtt cctgggcgga cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc	900
aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc	960
caggaggacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg cgtgagggt gcacaacgcc	1020
aagaccaagc cccgggagga gcagttcaat agcacctacc ggggtggtgtc cgtgctgacc	1080
gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag gaatacaagt gtaagggtgtc caacaagggc	1140
ctgcccagca gcatcgagaa aacctcagc aaggccaagg gccagcctcg ggagccccag	1200
gtgtacacc tgccccctag ccaagaggag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc	1260
ctgggtgaagg gcttctacc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc	1320
gagaacaact acaagaccac cccccctgtg ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac	1380
agccggctga ccgtggacaa gagccggtgg caggagggca acgtctttag ctgctccgtg	1440
atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagagcc tgagcctgtc cctgggcaag	1500
atgatctaca tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctct gtcactggtt	1560
atcacccctt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt	1620
atgagaccag tacaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa	1680
gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac	1740
aagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat	1800
gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac	1860
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag	1920
attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc	1980
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcatatgc aggcctgcc ccctcgc	2037

<210> 140

<211> 679

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多肽"

<400> 140

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5						10				15	
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Ser	Asn	Ile	Met	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser
				20					25				30		
Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser

35	40	45
Ser Gln Ser Val Phe Phe	Ser Ser Ser Gln Lys	Asn Tyr Leu Ala Trp
50	55	60
Tyr Gln Gln Ile Pro Gly	Gln Ser Pro Lys Leu	Leu Ile Tyr Trp Ala
65	70	75
Ser Thr Arg Glu Ser Gly	Val Pro Asp Arg Phe	Thr Gly Ser Gly Ser
85	90	95
Gly Thr Asp Phe Thr Leu	Thr Ile Ser Ser Val	Gln Ser Glu Asp Leu
100	105	110
Ala Ile Tyr Tyr Cys His	Gln Tyr Leu Ser Ser	Arg Thr Phe Gly Gly
115	120	125
Gly Thr Lys Leu Glu Ile	Lys Arg Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly Gly
130	135	140
Gly Ser Ser Gly Gly Gly	Ser Gln Val Gln Leu	Gln Gln Pro Gly Ala
145	150	155
Glu Val Val Lys Pro Gly	Ala Ser Val Lys Met	Ser Cys Lys Ala Ser
165	170	175
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser	Tyr Tyr Ile His Trp	Ile Lys Gln Thr Pro
180	185	190
Gly Gln Gly Leu Glu Trp	Val Gly Val Ile Tyr	Pro Gly Asn Asp Asp
195	200	205
Ile Ser Tyr Asn Gln Lys	Phe Lys Gly Lys Ala	Thr Leu Thr Ala Asp
210	215	220
Lys Ser Ser Thr Thr Ala	Tyr Met Gln Leu Ser	Ser Leu Thr Ser Glu
225	230	235
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr	Cys Ala Arg Glu Val	Arg Leu Arg Tyr Phe
245	250	255
Asp Val Trp Gly Ala Gly	Thr Thr Val Thr Val	Ser Ser Ser Gly Glu
260	265	270
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro	Cys Pro Pro Cys Pro	Ala Pro Glu Phe Leu
275	280	285
Gly Gly Pro Ser Val Phe	Leu Phe Pro Pro Lys	Pro Lys Asp Thr Leu
290	295	300
Met Ile Ser Arg Thr Pro	Glu Val Thr Cys Val	Val Val Asp Val Ser
305	310	315
Gln Glu Asp Pro Glu Val	Gln Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val Glu
325	330	335
Val His Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu	Gln Phe Asn Ser Thr
340	345	350

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 355 360 365
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 370 375 380
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 450 455 460
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495
 Ser Leu Gly Lys Met Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
 500 505 510
 Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly
 515 520 525
 Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
 530 535 540
 Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
 545 550 555 560
 Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 565 570 575
 Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 580 585 590
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 595 600 605
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 610 615 620
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 625 630 635 640
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 645 650 655
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His

660	665	670	
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
675			
<210> 141			
<211> 807			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注解="人工序列的描述：合成的 多核苷酸"			
<400> 141			
atggccctgc ctgtgacagc cctgetgetg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga			60
cccggatcca acatcatget gaccagagc cctagcagcc tggccgtgtc tgccggcgag			120
aaagtgacca tgagctgcaa gagcagccag agcgtgttct tcagcagctc ccagaagaac			180
tacctggcct ggtatcagca gatccccggc cagagcccca agctgctgat ctactgggcc			240
agcaccagag aaagcggcgt gcccgataga ttcaccggca gcggtcttgg caccgacttc			300
accctgacaa tcagcagcgt gcagagcgag gacctggcca tctactactg ccaccagtac			360
ctgagcagcc ggacctttgg cggaggcacc aagctggaaa tcaagagagg cggcggaggc			420
tcaggcggag gcgatctag tggcggagga tctcaggtgc agctgcagca gccaggcgcc			480
gaggtcgtga aacctggcgc ctctgtgaag atgtctctga aggccagcgg ctacaccttc			540
accagctact acatccactg gatcaagcag acccctggac agggcctgga atgggtggga			600
gtgatctacc ccggcaacga cgacatcagc tacaaccaga agttcaaggg caaggccacc			660
ctgaccgccg acaagtctag caccaccgcc tacatgcagc tgtccagcct gaccagcgag			720
gacagcgccg tgtactactg cgccagagaa gtgcggctgc ggtacttcga tgtgtgggga			780
gccggcacca ccgtgaccgt gtcattct			807
<210> 142			
<211> 269			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注解="人工序列的描述：合成的 多肽"			
<400> 142			
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu			
1 5 10 15			
His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Asn Ile Met Leu Thr Gln Ser Pro Ser			
20 25 30			

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

<210> 143

<211> 9742

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多核苷酸"

<400> 143

gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	taagatcctt	gagagttttc	60
gccccgaaga	acgttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	tctgctatgt	ggcgcggtat	120
tatcccgtat	tgacgccggg	caagagcaac	tcggtcgccg	catacactat	tctcagaatg	180
acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	ggatggcatg	acagtaagag	240
aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataacactgc	ggccaactta	cttctgacaa	300
cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	catgggggat	catgtaactc	360
gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	aaacgacgag	cgtgacacca	420
cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaactatt	aactggcgaa	ctacttactc	480
tagcttcccg	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcgga	taaagttgca	ggaccacttc	540
tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	atctggagcc	ggtgagcgtg	600
ggtctcgcgg	tatcattgca	gcaactgggc	cagatggtaa	gccctcccgt	atcgtagtta	660
tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	tagacagatc	gctgagatag	720
gtgcctcaact	gattaagcat	tggtaaactgt	cagaccaagt	ttactcatat	atactttaga	780
ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	gaagatcctt	tttgataatc	840
tcatgaccaa	aatcccctaa	cgtgagtttt	cgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	900
agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgcgt	aatctgctgc	ttgcaaacaa	960
aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttgtt	tgccggatca	agagctacca	actctttttc	1020
cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	taccaatac	tgttcttcta	gtgtagccgt	1080
agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	atacctcgct	ctgctaatec	1140
tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	gactcaagac	1200
gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	gggttcgtgc	acacagccca	1260
gcttggagcg	aacgacctac	accgaactga	gatactaca	gcgtgagcta	tgagaaagcg	1320
ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	aagcggcagg	gtcggaacag	1380
gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	cctgtcgggt	1440
ttcgccacct	ctgacttgag	cgctgatttt	tgtgatgctc	gtcagggggg	cggagcctat	1500
ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcttggc	cttttgctgg	ccttttgctc	1560
acatgttctt	tcctgcgta	tcccctgatt	ctgtggataa	ccgtattacc	gcctttgagt	1620
gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	ccgagcgcag	cgagtcagtg	agcgaggaag	1680
cggaagagcg	cccaatacgc	aaaccgctc	tccccgcgcg	ttggccgatt	cattaatgca	1740
gctggcacga	caggtttccc	gactggaaag	cgggcagtga	gcgcaacgca	attaatgtga	1800
gtagctcac	tcattaggca	ccccaggctt	tacactttat	gcttccggct	cgatgtttgt	1860
gtggaattgt	gagcggataa	caatttcaca	caggaaacag	ctatgacat	gattacgcca	1920
agcgcgcaat	taaccctcac	taaagggaac	aaaagctgga	gctgcaagct	taatgtagtc	1980
ttatgcaata	ctctttagt	cttgcaacat	ggtaacgatg	agttagcaac	atgccttaca	2040
aggagagaaa	aagcaccgtg	catgccgatt	ggtggaagta	aggtggtacg	atcgtgcctt	2100
attaggaagg	caacagacgg	gtctgacatg	gattggacga	accactgaat	tgccgcattg	2160
cagagatatt	gtatttaagt	gcctagctcg	atacataaac	gggtctctct	ggttagacca	2220
gatctgagcc	tgggagctct	ctggctaact	agggaaacca	ctgcttaagc	ctcaataaag	2280
cttgccttga	gtgcttcaag	tagtgtgtgc	ccgtctgttg	tgtgactctg	gtaactagag	2340

atccctcaga	cccttttagt	cagtgtgaa	aatctctagc	agtggcgccc	gaacagggac	2400
ttgaaagcga	aagggaaacc	agaggagctc	tctcgacgca	ggactcggct	tgctgaagcg	2460
cgcacggcaa	gaggcgaggg	gcggcgactg	gtgagtacgc	caaaaatfff	gactagcgga	2520
ggctagaagg	agagagatgg	gtgagagagc	gtcagtatta	agcgggggag	aattagatcg	2580
cgatgggaaa	aaattcggtt	aaggccaggg	ggaaagaaaa	aatataaatt	aaaacatata	2640
gtatgggcaa	gcagggagct	agaacgattc	gcagttaatc	ctggcctggt	agaacatca	2700
gaaggctgta	gacaaatact	gggacagcta	caaccatccc	ttcagacagg	atcagaagaa	2760
cttagatcat	tatataatac	agtagcaacc	ctctattgtg	tgcatcaaag	gatagagata	2820
aaagacacca	aggaagcttt	agacaagata	gaggaagagc	aaaacaaaag	taagaccacc	2880
gcacagcaag	cggccgctga	tcttcagacc	tggaggagga	gatatgaggg	acaattggag	2940
aagtgaatta	tataaatata	aagtagtaaa	aattgaacca	ttaggagtag	caccaccaa	3000
ggcaaagaga	agagtgggtc	agagagaaaa	aagagcagtg	ggaataggag	ctttgttctt	3060
tggtttcttg	ggagcagcag	gaagcactat	gggagcagcg	tcaatgacgc	tgacggtaca	3120
ggccagacaa	ttattgtctg	gtatagtgca	gcagcagaac	aatttgctga	gggctattga	3180
ggcgcaacag	catctgttgc	aactcacagt	ctggggcatc	aagcagctcc	aggcaagaat	3240
cctggctgtg	gaaagatacc	taaaggatca	acagctcctg	gggatttggg	gttgctctgg	3300
aaaactcatt	tgaccactg	ctgtgccttg	gaatgctagt	tggagtaata	aatctctgga	3360
acagatttgg	aatcacacga	cctggatgga	gtgggacaga	gaaattaaca	attacacaag	3420
cttaatacac	tccttaattg	aagaatcgca	aaaccagcaa	gaaaagaatg	aacaagaatt	3480
attggaatta	gataaatggg	caagtttgtg	gaattggttt	aacataacaa	attggctgtg	3540
gtatataaaa	ttattcataa	tgatagtagg	aggcttggtg	ggtttaagaa	tagtttttgc	3600
tgtactttct	atagtgaata	gagttaggca	gggatattca	ccattatcgt	ttcagaccca	3660
cctccaacc	ccgaggggac	ccgacaggcc	cgaaggaata	gaagaagaag	gtggagagag	3720
agacagagac	agatccattc	gattagttaa	cggatctcga	cggtatcgat	tagactgtag	3780
cccaggaata	tggcagctag	attgtacaca	tttagaagga	aaagttatct	tggtagcagt	3840
tcatgtagcc	agtggatata	tagaagcaga	agtaattcca	gcagagacag	ggcaagaaac	3900
agcatacttc	ctcttaaaat	tagcaggaag	atggccagta	aaaacagtac	atacagacaa	3960
tggcagcaat	ttcaccagta	ctacagttaa	ggccgctgt	tggtgggagg	ggatcaagca	4020
ggaatttggc	attccctaca	atcccaaaag	tcaaggagta	atagaatcta	tgaataaaga	4080
attaaagaaa	attataggac	aggtaaagaga	tcaggctgaa	catcttaaga	cagcagtaca	4140
aatggcagta	ttcatccaca	atfttaaaag	aaaagggggg	attggggggg	acagtgacag	4200
ggaaaagaata	gtagacataa	tagcaacaga	catacaaact	aaagaattac	aaaaacaaat	4260
tacaaaaatt	caaaaatftt	gggtttatta	cagggacagc	agagatccag	tttggctgca	4320
tacgcgtcgt	gaggctccgg	tgcccgtcag	tgggcagagc	gcacatcgcc	cacagtcccc	4380
gagaagttgg	ggggaggggt	cggcaattga	accggtgcct	agagaaggtg	gcgcggggta	4440
aactgggaaa	gtgatgtcgt	gtactggctc	cgcttttttc	ccgagggtgg	gggagaaccg	4500
tatataagtg	cagtagtcgc	cgtgaacgft	ctfttttcgca	acgggtttgc	cgccagaaca	4560
caggtaaagtg	ccgtgtgtgg	ttcccgcggg	cctggcctct	ttacgggtta	tggcccttgc	4620
gtgccttgaa	ttacttccac	ctggctgcag	tacgtgatcc	ttgatcccga	gcttcgggft	4680

ggaagtgggt	gggagagttc	gaggccttgc	gcttaaggag	ccccttcgcc	tcgtgcttga	4740
gttgaggcct	ggcctgggcg	ctggggccgc	cgcgtgcgaa	tctggtggca	ccttcgcgcc	4800
tgtctcgctg	ctttcgataa	gtctctagcc	atttaaaatt	tttgatgacc	tgctgcgacg	4860
ctttttttct	ggcaagatag	tcttgtaa	gcgggccaag	atctgcacac	tggtatttcg	4920
gtttttgggg	ccgcgggagg	cgacggggcc	cgtgcgtccc	agcgcacatg	ttcggcgagg	4980
cggggcctgc	gagcgcggcc	accgagaatc	ggacgggggt	agtctcaagc	tgccggcctc	5040
gctctgggtc	ctggcctcgc	gccgccgtgt	atcggccgc	cctgggcggc	aaggctggcc	5100
cggtcggcac	cagttgcgtg	agcggaaaga	tgcccgcttc	ccggccctgc	tgcagggagc	5160
tcaaaatgga	ggacgcggcg	ctcgggagag	cgggcgggtg	agtcaccac	acaaggaaa	5220
agggcctttc	cgctctcagc	cgctccttca	tgtgactcca	ctgagtaccg	ggcgccttcc	5280
aggcacctcg	attagttctc	gtgcttttgg	agtacgtcgt	ctttaggttg	gggggagggg	5340
ttttatgcga	tggagtttcc	ccacaactgag	tggttgagaa	ctgaagttag	gccagcttgg	5400
cacttgatgt	aattctcctt	ggaatttggc	ctttttgagt	ttggatcttg	gttcattctc	5460
aagcctcaga	cagtggttca	aagttttttt	cttccatttc	aggtgtcgtg	agctagctct	5520
agagccacca	tgccctgcgc	tgtgacagcc	ctgctgctgc	ctctggctct	gctgctgcat	5580
gccgctagac	ccgatccga	gatcgtgctg	acacagagcc	ctggaagcct	ggcctgtctt	5640
cctggcgagc	gcgtgacaat	gagctgcaag	agcagccaga	gcgtgttctt	cagcagctcc	5700
cagaagaact	acctggcctg	gtatcagcag	atccccggcc	agagccccag	actgctgac	5760
tactgggcca	gcaccagaga	aagcggcgtg	cccgatagat	tcaccggcag	cggctctggc	5820
accgacttca	ccctgacaat	cagcagcgtg	cagccccagg	acctggccat	ctactactgc	5880
caccagtacc	tgagcagccg	gacctttggc	cagggcacca	agctggaaat	caagagaggc	5940
ggcggaggct	ctggcggagg	cggatctagt	ggcggaggat	ctcaggtgca	gctgcagcag	6000
cctggcgccg	aggctcgtgaa	acctggcgcc	tctgtgaaga	tgtcctgcaa	ggccagcggc	6060
tacaccttca	ccagctacta	catccactgg	atcaagcaga	cccctggaca	ggccttgaa	6120
tggttgaggag	tgatctacc	cggcaacgac	gacatcagct	acaaccagaa	gttccagggc	6180
aaggccaccc	tgaccgccga	caagtctagc	accaccgctt	acatgcagct	gtccagcctg	6240
accagcgagg	acagcgccgt	gtactactgc	gccagagaag	tgccggctgcg	gtacttcgat	6300
gtgtggggcc	aggaaccac	cgtgaccgtg	tcattcttccg	gagagagcaa	gtaccggcct	6360
ccctgcccc	cttgccctgc	ccccgagttc	ctggcgggac	ccagcgtgtt	cctgttcccc	6420
cccaagccca	aggacaccct	gatgatcagc	cggacccccg	aggtgacctg	tgtggtgggtg	6480
gacgtgtccc	aggaggacc	cgaggtccag	ttcaactggt	acgtggacgg	cgtggagggtg	6540
cacaacgcca	agaccaagcc	ccgggaggag	cagttcaata	gcacctaccg	ggtggtgtcc	6600
gtgctgaccg	tgctgcacca	ggactggctg	aacggcaagg	aatacaagtg	taaggtgtcc	6660
aacaagggcc	tgcccagcag	catcgagaaa	accatcagca	aggccaaggg	ccagcctcgg	6720
gagccccagg	tgtacaccct	gccccctagc	caagaggaga	tgaccaagaa	ccaggtgtcc	6780
ctgacctgcc	tggtgaaggg	cttctacccc	agcgcacatg	ccgtggagtg	ggagagcaac	6840
ggccagcccc	agaacaacta	caagaccacc	ccccctgtgc	tgacagcga	cggcagcttc	6900
ttctgtaca	gccggctgac	cgtggacaag	agccggtggc	aggagggcaa	cgtcttttagc	6960
tgctccgtga	tgcacgaggc	cctgcacaac	cactacacc	agaagagcct	gagcctgtcc	7020

ctgggcaaga	tgatctacat	ctgggcgccc	ttggccggga	cttgtggggt	ccttctcctg	7080
tcaactggtta	tcacccttta	ctgcaaacgg	ggcagaaaga	aactcctgta	tatattcaaa	7140
caaccattta	tgagaccagt	acaaactact	caagaggaag	atggctgtag	ctgccgattt	7200
ccagaagaag	aagaaggagg	atgtgaactg	agagtgaagt	tcagcaggag	cgagacgccc	7260
cccgcgtaca	agcagggcc	gaaccagctc	tataacgagc	tcaatctagg	acgaagagag	7320
gagtacgatg	ttttggacaa	gagacgtggc	cgggaccctg	agatgggggg	aaagccgaga	7380
aggaagaacc	ctcaggaagg	cctgtacaat	gaactgcaga	aagataagat	ggcggaggcc	7440
tacagtgaga	ttgggatgaa	aggcgagcgc	cggaggggca	aggggcacga	tggcctttac	7500
caggtctca	gtacagccac	caaggacacc	tacgacgccc	ttcacatgca	ggccctgccc	7560
cctcgctaag	tcgacaatca	acctctggat	tacaaaattt	gtgaaagatt	gactgggtatt	7620
cttaactatg	ttgtctcttt	tacgctatgt	ggatacgtg	ctttaatgcc	tttgtatcat	7680
gctattgctt	cccgtatggc	tttcattttc	tectcettgt	ataaatcctg	gttgcctgtct	7740
ctttatgagg	agttgtggcc	cgttgtcagg	caacgtggcg	tgggtgtcac	tgtgtttgct	7800
gacgcaacc	ccactggttg	gggcattgcc	accacctgtc	agctcctttc	cgggactttc	7860
gctttcccc	tccttattgc	cacggcgga	ctcatcgccg	cctgccttgc	ccgctgctgg	7920
acaggggctc	ggctgttggg	cactgacaat	tccgtggtgt	tgtcggggaa	gctgacgtcc	7980
tttcttggc	tgctcgctg	tgttgccacc	tggattctgc	gcgggacgtc	cttctgctac	8040
gtcccttcgg	ccctcaatcc	agcggacctt	ccttcccgcg	gctgctgcc	ggctctgcgg	8100
cctcttccgc	gtcttcgctt	tcgccctcag	acgagtcgga	tctccctttg	ggccgcctcc	8160
ccgcctggaa	ttcgagctcg	gtacctttaa	gaccaatgac	ttacaaggca	gctgtagatc	8220
ttagccactt	tttaaaagaa	aaggggggac	tggaagggt	aattcactcc	caacgaagac	8280
aagatctgct	ttttgcttgt	actgggtctc	tctggttaga	ccagatctga	gcctgggagc	8340
tctctggcta	actagggaac	ccactgctta	agcctcaata	aagcttgctt	tgagtgtctc	8400
aagtagtgtg	tgcccgtctg	ttgtgtgact	ctggtaacta	gagatccctc	agaccctttt	8460
agtcagtgtg	gaaaatctct	agcagtagta	gttcatgtca	tcttattatt	cagtattttat	8520
aacttgcaaa	gaaatgaata	tcagagagtg	agaggaactt	gtttattgca	gcttataatg	8580
gttacaata	aagcaatagc	atcacaatt	tcacaataa	agcatttttt	tcaactgcatt	8640
ctagttgtgg	tttgtccaaa	ctcatcaatg	tatcttatca	tgtctggctc	tagctatccc	8700
gcccctaact	ccgcccagtt	ccgcccattc	tccgcccatt	ggctgactaa	ttttttttat	8760
ttatgcagag	gcccaggccg	cctcggcctc	tgagctattc	cagaagtagt	gaggaggctt	8820
ttttggaggc	ctagctaggg	acgtacceaa	ttcgccctat	agtgagtcgt	attacgcgcg	8880
ctcaactggc	gtcgttttac	aacgtcgtga	ctgggaaaac	cctggcgctta	cccaacttaa	8940
tcgccttgca	gcacatcccc	ccttcgccag	ctggcgtaat	agcgaagagg	cccgcaccga	9000
tcgcccttcc	caacagttgc	gcagcctgaa	tggcgaatgg	gacgcgcctt	gtagcggcgc	9060
attaagcgcg	gcgggtgtgg	tggttacgcg	cagcgtgacc	gctacacttg	ccagcgcctt	9120
agcgccttcc	cctttcgttt	tcttcccttc	ccttctcgc	acgttcgcct	gctttccccg	9180
tcaagctcta	aatcgggggc	tcccttttag	gttccgattt	agtgcctttac	ggcacctcga	9240
ccccaaaaaa	cttgattagg	gtgatggtt	acgtagtggt	ccatcgcctt	gatagacggt	9300
ttttcgcctt	ttgacgttgg	agtccacgtt	ctttaatagt	ggactcttgt	tccaaactgg	9360

aacaacactc aaccctatct cggcttattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc	9420
ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat	9480
attaacgctt acaatttagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt	9540
ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg	9600
cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt	9660
cccttttttg cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta	9720
aaagatgctg aagatcagtt gg	9742
<210> 144	
<211> 2037	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的 多核苷酸"	
<400> 144	
atggccctgc ctgtgacagc cctgtctgtg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga	60
cccggatccg agatcgtgct gacacagagc cctggaagcc tggccgtgtc tcttggcgag	120
cgcgtgacaa tgagctgcaa gagcagccag agcgtgttct tcagcagctc ccagaagaac	180
tacctggcct ggtatcagca gatccccggc cagagcccca gactgctgat ctactgggcc	240
agcaccagag aaagcggcgt gcccgataga ttaccggca gcggctctgg caccgacttc	300
accctgacaa tcagcagcgt gcagcccag gacctggcca tctactactg ccaccagtac	360
ctgagcagcc ggacctttgg ccagggcacc aagctggaaa tcaagagagg cggcggaggc	420
tctggcggag gcggatctag tggcggagga tctcaggtgc agctgcagca gcctggcgcc	480
gaggtcgtga aacctggcgc ctctgtgaag atgtctctga aggccagcgg ctacaccttc	540
accagctact acatccactg gatcaagcag acccctggac agggcctgga atgggtggga	600
gtgatctacc ccggcaacga cgacatcagc tacaaccaga agttccaggg caaggccacc	660
ctgaccgccg acaagtctag caccaccgcc tacatgcagc tgtccagcct gaccagcgag	720
gacagcgccg tgtactactg cgccagagaa gtgcggctgc ggtacttca tgtgtggggc	780
caggaacca ccgtgaccgt gtcattcttc ggagagagca agtacggccc tccctgcccc	840
ccttgccctg cccccgagtt cctgggcgga cccagcgtgt tctgttccc cccaagccc	900
aaggacacc tgatgatcag ccggacccc gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc	960
caggaggacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc	1020
aagaccaagc cccgggagga gcagttcaat agcacctacc ggggtggtgtc cgtgctgacc	1080
gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag gaatacaagt gtaaggtgtc caacaagggc	1140
ctgcccagca gcatcgagaa aacctcagc aaggccaagg gccagcctcg ggagccccag	1200
gtgtacacc tgccccctag ccaagaggag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc	1260
ctgggtgaagg gcttctacc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc	1320
gagaacaact acaagaccac cccccctgtg ctggacagcg acggcagctt cttctgtac	1380

agccggctga ccgtggacaa gagccggtgg caggagggca acgtctttag ctgctccgtg 1440
 atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagagcc tgagcctgtc cctgggcaag 1500
 atgatctaca tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt 1560
 atcacccttt actgcaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt 1620
 atgagaccag tacaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa 1680
 gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac 1740
 aagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 1800
 gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 1860
 cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagttag 1920
 attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1980
 agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc ctteacatgc aggcctgcc ccctcgc 2037

<210> 145

<211> 679

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多肽"

<400> 145

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

145		150		155		160
Glu Val Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser						
		165		170		175
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro						
		180		185		190
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp						
		195		200		205
Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp						
		210		215		220
Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu						
225		230		235		240
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe						
		245		250		255
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Glu						
		260		265		270
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu						
		275		280		285
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu						
		290		295		300
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser						
305		310		315		320
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu						
		325		330		335
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr						
		340		345		350
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn						
		355		360		365
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser						
		370		375		380
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln						
385		390		395		400
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val						
		405		410		415
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val						
		420		425		430
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro						
		435		440		445
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr						
		450		455		460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495
 Ser Leu Gly Lys Met Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
 500 505 510
 Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly
 515 520 525
 Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
 530 535 540
 Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
 545 550 555 560
 Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 565 570 575
 Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 580 585 590
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 595 600 605
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 610 615 620
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 625 630 635 640
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 645 650 655
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 660 665 670
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 675

<210> 146

<211> 738

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多核苷酸"

<400> 146

gagatcgtgc tgacacagag ccctggaagc ctggccgtgt ctctggcga ggcggtgaca 60
 atgagctgca agagcagcca gagcgtgttc ttcagcagct cccagaagaa ctacctggcc 120

tggatcagc agatccccgg ccagagcccc agactgctga tctactgggc cagcaccaga 180
 gaaagcggcg tgcccgatag attcacggc ageggetctg gcaccgactt caccctgaca 240
 atcagcagcg tgcagcccga ggacctggcc atctactact gccaccagta cctgagcagc 300
 cggacctttg gccagggcac caagctggaa atcaagagag gcggcgagg ctctggcgga 360
 ggcggatcta gtggcggagg atctcaggtg cagctgcagc agcctggcgc cgaggtcgtg 420
 aaacctggcg cctctgtgaa gatgtcctgc aaggccagcg gctacacctt caccagctac 480
 tacatccact ggatcaagca gaccctgga cagggcctgg aatgggtggg agtgatctac 540
 cccggcaacg acgacatcag ctacaaccag aagttccagg gcaaggccac cctgaccgcc 600
 gacaagtcta gcaccaccgc ctacatgcag ctgtccagcc tgaccagcga ggacagcgcc 660
 gtgtactact gcgccagaga agtgcggctg cggtaactcg atgtgtgggg ccaggggaacc 720
 accgtgaccg tgtcatct 738

<210> 147

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多肽"

<400> 147

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

145	150	155	160
Tyr Ile His Trp	Ile Lys Gln Thr Pro Gly	Gln Gly Leu Glu Trp Val	
	165	170	175
Gly Val Ile Tyr	Pro Gly Asn Asp Asp	Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe	
	180	185	190
Gln Gly Lys Ala	Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser	Thr Thr Ala Tyr	
	195	200	205
Met Gln Leu Ser	Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser	Ala Val Tyr Tyr Cys	
	210	215	220
Ala Arg Glu Val	Arg Leu Arg Tyr Phe Asp	Val Trp Gly Gln Gly Thr	
225	230	235	240
Thr Val Thr Val	Ser Ser		
	245		

<210> 148

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 148

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

130

<210> 149

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 149

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

<210> 150

<211> 93

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 150

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg
 1 5 10 15
 Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu
 20 25 30
 Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr
 35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp
 50 55 60
 Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Thr Gln Ala
 65 70 75 80
 Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys
 85 90

<210> 151

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
 多肽"

<400> 151

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

<210> 152

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
 多肽"

<400> 152

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Leu Glu Ala Ser Arg
 1 5 10 15
 Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu

	20		25		30										
Pro	Leu	His	Ala	Met	Met	Glu	Arg	Gly	Pro	Gln	Thr	Leu	Lys	Glu	Thr
	35		40		45										
Ser	Phe	Asn	Gln	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Leu	Met	Glu	Ala	Gln	Glu	Trp
	50		55		60										
Cys	Arg	Lys	Tyr	Met	Lys	Ser	Gly	Asn	Val	Lys	Asp	Leu	Thr	Gln	Ala
65			70		75									80	
Trp	Asp	Leu	Tyr	Tyr	His	Val	Phe	Arg	Arg	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	
			85		90									95	

<210> 153

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 153

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

<210> 154

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12) .. (12)

<223> 任何氨基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (78) .. (78)

<223> 任何氨基酸

<400> 154

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

<210> 155

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 155

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

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser
 85 90 95

<210> 156

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
 多肽"

<400> 156

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Leu Glu Ala Ser Arg
 1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu
 20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr
 35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp
 50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala
 65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser
 85 90 95

<210> 157

<211> 1132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
 多肽"

<400> 157

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
 1 5 10 15

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
 20 25 30

Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
 35 40 45

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro

50	55	60
Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu		
65	70	75
Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val		
	85	90
Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro		
	100	105
Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr		
	115	120
Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val		
	130	140
Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val		
	145	150
Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr		
	165	170
Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly		
	180	185
Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg		
	195	200
Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg		
	210	215
Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg		
	225	230
Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp		
	245	250
Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val		
	260	265
Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala		
	275	280
Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His		
	290	295
Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro		
	305	310
Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly		
	325	330
Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro		
	340	345
Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser		
	355	360
		365

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

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

Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln
 995 1000 1005
 Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln
 1010 1015 1020
 Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp
 1025 1030 1035
 Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly
 1040 1045 1050
 Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu
 1055 1060 1065
 Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr
 1070 1075 1080
 Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr
 1085 1090 1095
 Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr
 1100 1105 1110
 Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys
 1115 1120 1125

Thr Ile Leu Asp
 1130

<210> 158

<211> 4027

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 158

caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc 60
 cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgcgct cctgctgcg cagccactac cgcgaggtgc 120
 tgccgctggc cacgttcgtg cggcgcctgg ggccccaggg ctggcggctg gtgcagcgcg 180
 gggacccggc ggctttccgc gcgctggtgg cccagtgcct ggtgtgcgtg ccctgggacg 240
 cacggccgcc ccccgcgcc cctccttc gccaggtgtc ctgcctgaag gagctggtgg 300
 cccgagtgct gcagaggtg tgcgagcgcg gcgcgaagaa cgtgctggcc ttcggttcg 360
 cgctgctgga cggggccccg gggggcccc cagaggcctt caccaccagc gtgcgcagct 420
 acctgccc aa cacggtgacc gacgcaactgc gggggagcgg ggcgtggggg ctgctgttgc 480
 gccgcgtggg cgacgacgtg ctggttcacc tgctggcacg ctgcgcgctc tttgtgctgg 540
 tggtctccag ctgcgcctac caggtgtgcg ggccgccgct gtaccagctc ggcgctgcca 600

ctcaggccccg	gcccccgcca	cacgctagtg	gacccccgaag	gcgtctggga	tgcgaacggg	660
cctggaacca	tagcgtcagg	gaggccgggg	tccccctggg	cctgccagcc	ccgggtgcga	720
ggaggcgcgg	gggcagtgcc	agccgaagtc	tgccgttgcc	caagaggccc	aggcgtggcg	780
ctgcccctga	gccggagcgg	acgcccgttg	ggcaggggtc	ctgggcccac	ccgggcagga	840
cgcggtggacc	gagtgaccgt	ggtttctgtg	tggtgtcacc	tgccagaccc	gccgaagaag	900
ccacctcttt	ggaggggtgcg	ctctctggca	cgcgccactc	ccacccatcc	gtgggcccgc	960
agcaccacgc	gggcccccca	tccacatcgc	ggccaccacg	tccctgggac	acgccttgtc	1020
ccccggtgta	cgccgagacc	aagcacttcc	tctactctc	aggcgacaag	gagcagctgc	1080
ggccctcctt	cctactcagc	tctctgaggc	ccagcctgac	tggcgctcgg	aggctcgtgg	1140
agaccatctt	tctgggttcc	aggccctgga	tgccagggac	tccccgcagg	ttgccccgcc	1200
tgccccagcg	ctactggcaa	atgcggcccc	tgtttctgga	gctgcttggg	aaccacgcgc	1260
agtgcccccta	cggggtgctc	ctcaagacgc	actgcccgt	gcgagctgcg	gtcaccaccag	1320
cagccggtgt	ctgtgcccgg	gagaagcccc	agggtctgt	ggcggcccc	gaggaggagg	1380
acacagaccc	ccgtcgctg	gtgcagctgc	tccgccagca	cagcagcccc	tggcaggtgt	1440
acggcttcgt	gcgggcctgc	ctgcgccggc	tggtgcccc	aggcctctgg	ggctccaggc	1500
acaacgaacg	ccgcttctc	aggaacacca	agaagtcat	ctccctgggg	aagcatgcca	1560
agctctcgct	gcaggagctg	acgtggaaga	tgagcgtgcg	gggctgcgct	tggtctgcga	1620
ggagcccagg	ggttggtctg	gttccggccc	cagagcaccg	tctgcgtgag	gagatcctgg	1680
ccaagttcct	gcactggctg	atgagtgtgt	acgtcgtcga	gctgctcagg	tctttctttt	1740
atgtcacgga	gaccacgttt	caaaagaaca	ggctcttttt	ctaccggaag	agtgtctgga	1800
gcaagttgca	aagcattgga	atcagacagc	acttgaagag	ggtgcagctg	cgggagctgt	1860
cggaagcaga	ggtcaggcag	catcgggaag	ccaggccccg	cctgctgacg	tccagactcc	1920
gcttcatccc	caagcctgac	gggctgcggc	cgattgtgaa	catggactac	gtcgtgggag	1980
ccagaacggt	ccgcagagaa	aagagggccc	agcgtctcac	ctcgagggtg	aaggcactgt	2040
tcagcgtgct	caactacgag	cgggcgcggc	gccccggcct	cctgggcgcc	tctgtgctgg	2100
gcctggacga	tatccacagg	gcctggcgca	ccttctgtct	gcgtgtgcgg	gccagagacc	2160
cgccgcctga	gctgtacttt	gtcaaggtgg	atgtgacggg	cgcgtacgac	accatcccc	2220
aggacaggct	cacggaggtc	atgccagca	tcatcaaacc	ccagaacacg	tactgcgtgc	2280
gtcggtatgc	cgtggtccag	aaggcccgcc	atgggcacgt	ccgcaaggcc	ttcaagagcc	2340
acgtctctac	cttgacagac	ctccagccgt	acatgcgaca	gttcgtggct	cacctgcagg	2400
agaccagccc	gctgagggat	gccgtcgtca	tcgagcagag	ctcctccctg	aatgaggcca	2460
gcagtggcct	cttcgacgtc	ttctacgct	tcatgtgcca	ccacgccgtg	cgcatcaggg	2520
gcaagtccta	cgtccagtgc	caggggatec	cgcagggctc	catectctcc	acgtctctct	2580
gcagcctgtg	ctacggcgac	atggagaaca	agctgtttgc	ggggattcgg	cgggacgggc	2640
tgctcctgcg	tttggtggat	gatttcttgt	tggtgacacc	tcacctacc	cacgcgaaaa	2700
ccttcctcag	gaccctggtc	cgaggtgtcc	ctgagtatgg	ctgcgtggtg	aacttgcgga	2760
agacagtggg	gaacttccct	gtagaagacg	aggccctggg	tgccacggct	tttgttcaga	2820
tgccggccca	cggcctattc	ccctggtgcg	gcctgctgct	ggatacccgg	accctggagg	2880
tgcagagcga	ctactccagc	tatgccccga	cctccatcag	agccagtctc	accttcaacc	2940

gcggttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaactctt tggggtcttg cggctgaagt	3000
gtcacagcct gtttctggat ttgcaggtga acagcctcca gacggtgtgc accaacatct	3060
acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgcatg tgtgctgcag ctcccatttc	3120
atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tctgcgcgct catctctgac acggcctccc	3180
tctgctactc catcctgaaa gccaagaacg cagggatgtc gctgggggcc aagggcgccg	3240
ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcc acaagcattc ctgctcaagc	3300
tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tctggggtc actcaggaca gccagacgc	3360
agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgcct ggaggccgca gccaacccgg	3420
cactgccctc agacttcaag accatctctg actgatggcc acccgcccac agccaggccg	3480
agagcagaca ccagcagccc tgtcacgcc ggctctacgt cccagggagg gagggcgccg	3540
ccacaccag gcccgcaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct	3600
gcatgtccgg ctgaaggetg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc	3660
tgagtgtcca gcacacctgc cgttcttact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc	3720
agggccagct tttcctcacc aggagcccgg ctccactcc ccacatagga atagtccatc	3780
cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tgcctctctt tgccttccac ccccaccatc	3840
caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctgggaa tttggagtga ccaaaggtgt	3900
gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattgggg	3960
ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaaa	4020
aaaaaaaa	4027
<210> 159	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 159	
ggaggtccct caccttcta	19
<210> 160	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 160	
cggaggatct tatgctgaa	19

<210> 161	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 161	
cccgcttcca gatcataca	19
<210> 162	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 162	
ggagacctca acaagatat	19
<210> 163	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 163	
aaggcatggt cattggtat	19
<210> 164	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 164	

gcatgggtcat tggatatcat	19
<210> 165	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 165	
ggtcattgggt atcatgagt	19
<210> 166	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 166	
cctagtggggt atccctgta	19
<210> 167	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 167	
gaggatggac attggttctt	19
<210> 168	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	

<400> 168	
gcatgcaggc tacagttca	19
<210> 169	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 169	
ccagcacatg cactgttga	19
<210> 170	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 170	
cacatgcact gttgagtga	19
<210> 171	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 171	
ctggaggtcc ctcacettct a	21
<210> 172	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	

寡核苷酸”	
<400> 172	
gtcggaggat cttatgctga a	21
<210> 173	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解=”人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 173	
tgcccgcttc cagatcatac a	21
<210> 174	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解=”人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 174	
ctggagacct caacaagata t	21
<210> 175	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解=”人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 175	
tcaaggcatg gtcattggta t	21
<210> 176	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	

<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 176	
aggcatggtc attggtatca t	21
<210> 177	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 177	
atggtcattg gtatcatgag t	21
<210> 178	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 178	
gccctagtg g statccctgt a	21
<210> 179	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 179	
atgaggatgg acattgttct t	21
<210> 180	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 180	
gagcatgcag gctacagttc a	21
<210> 181	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 181	
ttccagcaca tgcactgttg a	21
<210> 182	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 182	
agcacatgca ctgttgagtg a	21
<210> 183	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 183	
tagaaggtga gggacctcca g	21
<210> 184	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"		
<400> 184		
ttcagcataa gatcctccga c		21
<210> 185		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"		
<400> 185		
tgtatgatct ggaagcgggc a		21
<210> 186		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"		
<400> 186		
atatcttggt gaggtctcca g		21
<210> 187		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"		
<400> 187		
ataccaatga ccatgccttg a		21
<210> 188		
<211> 21		
<212> DNA		

<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 188	
atgataccaa tgacccatgcc t	21
<210> 189	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 189	
atggtcattg gtatcatgag t	21
<210> 190	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 190	
gccctagtagg gtatccctgt a	21
<210> 191	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 191	
atgaggatgg acattgttct t	21
<210> 192	
<211> 21	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 192	
gagcatgcag gctacagttc a	21
<210> 193	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 193	
ttccagcaca tgcactgttg a	21
<210> 194	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 194	
agcacatgca ctggtgagtg a	21
<210> 195	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 195	
tagaaggtga gggacctcc	19
<210> 196	

<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 196	
ttcagcataa gatcctccg	19
<210> 197	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 197	
tgtatgatct ggaagcggg	19
<210> 198	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 198	
atatcttggt gaggtctcc	19
<210> 199	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 199	
ataccaatga ccatgcctt	19

<210> 200	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 200	
atgataccaa tgaccatgc	19
<210> 201	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 201	
atggtcattg gatatcatga	19
<210> 202	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 202	
gccctagtgg gtatccctg	19
<210> 203	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 203	

atgaggatgg acattgttc	19
<210> 204	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 204	
gagcatgcag gctacagtt	19
<210> 205	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 205	
ttccagcaca tgcactgtt	19
<210> 206	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 206	
agcacatgca ctgttgagt	19
<210> 207	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	

<400> 207	
ggccaggatg gttcttaga	19
<210> 208	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 208	
gcttcgtgct aaactggta	19
<210> 209	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 209	
gggcgtgact tccacatga	19
<210> 210	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 210	
caggcctaga gaagtttca	19
<210> 211	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	

寡核苷酸”	
<400> 211	
cttgaaccc attcctgaa	19
<210> 212	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解=”人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 212	
ggaaccatt cctgaaatt	19
<210> 213	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解=”人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 213	
gaaccattc ctgaaatta	19
<210> 214	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解=”人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 214	
aaccattcc tgaaattat	19
<210> 215	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	

<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 215	
accattcct gaaattatt	19
<210> 216	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 216	
ccattcctg aaattattt	19
<210> 217	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 217	
ctgtggttct attatatta	19
<210> 218	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 218	
aaatatgaga gcatgctaa	19
<210> 219	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 219	
tctaagaacc atcctggcc	19
<210> 220	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 220	
taccagttta gcacgaagc	19
<210> 221	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 221	
tcatgtggaa gtcacgccc	19
<210> 222	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 222	
tgaaacttct ctaggcctg	19
<210> 223	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<221>	来源	
<223>	/注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400>	223	
	ttcaggaatg ggttccaag	19
<210>	224	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400>	224	
	aatttcagga atgggttcc	19
<210>	225	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400>	225	
	taatttcagg aatgggttc	19
<210>	226	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400>	226	
	ataatttcag gaatgggtt	19
<210>	227	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 227	
aataatttca ggaatgggt	19
<210> 228	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 228	
aaataatttc aggaatggg	19
<210> 229	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 229	
taatataata gaaccacag	19
<210> 230	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 230	
ttagcatgct ctcatattt	19
<210> 231	
<211> 21	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 231	
gcggccagga tggttcttag a	21
<210> 232	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 232	
gagcttcgtg ctaaactggt a	21
<210> 233	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 233	
acgggcgtga cttccacatg a	21
<210> 234	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 234	
tgcaggccta gagaagtttc a	21
<210> 235	

<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 235	
tccttggaac ccattcctga a	21
<210> 236	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 236	
ttggaaccca ttctgaaat t	21
<210> 237	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 237	
tggaacccat tcctgaaatt a	21
<210> 238	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 238	
ggaaccatt cctgaaatta t	21

<210> 239	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 239	
gaaccattc ctgaaattat t	21
<210> 240	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 240	
aaccattcc tgaaattatt t	21
<210> 241	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 241	
ccctgtggtt ctattatatt a	21
<210> 242	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 242	

ttaaatatga gagcatgcta a	21
<210> 243	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 243	
tctaagaacc atcctggccg c	21
<210> 244	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 244	
taccagttta gcacgaagct c	21
<210> 245	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 245	
tcatgtggaa gtcacgcccg t	21
<210> 246	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	

<400> 246	
tgaaacttct ctaggcctgc a	21
<210> 247	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 247	
ttcaggaatg ggttccaagg a	21
<210> 248	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 248	
aatttcagga atgggttcca a	21
<210> 249	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 249	
taatttcagg aatgggttcc a	21
<210> 250	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	

寡核苷酸”	
<400> 250	
ataatttcag gaatgggttc c	21
<210> 251	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解=”人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 251	
aataatttca ggaatgggtt c	21
<210> 252	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解=”人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 252	
aaataatttc aggaatgggt t	21
<210> 253	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解=”人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
<400> 253	
taatataata gaaccacagg g	21
<210> 254	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	

<223> /注解="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"	
<400> 254	
ttagcatgct ctcatattta a	21
<210> 255	
<211> 750	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 255	
caagtgaac tcgtccagtc cgggtgcagaa gtcaagaagc caggagaatc actcaagatt	60
agctgcaaag gcagcggcta ctcttcaact tectactgga tcggctgggt gcgccagatg	120
cccggaaaagg gactggagtg gatgggaatc atctacctg gcgatagcga caccagatac	180
tccccgagct ttcaaggcca agtgaccatt tcggccgaca agtcgatctc caccgcgtat	240
ctgcagtgga gctcactgaa ggcttcggac accgcatgt actactgtgc ccggctgggg	300
ggaagcctgc ccgattacgg aatggacgtg tggggccagg gaaccatggt cactgtgtcc	360
tccgcctccg ggggtggagg ctccggtgga ggggggtccg gtggtggagg atcagaaatt	420
gtgctgacc agtctccgct gtccttgccct gtgaccccg gcgaaccgc aagcatctcc	480
tgccggtcgt cgcagtcctt gcttcaactc aacggctaca actacctga ttggtacctc	540
cagaagcctg gacagagccc acagctgtt atctacctg gctcgaacc ggccctcagga	600
gtgccggaca ggttctccgg ctccgggtcg ggaaccgact tcacgctgaa gatctcccgc	660
gtggaggccg aggacgtggg cgtgtactat tgcatgcagg cgctgcagac cttattaca	720
ttcggacagg ggactaaggt cgatatcaag	750
<210> 256	
<211> 753	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 256	
caagtccaac tcgtccaatc aggagctgaa gtcaagaagc ctggagcatc cgtgagagtg	60
tcctgtaaag cctccggcta catcttcaact aactactacg tgcactgggt cagacaggcc	120
ccgggccagg gactggaatg gatgggaatc atttccccgt ccggcggatc gcctacttac	180
gcgcaacggc tgcagggccg cgtgaccatg actcgggatc tctccacttc aaccgtgtac	240
atggaactgt ccagccttac atcggaggat actgacctgt acttctgcgc gagggagtcc	300
cggtgaggg gcaaccgctt cgggctgcag tcaagcatct tcgatcactg gggccagggc	360
accctcgtga ccgtgtccag cgctcgggg ggaggaggct ccgggggccc aggttcgggc	420
gggtggtgat ctgacattcg catgactcag tccccacct cactgtccgc tagcgtgggg	480
gaccgcgtga cgattccgtg ccaagccagc caggacatca acaaccatct gaactggtat	540
cagcagaagc ccggaaaagg cccgcagctg ctgatctacg acacctcga tctggagatc	600
ggcgtgccat cccggttctc cggttcggga agcggaaacc actttacct gactatctcc	660
tccttgcaac ccgaggacat tgccacctac tactgccagc agtacgaaa ctttcccctg	720

accttcgggg	gtggaaccaa	agtggagatc	aag	753		
<210>	257					
<211>	750					
<212>	DNA					
<213>	人					
<400>	257					
caagtgcagc	tcgtccaatc	cggtgcagaa	gtgaagaagc	ctggcgaatc	cctgaagatc	60
tcatgcaaag	gctcgggata	cagcttcacc	tcatattgga	ttggatgggt	cagacagatg	120
ccaggaaagg	gtctggagtg	gatgggaatc	atctaccggg	gagacagcga	taccgggtac	180
tccccgagct	tccagggaca	ggtcaccatc	tcggccgaca	agtccattac	tactgcctac	240
ttgcaatggg	cctcgetgcg	cgctccgat	agcgcctgt	actactgcgc	gagaggcggc	300
tactccgact	acgactacta	cttcgatttc	tggggacagg	ggacactcgt	gactgtgtcc	360
tccgcgtcgg	gtggcggcgg	ctcgggtgga	ggaggaagcg	gagggggagg	ctccgaaatt	420
gtgatgacc	agtcaccct	gtcgtccct	gtgactcctg	gggaaccggc	ctccatctcc	480
tgccggagct	cacagagcct	gctgcactcc	aacggataca	actacctcga	ttggtacctt	540
cagaagcccc	gccagtcc	ccagctgctg	atctacctgg	ggtccaaccg	ggctagcggc	600
gtgccggacc	gcttctccgg	ttccgggtct	ggaaccgact	tcacgctgaa	aatctccagg	660
gtggaggccg	aggacgtggg	agtgtattac	tgtatgcagg	ccctgcaaac	ccccttcacc	720
tttggcgggg	gcaccaaggt	cgagattaag				750
<210>	258					
<211>	720					
<212>	DNA					
<213>	人					
<400>	258					
caagtgaac	tcgtcaaag	cggtggagat	ctcgcaccagc	ccggaagatc	ccttagactc	60
tcatgtgccg	ccagcgggtt	caccttcgac	gactacgcta	tgcatgggt	gcgccaggcc	120
ccggggaagg	gactggaatg	ggtggccgtg	atttggccgg	acggcggaca	gaagtactac	180
ggagacagcg	tgaaggcg	gttcaccgtg	tcgagggaca	accgaagaa	taccctctac	240
cttcaaatga	actccctgcg	cgccaggac	accgcgatct	actactgcgt	gcgccacttt	300
aacgcatggg	attactgggg	acaggggact	ctggteactg	tgtcctccgc	ctctggcggc	360
ggaggttccg	gcggtggtgg	ctccggtgga	ggaggatcgg	acatccagct	gaccagctcc	420
ccttcctcac	tgtcggcgta	cgtgggaggc	cggtcacta	tcacgtgcca	ggcatcccag	480
ggcatttccc	agttcctgaa	ctggttccag	cagaagcccc	gaaaggcccc	taagctgttg	540
atttccgatg	ctagcaacct	ggaaccggc	gtgccgtcac	ggttcagcgg	ctccgggtcg	600
ggcaccgact	tcacctcac	catcactaac	ctccaaccgg	aggacatcgc	cacctattac	660
tgccagcagt	acgatgatct	gccactgact	ttcggcggcg	gaaccaaggt	cgaaatcaag	720
<210>	259					
<211>	744					
<212>	DNA					

<213> 人	
<400> 259	
caagtgaac tcgtccaatc cggtggtggt gtcgtgaac caggaaagtc tcttcgctc	60
tcatgcgctg ccagcggatt cacgttttcc atcttcgcta tgcaactggg ggcgcaggcc	120
ccgggaaagg gactggaatg ggtggcaacc atttcatacg atggatcaaa cgcgttctac	180
gccgactccg tgaaggaag gttcaccatc tcgagagaca actccaagga ctcgctgtat	240
ctgcaaatgg actccctgcg ccctgaggat accgccgtct actactgctg gaaggccggc	300
gacgggggat acgacgtgtt cgattcgtgg ggccaggga ctctggtcac cgtgtccagc	360
gcgagcgggg gaggcggatc gggtggtgga gggtccgggg gaggaggctc cgagatcgtg	420
atgactcagt cgccgctctc cctccccgtg acccccgag agccagctag catttcatgt	480
cggagctccc agtccctgct gcaactccaac ggctacaatt acctggattg gtacttgcag	540
aagcctgggc agagccctca gctgctgac tacctcggt cgaacagagc ctccggcgtg	600
ccggaccggt tttccgggag cggcagcggc accgatttca ccttgaaaat ctcccgcgtg	660
gaagccgagg acgtgggcgt gtactattgc atgcaggccc tgcagactcc caccttcggc	720
ccgggaacta aggtcgacat caag	744
<210> 260	
<211> 735	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 260	
gaagtgaat tgggtggaatc tggaggagga ttggtgaac ctggaggatc tctgagactg	60
tcatgtgccg ccagcggctt cacattttcc tctacgcga tgtcatgggt ccgccaggca	120
ccggggaaag gactggaatg ggtgtccgcc atttcgggat cgggaggctc gacctactac	180
gccgacagcg tgaaggaag attcactatc tcccgggata actccaagaa tactctgtat	240
ctccaaatga actccctgag ggccgaggat actgccgtgt actactgctg taaggaaacc	300
gactactacg gctcaggaac cttcgactac tggggccagg gcaccctcgt gaccgtgtcc	360
tcggcctccg gcggcggagg ttcggggggg ggcggttccg ggggagggg cagcgacatc	420
cagatgacc agtccccaag ctccccttcc gcgtccgtgg gagatcgcgt gaccatttcg	480
tgccgggcta gccaggcat cggtatctat cttgctggt accagcagcg gagcggaaag	540
ccgccccagc tgctgatcca cggcgcctca actctgcaat ccggggtccc cagccggttc	600
agcggtagcg ggtcgggtac cgactttacc ctgactatct cctccctcca accggaggac	660
ttgcctcct actggtgcca gcagtccaac aacttcctc ccaccttcgg ccagggaacg	720
aaggtcgaga ttaag	735
<210> 261	
<211> 732	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 261	
caagtgaac tcgtccagtc cgggtgcagaa gtgaaaaagc caggagaaag cctcaagatc	60

agctgcaagg gatctgggta cagcttcacc aactactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
cccggaaagg gactggagtg gatgggcatt atctaccctg gggactccga caccgggtat 180
tccccgagct tccaaggaca ggtcaccatc tccgccgata agtcgattag cactgcgtac 240
ttgcagtggg caagcctgaa ggcctcggac accgccatgt actactgcgc gagacacggg 300
ccctcgtcct ggggccaatt tgactactgg ggccagggaa cgcttgtgac cgtgtcgtcc 360
gcgtccgggg gtggaggatc aggaggagga ggctccgggt gtggcggtag cgacatccgg 420
ctgactcagt ccccttcctc actctccgcc tccgtggggg accgcgtgac cattacctgt 480
cgggcatcac agtccatcag ctcatacctg aactggtatc agcagaagcc ggggaaggcc 540
ccgaaactcc tgatctacgc cgctctctcc ctgcaatccg gcgtgccctc gagtttctcc 600
ggctccggct cggaaccga tttcaactctg acaattagca gctgcagcc tgaggatttc 660
gctacctact actgccagca gtctactctg actccgctga ctttcggcgg gggaaccaag 720
gtcgacatca ag 732

<210> 262

<211> 250

<212> PRT

<213> 人

<400> 262

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

Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 180 185 190
 Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 195 200 205
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 210 215 220
 Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Ile Thr
 225 230 235 240
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 245 250
 <210> 263
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 263
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Pro Thr Tyr Ala Gln Arg Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Leu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ser Arg Leu Arg Gly Asn Arg Leu Gly Leu Gln Ser Ser
 100 105 110
 Ile Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 145 150 155 160
 Asp Arg Val Thr Ile Pro Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn His
 165 170 175
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
 180 185 190

Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Glu Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 210 215 220
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Asn Leu Pro Leu
 225 230 235 240
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 245 250
 <210> 264
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 264
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Arg Ala Ser Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Tyr Ser Asp Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln
 130 135 140
 Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser
 145 150 155 160
 Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu
 165 170 175
 Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 180 185 190
 Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 195 200 205

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 210 215 220
 Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Phe Thr
 225 230 235 240
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 245 250
 <210> 265
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 265
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Asp Leu Ala Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Pro Asp Gly Gly Gln Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg His Phe Asn Ala Trp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 130 135 140
 Ser Ala Tyr Val Gly Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln
 145 150 155 160
 Gly Ile Ser Gln Phe Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 165 170 175
 Pro Lys Leu Leu Ile Ser Asp Ala Ser Asn Leu Glu Pro Gly Val Pro
 180 185 190
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
 195 200 205
 Thr Asn Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 210 215 220

Asp	Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
225					230					235					240
<210>	266														
<211>	248														
<212>	PRT														
<213>	人														
<400>	266														
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Lys
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ile	Phe
			20						25				30		
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Thr	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Ala	Phe	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asp	Ser	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90				95	
Val	Lys	Ala	Gly	Asp	Gly	Gly	Tyr	Asp	Val	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln
			100							105				110	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			115							120				125	
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser
			130											140	
Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys
145					150									160	
Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp
					165					170				175	
Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu
					180					185				190	
Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly
					195									205	
Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp
						210								220	
Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ala	Leu	Gln	Thr	Pro	Thr	Phe	Gly
225						230				235					240
Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys								
															245

<210> 267
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 267
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Glu Thr Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
 130 135 140
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser
 145 150 155 160
 Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Ile Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 165 170 175
 Arg Ser Gly Lys Pro Pro Gln Leu Leu Ile His Gly Ala Ser Thr Leu
 180 185 190
 Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 195 200 205
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ser Tyr
 210 215 220
 Trp Cys Gln Gln Ser Asn Asn Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240
 Lys Val Glu Ile Lys
 245

<210> 268

<211> 244

<212> PRT

<213> 人

<400> 268

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

<210> 269

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 269
Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5
<210> 270
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 270
Asn Tyr Tyr Val His
1 5
<210> 271
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 271
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5
<210> 272
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 272
Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 273
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 273
Asp Tyr Ala Met His
1 5
<210> 274
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 274
Ile Phe Ala Met His
1 5
<210> 275
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 275
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5
<210> 276
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 276

Asp Phe Phe Ile His

1 5

<210> 277

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 277

Asn Tyr Trp Ile Gly

1 5

<210> 278

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 278

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 279

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 279

Ile Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Pro Thr Tyr Ala Gln Arg Leu Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 280

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 280

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 281

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 281

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 282

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 282

Val Ile Trp Pro Asp Gly Gly Gln Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 283

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 283

Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Ala Phe Tyr Ala Asp Ser Val Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 284

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 284

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 285

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 285

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Val Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 286

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 286

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 287

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 287

Leu Gly Gly Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 288

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 288

Glu Ser Arg Leu Arg Gly Asn Arg Leu Gly Leu Gln Ser Ser Ile Phe

1 5 10 15

Asp His

<210> 289

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 289

Glu Asp Thr Ile Arg Gly Pro Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 290

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 290

Gly Gly Tyr Ser Asp Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 291

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 291

His Phe Asn Ala Trp Asp Tyr

1 5

<210> 292

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 292

Ala Gly Asp Gly Gly Tyr Asp Val Phe Asp Ser

1 5 10

<210> 293

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
肽"

<400> 293

Glu Thr Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 294

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
肽"

<400> 294

Trp Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Gly Ile Ala Asn Ile
1 5 10

<210> 295

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
肽"

<400> 295

His Gly Pro Ser Ser Trp Gly Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 296

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
肽"

<400> 296

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 297
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 297
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn His Leu Asn

1	5	10
---	---	----

 <210> 298
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 298
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asp Thr Trp Leu Ala

1	5	10
---	---	----

 <210> 299
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 299
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

 <210> 300
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 300

Gln Ala Ser Gln Gly Ile Ser Gln Phe Leu Asn

1 5 10

<210> 301

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 301

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 302

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 302

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Ile Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 303

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 303

Gln Ala Ser His Asp Ile Ser Asn Tyr Leu His

1 5 10

<210> 304
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 304
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 305
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 305
Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5
<210> 306
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 306
Asp Thr Ser Asn Leu Glu Ile
1 5
<210> 307
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 307

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Gly

1 5

<210> 308

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 308

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 309

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 309

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Pro

1 5

<210> 310

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 310

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 311

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 311
Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5
<210> 312
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 312
Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5
<210> 313
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 313
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5
<210> 314
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的

肽”
 <400> 314
 Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Ile Thr
 1 5
 <210> 315
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解=”人工序列的描述：合成的
 肽”
 <400> 315
 Gln Gln Tyr Glu Asn Leu Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 316
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解=”人工序列的描述：合成的
 肽”
 <400> 316
 Gln Gln Ala Ser Ile Phe Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 317
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解=”人工序列的描述：合成的
 肽”
 <400> 317
 Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 318
 <211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 318
Gln Gln Tyr Asp Asp Leu Pro Leu Thr
1 5
<210> 319
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 319
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Thr
1 5
<210> 320
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 320
Gln Gln Ser Asn Asn Phe Pro Pro Thr
1 5
<210> 321
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 321
Gln Gln Ser Asp Asp Leu Pro His Thr
1 5

<210> 322

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 322

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 323

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 323

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
1 5

<210> 324

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 324

Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
1 5

<210> 325

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 325
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5
<210> 326
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 326
Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
1 5
<210> 327
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 327
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
1 5
<210> 328
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 328

Gly Phe Thr Phe Ser Ile Phe

1 5

<210> 329

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 329

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

1 5

<210> 330

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 330

Gly Tyr Met Phe Thr Asp Phe

1 5

<210> 331

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 331

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr

1 5

<210> 332

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 332
Tyr Pro Gly Asp Ser Asp
1 5
<210> 333
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 333
Ser Pro Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 334
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 334
Ser Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 335
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 335
Tyr Pro Gly Asp Ser Asp

- 1 5
<210> 336
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 336
Trp Pro Asp Gly Gly Gln
1 5
<210> 337
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 337
Ser Tyr Asp Gly Ser Asn
1 5
<210> 338
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 338
Ser Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 339
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

Asp His

<210> 343

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 343

Glu Asp Thr Ile Arg Gly Pro Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1

5

10

15

<210> 344

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 344

Gly Gly Tyr Ser Asp Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Phe

1

5

10

<210> 345

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 345

His Phe Asn Ala Trp Asp Tyr

1

5

<210> 346

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 346
 Ala Gly Asp Gly Gly Tyr Asp Val Phe Asp Ser
 1 5 10
 <210> 347
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 347
 Glu Thr Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 348
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 348
 Trp Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Gly Ile Ala Asn Ile
 1 5 10
 <210> 349
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
 <400> 349
 His Gly Pro Ser Ser Trp Gly Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 350
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 350
Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
1 5 10
<210> 351
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 351
Ser Gln Asp Ile Asn Asn His
1 5
<210> 352
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 352
Ser Gln Asp Ile Asp Thr Trp
1 5
<210> 353
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 353
Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
1 5 10
<210> 354
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 354
Ser Gln Gly Ile Ser Gln Phe
1 5
<210> 355
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 355
Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
1 5 10
<210> 356
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 356
Ser Gln Gly Ile Gly Ile Tyr
1 5
<210> 357

肽”
<400> 360
Asp Thr Ser
1
<210> 361
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解=”人工序列的描述：合成的
肽”
<400> 361
Ala Ala Ser
1
<210> 362
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解=”人工序列的描述：合成的
肽”
<400> 362
Leu Gly Ser
1
<210> 363
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解=”人工序列的描述：合成的
肽”
<400> 363
Asp Ala Ser
1
<210> 364
<211> 3

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 364
Leu Gly Ser
1
<210> 365
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 365
Gly Ala Ser
1
<210> 366
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 366
Asp Ala Ser
1
<210> 367
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 371
Ala Leu Gln Thr Pro Phe
1 5
<210> 372
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 372
Tyr Asp Asp Leu Pro Leu
1 5
<210> 373
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 373
Ala Leu Gln Thr Pro
1 5
<210> 374
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 374

Ser Asn Asn Phe Pro Pro

1 5

<210> 375

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 375

Ser Asp Asp Leu Pro His

1 5

<210> 376

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 376

Ser Tyr Ser Thr Pro Leu

1 5

<210> 377

<211> 150

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 377

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 150

<210> 378

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述: 合成的肽"

<400> 378

Arg Gly Asp Ser

1

<210> 379

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述: 合成的多肽"

<400> 379

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1

5

10

15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20

25

30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35

40

<210> 380

<211> 123

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"

<400> 380

aggagtaaga ggagcagget cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60

gggcccaccc gcaagcatta ccagcctat gcccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc

123

<210> 381

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多肽"

<400> 381

Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr
1 5 10 15
Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp
 20 25 30
Val Thr Leu
 35

<210> 382

<211> 105

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多核苷酸"

<400> 382

acaaaaaaga agtattcatc cagtgtgcac gaccctaacg gtgaatacat gttcatgaga 60
gcagtgaaca cagccaaaaa atccagactc acagatgtga cccta 105

<210> 383

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
肽"

<400> 383

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

<210> 384

<211> 521

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<221> 来源

<223> /注解="未知序列的描述：野生型PGK启动子多核苷酸"

<400> 384

```

accctctct ccagccacta agccagttgc tcctcggct gacggctgca cgcgaggcct      60
ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccc tccttgtccc ggggtgtgatg gcggggtgtg    120
gggcggaggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc    180
gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga    240
cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg    300
ttccttggaa gggctgaatc cccgctcgt ccttcgcagc ggcccccg gtgttcccat    360
cgccgcttct agccccactg cgacgcttgc ctgcattct tacacgctct ggggtcccagc    420
cgcgcgacg caaagggcct tgggtcgggt ctgctggcg cagggacgcg tttgggtccc    480
gacggaacct tttccgcgtt ggggttgggg caccataagc t                          521

```

<210> 385

<211> 118

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多核苷酸"

<400> 385

```

accctctct ccagccacta agccagttgc tcctcggct gacggctgca cgcgaggcct      60
ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccc tccttgtccc ggggtgtgatg gcggggtg    118

```

<210> 386

<211> 221

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列的描述：合成的
多核苷酸"

<400> 386

```

accctctct ccagccacta agccagttgc tcctcggct gacggctgca cgcgaggcct      60
ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccc tccttgtccc ggggtgtgatg gcggggtgtg    120
gggcggaggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc    180
gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac g                          221

```

<210> 387

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"	
<400> 387	
accctctct ccagccacta agccagttgc tcctcggct gacggctgca cgcgaggcct	60
ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccc tccttgtccc ggggtgtgatg gcggggtgtg	120
gggcggaggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc	180
gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga	240
cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg	300
ttccttggaa gggctgaatc cccg	324
<210> 388	
<211> 422	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的多核苷酸"	
<400> 388	
accctctct ccagccacta agccagttgc tcctcggct gacggctgca cgcgaggcct	60
ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccc tccttgtccc ggggtgtgatg gcggggtgtg	120
gggcggaggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc	180
gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga	240
cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg	300
ttccttggaa gggctgaatc cccgcctcgt ccttcgcagc ggcccccg gtgttcccat	360
cgccgcttct aggccactg cgacgcttgc ctgcacttct tacacgctct gggctccagc	420
cg	422
<210> 389	
<211> 21	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注解="人工序列的描述：合成的肽"	
<220>	
<221> 变体	

<222> (1) .. (3)
 <223> /替换=" "
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (3)
 <223> /注解="关于对变体位置的说明,在序列中给出的变体残基没有优选性"
 <400> 389
 Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Pro Gly Pro
 20
 <210> 390
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述:合成的
 肽"
 <220>
 <221> 变体
 <222> (1) .. (3)
 <223> /替换=" "
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (3)
 <223> /注解="关于对变体位置的说明,在序列中给出的变体残基没有优选性"
 <400> 390
 Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 1 5 10 15
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 20
 <210> 391
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列的描述:合成的

肽”

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (3)

<223> /替换=” ”

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (3)

<223> /注解=”关于对变体位置的说明,在序列中给出的变体残基没有优选性”

<400> 391

Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
 1 5 10 15

Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 392

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解=”人工序列的描述:合成的肽”

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (3)

<223> /替换=” ”

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (3)

<223> /注解=”关于对变体位置的说明,在序列中给出的变体残基没有优选性”

<400> 392

Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20 25

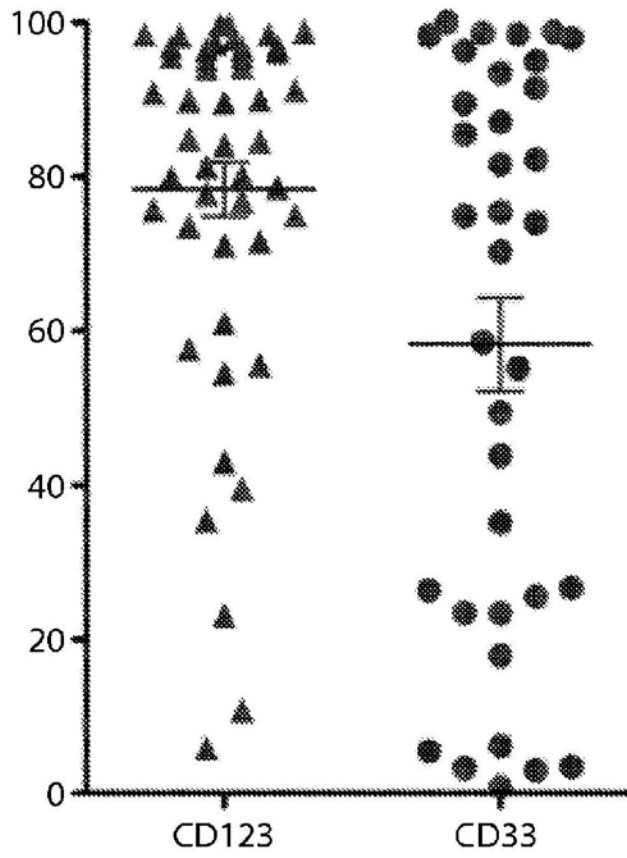


图1

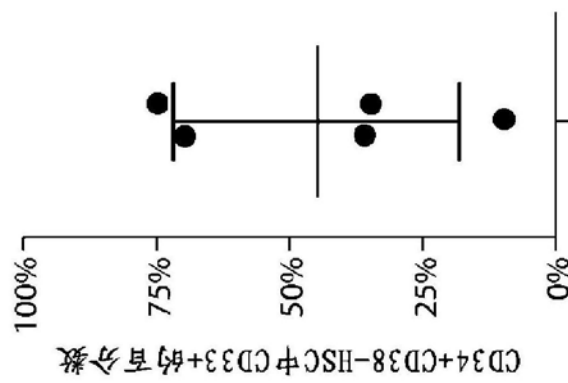


图2A

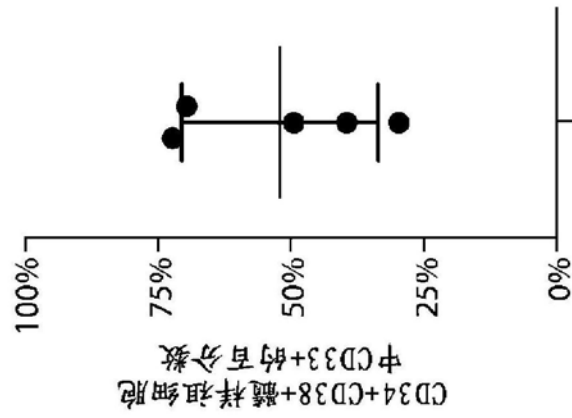


图2B

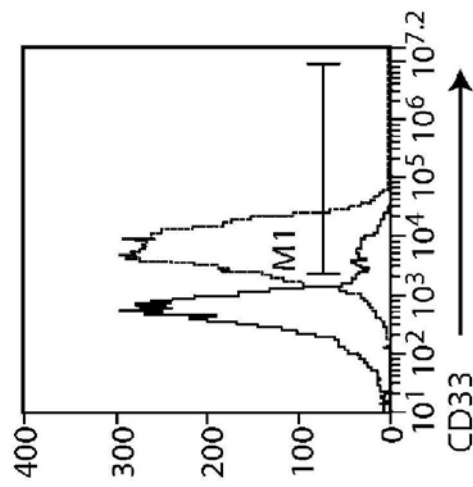


图2C

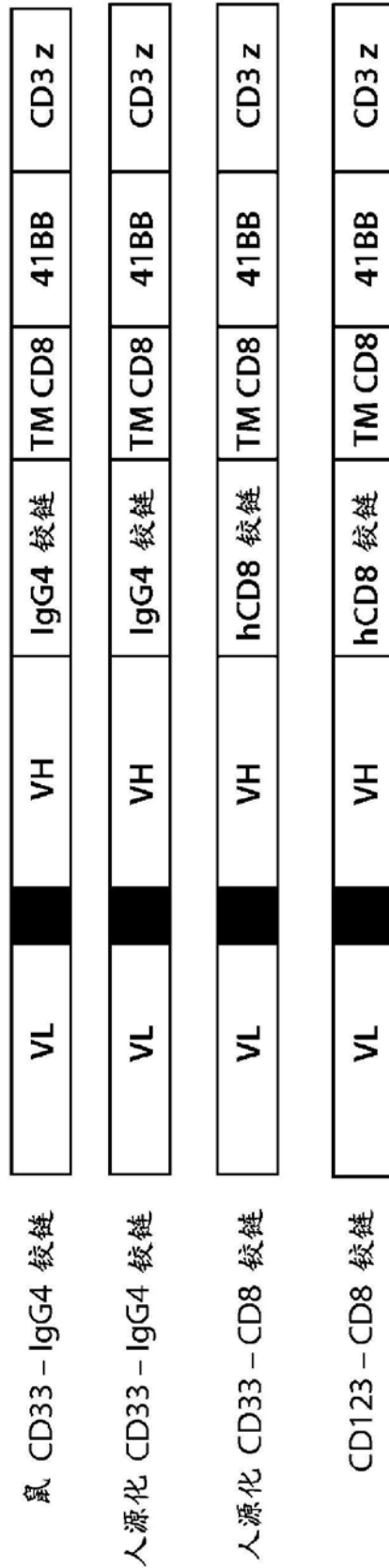


图3

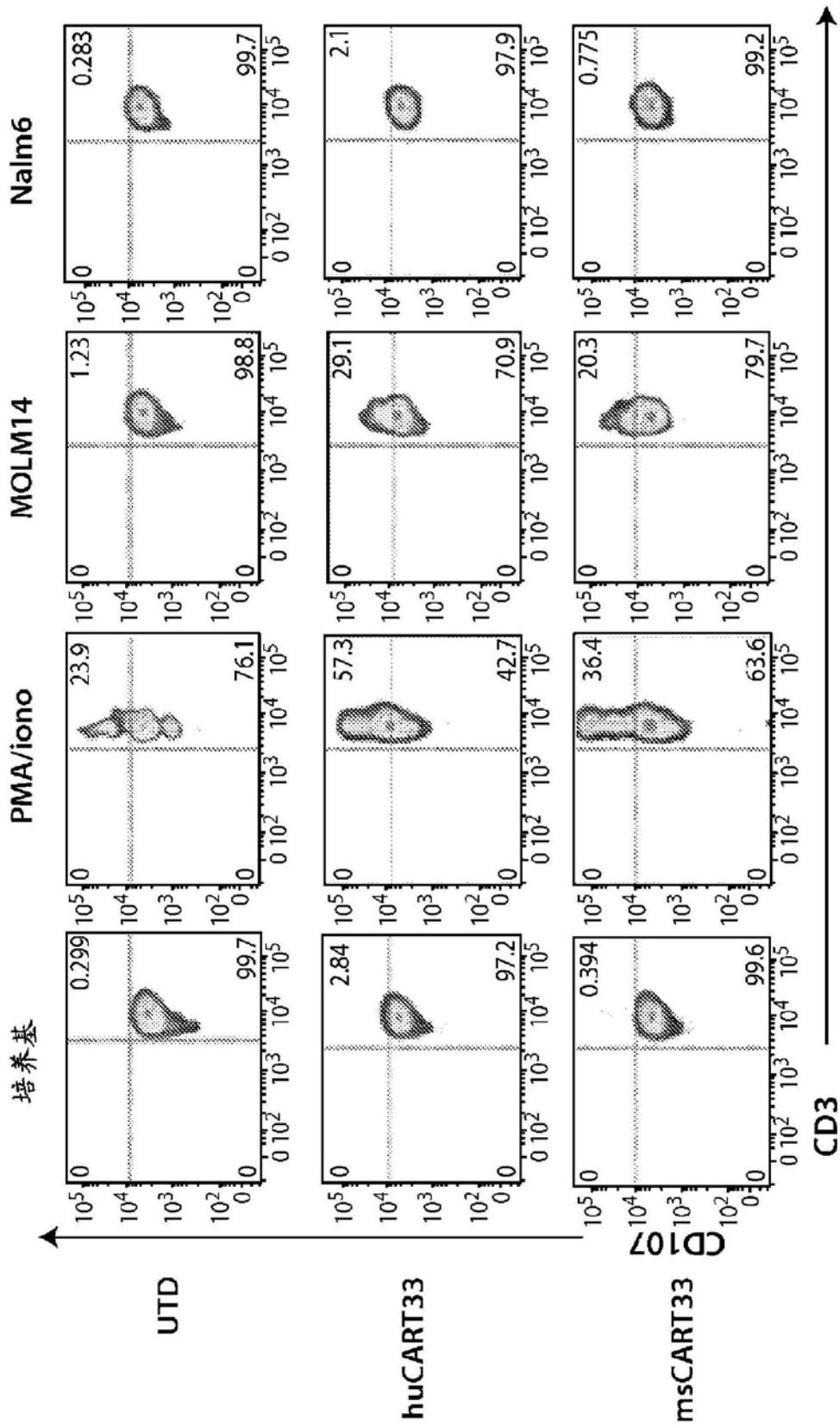


图4-1

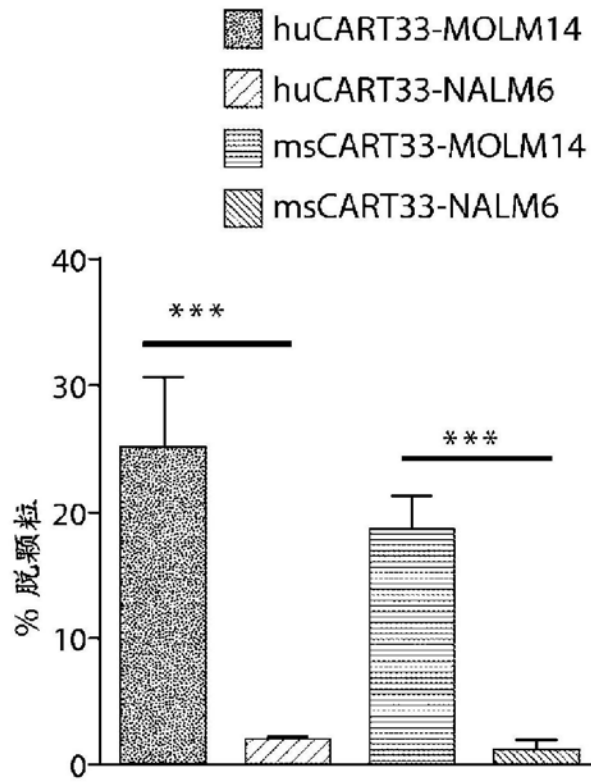


图4-2

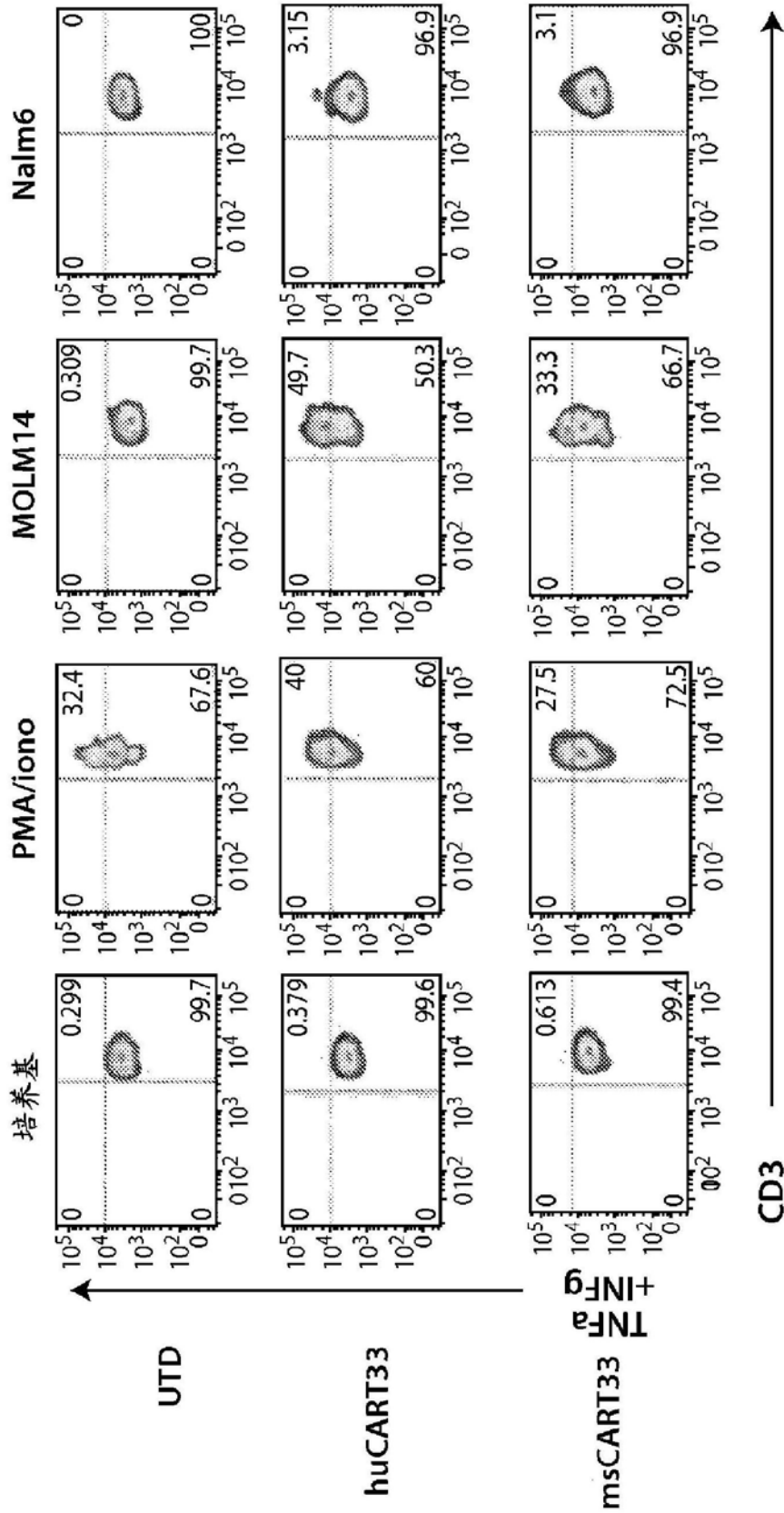


图5-1

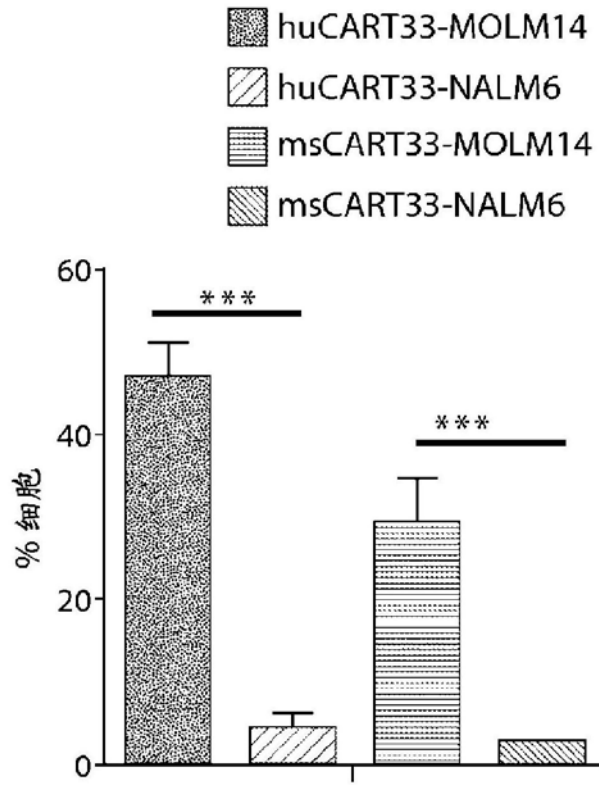


图5-2

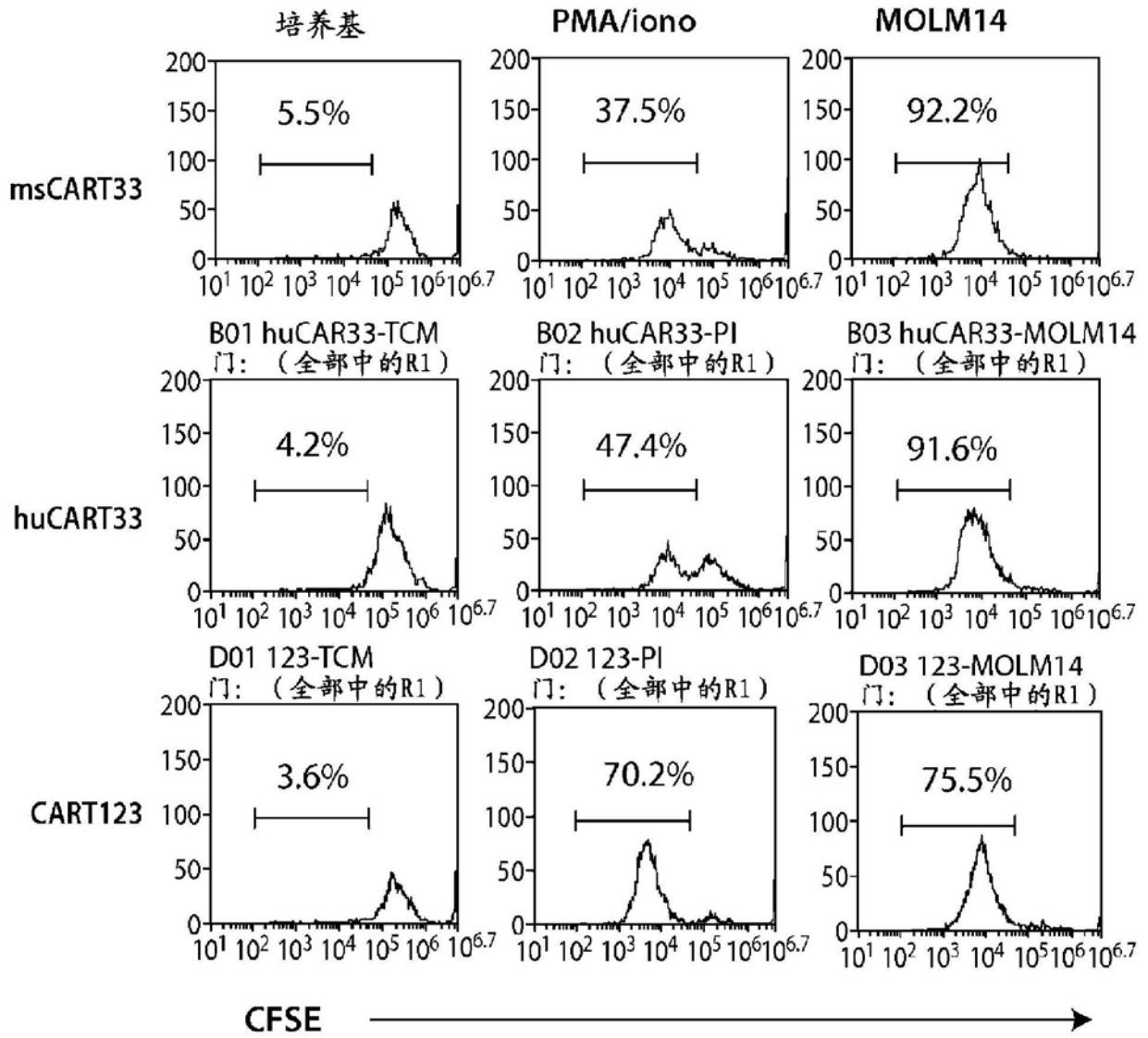


图6

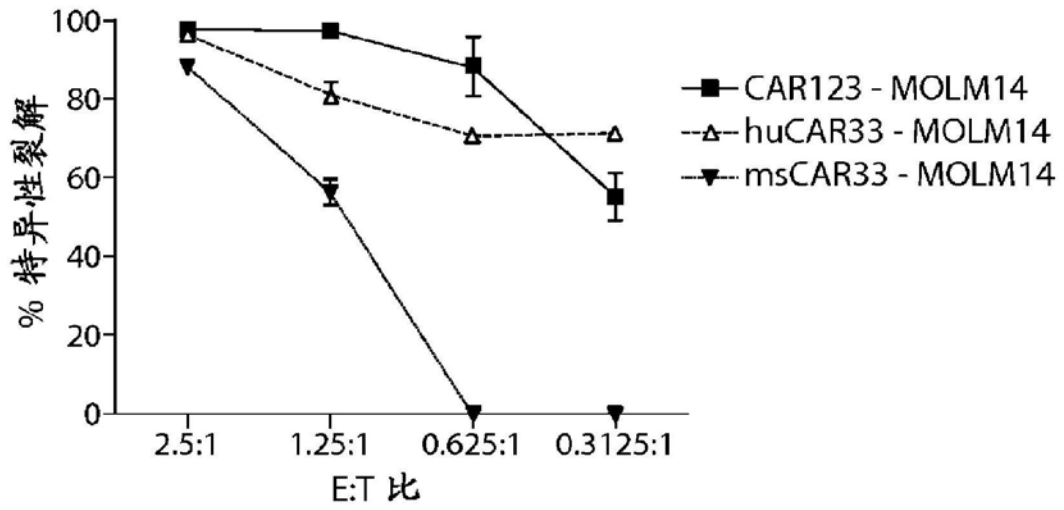


图7A

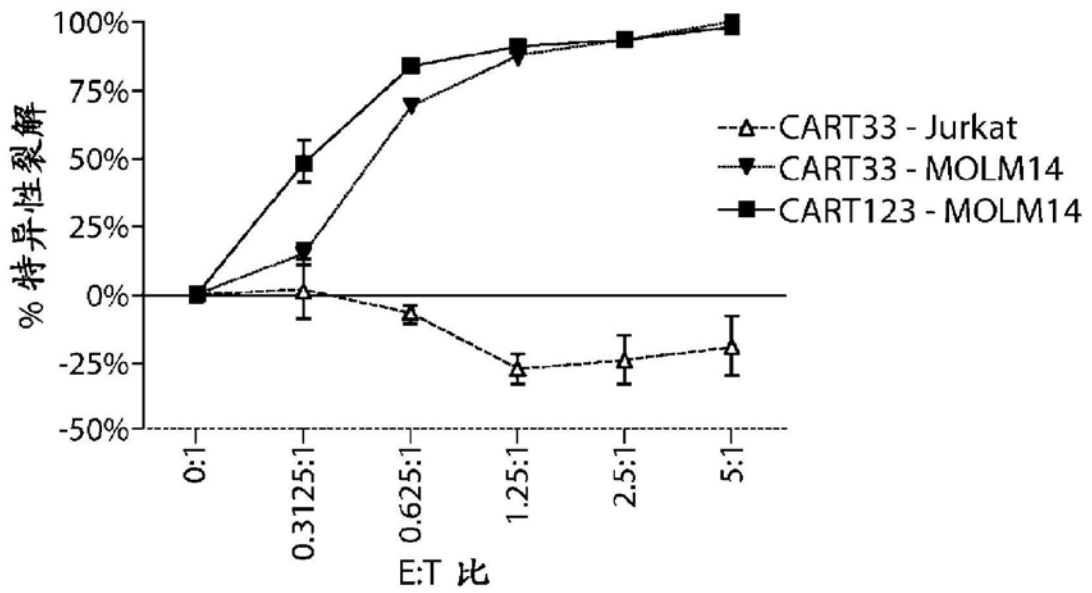


图7B

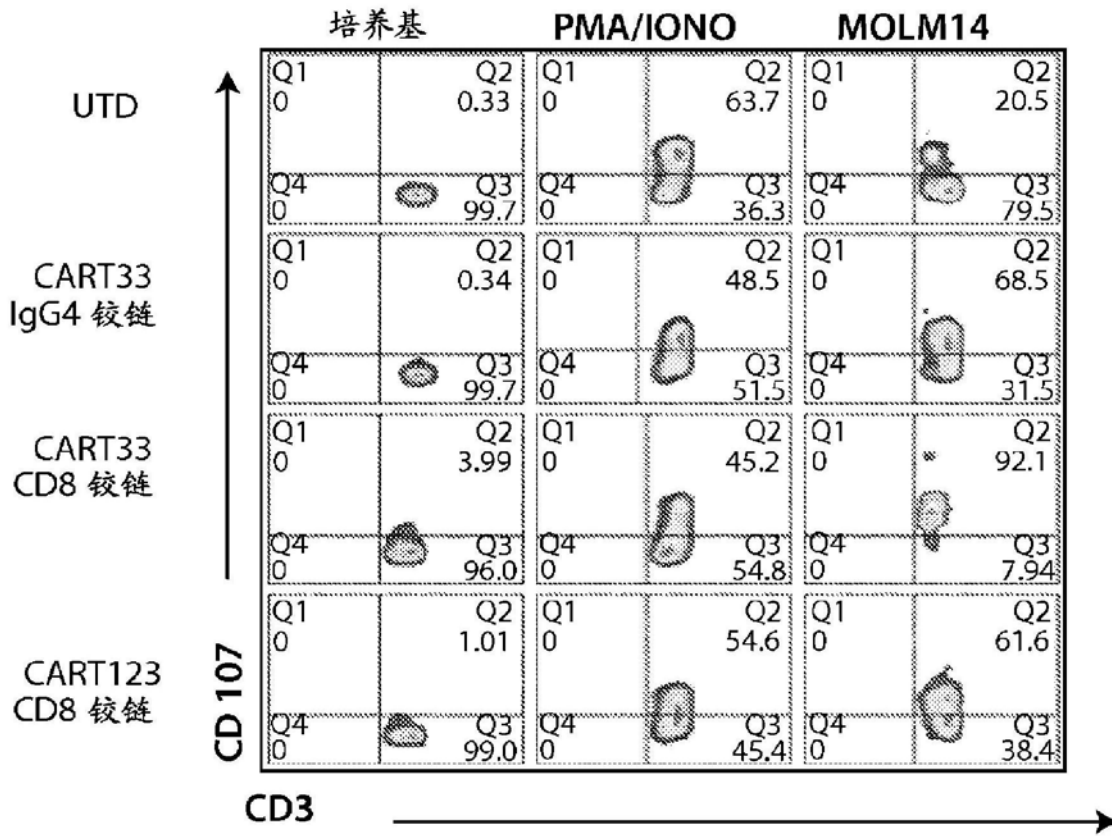


图8

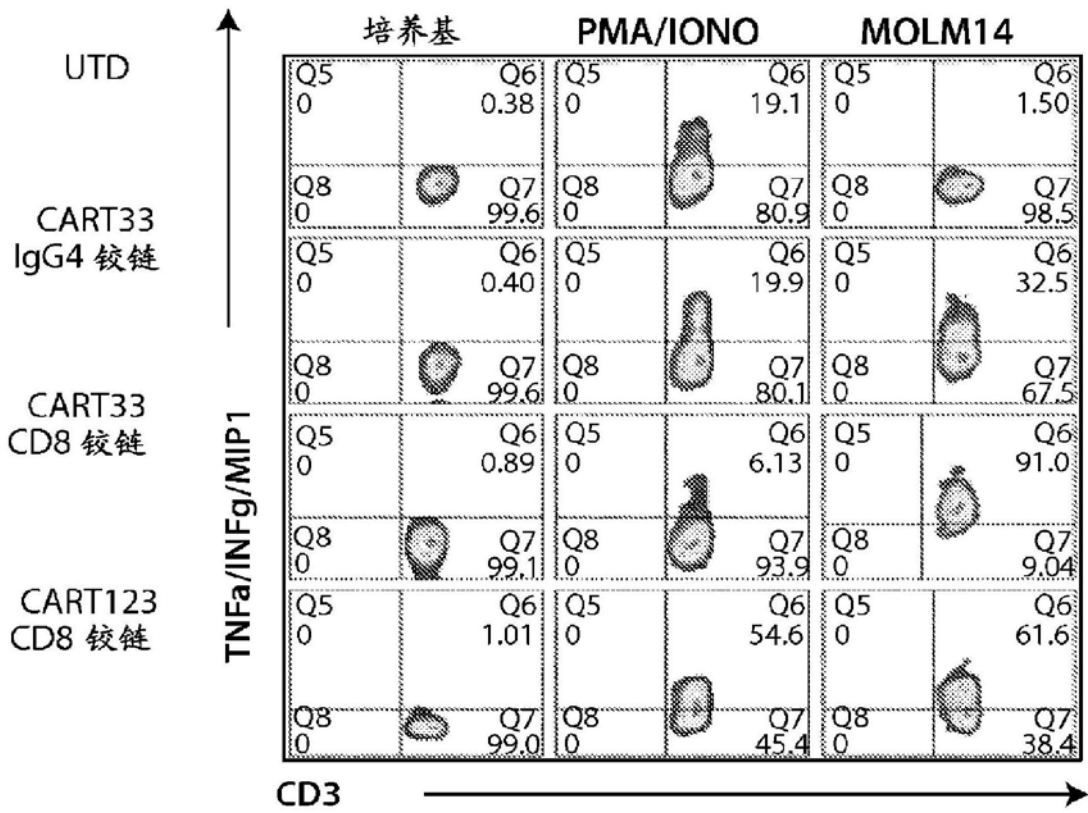


图9

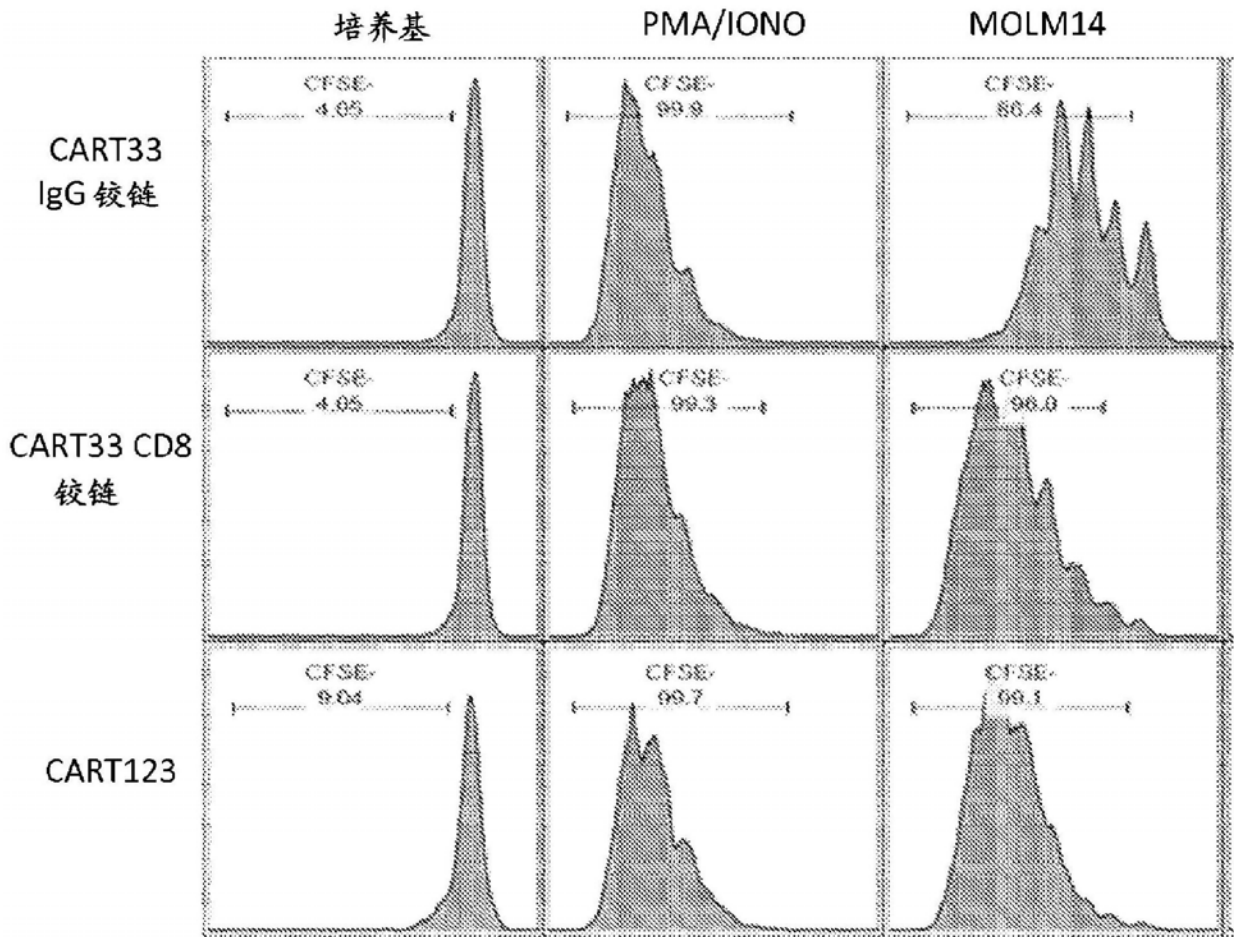


图10

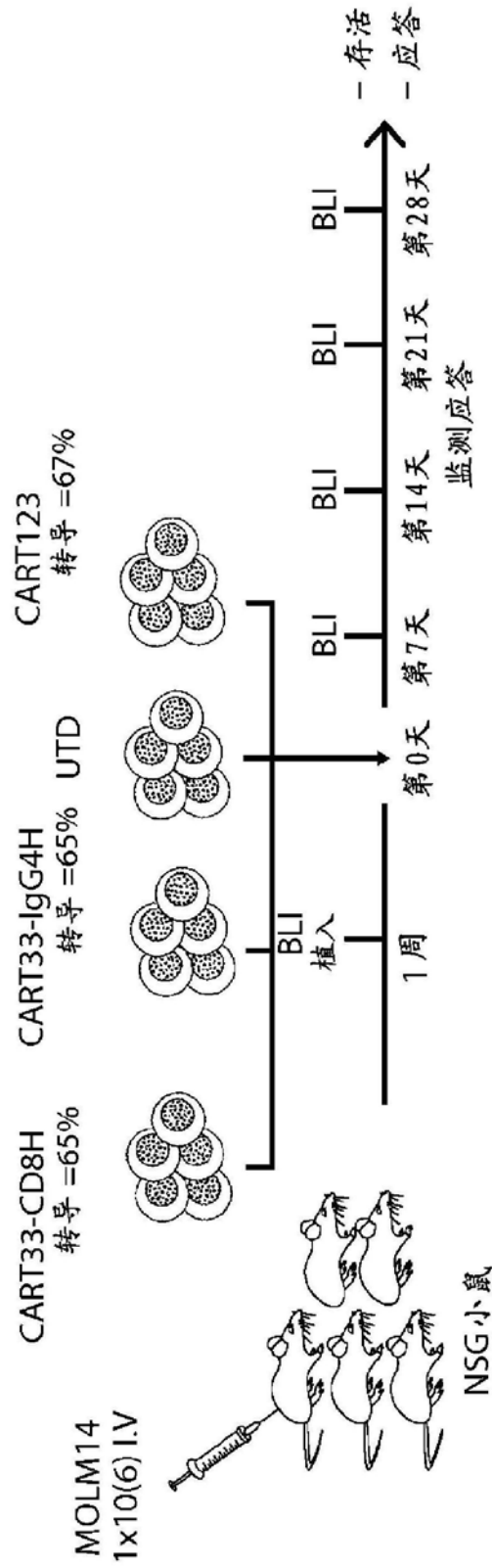


图11

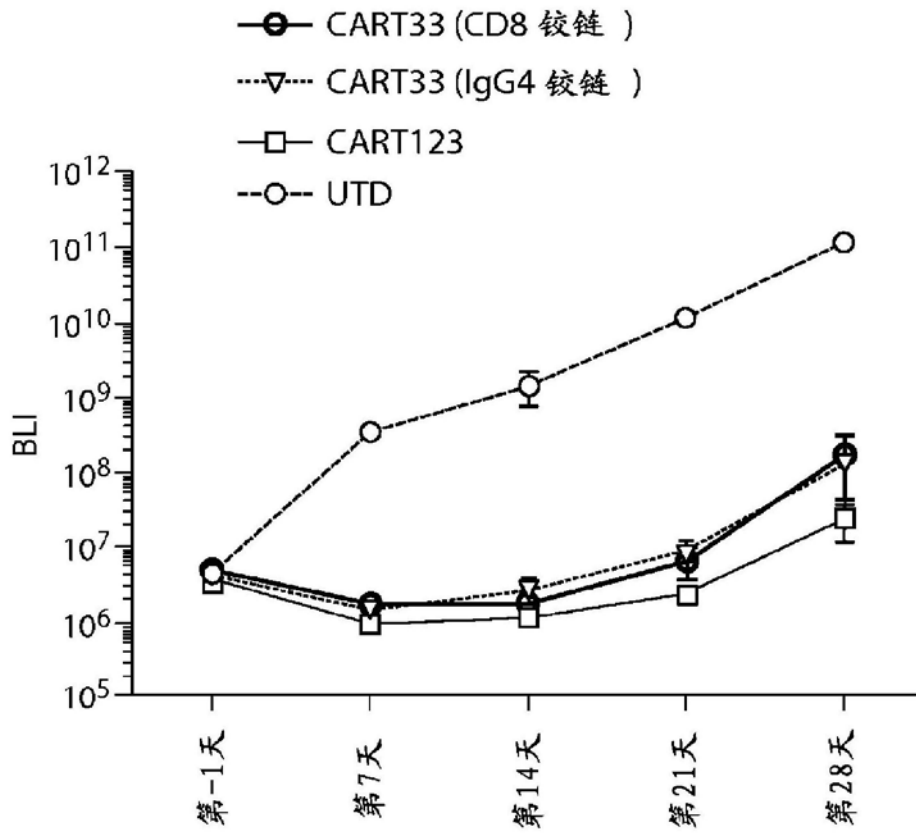


图12

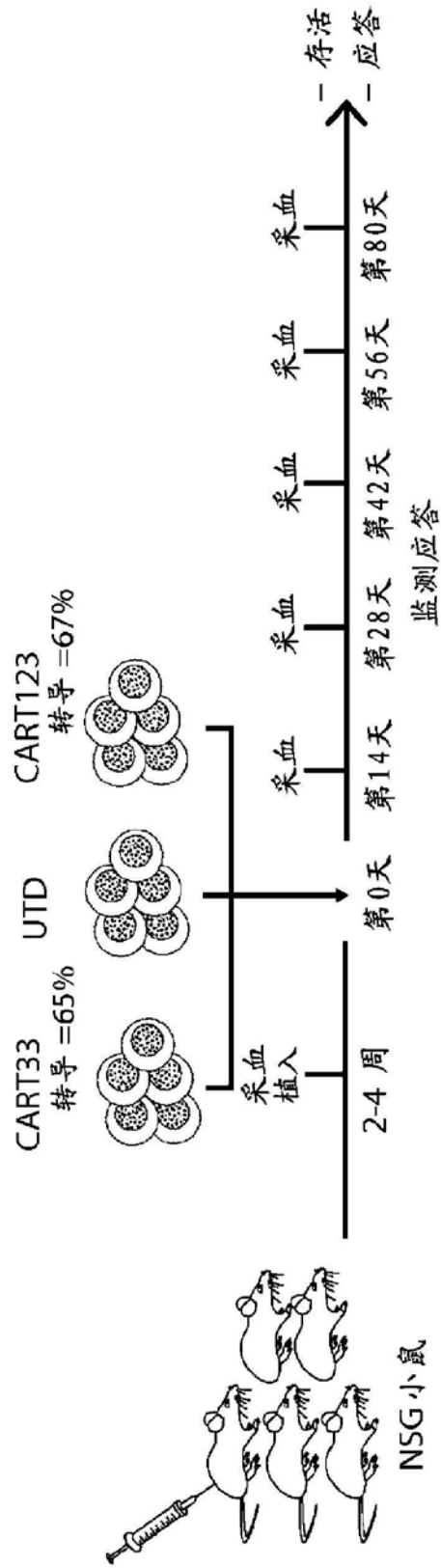


图13

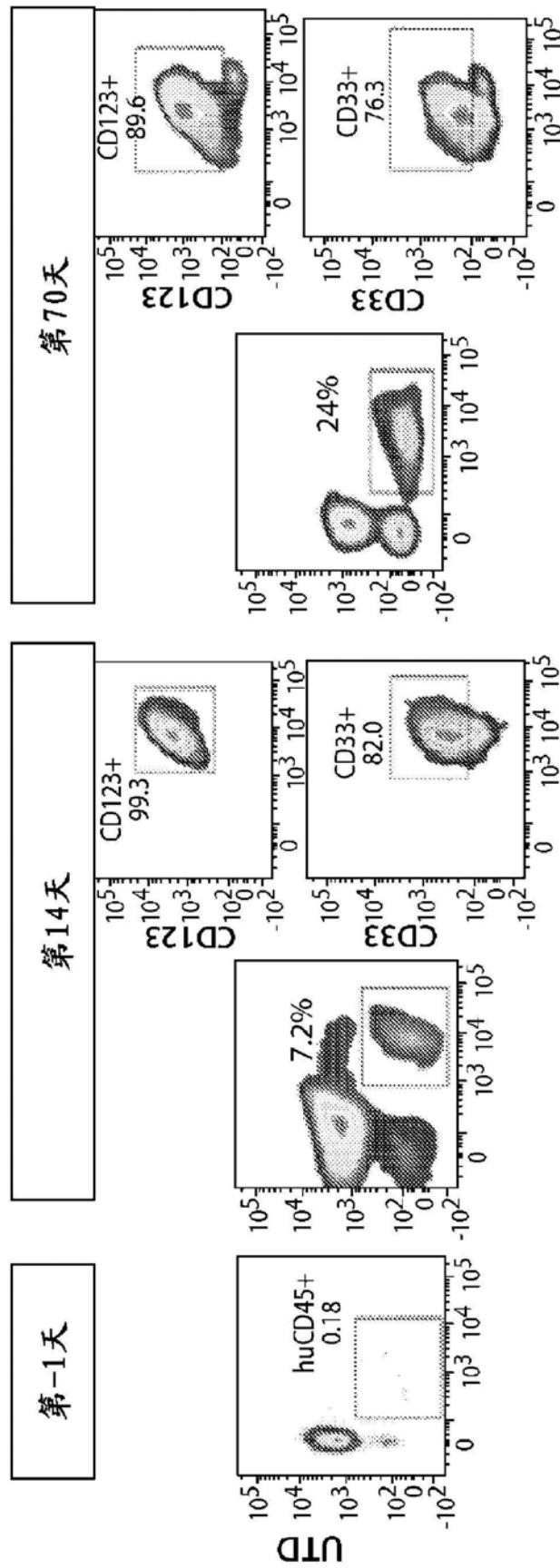


图14-1

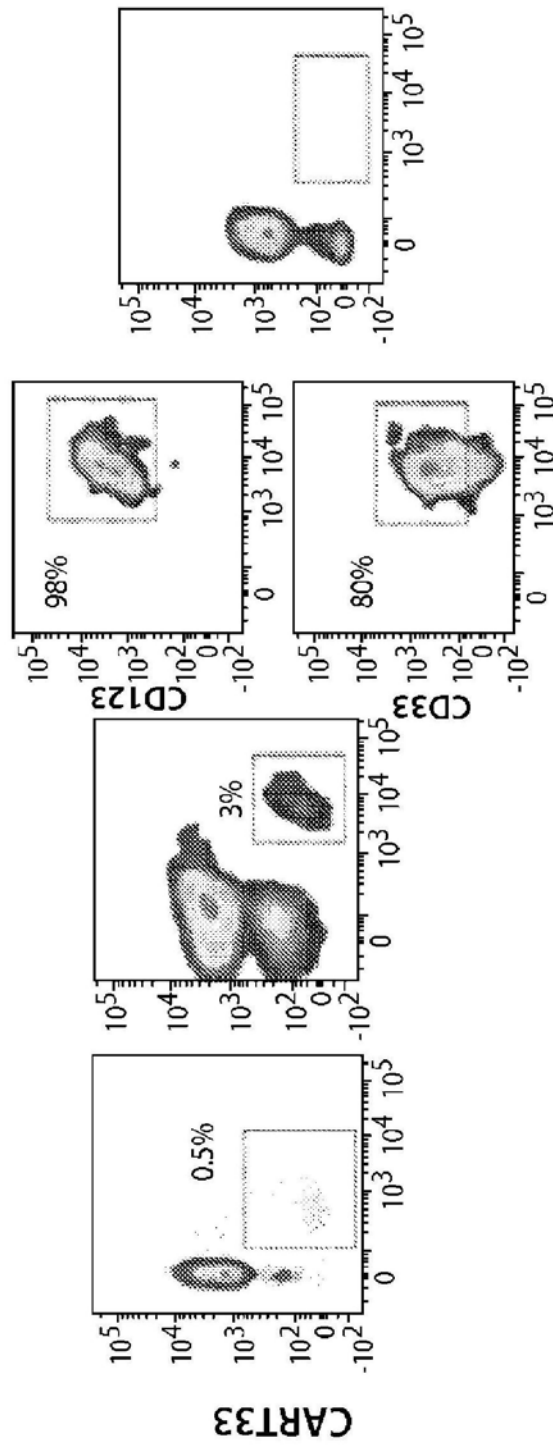


图14-2

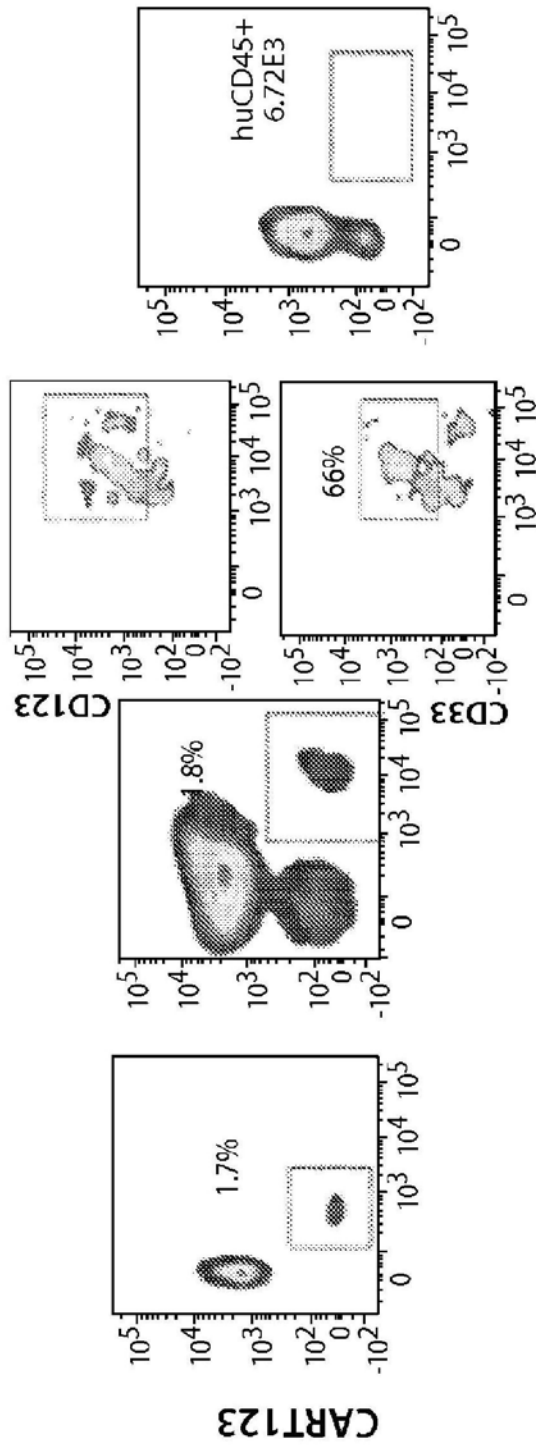


图14-3

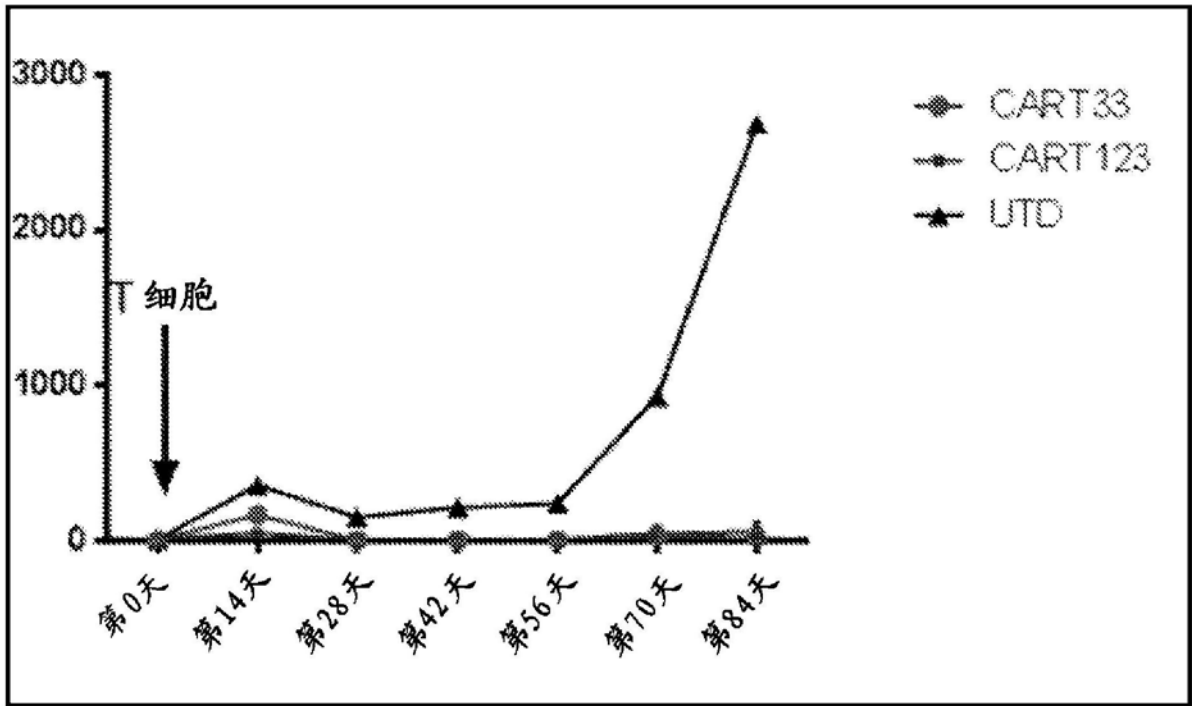


图15

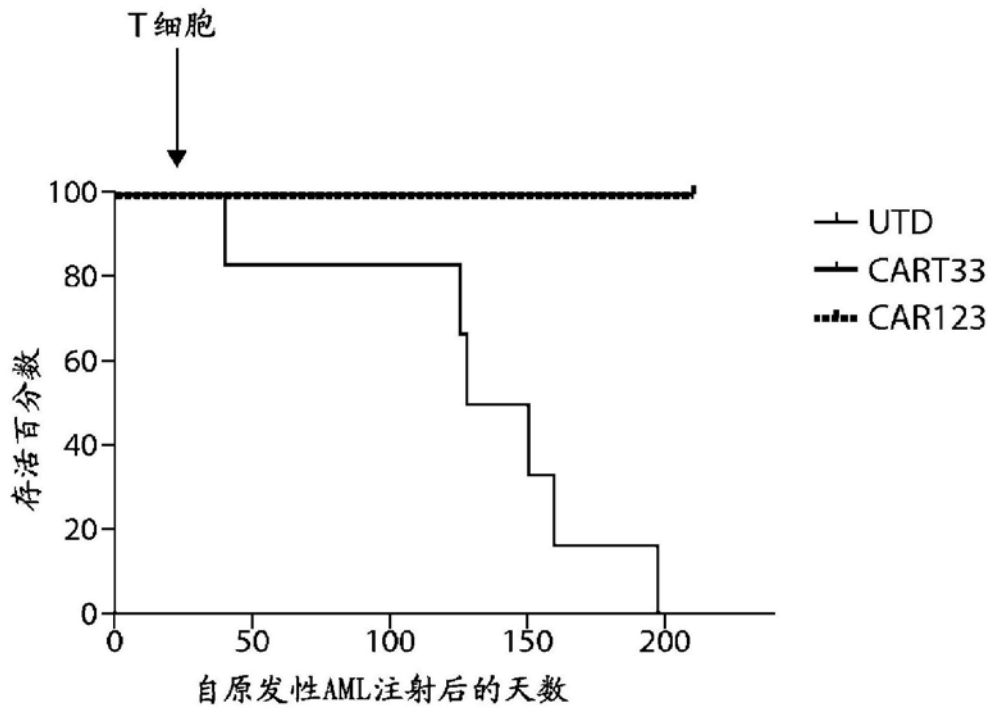


图16

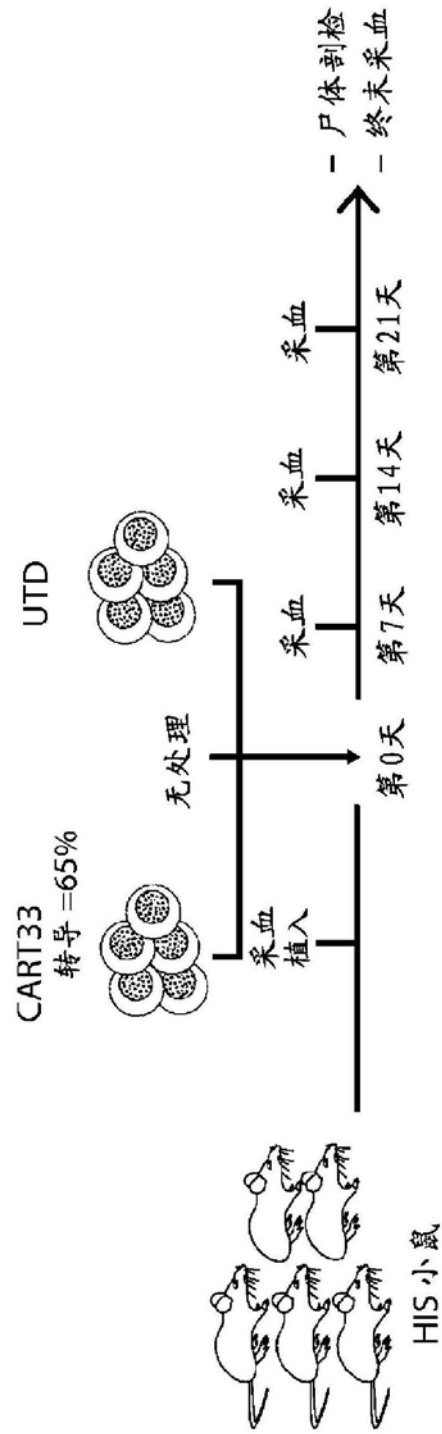


图17

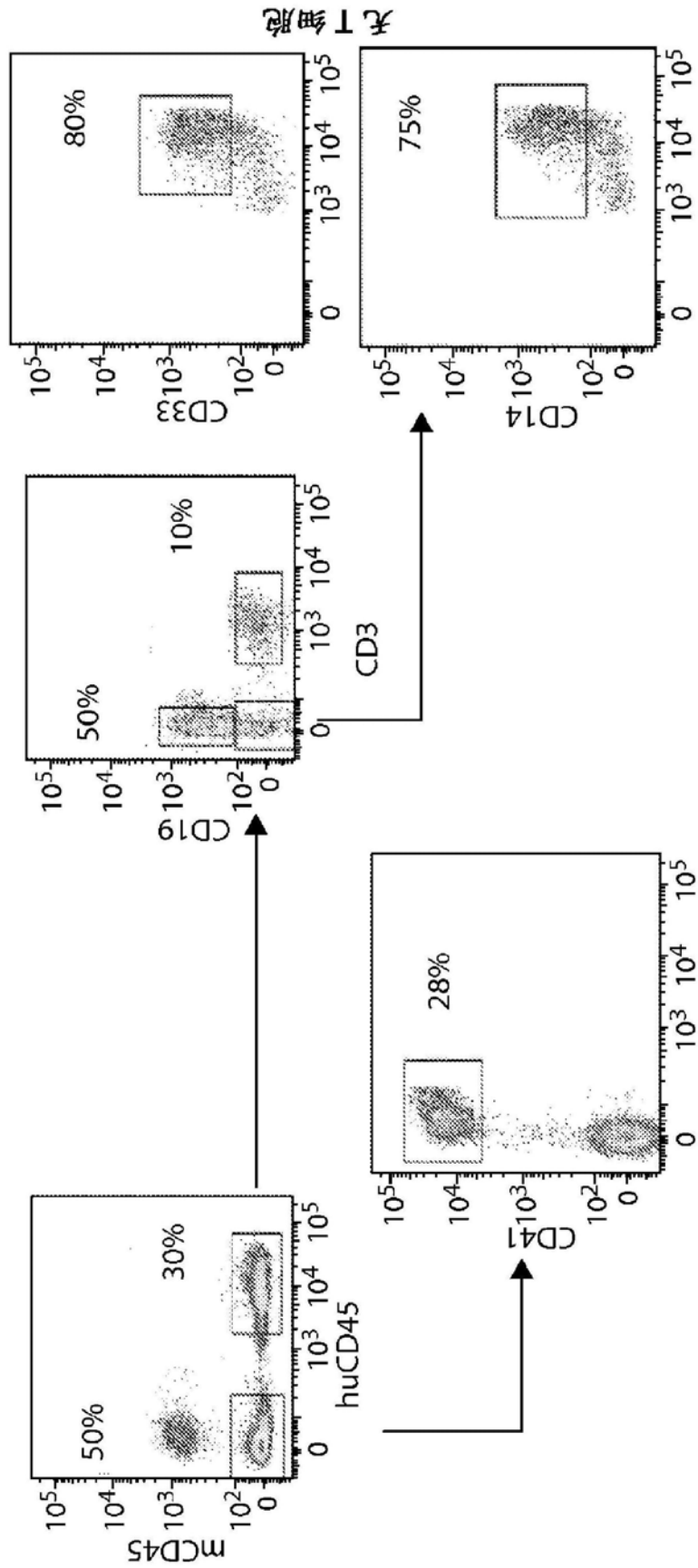


图18-1

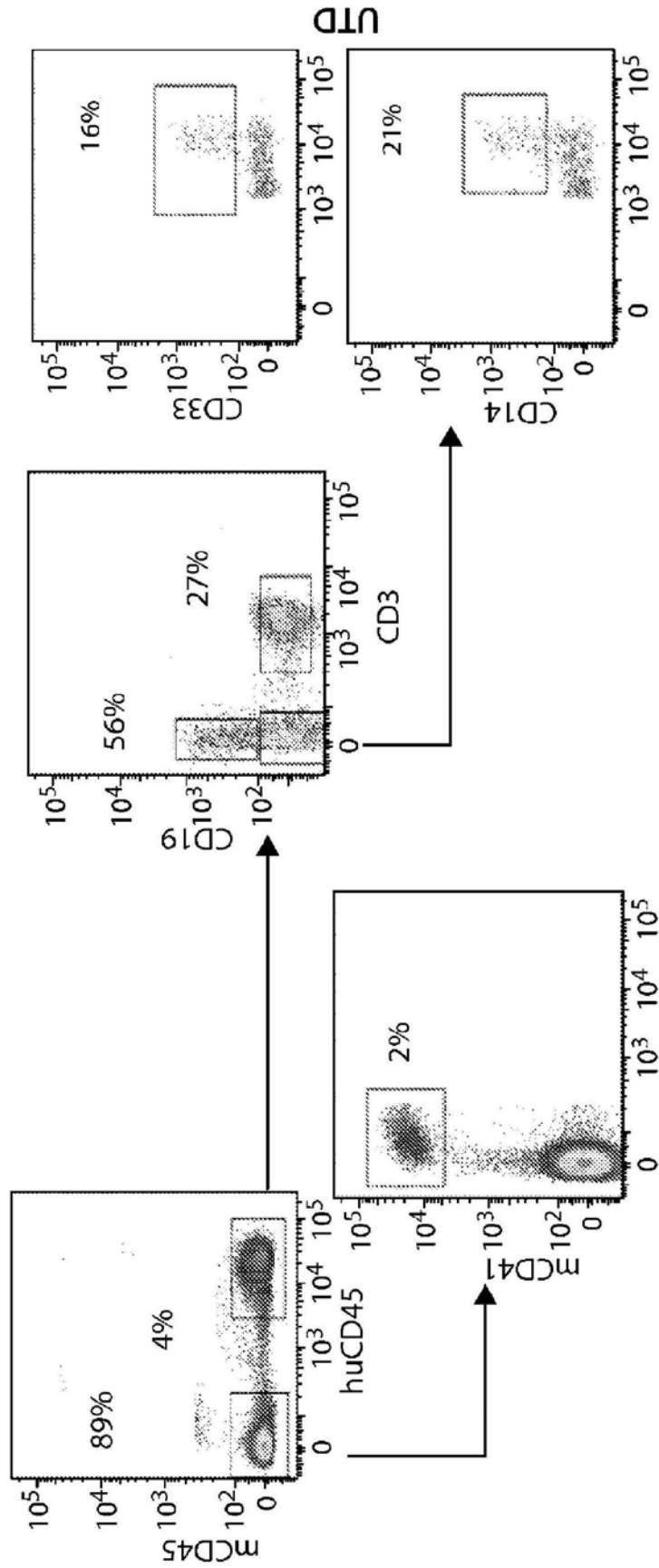


图18-2

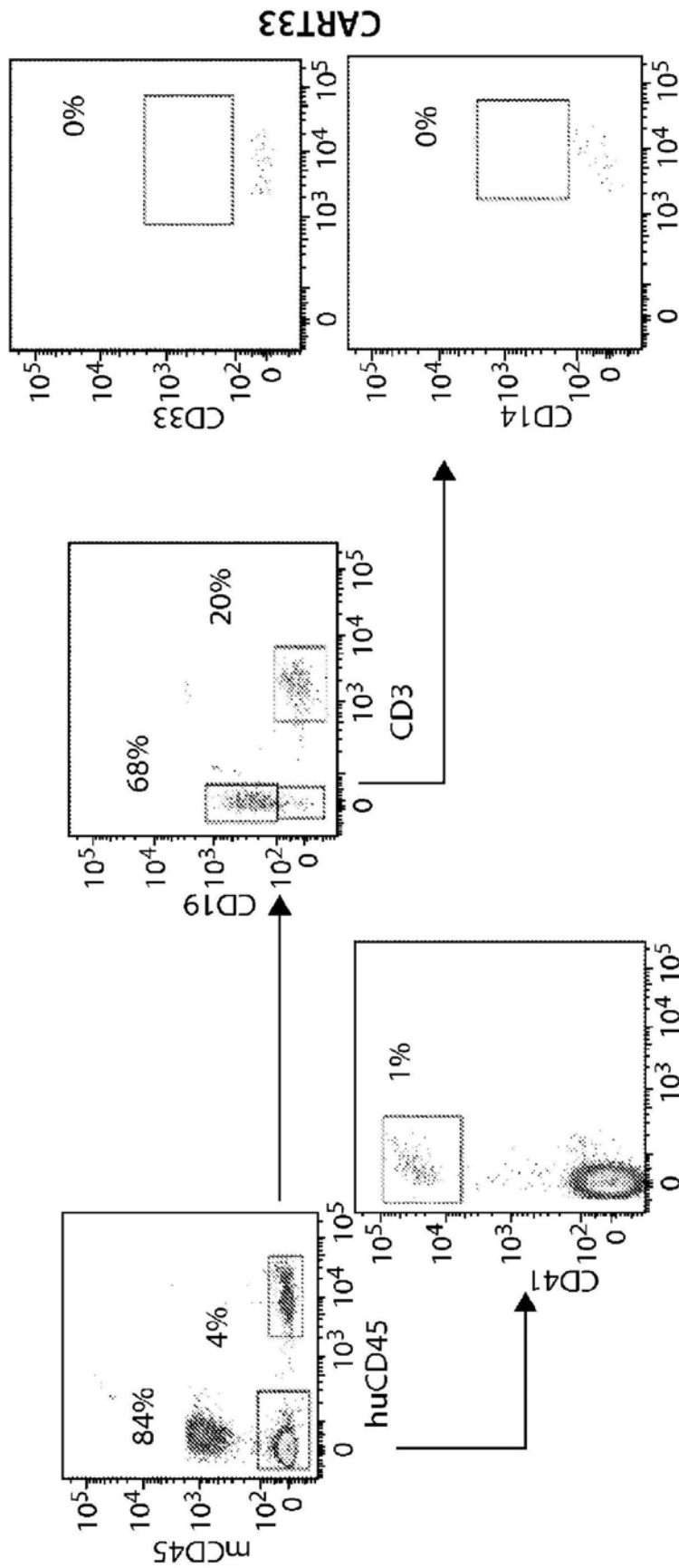


图18-3

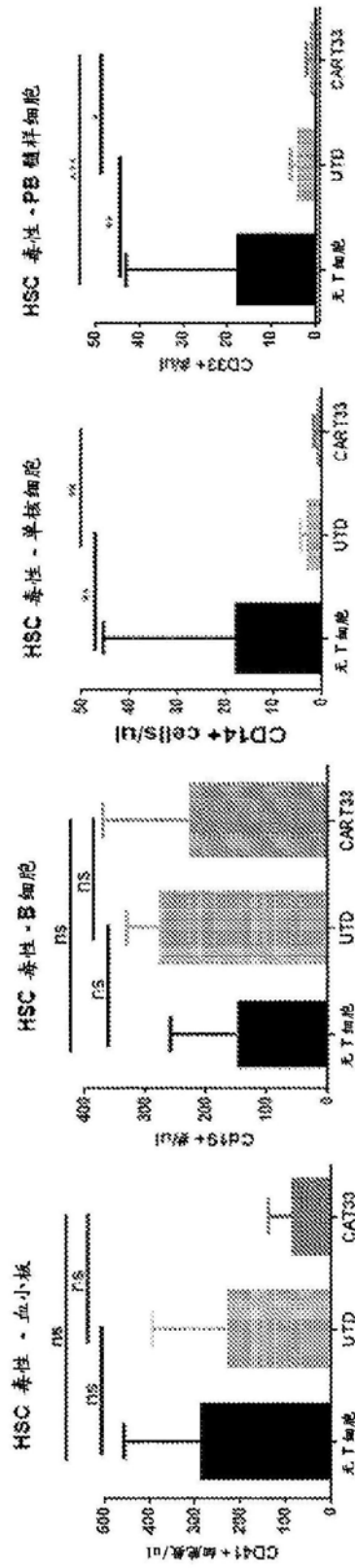


图19

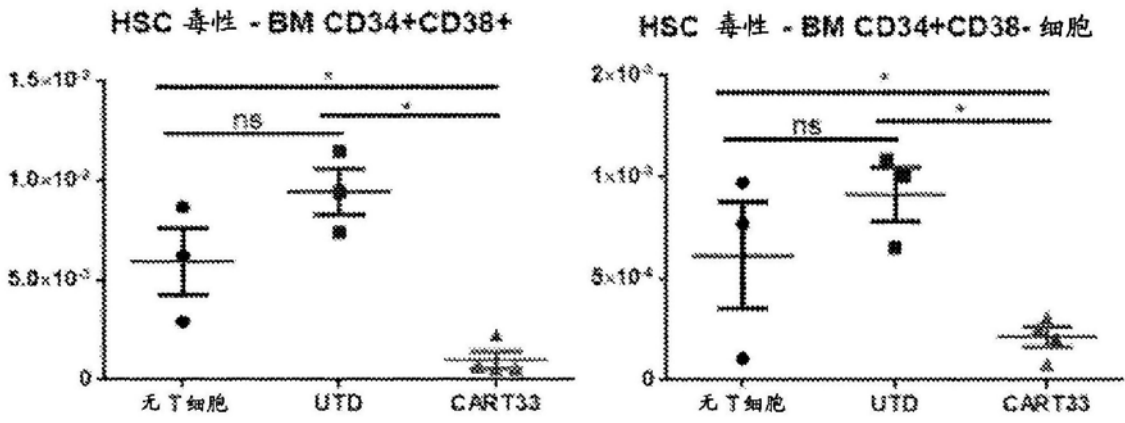


图20

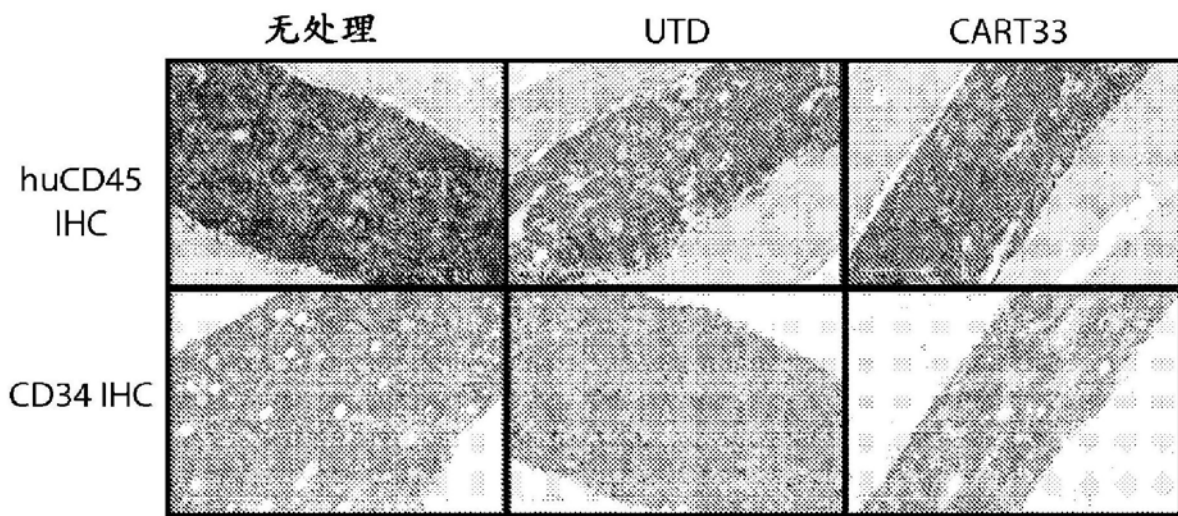


图21

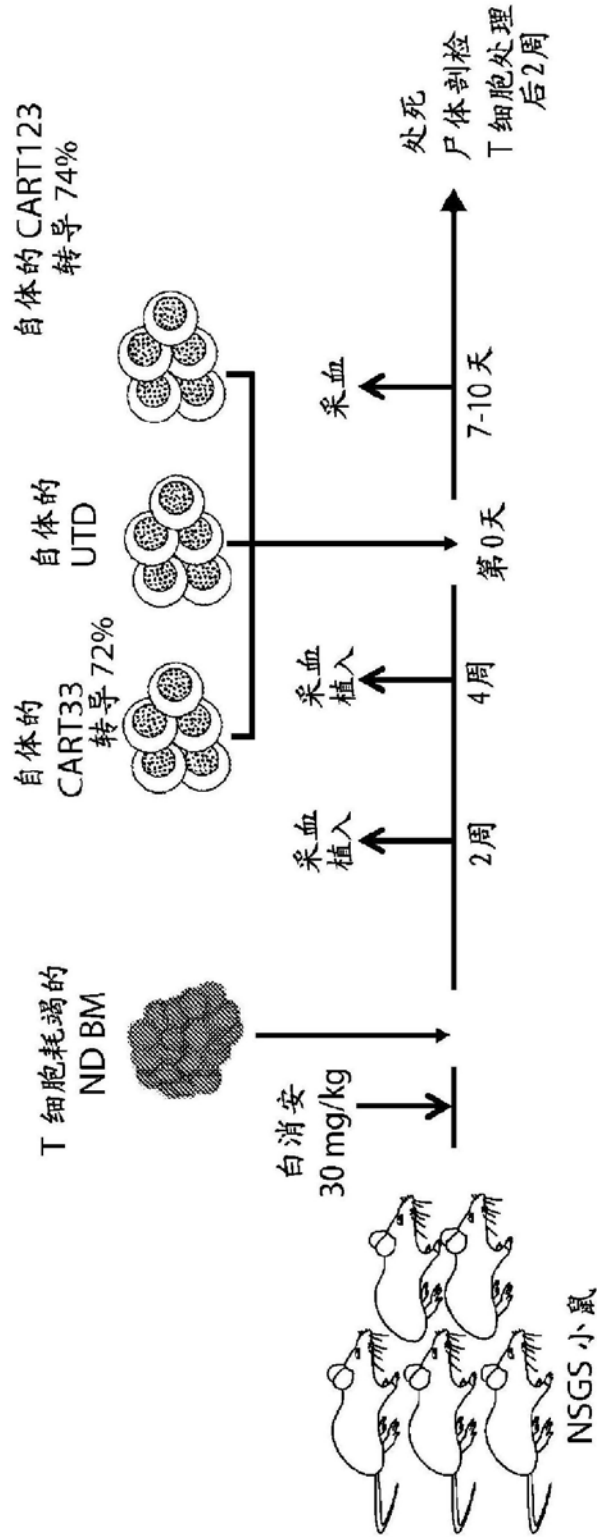


图22

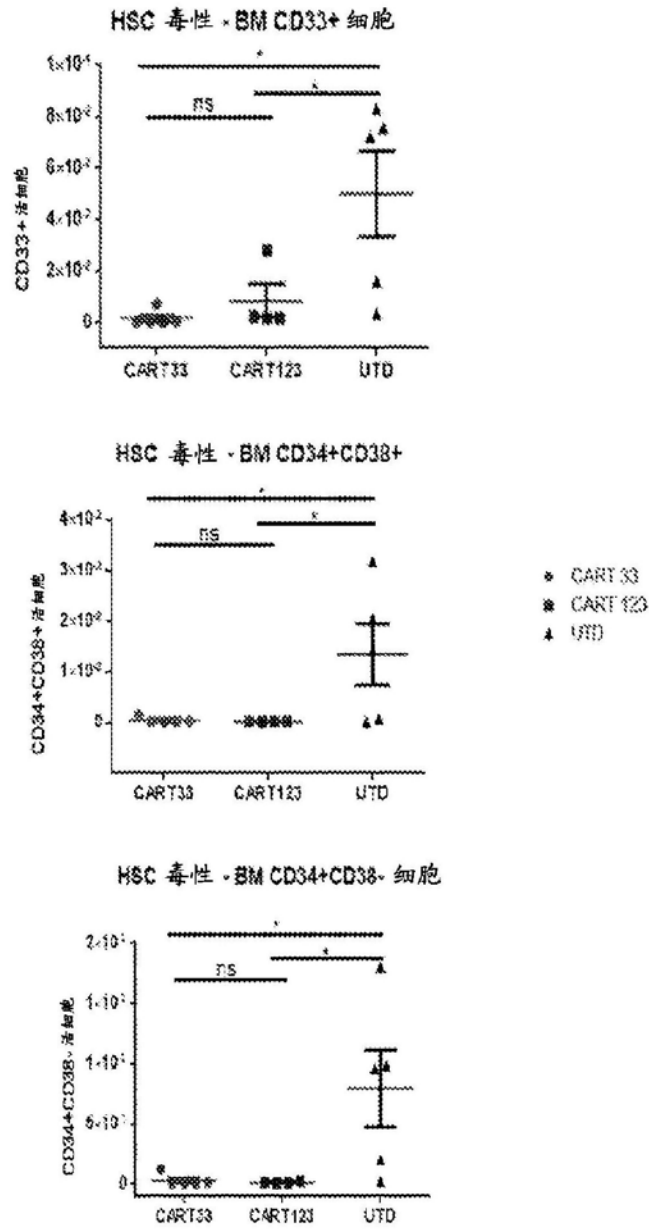


图23

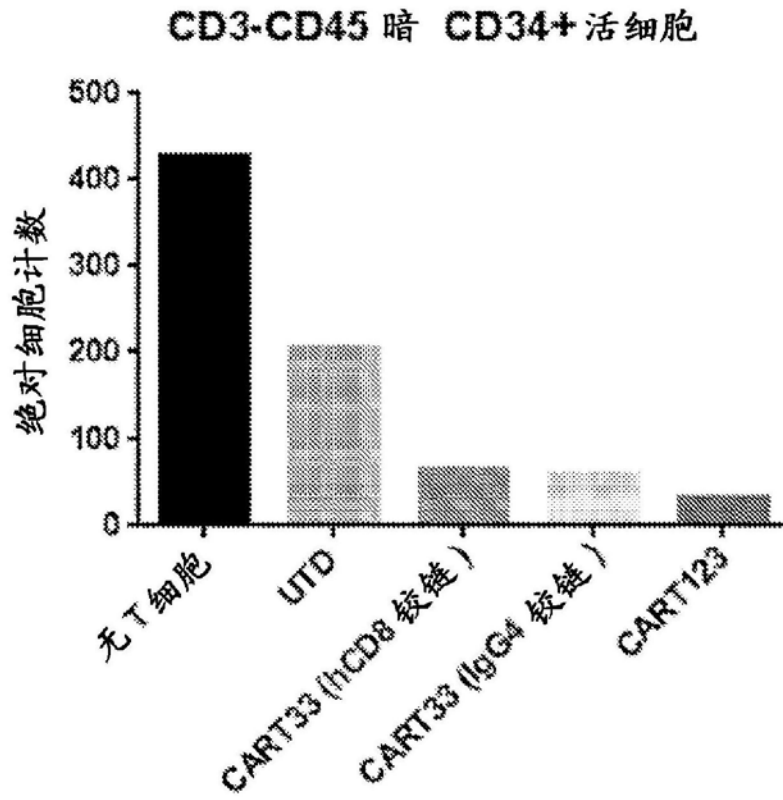


图24

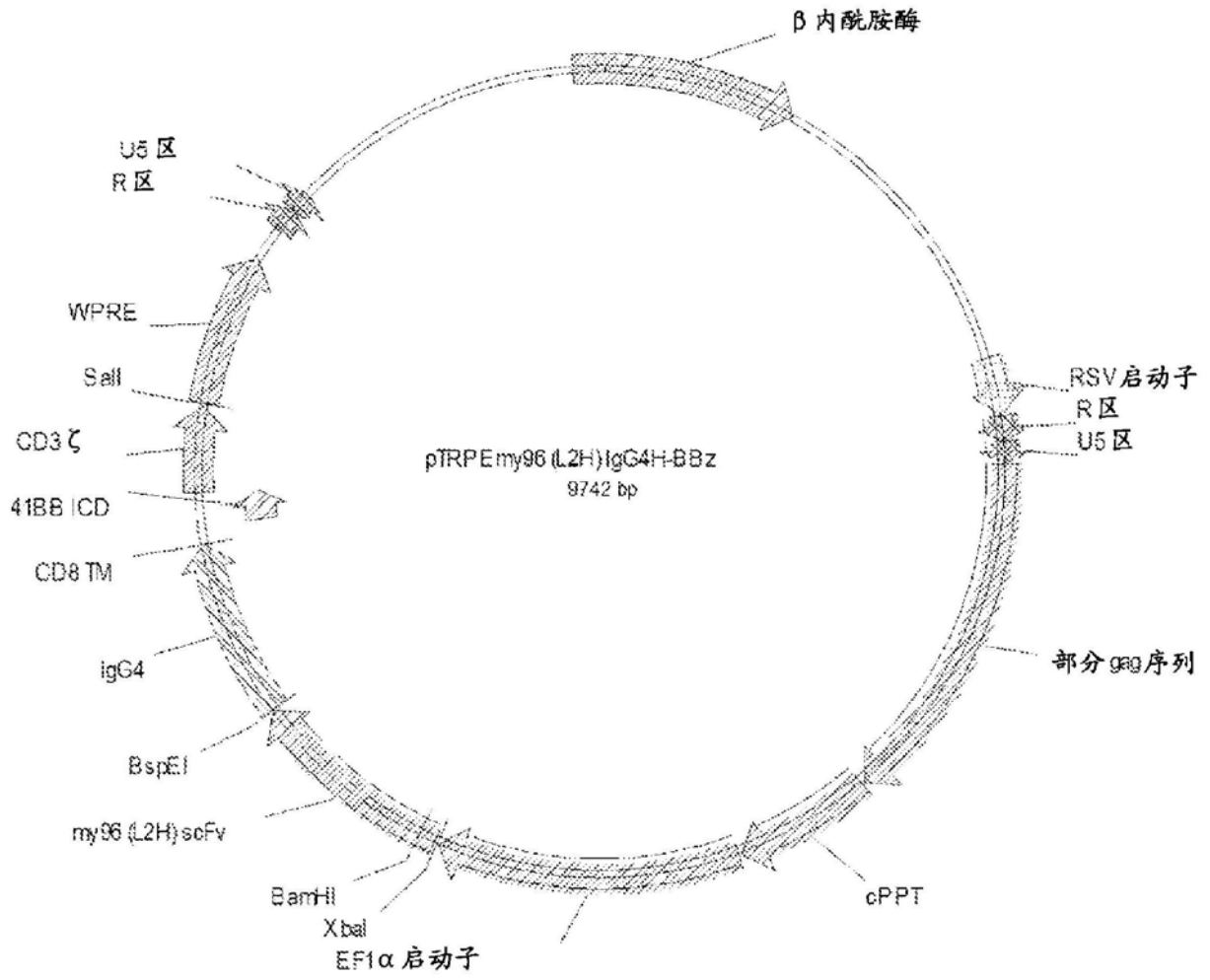


图25

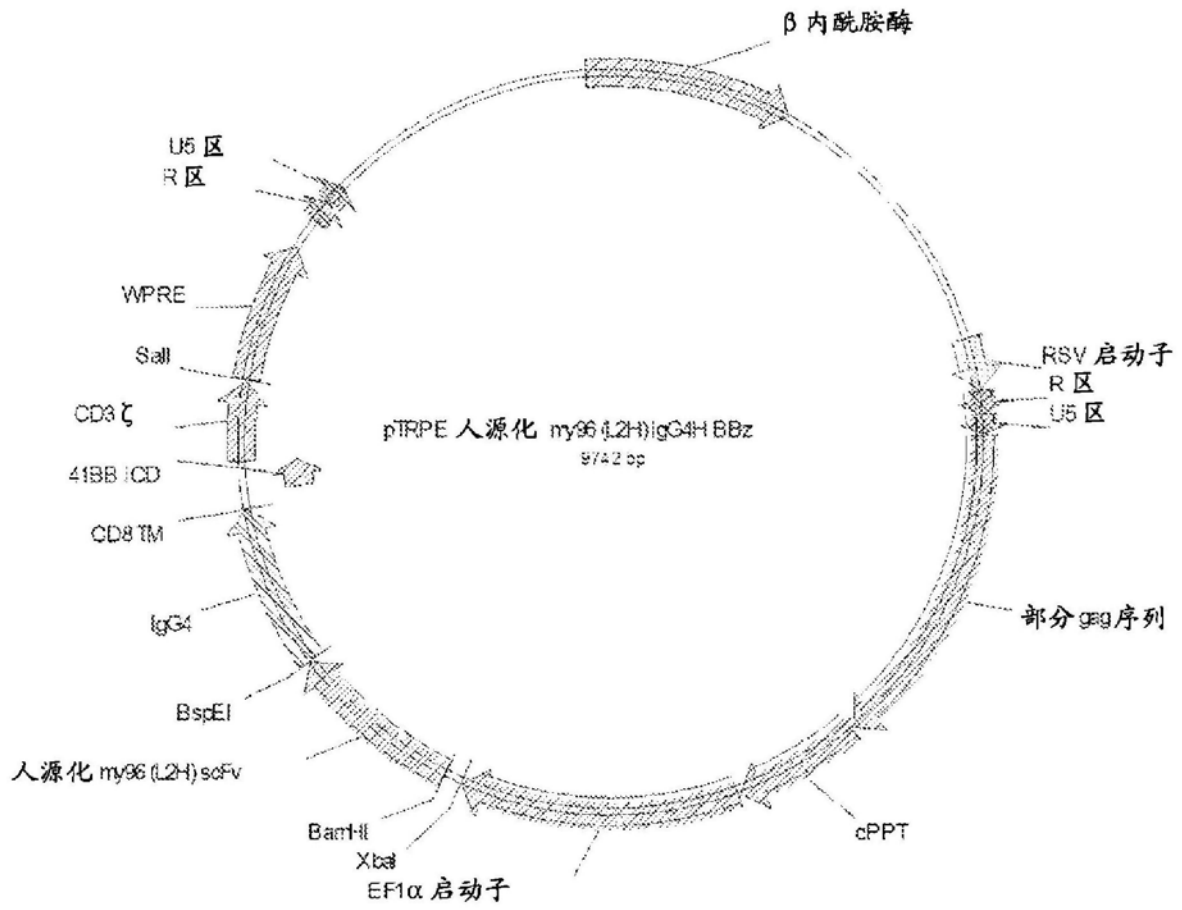


图26

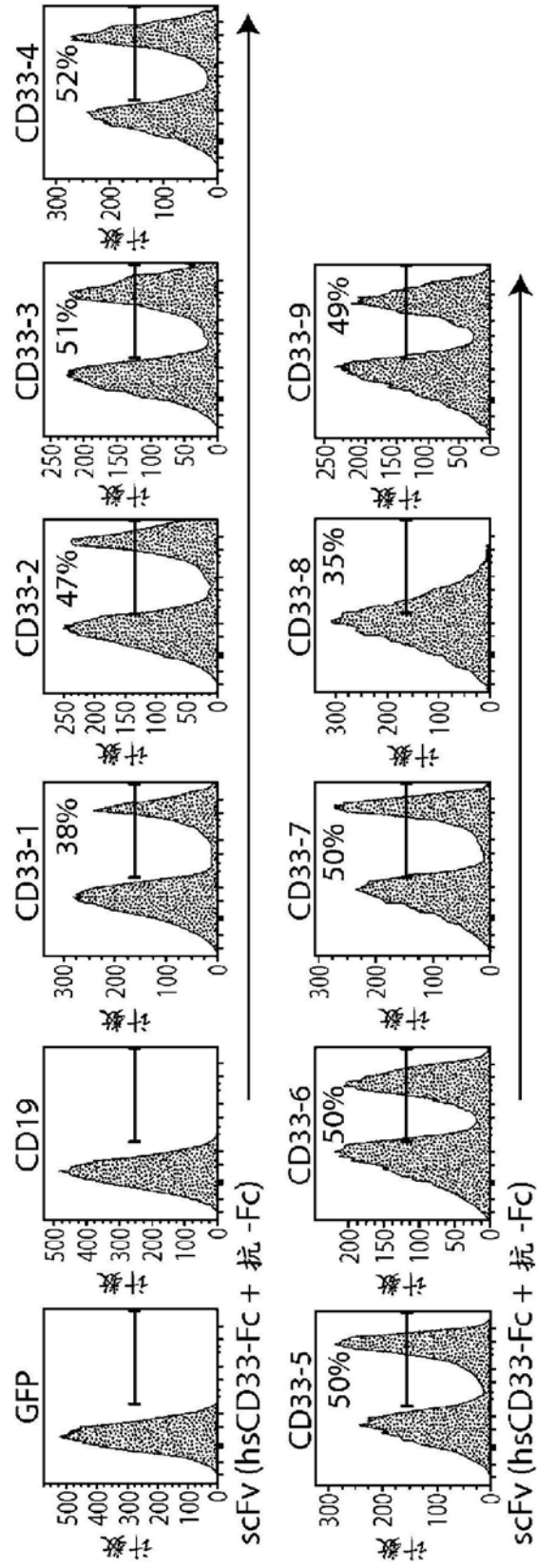


图27

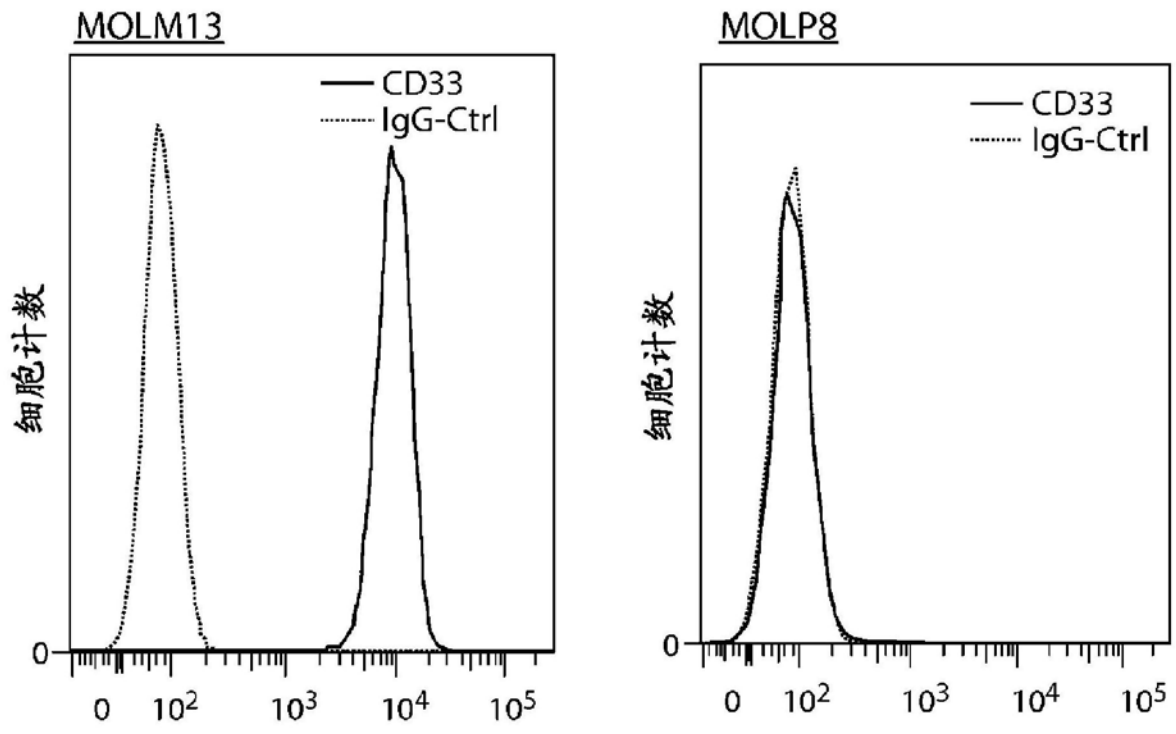


图28A

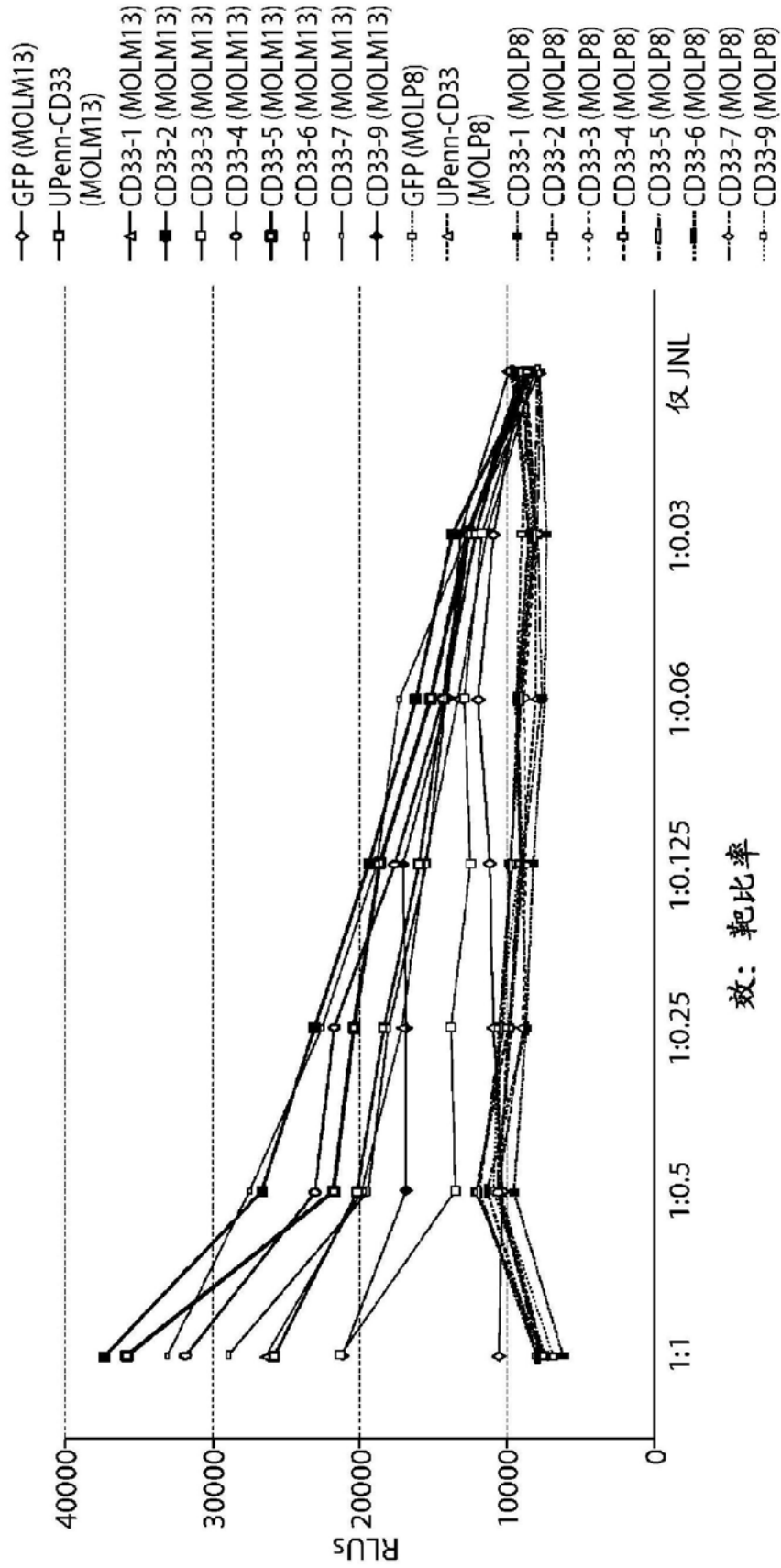


图28B

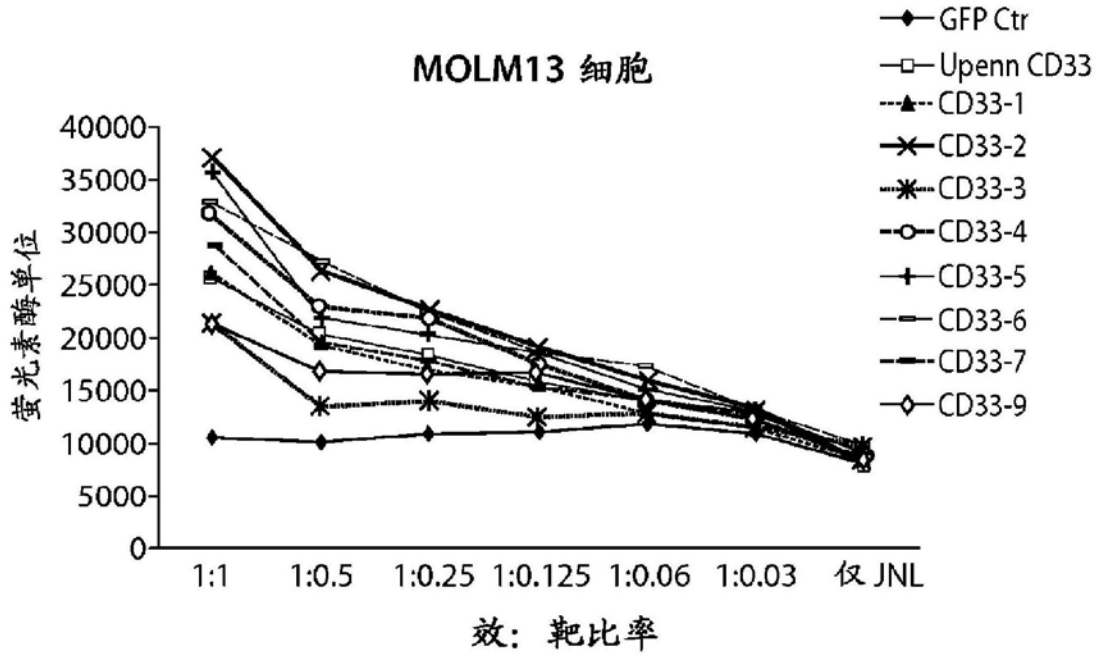


图28C

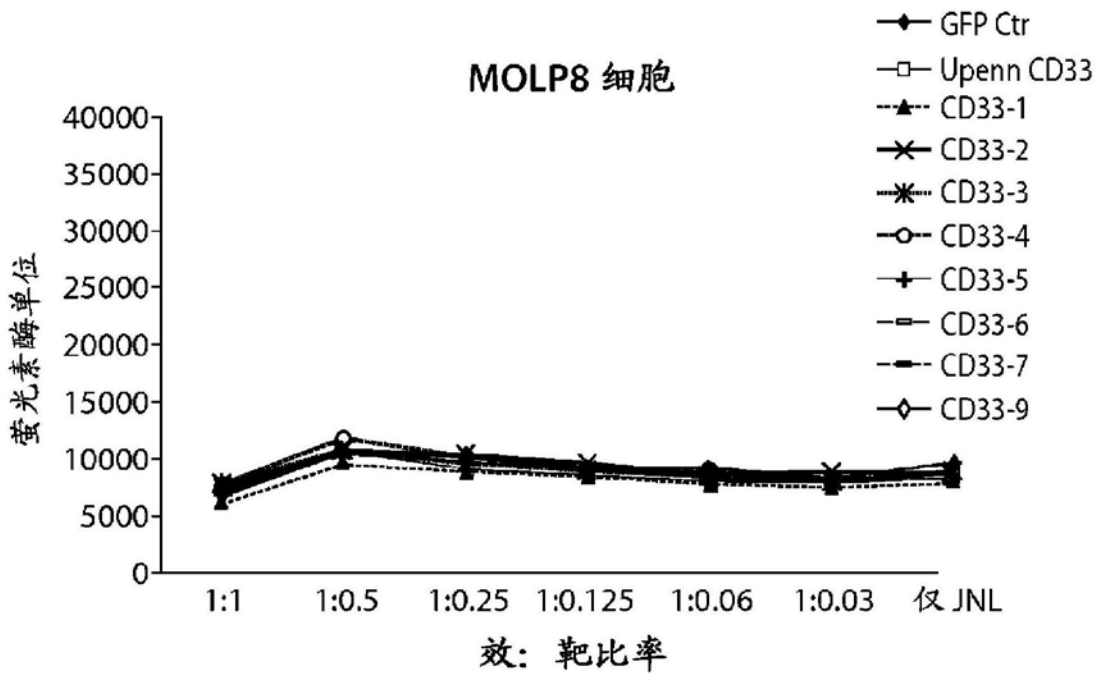


图28D

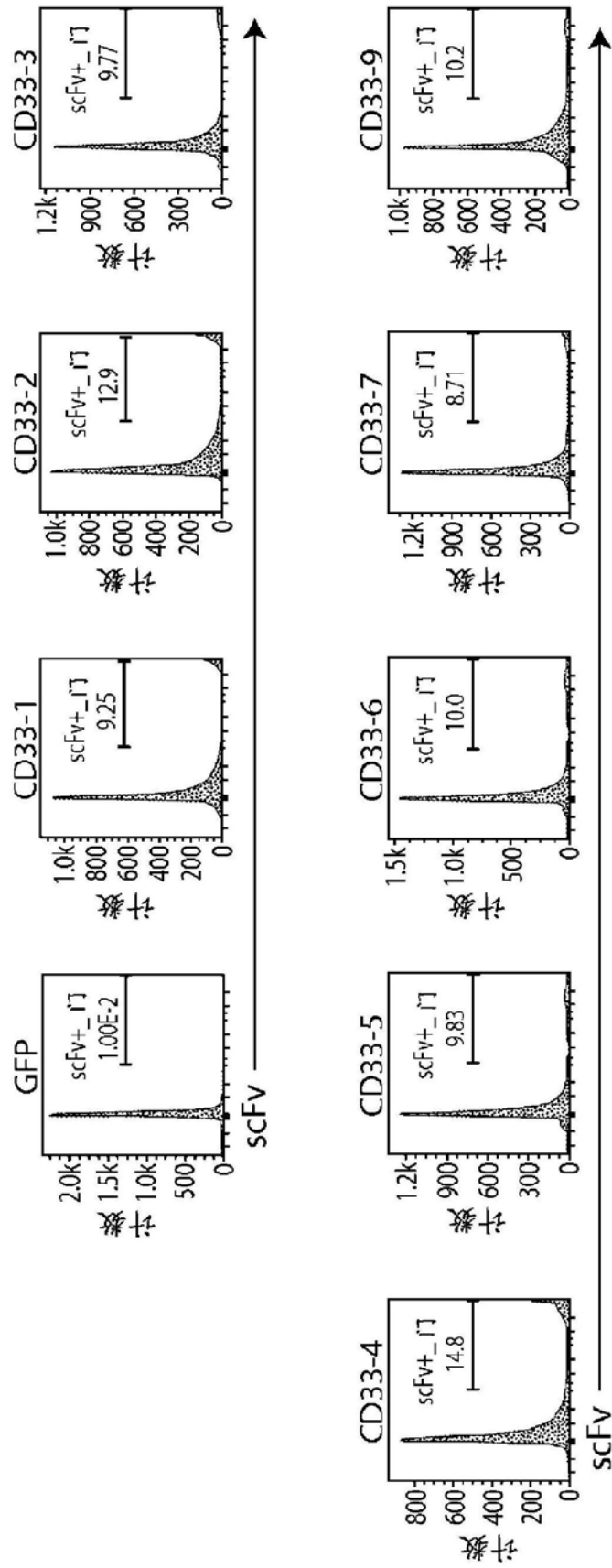


图29A

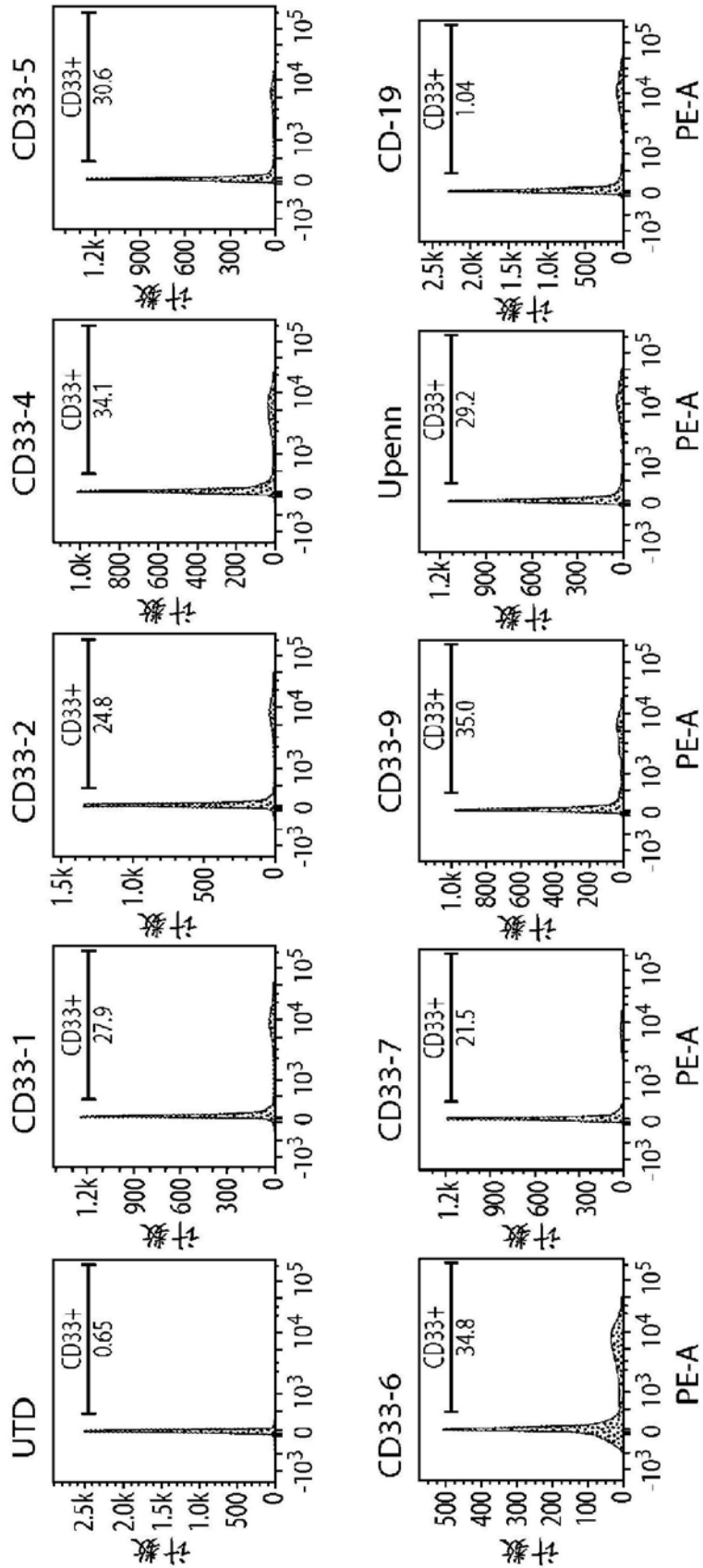


图29B

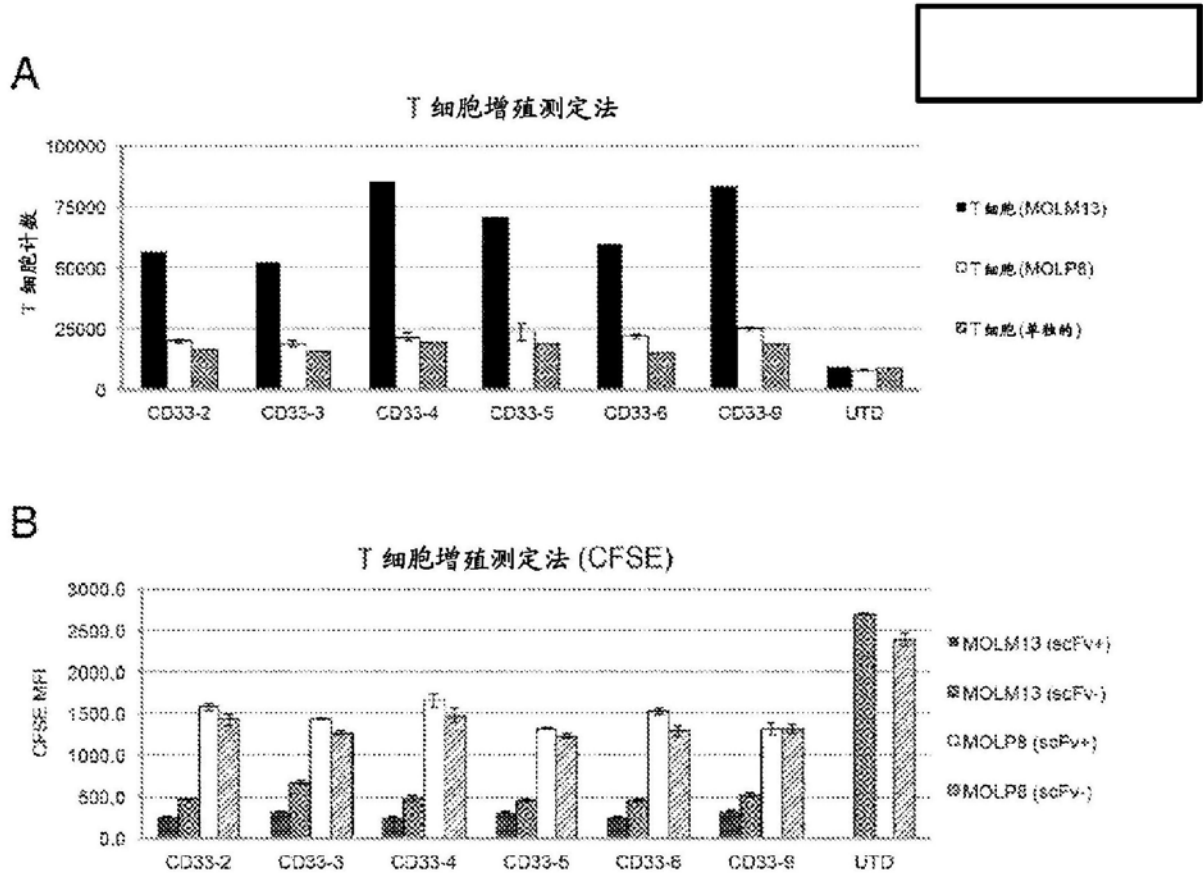


图30

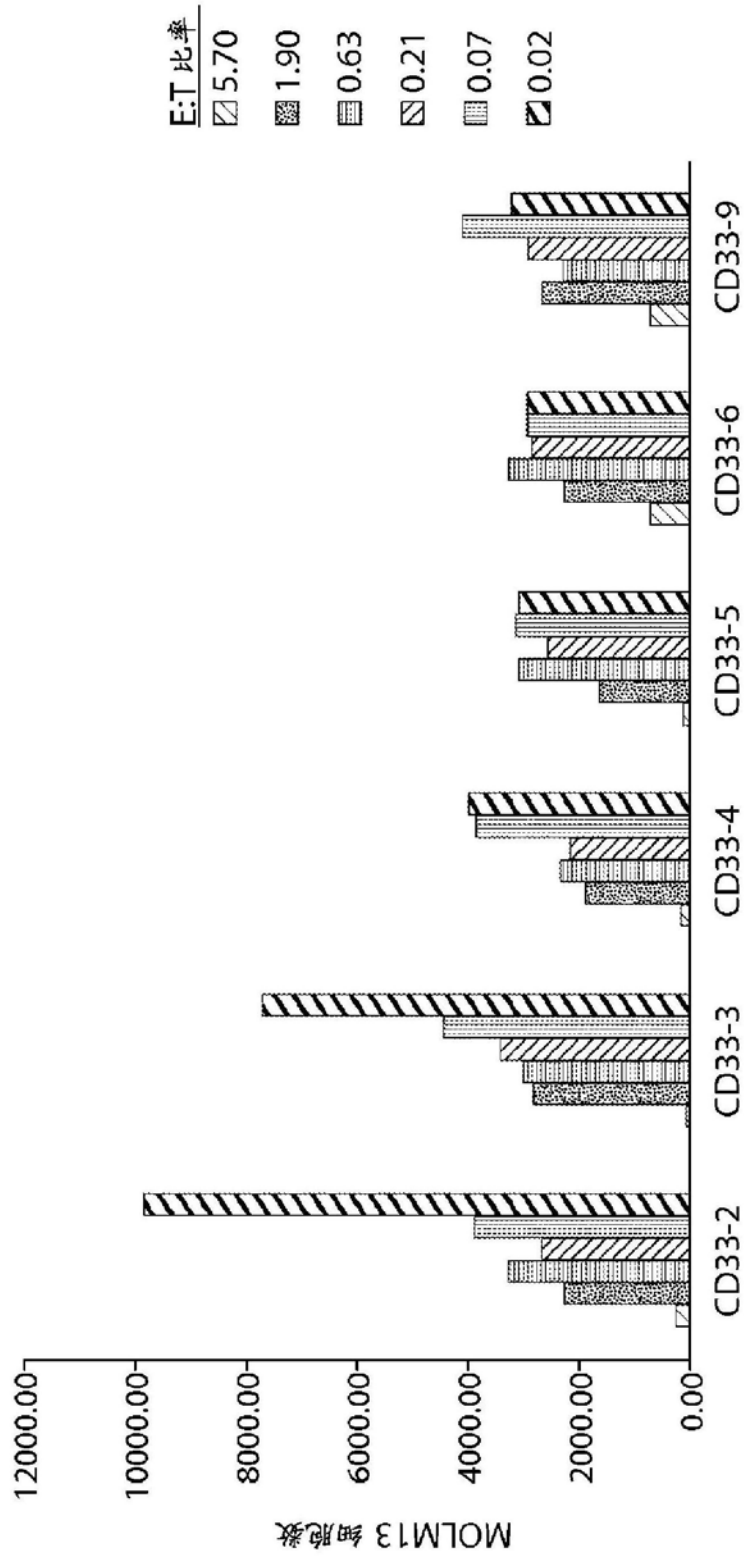


图31

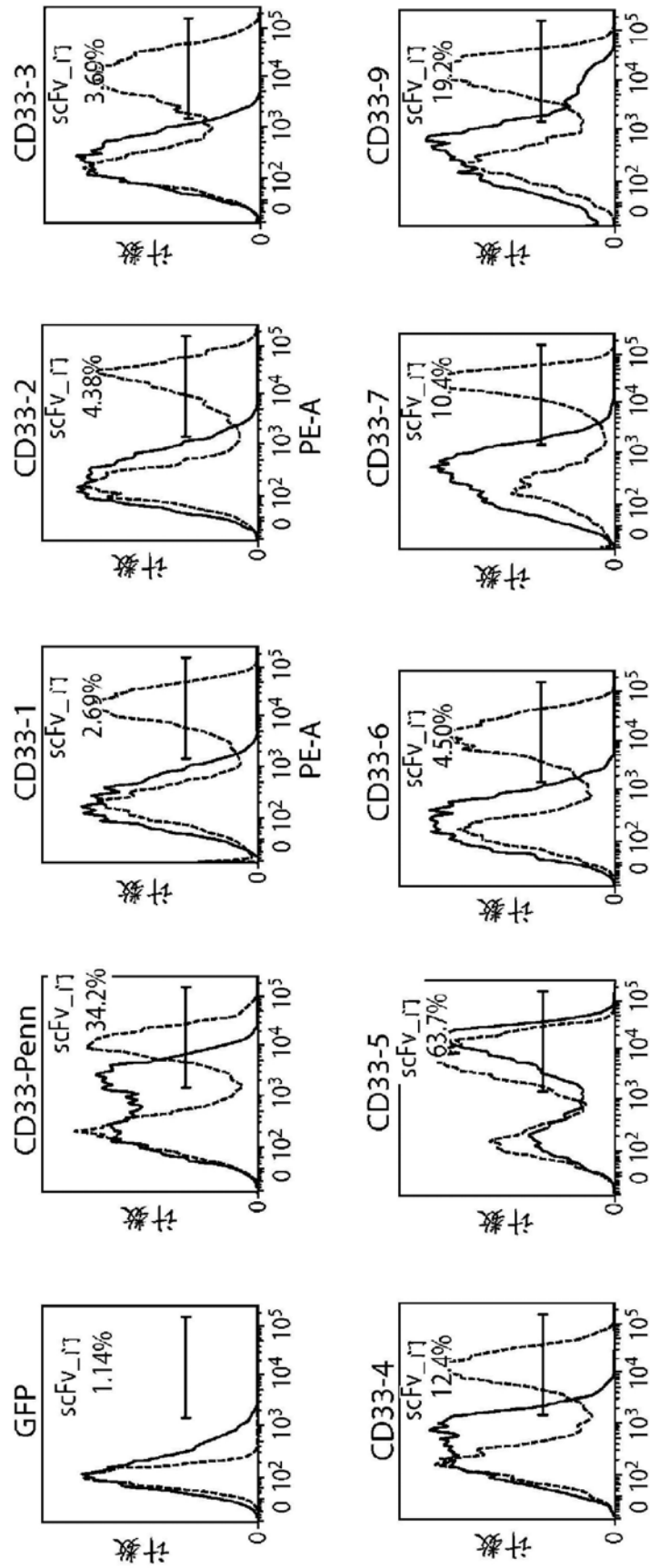


图32

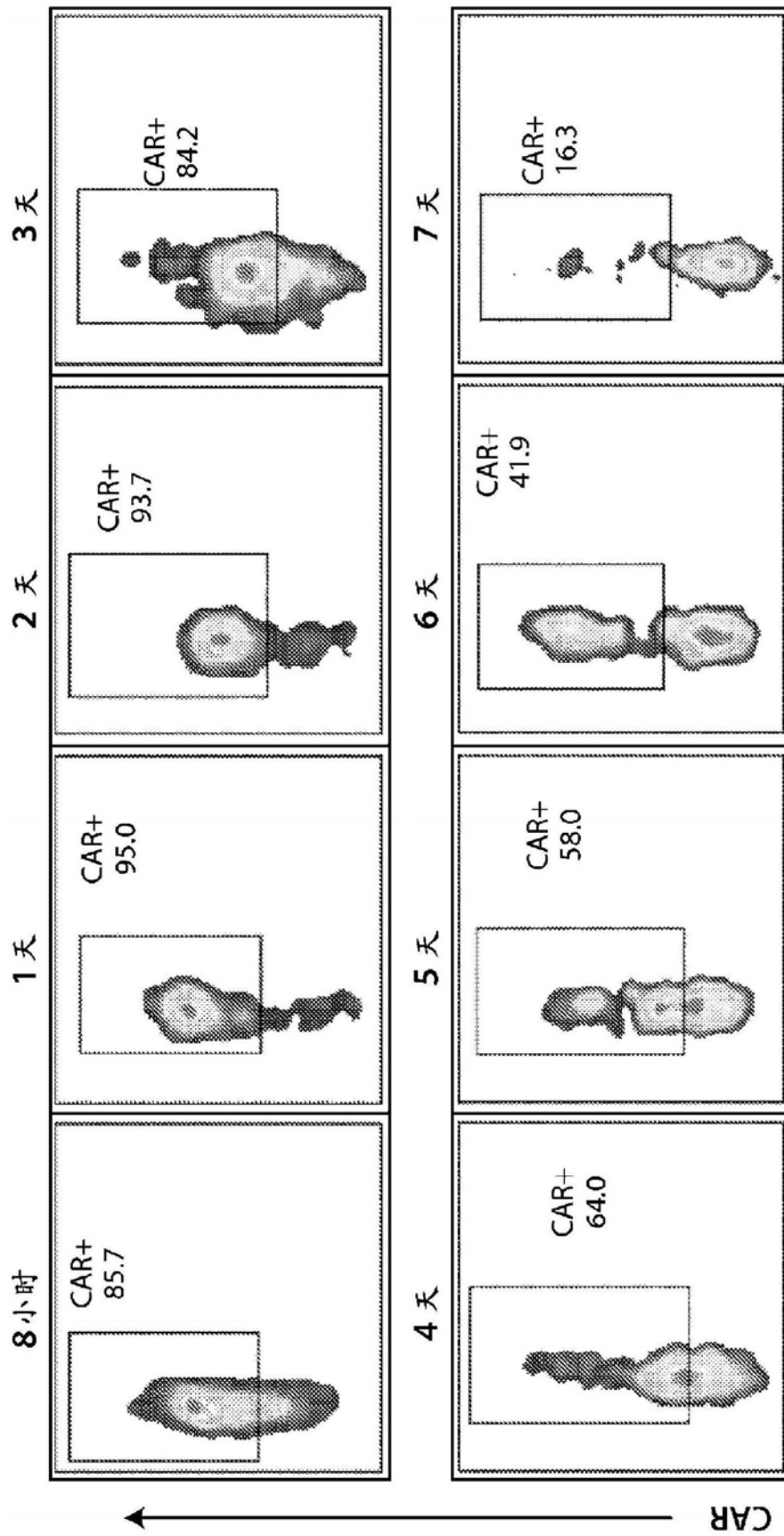


图33A

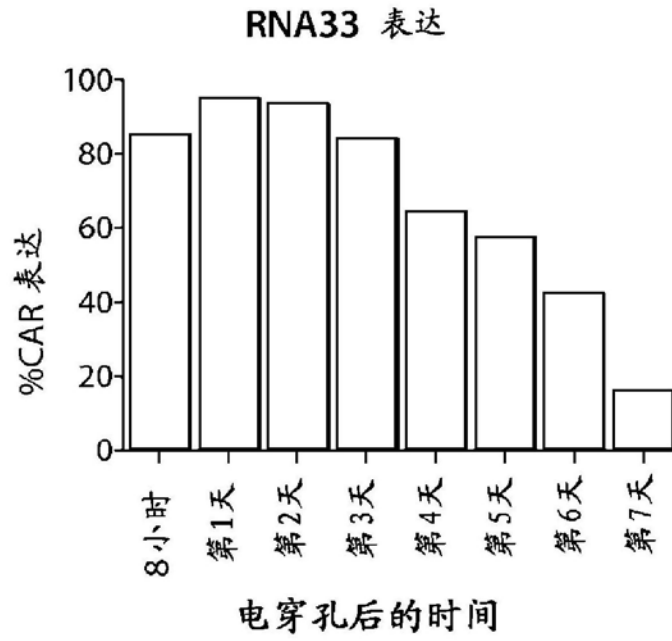


图33B

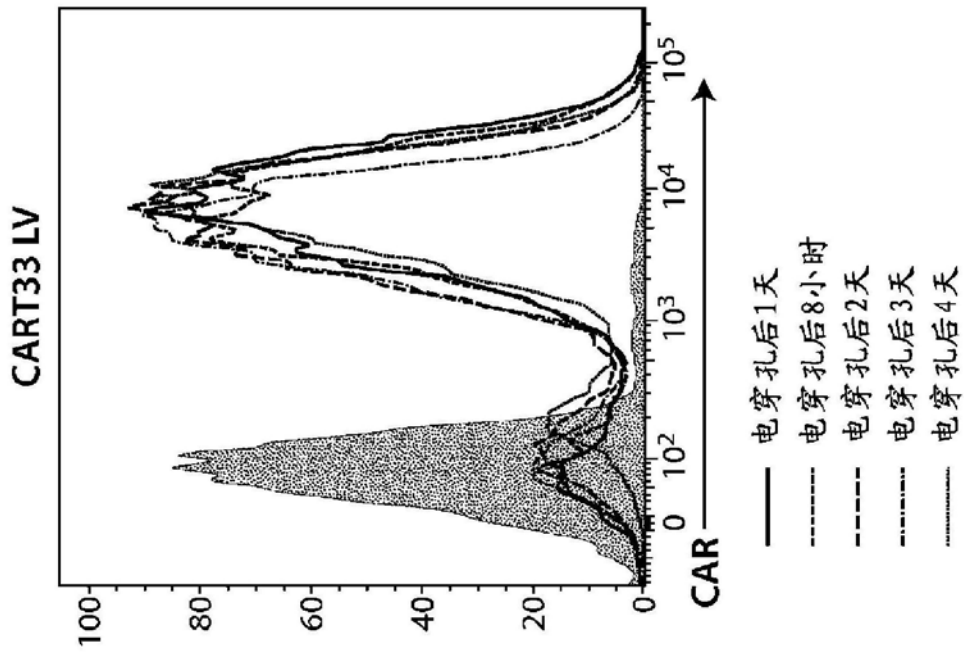


图34A

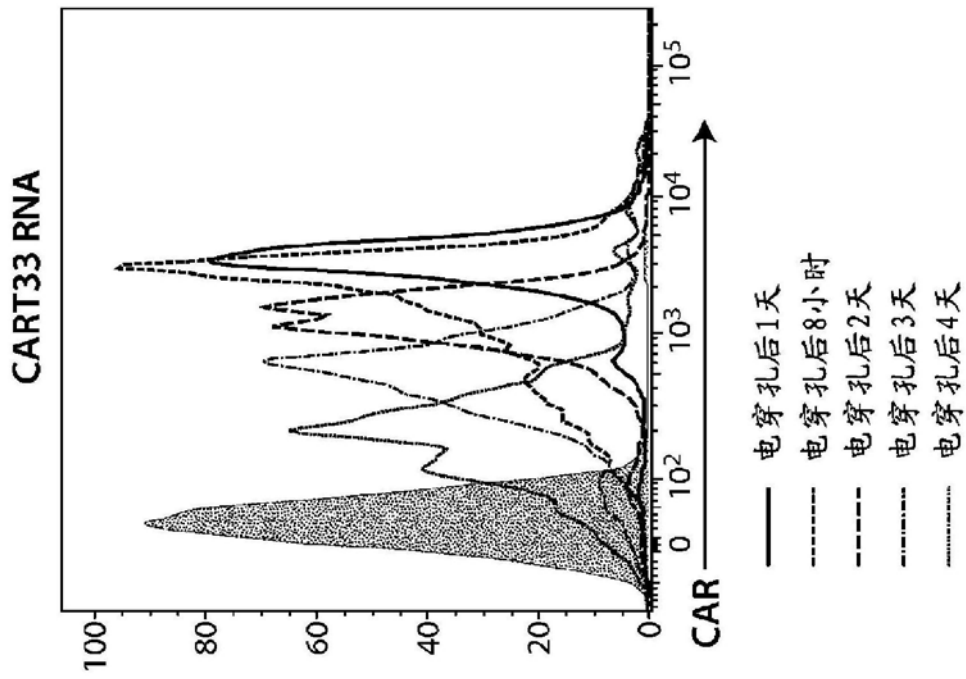


图34B

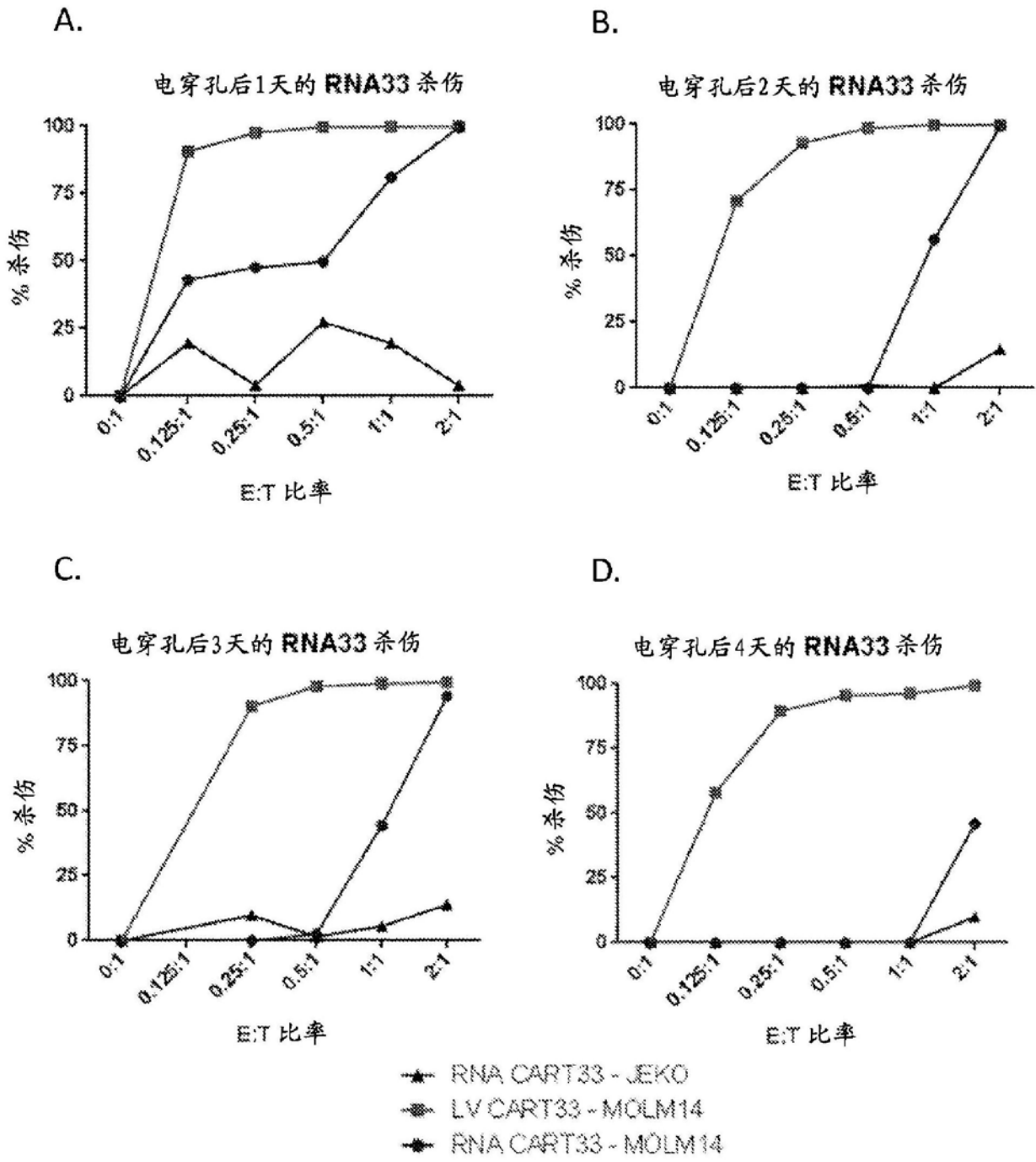


图35

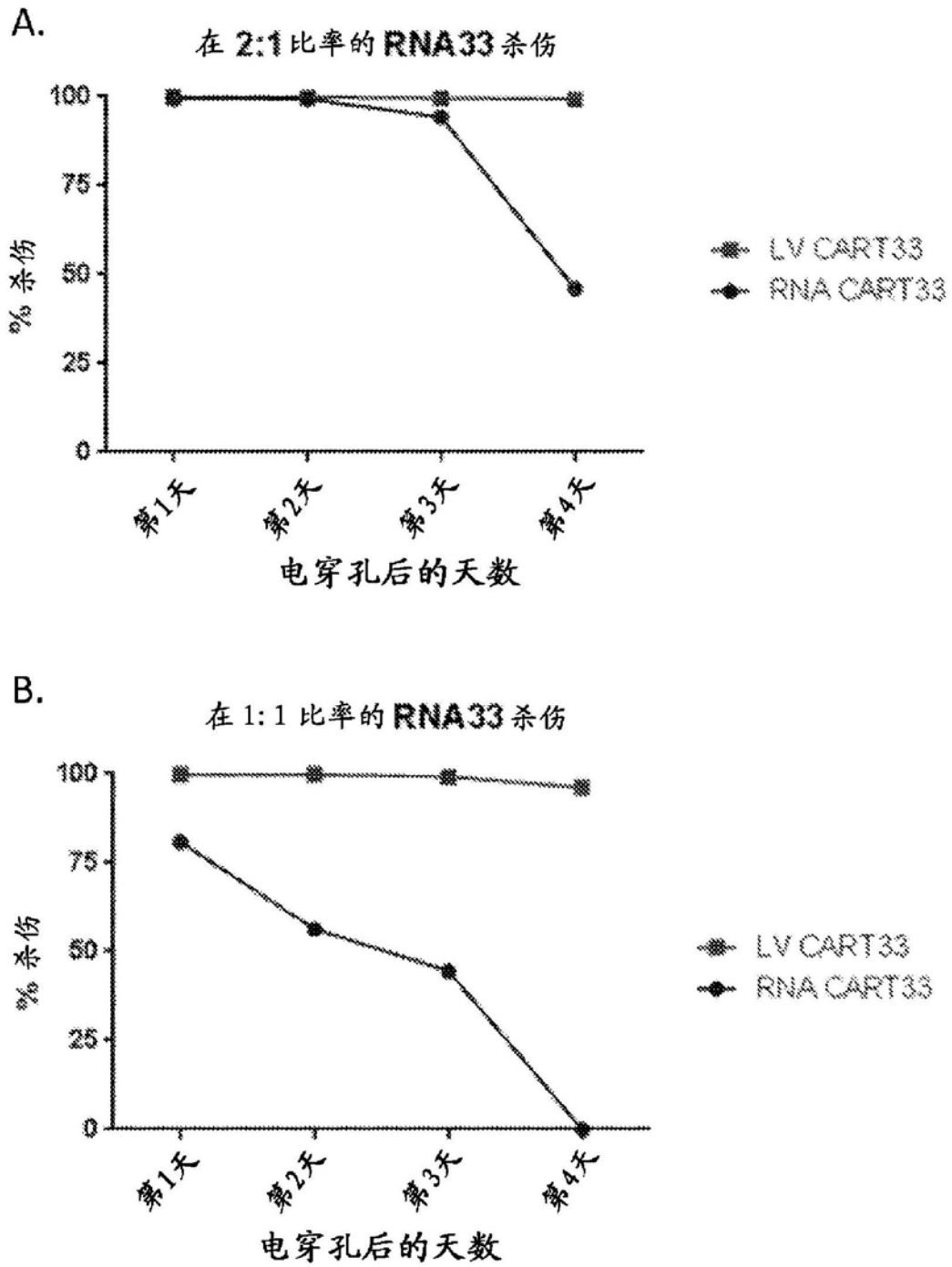


图36

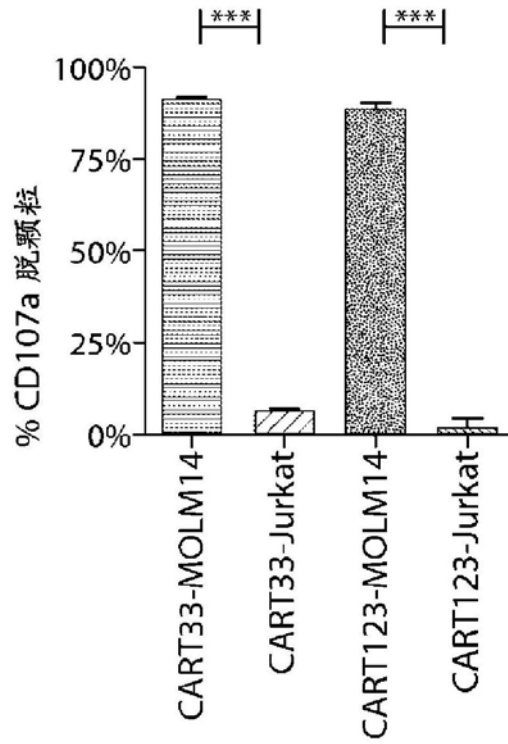


图37A

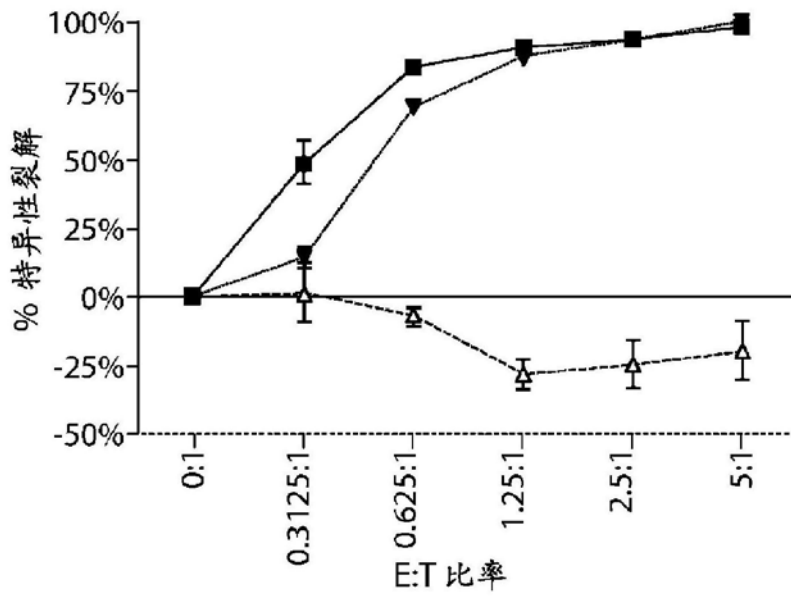


图37B

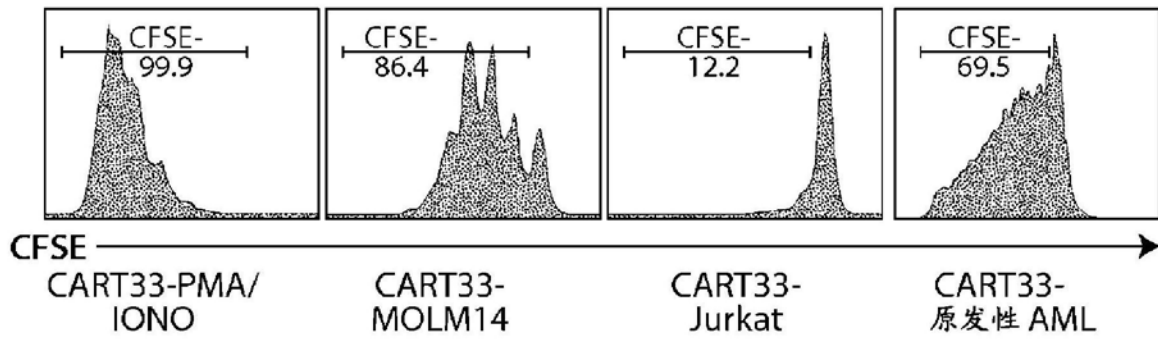


图37C

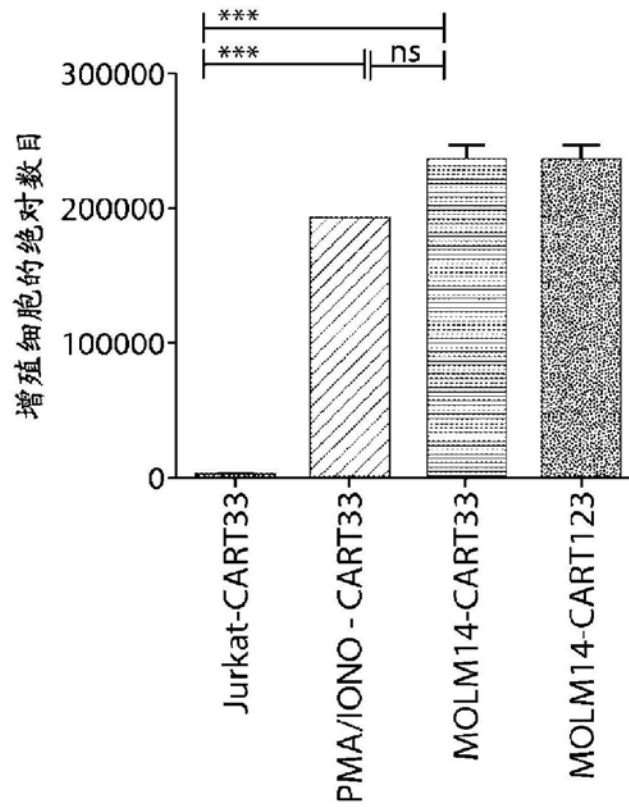


图37D

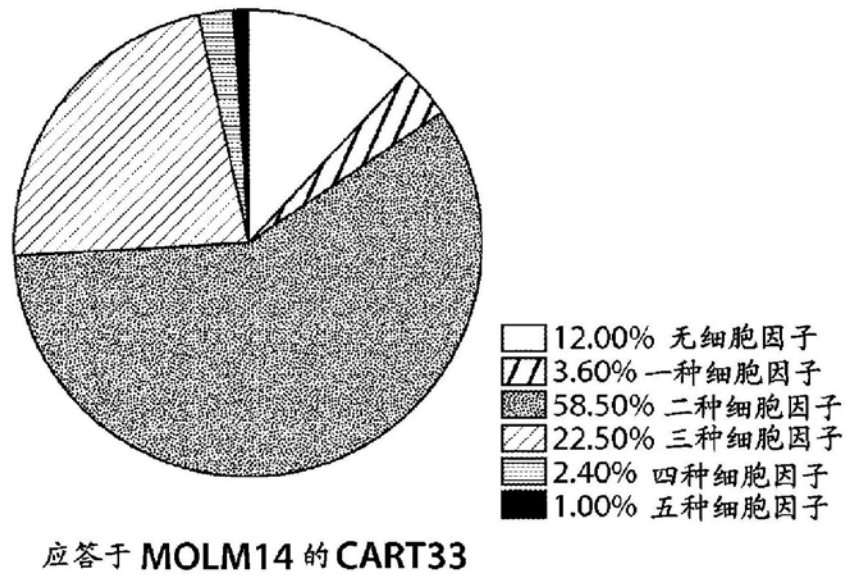


图38A

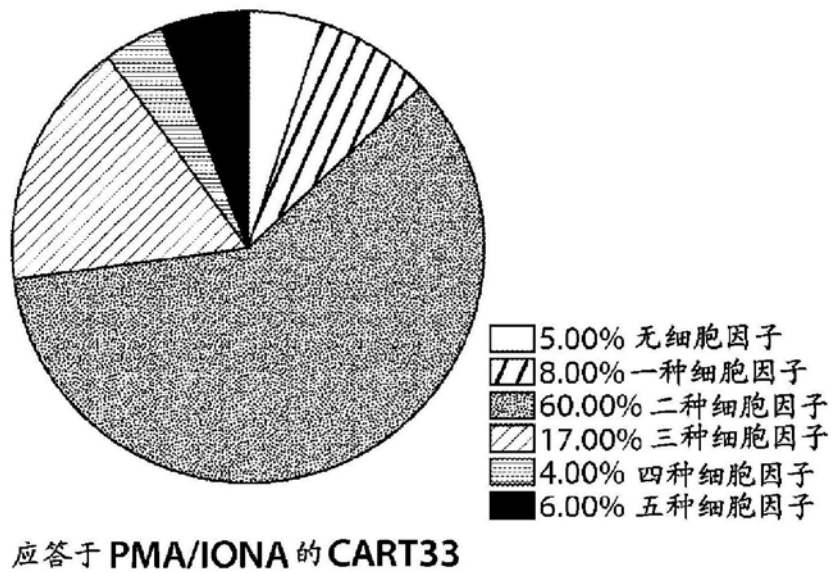


图38B

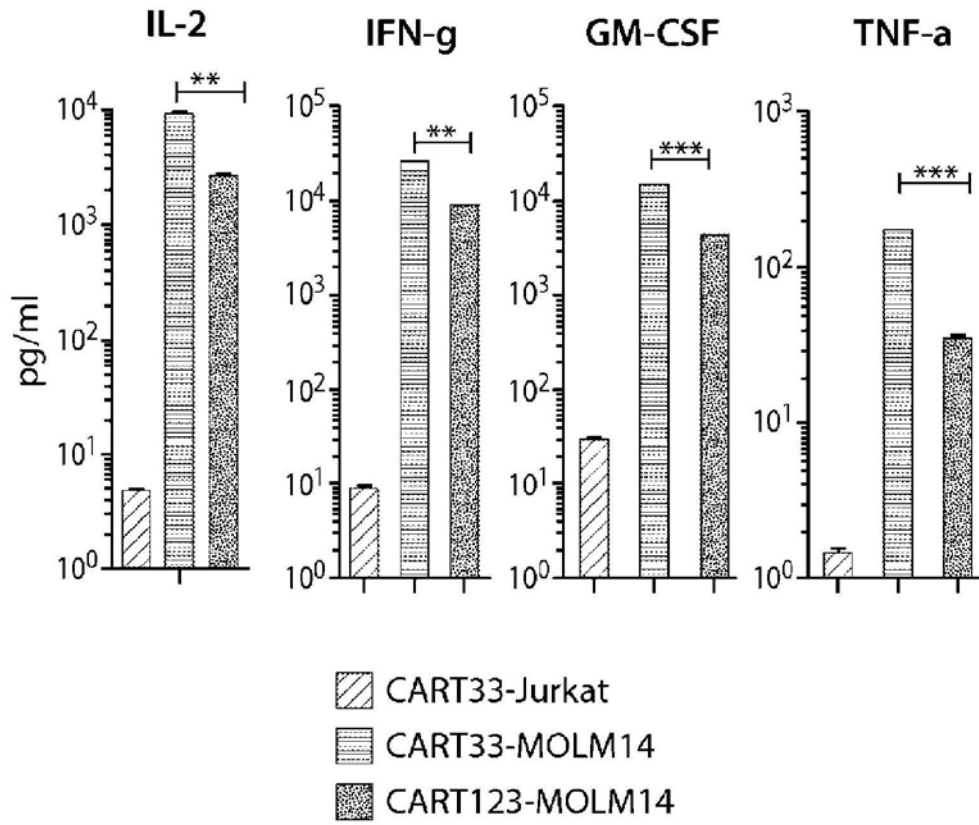


图38C

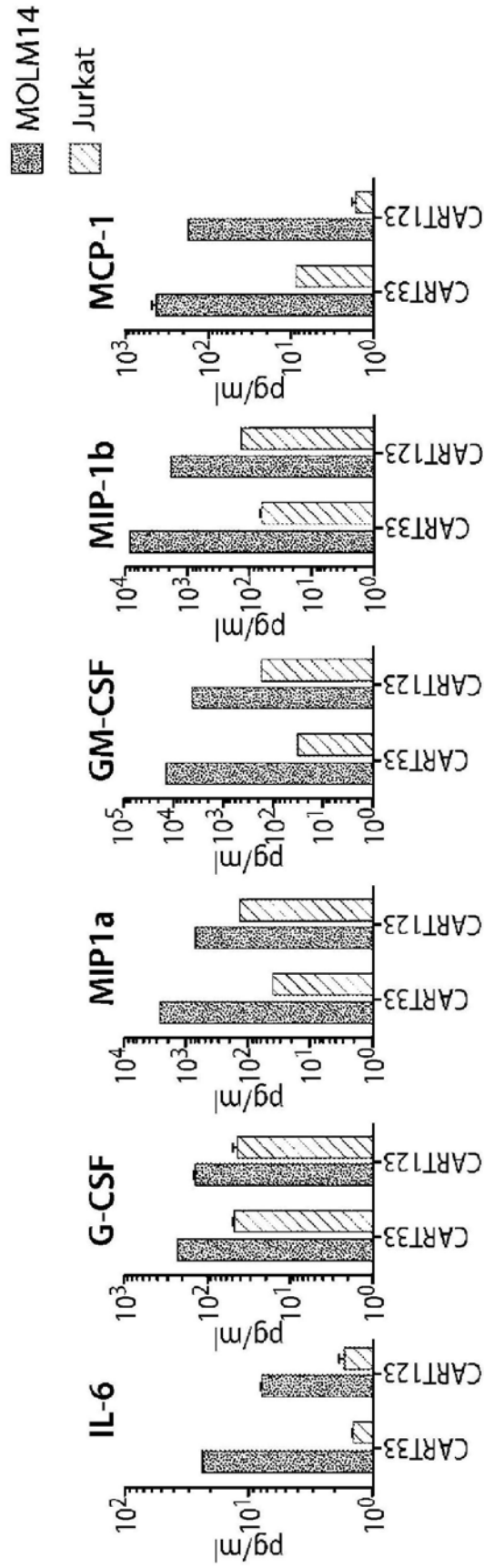


图39-1

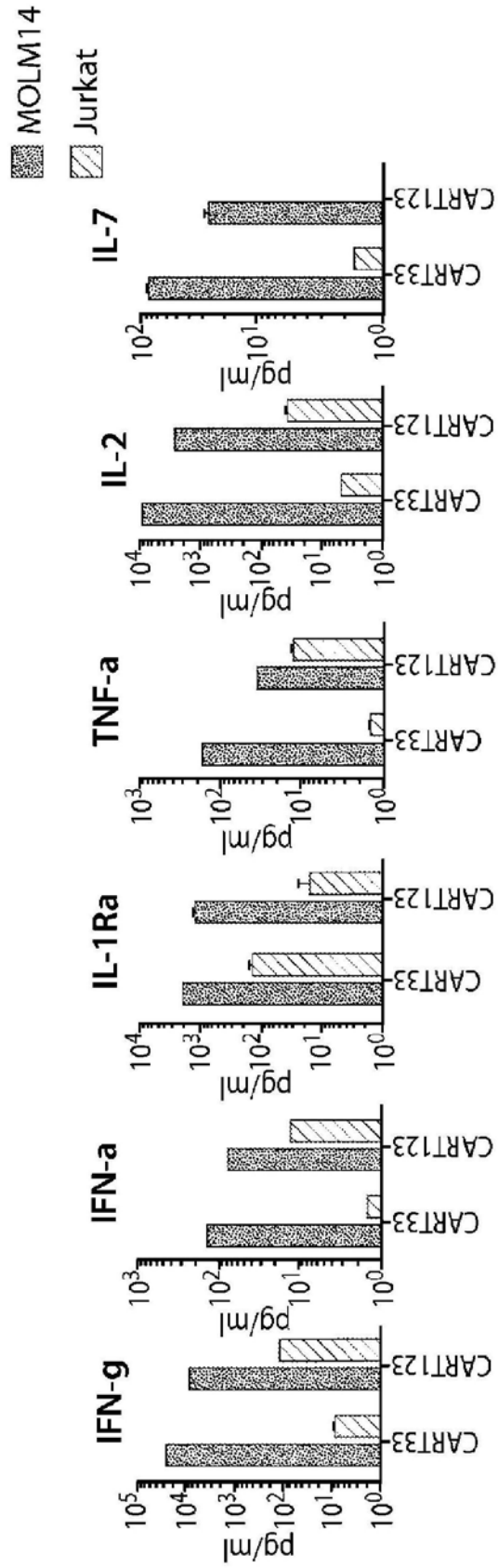


图39-2

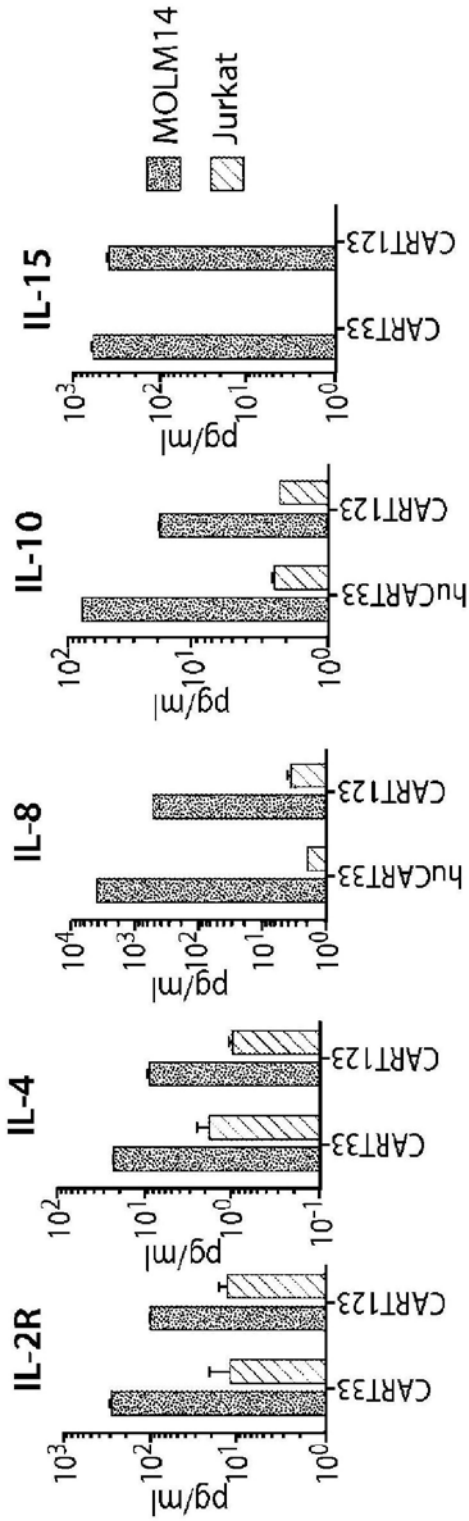


图39-3

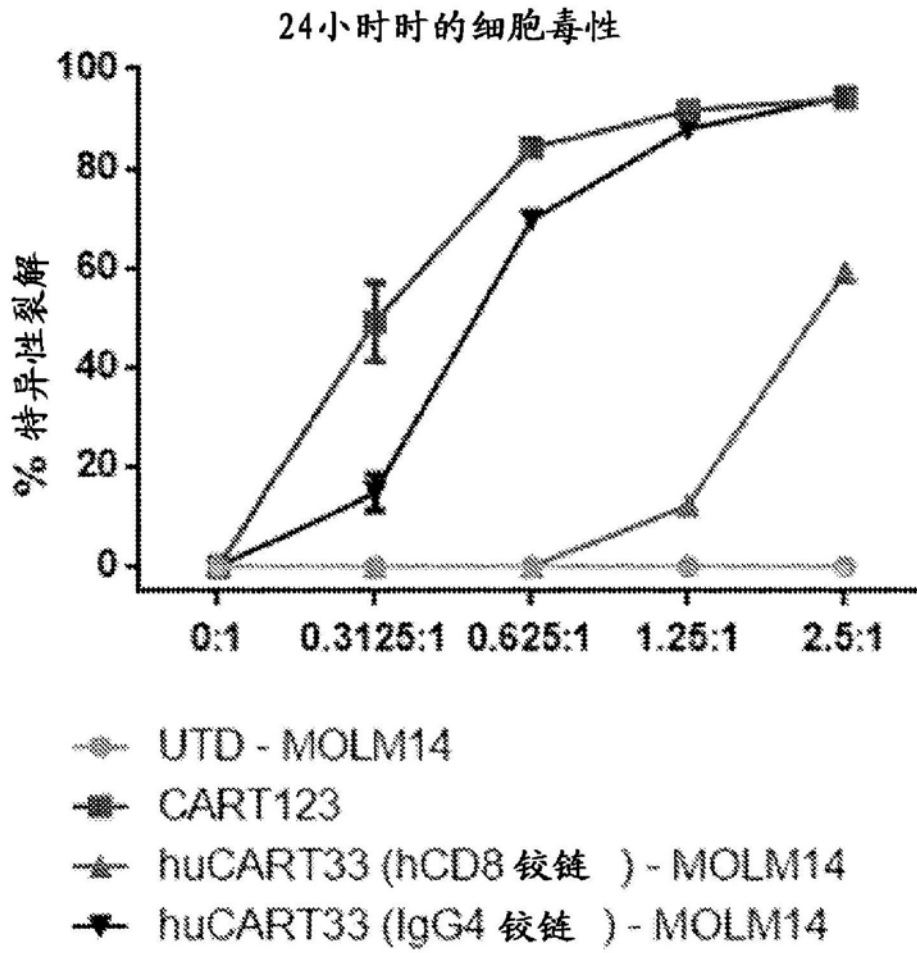


图40

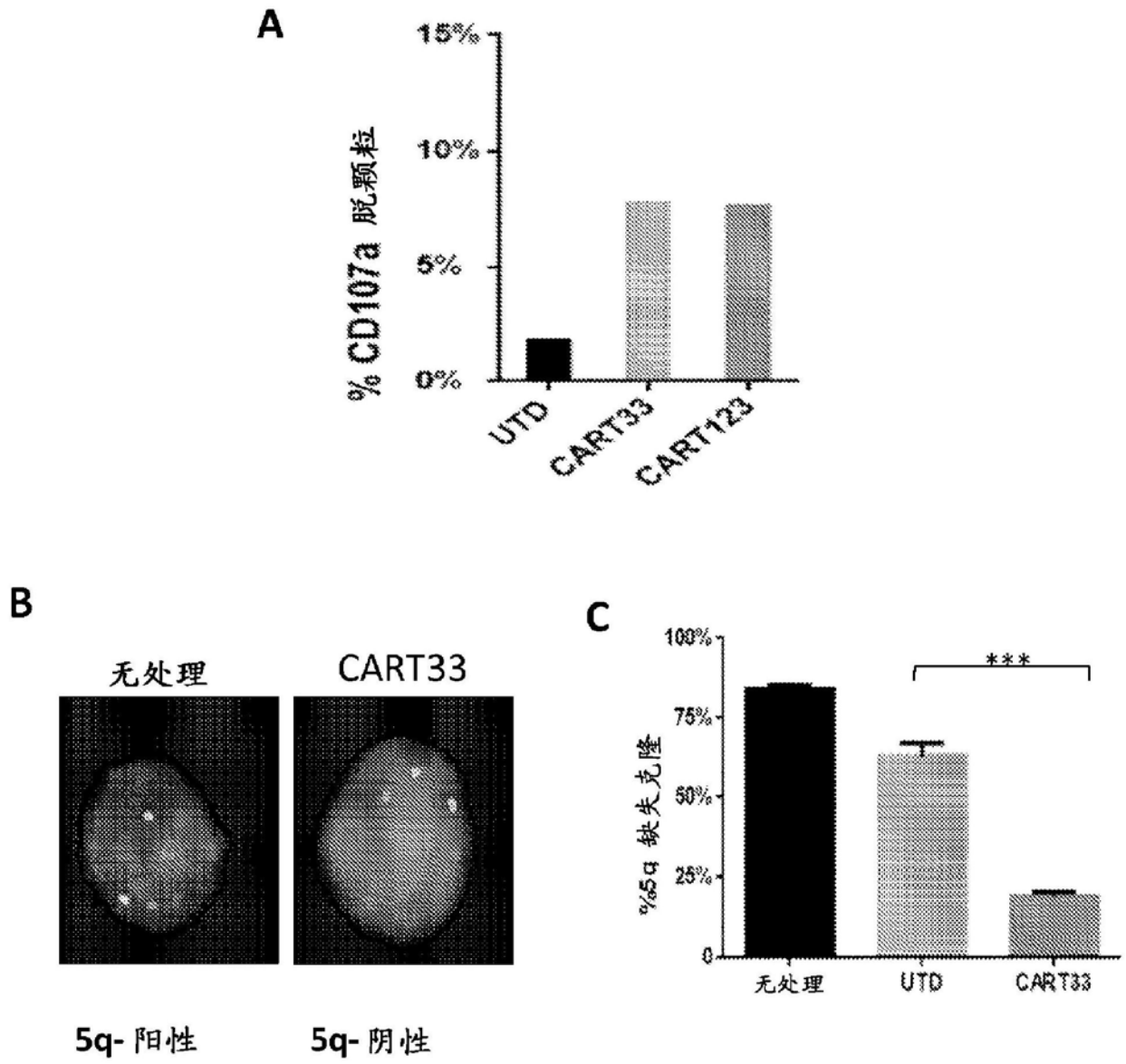


图41

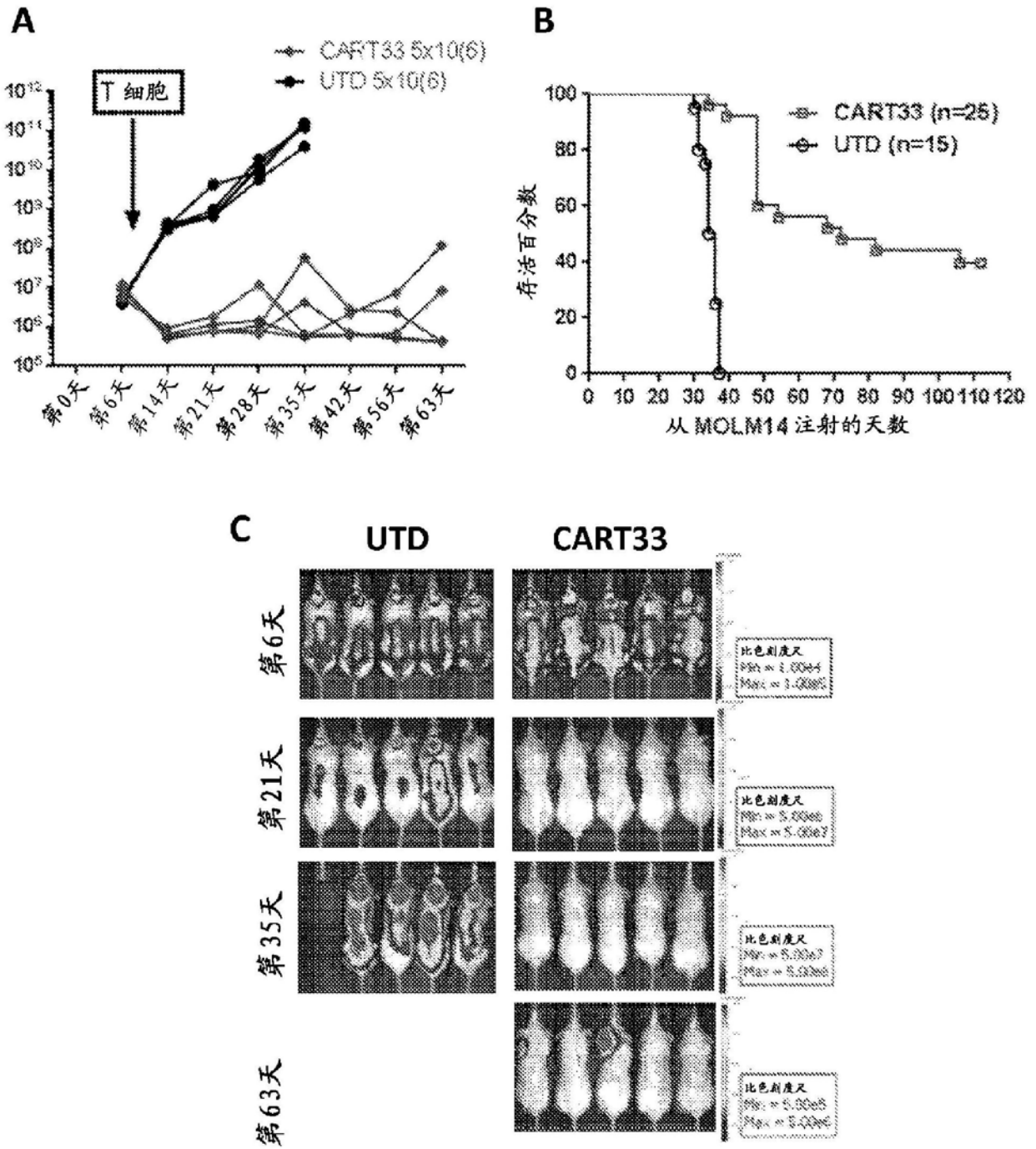


图42

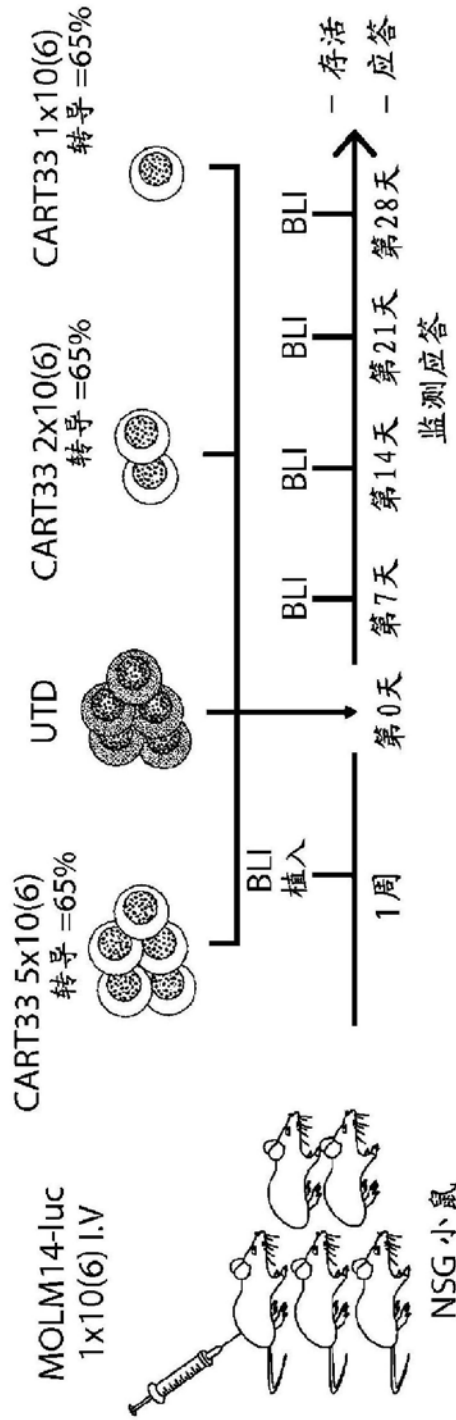


图43A

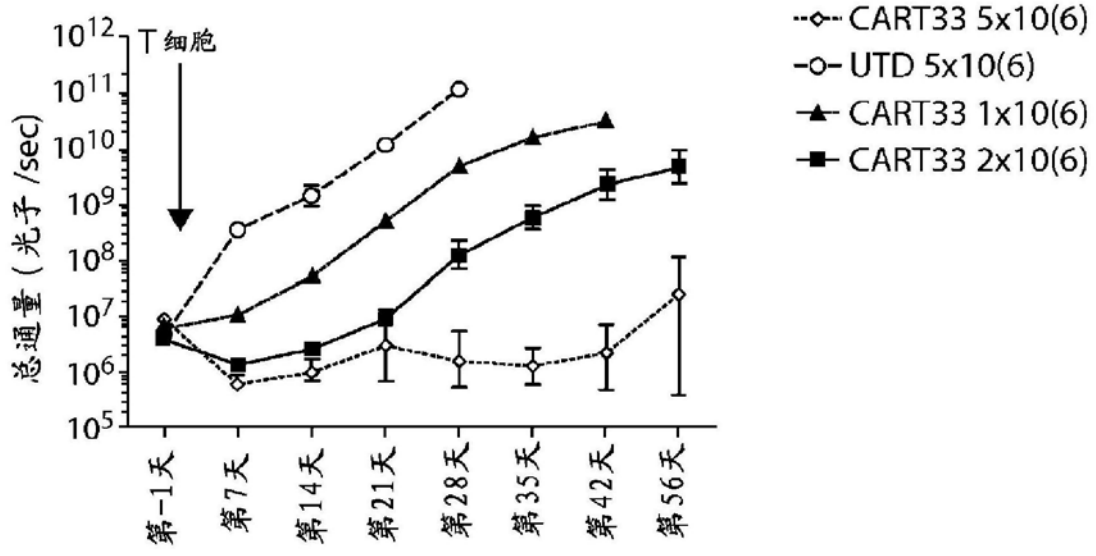


图43B

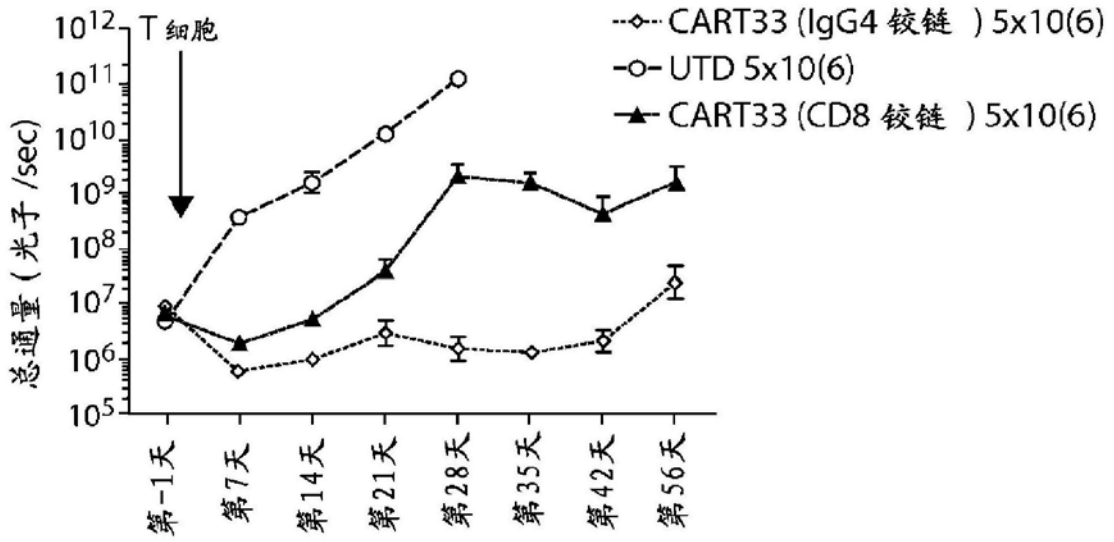


图44

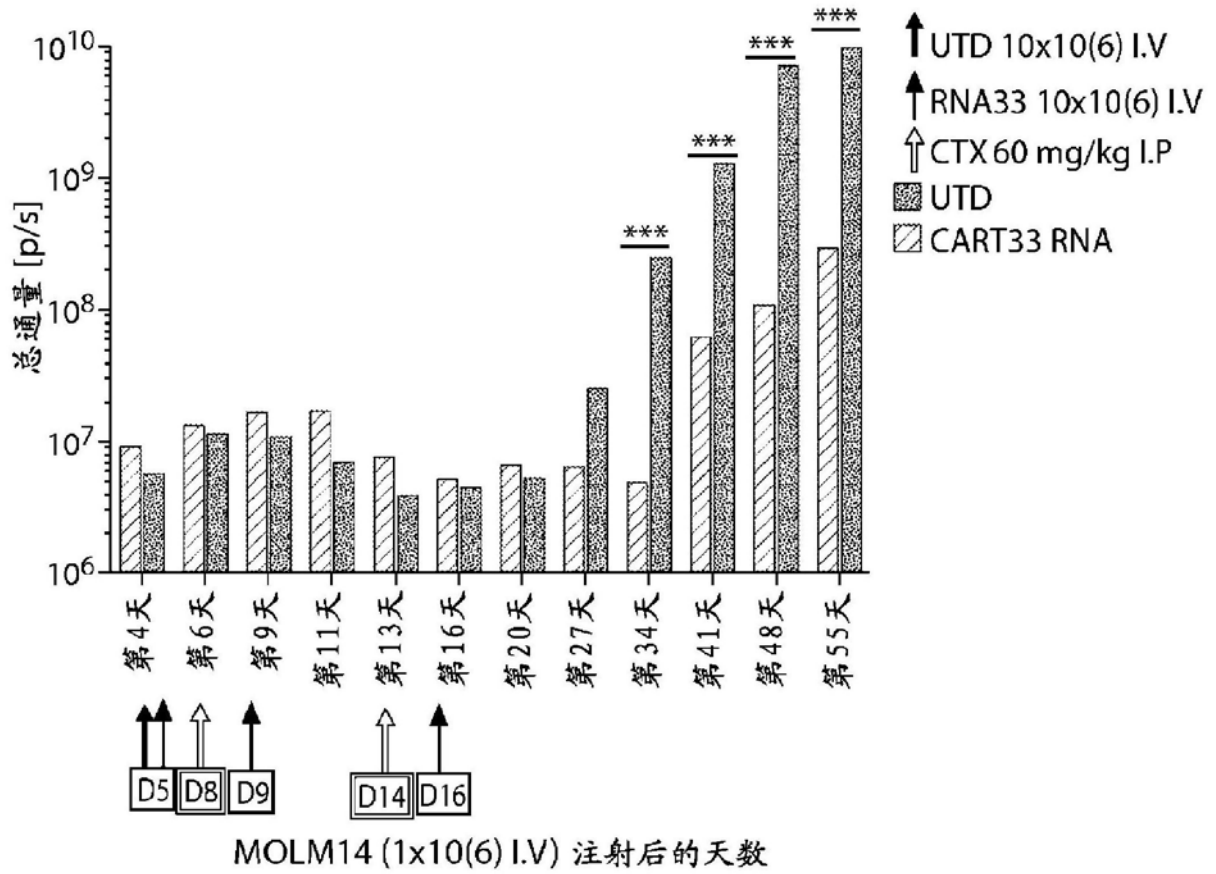


图45

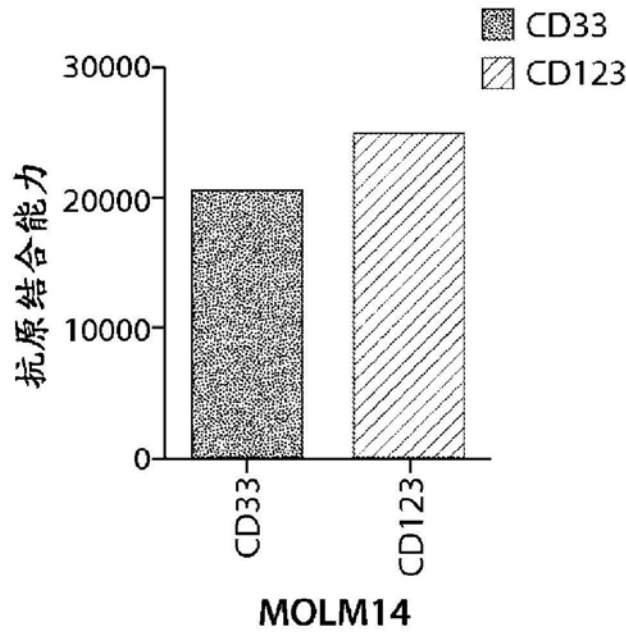


图46A

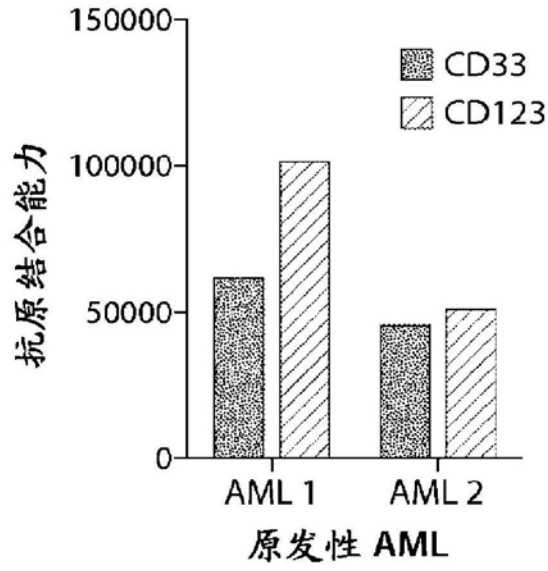


图46B

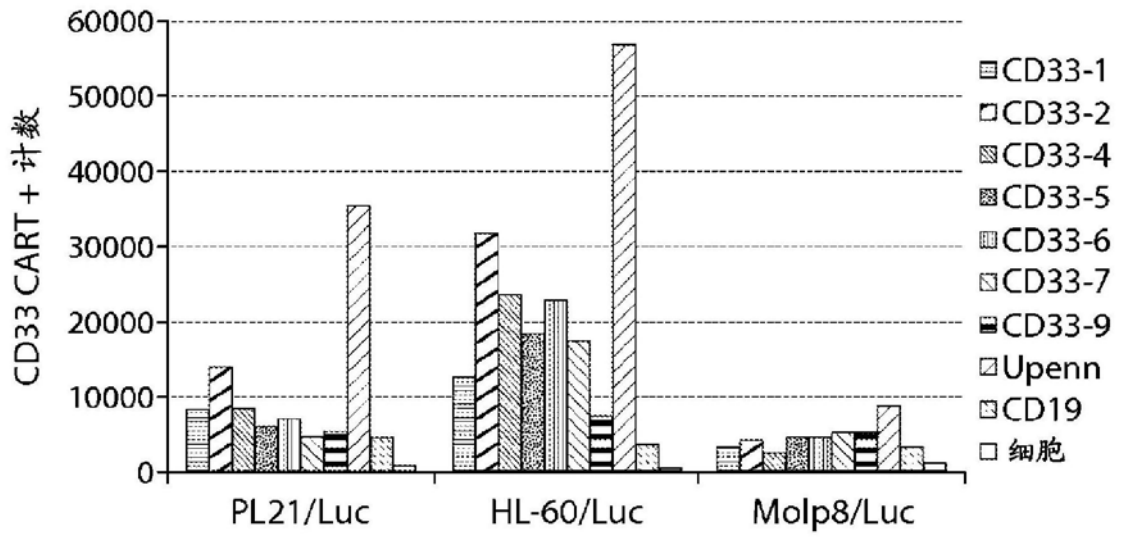


图47

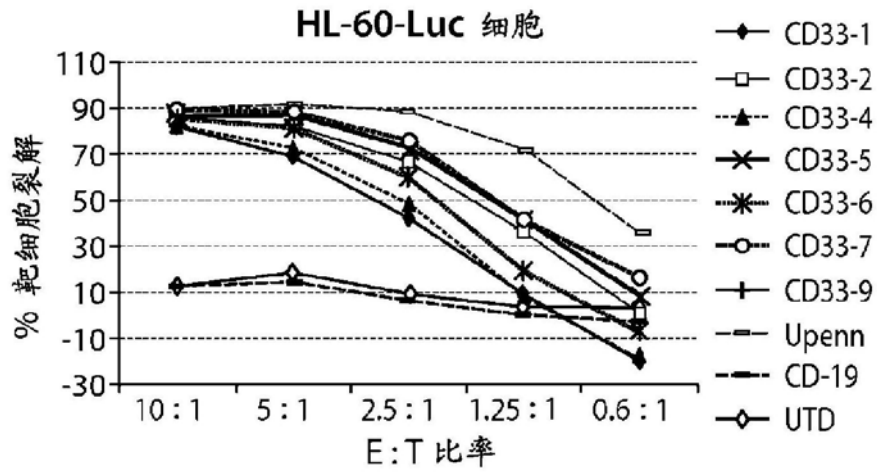


图48A

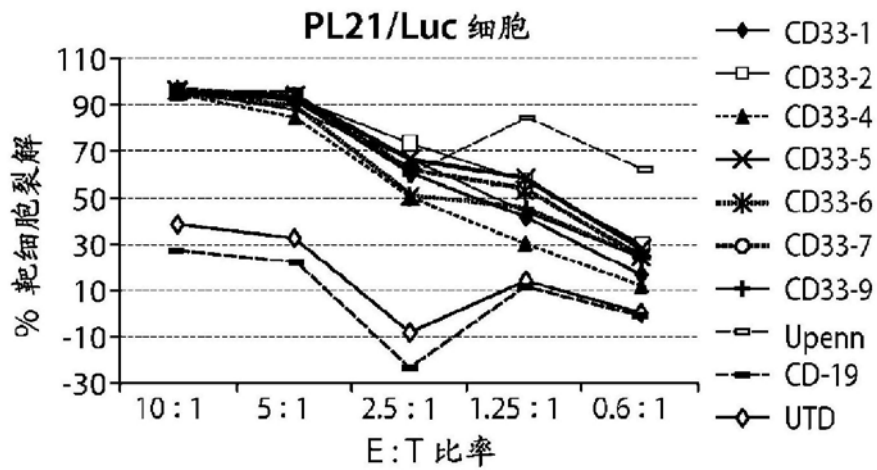


图48B

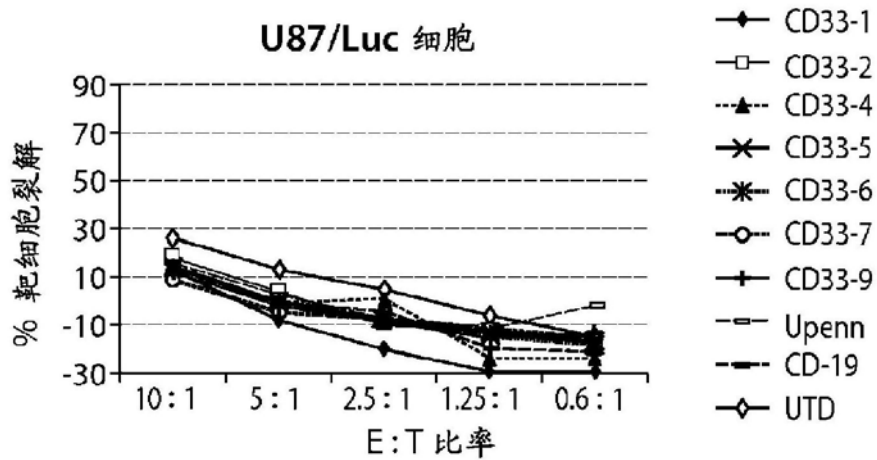


图48C

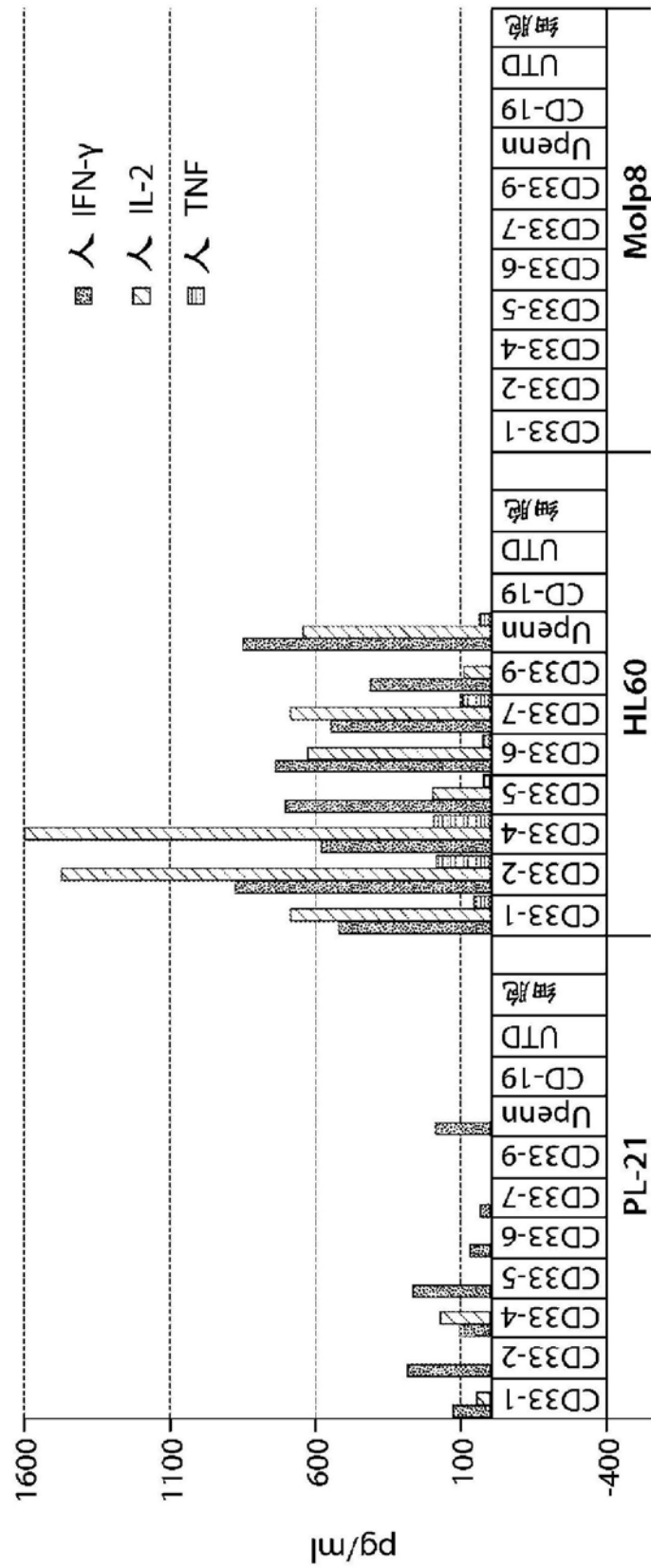


图49

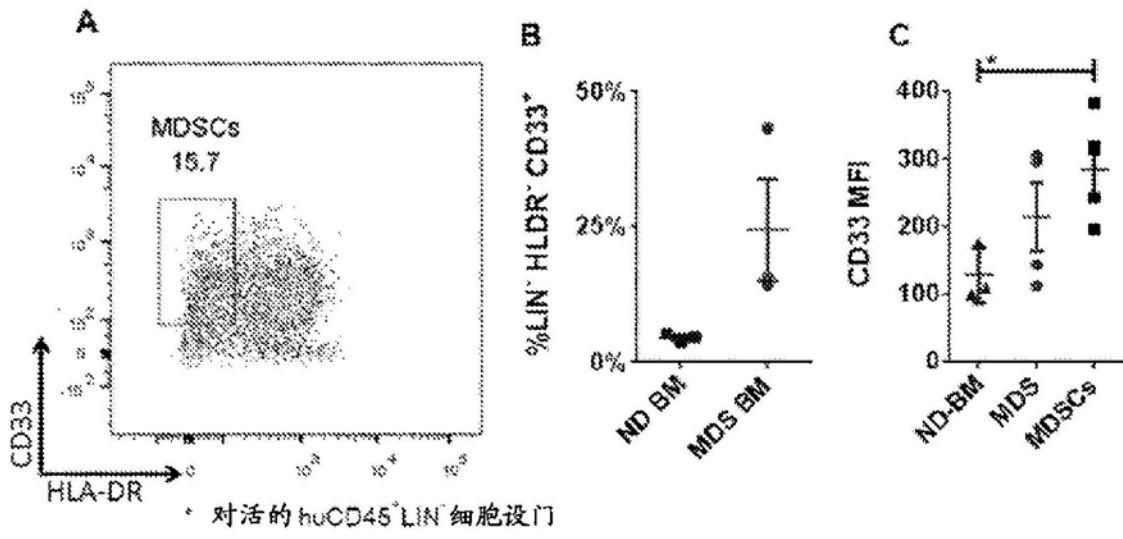


图50

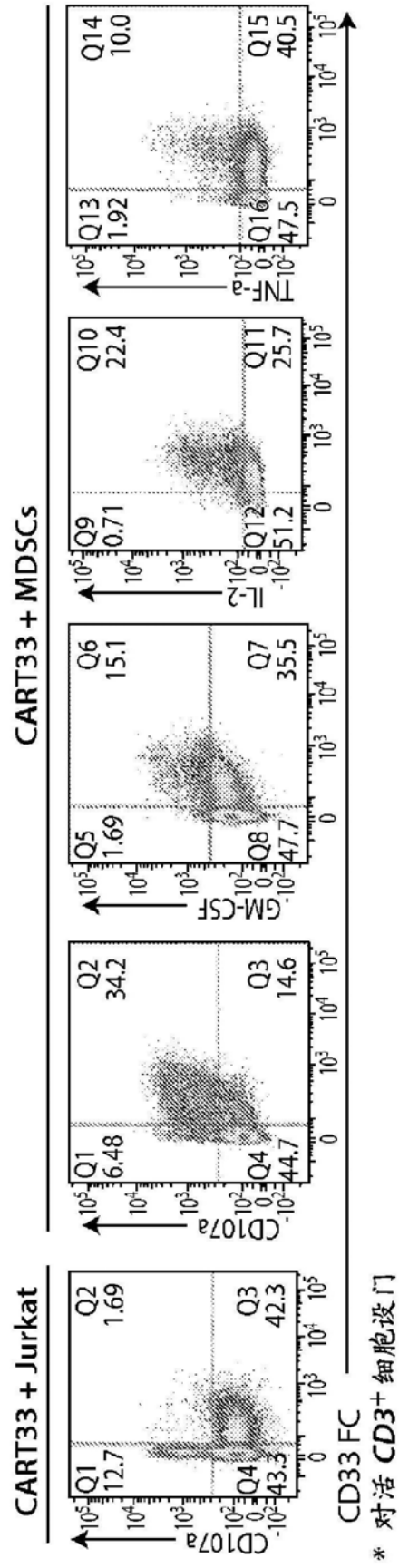


图51A

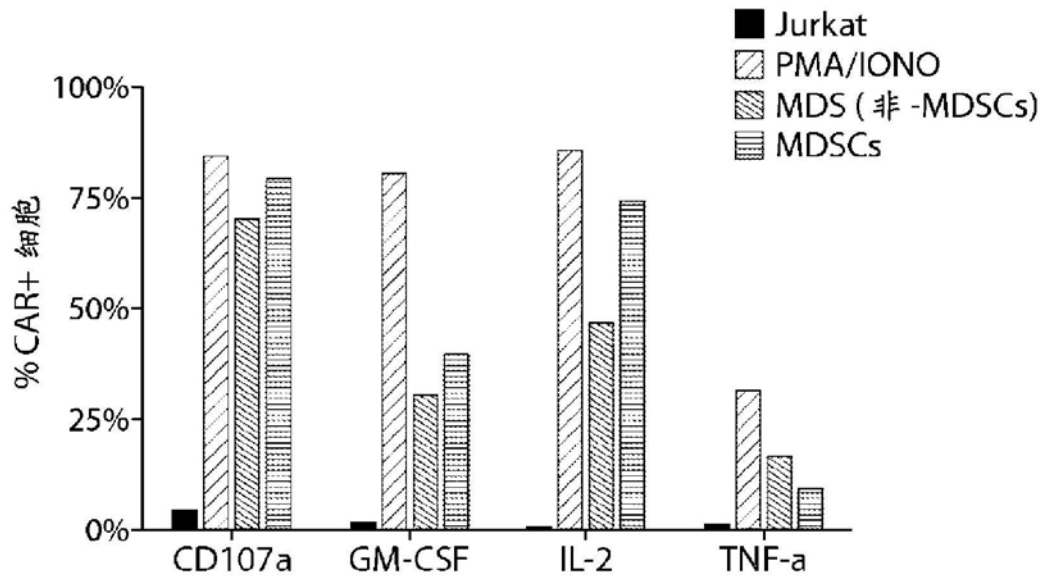


图51B

载体构建体

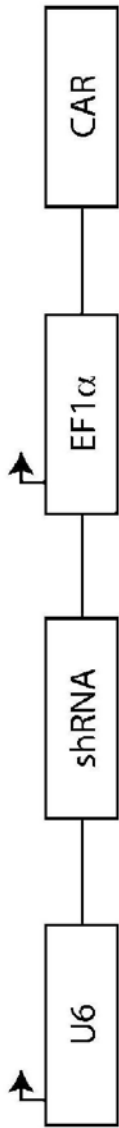


图 52A

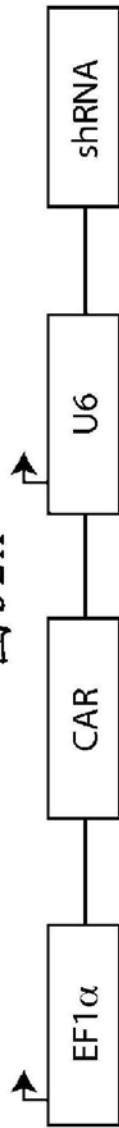


图 52B



图 52C



图 52D

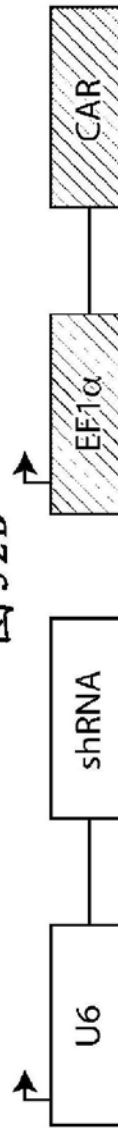


图 52E

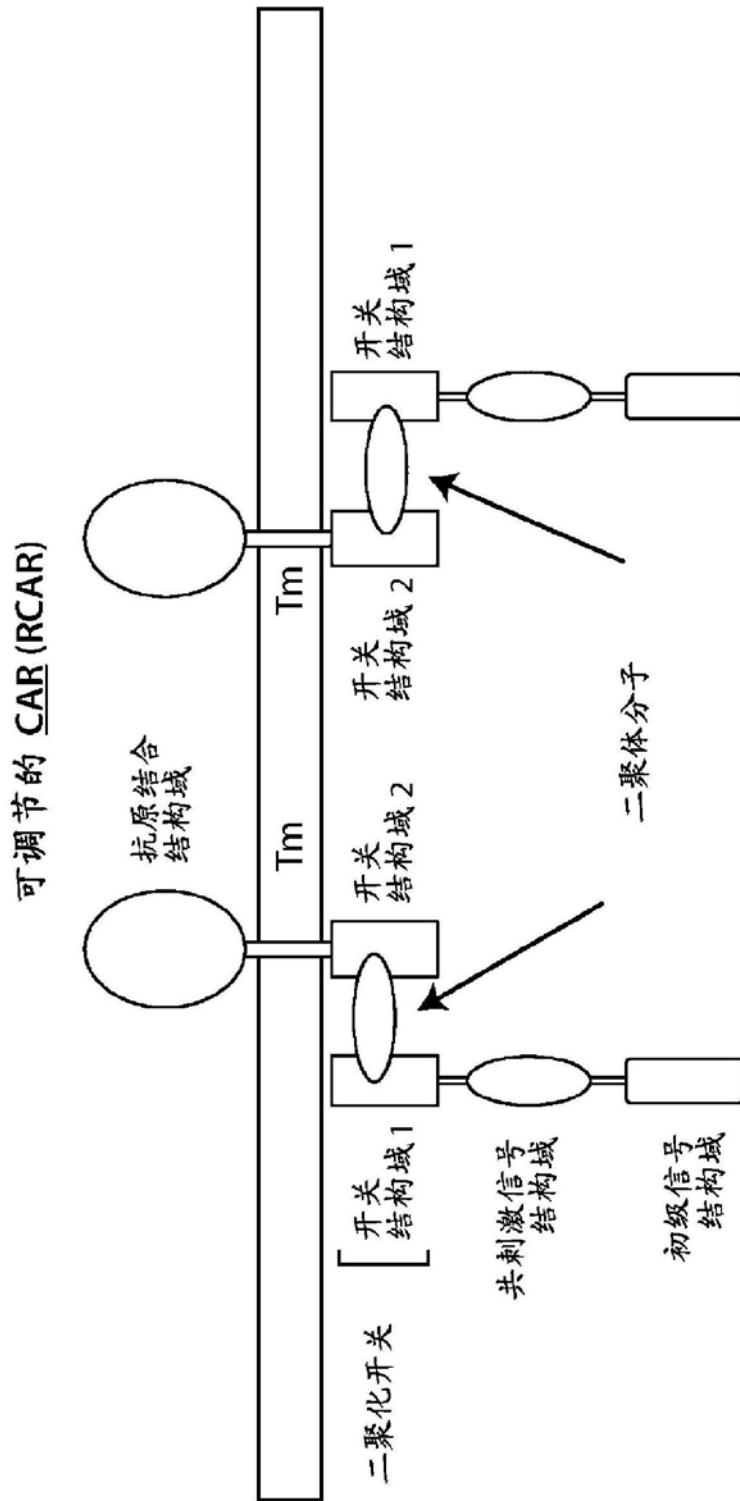


图53

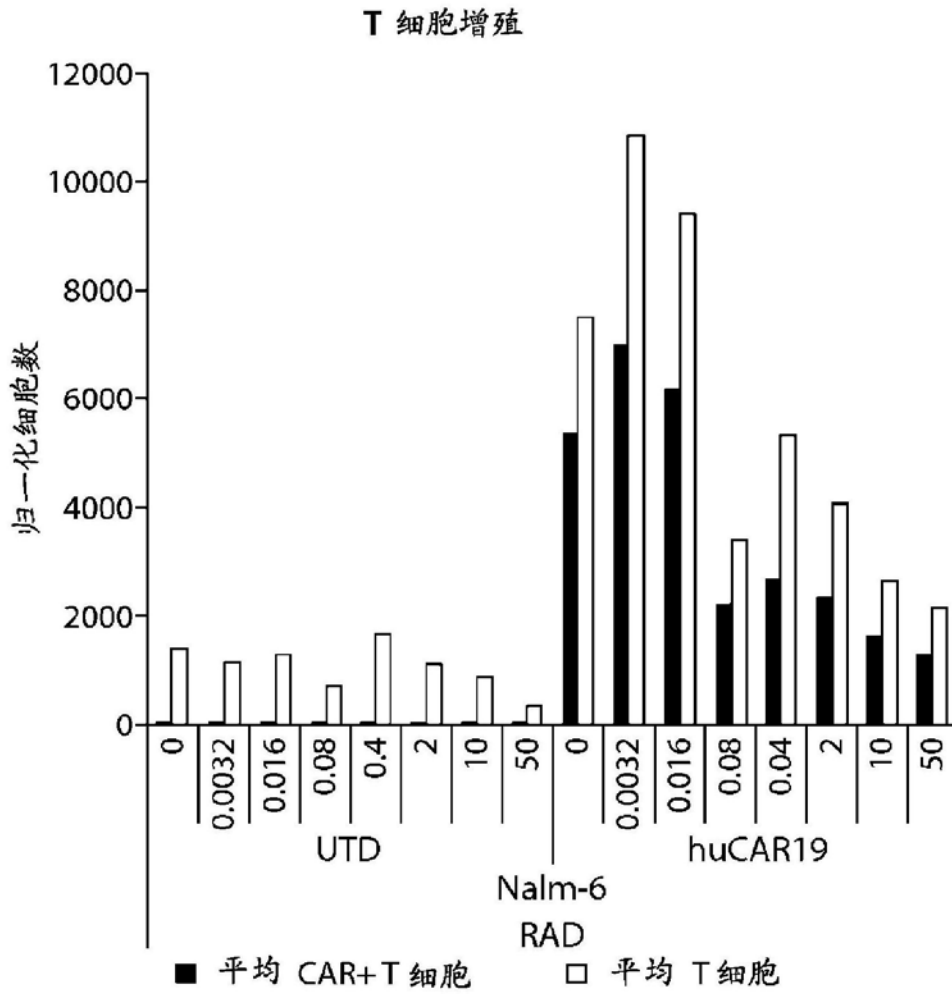


图54

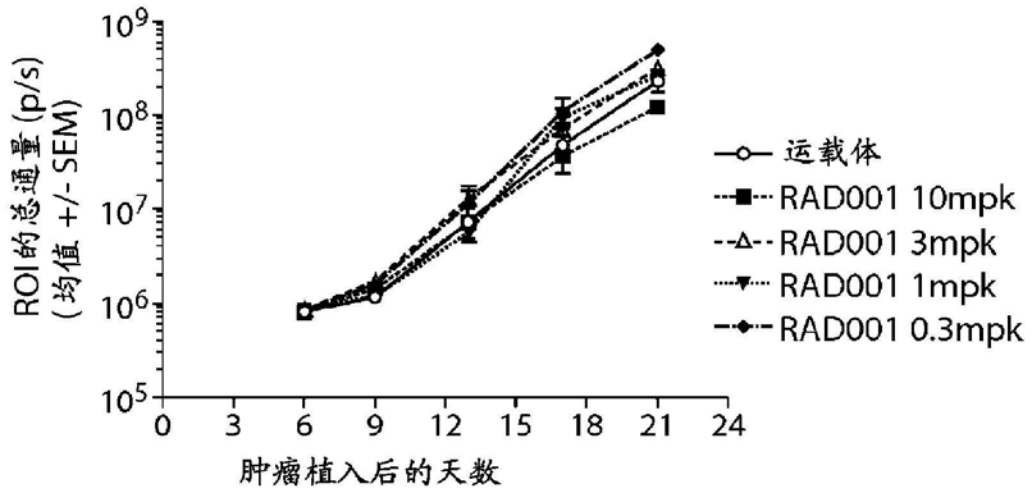


图55

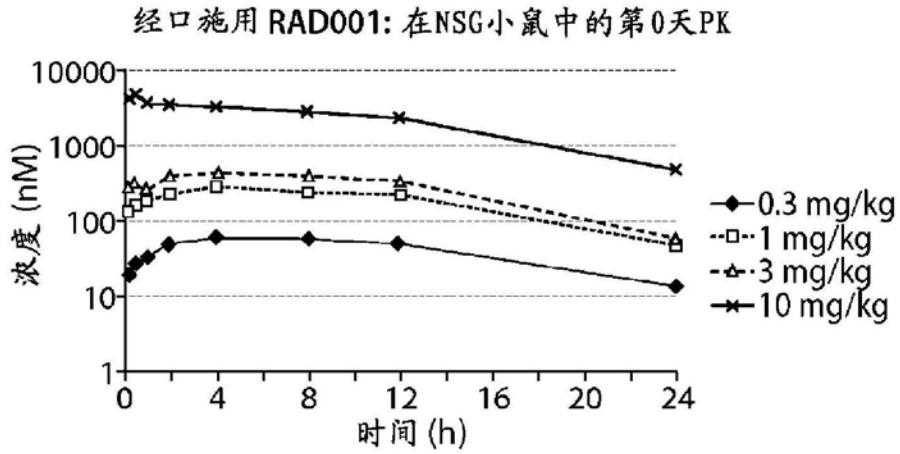


图56A

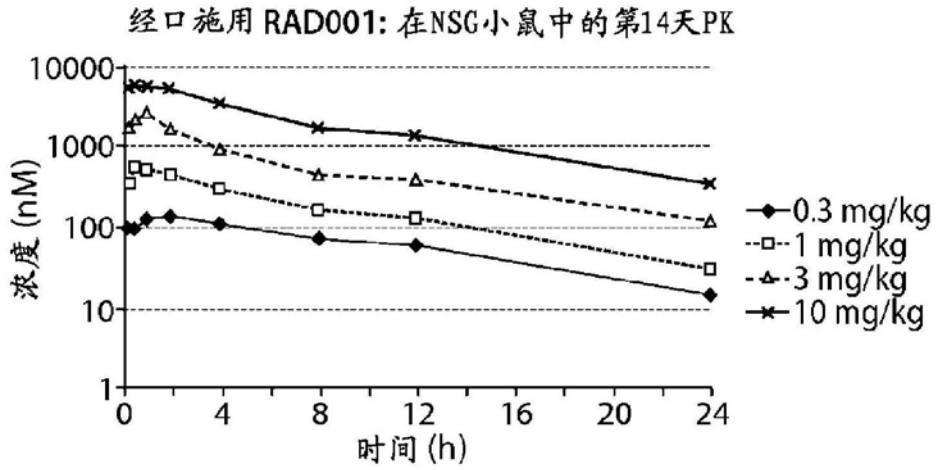


图56B

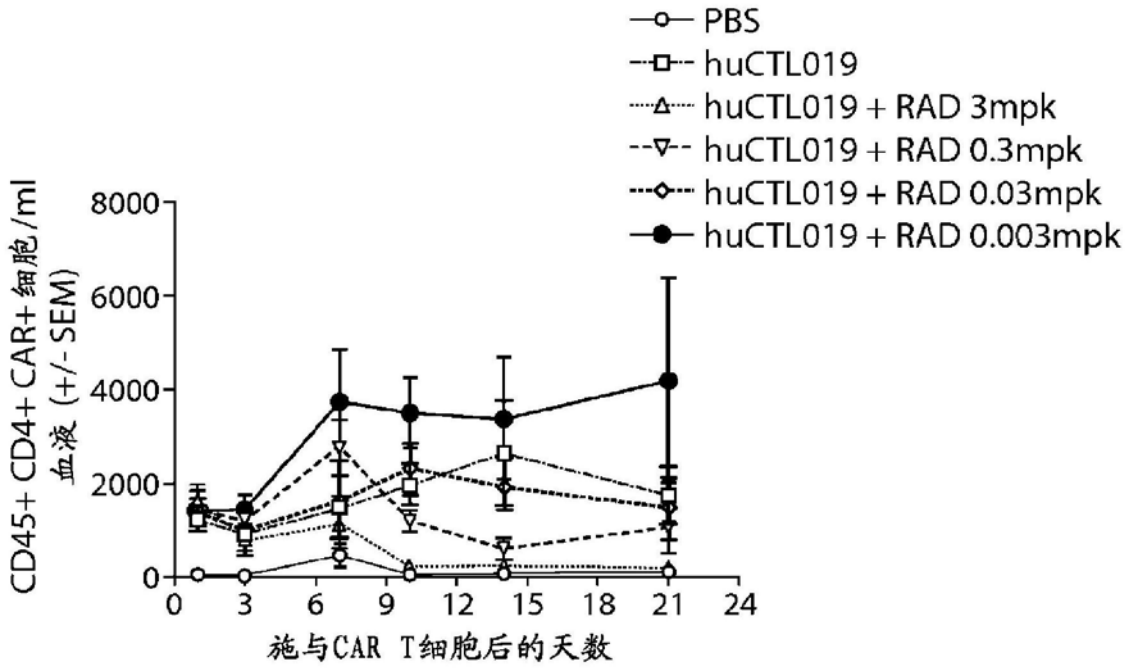


图57A

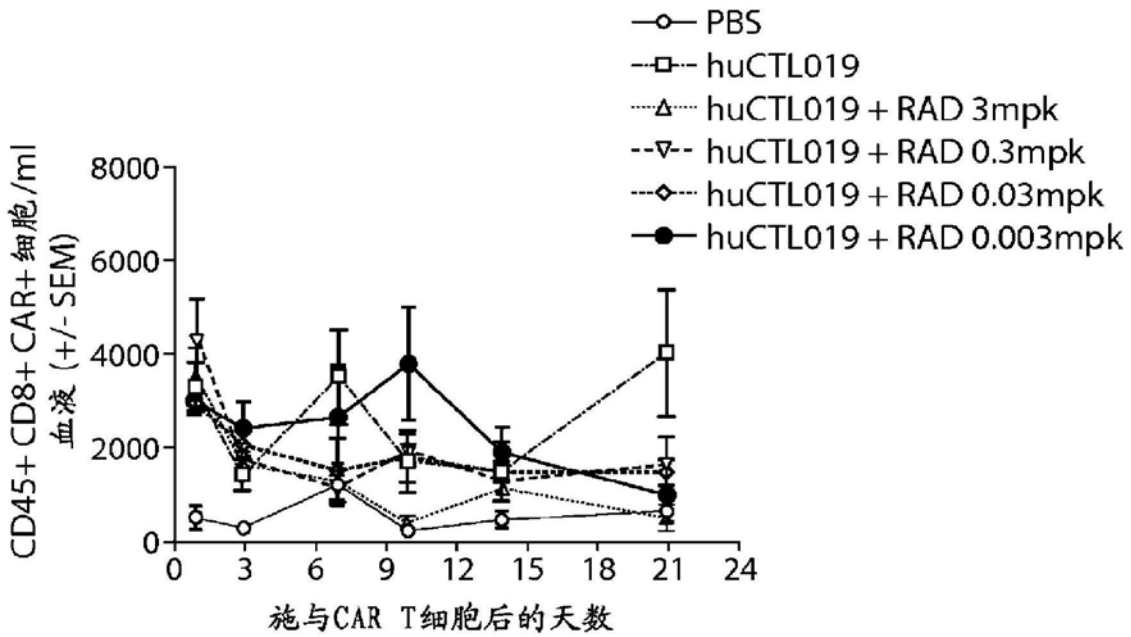


图57B

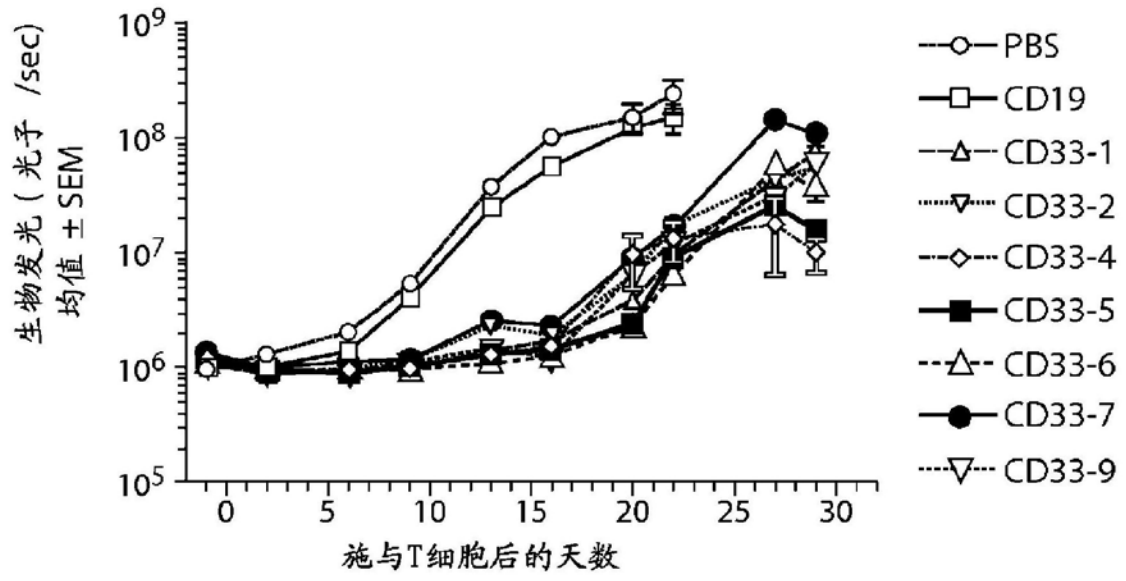


图58