(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116601167 A
(43)申请公布日 2023.08.15

(21)申请号 202180082644.8
(22)申请日 2021.12.09
(30)优先权数据
63/123,331 2020.12.09 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.06.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2021/000873 2021.12.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/123316 EN 2022.06.16
(71)申请人 武田药品工业株式会社
地址 日本大阪
(72)发明人 G·夏皮罗 约哈拉·舒伊塔尔
何星月 R·M·恩格
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 赵昊 汪烨君
(51)Int.Cl.
C07K 14/725(2006.01)

权利要求书3页 说明书108页
序列表66页 附图34页

(54)发明名称

鸟苷酸环化酶C(GCC)抗原结合剂的组合物及其使用方法

(57)摘要

公开了结合鸟苷酸环化酶C(GCC)的抗原结合剂(例如单结构域抗体),以及包含GCC抗原结合结构域的嵌合抗原受体。还公开了包含这些抗原结合剂及其片段的核酸、重组表达载体、宿主细胞、抗原结合片段和药物组合物。本发明还提供利用本文所提供的抗体和抗原结合分子的治疗方法。



图 1A

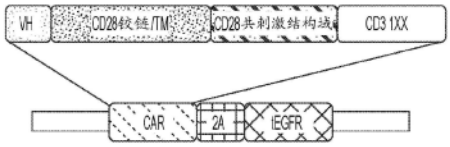


图 1B

CN 116601167 A

1.一种抗鸟苷酸环化酶C(GCC)嵌合抗原受体(CAR),其包含与鸟苷酸环化酶C(GCC)结合的细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和至少一个细胞内信号传导结构域。

2.如权利要求1所述的抗GCC CAR,其中所述抗原结合结构域包含

具有HYYWS(HCDR1)(SEQ ID NO:8)、RIYPSGSTSYNPSLKS(HCDR2)(SEQ ID NO:11)和DRSTGWSEWNSDL(HCDR3)(SEQ ID NO:16)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(V_H);

具有RYWMS(HCDR1)(SEQ ID NO:9)、KIRHDGGEKYYVDSV KG(HCDR2)(SEQ ID NO:12)和DYTRDV(HCDR3)(SEQ ID NO:17)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(V_H);

具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIKYDGSEKYYADS VKG(HCDR2)(SEQ ID NO:13)和DYNKDY(HCDR3)(SEQ ID NO:18)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(V_H);

具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIRHDGGEKYYPDS VKG(HCDR2)(SEQ ID NO:14)和DYNKDL(HCDR3)(SEQ ID NO:19)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(V_H);或

具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIRHDGGEKYYADS VKG(HCDR2)(SEQ ID NO:15)和DYNKDY(HCDR3)(SEQ ID NO:18)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(V_H)。

3.如权利要求1所述的抗GCC CAR,其中所述抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:20至少90%同一的重链可变区(V_H)。

4.如权利要求1所述的抗GCC CAR,其中所述抗原结合结构域包含

免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:21至少90%同一的氨基酸序列;

免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:26至少90%同一的氨基酸序列;

免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:27至少90%同一的氨基酸序列;或

免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:28至少90%同一的氨基酸序列。

5.如权利要求1-4中任一项所述的抗GCC CAR,其中所述抗原结合结构域包含仅具抗GCC抗原结合结构域的免疫球蛋白可变重链。

6.如权利要求1-5中任一项所述的抗GCC CAR,其中所述细胞外抗GCC抗原结合结构域前接有编码前导肽的前导核苷酸序列。

7.如权利要求28所述的抗GCC CAR,其中所述前导肽包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:42。

8.如权利要求1-7中任一项所述的抗GCC CAR,所述抗GCC CAR还包含铰链结构域。

9.如权利要求8所述的抗GCC CAR,其中所述铰链结构域包含CD28的铰链结构域。

10.如权利要求9所述的抗GCC CAR,其中所述CD28铰链结构域包含SEQ ID NO:29。

11.如权利要求8-10中任一项所述的抗GCC CAR,其中所述铰链结构域与所述跨膜结构域融合。

12.如权利要求1-11中任一项所述的抗GCC CAR,其中所述跨膜结构域包含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、CD8、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD83、CD86、CD134、CD137、CD154和TNFRSF19,以及其任何组合。

13.如权利要求12所述的抗GCC CAR,其中所述跨膜结构域包含CD28跨膜结构域。

14.如权利要求13所述的抗GCC CAR,其中所述CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:30。

15.如权利要求1-14中任一项所述的抗GCC CAR,其中所述至少一个细胞内信号传导结构域包含共刺激结构域和初级信号传导结构域。

16.如权利要求15所述的抗GCC CAR,其中所述共刺激结构域包含OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB(CD137)的功能性信号传导结构域,或其任何组合。

17.如权利要求16所述的抗GCC CAR,其中所述共刺激结构域包含CD28的功能性信号传导结构域。

18.如权利要求17所述的抗GCC CAR,其中所述CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:32。

19.如权利要求15-18所述的抗GCC CAR,其中所述初级信号传导结构域包含CD3ζ信号传导结构域。

20.如权利要求19所述的抗GCC CAR,其中所述CD3ζ信号传导结构域包含SEQ ID NO:33。

21.一种抗GCC CAR,所述抗GCC CAR包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:47-52。

22.一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸编码如权利要求1-21中任一项所述的抗GCC CAR。

23.如权利要求22所述的分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸还包含截短的表皮生长因子受体(tEGFR)序列。

24.如权利要求23所述的分离的多核苷酸,其中所述tEGFR包含核酸序列,所述核酸序列编码与SEQ ID NO:43至少95%、96%、97%、98%、99%同一的氨基酸序列。

25.如权利要求24所述的分离的多核苷酸,其中所述tEGFR包含核酸序列,所述核酸序列编码与SEQ ID NO:43同一的氨基酸序列。

26.如权利要求22-25中任一项所述的分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸还包含弗林蛋白酶识别位点和下游2A自裂解肽序列,所述弗林蛋白酶识别位点和下游2A自裂解肽序列被设计用于标签序列和CAR序列的同时双顺反子表达。

27.如权利要求26所述的分离的多核苷酸,其中所述2A自裂解肽选自F2A、P2A、E2A和T2A。

28.如权利要求27所述的分离的多核苷酸,其中所述2A自裂解肽为P2A。

29.一种载体,所述载体包含如权利要求22-28中任一项所述的分离的多核苷酸。

30.如权利要求29所述的载体,其中所述载体为腺病毒载体、腺病毒相关载体、DNA载体、慢病毒载体、质粒、逆转录病毒载体或RNA载体。

31.一种细胞,所述细胞包含如权利要求29或30所述的载体。

32.如权利要求31所述的细胞,其中所述细胞为T细胞、同种异体T细胞、自体T细胞或肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

33.一种细胞群体,所述细胞群体包含如权利要求1-20中任一项所述的抗GCC CAR或如权利要求22-32中任一项所述的核酸。

34.一种药盒,所述药盒包含如权利要求33所述的细胞群体。

35.一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求31或32所述的细胞群体。

36.如权利要求35所述的药物组合物,其中所述群体中大于70%、80%、90%或95%的细胞表达所述抗GCC CAR。

37.一种治疗癌症的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者施用包含如权利要求1-20中任一项所述的抗GCC CAR的药物组合物或细胞群体。

38.如权利要求37所述的方法,其中所述癌症选自胃肠癌、结肠直肠癌、结肠直肠腺癌、结肠直肠平滑肌肉瘤、结肠直肠淋巴瘤、结肠直肠黑素瘤、结肠直肠神经内分泌肿瘤、转移性结肠癌、胃癌、胃腺癌、胃淋巴瘤、胃肉瘤、食道癌、鳞状细胞癌、食道腺癌或胰腺癌。

39.如权利要求38所述的方法,其中所述癌症为胃肠癌。

40.如权利要求39所述的方法,其中所述胃肠癌为结肠癌、结肠直肠癌、胃癌或食道癌。

41.一种降低肿瘤生长或肿瘤大小的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者施用包含如权利要求1-21中任一项所述的抗GCC CAR的药物组合物或细胞群体。

鸟苷酸环化酶C(GCC)抗原结合剂的组合物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年12月9日提交的美国临时专利申请序列号63/123,331的优先权,所述临时专利申请以引用的方式整体并入本文中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经以电子方式以ASCII格式提交并且特此以引用的方式整体并入的序列表。所述ASCII副本创建于2021年11月19日,名称为MIL-005WO_SL.txt并且大小为140,478字节。

背景技术

[0005] 鸟苷酸环化酶C(GCC)为一种跨膜细胞表面受体,其功能为维持肠液、电解质体内稳态和细胞增殖,参见例如Carrithers等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 100:3018-3020(2003)。GCC表达于内衬小肠、大肠和直肠的粘膜细胞(Carriters等人,Dis Colon Rectum 39:171-181(1996))。GCC表达在肠上皮细胞的致瘤性转化之后仍维持,并且在所有原发性和转移性结肠直肠肿瘤中均有表达(Carriters等人,Dis Colon Rectum 39:171-181(1996);Buc等人,Eur J Cancer 41:1618-1627(2005);Carrithers等人,Gastroenterology 107:1653-1661(1994))。目前需要新颖的且改进的靶向GCC的方法。

发明内容

[0006] GCC信号传导途径的破坏与多种胃肠病症(包括结肠直肠癌)有关。本发明尤其提供新颖的抗GCC抗原结合分子(例如,单结构域抗体(sdAb))和包含抗GCC抗原结合结构域(例如,sdAb)的嵌合抗原受体(CAR)。此外,本发明提供表达所述CAR的宿主细胞(例如,T细胞),以及编码所述CAR或抗GCC抗原结合分子的核酸分子。所述CAR细胞包含在细胞表面上表达的抗GCC CAR分子。在一些实施方案中,所述CAR在经转导T细胞上表现出高表面表达,在体内具有高度细胞溶解和经转导T细胞扩增和持久性。还提供使用所公开的CAR、宿主细胞和核酸分子例如来治疗受试者的癌症的方法。

[0007] 在一个方面中,本发明提供一种抗鸟苷酸环化酶C(GCC)嵌合抗原受体(CAR),其包含与鸟苷酸环化酶C(GCC)结合的细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和至少一个细胞内信号传导结构域。

[0008] 在一些实施方案中,所述抗GCC CAR包含抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含:具有HYYWS(HCDR1)(SEQ ID NO:8)、RIYPSGSTSYNPSLKS(HCDR2)(SEQ ID NO:11)和DRSTGWSEWN SDL(HCDR3)(SEQ ID NO:16)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH);具有RYWMS(HCDR1)(SEQ ID NO:9)、KIRHDGGEKYYV DSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:12)和DYTRDV(HCDR3)(SEQ ID NO:17)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH);具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIKYDGSEKYYADSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:13)和DYNKDY(HCDR3)(SEQ ID NO:18)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH);具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIRHDGGEKYYPDSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:14)和DYNKDL(HCDR3)(SEQ ID NO:19)的互补决定

区(CDR)序列的重链可变区(VH);或具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIRHDGGEKYYADSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:15)和DYNKDY(HCDR3)(SEQ ID NO:18)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)。

[0009] 在一些实施方案中,所述抗GCC CAR的抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:20至少90%同一的重链可变区(VH)。

[0010] 在一些实施方案中,所述抗GCC CAR的抗原结合结构域包含免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:21至少90%同一的氨基酸序列;免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:26至少90%同一的氨基酸序列;免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:27至少90%同一的氨基酸序列;免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:28至少90%同一的氨基酸序列。

[0011] 在一些实施方案中,所述抗GCC CAR的抗原结合结构域包含仅具抗GCC抗原结合结构域的免疫球蛋白可变重链。

[0012] 在一些实施方案中,所述抗GCC CAR的细胞外抗GCC抗原结合结构域前接有编码前导肽的前导核苷酸序列。

[0013] 在一些实施方案中,所述前导肽包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:42。

[0014] 在一些实施方案中,所述抗GCC CAR还包含铰链结构域。

[0015] 在一些实施方案中,所述铰链结构域包含CD28的铰链结构域。

[0016] 在一些实施方案中,所述CD28铰链结构域包含SEQ ID NO:29。

[0017] 在一些实施方案中,所述抗GCC CAR包含与所述跨膜结构域融合的铰链结构域。

[0018] 在一些实施方案中,所述跨膜结构域包含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、CD8、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD83、CD86、CD134、CD137、CD154和TNFRSF19,以及其任何组合。

[0019] 在一些实施方案中,所述跨膜结构域包含CD28跨膜结构域。

[0020] 在一些实施方案中,所述CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:30。

[0021] 在一些实施方案中,所述至少一个细胞内信号传导结构域包含共刺激结构域和初级信号传导结构域。

[0022] 在一些实施方案中,所述共刺激结构域包含OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB(CD137)的功能性信号传导结构域,或其任何组合。

[0023] 在一些实施方案中,所述共刺激结构域包含CD28的功能性信号传导结构域。

[0024] 在一些实施方案中,所述CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:32。

[0025] 在一些实施方案中,所述初级信号传导结构域包含CD3ζ信号传导结构域。

[0026] 在一些实施方案中,所述CD3ζ信号传导结构域包含SEQ ID NO:33。

[0027] 在一个方面中,所述抗GCC CAR包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:47-52。

[0028] 在一些实施方案中,所述抗GCC CAR包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:47至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一。在一些实施方案中,所述抗GCC CAR包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:48至少80%、85%、90%、

95％、96％、97％、98％、99％或100％同一。在一些实施方案中，所述抗GCC CAR包含氨基酸序列，所述氨基酸序列与SEQ ID NO:49至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一。在一些实施方案中，所述抗GCC CAR包含氨基酸序列，所述氨基酸序列与SEQ ID NO:50至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一。在一些实施方案中，所述抗GCC CAR包含氨基酸序列，所述氨基酸序列与SEQ ID NO:51至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一。在一些实施方案中，所述抗GCC CAR包含氨基酸序列，所述氨基酸序列与SEQ ID NO:52至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一。

[0029] 在一个方面中，本发明提供一种编码本文所述的抗GCC CAR的分离的多核苷酸。

[0030] 在一些实施方案中，所述编码本文所述的抗GCC CAR的分离的多核苷酸还包含截短的表皮生长因子受体(tEGFR)序列。

[0031] 在一些实施方案中，所述tEGFR包含核酸序列，所述核酸序列编码与SEQ ID NO:43至少95％、96％、97％、98％、99％同一的氨基酸序列。

[0032] 在一些实施方案中，所述tEGFR包含核酸序列，所述核酸序列编码与SEQ ID NO:43同一的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施方案中，所述编码本文所述的抗GCC CAR的分离的多核苷酸还包含弗林蛋白酶识别位点和下游2A自裂解肽序列，所述弗林蛋白酶识别位点和下游2A自裂解肽序列被设计用于标签序列和CAR序列的同时双顺反子表达。

[0034] 在一些实施方案中，所述2A自裂解肽选自F2A、P2A、E2A和T2A。

[0035] 在一些实施方案中，所述2A自裂解肽为P2A。

[0036] 在一个方面中，本发明提供一种载体，所述载体包含编码本文所述的抗GCC CAR的分离的多核苷酸。

[0037] 在一些实施方案中，所述载体为腺病毒载体、腺病毒相关载体、DNA载体、慢病毒载体、质粒、逆转录病毒载体或RNA载体。在一些实施方案中，所述载体为逆转录病毒载体。

[0038] 在一个方面中，本发明提供一种细胞，所述细胞包含编码本文所述的抗GCC CAR的分离的多核苷酸。

[0039] 在一些实施方案中，所述细胞表达本文所述的抗GCC CAR。

[0040] 在一些实施方案中，所述细胞为T细胞、同种异体T细胞、自体T细胞或肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[0041] 在一个方面中，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物包含表达或能够可表达本文所述的抗GCC CAR的细胞群体。在一些实施方案中，所述药物组合物包含细胞群体，其中所述群体中大于70％、80％、90％或95％的细胞表达所述抗GCC CAR。

[0042] 在一个方面中，本发明提供一种治疗癌症的方法，所述方法包括向需要治疗的受试者施用包含本文所述的抗GCC CAR的药物组合物。

[0043] 在一些实施方案中，所述癌症选自胃肠癌、结肠直肠癌、结肠直肠腺癌、结肠直肠平滑肌肉瘤、结肠直肠淋巴瘤、结肠直肠黑素瘤、结肠直肠神经内分泌肿瘤、转移性结肠癌、胃癌、胃腺癌、胃淋巴瘤、胃肉瘤、食道癌、鳞状细胞癌、食道腺癌或胰腺癌。

[0044] 在一些实施方案中，所述癌症为胃肠癌。

[0045] 在一些实施方案中，所述胃肠癌为结肠癌、结肠直肠癌、胃癌或食道癌。

[0046] 在一个方面中,本发明提供一种通过施用包含本文所述的抗GCC CAR的药物组合物来降低肿瘤生长或肿瘤大小的方法。

[0047] 在一个方面中,本发明提供一种鸟苷酸环化酶C(GCC)结合剂,其包含具有HYYWS(HCDR1)(SEQ ID NO:8)、RIYPSGSTSYNPSL KS(HCDR2)(SEQ ID NO:11)和DRSTGWSEWNSDL(HCDR3)(SEQ ID NO:16)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)。

[0048] 在一个方面中,本发明提供一种鸟苷酸环化酶C(GCC)结合剂,其包含具有RYWMS(HCDR1)(SEQ ID NO:9)、KIRHDGGEKYYVD SVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:12)和DYTRDV(HCDR3)(SEQ ID NO:17)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)。

[0049] 在一个方面中,本发明提供一种鸟苷酸环化酶C(GCC)结合剂,其包含具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIKYDGSEKYYA DSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:13)和DYNKDY(HCDR3)(SEQ ID NO:18)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)。

[0050] 在一个方面中,本发明提供一种鸟苷酸环化酶C(GCC)结合剂,其包含具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIRHDGGEKYYPD SVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:14)和DYNKDL(HCDR3)(SEQ ID NO:19)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)。

[0051] 在一个方面中,本发明提供一种鸟苷酸环化酶C(GCC)结合剂,其包含具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIRHDGGEKYYA DSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:15)和DYNKDY(HCDR3)(SEQ ID NO:18)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)。

[0052] 在一些实施方案中,所述GCC结合剂包含免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:20至少90%同一的氨基酸序列。

[0053] 在一些实施方案中,所述GCC结合剂包含免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:21至少90%同一的氨基酸序列。

[0054] 在一些实施方案中,所述GCC结合剂包含免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:26至少90%同一的氨基酸序列。

[0055] 在一些实施方案中,所述GCC结合剂包含免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:27至少90%同一的氨基酸序列。

[0056] 在一些实施方案中,所述GCC结合剂包含免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:28至少90%同一的氨基酸序列。

[0057] 在一个方面中,本发明提供一种鸟苷酸环化酶C(GCC)结合剂,其包含免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:20至少90%同一的氨基酸序列。

[0058] 在一个方面中,本发明提供一种鸟苷酸环化酶C(GCC)结合剂,其包含免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:21至少90%同一的氨基酸序列。

[0059] 在一个方面中,本发明提供一种鸟苷酸环化酶C(GCC)结合剂,其包含免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:26至少90%同一的氨基酸序列。

[0060] 在一个方面中,本发明提供一种鸟苷酸环化酶C(GCC)结合剂,其包含免疫球蛋白重链可变(VH)区,所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:27至少90%同一的氨基酸序列。

[0061] 在一个方面中，本发明提供一种鸟苷酸环化酶C(GCC)结合剂，其包含免疫球蛋白重链可变(VH)区，所述免疫球蛋白重链可变(VH)区包含与SEQ ID NO:28至少90％同一的氨基酸序列。

[0062] 在一些实施方案中，所述GCC结合剂包含VH区，所述VH区包含与SEQ ID No:1、20、21、26、27或28中的任一者至少95％同一的氨基酸序列。

[0063] 在一些实施方案中，所述GCC结合剂包含VH区，所述VH区包含与SEQ ID NO:1、20、21、26、27或28中的任一者同一的氨基酸序列。

[0064] 在一些实施方案中，所述GCC结合剂选自由以下组成的组：IgA抗体、IgG抗体、IgE抗体、IgM抗体、双或多特异性抗体、Fab片段、Fab'片段、F(ab')2片段、Fd'片段、Fd片段、分离的CDR或其组；单链可变片段(scFv)、多肽-Fc融合物、单结构域抗体(sdAb)、VH、骆驼科动物抗体；掩蔽抗体、小模块免疫药物(“SMIPsTM”)、单链、串联双价抗体、VHH、抗运载蛋白(Anticalin)、纳米抗体、人源化抗体(humabody)、微型抗体、BiTE、锚蛋白(ankyrin)重复蛋白、DARPIN、Avimer、DART、TCR样抗体、Adnectin、Affilin、穿膜抗体(Trans-body)；亲和体(Affibody)、TrimerX、微量蛋白、Fynomer、Centyrin；以及KALBITOR。

[0065] 在一些实施方案中，所述GCC结合剂为单结构域抗体(sdAb)。

[0066] 在一些实施方案中，所述GCC结合剂为仅具重链的抗体(VH)。

[0067] 在一些实施方案中，所述GCC结合剂以介于约0.3纳摩尔浓度(nM)与约10nM之间的KD结合GCC。

[0068] 在一些实施方案中，所述GCC结合剂以介于约0.5nM与约8nM之间的EC50结合靶细胞上的GCC。

[0069] 在一个方面中，本发明提供一种治疗癌症的方法，所述方法包括向需要治疗的受试者施用本文所述的GCC结合剂。

[0070] 在一些实施方案中，所述癌症选自胃肠癌、结肠直肠癌、结肠直肠腺癌、结肠直肠平滑肌肉瘤、结肠直肠淋巴瘤、结肠直肠黑素瘤、结肠直肠神经内分泌肿瘤、转移性结肠癌、胃癌、胃腺癌、胃淋巴瘤、胃肉瘤、食道癌、鳞状细胞癌、食道腺癌或胰腺癌。

[0071] 在一些实施方案中，所述癌症为胃肠癌。

[0072] 在一些实施方案中，所述胃肠癌为结肠癌、结肠直肠癌、胃癌或食道癌。

[0073] 在一个方面中，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物包含GCC结合剂和药学上可接受的载体，其中所述GCC结合剂包含：具有HYYWS(HCDR1)(SEQ ID NO:8)、RIYPSGSTSYNPSLKS(HCDR2)(SEQ ID NO:11)和DRSTGWSEWNSDL(HCDR3)(SEQ ID NO:16)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)；具有RYWMS(HCDR1)(SEQ ID NO:9)、KIRHDGGEKYYVDSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:12)和DYTRDV(HCDR3)(SEQ ID NO:17)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)；具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIKYDGSEKYYADSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:13)和DYNKDY(HCDR3)(SEQ ID NO:18)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)；具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIRHDGGEK YYPDSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:14)和DYNKDL(HCDR3)(SEQ ID NO:19)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)；或具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIRHDGGEKYYADSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:15)和DYNKDY(HCDR3)(SEQ ID NO:18)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)。

[0074] 在一个方面中，本发明提供一种治疗癌症的方法，所述方法包括向需要治疗的受

试者施用GCC结合剂，其中所述GCC结合剂包含：具有HYYWS(HCDR1)(SEQ ID NO:8)、RIYPSGSTSYNPSLKS(HCDR2)(SEQ ID NO:11)和DRSTGWSEWNSDL(HCDR3)(SEQ ID NO:16)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)；具有RYWMS(HCDR1)(SEQ ID NO:9)、KIRHDGGEKYYVDSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:12)和DYTRDV(HCDR3)(SEQ ID NO:17)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)；具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIKYDGSEKYYADSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:13)和DYNKDY(HCDR3)(SEQ ID NO:18)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)；具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIRHDGG EKYYPDSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:14)和DYNKDL(HCDR3)(SEQ ID NO:19)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)；或具有RYWMT(HCDR1)(SEQ ID NO:10)、KIRHDGGEKYYADSVKG(HCDR2)(SEQ ID NO:15)和DYNKDY(HCDR3)(SEQ ID NO:18)的互补决定区(CDR)序列的重链可变区(VH)。

[0075] 在一个方面中，本发明提供一种核酸，所述核酸编码与SEQ IDNo:1、20、21、26、27或28中的任一者同一的VH氨基酸序列。

[0076] 在一个方面中，本发明提供一种载体，所述载体包含编码与SEQ ID No:1、20、21、26、27或28中的任一者同一的VH氨基酸序列的核酸。

[0077] 在一个方面中，本发明提供一种包含载体的分离的细胞，所述载体包含编码与SEQ ID No:1、20、21、26、27或28中的任一者同一的VH氨基酸序列的核酸。

[0078] 应理解，前述一般描述和以下详细描述两者均仅为示例性和解释性的，并且不限制要求保护的本发明。

附图说明

[0079] 由以下各图组成的本文所包括的附图仅用于说明目的而非限制。

[0080] 图1A和1B描绘示例性嵌合抗原受体(CAR)构建体。

[0081] 图2A-2D示出使用四种肿瘤细胞系进行的示例性抗GCC CAR-T体外细胞毒性试验。HT29-GCC细胞(一种经工程化以稳定表达GCC的人结肠直肠癌细胞系HT29)(图2A)；HT29-VEC(载体对照GCC阴性细胞系)(图2B)；和两种内源性表达GCC的肿瘤细胞系：GSU(图2C)和LS1034(图2D)。条形代表来自三次技术重复的平均值+SD值。数据代表用来自>3个供体的抗GCC CAR T细胞进行的>3个独立实验。CAR T细胞毒性在截短EGFR(tEGFR)不存在的情况下测定。

[0082] 图3A-3D示出使用四种肿瘤细胞系进行的示例性抗GCC CAR-T体外细胞毒性试验。HT29-GCC细胞(一种经工程化以稳定表达GCC的人结肠直肠癌细胞系HT29)(图3A)；HT29-VEC(载体对照GCC阴性细胞系)(图3B)；和两种内源性表达GCC的肿瘤细胞系：GSU(图3C)和LS1034(图3D)。条形代表来自三次技术重复的平均值+SD值。数据代表用来自>3个供体的抗GCC CAR T细胞进行的>3个独立实验。CAR T细胞毒性在截短EGFR(tEGFR)存在的情况下测定。

[0083] 图4A-4D示出由与表达GCC(HT29-GCC)(图4A)、GSU(图4C)、LS1034(图4D)和GCC-阴性(HT29-VEC，图4B)的肿瘤细胞体外共培养的抗GCC CAR-T细胞分泌的示例性IFN-g细胞因子。上清液中的分泌型IFNg是使用Intellicyt QBeads Human PlexScreen试剂盒(Sartorius，90702)测定。条形代表来自三次技术重复的平均值+SD值。数据代表用来自>3个供体的抗GCC CAR T细胞进行的>3个独立实验。细胞因子分泌在截短EGFR(tEGFR)不存在

的情况下测定。

[0084] 图5A-5D示出由与表达GCC(HT29-GCC)(图5A)、GSU(图5C)、LS1034(图5D)和GCC-阴性(HT29-VEC,图5B)的肿瘤细胞体外共培养的抗GCC CAR-T细胞分泌的示例性IFN-g细胞因子。上清液中的分泌型IFNg是使用Intellicyt QBeads Human PlexScreen试剂盒(Sartorius,90702)测定。条形代表来自三次技术重复的平均值+SD值。数据代表用来自>3个供体的抗GCC CAR T细胞进行的>3个独立实验。细胞因子分泌在截短EGFR(tEGFR)存在的情况下测定。

[0085] 图6A-6D示出由与表达GCC(HT29-GCC)(图6A)、GSU(图6C)、LS1034(图6D)和GCC-阴性(HT29-VEC,图6B)的肿瘤细胞体外共培养的抗GCC CAR-T细胞分泌的示例性IL-2细胞因子。上清液中的分泌型IFL-2是使用Intellicyt QBeads Human PlexScreen试剂盒(Sartorius,90702)测定。条形代表来自三次技术重复的平均值+SD值。数据代表用来自>3个供体的抗GCC CAR T细胞进行的>3个独立实验。细胞因子分泌在截短EGFR(tEGFR)不存在的情况下测定。

[0086] 图7A-7D示出由与表达GCC(HT29-GCC)(图7A)、GSU(图7C)、LS1034(图7D)和GCC-阴性(HT29-VEC,图7B)的肿瘤细胞体外共培养的抗GCC CAR-T细胞分泌的示例性IL-2细胞因子。上清液中的分泌型IFL-2是使用Intellicyt QBeads Human PlexScreen试剂盒(Sartorius,90702)测定。条形代表来自三次技术重复的平均值+SD值。数据代表用来自>3个供体的抗GCC CAR T细胞进行的>3个独立实验。细胞因子分泌在截短EGFR(tEGFR)存在的情况下测定。

[0087] 图8A和8B示出用从两个不同健康供体D393(图8A)和D686(图8B)制造的抗GCC CAR-T细胞处理的HT55模型(内源性表达GCC的结肠直肠癌,GCC H-分数＝300/300)中,平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(40天)的变化的示例性抗肿瘤作用结果。抗肿瘤作用在截短EGFR(tEGFR)不存在的情况下测定。

[0088] 图9A-9C示出用从三个不同健康供体D393(图9A)、D797(图9B)和D954(图9C)制造的抗GCC CAR-T细胞处理的HT55模型(内源性表达GCC的结肠直肠癌,GCC H-分数＝300/300)中,平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化的示例性抗肿瘤作用结果。抗肿瘤作用在截短EGFR(tEGFR)不存在的情况下测定。

[0089] 图10A-10C示出用从三个不同健康供体D393(图10A)、D797(图10B)和D954(图10C)制造的抗GCC CAR-T细胞处理的HT55模型(内源性表达GCC的结肠直肠癌,GCC H-分数＝300/300)中,平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化的示例性抗肿瘤作用结果。抗肿瘤作用在截短EGFR(tEGFR)存在的情况下测定。

[0090] 图11A-11C示出用从三个不同健康供体D393(图11A)、D954(图11B)和D686(图11C)制造的抗GCC CAR-T细胞处理的HT55模型(内源性表达GCC的结肠直肠癌,GCC H-分数＝300/300)中,平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化的示例性抗肿瘤作用结果。抗肿瘤作用在截短EGFR(tEGFR)不存在的情况下测定。

[0091] 图12A-12C示出用从三个不同健康供体D393(图12A)、D954(图12B)和D686(图12C)制造的抗GCC CAR-T细胞处理的HT55模型(内源性表达GCC的结肠直肠癌,GCC H-分数＝300/300)中,平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化的示例性抗肿瘤作用结果。抗肿瘤作用在截短EGFR(tEGFR)存在的情况下测定。

[0092] 图13A和13B示出用从两个不同健康供体D393(图13A)和D954(图13B)制造的抗GCC CAR-T细胞处理的GSU模型(内源性表达GCC的胃癌,GCC H-分数＝170/300)中,平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化的示例性抗肿瘤作用结果。抗肿瘤作用在截短EGFR(tEGFR)不存在的情况下测定。

[0093] 图14A和14B示出用从两个不同健康供体D393(图14A)和D954(图14B)制造的抗GCC CAR-T细胞处理的GSU模型(内源性表达GCC的胃癌,GCC H-分数＝170/300)中,平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化的示例性抗肿瘤作用结果。抗肿瘤作用在截短EGFR(tEGFR)存在的情况下测定。

[0094] 图15A-C示出用从三个不同健康供体D393(图15A)、D954(图15B)和D686(图15C)制造的抗GCC CAR-T细胞处理的GSU模型(内源性表达GCC的胃癌,GCC H-分数＝170/300)中,平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化的示例性抗肿瘤作用结果。抗肿瘤作用在截短EGFR(tEGFR)不存在的情况下测定。

[0095] 图16A-C示出用从三个不同健康供体D393(图16A)、D954(图16B)和D686(图16C)制造的抗GCC CAR-T细胞处理的GSU模型(内源性表达GCC的胃癌,GCC H-分数＝170/300)中,平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化的示例性抗肿瘤作用结果。抗肿瘤作用在截短EGFR(tEGFR)不存在的情况下测定。

[0096] 图17示出用从健康供体制造的抗GCC CAR-T细胞处理的LS1034模型(内源性表达GCC的结肠直肠癌,GCC H-分数＝300/300)中,平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化的示例性抗肿瘤功效。抗肿瘤作用在截短EGFR(tEGFR)不存在的情况下测定。

[0097] 图18示出用从健康供体制造的抗GCC CAR-T细胞处理的LS1034模型(内源性表达GCC的结肠直肠癌,GCC H-分数＝300/300)中,平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化的示例性抗肿瘤作用结果。抗肿瘤作用在截短EGFR(tEGFR)存在的情况下测定。

[0098] 定义

[0099] 为使本发明更易于理解,首先在下文定义某些术语。以下术语和其它术语的额外定义贯穿本说明书阐述。

[0100] 除非上下文另外明确指示,否则如本说明书和随附权利要求中所用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”包括复数个指示物。因此,例如,提及“方法”包括本文所述类型的和/或在阅读过本公开内容后对于本领域技术人员将变得显而易见的一种或多种方法和/或步骤。

[0101] 施用:如本文所用,向受试者“施用”组合物意指给予、施加组合物或使组合物与受试者接触。施用可通过多种途径中的任一者实现,所述途径诸如例如局部、口服、皮下、肌肉内、腹膜内、静脉内、鞘内和皮内。

[0102] 亲和力:如本文所用,术语“亲和力”是指结合部分(例如,抗原结合剂(例如,本文所述的可变结构域)与靶标(例如,抗原(例如GCC))之间的结合相互作用的特征,并且指示所述结合相互作用的强度。在一些实施方案中,亲和力的量度以解离常数(K_D)表示。在一些实施方案中,结合部分对靶标具有高亲和力(例如,小于约10^{-7}M、小于约10^{-8}M或小于约10^{-9}M的K_D)。在一些实施方案中,结合部分对靶标具有低亲和力(例如,高于约10^{-7}M、高于约10^{-6}M、高于约10^{-5}M或高于约10^{-4}M的K_D)。

[0103] 动物:如本文所用的术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方案中,“动

物”是指处于任何发育阶段的人。在一些实施方案中，“动物”是指处于任何发育阶段的非人动物。在某些实施方案中，非人动物为哺乳动物(例如啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物和/或猪)。在一些实施方案中，动物包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼、昆虫和/或蠕虫。在一些实施方案中，动物可为转基因动物、遗传工程化的动物和/或克隆。

[0104] 自体：如本文所用，术语“自体”是指来源于同一个体且稍后重新引入所述个体中的任何材料。

[0105] 同种异体：“同种异体”是指来源于一个个体的材料施用于一个或多个不同的个体。

[0106] 抗体或抗原结合剂：如本文所用，术语“抗体”或“抗原结合剂”是指包括足以赋予与特定靶抗原的特异性结合的规范免疫球蛋白序列元件的多肽。本领域技术人员将了解，所述术语可在本文中互换使用。在一些实施方案中，如本文所用，术语“抗体”或“抗原结合剂”还指“抗体片段”或“多个抗体片段”或“抗原结合部分”，其包括完整抗体的一部分，诸如例如抗体的抗原结合或可变区。“抗体片段”的实例包括Fab、Fab’、F(ab’)2和Fv片段；三抗体；四抗体；线性抗体；单链抗体分子；以及由抗体片段形成的多特异性抗体中所包括的含CDR部分。本领域技术人员应了解，术语“抗体片段”并不意味着并且不限于任何特定的产生模式。抗体片段可通过使用任何适当方法来产生，包括但不限于完整抗体的裂解、化学合成、重组产生等。如本领域中已知的，天然产生的完整抗体为包含两个相同的重链多肽(各自约50kD)和两个相同的轻链多肽(各自约25kD)的大约150kD的四聚体剂，所述多肽彼此缔合成通常被称为“Y形”的结构。每个重链包含至少四个结构域(每个约110个氨基酸长)-氨基末端可变(V_H)结构域(位于Y结构的尖端)，接着是三个恒定结构域：C_H1、C_H2和羧基末端C_H3(位于Y的茎的基部)。称为“开关”的短区连接重链可变区和恒定区。“铰链”将C_H2和C_H3结构域连接至抗体的其余部分。此铰链区中的两个二硫键将完整抗体中的两个重链多肽彼此连接。每个轻链包含两个结构域-氨基末端可变(V_L)结构域，接着是羧基末端恒定(C_L)结构域，彼此由另一个“开关”隔开。完整抗体四聚体由两个重链-轻链二聚体组成，其中重链和轻链通过单个二硫键彼此连接；两个其它二硫键将重链铰链区彼此连接，使得所述二聚体彼此连接且形成四聚体。天然产生的抗体也通常在C_H2结构域上被糖基化。天然抗体中的每个结构域都具有以“免疫球蛋白折叠”为特征的结构，所述免疫球蛋白折叠由在压缩的反平行β桶中彼此堆积的两个β折叠片(例如，3链、4链或5链折叠片)形成。每个可变结构域含有称为“互补决定区”(CDR1、CDR2和CDR3)的三个高变环和四个稍微不变的“框架”区(FR1、FR2、FR3和FR4)。当天然抗体折叠时，FR区形成为结构域提供结构框架的β折叠片，并且来自重链和轻链两者的CDR环区在三维空间中聚集在一起，这样使得它们产生位于Y结构的尖端处的单个高变抗原结合位点。抗体多肽链之间的氨基酸序列比较已定义了两种轻链(κ和λ)类别、若干重链(例如μ、γ、α、ε、δ)类别以及某些重链亚类(α1、α2、γ1、γ2、γ3和γ4)。抗体类别(IgA[包括IgA1、IgA2]、IgD、IgE、IgG[包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4]和IgM)是基于所用的重链序列的类别而定义的。

[0107] 出于本发明的目的，在某些实施方案中，包括在天然抗体中发现的足够免疫球蛋白结构域序列的任何多肽或多肽复合物可被称为和/或用作“抗体”或“抗原结合剂”，不论这种多肽是天然产生的(例如，由对抗原产生反应的生物体产生)还是通过重组工程化、化

学合成或其它人工系统或方法学产生的。在一些实施方案中，抗体为单克隆抗体；在一些实施方案中，抗体为多克隆抗体。在一些实施方案中，抗体具有为小鼠、兔、灵长类动物或人抗体的特征的恒定区序列。在一些实施方案中，如本领域中已知的，抗体序列元件为人源化、灵长类化、嵌合等。此外，如本文所用的术语“抗体”或“抗原结合剂”将被理解为涵盖(除非另有说明或从上下文清楚)在适当的实施方案中可指用于在替代性呈现中捕获抗体结构和功能特征的本领域已知的或已开发的构建体或形式中的任一种。举例而言，在一些实施方案中，所述术语可指双-或其它多-特异性(例如，zybodies等)抗体、小模块免疫药物(“SMIPs™”)、单链抗体、骆驼科动物抗体和/或抗体片段。在一些实施方案中，抗体可能缺乏它在天然产生时将具有的共价修饰(例如，聚糖的连接)。在一些实施方案中，抗体可含有共价修饰(例如，聚糖、有效载荷[例如可检测部分、治疗性部分、催化部分等]或其它侧基[例如聚乙二醇等]的连接)。

[0108] 大约或约：如本文所用，术语“大约”或“约”在应用于一个或多个目标值时是指类似于所陈述参考值的值。在某些实施方案中，除非另外说明或者另外从上下文显而易见，否则术语“大约”或“约”是指落在所陈述参考值的任一方向上(大于或小于)25％、20％、19％、18％、17％、16％、15％、14％、13％、12％、11％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％、1％或更小范围内的值范围(但这种数值将超过可能值的100％的情况除外)。

[0109] 互补决定区(CDR)：可变结构域的“CDR”为在可变区内，根据Kabat、Chothia的定义、Kabat和Chothia两者的累积、AbM、接触和/或构象定义或本领域中众所周知的任何CDR测定方法所鉴定的氨基酸残基。抗体CDR可被鉴定为最初由Kabat等人定义的高变区。参见例如，Kabat等人，1992，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，公共卫生署，NIH，Washington D.C。CDR的位置也可鉴定为最初由Chothia和其它人描述的结构环结构。参见例如，Chothia等人，Nature 342:877-883，1989。其它CDR鉴定方法包括“AbM定义”，其为Kabat与Chothia之间的折衷并且是使用Oxford Molecular的AbM抗体建模软件(现在为Accelrys®)推导而来；或基于观察到的抗原接触的CDR的“接触定义”，如MacCallum等人，J.Mol.Biol.，262:732-745，1996中所阐述。在本文中称为CDR的“构象定义”的另一种方法中，可将CDR的位置鉴定为对抗原结合做出焓贡献的残基。参见例如，Makabe等人，Journal of Biological Chemistry，283:1 156-1166，2008。仍然其它CDR边界定义可能不严格遵循以上方法之一，但将仍然与至少一部分的Kabat CDR重叠，尽管鉴于特定残基或残基组或甚至整个CDR不会显著影响抗原结合的预测或实验研究结果而可将它们缩短或延长。除非另有说明，否则如本文所用，CDR定义是根据Kabat CDR。

[0110] 效应子功能：如本文所用，术语“效应子功能”是指可归因于本文所述的抗原结合剂的那些生物活性。抗体效应子功能的实例包括：C1q结合和补体依赖性细胞毒性；Fc受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬作用；细胞表面受体(例如，B细胞受体)的下调；和B细胞活化。“降低的或最小化的”抗体效应子功能意指其与野生型或未修饰的抗体相比降低至少50％(或者60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％)。抗体效应子功能的测定可由本领域普通技术人员容易地确定和测量。在一些实施方案中，补体结合、补体依赖性细胞毒性和抗体依赖性细胞毒性的抗体效应子功能受到影响。在一些实施方案中，效应子功能通过恒定区中消除糖基化的突变(例如“无效应子突变”)而消除。在一个方面中，无效应子突变为CH2区的N297A或DANA突变(D265A+N297A)。

Shields等人,J.Biol.Chem.276(9):6591-6604(2001)。或者,导致效应子功能降低或消除的额外突变包括:K322A和L234A/L235A(LALA)。或者,效应子功能可通过生产技术而降低或消除,诸如在不糖基化的宿主细胞(例如大肠杆菌)中表达,或者其中导致在促进效应子功能方面无效或不太有效的改变的糖基化模式(例如,Shinkawa等人,J.Biol.Chem.278(5):3466-3473(2003))。

[0111] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或ADCC是指细胞毒性的一种形式,其中结合至某些细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的Fc受体(FcR)的分泌的Ig使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性地结合至携带抗原的靶细胞,并且随后用细胞毒素杀死所述靶细胞。所述抗体"武装"细胞毒性细胞,并且为通过这种机制杀死靶细胞所必需。介导ADCC的原代细胞(NK细胞)仅表达FcγRIII,而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。造血细胞上的Fc表达概述于Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-92(1991)的第464页的表3中。为了评估目标分子的ADCC活性,可进行体外ADCC测定,诸如美国专利号5,500,362或5,821,337中所述的测定。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外地,可在体内,例如在动物模型中,诸如Clynes等人,PNAS USA 95:652-656(1998)中所公开的动物模型中评估目标分子的ADCC活性。

[0112] 抗原:如本文所用,术语"抗原"是指引发免疫反应的剂;和/或当暴露于或施用于生物体时,由T细胞受体(例如,当由MHC分子呈递时)结合或与抗体(例如,由B细胞产生)结合的剂。在一些实施方案中,抗原在生物体中引发体液反应(例如,包括抗原特异性抗体的产生);替代地或另外地,在一些实施方案中,抗原在生物体中引发细胞反应(例如,涉及其受体与抗原特异性相互作用的T细胞)。本领域技术人员将了解,特定抗原可在靶生物体(例如,小鼠、兔、灵长类动物、人)的一个或数个成员中,而非在所述靶生物体物种的所有成员中引发免疫反应。在一些实施方案中,抗原在靶生物体物种的至少约25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的成员中引发免疫反应。在一些实施方案中,抗原结合至抗体和/或T细胞受体,并且可能或可能不在生物体中诱发特定生理反应。在一些实施方案中,例如,抗原可在体外结合至抗体和/或结合至T细胞受体,无论这种相互作用是否在体内发生。在一些实施方案中,抗原与特定体液或细胞免疫的产物反应,包括由异源性免疫原诱发的那些。在所公开的组合物和方法的一些实施方案中,GCC蛋白为抗原。

[0113] 相关联:如果一个事件或实体的存在、水平和/或形式与另一个事件或实体的存在、水平和/或形式相关,则两个事件或实体彼此"相关联",如所述术语在本文中所用。举例而言,如果特定实体(例如多肽)的存在、水平和/或形式与特定疾病、病症或疾患的发生率和/或易感性相关(例如在相关群体中),则认为所述特定实体与所述特定疾病、病症或疾患相关联。在一些实施方案中,如果两个或更多个实体直接或间接地相互作用,以使得它们彼此物理接近且保持物理接近,则它们彼此物理上"相关联"。在一些实施方案中,彼此物理上相关联的两个或更多个实体彼此共价连接;在一些实施方案中,彼此物理上相关联的两个或更多个实体彼此不共价连接,但例如借助于氢键、范德华相互作用(van der Waals interaction)、疏水相互作用、磁性及其组合非共价缔合。

[0114] 结合:应当理解,本文所用的术语"结合"通常是指两个或更多个实体之间的非共

价缔合。“直接”结合涉及实体或部分之间的物理接触;间接结合涉及通过与一个或多个中间实体进行物理接触的物理相互作用。两个或更多个实体之间的结合可在多种情况中的任一种下进行评估-包括在分离中或在更复杂的系统的情况下(例如,当与载体实体共价或以其它方式缔合时和/或在生物系统或细胞中)研究相互作用的实体或部分的情况。如本文所用,“K_a”是指特定结合部分与靶标形成结合部分/靶标复合物的缔合速率。如本文所用,“K_d”是指特定结合部分/靶标复合物的解离速率。如本文所用,“K_D”是指解离常数,其获自K_d比K_a的比率(即K_d/K_a),并且以摩尔浓度(M)表示。K_D值可使用本领域中良好建立的方法(例如通过使用表面等离子体共振)或使用生物传感器系统(诸如Biacore®系统)来测定。

[0115] 载体:如本文所用,术语“载体”是指与组合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。在一些示例性实施方案中,载体可包括无菌液体,诸如(例如)水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,诸如(例如)花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。在一些实施方案中,载体为或包括一种或多种固体组分。

[0116] 特征部分:如本文所用,术语“特征部分”在最广泛的意义上是指物质的一部分,其存在(或不存在)与物质的特定特征、属性或活性的存在(或不存在)相关联。在一些实施方案中,物质的特征部分是在所述物质中和在共享特定特征、属性或活性的相关物质中发现,而非在不共享特定特征、属性或活性的那些物质中发现的部分。

[0117] 密码子优化的:如本文所用,“密码子优化的”核酸序列是指已经被改变,使得核酸序列的翻译和所得蛋白质的表达针对特定表达系统改进、优化的核酸序列。“密码子优化的”核酸序列编码与所述“密码子优化的”核酸序列所基于的未优化亲本序列相同的蛋白质。例如,核酸序列可经“密码子优化”,以在哺乳动物细胞(例如,CHO细胞、人细胞、小鼠细胞等)、细菌细胞(例如,大肠杆菌)、昆虫细胞、酵母细胞或植物细胞中表达。

[0118] 可比较:如本文所用,术语“可比较”是指两种或更多种剂、实体、情况、条件组等,它们可彼此不同但足够相似,以允许在它们之间进行比较,使得可根据观察到的差异或相似性合理地得出结论。本领域普通技术人员将理解,在上下文中,在任何给定情况下,对于两种或更多种此类剂、实体、情况、条件组等需要何种同一性程度才被认为是可比较的。

[0119] 对应于:如本文所用,术语“对应于”通常用于指定目标多肽的氨基酸残基的位置/同一性。普通技术人员将理解,为简要起见,多肽中的残基通常使用基于参考相关多肽的规范编号系统来命名,使得“对应于”位置190处的残基的氨基酸,举例而言,实际上不必是特定氨基酸链中的第190个氨基酸,而是对应于所述参考多肽中第190个残基;本领域普通技术人员容易理解如何鉴定“相对应的”氨基酸。

[0120] 源自:如本文所用,短语“源自指测序列”或“对指测序列具有特异性”的序列是指包含与例如指测序列的连续区域对应(即,同一或互补)的大约至少6个核苷酸或至少2个氨基酸、至少约9个核苷酸或至少3个氨基酸、至少约10-12个核苷酸或4个氨基酸或至少约15-21个核苷酸或5-7个氨基酸的连续序列的序列。在某些实施方案中,所述序列包含指定的核苷酸或氨基酸序列的全部。如通过本领域中已知的技术所确定,所述序列可与特测序列所独有的序列区域互补(在多核苷酸序列的情况下)或同一。序列可来源的区域包括但不限于:编码特异性表位的区域、编码CDR的区域、编码框架序列的区域、编码恒定结构域区域的区域、编码可变结构域区域的区域,以及非翻译和/或非转录区域。所来源的序列不一定是物理地源自研究中的目标序列,而是可以任何方式产生,包括但不限于化学合成、复制、逆

转录或转录，其基于多核苷酸所来源的区域中的碱基的序列所提供的信息。因此，它可代表原始多核苷酸的有义或反义取向。此外，对应于指测序列的区域组合可以本领域中已知的方式进行修饰或组合，以符合预期用途。例如，序列可包含两个或更多个各自包含指测序列的一部分的连续序列，并且被与指测序列不同一但意图代表源自所述指测序列的序列的区域中断。关于抗体分子，“源自”包括在功能上或结构上与比较抗体相关的抗体分子，例如，“源自”包括具有相似或实质上相同的序列或结构，例如具有相同或相似的CDR、框架或可变区的抗体分子。抗体的“源自”还包括残基，例如一个或多个，例如2、3、4、5、6个或更多个残基，所述残基可为或可不为连续的，但根据编号方案或与比较序列的一般抗体结构的同源性或三维邻近性(即，在CDR或框架区内)而定义或鉴定。术语“源自”不限于物理地源自，而是包括通过任何方式产生，例如通过使用来自比较抗体的序列信息来设计另一抗体。

[0121] 测定：本文所述的许多方法学包括“测定”步骤。阅读本说明书的本领域普通技术人员将理解，这种“测定”可利用本领域技术人员可获得的多种技术中的任一种，包括例如本文明确提及的特定技术进行。在一些实施方案中，测定涉及物理样品的操作。在一些实施方案中，测定涉及对数据或信息的考虑和/或操作，例如利用适于执行相关分析的计算机或其它处理单元。在一些实施方案中，测定涉及从来源接收相关信息和/或材料。在一些实施方案中，测定涉及将样品或实体的一个或多个特征与可比较的参考物进行比较。

[0122] 工程化：如本文所用，术语“工程化”描述已由人设计或修饰和/或其存在和生产需要人为干预和/或活动的多核苷酸、多肽或细胞。例如，旨在设计用于引发特定效果且与天然存在的相同类型的细胞的效果不同的工程化细胞。在一些实施方案中，工程化细胞表达本文所述的嵌合抗原受体。在具体实施方式和实施例部分中描述示例性工程化方法。

[0123] 表位：如本文所用，术语“表位”包括被免疫球蛋白(例如，抗体或受体)结合组分全部或部分特异性识别的任一部分。在一些实施方案中，表位由抗原中的多个氨基酸组成。在一些实施方案中，当抗原采用相关三维构象时，此类氨基酸残基是表面暴露的。在一些实施方案中，当抗原采用这种构象时，氨基酸残基在空间中彼此物理上接近或等高。在一些实施方案中，当抗原采用替代构象(例如，线性化；例如，非线性表位)时，至少一些氨基酸彼此物理上分离。

[0124] 赋形剂：如本文所用，术语“赋形剂”是指可包含在药物组合物中，例如以提供或促成所需的稠度或稳定作用的非治疗剂。合适的药物赋形剂包括例如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。

[0125] 表达：术语“表达”或“表达的”，当关于本文中的核酸使用时，是指以下事件中的一者或多者：(1)DNA模板的RNA转录物产生(例如，通过转录)；(2)RNA转录物的加工(例如，通过剪接、编辑、5’帽形成和/或3’端形成)；(3)RNA翻译成多肽；和/或(4)多肽的翻译后修饰。

[0126] 离体：如本文所用，术语“离体”是指在外部环境中，例如在多细胞生物体外部发生的事件。在一些实施方案中，在将这种细胞或细胞群体施用于有需要的受试者之前，将细胞或细胞群体在多细胞生物体(例如，哺乳动物，诸如非人灵长类动物或人)的体外进行修饰，以表达本文所述的抗GCC分子。

[0127] 融合蛋白：如本文所用，术语“融合蛋白”是指由从编码两种不同(例如，异源性)蛋白质的至少一部分的核酸序列工程化的核酸序列编码的蛋白质。技术人员无疑知道，为了

产生融合蛋白，将核酸序列连接，使得所得阅读框不含内部终止密码子。在一些实施方案中，如本文所述的融合蛋白包括流感HA多肽或其片段。

[0128] 鸟苷酸环化酶C(GCC)：如本文所用，“GCC”，也称为“STAR”、“GUC2C”、“GUCY2C”或“ST受体”蛋白，是指哺乳动物GCC，优选人GCC蛋白。人GCC是指GenBank登录号：NM—004963中描述的蛋白质及其天然存在的等位基因蛋白质变体。其它变体为本领域中已知的。参见例如，登录号Ensp0000261170，Ensembl数据库，欧洲生物信息研究所(European Bioinformatics Institute)和韦尔科姆基金会桑格研究所(Wellcome Trust Sanger Institute)，美国专利申请号20060035852；或GenBank登录号AAB 19934。通常，天然存在的等位基因变体具有与SEQ ID NO:41的GCC序列至少95％、97％或99％同一的氨基酸序列。所述转录物编码具有1073个氨基酸的蛋白质产物，并描述于GenBank登录号：NM—004963中。GCC蛋白被表征为跨膜细胞表面受体蛋白，并且据信在维持肠液、电解质体内稳态和细胞增殖中起关键作用。

[0129] 宿主：术语“宿主”在本文中用于指其中存在目标多肽的系统(例如，细胞、生物体等)。在一些实施方案中，宿主为表达特定目标多肽的系统。

[0130] 宿主细胞：如本文所用，短语“宿主细胞”是指已引入外源性DNA(重组或以其它方式)的细胞。例如，宿主细胞可用于通过标准重组技术产生本文所述的多肽。技术人员在阅读本公开内容后将理解，此类术语不仅是指特定受试者细胞，而且指这种细胞的子代。由于某些修饰可能由于突变或环境影响而在后代中发生，因此这种子代可能实际上不与亲本细胞相同，但仍包括在如本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。在一些实施方案中，宿主细胞包括适合于表达外源性DNA(例如，重组核酸序列)的任何原核和真核细胞。示例性细胞包括原核生物和真核生物的细胞(单细胞或多细胞)、细菌细胞(例如大肠杆菌、芽孢杆菌属、链霉菌属等的菌株)、分枝杆菌细胞、真菌细胞、酵母细胞(例如，酿酒酵母(S.cerevisiae)、粟酒裂殖酵母(S.pombe)、巴斯德毕赤酵母(P.pastoris)、甲醇毕赤酵母(P.methanolica)等)、植物细胞、昆虫细胞(例如，SF-9、SF-21、杆状病毒感染的昆虫细胞、粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)等)、非人动物细胞、人细胞或细胞融合物，诸如(例如)杂交瘤或四源杂交瘤(quadromas)。在一些实施方案中，细胞为人、猴、猿、仓鼠、大鼠或小鼠细胞。在一些实施方案中，细胞为真核细胞，并且选自以下细胞：CHO(例如，CHO K1、DXB-11CHO、Veggie-CHO)、COS(例如，COS-7)、视网膜细胞、Vero、CV1、肾(例如HEK293、HEK293T、293EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60(例如BHK21)、Jurkat、Daudi、A431(表皮)、CV-1、U937、3T3、L细胞、C127细胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、塞尔托利细胞(Sertoli cell)、BRL 3A细胞、HT1080细胞、骨髓瘤细胞、肿瘤细胞和源自前述细胞的细胞系。在一些实施方案中，细胞包含一种或多种病毒基因，例如表达病毒基因的视网膜细胞(例如PER.C6™细胞)。

[0131] 免疫反应：如本文所用，术语“免疫反应”是指免疫系统的细胞如B细胞、T细胞、树突细胞、巨噬细胞或多形核细胞对刺激物如抗原或疫苗的反应。免疫反应可包括参与宿主防御反应的任何身体细胞，包括例如分泌干扰素或细胞因子的上皮细胞。免疫反应包括但不限于先天性和/或适应性免疫反应。如本文所用，保护性免疫反应是指保护受试者不受感染(预防感染或预防与感染相关的疾病的发展)的免疫反应。测量免疫反应的方法为本领域中众所周知的，包括例如测量淋巴细胞(诸如B或T细胞)的增殖和/或活性、细胞因子或趋化

因子的分泌、炎症、抗体产生和类似反应。

[0132] 体外:如本文所用,术语“体外”是指在人工环境中,例如在试管或反应容器中、在细胞培养物等中、而非在多细胞生物体内发生的事件。

[0133] 体内:如本文所用,术语“体内”是指在诸如人和非人动物的多细胞生物体内发生的事件。在基于细胞的系统的背景中,所述术语可用于指在活细胞(与例如体外或离体系统相反)内发生的事件。

[0134] 分离的:如本文所用,术语“分离的”是指物质和/或实体已(1)与其最初产生时(无论是在自然界和/或在实验环境中)与之相关联的至少一些组分分离,和/或(2)在人为干预下设计、生产、制备和/或制造。分离的物质和/或实体可与约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或多于约99%的它们最初与其缔合的其它组分分离。在一些实施方案中,分离的剂为约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或高于约99%纯。如本文所用,如果物质实质上不含其它组分,则所述物质为“纯的”。在一些实施方案中,如本领域技术人员将理解的,在与某些其它组分诸如(例如)一种或多种载体或赋形剂(例如,缓冲剂、溶剂、水等)组合之后,物质仍可被视为“分离的”或甚至“纯的”;在此类实施方案中,在不包括此类载体或赋形剂的情况下计算物质的分离百分比或纯度。仅举一个实例,在一些实施方案中,自然界中存在的生物聚合物,诸如多肽或多核苷酸在以下情况下被认为是“分离的”:a)根据其来源或衍生源不与在自然界中在其天然状态中伴随其的一些或全部组分缔合;b)其实质上不含来自在自然界中产生其的物种的相同物种的其它多肽或核酸;c)由来自细胞或其它表达系统的组分表达或以其它方式与来自细胞或其它表达系统的组分缔合(所述细胞或其它表达系统不是在自然界中产生其的物种)。因此,例如,在一些实施方案中,化学合成的或在不同于在自然界中产生其的细胞系统中合成的多肽被认为是“分离的”多肽。可替代地或另外地,在一些实施方案中,已进行一种或多种纯化技术的多肽在其已经与a)在自然界中与其缔合;和/或b)在最初生产时与其缔合的其它组分分离的程度上可被认为是“分离的”多肽。在一些实施方案中,细胞可与其它细胞“分离”(例如,纯化或分离)。例如,在一些实施方案中,可从未修饰的细胞中分离经工程化以表达本文所述的CAR的经遗传修饰的细胞。

[0135] 核酸:如本文所用,短语“核酸”在其最广泛的意义上是指作为寡核苷酸链或者可并入寡核苷酸链中的任何化合物和/或物质。在一些实施方案中,核酸是作为寡核苷酸链或者可经由磷酸二酯键联并入寡核苷酸链中的化合物和/或物质。如从上下文将显而易见,在一些实施方案中,“核酸”是指单独核酸残基(例如,核苷酸和/或核苷);在一些实施方案中,“核酸”是指包含单独核酸残基的寡核苷酸链。在一些实施方案中,“核酸”为或包含RNA;在一些实施方案中,“核酸”为或包含DNA。在一些实施方案中,核酸为、包含一个或多个天然核酸残基或由一个或多个天然核酸残基组成。在一些实施方案中,核酸为、包含一种或多种核酸类似物或由一种或多种核酸类似物组成。在一些实施方案中,核酸类似物与核酸的不同之处在于它不利用磷酸二酯主链。例如,在一些实施方案中,核酸为、包含一种或多种“肽核酸”或由其组成,所述太合算在本领域中已知并且在主链中具有肽键而不是磷酸二酯键,被认为在本发明的范围内。可替代地或另外地,在一些实施方案中,核酸具有一个或多个硫代磷酸酯和/或5’-N-亚磷酰胺键联而非磷酸二酯键。在一些实施方案中,核酸为、包含一种或

多种天然核苷(例如,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)或由其组成。在一些实施方案中,核酸为、包含一种或多种核苷类似物(例如,2-氨基腺苷、2-硫胸苷、肌苷、吡咯并-嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5丙炔基-胞苷、C-5丙炔基-尿苷、2-氨基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、O(6)-甲基鸟嘌呤、2-硫胞苷、甲基化碱基、插入碱基以及其组合)或由其组成。在一些实施方案中,与天然核酸中的那些相比,核酸包含一种或多种经修饰的糖(例如,2'-氟核糖、核糖、2'-脱氧核糖、阿拉伯糖和己糖)。在一些实施方案中,核酸具有编码功能基因产物,诸如RNA或蛋白质的核苷酸序列。在一些实施方案中,核酸包括一个或多个内含子。在一些实施方案中,通过从天然来源分离、通过基于互补模板聚合进行的酶促合成(体内或体外)、在重组细胞或系统中复制和化学合成中的一种或多种来制备核酸。在一些实施方案中,核酸的长度为至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、20、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000个或更多个残基。在一些实施方案中,核酸为单链;在一些实施方案中,核酸为双链。在一些实施方案中,核酸具有包含至少一个元件的核苷酸序列,所述至少一个元件编码多肽或者是编码多肽的序列的互补序列。在一些实施方案中,核酸具有酶活性。

[0136] 药学上可接受的媒介物:可用于本公开中的药学上可接受的载体(媒介物)为常规的。RemingtoN's Pharmaceutical Sciences,E.W.Martin,Mack Publishing Co.,Easton,PA,第15版(1975)描述适用于一种或多种治疗性组合物的药物递送的组合物和制剂(例如,包含本文所述的嵌合抗原受体的组合物),以及额外药剂。一般而言,载体的性质将取决于所采用的特定施用模式。例如,肠胃外制剂通常包含可注射流体,其包含药学上和生理学上可接受的流体,诸如水、生理盐水、平衡盐溶液、右旋糖水溶液、甘油或类似物作为媒介物。对于固体组合物而言(例如,粉末、丸剂、片剂或胶囊形式),常规无毒固体载体可包括例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物中性载体之外,待施用的药物组合物可含有少量无毒辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0137] 多肽:"多肽",一般而言,为通过肽键彼此连接的至少两个氨基酸的串。在一些实施方案中,多肽可包含至少3-5个氨基酸,每个氨基酸通过至少一个肽键连接至其它氨基酸。本领域普通技术人员将理解,多肽有时包括"非天然"氨基酸或仍然仍能够任选地整合到多肽链中的其它实体。在一些实施方案中,术语"多肽"用于指多肽的特定功能类别,诸如抗体、嵌合抗原受体或共刺激结构域多肽等。对于每一这种类别,本说明书提供和/或本领域知道所述类别内的已知示例性多肽的氨基酸序列的数个实例;在一些实施方案中,一种或多种此类已知多肽为所述类别的参考多肽。在此类实施方案中,术语"多肽"是指显示出与相关参考多肽足够的序列同源性或同一性的类别的任何成员,本领域技术人员将理解所述参考多肽应包括在所述类别中。在许多实施方案中,代表性类别的成员还与参考多肽共享显著活性。例如,在一些实施方案中,成员多肽显示出与参考多肽至少约30%-40%并且通常大于约50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的总体序列同源性或同一性程度,和/或包括显示出非常高的序列同一性(通常

大于90％或甚至95％、96％、97％、98％或99％)的至少一个区(即保守区,通常包括特征性序列元件)。这种保守区通常涵盖至少3-4个且经常多达20个或更多个氨基酸;在一些实施方案中,保守区涵盖至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15个或更多个连续氨基酸的至少一个链段。

[0138] 应理解,本发明的抗体和抗原结合剂可具有额外的保守性或非必需氨基酸取代,所述氨基酸取代对多肽功能没有实质性影响。特定取代是否将被容忍,即不会不利地影响所需的生物学性质(诸如结合活性),可如Bowie,J U等人,Science 247:1306-1310(1990)或Padlan等人,FASEB J.9:133-139(1995)中所述确定。“保守性氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基置换的氨基酸取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义。这些家族包括具有以下侧链的氨基酸: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)、不带电荷的极性侧链(例如,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,甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β-支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0139] 预防:如本文所用,术语“预防”是指预防、避免疾病表现,延迟特定疾病、病症或疾患(例如,感染,例如流感病毒感染)的发作和/或降低所述疾病、病症或疾患的一种或多种症状的频率和/或严重程度。在一些实施方案中,预防是在群体基础上评估的,使得如果在易患疾病、病症或疾患的群体中观察到所述疾病、病症或疾患的一种或多种症状的发展、频率和/或强度在统计学上显著降低,则认为剂“预防”所述特定疾病、病症或疾患。

[0140] 纯的:如本文所用,如果剂或实体实质上不含其它成分,则其为“纯的”。例如,含有超过约90％的特定剂或实体的制剂通常被认为是纯制剂。在一些实施方案中,剂或实体为至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少为99％纯的。

[0141] 重组:如本文所用,术语“重组”意指通过重组方式设计、工程化、制备、表达、产生或分离的多肽(例如,如本文所述的多肽),诸如使用转染至宿主细胞中的重组表达载体表达的多肽,从重组、组合多肽文库中分离的多肽,或通过涉及将选测序列元件剪接至另一者的任何其它方式制备、表达、产生或分离的多肽。在一些实施方案中,此类选测序列元件中的一者或多者在自然界中发现。在一些实施方案中,此类选测序列元件中的一者或多者和/或其组合在计算机中设计。在一些实施方案中,此类选测序列元件中的一者或多者由多个(例如,两个或更多个)已知序列元件的组合产生,所述已知序列元件并非天然存在于同一多肽中(例如,来自两个单独HA多肽的两个表位)。

[0142] 参考:术语“参考”在本文中经常用于描述与目标剂、个体、群体、样品、序列或值进行比较的标准或对照剂、个体、群体、样品、序列或值。在一些实施方案中,参考剂、个体、群体、样品、序列或值实质上与目标剂、个体、群体、样品、序列或值的测试和/或测定同时进行测试和/或测定。在一些实施方案中,参考剂、个体、群体、样品、序列或值是历史参考物,任选地在有形媒介中体现。通常,如本领域技术人员将理解的,参考剂、个体、群体、样品、序列或值在与用于确定或表征目标剂、个体、群体、样品、序列或值的条件可比较的条件下确定或表征。

[0143] 单结构域抗体:如本文所用,术语“单结构域抗体(sdAb)”、“可变单结构域”或“免

疫球蛋白单可变结构域(ISV)”、“单重链可变结构域(VH)抗体”是指与靶抗原结合的抗体的单一可变片段。这些术语在本文中可互换使用。sdAb为具有三个互补决定区(CDR)的单一抗原结合多肽。单独sdAb能够结合至抗原,而无需与相应的含CDR多肽配对。VH单结构域抗体是指具有人重链可变结构域或源自人重链可变结构域的结构域的单结构域抗体。在一些情况下,单结构域抗体由骆驼科动物HCAb工程化,并且其重链可变结构域被称为“VHH”。一些VHH还可称为纳米抗体。骆驼科动物sdAb是最小的已知抗原结合抗体片段之一(参见例如,Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-8(1993);Greenberg等人,Nature 374:168-73(1995);Hassanzadeh-Ghassabeh等人,Nanomedicine(Lond),8:1013-26(2013))。基本VHH从N末端至C末端具有以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1至FR4分别是指框架区1至4,并且其中CDR1至CDR3是指互补决定区1至3。如下文所解释,本发明的不同方面的一些实施方案涉及结合剂,所述结合剂包含可在轻链不存在的情况下结合GCC抗原的单一重链可变结构域抗体/免疫球蛋白重链单一可变结构域。

[0144] 受试者:如本文所用,术语“受试者”意指任何哺乳动物,包括人。在本发明的某些实施方案中,受试者为成人、青少年或婴儿。在一些实施方案中,术语“个体”或“患者”被使用并且意图可与“受试者”互换。本发明还涵盖施用药物组合物和/或实施子宫内治疗方法。例如,受试者可为患有癌症(例如胃肠来源)、癌症症状的患者(例如人患者或兽类患者),其中至少一些细胞表达GCC;或有癌症倾向的患者,其中至少一些细胞表达GCC。本发明的术语“非人动物”包括所有非人脊椎动物,例如非人哺乳动物和非哺乳动物,诸如非人灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等,除非另有说明。

[0145] 实质上:如本文所用,术语“实质上”是指展现总体或接近总体范围或程度的目标特征或特性的定性条件。生物学领域的普通技术人员将理解,生物和化学现象很少(如果有的话)达到完全和/或进行至完全或实现或避免绝对结果。因此,术语“实质上”在本文中用于捕获在许多生物和化学现象中固有的潜在完全性缺乏。

[0146] 治疗剂:如本文所用,术语“治疗剂”是指具有生物活性的剂(例如,抗原结合剂)。所述术语在本文中用于表示化合物、化合物的混合物、生物大分子或由生物材料制成的提取物。在一些实施方案中,治疗剂可为抗癌剂或化学治疗剂。如本文所用,术语“抗癌剂”或“化学治疗剂”是指具有抑制人赘生物,特别是恶性(癌性)病变,诸如癌、肉瘤、淋巴瘤或白血病的发展或进展的功能特性的剂。抑制转移或血管生成通常是抗癌剂或化学治疗剂的特性。化学治疗剂可为细胞毒性剂或细胞生长抑制剂。术语“细胞生长抑制剂”是指抑制或阻抑细胞生长和/或细胞增殖的剂。在一些实施方案中,治疗剂为经遗传修饰的细胞或抗体。在一些实施方案中,治疗剂为抗GCC CAR。在一些实施方案中,治疗剂为表达本文所述的GCC CAR的细胞(例如,细胞群体)。

[0147] 转化:如本文所用,是指将外源性DNA引入宿主细胞中的任何过程。可使用本领域中众所周知的各种方法在自然或人工条件下进行转化。转化可依赖于将外来核酸序列插入原核或真核宿主细胞中的任何已知方法。在一些实施方案中,特定转化方法是基于所转化的宿主细胞而选择,并且可包括但不限于病毒感染、电穿孔、接合、转染、脂转染。在一些实施方案中,“经转化的”细胞被稳定转化,因为插入的DNA能够作为自主复制质粒或作为宿主染色体的一部分而进行复制。在一些实施方案中,经转化的细胞在有限的时间段内瞬时表达所引入的核酸。

[0148] 治疗(treat)或治疗(treatment):如本文所用,术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”被定义为将抗GCC抗原结合剂(例如,抗GCC抗体或其片段、抗GCC CAR、包含抗GCC CAR的细胞等)施用于受试者,例如患者,或施用于(例如通过施加)来自受试者的分离的组织或细胞,所述分离的组织或细胞被返回所述受试者中。抗GCC抗原结合剂可单独施用或与第二剂组合施用。治疗可为治愈、疗愈、缓解、减轻、改变、补救、改善、缓和、改进或影响病症(例如癌症)、病症的症状或病症的倾向。尽管不希望受理论束缚,但据信治疗可在体外或体内引起细胞的抑制、消除或杀伤,或以其它方式降低细胞(例如异常细胞)介导病症,例如如本文所述的病症(例如,癌症)的能力。

[0149] 可变区或结构域:如本文所用,术语抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链和轻链的可变结构域可分别称为“VH”和“VL”。这些结构域通常是抗体的最易变部分(相对于同一类别的其它抗体)并且包含抗原结合位点。仅具重链的抗体具有单一重链可变区。

[0150] 载体:如本文所用,术语“载体”是指能够运输其所连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体为“质粒”,其是指可将额外的DNA区段连接至其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体为病毒载体,其中额外的DNA片段可连接至病毒基因组中。某些载体能够在它们被引入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可在引入宿主细胞中后整合至宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导它们所可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

具体实施方式

[0151] 本发明是基于发现特异性地结合鸟苷酸环化酶C(GCC)的新颖抗原结合剂及其在治疗方法中的用途。本申请提供抗GCC单结构域抗体(sdAb)和包含细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体(CAR),所述细胞外抗原结合结构域包含一个或多个GCC结合部分(诸如抗GCC sdAb)。

[0152] 本发明不限于本文所述的特定方法和实验条件,因为此类方法和条件可变化。还应理解,本文中所用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并且不意图用于限制,除非指明,因为本发明的范围将仅受所附权利要求限制。

[0153] 鸟苷酸环化酶C

[0154] 鸟苷酸环化酶C(GCC)(也称为STAR、ST受体、GUC2C和GUCY2C)为跨膜细胞表面受体,其在维持肠液、电解质体内稳态和细胞增殖中发挥作用(Carrithers等人,Proc Natl Acad Sci USA 100:3018-3020(2003);Mann等人,Biochem Biophys Res Commun 239:463-466(1997);Pitari等人,Proc Natl Acad Sci USA 100:2695-2699(2003));GenBank登录号NM_004963,其各自以引用的方式并入本文中)。这种功能是通过鸟苷蛋白的结合而介导的(Wiegand等人,FEBS Lett.311:150-154(1992))。GCC还为热稳定肠毒素(ST,例如,具有NTFYCCELCCNPACAGCY,SEQ ID NO:40的氨基酸序列)的受体,它是由大肠杆菌以及其它感染性生物体产生的肽(Rao,M.C.Ciba Found.Symp.112:74-93(1985);Knoop F.C.和Owens、M.J.Pharmacol.Toxicol.Methods 28:67-72(1992))。ST与GCC的结合活化导致肠道疾病(例如腹泻)的信号级联反应。人GCC的核苷酸序列(GenBank登录号NM—004963)。人GCC的氨

基酸序列(GenPept登录号NP—004954)：

[0155] MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLKNLEDAVNEGLEIVRGR
LQNAGLNVTVNATFMYSDGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISA
GSFGLSCDYKETLTRLMSPARKLMYFLVNFWKTNDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYLNALEASVSYFSHEL
GFKVVLRQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLKGDRAVAEDIVIILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLV
LTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDW
GDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSPTFTWKNSKLPNDITGRGPQILMIAVFTLTGAVVLLLL
VALLMLRKYRKDYELRQKKWSHIPPENIFPLETNETNHVSLKIDDDKRRDTIQRLRQCKYDKKRVILKDLKHNDGN
FTEKQKIELNKLLQIDYYNLTKFYGTVKLDTMIFGVIEYCERGSLREVLNDTISYPDGTFMDWEFKISVLYDIAKG
MSYLHSSKTEVHGRLKSTNCVVDSRMVVKITDFGCNSILPPKKDLWTAPEHLRQANISQKGDVYSYGIIAQEIILR
KETFYTLSCRDRNEKIFRVENSNGMKPFRPDLFLETAEEKELEVYLLVKNCWEEDPEKRPDFKKIETTLAKIFGLF
HDQKNESYMDTLIRRLQLYSRNLEHLVEERTQLYKAERDRADRLNFMLLPRLVVKSLKEKGFVEPELYEEVTIYFS
DIVGFTTICKYSTPMEVVDMLNDIYKSFDHIVDHHDVYKVETIGDAYMVASGLPKRNGNRHAIDIAKMALEILSFM
GTFELEHLPGLPIWIRIGVHSGPCAAGVVGIKMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPLRIHVSGSTIAILKRTECQFL
YEVRGETYLKGRGNETTYWLTGMKDQKFNLPTPPTVENQQRLQAEFSDMIANSLQKRQAAGIRSQKPRRVASYKKG
TLEYLQLNTTDKESTYF(SEQ ID NO:41)

[0156] GCC蛋白具有一些一般可接受的结构域,每个结构域都有助于GCC分子的功能。GCC的功能包括用于将蛋白质引导至细胞表面的信号传导、细胞外配体结合、酪氨酸激酶活性和鸟苷酸环化酶催化活性。在正常人组织中,GCC在粘膜细胞处表达,例如在内衬小肠、大肠和直肠的顶端刷状缘膜处表达(Carrithers等人,Dis Colon Rectum39:171-181(1996))。GCC表达在肠上皮细胞的致瘤性转化后仍维持,其在所有原发性和转移性结肠直肠肿瘤中表达(Carrithers等人,Dis Colon Rectum 39:171-181(1996);Buc等人,Eur J Cancer 41:1618-1627(2005);Carrithers等人,Gastroenterology 107:1653-1661(1994))。来自胃、食道和胃食道交界处的肿瘤细胞也表达GCC(参见例如,美国专利号6,767,704;Debruyne等人,Gastroenterology 130:1191-1206(2006))。组织特异性表达以及与癌症(例如胃肠来源的癌症(例如结肠癌、胃癌或食道癌))的关联可开发用于使用GCC作为这种疾病的诊断标志物(Carrithers等人,Dis Colon Rectum 39:171-181(1996);Buc等人,Eur J Cancer 41:1618-1627(2005))。

[0157] 作为细胞表面蛋白,GCC也可充当受体结合蛋白,诸如抗体或配体的治疗靶标。在正常肠组织中,GCC在上皮细胞紧密连接的顶端侧上表达,所述上皮细胞紧密连接在腔内环境与血管隔室之间形成不可渗透的屏障(Almenoff等人,Mol Microbiol 8:865-873);Guarino等人,Dig Dis Sci 32:1017-1026(1987))。因此,全身静脉内施用GCC结合蛋白治疗剂将对肠道GCC受体具有最小影响,同时可接近胃肠系统的肿瘤细胞,包括侵袭性或转移性结肠癌细胞、肠外或转移性大肠肿瘤、食道肿瘤或胃肿瘤、胃食道交界处的腺癌。此外,GCC在配体结合后通过受体介导的内吞作用而内化(Buc等人Eur J Cancer41:1618-1627(2005);Urbanski等人,Biochem Biophys Acta 1245:29-36(1995))。

[0158] 针对GCC的细胞外结构域产生的多克隆抗体(Nandi等人Protein Expr.Purif.8:151-159(1996))能够抑制ST肽结合至人和大鼠GCC,并且抑制人GCC造成的ST-介导cGMP产生。

[0159] GCC已被表征为涉及癌症(包括结肠癌)的蛋白质。还参见Carrithers等人,Dis Colon Rectum 39:171-181(1996);Buc等人,Eur JCancer 41:1618-1627(2005);Carrithers等人,Gastroenterology 107:1653-1661(1994);Urbanski等人,Biochem Biophys Acta 1245:29-36(1995)。

[0160] 本文所述的针对GCC的抗原结合分子治疗剂可用于抑制表达GCC的癌细胞。本发明的抗GCC抗原结合分子可结合人GCC。在一些实施方案中,本发明的抗GCC抗原结合分子可抑制配体(例如鸟苷蛋白或热稳定肠毒素)与GCC的结合。

[0161] 抗原结合分子

[0162] 本发明涉及抗GCC抗原结合分子。在一些实施方案中,本发明的抗GCC分子在与其所结合的表达GCC的细胞上的GCC结合后引起细胞反应。在一些实施方案中,本发明的抗GCC抗原结合剂可阻断配体结合至GCC。

[0163] 天然存在的哺乳动物抗体的典型结构单元为四聚体。每个四聚体由两对多肽链组成,每一对具有一条“轻链”(约25kDa)和一条“重链”(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的具有约100至110个或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基末端部分限定主要负责效应子功能的恒定区。人轻链可分为κ和λ轻链。重链可被分类为μ、δ、γ、α或ε,并且将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过具有约12个或更多氨基酸的“J”区连接,其中重链也包括具有另外约10个氨基酸的“D”区。一般参见Fundamental Immunology第7章(Paul,W.编,第2版,Raven Press,N.Y.(1989))。每一轻链/重链对的可变区形成抗体结合位点。抗GCC抗体分子的优选同种型为IgG免疫球蛋白,其可分类为四种亚类,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,各具有不同的γ重链。大多数治疗性抗体为IgG1类型的人抗体、嵌合抗体或人源化抗体。在一个特定实施方案中,抗GCC抗体分子具有IgG1同种型。

[0164] 每一重链和轻链对的可变区形成抗原结合位点。因此,完整IgG抗体具有两个相同的结合位点。然而,双功能或双特异性抗体为人工杂合构建体,其具有两个不同的重链/轻链对,导致两个不同的结合位点。

[0165] 所述链都展现由三个高变区(也称为互补决定区或CDR)连接的相对保守的框架区(FR)的相同一般结构。来自每一对的两条链的CDR通过框架区对准,从而能够与特异性表位结合。从N末端至C末端,轻链和重链两者均包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。每个结构域的氨基酸分配是根据下列文献的定义:Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987和1991))或Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987);Chothia等人,Nature 342:878-883(1989)。如本文所用,CDR是依据Kabat针对重链(HCDR1、HCDR2、HCDR3)和轻链(LCDR1、LCDR2、LCDR3)中的每一者而提及。

[0166] 抗GCC抗体分子可包含本文所述抗体的全部或CDR或重链的抗原结合子集。本文所述的抗GCC抗原结合剂的氨基酸序列,包括可变区和CDR,可见于表1-3中。

[0167] 因此,在一个实施方案中,抗体分子包括以下中的一者或两者:

[0168] (a)一、二、三个或抗原结合数目的人抗体(诸如源自人杂交瘤的抗体)或鼠类抗体的轻链CDR(LCDR1、LCDR2和/或LCDR3)(例如,US20180355062A1中描述的GCC抗体的轻链,其以引用的方式整体并入本文中)。在实施方案中,CDR可包含如下的LCDR1-3中的一个或多个

或全部的氨基酸序列:LCDR1或经修饰的LCDR1,其中一至七个氨基酸经保守性取代;LCDR2或经修饰的LCDR2,其中一或两个氨基酸经保守性取代;或LCDR3或经修饰的LCDR3,其中一或两个氨基酸经保守性取代;以及

[0169] (b)一、二、三个或抗原结合数目的重链CDR(HCDR1、HCDR2和/或HCDR3),如本文所述。在实施方案中,CDR可包含如下的HCDR1-3中的一个或多个或全部的氨基酸序列:HCDR1或经修饰的HCDR1,其中一或两个氨基酸经保守性取代;HCDR2或经修饰的HCDR2,其中一至四个氨基酸经保守性取代;或HCDR3或经修饰的HCDR3,其中一或两个氨基酸经保守性取代。

[0170] 在一些实施方案中,本发明的抗GCC抗体分子可使表达GCC的细胞(例如肿瘤细胞)产生抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。具有IgG1和IgG3同种型的抗体可用于引发抗体依赖性细胞毒性能力中的效应子功能,因为它们具有结合Fc受体的能力。具有IgG2和IgG4同种型的抗体可用于使ADCC反应最小化,因为它们结合至Fc受体的能力低。在相关实施方案中,可进行抗体的Fc区中取代或糖基化组成的变化,例如通过在经修饰的真核细胞系中生长,以增强Fc受体识别、结合抗GCC抗体所结合的细胞和/或介导所述细胞的细胞毒性的能力(参见例如,美国专利号7,317,091、5,624,821和出版物,包括WO 00/42072;Shields等人,J.Biol.Chem.276:6591-6604(2001);Lazar等人Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.103:4005-4010(2006);Satoh等人Expert Opin Biol.Ther.6:1161-1173(2006))。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段(例如,人来源的抗体、人抗体)可包括改变或裁剪功能(例如,效应子功能)的氨基酸取代或置换。例如,人来源的恒定区(例如,γ1恒定区、γ2恒定区)可被设计为降低补体活化和/或Fc受体结合。(参见例如,美国专利号5,648,260(Winter等人)、美国专利号5,624,821(Winter等人)和美国专利号5,834,597(Tso等人),其全部教义以引用的方式整体并入本文中)。优选地,含有此类氨基酸取代或置换的人来源的恒定区氨基酸序列与人来源的未改变的恒定区的氨基酸序列在全长上至少约95%同一,更优选地,与人来源的未改变的恒定区的氨基酸序列在全长上至少约99%同一。额外的抗GCC抗原结合分子进一步描述于美国专利号8,785,600(Nam等人)中,其全部教义以引用的方式并入本文中。

[0171] 在又一个实施方案中,效应子功能也可通过调节抗体的糖基化模式来改变。改变是指缺失抗体中发现的一个或多个碳水化合物部分,和/或添加抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。例如,在美国专利申请公布号2003/0157108(Presta)中描述了具有增强的ADCC活性和成熟的碳水化合物结构的抗体,所述结构缺乏连接至抗体的Fc区的岩藻糖。还参见美国专利申请公布号2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。Glycofi也开发了能够产生抗体的特异性糖型的酵母细胞系。

[0172] 额外地或可替代地,可制备具有改变的糖基化类型的抗体,例如具有降低量的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化抗体或具有增加的等分GlcNac结构的抗体。这种改变的糖基化模式已被证明可增加抗体的ADCC能力。此类碳水化合物修饰可通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体而完成。具有改变的糖基化机制的细胞已在本领域进行了描述,并且可用作为宿主细胞,其中经工程化以表达本发明的重组抗体,从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如,Hang等人的EP 1,176,195描述了具有功能上破坏的编码岩藻糖基转移酶的FUT8基因的细胞系,使得在这种细胞系中表达的抗体展现低岩藻糖基化。Presta的PCT公布WO 03/035835描述了变体CHO细胞系-Lec13细胞,其具有降低的将岩藻糖连接至Asn(297)-连接的碳水化合物的能力,从而导致在所述宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖

基化(还参见Shields,R.L.等人,2002J.Biol.Chem.277:26733-26740)。Umana等人的PCT公布WO 99/54342描述了经工程化以表达糖蛋白修饰的糖基转移酶(例如,β(1,4)-N乙酰氨基葡萄糖基转移酶III(GnTIII))的细胞系,使得在所述经工程化的细胞系中表达的抗体展现增加的等分GlcNac结构,这导致抗体的ADCC活性增加(还参见Umana等人,1999Nat.Biotech.17:176-180)。

[0173] 人源化抗体也可使用CDR移植方法制备。产生此类人源化抗体的技术为本领域中已知。通常,人源化抗体是通过获得编码与GCC结合的抗体的可变重链和可变轻链序列的核酸序列、鉴定所述可变重链和可变轻链序列中的互补决定区或"CDR"并将所述CDR核酸移植到人框架核酸序列上而产生。(参见例如,美国专利号4,816,567和5,225,539)。CDR和框架残基的位置可确定(参见Kabat,E.A.等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,美国卫生与公共服务部,NIH出版号91-3242;以及Chothia,C.等人J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。

[0174] 本文所述的抗GCC抗体分子具有表5和6列出的CDR氨基酸序列和编码CDR的核酸序列。在一些实施方案中,可将来自表5和6的序列并入识别GCC的分子中,以用于本文所述的治疗或诊断方法中。所选择的人框架为适合体内施用的一种框架,这意味着它不展现免疫原性。例如,这种确定可通过此类抗体的体内使用和氨基酸相似性研究的先前经验而进行。合适的框架区可选自人来源的抗体,其在供体抗体例如抗GCC抗体分子(例如,3G1)的等效部分(例如框架区)的氨基酸序列内的框架区的长度上具有至少约65%氨基酸序列同一性,并且优选至少约70%、80%、90%或95%氨基酸序列同一性。可使用合适的氨基酸序列比对算法,诸如CLUSTAL W,使用默认参数来确定氨基酸序列同一性。(Thompson J.D.等人,Nucleic Acids Res.22:4673-4680(1994))。

[0175] 一旦鉴定了待人源化的克隆抗体的CDR和FR,就可鉴定编码所述CDR的氨基酸序列,并将相对应的核酸序列移植到所选择的人FR上。这可使用已知的引物和接头来完成,所述引物和接头的选择为本领域中已知的。特定人抗体的所有CDR可被非人CDR的至少一部分置换,或者仅一些CDR可被非人CDR置换。仅需要置换人源化抗体与预定抗原结合所需的数量的CDR。在CDR移植到所选择的人FR上后,表达所得"人源化"可变重链和可变轻链序列,以产生与GCC结合的人源化Fv或人源化抗体。优选地,CDR移植的(例如,人源化的)抗体以与供体抗体的亲和力相似、实质上相同或更好的亲和力结合GCC蛋白。通常,人源化可变重链和轻链序列被表达为具有人恒定结构域序列的融合蛋白,因此获得与GCC结合的完整抗体。然而,可产生不含恒测序列的人源化Fv抗体。

[0176] 其中特定氨基酸已被取代、缺失或添加的人源化抗体也在本发明的范围内。特别地,人源化抗体可在框架区中具有氨基酸取代,例如以改进与抗原的结合。例如,所选择的小数目的人源化免疫球蛋白链的受体框架残基可被相应的供体氨基酸置换。取代的位置包括与CDR相邻的氨基酸残基,或能够与CDR相互作用的氨基酸残基(参见例如,美国专利号5,585,089或5,859,205)。受体框架可为成熟人抗体框架序列或共有序列。如本文所用,术语"共有序列"是指在相关家族成员中的某一区域的序列中的每一位置处最常见的或由最共同的残基设计的序列。多种人抗体共有序列可使用,包括人可变区的不同亚组的共有序列(参见Kabat,E.A.,等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,美国卫生与公共服务部,美国政府印务局(1991))。Kabat数据库及其应用可在线免费获得,例

如经由国家生物技术信息中心,Bethesda,Md.的IgBLAST(还参见,Johnson,G.和Wu,T.T.,Nucleic Acids Research 29:205-206(2001))。

[0177] 在某些实施方案中,GCC抗体分子为人抗GCC IgG1抗体。由于此类抗体具有与GCC分子的所需结合,因此此类抗体中的任一者都可容易地进行同种型转换,以产生人IgG4同种型,例如,同时仍具有相同的可变区(其在一定程度上定义所述抗体的特异性和亲和力)。因此,当产生满足如上文所讨论的所需"结构"属性的抗体候选物时,它们通常可提供至少某些通过同种型转换所需的额外"功能"属性。

[0178] 在一些方面中,包含抗体片段的本发明的CAR组合物的一部分经人源化,其中保留对靶抗原的高亲和力和其它有利的生物学特性。根据本发明的一个方面,人源化抗体和抗体片段是通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型分析所述亲本序列和各种概念性人源化产物的方法而制备。三维免疫球蛋白模型通常可用并且为本领域技术人员所熟悉的。计算机程序可用,所述计算机程序说明和展示所选择的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构。对这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中的可能作用,例如分析影响候选免疫球蛋白结合靶抗原的能力的残基。

[0179] 以此方式,可从受者和输入序列中选择和组合FR残基,以获得所需的抗体或抗体片段特征,诸如对靶抗原的增加的亲和力。一般而言,CDR残基直接且最实质地参与影响抗原结合。

[0180] 人源化抗体或抗体片段可保留与原始抗体相似的抗原特异性,例如,在本发明中,结合人GCC的能力。在一些实施方案中,人源化抗体或抗体片段可具有改进的与人GCC结合的亲和力和/或特异性。

[0181] 在一些实施方案中,抗GCC抗原结合剂包含表1中提供的一个或多个CDR序列。在一些实施方案中,抗GCC抗原结合剂包含具有表1中提供的CDR1的重链可变区。在一些实施方案中,抗GCC抗原结合剂包含具有表1中提供的CDR2的重链可变区。在一些实施方案中,抗GCC抗原结合剂包含具有表1中提供的CDR3的重链可变区。在一些实施方案中,抗GCC抗原结合剂包含具有表1中提供的CDR1、CDR2和CDR3的重链可变区。在一些实施方案中,抗GCC抗原结合剂包含表1中提供的一个或多个CDR序列,其中所述CDR包含1、2或3个氨基酸取代。在一个实施方案中,所述取代不会不利地影响结合剂与其靶标的结合。

[0182] 表1.示例性抗GCC CDR序列

[0183]

	HCDR1	HCDR2	HCDR3
V1	HYYWS (SEQ ID NO: 8)	RIYPSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 11)	DRSTGWSEWNSDL (SEQ ID NO: 16)
V1-01	HYYWS (SEQ ID NO: 8)	RIYPSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 11)	DRSTGWSEWNSDL (SEQ ID NO: 16)
V5	RYWMS (SEQ ID NO: 9)	KIRHDGGEKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 12)	DYTRDV (SEQ ID NO: 17)
V36	RYWMT	KIKYDGSEKYYADSVKG	DYNKDY

[0184]

	(SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 18)
V48	RYWMT (SEQ ID NO: 10)	KIRHDGGEKYYPDSVKG (SEQ ID NO: 14)	DYNKDL (SEQ ID NO: 19)
V51	RYWMT (SEQ ID NO: 10)	KIRHDGGEKYYADSVKG (SEQ ID NO: 15)	DYNKDY (SEQ ID NO: 18)

[0185] 非完整抗体的抗GCC抗体也可用于本发明。此类抗体可源自上述抗体中的任一者。

这种类型的有用的抗体分子包括(i)Fab片段,其为由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')$_2$片段,其为包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v)dAb片段(Ward等人,Nature 341:544-546(1989)),其由VH结构域组成;(vii)单结构域功能性重链抗体,其由VHH结构域组成(称为纳米抗体),参见例如Cortez-Retamozo等人,Cancer Res.64:2853-2857(2004),以及其中引用于的参考文献;和(vii)分离的CDR,例如一个或多个分离的CDR与足够的框架一起提供抗原结合片段。此外,虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由单独基因编码,但可使用重组方法通过合成接头将它们连接起来,所述合成接头使得它们能够以单一蛋白链形式制得,其中VL和VH区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如,Bird等人,Science 242:423-426(1988);以及Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988)。此类单链抗体也意图涵盖于术语抗体的"抗原结合片段"内。这些抗体片段是使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且以与完整抗体相同的方式针对效用进行筛选。抗体片段,诸如Fv、F(ab')$_2$和Fab可通过裂解完整蛋白质(例如通过蛋白酶或化学裂解)而制备。

[0186] 单结构域抗体

[0187] 单结构域抗体(sdAb)与常规4-链抗体的不同之处在于具有单一单体抗体可变结构域。例如,骆驼科动物和鲨鱼产生称为仅具重链的抗体(HcAb)的sdAb,其天然缺乏轻链。骆驼科动物仅具重链的抗体的每个臂中的抗原结合片段具有单一重链可变结构域(VHH),它可在没有轻链帮助的情况下对抗原具有高亲和力。骆驼科动物VHH被称为最小的功能性抗原结合片段,分子量大约为15kD。在一些实施方案中,抗原结合剂为单一人重链可变结构域(VH)抗体。此类结合分子也称为Humabody®且在本文中可互换使用。Humabody®为Crescendo Biologics Ltd的注册商标。

[0188] 本申请的一个方面提供特异性地结合至GCC(诸如人GCC)的分离的单结构域抗体(本文称为"抗GCC sdAb")。在一些实施方案中,抗GCC sdAb调节GCC活性。在一些实施方案中,抗GCC sdAb为拮抗剂抗体。进一步提供源自本文所述的抗GCC sdAb中的任一者的抗原结合片段,以及包含本文所述的抗GCC sdAb中的任一者的抗原结合蛋白。在一些实施方案中,抗GCC sdAb包含表1中提供的一、二和/或三个CDR序列。示例性抗GCC sdAb列于表2和3中。在一些实施方案中,抗GCC sdAb包含表2或表3中提供的可变重链。

[0189] 在一些实施方案中,一些或所有的CDR序列、重链可用于另一抗原结合剂中,例如用于CDR移植的人源化或嵌合抗体分子中。实施方案包括抗体分子,其包含足够的CDR,例如来自上述重链可变区之一的所有三个CDR,以允许结合至细胞表面GCC。

[0190] 在一些实施方案中,所述CDR,例如所有的HCDR,被嵌入人或人来源的框架区中。人框架区的实例包括人种系(germline)框架序列、已亲和力成熟(体内或体外)的人种系序列,或合成人序列,例如共有序列。在一个实施方案中,重链框架为IgG1或IgG2框架。

[0191] 在一些实施方案中,本发明的抗GCC抗原结合剂包含表2中提供的重链可变区氨基酸序列。在一些实施方案中,抗GCC抗原结合剂为仅具单结构域重链的抗体(例如,不包含免疫球蛋白轻链的抗原结合剂)。

[0192] 表2.示例性重链可变区(VH)氨基酸序列

[0193]

描述	VH 氨基酸序列
V1	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGK GLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLNLSSVTA ADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)
V1-01	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKG LEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)
V5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPG KGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSS (SEQ ID NO: 21)
V36	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPG GRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMD SLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 26)
V48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPG KGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMD NLRAEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)
V51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPG KGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 28)

[0194] 在一些实施方案中,本发明的抗GCC抗原结合剂包含重链可变区氨基酸序列,所述重链可变区氨基酸序列与表2中提供的VH序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一。在一些实施方案中,VH抗GCC抗原结合剂(例如,单结构域抗体)包含前导序列。在一些实施方案中,VH抗GCC抗原结合剂包含前导序列,所述前导序列包含MKHLWFFLLLVAAPRWVLS(SEQ ID NO:6)、MELGLSWVFLVAILEGVQC(SEQ ID NO:7)或MEFGLSWVFLVAIIKGVQC(SEQ ID NO:42)。在一些实施方案中,VH抗GCC抗原结合剂包含前导序列,所述前导序列包含MALPVTALLL PLALLLHAARP(SEQ ID NO:45)。

[0195] 在一些实施方案中,本发明的抗GCC抗原结合剂包含重链可变区氨基酸序列,所述重链可变区氨基酸序列与表3中提供的VH序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一。在一些实施方案中,本发明的抗GCC抗原结合剂包含重链可变区氨基酸序列,所述重链可变区氨基酸序列与表3中提供的VH序列同一。

[0196] 在一些实施方案中,VH抗GCC抗原结合剂(例如,单结构域抗体)包含前导序列,其条件为与表3中提供者至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一。在一些实施方案中,VH抗GCC抗原结合剂(例如,单结构域抗体)包含表3中提供的前导序列。

[0197] 表3.示例性重链可变区(VH)氨基酸序列

[0198]

	前导序列	VH 序列
V1	MKHLWFFLLL VAAPRWVLS (SEQ ID NO: 6)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWS WFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAM SVDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTG WSEWNSDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)
V1-01	MKHLWFFLLL VAAPRWVLS (SEQ ID NO: 6)	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWS WFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAM SVDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTG WSEWNSDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)
V5	MELGLSWVFL VAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWM SWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDY TRDVWGQGTAVTVSS (SEQ ID NO: 21)
V8	MELGLSWVFL VAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW MSWVRQAPGKGLEWVAKIKYDGSEKYYVDSVK GRFTISRDNAKNSVYLQMNSLRAEDTGVYYCAT DFTRDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 22)
V9	MELGLSWVFL VAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWM TWVRQAPGRGLEWVAKIRYDGGEKYYVDSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDF TRDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 23)
V30	MELGLSWVFL VAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYW MSWVRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYVDSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATD FTRDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24)
V31	MEFGLSWVFL VAIIKGVQC (SEQ ID NO: 42)	QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYW MSWVRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCAT DFTRDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 25)
V36	MELGLSWVFL VAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWM TWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDY NKDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 26)

[0199]

V48	MELGLSWVFL VAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYW MTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVK GRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTR DYNKDLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)
V51	MELGLSWVFL VAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWM TWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDY NKDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 28)

[0200] 用于体内治疗或诊断用途的抗体片段可受益于改进其血清半衰期的修饰。意图用于增加抗体的体内血清半衰期的适合有机部分可包括一个、两个或更多个选自以下的线性或分支部分：亲水性聚合物基团(例如，线性或分支聚合物(例如，聚烷二醇，诸如聚乙二醇、单甲氧基-聚乙二醇等)、碳水化合物(例如，葡聚糖、纤维素、多糖等)、亲水性氨基酸的聚合物(例如，聚赖氨酸、聚天冬氨酸等)、聚链烷氧化物和聚乙烯吡咯烷酮)、脂肪酸基团(例如，单羧酸或二羧酸)、脂肪酸酯基团、脂质基团(例如，二酰基甘油基团、神经鞘脂基团(例如，神经酰胺基))或磷脂基团(例如，磷脂酰乙醇胺基团)。优选地，有机部分结合至预定位点，其中与未缀合抗体部分相比，有机部分不会损害所得免疫缀合物的功能(例如，降低抗原结合亲和力)。有机部分可具有约500Da至约50,000Da，优选约2000、5000、10,000或20,000Da的分子量。用有机部分修饰多肽(例如抗体)的实例和方法可见于例如美国专利号4,179,

337和5,612,460、PCT公布号WO 95/06058和WO 00/26256,以及美国专利申请公布号20030026805中。

[0201] 嵌合抗原受体

[0202] 嵌合抗原受体(CAR)为包含三个必要单元的杂合分子:(1)细胞外抗原结合基序,(2)连接/跨膜基序,以及(3)细胞内T细胞信号传导基序(Long A H,Haso W M,Orentas R J.Lessons learned from a highly-active CD22-specific chimeric antigen receptor.Oncoimmunology.2013;2(4):e23621)。在本文公开的GCC特异性CAR的各种实施方案中,一般方案示于图1中。在一些实施方案中,抗GCC CAR从N末端至C末端包含信号或前导肽、抗原结合结构域、跨膜和/或铰链结构域、共刺激结构域和细胞内结构域。

[0203] 本发明提供CAR(例如,CAR多肽),所述CAR包含抗GCC结合结构域(例如,如本文所述的GCC结合结构域)、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,并且其中所述抗GCC结合结构域包含表1或8中所列的任何抗GCC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)。在一些实施方案中,抗GCC CAR从N末端至C末端包含信号或前导肽、抗GCC VH、CD28跨膜和铰链、CD28共刺激结构域和CD3ζ细胞内结构域。

[0204] 抗原结合结构域可为与抗原结合的任何蛋白质,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体以及其功能片段,包括但不限于:单结构域抗体,诸如重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)和骆驼科动物来源的纳米抗体的可变结构域(VHH),以及替代支架,所述支架在本领域中已知作为抗原结合结构域,诸如重组纤连蛋白结构域等。在一些实施方案中,抗原结合结构域

[0205] CAR的抗原结合基序通常在单链片段可变结构域(ScFv)、免疫球蛋白(Ig)分子的最小结合结构域或单结构域抗体之后形成(例如,WO2018/028647A1)。替代抗原结合基序,诸如受体配体(即,IL-13已被工程化为结合肿瘤表达的IL-13受体)、完整免疫受体、文库来源的肽和先天免疫系统效应分子(诸如NKG2D)也经工程化。关于定义最具CAR载体转导活性的T细胞群体、确定最佳培养和扩增技术以及定义CAR蛋白结构本身的分子细节,仍然存在相当重要的工作。

[0206] CAR的连接基序可为相对稳定的结构性结构域,诸如IgG的恒定结构域,或被设计为延伸的柔性接头。在一些实施方案中,抗GCC结合结构域(例如,包含表1或表7中提供的序列的多肽)经由接头(例如本文所述的接头)连接至跨膜结构域。在一些实施方案中,抗GCC CAR包括(Gly4-Ser)n接头,其中n为1、2、3、4、5或6(SEQ ID NO:72)。在一些实施方案中,接头包含RAAA(SEQ ID NO:53)的氨基酸序列。

[0207] 结构基序,诸如源自IgG恒定结构域的那些,可用于将ScFv结合结构域延伸远离T细胞膜表面。这对于结合结构域特别靠近肿瘤细胞表面膜的一些肿瘤靶标而言可能是重要的(诸如对于二唾液酸神经节苷脂GD2而言;Orentas等人,未公开的观察结构)。迄今为止,CAR中使用的信号传导基序始终包括CD3-ζ链,因为此核心基序是T细胞活化的关键信号。首个报道的第二代CAR的特征是CD28信号传导结构域和CD28跨膜序列。此基序也用于含有CD137(4-1BB)信号传导基序的第三代CAR中(Zhao Y等人J Immunol.2009;183(9):5563-74)。随着新技术的出现,用与抗CD3和抗CD28抗体连接的珠粒活化T细胞,以及来自CD28的经典“信号2”的出现,不再需要由CAR本身编码。使用珠粒活化,发现第三代载体在体外测定

中并不优于第二代载体,并且它们在白血病小鼠模型中没有优于第二代载体的明显益处(Haso W,Lee D W,Shah N N,Stetler-Stevenson M,Yuan CM,Pastan I H,Dimitrov D S,Morgan R A,FitzGerald D J,Barrett D M,Wayne A S,Mackall C L,Orentas R J.Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia,Blood.2013;121(7):1165-74;Kochenderfer J N等人Blood.2012;119(12):2709-20)。第二代CD28/CD3-ζ中的CD19特异性CAR(Lee D W等人American Society of Hematology Annual Meeting.New Orleans,La.;Dec.7-10,2013)和CD137/CD3-ζ信号传导格式(Porter D L等人NEngl J Med.2011;365(8):725-33)的临床成功证明了这一点。除了CD137之外,其它肿瘤坏死因子受体超级家族成员诸如OX40也能够在CAR转导的T细胞中提供重要的持续性信号(Yvon E等人Clin Cancer Res.2009;15(18):5852-60)。同样重要的是培养CAR T细胞群体的培养条件。

[0208] 基于T细胞的免疫疗法已成为合成生物学的新前沿;多重启动子和基因产物被设想为使这些高效细胞转向肿瘤微环境,其中T细胞可逃避负调控信号且介导有效肿瘤杀伤。通过用AP1903对诱导型半胱天冬酶9(caspase 9)进行药物诱导的二聚化而消除不想要的T细胞展示出可以药理学方式启动能够控制T细胞群体的强力开关的一种方式(Di Stasi A等人N Engl J Med.2011;365(18):1673-83)。因此,虽然看起来CAR能够以类似于内源性T细胞受体的方式触发T细胞活化,但迄今为止这种技术的临床应用的主要阻碍在于CAR+T细胞的体内扩增有限、在输注后细胞快速消失以及令人失望的临床活性。因此,本领域中存在对于发现使用可展现特异性且有效的抗肿瘤效果而无前述缺点(即高毒性、功效不足)的方法治疗癌症的新颖组合物和方法的迫切且长期的需要。

[0209] 本发明通过提供可用于治疗癌症和其它疾病和/或疾患的CAR组合物和治疗方法来满足这些需求。特别地,如本文所公开和描述,本发明提供CAR,所述CAR可用于治疗与GCC的失调表达相关的疾病、病症或疾患,并且所述CAR含有GCC抗原结合结构域,所述GCC抗原结合结构域在经转导的T细胞上展现高表面表达、展现高度细胞溶解和经转导的T细胞的体内扩增和持久性。

[0210] 在一些实施方案中,抗GCC抗原结合剂为嵌合抗原受体(CAR)。CAR的特征包括其以非MHC限制性方式将T细胞特异性和反应性重新引导至所选靶标和利用单克隆抗体的抗原结合特性的能力。非MHC限制性抗原识别使表达CAR的T细胞有能力识别与抗原加工无关的抗原,因此绕过肿瘤逃逸的主要机制。此外,当在T细胞中表达时,CAR有利地不与外源性T细胞受体(TCR)α和β链进行二聚化。

[0211] 细胞外结构域

[0212] 如本文所述,CAR包含靶标特异性结合元件(例如,抗GCC抗原结合剂的至少一部分),否则称为抗原结合结构域或部分。结构域的选择取决于定义靶细胞表面的配体的类型和数目。举例而言,可选择抗原结合结构域,以识别充当与特定疾病状态(例如,癌症)相关的靶细胞上的细胞表面标志物的配体(例如,GCC)。因此,在CAR中可充当抗原结合结构域的配体的细胞表面标志物的实例包括与病毒性、细菌性和寄生虫感染、自身免疫性疾病和癌细胞相关的那些。

[0213] 在一些实施方案中,抗GCC CAR的细胞外结构域包含抗原结合剂,所述抗原结合剂包含表1中所提供的至少一个CDR。在一些实施方案中,抗GCC CAR的细胞外结构域包含可变

重链，所述可变重链与表2或表3中提供的VH氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一。在一些实施方案中，抗GCC CAR的细胞外结构域包含表2中提供的可变重链。在一些实施方案中，抗GCC CAR的细胞外结构域包含表3中提供的可变重链。

[0214] 跨膜结构域

[0215] 关于跨膜结构域，在各种实施方案中，CAR可被设计为包含连接至CAR的细胞外结构域(例如，抗GCC抗原结合结构域)的跨膜结构域。跨膜结构域可包括与跨膜区相邻的一个或多个额外氨基酸，例如与所述跨膜区所来源的蛋白质的细胞外区域相关的一个或多个氨基酸(例如，所述细胞外区域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10至多达15个氨基酸)和/或与所述跨膜蛋白所来源的蛋白质的细胞内区域相关的一个或多个额外氨基酸(例如，所述细胞内区域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10至多达15个氨基酸)。

[0216] 在一个方面中，跨膜结构域是与所使用的CAR的其它结构域之一相关的跨膜结构域。在一些情况下，跨膜结构域可通过氨基酸取代来选择或修饰，以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合，例如使与受体复合物的其它成员的相互作用最小化。在一个方面中，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CAR进行同型二聚化。在一个不同方面中，跨膜结构域的氨基酸序列可经修饰或取代，以使与同一表达CAR的细胞(例如CART)中存在的天然结合配偶体的结合结构域的相互作用最小化。

[0217] 如本文所述，CAR包含跨膜结构域。关于跨膜结构域，CAR包含与CAR的细胞外GCC抗原结合结构域融合的一个或多个跨膜结构域。跨膜结构域可源自天然或合成来源。如果来源是天然的，则所述结构域可源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。

[0218] 在本文所述的CAR中具有特定用途的跨膜区可源自(即，至少包含以下各项的跨膜区)T细胞受体的α、β或ζ链、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、间皮素(mesothelin)、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。

[0219] 跨膜结构域可源自天然或重组来源。如果来源是天然的，则所述结构域可源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在一个方面中，当CAR已结合至靶标时，跨膜结构域能够向细胞内结构域发送信号。在本发明中具有特定用途的跨膜结构域可至少包括以下各项的跨膜结构域：例如T细胞受体的α、β或ζ链、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8(例如，CD8α、CD8β)、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。在一些实施方案中，跨膜结构域可至少包括共刺激分子的跨膜结构域，例如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、信号传导淋巴细胞活化分子(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、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CDIId、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和特异性地与CD83结合的配体。

[0220] 在一些实施方案中,CAR分子包含蛋白质的跨膜结构域,所述蛋白质选自由以下组成的组:T细胞受体的α、β或ζ链、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154。

[0221] 可替代地,跨膜结构域可为合成的,在这种情况下,它将主要包含疏水性残基,诸如亮氨酸和缬氨酸。在一些实施方案中,在合成跨膜结构域的每一端将发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。任选地,优选地长度介于2与10个氨基酸之间的短寡肽或多肽可在CAR的跨膜结构域与细胞质信号传导结构域之间形成键联。在一些实施方案中,接头为甘氨酸-丝氨酸双联体或丙氨酸三联体接头。

[0222] 在一些实施方案中,除了如上文所述的跨膜结构域之外,还使用天然地与CAR的结构域之一缔合的跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域可通过氨基酸取代来选择,以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以使与受体复合物的其它成员的相互作用最小化。

[0223] 在一些实施方案中,本发明的CAR中的跨膜结构域为CD28跨膜结构域。在一些实施方案中,CD28跨膜结构域包含FWVLVVVGG VLACYSLLVTVAFIIFWV SEQ ID NO:30的核酸序列。在一些实施方案中,CD28跨膜结构域包含编码SEQ ID NO:30的氨基酸序列的核酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如,取代)、但不超过20、10或5个修饰(例如,取代)的序列,或与SEQ ID NO:30的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

[0224] 在一些实施方案中,跨膜结构域可通过铰链(例如,来自人蛋白质的铰链)连接至CAR的细胞外区域(例如,CAR的抗原结合结构域)。举例而言,在一个实施方案中,铰链可为人Ig(免疫球蛋白)铰链,例如IgG4铰链或CD8a铰链。

[0225] 在CAR中,间隔区结构域(也称为铰链结构域)可布置在细胞外结构域与跨膜结构域之间,或布置在细胞内结构域与跨膜结构域之间。间隔区结构域意指用于连接跨膜结构域与细胞外结构域和/或跨膜结构域与细胞内结构域的任何寡肽或多肽。间隔区结构域包含至多300个氨基酸,优选10至100个氨基酸,并且最优选25至50个氨基酸。

[0226] 在数个实施方案中,接头可包括间隔区元件,所述间隔区元件在存在时增加接头的大小,使得效应分子或可检测标记物与抗体或抗原结合片段之间的距离增加。示例性间隔区为普通技术人员所已知,并且包括在美国专利号7,964,566、7,498,298、6,884,869、6,323,315、6,239,104、6,034,065、5,780,588、5,665,860、5,663,149、5,635,483、5,599,902、5,554,725、5,530,097、5,521,284、5,504,191、5,410,024、5,138,036、5,076,973、4,986,988、4,978,744、4,879,278、4,816,444和4,486,414,以及美国专利公布号20110212088和20110070248中所列的那些,所述专利各自以引用的方式整体并入本文中。

[0227] 间隔区结构域优选地具有促进CAR与抗原的结合并增强信号传导至细胞中的序列。预期促进结合的氨基酸的实例包括半胱氨酸、带电氨基酸以及潜在糖基化位点中的丝氨酸和苏氨酸,并且这些氨基酸可用作构成间隔区结构域的氨基酸。

[0228] 在一些实施方案中,CAR包含铰链结构域。在一些实施方案中,铰链结构域包含IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPG PSKP(SEQ ID NO:29)的核酸序列。在一些实施方案中,铰链结构域包含编码SEQ ID NO:29的氨基酸序列的核酸序列。在一些实施方案中,铰链结构域包含具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如,取代)、但

不超过20、10或5个修饰(例如,取代)的序列,或与SEQ ID NO:29的氨基酸序列具有95%-99%同一性的序列。

[0229] 在一些实施方案中,CAR包含CD8铰链结构域。在一些实施方案中,铰链结构域包含氨基酸序列TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(SEQ ID NO:5)。在一些实施方案中,CAR包含CD8跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域包含氨基酸序列IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC(SEQ ID NO:2)。在一些实施方案中,铰链结构域和跨膜结构域源自同一分子。在其它实施方案中,铰链结构域和跨膜结构域源自不同分子(例如,与CD28融合的CD8)。在一些实施方案中,CAR包含铰链结构域。在一些实施方案中,铰链结构域包含IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV(SEQ ID NO:31)的核酸序列。在一些实施方案中,铰链结构域包含编码SEQ ID NO:31的氨基酸序列的核酸序列。在一些实施方案中铰链结构域包含具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如,取代)、但不超过20、10或5个修饰(例如,取代)的序列。

[0230] 在一个实施方案中,CAR包含编码截短的表皮生长因子受体序列(tEGFR)的标签序列。在一些实施方案中,tEGFR标签包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列,或与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

[0231] 细胞内结构域

[0232] CAR的细胞质结构域或另外地细胞内信号传导结构域负责CAR已放置于其中的免疫细胞的至少一种正常效应子功能的活化。术语"效应子功能"是指细胞的专门功能。例如,T细胞的效应子功能可为细胞溶解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此,术语"细胞内信号传导结构域"是指转导效应子功能信号并指导细胞执行专门功能的蛋白质的一部分。虽然通常可使用完整细胞内信号传导结构域,但在许多情况下没有必要使用整条链。就使用细胞内信号传导结构域的截短部分而言,这种截短部分可用于代替完整链,只要其转导效应子功能信号即可。因此,术语"细胞内信号传导结构域"意在包括足以转导效应子功能信号的细胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0233] 用于CAR中的细胞内信号传导结构域的实例包括T细胞受体(TCR)和共受体的细胞质序列,所述细胞质序列共同作用以在抗原受体接合后启动信号转导;以及这些序列的任何衍生物和变体和具有相同功能能力的任何合成序列。仅通过TCR产生的信号不足以完全活化T细胞,并且还需要次级或共刺激信号。因此,T细胞活化可视为由两种不同类别的细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(初级细胞质信号传导序列)和以非抗原依赖性方式发挥作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级细胞质信号传导序列)。

[0234] 初级细胞质信号传导序列以刺激方式或以抑制方式调控TCR复合物的初级活化。以刺激方式起作用的初级细胞质信号传导序列可含有信号传导基序,所述信号传导基序被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM。在一些实施方案中,CAR内的含ITAM结构域涵盖与内源性TCR复合物无关的初级TCR的信号传导。在一个方面中,初级信号通过例如TCR/CD3复合物与负载有肽的MHC分子的结合而引发,并且导致T细胞反应(包括但不限于增殖、活化、分化和类似作用)的介导。以刺激方式起作用的初级细胞质信号传导序列(也称为"初级信号传导结构域")可含有被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号传导基序。

[0235] 在本文公开的CAR中具有特定用途的含ITAM的初级细胞质信号传导序列的实例包括源自TCRζ(CD3ζ)、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。ITAM的具体非限制性实例包括具有CD3.ζ.的氨基酸编号51至164(NCBI RefSeq:NP.sub.--932170.1)、Fc.ε.RI.γ.的氨基酸编号45至86(NCBI RefSeq:NP.sub.--004097.1)、Fc.ε.RI.β.的氨基酸编号201至244(NCBI RefSeq:NP.sub.--000130.1)、CD3.γ.的氨基酸编号139至182(NCBI RefSeq:NP.sub.--000064.1)、CD3.δ.的氨基酸编号128至171(NCBI RefSeq:NP.sub.--000723.1)、CD3.ε.的氨基酸编号153至207(NCBI RefSeq:NP.sub.--000724.1)、CD5的氨基酸编号402至495(NCBI RefSeq:NP.sub.--055022.2)、0022的氨基酸编号707至847(NCBI RefSeq:NP.sub.--001762.2)、CD79a的氨基酸编号166至226(NCBI RefSeq:NP.sub.--001774.1)、CD79b的氨基酸编号182至229(NCBI RefSeq:NP.sub.--000617.1)和CD66d的氨基酸编号177至252(NCBI RefSeq:NP.sub.--001806.2)的序列的肽,以及与这些肽具有相同功能的其变体。基于本文所述的NCBI RefSeq ID或GenBank的氨基酸序列信息的氨基酸编号是基于每种蛋白质的前体(包含信号肽序列等)的全长而进行编号。

[0236] 在实施方案中,细胞内信号结构域转导效应子功能信号并指导细胞执行专门功能。虽然可使用完整细胞内信号传导结构域,但在许多情况下没有必要使用整条链。就使用细胞内信号传导结构域的截短部分而言,此类截短部分可用于代替完整链,只要它转导效应子功能信号即可。因此,术语细胞内信号传导结构域意在包括足以转导效应子功能信号的细胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0237] 细胞内信号传导结构域产生促进含CAR的细胞(例如,CART细胞)的免疫效应子功能的信号。免疫效应子功能(例如,在CART细胞中)的实例包括细胞溶解活性和辅助活性,包括细胞因子的分泌。

[0238] 在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域可包含初级细胞内信号传导结构域。示例性初级细胞内信号传导结构域包括源自负责初级刺激或抗原依赖性刺激的分子的那些。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域可包含共刺激细胞内结构域。示例性共刺激细胞内信号传导结构域包括源自负责共刺激信号或非抗原依赖性刺激的分子的那些。例如,在CART的情况下,初级细胞内信号传导结构域可包含T细胞受体的细胞质序列,并且共刺激细胞内信号传导结构域可包含来自共受体或共刺激分子的细胞质序列。

[0239] 在一些实施方案中,初级细胞质信号传导序列包括源自CD3ζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(也称为"ICOS")、FceRI、CD66d、DAP10和DAP12的那些。在一个实施方案中,CAR中的细胞质信号传导分子包含源自CD3ζ的细胞质信号传导序列。

[0240] 在一个实施方案中,初级信号传导结构域包含经修饰的ITAM结构域,例如与天然ITAM结构域相比具有改变的(例如增加的或降低的)活性的突变的ITAM结构域。在一个实施方案中,初级信号传导结构域包含经修饰的含ITAM的初级细胞内信号传导结构域,例如优化的和/或截短的含ITAM的初级细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,初级信号传导结构域包括一个、两个、三个、四个或更多个ITAM基序。

[0241] 在一些实施方案中,CAR的细胞内结构域可被设计为包含CD3-ζ信号传导结构域本身或与在CAR的背景下可用的任何其它所需的细胞内信号传导结构域组合。例如,CAR的细

胞内结构域可包含CD3ζ链部分和共刺激信号传导区。共刺激信号传导区是指CAR的包含共刺激分子的细胞内结构域的一部分。共刺激分子为除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子，其为淋巴细胞对抗原的有效反应所必需。此类共刺激分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3以及与CD83特异性地结合的配体和等。在一些实施方案中，共刺激结构域包含蛋白质的功能性信号传导结构域，所述蛋白质选自由以下组成的组：OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)和4-1BB(CD137)。

[0242] 此类共刺激分子的具体非限制性实例包括具有CD2的氨基酸编号236至351(NCBI RefSeq:NP.sub.--001758.2)、CD4的氨基酸编号421至458(NCBI RefSeq:NP.sub.--000607.1)、CD5的氨基酸编号402至495(NCBI RefSeq:NP.sub.--055022.2)、CD8.α.的氨基酸编号207至235(NCBI RefSeq:NP.sub.--001759.3)、CD83的氨基酸编号196至210(GenBank:AAA35664.1)、CD28的氨基酸编号为181至220(NCBI RefSeq:NP.sub.--006130.1)、CD137的氨基酸编号为214至255(4-1BB,NCBI RefSeq:NP.sub.--001552.2)、CD134的氨基酸编号241至277(OX40,NCBI RefSeq:NP.sub.--003318.1)和ICOS的氨基酸编号166至199(NCBI RefSeq:NP.sub.--036224.1)的序列的肽，以及与这些肽具有相同功能的其变体。因此，虽然本发明主要使用4-1BB作为共刺激信号传导元件进行例示，但其它共刺激元件也在本公开的范围内。

[0243] CAR的细胞内信号传导结构域可包含初级信号传导结构域，例如CD3ζ信号传导结构域本身，或者它可与在本发明的CAR的背景下有用的一个或多个任何其它所需的细胞内信号传导结构域组合。例如，CAR的细胞内信号传导结构域可包含初级信号传导结构域，例如CD3ζ链部分，和共刺激信号传导域。共刺激信号传导结构域是指CAR的包含共刺激分子的细胞内结构域的一部分。共刺激分子为除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子，其为淋巴细胞对抗原的有效反应所必需。此类分子的实例包括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、信号传导淋巴细胞活化分子(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、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、GG AC、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特异性地结合的配体等。举例而言，已证明CD27共刺激可在体外增强人CART细胞的扩增、效应子功能和存活，并且在体内增强人T细胞的持久性和抗肿瘤活性(Song等人Blood.2012;119(3):696-706)。本发明的CAR的细胞质部分内的细胞内信号传导序列可以随机或以指定顺序彼此连接。

[0244] CAR的细胞质信号传导部分内的细胞质信号传导序列可以随机或指定顺序彼此连接。任选地，长度优选地介于2与10个氨基酸之间的短寡肽或多肽接头可形成键联。在一些实施方案中，接头为甘氨酸-丝氨酸双联体或丙氨酸三联体接头。

[0245] 在一些实施方案中,细胞内结构域被设计为包含CD28共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR的细胞内结构域包含与RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS(SEQ ID NO:32)至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列。

[0246] 在一些实施方案中,细胞内结构域被设计为包含CD3-ζ的信号传导结构域和CD28的信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内结构域包含具有一个或多个经修饰的基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)的CD3-ζ。在一些实施方案中,细胞内结构域包含CD3-ζ,其中三个基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)中的第一个未经修饰,并且第二个和第三个ITAM被改变,命名为"1XX"。在一些实施方案中,CAR的细胞内结构域包含与RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR(SEQ ID NO:33)至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列。

[0247] 在另一个实施方案中,细胞内结构域被设计为包含CD3-ζ的信号传导结构域和4-1BB的信号传导结构域。在又一个实施方案中,细胞内结构域被设计为包含CD3-ζ的信号传导结构域以及CD28和4-1BB的信号传导结构域。

[0248] 在一些实施方案中,CAR的细胞内结构域被设计为包含4-1BB的信号传导结构域和CD3-ζ的信号传导结构域,其中4-1BB的信号传导结构域包含KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(SEQ ID NO:3),并且CD3-ζ的信号传导结构域包含

[0249] RVKFSRSADAPAYKQGQNQ

[0250] LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(SEQ ID NO:4)或

[0251] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(SEQ ID NO:71)中所列的核酸序列。

[0252] 在一些实施方案中,CAR结构域通过多肽接头连接。举例而言,长度可介于2与10个氨基酸之间(例如,2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)的多肽接头可形成细胞内信号传导序列之间的键联。在一个实施方案中,甘氨酸-丝氨酸双联体可用作合适的接头。在一些实施方案中,单个氨基酸,例如丙氨酸、甘氨酸可用作合适的接头。

[0253] 在一个方面中,细胞内信号传导结构域被设计为包含两个或更多个,例如,2、3、4、5个或更多个共刺激信号传导结构域。在一个实施方案中,两个或更多个,例如2、3、4、5个或更多个共刺激信号传导结构域通过接头分子(例如,本文所述的接头分子)隔开。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域包含两个共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,接头分子为甘氨酸残基。在一些实施方案中,接头为丙氨酸残基。

[0254] 在一个方面中,细胞内信号传导结构域被设计为包含CD3-ζ的信号传导结构域和CD28的信号传导结构域。在一个方面中,细胞内信号传导结构域被设计为包含CD3-ζ的信号传导结构域和4-1BB的信号传导结构域。

[0255] 在一个方面中,细胞内信号传导结构域被设计为包含CD3-ζ的信号传导结构域和CD27的信号传导结构域。在一个方面中,细胞内信号传导结构域被设计为包含CD3-ζ的信号传导结构域和CD28的信号传导结构域。在一个方面中,细胞内信号传导结构域被设计为包含CD3-ζ的信号传导结构域和ICOS的信号传导结构域

[0256] 在一些实施方案中,抗GCC CAR包含与表4中所提供的氨基酸序列至少80%、85%、

90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列。

[0257] 表4.示例性抗GCC CAR的氨基酸序列

[0258]

CAR	序列
V1-01 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGA SISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVD TPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGT LVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHD GLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 48)
V5 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS GFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAV

[0259]

	TVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSK PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHD GLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 49)
V36 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAAS GFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLV TVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSK PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHD GLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 50)
V48 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAAS GFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRF TVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGTL VTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPS KPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHD GLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 51)
V51 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTL VTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPS KPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHD GLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 52)
V1 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG ASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSV DTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRG TLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPG PSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNE LQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALH MQALPPR (SEQ ID NO: 47)

[0260] 在一些实施方案中，抗GCC CAR包含与SEQ ID NO:47至少80％、85％、90％、95％、

96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列。

[0261] 在一些实施方案中，抗GCC CAR包含与SEQ ID NO:48至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列。

[0262] 在一些实施方案中，抗GCC CAR包含与SEQ ID NO:49至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列。

[0263] 在一些实施方案中，抗GCC CAR包含与SEQ ID NO:50至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列。

[0264] 在一些实施方案中，抗GCC CAR包含与SEQ ID NO:51至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列。

[0265] 在一些实施方案中，抗GCC CAR包含与SEQ ID NO:52至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的氨基酸序列。

[0266] CAR的功能特征

[0267] 本文所公开的CAR的功能部分也明确包括在本发明的范围中。术语“功能部分”当用于提及CAR时，是指本文所公开的一种或多种CAR的任何部分或片段，所述部分或片段保留为其一部分的CAR(亲本CAR)的生物活性。功能部分涵盖例如CAR的那些部分，所述部分保留识别靶细胞或检测、治疗或预防疾病的能力，达到与亲本CAR相似的程度、相同的程度或更高的程度。关于亲本CAR，功能部分可包含例如亲本CAR的约10％、25％、30％、50％、68％、80％、90％、95％或更多。

[0268] 功能部分可包含在所述部分的氨基或羧基末端或两个末端处的额外氨基酸，所述额外氨基酸在亲本CAR的氨基酸序列中并未发现。令人希望的是，所述额外氨基酸不干扰功能部分的生物功能，例如，识别靶细胞、检测癌症、治疗或预防癌症等。更理想地，与亲本CAR的生物活性相比，所述额外氨基酸增强生物活性。

[0269] 本发明的范围内包括本文所公开的CAR的功能变体。如本文所用，术语“功能变体”是指具有与亲本CAR实质上或显著的序列同一性或相似性的CAR、多肽或蛋白质，所述功能变体保留由其变体的CAR的生物活性。功能变体涵盖例如本文所述的CAR(亲本CAR)的那些变体，所述变体保留识别靶细胞的能力，达到与亲本CAR相似的程度、相同的程度或更高的程度。关于亲本CAR，功能变体可例如在氨基酸序列上与亲本CAR至少约30％、50％、75％、80％、90％、98％或更高同一。

[0270] 功能变体可例如包含亲本CAR的氨基酸序列，具有至少一个保守性氨基酸取代。可替代地或另外地，功能变体可包含亲本CAR的氨基酸序列，具有至少一个非保守性氨基酸取代。在这种情况下，非保守性氨基酸取代优选地不干扰或抑制功能变体的生物活性。非保守性氨基酸取代可增强功能变体的生物活性，使得功能变体的生物活性与亲本CAR相比增加。

[0271] CAR的氨基酸取代优选为保守性氨基酸取代。保守性氨基酸取代为本领域中已知的，并且包括氨基酸取代，其中具有特定物理和/或化学性质的氨基酸被交换为具有相同或类似化学或物理性质的另一氨基酸。例如，保守性氨基酸取代可为酸性/带负电荷极性氨基酸被另一酸性/负电荷极性氨基酸(例如Asp或Glu)取代、带有非极性侧链的氨基酸被另一带有非极性侧链的氨基酸(例如Ala、Gly、Val、He、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Val等)取代、碱性/带正电荷极性氨基酸被另一碱性/带正电荷极性氨基酸(例如Lys、His、Arg等)取代、带有极性侧链的不带电氨基酸被另一带有极性侧链的不带电氨基酸(例如Asn、Gin、Ser、

Thr、Tyr等)取代、带有β-分支侧链的氨基酸被另一带有β-分支侧链的氨基酸(例如He、Thr和Val)取代、带有芳香族侧链的氨基酸被另一带有芳香族侧链的氨基酸(例如His、Phe、Trp和Tyr)取代等。

[0272] CAR基本上可由本文所述的一个或多个特定氨基酸序列组成,使得其它组分(例如,其它氨基酸)不实质上改变功能变体的生物活性。

[0273] CAR(包括功能部分和功能变体)可具有任何长度,即,可包含任何数量的氨基酸,条件为所述CAR(或其功能部分或功能变体)保留其生物活性,例如,特异性地结合至抗原的能力、检测哺乳动物的患病细胞或治疗或预防哺乳动物的疾病等。例如,CAR可为约50至约5000个氨基酸长,诸如长度为50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、1000个或更多个氨基酸。

[0274] CAR(包括本发明的功能部分和功能变体)可包含合成氨基酸代替一种或多种天然存在的氨基酸。此类合成氨基酸为本领域中已知的,并且包括例如:氨基环己烷羧酸、正亮氨酸、-氨基正癸酸、高丝氨酸、S-乙酰基氨基甲基-半胱氨酸、反式-3-和反式-4-羟基脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、β-苯基丝氨酸β-羟基苯丙氨酸、苯基甘氨酸、a-萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、吲哚啉-2-羧酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸单酰胺、N'-苄基-N'-甲基-赖氨酸、N',N'-二苄基-赖氨酸、6-羟基赖氨酸、鸟氨酸、-氨基环戊烷羧酸、a-氨基环己烷羧酸、a-氨基环庚烷羧酸、a-(2-氨基-2-降莰烷)-羧酸、γ-二氨基丁酸、β-二氨基丙酸、高苯丙氨酸和a-叔丁基甘氨酸。

[0275] CAR(包括功能部分和功能变体)可经糖基化、酰胺化、羧化、磷酸化、酯化、N-酰化、经由例如二硫桥环化或转化为酸加成盐和/或任选地二聚化或聚合或缀合。

[0276] 取代和变体

[0277] 在一些实施方案中,涵盖本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能希望改进抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。抗体的氨基酸序列变体可通过引入适当的修饰至编码所述抗体的核酸序列中或通过肽合成而制备。此类修饰包括,例如,抗体的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。可进行缺失、插入和取代的任何组合,以完成最终构建体,条件为所述最终构建体具有所需的特征,例如抗原结合。

[0278] a)取代、插入和缺失变体

[0279] 在一些实施方案中,提供具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。进行取代诱变的目标位点包括HVR和FR。如下文参考氨基酸侧链类别进一步描述。可将氨基酸取代引入至目标抗体中,并将产物针对所需活性进行筛选,例如保留的/改进的抗原结合、降低的免疫原性或改进的ADCC或CDC。

[0280] 氨基酸可根据共同侧链特性来分组:

[0281] (1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0282] (2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0283] (3)酸性:Asp、Glu;

[0284] (4)碱性:His、Lys、Arg;

[0285] (5)影响链取向的残基:Gly、Pro;

[0286] (6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0287] 非保守性取代为将这些类别之一的成员交换为另一类别。

[0288] 在一些方面中,抗原结合结构域为人源化。非人抗体为人源化,其中抗体的特测序列或区域经修饰,以增加与在人中天然产生的抗体或其片段的相似性。在一个方面中,抗原结合结构域经人源化。人源化抗体(或抗原结合片段)可使用本领域中已知的各种技术产生,包括但不限于:CDR移植(参见例如,欧洲专利号EP 239,400;国际公布号WO 91/09967;和美国专利号5,225,539、5,530,101和5,585,089,其各自以引用的方式整体并入本文中)、饰面或重修表面(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;以及Roguska等人,1994,PNAS,91:969-973,其各自以引用的方式整体并入本文中)、链改组(参见例如,美国专利号5,565,332,其以引用的方式整体并入本文中),以及公开于例如美国专利申请公布号US2005/0042664;美国专利申请公布号US2005/0048617;美国专利号6,407,213;美国专利号5,766,886;国际专利公布号WO 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(23增刊):5973s-5977s(1995);Couto等人,Cancer Res.,55(8):1717-22(1995);Sandhu J S,Gene,150(2):409-10(1994);以及Pedersen等人,J.Mol.Biol.,235(3):959-73(1994),其各自以引用的方式整体并入本文中。通常,框架区中的框架残基将被来自CDR供体抗体的相应残基取代,以改变(例如改进)抗原结合。这些框架取代,例如保守取代通过本领域中众所周知的方法鉴定,例如通过对CDR与框架残基的相互作用进行建模以鉴定对于抗原结合而言重要的框架残基,和通过序列比较以鉴定在特定位置的不寻常框架残基。(参见例如,Queen等人,美国专利号5,585,089;以及Riechmann等人,1988,Nature,332:323,其以引用的方式整体并入本文中)。

[0289] 人源化抗体或抗体片段具有一个或多个保留在其中的来自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“输入”残基,通常取自“输入”可变结构域。如本文所提供的,人源化抗体或抗体片段包含一个或多个来自非人免疫球蛋白分子的CDR和其中构成框架的氨基酸残基完全或主要源自人种系的框架区。用于抗体或抗体片段的人源化的多种技术为本领域中已知的。

[0290] 取代变体的一种类型涉及取代亲本抗体(例如,人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,被选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体将在某些生物学特性(例如增加的亲和力、降低的免疫原性)方面具有修饰(例如,改进),和/或将实质上保留亲本抗体的某些生物学特性。示例性取代变体为亲和力成熟抗体,其可例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(诸如本文所述的那些)方便地产生。简言之,一个或多个HVR残基发生突变,并且变体抗体展示在噬菌体上并针对特定生物活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0291] 可在HVR中进行改变(例如,取代),以例如改进抗体亲和力。此类改变可在HVR“热点”中进行,即由在体细胞成熟过程中经历高频率突变的密码子编码的残基(参见例如,Chowdhury,Methods Mol.Biol.207:179-196(2008)),和/或SDR(a-CDR),其中测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建二级文库和从二级文库中重新选择而实现亲和力成熟已描述于例如Hoogenboom等人于Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人

编,Human Press,Totowa,NJ(2001))中。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)中的任一种将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后产生二级文库。然后筛选所述文库,以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向方法,其中使数个HVR残基(例如,一次4-6个残基)随机化。可例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性地鉴定参与抗原结合的HVR残基。特别是经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0292] 在一些实施方案中,取代、插入或缺失可发生在一个或多个HVR内,只要此类改变实质上不降低抗体结合抗原的能力即可。例如,可在HVR内进行实质上不降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文提供的保守性取代)。此类改变可在HVR“热点”或CDR之外。在上文提供的变体VH序列的一些实施方案中,每个HVR未被改变或含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0293] 一种可用于鉴定抗体的可作为诱变的靶标的残基或区域的方法被称为“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells(1989)Science,244:1081-1085所描述。在这种方法中,鉴定残基或靶残基的组(例如,带电残基,诸如Arg、Asp、His、Lys和Glu),并被中性或带负电氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸)置换,以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可在显示出对初始取代的功能敏感性的氨基酸位置处引入其它取代。可替代地或另外地,抗原-抗体复合物的晶体结构用于鉴定抗体与抗原之间的接触点。此类接触残基和相邻残基可作为取代的候选物而被靶向或消除。可筛选变体以确定其是否含有所需特性。

[0294] 氨基酸序列插入包括长度范围从一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N或C末端与增加抗体的血清半衰期的酶(例如针对ADEPT)或多肽的融合。

[0295] b)糖基化变体

[0296] 在一些实施方案中,本文提供的抗体被改变以增加或降低抗体被糖基化的程度。向抗体添加糖基化位点或是抗体缺失糖基化位点可方便地通过改变氨基酸序列,由此产生或移除一个或多个糖基化位点而实现。

[0297] 在抗体包含Fc区时,与其连接的碳水化合物可被改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含一般通过N键联连接至Fc区的CH2结构域的Asn297的分支双触角寡糖。参见例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰基葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及连接至双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可对本申请的抗体中的寡糖进行修饰,以产生具有某些改进的特性的抗体变体。

[0298] 在一些实施方案中,提供具有碳水化合物结构的抗体变体,所述碳水化合物结构缺乏(直接或间接)连接至Fc区的岩藻糖。例如,此类抗体中岩藻糖的量可为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。如通过MALDI-TOF质谱法所测量,通过相对于连接至Asn297的所有糖结构(例如复合、杂合和高甘露糖结构)的总和计算Asn297上的糖链内的岩藻糖的平均量来确定岩藻糖的量,如例如WO 2008/077546中所述。Asn297是指位于Fc区中约位置297的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号);然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可位于位置297上游或下游约±3个氨基酸处,即介于位置294与300之间。此类岩

藻糖基化变体可具有改进的ADCC功能。参见例如,美国专利公布号US 2003/0157108(Presta、L.);US 2004/0093621((Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺失”抗体变体相关的公布的实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人,J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括缺乏蛋白质岩藻糖基化的Lec13CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);US专利申请号US 2003/0157108 A1,Presta,L;和WO 2004/056312A1,Adams等人),以及敲除细胞系,诸如α-1、6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除CHO细胞(参见例如,Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);以及WO2003/085107)。

[0299] 进一步提供具有二等分寡糖的抗体变体,例如,其中连接至抗体的Fc区的双触角寡糖被GlcNAc二等分。此类抗体变体可具有降低的岩藻糖基化和/或改进的ADCC功能。此类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);以及US 2005/0123546(Umana等人)中。还提供在连接至Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可具有改进的CDC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);以及WO 1999/22764(Raju,S.)中。

[0300] CAR(包括其功能部分和功能变体)可通过本领域中已知的方法获得。CAR可通过制备多肽或蛋白质的任何合适的方法来制备。从头合成多肽和蛋白质的合适方法描述于参考文献中,诸如Chan等人,Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2000;Peptide and Protein Drug Analysis,Reid,R.编,Marcel Dekker,Inc.,2000;Epitope Mapping,Westwood等人编,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2001;以及美国专利号5,449,752。此外,多肽和蛋白质可使用本文所述的核酸使用标准重组方法重组地产生。参见例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:ALaboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.2001;以及Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons,N Y,1994。此外,一些CAR(包括其功能部分和功能变体)可从诸如植物、细菌、昆虫、哺乳动物(例如大鼠、人)等的来源中分离和/或纯化。分离和纯化的方法为本领域中已知的。或者,本文所述的CAR(包括其功能部分和功能变体)可由公司商业合成。在此方面中,CAR可为合成的、重组的、分离的和/或纯化的。

[0301] 可检测标记物和标签

[0302] 对本文公开的一种或多种抗原具有特异性的CAR、表达CAR的T细胞、单克隆抗体、其抗原结合片段也可与标签蛋白一起表达(例如,共表达)。在一些实施方案中,弗林蛋白酶识别位点和下游2A自裂解肽序列被设计用于标签序列和CAR序列的同时双顺反子表达。在一些实施方案中,2A序列包含GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(SEQ ID NO:44)的核酸序列。在一些实施方案中,弗林蛋白酶和P2A序列包含编码SEQ ID NO:44的氨基酸序列的核酸序列。在

一些实施方案中，P2A标签包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列或与其具有至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％同一性的序列。

[0303] 在一些实施方案中，对本文公开的一种或多种抗原具有特异性的CAR、表达CAR的T细胞、单克隆抗体、其抗原结合片段也可与EGFR一起表达。在一些实施方案中，对本文公开的一种或多种抗原具有特异性的CAR、表达CAR的T细胞、单克隆抗体、其抗原结合片段，与截短的EGFR(tEGFR)一起表达(例如，共表达)。在一些实施方案中，tEGFR包含与SEQ ID NO:43至少95％同一、至少96％同一、至少97％同一、至少98％同一、至少99％同一或100％同一的氨基酸序列。

[0304] tEGFR:MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHIL PVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSL GLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCV SCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVM GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM(SEQ ID NO:43)

[0305] 对本文公开的一种或多种抗原具有特异性的CAR、表达CAR的T细胞、单克隆抗体、其抗原结合片段也可与可检测标记物缀合；例如，能够通过ELISA、分光光度法、流式细胞术、显微术或诊断成像技术(诸如计算机断层摄影术(CT)、计算机轴向断层摄影术(CAT)扫描、磁共振成像(MRI)、核磁共振成像(NMRI)、磁共振断层摄影术(MTR)、超声、光纤检查和腹腔镜检查)检测的可检测标记物。可检测标记物的具体非限制性实例包括荧光团、化学发光剂、酶键联、放射性同位素和重金属或化合物(例如用于通过MRI检测的超顺磁性氧化铁纳米晶体)。例如，有用的可检测标记物包括荧光化合物，包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明(rhodamine)、5-二甲胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白、镧系元素磷光体等。还可使用生物发光标记物，诸如荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、黄色荧光蛋白(YFP)。对本文公开的一种或多种抗原具有特异性的CAR、表达CAR的T细胞、抗体、其抗原结合片段也可与可用于检测的酶缀合，诸如辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等。当CAR、表达CAR的T细胞、抗体、其抗原结合片段与可检测的酶缀合时，它可通过添加额外的试剂进行检测，所述酶使用所述额外试剂来产生可辨别的反应产物。例如，当辣根过氧化酶剂存在时，添加过氧化氢和二氨基联苯胺产生有色反应产物，所述产物可目视检测。CAR、表达CAR的T细胞、抗体、其抗原结合片段也可与生物素缀合，并且经由抗生物素蛋白(avidin)或链霉抗生物素蛋白(streptavidin)结合的间接测量来检测。应当注意的是，抗生物素蛋白本身可与酶或荧光标记缀合。

[0306] CAR、表达CAR的T细胞、抗体、其抗原结合片段可与顺磁性剂诸如钆缀合。顺磁性剂诸如超顺磁性氧化铁也可用作标记。抗体也可与镧系元素(诸如铕和镝)和锰缀合。抗体或抗原结合片段也可用可被二级报告基因识别的预定多肽表位(诸如亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)。

[0307] CAR、表达CAR的T细胞、抗体、其抗原结合片段也可与经放射性标记的氨基酸缀合。放射性标记可用于诊断和治疗目的。例如，放射性标记可用于通过x射线、发射光谱或其它诊断技术检测本文公开的一种或多种抗原和表达抗原的细胞。此外，放射性标记可在治疗上用作毒素，以治疗受试者的肿瘤，例如治疗神经母细胞瘤。多肽的标记的实例包括但不限

于以下放射性同位素或放射性核苷酸：^{3}H、^{14}C、^{15}N、^{35}S、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I。

[0308] 检测此类可检测标记物的方法为本领域技术人员众所周知的。因此，例如，放射性标记可使用照相胶片或闪烁计数器检测，荧光标记物可使用光检测器来检测所发出的光线而检测。酶标记通常通过提供酶与底物并检测通过酶对底物的作用而产生的反应产物而检测，并且通过简单地可视化有色标记来检测比色标记。

[0309] 核酸、表达载体和宿主细胞

[0310] 本发明的一个实施方案进一步提供一种核酸，所述核酸包含编码本文所述的任何CAR、抗体或其抗原结合部分(包括其功能部分和功能变体)的核苷酸序列。本发明的核酸可包含编码本文所述的前导序列、抗原结合结构域、跨膜结构域和/或细胞内T细胞信号传导结构域中的任一者的核苷酸序列。

[0311] 在一个方面中，本发明涵盖包含编码CAR的核酸分子的重组核酸构建体，其中所述核酸分子包含编码例如本文所述的抗GCC结合结构域的核酸序列，其与编码细胞内信号传导结构域的核酸序列相邻并在同一阅读框中。可用于CAR中的示例性的细胞内信号传导结构域包括但不限于：例如CD3-ζ、CD28、4-1BB等的一个或多个细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中，CAR可包含CD3-ζ、CD28、4-IBB等的任何组合。

[0312] 在一个方面中，本发明提供核酸，所述核酸包含与编码本文所述的CAR构建体的核酸至少约70％或更高，例如约80％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一的核苷酸序列。

[0313] 在一些实施方案中，核酸编码选自表1-3或表7中所提供的抗GCC VH序列的抗GCC结合结构域。在一些实施方案中，核酸包含与SEQ ID NO:61-70中的任一者至少约70％或更高，例如约80％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％或约99％同一的序列。在一些实施方案中，核酸包含与SEQ ID NO:61-70中的任一者同一的序列。

[0314] 在一些实施方案中，核苷酸序列可经密码子修饰。不受特定理论的束缚，据信核苷酸序列的密码子优化可增加mRNA转录物的翻译效率。核苷酸序列的密码子优化可涉及用天然密码子取代另一个编码相同氨基酸的密码子，但可通过细胞内更容易获得的tRNA翻译，从而提高翻译效率。核苷酸序列的优化也可降低干扰翻译的二级mRNA结构，从而提高翻译效率。

[0315] 在本发明的一个实施方案中，核酸可包含编码本发明CAR的抗原结合结构域的密码子修饰的核苷酸序列。在本发明的另一个实施方案中，核酸可包含编码本文所述的CAR中的任一者(包括其功能部分和功能变体)的密码子修饰的核苷酸序列。

[0316] 在一个方面中，本发明涉及载体，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，载体选自由以下组成的组：DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。

[0317] 在一个实施方案中，载体为慢病毒载体。在一个实施方案中，载体还包含启动子。在一个实施方案中，启动子为EF-1启动子。

[0318] 表达载体包括质粒、逆转录病毒、粘粒、YAC、EBV来源的附加体等。一种方便的载体为编码功能完整人CH或CL免疫球蛋白序列的载体，其具有工程化的适当限制性位点，使得可容易地插入和表达任何VH或VL序列。在此类载体中，剪接通常在插入J区的剪接供体位点

与人C区之前的剪接受体位点之间发生，并且也在人CH外显子内存在的剪接区处发生。合适的表达载体可含有许多组分，例如复制起点、选择性标记物基因、一个或多个表达控制元件，诸如转录控制元件(例如，启动子、增强子或终止子)和/或一个或多个翻译信号、信号序列或前导序列等。聚腺苷酸化和转录终止在编码区下游的天然染色体位点处发生。所得嵌合抗体可与任何强启动子连接。可使用的合适载体的实例包括适合于哺乳动物宿主并基于病毒复制系统的那些，诸如猿猴病毒40(SV40)、劳斯肉瘤病毒(RSV)、腺病毒2、牛乳头状瘤病毒(BPV)、乳多泡病毒BK突变体(BKV)，或小鼠和人巨细胞病毒(CMV)，以及莫罗尼氏鼠白血病病毒(MMLV)、天然Ig启动子等。多种合适的载体为本领域中已知的，包括在单一拷贝或多个拷贝中维持或整合到宿主细胞染色体中的载体，例如，经由LTR或经工程化而具有多个整合位点的人工染色体(Lindenbaum等人Nucleic Acids Res.32:e172(2004);Kennard等人Biotechnol.Bioeng.2009年5月20日在线)。合适载体的额外实例在后面章节中列出。

[0319] 本发明还包括可直接转染到细胞中的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对模板进行体外转录(IVT)，之后进行polyA添加，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)、待表达的核酸和polyA尾(长度通常为50至2000个碱基)。如此产生的RNA可有效地转染不同种类的细胞。在一个实施方案中，模板包括用于CAR的序列。在一个实施方案中，通过电穿孔将RNA CAR载体转导至细胞，例如T细胞或NK细胞中。

[0320] 因此，本发明提供包含核酸的表达载体，所述核酸编码抗体、抗体的抗原结合片段(例如，人、人源化、嵌合抗体或前述中任一者的抗原结合片段)、抗体链的核酸(例如，重链、轻链)或结合至GCC蛋白的抗体链的抗原结合部分。

[0321] 在真核宿主细胞中的表达是有用的，因为此类细胞比原核细胞更有可能组装和分泌正确折叠的和具有免疫学活性的抗体。然而，任何所产生的由于不正确折叠而失活的抗体可根据已知方法重新恢复活性(Kim和Baldwin,"Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", Ann.Rev.Biochem.51,第459-89页(1982))。有可能宿主细胞将产生完整抗体的一部分，诸如轻链二聚体或重链二聚体，其也为根据本发明的抗体同源物。

[0322] 在一个实施方案中，核酸可并入重组表达载体中。在此方面，一个实施方案提供包含所述核酸中任一者的重组表达载体。出于本文目的，术语"重组表达载体"意指经遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体，当所述构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列时，其允许宿主细胞表达所述mRNA、蛋白质、多肽或肽，并且所述载体在足以在细胞内表达所述mRNA、蛋白质、多肽或肽的条件下与所述细胞接触。载体并非作为整体天然存在。

[0323] 然而，载体的一部分可为天然存在的。重组表达载体可包含任一类型的核苷酸，包括但不限于DNA和RNA，其可为单链或双链、合成或部分获自天然来源，并且可含天然的、非天然的或经改变的核苷酸。重组表达载体可包含天然存在的或非天然存在的核苷酸间键联，或两种类型的键联。优选地，非天然存在或经改变的核苷酸或核苷酸间键联并不阻碍载体的转录或复制。

[0324] 在一个实施方案中，重组表达载体可为任何合适的重组表达载体，并且可用于转化或转染任何合适的宿主细胞。合适的载体包括被设计用于繁殖和扩增或用于表达或两者的载体，诸如质粒和病毒。载体可选自由下组成的组:pUC系列(Fermentas Life Sciences,

Glen Burnie,Md.)、pBluescript系列(Stratagene,LaJolla,Calif.)、pET系列(Novagen,Madison,Wis.)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden)和pEX系列(Clontech,Palo Alto,Calif.)。

[0325] 还可使用噬菌体载体,诸如λ、λZapII(Stratagene)、EMBL4和λNMI 149。植物表达载体的实例包括pBIO1、pBI101.2、pBHO1.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。重组表达载体可为病毒载体,例如逆转录病毒载体或慢病毒载体。慢病毒载体是源自慢病毒基因组的至少一部分的载体,尤其包括自失活慢病毒载体,如提供于Milone等人,Mol.Ther.17(8):1453-1464(2009)中。可用于临床中的慢病毒载体的其它实例包括例如但不限于,来自Oxford BioMedica plc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可获得,并且为本领域技术人员所已知。

[0326] 许多转染技术为本领域中已知的(参见例如,Graham等人,Virology,52:456-467(1973);Sambrook等人,同上;Davis等人,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier(1986);以及Chu等人,Gene,13:97(1981))。

[0327] 转染方法包括磷酸钙共沉淀(参见例如,Graham等人,同上)、直接微注射到培养细胞中(参见例如,Capecchi,Cell,22:479-488(1980))、电穿孔(参见例如,Shigekawa等人,BioTechniques,6:742-751(1988))、脂质体介导的基因转移(参见例如,Mannino等人,BioTechniques,6:682-690(1988))、脂质介导的转导(参见例如,Feigner等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84:7413-7417(1987))和使用高速微粒的核酸递送(参见例如,Klein等人,Nature,327:70-73(1987))。

[0328] 在一个实施方案中,重组表达载体可使用例如Sambrook等人,同上和Ausubel等人,同上中描述的标准重组DNA技术来制备。可制备环状或线性的表达载体的构建体,以含有在原核或真核宿主细胞中起作用的复制系统。复制系统可源自例如ColE1、2μ质粒、λ、SV40、牛乳突状瘤病毒等。

[0329] 在适当情况下并且将载体是基于DNA还是基于RNA考虑在内,重组表达载体可包含调控序列(诸如转录和翻译起始和终止密码子),所述调控序列对载体待引入其中的宿主细胞的类型(例如细菌、真菌、植物或动物)具有特异性。重组表达载体可包含限制位点,以帮助克隆。

[0330] 重组表达载体可包括一种或多种标记物基因,其允许选择经转化或经转染的宿主细胞。标记物基因包括杀生物剂抗性(例如对抗生素、重金属等的抗性),在营养缺陷型宿主中互补以提供原养型等。用于本发明表达载体的合适标记基因包括例如新霉素/G418抗性基因、潮霉素抗性基因、组氨醇抗性基因、四环素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因。

[0331] 重组表达载体可包含天然或非天然启动子,所述启动子与编码CAR(包括其功能部分和功能变体)的核苷酸序列或与编码所述CAR的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列可操作地连接的。启动子的选择(例如强、弱、诱导型、组织特异性和发育特异性)在技术人员的一般技能范围内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在技术人员的一般技能范围内。启动子可为非病毒启动子或病毒启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子、EF1α启动子或在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。

[0332] 重组表达载体可被设计为用于瞬时表达、稳定表达或两者。此外,重组表达载体可

制备用于组成型表达或诱导型表达。

[0333] 此外，重组表达载体可制备为包括自杀基因。如本文所用，术语“自杀基因”是指导致表达所述自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可为赋予表达基因的细胞对剂(例如药物)的敏感性，并且在细胞与所述剂接触或暴露于所述剂时导致细胞死亡的基因。自杀基因为本领域中已知的(参见例如，Suicide Gene Therapy:Methods and Reviews,Springer, Caroline J.(Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research,Sutton,Surrey,UK),Humana Press,2004)，并且包括例如单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨基酶、嘌呤核苷磷酸化酶和硝基还原酶。

[0334] 一个实施方案进一步提供包含本文所述的任何重组表达载体的宿主细胞。如本文所用，术语“宿主细胞”是指可含有本发明的重组表达载体的任一类型细胞。宿主细胞可为真核细胞，例如植物、动物、真菌或藻类，或者可为原核细胞，例如细菌或原生动物。宿主细胞可为培养的细胞或原代细胞，即直接从生物体(例如人)分离。宿主细胞可为附着细胞或悬浮细胞(即悬浮生长的细胞)。合适的宿主细胞为本领域中已知的，并且包括例如DH5a大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞、HEK293T细胞等。为了扩增或复制所述重组表达载体的目的，宿主细胞可为原核细胞，例如DH5a细胞。为了产生重组CAR的目的，宿主细胞可为哺乳动物细胞。宿主细胞可为人细胞。当宿主细胞可为任何细胞类型、可源自任何类型的组织并且可处于任何发育阶段时，宿主细胞可为外周血淋巴细胞(PBL)或外周血单核细胞(PBMC)。宿主细胞可为T细胞。

[0335] 出于本文的目的，T细胞可为任何T细胞，诸如培养的T细胞，例如原代T细胞，或来自培养的T细胞系(例如Jurkat、SupT1等)的T细胞，或从哺乳动物获得的T细胞。如果从哺乳动物获得，则T细胞可从多种来源获得，包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其它组织或液体。T细胞也可经富集或纯化。T细胞可为人细胞。T细胞可为分离自人的T细胞。T细胞可为任何类型的T细胞并且可处于任何发育阶段，包括但不限于：CD4+/CD8+双阳性T细胞、CD4+辅助T细胞(例如Th1和Th2细胞)、CD8+T细胞(例如，细胞毒性T细胞)、肿瘤浸润细胞、记忆T细胞、记忆干细胞(即Tscm)、初始T细胞等。T细胞可为CD8+T细胞或CD4+T细胞。

[0336] 在一个实施方案中，如本文所述的CAR可用于合适的非T细胞中。此类细胞为具有免疫效应功能的那些，诸如例如由多潜能干细胞产生的NK细胞和T样细胞。

[0337] 本申请的一个方面提供工程化的免疫效应细胞，所述细胞包含本文所述的CAR中的任一者，或上述分离的核酸中的任一者，或上述载体中的任一者。在一些实施方案中，免疫效应细胞为T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多潜能干细胞或胚胎干细胞。在一些实施方案中，免疫效应细胞为T细胞。

[0338] 一个实施方案还提供包含至少一种本文所述的宿主细胞的细胞群体。所述细胞群体可为异质群体，其包含含有所描述的任何重组表达载体的宿主细胞，以及至少一种其它细胞(例如不包含任何重组表达载体的宿主细胞(例如T细胞))，或除T细胞以外的细胞，例如B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌肉细胞、脑细胞等。可替代地，细胞群体可为实质上同质的群体，其中所述群体主要包含含有所描述的重组表达载体(例如基本上由其组成)的宿主细胞。群体也可为细胞的克隆群体，其中所述群体的所有细胞都为包含重组表达载体的单一宿主细胞的克隆，使得所述群体的所有细胞都包

含重组表达载体。在本发明的一个实施方案中，细胞群体为包含宿主细胞的克隆群体，所述宿主细胞包含如本文所述的重组表达载体。

[0339] CAR(包括其功能部分和变体)、核酸、重组表达载体、宿主细胞(包括其群体)和抗体(包括其抗原结合部分)可经分离和/或纯化。例如，经纯化(或经分离)的宿主细胞制剂为其中宿主细胞比其体内自然环境中的细胞更纯的宿主细胞制剂。此类宿主细胞可例如通过标准纯化技术来产生。在一些实施方案中，宿主细胞的制剂经纯化，使得宿主细胞占所述制剂的总细胞含量的至少约50％，例如至少约70％。例如，纯度可为至少约50％、可大于约60％、约70％或约80％或者可为约100％。

[0340] 编码所需分子的核酸序列可使用本领域中已知的重组方法获得，例如通过筛选来自表达所述基因的细胞的文库、通过从已知包括相同基因的载体中衍生出基因或通过使用标准技术直接从含有它们的细胞和组织中分离出。

[0341] 可替代地，目标基因可合成产生，而非克隆。本发明还提供其中插入本发明的DNA的载体。源自逆转录病毒(诸如慢病毒)的载体为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并在子代细胞中繁殖。慢病毒载体相对于源自癌-逆转录病毒(诸如鼠类白血病病毒)的载体具有额外的优点，因为它们可转导非增殖细胞(诸如肝细胞)。它们还具有低免疫原性的额外优点。

[0342] 编码CAR的天然或合成核酸的表达可通过将编码CAR多肽或其部分的核酸可操作地连接至启动子，并将所述构建体整合到表达载体中而实现。载体可适合于复制和整合至真核生物中。典型的克隆载体含有转录和翻译终止子、起始序列和用于调控所需核酸序列的表达的启动子。

[0343] 本发明的表达构建体也可用于核酸免疫化和基因疗法，使用标准基因递送方案。用于基因递送的方法为本领域中已知的。参见例如，美国专利号5,399,346、5,580,859、5,589,466，其以引用的方式整体并入本文中。在另一个实施方案中，本发明提供基因治疗载体。

[0344] 可将核酸克隆至多种类型的载体中。例如，可将核酸克隆到载体中，所述载体包括但不限于质粒、噬菌体、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特定目标载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。此外，表达载体可以病毒载体的形式提供至细胞中。

[0345] 病毒载体技术为本领域中已知的，并且描述于例如Sambrook等人(2001，Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)，以及其它病毒学和分子生物学手册。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。一般而言，合适的载体含有在至少一种生物体中有功能的复制起点、启动子序列、方便的限制性核酸内切酶位点和一种或多种选择性标记物(例如，WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0346] 目前已开发多种基于病毒的系统，用于将基因转移至哺乳动物细胞中。例如，逆转录病毒为基因传递系统提供方便的平台。可使用本领域中已知的技术将选定基因插入载体中，并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可分离重组病毒，并将其体内或离体递送至受试者的细胞中。许多逆转录病毒系统为本领域中已知的。在一些实施方案中，使用腺病毒载体。多种腺病毒载体为本领域中已知的。在一个实施方案中，使用慢病毒载体。

[0347] 额外的启动子元件(例如增强子)调控转录启动的频率。通常，这些位于起始位点

上游30-110bp的区域中，尽管最近证实许多启动子也含有位于起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间距通常是可调整的，使得当元件相互倒置或移动时，启动子功能得以保留。在胸苷激酶(tk)启动子中，在活性开始下降之前，启动子元件之间的间距可增加至50bp。取决于启动子，单独元件可协同或独立地发挥功能以活化转录。

[0348] 合适的启动子的一个实例为立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。此启动子序列为强组成型启动子序列，能够驱动与其可操作地连接的任一多核苷酸序列的高水平表达。

[0349] 合适的启动子的另一实例为延长生长因子-1 a(EF-1a)。然而，还可使用其它组成型启动子序列，包括但不限于：猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、爱泼斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒立即早期启动子、劳斯(Rous)肉瘤病毒启动子，以及人基因启动子，诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌凝蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。此外，本发明不应限于使用组成型启动子。诱导型启动子也被考虑作为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供分子开关，当需要这种表达时，它能够开启与其可操作连接的多核苷酸序列的表达，或者在不需要表达时关闭所述表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫氨酸启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0350] 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也可含有选择性标记物基因或报告基因或两者，以帮助从寻求通过病毒载体转染或感染的细胞群体中鉴定和选择表达细胞。在其它方面中，选择性标记物可携带在单独的DNA片段上，并用于共转染程序中。

[0351] 选择性标记物和报告基因两者均可侧接有适当的调控序列，以使其能够在宿主细胞中表达。有用的选择性标记物包括例如抗生素抗性基因，诸如neo等。报告基因用于鉴定潜在转染细胞和评估调控序列的功能性。一般而言，报告基因并不存在于接受者生物体或组织中，或不由接受者生物体或组织表达，并且编码其表达可通过一些易于检测的特性(例如酶活性)来显现的多肽。在将DNA引入接受者细胞后，在合适的时间测定报告基因的表达。合适的报告基因可包括编码荧光素酶、β-半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、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)。合适的表达系统为已知，并且可使用已知技术制备或商购获得。一般来说，具有显示报告基因的最高表达水平的最小5’侧翼区的构建体被鉴定为启动子。此类启动子区域可连接至报告基因，并用于评价剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0352] 将基因引入细胞中并表达的方法为本领域中已知的。在表达载体的情况下，将通过本领域已知的任何方法载体容易地引入宿主细胞，例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞中。例如，可通过物理、化学或生物手段将表达载体转移至宿主细胞中。将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂转染、微粒轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法为本领域中众所周知的。参见例如，Sambrook等人(2001,Molecular Cloning:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)。用将多核苷酸引入宿主细胞的优选方法为磷酸钙转染。

[0353] 用于将目标多核苷酸引入宿主细胞中的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体，并且尤其是逆转录病毒载体，已成为用于将基因插入哺乳动物(例如，人细胞)中的最

广泛使用的方法。其它病毒载体可源自慢病毒、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。用于将多核苷酸引入宿主细胞中的化学方法包括胶体分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。

[0354] 在体外和体内用作递送媒介物的示例性胶体系统是脂质体(例如,人工膜囊泡)。在使用非病毒递送系统的情况下,示例性递送媒介物为纳米颗粒,例如脂质体或其它合适的亚微米尺寸的递送系统。考虑使用脂质制剂将核酸引入宿主细胞中(体外、离体或体内)。在另一个方面中,核酸可与脂质缔合。与脂质缔合的核酸可被包封在脂质体的水性内部、散布在脂质体的脂质双层内、通过与脂质体和寡核苷酸两者缔合的连接分子连接至脂质体、包埋在脂质体中、与脂质体复合、分散在含有脂质的溶液中、与脂质混合、与脂质组合、以悬浮液形式包含于脂质中、含于胶束中或与胶束复合、或以其它方式与脂质缔合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体结合组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如,它们可存在于双层结构中、以胶束形式存在或具有“塌陷的”结构。它们也可简单地散布在溶液中,可能形成大小或形状不均匀的聚集体。脂质为脂肪物质,其可以是天然存在的或合成的脂质。例如,脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪滴,以及含有长链脂肪烃及其衍生物的化合物类别,诸如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛。

[0355] 适合使用的脂质可获自商业来源。例如,二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)可获自Sigma,St.Louis,MO;磷酸双十六烷基酯(“DCP”)可获自K&K Laboratories(Plainview,NY);胆固醇(“Choi”)可获自Calbiochem-Behring;二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)和其它脂质可获自Avanti Polar Lipids,Inc.(Birmingham,AL)。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的储备溶液可在约-20℃下储存。氯仿被用作唯一的溶剂,因为它比甲醇更容易蒸发。“脂质体”为通用术语,涵盖通过产生封闭的脂质双层或聚集体而形成的各种单层和多层脂质媒介物。脂质体的特征可在于具有囊泡结构,所述囊泡结构具有磷脂双层膜和内部水性介质。多层脂质体具有由水性介质隔开的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,多个脂质层会自发形成。脂质组分在形成封闭结构之前进行自我重排,并将水和溶解的溶质包埋在脂质双层之间(Ghosh等人,1991Glycobiology 5:505-10)。

[0356] 然而,还涵盖与正常囊泡结构相比在溶液中具有不同结构的组合物。例如,脂质可呈现胶束结构或仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。还考虑lipofectamine-核酸复合物。无论用于将外源核酸引入宿主细胞或以其它方式将细胞暴露于本发明抑制剂的方法如何,为了确认宿主细胞中重组DNA序列的存在,可进行多种测定。此类测定包括例如本领域技术人员熟知的“分子生物学”测定,诸如DNA印迹和RNA印迹、RT-PCR和PCR;“生物化学”测定,诸如检测特定肽的存在或不存在,例如通过免疫学手段(ELISA和蛋白质印迹)或通过本文所述的测定来鉴定落入本发明范围内的剂。

[0357] 本发明还提供载体,所述载体包含编码CAR的核酸分子。在一个方面中,可将CAR载体直接转导至细胞,例如T细胞中。在一个方面中,载体为克隆或表达载体,例如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、双微体)、逆转录病毒和慢病毒载体构建体的载体。在一个方面中,载体能够在哺乳动物T细胞中表达CAR构建体。在一个方面中,哺乳动物T细胞为人T细胞。

[0358] 在一些方面中,非病毒方法可用于将编码本文所述的CAR的核酸递送至细胞或组

织或受试者中。在一些实施方案中,非病毒方法包括使用转座子(也称为可转座元件)。在一些实施方案中,转座子为一段可将自身插入基因组中某个位置的DNA,例如,一段能够自我复制并将其拷贝插入基因组中的DNA,或一段可从更长的核酸中剪接出并插入基因组中的另一位置的DNA。

[0359] 额外的和示例性转座子和非病毒递送方法描述于2016年4月8日提交的国际申请WO 2016/164731的第196-198页,其以引用的方式整体并入本文中。

[0360] T细胞来源

[0361] 在扩增和遗传修饰(例如,以表达本文所述的CAR)之前,可从受试者获得细胞来源,例如T细胞或NK细胞。术语"受试者"旨在包括可在其中引发免疫反应的活生物体(例如哺乳动物)。受试者的实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。

[0362] 在实施方案中,免疫效应细胞(例如,免疫效应细胞群体),例如T细胞源自(例如分化自)干细胞,例如胚胎干细胞或多潜能干细胞,例如诱导型多潜能干细胞(iPSC)。在实施方案中,细胞为自体或同种异体细胞。在细胞为同种异体的实施方案中,例如源自干细胞(例如,iPSC)的细胞经修饰以降低它们的同种异体反应性。例如,细胞可经修饰以例如通过修饰(例如破坏)其T细胞受体来降低同种异体反应性。在实施方案中,位点特异性核酸酶可用于破坏T细胞受体,例如,在T细胞分化之后。在其它实例中,例如源自iPSC的T细胞的细胞可由病毒特异性T细胞生成,所述细胞由于识别病原体来源的抗原而不太可能引起移植物抗宿主疾病。又在其它实例中,同种异体反应性可例如通过从常见HLA单倍型生成iPSC而降低(例如最小化),使得它们与匹配的无关接受者受试者的组织相容。

[0363] 又在其它实例中,同种异体反应性可例如通过经由遗传修饰来阻抑HLA表达而降低(例如最小化)。例如,源自iPSC的T细胞可如例如Themeli等人Nat.Biotechnol.31.10(2013):928-35所述来加工,其以引用的方式并入本文中。在一些实例中,源自干细胞的免疫效应细胞(例如T细胞)可使用WO2014/165707(其以引用的方式并入本文)中描述的方法加工生成。

[0364] T细胞可从许多来源获得,包括外周血单核细胞、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、胸膜积液、脾组织和肿瘤。在本发明的某些方面中,可使用本领域中任何数目的T细胞系。在本发明的某些方面中,T细胞可使用本领域技术人员已知的任何数目的技术(诸如Ficoll™分离)而从受试者收集的血液单元来获得。在一个优选方面中,来自个体的循环血液的细胞通过单采血液成分术获得。单采血液成分术产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。在一个方面中,可洗涤通过单采血液成分术收集的细胞,以除去血浆级分,并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中,以用于后续加工步骤。在本发明的一个方面中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在另一个方面中,洗涤溶液不含钙且可不含镁,或者可不含许多(如果不是全部)二价阳离子。

[0365] 在钙不存在的情况下,初始活化步骤可导致活化放大。正如本领域普通技术人员将容易理解的,洗涤步骤可通过本领域技术人员已知的方法,诸如通过根据制造商的说明书使用半自动"流通"离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver5)来完成。在洗涤之后,可将细胞重悬于各种生物相容缓冲液中,诸如(例如)不含钙、不含镁的PBS、PlasmaLyte A或其它含或不含缓冲液的盐水溶液中。或

者,可移除单采血液成分术样品中的不需要的组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0366] 应认识到,本申请的方法可利用包含5%或更少(例如2%)的人AB血清的培养基条件,并利用已知的培养基条件和组合物,例如描述于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中的那些。

[0367] 在一个方面中,通过裂解红细胞并耗尽单核细胞,例如通过经由PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘析,从外周血淋巴细胞中分离T细胞。T细胞的特定亚群(诸如CD3+、CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+和CD45RO+T细胞)可通过正向或负向选择技术进一步分离。举例而言,在一个方面中,通过与抗CD3/抗CD28(例如,3x28)缀合的珠粒(诸如DYNABEADS® M-450CD3/CD28 T)一起孵育足以正向选择所需T细胞的时间段来分离T细胞。在一个方面中,时间段为约30分钟。在另一个方面中,时间段的范围为30分钟至36小时或更长,并且介于其间的所有整数值。在另一个方面中,时间段为至少1、2、3、4、5或6小时。在又一优选的方面中,时间段为10至24小时。在一个方面中,孵育时间段为24小时。与其它细胞类型相比,更长的孵育时间可用于在只有少量T细胞的任何情况下分离T细胞,诸如从肿瘤组织或从免疫受损个体中分离肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)。此外,使用更长的孵育时间可提高CD8+T细胞的捕获效率。因此,通过简单地缩短或延长时间允许T细胞结合至CD3/CD28珠粒,和/或通过增加或降低珠粒与T细胞的比率(如本文进一步描述),可在培养起始或培养工程期间的其它时间点优先选择或选除T细胞亚群。另外,通过增加或降低珠粒或其它表面上的抗CD3和/或抗CD28抗体的比率,可在培养起始或其它所需的时间点优先选择或选除T细胞亚群。本领域技术人员将认识到,还可在本发明的上下文中使用多轮选择。在某些方面中,可能希望执行选择程序并在活化和扩增制程中使用"未经选择的"细胞。"未经选择的"细胞也可经受进一步选择轮次。

[0368] 通过负向选择来富集T细胞群体可通过针对负向选择细胞所特有的表面标记物的抗体的组合来实现。一种方法为经由负向磁免疫粘附或流式细胞仪进行细胞分选和/或选择,其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的混合物。举例而言,为了通过负向选择来富集CD4+细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些方面中,可能希望富集或正向选择通常表达CD4+、CD25+、CD62Lhi、GITR+和FoxP3+的调控性T细胞。

[0369] 可替代地,在某些方面中,T调控细胞通过抗C25缀合的珠粒或其它类似选择方法耗尽。本文所述的方法可包括例如,使用例如本文所述的负向选择技术选择特异性免疫效应细胞(例如T细胞)亚群,所述亚群为T调控细胞耗尽的群体、CD25+耗尽的细胞。优选地,T调控耗尽的细胞群体含有少于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞。

[0370] 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从群体中移除T调控细胞(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,珠粒)缀合,或以其它方式涂覆于基材(例如珠粒)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。

[0371] 在一个实施方案中,使用来自Miltenyi™的CD25耗尽试剂从群体中移除T调控细胞

(例如CD25+T细胞)。在一个实施方案中,细胞与CD25耗尽试剂的比率为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。在一个实施方案中,例如对于T调控细胞(例如CD25+)耗尽,使用大于5亿个细胞/ml。在另一个方面中,使用6亿、7亿、8亿或9亿个细胞/ml的细胞浓度。在一个实施方案中,待耗尽的免疫效应细胞群体包括约6x109个CD25+T细胞。在其它方面中,待耗尽的免疫效应细胞群体包括约1x109至1 x 1010个CD25+T细胞,和介于其之间的任何整数值。在一个实施方案中,所得T调控耗尽细胞群体具有2x109个T调控细胞,例如CD25+细胞,或更低(例如,1x109、5x108、1x108、5x107、1x107或更少的CD25+细胞)。

[0372] 在一个实施方案中,使用具有耗尽管组(诸如管162-01)的CliniMAC系统从群体中移除T调控细胞(例如CD25+细胞)。在一个实施方案中,CliniMAC系统在诸如例如DEPLETION2.1的耗尽设定下运行。

[0373] 在不希望受特定理论束缚的情况下,在进行单采血液成分术之前或在制造表达CAR的细胞产物期间降低受试者中的免疫细胞的负向调控因子的水平(例如,减少不想要的免疫细胞(例如TREG细胞)的数量)可降低受试者复发的风险。举例而言,耗尽TREG细胞的方法为本领域中已知的。减少TREG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耗尽以及其组合。

[0374] 在一些实施方案中,制造方法包括在制造表达CAR的细胞之前减少(例如,耗尽)TREG细胞的数量。举例而言,制造方法包括使样品(例如单采血液成分术样品)与抗GITR抗体和/或抗CD25抗体(或其片段,或CD25结合配体)接触,例如以在制造表达CAR的细胞(例如T细胞、NK细胞)之前耗尽TREG细胞。

[0375] 在一个实施方案中,在收集用于表达CAR的细胞产物制造的细胞之前,用一种或多种减少TREG细胞的疗法预先治疗受试者,由此降低受试者对表达CAR的细胞治疗复发的风险。在一个实施方案中,减少TREG细胞的方法包括但不限于,向受试者施用环磷酰胺、抗GITR抗体、CD25耗尽或其组合中的一者或多者。施用环磷酰胺、抗GITR抗体、CD25耗尽或其组合中的一者或多者可在输注表达CAR的细胞产物之前、期间或之后进行。

[0376] 在一个实施方案中,在收集用于表达CAR的细胞产物制造的细胞之前,用环磷酰胺预先治疗受试者,从而降低受试者对表达CAR的细胞治疗复发的风险。在一个实施方案中,在收集用于表达CAR的细胞产物制造的细胞之前,用抗GITR抗体预先治疗受试者,从而降低受试者对表达CAR的细胞治疗复发的风险。

[0377] 在一个实施方案中,待移除的细胞群体并非调控性T细胞或肿瘤细胞,而是可以其它方式负向影响CART细胞的扩增和/或功能的细胞,例如表达CD14、CD11b、CD33、CD15或由潜在免疫抑制细胞表达的其它标记物的细胞。在一个实施方案中,此类细胞预期与调控性T细胞和/或肿瘤细胞同时移除或在所述耗尽之后移除或以另一顺序移除。

[0378] 本文所述的方法可包括多于一个选择步骤,例如多于一个耗尽步骤。可例如用针对负向选择的细胞所特有的表面标记物的抗体的组合来完成通过阴性选择富集T细胞群体。一种方法为经由负向磁免疫粘附或流式细胞术进行的细胞分选和/或选择,其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的混合物。举例而言,为了通过负向选择来富集CD4+细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。

[0379] 本文所述的方法可进一步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)的群体中移除细胞,由此提供T调控耗尽(例如,CD25+耗尽)和肿瘤抗原耗尽的细胞群体,所述细胞群体适于表达CAR(例如,如本文所述的CAR)。在一个实施方案中,表达肿瘤抗原的细胞与T调控细胞(例如CD25+细胞)同时移除。举例而言,抗CD25抗体或其片段和抗肿瘤抗原抗体或其片段可附着至同一基材(例如,珠粒)上,所述基材可用于移除细胞或抗CD25抗体或其片段,或者抗肿瘤抗原抗体或其片段可附着至单独的珠粒上,所述珠粒的混合物可用于移除所述细胞。在其它实施方案中,T调控细胞(例如CD25+细胞)的移除和表达肿瘤抗原的细胞的移除依序发生,并且可例如以任何顺序发生。

[0380] 还提供了包括以下的方法:从表达检查点抑制剂(例如本文所述的检查点抑制剂)的群体中移除细胞(例如,PD1+细胞、FAG3+细胞和TIM3+细胞中的一者或多者),从而提供T调控耗尽(例如CD25+耗尽)的细胞和检查点抑制剂耗尽的细胞(例如PD1+、FAG3+和/或TIM3+耗尽的细胞)群体。示例性检查点抑制剂包括B7-H1、B7-1、CD160、P1H、2B4、PD1、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM 5)、LAG3、TIGIT、CTLA-4、BTLA和LAIR1。在一个实施方案中,表达检查点抑制剂的细胞与T调控(例如CD25+细胞)同时移除。举例而言,抗CD25抗体或其片段和抗检查点抑制剂抗体或其片段可附着至同一珠粒上,所述珠粒可用于移除细胞或抗CD25抗体或其片段,并且抗检查点抑制剂抗体或其片段可附着至单独的珠粒上,所述珠粒的混合物可用于移除细胞。在其它实施方案中,T调控细胞(例如CD25+细胞)的移除和表达检查点细胞的移除为依序的,并且可例如以任何顺序发生。

[0381] 在一个实施方案中,可选择表达IFN-g、TNFa、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、颗粒酶B和穿孔素或其它适当分子(例如其它细胞因子)中的一者或多者的T细胞群体。用于筛选细胞表达的方法可例如通过PCT公布号:WO 2013/126712中描述的方法来确定。

[0382] 就通过正向或负向选择来分离所需的细胞群体而言,可改变细胞和表面(例如,颗粒如珠粒)的浓度。在某些方面中,可能希望显著降低珠粒与细胞混合在一起的体积(例如,增加细胞浓度),以确保细胞与珠粒的最大接触。举例而言,在一个方面中,使用20亿个细胞/mL的浓度。在一个方面中,使用10亿个细胞/mL的浓度。在另一方面中,使用大于1亿个细胞/mL。在另一个方面中,使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在又一个方面中,使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在其它方面中,可使用1.25亿个或1.5亿个细胞/mL的浓度。

[0383] 使用高浓度可导致细胞产率、细胞活化和细胞扩增增加。此外,使用高细胞浓度允许更有效地捕获可能微弱表达靶抗原的细胞(诸如CD28-阴性T细胞),或来自存在许多肿瘤细胞的样品(例如,白血病血液、肿瘤组织等)的细胞。此类细胞群体可具有治疗价值并且将期望获得。例如,使用高浓度的细胞允许更有效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8+T细胞。

[0384] 在相关方面中,可能希望使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞与表面(例如,颗粒诸如珠粒)的混合物,使颗粒与细胞之间的相互作用最小化。这就选择了待与颗粒结合的表达大量所需抗原的细胞。例如,CD4+T细胞表达较高水平的CD28,并且在稀释浓度下比

CD8+T细胞更有效地被捕获。

[0385] 在一个方面中,所使用的细胞浓度为5X 10e6/ml。在其它方面中,所使用的浓度可为约1X 105/ml至1X 106/ml,和介于其之间的任何整数值。

[0386] 在其它方面中,细胞可在2℃-10℃或在室温下在旋转器上以不同速度孵育不同时间长度。用于刺激的T细胞也可在洗涤步骤之后冷冻。不希望被理论束缚,冷冻和随后解冻步骤通过移除细胞群体中的粒细胞和一定程度的单核细胞而提供更均匀的产物。在移除血浆和血小板的洗涤步骤之后,细胞可悬浮于冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数为本领域中已知的并且可用于本文中,但一种方法涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或含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,或含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,或含有例如Hespan和PlasmaLyte A的其它合适的细胞冷冻培养基,然后将细胞以每分钟1°的速率冷冻至-80℃并储存在液氮储罐的气相中。可使用其它受控冷冻方法以及立即在-20℃下或在液氮中的非受控冷冻。

[0387] 在某些方面中,将冷冻保存的细胞如本文所述解冻并洗涤,并且允许在使用本发明的方法活化之前在室温下静置一小时。

[0388] 本发明的上下文中还考虑在可能需要如本文所述扩增细胞之前的时间段,从受试者收集血液样品或单采血液成分术产物。因此,可在任何必要的时间点收集待扩增的细胞的来源,并且分离所需的细胞(诸如T细胞)并将其冷冻,以待稍后用于许多将受益于T细胞疗法的疾病或疾患(诸如本文所述的那些)的T细胞疗法中。

[0389] 在一个方面中,血液样品或单采物取自大体上健康的受试者。在某些方面中,血液样品或单采物取自有发展疾病的风险但尚未发展疾病的大体上健康的受试者,并且分离并冷冻目标细胞以用于稍后使用。在某些方面中,可将T细胞扩增、冷冻并在以后使用。在某些方面中,在诊断如本文所述的特定疾病之后但在任何治疗之前不久从患者收集样品。

[0390] 在其它方面中,在进行多种相关治疗模式之前,从受试者的血液样品或单采物中分离细胞,所述治疗模式包括但不限于用剂诸如那他珠单抗(natalizumab)、依法珠单抗(efalizumab)、抗病毒剂、化学疗法、放射、免疫抑制剂(诸如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨喋呤、霉酚酸酯和FK506)、抗体或其它免疫清除剂(诸如CAMPATH、抗CD3抗体、环磷酰胺(cytoxan)、氟达拉滨(fludarabine)、环孢菌素、FK506、雷帕霉素(rapamycin)、霉酚酸、类固醇、FR901228和辐照)治疗。

[0391] 在本公开的另一方面中,T细胞在治疗后直接从患者获得,所述治疗使受试者具有功能性T细胞。在这方面,已观察到,在某些癌症治疗后,特别是使用损害免疫系统的药物治疗后,在治疗后不久在患者通常从治疗中恢复期间,所获得的T细胞的质量对于它们离体扩增的能力而言可能是最佳的或得到改善的。

[0392] 同样地,使用本文所述的方法进行离体操作后,这些细胞可处于用于增强植入和体内扩增的优选状态。因此,在本公开的上下文中预期在此恢复阶段收集血细胞,包括T细胞、树突状细胞或造血细胞的其它细胞。此外,在某些方面中,可使用动员(例如,使用GM-CSF的动员)和调理方案以在受试者中产生尤其是在治疗之后的限定窗口期期间有利于特定细胞类型的再增殖、再循环、再生和/或扩增的条件。示例性细胞类型包括T细胞、B细胞、树突状细胞和免疫系统的其它细胞。

[0393] 在一些实施方案中,T细胞群体为二甘油(diaglycerol)激酶(DGK)缺陷型。DGK缺陷型细胞包括不表达DGK RNA或蛋白质或具有降低的或受抑制的DGK活性的细胞。DGK缺陷型细胞可通过遗传方法生成,例如施用RNA干扰剂(例如siRNA、shRNA、miRNA),以减少或预防DGK表达。可替代地,可通过用本文所述的DGK抑制剂处理而产生DGK缺陷型细胞。

[0394] 在一个实施方案中,T细胞群体为Ikaros缺陷型。Ikaros缺陷型细胞包括不表达Ikaros RNA或蛋白质或具有降低的或受抑制的Ikaros活性的细胞,Ikaros缺陷型细胞可通过遗传方法产生,例如施用RNA干扰剂(例如siRNA、shRNA、miRNA),以降低或阻止Ikaros表达。

[0395] 可替代地,可通过用Ikaros抑制剂(例如来那度胺)处理而产生Ikaros缺陷型细胞。在实施方案中,T细胞群体为DGK缺陷型且Ikaros缺陷型,例如不表达DGK和Ikaros,或具有降低的或受抑制的DGK和Ikaros活性。可通过本文所述的任何方法产生此类DGK和Ikaros缺陷型细胞。在一个实施方案中,NK细胞获自受试者。在另一个实施方案中,NK细胞为NK细胞系,例如NK-92细胞系(Conkwest)。

[0396] 同种异体CAR免疫效应细胞

[0397] 在本文所述的实施方案中,免疫效应细胞可为同种异体免疫效应细胞,例如T细胞或NK细胞。举例而言,细胞可为同种异体T细胞,例如缺乏功能性T细胞受体(TCR)和/或人白细胞抗原(HLA),例如I类HLA和/或II类HLA的表达的同种异体T细胞。

[0398] 缺乏功能性TCR的T细胞可例如经工程化以使得其在其表面上不表达任何功能性TCR,经工程化以使得其不表达包含功能性TCR的一个或多个亚基,或经工程化以使得其在其表面上产生非常少的功能性TCR。可替代地,T细胞可表达实质上受损的TCR,例如通过表达TCR的一个或多个亚基的突变或截短形式。术语“实质上受损的TCR”意指此TCR不会在宿主中引发不良免疫反应。

[0399] 本文所述的T细胞可例如经工程化,使得其在其表面上不表达功能性HLA。举例而言,本文所述的T细胞可经工程化,使得细胞表面表达HLA(例如,I类HLA和/或II类HLA)被下调。

[0400] 在一些实施方案中,T细胞可缺乏功能性TCR和功能性HLA,例如I类HLA和/或II类HLA。缺乏功能性TCR和/或HLA表达的经修饰的T细胞可通过任何合适手段获得,包括TCR或HLA的一个或多个亚基的敲除(knock out)或敲低(knock down)。举例而言,T细胞可包括使用siRNA、shRNA、成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)或锌指核酸酶(ZFN)敲低TCR和/或HLA。

[0401] 在一些实施方案中,同种异体细胞可为例如,通过本文所述的任何方法不表达或以低水平表达抑制性分子的细胞。举例而言,细胞可为不表达或以低水平表达抑制性分子的细胞,所述抑制性分子例如可降低表达CAR的细胞建立免疫效应反应的能力。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、I类MHC、II类MHC、GAL9和腺苷。抑制性分子的抑制(例如通过在DNA、RNA或蛋白质水平上的抑制)可优化表达CAR的细胞的性能。在实施方案中,可使用抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA、成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)或锌指核酸内切酶(ZFN),例如如本文所述。

[0402] 用于抑制TCR或HLA的siRNA和shRNA

[0403] 在一些实施方案中，可在细胞中(例如T细胞中)，使用靶向编码TCR和/或HLA的核酸的siRNA或shRNA，和/或使用抑制性分子(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、I类MHC、II类MHC、GAL9和腺苷)抑制TCR表达和/或HLA表达。

[0404] siRNA和shRNA以及示例性shRNA的表达系统在例如2015年3月13日提交的国际公布WO2015/142675的第649和650段中进行了描述，所述国际公布以引用的方式整体并入。

[0405] 用于抑制TCR或HLA的CRISPR

[0406] 如本文所用的“CRISPR”或“用于TCR和/或HLA的CRISPR”或“用于抑制TCR和/或HLA的CRISPR”是指一组成簇规律间隔短回文重复序列，或包含这样的一组重复序列的系统。如本文所用，“Cas”是指CRISPR相关蛋白。

[0407] “CRISPR/Cas”系统是指源自CRISPR和Cas的系统，其可用于在细胞中(例如T细胞中)，使TCR和/或HLA基因和/或抑制分子(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、I类MHC、II类MHC、GAL9和腺苷)沉默和/或突变。CRISPR/Cas系统及其用途描述于例如，2015年3月13日提交的国际公布WO2015/142675的第651-658段中，所述国际公布以引用的方式整体并入。

[0408] 用于抑制TCR和/或HLA的TALEN

[0409] “TALEN”或“用于HLA和/或TCR的TALEN”或“用于抑制HLA和/或TCR的TALEN”是指转录活化因子样效应物核酸酶，其为可用于在细胞中(例如T细胞中)编辑HLA和/或TCR基因和/或抑制性分子(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、I类MHC、II类MHC、GAL9和腺苷)的人工核酸酶，。

[0410] TALEN及其用途描述于例如，2015年3月13日提交的国际公布WO2015/142675的第659-665段中，所述国际公布以引用的方式整体并入。

[0411] 用于抑制HLA和/或TCR的锌指核酸酶

[0412] “ZFN”或“锌指核酸酶”或“用于HLA和/或TCR的ZFN”或“用于抑制HLA和/或TCR的ZFN”是指锌指核酸酶，其为可用于在细胞中(例如T细胞中)编辑HLA和/或TCR基因和/或抑制性分子(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、I类MHC、II类MHC、GAL9和腺苷)的人工核酸酶。

[0413] ZFN及其用途描述于例如，2015年3月13日提交的国际公布WO2015/142675的第666-671段中，所述国际公布以引用的方式整体并入。

[0414] 端粒酶的表达

[0415] 虽然不希望受到任何特定理论的束缚，但在一些实施方案中，治疗性T细胞由于T细胞中的缩短端粒而对患者具有短期持久性；因此，用端粒酶基因转染可延长T细胞的端

粒,并提高患者中T细胞的持久性。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,例如端粒酶的催化亚基,例如TERT,例如hTERT。在一些方面中,本公开提供一种产生表达CAR的细胞的方法,所述方法包括使细胞与编码端粒酶亚基(例如端粒酶的催化亚基,例如,TERT,例如hTERT)的核酸接触。细胞可在与编码CAR的构建体接触之前、同时或之后与核酸接触。

[0416] 在一个方面中,本公开提供一种制造免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)群体的方法。在一个实施方案中,所述方法包括:提供免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)群体,使所述免疫效应细胞群体与编码CAR的核酸接触;以及在允许CAR和端例酶表达的条件下使所述免疫效应细胞群体与编码端粒酶亚基(例如,hTERT)的核酸接触。

[0417] 在一个实施方案中,编码端粒酶亚基的核酸为DNA。在一个实施方案中,编码端粒酶亚基的核酸包含驱动子,所述启动子能够驱动端粒酶亚基AAC5 1724.1的表达(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)。

[0418] 治疗方法

[0419] 本发明涉及治疗方法,所述治疗方法包括向受试者施用抗GCC抗原结合分子。在一些实施方案中,本文公开的抗GCC CAR和抗原结合分子可用于治疗或预防哺乳动物的疾病的方法中。在此方面,一个实施方案提供一种治疗或预防哺乳动物的癌症的方法,所述方法包括向哺乳动物施用有效治疗或预防哺乳动物的癌症的量的CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体、抗体和/或其抗原结合部分,和/或药物组合物。本发明还涉及如本文所述的抗GCC抗原结合分子(例如sdAb或CAR),其用于治疗疾病。本发明还涉及如本文所述的抗GCC抗原结合分子(例如sdAb或CAR),其用于治疗癌症。本发明还涉及如本文所述的抗GCC抗原结合分子(例如sdAb或CAR),其用于制造用于治疗癌症的药物。

[0420] 本文所述的组合物施用可以任何方便的方式进行,包括通过气雾剂吸入、注射、摄入、输注、植入或移植。本文所述的组合物可经动脉、皮下、皮内、肿瘤内、结内、髓内、肌肉内、通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内施用于患者。在一个实施方案中,本文所述的例如包含表达CAR的细胞的组合物通过皮内或皮下注射施用于患者。在一个实施方案中,本文所述的例如包含有表达CAR的细胞的组合物通过静脉注射施用。本文所述的例如包含表达CAR的细胞的组合物可直接注射至肿瘤、淋巴结或感染部位中。

[0421] 通常可陈述包含本文所述的免疫效应细胞的药物组合物可以104至109个细胞/kg体重,在一些实例中105至106细胞/kg体重(包括那些范围内的所有整数值)的剂量施用。免疫效应细胞组合物还可以这些剂量多次施用。细胞可使用免疫疗法中通常已知的输注技术施用(参见例如,Rosenberg等人,New Eng.J.of Med.319:1676,1988)。

[0422] 在某些方面中,可能需要将活化的免疫效应细胞施用于受试者,随后重新抽取血液(或进行单采血液成分术),依据本发明由其活化细胞并将这些经活化和扩增的细胞再输注至患者中。这一过程可每隔几周进行国瓷。在某些方面中,可从10cc至400cc的抽血中活化细胞。在某些方面中,从20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的抽血中活化细胞。

[0423] 在一些实施方案中，抗GCC CAR在供体细胞上表达。在一些实施方案中，用于T细胞疗法中的供体T细胞获自患者(例如，用于自体T细胞疗法)。在其它实施方案中，用于T细胞疗法的供体T细胞获自非患者的受试者(例如，同种异体T细胞疗法)。CAR+T细胞可以治疗有效量施用。举例而言，治疗有效量的T细胞可为至少约10^4个细胞、至少约10^5个细胞、至少约10^6个细胞、至少约10^7个细胞、至少约10^8个细胞、至少约10^9个细胞或至少约10^{10}个细胞。

[0424] 在一些实施方案中，T细胞的治疗有效量为约10^4个细胞、约10^5个细胞、约10^6个细胞、约10^7个细胞或约10^8个细胞。在一些实施方案中，CAR T细胞的治疗有效量为约2X10^6个细胞/kg、约3X10^6个细胞/kg、约4X10^6个细胞/kg、约5X10^6个细胞/kg、约6X10^6个细胞/kg、约7X10^6个细胞/kg、约8X10^6个细胞/kg、约9X10^6个细胞/kg、约1X10^7个细胞/kg、约2X10^7个细胞/kg、约3X10^7个细胞/kg、约4X10^7个细胞/kg、约5X10^7个细胞/kg、约6X10^7个细胞/kg、约7X10^7个细胞/kg、约8X10^7个细胞/kg或约9X10^7个细胞/kg。在一些实施方案中，CAR阳性活T细胞的治疗有效量介于约1X10^6与约2X10^6个CAR阳性活T细胞/kg体重之间，直至最大剂量约1x10^8个CAR阳性活T细胞。

[0425] 在一些实施方案中，CAR阳性活T细胞的治疗有效量介于约0.25X10^6与2X10^6之间。在一些实施方案中，CAR阳性活T细胞的治疗有效量为约0.25x10^6、0.3x10^6、0.4x10^6、约0.5x10^6、约0.6x10^6、约0.7x10^6、约0.8x10^6、约0.9x10^6、约1.0x10^6、约1.1x10^6、约1.2x10^6、约1.3x10^6、约1.4x10^6、约1.5x10^6、约1.6x10^6、约1.7x10^6、约1.8x10^6、约1.9x10^6或约2.0x10^6个CAR阳性活T细胞。

[0426] 在一些实施方案中，CAR阳性活T细胞的治疗有效量介于约0.4x10^8与约2x10^8个CAR阳性活T细胞之间。在一些实施方案中，CAR阳性活T细胞的治疗有效量为约0.4x10^8、约0.5x10^8、约0.6x10^8、约0.7x10^8、约0.8x10^8、约0.9x10^8、约1.0x10^8、约1.1x10^8、约1.2x10^8、约1.3x10^8、约1.4x10^8、约1.5x10^8、约1.6x10^8、约1.7x 10^8、约1.8x 10^8、约1.9x 10^8或约2.0x 10^8个CAR阳性活T细胞。

[0427] 在一些实施方案中，表达CAR的细胞(例如，本文所述的表达CAR的细胞，例如，表达GCC CAR的细胞)的剂量包含约1x 106个细胞/m2至约1x 109个细胞/m2，例如，约1x 107个细胞/m2至约5x 108个细胞/m2，例如，约1.5x 107个细胞/m2、约2x 107个细胞/m2、约4.5x 107个细胞/m2、约108个细胞/m2、约1.2x 108个细胞/m2或约2x 108个细胞/m2。

[0428] 本发明包括(除了其它事项之外)一种类型的细胞疗法，其中对T细胞进行遗传修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)，并且将CAR T细胞输注至有需要的接受者中。所输注细胞能够杀伤接受者中的肿瘤细胞。与抗体疗法不同，经CAR修饰的T细胞能够在体内复制，产生长期持久性，其可导致持续肿瘤控制。在各个方面中，在向患者施用T细胞后，施用于患者的T细胞在患者体内持续至少四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、十二个月、十三个月、十四个月、十五个月、十六个月、十七个月、十八个月、十九个月、二十个月、二十一个月、二十二个月、二十三个月、两年、三年、四年或五年。

[0429] 在一些实施方案中，表达GCC CAR的细胞以多个剂量(例如，第一剂量、第二剂量和任选地第三剂量)施用。在实施方案中，所述方法包括治疗患有癌症(例如结肠直肠癌)的受试者(例如成人受试者)，其包括向所述受试者施用第一剂量、第二剂量和任选的一个或多个额外剂量，每一剂量包含表达CAR分子(例如GCC CAR分子，例如在表7中提供的CAR分子)的免疫效应细胞。

[0430] 在实施方案中，所述方法包括施用2-5x 10^6个表达CAR的活细胞/kg的剂量，其中受试者的体重小于50kg；或施用1.0-2.5x 10^8个表达CAR的活细胞的剂量，其中受试者的体重为至少50kg。

[0431] 在实施方案中，向受试者，例如儿童或成人受试者施用单一剂量。

[0432] 在实施方案中，剂量依顺序天数施用，例如，在第1天施用第一剂量，在第2天施用第二剂量，并且在第3天施用任选的第三剂量(如果施用)。

[0433] 在实施方案中，施用第四、第五或第六剂量或更多个剂量。

[0434] 在实施方案中，第一剂量包含总剂量的约10％，第二剂量包含总剂量的约30％，并且第三剂量包含总剂量的约60％，其中前述百分比的总和为100％。在实施方案中，第一剂量包含总剂量的约9％-11％、8％-12％、7％-13％或5％-15％。在实施方案中，第二剂量包含总剂量的约29％-31％、28％-32％、27％-33％、26％-34％、25％-35％、24％-36％、23％-37％、22％-38％、21％-39％或20％-40％。在实施方案中，第三剂量包含总剂量的约55％-65％、50％-70％、45％-75％或40％-80％。在实施方案中，总剂量是指在1周、2周、3周或4周过程内所施用的表达CAR的活细胞的总数。在施用两个剂量的一些实施方案中，总剂量是指以第一和第二剂量向受试者施用的表达CAR的活细胞数目的总和。在施用三个剂量的一些实施方案中，总剂量是指在第一、第二和第三剂量中向受试者施用的表达CAR的活细胞数目的总和。

[0435] 在实施方案中，根据其中表达CAR的活细胞的数目来测量剂量。CAR表达可使用结合CAR分子的抗体分子和可检测标记，例如通过流式细胞测量术来测量。存活率可例如通过细胞计数器测量。

[0436] 本发明还包括一种类型的细胞疗法，其中例如通过体外转录的RNA修饰免疫效应细胞(例如NK细胞或T细胞)，以瞬时表达嵌合抗原受体(CAR)，并将表达CAR的细胞(例如，CART)输注至有需要的接受者中。所输注细胞能够杀伤接受者体内的癌细胞。因此，在各个方面中，在向患者施用表达CAR的细胞(例如，T细胞)之后，向患者施用的表达CAR的细胞(例如，T细胞)存在少于一个月，例如三周、两周、一周。

[0437] 不希望受任何特定理论束缚，由经CAR修饰的T细胞引发的抗癌免疫反应可为主动或被动免疫反应，或者替代地可归因于直接对比间接免疫反应。在一个方面中，经CAR(例如，GCC-CAR)转导的T细胞展现响应于表达靶抗原(例如，GCC)的人癌细胞的特异性促炎性细胞因子分泌和有效细胞溶解活性，抵抗可溶性靶抗原抑制，介导旁观者杀伤并介导已建立的人癌症的消退。举例而言，在表达靶抗原的癌症的非均质区域中的无抗原癌细胞可能容易受到先前已经对相邻抗原阳性癌细胞产生反应了的靶抗原重定向T细胞的间接破坏。

[0438] 在一个方面中，本公开的特征在于一种治疗受试者的癌症的方法。所述方法包括向受试者施用治疗，所述治疗包括施用表达CAR的细胞(例如，表达GCC CAR的细胞)，使得受试者的癌症得以治疗。在一个实施方案中，本文所述的表达CAR的细胞(例如，表达GCC CAR的细胞)的治疗导致以下中的一者或多者：表达CAR的细胞(例如，表达GCC CAR的细胞)的抗肿瘤活性改善或增加；表达CAR的细胞的增殖或持久性增加；表达CAR的细胞的浸润改善或增加；对肿瘤进展的抑制改善；肿瘤进展延迟；癌细胞增殖抑制或减少；和/或肿瘤负荷(例如肿瘤体积或大小)降低。在一个实施方案中，治疗导致表达CAR的细胞的持久性增加和/或表达CAR的细胞的持久性增加和较低例如降低的复发风险。

[0439] 本发明提供抑制表达抗原的(例如,表达GCC的)细胞群体的增殖或减少表达抗原的(例如,表达GCC的)细胞群体的方法。在一个实施方案中,所述方法包括施用CAR疗法(例如,表达CAR的细胞群体)。在某些实施方案中,相对于用不同癌症疗法治疗的受试者中的细胞和/或癌细胞的数量、数目、量或百分比,本文所述的疗法在具有抗原(例如GCC)或与表达抗原的(例如,表达GCC的)细胞相关的另一种癌症的受试者或动物模型中使细胞和/或癌细胞的数量、数目、量或百分比减少至少5%、10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%。在一个实施方案中,受试者为哺乳动物。在一些实施方案中,受试者为人。

[0440] 本发明还提供用于预防、治疗和/或管理病症,例如与表达抗原的细胞(例如,表达GCC的细胞)相关的病症(例如,本文所述的癌症)的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用表达CAR的细胞(例如,表达GCC CAR的细胞、表达CAR的细胞群体)。在一个方面中,受试者为人。

[0441] 在一个方面中,本发明涉及一种抑制癌细胞生长(例如,表达抗原的(例如表达GCC的)癌细胞)的方法,所述方法包括使所述癌细胞与表达CAR的(例如,表达GCC CAR的)细胞,例如本文所述的GCC CART细胞接触,以使得CART响应于抗原而被活化并靶向癌细胞,其中癌症的生长受到抑制。

[0442] 本公开还提供用于预防、治疗和/或管理疾病,例如与表达抗原的(例如表达GCC的)细胞相关的疾病(例如,表达所述抗原(例如GCC)的癌症)的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用表达CAR的细胞(例如,表达GCC CAR的细胞),所述细胞结合至表达抗原的细胞。在一些实施方案中,受试者为人。

[0443] 本公开还提供用于预防、治疗和/或管理与表达抗原的(例如,表达GCC的)细胞相关的疾病的方法,所述方法包含向有需要的受试者施用本发明的CART细胞(例如,抗GCC CART细胞),所述CART细胞结合至表达抗原的细胞。在一个方面中,受试者为人。

[0444] 本公开还提供用于预防与表达抗原(例如,表达GCC的)细胞相关的癌症复发的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用本发明的CART细胞(例如,抗GCC CART细胞),所述CART细胞结合至表达抗原(例如表达GCC)的细胞。在一个方面中,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文所述的CART细胞(例如,抗GCC CART细胞)与有效量的另一种疗法的组合,所述CART细胞结合至表达抗原(例如表达GCC的)的细胞。

[0445] 一个实施方案进一步包括在施用本文所公开的CAR之前,对哺乳动物进行淋巴细胞清除。淋巴细胞清除的实例包括但不限于非清髓性淋巴细胞清除化学疗法、清髓性淋巴细胞清除化学疗法、全身照射等。

[0446] 在一个特定示例性方面中,受试者可进行白细胞去除术,其中离体收集、富集或耗尽白细胞,以选择和/或分离目标细胞,例如T细胞。这些T细胞分离株可通过本领域中已知的方法扩增并进行处理,使得可引入本发明的一个或多个CAR构建体,由此产生本发明的CAR T细胞。有需要的受试者随后可进行高剂量化学疗法的标准治疗,之后进行外周血干细胞移植。在某些方面中,在移植之后或与移植同时,受试者接受本发明的扩增的表达CAR的细胞的输注。在另一个方面中,在手术前或手术后施用扩增的细胞。

[0447] 就其中施用宿主细胞或细胞群体的方法目的而言,细胞可为对哺乳动物而言同种

异体或自体的细胞。优选地，细胞为对哺乳动物而言自体的。如本文所用，同种异体意指源自与引入材料的个体相同物种的不同动物的任何材料。当一个或多个基因座处的基因不相同时，两个或更多个个体被称为彼此同种异体。在一些方面中，来自同一物种的个体的同种异体材料可能在遗传上完全不同，从而在抗原性上相互作用。如本文所用，“自体”意指源自同一个体的任何材料，之后将所述材料重新引入所述个体。

[0448] 本文所提及的哺乳动物可为任何哺乳动物。如本文所用，术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物，包括但不限于：啮齿目哺乳动物，诸如小鼠和仓鼠，以及兔形目哺乳动物，诸如兔。哺乳动物可来自食肉目，包括猫科动物(猫)和犬科动物(狗)。哺乳动物可来自偶蹄目，包括牛科动物(母牛)和猪科动物(猪)，或来自奇蹄目，包括马科动物(马)。哺乳动物可为灵长目、猿目(Ceboids)或猴目(Simoids)(猴)或类人猿目(人和猿)。在一些实施方案中，哺乳动物为人。

[0449] 关于所述方法，癌症可为任何癌症，包括以下中的任一者：急性淋巴细胞性癌、急性骨髓性白血病、肺泡横纹肌肉瘤、膀胱癌(例如，膀胱肉瘤)、骨癌、脑癌(例如，神经管母细胞瘤)、乳腺癌、肛门癌、肛管癌或肛门直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、外阴癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性癌、结肠癌、食道癌、子宫颈癌、纤维肉瘤、胃肠类癌肿瘤、头颈癌(例如头颈鳞状细胞癌)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、白血病、液体肿瘤、肝癌、肺癌(例如，非小细胞肺癌和肺腺癌)、淋巴瘤、间皮瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、B-慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和伯基特淋巴瘤(Burkitt’s lymphoma)、卵巢癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、实体瘤、滑膜肉瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌和输尿管癌。

[0450] 在某些实施方案中，癌症是胃肠癌。在一些实施方案中，癌症是胃癌。在一些实施方案中，癌症是结肠直肠癌。在一些实施方案中，癌症是结肠癌。在一些实施方案中，癌症具有异常GCC表达。

[0451] 如本文所用，术语“治疗”和“预防”以及其衍生词不一定意味着100％或完全治疗或预防。相反地，存在不同程度的治疗或预防，本领域普通技术人员认为所述治疗或预防具有潜在益处或治疗效果。在此方面，所述方法可提供任何量或任何水平的哺乳动物癌症的治疗或预防。

[0452] 此外，由所述方法提供的治疗或预防可包括治疗或预防所治疗或预防的疾病(例如癌症)的一种或多种疾患或症状。此外，出于本文的目的，“预防”可包括延迟疾病或其症状或疾患的发作。

[0453] 另一个实施方案提供一种检测哺乳动物中癌症的存在的方法，所述方法包括：(a)将包含来自哺乳动物的一个或多个细胞的样品与CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体、抗体和/或其抗原结合部分或药物组合物接触，由此形成复合物，(b)并检测所述复合物，其中检测到所述复合物指示所述哺乳动物中存在癌症。在一些实施方案中，接触可相对于哺乳动物在体外或体内发生。在一些实施方案中，接触是在体外。

[0454] 样品可通过任何合适的方法获得，例如活检或尸检。活检是从个体中取出组织和/或细胞。这种取出可以是从个体收集组织和/或细胞，以便对取出的组织和/或细胞进行实验。此实验可包括确定个体是否患有和/或正患有某种疾患或疾病状态的实验。疾患或疾病

可为例如癌症。

[0455] 关于检测哺乳动物中增生性病症(例如癌症)的存在的方法的一个实施方案,包含哺乳动物的细胞的样品可为包含全细胞、其裂解物或全细胞裂解物的级分(例如细胞核或细胞质级分、完整蛋白级分或核酸级分)的样品。如果样品包含全细胞,则细胞可为哺乳动物的任何细胞,例如任何器官或组织的细胞,包括血液细胞或内皮细胞。

[0456] 此外,复合物的检测可通过本领域中已知的多种方式进行。例如,本文所述的CAR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体或抗体或其抗原结合部分可用可检测标记进行标记,所述可检测标记诸如例如放射性同位素、荧光团(例如异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE))、酶(例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)和如上文所公开的元素颗粒(例如金颗粒)。

[0457] 测试CAR识别靶细胞的能力和抗原特异性的方法为本领域中已知的。例如,Clay等人,J.Immunol,163:507-513(1999)教导了测量细胞因子(例如干扰素-γ、粒细胞/单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤因子a(TNF-α)或白介素2(IL-2))释放的方法。此外,CAR功能可通过测量细胞的细胞毒性来进行评估,如Zhao等人,J.Immunol,174:4415-4423(2005)中所述。

[0458] 另一个实施方案提供本发明的CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体、抗体或其抗原结合部分和/或药物组合物用于治疗或预防哺乳动物的增生性病症(例如癌症)的用途。癌症可为本文所述的任何癌症。

[0459] 任何施用方法均可用于所公开的治疗剂,包括局部和全身施用。例如可使用局部、口服、血管内(诸如静脉内)、肌肉内、腹膜内、鼻内、皮内、鞘内和皮下施用。特定施用模式和给药方案将由主治临床医生选择,考虑到病例的细节(例如受试者、疾病、所涉及的疾病状态以及治疗是否为预防性)。在施用多于一种剂或组合物的情况下,可使用一种或多种施用途径;例如,化学治疗剂可口服施用,并且抗体或抗原结合片段或缀合物或组合物可静脉内施用。施用方法包括注射,其中CAR、CAR T细胞、缀合物、抗体、抗原结合片段或组合物提供于无毒的药学上可接受的载体(诸如水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液、5%人血清白蛋白、非挥发性油、油酸乙酯或脂质体)中。在一些实施方案中,可使用所公开的化合物的局部施用,例如通过将抗体或抗原结合片段施加至已移除肿瘤的组织区域,或怀疑倾向于发展肿瘤的区域。在一些实施方案中,包括治疗有效量的抗体或抗原结合片段的药物制剂的持续肿瘤内(或肿瘤附近)释放可为有益的。在其它实例中,缀合物作为滴眼剂局部施加至角膜,或玻璃体内施加至眼睛。

[0460] 所公开的治疗剂可配制成适合于精确剂量的单独施用的单位剂型。此外,所公开的治疗剂可以单剂量或多剂量方案施用。多剂量方案为其中主要治疗过程可为多于一个单独的剂量,例如1-10个剂量,之后根据需要在随后的时间间隔给予其它剂量,以维持或加强组合物的作用。治疗可涉及在几天至几个月甚至几年的时间内,每天一次或每天多次剂量的化合物。因此,剂量方案也将至少部分地基于待治疗受试者的特定需要而决定,并且将取决于施用医师的判断。

[0461] 在一个实施方案中,将CAR引入免疫效应细胞中,例如使用体外转录,并且受试者(例如人)接受本发明的表达CAR的细胞的初始施用,以及表达CAR的细胞的一次或多次后续施用,其中所述一或多次后续施用在少于15天内施用,例如在前一次施用之后14、13、12、

11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天。在一个实施方案中，每周向受试者(例如人)施用本发明的表达CAR的细胞的多于一次施用，例如每周施用本发明的表达CAR的细胞的2次、3次或4次施用。在一个实施方案中，受试者(例如人受试者)每周接受表达CAR的细胞的多于一次施用(例如，每周2次、3次或4次施用)(本文中还称为循环)，接着一周不施用表达CAR的细胞，并且接着向受试者施用表达CAR的细胞的一次或多次额外施用(例如，每周表达CAR的细胞的多于一次施用)。在另一个实施方案中，受试者(例如人受试者)接受表达CAR的细胞的多于一个周期，并且各周期之间的时间小于10、9、8、7、6、5、4或3天。在一个实施方案中，每隔一天施用表达CAR的细胞一次，每周施用3次。在一个实施方案中，施用本发明的表达CAR的细胞至少二、三、四、五、六、七、八周或更多周。

[0462] 抗体或缀合物的典型剂量的范围可为约0.01至约30mg/kg，诸如约0.1至约10mg/kg。

[0463] 在特定实例中，向受试者施用治疗性组合物，所述治疗性组合物包含缀合物、抗体、组合物、CAR、CAR T细胞或额外剂中的一者或多者，在多个每日施用时程下，诸如至少连续两天、连续10天等，例如持续数周、数月或数年的时间段。在一个实例中，向受试者施用缀合物、抗体、组合物或额外剂持续至少30天，诸如至少2个月、至少4个月、至少6个月、至少12个月、至少24个月或至少36个月的时间段。

[0464] 在一些实施方案中，所公开的方法包括向受试者提供手术、放射疗法和/或化学治疗剂与所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、CAR或表达CAR的T细胞的组合(例如，依次、实质上同时或同时)。此类剂和治疗的方法和治疗剂量为本领域技术人员已知的，并且可由熟练临床医师决定。额外剂的制备和给药时程可根据制造商的说明书或由熟练的执业人员依经验决定。此类化学疗法的制备和给药时程也描述于Chemotherapy Service,(1992),M.C.Perry编,Williams&Wilkins,Baltimore,Md中。

[0465] 在一些实施方案中，组合疗法可包括向受试者施用治疗有效量的额外癌症抑制剂。可与所述组合疗法一起使用的额外治疗剂的非限制性实例包括微管结合剂、DNA嵌入剂或交联剂、DNA合成抑制剂、DNA和RNA转录抑制剂、抗体、酶、酶抑制剂、基因调节剂和血管生成抑制剂。这些剂(它们以治疗有效量施用)和治疗可单独或组合使用。举例而言，任何适合的抗癌或抗血管生成剂可与本文所公开的CARS、CAR-T细胞、抗体、抗原结合片段或缀合物组合施用。此类剂的方法和治疗剂量为本领域技术人员已知的，并且可由熟练临床医师决定。

[0466] 额外化学治疗剂包括但不限于：烷化剂，诸如氮芥(例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、氮芥(chlormethine)、环磷酰胺、异环磷酰胺和美法仑(melphalan))、亚硝基脲(例如卡莫司汀(carmustine)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)和链脲佐菌素(streptozocin))、铂化合物(例如，卡铂(carboplatin)、顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)和BBR3464)、白消安(busulfan)、达卡巴嗪(dacarbazine)、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、丙卡巴肼(procarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、塞替哌(thiotepa)和乌拉莫司汀(uramustine)；抗代谢物，诸如叶酸(例如甲氨蝶呤(methotrexate)、培美曲塞(pemetrexed)和雷替曲塞(raltitrexed))、嘌呤(例如克拉屈滨(cladribine)、氯法拉滨(clofarabine)、氟达拉滨(fludarabine)、巯基嘌呤(mercaptopurine)和硫鸟嘌呤(tioguanine))、嘧啶(例如卡培他滨(capecitabine))、阿糖

胞苷(cytarabine)、氟尿嘧啶(fluorouracil)和吉西他滨(gemcitabine);植物生物碱,诸如鬼臼属(例如,依托泊苷(etoposide)和替尼泊苷(etoposide))、紫杉烷(例如,多西他赛(docetaxel)和紫杉醇(paclitaxel))、长春花(例如,长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)和长春瑞滨(vindesine));细胞毒性/抗肿瘤抗生素,诸如蒽环类家族成员(例如,道诺霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、伊达比星(epirubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)和伐柔比星(valrubicin))、博来霉素(bleomycin)、利福平(rifampicin)、羟基脲和丝裂霉素;拓扑异构酶抑制剂,诸如拓扑替康(topotecan)和伊立替康(irinotecan);单克隆抗体,诸如阿仑单抗(alemtuzumab)、贝伐单抗(alemtuzumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、吉妥珠单抗(gemtuzumab)、利妥昔单抗(rituximab)、帕尼单抗(panitumumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)和曲妥珠单抗(trastuzumab);光敏剂,诸如氨基乙酰丙酸、氨基乙酰丙酸甲酯、卟吩姆钠(porfimer sodium)和维替泊芬(verteporfin);和其它剂,诸如阿利维甲酸(alitretinoin)、六甲蜜胺(altretamine)、安吖啶(amsacrine)、阿那格雷(anagrelide)、三氧化二砷、天冬酰胺酶、阿昔替尼(axitinib)、贝沙罗汀(bexarotene)、贝伐单抗(bevacizumab)、硼替佐米(bortezomib)、塞来昔布(celecoxib)、地尼白介素-毒素连接物(denileukin diftitox)、埃罗替尼(erlotinib)、雌莫司汀(estramustine)、吉非替尼(gefitinib)、羟基甲酰胺、伊马替尼(imatinib)、拉帕替尼(lapatinib)、帕唑帕尼(pazopanib)、喷司他丁(pentostatin)、马索罗酚(masoprocol)、米托坦(mitotane)、培门冬酶(pegaspargase)、他莫昔芬(tamoxifen)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、威罗非尼(vemurafinib)、凡德他尼(vandetanib)和维甲酸(tretinoin)。此类剂的选择和治疗剂量是本领域技术人员已知的,并可由熟练的临床医生决定。

[0467] 考虑用于组合疗法中的一般化学治疗剂包括阿那曲唑(anastrozole)(Arimidex®)、比卡鲁胺(bicalutamide)(Casodex®)、硫酸博来霉素(bleomycin sulfate)(Blenoxane®)、白消安(busulfan)(Myleran®)、白消安注射液(Busulfex®)、卡培他滨(capecitabine)(Xeloda®)、N4-戊氧羰基-5-脱氧-5-氟胞苷、卡铂(carboplatin)(Paraplatin®)、卡莫司汀(carmustine)(BiCNU®)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)(Leukeran®)、顺铂(cisplatin)(Platinol®)、克拉屈滨(cladribine)(Leustatin®)、环磷酰胺(Cytoxan®或Neosar®)、阿糖胞苷(cytarabine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(cytosine arabinoside)(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂质体注射液(DepoCyt®)、达卡巴嗪(dacarbazine)(DTIC-Dome®)、放线菌素(dactinomycin)(Actinomycin D,Cosmegan)、盐酸柔红霉素(daunombicin hydrochloride)(Cembidine®)、柠檬酸柔红霉素脂质体注射液(DaunoXome ®)、地塞米松(dexamethasone)、多西他赛(docetaxel)(Taxotere®)、盐酸多柔比星(doxorubicin hydrochloride)(Adriamycin®、Rubex®)、依托泊苷(etoposide)(Vepesid®)、磷酸氟达拉滨(fludarabine phosphate)(Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®、Efudex®)、氟他胺(flutamide)(Eulexin®)、替扎西替滨(tezacitibine)、吉西他滨(Gemcitabine)(二氟脱氧胞苷)、羟基脲(Hydrea®)、伊达比星(Idarubicin)(Idamycin®)、异环磷酰胺(IFEX®)、伊立替康(irinotecan)(Camptosar®)、L-天冬酰胺酶(ELSPAR®)、亚叶

酸钙、美法仑(melphalan)(Alkeran®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、甲氨蝶呤(Folex®)、米托蒽醌(mitoxantrone)(Novantrone®)、麦罗塔(mylotarg)、紫杉醇(Taxol®)、必帝(phoenix)(Yttrium90/MX-DTPA)、喷司他丁(pentostatin)、聚苯丙生20(polifeprosan 20)与卡莫司汀植入物(Gliadel®)、柠檬酸他莫昔芬(tamoxifen citrate)(Nolvadex®)、替尼泊苷(teniposide)(Vumon®)、6-硫鸟嘌呤、噻替哌、替拉扎明(tirapazamine)(Tirazone®)、注射用盐酸拓扑替康(topotecan)(Hycamptin®)、长春碱(vinblastine)(Velban®)、长春新碱(vincristine)(Oncovin®)和长春瑞滨(vinorelbine)(Navelbine®)。

[0468] 示例性烷化剂公开于2016年4月8日提交的国际申请WO 2016/164731的第270-271页,所述国际申请以引用的方式整体并入本文。进一步的实力包括但不限于:氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯):尿嘧啶氮芥(Aminouracil Mustard®、Chlorethaminacil®、Demethyldopan®、Desmethyldopan®、Haemanthamine®、Nordopan®、Uracil nitrogen mustard®、Uracillost®、Uracilmostaza®、Uramustin®、Uramustine®)、氮芥(Mustargen®)、环磷酰胺(Cytoxan®、Neosar®、Clafen®、Endoxan®、Procytox®、Revimmune™)、异环磷酰胺(Mitoxana®)、美法仑(melphalan)(Alkeran®)、苯丁酸氮芥(Chlorambucil)(Leukeran®)、哌泊溴烷(pipobroman)(Amedel®、Vercyte®)、三亚乙基蜜胺(Hemel®、Hexalen®、Hexastat®)、三亚乙基硫代磷胺、替莫唑胺(Temozolomide)(Temodar®)、噻替哌(thiotepa)(Thioplex®)、白消安(busulfan)(Busilvex®、Myleran®)、卡莫司汀(carmustine)(BiCNU®)、洛莫司汀(lomustine)(CeeNU®)、链脲佐菌素(streptozocin)(Zanosar®)和达卡巴嗪(Dacarbazine)(DTIC-Dome®)。额外示例性烷化剂包括但不限于:奥沙利铂(Oxaliplatin)(Eloxatin®);替莫唑胺(Temozolomide)(Temodar®的Temodal®);更生霉素(Dactinomycin)(也称为放线菌素-D,Cosmegen®);美法仑(Melphalan)(也称为L-PAM、L-沙可来新和苯丙氨酸氮芥,Alkeran®);六甲蜜胺(Altretamine)(也称为六甲基密胺(HMM),Hexalen®);卡莫司汀(Carmustine)(BiCNU®);苯达莫司汀(Bendamustine)(Treanda®);白消安(Busulfan)(Busulfex®和Myleran®);卡铂(Carboplatin)(Paraplatin®);洛莫司汀(Lomustine)(也称为CCNU、CeeNU®);顺铂(Cisplatin)(也称为CDDP、Platinol®和Platinol®-AQ);苯丁酸氮芥(Chlorambucil)(Leukeran®);环磷酰胺(Cytoxan®和Neosar®);达卡巴嗪(Dacarbazine)(也称为DTIC、DIC和咪唑甲酰胺,DTIC-Dome®);六甲蜜胺(Altretamine)(也称为六甲基密胺(HMM),Hexalen®);异环磷酰胺(Ifex®);普雷努莫司汀(Prednumustine);丙卡巴肼(Procarbazine)(Matulane®);二氯甲基二乙胺(也称为氮芥(nitrogen mustard)、氮芥(mustine)和盐酸二氯甲基二乙胺,Mustargen®);链脲佐菌素(Streptozocin)(Zanosar®);噻替哌(Thiotepa)(也称为硫代磷酰胺、TESPA和TSPA、Thioplex®);环磷酰胺(Endoxan®、Cytoxan®、Neosar®、Procytox®、Revimmune®);和盐酸苯达莫司汀(Bendamustine HCl)(Treanda®)。

[0469] 示例性的基于铂的剂包括但不限于卡铂(carboplatin)、顺铂(cisplatin)和奥沙

利铂(oxaliplatin)。

[0470] 示例性血管生成抑制剂包括但不限于:A6(Angstrom Pharmacueticals)、ABT-510(Abbott Laboratories)、ABT-627(阿曲生坦)(Abbott Laboratories/Xinlay)、ABT-869(Abbott Laboratories)、阿克替米德(Actimid)(CC4047,泊马度胺)(Celgene Corporation)、AdGVPEDF.11D(GenVec)、ADH-1(Exherin)(Adherex Technologies)、AEE788(Novartis)、AG-013736(阿昔替尼)(Pfizer)、AG3340(普马司他(Prinomastat))(Agouron Pharmaceuticals)、AGX1053(AngioGenex)、AGX51(AngioGenex)、ALN-VSP(ALN-VSP 02)(Alnylam Pharmaceuticals)、AMG 386(Amgen)、AMG706(Amgen)、阿帕替尼(Apatinib)(YN968D1)(Jiangsu Hengrui Medicine)、AP23573(地磷莫司/MK8669)(Ariad Pharmaceuticals)、AQ4N(Novavea)、ARQ 197(ArQule)、ASA404(Novartis/Antisoma)、阿替莫德(Atiprimod)(Callisto Pharmaceuticals)、ATN-161(Attenuon)、AV-412(Aveo Pharmaceuticals)、AV-951(Aveo Pharmaceuticals)、安维汀(Avastin)(贝伐单抗)(Genentech)、AZD2171(西地尼布(Cediranib)/雷思停(Recentin))(AstraZeneca)、BAY 57-9352(替拉替尼(Telatinib))(Bayer)、BEZ235(Novartis)、BIBF1120(Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals)、BIBW 2992(Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals)、BMS-275291(Bristol-Myers Squibb)、BMS-582664(布立尼布(Brivanib))(Bristol-Myers Squibb)、BMS-690514(Bristol-Myers Squibb)、骨化三醇(Calcitriol)、CCI-779(Torisel)(Wyeth)、CDP-791(ImClone Systems)、Ceflatonin(高三尖山酯碱(Homoharringtonine)/HHT)(ChemGenex Therapeutics)、西乐葆(Celebrex)(塞来昔布)(Pfizer)、CEP-7055(Cephalon/Sanofi)、CHIR-265(Chiron Corporation)、NGR-TNF、COL-3(Metastat)(Collagenex Pharaceuticals)、考布他汀(Combretastatin)(Oxigene)、CP-751,871(芬妥木单抗(Figitumumab))(Pfizer)、CP-547,632(Pfizer)、CS-7017(Daiichi Sankyo Pharma)、CT-322(Angiocept)(Adnexus)、姜黄素(Curcumin)、达肝素(Dalteparin)(法安明(Fragmin))(Pfizer)、双硫仑(Disulfiram)(Antabuse)、E7820(Eisai Limited)、E7080(Eisai Limited)、EMD 121974(西仑吉肽(Cilengitide))(EMD Pharmaceuticals)、ENMD-1198(EntreMed)、ENMD-2076(EntreMed)、恩度(Endostar)(Simcere)、爱必妥(Erbitux)(ImClone/Bristol-Myers Squibb)、EZN-2208(Enzon Pharmaceuticals)、EZN-2968(Enzon Pharmaceuticals)、GC1008(Genzyme)、染料木素(Genistein)、GSK1363089 3(弗瑞替尼(Foretinib))(GlaxoSmithKline)、GW786034(帕唑帕尼)(GlaxoSmithKline)、GT-111(Vascular Biogenics Ltd.)、IMC—1121B(雷莫芦单抗)(ImClone Systems)、IMC-18F1(ImClone Systems)、IMC-3G3(ImClone LLC)、INCB007839(Incyte Corporation)、INGN 241(Introgen Therapeutics)、易瑞沙(Iressa)(ZD1839/吉非替尼)、LBH589(Faridak/Panobinostst)(Novartis)、诺适得(Lucentis)(兰尼单抗)(Genentech/Novartis)、LY317615(恩扎妥林(Enzastaurin))(Eli Lilly and Company)、Macugen(哌加他尼(Pegaptanib))(Pfizer)、MED1522(Abegrin)(Medlmmune)、MLN518(坦度替尼(Tandutinib))(Millennium)、新伐司他(Neovastat)(AE941/Benefin)(Aeterna Zentaris)、多吉美(Nexavar)(Bayer/Onyx)、NM-3(Genzyme Corporation)、诺司卡品(Noscapine)(Cougar Biotechnology)、NPT2358(Nereus Pharmaceuticals)、OSI-930(OSI)、帕洛米得529(Palomid 529)(Paloma Pharmaceuticals,Inc.)、Panzem胶囊(2ME2)

(EntreMed)、Panzem NCD(2ME2)(EntreMed)、PF-02341066(Pfizer)、PF-04554878(Pfizer)、PI-88(Progen Industries/Medigen Biotechnology)、PKC412(Novartis)、茶多酚E(Polyphenon E)(绿茶提取物)(Polypheno E International,Inc)、PPI-2458(Praecis Pharmaceuticals)、PTC299(PTC Therapeutics)、PTK787(瓦他拉尼(Vatalanib))(Novartis)、PXD101(贝利司他(Belinostat))(CuraGen Corporation)、RAD001(依维莫司(Everolimus))(Novartis)、RAF265(Novartis)、瑞戈非尼(Regorafenib)(BAY73-4506)(Bayer)、瑞复美(Revlimid)(Celgene)、利坦(Retaane)(Alcon Research)、SN38(脂质体)(Neopharm)、SNS-032(BMS-387032)(Sunesis)、SOM230(帕瑞肽(Pasireotide))(Novartis)、角鲨胺(Squalamine)(Genaera)、苏拉明(Suramin)、索坦(Sutent)(Pfizer)、特罗凯(Tarceva)(Genentech)、TB-403(Thrombogenics)、坦普斯他汀(Tempostatin)(Collard Biopharmaceuticals)、四硫代钼酸盐(Tetrathiomolybdate)(Sigma-Aldrich)、TG100801(TargeGen)、沙利度胺(Thalidomide)(Celgene Corporation)、亭扎肝素钠(Tinzaparin Sodium)、TKI258(Novartis)、TRC093(Tracon Pharmaceuticals Inc.)、VEGF Trap(阿柏西普)(Regeneron Pharmaceuticals)、VEGF Trap-Eye(Regeneron Pharmaceuticals)、维格林(Veglin)(VasGene Therapeutics)、硼替佐米(Bortezomib)(Millennium)、XL184(Exelixis)、XL647(Exelixis)、XL784(Exelixis)、XL820(Exelixis)、XL999(Exelixis)、ZD6474(AstraZeneca)、伏立诺他(Vorinostat)(Merck)和ZSTK474。

[0471] 示例性血管内皮生长因子(VEGF)受体抑制剂包括但不限于:贝伐单抗(Avastin®)、阿昔替尼(axitinib)(Inlyta®);丙氨酸布立尼布(Brivanib alaninate)(BMS-582664,(S)-((R)-1-[[4-[(4-氟-2-甲基-17/-吲哚-5-基氧基]-5-甲基吡咯并[2,1-/][1,2,4]三嗪-6-基氧基]丙-2-基)2-氨基丙酸酯);索拉非尼(Sorafenib)(Nexavar®);帕唑帕尼(Pazopanib)(Votrient®);苹果酸舒尼替尼(Sunitinib malate)(Sutent®);西地尼布(Cediranib)(AZD2171,CAS 288383-20-1);尼达尼布(Vargatef)(BIBF1120,CAS 928326-83-4);福瑞替尼(Foretinib)(GSK1363089);替拉替尼(Telatinib)(BAY57-9352,CAS 332012-40-5);阿帕替尼(Apatinib)(YN968D1,CAS 811803-05-1);伊马替尼(Imatinib)(Gleevec®);帕纳替尼(Ponatinib)(AP24534,CAS 943319-70-8);替沃扎尼(Tivozanib)(AV951,CAS 475108-18-0);瑞戈非尼(Regorafenib)(BAY73-4506,CAS 755037-03-7);二盐酸瓦他拉尼(Vatalanib dihydrochloride)(PTK787,CAS 212141-51-0);布立尼布(Brivanib)(BMS-540215,CAS 649735-46-6);凡德他尼(Vandetanib)(Caprelsa®或AZD6474);二磷酸莫替沙尼(Motesanib diphosphate)(AMG706,CAS 857876-30-3,N-(2,3-二氢-3,3-二甲基-1H-吲哚-6-基)-2-[(4-吡啶基甲基)氨基]-3-吡啶甲酰胺,描述于PCT公布号WO 02/066470中);多维替尼双乳酸(Dovitinib dilactic acid)(TKI258,CAS 852433-84-2);林法尼(Linfanib)(ABT869,CAS 796967-16-3);卡博替尼(Cabozantinib)(XL184,CAS 849217-68-1);来他替尼(Lestaurtinib)(CAS 111358-88-4);N-[5-[[[5-(1,1-二甲基乙基)-2-噁唑基]甲基]硫代]-2-噻唑基]-4-哌啶甲酰胺(BMS38703,CAS 345627-80-7);(3R,4R)-4-氨基-1-((4-((3-甲氧基苯基)氨基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS6905 14);N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[(3aa,5P,6aa)-八氢-2-甲基环戊并[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647,CAS 781613-23-8);4-甲基-

3-[[1-甲基-6-(3-吡啶基)-1//-吡唑并[3,4-i/]嘧啶-4-基]氨基]-/V-[3-(三氟甲基)苯基]-苯甲酰胺(BHG712,CAS 940310-85-0);和阿柏西普(Aflibercept)(Eylea®)。示例性EGF途径抑制剂包括但不限于:酪氨酸磷酸化抑制剂46(tyrphostin 46)、EKB-569、埃罗替尼(erlotinib)(Tarceva®)、吉非替尼(gefitinib)(Iressa®)、爱必妥(erbitux)、尼妥珠单抗(nimotuzumab)、拉帕替尼(lapatinib)(Tykerb®)、西妥昔单抗(cetuximab)(抗EGFR mAb)、188Re标记的尼妥珠单抗(抗EGFR mAb),以及一般性和具体地公开于WO 97/02266、EP 0 564409、WO 99/03854、EP 0 520 722、EP 0 566 226、EP 0 787 722、EP 0837 063、US 5,747,498、WO 98/10767、WO 97/30034、WO 97/49688、WO 97/38983和WO 96/33980中的那些化合物。

[0472] 示例性EGFR抗体包括但不限于:西妥昔单抗(Cetuximab)(Erbitux®);帕尼单抗(Panitumumab)(Vectibix®);马妥珠单抗(Matuzumab)(EMD-72000);曲妥珠单抗(Trastuzumab)(Herceptin®);尼妥珠单抗(Nimotuzumab)(hR3);扎鲁木单抗(Zalutumumab);TheraCIM h-R3;MDX0447(CAS 339151-96-1);和ch806(mAb-806,CAS 946414-09-1)。示例性表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂包括但不限于:盐酸埃罗替尼(Erlotinib hydrochloride)(Tarceva®)、吉非替尼(Gefitnib)(Iressa®);N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[[(3"S")-四氢-3-呋喃基]氧基]-6-喹唑啉基]-4(二甲基氨基)-2-丁酰胺(Tovok®);凡德他尼(Vandetanib)(Caprelsa®);拉帕替尼(Lapatinib)(Tykerb®);(3R,4R)-4-氨基-1-[[4-[(3-甲氧基苯基)氨基]吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基]甲基]哌啶-3-醇(BMS690514);二盐酸卡奈替尼(Canertinib dihydrochloride)(CI-1033);6-[4-[(4-乙基-1-哌嗪基)甲基]苯基]-/V-[(1R)-1-苯乙基]-7/-吡咯并[2,3-7]嘧啶-4-胺(AEE788,CAS 497839-62-0);木利替尼(Mubritinib)(TAK165);培利替尼(Pelitinib)(EKB569);阿法替尼(Afatinib)(BIBW2992);来那替尼(Neratinib)(HKI-272);A-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1//-吲唑-5-基]氨基]-5-甲基吡咯并[2,1-/][1,2,4]三嗪-6-基]-氨基甲酸,3)-3-吗啉基甲酯(BMS599626);/V-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[(3aa,5p,6aa)-八氢-2-甲基环戊并[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647,CAS 781613-23-8);和4-[4-[[(1R)-1-苯乙基]氨基]-7A/-吡咯并[2,3-z/J嘧啶-6-基-酚(PKI1 66,CAS 187724-61-4)。

[0473] 示例性mTOR抑制剂包括但不限于:雷帕霉素(rapamycin)(Rapamune®)及其类似物和衍生物;SDZ-RAD;替西罗莫司(Temsirolimus)(Torisel®;也称为CCI-779);地磷莫司(Ridaforolimus)(正式名称为德福莫司(deferolimus),(1R,2R,4S)-4-[(2R)-2[(IR,9S,125,15R,16E,1SR,19R,21R,23S,24£,26£,28Z,30S,32S,35R)-1,18-二羟基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-戊氧代-11,36-二氧杂-4-氮杂三环[30.3.1.0 4,9]三十六-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基环己基二甲基亚膦酸酯,也称为AP23573和MK8669,并且描述于PCT公布号WO 03/064383中);依维莫司(Everolimus)(Afinitor®或RAD001);雷帕霉素(Rapamycin)(AY22989,Sirolimus®);辛匹莫德(Simapimod)(CAS 164301-51-3);(5-{2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-i/]嘧啶-7-基]-2-甲氧基苯基)甲醇(AZD8055);2-氨基-8-[反式-A-(2-羟基乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-i/]嘧啶-7(8)-酮(PF04691502,CAS

1013101-36-4)；和2-[1,4-二氧代-4-[[4-(4-氧代-8-苯基-4//-1-苯并吡喃-2-基)吗啉鎓-4-基]甲氧基]丁基]-L-精氨酰甘氨酰基-L-α-天冬氨酰基-丝氨酸(SEQ ID NO:73)，内盐(SF1126,CAS 936487-67-1)。

[0474] 示例性免疫调节剂包括，例如：阿夫妥珠单抗(afutuzumab)(可得自Roche®)；培非格司亭(pegfilgrastim)(Neulasta®)；来那度胺(lenalidomide)(CC-5013，Revlimid®)；沙利度胺(thalidomide)(Thalomid®)、阿克替米德(actimid)(CC4047)；和IRX-2(人细胞因子的混合物，包括白介素1、白介素2和干扰素g，CAS 951209-71-5，可得自IRX Therapeutics)。示例性蒽环类包括，例如：多柔比星(doxorubicin)(Adriamycin®和Rubex®)；博来霉素(bleomycin)(lenoxane®)；柔红霉素(daunorubicin)(盐酸柔红霉素、道诺霉素和盐酸红比霉素，Cembidine®)；柔红霉素脂质体(柠檬酸柔红霉素脂质体，DaunoXome®)；米托蒽醌(mitoxantrone)(DHAD，Novantrone®)；表柔比星(epirubicin)(Ellence™)；埃达比星(idambicin)(Idamycin®、Idamycin PFS®)；丝裂霉素C(Mutamycin®)；格尔德霉素(geldanamycin)；除莠霉素(herbimycin)；雷维霉素(ravidomycin)；和去乙酰雷维霉素。示例性长春花生物碱包括，例如：酒石酸长春瑞滨(vinorelbine tartrate)(Navelbine®)、长春新碱(Vincristine)(Oncovin®)和长春地新(Vindesine)(Eldisine®))；长春碱(vinblastine)(也称为硫酸长春碱、长春花碱(vincaleukoblastine)和VLB、Alkaban-AQ®和Velban®)；和长春瑞滨(vinorelbine)(Navelbine®)。示例性蛋白酶体抑制剂包括硼替佐米(bortezomib)(Velcade®)；卡非佐米(carfilzomib)(PX-171-007，(S)-4-甲基-A/-((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-吗啉代乙酰胺基)-4-苯基丁酰胺基)-戊酰胺)；玛利佐米(marizomib)(NPI-0052)；柠檬酸艾沙佐米(ixazomib)(MLN-9708)；迪兰佐米(delanzomib)(CEP-18770)；和C-甲基-V-[(2-甲基-5-噻唑基)羰基J-L-丝氨酰基-C-甲基-V-[(5)-2-[(2/^)-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)。

[0475] 示例性磷酸肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂包括但不限于：4-[2-(1H-吲唑-4-基)-6-[[4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基]甲基]噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基]吗啉(也称为GDC 0941并描述于PCT公布号WO 09/036082和WO 09/055730中)；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(也称为BEZ 235或NVP-BEZ 235，并描述于PCT公布号WO 06/122806中)；4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺(也称为BKM120或NVP-BKM120，并且描述于PCT公布号WO2007/084786中)；托扎舍替(Tozasertib)(VX680或MK-0457，CAS 639089-54-6)；(5Z)-5-[[4-(4-吡啶基)-6-喹啉基]亚甲基]-2,4-噻唑烷二酮(GSK1059615，CAS 958852-01-2)；(1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(乙酰氧基)-1-[(二-2-丙烯基氨基)亚甲基]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-八氢-11-羟基-4-(甲氧基甲基)-4a,6a-二甲基环戊并[5,6]萘并[1,2-c]吡喃-2,7,10(1H)-三酮(PX866，CAS 502632-66-8)；和8-苯基-2-(吗啉-4-基)-色烯-4-酮(LY294002，CAS 154447-36-6)。

[0476] 示例性蛋白激酶B(PKB)或AKT抑制剂包括但不限于：8-[4-(1-氨基环丁基)苯基]-9-苯基-1,2,4-三唑并[3,4-f][1,6]萘啶-3(2H)-酮(MK-2206，CAS 1032349-93-1)；哌立福辛(Perifosine)(KRX0401)；4-十二烷基-N-1,3,4-噻二唑-2-基苯磺酰胺(PHT-427，CAS

1191951-57-1)；4-[2-(4-氨基-1,2,5-噁二唑-3-基)-1乙基-7-[(3S)-3-哌啶基甲氧基]-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-4-基]-2-甲基-3-丁炔-2-醇(GSK690693,CAS 937174-76-0)；8-(1-羟乙基)-2-甲氧基-3-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-6H-二苯并[b,d]吡喃-6-酮(帕洛米得529、P529或SG-00529)；曲西滨(Tricirbine)(6-氨基-4-甲基-8-(P-D-呋喃核糖基)-4H,8H-吡咯并[4,3,2-de]嘧啶并[4,5-c]哒嗪)；(aS)-a-[[[5-(3-甲基-1H-吲唑-5-基)-3-吡啶基]氧基]甲基]-苯乙胺(A674563,CAS 552325-73-2)；4-[(4-氯苯基)甲基]-1-(7H吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-4-哌啶胺(CCT128930,CAS 885499-61-6)；4-(4-氯苯基)-4-[4-(1H-吡唑-4-基)苯基]-哌啶(AT7867,CAS 857531-00-1)；和特立适(Archexin)(RX-0201,CAS 663232-27-7)。

[0477] 还可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)或抑制对于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)。在另一个方面中,本发明的细胞组合物可与骨髓移植、使用化学治疗剂(诸如氟达拉滨(fludarabin))、外部光束放射疗法(XRT)、环磷酰胺和/或诸如OKT3或CAMPATH的抗体的T细胞清除疗法结合(例如,之前、同时或之后)施用于患者。在一个方面中,本发明的细胞组合物在B细胞清除疗法(诸如与CD20反应的剂,例如利妥昔单抗(Rituxan))之后施用。例如,在一个实施方案中,受试者可接受使用高剂量化学疗法的标准治疗,接着进行外周血干细胞移植。在某些实施方案中,在移植之后,受试者接受本发明的经扩增免疫细胞的输注。在另一个实施方案中,扩增的细胞在手术之前或之后施用。

[0478] 组合疗法可提供协同作用且证明协同作用,即当活性成分一起使用所实现的效果大于单独使用所述化合物所产生的作用的总和。当活性成分如下述时可获得协同作用:(1)共同配制且在组合单位剂量制剂中同时施用或递送;(2)作为单独的制剂以交替或平行方式递送;或(3)通过一些其它方案。当以交替方式递送时,可在依序施用或递送(例如通过在不同注射器中的不同注射)化合物时达到协同作用。一般而言,在交替期间,每种活性成分的有效剂量依序(即连续地)施用,而在组合疗法中,两种或更多种活性成分的有效剂量一起施用。

[0479] 在一个实施方案中,在抗癌治疗后,将有效量的特异性地结合至一种或多种本文公开的抗原或其缀合物的抗体或抗原结合片段施用于患有肿瘤的受试者。在经过足以允许所施用抗体或抗原结合片段或缀合物与相对应癌细胞上表达的抗原形成免疫复合物的时间之后,检测所述免疫复合物。免疫复合物的存在(或不存在)指示治疗的有效性。举例而言,与治疗前取得的对照相比,免疫复合物的增加指示治疗无效,而与治疗前取得的对照相比,免疫复合物的减少指示治疗有效。

[0480] 在各个实施方案中,如本文所述的抗GCC抗原结合剂可包括在治疗过程中,所述治疗过程进一步包括向受试者施用至少一种额外剂。在各个实施方案中,与如本文所述的抗GCC抗原结合剂组合施用的额外剂可为化学治疗剂。在各个实施方案中,与如本文所述的抗原结合剂组合施用的额外剂,为抑制炎症的剂。

[0481] 在一些实施方案中,抗GCC抗原结合剂为对人GCC具有特异性的单结构域抗体。在一些实施方案中,抗GCC单结构域抗体可缀合(例如连接)至治疗剂(例如化学治疗剂和放射性原子),以结合至癌细胞、递送治疗剂至癌细胞,并杀伤表达人GCC的癌细胞。在一些实施

方案中，抗GCC结合剂与治疗剂连接。在一些实施方案中，治疗剂为化学治疗剂、细胞因子、放射性原子、siRNA或毒素。在一些实施方案中，治疗剂为化学治疗剂。在一些实施方案中，剂为放射性原子。

[0482] 在一些实施方案中，所述方法可与针对GCC相关病症的其它疗法结合进行。举例而言，组合物可在化学疗法之前或之后同时施用于受试者。在一些实施方案中，组合物可在过继疗法方法同时、之前或之后施用于受试者。

[0483] 在各个实施方案中，与如本文所述的抗GCC结合剂组合施用的额剂，可与抗GCC结合剂同时施用、与抗GCC结合剂在同一天施用或与抗GCC结合剂在同一周内施用。在各个实施方案中，与如本文所述的抗GCC结合剂组合施用的额外剂可以与抗GCC结合剂的单一制剂进行施用。在某些实施方案中，额外剂以与如本文所述的抗GCC结合剂的施用暂时分离的方式施用，例如在施用抗GCC结合剂之前或之后的一个或多个小时、之前或之后的一天或多天、之前或之后的一周或多周、之前或之后的一个月或多个月。在各个实施方案中，一种或多种额外剂的施用频率可与如本文所述的抗GCC结合剂的施用频率相同、相似或不同。

[0484] 在组合疗法中涵盖包括施用如本文所述的两种不同抗体的治疗方案和/或包括通过多种制剂和/或施用途径施用如本文所述的抗体的治疗方案。

[0485] 在一些实施方案中，组合物可与一种或多种额外治疗剂一起配制，例如用于治疗或预防受试者中的GCC相关病症(例如癌症或自身免疫性病症)的额外疗法。用于治疗受试者中的GCC相关病症的额外剂将取决于所治疗的特定病症而不同，但可包括但不限于利妥昔单抗(rituximab)、环磷酰胺、多柔比星(doxorubicin)、长春新碱(vincristine)、泼尼松(prednisone)、异环磷酰胺(osfamide)、卡铂(carboplatin)、依托泊苷(etoposide)、地塞米松(dexamethasone)、阿糖胞苷(cytarabine)、顺铂(cisplatin)、环磷酰胺或氟达拉滨(fludarabine)。

[0486] 本文所述的组合物可替代或增强先前或目前施用的疗法。举例而言，当用本文所述的组合物治疗时，一种或多种额外活性剂的施用可停止或减少，例如，在施用本文所述的抗GCC结合剂之后，可以较低水平施用例如较低水平的参考抗体(所述参考抗体交叉竞争GCC结合)。在一些实施方案中，可维持先前疗法的施用。在一些实施方案中，先前疗法将维持至组合物的水平达到足以提供治疗作用的程度。两种疗法可组合施用。

[0487] 在一些实施方案中，可向受试者施用降低或减轻与施用本文所述的疗法或组合(例如，表达CAR的细胞(例如，表达GCC CAR的细胞)和额外剂)相关的副作用的剂。与施用表达CAR的细胞相关的副作用包括但不限于CRS，以及噬血细胞性淋巴组织细胞增多症(HLH)，也称为巨噬细胞活化综合征(MAS)。CRS的症状包括高烧、恶心、短暂性低血压、缺氧等。因此，本文所述的方法可包括向受试者施用本文所述的疗法，例如表达CAR的细胞(例如，表达GCC CAR的细胞)，并且进一步施用剂以管理由用表达CAR的细胞治疗引起的可溶因子的水平升高。在一个实施方案中，受试者中升高的可溶性因子为IFN-g、TNFa、IL-2和IL-6中的一者或多者。因此，被施用以治疗这种副作用的剂可为可中和这些可溶性因子中的一者或多者的剂。此类剂包括但不限于类固醇、TNFa的抑制剂和IL-6的抑制剂。TNFa抑制剂的实例为依那西普(entanercept)。IL-6抑制剂的实例为托珠单抗(Tocilizumab)。

[0488] 在一个实施方案中，可向受试者施用增强本文所述的疗法的活性的剂，例如表达CAR的细胞(例如，表达GCC CAR的细胞)。举例而言，在一个实施方案中，剂可为抑制抑制性

分子的剂。例如在一些实施方案中，额外抑制性分子可降低表达CAR的细胞建立免疫效应反应的能力。抑制性分子的实例包括PD1、PD-F1、CTFA4、TIM3、FAG3、VISTA、BTFA、TIGIT、FAIR1、CD160和2B4。

[0489] 对抑制性分子的抑制(例如通过在DNA、RNA或蛋白质水平上的抑制)可优化表达CAR的细胞的性能。在实施方案中，抑制性核酸，例如抑制性核酸(例如dsRNA，例如siRNA或shRNA)可用于抑制表达CAR的细胞中的抑制性分子的表达。在一个实施方案中，抑制剂为shRNA。在一个实施方案中，抑制性分子在表达CAR的细胞中被抑制。在这些实施方案中，抑制抑制性分子的表达的dsRNA分子连接至编码CAR的组分(例如，所有组分)的核酸。

[0490] 在一些实施方案中，抑制性信号的抑制剂可为例如结合至抑制性分子的抗体或抗体片段。例如，剂可为与PD1、PD-L1、PD-L2或CTLA4结合的抗体或抗体片段(例如，伊匹单抗(ipilimumab)(也称为MDX-010和MDX-101，并以Yervoy®销售;Bristol-Myers Squibb);曲美木单抗(Tremelimumab)(IgG2单克隆抗体，可得自Pfizer，以前称为替西木单抗(ticilimumab)，CP-675,206)。增强例如表达CAR的细胞(例如表达GCC CAR的细胞)的活性的剂可为例如，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阳性信号相关的多肽，例如，与阳性信号相关的多肽为CD28、ICOS及其片段，例如CD28和/或ICOS的细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中，融合蛋白由表达CAR的相同细胞表达。在另一个实施方案中，融合蛋白由不表达抗GCC CAR的细胞(例如，T细胞)表达。

[0491] 在另一个实施方案中，受试者在细胞移植(例如同种异体干细胞移植)之前接受本公开的表达CAR的细胞(例如组合物)的输注。在一个优选实施方案中，表达CAR的细胞瞬时表达CAR，例如通过将编码CAR的mRNA进行电穿孔，由此在输注供体干细胞之前终止CAR的表达以避免移植失败。

[0492] 一些患者在施用期间或施用之后可能经历对本公开的化合物和/或其它抗癌药物的过敏反应;因此，通常施用抗过敏剂以使过敏反应的风险最小化。合适的抗过敏剂包括皮质类固醇，诸如地塞米松(dexamethasone)(例如，Decadron®)、倍氯米松(beclomethasone)(例如，Beclovent®)、氢化可的松(hydrocortisone)(也称为可的松、氢化可的松琥珀酸钠、氢化可的松磷酸钠，并且以商品名Ala-Cort®出售)、磷酸氢化可的松、Solu-Cortef®、Hydrocort Acetate®和Lanacort®)、泼尼松龙(prednisolone)(以商品名Delta-Cortel®、Orapred®、Pediapred®和Prelone®出售)、泼尼松(prednisone)(以商品名Deltasone®、Liquid Red®、Meticorten®和Orasone®出售)、甲基泼尼松龙(methylprednisolone)(也称为6-甲基泼尼松龙、醋酸甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙琥珀酸钠，以商品名Duralone®、Medralone®、Medrol®、M-Prednisol®和Solu-Medrol®出售);抗组胺药，诸如苯海拉明(diphenhydramine)(例如Benadryl®)、羟嗪和赛庚啶(cyproheptadine);和支气管扩张剂，诸如β-肾上腺素能受体激动剂、沙丁胺醇(albuterol)(例如Proventil®)和特布他林(terbutaline)(Brethine®)。一些患者在施用本公开的化合物和/或其它抗癌剂期间和之后可经历恶心;因此，抗呕吐剂被用于预防恶心(上胃)和呕吐。合适的抗呕吐剂包括阿瑞匹坦(aprepitant)(Emend®)、昂丹司琼(ondansetron)(Zofran®)、盐酸格拉司琼(granisetron HCl)(Kytril®)、劳拉西泮

(lorazepam)(Ativan®地塞米松(dexamethasone)(Decadron®)、丙氯拉嗪(prochlorperazine)(Compazine®)、卡索匹坦(casopitant)(Rezonic®的Zunrisa®)以及其组合。

[0493] 通常开立药物以减轻治疗期间所经历的疼痛,以使患者更加舒适。经常使用常见的非处方止痛药,如Tylenol®。然而,阿片类镇痛药,诸如氢可酮/扑热息痛(hydrocodone/paracetamol)或氢可酮/对乙酰氨基酚(hydrocodone/acetaminophen)(例如Vicodin®)、吗啡(morphine)(例如Astramorph®或Avinza®)、羟考酮(oxycodone)(例如OxyContin®或Percocet®)、盐酸羟吗啡酮(oxymorphone hydrochloride)(Opana®)和芬太尼(fentanyl)(例如,Duragesic®)也可用于中度或重度疼痛。

[0494] 为了保护正常细胞免于治疗毒性并限制器官毒性,可使用细胞保护剂(诸如神经保护剂、自由基清除剂、心脏保护剂、蒽环类外渗中和剂、营养物质等)作为辅助疗法。合适的细胞保护剂包括胺磷汀(Amifostine)(Ethyol®)、谷氨酰胺、地美司纳(dimesna)(Tavocept®)、美司纳(mesna)(Mesnex®)、右雷佐生(dexrazoxane)(Zinecard®或Totect®)、扎利罗登(xaliproden)(Xaprila®)和甲酰四氢叶酸(leucovorin)(也称为亚叶酸钙、嗜橙菌(citrovorum)因子和亚叶酸)。

[0495] 以代码、通用名或商品名鉴定的活性化合物的结构可取自标准药典实际版本"The Merck Index"或数据库,例如国际专利(例如IMS World Publications)。上述化合物可与本发明的化合物组合使用,可如本领域中所述制备和施用,如在上文所引用的文献中所述。

[0496] 在一个实施方案中,本公开提供药物组合物,所述药物组合物包含至少一种本公开的治疗剂(例如,本公开的治疗剂)或其药学上可接受的盐连同适合施用于人或动物受试者的药学上可接受的载体,单独或与其它抗癌剂一起。

[0497] 在一个实施方案中,本公开提供治疗患有细胞增生性疾病(诸如癌症)的人或动物受试者的方法。本公开提供治疗需要这种治疗的人或动物受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本公开的治疗剂或其药学上可接受的盐,单独或与其它抗癌剂一起。

[0498] 特别地,组合物将被配制为组合治疗剂或分开施用。在组合疗法中,本公开的化合物和其它抗癌剂可同步、同时或依序施用,没有特定的时间限制,其中这种施用提供两种化合物在患者体内的治疗有效水平。

[0499] 在一些实施方案中,本公开的化合物和其它抗癌剂通常通过输注或口服以任何顺序依次施用。给药方案可根据疾病的阶段、患者的身体健康状况、个别药物的安全性特征、个别药物的耐受性以及主治医师和执业医师熟知的其它标准而有所不同。取决于用于治疗的特定周期,本公开的治疗剂(例如GCC CAR)和其它抗癌剂可彼此相隔数分钟、数小时、数日或甚至数周施用。此外,周期可包括在治疗周期过程中一种药物比另一种药物更常被施用,并且在每次施用所述药物时以不同剂量施用。

[0500] 本公开的治疗剂(例如,GCC CAR)还可有利地用于与已知的治疗过程(例如,施用激素或尤其是放射)组合。本公开的化合物可特别用作放射增敏剂,特别是用于治疗对放射疗法表现出不良敏感性的肿瘤。

[0501] 在实施方案中,可向受试者施用降低或减轻与施用表达CAR的细胞相关的副作用

的剂。与施用表达CAR的细胞相关的副作用包括但不限于CRS,以及噬血细胞性淋巴组织细胞增多症(HLH),也称为巨噬细胞活化综合征(MAS)。

[0502] 因此,本文所述的方法可包括向受试者施用本文所述的表达CAR的细胞,并且进一步施用一种或多种剂以管理由用表达CAR的细胞治疗导致的可溶性因子的升高水平。在一个实施方案中,受试者中升高的可溶性因子为IFN-g、TNFa、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为IL-1、GMCSF、IL-10、IL-8、IL-5和fraktalkine中的一者或多者。因此,被施用以治疗这种副作用的剂可为可中和这些可溶性因子中的一者或多者的剂。

[0503] 在一个实施方案中,中和这些可溶性形式中的一者或多者的剂为抗体或其抗原结合片段。此类剂的实例包括但不限于类固醇(例如皮质类固醇)、TNFa的抑制剂和IL-6的抑制剂。TNFa抑制剂的实例为抗TNFa抗体分子,诸如英夫利昔单抗(infliximab)、阿达木单抗(adalimumab)、赛妥珠单抗聚乙二醇(certolizumab pegol)和戈利木单抗(golimumab)。TNFa抑制剂的另一实例为融合蛋白,诸如依那西普(entanercept)。TNFa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(pentoxifylline))和安非他酮(bupropion)。IL-6抑制剂的实例为抗IL-6抗体分子,诸如托珠单抗(tocilizumab)(toe)、萨瑞鲁单抗(sarilumab)、艾西莫单抗(elsilimomab)、CNTO 328、ALD518/BMS-945429、CNTO 136、CPSI-2364、CDP6038、VX30、ARGX-109、FE301和FM101。在一个实施方案中,抗IL-6抗体分子为托珠单抗。基于IL-1R的抑制剂的实例为阿那白滞素(anakinra)。

[0504] 在一些实施方案中,向受试者施用皮质类固醇,诸如例如甲基泼尼松龙(methylprednisolone)、氢化可的松(hydrocortisone)等。在一些实施方案中,向受试者施用血管加压剂,诸如例如去甲肾上腺素、多巴胺、苯肾上腺素、肾上腺素、加压素或其组合。

[0505] 在一个实施方案中,可向受试者施用退热剂。在一个实施方案中,可向受试者施用止痛剂。

[0506] 在一个实施方案中,可进一步向受试者施用增强表达CAR的细胞的活性或适合性的剂。例如,在一个实施方案中,剂可为抑制调节或调控(例如,抑制)T细胞功能的分子的剂。在一些实施方案中,调节或调控T细胞功能的分子为抑制性分子。抑制性分子,例如程序性死亡1(PD-1)或PD-1配体(PD-L1)在一些实施方案中可降低表达CAR的细胞建立免疫效应反应的能力。抑制性分子的实例包括PD-1、PD-L1、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和腺苷。对调节或调控(例如,抑制)T细胞功能(例如,通过在DNA、RNA或蛋白质水平上抑制)的分子的抑制可优化表达CAR的细胞的性能。在实施方案中,例如如本文所述的剂,例如抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA、成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)、转录活化因子样效应核酸酶(TALEN)或锌指核酸内切酶(ZFN)可用于抑制表达CAR的细胞中的抑制性分子的表达。在一个实施方案中,抑制剂为shRNA。在一个实施方案中,调节或调控(例如抑制)T细胞功能的剂在表达CAR的细胞中被抑制。在这些实施方案中,抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子与编码CAR的组分(例如所有组分)的核酸连接。

[0507] 在一个实施方案中,编码dsRNA分子(其调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子

的表达)的核酸分子可操作地连接至启动子,例如HI或U6来源的启动子,使得抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子可被表达,例如在表达CAR的细胞中表达。参见例如,Tiscomia G.,"Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA,"第3章,in Gene Transfer:Delivery and Expression of DNA and RNA(Friedmann和Rossi编).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。

[0508] 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细胞功能的分子的表达)的核酸分子存在于包含编码CAR的组分(例如所有组分)的核酸分子的相同载体(例如,慢病毒载体)上。在这样的实施方案中,编码dsRNA分子(其抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达)的核酸分子位于载体(例如,慢病毒载体)上,相对于编码CAR的组分(例如所有组分)的核酸的5'或3'。编码dsRNA分子(其抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达)的核酸分子可在与编码CAR的组分(例如所有组分)的核酸相同或不同方向上进行转录。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细胞功能的分子的表达)的核酸分子存在于除包含编码CAR的组分(例如所有组分)的核酸的载体以外的载体上。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细胞功能的分子的表达)的核酸分子在表达CAR的细胞中瞬时表达。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细胞功能的分子的表达)的核酸分子稳定整合至表达CAR的细胞的基因组中。用于表达CAR的组分(例如所有组分)与dsRNA分子(其抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达)的示例性载体的构型提供于例如2014年12月19日提交的国际公布WO20 15/090230的图47中,所述国际公布以引用的方式并入本文。

[0509] 在实施方案中,本文所述的疗法,例如表达CAR的细胞(例如,表达GCC CAR的细胞)与抗癫痫剂,例如乙酰唑胺(acetazolamide)、比伐西坦(bivaracetam)、卡马西平(carbamazepine)、氯巴占(clobazam)、氯硝西泮(clonazepam)、醋酸艾司利卡西平(eslicarbazepine acetate)、乙琥胺(ethosuximide)、加巴喷丁(gabapentin)、拉科酰胺(lacosamide)、拉莫三嗪(lamotrigine)、左乙拉西坦(levetiracetam)、奥卡西平(oxcarbazepine)、吡仑帕奈(perampanel)、苯巴比妥(phenobarbital)、苯妥英(phenytoin)、吡拉西坦(piracetam)、普瑞巴林(pregabalin)、普里米酮(primidone)、卢地那胺(rudinamide)、丙戊酸钠、司替戊醇(stiripentol)、噻加宾(tiagabine)、托吡酯(topiramate)、丙戊酸、氨己烯酸(vigabatrin)、唑尼沙胺(zonisamide)组合施用。参见,Weller等人,Lancet 13.9(2012):e375-e382。在实施方案中,抗癫痫剂在本文所述的治疗(例如表达CAR的细胞(例如表达GCC CAR的细胞))之前以有效预防癫痫的量施用。在实施方案中,抗癫痫剂的施用任选地在施用本文所述的治疗(例如表达CAR的细胞(例如,表达GCC CAR的细胞)全程和之后持续。在实施方案中,本文所述的治疗,例如表达CAR的细胞(例如表达GCC CAR的细胞)可在与抗癫痫剂和放射组合的治疗中使用。

[0510] 细胞因子释放综合征(CRS)

[0511] 细胞因子释放综合征(CRS)是可能危及生命的细胞因子相关毒性,其可能由于癌症免疫疗法(例如癌症抗体疗法或T细胞免疫疗法(例如CAR T细胞))而发生。CRS由高水平

的免疫活化在大量淋巴细胞和/或骨髓细胞在活化后释放炎症性细胞因子时引起。CRS的严重程度和症状的出现时间可能取决于免疫细胞活化的程度、所施用的治疗的类型和/或受试者的肿瘤负荷程度而有所不同。在用于癌症的T细胞疗法中，症状通常在施用T细胞疗法后数天至数周发作，例如当体内T细胞扩增达到峰值时。参见例如，Lee等人Blood.124.2(2014):188-95。

[0512] CRS的症状可包括神经毒性、弥散性血管内凝血、心脏功能障碍、成人呼吸窘迫综合征、肾衰竭和/或肝衰竭。例如，CRS的症状包括高烧、恶心、短暂性低血压、缺氧等。CRS可包括临床体质体征和症状，诸如发烧、疲劳、厌食、肌肉痛、关节痛、恶心、呕吐和头痛。CRS可包括临床皮肤体征和症状，诸如红疹。CRS可包括临床胃肠体征和症状，诸如恶心、呕吐和腹泻。CRS可包括临床呼吸体征和症状，诸如呼吸急促与低氧血症。CRS可包括临床心血管体征和症状，诸如心搏过速、脉搏压变宽、低血压、心输出量增加(早期)以及潜在心输出量降低(晚期)。CRS可包括临床凝血体征和症状，诸如d-二聚体升高、低纤维蛋白原血症伴随或未伴随出血。CRS可包括临床肾脏体征和症状，诸如氮血症。CRS可包括临床肝脏体征和症状，诸如转氨酶升高和高胆红素血症。CRS可包括临床神经系统体体征和症状，诸如头痛、精神状态改变、意识模糊、谵妄、找词困难或明显失语、幻觉、震颤、辨距困难、步态改变和癫痫发作。

[0513] IL-6被认为是CRS毒性的介导物。参见例如，同上。高IL-6水平可引发促炎性IL-6信号传导级联，从而导致一种或多种CRS症状。在一些情况下，C-反应蛋白(CRP)(由肝产生的生物分子，例如响应于IL-6)的水平可为IL-6活性的量度。在一些情况下，在CRS期间，CRP水平可增加数倍(例如数个log)。CRP水平可使用本文所述的方法，和/或本领域可用的标准方法来测量。

[0514] CRS评级

[0515] 在一些实施方案中，CRS可如下在严重程度上从1-5进行评级。1-3级是低于严重的CRS。第4-5级是严重的CRS。对于1级CRS，只需要症状性治疗(例如恶心、发烧、疲劳、肌痛、不适、头痛)，并且症状并非危及生命。对于2级CRS，症状需要中度介入，并且通常对于中度介入有反应。患有2级CRS的受试者发展对流体或一种低剂量血管加压剂有反应的低血压；或者发展2级器官毒性或对低流量氧气(<40％氧气)有反应的轻度呼吸症状。

[0516] 在3级CRS受试者中，低血压一般无法通过流体疗法或一种低剂量血管加压剂而逆转。这些受试者通常需要超过低流量的氧气，并且具有3级器官毒性(例如肾脏或心脏功能障碍或凝血障碍)和/或4级转氨酶升高。3级CRS受试者需要更积极的介入，例如40％或以上的氧气、高剂量的血管加压剂和/或多种血管加压剂。4级CRS受试者立即出现危及生命的症状，包括4级器官毒性或需要机械通气。4级CRS受试者通常不会有转氨酶升高。在5级CRS受试者中，毒性造成死亡。例如，在本文中以表9提供对CRS进行评级的标准。除非另外指明，否则如本文所用的CRS实质根据表9的标准的CRS。

[0517] 表9.CRS评级

[0518]

Grl	仅支持性照护
Gr2	IV 疗法+/- 住院。
Gr3	需要 IV 输液或低剂量血管活性剂的低血压或需要氧气、CPAP 或 BIPAP 的低氧血症。
Gr4	需要高剂量血管活性剂的低血压或需要机械性的低氧血症
Gr5	死亡

[0519] CRS疗法

[0520] 用于CRS的疗法包括IL-6抑制剂或IL-6受体(IL-6R)抑制剂(例如托珠单抗或西妥昔单抗)、sgp130阻断剂、血管活性药物、皮质类固醇、免疫抑制剂和机械通气。用于CRS的示例性疗法描述于国际申请WO2014011984中,其以引用的方式并入本文。

[0521] 托珠单抗是人源化免疫球蛋白G1kappa抗人IL-6R单克隆抗体。参见例如,同上。托珠单抗阻断IL-6与可溶性和膜结合IL-6受体(IL-6R)的结合,并且因此抑制经典和反式-IL-6信号传导。在实施方案中,托珠单抗以约4-12mg/kg的剂量施用,对于成人约4-8mg/kg和对于儿科受试者约8-12mg/kg,例如在1小时过程内施用。在一些实施方案中,CRS治疗剂为IL-6信号传导的抑制剂,例如IL-6或IL-6受体的抑制剂。在一个实施方案中,抑制剂为抗IL-6抗体,例如抗IL-6嵌合单克隆抗体,诸如西妥昔单抗。在其它实施方案中,抑制剂包含能够阻断IL-6信号传导的可溶性gp130或其片段。在一些实施方案中,sgp130或其片段与异源结构域(例如,Lc结构域)融合,例如为gp130-Lc融合蛋白,诸如LE301。在实施方案中,IL-6信号传导的抑制剂包含抗体,例如针对IL-6受体的抗体,诸如萨瑞鲁单抗(sarilumab)、奥洛吉珠单抗(olokizumab)(CDP6038)、艾西莫单抗(elsilimomab)、辛库单抗(simkumab)(CNTO 136)、ALD518/BMS-945429、ARGX-109或LM101。在一些实施方案中,IL-6信号传导的抑制剂包含小分子,诸如CPST2364。

[0522] 示例性的血管活性药物包括但不限于:血管紧张素-11、内皮素-1、α肾上腺素能激动剂、rostanoids、磷酸二酯酶抑制剂、内皮素拮抗剂、强心药(例如,肾上腺素、多巴酚丁胺、异丙肾上腺素、麻黄碱)、血管加压剂(例如,去甲肾上腺素、加压素、间苯二酚、加压素、亚甲基蓝)、扩张剂(例如,米力农(milrinone)、左西孟旦(levosimendan))和多巴胺。示例性血管加压剂包括但不限于去甲肾上腺素、多巴胺、苯肾上腺素、肾上腺素和加压素。在一些实施方案中,高剂量血管加压剂包括以下中的一种或多种:>20ug/min的去甲肾上腺素单一疗法、>10ug/kg/min的多巴胺单一疗法、>200ug/min的苯肾上腺素单一疗法和/或>10ug/min的肾上腺素单一疗法。在一些实施方案中,如果受试者使用加压素,则高剂量血管加压剂包括等效于>10ug/min的加压素+去甲肾上腺素,其中去甲肾上腺素等效剂量=[去甲肾上腺素(ug/min)]+[多巴胺(ug/kg/min)/2]+[肾上腺素(ug/min)]+[苯肾上腺素(ug/min)/10]。在一些实施方案中,如果受试者正接受组合血管加压剂(非加压素),则高剂量血管加压剂包括等效于>20ug/min的去甲肾上腺素,其中去甲肾上腺素等效剂量=[去甲肾上腺素(ug/min)]+[多巴胺(ug/kg/min)/2]+[肾上腺素(ug/min)]+[苯肾上腺素(ug/min)/10]。参见例如,同上。

[0523] 在一些实施方案中,低剂量血管加压剂为以低于以上针对高剂量血管加压剂列出的一种或多种剂量的剂量施用的血管加压剂。示例性皮质类固醇包括但不限于地塞米松、氢化可的松和甲基泼尼松龙。在实施方案中,使用0.5mg/kg剂量的地塞米松。在实施方案中,使用10mg/剂量的地塞米松最大剂量。在实施方案中,使用2mg/kg/天剂量的甲基泼尼松

龙。

[0524] 示例性免疫抑制剂包括但不限于TNFa的抑制剂或IL-1的抑制剂。在实施方案中，TNFa的抑制剂包含抗TNFa抗体，例如单克隆抗体，例如英夫利昔单抗(infliximab)。在实施方案中，TNFa的抑制剂包含可溶性TNFa受体(例如依那西普)。在实施方案中，IL-1或IL-1R抑制剂包含阿那白滞素。

[0525] 在一些实施方案中，向处于发展严重CRS风险的受试者施用抗IFN-γ或抗sIF2Ra疗法，例如针对抗IFN-γ或sIF2Ra的抗体分子。

[0526] 在实施方案中，对于已接受诸如博纳吐单抗(blinatumomab)的治疗性抗体分子并且患有CRS或处于发展CRS的风险的受试者，治疗性抗体分子以较低剂量和/或较低频率施用，或暂停施用治疗性抗体分子。

[0527] 在实施方案中，患有CRS或处于发展CRS风险的受试者用退热药物(诸如对乙酰氨基酚)进行治疗。在实施方案中，向本文的受试者施用或提供一种或多种本文所述的CRS疗法，例如IL-6抑制剂或IL-6受体(IL-6R)抑制剂(例如托珠单抗)、血管活性药物、皮质类固醇、免疫抑制剂或机械通气中的一者或多者，以任何组合，例如与本文所述的表达CAR的细胞组合。

[0528] 在实施方案中，向处于发展CRS的风险(例如严重CRS)(例如，被鉴定为具有发展为严重CRS的高风险状态)的受试者施用一种或多种本文所述的CRS疗法，例如IL-6抑制剂或IL-6受体(IL-6R)抑制剂(例如托珠单抗)、血管活性药物、皮质类固醇、免疫抑制剂或机械通气中的一者或多者，以任何组合，例如与本文所述的表达CAR的细胞组合。

[0529] 在实施方案中，将本文的受试者(例如处于发展严重CRS的风险的受试者或被鉴定为处于发展严重CRS的风险的受试者)转移至加护病房中。在一些实施方案中，监测本文的受试者(例如处于发展严重CRS的风险的受试者或被鉴定为处于发展严重CRS的风险的受试者)的与CRS相关的一种或多种症状或疾患，诸如发烧、心率升高、凝血障碍、MODS(多器官功能障碍综合征)、心血管功能障碍、分布性休克、心肌病、肝功能障碍、肾功能障碍、脑病、临床癫痫发作、呼吸衰竭或心搏过速。在一些实施方案中，本文的方法包括针对与CRS相关的症状或疾患中的一种施用治疗。例如，在实施方案中，例如如果受试者发展凝血障碍，则所述方法包括施用冷沉淀物。在一些实施方案中，例如如果受试者发展心血管功能障碍，则所述方法包括施用血管活性剂输注支持。在一些实施方案中，例如，如果受试者发展分布性休克，则所述方法包括施用α-激动剂疗法。在一些实施方案中，例如，如果受试者发展心肌病，则所述方法包括施用米力农疗法。在一些实施方案中，例如，如果受试者发展呼吸衰竭，则所述方法包括执行机械通气(例如，侵入性机械通气或非侵入性机械通气)。在一些实施方案中，例如，如果受试者发展休克，则所述方法包括施用类晶体和/或胶体流体。在实施方案中，表达CAR的细胞在施用本文所述的CRS的一种或多种疗法(例如IL-6抑制剂或IL-6受体(IL-6R)抑制剂(例如托珠单抗)、血管活性药物、皮质类固醇、免疫抑制剂或机械通气中的一者或多者)之前、同时或之后施用。在实施方案中，表达CAR的细胞在本文所述的CRS的一种或多种疗法(例如IL-6抑制剂或IL-6受体(IL-6R)抑制剂(例如托珠单抗)、血管活性药物、皮质类固醇、免疫抑制剂或机械通气中的一者或多者)施用后2周内(例如，在2周或1周内，或在14天内，例如，在14、13、12、11、10、9、8、7、5、6、4、3、2或1天或更短时间内)施用。在实施方案中，表达CAR的细胞在本文所述的CRS的一种或多种疗法(例如IL-6抑制剂或IL-6

受体(IL-6R)抑制剂(例如托珠单抗)、血管活性药物、皮质类固醇、免疫抑制剂或机械通气中的一者或多者)施用之前或之后施用至少1天(例如,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20天、1周、2周、3周、4周、1个月、2个月、3个月、3个月或更长时间)。

[0530] 在实施方案中,向本文的受试者(例如,具有发展严重CRS的风险的受试者或被鉴定为处于发展严重CRS的风险的受试者)施用单次剂量的IL-6抑制剂或IL-6受体(IL-6R)抑制剂(例如,托珠单抗)。在实施方案中,向受试者施用多次剂量(例如2、3、4、5、6次或更多次剂量)的IL-6抑制剂或IL-6受体(IL-6R)抑制剂(例如,托珠单抗)。

[0531] 在实施方案中,处于低或无CRS(例如严重CRS)风险的受试者(例如,被鉴定为处于发展严重CRS的低风险状态的受试者)不施用本文所述的CRS的疗法,例如IL-6抑制剂或IL-6受体(IL-6R)抑制剂(例如托珠单抗)、血管活性药物、皮质类固醇、免疫抑制剂或机械通气中的一者或多者。

[0532] 在一些实施方案中,通过本文所公开的方法治疗的受试者具有低严重程度的CRS,例如,1级、2级或3级。

[0533] 在实施方案中,表达CAR的活细胞以递增剂量进行施用。在实施方案中,第二剂量大于第一剂量,例如大10%、20%、30%或50%。在实施方案中,第二剂量为第一剂量的两倍、三倍、四倍或五倍。在实施方案中,第三剂量大于第二剂量,例如大10%、20%、30%或50%。在实施方案中,第三剂量为第二剂量的两倍、三倍、四倍或五倍。

[0534] 在某些实施方案中,所述方法包括下列a)-h)中的一、二、三、四、五、六、七者或全部:

[0535] a)在第一剂量中施用的表达CAR的活细胞的数目不超过在第二剂量中施用的表达CAR的活细胞数目的1/3;

[0536] b)在第一剂量中施用的表达CAR的活细胞的数目不超过所施用的表达CAR的活细胞的总数的1/X,其中X为2、3、4、5、6、7、8、9,、10、15、20、30、40或50;

[0537] c)在第一剂量中施用的表达CAR的活细胞的数目不超过1x107、2x 107、3x 107、4x 107、5x 107、6x 107、7x 107、8x 107、9x 107、1x 108、1.75x 108、2x 108、3x 108、4x 108或5x 108个表达CAR的活细胞,并且第二剂量大于第一剂量;

[0538] d)在第二剂量中施用的表达CAR的活细胞的数目不超过在第三剂量中施用的表达CAR的活细胞的数目的1/2;

[0539] e)在第二剂量中施用的表达CAR的活细胞的数目不超过所施用的表达CAR的活细胞的总数的1/Y,其中Y为2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40或50;

[0540] f)在第二剂量中施用的表达CAR的活细胞的数目不超过1x107、2x 107、3x 107、4x 107、5x 107、6x 107、7x 107、8x 107、9x 107、1x 108、1.75x 108、2x 108、3x 108、4x 108或5x 108个表达CAR的活细胞,并且第三剂量大于第二剂量;

[0541] h)第一、第二和任选的第三剂量的施用剂量和时间段被选择为使得受试者经历不大于4、3、2或1级的CRS。

[0542] 在实施方案中,总剂量为约5x 108个表达CAR的活细胞。在实施方案中,总剂量为约5x 107-5x 108个表达CAR的活细胞。在实施方案中,第一剂量为约5x 107个(例如,±10%、20%或30%)表达CAR的活细胞,第二剂量为约1.5x 108个(例如,±10%、20%或30%)表达CAR的活细胞,并且第三剂量为约3x 108个(例如,±10%、20%或30%)表达CAR

的活细胞。

[0543] 在实施方案中，在接受剂量之后，例如在接受第一剂量、第二剂量和/或第三剂量之后，对受试者进行CRS评估。

[0544] 在实施方案中，受试者接受CRS治疗，例如托珠单抗、皮质类固醇、依那西普或西妥昔单抗。在实施方案中，CRS治疗在包含CAR分子的细胞的第一剂量之前或之后施用。在实施方案中，CRS治疗在包含CAR分子的细胞的第二剂量之前或之后施用。在实施方案中，CRS治疗在包含CAR分子的细胞的第三剂量之前或之后施用。在实施方案中，CRS治疗在包含CAR分子的细胞的第一和第二剂量之间施用，和/或在包含CAR分子的细胞的第二和第三剂量之间施用。

[0545] 在实施方案中，在第一剂量之后患有CRS，诸如CRS 1、2、3或4级的受试者中，在第一剂量之后至少2、3、4或5天施用第二剂量。在实施方案中，在第二剂量之后患有CRS，诸如CRS 1、2、3或4级的受试者中，在第二剂量之后至少2、3、4或5天施用第三剂量。在实施方案中，在第一剂量后患有CRS的受试者中，表达CAR的细胞的第二剂量相对于不患有CRS的受试者将施用第二剂量的时间有所延迟。在实施方案中，在第二剂量后患有CRS的受试者中，表达CAR的细胞的第三剂量相对于不患有CRS的受试者将施用第三剂量的时间有所延迟。

[0546] 在实施方案中，在施用第一剂量之前，受试者患有具有高疾病负荷的癌症。在实施方案中，受试者的骨髓胚细胞水平为至少1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％或50％，例如至少5％。在实施方案中，受试者患有I、II、III或IV期的癌症。在实施方案中，受试者的单一肿瘤或多个肿瘤的肿瘤质量为至少1、2、5、10、20、50、100、200、500或1000g。

[0547] 在一些实施方案中，受试者患有癌症(例如结肠直肠癌)。在一些实施方案中，癌症为与例如，如本文所述的GCC表达相关的疾病。在实施方案中，CAR分子为如本文所述的CAR分子。

[0548] 在一个方面中，表达CAR的细胞(例如，表达GCC CAR的细胞)是使用慢病毒载体(诸如慢病毒)而产生。以所述方式产生的表达CAR的细胞将具有稳定CAR表达。源自逆转录病毒(诸如慢病毒)的载体为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以及其在子代细胞中繁殖。慢病毒载体相对于源自致癌-逆转录病毒(诸如鼠类白血病病毒)的载体具有额外的优点，因为它们可转导非增殖细胞(诸如肝细胞)。它们还具有低免疫原性的额外优点。逆转录病毒载体还可为，例如，γ逆转录病毒载体。γ逆转录病毒载体可包含例如启动子、包装信号(y)、引物结合位点(PBS)、一个或多个(例如，两个)长末端重复序列(LTR)和目标转基因，例如编码CAR的基因。γ逆转录病毒载体可缺乏病毒结构性基因，诸如gag、pol和env。示例性γ逆转录病毒载体包括鼠类白血病病毒(MLV)、脾-病灶形成病毒(SFFV)和骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)，以及源自所述病毒的载体。其它γ逆转录病毒载体描述于例如Tobias Maetzig等人，“Gammaretroviral Vectors:Biology,Technology and Application”Viruses.2011年7月;3(6):677-713中。

[0549] 在一个方面中，表达CAR的细胞在转导之后瞬时表达CAR载体持续4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15天。CAR的瞬时表达可受RNA CAR载体递送影响。在一个方面中，CAR RNA通过电穿孔转导至T细胞中。

[0550] 使用瞬时表达的表达CAR的细胞(尤其是具有鼠类scFv的表达CAR的细胞)治疗患

者时可出现的潜在问题为多次治疗后的过敏反应。不受限于此理论，据信这种过敏反应可能是由于患者发展体液抗CAR反应(即具有抗IgE同种型的抗CAR抗体)所引起。认为当抗原暴露中断10至14天时，患者的抗体产生细胞经历从IgG同种型(不会引起过敏反应)至IgE同种型的类别转换。

[0551] 如果患者在暂时CAR治疗过程中产生抗CAR抗体反应的风险高(例如由RNA转导产生的那些)，则表达CAR的细胞的输注中断不应持续超过10至14天。

[0552] 组合物

[0553] 本文提供用于基因疗法、免疫疗法和/或细胞疗法的组合物，所述组合物在载体(例如药学上可接受的载体)中包含所公开的CAR或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段、缀合物、CAR或表达CAR的T细胞(其特异性地结合至本文公开的一种或多种抗原)中的一者或多者。组合物可以用于向受试者施用的单位剂型来制备。施用的量和时间由主治临床医师酌情判断，以实现所需结果。组合物可被配制为用于全身(诸如静脉内)或局部(诸如肿瘤内)施用。在一个实例中，所公开的CAR或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段、缀合物被配制用于肠胃外施用，诸如静脉内施用。包含如本文所公开的CAR或表达CAR的T细胞、缀合物、抗体或抗原结合片段的组合物可用于例如治疗和检测肿瘤，例如且不限于神经母细胞瘤。在一些实例中，组合物可用于治疗或检测癌症。包含如本文所述的CAR或表达CAR的T细胞、缀合物、抗体或抗原结合片段的组合物还用于例如检测病理性血管生成。

[0554] 用于施用的组合物可包含溶解于药学上可接受的载体(诸如水性载体)中的CAR或表达CAR的T细胞、缀合物、抗体或抗原结合片段的溶液。可使用各种水性载体，例如，缓冲盐水等。这些溶液是无菌的，并且通常不含不希望的物质。这些组合物可通过常规且熟知的灭菌技术来进行灭菌。组合物可根据需要含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件，诸如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂、佐剂等，例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中的CAR或表达CAR的T细胞、抗体或抗原结合片段或缀合物的浓度可广泛变化，并且将主要根据所选择的特定施用方式和受试者的需要，基于流体体积、粘度、体重等进行选择。制备用于基因疗法、免疫疗法和/或细胞疗法的此类剂型的实际方法对于本领域技术人员而言是已知的或者将是显而易见的。

[0555] 在一些实施方案中，组合物包含与一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合的GCC CAR。此类组合物可包含缓冲液，诸如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等；碳水化合物，诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露糖醇；蛋白质；多肽或氨基酸，诸如甘氨酸；抗氧化剂；螯合剂，诸如EDTA或谷胱甘肽；佐剂(例如氢氧化铝)；和防腐剂。本发明的组合物在一个方面中被配制用于静脉内施用。

[0556] 本发明的药物组合物可以适合待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的量和频率将由诸如患者的疾患以及患者的疾病的类型和严重程度的因素确定，尽管适当剂量可通过临床试验确定。

[0557] 在一个实施方案中，药物组合物实质上不含污染物，例如，不存在可检测水平的污染物(例如选自由内毒素、支原体、有复制能力的慢病毒(RCL)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残留的抗CD3/抗CD28包被珠粒、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、细菌和真菌组成的组)。在一个实施方案中，细菌为选自由以下组成的组中的至少一者：粪产碱杆菌、白色念珠菌、大肠杆菌、流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟

菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌和酿脓链球菌A群。

[0558] 在一个方面中，本发明提供表达CAR的细胞(例如，CART细胞或表达CAR的NK细胞)群体。在一个方面中，本发明提供方法，所述方法包括施用与另一剂(例如激酶抑制剂，诸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)群体。

[0559] 在另一个方面中，本发明涉及包含本文所述的载体的细胞。在一个实施方案中，细胞为本文所述的细胞，例如人T细胞，例如本文所述的人T细胞。在一个实施方案中，人T细胞为CD8+T细胞。

[0560] 在另一个方面中，本发明涉及一种制造细胞的方法，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T细胞)。

[0561] 本发明还提供一种产生RNA工程化的细胞(例如本文所述的细胞，例如瞬时表达外源性RNA的T细胞)群体的方法。所述方法包括将体外转录的RNA或合成RNA引入细胞，其中RNA包含编码本文所述的CAR分子的核酸。

[0562] 在本文所述的任何方法和组合物的实施方案中，包含CAR的细胞包含编码CAR的核酸。在一个实施方案中，编码CAR的核酸为慢病毒载体。在一个实施方案中，编码CAR的核酸通过慢病毒转导引入细胞中。在一个实施方案中，编码CAR的核酸为RNA，例如体外转录的RNA。在一个实施方案中，编码CAR的核酸通过电穿孔引入细胞中。

[0563] 在本文所述的任何方法和组合物的实施方案中，细胞为T细胞或NK细胞。在一个实施方案中，T细胞为自体或同种异体T细胞。

[0564] 用于静脉内施用的典型组合物包含约0.01至约30mg/kg的抗体或抗原结合片段或缀合物/受试者/天(或CAR或表达CAR的T细胞或包含抗体或抗原结合片段的缀合物的相应剂量)。用于制备可施用组合物的实际方法将为本领域技术人员所已知或显而易见，并且更详细描述于诸如RemingtoN's Pharmaceutical Science，第19版，Mack Publishing Company，Easton，Pa.(1995)的文献中。

[0565] CAR或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段或缀合物可以冻干形式提供，并且在施用之前用无菌水再水合，尽管其也以已知浓度的无菌溶液提供。然后将CAR或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段或缀合物溶液添加至含有0.9％氯化钠、USP的输注袋中，并且在一些情况下以0.5至15mg/kg体重的剂量施用。在抗体或抗原结合片段和缀合物药物的施用方面，在本领域中已有相当多的经验；例如，自1997年RITUXAN®获批准以来，抗体药物已在美国上市。CAR或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段或其缀合物可通过缓慢输注来施用，而非静脉内推注或大丸剂。在一个实例中，施用较高负载剂量，随后以较低水平施用维持剂量。举例而言，初始负载剂量的4mg/kg抗体或抗原结合片段(或包含抗体或抗原结合片段的缀合物的相应剂量)可在90分钟的时间段内输注，如果先前剂量耐受良好，则随后在30分钟时间段内输注2mg/kg的每周维持剂量持续4-8周。

[0566] 受控释放肠胃外制剂可制成植入物、油性注射液或微粒系统。有关蛋白质递送系统的广泛概述，参见Banga，A.J.，Therapeutic Peptides and Proteins:Formulation，Processing，and Delivery Systems，Technomic Publishing Company，Inc.，Lancaster，Pa.，(1995)。微粒系统包括微球体、微颗粒、微胶囊、纳米胶囊、纳米球和纳米颗粒。微胶囊含有治疗性蛋白质(诸如细胞毒素或药物)作为中心核心。在微球体中，治疗剂分散在整个颗粒中。小于约1μm的颗粒、微球体和微胶囊通常分别称为纳米颗粒、纳米球和纳米胶囊。毛

细管具有大约5μm的直径,因此只有纳米颗粒可静脉内施用。微颗粒通常直径约100μm,并且皮下或肌肉施用。参见例如,Kreuter,J.,Colloidal Drug Delivery Systems,J.Kreuter编,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,第219-342页(1994);以及Tice和Tabibi,Treatise on Controlled Drug Delivery,A.Kydonieus编,Marcel Dekker,Inc.New York,N.Y.,第315-339页(1992)。

[0567] 聚合物可用于本文公开的CAR或表达CAR的T细胞、抗体或抗原结合片段或缀合物组合物的离子控制释放。用于受控药物递送的各种可降解和不可降解的聚合物基质为本领域中已知的(Langer,Accounts Chem.Res.26:537-542,1993)。举例而言,嵌段共聚物泊洛沙姆407在低温下以粘稠但流动的液体形式存在,但在体温下形成半固体凝胶。它已被证明是重组白介素-2和脲酶的配制和持续递送的有效媒介物(Johnston等人,Pharm.Res.9:425-434,1992;和Pec等人,J.Parent.Sci.Tech.44(2):58-65,1990)。可替代地,羟基磷灰石已被用作蛋白质的受控释放的微载体(Ijntema等人,Int.J.Pharm.112:215-224,1994)。在又一个方面中,脂质体用于脂质包封药物的受控释放以及药物靶向(Betageri等人,Liposome Drug Delivery Systems,Technomic Publishing Co.,Inc.,Lancaster,Pa.(1993))。已知用于治疗性蛋白质的受控递送的多种额外系统(参见美国专利号5,055,303;5,188,837;4,235,871;4,501,728;4,837,028;4,957,735;5,019,369;5,055,303;5,514,670;5,413,797;5,268,164;5,004,697;4,902,505;5,506,206;5,271,961;5,254,342和5,534,496)。

[0568] 药盒

[0569] 在一个方面中,还提供采用本文所公开的CAR的药盒。例如,用于治疗受试者的肿瘤或制备表达本文所公开的一种或多种CAR的CAR T细胞的药盒。药盒通常将包括如本文所公开的公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞。所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞中的多于一者可包括在药盒中。

[0570] 药盒可包括容器和在所述容器上或与所述容器相连的标记或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由诸如玻璃或塑料的各种材料形成。容器通常容纳组合物,所述组合物包含所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞中的一者或多者。在数个实施方案中,容器可具有无菌入口(例如,容器可为具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉内注射溶液袋或小瓶)。标记或包装插页指示组合物用于治疗特定疾患。

[0571] 标记或包装插页通常将进一步包括所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞的使用说明书,例如,用于治疗或预防肿瘤或制备CAR T细胞的方法中。包装插页通常包括常规包括在治疗产品的商业包装中的说明书,所述说明书含有关于使用此类治疗产品的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或警告的信息。说明书材料可为书面,呈电子形式(诸如计算机硬盘或光盘)或者可呈视觉形式(诸如视频文件)。药盒还可包括额外部件,以帮助药盒所设计用于的特定应用。因此,例如,药盒可额外地含有检测标记(诸如用于酶标记的酶底物、用于检测荧光标记的滤波器组、适当的二级标记(诸如二级抗体)等)的装置。药盒可额外包括缓冲液和常规用于实施特定方法的其它试剂。此类药盒和适当内容物为本领域技术人员众所周知。

[0572] 用于调控嵌合抗原受体的策略

[0573] 有许多方式可调控CAR活性。在一些实施方案中，其中CAR活性可经控制的可调控CAR(RCAR)是优化CAR治疗的安全性和功效所希望的。举例而言，使用例如融合至二聚化结构域的半胱天冬酶诱导细胞凋亡(参见例如，Di等人，N Engl.J.Med.2011年11月3日；365(18):1673-1683))可用作本发明的CAR疗法中的安全性开关。在另一实例中，表达CAR的细胞还可表达诱导型半胱天冬酶-9(iCaspase-9)分子，所述分子在施用二聚化药物(例如，利米度塞(rimiducid)(也称为AP1903(Bellicum Pharmaceuticals)或AP20187(Ariad))后导致半胱天冬酶-9的活化和细胞的凋亡。iCaspase-9分子含有二聚化化学诱导物(CID)结合结构域，其在CID存在下介导二聚化。这导致表达CAR的细胞的诱导性和选择性耗尽。在一些情况下，iCaspase-9分子由与编码CAR的载体分开的核酸分子编码。在某些情况下，iCaspase-9分子由与编码CAR的载体相同的核酸分子编码。iCaspase-9可提供安全性开关，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;Clinical Trial Id.No.NCT02107963;和Di Stasi等人N.Engl.J.Med.2011;365:1673-83。

[0574] 用于调控本发明的CAR疗法的替代策略包括使用使CAR活性失活或关闭的小分子或抗体，例如通过缺失表达CAR的细胞，例如通过诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。例如，本文所述的表达CAR的细胞还可表达抗原，所述抗原被能够诱导细胞死亡(例如ADCC或补体诱导的细胞死亡)的分子识别。例如，本文所述的表达CAR的细胞也可表达能够被抗体或抗体片段靶向的受体。此类受体的实例包括EpCAM、VEGFR、整联蛋白(例如，整联蛋白anb3、a4、aI3/4b3、a4b7、a5b1、anb3、an)、TNF受体超家族的成员(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、GD3、CD2、CD3、CD4、CD5、CD1 1、CD1 1a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/lgE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及其截短型式(例如，保留一个或多个细胞外表位但缺乏细胞质结构域内的一个或多个区域)。例如，本文所述的表达CAR的细胞还可表达截短的表皮生长因子受体(EGFR)，其缺乏信号传导能力但保留被能够诱导ADCC的分子例如西妥昔单抗(ERBITUX®)识别的表位，使得施用西妥昔单抗诱导ADCC和随后的表达CAR的细胞耗尽(参见例如，WO2011/056894和Jonnalagadda等人，Gene Ther.2013;20(8)853-860)。

[0575] 另一种策略包括在本文所述的表达CAR的细胞中表达组合来自本文所述的CD32和CD20抗原的靶表位的高度压缩的标记物/自杀基因，所述基因结合利妥昔单抗，从而导致表达CAR的细胞的选择性耗尽，例如通过ADCC(参见例如，Philip等人，Blood.2014;124(8)1277-1287)。用于耗尽本文所述的表达CAR的细胞的其它方法包括施用CAMPATH®(一种单克隆抗CD52抗体)，其选择性地结合并靶向成熟淋巴细胞(例如表达CAR的细胞)以用于破坏(例如通过诱导ADCC)。在其它实施方案中，表达CAR的细胞可使用CAR配体(例如抗独特型抗体)选择性地靶向。在一些实施方案中，抗独特型抗体可引起效应细胞活性，例如ADCC或ADC活性，由此降低表达CAR的细胞的数目。在其它实施方案中，CAR配体(例如抗独特型抗体)可偶联至可诱导细胞死亡的剂，例如毒素，由此降低表达CAR的细胞的数目。可替代地，CAR分子本身可被配置成使得活性可被调控，例如打开和关闭，如下所述。

[0576] 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通常为两个,其中本文所述的标准CAR的组分(例如抗原结合结构域和细胞内信号传导结构域)被分配在不同的多肽或成员上。在一些实施方案中,所述组多肽包括二聚化开关,所述二聚化开关在二聚化分子的存在下可使所述多肽相互偶联,例如,可将抗原结合结构域偶联至细胞内信号传导结构域。

[0577] 此类可调控CAR的额外描述和示例性配置提供于本文和国际公布号WO 2015/090229中,其特此以引用的方式整体并入本文。在一个实施方案中,RCAR包含两个多肽或成员:1)细胞内信号传导成员,其包含细胞内信号传导结构域(例如本文所述的初级细胞内信号传导结构域)和第一开关结构域;2)抗原结合成员,其包含抗原结合结构域(例如,靶向本文所述的肿瘤抗原,如本文所述)和第二开关结构域。任选地,RCAR包含本文所述的跨膜结构域。在一个实施方案中,跨膜结构域可设置在细胞内信号传导成员、抗原结合成员或两者上。(除非另有说明,否则当在本文描述RCAR的成员或元件时,顺序可如本文所提供,但也包括其它顺序。换言之,在一个实施方案中,顺序如文中所述,但在其它实施方案中,顺序可不同。例如,跨膜区一侧的元件顺序可与实施例不同,例如,开关结构域相对于细胞内信号结构域的位置可不同,例如,倒置)。

[0578] 在一个实施方案中,第一和第二开关结构域可形成细胞内或细胞外二聚化开关。在一个实施方案中,二聚化开关可为同二聚化开关,例如,其中第一和第二开关结构域为相同的;或异二聚化开关,例如,第一和第二开关结构域彼此不同。

[0579] 在实施方案中,RCAR可包含“多重开关”。多重开关可包含异二聚化开关结构域或同二聚化开关结构域。多重开关在第一成员(例如抗原结合成员)和第二成员(例如细胞内信号传导成员)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,第一成员可包含多个第一开关结构域,并且第二成员可包含多个第二开关结构域。在一个实施方案中,第一成员可包含第一和第二开关结构域,并且第二成员可包含第一和第二开关结构域。

[0580] 在一个实施方案中,细胞内信号传导成员包括一个或多个细胞内信号传导结构域,例如,初级细胞内信号传导结构域和一个或多个共刺激信号传导结构域。

[0581] 在一个实施方案中,抗原结合成员可包含一个或多个细胞内信号传导结构域,例如一个或多个共刺激信号传导结构域。在一个实施方案中,抗原结合成员包含多个,例如2或3个本文所述的共刺激信号传导结构域,例如选自4-IBB、CD28、CD27、ICOS和OX40,并且在实施方案中,无初级细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,抗原结合成员包含以下共刺激信号传导结构域,从细胞外至细胞内方向:4-1BB-CD27;4-1BB-CD27;CD27-4-1BB;4-1BBCD28;CD28-4-1BB;OX40-CD28;CD28-OX40;CD28-4-1BB;或4-1BB-CD28。在此类实施方案中,细胞内结合成员包含CD3ζ结构域。在此类实施方案中,RCAR包含(1)抗原结合成员,其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)细胞内信号传导结构域,其包含跨膜结构域或膜栓系结构域和至少一个初级细胞内信号传导结构域和第二开关结构域。

[0582] 一个实施方案提供RCAR,其中抗原结合成员未栓系至CAR细胞的表面。这允许具有细胞内信号传导成员的细胞与一个或多个抗原结合结构域方便地配对,而无需用编码抗原结合成员的序列转化细胞。在此类实施方案中,RCAR包含:1)细胞内信号传导成员,其包含:

第一开关结构域、跨膜结构域、细胞内信号传导结构域(例如初级细胞内信号传导结构域)和第一开关结构域;和2)抗原结合成员,其包含:抗原结合结构域和第二开关结构域,其中抗原结合成员不包含跨膜结构域或膜栓系结构域,并且任选地不包含细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,RCAR可进一步包含3)第二抗原结合成员,其包含:第二抗原结合结构域,例如结合由抗原结合结构域所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。

[0583] 本文还提供RCAR,其中抗原结合成员包含双特异性活化和靶向能力。在此实施方案中,抗原结合成员可包含多个,例如2、3、4或5个抗原结合结构域,例如scFv,其中每个抗原结合结构域结合至靶抗原,例如不同抗原或同一抗原,例如同一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为串联,并且任选地,每个抗原结合结构域之间设置有接头或铰链区。合适的接头和铰链区描述于本文中。

[0584] 一个实施方案提供具有允许增殖状态切换的构型的RCAR。在此实施方案中,RCAR包含:1)细胞内信号传导成员,其包含:任选地,跨膜结构域或膜栓系结构域;一个或多个共刺激信号传导结构域,例如选自4-IBB、CD28、CD27、ICOS和OX40,以及开关结构域;和2)抗原结合成员,其包含:抗原结合结构域、跨膜结构域和初级细胞内信号传导结构域,例如CD3ζ域,其中抗原结合成员不包含开关结构域,或不包含与细胞内信号传导成员上的开关结构域二聚化的开关结构域。在一个实施方案中,抗原结合成员不包含共刺激信号传导结构域。在一个实施方案中,细胞内信号传导成员包含来自同二聚化开关的开关结构域。在一个实施方案中,细胞内信号传导成员包含异二聚化开关的第一开关结构域,并且RCAR包含第二细胞内信号传导成员,其包含异二聚化开关的第二开关结构域。在此类实施方案中,第二细胞信号传导成员包含与细胞内信号传导成员相同的细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,二聚化开关为细胞内。在一个实施方案中,二聚化开关为细胞外。

[0585] 本文还提供包含RCAR编码序列的核酸和载体。编码RCAR的各种元件的序列可设置在同一核酸分子(例如,同一质粒或载体,例如病毒载体,例如慢病毒载体)上。

[0586] 在一个实施方案中,(i)编码抗原结合成员的序列和(ii)编码细胞内信号传导成员的序列可存在于同一核酸(例如载体)上。相应蛋白质的产生可例如通过使用单独启动子或通过使用双顺反子转录产物(其可通过裂解单一翻译产物或通过翻译两种单独的蛋白质产物来产生两种蛋白质)而实现。在一个实施方案中,编码可裂解肽(例如P2A或F2A序列)的序列设置于(i)与(ii)之间。在一个实施方案中,编码IRES(例如EMCV或EV71 IRES)的序列设置在(i)与(ii)之间。在这些实施方案中,(i)和(ii)被转录为单一RNA。在一个实施方案中,第一启动子可操作地连接至(i),并且第二启动子可操作地连接至(ii),使得(i)和(ii)被转录为单独的mRNA。

[0587] 可替代地,编码RCAR的各种元件的序列可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,例如慢病毒载体上。例如,(i)编码抗原结合成员的序列可存在于第一核酸(例如第一载体)上,并且(ii)编码细胞内信号传导成员的序列可存在于第二核酸(例如第二载体)上。

[0588] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语和短语具有与本领域普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管在本发明的实施或测试中可使用与本文所述的那些方法和材料相似或等效的任何方法和材料,但现在描述优选的方法和材料。本文提及

的所有文献均以引用的方式并入本文中。

[0589] 标准技术可用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂转染)。酶促反应和纯化技术可根据制造商的说明书或如本领域中通常完成的或如本文所述进行。前述技术和程序一般可根据本领域已知的常规方法,并且如贯穿本说明书所引用和讨论的各种一般性和更具体的参考文献中所描述而进行。参见例如,Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989)),其出于任何目的以引用的方式并入本文中。

[0590] 本文提及的所有公布、专利申请、专利和其它参考文献均以引用的方式整体并入本文中。将通过参考以下实施例更全面地理解本发明。

[0591] 实施例

[0592] 阐述实施例以帮助理解本发明,但并非旨在并且不应解释为以任何方式限制其范围。实施例不包括对本领域普通技术人员已知的常规方法(分子克隆技术等)的详细描述。

[0593] 实施例1.GCC VH抗体的分离和选择

[0594] 产生特异性地靶向人GCC的单结构域重链抗体(vH)(例如,表1-3中提供的抗GCC结合剂)。如表5所示,评估重组单结构域抗GCC VH构建体在体外与GCC的结合亲和力。结合动力学使用Octet结合测定来测定。这些在基于实时生物层干涉仪的生物传感器Octet(ForteBio)中测量。所有结合研究均在HBS-ET Octet动力学缓冲液中进行。生物传感器总是在不同步骤之间在Octet动力学缓冲液中洗涤。对每个VH进行七点两倍稀释系列。缔合步骤的每一者的接触时间为300秒,并且解离步骤在400-600秒之间变化。动力学缔合(ka)和解离(kd)速率常数通过使用ForteBio分析软件处理数据并将数据拟合至1:1结合模型而确定。亲和力计算值和动力学常数列于表5中。

[0595] 使用流式细胞术测量单结构域抗体与CT26细胞的结合。将CT26细胞与系列稀释的VH一起孵育,并通过流式细胞术测量荧光。通过FACS剂量反应测定证实抗GCC VH抗体与CT26细胞的结合,以获得细胞结合EC50(nM),如表5所示。

[0596] 表5.GCC VH抗体的结合亲和力

[0597]

GCC抗原结合剂	Koff (1/s)	KD(M)	与细胞结合的EC50 (M)
V1	0.00020795	3.2935E-10	7.2E-10
V5	0.000718667	7.713E-09	1.52E-09
V36	0.0035	0.000000105	N/A
V48	0.000341	1.375E-09	1.01E-09
V51	0.00185	9.544E-09	N/A

[0598] 为了测定稳定性,对VH构建体进行尺寸排阻色谱法(SEC)。简言之,将纯化的VH以不同浓度储存于PBS缓冲液中在4℃下过夜,然后使用SEC柱在不同时间点进行分析。将样拼注入磷酸钠缓冲液中。随时间推移收集数据,并与开始时(T=0)存在的相比较来计算储存后剩余的单体峰的面积。获得稳定性结果,如下表6所示。

[0599] 表6.使用SEC的过夜稳定性

[0600]

抗GCC VH抗体	%4℃单体(%)	纯度(%)	RT(分钟)
V1	108.4	91.5	3.586
V5	123.04	79.2	3.17

V36	92.43	79.36	3.08
V48	104.54	73.91	3.208
V51	109.2	59.22	3.304

[0601] 进行ELISA以测量VH与人轻链的结合。每一VH的结合值(作为OD450nm测量)均小于0.1,其为此测定的背景信号。

[0602] 实施例2.GCC嵌合抗原受体的设计和表征

[0603] 嵌合抗原受体构建体经工程化以包括包含上述单结构域抗体(例如,表2或表3中提供的VH)的细胞外结合结构域(例如,抗GCC结合剂序列)。CAR T构建体是通过将结合剂序列框内连接至CD28铰链/跨膜结构域和共刺激结构域以及CD3ζ-1xx信号传导结构域而产生。示例性CAR构建体的示意图示于图1A和1B中。在此实施例中测试的示例性CAR构建体序列提供于表4中。V1(SEQ ID NO:1)和V1-01(SEQ ID NO:20)预期适用于以下实施例中。

[0604] 将编码CAR构建体序列(SEQ ID NO:61-70)的核酸克隆至逆转录病毒质粒主链中。通过瞬时转染phenix ampho细胞(ATCC CRL-3213)而产生含有逆转录病毒载体的上清液,收获含有逆转录病毒载体的上清液并储存于-80℃。

[0605] 来自健康供体的人初级T细胞纯化自由leukopaks(购自经供体书面同意的商业提供者)分离的外周血单核细胞(PBMC),根据制造商提供的方案(EasySep™人T细胞分离试剂盒,Stem Cell Technologies#17951)使用CD3+细胞进行免疫磁珠选择。将T细胞在补充有10%青霉素-链霉素(Gibco 15140-122)和2ng/ml IL-2(Milteyni 130-097-743)的X-vivo 15培养基(Lonza#04-744Q)中,以1百万个细胞/ml的密度培养。将细胞用CD3/CD28MACS® T细胞TransAct试剂(Miltenyi Biotec MACS#130-111-160)活化,并在第2天或第3天用编码CAR构建体的逆转录病毒载体转导过夜。第二天,将CAR-T细胞培养物转移至G-Rex6®孔板(WilsonWolf P/N 80240M),并在补充有10%青霉素-链霉素(Gibco 15140-122)和2ng/ml IL-2(Milteyni 130-097-743)的X-vivo 15培养基(Lonza#04-744Q)中繁殖,直到第7-10天收获。每2-3天进行培养基更换和IL-2补充。

[0606] 使用抗EGFR抗体(R&D systems:FAB9577R)或用于CAR表面表达的可溶性GCC细胞外结构域重组蛋白通过流式细胞术评估CAR T细胞表达。

[0607] 实施例3.体外GCC CAR T细胞活性

[0608] 本实施例描述体外抗GCC CAR T细胞活性。检查表达抗GCC CAR(SEQ ID NO:48-52)的CAR-T细胞针对表达GCC的和GCC阴性的靶癌细胞系的细胞毒性。靶癌细胞系包括内源性地表达GCC的GSU、LS1034和HT55,以及HT29-GCC(经工程化以稳定表达GCC的人结肠直肠癌细胞系)及其载体对照细胞系(其为GCC阴性)HT29-vec。将每种靶细胞系接种在384孔板中,并以10:1、3:1、1:1和0.3:1的效应子与靶标(E:T)比率添加GCC CAR-T或非靶向CAR-T细胞(阴性对照)。包括仅包含靶细胞的孔和仅包含效应细胞的孔作为对照。两天后,使用CellTiter-Glo®One Solution Assay(Promega,G8462)测量细胞活力。靶细胞的活力百分比由共培养孔的发光信号计算,首先减去仅有效应细胞的孔的信号,之后除以仅有靶细胞的孔的信号。通过从100% GCC CAR-T细胞中减去靶细胞的活力百分比来计算杀伤百分比。

[0609] 与用作对照的非靶向CD19 CAR-T细胞(1928z-1xx)相比,VH抗GCC结合剂表达出针对表达GCC的靶细胞系的细胞杀伤。如图2A-2D所示,在不存在截短EGFR(tEGFR)的情况下表达抗GCC CAR的CAR-T细胞展现针对表达GCC的细胞HT29-GCC细胞(经工程化以稳定表达GCC

的人结肠直肠癌细胞系HT29)的体外细胞毒性(图2A);以及针对内源性表达GCC的细胞系GSU(图2C)和LS1034(图2D)的体外细胞毒性。如图3A-3D所示,在截短的EGFR(tEGFR)(SEQ ID NO:56-60)存在下表达抗GCC CAR的CAR-T细胞还展现针对表达GCC的细胞HT29-GCC(图3A)的体外细胞毒性;以及针对GSU(图3C)和LS1034(图3D)的体外细胞毒性。条形代表来自三次技术重复的平均值+SD值。数据代表用来自>3个供体的抗GCC CAR T细胞进行的>3个独立实验。GCC CAR-T细胞并未表现出针对GCC阴性HT29-vec细胞的细胞杀伤(图2B和图3B),表明GCC CAR-T细胞杀伤活性为抗原依赖性的。

[0610] 除了抗原依赖性细胞杀伤,GCC CAR-T细胞的体外活性还通过评价所述细胞的IFNγ和IL2的抗原依赖性分泌而进行评估。将具有抗GCC VH结合剂的GCC CAR-T细胞与表达GCC的和GCC阴性的靶癌细胞以10:1、3:1、1:1和0.3:1的E:T比率共培养。共培养两天后收集上清液。使用Intellicyt QBeads Human PlexScreen试剂盒(Sartorius,90702)检测上清液中的分泌型IFNγ和IL2。当与表达GCC的靶细胞共培养时,具有所有VH结合剂的GCC CAR-T细胞在tEGFR存在(5A-5D)和不存在(4A-4D)的情况下都分泌IFNγ,但与GCC阴性靶细胞共培养时则不然(图4B和5B),表明抗原依赖性细胞因子释放。当与表达GCC的靶细胞共培养时,具有所有VH结合剂的GCC CAR-T细胞在tEGFR存在(7A-7D)和不存在(6A-6D)的情况下都分泌IL2,但与GCC阴性靶细胞共培养时则不然(图6B和7B),表明抗原依赖性细胞因子释放。

[0611] 实施例4:体内GCC CAR T细胞活性

[0612] 本实施例描述体内抗GCC CAR T细胞活性。在内源性表达鸟苷酸环化酶C(GCC)的多重人结肠直肠癌肿瘤异种移植物模型中研究具有不同VH结合剂的GCC CAR-T的抗肿瘤活性。将非肥胖糖尿病/严重联合免疫缺陷/γ链-/-(NSG)小鼠皮下接种HT55细胞、LS1034细胞或GSU细胞。当平均肿瘤体积达到大约150mm^3时,紧急静脉内(IV)施用GCC CAR-T细胞或模拟T细胞(非靶向CAR-T)。评价不同剂量水平和供体来源,并且如图8A-18所示指明。肿瘤体积和体重每周测量两次,持续至多50天。

[0613] 在用由两个不同的健康供体D393(图8A)和D686(图8B)制造的抗GCC CAR-T细胞治疗的HT55模型(内源性地表达表达GCC的结肠直肠癌,GCC H分数=300/300)中测定平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(40天)的变化。在用由三个不同的健康供体D393(图9A)、D797(图9B)和D954(图9C)制造的抗GCC CAR-T细胞治疗的HT55模型中测定平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化。在用由健康供体D393(图10A)、D797(图10B)和D954(图10C)制造的共表达tEGFR的抗GCC CAR-T细胞治疗、以及用由健康供体D393制造的不存在tEGFR的抗GCC CAR-T细胞治疗的HT55模型中测定平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化。在用由三个不同的健康供体D393(图11A)、D954(图11B)和D686(图11C)制造的抗GCC CAR-T细胞治疗的HT55模型中测定平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化。在用由健康供体D393(图12A)、D954(图12B)和D686(图12C)制造的共表达tEGFR的v48抗GCC CAR-T细胞治疗的HT55模型中测定平均肿瘤体积(mm^3)随时间推移(42天)的变化,剂量为0.25x 10^6个CAR+细胞、0.5x 10^6个CAR+细胞或1x 10^6个CAR+细胞。

[0614] 在用由两个健康供体D393(图13A)、D954(图13B)、D393(图15A)、D954(图15B)和D686(图15C)制造的不存在tEGFR的抗GCC CAR-T细胞治疗的GSU模型(内源性表达GCC的胃癌,GCC H分数=170/300)中测定平均肿瘤体积(mm3)随时间推移(42天)的变化。在用由不同健康供体D393(图14A)、D954(图14B)、D393(图16A)、D954(图16B)和D686(图16C)制造的

共表达tEGFR的抗GCC CAR-T细胞治疗的GSU模型(内源性表达GCC的胃癌,GCC H分数＝170/300)中测定平均肿瘤体积(mm3)随时间推移(42天)的变化。

[0615] 在用由一个健康供体制造的共表达tEGFR(图18)或不存在tEGFR(图17)的抗GCC CAR-T细胞治疗的LS1034模型(内源性表达GCC的结肠直肠癌,GCC H分数＝300/300)中测定平均肿瘤体积(mm3)随时间推移(42天)的变化。

[0616] 与相应的对照组相比,来自多个供体的GCC CAR-T细胞的紧急IV施用导致对所有肿瘤模型中的肿瘤生长的显著抑制。与相应的对照组相比,在用GCC CAR T细胞治疗的携带LS1034或GSU肿瘤的NSG小鼠中,没有观察到显著体重减轻。在HT-55肿瘤模型中,所观察到的体重减轻是由于肿瘤负荷所致。GCC CAR-T细胞治疗后的肿瘤负荷降低可导致体重增加。

[0617] 因此已描述了本发明的至少一个实施方案的若干方面,应理解,各种改变、修改和改进对于本领域技术人员来说将是显而易见的。此类变更、修改和改进旨在成为本公开的一部分,并且旨在落入本发明的精神和范围内。因此,前述描述和附图仅作为举例,并且通过以下的权利要求详细地描述本发明。

[0618] 序列表

[0619] 下表7提供本文公开的描述和序列。

[0620] 表7.序列表

[0621]

SEQ ID NO	描述	序列
1	V1 vH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWF RQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTP KNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDL WGRGTLVTVSS
2	CD8跨膜结构域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
3	4-1BB细胞内结构域	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL
4	CD3-ζ信号传导结构域	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR
5	铰链序列	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACD
6	前导序列(v1)	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
7	前导序列(v5、v36、v48、v51)	MELGLSWVFLVAILEGVQC
8	V1 HCDR1	HYYWS
9	V5 HCDR1	RYWMS
10	V36 HCDR1	RYWMT
10	V48 HCDR1	RYWMT
10	V51 HCDR1	RYWMT
11	V1 HCDR2	RIYPSGSTSYNPSLKS

12	V5 HCDR2	KIRHDGGEKYYVDSVKG
13	V36 HCDR2	KIKYDGSEKYYADSVKG
14	V48 HCDR2	KIRHDGGEKYYPDSVKG
15	V51 HCDR2	KIRHDGGEKYYADSVKG
16	V1 HCDR3	DRSTGWSEWNSDL
17	V5 HCDR3	DYTRDV
18	V36 HCDR3	DYNKDY
19	V48 HCDR3	DYNKDL
18	V51 HCDR3	DYNKDY
20	V1	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWF RQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTP KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDL WGRGTLVTVSS
21	V5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSW VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQ GTAVTVSS
22	V8	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSW VRQAPGKGLEWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSVYLQMNSLRAEDTGVYYCATDFTRDVWGQ GTTVTVSS
23	V9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGRGLEWVAKIRYDGGEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQ GTTVTVSS
24	V30	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWMSW VRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQ GTTVTVSS
25	V31	QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSW VRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCATDFTRDVWGQ GTTVTVSS
26	V36	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQ GTLVTVSS
27	V48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSR DNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDYNKDLWG QGTLVTVSS
28	V51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTW

[0622]

		VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQ GTLVTVSS
29	CD28 铰链结构域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP
30	CD28 跨膜结构域	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
31	CD28 铰链/跨膜结构域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
32	CD28 信号结构域	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AYRS
33	CD3z-1XX 突变体信号传导结构域	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFS EIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQA LPPR
34	组合的 CAR 跨膜结构域和细胞内结构域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS DYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMK GERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
35	V1-01 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGS TSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSIEVMYPPP YLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVV GGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTP RRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGK GHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
36	V5 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRH DGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSSIEVMYPPPYL DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPR RPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKG HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
37	V36 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKY DGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAE DTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSIEVMYPPPYL DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPR

[0623]

[0624]

		RPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKG HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
38	V48 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGS LRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRH DGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAE DTAMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSSIEVMYPPPYL DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPR RPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKG HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
39	V51 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRH DGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSIEVMYPPPYL DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKM AEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDAL HMQALPPR
40	热稳定型肠毒素	NTFYCCELCCNPACAGCY
41	GCC AA 序列	MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEI SVLMMGNSAFAEPLKNLEDAVNEGLEIVRGRLQNAG LNVTVNATFMYSDGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKIS NAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSF GLSCDYKETLTRLMSPARKLMYFLVNFWKTNDLPFK TYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYLNALEASVSYFSHEL GFKVVLRQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYK LKGDRAVAEDIVIILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNV LVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGILLFG HMLKIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYDGPVTLDD WGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYP VDMSPTFTWKNSKLPNDITGRGPQILMIAVFTLTGAV VLLLLVALLMLRKYRKDYELRQKKWSHIPPENIFPLE TNETNHVSLKIDDDKRRDTIQRLRQCKYDKKRVILKD LKHNDGNFTEKQKIELNKLLQIDYYNLTKFYGTVKLD TMIFGVIEYCERGSLREVLNDTISYPDGTFMDWEFKIS VLYDIAKGMSYLHSSKTEVHGRLKSTNCVVDSRMVV KITDFGCNSILPPKKDLWTAPEHLRQANISQKGDVYSY GIIAQEIILRKETFYTLSCRDRNEKIFRVENSNGMKPFR PDLFLETAEEKELEVYLLVKNCWEEDPEKRPDFKKIET TLAKIFGLFHDQKNESYMDTLIRRLQLYSRNLEHLVEE RTQLYKAERDRADRLNFMLLPRLVVKSLKEKGFVEPE

[0625]

		LYEEVTIYFSDIVGFTTICKYSTPMEVVDMLNDIYKSF DHIVDHHDVYKVETIGDAYMVASGLPKRNGNRHAIDI AKMALEILSFMGTFELEHLPGLPIWIRIGVHSGPCAAG VVGIKMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPLRIHVSGSTI AILKRTECQFLYEVRGETYLKGRGNETTYWLTGMKD QKFNLPTPPTVENQQRLQAEFSDMIANSLQKRQAAGI RSQKPRRVASYKKGTLEYLQLNTTDKESTYF
42	v31 前导序列	MEFGLSWVFLVAIIKGVQC
43	tEGFR	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSI NATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQ ELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKN LCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQV CHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNL LEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNC IQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM
44	P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
45	前导序列	MALPVTALLLPLALLLHAARP
46	V1 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHS QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWF RQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTP KNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDL WGRGTLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKH LCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF WVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPR DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKD KMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTF DALHMQALPPR
47	V1 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHS QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWF RQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTP KNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDL WGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHV KGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTV AFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNE LQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTAT KDTFDALHMQALPPR
48	V1-01 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGS TSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSRAAAIEVM YPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWV LVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM

		NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGER RRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
49	V5 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRH DGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSSRAAAIEVMY PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
50	V36 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKY DGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAE DTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEVMY PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
51	V48 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGS LRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRH DGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAE DTAMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSSRAAAIEVMY PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR
52	V51 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRH DGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEVMY PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKM AEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDAL HMQALPPR
53	接头序列	RAAA
54	接头序列	GGGGS
55	V1 CAR (28z1xx-tE	MGWSCIILFLVATATGVHS QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWF

[0626]

		GFR)	RQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTP KNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDL WGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHV KGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTV AFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNE LQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTAT KDTFDALHMQALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSI NATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQ ELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKN LCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQV CHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNL LEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNC IQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
[0627]	**56**	V1-01 CAR (28z1xx-tEGFR)	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGS TSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSRAAAIEVM YPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWV LVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGER RRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSI NATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQ ELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKN LCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQV CHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNL LEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNC IQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
	57	V5 CAR (28z1xx-tEGFR)	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRH DGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSSRAAAIEVMY PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERR

[0628]

		RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSI NATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQ ELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKN LCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQV CHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNL LEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNC IQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
58	V36 CAR (28z1xx-tEGFR)	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKY DGSEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAE DTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEVMY PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSI NATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQ ELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKN LCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQV CHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNL LEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNC IQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
59	V48 CAR (28z1xx-tEGFR)	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGS LRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRH DGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAE DTAMYYCTRDYNKDLWGQGTLVTVSSRAAAIEVMY PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSI NATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQ ELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKN LCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQV CHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNL

[0629]

		LEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNC IQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
60	V51 CAR (28z1xx-tEGFR)	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRH DGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSSRAAAIEVMY PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSI NATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQ ELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKN LCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQV CHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNL LEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNC IQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM
61	V1-01 CAR 核酸序列	ATGGGCTGGTCTTGTATTATCTTGTTTCTCGTCGCAA CTGCTACAGGCGTTCATTCTGAAGTTCAACTCCAAG AATCTGGTCCTGGCCTGGTGAAACCTTCCGAAACTC TCTCACTCACCTGTACCGTCTCAGGCGCTTCAATAT CACACTATTATTGGTCTTGGTTCCGGCAACCTGCAG GCAAAGGTCTCGAATGGATAGGCAGAATATATCCC AGTGGAAGCACCTCCTATAATCCCTCTCTCAAGTCA AGAGTTGCAATGAGCGTTGACACACCCAAGAACCA ATTCTCCCTCAAGCTGTCATCTGTAACTGCCGCCGA TACTGCCGTTTACTACTGCGCTAGAGATAGATCAAC CGGATGGTCAGAATGGAATTCAGATCTGTGGGGAC GGGGAACCCTCGTGACCGTATCTTCTCGGGCGGCCG CAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACA ATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAA GGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGA CCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGT GGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTG GCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGC AGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCC CGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCC CTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTC CAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG CGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGG

[0630]

		GAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCT GTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG CCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGGGTCT CAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCCTTC ACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
62	V5 CAR 核酸序列	ATGGAACTGGGACTGTCTTGGGTGTTCCTGGTCGCT ATATTGGAAGGAGTACAGTGCCAGGTCCAGCTCGT CGAGTCCGGGGGTGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCA GCCTCCGGCTGAGCTGCACAGCCTCAGGGTTTACAT TCAGCAGGTACTGGATGAGTTGGGTTAGGCAAGCC CCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTGGCCAAAATCCG ACATGATGGGGGCGAAAAGTACTATGTGGATAGTG TGAAGGGACGGTTCACAATATCACGAGACAATGCC AAAAACTCTTTGTACCTGCAAATGAACTCCCTGCGC GCCGAAGACACAGCTGTGTACTACTGCGCTACAGA CTACACTAGGGACGTCTGGGGTCAAGGAACAGCCG TCACCGTGAGTAGTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTT ATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGC AATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCT TTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCC CTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGC TTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT TTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGC ACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCC GGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCC ACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGA AGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAG CAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCT AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGA GACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCG AGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGA ACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTG AGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAA GGGGCACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGC CACCAAGGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGG CCCTGCCCCCTCGCTAA
63	V36 CAR 核酸序列	ATGGAGCTGGGATTGTCCTGGGTTTTCCTGGTGGCT ATACTCGAAGGCGTACAGTGTGAAGTGCAGTTGGT GGAGAGTGGCGGTGGCCTGGCCCAGCCGGGAGGCT CTTTGAGACTCTCCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACTTT CTCCCGCTATTGGATGACCTGGGTCCGGCAGGCGCC CGGCGGACGCCTGGAGTGGGTGGCTAAGATCAAGT ATGATGGATCAGAAAAATATTACGCAGATAGCGTA AAAGGCCGGTTCACAATATCCAGGGATAATGCAAA AAACTCCCTGTATCTGCAGATGGATAGCCTGCGCGC TGAAGACACCGCCGTATATTATTGCACAAGAGACT ACAATAAAGATTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTT ACGGTGAGCTCACGGGCGGCCGCAATTGAAGTTAT GTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAA

[0631]

		TGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTT GTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCT TTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTT GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTT TCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC AGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGG GCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACC ACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTT CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGG GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACG TGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAA GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTG CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGAT TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG CACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACC AAGGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG CCCCCTCGC
64	V48 CAR 核酸序列	ATGGAGCTGGGGCTTTCTTGGGTGTTTCTGGTAGCC ATCCTCGAGGGAGTCCAGTGCGAGGTCCAGCTCGT CGAATCTGGCGGGGGGCTGGTCCAGCCTGGCGGTT CTCTCCGCCTGACCTGTGCGGCCTCAGGGTTCACTT TCAGCCGGTACTGGATGACATGGGTGAGACAGGCC CCCGGCAAGGGACTGGAATGGGTAGCAAAGATTAG GCACGACGGCGGTGAGAAATACTATCCCGACAGTG TCAAGGGGCGGTTTACTGTCTCCCGAGATAATGCCA AAAACTCACTCTACCTGCAGATGGATAATCTGCGA GCGGAGGATACTGCTATGTACTACTGTACTCGAGAC TACAACAAGGACCTGTGGGGGCAGGGGACACTGGT GACGGTTAGTTCTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTAT GTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAA TGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTT GTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCT TTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTT GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTT TCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC AGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGG GCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACC ACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTT CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGG GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACG TGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAA GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTG CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGAT TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG CACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACC AAGGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG CCCCCTCGC
65	V51 CAR	ATGGAACTGGGACTGTCATGGGTCTTTCTCGTGGCC

[0632]

	核酸序列	ATTCTCGAGGGGGTCCAGTGTGAGGTTCAGCTGGTG GAGAGCGGGGGGGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGCAG TCTTAGGTTGTCATGTGCCGCGAGCGGGTTCACGTT CTCACGATATTGGATGACCTGGGTTCGCCAGGCACC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCCAAGATCAGGC ACGACGGCGGAGAAAAATATTACGCGGATTCCGTG AAAGGCAGATTCACAATCTCTAGGGATAACGCCAA AAATTCCCTTTATCTTCAGATGAATAGCCTGAGGGC TGAAGACACTGCCGTGTACTACTGCACGCGGGATT ACAACAAAGATTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTG ACCGTCAGCTCTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATG TATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAAT GGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTG TCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTT TGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGC TATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCT GGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT GACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCC CACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACG CGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAG CAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCC AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGA AGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGG AAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCA GAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTG GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCA CGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAA GGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCC CCCTCGC
66	V1-01 CAR + tEGFR 核酸序列	ATGGGCTGGTCTTGTATTATCTTGTTTCTCGTCGCAA CTGCTACAGGCGTTCATTCTGAAGTTCAACTCCAAG AATCTGGTCCTGGCCTGGTGAAACCTTCCGAAACTC TCTCACTCACCTGTACCGTCTCAGGCGCTTCAATAT CACACTATTATTGGTCTTGGTTCCGGCAACCTGCAG GCAAAGGTCTCGAATGGATAGGCAGAATATATCCC AGTGGAAGCACCTCCTATAATCCCTCTCTCAAGTCA AGAGTTGCAATGAGCGTTGACACACCCAAGAACCA ATTCTCCCTCAAGCTGTCATCTGTAACTGCCGCCGA TACTGCCGTTTACTACTGCGCTAGAGATAGATCAAC CGGATGGTCAGAATGGAATTCAGATCTGTGGGGAC GGGGAACCCTCGTGACCGTATCTTCTCGGGCGGCCG CAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACA ATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAA GGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGA CCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGT GGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTG GCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGC AGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCC CGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCC

[0633]

		CTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTC CAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG CGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGG GAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCT GTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG CCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGGGTCT CAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCCTTC ACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGAAGCGGAGCT ACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGT GGAGGAGAACCCTGGACCCATGCTTCTCCTGGTGA CAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCAT TCCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAG GTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATG CTACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCA TCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTA GGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGACC CACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAA ATCACAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAA AACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGA AATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGT TTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCT TGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGA GATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTAT GCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGAC CTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAG GTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGC CATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCG GAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAG CCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTC TGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCT GAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCA GGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAG ACAACTGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCC CCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATG GGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGA CGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTG CACCTACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCT GTCCCACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCA CTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGG TGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATG
67	V5 CAR + tEGFR 核酸序列	ATGGAACTGGGACTGTCTTGGGTGTTCCTGGTCGCT ATATTGGAAGGAGTACAGTGCCAGGTCCAGCTCGT CGAGTCCGGGGGGTGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCA GCCTCCGGCTGAGCTGCACAGCCTCAGGGTTTACAT TCAGCAGGTACTGGATGAGTTGGGTTAGGCAAGCC CCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTGGCCAAAATCCG ACATGATGGGGGCGAAAAGTACTATGTGGATAGTG

[0634]

		TGAAGGGACGGTTCACAATATCACGAGACAATGCC AAAAACTCTTTGTACCTGCAAATGAACTCCCTGCGC GCCGAAGACACAGCTGTGTACTACTGCGCTACAGA CTACACTAGGGACGTCTGGGGTCAAGGAACAGCCG TCACCGTGAGTAGTGCGGCCGCAATTGAAGTTATGT ATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATG GAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTC CAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTT GGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCT ATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCT GGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT GACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCC CACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACG CGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAG CAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCC AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGA AGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGG AAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCA GAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTG GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCA CGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAA GGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCC CCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCT GAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGAC CCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTG AGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCA AAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACAC TTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCAC ATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACA CATACTCCTCCTCTGGACCCACAGGAACTGGATATT CTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCC ATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGG ACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTC AGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTC AAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGG AAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACT GGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACC AAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAA GGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCC CGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGC GTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAG GGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCC ACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCT GCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATCCAGTGT GCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACC TGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCT

[0635]

		GGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCC ACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTG GGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCCACGAATGGGCCT AAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGC CCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGG CCTCTTCATG
68	V36 CAR + tEGFR 核酸序列	ATGGAGCTGGGATTGTCCTGGGTTTTCCTGGTGGCT ATACTCGAAGGCGTACAGTGTGAAGTGCAGTTGGT GGAGAGTGGCGGTGGCCTGGCCCAGCCGGGAGGCT CTTTGAGACTCTCCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACTTT CTCCCGCTATTGGATGACCTGGGTCCGGCAGGCGCC CGGCGGACGCCTGGAGTGGGTGGCTAAGATCAAGT ATGATGGATCAGAAAAATATTACGCAGATAGCGTA AAAGGCCGGTTCACAATATCCAGGGATAATGCAAA AAACTCCCTGTATCTGCAGATGGATAGCCTGCGCGC TGAAGACACCGCCGTATATTATTGCACAAGAGACT ACAATAAAGATTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTT ACGGTGAGCTCACGGGCGGCCGCAATTGAAGTTAT GTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAA TGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTT GTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCT TTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTT GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTT TCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC AGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGG GCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACC ACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTT CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGG GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACG TGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAA GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTG CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGAT TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG CACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACC AAGGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG CCCCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTG CTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGG ACCCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTG TGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACG CAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTA AAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAAC ACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCC ACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCA CACATACTCCTCCTCTGGACCCACAGGAACTGGATA TTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGC TGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTC CATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAG GACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGT CAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCT

[0636]

		CAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAG GAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAAC TGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAAC CAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCA AGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCC CCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGC GTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATG CGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAA GGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGC CACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCAC CTGCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATCCAGT GTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGA CCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACC CTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTG CCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCAC TGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCCACGAATGGGC CTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGG GCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATC GGCCTCTTCATG
69	V48 CAR + tEGFR 核酸序列	ATGGAGCTGGGGCTTTCTTGGGTGTTTCTGGTAGCC ATCCTCGAGGGAGTCCAGTGCGAGGTCCAGCTCGT CGAATCTGGCGGGGGGCTGGTCCAGCCTGGCGGTT CTCTCCGCCTGACCTGTGCGGCCTCAGGGTTCACTT TCAGCCGGTACTGGATGACATGGGTGAGACAGGCC CCCGGCAAGGGACTGGAATGGGTAGCAAAGATTAG GCACGACGGCGGTGAGAAATACTATCCCGACAGTG TCAAGGGGCGGTTTACTGTCTCCCGAGATAATGCCA AAAACTCACTCTACCTGCAGATGGATAATCTGCGA GCGGAGGATACTGCTATGTACTACTGTACTCGAGAC TACAACAAGGACCTGTGGGGGCAGGGGACACTGGT GACGGTTAGTTCTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTAT GTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAA TGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTT GTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCT TTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTT GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTT TCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC AGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGG GCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACC ACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTT CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGG GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACG TGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAA GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTG CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGAT TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG CACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACC AAGGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG CCCCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTG

[0637]

		CTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGG ACCCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTG TGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACG CAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTA AAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAAC ACTTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCC ACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCA CACATACTCCTCCTCTGGACCCACAGGAACTGGATA TTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGC TGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTC CATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAG GACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGT CAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCT CAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAG GAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAAC TGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAAC CAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCA AGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCC CCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGC GTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATG CGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAA GGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGC CACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCAC CTGCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATCCAGT GTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGA CCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACC CTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTG CCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCAC TGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCCACGAATGGGC CTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGG GCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATC GGCCTCTTCATG
70	V51 CAR + tEGFR 核酸序列	ATGGAACTGGGACTGTCATGGGTCTTTCTCGTGGCC ATTCTCGAGGGGGTCCAGTGTGAGGTTCAGCTGGTG GAGAGCGGGGGGGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGCAG TCTTAGGTTGTCATGTGCCGCGAGCGGGTTCACGTT CTCACGATATTGGATGACCTGGGTTCGCCAGGCACC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCCAAGATCAGGC ACGACGGCGGAGAAAAATATTACGCGGATTCCGTG AAAGGCAGATTCACAATCTCTAGGGATAACGCCAA AAATTCCCTTTATCTTCAGATGAATAGCCTGAGGGC TGAAGACACTGCCGTGTACTACTGCACGCGGGATT ACAACAAAGATTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTG ACCGTCAGCTCTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATG TATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAAT GGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTG TCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTT TGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGC TATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCT GGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT

[0638]

		GACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCC CACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACG CGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAG CAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCC AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGA AGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGG AAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCA GAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTG GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCA CGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAA GGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCC CCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCT GAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGAC CCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTG AGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCA AAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAA GACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACAC TTCAAAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCAC ATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACA CATACTCCTCCTCTGGACCCACAGGAACTGGATATT CTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCC ATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGG ACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTC AGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTC AAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGG AAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACT GGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACC AAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAA GGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCC CGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCG TCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGC GTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAG GGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCC ACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCT GCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATCCAGTGT GCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACC TGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCT GGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCC ACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTG GGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCCACGAATGGGCCT AAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGC CCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGG CCTCTTCATG

[0639] 等效物

[0640] 在权利要求中使用诸如“第一”、“第二”、“第三”的顺序术语来修饰权利要求要素本身并不意味着一个权利要求要素相对于另一个权利要求要素的任何优先、居先或顺序或执行方法的动作所依的时间顺序，而仅作为区分具有特定名称的一个权利要求要素与具有相同名称(但使用顺序术语)的另一个要素以区分权利要求要素的标记。

[0641] 如本文在说明书和权利要求中所用的冠词“一个(种)(a/an)”，除非相反地明确指示，否则应理解为包括复数个指示物。除非相反指出或另外从上下文明显看出，否则如果一个、多于一个或所有组成员存在于、被用于或以其它方式关联于给定的产物或方法，则认为

在组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或描述得到了满足。本发明包括其中组中恰好有一个成员存在于、被用于或以其它方式关联于给定的产物或方法的实施方案。本发明还包括其中多于一个或全部组成员存在于、被用于或以其它方式关联于给定产物或方法的实施方案。此外，应当理解，本发明涵盖所有变化、组合和排列，其中来自所列权利要求的一个或多个限制、要素、条款、描述性术语等引入另一从属于同一独立权利要求(或相关的任何其它权利要求)的权利要求中，除非另有说明或除非本领域普通技术人员可明显看出矛盾或不一致。在要素以列表形式(例如，以马库什组(Markush group)或类似格式)呈现的情况下，应当理解，还公开所述要素的各子组，并且可从所述组中移除任一要素。应当理解，一般而言，在本发明或本发明的方面被称为包含特定要素、特征等的情况下，本发明的某些实施方案或本发明的方面由或基本上由此类要素、特征等组成。为了简单起见，在本文中那些实施方案并未在每种情况下以如此多的词语具体阐述。还应当理解，本发明的任何实施方案或方面都可明确地从权利要求中排除，而不论特定的排除是否在说明书中有陈述。用于描述本发明的背景并提供关于其实施的额外细节所引用的出版物、网站和其它参考数据均特此以引用的方式并入。

序列表

<110> 武田药品工业株式会社(TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED)
<120> 鸟苷酸环化酶C (GCC)抗原结合剂的组合物及其使用方法
<130> MIL-005WO
<140>
<141>
<150> 63/123,331
<151> 2020-12-09
<160> 73
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 1

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

<210> 2
<211> 24
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 2
Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20
<210> 3
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"
<400> 3
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40
<210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"
<400> 4
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> 5
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 5

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> 6
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 6

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 7
<211> 19
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 7
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys
<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 8
His Tyr Tyr Trp Ser
1 5
<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 9
Arg Tyr Trp Met Ser
1 5
<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"

<400> 10
Arg Tyr Trp Met Thr
1 5
<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 11
Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 12
Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 13
Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 14

<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 14
Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 15
Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 16
Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp Leu
1 5 10
<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 17
Asp Tyr Thr Arg Asp Val
1 5
<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 18
Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr
1 5
<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 19
Asp Tyr Asn Lys Asp Leu
1 5
<210> 20
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 20
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

<210> 21
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 21

Gln 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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Thr Asp Tyr Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 22

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

<210> 23
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 23

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 Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ala Lys Ile Arg Tyr Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Thr Asp Phe Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 24
Gln 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 Asn Phe Gly Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val
35 40 45
Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Thr Asp Phe Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 115
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 25

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

<210> 26
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 26

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Ala	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr
			20					25				30			
Trp	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gly	Arg	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Lys	Ile	Lys	Tyr	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asp Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 28

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 Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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
Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 29

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 29

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

<210> 30

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 30
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25
<210> 31
<211> 66
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 31
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
35 40 45
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
50 55 60
Trp Val
65
<210> 32
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 32
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> 33
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 33

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 Phe Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 34
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 34

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
35 40 45
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
50 55 60
Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
65 70 75 80
Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
85 90 95
Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
100 105 110
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
115 120 125
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
130 135 140
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
145 150 155 160
Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
165 170 175
Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
180 185 190
His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe
195 200 205
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
210 215

<210> 35
<211> 359
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 35
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile
35 40 45

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

355

<210> 36

<211> 353

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 36

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

225 230 235 240
Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
245 250 255
Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
260 265 270
Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
275 280 285
Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln
290 295 300
Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
305 310 315 320
Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr
325 330 335
Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
340 345 350
Arg

<210> 37
<211> 353
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 37
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gly Arg Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

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

<210> 38
<211> 353
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"

<400> 38

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

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
305 310 315 320
Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr
325 330 335
Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
340 345 350
Arg

<210> 39
<211> 353
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 39

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

180 185 190

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu

195 200 205

His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg

210 215 220

Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg

225 230 235 240

Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln

245 250 255

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu

260 265 270

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly

275 280 285

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln

290 295 300

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu

305 310 315 320

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr

325 330 335

Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro

340 345 350

Arg

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)

<400> 40

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly

1 5 10 15

Cys Tyr

<210> 41

<211> 1073

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 41

Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln

1 5 10 15

Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn

20 25 30

Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala
35 40 45
Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile
50 55 60
Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala
65 70 75 80
Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg
85 90 95
Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala
100 105 110
Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr
115 120 125
Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala
130 135 140
Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu
145 150 155 160
Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys
165 170 175
Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val
180 185 190
Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala
195 200 205
Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val
210 215 220
Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn
225 230 235 240
Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr
245 250 255
Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
260 265 270
Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
275 280 285
Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
290 295 300
Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
305 310 315 320
Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu
325 330 335
Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala

340 345 350

His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
355 360 365

Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
370 375 380

Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
385 390 395 400

Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
405 410 415

Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Ile Leu
420 425 430

Met Ile Ala Val Phe Thr Leu Thr Gly Ala Val Val Leu Leu Leu Leu
435 440 445

Val Ala Leu Leu Met Leu Arg Lys Tyr Arg Lys Asp Tyr Glu Leu Arg
450 455 460

Gln Lys Lys Trp Ser His Ile Pro Pro Glu Asn Ile Phe Pro Leu Glu
465 470 475 480

Thr Asn Glu Thr Asn His Val Ser Leu Lys Ile Asp Asp Asp Lys Arg
485 490 495

Arg Asp Thr Ile Gln Arg Leu Arg Gln Cys Lys Tyr Asp Lys Lys Arg
500 505 510

Val Ile Leu Lys Asp Leu Lys His Asn Asp Gly Asn Phe Thr Glu Lys
515 520 525

Gln Lys Ile Glu Leu Asn Lys Leu Leu Gln Ile Asp Tyr Tyr Asn Leu
530 535 540

Thr Lys Phe Tyr Gly Thr Val Lys Leu Asp Thr Met Ile Phe Gly Val
545 550 555 560

Ile Glu Tyr Cys Glu Arg Gly Ser Leu Arg Glu Val Leu Asn Asp Thr
565 570 575

Ile Ser Tyr Pro Asp Gly Thr Phe Met Asp Trp Glu Phe Lys Ile Ser
580 585 590

Val Leu Tyr Asp Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu His Ser Ser Lys
595 600 605

Thr Glu Val His Gly Arg Leu Lys Ser Thr Asn Cys Val Val Asp Ser
610 615 620

Arg Met Val Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Cys Asn Ser Ile Leu Pro
625 630 635 640

Pro Lys Lys Asp Leu Trp Thr Ala Pro Glu His Leu Arg Gln Ala Asn
645 650 655

Ile Ser Gln Lys Gly Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Ile Ile Ala Gln Glu
660 665 670
Ile Ile Leu Arg Lys Glu Thr Phe Tyr Thr Leu Ser Cys Arg Asp Arg
675 680 685
Asn Glu Lys Ile Phe Arg Val Glu Asn Ser Asn Gly Met Lys Pro Phe
690 695 700
Arg Pro Asp Leu Phe Leu Glu Thr Ala Glu Glu Lys Glu Leu Glu Val
705 710 715 720
Tyr Leu Leu Val Lys Asn Cys Trp Glu Glu Asp Pro Glu Lys Arg Pro
725 730 735
Asp Phe Lys Lys Ile Glu Thr Thr Leu Ala Lys Ile Phe Gly Leu Phe
740 745 750
His Asp Gln Lys Asn Glu Ser Tyr Met Asp Thr Leu Ile Arg Arg Leu
755 760 765
Gln Leu Tyr Ser Arg Asn Leu Glu His Leu Val Glu Glu Arg Thr Gln
770 775 780
Leu Tyr Lys Ala Glu Arg Asp Arg Ala Asp Arg Leu Asn Phe Met Leu
785 790 795 800
Leu Pro Arg Leu Val Val Lys Ser Leu Lys Glu Lys Gly Phe Val Glu
805 810 815
Pro Glu Leu Tyr Glu Glu Val Thr Ile Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly
820 825 830
Phe Thr Thr Ile Cys Lys Tyr Ser Thr Pro Met Glu Val Val Asp Met
835 840 845
Leu Asn Asp Ile Tyr Lys Ser Phe Asp His Ile Val Asp His His Asp
850 855 860
Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly
865 870 875 880
Leu Pro Lys Arg Asn Gly Asn Arg His Ala Ile Asp Ile Ala Lys Met
885 890 895
Ala Leu Glu Ile Leu Ser Phe Met Gly Thr Phe Glu Leu Glu His Leu
900 905 910
Pro Gly Leu Pro Ile Trp Ile Arg Ile Gly Val His Ser Gly Pro Cys
915 920 925
Ala Ala Gly Val Val Gly Ile Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly
930 935 940
Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Leu
945 950 955 960
Arg Ile His Val Ser Gly Ser Thr Ile Ala Ile Leu Lys Arg Thr Glu

965 970 975
Cys Gln Phe Leu Tyr Glu Val Arg Gly Glu Thr Tyr Leu Lys Gly Arg
980 985 990
Gly Asn Glu Thr Thr Tyr Trp Leu Thr Gly Met Lys Asp Gln Lys Phe
995 1000 1005
Asn Leu Pro Thr Pro Pro Thr Val Glu Asn Gln Gln Arg Leu Gln
1010 1015 1020
Ala Glu Phe Ser Asp Met Ile Ala Asn Ser Leu Gln Lys Arg Gln
1025 1030 1035
Ala Ala Gly Ile Arg Ser Gln Lys Pro Arg Arg Val Ala Ser Tyr
1040 1045 1050
Lys Lys Gly Thr Leu Glu Tyr Leu Gln Leu Asn Thr Thr Asp Lys
1055 1060 1065
Glu Ser Thr Tyr Phe
1070

<210> 42
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 42
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys

<210> 43
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 43
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

165 170 175

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly

180 185 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu

195 200 205

Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys

210 215 220

Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu

225 230 235 240

Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met

245 250 255

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala

260 265 270

His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val

275 280 285

Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His

290 295 300

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro

305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala

325 330 335

Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
340 345 350
Ile Gly Leu Phe Met
355

<210> 44
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 44
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> 45
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 45
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> 46
<211> 359
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"
<400> 46

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

305 310 315 320
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
325 330 335
Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His
340 345 350
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355

<210> 47
<211> 363
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 47
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile
35 40 45
Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
65 70 75 80
Ser Leu Lys Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Ser Leu Asn Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp
115 120 125
Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala
130 135 140
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
145 150 155 160
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
165 170 175
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

180 185 190
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
195 200 205
Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
210 215 220
Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
225 230 235 240
Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
245 250 255
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
260 265 270
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
275 280 285
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
290 295 300
Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
305 310 315 320
Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
325 330 335
His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe
340 345 350
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355 360

<210> 48
<211> 363
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile
35 40 45
Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp
115 120 125

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala
130 135 140

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
145 150 155 160

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
165 170 175

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
180 185 190

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
195 200 205

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
210 215 220

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
225 230 235 240

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
245 250 255

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
260 265 270

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
275 280 285

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
290 295 300

Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
305 310 315 320

Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
325 330 335

His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe
340 345 350

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355 360

<210> 49
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 49

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

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
245 250 255
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
275 280 285
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350
Ala Leu Pro Pro Arg
355

<210> 50
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 50
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gly Arg Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

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

<210> 51
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成

多肽"

<400> 51

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

290 295 300
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350
Ala Leu Pro Pro Arg
355

<210> 52
<211> 357
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 52
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125
Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
130 135 140
Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145 150 155 160
Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys

165 170 175
Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
180 185 190
Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205
Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
210 215 220
Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225 230 235 240
Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
245 250 255
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
275 280 285
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350
Ala Leu Pro Pro Arg
355

<210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 53
Arg Ala Ala Ala
1

<210> 54
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
<400> 54
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 55
<211> 742
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"
<400> 55
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile
35 40 45
Ser His Tyr Tyr Trp Ser Trp Phe Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
65 70 75 80
Ser Leu Lys Ser Arg Val Ala Met Ser Val Asp Thr Pro Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Ser Leu Asn Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Thr Gly Trp Ser Glu Trp Asn Ser Asp
115 120 125
Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala
130 135 140
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
145 150 155 160
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
165 170 175

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
180 185 190
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
195 200 205
Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
210 215 220
Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
225 230 235 240
Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
245 250 255
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
260 265 270
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
275 280 285
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
290 295 300
Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
305 310 315 320
Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
325 330 335
His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe
340 345 350
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr
355 360 365
Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
370 375 380
Pro Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His
385 390 395 400
Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile
405 410 415
Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His
420 425 430
Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val
435 440 445
Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln
450 455 460
Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu
465 470 475 480
Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn

485 490 495
Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu
500 505 510
Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys
515 520 525
Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys
530 535 540
Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln
545 550 555 560
Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr
565 570 575
Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro
580 585 590
Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu
595 600 605
Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val
610 615 620
Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala
625 630 635 640
Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys
645 650 655
Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly
660 665 670
Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly
675 680 685
His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly
690 695 700
Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile
705 710 715 720
Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu
725 730 735
Gly Ile Gly Leu Phe Met
740

<210> 56
<211> 742
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 56

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

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

595 600 605

Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val
610 615 620

Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala
625 630 635 640

Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys
645 650 655

Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly
660 665 670

Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly
675 680 685

His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly
690 695 700

Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile
705 710 715 720

Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu
725 730 735

Gly Ile Gly Leu Phe Met
740

<210> 57
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 57

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asp Tyr Thr Arg Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Ala Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
130 135 140

Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145 150 155 160

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
165 170 175

Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
180 185 190

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
210 215 220

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225 230 235 240

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
245 250 255

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
275 280 285

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350

Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys
355 360 365

Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val
370 375 380

Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile
385 390 395 400

Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser
405 410 415
Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser
420 425 430
Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser
435 440 445
Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys
450 455 460
Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu
465 470 475 480
Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly
485 490 495
Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn
500 505 510
Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp
515 520 525
Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn
530 535 540
Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser
545 550 555 560
Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala
565 570 575
Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val
580 585 590
Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn
595 600 605
Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile
610 615 620
Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr
625 630 635 640
Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly
645 650 655
Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn
660 665 670
Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys
675 680 685
His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys
690 695 700
Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly

705 710 715 720
Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
725 730 735

<210> 58
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 58
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gly Arg Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Lys Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125
Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
130 135 140
Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145 150 155 160
Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
165 170 175
Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
180 185 190
Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205
Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro

210 215 220
Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225 230 235 240
Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
245 250 255
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
275 280 285
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350
Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys
355 360 365
Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val
370 375 380
Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile
385 390 395 400
Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser
405 410 415
Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser
420 425 430
Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser
435 440 445
Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys
450 455 460
Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu
465 470 475 480
Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly
485 490 495
Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn
500 505 510
Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp
515 520 525

Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn
530 535 540
Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser
545 550 555 560
Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala
565 570 575
Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val
580 585 590
Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn
595 600 605
Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile
610 615 620
Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr
625 630 635 640
Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly
645 650 655
Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn
660 665 670
Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys
675 680 685
His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys
690 695 700
Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly
705 710 715 720
Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
725 730 735

<210> 59
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 59
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Lys Ile Arg His Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Pro
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110
Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Asn Lys Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125
Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
130 135 140
Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
145 150 155 160
Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
165 170 175
Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
180 185 190
Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205
Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
210 215 220
Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225 230 235 240
Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
245 250 255
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
275 280 285
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln

340 345 350

Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys

355 360 365

Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val

370 375 380

Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile

385 390 395 400

Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser

405 410 415

Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser

420 425 430

Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser

435 440 445

Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys

450 455 460

Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu

465 470 475 480

Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly

485 490 495

Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn

500 505 510

Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp

515 520 525

Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn

530 535 540

Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser

545 550 555 560

Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala

565 570 575

Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val

580 585 590

Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn

595 600 605

Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile

610 615 620

Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr

625 630 635 640

Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly

645 650 655

Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn
660 665 670
Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys
675 680 685
His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys
690 695 700
Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly
705 710 715 720
Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
725 730 735

<210> 60
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 60

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

Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
165 170 175
Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
180 185 190
Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205
Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
210 215 220
Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225 230 235 240
Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
245 250 255
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
260 265 270
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
275 280 285
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe
290 295 300
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly
305 310 315 320
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln
325 330 335
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln
340 345 350
Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys
355 360 365
Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val
370 375 380
Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile
385 390 395 400
Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser
405 410 415
Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser
420 425 430
Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser
435 440 445
Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys
450 455 460
Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu

465 470 475 480
Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly
485 490 495
Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn
500 505 510
Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp
515 520 525
Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn
530 535 540
Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser
545 550 555 560
Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala
565 570 575
Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val
580 585 590
Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn
595 600 605
Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile
610 615 620
Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr
625 630 635 640
Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly
645 650 655
Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn
660 665 670
Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys
675 680 685
His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys
690 695 700
Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly
705 710 715 720
Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
725 730 735

<210> 61
<211> 1089
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"
<400> 61
atgggctggt cttgtattat cttgtttctc gtcgcaactg ctacaggcgt tcattctgaa 60
gttcaactcc aagaatctgg tcctggcctg gtgaaacctt ccgaaactct ctcactcacc 120
tgtaccgtct caggcgcttc aatatcacac tattattggt cttggttccg gcaacctgca 180
ggcaaaggtc tcgaatggat aggcagaata tatcccagtg gaagcacctc ctataatccc 240
tctctcaagt caagagttgc aatgagcgtt gacacaccca agaaccaatt ctccctcaag 300
ctgtcatctg taactgccgc cgatactgcc gtttactact gcgctagaga tagatcaacc 360
ggatggtcag aatggaattc agatctgtgg ggacggggaa ccctcgtgac cgtatcttct 420
cgggcggccg caattgaagt tatgtatcct cctccttacc tagacaatga gaagagcaat 480
ggaaccatta tccatgtgaa agggaaacac ctttgtccaa gtcccctatt tcccggacct 540
tctaagccct tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 600
gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt 660
gactacatga acatgactcc ccgccgcccc gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat 720
gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccagagtga agttcagcag gagcgcagac 780
gccccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 840
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 900
agaaggaaga accctcagga aggcctgttc aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 960
gccttcagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 1020
ttccagggtc tcagtacagc caccaaggac accttcgacg cccttcacat gcaggccctg 1080
ccccctcgc 1089
<210> 62
<211> 1074
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"
<400> 62
atggaactgg gactgtcttg ggtgttcctg gtcgctatat tggaaggagt acagtgccag 60
gtccagctcg tcgagtccgg gggtggcctg gtgcagcccg gcggcagcct ccggctgagc 120
tgcacagcct cagggtttac attcagcagg tactggatga gttgggttag gcaagccccct 180
ggcaaaggcc tggagtgggt ggccaaaatc cgacatgatg ggggcgaaaa gtactatgtg 240
gatagtgtga agggacggtt cacaatatca cgagacaatg ccaaaaactc tttgtacctg 300
caaatgaact ccctgcgcgc cgaagacaca gctgtgtact actgcgctac agactacact 360
agggacgtct ggggtcaagg aacagccgtc accgtgagta gtcgggcggc cgcaattgaa 420
gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480

aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540
ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600
attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660
ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720
gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag 780
ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840
gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900
gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960
atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020
gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg ctaa 1074

<210> 63
<211> 1071
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"
<400> 63

atggagctgg gattgtcctg ggttttcctg gtggctatac tcgaaggcgt acagtgtgaa 60
gtgcagttgg tggagagtgg cggtggcctg gcccagccgg gaggctcttt gagactctcc 120
tgcgctgcct ccggcttcac tttctcccgc tattggatga cctgggtccg gcaggcgccc 180
ggcggacgcc tggagtgggt ggctaagatc aagtatgatg gatcagaaaa atattacgca 240
gatagcgtaa aaggccggtt cacaatatcc agggataatg caaaaaactc cctgtatctg 300
cagatggata gcctgcgcgc tgaagacacc gccgtatatt attgcacaag agactacaat 360
aaagattact ggggccaggg aaccctggtt acggtgagct cacgggcggc cgcaattgaa 420
gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480
aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540
ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600
attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660
ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720
gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag 780
ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840
gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900
gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960
atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020
gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg c 1071

<210> 64
<211> 1071

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"
<400> 64
atggagctgg ggctttcttg ggtgtttctg gtagccatcc tcgagggagt ccagtgcgag 60
gtccagctcg tcgaatctgg cgggggggctg gtccagcctg gcggttctct ccgcctgacc 120
tgtgcggcct cagggttcac tttcagccgg tactggatga catgggtgag acaggccccc 180
ggcaagggac tggaatgggt agcaaagatt aggcacgacg gcggtgagaa atactatccc 240
gacagtgtca aggggcggtt tactgtctcc cgagataatg ccaaaaactc actctacctg 300
cagatggata atctgcgagc ggaggatact gctatgtact actgtactcg agactacaac 360
aaggacctgt gggggcaggg gacactggtg acggttagtt ctcgggcggc cgcaattgaa 420
gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480
aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540
ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600
attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660
ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720
gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780
ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840
gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900
gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960
atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020
gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg c 1071
<210> 65
<211> 1071
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"
<400> 65
atggaactgg gactgtcatg ggtctttctc gtggccattc tcgaggggt ccagtgtgag 60
gttcagctgg tggagagcgg gggggtctg gttcagccag gtggcagtct taggttgtca 120
tgtgccgcga gcgggttcac gttctcacga tattggatga cctgggttcg ccaggcacca 180
gggaaggggc tggagtgggt cgccaagatc aggcacgacg gcggagaaaa atattacgcg 240
gattccgtga aaggcagatt cacaatctct agggataacg ccaaaaattc cctttatctt 300

cagatgaata gcctgagggc tgaagacact gccgtgtact actgcacgcg ggattacaac 360
aaagattatt ggggccaggg aacactggtg accgtcagct ctcgggcggc cgcaattgaa 420
gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480
aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540
ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600
attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660
ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720
gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780
ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840
gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900
gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960
atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020
gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccctcg c 1071

<210> 66
<211> 2226
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"
<400> 66

atgggctggt cttgtattat cttgtttctc gtcgcaactg ctacaggcgt tcattctgaa 60
gttcaactcc aagaatctgg tcctggcctg gtgaaacctt ccgaaactct ctcactcacc 120
tgtaccgtct caggcgcttc aatatcacac tattattggt cttggttccg gcaacctgca 180
ggcaaaggtc tcgaatggat aggcagaata tatcccagtg gaagcacctc ctataatccc 240
tctctcaagt caagagttgc aatgagcgtt gacacaccca agaaccaatt ctccctcaag 300
ctgtcatctg taactgccgc cgatactgcc gtttactact gcgctagaga tagatcaacc 360
ggatggtcag aatggaattc agatctgtgg ggacggggaa ccctcgtgac cgtatcttct 420
cgggcggccg caattgaagt tatgtatcct cctccttacc tagacaatga gaagagcaat 480
ggaaccatta tccatgtgaa agggaaacac ctttgtccaa gtcccctatt tcccggacct 540
tctaagccct tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 600
gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt 660
gactacatga acatgactcc ccgccgcccc gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat 720
gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccagagtga agttcagcag gagcgcagac 780
gcccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 840
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 900
agaaggaaga accctcagga aggcctgttc aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 960
gccttcagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 1020

ttccagggtc tcagtacagc caccaaggac accttcgacg cccttcacat gcaggccctg 1080
ccccctcgcg gaagcggagc tactaacttc agcctgctga agcaggctgg agacgtggag 1140
gagaaccctg gacccatgct tctcctggtg acaagccttc tgctctgtga gttaccacac 1200
ccagcattcc tcctgatccc acgcaaagtg tgtaacggaa taggtattgg tgaatttaaa 1260
gactcactct ccataaatgc tacgaatatt aaacacttca aaaactgcac ctccatcagt 1320
ggcgatctcc acatcctgcc ggtggcattt aggggtgact ccttcacaca tactcctcct 1380
ctggacccac aggaactgga tattctgaaa accgtaaagg aaatcacagg gtttttgctg 1440
attcaggctt ggcctgaaaa caggacggac ctccatgcct ttgagaacct agaaatcata 1500
cgcggcagga ccaagcaaca tggtcagttt tctcttgcag tcgtcagcct gaacataaca 1560
tccttgggat tacgctccct caaggagata agtgatggag atgtgataat ttcaggaaac 1620
aaaaatttgt gctatgcaaa tacaataaac tggaaaaaac tgtttgggac ctccggtcag 1680
aaaaccaaaa ttataagcaa cagaggtgaa aacagctgca aggccacagg ccaggtctgc 1740
catgccttgt gctcccccga gggctgctgg ggcccggagc ccagggactg cgtctcttgc 1800
cggaatgtca gccgaggcag ggaatgcgtg gacaagtgca accttctgga gggtgagcca 1860
agggagtttg tggagaactc tgagtgcata cagtgccacc cagagtgcct gcctcaggcc 1920
atgaacatca cctgcacagg acggggacca gacaactgta tccagtgtgc ccactacatt 1980
gacggccccc actgcgtcaa gacctgcccg gcaggagtca tgggagaaaa caacaccctg 2040
gtctggaagt acgcagacgc cggccatgtg tgccacctgt gccatccaaa ctgcacctac 2100
ggatgcactg ggccaggtct tgaaggctgt cccacgaatg ggcctaagat cccgtccatc 2160
gccactggga tggtgggggc cctcctcttg ctgctggtgg tggccctggg gatcggcctc 2220
ttcatg 2226

<210> 67
<211> 2205
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"
<400> 67

atggaactgg gactgtcttg ggtgttcctg gtcgctatat tggaaggagt acagtgccag 60
gtccagctcg tcgagtccgg gggtggcctg gtgcagcccg gcggcagcct ccggctgagc 120
tgcacagcct cagggtttac attcagcagg tactggatga gttgggttag gcaagccccc 180
ggcaaaggcc tggagtgggt ggccaaaatc cgacatgatg ggggcgaaaa gtactatgtg 240
gatagtgtga agggacggtt cacaatatca cgagacaatg ccaaaaactc tttgtacctg 300
caaatgaact ccctgcgcgc cgaagacaca gctgtgtact actgcgctac agactacact 360
agggacgtct ggggtcaagg aacagccgtc accgtgagta gtgcggccgc aattgaagtt 420
atgtatcctc ctccttacct agacaatgag aagagcaatg gaaccattat ccatgtgaaa 480
gggaaacacc tttgtccaag tcccctattt cccggacctt ctaagccctt ttgggtgctg 540

gtggtggttg gtggagtcct ggcttgctat agcttgctag taacagtggc ctttattatt 600
ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa catgactccc 660
cgccgccccg ggcccacccg caagcattac cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca 720
gcctatcgct ccagagtgaa gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc 780
cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac 840
aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa 900
ggcctgttca atgaactgca gaaagataag atggcggagg ccttcagtga gattgggatg 960
aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt tccagggtct cagtacagcc 1020
accaaggaca ccttcgacgc ccttcacatg caggccctgc cccctcgcgg aagcggagct 1080
actaacttca gcctgctgaa gcaggctgga gacgtggagg agaaccctgg acccatgctt 1140
ctcctggtga caagccttct gctctgtgag ttaccacacc cagcattcct cctgatccca 1200
cgcaaagtgt gtaacggaat aggtattggt gaatttaaag actcactctc cataaatgct 1260
acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc tccatcagtg gcgatctcca catcctgccg 1320
gtggcattta ggggtgactc cttcacacat actcctcctc tggacccaca ggaactggat 1380
attctgaaaa ccgtaaagga aatcacaggg tttttgctga ttcaggcttg gcctgaaaac 1440
aggacggacc tccatgcctt tgagaaccta gaaatcatac gcggcaggac caagcaacat 1500
ggtcagtttt ctcttgcagt cgtcagcctg aacataacat ccttgggatt acgctccctc 1560
aaggagataa gtgatggaga tgtgataatt tcaggaaaca aaaatttgtg ctatgcaaat 1620
acaataaact ggaaaaaact gtttgggacc tccggtcaga aaaccaaaat tataagcaac 1680
agaggtgaaa acagctgcaa ggccacaggc caggtctgcc atgccttgtg ctcccccgag 1740
ggctgctggg gcccggagcc cagggactgc gtctcttgcc ggaatgtcag ccgaggcagg 1800
gaatgcgtgg acaagtgcaa ccttctggag ggtgagccaa gggagtttgt ggagaactct 1860
gagtgcatac agtgccaccc agagtgcctg cctcaggcca tgaacatcac ctgcacagga 1920
cggggaccag acaactgtat ccagtgtgcc cactacattg acggccccca ctgcgtcaag 1980
acctgcccgg caggagtcat gggagaaaac aacaccctgg tctggaagta cgcagacgcc 2040
ggccatgtgt gccacctgtg ccatccaaac tgcacctacg gatgcactgg gccaggtctt 2100
gaaggctgtc ccacgaatgg gcctaagatc ccgtccatcg ccactgggat ggtgggggcc 2160
ctcctcttgc tgctggtggt ggccctgggg atcggcctct tcatg 2205

<210> 68
<211> 2208
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"
<400> 68

atggagctgg gattgtcctg ggttttcctg gtggctatac tcgaaggcgt acagtgtgaa 60
gtgcagttgg tggagagtgg cggtggcctg gcccagccgg gaggctcttt gagactctcc 120

tgcgctgcct ccggcttcac tttctcccgc tattggatga cctgggtccg gcaggcgccc 180
ggcggacgcc tggagtgggt ggctaagatc aagtatgatg gatcagaaaa atattacgca 240
gatagcgtaa aaggccggtt cacaatatcc agggataatg caaaaaactc cctgtatctg 300
cagatggata gcctgcgcgc tgaagacacc gccgtatatt attgcacaag agactacaat 360
aaagattact ggggccaggg aaccctggtt acggtgagct cacgggcggc cgcaattgaa 420
gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480
aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540
ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600
attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660
ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720
gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780
ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840
gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900
gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960
atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020
gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg cggaagcgga 1080
gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaaccc tggacccatg 1140
cttctcctgg tgacaagcct tctgctctgt gagttaccac acccagcatt cctcctgatc 1200
ccacgcaaag tgtgtaacgg aataggtatt ggtgaattta aagactcact ctccataaat 1260
gctacgaata ttaaacactt caaaaactgc acctccatca gtggcgatct ccacatcctg 1320
ccggtggcat ttaggggtga ctccttcaca catactcctc ctctggaccc acaggaactg 1380
gatattctga aaaccgtaaa ggaaatcaca gggtttttgc tgattcaggc ttggcctgaa 1440
aacaggacgg acctccatgc ctttgagaac ctagaaatca tacgcggcag gaccaagcaa 1500
catggtcagt tttctcttgc agtcgtcagc ctgaacataa catccttggg attacgctcc 1560
ctcaaggaga taagtgatgg agatgtgata atttcaggaa acaaaaattt gtgctatgca 1620
aatacaataa actggaaaaa actgtttggg acctccggtc agaaaaccaa aattataagc 1680
aacagaggtg aaaacagctg caaggccaca ggccaggtct gccatgcctt gtgctccccc 1740
gagggctgct ggggcccgga gcccagggac tgcgtctctt gccggaatgt cagccgaggc 1800
agggaatgcg tggacaagtg caaccttctg gagggtgagc caagggagtt tgtggagaac 1860
tctgagtgca tacagtgcca cccagagtgc ctgcctcagg ccatgaacat cacctgcaca 1920
ggacggggac cagacaactg tatccagtgt gcccactaca ttgacggccc ccactgcgtc 1980
aagacctgcc cggcaggagt catgggagaa aacaacaccc tggtctggaa gtacgcagac 2040
gccggccatg tgtgccacct gtgccatcca aactgcacct acggatgcac tgggccaggt 2100
cttgaaggct gtcccacgaa tgggcctaag atcccgtcca tcgccactgg gatggtgggg 2160
gccctcctct tgctgctggt ggtggccctg gggatcggcc tcttcatg 2208

<210> 69
<211> 2208
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"

<400> 69

atggagctgg ggctttcttg ggtgtttctg gtagccatcc tcgagggagt ccagtgcgag 60
gtccagctcg tcgaatctgg cgggggggctg gtccagcctg gcggttctct ccgcctgacc 120
tgtgcggcct cagggttcac tttcagccgg tactggatga catgggtgag acaggccccc 180
ggcaagggac tggaatgggt agcaaagatt aggcacgacg gcggtgagaa atactatccc 240
gacagtgtca aggggcggtt tactgtctcc cgagataatg ccaaaaactc actctacctg 300
cagatggata atctgcgagc ggaggatact gctatgtact actgtactcg agactacaac 360
aaggacctgt gggggcaggg gacactggtg acggttagtt ctcgggcggc cgcaattgaa 420
gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480
aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540
ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600
attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660
ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720
gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780
ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840
gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900
gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960
atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020
gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg cggaagcgga 1080
gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaaccc tggacccatg 1140
cttctcctgg tgacaagcct tctgctctgt gagttaccac acccagcatt cctcctgatc 1200
ccacgcaaag tgtgtaacgg aataggtatt ggtgaattta aagactcact ctccataaat 1260
gctacgaata ttaaacactt caaaaactgc acctccatca gtggcgatct ccacatcctg 1320
ccggtggcat ttaggggtga ctccttcaca catactcctc ctctggaccc acaggaactg 1380
gatattctga aaaccgtaaa ggaaatcaca gggtttttgc tgattcaggc ttggcctgaa 1440
aacaggacgg acctccatgc ctttgagaac ctagaaatca tacgcggcag gaccaagcaa 1500
catggtcagt tttctcttgc agtcgtcagc ctgaacataa catccttggg attacgctcc 1560
ctcaaggaga taagtgatgg agatgtgata atttcaggaa acaaaaattt gtgctatgca 1620
aatacaataa actggaaaaa actgtttggg acctccggtc agaaaaccaa aattataagc 1680
aacagaggtg aaaacagctg caaggccaca ggccaggtct gccatgcctt gtgctccccc 1740
gagggctgct ggggcccgga gcccagggac tgcgtctctt gccggaatgt cagccgaggc 1800
agggaatgcg tggacaagtg caaccttctg gagggtgagc caagggagtt tgtggagaac 1860
tctgagtgca tacagtgcca cccagagtgc ctgcctcagg ccatgaacat cacctgcaca 1920
ggacggggac cagacaactg tatccagtgt gcccactaca ttgacggccc ccactgcgtc 1980
aagacctgcc cggcaggagt catgggagaa aacaacaccc tggtctggaa gtacgcagac 2040

gccggccatg tgtgccacct gtgccatcca aactgcacct acggatgcac tgggccaggt 2100
cttgaaggct gtcccacgaa tgggcctaag atcccgtcca tcgccactgg gatggtgggg 2160
gccctcctct tgctgctggt ggtggccctg gggatcggcc tcttcatg 2208

<210> 70
<211> 2208
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"
<400> 70

atggaactgg gactgtcatg ggtctttctc gtggccattc tcgagggggt ccagtgtgag 60
gttcagctgg tggagagcgg gggggtctg gttcagccag gtggcagtct taggttgtca 120
tgtgccgcga gcgggttcac gttctcacga tattggatga cctgggttcg ccaggcacca 180
gggaaggggc tggagtgggt cgccaagatc aggcacgacg gcggagaaaa atattacgcg 240
gattccgtga aaggcagatt cacaatctct agggataacg ccaaaaattc cctttatctt 300
cagatgaata gcctgagggc tgaagacact gccgtgtact actgcacgcg ggattacaac 360
aaagattatt ggggccaggg aacactggtg accgtcagct ctcgggcggc cgcaattgaa 420
gttatgtatc ctcctcctta cctagacaat gagaagagca atggaaccat tatccatgtg 480
aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 540
ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600
attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660
ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720
gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag 780
ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 840
gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 900
gaaggcctgt tcaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggccttcag tgagattggg 960
atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc ttttccaggg tctcagtaca 1020
gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac atgcaggccc tgcccccctcg cggaagcgga 1080
gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaaccc tggacccatg 1140
cttctcctgg tgacaagcct tctgctctgt gagttaccac acccagcatt cctcctgatc 1200
ccacgcaaag tgtgtaacgg aataggtatt ggtgaattta aagactcact ctccataaat 1260
gctacgaata ttaaacactt caaaaactgc acctccatca gtggcgatct ccacatcctg 1320
ccggtggcat ttaggggtga ctccttcaca catactcctc ctctggaccc acaggaactg 1380
gatattctga aaaccgtaaa ggaaatcaca gggtttttgc tgattcaggc ttggcctgaa 1440
aacaggacgg acctccatgc ctttgagaac ctagaaatca tacgcggcag gaccaagcaa 1500
catggtcagt tttctcttgc agtcgtcagc ctgaacataa catccttggg attacgctcc 1560
ctcaaggaga taagtgatgg agatgtgata atttcaggaa acaaaaattt gtgctatgca 1620

aatacaataa actggaaaaa actgtttggg acctccggtc agaaaaccaa aattataagc 1680
aacagaggtg aaaacagctg caaggccaca ggccaggtct gccatgcctt gtgctccccc 1740
gagggctgct ggggcccgga gcccagggac tgcgtctctt gccggaatgt cagccgaggc 1800
agggaatgcg tggacaagtg caaccttctg gagggtgagc caagggagtt tgtggagaac 1860
tctgagtgca tacagtgcca cccagagtgc ctgcctcagg ccatgaacat cacctgcaca 1920
ggacggggac cagacaactg tatccagtgt gcccactaca ttgacggccc ccactgcgtc 1980
aagacctgcc cggcaggagt catgggagaa aacaacaccc tggtctggaa gtacgcagac 2040
gccggccatg tgtgccacct gtgccatcca aactgcacct acggatgcac tgggccaggt 2100
cttgaaggct gtcccacgaa tgggcctaag atcccgtcca tcgccactgg gatggtgggg 2160
gccctcctct tgctgctggt ggtggccctg gggatcggcc tcttcatg 2208

<210> 71
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<400> 71

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> 72
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"
<220>
<221> SITE
<222> (1)..(30)
<223> /注释="此序列可包含1-6个'Gly Gly Gly Gly Ser'
重复单元"
<400> 72
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> 73
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<400> 73
Arg Gly Asp Ser
1



图1A

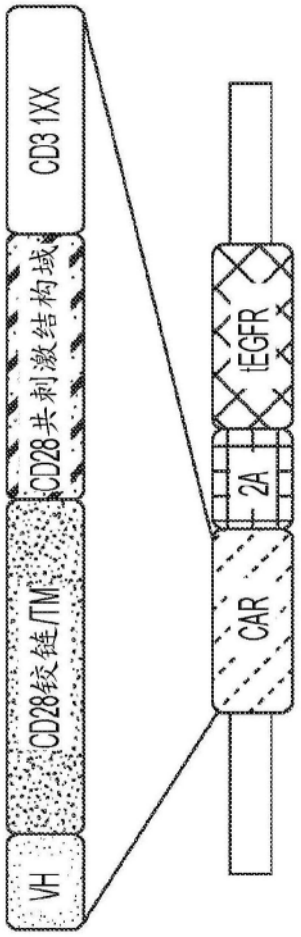

CD3 1XX
CD28共刺激结构域
CD28铰链/TM
VH
CAR
2A
tEGFR

图1B

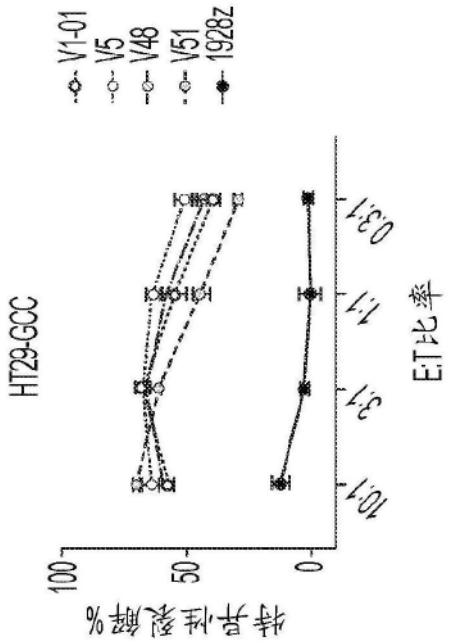

V1-01
V5
V48
V51
1928z
HT29-GCC
特异性裂解%
100
50
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图2A

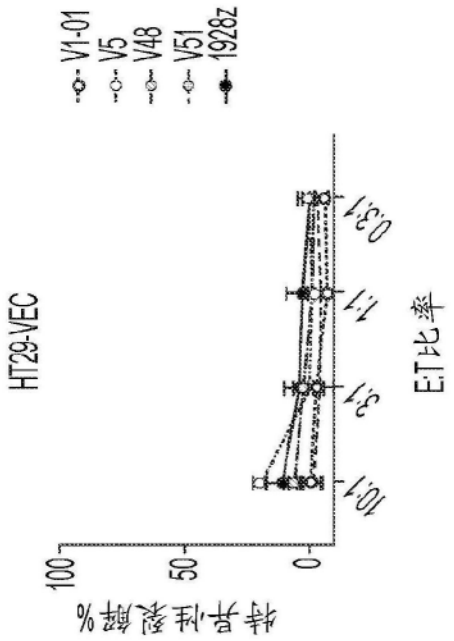

V1-01
V5
V48
V51
1928z
HT29-VEC
特异性裂解%
100
50
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图2B

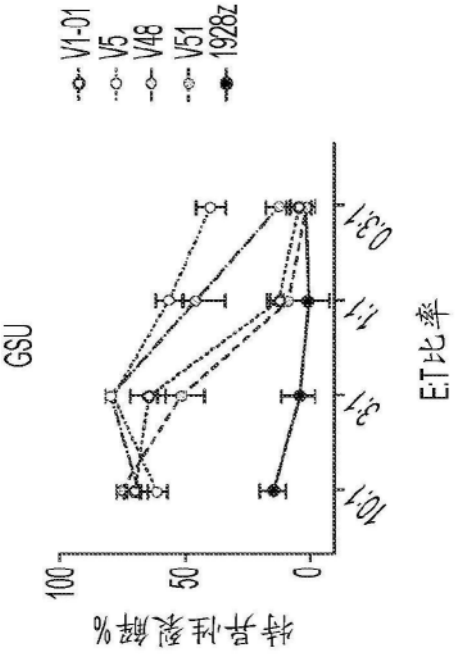

V1-01
V5
V48
V51
1928z
GSU
特异性裂解%
100
50
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图2C

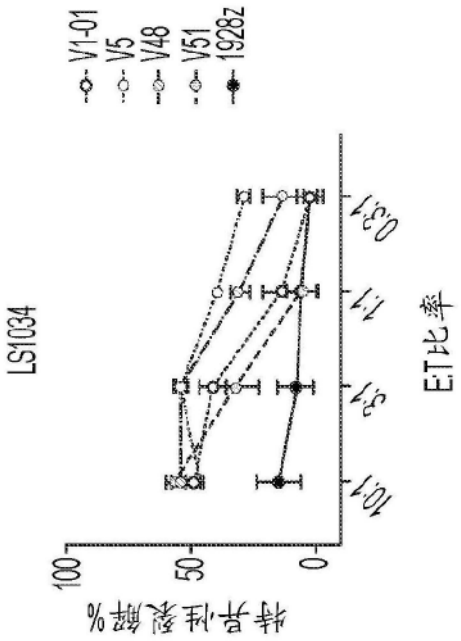

V1-01
V5
V48
V51
1928z
LS1034
特异性裂解%
100
50
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图2D

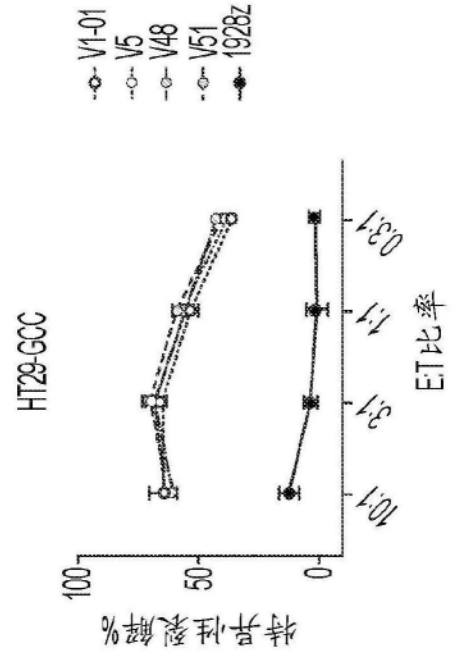

V1-01
V5
V48
V51
1928z
HT29-GCC
特异性裂解%
100
50
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图3A

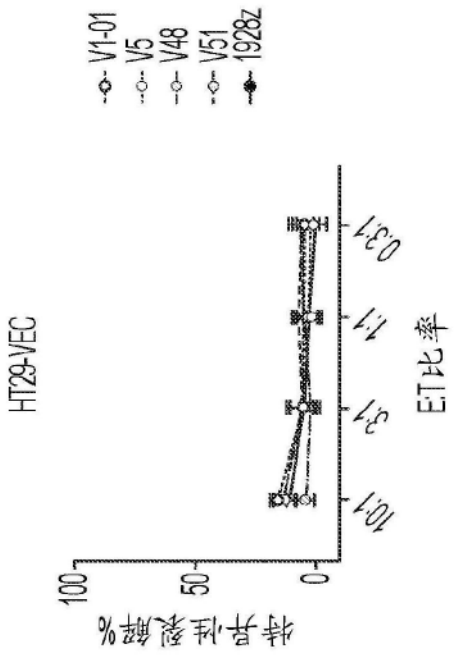

V1-01
V5
V48
V51
1928z
HT29-VEC
特异性裂解%
100
50
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图3B

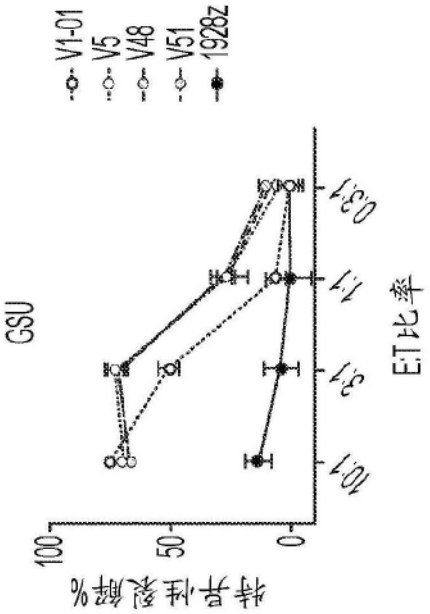

V1-01
V5
V48
V51
1928z
GSU
特异性裂解%
100
50
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图3C

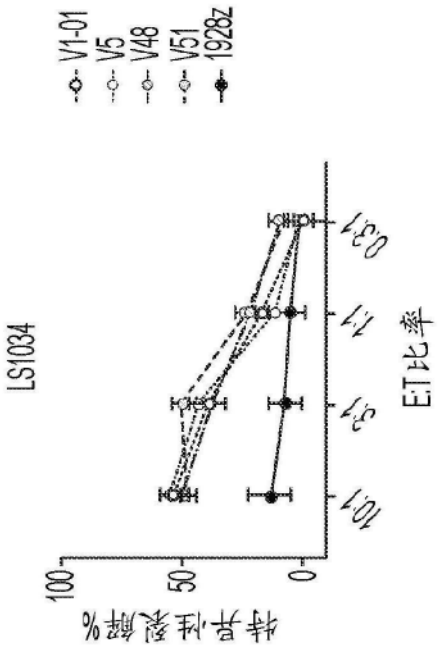

V1-01
V5
V48
V51
1928z
LS1034
特异性裂解%
100
50
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图3D

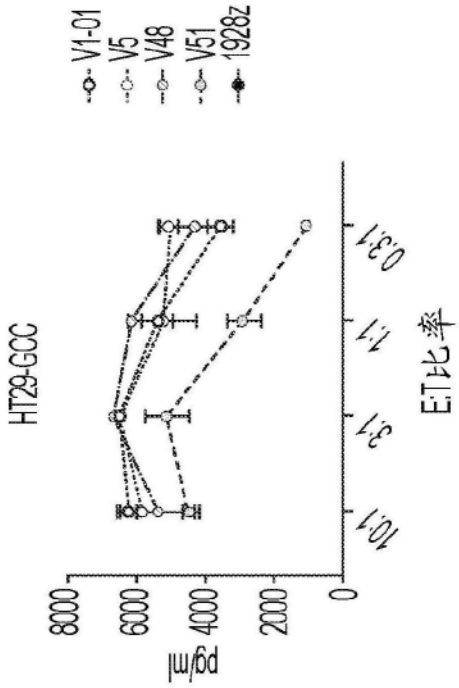

V1-01
V5
V48
V51
1928z
HT29-GCC
pg/ml
8000
6000
4000
2000
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图4A

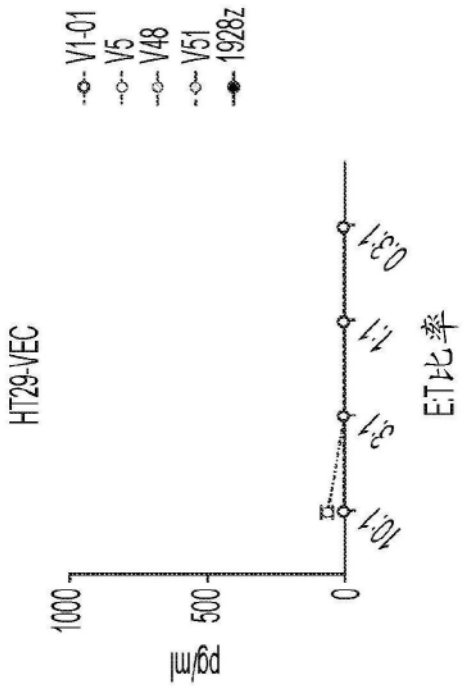

V1-01
V5
V48
V51
1928z
HT29-VEC
pg/ml
1000
500
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图4B

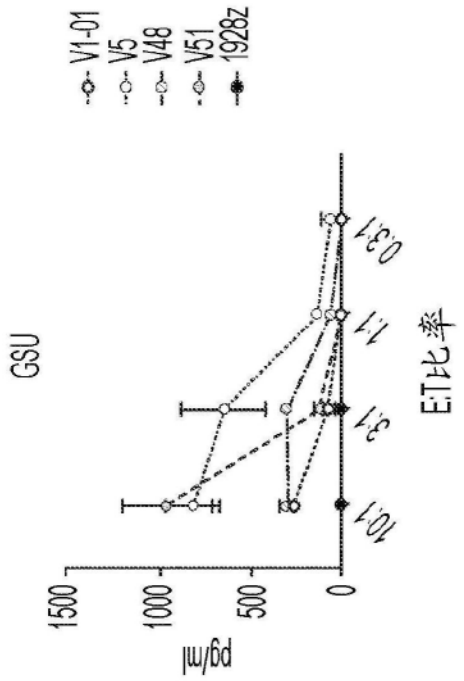

V1-01
V5
V48
V51
1928z
GSU
pg/ml
1500
1000
500
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图4C

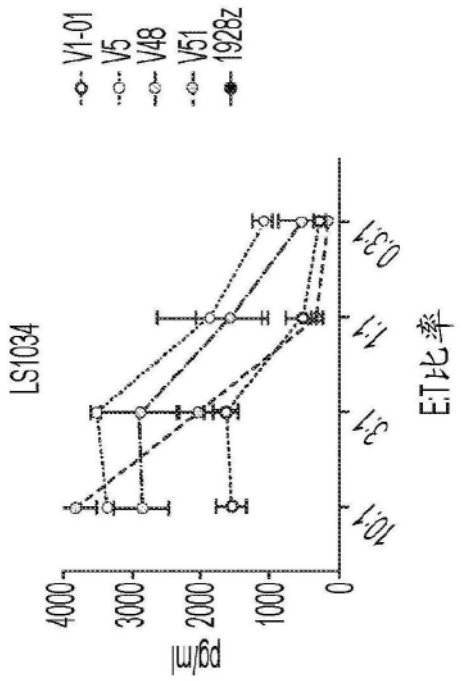

V1-01
V5
V48
V51
1928z
LS1034
pg/ml
4000
3000
2000
1000
0
0.3:1
1:1
3:1
10:1
E:T比率

图4D

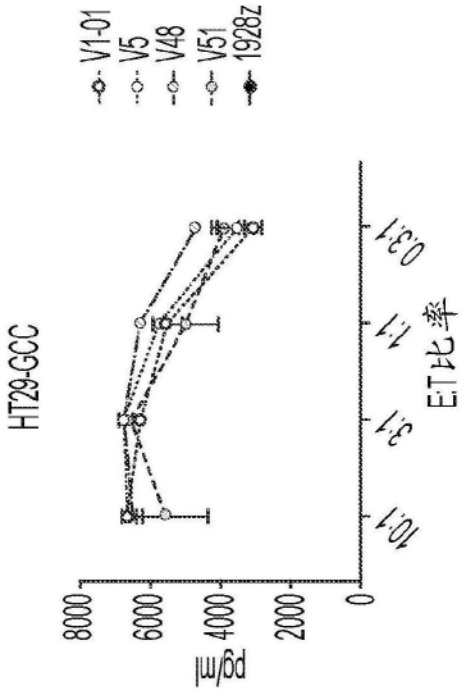

V1-01
V5
V48
V51
1928z
HT29-GCC
pg/ml
8000
6000
4000
2000
0
0.3:1
1:1
3:1
10:1
E:T比率

图5A

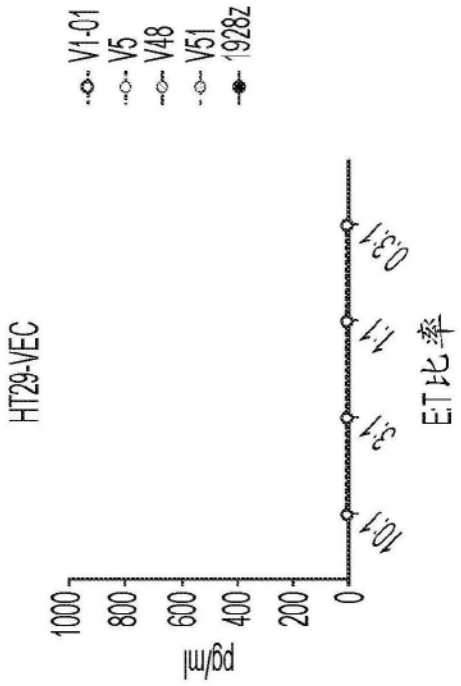

V1-01
V5
V48
V51
1928z
HT29-VEC
pg/ml
1000
800
600
400
200
0
0.3:1
1:1
3:1
10:1
E:T比率

图5B

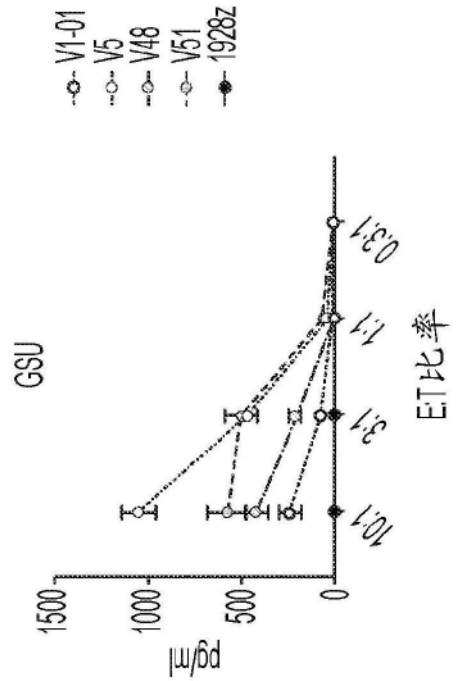

V1-01
V5
V48
V51
1928z
GSU
pg/ml
1500
1000
500
0
0.3:1
1:1
3:1
10:1
E:T比率

图5C

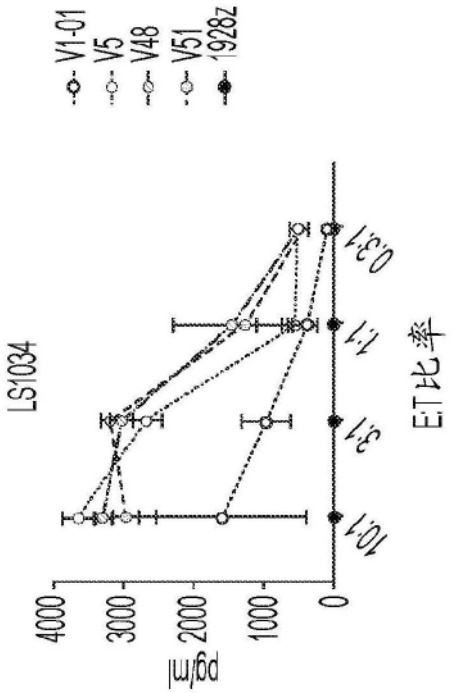

V1-01
V5
V48
V51
1928z
LS1034
pg/ml
4000
3000
2000
1000
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图5D

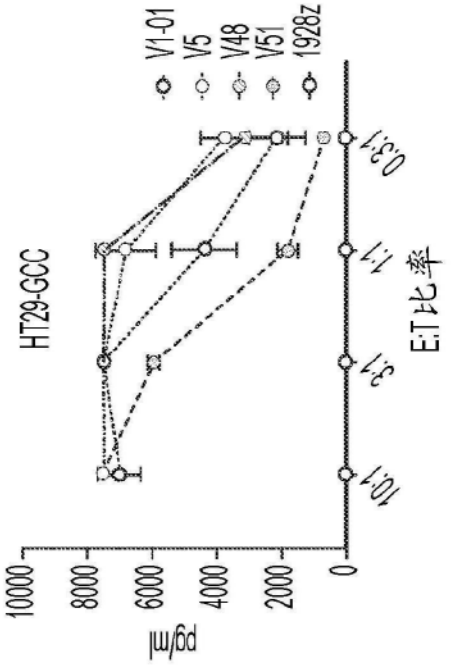

V1-01
V5
V48
V51
1928z
HT29-GCC
pg/ml
10000
8000
6000
4000
2000
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图6A

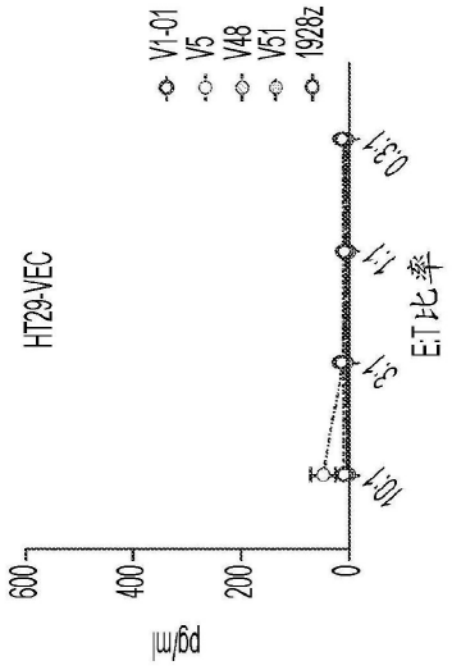

V1-01
V5
V48
V51
1928z
HT29-VEC
pg/ml
600
400
200
0
0.3:1
1:1
3:1
10:1
E:T比率

图6B

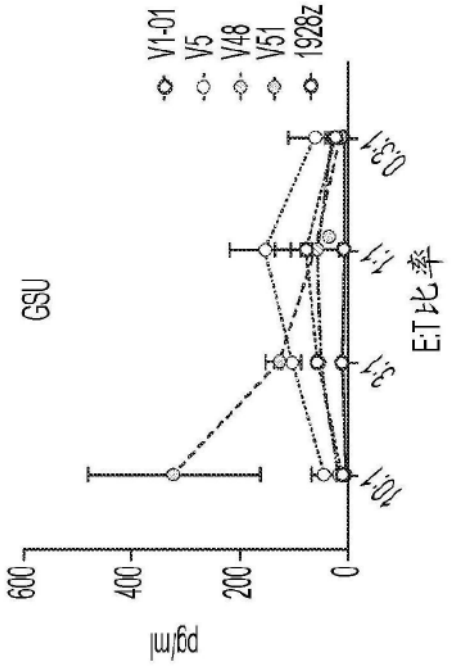

V1-01
V5
V48
V51
1928z
GSU
pg/ml
600
400
200
0
0.3:1
1:1
3:1
10:1
E:T比率

图6C

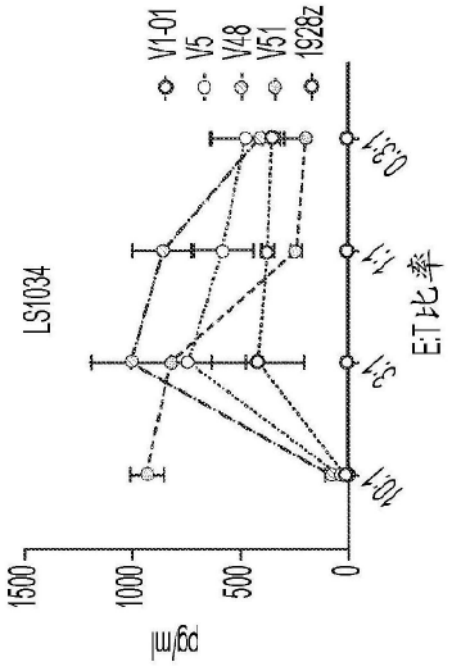

V1-01
V5
V48
V51
1928z
LS1034
pg/ml
1500
1000
500
0
0.3:1
1:1
3:1
10:1
E:T比率

图6D

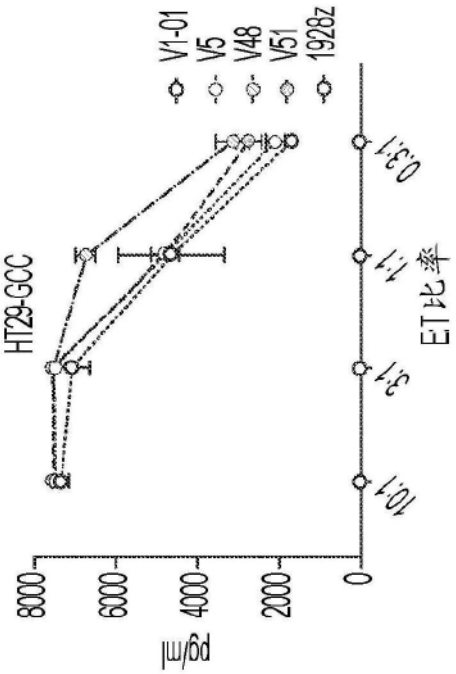

V1-01
V5
V48
V51
1928z
HT29-GCC
pg/ml
8000
6000
4000
2000
0
0.3:1
1:1
3:1
10:1
E:T比率

图7A

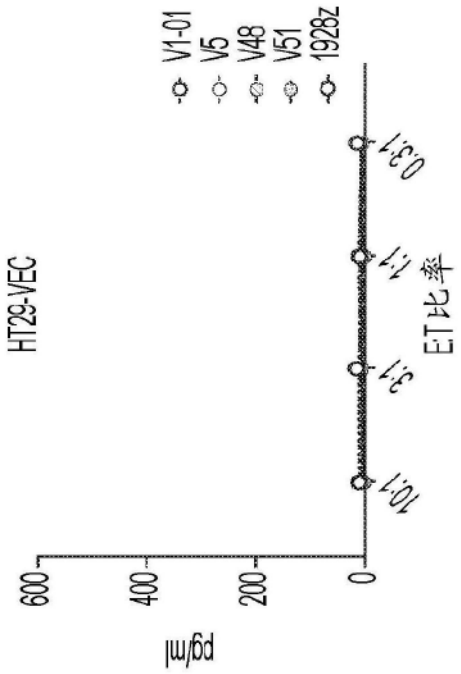

V1-01
V5
V48
V51
1928z
HT29-VEC
pg/ml
600
400
200
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图7B

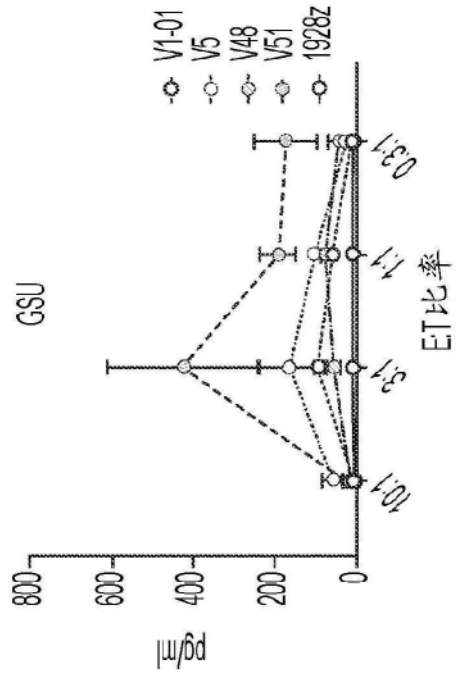

V1-01
V5
V48
V51
1928z
GSU
pg/ml
800
600
400
200
0
10:1
3:1
1:1
0.3:1
E:T比率

图7C

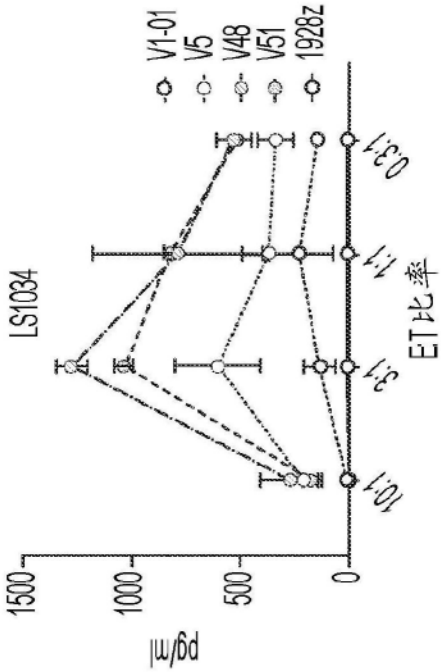

V1-01
V5
V48
V51
1928z
LS1034
pg/ml
1500
1000
500
0
0.3:1
1:1
3:1
10:1
E:T比率

图7D

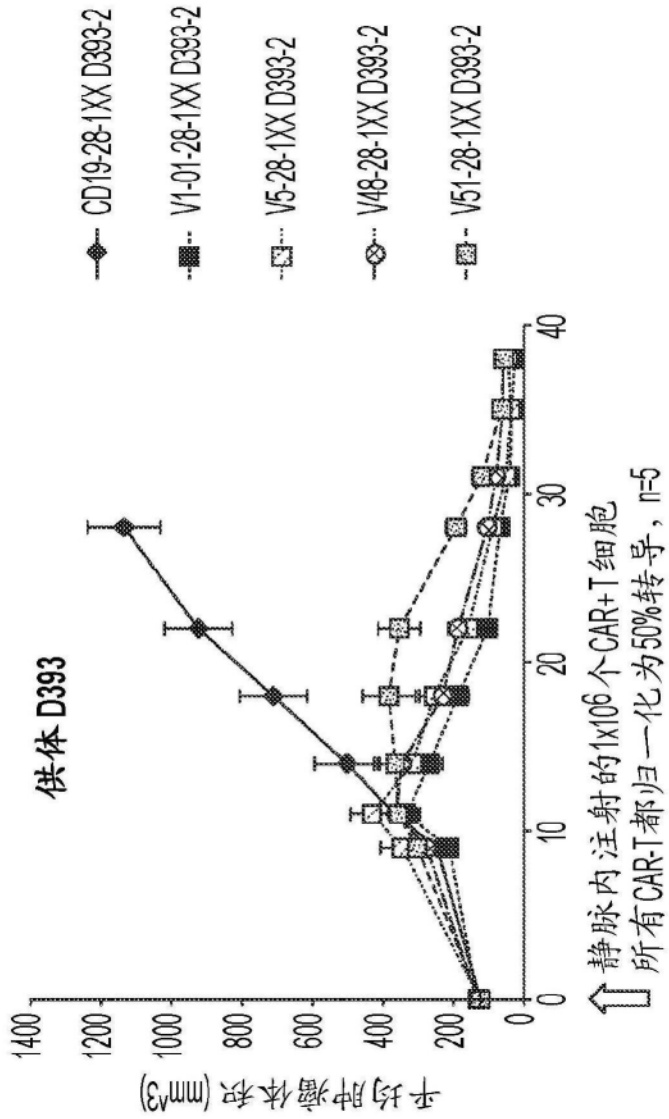

CD19-28-1XX D393-2
V1-01-28-1XX D393-2
V5-28-1XX D393-2
V48-28-1XX D393-2
V51-28-1XX D393-2
供体 D393
平均肿瘤体积 (mm^3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
静脉内注射的1x10^6个CAR+T细胞
所有CAR-T都归一化为50%转导，n=5

图8A

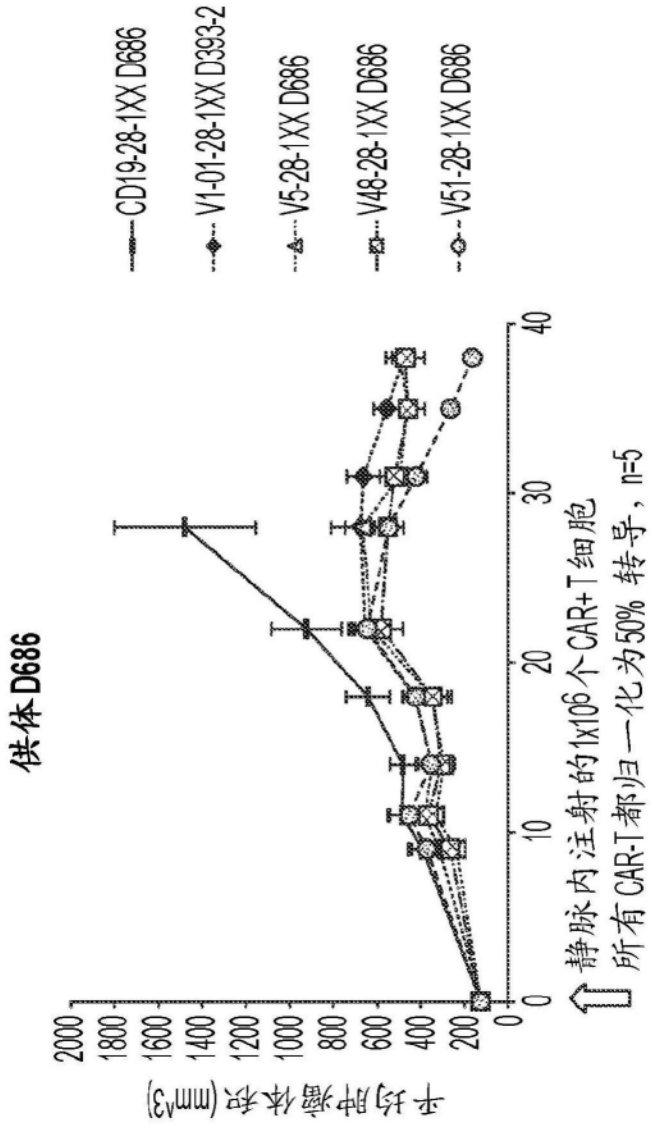

供体 D686
CD19-28-1XX D686
V1-01-28-1XX D393-2
V5-28-1XX D686
V48-28-1XX D686
V51-28-1XX D686
平均肿瘤体积 (mm^3)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
静脉内注射的1x10^6个CAR+T细胞
所有CAR-T都归一化为50% 转导，n=5

图8B

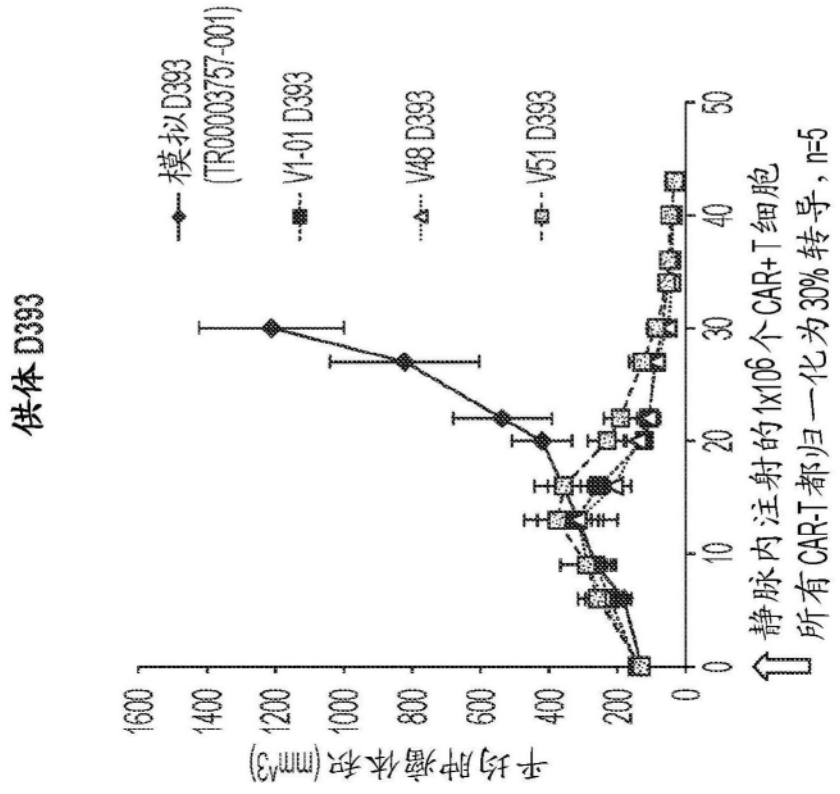

供体 D393
模拟 D393 (TR00003757-001)
V1-01 D393
V48 D393
V51 D393
平均肿瘤体积 (mm^3)
静脉内注射的1x10^6个 CAR+T细胞
所有 CAR-T都归一化为30%转导，n=5

图9A

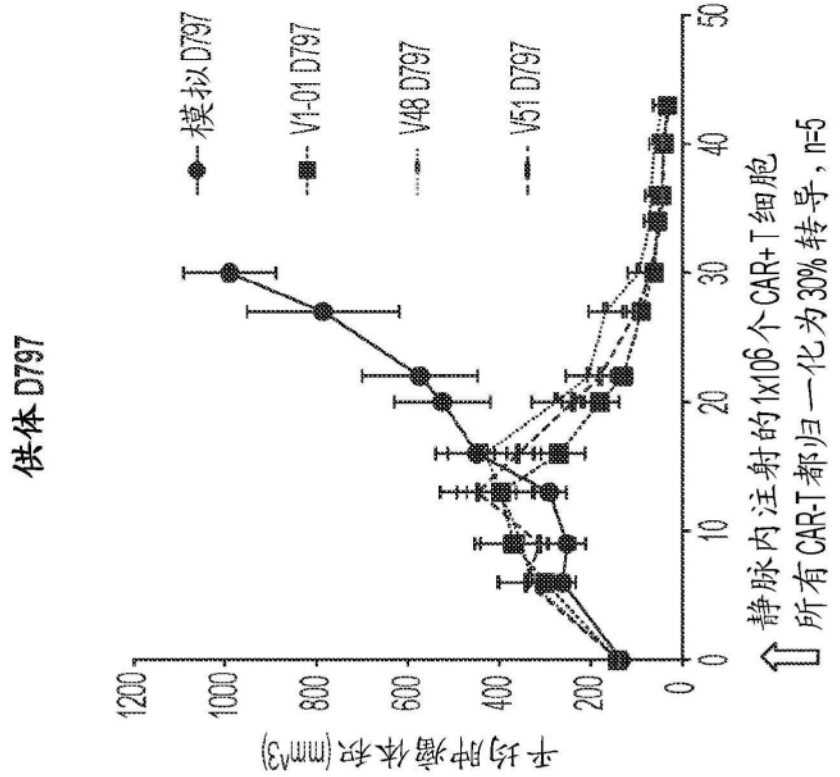

供体 D797
模拟 D797
V1-01 D797
V48 D797
V51 D797
平均肿瘤体积 (mm^3)
静脉内注射的1x10^6个 CAR+T细胞
所有 CAR-T都归一化为30%转导，n=5

图9B

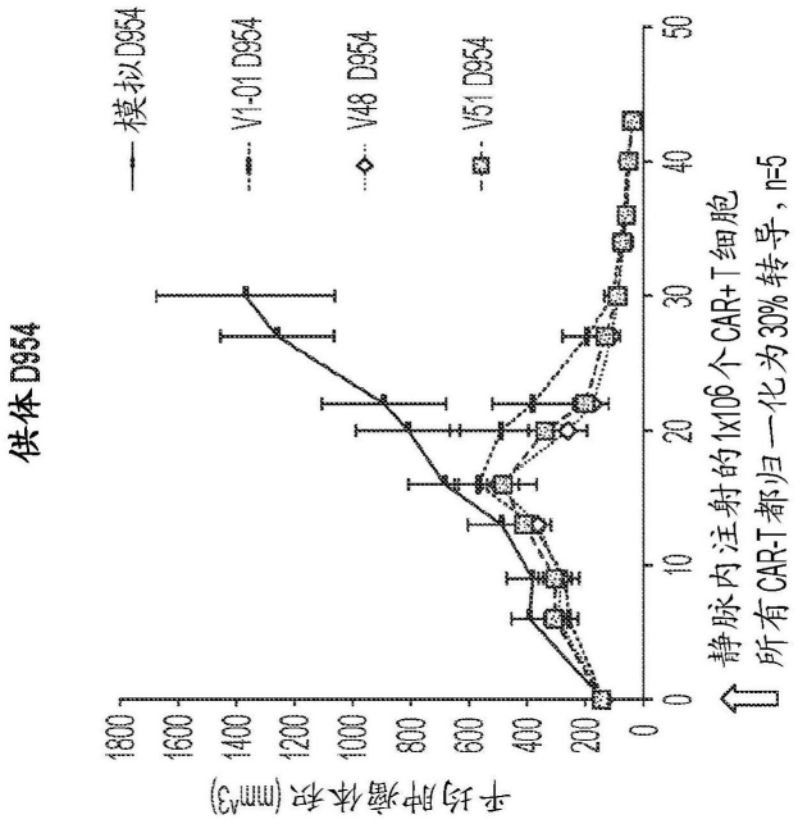

供体 D954
模拟 D954
V1-01 D954
V48 D954
V51 D954
平均肿瘤体积 (mm3)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的1x10^6个CAR+T细胞
所有CAR-T都归一化为30%转导，n=5

图9C

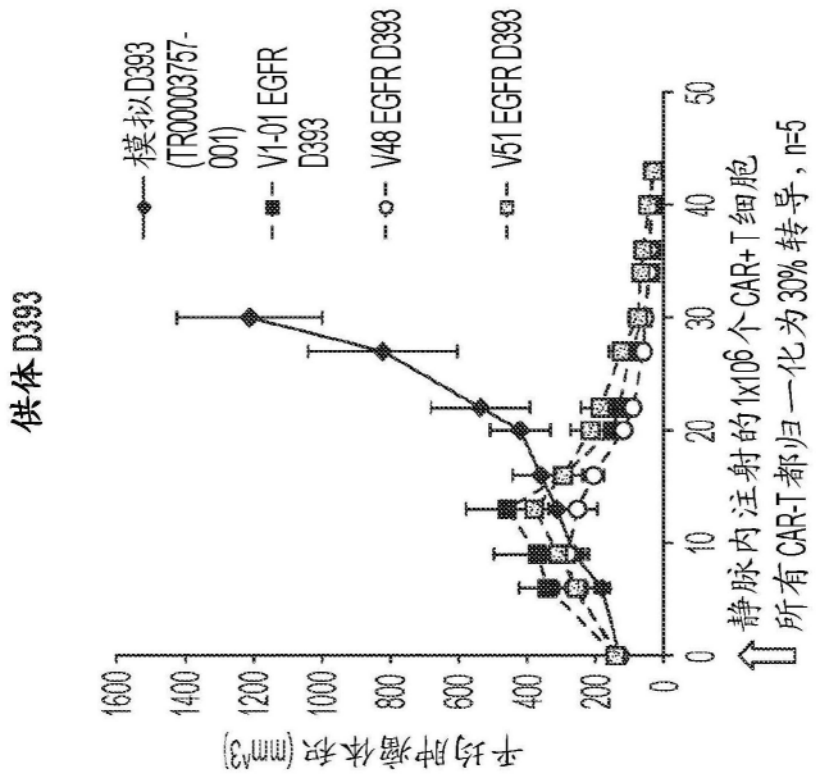

供体 D393
模拟 D393 (TR00003757-001)
V1-01 EGFR D393
V48 EGFR D393
V51 EGFR D393
平均肿瘤体积 (mm3)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的 1x10^6 个 CAR+T 细胞
所有 CAR-T 都归一化为 30% 转导，n=5

图10A

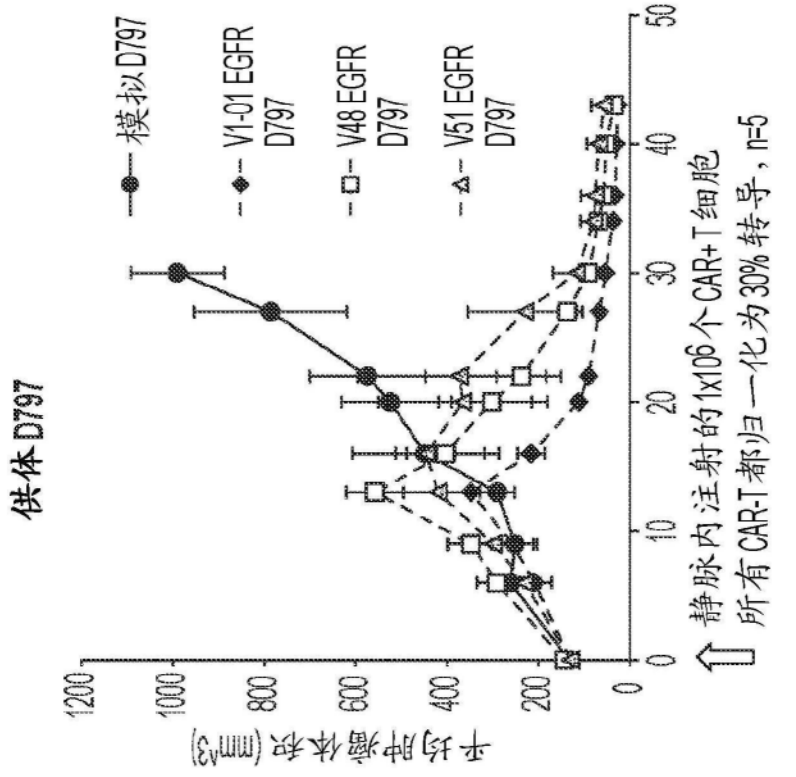

供体 D797
模拟 D797
V1-01 EGFR D797
V48 EGFR D797
V51 EGFR D797
平均肿瘤体积 (mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的 1x10^6 个 CAR+T 细胞
所有 CAR-T 都归一化为 30% 转导，n=5

图10B

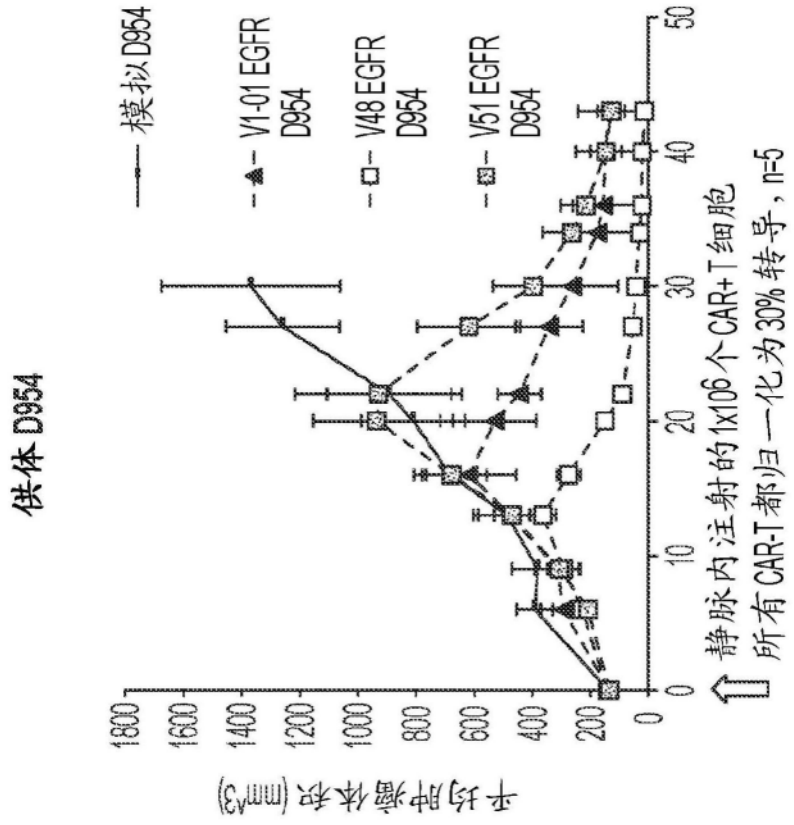

供体 D954
模拟 D954
V1-01 EGFR D954
V48 EGFR D954
V51 EGFR D954
平均肿瘤体积 (mm^3)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的1x10^6个 CAR+ T细胞
所有 CAR-T 都归一化为30% 转导，n=5

图10C

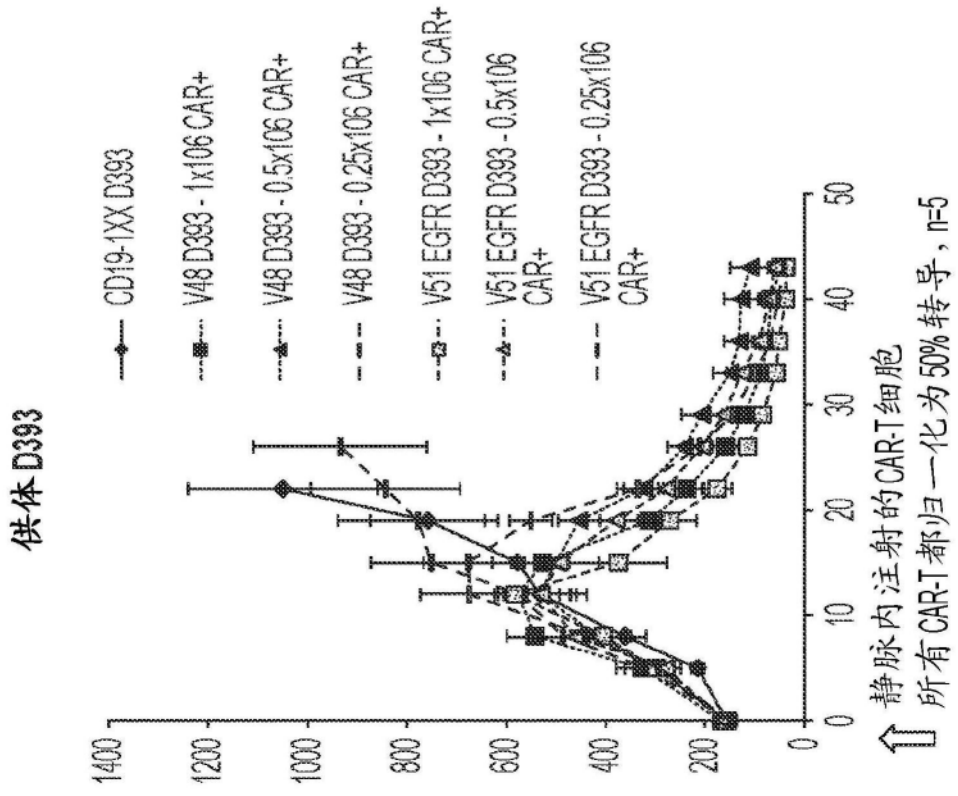

供体 D393
CD19-1XX D393
V48 D393 - 1x106 CAR+
V48 D393 - 0.5x106 CAR+
V48 D393 - 0.25x106 CAR+
V51 EGFR D393 - 1x106 CAR+
V51 EGFR D393 - 0.5x106 CAR+
V51 EGFR D393 - 0.25x106 CAR+
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的CAR-T细胞
所有CAR-T都归一化为50%转导，n=5

图11A

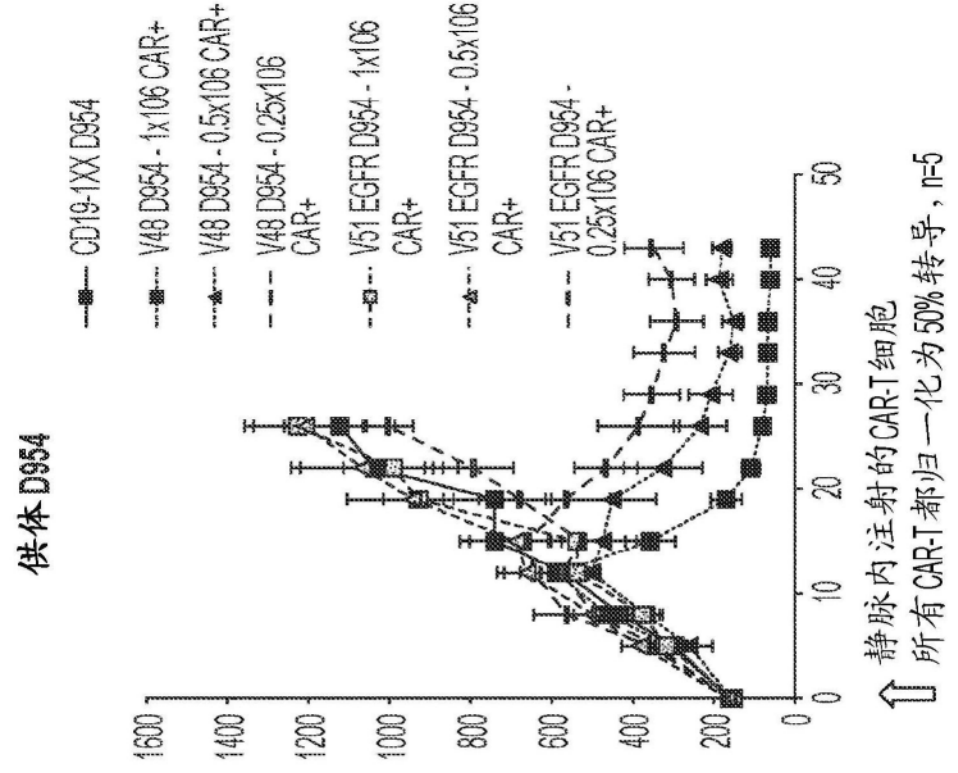

供体 D954
CD19-1XX D954
V48 D954 - 1x106 CAR+
V48 D954 - 0.5x106 CAR+
V48 D954 - 0.25x106 CAR+
V51 EGFR D954 - 1x106 CAR+
V51 EGFR D954 - 0.5x106 CAR+
V51 EGFR D954 - 0.25x106 CAR+
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的CAR-T细胞
所有CAR-T都归一化为50%转导，n=5

图11B

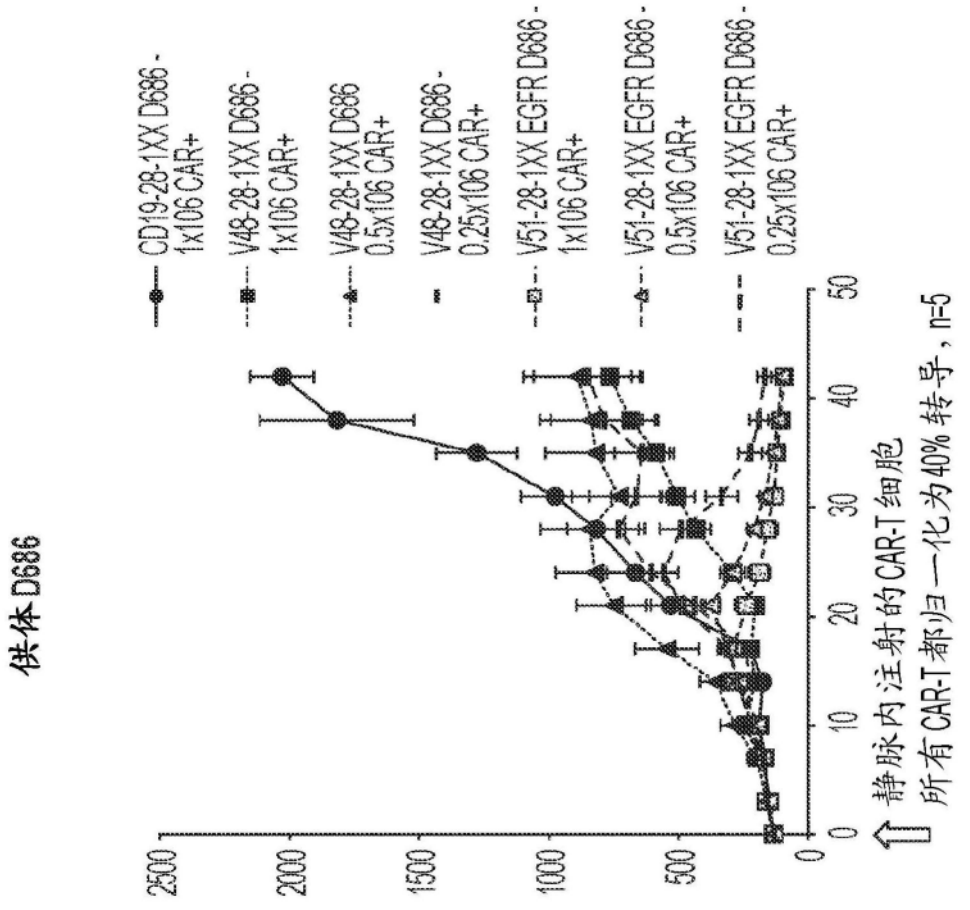

供体D686
CD19-28-1XX D686 - 1x106 CAR+
V48-28-1XX D686 - 1x106 CAR+
V48-28-1XX D686 0.5x106 CAR+
V48-28-1XX D686 - 0.25x106 CAR+
V51-28-1XX EGFR D686 - 1x106 CAR+
V51-28-1XX EGFR D686 - 0.5x106 CAR+
V51-28-1XX EGFR D686 - 0.25x106 CAR+
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的CAR-T细胞
所有CAR-T都归一化为40%转导，n=5

图11C

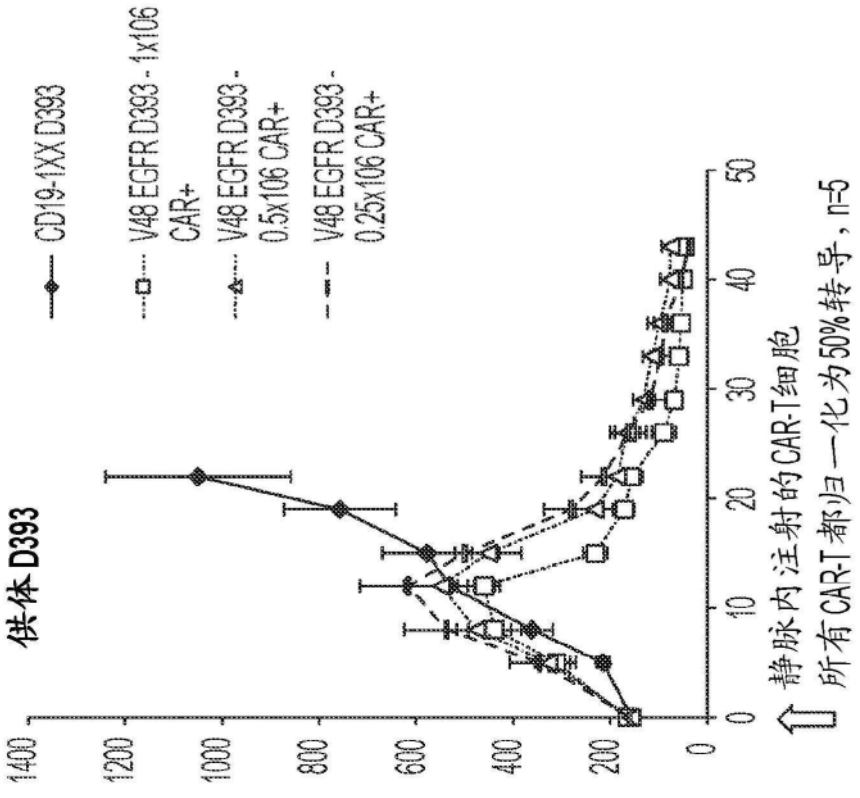

供体 D393
CD19-1XX D393
V48 EGFR D393 - 1x106 CAR+
V48 EGFR D393 - 0.5x106 CAR+
V48 EGFR D393 - 0.25x106 CAR+
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的CAR-T细胞
所有CAR-T都归一化为50%转导，n=5

图12A

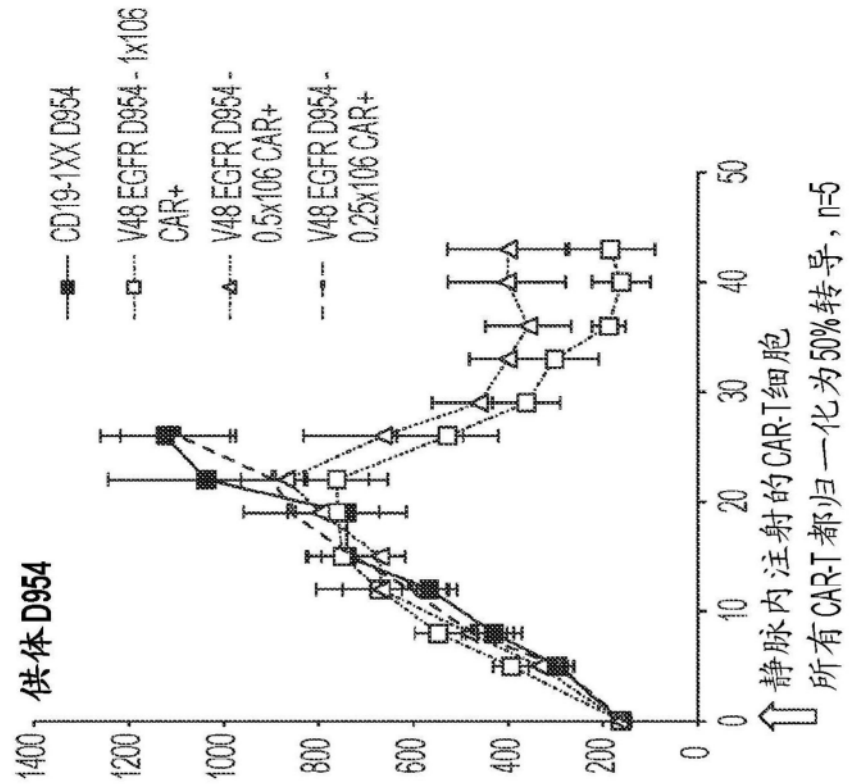

供体 D954
CD19-1XX D954
V48 EGFR D954 - 1x106 CAR+
V48 EGFR D954 - 0.5x106 CAR+
V48 EGFR D954 - 0.25x106 CAR+
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的CAR-T细胞
所有CAR-T都归一化为50%转导，n=5

图12B

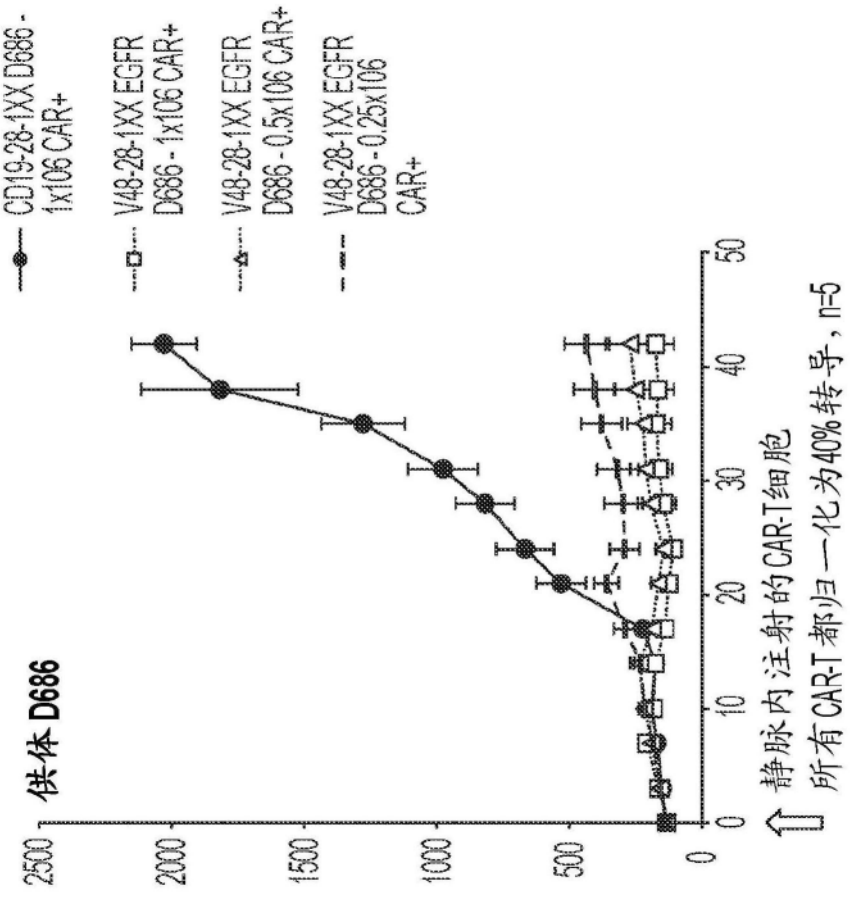

CD19-28-1XX D686 - 1x106 CAR+
V48-28-1XX EGFR D686 - 1x106 CAR+
V48-28-1XX EGFR D686 - 0.5x106 CAR+
V48-28-1XX EGFR D686 - 0.25x106 CAR+
供体 D686
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的CAR-T细胞
所有CAR-T都归一化为40%转导，n=5

图12C

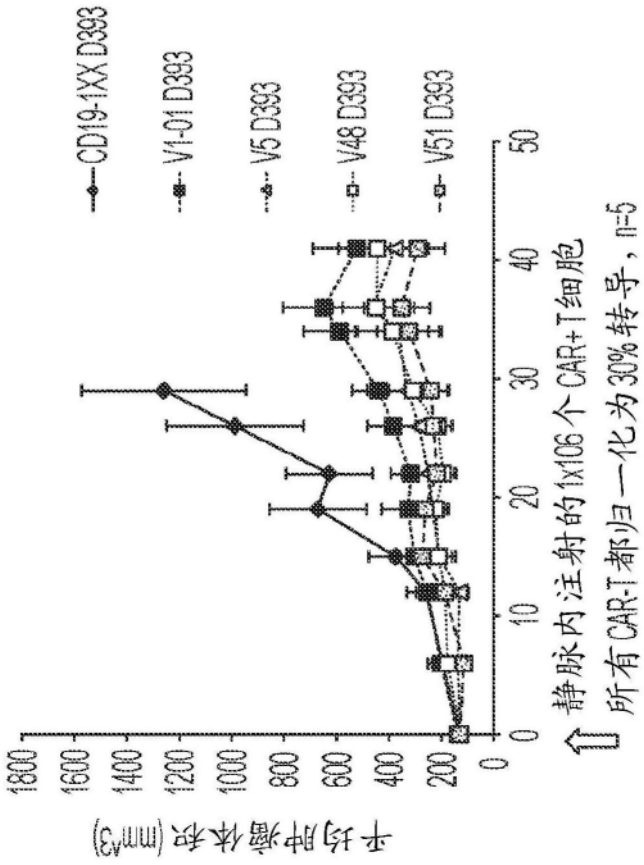

CD19-1XX D393
V1-01 D393
V5 D393
V48 D393
V51 D393
平均肿瘤体积 (mm^3)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的1x106个CAR+T细胞
所有CAR-T都归一化为30%转导，n=5

图13A

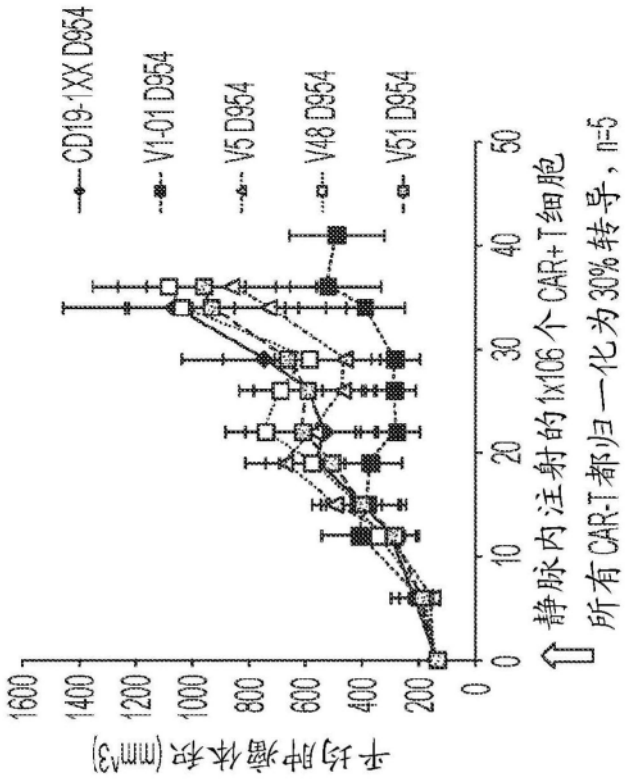

CD19-1XX D954
V1-01 D954
V5 D954
V48 D954
V51 D954
平均肿瘤体积(mm^3)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的1x106个CAR+T细胞
所有CAR-T都归一化为30%转导，n=5

图13B

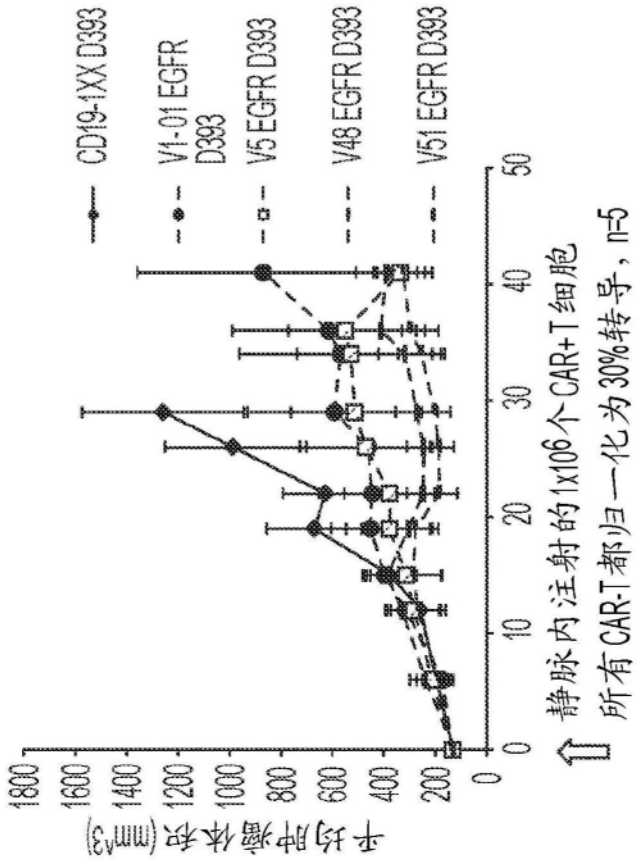

CD19-1XX D393
V1-01 EGFR D393
V5 EGFR D393
V48 EGFR D393
V51 EGFR D393
平均肿瘤体积 (mm3)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的1x10^6个CAR+T细胞
所有CAR-T都归一化为30%转导，n=5

图14A

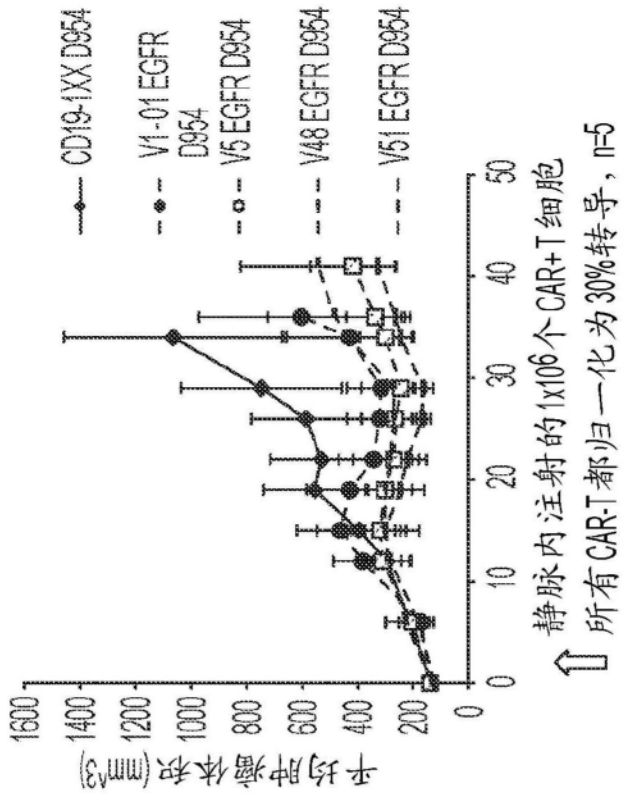

CD19-1XX D954
V1-01 EGFR D954
V5 EGFR D954
V48 EGFR D954
V51 EGFR D954
平均肿瘤体积(mm3)
静脉内注射的1x106个CAR+T细胞
所有CAR-T都归一化为30%转导，n=5

图14B

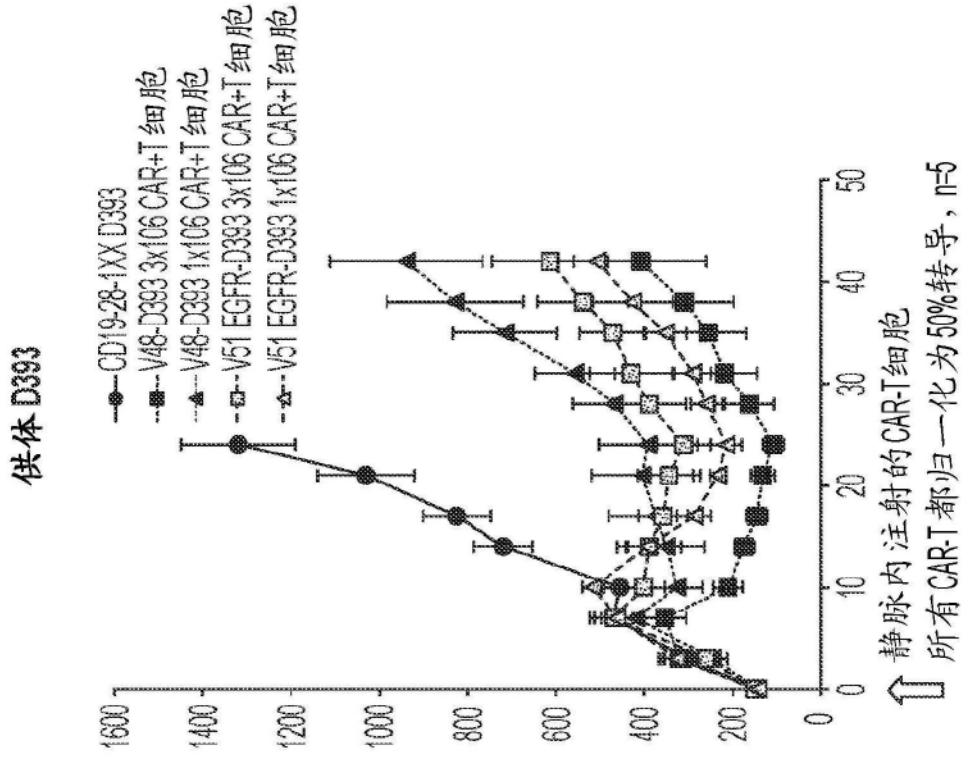

供体 D393
CD19-28-1XX D393
V48-D393 3x106 CAR+T细胞
V48-D393 1x106 CAR+T细胞
V51 EGFR-D393 3x106 CAR+T细胞
V51 EGFR-D393 1x106 CAR+T细胞
静脉内注射的CAR-T细胞
所有CAR-T都归一化为50%转导，n=5

图15A

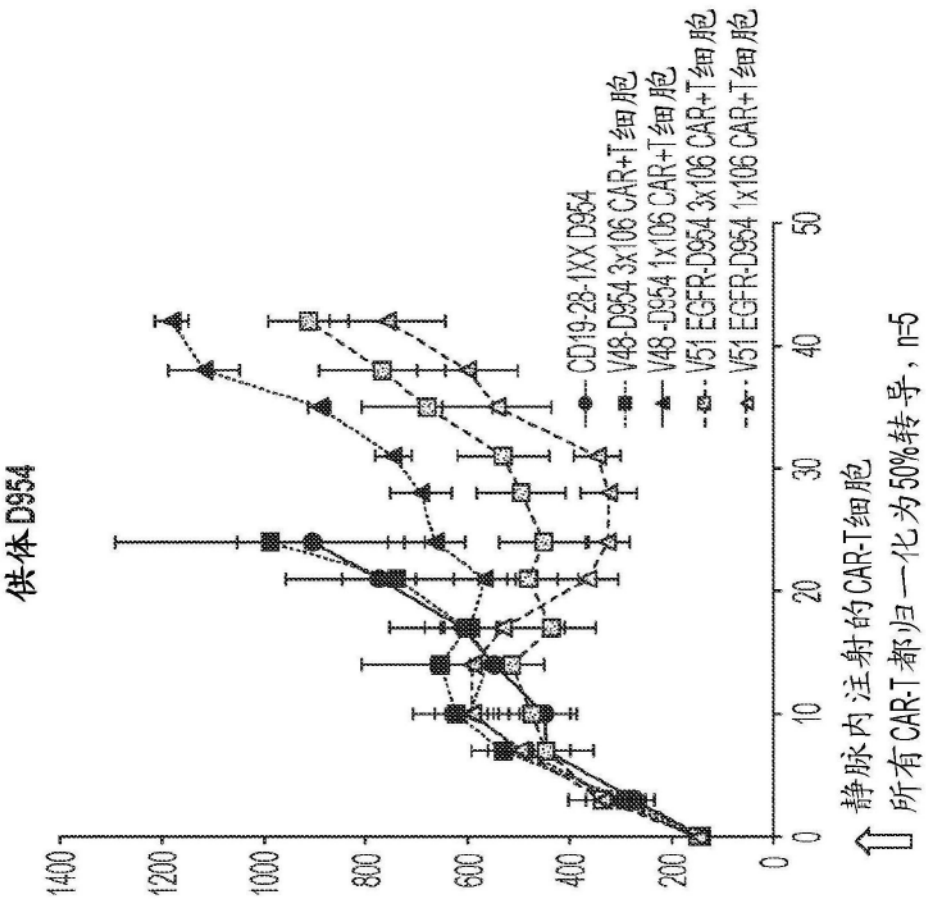

供体 D954
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
CD19-28-1XX D954
V48-D954 3x106 CAR+T细胞
V48 -D954 1x106 CAR+T细胞
V51 EGFR-D954 3x106 CAR+T细胞
V51 EGFR-D954 1x106 CAR+T细胞
静脉内注射的CAR-T细胞
所有CAR-T都归一化为50%转导，n=5

图15B

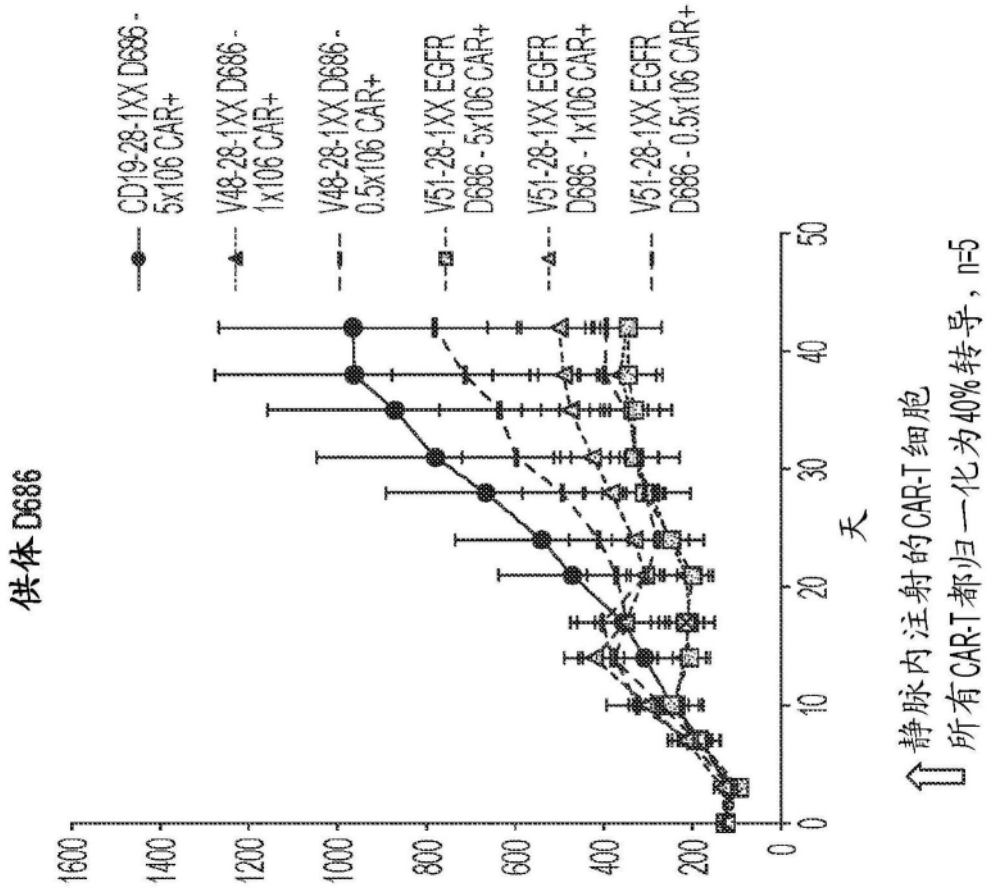

供体 D686
CD19-28-1XX D686 - 5x106 CAR+
V48-28-1XX D686 - 1x106 CAR+
V48-28-1XX D686 - 0.5x106 CAR+
V51-28-1XX EGFR D686 - 5x106 CAR+
V51-28-1XX EGFR D686 - 1x106 CAR+
V51-28-1XX EGFR D686 - 0.5x106 CAR+
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
天
静脉内注射的CAR-T细胞
所有CAR-T都归一化为40%转导，n=5

图15C

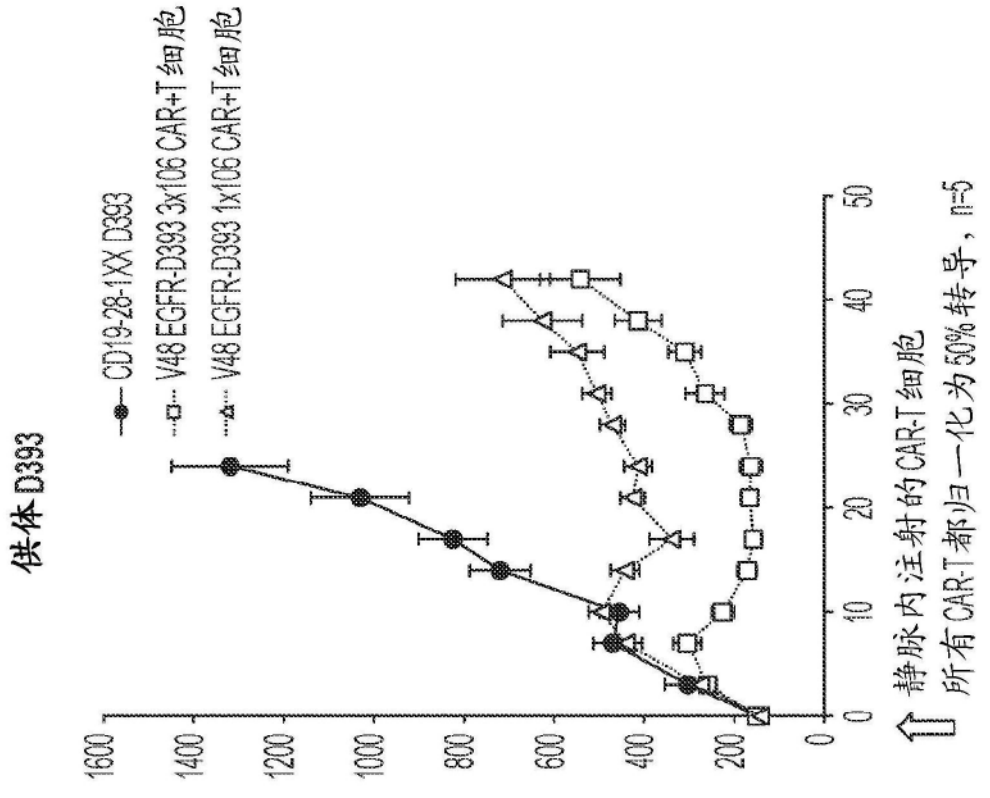

供体 D393
CD19-28-1XX D393
V48 EGFR-D393 3x106 CAR+T 细胞
V48 EGFR-D393 1x106 CAR+T 细胞
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的 CAR-T 细胞
所有 CAR-T 都归一化为 50% 转导，n=5

图16A

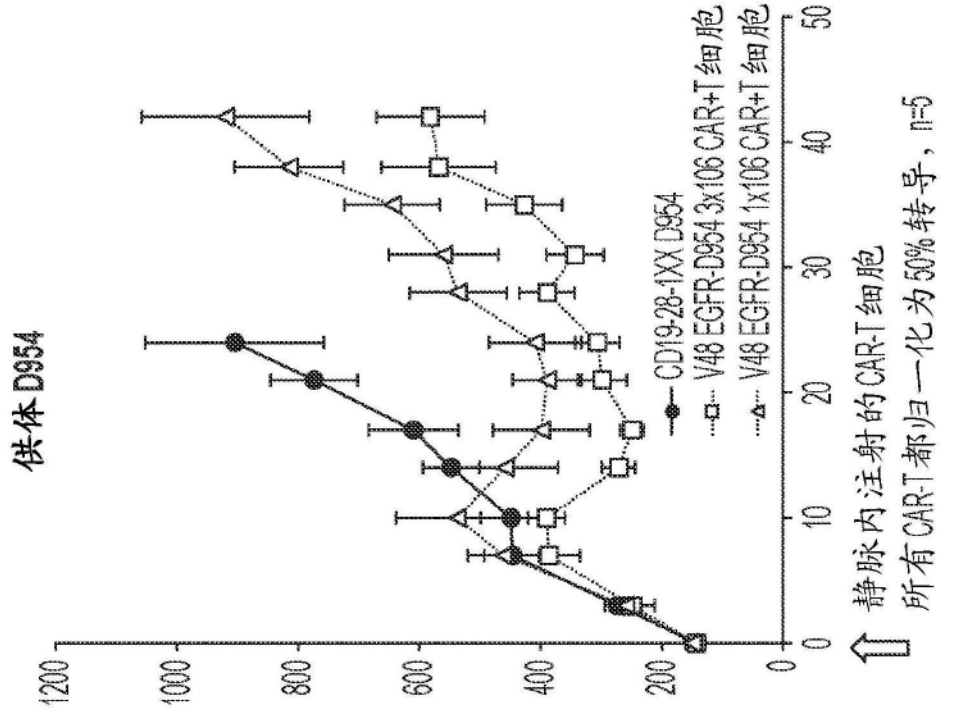

供体 D954
CD19-28-1XX D954
V48 EGFR-D954 3x106 CAR+T 细胞
V48 EGFR-D954 1x106 CAR+T 细胞
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
静脉内注射的 CAR-T 细胞
所有 CAR-T 都归一化为 50% 转导，n=5

图16B

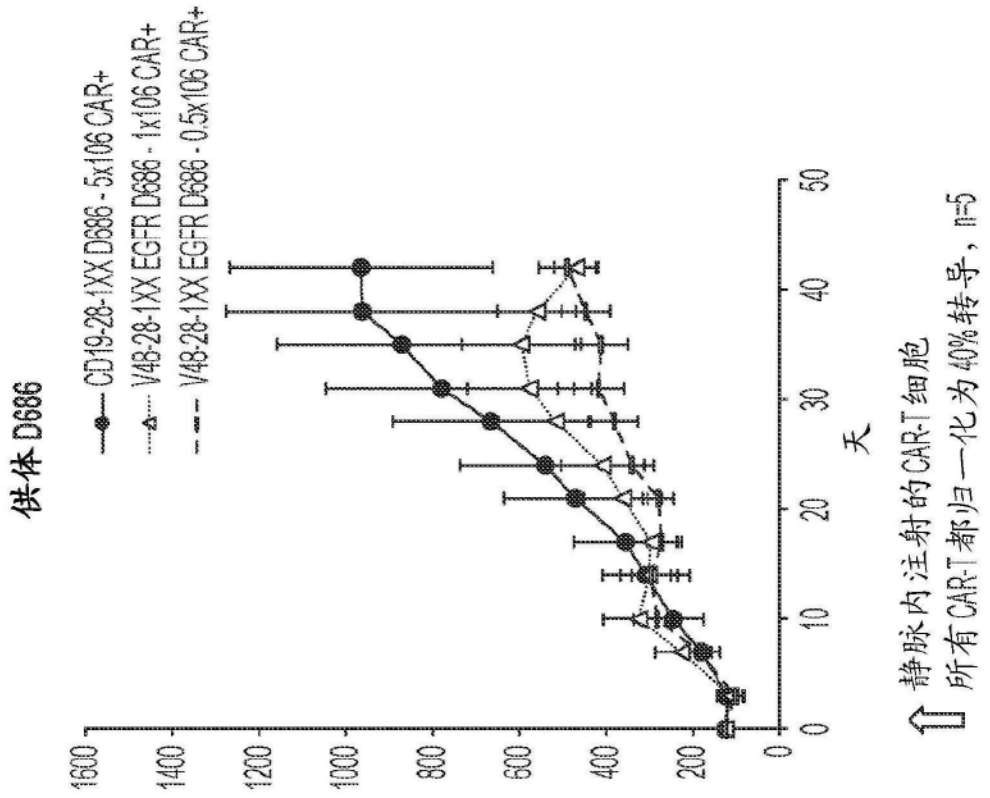

供体 D686
CD19-28-1XX D686 - 5x106 CAR+
V48-28-1XX EGFR D686 - 1x106 CAR+
V48-28-1XX EGFR D686 - 0.5x106 CAR+
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
天
静脉内注射的CAR-T细胞
所有CAR-T都归一化为40%转导，n=5

图16C

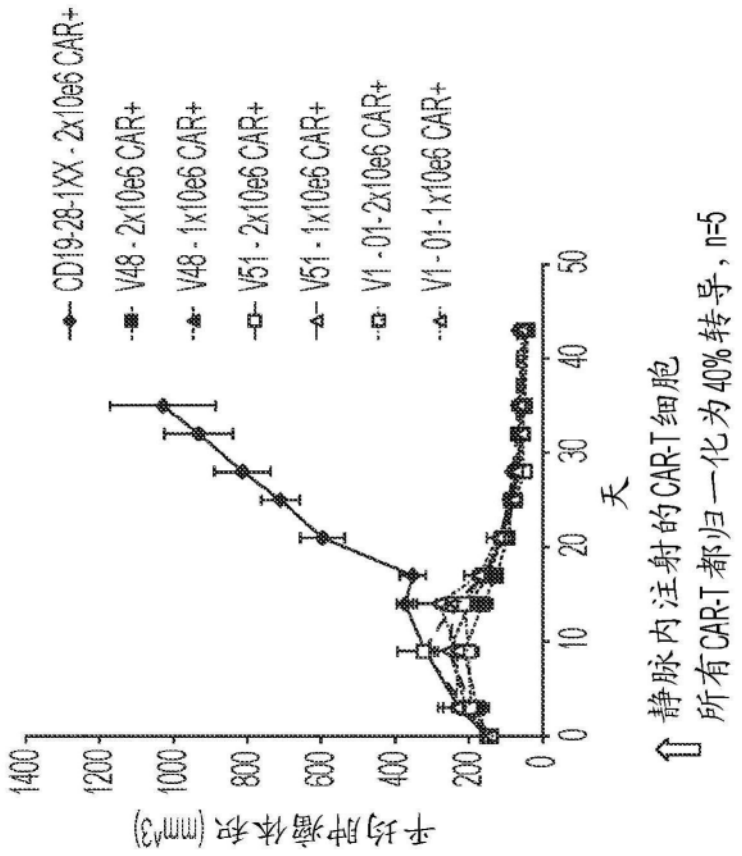

CD19-28-1XX - 2x10e6 CAR+
V48 - 2x10e6 CAR+
V48 - 1x10e6 CAR+
V51 - 2x10e6 CAR+
V51 - 1x10e6 CAR+
V1 - 01 - 2x10e6 CAR+
V1 - 01 - 1x10e6 CAR+
平均肿瘤体积 (mm^3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
天
静脉内注射的CAR-T细胞
所有CAR-T都归一化为40%转导，n=5

图17

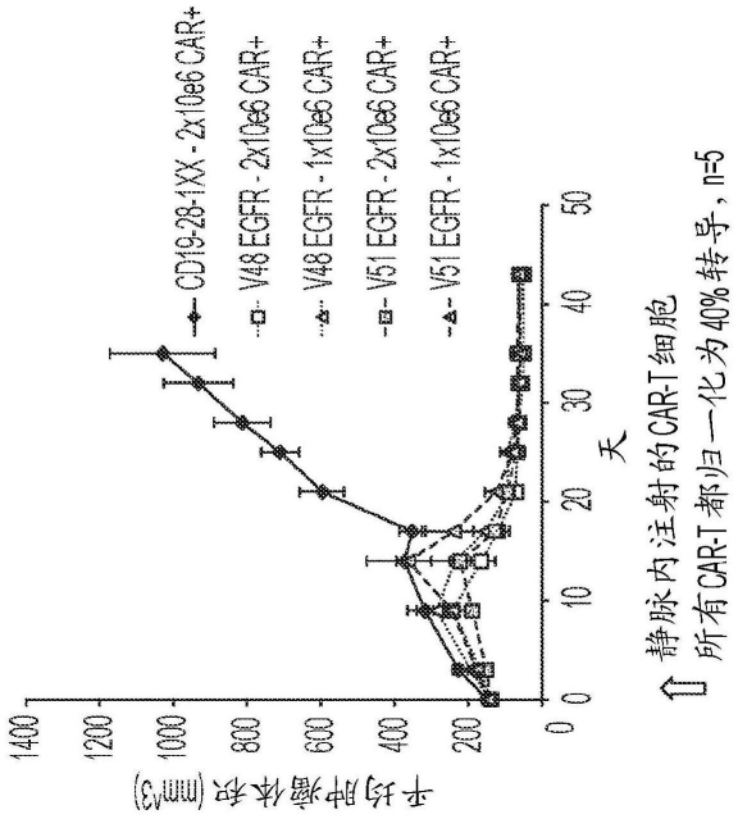

CD19-28-1XX - 2x10e6 CAR+
V48 EGFR - 2x10e6 CAR+
V48 EGFR - 1x10e6 CAR+
V51 EGFR - 2x10e6 CAR+
V51 EGFR - 1x10e6 CAR+
平均肿瘤体积 (mm3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
50
天
静脉内注射的CAR-T细胞
所有CAR-T都归一化为40%转导，n=5

图18