



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113227145 A

(43) 申请公布日 2021.08.06

(21) 申请号 201980085366.4

(22) 申请日 2019.10.30

(30) 优先权数据

62/752,889 2018.10.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.06.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/058710 2019.10.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/092467 EN 2020.05.07

(71) 申请人 得克萨斯大学体系董事会

地址 美国得克萨斯

(72) 发明人 F·褚 S·S·尼拉普 J·曹

刘景伟

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

代理人 李程达

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

权利要求书8页 说明书30页  
序列表40页 附图15页

(54) 发明名称

抗CD79b抗体和嵌合抗原受体及其使用方法

(57) 摘要

本文提供了CD79b抗体和CD79b特异性嵌合抗原受体(CAR)。本文还提供了表达CD79b特异性CAR的T细胞和通过施用CD79b特异性CAR T细胞治疗癌症的方法。

1. 一种分离的单克隆抗体,其中所述抗体与CD79b特异性结合并包含:

(I):

- (a) 第一V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:3相同;
- (b) 第二V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:4相同;
- (c) 第三V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:5相同;
- (d) 第一V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:8相同;
- (e) 第二V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:9相同;和
- (f) 第三V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:10相同;

(II):

- (a) 第一V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:13相同;
- (b) 第二V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:14相同;
- (c) 第三V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:15相同;
- (d) 第一V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:18相同;
- (e) 第二V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:19相同;和
- (f) 第三V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:20相同;或

(III):

- (a) 第一V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:23相同;
- (b) 第二V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:24相同;
- (c) 第三V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:25相同;
- (d) 第一V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:28相同;
- (e) 第二V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:29相同;和
- (f) 第三V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:30相同。

2. 权利要求1的抗体,其中所述抗体包含:

- (a) 第一V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:3相同;
- (b) 第二V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:4相同;
- (c) 第三V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:5相同;
- (d) 第一V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:8相同;
- (e) 第二V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:9相同;和
- (f) 第三V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:10相同。

3. 权利要求2的抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:2的V<sub>H</sub>结构域至少约80%相同的V<sub>H</sub>结构域和与SEQ ID NO:7的V<sub>L</sub>结构域至少约80%相同的V<sub>L</sub>结构域。

4. 权利要求2的抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:2的V<sub>H</sub>结构域相同的V<sub>H</sub>结构域和与SEQ ID NO:7的V<sub>L</sub>结构域相同的V<sub>L</sub>结构域。

5. 权利要求1的抗体,其中所述抗体包含:

- (a) 第一V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:13相同;
- (b) 第二V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:14相同;
- (c) 第三V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:15相同;
- (d) 第一V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:18相同;
- (e) 第二V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:19相同;和

(f) 第三V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:20相同。

6. 权利要求5的抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:12的V<sub>H</sub>结构域至少约80%相同的V<sub>H</sub>结构域和与SEQ ID NO:17的V<sub>L</sub>结构域至少约80%相同的V<sub>L</sub>结构域。

7. 权利要求5的抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:12的V<sub>H</sub>结构域相同的V<sub>H</sub>结构域和与SEQ ID NO:17的V<sub>L</sub>结构域相同的V<sub>L</sub>结构域。

8. 权利要求1的抗体,其中所述抗体包含:

(a) 第一V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:23相同;

(b) 第二V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:24相同;

(c) 第三V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:25相同;

(d) 第一V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:28相同;

(e) 第二V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:29相同;和

(f) 第三V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:30相同。

9. 权利要求8的抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:22的V<sub>H</sub>结构域至少约80%相同的V<sub>H</sub>结构域和与SEQ ID NO:27的V<sub>L</sub>结构域至少约80%相同的V<sub>L</sub>结构域。

10. 权利要求8的抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:22的V<sub>H</sub>结构域相同的V<sub>H</sub>结构域和与SEQ ID NO:27的V<sub>L</sub>结构域相同的V<sub>L</sub>结构域。

11. 权利要求1-10中任一项的抗体,其中所述抗体是重组的。

12. 权利要求1的抗体,其中所述抗体是IgG、IgM、IgA或其抗原结合片段。

13. 权利要求1-10中任一项的抗体,其中所述抗体是Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab')<sub>3</sub>、单价scFv、二价scFv或单结构域抗体。

14. 权利要求1-12中任一项的抗体,其中所述抗体是人抗体、人源化抗体或去免疫化抗体。

15. 权利要求1-14中任一项的抗体,其中所述抗体与显像剂、化学治疗剂、毒素或放射性核素缀合。

16. 一种组合物,其包含在药学上可接受的载体中的权利要求1-15中任一项的抗体。

17. 一种分离的多核苷酸分子,其包含编码权利要求1-14中任一项的抗体的核酸序列。

18. 一种包含抗体V<sub>H</sub>结构域的重组多肽,所述抗体V<sub>H</sub>结构域包含克隆14的V<sub>H</sub>结构域的CDR1-3 (SEQ ID NO:3、4和5) 和克隆14的V<sub>H</sub>结构域的CDR1-3 (SEQ ID NO:8、9和10)。

19. 一种包含抗体V<sub>H</sub>结构域的重组多肽,所述抗体V<sub>H</sub>结构域包含克隆16a的V<sub>H</sub>结构域的CDR1-3 (SEQ ID NO:13、14和15) 和克隆16a的V<sub>H</sub>结构域的CDR1-3 (SEQ ID NO:18、19和20)。

20. 一种包含抗体V<sub>H</sub>结构域的重组多肽,所述抗体V<sub>H</sub>结构域包含克隆45的V<sub>H</sub>结构域的CDR1-3 (SEQ ID NO:23、24和25) 和克隆45的V<sub>H</sub>结构域的CDR1-3 (SEQ ID NO:28、29和30)。

21. 一种分离的多核苷酸分子,其包含编码权利要求18-20中任一项的多肽的核酸序列。

22. 一种宿主细胞,其包含一种或多种编码权利要求1-14中任一项的抗体或权利要求18-20中任一项的重组多肽的多核苷酸分子。

23. 权利要求22的宿主细胞,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞、酵母细胞、细菌细胞、纤毛虫细胞或昆虫细胞。

24. 一种用于治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量

的权利要求1-13中任一项的抗体。

25. 权利要求24的方法,其中所述癌症是B细胞恶性肿瘤。

26. 权利要求24的方法,其中所述抗体在药学上可接受的组合物中。

27. 权利要求24的方法,其中所述抗体是全身施用的。

28. 权利要求24的方法,其中所述抗体是静脉内、皮内、瘤内、肌肉内、腹膜内、皮下或局部施用的。

29. 权利要求24的方法,其还包括向所述受试者施用至少第二抗癌疗法。

30. 权利要求29的方法,其中所述第二抗癌疗法是手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。

31. 权利要求29的方法,其中所述第二抗癌疗法包括过继性T细胞疗法。

32. 一种工程化的CD79b靶向嵌合抗原受体(CAR),其包含CD3 $\zeta$ 、CD28、4-1BB和/或OX40信号传导结构域。

33. 权利要求32的CAR,其中所述CAR包含CD3 $\zeta$ 和CD28信号传导结构域。

34. 权利要求32的CAR,其中所述CAR包含CD3 $\zeta$ 和4-1BB信号传导结构域。

35. 权利要求32的CAR,其中所述CAR包含CD3 $\zeta$ 和OX-40信号传导结构域。

36. 权利要求32的CAR,其中所述CAR由病毒载体编码。

37. 权利要求36的CAR,其中所述病毒载体是慢病毒载体。

38. 权利要求32-37中任一项的CAR,其中所述CAR包含选自F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv和scFv的抗原结合结构域。

39. 权利要求32的CAR,其中所述抗原结合结构域包含权利要求1-14中任一项的抗体或其片段。

40. 权利要求39的CAR,其中所述抗原结合结构域包含:

(I):

(a) 第一V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:3相同;

(b) 第二V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:4相同;

(c) 第三V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:5相同;

(d) 第一V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:8相同;

(e) 第二V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:9相同;和

(f) 第三V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:10相同;

(II):

(a) 第一V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:13相同;

(b) 第二V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:14相同;

(c) 第三V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:15相同;

(d) 第一V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:18相同;

(e) 第二V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:19相同;和

(f) 第三V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:20相同;或

(III):

(a) 第一V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:23相同;

(b) 第二V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:24相同;

- (c) 第三 $V_H$  CDR, 其与SEQ ID NO:25相同;
- (d) 第一 $V_L$  CDR, 其与SEQ ID NO:28相同;
- (e) 第二 $V_L$  CDR, 其与SEQ ID NO:29相同; 和
- (f) 第三 $V_L$  CDR, 其与SEQ ID NO:30相同。

41. 权利要求39的CAR, 其中所述抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:31、32或33的氨基酸序列具有至少90%同一性的scFV。

42. 权利要求39的CAR, 其中所述抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:31、32或33的氨基酸序列的scFV。

43. 权利要求33-42中任一项的CAR, 其中所述抗原结合结构域包含通过接头连接至 $V_L$ 结构域的 $V_H$ 结构域。

44. 权利要求43的CAR, 其中所述接头是接头1 (SEQ ID NO:44或45)、接头2 (SEQ ID NO:46或47)、接头3 (SEQ ID NO:48或49) 或接头4 (SEQ ID NO:50或51)。

45. 权利要求43中任一项的CAR, 其中所述CAR包含 $V_L$ -接头1- $V_H$ 、 $V_L$ -接头2- $V_H$ 、 $V_L$ -接头3- $V_H$ 、 $V_L$ -接头4- $V_H$ 、 $V_H$ -接头1- $V_L$ 、 $V_H$ -接头2- $V_L$ 、 $V_H$ -接头3- $V_L$ 或 $V_H$ -接头4- $V_L$ 。

46. 权利要求32-45中任一项的CAR, 其中所述CAR包含铰链。

47. 权利要求46的CAR, 其中所述铰链是CD8铰链1 (SEQ ID NO:52或53)、CD8铰链2 (SEQ ID NO:54或55)、CD8铰链3 (SEQ ID NO:56或57)、CD28铰链 (SEQ ID NO:58或59)、IgG4铰链 (SEQ ID NO:60或61)、IgG4 CH2 (SEQ ID NO:62或63)、IgG4 CH2CH3 (SEQ ID NO:64或65) 或IgG4 CH1CH2CH3 (SEQ ID NO:66或67)。

48. 权利要求32-47中任一项的CAR, 其中所述CAR包含跨膜结构域。

49. 权利要求48的CAR, 其中所述跨膜结构域是CD8 TM1 (SEQ ID NO:68或69)、CD8 TM2 (SEQ ID NO:70或71) 或CD28 TM (SEQ ID NO:72或73)。

50. 权利要求32-49中任一项的CAR, 其还包含转导标志物和/或安全开关。

51. 权利要求50的CAR, 其中所述转导标志物是增强型绿色荧光蛋白 (eGFP)。

52. 权利要求51的CAR, 其中所述eGFP具有SEQ ID NO:83的氨基酸序列。

53. 权利要求50的CAR, 其中所述转导标志物和/或安全开关是截短的表皮生长因子 (EGFR)。

54. 权利要求53的CAR, 其中所述EGFR具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

55. 权利要求50的CAR, 其中所述转导标志物和/或安全开关通过切割肽与所述CAR连接。

56. 权利要求55的CAR, 其中所述切割肽是2A肽。

57. 权利要求56的CAR, 其中所述2A肽是T2A肽。

58. 权利要求57的CAR, 其中所述T2A肽具有SEQ ID NO:85的氨基酸序列。

59. 权利要求32-58中任一项的CAR, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:34、35、36、37、38、39、86、87或88的氨基酸序列具有至少90%同一性的序列。

60. 权利要求32-58中任一项的CAR, 其中所述CAR包含具有SEQ ID NO:34、35、36、37、38、39、86、87或88的氨基酸序列的序列。

61. 权利要求32-60中任一项的CAR, 其中所述CAR进一步包含第二抗原结合结构域。

62. 权利要求61的CAR, 其中所述第二抗原结合结构域是CD19、CD20或CD22抗原结合结

构域。

63. 一种工程化CD79b CAR或TCR,其具有包含以下的抗原结合结构域:

(I):

- (a) 第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:3相同;
- (b) 第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:4相同;
- (c) 第三 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:5相同;
- (d) 第一 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:8相同;
- (e) 第二 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:9相同;和
- (f) 第三 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:10相同;

(II):

- (a) 第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:13相同;
- (b) 第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:14相同;
- (c) 第三 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:15相同;
- (d) 第一 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:18相同;
- (e) 第二 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:19相同;和
- (f) 第三 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:20相同;或

(III):

- (a) 第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:23相同;
- (b) 第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:24相同;
- (c) 第三 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:25相同;
- (d) 第一 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:28相同;
- (e) 第二 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:29相同;和
- (f) 第三 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:30相同。

64. 权利要求63的CAR,其中所述抗原结合结构域包含:

- (a) 第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:3相同;
- (b) 第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:4相同;
- (c) 第三 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:5相同;
- (d) 第一 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:8相同;
- (e) 第二 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:9相同;和
- (f) 第三 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:10相同。

65. 权利要求64的CAR或TCR,其中所述抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:2的 $V_H$ 结构域至少约80%相同的 $V_H$ 结构域和与SEQ ID NO:7的 $V_L$ 结构域至少约80%相同的 $V_L$ 结构域。

66. 权利要求64的CAR或TCR,其中所述抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:2的 $V_H$ 结构域相同的 $V_H$ 结构域和与SEQ ID NO:7的 $V_L$ 结构域相同的 $V_L$ 结构域。

67. 权利要求63的CAR或TCR,其中所述抗体包含:

- (a) 第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:13相同;
- (b) 第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:14相同;
- (c) 第三 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:15相同;
- (d) 第一 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:18相同;

(e) 第二V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:19相同;和

(f) 第三V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:20相同。

68. 权利要求67的CAR或TCR,其中所述抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:12的V<sub>H</sub>结构域至少约80%相同的V<sub>H</sub>结构域和与SEQ ID NO:17的V<sub>L</sub>结构域至少约80%相同的V<sub>L</sub>结构域。

69. 权利要求67的CAR或TCR,其中所述抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:12的V<sub>H</sub>结构域相同的V<sub>H</sub>结构域和与SEQ ID NO:17的V<sub>L</sub>结构域相同的V<sub>L</sub>结构域。

70. 权利要求63的CAR或TCR,其中所述抗原结合结构域包含:

(a) 第一V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:23相同;

(b) 第二V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:24相同;

(c) 第三V<sub>H</sub> CDR,其与SEQ ID NO:25相同;

(d) 第一V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:28相同;

(e) 第二V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:29相同;和

(f) 第三V<sub>L</sub> CDR,其与SEQ ID NO:30相同。

71. 权利要求70的CAR或TCR,其中所述抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:22的V<sub>H</sub>结构域至少约80%相同的V<sub>H</sub>结构域和与SEQ ID NO:27的V<sub>L</sub>结构域至少约80%相同的V<sub>L</sub>结构域。

72. 权利要求70的CAR或TCR,其中所述抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:22的V<sub>H</sub>结构域相同的V<sub>H</sub>结构域和与SEQ ID NO:27的V<sub>L</sub>结构域相同的V<sub>L</sub>结构域。

73. 权利要求63的CAR或TCR,其中所述CAR包含一个或多个信号传导结构域CD3 $\xi$ 、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137或其组合。

74. 权利要求63的CAR或TCR,其中所述CAR包含CD3 $\zeta$ 和CD28信号传导结构域。

75. 权利要求63的CAR或TCR,其中所述CAR包含CD3 $\zeta$ 和4-1BB信号传导结构域。

76. 权利要求63的CAR或TCR,其中所述CAR包含CD3 $\zeta$ 和OX-40信号传导结构域。

77. 权利要求63的CAR或TCR,其中所述CAR或TCR由病毒载体编码。

78. 权利要求77的CAR或TCR,其中所述病毒载体是慢病毒载体。

79. 权利要求63的CAR或TCR,其中所述抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:31、32或33的氨基酸序列具有至少90%同一性的scFV。

80. 权利要求63的CAR或TCR,其中所述抗原结合结构域包含具有SEQ ID NO:31、32或33的氨基酸序列的scFV。

81. 权利要求63-80中任一项的CAR或TCR,其中所述抗原结合结构域包含通过接头连接至V<sub>L</sub>结构域的V<sub>H</sub>结构域。

82. 权利要求81的CAR或TCR,其中所述接头是接头1 (SEQ ID NO:44或45)、接头2 (SEQ ID NO:46或47)、接头3 (SEQ ID NO:48或49)或接头4 (SEQ ID NO:50或51)。

83. 权利要求63-82中任一项的CAR或TCR,其中所述CAR包含V<sub>L</sub>-接头1-V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>-接头2-V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>-接头3-V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>-接头4-V<sub>H</sub>、V<sub>H</sub>-接头1-V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>-接头2-V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>-接头3-V<sub>L</sub>或V<sub>H</sub>-接头4-V<sub>L</sub>。

84. 权利要求63-83中任一项的CAR或TCR,其中所述CAR或TCR包含铰链。

85. 权利要求84的CAR或TCR,其中所述铰链是CD8铰链1 (SEQ ID NO:52或53)、CD8铰链2 (SEQ ID NO:54或55)、CD8铰链3 (SEQ ID NO:56或57)、CD28铰链 (SEQ ID NO:58或59)、IgG4铰链 (SEQ ID NO:60或61)、IgG4 CH2 (SEQ ID NO:62或63)、IgG4 CH2CH3 (SEQ ID NO:64或65),或IgG4CH1CH2CH3 (SEQ ID NO:66或67)。

86. 权利要求63-85中任一项的CAR或TCR,其中所述CAR包含跨膜结构域。
87. 权利要求86的CAR或TCR,其中所述跨膜结构域是CD8TM1 (SEQ ID NO:68或69)、CD8 TM2 (SEQ ID NO:70或71) 或CD28 TM (SEQ ID NO:72或73)。
88. 权利要求63的CAR或TCR,其还包含转导标志物和/或安全开关。
89. 权利要求88的CAR或TCR,其中所述转导标志物是增强型绿色荧光蛋白 (eGFP)。
90. 权利要求89的CAR或TCR,其中所述eGFP具有SEQ ID NO:83的氨基酸序列。
91. 权利要求88的CAR,其中所述转导标志物和/或安全开关是截短的表皮生长因子 (EGFR)。
92. 权利要求91的CAR或TCR,其中所述EGFR具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列。
93. 权利要求88的CAR或TCR,其中所述转导标志物和/或安全开关通过切割肽与所述CAR连接。
94. 权利要求93的CAR或TCR,其中所述切割肽是2A肽。
95. 权利要求94的CAR或TCR,其中所述2A肽是T2A肽。
96. 权利要求95的CAR或TCR,其中所述T2A肽具有SEQ ID NO:85的氨基酸序列。
97. 权利要求63的CAR或TCR,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:34、35、36、37、38、39、86、87或88的氨基酸序列具有至少90%同一性的序列。
98. 权利要求63的CAR或TCR,其中所述CAR包含具有SEQ ID NO:34、35、36、37、38、39、86、87或88的氨基酸序列的序列。
99. 权利要求63的CAR或TCR,其中所述CAR进一步包含第二抗原结合结构域。
100. 权利要求99的CAR或TCR,其中所述第二抗原结合结构域是CD19、CD20或CD22抗原结合结构域。
101. 一种表达载体,其编码权利要求32-100中任一项的CAR或TCR。
102. 一种宿主细胞,其经工程化以表达CD79b CAR或CD79b TCR。
103. 权利要求102的细胞,其中所述细胞经工程化以表达权利要求30-100中任一项的CAR。
104. 权利要求102的细胞,其中所述宿主细胞是免疫细胞。
105. 权利要求104的细胞,其中所述免疫细胞是T细胞。
106. 权利要求105的细胞,其中所述T细胞是原代人T细胞或TIL。
107. 权利要求105的细胞,其中T细胞是CD4<sup>+</sup>T细胞或CD8<sup>+</sup>T细胞。
108. 权利要求106的细胞,其中所述原代人T细胞获自健康供体。
109. 权利要求105的细胞,其中所述T细胞是自体的。
110. 权利要求105的细胞,其中所述T细胞是同种异体的。
111. 权利要求102的细胞,其中使用CRISPR或转座酶系统工程化所述细胞。
112. 一种药物组合物,其包含CD79b CAR T细胞和药物载体。
113. 权利要求112的组合物,其中所述CD79b CAR T细胞经工程化以表达权利要求32-100中任一项的CAR。
114. 一种用于治疗受试者的癌症的组合物,其包含有效量的CD79b CAR T细胞。
115. 权利要求114的组合物,其中所述CD79b CAR T细胞经工程化以表达权利要求32-100中任一项的CAR。



116. 包含有效量的CD79b CAR T细胞的组合物用于治疗受试者的癌症的用途。
117. 权利要求114的用途,其中所述CD79b CAR T细胞经工程化以表达权利要求32-100中任一项的CAR。
118. 一种用于治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的CD79b CAR T细胞。
119. 权利要求118的方法,其中所述CD79b CAR T细胞经工程化以表达权利要求32-100中任一项的CAR。
120. 权利要求118的方法,其中所述癌症是B细胞恶性肿瘤。
121. 权利要求120的方法,其中所述B细胞恶性肿瘤是B细胞急性成淋巴细胞白血病(ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤或慢性淋巴细胞白血病。
122. 权利要求118的方法,其中所述受试者先前已被施用CD19CAR疗法。
123. 权利要求122的方法,其中所述受试者对CD19 CAR疗法具有抗性。
124. 权利要求123的方法,其中所述受试者具有CD19抗原丢失。
125. 权利要求124的方法,其中所述受试者已经复发CD19阴性肿瘤。
126. 权利要求118的方法,其中所述CD79b CAR T细胞静脉内、皮内、瘤内、肌肉内、腹膜内、皮下或局部施用。
127. 权利要求118的方法,其中静脉内施用所述CD79b CAR T细胞。
128. 权利要求118的方法,其还包括向所述受试者施用至少第二抗癌疗法。
129. 权利要求128的方法,其中所述第二抗癌疗法是手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。
130. 权利要求118的方法,其中所述癌症是表达CD79b的癌症。

## 抗CD79b抗体和嵌合抗原受体及其使用方法

[0001] 本申请要求于2018年10月30日提交的美国临时申请号62/752,889的权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0002] 序列表的并入

[0003] 包含在名为“UTFCP1405W0\_ST25.txt”的文件中的序列表(该文件为73KB(在**Microsoft Windows®**中测量)并且创建于2019年10月29日)通过电子提交在此提交,并通过引用并入本文。

### 背景技术

[0004] 1. 领域

[0005] 本发明一般涉及免疫学和医学领域。更具体地说,它涉及CD79b嵌合抗原受体及其使用方法。

[0006] 2. 相关技术描述

[0007] 靶向CD19的嵌合抗原受体(CAR) T细胞在B细胞恶性肿瘤中非常有效。最近,美国FDA批准了两种抗CD19 CAR T细胞治疗产品,用于复发性或难治性B细胞急性成淋巴细胞白血病(ALL)和/或大B细胞淋巴瘤。在关键性试验中,在这些患者的~40-50%中观察到持续超过1年的持久缓解。但是,复发或进展的发生率为~50-60%,并且耐药性的主要原因似乎是由于CD19抗原的丢失。因此,迫切需要开发针对新靶标的CAR T细胞疗法以进一步改善这些患者的结果。

### 发明内容

[0008] 在第一个实施方案中,本公开内容提供了一种分离的单克隆抗体,其中所述抗体与CD79b特异性结合并且包含:(I):(a)第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:3相同;(b)第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:4相同;(c)第三 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:5相同;(d)第一 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:8相同;(e)第二 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:9相同;和(f)第三 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:10相同;(II):(a)第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:13相同;(b)第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:14相同;(c)第三 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:15相同;(d)第一 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:18相同;(e)第二 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:19相同;和(f)第三 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:20相同;或(III):(a)第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:23相同;(b)第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:24相同;(c)第三 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:25相同;(d)第一 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:28相同;(e)第二 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:29相同;和(f)第三 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:30相同。

[0009] 在一些方面,抗体包含与SEQ ID NO:2的 $V_H$ 结构域至少约80%(例如,81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的 $V_H$ 结构域和与SEQ ID NO:7的 $V_L$ 结构域至少约80%相同的 $V_L$ 结构域。在某些方面,所述抗体包含与SEQ ID NO:12的 $V_H$ 结构域至少约80%(例如,81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的 $V_H$ 结构域和与SEQ ID NO:17的 $V_L$ 结构域至少约80%相同的 $V_L$ 结

构域。在一些方面,所述抗体包含与SEQ ID NO:22的V<sub>H</sub>结构域至少约80% (例如,81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的V<sub>H</sub>结构域和与SEQ ID NO:27的V<sub>L</sub>结构域至少约80%相同的V<sub>L</sub>结构域。

[0010] 在某些方面,抗体是重组的。抗体可以是IgG、IgM、IgA或其抗原结合片段。抗体可以是Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab')<sub>3</sub>、单价scFv、二价scFv或单结构域抗体。在某些方面,抗体是人抗体、人源化抗体或去免疫化抗体。抗体可以与显像剂、化学治疗剂、毒素或放射性核素缀合。另一个实施方案提供了包含在药学上可接受的承载体中的实施方案的CD79b抗体的组合物。本文还提供了分离的多核苷酸分子,其包含编码实施方案的CD79b抗体的核酸序列。

[0011] 另一个实施方案提供了包含抗体V<sub>H</sub>结构域的重组多肽,所述抗体V<sub>H</sub>结构域包含克隆14的V<sub>H</sub>结构域的CDR 1-3 (SEQ ID NO:3、4和5) 和克隆14的V<sub>H</sub>结构域的CDR 1-3 (SEQ ID NO:8、9和10)。另一个实施方案提供了包含抗体V<sub>H</sub>结构域的重组多肽,所述抗体V<sub>H</sub>结构域包含克隆16a的V<sub>H</sub>结构域的CDR 1-3 (SEQ ID NO:13、14和15) 和克隆16a的V<sub>H</sub>结构域的CDR 1-3 (SEQ ID NO:18、19和20)。本文进一步提供了包含抗体V<sub>H</sub>结构域的重组多肽,所述抗体V<sub>H</sub>结构域包含克隆45的V<sub>H</sub>结构域的CDR1-3 (SEQ ID NO:23、24和25) 和克隆45的V<sub>H</sub>结构域的CDR1-3 (SEQ ID NO:28、29和30)。进一步的实施方案提供了包含编码实施方案的CD79b多肽的核酸序列的分离的多核苷酸分子。本文还提供了一种宿主细胞,其包含一种或多种编码实施方案的CD79b抗体或重组多肽的多核苷酸分子。宿主细胞可以是哺乳动物细胞、酵母细胞、细菌细胞、纤毛虫细胞或昆虫细胞。

[0012] 另一个实施方案提供了用于治疗患有癌症的受试者的方法,其包括向受试者施用有效量的实施方案的CD79b抗体。在一些方面,癌症是B细胞恶性肿瘤。在某些方面,抗体在药学上可接受的组合物中。在一些方面,抗体被全身施用。抗体可以静脉内、皮内、瘤内、肌肉内、腹膜内、皮下或局部施用。在另外的方面,所述方法进一步包括向受试者施用至少第二抗癌疗法。在一些方面,第二抗癌疗法是手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。在某些方面,第二抗癌疗法包括过继性T细胞疗法。

[0013] 另一个实施方案提供了工程化的靶向CD79b的嵌合抗原受体 (CAR),其包含CD3 $\zeta$ 、CD28、4-1BB和/或OX40信号传导结构域。CD3 $\zeta$ 信号传导结构域可以与SEQ ID NO:80或81至少约80% (例如,81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同。CD28信号传导结构域可以与SEQ ID NO:74或75至少约80% (例如,81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同。4-1BB信号传导结构域可以与SEQ ID NO:76或77至少约80% (例如,81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同。4-1BB信号传导结构域可以与SEQ ID NO:78或79至少约80% (例如,81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同。

[0014] 在一些方面,CAR由病毒载体例如慢病毒载体编码。在特定方面,CAR包含选自由F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv和scFv组成的组的抗原结合结构域。抗原结合结构域可包含实施方案的CD79b抗体或其片段,例如scFv。

[0015] 在一些方面,抗原结合结构域包含(I):(a)第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:3相同;(b)第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:4相同;(c)第三 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:5相同;(d)第一 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:8相同;(e)第二 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:9相同;和(f)第三 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:10相同;(II):(a)第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:13相同;(b)第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:14相同;(c)第三 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:15相同;(d)第一 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:18相同;(e)第二 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:19相同;和(f)第三 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:20相同;或(III):(a)第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:23相同;(b)第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:24相同;(c)第三 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:25相同;(d)第一 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:28相同;(e)第二 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:29相同;和(f)第三 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:30相同。在某些方面,抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:31、32或33的氨基酸序列具有至少90%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的scFv。

[0016] 在另外的方面,CAR进一步包括转导标志物和/或安全开关。转导标志物可以是增强型绿色荧光蛋白(eGFP)(例如,SEQ ID NO:82或83)。在某些方面,转导标志物和/或安全开关是截短的表皮生长因子(EGFR)(例如,SEQ ID NO:40或41)。在一些方面,转导标志物和/或安全开关通过切割肽(例如2A肽)与CAR连接。在一些方面,2A肽是T2A肽(SEQ ID NO:84或85)。

[0017] 在一些方面,CAR包含与SEQ ID NO:34、35、36、37、38、39、86、87或88的氨基酸序列具有至少90%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的序列。

[0018] 在某些方面,CAR进一步包含第二抗原结合结构域。在一些方面,第二抗原结合结构域是CD19、CD20或CD22抗原结合结构域。

[0019] 在一些方面,CAR包含接头。例如,接头可以是接头1(SEQ ID NO:44或45)、接头2(SEQ ID NO:46或47)、接头3(SEQ ID NO:48或49)或接头4(SEQ ID NO:50或51)。在某些方面,CAR包含铰链。例如,铰链可以是CD8铰链1(SEQ ID NO:52或53)、CD8铰链2(SEQ ID NO:54或55)、CD8铰链3(SEQ ID NO:56或57)、CD28铰链(SEQ ID NO:58或59)、IgG4铰链(SEQ ID NO:60或61)、IgG4 CH2(SEQ ID NO:62或63)、IgG4 CH2CH3(SEQ ID NO:64或65)或IgG4 CH1CH2CH3(SEQ ID NO:66或67)。在特定方面,CAR包含跨膜结构域(TM)。例如,TM可以是CD8 TM1(SEQ ID NO:68或69)、CD8 TM2(SEQ ID NO:70或71)或CD28 TM(SEQ ID NO:72或73)。在一些方面,CAR构建体包含 $V_L$ -接头1- $V_H$ ;  $V_L$ -接头2- $V_H$ ;  $V_L$ -接头3- $V_H$ ;  $V_L$ -接头4- $V_H$ ;  $V_H$ -接头1- $V_L$ ;  $V_H$ -接头2- $V_L$ ;  $V_H$ -接头3- $V_L$ ;或 $V_H$ -接头4- $V_L$ 。在某些方面,CAR包含 $V_L$ --接头-- $V_H$ --铰链--TM--信号传导结构域。在其他方面,CAR包含 $V_H$ --接头-- $V_L$ --铰链--TM--信号传导结构域。

[0020] 在另一个实施方案中,提供了具有抗原结合结构域的工程化CD79b CAR或T细胞受体(TCR),所述抗原结合结构域包含(I):(a)第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:3相同;(b)第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:4相同;(c)第三 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:5相同;(d)第一 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:8相同;(e)第二 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:9相同;和(f)第三 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:10相同;(II):(a)第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:13相同;(b)第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:14相同;(c)第三 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:15相同;(d)第一 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:18相同;(e)第二 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:19相同;和(f)第三 $V_L$  CDR,其与SEQ ID NO:20相同;或(III):(a)第一 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:23相同;(b)第二 $V_H$  CDR,其与SEQ ID NO:24相同;

(c) 第三 $V_H$  CDR, 其与SEQ ID NO:25相同; (d) 第一 $V_L$  CDR, 其与SEQ ID NO:28相同; (e) 第二 $V_L$  CDR, 其与SEQ ID NO:29相同; 和(f) 第三 $V_L$  CDR, 其与SEQ ID NO:30相同。

[0021] 在一些方面, 抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:2的 $V_H$ 结构域至少约80% (例如, 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的 $V_H$ 结构域和与SEQ ID NO:7的 $V_L$ 结构域至少约80%相同的 $V_L$ 结构域。在某些方面, 抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:12的 $V_H$ 结构域至少约80% (例如, 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的 $V_H$ 结构域和与SEQ ID NO:17的 $V_L$ 结构域至少约80%相同的 $V_L$ 结构域。在一些方面, 抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:22的 $V_H$ 结构域至少约80% (例如, 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的 $V_H$ 结构域和与SEQ ID NO:27的 $V_L$ 结构域至少约80%相同的 $V_L$ 结构域。

[0022] 在一些方面, CAR包含一个或多个信号传导结构域CD3 $\xi$ 、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137或其组合。在特定方面, CAR包含CD3 $\xi$ 和CD28信号传导结构域。在一些方面, CAR包含CD3 $\xi$ 和4-1BB信号传导结构域。在一些方面, CAR包含CD3 $\xi$ 和OX40信号传导结构域。

[0023] 在某些方面, CAR由病毒载体 (例如慢病毒载体) 编码。

[0024] 在某些方面, 抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:31、32或33的氨基酸序列具有至少90% (例如, 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的scFV。

[0025] 在另外的方面, CAR进一步包括转导标志物和/或安全开关。转导标志物可以是增强型绿色荧光蛋白 (eGFP) (例如, SEQ ID NO:82或83)。在某些方面, 转导标志物和/或安全开关是截短的表皮生长因子 (EGFR) (例如, SEQ ID NO:40或41)。在一些方面, 转导标志物和/或安全开关通过切割肽 (例如2A肽) 与CAR连接。在一些方面, 2A肽是T2A肽 (SEQ ID NO:84或85)。

[0026] 在一些方面, CAR包含接头。例如, 接头可以是接头1 (SEQ ID NO:44或45)、接头2 (SEQ ID NO:46或47)、接头3 (SEQ ID NO:48或49) 或接头4 (SEQ ID NO:50或51)。在某些方面, CAR包含铰链。例如, 铰链可以是CD8铰链1 (SEQ ID NO:52或53)、CD8铰链2 (SEQ ID NO:54或55)、CD8铰链3 (SEQ ID NO:56或57)、CD28铰链 (SEQ ID NO:58或59)、IgG4铰链 (SEQ ID NO:60或61)、IgG4 CH2 (SEQ ID NO:62或63)、IgG4 CH2CH3 (SEQ ID NO:64或65) 或IgG4 CH1CH2CH3 (SEQ ID NO:66或67)。在特定方面, CAR包含跨膜结构域 (TM)。例如, TM可以是CD8 TM1 (SEQ ID NO:68或69)、CD8 TM2 (SEQ ID NO:70或71) 或CD28 TM (SEQ ID NO:72或73)。在一些方面, CAR构建体包含 $V_L$ -接头1- $V_H$ ;  $V_L$ -接头2- $V_H$ ;  $V_L$ -接头3- $V_H$ ;  $V_L$ -接头4- $V_H$ ;  $V_H$ -接头1- $V_L$ ;  $V_H$ -接头2- $V_L$ ;  $V_H$ -接头3- $V_L$ ; 或 $V_H$ -接头4- $V_L$ 。在某些方面, CAR包含 $V_L$ --接头-- $V_H$ --铰链--TM--信号传导结构域。在其他方面, CAR包含 $V_H$ --接头-- $V_L$ --铰链--TM--信号传导结构域。

[0027] 在一些方面, CAR包含与SEQ ID NO:34、35、36、37、38、39、86、87或88的氨基酸序列具有至少90% (例如, 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 同一性的序列。

[0028] 在某些方面, CAR进一步包含第二抗原结合结构域。在一些方面, 第二抗原结合结构域是CD19、CD20或CD22抗原结合结构域。

[0029] 在另一个实施方案中, 提供了编码本发明的实施方案的CD79bCAR的表达载体。

[0030] 本文进一步提供了一种宿主细胞,该宿主细胞经工程化以表达CD79b CAR或TCR,例如本发明的实施方案的CD79b。在一些方面,宿主细胞是免疫细胞,例如T细胞。在一些方面,T细胞是原代人T细胞或TIL。在某些方面,T细胞是CD4<sup>+</sup>T细胞或CD8<sup>+</sup>T细胞。在一些方面,原代人T细胞获自健康供体。T细胞可以是自体的或同种异体的。在一些方面,使用CRISPR或转座酶系统工程化细胞(例如,使用CAR或TCR)。

[0031] 本文还提供了一种药物组合物,其包含CD79b CAR T细胞,例如本发明的实施方案的CAR T细胞,以及药物载体。本文进一步提供了一种用于治疗受试者的癌症的组合物,其包含有效量的CD79bCAR T细胞,例如本发明的实施方案的CAR T细胞。在另一个实施方案中,提供了包含有效量的CD79b CAR T细胞(例如本发明的实施方案的CAR T细胞)的组合物用于治疗受试者的癌症的用途。

[0032] 在进一步的实施方案中,提供了一种用于治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的CD79b CAR T细胞,例如本发明的实施方案的CAR T细胞。在一些方面,癌症是B细胞恶性肿瘤,例如B细胞急性成淋巴细胞白血病(ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤或慢性淋巴细胞白血病。在某些方面,癌症是表达CD79b的癌症。

[0033] 在一些方面,受试者先前已被施用CD19 CAR疗法。在某些方面,受试者对CD19 CAR疗法具有抗性,例如由于CD19抗原丢失。在某些方面,受试者已经复发了CD19阴性肿瘤。

[0034] 在某些方面,CD79b CAR T细胞静脉内、皮内、瘤内、肌肉内、腹膜内、皮下或局部施用。在另外的方面,所述方法还包括向受试者施用至少第二抗癌疗法。在一些方面,第二抗癌疗法是手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。

[0035] 本发明的其他目的、特征和优点将从以下详细描述中变得明显。然而,应当理解,详细描述和具体实施例虽然指明了本发明的优选实施方案,但仅以举例说明的方式给出,因为在本发明的精神和范围内的各种变化和修改从此详细描述对于本领域技术人员来说将变得明显。

[0036] 附图简要说明

[0037] 下列附图构成本说明书的一部分,并被包括在内以进一步举例说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个并结合在此呈现的具体实施方案的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0038] 图1A-1D: (A) 细胞系中的CD79b表达。(B) 人体组织中的CD79b表达。(C) 白血病中的CD79b表达。(D) 淋巴瘤中的CD79b表达。

[0039] 图2A-2D: (A) CD79b转导的细胞的流式细胞术分析。(B) CD79b单克隆抗体的结合亲和力。(C) CD79b单克隆抗体的表征。(D) 淋巴瘤细胞系的克隆14染色。

[0040] 图3A-3D: (A) 描绘CD79b CAR的构建体的示意图。(B) CD79bCAR和CD19 CAR的流式细胞术分析。(C) 以未转导的T细胞作为对照的CD79b CAR和CD19 CAR的细胞毒性百分比。(D) 以未转导的T细胞作为对照的CD79b CAR和CD19 CAR的流式细胞术。

[0041] 图4A-4D: (A) 与CD79b CAR和CD19外显子2  $\Delta$  剪接变体共培养的T细胞。(B) 以5:1的效应物:靶标比率孵育4天的CAR的效力的流式细胞术分析。(C) 具有CD79b CAR的Daudi细胞的绝对细胞计数。(D) 具有CD79b CAR的CD19敲低细胞的绝对细胞计数。

[0042] 图5A-5C: (A) 临床前研究的示意图。(B) 研究期间小鼠的生物发光图像。(C) 研究期

间小鼠的存活百分比。

[0043] 举例说明性实施方案的描述

[0044] CD79b是泛B细胞谱系标志物和B细胞受体复合物的重要组分。CD79b在正常B细胞和B细胞恶性肿瘤中广泛表达,并且其表达通常保留在CD19特异性CAR T细胞治疗后复发的CD19阴性肿瘤中。因此,在某些实施方案中,本公开内容提供了CD79b单克隆抗体和CD79b特异性CAR,例如CD79b-CAR T细胞。

[0045] 本研究证明了本发明的CD79b特异性CAR T细胞产品在体外和体内模型中的功效。通过杂交瘤技术开发了三种针对人CD79b的鼠单克隆抗体,并证明它们与重组人CD79b特异性结合,具有高亲和力(Kd范围为1.44-17.8nM),并染色多种淋巴瘤细胞系。接下来,克隆了CD79b抗体重链和轻链的可变区,并为具有CD3 $\zeta$ 和CD28/4-1BB共刺激结构域的抗CD79b CAR开发了慢病毒构建体。结果表明,抗CD79b CAR构建体可以使用慢病毒转导到健康供体的原代CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞中,转导效率超过70%。

[0046] 观察到抗CD79b CAR T细胞而非未转导的T细胞表现出与对照抗CD19 CAR T细胞相当的针对Daudi伯基特淋巴瘤和Mino套细胞淋巴瘤细胞系的显著细胞毒性活性。更重要的是,抗CD79b而非抗CD19 CAR T细胞裂解CD19-CD79b<sup>+</sup>淋巴瘤细胞。当它们与淋巴瘤细胞共培养时,在CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>抗CD79b CAR T细胞中还观察到显著的脱颗粒作用。还在NSG小鼠中针对Mino淋巴瘤异种移植模型在体内检查了抗CD79b CAR T细胞的功效。将萤光素酶标记的Mino套细胞淋巴瘤细胞以 $2 \times 10^6$ 个肿瘤细胞/小鼠静脉内注射到NSG小鼠中。18天后,通过尾静脉用未转导的原代T细胞、抗CD19 CAR T细胞或抗CD79b CAR T细胞以 $10 \times 10^6$ 个T细胞/小鼠处理小鼠。生物发光成像用于评估肿瘤负荷。结果显示,在用未转导的T细胞处理的小鼠中的进行性肿瘤生长。而在用抗CD19和抗CD79b CAR T细胞处理的小鼠中,肿瘤生长受到抑制,并且存活率提高。因此,这些结果显示了这种新型抗CD79b CAR T细胞疗法在患有B细胞恶性肿瘤的患者中的功效,这可能是克服CD19特异性CAR T细胞疗法后由于CD19丢失而导致的耐药性的新策略。

[0047] 在一些方面,本发明的抗CD79b CAR构建体由慢病毒载体编码。载体可以转导到免疫细胞例如T细胞中。构建体可以包含CD28、CD3 $\zeta$ 和/或4-1BB信号传导结构域。构建体可以包含转导标志物,例如eGFP或截短的EGFR结构域。转导标志物可以通过切割肽(例如2A肽)与CAR连接。

[0048] 本文进一步提供了通过施用本文提供的CD79b特异性CAR免疫细胞(例如T细胞)来治疗癌症的方法。癌症可以是B细胞恶性肿瘤,例如表达CD79b的B细胞急性淋巴细胞白血病(ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤或慢性淋巴细胞白血病。本疗法可用于治疗在抗CD19-CAR T细胞疗法后复发CD19阴性肿瘤的患有B细胞恶性肿瘤的受试者。

[0049] I. 定义

[0050] 如本文所用,就指定组分而言,“基本上不含”在本文中用于表示没有任何指定组分被有意配制到组合物中和/或仅作为污染物或以痕量存在。因此,由组合物的任何意外污染导致的指定组分的总量远低于0.05%,优选低于0.01%。最优选的是其中用标准分析方法不能检测到指定组分的量的组合物。

[0051] 如本文说明书所使用的,“一个”或“一种”可表示一个或多个/一种或多种。如本文

在权利要求中所使用的,当与词语“包含”结合使用时,词语“一个”或“一种”可以表示一个或多个/一种或多种。

[0052] 除非明确指出仅指代替代方案或替代方案是互斥的,否则在权利要求中使用术语“或”来表示“和/或”,尽管本公开内容支持仅指替代方案以及“和/或”的定义。如本文所用,“另一个”可表示至少第二个或更多个。术语“大约”、“基本上”和“约”通常表示所陈述的值 $\pm 5\%$ 。

[0053] 疾病或病况的“治疗”或疗法是指执行方案(其可以包括向患者施用一种或多种药物)以试图减轻疾病的体征或症状。治疗的期望效果包括降低疾病进展的速度、改善或缓和疾病状态以及缓解或改善预后。缓解可以在疾病或病况的体征或症状出现之前以及在其出现之后发生。因此,“治疗”或“疗法”可包括疾病或非期望病况的“预防”或“防止”。另外,“治疗”或“疗法”不需要完全缓解体征或症状,不需要治愈,并且特别包括仅对患者有轻微影响的方案。

[0054] 本申请通篇使用的术语“治疗益处”或“治疗上有效”是指在这种病况的医学治疗方面促进或增强受试者的健康的任何事物。这包括但不限于减少疾病的体征或症状的频率或严重程度。例如,癌症的治疗可涉及例如肿瘤大小的减小、肿瘤侵袭性的降低、癌症生长速率的降低或转移的预防。癌症的治疗还可以指延长患有癌症的受试者的存活。

[0055] “受试者”和“患者”是指人类或非人类,例如灵长类动物、哺乳动物和脊椎动物。在特定实施方案中,受试者是人。

[0056] 短语“药学上或药理学上可接受的”是指当适当地施用至动物例如人时不产生不良反应、过敏反应或其他异常反应的分子实体和组合物。根据本公开内容本领域技术人员将知晓包含抗体或另外的活性成分的药物组合物的制备。此外,对于动物(例如,人)施用,将理解制剂应满足FDA生物标准办公室要求的无菌、产热原性、一般安全性和纯度标准。

[0057] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括任何和所有水性溶剂(例如,水、醇/水溶液、盐水溶液、肠胃外媒介物,例如氯化钠、Ringer右旋糖等)、非水性溶剂(例如,丙二醇、聚乙二醇、植物油和可注射的有机酯,例如油酸乙酯)、分散介质、涂层、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如,抗细菌剂或抗真菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料、流体和营养补充剂,这样的类似材料及其组合,如将是本领域普通技术人员所已知的。药物组合物中各种组分的pH和准确浓度根据众所周知的参数进行调节。

[0058] II. CD79b抗体

[0059] 在某些实施方案中,预期了结合CD79b的至少一部分并抑制CD79b信号传导的抗体或其片段。如本文所用,术语“抗体”旨在泛指任何免疫结合剂,例如IgG、IgM、IgA、IgD、IgE和遗传修饰的IgG以及包含保留抗原结合活性的抗体CDR结构域的多肽。抗体可选自嵌合抗体、亲和力成熟抗体、多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、人抗体或抗原结合抗体片段或天然或合成配体。优选地,抗CD79b抗体是单克隆抗体或人源化抗体。

[0060] 因此,通过已知手段和如本文所述,可以产生对CD79b、其各自的表位中的一种或多种或任何前述的缀合物具有特异性的多克隆或单克隆抗体、抗体片段和结合结构域和CDR(包括上述任何一种的工程化形式),无论这样的抗原或表位是从天然来源分离的还是天然化合物的合成衍生物或变体。



[0061] 适用于本发明的实施方案的抗体片段的实例包括但不限于：(i) Fab片段，其由 $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ 和 $C_H$ 结构域组成；(ii) 由 $V_H$ 和 $C_H$ 结构域组成的“Fd”片段；(iii) 由单一抗体的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域组成的“Fv”片段；(iv) “dAb”片段，其由 $V_H$ 结构域组成；(v) 分离的CDR区；(vi) F(ab')<sub>2</sub>片段，其是包含两个连接的Fab片段的二价片段；(vii) 单链Fv分子(“scFv”)，其中 $V_H$ 结构域和 $V_L$ 结构域通过允许两个结构域缔合以形成结合结构域的肽接头连接；(viii) 双特异性单链Fv二聚体(参见美国专利号5,091,513)；和(ix) 通过基因融合(美国专利申请公开号20050214860)构建的双抗体、多价或多特异性片段。Fv、scFv或双抗体分子可以通过引入连接 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域的二硫桥来稳定。还可以制备包含连接到CH3结构域的scFv的微型抗体。

[0062] 在实施方案中还预期了抗体样结合肽模拟物。Liu等人(2003)描述了“抗体样结合肽模拟物”(ABiP)，其是用作精简抗体并具有更长的血清半衰期以及更少繁琐的合成方法的某些优势的肽。

[0063] 动物可以接种抗原，例如CD79b胞外结构域(ECD)蛋白，以产生对CD79b特异的抗体。通常，抗原与另一个分子结合或缀合以增强免疫反应。如本文所用，缀合物是与用于在动物中引发免疫反应的抗原结合的任何肽、多肽、蛋白质或非蛋白质物质。在动物中响应于抗原接种而产生的抗体包括由多种产生抗体的个体B淋巴细胞制备的多种不同分子(多克隆抗体)。多克隆抗体是抗体种类的混合群体，其各自可以识别相同抗原上的不同表位。鉴于用于动物中多克隆抗体产生的正确条件，动物血清中的大多数抗体将识别用于免疫动物的抗原化合物上的集体表位。这种特异性通过亲和纯化进一步增强，以仅选择识别感兴趣的抗原或表位的那些抗体。

[0064] 单克隆抗体是单一种类的抗体，其中每个抗体分子识别相同的表位，因为所有产生抗体的细胞都来源于单个B淋巴细胞细胞系。产生单克隆抗体(MAb)的方法通常使用与用于制备多克隆抗体的那些相同的细胞系开始。在一些实施方案中，啮齿动物(例如小鼠和大鼠)用于产生单克隆抗体。在一些实施方案中，兔、绵羊或蛙细胞用于产生单克隆抗体。大鼠的使用是众所周知的并且可以提供某些优势。小鼠(例如，BALB/c小鼠)是常规使用的，并且通常提供高百分比的稳定融合。

[0065] 杂交瘤技术涉及来自先前用CD79b抗原免疫的小鼠的单个B淋巴细胞与永生性骨髓瘤细胞(通常小鼠骨髓瘤)的融合。该技术提供了一种将单个产生抗体的细胞繁殖无限代的方法，从而可以产生无限量的结构相同的具有相同抗原或表位特异性的抗体(单克隆抗体)。

[0066] 血浆B细胞( $CD45^+CD5^-CD19^+$ )可以从经免疫的兔的新鲜制备的兔外周血单核细胞分离，并针对CD79b结合细胞进行进一步选择。富集产生抗体的B细胞后，可以分离总RNA并合成cDNA。可以扩增来自重链和轻链的抗体可变区的DNA序列，将其构建到噬菌体展示Fab表达载体中，并转化到大肠杆菌中。特异性结合Fab的CD79b可以通过多轮富集淘选选择出来并测序。选择的CD79b结合命中可以使用哺乳动物表达载体系统在人胚胎肾(HEK293)细胞(Invitrogen)中表达为兔和兔/人嵌合形式的全长IgG，并使用具有快速蛋白液相色谱(FPLC)分离单元的蛋白G树脂进行纯化。

[0067] 在一个实施方案中，抗体是嵌合抗体，例如包含移植到异源非人、人或人源化序列(例如框架和/或恒定结构域序列)的来自非人供体的抗原结合序列的抗体。已经开发出用人类来源的类似结构域代替单克隆抗体的轻链和重链恒定结构域而使外源抗体的可变区

保持完整的方法。可选择地，“全人”单克隆抗体在人免疫球蛋白基因的转基因小鼠中产生。还已经开发了通过重组构建具有啮齿动物(例如小鼠)和人氨基酸序列的抗体可变结构域来将单克隆抗体的可变结构域转化为更多人形式的方法。在“人源化”单克隆抗体中，只有高变CDR来源于小鼠单克隆抗体，框架和恒定区来源于人类氨基酸序列(参见美国专利号5,091,513和6,881,557)。据信，用人类抗体的相应位置中发现的氨基酸序列替换啮齿动物特征性的抗体中的氨基酸序列将降低治疗使用期间不良免疫反应的可能性。产生抗体的杂交瘤或其他细胞还可经受基因突变或其他变化，其可能会或可能不会改变由杂交瘤产生的抗体的结合特异性。

[0068] 用于在各种动物物种中产生多克隆抗体以及用于产生各种类型的单克隆抗体(包括人源化的、嵌合的和完全人的)的方法是本领域众所周知的并且是高度可预测的。例如，以下美国专利和专利申请提供了对此类方法的实现性描述：美国专利申请号2004/0126828和2002/0172677；和美国专利号3,817,837；3,850,752；3,939,350；3,996,345；4,196,265；4,275,149；4,277,437；4,366,241；4,469,797；4,472,509；4,606,855；4,703,003；4,742,159；4,767,720；4,816,567；4,867,973；4,938,948；4,946,778；5,021,236；5,164,296；5,196,066；5,223,409；5,403,484；5,420,253；5,565,332；5,571,698；5,627,052；5,656,434；5,770,376；5,789,208；5,821,337；5,844,091；5,858,657；5,861,155；5,871,907；5,969,108；6,054,297；6,165,464；6,365,157；6,406,867；6,709,659；6,709,873；6,753,407；6,814,965；6,849,259；6,861,572；6,875,434；和6,891,024。本文及其中引用的所有专利、专利申请出版物和其他出版物均通过引用并入本申请。

[0069] 抗体可以从任何动物来源(包括鸟类和哺乳动物)产生。优选地，抗体是绵羊、鼠(例如小鼠和大鼠)、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡。此外，更新的技术允许从人类组合抗体文库中开发和筛选人类抗体。例如，噬菌体抗体表达技术允许在没有动物免疫的情况下产生特异性抗体，如美国专利号6,946,546中所述的，其通过引用并入本文。

[0070] 完全预期针对CD79b的抗体将具有中和或抵消CD79b的作用(而不管动物物种、单克隆细胞系或其他抗体来源)的能力。某些动物物种对于产生治疗性抗体可能是不太优选的，因为它们更可能由于通过抗体的“Fc”部分激活补系统而引起过敏反应。然而，完整抗体可以被酶促消化成“Fc”(补体结合)片段和消化成具有结合结构域或CDR的抗体片段。去除Fc部分降低了抗原抗体片段将引起不希望的免疫反应的可能性，以及因此，不含Fc的抗体可以优先用于预防性或治疗性治疗。如上所述，抗体还可以被构建为是嵌合的或部分或完全人的，以减少或消除由向动物施用已在其他物种中产生或具有来自其他物种的序列的抗体而导致的不利免疫后果。

[0071] 置换变体通常在蛋白质内的一个或多个位点包含一个氨基酸与另一个氨基酸的交换，并且可以被设计为在具有或不具有其他功能或特性的损失的情况下调节多肽的一个或多个特性。置换可以是保守的，即一个氨基酸被替换为具有相似形状和电荷的一个氨基酸。保守置换在本领域中是众所周知的，并且包括例如以下的改变：丙氨酸到丝氨酸；精氨酸到赖氨酸；天冬酰胺到谷氨酰胺或组氨酸；天冬氨酸到谷氨酸；半胱氨酸到丝氨酸；谷氨酰胺到天冬酰胺；谷氨酸到天冬氨酸；甘氨酸到脯氨酸；组氨酸到天冬酰胺或谷氨酰胺；异亮氨酸到亮氨酸或缬氨酸；亮氨酸到缬氨酸或异亮氨酸；赖氨酸到精氨酸；甲硫氨酸到亮氨酸或异亮氨酸；苯丙氨酸到酪氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸；丝氨酸到苏氨酸；苏氨酸到丝氨酸；

色氨酸到酪氨酸;酪氨酸到色氨酸或苯丙氨酸;和缬氨酸到异亮氨酸或亮氨酸。可选择地,置换可以是非保守的,使得影响多肽的功能或活性。非保守性改变通常涉及将残基置换为化学上不同的残基,例如极性或带电荷的氨基酸置换为非极性或不带电荷的氨基酸,反之亦然。

[0072] 蛋白质可以是重组的,或体外合成的。可选择地,可以从细菌分离非重组或重组蛋白质。还预期可以在组合物和方法中应用含有这样的变体的细菌。因此,不需要分离蛋白质。

[0073] 预期在组合物中每毫升含有约0.001mg至约10mg的总多肽、肽和/或蛋白质。因此,组合物中蛋白质的浓度可为约、至少约或至多约0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0mg/ml或更多(或其中可推导出的任何范围)。其中,约、至少约或至多约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%可以是结合CD79b的抗体。

[0074] 抗体或优选抗体的免疫学部分可以化学缀合至或表达为与其他蛋白质的融合蛋白质。出于本说明书和所附权利要求的目的,所有此类融合蛋白均包括在抗体或抗体的免疫学部分的定义中。

[0075] 实施方案提供了针对CD79b、多肽和肽的抗体和抗体样分子,其与至少一种试剂连接以形成抗体缀合物或有效载荷。为了提高抗体分子作为诊断或治疗剂的功效,常规的是连接或共价结合或复合至少一种所需分子或部分。这样的分子或部分可以是但不限于至少一种效应分子或报告分子。效应分子包括具有所需活性例如细胞毒性活性的分子。与抗体附接的效应分子的非限制性实例包括毒素、治疗酶、抗生素、放射性标记的核苷酸等。相比之下,报告分子被定义为可以使用测定法检测的任何部分。与抗体缀合的报告分子的非限制性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、生色团、发光分子、光亲和分子、有色颗粒或配体,例如生物素。

[0076] 本领域已知几种将抗体附接至或缀合到其缀合部分的方法。一些附接方法包括使用金属螯合络合物,其利用例如与抗体附接的有机螯合剂,例如二亚乙基三胺五乙酸酐(DTPA);乙三胺四乙酸;N-氯-对-甲苯磺酰胺;和/或四氯-3-6-二苯基甘脲-3。单克隆抗体也可以在偶联剂例如戊二醛或高碘酸盐的存在下与酶反应。在这些偶联剂的存在下或通过异硫氰酸酯反应来制备具有荧光素标志物的缀合物。

[0077] III. T细胞疗法

[0078] 本公开内容的某些实施方案涉及获得T细胞并将其施用至受试者作为靶向癌细胞的免疫疗法。在过去的二十年中,已经描述了几种用于衍生、激活和扩增功能性抗肿瘤效应T细胞的基本方法。这些包括:自体细胞,例如肿瘤浸润淋巴细胞(TIL);使用自体DC、淋巴细胞、人工抗原呈递细胞(APC)或包被有T细胞配体和激活抗体的珠子或通过捕获靶细胞膜分离的细胞在体外激活T细胞;天然表达抗宿主肿瘤T细胞受体(TCR)的同种异体细胞;和被基因重编程或“重定向”以表达展示抗体样肿瘤识别能力的肿瘤反应性TCR或嵌合TCR分子(被

称为“T体”)的非肿瘤特异性的自体或同种异体细胞。这些方法产生了可用于本公开内容的方法的用于T细胞制备和免疫的许多方案。

#### [0079] A.T细胞制备

[0080] 在一些实施方案中,T细胞来源于血液、骨髓、淋巴或淋巴器官。在一些方面,细胞是人细胞。细胞通常是原代细胞,例如直接从受试者分离和/或从受试者分离并冷冻的那些。在一些实施方案中,细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个子集,例如完整的T细胞群、CD4<sup>+</sup>细胞、CD8<sup>+</sup>细胞及其亚群,例如通过功能、激活状态、成熟度、分化潜能、扩增、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、特定器官或区室中的存在、标志物或细胞因子分泌特征谱和/或分化程度定义的那些。关于待治疗的受试者,细胞可以是同种异体的和/或自体的。在一些方面,例如对于现成技术,细胞是多能性和/或多潜能的,例如干细胞,例如诱导多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,所述方法包括如本文所述从受试者分离细胞,对其进行制备、加工、培养和/或工程化,并且在冷冻保存之前或之后将它们重新引入同一患者。

[0081] T细胞(例如CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup>T细胞)的亚型和亚群包括幼稚T( $T_N$ )细胞、效应T细胞( $T_{EFF}$ )、记忆T细胞及其亚型,例如干细胞记忆T( $T_{SCM}$ )、中枢记忆T( $T_{CM}$ )、效应记忆T( $T_{EM}$ )或终末分化效应记忆T( $T_{TEMRA}$ )细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关不变性T(MAIT)细胞、天然存在和适应性调节性T( $T_{reg}$ )细胞、辅助T细胞,例如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助T细胞、 $\alpha/\beta$ T细胞和 $\delta/\gamma$ T细胞。

[0082] 在一些实施方案中,一种或多种T细胞群富集或耗尽对特定标志物(例如表面标志物)呈阳性或对特定标志物呈阴性的细胞。在一些情况下,此类标志物是在某些T细胞群(例如,非记忆细胞)上不存在或以相对低水平表达但在某些其他T细胞群(例如,记忆细胞)上存在或以相对较高水平表达的标志物。在一个实施方案中,细胞(例如,CD8<sup>+</sup>细胞或CD3<sup>+</sup>细胞)富集对CD45RO、CCR7、CD28、CD27、CD44、CD127和/或CD62L呈阳性或表达高表面水平的CD45RO、CCR7、CD28、CD27、CD44、CD127和/或CD62L的细胞和/或耗尽(例如,针对其进行阴性选择)对CD45RA呈阳性或表达高表面水平的CD45RA的细胞。在一些实施方案中,细胞富集或耗尽对CD122、CD95、CD25、CD27和/或IL7-Ra(CD127)呈阳性或表达高表面水平的CD122、CD95、CD25、CD27和/或IL7-Ra(CD127)的细胞。在一些实例中,CD8<sup>+</sup>T细胞富集对CD45RO(或对CD45RA呈阴性)和对CD62L呈阳性的细胞。

[0083] 在一些实施方案中,通过阴性选择在非T细胞(例如B细胞、单核细胞或其他白细胞)上表达的标志物(例如CD14)来从PBMC样品中分离T细胞。在一些方面,CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>选择步骤用于分离CD4<sup>+</sup>辅助T细胞和CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞。此类CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>群体可以通过阳性或阴性选择在一个或多个幼稚、记忆和/或效应T细胞亚群上表达的或表达至相对较高程度的标志物而进一步分选为亚群。

[0084] 在一些实施方案中,例如通过基于与相应亚群相关的表面抗原的阳性或阴性选择,使CD8<sup>+</sup>细胞进一步富集或耗尽幼稚、中枢记忆、效应记忆和/或中枢记忆干细胞。在一些实施方案中,进行针对中枢记忆T( $T_{CM}$ )细胞的富集以提高功效,例如以改善施用后的长期存活、扩增和/或植入,这在一些方面在此类亚群中特别稳健。在一些实施方案中,组合 $T_{CM}$ -富集的CD8<sup>+</sup>T细胞和CD4<sup>+</sup>T细胞进一步增强功效。

[0085] 在一些实施方案中,T细胞是自体T细胞。在该方法中,从患者获得肿瘤样品并获得单细胞悬浮液。单细胞悬浮液可以以任何合适的方式获得,例如机械地(使用例如gentleMACS™ Dissociator,Miltenyi Biotec,Auburn,Calif.分解肿瘤)或酶促地(例如,胶原酶或DNA酶)。肿瘤酶促消化物的单细胞悬浮液在白介素-2 (IL-2) 中培养。培养细胞直至汇合(例如约 $2 \times 10^6$ 个淋巴细胞),例如培养约5至约21天,优选约10至约14天。例如,可以培养细胞5天、5.5天或5.8天至21天、21.5天或21.8天,例如10天、10.5天或10.8天至14天、14.5天或14.8天。

[0086] 可以合并培养的T细胞并快速扩增。快速扩增使抗原特异性T细胞的数量在约10至约14天,优选约14天的时间内增加至少约50倍(例如,50、60、70、80、90或100倍或更多)。更优选地,快速扩增提供在约10至约14天,优选约14天的时间内至少约200倍(例如,200、300、400、500、600、700、800、900倍或更多)的增加。

[0087] 可以通过本领域已知的多种方法中的任一种来实现扩增。例如,在饲养淋巴细胞和白介素-2 (IL-2) 或白介素-15 (IL-15) (优选IL-2) 的存在下,使用非特异性T细胞受体刺激可以快速扩增T细胞。非特异性T细胞受体刺激物可包括约30ng/ml的OKT3,其是一种小鼠单克隆抗CD3抗体(可从**Ortho-McNeil®**,Raritan,N.J.获得)。可选择地,可以通过在T细胞生长因子(例如300IU/ml IL-2或IL-15,优选IL-2) 的存在下用一种或多种癌症抗原(包括其抗原部分(例如表位)或细胞)(其可以任选地从载体表达,例如人白细胞抗原A2 (HLA-A2) 结合肽)在体外刺激外周血单核细胞(PBMC)来快速扩增T细胞。通过用负载在表达HLA-A2的抗原呈递细胞上的相同癌症抗原再次刺激来迅速扩增体外诱导的T细胞。可选择地,例如,可以用经辐照的自体淋巴细胞或用经辐照的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2再次刺激T细胞。

[0088] 可以修饰自体T细胞以表达促进自体T细胞的生长和活化的T细胞生长因子。合适的T细胞生长因子包括例如白介素(IL)-2、IL-7、IL-15和IL-12。合适的修饰方法是本领域已知的。参见,例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.2001;和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and John Wiley& Sons,NY,1994。在特定方面,修饰的自体T细胞以高水平表达T细胞生长因子。T细胞生长因子编码序列(例如IL-12的)以及启动子(其与T细胞生长因子编码序列的可操作连接促进高水平表达)在本领域是容易获得的。

#### [0089] B.遗传工程化的抗原受体

[0090] T细胞可以被遗传工程化以表达抗原受体,例如工程化的TCR或嵌合抗原受体(CAR)。例如,自体T细胞被修饰以表达对癌症抗原(例如CD79b)具有抗原特异性的T细胞受体(TCR)。合适的TCR包括例如对黑色素瘤抗原(例如gp100或MART-1)具有抗原特异性的那些。合适的修饰方法是本领域已知的。参见,例如Sambrook和Ausubel,同上。例如,可以使用Heemskerk等人,Hum Gene Ther.19:496-510(2008)和Johnson等人,Blood 114:535-46(2009)描述的转导技术转导T细胞以表达对癌症抗原具有抗原特异性的TCR。

[0091] 在一些实施方案中,T细胞包含一种或多种通过遗传工程化引入的编码一种或多种抗原受体的核酸,以及此类核酸的遗传工程化产物。在一些实施方案中,核酸是异源的,即通常不存在于细胞或从细胞获得的样品中,例如从另一种生物体或细胞获得的核酸,其

例如在经工程化的细胞和/或衍生出这种细胞的生物体中通常不存在。在一些实施方案中,核酸不是天然存在的,例如在自然界中未发现的核酸(例如,嵌合的)。

[0092] 在一些实施方案中,CAR包含与CD79b特异性结合的细胞外抗原识别结构域。在一些实施方案中,抗原是在细胞表面表达的蛋白质。在一些实施方案中,CAR是TCR样CAR并且抗原是经加工的肽抗原,例如细胞内蛋白质的肽抗原,其像TCR一样在主要组织相容性复合物(MHC)分子的情况下在细胞表面上被识别。

[0093] 示例性的抗原受体(包括CAR和重组TCR)以及用于将受体工程化和引入细胞的方法包括描述于例如以下中的那些:国际专利申请公开号W0200014257、W02013126726、W02012/129514、W02014031687、W02013/166321、W02013/071154、W02013/123061,美国专利申请公开号US2002131960、US2013287748、US20130149337、美国专利号6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353和8,479,118以及欧洲专利申请号EP2537416,和/或Sadelain等人,2013;Davila等人,2013;Turtle等人,2012;Wu等人,2012描述的那些。在一些方面,遗传工程化的抗原受体包括美国专利号7,446,190中描述的CAR,以及国际专利申请公开号W0/2014055668A1中描述的那些。

[0094] 1. 嵌合抗原受体

[0095] 在一些实施方案中,CAR包含:a)细胞内信号传导结构域,b)跨膜结构域,和c)包含抗原结合区的细胞外结构域。

[0096] 在一些实施方案中,工程化抗原受体包括CAR,包括激活或刺激性CAR、共刺激CAR(参见W02014/055668)和/或抑制性CAR(iCAR,参见Fedorov等人,2013)。CAR通常包括与一种或多种细胞内信号传导组分连接的细胞外抗原(或配体)结合结构域,在一些方面,通过接头和/或一个或多个跨膜结构域连接。此类分子通常模拟或近似通过天然抗原受体的信号、通过与共刺激受体组合的此类受体的信号和/或通过单独的共刺激受体的信号。

[0097] 本公开内容的某些实施方案涉及核酸(包括编码抗原特异性CAR多肽(包括已被人源化以降低免疫原性的CAR(hCAR),其包含细胞内信号传导结构域、跨膜结构域以及包含一个或多个信号传导基序的细胞外结构域)的核酸)的用途。在某些实施方案中,CAR可以识别包含一种或多种抗原之间的共享空间的表位。在某些实施方案中,结合区可包含单克隆抗体的互补决定区、单克隆抗体的可变区和/或其抗原结合片段。在另一个实施方案中,该特异性来源于与受体结合的肽(例如,细胞因子)。

[0098] 预期人类CAR核酸可以是用于增强人类患者的细胞免疫疗法的人类基因。在一个具体实施方案中,本发明包括全长CAR cDNA或编码区。抗原结合区或结构域可包含来源于特定人单克隆抗体的单链可变片段(scFv)的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>链的片段,例如美国专利7,109,304中描述的那些,该专利以引用方式并入本文。该片段还可以是人抗原特异性抗体的任何数量的不同抗原结合结构域。在更具体的实施方案中,该片段是由针对人类密码子使用优化以用于在人类细胞中表达的序列编码的抗原特异性scFv。

[0099] 该布置可以是多聚体,例如双抗体或多聚体。多聚体最有可能通过将轻链和重链的可变部分交叉配对成双抗体而形成。构建体的铰链部分可以有多种选择,从完全删除到保留第一个半胱氨酸,到脯氨酸而不是丝氨酸置换,到截短到第一个半胱氨酸。可以删除Fc部分。任何稳定和/或二聚化的蛋白质都可以达到这个目的。可以使用Fc结构域的仅一个,

例如来自人免疫球蛋白的CH2或CH3结构域。还可以使用已被修饰以改善二聚化的人类免疫球蛋白的铰链、CH2和CH3区域。还可以仅使用免疫球蛋白的铰链部分。还可以使用CD8 $\alpha$ 的部分。

[0100] 在一些实施方案中，CAR核酸包含编码其他共刺激受体的序列，例如跨膜结构域和修饰的CD28胞内信号传导结构域。其他共刺激受体包括但不限于CD28、CD27、OX-40 (CD134) 和4-1BB (CD137) 中的一种或多种。

[0101] 在一些实施方案中，CAR构建为对特定抗原(或标志物或配体)(例如待通过过继疗法靶向的特定细胞类型中表达的抗原，例如癌症标志物，和/或旨在诱导抑制反应的抗原，例如在正常或非患病细胞类型上表达的抗原)具有特异性。因此，CAR通常在其细胞外部分中包括一种或多种抗原结合分子，例如一种或多种抗原结合片段、结构域或部分，或一种或多种抗体可变结构域，和/或抗体分子。在一些实施方案中，CAR包含抗体分子的一个或多个抗原结合部分，例如来源于单克隆抗体(mAb)的可变重(VH)和可变轻(VL)链的单链抗体片段(scFv)。

[0102] 编码嵌合受体的开放阅读框的序列可以从基因组DNA来源、cDNA来源获得，或可以合成(例如，通过PCR)，或通过其组合获得。取决于基因组DNA的大小和内含子的数量，可能期望的是使用cDNA或其组合，因为发现内含子可以稳定mRNA。此外，使用内源性或非编码区来稳定mRNA可能是进一步有利的。

[0103] 预期可以将嵌合构建体作为裸DNA或在合适的载体中引入免疫细胞。使用裸DNA通过电穿孔稳定转染细胞的方法是本领域已知的。参见例如美国专利号6,410,319。裸DNA通常是指以用于表达的适当方向包含在质粒表达载体中的编码嵌合受体的DNA。

[0104] 可选择地，可以使用病毒载体(例如逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体或慢病毒载体)将嵌合构建体引入免疫细胞。用于根据本公开内容的方法使用的合适载体在免疫细胞中是非复制性的。已知大量基于病毒的载体，其中维持在细胞中的病毒的拷贝数足够低以维持细胞的活力，例如基于HIV、SV40、EBV、HSV或BPV的载体。

[0105] 在一些方面，抗原特异性结合或识别成分与一个或多个跨膜和细胞内信号传导结构域连接。在一些实施方案中，CAR包含与CAR的细胞外结构域融合的跨膜结构域。在一个实施方案中，使用与CAR中的结构域之一天然缔合的跨膜结构域。在一些情况下，通过氨基酸置换选择或修饰跨膜结构域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，以最小化与受体复合物的其他成员的相互作用。

[0106] 在一些实施方案中，跨膜结构域来源于天然或合成来源。在来源是天然的情况下，一些方面中的结构域来源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区包括来源于(即至少包含其一个或多个跨膜区)CD28、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 和T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链的那些。可选择地，一些实施方案中的跨膜结构域是合成的。在一些方面，合成的跨膜结构域主要包含疏水性残基，例如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面，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。

[0107] 在具体的实施方案中，本发明的CAR构建体包含轻链-接头-重链-铰链-跨膜结构域-信号传导结构域。接头可以是接头1(SEQ ID NO:44或45)、接头2(SEQ ID NO:46或47)、接头3(SEQ ID NO:48或49)或接头4(SEQ ID NO:50或51)。铰链可以是CD8铰链1(SEQ ID NO:52或53)、CD8铰链2(SEQ ID NO:54或55)、CD8铰链3(SEQ ID NO:56或57)、CD28铰链(SEQ

ID NO:58或59)、IgG4铰链(SEQ ID NO:60或61)、IgG4 CH2(SEQ ID NO:62或63)、IgG4 CH2CH3(SEQ ID NO:64或65)或IgG4 CH1CH2CH3(SEQ ID NO:66或67)。跨膜结构域可以是CD8 TM1(SEQ ID NO:68或69)、CD8 TM2(SEQ ID NO:70或71)或CD28 TM(SEQ ID NO:72或73)。信号传导结构域可以是CD28(SEQ ID NO:74或75)、4-1BB(SEQ ID NO:76或77)、OX-40(SEQ ID NO:78或79)和/或CD3细胞内(SEQ ID NO:80或81)。CAR构建体还可包含GFP(SEQ ID NO:82或83)、T2A(SEQ ID NO:84或85)和/或EGFR(SEQ ID NO:40或41)。示例性重链(HC)、接头和轻链(LC)组合可包括但不限于:LC-接头1-HC;LC-接头2-HC;LC-接头3-HC;LC-接头4-HC;HC-接头1-LC;HC-接头2-LC;HC-接头3-LC;或HC-接头4-LC。

## [0108] 2. T细胞受体 (TCR)

[0109] 在一些实施方案中,遗传工程化抗原受体包括重组TCR和/或从天然存在的T细胞克隆的TCR。“T细胞受体”或“TCR”是指含有可变 $\alpha$ 和 $\beta$ 链(也分别称为TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ )或可变 $\gamma$ 和 $\delta$ 链(也分别称为TCR $\gamma$ 和TCR $\delta$ )和能够特异性结合与MHC受体结合的抗原肽的分子。在一些实施方案中,TCR呈 $\alpha\beta$ 形式。

[0110] 通常,以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR通常在结构上相似,但表达它们的T细胞可能具有不同的解剖学位置或功能。TCR可以在细胞表面上或以可溶形式存在。通常,TCR存在于T细胞(或T淋巴细胞)表面,在其上它通常负责识别与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的抗原。在一些实施方案中,TCR还可以包含恒定结构域、跨膜结构域和/或短胞质尾(参见例如Janeway等人,1997)。例如,在一些方面,TCR的每条链可以具有一个N-末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区和位于C-末端的短胞质尾。在一些实施方案中,TCR与参与介导信号转导的CD3复合物的不变蛋白缔合。除非另有说明,术语“TCR”应理解为包括其功能性TCR片段。该术语还包括完整或全长TCR,包括 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。

[0111] 因此,为了本文的目的,提及TCR包括任何TCR或功能片段,例如TCR的抗原结合部分,其结合在MHC分子中结合的特定抗原肽,即MHC-肽复合物。TCR的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”(可以互换使用)是指含有TCR的结构性结构域的一部分但结合完整的TCR结合的抗原(例如MHC-肽复合物)的分子。在某些情况下,抗原结合部分包含足以形成用于与特定MHC-肽复合物结合的结合位点的TCR的可变结构域,例如TCR的可变 $\alpha$ 链和可变 $\beta$ 链,例如通常其中每条链包含三个互补决定区。

[0112] 在一些实施方案中,TCR链的可变结构域缔合以形成环,或类似于免疫球蛋白的互补决定区(CDR),其通过形成TCR分子的结合位点赋予抗原识别和确定肽特异性。通常,与免疫球蛋白一样,CDR由框架区(FR)分隔(参见,例如Jores等人,1990;Chothia等人,1988;Lefranc等人,2003)。在一些实施方案中,CDR3是负责识别经加工的抗原的主要CDR,尽管 $\alpha$ 链的CDR1也已显示与抗原肽的N-末端部分相互作用,而 $\beta$ 链的CDR1与肽的C-末端部分相互作用。CDR2被认为识别MHC分子。在一些实施方案中, $\beta$ -链的可变区可包含进一步的高变(HV4)区。

[0113] 在一些实施方案中,TCR链包含恒定结构域。例如,像免疫球蛋白一样,TCR链(例如, $\alpha$ -链、 $\beta$ -链)的细胞外部分可以包含两个免疫球蛋白结构域,即在N端的可变结构域(例如, $V_\alpha$ 或 $V_\beta$ ;通常是基于Kabat编号的氨基酸1至116,Kabat等人,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,第5版)和与细胞膜相邻的一个恒定结构



域(例如, $\alpha$ -链恒定结构域或 $C_\alpha$ ,其通常是基于Kabat的氨基酸117至259, $\beta$ -链恒定结构域或 $C_\beta$ ,其通常是基于Kabat的氨基酸117至295)。例如,在一些情况下,通过所述两条链形成的TCR的细胞外部分含有两个膜近端恒定结构域和含有CDR的两个膜远端可变结构域。TCR结构域的恒定结构域含有短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,从而在两条链之间建立连接。在一些实施方案中,TCR可在 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链的每一个中具有额外的半胱氨酸残基,使得TCR在恒定结构域中包含两个二硫键。

[0114] 在一些实施方案中,TCR链可包含跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域带正电荷。在一些情况下,TCR链包含胞质尾。在一些情况下,该结构允许TCR与其他分子(例如CD3)结合。例如,含有恒定结构域和跨膜区的TCR可以将蛋白质锚定在细胞膜中,并与CD3信号传导装置或复合物的不变亚基缔合。

[0115] 通常,CD3是一种多蛋白复合物,其可具有在哺乳动物中的三条不同的链( $\gamma$ 、 $\delta$ 和 $\epsilon$ )以及 $\zeta$ 链。例如,在哺乳动物中,复合物可以包含CD3 $\gamma$ 链、CD3 $\delta$ 链、两条CD3 $\epsilon$ 链以及CD3 $\zeta$ 链的同源二聚体。CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\epsilon$ 链是含有单个免疫球蛋白结构域的免疫球蛋白超家族的高度相关的细胞表面蛋白。CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\epsilon$ 链的跨膜区带负电荷,这是允许这些链与带正电荷的T细胞受体链缔合的特征。CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\epsilon$ 链的细胞内尾部各包含一个保守基序,被称为基于酪氨酸的免疫受体激活基序或ITAM,而每条CD3 $\zeta$ 链具有三个。通常,ITAM参与TCR复合体的信号传导能力。这些辅助分子具有带负电荷的跨膜区域,并在将信号从TCR传播到细胞中发挥作用。CD3和 $\zeta$ 链与TCR一起形成所谓的T细胞受体复合物。

[0116] 在一些实施方案中,TCR可以是两条链 $\alpha$ 和 $\beta$ (或任选地 $\gamma$ 和 $\delta$ )的异二聚体,或它可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中,TCR是包含例如通过一个或多个二硫键连接的两条单独链( $\alpha$ 和 $\beta$ 链或 $\gamma$ 和 $\delta$ 链)的异二聚体。在一些实施方案中,鉴定针对靶抗原(例如,癌症抗原)的TCR并将其引入细胞中。在一些实施方案中,编码TCR的核酸可以从多种来源获得,例如通过可公开获得的TCR DNA序列的聚合酶链反应(PCR)扩增。在一些实施方案中,TCR获自生物来源,例如获自细胞诸如T细胞(例如细胞毒性T细胞)、T细胞杂交瘤或其他可公开获得的来源。在一些实施方案中,T细胞可以获自体内分离的细胞。在一些实施方案中,可从患者中分离高亲和力和T细胞克隆,并分离TCR。在一些实施方案中,T细胞可以是培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方案中,针对靶抗原的TCR克隆已经在用人免疫系统基因(例如,人白细胞抗原系统,或HLA)工程化的转基因小鼠中产生。在一些实施方案中,噬菌体展示用于分离针对靶抗原的TCR。在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分可以根据TCR序列的知识合成产生。

#### [0117] C. 递送方法

[0118] 本领域技术人员将很好地胜任通过标准重组技术来构建用于本公开内容的抗原受体的表达的载体(参见,例如Sambrook等人,2001和Ausubel等人,1996,两者均通过引用并入本文)。载体包括但不限于质粒、粘粒、病毒(噬菌体,动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如YAC),例如逆转录病毒载体(例如来源于莫洛尼氏鼠白血病病毒载体(MoMLV)、MSCV、SFFV、MPSV、SNV等)、慢病毒载体(例如来源于HIV-1、HIV-2、SIV、BIV、FIV等)、腺病毒(Ad)载体(包括其有复制能力、复制缺陷和无病毒基因(gutless)形式)、腺病毒相关病毒(AAV)载体、猿猴病毒40(SV-40)载体、牛乳头瘤病毒载体、Epstein-Barr病毒载体、疱疹病毒载体、痘苗病毒载体、哈维鼠肉瘤病毒载体、鼠乳腺肿瘤病毒载体、Rous肉瘤病毒载体、细

小病毒载体、脊髓灰质炎病毒载体、水泡性口炎病毒载体、马拉巴病毒载体和B群腺病毒enadenotucirev载体。

[0119] a. 病毒载体

[0120] 在本公开内容的某些方面可以提供编码抗原受体的病毒载体。在产生重组病毒载体时,通常用异源(或非天然)蛋白质的基因或编码序列替换非必需基因。病毒载体是一种利用病毒序列将核酸和可能地蛋白质引入细胞的表达构建体。某些病毒通过受体介导的内吞作用感染细胞或进入细胞以及整合到宿主细胞基因组中并稳定有效地表达病毒基因的能力使它们成为将外来核酸转移到细胞(例如哺乳动物细胞)中的有吸引力的候选者。下文描述了可用于递送本发明的某些方面的核酸的病毒载体的非限制性实例。

[0121] 慢病毒是复杂的逆转录病毒,除了常见的逆转录病毒基因gag、pol和env外,其还含有其他具有调节或结构功能的基因。慢病毒载体是本领域众所周知的(参见,例如美国专利6,013,516和5,994,136)。

[0122] 重组慢病毒载体能够感染非分裂细胞并且可用于体内和离体基因转移和核酸序列的表达。例如,在美国专利5,994,136(通过引用并入本文)中描述了能够感染非分裂细胞的重组慢病毒,其中合适的宿主细胞被两种或更多种携带包装功能(即gag、pol和env以及rev和tat)的载体转染。

[0123] b. 调节元件

[0124] 包含在本公开内容中有用的载体中的表达盒特别包含(在5'到3'方向)与蛋白质编码序列可操作地连接的真核转录启动子、包含间插序列的剪接信号和转录终止/聚腺苷酸化序列。在真核细胞中控制蛋白质编码基因的转录的启动子和增强子由多种遗传元件组成。细胞机制能够收集和整合每个元件传达的调节信息,从而允许不同的基因进化出转录调节的不同的、通常是复杂的模式。在本公开内容的上下文中使用的启动子包括组成型、诱导型和组织特异性启动子。

[0125] (i) 启动子/增强子

[0126] 本文提供的表达构建体包含驱动抗原受体的表达的启动子。启动子通常包含用于定位RNA合成的起始位点的序列。对于此,最著名的实例是TATA盒,但在一些缺乏TATA盒的启动子(例如用于哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子和用于SV40晚期基因的启动子)中,覆盖起始位点本身的离散元件有助于固定起始的位置。另外的启动子元件调节转录起始的频率。通常,这些启动子位于起始位点上游30110bp的区域中,尽管已显示许多启动子也包含起始位点下游的功能元件。为了使编码序列处于启动子的“控制之下”,将转录阅读框的转录起始位点的5'末端定位在所选启动子的“下游”(即3')。“上游”启动子刺激DNA转录并促进编码的RNA的表达。

[0127] 启动子元件之间的间距通常是灵活的,因此当元件相对于彼此倒置或移动时,启动子功能得以保留。在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以增加至相距50bp。取决于启动子,似乎各个元件可以协同或独立地起作用以激活转录。启动子可以与或不与“增强子”结合使用,“增强子”是指参与核酸序列的转录激活的顺式作用调节序列。

[0128] 启动子可以是与核酸序列天然缔合的启动子,如可以通过分离位于编码区段和/或外显子上游的5'非编码序列而获得的。这种启动子可以被称为“内源的”。类似地,增强子

可以是与核酸序列天然缔合的增强子,位于该序列的下游或上游。可选择地,通过将编码核酸区段置于重组或异源启动子的控制下将获得某些优势,所述启动子是指在其天然环境中通常不与核酸序列缔合的启动子。重组或异源增强子也指在其天然环境中通常不与核酸序列缔合的增强子。此类启动子或增强子可包括其他基因的启动子或增强子,以及从任何其他病毒或原核或真核细胞分离的启动子或增强子,以及非“天然存在”的启动子或增强子,即包含不同转录调控区的不同元件,和/或改变表达的突变。例如,重组DNA构建中最常用的启动子包括 $\beta$ 内酰胺酶(青霉素酶)、乳糖和色氨酸(trp-)启动子系统。除了合成地产生启动子和增强子的核酸序列之外,还可以结合本文公开的组合物使用重组克隆和/或核酸扩增技术(包括PCR<sup>TM</sup>)产生序列。此外,预期还可以使用指导在非核细胞器例如线粒体、叶绿体等内的序列的转录和/或表达的控制序列。

[0129] 自然地,重要的是采用有效指导DNA区段在选择用于表达的细胞器、细胞类型、组织、器官或生物体中的表达的启动子和/或增强子。分子生物学领域的技术人员通常知道用于蛋白质表达的启动子、增强子和细胞类型组合的使用(参见,例如Sambrook等人,1989,通过引用并入本文)。所采用的启动子可以是组成型的、组织特异性的、诱导型的和/或在合适的条件下可用于指导引入的DNA区段的高水平表达,例如在重组蛋白和/或肽的大规模生产中是有利的。启动子可以是异源的或内源的。

[0130] 此外,任何启动子/增强子组合(例如,根据真核启动子数据库EPDB,通过万维网在epd.isb-sib.ch/获得)也可用于驱动表达。T3、T7或SP6细胞质表达系统的使用是另一个可能的实施方案。如果提供适当的细菌聚合酶(作为递送复合物的一部分或作为额外的基因表达构建体),真核细胞可以支持从某些细菌启动子的细胞质转录。

[0131] 启动子的非限制性实例包括早期或晚期病毒启动子,例如SV40早期或晚期启动子、巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)早期启动子;真核细胞启动子,例如, $\beta$ 肌动蛋白启动子、GADPH启动子、金属硫蛋白启动子;和串联反应元件启动子,例如环AMP反应元件启动子(cre)、血清反应元件启动子(sre)、佛波酯启动子(TPA)和最小TATA框附近的反应元件启动子(tre)。还可以使用人生长激素启动子序列(例如,在Genbank登录号X05244,核苷酸283-341中描述的人生长激素最小启动子)或小鼠乳腺肿瘤启动子(可从ATCC目录号ATCC45007获得)。在某些实施方案中,启动子是CMV IE、dectin-1、dectin-2、人CD11c、F4/80、SM22、RSV、SV40、Ad MLP、 $\beta$ -肌动蛋白、I类MHC或II类MHC启动子,但是可用于驱动治疗性基因的表的任何其启动子适用于本公开内容的实践。

[0132] 在某些方面,本公开内容的方法还涉及增强子序列,即增加启动子的活性并且具有顺式地而无论其取向地起作用的潜能(即使在相对长的距离上(多至距靶标启动子几千个碱基)也如此)的核酸序列。然而,增强子功能不一定限于如此长的距离,因为它们也可以在非常接近给定启动子的地方发挥作用。

[0133] (ii) 起始信号和连锁表达

[0134] 特定的起始信号也可用于本公开内容提供的表达构建体中以用于编码序列的有效翻译。这些信号包括ATG起始密码子或相邻序列。可能需要提供外源翻译控制信号,包括ATG起始密码子。本领域普通技术人员将能够容易地确定这一点并提供必要的信号。众所周知,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框“在读框内”,以确保整个插入序列的翻译。外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然的或合成的。通过包含适当的转录增强子元件可

以增强表达效率。

[0135] 在某些实施方案中,使用内部核糖体进入位点(IRES)元件来产生多基因或多顺反子信息。IRES元件能够绕过5'甲基化Cap依赖性翻译的核糖体扫描模型,并在内部位点开始翻译。来自小核糖核酸病毒家族的两个成员(脊髓灰质炎和脑心肌炎)的IRES元件以及来自哺乳动物信使的IRES已被描述。IRES元件可以连接到异源的开放阅读框。多个开放阅读框可以一起转录,每个阅读框由一个IRES分隔,从而创建多顺反子信息。凭借IRES元件,每个开放阅读框对于核糖体是可接近的以用于有效翻译。使用单个启动子/增强子来转录单个信使可以有效地表达多个基因。

[0136] 此外,某些2A序列元件可用于在本公开内容提供的构建体中产生基因的连锁或共表达。例如,切割序列可用于通过连接开放阅读框以形成单个顺反子来共表达基因。示例性切割序列是F2A(口蹄疫病毒2A)或“2A样”序列(例如,Thosea asigna病毒2A;T2A)。

[0137] (iii)复制起点

[0138] 为了在宿主细胞中繁殖载体,它可以包含一个或多个复制起点(通常称为“ori”),例如对应于如上文所述的EBV的oriP的核酸序列或在编程中具有类似或提升的功能的遗传工程化的oriP,复制起点是在其上起始复制的特定核酸序列。可选择地,可以使用如上文所述的其他染色体外复制病毒的复制起点或自主复制序列(ARS)。

[0139] c.选择 and 可筛选标志物

[0140] 在一些实施方案中,可以通过在表达载体中包括标志物来体外或体内鉴别含有本公开内容的构建体的细胞。此类标志物将赋予细胞可鉴别的变化,从而允许容易地鉴别含有表达载体的细胞。通常,选择标志物是赋予允许选择的特性的标志物。阳性选择标志物是该标志物的存在允许其选择的标志物,而阴性选择标志物是其存在阻止其选择的标志物。阳性选择标志物的一个实例是抗药性标志物。

[0141] 通常药物选择标志物的包含有助于克隆和鉴定转化体,例如,赋予对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、博来霉素和组氨酸的抗性的基因是有用的选择标志物。除了赋予允许基于条件的实施区分转化体的表型的标志物之外,还预期了其他类型的标志物,包括可筛选标志物,例如以比色分析为基础的GFP。可选择地,可以使用可筛选的酶作为阴性选择标志物,例如单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。本领域技术人员还知道如何使用免疫标志物,可能与FACS分析结合使用。所使用的标志物被认为并不重要,只要它能够与编码基因产物的核酸同时表达即可。选择和可筛选标志物的其他实例是本领域技术人员众所周知的。

[0142] d.核酸递送的其他方法

[0143] 除了编码抗原受体的核酸的病毒递送之外,以下是将重组基因递送至给定宿主细胞的另外的方法,并因此在本公开内容中被考虑。

[0144] 将核酸(例如DNA或RNA)引入本公开内容的免疫细胞中可使用用于核酸递送以转化细胞的任何合适的方法,如本文所述的或如本领域技术人员已知的。此类方法包括但不限于直接递送DNA,例如通过离体转染,通过注射,包括显微注射;通过电穿孔;通过磷酸钙沉淀;通过使用DEAE-葡聚糖,然后使用聚乙二醇;通过直接声波加载;通过脂质体介导的转染和受体介导的转染;通过微粒轰击;通过与碳化硅纤维的搅拌;通过农杆菌介导的转化;通过干燥/抑制介导的DNA摄取,以及这些方法的任何组合。通过应用诸如这些的技术,可以

稳定或瞬时转化细胞器、细胞、组织或生物体。

[0145] IV、治疗方法

[0146] 本发明的实施方案的某些方面可用于预防或治疗与CD79b信号传导相关的疾病或病症。CD79b的信号传导可以通过任何合适的药物减少以防止癌细胞增殖。优选地,此类物质将是抗CD79b抗体或抗CD79b CAR T细胞。

[0147] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于免疫治疗的方法,其包括施用有效量的本公开内容的CAR T细胞。在一个实施方案中,通过转移引发免疫应答的CAR T细胞群来治疗医学疾病或病症。在本公开内容的某些实施方案中,通过转移引发免疫应答的CAR T细胞群来治疗癌症。本文提供了用于治疗个体的癌症或延缓其进展的方法,所述方法包括向个体施用有效量的抗原特异性细胞疗法。本方法可用于治疗免疫病症、实体癌和血液癌症。具体地,癌症可以是B细胞恶性肿瘤,例如B细胞急性成淋巴细胞白血病(ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病。

[0148] 本治疗方法可用于的肿瘤包括任何恶性细胞类型,例如在实体瘤或血液肿瘤中发现的那些。示例性实体瘤可包括但不限于选自胰腺、结肠、盲肠、胃、脑、头、颈、卵巢、肾、喉、肉瘤、肺、膀胱、黑色素瘤、前列腺和乳房的器官的肿瘤。示例性血液肿瘤包括骨髓肿瘤、T或B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤、母细胞瘤、骨髓瘤等。可以使用本文提供的方法治疗的癌症的其他实例包括但不限于肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、腹膜癌、胃部癌或胃癌(包括胃肠癌和胃肠道间质瘤)、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌腺癌、肾脏癌或肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、各种类型的头颈癌和黑色素瘤。

[0149] 癌症具体可以是以下组织学类型,但不限于这些:赘生物,恶性;癌;癌,未分化;巨细胞和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛基质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;胃泌素瘤,恶性;胆管癌;肝细胞癌;组合的肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤息肉中的腺癌;腺癌,家族性结肠息肉病;实体癌;类癌瘤,恶性;支气管肺泡腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌;嗜酸细胞癌;嗜酸性腺癌;嗜碱性粒细胞癌;透明细胞腺癌;颗粒细胞癌;滤泡性腺癌;乳头状和滤泡性腺癌;无包膜形成的硬化性癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜样癌;皮肤附属物癌;大汗腺腺癌;皮脂腺癌;耵聍腺腺癌;粘液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌;粘液性囊腺癌;粘液腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎性癌;佩吉特氏病,乳腺;腺泡细胞癌;腺鳞癌;腺癌伴鳞状上皮化生;胸腺瘤,恶性;卵巢间质瘤,恶性;卵泡膜细胞瘤,恶性;颗粒细胞瘤,恶性;男性母细胞瘤,恶性;Sertoli细胞瘤;莱迪希细胞瘤,恶性;脂质细胞瘤,恶性;副神经节瘤,恶性;乳腺外副神经节瘤,恶性;嗜铬细胞瘤;血管球肉瘤;恶性黑色素瘤;无黑色素性恶性黑色素瘤;浅表扩散性黑色素瘤;雀斑样痣恶性黑色素瘤;肢端雀斑样黑色素瘤;结节性黑色素瘤;巨大色素痣中的恶性黑色素瘤;上皮样细胞黑色素瘤;蓝色痣,恶性;肉瘤;纤维肉瘤;纤维组织细胞瘤,恶性;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎横纹肌肉瘤;肺泡横纹肌肉瘤;基质肉瘤;混合性肿瘤,恶性;Muller混合瘤;肾母细胞瘤;肝母细胞瘤;癌肉瘤;间质瘤,恶性;布伦纳瘤,恶性;叶状瘤,恶性;滑膜肉瘤;间皮瘤,恶性;无性细胞瘤;胚胎癌;畸胎瘤,恶性;卵巢甲状腺肿,恶性;绒毛膜癌;中肾瘤,恶性;血管肉瘤;血管内

皮瘤,恶性;卡波西氏肉瘤;血管外皮瘤,恶性;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;皮质旁骨肉瘤;软骨肉瘤;软骨母细胞瘤,恶性;间质软骨肉瘤;骨巨细胞瘤;尤因氏肉瘤;牙源性肿瘤,恶性;成釉细胞牙肉瘤;成釉细胞瘤,恶性;成釉细胞纤维肉瘤;松果体瘤,恶性;脊索瘤;胶质瘤,恶性;室管膜瘤;星形细胞瘤;原生质星形细胞瘤;纤维性星形细胞瘤;星形母细胞瘤;胶质母细胞瘤;少突胶质细胞瘤;少突胶质母细胞瘤;原始神经外胚层;小脑肉瘤;神经节神经母细胞瘤;成神经细胞瘤;视网膜母细胞瘤;嗅觉神经源性肿瘤;脑膜瘤,恶性;神经纤维肉瘤;神经鞘瘤,恶性;颗粒细胞瘤,恶性;恶性淋巴瘤;霍奇金氏病;霍奇金氏;副肉芽肿;恶性淋巴瘤,小淋巴细胞性;恶性淋巴瘤,大细胞,弥漫性;恶性淋巴瘤,滤泡性;蕈样肉芽肿;其他指定的非霍奇金淋巴瘤;B细胞淋巴瘤;低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL)NHL;中级/滤泡性NHL;中级弥散性NHL;高级免疫母细胞性NHL;高级淋巴母细胞性NHL;高级小非裂解细胞NHL;巨大肿块NHL;套细胞淋巴瘤;艾滋病相关淋巴瘤;Waldenstrom巨球蛋白血症;恶性组织细胞增生症;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增生性小肠疾病;白血病;淋巴性白血病;浆细胞性白血病;红白血病;淋巴肉瘤细胞性白血病;髓细胞性白血病;嗜碱细胞性白血病;嗜酸细胞性白血病;单核细胞性白血病;肥大细胞性白血病;巨核母细胞性白血病;髓样肉瘤;毛细胞性白血病;慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性成淋巴细胞白血病(ALL);急性髓细胞性白血病(AML);和慢性成髓细胞性白血病。

[0150] 特定实施方案涉及白血病的治疗方法。白血病是血液或骨髓的癌症,其特征存在于血细胞(通常是白血球(白细胞))的异常增殖(通过繁殖产生)。它是被称为血液肿瘤的广泛疾病的一部分。白血病是涵盖多种疾病的广义术语。白血病在临床和病理上分为急性和慢性两种形式。

[0151] 在本公开内容的方法的一些实施方案中,个体中活化的CD4和/或CD8 T细胞的特征在于产生 $\gamma$ -IFN的CD4和/或CD8 T细胞和/或相对于使用该组合的施用之前增强的溶细胞活性。 $\gamma$ -IFN可以通过本领域已知的任何方式测量,包括例如涉及细胞固定、透化和用抗 $\gamma$ -IFN抗体染色的细胞内细胞因子染色(ICS)。溶细胞活性可以通过本领域已知的任何方式来测量,例如,使用利用混合的效应细胞和靶细胞的细胞杀伤测定。

[0152] 在一些实施方案中,可以在T细胞疗法之前向受试者施用非清髓性淋巴清除化疗(nonmyeloablative lymphodepleting chemotherapy)。非清髓性淋巴清除化疗可以是任何合适的此类疗法,其可以通过任何合适的途径进行施用。非清髓性淋巴清除化疗可包括,例如,施用环磷酰胺和氟达拉滨,特别是如果癌症是黑色素瘤(其可以是转移性的)时。施用环磷酰胺和氟达拉滨的示例性途径是静脉内。同样,可以施用任何合适剂量的环磷酰胺和氟达拉滨。在特定方面,施用约60mg/kg的环磷酰胺两天,此后施用约25mg/m<sup>2</sup>的氟达拉滨五天。

[0153] 在某些实施方案中,将促进自体T细胞生长和活化的T细胞生长因子与自体T细胞同时或在自体T细胞之后施用至受试者。T细胞生长因子可以是促进自体T细胞的生长和活化的任何合适的生长因子。合适的T细胞生长因子的实例包括白介素(IL)-2、IL-7、IL-15和IL-12,它们可以单独使用或以各种组合使用,例如IL-2和IL-7,IL-2和IL-15,IL-7和IL-15,IL-2、IL-7和IL-15,IL-12和IL-7,IL-12和IL-15或IL-12和IL2。IL-12是优选的T细胞生长因子。

[0154] 治疗有效量的免疫细胞可以通过多种途径施用,包括肠胃外施用,例如静脉内、腹

膜内、肌内、胸骨内或关节内注射或输注。

[0155] 对于离散的、实体的、可接近的肿瘤特别考虑肿瘤内注射或注射到肿瘤脉管系统中。局部、区域或全身施用也可能是合适的。对于>4cm的肿瘤,施用体积将为约4-10ml(尤其是10ml),而对于<4cm的肿瘤,将使用约1-3ml(尤其是3ml)的体积。以单剂量递送的多次注射包括约0.1至约0.5ml体积。

[0156] 可以在与疾病一致的治疗方案中施用T细胞群,例如在一到几天内单次或几次剂量以改善疾病状态或在延长的时间内的定期剂量以抑制疾病进展并预防疾病复发。制剂中使用的精确剂量还将取决于施用途径以及疾病或病症的严重性,并且应根据从业者的判断和每个患者的情况来决定。T细胞的治疗有效量将取决于所治疗的受试者、病痛的严重程度和类型以及施用方式。在一些实施方案中,可用于治疗人受试者的剂量为至少 $3.8 \times 10^4$ 、至少 $3.8 \times 10^5$ 、至少 $3.8 \times 10^6$ 、至少 $3.8 \times 10^7$ 、至少 $3.8 \times 10^8$ 、至少 $3.8 \times 10^9$ 或至少 $3.8 \times 10^{10}$ 个T细胞/ $m^2$ 。在某些实施方案中,用于治疗人受试者的剂量范围为约 $3.8 \times 10^9$ 至约 $3.8 \times 10^{10}$ 个T细胞/ $m^2$ 。在另外的实施方案中,T细胞的治疗有效量可以为约 $5 \times 10^6$ 个细胞/kg体重至约 $7.5 \times 10^8$ 个细胞/kg体重,例如约 $2 \times 10^7$ 个细胞至约 $5 \times 10^8$ 个细胞/kg体重,或约 $5 \times 10^7$ 个细胞至约 $2 \times 10^8$ 个细胞/kg体重。T细胞的确切数量由本领域技术人员根据受试者的年龄、体重、性别和生理状况来容易地确定。可以从由体外或动物模型测试系统得出的剂量反应曲线推断有效剂量。

#### [0157] A. 药物组合物

[0158] 本文还提供了包含CAR T细胞和药学上可接受的承载体的药物组合物和制剂。

[0159] 本文所述的药物组合物和制剂可通过将具有所需纯度的活性成分(例如抗体或多肽)与一种或多种任选的药学上可接受的载体混合来制备(Remington's Pharmaceutical Sciences第22版,2012),其呈冻干制剂或水溶液的形式。药学上可接受的载体通常在所采用的剂量和浓度下对受体无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲基氯化铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;盐形成抗衡离子,例如钠;金属配合物(例如Zn-蛋白配合物);和/或非离子表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药学上可接受的载体还包括间质药物分散剂,例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,例如rHuPH20(**HYLENEX®**, Baxter International, Inc.)。一方面,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶例如软骨素酶组合。

#### [0160] B. 组合疗法

[0161] 在某些实施方案中,本发明的实施方案的组合物和方法涉及与至少一种另外的疗法组合的T细胞群。另外的疗法可以是放射疗法、手术(例如肿块切除术和乳房切除术)、化学疗法、基因疗法、DNA疗法、病毒疗法、RNA疗法、免疫疗法、骨髓移植、纳米疗法、单克隆抗

体疗法或前述的组合。另外的疗法可以是辅助疗法或新辅助疗法的形式。

[0162] 在一些实施方案中,另外的疗法是小分子酶抑制剂或抗转移剂的施用。在一些实施方案中,另外的疗法是副作用限制剂(例如,旨在减少治疗的副作用的发生和/或严重性的药剂,例如抗恶心剂等)的施用。在一些实施方案中,另外的疗法是放射疗法。在一些实施方案中,另外的疗法是手术。在一些实施方案中,另外的疗法是放射疗法和手术的组合。在一些实施方案中,另外的疗法是伽马辐照。在一些实施方案中,另外的疗法是靶向PBK/AKT/mTOR途径疗法、HSP90抑制剂、微管蛋白抑制剂、细胞凋亡抑制剂和/或化学预防剂。另外的疗法可以是本领域已知的一种或多种化学治疗剂。

[0163] 可以相对于另外的癌症疗法(例如免疫检查点疗法)在之前、期间、之后或以各种组合施用免疫细胞疗法。施用间隔可以从同时至数分钟至数天至数周。在其中免疫细胞疗法与另外的治疗剂分开地提供给患者的实施方案中,通常将确保在每次递送的时间之间没有显著的时间段到期,使得两种化合物将仍然能够发挥对患者有利的联合作用。在这样的情况下,预期可以在彼此约12至24或72小时内,更具体地在彼此约6-12小时内为患者提供抗体疗法和抗癌疗法。在一些情况下,可能期望将治疗时间显著延长,其中在各自施用之间流逝几天(2、3、4、5、6或7)至几周(1、2、3、4、5、6、7、7或8)。

[0164] 可以采用各种组合。对于下面的实例,免疫细胞疗法为“A”,和抗癌疗法为“B”:

[0165] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/AA/B/B/B B/A/B/B

[0166] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/AB/B/A/A

[0167] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/AA/A/B/A

[0168] 考虑到试剂的毒性(如果有的话),本发明的实施方案的任何化合物或疗法向患者的施用将遵循用于施用此类化合物的一般方案。因此,在一些实施方案中,存在监测归因于组合疗法的毒性的步骤。

#### [0169] 1. 化学疗法

[0170] 根据本发明的实施方案可以使用多种化学治疗剂。化学治疗剂的实例包括烷基化剂,例如噻替派和环磷酰胺;磺酸烷基酯,例如白消安,英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶,例如苯并多巴,卡波醌(carboquone),米特多巴(meturedopa)和尤利多巴(uredopa);乙烯亚胺和甲基三聚氧胺(methylamelamine),包括六甲蜜胺,三乙烯三聚氰胺,三乙烯磷酰胺(triethylenephosphoramidate),三乙稀硫磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三甲基三聚氰胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(特别是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成类似物拓朴替康);苔藓抑素;callystatin;CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin),卡折来新(carzelesin)和比折来(bizelesin)新合成类似物);念珠藻素(特别是念珠藻素1和念珠藻素8);尾海兔素;多卡霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);eleutherobin;水鬼蕉碱(pancratistatin);sarcodictyin;海绵抑素;氮芥,例如苯丁酸氮芥,萘氮芥,氯磷酰胺,雌氮芥,异环磷酰胺,甲氮芥,盐酸甲氧氮芥,美法仑,新恩比兴(novembichin),苯芥胆甾醇(phenesterine),泼尼氮芥,曲磷胺,和尿嘧啶氮芥;亚硝基尿素(nitrosureas),例如卡莫司汀,氯脲霉素,福莫司汀,洛莫司汀,尼莫司汀和雷莫司汀;抗生素,例如烯二炔抗生素(例如,卡奇霉素,特别是卡奇霉素 $\gamma$  II和卡奇霉素 $\omega$  II);达米辛(dynemicin),包括达米辛A;双膦酸盐,例如氯膦酸盐;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素生色团和相关的色蛋白烯二炔类抗生素



生色团, aclacinomycin, 放线菌素, 安曲霉素, 重氮丝氨酸, 博来霉素, 放线菌素C (cactinomycin), 卡拉比辛 (carabycin), 洋红霉素, 嗜癌菌素, 色霉素, 放线菌素D, 道诺霉素, 地托比星, 6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸, 多柔比星 (包括吗啉基-多柔比星, 氰基吗啉基-多柔比星, 2-吡咯啉基-多柔比星, 和 deoxydoxorubicin), 表柔比星, 依索比星, 伊达比星, 麻西罗霉素 (marcellomycin), 丝裂霉素例如丝裂霉素C, 霉酚酸, 诺加霉素 (nogalarnycin), 橄榄霉素, 培洛霉素, potfiromycin, 嘌呤霉素, 三铁阿霉素 (quelamycin), 罗多比星, 链黑菌素, 链唑霉素, 杀结核菌素, 乌苯美司, 净司他丁, 和佐柔比星; 抗代谢物例如甲氨蝶呤和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物例如二甲叶酸 (denopterin), 蝶罗呤, 和三甲曲沙; 嘌呤类似物例如氟达拉滨, 6-巯嘌呤, 硫咪嘌呤, 和硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物例如环胞苷, 阿扎胞苷, 6-氮尿苷, 卡莫氟, 阿糖胞苷, 二脱氧尿苷, 去氧氟尿苷, 依诺他滨, 和氟尿苷; 雄激素, 例如卡普睾酮, 丙酸甲雄烷酮, 表硫雄醇, 美雄烷, 和睾内脂; 抗肾上腺, 例如米托坦和曲洛司坦; 叶酸补充剂例如亚叶酸; 醋葡醛内酯; 醛磷酰胺糖苷; 氨基乙酰丙酸; 恩尿嘧啶; 安吡啶; bestrabucil; 比生群; 依达曲沙; 得弗伐胺; 地美可辛; 地吡醌; elfornithine; 依利醋铵; 埃博霉素; 乙环氧啶; 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖; 氯尼达明 (lonidainine); 美登醇, 例如美登素和安丝菌素; 米托胍脲; 米托蒽醌; mopidanmol; nitraerine; 喷司他丁; 蛋氨酸芥; 吡柔比星; 洛索蒽醌; 鬼臼酸; 2-乙基胍类; 甲基苄胍; PSK 多糖复合物; 丙亚胺; 根霉素; 西佐喃; 锗螺胺; 细格孢氮杂酸; 三亚胺醌; 2, 2', 2''-三氯三乙胺; 单端孢霉烯族毒素类 (特别是 T-2 毒素, 黏液霉素 A, 杆孢菌素 A 和 anguidine); 乌拉坦; 长春地辛; 氮烯唑胺; 甘露莫司汀; 二溴甘露醇; 二溴卫矛醇; 哌血生; gacytosine; 阿拉伯糖苷 ("Ara-C"); 环磷酰胺; 紫杉烷, 例如紫杉醇和多西他赛吉西他滨; 6-硫鸟嘌呤; 巯嘌呤; 铂配位复合物, 例如顺铂、奥沙利铂和卡铂; 长春碱; 铂; 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酰胺; 米托蒽醌; 长春新碱; 长春瑞滨; 能灭瘤 (novantrone); 替尼泊苷; 依达曲沙; 柔红霉素; 氨基蝶呤; 希罗达; 伊班膦酸盐; 伊利替康 (例如 CPT-11); 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 类视黄醇, 例如视黄酸; 卡培他滨; 卡铂, 丙卡巴嗪, plicomycin, 吉西他滨, 那韦尔滨, 法呢基蛋白转移酶抑制剂, 跨铂 (transplatinum) 和上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

### [0171] 2. 放射疗法

[0172] 引起DNA损伤并已被广泛使用的其他因素包括通常已知的  $\gamma$  射线、X射线和/或放射性同位素向肿瘤细胞的定向递送。也可以考虑其他形式的DNA损伤因素, 例如微波、质子束辐照和UV辐照。最有可能的是所有这些因素影响对DNA、DNA的前体、DNA的复制和修复以及染色体的装配和维持的广泛损害。X射线的剂量范围从长时间 (3-4周) 的50至200伦琴的每日剂量到2000至6000伦琴的单剂量。放射性同位素的剂量范围广泛变化, 并且取决于同位素的半衰期、所发射的辐照的强度和类型以及肿瘤细胞的吸收。

### [0173] 3. 免疫疗法

[0174] 本领域技术人员将理解, 免疫疗法可以与实施方案的方法组合或结合使用。在癌症治疗的背景下, 免疫疗法通常依赖使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。利妥昔单抗 (**RITUXAN®**) 是这样的实例。免疫效应子可以是例如对肿瘤细胞表面上的某些标志物具有特异性的抗体。单独的抗体可以充当疗法的效应子, 或者它可以募集其他细胞来实际影响细胞杀伤。抗体也可以与药物或毒素 (化疗剂, 放射性核素, 蓖麻毒蛋白A链, 霍乱毒素, 百日咳毒素等) 缀合, 并用作靶向剂。可选择地, 效应子可以是携带直接或间接与

肿瘤细胞靶标相互作用的表面分子的淋巴细胞。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0175] 抗体-药物缀合物 (ADC) 包含与杀细胞药物共价连接的单克隆抗体 (MAb) 并且可用于组合疗法。这种方法将MAb针对其抗原靶标的高特异性与高效的细胞毒性药物结合在一起,从而产生了“经武装的”MAb,其将有效载荷(药物)递送至具有丰富抗原水平的肿瘤细胞。药物的靶向递送还使其在正常组织中的暴露最小化,从而降低了毒性并改善了治疗指数。示例性ADC药物包括**ADCETRIS**<sup>®</sup>(本妥昔单抗(brentuximab vedotin))和**KADCYLA**<sup>®</sup>(曲妥珠单抗(trastuzumab emtansine)或T-DM1)。

[0176] 在免疫疗法的一方面,肿瘤细胞必须带有一些易于靶向的标志物,即其在大多数其他细胞上不存在。存在许多肿瘤标志物,并且在本发明的实施方案的背景下,这些肿瘤标志物中的任何一种都可能适于靶向。常见的肿瘤标志物包括CD20,癌胚抗原,酪氨酸酶(p97),gp68,TAG-72,HMFG,唾液酸化的路易斯抗原,MucA,MucB,PLAP,层粘连蛋白受体,erb B,erb b2和p155。免疫疗法的可选择方面是将抗癌作用与免疫刺激作用相结合。还存在免疫刺激分子,包括:细胞因子,例如IL-2,IL-4,IL-12,GM-CSF, $\gamma$ -IFN,趋化因子,例如MIP-1,MCP-1,IL-8和生长因子,例如FLT3配体。

[0177] 免疫疗法的实例包括免疫佐剂,例如牛分枝杆菌,恶性疟原虫,二硝基氯苯和芳香族化合物;细胞因子疗法,例如干扰素 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ ,IL-1,GM-CSF和TNF;基因疗法,例如TNF,IL-1,IL-2和p53;和单克隆抗体,例如抗CD20,抗神经节苷脂GM2和抗p185。预期可以将一种或多种抗癌疗法与本文所述的抗体疗法一起使用。

[0178] 在一些实施方案中,免疫疗法可以是免疫检查点抑制剂。免疫检查点调高信号(例如共刺激分子)或调低信号。可能被免疫检查点阻断靶向的抑制性免疫检查点包括腺苷A2A受体(A2AR),B7-H3(也称为CD276),B和T淋巴细胞弱化剂(BTLA),细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4,也称为CD152),吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO),杀伤细胞免疫球蛋白(KIR),淋巴细胞激活基因3(LAG3),程序性死亡1(PD-1),T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白域3(TIM-3)和T细胞激活的V-结构域Ig抑制剂(VISTA)。特别地,免疫检查点抑制剂靶向PD-1轴和/或CTLA-4。

[0179] 免疫检查点抑制剂可以是药物,例如小分子,配体或受体的重组形式,或者特别是抗体,例如人抗体。可以使用免疫检查点蛋白或其类似物的已知抑制剂,特别是可以使用抗体的嵌合、人源化或人形式。如本领域技术人员将知道的,替代和/或等同名称可以用于本公开内容中提及的某些抗体。在本公开内容的上下文中,这样的替代和/或等同名称是可互换的。例如,已知lambrolizumab也已知为替代和等同名称MK-3475和派姆单抗(pembrolizumab)。

[0180] 在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其配体结合伴侣结合的分子。在一个具体方面,PD-1配体结合伴侣是PDL1和/或PDL2。在另一个实施方案中,PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1与其结合伴侣结合的分子。在特定方面,PDL1结合伴侣是PD-1和/或B7-1。在另一个实施方案中,PDL2结合拮抗剂是抑制PDL2与其结合伴侣结合的分子。在一个具体方面,PDL2结合伴侣是PD-1。拮抗剂可以是抗体,其抗原结合片段,免疫粘附素,融合蛋白或寡肽。

[0181] 在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体(例如,人抗体、人源化抗体或

嵌合抗体)。在一些实施方案中,抗PD-1抗体选自纳武单抗、派姆单抗和CT-011。在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是免疫粘附素(例如,包含与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PDL1或PDL2的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是AMP-224。纳武单抗(也称为MDX-1106-04,MDX-1106,ONO-4538,BMS-936558和**OPDIVO**<sup>®</sup>)是可以使用的抗PD-1抗体。派姆单抗(也称为MK-3475,Merck 3475,lambrolizumab,**KEYTRUDA**<sup>®</sup>和SCH-900475)是示例性抗PD-1抗体。CT-011(也称为hBAT或hBAT-1)也是抗PD-1抗体。AMP-224(也称为B7-DCIg)是PDL2-Fc融合可溶性受体。

[0182] 可以在本文提供的方法中靶向的另一个免疫检查点是细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4),也称为CD152。人CTLA-4的完整cDNA序列的Genbank登录号为L15006。CTLA-4发现于T细胞的表面,并且当与抗原呈递细胞表面上的CD80或CD86结合时,充当“关闭”开关。CTLA4是免疫球蛋白超家族的成员,其在辅助T细胞的表面表达并向T细胞传递抑制信号。CTLA4与T细胞共刺激蛋白CD28相似,并且两种分子均与抗原呈递细胞上的CD80和CD86(分别也称为B7-1和B7-2)结合。CTLA4将抑制信号传递给T细胞,而CD28传递刺激信号。细胞内CTLA4也存在于调节性T细胞中,并且可能对它们的功能很重要。通过T细胞受体和CD28的T细胞活化导致CTLA-4(B7分子的抑制受体)的表达增加。

[0183] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。

[0184] 适用于本发明方法的抗人-CTLA-4抗体(或衍生自其的VH和/或VL结构域)可以使用本领域众所周知的方法产生。可选择地,可以使用本领域公认的抗CTLA-4抗体。示例性的抗CTLA-4抗体是伊匹单抗(也称为10D1,MDX-010,MDX-101和**Yervoy**<sup>®</sup>)或其抗原结合片段和变体。在其他实施方案中,抗体包含伊匹单抗的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施方案中,抗体包含伊匹单抗的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及伊匹单抗的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,所述抗体竞争与CTLA-4上与上述抗体相同的表位的结合和/或与CTLA-4上与上述抗体相同的表位结合。在另一个实施方案中,所述抗体与上述抗体具有至少约90%的可变区氨基酸序列同一性(例如,与伊匹单抗具有至少约90%、95%或99%的可变区同一性)。

#### [0185] 4. 手术

[0186] 大约60%的癌症患者将接受某种类型的手术,包括预防性、诊断或分期性、治愈性和姑息手术。治愈性手术包括切除(其中全部或部分癌组织被物理移除、切除和/或破坏),并且可以与其他疗法(例如本发明的实施方案的治疗,化学疗法,放射疗法,激素疗法,基因疗法,免疫疗法和/或替代疗法)结合使用。肿瘤切除术是指物理切除至少一部分肿瘤。除肿瘤切除术外,手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微控制手术(莫氏手术)。

[0187] 在切除部分或全部癌细胞、组织或肿瘤后,可在体内形成空腔。可以通过使用其他抗癌疗法对该区域进行灌注、直接注射或局部应用来完成治疗。例如,可以每1、2、3、4、5、6或7天,或者每1、2、3、4和5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月重复这种治疗。这些治疗也可以具有不同的剂量。

#### [0188] 5. 其他药剂

[0189] 预期可以将其他药剂与本发明的实施方案的某些方面组合使用以改善治疗的疗

效。这些另外的药剂包括影响细胞表面受体的上调和GAP连接的药剂,细胞生长抑制剂和分化剂,细胞粘附抑制剂,增加过度增殖细胞对凋亡诱导剂的敏感性的药剂或其他生物药剂。通过增加GAP连接数增加细胞间信号传导将增加对邻近的过度增殖细胞群的抗过度增殖作用。在其他实施方案中,细胞生长抑制剂或分化剂可以与本发明的实施方案的某些方面结合使用以改善治疗的抗过度增殖功效。预期细胞粘附抑制剂改善本发明的实施方案的功效。细胞粘附抑制剂的实例是粘着斑激酶 (FAK) 抑制剂和洛伐他汀。

#### [0190] V. 制品或试剂盒

[0191] 本文还提供了包含免疫细胞的制品或试剂盒。制品或试剂盒可进一步包括包装插页,该包装插页包含用于使用免疫细胞以治疗或延迟个体中癌症的进展或增强患有癌症的个体的免疫功能的说明。本文所述的任何抗原特异性免疫细胞可包括在制品或试剂盒中。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、袋子和注射器。容器可以由多种材料(例如玻璃、塑料(例如聚氯乙烯或聚烯烃)或金属合金(例如不锈钢或哈氏合金))形成。在一些实施方案中,容器容纳制剂,并且在容器上或与容器相关的标签可以指示使用说明。制品或试剂盒还可以包括从商业和用户角度出发期望的其他材料,包括其他缓冲剂,稀释剂,过滤器,针头,注射器和带有使用说明的包装插页。在一些实施方案中,制品还包括一种或多种其他药剂(例如化学治疗剂和抗肿瘤剂)。用于一种或多种药剂的合适容器包括例如瓶子、小瓶、袋子和注射器。

#### [0192] VI. 实施例

[0193] 包括以下实施例以证明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解,以下实施例中公开的技术代表发明人发现的在本发明的实践中发挥良好作用的技术,因此可以认为构成其实践的优选方式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应当理解,可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下在所公开的特定实施方案中进行许多改变,并且仍可获得类似或相似的结果。

#### [0194] 实施例1-CD79b抗体和CAR的开发

[0195] CD79b表达局限于B细胞谱系:使用实时PCR,发现CD79b在广泛的B细胞淋巴瘤细胞系(包括Mino、Daudi、HBC-1、Jeko、SUDHL6、SUDHL4和U2932)中表达,但在Jurkat和J76 T细胞淋巴瘤/白血病细胞系中没有表达(图1A)。为了确定CD79b是否在正常组织上表达,从Applied Biosystems获得包含20种正常人组织总RNA的FirstChoice Human Total RNA Survey Panel。从来自人扁桃体样品的纯化的B和T细胞提取总RNA,并分别用作阳性和阴性对照。发现CD79b转录物仅存在于淋巴组织(例如脾和淋巴结)中,但在所有非淋巴正常组织中不存在(图1B)。

[0196] 使用可公开获得的基因表达数据集 (Oncomine),发现CD79b在ALL和慢性淋巴细胞白血病(图1C)和多种B细胞淋巴瘤亚型(例如伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤和套细胞淋巴瘤)(图1D)中高度表达。括号中显示了每种肿瘤类型的样品数量。

[0197] 针对人CD79b的多种单克隆抗体的产生和抗体的重链和轻链序列的鉴定:通过杂交瘤技术通过用表达人CD79b的小鼠成纤维细胞L细胞免疫小鼠来产生抗人CD79b单克隆抗体(图2A)。通过ELISA,鉴定了对重组人CD79b蛋白具有高结合能力的三个克隆(图2B)。这三种单克隆抗体的亲和力进一步通过Octet测定确定,并选择Kd值分别为1.44、17.8和2.0nM的三个克隆14(IgG1)、16A(IgG2)和45(IgG2)用于进一步开发(图2C)。单克隆抗体克隆#14

与荧光染料缀合并显示染色B细胞淋巴瘤细胞系,与来自BD Biosciences的商业抗CD79b抗体相当(图2D)。提取单克隆抗体的杂交瘤的总RNA,合成cDNA。5'-RACE PCR(cDNA末端快速扩增)用于克隆重链和轻链的V基因。通过DNA序列预测蛋白质序列。纯化杂交瘤培养上清液,并从MD Anderson Proteomics Core Facility通过质谱法确认重链和轻链蛋白质序列。

[0198] 抗CD79b CAR T细胞的产生:使用可变区的单链片段(scFv)的特定序列,产生了抗CD79b CAR的几种构建体。为了检测转导的T细胞中的CAR表达,使用CAR增强型绿色荧光蛋白(eGFP)融合构建体或截短的人表皮生长因子受体(huEGFRt)(图3A)。后者还可以用作安全开关以在严重毒性的情况下消除CAR T细胞。掺入CD3- $\zeta$ (CD3z)链以提供用于T细胞活化的信号1并且掺入共刺激结构域CD28或4-1BB以提供信号2(图3A)。

[0199] 将这些构建体克隆到慢病毒载体pHR\_SFFV中,然后将其用于转导原代健康供体T细胞。使用克隆45-CD79b-CD28-CAR,通过CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞中的eGFP表达确定的代表性转导效率(>70%)显示在图3B中。抗CD19-CAR T细胞用作对照。

[0200] CAR T细胞针对用CellTrace Far Red标记的Daudi细胞的细胞毒性活性通过Aqua染色在16小时流式细胞术测定中以指定的效应物:靶标(E:T)比率确定(图3C)。在20:1的E:T比率下,各种培养条件的死细胞百分比(右上象限)的代表性点图显示在图3D中。数据显示,与未转导的对照T细胞相比,抗CD19-CAR T细胞和抗CD79b-CAR T细胞对Daudi伯基特淋巴瘤细胞具有高度细胞毒性。

[0201] 抗CD79b CAR T细胞对CD19<sup>+</sup>和CD19<sup>-</sup>淋巴瘤细胞均具有细胞毒性:为了确定抗CD79b CAR T细胞针对CD19阴性(CD19<sup>-</sup>)淋巴瘤细胞的功效,使用缺乏CD19的弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系SUDHL6进行脱粒和细胞毒性测定。首先,CD19通过CRISPR-Cas9敲除(CD19KOSUDHL6),然后这些淋巴瘤细胞用缺乏外显子2的CD19剪接变体(CD19Dex2)(其是用于抗CD19 CAR构建体的抗CD19抗体克隆FMC63的结合位点)进行转导。

[0202] 未转导的原代T细胞(CtrlT)、克隆-14-CD79b-CD28 CAR、14-CD79b-4-1BB CAR和FMC63-CD19-CD28 CAR与Daudi或上述SUDHL6细胞(CD19KOSUDHL6-CD19Dex2)以5:1的E:T比率共培养。T细胞用CellTrace Far Red标记,靶细胞用CellTrace Violet标记。2小时后,将高尔基体抑制剂和脱粒标志物(CD107a/b)添加到培养物中以确定T细胞的脱粒。共培养4天后测定针对肿瘤细胞的细胞毒性活性。14-CD79b-CD28和14-CD79b-4-1BB CAR T细胞而非对照T细胞显示出显著增加的针对这两种细胞系的脱粒和细胞毒性活性(图4A和B)。相比之下,FMC63-CD19-CD28 CAR对CD19<sup>+</sup>Daudi具有细胞毒性,但对CD19KOSUDHL6-CD19Dex2肿瘤细胞没有细胞毒性。

[0203] 使用用于流式细胞术的CountBright Absolute Counting Bead,在共培养4天后还测定了活肿瘤细胞的绝对数量(图4C)。结果与观察到的活肿瘤细胞百分比一致(图4B)。显示了靶细胞和效应T细胞的代表性点图(图4A和B)。实验重复至少3次,结果相似。

[0204] 抗CD79b CAR T细胞表现出针对淋巴瘤异种移植物的体内功效:为了测试抗CD79b CAR T细胞的体内功效,将表达萤火虫萤光素酶基因的Mino套细胞淋巴瘤细胞系以 $2 \times 10^6$ 个肿瘤细胞/小鼠IV注射到NSG小鼠中。18天后,用未转导的原代T细胞、抗CD19-CD28 CAR T细胞或克隆45抗CD79b-CD28 CAR T细胞以 $10 \times 10^6$ 个CAR<sup>+</sup>T细胞或未转导的T细胞/小鼠通过尾静脉注射处理小鼠。生物发光成像用于评估肿瘤负荷(图5A)。结果显示了在用未转导的T

细胞处理的小鼠中的进行性肿瘤生长。相比之下,在用抗CD19和抗CD79bCAR T细胞处理的小鼠中观察到良好的肿瘤控制和显著改善的存活 ( $p<0.05$ ) (图5B和C)。对于每个单独的实验至少验证了体外结果3次,并验证了体内结果2次。因此,抗CD79b CAR疗法可用于具有或没有CD19表达的B细胞恶性肿瘤的治疗。

[0205] 鉴于本公开内容,可以在不进行过度实验的情况下进行和执行本文公开和要求保护的所有方法。尽管已经根据优选实施方案描述了本发明的组合物和方法,但是对于本领域技术人员而言明显的是,可以在不背离本发明的概念、精神和范围的情况下对所述方法以及本文所描述的方法的步骤或步骤顺序进行变化。更具体地,将明显的是,化学和生理相关的某些试剂可以代替本文所述的试剂,而将获得相同或相似的结果。对于本领域技术人员明显的所有这些类似的替代和修改都被认为在所附权利要求所限定的本发明的精神、范围和概念之内。

[0206] 参考文献

[0207] 以下参考文献在提供示例性的程序或补充本文所示的那些的其他细节的程度上被特别地通过引用并入本文。

[0208] Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and John Wiley&Sons,NY,1994.

[0209] Chothia等人,1988.

[0210] Davila等人,2013.

[0211] 欧洲专利申请号EP2537416

[0212] Heemskerk等人Hum Gene Ther.19:496-510,2008.

[0213] 国际专利申请号WO/2014055668 A1.

[0214] 国际专利申请号WO200014257

[0215] 国际专利申请号WO2012/129514

[0216] 国际专利申请号WO2013/071154

[0217] 国际专利申请号WO2013/123061

[0218] 国际专利申请号WO2013/166321

[0219] 国际专利申请号WO2013126726

[0220] 国际专利申请号WO2014031687

[0221] Johnson等人Blood 114:535-46,2009.

[0222] Jores等人,1990.

[0223] Kabat等人,"Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,5<sup>th</sup> ed.

[0224] Lefranc等人,2003.

[0225] Liu等人,2003.

[0226] Remington's Pharmaceutical Sciences 22<sup>nd</sup> edition,2012.

[0227] Sadelain等人,2013.

[0228] Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3<sup>rd</sup> ed.,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.2001.

- [0229] Turtle等人,2012.
- [0230] 美国专利号5,091,513
- [0231] 美国专利号5,091,513
- [0232] 美国专利号5,994,136
- [0233] 美国专利号6,013,516
- [0234] 美国专利号6,410,319
- [0235] 美国专利号6,410,319
- [0236] 美国专利号6,451,995
- [0237] 美国专利号6,881,557
- [0238] 美国专利号6,946,546
- [0239] 美国专利号7,070,995
- [0240] 美国专利号7,265,209
- [0241] 美国专利号7,354,762
- [0242] 美国专利号7,446,179
- [0243] 美国专利号7,446,190
- [0244] 美国专利号7,446,191
- [0245] 美国专利号8,252,592
- [0246] 美国专利号8,324,353
- [0247] 美国专利号8,339,645
- [0248] 美国专利号8,398,282
- [0249] 美国专利号8,479,118
- [0250] 美国专利号7,446,190
- [0251] 美国专利公开号US2002131960
- [0252] 美国专利公开号US20050214860
- [0253] 美国专利公开号US20130149337
- [0254] 美国专利公开号US2013287748
- [0255] Wu等人,2012





Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Asn Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 3

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser  
 1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 4

Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro  
 1 5

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 5

Asn Met Asp Ser  
 1

<210> 6

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 6

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc

60

atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgtggt ggtaccacca gaagccagga 120  
 tcctcccca gactcctgat ttttgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc 180  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgaa 240  
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg actagttacc cgtacacgtt cggagggggg 300  
 accaagctgg aaataaaa 318

<210> 7

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 7

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Trp Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Phe

35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Tyr Pro Tyr Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 8

Ser Ser Val Ser Tyr

1 5

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 9

Asp Thr Ser

1

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 10

Gln Gln Trp Thr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1

5

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 363

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成寡核甘酸

&lt;400&gt; 11

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggctcc agtgaagctg	60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactggg tgaactgggt gaagcagagg	120
cctggacgag gcctcgagtg gattggaagg attgatacctt ccgatagtga aactcactac	180
aatcaaaaagt tcaaggacaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac	240
atccaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagatggact	300
atggtagtag ttacggatgc tatggactac tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc	360
tca	363

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 12

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Pro Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20

25

30

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

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp  
 1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 14

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr  
 1 5

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 15

Ala Arg Trp Thr Met Val Val Val Thr Asp Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210>	16	
<211>	324	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	16	
	gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc	60
	atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggaac	120
	caacagaaac caggacagcc acccagaactc ctcactatc ttgtatccaa cctagaatct	180
	gggggtccctg ccagggttcag tggcagtgagg tctgggacag acttcaccct caacatccat	240
	cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattaggga gcttacacgt	300
	tcggagggggg gaccaagctg gaaa	324
<210>	17	
<211>	108	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成氨基酸	
<400>	17	
	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
	1                    5                    10                    15	
	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser	
	20                    25                    30	
	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
	35                    40                    45	
	Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala	
	50                    55                    60	
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His	
	65                    70                    75                    80	
	Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg	
	85                    90                    95	
	Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Ser Trp Lys	
	100                    105	
<210>	18	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 合成氨基酸

<400> 18

Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr

1 5 10

<210> 19

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 19

Leu Val Ser

1

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 20

Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly

1 5 10

<210> 21

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 21

gaggtgcagc tgcaggagtc tggggctgag cttgtgaggc caggggcctt agtcaagttg 60

tcctgcagag cttctggctt caacattaaa gactactata tgcactgggt gaagcagagg 120

cctgaacagg gcctggagtg gattggatgg attgatectg agaatggtaa ttctatatat 180

gacccgaagt tccagggcaa ggccagtata acagcagaca catcctcaa cacagcctac 240

ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc ttagtagacctt 300

tactacggta gagggactct ggtcactgtc tctgca 336

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 22

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

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 23

Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr	Tyr
1				5			

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 24

Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Gly	Asn	Ser
1				5			

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 25

Ala Val Asp Leu Tyr Tyr Gly Arg Gly Thr Leu Val

1 5 10

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成寡核甘酸

&lt;400&gt; 26

aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact 60

atgcgctgta agtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttgccc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180

gaatctggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc 240

atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcataatt cctctcctcg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 27

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95

Phe Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110



<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 28

Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 29

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 29

Trp Ala Ser

1

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 30

His Gln Phe Leu Ser Ser Tyr Thr

1 5

<210> 31

<211> 696

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 31

caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagtc aagtgtagt tacatgtggt ggtaccacca gaagccagga 120

tcctcccca gactcctgat ttttgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg actagttacc cgtacacgtt cggagggggg 300

accaagctgg aaataaaagg aggaggtggt agtggtggag gaggaagtgg aggaggagga	360
agtgaggtgc agctgcagga gtctggacct gagctgaaga agcctggaga gacagtcaag	420
atctcctgca aggccttctgg ttataccttc acagactatt caatgcactg ggtgaagcag	480
gctccaggaa agggttttaa gtggatgggc tggataaaca ctgagactgg tgagccaaca	540
tatgcagatg acttcaaggg acggtttgcc ttctctttgg aaacctctgc cagcactgcc	600
tatttgcaga tcaacaacct caaaaatgat gacacggcta catatttctg taatatggac	660
tcctgggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctca	696

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 732

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成寡核甘酸

&lt;400&gt; 32

gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc	60
atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gacttgaac	120
caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct	180
gggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattaggga gcttacacgt	300
tcggaggggg gaccaagctg gaaaggagga ggtggtagt gtggaggagg aagtggagga	360
ggaggaagtc aggtccaact gcagcagcct ggggctgagc ttgtgaagcc tggggctcca	420
gtgaagctgt cctgcaaggc ttctggctac acctcacca gctactgggt gaactgggtg	480
aagcagaggc ctggacgagg cctcgagtgg attggaagga ttgatccttc cgatagttaa	540
actcactaca atcaaaagtt caaggacaag gccacactga ctgtagacaa atcctccagc	600
acagcctaca tccaactcag cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtgca	660
agatggacta tggtagtagt tacggatgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc	720
accgtctcct ca	732

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 717

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成寡核甘酸

&lt;400&gt; 33

aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact	60
atgcgctgta agtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttgccc	120
tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg	180
gaatctgggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc	240
atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcacatcaatt cctctcctcg	300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaaggag gaggtggtag tggtaggagga	360
ggaagtggag gaggaggaag tgaggtgcag ctgcaggagt ctggggctga gcttgtgagg	420
ccaggggcct tagtcaagtt gtcctgcaga gcttctggct tcaacattaa agactactat	480
atgcactggg tgaagcagag gcctgaacag ggcctggagt ggattggatg gattgatcct	540
gagaatggta attctatata tgacccgaag ttccaggga aggccagtat aacagcagac	600
acatcctcca acacagccta cctgcagctc agcagcctga catctgagga cactgccgtc	660
tattactgtg ctgtagacct ttactacggt agagggactc tggtcactgt ctctgca	717
<210> 34	
<211> 2121	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核甘酸	
<400> 34	
caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccaggga gaaggtcacc	60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaatg tacatgtggt ggtaccacca gaagccagga	120
tcctcccca gactcctgat ttttgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc	180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagccgaat ggaggctgaa	240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg actagttacc cgtacacgtt cggagggggg	300
accaagctgg aaataaaagg aggaggtggt agtggtagg gaggaagtgg aggaggagga	360
agtgaggtgc agctgcagga gtctggacct gagctgaaga agcctggaga gacagtcaag	420
atctcctgca aggcttctgg ttataccttc acagactatt caatgcactg ggtgaagcag	480
gctccaggaa aggggtttaa gtggatgggc tggataaaca ctgagactgg tgagccaaca	540
tatgcagatg acttcaaggg acggtttgcc ttctctttgg aaacctctgc cagcactgcc	600
tatttgacaga tcaacaacct caaaaatgat gacacggcta catatttctg taatatggac	660
tcctgggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcaaca ctactccagc accacgacca	720
ccaacacctg ctccaactat cgcactctca ccactttctc tacgtccaga agcatgccga	780
ccagctgcag gaggtgcagt tcatacgaga ggtctagatt tcgcatgtga tatctacatc	840
tgggcaccat tggctgggac ttgtggtgtc cttctcctat cactggttat caccctttac	900
tgctgggtta gaagtaaaag aagtaggcta cttcatagt attacatgaa tatgactcct	960
cgacgacctg gtcccacccg taagcattat cagccctatg caccaccag agatttcgca	1020
gcctatcgct ccagagttaa atttagcaga agtgcagatg ctctgcgta taaacagggt	1080
caaaaccaac tatataatga actaaatcta ggacgaagag aagaatatga tgtttttagat	1140
aaaagacgtg gtcgagatcc tgaaatggga ggaaaaccta gaagaaaaaa tcctcaagaa	1200
ggcctatata atgaactaca aaaagataag atggcagaag cttatagtga aattggaatg	1260
aaaggagaac gtcgtagagg taaaggtcat gatggtcttt atcaaggtct tagtacagca	1320
acaaaagata catatgatgc acttcatatg caagcacttc cacctcgttt cgaagagcaa	1380
aaacttatct ctgaagagga cctcatggtg agcaaggcg aggagctgtt caccggggtg	1440
gtgcccattc tggctcgagct ggacggcgac gtaaacggcc acaagttcag cgtgtccggc	1500

gagggcgagg	gcgatgccac	ctacggcaag	ctgaccctga	agttcatctg	caccaccggc	1560
aagctgcccc	tgccctggcc	caccctcgtg	accaccctga	cctacggcgt	gcagtgttc	1620
agccgctacc	ccgaccacat	gaagcagcac	gacttcttca	agtccgccat	gcccgaaggc	1680
tacgtccagg	agcgcaccat	cttcttcaag	gacgacggca	actacaagac	ccgcgccgag	1740
gtgaagtctg	agggcgacac	cctggtgaac	cgcctcgagc	tgaaggcat	cgacttcaag	1800
gaggacggca	acatcctggg	gcacaagctg	gagtacaact	acaacagcca	caacgtctat	1860
atcatggccg	acaagcagaa	gaacggcatc	aaggtgaact	tcaagatccg	ccacaacatc	1920
gaggacggca	gcgtgcagct	cgccgaccac	taccagcaga	acacccccat	cggcgacggc	1980
cccgtgctgc	tgcccgacaa	ccactacctg	agcaccagct	ccgccctgag	caaagacccc	2040
aacgagaagc	gcgatcacat	ggtcctgctg	gagttcgtga	ccgccgccgg	gatcactctc	2100
ggcatggacg	agctgtacaa	g				2121
<210>	35					
<211>	2496					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	合成寡核甘酸					
<400>	35					
caaattgttc	tcaccagtc	tccagcaatc	atgtctgcat	ctccagggga	gaaggtcacc	60
atgacctgca	gtgccagctc	aagtgttaagt	tacatgtggt	ggcaccacca	gaagccaggt	120
tcttccccca	gactcctgat	ttttgacaca	tccaacctgg	cttctggagt	ccctgttcgc	180
ttcagtgcca	gtgggtcttg	gacctcttac	tctctcacia	tcagccgaat	ggaggctgaa	240
gatgctgcca	cttattactg	ccagcagtg	acaagttacc	cgtacacgtt	cggagggggg	300
accaagctgg	aaataaaagg	aggaggtggt	agtgggtggag	gaggaagtgg	aggaggagga	360
agtgaagtg	agctgcagga	gtctggacct	gagctgaaga	agcctggaga	gacagtcaag	420
atctcctgca	aggcttcttg	ttataccttc	acagactatt	caatgcactg	ggtgaagcag	480
gctccaggaa	agggttttaa	gtggatgggc	tggataaaca	ctgagactgg	tgagccaaca	540
tatgcagatg	acttcaagg	acggtttgcc	ttctcttttg	aaacctctgc	cagcactgcc	600
tattttgcaga	tcaacaacct	caaaaatgat	gacacggcta	catatttctg	taatattggac	660
tcctgggggtc	aaggaacctc	agtcaccgtc	tcctcaacta	gtattgaagt	tatgtatcct	720
cctccttacc	tagacaatga	gaagagcaat	ggaaccatta	tccatgtgaa	agggaacac	780
ctttgtccaa	gtcccctatt	tcccggacct	tctaagccct	tttgggtgct	ggtgggtggtt	840
ggtggagtc	tggttgcta	tagcttgcta	gtaacagtgg	cctttattat	tttctgggtt	900
agaagtaaaa	gaagtaggct	acttcatagt	gattacatga	atatgactcc	tcgacgacct	960
ggtcccaccc	gtaagcatta	tcagccctat	gcaccaccac	gagatttcgc	agcctatcgc	1020
tccagagtta	aatttagcag	aagtgcagat	gctcctgcgt	ataaacagg	tcaaaaccaa	1080
ctatataatg	aactaaatct	aggacgaaga	gaagaatatg	atgttttaga	taaaagacgt	1140
ggtcgagatc	ctgaaatggg	aggaaaacct	agaagaaaaa	atcctcaaga	aggcctatat	1200
aatgaactac	aaaaagataa	gatggcagaa	gcttatagtg	aaattggaat	gaaaggagaa	1260

cgctcgtagag gtaaagggtca tgatgggtctt tatcaaggctc ttagtacagc aacaaaagat	1320
acatatgatg cacttcatat gcaagcactt ccacctcggt tcgaaggctc cggcgagggc	1380
agaggcagtc tgctgacatg cggtgacgtg gaagagaatc ccggccctat gcttctcctg	1440
gtgacaagcc ttctgctctg tgagttacca caccagcat tcctccgcaa agtgtgtaac	1500
ggaataggta ttggtgaatt taaagactca ctctccataa atgctacgaa tattaaacac	1560
ttcaaaaaact gcacctccat cagtggcgat ctccacatcc tgccgggtggc atttaggggt	1620
gactccttca cacatactcc tcctctagat ccacaggaac tggatattct gaaaaccgta	1680
aaggaaatca cagggttttt gctgattcag gcttggcctg aaaacaggac ggacctccat	1740
gcctttgaga acctagaaat catacgcggc aggaccaagc aacatgggtca gttttctctt	1800
gcagtcgtca gcctgaacat aacatccttg ggattacgt ccctcaagga gataagtgat	1860
ggagatgtga taatttcagg aaacaaaaat ttgtgctatg caaatacaat aaactggaaa	1920
aaactgtttg ggacctccgg tcagaaaacc aaaattataa gcaacagagg tgaaaacagc	1980
tgcaaggcca caggccaggt ctgccatgcc ttgtgctccc ccgagggtg ctggggccccg	2040
gagcccaggg actgcgtctc ttgccggaat gtcagccgag gcagggaatg cgtggacaag	2100
tgcaaccttc tggagggtga gccaaggag tttgtggaga actctgagtg catacagtgc	2160
caccagagt gcctgcctca ggccatgaac atcacctgca caggacggg accagacaac	2220
tgtatccagt gtgcccacta cattgacggc cccactgcg tcaagacctg cccggcagga	2280
gtcatgggag aaaacaacac cctggtctgg aagtacgcag acgccggcca tgtgtgccac	2340
ctgtgccatc caaactgcac ctacggatgc actgggccag gtcttgaagg ctgtccaacg	2400
aatgggccta agatcccgtc catcgccact gggatggtgg gggccctcct cttgctgctg	2460
gtggtggccc tggggatcgg cctcttcatg cgaagg	2496

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 2157

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成寡核苷酸

&lt;400&gt; 36

gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc	60
atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gactggaac	120
caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct	180
ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattaggga gcttacacgt	300
tcggaggggg gaccaagctg gaaaggagga ggtggtagt gtggaggagg aagtggagga	360
ggaggaagtc aggtccaact gcagcagcct ggggctgagc ttgtgaagcc tggggctcca	420
gtgaagctgt cctgcaaggc ttctggttac accttaccac gctactgggt gaactgggtg	480
aagcagaggc ctggacgagg cctcgagtgg attggaagga ttgatccttc cgatagtga	540
actcactaca atcaaaagt caaggacaag gccacactga ctgtagacaa atcctccagc	600
acagcctaca tccaactcag cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtgca	660

agatggacta	tggtagtagt	tacggatgct	atggactact	ggggtcaagg	aacctcagtc	720
accgtctcct	caacaactac	tccagcacca	cgaccaccaa	cacctgctcc	aactatcgca	780
tctcaaccac	tttctctacg	tccagaagca	tgccgaccag	ctgcaggagg	tgcagttcat	840
acgagaggtc	tagatttctgc	atgtgatata	tacatctggg	caccattggc	tgggacttgt	900
ggtgtccttc	tcctatcact	ggttatcacc	ctttactgct	gggttagaag	taaaagaagt	960
aggctacttc	atagtgatta	catgaatatg	actcctcgac	gacctgggtcc	cacccgtaag	1020
cattatcagc	cctatgcacc	accacgagat	ttcgcagcct	atcgctccag	agttaaattt	1080
agcagaagtg	cagatgctcc	tgcgataaaa	cagggtcaaa	accaactata	taatgaacta	1140
aatctaggac	gaagagaaga	atatgatgtt	ttagataaaa	gacgtgggtcg	agatcctgaa	1200
atgggaggaa	aacctagaag	aaaaaatcct	caagaaggcc	tatataatga	actacaaaaa	1260
gataagatgg	cagaagctta	tagtgaaatt	ggaatgaaag	gagaacgtcg	tagaggtaaa	1320
ggtcatgatg	gtctttatca	aggtcttagt	acagcaacaa	aagatacata	tgatgcactt	1380
catatgcaag	cacttccacc	tcgtttcgaa	gagcaaaaac	ttatctctga	agaggacctc	1440
atggtgagca	agggcgagga	gctgttcacc	ggggtggtgc	ccatcctggt	cgagctggac	1500
ggcgacgtaa	acggccacaa	gttcagcgtg	tccggcgagg	gcgagggcga	tgccacctac	1560
ggcaagctga	ccctgaagtt	catctgcacc	accggcaagc	tgcccgtgcc	ctggcccacc	1620
ctcgtgacca	ccctgaccta	cggcgtgcag	tgcttcagcc	gctaccccga	ccacatgaag	1680
cagcacgact	tcttcaagtc	cgccatgccc	gaaggctacg	tccaggagcg	caccatcttc	1740
ttcaaggacg	acggcaacta	caagaccgcg	gccgaggtga	agttcgaggg	cgacaccctg	1800
gtgaaccgca	tcgagctgaa	gggcatcgac	ttcaaggagg	acggcaacat	cctggggcac	1860
aagctggagt	acaactacaa	cagccacaac	gtctatatca	tggccgacaa	gcagaagaac	1920
ggcatcaagg	tgaacttcaa	gatccgccac	aacatcgagg	acggcagcgt	gcagctcgcc	1980
gaccactacc	agcagaacac	ccccatcggc	gacggccccg	tgctgctgcc	cgacaaccac	2040
tacctgagca	cccagtccgc	cctgagcaaa	gaccccaacg	agaagcgcg	tcacatggtc	2100
ctgctggagt	tcgtgaccgc	cgccgggatc	actctcggca	tggacgagct	gtacaag	2157
<210> 37						
<211> 2535						
<212> DNA						
<213> 人工序列						
<220>						
<223> 合成寡核苷酸						
<400> 37						
gacattgtgc	tgacacagtc	tcctgcttcc	ttagctgtat	ctctggggca	gagggccacc	60
atctcataca	gggccagcaa	aagtgtcagt	acatctggct	atagttatat	gacttgaac	120
caacagaaac	caggacagcc	accagactc	ctcatctatc	ttgtatccaa	cctagaatct	180
ggggtccctg	ccaggttcag	tggcagtggg	tctgggacag	acttcaccct	caacatccat	240
cctgtggagg	aggaggatgc	tgcaacctat	tactgtcagc	acattaggga	gcttacacgt	300
tcggaggggg	gaccaagctg	gaaaggagga	ggtggtagt	gtggaggagg	aagtggagga	360
ggaggaagtc	aggtccaact	gcagcagcct	ggggctgagc	ttgtgaagcc	tggggctcca	420

gtgaagctgt cctgcaaggc ttctggctac accttcacca gctactgggt gaactgggtg	480
aagcagaggc ctggacgagg cctcgagtgg attggaagga ttgataccttc cgatagttaa	540
actcactaca atcaaaaagtt caaggacaag gccacactga ctgtagacaa atcctccagc	600
acagcctaca tccaactcag cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtgca	660
agatggacta tggtagtagt tacggatgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc	720
accgtctcct caactagtat tgaagttatg tatcctcctc cttacctaga caatgagaag	780
agcaatggaa ccattatcca tgtgaaaggg aaacaccttt gtccaagtcc cctatttccc	840
ggaccttcta agcccttttg ggtgctgggt gtggttgggt gagtcctggc ttgctatagc	900
ttgctagtaa cagtggcctt tattattttc tgggttagaa gtaaaagaag taggctactt	960
catagtgatt acatgaatat gactcctcga cgacctggtc ccaccgtaa gcattatcag	1020
ccctatgcac caccacgaga ttctgcagcc tatcgtccca gagttaaatt tagcagaagt	1080
gcagatgctc ctgcgtataa acagggtcaa aaccaactat ataatgaact aaatctagga	1140
cgaagagaag aatatgatgt tttagataaa agacgtggtc gagatcctga aatgggagga	1200
aaacctagaa gaaaaaatcc tcaagaaggc ctatataatg aactacaaaa agataagatg	1260
gcagaagctt atagtgaat tggaatgaaa ggagaacgtc gtagaggtaa aggtcatgat	1320
ggtctttatc aaggtcttag tacagcaaca aaagatacat atgatgcact tcatatgcaa	1380
gcacttcac ctcgtttcga aggtccggc gagggcagag gcagtctgct gacatgcgtt	1440
gacgtggaag agaatcccg ccctatgctt ctctggtga caagccttct gctctgtgag	1500
ttaccacacc cagcattcct ccgcaaagtg tgtaacggaa taggtattgg tgaatttaaa	1560
gactcactct ccataaatgc tacgaatatt aaacacttca aaaactgcac ctccatcagt	1620
ggcgtatccc acatcctgcc ggtggcattt aggggtgact ccttcacaca tactcctcct	1680
ctagatccac aggaactgga tattctgaaa accgtaaagg aaatcacagg gtttttgctg	1740
attcaggctt ggcctgaaaa caggacggac ctccatgcct ttgagaacct agaaatcata	1800
cgcggcagga ccaagcaaca tggtcagttt tctcttgcat tcgtcagcct gaacataaca	1860
tccttgggat tacgctccct caaggagata agtgatggag atgtgataat ttcaggaaac	1920
aaaaatttgt gctatgcaa tacaataaac tggaaaaaac tgtttgggac ctccggtcag	1980
aaaacaaaaa ttataagcaa cagaggtgaa aacagctgca aggccacagg ccaggctctgc	2040
catgccttgt gctccccga gggctgctgg ggcccgagc ccagggactg cgtctcttgc	2100
cggaatgtca gccgaggcag ggaatgcgtg gacaagtgca accttctgga gggtagacca	2160
agggagtttg tggagaactc tgagtgcata cagtgccacc cagagtgcct gcctcaggcc	2220
atgaacatca cctgcacagg acggggacca gacaactgta tccagtgtgc ccactacatt	2280
gacggcccc actgcgtcaa gacctgccg gcaggagtca tgggagaaaa caacaccctg	2340
gtctggaagt acgcagacgc cggccatgtg tgccacctgt gccatccaaa ctgcacctac	2400
ggatgcactg ggccaggctt tgaaggtgt ccaacgaatg ggcctaagat cccgtccatc	2460
gccactggga tgggtggggc cctcctcttg ctgctggtgg tggccctggg gatcggcctc	2520
ttcatgcgaa ggtaa	2535
<210> 38	
<211> 2142	
<212> DNA	

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成寡核甘酸

&lt;400&gt; 38

aacattatga	tgacacagtc	gccatcatct	ctggctgtgt	ctgcaggaga	aaaggtcact	60
atgcgctgta	agtccagtca	aagtgtttta	tacagttcaa	atcagaagaa	ctacttggcc	120
tggtaccagc	agaaaccagg	gcagtctcct	aaactgctga	tctactgggc	atccactagg	180
gaatctgggtg	tccctgatcg	cttcacaggc	agtggatctg	ggacagattt	tactcttacc	240
atcagcagtg	tacaagctga	agacctggca	gtttattact	gtcatcaatt	cctctcctcg	300
tacacgttcg	gaggggggac	caagctggaa	ataaaaggag	gaggtggtag	tggtggagga	360
ggaagtggag	gaggaggaag	tgaggtgcag	ctgcaggagt	ctggggctga	gcttgtgagg	420
ccaggggcct	tagtcaagtt	gtcctgcaga	gcttctggct	tcaacattaa	agactactat	480
atgcactggg	tgaagcagag	gcctgaacag	ggcctggagt	ggattggatg	gattgatcct	540
gagaatggta	attctatata	tgacccgaag	ttccagggca	aggccagtat	aacagcagac	600
acatcctcca	acacagccta	cctgcagctc	agcagcctga	catctgagga	cactgccgtc	660
tattactgtg	ctgtagacct	ttactacggg	agagggactc	tggtcactgt	ctctgcaaca	720
actactccag	caccacgacc	accaacacct	gctccaacta	tcgcatctca	accactttct	780
ctacgtccag	aagcatgccg	accagctgca	ggaggtgcag	ttcatacgag	aggtctagat	840
ttcgcatgtg	atatctacat	ctgggcacca	ttggctggga	cttgtggtgt	ccttctccta	900
tcactggtta	tcacccttta	ctgctgggtt	agaagtaaaa	gaagtaggct	acttcatagt	960
gattacatga	atatgactcc	tcgacgacct	ggtcccaccc	gtaagcatta	tcagccctat	1020
gcaccaccac	gagatttcgc	agcctatcgc	tccagagtta	aatttagcag	aagtgcagat	1080
gctcctgcgt	ataaacaggg	tcaaaaccaa	ctatataatg	aactaaatct	aggacgaaga	1140
gaagaatatg	atgttttaga	taaaagacgt	ggtcgagatc	ctgaaatggg	aggaaaacct	1200
agaagaaaaa	atcctcaaga	aggcctatat	aatgaactac	aaaaagataa	gatggcagaa	1260
gcttatagtg	aaattggaat	gaaaggagaa	cgtcgtagag	gtaaaggcca	tgatggtctt	1320
tatcaaggtc	ttagtacagc	aacaaaagat	acatatgatg	cacttcatat	gcaagcactt	1380
ccacctcggt	tcgaagagca	aaaacttatc	tctgaagagg	acctcatggt	gagcaagggc	1440
gaggagctgt	tcaccggggg	ggtgcccata	ctggctgagc	tggacggcga	cgtaaacggc	1500
cacaagttca	gcgtgtccgg	cgagggcgag	ggcgatgcc	cctacggcaa	gctgaccctg	1560
aagttcatct	gcaccaccgg	caagctgccc	gtgcccgggc	ccacctcgt	gaccaccctg	1620
acctacggcg	tgagtgctt	cagccgtac	cccaccaca	tgaagcagca	cgacttcttc	1680
aagtccgcca	tgcccgaagg	ctacgtccag	gagcgacca	tcttcttcaa	ggacgacggc	1740
aactacaaga	cccgcgccga	ggtgaagtgc	gagggcgaca	ccctggtgaa	ccgcacgcag	1800
ctgaagggca	tcgacttcaa	ggaggacggc	aacatcctgg	ggcacaagct	ggagtacaac	1860
tacaacagcc	acaacgtcta	tatcatggcc	gacaagcaga	agaacggcat	caaggtgaac	1920
ttcaagatcc	gccacaacat	cgaggacggc	agcgtgcagc	tcgccgacca	ctaccagcag	1980
aacaccccc	tcggcgacgg	ccccgtgctg	ctgcccagca	accactacct	gagcaccag	2040
tccgccctga	gcaaagaccc	caacgagaag	cgcgatcaca	tggtcctgct	ggagttcgtg	2100



accgccgccg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca ag	2142
<210> 39	
<211> 2517	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 39	
aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact	60
atgcgctgta agtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc	120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg	180
gaatctggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc	240
atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcataaatt cctctcctcg	300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaaggag gaggtggtag tgggtggagga	360
ggaagtggag gaggaggaag tgaggtgcag ctgcaggagt ctggggctga gcttgtgagg	420
ccaggggcct tagtcaagtt gtccctgcaga gcttctggct tcaacattaa agactactat	480
atgcactggg tgaagcagag gcctgaacag ggcctggagt ggattggatg gattgatcct	540
gagaatggta attctatata tgacccgaag ttccaggga aggccagtat aacagcagac	600
acatcctcca acacagccta cctgcagctc agcagcctga catctgagga cactgccgtc	660
tattactgtg ctgtagacct ttactacggg agagggactc tggctactgt ctctgcaact	720
agtattgaag ttatgtatcc tcctccttac ctagacaatg agaagagcaa tggaaccatt	780
atccatgtga aagggaacaa cctttgtcca agtcccctat ttcccggacc ttctaagccc	840
ttttgggtgc tgggtggtgtg tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg	900
gcctttatta ttttctgggt tagaagtaaa agaagtaggc tacttcatag tgattacatg	960
aatatgactc ctcgacgacc tgggtcccacc cgtaagcatt atcagcccta tgcaccacca	1020
cgagatttcg cagcctatcg ctccagagtt aaatttagca gaagtgcaga tgctcctgcg	1080
tataaacagg gtcaaaacca actatataat gaactaaatc taggacgaag agaagaatat	1140
gatgttttag ataaaagacg tggctgagat cctgaaatgg gaggaacc tagaagaaaa	1200
aatcctcaag aaggcctata taatgaacta caaaaagata agatggcaga agcttatagt	1260
gaaattggaa tgaaaggaga acgtcgtaga ggtaaaggtc atgatggtct ttatcaaggt	1320
cttagtacag caacaaaaga tacatatgat gcacttcata tgcaagcact tccacctcgt	1380
ttcgaaggct ccggcgaggg cagaggcagt ctgctgacat gcggtgacgt ggaagagaat	1440
cccggcccta tgcttctcct ggtgacaagc cttctgctct gtgagttacc acaccagca	1500
ttcctccgca aagtgtgtaa cggaataggt attggtgaat ttaaagactc actctccata	1560
aatgctacga atattaaaca cttcaaaaac tgcacctcca tcagtggcga tctccacatc	1620
ctgccggtgg catttagggg tgactccttc acacatactc ctctctaga tccacaggaa	1680
ctggatatctc tgaaaaccgt aaaggaaatc acagggtttt tgctgattca ggcttggcct	1740
gaaaacagga cggacctcca tgcctttgag aacctagaaa tcatacgcgg caggaccaag	1800
caacatggtc agttttctct tgcagtcgtc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc	1860

tccctcaagg agataagtga tggagatgtg ataatttcag gaaacaaaaa tttgtgctat	1920
gcaaatataca taaactggaa aaaactgttt gggacctccg gtcagaaaac caaaattata	1980
agcaacagag gtgaaaacag ctgcaaggcc acaggccagg tctgccatgc cttgtgctcc	2040
cccgagggtc gctggggccc ggagcccagg gactgcgtct cttgccgga tgtcagccga	2100
ggcagggaat gcgtggacaa gtgcaacctt ctggagggtg agccaaggga gtttgtggag	2160
aactctgagt gcatacagt ccacccagag tgctgcctc aggccatgaa catcacctgc	2220
acaggacggg gaccagacaa ctgtatccag tgtgccact acattgacgg cccccactgc	2280
gtcaagacct gcccggcagg agtcatggga gaaaacaaca ccctggtctg gaagtacga	2340
gacgccggcc atgtgtgcc cctgtgccat ccaaactgca cctacggatg cactgggcca	2400
ggtcttgaag gctgtccaac gaatgggcct aagatcccg ccatcgccac tgggatggtg	2460
ggggccctcc tcttctgct ggtggtggcc ctggggatcg gcctcttcat gcgaagg	2517
<210> 40	
<211> 1011	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核甘酸	
<400> 40	
cgcaaagtgt gtaacggaat aggtattggt gaatttaaag actcactctc cataaatgct	60
acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc tccatcagt gcgatctcca catcctgccg	120
gtggcattta ggggtgactc cttcacacat actcctctc tagatccaca ggaactggat	180
attctgaaaa ccgtaaagga aatcacaggg tttttgctga ttcaggcttg gcctgaaaac	240
aggacggacc tccatgcctt tgagaacct gaaatcatac gcggcaggac caagcaacat	300
ggtcagtttt ctcttgcat cgtcagcctg aacataacat ccttgggatt acgctccctc	360
aaggagataa gtgatggaga tgtgataatt tcaggaaaca aaaatttgtg ctatgcaaat	420
acaataaact ggaaaaaact gtttgggacc tccggtcaga aaaccaaact tataagcaac	480
agaggtgaaa acagctgcaa ggccacaggc caggctctgc atgccttgat ctcccccgag	540
ggctgctggg gcccggagcc cagggactgc gtctcttgcc ggaatgtcag ccgaggcagg	600
gaatgcgtgg acaagtgcaa cttcttgagg ggtgagccaa gggagtttgt ggagaactct	660
gagtgcatat agtgccaccc agagtgcctg cctcaggcca tgaacatcac ctgcacagga	720
cggggaccag acaactgtat ccagtgtgcc cactacattg acggccccca ctgcgtcaag	780
acctgcccgg caggagtcac gggagaaaac aacacctgg tctggaagta cgcagacgcc	840
ggccatgtgt gccacctgtg ccatccaaac tgcacctac gatgcactgg gccaggtctt	900
gaaggctgtc caacgaatgg gcctaagatc ccgtccatcg ccactgggat ggtgggggcc	960
ctcctcttgc tgctggtggt ggccctgggg atcggcctct tcatgcaag g	1011
<210> 41	
<211> 337	
<212> PRT	
<213> 人工序列	

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 41

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

Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro  
 290 295 300  
 Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala  
 305 310 315 320  
 Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg  
 325 330 335

Arg

<210> 42

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核甘酸

<400> 42

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga 60

ccc 63

<210> 43

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 43

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> 44

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核甘酸

<400> 44

ggtggcggag gttct 15

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 45

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成寡核苷酸

&lt;400&gt; 46

ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc

30

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 47

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成寡核苷酸

&lt;400&gt; 48

ggaggagggtg gtagtggtgg aggaggaagt ggaggaggag gaagt

45

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210>	50	
<211>	60	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	50	
	ggaggagggtg gtagtggtgg aggaggaagt ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc	60
<210>	51	
<211>	20	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成氨基酸	
<400>	51	
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	
	1 5 10 15	
	Gly Gly Gly Ser	
	20	
<210>	52	
<211>	135	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	52	
	acaactactc cagcaccacg accaccaaca cctgctccaa ctatcgcatc tcaaccactt	60
	tctctacgtc cagaagcatg ccgaccagct gcaggagggtg cagttcatac gagaggtcta	120
	gatttcgcat gtgat	135
<210>	53	
<211>	45	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成氨基酸	
<400>	53	
	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>	54			
<211>	141			
<212>	DNA			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	合成寡核苷酸			
<400>	54			
aagcccaaaa ctactccagc accacgacca ccaacacctg ctccaactat cgcattctcaa				60
ccactttctc tacgtccaga agcatgccga ccagctgcag gaggtgcagt tcatacgaga				120
ggtctagatt tcgcatgtga t				141
<210>	55			
<211>	47			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	合成氨基酸			
<400>	55			
Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr				
1 5 10 15				
Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala				
	20	25	30	
Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp				
	35	40	45	
<210>	56			
<211>	174			
<212>	DNA			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	合成寡核苷酸			
<400>	56			
ttcagccact tcgtgccgt cttcctgccg gcgaagccca caactactcc agcaccacga				60
ccaccaaac ctgtccaac tatcgcatt caaccacttt ctctacgtcc agaagcatgc				120
cgaccagctg caggaggtgc agttcatacg agaggtctag atttcgcatt tgat				174
<210>	57			
<211>	58			
<212>	PRT			

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 57

```

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

```

<210> 58

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核甘酸

<400> 58

```

attgaagtta tgtatcctcc tccttaccta gacaatgaga agagcaatgg aaccattatc      60
catgtgaaag gg                                                                72

```

<210> 59

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 59

```

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
          20

```

<210> 60

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核甘酸

<400> 60



gagtccaaat atggtccccc atgcccata tgccca	36
<210> 61	
<211> 12	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成氨基酸	
<400> 61	
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	
1 5 10	
<210> 62	
<211> 369	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 62	
gagtccaaat atggtccccc atgcccata tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca	60
tcagtcttcc tgttccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag	120
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac	180
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttccaaagc	240
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacgctc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	300
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtctctca tcgagaaaac catctccaaa	360
gccaaaggg	369
<210> 63	
<211> 123	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成氨基酸	
<400> 63	
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe	
1 5 10 15	
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	
20 25 30	
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	
35 40 45	
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	
50 55 60	

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 85 90 95  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
 100 105 110  
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 115 120

<210> 64

<211> 687

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 64

gagtccaaat atggtccccc atgcccatca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 60  
 tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag 120  
 gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 180  
 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttccaaagc 240  
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 300  
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 360  
 gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 420  
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 480  
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 540  
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctcaccg tggacaagag caggtggcag 600  
 gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 660  
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 687

<210> 65

<211> 229

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 65

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

35	40	45
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val	Gln Phe Asn Trp Tyr Val	Asp Gly Val
50	55	60
Glu Val His Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe	Gln Ser
65	70	75
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val	Leu Thr Val Leu His Gln	Asp Trp Leu
85	90	95
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	Lys Val Ser Asn Lys Gly	Leu Pro Ser
100	105	110
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser	Lys Ala Lys Gly Gln Pro	Arg Glu Pro
115	120	125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	Ser Gln Glu Glu Met Thr	Lys Asn Gln
130	135	140
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	Asp Ile Ala
145	150	155
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	Lys Thr Thr
165	170	175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	Ser Arg Leu
180	185	190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	Gln Glu Gly Asn Val Phe	Ser Cys Ser
195	200	205
Val Met His Glu Ala Leu His	Asn His Tyr Thr Gln Lys	Ser Leu Ser
210	215	220
Leu Ser Pro Gly Lys		
225		
<210>	66	
<211>	981	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	66	
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc	ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag	gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg	cacaccttcc cggctgtcct acagtctctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc	gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc	aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc	300
aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc	gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc	360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg	420

```

tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat    480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcca aagcacgtac    540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag    600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa    660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag    720
aaccagggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag    780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc    840
gacggctcct tcttcctcta cagcaggctc accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg    900
aatgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc    960
ctctccctgt ctccgggtaa a                                           981

```

<210> 67

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 67

```

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

```

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

<210> 68

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 68

atctacatct gggcaccatt ggctgggact tgtggtgtcc ttctcctatc actggttacc

60

accctttact gc

72

<210> 69

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 69

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

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 84

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成寡核甘酸

&lt;400&gt; 70

atctacatct gggcaccatt ggctgggact tgtggtgtcc ttctcctatc actggttatac 60

acccttttact gcaaccacag gaac 84

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 71

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 Asn His Arg Asn

20

25

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成寡核甘酸

&lt;400&gt; 72

aaacaccttt gtccaagtcc cctattttccc ggacctteta agcccttttg ggtgctggtg 60

gtggttggtg gagtcctggc ttgctatagc ttgctagtaa cagtggcctt tattatatttc 120

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 73

Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe

1 5 10 15

Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu	
20	25
30	
Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe	
35	40
<210> 74	
<211> 123	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 74	
agaagtaaaa gaagtaggct acttcatagt gattacatga atatgactcc tcgacgacct	60
gggtcccaccc gtaagcatta tcagccctat gcaccaccac gagatttcgc agcctatcgc	120
tcc	123
<210> 75	
<211> 41	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成氨基酸	
<400> 75	
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> 76	
<211> 126	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 76	
aaacgaggta gaaaaaaact tctttatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa	60
actactcaag aggaagatgg atgtagttgt cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt	120
gaactg	126
<210> 77	
<211> 112	

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 77

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

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成寡核甘酸

&lt;400&gt; 78

aggcgcgacc agcggctgcc acctgatgca cacaagccac caggaggagg ctctttccgg 60  
 accccaatcc aggaggagca ggcagacgca cacagcacac tggccaagat c 111

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 79

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser  
 20 25 30



Thr Leu Ala Lys Ile

35

<210> 80

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 80

agagttaaat ttagcagaag tgcagatgct cctgcgtata aacagggtca aaaccaacta	60
tataatgaac taaatctagg acgaagagaa gaatatgatg ttttagataa aagacgtggt	120
cgagatcctg aaatgggagg aaaacctaga agaaaaaatc ctcaagaagg cctatataat	180
gaactacaaa aagataagat ggcagaagct tatagtgaaa ttggaatgaa aggagaacgt	240
cgtagaggta aaggatcatga tggctctttat caaggtctta gtacagcaac aaaagataca	300
tatgatgcac ttcatatgca agcacttcca cctcgt	336

<210> 81

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 81

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

<210> 82

<211> 717

<212> DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成寡核甘酸

&lt;400&gt; 82

```

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac      60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac      120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc      180
ctcgtgacca ccctgacctt cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag      240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggtacg tccaggagcg caccatcttc      300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg      360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac      420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac      480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc      540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac      600
tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcg tcacatggtc      660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaag      717

```

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成氨基酸

&lt;400&gt; 83

```

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

```

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr  
 130 135 140  
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn  
 145 150 155 160  
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser  
 165 170 175  
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly  
 180 185 190  
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu  
 195 200 205  
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe  
 210 215 220  
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
 225 230 235

<210> 84

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核甘酸

<400> 84

gagggcagag gcagtctgct gacatgcggt gacgtggaag agaatcccgg ccct

54

<210> 85

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 85

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro  
 1 5 10 15

Gly Pro

<210> 86

<211> 2115

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核甘酸

<400> 86

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc	60
atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgtggt ggtaccacca gaagccagga	120
tcctcccccga gactcctgat ttttgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc	180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgaa	240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg actagttacc cgtacacgtt cggagggggg	300
accaagctgg aaataaaaagg aggaggtggt agtgggtggag gaggaagtgg aggaggagga	360
agtgaggtgc agctgcagga gtctggacct gagctgaaga agcctggaga gacagtcaag	420
atctcctgca aggcttctgg ttataccttc acagactatt caatgcactg ggtgaagcag	480
gctccaggaa agggtttaaa gtggatgggc tggataaaca ctgagactgg tgagccaaca	540
tatgcagatg acttcaaggg acggtttgcc ttctctttgg aaacctctgc cagcactgcc	600
tattttgcaga tcaacaacct caaaaatgat gacacggcta catatttctg taatatggac	660
tcctggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcaacia ctactccagc accacgacca	720
ccaacacctg ctccaactat cgcactctca ccaatttctc tacgtccaga agcatgccga	780
ccagctgcag gaggtgcagt tcatacgaga ggtctagatt tcgcatgtga tatctacatc	840
tgggcaccat tggctgggac ttgtggtgtc cttctcttat cactggttat caccctttac	900
tgctgggtta gaagtaaaag aagtaggcta cttcatagt attacatgaa tatgactcct	960
cgacgacctg gtcccacccg taagcattat cagccctatg caccaccag agatttcgca	1020
gcctatcgct ccagagttaa atttagcaga agtgcagatg ctctgcgta taaacagggt	1080
caaaaccaac tatataatga actaaatcta ggacgaagag aagaatatga tgtttttagat	1140
aaaagacgtg gtcgagatcc tgaaatggga ggaaaaccta gaagaaaaaa tcctcaagaa	1200
ggcctatata atgaactaca aaaagataag atggcagaag cttatagtga aattggaatg	1260
aaaggagaac gtcgtagagg taaaggatcat gatggtcttt atcaaggctt tagtacagca	1320
acaaaagata catatgatgc acttcatatg caagcacttc cacctcgtga gcaaaaactt	1380
atctctgaag aggacctcat ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc	1440
atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc	1500
gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg	1560
cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc	1620
taccccgacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc	1680
caggagcgca ccatcttctt caaggacgac ggcaactaca agaccgcgc cgaggtgaag	1740
ttcgaggcg acacctggt gaaccgcac gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac	1800
ggcaacatcc tggggcacia gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg	1860
gccgacaagc agaagaacgg catcaagggt aacttcaaga tccgccacia catcgaggac	1920
ggcagcgtgc agctcgccga ccactaccag cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg	1980
ctgctgcccc acaaccacta cctgagcacc cagtccgccc tgagcaaaga cccaacgag	2040
aagcgcgatc acatggtcct gctggagtgc gtgaccgccc ccgggatcac tctcgcatg	2100
gacgagctgt acaag	2115
<210> 87	
<211> 2151	
<212> DNA	

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成寡核甘酸

&lt;400&gt; 87

gacattgtgc	tgacacagtc	tcctgcttcc	ttagctgtat	ctctggggca	gagggccacc	60
atctcataca	gggccagcaa	aagtgtcagt	acatctggct	atagttatat	gcactggaac	120
caacagaaac	caggacagcc	acccagactc	ctcatctatc	ttgtatccaa	cctagaatct	180
ggggtccctg	ccagggttcag	tggcagtggg	tctgggacag	acttcaccct	caacatccat	240
cctgtggagg	aggaggatgc	tgcaacctat	tactgtcagc	acattaggga	gcttacacgt	300
tcggaggggg	gaccaagctg	gaaaggagga	ggtggtagtg	gtggaggagg	aagtggagga	360
ggaggaagtc	aggtccaact	gcagcagcct	ggggctgagc	ttgtgaagcc	tggggctcca	420
gtgaagctgt	cctgcaaggc	ttctggctac	accttcacca	gctactgggt	gaactgggtg	480
aagcagaggc	ctggacgagg	cctcgagtgg	attggaagga	ttgatccttc	cgatagtga	540
actcactaca	atcaaaagtt	caaggacaag	gccacactga	ctgtagacaa	atcctccagc	600
acagcctaca	tccaactcag	cagcctgaca	tctgaggact	ctgcggtcta	ttactgtgca	660
agatggacta	tggtagtagt	tacggatgct	atggactact	ggggtcaagg	aacctcagtc	720
accgtctcct	caacaactac	tccagcacca	cgaccaccaa	cacctgctcc	aactatcgca	780
tctcaaccac	tttctctacg	tccagaagca	tgccgaccag	ctgcaggagg	tgcagttcat	840
acgagaggtc	tagatttcgc	atgtgatatc	tacatctggg	caccattggc	tgggacttgt	900
ggtgtccttc	tcctatcact	ggttatcacc	ctttactgct	gggttagaag	taaaagaagt	960
aggctacttc	atagtgatta	catgaatatg	actcctcgac	gacctggtcc	cacccgtaag	1020
cattatcagc	cctatgcacc	accacgagat	ttcgcagcct	atcgctccag	agttaaattt	1080
agcagaagtg	cagatgctcc	tgcgtataaa	cagggtcaaa	accaactata	taatgaacta	1140
aatctaggac	gaagagaaga	atatgatgtt	ttagataaaa	gacgtggtcg	agatcctgaa	1200
atggggaggaa	aacctagaag	aaaaaatcct	caagaaggcc	tatataatga	actacaaaaa	1260
gataagatgg	cagaagctta	tagtgaaatt	ggaatgaaag	gagaacgtcg	tagaggtaaa	1320
ggtcatgatg	gtctttatca	aggtcttagt	acagcaacaa	aagatacata	tgatgcactt	1380
catatgcaag	cacttccacc	tcgtgagcaa	aaacttatct	ctgaagagga	cctcatggtg	1440
agcaagggcg	aggagctgtt	caccgggggtg	gtgcccattcc	tggtcgagct	ggacggcgac	1500
gtaaacggcc	acaagttcag	cgtgtccggc	gagggcgagg	gcgatgccac	ctacggcaag	1560
ctgaccctga	agttcatctg	caccaccggc	aagctgcccc	tgccctggcc	caccctcgctg	1620
accaccctga	cctacggcgt	gcagtgtctc	agccgctacc	ccgaccacat	gaagcagcac	1680
gacttcttca	agtccgccat	gcccgaaggc	tacgtccagg	agcgcacat	cttcttcaag	1740
gacgacggca	actacaagac	ccgcgccgag	gtgaagtctg	agggcgacac	cctggtgaac	1800
cgcacgcagc	tgaaggcat	cgacttcaag	gaggacggca	acatcctggg	gcacaagctg	1860
gagtacaact	acaacagcca	caacgtctat	atcatggccg	acaagcagaa	gaacggcatc	1920
aaggtgaact	tcaagatccg	ccacaacatc	gaggacggca	gcgtgcagct	cgccgaccac	1980
taccagcaga	acacccccat	cggcgacggc	cccgtgtctg	tgcccgacaa	ccactacctg	2040
agcaccacgt	ccgccctgag	caaagacccc	aacgagaagc	gcgatcacat	ggtcctgctg	2100

gagttcgtga cgcgcccg gatactctc ggcattggacg agctgtacaa g	2151
<210> 88	
<211> 2136	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 88	
aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact	60
atgcgctgta agtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc	120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg	180
gaatctggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc	240
atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcattcaatt cctctcctcg	300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaaggag gaggtggtag tgggtggagga	360
ggaagtggag gaggaggaag tgaggtgcag ctgcaggagt ctggggctga gcttgtgagg	420
ccaggggcct tagtcaagtt gtccctgcaga gcttctggct tcaacattaa agactactat	480
atgcactggg tgaagcagag gcctgaacag ggcctggagt ggattggatg gattgatcct	540
gagaatggta attctatata tgacccgaag ttccaggga aggccagtat aacagcagac	600
acatcctcca acacagccta cctgcagctc agcagcctga catctgagga cactgccgtc	660
tattactgtg ctgtagacct ttactacggg agagggactc tggctactgt ctctgcaaca	720
actactccag caccacgacc accaacacct gctccaacta tcgcatctca accactttct	780
ctacgtccag aagcatgccg accagctgca ggaggtgcag ttcatagag aggtctagat	840
ttcgcagtg atattctacat ctgggcacca ttggctggga cttgtggtgt cttctccta	900
tcactgggta tcacccttta ctgctgggtt agaagtaaaa gaagtaggct acttcatagt	960
gattacatga atattgactcc tcgacgacct ggtccacccc gtaagcatta tcagccctat	1020
gcaccaccac gagatttcgc agcctatcgc tccagagtta aatttagcag aagtgcagat	1080
gctcctgcgt ataaacaggg tcaaaaccaa ctatataatg aactaaatct aggacgaaga	1140
gaagaatatg atgttttaga taaaagacgt ggtcgagatc ctgaaatggg aggaaaacct	1200
agaagaaaaa atcctcaaga aggcctatat aatgaactac aaaaagataa gatggcagaa	1260
gcttatagtg aaattggaat gaaaggagaa cgtcgtagag gtaaaggatc tgatggtctt	1320
tatcaaggtc ttagtacagc aacaaaagat acatatgatg cacttcatat gcaagcactt	1380
ccacctcgtg agcaaaaaact tatctctgaa gaggacctca tgggtgagcaa gggcgaggag	1440
ctgttcaccg ggggtggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag	1500
ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac cctgaagtgc	1560
atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac cctgacctac	1620
ggcgtgcagt gcttcagccc ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc	1680
gcatgccccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga cggcaactac	1740
aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacacctgg tgaaccgat cgagctgaag	1800
ggcatcgact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac	1860

---

agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag	1920
atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg cagctcgccg accactacca gcagaacacc	1980
cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc	2040
ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc	2100
gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaag	2136

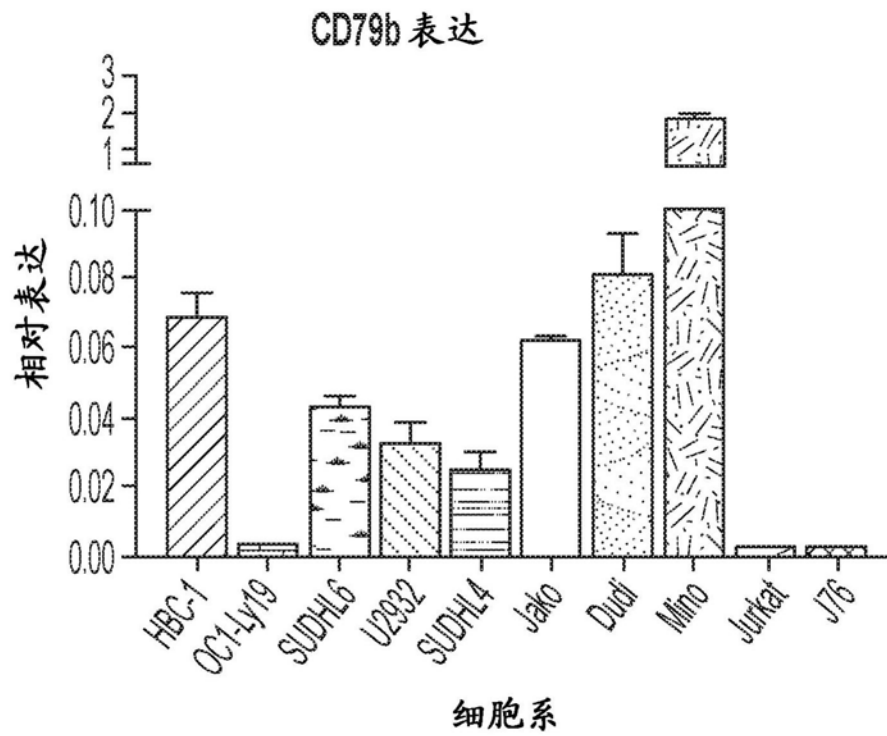


图1A

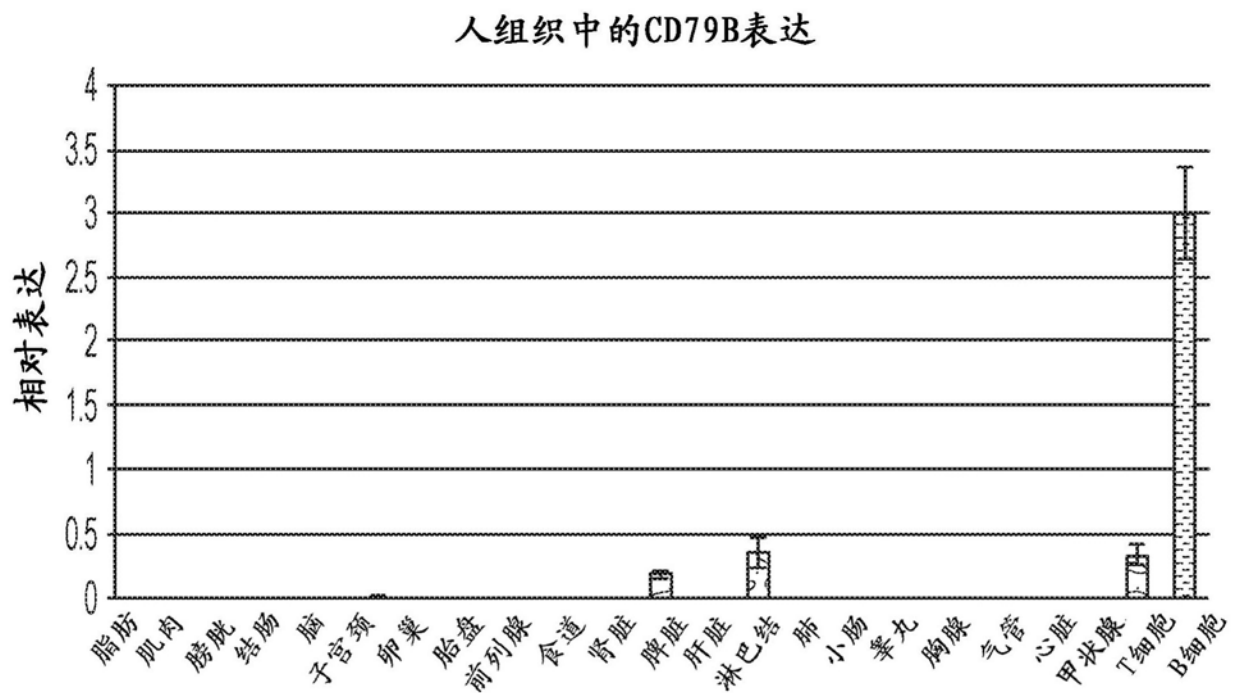


图1B



Haferlach白血病中的CD79B表达  
慢性淋巴细胞白血病vs. 正常

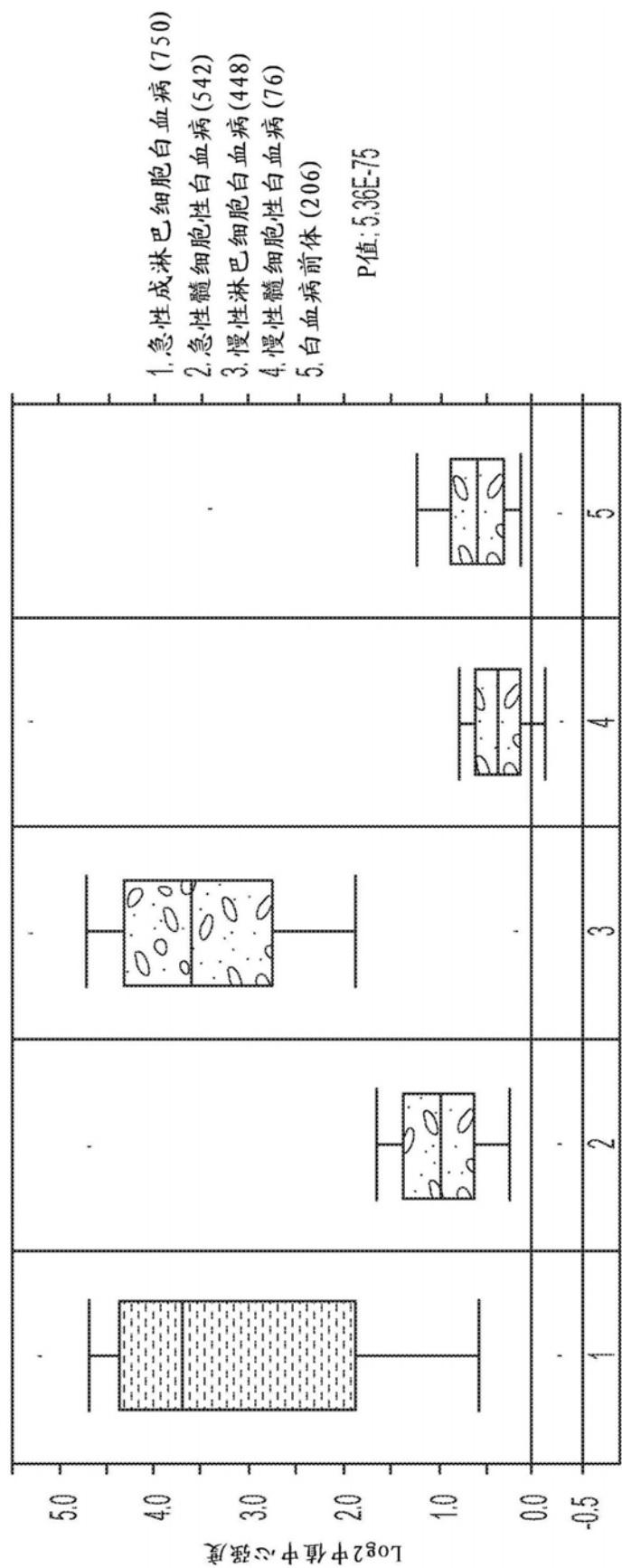


图1C

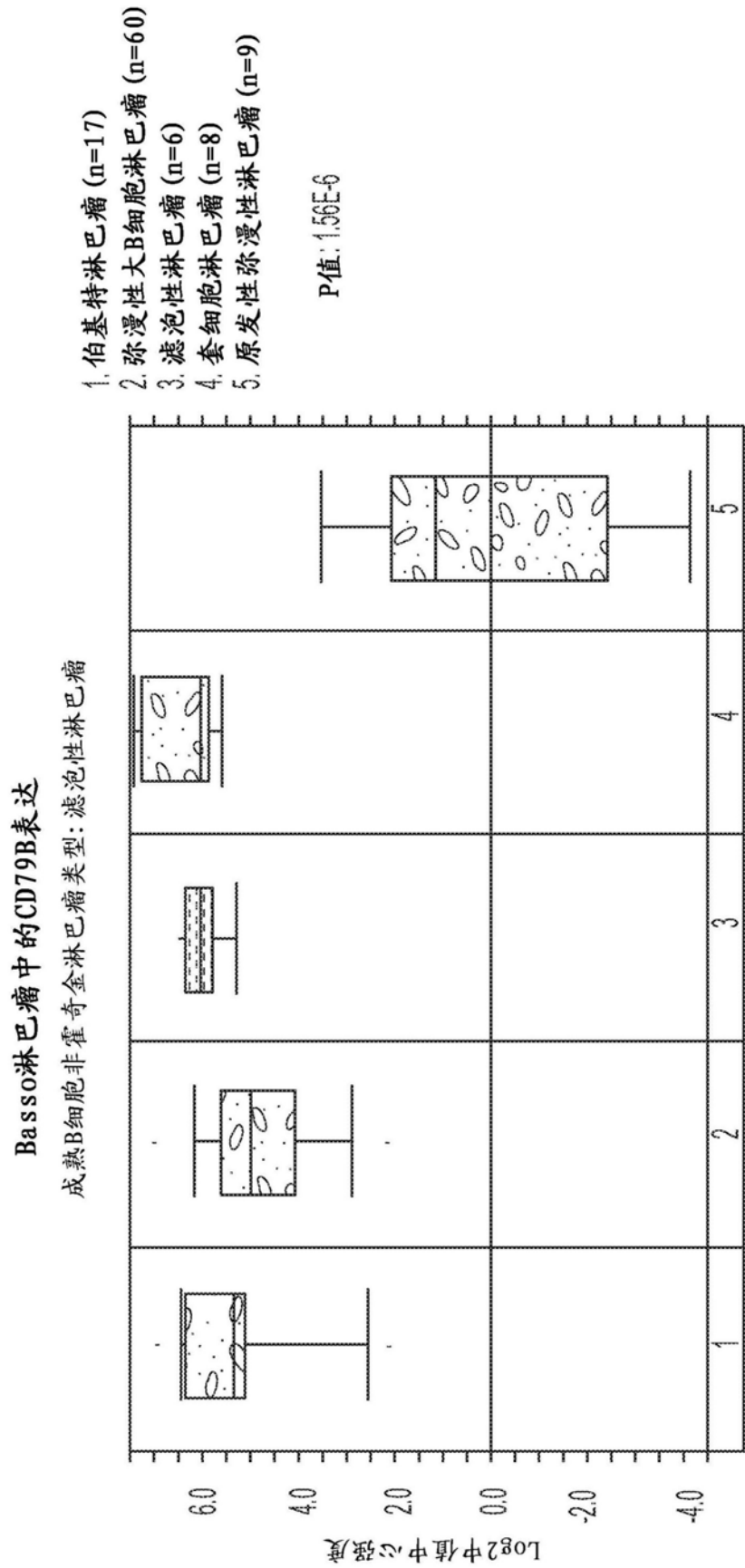


图1D

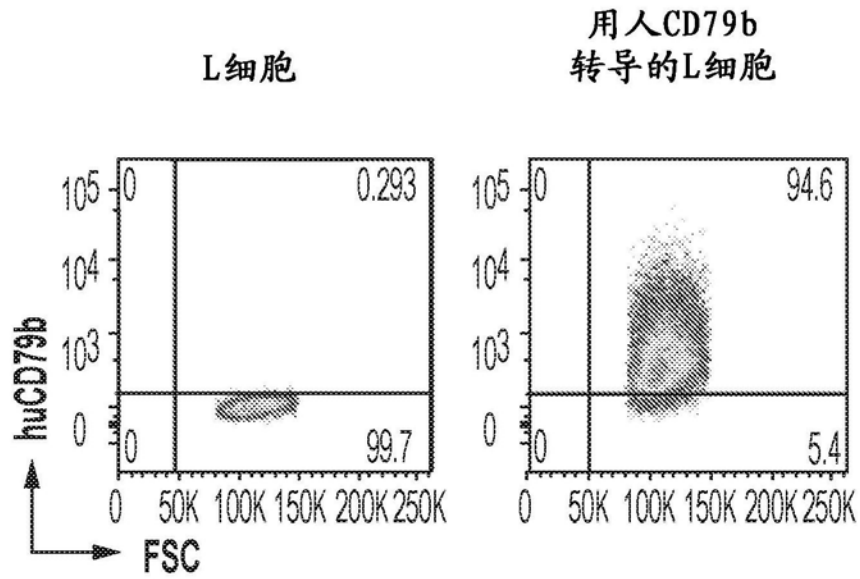


图2A

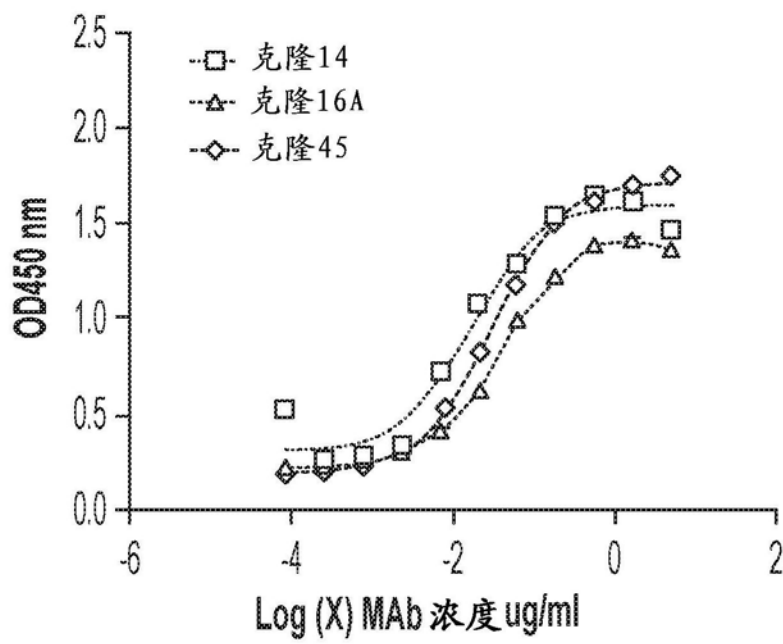
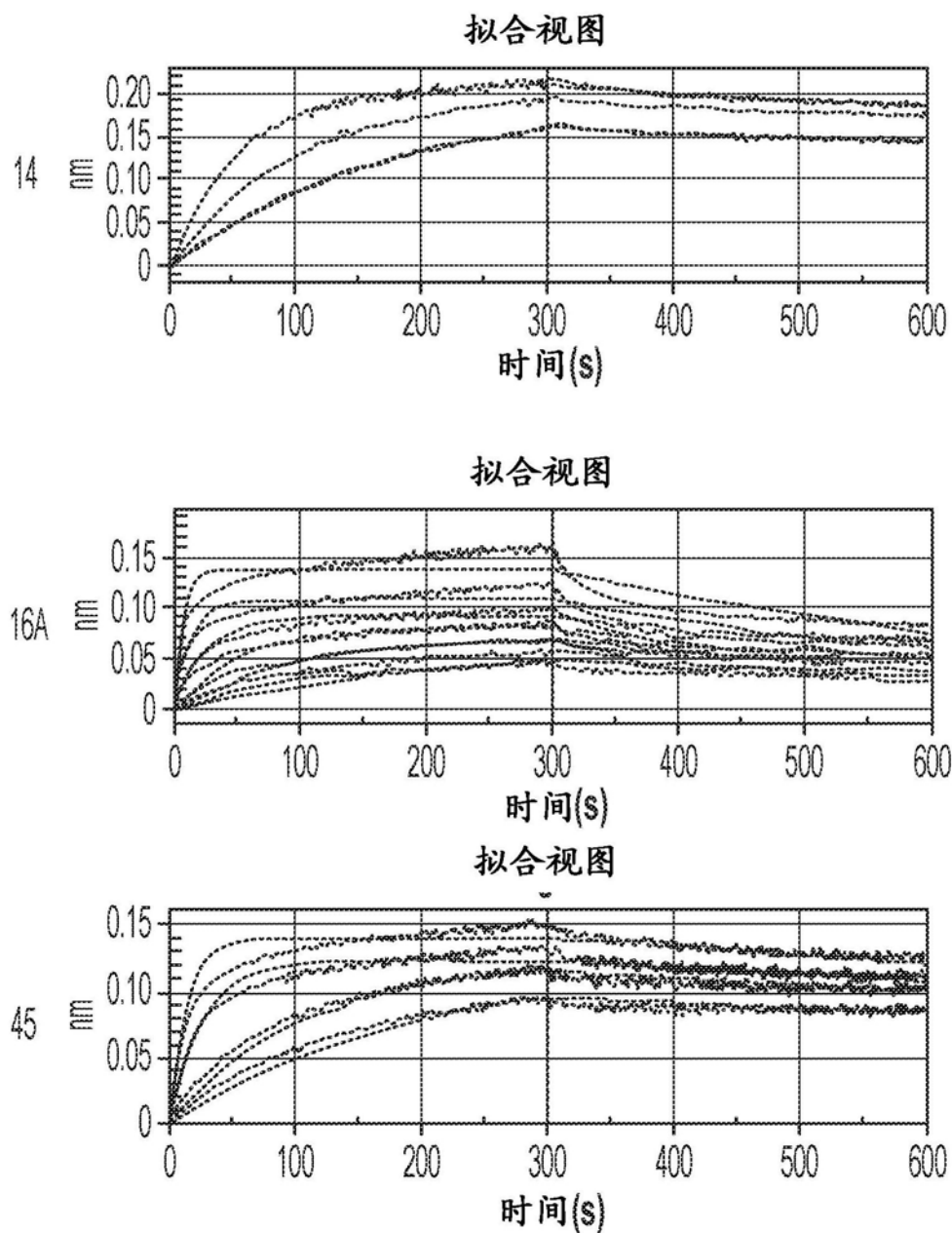


图2B



克隆	同种型	EC50(ng/ml)	KD (nM)
260A-14	IgG1	16.17	1.44
260B-16A	IgG2	35.69	17.8
260B-45	IgG2	30.13	2.0

图2C

## 淋巴瘤细胞系的克隆260A-14染色

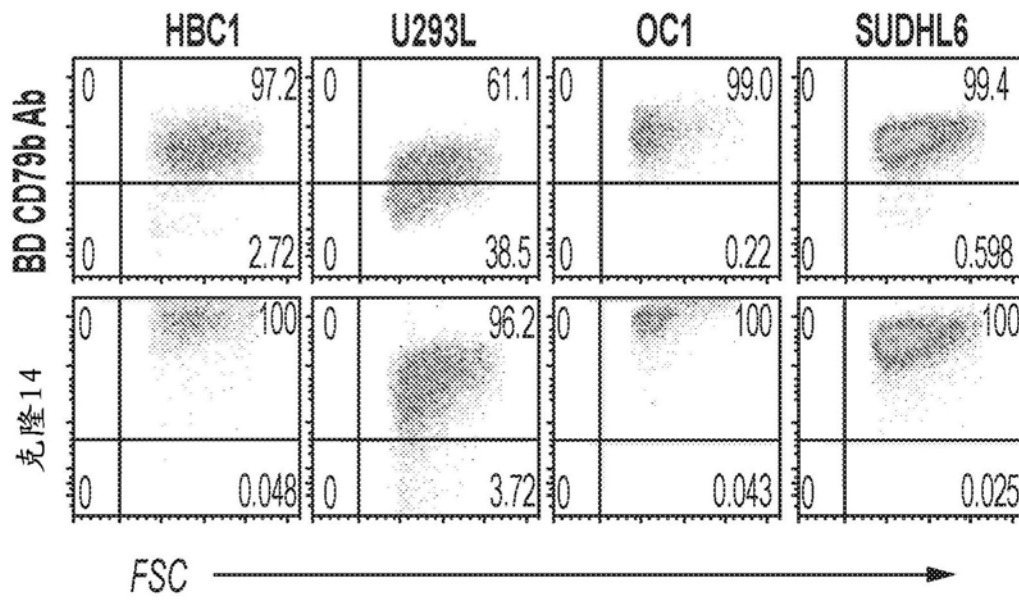


图2D

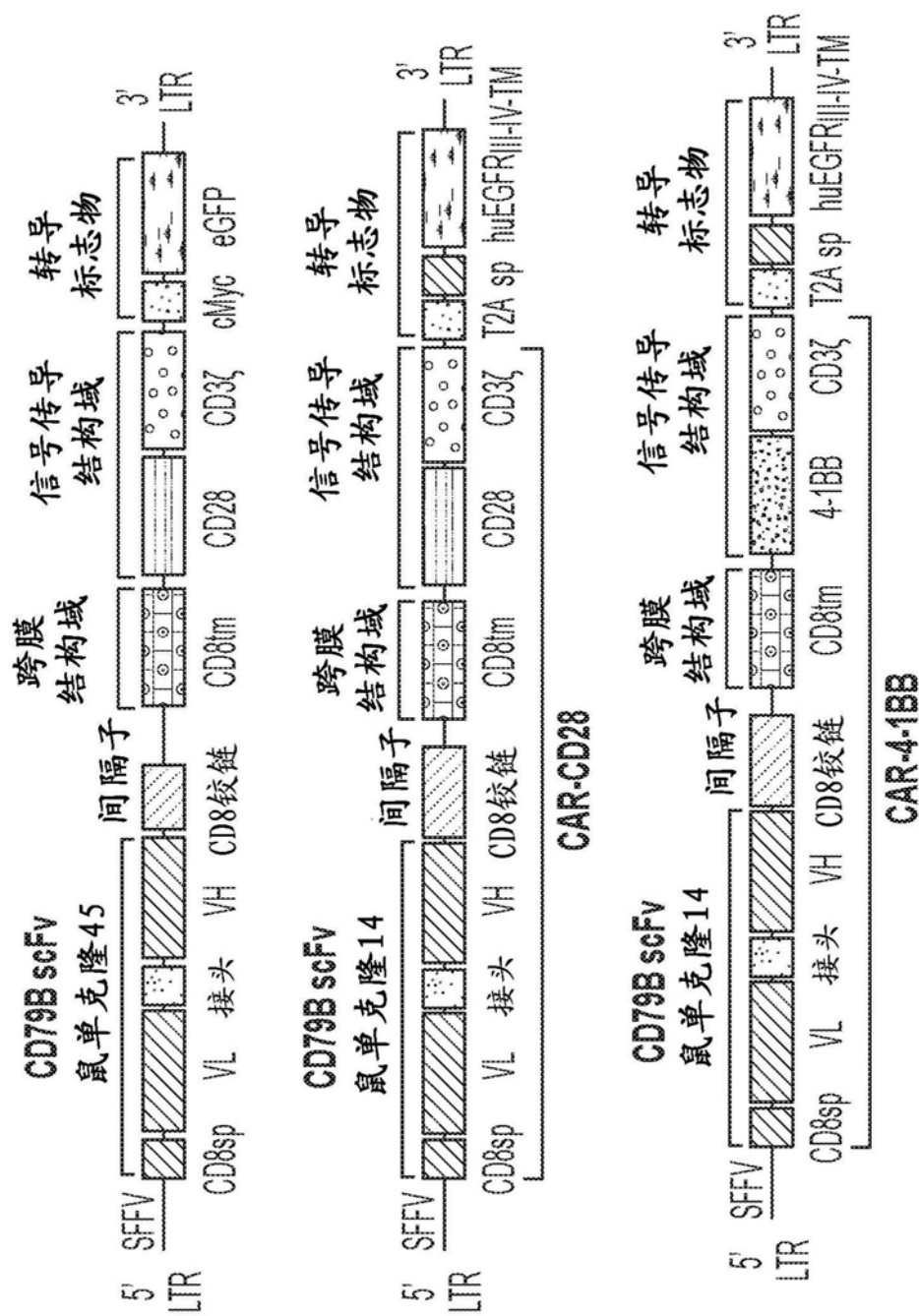


图3A

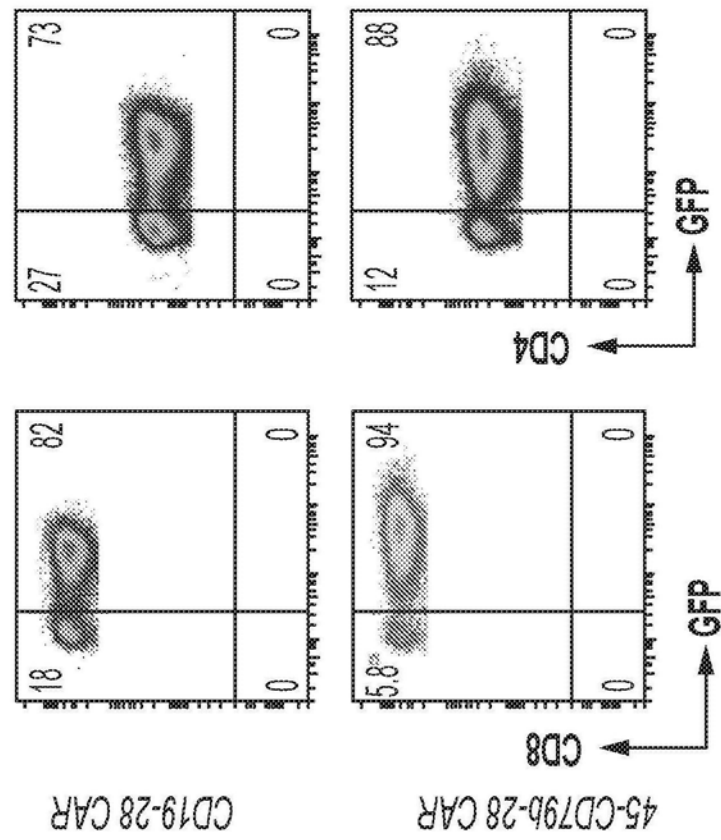


图3B

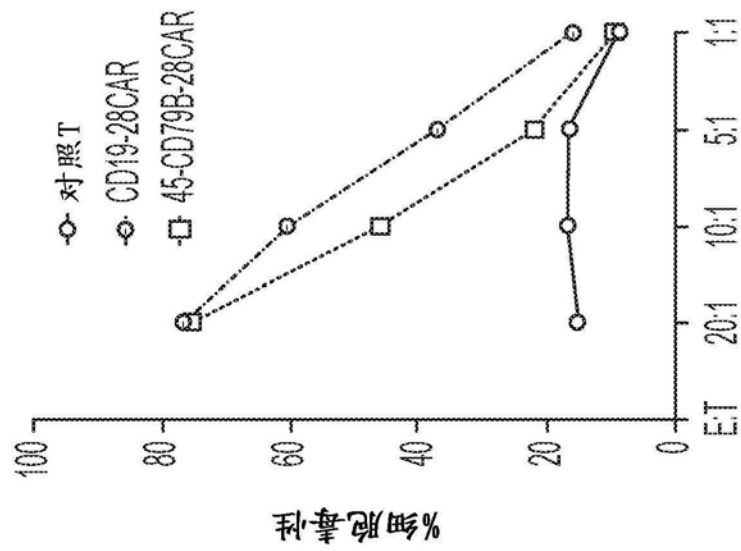


图3C

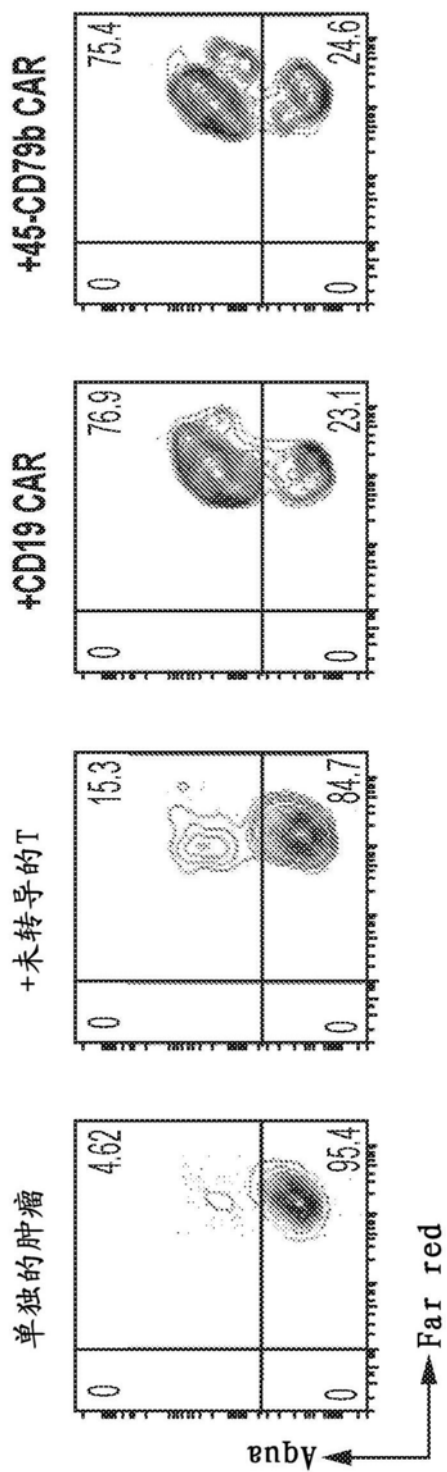


图3D



与用CD19外显子2 $\Delta$ 剪接变体转导的  
CD19<sup>KO</sup> SUDHL6共培养的T细胞

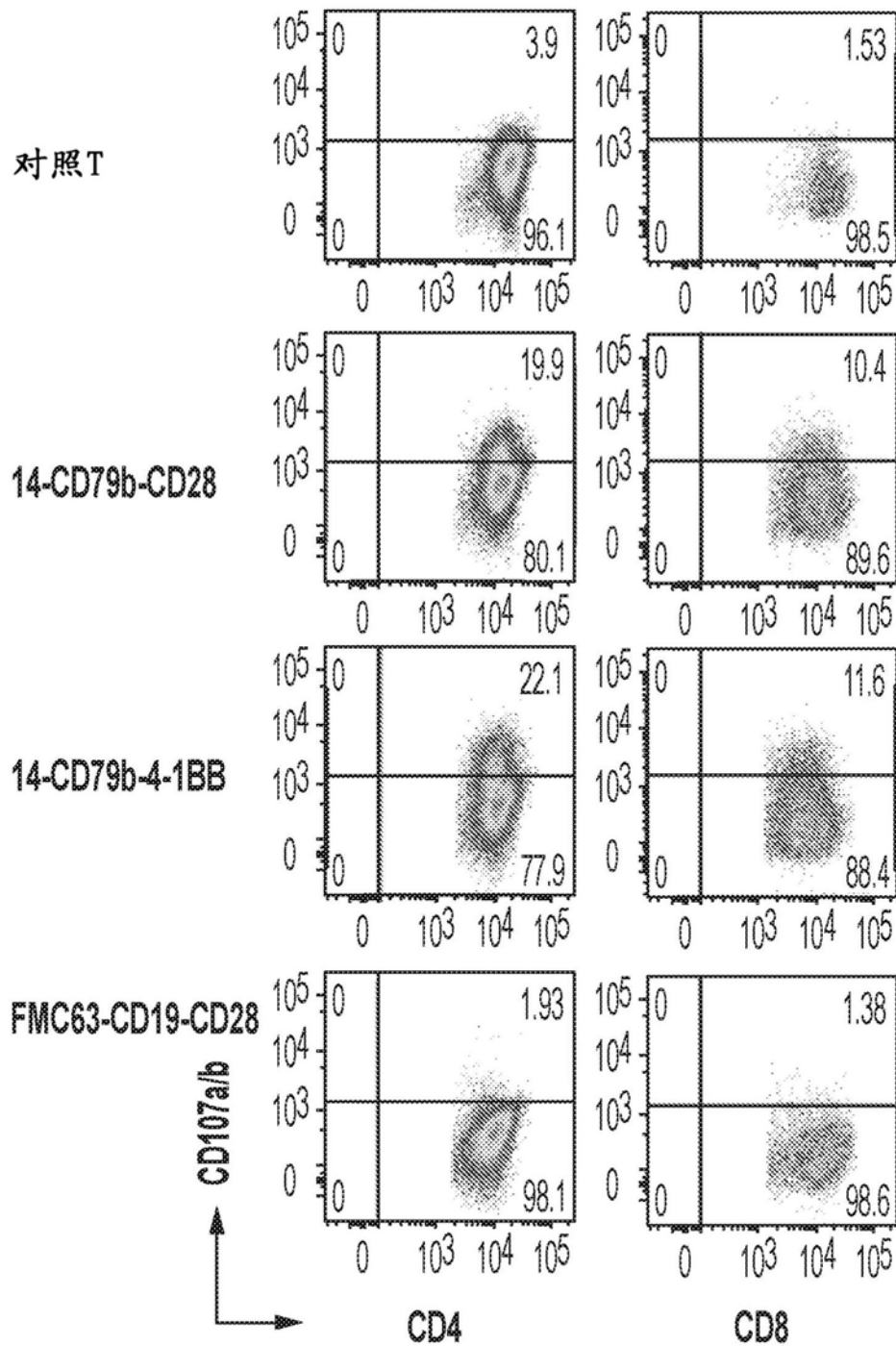


图4A

E:T=5:1 孵育4天

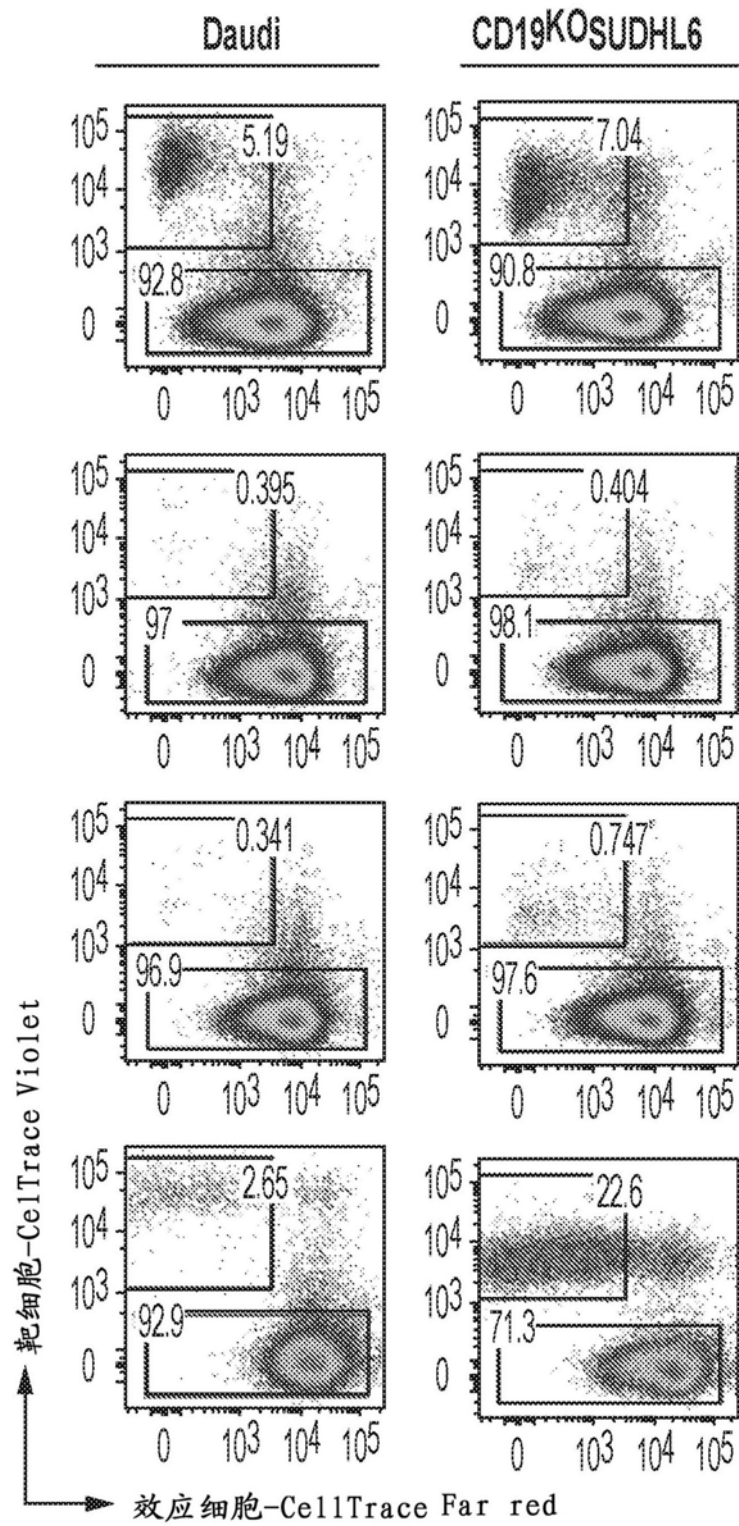


图4B

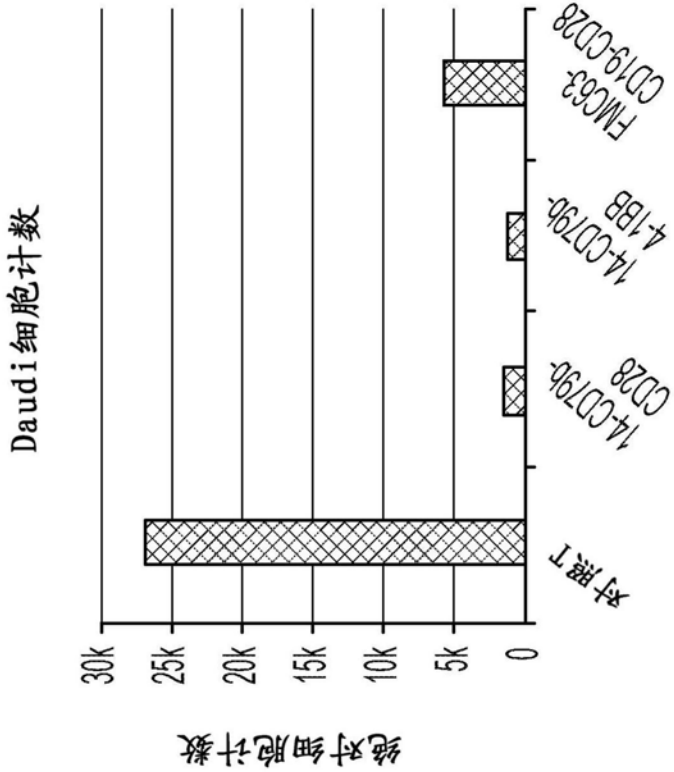


图4C

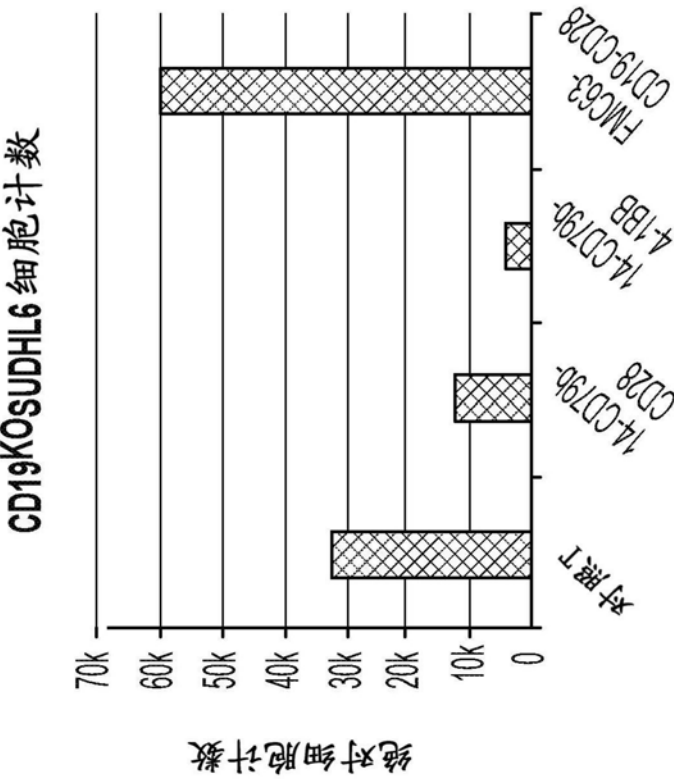


图4D

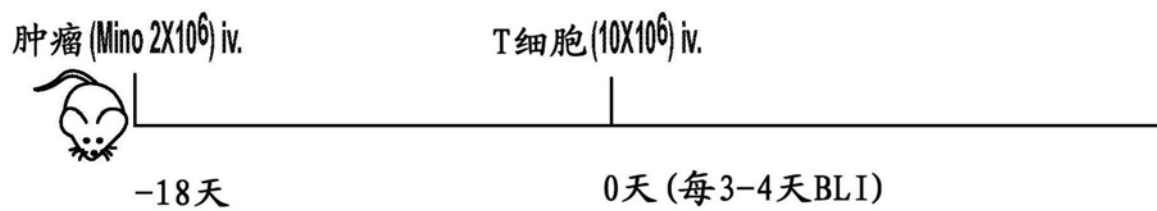


图5A



图5B

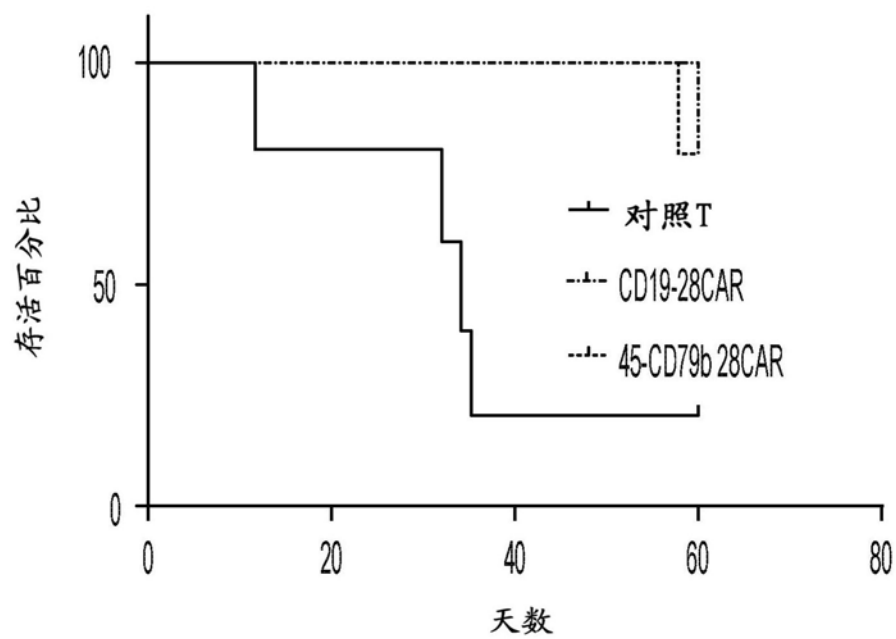


图5C