(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114585641 B
(45)授权公告日 2025.05.23

(21)申请号 202080050015.2
(22)申请日 2020.05.18
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114585641 A
(43)申请公布日 2022.06.03
(30)优先权数据
62/848,983 2019.05.16 US
62/975,966 2020.02.13 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.01.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/033382 2020.05.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/232433 EN 2020.11.19

(73)专利权人 纪念斯隆-凯特琳癌症中心
地址 美国纽约州
(72)发明人 M·塞德莱恩 P·S·阿杜苏米利
(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
专利代理师 龙淳 叶占洋

(51)Int.Cl.
C07K 14/705(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)

(56)对比文件
CN 107106665 A,2017.08.29
CN 108715616 A,2018.10.30

审查员 杨啸天

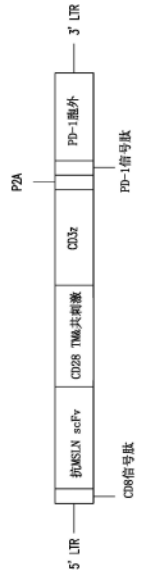
权利要求书2页 说明书102页
序列表67页 附图98页

(54)发明名称

间皮素CAR及其用途

(57)摘要

本公开的主题提供多肽组合物,其包含靶向间皮素的嵌合抗原受体(CAR);和程序性死亡1的显性负形式(PD-1DN)。还提供包含这类多肽组合物的免疫应答细胞以及所述多肽组合物和免疫应答细胞用于治疗,例如治疗实体瘤的用途。



CN 114585641 B

1.一种T细胞,其包括多肽组合物,所述多肽组合物包括:

i)嵌合抗原受体(CAR),其包含SEQ ID NO:56所示氨基酸序列;和

ii)程序性死亡1的显性负形式(PD-1DN),其包含SEQ ID NO:48的氨基酸21至165和SEQ ID NO:86的氨基酸137至207。

2.根据权利要求1所述的T细胞,其中所述PD-1DN和/或所述CAR为重组表达。

3.根据权利要求1所述的T细胞,其中所述PD-1DN和/或所述CAR由载体表达。

4.根据权利要求1所述的T细胞,其中所述T细胞选自细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞和自然杀伤T(NKT)细胞。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的T细胞,其中所述细胞是自体的。

6.根据权利要求1-4中任一项所述的T细胞,其中所述细胞是同种异体的。

7.一种药物组合物,其包含有效量的权利要求1-6中任一项所述的T细胞和药学上可接受的赋形剂。

8.根据权利要求7所述的药物组合物,其包含10^4至10^6个T细胞。

9.根据权利要求7所述的药物组合物,其包含至少10^5个T细胞。

10.根据权利要求7-9中任一项所述的药物组合物,其包含10^5个T细胞。

11.根据权利要求7-9中任一项所述的药物组合物,其用于预防和/或治疗受试者的瘤、治疗瘤复发的受试者、减少受试者的肿瘤负荷、增加或延长患有瘤的受试者的生存期、预防和/或治疗受试者的炎症性疾病、和/或预防接受器官移植的受试者的移植物排斥反应。

12.一种核酸,其包含SEQ ID NO:123或SEQ ID NO:124所示核苷酸序列。

13.一种载体,其包含权利要求12所述的核酸。

14.根据权利要求13所述的载体,其为逆转录病毒载体。

15.根据权利要求14所述的载体,其中所述逆转录病毒载体为γ-逆转录病毒载体或慢病毒载体。

16.一种生产T细胞的方法,所述方法包括将权利要求1-6中任一项提及的多肽组合物、权利要求12的核酸、或权利要求13-15中任一项的载体引入T细胞。

17.一种试剂盒,其包含权利要求1-6中任一项的T细胞、权利要求12的核酸、权利要求13-15中任一项的载体、或权利要求7-11中任一项的药物组合物。

18.根据权利要求17所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包括用于治疗和/或预防受试者的瘤、治疗瘤复发的受试者、减少受试者的肿瘤负荷、增加或延长患有瘤的受试者的生存期,其中所述瘤或肿瘤表达间皮素。

19.有效量的权利要求1-6中任一项所述的T细胞、或权利要求7-11中任一项所述的药物组合物在制备预防和/或治疗受试者的瘤的药物中的用途,其中所述瘤选自间皮瘤、肺癌、及其组合。

20.有效量的权利要求1-6中任一项所述的T细胞、或权利要求7-11中任一项所述的药物组合物在制备减少受试者肿瘤负荷的药物中的用途,其中所述肿瘤选自间皮瘤、肺癌、及其组合。

21.根据权利要求20所述的用途,其减少受试者的肿瘤细胞数目、减小肿瘤大小、和/或根除肿瘤。

22.有效量的权利要求1-6中任一项所述的T细胞、或权利要求7-11中任一项所述的药

物组合物在制备治疗瘤复发的受试者的药物中的用途,其中所述瘤选自间皮瘤、肺癌、及其组合。

23.根据权利要求22所述的用途,其中所述受试者在所述T细胞或所述组合物的所述施用之前接受免疫治疗。

24.有效量的权利要求1-6中任一项所述的T细胞,或权利要求7-11中任一项所述的药物组合物在制备增加或延长患有瘤的受试者的生存期的药物中的用途,其中所述瘤选自间皮瘤、肺癌、及其组合。

25.有效量的权利要求1-6中任一项所述的T细胞、或权利要求7-11中任一项所述的药物组合物在制备增加免疫激活细胞因子产生以响应受试者中的癌细胞的药物中的用途,其中所述癌细胞选自间皮瘤、肺癌、及其组合。

26.根据权利要求25所述的用途,其中所述免疫激活细胞因子选自粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、干扰素调节因子7(IRF7)、及其组合。

27.根据权利要求19-26中任一项所述的用途,其还包括施用至少一种免疫调节剂。

28.根据权利要求27所述的用途,其中所述至少一种免疫调节剂选自免疫刺激剂、检查点免疫阻断剂、放射治疗剂、化疗剂、及其组合。

29.根据权利要求28所述的用途,其中所述免疫刺激剂选自IL-12、激动剂共刺激单克隆抗体、及其组合。

30.根据权利要求29所述的用途,其中所述免疫刺激剂为IL-12。

31.根据权利要求28所述的用途,其中所述激动剂共刺激单克隆抗体选自抗4-1BB抗体、抗OX40抗体、抗ICOS抗体、及其组合。

32.根据权利要求31所述的用途,其中所述激动剂共刺激单克隆抗体为抗4-1BB抗体。

33.根据权利要求28所述的用途,其中所述检查点免疫阻断剂选自抗PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗LAG3抗体、抗B7-H3抗体、抗TIM3抗体、及其组合。

34.根据权利要求33所述的用途,其中所述检查点免疫阻断剂为抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体。

35.根据权利要求27所述的用途,其中所述受试者为人。

36.根据权利要求27所述的用途,其中经胸膜或胸膜内向所述受试者施用所述T细胞。

间皮素CAR及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年5月16日提交的美国临时申请号:62/848,983和2020年2月13日提交的美国临时申请号:62/975,966的优先权,其各自的内容通过引用以其整体并入,并且要求每个所要求的优先权。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表是通过EFS-Web以ASCII格式提交的,在此通过引用整体并入。ASCII副本创建于2020年5月13日,命名为0727341041SL_ST25.TXT,大小为144,318字节。

技术领域

[0005] 本公开主题提供用于增强对癌症和病原体的免疫应答的方法和组合物。它涉及特异性靶向人间皮素的嵌合抗原受体(CAR),以及包含这类CAR的免疫应答细胞。本公开的靶向间皮素的CAR具有增强的免疫激活特性,包括抗肿瘤活性,同时具有最小化CAR诱导的毒性和免疫原性的特征。

背景技术

[0006] 基于细胞的免疫治疗是一种具有治愈癌症潜力的疗法。可以通过引入编码对选择的抗原特异性的人工或合成抗原受体(称为嵌合抗原受体(CAR))的遗传物质对T细胞和其他免疫细胞进行修饰以靶向肿瘤抗原。使用CAR的靶向T细胞疗法最近在治疗一些血液系统恶性肿瘤方面取得临床成功。然而,将表达CAR的T细胞疗法用于实体瘤存在一些障碍,必须克服这些障碍才能实现临床益处。恶性细胞适应产生免疫抑制微环境以保护自己免受免疫识别和清除。这种肿瘤微环境对涉及刺激免疫反应的治疗方法提出挑战,例如靶向T细胞疗法。实体瘤也可能被限制在阻碍有效T细胞运输、缺乏激动性共刺激配体的表达和/或表达T细胞功能负调节因子的解剖区间内。因此,成功清除实体瘤需要有效的肿瘤渗透和克服肿瘤引起的免疫抑制。此外,实体瘤对选择能够通过强力的T细胞根除肿瘤且对非肿瘤组织的毒性最小或可耐受的最佳免疫靶标抗原提出挑战。

[0007] 因此,需要设计用于治疗癌症(特别是实体瘤)的CAR的能够以最小的毒性和免疫原性诱导有效的肿瘤根除的新的治疗策略。

发明内容

[0008] 本公开的主题提供多肽组合物,其包含(a)特异性靶向间皮素(例如,人间皮素)的嵌合抗原受体(CAR);(b)显性负形式的程序性死亡1(PD-1 DN);包含此类多肽组合物的免疫应答细胞,以及这些多肽组合物和免疫应答细胞的用途,例如,用于治疗癌症。

[0009] 本公开的主题提供多肽组合物。在某些实施方式中,多肽组合物包含:i)嵌合抗原受体(CAR)和ii)显性负形式的程序性死亡1(PD-1DN),其中CAR包含(a)胞外抗原结合结构域和(b)包含修饰的CD3ζ多肽的胞内信号传导结构域,所述CD3ζ多肽包含ITAM2变体和

ITAM3变体,其中ITAM2变体和ITAM3变体中的每一个都包含两个功能丧失突变。

[0010] 在某些实施方式中,胞外抗原结合结构域包含:重链可变区,其包含含有SEQ ID NO:76所示氨基酸序列的CDR1,含有SEQ ID NO:77所示氨基酸序列的CDR2,含有SEQ ID NO:78所示氨基酸序列的CDR3;和轻链可变区,其包含含有SEQ ID NO:79所示氨基酸序列的CDR1,含有SEQ ID NO:80所示氨基酸序列的CDR2,含有SEQ ID NO:81所示氨基酸序列的CDR3。

[0011] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含:(a)包含配体结合区的程序性死亡1(PD-1)的胞外结构域的至少一部分,和(b)第一跨膜结构域。

[0012] 在某些实施方式中,PD-1 DN的第一跨膜结构域包含CD8多肽、CD28多肽、CD3ζ多肽、CD4多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、CD166多肽、CD166多肽、CD8a多肽、CD8b多肽、ICOS多肽、ICAM-1多肽、CTLA-4多肽、CD27多肽、CD40/My88肽、NKGD2肽、或其组合。在某些实施方式中,PD-1 DN的第一跨膜结构域包含CD8多肽。在某些实施方式中,PD-1 DN的第一跨膜结构域中包含的CD8多肽包含SEQ ID NO:86的氨基酸137至207。在某些实施方式中,PD-1 DN缺少胞内结构域。在某些实施方式中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:48的氨基酸21至165和SEQ ID NO:86的氨基酸137至207。

[0013] 在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域以约1nM至约25nM的EC50值特异性结合人间皮素。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域以约20nM的EC50值特异性结合人间皮素。

[0014] 在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)、任选交联的Fab、或$F(ab)_2$。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域包含人scFv。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域识别间皮素表达水平为约1000或更多间皮素结合位点/细胞的人间皮素。

[0015] 在某些实施方式中,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:82所示氨基酸序列具有至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:82所示氨基酸序列。

[0016] 在某些实施方式中,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:83所示氨基酸序列具有至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:83所示氨基酸序列。

[0017] 在某些实施方式中,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:82所示氨基酸序列具有至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列,并且所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:83所示氨基酸序列

具有至少约80％、至少约81％、至少约82％、至少约83％、至少约84％、至少约85％、至少约86％、至少约87％、至少约88％、至少约89％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％、或至少约100％同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:82所示氨基酸序列,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:83所示氨基酸序列。

[0018] 在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域包含重链可变区和轻链可变区之间的接头。

[0019] 在某些实施方式中,前导序列共价连接至胞外抗原结合结构域的N端。在某些实施方式中,所述前导序列包含CD8多肽。在某些实施方式中,所述CD8多肽由SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,PD-1胞外结构域的至少一部分包含SEQ ID NO:48的氨基酸21至165。

[0020] 在某些实施方式中,CAR的修饰的CD3ζ多肽中的每个功能丧失突变位于酪氨酸氨基酸残基处。在某些实施方式中,所述ITAM2变体包含SEQ ID NO:29所示氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中,ITAM3变体包含SEQ ID NO:33所示氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM1。在某些实施方式中,天然ITAM1包含SEQ ID NO:23所示氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含SEQ ID NO:35所示氨基酸序列或由其组成。

[0021] 在某些实施方式中,CAR包含SEQ ID NO:56所示氨基酸序列或由其组成。

[0022] 在某些实施方式中,CAR还包含第二跨膜结构域。在某些实施方式中,CAR的第二跨膜结构域包含CD8多肽、CD28多肽、CD3ζ多肽、CD4多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、CD166多肽、CD166多肽、CD8a多肽、CD8b多肽、ICOS多肽、ICAM-1多肽、CTLA-4多肽、CD27多肽、CD40/My88肽、NKGD2肽、或其组合。在某些实施方式中,CAR的第二跨膜结构域包含CD28多肽。

[0023] 在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域还包含共刺激信号传导结构域。在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含CD28多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、DAP-10多肽、CD27多肽、CD40/My88多肽、NKGD2多肽、或其组合。在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含CD28多肽。

[0024] 本公开的主题提供包含本文公开的多肽组合物的免疫应答细胞。在某些实施方式中,PD-1 DN和/或CAR被重组表达。在某些实施方式中,PD-1 DN和/或CAR由载体表达。在某些实施方式中,免疫应答细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、从中可分化淋巴细胞的多能干细胞。在某些实施方式中,多能干细胞是胚胎干细胞或诱导多能干细胞。在某些实施方式中,免疫应答细胞是T细胞。在某些实施方式中,T细胞选自细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞和自然杀伤T(NKT)细胞。在某些实施方式中,免疫应答细胞是自体的。在某些实施方式中,免疫应答细胞是同种异体的。

[0025] 本公开的主题还提供包含本文公开的免疫应答细胞的组合物。在某些实施方式中,组合物是还包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在某些实施方式中,药物组合物包含约10^4至10^6个免疫应答细胞。在某些实施方式中,药物组合物包含至少约10^5个免疫应答细胞。在某些实施方式中,药物组合物包含约10^5个免疫应答细胞。在某些实施方式中,药物组合物用于预防和/或治疗受试者的瘤、治疗瘤复发的受试者、降低受试者的肿瘤负荷、增加或延长患有瘤的受试者的生存期、预防和/或治疗受试者的炎症性疾病,和/或预防接

受器官移植的受试者的移植物排斥反应。

[0026] 此外,本公开的主题提供包含编码本文公开的多肽组合物的多核苷酸的核酸组合物。在某些实施方式中,多核苷酸包含SEQ ID NO:123所示的核苷酸序列。在某些实施方式中,多核苷酸包含SEQ ID NO:124所示的核苷酸序列。本公开主题还提供包含本公开的核酸组合物的载体。在某些实施方式中,载体是逆转录病毒载体。在某些实施方式中,逆转录病毒载体是γ-逆转录病毒载体或慢病毒载体。

[0027] 本公开的主题提供产生本文公开的免疫应答细胞的方法。在某些实施方式中,所述方法包括将本公开的多肽组合物、本公开的核酸组合物、或本公开的载体引入免疫应答细胞。

[0028] 本公开的主题提供包含本公开的多肽组合物、本公开的核酸组合物、本公开的载体、本公开的免疫应答细胞、或本公开的药物组合物的试剂盒。在某些实施方式中,试剂盒还包括用于治疗和/或预防瘤的书面说明。

[0029] 此外,本公开的主题提供使用上述免疫应答细胞的各种方法。例如,本公开的主题提供减少受试者的肿瘤负荷的方法,其中所述方法包括向受试者施用有效量的免疫应答细胞或本文公开的药物组合物。在某些实施方式中,所述方法减少受试者体内的肿瘤细胞数量、减小肿瘤大小、和/或根除肿瘤。

[0030] 本公开的主题还提供增加或延长患有瘤的受试者的存活期的方法,其中所述方法包括向受试者施用有效量的本公开的免疫应答细胞或本公开的药物组合物。

[0031] 在某些实施方式中,瘤或肿瘤是实体瘤。在某些实施方式中,实体瘤选自间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胸膜肿瘤、胶质母细胞瘤、食道癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃肿瘤、胆管癌、宫颈癌、唾液腺癌、及其组合。

[0032] 本公开的主题提供治疗瘤复发的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本文公开的免疫应答细胞或药物组合物。在某些实施方式中,受试者在免疫应答细胞或组合物的施用之前接受免疫治疗。

[0033] 此外,本公开的主题提供增加免疫激活细胞因子的产生以响应受试者的癌细胞或病原体的方法。在某些实施方式中,所述方法包括向受试者施用有效量的本文公开的免疫应答细胞或药物组合物。在某些实施方式中,免疫激活细胞因子选自粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、干扰素调节因子7(IRF7)、及其组合。

[0034] 根据本公开的主题,上述各种方法可以包括施用至少一种免疫调节剂。在某些实施方式中,至少一种免疫调节剂选自免疫刺激剂、检查点免疫阻断剂、放射治疗剂、化疗剂、及其组合。在一些实施方式中,免疫刺激剂选自IL-12、激动剂共刺激单克隆抗体、及其组合。在某些实施方式中,免疫刺激剂是IL-12。在一些实施方式中,激动剂共刺激单克隆抗体选自抗4-1BB抗体、抗OX40抗体、抗ICOS抗体、及其组合。在某些实施方式中,激动剂共刺激单克隆抗体是抗4-1BB抗体。在某些实施方式中,检查点免疫阻断剂选自抗PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗LAG3抗体、抗B7-H3抗体、抗-TIM3抗体、及其组合。在某些实施方式中,检查点免疫阻断剂是抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体。在某些实施方式中,受试者是人。

[0035] 在某些实施方式中,免疫应答细胞经胸膜或胸膜内施用于受试者。

[0036] 本公开的主题还提供一种在受试者中预防和/或治疗炎症性疾病的方法。在某些

实施方式中,所述方法包括向受试者施用本公开的免疫应答细胞或药物组合物。在某些实施方式中,免疫应答细胞是免疫抑制细胞。在某些实施方式中,免疫抑制细胞是调节性T细胞。在某些实施方式中,炎症性疾病是胰腺炎。在某些实施方式中,受试者是人。在某些实施方式中,受试者是器官移植的接受者。在某些实施方式中,受试者是胰腺移植物的接受者。

[0037] 本公开的主题进一步提供在接受器官移植的受试者中预防移植物排斥反应的方法。在某些实施方式中,所述方法包括向受试者施用本公开的免疫应答细胞或药物组合物。在某些实施方式中,免疫应答细胞是免疫抑制细胞。在某些实施方式中,免疫抑制细胞是调节性T细胞。在某些实施方式中,受试者是人。在某些实施方式中,受试者是胰腺移植物的接受者。

附图说明

[0038] 以下详细描述以实施例的方式给出,但并不旨在将本公开的主题限制为所描述的特定实施方式,可以结合附图来理解。

[0039] 图1描述根据本公开主题的某些实施方式的多肽组合物。多肽组合物包含CAR,所述CAR包含抗间皮素(MSLN)scFv、CD28跨膜结构域、CD28胞质信号传导结构域、CD3ζ信号传导结构域(例如,包含ITAM2变体和ITAM3变体)。CAR通过可切割的P2A肽与PD1DNR(和PD1信号传导结构域)融合。SP:信号肽;scFv:单链可变片段;TM:跨膜结构域;cyt:胞质结构域;DNR:显性负受体;LTR:长末端重复。

[0040] 图2描述实施例2中公开的各种构建体。

[0041] 图3A-3D描述生产细胞系RD114中的病毒产生。RD114细胞用不同稀释度(未稀释、1:2和1:4)的H29病毒上清转导,并使用抗Fab抗体通过流式细胞术对CAR表达进行染色。RD114空作为阴性对照。图3A显示RD114空(作为阴性对照)。图3B显示未稀释;图3C显示上清1:2稀释;和图3D显示上清1:4稀释。

[0042] 图4A-4E描述用M28z1XX-P2A-PD1DNR-供体H116-2转导人T细胞。用不同浓度的RD114病毒上清转导PHA激活的T细胞(图4A显示1:2,图4B显示1:5,图4C显示1:7,图4D显示1:15,图4E显示未转导("UT")),并使用流式细胞术通过抗Fab染色对CAR表达进行染色,通过抗PD1染色对PD1DNR进行染色。

[0043] 图5A-5E描述用M28z1XX-P2A-PD1DNR-供体H18转导人T细胞。用不同浓度的RD114病毒上清转导PHA激活的T细胞(图5A显示1:2,图5B显示1:5,图5C显示1:10,图5D显示1:15,图5E显示未转导("UT")),并使用流式细胞术通过抗Fab染色对CAR表达进行染色,并通过抗PD1染色对PD1DNR进行染色。

[0044] 图6A-6F描述用M28z1XX-P2A-PD1DNR-供体H19转导人T细胞。用不同浓度的RD114病毒上清转导PHA激活的T细胞(图6A显示1:2,图6B显示1:5,图6C显示1:7;图6D显示1:10,图6E显示1:15,图6F显示未转导("UT")),并使用流式细胞术通过抗Fab染色对CAR表达进行染色,通过抗PD1染色对PD1DNR进行染色。

[0045] 图7A-7C描述载体拷贝数(VCN)与平均荧光强度(MFI)的相关性。用不同浓度的RD114病毒上清转导PHA激活的T细胞,并通过抗Fab染色对CAR表达进行染色和流式细胞术分析。分离转导的T细胞的基因组DNA,并使用qPCR确定载体拷贝数VCN/μg DNA。CAR阳性细胞的MFI与三个不同供体的VCN/μg DNA相关。图7A显示供体H19;图7B显示供体H18,图7C显

示供体H116-2。

[0046] 图8描述来自3个不同供体的转导T细胞的细胞毒性。高MSLN靶细胞(MGM)与来自不同供体的M28z1xx-PD1DNR CAR-T细胞以不同的E:T比使用基于阻抗的试验进行共培养。M28z1xx-PD1DNR CAR T细胞以1:1的E:T比介导MGM细胞的细胞溶解。M28z1xx-PD1DNR CAR T细胞杀伤高MSLN靶细胞。

[0047] 图9描述基于阻抗的细胞毒性测量(eCTL)的示例。

[0048] 图10描述使用eCTL对各种构建体进行比较分析的参数。

[0049] 图11A-11E描述靶细胞系的MSLN和PD-L1表达。通过流式细胞术评估间皮瘤(MGM(如图11A所示)、MGM-PDL1(如图11B所示)和MSTOG(如图11C所示)和肺癌(A549GM(如图11D所示)和A549G(如图11e所示))细胞系的MSLN和PD-L1表达。MGM、MGM-PDL1和A549GM过度表达MSLN;MGM-PDL1细胞额外过度表达PD-L1。

[0050] 图12A-12E描述转导的T细胞的CAR和PD1表达。对用M28z(如图12A所示)、M28z1xx(如图12B所示)、M28z-PD1DNR(如图12C所示)和M28z1xx-PD1DNR(如图12D所示)转导的人T细胞使用流式细胞术通过抗myc染色分析CAR表达,通过抗PD1染色分析PD1/PD1DNR表达。图12E显示未转导的("UT")T细胞。

[0051] 图13A-13C描述携带有1XX结构域和PD1DNR的CAR T细胞对高MSLN肿瘤细胞(MGM)的抗肿瘤疗效的比较分析。高MSLN靶细胞(MGM)与M28z、M28z1xx、M28z-PD1DNR、M28z1XX-PD1DNR或未转导的T细胞以指定的E:T比共培养。使用基于阻抗的试验评估抗肿瘤疗效。图13A显示约3:1的E:T比。图13B显示约1:1的E:T比。图13C显示约0.33:1的E:T比。

[0052] 图14描述携带有1xx结构和PD1DNR的CAR T细胞对高MSLN肿瘤细胞(MGM)的细胞毒性的比较分析。用铬51标记的高MSLN靶细胞(MGM)与M28z、M28z1xx、M28z-PD1DNR、M28z1xx-PD1DNR或未转导的T细胞以指定的E:T比共培养18小时。细胞毒性由铬51CTL测定。

[0053] 图15A-15C描述携带有1xx结构域和PD1DNR的CAR T细胞对MSLN阴性肿瘤细胞(MSTOG)的抗肿瘤疗效的比较分析。MSLN阴性靶细胞(MSTOG)与M28z、M28z1xx、M28z-PD1DNR、M28z1xx-PD1DNR或未转导的T细胞以指定的E:T比共培养。使用基于阻抗的试验来评估抗肿瘤疗效。图15A显示约3:1的E:T比。图15B显示约1:1的E:T比。图15C显示约0.33:1的E:T比。

[0054] 图16描述携带有1XX结构域和PD1DNR的CAR T细胞对MSLN阴性肿瘤细胞(MSTOG)的细胞毒性的比较分析。用铬51标记的MSLN阴性靶细胞(MSTOG)与M28z、M28z1XX、M28z-PD1DNR、M28z1XX-PD1DNR或未转导的T细胞以指定的E:T比共培养18小时。细胞毒性由铬51CTL测定。

[0055] 图17A-17C描述携带有1XX结构域和PD1DNR的CART细胞对于过度表达PDL1的高MSLN肿瘤细胞的抗肿瘤疗效的比较分析。过度表达PDL1(MGM-PDL1)的高MSLN靶细胞与M28z、M28z1XX、M28z-PD1DNR、M28z1XX-PD1DNR或未转导的T细胞以指定的E:T比共培养。使用基于阻抗的试验来评估抗肿瘤疗效。图17A显示约3:1的E:T比。图17B显示约1:1的E:T比。图17C显示约0.33:1的E:T比。

[0056] 图18A-18C描述携带有1xx结构域和PD1DNR的CAR T细胞对高MSLN肿瘤细胞(A549GM)的抗肿瘤疗效的比较分析。高MSLN靶细胞(A549GM)与M28z、M28z1xx、M28z-PD1DNR、M28z1xx-PD1DNR或未转导的T细胞以指定的E:T比共培养。使用基于阻抗的试验来

评估抗肿瘤疗效。图18A显示约10:1的E:T比。图18B显示约5:1的E:T比。图18C显示约2:1的E:T比。

[0057] 图19A-19C描述携带有1xx结构域和PD1DNR的CAR T细胞的抗肿瘤疗效的比较分析:低MSLN肿瘤细胞(A549G)。低MSLN靶细胞(A549G)与M28z、M28z1xx、M28z-PD1DNR、M28z1xx-PD1DNR或未转导的T细胞以指定的E:T比共培养。使用基于阻抗的试验评估抗肿瘤疗效。图19A显示约10:1的E:T比。图19B显示约5:1的E:T比。图19C显示约2:1的E:T比。

[0058] 图20A-20D描述各种治疗的体内研究结果。图20A显示M28z、带有PD1抗体的M28z、和带有PD1DNR的M28z的CAR T细胞的体内疗效比较。图20B显示M28z和M28z1XX+PD1DNR CAR T细胞的体内疗效比较。图20C显示肿瘤负荷成像,显示肿瘤再攻击后的全身抗肿瘤免疫。图20D显示表现出CAR T细胞渗透的原位MPM肿瘤的体外免疫荧光染色。

[0059] 图21描述M28z1XXPD1DNR CAR的结构和组件。与M28z相反,M28z1XXPD1DNR CAR T细胞具有突变的CD3ζ信号传导结构域,具有单一功能性ITAM,并共表达由CD8跨膜和铰链结构域组成的PD1DNR,并缺乏内源性PD1中存在的胞内PD1信号传导结构域。

[0060] 图22描述CAR T细胞载体的结构。

[0061] 图23描述间皮素(MSLN)、PD-L1和GFP在肿瘤细胞系上的表达。通过流式细胞术分析MGM、MGM-PDL1和MSTOG肿瘤细胞的间皮素(左图)、PD-L1(中图)和GFP(右图)表达。所示为相对于侧向散射面积(Y轴)绘制的描述相对表达强度的密度图。

[0062] 图24A-24D描述原位MPM小鼠模型。图24A显示在MPM小鼠模型(右上图)中重现的人MPM(左上图)的大体外观,肿瘤包裹心脏、肺和纵隔结构,并且肿瘤侵入胸壁(下图)。图24B显示通过CD34免疫荧光展示的肿瘤广泛的血管分布。图24C显示由BLI监测的肿瘤负荷进展与通过MRI在各自的时间点测量的肿瘤体积相关。图24D显示通过系列BLI和MRI监测的肿瘤负荷进展。

[0063] 图25A-25C描述通过免疫组化分析人组织中间皮素的表达。图25A显示MPM与正常胸膜和心包中间皮素的表达。图25B显示间皮素在肺腺癌和正常肺组织中的表达。图25C显示间皮素在三阴性乳腺癌和正常乳腺组织中的表达。

[0064] 图26描述可以使用不同稀释度的病毒上清滴定M28z1XXPD1DNR表达。用编码M28z1XXPD1DNR(左图)或mycM28z1XXPD1DNR(中图)的不同稀释度的病毒上清转导人T细胞。通过流式细胞术评估活CD3阳性细胞的CAR(Y轴)和PD1(X轴)表达。描述的结果来自3个不同供体中的1个供体代表。

[0065] 图27描述通过MFI测量的与VCN相关的CAR表达。用编码M28z1XXPD1DNR或mycM28z1XXPD1DNR的不同稀释度的逆转录病毒上清转导来自3个不同供体的人T细胞。绘制出CAR阳性T细胞的MFI(通过流式细胞术测定)与VCN(通过qPCR测定)的关系图。R^2值来自线性回归分析(黑线)。

[0066] 图28A-28D描述PD1和PD1DNR在mycM28z1XXPD1DNR和mycM28z CAR T细胞中的表达。图28A显示mycM28z和mycM28z1XXPD1DNR CART细胞的CAR表面表达百分比。图28B显示PD1表面表达阳性的CD3阳性细胞百分比。图28C显示CD3阳性细胞PD1表面表达的MFI。图28D显示与未转导的T细胞相比,PD1胞外和PD1胞内结构域的相对mRNA表达的倍数变化。

[0067] 图29描述表达M28z1XXPD1DNR的T细胞(带或不带myc标签)在体外表现出同等的抗肿瘤疗效。用M28z1XXPD1DNR(红色)或mycM28z1XXPD1DNR(绿色)(转导范围,37%-63%)转

导来自3个不同供体的人T细胞,并与MGM细胞共培养(绿色;箭头表示添加T细胞的时间)。使用基于阻抗的细胞毒性试验,在指定的E:T比下比较两种构建体的抗肿瘤疗效。

[0068] 图30显示mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞介导抗原特异性、HLA非依赖性肿瘤溶解。用mycM28z1XXPD1DNR(蓝色)或mycM28z(红色)转导的人T细胞与MGM、MGM-PDL1或MSTOG肿瘤细胞以指定的E:T比共培养。共培养18小时后,通过^{51}Cr释放试验评估CAR T细胞的细胞毒性。未转导的T细胞(橙色)作为对照。

[0069] 图31描述表达间皮素的肿瘤细胞刺激后mycM28z1XXPD1DNR CAR-T细胞的积聚。用mycM28z1XXPD1DNR(蓝色)或mycM28z(红色)转导的人T细胞以1:1的E:T比重复暴露于MGM或MGM-PDL1靶细胞48小时。在每次抗原刺激后,通过绝对CAR T细胞计数来量化CAR T细胞的积累。

[0070] 图32显示在初始抗原刺激下,mycM28z1XXPD1DNR CAR-T细胞表现出与mycM28z CAR-T细胞相似的细胞毒性。用mycM28z1XXPD1DNR(蓝色)或mycM28z(红色)转导的人T细胞与^{51}Cr标记的MGM或MGM-PDL1靶细胞以指定的E:T比共培养。18小时后使用^{51}Cr释放试验评估细胞毒性。未转导的T细胞(橙色)作为对照。

[0071] 图33显示在重复抗原刺激下,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞保持抗肿瘤疗效。将mycM28z1XXPD1DNR(蓝色)或mycM28z(红色)转导的人T细胞以3:1的E:T比反复暴露于MGM(左图)或MGM-PDL1(右图)靶细胞中48小时,共4次刺激,随后以1:1的E:T比进行2次额外的刺激。在共培养18小时后,在指定的E:T比下,通过第四和第七抗原刺激后的^{51}Cr释放试验评估CAR T细胞的细胞毒性。

[0072] 图34显示mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞在抗原刺激下分泌效应细胞因子。将mycM28z1XXPD1DNR(蓝色)或mycM28z(红色)转导的人T细胞以1:1的E:T比重复暴露于MGM(顶行)或MGM-PDL1(底行)靶细胞48小时。在第一次、第三次和第六次抗原暴露后24小时收集无细胞上清,并通过Luminex分析评估效应细胞因子的分泌。

[0073] 图35描述对mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞进行单次低剂量的3×10^4胸膜内给药在体内显示出抗肿瘤疗效。荷原位MGM肿瘤的雌性NSG小鼠接受单次胸膜内剂量的P28z CAR T细胞(n=6,红色条)或mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞(n=10,蓝色条)治疗。用BLI测定肿瘤负荷。所示时间点代表CAR T细胞给药后第15天,这时P28z CAR T细胞治疗的小鼠开始死亡。统计显著性采用非配对学生t检验(双尾)确定。***$p<0.001$。

[0074] 图36A-36D描述胸膜内施用的mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞在体内表现出抗肿瘤疗效并提高生存率。图3A显示单次剂量mycM28z(1×10^5)或mycM28z1XXPD1DNR(1×10^5或5×10^4)CAR T细胞(n=7-8)治疗的荷MGM-PDL1瘤的雌性NSG小鼠的系列肿瘤BLI。所示为每个治疗组4只处于腹侧位的小鼠。图36B显示相应的系列肿瘤BLI(背侧和腹侧的平均值),表明每只治疗小鼠的肿瘤负荷。图36C显示治疗后相应的小鼠体重。图36D显示比较mycM28z和mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞体内疗效的Kaplan-Meier生存分析。生存曲线采用对数秩检验进行分析。*$p<0.05$,**$p<0.01$。

[0075] 图37描述在经胸膜内治疗的小鼠的原发肿瘤中检测到mycM28z1XXPD1DNR CART细胞。用5×10^5未转导T细胞(左)、mycM28z CAR T细胞(中)或mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞(右)治疗小鼠胸膜MGM肿瘤。在胸膜内注射T细胞后3天收集肿瘤组织,固定,并通过免疫荧光对肿瘤间皮素(绿色)、人CD45阳性细胞(红色)和DAPI(细胞核,蓝色)进行体外染色。

[0076] 图38A和38B显示mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞抵抗体内反复肿瘤攻击后的肿瘤重建。图38A显示说明肿瘤再攻击实验的方案:胸膜内施用mycM28z或mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞(单剂量1×10^5CAR-T细胞)后68天和胸膜内根除MGM-PDL1肿瘤细胞(8×10^5的接种剂量)后,每4-8天,用递增剂量(2×10^6至11×10^6)的MGM肿瘤细胞腹腔内再次攻击小鼠10次。图38B显示系列BLI,表明单次胸膜内剂量的mycM28z(2只小鼠,红线)或mycM28z1XXPD1DNR(3只小鼠,黑线)CAR T细胞和治疗第68天开始肿瘤再攻击后的肿瘤负荷。黑色箭头表示随着剂量的增加,腹腔内肿瘤再次攻击的时间点。

[0077] 图39A-39C描述使用用于临床试验的载体库制造的M28z1XXPD1DNRCAR T细胞在体内具有抗肿瘤疗效并延长生存期。图39A显示通过CTCEF使用用于临床试验的病毒上清制造的6×10^4(n=8)或2×10^5(n=10)的M28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的荷MGM瘤的雌性NSG小鼠的系列肿瘤BLI。图39B显示治疗后相应的小鼠体重。图39C显示Kaplan-Meier生存分析。

[0078] 图40描述雄性小鼠在中期处死时的平均体重。所示为第1组(非肿瘤对照组)、第3组(对照组)和第5组(供试品)。

[0079] 图41描述雌性小鼠在中期处死时的平均体重。所示为第2组(非肿瘤对照组)、第4组(对照组)和第6组(供试品)。

[0080] 图42描述雄性小鼠最终处死时的平均体重。所示为第7组(非肿瘤对照组)、第9组(对照组)和第11组(供试品)。

[0081] 图43描述雌性小鼠最终处死时的平均体重。所示为第8组(非肿瘤对照组)、第10组(对照组)和第12组(供试品)。

[0082] 图44描述CAR T细胞治疗的和赋形剂治疗的小鼠肿瘤中人T细胞的鉴定。用DAPI、抗人CD45 APC/CY7和抗人CD3 PE/CY7抗体对来自CAR T细胞治疗的和赋形剂治疗的小鼠的胸膜内肿瘤组织细胞进行染色,通过流式细胞术检测活的人T细胞。所示为DAPI阴性(活)单个细胞的人CD3表达(X轴)和人CD45表达(Y轴)的密度图。门显示人CD45和人CD3染色阳性的细胞,代表人T细胞。

[0083] 图45描述CAR T细胞治疗的和赋形剂治疗的小鼠脾脏中人T细胞的鉴定。用DAPI、抗人CD45 APC/CY7和抗人CD3 PE/CY7抗体对来自CAR T细胞治疗和赋形剂治疗小鼠的脾组织细胞进行染色,通过流式细胞术检测活的人T细胞。所示为DAPI阴性(活)单个细胞的人CD3表达(X轴)和人CD45表达(Y轴)的密度图。门显示人CD45和人CD3染色阳性的细胞,代表人T细胞。

[0084] 图46描述雄性小鼠的BLI。

[0085] 图47描述雌性小鼠的BLI。

具体实施方式

[0086] 本发明公开的主题提供包含靶向间皮素的嵌合抗原受体(CAR)和程序性死亡1(PD-1DN)的显性负形式的多肽组合物,以及包含所述多肽组合物的免疫应答细胞(例如,T细胞或NK细胞)。本公开主题还提供使用所述多肽组合物诱导和/或增强免疫应答细胞对靶标抗原的免疫应答和/或治疗和/或预防肿瘤或其他需要减少免疫细胞耗竭的疾病/病症的方法。

[0087] T细胞的持续抗原暴露,如在癌症中,导致T细胞分化状态的改变,称为耗竭,使CAR

T细胞功能失调(Youngblood等人,Int Immunol.2010;22(10):797-803;Wherry等人,Nat Rev Immunol.2015;15(8):486-499)。先前的研究表明,CAR活化电位与CD3ζ胞质结构域中存在的三种ITAM(1-2-3)相关(Acuto等人,Nat Rev Immunol.2003;3(12):939-951;Love等人,Cold Spring Harb Perspect Biol.2010;2(6):a002485)。最近的研究表明,这种CAR活化电位可以通过突变ITAM来校准,从而降低其功能。重要的是,研究表明,通过在CD3ζ结构域的第二位和第三位ITAM(1-X-X;此处指定为“1XX”)中引入点突变,CAR T细胞的命运在存在高抗原暴露的情况下从耗尽状态改变为均衡的效应和记忆状态(Feucht等人,Nat Med.2019;25(1):82-88)。

[0088] CAR T细胞在实体瘤微环境中遇到的另一个障碍是通过PD1介导的细胞溶解活性的抑制,PD1是抗原介导的T细胞活化后表达的抑制性受体。此外,在暴露于T细胞分泌的促凋亡细胞因子后,肿瘤细胞增强共抑制配体如PD-L1的表达(McGray等人,Mol Ther.2014年;22(1):206-218;Spranger等人,Sci Transl Med.2013;5(200):200ra116;Moon等人,Clin Cancer Res.2014;20(16):4262-4273)。为了克服这一障碍,我们的研究小组将靶向间皮素的CAR T细胞与PD1阻断抗体相结合,以拯救耗竭的CAR T细胞,在我们的原位小鼠模型中恢复CAR T细胞的抗肿瘤疗效(Cherkassky等人,J Clin Invest.2016;126(8):3130-3144;Grosser等人,Cancer Cell.2019;36(5):471-482)。为避免PD1检查点阻断剂的重复用量和相关的临床不良反应,我们的研究小组已经证明,使用细胞固有的PD1检查点阻断策略,其中PD1DNR与第二代CAR共同转导到T细胞中,最终使转导细胞抵抗实体瘤微环境中的肿瘤PD-L1介导的抑制,Cherkassky等人,J Clin Invest.2016;126(8):3130-3144;Grosser等人,Cancer Cell.2019;36(5):471-482)。

[0089] 因此,为了开发具有增强的治疗特征、功能持久性和对肿瘤介导的抑制耐受的CAR T细胞,发明人将1XX和PD1DNR组件纳入第二代CAR载体设计中,这使得这些细胞能够在高度免疫抑制的实体瘤的微环境中有效地发挥作用。

[0090] 为了明确披露而非限制,详细说明分为以下小节:

[0091] 5.1.定义;

[0092] 5.2.多肽组合物;

[0093] 5.2.1.PD-1 DN;

[0094] 5.2.2.靶向间皮素的CAR;和

[0095] 5.2.3.示例性多肽组合物;

[0096] 5.3.免疫应答细胞;

[0097] 5.4.核酸组合物和载体;

[0098] 5.5.多肽和类似物;

[0099] 5.6.药物组合物和给药;

[0100] 5.7.制剂;

[0101] 5.8.治疗方法;和

[0102] 5.9.试剂盒

[0103] 5.1.定义

[0104] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有本领域技术人员通常理解的含义。

[0105] 如本文所使用的,术语“约”或“大约”是指在由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,其将部分取决于如何测量或确定该值,即测量系统的限制。例如,根据本领域的实践,“约”可指在3个或3个以上的标准偏差内。或者,“约”可指给定值的高达20%,例如,高达10%、高达5%、或高达1%的范围。或者,特别是关于生物系统或过程,该术语可以表示在一个数量级内,例如,在一个值的5倍或2倍内。

[0106] “免疫应答细胞”是指在免疫应答中起作用的细胞或其祖细胞或其子代细胞。

[0107] “激活免疫应答细胞”是指诱导细胞内蛋白质表达的信号转导或变化,从而引发免疫应答。例如,当CD3链响应配体结合和免疫受体酪氨酸基抑制基序(ITAM)而聚集时,信号转导级联产生。在某些实施方式中,当嵌合抗原受体(CAR)结合到抗原时,发生免疫突触的形成,其包括在结合受体附近的许多分子(例如,CD4或CD8、CD3γ/δ/ε/ζ等)的聚集。这种膜结合信号传导分子的聚集允许包含在CD3链中的ITAM基序磷酸化。这种磷酸化反过来启动T细胞激活途径,最终激活转录因子,如NF-κB和AP-1。这些转录因子诱导T细胞的全局基因表达,以增加IL-2的产生,促进增殖和主调节因子T细胞蛋白的表达,从而启动T细胞介导的免疫应答。

[0108] “刺激免疫应答细胞”是指产生强大和持续免疫应答的信号。在各种实施方式中,这发生在免疫应答细胞(例如,T细胞)激活后,或同时通过包括但不限于CD28、CD137(4-1BB)、OX40、CD40和ICOS的受体介导。接收多种共刺激信号对于建立一个强大的、长期的T细胞介导的免疫反应很重要。T细胞会很快受到抑制并对抗原无反应。虽然这些共刺激信号的作用可能不同,但它们通常会导致基因表达增加,从而产生长寿命、增殖和抗凋亡的T细胞,这些T细胞对抗原产生强烈反应,从而实现彻底和持续的根除。

[0109] 如本文所用,术语“抗体”不仅指完整的抗体分子,还指保留免疫原结合能力的抗体分子片段。此类片段在本领域中也是众所周知的,并且在体外和体内都被经常使用。因此,如本文所用,术语“抗体”不仅指完整的免疫球蛋白分子,而且还指众所周知的活性片段$F(ab')_2$和Fab。$F(ab')_2$和缺乏完整抗体的Fe片段的Fab片段,从循环中清除得更快,并且与完整抗体相比其非特异性组织结合较少(Wahl等人,J.Nucl.Med.24:316-325(1983)。如本文所用,抗体包括全天然抗体、双特异性抗体、嵌合抗体、Fab、Fab',单链V区片段(scFv)、融合多肽和非常规抗体。在某些实施方式中,抗体是包含至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白链通过二硫键相互连接。每个重链由一个重链可变区(此处缩写为V_H)和一个重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由CH1、CH2和CH3这三个结构域组成。每条轻链由一个轻链可变区(此处缩写为V_L)和一个轻链恒定区C_L组成。轻链恒定区域由一个结构域C_L组成。V_H和V_L可进一步细分为称为互补决定区(CDR)的超变区,与称为框架区(FR)的更为保守的区域相点缀。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含一个与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1 q)。

[0110] 如本文所用,“CDR”定义为抗体的互补决定区氨基酸序列,其为免疫球蛋白重链和轻链的超变区。参见,例如,Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第4版,美国卫生与公众服务部,国家卫生研究院(1987)。通常,抗体在可变区中包含三个重链和三个轻链CDR或CDR区。CDR为抗体与抗原或表位的结合提供了大部分的接

触残基。在某些实施方式中,使用Kabat系统描述CDR区(Kabat,E.A.等(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,美国卫生与公众服务部,国家卫生研究院出版第91-3242号)。在某些实施方式中,根据Kabat系统识别CDR。

[0111] 如本文所用,术语“单链可变片段”或者“scFv”是一种免疫球蛋白重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)共价连接形成V_H::V_L异二聚体的融合蛋白。V_H和V_L直接连接或由肽编码的接头连接(例如,10、15、20、25个氨基酸),连接V_H的N端与V_L的C端,或V_H的C端与V_L的N端。接头通常富含甘氨酸以获得柔韧性,以及丝氨酸或苏氨酸以获得溶解度。“接头”如本文所用,应指共价连接两个或多个多肽或核酸以使它们彼此连接的功能组(例如,化学物或多肽)。如本文所用,“肽接头”指用于将两个蛋白质连接在一起的一个或多个氨基酸(例如,连接V_H和V_L结构域)。在某些实施方式中,接头包含或由SEQ ID NO:66所示氨基酸序列组成,其提供如下:

[0112] GGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 66]。

[0113] 编码SEQ ID NO:66的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:50中示出,其提供如下:

[0114] GGAGGTGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCA [SEQ ID NO:50]。

[0115] 编码氨基酸序列SEQ ID NO:66的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:51中示出,其提供如下:

[0116] GGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCA [SEQ ID NO:51]

[0117] 尽管去除了恒定区并引入了接头,scFv仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。单链Fv多肽抗体可以从包括Huston等人描述的V_H和V_L编码序列的核酸中表达。(Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-58831988)。另见美国专利号5,091,513、5,132,405和4,956,778;以及美国专利出版物编号20050196754和20050196754。具有抑制活性的拮抗性scFv已经被描述(参见,例如,Zhao等人,Hyrbidoma(Larchmt)2008 27(6):455-51;Peter等人,J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12;Shieh等人,J Imunol 2009 183(4):2277-85;Giomarelli等人,Thromb Haemost 2007 97(6):955-63;Fife等人,J Clin Invst 2006 116(8):2252-61;Brocks等人,Immunotechnology 1997 3(3):173-84;Moosmayer等人,Ther Immunol 1995 2(10:31-40)。具有刺激活性的激动性scFv已经被描述(参见,例如,Peter等人,J Bioi Chern 2003 25278(38):36740-7;Xie等人,Nat Biotech 1997 15(8):768-71;Ledberter等人,Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55;Ho等人,BioChim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66)。

[0118] 如本文所用,“F(ab)”指结合抗原但为单价且不具有Fc部分的抗体结构片段,例如,经木瓜酶消化抗体产生两个F(ab)片段和Fc片段(例如,重(H)链恒定区;不结合抗原的Fc区)。

[0119] 如本文所用,“$F(ab')_2$”是指通过胃蛋白酶消化整个IgG抗体产生的抗体片段,其中所述片段具有两个抗原结合(ab')(二价)区域,其中每个(ab')区域包含两个单独的氨基酸链,用于结合抗原的由S-S键连接的H链的一部分和轻链(L),剩余的H链部分连接在一起。“$F(ab')_2$”片段可拆分为两个单独的Fab'片段。

[0120] 如本文所用,术语“载体”指如质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒、病毒粒子

等,当与适当的控制元件结合时能够复制并且能够将基因序列转移到细胞中的任何遗传元件。因此,该术语包括克隆和表达载体,以及病毒载体和质粒载体。

[0121] 如本文所用,术语“表达载体”是指重组核酸序列,即重组DNA分子,其包含在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所需的期望编码序列和适当核酸序列。在原核生物中表达所必需的核酸序列通常包括启动子、操作子(可选)和核糖体结合位点,通常还有其他序列一起。已知真核细胞利用启动子、增强子、终止和多聚腺苷酸化信号。

[0122] 如本文所用,术语“亲和力”意指结合强度的量度。亲和力可能取决于抗体结合位点和抗原决定簇之间立体化学匹配的紧密程度、它们之间接触面积的大小、和/或带电和疏水基团的分布。本领域已知用于计算抗体对抗原的亲和力的方法,包括但不限于各种抗原结合实验,例如功能分析(例如,流式细胞术分析)。

[0123] 本文使用的术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指包含一个与能够激活或刺激免疫应答细胞的胞内信号传导结构域融合的胞外抗原结合结构域和跨膜结构域的分子。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域包含scFv。scFv可通过融合抗体的可变重区和轻区获得。替代地或附加地,scFv可从Fab(而不是从抗体,例如从Fab文库获得)衍生。在某些实施方式中,scFv融合到跨膜结构域,然后融合到胞内信号传导结构域。在某些实施方式中,选择对抗原具有高结合亲和力的CAR。

[0124] 如本文所用,术语“核酸分子”包括编码所需多肽或其片段的任何核酸分子。这种核酸分子不需要与内源性核酸序列100%同源或相似,但可以表现出实质性的同一性。

[0125] “基本同一性”或“基本同源性”是指与参考氨基酸序列(例如,本文所述的任一氨基酸序列)或参考核酸序列(例如,本文所述的任一核酸序列)具有至少约50%的同源性或同一性的氨基酸序列或核酸分子。在某些实施方式中,该序列与用于比较的参考氨基酸或参考核酸的序列具有至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、或至少约100%的同源性或同一性。

[0126] 序列同一性可以通过使用序列分析软件来测量(例如,Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group,威斯康星大学生物技术中心,麦迪逊大学大道1710号,威斯康星州53705,BLAST,BESTFIT,GAP,或PILEUP/PRETTYBOX程序)。此类软件通过为各种替换、删除和/或其他修改赋予同源度来匹配相同或相似的序列。保守替换通常包括以下组内的替换:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸,苏氨酸、赖氨酸、精氨酸;和苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中,可使用BLAST程序,概率分数在e-3和e-100之间表示密切相关的序列。

[0127] 如本文所用,两个氨基酸序列之间的同源性百分比相当于两个序列之间的同一性百分比。两个序列之间的同一性百分比是序列共享的相同位置的数量的函数(即%同源性=相同位置数/位置总数×100),考虑到空位的数量和每个空位的长度,需要引入空位以实现两个序列的最佳联配。序列的比较和两个序列之间的同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。

[0128] 两个氨基酸序列之间的同源性百分比可使用E.Meyers和W.Miller(Comput.Appl.Biosci.,4:11-17(1988))的算法确定,该算法已纳入ALIGN程序(版本2.0),使用PAM120重量残基表,空位长度罚值为12,空位罚值为4。此外,可以使用Needleman和

Wunsch(J.Mol.Biol.48:444-453(1970))算法确定两个氨基酸序列之间的同源性百分比,该算法已被纳入GCG软件包(访问www.gcg.com)中的GAP程序,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,空位权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0129] 另外或可选地,本公开主题的氨基酸序列还可以用作“查询序列(query sequence)”,以对公共数据库执行搜索,例如用于识别相关序列。可以使用Altschul等人(1990)J.Mol.Biol.215:403-10的XBLAST程序(2.0版)执行此类搜索。可以使用XBLAST程序执行BLAST蛋白质搜索,得分=50,字长=3,以获得与本文公开的特定序列(例如,scFv m903、m904、m905、m906和m900的重链和轻链可变区序列)同源的氨基酸序列。为了获得空位联配以用于比较,可以使用Gapped BLAST,如Altschul等人,(1997)Nucleic Acid Res.25(17):3389-3402所述。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。本文所使用的术语“组成型表达”或“结构性表达”是指在所有生理条件下的表达或表达的。

[0130] “疾病”是指损害或干扰细胞、组织或器官正常功能的任何病情、疾病或病症,例如肿瘤和细胞病原体感染。

[0131] “有效量”是指足以产生治疗效果的量。在某些实施方式中,“有效量”是足以阻止、改善或抑制肿瘤的持续增殖、生长或转移(例如,侵袭或迁移)的量。

[0132] “调节”是指正或负的改变。示例性调节包括约1%、约2%、约5%、约10%、约25%、约50%、约75%、或约100%的改变。

[0133] “增加”是指正改变至少5%。改变可能是约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%、约100%或更多。

[0134] “减少”是指负改变至少5%。改变可能是约5%,约10%,约25%,约30%,约50%,约75%,甚至约100%。

[0135] “分离的细胞”是指从与自然伴随细胞的分子和/或细胞成分中分离出来的细胞。

[0136] 术语“分离的”、“纯的”或“生物纯的”是指物质在不同程度上不含通常在其天然状态下伴随其存在的成分。“分离”是指一种与原始来源或环境的分离程度。“纯化”表示比分离更高的分离程度。“纯的”或“生物纯的”蛋白质充分不含其他物质,因此任何杂质都不会对蛋白质的生物学特性产生实质性影响或导致其他不利后果。也就是说,核酸或多肽如果基本上不含细胞物质、病毒物质或通过重组DNA技术生产时的培养基,或化学前体或化学合成时的其他化学物质,那么它就是“纯的”。纯度和均一性通常使用分析化学技术确定,例如,聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法。术语“纯的”可表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中基本上形成一条带。对于可进行修饰(例如,磷酸化或糖基化)的蛋白质,不同的修饰可产生不同的分离蛋白质,其可分别纯化。

[0137] “瘤”是指一种以细胞或组织的病理性增殖及其随后向其他组织或器官迁移或侵袭为特征的疾病。瘤生长通常是不受控制和进行性的,并且发生在不会诱发或导致正常细胞增殖停止的条件下。瘤可影响多种细胞类型、组织或器官,包括但不限于选自以下的器官:膀胱、骨、脑、乳房、软骨、胶质细胞、食管、输卵管、胆囊、心脏、肠、肾脏、肝脏、肺、淋巴结、神经组织、卵巢、胰腺、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾脏、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、泌尿生殖道、输尿管、尿道、子宫、和阴道,或其组织或细胞类型。瘤包括癌症,例如肉瘤、恶性上皮肿瘤或浆细胞瘤(浆细胞的恶性肿瘤)。在某些实施方式中,瘤为实体瘤。瘤可以是原

发性肿瘤或原发性癌症。此外,瘤可能处于转移状态。

[0138] 如本文所用,术语“保守序列修饰”指不显著影响或改变本公开的包含氨基酸序列的靶向间皮素的CAR(例如,CAR的胞外抗原结合结构域)的结合特征的氨基酸修饰。保守修饰可以包括氨基酸替换、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术,例如定点突变和PCR介导的突变,将修饰引入本公开的CAR的胞外抗原结合结构域。氨基酸可以根据其物理化学性质(如电荷和极性)进行分组。保守氨基酸替换是指将氨基酸残基替换为同组的氨基酸。例如,氨基酸可以按电荷分类:带正电荷的氨基酸包括赖氨酸、精氨酸、组氨酸,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸,中性电荷的氨基酸包括丙氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、和缬氨酸。此外,氨基酸可按极性分组:极性氨基酸包括精氨酸(碱性极性)、天冬酰胺、天冬氨酸(酸性极性)、谷氨酸(酸性极性)、谷氨酰胺、组氨酸(碱性极性)、赖氨酸(碱性极性)、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸;非极性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸。因此,CDR区内的一个或多个氨基酸残基可以被来自同一组的其他氨基酸残基替换,并且可以使用本文所述的功能分析测试改变的抗体的保留功能(即,上文(c)至(l)中所述的功能)。在某些实施方式中,特定序列或CDR区内的不多于一个、不多于两个、不多于三个、不多于四个、不多于五个残基被改变。

[0139] “信号序列”或“前导序列”是指存在于新合成蛋白质的N-端的肽序列(例如,5、10、15、20、25或30个氨基酸),其引导蛋白质进入分泌途径。示例性前导序列包括但不限于人IL-2信号序列(例如MYRMQLLSCIALSLALVTNS[SEQ ID NO:67])、小鼠IL-2信号序列(例如,MYSMQLASCVTLTLVLLVNS[SEQ ID NO:68]);人kappa前导序列(例如,METPAQLLFLLLLWLPDTTG[SEQ ID NO:69]),小鼠kappa前导序列(例如,METDTLLLWVLLLWVPGSTG[SEQ ID NO:70]);人CD8前导序列(例如,MALPVTALLLPLALLLHAARP[SEQ ID NO:71]);截短的人CD8信号肽(例如,MALPVTALLLPLALLLHA[SEQ ID NO:72]);人白蛋白信号序列(例如,MKWVTFISLLFSSAYS[SEQ ID NO:73]);以及人催乳素信号序列(例如,MDSKGSSQKGSRLLLLLVVSNLLLCQGVVS[SEQ ID NO:74])。

[0140] 在某些实施方式中,CAR在N端包含CD8信号肽,例如,信号肽连接到CAR的胞外抗原结合结构域。在某些实施方式中,CD8信号肽包含SEQ ID NO:71所示氨基酸序列或由其组成。

[0141] 编码SEQ ID NO:71的氨基酸序列的示例性核苷酸在SEQ ID NO:125中示出。SEQ ID NO:125提供如下。

[0142] ATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCCT [SEQ ID NO: 125]

[0143] 术语“包含”、“包括”具有美国专利法赋予它们的广义含义,可指“包含”、“包括”等此类含义。

[0144] 如本文所用,“治疗”是指试图改变所治疗的个体或细胞的病程的临床干预,并且可以用于预防或在临床病理过程中进行。治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、缓解症状、减轻疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展速度、改善或缓解疾病状态,缓解或改善预后。通过预防疾病或病症的进展,治疗可防止因受影响或被诊断的受试者或被怀疑患有这种疾病的受试者的病症而病情恶化,但是,治疗也可以防止有患

该疾病风险的受试者或怀疑患有该疾病的受试者出现该疾病或该疾病的症状。

[0145] 本文中的“个体”或“受试者”是脊椎动物,例如人或非人动物(例如哺乳动物)。哺乳动物包括但不限于人、灵长类动物、家畜、运动动物、啮齿动物和宠物。非人动物受试者的非限制性例子包括啮齿动物,如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠;兔子;狗;猫;绵羊;猪;山羊;牛;马;以及非人灵长类动物,如猿和猴子。本文使用的术语“免疫受损”是指具有免疫缺陷的受试者。受试者极易受到机会性感染,即由通常不会导致免疫系统健康的人患病的生物体引起的感染,但会影响免疫系统功能不良或受到抑制的人。

[0146] 本公开主题的其他方面都在以下公开中描述,并且在本公开主题的范围内。

[0147] 5.2.多肽组合物

[0148] 本发明公开的主题提供包含靶向间皮素的嵌合抗原受体(CAR)和程序性死亡1的显性负形式(PD-1 DN)的多肽组合物。

[0149] 5.2.1.程序性死亡1的显性负形式(PD-1 DN)

[0150] 程序性死亡1的显性负形式(称为“PD-1 DN”)可增强包含CAR的免疫应答细胞的治疗效果。在某些实施方式中,PD-1 DN包含(a)包含配体结合区的程序性死亡1(PD-1)胞外结构域的至少一部分,以及(b)跨膜结构域。

[0151] 在某些实施方式中,免疫应答细胞(例如T细胞或其前体细胞)被工程改造以表达PD-1的显性负形式(DN形式)。

[0152] 恶性细胞适应产生保护细胞免受免疫识别和消除的免疫抑制微环境(Sharpe等人,Dis.Model Mech.2015;8:337-350)。免疫抑制微环境限制了免疫治疗方法。本公开主题通过在免疫应答细胞或其前体细胞中表达细胞介导的免疫应答抑制剂的DN形式来解决该限制。WO2017/040945和WO2017/100428(每个的内容以其整体并入本文)中披露了细胞介导免疫应答抑制剂的DN形式的详细信息。

[0153] 程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)是活化的T细胞与其相应配体(内源性巨噬细胞和树突状细胞上表达的PD-L1和PD-L2)结合时的负免疫调节器。PD-1是一种由268个氨基酸组成的I型膜蛋白。PD-1有两个配体,PD-L1和PD-L2,它们是B7家族的成员。该蛋白的结构包括胞外IgV结构域、随后是跨膜区和胞内尾部。胞内尾部包含位于免疫受体酪氨酸基抑制基序和免疫受体酪氨酸基开关基序中的两个磷酸化位点。PD-1负调节TCR信号。SHP-1和SHP-2磷酸酶通过配体结合结合到PD-1的细胞质尾部。PD-L1的上调是肿瘤细胞逃避宿主免疫系统的机制之一。在临床前和临床试验中,通过拮抗性抗体阻断PD-1可诱导通过宿主内源性免疫系统介导的抗肿瘤反应。

[0154] 在某些实施方式中,PD-1多肽由具有GenBank No.NP_005009.2(SEQ ID No:48)的氨基酸或其片段组成。在某些实施方式中,SEQ ID NO:48的氨基酸1至20是PD-1的信号肽(或肽信号)。在某些实施方式中,SEQ ID NO:48的氨基酸21至170是PD-1的胞外结构域。在某些实施方式中,SEQ ID NO:48的氨基酸171至191是PD-1的跨膜结构域。在某些实施方式中,SEQ ID NO:48的氨基酸192至288是PD-1的胞内结构域。以下提供SEQ ID NO:48:

[0155]
```
MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS
ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS
LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP
CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL  [SEQ ID NO: 48]
```

[0156] 在某些实施方式中,PD-1的胞外结构域包含配体结合结构域(称为“胞外配体结合

结构域")。在某些实施方式中,PD-1的胞外配体结合结构域融合一个或多个异源多肽序列,即,PD-1 DN是嵌合序列。例如,PD-1的胞外配体结合域可在其N端与可选为异源信号肽(包括本文所述的各种信号肽)的信号肽融合。此外,PD-1 DN可包含可选为异源跨膜结构域的跨膜结构域,包括本文所述的各种跨膜结构域中的任何一种。

[0157] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含PD-1多肽的胞外结构域(例如,SEQ ID NO:48的氨基酸21至170)或其配体结合部分(例如,SEQ ID NO:48的氨基酸21至165)。表达这种PD-1 DN的细胞在PD-1免疫检查点途径中发出信号的能力可能缺乏或降低。在某些实施方式中,PD-1 DN是由胞内结构域的缺失(例如,PD-1 DN缺少SEQ ID NO:48的氨基酸192至288)或其部分组成的缺失突变体。由胞内结构域缺失组成的PD-1可能减少或抑制PD-1介导的免疫检查点途径。

[0158] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含PD-1的胞外配体结合结构域。在某些实施方式中,PD-1 DN包含PD-1多肽的胞外配体结合结构域和PD-1多肽的跨膜结构域。在某些实施方式中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:58所示氨基酸序列(或SEQ ID NO:48中的氨基酸21至165)或由其组成。下面提供SEQ ID NO:58。

[0159] PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQ [SEQ ID NO: 58]

[0160] 编码SEQ ID NO:58(或SEQ ID NO:48的氨基酸21至165)的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:59中。

[0161] CCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTG ACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTAC CGCATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGAC TGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAAT GACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCA GAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGC CAG [SEQ ID NO: 59]

[0162] 在某些实施方式中,PD-1 DN还包含信号肽,例如,PD-1 DN包含PD-1多肽的胞外配体结合结构域、PD-1多肽的跨膜结构域和PD-1多肽的信号肽。在某些实施方式中,信号肽包含SEQ ID NO:48的氨基酸1-20或由其组成。编码SEQ ID NO:48的氨基酸1-20的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:60中。

[0163] ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGCTGGCGG [SEQ ID NO: 60]

[0164] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:48的氨基酸1至165或由其组成。

[0165] 编码SEQ ID NO:48的氨基酸1-165的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:61中。

[0166] ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTC TTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGAC AACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCC AGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGT GTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACC TACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTG ACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAG [SEQ ID NO: 61]

[0167] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:48的氨基酸21至151或由其组成。在某些实施方式中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:48的氨基酸1至151或由其组成。在某些实施方式

中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:48的氨基酸21至151或由其组成。在某些实施方式中,PD-1 DN包含从SEQ ID NO:48的氨基酸21开始到SEQ ID NO:48的氨基酸151至165之间的氨基酸序列或由其组成。

[0168] 在某些实施方式中,PD-1 DN进一步包含CD8多肽。在某些实施方式中,PD-1 DN包含PD-1的胞外结构域或其部分(例如,胞外配体结合结构域),其融合到CD8的跨膜结构域和/或铰链结构域。在某些实施方式中,PD-1 DN包含CD8的跨膜结构域(例如,SEQ ID NO:86的氨基酸183至203)。此类实施方式代表包含来自不同(异源)多肽的跨膜结构域的嵌合DN形式。如上所述,包含异源结构域(例如跨膜结构域)的PD-1 DN可任选地包括来自异源多肽的附加序列。在某些实施方式中,PD-1 DN包含来自跨膜结构域的异源多肽N端的附加序列。在某些实施方式中,PD-1 DN包含CD8的铰链结构域。在某些实施方式中,异源序列包含CD8多肽的附加N端序列(例如,SEQ ID NO:86的氨基酸137至182(或任选地起始于氨基酸138或139))。在某些实施方式中,PD-1 DN包含来自CD8跨膜结构域的异源多肽C端的附加序列。在某些实施方式中,附加的C端序列是SEQ ID NO:86的氨基酸204至209。

[0169] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含CD8多肽的跨膜结构域(例如,SEQ ID NO:86的氨基酸183至203)、CD8多肽的铰链结构域(例如,SEQ ID NO:86的氨基酸137至182)和CD8多肽的附加C端序列(例如,SEQ ID NO:86的氨基酸204至207。在某些实施方式中,PD-1 DN包含由SEQ ID NO:86的氨基酸137至207组成的CD8多肽。

[0170] 编码SEQ ID NO:86的氨基酸137至207的示例性核苷酸序列列于SEQ ID NO:62中,其提供如下:

[0171]
```
CCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTAC
ATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAAC
[SEQ ID NO: 62]
```

[0172] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含CD8多肽的跨膜结构域(例如,SEQ ID NO:86的氨基酸183至203)、CD8多肽的铰链结构域(例如,SEQ ID NO:86的氨基酸137至182)和CD8多肽的附加C端序列(例如,SEQ ID NO:86的氨基酸204至209。在某些实施方式中,PD-1 DN包含由SEQ ID NO:86的氨基酸137至209组成的CD8多肽。

[0173] 编码SEQ ID NO:86的氨基酸137至209的示例性核苷酸序列列于如下提供的SEQ ID NO:63中:

[0174]
```
CCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTAC
ATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAACCAC
AGG [SEQ ID NO: 63]
```

[0175] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含下文提供的SEQ ID NO:49所示氨基酸序列。

[0176]
```
MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNA
TFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQL
PNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAE
VPTAHPSPSPRPAGQAAAPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA
GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN [SEQ ID NO: 49]
```

[0177] 编码SEQ ID NO:49所示氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:64中示出,其提供如下:

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTC
TTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGAC
AACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCC
AGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGT

[0178] GTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACC
TACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTG
ACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGGCGGCCGCA
CCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTAC
ATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAAC
[SEQ ID NO: 64]

[0179] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含下文提供的SEQ ID NO:118所示氨基酸序列。

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNA
TFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQL

[0180] PNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAE
VPTAHPSPSPRPAGQAAA*PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA*
*GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT*CGVLLLSLVITLYCNHR [SEQ ID NO: 118]

[0181] 编码SEQ ID NO:118所示氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:119中所述,其提供如下:

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTC
TTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGAC
AACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCC
AGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGT
GTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACC

[0182] TACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTG
ACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGGCGGCCGCA
CCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTAC
ATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAACCAC
AGG [SEQ ID NO: 119]

[0183] 在某些实施方式中,PD-1 DN的跨膜结构域包含横跨膜的至少一部分的疏水性α螺旋。不同的跨膜结构域导致不同的受体稳定性。根据本公开主题,PD-1 DN的跨膜结构域可包含本文公开的任何多肽的天然或修饰的跨膜结构域,例如,可包含在嵌合抗原受体中的任何跨膜结构域。在某些实施方式中,跨膜结构域是CD8多肽、CD28多肽、CD3ζ多肽、CD40多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、CD84多肽、CD166多肽、CD8a多肽、CD8b多肽、ICOS多肽、ICAM-1多肽、CTLA-4多肽、CD27多肽,CD40/My88肽、NKGD2肽、合成多肽(不基于与免疫应答相关的蛋白质)或其组合。在某些实施方式中,跨膜结构域为CD8多肽。这些跨膜结构域的细节将在下面的章节中描述。

[0184] 5.2.2.靶向间皮素的嵌合抗原受体(CAR)

[0185] 本发明公开的多肽组合物包含特异性靶向间皮素(例如,人间皮素)的CAR。

[0186] CAR是一种工程化受体,其可移植或赋予免疫效应细胞特异性。CAR可用于将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上;通过逆转录病毒载体促进其编码序列的转移。

[0187] 共有三代CAR。“第一代”CAR通常由与跨膜结构域融合的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)组成,胞外抗原结合结构域与胞质/胞内信号传导结构域融合。“第一代”CAR可以提供从头抗原识别,并通过单个融合分子中的CD3ζ链信号结构域激活$CD4^+$和$CD8^+$T细胞,独立于HLA介导的抗原呈递。“第二代”CAR添加来自各种共刺激分子的胞内信号传导结构域(例如,CD28、4-1BB、ICOS、OX40、CD27、CD40/My88和NKGD2)到CAR的细胞质尾部,以向T细胞提供额外信号。“第二代”CAR包括同时提供共刺激(例如,CD28或4-1BB)和激活(CD3ζ)的

CAR。“第三代”CAR包括提供多重共刺激(如CD28和4-1BB)和激活(CD3ζ)的CAR。在某些实施方式中,CAR是第二代CAR。在某些实施方式中,CAR包含与抗原结合的胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域,其中胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在某些实施方式中,CAR还包括铰链/间隔区。

[0188] 5.2.2.1.CAR的胞外抗原结合结构域

[0189] CAR的胞外抗原结合结构域特异性结合间皮素,例如人间皮素。在某些实施方式中,胞外抗原结合结构域是scFv。在某些实施方式中,scFv是人scFv。在某些实施方式中,scFv是人源化scFv。在某些实施方式中,scFv是鼠scFv。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域是Fab,其可选地交联。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域为F(ab)$_2$。在某些实施方式中,上述任何分子可包含在具有异源序列的融合蛋白中以形成胞外抗原结合结构域。在某些实施方式中,通过使用抗原Fc融合蛋白筛选scFv噬菌体文库来鉴定scFv。scFv可从携带人V_L和/或V_H基因的小鼠中衍生。scFv也可以被骆驼科重链(例如,来自骆驼科,羊驼属的VHH,等)或细胞表面受体的部分天然配体取代。

[0190] 间皮素是一种在实体癌中高度表达的免疫原性细胞表面抗原。间皮素参与细胞增殖、粘附、侵袭、细胞信号传导和转移。研究表明,表达间皮素的肿瘤分泌的血清可溶性间皮素相关肽可在人和小鼠中检测到,并且已证明与治疗反应和预后相关。在正常组织中,间皮素仅在胸膜、心包和腹膜中低水平表达。抗间皮素重组免疫毒素SS1P在患者体内显示出特异性和显著的抗肿瘤活性。在一项胰腺癌疫苗试验中,具有生存优势的患者具有一致的$CD8^+$T细胞对与疫苗诱导的迟发型超敏反应相关的间皮素的反应。来自间皮素的特异性T细胞表位被发现激活人T细胞以有效溶解表达间皮素的人肿瘤。因此,有强有力的支持性证据表明,靶向间皮素的过继免疫治疗可以针对表达间皮素的肿瘤。

[0191] 在某些实施方式中,CAR与人间皮素结合。在某些实施方式中,人间皮素包含或由NCBI参考号为AAV87530.1(SEQ ID No:75)的氨基酸序列或其片段组成。

[0192] SEQ ID NO:75如下所示:

[0193]
```
MALPTARPLL GSCGTPALGS LLFLLFSLGW VQPSRTLAGE TGQEAAPLDG VLANPPNISS LSPRQLLGFP
CAEVSGLSTE RVRELAVALA QKNVKLSTEQ LRCLAHRLSE PPEDLDALPL DLLLFLNPDA FSGPQACTHF
FSRITKANVD LLPRGAPERQ RLLPAALACW GVRGSLLSEA DVRALGGLAC DLPGRFVAES AEVLLPRLVS
CPGPLDQDQQ EAARAALQGG GPPYGPPSTW SVSTMDALRG LLPVLGQPII RSIPQGIVAA WRQRSSRDPS
WRQPERTILR PRFRREVEKT ACPSGKKARE IDESLIFYKK WELEACVDAA LLATQMDRVN AIPFTYEQLD
VLKHKLDELY PQGYPESVIQ HLGYLFLKMS PEDIRKWNVT SLETLKALLE VNKGHEMSPQ VATLIDRFVK
GRGQLDKDTL DTLTAFYPGY LCSLSPEELS SVPPSSIWAV RPQDLDTCDP RQLDVLYPKA RLAFQNMNGS
EYFVKIQSFL GGAPTEDLKA LSQQNVSMDL ATFMKLRTDA VLPLTVAEVQ KLLGPHVEGL KAEERHRPVR
DWILRQRQDD LDTLGLGLQG GIPNGYLVLD LSVQEALSGT PCLLGPGPVL TVLALLLAST LA [SEQ ID
NO:75]
```

[0194] 在某些实施方式中,通过酶联免疫吸附试验(ELISA)测量,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,包含scFv或其类似物)以约1nM至约25nM的EC50值与人间皮素结合。在某些实施方式中,通过ELISA测量,CAR的胞外抗原结合结构域具有约20nM的EC50值。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域包含美国专利号8,357,783中所述的抗间皮素抗体或其抗原结合部分,其全部内容通过引用并入本文。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域衍生自结合人间皮素的抗体的重链可变区和轻链可变区,例如,Feng等人在Mol.Cancer Therapy(2009);8(5):1113-1118中公开的抗体m912,其全部内容通过引用并入本文。通过对重组间皮素的筛选,从人Fab文库中分离出抗体m912。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域来自Fab文库(例如,来自人或小鼠Fab文库)。

[0195] CAR的胞外抗原结合结构域(实施方式,例如,在scFv或其类似物中)的结合可通过例如酶联免疫吸附试验(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、FACS分析、活体检测(如生长抑制)、或Western Blot法来确认。这些分析中的每一种通常通过使用特定于目标复合物的标记试剂(例如,抗体或scFv)来检测特定目标的蛋白质抗体复合物的存在。例如,scFv可以被放射性标记并用于放射免疫分析(RIA)(例如,见Weintraub,B.,Principles of Radioimmunoassays,Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques,The Endocrine Society,March,1986,通过引用并入本文)。放射性同位素可通过使用γ计数器或闪烁计数器或放射自显影等方法进行检测。在某些实施方式中,靶向间皮素的胞外抗原结合结构域用荧光标记物标记。荧光标记的非限制性示例包括绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(例如,EBFP、EBFP2、Azurite和mKalama1)、青色荧光蛋白(例如,ECFP、Cerulean和CyPet)和黄色荧光蛋白(如YFP、Citrine、Venus和YPet)。在某些实施方式中,靶向间皮素的人scFv用GFP标记。

[0196] 在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域以约1000个或更多间皮素结合位点/细胞的间皮素水平与人间皮素结合。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域以约1000至约50000间皮素结合位点/细胞的间皮素水平与人间皮素结合。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域不与少于1000个间皮素结合位点/细胞的间皮素表达水平的人间皮素结合,例如表达于正常组织的人间皮素,如正常胸膜、心包和腹膜组织。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域不结合间皮素表达水平超过50000间皮素结合位点/细胞的人间皮素。在某些实施方式中,包含在CAR中的人scFv以约1000至约50000间皮素结合位点/细胞的间皮素表达水平与人间皮素结合。在某些实施方式中,包含在CAR中的人scFv不结合间皮素表达水平大于50000或小于1000间皮素结合位点/细胞的人间皮素。

[0197] 在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包含重链可变区(V_H),所述重链可变区包含有:包含或由SEQ ID NO:76所示氨基酸序列或其保守修饰组成的CDR1、包含或由SEQ ID NO:77所示氨基酸序列或其保守修饰组成的CDR2、以及包含或由SEQ ID NO:78所示氨基酸序列或其保守修饰组成的CDR3。在某些实施方式中,V_H包含有:包含或由SEQ ID NO:76所示氨基酸序列组成的CDR1、包含或由SEQ ID NO:77所示氨基酸序列组成的CDR2、和包含或由SEQ ID NO:78所示氨基酸序列组成的CDR3。

[0198] 在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包含轻链可变区(V_L),所述轻链可变区包含有:包含或由SEQ ID NO:79所示氨基酸序列或其保守修饰组成的CDR1、包含或由SEQ ID NO:80所示氨基酸序列或其保守修饰组成的CDR2、包含或由SEQ ID NO:81所示氨基酸序列或其保守修饰组成的CDR3。在某些实施方式中,V_L包含有:包含或由SEQ ID NO:79所示氨基酸序列组成的CDR1、包含或由SEQ ID NO:80所示氨基酸序列组成的CDR2、和包含或由SEQ ID NO:81所示氨基酸序列组成的CDR3。

[0199] 在某些实施方式中,V_H包含有:包含或由SEQ ID NO:76所示氨基酸序列或其保守修饰组成的CDR1、包含或由SEQ ID NO:77所示氨基酸序列或其保守修饰组成的CDR2、以及包含或由SEQ ID NO:78所示氨基酸序列或其保守修饰组成的CDR3;并且所述V_L包含有:包含或由SEQ ID NO:79所示氨基酸序列或其保守修饰组成的CDR1、包含或由SEQ ID NO:80所示氨基酸序列或其保守修饰组成的CDR2、以及包含或由SEQ ID NO:81所示氨基酸序列或其保守修饰组成的CDR3。在某些实施方式中,V_H包含有:包含或由SEQ ID NO:76所示氨基酸序

列组成的CDR1、包含或由SEQ ID NO:77所示氨基酸序列组成的CDR2、和包含或由SEQ ID NO:78所示氨基酸序列组成的CDR3;所述V_L包含有:包含或由SEQ ID NO:79所示氨基酸序列组成的CDR1、包含或由SEQ ID NO:80所示氨基酸序列组成的CDR2和包含或由SEQ ID NO:81所示氨基酸序列组成的CDR3。在某些实施方式中,根据Kabat编号系统来识别CDR。

[0200] 在某些实施方式中,重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:82所示氨基酸序列。在某些实施方式中,轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:83所示氨基酸序列。在某些实施方式中,所述V_H包含SEQ ID NO:82所示氨基酸序列,所述V_L包含SEQ ID NO:83所示氨基酸序列,可选地在V_H和V_L之间具有(iii)接头序列,例如接头肽。在某些实施方式中,接头包含或由SEQ ID NO:66所示氨基酸序列组成。在某些实施方式中,V_H包含与SEQ ID NO:82所示氨基酸序列具有至少约80%(例如,至少约85%、至少约90%、或至少约95%)同源性或同一性的氨基酸序列。例如,V_H包含与SEQ ID NO:82所示氨基酸序列具有约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,V_H包含SEQ ID NO:82所示氨基酸序列。在某些实施方式中,V_L包含与SEQ ID NO:83所示氨基酸序列具有至少约80%(例如,至少约85%、至少约90%、或至少约95%)同源性或同一性的氨基酸序列。例如,V_L包含与SEQ ID NO:83所示氨基酸序列具有约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,V_L包含SEQ ID NO:83所示氨基酸序列。在某些实施方式中,V_H包含与SEQ ID NO:82所示氨基酸序列具有至少约80%(例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%)同源性或同一性的氨基酸序列,并且V_L包含与SEQ ID NO:83所示氨基酸序列具有至少约80%(例如,至少约85%、至少约90%、或至少约95%)同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,V_H包含SEQ ID NO:82所示氨基酸序列,V_L包含SEQ ID NO:83所示氨基酸序列。

[0201] SEQ ID NO:52中示出了编码SEQ ID NO:82的氨基酸序列的示例性核酸序列。

[0202] SEQ ID NO:53中示出了编码SEQ ID NO:83的氨基酸序列的示例性核酸序列。

[0203] 在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包含与SEQ ID NO:84所示氨基酸序列具有至少约80%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%(例如,约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、或约99%)同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包含或由SEQ ID NO:84所示氨基酸序列组成。在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)特异性结合到人间皮素多肽(例如,包含SEQ ID NO:75所示氨基酸序列的人间皮素多肽)。

[0204] 编码SEQ ID NO:84的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:85中示出。

[0205] 在某些实施方式中,scFv是人scFv。

[0206] SEQ ID NO:52、53和76-85如下所示:

CAGGTTCAGCTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGCACAGTT
TCTGGAGGCAGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCCTGGATTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTGGAG
TGGATTGGGTACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAACTATCAGT
GTGGACACAAGCAAGAATCAGTTTTCACTCAAACTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTGCTGTTTATTAT
TGTGCCAGGGAGGGGAAAAATGGGGCATTTGATATTTGGGGTCAGGGCACAATGGTGACAGTCAGCTCT
[SEQ ID NO: 52]

[0207]

CGCCATCAGATGACTCAGTCCCCCTCCAGTCTTTCTGCCTCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAGA
GCAAGTCAGAGCATATCATCCTATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAATTGCTGATT
TATGCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTGCCAAGCAGGTTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTCACA
TTGACAATCAGCTCCCTCCAACCTGAAGATTTTGCCACCTACTATTGCCAGCAATCCTACAGCACGCCCCTG
ACTTTTGGAGGTGGCACAAAGGTAGAGATCAAGAGGACT [SEQ ID NO: 53]

GGSVSSGSYY [SEQ ID NO: 76]

IYYSGST [SEQ ID NO: 77]

AREGKNGAFDIW [SEQ ID NO: 78]

QSISSY [SEQ ID NO: 79]

AASS [SEQ ID NO: 80]

QQSYSTPLTF [SEQ ID NO: 81]

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTIS
VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGKNGAFDIWGQGTMVTVSS [SEQ ID NO: 82]

RHQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRT [SEQ ID NO: 83]

[0208] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTIS
VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGKNGAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSRHQMTQSPSS
LSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRT [SEQ ID NO: 84]

CAGGTTCAGCTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGCACAGTT
TCTGGAGGCAGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCCTGGATTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTGGAG
TGGATTGGGTACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAACTATCAGT
GTGGACACAAGCAAGAATCAGTTTTCACTCAAACTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTGCTGTTTATTAT
TGTGCCAGGGAGGGGAAAAATGGGGCATTTGATATTTGGGGTCAGGGCACAATGGTGACAGTCAGCTCTGGA
GGTGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCACGCCATCAGATGACTCAGTCCCCCTCCAGT
CTTTCTGCCTCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAGAGCAAGTCAGAGCATATCATCCTATCTGAAC
TGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAATTGCTGATTTATGCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTG
CCAAGCAGGTTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTCACATTGACAATCAGCTCCCTCCAACCTGAAGAT
TTTGCCACCTACTATTGCCAGCAATCCTACAGCACGCCCCTGACTTTTGGAGGTGGCACAAAGGTAGAGATC
AAGAGGACT [SEQ ID NO: 85]

[0209] 在某些实施方式中,重链可变区包含与下文提供的SEQ ID NO:36所示氨基酸序列具有至少约80%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%(例如,约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)同源性或同一性的氨基酸序列。

[0210] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLE
WIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY
CAREGKNGAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTSGQAG [SEQ ID NO: 36]

[0211] 编码SEQ ID NO:36的氨基酸序列的示例性核酸序列在下文提供的SEQ ID NO:37中示出。

[0212]
```
caggtgcagctgcaggagtccggcccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctc      60
acctgcactgtctctggtggctccgtcagcagtggtagttactactggagctggatccgg     120
cagcccccagggaagggactggagtggattgggtatatctattacagtgggagcaccaac     180
tacaacccctccctcaagagtcgagtcaccatatcagtagacacgtccaagaaccagttc     240
tccctgaagctgagctctgtgaccgctgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagag     300
gggaagaatggggcttttgatatctggggccaagggacaatggtcaccgtctcttcagcc     360
tccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggc     420
acagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgg     480
aactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcagga     540
ctctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctac     600
atctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaa     660
tcttgtgacaaaactagtggccaggccggccac     693 [SEQ ID NO:37]
```

[0213] 在某些实施方式中,轻链可变区包含与下文提供的SEQ ID NO:38所示氨基酸序列具有至少约80%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%(例如,约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)同源性或同一性的氨基酸序列。

[0214]
```
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
YAASSLQSGVPSGFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPL
TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:38]
```

[0215] 编码SEQ ID NO:38的氨基酸序列的示例性核酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:39中。

[0216]
```
gacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc      60
atcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtatcagcagaaacca     120
gggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatca     180
gggttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtctgcaacct     240
gaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccccgctcactttcggcgga     300
gggaccaaggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcca     360
tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctat     420
cccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag     480
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctactgcctcagcagcaccctgacg     540
ctgagcaaagcagactacgagaaacacaaactctacgcctgcgaagtcacccatcagggc     600
ctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt [SEQ ID NO:39]
```

[0217] 在某些实施方式中,轻链可变区包含与下文提供的SEQ ID NO:40所示氨基酸序列具有至少约80%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%(例如,约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)同源性或同一性的氨基酸序列。

[0218]
```
RHQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSGFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[SEQ ID NO:40]
```

[0219] 在某些实施方式中,重链可变区包含与下文提供的SEQ ID NO:41所示氨基酸序列具有至少约80%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%(例如,约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)同源性或同一性的氨基酸序列。

[0220] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYI YYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGKNGAFD IWGQGTMVTVSSS [SEQ ID NO:41]

[0221] 在某些实施方式中,轻链可变区包含SEQ ID NO:38的氨基酸1-107。在某些实施方式中,轻链可变区包含SEQ ID NO:40的氨基酸1-107。

[0222] 在某些实施方式中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包含与下文提供的SEQ ID NO:42所示氨基酸序列具有至少约80%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%(例如,约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)同源性或同一性的氨基酸序列。

[0223] Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S V S S G S Y Y W S W I R Q P P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R E G K N G A F D I W G Q G T M V T V S S S S G G G G S G G G G S G G G G S R H Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P L T F G G G T K V E I K G Q A G H H H H H H G D Y K D D D D K G [SEQ ID NO:42]

[0224] 编码SEQ ID NO:42的氨基酸序列的示例性核酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:45中。

[0225] atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccgcaggtgcag ctgcaggagtccggcccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtggc tccgtcagcagtggtagttactactggagctggatccggcagccccagggaagggactggagtggattggg tatatctattacagtgggagcaccaactacaaccctccctcaagagtcgagtcaccatatcagtagacacg

[0226] tccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgctgcggacacggccgtgtattactgtgcgaga gaggggaagaatggggcttttgatatctggggccaagggacaatggtcaccgtctcttcaggtggaggcggt tcaggcggaggtggctctggcggtggcggatcacgacatcagatgacccagtctccatcctccctgtctgca tctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtatcag cagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaagg ttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtctgcaacctgaagattttgcaact tactactgtcaacagagttacagtaccccgctcactttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacggact gcggccgca [SEQ ID NO:45]

[0227] 编码SEQ ID NO:42的氨基酸序列的示例性核酸序列如下文提供的SEQ ID NO:46所述。SEQ ID NO:46所述的核酸序列针对密码子使用进行了综合优化,这可以增加CAR的表达。

[0228] ATGGCGCTGCCGGTGACCGCGCTGCTGCTGCCGCTGGCGCTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGCAGGTGCAG CTGCAGGAAAGCGGCCCGGGCCTGGTGAAACCGAGCGAAACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCGGCGGC AGCGTGAGCAGCGGCAGCTATTATTGGAGCTGGATTCGCCAGCCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGATTGGC TATATTTATTATAGCGGCAGCACCAACTATAACCCGAGCCTGAAAAGCCGCGTGACCATTAGCGTGGATACC AGCAAAAACCAGTTTAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCGGCGGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGC GAAGGCAAAAACGGCGCGTTTGATATTTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACCGTGAGCAGCGGCGGCGGCGGC AGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCCGCCATCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCG AGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTAGCAGCTATCTGAACTGGTATCAG CAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATTTATGCGGCGAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCGAGCCGC TTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTGCGACC TATTATTGCCAGCAGAGCTATAGCACCCCGCTGACCTTTGGCGGCGGCACCAAAGTGGAAATTAAACGCACC GCGGCGGCG [SEQ ID NO:46]

[0229] 编码SEQ ID NO:42氨基酸序列的示例性核酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:47中。SEQ ID NO:47中所示的核酸序列针对密码子使用进行了综合优化,其可增加CAR的表达。

[0230] atggccCTCCCGGTAACGGCTCTGCTGCTTCCACTCGCACTGCTCTTGCATGCTGCCAGACCACAGGTCCAG
CTGCAGGAGAGTGGGCCTGGACTGGTTAAGCCGAGTGAGACACTTTCCTTGACGTGCACTGTGAGCGGGGGA
AGTGTGTCCTCAGGTAGTTATTACTGGTCCTGGATTCGCCAGCCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGATAGGT
TATATCTATTATTCTGGCAGCACTAATTACAATCCTTCTCTCAAAAGTAGGGTGACAATTTCAGTGGATACT
TCCAAAAATCAGTTTAGTCTGAAGCTCAGCTCTGTGACAGCTGCTGATACTGCAGTTTACTACTGCGCCAGG
GAGGGGAAGAATGGCGCCTTCGATATTTGGGGACAGGGCACTATGGTGACTGTATCAAGCGGAGGCGGTGGC
AGCGGCGGGGGAGGGAGTGGAGGCGGCGGGTCTCGACATCAGATGACACAGAGCCCATCATCACTTAGCGCC
AGCGTTGGCGACCGGGTTACGATAACATGCAGGGCTTCCCAATCTATCAGTTCTTATCTGAACTGGTATCAG
CAGAAACCAGGTAAGGCCCCCAAGCTGCTCATCTACGCAGCCTCATCCCTGCAGAGCGGCGTCCCTAGTCGA
TTTTCCGGTAGTGGGTCAGGGACAGATTTTACCCTGACTATCAGTTCACTGCAGCCCGAGGACTTCGCGACA
TACTATTGCCAACAGTCCTATAGTACACCCTTGACATTTGGCGGCGGGACTAAAGTAGAAATTAAACGCACC
gcggccgca [SEQ ID NO:47]

[0231] 由与指定序列(例如,SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:42)具有至少约80%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%(例如,约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)同源性或序列同一性组成的V_H和/或V_L氨基酸序列可包含相对于指定序列的替换(例如保守替换)、插入或删除,但保留与靶标抗原(例如间皮素)结合的能力。在某些实施方式中,在指定序列中(例如,SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:42)替换、插入和/或删除总共1至10个氨基酸。在某些实施方式中,替换、插入或删除发生在胞外抗原结合结构域的CDR之外的区域(例如,在FR中)。在某些实施方式中,胞外抗原结合结构域包含选自SEQ ID NO:82和83中的V_H和/或V_L序列,包括该序列(SEQ ID NO:82和83)的翻译后修饰。

[0232] 5.2.2.2.CAR跨膜结构域

[0233] 在某些实施方式中,CAR包含跨膜结构域。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含横跨膜的至少一部分的疏水性α螺旋。不同的跨膜结构域导致不同的受体稳定性。抗原识别后,受体聚集并向细胞发送信号。根据本公开主题,CAR的跨膜结构域可包含CD8多肽、CD28多肽、CD3ζ多肽、CD40多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、CD84多肽、CD166多肽、CD8a多肽CD8b多肽、ICOS多肽、ICAM-1多肽、CTLA-4多肽、CD27多肽、CD40/My88肽、NKGD2肽、合成多肽(不基于与免疫应答相关的蛋白质)或其组合的天然或修饰跨膜结构域。

[0234] CD8

[0235] 在某些实施方式中,跨膜结构域包含CD8多肽(例如,CD8的跨膜结构域或其一部分)。在某些实施方式中,跨膜结构域包含人CD8的跨膜结构域或其一部分。在某些实施方式中,CD8多肽包含与NCBI参考号为NP_001139345.1(SEQ ID No:86)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%至少约99%或至少约100%同源性或同一性和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中,CD8多肽包含或由SEQ ID NO:86的连续部分的氨基酸序列组成,其长度至少约为20、或至少约为30、或至少约为40、或至少约为50、或至少约为60、或至少约为70、且最多约为235个氨基酸。在某些实施方式中,CD8多肽包含或由SEQ ID NO:86的氨基酸1至235、1至50、50至100、100至150、150至200、137至209、或200至235的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,本公开主题的CAR包含跨膜结构域,所述跨膜结构域包含有包含或由SEQ ID NO:86的氨基酸137至209的氨基酸序列组成的CD8多肽。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD8多肽,其包含或由SEQ ID NO:86的

氨基酸137至207组成。

[0236] MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLY LSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCK CPRPVVKSGDKPSLSARYV [SEQ ID NO: 86]

[0237] 在某些实施方式中,跨膜结构域包含小鼠CD8的跨膜结构域或其部分。在某些实施方式中,CD8多肽包含或由与NCBI参考号为AAA92533.1(SEQ ID NO:87)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,CD8多肽包含或由SEQ ID NO:87的连续部分的氨基酸序列组成,其长度至少约为20、或至少约为30、或至少约为40、或至少约为50、或至少约为60、或至少约为70、或至少约为100、或至少约为200、且最多为247个氨基酸。在某些实施方式中,CD8多肽包含或由SEQ ID NO:87的氨基酸1至247、1至50、50至100、100至150、150至200、151至219、或200至247的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含有包含或由SEQ ID NO:87的氨基酸151至219组成的CD8多肽。

[0238]
```
1   MASPLTRFLS LNLLLMGESI ILGSGEAKPQ APELRIFPKK MDAELGQKVD LVCEVLGSVS
61  QGCSWLFQNS SSKLPQPTFV VYMASSHNKI TWDEKLNSSK LFSAVRDTNN KYVLTLNKFS
121 KENEGYYFCS VISNSVMYFS SVVPVLQKVN STTTKPVLRT PSPVHPTGTS QPQRPEDCRP
181 RGSVKGTGLD FACDIYIWAP LAGICVAPLL SLIITLICYH RSRKRVCKCP RPLVRQEGKP
241 RPSEKIV [SEQ ID NO: 87]
```

[0239] 在某些实施方式中,CD8多肽包含或由SEQ ID NO:88所示氨基酸序列组成,其提供如下:

[0240] STTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICY [SEQ ID NO: **88**]

[0241] 编码SEQ ID NO:88的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:89中示出,其提供如下。

[0242] TCTACTACTACCAAGCCAGTGCTGCGAACTCCCTCACCTGTGCACCCTACCGGGACATCTCAGCCCCAGAGA CCAGAAGATTGTCGGCCCCGTGGCTCAGTGAAGGGGACCGGATTGGACTTCGCCTGTGATATTTACATCTGG GCACCCTTGGCCGGAATCTGCGTGGCCCTTCTGCTGTCCTTGATCATCACTCTCATCTGCTAC **[SEQ ID NO: 89]**

[0243] CD28

[0244] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD28多肽(例如,CD28的跨膜结构域或其部分)。在某些实施方式中,跨膜结构域包含人CD28的跨膜结构域或其部分。在某些实施方式中,CD28多肽包含或由与NCBI参考号为NP_006130(SEQ ID NO:90)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,CD28多肽包含或由SEQ ID NO:90的连续部分的氨基酸序列组成,其长度至少约为20、至少约为25、或至少约为30、或至少约为40、或至少约为50、且最多约为220个氨基酸。在某些实施方式中,CD28多肽包含或由SEQ ID NO:90的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、114至220、153至179、150至200、或200至220的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD28多肽,其包含或由SEQ ID NO:92(或SEQ ID NO:90的氨基酸153至179)组成。SEQ ID NO:93中示出编码SEQ ID NO:92的氨基酸序列或SEQ ID NO:90的氨基酸153至179的示例性核酸序列。在

某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD28多肽,其包含或由SEQ ID NO:90的氨基酸114至220的氨基酸序列组成。SEQ ID NO:91中示出编码SEQ ID NO:92的氨基酸序列(或SEQ ID NO:90的氨基酸153至179)的示例性核苷酸序列。SEQ ID NO:90-93如下所示:

```
1   MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD
61  SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP
121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR
181 SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS [SEQ ID NO: 90]
```

[0245] ttttgggtgctggtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattatt ttctgggtg [SEQ ID NO: 91]

FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWV [SEQ ID NO: 92].

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATT TTCTGGGTG [SEQ ID NO: 93]

[0246] 在某些实施方式中,跨膜结构域包含小鼠CD28的跨膜结构域或其部分。在某些实施方式中,CD28多肽包含或由与NCBI参考号为NP_031668.3(SEQ ID NO:97)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%至少约99%或至少约100%同源性或同一性,和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,CD28多肽包含或由SEQ ID NO:97的连续部分的氨基酸序列组成,其长度至少约为20、或至少约为30、或至少约为40、或至少约为50、且最多为218个氨基酸。在某些实施方式中,CD28多肽包含或由SEQ ID NO:97的氨基酸1至218、1至50、50至100、100至150、114至220、150至200、151至177、或200至218的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD28多肽,其包含或由SEQ ID NO:97的氨基酸151至177组成。

[0247] SEQ ID NO:97如下所示:

[0248]
```
1  MTLRLLFLAL NFFSVQVTEN KILVKQSPLL VVDSNEVSLS CRYSYNLLAK EFRASLYKGV
61 NSDVEVCVGN GNFTYQPQFR SNAEFNCDGD FDNETVTFRL WNLHVNHTDI YFCKIEFMYP
121 PPYLDNERSN GTIIHIKEKH LCHTQSSPKL FWALVVVAGV LFCYGLLVTV ALCVIWTNSR
181 RNRLLQSDYM NMTPRRPGLT RKPYQPYAPA RDFAAYRP [SEQ ID NO: 97]
```

[0249] CD84

[0250] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD84多肽或其一部分的天然或修饰跨膜结构域。CD84多肽可具有与NCBI参考号为NP_001171808.1(SEQ ID No:1)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性,和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列。在某些实施方式中,CD84多肽包含或由SEQ ID NO:1的连续部分的氨基酸序列组成,其长度至少约为20、或至少约为30、或至少约为40、或至少约为50、且最多约为345个氨基酸。在某些实施方式中,CD84多肽包含或由SEQ ID NO:1的氨基酸1至345、1至50、50至100、100至150、150至200、226至250、250至300、或300至345的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含或由CD84多肽组成,该CD84多肽包含或由SEQ ID NO:1的氨基酸226至250组成。

[0251] 由SEQ ID NO:1如下所示:

[0252]
```
1 maqhhlwill lclqtwpeaa gkdseiftvn gilgesvtfp vniqeprqvk iiawtsktsv
61 ayvtpgdset apvvtvthrn yyerihalgp nynlvisdlr medagdykad intqadpytt
121 tkrynlqiyr rlgkpkitqs lmasvnstcn vtltcsveke eknvtynwsp lgeegnvlqi
181 fqtpedqelt ytctaqnpvs nnsdsisarq lcadiamgfr thhtgllsvl amffllvlil
241 ssvflfrlfk rrqgrifpeg sclntftknp yaaskktiyt yimasrntqp aesriydeil
301 qskvlpskee pvntvysevq fadkmgkast qdskppgtss yeivi [SEQ ID NO: 1]
```

[0253] 编码SEQ ID NO:1的氨基酸226至250的示例性核苷酸序列在下文提供的SEQ ID NO:2中示出。

[0254]
```
TTGCTGAGCGTGCTGGCTATGTTCTTTCTGCTTGTTCTCATTCTGTCTTCAGTGTTTTTGTTCCGTTTGTTC
AAG [SEQ ID NO: 2]
```

[0255] CD166

[0256] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD166多肽或其一部分的天然或修饰的跨膜结构域。CD166多肽可具有与NCBI参考号为NP_001618.2(SEQ ID NO:3)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列。在某些实施方式中,CD166多肽包含或由SEQ ID NO:3的连续部分的氨基酸序列组成,其长度至少约为20,或至少约为30,或至少约为40,或至少约为50,至少约为100,且最多约为583个氨基酸。在某些实施方式中,CD166多肽包含或由SEQ ID NO:3的氨基酸1至583、1至50、50至100、100至150、150至200、200至300、300至400、400至500、528至549、或500至583的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,包含在本公开的CAR的跨膜结构域中的CD166多肽包含或由SEQ ID NO:3的氨基酸528至553的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,包含在CAR的跨膜结构域中的CD166多肽包含或由SEQ ID NO:3的氨基酸528至549的氨基酸序列组成。

[0257] SEQ ID NO:3如下所示:

[0258]
```
1   MESKGASSCR LLFCLLISAT VFRPGLGWYT VNSAYGDTII IPCRLDVPQN LMFGKWKYEK
61  PDGSPVFIAF RSSTKKSVQY DDVPEYKDRL NLSENYTLSI SNARISDEKR FVCMLVTEDN
121 VFEAPTIVKV FKQPSKPEIV SKALFLETEQ LKKLGDCISE DSYPDGNITW YRNGKVLHPL
181 EGAVVIIFKK EMDPVTQLYT MTSTLEYKTT KADIQMPFTC SVTYYGPSGQ KTIHSEQAVF
241 DIYYPTEQVT IQVLPPKNAI KEGDNITLKC LGNGNPPPEE FLFYLPGQPE GIRSSNTYTL
301 TDVRRNATGD YKCSLIDKKS MIASTAITVH YLDLSLNPSG EVTRQIGDAL PVSCTISASR
361 NATVVWMKDN IRLRSSPSFS SLHYQDAGNY VCETALQEVE GLKKRESLTL IVEGKPQIKM
421 TKKTDPSGLS KTIICHVEGF PKPAIQWTIT GSGSVINQTE ESPYINGRYY SKIIISPEEN
481 VTLTCTAENQ LERTVNSLNV SAISIPEHDE ADEISDENRE KVNDQAKLIV GIVVGLLLAA
541 LVAGVVYWLY MKKSKTASKH VNKDLGNMEE NKKLEENNHK TEA [SEQ ID NO: 3]
```

[0259] 编码SEQ ID NO:3的氨基酸528至553的示例性核苷酸序列见下文提供的SEQ ID NO:4。

[0260]
```
CTAATTGTGGGAATCGTTGTTGGTCTCCTCCTTGCTGCCCTTGTTGCTGGTGTCGTCTACTGGCTGTACATG
AAGAAG [SEQ ID NO: 4]
```

[0261] CD8a

[0262] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包括CD8a多肽或其一部分的天然或修饰跨膜结构域。CD8a多肽可具有与由NCBI参考号NP_001139345.1(SEQ ID No:5)或其片段组成的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性,和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列。在某些实施方式中,CD8a多肽包含或由SEQ ID NO:5的连续部分的氨基酸序列组成,其长度至少约为20,或至少约为30,或至少约

为40,或至少约为50,且最多约为235个氨基酸。在某些实施方式中,所述CD8a多肽包含或由SEQ ID NO:5的氨基酸1至235、1至50、50至100、100至150、183至207、150至200、或200至235的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD8a多肽,所述CD8a多肽包含或由SEQ ID NO:5的氨基酸183至207组成。SEQ ID NO:5提供如下:

[0263]
```
1   MALPVTALLL PLALLLHAAR PSQFRVSPLD RTWNLGETVE LKCQVLLSNP TSGCSWLFQP
61  RGAAASPTFL LYLSQNKPKA AEGLDTQRFS GKRLGDTFVL TLSDFRRENE GYYFCSALSN
121 SIMYFSHFVP VFLPAKPTTT PAPRPPTPAP TIASQPLSLR PEACRPAAGG AVHTRGLDFA
181 CDIYIWAPLA GTCGVLLLSL VITLYCNHRN RRRVCKCPRP VVKSGDKPSL SARYV

[SEQ ID NO: 5]
```

[0264] 编码SEQ ID NO:5的氨基酸183至207的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:6中。

[0265] atctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttttactgcaac [SEQ ID NO: 6]

[0266] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD8b多肽或其一部分的天然或修饰的跨膜结构域。CD8b多肽可具有与NCBI参考号为NP_742099.1(SEQ ID No:7)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性,和/或可任选地包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列。在某些实施方式中,CD8b多肽包含或由SEQ ID NO:7的连续部分的氨基酸序列组成,该序列的长度至少约为20、或至少约为30、或至少约为40、或至少约为50且最多约为221个氨基酸。在某些实施方式中,CD8b多肽包含或由SEQ ID NO:7的氨基酸1至221、1至50、50至100、100至150、171至195、150至200、或200至221的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD8b多肽,其包含或由SEQ ID NO:7的氨基酸171至195组成。以下提供SEQ ID NO:7:

[0267]
```
1   MRPRLWLLLA AQLTVLHGNS VLQQTPAYIK VQTNKMVMLS CEAKISLSNM RIYWLRQRQA
61  PSSDSHHEFL ALWDSAKGTI HGEEVEQEKI AVFRDASRFI LNLTSVKPED SGIYFCMIVG
121 SPELTFGKGT QLSVVDFLPT TAQPTKKSTL KKRVCRLPRP ETQKGPLCSP ITLGLLVAGV
181 LVLLVSLGVA IHLCCRRRRA RLRFMKQLRL HPLEKCSRMD Y [SEQ ID NO: 7]
```

[0268] 编码SEQ ID NO:7的氨基酸171至195的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:8中。

[0269] ATCACCCTTGGCCTGCTGGTGGCTGGCGTCCTGGTTCTGCTGGTTTCCCTGGGAGTGGCCATCCACCTGTGCTGC [SEQ ID NO: 8]

[0270] ICOS

[0271] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含ICOS多肽或其一部分的天然或修饰跨膜结构域。ICOS多肽可具有与NCBI参考号为NP_036224.1(SEQ ID No:9)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性,和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列。在某些实施方式中,ICOS多肽包含或由作为SEQ ID NO:9的连续部分的氨基酸序列组成,该序列的长度至少约为20个、或至少约为30个、或至少约为40个、或至少约为50个、最多约为199个氨基酸。在某些实施方式中,ICOS多肽包含或由SEQ ID NO:9的氨基酸1至199、1至50、50至100、100至150、141至165、或150至199的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含ICOS多肽,其包含或由SEQ ID NO:9的氨基酸141至165组成。SEQ ID NO:9如下所示:

[0272]
```
1   MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGGQ
61  ILCDLTKTKG SGNTVSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD HSHANYYFCN LSIFDPPPFK
121 VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY
181 MFMRAVNTAK KSRLTDVTL [SEQ ID NO: 9]
```

[0273] 编码SEQ ID NO:9的氨基酸141至165的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:10中。

[0274]
```
TTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTT
ACA [SEQ ID NO: 10]
```

[0275] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CTLA-4多肽或其一部分的天然或修饰的跨膜结构域。CTLA-4多肽可具有与NCBI参考号为NP_005205.2(SEQ ID No:11)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性,和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列。在某些实施方式中,CTLA-4多肽包含或由作为SEQ ID NO:11的连续部分的氨基酸序列组成,其长度至少约为20、或至少约为30、或至少约为40、或至少约为50、且最多约为223个氨基酸。在某些实施方式中,CTLA-4多肽包含或由SEQ ID NO:11的氨基酸1至223、1至50、50至100、100至150、162至186、150至200、或200至223的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CTLA-4多肽,其包含或由SEQ ID NO:11的氨基酸162至186组成。SEQ ID NO:11如下所示:

[0276]
```
1   MACLGFQRHK AQLNLATRTW PCTLLFFLLF IPVFCKAMHV AQPAVVLASS RGIASFVCEY
61  ASPGKATEVR VTVLRQADSQ VTEVCAATYM MGNELTFLDD SICTGTSSGN QVNLTIQGLR
121 AMDTGLYICK VELMYPPPYY LGIGNGTQIY VIDPEPCPDS DFLLWILAAV SSGLFFYSFL
181 LTAVSLSKML KKRSPLTTGV YVKMPPTEPE CEKQFQPYFI PIN [SEQ ID NO: 11]
```

[0277] 编码SEQ ID NO:11的氨基酸162至186的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:12中。

[0278]
```
TTCCTCCTCTGGATCCTTGCAGCAGTTAGTTCGGGGTTGTTTTTTTATAGCTTTCTCCTCACAGCTGTTTCT
TTG [SEQ ID NO: 12]
```

[0279] ICAM-1

[0280] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含ICAM-1多肽或其一部分的天然或修饰的跨膜结构域。ICAM-1多肽可具有与NCBI参考号为NP_000192.2(SEQ ID NO:13)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性,和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列。在某些实施方式中,ICAM-1多肽包含或由作为SEQ ID NO:13的连续部分的氨基酸序列组成,其长度至少约为20个、或至少约为30个、或至少约为40个、或至少约为50个、且最多约为220个氨基酸。在某些实施方式中,ICAM-1多肽包含或由SEQ ID NO:13的氨基酸1至532、1至50、50至100、100至150、150至200、200至300、300至400、481至507、400至500、或500至532的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含ICAM-1多肽,该ICAM-1多肽包含或由SEQ ID NO:13的氨基酸481至507组成。SEQ ID NO:13如下所示:

[0281]
```
1   MAPSSPRPAL PALLVLLGAL FPGPGNAQTS VSPSKVILPR GGSVLVTCST SCDQPKLLGI
61  ETPLPKKELL LPGNNRKVYE LSNVQEDSQP MCYSNCPDGQ STAKTFLTVY WTPERVELAP
121 LPSWQPVGKN LTLRCQVEGG APRANLTVVL LRGEKELKRE PAVGEPAEVT TTVLVRRDHH
181 GANFSCRTEL DLRPQGLELF ENTSAPYQLQ TFVLPATPPQ LVSPRVLEVD TQGTVVCSLD
241 GLFPVSEAQV HLALGDQRLN PTVTYGNDSF SAKASVSVTA EDEGTQRLTC AVILGNQSQE
301 TLQTVTIYSF PAPNVILTKP EVSEGTEVTV KCEAHPRAKV TLNGVPAQPL GPRAQLLLKA
361 TPEDNGRSFS CSATLEVAGQ LIHKNQTREL RVLYGPRLDE RDCPGNWTWP ENSQQTPMCQ
421 AWGNPLPELK CLKDGTFPLP IGESVTVTRD LEGTYLCRAR STQGEVTRKV TVNVLSPRYE
481 IVIITVVAAA VIMGTAGLST YLYNRQRKIK KYRLQQAQKG TPMKPNTQAT PP [SEQ ID
NO: 13]
```

[0282] 编码SEQ ID NO:13的氨基酸481至507的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:14中。

[0283]
```
ATTGTCATCATCACTGTGGTAGCAGCCGCAGTCATAATGGGCACTGCAGGCCTCAGCACGTACCTCTATAAC
CGCCAGCGG [SEQ ID NO: 14]
```

[0284] 5.2.2.3.CAR的铰链/间隔区

[0285] 在某些实施方式中,CAR包含将胞外抗原结合结构域连接到跨膜结构域的铰链/间隔区。铰链/间隔区可以足够灵活,以允许抗原结合域在不同方向上定向以促进抗原识别。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区可包含CD8多肽、CD28多肽、CD3ζ多肽、CD40多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、CD84多肽、CD166多肽、CD8a多肽、CD8b多肽、ICOS多肽、ICAM-1多肽、CTLA-4多肽、CD27多肽、CD40/My88肽、NKGD2肽、合成多肽(不基于与免疫应答相关的蛋白质)或其组合的天然或修饰铰链区。铰链/间隔区可以是来自IgG1的铰链区、或者免疫球蛋白的CH_2CH_3区和CD3的部分、CD28多肽的部分(例如,SEQ ID NO:90的一部分)、CD8多肽的一部分(例如,SEQ ID NO:86的一部分或SEQ ID NO:87的一部分)、与上述任何一种具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、或至少约100%同源性或同一性的变体,或合成间隔序列。

[0286] CD28

[0287] 在某些实施方式中,如本文所述,CAR的铰链/间隔区包含CD28多肽或其一部分的天然或修饰铰链区。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含CD28多肽,其包含或由SEQ ID NO:15所示氨基酸序列(或SEQ ID NO:90中的氨基酸114至152)组成。下文提供SEQ ID NO:15。

[0288] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP [SEQ ID NO: 15]

[0289] 编码SEQ ID NO:15(或SEQ ID NO:90的氨基酸114至152)的氨基酸序列的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:54中。

[0290]
```
attgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaaggg
aaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccc [SEQ ID NO: 54]
```

[0291] CD84

[0292] 在某些实施方式中,如本文所述,CAR的铰链/间隔区包含CD84多肽或其一部分的天然或修饰铰链区。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含CD84多肽,所述多肽包含或由SEQ ID NO:1的氨基酸187至225组成。编码SEQ ID NO:1的氨基酸187至225的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:16中。

[0293]
```
CAAGAGCTGACTTACACGTGTACAGCCCAGAACCCTGTCAGCAACAATTCTGACTCCATCTCTGCCCGGCAG
CTCTGTGCAGACATCGCAATGGGCTTCCGTACTCACCACACCGGG [SEQ ID NO: 16]
```

[0294] CD166

[0295] 在某些实施方式中,如本文所述,CAR的铰链/间隔区包含CD166多肽或其一部分的天然或修饰铰链区。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含CD166多肽,该多肽包含或由SEQ ID NO:3的氨基酸489至527组成。编码SEQ ID NO:3的氨基酸489至527的示例性核酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:17中。

[0296] ACCAACTGGAGAGAACAGTAAACTCCTTGAATGTCTCTGCTATAAGTATTCCAGAACACGATGAGGCAGACG AGATAAGTGATGAAAACAGAGAAAAGGTGAATGACCAGGCAAAA [SEQ ID NO: 17]

[0297] 在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含CD166多肽,所述多肽包含或由SEQ ID NO:3的氨基酸484至527组成。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包括CD166多肽,其包含或由SEQ ID NO:3的氨基酸506至527组成。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包括CD166多肽,该多肽包含或由SEQ ID NO:3的氨基酸517至527组成。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区域包括CD166多肽,所述多肽包含或由SEQ ID NO:109或SEQ ID NO:110所示氨基酸序列组成。SEQ ID NO:109和110如下所示。

[0298] NQLERTVNSLNVPAISIPEHDEADEISDENREKVNDQAK [SEQ ID NO: 109]
AAANQLERTVNSLNVSAISIPEHDEADEISDENREKVNDQAK [SEQ ID NO: 110]

[0299] 在某些实施方式中,包含在CAR的铰链/间隔区和跨膜结构域中的CD166多肽包含或由SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:116或SEQ ID NO:117所示氨基酸序列组成。SEQ ID NO:111-117如下所示。

[0300] PEHDEADEISDENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWLYMKK [SEQ ID NO: 111]
ENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWLYMKK [SEQ ID NO: 112]
NQLERTVNSLNVPAISIPEHDEADEISDENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWLYMKK [SEQ ID NO: 113]
TCTAENQLERTVNSLNVSAISIPEHDEADEISDENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWL [SEQ ID NO: 114]
PEHDEADEISDENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWL [SEQ ID NO: 115]
NQLERTVNSLNVSAISIPEHDEADEISDENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWL [SEQ ID NO: 116]
AAANQLERTVNSLNVSAISIPEHDEADEISDENREKVNDQAKLIVGIVVGLLLAALVAGVVYWLYMKK [SEQ ID NO: 117]

[0301] CD8a

[0302] 在某些实施方式中,如本文所述,CAR的铰链/间隔区包含CD8a多肽或其一部分的天然或修饰铰链区。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含CD8a多肽,其包含或由SEQ ID NO:5的氨基酸137至182组成。编码SEQ ID NO:5的氨基酸137至182的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:18中。

[0303] cccaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgc ccagaggcgtgccggccagcggcgggggcgcagtgcacacgaggggctggacttcgcctgtgat [SEQ ID NO: 18]

[0304] CD8b

[0305] 在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含如本文所述的CD8b多肽的天然或修饰铰链区。在某些实施方式中,包含在CAR的铰链/间隔区中的CD8b多肽包含或由SEQ ID NO:7的氨基酸132至170组成。编码SEQ ID NO:7的氨基酸132至170的示例性核苷酸序列列于下

文提供的SEQ ID NO:19中。

[0306] CTGAGTGTGGTTGATTTCCTTCCCACCACTGCCCAGCCCACCAAGAAGTCCACCCTCAAGAAGAGAGTGTGC CGGTTACCCAGGCCAGAGACCCAGAAGGGCCCACTTTGTAGCCCC [SEQ ID NO: 19]

[0307] ICOS

[0308] 在某些实施方式中,如本文所述,CAR的铰链/间隔区包含ICOS多肽或其部分的天然或修饰铰链区。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含ICOS多肽,该多肽包含或由SEQ ID NO:9的氨基酸102至140组成。编码SEQ ID NO:9的氨基酸102至140的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:20中。

[0309] tctcatgccaactattacttctgcaacctatcaatttttgatcctcctcctttaaagtaactcttacagga ggatatttgcatatttatgaatcacaactttgttgccagctgaag [SEQ ID NO: 20]

[0310] CTLA-4

[0311] 在某些实施方式中,如本文所述,CAR的铰链/间隔区包含CTLA-4多肽或其一部分的天然或修饰铰链区。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含CTLA-4多肽,该多肽包含或由SEQ ID NO:11的氨基酸123至161组成。编码SEQ ID NO:11的氨基酸123至161的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:21中。

[0312] GACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTGGAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGA ACCCAGATTTATGTAATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGAC [SEQ ID NO: 21]

[0313] ICAM-1

[0314] 在某些实施方式中,如本文所述,CAR的铰链/间隔区包含ICAM-1多肽或其一部分的天然或修饰铰链区。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含ICAM-1多肽,所述多肽包含或由SEQ ID NO:13的氨基酸442至480组成。编码SEQ ID NO:13的氨基酸442至480的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:22中。

[0315] GGGGAATCAGTGACTGTCACTCGAGATCTTGAGGGCACCTACCTCTGTCGGGCCAGGAGCACTCAAGGGGAG GTCACCCGCAAGGTGACCGTGAATGTGCTCTCCCCCCGGTATGAG [SEQ ID NO: 22]

[0316] 在某些实施方式中,靶向间皮素的CAR包括铰链/间隔区。在某些实施方式中,铰链/间隔区位于胞外抗原结合结构域和跨膜结构域之间。在某些实施方式中,铰链/间隔区包含CD8多肽、CD28多肽、CD3ζ多肽、CD4多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、CD166多肽、CD8a多肽、CD8b多肽、ICOS多肽、ICAM-1多肽、CTLA-4多肽、CD27多肽、CD40/My88肽、NKGD2肽、合成多肽(不基于与免疫反应相关的蛋白质)、或其组合。在某些实施方式中,跨膜结构域包含CD8多肽、CD28多肽、CD3ζ多肽、CD4多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、CD166多肽、CD8a多肽、CD8b多肽、ICOS多肽、ICAM-1多肽、CTLA-4多肽、CD27多肽、CD40/My88肽、NKGD2肽、合成多肽(不基于与免疫应答相关的蛋白质)、或其组合。

[0317] 在某些实施方式中,跨膜结构域和铰链/间隔区源自同一分子。在某些实施方式中,跨膜结构域和铰链/间隔区源自不同的分子。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含CD28多肽且CAR的跨膜结构域包含CD28多肽。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含CD28多肽且CAR的跨膜结构域包含CD28多肽。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含CD84多肽且CAR的跨膜结构域包含CD84多肽。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含CD166多肽且CAR的跨膜结构域包含CD166多肽。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含CD8a多肽且CAR的跨膜结构域包含CD8a多肽。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含

CD8b多肽且CAR的跨膜结构域包含CD8b多肽。在某些实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含CD28多肽且CAR的跨膜结构域包含ICOS多肽。

[0318] 5.2.2.4.CAR的胞内信号传导结构域

[0319] A.CD3ζ

[0320] 在某些实施方式中,CAR包含胞内信号传导结构域。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含CD3ζ多肽,其可激活或刺激细胞(例如淋巴系细胞,如T细胞)。野生型("天然")CD3ζ包含三个基于免疫受体酪氨酸的激活基序("ITAM")(例如ITAM1、ITAM2和ITAM3)、三个富碱性的伸展(BRS)区(BRS1、BRS2和BRS3),并在抗原结合后将激活信号传递给细胞(例如淋巴系细胞,例如T细胞)。天然CD3ζ链的胞内信号传导结构域是内源性TCR信号的主要递质。

[0321] 在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含天然CD3ζ多肽。在某些实施方式中,天然CD3ζ多肽包含或由与NCBI参考号为NP_932170(SEQ ID No:94)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,天然CD3ζ多肽包含或由作为SEQ ID NO:94的连续部分的氨基酸序列组成,其长度至少约为20、或至少约为30、或至少约为40、或至少约为50、或至少约为100、或至少约为110,且最多约为164个氨基酸。在某些实施方式中,天然CD3ζ多肽包含或由SEQ ID NO:94的氨基酸1至50、50至100、100至150、50至164、55至164、或150至164的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,天然CD3ζ多肽包含或由SEQ ID NO:94的氨基酸52至164的氨基酸序列组成。

[0322] 以下提供SEQ ID NO:94:

1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD

[0323] 61 APAYQQGQNQ LYNELNLGRR EEYDVLDKRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGL YNELQKDKMA

121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [SEQ ID NO: 94]

[0324] 在某些实施方式中,CD3ζ多肽包含或由与SEQ ID NO:95所示氨基酸序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%、至少约100%同源性或同一性,和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列组成。SEQ ID NO:95如下所示:

RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPR RKNPQEGLYN

[0325] ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDT YDALHMQALP PR [SEQ ID NO: 95]

[0326] 编码SEQ ID NO:95的氨基酸序列的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:96中。

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC

AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAG

[0327] CCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT

GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCC

ACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [SEQ ID NO: 96]

[0328] 在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的人CD3ζ多肽。在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含或由与SEQ ID NO:35所示氨基酸序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至

少约90％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、或至少约99％、至少约100％同源性或同一性，和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列组成。以下提供SEQ ID NO:35：

RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPR RKNPQEGLFN

[0329] ELQKDKMAEA FSEIGMKGER RRGKGHDGLF QGLSTATKDT FDALHMQALP PR [SEQ ID NO: 35]

[0330] 编码SEQ ID NO:35的氨基酸序列的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:55中。

[0331] agagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctc aatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaag ccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtTcaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctTcagt gagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttTccaggggctcagtacagcc accaaggacacctTcgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc [SEQ ID NO: 55]

[0332] 在某些实施方式中，修饰的CD3ζ多肽包含一个、两个或三个ITAM变体。在某些实施方式中，修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM1。在某些实施方式中，天然ITAM1包含或由SEQ ID NO:23所示氨基酸序列组成。

[0333] QNQLYNELNLGRREEYDVLDKR [SEQ ID NO: 23]

[0334] 编码SEQ ID NO:23的氨基酸序列的示例性核酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:24中。

[0335] cagaaccagctctataacgagctcaatctagga cgaagagaggagtacgatgttttggacaagaga [SEQ ID NO: 24]

[0336] 在某些实施方式中，修饰的CD3ζ多肽包含ITAM1变体，所述ITAM1变体包含一个或多个功能丧失突变。在某些实施方式中，ITAM1变体包含或由两个功能丧失突变组成。在某些实施方式中，一个或多个(例如，两个)功能丧失突变中的每一个包含或由ITAM1中酪氨酸残基的突变组成。在某些实施方式中，ITAM1变体(例如，由两个功能丧失突变组成的变体)包含或由下文提供的SEQ ID NO:25所示氨基酸序列组成。

[0337] QNQLFNELNLGRREEFDVLDKR [SEQ ID NO: 25]

[0338] 编码SEQ ID NO:25的氨基酸序列的示例性核酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:26中。

[0339] cagaaccagctctTtaacgagctcaatctagga cgaagagaggagtTcgatgttttggacaagaga [SEQ ID NO: 26]

[0340] 在某些实施方式中，修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM2。在某些实施方式中，天然ITAM2包含或由下文提供的SEQ ID NO:27所示氨基酸序列组成。

[0341] QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK [SEQ ID NO: 27]

[0342] 编码SEQ ID NO:27的氨基酸序列的示例性核酸序列在SEQ ID NO:28中示出，如下所示。

[0343] caggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaa [SEQ ID NO: 28]

[0344] 在某些实施方式中，修饰的CD3ζ多肽包含ITAM2变体，所述ITAM2变体包含一个或

多个功能丧失突变。在某些实施方式中,ITAM2变体包含或由两个功能丧失突变组成。在某些实施方式中,一个或多个(例如,两个)功能丧失突变中的每一个包含或由ITAM2中酪氨酸残基的突变组成。在某些实施方式中,ITAM2变体(例如,由两个功能丧失突变组成的变体)包含或由下文提供的SEQ ID NO:29所示氨基酸序列组成。

[0345] QEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMK [SEQ ID NO: 29]

[0346] 编码SEQ ID NO:29的氨基酸序列的示例性核酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:30中。

[0347] caggaaggcctgtTcaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctTcagtgagattgggatgaaa [SEQ ID NO: 30]

[0348] 在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM3。在某些实施方式中,天然ITAM3包含或由下文提供的SEQ ID NO:31所示氨基酸序列组成。

[0349] HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ [SEQ ID NO: 31]

[0350] 编码SEQ ID NO:31的氨基酸序列的示例性核酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:32中。

[0351] cacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcag [SEQ ID NO: 32]

[0352] 在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含ITAM3变体,所述ITAM3变体包含一个或多个功能丧失突变。在某些实施方式中,ITAM3变体包含或由两个功能丧失突变组成。在某些实施方式中,一个或多个(例如,两个)功能丧失突变中的每一个包括或由ITAM3中酪氨酸残基的突变组成。在某些实施方式中,ITAM3变体(例如,由两个功能丧失突变组成的变体)包含或由下文提供的SEQ ID NO:33所示氨基酸序列组成。

[0353] HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQ [SEQ ID NO: 33]

[0354] 编码SEQ ID NO:33氨基酸序列的示例性核酸序列在SEQ ID NO:34中示出,如下所示。

[0355] cacgatggcctttTccaggggctcagtacagccaccaaggacacctTcgacgcccttcacatgcag [SEQ ID NO: 34]

[0356] 在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,该修饰的CD3ζ多肽包含有:包含或由一个或多个功能丧失突变组成的ITAM1变体、包含或由一个或多个功能丧失突变组成的ITAM2变体、和/或包含或由一个或多个功能丧失突变组成的ITAM3变体、或其组合。

[0357] 在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,该修饰的CD3ζ多肽包含有:包含或由一个或多个(例如,两个)功能丧失突变组成的ITAM2变体,和包含或由一个或多个(例如,两个)功能丧失突变组成的ITAM3变体。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,所述CD3ζ多肽包含有天然ITAM1、包含或由两个功能丧失突变组成的ITAM2变体和包含或由两个功能丧失突变组成的ITAM3变体。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,所述CD3ζ多肽包含:由SEQ ID NO:23所示氨基酸序列组成的天然ITAM1、由SEQ ID NO:29所示氨基酸序列组成的ITAM2变体,以及由SEQ ID NO:33所示氨基酸序列组成的ITAM3变体(例如,被指定为“1XX”的构建体)。在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含或由SEQ ID NO:35所示氨基酸序列组成。

[0358] 在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,该修饰的CD3ζ多肽包含有:包含或由一个或多个(例如,两个)功能丧失突变组成的ITAM1变体,以及包含或由一个或多个(例如,两个)功能丧失突变组成的ITAM3变体。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,该修饰的CD3ζ多肽包含有:包含或由两个功能丧失突变组成的ITAM1变体、天然ITAM2和包含或由两个功能丧失突变组成的ITAM3变体。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,该修饰的CD3ζ多肽包含有:由SEQ ID NO:25所示氨基酸序列组成的ITAM1变体、由SEQ ID NO:27所示氨基酸序列组成的天然ITAM2、以及由SEQ ID NO:33所示氨基酸序列组成的ITAM3变体(例如,被指定为"X2X"的构建体)。

[0359] 在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,所述修饰的CD3ζ多肽包含有:包含或由一个或多个(例如,两个)功能丧失突变组成的ITAM1变体和包含或由一个或多个(例如,两个)功能丧失突变组成的ITAM2变体。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,该修饰的CD3ζ多肽包含或由包含两个功能丧失突变的ITAM1变体、包含或由两个功能丧失突变组成的ITAM2变体和天然ITAM3组成。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,该修饰的CD3ζ多肽包含由SEQ ID NO:25所示氨基酸序列组成的ITAM1变体、由SEQ ID NO:29所示氨基酸序列组成的ITAM2变体、以及由SEQ ID NO:31所示氨基酸序列组成的天然ITAM3(例如,被指定为"XX3"的构建体)。

[0360] 在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,所述修饰的CD3ζ多肽包含含有一个或多个(例如,两个)功能丧失突变的ITAM1变体。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,所述修饰的CD3ζ多肽包含有:包含或由两个功能丧失突变组成的ITAM1变体、天然ITAM2、和天然ITAM3。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,所述修饰的CD3ζ多肽包含由SEQ ID NO:25所示氨基酸序列组成的ITAM1变体、由SEQ ID NO:27所示氨基酸序列组成的天然ITAM2和由SEQ ID NO:31所示氨基酸序列组成的天然ITAM3(例如,指定为"X23"的构建体)。

[0361] 在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,该修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM1、天然ITAM2和包含一个或多个(例如,两个)功能丧失突变的ITAM3变体。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,该修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM1、天然ITAM2和包含或由两个功能丧失突变组成的ITAM1变体。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,所述修饰的CD3ζ多肽包含由SEQ ID NO:23所示氨基酸序列组成的天然ITAM1、由SEQ ID NO:27所示氨基酸序列组成的天然ITAM2、由SEQ ID NO:33中规定的氨基酸序列组成的ITAM3变体(例如,指定为"12X"的构建体)。

[0362] 在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,所述修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM1、包含一个或多个(例如,两个)功能丧失突变的ITAM2变体和天然ITAM3。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,所述修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM1、包含或由两个功能丧失突变组成的ITAM2变体和天然ITAM3。在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,所述修饰的CD3ζ多肽包含由SEQ ID NO:23所示氨基酸序列组成的天然ITAM1,由SEQ ID NO:29所示氨基酸序列组成

的ITAM2变体,由SEQ ID NO:31所示氨基酸序列组成的天然ITAM3变体(例如,指定为“1X3”的构建体)。

[0363] 在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含修饰的CD3ζ多肽,所述修饰的CD3ζ多肽包含一个或两个ITAM的缺失。在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含或由ITAM1和ITAM2的缺失组成,例如,修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM3或ITAM3变体,且不包含ITAM1或ITAM2。在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含由SEQ ID NO:31所示氨基酸序列组成的天然ITAM3,且不包含ITAM1(天然或修饰的)或ITAM2(天然或修饰的)(例如,指定为“D12”的构建体)。

[0364] 在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含或由ITAM2和ITAM3的缺失组成,例如,修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM1或ITAM1变体,且不包含ITAM2或ITAM3。在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含由SEQ ID NO:23所示氨基酸序列组成的天然ITAM1,且不包含ITAM2(天然或修饰的)或ITAM3(天然或修饰的)(例如,指定为“D23”的构建体)。

[0365] 在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含或由ITAM1和ITAM3的缺失组成,例如,修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM2或ITAM2变体,且不包含ITAM1或ITAM3。在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含由SEQ ID NO:27所示氨基酸序列组成的天然ITAM2,且不包含ITAM1(天然或修饰的)或ITAM3(天然或修饰的)(例如,指定为“D13”的构建体)。

[0366] 在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含或由ITAM1的缺失组成,例如,修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM2或ITAM2变体,以及天然ITAM3或ITAM3变体,且不包含ITAM1(天然或修饰的)。

[0367] 在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含或由ITAM2缺失组成,例如,修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM1或ITAM1变体,以及天然ITAM3或ITAM3变体,且不包含ITAM2(天然或修饰的)。

[0368] 在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽包含或由ITAM3的缺失组成,例如,修饰的CD3ζ多肽包含天然ITAM1或ITAM1变体,以及天然ITAM2或ITAM2变体,且不包含ITAM3(天然或修饰的)。

[0369] B.共刺激信号传导区

[0370] 在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域还包括至少一个共刺激信号传导区。在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含可提供最佳淋巴细胞活化的共刺激分子的至少一部分。

[0371] 如本文所用,“共刺激分子”指淋巴细胞对抗原的有效反应所需的除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。共刺激分子的非限制性示例包括CD28、4-1BB、OX40、ICOS、DAP-10、CD27、CD40和NKGD2。共刺激分子可与共刺激配体结合,所述配体是在细胞表面表达的蛋白质,其在与受体结合时产生共刺激反应,即当抗原结合到其CAR分子时影响所提供刺激的细胞内反应。共刺激配体包括但不限于CD80、CD86、CD70、OX40L和4-1BBL。作为一个示例,4-1BB配体(即,4-1BBL)可结合到4-1BB(也称为“CD137”)以提供胞内信号,所述信号与CAR信号结合诱导CAR^{+}T细胞的效应细胞功能。U.S.7,446,190中公开了包含含有共刺激信号传导区(包括4-1BB、ICOS或DAP-10)的胞内信号传导结构域的CAR,其通过引用整体并入本文。

[0372] 在某些实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区,所述共刺激信号传导区包含CD28多肽(例如CD28的胞内结构域或其一部分)。在某些实施方式中,共

刺激信号传导区包含人CD28的胞内结构域或其一部分。在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含CD28多肽,其包含或由SEQ ID NO:90的氨基酸180至220组成。

[0373] 在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含CD28多肽,其包含或由SEQ ID NO:101(或SEQ ID NO:90的氨基酸180至220)所示氨基酸序列组成。下面提供SEQ ID NO:101。

[0374] RSKRSRLLHS DYMNMTPRRP GPTRKHYQPY APPRDFAAYR S [SEQ ID NO: 101]

[0375] 编码SEQ ID NO:101(或SEQ ID NO:90的氨基酸180至220的氨基酸序列)的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:102中。

[0376] AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCC ACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC [SEQ ID NO: 102]

[0377] 在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含CD28多肽,其包含或由SEQ ID NO:108(或SEQ ID NO:90的氨基酸180至219)所示氨基酸序列组成。下文提供SEQ ID NO:108。

[0378] RSKRSRLLHS DYMNMTPRRP GPTRKHYQPY APPRDFAAYR K [SEQ ID NO: 108]

[0379] 在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含小鼠CD28的胞内结构域或其一部分。在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含或由SEQ ID NO:97的氨基酸178至218组成。

[0380] 编码SEQ ID NO:97的氨基酸178至218的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:98中。

[0381] aat agtagaagga acagactcct tcaaagtgac tacatgaaca tgactccccg gaggcctggg ctcactcgaa agccttacca gccctacgcc cctgccagag actttgcagc gtaccgcccc [SEQ ID NO: 98]

[0382] 在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含或由CD28多肽组成,所述CD28多肽包含或由SEQ ID NO:99所示氨基酸序列组成。以下提供SEQ ID NO:99:

[0383] NSRRNRLLQS DYMNMTPRRP GLTRKPYQPY APARDFAAYR P [SEQ ID NO: 99]。

[0384] 编码SEQ ID NO:99的氨基酸序列的示例性核酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:100中。

[0385] AATAGTAGAAGGAACAGACTCCTTCAAAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGGAGGCCTGGGCTCACTCGA AAGCCTTACCAGCCCTACGCCCCTGCCAGAGACTTTGCAGCGTACCGCCCC [SEQ ID NO: 100]

[0386] 在某些实施方式中,共刺激信号传导区包括第一共刺激分子的一部分和第二共刺激分子的一部分,例如,CD28的胞内结构域和4-1BB的胞内结构域或CD28的胞内结构域和OX40的胞内结构域。

[0387] 在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含4-1BB多肽(例如,4-1BB的胞内结构域或其一部分)。在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含人4-1BB的胞内结构域或其一部分。4-1BB可作为肿瘤坏死因子(TNF)配体并具有刺激活性。在某些实施方式中,4-1BB多肽包含或由与NCBI参考号为NP_001552.2(SEQ ID NO:103)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同源性或同一性,和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,4-1BB多肽包含或由作为SEQ ID NO:103的连续部分的氨基酸序列组成,其长度至少约为20、至少约为25、或至少约为30、或至少约为40、或至少约为50、且最多约为255个氨基酸。在某些实施方式中,4-1BB多肽包含或由

SEQ ID NO:103的氨基酸1至255、1至50、50至100、100至150、150至200、214至255、或200至255的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含4-1BB多肽,该多肽包含或由SEQ ID NO:104(或SEQ ID NO:103的氨基酸214至255)组成。SEQ ID NO:103和104如下所示:

[0388]
```
1   MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
61  TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC
121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE
181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG
241 CSCRFPEEEE GGCEL [SEQ ID NO: 103]

KRGRKKLLYI FKQPFMRPVQ TTQEEDGCSC RFPEEEEGGC EL [SEQ ID NO: 104]。
```

[0389] 编码SEQ ID NO:104的氨基酸序列(或SEQ ID NO:103的氨基酸214至255)的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:105中。

[0390]
```
AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCA
AGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG [SEQ ID
NO: 105]
```

[0391] 在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含OX40多肽(例如,OX40的胞内结构域或其一部分)。在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含人OX40的胞内结构域或其一部分。在某些实施方式中,OX40多肽包含或由与NCBI参考号为NP_003318.1(SEQ ID No:106)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同源性或同一性,和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,OX40多肽包含或由作为SEQ ID NO:106的连续部分的氨基酸序列组成,其长度至少约为20、至少约为25、或至少约为30、或至少约为40、或至少约为50、且最多约为277个氨基酸。在某些实施方式中,OX40多肽包含或由SEQ ID NO:106的氨基酸1至277、1至50、50至100、100至150、150至200、或200至277的氨基酸序列组成。下文提供SEQ ID NO:106。

[0392]
```
1   MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ
61  NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK
121 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ
181 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL
241 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI [SEQ ID NO: 106]
```

[0393] 在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含ICOS多肽(例如,ICOS的胞内结构域或其一部分)。在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含人ICO的胞内结构域或其一部分。在某些实施方式中,ICOS多肽包含或由与NCBI参考号为NP_036224(SEQ ID NO:65)的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同源性或同一性,和/或可任选包含最多一个或最多两个或最多三个保守氨基酸替换的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,ICOS多肽包含或由作为SEQ ID NO:65的连续部分的氨基酸序列组成,其长度至少约为20、至少约为25、或至少约为30、或至少约为40、或至少约为50、且最多约为199个氨基酸。在某些实施方式中,ICOS多肽包含或由SEQ ID NO:65的氨基酸1至199、1至50、50至100、100至150、或150至199的氨基酸序列组成。下文提供SEQ ID NO:65。

[0394]
```
1   MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGGQ
61  ILCDLTKTKG SGNTVSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD HSHANYYFCN LSIFDPPPFK
121 VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY
181 MFMRAVNTAK KSRLTDVTL [SEQ ID NO: 65]
```

[0395] 在某些实施方式中,本发明公开的靶向间皮素的CAR进一步包含用于在人细胞中表达核酸序列的诱导型启动子。用于表达CAR基因的启动子可以是组成型启动子,例如泛素C(UbiC)启动子。

[0396] 在某些实施方式中,突变位点和/或来自不同蛋白质的CAR结构域/基序/区域被去免疫。使用NetMHC 4.0服务器可以预测不同CAR部分之间连接的免疫原性。对于每个含有来自下一部分的至少一个氨基酸的肽,可以预测所有等位基因与HLA A、B和C的结合亲和力。每种肽的免疫原性得分可分配给每种肽。免疫原性得分可使用公式计算:免疫原性得分=$[(50\text{-结合亲和力})*\text{HLA频率}]_n$。n是每个肽的预测数。

[0397] 5.2.2.5.示例性CAR

[0398] 在某些实施方式中,靶向间皮素的CAR包括:

[0399] (a)胞外抗原结合结构域,其包含V_H和V_L,所述V_H包含由SEQ ID NO:76所示氨基酸序列组成的CDR1、由SEQ ID NO:77所示氨基酸序列组成的CDR2、和由SEQ ID NO:78所示氨基酸序列组成的CDR3;所述V_L包含由SEQ ID NO:79所示氨基酸序列组成的CDR1、由SEQ ID NO:80所示氨基酸序列组成的CDR2和由SEQ ID NO:81所示氨基酸序列组成的CDR3;

[0400] (b)包含CD28多肽(例如人CD28或其一部分的跨膜结构域)的跨膜结构域;

[0401] (c)CD28铰链/间隔区(例如,人CD28或其一部分的铰链/间隔区);和

[0402] (d)胞内信号传导结构域,其包含(i)修饰的CD3ζ多肽(例如,修饰的人CD3ζ多肽),其包含天然ITAM1、由两个功能丧失突变组成的ITAM2变体、和由两个功能丧失突变组成的ITAM3变体、以及(ii)包含CD28多肽(例如,人CD28多肽,例如,人CD28或其一部分的胞内结构域)的共刺激信号传导区。

[0403] 在某些实施方式中,跨膜结构域包含CD28多肽,其由SEQ ID NO:92所示氨基酸序列(或SEQ ID NO:90中的氨基酸153至179)组成。

[0404] 在某些实施方式中,CD28铰链/间隔区由SEQ ID NO:15所示氨基酸序列(或SEQ ID NO:90的氨基酸114至152)组成。

[0405] 在某些实施方式中,修饰的CD3ζ多肽由SEQ ID NO:35所示氨基酸序列组成。

[0406] 在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含CD28多肽,其由SEQ ID NO:101所示氨基酸序列(或SEQ ID NO:90的氨基酸180至220)组成。

[0407] 在某些实施方式中,CAR包含与SEQ ID NO:56所示氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%、至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR包含SEQ ID NO:56所示氨基酸序列。下文提供SEQ ID NO:56。

[0408]
```
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTIS
VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGKNGAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSRHQMTQSPSS
LSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWV
LVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGE
RRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR [SEQ ID NO: 56]
```

[0409] 编码SEQ ID NO:56的氨基酸序列的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:57中。

[0410]
CAGGTTCAGCTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGCACAGTT
TCTGGAGGCAGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCCTGGATTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTGGAG
TGGATTGGGTACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAACTATCAGT
GTGGACACAAGCAAGAATCAGTTTTCACTCAAACTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTGCTGTTTATTAT
TGTGCCAGGGAGGGGAAAAATGGGGCATTTGATATTTGGGGTCAGGGCACAATGGTGACAGTCAGCTCTGGA
GGTGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCACGCCATCAGATGACTCAGTCCCCCTCCAGT
CTTTCTGCCTCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAGAGCAAGTCAGAGCATATCATCCTATCTGAAC
TGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAATTGCTGATTTATGCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTG
CCAAGCAGGTTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTCACATTGACAATCAGCTCCCTCCAACCTGAAGAT
TTTGCCACCTACTATTGCCAGCAATCCTACAGCACGCCCCTGACTTTTGGAGGTGGCACAAAGGTAGAGATC
AAGAGGACTGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACC
ATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTG
CTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGC
AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC
GCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAG
TACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAG
GAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGGGGCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCC
CTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [SEQ ID NO: 57]

[0411] 在某些实施方式中,CAR还包括CD8前导。在某些实施方式中,CD8前导包含或由SEQ ID NO:71所示氨基酸序列组成。

[0412] 编码SEQ ID NO:71的氨基酸序列的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:120中。

[0413] ATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCCT [SEQ ID NO: 120]

[0414] 在某些实施方式中,CAR包含与SEQ ID NO:43所示氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列,提供于下文。在某些实施方式中,CAR包含或由SEQ ID NO:43所示氨基酸序列组成。SEQ ID NO:43包括由SEQ ID NO:71所示氨基酸序列组成的CD8前导。以下提供SEQ ID NO:43:

[0415]
MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWI
RQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
EGKNGAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSRHQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA
SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT
YYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLF
PGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY
QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG
GKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHM
QALPPR [SEQ ID NO: 43]

[0416] 编码SEQ ID NO:43的氨基酸序列的示例性核苷酸序列列于下文提供的SEQ ID NO:44中。

[0417]
ATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTCAGGT
TCAGCTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGCACAGTTT
CTGGAGGCAGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCCTGGATTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTG
GAGTGGATTGGGTACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAAC
TATCAGTGTGGACACAAGCAAGAATCAGTTTTCACTCAAACTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTG
CTGTTTATTATTGTGCCAGGGAGGGGAAAAATGGGGCATTTGATATTTGGGGTCAGGGCACAATGGTG
ACAGTCAGCTCTGGAGGTGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCACGCCATCAGAT
GACTCAGTCCCCCTCCAGTCTTTCTGCCTCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAGAGCAAGTC
AGAGCATATCATCCTATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAATTGCTGATTTAT
GCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTGCCAAGCAGGTTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTCAC
ATTGACAATCAGCTCCCTCCAACCTGAAGATTTTGCCACCTACTATTGCCAGCAATCCTACAGCACGC
CCCTGACTTTTGGAGGTGGCACAAAGGTAGAGATCAAGAGGACTGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTAT
CCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTG

TCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGG
CTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTC
CTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTA
TGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG
CGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT
TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGG
CCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC
GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGGGGCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGAC
GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [SEQ ID NO: 44]

[0418] 5.2.3.示例性多肽组合物

[0419] 在某些实施方式中,多肽组合物包含有:包含或由SEQ ID NO:56所示氨基酸序列组成的靶向间皮素的CAR,以及包含或由SEQ ID NO:48中的氨基酸21至165组成的PD-1 DN。

[0420] 在某些实施方式中,多肽组合物包含有:包含或由SEQ ID NO:56所示氨基酸序列组成的靶向间皮素的CAR,以及包含或由SEQ ID NO:48中的氨基酸1至165组成的PD-1 DN。

[0421] 在某些实施方式中,多肽组合物包含有:包含或由SEQ ID NO:56所示氨基酸序列组成的靶向间皮素的CAR,以及包含或由SEQ ID NO:49所示氨基酸序列组成的PD-1 DN。

[0422] 在某些实施方式中,多肽组合物包含有:包含或由SEQ ID NO:56所示氨基酸序列组成的靶向间皮素的CAR,以及包含或由SEQ ID NO:118所示氨基酸序列组成的PD-1 DN。

[0423] 在某些实施方式中,多肽组合物包含有:包含或由SEQ ID NO:56所示氨基酸序列组成的靶向间皮素的CAR,以及包含或由SEQ ID NO:71所示氨基酸序列组成的CD8前导序列,以及包含或由SEQ ID NO:48中的氨基酸21至165组成的PD-1 DN。

[0424] 在某些实施方式中,多肽组合物包含有:包含或由SEQ ID NO:56所示氨基酸序列组成的靶向间皮素的CAR,以及包含或由SEQ ID NO:71所示氨基酸序列组成的CD8前导序列,以及包含或由SEQ ID NO:48中的氨基酸1至165组成的PD-1 DN。

[0425] 在某些实施方式中,多肽组合物包含有:包含或由SEQ ID NO:56所示氨基酸序列组成靶向间皮素的CAR,以及包含或由SEQ ID NO:71所示氨基酸序列组成的CD8前导序列,以及包含或由SEQ ID NO:49所示氨基酸序列组成的PD-1 DN。

[0426] 在某些实施方式中,多肽组合物包含有:包含或由SEQ ID NO:56所示氨基酸序列组成的靶向间皮素的CAR,以及包含或由SEQ ID NO:71所示氨基酸序列组成的CD8前导序列,以及包含或由SEQ ID NO:118所示氨基酸序列组成的PD-1 DN。

[0427] 5.3.免疫应答细胞

[0428] 本公开主题提供包含本文公开的多肽组合物的免疫应答细胞。在某些实施方式中,CAR能够激活免疫应答细胞。在某些实施方式中,所述多肽组合物能够促进所述免疫应

答细胞的抗肿瘤疗效。免疫应答细胞可以用多肽组合物转导,从而使细胞共表达CAR和PD-1 DN。

[0429] 本公开主题的免疫应答细胞可以是淋巴系细胞。包括B细胞、T细胞和自然杀伤(NK)细胞的淋巴系提供抗体的产生、细胞免疫系统的调节、血液中异物的检测、宿主的外来细胞的检测等。淋巴系免疫应答细胞的非限制性示例包括T细胞、自然杀伤(NK)细胞、胚胎干细胞、和多能干细胞(例如,可分化出淋巴细胞的细胞)。T细胞可以是胸腺中成熟的淋巴细胞,主要负责细胞介导的免疫。T细胞参与适应性免疫系统。本公开主题的T细胞可以是任何类型的T细胞,包括但不限于辅助性T细胞、细胞毒性T细胞、记忆性T细胞(包括中枢记忆性T细胞、干细胞样记忆性T细胞(或干样记忆性T细胞)和两种效应记忆T细胞:例如,T_{EM}细胞和T_{EMRA}细胞、调节性T细胞(也称为抑制性T细胞)、自然杀伤T细胞、粘膜相关恒定T细胞和γδT细胞。细胞毒性T细胞(CTL或杀伤性T细胞)是能够诱导受感染的体细胞或肿瘤细胞死亡的T淋巴细胞的子集。患者自身的T细胞可以通过引入抗原识别受体(例如CAR或TCR)进行基因修饰以靶向特定抗原。在某些实施方式中,免疫应答细胞是T细胞。T细胞可以是$CD4^+$T细胞或$CD8^+$T细胞。在某些实施方式中,T细胞是$CD4^+$T细胞。在某些实施方式中,T细胞是$CD8^+$T细胞。

[0430] 自然杀伤(NK)细胞可以是淋巴细胞,是细胞介导免疫的一部分,在先天性免疫反应中发挥作用。NK细胞不需要事先激活即可对靶细胞发挥细胞毒性作用。

[0431] 本公开主题的人淋巴细胞的类型包括但不限于外周供者淋巴细胞,例如,在如下参考中所公开的那些,Sadelain,M.等人2003 Nat Rev Cancer 3:35-45(披露经基因改造以表达CAR的外周供者淋巴细胞)、Morgan,R.A.等人2006Science 314:126-129(公开了经基因改造以表达全长肿瘤抗原识别T细胞受体复合物(包括α和β异二聚体))、Panelli,M.C.等人,2000 J Immunol 164:495-504;Panelli,M.C.等人,2000 J Immunol 164:4382-4392(披露肿瘤活检中来源于肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的淋巴细胞培养物)、以及Dupont,J.等人,2005 Cancer Res 65:5417-5427;Papanicolaou,G.A.等人,2003 Blood 102:2498-2505(披露使用人工抗原呈递细胞(AAPC)或脉冲树突状细胞的选择性体外扩增抗原特异性外周血白细胞)。免疫应答细胞(例如T细胞)可以是自体的、非自体的(例如同种异体的),或者从工程化祖细胞或干细胞体外获得。

[0432] 在某些实施方式中,本发明公开的免疫应答细胞包含靶向间皮素的CAR,其包含或由SEQ ID NO:56所示氨基酸序列组成,以及包含或由SEQ ID NO:48中的氨基酸1至165组成的PD-1 DN。

[0433] 在某些实施方式中,包含本公开主题的一个或多个CAR和/或PD-1/DN多肽的本公开免疫应答细胞是同种异体或自体EBV致敏细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。例如,EBV致敏细胞毒性T细胞的产生可能涉及从EBV血清阳性的自体或异体供体中分离PBMC,并通过去除单核细胞和NK细胞富集T细胞。EBV致敏的细胞毒性T细胞也可通过将供体PBMC或纯化的供体T细胞与表达一种或多种EBV抗原并将EBV抗原呈递给未受刺激的T细胞的“刺激”细胞接触而产生,从而引起EBV致敏的CTL的刺激和扩增。值得注意的是,在某些实施方式中,此类方法从包含$CD3^+$细胞的受试者中获得细胞样本(例如PBMC),并将所述$CD3^+$细胞与抗原和/或抗原呈递刺激细胞接触。在某些实施方式中,在接触抗原之前,通过本领域已知的方法(例如,从样本中阳性选择$CD3^+$细胞和/或通过从样本中去除不需要的细胞或组分而阴性选择)从样本

中分离$CD3^+$T细胞。在某些实施方式中,此类方法包括使用荧光激活细胞分选(FACS)、抗CD3珠(例如磁珠)、塑料粘附、使用抗CD56耗尽NK细胞、淘析、和/或其组合进行选择。EBV抗原包括,例如,潜伏膜蛋白(LMP)和EBV核抗原(EBNA)蛋白,例如LMP-1、LMP-2A、LMP-2B和EBNA-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C和EBNA-LP。包含识别一个或多个EBV特异性抗原的T细胞受体的细胞毒性T细胞被认为已对这些EBV抗原"敏感",因此在本文中被称为"EBV敏感的细胞毒性T细胞"。产生同种异体或自体EBV特异性细胞毒性T细胞群体的可能包含一种或多种本公开CAR多肽的方法描述于,例如,Barker等人,Blood 116(23):5045-49(2010);Doubrovina等人,Blood 119(11):2644-56(2012);Koehne等人,Blood 99(5):1730-40(2002);以及Smith等人,Cancer Res.72(5):1116-25(2012),通过引用的方式纳入这些学说。类似地,细胞毒性T细胞可对其他病毒抗原"敏感",包括巨细胞病毒(CMV)、乳头状瘤病毒(例如HPV)、腺病毒、多瘤病毒(例如BKV、JCV和Merkel细胞病毒)、逆转录病毒(例如HTLV-I,也包括慢病毒,例如HIV)、小核糖核酸病毒(例如甲型肝炎病毒)、嗜肝DNA病毒(例如乙型肝炎病毒)、丙型肝炎病毒属(例如丙型肝炎病毒)、丁型肝炎病毒属(例如丁型肝炎病毒)、戊型肝炎病毒属(例如戊型肝炎病毒)等。在某些实施方式中,靶标抗原来自肿瘤病毒。在某些实施方式中,用于产生本公开的CAR T细胞的T细胞是多功能T细胞,例如,那些能够诱导多种免疫效应器功能的T细胞,其比仅产生例如单个免疫效应器的细胞提供对病原体更有效的免疫应答(例如,单个生物标记物,如细胞因子或CD107a)。在慢性感染期间,功能较低、功能单一或甚至"耗竭"的T细胞可能主导免疫应答,从而对预防病毒相关并发症产生负面影响。在某些实施方式中,本公开的CAR T细胞是多功能的。在某些实施方式中,用于产生本公开的CAR T细胞的至少约50%的T细胞是$CD4^+$T细胞。在某些此类实施方式中,T细胞少于约50%的$CD4^+$T细胞。在某些实施方式中,T细胞主要为$CD4^+$T细胞。

[0434] 在某些实施方式中,用于生成本公开的CAR T细胞的至少约50%的T细胞是$CD8^+$T细胞。在某些此类实施方式中,T细胞小于约50%的$CD8^+$T细胞。在某些实施方式中,T细胞主要是$CD8^+$T细胞。在某些实施方式中,T细胞(例如,本文所述的敏感的T细胞和/或CAR T细胞)在施用给受试者之前存储在细胞文库或库中。

[0435] 本发明公开的免疫应答细胞还可包含至少一种外源性共刺激配体,使得免疫应答细胞共表达或被诱导共表达间皮素特异性CAR和至少一种外源性共刺激配体。间皮素特异性CAR和至少一种共刺激配体之间的相互作用提供对免疫应答细胞(例如T细胞)的完全激活非常重要的非抗原特异性信号。共刺激配体包括但不限于肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员和免疫球蛋白(Ig)超家族配体。TNF是一种参与全身炎症并刺激急性期反应的细胞因子。其主要作用是调节免疫细胞。TNF超家族成员有许多共同特征。大多数TNF超家族成员合成为包含一个短的细胞质片段和一个相对较长的细胞外区域的I型跨膜蛋白(细胞外C端)。TNF超家族成员包括但不限于神经生长因子(NGF)、CD40L(CD40L)/CD154、CD137L/4-1BBL、TNF-α、CD134L/OX40L/CD252、CD27L/CD70、Fas配体(FasL)、CD30L/CD153、肿瘤坏死因子β(TNFβ)/淋巴毒素α(LTα)、淋巴毒素β(LTβ)、CD257/B细胞激活因子(BAFF)/Blys/THANK/Tall-1、糖皮质激素诱导的TNF受体配体(GITRL)和TNF相关的凋亡诱导配体(TRAIL)、LIGHT(TNFSF14)。免疫球蛋白(Ig)超家族是一大类参与细胞识别、结合或粘附过程的细胞表面和可溶性蛋白质。这些蛋白质与免疫球蛋白具有相同的结构特征——它们拥有一个免疫球蛋白结构域(折叠)。免疫球蛋白超家族配体包括但不限于CD28的两种配体CD80和CD86,PD-1

的配体PD-L1/(B7-H1)。

[0436] 在某些实施方式中,至少一种共刺激配体选自4-1BBL、CD80、CD86、CD70、OX40L、CD48、TNFRSF14、PD-L1及其组合。在某些实施方式中,共刺激配体为4-1BBL。4-1BBL可以共价连接到靶向间皮素的CAR胞外抗原结合结构域的5'端。或者,4-1BBL可以共价连接到靶向间皮素的CAR的胞内信号传导结构域的3'端。

[0437] 此外,本发明公开的免疫应答细胞可进一步包含至少一种外源性细胞因子,使得免疫应答细胞共表达或被诱导共表达间皮素特异性CAR和至少一种外源性细胞因子。在某些实施方式中,至少一种外源性细胞因子选自IL-2、IL-3、IL-6、IL-7、IL-11、IL-12、IL-15、IL-17和IL-21。在某些实施方式中,至少一种外源性细胞因子包含IL-12。在某些实施方式中,免疫应答细胞共表达靶向间皮素的CAR和外源性IL-12。IL-12可以共价连接到靶向间皮素的CAR的胞内信号传导结构域的3'端。

[0438] 此外,免疫应答细胞可表达第二CAR,该第二CAR与第二抗原(间皮素或间皮素以外的抗原)结合。在本公开主题中,可用作第二CAR与间皮素特异性CAR结合的CAR包括Sadelain等人,"The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design"Cancer Discovery,OF1-11,(2013)、Chicaybam等人,(2011),Brentjens等人Nature Medicine 9:279-286(2003)和U.S.7,446,190中所述的CAR,通过引用将其整体并入本文,例如,CD19靶向CAR(见U.S.7,446,190;U.S.2013/0071414),HER2靶向CAR(见Ahmed等人,Clin Cancer Res.,2010),MUC16靶向CAR(见Chekmasova等人,2011),前列腺特异性膜抗原(PSMA)靶向CAR(例如,Zhong等人,Molecular Therapy,18(2):413-420(2010)中所述的CAR,所有这些都通过引用并入本文。表达两个或更多抗原识别受体(例如,CAR)的免疫应答细胞在WO 2014/055668中进行了描述,其全文通过引用并入本文。

[0439] 第二抗原可以是肿瘤抗原或病原体抗原。任何合适的肿瘤抗原(抗原肽)适合用于本文所述的肿瘤相关实施方式。肿瘤抗原的来源包括但不限于癌症蛋白质。第二抗原可表达为肽或完整蛋白质或其部分。完整蛋白质或其部分可为天然或诱变。合适的第二抗原包括但不限于前列腺特异性膜抗原(PSMA)和前列腺干细胞抗原(PCSA)。在一些实施方式中,肿瘤抗原可以是碳酸酐酶IX(CAIX)、癌胚抗原(CEA)、CD5、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD123、CD133、CD138,巨细胞病毒(CMV)感染细胞的抗原(例如,细胞表面抗原)、上皮糖蛋白2(EGP2)、上皮糖蛋白40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、受体酪氨酸蛋白激酶Erb-B2、Erb-B3、Erb-B4、叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体a、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、人端粒酶逆转录酶(hTERT)、白细胞介素-13受体亚单位α-2(IL-13Rα2)、κ-轻链、激酶插入域受体(KDR)、Lewis A(CA19.9)、Lewis Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1CAM)、黑色素瘤抗原家族A、1(MAGE-AI)、粘蛋白16(Muc-16)、粘蛋白1(Muc-1)、NKG2D配体、癌睾丸抗原NY-ESO-1、瘤胎抗原(h5T4)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、血管内皮生长因子R2(VEGF-R2)、Wilm's肿瘤蛋白(WT-1)、1型酪氨酸蛋白激酶跨膜受体(ROR1),或其组合。

[0440] 用于治疗病原体感染或其他传染病的合适的致病性抗原,例如在免疫功能低下的受试者中,包括但不限于存在于巨细胞病毒(CMV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、和流感病毒中的病毒抗原。包括靶向病毒抗原的第二CAR的免疫应答细胞可用

于治疗病毒性疾病。在某些实施方式中,靶向间皮素的CAR和结合CMV抗原的第二CAR在免疫应答细胞(例如,细胞毒性T淋巴细胞)中共表达,可用于治疗CMV。

[0441] 可在本公开主题的方法中使用的间皮素特异性或间皮素靶向性人淋巴细胞包括但不限于外周供体淋巴细胞,例如,Sadelain,M.,等人2003 Nat Rev Cancer 3:35-45(披露经基因修饰以表达CAR的外周供体淋巴细胞)、Morgan,R.A.等人,2006 Science 314:126-129(披露经基因改造以表达全长肿瘤抗原识别T细胞受体复合物(包括α和β异二聚体)的外周供体淋巴细胞)、Panelli,M.C.等人2000 J Immunol 164:495-504;Panelli,M.C.等人2000 J Immunol 164:4382-4392(披露肿瘤活检中肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)衍生的淋巴细胞培养物)和Dupont,J.等人2005 Cancer Res 65:5417-5427;Papanicolaou,G.A.等人2003 Blood 102:2498-2505(披露使用人工抗原呈递细胞(AAPC)或脉冲树突状细胞选择性体外扩增抗原特异性外周血白细胞)中公开的那些。免疫应答细胞(如T细胞)可以是自体的、非自体的(如同种异体的),或从工程化祖细胞或干细胞体外衍生的。

[0442] 试验可用于比较共刺激信号对增强靶向间皮素的CAR转导的T细胞增殖、效应器功能和重复(每周)抗原刺激后的积累的影响。外周血淋巴细胞(PBL)可根据IRB批准的方案从健康志愿者身上采集并转导。基因转移效率可通过FACS分析进行监测,以量化GFP^+(转导)T细胞的比例和/或通过定量PCR进行监测。利用成熟的共培养系统(Gade,T.P.等人,Cancer Res.65 9080-9088(2005);Gong,M.C.等人,Neoplasia.1123-127(1999);Latouche,J.B.和Sadelain,M.Nat.Biotechnol.18405-409(2000)),可以确定表达间皮素的成纤维细胞AAPC(vs.间皮素对照组)是否从转导的T细胞中直接释放细胞因子(细胞上清LUMINEX分析IL-2、IL-4、IL-10、IFN-γ、TNF-α和GM-CSF)、T细胞增殖(通过CFSE标记)和T细胞存活(通过膜联蛋白V染色)。可以评估CD80和/或4-1BBL对T细胞存活、增殖和疗效的影响。T细胞可能会暴露在反复刺激下间皮素$^+$($MSLN^+$)靶细胞,并确定反复刺激后T细胞增殖和细胞因子反应是否保持相似或减弱。可使用铬释放试验进行具有多个E:T比的细胞毒性试验。可选择使用双向ANNOVA进行统计分析,然后进行成对多重比较程序,其中数据可表示为平均值±SEM。可以确定CD4和CD8 T细胞亚型(激活效应性、中枢记忆性、效应记忆性)以确定哪些条件有利于中枢记忆性表型的维持或扩展。

[0443] 在某些实施方式中,本公开的免疫应答细胞(例如,T细胞)表达约1至约4、约2至约4、约3至约4、约1至约2、约1至约3、或约2至约3载体拷贝数/细胞的靶向间皮素的CAR。例如,本公开的免疫应答细胞(例如T细胞)表达约1、约2、约3或约4个载体拷贝数/细胞的靶向间皮素的CAR。在某些实施方式中,本公开的免疫应答细胞(例如,T细胞)表达约3到约4个载体拷贝数/细胞的靶向间皮素的CAR。在某些实施方式中,免疫应答细胞(例如T细胞)的细胞毒性和细胞因子产量与细胞中间皮素特异性CAR的表达水平成比例。例如,免疫应答细胞中的CAR表达水平越高,免疫应答细胞表现出的细胞毒性和细胞因子产量就越大。具有高间皮素CAR表达水平的免疫应答细胞(例如,T细胞)可诱导抗原特异性细胞因子的产生或分泌和/或对具有间皮素低表达水平的组织或细胞显示细胞毒性,例如,约2000或更少、约1000或更少、约900或更少、约800或更少、约700或更少,约600或更少、约500或更少、约400或更少、约300或更少、约200或更少、约100或更少的间皮素结合位点/细胞。另外或可选地,本公开的免疫应答细胞(例如,T细胞)的细胞毒性和细胞因子产量与靶组织或靶细胞中人间皮素的表达水平成比例。例如,靶细胞中人间皮素的表达水平越高,免疫应答细胞表现出的细胞毒

性和细胞因子产量就越大。

[0444] 在某些实施方式中,目标细胞为异质性MSLN表达细胞,其为包含低MSLN表达细胞和高MSLN表达细胞的细胞群。本发明公开的免疫应答细胞可在存在高MSLN表达细胞的情况下对低MSLN表达细胞(例如,约2000或更少、约1000或更少、约900或更少、约800或更少、约700或更少、约600或更少、约500或更少、约400或更少、约300或更少、约200或更少、或约100或更少MSLN结合位点/细胞)表现出增强的细胞毒性和抗肿瘤活性。在某些实施方式中,即使存在高MSLN表达细胞,免疫应答细胞对MSLN阴性细胞的细胞毒性或非特异性杀伤作用也不会增加。因此,免疫应答细胞在高MSLN表达细胞存在下对低MSLN表达细胞表现出增加的细胞毒性和抗肿瘤活性,同时保持对MSLN阴性细胞的安全性。

[0445] 在某些实施方式中,免疫应答细胞可表达一个或多个粘附分子,其可增加MSLN特异性CAR的亲和力,尤其是当CAR为低亲和力CAR时。粘附分子的非限制性示例包括CD2和VLA-4。在免疫应答细胞上表达的CD2可与靶细胞上(例如癌细胞)表达的CD58结合。在免疫应答细胞上表达的VLA-4可与靶细胞(例如癌细胞)上的VCAM-1结合。

[0446] CTL的未纯化来源可以是本领域已知的任何来源,例如骨髓、胎儿、新生儿或成人或其他造血细胞来源,例如胎肝、外周血或脐带血。可采用各种技术分离细胞。例如,阴性选择方法可用于初步去除非CTL。单克隆抗体(mAbs)在识别与特定细胞谱系和/或阳性和阴性选择的分化阶段相关的标记时特别有用。

[0447] 大部分终末分化细胞最初可通过相对粗糙的分离来去除。例如,磁珠分离可用于初步去除大量无关细胞。在某些实施方式中,至少约80%,通常至少70%的总造血细胞将在细胞分离之前被去除。

[0448] 分离程序包括但不限于密度梯度离心;复位;与改变细胞密度的颗粒偶联;用抗体包裹的磁珠进行磁分离;亲和层析;与mAb结合或结合使用的细胞毒性剂,包括但不限于补体和细胞毒素;以及使用附着在固体基质(例如平板、芯片)上的抗体进行淘洗、淘析或任何其他方便的技术。

[0449] 用于分离和分析的技术包括但不限于流式细胞术,其可具有不同程度的复杂度,例如,多个颜色通道、低角度和钝角光散射检测通道、阻抗通道。

[0450] 通过使用与死细胞相关的染料,例如碘化丙啶(PI),可以针对死细胞选择细胞。在某些实施方式中,将细胞收集在包含2%胎牛血清(FCS)或0.2%牛血清白蛋白(BSA)的培养基或任何其他合适的,例如无菌等渗培养基中。

[0451] 5.4.核酸组合物和载体

[0452] 本公开主题提供编码本文公开的多肽组合物(例如,在第5.2节中公开)的核酸组合物。在某些实施方式中,核酸组合物包含编码本文公开的多肽组合物(例如,第5.2节中公开的一种)的多核苷酸。还提供包含此类核酸组合物的载体,以及包含此类核酸组合物或载体的细胞。

[0453] 在某些实施方式中,所述核酸组合物还包含可操作地连接到所述多肽组合物的启动子。在某些实施方式中,启动子为内源性或外源性。在某些实施方式中,外源性启动子选自延伸因子(EF)-1启动子、CMV启动子、SV40启动子、PGK启动子和金属硫蛋白启动子。在某些实施方式中,启动子是诱导型启动子。在某些实施方式中,诱导型启动子选自NFAT转录响应元件(TRE)启动子、CD69启动子、CD25启动子和IL-2启动子。

[0454] 核酸组合物可通过现有技术已知的方法或如本文所述施用于受试者或和/或递送到细胞中。

[0455] 免疫应答细胞(例如,T细胞或NK细胞)的基因修饰可通过用重组DNA构建体转导基本均质的细胞组合物来完成。在某些实施方式中,逆转录病毒载体(γ逆转录病毒或慢病毒)用于将DNA构建体引入细胞。例如,编码抗原识别受体的多核苷酸可以被克隆到逆转录病毒载体中,并且可以由其内源性启动子、逆转录病毒长末端重复序列或特定于目标细胞类型的启动子驱动表达。也可以使用非病毒载体。

[0456] 对于免疫应答细胞的初始基因修饰以包括抗原识别受体(例如,CAR或TCR),通常使用逆转录病毒载体进行转导,但也可以使用任何其他合适的病毒载体或非病毒递送系统。CAR和PD-1 DN可以构建在单个载体的多个表达盒或多个载体上单、多顺反子表达盒中。构建多顺反子表达盒的元件示例包括但不限于各种病毒和非病毒内部核糖体进入位点(IRES,例如FGF-1 IRES、FGF-2 IRES、VEGF IRES、IGF-Ⅱ IRES、NF-κB IRES、RUNX1 IRES、p53 IRES、甲型肝炎IRES、丙型肝炎IRES、瘟疫病毒IRES、口疮病毒IRES、小核糖核酸病毒IRES、脊髓灰质炎病毒IRES和脑心肌炎病毒IRES)和可切割接头(例如2A肽,例如P2A、T2A、E2A和F2A肽)。在某些实施方式中,P2A肽包含或由SEQ ID NO:107所示氨基酸序列组成,其提供如下:

[0457] GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPM [SEQ ID NO: 107]

[0458] 在某些实施方式中,P2A肽包含或由SEQ ID NO:121所示氨基酸序列组成,其提供如下:

[0459] ATNFSLLKQAGDVEENPGP [SEQ ID NO: 121]

[0460] SEQ ID NO:122中示出编码SEQ ID NO:121的氨基酸序列的示例性核苷酸序列,其提供如下:

[0461] GCAACAAACTTCTCACTACTCAAACAAGCAGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCA [SEQ ID NO: 122]

[0462] 逆转录病毒载体和适当的包装线的组合也适用,其中衣壳蛋白对感染人细胞有作用。各种双嗜性病毒生产细胞系是已知的,包括但不限于PA12(Miller等人(1985)Mol.cell.Biol.5:431-437);PA317(Miller等人(1986)Mol.Cell.Biol.6:2895-2902)和CRIP(Danos等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:6460-6464)。非两性(病毒)颗粒也适用,例如,使用VSVG、RD114或GALV包装的假型(病毒)颗粒和本领域已知的任何其他假型(病毒)颗粒。

[0463] 可能的转导方法还包括细胞与生产者细胞的直接共培养,例如,通过Bregni等人(1992)Blood 80:1418-1422的方法,或单独使用病毒上清或使用含有或不含有适当生长因子和聚阳离子的浓缩载体培养,例如,通过Xu等人(1994)Exp.Hemat.22:223-230;和Hughes等人(1992)J.Clin.Invest.89:1817的方法。

[0464] 其他转导病毒载体可用于修饰免疫应答细胞。在某些实施方式中,所选载体显示出高感染效率和稳定的整合和表达(参见,例如,Cayouette等人,Human Gene Therpy 8:423-430,1997;Kido等人,Current Eye Research 15:833-844,1996;Bloomer等人,Journal of Virology 71:6641-6649,1997;Naldini等人,Science 272:263-267,1996;Miyoshi等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.94:10319,1997)。可使用的其他病毒载体包括,

例如,腺病毒、慢病毒和腺苷酸相关病毒载体、痘苗病毒、牛乳头状瘤病毒、或疱疹病毒,例如爱泼斯坦-巴尔病毒(另见下列中的载体,例如,Miller,Human Gene Therapy 15-14,1990;Friedman,Science 244:1275-1281,1989;Eglitis等人,BioTechniques 6:608-614,1988;Tolstoshev等人,Current Opinion in Biotechnology1:55-61,1990;Sharp,The Lancet 337:1277-1278,1991;Cornetta等人,Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322,1987;Anderson,Science 226:401-409,1984;Mone,Blood Cells 17:407-416,1991;Miller等人,Biotechnology 7:980-990,1989;LeGal La Salle等人,Science 259:988-990,1993;以及Johnson,Chest 107:77S-83S,1995)。逆转录病毒载体发展得特别好,并已用于临床(Rosenberg等人,N.Engl.J.Med 323:370,1990;Anderson等人,美国专利号第5,399,346号)。

[0465] 在某些实施方式中,编码本公开的多肽组合物的载体是逆转录病毒载体,例如SGFγ-逆转录病毒载体,其可以是莫洛尼(Moloney)小鼠白血病逆转录病毒载体。在某些实施方式中,所述载体包含或由SEQ ID NO:123中所述的核酸序列组成,其提供如下:

[0466]
ATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTCAGGTTCAG
CTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGCACAGTTTCTGGAGGC
AGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCCTGGATTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTGGAGTGGATTGGG
TACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAACTATCAGTGTGGACACA
AGCAAGAATCAGTTTTCACTCAAACTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTGCTGTTTATTATTGTGCCAGG
GAGGGGAAAAATGGGGCATTTGATATTTGGGGTCAGGGCACAATGGTGACAGTCAGCTCTGGAGGTGGAGGC
TCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCACGCCATCAGATGACTCAGTCCCCCTCCAGTCTTTCTGCC
TCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAGAGCAAGTCAGAGCATATCATCCTATCTGAACTGGTACCAG
CAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAATTGCTGATTTATGCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTGCCAAGCAGG
TTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTCACATTGACAATCAGCTCCCTCCAACCTGAAGATTTTGCCACC
TACTATTGCCAGCAATCCTACAGCACGCCCCTGACTTTTGGAGGTGGCACAAAGGTAGAGATCAAGAGGACT
gcggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccat
gtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttgggtgctggtggtg
gttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgaggagtaag
aggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaagcattac
cagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcc
cccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtt
ttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctg
tTcaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctTcagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggagg
ggcaaggggcacgatggcctttTccaggggctcagtacagccaccaaggacacctTcgacgcccttcacatg
caggccctgccccctcgcGGATCTGGAGCAACAAACTTCTCACTACTCAAACAAGCAGGTGACGTGGAGGAG
AATCCCGGCCCAATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGCTGGCGG
CCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTG
ACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTAC
CGCATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGAC

TGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAAT
GACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCA
GAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGC
CAGGCGGCCGCACCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCCACGATCGCGTCGCAGCCC
CTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCC
TGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTT
TACTGCAACCACAGGCGGATCCAATAAcagccactcgaggatccGGATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGGA
TATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTGACTCAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGCCATAGA
TAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGC
TAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGT
CAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAG
GGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCT
CAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTC
CAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCT
GTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGA
TTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCT
GTTCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCACACATGCAGCATGTAT
CAAAATTAATTTGGTTTTTTTTCTTAAGTATTTACATTAAATGGCCATAGTACTTAAAGTTACATTGGCTTC
CTTGAAATAAACATGGAGTATTCAGAATGTGTCATAAATATTTCTAATTTTAAGATAGTATCTCCATTGGCT
TTCTACTTTTTCTTTTATTTTTTTTTGTCCTCTGTCTTCCATTTGTTGTTGTTGTTGTTTGTTTGTTTGTTT
GTTGGTTGGTTGGTTAATTTTTTTTTAAAGATCCTACACTATAGTTCAAGCTAGACTATTAGCTACTCTGTA
ACCCAGGGTGACCTTGAAGTCATGGGTAGCCTGCTGTTTTAGCCTTCCCACATCTAAGATTACAGGTATGAG
CTATCATTTTTGGTATATTGATTGATTGATTGATTGATGTGTGTGTGTGTGATTGTGTTTGTGTGTGTGACT
GTGAAAATGTGTGTATGGGTGTGTGTGAATGTGTGTATGTATGTGTGTGTGTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GCATGTGTGTGTGTGTGACTGTGTCTATGTGTATGACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTTGTGAAAAAATATTCTATGGTAGTGAGAGCCAACGCTCCGGCTCAGGTGTCAGGTTGGTT
TTTGAGACAGAGTCTTTCACTTAGCTTGGAATTCactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaacc

[0467] ctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggccc
gcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctcctta
cgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaa
gccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttaca
gacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgatga
cgaaagggcctcgtgatacgcctatttttataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggt
ggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccg
ctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttc
cgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaa
gtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatc
cttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggta
ttatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgag
tactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacc
atgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttg
cacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgac
gagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttact
ctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcc
cttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagca
ctggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaa
cgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactca
tatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttttgataat
ctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaagga
tcttcttgagatccttttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtg
gtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacca
aatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctc
gctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaaga
cgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcga
acgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagcattgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaag
gcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcc

[0468]

tggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggg
gggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttgctggccttttgct
cacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgatacc
gctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcccaatacgcaaa
ccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggc
agtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggctttacactttatgcttccg
gctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgcc
AAGCTTTGCTCTTAGGAGTTTCCTAATACATCCCAAACTCAAATATATAAAGCATTTGACTTGTTCTATGCC
CTAGGGGGCGGGGGGAAGCTAAGCCAGCTTTTTTTAACATTTAAAATGTTAATTCCATTTTAAATGCACAGA
TGTTTTTATTTCATAAGGGTTTCAATGTGCATGAATGCTGCAATATTCCTGTTACCAAAGCTAGTATAAATA
AAAATAGATAAACGTGGAAATTACTTAGAGTTTCTGTCATTAACGTTTCCTTCCTCAGTTGACAACATAAAT
GCGCTGCTGAGCAAGCCAGTTTGCATCTGTCAGGATCAATTTCCCATTATGCCAGTCATATTAATTACTAGT
CAATTAGTTGATTTTTATTTTTGACATATACATGTGAATGAAAGACCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGC
TTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGG
AACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCC
AAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGG
GCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGG
GTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTC
GCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGA
CTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTC
CTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGAT
CGGGAGACCCCTGCCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTGTCTG
TCCGATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGCGTCGGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATC
TGGCGGACCCGTGGTGGAACTGACGAGTTCGGAACACCCGGCCGCAACCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTC
GGGGGCCGTTTTTGTGGCCCGACCTGAGTCCTAAAATCCCGATCGTTTAGGACTCTTTGGTGCACCCCCCTT
AGAGGAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAACAGTTCCCGCCTCCGTCTGAATTTTTGCT
TTCGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGCGCGTCTTGTCTGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGAC
TGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATATGGGCCCGGGCTAGcctgttaccactCCCTTAAGTTTGACCTTAGG
TCACTGGAAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTT
CTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCTCATCAC
CCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCAGGTccccTACATCGTGACCTG
GGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCC

TCCATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCT
CACTCCTTCTCTAGGCGCCCCCATATGGCCATATGAGATCTTATATGGGGCACCCCCGCCCCTTGTAAACTT
CCCTGACCCTGACATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGT
CCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAACTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCC
TTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGCCGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACC
TTACACAGTCCTGCTGACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCCA
CGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCC [SEQ ID NO: 123]

[0469] 在某些实施方式中,所述载体包含或由SEQ ID NO:124中所述的核苷酸序列组成,其提供如下:

[0470]

ATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTCAG
GTTCAGCTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGCACAGTTTCT
GGAGGCAGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCCTGGATTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTGGAGTGG
ATTGGGTACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAACTATCAGTGTG
GACACAAGCAAGAATCAGTTTTCACTCAAACTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTGCTGTTTATTATTGT
GCCAGGGAGGGGAAAAATGGGGCATTTGATATTTGGGGTCAGGGCACAATGGTGACAGTCAGCTCTGGAGGT
GGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCACGCCATCAGATGACTCAGTCCCCCTCCAGTCTT
TCTGCCTCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAGAGCAAGTCAGAGCATATCATCCTATCTGAACTGG
TACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCAAATTGCTGATTTATGCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTGCCA
AGCAGGTTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTCACATTGACAATCAGCTCCCTCCAACCTGAAGATTTT
GCCACCTACTATTGCCAGCAATCCTACAGCACGCCCCTGACTTTTGGAGGTGGCACAAAGGTAGAGATCAAG
AGGACTgcggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccatt
atccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttgggtgctg
gtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgagg
agtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaag
cattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgca
gacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtac
gatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaa
ggcctgtTcaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctTcagtgagattgggatgaaaggcgagcgc
cggaggggcaaggggcacgatggcctttTccaggggctcagtacagccaccaaggacacctTcgacgccctt
cacatgcaggccctgcccccctcgcGGATCTGGAGCAACAAACTTCTCACTACTCAAACAAGCAGGTGACGTG
GAGGAGAATCCCGGCCCAATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGC
TGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTC
GTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAAC
TGGTACCGCATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGC
CAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGG
CGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTG
CGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCA
GCCGGCCAGGCGGCCGCACCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCCACGATCGCGTCG
CAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGAC

TTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATC
ACCCTTTACTGCAACCACAGGCGGATCCAATAAcagccactcgaggatccGGATTAGTCCAATTTGTTAAAG
ACAGGATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTTGACTCAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGC
CATAGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCCACCTGTAGGTTTG
GCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGAT
CAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCG
GCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCC
CCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGA
TGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTC
GCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTC
CTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGT
CTCGCTGTTCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCACATGCAGCAT
GTATCAAAATTAATTTGGTTTTTTTTCTTAAGTATTTACATTAAATGGCCATAGTACTTAAAGTTACATTGG
CTTCCTTGAAATAAACATGGAGTATTCAGAATGTGTCATAAATATTTCTAATTTTAAGATAGTATCTCCATT
GGCTTTCTACTTTTTCTTTTATTTTTTTTTGTCCTCTGTCTTCCATTTGTTGTTGTTGTTGTTTGTTTGTTT
GTTTGTTGGTTGGTTGGTTAATTTTTTTTTAAAGATCCTACACTATAGTTCAAGCTAGACTATTAGCTACTC
TGTAACCCAGGGTGACCTTGAAGTCATGGGTAGCCTGCTGTTTTAGCCTTCCCACATCTAAGATTACAGGTA
TGAGCTATCATTTTTGGTATATTGATTGATTGATTGATTGATGTGTGTGTGTGTGTGATTGTGTTTGTGTGTGT
GAtTGTGtAtATGTGTGTATGGtTGTGTGTGAtTGTGTGTATGTATGTtTGTGTGTGAtTGTGTGTGTGTGa
tTGTGCATGTGTGTGTGTGTGAtTGTGTtTATGTGTATGAtTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT

GTGTGTGTGTGTGTTGTGtAtAtATATTTATGGTAGTGAGAGgCAACGCTCCGGCTCAGGTGTCAGGTTG
GTTTTTGAGACAGAGTCTTTCACTTAGCTTGGAATTCactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaa
accctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagagg
cccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctcc
ttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagt
taagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgctt
acagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcga
gacgaaagggcctcgtgatacgcctatttttataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcag
gtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatc
cgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatt
tccgtgtcgcccttattccctttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtga
aagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaaga
tccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcgg
tattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttg
agtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataa
ccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttt
tgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacg
acgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactactta
ctctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcgg
cccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcag
cactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatg
aacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttact
catatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgata
atctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaag
gatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgg
tggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatac
caaatactgtTcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacc
tcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaa
gacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagc
gaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagcTAtgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaa
[0471] aggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacg

cctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcag
gggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttgctggccttttg
ctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgata
ccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcccaatacgca
aaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgg
gcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggctttacactttatgcttc
cggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacg
ccAAGCTTTGCTCTTAGGAGTTTCCTAATACATCCCAAACTCAAATATATAAAGCATTTGACTTGTTCTATG
CCCTAGGGGGCGGGGGGAAGCTAAGCCAGCTTTTTTTAACATTTAAAATGTTAATTCCATTTTAAATGCACA
GATGTTTTTATTTCATAAGGGTTTCAATGTGCATGAATGCTGCAATATTCCTGTTACCAAAGCTAGTATAAA
TAAAAATAGATAAACGTGGAAATTACTTAGAGTTTCTGTCATTAACGTTTCCTTCCTCAGTTGACAACATAA
ATGCGCTGCTGAGAAGCCAGTTTGCATCTGTCAGGATCAATTTCCCATTATGCCAGTCATATTAATTACTAG
TCAATTAGTTGATTTTTATTTTTGACATATACATGTGAAAGACCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTA
AGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAAC
AGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAG
AACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCC
AAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTG
CCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCG
CGCTTcTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGcGCGCCAGTCCTCCGATTGACTG
AGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCTT
GGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGATCGG
GAGACCCCTGCCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTGTCTGTCC
GATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGCGTCGGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGG
CGGACCCGTGGTGGAACTGACGAGTTCGGAACACCCGGCCGCAACCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTCGGG
GGCCGTTTTTGTGGCCCGACCTGAGTCCTAAAATCCCGATCGTTTAGGACTCTTTGGTGCACCCCCCTTAGA
GGAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAACAGTTCCCGCCTCCGTCTGAATTTTTGCTTTC
GGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGCGCGTCTTGTCTGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGT
GTTTCTGTATTTGTCTGAAAATATGGGCCCGGGCTAGcctgttaccactCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCA
CTGGAAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTCTG
CTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCTCATCACCCA

[0472] GGTTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCAGGTccccTACATCGTGACCTGGGA
AGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCCTCC
ATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCAC
TCCTTCTCTAGGCGCCCCCATATGGCCATATGAGATCTTATATGGGGCACCCCCGCCCCTTGTAAACTTCCC
TGACCCTGACATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCA
GCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAACTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCCTTA
CCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGCCGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTA
CACAGTCCTGCTGACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCCACGT
GAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCC [SEQ ID NO: 124]

[0473] 非病毒方法也可用于免疫应答细胞的基因修饰。例如,将核酸分子引入免疫应答细胞可通过在存在脂质体转染的情况下施用核酸(Feigner等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.84:7413,1987;Ono等人,Neurosicience Letters 17:259,1990;Brigham等人,Am.J.Med.Sci.298:278,1989;Staubinger等人,Methods in enzymology 101:512,1983),可通过脱唾液酸类粘多聚赖氨酸配合(Wu等人,Journal of Biological Chemistry 263:14621,1988;Wu等人,Journal of Biological Chemistry 264:16985,1989),或通过在外科条件下微量注射(Wolff等人,Science 247:1465,1990)。其他非病毒性基因转移方法包括使用磷酸钙、DEAE-葡聚糖、电穿孔、和原生质体融合进行体外转染。脂质体也可能有助于将DNA输送到细胞中。将正常基因移植到受试者的受影响组织中也可以通过将正常的核酸移植到体外培养的细胞类型中(例如,自体或异源原代细胞或其后代),然后将细胞(或其后代)注射到目标组织或进行全身注射。也可使用转座酶或靶向核酸酶(例如锌指核酸酶、归巢核酸内切酶、或TALE核酸酶、CRISPR)衍生或获得重组受体。可通过RNA电穿孔获得瞬时表达。

[0474] 任何靶向基因组编辑方法可用于表达多肽组合物。在某些实施方式中,CRISPR系统用于表达本文所公开的多肽组合物。在某些实施方式中,锌指核酸酶用于表达本文所公开的多肽组合物。在某些实施方式中,TALEN系统用于表达本文公开的多肽组合物。

[0475] 规律间隔成簇短回文重复序列(CRISPR)系统是在原核细胞中发现的一种基因组编辑工具。当用于基因组编辑时,所述系统包括Cas9(一种能够利用crRNA作为向导以改造DNA的蛋白质)、CRISPR RNA(crRNA,包含用来引导Cas9至宿主DNA正确部分的RNA以及与tracrRNA结合的区域(通常为发夹环形式),该区域与Cas9形成活性复合物)、反式激活crRNA(tracrRNA,与crRNA结合并与Cas9形成活性复合物)、和DNA修复模板的可选部分(引导细胞修复过程的DNA,允许插入特定的DNA序列)。CRISPR/Cas9通常使用质粒转染靶细胞。需要为每项应用设计crRNA,因为这是Cas9用于识别和直接结合细胞中靶DNA的序列。还需要为每项应用设计携带CAR表达盒的修复模板,因为它必须与剪切的任一侧序列重叠且编码插入序列。多个crRNA和tracrRNA可以打包在一起形成单一的向导RNA(sgRNA)。sgRNA可以与Cas9基因结合在一起,并制成质粒,以便转染细胞。

[0476] 锌指核酸酶(ZFN)是一种人工限制性内切酶,由锌指DNA结合域和DNA切割域结合产生。锌指结构域可以被设计成靶向特定的DNA序列,从而使锌指核酸酶能够靶向基因组内的预期序列。单个ZFN的DNA结合域通常包含多个单独的锌指重复序列,并且每个锌指重复序列可以识别多个碱基对。生成新的锌指结构域的最常用方法是结合已知特异性的较小锌指“模块”。ZFN中最常见的裂解结构域是来自Ⅱs型限制性内切酶Fok I的非特异性裂解结构域。利用内源性同源重组(HR)机制和携带CAR表达盒的同源DNA模板,ZFN可用于将CAR表达盒插入基因组。当目标序列被ZFN切割时,HR机制搜索受损染色体和同源DNA模板之间的

同源性,然后在染色体的两个断裂端之间复制模板序列,同源DNA模板由此整合到基因组中。

[0477] 转录激活物样效应器核酸酶(TALEN)是一种限制性内切酶,可以通过工程切割特定的DNA序列。TALEN系统的工作原理与ZFN几乎相同。它们是通过结合转录激活物样效应器DNA结合域和DNA切割域而生成的。转录激活物样效应器(TALEs)由33-34个氨基酸重复基序组成,具有两个可变位置(对特定核苷酸具有很强的识别能力)。通过组装这些TALE的阵列,TALE DNA结合域可以被工程为结合所需的DNA序列,从而引导核酸酶在基因组中的特定位置切割。用于多核苷酸治疗方法的cDNA表达可由任何合适的启动子控制(例如,人巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)或金属硫蛋白启动子),并由任何合适的哺乳动物调节元件或内含子(例如,延伸因子1a增强子/启动子/内含子结构)调控。例如,如果需要,已知优先控制特定细胞类型中的基因表达的增强子可用于控制核酸的表达。所使用的增强子可包括但不限于那些具有组织或细胞特异性的增强子。或者,如果基因组克隆用作治疗性构建体,则可通过同源调控序列或(如果需要)通过源自异源的调控序列(包括上述任何启动子或调控元件)来介导调控。

[0478] 递送基因组编辑剂/系统的方法可以根据需要而有所不同。在某些实施方式中,所选基因组编辑方法的组分作为一个或多个质粒中的DNA构建体递送。在某些实施方式中,所述组分经由病毒载体递送。常见的递送方法包括但不限于电穿孔、微量注射、基因枪、穿刺转染、静水压、持续输注、超声、磁感染、腺相关病毒、病毒载体的假型包膜蛋白、复制活性载体顺式和反式作用元件、单纯疱疹病毒、和化学载体(例如寡核苷酸、脂复合物、聚合物囊泡、多聚体、树枝状分子、无机纳米颗粒和细胞穿透肽)。

[0479] 5.5.多肽和类似物

[0480] 本公开主题中还包括本文公开的多肽(例如间皮素、CD28、CD8、CD3ζ和PD-1 DN等)或其片段,这些多肽或片段经过修饰,以增强其在免疫应答细胞中表达时的抗肿瘤活性。本公开主题提供通过改变序列来优化氨基酸序列或核酸序列的方法。这种改变可能包括某些突变、缺失、插入或翻译后修饰。本公开主题还包括本文公开的任何多肽的类似物(包括但不限于间皮素、CD28、CD8、CD3ζ和PD-1 DN)。类似物可通过氨基酸序列差异、翻译后修饰或两者均有而不同于本文公开的多肽。类似物可显示与本公开主题的氨基酸序列的全部或部分具有至少约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多的同源性。序列比较的长度为至少5、10、15或20个氨基酸残基,例如,至少25、50或75个氨基酸残基,或超过100个氨基酸残基。同样,在确定相似度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,概率分数在e^{-3}和e^{-100}之间表示密切相关的序列。修饰包括多肽的体内和体外化学衍生,例如乙酰化、羧化、磷酸化或糖基化;这种修饰可能发生在多肽合成或加工过程中,或在用分离的修饰酶处理后。类似物也可能不同于通过改变初始序列产生的多肽。这些包括遗传变异,包括自然变异和诱导变异(例如,由辐照或暴露于乙胺甲基硫酸盐的随机突变或如Sambrook,Fritsch和Maniatis,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(2d ed.),CSH Press,1989,或Ausubel等人,同上中所描述的位点特异性突变)。还包括环化肽、分子和含有L-氨基酸以外的残基的类似物,例如,D-氨基酸或非自然产生或合成的氨基酸,例如β或γ氨基酸。

[0481] 除了全长多肽外,本公开主题还提供本文公开的任何一种多肽或肽结构域的片

段。如本文所用,术语“片段”指至少5、10、13或15个氨基酸。在某些实施方式中,片段包含至少20个连续氨基酸、至少30个连续氨基酸或至少50个连续氨基酸。在某些实施方式中,片段包含至少60至80、100、200、300或更多连续氨基酸。片段可通过本领域技术人员已知的方法产生,或可通过正常蛋白质加工产生(例如,从新生多肽中去除生物活性不需要的氨基酸,或通过选择性mRNA剪接或选择性蛋白质加工事件去除氨基酸)。

[0482] 非蛋白质类似物具有设计的模拟本文公开的蛋白质的功能活性的化学结构。此类类似物可能超过原多肽的生理活性。模拟设计的方法在本领域中众所周知,并且可以根据这些方法通过修改化学结构来进行类似物的合成,使得所得类似物在免疫应答细胞中表达时增加原始多肽的抗肿瘤活性。这些化学修饰包括但不限于取代可替代的R基团和改变参考多肽特定碳原子的饱和度。在某些实施方式中,蛋白质类似物对体内降解相对耐受,从而在给药时产生更持久的治疗效果。用于测量功能活性的测定包括但不限于以下示例中所述的测定。

[0483] 根据本公开主题,编码特异性结合人间皮素(例如,scFv、Fab或$(Fab)_2$)、CD3ζ、CD8、CD28、4-1BB、4-1BBL和IL-12的胞外抗原结合结构域的多核苷酸可通过密码子优化进行修饰。密码子优化可以改变自然发生的和重组的基因序列,以在任何给定的表达系统中达到最高的生产力水平。参与蛋白质表达不同阶段的因素包括密码子适应性、mRNA结构以及转录和翻译中的各种顺式元件。本领域技术人员已知的任何合适密码子优化方法或技术可用于修饰本公开主题的多核苷酸,包括但不限于OptimumGene™,Encor优化和Blue Heron。

[0484] 密码子优化可以基于四种不同的算法(例如Blue Heron和Encore算法)执行。将从所有四种算法中获得的密码子优化序列进行混合,并去除所有CPG和BAM-H1以获得最佳克隆。在某些实施方式中,密码子优化的核酸序列与密码子优化之前的原始序列约70%同源。为了在免疫应答细胞(例如人原代T细胞)中获得高效表达,将密码子优化的核酸序列连接到CD8前导序列,例如编码SEQ ID NO:71的多核苷酸。CD8前导序列在scFv重链(QVQL)之前提供最佳信号切割。密码子优化优化间皮素CAR在免疫应答细胞(例如,多个人供体原代T细胞)中的表达,具有良好的转导效率。针对不同间皮素表达的多种血液癌细胞和实体癌细胞,对多个供体T细胞中的多个CAR载体拷贝数进行功能效率、特异性和敏感性测试。具有载体拷贝数为1-4(更具体地,约为3-4)的密码子优化的靶向间皮素的CAR对间皮素高表达靶点提供高效细胞毒性,但对间皮素低表达靶点(即正常组织)的反应性最低。上述基因工程产生对间皮素高表达的癌细胞有反应,同时使间皮素低表达的正常组织免受伤害的特异性间皮素CAR,该CAR在确保安全性的同时,最适合用作癌症治疗的临床载体。

[0485] 5.6.药物组合物和给药

[0486] 本发明公开的主题提供包含本发明公开的细胞的组合物(例如,如第5.3节所公开)。组合物中包含的细胞数量可根据组合物的用途和/或接受组合物的受试者的大小、年龄、性别、体重和病情而变化。在某些实施方式中,所述组合物包含约10^4至约10^{10}、约10^4至约10^6、约10^5至约10^6、约10^5至约10^7、约10^5至约10^9或约10^6至约10^8个本公开的免疫应答细胞。在某些实施方式中,所述组合物包含至少约1×10^5、至少约5×10^5、至少约1×10^6、至少约1×10^7、至少约1×10^8个本公开的免疫应答细胞。在某些实施方式中,所述组合物包含约1×10^5个本公开的细胞。

[0487] 包含本公开的免疫应答细胞的组合物可系统地或直接提供给受试者,用于诱导和/或增强对抗原的免疫应答和/或治疗和/或预防肿瘤、病原体感染或传染病、炎症性疾病或移植物排斥。在某些实施方式中,将本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物直接注射到目标器官(例如,受肿瘤影响的器官)中。或者,本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物间接提供给目标器官,例如,通过给药进入循环系统(例如,肿瘤脉管系统)。可在施用细胞或组合物之前、期间或之后提供扩增剂和分化剂,以在体外或体内增加T细胞、NK细胞或CTL细胞的产生。

[0488] 本公开的免疫应答细胞可以在任何生理上可接受的赋形剂中给药,通常是血管内给药,但它们也可以被引入骨或其他方便的部位,在这些部位细胞可以找到再生和分化的合适位置(例如胸腺)。通常,至少会施用约1×10^5个细胞,最终达到约1×10^{10}或更多。本公开的免疫应答细胞可包含纯化的细胞群。本领域技术人员可以使用各种众所周知的方法,例如荧光激活细胞分选(FACS),很容易地确定本公开的免疫应答细胞在群体中的百分比。包含本公开的免疫应答细胞的群体中的合适纯度范围为约50%至约55%、约5%至约60%、和约65%至约70%。在某些实施方式中,纯度为约70%至约75%、约75%至约80%、或约80%至约85%。在某些实施方式中,纯度为约85%至约90%、约90%至约95%、和约95%至约100%。本领域技术人员可以很容易地调整剂量(例如,纯度降低可能需要增加剂量)。可通过注射、导管或类似方式引入细胞。

[0489] 本公开的组合物可以是包含本公开的免疫应答细胞或其祖细胞和药学上可接受的载体的药物组合物。给药可以是自体的,也可以是异源的。例如,免疫应答细胞或祖细胞可从一个受试者获得,并给予同一受试者或不同的相容受试者。外周血衍生的免疫应答细胞或其后代(例如,体内、体外或体外衍生的)可通过局部注射进行给药,包括导管给药、全身注射、局部注射、静脉注射或肠外给药。当施用本公开主题的治疗组合物(例如,包含本公开的免疫应答细胞的药物组合物)时,可将其配制成单位剂量的可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0490] 5.7.制剂

[0491] 包含本公开的免疫应答细胞的组合物可以方便地作为无菌液体制剂提供,例如等渗水性溶液、悬浮液、乳液、分散液或可缓冲到选定pH值的粘性组合物。液体制剂通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。此外,液体组合物给药更方便,尤其是通过注射。另一方面,粘性组合物可在适当的粘度范围内配制,以提供更长的与特定组织的接触时间。液体或粘性组合物可包含载体,其可为赋形剂或分散介质,包含例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)及其适当混合物。

[0492] 无菌注射溶液可通过将基因修饰的免疫应答细胞加入所需量的适当赋形剂中,并根据需要加入不同量的其他成分来制备。此类组合物可与适当的载体、稀释剂或赋形剂(例如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)混合。所述组合物也可冻干。所述组合物可包含辅助物质,例如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如甲基纤维素)、pH缓冲剂、凝胶或增粘添加剂、防腐剂、调味剂、着色剂等,具体取决于给药途径和所需制备方法。标准文本,如1985年第17版“REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE”,通过引用并入本文,可参考以制备合适的制剂,无需过度实验。

[0493] 可以添加增强组合物稳定性和无菌性的各种添加剂,包括抗菌防腐剂、抗氧化剂、

螯合剂和缓冲剂。可通过各种抗细菌和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等)确保预防微生物活动。通过使用延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可延长可注射药物形式的吸收。然而,根据本公开的主题,所使用的任何载体、稀释剂或添加剂必须与基因修饰的免疫应答细胞或其祖细胞相容。

[0494] 所述组合物可以是等渗的,即它们可以具有与血液和泪液相同的渗透压。所述组合物的所需等渗性可使用氯化钠或其他药学上可接受的试剂(如右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或其他无机或有机溶质)来完成。氯化钠尤其适用于含有钠离子的缓冲液。

[0495] 如果需要,可使用医药上可接受的增稠剂将组合物的粘度维持在选定水平。例如,甲基纤维素容易获得且经济,易于使用。其他合适的增稠剂包括,例如黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆等。增稠剂的浓度取决于所选的药剂。重要的一点是,使用能达到选定粘度的量。显然,合适载体和其他添加剂的选择将取决于具体的给药途径和特定剂型的性质,例如液体剂型(例如,组合物是否配制为溶液、悬浮液、凝胶或其他液体形式(例如时间释放形式或液体填充形式))。

[0496] 待给药的细胞数量因接受治疗的受试者而异。在某些实施方式中,将约10^4与约10^{10}之间、约10^5与约10^9之间、约10^4与约10^6之间、约10^5与约10^6之间、约10^5与约10^7之间、或约10^6与约10^8之间的本公开的免疫应答细胞给药于人受试者。更有效的细胞可以以更小的数量给药。在某些实施方式中,至少约1×10^5、至少约1×10^6、至少约1×10^7、1×10^8、至少约2×10^8、至少约3×10^8、至少约4×10^8、或至少约5×10^8的本公开的免疫应答细胞给药于人受试者。有效量的精确确定可能基于每个受试者的个体因素,包括他们的大小、年龄、性别、体重和特定受试者的病情。本领域技术人员可根据本发明和本领域知识容易地确定剂量。在某些实施方式中,将约1×10^5的本发明公开的细胞给药于受试者。

[0497] 本领域技术人员可以容易地确定组合物中的细胞和可选添加剂、赋形剂和/或载体的量以及给药方法。通常,任何添加剂(除活性细胞和/或试剂外)在磷酸盐缓冲盐水中以0.001至50%(重量)的溶液的量存在,并且活性成分以微克至毫克的顺序存在,例如约0.0001至约5wt%,约0.0001至约1wt%,约0.0001至约0.05wt%或约0.001至约20wt%、约0.01至约10wt%或约0.05至约5wt%。对于给动物或人给药的任何成分,可确定以下内容:毒性,例如通过在合适的动物模型(如啮齿动物,如小鼠)中测定致死剂量(LD)和LD50;引起适当反应的组合物的剂量、其中组分的浓度和施用组合物的时间。此类确定不需要根据本领域技术人员的知识、本公开和本文引用的文件进行不必要的实验。而且,连续给药的时间可以无需不必要的实验而确定。

[0498] 5.8.治疗方法

[0499] 本公开主题的免疫应答细胞及包含其的组合物可用于治疗和/或预防肿瘤、病原体感染、传染病、炎症性疾病或移植物排斥。此类免疫应答细胞可给药于需要其治疗或预防实体瘤(例如间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胸膜肿瘤、胶质母细胞瘤、食管癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃肿瘤和/或胆管癌)的受试者(例如,人受试者)。在某些实施方式中,免疫应答细胞是T细胞。T细胞可以是$CD4^+$T细胞或$CD8^+$T细胞。在某些实施方式中,T细胞是$CD4^+$T细胞。

[0500] 本公开主题提供在需要的受试者中诱导和/或增加需要免疫应答的的方法。本发明公开的免疫应答细胞及包含其的组合物可用于治疗和/或预防受试者中的肿瘤。本发明

公开的免疫应答细胞及其组合物可用于延长患有肿瘤的受试者的生存期。本发明公开的免疫应答细胞及包含其的组合物还可用于治疗和/或预防受试者的病原体感染或其他传染病，例如，免疫功能低下的人受试者。此类方法包括以有效量施用本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物(例如，药物组合物)以实现所需效果，无论是缓解现有病情还是防止复发。对于治疗而言，给药量是产生预期效果的有效量。有效量可在一次或一系列给药中提供。有效量可通过丸剂或持续灌注提供。

[0501] “有效量”(或“治疗有效量”)是指足以通过治疗产生有益或预期临床结果的量。有效量可以一次或多次给受试者给药。就治疗而言，有效量是足以减轻、改善、稳定、逆转或减缓疾病进展，或以其他方式减少疾病病理后果的量。有效量通常由医生根据具体情况确定，并且在本领域技术人员的技能范围内。在确定达到有效量的适当剂量时，通常会考虑几个因素。这些因素包括受试者的年龄、性别和体重、所治疗的疾病、病情严重程度以及所给药的免疫应答细胞的形式和有效浓度。

[0502] 对于使用抗原特异性T细胞的过继免疫治疗，通常输注约10^6至约10^{10}(例如，约10^9)范围内的细胞剂量。然而，由于本公开的多肽组合物的高效率，需要较少数量的本公开的细胞来实现期望的效果。例如，约1×10^5个本公开的细胞足以实现期望的效果。

[0503] 在免疫应答细胞给药于受试者体内并随后分化后，免疫应答细胞被诱导，专门针对一种特定抗原(例如，人间皮素)。“诱导”T细胞可包括抗原特异性T细胞失活，例如通过缺失或无能。失活对于建立或重建耐受性尤其有用，例如在自身免疫性疾病中。本公开主题的免疫应答细胞可通过本领域已知的任何方法进行给药，包括但不限于胸膜给药、静脉给药、皮下给药、结内给药、瘤内给药、鞘内给药、胸膜内给药、腹腔给药、和直接向胸腺给药。在某些实施方式中，向需要的受试者胸膜给药免疫应答细胞和/或包含其的组合物。在某些实施方式中，将免疫应答细胞和/或包含其的组合物经胸膜内施用于需要的受试者。

[0504] 本公开主题提供使用免疫应答细胞(例如T细胞)的各种方法。例如，本发明公开的主题提供减少受试者肿瘤负荷的方法。在某些实施方式中，减少肿瘤负荷的方法包括向受试者施用有效量的本发明免疫应答细胞或包含其的组合物。本发明公开的免疫应答细胞可减少受试者中的肿瘤细胞数量、减小肿瘤大小和/或根除肿瘤。肿瘤可以是实体瘤。实体瘤的非限制性示例包括间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胸膜肿瘤、胶质母细胞瘤、食管癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃肿瘤、和胆管癌。

[0505] 本发明公开的主题还提供增加或延长患有肿瘤的受试者生存期的方法。在某些实施方式中，增加或延长具有肿瘤形成性肿瘤的受试者的生存期的方法包括向受试者给药有效量的本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物。所述方法可以减少或消除受试者的肿瘤负荷。此外，本发明公开的主题提供用于增加受试者免疫应答的方法，包括向受试者施用本发明公开的免疫应答细胞或包含其的组合物。本发明公开的主题还提供治疗和/或预防受试者肿瘤的方法，包括向受试者施用本发明公开的免疫应答细胞或包含其的组合物。

[0506] 在某些实施方式中，肿瘤为实体瘤。肿瘤可以是原发性肿瘤或原发性癌症。此外，肿瘤可能处于转移状态。

[0507] 可使用本公开主题的免疫应答细胞抑制其生长的癌症包括通常对免疫治疗有反应的癌症。癌症治疗的非限制性示例包括间皮瘤、肺癌(例如非小细胞肺癌)、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌(例如转移性乳腺癌、转移性三阴性乳腺癌)、结肠癌、胸膜肿瘤、胶质母细胞瘤、

食管癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃肿瘤、胆管癌、宫颈癌和唾液腺癌。此外,本公开主题包括可使用本公开主题的免疫应答细胞抑制其生长的难治性或复发性恶性肿瘤。

[0508] 可使用本公开主题的方法治疗的其他肿瘤或癌症的示例包括骨癌、肠癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、黑色素瘤(皮肤或眼内恶性黑色素瘤)、肾癌(例如透明细胞癌)、喉癌、前列腺癌(如激素难治性前列腺癌)、血癌(如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、子宫癌、直肠癌、肛门区癌、膀胱癌、脑癌、胃癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、白血病(例如,急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性髓系白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性粒单核细胞白血病、急性单核细胞白血病、急性红白血病、慢性白血病、慢性粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金病、非霍奇金病)、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统肿瘤(CNS)、原发性中枢神经系统淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症,包括石棉诱发的癌症,包括Waldenstrom巨球蛋白血症、重链疾病和实体瘤,如肉瘤和癌(如纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肝癌、尼罗河管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、Wilm's瘤、宫颈癌、唾液腺癌、子宫癌、睾丸癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少胶质细胞瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。

[0509] 此外,本发明公开的主题提供增加免疫激活细胞因子产生以响应受试者体内的癌细胞或病原体的方法。在某些实施方式中,所述方法包括向受试者施用本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物。免疫激活细胞因子可以是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、干扰素调节因子7(IRF7)及其组合。在某些实施方式中,免疫应答细胞增加GM-CSF、IFN-γ和/或TNF-α的产生。

[0510] 本发明公开的主题提供对治疗实体瘤特别有用的疗法(实体瘤为例如,间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胸膜肿瘤、胶质母细胞瘤、食管癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃肿瘤和胆管癌)。实体瘤可以是原发性肿瘤或转移性肿瘤。某些实体瘤是异质性MSLN表达肿瘤,例如乳腺癌(如TNBC)、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、食管癌、结肠癌、胃癌和恶性胸膜间皮瘤(MPM)。异质性MSLN表达细胞(例如,肿瘤细胞)是包含低MSLN表达细胞和高MSLN表达细胞的细胞群。在存在高MSLN表达细胞的情况下,本发明公开的免疫应答细胞可对低MSLN表达细胞(例如,约2000或更少、约1000或更少、约900或更少、约800或更少、约700或更少、约600或更少、约500或更少、约400或更少、约300或更少、约200或更少、或约100或更少的MSLN结合位点/细胞)表现出增强的细胞毒性和抗肿瘤活性。在某些实施方式中,即使在存在高MSLN表达细胞的情况下,免疫应答细胞也不会对MSLN阴性细胞表现出增加的细胞毒性或非特异性杀伤。因此,免疫应答细胞可以在存在高MSLN表达细胞的情况下对低MSLN表达细胞表现出增加的细胞毒性和抗肿瘤活性,同时保留对MSLN阴性细胞的安全性。

[0511] 此外,本公开的主题提供用于治疗患有病原体感染(例如,病毒感染、细菌感染、真

菌感染、寄生虫感染或原生动物感染)的受试者的方法。本公开的主题特别适用于增强免疫功能低下的受试者的免疫应答。易受使用本发明方法治疗影响的示例性病毒感染包括但不限于巨细胞病毒(CMV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、人免疫缺陷病毒(HIV)和流感病毒感染。因此,本公开的主题提供一种治疗或预防受试者中病原体感染的方法,所述方法包括施用有效量的本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物。

[0512] 根据本公开主题,上述各种方法可包括施用至少一种免疫调节剂。免疫调节剂的非限制性示例包括免疫刺激剂、检查点免疫阻断剂、放射治疗剂和化疗剂。在某些实施方式中,免疫调节剂为免疫刺激剂。免疫刺激剂的非限制性示例包括IL-12和激动剂共刺激单克隆抗体。在某些实施方式中,免疫刺激剂为IL-12。在某些实施方式中,本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物与抗IL-12抗体结合可用于治疗乳腺癌(BC),例如转移性三阴性乳腺癌(TNBC)。激动剂共刺激单克隆抗体的非限制性示例包括抗4-1BB抗体、抗OX40抗体和抗ICOS抗体。在某些实施方式中,激动剂共刺激单克隆抗体是抗4-1BB抗体。

[0513] 在某些实施方式中,本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物不仅可以展示肿瘤靶向过继性T细胞治疗,而且可以通过设计改良的抗原受体和通过使用IL-12进行免疫调节来干预宿主微环境来增强T细胞功能。在所有免疫治疗方法中,一种多功能细胞因子IL-12被认为是治疗BC最有希望的方法之一(Boggio,K.等人,Cancer Res 60,359-364(2000);Czerniecki,B.J.等人,Cancer Res 67,1842-1852(2007);Nanni,P.等人,J Exp Med 194,1195-1205(2001))。IL-12被认为是适应性1型细胞介导免疫的主要调节因子,这是参与抗肿瘤反应的关键途径(Del Vecchio,M.等人,Clin Cancer Res 13,4677-4685(2007))。IL-12在不同水平上调节抗肿瘤反应,包括CD4 T细胞向Th1表型分化(Wesa等人,J Immunother 30,75-82(2007))、增强T细胞和NK效应器功能(Curtsinger等人,J Exp Med 197,1141-1151(2003)),重塑先天免疫反应(Chmilewski等人,Cancer Res 71,5697-5706)(2011)),以及调节肿瘤血管生成(Voest等人,J Natl Cancer Inst 87,581-586(1995))。IL-12的免疫调节和抗血管生成功能提供将该细胞因子与本公开主题的用于治疗癌症,例如BC(例如TNBC)的免疫应答细胞结合使用的理据。在148项临床试验中,包括向癌症患者施用IL-12(其中36项为最近报道),通过腹腔注射(Lenzi等人,Clin.Cancer Res.8,3686-3695(2002))或皮下注射(Mahvi等人,Cancer Gene Ther.14,717-723(2007);Kang等人,Hum.Gene Ther.12,671-684(2001))成功进行了Ⅱ期研究。IL-12已经表明,通过基因转移产生的IL-12旁分泌可以诱导对局部和远处的肿瘤的免疫。尽管一些研究已经证明IL-12在乳腺癌(BC)临床前模型中的抗癌效果(Boggio等人,Cancer Res 60,359-364(2000);Nanni等人,J Exp Med 194,1195-1205(2001)),在一些晚期癌症临床试验中观察到重组人IL-12给药导致的显著毒性妨碍其临床应用。为克服这一局限性,许多小组已经证明,在BC的临床模型中,使用腺病毒载体在肿瘤内输送IL-12可诱导肿瘤消退和T细胞激活(Gyorffy等人,J Immunol 166,6212-6217(2001);Bramson等人,Hum Gene Ther 7,1995-2002(1996))。最近,Sabel等人使用聚乳酸微球将IL-12释放到肿瘤中,并发现抗肿瘤反应主要由NK细胞介导(Sabel等人,Brest Cancer Res 122,325-336(2010))。其他研究者使用间充质基质细胞将IL-12局部递送至小鼠BC(Eliopoulos等人,Cancer Res 68,4810-4818(2008))。紫杉醇和曲妥珠单抗联合IL-12在HER2/neu表达的恶性肿瘤患者中的I期试验显示,IL-12和曲妥珠单抗在刺激NK细胞细胞因子分泌方面具有显著的协同作用(Bekaii-Saab等人,

Molecular cancer therapeutics 8,2983-2991(2009))。因此,IL-12作为一种抗癌剂具有相当大的前景,在过继性T细胞治疗方法中作为一种共刺激物使用是合理的。

[0514] 在某些实施方式中,免疫调节剂为检查点免疫阻断剂。检查点免疫阻断剂的非限制性示例包括抗PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗LAG3抗体、抗B7-H3抗体和抗TIM3抗体。在某些实施方式中,检查点免疫阻断剂为是抗PD-L1抗体。在某些实施方式中,本公开主题的免疫应答细胞或包含其的组合物与抗PD-L1抗体联合可用于治疗乳腺癌(BC),例如TNBC。

[0515] 程序性细胞死亡配体1(PD-L1/B7-H4/CD274)是一种抑制性信号,通常在活跃的炎症组织中表达,用作限制T细胞激活的负反馈环。PD-L1表达通常在非炎症正常组织(包括乳腺(Dong等人,Nature medicine 8,793-800(2002)))中是缺失的,相反,PD-L1表达在癌症组织中最为普遍,尤其是在有炎症浸润的组织中(Spranger等人,Science translational medicine 5,200ra116(2013))。这种与炎症的关联可能是由于肿瘤细胞暴露于T细胞激活产生的T细胞分泌的细胞因子时PD-L1上调。这种表达模式在BC中表现出来,50%-75%的BC样本PD-L1染色呈阳性,并且PD-L1的表达与严重的淋巴细胞浸润密切相关(Brown等人,Journal of immunology 170,1257-1266(2003);Ghebeh等人,Neoplasia 8,190-198(2006);Ghebeh等人,BMC cancer 8,57(2008))。BC浸润性T细胞在54%的患者中也表达PD-L1(Ghebeh等人,BMC cancer 8,57(2008))。一些BC也可能天然表达PD-L1,继发于致癌信号。PI(3)K通路的激活导致BC细胞中PD-L1蛋白的上调,患者肿瘤中的PI(3)K激活与PD-L1表达显著相关(Crane等人,Oncogene 28,306-312(2009))。激活的T细胞表达PD-1在空间和时间上将配体与免疫抑制TME中的受体表达联系起来。BC组织中PD-L1的表达表明它是这些患者的免疫治疗靶点。PD-L1/PD-1阻断剂在多种临床前癌症模型(包括乳腺癌(Ge等人,Cancer letters 336,253-259(2013)))中的疗效为使用PD-L1或PD-1靶向抗体治疗晚期癌症患者的I期试验铺平道路。一项I期研究(使用PD-1抗体)证明仅对PD-L1+患者有效(Topalian等人,The New England journal of medicine 366,2443-2454(2012))。基因工程T细胞为克服TME内的共抑制检查点和典型的共刺激缺乏提供独特的优势。表达CAR的T细胞确实被工程为优化其共刺激需求,以支持T细胞的扩增、存活和功能。

[0516] 在一些实施方式中,免疫调节剂是放射治疗剂。局部、辐射诱导的免疫环境不仅可以为增强靶向T细胞在肿瘤中的植入提供先决条件(从而消除系统性淋巴清除治疗的需要),而且放射治疗和过继性T细胞治疗联合产生的免疫反应也增强远位抗肿瘤疗效。在抗辐射肿瘤中,CART细胞中的4-1BB共刺激信号传导可以克服免疫抑制。在一些实施方式中,免疫调节剂是化疗剂,包括但不限于顺铂。顺铂诱导的趋化因子和细胞因子分泌可促进MSLN靶向和内源性T细胞反应。

[0517] 研究表明,存在高水平的细胞毒性肿瘤浸润淋巴细胞(cTIL)和低水平的调节性T细胞(Treg)的肺腺癌(LAC)和恶性胸膜间皮瘤(MPM)患者有更好的预后和更长的无进展生存期(Servais等人,Clin Cancer Res(May 1,2012);18:2478-2489;Kachala等人,Clin Cancer Res(2013);20(4);1020-8)。使用靶向MSLN的CAR的过继性T细胞疗法可用于促进LAC和MPM中的cTIL。Servais(2012)和Kachala(2013)报道MSLN在LAC和MPM中过度表达并促进攻击性,证明选择MSLN作为CAR T细胞治疗的靶点是合理的。顺铂和放疗后TIL比例的增加与小鼠模型和患者的预后改善相关。

[0518] 肿瘤放疗-顺铂治疗-诱发肿瘤和远位免疫调节可以为过继转移的T细胞更好的植入提供所需的预处理;利用肿瘤和基质免疫调节的T细胞共刺激策略可以增强内源性和过继转移T细胞的抗肿瘤疗效。

[0519] 此外,上面描述的使用表达间皮素特异性CAR的免疫应答细胞(例如T细胞)的不同方法,例如用于治疗受试者的癌症,或用于减少受试者的肿瘤负荷,可与癌细胞抗原调节相结合。表达间皮素特异性CAR的免疫应答细胞(例如T细胞)可以靶向并杀伤肿瘤或癌细胞膜上表达的MSLN(称为“细胞膜MSLN”),但不能杀伤细胞质MSLN。某些肿瘤或癌症(如肺癌和间皮瘤)具有较低的细胞膜MSLN,但有较高的细胞质MSLN。癌细胞抗原调节可增加肿瘤或癌细胞中细胞膜MSLN的表达,这可使肿瘤或癌细胞更有可能被表达CAR的免疫应答细胞靶向,从而更容易被免疫应答细胞杀伤。在某些实施方式中,癌细胞抗原调节是放射。

[0520] 可将进一步修饰引入免疫应答细胞(例如T细胞)以避免或最小化免疫并发症(称为“恶性T细胞转化”)的风险,例如移植物抗宿主病(GvHD),或当健康组织表达与肿瘤细胞相同的靶抗原时,导致类似于GvHD的结果。这个问题的潜在解决方案是将自杀基因工程到表达CAR的T细胞。合适的自杀基因包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(hsv-tk)、诱导型Caspase 9自杀基因(iCasp-9)和截短的人表皮生长因子受体(EGFRt)多肽。在某些实施方式中,自杀基因是EGFRt多肽。EGFRt多肽可通过施用抗EGFR单克隆抗体(例如,西妥昔单抗)消除T细胞。EGFRt可以共价连接到靶向间皮素的CAR的胞内信号传导结构域的3’端。自杀基因可以包含在包含编码本公开的间皮素特异性CAR的核酸的载体中。通过这种方式,在恶性T细胞转化(例如GVHD)期间施用旨在激活自杀基因的前药(例如,前药(如AP1903,可激活iCasp-9))触发自杀基因激活的表达CAR的T细胞中的凋亡。

[0521] 此外,本公开主题提供一种预防和/或治疗受试者炎症性疾病的方法。在某些实施方式中,所述方法包括向受试者施用本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物。在某些实施方式中,免疫应答细胞是免疫抑制细胞。在某些实施方式中,免疫抑制细胞是调节性T细胞。在某些实施方式中,炎症性疾病为胰腺炎。在某些实施方式中,受试者是人。在某些实施方式中,受试者是器官移植的接受者,例如胰腺移植的接受者。

[0522] 此外,本公开主题提供一种防止作为器官移植受体的受试者体内发生移植物排斥反应的方法。在某些实施方式中,所述方法包括向受试者施用本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物。在某些实施方式中,免疫应答细胞是免疫抑制细胞。在某些实施方式中,免疫抑制细胞是调节性T细胞。在某些实施方式中,受试者是人。在另一个实施方式中,受试者是胰腺移植的接受者。

[0523] 本公开的靶向间皮素的CAR可被转导到免疫抑制细胞中,例如调节性T细胞。可将转导的免疫抑制细胞施用于具有炎症性病情或炎症性疾病的受试者(例如,人)。在一些实施方式中,炎症部位或炎症性疾病部位具有高表达水平的间皮素,其由本公开的MSLN-CAR识别。炎症性病情可能非常严重,例如重症胰腺炎。此外,转导的免疫抑制细胞可以施用于接受器官移植的受试者。

[0524] 此外,本公开的靶向间皮素的CAR以及靶向MHC抗原的第二CAR可共转导到免疫抑制细胞中(例如调节性T细胞)中,以便免疫抑制细胞可在移植胰腺的部位特异性聚集。在某些实施方式中,MHC Ⅰ类受试者接受来自MHC Ⅱ类供体的胰腺移植;受体的调节性T细胞用本公开的MSLN特异性CAR和第二个靶向MHC Ⅱ类抗原的CAR转导,因此,受体的转导调节性T

细胞在移植胰腺的部位聚集/汇集,避免移植物或器官排斥。

[0525] 适合进行治疗的人受试者通常包括两个治疗组,可通过临床标准加以区分。患有“晚期疾病”或“高肿瘤负荷”的受试者是那些患有临床可测量肿瘤的受试者。临床可测量的肿瘤是指可以根据肿瘤质量(例如,通过触诊、CAT扫描、声波图、乳房X光检查或X光检查;阳性生化或组织病理学标记本身不足以识别该人群)进行检测的肿瘤。向这些受试者给药药物组合物以引起抗肿瘤反应,目的是缓解他们的病情。理想情况下,肿瘤质量会因此减少,而任何临床改善都是有益的。临床改善包括降低肿瘤的风险或进展速率或减少病理后果。

[0526] 第二组合适的受试者在本领域中称为“佐剂组”。这些个体有肿瘤病史,但对另一种治疗方式有反应。先前的治疗可以包括但不限于手术切除、放疗和传统化疗。因此,这些个体没有临床可测量的肿瘤。然而,他们被怀疑存在疾病进展的风险,要么是在原发肿瘤部位附近,要么是肿瘤转移。这一群体可进一步细分为高风险和低风险个体。细分根据初治前后观察到的特征进行。这些特征在临床技术中是已知的,并且适用于每种不同的肿瘤。高危亚组的典型特征是肿瘤侵犯邻近组织,或显示淋巴结受累。

[0527] 另一组具有肿瘤的遗传易感性,但尚未证实肿瘤的临床症状。例如,对与乳腺癌相关的基因突变检测呈阳性但仍处于生育年龄的妇女可希望接受本文所述的一个或多个免疫应答细胞的预防性治疗,以防止肿瘤的发生,直到其适合进行预防性手术。

[0528] 作为增强免疫应答细胞抗肿瘤疗效的抗间皮素CAR和PD-1 DN表面表达的结果,过继转移的T或NK细胞在肿瘤部位具有增强的选择性细胞溶解活性。此外,在定位于肿瘤或病毒感染并增殖后,T细胞将肿瘤或病毒感染部位转化为一个高传导性环境,供各式各样的免疫细胞参与生理性抗肿瘤或抗病毒反应(肿瘤浸润淋巴细胞、NK细胞、NKT细胞、树突状细胞和巨噬细胞)。

[0529] 此外,本公开的主题提供用于治疗和/或预防受试者(例如,免疫功能低下的受试者)体内的病原体感染(例如,病毒感染、细菌感染、真菌感染、寄生虫感染或原生动物感染)的方法。所述方法可包括向患有病原体感染的受试者施用有效量的本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物。易受治疗的示例性病毒感染包括但不限于巨细胞病毒(CMV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、人免疫缺陷病毒(HIV)和流感病毒感染。

[0530] 可将进一步修饰引入到本公开的免疫应答细胞(如T细胞),以避免或最小化免疫并发症(称为“恶性T细胞转化”)的风险,例如移植物抗宿主病(GvHD),或当健康组织表达与肿瘤细胞相同的靶抗原时导致类似GvHD的结果。这个问题的潜在解决方案是将自杀基因工程到本公开的免疫应答细胞中。合适的自杀基因包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(hsv-tk),诱导型Caspase 9自杀基因(iCasp-9)和截短的人表皮生长因子受体(EGFRt)多肽。在某些实施方式中,自杀基因是EGFRt多肽。EGFRt多肽可通过给药抗EGFR单克隆抗体(例如西妥昔单抗)消除T细胞。EGFRt可以共价连接到本公开的CAR的抗原识别受体的上游。自杀基因可以包含在包含编码本公开的CAR的核酸的载体中。通过这种方式,在恶性T细胞转化(如GVHD)期间给药旨在激活自杀基因的前药(例如,前药(如AP1903,可激活iCasp-9))触发自杀基因激活的表达CAR的T细胞凋亡。将自杀基因结合到本公开的CAR中可在很短的时间内消除大部分CAR T细胞,从而提高安全性。本公开的结合有自杀基因的免疫应答细胞(例如T细胞)可以在CAR T细胞输注后的特定时间点被预先清除,或者在毒性的早期迹象时被根除。

[0531] 5.9.试剂盒

[0532] 本公开主题提供用于诱导和/或增强免疫应答和/或治疗和/或预防受试者体内肿瘤或病原体感染的试剂盒。在某些实施方式中,试剂盒包含有效量的本公开的免疫应答细胞或包含其的药物组合物。在某些实施方式中,试剂盒包含无菌容器;这些容器可以是盒、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、小袋、泡罩包装或本领域已知的其他合适的容器形式。这些容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或其他适合盛装药物的材料制成。在某些实施方式中,试剂盒包括编码抗间皮素CAR的分离的核酸分子和编码可表达形式的PD-1 DN的分离的核酸分子,其可任选地包含在相同或不同的载体中。

[0533] 如果需要,提供免疫应答细胞和/或核酸分子,同时提供用于将这些细胞或核酸分子给药于患有肿瘤或病原体或免疫失调或有发展风险的受试者的说明书。说明书通常包括有关使用所述组合物治疗和/或预防肿瘤或病原体感染的信息。在某些实施方式中,说明书包括以下至少一项:治疗剂的说明;治疗或预防肿瘤、病原体感染或免疫失调或其症状的剂量表和给药;注意事项;警告;适应症;禁忌症;超剂量信息;不良反应;动物药理学;临床研究;和/或参考资料。说明可直接打印在容器上(如有),或作为标签贴在容器上,或作为单独的纸张、小册子、卡片、或容器内或随容器提供的文件夹。

[0534] 6.实施例

[0535] 除非另有说明,否则本发明的实践采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些技术完全在本领域技术人员的能力范围内。这些技术在文献中有充分的解释,例如,《分子克隆:实验室手册》,第二版(Sambrook,1989年);《寡核苷酸合成》(Gait,1984年);《动物细胞培养》(Freshney,1987年);《酶学方法》《实验免疫学手册》(Weir,1996);《哺乳动物细胞的基因转移载体》(Miller和Calos,1987年);《分子生物学的现行方案》(Ausubel,1987年);《PCR:聚合酶链反应》(Mullis,1994);《免疫学的现行方案》(Coligan,1991年)。这些技术适用于本文公开的多核苷酸和多肽的生产,因此,在制造和实施本公开主题时可考虑这些技术。将在下面的部分中讨论用于特定实施方式的特别有用的技术。

[0536] 提出以下示例是为了向本领域的普通技术人员提供关于如何制造和使用本公开的细胞和组合物的完整公开和描述,并且不旨在限制发明者认为他们发明内容的范围。

[0537] 实施例1

[0538] 制备本公开的多肽组合物。所述多肽组合物包括:(i)结合人间皮素的CAR和(ii)程序性死亡1(PD-1 DN)的显性负形式,如图1所示。靶向间皮素的CAR包含(a)CD8信号肽(例如,由SEQ ID NO:71所示氨基酸序列组成的CD8信号肽),(b)胞外抗原结合结构域,其为scFv,包含有V_H,所述V_H包含由SEQ ID NO:76所示氨基酸序列组成的CDR1、由SEQ ID NO:77所示氨基酸序列组成的CDR2、和具有SEQ ID NO:78所示氨基酸序列的CDR3;以及V_L,所述V_L包含由SEQ ID NO:79所示氨基酸序列组成的CDR1、由SEQ ID NO:80所示氨基酸序列组成的CDR2、和由SEQ ID NO:81所示氨基酸序列组成的CDR3,(c)包含CD28多肽的跨膜结构域(例如,由SEQ ID NO:92所示氨基酸序列(或SEQ ID NO:90的氨基酸153至179)组成的CD28多肽),(d)CD28铰链/间隔区(例如,由SEQ ID NO:15所示氨基酸序列(或SEQ ID NO:90的氨基酸114至152)组成的CD28多肽),和(e)胞内信号传导结构域,其包含由SEQ ID NO:35所示氨基酸序列组成的修饰CD3ζ多肽和包含CD28多肽的共刺激信号传导区(例如,由SEQ ID NO:

101所示氨基酸序列(或SEQ ID NO:90中的氨基酸180至220)组成的CD28多肽)。PD-1 DN包含由SEQ ID NO:48的氨基酸1至20组成的PD-1信号肽、由SEQ ID NO:48的氨基酸21至165组成的PD-1胞外结构域、和由SEQ ID NO:86的氨基酸137至207组成的CD8多肽。所述多肽组合物还包含具有SEQ ID NO:121所示氨基酸序列的P2A肽,其位于CAR和PD-1 DN之间,如图1所示。多肽组合物设计为“M28z1XXPD1DNR”。

[0539] 包含在多肽结构中的CAR具有SEQ ID NO:56所示氨基酸序列。编码所述多肽结构的示例性核酸序列在SEQ ID NO:123中示出。编码所述多肽组合物的另一示例性核酸序列在SEQ ID NO:124中示出。

[0540] 实施例2

[0541] 本发明研究具有实施例1中所述多肽组合物结构的M28z1XX-P2A-PD1DNR的活性。如图2所示,将替代结构和对照构建体的结构与M28z1XX-P2A-PD1DNR进行比较。

[0542] 在生产细胞系RD114中生成包含CAR构建体的病毒载体如图3A-3D所示。用不同稀释度的H29病毒上清(未稀释、1:2和1:4)转导RD114细胞,并使用抗Fab抗体通过流式细胞术染色CAR表达。RD114空白作为阴性对照。如图4A-4E、5A-5E和6A-6F所示,用M28z1XX-P2A-PD1DNR成功转导人T细胞。用不同浓度RD114病毒上清转导PHA激活的T细胞,并用流式细胞术用抗Fab染色法对CAR表达进行染色,用抗PD1染色法对PD1DNR进行染色。本发明研究载体拷贝数(VCN)是否与平均荧光强度(MFI)相关。用不同浓度的RD114病毒上清转导PHA激活的T细胞,并通过抗Fab染色和流式细胞术分析对CAR表达进行染色。分离转导T细胞的基因组DNA,并使用qPCR确定载体拷贝数为VCN/μg DNA。如图7A-7C所示,CAR阳性细胞的MFI与所有三个受试供体的VCN/μg DNA相关。人$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的转导率如表1所示。

[0543] 表1

[0544]

供体	稀释度	CD3+ Fab+		CD3+ Fab+ PD1+		CD3+ CD8+		CD3+ CD4+	
		%	阳性的MFI	%	阳性的MFI	%总	%Fab+	%总	%Fab+
H116-2	1:7	62	4138	59	9142	33	69	64	58
H18	1:5	57	5410	65	10555	46	63	50	52
H19	1:10	64	3863	57	8107	50	69	45	60

[0545] 接下来,本发明研究M28z1XX-PD1DNR CAR T细胞的细胞溶解作用。采用基于阻抗的试验将高MSLN靶细胞(MGM)与来自不同供体的M28z1XX-PD1DNRCAR T细胞以不同的E:T比共培养。结果如图8所示。如图8所示,M28z1XX-PD1DNR CAR转导的T细胞对所有三种受试不同供体均表现出有效的细胞毒性。效应细胞毒性跨越多个E:T比(数据未显示)。

[0546] 结论:

[0547] 在RD114细胞中成功制备M28z1XX-PD1DNR载体。所有构建体均成功建立稳定的生产细胞系。对病毒载体进行滴定,以在多供体T细胞中产生约40-60%的转导。CD4和CD8 T细胞被成功转导表达CAR和PD1DNR。观察到载体拷贝数与转导之间存在相关性。

[0548] 实施例3

[0549] 本实施例描述各种构建体的比较分析,包括M28z1XX-PD1DNR。采用基于阻抗的试验测定细胞毒性。基于阻抗的细胞毒性测量(eCTL)原理如图9所示。比较分析的参数如图10所示,包括CAR构建体、供体、CAR靶标和E:T比。检测靶细胞系中MSLN和PD-L1的表达。通过流

式细胞术检测间皮瘤(MGM、MGM-PDL1和MSTOG)和肺癌(A549GM和A549G)细胞系中MSLN和PD-L1的表达。结果如图11A-11E所示。MGM、MGM-PDL1和A549GM过度表达MSLN。MGM-PDL1细胞额外过度表达PD-L1。

[0550] 同时检测转导T细胞的CAR和PD1表达。使用流式细胞术,通过抗myc染色分析用M28z、M28z1xx、M28z-PD1DNR或M28z1XX-PD1DNR转导的人T细胞的CAR表达,并通过抗PD1染色分析PD1/PD1DNR表达。结果如图12A-12E所示。

[0551] 比较分析表达M28z、M28z1XX、M28z-PD1DNR或M28z1XX-PD1DNR的CAR T细胞对高MSLN肿瘤细胞(MGM)的抗肿瘤疗效。高MSLN靶细胞(MGM)与M28z、M28z1XX、M28z-PD1DNR、M28z1XX-PD1DNR或未转导的T细胞以不同的E:T比共培养。采用基于阻抗的试验评估抗肿瘤疗效。结果如图13A-13C所示。此外,用铬-51标记的高MSLN靶细胞(MGM)与M28z、M28z1XX、M28z-PD1DNR、M28z1XX-PD1DNR或未转导的T细胞以不同的E:T比共培养18小时。通过铬-51 CTL测定细胞毒性。结果如图14所示。

[0552] 接下来,比较分析表达M28z、M28z1XX、M28z-PD1DNR或M28z1XX-PD1DNR的CAR T细胞对MSLN阴性肿瘤细胞(MSTOG)的抗肿瘤疗效。MSLN阴性靶细胞(MSTOG)与M28z、M28z1XX、M28z-PD1DNR、M28z1XX-PD1DNR或未转导的T细胞以指定的E:T比共培养。抗肿瘤疗效采用基于阻抗的试验进行评估。结果如图15A-15C所示。此外,用铬-51标记的MSLN阴性靶细胞(MSTOG)与M28z、M28z1XX、M28z-PD1DNR、M28z1XX-PD1DNR或未转导的T细胞以不同的E:T比共培养18小时。通过铬-51 CTL测定细胞毒性。结果如图16所示。

[0553] 此外,对表达M28z、M28z1XX、M28z-PD1DNR或M28z1XX-PD1DNR的CAR T细胞对过度表达PDL1的高MSLN肿瘤细胞的抗肿瘤疗效进行比较分析。将过度表达PDL1的高MSLN靶细胞(MGM-PDL1)与M28z、M28z1XX、M28z-PD1DNR、M28z1XX-PD1DNR或未转导的T细胞以不同的E:T比共培养。采用基于阻抗的试验评估抗肿瘤疗效。结果如图19A-19C所示。同样,测定表达M28z、M28z1XX、M28z-PD1DNR或M28z1XX-PD1DNR的CAR T细胞对高MSLN肿瘤细胞(A549GM)的抗肿瘤疗效的比较分析,结果如图18A-18C所示;和测定表达M28z、M28z1XX、M28z-PD1DNR或M28z1XX-PD1DNR的CAR T细胞对低MSLN肿瘤细胞(A549G)的抗肿瘤疗效的比较分析,结果如图19A-19C所示。

[0554] 结论:

[0555] M28z1XX-PD1DNR构建体以E:T比依赖的方式杀死$MSLN^+$靶细胞,结果在不同癌症(肺癌和间皮瘤细胞系)的不同T细胞供体中重现。靶向杀伤与MSLN表达水平相关,对PD-L1高表达的$MSLN^+$靶细胞有效。

[0556] 实施例4-具有胞内PD-1检查点阻断的临床级靶向间皮素的CAR T细胞的区域输送:转化为I期试验

[0557] 总结:本实施例提供临床级M28z1XXPD1DNR CAR T细胞的临床前安全性和增强抗肿瘤疗效的证据。

[0558] 方法:通过铬释放、积累和Luminex分析,分别评估工程表达M28z或M28z1XXPD1DNR CAR的人T细胞的比较细胞毒性、增殖和细胞因子分泌。通过连续生物发光成像和比较生存率,研究单剂量(1×10^5CAR T细胞;E:T 1:1000)胸膜内给药M28z或M28z1XXPD1DNR CAR T细胞在患有原位胸膜间皮瘤的NSG小鼠中抗肿瘤疗效。肿瘤根除后,通过反复肿瘤攻击(2×10^6至11×10^6肿瘤细胞的递增剂量)测试CAR T细胞的功能持久性。

[0559] 结果:在体外,M28z和M28z1XXPD1DNR CAR T细胞均表现出抗原特异性细胞毒性、积累和效应细胞因子分泌(见表2)。在体内,与单剂量M28z CAR T细胞相比,单剂量M28z1XXPD1DNR CAR T细胞在10次肿瘤再攻击(见表2)后可导致肿瘤根除、提高生存率和对肿瘤重建的抵抗力。

[0560] 结论:在不使用抗PD1抗体的情况下,CAR T细胞的安全性、肿瘤根除性和功能持续性的数据支持在胸膜间皮瘤患者中经胸膜内给药M28z1XXPD1DNRCAR T细胞的I期临床试验的启动。

[0561] 表2 M28z和M28z1XXPD1DNR CAR T细胞构建体的比较

[0562]

	M28z	M28z1XXPD1DNR
靶标	间皮素	间皮素
共刺激结构域	CD28	CD28
CD3z	无突变	两个 ITAM 突变（1XX）
T 细胞内在检查点阻断（PD1DNR）	否	是
体外结果		
人 T 细胞转导，范围	25%-82%	30%-87%
与未转导相比，PD1 胞外结构域 mRNA 表达，倍数	4	157
细胞毒性，范围		
E:T 10:1	35%-45%	25%-51%
E:T 5:1	28%-44%	20%-38%
E:T 2:1	17%-32%	14%-24%
积累，范围，倍数	110-390	53-622
效应细胞因子（E:T 1:1，24 h），范围		
IL-2	18-23 ng/mL	9-19 ng/mL
TNF-α	545-977 pg/mL	380-852 pg/mL
IFN-γ	8-11 ng/mL	6-15 ng/mL
体内结果		
肿瘤根除	26 天	19 天
中位生存期	56 天	未到
再攻击后通过生物发光成像测量肿瘤进展		
15 天再攻击 3 次	+1 log	+0.2 log
52 天再攻击 10 次	+1-2 log	+0.2 log
目前状态	过渡到 II 期临床试验	• 生产的临床级载体和病毒上清

[0563] 实施例5-具有细胞固有PD-1阻断剂的下一代CAR T细胞:临床基本原理、临床前和

临床试验方案制定

[0564] 恶性胸膜间皮瘤(MPM)是一种低突变负担和低PDL1表达的癌症,抑制抗PD1抗体的反应。在正在进行的I/Ⅱ期试验(NCT02414269,n=41)中,已经证实胸膜内给药间皮素靶向嵌合抗原受体(M28z CAR)T细胞然后是PD-1抗体的安全性和抗肿瘤疗效。具有细胞固有抗PD1策略的CART细胞是安全的,并且可以针对低PDL1和高PDL1肿瘤提供抗肿瘤疗效,而无需重复给药抗PD1抗体。

[0565] 总结:本实施例提供临床级M28z1XXPD1DNR CAR T细胞的临床前安全性和增强抗肿瘤疗效的证据。

[0566] 方法:将临床级M28z和M28z1XXPD1DNR(具有PD-1显性负受体的修饰CD3z结构域)CAR作为效应物转导入多供体T细胞,并以具有低PDL1和高PDL1的MPM细胞作为靶细胞。在不同的E:T比下,在患有原位MPM小鼠中评估比较的体外和体内抗肿瘤疗效。系统性抗肿瘤免疫通过在远位重复肿瘤攻击进行测试。

[0567] 结果:体外实验中,M28z与M28z1XXPD1DNR CAR(抗原特异性细胞毒性、积累和效应细胞因子分泌)之间没有发现显著差异。在体内,单剂量的(1×10^5CAR T细胞)经胸膜内给药M28z CAR T细胞,或反复给药抗PD1抗体或细胞固有PD1DNR,可导致类似的肿瘤根除,生存率提高,并且体重增加。参见图20A和表3。在原位MPM小鼠中,单次低剂量(1×10^5CAR T细胞)的M28z1XXPD1DNR CAR T细胞根除胸膜肿瘤,与M28z CAR T细胞相比,通过抵抗远处腹膜部位的肿瘤再攻击而无任何毒性(PD1DNR与小鼠PDL1/2结合),显示出增强的系统免疫性。参见图20B和图20C。与未转导的T细胞相比,获得的肿瘤显示出更高和更深的CAR T细胞渗透。参见图20D。

[0568] 结论:单次、低剂量胸膜内给药M28z1XXPD1DNR CAR T细胞证明可行性、安全性、肿瘤根除、功能持久性和系统性抗肿瘤免疫。

[0569] 表3 PD-1 DNR CAR T细胞与CAR T细胞检查点阻断剂治疗特征的比较

[0570]

特征	PD-1 DNA CAR T 细胞	检查点阻断剂与 CAR T 细胞
机制	细胞固有	细胞外来
潜在剂量	单次	多次
靶向治疗	是	否
毒性	定位到肿瘤	全身性
肿瘤穿透的限制	不太可能	抗体穿透的限制

[0571]

病人选择	不需要	肿瘤 PD-L1 高
抗原反应	多	多

[0572] 实施例6

[0573] 1.总结

[0574] 恶性胸膜间皮瘤(MPM)是一种与石棉接触相关的罕见致命恶性肿瘤。MPM是一种区域性侵袭性原发性胸膜恶性肿瘤,以侵犯重要器官或胸壁为特征(Carbone等人,CA Cancer J Clin.2019;69(5):402-429)。报告大多数患者(60%-70%)患有局部区域性晚期疾病,且无法切除(Nelson等人,J Clin Oncol.2017;35(29):3354-3362;Flores等人,J Thorac Oncol.2007;2(10):957-965)。即使成功完成化疗、积极手术切除和放射治疗的组合,接受

治疗患者的中位生存期仅为9-17个月(Flores等人,J Thorac Oncol.2007;2(10):957-965)。自2003年以来,没有FDA批准的MPM新疗法(Tsao等人,J Thorac Oncol.2018;13(11):1655-1667)。目前MPM患者一线系统治疗的护理标准是顺铂加培美曲塞,中位总生存期为12.1个月,而单用顺铂为9.3个月(Vogelzang等人,J Clin Oncol.2003;21(14):2636-2644)。由于MPM患者具有较低的肿瘤突变负担和较低的程序性死亡配体1(PD-L1)表达,他们对免疫检查点抑制剂的反应有限,并且大量未满足的需求仍然存在(Yarchoan等人,JCI Insight.2019;4(6);Forde等人,Curr Treat Options Oncol.2019;20(2):18)。MPM的局限性、潜在可及性以及在出现时相对缺乏转移使其成为区域靶向治疗的合适候选(Nelson等人,JClin Oncol.2017;35(29):3354-3362)。

[0575] 本实施例描述为支持M28z1XXPD1DNR嵌合抗原受体(CAR)T细胞的胸膜内剂量、一种用于治疗诊断为(组织学或细胞学记录)MPM的至少接受一个化疗方案,并记录有肿瘤的患者的实验性新药的临床应用而进行的非临床研究。

[0576] 这是一项单中心I期研究,最多有36名参与者,旨在评估经环磷酰胺预处理后的基因定向自体M28z1XXPD1DNR CAR T细胞的安全性、剂量要求和靶向效率。本研究中有5个计划剂量水平:1×10^6、3×10^6、6×10^6、1×10^7和3×10^7M28z1XXPD1DNR CAR T细胞/kg,前提是没有剂量限制毒性。M28z1XXPD1DNR CAR T细胞通过留置胸膜导管输注。在治疗前,通过免疫组织化学分析活检肿瘤和/或可溶性间皮素相关肽的血液水平,筛选患者间皮素的表达。

[0577] M28z1XXPD1DNR CAR T细胞是用从载体产生主细胞库293VEC-GALV-SFG-M28z1XXPD1DNR生成的γ-逆转录病毒载体储备上清体外转导的自体T细胞。载体中编码的CAR的主要组件有:

[0578] 1)用于靶向表达间皮素的肿瘤的人抗间皮素scFv,

[0579] 2)用于传导T细胞存活和增殖信号的人CD28共刺激域,

[0580] 3)用于校准T细胞激活的点突变的人CD3ζ,其具有单一功能免疫受体酪氨酸基激活基序(ITAM),和

[0581] 4)用于保护T细胞在抗原暴露后不会进入功能紊乱或衰竭状态的程序性细胞死亡蛋白1(PD1)显性负受体(PD1DNR),(见图21)。

[0582] 间皮素是一种癌细胞表面抗原,在大多数MPM、肺癌、三阴性乳腺癌、胰腺癌和卵巢癌以及一些食管癌中过度表达(Pastan等人,Cancer Res.2014;74(11):2907-2912;Kachala等人,Clin Cancer Res.2014;20(4):1020-1028;Tang等人,Anticancer Agents Med Chem.2013;13(2):276-280;Servais等人,Clin Cancer Res.2012;Kelly等人,Mol Cancer Ther.2012;11(3):517-525;Tchou等人,Breast Cancer Res Treat.2012;133(2):799-804)。发明人之前已经证明间皮素过度表达促进肺腺癌(n=1200)的侵袭性(Kachala等人,Clin Cancer Res.2014;20(4):1020-1028),MPM(n=250)(Servais等人,Clin Cancer Res.2012;Kelly等人,Mol Cancer Ther.2012;11(3):517-525)和三阴性乳腺癌(n=250)(Tozbikian等人,PLoS One.2014;9(12):e114900)。除间皮素在肿瘤中的表达相对较高外,与正常组织相比,间皮素在正常腹膜、胸膜和心包间皮表面的表达水平也非常低(Villena-Vargas等人,Ann Cardiothorac Surg.2012;1(4):466-471),使其成为实体瘤CAR T细胞治疗的理想靶点。间皮素的生物学功能尚不清楚,还在研究中。

[0583] 此前,在宾夕法尼亚大学进行的一项临床研究中(NCT01355965),将靶向间皮素的

CAR T细胞静脉注射给人(3×10^8细胞/m^2或4.8×10^7细胞/剂量),其中,该CAR包含鼠scFv。据报道,在1名患者中发现的过敏反应是由针对该研究中使用的CAR构建体的人源化小鼠scFv部分开发的抗鼠抗体反应引起的(Beatty等人,Cancer Immunol Res.2014)。相反,在最近一项由发明人实验室进行的I期研究中(NCT02414269),靶向间皮素的CAR T细胞(高达6×10^7CAR T细胞/kg)经胸膜内给药,其由来自人Fab文库的全人scFv组成(Feng等人,Mol Cancer Ther.2009)。迄今为止,已有40名患者接受治疗,而未观察到剂量限制性毒性。本研究在一组患者(n=18)中观察到初步疗效,这些患者接受CAR T细胞治疗,随后接受至少3剂派姆单抗(抗PD1)治疗,并进行了另外3个月的随访。重要的是,该组中83%的患者在6个月时不需要新的或额外的治疗,半数患者在18个月内没有接受额外的治疗。此外,在大多数患者中,经胸膜内给药>100天后,在外周血中检测到CAR T细胞,表明这些细胞在患者体内持续存在。

[0584] 为支持首次人体临床试验,M28z1XXPD1DNR CAR T细胞的药理学项目由一系列正交的体外特异性、细胞毒性、积累和细胞因子分泌研究以及小鼠体内肿瘤疗效和生存研究组成,其结果为转化为临床应用建议有效剂量。表4提供非临床药理学和毒理学分析及其主要结果的综合总结。

[0585] 表4药理学和毒理学分析及其主要结果的综合总结

[0586]

实验	目的	主要结果
人肿瘤中的间皮素表达	明确人肿瘤中细胞表面间皮素的分布	-在实体瘤中间皮素表达 -在正常肺和胸部组织中没有间皮素表达
转导	确定病毒上清转导效率	-病毒上清浓度与 CAR 和 PD1DNR 转导效率成正比
载体拷贝数（VCN）	确定 T 细胞基因组中插入的载体数	-CAR 表达和 VCN 之间为正相关 -CAR 转导优化至 35%-70%以保持 VCN≤5
PD1DNR 量化	明显地量化内源性 PD1 和 PD1DNR 水平	-mycM28z1XXPD1DNR CAR T 细胞的 PD1 胞外结构域在蛋白质水平上调（>2 倍），以及在 mRNA 水平上调(>100 倍）
Myc-标签干扰	研究 myc 标签对 CAR 功能的干扰	- 有无 myc 标签的 M28z1XXPD1DNR CAR T 细

[0587]

		胞在体外均表现出相同的抗肿瘤疗效
细胞毒性	确定抗原特异性细胞毒性	-mycM28z1XXPD1DNR CAR T 细胞介导抗原特异性 HLA 非依赖性肿瘤消除
积累	研究 CAR T 细胞积累	-经过 6 轮抗原刺激发现 mycM28z1XXPD1DNR CAR T 细胞增殖并积累至 622 倍
重复抗原刺激	研究在连续抗原暴露下的细胞毒性	- 初始抗原刺激：mycM28z1XXPD1DNR CAR T 细胞与 mycM28z CAR T 细胞之间的细胞毒性相似 - 重复抗原刺激：mycM28z1XXPD1DNR CAR T 细胞的细胞毒性保持但 mycM28z CAR T 细胞的细胞毒性降低
细胞因子分泌	量化抗原刺激后的细胞因子分泌	- 抗原刺激后 mycM28z1XXPD1DNR CAR T 细胞分泌效应细胞因子（IL-2、IFN-γ、TNF-α） -在重复抗原刺激后效应细胞因子分泌降低
体内抗肿瘤疗效	研究体内抗肿瘤疗效和存活	-在单次胸膜内给药一剂 3×10^4 mycM28z1XXPD1DNR CAR T 细胞/小鼠后观察到疗效和肿瘤根除 -使用 mycM28z1XXPD1DNR CAR T 细胞（5×10^4 和 1×10^5）治疗的小鼠保持无肿瘤状态直到研究结束（第 68 天；未到中位生存期 vs. 使用 mycM28z CAR T 细胞治疗的小鼠中位生存期为 50 天）

[0588]

体外肿瘤的免疫荧光染色	检测经胸膜内治疗的小鼠的初代肿瘤内的 CAR T 细胞	- 发现局部给药 mycM28z1XXPD1DNR CAR T 细胞在癌周区域渗透肿瘤和富集
体内重复抗原攻击	研究功能持久性和长期抗肿瘤疗效	-单次胸膜内给药一剂 1×10^5 mycM28z1XXPD1DNR CAR T 细胞通过抵抗腹膜内肿瘤的再攻击显示出优越的功能持久性和增强的长期抗肿瘤活性 -mycM28z CAR T 细胞在抗原再攻击后变得功能失调
体内临床级 CAR T 细胞抗肿瘤疗效	验证用于临床试验的用载体库转导的冷冻保存的 T 细胞的抗肿瘤疗效	- 冷冻保存的临床级 M28z1XXPD1DNR CAR T 细胞在解冻后显示出高活力，表现出抗肿瘤疗效和延长的体内生存期 -未观察到毒性
毒性	研究体内毒性	-无死亡和发病 -无显著的临床迹象 -与无肿瘤对照相比体重无明显差异 -组织病理学：未见与急性或迟发毒性相关的镜检结果 -血液学：研究第 15 天处死的雌性小鼠单核细胞平均百分比较高；与任何镜检结果不相关 -临床化学：研究第 14 天处死的雄性小鼠平均总蛋白值较低；与任何镜检结果不相关 -在间皮素瘤异种移植模型中单次原位给药 1×10^5 mycM28z1XXPD1DNR CAR T 细胞耐受良好

[0589] 为便于临床前研究中对CAR T细胞的检测,生成在间皮素特异性scFv的N端含有

myc标签的CAR T细胞(mycM28z1XXPD1DNR)。为评估mycM28z1XXPD1DNR和M28z1XXPD1DNR CAR T细胞的一致性,比较病毒上清的转导效率并观察两种构建体之间载体组件的一致的浓度依赖性表达。此外,由于P2A自裂解肽的存在,CAR和PD1DNR在每个转导细胞内均按比例表达,该肽可有效介导双顺反子转基因表达。将表达CAR的转导细胞百分比与T细胞基因组中插入的载体拷贝数进行比较后,观察到用于转导的病毒上清稀释度与产生的载体拷贝数(VCN)之间存在正线性关联。从这些观察结果可以确定,表达CAR的T细胞的35%-70%范围可确保最佳的转导效率,这个范围(1)保持较低的VCN:细胞比率,(2)降低插入突变的风险,而插入突变通常伴随着较高的VCN:细胞比率。

[0590] 为确认PD1DNR的表达并将其与内源性对应物区分开来,使用流式细胞术和qPCR分析分别测量和比较mycM28z1XXPD1DNR和mycM28z转导的T细胞中细胞表面蛋白和细胞内PD1的mRNA表达。在细胞表面蛋白质水平上,与mycM28z CAR T细胞相比,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞显示PD1染色阳性细胞百分比增加2倍,PD1阳性细胞显示的平均荧光强度(MFI)增加3倍。在mRNA水平上,相对于未转导的T细胞,mycM28z CAR T细胞在PD1胞外和胞内结构域均显示出4倍增加,而mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的PD1胞外结构域增加157倍,PD1胞内结构域仅增加2倍。PD1胞外结构域的表达数量级更高表明PD1DNR的高表达,其用于对抗检查点抑制。

[0591] 最后,为排除myc标签(用于临床前研究)对CAR功能的任何潜在干扰,使用基于阻抗的细胞毒性试验比较mycM28z1XXPD1DNR和M28z1XXPD1DNR CAR T细胞的抗肿瘤疗效,该试验显示3个不同供体的间皮素阳性肿瘤细胞的动力学和整体杀伤没有差异,证实myc标签不会干扰CAR功能。

[0592] 接下来,分析mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的特异性、细胞毒性、积累和细胞因子分泌。在^{51}Cr细胞毒性试验中,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞对间皮素阳性肿瘤细胞表现出抗原特异性和人白细胞抗原(HLA)-非依赖性细胞毒性,同时具有PD-L1的组成性表达和过度表达。未观察到对间皮素阴性肿瘤细胞的非特异性细胞毒性。在没有间皮素抗原表达的情况下,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞对PD-L1过度表达的靶细胞不表达任何细胞毒性。在进行重复抗原刺激试验(抗原应激试验)后,发现在6次抗原刺激期间,mycM28z1XXPD1DNR和mycM28z CART细胞的扩增倍数高达622倍。在测试的时间点,构建体在第一次抗原刺激后表现出类似的细胞毒性,并在第四次抗原刺激前保持类似的细胞毒性。当效应子与靶标(E:T)比率进一步降低以增加抗原应激时,在第七次抗原刺激时,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞比mycM28z CAR T细胞保留的细胞毒性更好。然而,在试验过程中,mycM28z1XXPD1DNR和mycM28z CAR T细胞的效应细胞因子(IL-2、IFN-γ和TNF-α)的分泌逐渐减少,表明这两种构建体的安全性。

[0593] 将与萤火虫荧光素酶(ffLuc)共转导的MPM肿瘤细胞经胸膜内给药以建立代表MPM原位癌模型的肿瘤。为非侵入性监测肿瘤生长,使用我们实验室先前发表的定量监测胸膜肿瘤消退或进展的优化方案,向荷瘤小鼠腹腔内注射150mg/kg剂量的荧光素,并在15分钟后在IVIS光谱成像系统中显示(Perkinlemer,Waltham,MA)(Servais等人,Curr Protoc Pharmacol.2011;Chapter 14:Unit14 21)。

[0594] 在研究CAR T细胞体内抗肿瘤活性的初始实验中,荷原位肿瘤的NSG小鼠接受单次胸膜内给药3×10^4mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的治疗,并与单次胸膜内给药针对前列腺

特异性膜抗原(P28z)的对照CAR T细胞治疗的小鼠进行比较。15天后,用mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠显示出显著的肿瘤负荷减少(p=0.0002),而用P28z CART细胞治疗的小鼠由于高肿瘤负荷开始变得垂死。

[0595] 在第二次体内研究中,将患有原位肿瘤的小鼠分为3组,每组接受1×10^5或5×10^4mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞或1×10^5mycM28z CAR T细胞的单次胸膜内剂量。连续肿瘤显像显示,早在CAR T细胞给药后5天,肿瘤负荷降低,通过生物发光成像(BLI)信号降低至基线水平确定肿瘤完全根除,用1×10^5mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠约在第19天肿瘤完全根除,用1×10^5mycM28z CAR T细胞治疗的小鼠约在第26天肿瘤完全根除。使用任一剂量mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠在研究结束(68天)前保持无肿瘤。用1×10^5mycM28z CAR T细胞治疗的小鼠的中位生存期为50天;使用任一剂量mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠未达到中位生存率(>68天;p=0.0085-0.0427)。体外胸膜肿瘤的免疫荧光成像显示,局部递送后3天,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞以高密度包围肿瘤周围,并侵入肿瘤实质。这些结果通过使用来自用mycM28z1XXPD1DNR CAR转导的不同百分比的CD4和CD8 T细胞的多个供体的T细胞重现。

[0596] 为研究mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的功能持久性,对接受单次胸膜内剂量为1×10^5mycM28z1XXPD1DNR或mycM28z CAR T细胞的原位MPM小鼠通过每4-8天最多10次腹腔给药(在腹膜腔内比在胸膜腔内重复给药细胞更可行)递增剂量的(2×10^6至11×10^6细胞/剂量)间皮素阳性肿瘤细胞进行再攻击。在每次肿瘤再攻击后不久,用mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠的BLI信号达到峰值,并在所有再攻击时间点回到基线水平。相反,用mycM28z CAR T细胞治疗的小鼠在多达5次肿瘤再攻击中显示出相同的趋势,但在后期肿瘤再攻击时间点(6至10)给予较高肿瘤剂量后,未能控制肿瘤重建,导致肿瘤复发和垂死状态。mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞抵抗10次重复攻击的腹腔内肿瘤建立,甚至在单次胸膜内给药剂量1×10^5CAR T细胞后>126天,没有任何明显的毒性迹象。在高抗原应激环境中,与体内mycM28z CAR T细胞相比,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞表现出优越的功能持久性和增强的抗肿瘤疗效。为证实这种增强的疗效不是由移植物抗宿主病引起的(用CAR T细胞治疗的NSG小鼠中移植物抗宿主病在此时间点很常见),施用了非抗原表达靶标,结果是肿瘤BLI增加而无抗肿瘤反应,证实观察到的抗肿瘤疗效是抗原特异性的。

[0597] 为验证M28z1XXPD1DNR CAR编码的病毒上清转导的用于临床试验的冷冻保存的T细胞的抗肿瘤疗效,将由MSK Cell Therapy and Cell Engineering Facility(CTCEF)产生的M28z1XXPD1DNR CAR T细胞导入,对M28z1XXPD1DNR CAR T细胞进行解冻(解冻后生存率:88%)并以6×10^4和2×10^5CAR T细胞/小鼠的剂量注射入患有原位MPM小鼠的胸膜内。观察两种剂量的肿瘤消退和根除情况,100%的小鼠存活至观察期结束(第70天),而未经治疗的小鼠肿瘤进展,导致第19天死亡。冷冻保存的CAR T细胞在解冻后表现出高活力,并且有效,没有任何毒性迹象。

[0598] 在进行上述疗效实验时,在小鼠身上未观察到任何毒性,体重始终保持稳定。

[0599] 本实施例第3节(标题为“非临床毒理学”)描述了一项在小鼠中进行的研究,以具体评估mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞在MPM原位小鼠模型中的潜在毒性。对96只(48只雄性和48只雌性)NSG小鼠的死亡率、发病率、体重、临床体征、血液学和临床化学、大体尸检和组织病理学数据进行评估,这些小鼠患有8天大的原位间皮瘤,随机分为对照组和治疗组。通

过原位注射一次性给药一剂1×10^{5}CAR T细胞/小鼠或赋形剂对照(5×10^{6}CAR T细胞/kg)。在CAR T细胞或赋形剂给药后第2天和第14天(分别为中期和最终处死),对小鼠使用镇静剂,以进行尸检,并评估血液学和临床化学参数。选择第14天作为最终处死的时间点,因为肿瘤在此时间点或显著消退或已被根除(如先前实验中的BLI或尸检所示)。在这个时间点进行处死和尸检可以检查间皮素低表达水平的正常组织,特别是胸膜、腹膜和心包的任何靶向、非肿瘤效应(我们CAR中使用的scFv对小鼠间皮素产生反应)(Feng等人,Mol Cancer Ther.2009),在没有高抗原表达的肿瘤负荷的情况下,伴随着CAR T细胞扩增峰值。

[0600] 本研究中未观察到动物的死亡或发病,但对照赋形剂治疗组的2只动物除外,它们在给予肿瘤后20-22天因发病和呼吸困难而经历选择处死。我们实验室之前的工作表明,对照赋形剂治疗的动物可能在肿瘤给药后约20-22天因肿瘤负荷而变得垂死(Servais等人,Clin Cancer Res.2012;Servais等人,Curr Protoc Pharmacol.2011;Chapter 14:Unit14 21;Adusumilli等人,Sci Transl Med.2014;6(261):261ra151;Cherkassky等人,J Clin Invest.2016;126(8):3130-3144;Servais等人,PLoS One.2011;6(10):e26722)。因此,这些处死是计划外的,但并非意料之外。没有死亡或发病追溯到CAR T细胞。接受赋形剂对照的动物在研究期间体重逐渐下降,且与非肿瘤对照组和接受mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠相比,体重存在明显差异。这归因于对照赋形剂治疗动物的肿瘤负荷增加。未观察到使用mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠出现明显的临床症状。观察到一只供试品治疗的小鼠出现轻微结痂,这是由于手术夹引起的刺激,因为没有其他动物受到影响且动物活动正常。在整个监测期间,小鼠表现正常。

[0601] 与肿瘤对照赋形剂小鼠(平均值3.34%,n=5)相比,在CAR T细胞给药14天后接受最终处死的mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的雌性小鼠的单核细胞百分比平均值较高(平均值18.44%,n=5)($p<0.0001$)。建立的单核细胞百分比的参考范围为0.9%-18%。然而,这与任何显微镜观察结果都不相关。未观察到评估的血液学参数的其他显著或异常结果。供试品治疗组和相应的赋形剂治疗组之间的任何差异均在正常参考范围内,或在生物学上不相关或无统计学意义。

[0602] 使用mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的雄性小鼠在CAR T细胞给药后14天进行最终处死,与肿瘤对照赋形剂小鼠(平均值4.68g/dL,n=4)相比,其平均总蛋白值较低(平均值3.83g/dL,n=5)($p=0.0022$)。建立的总蛋白质参考范围为4.1-6.4g/dL。然而,这与任何显微镜观察结果都不相关。给药供试品后,未观察到对临床化学参数的其他不良影响。供试品治疗组和相应的赋形剂治疗组之间的任何差异均在正常参考范围内,或在生物学上不相关或无统计学意义。

[0603] 病理组织学检查显示,在中期和最终的处死日,没有与mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞给药急性或迟发毒性相关的显微镜观察结果。CAR T细胞中期处死组动物的镜检结果包括异种移植瘤内存在混合细胞浸润。这被认为与供试品给药有关,但与任何供试品毒性无关。任何其他观察到的与对照组发生率相似或在所使用的物种/菌株中常见的结果被确定为偶发性发生。

[0604] 胸膜内给药8天后,在肿瘤和脾脏中发现mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞,BLI显示,在2周时间点,CAR T细胞治疗小鼠的肿瘤负荷显著降低,证实了给药成功和供试品的药理活性。在同一时间点获得的小鼠血浆细胞因子水平显示,接受CAR T细胞治疗的小鼠的IL-4

水平略高于接受赋形剂对照的小鼠。IL-10、IL-6、KC/GRO和TNF-α水平通常较低，接受CAR T细胞的小鼠和接受赋形剂对照的小鼠之间没有显著差异。未检测到IFN-γ、IL-12p70、IL-1β、IL-2和IL-5(低于定量限)。

[0605] 总之，数据表明M28z1XXPD1DNR CAR T细胞具有良好的耐受性。1×10^5细胞/小鼠的剂量比患者的起始剂量(1×10^6细胞/kg体重)高5倍，相当于5×10^6细胞/kg。M28z1XXPD1DNR CAR T细胞具有与M28z CAR T细胞相同的抗原靶向部分，其患者安全数据(n＝50)已可获得。在我们的临床试验(IND16354)中，胸膜内给药高达6×10^7M28zCAR T细胞/kg并联合CAR T细胞给药3周后给予抗PD1检查点阻断抗体，我们没有观察到任何剂量限制性毒性，也没有观察到靶向、非肿瘤毒性。四名患者在多剂量抗PD1药物(冲洗期为4周)后接受第二剂胸膜内M28z CAR T细胞注射，未观察到毒性。总之，所有可获得的临床前和临床数据合理地说明M28z1XXPD1DNR CAR T细胞的建议的起始剂量和给药途径不会对我们的患者造成不可接受的风险。

[0606] 2.非临床药理学

[0607] A.方法

[0608] CAR载体 表5总结了非临床研究中使用的载体。

[0609] 表5非临床研究中使用的载体概述

[0610]

载体	蛋白表达
mycM28z	间皮素特异性 scFv（myc 标签）、CD28、CD3ζ
mycM28z1XXPD1DNR	间皮素特异性 scFv（myc 标签）、CD28、CD3ζ(1XX)、P2A、PD1DNR
M28z1XXPD1DNR（研究级）	间皮素特异性 scFv、CD28、CD3ζ(1XX)、P2A、PD1DNR
M28z1XXPD1DNR（临床级*）	间皮素特异性 scFv、CD28、CD3ζ(1XX)、P2A、PD1DNR
GFP-ffLuc（转导入肿瘤细胞中）	GFP、萤火虫荧光素酶
p28z（阴性对照）	前列腺特异性膜抗原（PSMA）scFv、CD28、CD3ζ

[0611] *临床级:由MSK Cell Therapy and Cell Engineering Facility使用为临床试验生产的病毒上清制造的CAR T细胞。

[0612] 靶向间皮素的CAR构建体包含间皮素特异性scFv(克隆m912)(Feng等人,Mol Cancer Ther.2009)，融合到CD28共刺激结构域和CD3ζ信号传导结构域(M28z)。CD3ζ链在其三个ITAM中的两个发生突变，形成单一功能性ITAM(称为1XX)(Feucht等人,Nat Med.2019;25(1):82-88)。CAR通过来源于猪捷申病毒-1的P2A位点与PD1DNR融合。PD1DNR由PD1信号肽和PD1胞外结构域与CD8跨膜和铰链结构域融合而成(Cherkassky等人,J Clin Invest.2016;126(8):3130-3144)。该诱饵受体耗尽PD1信号传导结构域，从而提供T细胞内在检查点阻断。为了便于检测CAR，将myc标签(氨基酸序列EQKLISEEDL×2)融合到构建体mycM28z和mycM28z1XXPD1DNR中scFv的N端。为避免人体免疫原性的任何潜在风险，临床级

构建体M28z1XXPD1DNR不含myc标签。此外,对蛋白质表达进行密码子优化,以避免在构建CAR和PD1DNR时产生任何免疫原性。非临床研究中使用的构建体的详细结构如图22所示。

[0613] CAR构建体的表达受逆转录病毒SFG载体的莫洛尼(Moloney)鼠白血病病毒长末端重复(LTR)的控制(Riviere等人,Proc Natl Acad Sci U S A.1995;92(15):6733-6737)。CAR和PD1DNR的表达均由逆转录病毒LTR驱动。

[0614] 将所有CAR载体转染到293T H29包装细胞系中,利用这些细胞产生的病毒上清转导并产生稳定的293T RD114细胞系。

[0615] CAR T细胞:根据机构审查委员会批准的协议,从健康志愿献血者的血液中分离出人初始T淋巴细胞。通过淋巴细胞分离培养基(康宁,纽约,NY)上的低密度离心分离植物血凝素激活的外周血单个核细胞(PBMC)。分离后两天,在24℃条件下,在涂有15μg/mL RetroNectin(Takara,志贺县,日本)的6孔培养板上,1800g持续60分钟通过离心接种(spinoculation),用含有mycM28z、mycM28z1XXPD1DNR或M28z1XXPD1DNR载体的病毒上清转导PBMC。离心接种后,将转导的PBMC保存在RPMI-1640中,并添加10%胎牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺、100单位/mL青霉素、100μg/mL链霉素和20单位/mL IL-2。通过流式细胞术分析带标签CAR的scFv上myc标签的表达,或通过F(ab')$_2$片段特异性抗人IgG抗体染色来检测M28z1XXPD1DNR的未带标签CAR的scFv的表达,从而确定转导效率。CAR T细胞通过抗人CD3染色检测的活性>70%,T细胞纯度>95%,流式细胞仪检测转导效率为35%-70%,以及CD4/CD8表达。表6总结了非临床研究中使用的T细胞的特征。

[0616] 表6用于非临床研究的T细胞特征

[0617]

PBMC 供体	%CD3	%CD3+ CAR	%CD3+ CAR CD4+	%CD3+ CAR CD8+
H16	97-98	43-62	48-57	33-45
H18	97-99	38-57	42-45	45-52
H19	98	37-64	41-46	47-51
C	97-98	65-66	37-38	55-57
C1	97	64-70	46	48-49
H1	97	56-60	38	未确定

[0618] 肿瘤细胞 对来自MSTO-211H人胸膜间皮瘤细胞系(ATCC CRL-2081)的细胞进行基因修饰,并用于体外和体内研究(表7)。

[0619] 表7非临床研究中使用的肿瘤细胞概述

[0620]

肿瘤细胞	蛋白质表达
MSTOG	GFP、ffLuc
MGM	GFP、ffLuc、间皮素
MGM-PGL1	GFP、ffLuc、间皮素、PD-L1

[0621] MSTO-211H是一种双相MPM癌细胞系,缺乏内源性CD80/86共刺激配体的表达。对MSTO-211H细胞进行逆转录病毒转导以表达GFP和ffLuc蛋白,称为MSTOG,允许使用在MSK构建的SFG逆转录病毒载体进行无创性体内BLI。将含有过滤病毒的培养基添加到使用8μg/mL聚凝胺(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)渗透的细胞中。24小时后,用新收集的病毒重新感染细胞。用亚克隆到SFG逆转录病毒载体中的人间皮素变体1(从人卵巢癌细胞系[OVCAR-3]中

分离)转导这些细胞,以产生间皮素+MSTO-211H细胞,称为MGM。类似地,MGM细胞被PD-L1(OriGene cDNA亚克隆到SFG载体中)转导,产生MGM-PDL1。肿瘤细胞保存在37℃的5%CO_2增湿培养箱中含有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺、100单位/毫升青霉素和100μg/mL链霉素的RPMI-1640培养基中。观察到荧光素酶表达的肿瘤细胞数与体外BLI光子计数之间的线性相关性(Pearson r=0.999,p<0.0001,数据未显示)。转导蛋白的相对表达水平如图23所示。

[0622] 流式细胞术 使用Attune NxT流式细胞仪(ThermoScientific,Waltham,MA)或BD LSRFortessa(BD Biosciences,San Jose,CA)进行流式细胞术。使用藻红蛋白偶联抗人间皮素大鼠IgG2a(R&DSystems,Minneapolis,MN)检测肿瘤细胞上的人间皮素细胞表面表达。使用藻红蛋白-花青7偶联抗人PD-L1小鼠IgG1(BD Biosciences)检测肿瘤细胞上的人PD-L1细胞表面表达。使用别藻蓝蛋白-花青素7-偶联抗人CD3小鼠IgG2α或藻红蛋白-花青素7偶联抗人CD3小鼠IgG1抗体(BioLegend,San Diego,CA)分析人T细胞的人CD3的细胞表面表达以及分别使用异硫氰酸荧光素偶联抗人CD4小鼠IgG1(BioLegend)或Alexa Fluor 488偶联抗人CD8小鼠IgG1(BioLegend)分析人CD4或人CD8。使用藻红蛋白偶联抗myc标签抗体(Cell Signaling Technology,Danvers,MA)或Alexa Fluor 647偶联$F(ab')_2$片段-特异性山羊抗人$F(ab')_2$片段(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA)对CAR的细胞表面表达进行定量。用Brilliant Violet 711偶联抗人PD1小鼠IgG1(BioLegend)分析CAR T细胞上PD1的细胞表面表达。为了体外检测人T细胞,用藻红蛋白花青素7偶联抗人CD3小鼠IgG1抗体和别藻蓝蛋白花青素7偶联抗人CD45小鼠IgG1抗体(BioLegend)对处理过的小鼠组织进行染色。通过使用4'6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI,ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)或eFluor 506(ThermoFisher Scientific)对细胞进行染色,以区分活细胞和死细胞。使用FCS Express(De Novo Software,Pasadena,CA)和FlowJo(BD Biosciences)软件进行数据分析。表8总结了用于流式细胞术的抗体。

[0623] 表8用于非临床药理学研究的流式细胞术抗体

[0624]

标记	克隆	物种	抗体格式	荧光素	制造商
CD3	HIT3a	小鼠	IgG2a	APC-CY7	BioLegend
	UCHT1	小鼠	IgG1	PE-CY7	BioLegend
CD45	2D1	小鼠	IgG1	APC-CY7	BioLegend

[0625]

CD4	RPA-T4	小鼠	IgG1	FITC	BioLegend
CD8	RPA-T8	小鼠	IgG1	AF700	BioLegend
PD1	EH12.2H7	小鼠	IgG1	BV711	BioLegend
Myc 标签	1B11	小鼠	IgG2a	PE	Cell Signaling
抗 $F(ab')_2$	多克隆	山羊	$F(ab')_2$	AF647	Jacson ImmunoRearch
间皮素	420411	大鼠	IgG2a	PE	R&D Systems
PD-L1	MIH1	小鼠	IgG1	PE-CY7	BD Biosciences

[0626] VCN的测定 使用Miniprep Kit(Qiagen,Hilden,Germany)分离CAR T细胞的总基因组DNA。TaqManPCR引物和探针用于检测SFG和管家基因白蛋白(ALB)。人SFG探针和引物序

列:

[0627] 探针序列:5'-VIC-AGGACCTTACACAGTCCTGCTGAC-TAMRA-3'[SEQ ID NO:126]

[0628] 正向引物序列:5'-AGAACCTAGAACCTCGCTGGA-3'[SEQ ID NO:127]

[0629] 反向引物序列:5'-CTGCGATGCCGTCTACTTTG-3'[SEQ ID NO:128]

[0630] 人ALB探针和引物序列:

[0631] 探针序列:

[0632] 5'-VIC-TGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGA-TAMRA-3'[SEQ ID NO:129]

[0633] 正向引物序列:5'-TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT-3'[SEQ ID NO:130]

[0634] 反向引物序列:5'-CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT-3'[SEQ ID NO:131]

[0635] 扩增反应(25μL)含有5μL(150μg)基因组DNA和12.5μL TaqMan Fast Advanced Master Mix(ThermoFisher Scientific),0.8μL引物(正向和反向),0.2μL TaqMan探针和5.7μL蒸馏水。qPCR条件如下:50℃(2分钟)、95℃(20分钟),然后使用QuantStudio 7-Flex Real-Time PCR System(ThermoFisher Scientific)进行42个95℃(15秒)和60℃(1分钟)的循环。所有PCR检测均一式三份进行。每个细胞的VCN计算为(SFG平均数量/ALB平均数量)*2的比率。根据SFG和ALB标准曲线推算平均量。

[0636] PD1 mRNA表达的测定 使用Miniprep Kit(Qiagen)从CART细胞中分离总RNA,并使用High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(ThermoFisher Scientific)进行逆转录反应。SYBR Green法用于检测人PDCD1的细胞外和胞内结构域。人甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)用于标准化。使用以下引物。

[0637] GAPDH引物序列:

[0638] 正向引物序列:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'[SEQ ID NO:132]

[0639] 反向引物序列:5'-CATGGGTGGAATCATATTGGAA-3'[SEQ ID NO:133]

[0640] PD1胞外结构域引物序列(Yoon等人,Science.2015;349(6247):1261669):

[0641] 正向引物序列:5'-CCAGGATGGTTCTTAGACTCCC-3'[SEQ ID NO:134]

[0642] 反向引物序列:5'-TTTAGCACGAAGCTCTCCGAT-3'[SEQ ID NO:135]

[0643] PD1胞内结构域引物序列(Hsu等人,J Immunol.2016;197(5):1884-1892):

[0644] 正向引物序列:5'-ACGAGGGACAATAGGAGCCA-3'[SEQ ID NO:136]

[0645] 反向引物序列:5'-GGCATACTCCGTCTGCTCAG-3'[SEQ ID NO:137]

[0646] cDNA稀释5倍,用于随后的qPCR试验。扩增反应(20μL)含有从200ng总RNA中产生的cDNA和10μL QuantiTect SYBR Green PCR Mix(Qiagen)、4μL引物(正向和反向,每个200nM)和蒸馏水。qPCR条件如下:95℃(15分钟)、95℃(20分钟),然后使用QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR系统(ThermoFisher Scientific)进行45个94℃(15秒),60℃(30秒),72℃(30秒)和50℃(数据收集20秒)的循环。所有PCR检测均一式三份进行。所有引物均通过Integrated DNA Technologies(Coralville,IA)合成,并计算扩增效率(E)值。目的基因的相对表达根据Pfaffl公式按比例归一化到内参组(Pfaff,Nucleic Acids Res.2001;29(9):e45)

[0647] 相对比例=$(E_{目的基因})^{\Delta Ct目的基因(对照-样品)}/(E_{内参基因})^{\Delta Ct内参基因(对照-样品)}$

[0648] 目的基因=PD1胞外/胞内结构域;内参基因=GAPDH;对照=未转导的T细胞。

[0649] ^{51}Cr细胞毒性试验 通过标准51Cr释放试验测定并比较mycM28z1XXPD1DNR CAR T

细胞与mycM28z T细胞的细胞毒性。在96孔圆底平板中,将含有10％FBS、2mM L-谷氨酰胺、100单位/mL青霉素和100μg/mL链霉素的200μL RPMI中的5×10^5至1×10^6总T细胞在100μL培养基中按1:2连续稀释。将靶细胞与每1×10^6细胞75μCi的^{51}Cr孵育2h,并以5×10^3细胞/100μL的终浓度重悬。用培养基洗涤3次后,将100μL靶细胞添加到T细胞中,一式三份,并在37℃的5％CO_2增湿培养箱中孵育4-18h。收集上清,将其置于96孔Lumina板(Perkineller)上,并在PerkinElmer TopCount上测量。在单独使用培养基培养的靶细胞中评估自发^{51Cr}释放,在100μL 0.2％Triton X-100培养的靶细胞中测定最大^{51Cr}释放。特异性溶解的百分比计算如下:[(每分钟实验计数(cpm)-自发释放cpm)/(总cpm-自发释放cpm)]×100。数据报告为三次测量的平均值+/-平均值的标准误差,并使用Microsoft Excel(Microsoft,Redmond,WA)或GraphPad Prism(GraphPad Software,La Jolla,CA)进行分析。

[0650] 阻抗试验 使用xCELLigence实时细胞分析仪器(ACEA Biosciences,San Diego,CA)实时评估体外CAR T细胞诱导的靶细胞杀伤。首先,将含有10％FBS、2mM L-谷氨酰胺、100单位/mL青霉素和100μg/mL链霉素的50μL RPMI作为靶细胞和效应细胞的培养基添加到涂覆有金微电极(ACEA Biosciences)的96孔微量滴定板中,以测量背景阻抗。其次,在每孔100μL培养基中接种10000个靶细胞,并在以1:1至1:3的E:T比将CAR T细胞以一式三份的形式添加到50μL培养基中之前监测靶细胞粘附24-34小时。为了评估因CAR T细胞诱导的靶细胞杀伤和脱离而引起的阻抗变化,在添加效应细胞后,在37℃下,在5％CO_2增湿培养箱中每15分钟记录一次数据,持续4天。

[0651] 重复抗原刺激 为了研究CAR T细胞在体外重复抗原刺激下的抗肿瘤疗效,将mycM28z1XXPD1DNR或mycM28z作为对照转导的3.3×10^5至1×10^6T细胞与3.3×10^5辐照(irradiated)靶细胞(E:T比为1:1至3:1)在24孔细胞培养板中在含有10％FBS、2mM L-谷氨酰胺、100单位/mL青霉素和100μg/mL链霉素的1mL RPMI中共培养。共培养48小时后,通过流式细胞术聚集、计数T细胞,分析其CAR的表达,并以相同的E:T比与辐照靶细胞重新移植长达6轮的重复抗原暴露。在1、3和6轮抗原暴露后,使用^{51}铬释放和基于阻抗的试验来评估CAR T细胞的细胞毒性。

[0652] 积累 通过将mycM28z1XXPD1DNR或mycM28z作为对照转导的3.3×10^5T细胞与3.3×10^5辐照的靶细胞(E:T比为1:1)在24孔细胞培养板中在含有10％FBS、2mM L-谷氨酰胺、100单位/mL青霉素和100μg/mL链霉素的1mL RPMI中共培养,以评估积累。共培养48小时后,通过流式细胞术聚集、计数T细胞,分析其CAR的表达,并以相同的E:T比与辐照的靶细胞重新移植长达6轮的重复抗原暴露。每个抗原刺激周期后的CAR T细胞数量用于通过绝对T细胞计数确定CAR T细胞随时间的积累。

[0653] 细胞因子定量 通过将mycM28z1XXPD1DNR或mycM28z作为对照转导的3.3×10^5T细胞与3.3×10^3辐照的靶细胞(E:T比为1:1)在24孔细胞培养板中在含有10％FBS、2mM L-谷氨酰胺、100单位/mL青霉素和100μg/mL链霉素的1mL RPMI中共培养,进行细胞因子释放测定。共培养48小时后,通过流式细胞术收集、计数T细胞,分析其CAR的表达,并以相同的E:T比与辐照的靶细胞重新移植长达6轮的重复抗原暴露。对于细胞因子定量,在共培养24小时后收集上清以重复抗原刺激1、3和6,并在室温下以800g离心10分钟以去除细胞和碎片。根据制造商的说明书,使用Human Cytokine Magnetic 30-plex面板(Invitrogen,Carlsbad,CA)和MAGPIX系统(Luminex,Austin,TX)测定细胞因子水平,一式两份。

[0654] 原位小鼠模型 原位肿瘤模型被认为比标准皮下模型更具临床相关性,能更好预测药物疗效。由于肿瘤细胞直接植入起源器官,这些肿瘤比传统的皮下异种移植肿瘤模型更好地反映了原始情况(例如微环境)。荧光素酶基因转染的肿瘤细胞与这些细胞的原位植入相结合,使得肿瘤生长、肿瘤分布和转移生长的无创可视化成为可能。

[0655] 使用6-10周龄的雌性和雄性NOD/SCID gamma小鼠(The Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)制作原位模型。所有程序均按照Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)批准的协议进行。用吸入的异氟醚和氧气麻醉小鼠。为了建立原位MPM肿瘤,通过右胸切口直接胸膜内注射200μL无血清培养基中的间皮素表达细胞(8×10^5肿瘤细胞)。注射后8-12天接种后,>95%的小鼠中肿瘤建立。根据IACUC指南,小鼠在垂死时被处死。

[0656] 该模型再现了人肿瘤微环境,反映了MPM的大体外观和组织病理学特征(见图24A)。此外,在我们的小鼠模型中,MPM肿瘤的广泛淋巴血管化(见图24B)是人MPM的特征。

[0657] BLI是一种敏感的活体检测方法,能够检测到胸膜腔内少至1×10^3的肿瘤细胞。标准化和敏感性基于我们自己的实验(Kachala等人,Clin Cancer Res.2014;20(4):1020-1028;Servais等人,Clin Cancer Res.2012;Servais等人,Curr Protoc Pharmacol.2011;Chapter 14:Unit14 21;Servais等人,PLoS One.2011;6(10):e26722;Servais等人,J Mol Med(Berl).2011;89(8):753-769)。观察到BLI肿瘤信号与通过磁共振成像(MRI)确定的胸膜肿瘤体积之间存在强相关性,MRI是肿瘤体积评估的金标准($r=0.86$,$p<0.0001$,根据小鼠内聚类进行调整;图24C和24D)。我们对定量BLI的发现归因于这样一个事实,即肿瘤沿着胸壁生长,胸膜皮增厚,使肿瘤深度最小化(图24A)。因此,原位胸膜癌模型中的BLI可提供准确的肿瘤负荷定量评估,从而为活体小鼠生物标记物性能的无创性系列评估提供可比标准。通过免疫组织化学和流式细胞术分析,我们观察到,即使在疾病晚期,原位MPM模型中间皮素的表达仍然持续(数据未显示)。

[0658] 小鼠组织处理用CO_2对小鼠实施安乐死,并使用冰冷的RPMI-1640将胸膜肿瘤和脾脏收集在一个50mL锥形管中。处理时,通过40μm细胞过滤器研磨(ground)组织,并在4℃下以450g离心5分钟。如果细胞颗粒出现血色(bloody),则将其重新悬浮在2mL ACK裂解缓冲液(Lonza,Basel,Switzerland)中,并在室温下孵育5分钟。在4℃下450g额外离心5min后,将细胞颗粒重新悬浮在含有5%牛血清白蛋白的PBS中,用于洗涤和抗体染色,以便可立即用于流式细胞术。

[0659] 免疫荧光 用5×10^5mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞、mycM28zCAR T细胞或未转导的T细胞注射已建立MGM胸膜肿瘤的雌性NSG小鼠。注射后三天,处死小鼠,分离胸膜肿瘤,在室温下用4%多聚甲醛固定过夜,并使用Leica ASP6025组织处理器(Leica Biosystems,Wetzlar,Germany)进行石蜡包埋处理。新鲜切割的5μm石蜡切片在Leica Bond RX(Leica Biosystems)上用1.25μg/mL CD45小鼠单克隆抗体克隆2B11+PD7/26(Dako)染色1小时,并在Leica Bond Protocol F上用1:200 Tyramide Alexa Fluor 594 detection(Life Technologies,Carlsbad,CA)持续10分钟,随后,用0.03μg/mL Mesothelin Rabbit Monoclonal CloneD9R5G(细胞信号)持续1h和在Leica Bond Protocol F上1:200 Tyramide Alexa Fluor 488检测(Life Technologies)持续10min。在每次染色之前,用Leica Bond ER2缓冲液(Leica Biosystems)在100℃下预处理切片20min。染色后,用

Mowiol将切片安装在Vectra3.0多光谱显微镜(Perkin Elmer)上,使用20X物镜进行数字扫描。

[0660] 肿瘤组织学和免疫染色 石蜡包埋的4%多聚甲醛-固定组织样本经苏木精和伊红染色后进行肿瘤组织病理学评估。使用Ventana平台,使用小鼠抗人间皮素IgG(1:100;Vector Labs,Burlingame,CA)对人间皮素进行免疫组织化学分析。间皮素的分级由不了解临床数据的病理学家进行,结果如下:0(无染色)、1(弱表达)、2(中度表达)和3(强表达)。间皮素阳性肿瘤细胞相对于单个核心中发现的所有肿瘤细胞的分布分为0(无)、1(1%-50%)和2(51%-100%)。

[0661] MRI使用配备有400mT/m梯度线圈和32mm ID定制鸟笼式谐振器的Bruker 4.7T USR扫描仪(Bruker Biospin,Ettlingen,Germany)进行MRI。

[0662] 使用动物呼吸触发的RARE快速自旋-回波序列[重复时间(TR)=1.7秒,回波时间(TE)=40毫秒,平均为12秒]获取胸椎轴向MRI图像,以减少呼吸引起的运动伪影。切片厚度为0.7mm,平面内图像分辨率为117×156mm。通过使用Bruker ParaVision Xtip软件(Bruker Biospin)追踪每个切片中的肿瘤边界来测量肿瘤体积(mm^3),然后根据每个切片中的肿瘤区域面积进行计算。

[0663] BLI BLI用于无创性成像肿瘤负荷。小鼠腹腔注射一剂150mg/kg的D-荧光素。15分钟后,使用IVIS光谱体内成像系统(Perkinlemer)测量小鼠背侧和腹侧的肿瘤生物发光。背侧和腹侧的平均总流量报告为BLI信号,单位为光子每秒。

[0664] 小鼠血浆样本中细胞因子的定量使用10-plex V-plex Mouse Proinflammatory Panel 1 assay(Meso Scale Diagnostics,Rockville,MD)对毒理学研究中的一组小鼠血浆中的细胞因子水平进行定量。分析以下细胞因子:IFN-γ、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12p70、KC/GRO和TNF-α。在可用的情况下,将60μL血浆稀释2倍并镀入孔中,一式两份。结果(每个样本n=2)报告为皮克/毫升血浆。细胞因子定量由MSK的Immune Monitoring Facility进行。

[0665] B.人体组织间皮素和体外CAR T细胞研究

[0666] B.1.在肿瘤和正常组织中的间皮素表达

[0667] 已发表的研究发现在正常胸膜、腹膜和心包中间皮素的表达非常低。使用间皮素免疫组化分析对MPM、肺腺癌和三阴性乳腺癌人体组织以及正常组织对照进行了广泛研究(Kachala等人,Clin Cancer Res.2014;20(4):1020-1028;Servais等人,Clin Cancer Res.2012;Rizk等人,Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.2012;21(3):482-486)。如图25A-25C所示,与正常组织相比,间皮素在人MPM和肺癌中过度表达(见图25A)。间皮素在69%的肺腺癌中过度表达,而在正常肺中不表达(见图25B)。同样,间皮素在正常乳腺组织中不表达,但在三阴性乳腺癌中过度表达(见图25C)。

[0668] B.2.用M28z1XXPD1DNR转导人T细胞

[0669] 滴定从稳定的293T RD114细胞系获得的编码M28z1XXPD1DNR或mycM28z1XXPD1DNR的病毒上清,通过流式细胞术评估人T细胞的转导效率。用CAR和PD1DNR成功转导T细胞,供者依赖性表面表达水平范围为32%至73%CAR和22%至64%PD1(包括PD1DNR和内源性PD1表达),用于测试稀释的病毒上清(见图26)。CAR和PD1DNR因P2A自裂解肽介导的双顺反子转基因表达而成比例表达。

[0670] B.3.载体拷贝数(VCN)

[0671] 在用M28z1XXPD1DNR成功转导人T细胞后,接下来分析了CAR表达与T细胞基因组中载体拷贝整合之间的关系。在多个供体和编码M28z1XXPD1DNR或mycM28z1XXPD1DNR的病毒上清稀释液中发现CAR阳性细胞的MFI与VCN之间存在密切的相关性,产生的R^2值在0.89到0.99之间(见图27)。发现转导效率和VCN依赖于供体,但尤其是在转导效率>70%时观察到高VCN(>5/细胞),尤其是在转导效率<35%时(数据未显示)观察到低VCN(<1/细胞)。为了避免插入突变的高风险并确保T细胞的有效转导,我们对所有构建体的病毒上清进行滴定,以在随后的所有体外和体内实验中产生35%-70%的转导效率。

[0672] B.4.M28z1XXPD1DNR CAR T细胞过度表达PD1胞外结构域

[0673] 用M28z1XXPD1DNR转导的人T细胞表达PD1DNR,PD1DNR是一种缺失胞内PD1信号结构域的诱饵受体。分别采用流式细胞术和qPCR技术检测mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞和mycM28z CAR T细胞中相对PD1蛋白表面和mRNA的表达。在相似的CAR表面表达(64%-70%,见图28A)下,与mycM28z CAR T细胞相比,细胞表面PD1染色导致在mycM28z1XXPD1DNRCAR T细胞上检测到较高的PD1水平,无论是阳性细胞百分比(2倍)还是强度(3.4倍)(见图28B和28C)。PD1细胞表面表达的检测仅限于PD1DNR和内源性PD1中存在的胞外结构域。因此,尽管PD1胞外结构域的高表面表达是由PD1DNR的表达引起的,并且表明PD1DNR的表达,但在细胞表面水平上无法区分PD1DNR和内源性PD1。

[0674] 为了进一步探讨PD1DNR和内源性PD1表达的差异,通过qPCR研究了相对mRNA表达。为了区分PD1DNR和内源性PD1的表达,设计了PD1胞外和胞内结构域的特异性引物,并测量了mycM28z1XXPD1DNR和mycM28z CAR T细胞相对于未转导T细胞的PD1胞外和胞内结构域的mRNA表达。mycM28z CAR T细胞不表达PD1DNR,因此仅以胞外和胞内结构域的等摩尔比率表达内源性PD1。虽然胞内结构域的表达仅限于内源性PD1,但胞外结构域同时由PD1DNR和内源性PD1表达。结果发现,与未转导的T细胞相比,mycM28z CAR T细胞表达的PD1胞外和胞内结构域水平高出4倍。然而,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞表现出PD1胞外结构域157倍的上调;未转导的T细胞仅表现出PD1胞内结构域的2倍上调(见图28D)。

[0675] 总之,这些数据证实,与内源性PD1相比,在mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞中,PD1DNR在mRNA水平和蛋白质水平均过度表达。这一发现为T细胞内在检查点阻断提供基础。

[0676] B.5.有无myc标签的M28z1XXPD1DNR CAR T细胞的功能比较

[0677] 为了便于检测CAR表达,M28z1XXPD1DNR CAR T细胞由myc标签融合到抗间皮素scFv的N端生成,产生mycM28z1XXPD1DNR。为了排除myc标签对CAR功能的任何潜在干扰,进行了M28z1XXPD1DNR(无标签)和mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞之间的抗肿瘤疗效的头对头比较。用M28z1XXPD1DNR和mycM28z1XXPD1DNR以相似的转导水平(37%-63%,通过用抗人F(ab′)$_2$片段-特异性山羊F(ab′)$_2$片段染色的细胞的流式细胞术测定)转导的3个独立供体制备的人T细胞在不同E:T比下,动力学和MGM靶细胞的总体杀伤(率)没有差异(见图29)。

[0678] B.6.mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞介导抗原特异性、HLA非依赖性肿瘤溶解

[0679] mycM28z1XXPD1DNR与mycM28z CAR T细胞的细胞毒性活性是针对一组肿瘤细胞系通过^{51}Cr释放试验测定的,包括具有(GM)和不具有(G)间皮素表达的人间皮瘤细胞(MSTO-211H)以及具有组成型PD-L1表达的人间皮瘤细胞。与mycM28z CAR T细胞类似,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞在与表达间皮素的肿瘤细胞以多种E:T比共培养18小时后,

有效杀死MGM和MGM-PDL1靶细胞,如以下细胞毒性试验结果所示(见图30)。未观察到mycM28z1XXPD1DNR或mycM28z CAR T细胞对间皮素阴性的MSTOG肿瘤细胞的非特异性杀伤作用。未转导的T细胞对两种靶细胞均无杀伤作用。这些结果证实M28z1XXPD1DNR CAR T细胞以间皮素特异性和HLA非依赖性方式杀死靶细胞。

[0680] B.7.mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞积累

[0681] 为了研究mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞在间皮素表达的肿瘤细胞(具有可诱导PD-L1表达(MGM)或组成型PD-L1表达(MGM-PDL1))在重复抗原刺激下是否能维持T细胞的积累,我们对mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的扩增进行了量化,并与mycM28z CAR T细胞的扩增进行了比较。在6次重复抗原刺激过程中,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞扩增至622倍,与mycM28z CAR T细胞类似(见图31)。

[0682] B.8.重复抗原刺激后mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的抗肿瘤疗效

[0683] 在第一次抗原暴露后,与mycM28z CAR T细胞相比,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞对MGM和MGM-PDL1靶细胞显示出E:T比依赖性细胞毒性,但没有显示出细胞毒性的差异(参见图32)。为了研究持续抗原暴露(或高抗原应激)期间mycM28z1XXPD1DNR和mycM28z CAR T细胞的细胞毒性能力,CAR T细胞每48小时以3:1的E:T比与辐照MGM或MGM-PDL1靶细胞重复共培养4个周期。在第三个周期结束时,在^{51}Cr细胞毒性试验中对CAR T细胞样品进行第四次抗原刺激。在第四次抗原刺激期间,mycM28z1XXPD1DNR和mycM28z CAR T细胞表现出相当的细胞毒性(见图33)。

[0684] 为了进一步增加抗原应激,模拟实体瘤中的高肿瘤负荷,在第五和第六个抗原刺激周期中,CAR T细胞与靶细胞以1:1的E:T比共培养。在第六个周期结束时,另一个CAR T细胞样本被收集,并在^{51}Cr细胞毒性试验中接受第七个周期的抗原刺激。第七次抗原刺激后,mycM28z CAR T细胞对两种靶细胞系的细胞毒性显著降低。相反,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞仍保留对靶细胞的细胞毒性。与mycM28z CAR T细胞相比,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞对靶细胞的肿瘤细胞杀伤能力更强,PD-L1表达量较高(参见图33),尽管与初始和第四次抗原刺激相比,细胞毒性降低。总的来说,这些数据表明mycM28z CAR T细胞在慢性抗原暴露时达到耗尽状态,而mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞即使在高抗原应激的环境中也能够保持抗肿瘤活性。观察到的效果取决于生物学参数,如供体、E:T比和肿瘤与CAR T细胞的共培养时间。

[0685] B.9.mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞释放的靶向刺激的细胞因子

[0686] 通过Luminex分析评估mycM28z1XXPD1DNR和mycM28z CAR T细胞在重复抗原刺激后释放的效应细胞因子。在第一次抗原刺激后,mycM28z1XXPD1DNR和mycM28z CAR T细胞均分泌高水平的IL-2、IFN-γ和TNF-α。然而,重复抗原刺激后,两种CAR T细胞的效应细胞因子分泌减少(见图34)。

[0687] C.体内研究

[0688] C.1.ffLuc肿瘤细胞显示mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的抗肿瘤疗效

[0689] 采用原位模型,在小鼠体内进行了一系列实验,通过测量肿瘤负荷和动物生存率来研究mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的特异性和效力。在开始T细胞治疗之前,使用系列BLI确认肿瘤建立,以在干预组之间平衡(equalize)肿瘤负荷,随后测量对治疗的反应。

[0690] 为了研究mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的抗肿瘤疗效,在接种原位MGM肿瘤13天

后,将单次低剂量的3×10^4CAR T细胞经胸膜内注入雌性NSG小鼠体内。选择低剂量是为了模拟CAR T细胞面临的高肿瘤抗原负荷。与接受P28z CAR T细胞的对照小鼠相比,单剂量mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠在T细胞给药15天后肿瘤负荷大幅度减轻(p=0.0002)(见图35)。治疗后第15天,如预期的那样,给予P28z CAR T细胞的小鼠因高肿瘤负荷而开始变得垂死,而接受mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的小鼠未观察到任何毒性迹象。

[0691] 在单次剂量为3×10^4mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞/小鼠(转化为1.2×10^6至1.5×10^6细胞/kg;小鼠体重20-25g)时观察到疗效和肿瘤根除,发明人选择将小鼠内剂量水平增加3-4倍,以研究毒性(在本实施例第3节中报告(标题为"非临床毒理学"))。

[0692] 在随后的实验中,患有建立的MGM-PDL1胸膜肿瘤的雌性NSG小鼠在肿瘤接种11天后,接受单次胸膜内给药每只小鼠1×10^5或5×10^4mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞(E:T比,1:1000至1:2000;2.5×10^6至5×10^6细胞/kg;小鼠平均体重20g)或1×10^5mycM28z CAR T细胞/小鼠作为对照的治疗。如我们之前所述,E:T比通过肿瘤负荷量化进行估算(Servais等人,Curr Protoc Pharmacol.2011;Chapter 14:Unit14 21;Servais等人,PLoS One.2011;6(10):e26722)。

[0693] 用D-荧光素(用于ffluc的荧光素)进行的一系列肿瘤成像显示,早在CAR T细胞给药后5天,BLI就显示肿瘤负荷有所降低,用1×10^5mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠约在第19天肿瘤完全消除(背景BLI信号),用1×10^5mycM28z CAR T细胞治疗的小鼠约在第26天肿瘤完全消除(见图36A和36B)。未经治疗的小鼠在开始治疗后9-12天变得垂死(见图36B)。使用mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞(剂量为1×10^5和5×10^4)维持肿瘤根除的状态,直到第68天研究结束。然而,在用mycM28z CAR T细胞治疗的小鼠中,因濒死状态和体重减轻的小鼠在第68天之前被处死,尸检显示肿瘤存在。在整个研究期间,使用任一剂量的mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠体重呈线性增加,而使用mycM28z CAR T细胞治疗的小鼠在研究结束时体重下降(见图36C)。未经治疗的小鼠的中位生存期为12天,经1×10^5mycM28z CAR T细胞治疗的小鼠为50天;使用任一剂量mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠均未达到中位生存率(见图36D)。与使用mycM28z CAR T细胞治疗的小鼠相比,使用mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠的生存期显著延长(对于5×10^4mycM28z1XXPD1DNR,p=0.0085;对于1×10^5mycM28z1XXPD1DNR,p=0.0427,相对于1×10^5mycM28z CAR T细胞)。在使用mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠中未观察到明显的临床毒性迹象。

[0694] C.2.原发性肿瘤中mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的检测

[0695] 在一组小鼠中,经胸膜间注射5×10^5mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞、mycM28z CAR T细胞或未转导的T细胞至荷MGM胸膜肿瘤NSG小鼠体内,胸膜肿瘤在注射后3天被分离,并使用免疫荧光通过人CD45和人肿瘤间皮素染色分析人T细胞浸润。

[0696] 在用未转导T细胞治疗的小鼠中,仅在肿瘤周围和实质中发现少量未转导T细胞,而mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞和mycM28zCAR T细胞在肿瘤周围区域和肿瘤与肿瘤周围区域的交界处密度较高(见图37)。这些数据表明,局部(胸膜内)给药间皮素靶向的T细胞在肿瘤周围富集,并从肿瘤周围浸润到肿瘤内。

[0697] C.3.体内肿瘤再攻击后mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的抗肿瘤活性

[0698] 为了研究mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的功能持久性,通过进行腹腔内注射递增

剂量的MGM肿瘤细胞对单次胸膜内剂量1×10^5mycM28z1XXPD1DNR或mycM28z CAR T细胞治疗的患有胸膜MGM-PDL1肿瘤(n=5)的小鼠进行再攻击。胸膜内T细胞给药后68天后在胸膜肿瘤根除后开始再攻击,起始剂量为2×10^6肿瘤细胞。每4-8天一次共再攻击10次,肿瘤剂量增加至11×10^6肿瘤细胞(见图38A)。每次施用后不久,肿瘤再攻击与BLI信号增加相关,随后BLI降低,表明T细胞介导的肿瘤消退(见图38B)。随着肿瘤细胞剂量的递增,BLI峰值信号增加,与使用相同剂量的mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的小鼠相比,使用mycM28z CAR T细胞的小鼠BLI信号的增加明显更高。特别地,用mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠的BLI信号在每次肿瘤再攻击后不久达到峰值,但即使在最高再攻击剂量下也恢复到基线BLI信号(见图38B)。相比之下,使用mycM28z CAR T细胞治疗的小鼠,最多5次肿瘤再攻击后BLI信号最初增加后BLI降低,但在较高肿瘤剂量后,它们最终失去了控制肿瘤重建的能力,导致BLI信号和肿瘤负荷持续增加,并处于濒死状态。mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞在10次重复攻击中抵抗腹腔内肿瘤形成,甚至在单次胸膜内剂量1×10^5CAR T细胞后>126天,没有任何明显的临床毒性迹象。这些数据表明mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞不仅能够局部控制胸膜腔内的肿瘤,而且能够控制体内远处的肿瘤。在体内,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞在慢性抗原暴露后,通过重复抗原攻击仍保持功能,并长期持续,而mycM28z CAR T细胞在重复抗原再攻击后变得功能失调,表明mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞具有优越的功能持续性和增强的长期抗肿瘤活性。我们已经证实,这种增强的疗效不是由于移植物抗宿主病。施用非抗原表达靶标,发现肿瘤BLI增加,没有抗肿瘤反应,证实抗肿瘤疗效是抗原特异性的。

[0699] C.4.临床级M28z1XXPD1DNR CAR T细胞的抗肿瘤疗效

[0700] 本研究的目的是验证由MSK Cell Therapy和MSK Cell Therapy and Cell Engineering Facility(CTCEF)产生的冷冻保存M28z1XXPD1DNR CAR T细胞的抗肿瘤疗效。在胸膜内注射之前,冷冻保存的等份M28z1XXPD1DNR CAR T细胞在含有10%FBS的RPMI-1640中解冻,在不含FBS的RPMI-1640中洗涤两次,并在不含FBS的RPMI-1640中重新悬浮作为注射赋形剂。通过吖啶橙/碘化丙啶染色法测定解冻后和注射前CART细胞的生存率为88%。以6×10^4或2×10^5活性CAR T细胞/小鼠(n=8-10)的剂量将CAR T细胞注射到有胸膜MGM肿瘤的雌性NSG小鼠胸膜内。连续肿瘤BLI显示,用2×10^5CAR T细胞治疗的小鼠在第16天时肿瘤被清除(见图39A)。用6×10^4CAR T细胞治疗的小鼠在第29天显示肿瘤消退和根除(见图39A)。两个治疗组均未观察到体重减轻,而未经治疗的荷瘤小鼠在开始治疗后19天内体重减轻并死亡(见图39B和39C)。在观察期结束时(第70天,见图39C),在接受CART细胞治疗的小鼠中未观察到的毒性,100%的受治疗小鼠存活。本研究证实,使用为拟进行的临床试验生产的载体库制造的冷冻保存M28z1XXPD1DNR CAR T细胞解冻后表现出高活性,在体内表现出抗肿瘤疗效,并且在小鼠中具有良好的耐受性。

[0701] 3.非临床毒理学

[0702] A.非临床安全性研究总结

[0703] M28z1XXPD1DNR CAR T细胞结合和活性特定于人间皮素,因此没有理想的药理学相关物种可用于进行非临床安全性研究。此外,靶抗原表达模式的可变性以及人多肽(如免疫感受态小鼠中的CAR)的清除机制和免疫原性的差异阻碍了动物预测人中CAR T细胞毒性的有效性。由于M28z1XXPD1DNR CAR T细胞在表达人间皮素的原位免疫缺陷小鼠模型中具有相关的药效作用(细胞因子、积累、肿瘤消退),因此我们在该异种模型中进行了安全性研

究。这是一项由Antitumor Assessment Core Facility在MSK进行的Good Laboratory Practice(GLP)研究。本节讨论了本研究的设计、方法和结果。

[0704] 本研究选择的CAR T细胞剂量为1×10^5mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞。选择该剂量是因为它比我们临床前小鼠模型中治疗原位间皮瘤的测试的最小有效量(3×10^4mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞)高3-4倍。重要的是,CAR T细胞的选择剂量(1×10^5细胞/小鼠或5×10^6细胞/千克)比当前研究中建议的起始剂量(1×10^6细胞/千克)高5倍。在发明人发表的研究中,含PD1DNR的靶向间皮素的CAR(Cherkassky等人,J Clin Invest.2016;126(8):3130-3144)在40000-50000CAR T细胞的剂量下,显示可以消除原位胸膜间皮瘤小鼠中的高胸膜肿瘤负荷。

[0705] 将CAR T细胞通过胸膜内注射到胸膜腔内含有间皮瘤异种移植物的NSG小鼠体内。与其他试剂(如抗体)不同,胸膜内给药最初仅限于胸膜腔,研究表明,在小鼠和人中,胸膜内给药的CAR T细胞在一两天内进行系统循环,而不限于胸膜腔(Adusumilli等人,Sci Transl Med.2014;6(261):261ra151;Cherkassky等人,J Clin Invest.2016;126(8):3130-3144;Adusumilli等人,Cancer Res 2019;79(13))。特别是,发明人在小鼠和人身上都观察到,胸膜内给药的CAR T细胞被抗原激活,并在短时间内增殖到比初始给药剂量高5-10倍(Adusumilli等人,Sci Transl Med.2014;6(261):261ra151;Cherkassky等人,J Clin Invest.2016;126(8):3130-3144),因此本研究中测试的CAR T细胞的实际数量在短时间内比初始给药剂量高5-10倍。

[0706] 在评估M28z1XXPD1DNRCAR T细胞的人体安全性时,以下注意事项非常重要。

[0707] 1.先前人使用CAR T细胞的经验表明,夸大的药理学是不良事件的主要原因,不良事件是可监测和可管理的。在我们的一期临床研究中,没有关于靶向间皮素的CARCAR T细胞靶向、非肿瘤毒性相关不良反应的报告(Adusumilli等人,Cancer Res.2019;79(13))。

[0708] 2.在体外研究中,观察到mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的药理活性与靶细胞表面的间皮素表达相关。

[0709] 3.在发明人的MPM原位模型中,在荷MPM肿瘤的小鼠中单次胸膜内注射mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞后,观察到特异性细胞毒性和增加的生存率。未经mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠将在肿瘤植入后20-22天内死亡。在7天内,肿瘤负荷显著减轻,这些动物在68天后仍保持治愈;相比之下,未经治疗的对照组的中位生存期为12天,而经mycM28z治疗的对照组的中位生存期为50天。对96只(48只雄性和48只雌性)NSG小鼠(Jackson实验室)的死亡率和发病率、体重、临床体征、血液学和临床化学、大体尸检和组织病理学数据进行评估,这些小鼠患有8天大的原位间皮瘤,随机分为对照组和治疗组。选择RPMI-1640中1×10^5细胞/小鼠(约5×10^6细胞/kg)的剂量,其至少相当于该模型中体外和体内原理验证实验中确定的近似最小有效量(3×10^4细胞/小鼠)的3-4倍。合理选择剂量和尸检方案:(a)尽管较高的初始测试剂量可能允许调查剂量给药的任何即时不良反应(在正在进行的临床试验中未发现此类效应),生物学和药理学不能反映mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的功能持久性和增殖(即,在实体瘤微环境中,与高剂量诱导肿瘤根除的短暂的动力学相比,允许相对较高数量的CAR T细胞在肿瘤/机体中存在较长一段时间是很重要的),以及(b)选择第14天是因为肿瘤在此时间点显著消退或已被根除(如先前实验中的BLI或尸检所证明)(Adusumilli等人,Sci Transl Med.2014;6(261):

261ra151;Cherkassky等人,J Clin Invest.2016;126(8):3130-3144)。在此时间点对小鼠的处死和尸检允许检查间皮素低表达水平的正常组织,特别是胸膜、腹膜和心包的任何靶向、非肿瘤效应(我们的CAR中使用的scFv对小鼠间皮素产生反应)(Feng等人,Mol Cancer Ther.2009),在没有间皮素高表达的肿瘤负荷的情况下,出现峰值CAR T细胞扩增。

[0710] 在研究第1天(雄性小鼠)或研究第2天(雌性小鼠)通过原位注射给药一次mycM28z1XXPD1DNRCART细胞或对照赋形剂。在研究第8天之前,每周观察两次所有动物的死亡率和发病率,然后每天监测(工作日),直到研究第1天。给药后,每天对动物进行监测,直到研究结束(研究第15天)。在研究第8天之前每周记录两次体重,然后每天监测(工作日),直到研究第1天。给药后,每天记录体重,直到研究结束(研究第15天)。在研究第1天之前每周记录两次临床体征,然后从研究第1天到第15天进行每日监测。在研究第2天(雄性小鼠的中期处死)、研究第3天(雌性小鼠的中期处死)、研究第14天(雄性小鼠的最终处死)和研究第15天(雌性小鼠的最终处死),用异氟醚对小鼠进行镇静,并采集血液用于血液学和临床化学。对于大体和完全尸检,收集组织并固定在福尔马林中。尸检期间未丢弃任何组织。尸检时,Antitumor Assessment Core Facility的成员对每只动物进行了大体检查。使用标准术语记录任何肉眼可见的病变或其他异常发现,并将其提供给病理学家,以便与显微镜观察结果相关联。为了进行组织病理学分析,所有尸检动物的组织都保存在福尔马林中。在固定剂中至少24小时后,处理组织并将其包埋在石蜡中。石蜡块在4毫米处切片。然后用苏木精和曙红对得到的未染色切片进行染色。然后将切片运送至HSRL.,由通过资格认证的病理学家检查。根据标准化命名法进行形态学诊断,记录病变。在研究第9天(雄性小鼠)和第10天(雌性小鼠),从一组小鼠中收集血浆,并通过MSK(非GLP)的Immune Monitoring Core Facility进行细胞因子评估。此外,从一组小鼠中分离脾脏和肿瘤,通过流式细胞术(非GLP)鉴定mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞。在研究第1/1、7/8和14/15天,使用荧光素(背侧/腹侧)对一组动物进行成像,以评估肿瘤负荷和供试品疗效。

[0711] 本研究中未观察到动物的死亡或发病,但成像队列中的2只对照动物除外,它们在研究第12天和第14天(肿瘤给药后第20-22天)因发病和呼吸困难被选择处死。发明人实验室先前的工作表明,对照动物可能在给予肿瘤后约20-22天因肿瘤负荷而变得垂死(Servais等人,Clin Cancer Res.2012;Servais等人,Curr Protoc Pharmacol.2011;Chapter 14:Unit14 21;Adusumilli等人,Sci Transl Med.2014;6(261):261ra151;Cherkassky等人,J Clin Invest.2016;126(8):3130-3144;Servais等人,PLoS One.2011;6(10):e26722)。因此,这些处死是计划外的,但并非意料之外。没有死亡或发病追溯到供试品。

[0712] 接受赋形剂对照的动物在研究期间体重逐渐下降,且与非肿瘤对照组和接受mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠相比,体重存在明显差异。这归因于对照动物的肿瘤负荷增加。

[0713] 未观察到使用mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠出现明显的临床症状。观察到一只供试品治疗的小鼠出现轻微结痂,这是由于手术夹引起的刺激,因为没有其他动物受到影响且动物活动正常。在整个监测期间,小鼠表现正常。

[0714] 与第10组(肿瘤对照赋形剂)(平均值3.34%,n=5)相比,第12组(在研究第15天最终处死)中使用mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的雌性小鼠的单核细胞百分比平均值较

高(平均值18.44%,n=5)(p<0.0001)。建立的单核细胞百分比的参考范围为0.9%-18%。然而,这与任何显微镜观察结果都不相关。未观察到评估的血液学参数的其他显著或异常结果。供试品治疗组和相应的赋形剂治疗组之间的任何差异均在正常参考范围内,或在生物学上不相关或无统计学意义。

[0715] 与第9组(肿瘤对照赋形剂)(平均值4.68g/dL,n=4)相比,第11组(在研究第14天最终处死)中使用mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的雄性小鼠的平均总蛋白值较低(平均值为3.83g/dL,n=5)(p=0.0022)。建立的总蛋白质参考范围为4.1-6.4g/dL。然而,这与任何显微镜观察结果都不相关。给药供试品后,未观察到对临床化学参数的其他不良影响。供试品治疗组和相应的赋形剂治疗组之间的任何差异均在正常参考范围内,或在生物学上不相关或无统计学意义。

[0716] 在尸检时,没有收集到肿瘤组织,但如预期的那样,在中期处死的许多动物中观察到了肿瘤组织。在最终处死时,赋形剂对照动物的肿瘤负荷很明显,但在大多数情况下,在供试品治疗的动物中观察到轻微或无肿瘤病灶。个别动物尸检时的大体观察结果包括斑点肝、小脾脏、蓝色精囊、深绿色胆囊、蓝色胆囊、油性肾、肝内泡和脾脏白斑。这些发现都与显微镜观察的结果不相关。由于淋巴细胞耗竭,NSG小鼠表型中出现小脾脏在预期内。

[0717] 组织病理学检查确定,在中期(研究第2/3天)和最终(研究第14/15天)处死日,没有与供试品给药的急性或迟发毒性相关的显微镜观察结果。第5组和第6组动物的镜检结果(供试品;中期处死)包括肺中异种移植肿瘤内存在混合细胞浸润。这被认为与供试品给药有关,但与任何供试品毒性无关。这一发现在另一项单独的研究中被证实,该研究通过对经胸膜内治疗的小鼠原发肿瘤中的mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞进行免疫荧光染色,见本实施例第2.C.2节)。任何其他观察到的与对照组发生率相似或在所使用的物种/菌株中常见的结果被确定为偶发性发生。

[0718] 研究第1/1天的活体BLI表明各组所有动物均成功给予肿瘤。在对照赋形剂给药后,雄性和雌性小鼠组动物的肿瘤负荷在每个测量时间点增加,2只动物因发病需要较早成像。注射供试品后,雄性和雌性小鼠组动物的肿瘤负荷在注射后1周增加;然而,在2周的时间点,负担大幅度减轻。在mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠中,经胸膜内给药8天后,在脾脏组织和肿瘤中检测到人T细胞,但在赋形剂治疗的小鼠中未检测到人T细胞。在同一时间点获得的小鼠血浆细胞因子水平显示,与赋形剂对照治疗的小鼠相比,用CAR T细胞治疗的小鼠的IL-4水平略有升高。IL-10、IL-6、KC/GRO和TNF-α水平通常较低,接受CAR T细胞的小鼠和接受赋形剂对照的小鼠之间没有显著差异。未检测到IFN-γ、IL-12p70、IL-1β、IL-2和IL-5(低于定量限)。

[0719] 本研究的目的是评估单次原位注射后NSG小鼠体内mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的急性和迟发毒性。在整个研究过程中,对体重、临床体征、血液学、临床化学和组织病理学数据进行收集并分析。本研究结果表明,在间皮瘤异种移植模型中,单次原位给予1×10^5mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞耐受性良好。

[0720] B.方法

[0721] 测试系统。实验用Jackson实验室的6-8周龄雄性和雌性NSG小鼠进行。肿瘤组小鼠在研究第1天(雄性小鼠)和研究第2天(雌性小鼠)通过胸膜内剂量接受800000MGM细胞/小鼠。预计这些小鼠在注射后约5-20天出现胸膜疾病症状。

[0722] 供试品。试验品(mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞)由发明人在MSK制备。来自健康供体的PBMC于2019年5月11日解冻,并于2019年7月11日用编码mycM28z1XXPD1DNR的逆转录病毒颗粒转导。注射前,将转导的PBMC保存在含有10％FBS、100单位/mL青霉素、100μg/mL链霉素和20单位/mL IL-2的RPMI-1640培养基中。在2019年11月13日(雄性小鼠)和2019年11月14日(雌性小鼠)注射当天,聚集转导细胞,通过流式细胞术分析CD3和CAR表达,洗涤并重新悬浮在赋形剂(不含FBS和酚红的RPMI-1640)中,并储存在冰上直至注射。

[0723] 将mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞以5×10^5活的CAR T细胞/mL的终浓度重悬在赋形剂中。测定细胞活力。然后将制备好的溶液在转移到冰上Animal Facility供即时使用。在整个研究期间,在这些条件下,可供使用并储存在冰上的供试品被认为是稳定的。CAR T细胞制剂是在发明人的实验室中,在室温无菌条件下的层流罩内进行的。在给药前和给药后测定活力和CAR表达。

[0724] 赋形剂。用于制备CAR T细胞制剂和给对照组给药的赋形剂为不含FBS和酚红(GIBCO,cat#32404,批号2099376)的无菌RPMI-1640培养基。赋形剂被转移到冰上Animal Facility,以便即时使用。根据制造商提供的分析证书,在整个研究期间,在这些条件下,可供使用并储存在冰上的赋形剂被认为是稳定的。在室温、无菌条件下,在发明人实验室的层流罩内进行赋形剂制备。

[0725] 研究设计。所有队列在研究第1天之前被随机分为研究组。动物到达后,从动物板条箱中随机选择动物,并将其分入各自的治疗组,如下表9所示。通过使用鼠耳打孔器辨别小鼠。

[0726] 肿瘤组小鼠在给药供试品前8天通过胸膜原位注射接受8×10^5MGM细胞。在研究第1天(雄性小鼠)或研究第2天(雌性小鼠)同样通过原位注射一次给药mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞或对照赋形剂。以200μL/小鼠的注射量给药肿瘤细胞、赋形剂和供试品。

[0727] 表9小组分配

[0728]

分组*	小鼠/组	性别	小鼠 ID#	血液/组织收集	尸检
中期处死					
1. 无肿瘤-对照赋形剂	3	M	1-3	CBC&Chem	大体
2. 无肿瘤-对照赋形剂	3	F	4-6	CBC&Chem	大体
3. 肿瘤-对照赋形剂	10	M	7-16	CBC&Chem	完全
4. 肿瘤-对照赋形剂	10	F	17-26	CBC&Chem	完全
5. 肿瘤-供试品	10	M	27-36	CBC&Chem	完全
6. 肿瘤-供试品	10	F	37-46	CBC&Chem	完全
最终处死 第 14/15 天					
7. 无肿瘤-对照赋形剂	3	M	47-49	CBC&Chem	大体
8. 无肿瘤-对照赋形剂	3	F	50-52	CBC&Chem	大体
9. 肿瘤-对照赋形剂	5	M	53-57	CBC&Chem	完全
10. 肿瘤-对照赋形剂	5	F	58-62	CBC&Chem	完全

[0729]

11. 肿瘤-供试品	5	M	63-67	CBC&Chem	完全
12. 肿瘤-供试品	5	F	68-72	CBC&Chem	完全
TK/细胞因子					
13. 肿瘤-对照赋形剂	3	M	73-75	肿瘤、脾脏、200 μL EDTA	无
14. 肿瘤-对照赋形剂	3	F	76-78	肿瘤、脾脏、200 μL EDTA	无
15. 肿瘤-供试品	3	M	79-81	肿瘤、脾脏、200 μL EDTA	无
16. 肿瘤-供试品	3	F	82-84	肿瘤、脾脏、200 μL EDTA	无
成像					
17. 肿瘤-对照赋形剂	3	M	85-87	无	无
18. 肿瘤-对照赋形剂	3	F	88-90	无	无
19. 肿瘤-供试品	3	M	91-93	无	无
20. 肿瘤-供试品	3	F	94-96	无	无

[0730] *分组说明:

[0731] 无肿瘤-对照赋形剂:非肿瘤小鼠+RPMI1640

[0732] 肿瘤-对照赋形剂:MGM肿瘤小鼠+RPMI1640

[0733] 肿瘤-供试品:MGM肿瘤小鼠+1×10^5mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞

[0734] 在整个研究过程中收集临床体征和体重以评估发病率,并在给药后1天和14天分别评估急性和迟发毒性。在急性和延迟时间点收集和评估血液学、临床化学和组织病理学数据,以确定供试品耐受性。

[0735] 评估的参数。

[0736] 死亡和发病。在研究第8天之前,每周观察两次所有动物的死亡和发病,然后每天监测(工作日),直到研究第1天。给药后,每天对动物进行监测,直到研究结束(研究第15天)。

[0737] 体重。在研究第8天之前每周记录两次体重,然后每天监测(工作日),直到研究第1天。给药后,每天记录体重,直到研究结束(研究第15天)。

[0738] 临床症状。在研究第1天之前每周记录两次临床体征,然后从研究第1天到第15天进行每日监测。

[0739] 血液学。在研究第2天(雄性第1、3、5组)、研究第3天(雌性第2、4、6组)、研究第14天(雄性第7、9、11组)和研究第15天(雌性第8、10、12组),用异氟醚对小鼠进行镇静,并将全血收集在EDTA管中,用于表10所示的以下测量:

[0740] 表10血液学参数

[0741]

中性粒细胞	白细胞计数
淋巴细胞	红细胞计数
单核细胞	血红蛋白浓度
嗜酸性粒细胞	血细胞比容
嗜碱性粒细胞	平均红细胞体积
%中性粒细胞	平均血红蛋白量
%淋巴细胞	平均血红蛋白浓度
%单核细胞	红细胞分布宽度
%嗜酸性粒细胞	血小板计数
%嗜碱性粒细胞	平均血小板体积

[0742] 临床化学。在研究第2天(雄性组1、3、5)、研究第3天(雌性组2、4、6)、研究第14天(雄性组7、9、11)和研究第15天(雌性组8、10、12),用异氟醚对小鼠进行镇静。在血清分离管中收集全血。如表11所示,分离并分析血清进行以下测量:

[0743] 表11临床化学参数

[0744]

血尿素氮	胆固醇
肌酸酐	丙氨酸转氨酶
磷	天冬氨酸转氨酶
钙	碱性磷酸酶
总蛋白	总胆红素
白蛋白	钠
球蛋白	钾
白蛋白/球蛋白比	氯化物
葡萄糖	钠/钾比

[0745] 尸检。在研究第2天(雄性组1、3、5)、研究第3天(雌性组2、4、6)、研究第14天(雄性

组7、9、11)和研究第15天(雌性组8、10、12),通过二氧化碳注射对小鼠实施安乐死。对第1、2、7和8组的动物进行大体尸检,对第3-6和9-12组的动物进行完全尸检。收集组织并在福尔马林中固定。尸检期间未丢弃任何组织。

[0746] 大体病理观察。尸检时,对Antitumor Assessment Core Facility的成员对每只动物进行了大体检查。使用标准术语记录任何肉眼可见的病变或其他异常发现,并将其提供给病理学家,以便与镜检结果相关联。

[0747] 组织病理学。所有尸检动物的组织均保存在福尔马林中。在固定剂中至少24小时后,处理表12所示的组织并将其包埋在石蜡中(用星号标记的组织在包埋前脱钙)。石蜡块在4毫米处切片。然后用苏木精和曙红对未染色的切片进行染色。然后将切片运送至HSRL,由经资格认证的病理学家进行检查。根据标准化命名法进行形态学诊断,记录病变。

[0748] 表12镜检的组织

[0749]

肾上腺	胰腺
骨(骨髓)*	直肠
脑(脑干、小脑、和大脑)	唾液腺
食管	皮肤
眼	脾脏
胆囊	胸骨*
心脏	后膝关节*
腹股沟淋巴结	胃
肠(十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠)	睾丸、附睾、精囊、和前列腺(雄性)
肾脏	胸腺
肝脏	甲状腺
肺	舌头
肠系膜淋巴结	气管
口鼻腔(鼻腔)*	膀胱
卵巢、子宫角、子宫、子宫颈、和阴道(雌性)	脊柱*

[0750] 细胞因子分析(非GLP)。在研究第9天(雄性小鼠)和第10天(雌性小鼠),在EDTA管中从第13、15(雄性)、14和16(雌性)组小鼠中采集血液。分离血浆并冷冻。由MSK(非GLP)的Immune Monitoring Core Facility进行细胞因子评估。

[0751] 毒代动力学:通过流式细胞术(非GLP)鉴定CAR T细胞。在研究第9天(雄性小鼠)和第10天(雌性小鼠),从第13、15(雄性)、14和16组(雌性)小鼠中采集血液。对所有动物进行大体尸检,同时将肿瘤组织和脾脏置于RPMI培养基中。将样品立即提供给发明人,以便通过流式细胞术(非GLP)鉴定mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞。

[0752] 生物发光成像。在研究第1/1、7/8和14/15天,使用荧光素(背侧/腹侧)对第17-20

组的动物进行成像,以评估肿瘤负荷和供试品的疗效。

[0753] 统计方法。计算体重、血液学和临床化学参数的组平均值和标准偏差。对于血液学和临床化学,在每个时间点,计算供试品治疗组和相应赋形剂治疗组的平均值之间的百分比差异。这些差异的统计显著性采用非配对t检验进行分析,并认为在$p<0.05$时具有统计显著性。使用Ascentos版本1.3.4进行统计分析,该版本是由PDS Life Sciences(Mt.Arlington,NJ)开发的临床前实验室信息系统软件。通过使用实验室建立的1.5×IQR测试和参数参考范围评估潜在异常值的个体值,对临床数据进行审查。从统计分析中删除任何确定为异常值的值。

[0754] C.结果

[0755] C.1.死亡率和发病率

[0756] 发明人之前的研究表明,对照动物可能在肿瘤给予后约20-22天因肿瘤负荷而变得垂死。由于发病和呼吸困难,成像队列中的两只对照动物(86[第17组]和88[第19组])在研究的第12天和第14天进行了选择性处死。处死后对每只动物的大体尸检表明,在胸腔内肺和心脏周围存在严重的肿瘤负荷。两只动物均使用对照赋形剂进行治疗,证明发病在预期范围内。因此,尽管这些处死是计划外的,但却并非意料之外。本研究中未观察到任何动物的其他死亡或发病。

[0757] C.2.体重

[0758] 各组平均体重汇总如图40-43所示。在研究第14天,第9组(对照载体)中的动物在研究期间体重逐渐下降,且与非肿瘤对照组(第7组)和供试品动物(第11组)相比,体重存在显著差异。这归因于对照组动物的肿瘤负荷增加(见图42)。类似地,从研究第13天开始,一直持续到研究结束,与第8组(非肿瘤对照组)和第12组(供试品)相比,第10组(对照赋形剂组)的动物在体重上表现出显著差异,(见图43)。这也归因于肿瘤负荷。所有动物在手术后第二天(雄性小鼠为第2天,雌性小鼠为第3天)体重均显示出下降,这归因于手术。非肿瘤对照组和使用mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗的小鼠在手术后2-3天内恢复了其手术前的初始体重,并在剩余的研究期间体重逐渐增加,而使用赋形剂治疗的小鼠在手术后体重几乎没有恢复,并且随着时间的推移体重逐渐减轻同时肿瘤负荷增加(见图42和43)。

[0759] C.3.临床症状

[0760] 第17组(对照赋形剂组)中的动物出现脱发(85,87)和结痂(87)的迹象,这归因于笼子内的侵略者动物。一旦动物被分开,迹象就会减少,这表明观察结果是由于动物打架所致。在研究第12天,观察到86号动物呼吸困难,活动减少,这是由于肿瘤负荷,并导致选择处死。观察到93号动物(第19组,供试品)有轻微结痂;然而,这归因于手术夹引起的刺激,因为笼子中没有其他动物受到影响,动物活动正常。在选择处死前2天,观察到88号动物(第18组,对照赋形剂组)眼睛发红。这种临床症状可能是动物在选择处死前因肿瘤负荷而不适的早期迹象。

[0761] 在本研究期间未观察到其他明显的临床症状。在整个监测期间,小鼠表现正常。

[0762] C.4.血液学

[0763] 第12组(雌性小鼠,供试品)与第10组(肿瘤对照赋形剂)(平均值3.34%,$n=5$)相比,单核细胞平均百分值较高(平均值18.44%,$n=5$)($p=0.0001$)。单核细胞百分比的参考范围为0.9%-18%。然而,这与任何镜检结果都不相关。

[0764] 未观察到其他评估的血液学参数的显著或异常结果。供试品治疗组和相应的赋形剂治疗组之间的任何差异均在正常参考范围内,或在生物学上不相关或统计学上不显著。

[0765] C.5.临床化学

[0766] 第11组(雄性小鼠,供试品)的平均总蛋白值(平均值,3.83g/dL,n=5)(p=0.0022)低于第9组(肿瘤对照载体)(平均值,4.68g/dL,n=4)。总蛋白质的参考范围为4.1-6.4g/dL。然而,这与任何镜检结果都不相关。

[0767] 服用供试品后,未观察到对临床化学参数的其他不良影响。供试品治疗组和相应的赋形剂治疗组之间的任何差异均在正常参考范围内,或在生物学上不相关或无统计学意义。

[0768] C.6.大体病理观察

[0769] 在尸检时,没有收集到肿瘤组织,但如预期的那样,在中期处死的许多动物中观察到了肿瘤组织。在最终处死时,对照赋形剂动物的肿瘤负荷很明显,但在大多数情况下,在测试的供试品治疗的动物中观察到轻微或无肿瘤病灶。尸检时的其他发现详见下表13。

[0770] 表13宏观观察与镜检结果相关

[0771]

大体观察	观察的动物(组号)	相关检查结果	供试品相关?
斑点肝	11（G3-对照赋形剂)32(G5-供试品）59（G10-对照赋形剂）60（G10-对照赋形剂）71（G12-供试品）	与镜检结果不相关	否
小脾脏	11（G3-对照赋形剂） 16（G3-对照赋形剂） 25（G4-对照赋形剂） 30（G5-供试品） 34（G5-供试品） 40（G6-供试品） 45（G6-供试品） 56（G9-对照赋形剂） 58（G10-对照赋形剂） 59（G10-对照赋形剂） 60（G10-对照赋形剂）	淋巴细胞消耗-NSG 小鼠表型的预期部分	否

[0772]

	65（G11-供试品） 71（G12-供试品）		
蓝色精囊	57（G9-对照赋形剂）	与镜检结果不相关	否
深绿色胆囊	107（G9-对照赋形剂）	与镜检结果不相关	否
蓝色胆囊	62（G10-对照赋形剂）	与镜检结果不相关	否
油性肾	21（G4-对照赋形剂） 71（G12-供试品）	与镜检结果不相关	否
肝内泡	40（G6-供试品）	与镜检结果不相关	否
脾脏白斑	69（G12-供试品）	适度的细胞腺癌-被认为是自发结果	否

[0773] 尸检期间未见其他大体观察结果

[0774] C.7.组织病理学

[0775] 组织病理学检查确定,在中期(第2天)和最终(第14天)处死日,没有与供试品给药的急性或迟发毒性相关的镜检结果。

[0776] 第5组和第6组(供试品)动物的镜检结果包括肺部异种移植肿瘤内存在混合细胞浸润。这被认为与供试品给药有关,但与任何供试品毒性无关。这一发现在一项单独的研究中得到了证实,该研究通过对经胸膜内治疗的小鼠原发肿瘤中的mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞进行免疫荧光染色(见本实施例第2.C.2节)。

[0777] 任何其他观察到的与对照组发生率相似或在所使用的物种/菌株中常见的结果被确定为偶发性发生。

[0778] C.8.细胞因子分析

[0779] 测量从第13-16组(试验品/赋形剂给药后8天)收集的血浆中的细胞因子水平,以检查mycM28z1XXPD1DNRCAR T细胞与赋形剂对照对受治疗小鼠外周细胞因子表达的毒性。对一下细胞因子进行分析:IFN-γ、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12p70、KC/GRO和TNF-α。

[0780] 该分析结果表明,无论接受CART细胞还是赋形剂对照,所有动物的IFN-γ、IL-12p70、IL-1β、IL-2和IL-5水平均无法检测(低于定量限值)。IL-4在低水平下可检测到,并且是唯一一种在接受CAR T细胞的小鼠中显示出略高于接受赋形剂对照的小鼠的水平的细胞因子。检测到的所有其他高于定量限值的细胞因子(如IL-10、IL-6、KC/GRO和TNF-α)水平通常很低,且在接受CAR T细胞的小鼠与接受赋形剂对照的小鼠之间无显著差异。

[0781] C.9.肿瘤和脾脏中mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的鉴定

[0782] 为确认mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的注射,第13-16组在供试品/赋形剂给药后8天处死。通过流式细胞术分离、处理和染色脾脏和肿瘤中的人T细胞(CD45+CD3+)。在所有mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗小鼠的肿瘤和脾脏组织中检测到人T细胞,但在赋形剂

治疗小鼠的肿瘤和脾脏组织中未检测到人T细胞(见图44和45)。

[0783] C.10.生物发光成像

[0784] 在17-20组小鼠上进行全身光学BLI(IVIS),以提供MGM肿瘤负荷的定性评估。研究第1/1天的图像显示各组所有动物的肿瘤施用成功。给药对照赋形剂后,第17组(雄性小鼠)和第18组(雌性小鼠)动物的肿瘤负荷在每个测量时间点增加,其中2只动物因发病需要尽早成像。给药供试品后,第19组(雄性小鼠)和第20组(雌性小鼠)动物的肿瘤负荷在注射后1周增加;然而,在2周的时间点,负担显著减轻。雄性和雌性小鼠的成像结果分别如图46和47所示。

[0785] D.讨论

[0786] 进行了广泛的药理学研究,以确定M28z1XXPD1DNR CAR T细胞在体外和体内的抗肿瘤疗效。研究表明,当抗原刺激时,mycM28z1XXPD1DNR CART细胞以间皮素依赖和HLA非依赖的方式杀死靶细胞,积累并分泌效应细胞因子。使用重复抗原刺激进行的复杂抗原应激试验表明,在试验过程中,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞比mycM28z CAR T细胞保留细胞毒性的时间更长。在体内,重复抗原攻击显示,与mycM28z CAR T细胞相比,mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞具有优越的功能持久性,导致随着对mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞治疗小鼠的肿瘤剂量不断增加,在一系列10次肿瘤再攻击中连续肿瘤消退,但mycM28z CAR T细胞治疗小鼠的肿瘤最终进展和复发。

[0787] 动物药理学研究与研究CAR T细胞的抗肿瘤疗效更相关,因为它们涵盖了药理学和药代动力学的重要方面,而这些方面无法在体外试验中进行研究。诸如给药途径、转运至肿瘤部位、归巢至淋巴器官、系统循环、体内持久性等因素,以及尽管所使用的免疫受损小鼠系存在局限性,但与肿瘤免疫微环境的相互作用最终调节抗肿瘤疗效。发明人已经开发出一种与转移相关的类似于人疾病的胸膜间皮瘤原位小鼠模型(Servais等人,Clin Cancer Res.2012)。发明人已经证明,T细胞的区域(胸膜内)给药不仅对胸膜疾病而且对播散性肿瘤部位都具有极大优势(Adusumilli等人,Sci Transl Med.2014;6(261):261ra151)。更重要的是,在正在进行的临床试验(IND 16354)中观察到的结果反映我们在原位MPM小鼠模型中的原始观察结果,证明了该模型在临床相关性方面的有效性(Adusumilli等人,Cancer Res 2019;79(13))。在本研究中,观察到单次低剂量的3×10^4mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞局部递送可完全根除肿瘤,且未观察到靶向、非肿瘤毒性的迹象。单次原位剂量1×10^5mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞在间皮瘤异种移植小鼠模型中的毒性研究(恢复期为2周)证实,对mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的耐受良好。在死亡率、临床观察、体重变化和大体/镜检方面未有明显发现。镜检显示异种移植瘤内存在混合细胞浸润,这在赋形剂治疗的小鼠中未观察到,但表明mycM28z1XXPD1DNR CAR T细胞的药理作用。雄性受试小鼠的平均总蛋白值较低,雌性受试小鼠在2周的时间点表现出较高的平均单核细胞百分比,但两者均与任何镜检结果不相关。

[0788] CAR T细胞,包括靶向间皮素的CARCAR T细胞,已经在人中进行了评估,并且据报道是安全的,具有明确的、可控制的副作用,如发烧、寒战、肌痛、超敏反应和因T细胞造成的炎症而产生的过敏反应。通过对产品进行广泛测试,有复制能力的逆转录病毒的风险将降至最低。此外,患者T细胞将每12周进行一次检测,持续2年或直到疾病进展。在CAR T细胞给药后,将对患者进行长达15年的随访。

[0789] 这些数据的综合评估已用于建立人体的安全起始剂量,并支持剂量递增方案。

[0790] 本公开主题的实施方式

[0791] 从前面的描述可以明显看出,可以对本公开的主题进行变化和修改以使其适用于各种用途和情况。这些实施方式也在以下权利要求的范围内。

[0792] 本文中对变量任何定义中元素列表的叙述包括该变量作为所列元素的任何单个元素或组合(或子组合)的定义。本文对实施方式的叙述包括将所述实施方式作为任何单个实施方式或与任何其他实施方式或其部分组合。

[0793] 本说明书中提及的所有专利和出版物均通过引用并入本文,其程度与每项独立专利和出版物明确且单独地表示通过引用并入的程度相同。

[0001] 序列表

[0002] <110> 纪念斯隆凯特琳癌症中心

[0003] <120> 间皮素CAR及其用途

[0004] <130> 072734.1041

[0005] <150> US 62/848,983

[0006] <151> 2019-05-16

[0007] <150> US 62/975,966

[0008] <151> 2020-02-13

[0009] <160> 137

[0010] <170> PatentIn 版本 3.5

[0011] <210> 1

[0012] <211> 345

[0013] <212> PRT

[0014] <213> 智人

[0015] <400> 1

[0016] Met Ala Gln His His Leu Trp Ile Leu Leu Leu Cys Leu Gln Thr Trp

[0017] 1 5 10 15

[0018] Pro Glu Ala Ala Gly Lys Asp Ser Glu Ile Phe Thr Val Asn Gly Ile

[0019] 20 25 30

[0020] Leu Gly Glu Ser Val Thr Phe Pro Val Asn Ile Gln Glu Pro Arg Gln

[0021] 35 40 45

[0022] Val Lys Ile Ile Ala Trp Thr Ser Lys Thr Ser Val Ala Tyr Val Thr

[0023] 50 55 60

[0024] Pro Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Val Thr Val Thr His Arg Asn

[0025] 65 70 75 80

[0026] Tyr Tyr Glu Arg Ile His Ala Leu Gly Pro Asn Tyr Asn Leu Val Ile

[0027] 85 90 95

[0028] Ser Asp Leu Arg Met Glu Asp Ala Gly Asp Tyr Lys Ala Asp Ile Asn

[0029] 100 105 110

[0030] Thr Gln Ala Asp Pro Tyr Thr Thr Thr Lys Arg Tyr Asn Leu Gln Ile

[0031] 115 120 125

[0032] Tyr Arg Arg Leu Gly Lys Pro Lys Ile Thr Gln Ser Leu Met Ala Ser

[0033] 130 135 140

[0034] Val Asn Ser Thr Cys Asn Val Thr Leu Thr Cys Ser Val Glu Lys Glu

[0035] 145 150 155 160

[0036] Glu Lys Asn Val Thr Tyr Asn Trp Ser Pro Leu Gly Glu Glu Gly Asn

[0037] 165 170 175

[0038] Val Leu Gln Ile Phe Gln Thr Pro Glu Asp Gln Glu Leu Thr Tyr Thr

[0039] 180 185 190

[0040] Cys Thr Ala Gln Asn Pro Val Ser Asn Asn Ser Asp Ser Ile Ser Ala

[0041] 195 200 205

[0042] Arg Gln Leu Cys Ala Asp Ile Ala Met Gly Phe Arg Thr His His Thr
[0043] 210 215 220
[0044] Gly Leu Leu Ser Val Leu Ala Met Phe Phe Leu Leu Val Leu Ile Leu
[0045] 225 230 235 240
[0046] Ser Ser Val Phe Leu Phe Arg Leu Phe Lys Arg Arg Gln Gly Arg Ile
[0047] 245 250 255
[0048] Phe Pro Glu Gly Ser Cys Leu Asn Thr Phe Thr Lys Asn Pro Tyr Ala
[0049] 260 265 270
[0050] Ala Ser Lys Lys Thr Ile Tyr Thr Tyr Ile Met Ala Ser Arg Asn Thr
[0051] 275 280 285
[0052] Gln Pro Ala Glu Ser Arg Ile Tyr Asp Glu Ile Leu Gln Ser Lys Val
[0053] 290 295 300
[0054] Leu Pro Ser Lys Glu Glu Pro Val Asn Thr Val Tyr Ser Glu Val Gln
[0055] 305 310 315 320
[0056] Phe Ala Asp Lys Met Gly Lys Ala Ser Thr Gln Asp Ser Lys Pro Pro
[0057] 325 330 335
[0058] Gly Thr Ser Ser Tyr Glu Ile Val Ile
[0059] 340 345
[0060] <210> 2
[0061] <211> 75
[0062] <212> DNA
[0063] <213> 人工序列
[0064] <220>
[0065] <223> 合成多核苷酸
[0066] <400> 2
[0067] ttgctgagcg tgctggctat gttctttctg cttgttctca ttctgtcttc agtgtttttg 60
[0068] ttccgtttgt tcaag 75
[0069] <210> 3
[0070] <211> 583
[0071] <212> PRT
[0072] <213> 智人
[0073] <400> 3
[0074] Met Glu Ser Lys Gly Ala Ser Ser Cys Arg Leu Leu Phe Cys Leu Leu
[0075] 1 5 10 15
[0076] Ile Ser Ala Thr Val Phe Arg Pro Gly Leu Gly Trp Tyr Thr Val Asn
[0077] 20 25 30
[0078] Ser Ala Tyr Gly Asp Thr Ile Ile Ile Pro Cys Arg Leu Asp Val Pro
[0079] 35 40 45
[0080] Gln Asn Leu Met Phe Gly Lys Trp Lys Tyr Glu Lys Pro Asp Gly Ser
[0081] 50 55 60
[0082] Pro Val Phe Ile Ala Phe Arg Ser Ser Thr Lys Lys Ser Val Gln Tyr
[0083] 65 70 75 80

[0084] Asp Asp Val Pro Glu Tyr Lys Asp Arg Leu Asn Leu Ser Glu Asn Tyr
[0085] 85 90 95
[0086] Thr Leu Ser Ile Ser Asn Ala Arg Ile Ser Asp Glu Lys Arg Phe Val
[0087] 100 105 110
[0088] Cys Met Leu Val Thr Glu Asp Asn Val Phe Glu Ala Pro Thr Ile Val
[0089] 115 120 125
[0090] Lys Val Phe Lys Gln Pro Ser Lys Pro Glu Ile Val Ser Lys Ala Leu
[0091] 130 135 140
[0092] Phe Leu Glu Thr Glu Gln Leu Lys Lys Leu Gly Asp Cys Ile Ser Glu
[0093] 145 150 155 160
[0094] Asp Ser Tyr Pro Asp Gly Asn Ile Thr Trp Tyr Arg Asn Gly Lys Val
[0095] 165 170 175
[0096] Leu His Pro Leu Glu Gly Ala Val Val Ile Ile Phe Lys Lys Glu Met
[0097] 180 185 190
[0098] Asp Pro Val Thr Gln Leu Tyr Thr Met Thr Ser Thr Leu Glu Tyr Lys
[0099] 195 200 205
[0100] Thr Thr Lys Ala Asp Ile Gln Met Pro Phe Thr Cys Ser Val Thr Tyr
[0101] 210 215 220
[0102] Tyr Gly Pro Ser Gly Gln Lys Thr Ile His Ser Glu Gln Ala Val Phe
[0103] 225 230 235 240
[0104] Asp Ile Tyr Tyr Pro Thr Glu Gln Val Thr Ile Gln Val Leu Pro Pro
[0105] 245 250 255
[0106] Lys Asn Ala Ile Lys Glu Gly Asp Asn Ile Thr Leu Lys Cys Leu Gly
[0107] 260 265 270
[0108] Asn Gly Asn Pro Pro Pro Glu Glu Phe Leu Phe Tyr Leu Pro Gly Gln
[0109] 275 280 285
[0110] Pro Glu Gly Ile Arg Ser Ser Asn Thr Tyr Thr Leu Thr Asp Val Arg
[0111] 290 295 300
[0112] Arg Asn Ala Thr Gly Asp Tyr Lys Cys Ser Leu Ile Asp Lys Lys Ser
[0113] 305 310 315 320
[0114] Met Ile Ala Ser Thr Ala Ile Thr Val His Tyr Leu Asp Leu Ser Leu
[0115] 325 330 335
[0116] Asn Pro Ser Gly Glu Val Thr Arg Gln Ile Gly Asp Ala Leu Pro Val
[0117] 340 345 350
[0118] Ser Cys Thr Ile Ser Ala Ser Arg Asn Ala Thr Val Val Trp Met Lys
[0119] 355 360 365
[0120] Asp Asn Ile Arg Leu Arg Ser Ser Pro Ser Phe Ser Ser Leu His Tyr
[0121] 370 375 380
[0122] Gln Asp Ala Gly Asn Tyr Val Cys Glu Thr Ala Leu Gln Glu Val Glu
[0123] 385 390 395 400
[0124] Gly Leu Lys Lys Arg Glu Ser Leu Thr Leu Ile Val Glu Gly Lys Pro
[0125] 405 410 415

[0126] Gln Ile Lys Met Thr Lys Lys Thr Asp Pro Ser Gly Leu Ser Lys Thr
[0127] 420 425 430
[0128] Ile Ile Cys His Val Glu Gly Phe Pro Lys Pro Ala Ile Gln Trp Thr
[0129] 435 440 445
[0130] Ile Thr Gly Ser Gly Ser Val Ile Asn Gln Thr Glu Glu Ser Pro Tyr
[0131] 450 455 460
[0132] Ile Asn Gly Arg Tyr Tyr Ser Lys Ile Ile Ile Ser Pro Glu Glu Asn
[0133] 465 470 475 480
[0134] Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Glu Asn Gln Leu Glu Arg Thr Val Asn
[0135] 485 490 495
[0136] Ser Leu Asn Val Ser Ala Ile Ser Ile Pro Glu His Asp Glu Ala Asp
[0137] 500 505 510
[0138] Glu Ile Ser Asp Glu Asn Arg Glu Lys Val Asn Asp Gln Ala Lys Leu
[0139] 515 520 525
[0140] Ile Val Gly Ile Val Val Gly Leu Leu Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly
[0141] 530 535 540
[0142] Val Val Tyr Trp Leu Tyr Met Lys Lys Ser Lys Thr Ala Ser Lys His
[0143] 545 550 555 560
[0144] Val Asn Lys Asp Leu Gly Asn Met Glu Glu Asn Lys Lys Leu Glu Glu
[0145] 565 570 575
[0146] Asn Asn His Lys Thr Glu Ala
[0147] 580
[0148] <210> 4
[0149] <211> 78
[0150] <212> DNA
[0151] <213> 人工序列
[0152] <220>
[0153] <223> 合成多核苷酸
[0154] <400> 4
[0155] ctaattgtgg gaatcgttgt tggtctcctc cttgctgccc ttgttgctgg tgtcgtctac 60
[0156] tggctgtaca tgaagaag 78
[0157] <210> 5
[0158] <211> 235
[0159] <212> PRT
[0160] <213> 智人
[0161] <400> 5
[0162] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0163] 1 5 10 15
[0164] His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr
[0165] 20 25 30
[0166] Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser
[0167] 35 40 45

[0168] Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala
[0169] 50 55 60
[0170] Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala
[0171] 65 70 75 80
[0172] Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp
[0173] 85 90 95
[0174] Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr
[0175] 100 105 110
[0176] Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe
[0177] 115 120 125
[0178] Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
[0179] 130 135 140
[0180] Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
[0181] 145 150 155 160
[0182] Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
[0183] 165 170 175
[0184] Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
[0185] 180 185 190
[0186] Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His
[0187] 195 200 205
[0188] Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser
[0189] 210 215 220
[0190] Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
[0191] 225 230 235
[0192] <210> 6
[0193] <211> 75
[0194] <212> DNA
[0195] <213> 人工序列
[0196] <220>
[0197] <223> 合成多核苷酸
[0198] <400> 6
[0199] atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgtc actggttatc 60
[0200] acccttttact gcaac 75
[0201] <210> 7
[0202] <211> 221
[0203] <212> PRT
[0204] <213> 智人
[0205] <400> 7
[0206] Met Arg Pro Arg Leu Trp Leu Leu Leu Ala Ala Gln Leu Thr Val Leu
[0207] 1 5 10 15
[0208] His Gly Asn Ser Val Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln
[0209] 20 25 30

[0210] Thr Asn Lys Met Val Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser
[0211] 35 40 45
[0212] Asn Met Arg Ile Tyr Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp
[0213] 50 55 60
[0214] Ser His His Glu Phe Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile
[0215] 65 70 75 80
[0216] His Gly Glu Glu Val Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala
[0217] 85 90 95
[0218] Ser Arg Phe Ile Leu Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly
[0219] 100 105 110
[0220] Ile Tyr Phe Cys Met Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys
[0221] 115 120 125
[0222] Gly Thr Gln Leu Ser Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro
[0223] 130 135 140
[0224] Thr Lys Lys Ser Thr Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro
[0225] 145 150 155 160
[0226] Glu Thr Gln Lys Gly Pro Leu Cys Ser Pro Ile Thr Leu Gly Leu Leu
[0227] 165 170 175
[0228] Val Ala Gly Val Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Val Ala Ile His
[0229] 180 185 190
[0230] Leu Cys Cys Arg Arg Arg Arg Ala Arg Leu Arg Phe Met Lys Gln Leu
[0231] 195 200 205
[0232] Arg Leu His Pro Leu Glu Lys Cys Ser Arg Met Asp Tyr
[0233] 210 215 220
[0234] <210> 8
[0235] <211> 75
[0236] <212> DNA
[0237] <213> 人工序列
[0238] <220>
[0239] <223> 合成多核苷酸
[0240] <400> 8
[0241] atcacccttg gcctgctggt ggctggcgtc ctggttctgc tggtttccct gggagtggcc 60
[0242] atccacctgt gctgc 75
[0243] <210> 9
[0244] <211> 199
[0245] <212> PRT
[0246] <213> 智人
[0247] <400> 9
[0248] Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
[0249] 1 5 10 15
[0250] Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
[0251] 20 25 30

[0252] Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val
[0253] 35 40 45
[0254] Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp
[0255] 50 55 60
[0256] Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu
[0257] 65 70 75 80
[0258] Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
[0259] 85 90 95
[0260] Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser
[0261] 100 105 110
[0262] Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
[0263] 115 120 125
[0264] His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
[0265] 130 135 140
[0266] Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
[0267] 145 150 155 160
[0268] Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro
[0269] 165 170 175
[0270] Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
[0271] 180 185 190
[0272] Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
[0273] 195
[0274] <210> 10
[0275] <211> 75
[0276] <212> DNA
[0277] <213> 人工序列
[0278] <220>
[0279] <223> 合成多核苷酸
[0280] <400> 10
[0281] ttctggttac ccataggatg tgcagccttt gttgtagtct gcattttggg atgcatactt 60
[0282] atttgttggc ttaca 75
[0283] <210> 11
[0284] <211> 223
[0285] <212> PRT
[0286] <213> 智人
[0287] <400> 11
[0288] Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
[0289] 1 5 10 15
[0290] Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
[0291] 20 25 30
[0292] Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
[0293] 35 40 45

[0294] Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
[0295] 50 55 60
[0296] Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
[0297] 65 70 75 80
[0298] Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
[0299] 85 90 95
[0300] Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
[0301] 100 105 110
[0302] Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
[0303] 115 120 125
[0304] Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
[0305] 130 135 140
[0306] Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
[0307] 145 150 155 160
[0308] Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
[0309] 165 170 175
[0310] Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
[0311] 180 185 190
[0312] Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
[0313] 195 200 205
[0314] Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
[0315] 210 215 220
[0316] <210> 12
[0317] <211> 75
[0318] <212> DNA
[0319] <213> 人工序列
[0320] <220>
[0321] <223> 合成多核苷酸
[0322] <400> 12
[0323] ttcctcctct ggatccttgc agcagttagt tcggggttgt ttttttatag ctttctcctc 60
[0324] acagctgttt ctttg 75
[0325] <210> 13
[0326] <211> 532
[0327] <212> PRT
[0328] <213> 智人
[0329] <400> 13
[0330] Met Ala Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ala Leu Pro Ala Leu Leu Val Leu
[0331] 1 5 10 15
[0332] Leu Gly Ala Leu Phe Pro Gly Pro Gly Asn Ala Gln Thr Ser Val Ser
[0333] 20 25 30
[0334] Pro Ser Lys Val Ile Leu Pro Arg Gly Gly Ser Val Leu Val Thr Cys
[0335] 35 40 45

[0336] Ser Thr Ser Cys Asp Gln Pro Lys Leu Leu Gly Ile Glu Thr Pro Leu
[0337] 50 55 60
[0338] Pro Lys Lys Glu Leu Leu Leu Pro Gly Asn Asn Arg Lys Val Tyr Glu
[0339] 65 70 75 80
[0340] Leu Ser Asn Val Gln Glu Asp Ser Gln Pro Met Cys Tyr Ser Asn Cys
[0341] 85 90 95
[0342] Pro Asp Gly Gln Ser Thr Ala Lys Thr Phe Leu Thr Val Tyr Trp Thr
[0343] 100 105 110
[0344] Pro Glu Arg Val Glu Leu Ala Pro Leu Pro Ser Trp Gln Pro Val Gly
[0345] 115 120 125
[0346] Lys Asn Leu Thr Leu Arg Cys Gln Val Glu Gly Gly Ala Pro Arg Ala
[0347] 130 135 140
[0348] Asn Leu Thr Val Val Leu Leu Arg Gly Glu Lys Glu Leu Lys Arg Glu
[0349] 145 150 155 160
[0350] Pro Ala Val Gly Glu Pro Ala Glu Val Thr Thr Thr Val Leu Val Arg
[0351] 165 170 175
[0352] Arg Asp His His Gly Ala Asn Phe Ser Cys Arg Thr Glu Leu Asp Leu
[0353] 180 185 190
[0354] Arg Pro Gln Gly Leu Glu Leu Phe Glu Asn Thr Ser Ala Pro Tyr Gln
[0355] 195 200 205
[0356] Leu Gln Thr Phe Val Leu Pro Ala Thr Pro Pro Gln Leu Val Ser Pro
[0357] 210 215 220
[0358] Arg Val Leu Glu Val Asp Thr Gln Gly Thr Val Val Cys Ser Leu Asp
[0359] 225 230 235 240
[0360] Gly Leu Phe Pro Val Ser Glu Ala Gln Val His Leu Ala Leu Gly Asp
[0361] 245 250 255
[0362] Gln Arg Leu Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Asn Asp Ser Phe Ser Ala
[0363] 260 265 270
[0364] Lys Ala Ser Val Ser Val Thr Ala Glu Asp Glu Gly Thr Gln Arg Leu
[0365] 275 280 285
[0366] Thr Cys Ala Val Ile Leu Gly Asn Gln Ser Gln Glu Thr Leu Gln Thr
[0367] 290 295 300
[0368] Val Thr Ile Tyr Ser Phe Pro Ala Pro Asn Val Ile Leu Thr Lys Pro
[0369] 305 310 315 320
[0370] Glu Val Ser Glu Gly Thr Glu Val Thr Val Lys Cys Glu Ala His Pro
[0371] 325 330 335
[0372] Arg Ala Lys Val Thr Leu Asn Gly Val Pro Ala Gln Pro Leu Gly Pro
[0373] 340 345 350
[0374] Arg Ala Gln Leu Leu Leu Lys Ala Thr Pro Glu Asp Asn Gly Arg Ser
[0375] 355 360 365
[0376] Phe Ser Cys Ser Ala Thr Leu Glu Val Ala Gly Gln Leu Ile His Lys
[0377] 370 375 380

[0378] Asn Gln Thr Arg Glu Leu Arg Val Leu Tyr Gly Pro Arg Leu Asp Glu
[0379] 385 390 395 400
[0380] Arg Asp Cys Pro Gly Asn Trp Thr Trp Pro Glu Asn Ser Gln Gln Thr
[0381] 405 410 415
[0382] Pro Met Cys Gln Ala Trp Gly Asn Pro Leu Pro Glu Leu Lys Cys Leu
[0383] 420 425 430
[0384] Lys Asp Gly Thr Phe Pro Leu Pro Ile Gly Glu Ser Val Thr Val Thr
[0385] 435 440 445
[0386] Arg Asp Leu Glu Gly Thr Tyr Leu Cys Arg Ala Arg Ser Thr Gln Gly
[0387] 450 455 460
[0388] Glu Val Thr Arg Lys Val Thr Val Asn Val Leu Ser Pro Arg Tyr Glu
[0389] 465 470 475 480
[0390] Ile Val Ile Ile Thr Val Val Ala Ala Ala Val Ile Met Gly Thr Ala
[0391] 485 490 495
[0392] Gly Leu Ser Thr Tyr Leu Tyr Asn Arg Gln Arg Lys Ile Lys Lys Tyr
[0393] 500 505 510
[0394] Arg Leu Gln Gln Ala Gln Lys Gly Thr Pro Met Lys Pro Asn Thr Gln
[0395] 515 520 525
[0396] Ala Thr Pro Pro
[0397] 530
[0398] <210> 14
[0399] <211> 81
[0400] <212> DNA
[0401] <213> 人工序列
[0402] <220>
[0403] <223> 合成多核苷酸
[0404] <400> 14
[0405] attgtcatca tcactgtggt agcagccgca gtcataatgg gcactgcagg cctcagcacg 60
[0406] tacctctata accgccagcg g 81
[0407] <210> 15
[0408] <211> 39
[0409] <212> PRT
[0410] <213> 人工序列
[0411] <220>
[0412] <223> 合成多肽
[0413] <400> 15
[0414] Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
[0415] 1 5 10 15
[0416] Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
[0417] 20 25 30
[0418] Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro
[0419] 35

[0420] <210> 16

[0421] <211> 117

[0422] <212> DNA

[0423] <213> 人工序列

[0424] <220>

[0425] <223> 合成多核苷酸

[0426] <400> 16

[0427] caagagctga cttacacgtg tacagcccag aaccctgtca gcaacaattc tgactccatc 60

[0428] tctgcccggc agctctgtgc agacatcgca atgggcttcc gtactcacca caccggg 117

[0429] <210> 17

[0430] <211> 116

[0431] <212> DNA

[0432] <213> 人工序列

[0433] <220>

[0434] <223> 合成多核苷酸

[0435] <400> 17

[0436] accaactgga gagaacagta aactccttga atgtctctgc tataagtatt ccagaacacg 60

[0437] atgaggcaga cgagataagt gatgaaaaca gagaaaaggt gaatgaccag gcaaaa 116

[0438] <210> 18

[0439] <211> 138

[0440] <212> DNA

[0441] <213> 人工序列

[0442] <220>

[0443] <223> 合成多核苷酸

[0444] <400> 18

[0445] cccaccacga cgccagcgcc gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc 60

[0446] ctgtccctgc gcccagaggc gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgca cacgaggggg 120

[0447] ctggacttcg cctgtgat 138

[0448] <210> 19

[0449] <211> 117

[0450] <212> DNA

[0451] <213> 人工序列

[0452] <220>

[0453] <223> 合成多核苷酸

[0454] <400> 19

[0455] ctgagtgtgg ttgatttcct tcccaccact gcccagccca ccaagaagtc caccctcaag 60

[0456] aagagagtgt gccggttacc caggccagag acccagaagg gcccactttg tagcccc 117

[0457] <210> 20

[0458] <211> 117

[0459] <212> DNA

[0460] <213> 人工序列

[0461] <220>

[0462] <223> 合成多核苷酸

[0463] <400> 20

[0464] tctcatgcca actattactt ctgcaaccta tcaatttttg atcctcctcc ttttaaagta 60

[0465] actcttacag gaggatattt gcatatttat gaatcacaac tttgttgcca gctgaag 117

[0466] <210> 21

[0467] <211> 117

[0468] <212> DNA

[0469] <213> 人工序列

[0470] <220>

[0471] <223> 合成多核苷酸

[0472] <400> 21

[0473] gacacgggac tctacatctg caaggtggag ctcatgtacc caccgccata ctacctgggc 60

[0474] ataggcaacg gaacccagat ttatgtaatt gatccagaac cgtgcccaga ttctgac 117

[0475] <210> 22

[0476] <211> 117

[0477] <212> DNA

[0478] <213> 人工序列

[0479] <220>

[0480] <223> 合成多核苷酸

[0481] <400> 22

[0482] ggggaatcag tgactgtcac tcgagatctt gagggcacct acctctgtcg ggccaggagc 60

[0483] actcaagggg aggtcacccg caaggtgacc gtgaatgtgc tctccccccg gtatgag 117

[0484] <210> 23

[0485] <211> 22

[0486] <212> PRT

[0487] <213> 人工序列

[0488] <220>

[0489] <223> 合成多肽

[0490] <400> 23

[0491] Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

[0492] 1 5 10 15

[0493] Asp Val Leu Asp Lys Arg

[0494] 20

[0495] <210> 24

[0496] <211> 66

[0497] <212> DNA

[0498] <213> 人工序列

[0499] <220>

[0500] <223> 合成多核苷酸

[0501] <400> 24

[0502] cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac 60

[0503] aagaga 66

[0504] <210> 25
[0505] <211> 22
[0506] <212> PRT
[0507] <213> 人工序列
[0508] <220>
[0509] <223> 合成多肽
[0510] <400> 25
[0511] Gln Asn Gln Leu Phe Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Phe
[0512] 1 5 10 15
[0513] Asp Val Leu Asp Lys Arg
[0514] 20
[0515] <210> 26
[0516] <211> 66
[0517] <212> DNA
[0518] <213> 人工序列
[0519] <220>
[0520] <223> 合成多核苷酸
[0521] <400> 26
[0522] cagaaccagc tctttaacga gctcaatcta ggacgaagag aggagttcga tgttttggac 60
[0523] aagaga 66
[0524] <210> 27
[0525] <211> 23
[0526] <212> PRT
[0527] <213> 人工序列
[0528] <220>
[0529] <223> 合成多肽
[0530] <400> 27
[0531] Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
[0532] 1 5 10 15
[0533] Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
[0534] 20
[0535] <210> 28
[0536] <211> 69
[0537] <212> DNA
[0538] <213> 人工序列
[0539] <220>
[0540] <223> 合成多核苷酸
[0541] <400> 28
[0542] caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgagatt 60
[0543] gggatgaaa 69
[0544] <210> 29
[0545] <211> 23

[0546] <212> PRT
[0547] <213> 人工序列
[0548] <220>
[0549] <223> 合成多肽
[0550] <400> 29
[0551] Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
[0552] 1 5 10 15
[0553] Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys
[0554] 20
[0555] <210> 30
[0556] <211> 69
[0557] <212> DNA
[0558] <213> 人工序列
[0559] <220>
[0560] <223> 合成多核苷酸
[0561] <400> 30
[0562] caggaaggcc tgttcaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggcctt cagtgagatt 60
[0563] gggatgaaa 69
[0564] <210> 31
[0565] <211> 22
[0566] <212> PRT
[0567] <213> 人工序列
[0568] <220>
[0569] <223> 合成多肽
[0570] <400> 31
[0571] His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
[0572] 1 5 10 15
[0573] Asp Ala Leu His Met Gln
[0574] 20
[0575] <210> 32
[0576] <211> 66
[0577] <212> DNA
[0578] <213> 人工序列
[0579] <220>
[0580] <223> 合成多核苷酸
[0581] <400> 32
[0582] cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 60
[0583] atgcag 66
[0584] <210> 33
[0585] <211> 22
[0586] <212> PRT
[0587] <213> 人工序列

[0588] <220>
[0589] <223> 合成多肽
[0590] <400> 33
[0591] His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe
[0592] 1 5 10 15
[0593] Asp Ala Leu His Met Gln
[0594] 20
[0595] <210> 34
[0596] <211> 66
[0597] <212> DNA
[0598] <213> 人工序列
[0599] <220>
[0600] <223> 合成多核苷酸
[0601] <400> 34
[0602] cacgatggcc ttttccaggg gctcagtaca gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac 60
[0603] atgcag 66
[0604] <210> 35
[0605] <211> 112
[0606] <212> PRT
[0607] <213> 人工序列
[0608] <220>
[0609] <223> 合成多肽
[0610] <400> 35
[0611] Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
[0612] 1 5 10 15
[0613] Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
[0614] 20 25 30
[0615] Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
[0616] 35 40 45
[0617] Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys
[0618] 50 55 60
[0619] Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
[0620] 65 70 75 80
[0621] Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala
[0622] 85 90 95
[0623] Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0624] 100 105 110
[0625] <210> 36
[0626] <211> 230
[0627] <212> PRT
[0628] <213> 人工序列
[0629] <220>

[0630] <223> 合成多肽

[0631] <400> 36

[0632] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

[0633] 1 5 10 15

[0634] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly

[0635] 20 25 30

[0636] Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

[0637] 35 40 45

[0638] Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser

[0639] 50 55 60

[0640] Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

[0641] 65 70 75 80

[0642] Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[0643] 85 90 95

[0644] Cys Ala Arg Glu Gly Lys Asn Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

[0645] 100 105 110

[0646] Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

[0647] 115 120 125

[0648] Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

[0649] 130 135 140

[0650] Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

[0651] 145 150 155 160

[0652] Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

[0653] 165 170 175

[0654] Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

[0655] 180 185 190

[0656] Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

[0657] 195 200 205

[0658] Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

[0659] 210 215 220

[0660] Thr Ser Gly Gln Ala Gly

[0661] 225 230

[0662] <210> 37

[0663] <211> 693

[0664] <212> DNA

[0665] <213> 人工序列

[0666] <220>

[0667] <223> 合成多核苷酸

[0668] <400> 37

[0669] caggtgcagc tgcaggagtc cggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

[0670] acctgcactg tctctggtgg ctccgtcagc agtggtagtt actactggag ctggatccgg 120

[0671] cagcccccag ggaagggact ggagtggatt gggtatatct attacagtgg gagcaccaac 180

[0672] tacaacccct ccctcaagag tcgagtcacc atatcagtag acacgtccaa gaaccagttc 240
[0673] tccctgaagc tgagctctgt gaccgctgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
[0674] gggaagaatg gggcttttga tatctggggc caagggacaa tggtcaccgt ctcttcagcc 360
[0675] tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
[0676] acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
[0677] aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
[0678] ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
[0679] atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
[0680] tcttgtgaca aaactagtgg ccaggccggc cac 693
[0681] <210> 38
[0682] <211> 214
[0683] <212> PRT
[0684] <213> 人工序列
[0685] <220>
[0686] <223> 合成多肽
[0687] <400> 38
[0688] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0689] 1 5 10 15
[0690] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
[0691] 20 25 30
[0692] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0693] 35 40 45
[0694] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Gly Phe Ser Gly
[0695] 50 55 60
[0696] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0697] 65 70 75 80
[0698] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
[0699] 85 90 95
[0700] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[0701] 100 105 110
[0702] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[0703] 115 120 125
[0704] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[0705] 130 135 140
[0706] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[0707] 145 150 155 160
[0708] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[0709] 165 170 175
[0710] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[0711] 180 185 190
[0712] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[0713] 195 200 205

[0714] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0715] 210
[0716] <210> 39
[0717] <211> 640
[0718] <212> DNA
[0719] <213> 人工序列
[0720] <220>
[0721] <223> 合成多核苷酸
[0722] <400> 39
[0723] gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
[0724] atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
[0725] gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
[0726] gggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
[0727] gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga 300
[0728] gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
[0729] tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
[0730] cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
[0731] gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctact gcctcagcag caccctgacg 540
[0732] ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa ctctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
[0733] ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt 640
[0734] <210> 40
[0735] <211> 214
[0736] <212> PRT
[0737] <213> 智人
[0738] <400> 40
[0739] Arg His Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0740] 1 5 10 15
[0741] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
[0742] 20 25 30
[0743] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0744] 35 40 45
[0745] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Gly Phe Ser Gly
[0746] 50 55 60
[0747] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0748] 65 70 75 80
[0749] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
[0750] 85 90 95
[0751] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[0752] 100 105 110
[0753] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[0754] 115 120 125
[0755] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

[0756] 130 135 140

[0757] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

[0758] 145 150 155 160

[0759] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

[0760] 165 170 175

[0761] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

[0762] 180 185 190

[0763] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

[0764] 195 200 205

[0765] Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0766] 210

[0767] <210> 41

[0768] <211> 120

[0769] <212> PRT

[0770] <213> 人工序列

[0771] <220>

[0772] <223> 合成多肽

[0773] <400> 41

[0774] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

[0775] 1 5 10 15

[0776] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly

[0777] 20 25 30

[0778] Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

[0779] 35 40 45

[0780] Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser

[0781] 50 55 60

[0782] Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

[0783] 65 70 75 80

[0784] Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[0785] 85 90 95

[0786] Cys Ala Arg Glu Gly Lys Asn Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

[0787] 100 105 110

[0788] Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ser

[0789] 115 120

[0790] <210> 42

[0791] <211> 262

[0792] <212> PRT

[0793] <213> 人工序列

[0794] <220>

[0795] <223> 合成多核苷酸

[0796] <400> 42

[0797] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

[0798] 1 5 10 15
[0799] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
[0800] 20 25 30
[0801] Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
[0802] 35 40 45
[0803] Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
[0804] 50 55 60
[0805] Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
[0806] 65 70 75 80
[0807] Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0808] 85 90 95
[0809] Cys Ala Arg Glu Gly Lys Asn Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
[0810] 100 105 110
[0811] Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[0812] 115 120 125
[0813] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg His Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
[0814] 130 135 140
[0815] Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
[0816] 145 150 155 160
[0817] Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
[0818] 165 170 175
[0819] Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly
[0820] 180 185 190
[0821] Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
[0822] 195 200 205
[0823] Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
[0824] 210 215 220
[0825] Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
[0826] 225 230 235 240
[0827] Ile Lys Gly Gln Ala Gly His His His His His His Gly Asp Tyr Lys
[0828] 245 250 255
[0829] Asp Asp Asp Asp Lys Gly
[0830] 260
[0831] <210> 43
[0832] <211> 486
[0833] <212> PRT
[0834] <213> 人工序列
[0835] <220>
[0836] <223> 合成多肽
[0837] <400> 43
[0838] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0839] 1 5 10 15

[0840] His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
[0841] 20 25 30
[0842] Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly
[0843] 35 40 45
[0844] Ser Val Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro
[0845] 50 55 60
[0846] Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
[0847] 65 70 75 80
[0848] Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr
[0849] 85 90 95
[0850] Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
[0851] 100 105 110
[0852] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Lys Asn Gly Ala Phe Asp
[0853] 115 120 125
[0854] Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
[0855] 130 135 140
[0856] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg His Gln Met Thr
[0857] 145 150 155 160
[0858] Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
[0859] 165 170 175
[0860] Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
[0861] 180 185 190
[0862] Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser
[0863] 195 200 205
[0864] Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
[0865] 210 215 220
[0866] Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
[0867] 225 230 235 240
[0868] Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly
[0869] 245 250 255
[0870] Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr
[0871] 260 265 270
[0872] Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His
[0873] 275 280 285
[0874] Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser
[0875] 290 295 300
[0876] Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr
[0877] 305 310 315 320
[0878] Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys
[0879] 325 330 335
[0880] Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg
[0881] 340 345 350

[0882] Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp
[0883] 355 360 365
[0884] Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
[0885] 370 375 380
[0886] Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
[0887] 385 390 395 400
[0888] Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
[0889] 405 410 415
[0890] Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
[0891] 420 425 430
[0892] Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile
[0893] 435 440 445
[0894] Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe
[0895] 450 455 460
[0896] Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met
[0897] 465 470 475 480
[0898] Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0899] 485
[0900] <210> 44
[0901] <211> 1458
[0902] <212> DNA
[0903] <213> 人工序列
[0904] <220>
[0905] <223> 合成多核苷酸
[0906] <400> 44
[0907] atggccctgc cagtaacggc tctgctgctg ccacttgctc tgctcctcca tgcagccagg 60
[0908] cctcaggttc agcttcagga gagtggccca ggcctggtga agccaagtga gactctcagc 120
[0909] ttgacttgca cagtttctgg aggcagtgtc tcctcaggca gctattattg gtcctggatt 180
[0910] cggcagcccc ctgggaaagg cctggagtgg attgggtaca tatattacag tggcagcaca 240
[0911] aattacaatc catccctgaa gtctcgagta actatcagtg tggacacaag caagaatcag 300
[0912] ttttcactca aactgtcttc tgtgactgct gctgacactg ctgtttatta ttgtgccagg 360
[0913] gaggggaaaa atggggcatt tgatatttgg ggtcagggca caatggtgac agtcagctct 420
[0914] ggaggtggag gctcaggagg aggaggcagt ggaggtggtg ggtcacgcca tcagatgact 480
[0915] cagtcccccc ccagtctttc tgcctcagtt ggggatagag tgaccatcac atgcagagca 540
[0916] agtcagagca tatcatccta tctgaactgg taccagcaga agccagggaa agcccccaaa 600
[0917] ttgctgattt atgcagcctc aagtctccag agtggggtgc caagcaggtt ctcaggcagt 660
[0918] ggcagtggga cagatttcac attgacaatc agctccctcc aacctgaaga ttttgccacc 720
[0919] tactattgcc agcaatccta cagcacgccc ctgacttttg gaggtggcac aaaggtagag 780
[0920] atcaagagga ctgcggccgc aattgaagtt atgtatcctc ctccttacct agacaatgag 840
[0921] aagagcaatg gaaccattat ccatgtgaaa gggaaacacc tttgtccaag tcccctattt 900
[0922] cccggacctt ctaagccctt ttgggtgctg gtggtggttg gtggagtcct ggcttgctat 960
[0923] agcttgctag taacagtggc ctttattatt ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc 1020

[0924] ctgcacagtg actacatgaa catgactccc cgccgccccg ggcccacccg caagcattac 1080
[0925] cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca gcctatcgct ccagagtgaa gttcagcagg 1140
[0926] agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 1200
[0927] ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg 1260
[0928] ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgttca atgaactgca gaaagataag 1320
[0929] atggcggagg ccttcagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 1380
[0930] gatggccttt tccaggggct cagtacagcc accaaggaca ccttcgacgc ccttcacatg 1440
[0931] caggccctgc cccctcgc 1458
[0932] <210> 45
[0933] <211> 801
[0934] <212> DNA
[0935] <213> 人工序列
[0936] <220>
[0937] <223> 合成多核苷酸
[0938] <400> 45
[0939] atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
[0940] ccgcaggtgc agctgcagga gtccggccca ggactggtga agccttcgga gaccctgtcc 120
[0941] ctcacctgca ctgtctctgg tggctccgtc agcagtggta gttactactg gagctggatc 180
[0942] cggcagcccc cagggaaggg actggagtgg attgggtata tctattacag tgggagcacc 240
[0943] aactacaacc cctccctcaa gagtcgagtc accatatcag tagacacgtc caagaaccag 300
[0944] ttctccctga agctgagctc tgtgaccgct gcggacacgg ccgtgtatta ctgtgcgaga 360
[0945] gaggggaaga atggggcttt tgatatctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcttca 420
[0946] ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcacgaca tcagatgacc 480
[0947] cagtctccat cctccctgtc tgcatctgta ggagacagag tcaccatcac ttgccgggca 540
[0948] agtcagagca ttagcagcta tttaaattgg tatcagcaga aaccagggaa agcccctaag 600
[0949] ctcctgatct atgctgcatc cagtttgcaa agtggggtcc catcaaggtt cagtggcagt 660
[0950] ggatctggga cagatttcac tctcaccatc agcagtctgc aacctgaaga ttttgcaact 720
[0951] tactactgtc aacagagtta cagtaccccg ctcactttcg gcggagggac caaggtggag 780
[0952] atcaaacgga ctgcggccgc a 801
[0953] <210> 46
[0954] <211> 801
[0955] <212> DNA
[0956] <213> 人工序列
[0957] <220>
[0958] <223> 合成多核苷酸
[0959] <400> 46
[0960] atggcgctgc cggtgaccgc gctgctgctg ccgctggcgc tgctgctgca tgcggcgcgc 60
[0961] ccgcaggtgc agctgcagga aagcggcccg ggcctggtga aaccgagcga aaccctgagc 120
[0962] ctgacctgca ccgtgagcgg cggcagcgtg agcagcggca gctattattg gagctggatt 180
[0963] cgccagccgc cgggcaaagg cctggaatgg attggctata tttattatag cggcagcacc 240
[0964] aactataacc cgagcctgaa aagccgcgtg accattagcg tggataccag caaaaaccag 300
[0965] tttagcctga aactgagcag cgtgaccgcg gcggataccg cggtgtatta ttgcgcgcgc 360

[0966] gaaggcaaaa acggcgcgtt tgatatttgg ggccagggca ccatggtgac cgtgagcagc 420
[0967] ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagccgcca tcagatgacc 480
[0968] cagagcccga gcagcctgag cgcgagcgtg ggcgatcgcg tgaccattac ctgccgcgcg 540
[0969] agccagagca ttagcagcta tctgaactgg tatcagcaga aaccgggcaa agcgccgaaa 600
[0970] ctgctgattt atgcggcgag cagcctgcag agcggcgtgc cgagccgctt tagcggcagc 660
[0971] ggcagcggca ccgattttac cctgaccatt agcagcctgc agccggaaga ttttgcgacc 720
[0972] tattattgcc agcagagcta tagcaccccg ctgacctttg gcggcggcac caaagtggaa 780
[0973] attaaacgca ccgcggcggc g 801
[0974] <210> 47
[0975] <211> 801
[0976] <212> DNA
[0977] <213> 人工序列
[0978] <220>
[0979] <223> 合成多核苷酸
[0980] <400> 47
[0981] atggccctcc cggtaacggc tctgctgctt ccactcgcac tgctcttgca tgctgccaga 60
[0982] ccacaggtcc agctgcagga gagtgggcct ggactggtta agccgagtga gacactttcc 120
[0983] ttgacgtgca ctgtgagcgg gggaagtgtg tcctcaggta gttattactg gtcctggatt 180
[0984] cgccagccac caggaaaggg actggagtgg ataggttata tctattattc tggcagcact 240
[0985] aattacaatc cttctctcaa aagtagggtg acaatttcag tggatacttc caaaaatcag 300
[0986] tttagtctga agctcagctc tgtgacagct gctgatactg cagtttacta ctgcgccagg 360
[0987] gaggggaaga atggcgcctt cgatatttgg ggacagggca ctatggtgac tgtatcaagc 420
[0988] ggaggcggtg gcagcggcgg gggagggagt ggaggcggcg ggtctcgaca tcagatgaca 480
[0989] cagagcccat catcacttag cgccagcgtt ggcgaccggg ttacgataac atgcagggct 540
[0990] tcccaatcta tcagttctta tctgaactgg tatcagcaga aaccaggtaa ggccccccaag 600
[0991] ctgctcatct acgcagcctc atccctgcag agcggcgtcc ctagtcgatt ttccggtagt 660
[0992] gggtcaggga cagattttac cctgactatc agttcactgc agcccgagga cttcgcgaca 720
[0993] tactattgcc aacagtccta tagtacaccc ttgacatttg gcggcgggac taaagtagaa 780
[0994] attaaacgca ccgcggccgc a 801
[0995] <210> 48
[0996] <211> 288
[0997] <212> PRT
[0998] <213> 智人
[0999] <400> 48
[1000] Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
[1001] 1 5 10 15
[1002] Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
[1003] 20 25 30
[1004] Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
[1005] 35 40 45
[1006] Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
[1007] 50 55 60

[1008] Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
[1009] 65 70 75 80
[1010] Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
[1011] 85 90 95
[1012] Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
[1013] 100 105 110
[1014] Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
[1015] 115 120 125
[1016] Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
[1017] 130 135 140
[1018] Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
[1019] 145 150 155 160
[1020] Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
[1021] 165 170 175
[1022] Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
[1023] 180 185 190
[1024] Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
[1025] 195 200 205
[1026] Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
[1027] 210 215 220
[1028] Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
[1029] 225 230 235 240
[1030] Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
[1031] 245 250 255
[1032] Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
[1033] 260 265 270
[1034] Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
[1035] 275 280 285
[1036] <210> 49
[1037] <211> 239
[1038] <212> PRT
[1039] <213> 人工序列
[1040] <220>
[1041] <223> 合成多肽
[1042] <400> 49
[1043] Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
[1044] 1 5 10 15
[1045] Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
[1046] 20 25 30
[1047] Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
[1048] 35 40 45
[1049] Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

[1050] 50 55 60

[1051] Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

[1052] 65 70 75 80

[1053] Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

[1054] 85 90 95

[1055] Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

[1056] 100 105 110

[1057] Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu

[1058] 115 120 125

[1059] Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val

[1060] 130 135 140

[1061] Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro

[1062] 145 150 155 160

[1063] Arg Pro Ala Gly Gln Ala Ala Ala Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg

[1064] 165 170 175

[1065] Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg

[1066] 180 185 190

[1067] Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly

[1068] 195 200 205

[1069] Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr

[1070] 210 215 220

[1071] Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn

[1072] 225 230 235

[1073] <210> 50

[1074] <211> 45

[1075] <212> DNA

[1076] <213> 人工序列

[1077] <220>

[1078] <223> 合成多核苷酸

[1079] <400> 50

[1080] ggaggtggag gctcaggagg aggaggcagt ggaggtggtg ggtca 45

[1081] <210> 51

[1082] <211> 45

[1083] <212> DNA

[1084] <213> 人工序列

[1085] <220>

[1086] <223> 合成多核苷酸

[1087] <400> 51

[1088] ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatca 45

[1089] <210> 52

[1090] <211> 357

[1091] <212> PRT

[1092] <213> 人工序列

[1093] <220>

[1094] <223> 合成多肽

[1095] <400> 52

[1096] Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Ala Gly Gly
[1097] 1 5 10 15
[1098] Ala Gly Ala Gly Thr Gly Gly Cys Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Thr
[1099] 20 25 30
[1100] Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Ala Ala Gly Thr Gly Ala Gly
[1101] 35 40 45
[1102] Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Thr Thr
[1103] 50 55 60
[1104] Gly Cys Ala Cys Ala Gly Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly
[1105] 65 70 75 80
[1106] Cys Ala Gly Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Cys
[1107] 85 90 95
[1108] Ala Gly Cys Thr Ala Thr Thr Ala Thr Thr Gly Gly Thr Cys Cys Thr
[1109] 100 105 110
[1110] Gly Gly Ala Thr Thr Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Cys
[1111] 115 120 125
[1112] Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly
[1113] 130 135 140
[1114] Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Ala Cys Ala Thr Ala Thr
[1115] 145 150 155 160
[1116] Ala Thr Thr Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Cys
[1117] 165 170 175
[1118] Ala Ala Ala Thr Thr Ala Cys Ala Ala Thr Cys Cys Ala Thr Cys Cys
[1119] 180 185 190
[1120] Cys Thr Gly Ala Ala Gly Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Thr Ala Ala
[1121] 195 200 205
[1122] Cys Thr Ala Thr Cys Ala Gly Thr Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Cys
[1123] 210 215 220
[1124] Ala Ala Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Thr Cys Ala Gly Thr Thr Thr
[1125] 225 230 235 240
[1126] Thr Cys Ala Cys Thr Cys Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Thr
[1127] 245 250 255
[1128] Cys Thr Gly Thr Gly Ala Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala
[1129] 260 265 270
[1130] Cys Ala Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr Thr Thr Ala Thr Thr Ala Thr
[1131] 275 280 285
[1132] Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala
[1133] 290 295 300

[1134] Ala Ala Ala Ala Thr Gly Gly Gly Gly Cys Ala Thr Thr Thr Gly Ala
[1135] 305 310 315 320
[1136] Thr Ala Thr Thr Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Ala Gly Gly Gly Cys
[1137] 325 330 335
[1138] Ala Cys Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Cys Ala Gly Thr Cys Ala
[1139] 340 345 350
[1140] Gly Cys Thr Cys Thr
[1141] 355
[1142] <210> 53
[1143] <211> 327
[1144] <212> DNA
[1145] <213> 人工序列
[1146] <220>
[1147] <223> 合成多核苷酸
[1148] <400> 53
[1149] cgccatcaga tgactcagtc cccctccagt ctttctgcct cagttgggga tagagtgacc 60
[1150] atcacatgca gagcaagtca gagcatatca tcctatctga actggtacca gcagaagcca 120
[1151] gggaaagccc ccaaattgct gatttatgca gcctcaagtc tccagagtgg ggtgccaagc 180
[1152] aggttctcag gcagtggcag tgggacagat ttcacattga caatcagctc cctccaacct 240
[1153] gaagattttg ccacctacta ttgccagcaa tcctacagca cgcccctgac ttttggaggt 300
[1154] ggcacaaagg tagagatcaa gaggact 327
[1155] <210> 54
[1156] <211> 117
[1157] <212> DNA
[1158] <213> 人工序列
[1159] <220>
[1160] <223> 合成多核苷酸
[1161] <400> 54
[1162] attgaagtta tgtatcctcc tccttaccta gacaatgaga agagcaatgg aaccattatc 60
[1163] catgtgaaag ggaaacacct ttgtccaagt cccctatttc ccggaccttc taagccc 117
[1164] <210> 55
[1165] <211> 336
[1166] <212> DNA
[1167] <213> 人工序列
[1168] <220>
[1169] <223> 合成多核苷酸
[1170] <400> 55
[1171] agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
[1172] tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
[1173] cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgttcaat 180
[1174] gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc ttcagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
[1175] cggaggggca aggggcacga tggccttttc caggggctca gtacagccac caaggacacc 300

[1176] ttcgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

[1177] <210> 56

[1178] <211> 465

[1179] <212> PRT

[1180] <213> 人工序列

[1181] <220>

[1182] <223> 合成多肽

[1183] <400> 56

[1184] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

[1185] 1 5 10 15

[1186] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly

[1187] 20 25 30

[1188] Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

[1189] 35 40 45

[1190] Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser

[1191] 50 55 60

[1192] Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

[1193] 65 70 75 80

[1194] Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[1195] 85 90 95

[1196] Cys Ala Arg Glu Gly Lys Asn Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

[1197] 100 105 110

[1198] Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[1199] 115 120 125

[1200] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg His Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

[1201] 130 135 140

[1202] Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

[1203] 145 150 155 160

[1204] Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

[1205] 165 170 175

[1206] Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val

[1207] 180 185 190

[1208] Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

[1209] 195 200 205

[1210] Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

[1211] 210 215 220

[1212] Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

[1213] 225 230 235 240

[1214] Lys Arg Thr Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu

[1215] 245 250 255

[1216] Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His

[1217] 260 265 270

[1218] Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val
[1219] 275 280 285
[1220] Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
[1221] 290 295 300
[1222] Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
[1223] 305 310 315 320
[1224] His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
[1225] 325 330 335
[1226] Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
[1227] 340 345 350
[1228] Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
[1229] 355 360 365
[1230] Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
[1231] 370 375 380
[1232] Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
[1233] 385 390 395 400
[1234] Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln
[1235] 405 410 415
[1236] Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
[1237] 420 425 430
[1238] Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr
[1239] 435 440 445
[1240] Ala Thr Lys Asp Thr Phe Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
[1241] 450 455 460
[1242] Arg
[1243] 465
[1244] <210> 57
[1245] <211> 1395
[1246] <212> DNA
[1247] <213> 人工序列
[1248] <220>
[1249] <223> 合成多核苷酸
[1250] <400> 57
[1251] caggttcagc ttcaggagag tggcccaggc ctggtgaagc caagtgagac tctcagcttg 60
[1252] acttgcacag tttctggagg cagtgtctcc tcaggcagct attattggtc ctggattcgg 120
[1253] cagccccctg ggaaaggcct ggagtggatt gggtacatat attacagtgg cagcacaaat 180
[1254] tacaatccat ccctgaagtc tcgagtaact atcagtgtgg acacaagcaa gaatcagttt 240
[1255] tcactcaaac tgtcttctgt gactgctgct gacactgctg tttattattg tgccagggag 300
[1256] gggaaaaatg gggcatttga tatttggggt cagggcacaa tggtgacagt cagctctgga 360
[1257] ggtggaggct caggaggagg aggcagtgga ggtggtgggt cacgccatca gatgactcag 420
[1258] tccccctcca gtctttctgc ctcagttggg gatagagtga ccatcacatg cagagcaagt 480
[1259] cagagcatat catcctatct gaactggtac cagcagaagc cagggaaagc ccccaaattg 540

[1260] ctgatttatg cagcctcaag tctccagagt ggggtgccaa gcaggttctc aggcagtggc 600
[1261] agtgggacag atttcacatt gacaatcagc tccctccaac ctgaagattt tgccacctac 660
[1262] tattgccagc aatcctacag cacgcccctg acttttggag gtggcacaaa ggtagagatc 720
[1263] aagaggactg cggccgcaat tgaagttatg tatcctcctc cttacctaga caatgagaag 780
[1264] agcaatggaa ccattatcca tgtgaaaggg aaacaccttt gtccaagtcc cctatttccc 840
[1265] ggaccttcta agccctttg ggtgctggtg gtggttggtg gagtcctggc ttgctatagc 900
[1266] ttgctagtaa cagtggcctt tattattttc tgggtgagga gtaagaggag caggctcctg 960
[1267] cacagtgact acatgaacat gactccccgc cgccccgggc ccacccgcaa gcattaccag 1020
[1268] ccctatgccc caccacgcga cttcgcagcc tatcgctcca gagtgaagtt cagcaggagc 1080
[1269] gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga 1140
[1270] cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga 1200
[1271] aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgttcaatg aactgcagaa agataagatg 1260
[1272] gcggaggcct tcagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat 1320
[1273] ggccttttcc aggggctcag tacagccacc aaggacacct tcgacgccct tcacatgcag 1380
[1274] gccctgcccc ctcgc 1395
[1275] <210> 58
[1276] <211> 145
[1277] <212> PRT
[1278] <213> 人工序列
[1279] <220>
[1280] <223> 合成多肽
[1281] <400> 58
[1282] Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
[1283] 1 5 10 15
[1284] Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
[1285] 20 25 30
[1286] Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
[1287] 35 40 45
[1288] Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
[1289] 50 55 60
[1290] Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
[1291] 65 70 75 80
[1292] Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
[1293] 85 90 95
[1294] Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
[1295] 100 105 110
[1296] Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
[1297] 115 120 125
[1298] Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
[1299] 130 135 140
[1300] Gln
[1301] 145

[1302] <210> 59
[1303] <211> 435
[1304] <212> DNA
[1305] <213> 人工序列
[1306] <220>
[1307] <223> 合成多核苷酸
[1308] <400> 59
[1309] ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc 60
[1310] ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 120
[1311] gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 180
[1312] gctttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 240
[1313] cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 300
[1314] tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 360
[1315] gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcaccc 420
[1316] aggccagccg gccag 435
[1317] <210> 60
[1318] <211> 60
[1319] <212> DNA
[1320] <213> 人工序列
[1321] <220>
[1322] <223> 合成多核苷酸
[1323] <400> 60
[1324] atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60
[1325] <210> 61
[1326] <211> 495
[1327] <212> DNA
[1328] <213> 人工序列
[1329] <220>
[1330] <223> 合成多核苷酸
[1331] <400> 61
[1332] atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60
[1333] ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc 120
[1334] ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180
[1335] gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240
[1336] gctttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300
[1337] cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
[1338] tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 420
[1339] gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcaccc 480
[1340] aggccagccg gccag 495
[1341] <210> 62
[1342] <211> 213
[1343] <212> DNA

[1344] <213> 人工序列
[1345] <220>
[1346] <223> 合成多核苷酸
[1347] <400> 62
[1348] cccaccacga cgccagcgcc gcgaccacca accccggcgc ccacgatcgc gtcgcagccc 60
[1349] ctgtccctgc gcccagaggc gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgca cacgaggggg 120
[1350] ctggacttcg cctgtgatat ctacatctgg gcgcccctgg ccgggacttg tggggtcctt 180
[1351] ctcctgtcac tggttatcac cctttactgc aac 213
[1352] <210> 63
[1353] <211> 219
[1354] <212> DNA
[1355] <213> 人工序列
[1356] <220>
[1357] <223> 合成多核苷酸
[1358] <400> 63
[1359] cccaccacga cgccagcgcc gcgaccacca accccggcgc ccacgatcgc gtcgcagccc 60
[1360] ctgtccctgc gcccagaggc gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgca cacgaggggg 120
[1361] ctggacttcg cctgtgatat ctacatctgg gcgcccctgg ccgggacttg tggggtcctt 180
[1362] ctcctgtcac tggttatcac cctttactgc aaccacagg 219
[1363] <210> 64
[1364] <211> 717
[1365] <212> DNA
[1366] <213> 人工序列
[1367] <220>
[1368] <223> 合成多核苷酸
[1369] <400> 64
[1370] atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60
[1371] ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc 120
[1372] ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180
[1373] gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240
[1374] gctttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300
[1375] cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
[1376] tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 420
[1377] gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcaccc 480
[1378] aggccagccg gccaggcggc cgcacccacc acgacgccag cgccgcgacc accaaccccg 540
[1379] gcgcccacga tcgcgtcgca gcccctgtcc ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg 600
[1380] gggggcgcag tgcacacgag ggggctggac ttcgcctgtg atatctacat ctgggcgccc 660
[1381] ctggccggga cttgtggggt ccttctcctg tcactggtta tcacccttta ctgcaac 717
[1382] <210> 65
[1383] <211> 199
[1384] <212> PRT
[1385] <213> 智人

[1386] <400> 65

[1387] Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
[1388] 1 5 10 15
[1389] Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
[1390] 20 25 30
[1391] Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val
[1392] 35 40 45
[1393] Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp
[1394] 50 55 60
[1395] Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu
[1396] 65 70 75 80
[1397] Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
[1398] 85 90 95
[1399] Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser
[1400] 100 105 110
[1401] Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
[1402] 115 120 125
[1403] His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
[1404] 130 135 140
[1405] Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
[1406] 145 150 155 160
[1407] Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro
[1408] 165 170 175
[1409] Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
[1410] 180 185 190
[1411] Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
[1412] 195

[1413] <210> 66
[1414] <211> 15
[1415] <212> PRT
[1416] <213> 人工序列
[1417] <220>
[1418] <223> 合成多肽
[1419] <400> 66

[1420] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[1421] 1 5 10 15

[1422] <210> 67
[1423] <211> 20
[1424] <212> PRT
[1425] <213> 人工序列
[1426] <220>
[1427] <223> 合成多肽

[1428] <400> 67
[1429] Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
[1430] 1 5 10 15
[1431] Val Thr Asn Ser
[1432] 20
[1433] <210> 68
[1434] <211> 20
[1435] <212> PRT
[1436] <213> 人工序列
[1437] <220>
[1438] <223> 合成多肽
[1439] <400> 68
[1440] Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Thr Leu Thr Leu Val Leu
[1441] 1 5 10 15
[1442] Leu Val Asn Ser
[1443] 20
[1444] <210> 69
[1445] <211> 20
[1446] <212> PRT
[1447] <213> 人工序列
[1448] <220>
[1449] <223> 合成多肽
[1450] <400> 69
[1451] Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
[1452] 1 5 10 15
[1453] Asp Thr Thr Gly
[1454] 20
[1455] <210> 70
[1456] <211> 20
[1457] <212> PRT
[1458] <213> 人工序列
[1459] <220>
[1460] <223> 合成多肽
[1461] <400> 70
[1462] Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
[1463] 1 5 10 15
[1464] Gly Ser Thr Gly
[1465] 20
[1466] <210> 71
[1467] <211> 21
[1468] <212> PRT
[1469] <213> 人工序列

[1470] <220>
[1471] <223> 合成多肽
[1472] <400> 71
[1473] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[1474] 1 5 10 15
[1475] His Ala Ala Arg Pro
[1476] 20
[1477] <210> 72
[1478] <211> 18
[1479] <212> PRT
[1480] <213> 人工序列
[1481] <220>
[1482] <223> 合成多肽
[1483] <400> 72
[1484] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[1485] 1 5 10 15
[1486] His Ala
[1487] <210> 73
[1488] <211> 16
[1489] <212> PRT
[1490] <213> 人工序列
[1491] <220>
[1492] <223> 合成多肽
[1493] <400> 73
[1494] Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser
[1495] 1 5 10 15
[1496] <210> 74
[1497] <211> 30
[1498] <212> PRT
[1499] <213> 人工序列
[1500] <220>
[1501] <223> 合成多肽
[1502] <400> 74
[1503] Met Asp Ser Lys Gly Ser Ser Gln Lys Gly Ser Arg Leu Leu Leu Leu
[1504] 1 5 10 15
[1505] Leu Val Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys Gln Gly Val Val Ser
[1506] 20 25 30
[1507] <210> 75
[1508] <211> 622
[1509] <212> PRT
[1510] <213> 智人
[1511] <400> 75

[1512] Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro
[1513] 1 5 10 15
[1514] Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln
[1515] 20 25 30
[1516] Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
[1517] 35 40 45
[1518] Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg
[1519] 50 55 60
[1520] Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu
[1521] 65 70 75 80
[1522] Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
[1523] 85 90 95
[1524] Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
[1525] 100 105 110
[1526] Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro
[1527] 115 120 125
[1528] Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr His Phe Phe Ser Arg Ile
[1529] 130 135 140
[1530] Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln
[1531] 145 150 155 160
[1532] Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
[1533] 165 170 175
[1534] Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
[1535] 180 185 190
[1536] Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
[1537] 195 200 205
[1538] Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg
[1539] 210 215 220
[1540] Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp
[1541] 225 230 235 240
[1542] Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly
[1543] 245 250 255
[1544] Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg
[1545] 260 265 270
[1546] Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile
[1547] 275 280 285
[1548] Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser
[1549] 290 295 300
[1550] Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys
[1551] 305 310 315 320
[1552] Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met
[1553] 325 330 335

[1554] Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu
[1555] 340 345 350
[1556] Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val
[1557] 355 360 365
[1558] Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile
[1559] 370 375 380
[1560] Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu
[1561] 385 390 395 400
[1562] Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp
[1563] 405 410 415
[1564] Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr
[1565] 420 425 430
[1566] Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu
[1567] 435 440 445
[1568] Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp
[1569] 450 455 460
[1570] Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala
[1571] 465 470 475 480
[1572] Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile
[1573] 485 490 495
[1574] Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser
[1575] 500 505 510
[1576] Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr
[1577] 515 520 525
[1578] Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly
[1579] 530 535 540
[1580] Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg
[1581] 545 550 555 560
[1582] Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu
[1583] 565 570 575
[1584] Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser
[1585] 580 585 590
[1586] Val Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro
[1587] 595 600 605
[1588] Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala
[1589] 610 615 620
[1590] <210> 76
[1591] <211> 10
[1592] <212> PRT
[1593] <213> 人工序列
[1594] <220>
[1595] <223> 合成多肽

[1596] <400> 76
[1597] Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr
[1598] 1 5 10
[1599] <210> 77
[1600] <211> 7
[1601] <212> PRT
[1602] <213> 人工序列
[1603] <220>
[1604] <223> 合成多肽
[1605] <400> 77
[1606] Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
[1607] 1 5
[1608] <210> 78
[1609] <211> 12
[1610] <212> PRT
[1611] <213> 人工序列
[1612] <220>
[1613] <223> 合成多肽
[1614] <400> 78
[1615] Ala Arg Glu Gly Lys Asn Gly Ala Phe Asp Ile Trp
[1616] 1 5 10
[1617] <210> 79
[1618] <211> 6
[1619] <212> PRT
[1620] <213> 人工序列
[1621] <220>
[1622] <223> 合成多肽
[1623] <400> 79
[1624] Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
[1625] 1 5
[1626] <210> 80
[1627] <211> 4
[1628] <212> PRT
[1629] <213> 人工序列
[1630] <220>
[1631] <223> 合成多肽
[1632] <400> 80
[1633] Ala Ala Ser Ser
[1634] 1
[1635] <210> 81
[1636] <211> 10
[1637] <212> PRT

[1638] <213> 人工序列
[1639] <220>
[1640] <223> 合成多肽
[1641] <400> 81
[1642] Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe
[1643] 1 5 10
[1644] <210> 82
[1645] <211> 119
[1646] <212> PRT
[1647] <213> 人工序列
[1648] <220>
[1649] <223> 合成多肽
[1650] <400> 82
[1651] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
[1652] 1 5 10 15
[1653] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
[1654] 20 25 30
[1655] Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
[1656] 35 40 45
[1657] Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
[1658] 50 55 60
[1659] Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
[1660] 65 70 75 80
[1661] Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[1662] 85 90 95
[1663] Cys Ala Arg Glu Gly Lys Asn Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
[1664] 100 105 110
[1665] Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[1666] 115
[1667] <210> 83
[1668] <211> 109
[1669] <212> PRT
[1670] <213> 人工序列
[1671] <220>
[1672] <223> 合成多肽
[1673] <400> 83
[1674] Arg His Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1675] 1 5 10 15
[1676] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
[1677] 20 25 30
[1678] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[1679] 35 40 45

[1680] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1681] 50 55 60
[1682] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1683] 65 70 75 80
[1684] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
[1685] 85 90 95
[1686] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
[1687] 100 105
[1688] <210> 84
[1689] <211> 243
[1690] <212> PRT
[1691] <213> 人工序列
[1692] <220>
[1693] <223> 合成多肽
[1694] <400> 84
[1695] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
[1696] 1 5 10 15
[1697] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
[1698] 20 25 30
[1699] Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
[1700] 35 40 45
[1701] Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
[1702] 50 55 60
[1703] Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
[1704] 65 70 75 80
[1705] Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[1706] 85 90 95
[1707] Cys Ala Arg Glu Gly Lys Asn Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
[1708] 100 105 110
[1709] Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[1710] 115 120 125
[1711] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg His Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
[1712] 130 135 140
[1713] Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
[1714] 145 150 155 160
[1715] Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
[1716] 165 170 175
[1717] Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
[1718] 180 185 190
[1719] Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[1720] 195 200 205
[1721] Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

[1722] 210 215 220
[1723] Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
[1724] 225 230 235 240
[1725] Lys Arg Thr
[1726] <210> 85
[1727] <211> 729
[1728] <212> DNA
[1729] <213> 人工序列
[1730] <220>
[1731] <223> 合成多核苷酸
[1732] <400> 85
[1733] caggttcagc ttcaggagag tggcccaggc ctggtgaagc caagtgagac tctcagcttg 60
[1734] acttgcacag tttctggagg cagtgtctcc tcaggcagct attattggtc ctggattcgg 120
[1735] cagccccctg ggaaaggcct ggagtggatt gggtacatat attacagtgg cagcacaaat 180
[1736] tacaatccat ccctgaagtc tcgagtaact atcagtgtgg acacaagcaa gaatcagttt 240
[1737] tcactcaaac tgtcttctgt gactgctgct gacactgctg tttattattg tgccagggag 300
[1738] gggaaaaatg gggcatttga tatttggggt cagggcacaa tggtgacagt cagctctgga 360
[1739] ggtggaggct caggaggagg aggcagtgga ggtggtgggt cacgccatca gatgactcag 420
[1740] tccccctcca gtctttctgc ctcagttggg gatagagtga ccatcacatg cagagcaagt 480
[1741] cagagcatat catcctatct gaactggtac cagcagaagc cagggaaagc ccccaaattg 540
[1742] ctgatttatg cagcctcaag tctccagagt ggggtgccaa gcaggttctc aggcagtggc 600
[1743] agtgggacag atttcacatt gacaatcagc tccctccaac ctgaagattt tgccacctac 660
[1744] tattgccagc aatcctacag cacgcccctg acttttggag gtggcacaaa ggtagagatc 720
[1745] aagaggact 729
[1746] <210> 86
[1747] <211> 235
[1748] <212> PRT
[1749] <213> 智人
[1750] <400> 86
[1751] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[1752] 1 5 10 15
[1753] His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr
[1754] 20 25 30
[1755] Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser
[1756] 35 40 45
[1757] Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala
[1758] 50 55 60
[1759] Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala
[1760] 65 70 75 80
[1761] Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp
[1762] 85 90 95
[1763] Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr

[1764] 100 105 110
[1765] Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe
[1766] 115 120 125
[1767] Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
[1768] 130 135 140
[1769] Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
[1770] 145 150 155 160
[1771] Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
[1772] 165 170 175
[1773] Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
[1774] 180 185 190
[1775] Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His
[1776] 195 200 205
[1777] Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser
[1778] 210 215 220
[1779] Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
[1780] 225 230 235
[1781] <210> 87
[1782] <211> 247
[1783] <212> PRT
[1784] <213> 小家鼠
[1785] <400> 87
[1786] Met Ala Ser Pro Leu Thr Arg Phe Leu Ser Leu Asn Leu Leu Leu Met
[1787] 1 5 10 15
[1788] Gly Glu Ser Ile Ile Leu Gly Ser Gly Glu Ala Lys Pro Gln Ala Pro
[1789] 20 25 30
[1790] Glu Leu Arg Ile Phe Pro Lys Lys Met Asp Ala Glu Leu Gly Gln Lys
[1791] 35 40 45
[1792] Val Asp Leu Val Cys Glu Val Leu Gly Ser Val Ser Gln Gly Cys Ser
[1793] 50 55 60
[1794] Trp Leu Phe Gln Asn Ser Ser Ser Lys Leu Pro Gln Pro Thr Phe Val
[1795] 65 70 75 80
[1796] Val Tyr Met Ala Ser Ser His Asn Lys Ile Thr Trp Asp Glu Lys Leu
[1797] 85 90 95
[1798] Asn Ser Ser Lys Leu Phe Ser Ala Val Arg Asp Thr Asn Asn Lys Tyr
[1799] 100 105 110
[1800] Val Leu Thr Leu Asn Lys Phe Ser Lys Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe
[1801] 115 120 125
[1802] Cys Ser Val Ile Ser Asn Ser Val Met Tyr Phe Ser Ser Val Val Pro
[1803] 130 135 140
[1804] Val Leu Gln Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr
[1805] 145 150 155 160

[1806] Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu
[1807] 165 170 175
[1808] Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala
[1809] 180 185 190
[1810] Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Pro
[1811] 195 200 205
[1812] Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys
[1813] 210 215 220
[1814] Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro
[1815] 225 230 235 240
[1816] Arg Pro Ser Glu Lys Ile Val
[1817] 245
[1818] <210> 88
[1819] <211> 69
[1820] <212> PRT
[1821] <213> 人工序列
[1822] <220>
[1823] <223> 合成多肽
[1824] <400> 88
[1825] Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro Val His Pro
[1826] 1 5 10 15
[1827] Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg Pro Arg Gly
[1828] 20 25 30
[1829] Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
[1830] 35 40 45
[1831] Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu Ile Ile
[1832] 50 55 60
[1833] Thr Leu Ile Cys Tyr
[1834] 65
[1835] <210> 89
[1836] <211> 207
[1837] <212> DNA
[1838] <213> 人工序列
[1839] <220>
[1840] <223> 合成多核苷酸
[1841] <400> 89
[1842] tctactacta ccaagccagt gctgcgaact ccctcacctg tgcaccctac cgggacatct 60
[1843] cagccccaga gaccagaaga ttgtcggccc cgtggctcag tgaaggggac cggattggac 120
[1844] ttcgcctgtg atatttacat ctgggcaccc ttggccggaa tctgcgtggc ccttctgctg 180
[1845] tccttgatca tcactctcat ctgctac 207
[1846] <210> 90
[1847] <211> 220

[1848] <212> PRT
[1849] <213> 智人
[1850] <400> 90
[1851] Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
[1852] 1 5 10 15
[1853] Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
[1854] 20 25 30
[1855] Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
[1856] 35 40 45
[1857] Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
[1858] 50 55 60
[1859] Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
[1860] 65 70 75 80
[1861] Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
[1862] 85 90 95
[1863] Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
[1864] 100 105 110
[1865] Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
[1866] 115 120 125
[1867] Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
[1868] 130 135 140
[1869] Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
[1870] 145 150 155 160
[1871] Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
[1872] 165 170 175
[1873] Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
[1874] 180 185 190
[1875] Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
[1876] 195 200 205
[1877] Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
[1878] 210 215 220
[1879] <210> 91
[1880] <211> 81
[1881] <212> DNA
[1882] <213> 人工序列
[1883] <220>
[1884] <223> 合成多核苷酸
[1885] <400> 91
[1886] ttttgggtgc tggtggtggt tggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60
[1887] gcctttatta ttttctgggt g 81
[1888] <210> 92
[1889] <211> 27

[1890] <212> PRT
[1891] <213> 人工序列
[1892] <220>
[1893] <223> 合成多肽
[1894] <400> 92
[1895] Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
[1896] 1 5 10 15
[1897] Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
[1898] 20 25
[1899] <210> 93
[1900] <211> 81
[1901] <212> DNA
[1902] <213> 人工序列
[1903] <220>
[1904] <223> 合成多核苷酸
[1905] <400> 93
[1906] ttttgggtgc tggtggtggt tggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60
[1907] gcctttatta ttttctgggt g 81
[1908] <210> 94
[1909] <211> 164
[1910] <212> PRT
[1911] <213> 智人
[1912] <400> 94
[1913] Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
[1914] 1 5 10 15
[1915] Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
[1916] 20 25 30
[1917] Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
[1918] 35 40 45
[1919] Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
[1920] 50 55 60
[1921] Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
[1922] 65 70 75 80
[1923] Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
[1924] 85 90 95
[1925] Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
[1926] 100 105 110
[1927] Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
[1928] 115 120 125
[1929] Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
[1930] 130 135 140
[1931] Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala

[1932] 145 150 155 160
[1933] Leu Pro Pro Arg
[1934] <210> 95
[1935] <211> 112
[1936] <212> PRT
[1937] <213> 人工序列
[1938] <220>
[1939] <223> 合成多肽
[1940] <400> 95
[1941] Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
[1942] 1 5 10 15
[1943] Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
[1944] 20 25 30
[1945] Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
[1946] 35 40 45
[1947] Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
[1948] 50 55 60
[1949] Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
[1950] 65 70 75 80
[1951] Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
[1952] 85 90 95
[1953] Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[1954] 100 105 110
[1955] <210> 96
[1956] <211> 336
[1957] <212> DNA
[1958] <213> 人工序列
[1959] <220>
[1960] <223> 合成多核苷酸
[1961] <400> 96
[1962] agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
[1963] tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
[1964] cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
[1965] gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
[1966] cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
[1967] tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336
[1968] <210> 97
[1969] <211> 218
[1970] <212> PRT
[1971] <213> 小家鼠
[1972] <400> 97
[1973] Met Thr Leu Arg Leu Leu Phe Leu Ala Leu Asn Phe Phe Ser Val Gln

[1974] 1 5 10 15
[1975] Val Thr Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Leu Leu Val Val
[1976] 20 25 30
[1977] Asp Ser Asn Glu Val Ser Leu Ser Cys Arg Tyr Ser Tyr Asn Leu Leu
[1978] 35 40 45
[1979] Ala Lys Glu Phe Arg Ala Ser Leu Tyr Lys Gly Val Asn Ser Asp Val
[1980] 50 55 60
[1981] Glu Val Cys Val Gly Asn Gly Asn Phe Thr Tyr Gln Pro Gln Phe Arg
[1982] 65 70 75 80
[1983] Ser Asn Ala Glu Phe Asn Cys Asp Gly Asp Phe Asp Asn Glu Thr Val
[1984] 85 90 95
[1985] Thr Phe Arg Leu Trp Asn Leu His Val Asn His Thr Asp Ile Tyr Phe
[1986] 100 105 110
[1987] Cys Lys Ile Glu Phe Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Arg
[1988] 115 120 125
[1989] Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Ile Lys Glu Lys His Leu Cys His Thr
[1990] 130 135 140
[1991] Gln Ser Ser Pro Lys Leu Phe Trp Ala Leu Val Val Val Ala Gly Val
[1992] 145 150 155 160
[1993] Leu Phe Cys Tyr Gly Leu Leu Val Thr Val Ala Leu Cys Val Ile Trp
[1994] 165 170 175
[1995] Thr Asn Ser Arg Arg Asn Arg Leu Leu Gln Ser Asp Tyr Met Asn Met
[1996] 180 185 190
[1997] Thr Pro Arg Arg Pro Gly Leu Thr Arg Lys Pro Tyr Gln Pro Tyr Ala
[1998] 195 200 205
[1999] Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Pro
[2000] 210 215
[2001] <210> 98
[2002] <211> 123
[2003] <212> DNA
[2004] <213> 人工序列
[2005] <220>
[2006] <223> 合成多核苷酸
[2007] <400> 98
[2008] aatagtagaa ggaacagact ccttcaaagt gactacatga acatgactcc ccggaggcct 60
[2009] gggctcactc gaaagcctta ccagccctac gcccctgcca gagactttgc agcgtaccgc 120
[2010] ccc 123
[2011] <210> 99
[2012] <211> 41
[2013] <212> PRT
[2014] <213> 人工序列
[2015] <220>

[2016] <223> 合成多肽
[2017] <400> 99
[2018] Asn Ser Arg Arg Asn Arg Leu Leu Gln Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
[2019] 1 5 10 15
[2020] Pro Arg Arg Pro Gly Leu Thr Arg Lys Pro Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
[2021] 20 25 30
[2022] Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Pro
[2023] 35 40
[2024] <210> 100
[2025] <211> 123
[2026] <212> DNA
[2027] <213> 人工序列
[2028] <220>
[2029] <223> 合成多核苷酸
[2030] <400> 100
[2031] aatagtagaa ggaacagact ccttcaaagt gactacatga acatgactcc ccggaggcct 60
[2032] gggctcactc gaaagcctta ccagccctac gcccctgcca gagactttgc agcgtaccgc 120
[2033] ccc 123
[2034] <210> 101
[2035] <211> 41
[2036] <212> PRT
[2037] <213> 人工序列
[2038] <220>
[2039] <223> 合成多肽
[2040] <400> 101
[2041] Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
[2042] 1 5 10 15
[2043] Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
[2044] 20 25 30
[2045] Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
[2046] 35 40
[2047] <210> 102
[2048] <211> 123
[2049] <212> DNA
[2050] <213> 人工序列
[2051] <220>
[2052] <223> 合成多核苷酸
[2053] <400> 102
[2054] aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60
[2055] gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120
[2056] tcc 123
[2057] <210> 103

[2058] <211> 255
[2059] <212> PRT
[2060] <213> 智人
[2061] <400> 103
[2062] Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
[2063] 1 5 10 15
[2064] Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
[2065] 20 25 30
[2066] Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
[2067] 35 40 45
[2068] Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
[2069] 50 55 60
[2070] Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
[2071] 65 70 75 80
[2072] Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
[2073] 85 90 95
[2074] Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
[2075] 100 105 110
[2076] Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
[2077] 115 120 125
[2078] Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
[2079] 130 135 140
[2080] Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
[2081] 145 150 155 160
[2082] Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
[2083] 165 170 175
[2084] Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
[2085] 180 185 190
[2086] Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
[2087] 195 200 205
[2088] Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
[2089] 210 215 220
[2090] Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
[2091] 225 230 235 240
[2092] Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
[2093] 245 250 255
[2094] <210> 104
[2095] <211> 42
[2096] <212> PRT
[2097] <213> 人工序列
[2098] <220>
[2099] <223> 合成多肽

[2100] <400> 104
[2101] Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
[2102] 1 5 10 15
[2103] Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
[2104] 20 25 30
[2105] Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
[2106] 35 40
[2107] <210> 105
[2108] <211> 126
[2109] <212> DNA
[2110] <213> 人工序列
[2111] <220>
[2112] <223> 合成多核苷酸
[2113] <400> 105
[2114] aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
[2115] actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
[2116] gaactg 126
[2117] <210> 106
[2118] <211> 277
[2119] <212> PRT
[2120] <213> 智人
[2121] <400> 106
[2122] Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
[2123] 1 5 10 15
[2124] Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
[2125] 20 25 30
[2126] Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
[2127] 35 40 45
[2128] Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
[2129] 50 55 60
[2130] Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
[2131] 65 70 75 80
[2132] Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
[2133] 85 90 95
[2134] Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
[2135] 100 105 110
[2136] Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
[2137] 115 120 125
[2138] Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
[2139] 130 135 140
[2140] Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
[2141] 145 150 155 160

[2142] Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
[2143] 165 170 175
[2144] Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
[2145] 180 185 190
[2146] Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
[2147] 195 200 205
[2148] Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
[2149] 210 215 220
[2150] Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
[2151] 225 230 235 240
[2152] Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
[2153] 245 250 255
[2154] Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
[2155] 260 265 270
[2156] Thr Leu Ala Lys Ile
[2157] 275
[2158] <210> 107
[2159] <211> 23
[2160] <212> PRT
[2161] <213> 人工序列
[2162] <220>
[2163] <223> 合成多肽
[2164] <400> 107
[2165] Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
[2166] 1 5 10 15
[2167] Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met
[2168] 20
[2169] <210> 108
[2170] <211> 41
[2171] <212> PRT
[2172] <213> 人工序列
[2173] <220>
[2174] <223> 合成多肽
[2175] <400> 108
[2176] Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
[2177] 1 5 10 15
[2178] Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
[2179] 20 25 30
[2180] Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Lys
[2181] 35 40
[2182] <210> 109
[2183] <211> 39

[2184] <212> PRT
[2185] <213> 人工序列
[2186] <220>
[2187] <223> 合成多肽
[2188] <400> 109
[2189] Asn Gln Leu Glu Arg Thr Val Asn Ser Leu Asn Val Pro Ala Ile Ser
[2190] 1 5 10 15
[2191] Ile Pro Glu His Asp Glu Ala Asp Glu Ile Ser Asp Glu Asn Arg Glu
[2192] 20 25 30
[2193] Lys Val Asn Asp Gln Ala Lys
[2194] 35
[2195] <210> 110
[2196] <211> 42
[2197] <212> PRT
[2198] <213> 人工序列
[2199] <220>
[2200] <223> 合成多肽
[2201] <400> 110
[2202] Ala Ala Ala Asn Gln Leu Glu Arg Thr Val Asn Ser Leu Asn Val Ser
[2203] 1 5 10 15
[2204] Ala Ile Ser Ile Pro Glu His Asp Glu Ala Asp Glu Ile Ser Asp Glu
[2205] 20 25 30
[2206] Asn Arg Glu Lys Val Asn Asp Gln Ala Lys
[2207] 35 40
[2208] <210> 111
[2209] <211> 48
[2210] <212> PRT
[2211] <213> 人工序列
[2212] <220>
[2213] <223> 合成多肽
[2214] <400> 111
[2215] Pro Glu His Asp Glu Ala Asp Glu Ile Ser Asp Glu Asn Arg Glu Lys
[2216] 1 5 10 15
[2217] Val Asn Asp Gln Ala Lys Leu Ile Val Gly Ile Val Val Gly Leu Leu
[2218] 20 25 30
[2219] Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Val Val Tyr Trp Leu Tyr Met Lys Lys
[2220] 35 40 45
[2221] <210> 112
[2222] <211> 37
[2223] <212> PRT
[2224] <213> 人工序列
[2225] <220>

[2226] <223> 合成多肽
[2227] <400> 112
[2228] Glu Asn Arg Glu Lys Val Asn Asp Gln Ala Lys Leu Ile Val Gly Ile
[2229] 1 5 10 15
[2230] Val Val Gly Leu Leu Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Val Val Tyr Trp
[2231] 20 25 30
[2232] Leu Tyr Met Lys Lys
[2233] 35
[2234] <210> 113
[2235] <211> 65
[2236] <212> PRT
[2237] <213> 人工序列
[2238] <220>
[2239] <223> 合成多肽
[2240] <400> 113
[2241] Asn Gln Leu Glu Arg Thr Val Asn Ser Leu Asn Val Pro Ala Ile Ser
[2242] 1 5 10 15
[2243] Ile Pro Glu His Asp Glu Ala Asp Glu Ile Ser Asp Glu Asn Arg Glu
[2244] 20 25 30
[2245] Lys Val Asn Asp Gln Ala Lys Leu Ile Val Gly Ile Val Val Gly Leu
[2246] 35 40 45
[2247] Leu Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Val Val Tyr Trp Leu Tyr Met Lys
[2248] 50 55 60
[2249] Lys
[2250] 65
[2251] <210> 114
[2252] <211> 66
[2253] <212> PRT
[2254] <213> 人工序列
[2255] <220>
[2256] <223> 合成多肽
[2257] <400> 114
[2258] Thr Cys Thr Ala Glu Asn Gln Leu Glu Arg Thr Val Asn Ser Leu Asn
[2259] 1 5 10 15
[2260] Val Ser Ala Ile Ser Ile Pro Glu His Asp Glu Ala Asp Glu Ile Ser
[2261] 20 25 30
[2262] Asp Glu Asn Arg Glu Lys Val Asn Asp Gln Ala Lys Leu Ile Val Gly
[2263] 35 40 45
[2264] Ile Val Val Gly Leu Leu Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Val Val Tyr
[2265] 50 55 60
[2266] Trp Leu
[2267] 65

[2268] <210> 115
[2269] <211> 44
[2270] <212> PRT
[2271] <213> 人工序列
[2272] <220>
[2273] <223> 合成多肽
[2274] <400> 115
[2275] Pro Glu His Asp Glu Ala Asp Glu Ile Ser Asp Glu Asn Arg Glu Lys
[2276] 1 5 10 15
[2277] Val Asn Asp Gln Ala Lys Leu Ile Val Gly Ile Val Val Gly Leu Leu
[2278] 20 25 30
[2279] Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Val Val Tyr Trp Leu
[2280] 35 40
[2281] <210> 116
[2282] <211> 61
[2283] <212> PRT
[2284] <213> 人工序列
[2285] <220>
[2286] <223> 合成多肽
[2287] <400> 116
[2288] Asn Gln Leu Glu Arg Thr Val Asn Ser Leu Asn Val Ser Ala Ile Ser
[2289] 1 5 10 15
[2290] Ile Pro Glu His Asp Glu Ala Asp Glu Ile Ser Asp Glu Asn Arg Glu
[2291] 20 25 30
[2292] Lys Val Asn Asp Gln Ala Lys Leu Ile Val Gly Ile Val Val Gly Leu
[2293] 35 40 45
[2294] Leu Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Val Val Tyr Trp Leu
[2295] 50 55 60
[2296] <210> 117
[2297] <211> 68
[2298] <212> PRT
[2299] <213> 人工序列
[2300] <220>
[2301] <223> 合成多肽
[2302] <400> 117
[2303] Ala Ala Ala Asn Gln Leu Glu Arg Thr Val Asn Ser Leu Asn Val Ser
[2304] 1 5 10 15
[2305] Ala Ile Ser Ile Pro Glu His Asp Glu Ala Asp Glu Ile Ser Asp Glu
[2306] 20 25 30
[2307] Asn Arg Glu Lys Val Asn Asp Gln Ala Lys Leu Ile Val Gly Ile Val
[2308] 35 40 45
[2309] Val Gly Leu Leu Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Val Val Tyr Trp Leu

[2310] 50 55 60
[2311] Tyr Met Lys Lys
[2312] 65
[2313] <210> 118
[2314] <211> 241
[2315] <212> PRT
[2316] <213> 人工序列
[2317] <220>
[2318] <223> 合成多肽
[2319] <400> 118
[2320] Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
[2321] 1 5 10 15
[2322] Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
[2323] 20 25 30
[2324] Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
[2325] 35 40 45
[2326] Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
[2327] 50 55 60
[2328] Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
[2329] 65 70 75 80
[2330] Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
[2331] 85 90 95
[2332] Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
[2333] 100 105 110
[2334] Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
[2335] 115 120 125
[2336] Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
[2337] 130 135 140
[2338] Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
[2339] 145 150 155 160
[2340] Arg Pro Ala Gly Gln Ala Ala Ala Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
[2341] 165 170 175
[2342] Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
[2343] 180 185 190
[2344] Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
[2345] 195 200 205
[2346] Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
[2347] 210 215 220
[2348] Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His
[2349] 225 230 235 240
[2350] Arg
[2351] <210> 119

[2352] <211> 723
[2353] <212> DNA
[2354] <213> 人工序列
[2355] <220>
[2356] <223> 合成多核苷酸
[2357] <400> 119
[2358] atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60
[2359] ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc 120
[2360] ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180
[2361] gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240
[2362] gctttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300
[2363] cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
[2364] tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 420
[2365] gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcaccc 480
[2366] aggccagccg gccaggcggc cgcacccacc acgacgccag cgccgcgacc accaaccccg 540
[2367] gcgcccacga tcgcgtcgca gcccctgtcc ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg 600
[2368] gggggcgcag tgcacacgag ggggctggac ttcgcctgtg atatctacat ctgggcgccc 660
[2369] ctggccggga cttgtggggt ccttctcctg tcactggtta tcacccttta ctgcaaccac 720
[2370] agg 723
[2371] <210> 120
[2372] <211> 63
[2373] <212> DNA
[2374] <213> 人工序列
[2375] <220>
[2376] <223> 合成多核苷酸
[2377] <400> 120
[2378] atggccctgc cagtaacggc tctgctgctg ccacttgctc tgctcctcca tgcagccagg 60
[2379] cct 63
[2380] <210> 121
[2381] <211> 19
[2382] <212> PRT
[2383] <213> 人工序列
[2384] <220>
[2385] <223> 合成多核苷酸
[2386] <400> 121
[2387] Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
[2388] 1 5 10 15
[2389] Pro Gly Pro
[2390] <210> 122
[2391] <211> 57
[2392] <212> DNA
[2393] <213> 人工序列

[2394] <220>

[2395] <223> 合成多核苷酸

[2396] <400> 122

[2397] gcaacaaact tctcactact caaacaagca ggtgacgtgg aggagaatcc cggccca 57

[2398] <210> 123

[2399] <211> 8613

[2400] <212> DNA

[2401] <213> 人工序列

[2402] <220>

[2403] <223> 合成多核苷酸

[2404] <400> 123

[2405] atggccctgc cagtaacggc tctgctgctg ccacttgctc tgctcctcca tgcagccagg 60

[2406] cctcaggttc agcttcagga gagtggccca ggcctggtga agccaagtga gactctcagc 120

[2407] ttgacttgca cagtttctgg aggcagtgtc tcctcaggca gctattattg gtcctggatt 180

[2408] cggcagcccc ctgggaaagg cctggagtgg attgggtaca tatattacag tggcagcaca 240

[2409] aattacaatc catccctgaa gtctcgagta actatcagtg tggacacaag caagaatcag 300

[2410] ttttcactca aactgtcttc tgtgactgct gctgacactg ctgtttatta ttgtgccagg 360

[2411] gaggggaaaa atggggcatt tgatatttgg ggtcagggca caatggtgac agtcagctct 420

[2412] ggaggtggag gctcaggagg aggaggcagt ggaggtggtg ggtcacgcca tcagatgact 480

[2413] cagtcccccc ccagtctttc tgcctcagtt ggggatagag tgaccatcac atgcagagca 540

[2414] agtcagagca tatcatccta tctgaactgg taccagcaga agccagggaa agcccccaaa 600

[2415] ttgctgattt atgcagcctc aagtctccag agtggggtgc caagcaggtt ctcaggcagt 660

[2416] ggcagtggga cagatttcac attgacaatc agctccctcc aacctgaaga ttttgccacc 720

[2417] tactattgcc agcaatccta cagcacgccc ctgacttttg gaggtggcac aaaggtagag 780

[2418] atcaagagga ctgcggccgc aattgaagtt atgtatcctc ctccttacct agacaatgag 840

[2419] aagagcaatg gaaccattat ccatgtgaaa gggaaacacc tttgtccaag tcccctattt 900

[2420] cccggacctt ctaagccctt ttgggtgctg gtggtggttg gtggagtcct ggcttgctat 960

[2421] agcttgctag taacagtggc ctttattatt ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc 1020

[2422] ctgcacagtg actacatgaa catgactccc cgccgccccg ggcccacccg caagcattac 1080

[2423] cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca gcctatcgct ccagagtgaa gttcagcagg 1140

[2424] agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 1200

[2425] ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg 1260

[2426] ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgttca atgaactgca gaaagataag 1320

[2427] atggcggagg ccttcagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 1380

[2428] gatggccttt tccaggggct cagtacagcc accaaggaca ccttcgacgc ccttcacatg 1440

[2429] caggccctgc cccctcgcgg atctggagca acaaacttct cactactcaa acaagcaggt 1500

[2430] gacgtggagg agaatcccgg cccaatgcag atcccacagg cgccctggcc agtcgtctgg 1560

[2431] gcggtgctac aactgggctg gcggccagga tggttcttag actccccaga caggccctgg 1620

[2432] aaccccccca ccttctcccc agccctgctc gtggtgaccg aaggggacaa cgccaccttc 1680

[2433] acctgcagct tctccaacac atcggagagc ttcgtgctaa actggtaccg catgagcccc 1740

[2434] agcaaccaga cggacaagct ggccgctttc cccgaggacc gcagccagcc cggccaggac 1800

[2435] tgccgcttcc gtgtcacaca actgcccaac gggcgtgact tccacatgag cgtggtcagg 1860

[2436] gcccggcgca atgacagcgg cacctacctc tgtggggcca tctccctggc ccccaaggcg 1920
[2437] cagatcaaag agagcctgcg ggcagagctc agggtgacag agagaagggc agaagtgccc 1980
[2438] acagcccacc ccagcccctc acccaggcca gccggccagg cggccgcacc caccacgacg 2040
[2439] ccagcgccgc gaccaccaac cccggcgccc acgatcgcgt cgcagcccct gtccctgcgc 2100
[2440] ccagaggcgt gccggccagc ggcgggggggc gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgcc 2160
[2441] tgtgatatct acatctgggc gcccctggcc gggacttgtg gggtccttct cctgtcactg 2220
[2442] gttatcaccc tttactgcaa ccacaggcgg atccaataac agccactcga ggatccggat 2280
[2443] tagtccaatt tgttaaagac aggatatcag tggtccaggc tctagttttg actcaacaat 2340
[2444] atcaccagct gaagcctata gagtacgagc catagataaa ataaaagatt ttatttagtc 2400
[2445] tccagaaaaa ggggggaatg aaagacccca cctgtaggtt tggcaagcta gcttaagtaa 2460
[2446] cgccattttg caaggcatgg aaaaatacat aactgagaat agagaagttc agatcaaggt 2520
[2447] caggaacaga tggaacagct gaatatgggc caaacaggat atctgtggta agcagttcct 2580
[2448] gccccggctc agggccaaga acagatggaa cagctgaata tgggccaaac aggatatctg 2640
[2449] tggtaagcag ttcctgcccc ggctcagggc caagaacaga tggtccccag atgcggtcca 2700
[2450] gccctcagca gtttctagag aaccatcaga tgtttccagg gtgccccaag gacctgaaat 2760
[2451] gaccctgtgc cttatttgaa ctaaccaatc agttcgcttc tcgcttctgt tcgcgcgctt 2820
[2452] ctgctccccg agctcaataa aagagcccac aacccctcac tcggggcgcc agtcctccga 2880
[2453] ttgactgagt cgcccgggta cccgtgtatc caataaaccc tcttgcagtt gcatccgact 2940
[2454] tgtggtctcg ctgttccttg ggagggtctc ctctgagtga ttgactaccc gtcagcgggg 3000
[2455] gtctttcaca catgcagcat gtatcaaaat taatttggtt ttttttctta agtatttaca 3060
[2456] ttaaatggcc atagtactta aagttacatt ggcttccttg aaataaacat ggagtattca 3120
[2457] gaatgtgtca taaatatttc taattttaag atagtatctc cattggcttt ctacttttc 3180
[2458] ttttattttt ttttgtcctc tgtcttccat ttgttgttgt tgttgtttgt ttgtttgttt 3240
[2459] gttggttggt tggttaattt ttttttaaag atcctacact atagttcaag ctagactatt 3300
[2460] agctactctg taacccaggg tgaccttgaa gtcatgggta gcctgctgtt ttagccttcc 3360
[2461] cacatctaag attacaggta tgagctatca tttttggtat attgattgat tgattgattg 3420
[2462] atgtgtgtgt gtgtgattgt gtttgtgtgt gtgactgtga aaatgtgtgt atgggtgtgt 3480
[2463] gtgaatgtgt gtatgtatgt gtgtgtgtga gtgtgtgtgt gtgtgtgtgc atgtgtgtgt 3540
[2464] gtgtgactgt gtctatgtgt atgactgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 3600
[2465] gtgtgtgtgt gttgtgaaaa aatattctat ggtagtgaga gccaacgctc cggctcaggt 3660
[2466] gtcaggttgg tttttgagac agagtctttc acttagcttg gaattcactg gccgtcgttt 3720
[2467] tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg ttacccaact taatcgcctt gcagcacatc 3780
[2468] ccccttttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct tcccaacagt 3840
[2469] tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgcctga tgcggtattt tctccttacg catctgtgcg 3900
[2470] gtatttcaca ccgcatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa 3960
[2471] gccagccccg acacccgcca acacccgctg acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccgg 4020
[2472] catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac 4080
[2473] cgtcatcacc gaaacgcgcg atgacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt 4140
[2474] aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc 4200
[2475] ggaacccCta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa 4260
[2476] taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc 4320
[2477] cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcacccagaa 4380

[2478] acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa 4440
[2479] ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg 4500
[2480] atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa 4560
[2481] gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc 4620
[2482] acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc 4680
[2483] atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta 4740
[2484] accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag 4800
[2485] ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca 4860
[2486] acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata 4920
[2487] gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc 4980
[2488] tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca 5040
[2489] ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca 5100
[2490] actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg 5160
[2491] taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa 5220
[2492] tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt 5280
[2493] gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat 5340
[2494] cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg 5400
[2495] gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga 5460
[2496] gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac 5520
[2497] tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt 5580
[2498] ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag 5640
[2499] cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc 5700
[2500] gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag 5760
[2501] gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca 5820
[2502] gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt 5880
[2503] cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc 5940
[2504] tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc 6000
[2505] cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc 6060
[2506] cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa 6120
[2507] ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac 6180
[2508] tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc 6240
[2509] caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag cggataacaa 6300
[2510] tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc tttgctctta ggagtttcct 6360
[2511] aatacatccc aaactcaaat atataaagca tttgacttgt tctatgccct agggggcggg 6420
[2512] gggaagctaa gccagctttt tttaacattt aaaatgttaa ttccatttta aatgcacaga 6480
[2513] tgtttttatt tcataagggt ttcaatgtgc atgaatgctg caatattcct gttaccaaag 6540
[2514] ctagtataaa taaaaataga taaacgtgga aattacttag agtttctgtc attaacgttt 6600
[2515] ccttcctcag ttgacaacat aaatgcgctg ctgagcaagc cagtttgcat ctgtcaggat 6660
[2516] caatttccca ttatgccagt catattaatt actagtcaat tagttgattt ttatttttga 6720
[2517] catatacatg tgaatgaaag accccacctg taggtttggc aagctagctt aagtaacgcc 6780
[2518] attttgcaag gcatggaaaa atacataact gagaatagaa aagttcagat caaggtcagg 6840
[2519] aacagatgga acagctgaat atgggccaaa caggatatct gtggtaagca gttcctgccc 6900

[2520] cggctcaggg ccaagaacag atggaacagc tgaatatggg ccaaacagga tatctgtggt 6960
[2521] aagcagttcc tgccccggct cagggccaag aacagatggt ccccagatgc ggtccagccc 7020
[2522] tcagcagttt ctagagaacc atcagatgtt tccagggtgc cccaaggacc tgaaatgacc 7080
[2523] ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttatgc 7140
[2524] tccccgagct caataaaaga gcccacaacc cctcactcgg ggcgccagtc ctccgattga 7200
[2525] ctgagtcgcc cgggtacccg tgtatccaat aaaccctctt gcagttgcat ccgacttgtg 7260
[2526] gtctcgctgt tccttgggag ggtctcctct gagtgattga ctacccgtca gcgggggtct 7320
[2527] ttcatttggg ggctcgtccg ggatcgggag acccctgccc agggaccacc gacccaccac 7380
[2528] cgggaggtaa gctggccagc aacttatctg tgtctgtccg attgtctagt gtctatgact 7440
[2529] gattttatgc gcctgcgtcg gtactagtta gctaactagc tctgtatctg gcggacccgt 7500
[2530] ggtggaactg acgagttcgg aacacccggc cgcaaccctg ggagacgtcc cagggacttc 7560
[2531] gggggccgtt tttgtggccc gacctgagtc ctaaaatccc gatcgtttag gactctttgg 7620
[2532] tgcacccccc ttagaggagg gatatgtggt tctggtagga gacgagaacc taaaacagtt 7680
[2533] cccgcctccg tctgaatttt tgctttcggt ttgggaccga agccgcgccg cgcgtcttgt 7740
[2534] ctgctgcagc atcgttctgt gttgtctctg tctgactgtg tttctgtatt tgtctgaaaa 7800
[2535] tatgggcccg ggctagcctg ttaccactcc cttaagtttg accttaggtc actggaaaga 7860
[2536] tgtcgagcgg atcgctcaca accagtcggt agatgtcaag aagagacgtt gggttacctt 7920
[2537] ctgctctgca gaatggccaa cctttaacgt cggatggccg cgagacggca cctttaaccg 7980
[2538] agacctcatc acccaggtta agatcaaggt cttttcacct ggcccgcatg gacacccaga 8040
[2539] ccaggtcccc tacatcgtga cctgggaagc cttggctttt gacccccctc cctgggtcaa 8100
[2540] gcccttttgta caccctaagc ctccgcctcc tcttcctcca tccgccccgt ctctcccccct 8160
[2541] tgaacctcct cgttcgaccc cgcctcgatc ctccctttat ccagccctca ctccttctct 8220
[2542] aggcgccccc atatggccat atgagatctt atatggggca cccccgcccc ttgtaaactt 8280
[2543] ccctgaccct gacatgacaa gagttactaa cagcccctct ctccaagctc acttacaggc 8340
[2544] tctctactta gtccagcacg aagtctggag acctctggcg gcagcctacc aagaacaact 8400
[2545] ggaccgaccg gtggtacctc acccttaccg agtcggcgac acagtgtggg tccgccgaca 8460
[2546] ccagactaag aacctagaac ctcgctggaa aggaccttac acagtcctgc tgaccacccc 8520
[2547] caccgccctc aaagtagacg gcatcgcagc ttggatacac gccgcccacg tgaaggctgc 8580
[2548] cgaccccggg ggtggaccat cctctagact gcc 8613
[2549] <210> 124
[2550] <211> 8604
[2551] <212> DNA
[2552] <213> 人工序列
[2553] <220>
[2554] <223> 合成多核苷酸
[2555] <400> 124
[2556] atggccctgc cagtaacggc tctgctgctg ccacttgctc tgctcctcca tgcagccagg 60
[2557] cctcaggttc agcttcagga gagtggccca ggcctggtga agccaagtga gactctcagc 120
[2558] ttgacttgca cagtttctgg aggcagtgtc tcctcaggca gctattattg gtcctggatt 180
[2559] cggcagcccc ctgggaaagg cctggagtgg attgggtaca tatattacag tggcagcaca 240
[2560] aattacaatc catccctgaa gtctcgagta actatcagtg tggacacaag caagaatcag 300
[2561] ttttcactca aactgtcttc tgtgactgct gctgacactg ctgtttatta ttgtgccagg 360

[2562] gaggggaaaa atggggcatt tgatatttgg ggtcagggca caatggtgac agtcagctct 420
[2563] ggaggtggag gctcaggagg aggaggcagt ggaggtggtg ggtcacgcca tcagatgact 480
[2564] cagtcccccc ccagtctttc tgcctcagtt ggggatagag tgaccatcac atgcagagca 540
[2565] agtcagagca tatcatccta tctgaactgg taccagcaga agccagggaa agcccccaaa 600
[2566] ttgctgattt atgcagcctc aagtctccag agtggggtgc caagcaggtt ctcaggcagt 660
[2567] ggcagtggga cagatttcac attgacaatc agctccctcc aacctgaaga ttttgccacc 720
[2568] tactattgcc agcaatccta cagcacgccc ctgacttttg gaggtggcac aaaggtagag 780
[2569] atcaagagga ctgcggccgc aattgaagtt atgtatcctc ctccttacct agacaatgag 840
[2570] aagagcaatg gaaccattat ccatgtgaaa gggaaacacc tttgtccaag tcccctattt 900
[2571] cccggacctt ctaagccctt ttgggtgctg gtggtggttg gtggagtcct ggcttgctat 960
[2572] agcttgctag taacagtggc ctttattatt ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc 1020
[2573] ctgcacagtg actacatgaa catgactccc cgccgccccg ggcccacccg caagcattac 1080
[2574] cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca gcctatcgct ccagagtgaa gttcagcagg 1140
[2575] agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 1200
[2576] ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg 1260
[2577] ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgttca atgaactgca gaaagataag 1320
[2578] atggcggagg ccttcagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 1380
[2579] gatggccttt tccaggggct cagtacagcc accaaggaca ccttcgacgc ccttcacatg 1440
[2580] caggccctgc cccctcgcgg atctggagca acaaacttct cactactcaa acaagcaggt 1500
[2581] gacgtggagg agaatcccgg cccaatgcag atcccacagg cgccctggcc agtcgtctgg 1560
[2582] gcggtgctac aactgggctg gcggccagga tggttcttag actccccaga caggccctgg 1620
[2583] aaccccccca ccttctcccc agccctgctc gtggtgaccg aaggggacaa cgccaccttc 1680
[2584] acctgcagct tctccaacac atcggagagc ttcgtgctaa actggtaccg catgagcccc 1740
[2585] agcaaccaga cggacaagct ggccgctttc cccgaggacc gcagccagcc cggccaggac 1800
[2586] tgccgcttcc gtgtcacaca actgcccaac gggcgtgact tccacatgag cgtggtcagg 1860
[2587] gcccggcgca atgacagcgg cacctacctc tgtggggcca tctccctggc ccccaaggcg 1920
[2588] cagatcaaag agagcctgcg ggcagagctc agggtgacag agagaagggc agaagtgccc 1980
[2589] acagcccacc ccagcccctc acccaggcca gccggccagg cggccgcacc caccacgacg 2040
[2590] ccagcgccgc gaccaccaac cccggcgccc acgatcgcgt cgcagcccct gtccctgcgc 2100
[2591] ccagaggcgt gccggccagc ggcgggggggc gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgcc 2160
[2592] tgtgatatct acatctgggc gcccctggcc gggacttgtg gggtccttct cctgtcactg 2220
[2593] gttatcaccc tttactgcaa ccacaggcgg atccaataac agccactcga ggatccggat 2280
[2594] tagtccaatt tgttaaagac aggatatcag tggtccaggc tctagttttg actcaacaat 2340
[2595] atcaccagct gaagcctata gagtacgagc catagataaa ataaaagatt ttatttagtc 2400
[2596] tccagaaaaa ggggggaatg aaagacccca cctgtaggtt tggcaagcta gcttaagtaa 2460
[2597] cgccattttg caaggcatgg aaaaatacat aactgagaat agagaagttc agatcaaggt 2520
[2598] caggaacaga tggaacagct gaatatgggc caaacaggat atctgtggta agcagttcct 2580
[2599] gccccggctc agggccaaga acagatggaa cagctgaata tgggccaaac aggatatctg 2640
[2600] tggtaagcag ttcctgcccc ggctcagggc caagaacaga tggtccccag atgcggtcca 2700
[2601] gccctcagca gtttctagag aaccatcaga tgtttccagg gtgccccaag gacctgaaat 2760
[2602] gaccctgtgc cttatttgaa ctaaccaatc agttcgcttc tcgcttctgt tcgcgcgctt 2820
[2603] ctgctccccg agctcaataa aagagcccac aacccctcac tcggggcgcc agtcctccga 2880

[2604] ttgactgagt cgcccgggta cccgtgtatc caataaaccc tcttgcagtt gcatccgact 2940
[2605] tgtggtctcg ctgttccttg ggagggtctc ctctgagtga ttgactaccc gtcagcgggg 3000
[2606] gtctttcaca tgcagcatgt atcaaaatta atttggtttt ttttcttaag tatttacatt 3060
[2607] aaatggccat agtacttaaa gttacattgg cttccttgaa ataaacatgg agtattcaga 3120
[2608] atgtgtcata aatatttcta attttaagat agtatctcca ttggctttct acttttttct 3180
[2609] ttatttttt ttgtcctctg tcttccattt gttgttgttg ttgtttgttt gtttgtttgt 3240
[2610] tggttggttg gttaattttt ttttaaagat cctacactat agttcaagct agactattag 3300
[2611] ctactctgta acccagggtg accttgaagt catgggtagc ctgctgtttt agccttccca 3360
[2612] catctaagat tacaggtatg agctatcatt tttggtatat tgattgattg attgattgat 3420
[2613] gtgtgtgtgt gtgattgtgt ttgtgtgtgt gattgtgtat atgtgtgtat ggttgtgtgt 3480
[2614] gattgtgtgt atgtatgttt gtgtgtgatt gtgtgtgtgt gattgtgcat gtgtgtgtgt 3540
[2615] gtgattgtgt ttatgtgtat gattgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 3600
[2616] gtgtgtgtgt tgtgtatata tatttatggt agtgagaggc aacgctccgg ctcaggtgtc 3660
[2617] aggttggttt ttgagacaga gtctttcact tagcttggaa ttcactggcc gtcgttttac 3720
[2618] aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc 3780
[2619] ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc 3840
[2620] gcagcctgaa tggcgaatgg cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggta 3900
[2621] tttcacaccg catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc 3960
[2622] agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat 4020
[2623] ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt 4080
[2624] catcaccgaa acgcgcgaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctatttta taggttaatg 4140
[2625] tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa 4200
[2626] cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac 4260
[2627] cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg 4320
[2628] tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc 4380
[2629] tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg 4440
[2630] atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga 4500
[2631] gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc 4560
[2632] aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag 4620
[2633] aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga 4680
[2634] gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg 4740
[2635] ctttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga 4800
[2636] atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt 4860
[2637] tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact 4920
[2638] ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt 4980
[2639] ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg 5040
[2640] ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta 5100
[2641] tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac 5160
[2642] tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta 5220
[2643] aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt 5280
[2644] tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt 5340
[2645] tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 5400

[2646] gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc 5460
[2647] agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg 5520
[2648] tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg 5580
[2649] ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggt 5640
[2650] cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac 5700
[2651] tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg 5760
[2652] acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg 5820
[2653] gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat 5880
[2654] ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt 5940
[2655] tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttcctgcg ttatcccctg 6000
[2656] attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa 6060
[2657] cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc 6120
[2658] ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga 6180
[2659] aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg 6240
[2660] ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc 6300
[2661] acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagctttg ctcttaggag tttcctaata 6360
[2662] catcccaaac tcaaatatat aaagcatttg acttgttcta tgccctaggg ggcgggggga 6420
[2663] agctaagcca gctttttta acatttaaaa tgttaattcc attttaaatg cacagatgtt 6480
[2664] tttatttcat aagggtttca atgtgcatga atgctgcaat attcctgtta ccaaagctag 6540
[2665] tataaataaa aatagataaa cgtggaaatt acttagagtt tctgtcatta acgtttcctt 6600
[2666] cctcagttga caacataaat gcgctgctga gaagccagtt tgcatctgtc aggatcaatt 6660
[2667] tcccattatg ccagtcatat taattactag tcaattagtt gatttttatt tttgacatat 6720
[2668] acatgtgaaa gaccccacct gtaggtttgg caagctagct taagtaacgc cattttgcaa 6780
[2669] ggcatggaaa aatacataac tgagaataga aaagttcaga tcaaggtcag gaacagatgg 6840
[2670] aacagctgaa tatgggccaa acaggatatc tgtggtaagc agttcctgcc ccggctcagg 6900
[2671] gccaagaaca gatggaacag ctgaatatgg gccaaacagg atatctgtgg taagcagttc 6960
[2672] ctgccccggc tcagggccaa gaacagatgg tccccagatg cggtccagcc ctcagcagtt 7020
[2673] tctagagaac catcagatgt ttccagggtg ccccaaggac ctgaaatgac cctgtgcctt 7080
[2674] atttgaacta accaatcagt tcgcttctcg cttctgttcg cgcgcttctg ctccccgagc 7140
[2675] tcaataaaag agcccacaac ccctcactcg gcgcgccagt cctccgattg actgagtcgc 7200
[2676] ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt ggtctcgctg 7260
[2677] ttccttggga gggtctcctc tgagtgattg actacccgtc agcgggggtc tttcatttgg 7320
[2678] gggctcgtcc gggatcggga gacccctgcc cagggaccac cgacccacca ccgggaggta 7380
[2679] agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac tgattttatg 7440
[2680] cgcctgcgtc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggacccg tggtggaact 7500
[2681] gacgagttcg gaacacccgg ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt cgggggccgt 7560
[2682] ttttgtggcc cgacctgagt cctaaaatcc cgatcgttta ggactctttg gtgcaccccc 7620
[2683] cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt tcccgcctcc 7680
[2684] gtctgaattt ttgctttcgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg tctgctgcag 7740
[2685] catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaaa atatgggccc 7800
[2686] gggctagcct gttaccactc ccttaagttt gaccttaggt cactggaaag atgtcgagcg 7860
[2687] gatcgctcac aaccagtcgg tagatgtcaa gaagagacgt tgggttacct tctgctctgc 7920

[2688] agaatggcca acctttaacg tcggatggcc gcgagacggc acctttaacc gagacctcat 7980
[2689] cacccaggtt aagatcaagg tcttttcacc tggcccgcat ggacacccag accaggtccc 8040
[2690] ctacatcgtg acctgggaag ccttggcttt tgacccccct ccctgggtca agccctttgt 8100
[2691] acaccctaag cctccgcctc ctcttcctcc atccgccccg tctctccccc ttgaacctcc 8160
[2692] tcgttcgacc ccgcctcgat cctcccttta tccagccctc actccttctc taggcgcccc 8220
[2693] catatggcca tatgagatct tatatggggc acccccgccc cttgtaaact tccctgaccc 8280
[2694] tgacatgaca agagttacta acagcccctc tctccaagct cacttacagg ctctctactt 8340
[2695] agtccagcac gaagtctgga gacctctggc ggcagcctac caagaacaac tggaccgacc 8400
[2696] ggtggtacct cacccttacc gagtcggcga cacagtgtgg gtccgccgac accagactaa 8460
[2697] gaacctagaa cctcgctgga aaggacctta cacagtcctg ctgaccaccc ccaccgccct 8520
[2698] caaagtagac ggcatcgcag cttggataca cgccgcccac gtgaaggctg ccgaccccgg 8580
[2699] gggtggacca tcctctagac tgcc 8604
[2700] <210> 125
[2701] <211> 63
[2702] <212> DNA
[2703] <213> 人工序列
[2704] <220>
[2705] <223> 合成多核苷酸
[2706] <400> 125
[2707] atggccctgc cagtaacggc tctgctgctg ccacttgctc tgctcctcca tgcagccagg 60
[2708] cct 63
[2709] <210> 126
[2710] <211> 24
[2711] <212> DNA
[2712] <213> 人工序列
[2713] <220>
[2714] <223> 合成多核苷酸
[2715] <400> 126
[2716] aggaccttac acagtcctgc tgac 24
[2717] <210> 127
[2718] <211> 21
[2719] <212> DNA
[2720] <213> 人工序列
[2721] <220>
[2722] <223> 合成多核苷酸
[2723] <400> 127
[2724] agaacctaga acctcgctgg a 21
[2725] <210> 128
[2726] <211> 20
[2727] <212> DNA
[2728] <213> 人工序列
[2729] <220>

[2730] <223> 合成多核苷酸
[2731] <400> 128
[2732] ctgcgatgcc gtctactttg 20
[2733] <210> 129
[2734] <211> 27
[2735] <212> DNA
[2736] <213> 人工序列
[2737] <220>
[2738] <223> 合成多核苷酸
[2739] <400> 129
[2740] tgctgaaaca ttcaccttcc atgcaga 27
[2741] <210> 130
[2742] <211> 25
[2743] <212> DNA
[2744] <213> 人工序列
[2745] <220>
[2746] <223> 合成多核苷酸
[2747] <400> 130
[2748] tgaaacatac gttcccaaag agttt 25
[2749] <210> 131
[2750] <211> 26
[2751] <212> DNA
[2752] <213> 人工序列
[2753] <220>
[2754] <223> 合成多核苷酸
[2755] <400> 131
[2756] ctctccttct cagaaagtgt gcatat 26
[2757] <210> 132
[2758] <211> 18
[2759] <212> DNA
[2760] <213> 人工序列
[2761] <220>
[2762] <223> 合成多核苷酸
[2763] <400> 132
[2764] gaaggtgaag gtcggagt 18
[2765] <210> 133
[2766] <211> 22
[2767] <212> DNA
[2768] <213> 人工序列
[2769] <220>
[2770] <223> 合成多核苷酸
[2771] <400> 133

[2772] catgggtgga atcatattgg aa 22
[2773] <210> 134
[2774] <211> 22
[2775] <212> DNA
[2776] <213> 人工序列
[2777] <220>
[2778] <223> 合成多核苷酸
[2779] <400> 134
[2780] ccaggatggt tcttagactc cc 22
[2781] <210> 135
[2782] <211> 21
[2783] <212> DNA
[2784] <213> 人工序列
[2785] <220>
[2786] <223> 合成多核苷酸
[2787] <400> 135
[2788] tttagcacga agctctccga t 21
[2789] <210> 136
[2790] <211> 20
[2791] <212> DNA
[2792] <213> 人工序列
[2793] <220>
[2794] <223> 合成多核苷酸
[2795] <400> 136
[2796] acgagggaca ataggagcca 20
[2797] <210> 137
[2798] <211> 20
[2799] <212> DNA
[2800] <213> 人工序列
[2801] <220>
[2802] <223> 合成多核苷酸
[2803] <400> 137
[2804] ggcatactcc gtctgctcag 20

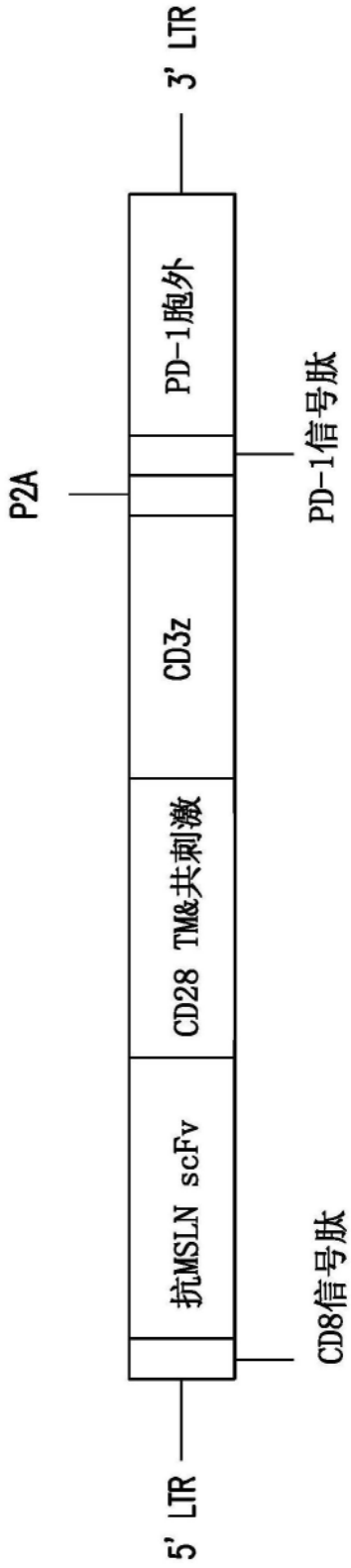

3' LTR
PD-1胞外
PD-1信号肽
P2A
CD3z
CD28 TM&共刺激
抗MSLN scFv
CD8信号肽
5' LTR

图1

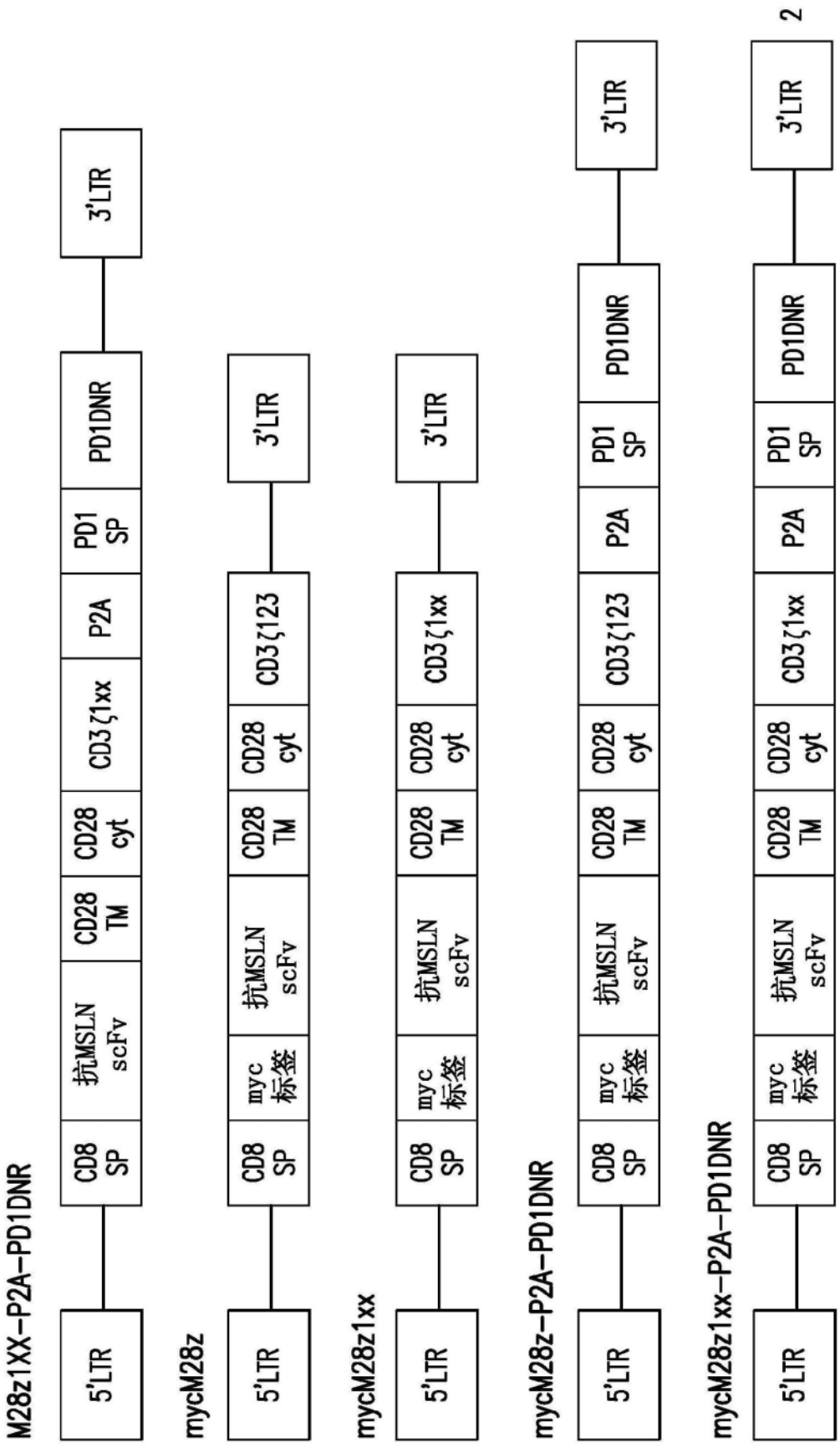
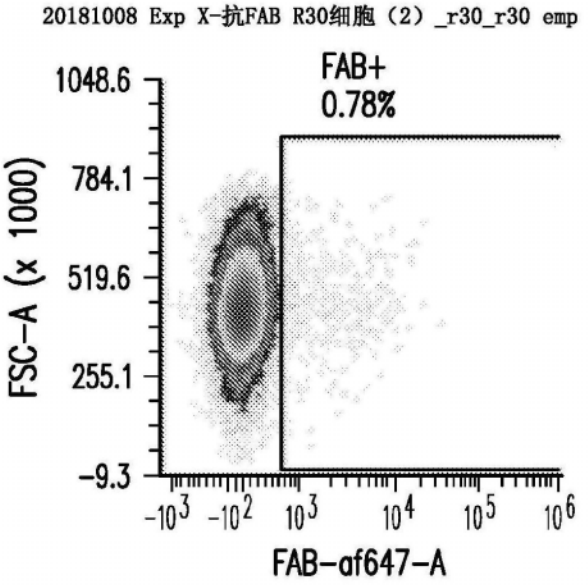

M28z1XX-P2A-PD1DNR
5'LTR
CD8 SP
抗MSLN scFv
CD28 TM
CD28 cyt
CD3ζ1xx
P2A
PD1 SP
PD1DNR
3'LTR
mycM28z
5'LTR
CD8 SP
myc 标签
抗MSLN scFv
CD28 TM
CD28 cyt
CD3ζ123
3'LTR
mycM28z1xx
5'LTR
CD8 SP
myc 标签
抗MSLN scFv
CD28 TM
CD28 cyt
CD3ζ1xx
3'LTR
mycM28z-P2A-PD1DNR
5'LTR
CD8 SP
myc 标签
抗MSLN scFv
CD28 TM
CD28 cyt
CD3ζ123
P2A
PD1 SP
PD1DNR
3'LTR
mycM28z1xx-P2A-PD1DNR
5'LTR
CD8 SP
myc 标签
抗MSLN scFv
CD28 TM
CD28 cyt
CD3ζ1xx
P2A
PD1 SP
PD1DNR
3'LTR
2

图2

H29上清转导RD114

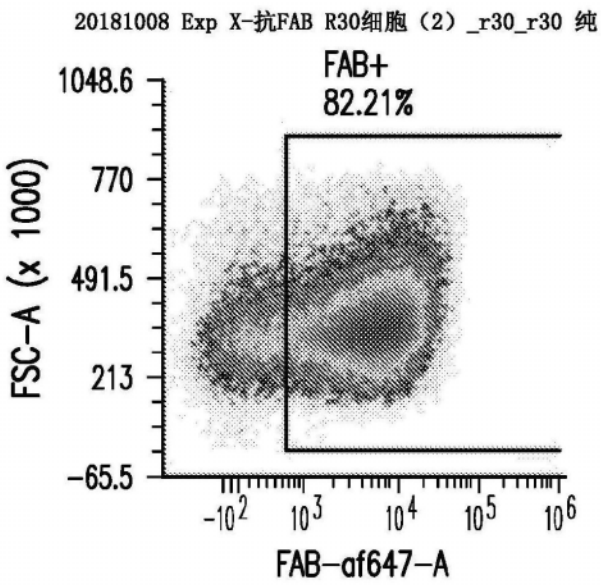
RD114 空



MFI Fab+:

图3A

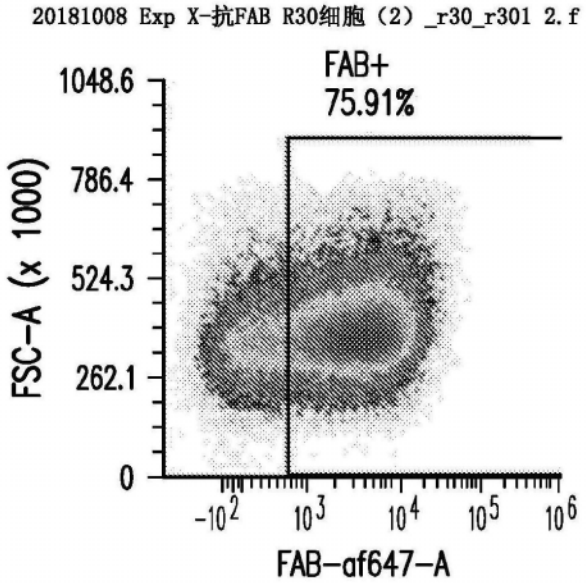
未稀释上清



4849

图3B

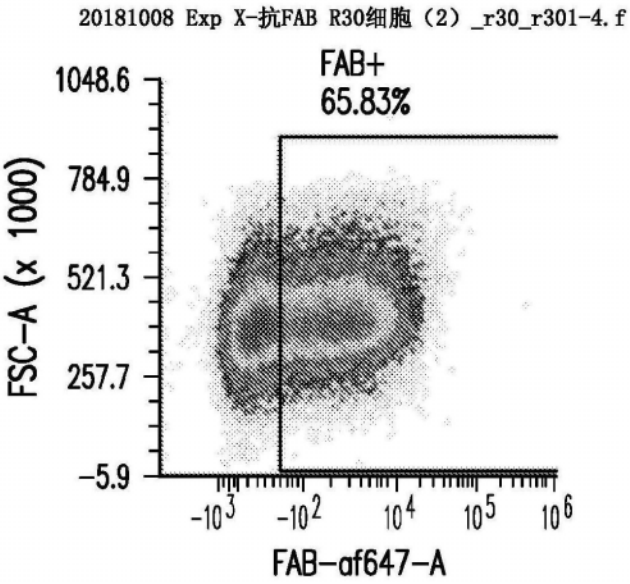
上清1:2



3266

图3C

上清1:4



2406

图3D

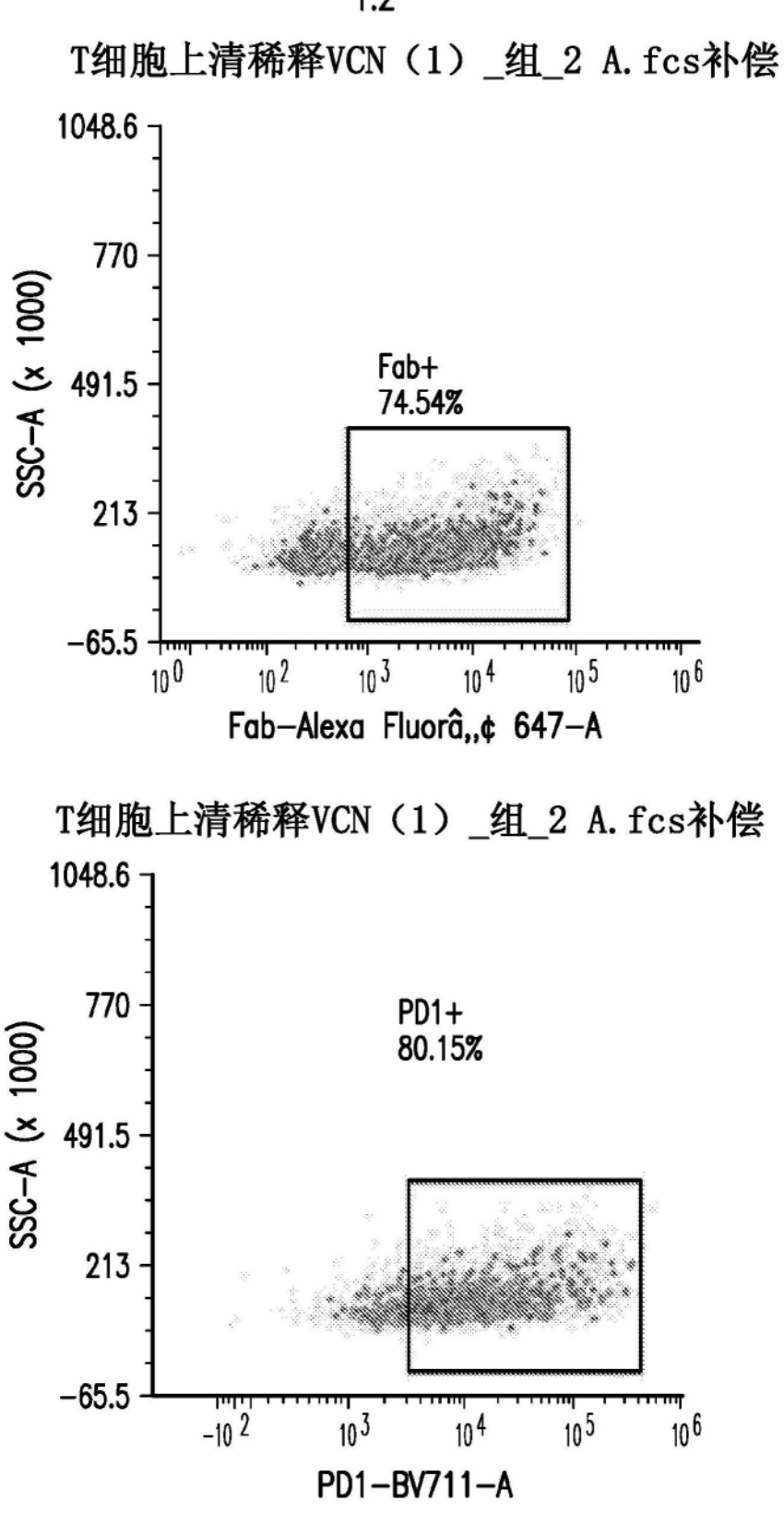

1:2
T细胞上清稀释VCN（1）_组_2 A.fcs补偿
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (x 1000)
Fab+
74.54%
10^0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
Fab-Alexa Fluorâ,,¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_2 A.fcs补偿
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (x 1000)
PD1+
80.15%
-10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PD1-BV711-A

图4A

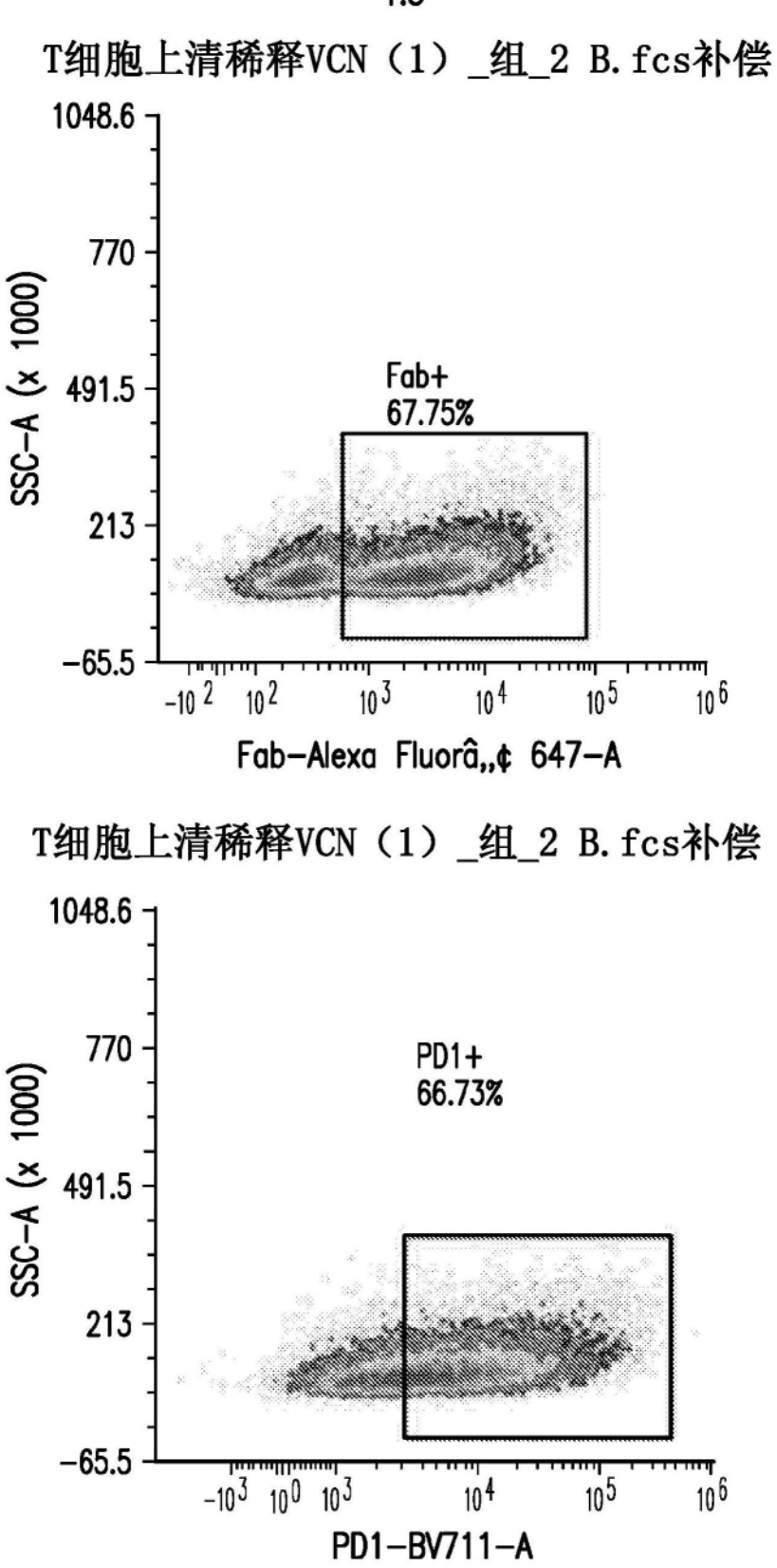

1:5
T细胞上清稀释VCN（1）_组_2 B.fcs补偿
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (x 1000)
Fab+
67.75%
-10 2
10 2
10 3
10 4
10 5
10 6
Fab-Alexa Fluorâ,,¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_2 B.fcs补偿
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (x 1000)
PD1+
66.73%
-10 3
10 0
10 3
10 4
10 5
10 6
PD1-BV711-A

图4B

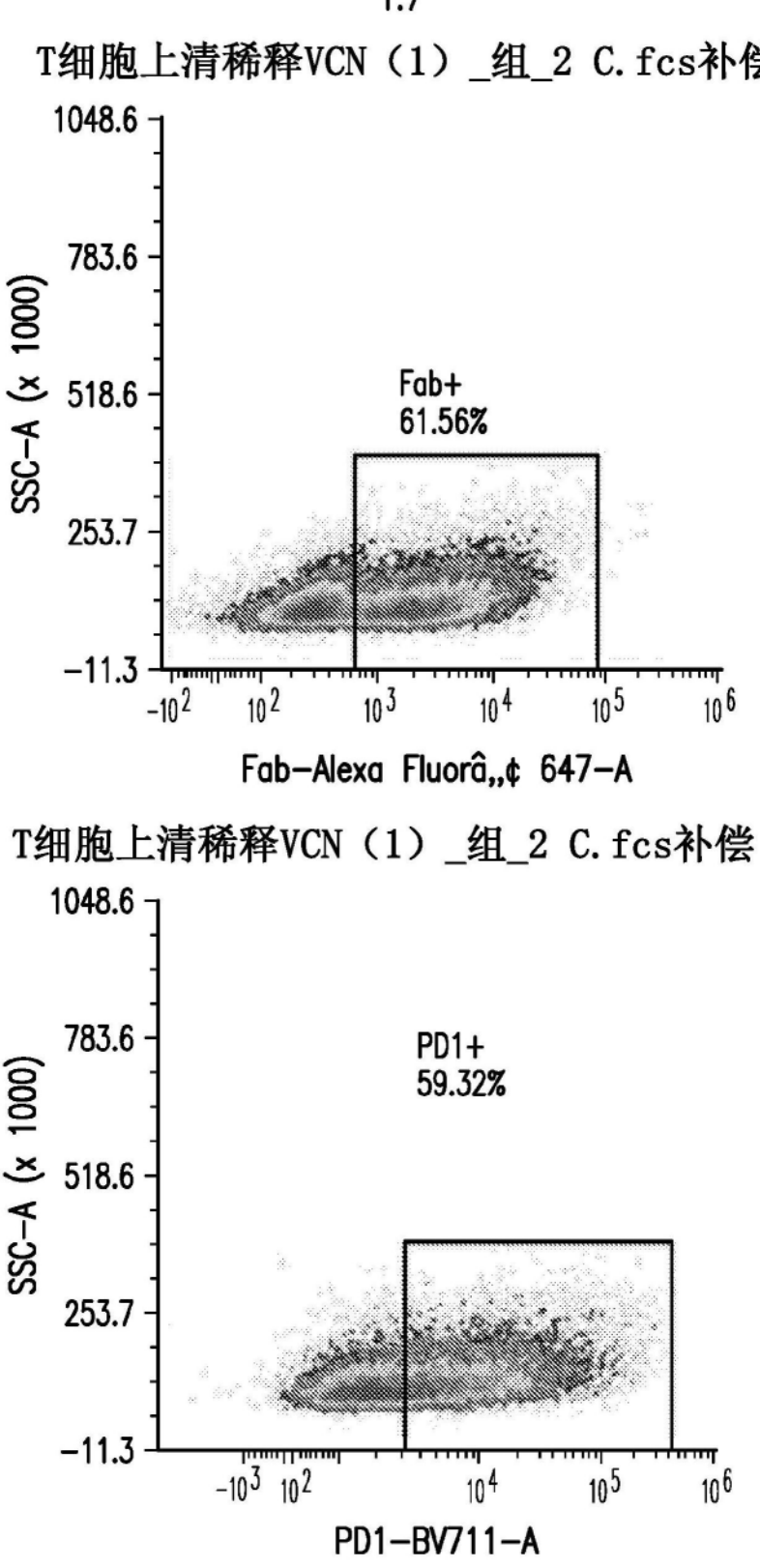
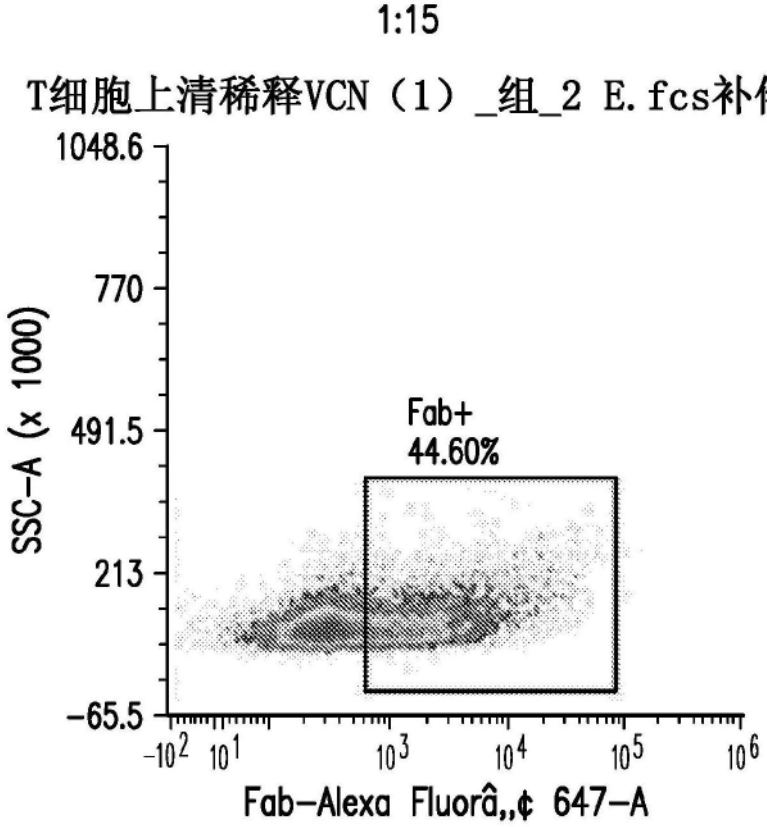

1:7
T细胞上清稀释VCN（1）_组_2 C.fcs补偿
1048.6
783.6
518.6
253.7
-11.3
SSC-A (x 1000)
Fab+
61.56%
-10^2
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
Fab-Alexa Fluorâ„¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_2 C.fcs补偿
1048.6
783.6
518.6
253.7
-11.3
SSC-A (x 1000)
PD1+
59.32%
-10^3
10^2
10^4
10^5
10^6
PD1-BV711-A

图4C


1:15
T细胞上清稀释VCN（1）_组_2 E.fcs补偿
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (x 1000)
Fab+
44.60%
-10^2 10^1 10^3 10^4 10^5 10^6
Fab-Alexa Fluorâ,,¢ 647-A

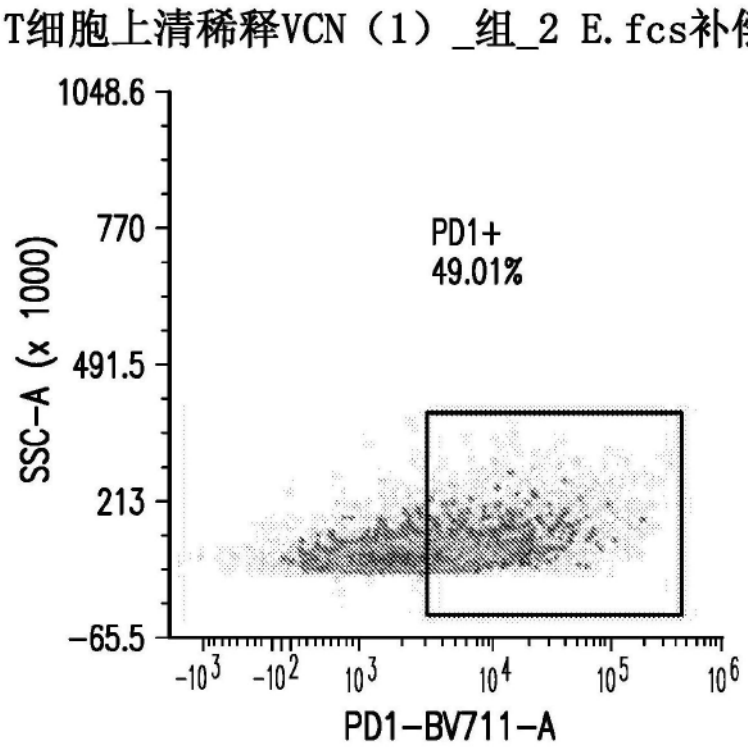

T细胞上清稀释VCN（1）_组_2 E.fcs补偿
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (x 1000)
PD1+
49.01%
-10^3 -10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
PD1-BV711-A

图4D

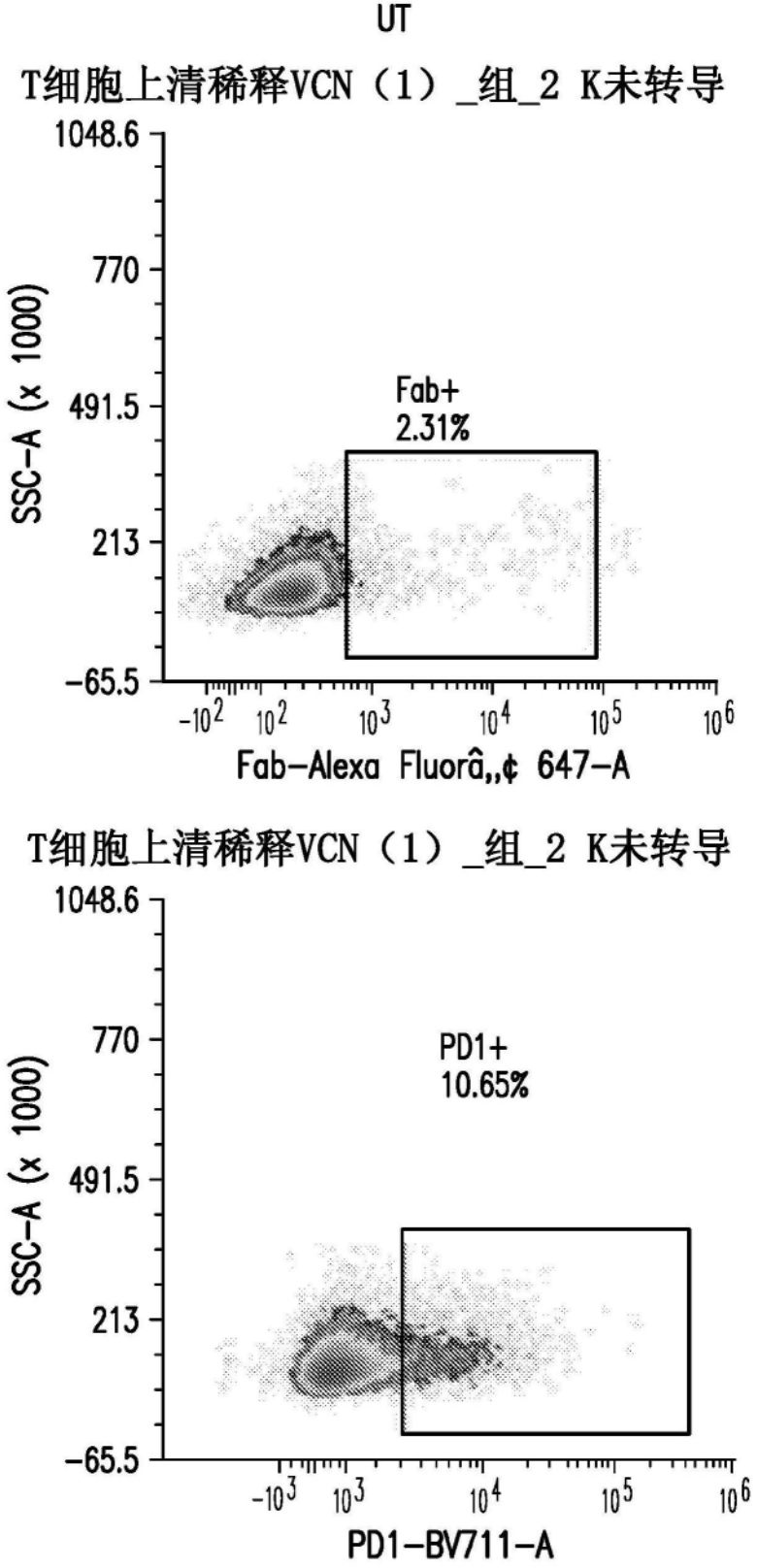

UT
T细胞上清稀释VCN（1）_组_2 K未转导
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (x 1000)
Fab+
2.31%
-10^2
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
Fab-Alexa Fluorâ,,¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_2 K未转导
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (x 1000)
PD1+
10.65%
-10^3
10^3
10^4
10^5
10^6
PD1-BV711-A

图4E

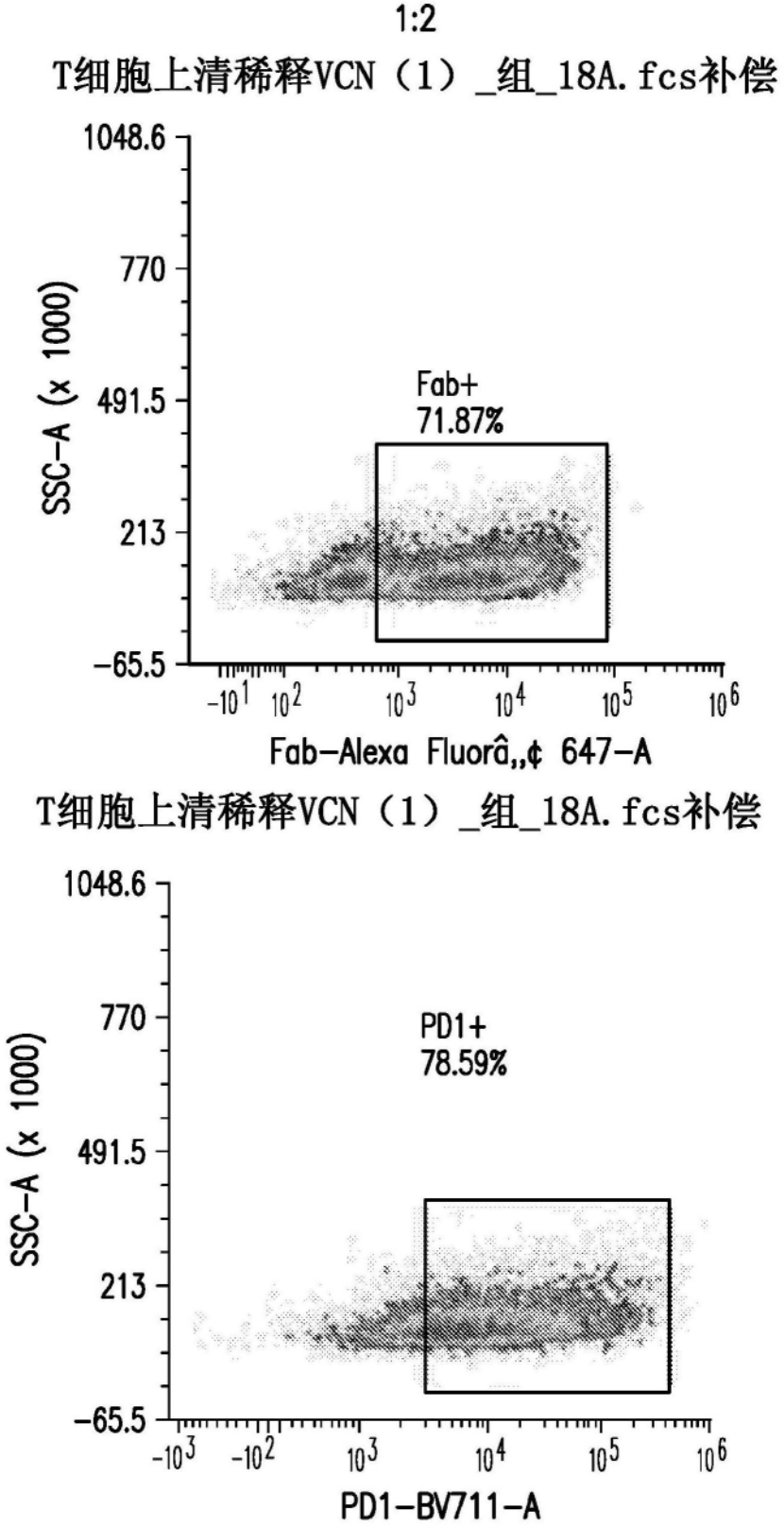

1:2
T细胞上清稀释VCN（1）_组_18A.fcs补偿
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (x 1000)
Fab+
71.87%
-10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
Fab-Alexa Fluorâ,,¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_18A.fcs补偿
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (x 1000)
PD1+
78.59%
-10^3 -10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
PD1-BV711-A

图5A

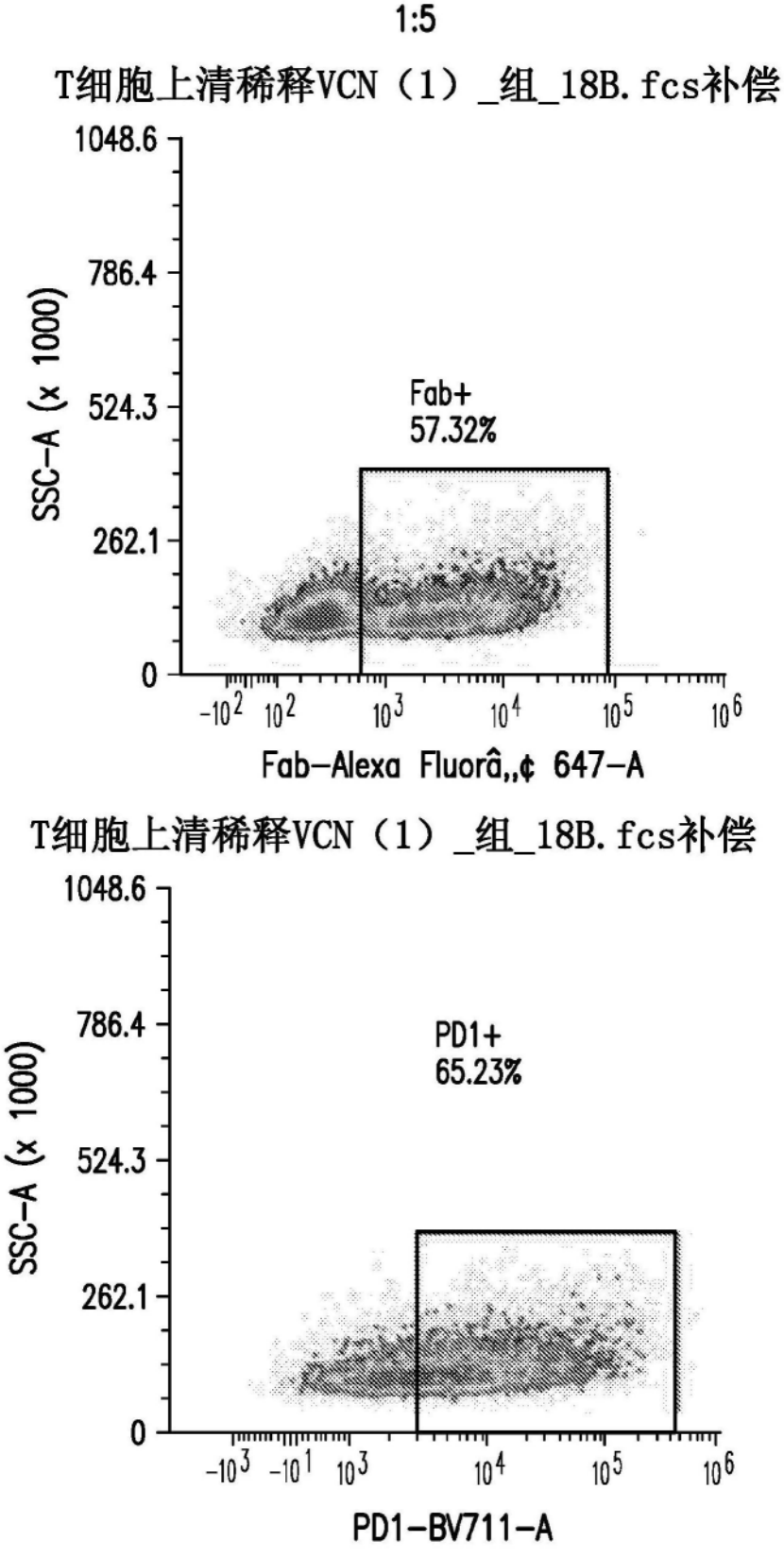

1:5
T细胞上清稀释VCN（1）_组_18B.fcs补偿
1048.6
786.4
524.3
262.1
0
SSC-A (x 1000)
Fab+
57.32%
-10^2 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
Fab-Alexa Fluorâ,,¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_18B.fcs补偿
1048.6
786.4
524.3
262.1
0
SSC-A (x 1000)
PD1+
65.23%
-10^3 -10^1 10^3 10^4 10^5 10^6
PD1-BV711-A

图5B

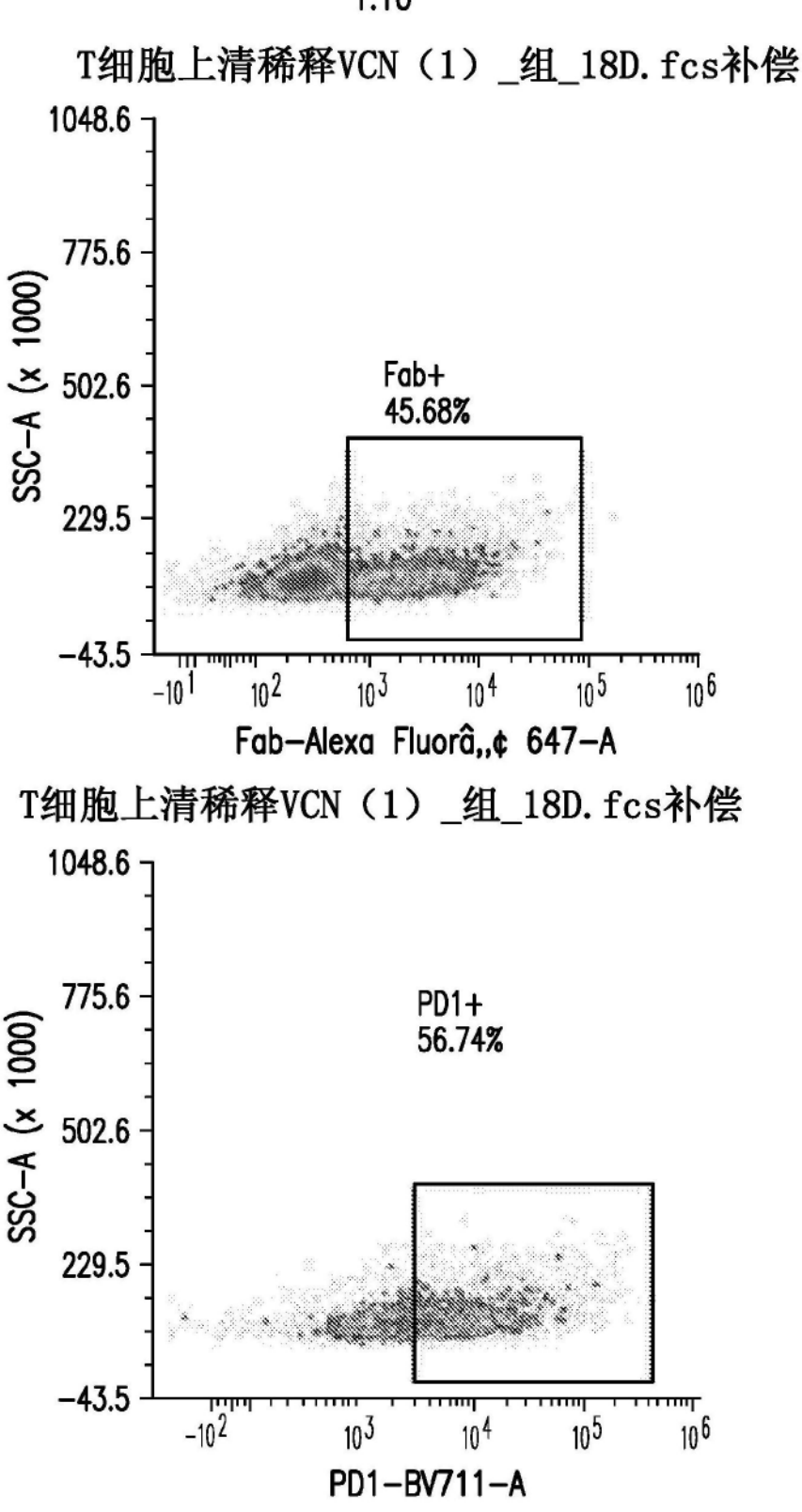

1:10
T细胞上清稀释VCN（1）_组_18D.fcs补偿
1048.6
775.6
502.6
229.5
-43.5
SSC-A (x 1000)
Fab+
45.68%
-10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
Fab-Alexa Fluorâ,,¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_18D.fcs补偿
1048.6
775.6
502.6
229.5
-43.5
SSC-A (x 1000)
PD1+
56.74%
-10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PD1-BV711-A

图5C

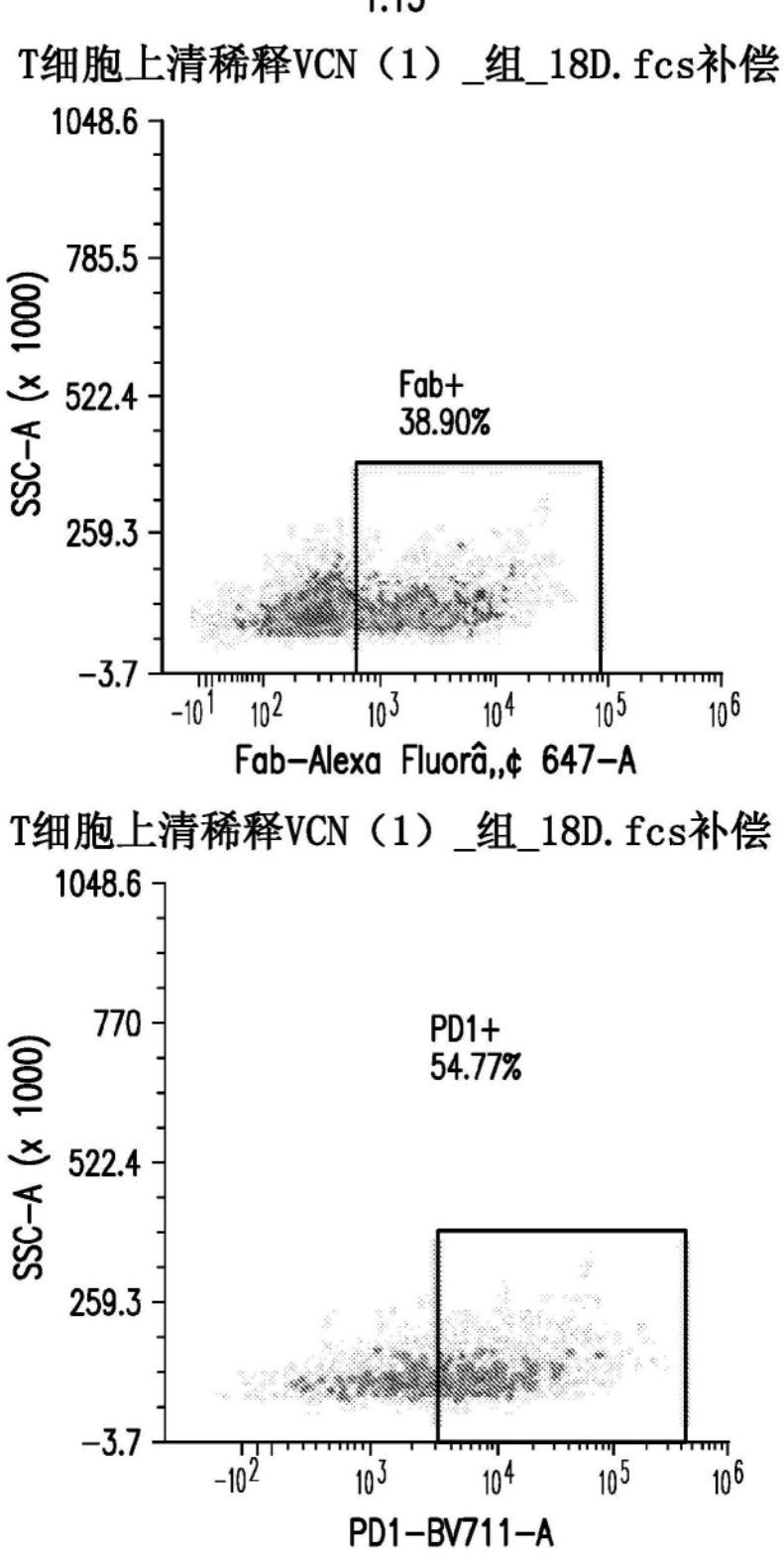

1:15
T细胞上清稀释VCN（1）_组_18D.fcs补偿
1048.6
785.5
522.4
259.3
-3.7
SSC-A (x 1000)
Fab+
38.90%
-10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
Fab-Alexa Fluorâ,,¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_18D.fcs补偿
1048.6
770
522.4
259.3
-3.7
SSC-A (x 1000)
PD1+
54.77%
-10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PD1-BV711-A

图5D

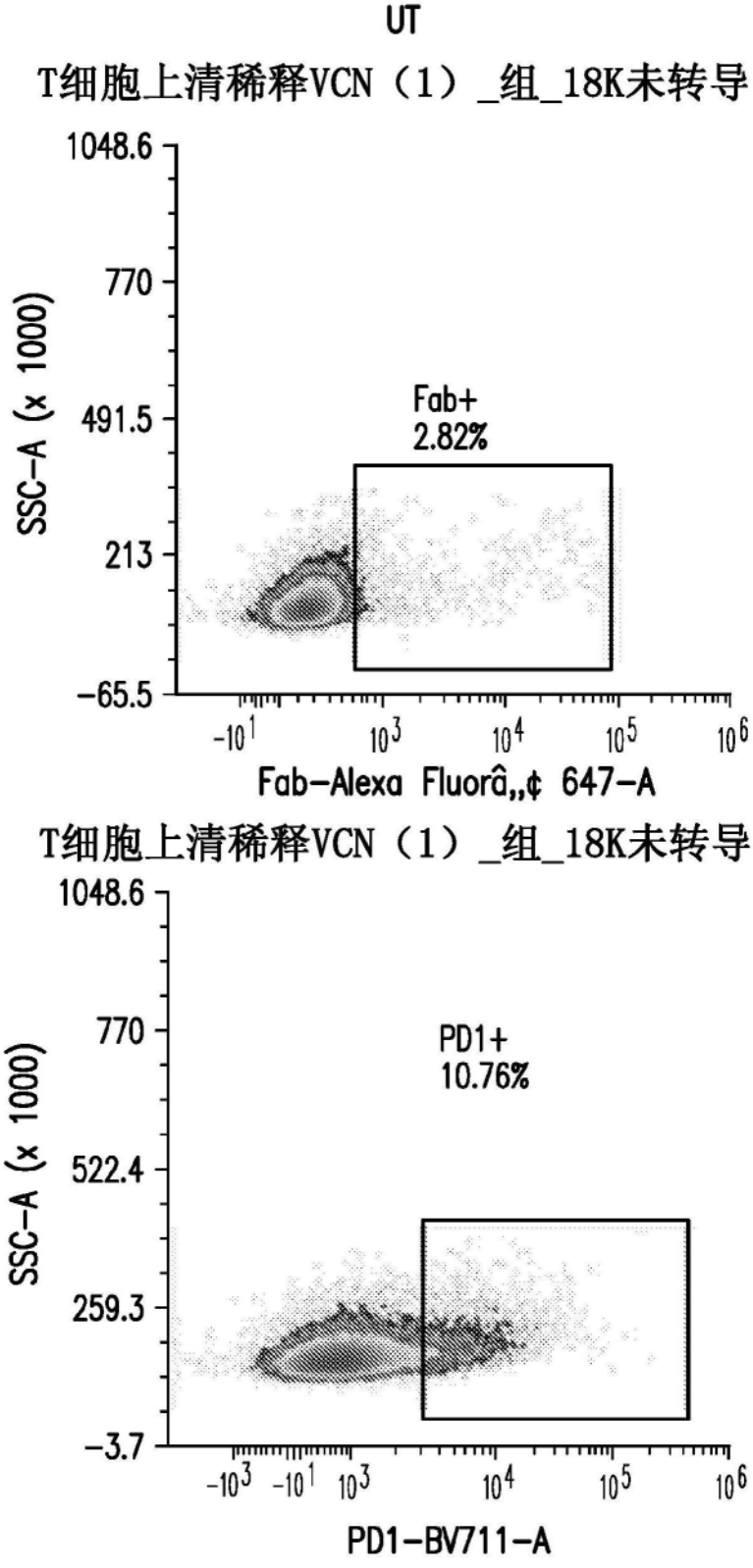

UT
T细胞上清稀释VCN（1）_组_18K未转导
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (x 1000)
Fab+
2.82%
-10^1
10^3
10^4
10^5
10^6
Fab-Alexa Fluorâ„¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_18K未转导
1048.6
770
522.4
259.3
-3.7
SSC-A (x 1000)
PD1+
10.76%
-10^3
-10^1
10^3
10^4
10^5
10^6
PD1-BV711-A

图5E

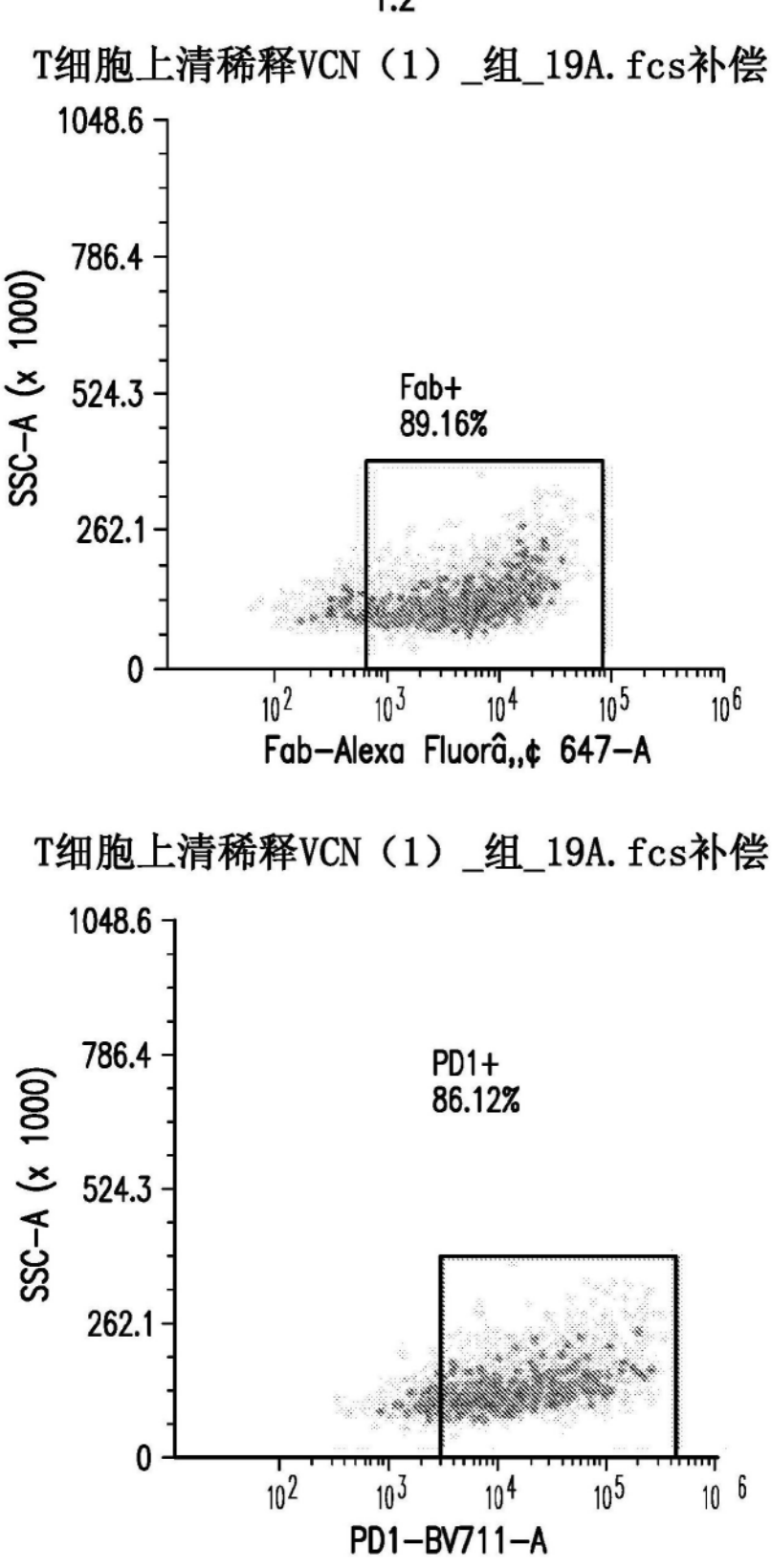

1:2
T细胞上清稀释VCN（1）_组_19A.fcs补偿
1048.6
786.4
524.3
262.1
0
SSC-A (x 1000)
Fab+
89.16%
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
Fab-Alexa Fluorâ„¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_19A.fcs补偿
1048.6
786.4
524.3
262.1
0
SSC-A (x 1000)
PD1+
86.12%
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PD1-BV711-A

图6A

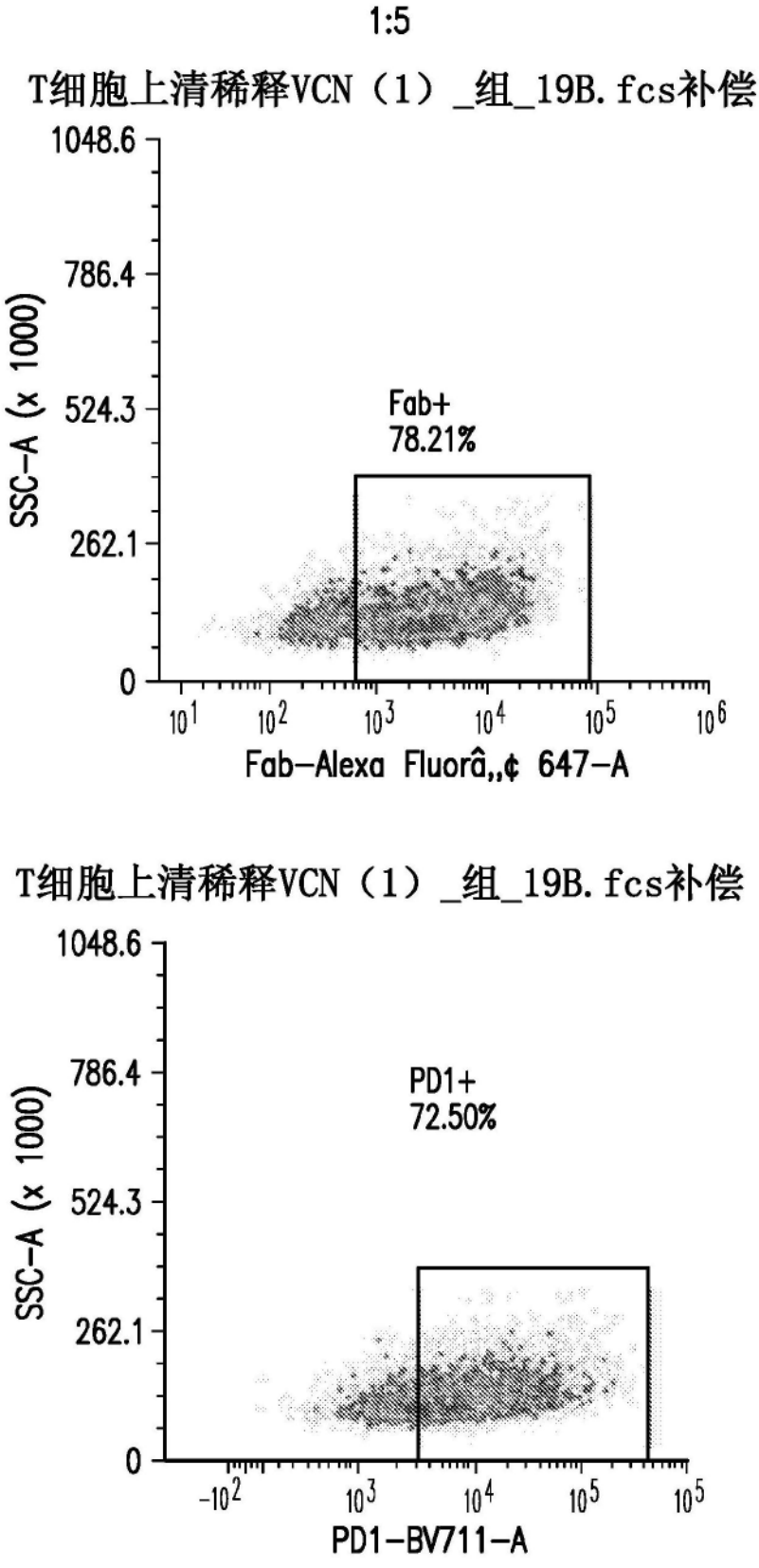

1:5
T细胞上清稀释VCN（1）_组_19B.fcs补偿
1048.6
786.4
524.3
262.1
0
SSC-A (x 1000)
Fab+
78.21%
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
Fab-Alexa Fluorâ,,¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_19B.fcs补偿
1048.6
786.4
524.3
262.1
0
SSC-A (x 1000)
PD1+
72.50%
-10^2 10^3 10^4 10^5 10^5
PD1-BV711-A

图6B

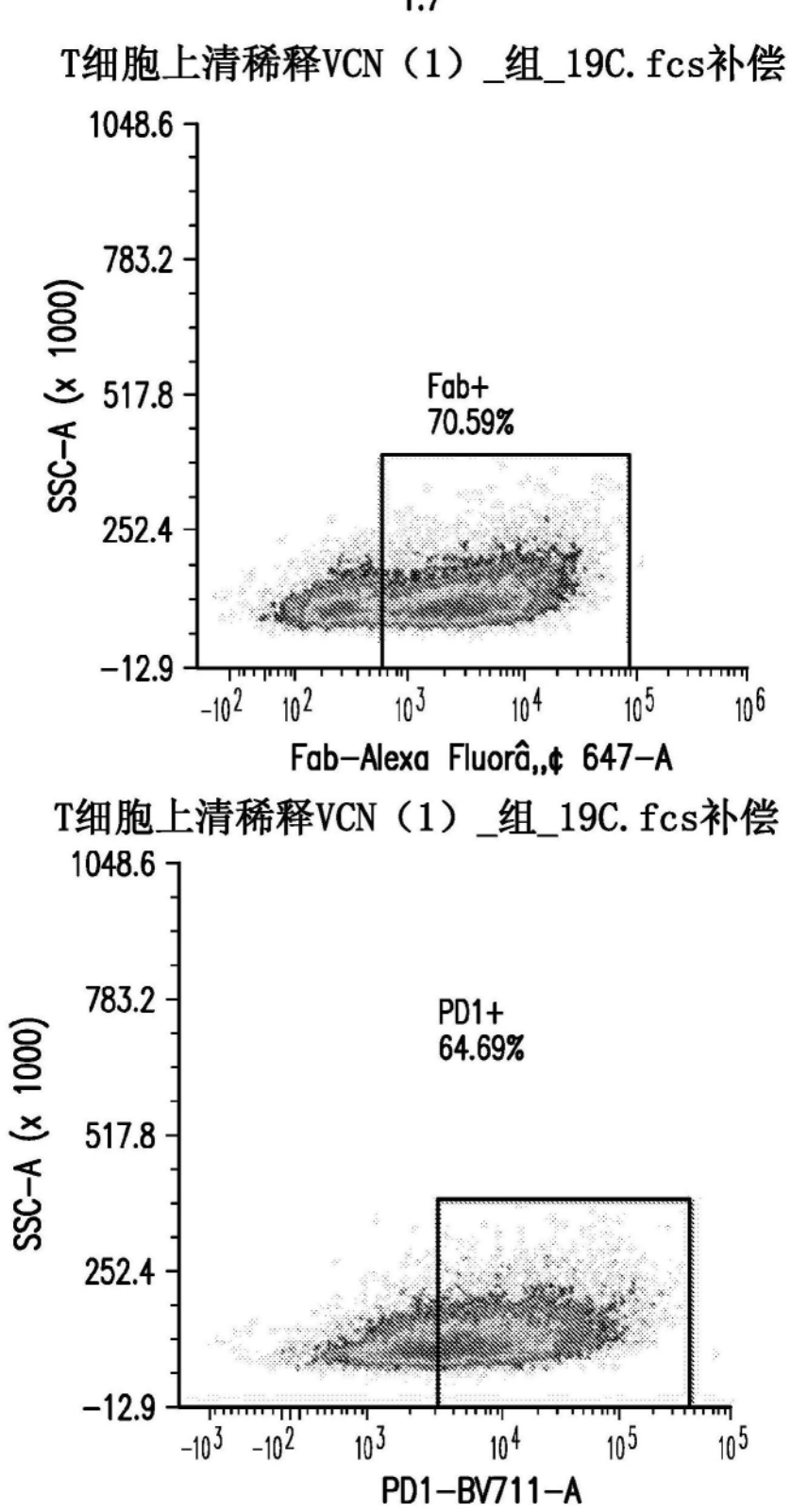

1:7
T细胞上清稀释VCN（1）_组_19C.fcs补偿
1048.6
783.2
517.8
252.4
-12.9
SSC-A (x 1000)
Fab+
70.59%
-10^2
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
Fab-Alexa Fluorâ„¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_19C.fcs补偿
1048.6
783.2
517.8
252.4
-12.9
SSC-A (x 1000)
PD1+
64.69%
-10^3
-10^2
10^3
10^4
10^5
10^5
PD1-BV711-A

图6C

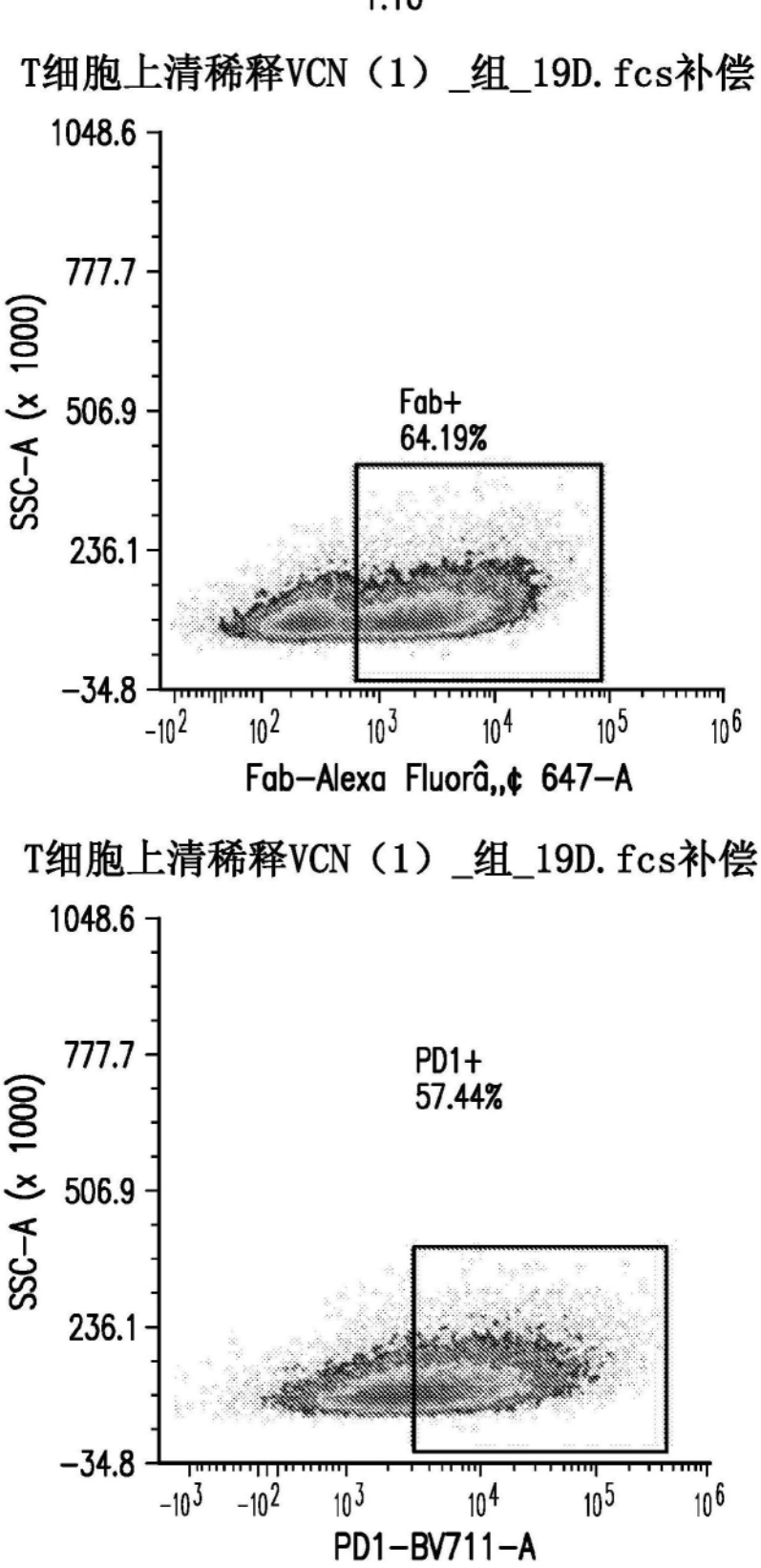

1:10
T细胞上清稀释VCN（1）_组_19D.fcs补偿
1048.6
777.7
506.9
236.1
-34.8
SSC-A (x 1000)
Fab+
64.19%
-10^2
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
Fab-Alexa Fluorâ,,¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_19D.fcs补偿
1048.6
777.7
506.9
236.1
-34.8
SSC-A (x 1000)
PD1+
57.44%
-10^3
-10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PD1-BV711-A

图6D

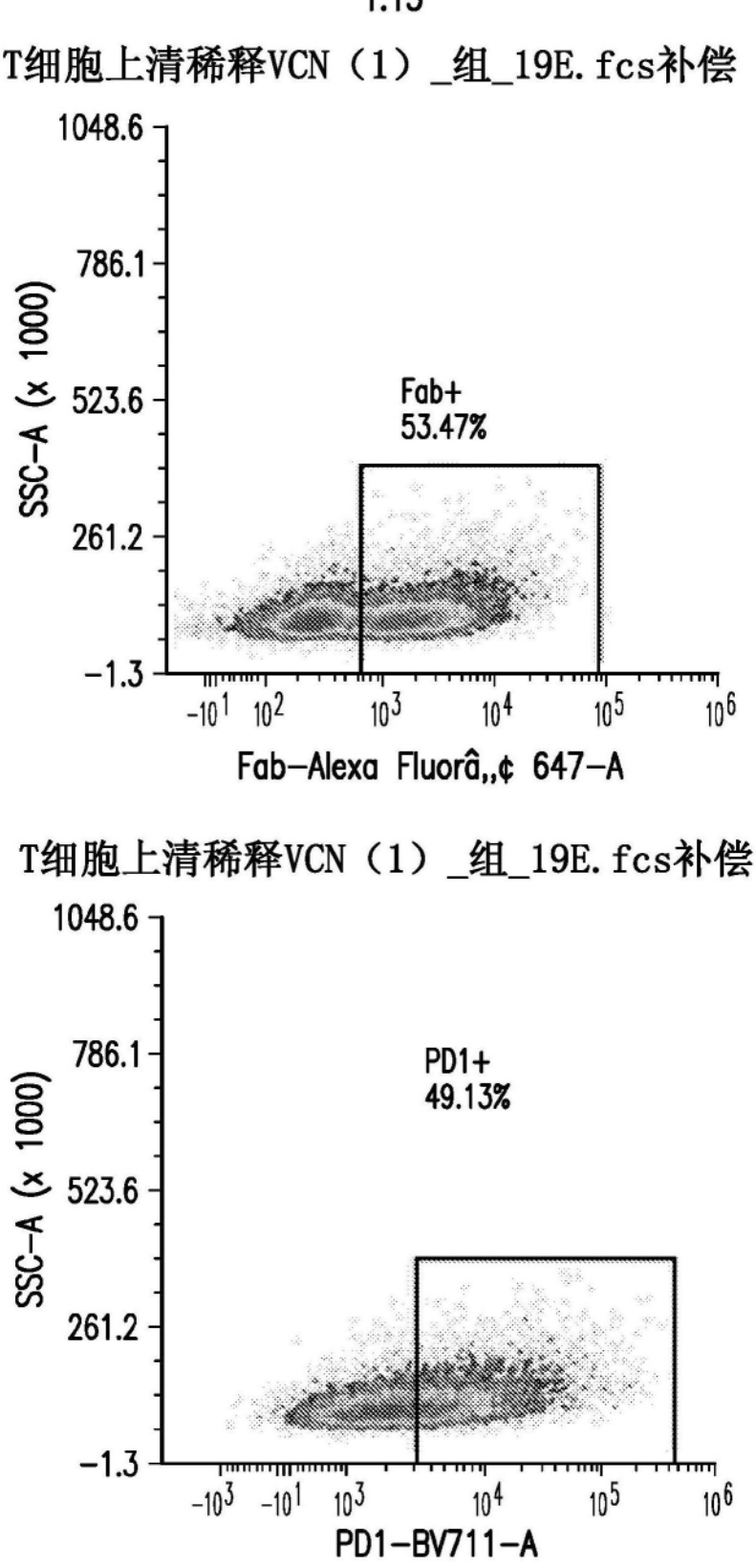
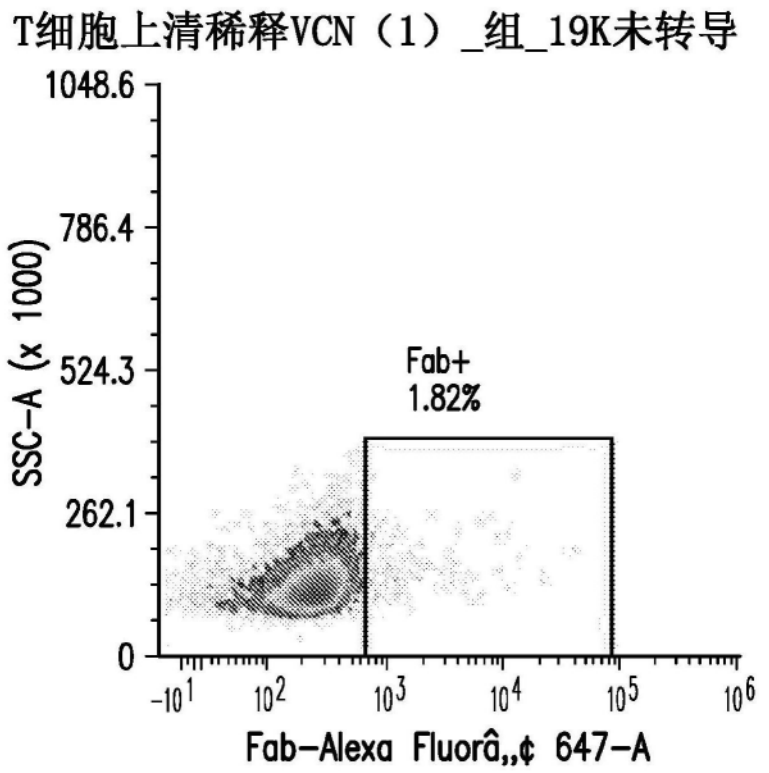

1:15
T细胞上清稀释VCN（1）_组_19E.fcs补偿
1048.6
786.1
523.6
261.2
-1.3
SSC-A (x 1000)
Fab+
53.47%
-10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
Fab-Alexa Fluorâ,,¢ 647-A
T细胞上清稀释VCN（1）_组_19E.fcs补偿
1048.6
786.1
523.6
261.2
-1.3
SSC-A (x 1000)
PD1+
49.13%
-10^3 -10^1 10^3 10^4 10^5 10^6
PD1-BV711-A

图6E

UT


T细胞上清稀释VCN（1）_组_19K未转导
1048.6
786.4
524.3
262.1
0
SSC-A (x 1000)
Fab+
1.82%
-10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
Fab-Alexa Fluorâ„¢ 647-A

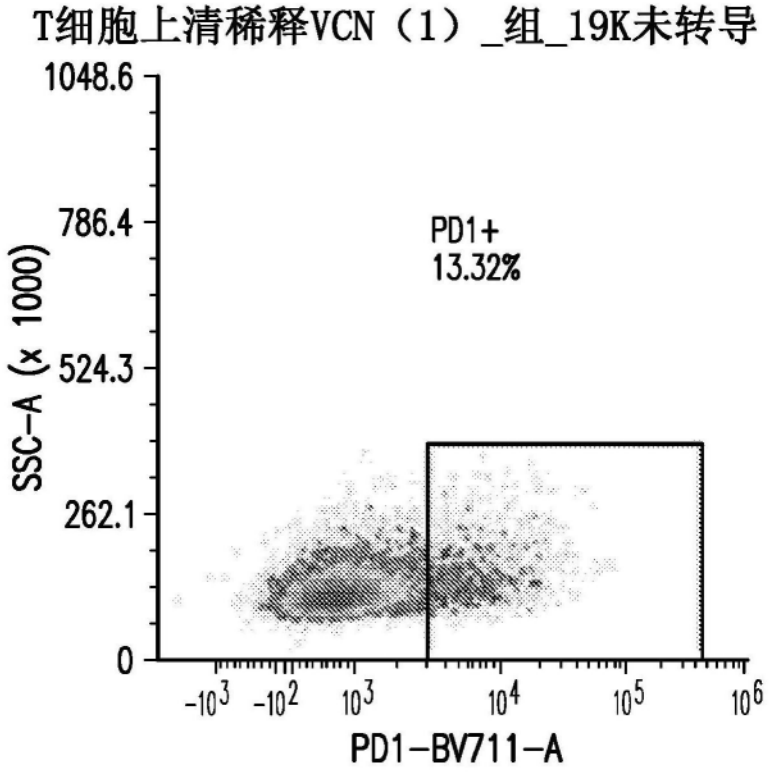

T细胞上清稀释VCN（1）_组_19K未转导
1048.6
786.4
524.3
262.1
0
SSC-A (x 1000)
PD1+
13.32%
-10^3
-10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PD1-BV711-A

图6F

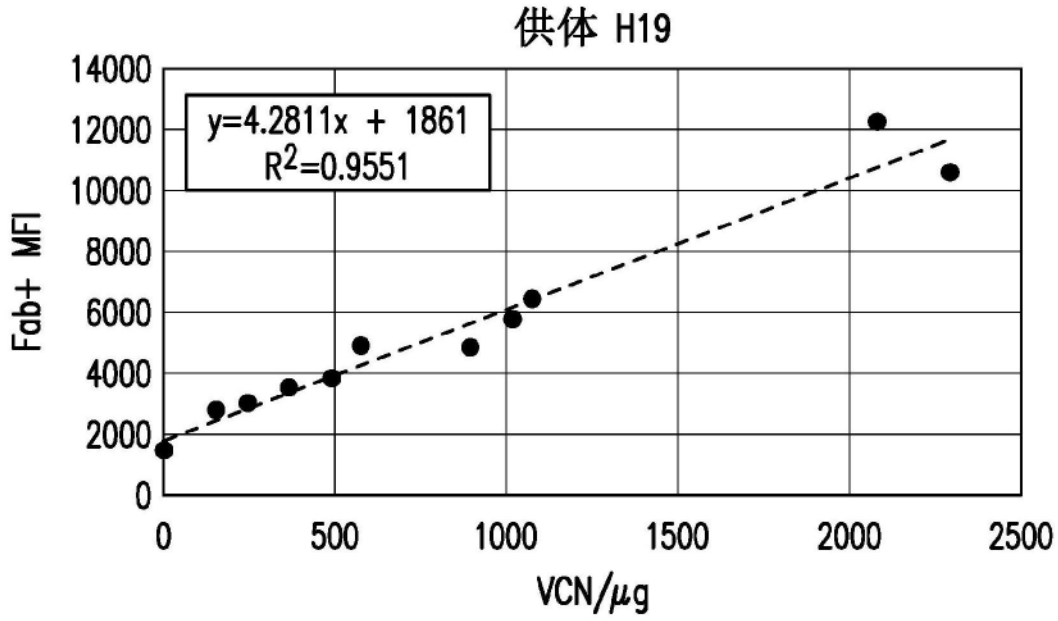

供体 H19
y=4.2811x + 1861
R2=0.9551
Fab+ MFI
VCN/μg
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
0
500
1000
1500
2000
2500

图7A

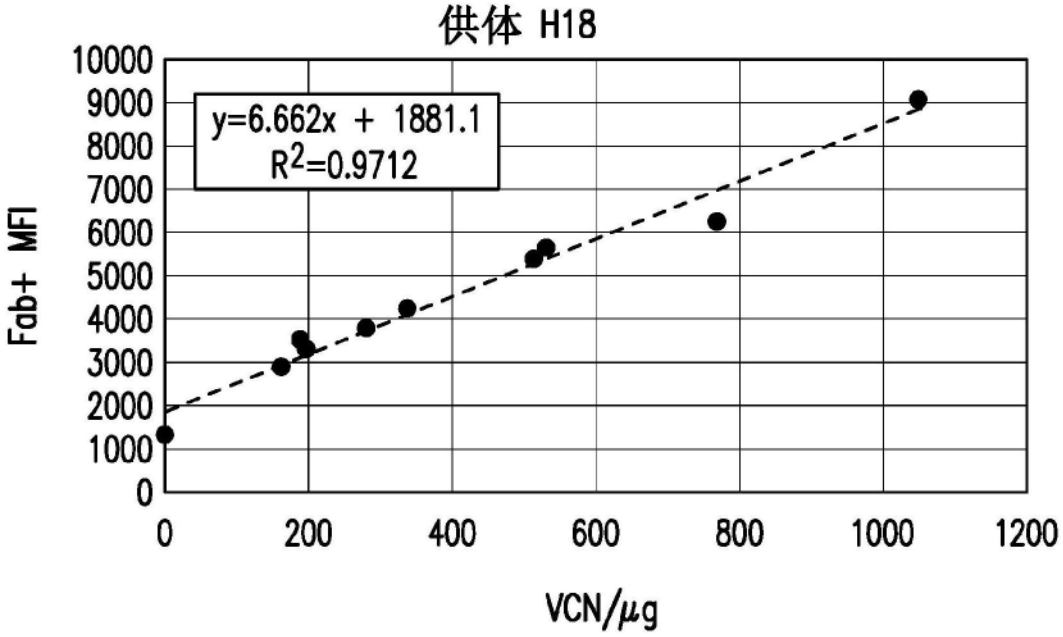

供体 H18
y=6.662x + 1881.1
R2=0.9712
Fab+ MFI
VCN/μg
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000
10000
0
200
400
600
800
1000
1200

图7B

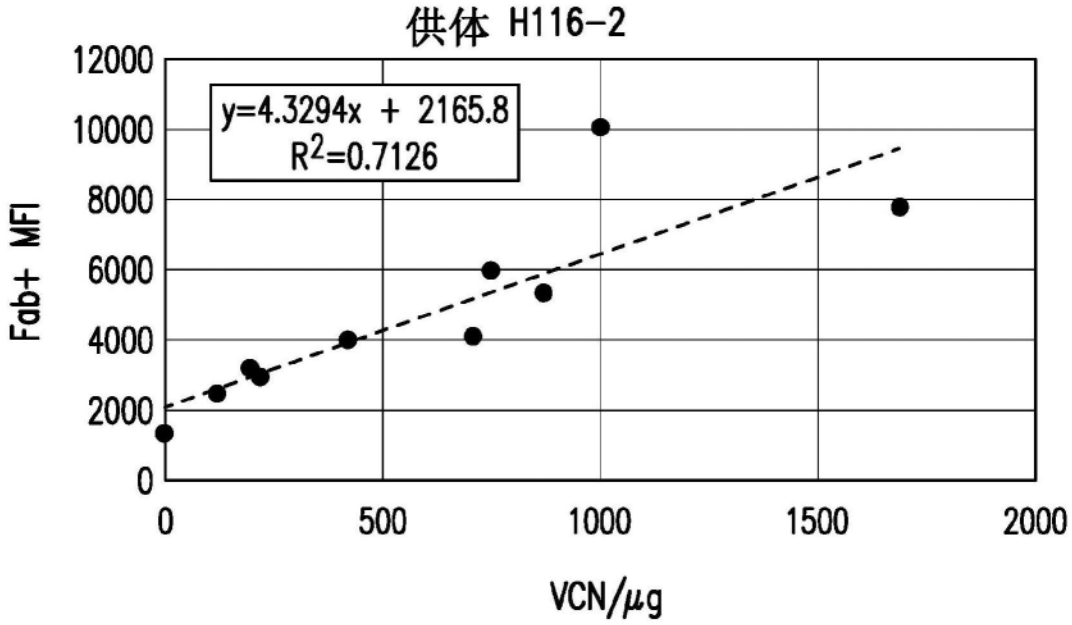

供体 H116-2
y=4.3294x + 2165.8
R2=0.7126
Fab+ MFI
VCN/μg
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
500
1000
1500
2000

图7C

供体	CD3+ Fab+	
	%	阳性的MFI
H116-2	62	4138
H18	57	5410
H19	64	3863

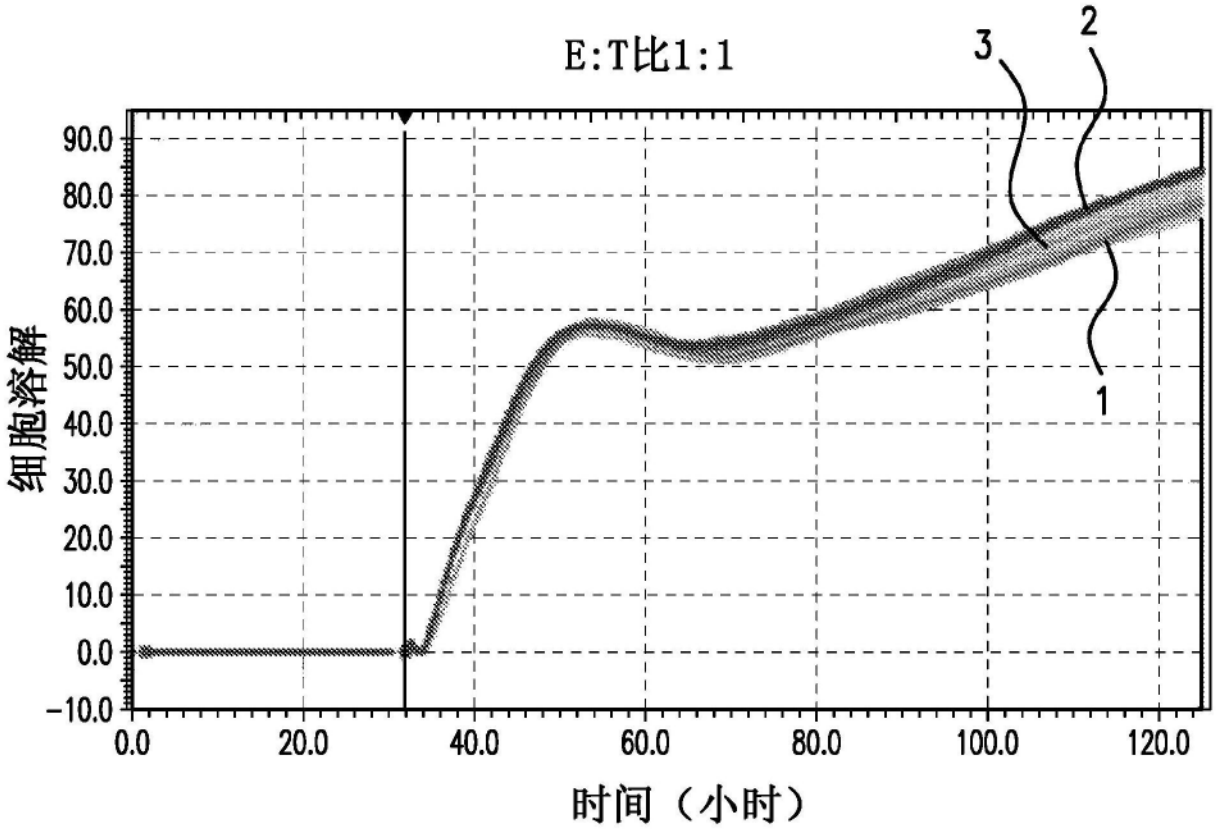


图8

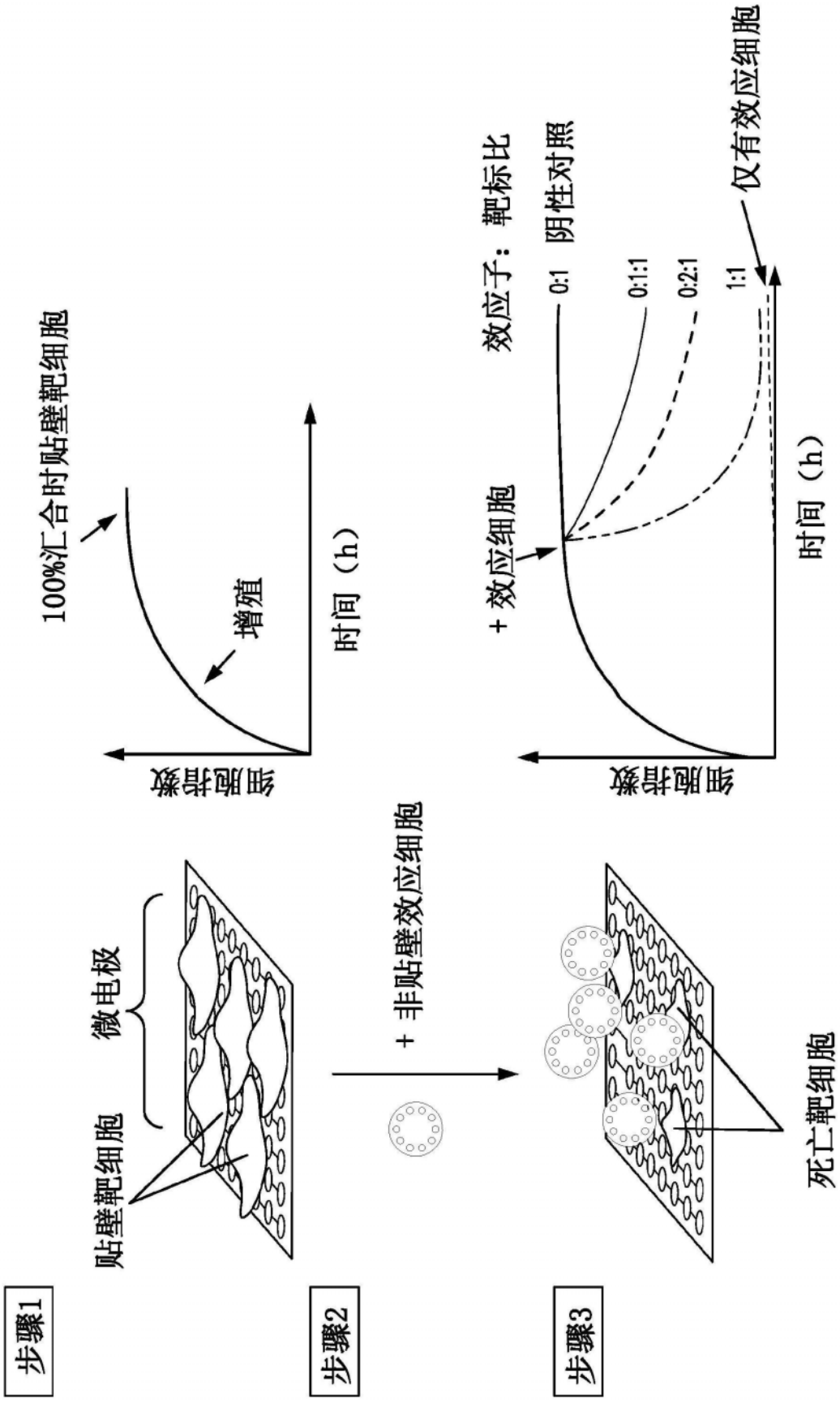

步骤1
贴壁靶细胞
微电极
步骤2
+ 非贴壁效应细胞
步骤3
死亡靶细胞
100%汇合时贴壁靶细胞
增殖
细胞指数
时间（h）
+ 效应细胞
效应子：靶标比
0:1 阴性对照
0:1:1
0:2:1
1:1
仅有效应细胞
细胞指数
时间（h）

图9

构建体

- mycM28z
- mycM28z1XX
- mycM28z-P2A-PD1DNR
- mycM28z1XX-P2A-PD1DNR

供体

- H19
- BC-O+

上清稀释度

构建体	选择的稀释度
mycM28z	1:4
mycM28z1XX	1:4
mycM28z-P2A-PD1DNR	1:7
mycM28z-P2A-PD1DNR	1:4

eCTL的靶标

- MGM（高MSLN）
- MGM –PDL1（高MSLN，高PDL1）
- MSTO-G（MSLN阴性）
- A549GM（高MSLN）
- A549G（低MSLN）

间皮瘤细胞系的E:T比

- 3:1
- 1:1
- 0.33:1

肺癌细胞系的E:T比

- 10:1
- 5:1
- 2:1

图10

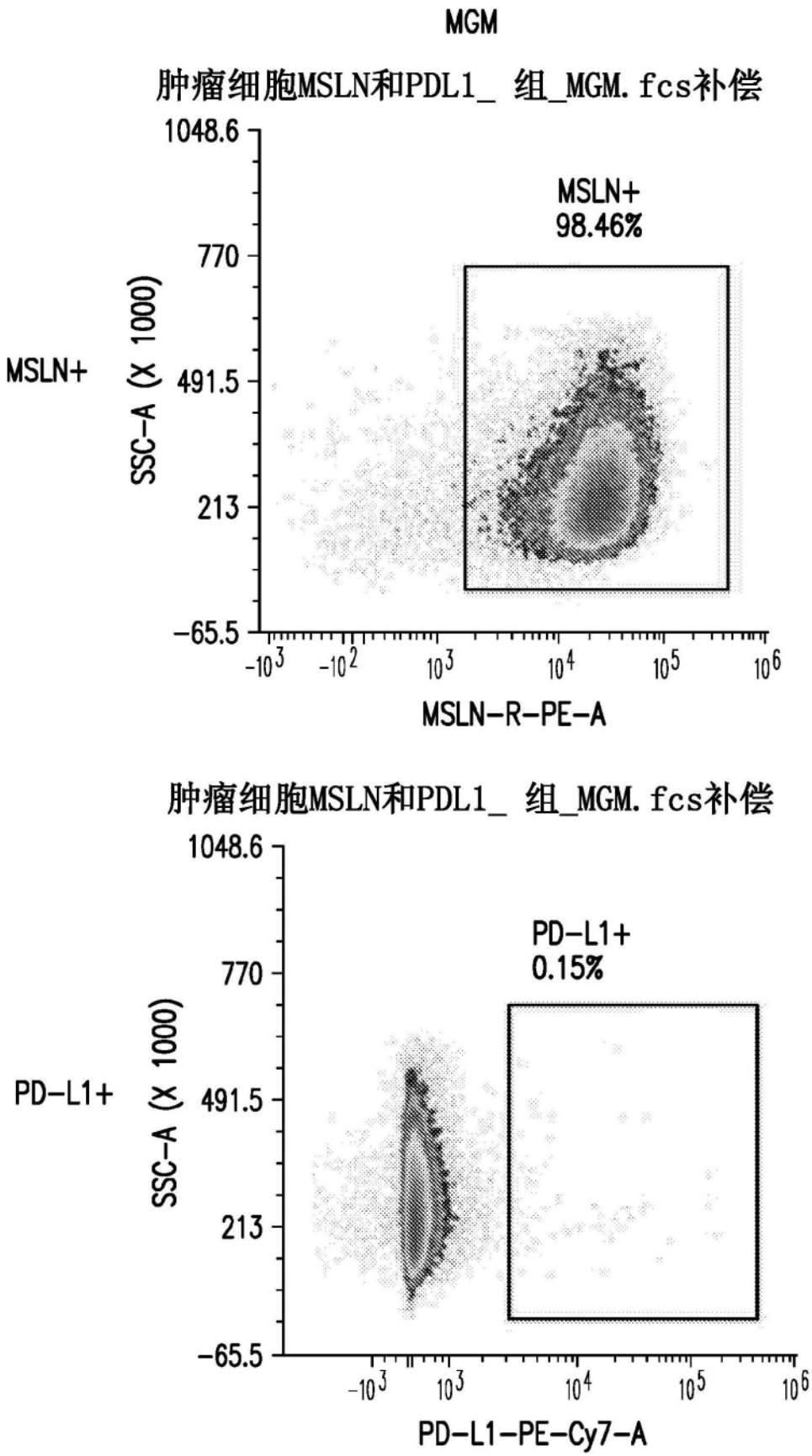

MGM
肿瘤细胞MSLN和PDL1_ 组_MGM.fcs补偿
MSLN+
98.46%
MSLN+
SSC-A (X 1000)
1048.6
770
491.5
213
-65.5
-10^3
-10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
MSLN-R-PE-A
肿瘤细胞MSLN和PDL1_ 组_MGM.fcs补偿
PD-L1+
0.15%
PD-L1+
SSC-A (X 1000)
1048.6
770
491.5
213
-65.5
-10^3
10^3
10^4
10^5
10^6
PD-L1-PE-Cy7-A

图11A

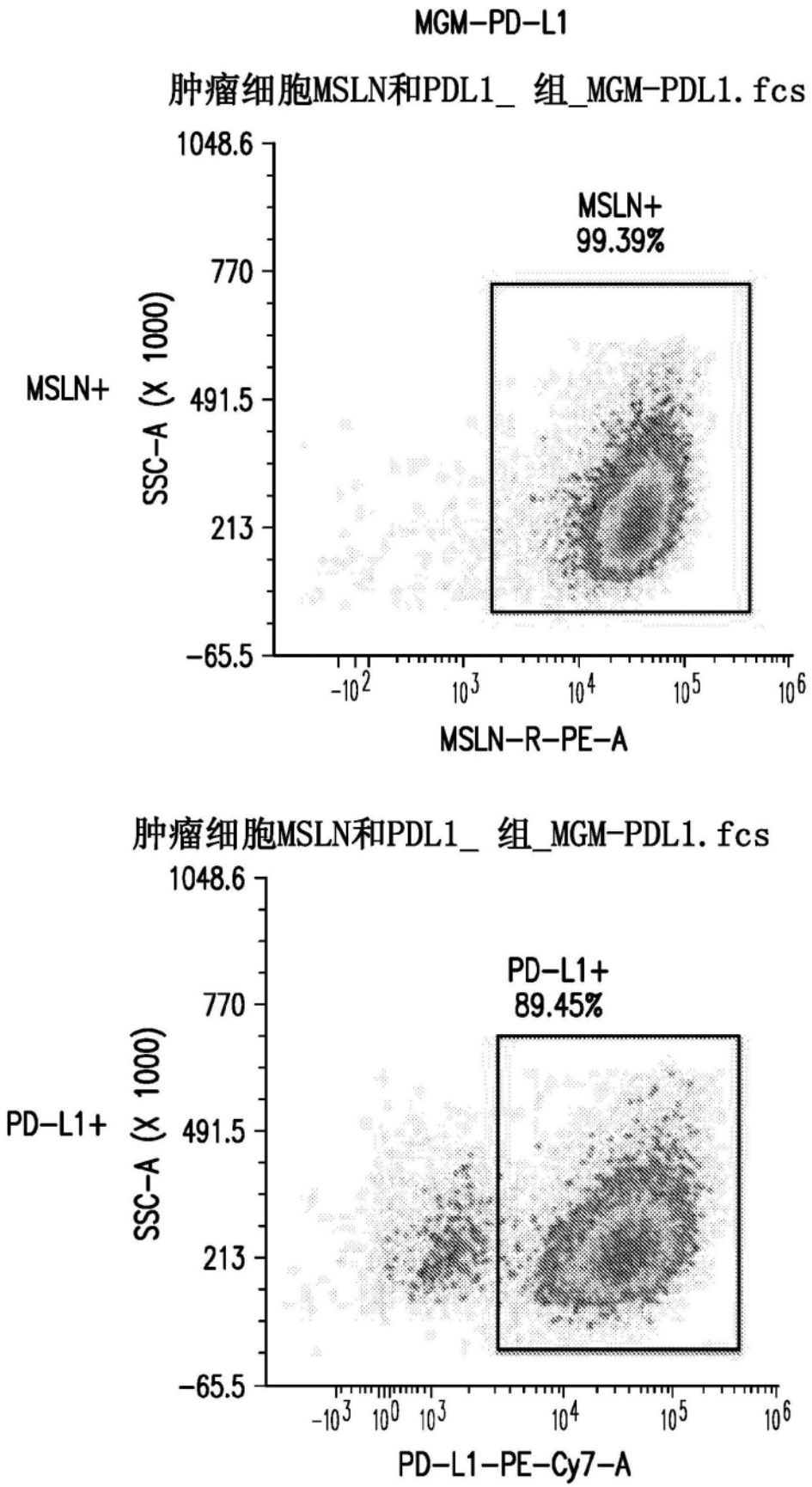

MGM-PD-L1
肿瘤细胞MSLN和PDL1_ 组_MGM-PDL1.fcs
MSLN+
99.39%
MSLN+
SSC-A (X 1000)
1048.6
770
491.5
213
-65.5
-10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
MSLN-R-PE-A
肿瘤细胞MSLN和PDL1_ 组_MGM-PDL1.fcs
PD-L1+
89.45%
PD-L1+
SSC-A (X 1000)
1048.6
770
491.5
213
-65.5
-10^3
10^0
10^3
10^4
10^5
10^6
PD-L1-PE-Cy7-A

图11B

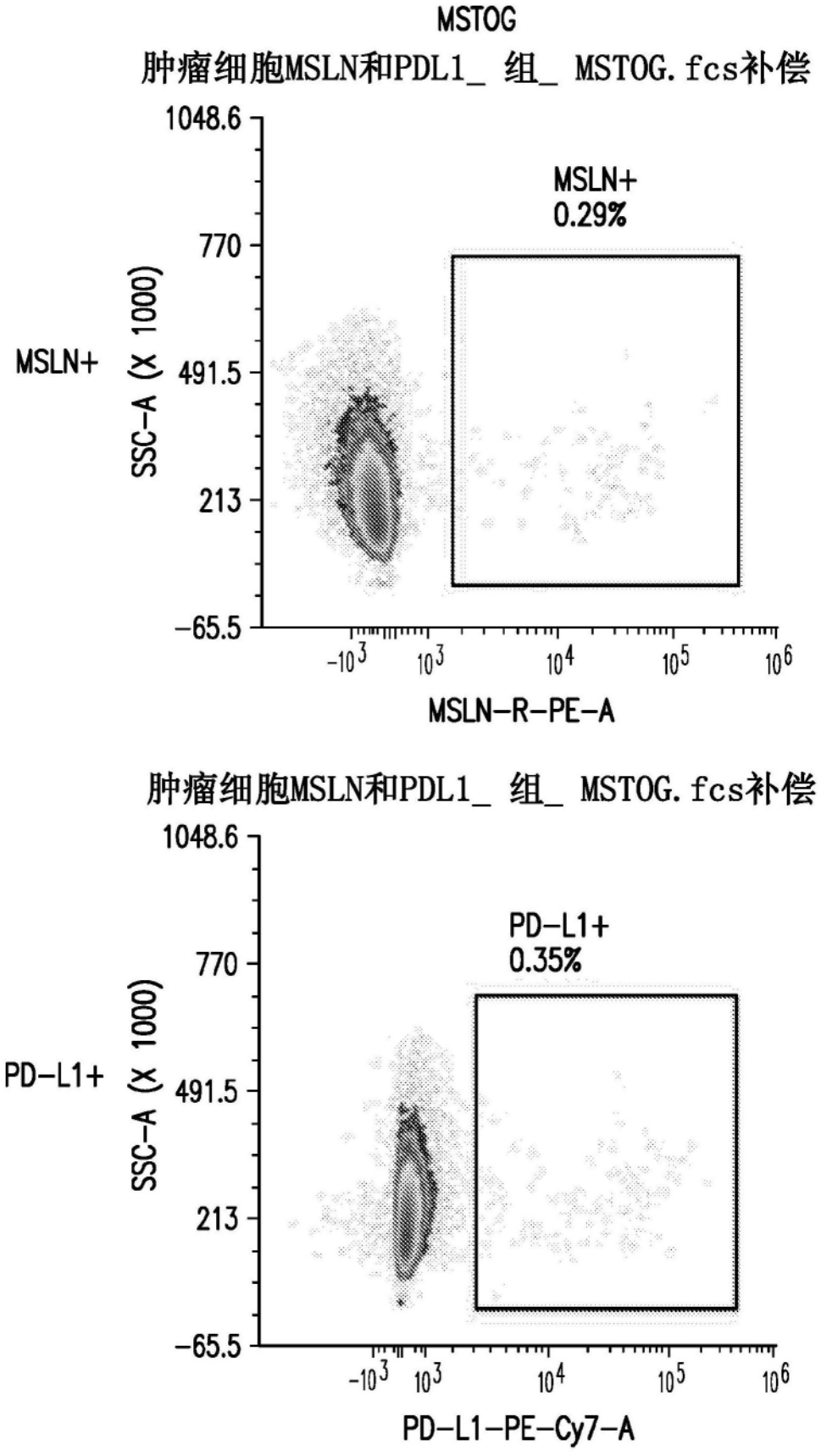

MSTOG
肿瘤细胞MSLN和PDL1_ 组_ MSTOG.fcs补偿
MSLN+
0.29%
MSLN+
SSC-A (X 1000)
1048.6
770
491.5
213
-65.5
-10^3
10^3
10^4
10^5
10^6
MSLN-R-PE-A
肿瘤细胞MSLN和PDL1_ 组_ MSTOG.fcs补偿
PD-L1+
0.35%
PD-L1+
SSC-A (X 1000)
1048.6
770
491.5
213
-65.5
-10^3
10^3
10^4
10^5
10^6
PD-L1-PE-Cy7-A

图11C

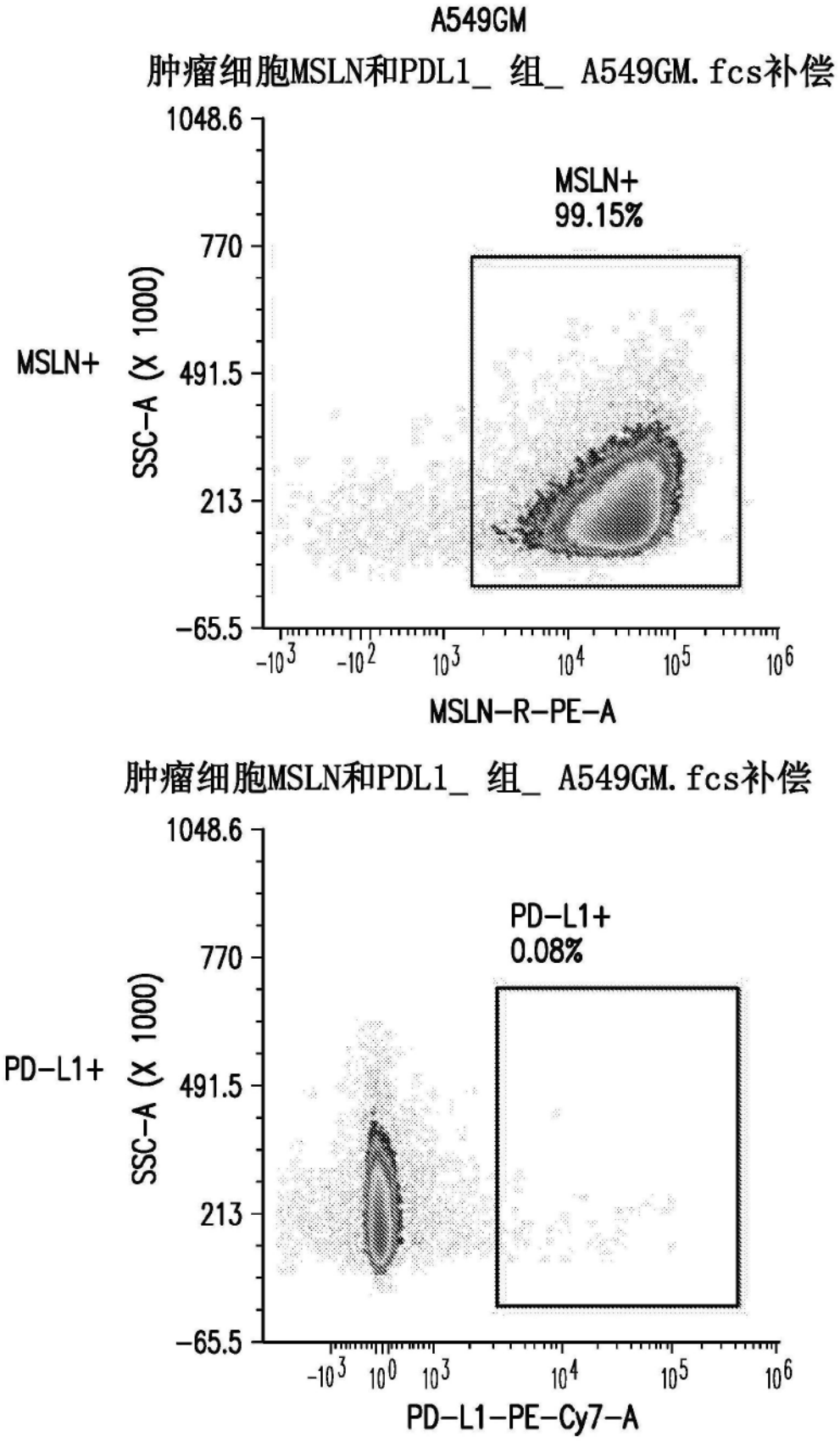

A549GM
肿瘤细胞MSLN和PDL1_ 组_ A549GM.fcs补偿
MSLN+
99.15%
MSLN+
SSC-A (X 1000)
1048.6
770
491.5
213
-65.5
-10^3
-10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
MSLN-R-PE-A
肿瘤细胞MSLN和PDL1_ 组_ A549GM.fcs补偿
PD-L1+
0.08%
PD-L1+
SSC-A (X 1000)
1048.6
770
491.5
213
-65.5
-10^3
10^0
10^3
10^4
10^5
10^6
PD-L1-PE-Cy7-A

图11D

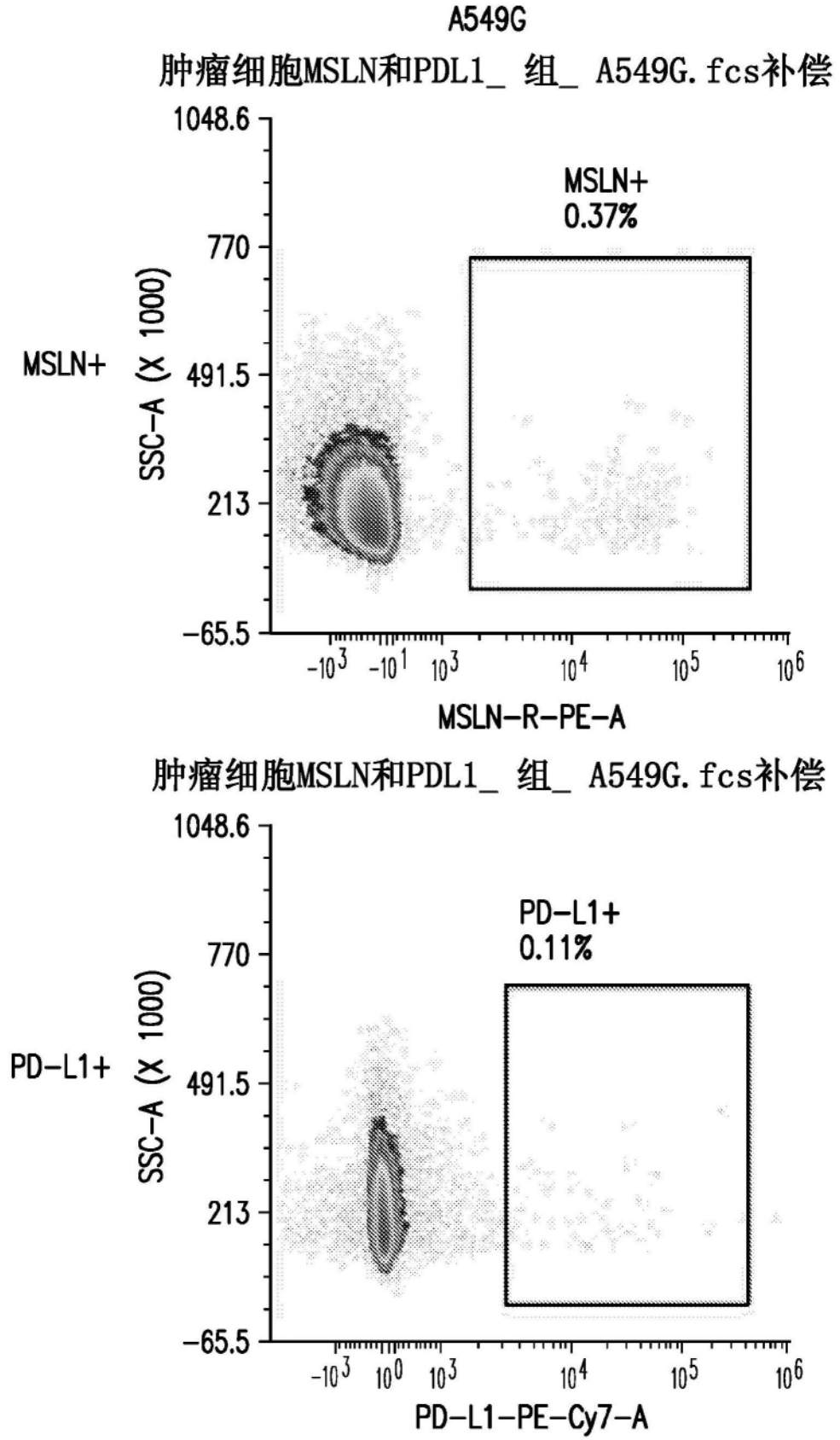

A549G
肿瘤细胞MSLN和PDL1_ 组_ A549G.fcs补偿
MSLN+
0.37%
MSLN+
SSC-A (X 1000)
1048.6
770
491.5
213
-65.5
-10^3
-10^1
10^3
10^4
10^5
10^6
MSLN-R-PE-A
肿瘤细胞MSLN和PDL1_ 组_ A549G.fcs补偿
PD-L1+
0.11%
PD-L1+
SSC-A (X 1000)
1048.6
770
491.5
213
-65.5
-10^3
10^0
10^3
10^4
10^5
10^6
PD-L1-PE-Cy7-A

图11E

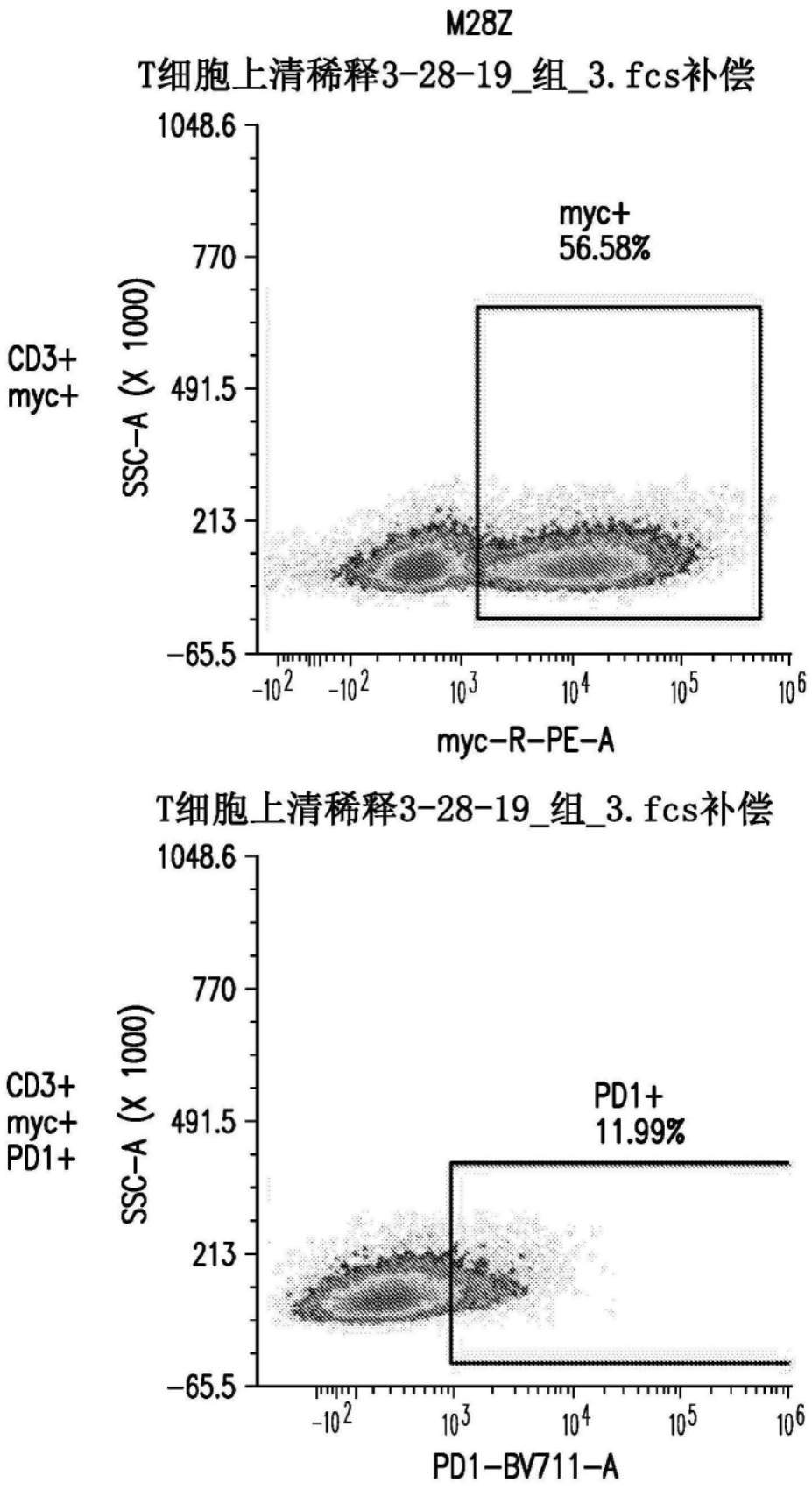

M28Z
T细胞上清稀释3-28-19_组_3.fcs补偿
CD3+
myc+
myc+
56.58%
SSC-A (X 1000)
1048.6
770
491.5
213
-65.5
-10^2
-10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
myc-R-PE-A
T细胞上清稀释3-28-19_组_3.fcs补偿
CD3+
myc+
PD1+
PD1+
11.99%
SSC-A (X 1000)
PD1-BV711-A

图12A

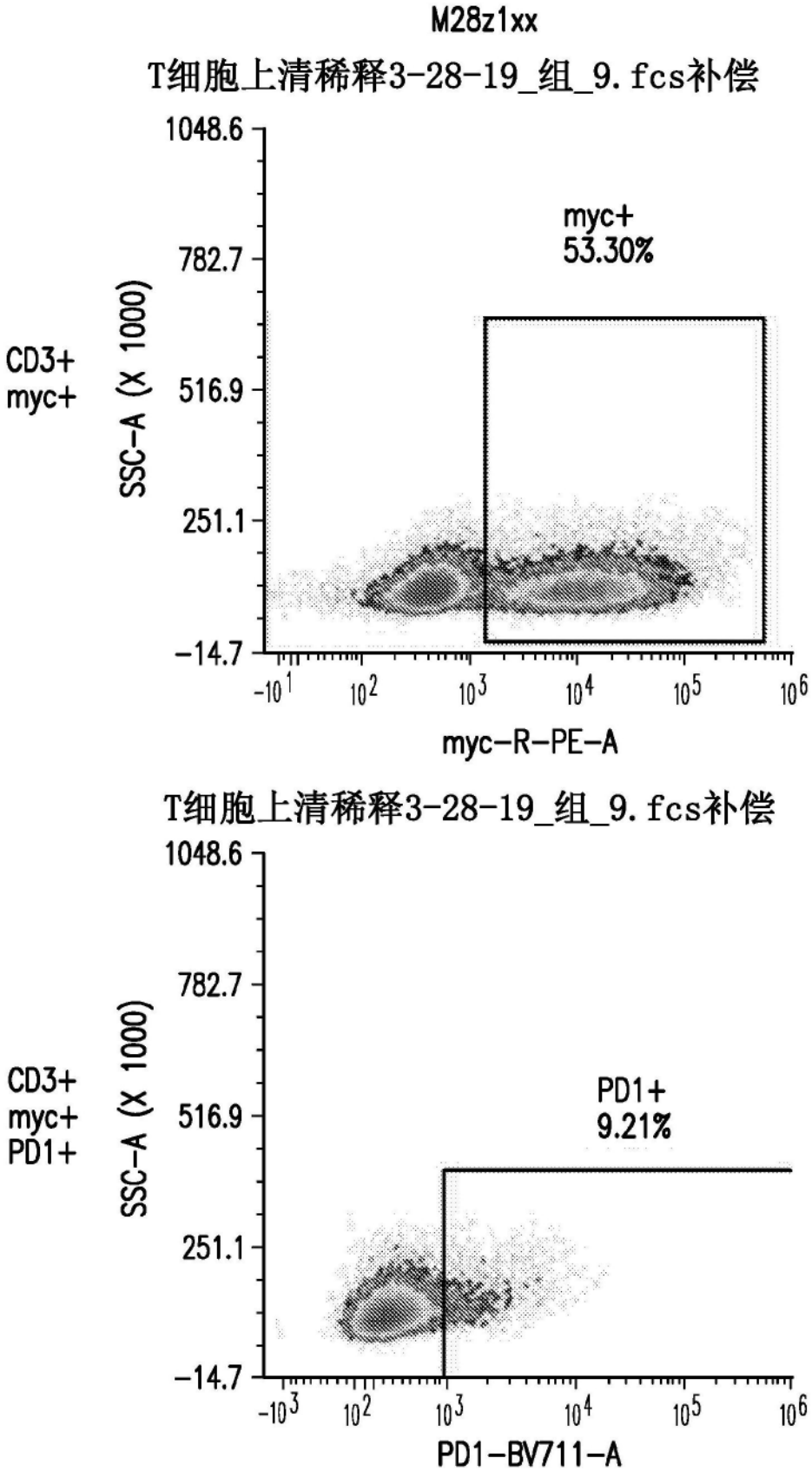

M28z1xx
T细胞上清稀释3-28-19_组_9.fcs补偿
1048.6
782.7
516.9
251.1
-14.7
SSC-A (X 1000)
CD3+
myc+
myc+
53.30%
-10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
myc-R-PE-A
T细胞上清稀释3-28-19_组_9.fcs补偿
1048.6
782.7
516.9
251.1
-14.7
SSC-A (X 1000)
CD3+
myc+
PD1+
PD1+
9.21%
-10^3
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PD1-BV711-A

图12B

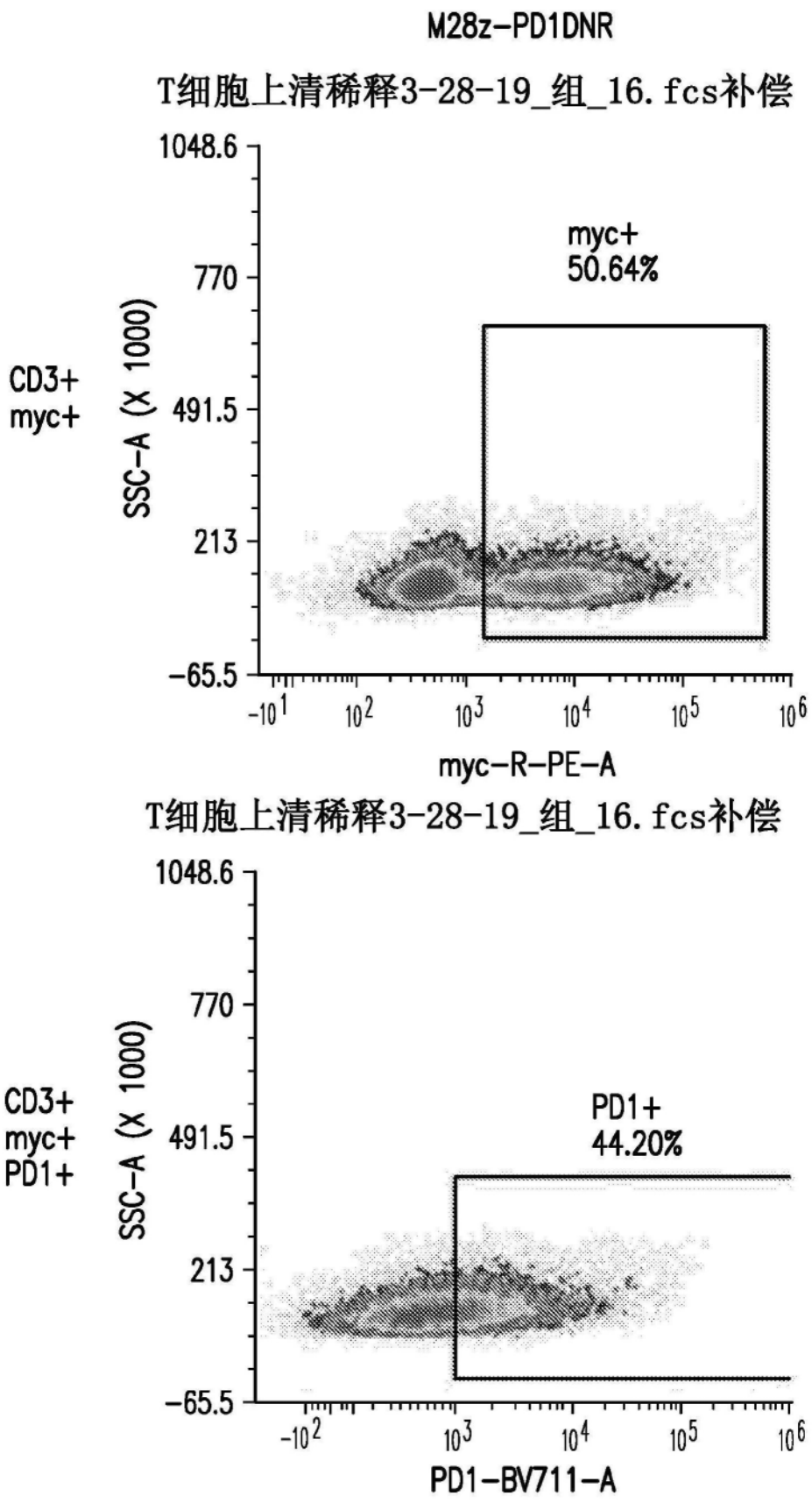

M28z-PD1DNR
T细胞上清稀释3-28-19_组_16.fcs补偿
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (X 1000)
CD3+
myc+
myc+
50.64%
-10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
myc-R-PE-A
T细胞上清稀释3-28-19_组_16.fcs补偿
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (X 1000)
CD3+
myc+
PD1+
PD1+
44.20%
-10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PD1-BV711-A

图12C

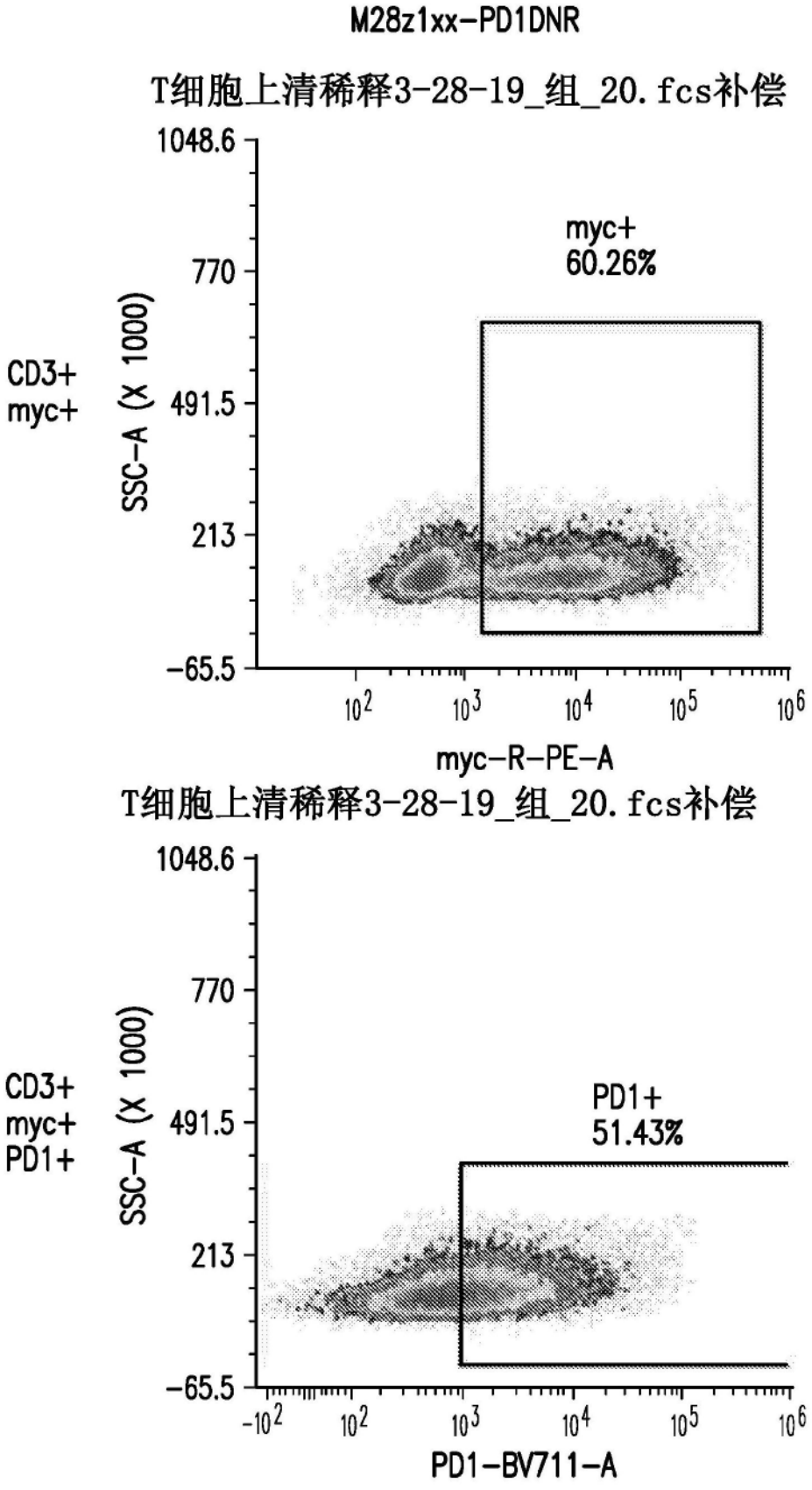

M28z1xx-PD1DNR
T细胞上清稀释3-28-19_组_20.fcs补偿
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (X 1000)
CD3+
myc+
myc+
60.26%
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
myc-R-PE-A
T细胞上清稀释3-28-19_组_20.fcs补偿
1048.6
770
491.5
213
-65.5
SSC-A (X 1000)
CD3+
myc+
PD1+
PD1+
51.43%
-10^2
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PD1-BV711-A

图12D

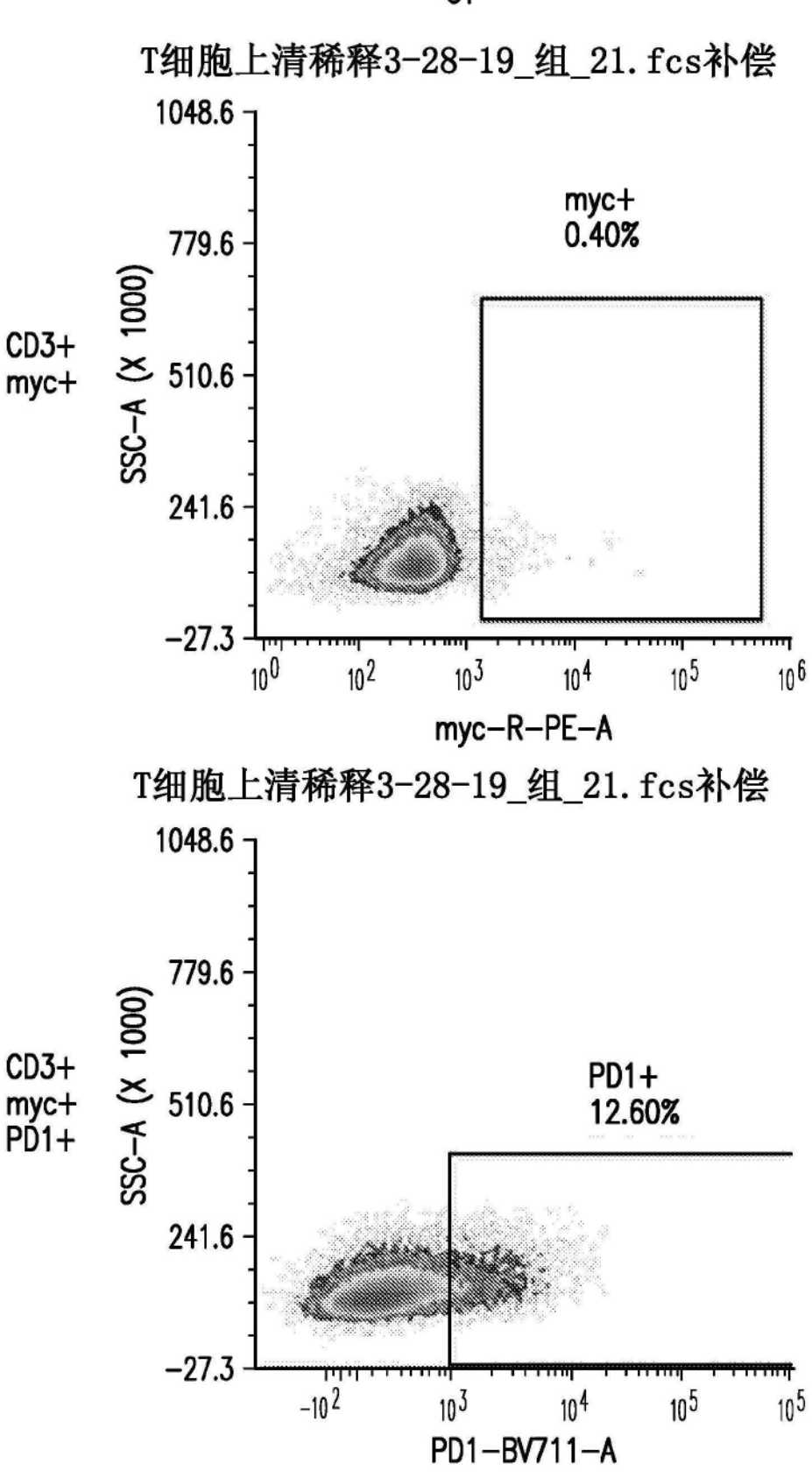

UT
T细胞上清稀释3-28-19_组_21.fcs补偿
1048.6
779.6
510.6
241.6
-27.3
CD3+
myc+
SSC-A (X 1000)
myc+
0.40%
10^0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
myc-R-PE-A
T细胞上清稀释3-28-19_组_21.fcs补偿
1048.6
779.6
510.6
241.6
-27.3
CD3+
myc+
PD1+
SSC-A (X 1000)
PD1+
12.60%
-10^2
10^3
10^4
10^5
10^5
PD1-BV711-A

图12E

高MSLN（MGM）-E:T比 3:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

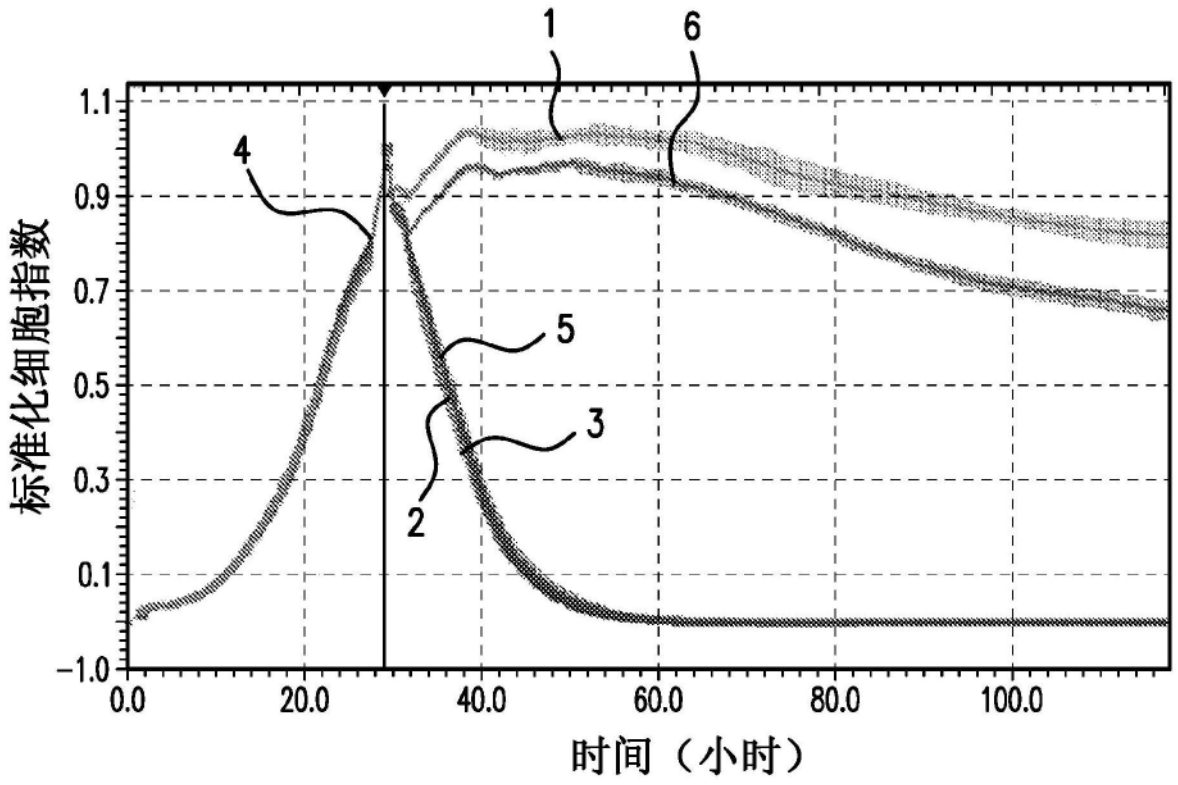


图13A

高MSLN（MGM）-E:T比 1:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

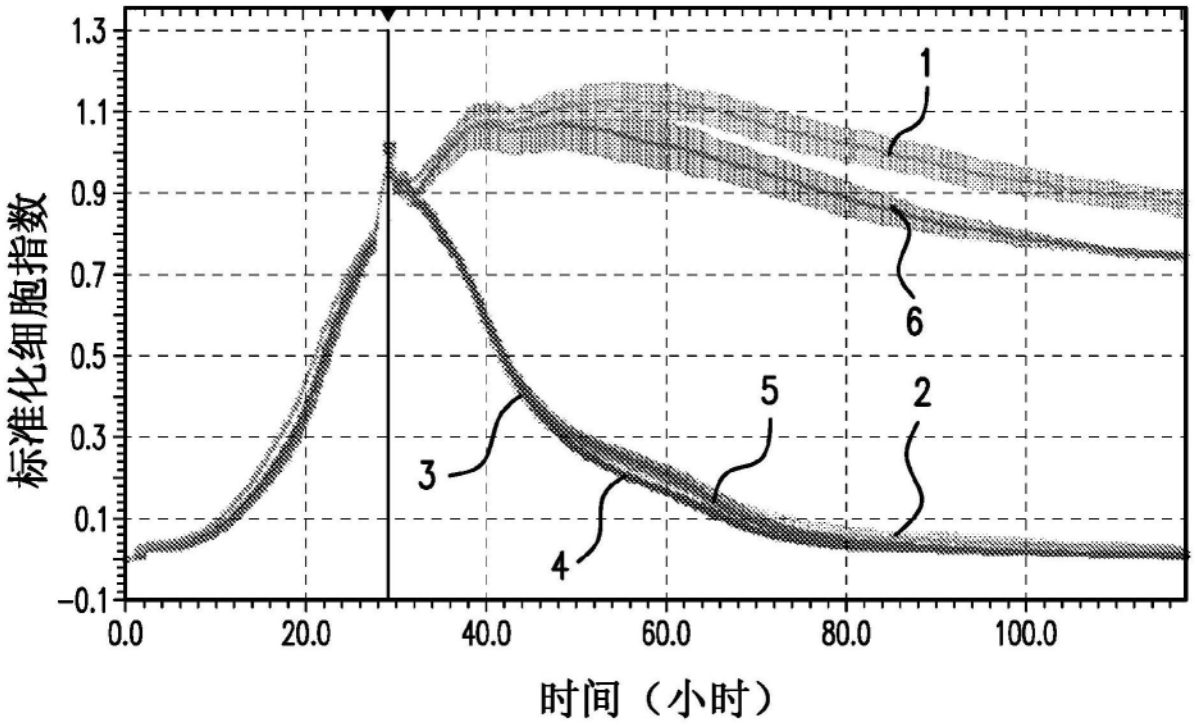


图13B

高MSLN（MGM）-E:T比 0.33:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

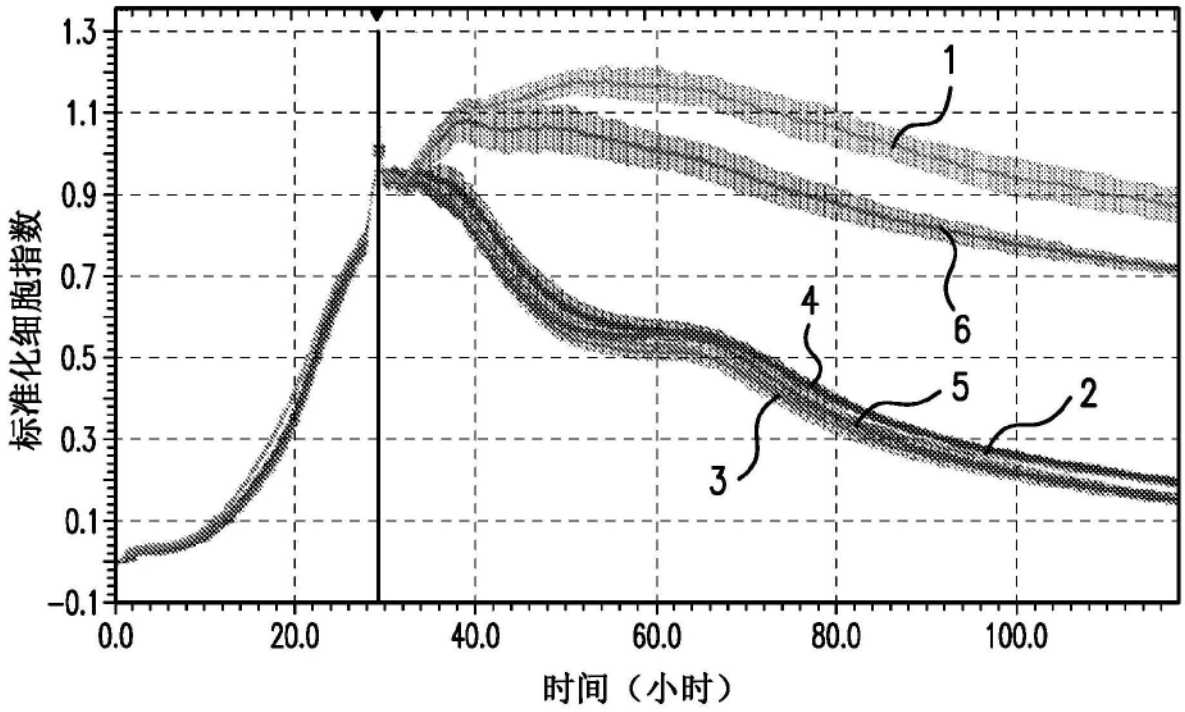


图13C

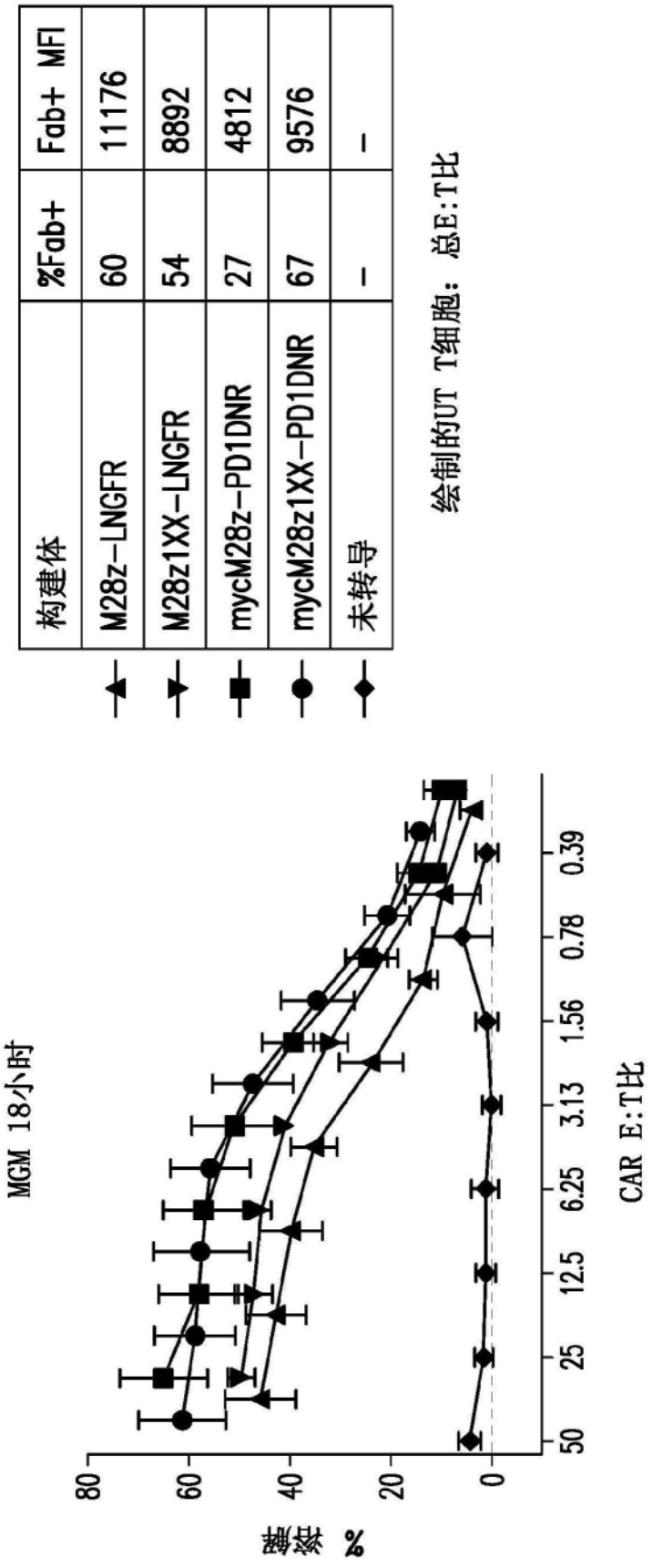

构建体
%Fab+
Fab+ MFI
M28z-LNGFR
60
11176
M28z1XX-LNGFR
54
8892
mycM28z-PD1DNR
27
4812
mycM28z1XX-PD1DNR
67
9576
未转导
–
–
绘制的UT T细胞：总E:T比
MGM 18小时
% 溶解
80
60
40
20
0
50
25
12.5
6.25
3.13
1.56
0.78
0.39
CAR E:T比

图14

MSLN阴性（MSTOG）-E:T比3:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

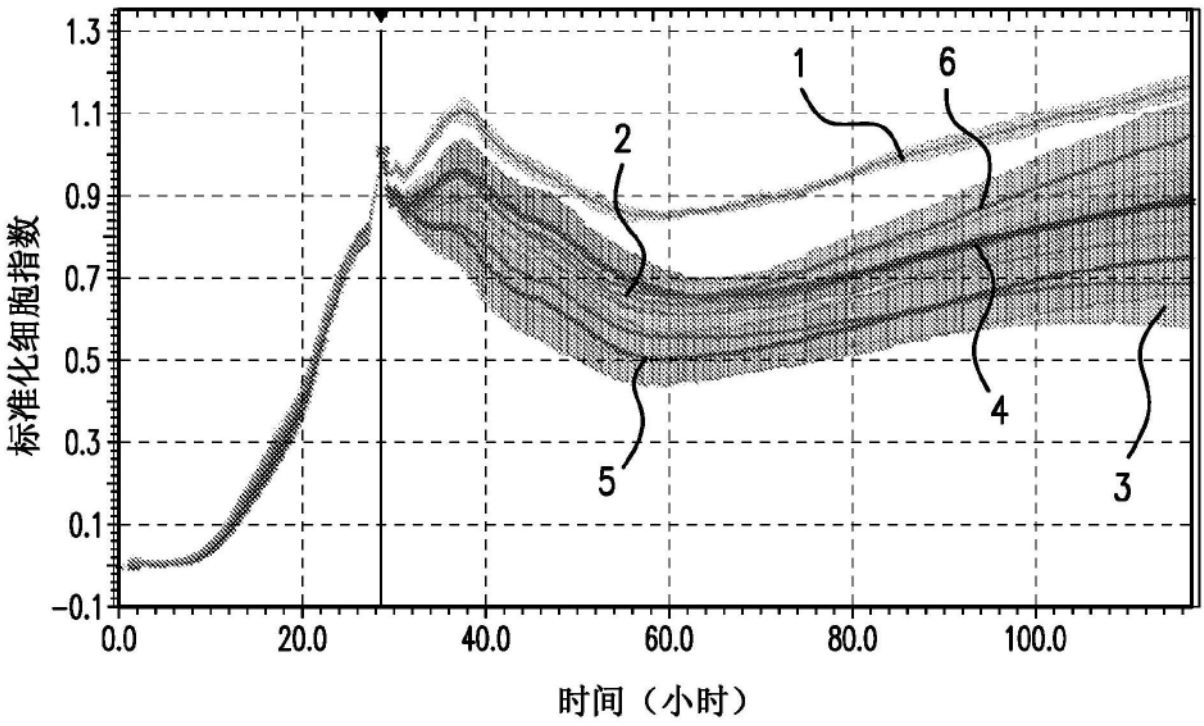


图15A

MSLN阴性（MSTOG）-E:T比1:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

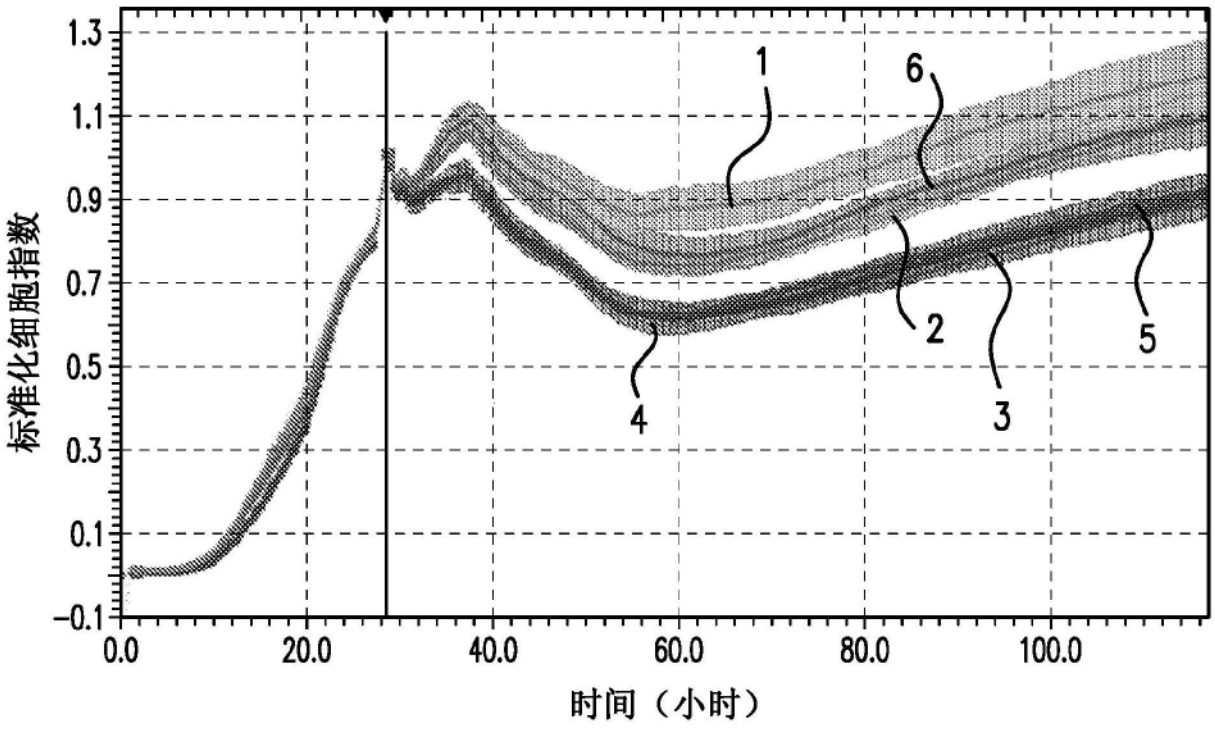


图15B

MSLN阴性（MSTOG）-E:T比0.33:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

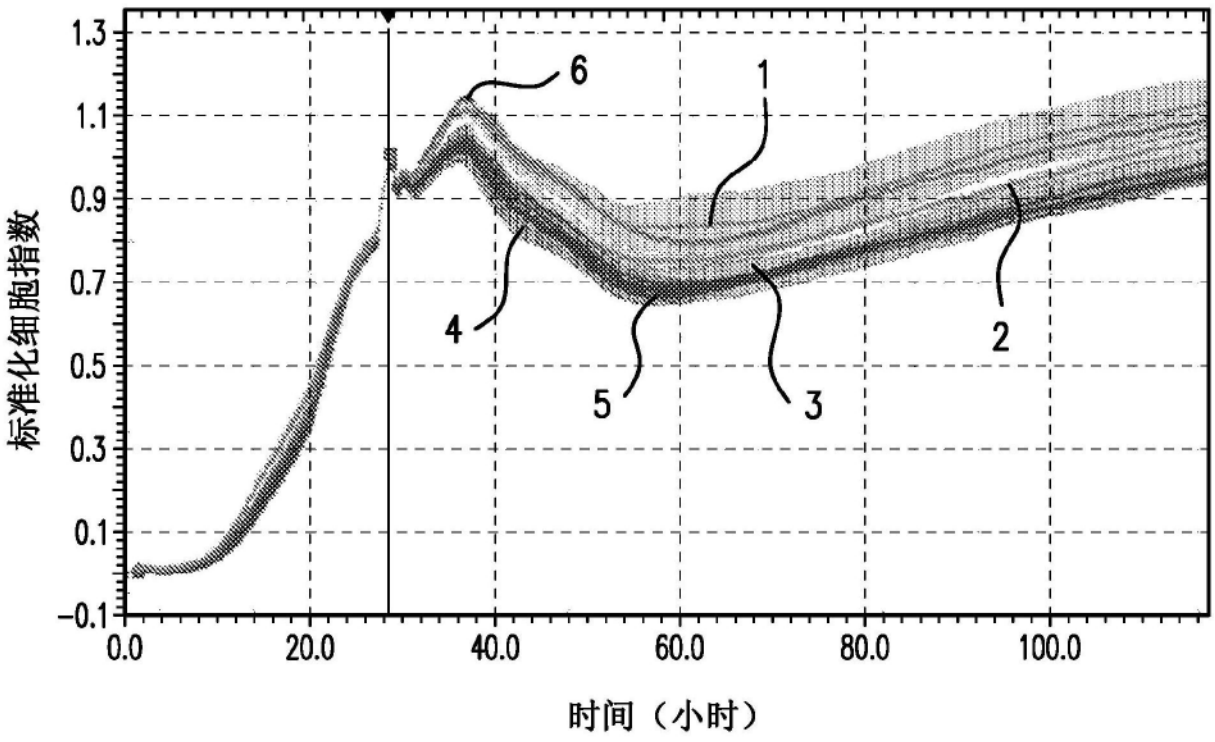


图15C

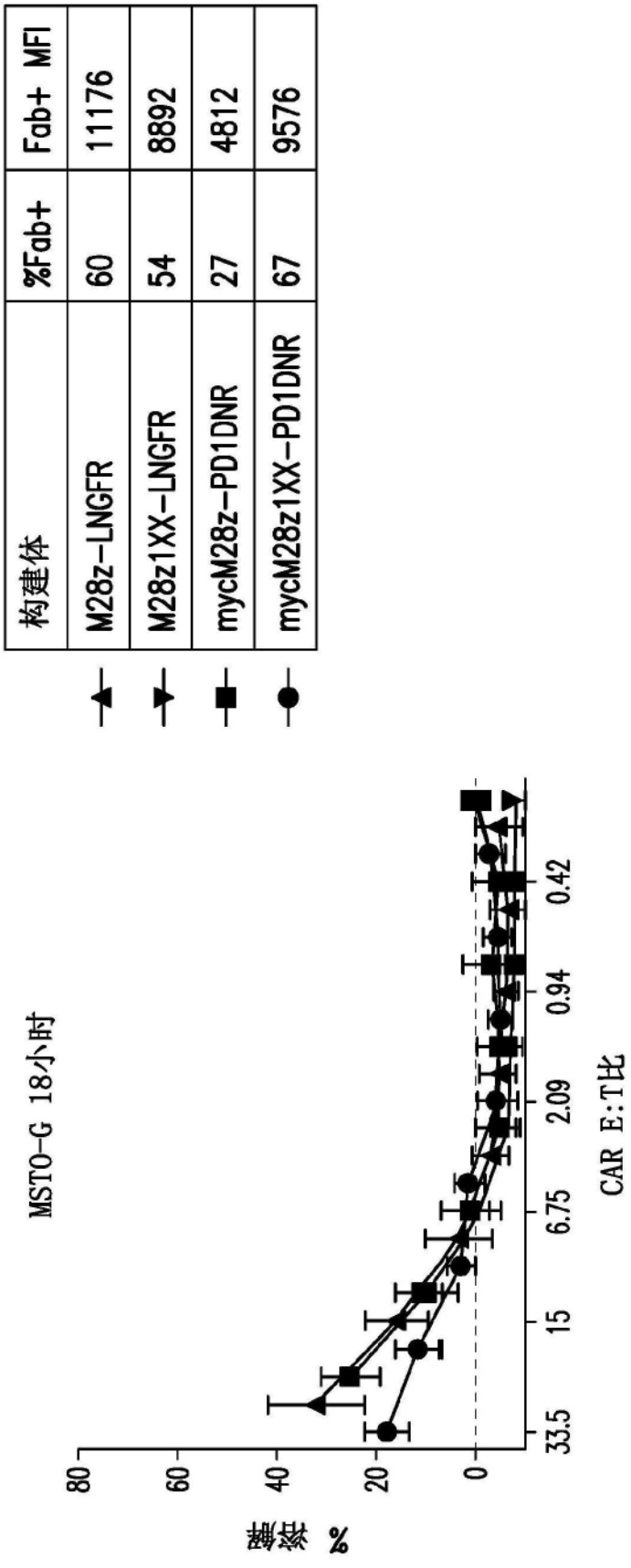

构建体 %Fab+ Fab+ MFI
M28z-LNGFR 60 11176
M28z1XX-LNGFR 54 8892
mycM28z-PD1DNR 27 4812
mycM28z1XX-PD1DNR 67 9576
MSTO-G 18小时
% 溶解
80
60
40
20
0
33.5
15
6.75
2.09
0.94
0.42
CAR E:T比

图16

高MSLN和PD-L1（MGM-PDL1）-E:T比3:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

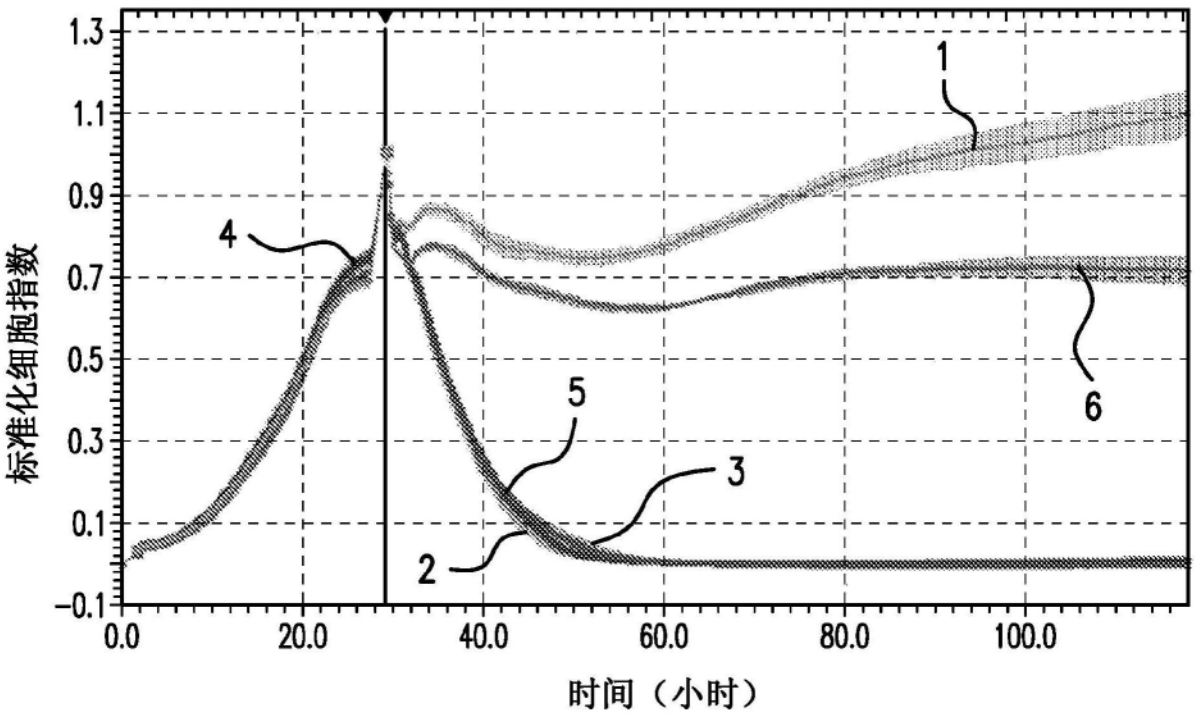


图17A

高MSLN和PD-L1（MGM-PDL1）-E:T比1:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

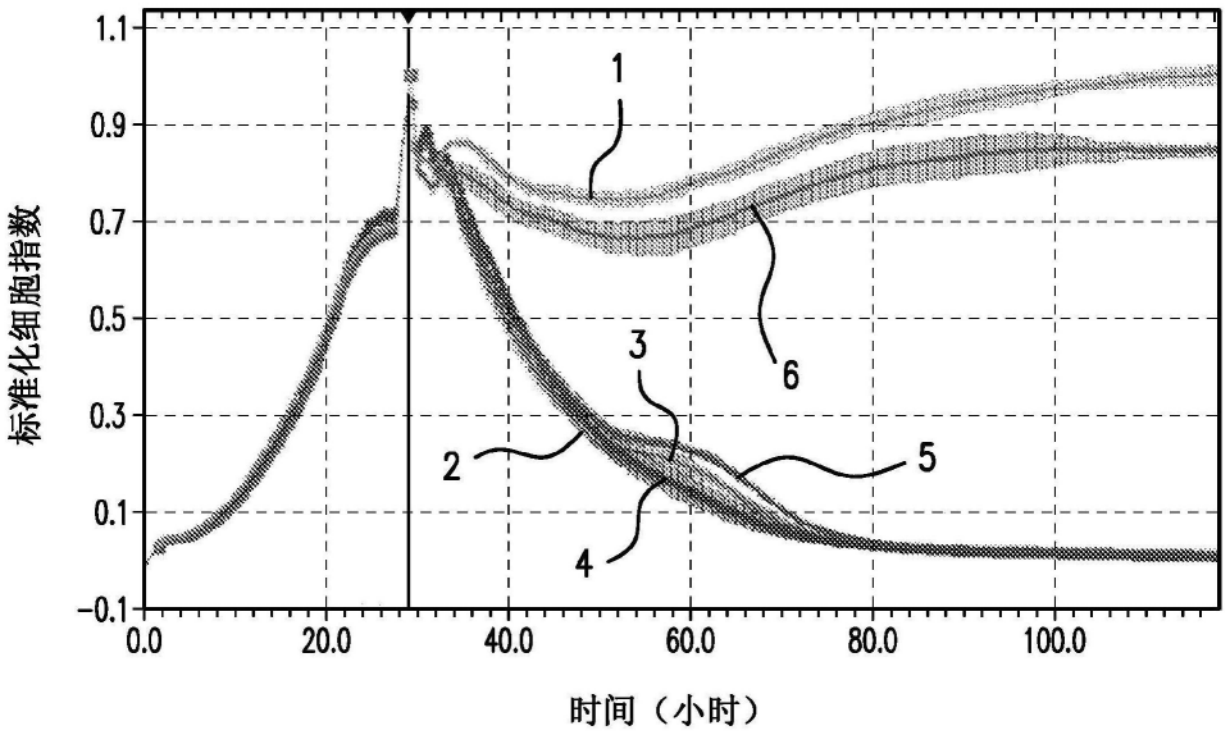


图17B

高MSLN和PD-L1（MGM-PDL1）-E:T比0.33:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

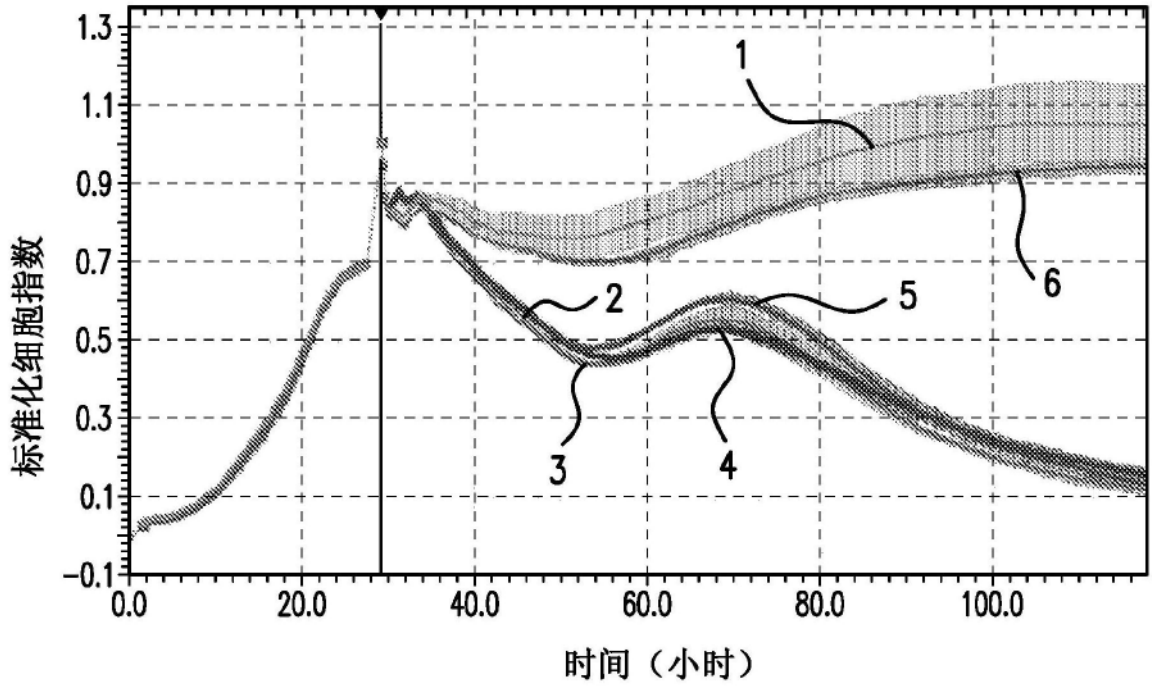


图17C

高MSLN（A549GM）-E:T比10:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

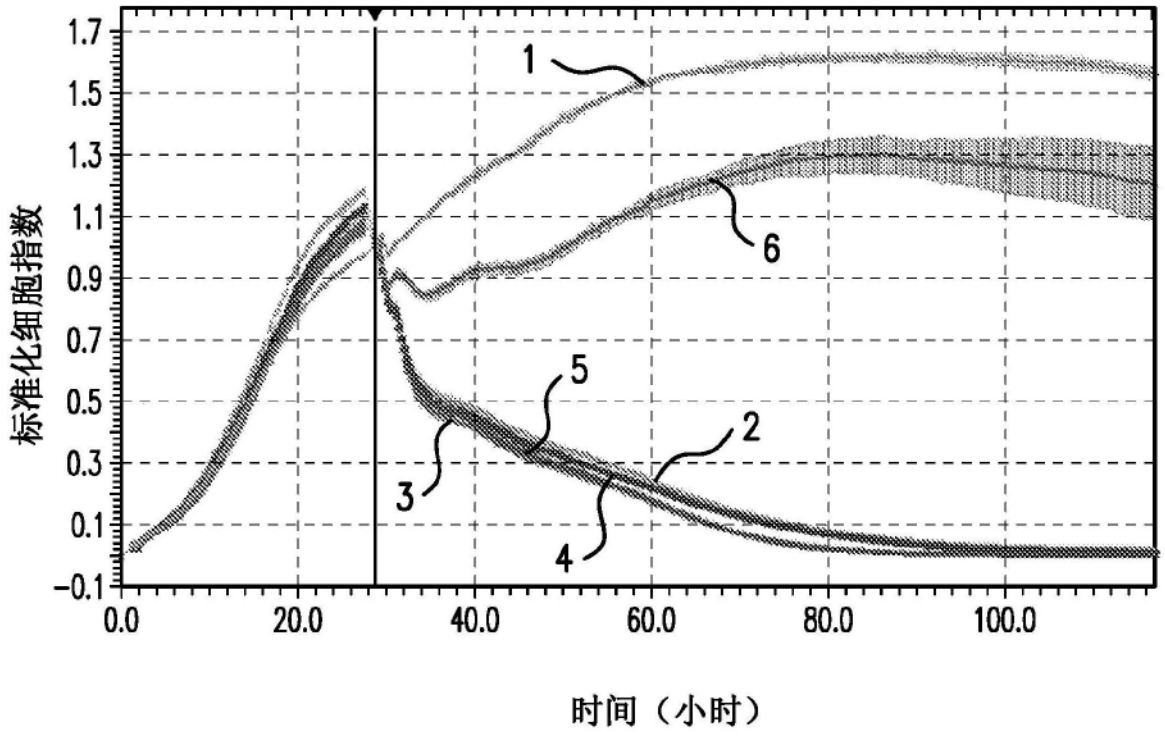


图18A

高MSLN（A549GM）-E:T比5:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

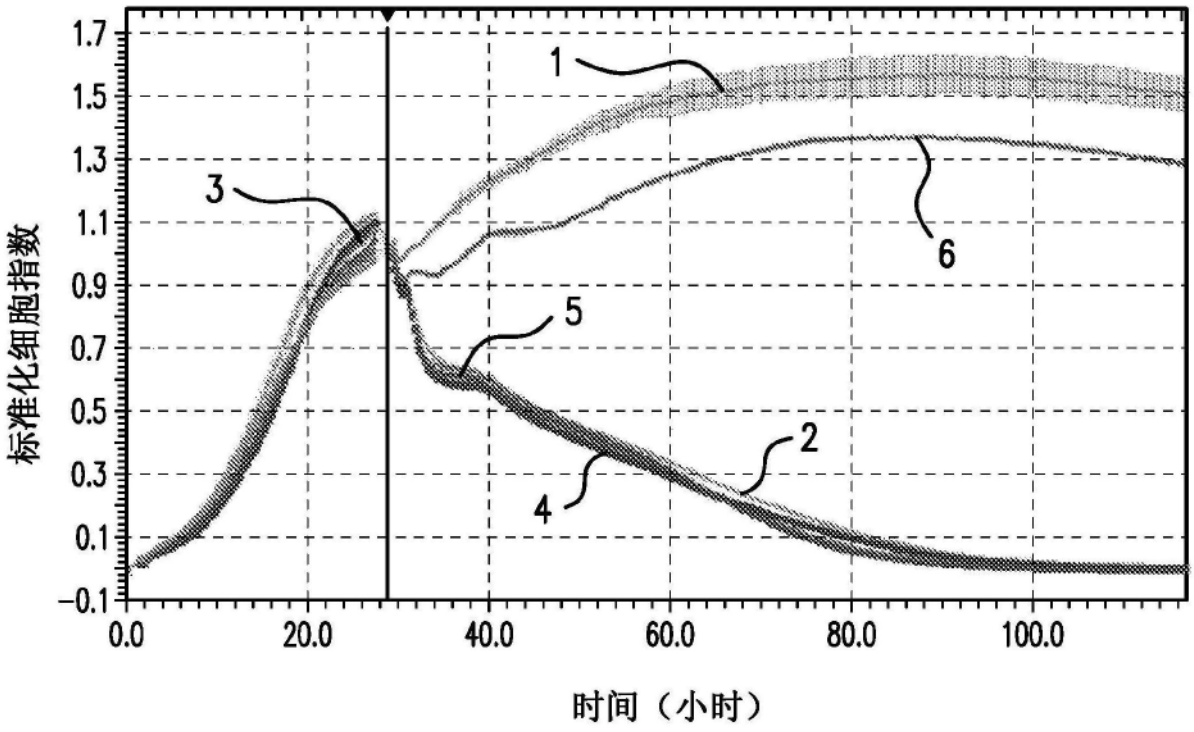


图18B

高MSLN（A549GM）-E:T比2:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

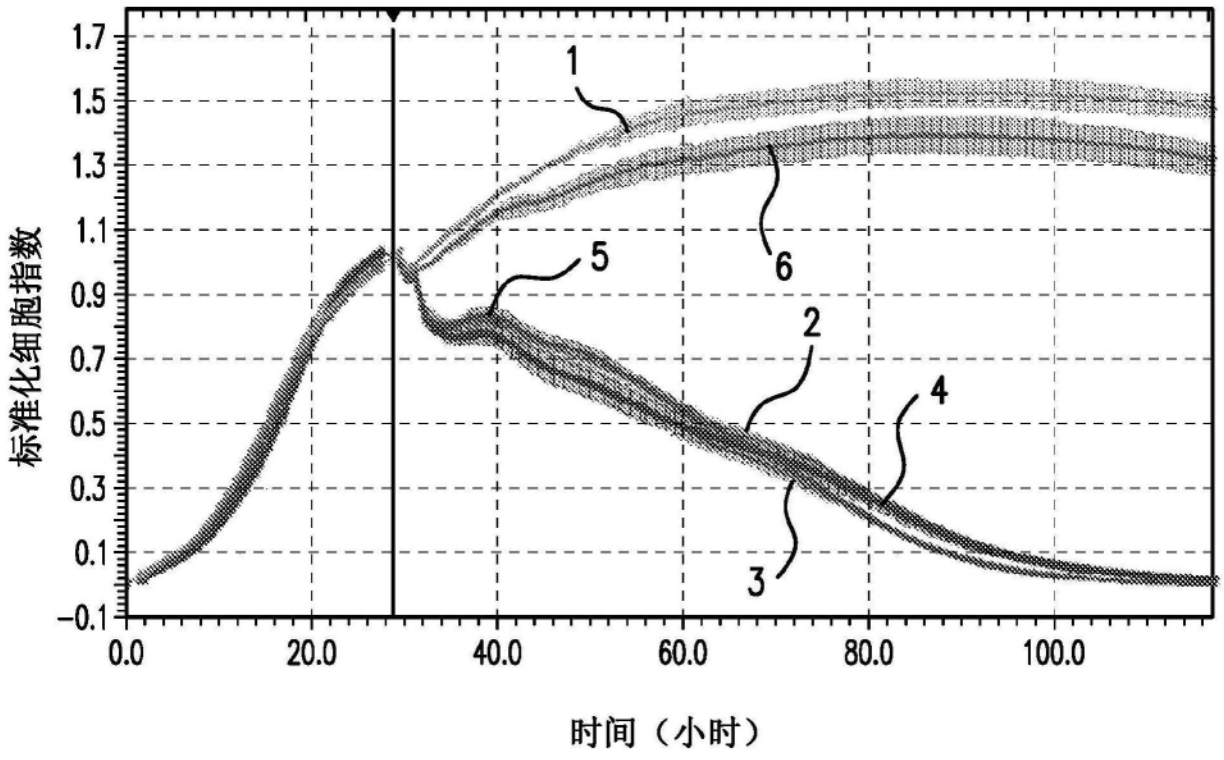


图18C

低MSLN（A549G）-E:T比10:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

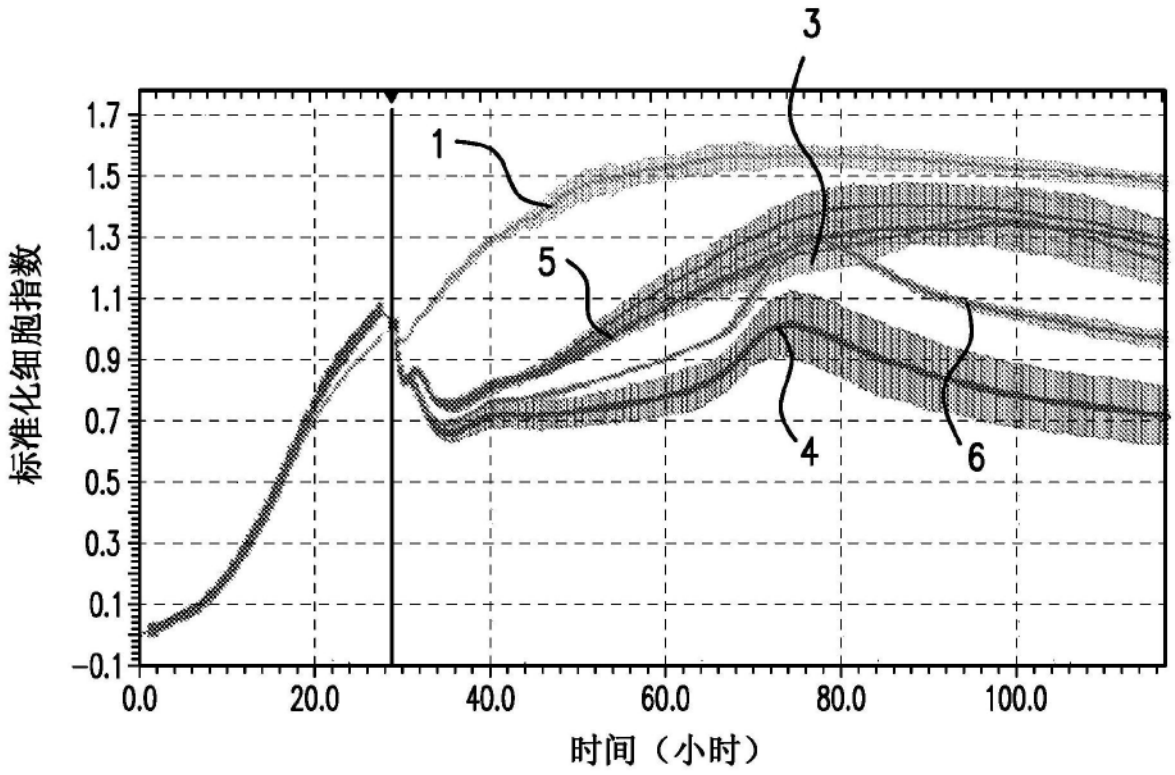


图19A

低MSLN（A549G）-E:T比5:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

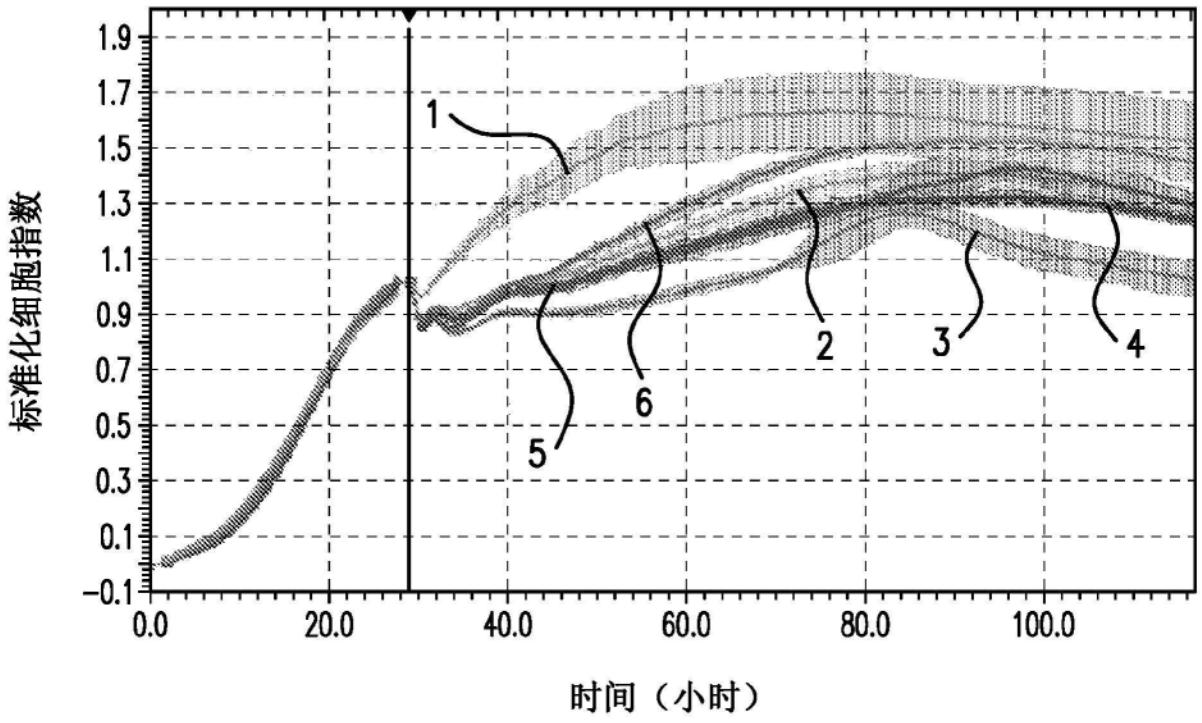


图19B

低MSLN（A549G）-E:T比2:1

构建体	%myc+	Myc+ MFI	
仅肿瘤	–	–	1
M28z	57	11612	2
M28z1XX	53	10648	3
M28z-PD1DNR	51	6948	4
M28z1XX-PD1DNR	60	8377	5
未转导	–	–	6

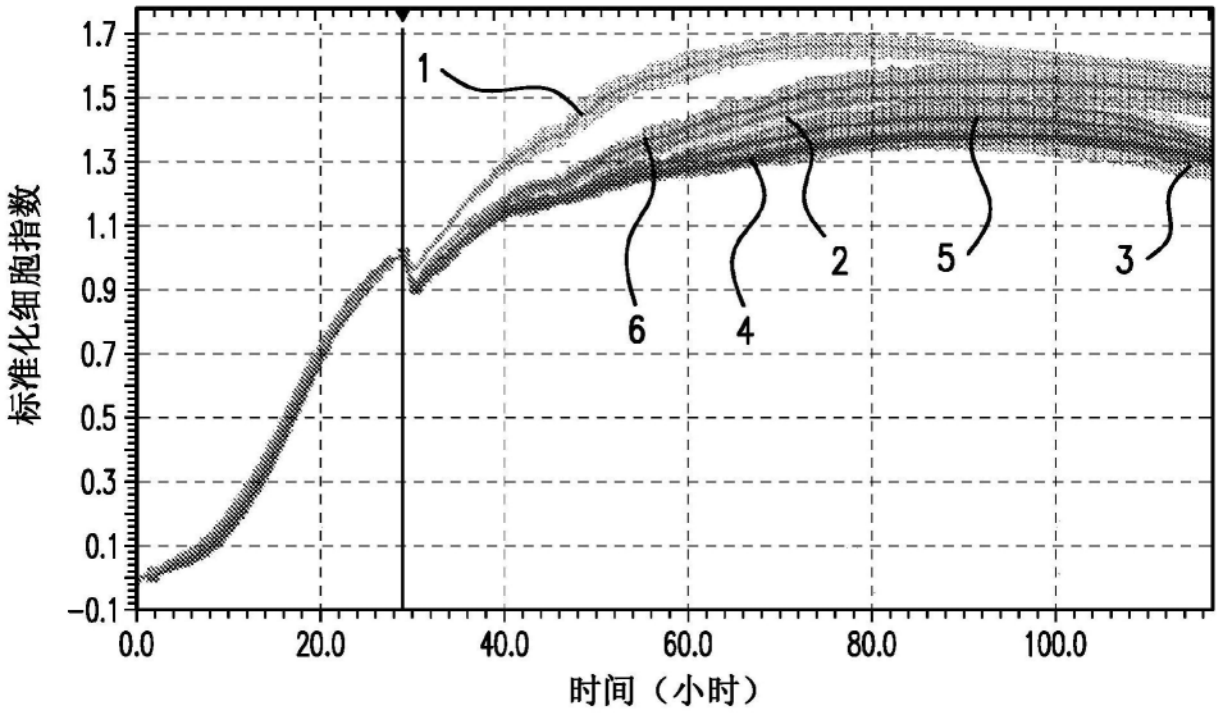


图19C

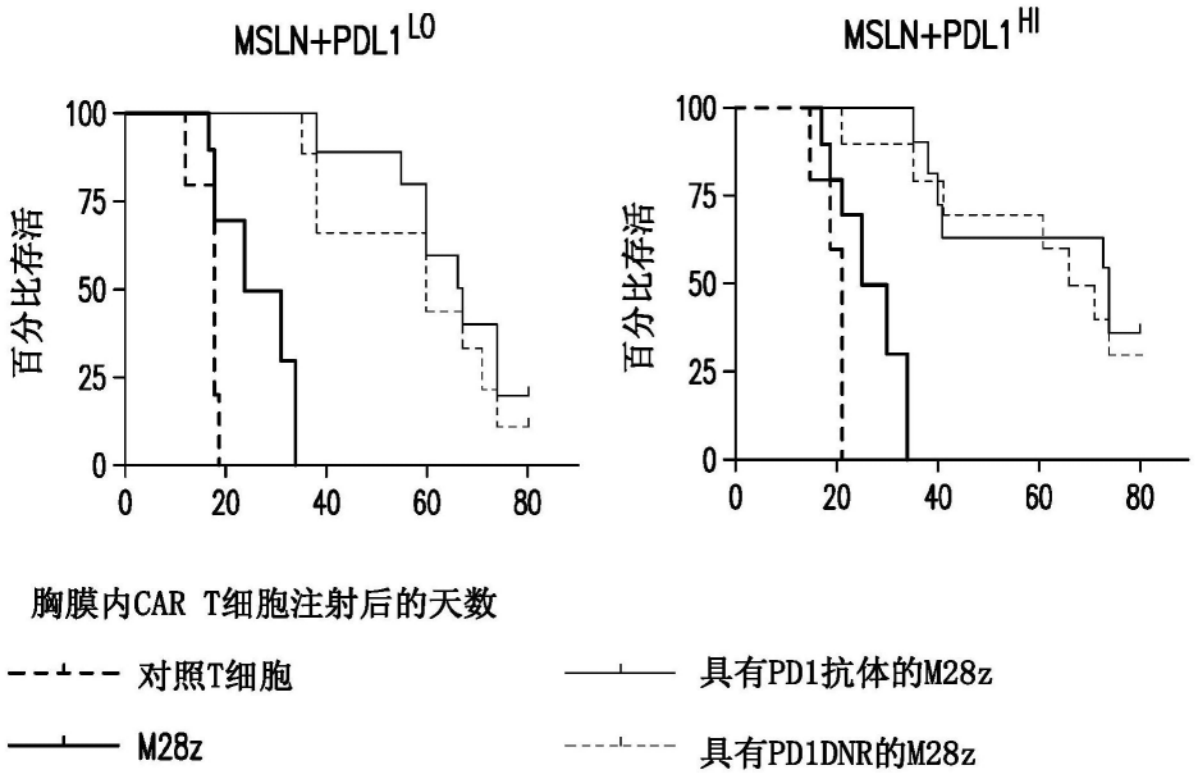

MSLN+PDL1 LO
MSLN+PDL1 HI
百分比存活
100
75
50
25
0
0
20
40
60
80
胸膜内CAR T细胞注射后的天数
对照T细胞
M28z
具有PD1抗体的M28z
具有PD1DNR的M28z

图20A

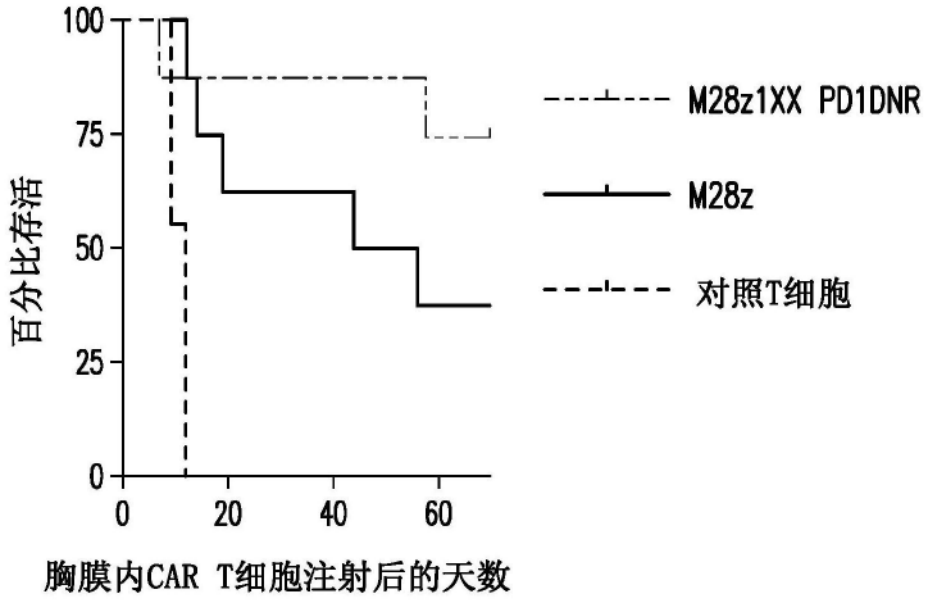

100
75
50
25
0
百分比存活
0
20
40
60
胸膜内CAR T细胞注射后的天数
M28z1XX PD1DNR
M28z
对照T细胞

图20B

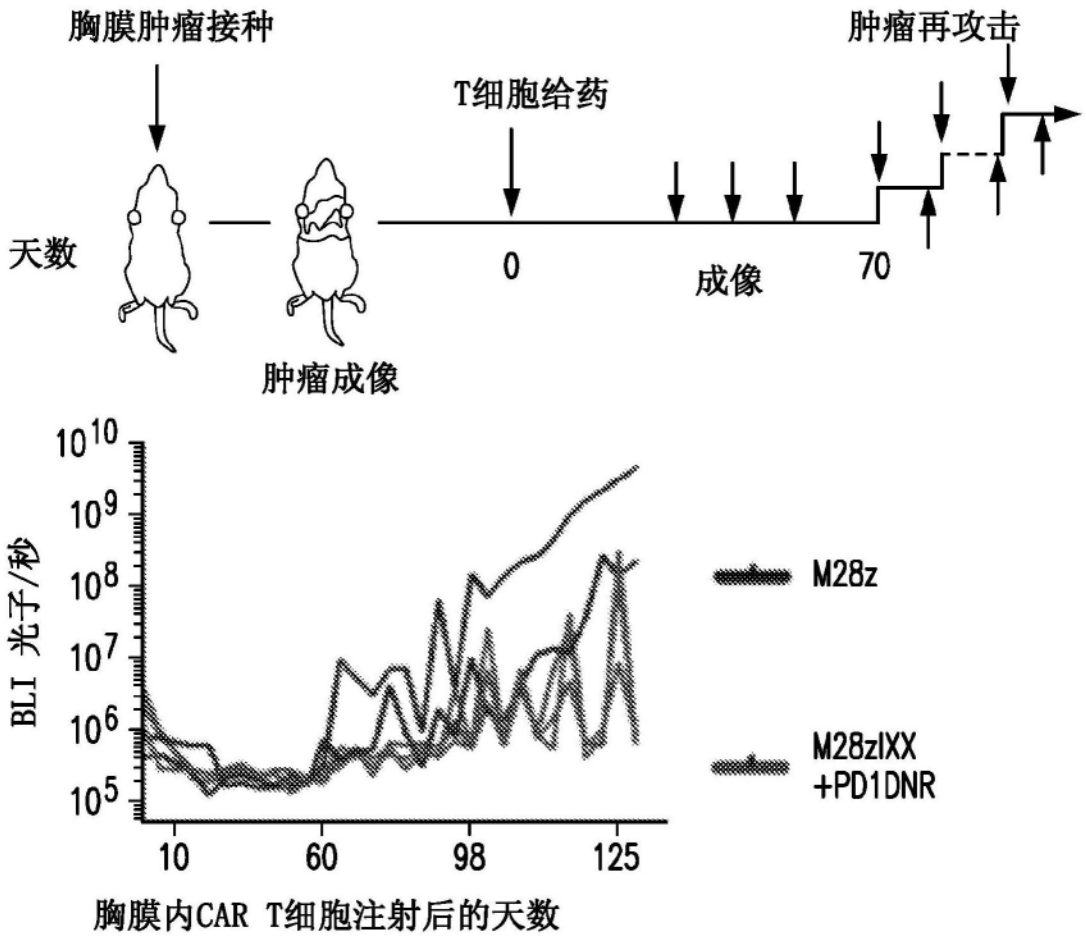

胸膜肿瘤接种
肿瘤再攻击
T细胞给药
天数
0
成像
70
肿瘤成像
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
BLI 光子/秒
M28z
M28z1XX
+PD1DNR
10
60
98
125
胸膜内CAR T细胞注射后的天数

图20C

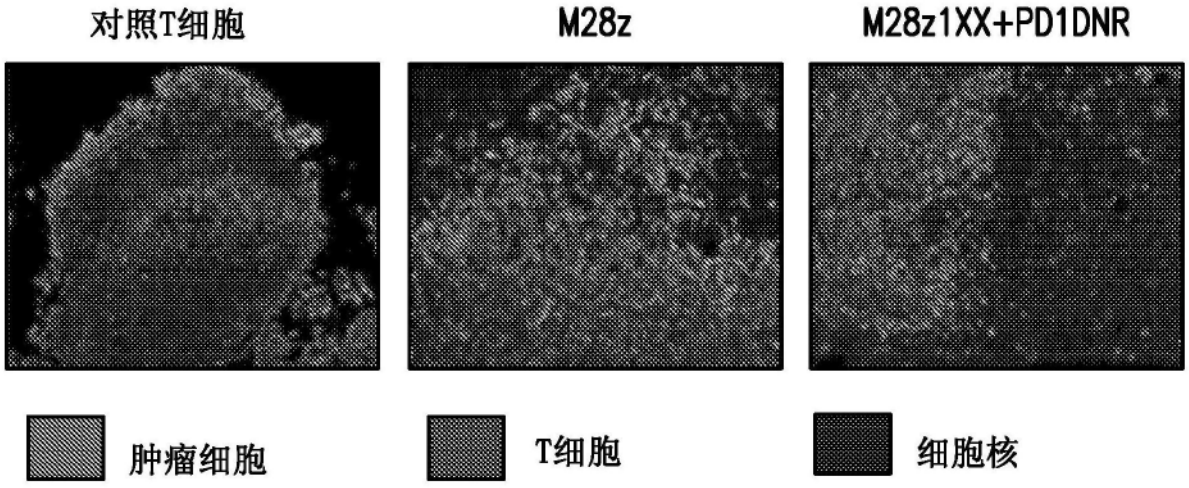

对照T细胞
M28z
M28z1XX+PD1DNR
肿瘤细胞
T细胞
细胞核

图20D

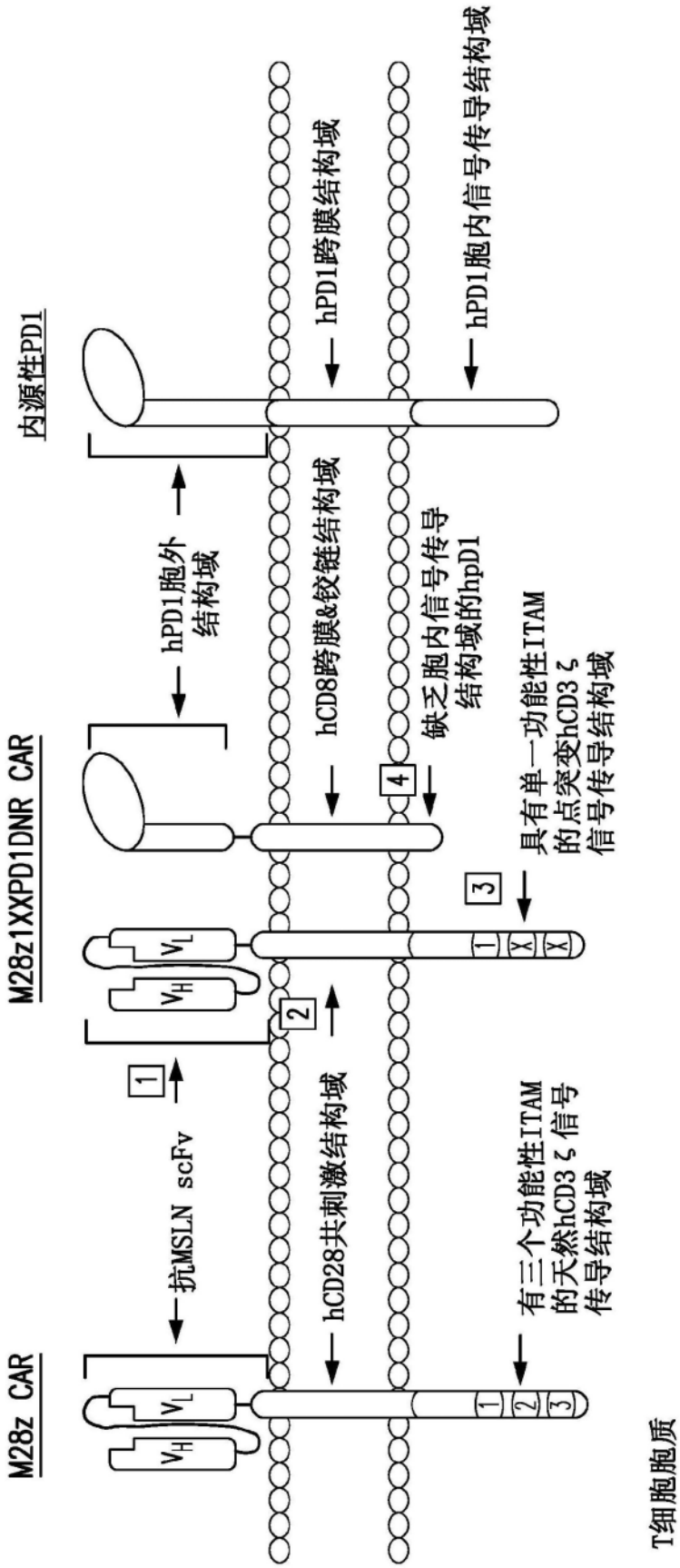

M28z CAR
M28z1XXPD1DNR CAR
内源性PD1
抗MSLN scFv
hCD28共刺激结构域
有三个功能性ITAM
的天然hCD3ζ信号
传导结构域
hPD1胞外
结构域
hCD8跨膜&铰链结构域
缺乏胞内信号传导
结构域的hpD1
具有单一功能性ITAM
的点突变hCD3ζ
信号传导结构域
hPD1跨膜结构域
hPD1胞内信号传导结构域
T细胞胞质

图21

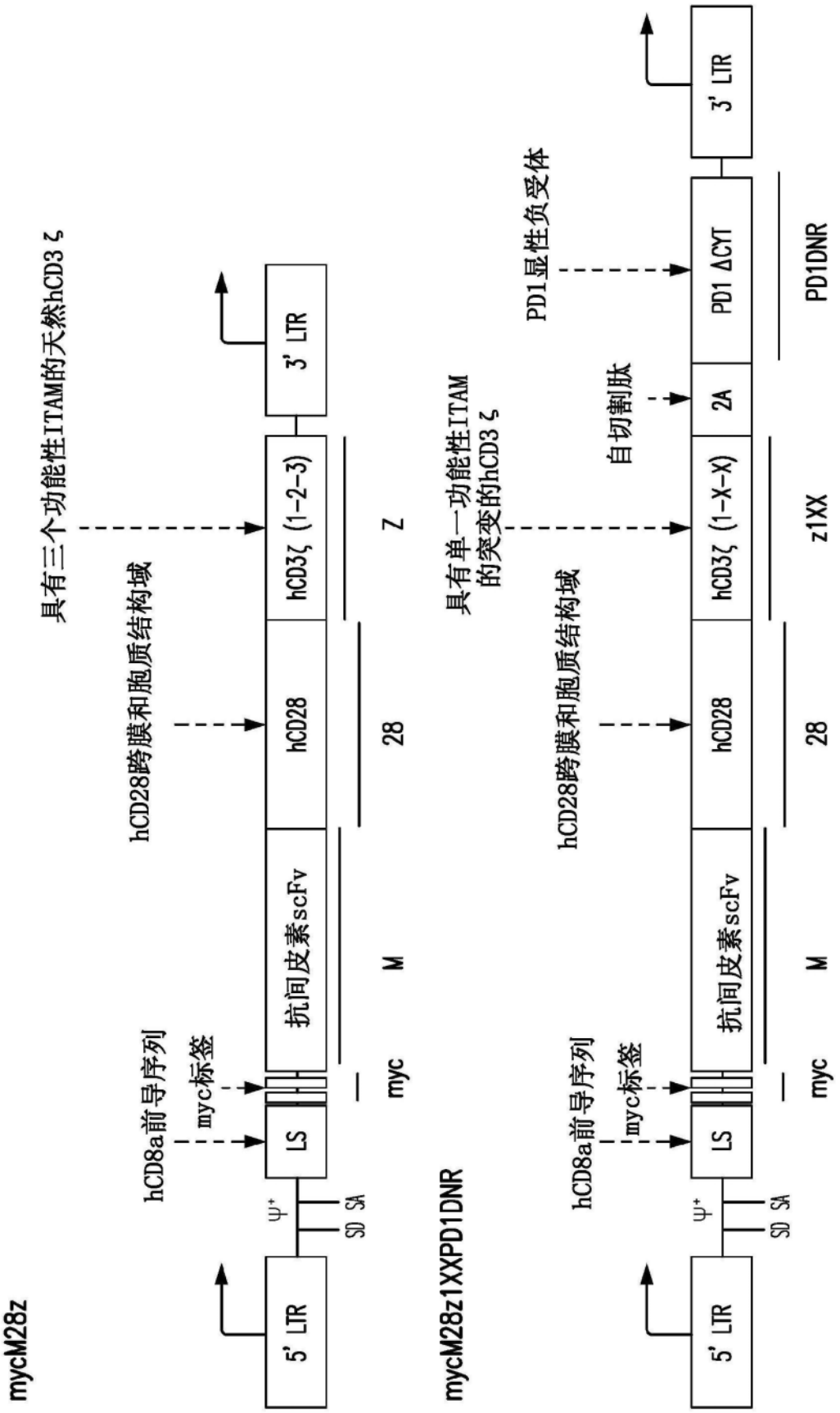

mycM28z
5' LTR
Ψ+
SD SA
LS
myc标签
hCD8a前导序列
抗间皮素scFv
hCD28
hCD3ζ (1-2-3)
3' LTR
hCD28跨膜和胞质结构域
具有三个功能性ITAM的天然hCD3 ζ
myc
M
28
Z
mycM28z1XXPD1DNR
具有单一功能性ITAM
的突变的hCD3 ζ
自切割肽
2A
PD1 ΔCYT
PD1显性负受体
z1XX
PD1DNR

图22

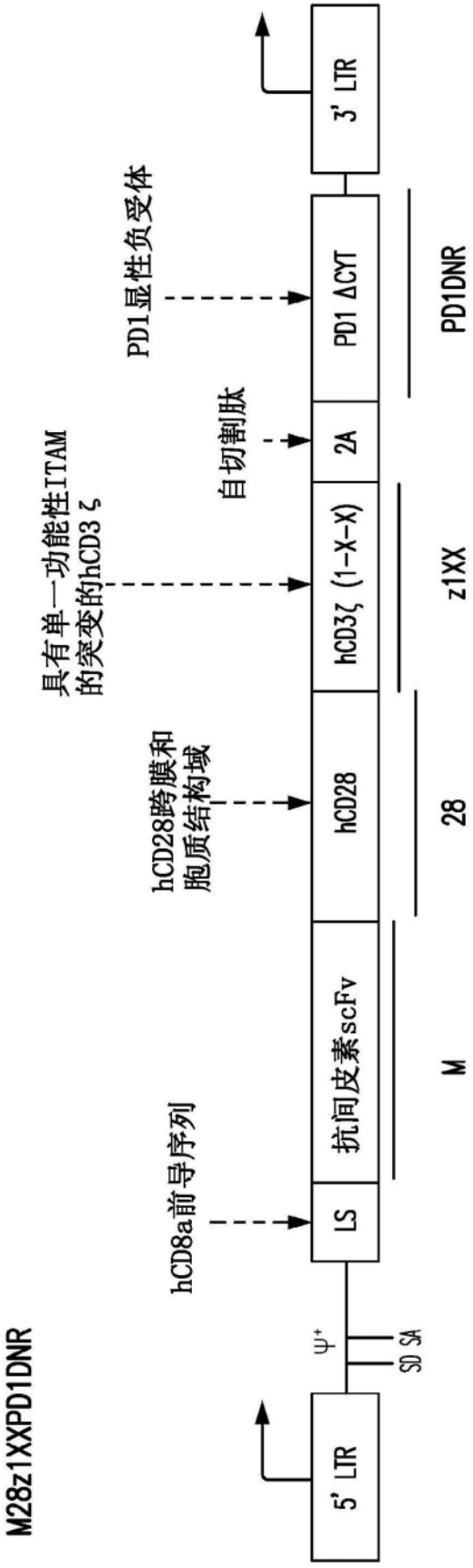

M28z1XXPD1DNR
5' LTR
Ψ+
SD SA
LS
hCD8a前导序列
抗间皮素scFv
M
hCD28
hCD28跨膜和胞质结构域
28
具有单一功能性ITAM的突变的hCD3 ζ
hCD3ζ (1-X-X)
z1XX
自切割肽
2A
PD1显性负受体
PD1 ΔCYT
PD1DNR
3' LTR

图22续

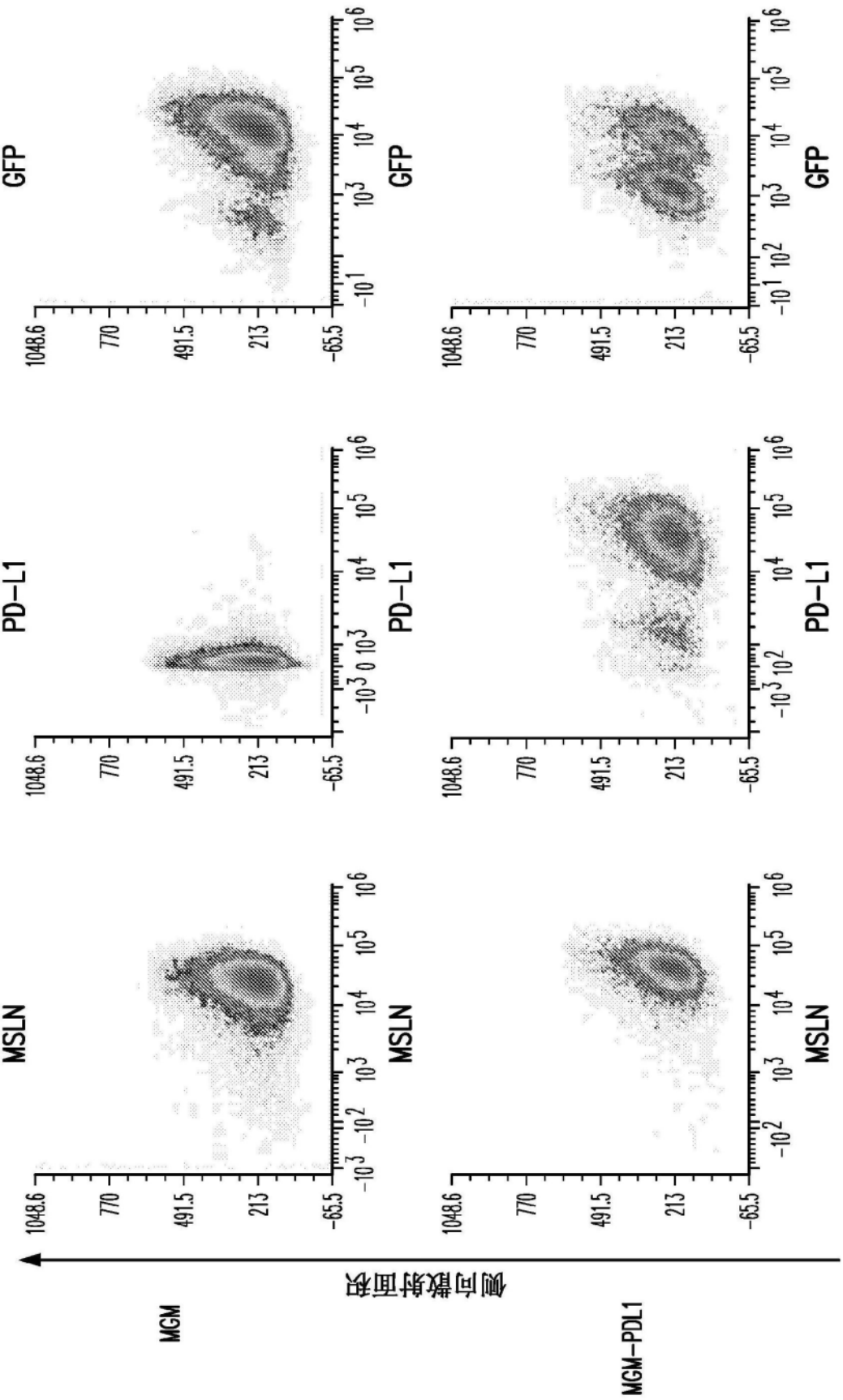


图23

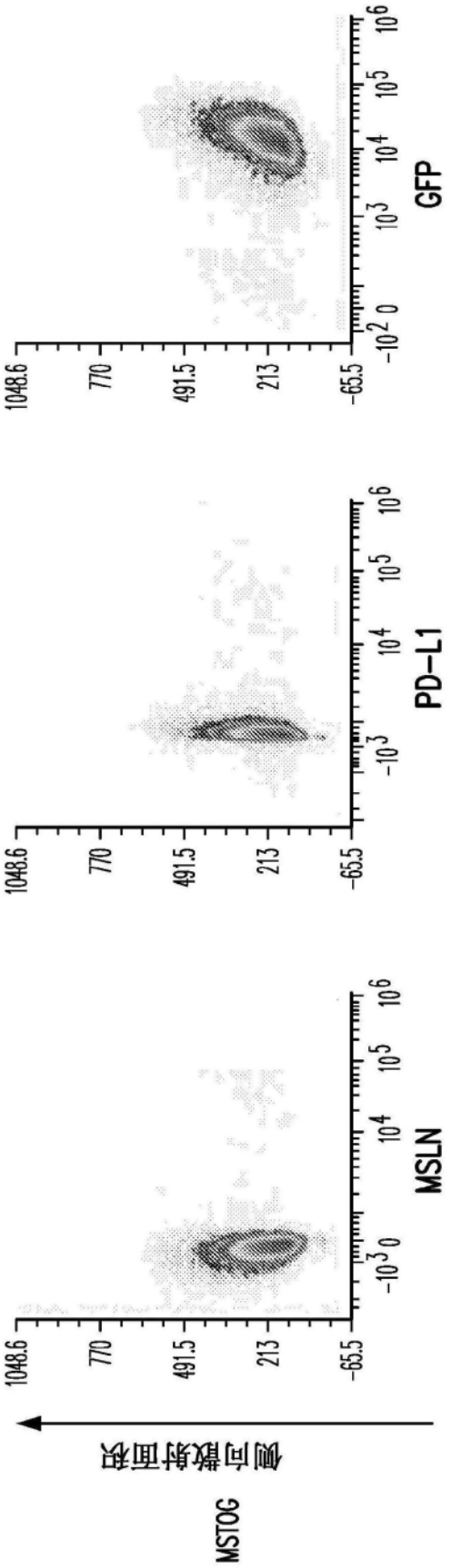

侧向散射面积
MSTOG
MSLN
PD-L1
GFP
1048.6
770
491.5
213
-65.5
-10^3 0 10^4 10^5 10^6
-10^2 0 10^3 10^4 10^5 10^6

图23续

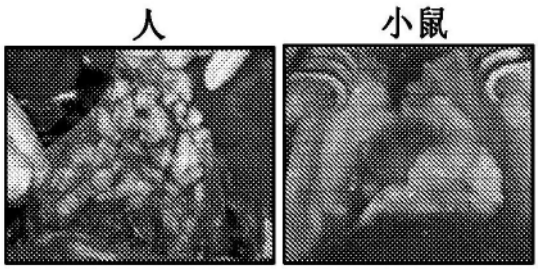


图24A

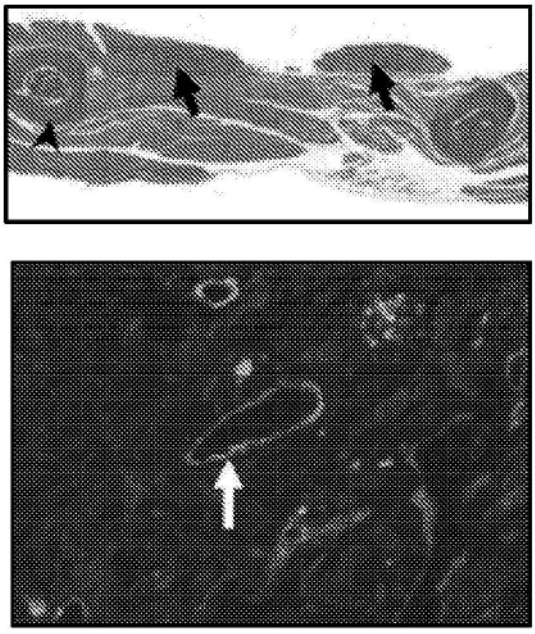


图24B

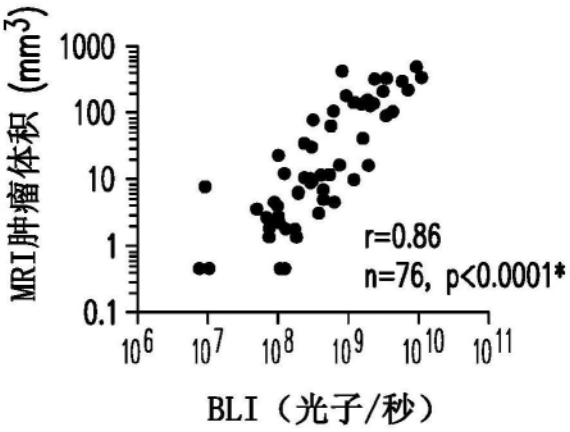


图24C

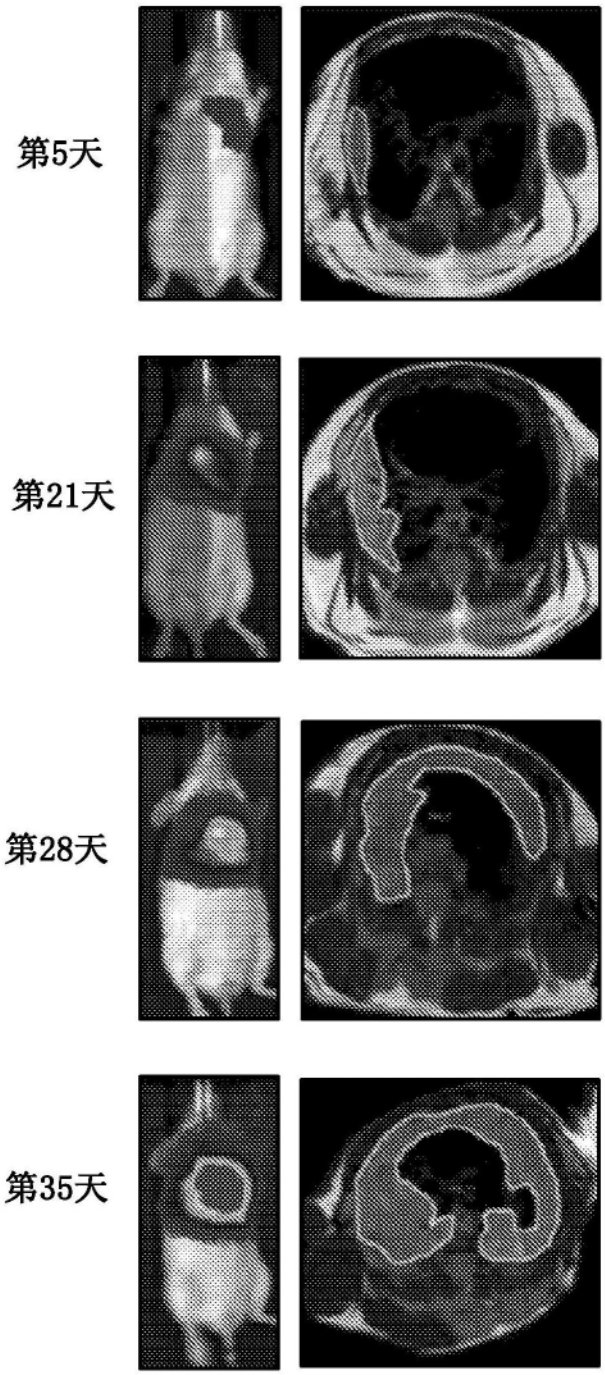


图24D

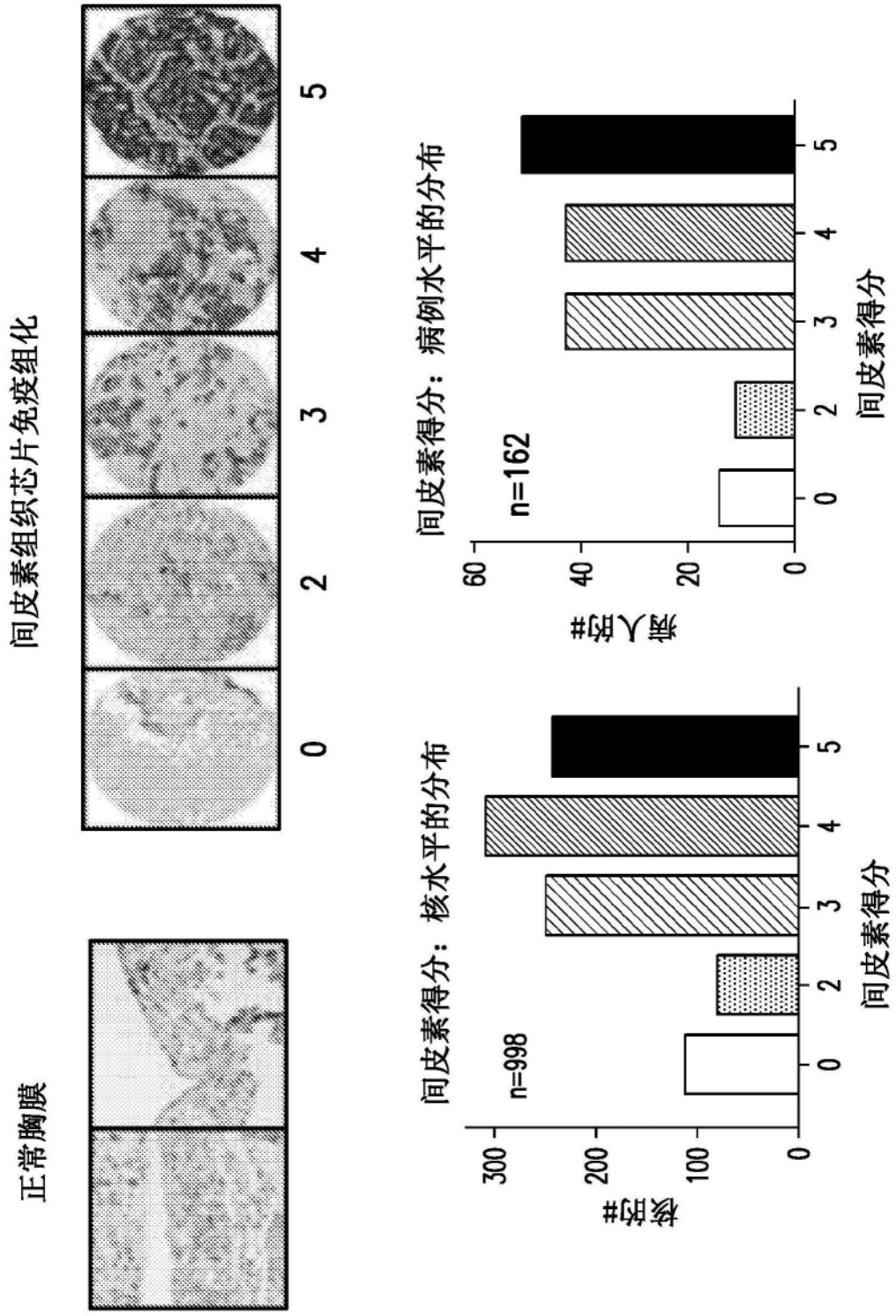

正常胸膜
间皮素组织芯片免疫组化
0
2
3
4
5
间皮素得分：核水平的分布
n=998
核的#
间皮素得分
间皮素得分：病例水平的分布
n=162
病人的#
间皮素得分

图25A

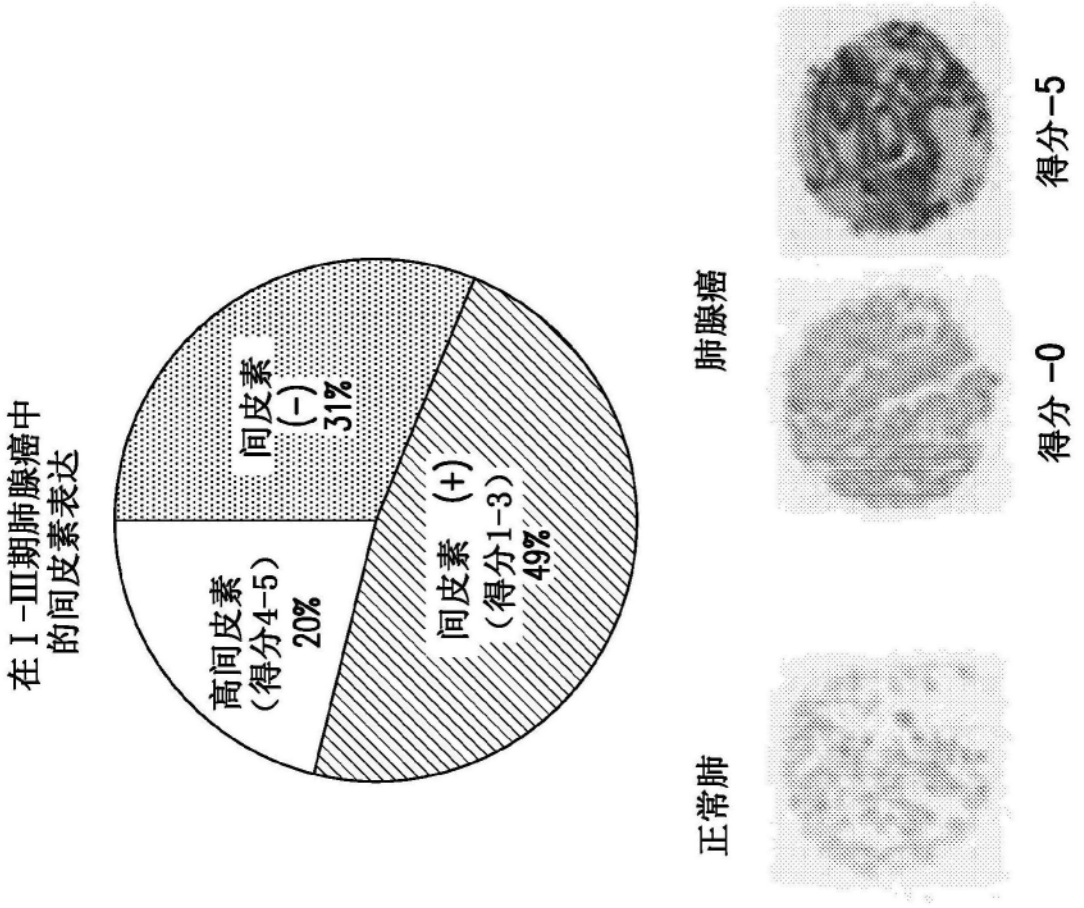

在Ⅰ-Ⅲ期肺腺癌中
的间皮素表达
间皮素
(-)
31%
高间皮素
（得分4-5）
20%
间皮素 (+)
（得分1-3）
49%
肺腺癌
正常肺
得分-5
得分-0

图25B

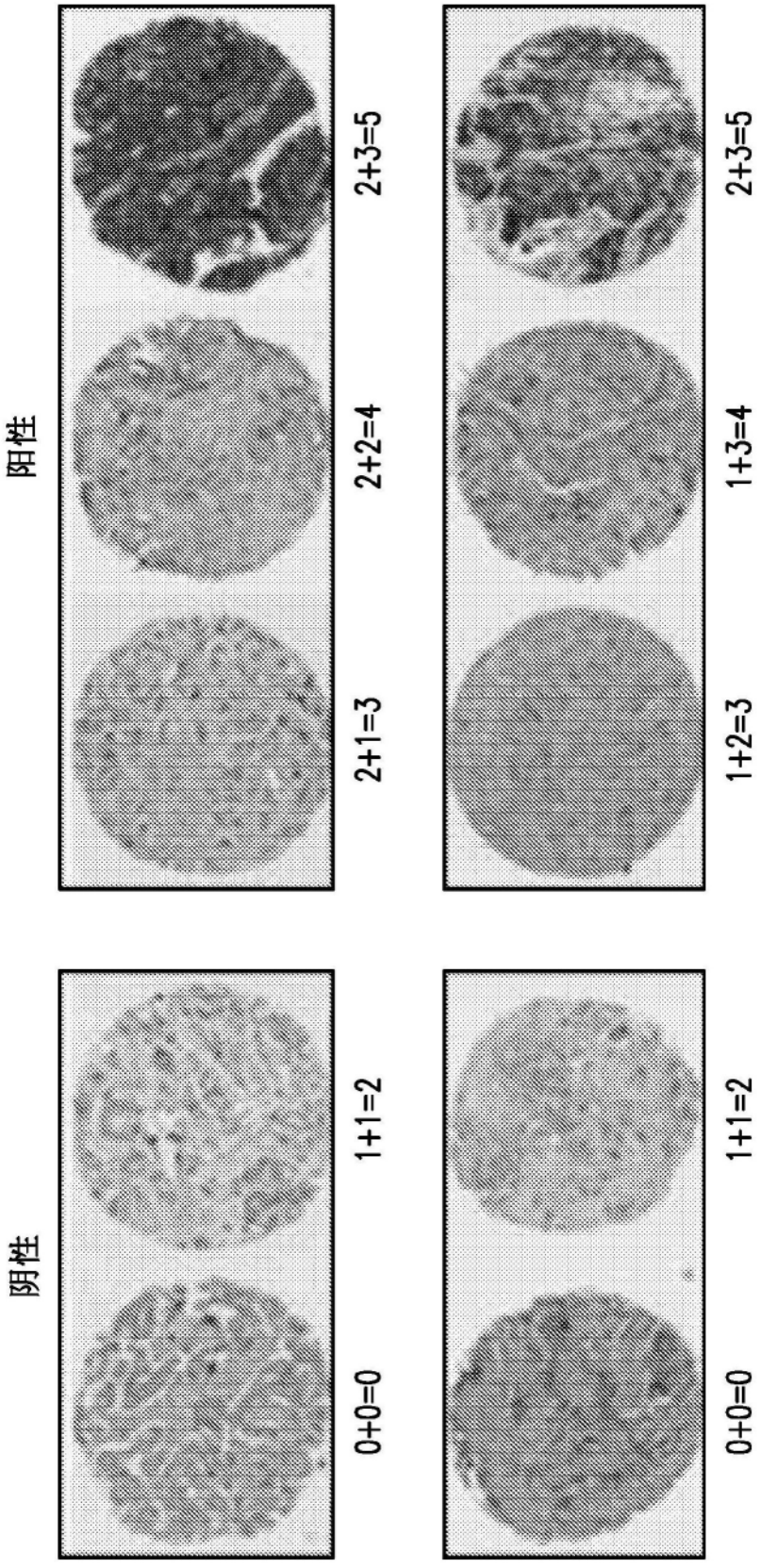


图25C

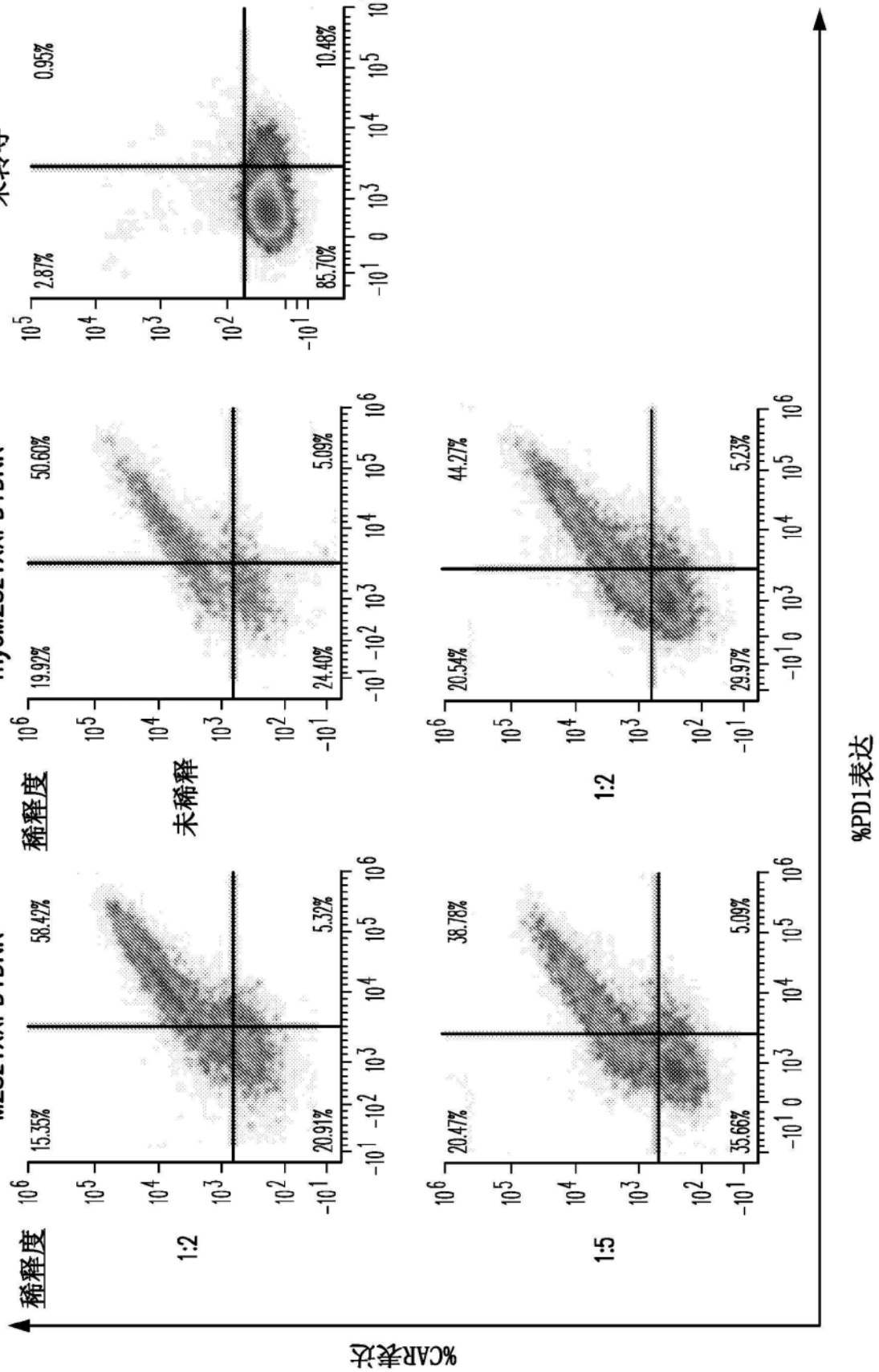

未转导
0.95%
2.87%
85.70%
10.48%
mycM28z1XXPD1DNR
50.60%
19.92%
24.40%
5.09%
未稀释
稀释度
44.27%
20.54%
29.97%
5.23%
1:2
M28z1XXPD1DNR
58.42%
15.35%
20.91%
5.32%
稀释度
38.78%
20.47%
35.66%
5.09%
1:5
%CAR表达
%PD1表达

图26

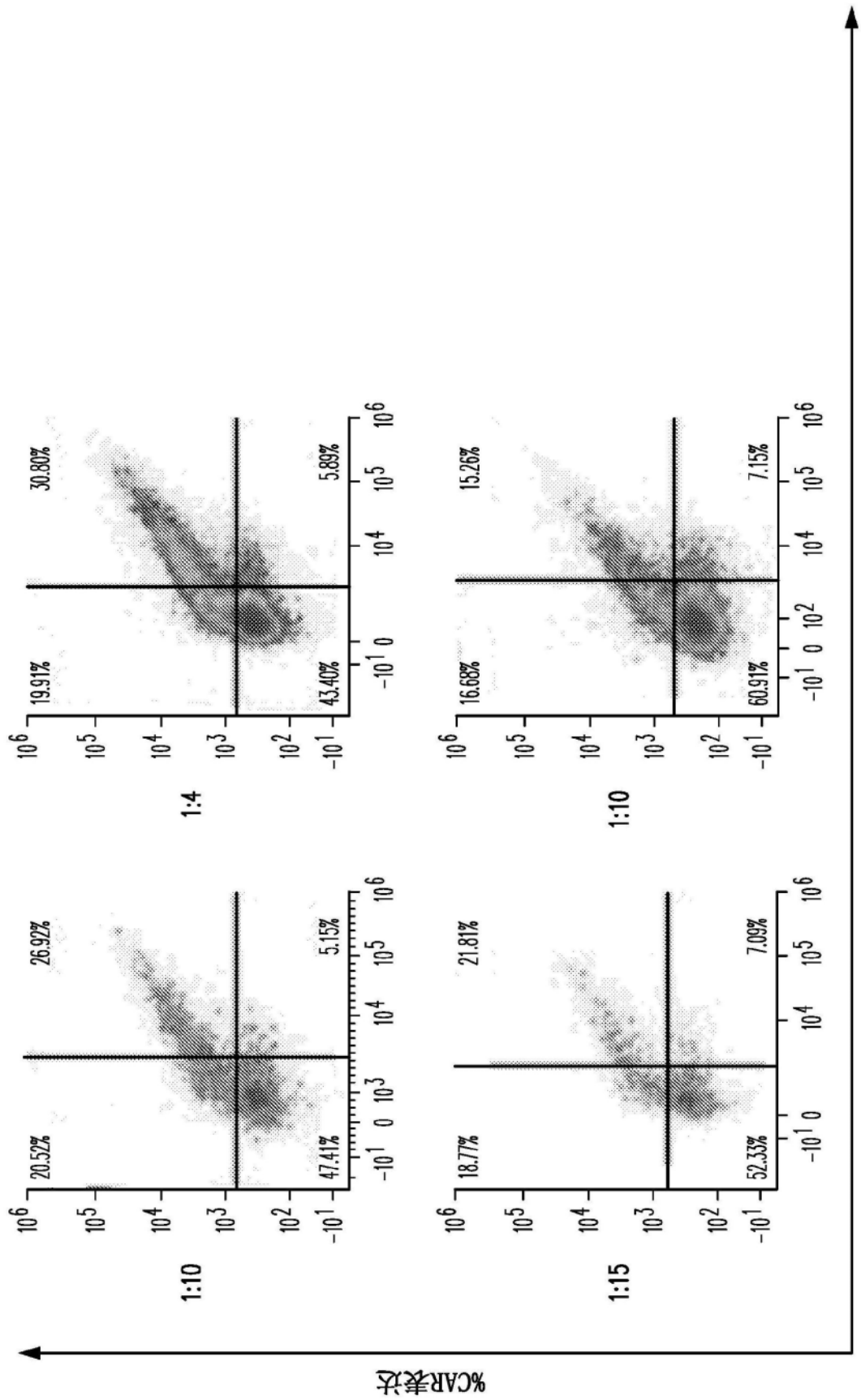

%CAR表达
%PD1表达
1:4
1:10
1:10
1:15
19.91%
30.80%
43.40%
5.89%
20.52%
26.92%
47.41%
5.15%
16.68%
15.26%
60.91%
7.15%
18.77%
21.81%
52.33%
7.09%

图26续

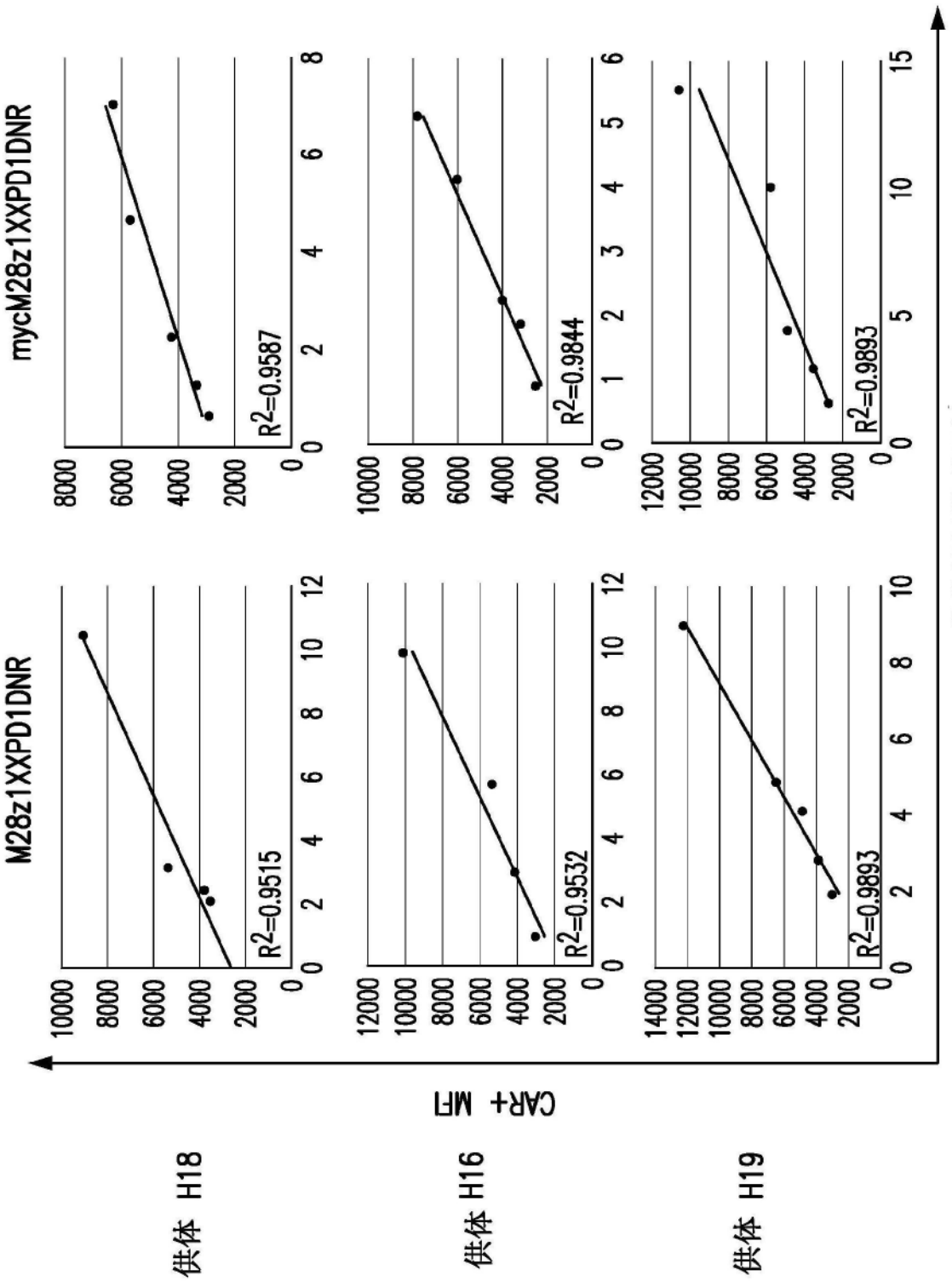
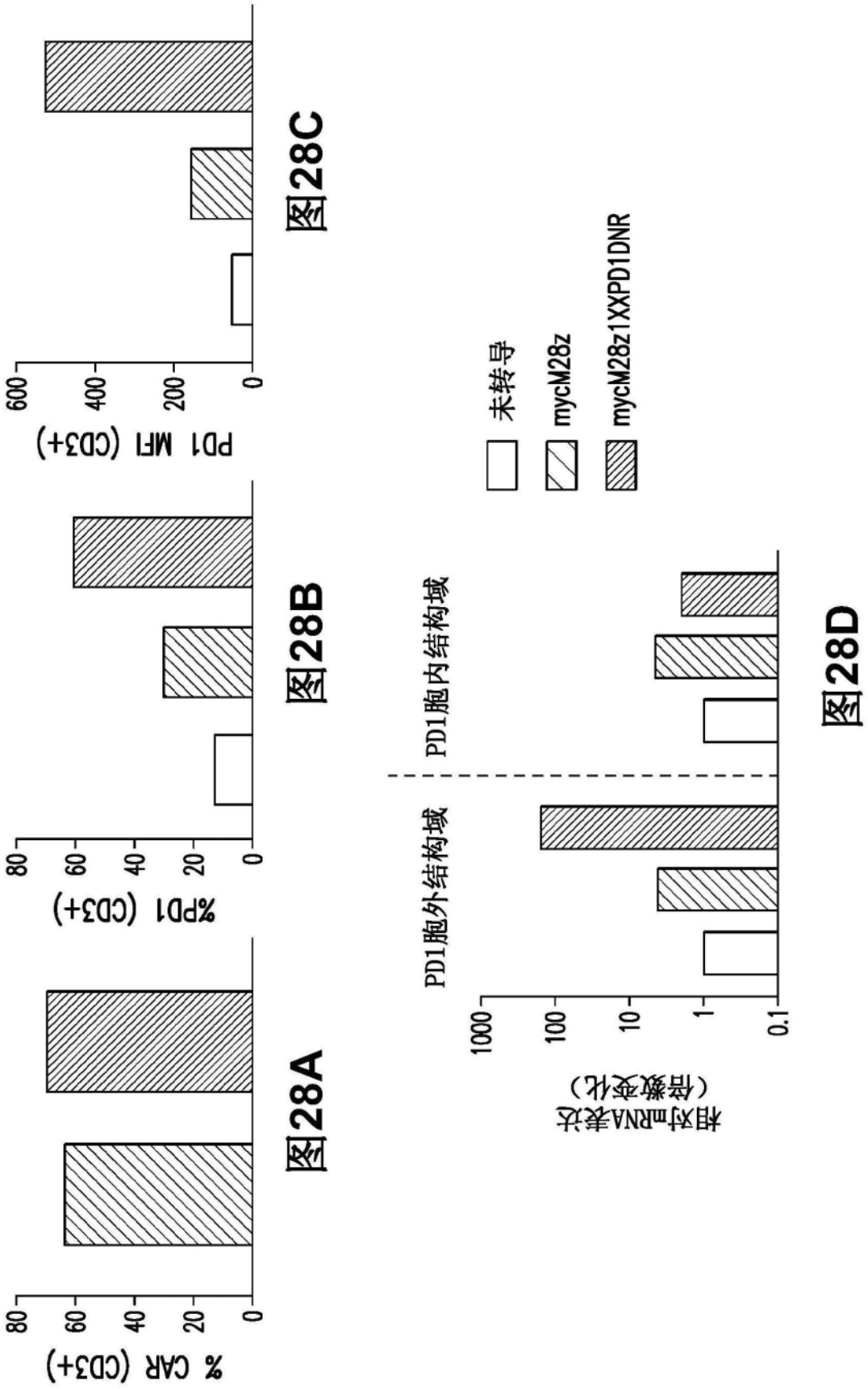

M28z1XXPD1DNR
mycM28z1XXPD1DNR
R2=0.9515
R2=0.9532
R2=0.9893
R2=0.9587
R2=0.9844
R2=0.9893
CAR+ MFI
载体拷贝数/细胞
供体 H18
供体 H16
供体 H19

图27


% CAR (CD3+)
0
20
40
60
80
图28A
%PD1 (CD3+)
0
20
40
60
80
图28B
PD1 MFI (CD3+)
0
200
400
600
图28C
未转导
mycM28z
mycM28z1XXPD1DNR
PD1胞外结构域
PD1胞内结构域
相对mRNA表达
（倍数变化）
0.1
1
10
100
1000
图28D

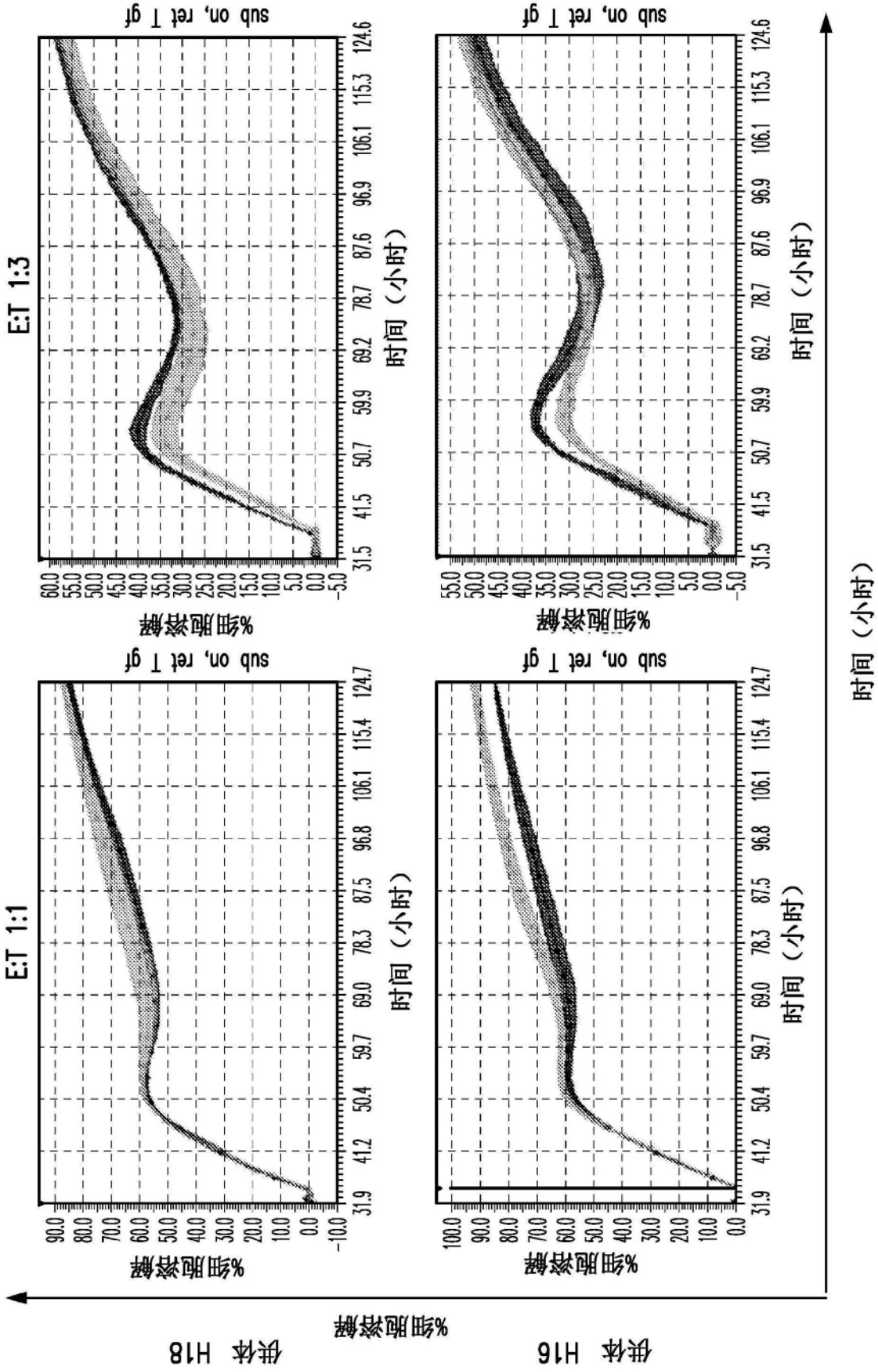


图29

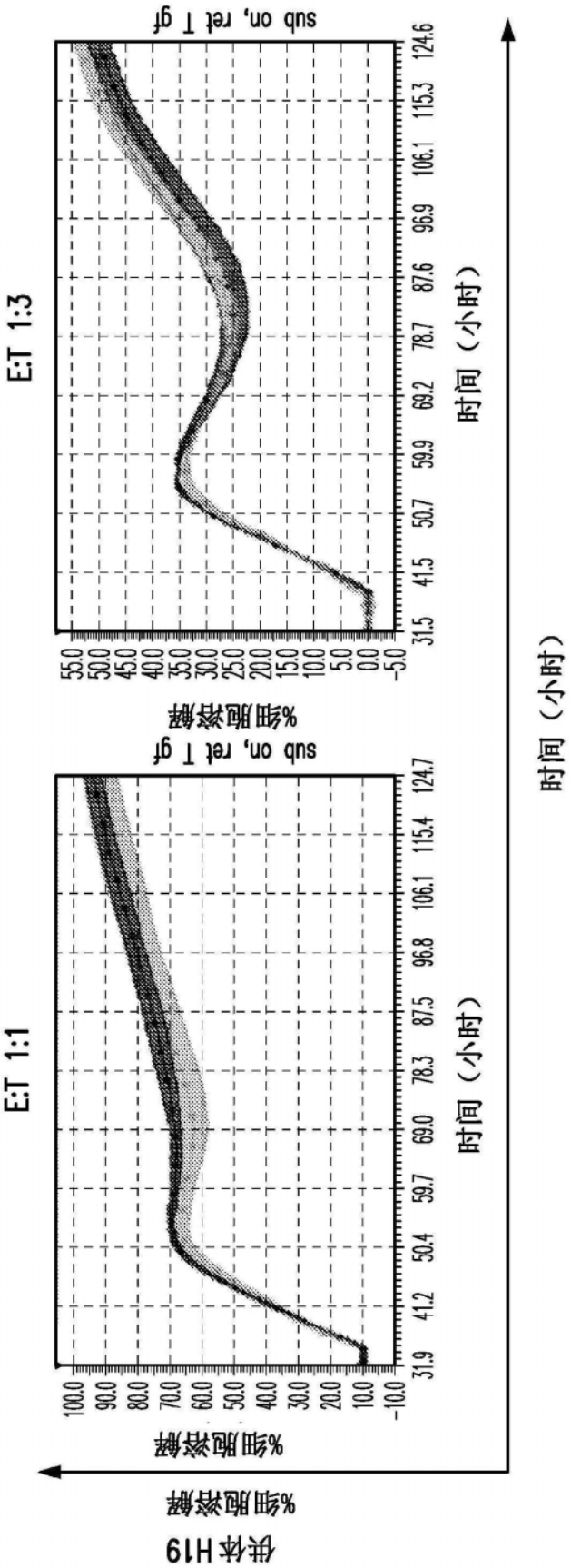

供体H19
%细胞溶解
%细胞溶解
时间（小时）
E:T 1:1
sub on, ret T gf
%细胞溶解
100.0 90.0 80.0 70.0 60.0 50.0 40.0 30.0 20.0 10.0 -10.0
31.9 41.2 50.4 59.7 69.0 78.3 87.5 96.8 106.1 115.4 124.7
时间（小时）
E:T 1:3
sub on, ret T gf
%细胞溶解
55.0 50.0 45.0 40.0 35.0 30.0 25.0 20.0 15.0 10.0 5.0 0.0 -5.0
31.5 41.5 50.7 59.9 69.2 78.7 87.6 96.9 106.1 115.3 124.6
时间（小时）

图29续

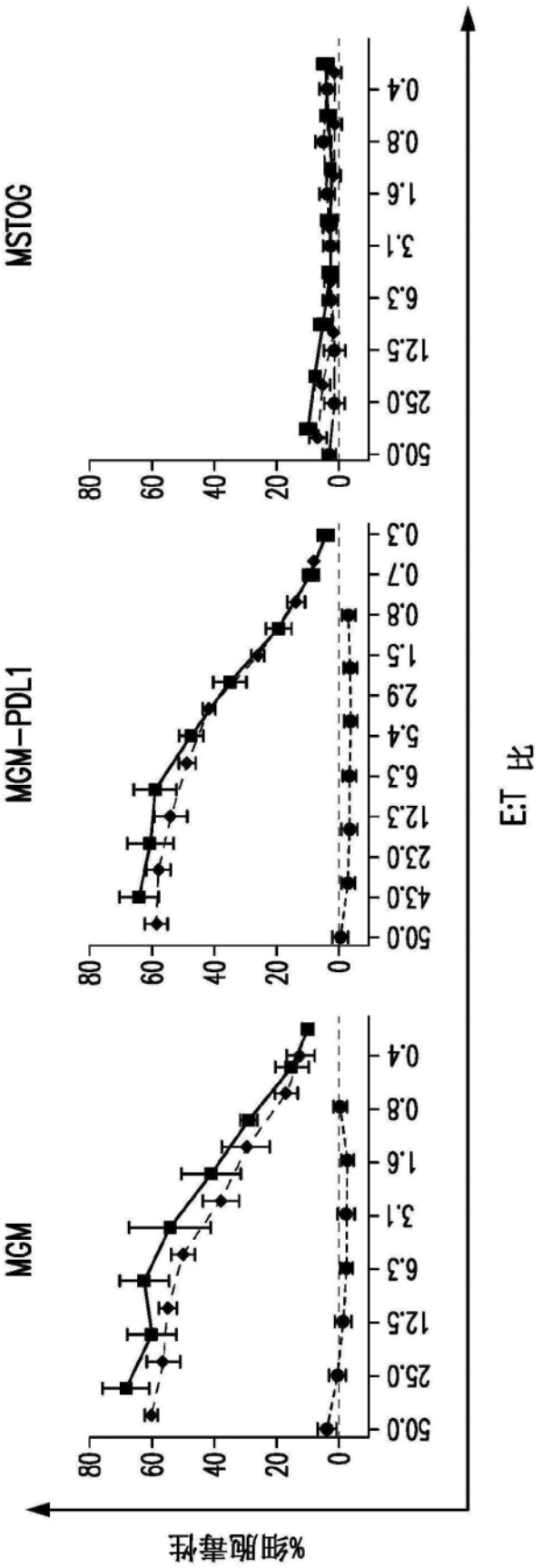

%细胞毒性
E:T 比
MGM
MGM-PDL1
MSTOG
0
20
40
60
80
50.0
25.0
12.5
6.3
3.1
1.6
0.8
0.4
0.3
0.7
1.5
2.9
5.4
12.3
23.0
43.0

图30

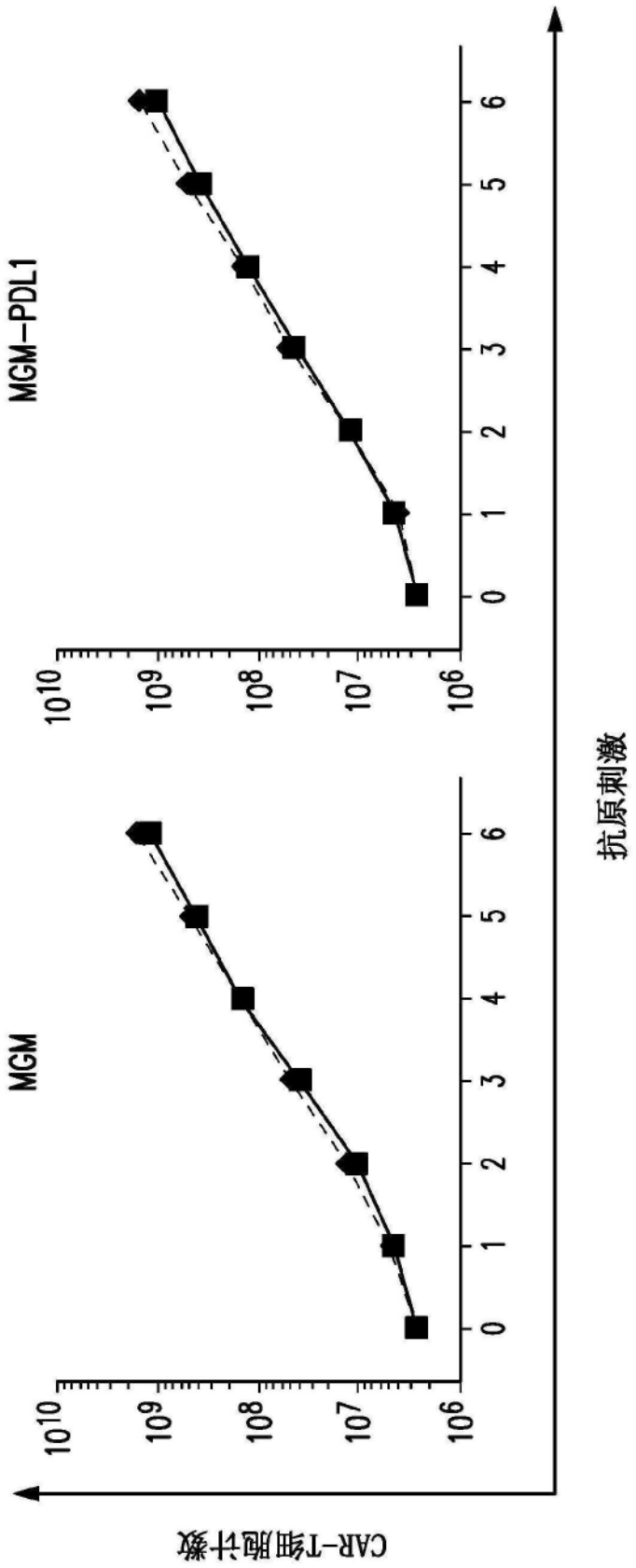


图31

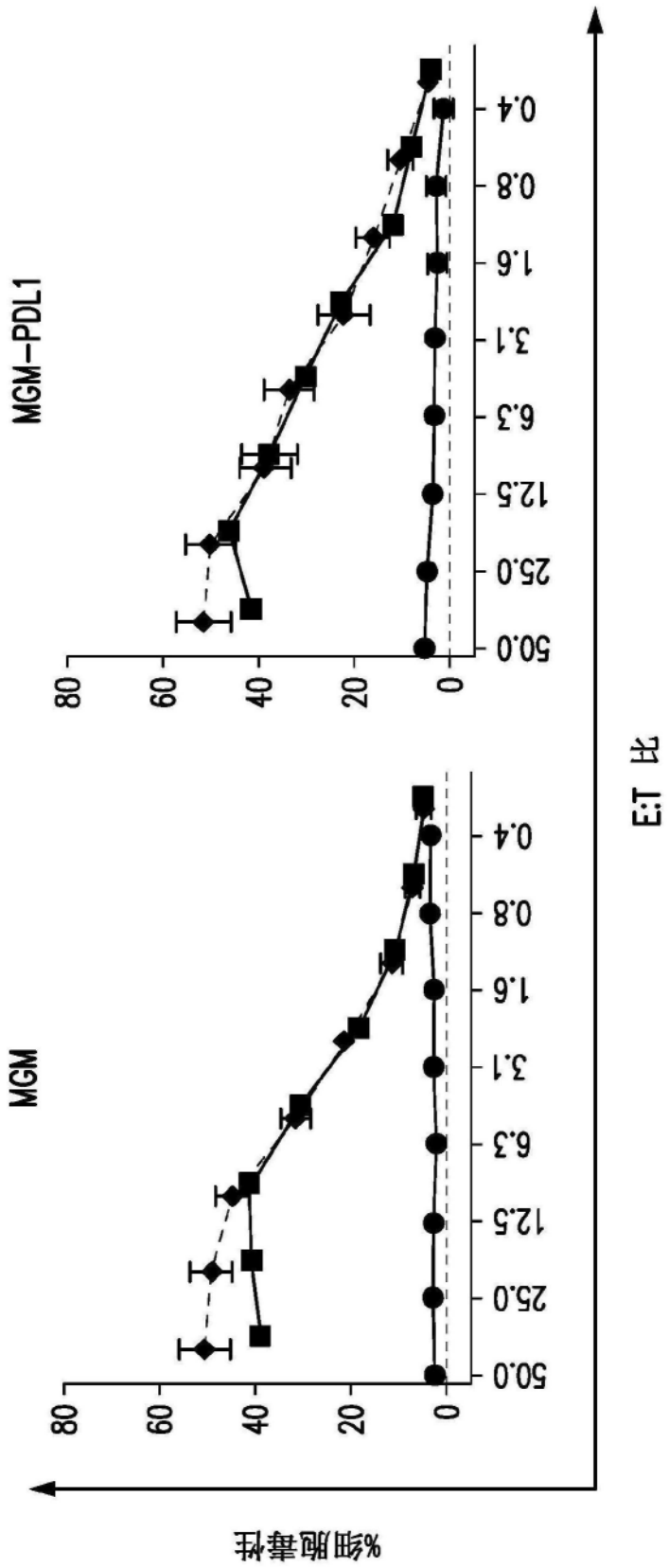


图32

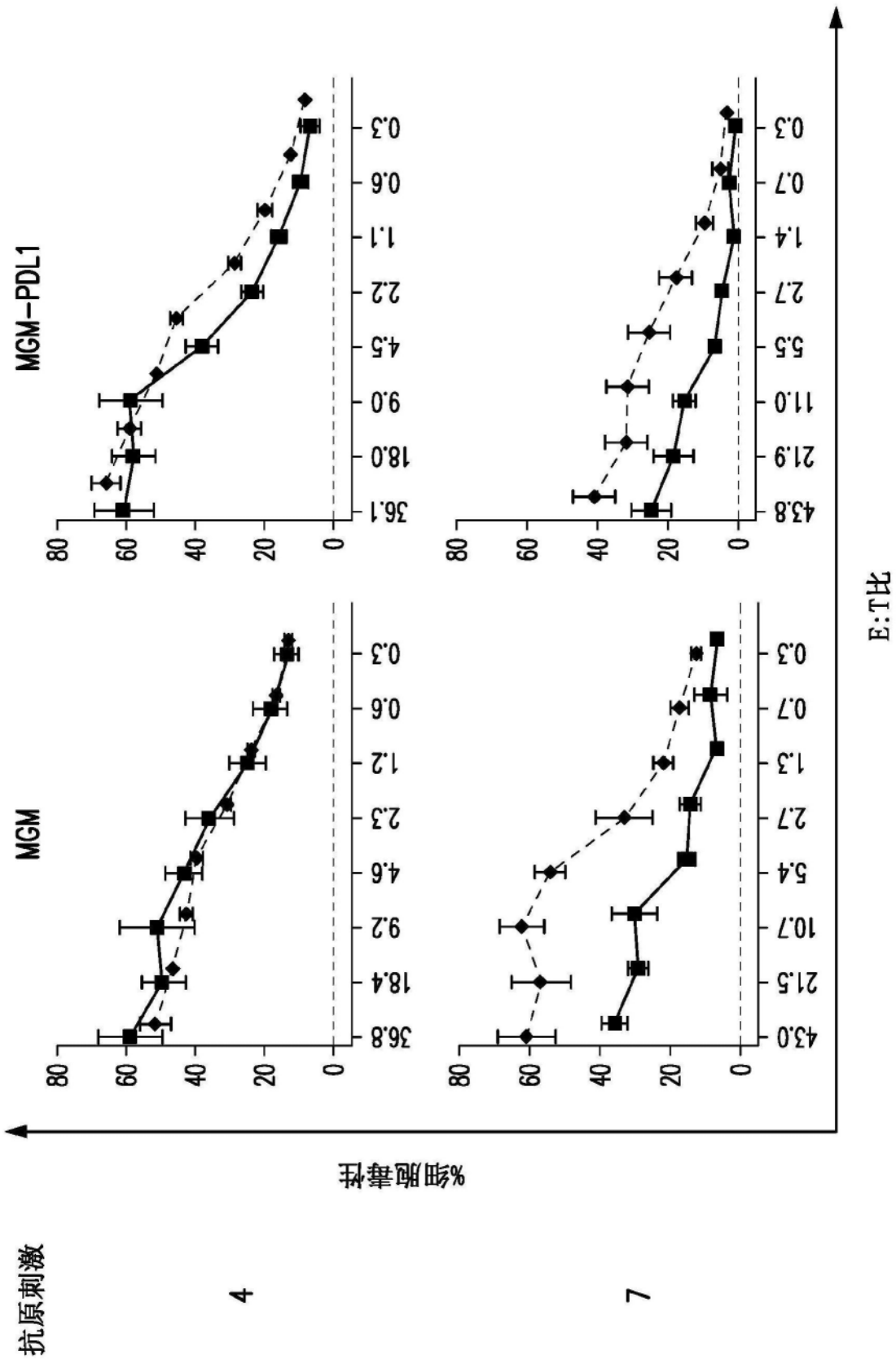

抗原刺激
4
7
%细胞毒性
E:T比
MGM
MGM-PDL1
0
20
40
60
80
0.3
0.6
1.2
2.3
4.6
9.2
18.4
36.8
0.3
0.7
1.3
2.7
5.4
10.7
21.5
43.0
0.3
0.6
1.1
2.2
4.5
9.0
18.0
36.1
0.3
0.7
1.4
2.7
5.5
11.0
21.9
43.8

图33

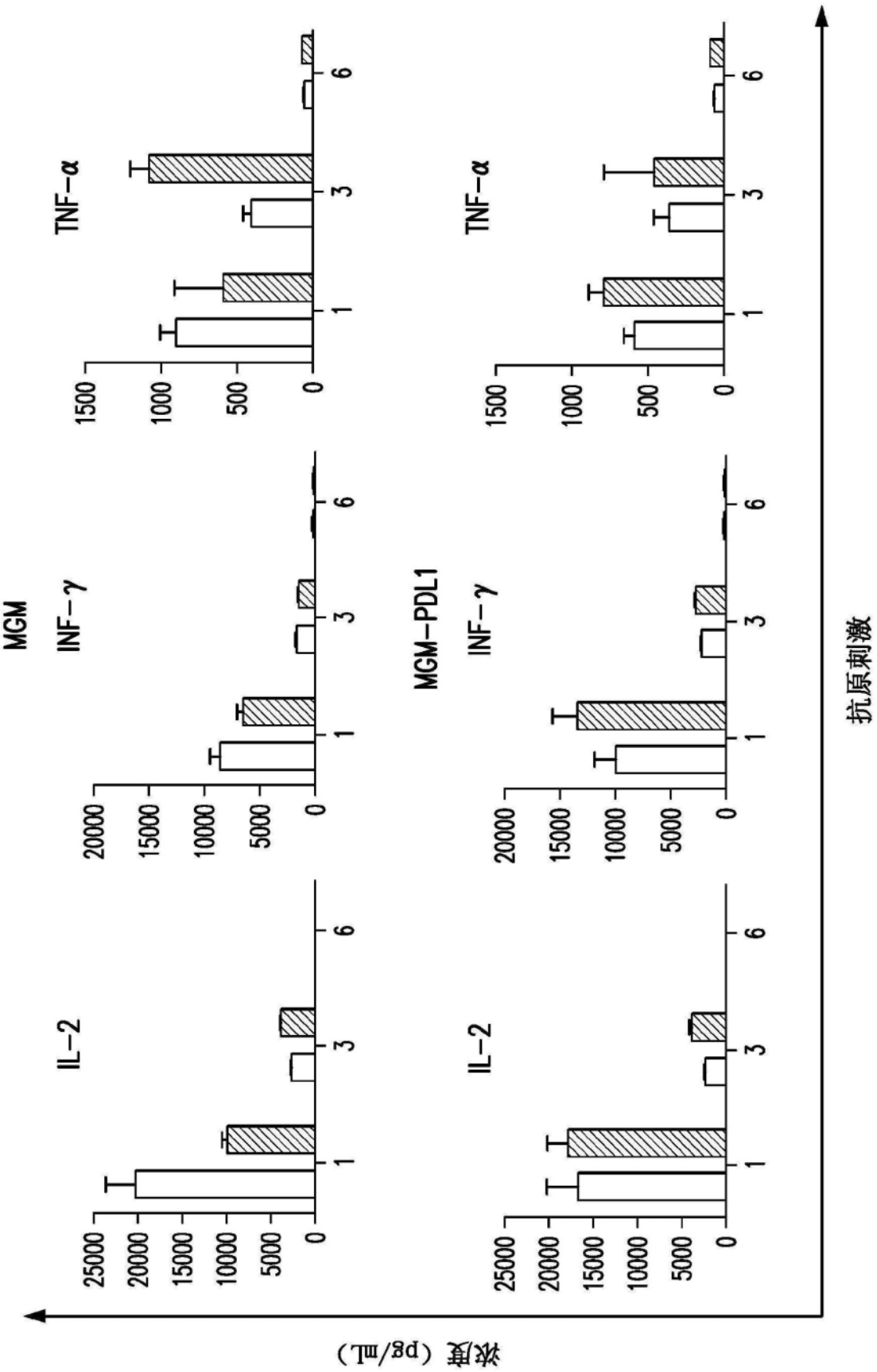

MGM
MGM-PDL1
IL-2
INF-γ
TNF-α
浓度 (pg/mL)
抗原刺激
0
5000
10000
15000
20000
25000
500
1000
1500
1
3
6

图34

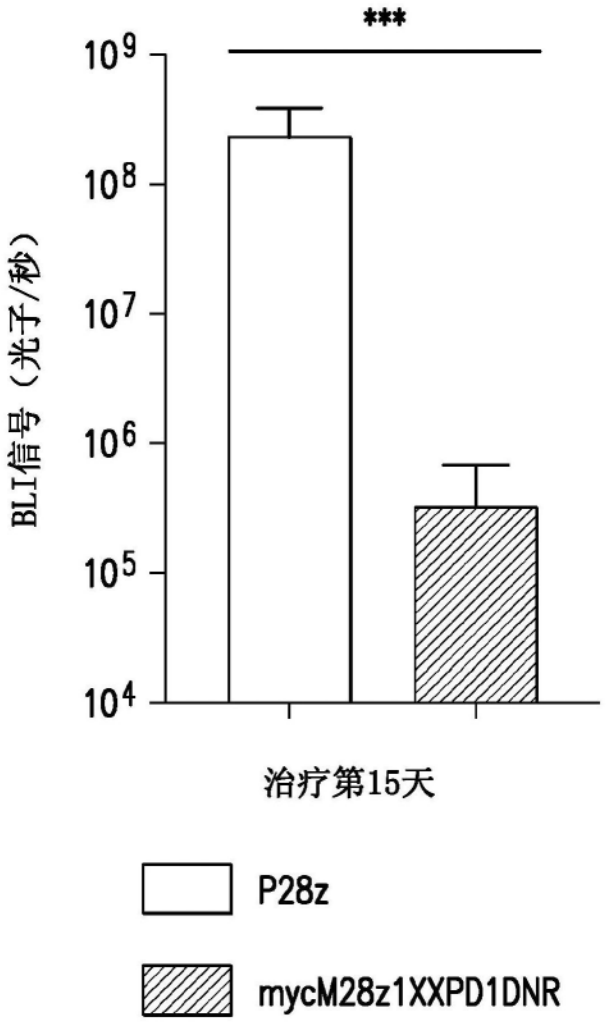

***
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
BLI信号（光子/秒）
治疗第15天
P28z
mycM28z1XXPD1DNR

图35

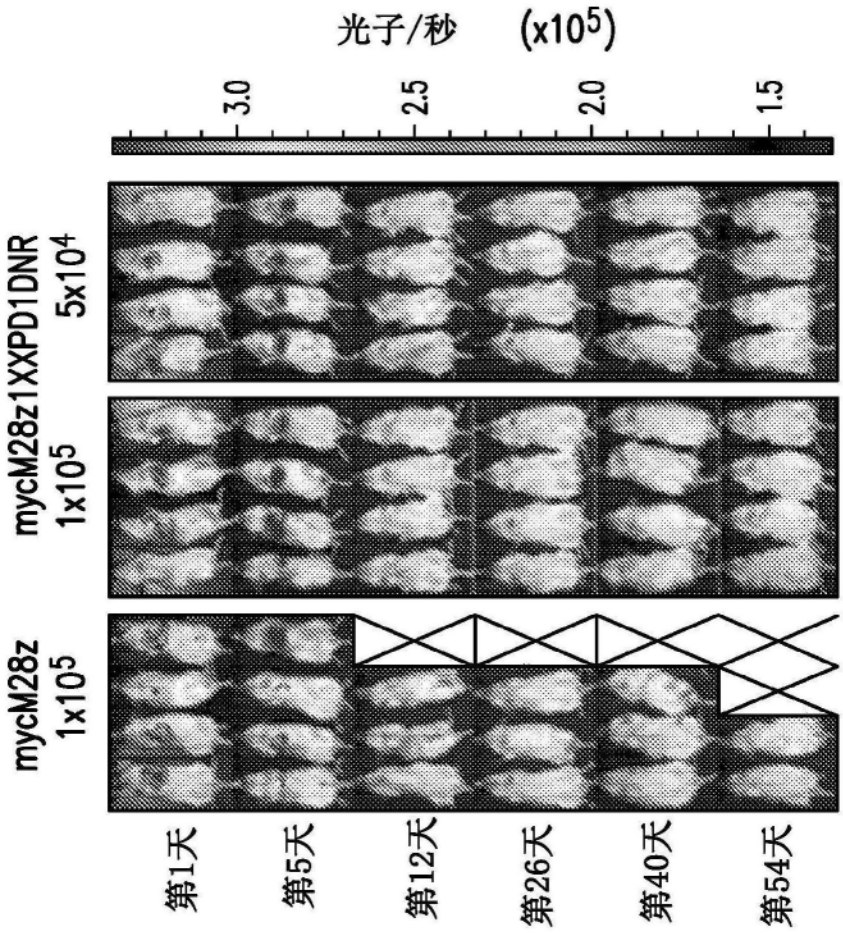

光子/秒 (x10^5)
3.0
2.5
2.0
1.5
mycM28z1XXPD1DNR 5x10^4
mycM28z1XXPD1DNR 1x10^5
mycM28z 1x10^5
第1天
第5天
第12天
第26天
第40天
第54天

图36A

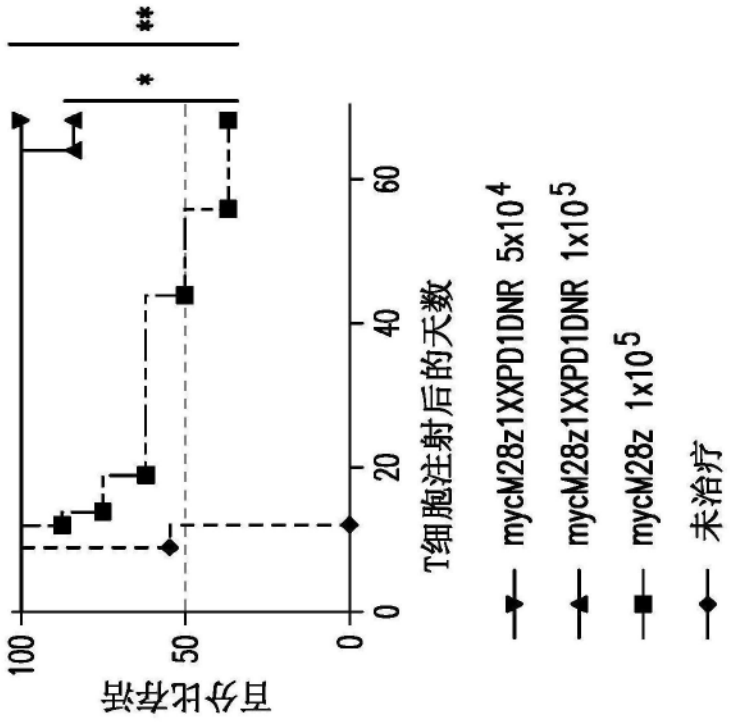

**
*
百分比存活
100
50
0
0
20
40
60
T细胞注射后的天数
mycM28z1XXPD1DNR 5x10^4
mycM28z1XXPD1DNR 1x10^5
mycM28z 1x10^5
未治疗

图36D

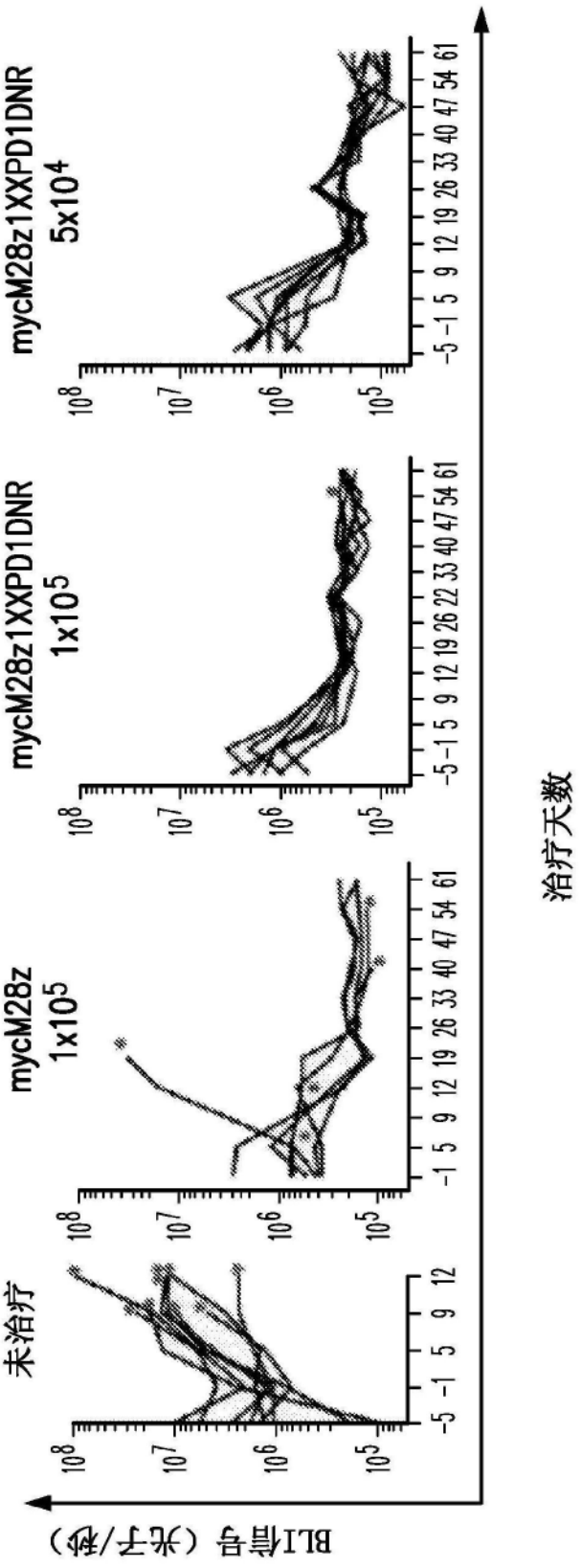

未治疗
mycM28z
1x10^5
mycM28z1XXPD1DNR
1x10^5
mycM28z1XXPD1DNR
5x10^4
BLI信号（光子/秒）
治疗天数

图36B

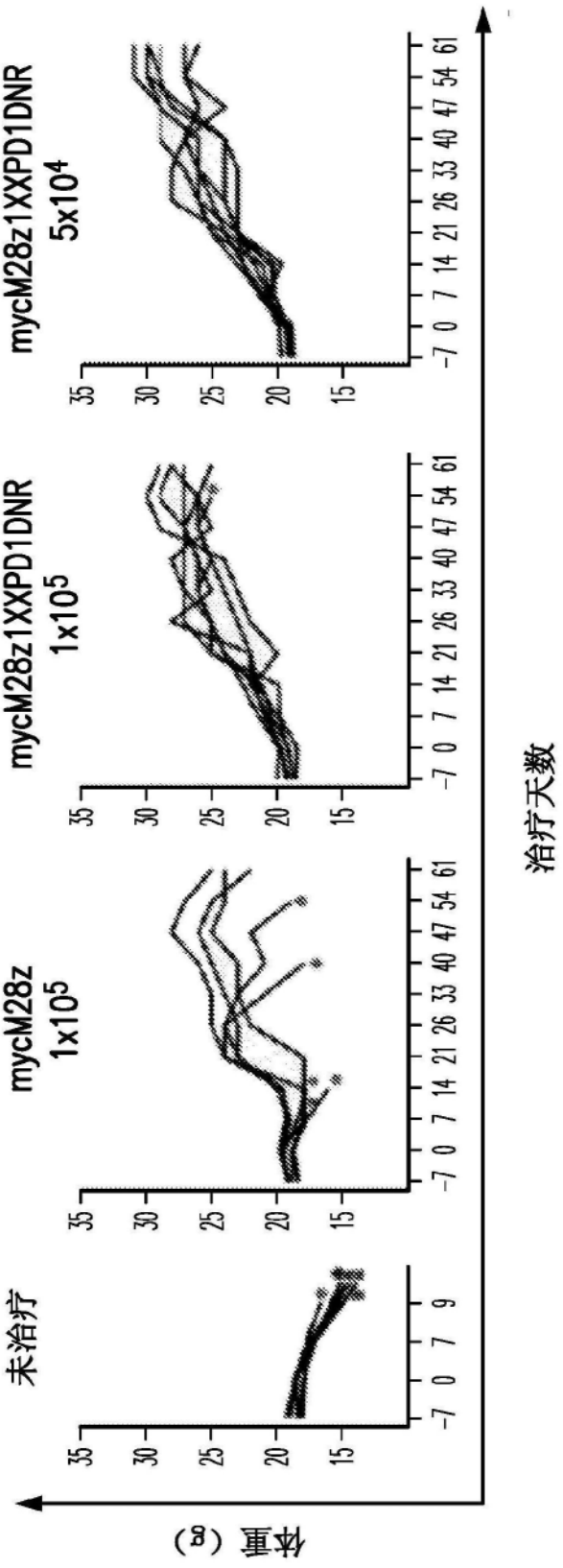

未治疗
mycM28z
1x10^5
mycM28z1XXPD1DNR
1x10^5
mycM28z1XXPD1DNR
5x10^4
体重（g）
治疗天数

图36C

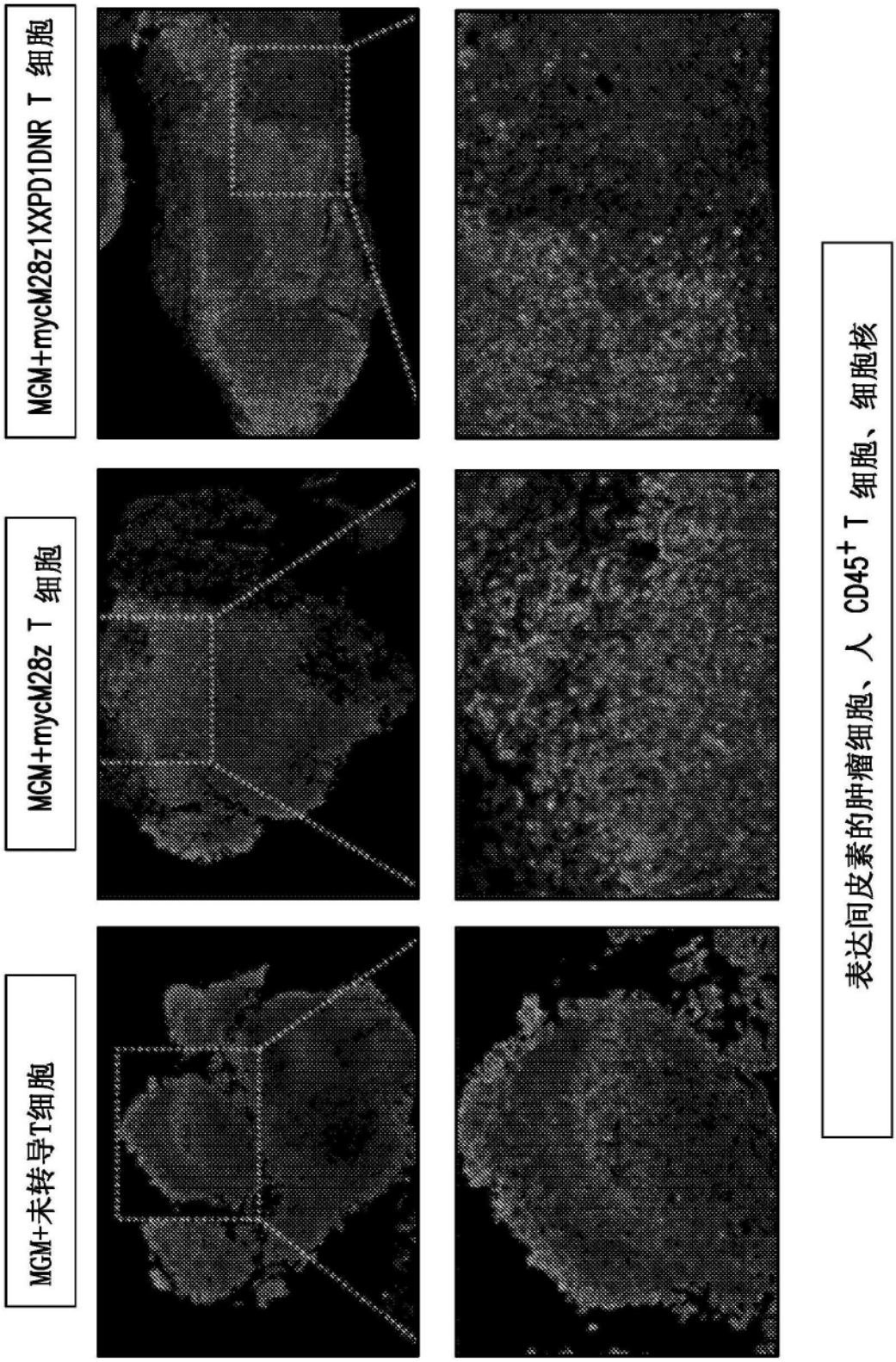

MGM+未转导T细胞
MGM+mycM28z T 细胞
MGM+mycM28z1XXPD1DNR T 细胞
表达间皮素的肿瘤细胞、人 CD45+ T 细胞、细胞核

图37

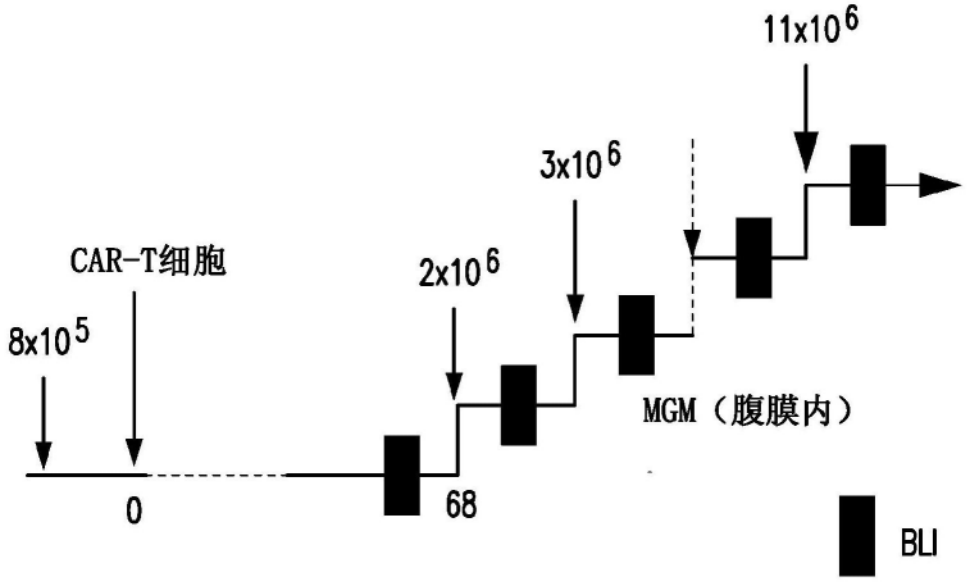

11x10^6
3x10^6
CAR-T细胞
2x10^6
8x10^5
MGM（腹膜内）
0
68
BLI

图38A

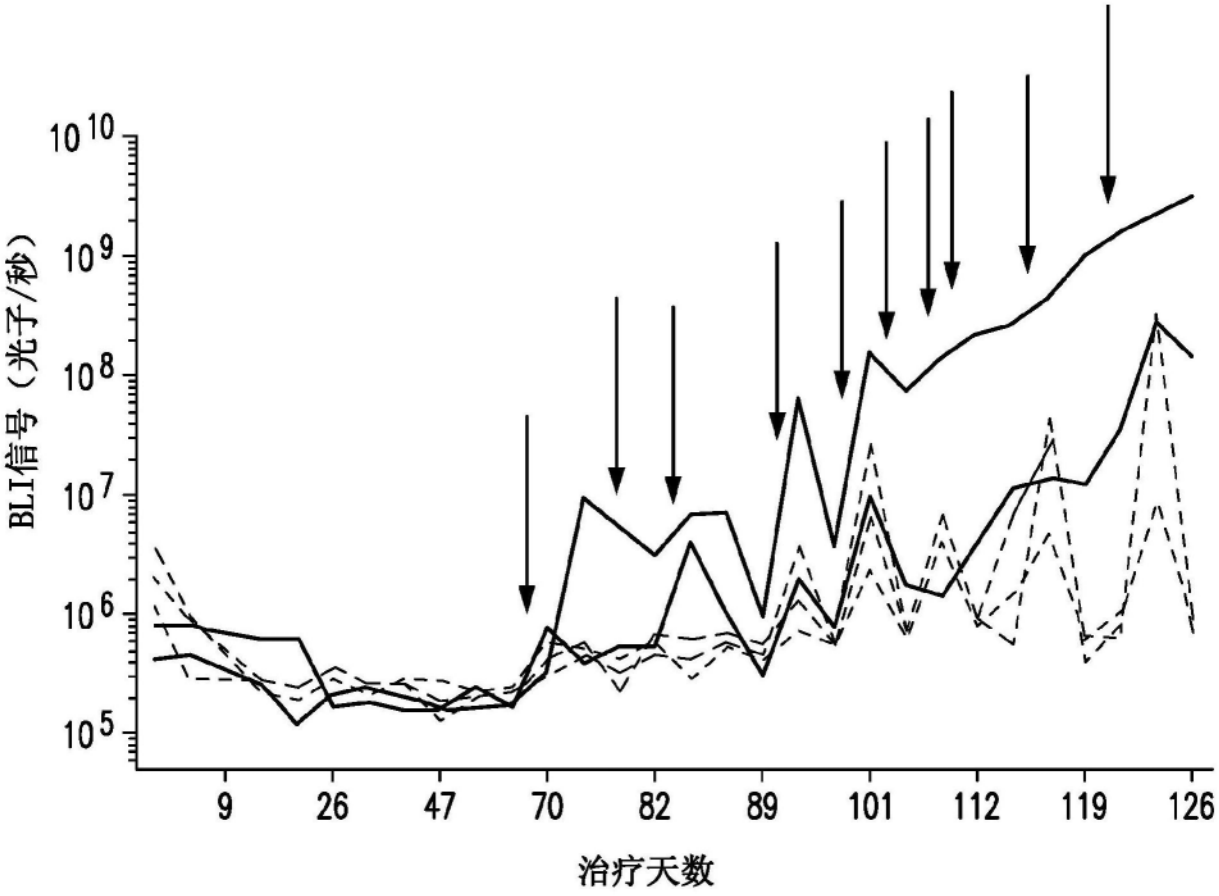

BLI信号（光子/秒）
10^10
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
9
26
47
70
82
89
101
112
119
126
治疗天数

图38B

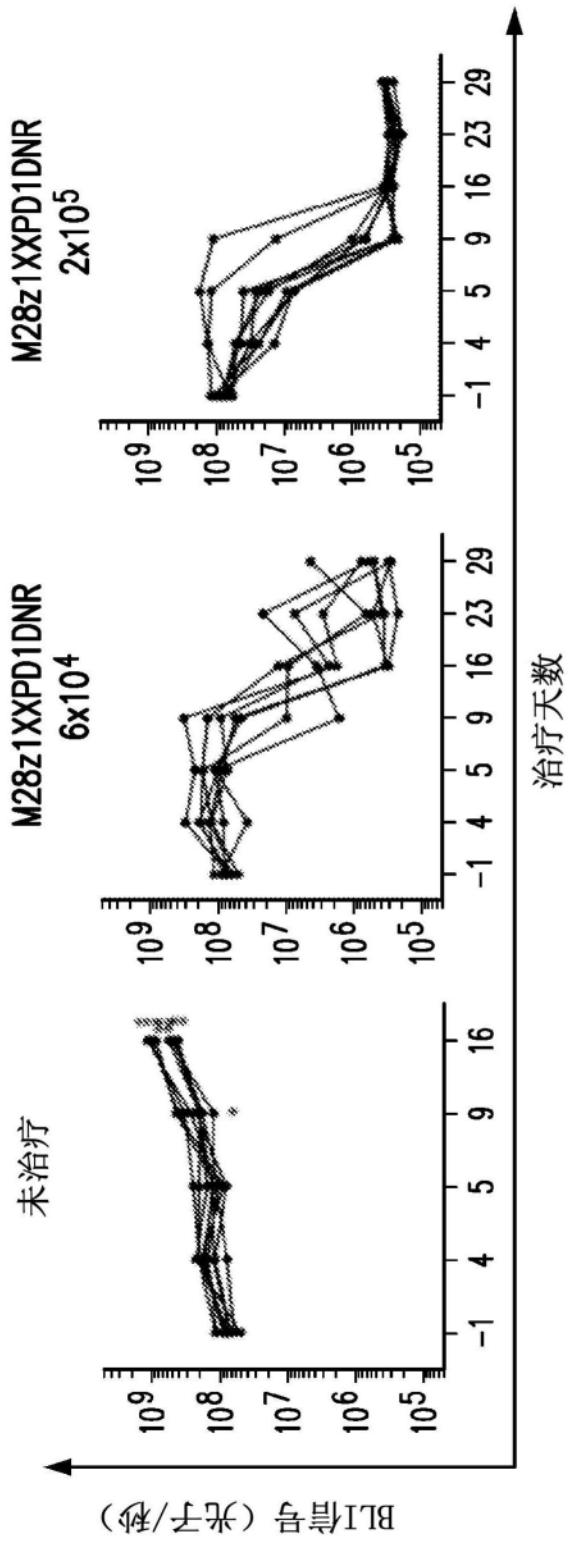

未治疗
M28z1XXPD1DNR
6x10^4
M28z1XXPD1DNR
2x10^5
BLI信号（光子/秒）
治疗天数

图39A

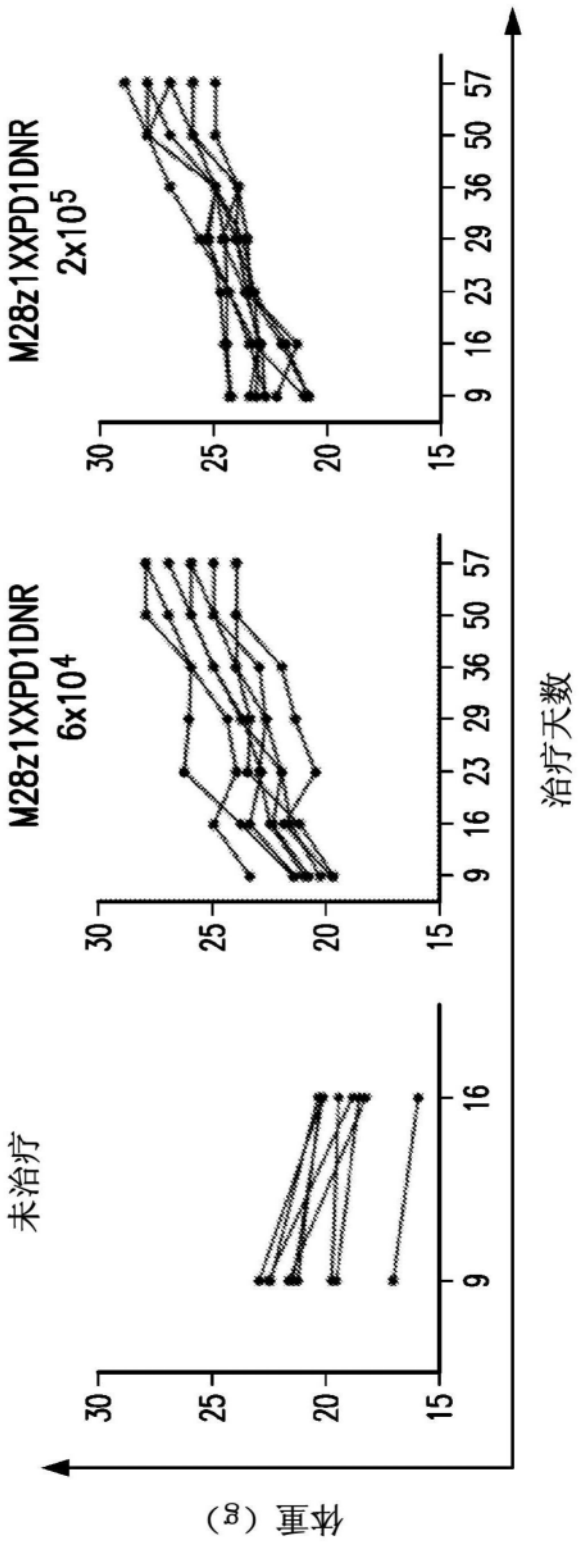

未治疗
M28z1XXPD1DNR
6x10⁴
M28z1XXPD1DNR
2x10⁵
30
25
20
15
9
16
23
29
36
50
57
治疗天数
体重（g）

图39B

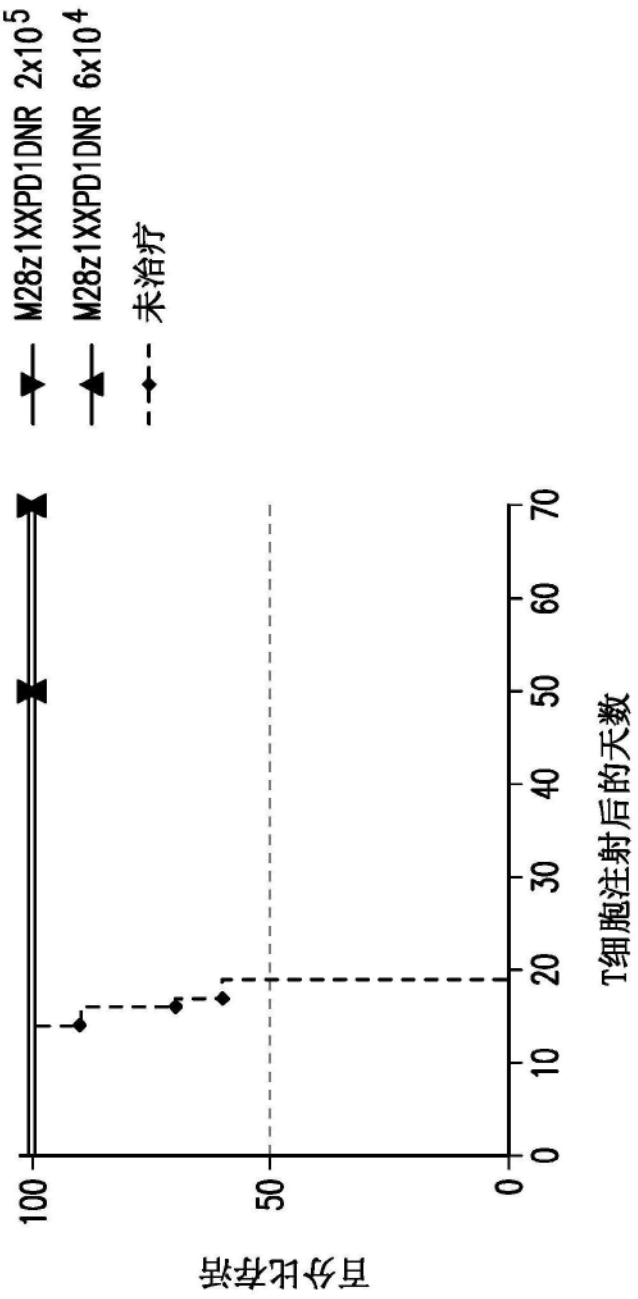

M28z1XXPD1DNR 2x10^5
M28z1XXPD1DNR 6x10^4
未治疗
百分比存活
100
50
0
0
10
20
30
40
50
60
70
T细胞注射后的天数

图39C

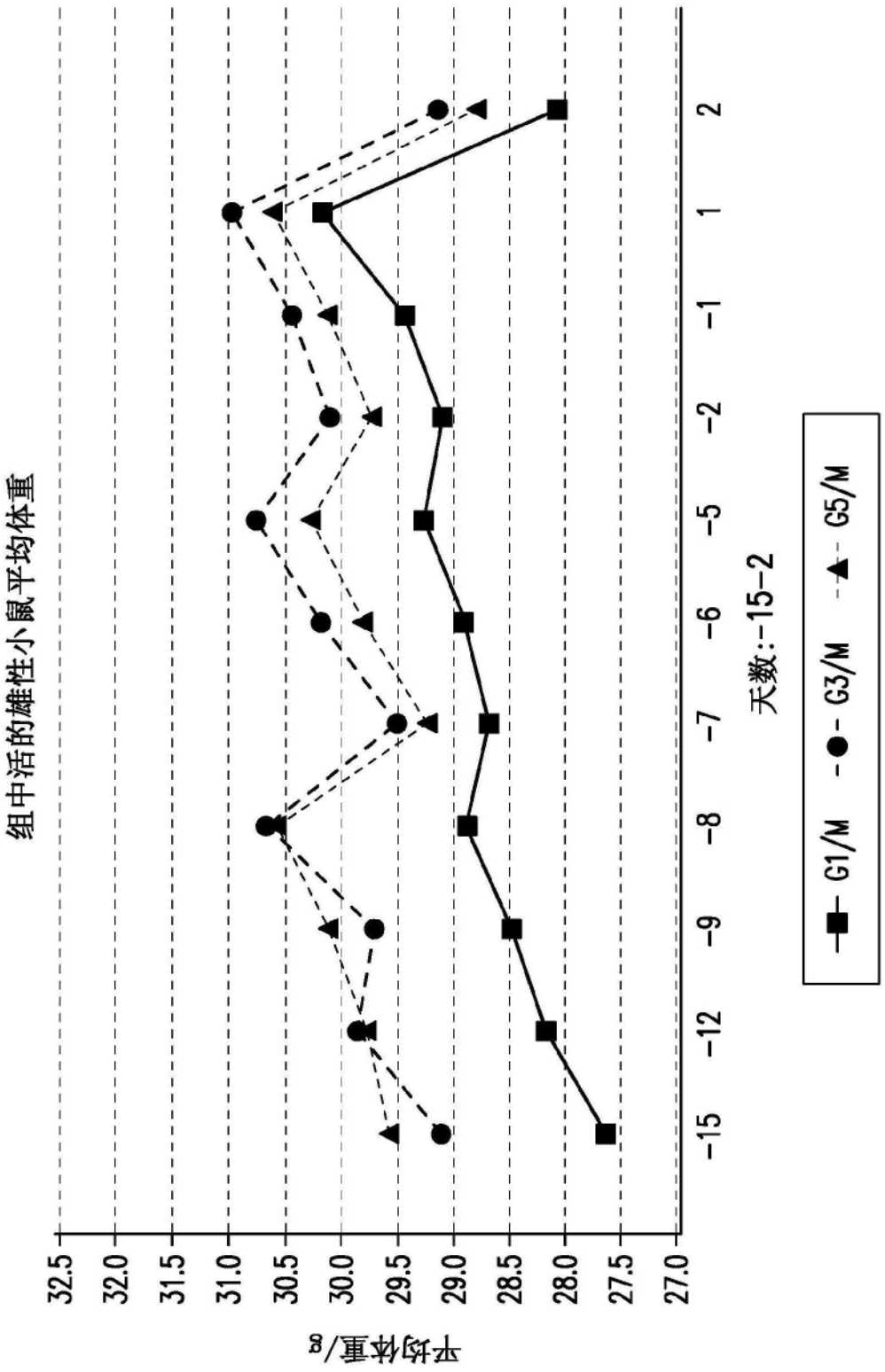

组中活的雄性小鼠平均体重
平均体重/g
32.5
32.0
31.5
31.0
30.5
30.0
29.5
29.0
28.5
28.0
27.5
27.0
-15
-12
-9
-8
-7
-6
-5
-2
-1
1
2
天数:-15-2
G1/M
G3/M
G5/M

图40

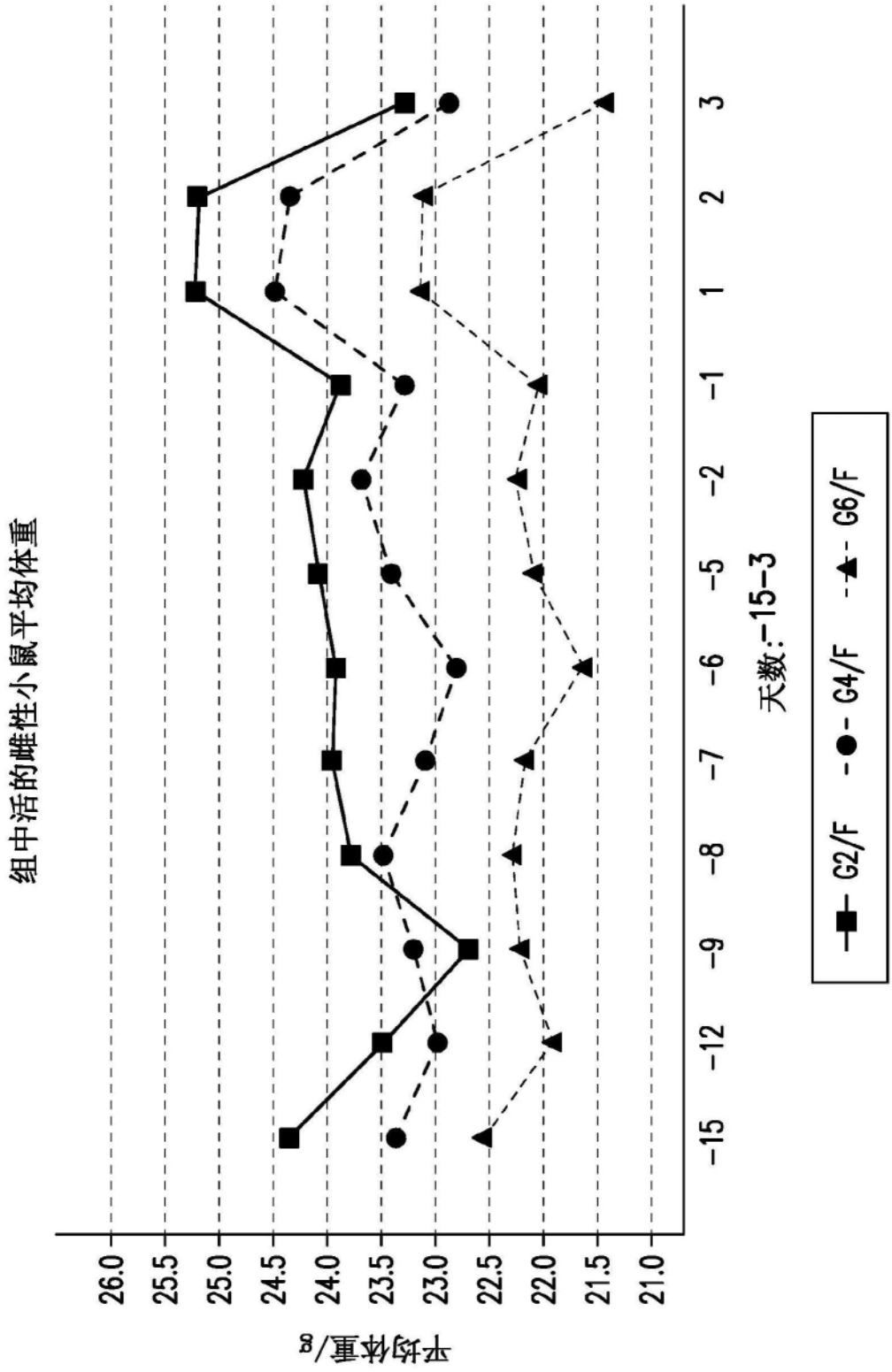

组中活的雌性小鼠平均体重
平均体重/g
26.0
25.5
25.0
24.5
24.0
23.5
23.0
22.5
22.0
21.5
21.0
-15
-12
-9
-8
-7
-6
-5
-2
-1
1
2
3
天数:-15-3
G2/F
G4/F
G6/F

图41

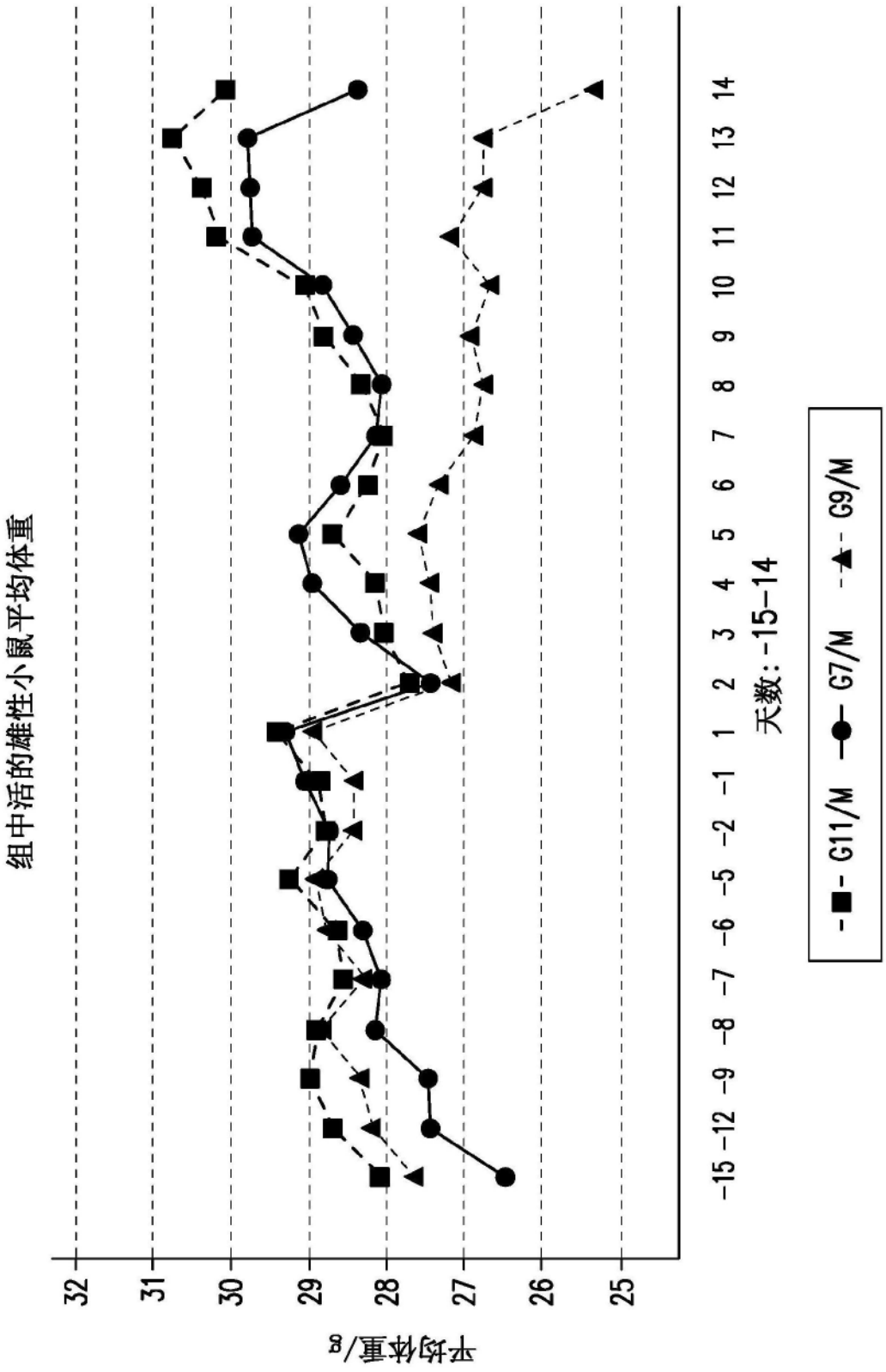

组中活的雄性小鼠平均体重
平均体重/g
32
31
30
29
28
27
26
25
-15 -12 -9 -8 -7 -6 -5 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
天数:-15-14
G11/M
G7/M
G9/M

图42

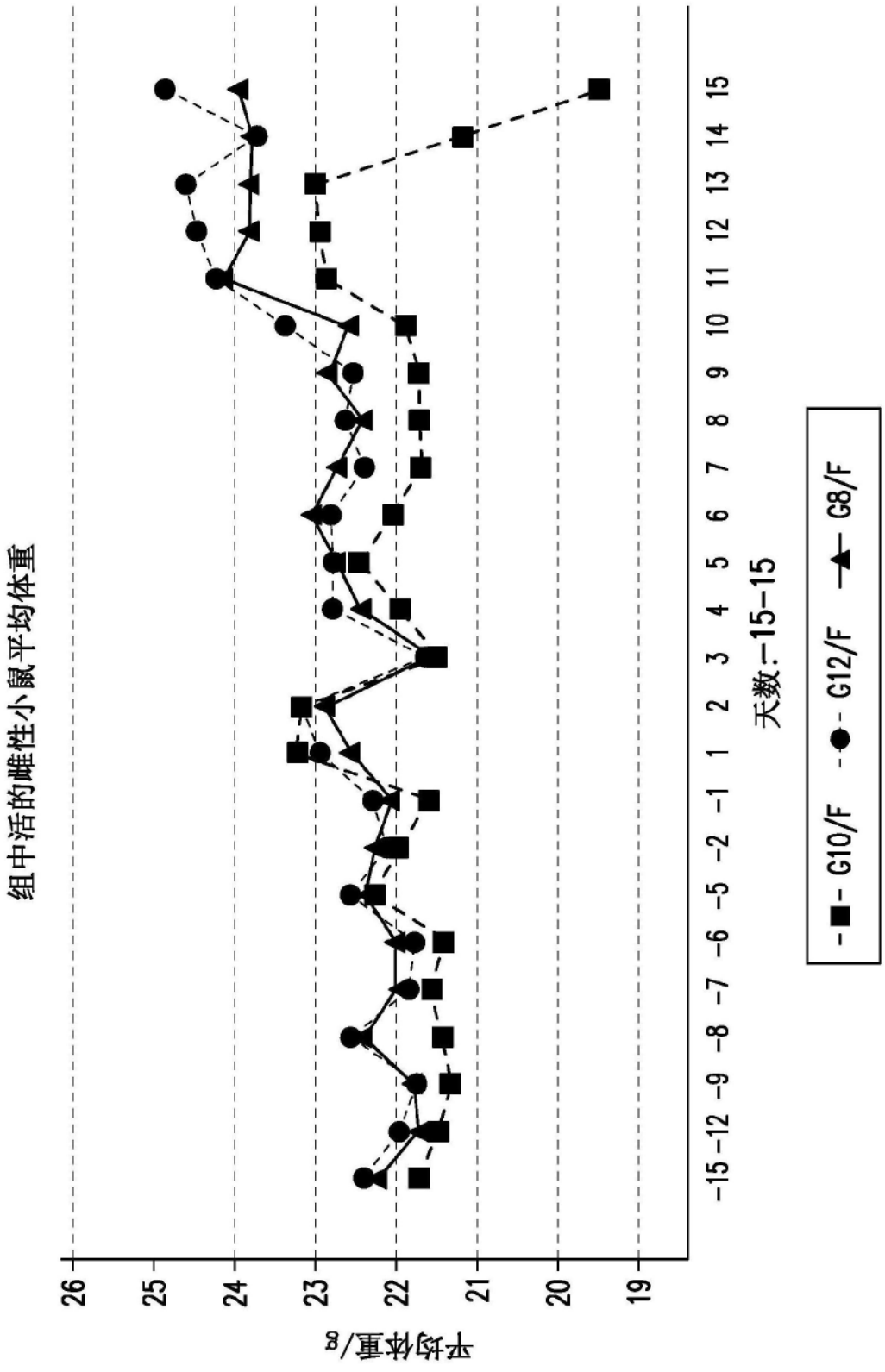

组中活的雌性小鼠平均体重
平均体重/g
26
25
24
23
22
21
20
19
-15 -12 -9 -8 -7 -6 -5 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
天数:-15-15
G10/F
G12/F
G8/F

图43

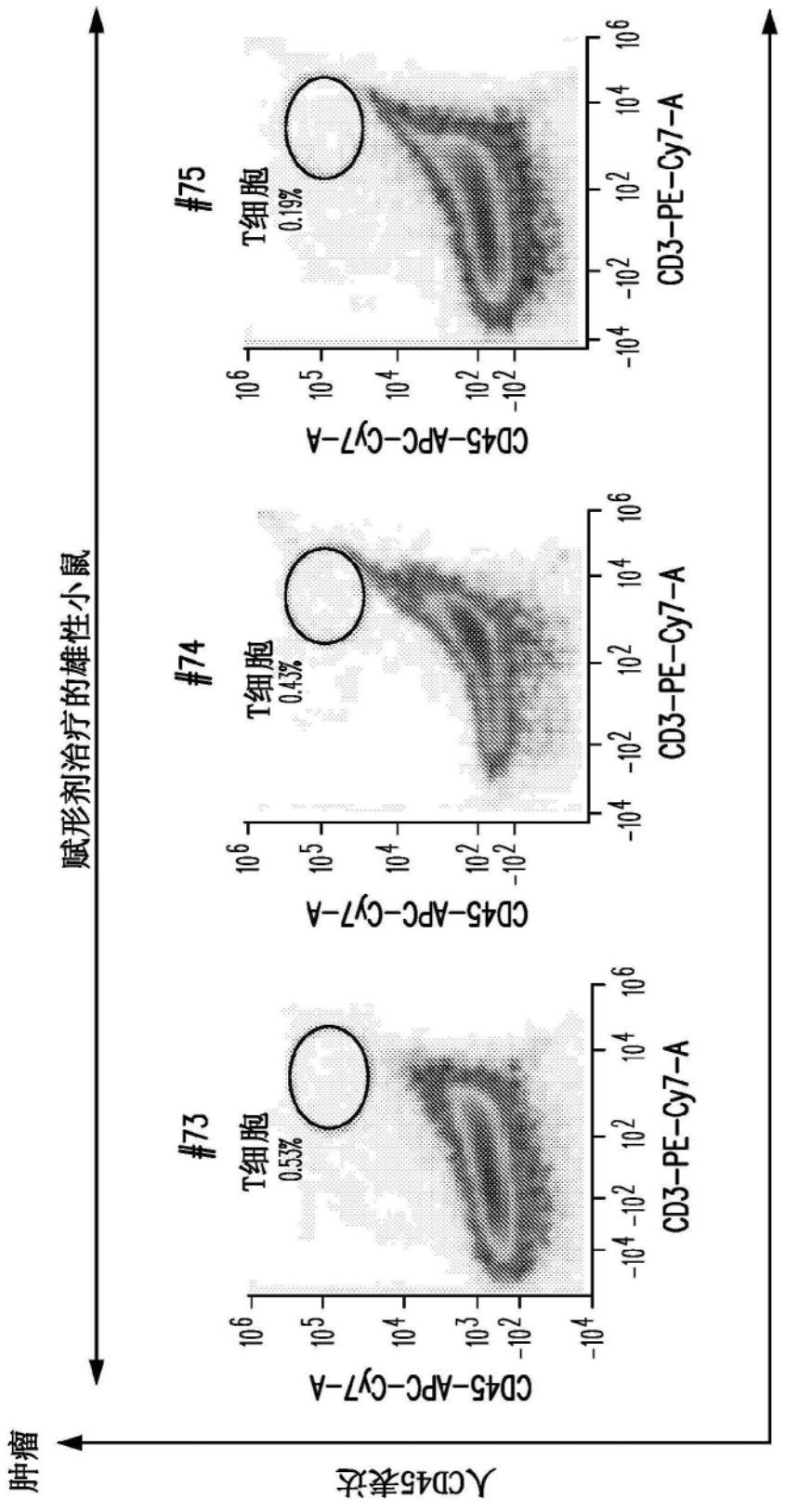

肿瘤
人CD45表达
赋形剂治疗的雌性小鼠
人CD3表达
#73
T细胞
0.53%
#74
T细胞
0.43%
#75
T细胞
0.19%
CD45-APC-Cy7-A
CD3-PE-Cy7-A

图44

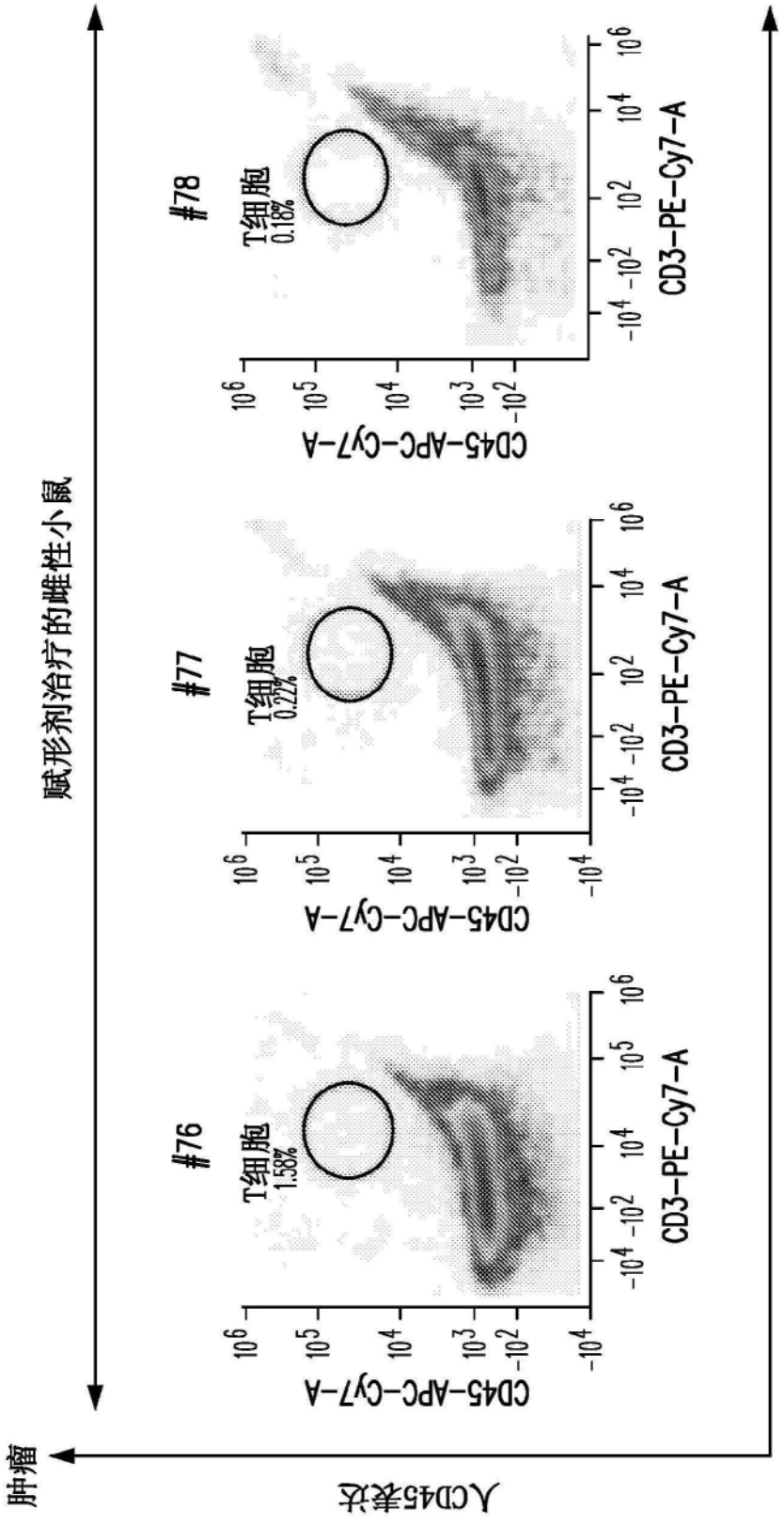

赋形剂治疗的雌性小鼠
肿瘤
人CD45表达
人CD3表达
#76
T细胞
1.58%
#77
T细胞
0.22%
#78
T细胞
0.18%
CD45-APC-Cy7-A
CD3-PE-Cy7-A

图44续

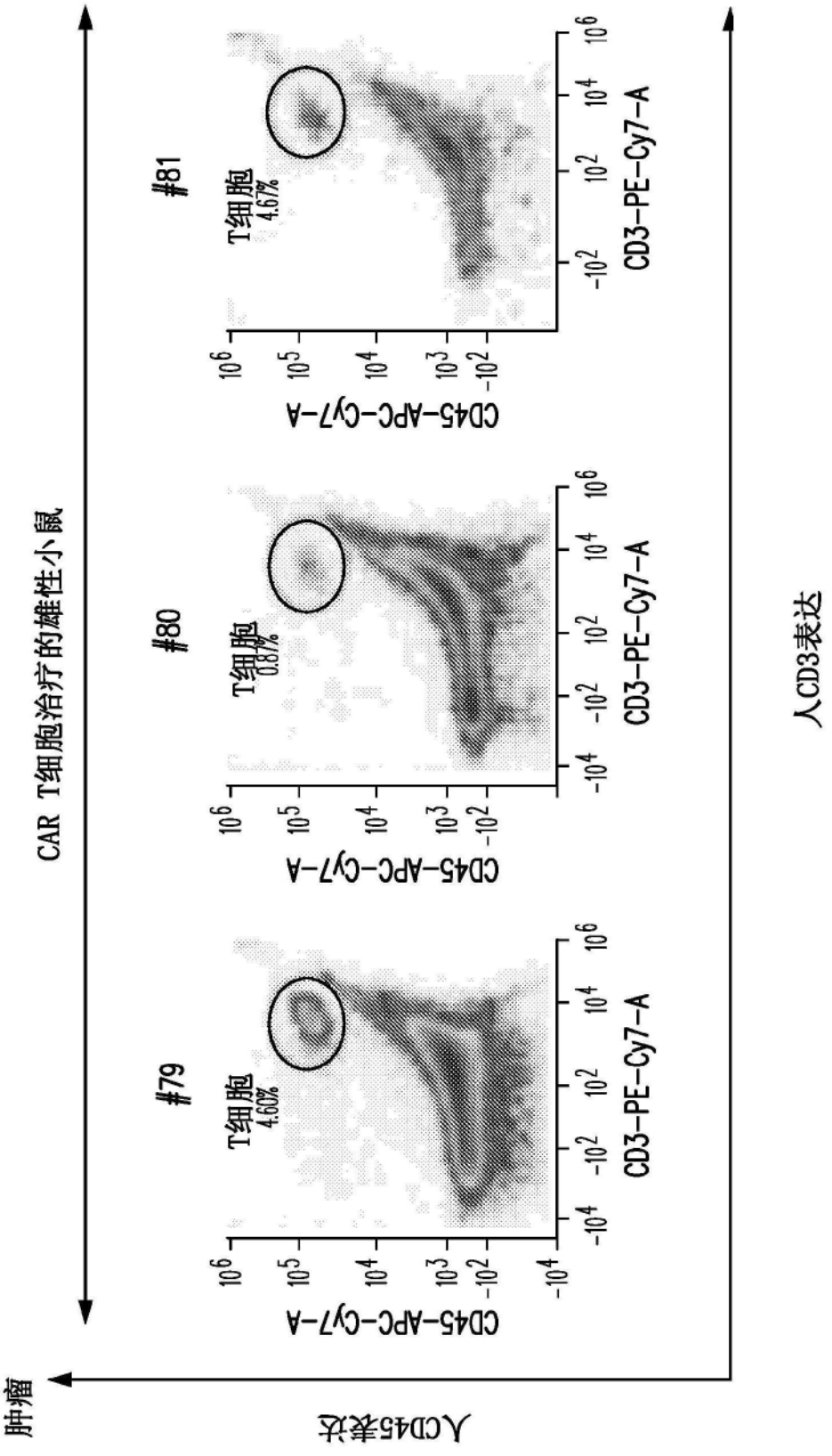

肿瘤
人CD45表达
CAR T细胞治疗的雄性小鼠
#79
T细胞
4.60%
#80
T细胞
0.87%
#81
T细胞
4.67%
CD45-APC-Cy7-A
CD3-PE-Cy7-A
人CD3表达

图44续

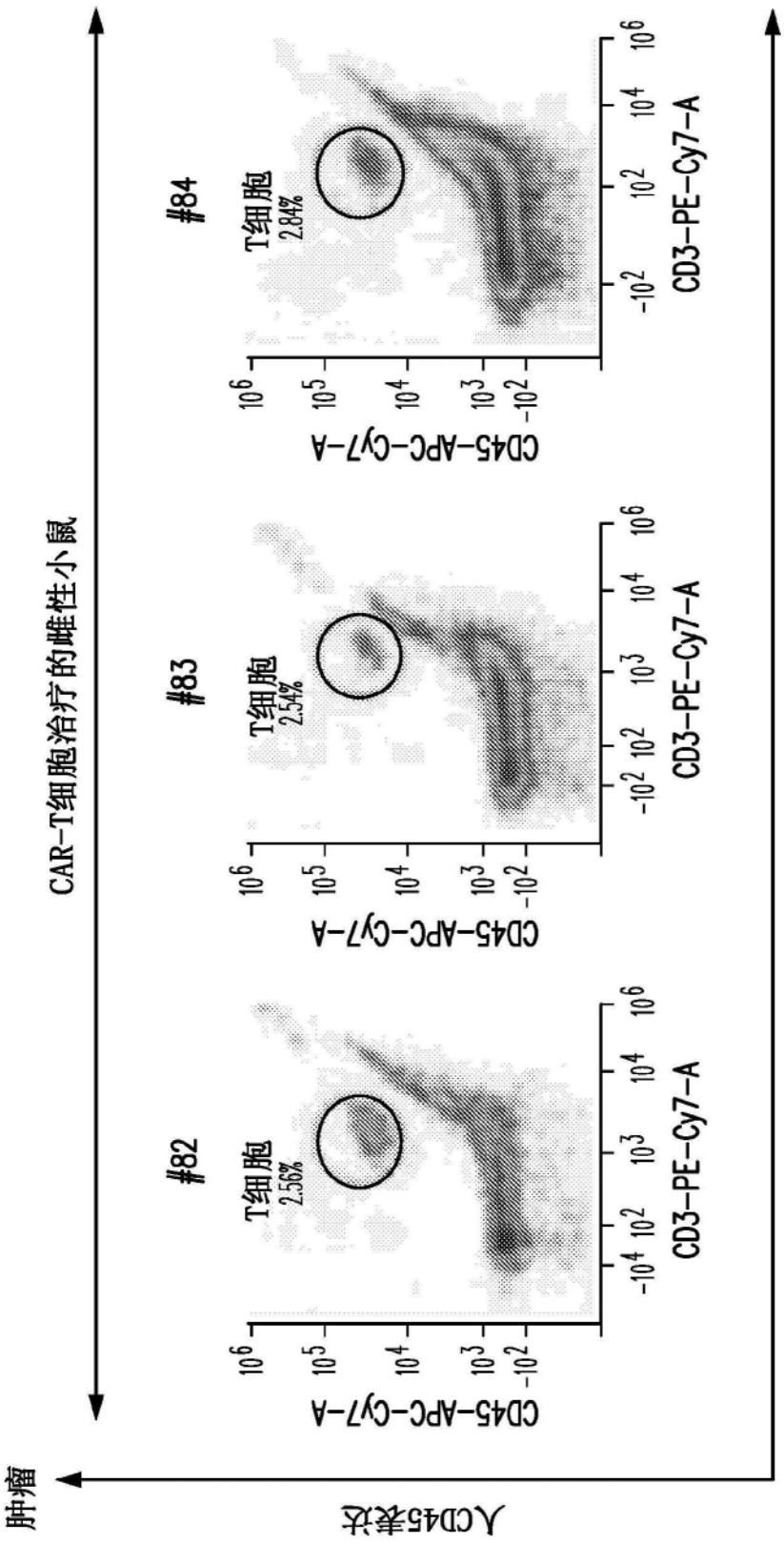

肿瘤
人CD45表达
CAR-T细胞治疗的雌性小鼠
#82
T细胞
2.56%
#83
T细胞
2.54%
#84
T细胞
2.84%
CD45-APC-Cy7-A
CD3-PE-Cy7-A
人CD3表达

图44续

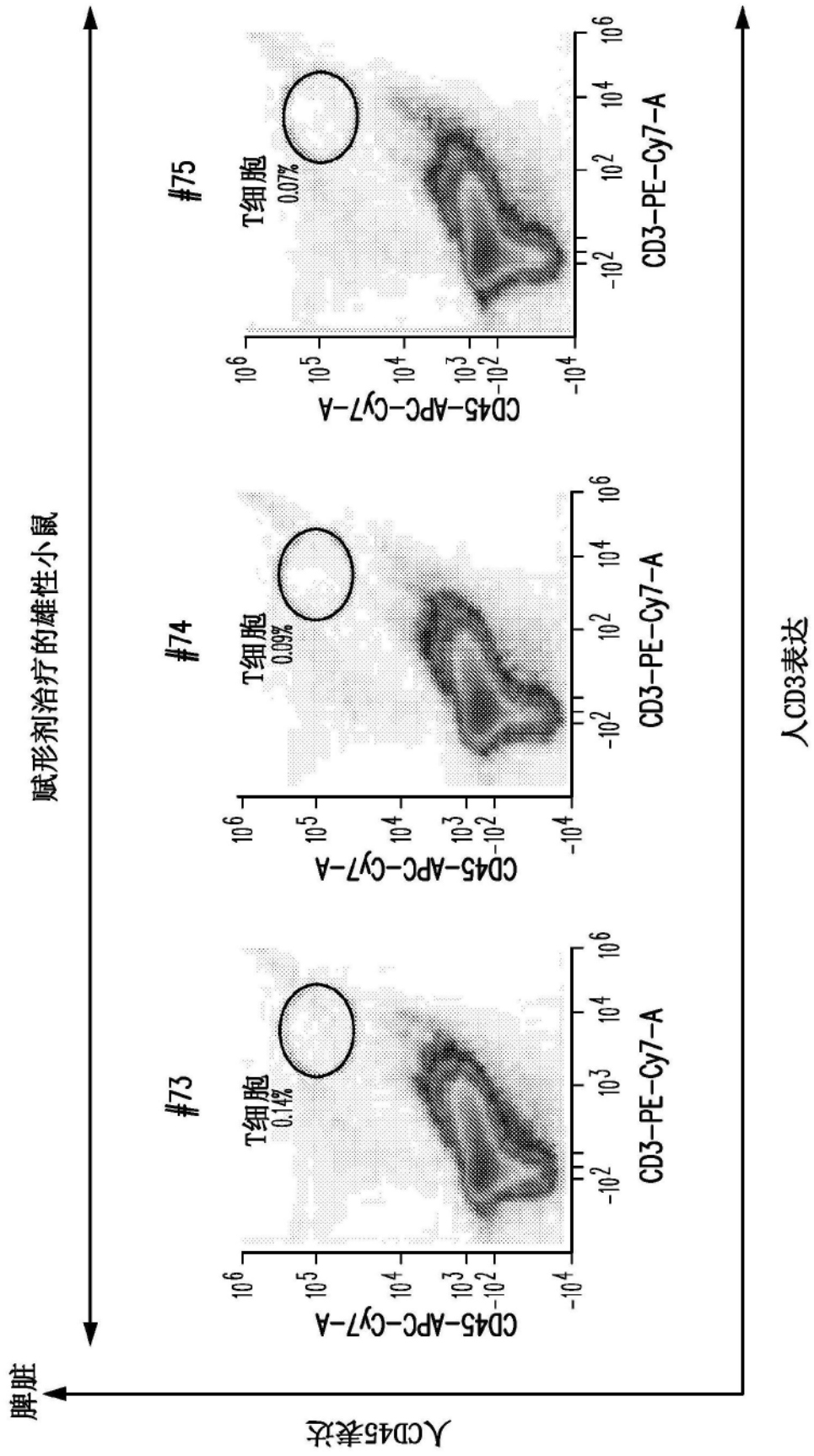

脾脏
人CD45表达
赋形剂治疗的雄性小鼠
人CD3表达
#73
T细胞
0.14%
#74
T细胞
0.09%
#75
T细胞
0.07%
CD45-APC-Cy7-A
CD3-PE-Cy7-A

图45

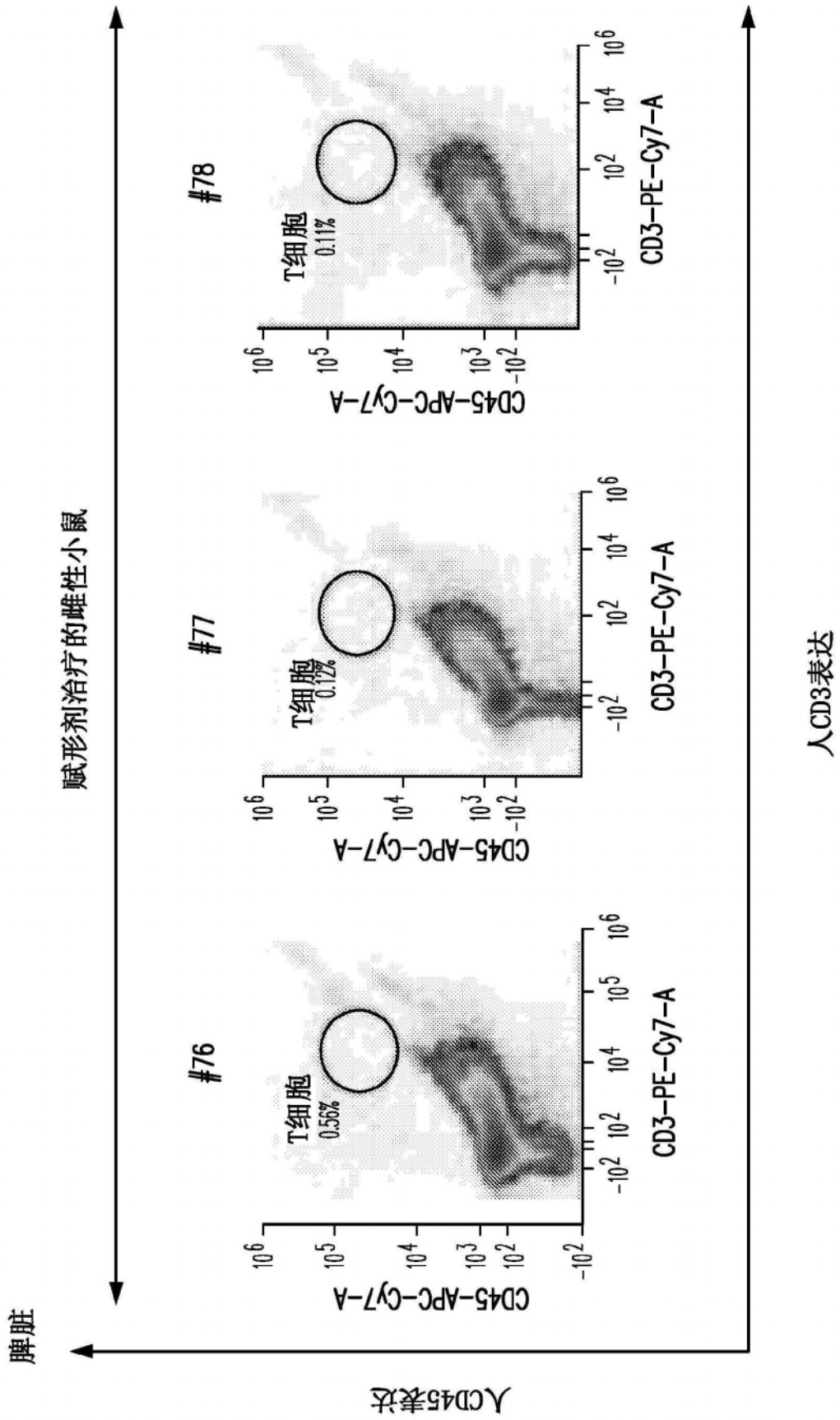

脾脏
赋形剂治疗的雌性小鼠
#76
#77
#78
T细胞
0.56%
T细胞
0.12%
T细胞
0.11%
CD45-APC-Cy7-A
CD3-PE-Cy7-A
人CD45表达
人CD3表达

图45续

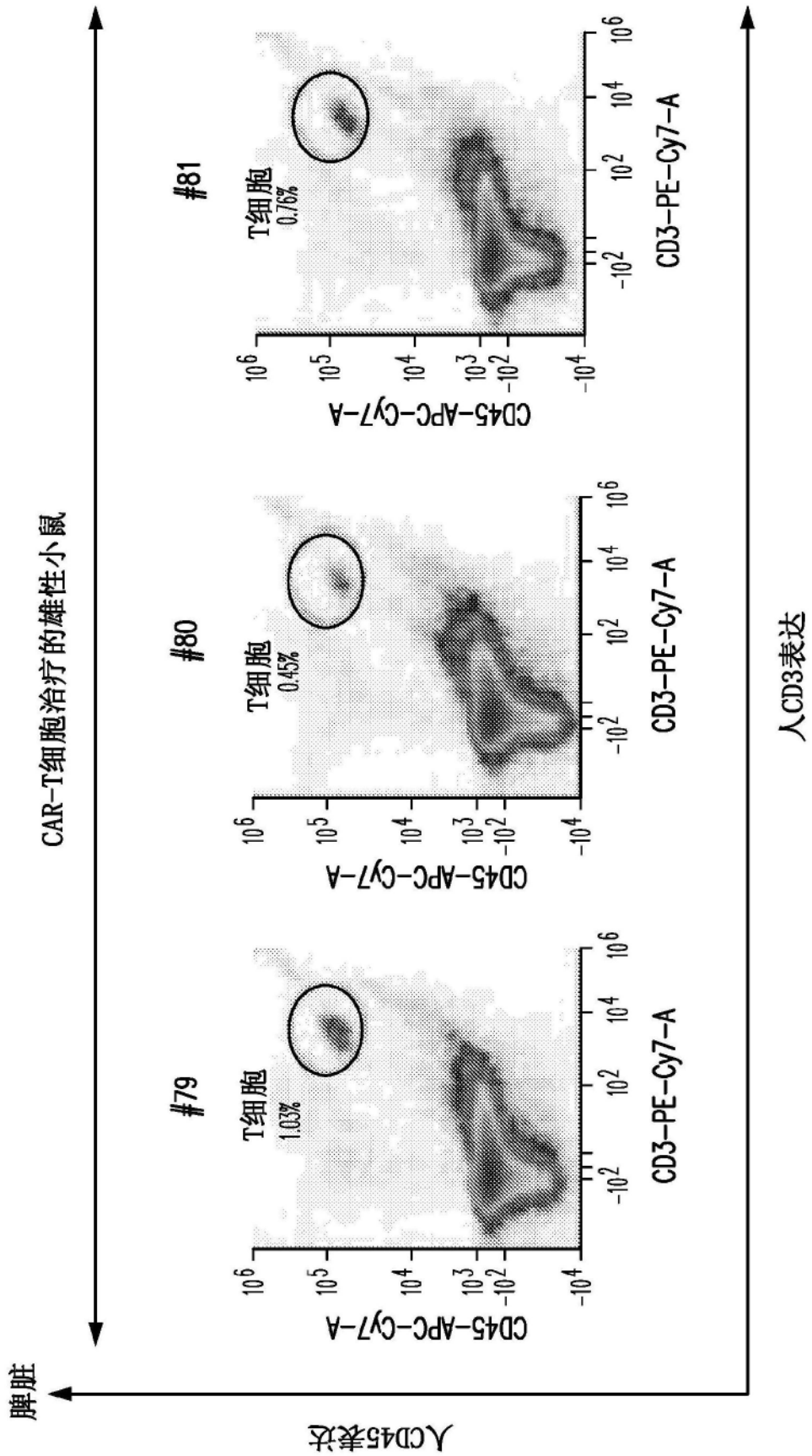

CAR-T细胞治疗的雄性小鼠
脾脏
人CD45表达
人CD3表达
#79
T细胞
1.03%
#80
T细胞
0.45%
#81
T细胞
0.76%
CD45-APC-Cy7-A
CD3-PE-Cy7-A

图45续

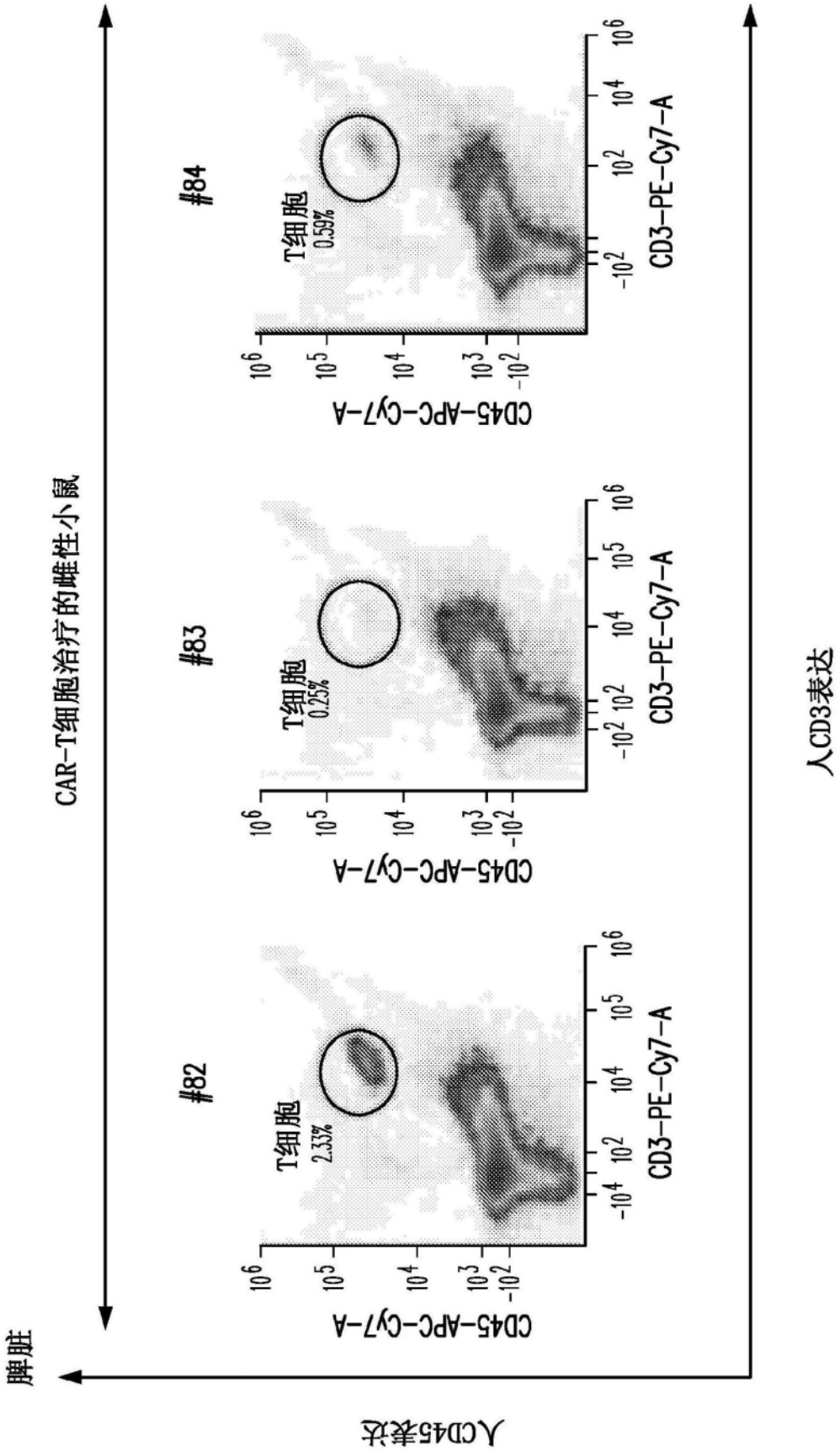

脾脏
CAR-T细胞治疗的雌性小鼠
人CD45表达
人CD3表达
#82
#83
#84
T细胞
2.33%
T细胞
0.25%
T细胞
0.59%
CD45-APC-Cy7-A
CD3-PE-Cy7-A

图45续

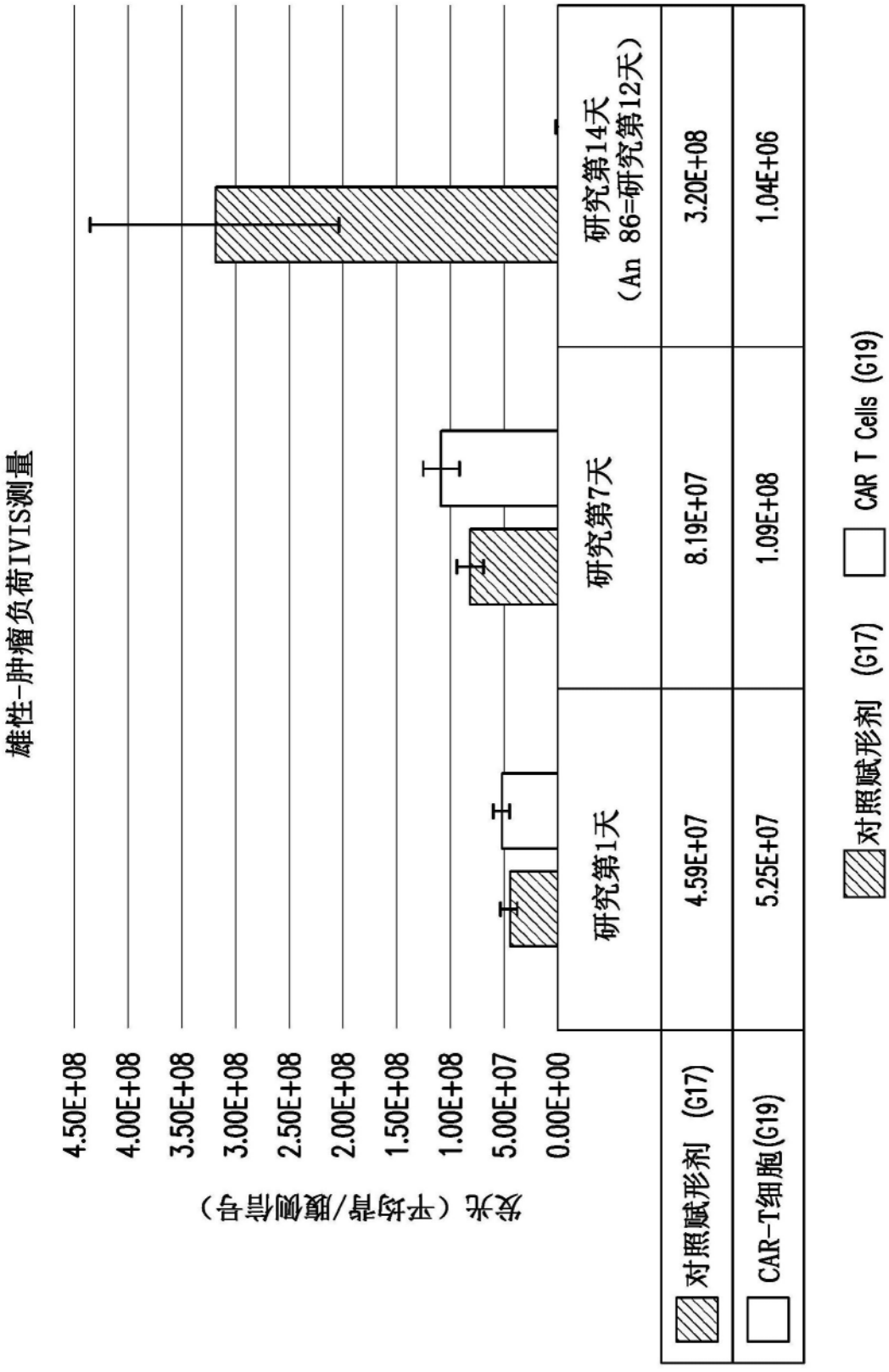

雄性-肿瘤负荷IVIS测量
发光（平均背/腹侧信号）
4.50E+08
4.00E+08
3.50E+08
3.00E+08
2.50E+08
2.00E+08
1.50E+08
1.00E+08
5.00E+07
0.00E+00
研究第1天
研究第7天
研究第14天
（An 86=研究第12天）
对照赋形剂 (G17)
4.59E+07
8.19E+07
3.20E+08
CAR-T细胞(G19)
5.25E+07
1.09E+08
1.04E+06
对照赋形剂 (G17)
CAR T Cells (G19)

图46

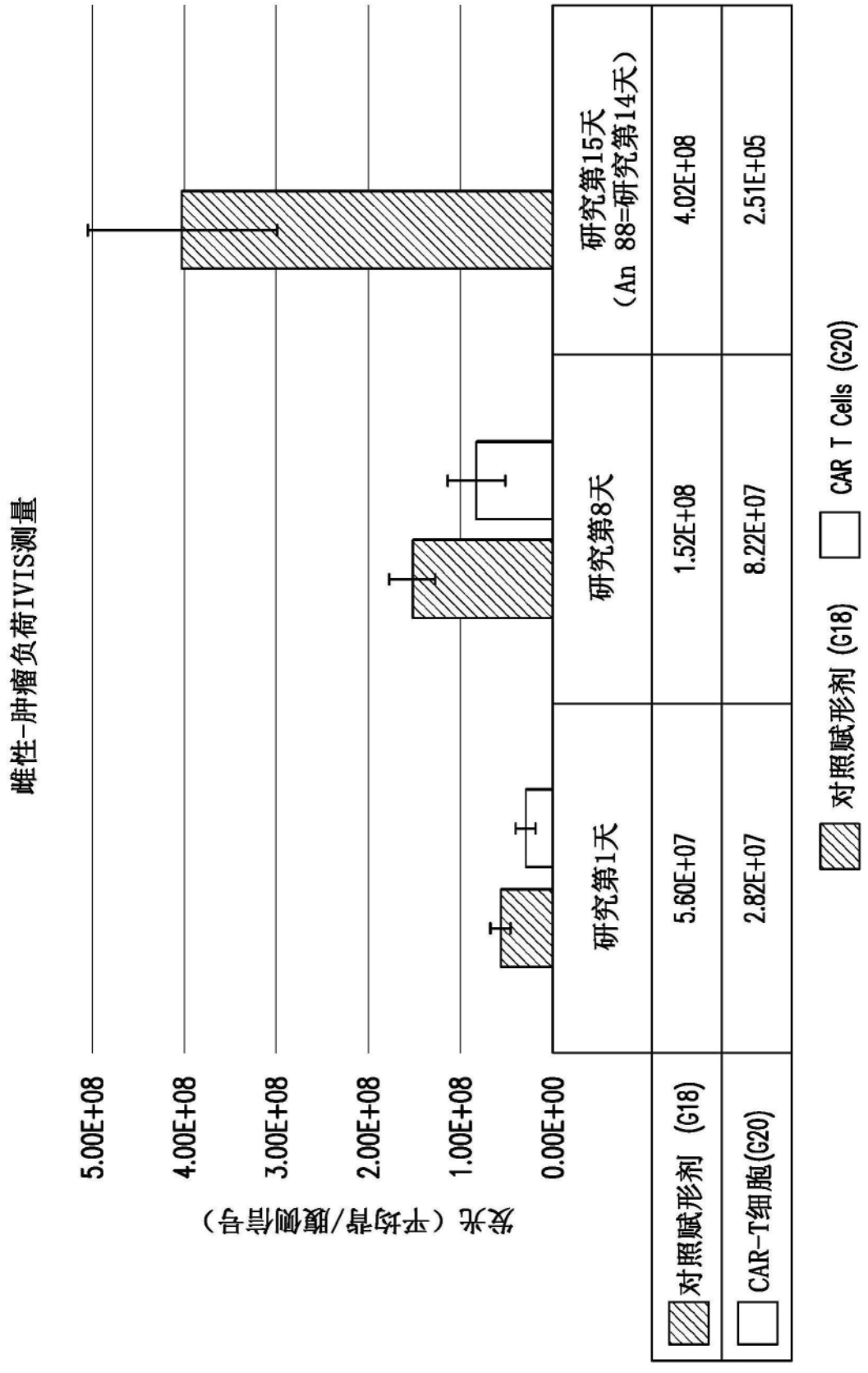

雌性-肿瘤负荷IVIS测量
发光（平均背/腹侧信号）
5.00E+08
4.00E+08
3.00E+08
2.00E+08
1.00E+08
0.00E+00
研究第1天
研究第8天
研究第15天
（An 88=研究第14天）
对照赋形剂 (G18) 5.60E+07 1.52E+08 4.02E+08
CAR-T细胞(G20) 2.82E+07 8.22E+07 2.51E+05
对照赋形剂 (G18)
CAR T Cells (G20)

图47