



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111139256 A

(43)申请公布日 2020.05.12

(21)申请号 201911338490.5

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

(22)申请日 2014.02.20

代理人 张莉 黄革生

(30)优先权数据

61/767,071 2013.02.20 US

61/888,255 2013.10.08 US

(51)Int.Cl.

C12N 15/62(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

201480009507.1 2014.02.20

(71)申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

申请人 宾夕法尼亚大学托管会

高等教育联邦体系匹兹堡大学

(72)发明人 J·布罗格顿 L·A·约翰逊

C·H·琼 A·洛 M·毛斯

J·朔勒 冈田秀穗

权利要求书5页 说明书111页

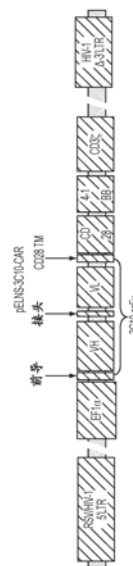
序列表106页 附图26页

(54)发明名称

使用人源化抗EGFRvIII嵌合抗原受体治疗  
癌症

(57)摘要

本发明提供用于治疗EGFRvIII表达相关疾病的组合物和方法。本发明还涉及特异于EGFRvIII的嵌合抗原受体(CAR)、编码其的载体和包含抗EGFRvIII CAR的重组T细胞。本发明还包括施用表达包含抗EGFRvIII结合结构域的CAR的遗传修饰T细胞的方法。



1. 编码嵌合抗原受体 (CAR) 的分离的核酸分子, 其中所述编码的 CAR 包含抗 EGFRvIII 结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域, 所述胞内信号传导结构域包含一级信号传导结构域、或共刺激结构域、或一级信号传导结构域和共刺激结构域, 其中所述抗 EGFRvIII 结合结构域包含轻链可变区和重链可变区, 其中:

(a) 重链可变区包含:

(i) 包含序列 DYYIH (SEQ ID NO:22) 的 CDR1;

(ii) 包含序列 RIDPENDETKYGPIFQG (SEQ ID NO:23) 的 CDR2; 和

(iii) 包含序列 RGGVY (SEQ ID NO:24) 的 CDR3;

(b) 轻链可变区包含:

(i) 包含序列 KSSQSLLSDGKTYLN (SEQ ID NO:26) 的 CDR1;

(ii) 包含序列 LVSKLDS (SEQ ID NO:27) 的 CDR2; 和

(iii) 包含序列 WQGTHFPQT (SEQ ID NO:28) 的 CDR3;

且

(c) 所述抗 EGFRvIII 结合结构域包含氨基酸序列, 所述氨基酸序列:

(i) 与 SEQ ID NO:68 的轻链可变区和/或重链可变区具有至少 95% 序列同一性;

(ii) 具有 SEQ ID NO:68 的轻链可变区和/或重链可变区的不超过 20 个修饰;

(iii) 与 SEQ ID NO:50 的轻链可变区和/或重链可变区具有至少 95% 序列同一性; 或

(iv) 与 SEQ ID NO:80 的轻链可变区和/或重链可变区具有至少 95% 序列同一性。

2. 权利要求 1 的分离的核酸分子, 其中:

(a) 轻链可变区包含表 2 中所列的轻链可变区或与表 2 中所列的轻链可变区具有 95-99% 序列同一性的氨基酸序列; 和

(b) 重链可变区包含表 2 中所列的重链可变区或与表 2 中所列的重链可变区具有 95-99% 序列同一性的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 或 2 的分离的核酸分子, 其中:

(a) 抗 EGFRvIII 结合结构域的轻链可变区包含与 SEQ ID NO:68 的轻链可变区的氨基酸序列具有 95-99% 序列同一性的氨基酸序列, 且抗 EGFRvIII 结合结构域的重链可变区包含与 SEQ ID NO:68 的重链可变区的氨基酸序列具有 95-99% 序列同一性的氨基酸序列;

(b) 抗 EGFRvIII 结合结构域的轻链可变区包含与 SEQ ID NO:50 的轻链可变区的氨基酸序列具有 95-99% 序列同一性的氨基酸序列, 且抗 EGFRvIII 结合结构域的重链可变区包含与 SEQ ID NO:50 的重链可变区的氨基酸序列具有 95-99% 序列同一性的氨基酸序列;

(c) 抗 EGFRvIII 结合结构域的轻链可变区包含与 SEQ ID NO:80 的轻链可变区的氨基酸序列具有 95-99% 序列同一性的氨基酸序列, 且抗 EGFRvIII 结合结构域的重链可变区包含与 SEQ ID NO:80 的重链可变区的氨基酸序列具有 95-99% 序列同一性的氨基酸序列;

(d) 抗 EGFRvIII 结合结构域的轻链可变区包含 SEQ ID NO:68 的轻链可变区的氨基酸序列, 且抗 EGFRvIII 结合结构域的重链可变区包含 SEQ ID NO:68 的重链可变区的氨基酸序列;

(e) 抗 EGFRvIII 结合结构域的轻链可变区包含 SEQ ID NO:50 的轻链可变区的氨基酸序列, 且抗 EGFRvIII 结合结构域的重链可变区包含 SEQ ID NO:50 的重链可变区的氨基酸序列; 或

(f) 抗EGFRvIII结合结构域的轻链可变区包含SEQ ID NO:80的轻链可变区的氨基酸序列,且抗EGFRvIII结合结构域的重链可变区包含SEQ ID NO:80的重链可变区的氨基酸序列。

4. 前述权利要求任一项的分离的核酸分子,其中抗EGFRvIII结合结构域包含SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:80的氨基酸序列。

5. 前述权利要求任一项的分离的核酸分子,其中:

(i) 编码抗EGFRvIII结合结构域的核酸分子包含与SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:81的核苷酸序列具有至少95%序列同一性的核苷酸序列;

(ii) 编码抗EGFRvIII结合结构域的核酸分子包含SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:81的核苷酸序列;

(iii) 编码的CAR包含SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:85的氨基酸序列、或与其具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;和/或

(iv) 编码CAR的核酸分子包含SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:54或SEQ ID NO:84的核苷酸序列、或与其具有至少95%序列同一性的核苷酸序列。

6. 前述权利要求任一项的分离的核酸分子,其中抗EGFRvIII结合结构域包含人抗体或人源化抗体或抗体片段,任选地其中抗体片段是scFv。

7. 前述权利要求任一项的分离的核酸分子,其中:

(i) 编码的CAR包含跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自以下蛋白的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154;

(ii) 所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;在SEQ ID NO:15的氨基酸序列上包含至少一个修饰但不超过20个修饰的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列;和/或

(iii) 编码跨膜结构域的核酸分子包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列、或与其具有至少95%同一性的核苷酸序列。

8. 前述权利要求任一项的分离的核酸分子,其中抗EGFRvIII结合结构域通过铰链区与跨膜结构域连接,任选地其中:

(i) 铰链区包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列、或与其具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或

(ii) 编码铰链区的核酸分子包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列、或与其具有至少95%序列同一性的核苷酸序列。

9. 前述权利要求任一项的分离的核酸分子,其中胞内信号传导结构域包含还包含一级信号传导结构域和共刺激结构域,例如,选自以下蛋白的功能性信号传导结构域:OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137),任选地其中:

(i) 共刺激结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;在SEQ ID NO:16的氨基酸序列中包含至少一个修饰但不超过20个修饰的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;或

(ii) 编码共刺激结构域的核酸分子包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列、或与其具有至少95%序列同一性的核苷酸序列。

10. 前述权利要求任一项的分离的核酸分子,其中:

(i) 胞内信号传导结构域包含一级信号传导结构域;

(ii) 胞内信号传导结构域包含共刺激结构域;

(iii) 胞内信号传导结构域包含4-1BB的功能性信号传导结构域和CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域;

(iv) 共刺激结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;在SEQ ID NO:16的氨基酸序列上包含至少一个修饰但不超过20个修饰的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;且一级信号传导结构域包含SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的氨基酸序列;在SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的氨基酸序列上包含至少一个修饰但不超过20个修饰的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;

(v) 胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列和SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的氨基酸序列,其中包含胞内信号传导结构域的这些氨基酸序列在相同读框中作为单个多肽链表达;和/或

(vi) 编码胞内信号传导结构域的核酸分子包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列或与其具有至少95%序列同一性的核苷酸序列、和/或SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:100的核苷酸序列或与其具有至少95%序列同一性的核苷酸序列。

11. 前述权利要求任一项的分离的核酸分子,其中CAR包含前导序列,任选地其中前导序列包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

12. 由前述权利要求任一项的核酸分子编码的分离的CAR分子,任选地其中所述分离的CAR分子包含SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:55、或SEQ ID NO:85的氨基酸序列、或与其具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

13. 嵌合抗原受体 (CAR) 分子,其包含抗EGFRvIII结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域包含一级信号传导结构域、或共刺激结构域、或一级信号传导结构域和共刺激结构域,其中所述抗EGFRvIII结合结构域包含轻链可变区和重链可变区,其中:

(a) 重链可变区包含:

(i) 包含序列DYVYIH (SEQ ID NO:22) 的CDR1;

(ii) 包含序列RIDPENDETKYGPIFQG (SEQ ID NO:23) 的CDR2;和

(iii) 包含序列RGGVY (SEQ ID NO:24) 的CDR3;

(b) 轻链可变区包含:

(i) 包含序列KSSQSLLSDGKTYLN (SEQ ID NO:26) 的CDR1;

(ii) 包含序列LVSKLDS (SEQ ID NO:27) 的CDR2;和

(iii) 包含序列WQGTHFPQT (SEQ ID NO:28) 的CDR3;

且

(c) 所述抗EGFRvIII结合结构域包含氨基酸序列,所述氨基酸序列:

(i) 与SEQ ID NO:68的轻链可变区和/或重链可变区具有至少95%序列同一性;

(ii) 具有SEQ ID NO:68的轻链可变区和/或重链可变区的不超过20个修饰;

(iii) 与SEQ ID NO:50的轻链可变区和/或重链可变区具有至少95%序列同一性;或

(iv) 与SEQ ID NO:80的轻链可变区和/或重链可变区具有至少95%序列同一性。

14. 权利要求13的CAR分子,其中所述CAR分子是权利要求2-12任一项中定义的CAR。

15. 抗EGFRvIII结合结构域,其包含轻链可变区和重链可变区,其中:

(a) 重链可变区包含:

(i) 包含序列DYYIH (SEQ ID NO:22) 的CDR1;

(ii) 包含序列RIDPENDETKYGPIFQG (SEQ ID NO:23) 的CDR2;和

(iii) 包含序列RGGVY (SEQ ID NO:24) 的CDR3;

(b) 轻链可变区包含:

(i) 包含序列KSSQSLLSDSGKTYLN (SEQ ID NO:26) 的CDR1;

(ii) 包含序列LVSKLDS (SEQ ID NO:27) 的CDR2;和

(iii) 包含序列WQGTHFPQT (SEQ ID NO:28) 的CDR3;

且

(c) 所述抗EGFRvIII结合结构域包含氨基酸序列,所述氨基酸序列:

(i) 与SEQ ID NO:68的轻链可变区和/或重链可变区具有至少95%序列同一性;

(ii) 具有SEQ ID NO:68的轻链可变区和/或重链可变区的不超过20个修饰;

(iii) 与SEQ ID NO:50的轻链可变区和/或重链可变区具有至少95%序列同一性;或

(iv) 与SEQ ID NO:80的轻链可变区和/或重链可变区具有至少95%序列同一性。

16. 包含权利要求1-11任一项的核酸分子的载体,任选地其中:

(i) 载体选自DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、或逆转录病毒载体;

(ii) 载体还包含启动子,例如EF-1启动子,例如包含SEQ ID NO:97的核苷酸序列的EF-1启动子;

(iii) 载体是体外转录载体;

(iv) 载体还包含含有poly (A) 尾的核苷酸序列;和/或

(v) 载体还包含含有3' UTR的核苷酸序列。

17. 包含权利要求1-11任一项的核酸分子、权利要求12的分离的CAR分子、权利要求13或14的CAR分子、或权利要求16的载体的分离的细胞,任选地其中:

(i) 细胞是T细胞,例如CD8+T细胞;和/或

(ii) 细胞是人细胞。

18. 一种体外或离体方法:

(i) 所述方法是制备细胞的方法,包括用权利要求1-11任一项的核酸分子或权利要求16的载体转导T细胞;或

(ii) 所述方法是产生RNA工程化细胞群的方法,包括将体外转录的RNA或合成的RNA引入细胞中,其中所述RNA包含权利要求1-11任一项的核酸分子。

19. 权利要求17的细胞用于在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫的方法,所述方法包括向哺乳动物施用有效量的所述细胞。

20. 权利要求17的细胞用于治疗罹患EGFRvIII表达相关疾病的哺乳动物的方法,包括向哺乳动物施用有效量的所述细胞,任选地其中EGFRvIII表达相关疾病是选自以下的癌症:多形性成胶质细胞瘤 (GBM)、间变型星形细胞瘤、巨细胞型成胶质细胞瘤、胶质肉瘤、间变型少突胶质细胞瘤、间变型室管膜细胞瘤、脉络丛瘤、间变性神经节胶质细胞瘤

(anaplastic ganglioglioma)、成松果体细胞瘤、髓上皮瘤、成室管膜细胞瘤、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤 (supratentorial primitive neuroectodermal tumor)、非典型畸胎样/横纹肌样瘤 (atypical teratoid/rhabdoid tumor)、肺癌 (例如非小细胞肺癌)、胸、前列腺、卵巢、结直肠和膀胱癌、以及其任何组合, 和任何所述癌症的转移。

21. 权利要求1-11任一项的分离的核酸分子、权利要求12的分离的CAR分子、权利要求13或14的CAR分子、权利要求16的载体、或权利要求17的细胞用作药物。

## 使用人源化抗EGFRvIII嵌合抗原受体治疗癌症

[0001] 本申请是申请日为2014年2月20日的、发明名称为“使用人源化抗 EGFRvIII嵌合抗原受体治疗癌症”的中国专利申请201480009507.1 (PCT/US2014/017364)的分案申请。

[0002] 本申请要求2013年10月8日递交的美国系列号61/888,255和2013年2月20日递交的美国系列号61/767,071的优先权,这些美国申请的全部内容均并入此处作为参考。

[0003] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明在美国国立卫生研究院 (NIH) 资助的2R01 NS055140和1P01 CA1322714下由政府支持而完成。政府在本发明中享有一定的权利。

[0005] 序列表

[0006] 本申请包含序列表,该序列表已经以ASCII格式电子提交,特此将其全部内容并入作为参考。所述ASCII拷贝创建于2014年2月20日,命名为N2067-7000W0\_SL.txt,228,605字节大小。

### 发明领域

[0007] 本发明一般地涉及,经工程化以表达嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞在治疗表皮生长因子受体III表达相关疾病中的用途。

### 背景技术

[0008] 尽管中枢神经系统 (CNS) 常常被认为是免疫学特免的 (Okada等,2009, Crit Rev Immunol 29:1-42),但近来在恶性胶质瘤患者中的疫苗研究证实了阳性结果 (Aguilar等,2012,Curr Treat Options Oncol 13:437-450; Ruzevick等,2012,Neurosurg Clin N Am 23:459-470;15;和Okada等,2011,J Clin Oncol 29:330-336)。然而,依赖于完整宿主免疫活性的疫苗功效可由于免疫抑制性细胞因子的肿瘤表达以及化疗和放疗而遭受到全身性免疫抑制。另一方面,使用自体T细胞,尤其是转导了嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞,进行过继性细胞转移 (ACT) 治疗,在探索性血液癌症试验中已经表现出希望 (Kalos等,2011,Sci Transl Med 3(95):95ra73;和Porter等,2011,New England Journal of Medicine 365:725-733)。

[0009] 常常在各种癌中,包括胸、肺、头和颈癌、以及成胶质细胞瘤中检测到表皮生长因子受体 (EGFR) 的增强表达。EGF受体基因中自发的重排最先在原发性人成胶质细胞瘤中被鉴定到,并已经在几乎所有情况下在具有 EGFR扩增的肿瘤中报道了改变。这些重排导致三种不同类型的突变。最常见的是III型EGF缺失突变受体 (EGFRvIII),特征在于EGFR mRNA中外显子2-7的缺失。这些缺失相应于cDNA核苷酸275-1075 (编码氨基酸6-276),推测由可变剪接或重排引起。EGFR基因的胞外域中801bp 的缺失造成正常EGFR蛋白的读框内截短,导致145kDa受体,由此形成肿瘤特异的免疫原性表位 (综述见Hatanpaa等,2010,Neoplasia 12:675-684;Mukasa等,2010,Proc Natl Acad Sci USA 107:2616-2621)。EGFRvIII 表达已经在许多肿瘤类型中被观察到,包括多形性成胶质细胞瘤 (GBM),但是在正常组织中罕见。EGFRvIII在24%到67%GBM病例中表达,并且在存活 $\geq 1$ 年的患者中,EGFRvIII表达是一

个独立的阴性预后指标 (Heimberger等,2005,Clin.Cancer Res.11:1462-1466; Heimberger等,2005, J Transl.Med 3:38)。

#### [0010] 发明概述

[0011] 本发明通过提供优化的和/或人源化的结合表皮生长因子受体III (EGFRvIII)的抗体或抗体片段(例如scFv),提供,例如,用于在患者中控制免疫应答的组合物和方法,其中所述抗体或抗体片段整合在嵌合抗原受体(CAR)构建体中。在一些实施方案中,本发明涉及经工程化表达结合 EGFRvIII的抗体或抗体片段(例如结合EGFRvIII的人源化抗体或抗体片段)的T细胞在治疗EGFRvIII表达相关癌症中的用途,其中所述抗体或抗体片段整合在CAR中。在一些方面,本发明涉及过继细胞转移,由于与体内免疫诱导的天然T细胞相比,可以对离体(ex vivo)制备的细胞的特异性、数量和功能表型进行远远好得多的操作和控制,故过继细胞转移可能特别适用于胶质瘤患者。

[0012] 因此,一方面,本发明涉及编码嵌合抗原受体(CAR)的分离核酸分子,其中该CRA包含:包括抗EGFRvIII结合结构域的抗体或抗体片段(例如,特异性结合EGFRvIII的人源化抗体或抗体片段)、跨膜结构域、和胞内信号传导结构域(例如,包含共刺激结构域和/或第一信号传导结构域(primary signaling domain)的胞内信号传导结构域)。在一个实施方案中,CAR包含:包括本文所述抗EGFRvIII结合结构域的抗体或抗体片段(例如,本文所述特异性结合EGFRvIII的人源化抗体或抗体片段)、本文所述跨膜结构域、和本文所述胞内信号传导结构域(例如,包含共刺激结构域和/或第一信号传导结构域的胞内信号传导结构域)。

[0013] 在一个实施方案中,编码的抗EGFRvIII结合结构域包含本文所述抗 EGFRvIII结合结构域的轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区 2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)之一或多个(例如所有三个)、以及本文所述抗EGFRvIII结合结构域的重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)之一或多个(例如所有三个),例如,包含一个或多个(如所有三个)LC CDR 和一个或多个(如所有三个)HC CDR的人源化抗EGFRvIII结合结构域。在一个实施方案中,编码的抗EGFRvIII结合结构域包含本文(例如表2或 SEQ ID NO:11中)所述轻链可变区和/或本文(例如表2或SEQ ID NO:11 中)所述重链可变区。在一个实施方案中,编码的抗EGFRvIII结合结构域是包含表2或SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域(例如scFv)包含:轻链可变区,其包含在表2或SEQ ID NO:11所示轻链可变区的氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过30个、20个或10个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与表2或SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含在表2或SEQ ID NO:11所示重链可变区的氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过30个、20个或10个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与表2或SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域包含选自SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:50,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:68,SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80,和SEQ ID NO:86的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码抗EGFRvIII结合结构域的核酸序列包含 SEQ ID NO:68的序列。在一个实施方案中,编码抗EGFRvIII结合结构域的核酸序列包含选自SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:57,SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:69,SEQ ID NO:75,SEQ ID NO:81,和SEQ ID NO:98的序列、或与其具有95-99%

同一性的序列。在一个实施方案中,编码的抗EGFRvIII结合结构域是scFv,包含本文(例如表2或SEQ ID NO:11中)所述氨基酸序列的轻链可变区与包含本文(例如表2或SEQ ID NO:11中)所述氨基酸序列的重链可变区通过接头(例如本文所述接头)结合。在一个实施方案中,编码的抗EGFRvIII结合结构域包括(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub>接头,其中n是1,2,3,4,5,或6,优选4(SEQ ID NO:110)。scFv的轻链可变区和重链可变区可以为例如下面的任何取向:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0014] 在一个实施方案中,编码的CAR包括跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自以下的蛋白的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ , $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154。在一个实施方案中,编码的跨膜结构域包含SEQ ID NO:15的序列。在一个实施方案中,编码的跨膜结构域包含在SEQ ID NO:15的氨基酸序列中具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过20个、10个或5个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码跨膜结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:8的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0015] 在一个实施方案中,编码的抗EGFRvIII结合结构域与跨膜结构域通过铰链区连接,例如本文所述铰链区。在一个实施方案中,编码的铰链区包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108、或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码铰链区的核酸序列包含SEQ ID NO:7、或SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:107或SEQ ID NO:109的序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0016] 在一个实施方案中,分离的核酸分子还包含编码共刺激结构域,例如本文所述共刺激结构域的序列。在一个实施方案中,编码的共刺激结构域包含选自以下的蛋白的功能性信号传导结构域:OX40,CD2,CD27,CD28,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),ICOS(CD278),和4-1BB(CD137)。在一个实施方案中,编码的共刺激结构域包含SEQ ID NO:16的序列。在一个实施方案中,编码的共刺激结构域包含SEQ ID NO:102的序列。在一个实施方案中,编码的共刺激结构域包含在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102的氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过20个、10个或5个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码共刺激结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:9的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0017] 在一个实施方案中,分离的核酸分子还包含编码胞内信号传导结构域,例如本文所述胞内信号传导结构域的序列。在一个实施方案中,编码的胞内信号传导结构域包含4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域。在一个实施方案中,编码的胞内信号传导结构域包含CD27的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域。在一个实施方案中,编码的胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102的序列和/或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的序列。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含在SEQ ID NO:16的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过20个、10个或5个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码的胞内信

号传导结构域包含SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO:102的序列和SEQ ID NO:17或SEQ ID NO: 99的序列, 其中包含胞内信号传导结构域的这些序列在相同读框中作为单一多肽链表达。在一个实施方案中, 编码胞内信号传导结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO: 103的序列或与其具有95-99%同一性的序列、和/或 SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:100的序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0018] 另一方面, 本发明涉及编码CAR构建体的分离核酸分子, 所述CAR 构建体包含: 前导序列, 例如本文所述前导序列, 例如SEQ ID NO:13的前导序列; 本文所述抗EGFRvIII结合结构域, 例如包含本文所述LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC CDR1, HC CDR2和HC CDR3的抗EGFRvIII结合结构域, 例如表2或SEQ ID NO:11中所述抗EGFRvIII结合结构域、或与其具有95-99%同一性的序列; 本文所述铰链区, 例如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108的铰链区; 本文所述跨膜结构域, 例如具有SEQ ID NO:15的序列的跨膜结构域; 和胞内信号传导结构域, 例如本文所述胞内信号传导结构域。在一个实施方案中, 编码的胞内信号传导结构域包含: 共刺激结构域, 例如本文所述共刺激结构域, 例如具有SEQ ID NO:16的序列的4-1BB共刺激结构域; 和/或第一信号传导结构域, 例如本文所述第一信号传导结构域, 例如具有SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的序列的CD3 $\zeta$ 刺激结构域。在一个实施方案中, 编码的胞内信号传导结构域包含: 共刺激结构域, 例如本文所述共刺激结构域, 例如具有SEQ ID NO:102的序列的CD27共刺激结构域; 和/或第一信号传导结构域, 例如本文所述第一信号传导结构域, 例如具有SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的序列的CD3 $\zeta$ 刺激结构域。在一个实施方案中, 编码的胞内信号传导结构域包含: 共刺激结构域, 例如本文所述共刺激结构域, 例如具有SEQ ID NO:16的序列的4-1BB共刺激结构域; 和第一信号传导结构域, 例如本文所述第一信号传导结构域, 例如具有SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的序列的CD3 $\zeta$ 刺激结构域。在一个实施方案中, 编码的胞内信号传导结构域包含: 共刺激结构域, 例如本文所述共刺激结构域, 例如具有SEQ ID NO:102的序列的CD27共刺激结构域; 和第一信号传导结构域, 例如本文所述第一信号传导结构域, 例如具有SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的序列的CD3 $\zeta$ 刺激结构域。在一个实施方案中, 编码CAR构建体的分离核酸分子包括由SEQ ID NO:6的核酸序列或与其具有95-99%同一性的序列编码的前导序列。在一个实施方案中, 编码CAR构建体的分离核酸分子包括由SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:98的核酸序列、或与其具有95-99%同一性的序列编码的抗EGFR结合结构域。在一个实施方案中, 编码CAR构建体的分离核酸分子包括由SEQ ID NO:69或与其具有95-99%同一性的序列编码的抗EGFR结合结构域。在一个实施方案中, 编码CAR构建体的分离核酸分子包括由SEQ ID NO:4或与其具有95-99%同一性的序列编码的抗EGFR结合结构域。在一个实施方案中, 编码CAR构建体的分离核酸分子包括由SEQ ID NO:8或与其具有95-99%同一性的序列编码的跨膜序列。在一个实施方案中, 编码CAR构建体的分离核酸分子包括由SEQ ID NO:9的核酸序列或与其具有95-99%同一性的序列、和/或SEQ ID NO:10的核酸序列或与其具有95-99%同一性的序列编码的胞内信号传导结构域序列。

[0019] 在一个实施方案中, 分离的核酸分子包含 (例如, 是) 编码SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:90的CAR 氨基酸序列的核酸, 或编码在SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:

49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:90的氨基酸序列上具有至少一个、两个、三个、四个、五个、10个、15个、20个或30个修饰(例如替代)但不超过 60、50或40个修饰(例如替代)的氨基酸序列的核酸,或编码与SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:90具有 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%同一性的氨基酸序列的核酸。在一个实施方案中,分离的核酸分子包含(例如,是)编码SEQ ID NO:1 或SEQ ID NO:2的CAR氨基酸序列的核酸,或编码在SEQ ID NO:1或 SEQ ID NO:2的氨基酸序列上具有至少一个、两个、三个、四个、五个、10个、15个、20个或30个修饰(例如替代)但不超过60、50或40个修饰(例如替代)的氨基酸序列的核酸,或编码与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2 的氨基酸序列具有85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%同一性的氨基酸序列的核酸。

[0020] 在一个实施方案中,分离的核酸分子包含(例如,是)SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:84或SEQ ID NO:89的核酸序列、或与SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:84或SEQ ID NO:89的核酸序列具有85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%同一性的核酸序列。在一个实施方案中,分离的核酸分子包含(例如,是)SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19的核酸序列、或与SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19具有85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%同一性的核酸序列。

[0021] 一方面,本发明涉及编码抗EGFRvIII结合结构域的分离核酸分子,其中该抗EGFRvIII结合结构域包含本文所述抗EGFRvIII结合结构域的轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)之一或多个(例如所有三个)、以及本文所述抗 EGFRvIII结合结构域的重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区 2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)之一或多个(例如所有三个),例如,包含一个或多个(如所有三个)LC CDR和一个或多个(如所有三个)HC CDR的人源化抗EGFRvIII结合结构域。在一个实施方案中,编码的抗EGFRvIII结合结构域包含本文所述(例如SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74或80中)轻链可变区和/或本文所述(例如SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74或80中)重链可变区。在一个实施方案中,编码的抗 EGFRvIII结合结构域是包含SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74或80中所示氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,抗EGFRvIII 结合结构域(例如scFv)包含:轻链可变区,其包含在SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74或80中所示轻链可变区的氨基酸序列中具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过30、20或10个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74或80中氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含在SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74或80中所示重链可变区的氨基酸序列中具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过30、20或10个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74或80中氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域包含选自SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:86的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码抗EGFRvIII

结合结构域的核酸序列包含选自SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:51,SEQ ID NO:57,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:75,SEQ ID NO:81和SEQ ID NO:98的序列、或与其具有 95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码的抗EGFRvIII结合结构域是scFv,且包含本文(例如表2中)所述氨基酸序列的轻链可变区与包含本文(例如表2中)所述氨基酸序列的重链可变区通过接头,例如本文所述接头连接。在一个实施方案中,编码的抗EGFRvIII结合结构域包括 (Gly4-Ser)<sub>n</sub>接头,其中n是1,2,3,4,5,或6,优选地4 (SEQ ID NO:110)。scFv的轻链可变区和重链可变区可以是例如以下任何取向:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0022] 另一方面,本发明涉及由核酸分子编码的分离的多肽分子。一个实施方案中,分离的多肽分子包含选自SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:49,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:67,SEQ ID NO:73,SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:90的序列、或与其具有 95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,分离的多肽包含SEQ ID NO:73的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,分离的多肽包含SEQ ID NO:79的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0023] 另一方面,本发明涉及分离的嵌合抗原受体(CAR)分子,其包含抗-EGFRvIII结合结构域(例如特异性结合EGFRvIII的人源化抗体或抗体片段)、跨膜结构域和胞内信号传导结构域(例如包含共刺激结构域和/或第一信号传导结构域的胞内信号传导结构域)。在一个实施方案中,CAR 包含包括本文所述抗EGFRvIII结合结构域的抗体或抗体片段(例如本文所述的特异性结合EGFRvIII的人源化抗体或抗体片段)、本文所述跨膜结构域、和本文所述胞内信号传导结构域(例如本文所述包含共刺激结构域和/或第一信号传导结构域的胞内信号传导结构域)。

[0024] 在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域包含本文所述抗 EGFRvIII结合结构域的轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区 2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)之一或多个(例如所有三个)、以及本文所述抗EGFRvIII结合结构域的重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)之一或多个(例如所有三个),例如,包含一个或多个(如所有三个)LC CDR 和一个或多个(如所有三个)HC CDR的人源化抗EGFRvIII结合结构域。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域包含本文所述(例如表2或 SEQ ID NO:11中)轻链可变区和/或本文所述(例如表2或SEQ ID NO:11 中)重链可变区。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域是包含表2 或SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域(例如scFv)包含:轻链可变区,其包含在表2或SEQ ID NO:11中所示轻链可变区的氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过30、20或10个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与表2或SEQ ID NO:11中氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含在表2或SEQ ID NO:11所示重链可变区的氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过30、20或10个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与表2或SEQ ID NO:11中氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,抗EGFRvIII 结合结构域包含选自SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:50,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:68,SEQ ID NO:74,SEQ ID NO:80 和SEQ ID NO:86的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域是scFv,且包含本文(例如

表2或SEQ ID NO:11中)所述氨基酸序列的轻链可变区与包含本文(例如表2或SEQ ID NO:11中)所述氨基酸序列的重链可变区通过接头,例如本文所述接头连接。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域包括(Gly4-Ser)<sub>n</sub>接头,其中n是1,2,3,4,5,或6,优选地4(SEQ ID NO:110)。scFv的轻链可变区和重链可变区可以是例如以下任何取向:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0025] 在一个实施方案中,分离的CAR分子包含选自以下的蛋白的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ , $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154。在一个实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:15的序列。在一个实施方案中,跨膜结构域包含在SEQ ID NO:15的氨基酸序列中具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过20个、10个或5个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0026] 在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域与跨膜结构域通过铰链区连接,例如本文所述铰链区。在一个实施方案中,编码的铰链区包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0027] 在一个实施方案中,分离的CAR分子还包含编码共刺激结构域,例如本文所述共刺激结构域的序列。在一个实施方案中,共刺激结构域包含选自以下的蛋白的功能性信号传导结构域:OX40,CD2,CD27,CD28,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18)和4-1BB(CD137)。在一个实施方案中,共刺激结构域包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102的序列。在一个实施方案中,共刺激结构域包含在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102的氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过20个、10个或5个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,分离的CAR分子还包含编码胞内信号传导结构域,例如本文所述胞内信号传导结构域的序列。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含4-1BB或CD27的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102的序列和/或SEQ ID NO:17的序列。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102的序列和/或SEQ ID NO:99的序列。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过20个、10个或5个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102的序列和SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的序列,其中包含胞内信号传导结构域的这些序列在相同读框中作为单一多肽链表达。

[0028] 在一个实施方案中,分离的CAR分子还包含前导序列,例如本文所述前导序列。在一个实施方案中,前导序列包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0029] 另一方面,本发明涉及分离的CAR分子,其包含前导序列(例如本文所述前导序列,例如SEQ ID NO:13的前导序列、或与其具有95-99%同一性的序列)、本文所述抗EGFRvIII结合结构域(例如包含本文所述LC CDR1,LC CDR2,LC CDR3,HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3

的抗 EGFRvIII结合结构域,例如表2或SEQ ID NO:11中所述抗EGFRvIII结合结构域、或与其具有95-99%同一性的序列)、铰链区(如本文所述铰链区,例如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108的铰链区、或与其具有95-99%同一性的序列)、跨膜结构域(如本文所述跨膜结构域,例如具有SEQ ID NO:15的序列或与其具有95-99%同一性的序列的跨膜结构域)、和胞内信号传导结构域(例如本文所述胞内信号传导结构域,例如包含共刺激结构域和/或第一信号传导结构域的胞内信号传导结构域)。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含共刺激结构域,例如本文所述共刺激结构域(例如具有SEQ ID NO:16的序列的4-1BB共刺激结构域或具有SEQ ID NO:102的序列的CD27共刺激结构域、或与其具有95-99%同一性),和/或第一信号传导结构域,例如本文所述第一信号传导结构域(例如具有SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99 的序列的CD3 $\zeta$ 刺激结构域,或与其具有95-99%同一性)。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含共刺激结构域,例如本文所述共刺激结构域,例如具有SEQ ID NO:16的序列的4-1BB共刺激结构域或具有 SEQ ID NO:102的序列的CD27共刺激结构域,和/或第一信号传导结构域,例如本文所述第一信号传导结构域,例如具有SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的序列的CD3 $\zeta$ 刺激结构域。

[0030] 在一个实施方案中,分离的CAR分子包含(例如,是)SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:67,SEQ ID NO:73,SEQ ID NO:79,SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:90的氨基酸序列,或在SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:49,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:67,SEQ ID NO:73,SEQ ID NO:79,SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:90的氨基酸序列上具有至少一个、两个、三个、四个、五个、10个、15个、20个或30个修饰(例如替代)但不超过60、50或40个修饰(例如替代)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:49,SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:67,SEQ ID NO:73,SEQ ID NO:79,SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:90具有85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,分离的CAR分子包含(例如,是)SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或在SEQ ID NO:1或 SEQ ID NO:2的氨基酸序列上具有至少一个、两个、三个、四个、五个、10个、15个、20个或30个修饰(例如替代)但不超过60、50或40个修饰(例如替代)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,分离的CAR分子包含(例如,是)SEQ ID NO:73的氨基酸序列,或在SEQ ID NO:73的氨基酸序列上具有至少一个、两个、三个、四个、五个、10个、15个、20个或30个修饰(例如替代)但不超过60、50或40个修饰(例如替代)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:73的氨基酸序列具有85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,分离的CAR分子包含(例如,是)SEQ ID NO:79的氨基酸序列,或在SEQ ID NO:79的氨基酸序列上具有至少一个、两个、三个、四个、五个、10个、15个、20个或30个修饰(例如替代)但不超过 60、50或40个修饰(例如替代)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:79的氨基酸序列具有85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0031] 一方面,本发明涉及抗EGFRvIII结合结构域,其包含本文所述抗 EGFRvIII结合结构域的轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区 2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)之一或多个(例如所有三个)、以及本文所述抗EGFRvIII结合结构域的重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)之一或多个

(例如所有三个),例如,包含一个或多个(如所有三个)LC CDR 和一个或多个(如所有三个)HC CDR的人源化抗EGFRvIII结合结构域。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域包含本文(例如SEQ ID NO: 38,44,50,56,62,68,74或80中)所述轻链可变区和/或本文(例如SEQ ID NO:38,44,50,56,62,68,74或80中)所述重链可变区。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域是包含SEQ ID NO:38,44,50,56,62,68,74或80 中的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,抗EGFRvIII 结合结构域(例如scFv)包含:轻链可变区,其包含在SEQ ID NO:38,44,50, 56,62,68,74或80中所示轻链可变区的氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过30个、20个或10个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:38,44,50,56,62,68,74或80中的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含在SEQ ID NO:38,44, 50,56,62,68,74或80中所示重链可变区的氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过30个、20个或10个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:38,44,50,56,62,68,74或80中的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域包含选自SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:50,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:68,SEQ ID NO:74,SEQ ID NO:80, 和SEQ ID NO:86的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域是scFv,包含本文(例如表2中)所述氨基酸序列的轻链可变区与包含本文(例如表2中)所述氨基酸序列的重链可变区通过接头(例如本文所述接头)结合。在一个实施方案中,抗 EGFRvIII结合结构域包括(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub>接头,其中n是1,2,3,4,5,或6,优选4(SEQ ID NO:110)。scFv的轻链可变区和重链可变区可以为例如下面的任何取向:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0032] 另一方面,本发明涉及包含本文所述核酸分子,例如本文所述编码 CAR的核酸分子的载体。一个实施方案中,载体选自:DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、或逆转录病毒载体。

[0033] 一个实施方案中,载体是慢病毒载体。一个实施方案中,载体还包含启动子。一个实施方案中,启动子是EF-1启动子。在一个实施方案中,EF-1启动子包含SEQ ID NO:97的序列。

[0034] 一个实施方案中,载体是体外转录载体,例如转录本文所述核酸分子的RNA的载体。一个实施方案中,该核酸序列在载体中还包含poly(A)尾,例如本文所述polyA尾,例如包含大约150个腺苷碱基(SEQ ID NO:111)。一个实施方案中,该核酸序列在载体中还包含3' UTR,例如本文所述 3' UTR,例如包含源自人β球蛋白的3' UTR的至少一个重复。

[0035] 另一方面,本发明涉及包含本文所述载体的细胞。一个实施方案中,细胞是本文所述细胞,例如人T细胞,例如本文所述人T细胞。一个实施方案中,人T细胞是CD8<sup>+</sup> T细胞。

[0036] 另一方面,本发明涉及产生细胞的方法,包括用包含编码CAR例如本文所述CAR的核酸的载体,转导本文所述细胞,例如本文所述T细胞。

[0037] 本发明还提供产生瞬时地表达外源RNA的RNA工程化细胞,例如本文所述细胞,例如T细胞的群体的方法。该方法包括:将体外转录的RNA 或合成的RNA引入细胞,其中该RNA包含编码本文所述CAR分子的核酸。

[0038] 另一方面,本发明涉及在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫的方法,包括向哺乳动物施用有效量的表达CAR分子的细胞,例如表达本文所述CAR分子的细胞。一个实施方案中,细胞

是自体T细胞。一个实施方案中,细胞是同种异体T细胞。一个实施方案中,哺乳动物是人。

[0039] 另一方面,本发明涉及治疗哺乳动物的方法,所述哺乳动物患有与 EGFRvIII表达相关的疾病(例如,与EGFRvIII表达相关的增生性疾病、癌前病症、和非癌相关适应症),所述方法包括向哺乳动物施用有效量的表达CAR分子的细胞,例如表达本文所述CAR分子的细胞。

[0040] 一个实施方案中,疾病是本文所述疾病。一个实施方案中,与EGFRvIII 相关的疾病是成胶质细胞瘤。一个实施方案中,与EGFRvIII相关的疾病是癌症,例如选自以下的癌症:多形性成胶质细胞瘤(GBM)、间变型星形细胞瘤、巨细胞型成胶质细胞瘤、胶质肉瘤、间变型少突胶质细胞瘤、间变型室管膜细胞瘤、脉络丛癌、间变性神经节细胞胶质瘤(anaplastic ganglioglioma)、成松果体细胞瘤、髓上皮瘤、成室管膜细胞瘤、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤(supratentorial primitive neuroectodermal tumor)、非典型畸胎样/横纹肌样瘤(atypical teratoid/rhabdoid tumor)、肺癌(例如非小细胞肺癌)、胸、前列腺、卵巢、结直肠和膀胱癌、以及其任何组合,和任何所述癌症的转移。

[0041] 一个实施方案中,表达CAR分子,例如本文所述CAR分子的细胞与增加CAR分子表达细胞的功效的活性剂(例如本文所述活性剂)组合施用。

[0042] 一个实施方案中,表达CAR分子,例如本文所述CAR分子的细胞,与改善一种或多种副作用的活性剂(例如本文所述活性剂)组合施用,其中所述副作用和施用表达CAR分子的细胞相关。

[0043] 一个实施方案中,表达CAR分子,例如本文所述CAR分子的细胞,与治疗EGFRvIII相关疾病的活性剂,例如本文所述活性剂,组合施用。

[0044] 一个实施方案中,表达CAR分子,例如本文所述CAR分子的细胞,以本文所述的剂量和/或给药方案施用。

[0045] 一个实施方案中,表达CAR分子,例如本文所述CAR分子的细胞,作为一线治疗,施用于疾病,例如癌症,例如本文所述癌症。另一个实施方案中,表达CAR分子,例如本文所述CAR分子的细胞,作为第二、第三、第四线治疗,施用于疾病,例如癌症,例如本文所述癌症。

[0046] 另一方面,本发明涉及,将编码本发明CAR的分离核酸分子、本发明分离的CAR多肽分子、包含本发明CAR的载体、和包含本发明CAR 的细胞用作药物,例如,如本文所述。

[0047] 另一方面,本发明涉及,将本发明编码CAR的分离核酸分子、本发明分离的CAR多肽分子、本发明包含CAR的载体、和本发明包含CAR 的细胞用于治疗表达EGFRvIII的疾病,例如,如本文所述的表达 EGFRvIII的疾病。

[0048] 附图简述

[0049] 图1A和1B是编码3C10-CAR和miR-17-92的慢病毒载体的示意图。图1A显示3C10-CAR表达载体pELNS-3C10-CAR;图1B显示miR-17-92 表达慢病毒载体。

[0050] 图2A至2C的一系列图显示,通过慢病毒转导的3C10-CAR和 miR-17-92在人T细胞中的功能性表达。CD3<sup>+</sup> T细胞转导了单独的 pELNS-3C10-CAR或转导了pELNS-3C10-CAR和FG12-EF1a-miR-17/92 两者。

[0051] 图3A至3D的一系列图显示,CAR-T细胞中miR17-92的共表达赋予对TGF- $\beta$ 和TMZ的抑制性效应的抵抗性。CAR-T细胞(空心柱)和共转导了miR-17-92的细胞(实心柱),与表达EGFRvIII的APC,在所示浓度的TGF- $\beta$ 和TMZ存在下,共培养。

- [0052] 图4A和4B的图显示CAR-T细胞在携带U87-EGFRvIII肿瘤的小鼠中的强治疗效果。
- [0053] 图5A至5C的一系列图显示,CAR-T细胞中共转导的miR-17-92可以赋予改善的抵抗再次攻击的胶质瘤细胞的保护作用。
- [0054] 图6的图显示,代表性EGFRvIII CAR (按出现顺序,分别为SEQ ID NO:1、121和2) 的比较。
- [0055] 图7的图显示,转导了EGFRvIII CAR的人T细胞表现出了对表达EGFRvIII的U87人GBM细胞 (U87-EGFRvIII) 的特异有力裂解。
- [0056] 图8的图显示,所有抗EGFRvIII CART均清除肿瘤细胞,但到第7 天构建体3C10.BBz CART清除肿瘤最快。
- [0057] 图9的表显示人源化EGFRvIII的VH和VL序列 (按出现顺序,分别为SEQ ID NOS 122-127) 。
- [0058] 图10的图显示与EGFRvIII+细胞系结合的可溶性人源化scFv构建体的体外结合。
- [0059] 图11的图显示与EGFR野生型细胞系结合的可溶性人源化scFv构建体的体外结合,其中克隆73 (也称作CAR6) 和克隆74 (也称作CAR7) 显示更安全的性质。
- [0060] 图12的图比较在瞬时转染Jurkat细胞和用Fc融合蛋白检测时鼠CAR9和人CAR10对EGFRvIII和野生型EGFR的特异性。
- [0061] 图13的图显示,用人源化EGFRvIII CAR构建体mCAR19 (对照)、CAR10、CAR9和CAR6对供体T细胞进行的原代T细胞转导,其中以饱和量的EGFRvIII进行染色。
- [0062] 图14的图显示,由BHK-EGFRvIII而非野生型细胞导致的人源化 EGFRvIII CAR构建体的萤光素酶活性。
- [0063] 图15的图显示,响应于U87vIII攻击,人源化EGFRvIII CAR构建体增殖;而响应于野生型EGFR,无背景增殖。
- [0064] 图16的图显示,在U87vIII攻击存在下,人源化EGFRvIII CAR构建体体外增殖。
- [0065] 图17的图显示4小时51-铬释放肿瘤杀伤试验,其中人源化EGFRvIII CAR构建体,2173 (CAR6) 和CAR9,特异性杀伤表达EGFRvIII的细胞,但不杀伤野生型EGFR细胞。
- [0066] 图18的图显示,在用转导了人源化EGFRvIII CAR构建体 (CAR6) 的 CAR+ T细胞处理的小鼠中,体内肿瘤大小进展 (cm<sup>3</sup>,左上图) 和肿瘤发光进展平均值 (p/s/cm<sup>2</sup>/sr,右上图)、和kaplan-meier存活曲线 (下图) 。
- [0067] 发明详述
- [0068] 除非另有定义,否则本文中所用的所有技术和科学术语均具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。
- [0069] 术语“a”和“an”指一个或一个以上 (即至少一个) 该冠词的语法对象。例如,“an”元素指一个元素或一个以上元素。
- [0070] 术语“大约”,当用于可测量值例如量、时间持续期等等时,意在涵盖自所述值±20%的变动、或一些情况下±10%、或一些情况下±5%、或一些情况下±1%、或一些情况下±0.1%的变动,因为这些变动均适用于实施本公开的方法。
- [0071] 术语“嵌合抗原受体”或“CAR”指,包含至少胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞质信号传导结构域 (在本文中也称为“胞内信号传导结构域”) 的重组多肽构建体,其中所述胞质信号传导结构域包含源自下文定义的刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面,刺

激分子是与T细胞受体复合物相关的 $\zeta$ 链。一方面,胞质信号传导结构域还包含源自至少一个下文定义的共刺激分子的一个或多个功能性信号传导结构域。一方面,共刺激分子选自4-1BB(即CD137)和/或CD28。一方面,CAR包含嵌合融合蛋白,所述蛋白包含胞外抗原识别结构域、跨膜结构域、和胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域含有源自刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面,CAR包含嵌合融合蛋白,所述蛋白包含胞外抗原识别结构域、跨膜结构域、和胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域含有源自共刺激分子的功能性信号传导结构域和源自刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面,CAR包含嵌合融合蛋白,所述蛋白包含胞外抗原识别结构域、跨膜结构域、和胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域含有源自一个或多个共刺激分子的两个功能性信号传导结构域和源自刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面,CAR包含嵌合融合蛋白,所述蛋白包含胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域包含源自一个或多个共刺激分子的至少两个功能性信号传导结构域和源自刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面,CAR在CAR 融合蛋白的氨基端(N端)包含可选的前导序列。一方面,CAR在胞外抗原识别结构域的N端还包含前导序列,其中前导序列任选地在CAR的细胞加工和定位至细胞膜的过程中从抗原识别结构域(例如scFv)切下。

[0072] 术语“信号传导结构域”指,通过下述方式发挥作用的蛋白质的功能性部分:经由确定的信号传导途径、通过产生第二信使而将信息传递到细胞内以调节细胞活性、或通过响应于此类信使而作为效应子发挥作用。

[0073] 术语“EGFR”指任何哺乳动物的成熟全长表皮生长因子受体,包括人和非人形式。1186个氨基酸的人EGFR描述于Ullrich等,Nature 309:418-425(1984)和GenBank登录号AF125253和SwissProt Acc No P00533-2中。

[0074] 术语“EGFRvIII”指表皮生长因子受体变体III。EGFRvIII是在人类肿瘤中观察到的最常见的EGFR变体,但在正常组织中罕见。该蛋白由外显子2-7的读框内缺失导致,其中在EGFR胞外结构域中在外显子1和 8的连接处产生新的甘氨酸残基,由此形成肿瘤特异性表位。EGFRvIII 在24%到67%GBM中表达,但不在正常组织中表达。EGFRvIII也称作 III型突变体、德尔塔EGFR、EGFRde2-7、和 $\Delta$ EGFR,描述在美国专利号6,455,498,6,127,126,5,981,725,5,814,317,5,710,010,5,401,828,和 5,212,290中。EGFRvIII的表达可以由染色体缺失导致,也可以由异常的可变剪接引起。参见Sugawa et al.,1990,Proc.Natl.Acad.Sci. 87:8602-8606。

[0075] 如本文中所用,术语“抗体”指特异性结合抗原的、源自免疫球蛋白分子的蛋白质或多肽序列。抗体可以是多克隆或单克隆的、多链或单链的、或完整免疫球蛋白,并可以来源于天然来源或来自重组来源。抗体可以是免疫球蛋白分子的四聚体。

[0076] 术语“抗体片段”指完整抗体的至少一部分或其重组变体,并可以指完整抗体的抗原结合结构域,例如,抗原性决定可变区,其足以赋予抗体片段对靶标例如抗原的识别和特异性结合。抗体片段的例子包括,但不限于,Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段、scFv抗体片段、线性抗体、单结构域抗体如sdAb(VH或VL)、驼类VHH结构域、和从抗体片段形成的多特异性抗体。术语“scFv”指,包含至少一个含有轻链可变区的抗体片段和至少一个含有重链可变区的抗体片段的融合蛋白,其中轻链可变区和重链可变区通过短的柔性肽接头连续连接,能够表达为单链多肽,并且其中scFv 保持其所源自的完整抗体的特异性。除非特别指出,否

则在本文中scFv可以以任何一种顺序具有VL和VH可变区,例如相对于多肽的N端和C端,scFv可以包含VL-接头-VH或可以包含VH-接头-VL。

[0077] 本发明CAR组合物中包含抗体或其抗体片段的部分可以以各种形式存在,包括例如,单结构域抗体片段(sdAb)、单链抗体(scFv)和人源化抗体,其中抗原结合结构域作为连续多肽链的一部分表达(Harlow et al.,1999, In:Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Harlow et al.,1989,In:Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,New York;Houston et al.,1988,Proc.Natl. Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Bird et al.,1988,Science 242:423-426)。一方面,本发明CAR组合物的抗原结合结构域包含抗体片段。再一方面,CAR 包含含有scFv的抗体片段。

[0078] 术语“抗体重链”指,天然构象的抗体分子中存在的两类多肽链中的较大者,其通常决定抗体的类别。

[0079] 术语“抗体轻链”指,天然构象的抗体分子中存在的两类多肽链中的较小者。 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链指两种主要的抗体轻链同种型。

[0080] 术语“重组抗体”指,使用重组DNA技术产生的抗体,例如,通过噬菌体或酵母表达系统表达的抗体。该术语也应理解为指,通过如下方式产生的抗体:合成编码该抗体的DNA分子和该DNA分子表达抗体蛋白;或合成规定该抗体的氨基酸序列,其中该DNA或氨基酸序列通过使用本领域可得和熟知的重组DNA或氨基酸序列技术而获得。

[0081] 术语“抗原”或“Ag”在本文中定义为可以激起免疫反应的分子。免疫反应可以涉及抗体的产生、或特定的免疫活性细胞的激活、或两者。本领域技术人员明了,任何大分子,包括基本上所有的蛋白或肽,均可以充当抗原。此外,抗原可以源自重组DNA或基因组DNA。本领域技术人员明了,包含编码可以引起免疫反应的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA,均可以编码“抗原”(正如该术语在本文所用的)。此外,本领域技术人员明了,抗原不必仅由基因的全长核苷酸序列编码。容易明了的,本发明包括,但不限于,使用一个以上基因的部分核苷酸序列,这些核苷酸序列可以以各种组合方式排列以编码可以引起期望免疫反应的多肽。此外,本领域技术人员明了,抗原无需由“基因”编码。容易明了的,抗原可以合成产生、或可以源自生物样品、或可以是除多肽之外的大分子。所述生物样品可以包括,但不限于,组织样品、肿瘤样品、细胞或液体以及其它生物学成分。

[0082] 术语“抗肿瘤效应”指生物学效应,其可以表现为多种形式,包括但不限于,例如肿瘤体积的缩小、肿瘤细胞数量的减少、转移瘤数量的减少、寿命的增加、肿瘤细胞增殖的减少、肿瘤细胞存活的减少、或各种与癌性病症相关的生理症状的改善。“抗肿瘤效应”也可以表现为本发明肽、多核苷酸、细胞和抗体从一开始就防止肿瘤发生的能力。

[0083] 术语“自体”指,从个体获得并之后重新引入该同一个体中的任何物质。

[0084] 术语“同种异体”指引入个体的任何物质,其中该物质来自与个体相同物种的不同动物。当两个或两个以上个体在一个或多个基因座上的基因不同时,这些个体被称为是同种异基因的。在一些方面,来自相同物种的个体的同种异体物质可以在遗传上足够不同以发生抗原性上的相互作用。

[0085] 术语“异种”指源自不同物种的动物的移植物。

[0086] 术语“癌症”指特征在于快速且不受控的异常细胞生长的疾病。癌症细胞可以局部

地或通过血流和淋巴系统而扩散到身体的其它部分。本文描述了各种癌症的例子,包括但不限于,成胶质细胞瘤、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。

[0087] 本文中术语“与EGFRvIII表达相关的疾病”包括,但不限于,与 EGFRvIII表达相关的疾病、或与表达EGFRvIII的细胞(包括各种癌症的肿瘤细胞)相关的病症,例如成胶质细胞瘤(包括成胶质细胞瘤干细胞);胸、卵巢、和非小细胞肺癌;头颈鳞状细胞癌;成神经管细胞瘤、结直肠癌、前列腺癌、和膀胱癌。不受限于特定理论或机制,据认为,本发明CAR 通过引起针对EGFRvIII的抗原特异性反应,提供以下一项或多项:靶向和破坏EGFRvIII表达肿瘤细胞、减少或消除肿瘤、促进免疫细胞向肿瘤部位的浸润、和增强/延长抗肿瘤反应。由于EGFRvIII在正常(即非癌)组织中以不可检测的水平表达,故本发明CAR被认为可以有利地实质性避免靶向/破坏正常组织和细胞。

[0088] 术语“保守性序列修饰”旨在指,该氨基酸修饰不显著地影响或改变包含该氨基酸序列的抗体或抗体片段的结合特征。保守性修饰包括氨基酸替代、添加和缺失。修饰可以通过本领域已知的标准技术引入本发明抗体或抗体片段,例如定点诱变和PCR介导的诱变。保守氨基酸替代是氨基酸残基被具有相似侧链的另一氨基酸残基替代。具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已有定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 $\beta$ 分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、和具有芳香族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,本发明CAR中的一个或多个氨基酸残基可以替换为来自相同侧链家族的其它氨基酸残基,改变的CAR可以使用本文所述的功能性试验加以测试。

[0089] 术语“刺激”指,由刺激分子(例如TCR/CD3复合物)与其关联配体结合诱导的初始反应,由此介导信号传导事件,例如,但不限于,经由 TCR/CD3复合物的信号传导。刺激可以介导某些分子的改变表达,例如 TGF- $\beta$ 的下调、和/或细胞骨架结构的重组织等等。

[0090] 术语“刺激分子”指T细胞表达的分子,该分子提供第一胞质信号传导序列,其中对于T细胞信号传导途径的至少一些方面,所述序列以刺激性方式调节TCR复合物的初始活化。一方面,第一信号由例如TCR/CD3 复合物与加载了肽的MHC分子的结合而引发,由此介导T细胞反应(包括但不限于,增殖、活化、分化等)。以刺激性方式起作用的第一胞质信号传导序列(也称作“第一信号传导结构域”)可以包含称作免疫受体酪氨酸激活基序或ITAM的信号传导基序。在本发明中尤其有用的包含ITAM 的第一胞质信号传导序列的例子包括,但不限于,源自TCR $\zeta$ 、FcR  $\gamma$ , FcR  $\beta$ , CD3  $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278(也称作“ICOS”)和CD66d的第一胞质信号传导序列。在特定的本发明CAR中,在任何一个或多个本发明CAR中胞内信号传导结构域包含胞内信号传导序列,例如CD3- $\zeta$ 的第一信号传导序列。在特定的本发明CAR中,CD3- $\zeta$ 的第一信号传导序列是SEQ ID NO:17中所示的序列、或来自非人物种如小鼠、啮齿类动物、猴、猿等的等价残基。在特定的本发明CAR中,CD3- $\zeta$ 的第一信号传导序列是SEQ ID NO:99中所示序列、或来自非人物种如小鼠、啮齿类动物、猴、猿等的等价残基。

[0091] 术语“抗原呈递细胞”或“APC”指,在其表面展示与主要组织相容性复合物(MHC)复合的外来抗原的免疫系统细胞,例如辅助细胞(例如B 细胞、树突细胞等)。T细胞可以使用其T细胞受体(TCR)识别这些复合物。APC加工抗原并将其呈递给T细胞。

[0092] 在本文中,“胞内信号传导结构域”指分子的胞内部分。胞内信号传导结构域产生可以促进含CAR的细胞(例如CART细胞)的免疫效应子功能的信号。免疫效应子功能的例子,例如在CART细胞中,包括细胞裂解活性和辅助活性,包括分泌细胞因子。

[0093] 在一个实施方案中,胞内信号传导结构域可以包含第一胞内信号传导结构域。示例性第一胞内信号传导结构域包括源自负责第一刺激或抗原依赖性刺激的分子的那些结构域。一个实施方案中,胞内信号传导结构域可以包含共刺激胞内结构域。示例性共刺激胞内信号传导结构域包括源自负责共刺激信号或抗原非依赖性刺激的分子的那些结构域。例如,在CART 的情况下,第一胞内信号传导结构域可以包含T细胞受体的胞质序列,共刺激胞内信号传导结构域可以包含来自共受体或共刺激分子的胞质序列。

[0094] 第一胞内信号传导结构域可以包含称作免疫受体酪氨酸激活基序或 ITAM的信号传导基序。含有ITAM的第一胞质信号传导序列的例子包括但不限于源自CD3 $\zeta$ 、FcR $\gamma$ ,FcR $\beta$ ,CD3 $\gamma$ ,CD3 $\delta$ ,CD3 $\epsilon$ ,CD5,CD22, CD79a,CD79b,CD66d DAP10和DAP12的那些。

[0095] 术语“ $\zeta$ ”或“ $\zeta$ 链”、“CD3- $\zeta$ ”或“TCR- $\zeta$ ”定义为GenBan登录号BAG36664.1提供的蛋白质、或来自非人物种例如小鼠、啮齿类动物、猴、猿等的等价残基;“ $\zeta$ 刺激结构域”或“CD3- $\zeta$ 刺激结构域”或“TCR- $\zeta$ 刺激结构域”定义为来自 $\zeta$ 链的胞质结构域的氨基酸残基,其足以功能性地传递T细胞活化所需的初始信号。一方面, $\zeta$ 的胞质结构域包含GenBan 登录号BAG36664.1的残基52至164、或作为其功能性直向同源物的来自非人物种例如小鼠、啮齿类动物、猴、猿等的等价残基。一方面,“ $\zeta$ 刺激结构域”或“CD3- $\zeta$ 刺激结构域”是SEQ ID NO:17提供的序列。一方面,“ $\zeta$ 刺激结构域”或“CD3- $\zeta$ 刺激结构域”是SEQ ID NO:99提供的序列。

[0096] 术语“共刺激分子”指T细胞上的关连结合配偶体,其特异性结合共刺激配体,由此介导T细胞的共刺激反应,例如,但不限于,增殖。共刺激分子是有效免疫反应所需的、非抗原受体的细胞表面分子或其配体。共刺激分子包括但不限于,MHC I类分子、BTLA和To11配体受体、以及 OX40,CD2,CD27,CD28,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18)和4-1BB(CD137)。

[0097] 共刺激胞内信号传导结构域可以源自共刺激分子的胞内部分。共刺激分子可以出现在以下蛋白质家族中:TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、和激活性NK细胞受体。此类分子的例子包括CD27,CD28,4-1BB(CD137), OX40,GITR,CD30,CD40,ICOS,BAFFR,HVEM,淋巴细胞功能相关抗原1(LFA-1),CD2,CD7,LIGHT,NKG2C,SLAMF7,NKp80,CD160, B7-H3,和特异结合CD83的配体等等。

[0098] 胞内信号传导结构域可以包含其所源自的分子的整个胞内部分、或该分子的整个天然胞内信号传导结构域、或其功能片段。

[0099] 术语“4-1BB”指TNFR超家族的成员,其具有GenBank Acc.No. AAA62478.2的氨基酸序列、或来自非人物种例如小鼠、啮齿类动物、猴、猿等的等价残基;“4-1BB共刺激结构域”定义为GenBank Acc.No. AAA62478.2的氨基酸残基214-255,或来自非人物种例如小鼠、啮齿类动物、猴、猿等的等价残基。一方面,“4-1BB共刺激结构域”是SEQ ID NO: 16中提供的序列、或来自非人物种例如小鼠、啮齿类动物、猴、猿等的等价残基。

[0100] 术语“编码”指多核苷酸例如基因、DNA或mRNA中特定核苷酸序列的固有性质,即所述序列可以充当模板,以在生物学过程中合成具有规定的核苷酸序列(例如rRNA、tRNA和mRNA)或规定的氨基酸序列的其它聚合物和大分子以及由此导致的生物学性质。因此,当相应于基因的 mRNA在细胞或其它生物学系统中的转录和翻译导致蛋白质产生时,则该基因、cDNA、或RNA编码该蛋白。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同,通常在序列表中提供)和非编码链(用作基因或cDNA转录的模板)两者都可以被称作编码蛋白、或该基因或cDNA的其它产物。

[0101] 除非另外规定,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此为简并形式的编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。当编码蛋白的核苷酸序列可以在一些形式中含有内含子时,短语编码蛋白或RNA的“核苷酸序列”也可以包括内含子。

[0102] 术语“有效量”或“治疗有效量”在本文中可以互换使用,指如本文所述可以有效地实现特定生物学结果的化合物、制剂、物质或组合物的量。

[0103] 术语“内源”指来自生物体、细胞、组织或系统的任何物质、或在生物体、细胞、组织或系统中产生的任何物质。

[0104] 术语“外源”指从生物体、细胞、组织或系统引入的、或在生物体、细胞、组织、或系统之外产生的任何物质。

[0105] 术语“表达”指启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0106] 术语“转移载体”指包含分离的核酸并可以用于将该分离的核酸递送至细胞内部的组合物。本领域已知许多载体,包括但不限于,线性多核苷酸、与离子或两亲性化合物结合的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“转移载体”包括自主复制质粒或病毒。该术语也应理解为还包括利于核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒的化合物,例如多赖氨酸化合物、脂质体等。病毒转移载体的例子包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0107] 术语“表达载体”指含有重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列有效连接的表达控制序列。表达载体包含足以实现表达的顺式作用元件;用于表达的其它元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中提供。表达载体包括可以掺入所述重组多核苷酸的本领域已知的所有表达载体,包括粘粒、质粒(例如裸露的或包含在脂质体中的)和病毒(例如慢病毒、逆转录病毒、腺病毒、和腺相关病毒)。

[0108] 术语“慢病毒”指慢病毒科的属。慢病毒在逆转录病毒中是独特的,能够感染非分裂细胞;它们能将显著量的遗传信息递送到宿主细胞的DNA 中,由此它们是最为有效的基因递送载体方法之一。HIV、SIV和FIV均是慢病毒的例子。

[0109] 术语“慢病毒载体”指源自慢病毒基因组的至少一个部分的载体,包括尤其是 Milone et al., Mol. Ther. 17 (8):1453-1464 (2009) 中提供的自失活慢病毒载体。可以在临床上使用的慢病毒载体的其它例子包括但不限于,例如Oxford BioMedica的 **LENTIVECTOR®** 基因递送技术、Lentigen的 LENTIMAX™ 载体系统等。非临床类的慢病毒载体也可以获得,并是本领域技术人员已知的。

[0110] 术语“同源性”或“同一性”在本文中指两个聚合物分子之间,例如两个核酸分子之间、例如两个DNA分子或两个RNA分子之间、或两个多肽分子之间的亚单位序列同一性。当一个亚单位位置在两个分子中被相同单体亚单位占据时,例如当两个DNA分子在一个位置上

都被腺苷占据时,则它们在该位置是同源的或同一的。两个序列之间的同源性是匹配的或同源的位置数的直接函数;例如,当两个序列中半数位置(例如在长10个亚单位的聚合物中5个位置)是同源的,则这两个序列50%同源;如果90%的位置(例如10个中9个)是匹配的或同源的,则这两个序列90%同源。

[0111] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是含有源自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、或抗体的其它抗原结合子序列)。就最大的部分而言,人源化抗体和其抗体片段是人免疫球蛋白(受体抗体或抗体片段),其中受体的互补决定区(CDR)的残基被来自具有期望特异性、亲和性和能力的非人物种(例如小鼠、大鼠或兔)(供体抗体)的CDR替代。一些情况下,人免疫球蛋白的Fv构架区(FR)残基被相应的非人残基替代。此外,人源化抗体/抗体片段可以包含既不存在于受体抗体中也不存在于导入的CDR或构架序列中的残基。这些修饰可以进一步精细化和优化抗体或抗体片段的性能。一般地,人源化抗体或其抗体片段包含至少一个,典型地两个,可变区的实质上全部,其中全部或实质上全部的CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR区,而全部或显著部分的FR区为人免疫球蛋白序列的。人源化抗体或抗体片段也可以包含至少一部分的免疫球蛋白恒定区(Fc),典型地人免疫球蛋白的Fc。更多细节参见Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332:323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596, 1992。

[0112] 术语“人”抗体指完全人抗体和有效人抗体。“完全人”指,免疫球蛋白例如抗体或抗体片段的整个分子是人来源的或由与该抗体或免疫球蛋白的人形式相同的氨基酸序列组成。“有效人”抗体是指,抗体包括足够数量的人氨基酸位置,从而该抗体在正常人中不引起免疫原性反应。

[0113] 术语“分离的”意指,从天然状态改变或移出。例如,天然存在于活动物中的核酸或肽不是“分离的”,但与其天然状态下的共存物部分地或完全地分开的该核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白可以以基本上纯的形式存在,或可以存在于非天然环境例如宿主细胞中。

[0114] 在本发明中,对于常见核酸碱基,使用以下缩写。“A”指腺苷,“C”指胞嘧啶,“G”指鸟苷,“T”指胸腺嘧啶,“U”指尿嘧啶。

[0115] 术语“有效连接”或“转录控制”指,调节序列和异源核酸序列之间功能性连接从而导致后者表达。例如,第一核酸序列与第二核酸序列有效连接,则第一核酸序列被置于与第二核酸序列的功能性关系中。例如,启动子与编码序列有效连接时,启动子影响编码序列的转录或表达。有效连接的DNA序列可以彼此相邻,并例如在需要连接两个蛋白编码区时,在相同的读框中。

[0116] 术语“腹膜外”施用免疫原性组合物包括,例如皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)、或胸骨内注射、肿瘤内、或输注技术。

[0117] 术语“核酸”或“多核苷酸”指,单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)和其聚合物。除非特别限定,否则该术语涵盖包含天然核苷酸的已知类似物的核酸,其中该核酸与参考核酸具有相似的结合性质并以类似于天然核苷酸的方式代谢。除非另外指出,否则一个特定核酸序列也隐含地包括其保守修饰的变体(例如简并密码子替代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列、以及该明确指出的序列。特别地,简并密码子替代可

以通过如下实现：产生序列，在该序列中一个或多个选定的（或所有）密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基替代（Batzer et al., Nucleic Acid Res.19:5081(1991)；Ohtsuka et al., J.Biol.Chem. 260:2605-2608(1985)；and Rossolini et al., Mol.Cell.Probes 8:91-98 (1994)）。

[0118] 术语“肽”、“多肽”、和“蛋白”可互换使用，指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸，对于氨基酸的最大数目没有限制，可以包含蛋白或肽的序列。多肽包括含有彼此通过肽键连接的两个或两个以上氨基酸的任何肽或蛋白质。在本文中，该术语既指短链（在本领域中通常也称作例如肽、寡肽和寡聚物），也指较长链（通常在本领域中称为蛋白质），存在许多类型的蛋白质。“多肽”包括例如生物活性片段、基本同源多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等等。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

[0119] 术语“启动子”指，可以被细胞的合成机器或引入的合成机器识别的、启动多核苷酸序列的特定转录所需的DNA序列。

[0120] 术语“启动子/调节序列”指，表达基因产物所需的核酸序列，其中所述基因产物与启动子/调节序列有效连接。在一些情况中，该序列可以是核心启动子序列，在其它情况中该序列还可以包括增强子序列和表达基因产物所需的其它调节元件。启动子/调节序列可以例如以组织特异性方式表达基因产物。

[0121] 术语“组成型启动子”指这样的核苷酸序列，当与编码或规定基因产物的多核苷酸有效连接时，该核苷酸序列在细胞的大多数或所有生理条件下造成基因产物在细胞中产生。

[0122] 术语“诱导性启动子”指这样的核苷酸序列，当与编码或规定基因产物的多核苷酸有效连接时，该核苷酸序列基本上仅在细胞中存在对应于该启动子的诱导物时造成基因产物在细胞中产生。

[0123] 术语“组织特异性启动子”指这样的核苷酸序列，当与编码或规定基因产物的多核苷酸有效连接时，该核苷酸序列基本上仅在细胞是对应于该启动子的组织类型的细胞时才造成基因产物在该细胞中产生。

[0124] 术语“柔性多肽接头”或“接头”用于scFv的上下文中时指，由氨基酸例如甘氨酸和/或丝氨酸残基组成的肽接头，其单独或组合使用，以将可变重链区和可变轻链区连接在一起。一个实施方案中，柔性多肽接头是 Gly/Ser接头，包括氨基酸序列 (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:112)，其中n是等于或大于1的正整数。例如，n=1, n=2, n=3, n=4, n=5 和 n=6, n=7, n=8, n=9 和 n=10。在一个实施方案中，柔性多肽接头包括，但不限于，(Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:113) 或 (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:114)。在另一实施方案中，接头包括 (Gly<sub>2</sub>Ser), (GlySer) 或 (Gly<sub>3</sub>Ser) (SEQ ID NO:112) 的多个重复。WO2012/138475 (并入本文作为参考) 中描述的接头也包括在本发明的范围内。

[0125] 在本文中，5' 帽子（也称作RNA帽子、RNA 7-甲基鸟苷帽子、或RNA m<sup>7</sup>G帽子）是修饰的鸟嘌呤核苷酸，其在转录开始后不久添加到真核信使 RNA的“前”或5' 末端。5' 帽子由与第一个转录的核苷酸连接的端基组成。其存在对于核糖体识别和抗RNA酶保护作用是关键。加帽与转录偶联，以共转录方式发生，由此加帽与转录彼此影响。在转录开始后不久，与RNA 聚合酶缔合的帽子合成复合物结合到合成的mRNA的5' 末端。该酶学复合物催化mRNA加

帽所需的化学反应。合成以多步骤生物化学反应进行。可以修饰加帽部分以调节mRNA的功能性,例如其稳定性或翻译效率。

[0126] 在本文中,“体外转录的RNA”指已经体外合成的RNA,优选mRNA。一般地,体外转录的RNA从体外转录载体产生。体外转录载体包含用于产生该体外转录RNA的模板。

[0127] 在本文中,“poly (A)”是通过多腺苷酸化连接到mRNA上的一系列腺苷。在用于瞬时表达的构建体的优选实施方案中,polyA为50到5000 (SEQ ID NO:115),优选大于64,更优选大于100,更优选大于300或400。可以化学或酶学修饰poly (A) 序列,以调节mRNA功能性,例如定位、稳定性或翻译效率。

[0128] 在本文中,“多腺苷酸化”指将多腺苷酰基部分或其修饰变体共价连接到信使RNA分子上。在真核生物中,大多数信使RNA (mRNA) 分子在3' 末端被多腺苷酸化。3' poly (A) 尾是通过酶(多腺苷酸化聚合酶)的作用加到 mRNA前体上的腺嘌呤核苷酸(常常几百个)长序列。在高等真核生物中, poly (A) 尾添加到含有特定序列(多腺苷酸化信号)的转录物上。Poly (A) 尾和与其结合的蛋白质有助于保护mRNA避免外切核酸酶的降解。多腺苷酸化对于转录终止、mRNA从细胞核的输出、和翻译也是重要的。多腺苷酸化可以在细胞核中在DNA转录成RNA后立即发生,但此外,也可以随后在细胞质中发生。转录终止后,通过与RNA聚合物缔合的内切核苷酸酶复合物的作用,mRNA链被切割。切割位点通常的特征是在切割位点附近存在碱基序列AAUAAA。在切割mRNA后,腺苷残基添加到切割位点的游离3' 末端。

[0129] 本文中,“瞬时”指未整合的转基因为期数小时、数天或数周的表达,其中该表达时间少于当基因整合在基因组中或包含在宿主细胞的稳定质粒复制子中时的基因表达时间。

[0130] 术语“信号转导途径”指多种信号转导分子之间的生物化学关系,这些分子在信号从细胞的一部分传递到细胞的另一部分中起作用。术语“细胞表面受体”包括能够接受信号并跨细胞膜传递信号的分子和分子复合物。

[0131] 术语“个体”旨在包括可以引起免疫反应的活生物体(哺乳动物、人)。

[0132] 术语“基本上纯的”细胞指,该细胞基本上不含其他细胞类型。基本上纯的细胞也指,该细胞已经与在其天然状态下和其正常相关的其他细胞类型分开。在一些情况下,基本上纯的细胞群指均质细胞群体。在其它情况下,该术语仅指,细胞已经与在其天然状态下和其天然相关的细胞分开。在一些方面,在体外培养细胞。在其它方面,没有在体外培养细胞。

[0133] 术语“治疗”(therapeutic)在本文中意指治疗(treatment)。治疗效果通过降低、抑制、减轻或根除疾病状态而获得。

[0134] 术语“预防”(prophylaxis)在本文中意指对疾病或疾病状态的防止或预防性治疗。

[0135] 在本发明中,“肿瘤抗原”或“过度增生性病征抗原”或“与过度增生性病征相关的抗原”指,特定过度增生性病征所共有的抗原。在一些方面,本发明的过度增生性病征抗原来源于癌症,包括但不限于,原发性或转移性黑素瘤、胸腺瘤、淋巴瘤、肉瘤、肺癌、肝癌、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkins lymphoma)、白血病、子宫癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌、和腺癌例如胸腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌等。

[0136] 术语“转移的”或“转化的”或“转导的”指,外源核酸被转移或引入宿主细胞中的过程。“转移的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经转移了、转化了或转导了外源核酸的细胞。该细胞包括原代受试细胞和其后代。

[0137] 术语“特异结合”指,抗体或配体识别和结合样品中存在的关连结合配偶体蛋白(例如,存在于T细胞上的刺激和/或共刺激分子),但基本上不识别或结合样品中的其它分子。

[0138] 范围:在整个本公开中,本发明的多个方面可以以范围的形式给出。应当理解,以范围形式描述仅仅是为方便和简短起见,不应理解为对本发明范围构成硬性限制。因此,范围的描述应当视为已经具体公开了所有可能的子范围以及在该范围内的各个数值。例如,诸如1至6的范围描述应视为已经具体公开了子范围例如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等等,以及落入该范围的各个数值,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。作为另一实例,范围例如95-99%同一性包括95%,96%,97%,98%或99%同一性,并包括子范围例如96-99%,96-98%,96-97%,97-99%,97-98%和98-99%同一性。无论范围的宽度如何,这均适用。

[0139] 发明详述

[0140] 本文提供使用抗EGFRvIII嵌合抗原受体(CAR)治疗疾病例如癌症的组合物和方法。

[0141] 一方面,本发明提供多种嵌合抗原受体,其包含经工程化而特异性结合EGFRvIII蛋白的抗体或抗体片段。一方面,本发明提供经工程化而表达CAR的细胞(例如T细胞),其中该CAR T细胞(“CART”)表现出抗肿瘤性质。一方面,用CAR转化细胞,CAR在细胞表面上表达。一些实施方案中,用编码CAR的病毒载体转导细胞(例如T细胞)。在一些实施方案中,病毒载体是逆转录病毒载体。一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。一些这样的实施方案中,细胞可以稳定地表达CAR。在其它实施方案中,用编码CAR的核酸,例如mRNA、cDNA、DNA,转染细胞(例如T细胞)。在一些这样的实施方案中,细胞可以瞬时表达CAR。

[0142] 一方面,CAR的EGFRvIII蛋白结合部分是scFv抗体片段。一方面,该抗体片段是功能性的,由此,与其所来自的IgG抗体相比,其保持等价的结合亲合力,例如其以相当的功效结合相同抗原。一方面,该抗体片段是功能性的,由此其提供生物学反应,所述反应可以包括但不限于激活免疫反应、抑制从其靶抗原的信号传导起始、抑制激酶活性等,这些是本领域技术人员理解的。

[0143] 一方面,CAR的EGFRvIII抗原结合结构域是鼠scFv抗体片段。另一方面,CAR的EGFRvIII抗原结合结构域是,相对于其所源自的鼠序列scFv被人源化的scFv抗体片段。示例性抗EGFRvIII亲本鼠单克隆抗体(3C10)的产生公开在Okamoto et al. (British J. Cancer 1996,73:1366-1372)中。示例性抗EGFRvIII全人抗体(139)公开在Morgan et al. (2012) Human Gene Therapy,23:1043-1953,其内容并入此处作为参考。一方面,鼠序列的scFv包含SEQ ID NO:11。该鼠scFv的人源化对于临床环境可能是期望的,其中小鼠特异性残基可能在接受EGFRvIII治疗(例如用转导了该EGFRvIII构建体的T细胞治疗)的患者中诱导人抗鼠抗原(HAMA)反应。

[0144] 一方面,CAR的抗EGFRvIII结合结构域部分由转基因编码,该转基因的序列已经针对在哺乳动物细胞中表达而进行了密码子优化。一方面,本发明的整个CAR构建体由转基因编码,该转基因的整个序列已经针对在哺乳动物细胞中表达而进行了密码子优化。密码子优化指,同义密码子(即,编码相同氨基酸的密码子)在编码DNA中的出现频率在不同物种中存在偏好。密码子简并性允许多个核苷酸序列编码相同的多肽。本领域已知多种密码子优化方法,包括例如公开在至少美国专利号5,786,464和6,114,148中的方法。

[0145] 一方面, CAR的抗EGFRvIII结合结构域是人源化的抗EGFRvIII结合结构域。例如, 一个实施方案中, 抗EGFRvIII结合结构域包含SEQ ID NO:38中提供的scFv部分。一方面, 人源化抗EGFRvIII结合结构域包含SEQ ID NO:44中提供的scFv部分。一方面, 人源化抗EGFRvIII结合结构域包含SEQ ID NO:50中提供的scFv部分。一方面, 人源化抗EGFRvIII结合结构域包含SEQ ID NO:56中提供的scFv部分。一方面, 人源化抗EGFRvIII结合结构域包含SEQ ID NO:62中提供的scFv部分。一方面, 人源化抗EGFRvIII结合结构域包含SEQ ID NO:68中提供的scFv部分。一方面, 人源化抗EGFRvIII结合结构域包含SEQ ID NO:74中提供的scFv部分。一方面, 人源化抗EGFRvIII结合结构域包含SEQ ID NO:80中提供的scFv部分。一方面, 人源化抗EGFRvIII结合结构域包含SEQ ID NO:86中提供的scFv部分。

[0146] 一方面, 本文公开的CAR包括特定抗体的抗原结合结构域和胞内信号传导结构域。例如, 一些方面, 胞内信号传导结构域包括但不限于, CD3- $\zeta$ 链、4-1BB和CD28信号传导模块及其组合。

[0147] 一方面, 抗原结合结构域结合EGFRvIII。一方面, CAR包含SEQ ID NO:43中提供的序列。一方面, CAR包含SEQ ID NO:49中提供的序列。一方面, CAR包含SEQ ID NO:55中提供的序列。一方面, CAR包含SEQ ID NO:61中提供的序列。一方面, CAR包含SEQ ID NO:67中提供的序列。一方面, CAR包含SEQ ID NO:73中提供的序列。一方面, CAR包含SEQ ID NO:79中提供的序列。一方面, CAR包含SEQ ID NO:85中提供的序列。

[0148] 一方面, CAR包含至少一个胞内信号传导结构域, 其选自CD137 (4-1BB) 信号传导结构域、CD28信号传导结构域、CD3 $\zeta$ 信号结构域, 及其任何组合。一方面, CAR包含一个或多个共刺激分子的至少一个胞内信号传导结构域, 其不是CD137 (4-1BB) 或CD28、CD3 $\zeta$ 信号结构域, 及其任何组合。

[0149] 此外, 本发明提供CAR组合物、及其在用于治疗疾病例如癌症或任何恶性或自身免疫疾病的药物或方法中的应用, 其中所述疾病涉及表达EGFRvIII的细胞或组织。

[0150] 本发明还提供用于(例如在CAR表达细胞中, 例如T细胞中)过表达miR-17-92的组合物和方法。一方面, 转基因来源的miR-17-92过表达可以导致CAR转导的T细胞对肿瘤诱导的免疫抑制和化疗具有改善的抵抗性, 由此促进持久的治疗效果。

[0151] 嵌合抗原受体 (CAR)

[0152] 本发明涵盖包含编码CAR的序列的重组DNA构建体, 其中CAR包含与EGFRvIII特异的抗体片段, 例如特异结合EGFRvIII的人抗体片段。一方面, EGFRvIII是人EGFRvIII, 编码该抗体片段的核酸序列与编码胞内信号传导结构域的核酸序列相邻且在相同读框中。胞内信号传导结构域可以包含共刺激信号传导结构域和/或第一信号传导结构域, 例如 $\zeta$ 链。共刺激信号传导结构域指包含共刺激分子的胞内结构域的至少一部分的CAR部分。

[0153] 在特定方面, 本发明CAR构建体包含选自SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:86的scFv结构域, 其中该scFv可以前接可选的前导序列, 例如SEQ ID NO:13中提供的前导序列, 并后接可选的铰链序列(例如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108中提供的铰链序列)、跨膜区(例如SEQ ID NO:15中提供的)、胞内信号传导结构域(包括SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102)和CD3 $\zeta$ 序列(包括SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99), 其中这些结构域相邻并在相同读框中以形成单个融合蛋白。本发明还包括

编码多肽的核苷酸序列,该多肽具有选自SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:50,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:68,SEQ ID NO:74,SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:86的scFv片段、和SEQ ID NO:13-17的结构域之每一个。本发明还包括编码多肽的核苷酸序列,所述多肽具有选自SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:50,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:68,SEQ ID NO:74,SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:86的scFv片段、和SEQ ID NO:13-16及SEQ ID NO:99的结构域之每一个。一方面,EGFRvIII CAR构建体包含可选前导序列、特异结合EGFRvIII的胞外抗原结合结构域、铰链、跨膜结构域、和胞内刺激结构域。一方面,EGFRvIII CAR构建体包含可选前导序列、特异结合EGFRvIII的胞外抗原结合结构域、铰链、跨膜结构域、和包括共刺激结构域和第一刺激结构域的胞内信号传导结构域。包含人源化的scFv结构域的特定EGFRvIII CAR构建体提供在SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:49,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:67,SEQ ID NO:73,SEQ ID NO:79,SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:90中。包含鼠scFv结构域的特定EGFRvIII CAR构建体提供在SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中。

[0154] 一个示例性前导序列为SEQ ID NO:13。一个示例性铰链/间隔序列为SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108。一个示例性跨膜结构域序列为SEQ ID NO:15。一个示例性4-1BB蛋白共刺激结构域序列为SEQ ID NO:16。一个示例性CD27蛋白共刺激结构域序列为SEQ ID NO:102。一个示例性CD3 $\zeta$ 结构域的第一信号传导结构域序列为SEQ ID NO:17。另一示例性CD3 $\zeta$ 结构域的第一信号传导结构域序列为SEQ ID NO:99。

[0155] 一方面,本发明涵盖包含编码CAR的核酸分子的重组核酸构建体,其中该核酸分子包含与编码胞内信号传导结构域的核酸序列相邻并在相同的读框中的、编码(例如如本文所述的)抗EGFRvIII结合结构域的核酸序列。一方面,抗EGFRvIII结合结构域选自SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:50,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:68,SEQ ID NO:74,SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:86中的一个或多个。一方面,抗EGFRvIII结合结构域由在选自以下的序列中提供的核苷酸序列编码:SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:51,SEQ ID NO:57,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:69,SEQ ID NO:75,SEQ ID NO:81和SEQ ID NO:98。一方面,抗EGFRvIII结合结构域由SEQ ID NO:39编码。一方面,抗EGFRvIII结合结构域由SEQ ID NO:45编码。一方面,抗EGFRvIII结合结构域由SEQ ID NO:51编码。一方面,抗EGFRvIII结合结构域由SEQ ID NO:57编码。一方面,抗EGFRvIII结合结构域由SEQ ID NO:63编码。一方面,抗EGFRvIII结合结构域由SEQ ID NO:69编码。一方面,抗EGFRvIII结合结构域由SEQ ID NO:75编码。一方面,抗EGFRvIII结合结构域由SEQ ID NO:81编码。

[0156] 一方面,本发明涵盖包含编码CAR的核酸分子的重组核酸构建体,其中该核酸分子包含选自SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:48,SEQ ID NO:54,SEQ ID NO:60,SEQ ID NO:66,SEQ ID NO:72,SEQ ID NO:78,SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:90的编码抗EGFRvIII结合结构域的核酸序列,其中该序列与编码胞内信号传导结构域的核酸序列相邻并在相同读框中。可以用于CAR中的示例性胞内信号传导结构域包括但不限于,例如CD3- $\zeta$ ,CD28,4-1BB等的一个或多个胞内信号传导结构域。一些情况下,CAR可以包含CD3- $\zeta$ ,CD28,4-1BB等的胞内信号传导结构域的任何组合。一方面,核酸构建体包含SEQ ID NO:42。一方面,CAR构建体的核酸序列为SEQ ID NO:48。一方面,核酸构建体包含SEQ ID NO:54。一方面,核酸构建体包含SEQ ID NO:60。一方面,核酸构建体包含SEQ ID NO:66。一方面,核酸构建体包含SEQ ID NO:72。

一方面,核酸构建体包含SEQ ID NO: 78。一方面,核酸构建体包含SEQ ID NO:84。

[0157] 编码期望分子的核酸序列可以使用标准技术通过本领域熟知的重组方法获得,例如对来自编码该基因的细胞的文库进行筛选,从已知包括该基因的载体获得该基因、或从含有该基因的细胞和组织直接分离。备选地,目的核酸可以合成产生,而不进行克隆。

[0158] 本发明包括可以直接转导至细胞中的、表达CAR的逆转录病毒和慢病毒载体构建体。

[0159] 本发明还包括可以直接地转染至细胞中的RNA构建体。用于产生可以用于转染的mRNA的方法包括:用特别设计的引物体外转录(IVT)模板,之后添加poly A,以产生含有3'和5'非翻译序列("UTR")、5'帽子和/或内部核糖体进入位点(IRES)、待表达核酸和polyA尾(典型地50-2000个碱基长度)的构建体。由此产生的RNA可以有效地转染不同类型的细胞。一个实施方案中,模板包括编码CAR的序列。在一个实施方案中,RNA CAR载体通过电穿孔转导入T细胞。

[0160] 抗原结合结构域

[0161] 一方面,本发明CAR包含靶特异性结合元件(也称作抗原结合结构域)。该部分的选择取决于定义靶细胞表面的配体的类型和数量。例如,可以选择抗原结合结构域,以识别作为靶细胞上与特定疾病状态相关的细胞表面标志发挥作用的配体。由此,可以充当本发明CAR的抗原结合结构域的配体的细胞表面标志的例子包括,与病毒、细菌、寄生物感染、自身免疫疾病和癌细胞相关的那些细胞表面标志。

[0162] 一方面,可以通过将特异性结合期望抗原的抗原结合结构域工程化掺入CAR中,使CAR介导的T细胞反应指向目的抗原。

[0163] 一方面,包含抗原结合结构域的CAR部分包含靶向EGFRvIII的抗原结合结构域。一方面,抗原结合结构域靶向人EGFRvIII。例如,通过用包括EGFRvIII特异性融合连接处的14氨基酸肽(LEEKKGNYVVDHC;SEQ ID NO:101)免疫小鼠,产生了抗EGFRvIII的小鼠单克隆抗体(IgG2b)3C10,该抗体显示出高度特异地识别EGFRvIII,而没有任何可检测的与野生型EGFR的结合(Okamoto et al, British J.Cancer 1996,73:1366-1372)。因此,一些实施方案中,抗原结合结构域靶向EGFRvIII融合连接处结构域中的氨基酸序列,例如包含加入的甘氨酸残基的氨基酸序列。一些实施方案中,抗原结合结构域靶向SEQ ID NO:101氨基酸序列中的一个或多个氨基酸序列。

[0164] 抗原结合结构域可以是与抗原结合的任何结构域,包括但不限于,单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体、及其功能性片段,包括但不限于,单结构域抗体如重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)、和驼源纳米抗体(nanobody)的可变结构域(VHH)、以及本领域已知的发挥抗原结合结构域功能的替代性支架,例如重组纤连蛋白结构域,等。在一些情况下,有利的是,抗原结合结构域来源于CAR将最终用于的相同物种。例如,为了用于人类,对于CAR的抗原结合结构域,可能有利的是,包含抗体或抗体片段的抗原结合结构域的人或人源化残基。

[0165] 因此,一方面,抗原结合结构域包含人抗体或抗体片段。另一方面,抗原结合结构域包含人源化抗体或抗体片段。一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域包含本文所述抗EGFRvIII结合结构域的轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)之一或多个(例如一个、两个、或所有三个)、以及本文所述抗

EGFRvIII结合结构域的重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区 2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)之一或多个(例如,一个、两个、或所有三个)。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域包含本文所述轻链可变区和/或重链可变区。一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域是包含氨基酸序列的轻链可变区和重链可变区(例如本文所述轻链可变区和重链可变区)的scFv。一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域(例如scFv)包含:轻链可变区,其包含在本文提供的轻链可变区的氨基酸序列中具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过30、20或10个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与本文提供的氨基酸序列具有85-99%(例如90-99%或95-99%)同一性的序列;和/或重链可变区,其包含在本文提供的重链可变区的氨基酸序列中具有至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过30、20或10个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与本文提供的氨基酸序列具有85-99%(例如90-99%或95-99%)同一性的序列。一方面,抗原结合结构域包含选自SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:86的一个或多个序列。一方面,人源化CAR为选自SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85和 SEQ ID NO:90的一个或多个序列。

[0166] 一些方面,非人抗体是人源化的,其中抗体的特定序列或区域被修饰以增加与天然产生于人体中的抗体或其片段的相似性。一方面,抗原结合结构域为人源化的。

[0167] 人源化抗体可以使用本领域熟知的各种技术产生,包括但不限于CDR 嫁接(见例如欧洲专利号EP 239,400;国际公布号W0 91/09967;和美国专利号5,225,539,5,530,101,和5,585,089,每份文献均特此完整地并入此处作为参考)、镶饰(veneering)或表面重塑(resurfacing)(参见例如欧洲专利号 EP592,106和EP519,596;Padlan,1991,Molecular Immunology, 28(4/5):489-498;Studnicka et al.,1994,Protein Engineering,7(6):805-814;和Roguska et al.,1994,PNAS,91:969-973,每份文献均特此完整地并入此处作为参考)、链改组(参见例如美国专利号5,565,332,该文献特此完整地并入此处作为参考),和以下文献中公开的技术:例如美国专利申请公布号 US2005/0042664,美国专利申请公布号US2005/0048617,美国专利号 6,407,213,美国专利号5,766,886,国际公布号W0 9317105,Tan et al., 2002,J.Immunol.,169:1119-25;Caldas et al.,2000,Protein Eng., 13(5):353-60;Morea et al.,2000,Methods,20:267-79;Baca et al.,1997,J. Biol.Chem.,272:10678-84;Roguska et al.,1996,Protein Eng., 9(10):895-904;Couto et al.,1995,Cancer Res.,55:5973s-5977;Couto et al.,1995,Cancer Res.,55(8):1717-22;Sandhu 1994Gene,150(2):409-10; and Pedersen et al.,1994,J.Mol.Biol., 235(3):959-73(每份文献均特此完整地并入此处作为参考)。经常地,构架区中的构架残基被来自CDR供体抗体的相应残基替代,以改变例如改善抗原结合。这些构架替代物可以通过本领域熟知的方法鉴定,例如,通过模建CDR和构架残基的相互作用以鉴定对于抗原结合重要的构架残基、以及进行序列比较以鉴定在特定位置上的不寻常构架残基(见例如,Queen et al.,U.S.Pat.No.5,585,089;和 Riechmann et al.,1988,Nature,332:323,每份文献均特此完整地并入此处作为参考)。

[0168] 人源化抗体或抗体片段中保留来自非人来源的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常被称作“输入”残基,其典型地取自“输入”可变区。在本文中,人源化抗体或抗

体片段包含来自非人免疫球蛋白分子的一个或多个CDR和构架区,其中包含构架的氨基酸残基完全地或大多数地来自人种系。本领域熟知多种用于将抗体或抗体片段人源化的技术,其基本上可以按照Winter及其同事的方法进行(Jones et al.,Nature, 321:522-525 (1986);Riechmann et al.,Nature,332:323-327(1988); Verhoeyen et al.,Science, 239:1534-1536(1988)),其中用啮齿类动物CDR 或CDR序列替代相应的人抗体序列,即,CDR嫁接(EP 239,400;PCT公布号W0 91/09967;和U.S.Pat.Nos.4,816,567;6,331,415;5,225,539; 5,530,101;5,585,089;6,548,640,文献内容特此完整地并入此处作为参考)。在此人源化抗体和抗体片段中,实质上不到全部的人可变结构域已经被来自非人物种的相应序列替代。人源化抗体常是人抗体,其中一些CDR残基和可能地一些构架(FR)残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基替代。抗体和抗体片段的人源化也可以通过镶饰或表面重塑实现(EP 592,106; EP 519,596;Padlan,1991,Molecular Immunology,28(4/5):489-498; Studnicka et al.,Protein Engineering,7(6):805-814(1994);和Roguska et al.,PNAS,91:969-973(1994))或通过链改组实现(U.S.Pat.No.5,565,332),每份文献均特此完整地并入此处作为参考。

[0169] 可以选择待用于制备人源化抗体的人可变结构域(重和轻两者),以降低抗原性。根据所谓的“最佳匹配”(best-fit)方法,相对于已知人可变结构域序列的完整文库,筛选啮齿类抗体的可变结构域序列。然后,最接近啮齿类的人序列可以被接受为人构架(FR)用于人源化抗体(Sims et al.,J. Immunol.,151:2296(1993);Chothia et al.,J.Mol.Biol.,196:901(1987),文献内容特此完整地并入此处作为参考)。另一方法使用源自共有序列的特定构架,其中所述共有序列为具有特定亚组的轻链或重链的所有人抗体的共有序列。同一构架可以用于几种不同的人源化抗体(参见,例如Carter et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);Presta et al.,J.Immunol., 151:2623(1993),文献内容特此完整地并入此处作为参考)。

[0170] 一些方面,本发明CAR组合物中包含抗体片段的部分是人源化的,保留对靶抗原的高度亲合力和其它有利的生物学性质。根据本发明一方面,人源化抗体和抗体片段通过如下方法制备:使用亲本和人源化序列的三维模型,分析亲本序列和各种概念人源化产物。三维免疫球蛋白模型是通常可获得的,并是本领域技术人员熟悉的。可获得描述和展示选定的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。通过对这些展示物的观察,可以分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能性中发挥的可能作用,例如,分析影响候选免疫球蛋白结合靶抗原的能力的残基。以此方式,可以从受体和输入序列选择和组合FR残基,以便实现期望的抗体或抗体片段特征,例如对靶抗原增加的亲合力。一般地,CDR残基直接地且最为实质性地参与影响抗原结合。

[0171] 一方面,抗EGFRvIII结合结构域是例如Fv、Fab、或(Fab')<sub>2</sub>、或双功能(例如双特异性)杂种抗体(例如Lanzavecchia et al.,Eur.J.Immunol. 17,105(1987))。一方面,本文提供的抗体片段是scFv。一方面,scFv结合EGFRvIII但不结合野生型EGFR。一些情况中,人scFv也可以来源于酵母展示文库。

[0172] 一些情况中,scFv可以根据本领域已知的方法制备(参见例如Bird et al.,(1988)Science 242:423-426和Huston et al.,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85:5879-5883)。scFv分子可以通过使用柔性多肽接头将VH和VL区连接在一起而产生。scFv分

子可以含有具有优化的长度和/或氨基酸组成的接头(例如Ser-Gly接头)。接头长度可以很大地影响scFv的可变区折叠和相互作用的方式。事实上,如果使用短多肽接头(例如5-10个氨基酸),将妨碍链内折叠。此外也需要链间折叠以将两个可变区拉到一起以形成功能性表位结合位点。接头取向和大小的例子可以参见例如,Hollinger et al. 1993Proc Natl Acad.Sci.U.S.A.90:6444-6448,U.S.专利申请公布号 2005/0100543,2005/0175606,2007/0014794,和PCT公布号 W02006/020258和W02007/024715,这些文献的内容特此并入作为参考。

[0173] scFv可以在其VL和VH区之间包含至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,25,30,35,40,45,50,或更多个氨基酸残基的接头。接头序列可以包含任何天然氨基酸。一些实施方案中,接头序列包含氨基酸甘氨酸和丝氨酸。另一实施方案中,接头序列包含成组的甘氨酸和丝氨酸重复,例如(Gly4Ser)<sub>n</sub>(SEQ ID NO:37),其中n是等于或大于1的正整数。在一个实施方案中,接头可以是(Gly4Ser)<sub>4</sub>(SEQ ID NO:113)或(Gly4Ser)<sub>3</sub>(SEQ ID NO:114)。接头长度的变化可以保持或增强活性,在活性研究中引起优异的功效。

[0174] 稳定性和突变

[0175] 抗EGFRvIII结合结构域,例如scFv分子(例如可溶性scFv),的稳定性可以参考常规对照scFv分子或全长抗体的生物物理性质(例如热稳定性)进行评价。一个实施方案中,人源化scFv具有热稳定性,在所描述的试验中该热稳定性比对照结合分子(例如常规scFv分子)高大约0.1,大约0.25,大约0.5,大约0.75,大约1,大约1.25,大约1.5,大约1.75,大约2,大约2.5,大约3,大约3.5,大约4,大约4.5,大约5,大约5.5,大约6,大约6.5,大约7,大约7.5,大约8,大约8.5,大约9,大约9.5,大约10摄氏度,大约11摄氏度,大约12摄氏度,大约13摄氏度,大约14摄氏度,或大约15摄氏度。

[0176] 抗EGFRvIII结合结构域例如scFv的改良热稳定性将随后被赋予到整个EGFRvIII CAR构建体上,导致EGFRvIII CAR构建体的改善治疗性质。抗EGFRvIII结合结构域例如scFv的热稳定性,相比常规抗体,可以提高至少大约2℃或3℃。一个实施方案中,抗EGFRvIII抗体结构域,例如scFv,相比常规抗体,具有提高1℃的热稳定性。另一个实施方案中,抗EGFRvIII抗体结构域,例如scFv,相比常规抗体,具有提高2℃的热稳定性。另一个实施方案中,抗EGFRvIII抗体结构域,例如scFv,相比常规抗体,具有提高4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15℃的热稳定性。可以例如在本文公开的scFv分子和该scFv的VH和VL所源自的抗体的scFv分子或Fab片段之间进行比较。可以使用本领域已知的方法测量热稳定性。例如,在一个实施方案中,可以测量T<sub>m</sub>。测量T<sub>m</sub>的方法和确定蛋白质稳定性的其它方法在下文中更有详细的描述。

[0177] scFv的突变(由可溶性scFv的人源化或直接诱变引起)可以改变该scFv的稳定性,并改善该scFv和EGFRvIII CAR构建体的整体稳定性。可以使用量度例如T<sub>m</sub>、温度变性和温度聚集,将人源化scFv的稳定性与鼠scFv进行比较。可以使用实施例描述的试验,确定突变的scFv的结合能力。

[0178] 一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域,例如scFv包含至少一个由人源化过程引起的突变,由此该突变的scFv赋予EGFRvIII构建体改善的稳定性。另一实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域,例如scFv包含至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10个由人源化过程引起的突

变,由此该突变的scFv 赋予EGFRvIII构建体改善的稳定性。

[0179] 评价蛋白稳定性的方法

[0180] 可以使用例如下述方法,评价抗原结合结构域的稳定性。此类方法允许确定多个热解折叠过渡,其中最不稳定的结构域首先解折叠、或限制协同解折叠的多结构域单位(例如,表现出单个解折叠过渡的多结构域蛋白)的整体稳定性阈值。可以以多种其它方式鉴定最不稳定的结构域。可以进行诱变以探测哪个结构域限制整体稳定性。此外,多结构域蛋白的蛋白酶抗性可以在已知最不稳定的结构域固有解折叠的条件下通过DSC或其它光谱方法进行测定(Fontana, et al., (1997) Fold. Des., 2: R17-26; Dimasi et al. (2009) J. Mol. Biol. 393: 672-692)。一旦鉴定了最不稳定的结构域,可以使用编码该结构域(或其部分)的序列作为测试序列用于这些方法中。

[0181] a) 热稳定性

[0182] 组合物的热稳定性可以使用非限制性的本领域已知的生物物理或生物化学技术分析。在某些实施方案中,可以通过分析性光谱学,评价热稳定性。

[0183] 一个示例性分析光谱学方法是差示扫描量热法(DSC)。DSC使用量热仪,该量热仪对伴随大多数蛋白或蛋白结构域的解折叠的热吸收敏感(参见例如, Sanchez-Ruiz, et al., Biochemistry, 27: 1648-52, 1988)。为了确定蛋白质的热稳定性,将蛋白样品插入量热仪,升高温度直到Fab或scFv解折叠。蛋白质发生解折叠时的温度指示整体蛋白稳定性。

[0184] 另一示例性分析光谱学方法是圆二色谱(CD)。CD光谱测量组合物的光学活性随着温度增加而出现的变化。圆二色(CD)光谱测量由于结构的不对称性造成的左圆偏振光和右圆偏振光的吸收差异。由无序的或解折叠的结构导致的CD谱与由有序的或折叠的结构导致的CD谱十分不同。CD谱反映蛋白质对升温的变性效应的敏感性,并由此可以指示蛋白质的热稳定性(见van Mierlo and Steemsma, J. Biotechnol., 79 (3): 281-98, 2000)。

[0185] 另一用于测量热稳定性的示例性分析光谱学方法是荧光发射光谱(见 van Mierlo和Steemsma,同上引文)。再一用于测量热稳定性的示例性分析光谱学方法是核磁共振(NMR)光谱法(参见例如van Mierlo和 Steemsma,同上引文)。

[0186] 组合物的热稳定性可以通过生物化学方法测量。示例性的用于评价热稳定性的生物化学方法是热攻击试验。在“热攻击试验”中,组合物接受一系列的升高温度一段设定的时间。例如,在一个实施方案中,对受试scFv 分子或包含scFv分子的分子施予一系列的递增温度,为期例如1-1.5小时。然后,通过相关生物化学试验,测量蛋白质的活性。例如,如果蛋白质是结合蛋白(例如scFv或含scFv的多肽),则可以通过功能性或定量性 ELISA,测量该结合蛋白的结合活性。

[0187] 此类试验可以以高通量形式进行,在实施例中公开了使用大肠杆菌(E. coli)和高通量筛选的试验。可以使用本领域已知的方法,构建抗EGFRvIII 结合结构域(例如scFv)变体文库。可以诱导抗EGFRvIII结合结构域(例如 scFv)表达,并对抗EGFRvIII结合结构域(例如scFv)施加热攻击。可以测试攻击后的受试样品的结合,对稳定的那些抗EGFRvIII结合结构域(例如 scFv)进行规模扩大和进一步表征。

[0188] 可以使用上述任何技术(例如分析光谱学技术),测量组合物的熔解温度( $T_m$ ),评价热稳定性。熔解温度是热转变曲线中点的温度,在此组合物中50%的分子处于折叠态(参见例如Dimasi et al. (2009) J. Mol Biol. 393: 672-692)。在一个实施方案中,抗EGFRvIII

结合结构域,例如scFv,的  $T_m$ 值是大约40℃,41℃,42℃,43℃,44℃,45℃,46℃,47℃,48℃,49℃,50℃,51℃,52℃,53℃,54℃,55℃,56℃,57℃,58℃,59℃,60℃,61℃,62℃,63℃,64℃,65℃,66℃,67℃,68℃,69℃,70℃,71℃,72℃,73℃,74℃,75℃,76℃,77℃,78℃,79℃,80℃,81℃,82℃,83℃,84℃,85℃,86℃,87℃,88℃,89℃,90℃,91℃,92℃,93℃,94℃,95℃,96℃,97℃,98℃,99℃,100℃。在一个实施方案中,IgG的 $T_m$ 值是大约40℃,41℃,42℃,43℃,44℃,45℃,46℃,47℃,48℃,49℃,50℃,51℃,52℃,53℃,54℃,55℃,56℃,57℃,58℃,59℃,60℃,61℃,62℃,63℃,64℃,65℃,66℃,67℃,68℃,69℃,70℃,71℃,72℃,73℃,74℃,75℃,76℃,77℃,78℃,79℃,80℃,81℃,82℃,83℃,84℃,85℃,86℃,87℃,88℃,89℃,90℃,91℃,92℃,93℃,94℃,95℃,96℃,97℃,98℃,99℃,100℃。在一个实施方案中,多价抗体的 $T_m$ 值是大约40℃,41℃,42℃,43℃,44℃,45℃,46℃,47℃,48℃,49℃,50℃,51℃,52℃,53℃,54℃,55℃,56℃,57℃,58℃,59℃,60℃,61℃,62℃,63℃,64℃,65℃,66℃,67℃,68℃,69℃,70℃,71℃,72℃,73℃,74℃,75℃,76℃,77℃,78℃,79℃,80℃,81℃,82℃,83℃,84℃,85℃,86℃,87℃,88℃,89℃,90℃,91℃,92℃,93℃,94℃,95℃,96℃,97℃,98℃,99℃,100℃。

[0189] 热稳定性也可以通过使用分析性量热技术(例如DSC)测量组合物的比热或热容( $C_p$ )而评价。组合物的比热是上升1℃(1mol水的温度)所需的能量(例如,kcal/mol)。大 $C_p$ 是变性或失活的蛋白质组合物的标志。组合物的热容改变( $\Delta C_p$ )可以通过确定组合物在其热转变前和后的比热而测量。热稳定性也可以通过测量或确定其它热力学稳定性参数,包括解折叠的吉布斯自由能( $\Delta G$ )、解折叠的焓( $\Delta H$ )、或解折叠的熵( $\Delta S$ ),来评价。可以用一个或多个上述生物化学试验(例如热攻击试验),确定组合物的50%保持其活性(例如结合活性)时的温度(即 $T_c$ 值)。

[0190] 此外,与未突变的抗EGFRvIII结合结构域(例如scFv)相比,抗EGFR vIII结合结构域(例如scFv)的突变可以改变该抗EGFR vIII结合结构域(例如scFv)的热稳定性。当将人源化的抗EGFR vIII结合结构域(例如scFv)并入抗EGFRvIII CAR构建体中时,该抗EGFRvIII结合结构域(例如人源化scFv)可以赋予整个抗EGFRvIII CAR构建体热稳定性。一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域(例如scFv)包含可以赋予该抗EGFRvIII结合结构域(例如scFv)热稳定性的单突变。另一实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域(例如scFv)包含可以赋予该抗EGFRvIII结合结构域(例如scFv)热稳定性的多突变。一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域(例如scFv)中的多突变对该抗EGFRvIII结合结构域(例如scFv)的热稳定性产生加性效应。

[0191] b) %聚集

[0192] 组合物的稳定性可以通过测量其发生聚集的倾向而确定。可以通过多种非限制性的生物化学或生物物理学技术测量聚集。例如,可以使用色谱法,例如大小排阻色谱(SEC)评价组合物的聚集。SEC基于大小分离分子。以半固体聚合物凝胶珠装柱,所述珠子可以允许离子和小分子进入其内部但不允许大分子进入。当将蛋白质组合物加至柱顶端后,与大蛋白聚集物可得的溶剂体积相比,致密折叠的蛋白质(即,未聚集蛋白质)通过更大的溶剂体积分布。因此,大聚集物更为快速地移动通过柱子,并以此方式可以将混合物分离或分级分离为组分。可以在从凝胶中洗脱后,分开地对每个级分进行定量(例如通过光散射)。因此,组合物的%聚集可以通过比较级分浓度和上柱的蛋白质的总浓度而确定。稳定的组合

物从柱子中作为基本上单一的级分而洗脱,并在洗脱谱或色谱中表现为基本上单一的峰。

[0193] c) 结合亲合力

[0194] 组合物的稳定性可以通过确定其靶标结合亲合力而评价。本领域已知众多的确定结合亲合力的方法。一个示例性确定结合亲合力的方法使用表面等离子体共振。表面等离子体共振是一种光学现象,利用该现象,通过例如使用BIAcore系统(Pharmacia Biosensor AB,Uppsala,Sweden and Piscataway,N.J.),检测生物芯片基质中蛋白浓度的变化,可以分析实时的生物特异性相互作用。进一步的描述参见Jonsson,U.,et al.(1993) Ann. Biol.Clin.51:19-26;Jonsson,U.,i(1991) Biotechniques 11:620-627; Jonsson,B.,et al.(1995) J.Mol.Recognit.8:125-131;和Johnnson,B.,et al.(1991) Anal.Biochem.198: 268-277。

[0195] 一方面,CAR的抗原结合结构域包含与本文所述抗原结合结构域的氨基酸序列同源的氨基酸序列,并且该抗原结合结构域保持本文所述抗 EGFRvIII抗体片段的期望功能性质。一个特定方面,本发明CAR组合物包含抗体片段。再一方面,抗体片段包含scFv。

[0196] 在多个方面,CAR的抗原结合结构域被工程化改造,其中修饰一个或两个可变区(例如VH和/或VL)中,例如一个或多个CDR区中和/或一个或多个构架区中的一个或多个氨基酸。一个特定方面,本发明CAR组合物包含抗体片段。再一方面,该抗体片段包含scFv。

[0197] 本领域普通技术人员明了,可以进一步修饰本发明抗体或抗体片段,使其在氨基酸序列上发生变化(例如不同于野生型)但在期望活性上不变。例如,可以对蛋白质进行在“非必需”氨基酸残基位置导致氨基酸替代的其他核苷酸替代。例如,可以将分子中的非必需氨基酸残基替代为来自相同侧链家族的另一氨基酸残基。另一实施方案中,可以将一个氨基酸链替代为在侧链家族成员的组成和/或顺序上不同的结构相似的链,例如可以进行保守替代——将氨基酸残基替代为具有相似侧链的氨基酸残基。

[0198] 本领域中已经鉴定了具有相似侧链的氨基酸残基的家族,包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0199] 对于两个或两个以上核酸或多肽序列,同一性百分数涉及相同的两个或两个以上序列。当使用以下序列比较算法之一或通过手工比对和目视而将两个序列在比较窗或指定区域中比较并基于最大对应性而对齐后,如果两个序列具有规定百分数的相同氨基酸残基或核苷酸(例如,在规定区域中,或未规定时在整个序列上,60%同一,任选地70%,71%,72%,73%,74%,75%,76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%同一),则两个序列“基本上相同”。任选地,同一性存在于长度至少大约50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域上,或更优选地长度100至500或1000或更多个核苷酸(或20、50、200或更多个氨基酸)的区域上。

[0200] 为了序列比较,典型地,一个序列充当参考序列,与受试序列进行比较。当使用序列比较算法时,将受试序列和参考序列输入计算机,指定子序列坐标(如果必要的话),并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或可以指定替代参数。然后序列比较算法将

基于程序参数计算受试序列相对于参考序列的百分数序列同一性。用于比较的序列比对方法是本领域技术人员已知的。用于比较的最佳序列比对可以例如通过如下方式实现:Smith和Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c的局部同源性算法; Needleman和Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443的同源性比对算法; , Pearson和Lipman, (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444的相似性搜索方法; 这些算法的计算机化执行程序 (GAP, BESTFIT, FASTA, 和 TFASTA, 在Wisconsin Genetics软件包中, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI); 或手工比对和目视检查 (参见, 例如Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology)。

[0201] 适用于确定百分数序列同一性和序列相似性的两个算法例子是 BLAST和BLAST 2.0算法, 其分别描述在Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; 和 Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410。实施BLAST分析的软件可以通过美国国立生物技术信息中心而为公众所获得。

[0202] 也可以使用E. Meyers和W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17)的算法 (该算法已经并入ALIGN程序 (版本2.0)), 使用PAM120 权重残基表、12的空位长度罚分和4的空位罚分, 确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。此外, 可以使用Needleman和Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453) 算法 (已经并入GCG软件包中的GAP程序 (可从 [www.gcg.com](http://www.gcg.com) 获得), 使用Blossom 62矩阵或PAM250矩阵、以及16, 14, 12, 10, 8, 6, 或4的空位权重和1, 2, 3, 4, 5, 或6的长度权重, 确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。

[0203] 一方面, 本发明考虑修饰起始抗体或片段 (例如scFv) 氨基酸序列, 产生功能性等价分子。例如, 可以修饰包含在CAR中的抗EGFRvIII结合结构域, 例如scFv的VH或VL, 以保留该抗EGFRvIII结合结构域 (例如 scFv) 的起始VH或VL构架区的至少大约70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%同一性。本发明考虑修饰整个CAR构建体, 例如在CAR构建体的多个结构域的一个或多个氨基酸序列中进行修饰, 以产生功能性等价分子。可以修饰 CAR构建体, 以保留起始CAR构建体的至少大约70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%同一性。

[0204] 跨膜结构域

[0205] 就跨膜结构域而言, 在多个实施方案中, CAR可以设计以包含与CAR 的胞外结构域连接的跨膜结构域。跨膜结构域可以包括与该跨膜区相邻的一个或多个额外的氨基酸, 例如与该跨膜结构域所源自的蛋白质的胞外区相关的一个或多个氨基酸 (例如, 该胞外区的1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10至多达15个氨基酸), 和/或与该跨膜结构域所源自的蛋白质的胞内区相关的一个或多个氨基酸 (例如, 该胞内区的1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10至多达15个氨基酸)。一方面, 跨膜结构域是与CAR所用的其它结构域之一相关的跨膜结构域。一些情况下, 跨膜结构域可以经选择或氨基酸替代修饰而避免该结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合, 例如, 以最小化与受体复合物的其它成员的相互作用。一方面, 跨膜结构域能够与CAR T细胞表面上的另一CAR发生同二聚化。一个不同方面, 可以修饰或替代跨膜结构域的氨基酸序列, 以最小化与相同CART中存在的天然结合配偶体的结合结构域的相互作用。

[0206] 跨膜结构域可以来源于天然或重组来源。当来源是天然来源时,结构域可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在一个方面,每当CAR与靶标结合,跨膜结构域就能够将信号传导至胞内结构域。在本发明中特别有用的跨膜结构域可以包括至少如下蛋白的跨膜结构域:例如T细胞受体的 $\alpha$ ,  $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154。

[0207] 一些情况下,跨膜结构域可以通过铰链例如来自人蛋白的铰链与CAR的胞外区,例如CAR的抗原结合结构域连接。例如,一个实施方案中,铰链可以是人Ig(免疫球蛋白)铰链,例如IgG4铰链,或CD8a铰链。一个实施方案中,铰链或间隔序列包含(例如为)SEQ ID NO:14的氨基酸序列。一方面,跨膜结构域包含(例如为)SEQ ID No:15的跨膜结构域。

[0208] 一方面,铰链或间隔序列包含IgG4铰链。例如,一个实施方案中,铰链或间隔序列包含具有如下氨基酸序列的铰链:

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK  
[0209] TISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGKM

[0210] (SEQ ID NO:104)。一些实施方案中,铰链或间隔包含由如下核苷酸序列编码的铰链:

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGG  
ACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGA  
CCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCA  
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGG  
GAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA  
GGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCC  
[0211] AGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGG  
TGACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC  
CTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC  
GGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCA  
GCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAA  
CGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGA  
GCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (SEQ ID NO:105).

[0212] 一方面,铰链或间隔包含IgD铰链。例如,一个实施方案中,铰链或间隔包含具有如下氨基酸序列的铰链:

RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERET  
KTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTG  
[0213] GVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSPQRLMALREPAAQA  
PVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG  
STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRLLNASRSLEVSVDH

[0214] (SEQ ID NO:106)。一些实施方案中,铰链或间隔包含由如下核苷酸序列编码的铰

链:

AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCA  
GGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACT  
GGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGA  
GAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATAACCCAGCCGCTGGGCGTCTATC  
TCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGT  
TTCGTCTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGAAA  
GGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCT  
CAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTC

[0215]

TGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAG  
AGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTG  
ATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCC  
AACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCG  
CTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTC  
TTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTC  
CCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACG  
TGACTGACCATT (SEQ ID NO:107).

[0216] 一方面,跨膜结构域可以是重组的,在此情形下其可以主要包含疏水残基例如亮氨酸和缬氨酸。一方面,在重组跨膜结构域的两端可以均存在苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸三联体。

[0217] 任选地,短寡肽或多肽接头,例如2至10个氨基酸长度,可以在CAR 的跨膜结构域和胞质区之间形成连接。甘氨酸-丝氨酸二联体是适直接头的例子。例如,一方面,接头包含氨基酸序列GGGSGGGGS (SEQ ID NO:108)。一些实施方案中,接头由核苷酸序列GGTGGCGGAGGT TCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO:109) 编码。

[0218] 胞质结构域

[0219] CAR的胞质结构域或区域包括胞内信号传导结构域。胞内信号传导结构域通常负责激活已经引入了CAR的免疫细胞的至少一种正常效应子功能。术语“效应子功能”是指细胞的特化功能。T细胞的效应子功能,例如可以是细胞裂解活性或辅助活性,包括分泌细胞因子。因此,术语“胞内信号传导结构域”指蛋白质中可以转导效应子功能信号和指导细胞实现特化功能的部分。尽管通常可以使用整个胞内信号传导结构域,但许多情况下无需使用整条链。就使用胞内信号传导结构域的截短部分而言,只要该截短部分可以转导效应子功能信号,则可以使用该截短部分替代完整链。术语胞内信号传导结构域由此意在包括足以转导效应子功能信号的胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0220] 可以用于本发明CAR中的胞内信号传导结构域的例子包括:T细胞受体 (TCR) 和共受体 (两者在抗原受体缔合后协同起作用以起始信号转导) 的胞质序列、以及这些序列的任何衍生物或变体、和具有相同功能性能的任何重组序列。

[0221] 已知,通过TCR单独产生的信号不足以完全激活T细胞,还需要第二和/或共刺激信号。因此,可以说,T细胞活化由两类不同的胞质信号序列介导:通过TCR起始抗原依赖性初

始活化的序列(第一胞内信号传导结构域)、和以抗原非依赖性方式起作用以提供第二或共刺激信号的序列(第二胞质信号传导结构域,例如共刺激结构域)。

[0222] 第一信号传导结构域以刺激方式或以抑制方式调节TCR复合物的初始活化。以刺激性方式起作用的第一胞内信号传导结构域可以含有称作免疫受体酪氨酸激活基序或ITAM的信号传导基序。

[0223] 在本发明中尤其有用的含有ITAM的第一胞内信号传导结构域的例子包括:TCR $\zeta$ 、FcR $\gamma$ ,FcR $\beta$ ,CD3 $\gamma$ ,CD3 $\delta$ ,CD3 $\epsilon$ ,CD5,CD22,CD79a,CD79b,和CD66d的胞内信号传导结构域。一个实施方案中,本发明CAR,例如选自SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:49,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:67,SEQ ID NO:73,SEQ ID NO:79和SEQ ID NO:85的CAR,包含CD3- $\zeta$ 的胞内信号传导结构域,例如第一信号传导结构域。一个实施方案中,第一信号传导结构域包含相对于天然ITAM结构域具有改变的(例如增加或减少的)活性的修饰ITAM结构域,例如突变的ITAM结构域。一个实施方案中,第一信号传导结构域包含含有修饰的ITAM的第一胞内信号传导结构域,例如,含有优化的和/或截短的ITAM的第一胞内信号传导结构域。一个实施方案中,第一信号传导结构域包含一个、两个、三个、四个或更多个ITAM基序。

[0224] CAR的胞内信号传导结构域可以包含CD3 $\zeta$ 信号传导结构域本身,或其可以与在本发明CAR中有用的任何其它期望的胞内信号传导结构域组合。例如,CAR的胞内信号传导结构域可以包含CD3 $\zeta$ 链部分和共刺激信号传导结构域。共刺激信号传导结构域指,CAR中包含共刺激分子的胞内结构域的部分。共刺激分子是非抗原受体或其配体的细胞表面分子,其是淋巴细胞对抗原产生充分应答所必需的。此类分子的例子包括CD27,CD28,4-1BB(CD137),OX40,CD30,CD40,PD-1,ICOS,淋巴细胞功能相关抗原1(LFA-1),CD2,CD7,LIGHT,NKG2C,B7-H3,和特异性结合CD83的配体,等等。例如,CD27共刺激已经被证实可以体外增强人CART细胞的扩增、效应子功能、和存活,以及体内提高人T细胞的持久性和抗肿瘤活性。

[0225] 在本发明CAR的胞质部分中胞内信号传导序列可以彼此以随机或规定的顺序连接。可选地,短寡肽或多肽接头,例如2-10个氨基酸长度(例如2,3,4,5,6,7,8,9,或10个氨基酸),可以在胞内信号传导序列之间形成连接。一个实施方案中,甘氨酸-丝氨酸二联体可以用作适宜的接头。一个实施方案中,可以使用单氨基酸,例如丙氨酸、甘氨酸作为合适的接头。

[0226] 一方面,设计胞内信号传导结构域,以包含两个或更多个例如2、3、4、5或更多个共刺激信号传导结构域。一个实施方案中,该两个或更多个,例如2、3、4、5或更多个共刺激信号传导结构域通过接头分子,例如本文所述接头分子分开。一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含两个共刺激信号传导结构域。一些实施方案中,接头分子是甘氨酸残基。一些实施方案中,接头是丙氨酸残基。

[0227] 一方面,设计胞内信号传导结构域,以包含CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域和CD28的信号传导结构域。一方面,设计胞内信号传导结构域,以包含CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域和4-1BB的信号传导结构域。一方面,4-1BB的信号传导结构域是SEQ ID NO:16的信号传导结构域。一方面,CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域是SEQ ID NO:17的信号传导结构域。

[0228] 一方面,设计胞内信号传导结构域,以包含CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域和CD27的信号传导结构域。一方面,CD27的信号传导结构域包含氨基酸序列QRRKYRSNKGESPVPEAEPCTRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPA CSP(SEQ ID NO:102)。一方面,CD27的信号传导结构域由如下

核苷酸序列编码：

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCC  
[0229] GCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCA  
GCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:103).

[0230] 一方面，本文所述表达CAR的细胞可以进一步包含第二CAR，例如包括不同抗原结合结构域(例如针对相同靶标(EGFRvIII)或不同靶标)的第二CAR。

[0231] 另一方面，本发明提供CAR表达细胞例如CART细胞群。一些实施方案中，CAR表达细胞群包含表达不同CAR的细胞混合物。例如，一个实施方案中，CART细胞群可以包括第一细胞和第二细胞，第一细胞表达具有本文所述抗EGFRvIII结合结构域的CAR，第二细胞表达具有不同抗EGFRvIII结构域(例如，与第一细胞表达的CAR中的抗EGFRvIII结合结构域不同的、本文描述的抗EGFRvIII结合结构域)的CAR。另一实例，CAR表达细胞群可以包括第一细胞和第二细胞，第一细胞表达包括(如本文所述的)抗EGFRvIII结合结构域的CAR，第二细胞表达包括针对非EGFRvIII靶的抗原结合结构域的CAR。一个实施方案中，CAR表达细胞群包括例如第一细胞和第二细胞，第一细胞表达包括第一胞内信号传导结构域的CAR，第二细胞表达包括第二信号传导结构域的CAR。

[0232] 另一方面，本发明提供细胞群，其中群体中至少一个细胞表达具有本文所述抗EGFRvIII结构域的CAR，第二细胞表达其它活性剂，例如，增强CAR表达细胞的活性的活性剂。例如，一个实施方案中，活性剂可以是抑制抑制性分子的活性剂。抑制性分子例如PD1可以在一些实施方案中降低CAR表达细胞发动免疫效应子反应的能力。抑制性分子的例子包括PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4和TGFR $\beta$ 。

[0233] RNA转染

[0234] 本文公开用于产生体外转录的RNA CAR的方法。本发明还包括编码CAR的RNA构建体，其可以直接地转染至细胞中。用于产生在转染中使用的mRNA的方法可以包括：用特别设计的引物体外转录(IVT)模板，之后添加poly A，以产生含有3'和5'非翻译序列(“UTR”)、5'帽子和/或内部核糖体进入位点(IRES)、待表达核酸和polyA尾(典型地50-2000个碱基长度)(SEQ ID NO:116)的构建体。由此产生的RNA可以有效地转染不同类型的细胞。一个实施方案中，模板包括编码CAR的序列。

[0235] 一方面，EGFRvIII CAR由信使RNA(mRNA)编码。一个方面，将编码EGFRvIII CAR的mRNA引入T细胞中以产生CART细胞。

[0236] 一个实施方案中，可以将体外转录的RNA CAR以瞬时转染的形式引入细胞。该RNA可以使用聚合酶链式反应(PCR)产生的模板，通过体外转录而产生。来自任何来源的目的DNA均可以通过PCR直接地转化为模板，并利用合适的引物和RNA聚合酶以体外合成mRNA。该DNA的来源可以是例如基因组DNA、质粒DNA、噬菌体DNA、cDNA、合成的DNA序列、或任何其它合适的DNA来源。用于体外转录的期望模板是本发明的CAR。例如，RNA CAR的模板可以包含：含有抗肿瘤抗体的单链可变结构域的胞外区；铰链区，跨膜结构域(例如CD8a的跨膜结构域)；和包括胞内信号传导结构域(例如包含CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域和4-1BB的信号传导结构域)的胞质区。

[0237] 一个实施方案中，待用于PCR的DNA包含开放阅读框。该DNA可以来自生物体基因组的天然DNA序列。一个实施方案中，该核酸可以包括5'和/或3'非翻译区(UTR)的一些或全

部。该核酸可以包括内含子和外显子。一个实施方案中,待用于PCR的DNA是人核酸序列。另一实施方案中,待用于PCR的DNA是包括5' 和3' UTR的人核酸序列。该DNA可以备选地是正常不在天然生物体中表达的人工DNA序列。示例性人工DNA 序列含有连接在一起以形成编码融合蛋白的开放阅读框的基因部分。这些连接在一起的DNA部分可以来自单个生物体,或来自一种以上的生物。

[0238] 可以使用PCR产生用于体外转录mRNA的模板,其中所述mRNA可以用于转染。本领域熟知实施PCR的方法。可以设计用于PCR的引物,以具有与待用作PCR模板的DNA的区域实质性互补的区域。“实质性互补”在本文中指这样的核苷酸序列,其中该引物序列中的大多数或全部的碱基是互补的,或一个或多个碱基是不互补的或错配的。实质性互补序列能够与目的DNA靶标在用于PCR的退火条件下退火或杂交。可以设计引物以实质性互补于DNA模板的任何部分。例如,可以设计引物,以扩增正常在细胞中转录的核酸部分(开放阅读框),包括5' 和3' UTR。也可以设计引物,以扩增编码目的特定结构域的核酸部分。一个实施方案中,可设计引物,以扩增人cDNA的编码区,包括5' 和3' UTR的全部或部分。用于PCR的引物可以通过本领域熟知的合成方法产生。“正向引物”是含有与DNA模板上待扩增DNA序列上游的核苷酸实质性互补的核苷酸区域的引物。“上游”在本文中用于指,相对于编码链而言,位于待扩增DNA 序列的5' 的位置。“反向引物”是含有与待扩增DNA序列下游的双链DNA 模板实质性互补的核苷酸区域的引物。“下游”在本文中用于指,相对于编码链而言,位于待扩增DNA序列的3' 的位置。

[0239] 可以用于PCR的任何DNA聚合酶均可以用于本文公开的方法中。试剂和聚合酶可以从多个来源商购获得。

[0240] 也可以使用能够促进稳定性和/或翻译效率的化学结构。RNA优选具有5' 和3' UTR。一个实施方案中,5' UTR长1至3000个核苷酸。加到编码区上的5' 和3' UTR序列的长度可以通过不同方法改变,包括但不限于,设计与UTR的不同区域退火的PCR引物。使用该方法,本领域普通技术人员可以修饰所需的5' 和3' UTR长度,以在转录的RNA转染后实现最佳的翻译效率。

[0241] 对于目的核酸,5' 和3' UTR可以是天然的、内源的5' 和3' UTR。或者,可以通过将对于目的核酸而言非内源的UTR序列并入正向和反向引物中,或通过对模板的任何其它修饰,以加入该UTR序列。可以通过使用对于目的核酸而言非内源的UTR序列,改变RNA的稳定性和/或翻译效率。例如,已知3' UTR序列中富AU元件可以降低mRNA的稳定性。因此,可以基于本领域已知的UTR的性质,选择或设计3' UTR以增加转录的RNA 的稳定性。

[0242] 一个实施方案中,5' UTR可以包含内源核酸的Kozak序列。或者,当通过如上所述PCR添加相对于目的核酸而言非内源的5' UTR时,可以通过加入该5' UTR序列而重新设计共有Kozak序列。Kozak序列可以增加一些RNA转录物的翻译效率,但似乎不是所有RNA实现有效翻译所必需的。本领域已知许多mRNA对Kozak序列的要求。其它实施方案中,5' UTR 可以是RNA病毒的5' UTR,其中所述RNA病毒的RNA基因组在细胞中是稳定的。其它实施方案中,可以在3' 或5' UTR中使用各种核苷酸类似物以阻碍mRNA的外切核酸酶降解。

[0243] 为了从DNA模板合成RNA而无需基因克隆,应当将转录启动子与 DNA模板连接,置于待转录的序列的上游。当将发挥RNA聚合酶启动子功能的序列加至正向引物的5' 末端时,该RNA聚合酶启动子将并入PCR 产物中位于待转录的开放阅读框上游。一个优选实施方案

中,启动子是T7 聚合酶启动子,见本文其它地方的描述。其它有用的启动子包括但不限于,T3和SP6 RNA聚合酶启动子。本领域已知T7、T3和SP6启动子的共有核苷酸序列。

[0244] 在一个优选实施方案中,mRNA具有5' 末端帽子和3' poly (A) 尾,其决定核糖体结合、翻译起始和mRNA在细胞中的稳定性。在环状DNA模板上,例如,质粒DNA上,RNA聚合酶产生生长的连环体产物,该产物不适于在真核细胞中表达。转录在3' UTR末端线性化的质粒DNA,可以导致正常大小的mRNA,该mRNA即使在转录后被多腺苷酸化,在真核生物转染中也是无效的。

[0245] 在线性DNA模板上,噬菌体T7 RNA聚合酶可以延长转录物的3' 末端以超过模板的最后一个碱基 (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003))。

[0246] 分子克隆是将polyA/T链加入DNA模板中的常规方法。然而,加入质粒DNA中的polyA/T序列可造成质粒不稳定,这就是为什么从细菌细胞中获得的质粒DNA模板常常被缺失和其它异常高度污染的原因。这使得克隆程序不仅仅是费力的费时的,而且常常是不可靠的。因此,高度期望无需克隆而允许构建带有polyA/T 3' 链的DNA模板的方法。

[0247] 可以通过含有polyT尾,例如100T尾 (SEQ ID NO:117) 的反向引物 (大小可以是50-5000T (SEQ ID NO:118)) 在PCR期间、或通过任何其它方法,包括但不限于DNA连接或体外重组,在PCR之后,产生转录DNA模板的polyA/T片段。Poly (A) 尾也可以赋予RNA稳定性,减少其降解。一般地,poly (A) 尾的长度与转录的RNA的稳定性正相关。一个实施方案中, poly (A) 尾为100至5000个腺苷 (SEQ ID NO:119)。

[0248] RNA的poly (A) 尾可以在体外转录后使用poly (A) 聚合酶,例如大肠杆菌polyA聚合酶 (E-PAP) 进一步延长。一个实施方案中,将poly (A) 尾的长度从100个核苷酸增加至300到400个核苷酸 (SEQ ID NO:120) 导致RNA 翻译效率的大约2倍增加。此外,在3' 末端连接不同化学基团也可以增加 mRNA稳定性。该连接物可以含有修饰的/人工的核苷酸、适体 (aptamer) 和其它化合物。例如,ATP类似物可以使用poly (A) 聚合酶加入poly (A) 尾中。ATP类似物可以进一步增加RNA的稳定性。

[0249] 5' 帽子也向RNA分子提供稳定性。在一个优选实施方案中,通过本文方法产生的RNA包括5' 帽子。5' 帽子可以使用本领域已知和本文描述的技术提供 (Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., *RNA*, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330:958-966 (2005))。

[0250] 通过本文所述方法产生的RNA也可以含有内部核糖体进入位点 (IRES) 序列。IRES序列可以是任何病毒的、染色体的或人工设计的序列,其可以起始帽子非依赖性的核糖体与mRNA的结合,以及促进翻译起始。可以包括适于细胞电穿孔的任何溶质,所述溶质可以含有利于细胞通透性和存活力的因素,例如糖、肽、脂质、蛋白质、抗氧化剂、和表面活性剂。

[0251] 可以使用多种不同方法将RNA引入靶细胞,例如,商业可得方法,包括但不限于,电穿孔 (Amaza Nucleofector-II (Amaza Biosystems, Cologne, Germany)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) 或 Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany), 使用脂转染的阳离子脂质体介导的转染、聚合酶囊化、肽介导的转染、或生物轰击粒子递送系统例如“基因枪”(参见例如 Nishikawa, et al. *Hum Gene Ther.*, 12 (8):861-70 (2001))。

[0252] 编码CAR的核酸构建体

[0253] 本发明提供编码一个或多个本文所述CAR构建体的核酸分子。一方面,核酸分子以信使RNA转录物的形式提供。一方面,核酸分子以DNA 构建体的形式提供。

[0254] 因此,一方面,本发明涉及编码嵌合抗原受体 (CAR) 的分离核酸分子,其中CAR包含抗EGFRvIII结合结构域(例如人源化抗EGFRvIII结合结构域)、跨膜结构域、和胞内信号传导结构域,其中所述胞内信号传导结构域包含刺激结构域,例如共刺激信号传导结构域和/或第一信号传导结构域,例如 $\zeta$ 链。一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域是本文所述抗EGFRvIII结合结构域,例如,包含选自SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:68,SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:80的序列、或与其具有95-99%同一性的序列的抗 EGFRvIII结合结构域。在一个实施方案中,分离的核酸分子还包含编码共刺激结构域的序列。在一个实施方案中,共刺激结构域是选自以下的蛋白的功能性信号传导结构域:OX40,CD27,CD28,CDS,ICAM-1,LFA-1 (CD11a/CD18),ICOS (CD278)和4-1BB (CD137)。在一个实施方案中,共刺激结构域包含SEQ ID NO:16的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,跨膜结构域是选自以下的蛋白的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ , $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16, CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154。在一个实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:15的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含4-1BB的功能性信号传导结构域和CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:102的序列或与其具有95-99%同一性的序列,以及SEQ ID NO:17或 SEQ ID NO:99的序列或与其具有95-99%同一性的序列,其中包含胞内信号传导结构域的这些序列在相同的读框中作为单个多肽链表达。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域与跨膜结构域通过铰链区,例如本文所述的铰链连接。在一个实施方案中,铰链区包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0255] 另一方面,本发明涉及编码CAR构建体的分离核酸分子,所述CAR 构建体包含SEQ ID NO:13的前导序列、具有选自SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:50,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74,SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:86的序列(或与其具有95-99%同一性的序列)的scFv结构域、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:104 或SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108(或与其具有95-99%同一性的序列) 的铰链区、具有SEQ ID NO:15的序列(或与其具有95-99%同一性的序列) 的跨膜结构域、具有SEQ ID NO:16的序列(或与其具有95-99%同一性的序列)的4-1BB共刺激结构域或具有SEQ ID NO:102的序列(或与其具有95-99%同一性的序列)的CD27共刺激结构域、和具有SEQ ID NO:17或 SEQ ID NO:99(或与其具有95-99%同一性的序列)的CD3 $\zeta$ 刺激结构域。

[0256] 另一方面,本发明涉及核酸分子编码的分离多肽分子。一个实施方案中,分离的多肽分子包含选自SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:49,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:67,SEQ ID NO:73,SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:90的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,分离的多肽包含SEQ ID NO:73的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,分离的多肽包含SEQ ID NO:79的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0257] 另一方面,本发明涉及编码嵌合抗原受体(CAR)分子的核酸分子,所述CAR分子包含抗EGFRvIII结合结构域、跨膜结构域、和含有刺激结构域的胞内信号传导结构域,其中所述抗EGFRvIII结合结构域包含选自 SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:50,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:68,SEQ ID NO:74,SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:86 的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0258] 在一个实施方案中,编码的CAR分子还包含编码共刺激结构域的序列。在一个实施方案中,共刺激结构域是选自以下蛋白的功能性信号传导结构域:OX40,CD27,CD28,CDS, ICAM-1,LFA-1 (CD11a/CD18) 和 4-1BB (CD137)。在一个实施方案中,共刺激结构域包含SEQ ID NO:16的序列。在一个实施方案中,跨膜结构域是选自以下的蛋白的跨膜结构域: T细胞受体的 $\alpha$ , $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9, CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80, CD86,CD134,CD137和CD154。在一个实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:15的序列。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含4-1BB的功能性信号传导结构域和 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含 SEQ ID NO:16的序列和SEQ ID NO:17的序列,其中包含胞内信号传导结构域的这些序列在相同读框中作为单一多肽链表达。在一个实施方案中,抗EGFRvIII结合结构域通过铰链区与跨膜结构域连接。在一个实施方案中,铰链区包含SEQ ID NO:14。在一个实施方案中,铰链区包含SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108。

[0259] 另一方面,本发明涉及编码的CAR分子,其包含SEQ ID NO:13的前导序列、具有选自SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:50,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:68,SEQ ID NO:74,SEQ ID NO:80 和SEQ ID NO:86的序列或与其95-99%同一性的序列的 scFv结构域、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:108的铰链区、具有SEQ ID NO:15的序列的跨膜结构域、具有SEQ ID NO:16 的序列的4-1BB共刺激结构域或具有SEQ ID NO:102的序列的CD27共刺激结构域、和具有SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的序列的CD3 $\zeta$ 刺激结构域。在一个实施方案中,编码的CAR分子包含选自SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:67,SEQ ID NO:73,SEQ ID NO:79,SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:90的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码的CAR分子包含SEQ ID NO:73的序列或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,分离的CAR分子包含SEQ ID NO:79的序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0260] 编码期望分子的核酸序列可以使用标准技术,使用本领域已知的重组方法获得,例如,对来自编码该基因的细胞的文库进行筛选、从已知包括该基因的载体获得该基因、或直接从含有该基因的细胞和组织分离。备选地,目的基因可以合成产生,而不进行克隆。

[0261] 本发明还提供其中插入了本发明DNA的载体。源自逆转录病毒如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具,这是因为其允许转基因长期稳定整合和在子代细胞中扩增。相对于来源于致癌逆转录病毒例如鼠白血病病毒的载体,慢病毒载体具有额外的优势——其可以转导非增殖细胞,例如肝细胞。慢病毒载体还具有低免疫原性的额外优势。

[0262] 简述之,典型地可以通过将编码CAR多肽或其部分的核酸与启动子有效连接、将该构建体插入表达载体中,而实现编码CAR的天然或合成核酸的表达。载体可以适于在真核生物中复制和整合。典型的克隆载体含有转录和翻译终止子、起始序列、和用于调节期望核酸

序列表达的启动子。

[0263] 使用标准基因递送方案,本发明表达构建体也可以用于核酸免疫和基因治疗。用于基因递送的方法是本领域已知的。参见例如美国专利号 5,399,346,5,580,859,5,589,466,其特此完整地并入此处作为参考。另一实施方案中,本发明提供基因治疗载体。

[0264] 核酸可以克隆在多种类型的载体中。例如,可以将核酸克隆在载体,包括但不限于,质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒中。尤其有意义的载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体、和测序载体。

[0265] 此外,表达载体可以以病毒载体的形式提供给细胞。病毒载体技术是本领域熟知的,并描述在例如Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) 中、以及其它病毒学和分子生物学手册中。可以用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。一般,合适的载体含有在至少一种生物中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制性内切酶位点、和一种或多种选择标记(例如WO 01/96584;WO 01/29058;和 U.S.Pat.No.6,326,193)。

[0266] 许多基于病毒的系统已经被开发出来用于将基因转移至哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒为基因递送系统提供了方便的平台。可以使用本领域已知的技术,将选定的基因插入载体中,包装入逆转录病毒粒子。然后可以分离重组病毒,并将其体内或离体递送至受试者的细胞中。本领域已知许多逆转录病毒载体。一些实施方案中,使用腺病毒载体。本领域已知许多腺病毒载体。一个实施方案中,使用慢病毒载体。

[0267] 其它启动子元件例如增强子调节转录起始的频率。典型地,这些元件位于起始位点上游30-110bp的区域中,但是近来证实许多启动子在起始位点下游也含有功能性元件。启动子元件之间的间隔常常是灵活可变的,因此当元件彼此相对发生颠倒或移位时启动子功能可以被保留。在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件间的间隔可以增加至50bp远,此后活性才开始下降。取决于启动子,各元件似乎可以协同地或独立地发挥作用以激活转录。

[0268] 合适启动子的一个例子是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是强组成型启动子序列,能够驱动与其有效连接的任何多核苷酸序列高水平表达。另一合适启动子的例子是延伸因子1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )。然而,也可以使用其他组成型启动子,包括但不限于,猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、EP病毒立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子,例如,但不限于,肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子、肌酸激酶启动子。此外,本发明不应限于应用组成型启动子。诱导性启动子也被视为本发明的部分。诱导性启动子的使用提供了一个分子开关,使得能够在期望表达发生的时候打开与该启动子有效连接的多核苷酸序列的表达、或在不期望表达发生时关闭该表达。诱导性启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子、和四环素启动子。

[0269] 为了评价CAR多肽或其部分的表达,待引入细胞的表达载体也可以含有选择标记基因或报告基因或两者,以利于从病毒载体转染或感染的细胞群中鉴定和选择出表达细胞。其它方面,选择标记可以携带在分开的DNA段上,用于共转染程序。选择标记和报告基因可以侧接合适的调节序列以便在宿主细胞中表达。有用的选择标记包括例如抗生素抗性

基因,例如neo等等。

[0270] 报告基因可以用于鉴定潜在转染的细胞和用于评价调节序列的功能性。一般地,报告基因是在受体生物体或组织中不存在或不表达的基因,其编码的多肽的表达可以通过一些易于检测的性质,例如酶学活性来体现。可以在将DNA引入受体细胞中后在合适的时间测试报告基因的表达。合适的报告基因可以包括编码萤光素酶、 $\beta$ 半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌性碱性磷酸酶的基因、或绿色荧光蛋白基因(例如Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是熟知的,可以使用已知技术制备或商业购买获得。一般,将表现出最高报告基因表达水平的、具有最少5'侧翼区的构建体鉴定为启动子。该启动子区域可以与报告基因连接,用于评价试剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0271] 本领域已知用于将基因引入细胞和在细胞中表达的方法。就表达载体而言,该载体可以通过本领域的任何方法容易地引入宿主细胞,例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如,可以通过物理、化学或生物学手段,将表达载体转移至宿主细胞中。

[0272] 可以将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等等。用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域熟知的。参见例如,Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。将多核苷酸引入宿主细胞的一个优选方法是磷酸钙转染。

[0273] 将目的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体,尤其是逆转录病毒载体,已经成为将基因插入哺乳动物、例如人细胞中的最为广泛使用的方法。其它病毒载体可以源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒、和腺相关病毒,等等。参见例如美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0274] 将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统,例如大分子复合物、纳米囊、微球、珠、和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、微胶粒、混合微胶粒、和脂质体。可以体外和体内用作递送运载体的一个示例性胶体系统是脂质体(例如人工膜小泡)。

[0275] 在利用非病毒递送系统的情况下,一个示例性递送运载体是纳米颗粒,例如脂质体或其它合适的亚微米大小的递送系统。可以考虑使用脂质制剂将核酸引入宿主细胞(体外、离体或体内)。另一方面,可以使核酸与脂质关联。与脂质关联的核酸可以被包封在脂质体的水性内部、分散在脂质体的脂质双层中、通过与脂质体和该寡核苷酸两者结合的连接分子附着于脂质体、截留在脂质体中、与脂质体复合、分散在含脂质溶液中、与脂质混合、与脂质组合、以悬浮液形式包含在脂质中、包含在微胶粒中或与微胶粒复合、或以其它方式与脂质关联。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体相关组合物不限于在溶液中的任何粒子结构。例如,它们可以在双层结构中、作为微胶粒、或与“塌陷”结构一起存在。它们也可以仅仅分散在溶液中,可能地形成在大小或形状上不均一的聚集物。脂质是脂肪物质,其可以是天然或合成的脂质。例如,脂质包括天然存在于胞质中的脂肪小滴、以及含有长链脂族烃及其衍生物例如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛的一类化合物。

[0276] 适用的脂质可以从商业来源获得。例如,二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (“DMPC”) 可以从Sigma, St. Louis, MO获得; 磷酸二鲸蜡酯 (“DCP”) 可以从K&K Laboratories (Plainview, NY) 获得; 胆固醇 (“Choi”) 可以从 Calbiochem-Behring获得; 二肉豆蔻酰磷脂酰甘油 (“DMPG”) 和其它脂质可以从Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL) 获得。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的贮存溶液可以储存在大约-20°C。因为氯仿比甲醇更容易蒸发,故可以将氯仿用作

唯一溶剂。

[0277] “脂质体”是一个一般术语,涵盖通过产生闭合的脂质双层或聚集物而形成的各种单层和多层脂质运载体。脂质体可以表征为:具有带磷脂双层膜和内部水性介质的小泡结构。多层脂质体具有多个脂质层,层之间通过水性介质分开。当将磷脂悬浮在过量的水性溶液中时,脂质体自发形成。脂质组分经历自重排,之后形成闭合的结构,将水和溶解的溶质截留在脂质双层之间 (Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5:505-10)。然而,在溶液中具有不同于正常小泡结构的结构的组合物也涵盖在该术语中。例如,脂质可以采取微胶粒结构,或仅仅以非均一的脂质分子聚合物形式存在。本发明也考虑 lipofectamine-核酸复合物。

[0278] 不管用于将外源核酸引入宿主细胞或使细胞暴露于本发明抑制剂的方法如何,可以实施多种试验来验证宿主细胞中重组DNA序列的存在。这些试验包括,例如,本领域技术人员熟知的“分子生物学”试验,例如 Southern和Northern印迹、RT-PCR和PCR;“生物化学”试验,例如,通过如免疫学手段 (ELISA和Western印迹) 检测特定肽的存在或不存在,或通过本文所述试验鉴定落入本发明范围的活性剂。

[0279] 本发明还提供包含CAR编码核酸分子的载体。一方面,可以直接将 CAR载体转导至细胞,例如T细胞中。一方面,载体是克隆或表达载体,例如,包括但不限于,一种或多种质粒(例如表达质粒、克隆载体、小环、微载体、双微小染色体)、逆转录病毒和慢病毒载体构建体。一方面,载体能够在哺乳动物T细胞中表达CAR构建体。一方面,哺乳动物T细胞是人T细胞。

[0280] T细胞来源

[0281] 在扩增和遗传修饰前,从个体获得T细胞源。术语“个体”旨在包括可以引发免疫反应的活生物体(例如哺乳动物)。个体的实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠、及其转基因物种。可以从多种来源,包括外周血单个核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织、和肿瘤,获得T细胞。在本发明一些方面,可以使用本领域可得的任何T细胞系。本发明一些方面,T细胞可以从使用本领域已知的任何技术(例如 Ficoll™分离术)从个体采集的血液单位获得。一个优选方面,通过单采血液成分术,从个体循环血液获得细胞。单采血液成分术的产品典型地含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它具核白细胞、红细胞、和血小板。一方面,可以洗涤通过单采血液成分术收集的细胞,以去除血浆级分,并将细胞放入合适的缓冲液或介质中以用于随后的加工步骤。在本发明的一个方面,用磷酸盐缓冲盐水(PBS) 洗涤细胞。在备选方面,洗涤溶液缺钙,并可以缺镁或可以缺失即使不是所有也是很多的二价阳离子。在缺钙的情况下初始活化步骤可以导致放大的活化。本领域普通技术人员易于明了,洗涤步骤可以通过本领域已知的方法进行,例如根据厂商说明书使用半自动“贯流式”(flow-through) 离心机(例如, Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate、或Haemonetics Cell Saver 5)。洗涤后,可以将细胞重悬浮在各种生物相容性缓冲液中,例如无 Ca、无Mg的PBS、PlasmaLyte A、或具有或不具有缓冲剂的其它盐水溶液。备选地,可以除去单采血液成分术样品的不期望成分,将细胞直接重悬浮在培养基中。

[0282] 一方面,通过裂解红细胞和消除单核细胞,例如通过PERCOLL™梯度离心或通过对流离心淘洗,从外周血淋巴细胞分离T细胞。可以通过阳性或阴性选择技术,进一步分离特定的T细胞亚群,例如CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, 和CD45RO<sup>+</sup>T细胞。例如,一方面,可

以通过与抗CD3/抗CD28(例如3x28)-缀合珠,例如**DYNABEADS®**M-450 CD3/CD28 T一起孵育足以实现期望T细胞的阳性选择的一段时间,以分离T细胞。一方面,时间为大约30分钟。再一方面,时间为30分钟至36 小时或更长、以及居间的所有整数值。再一方面,时间为至少1、2、3、4、5、或6小时。另一优选方面,时间为10至24小时。一方面,孵育时间是 24小时。在相对其他细胞类型存在很少的T细胞的任何情况下,可以使用更长的孵育时间,以分离T细胞,例如从肿瘤组织或从免疫受损个体分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。此外,可以使用更长的孵育时间,以增加捕获 CD8<sup>+</sup> T细胞的效率。因此,通过简单地缩短或延长允许T细胞结合 CD3/CD28珠的时间,和/或通过增加或减少珠子与T细胞的比例(如本文进一步描述),可以在培养开始时或在培养过程中的其他时间点上,优先地选出或选择除去T细胞的亚群。此外,通过增加或减少珠子或其它表面上抗CD3和/或抗CD28抗体的比例,可以在培养开始时或在其他期望时间点上,优先地选出或选择除去T细胞的亚群。本领域技术人员明了,在本发明中也可以使用多个回合的选择。一些方面中,可能期望实施选择程序并在活化和扩增程序中使用“未被选择的”细胞。也可以对“未被选择的”细胞进行其它回合的选择。

[0283] 可以使用针对表面标志的抗体组合,通过阴性选择而富集T细胞群体,其中所述表面标志独特于阴性选择的细胞。一个方法是,通过阴性磁性免疫粘附或流式细胞术进行的细胞分选和/或选择,其中使用针对阴性选择的细胞上存在的细胞表面标志的单克隆抗体混合物。例如,为了通过阴性选择富集CD4<sup>+</sup>细胞,单克隆抗体混合物典型地包括抗CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR和CD8的抗体。一些方面,可能期望富集或阳性选择典型地表达CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD62Lhi, GITR<sup>+</sup>和FoxP3<sup>+</sup>的调节性T细胞。备选地,在一些方面,通过抗C25缀合珠或其它类似的选择方法,耗竭T调节细胞。

[0284] 一个实施方案中,可以选择表达IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, 粒酶B和穿孔蛋白中的一种或多种或其它合适分子(例如其它细胞因子)的T细胞群。可以确定用于筛选细胞表达的方法,例如通过PCT公布号W02013/126712中描述的方法。

[0285] 为了通过阴性或阳性选择分离期望细胞群,可以变化细胞和表面(例如颗粒如珠)的浓度。一些方面,可能期望显著减少珠子和细胞混合在一起的体积(例如增加细胞浓度),从而保证细胞和珠子的最大接触。例如,一方面,使用20亿细胞/ml的浓度。一方面,使用10亿细胞/ml的浓度。再一方面,使用大于1亿细胞/ml的浓度。再一方面,使用1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 或5.0千万细胞/ml的浓度。一方面,使用7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 或10.0千万细胞/ml的浓度。再一方面,可以使用1.25或1.50亿细胞/ml 的浓度。使用高浓度可以导致增加的细胞产率、细胞激活和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度可以更有效地捕获可能弱表达目的靶抗原的细胞,例如CD28阴性T细胞,或从有许多肿瘤细胞存在的样品(例如白血病血液、肿瘤组织等)中实现更有效的捕获。该细胞群可以具有治疗价值,并可能期望获得。例如,使用高浓度细胞,将允许更有效地选择正常具有较弱的CD28 表达的CD8<sup>+</sup> T细胞。

[0286] 在一个相关方面,可能期望使用较低的细胞浓度。通过显著稀释T细胞和表面(例如颗粒如珠)的混合物,可以最小化颗粒和细胞之间的相互作用。这可以选择表达高量与颗粒结合的期望抗原的细胞。例如,与CD8<sup>+</sup> T 细胞相比,CD4<sup>+</sup> T细胞表达较高水平的CD28,在稀释浓度中可以更为有效地被捕获。一方面,使用的细胞浓度是 $5 \times 10^6$ /ml。其它方面,所用

浓度可以是大约 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 、以及居间的任何整数数值。

[0287] 其它方面,可以在转子上,在 $2-10^\circ\text{C}$ 或室温,以变化的速度孵育细胞变化长度的时间。

[0288] 也可以在洗涤步骤后冷冻用于刺激的T细胞。不受理论的约束,冷冻和随后的融化步骤可以通过去除细胞群中的粒细胞和一定程度地单核细胞而导致更均一的产品。在去除血浆和血小板的洗涤步骤后,可以将细胞悬浮在冷冻溶液中。许多冷冻溶液和参数是本领域已知的并可以用于本发明中,其中一个方法涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或含有10%葡聚糖40 (Dextran 40) 和5%葡萄糖 (Dextrose)、20%人血清白蛋白和7.5%DMSO、或31.25%Plasmalyte-A、31.25%葡萄糖5%、0.45% NaCl、10%葡聚糖40和5%葡萄糖、20%人血清白蛋白、和7.5%DMSO 的培养基,或含有例如Hespan和PlasmaLyte A的其它合适细胞冷冻介质。然后,细胞可以以每分钟 $1^\circ\text{C}$ 的速度冷冻至 $-80^\circ\text{C}$ ,并在液氮储存罐的气相中保存。可以使用其它的受控冷冻方法,以及在 $-20^\circ\text{C}$ 或在液氮中立即地不受控冷冻。

[0289] 一些方面,按本文所述将冷藏的细胞融化和洗涤,允许其在室温停留 1小时,之后使用本发明方法活化。

[0290] 本发明也考虑,在可能需要本文的扩增细胞前的时间,从个体收集血液样品或单采血液成分产品。由此,可以在所需的任何时间点收集待扩增的细胞的来源,分离和冷冻期望的细胞例如T细胞,以随后在T细胞治疗中用于将受益于T细胞治疗的任何疾病或病症,如本文所述的疾病和病症。一方面,从总体健康的个体采集血液样品或单采血液成分。一些方面,从总体健康的个体采集血液样品或单采血液成分,其中所述个体有罹患疾病的风险但尚未出现疾病;并分离和冷冻目的细胞用于后期使用。在一些方面,可以扩增、冷冻和随后使用T细胞。一些方面,在诊断出本文所述特定疾病不久但在任何治疗之前从患者收集样品。再一方面,在任何相关治疗形式之前,从获自个体的血液样品或单采血液成分中分离细胞,其中所述相关治疗形式包括但不限于,用药剂治疗,例如那他珠单抗 (Natalizumab)、依法珠单抗 (efalizumab)、抗病毒药、化疗、放射、免疫抑制剂例如环孢素 (cyclosporin)、硫唑嘌呤 (azathioprine)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、霉酚酸酯 (mycophenolate) 和 FK506、抗体或其它免疫清除剂 (immunoablative agents) 例如CAMPATH、抗CD3抗体、环磷酰胺 (cytoxan)、氟达拉滨 (fludarabine)、环孢素 (cyclosporin)、FK506、雷帕霉素 (rapamycin)、霉酚酸 (mycophenolic acid)、类固醇 (steroids)、FR901228 和辐射。

[0291] 在本发明的再一方面,在保留个体的功能性T细胞的治疗后,直接从患者获得T细胞。在此方面,已经观察到,在某些癌症治疗之后,尤其是使用损伤免疫系统的药物进行治疗之后,在治疗后不久在患者从该治疗正常恢复的时间段中,获得的T细胞的质量就其离体扩增的能力而言可能是最佳的或者是改善的。同样地,在使用本文所述方法离体操作后,就增强的植入和体内扩增而言,这些细胞也可能处于优选的状态。因此,本发明考虑,在该恢复期收集血液细胞,包括T细胞、树突细胞、或造血谱系的其它细胞。此外,在一些方面,可以使用动员 (例如用GM-CSF动员) 和调理方案以在个体中创造这样的条件,该条件将利于,尤其是在治疗后的规定时间窗中,特定细胞类型的种群恢复、再循环、再生、和/或扩增。示例性细胞类型包括T细胞、B细胞、树突细胞、和免疫系统的其它细胞。

[0292] T细胞的活化和扩增

[0293] 通常可以使用在例如美国专利6,352,694;6,534,055;6,905,680; 6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869; 7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;和美国专利申请公布号20060121005中描述的方法,活化和扩增T细胞。

[0294] 一般地,本发明的T细胞可以通过与表面接触进行扩增,其中所述表面已经连接了可以刺激CD3/TCR复合物相关信号的活性剂和可以刺激T 细胞表面共刺激分子的配体。特别地,可以如本文所述刺激T细胞群,例如通过接触固定在表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段或抗CD2抗体,或通过接触与钙离子载体缀合的蛋白激酶C激活物(例如苔藓抑制素)。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,可以使用结合该辅助分子的配体。例如,可以在合适刺激T细胞增殖的条件下,使T细胞群接触抗CD3抗体和抗CD28抗体。为了刺激CD4<sup>+</sup> T细胞或CD8<sup>+</sup> T细胞增殖,可以使用抗 CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的例子包括9.3,B-T3,XR-CD28 (Diaclone, **Besançon**, France),也可以使用本领域通常已知的其它方法(Berg et al., Transplant Proc. 30 (8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190 (9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227 (1-2):53-63, 1999)。

[0295] 在一些方面,用于T细胞的第一刺激信号和共刺激信号可以通过不同的方案提供。例如,提供各信号的活性剂可以在溶液中或偶联在表面上。当与表面偶联时,这些活性剂可以与相同表面偶联(即,“顺式”方式),或与分开的表面偶联(即,“反式”方式)。备选地,可以将一种活性剂偶联在表面上,而另一活性剂可以在溶液中。一方面,提供共刺激信号的活性剂与细胞表面结合,而提供第一活化信号的活性剂在溶液中或偶联在表面上。一些方面,两种活性剂均可以在溶液中。一个方面,这些活性剂可以是可溶形式,然后交联到表面上,所述表面例如表达与所述活性剂结合的Fc受体或抗体或其它结合剂的细胞。在此方面,参见例如,美国专利申请公布号20040101519和20060034810关于人工抗原呈递细胞(aAPC)的描述,可以考虑将其用于在本发明中活化和扩增T细胞。

[0296] 一方面,将两种活性剂固定在珠子上,在相同珠子上(即“顺式”)或在不同的珠子上(即“反式”)。例如,提供第一活化信号的活性剂是抗 CD3抗体或其抗原结合片段,提供共刺激信号的活性剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段;两种活性剂以等分子量共同固定在相同的珠子上。一方面,与珠子结合的各抗体以1:1比例用于CD4<sup>+</sup> T细胞扩增和T细胞生长。在本发明一些方面,使用一定比例的与珠子结合的抗CD3:CD28抗体,该比例导致所观察到的T细胞扩增比使用1:1比例时所观察到的T细胞扩增增加。一个特别的方面,与使用1:1比例观察到的扩增相比,观察到增加了大约1至大约3倍。一方面,与珠子结合的CD3:CD28抗体的比例可以为100:1至1:100,以及其间的所有整数值。本发明一方面,与抗CD3抗体相比,更多的抗CD28抗体与颗粒结合,即,CD3:CD28比例小于1。在本发明一些方面,与珠子结合的抗CD28抗体与抗CD3抗体的比例大于 2:1。一个特定方面,与珠子结合的抗CD3:CD28抗体以1:100的比例使用。一方面,与珠子结合的抗CD3:CD28抗体以1:75的比例使用。再一方面,与珠子结合的抗CD3:CD28抗体以1:50的比例使用。一方面,与珠子结合的抗CD3:CD28抗体以1:30的比例使用。一个优选方面,与珠子结合的抗CD3:CD28抗体以1:10的比例使用。一方面,与珠子结合的抗CD3:CD28 抗体以1:3的比例使用。再一方面,与珠子结合的抗CD3:CD28抗体以3:1 的比例使用。

[0297] 可以使用1:500至500:1以及其间任何整数数值的颗粒:细胞比例,以刺激T细胞或

其它靶细胞。本领域普通技术人员可以明了,颗粒与细胞的比例可取决于颗粒相对于靶细胞的大小。例如,小尺寸的珠子仅能结合少数细胞,而较大的珠子能够结合许多细胞。一些方面,细胞与颗粒的比例可以为1:100至100:1、以及其间的任何整数数值;在其它方面,也可以使用1:9至9:1以及其间的任何整数数值的比例以刺激T细胞。可以导致T细胞刺激的抗CD3和抗CD28偶联颗粒与T细胞的比例可以如上所述变动,然而一些优选的值包括1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1和15:1,其中一个优选比例是至少1:1颗粒/T细胞。一方面,使用1:1或更少的颗粒:细胞比例。一个特定方面,优选的颗粒:细胞比例是1:5。其它方面,可以根据刺激日,改变颗粒:细胞比例。例如,一方面,在第一日颗粒:细胞比例为1:1至10:1,之后为期多达10天以1:1至1:10最终比例(基于添加日的细胞计数)每天或每隔一天向细胞中添加额外的颗粒。一个特定方面,颗粒:细胞比例在刺激的第一日为1:1,在刺激的第三日和第五日调整至1:5。一方面,以每天或每隔一天为基础加入颗粒,在第一天达最终比例1:1,在刺激的第三日和第五日达1:5。一方面,颗粒:细胞比例在刺激的第一日为2:1,在刺激的第三日和第五日调节至1:10。一方面,每日或每隔一日加入颗粒,在第一天达最终比例1:1,在刺激的第三日和第五日达1:10。本领域技术人员明了,本发明可以适用各种其它比例。尤其是,可以根据颗粒大小和细胞大小和类型,改变比例。一方面,第一日可用的最典型的比例是在1:1、2:1和3:1附近。

[0298] 在本发明其他方面,细胞例如T细胞与活性剂包被的珠组合,随后分离细胞和珠子,然后培养细胞。在备选方面,在培养之前,活性剂包被的珠与细胞不分离,而是一起培养。再一方面,首先通过施加力例如磁力浓缩珠子和细胞,导致增加的细胞表面标志连接,由此诱导细胞刺激。

[0299] 例如,可以通过使抗CD3和抗CD28抗体附着的顺磁珠(3x28珠)与T细胞接触,以连接细胞表面蛋白。一方面,将细胞(例如,  $10^4$  至  $10^9$  个T细胞)与珠子(例如 **DYNABEADS®** M-450CD3/CD28T顺磁珠,以1:1比例)在缓冲液例如PBS(无二价阳离子例如钙和镁)中组合。再次,本领域普通技术人员将明了,可以使用任何细胞浓度。例如,样品中的靶细胞可十分稀少,仅占样品的0.01%;或整个样品(即100%)可以包含目的靶细胞。因此,任何细胞数量都在本发明范围内。一些方面,可能期望显著降低颗粒和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞浓度),以确保细胞和颗粒的最大接触。例如,一方面,使用大约20亿细胞/ml的浓度。再一方面,使用大于1亿细胞/ml的浓度。再一方面,使用1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 或5.0千万细胞/ml的浓度。一方面,使用7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 或10.0千万细胞/ml的浓度。再一方面,可以使用1.25或1.50亿细胞/ml的浓度。使用高浓度可以导致增加的细胞产率、细胞激活和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度,可以更有效地捕获可能弱表达目的靶抗原的细胞,例如CD28 阴性T细胞。细胞群可以具有治疗价值,并在一些方面是期望获得的。例如,使用高浓度细胞将允许更有效地选择正常具有较弱的CD28表达的 CD8<sup>+</sup> T细胞。

[0300] 本发明一方面,可以培养混合物几个小时(大约3小时)至大约14天或其间任何小时整数。一方面,可以培养混合物21天。本发明一方面,将珠子和T细胞一起培养大约8天。一方面,将珠子和T细胞一起培养2-3天。也可能期望几个刺激循环,这样T细胞培养时间可以是60天或更多。适用于T细胞培养的条件包括合适的培养基(例如,极限必需培养基或

RPMI培养基1640或X-vivo 15 (Lonza)), 所述培养基可以含有增殖和存活所需的因子, 包括血清 (例如胎牛血清或人血清)、白介素2 (IL-2)、胰岛素、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 、或本领域已知的用于细胞生长的任何其它添加剂。用于细胞生长的其它添加剂包括但不限于, 表面活性剂、plasmanate、和还原剂如N-乙酰基半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可以包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 $\alpha$ -MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20、Optimizer, 具有添加的氨基酸、丙酮酸钠、和维生素、无血清或补充了合适量的血清 (或血浆) 或规定的一组激素、和/或对于T细胞生长和扩增足够量的细胞因子。抗生素例如青霉素和链霉素仅包括在实验培养物中, 而不包括在待输注于个体的细胞培养物中。将靶细胞维持 in 支持生长所需的条件下, 例如合适的温度 (例如37 $^{\circ}$ C) 和大气 (例如空气加5%CO<sub>2</sub>) 下。

[0301] 接受不同次数刺激的T细胞可以表现出不同特征。例如, 典型的血液或单采血液成分术外周血单个核细胞产品中辅助T细胞群 (TH, CD4+) 大于细胞毒性或抑制性T细胞群 (TC, CD8+)。通过刺激CD3和CD28受体离体扩增T细胞, 将产生T细胞群, 该T细胞群在大约第8-9天前主要由 TH细胞组成, 而在大约第8-9天后该T细胞群包含日益更大的TC细胞群。因此, 取决于治疗目的, 可能有利的是, 向个体输注主要包含TH细胞的 T细胞群。相似地, 如果已经分离了抗原特异性T细胞亚组, 则将该亚组扩增至更大程度可能是有利的。

[0302] 此外, 除了CD4和CD8标志, 其它表型标志在细胞扩增过程期间也显著地, 但在很大程度上可重现地, 变化。因此, 该可重现性使得能够针对特定目的按需定制活化的T细胞产品。

[0303] 一旦构建EGFRvIII CAR, 可以使用各种试验评价该分子的活性, 例如但不限于, 在抗原刺激后扩增T细胞的能力, 在缺乏再刺激的情况下维持T细胞扩增的能力, 和在合适的体外和动物模型中抗癌活性。以下更详细地描述用于评价EGFRvIII CAR效应的试验。

[0304] 可以使用Western印迹分析原代T细胞中的CAR表达, 以检测单体和二聚体的存在。参见例如Milone et al., Molecular Therapy 17 (8): 1453-1464 (2009)。极简言之, 在体外扩增表达CAR的T细胞 (CD4+和CD8+ T细胞的1:1混合物) 10天以上, 之后裂解, 在还原条件下进行SDS-PAGE。通过western印迹, 使用抗TCR- $\zeta$ 链抗体, 检测含有全长TCR- $\zeta$ 胞质结构域的CAR和内源TCR- $\zeta$ 链。对该相同的T细胞亚组, 在非还原条件下进行SDS-PAGE分析, 以允许评价共价二聚体的形成。

[0305] 可以通过流式细胞术, 测量抗原刺激后CAR+ T细胞的体外扩增。例如, 用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 aAPC刺激CD4+和CD8+ T细胞的混合物, 之后用待分析的启动子控制下表达GFP的慢病毒载体转导。示例性启动子包括 CMV IE基因、EF-1 $\alpha$ 、泛素C或磷酸甘油激酶 (PGK) 启动子。可以在培养第6天在该CD4+和/或CD8+T细胞亚组中通过流式细胞术评价GFP荧光。参见例如Milone et al., Molecular Therapy 17 (8): 1453-1464 (2009)。备选地, 用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28包被的磁珠在第0天刺激CD4+和CD8+ T细胞的混合物, 并在第1天通过表达CAR和eGFP以及使用2A核糖体跳跃序列的双顺反子慢病毒载体、向所述混合物转导CAR。在洗涤后, 用抗CD3和抗CD28抗体存在下表达hCD32和4-1BBL的K562细胞 (K562-BBL-3/28)、或EGFRvIII+U-87细胞 (U-87-EGFRvIII) 或野生型 U-87细胞 (U-87野生型), 再刺激培养物。向培养物每隔一天以100IU/ml 加入外源IL-2。使用基于珠子的计数, 通过流式细胞术, 计数GFP+ T细胞。参见例如Milone et al., Molecular Therapy 17 (8): 1453-1464 (2009)。

[0306] 也可以测量在无再刺激的情况下维持的CAR<sup>+</sup> T细胞扩增。参见例如 Milone et al., Molecular Therapy 17 (8):1453-1464 (2009)。简言之,在用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28包被的磁珠在第0天刺激并用所示的CAR在第1天转导后,在培养的第8天使用Coulter Multisizer III颗粒计数器测量平均T细胞体积(f1)。

[0307] 可以如先前描述,例如Milone et al., Molecular Therapy 17 (8): 1453-1464 (2009),评价细胞增殖和细胞因子产生。简言之,在微量滴定板中,通过将洗涤后的T细胞与靶细胞,例如表达EGFRvIII或EGFR野生型(wt)或CD32和CD137(KT32-BBL)的U87MG、BHK或CHO细胞,以1:1最终T细胞:靶细胞比例混合,从而评价CAR介导的增殖。将抗CD3(克隆OKT3)和抗CD28(克隆9.3)单克隆抗体加入具有KT32-BBL 细胞的培养物中,以充当刺激T细胞增殖的阳性对照,这是因为这些信号可以支持长期的CD8<sup>+</sup>T细胞离体扩增。使用CountBright<sup>TM</sup>荧光珠(Invitrogen, Carlsbad, CA)和流式细胞术,按厂商所述,计数培养物中的T 细胞。使用以eGFP-2A连接的CAR表达慢病毒载体工程化构建的T细胞,通过GFP表达,鉴定CAR<sup>+</sup> T细胞。对于不表达GFP的CAR<sup>+</sup>T细胞,可以使用生物素化的重组EGFRvIII蛋白和第二亲和素-PE缀合物,检测CAR<sup>+</sup> T细胞。也可以使用特异性单克隆抗体(BD Biosciences)同时检测T细胞上的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>表达。可以使用人TH1/TH2细胞因子细胞计量珠阵列试剂盒(BD Biosciences, San Diego, CA),根据厂商说明书,在再刺激后24小时收集的上清液上,进行细胞因子测量。使用FACScalibur 流式细胞仪评价荧光,根据厂商说明书分析数据。

[0308] 可以通过标准<sup>51</sup>Cr-释放试验,评价细胞毒性。参见例如Milone et al., Molecular Therapy 17 (8):1453-1464 (2009)。简言之,在37℃在频繁搅拌下用<sup>51</sup>Cr(作为NaCrO<sub>4</sub>, New England Nuclear, Boston, MA)加载表达 EGFRvIII或EGFR野生型(wt)的靶细胞(U87MG, BHK或CHO细胞)2 小时,在完全RPMI中洗涤两次,接种在微量滴定板中。在孔中在完全 RPMI中以不同的效应细胞:靶细胞比例(E:T),将效应T细胞和靶细胞混合。也制备仅含有培养基(自发释放,SR)或1%triton-X 100洗涤剂溶液(总释放,TR)的其它孔。在37℃孵育4小时后,收获来自各孔的上清液。然后使用 $\gamma$  粒子计数器(Packard Instrument Co., Waltham, MA)测量释放的<sup>51</sup>Cr。每个条件至少一式三份重复,使用公式:%裂解=(ER-SR)/(TR- SR),计算裂解百分数,其中ER代表每个试验条件下释放的平均<sup>51</sup>Cr。也可以使用备选的细胞毒性试验,例如流式细胞毒性试验,例如实施例8 中描述的试验。

[0309] 可以使用叩甲红和叩甲绿荧光素酶同时跟踪肿瘤进程和T细胞运输,这两种荧光素酶使用相同的荧光素底物但发射在可见光谱的相对端的光。

[0310] 其它试验,包括本文实施例部分描述的试验,以及本领域已知的那些试验,也可以用于评价本发明的EGFRvIII CAR构建体。

[0311] 在表达EGFRvIII的疾病和病症上的治疗应用

[0312] EGFRvIII是肿瘤特异的、配体不依赖型、具有组成型活性的表皮生长因子受体变体。本发明提供用于治疗EGFRvIII相关疾病和病症的组合物和方法。一个EGFRvIII相关疾病和病症的例子是胶质细胞瘤。

[0313] 胶质细胞瘤指,始于胶质细胞(例如,围绕和支持神经细胞的细胞,包括少突胶质细胞、星形细胞、小胶质细胞、和室管膜细胞)的一种中枢神经系统癌症。胶质细胞瘤就其发生和恶性程度上是尤其严重的,根据其详细的病理学组织类型可以划分为7个或更多个类型,例如,成胶质细胞瘤和间变型星形细胞瘤。在确定原发性脑肿瘤的恶性度时,使用疾病

阶段(肿瘤大小、远距离转移的存在)和组织学恶性。根据脑肿瘤治疗指南((2002) Kanehara&Co.,Ltd.)组织学恶性划分为4个水平,即G1至G4,其分别相应于WH01至WH04。数字越大,恶性度越高。例如,成胶质细胞瘤的恶性度是G4(WH04),而间变型星形细胞瘤的恶性度是G3(WH03),G3和G4均被归类为恶性的。因此,根据一些实施方案,本发明方法靶向恶性胶质细胞瘤。其它方面,本发明靶向多形性成胶质细胞瘤(GBM)。在其它实施方案中,本发明组合物和方法用于治疗其它胶质细胞瘤,包括但不限于,间变型星形细胞瘤、巨细胞型成胶质细胞瘤、胶质肉瘤、间变型少突胶质细胞瘤、间变型室管膜细胞瘤、脉络丛癌、间变性神经节胶质细胞瘤(anaplastic ganglioglioma)、成松果体细胞瘤、髓上皮瘤、成室管膜细胞瘤、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤(supratentorial primitive neuroectodermal tumor)和非典型畸胎样/横纹肌样瘤(atypical teratoid/rhabdoid tumor)。

[0314] 成胶质细胞瘤是成年人中最常见的原发性脑肿瘤。在美国每年诊断为恶性原发性脑肿瘤的18,000名患者中,一半以上患有多形性成胶质细胞瘤。多形性成胶质细胞瘤是间变型、高度细胞性肿瘤,具有高增殖指数、微血管增殖和病灶坏死。体征和症状取决于几个因素(肿瘤在脑中的大小、生长速度和位置),并主要表现为头痛、癫痫、神经学缺陷、精神状态改变。多形性成胶质细胞瘤的预后一直令人沮丧。对于大多数患者,存活时间小于2年。Karnofsky功能状态(KPS)是最重要的预后因子之一:具有KPS>70的患者在大约18%病例中在18个月是存活的,相对地具有较低KPS评分的患者中13%存活。原代多形性成胶质细胞瘤从胶质细胞从头发,典型地具有少于6个月的临床史,在较年老患者中更为普遍,呈现小细胞组织学。继发性多形性成胶质细胞瘤从先前存在的低级别星形细胞瘤历经数月或数年而形成,主要影响较为年轻的个体并呈现巨细胞组织学。

[0315] 恶性胶质细胞瘤也称作高级胶质细胞瘤。其可以影响脑和脊髓。一些方面,本发明组合物和方法可以用于治疗带有脑恶性胶质细胞瘤的个体,例如,选自间变型星形细胞瘤(AA)、多形性成胶质细胞瘤(GBM)、间变型少突胶质细胞瘤(AO)和间变型少突-星形细胞瘤(oligoastrocytomas)(AOA)。一些方面,本发明组合物和方法可以用于治疗带有多形性成胶质细胞瘤(GBM)的个体。

[0316] 多形性成胶质细胞瘤是星形细胞瘤的最恶性阶段,存活时间在大多数患者中少于2年。组织学上,这些肿瘤的特征在于高增殖指数、内皮增生和病灶坏死。这些损伤的高度增生性质可能源自多种促有丝分裂效应。GBM的一个标志是内皮增生。在GBM中发现大量血管发生生长因子及其受体。

[0317] 存在星形细胞瘤的生物学亚组,其可反映在这些肿瘤中观察到的临床异质性。这些亚组包括儿童弥漫型脑干胶质细胞瘤、常常尾随恶性进程的纤维型星形细胞瘤(fibrillary astrocytoma)。脑干GBM与影响较年轻患者的成年GBM共有遗传特征。多形性黄色星形细胞瘤(PXA)是浅表的低级别星形细胞肿瘤,主要影响年轻成年人。尽管这些肿瘤具有怪异的组织学外观,但它们典型地是缓慢生长的肿瘤,易于接受手术治愈。然而,一些PXA可以复发为GBM。纤维性星形细胞瘤(pilocytic astrocytoma)是最常见的儿童星形细胞肿瘤,在临床和组织病理学上不同于影响成人的弥漫性、纤维型星形细胞瘤。纤维性星形细胞瘤与弥漫性纤维型星形细胞瘤不具有相同的基因组改变。室管膜下巨细胞型星形细胞瘤(SEGA)是脑室周围的低级别星形细胞肿瘤,通常与结节性硬化(TS)相关,在组织学上与

衬于TS 患者脑室的所谓“candle-gutterings”相同。类似于TS中的其它肿瘤损伤,这些损伤是缓慢生长的,可能比真正的赘生物更类似于错构瘤。婴儿型促纤维增生性脑星形细胞瘤(DCAI)和婴儿型促纤维增生性节细胞胶质瘤(DIGG)是大的、浅表的、通常囊性的、良性星形细胞瘤,影响一岁或两岁内的儿童。

[0318] 少突胶质细胞瘤和少突星形细胞瘤(混合型胶质细胞瘤)是弥漫性、主要CNS胶质肿瘤,临床上和生物学上与弥漫性纤维型星形细胞瘤最密切相关。然而,该肿瘤比星形细胞瘤要少见得多,一般比该弥漫性星形细胞瘤具有更好的预后。少突胶质细胞瘤和少突星形细胞瘤可以进展至WHO III 级别的间变型少突胶质细胞瘤或间变型少突星形细胞瘤,或进展至WHO IV级别的GBM。因此,导致少突胶质细胞瘤的遗传改变也构成另一达到GBM的途径。

[0319] 室管膜细胞瘤是一类临床多样的胶质细胞瘤,从儿童的侵袭性脑室内肿瘤到成年人中的良性脊髓肿瘤。室管膜细胞瘤转化为GBM是少见的。脉络丛肿瘤也是一组多样肿瘤,其优先发生在脑室系统中,从儿童的侵袭性幕上脑室内肿瘤到成年人的良性小脑桥脑角肿瘤。脉络丛肿瘤已经被报道偶发于具有Li-Fraumeni综合征和von Hippel-Lindau (VHL) 疾病的患者中。

[0320] 成神经管细胞瘤是发生在颅后窝的恶性原始肿瘤,主要在儿童中出现。这些肿瘤也出现在年轻成年人中。成神经管细胞瘤常常可以手术切除,并随后以化疗和/或放疗治疗。其可以局部或偶然地复发为从颅后窝到脊柱的播散转移(drop metastasis)。脑膜瘤是常见的颅内肿瘤,产生于脑膜中,压迫下方的脑。尽管典型地被认为是良性的并仅仅在罕见的情况下是恶性的,但对这些肿瘤的管理常常构成临床挑战。脑膜瘤的组织学级别多样,其中大多数良性,WHO级别I/IV(82%);较不常见的非典型的,WHO II/IV(15%);以及稀少地以间变性或恶性出现,WHO III/IV级(3%)。

[0321] 神经鞘瘤是出现在外周神经上的良性肿瘤。神经鞘瘤可以发于颅神经,特别地第八颅神经的前庭部分(前庭神经鞘瘤、听神经瘤),在此处其呈现为小脑桥脑角肿块。成血管细胞瘤是不定起源的肿瘤,由内皮细胞、周细胞和所谓的基质细胞组成。这些良性肿瘤最常发生在年轻成人的小脑和脊髓中。多发性成血管细胞瘤是von Hippel-Lindau病(VHL)的特征。血管外皮细胞瘤(HPC)是可以展现出局部侵袭性行为并可以转移的硬膜肿瘤。有关基于硬膜的血管外皮细胞瘤(HPC)的组织发生,长期以来一直存在争议,一些作者将其归类为独立实体,而其他作者将其归类为脑膜瘤的亚型。

[0322] 原发性和转移性脑肿瘤的症状常常取决于肿瘤在脑中的位置和大小。由于脑的不同区域负责特定的功能,因此临床症状变化很大。大脑额叶中的肿瘤可能造成虚弱和瘫痪、情绪紊乱、思考困难、意识迷糊和方向障碍、以及大的情绪波动。顶叶肿瘤可以造成癫痫、麻木或瘫痪、书写困难、不能解决简单数学问题、难于进行某些活动、和丧失触觉。枕叶肿瘤可引起在每个视野的一半中的视力丧失、幻视、和癫痫。颞叶肿瘤可以引起癫痫、知觉和空间障碍、和感觉性失语。如果肿瘤发生在小脑中,个体可能患有共济失调、协调障碍、头痛、和呕吐。下丘脑肿瘤可能引起情绪变动、和冷热感知改变。此外,下丘脑肿瘤可影响儿童的生长和营养。除了小脑之外,在脑一侧上的肿瘤将在对侧躯体上引起症状和损害。

[0323] 本发明组合和方法可以用于治疗已被表征为具有EGFRvIII表达细胞或组织的个体、或疑似具有EGFRvIII表达细胞或组织的个体。例如,受益于本发明治疗的个体包括患有胶质细胞瘤的个体、或疑似患有胶质细胞瘤的个体,例如,表现为存在以下一种或多种症

状:头痛、恶心和呕吐、癫痫、视力丧失、疼痛、虚弱、四肢麻木、和/或由增加的颅内压力引起的颅神经紊乱。在特定的实施方案中,所治疗的胶质细胞瘤是多形性成胶质细胞瘤。根据该实施方案,多形性成胶质细胞瘤可以在脑或脊髓中。

[0324] 本发明提供抑制表达EGFRvIII的细胞群增殖或减少该细胞群的方法,该方法包括使包含EGFRvIII表达细胞的细胞群与本文所述表达CAR 的细胞例如T细胞接触,其中所述CAR表达细胞与该EGFRvIII表达细胞结合。在特定实施方案中,本发明提供抑制表达EGFRvIII的癌细胞群增殖或减少该癌细胞群的方法,该方法包括使表达EGFRvIII的癌细胞群与本文所述的本发明CAR表达细胞例如T细胞接触,其中所述CAR表达细胞与该EGFRvIII表达细胞结合。另一实施方案中,本发明提供用于抑制表达EGFRvIII的癌细胞群增殖或减少该癌细胞群的方法,该方法包括使表达EGFRvIII的癌细胞群与结合该EGFRvIII表达细胞的本发明 EGFRvIII CART细胞接触。在一些实施方案中,在胶质细胞瘤或与 EGFRvIII表达细胞相关的其它癌症的患者个体或动物模型中,与阴性对照相比,本发明EGFRvIII CART细胞使个体或动物模型中细胞和/或癌细胞的数量、数目、量或百分比减少至少25%,至少30%,至少40%,至少 50%,至少65%,至少75%,至少85%,至少95%,或至少99%。一方面,个体是人。

[0325] 本发明还提供预防、治疗和/或管理与EGFRvIII表达细胞相关的病症(例如成胶质细胞瘤)的方法,该方法包括向有需要的个体施用本文所述与 EGFRvIII表达细胞结合的EGFRvIII CART细胞。一方面,个体是人。

[0326] 本发明提供用于防止EGFRvIII表达细胞相关癌症复发的方法,该方法包括向有需要的个体施用与该EGFRvIII表达细胞结合的本文所述 EGFRvIII CART细胞。另一实施方案中,该方法包括向有需要的个体组合施用有效量的与该EGFRvIII表达细胞结合的本文所述EGFRvIII CART细胞和有效量的其它治疗。

[0327] 一方面,本发明涉及包含与启动子有效连接的EGFRvIII CAR的载体,其用于哺乳动物T细胞中表达。一方面,本发明提供表达EGFRvIII CAR的重组T细胞用于治疗EGFRvIII表达肿瘤的用途。表达抗EGFRvIII CAR的重组T细胞称为EGFRvIII CART。一方面,本发明EGFRvIII CART能够通过其表面上表达的至少一个本发明EGFRvIII CAR与肿瘤细胞接触,从而该EGFRvIII CART响应该抗原而被激活,该CART靶向肿瘤细胞并抑制肿瘤生长。

[0328] 一方面,本发明涉及抑制表达EGFRvIII的肿瘤细胞生长的方法,包括使肿瘤细胞与本文所述EGFRvIII CART细胞接触,从而该CART将响应该抗原而被激活并靶向癌细胞,其中肿瘤的生长被抑制。一方面,活化的CART靶向并杀死癌细胞。

[0329] 一方面,本发明涉及在个体中治疗癌症的方法。该方法包括向个体施用本文所述EGFRvIII CART细胞,从而治疗个体中的癌症。可以通过本发明EGFRvIII CART细胞治疗的一个癌症例子是与EGFRvIII表达相关的癌症。一方面,与EGFRvIII相关的癌症是成胶质细胞瘤。

[0330] 一方面,与EGFRvIII相关的癌症选自:多形性成胶质细胞瘤(GBM)、间变型星形细胞瘤、巨细胞型成胶质细胞瘤、胶质肉瘤、间变型少突胶质细胞瘤、间变型室管膜细胞瘤、脉络丛癌、间变性神经节胶质细胞瘤(anaplastic ganglioglioma)、成松果体细胞瘤、髓上皮瘤、成室管膜细胞瘤、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤(supratentorial primitive neuroectodermal tumor)和非典型畸胎样/横纹肌样瘤(atypical teratoid/

rhabdoid tumor)、非小细胞肺癌、肺、胸、前列腺、卵巢、结直肠和膀胱癌、及其任何组合。

[0331] 本发明包括细胞治疗形式,其中遗传修饰T细胞以表达嵌合抗原受体(CAR),将该CART细胞输注入有需要的受体中。输注的细胞能够在受体中杀死肿瘤细胞。一些实施方案中,CAR修饰的T细胞能够体内复制,导致长期持久性,从而这可以导致维持的肿瘤控制。在多个方面,在T细胞施用给患者后,施用给患者的T细胞或其后代在患者中维持至少4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、两年、三年、四年、或五年。

[0332] 一方面,本文所述CAR修饰的T细胞可以是疫苗形式,用于哺乳动物的离体免疫和/或体内治疗。一方面,哺乳动物是人。

[0333] 有关离体免疫,在将细胞施用给哺乳动物之前,至少实施以下之一: i) 扩增细胞; ii) 将编码CAR的核酸引入细胞;或iii) 冷藏该细胞。

[0334] 离体程序是本领域已知的,下面将更详细地讨论。简言之,从哺乳动物(例如人)分离细胞,用表达本文所述CAR的载体对细胞进行遗传修饰(例如体外转导或转染)。CAR修饰的细胞可以施用给哺乳动物受体以提供治疗益处。哺乳动物受体可以是人,CAR修饰的细胞可以是受体的自体细胞。或者,细胞相对于受体而言可以是同种异体的、同种同基因的或异种的。

[0335] 离体扩增造血干细胞和祖先细胞的方法描述在美国专利号5,199,942,该文献并入此处作为参考,该方法可以用于本发明的细胞。其它适宜的方法是本领域已知的,因此,本发明不限于任何特定的离体细胞扩增方法。简言之,T细胞的离体培养和扩增可以包括:(1) 从哺乳动物从采集的外周血或骨髓外植体,收集CD34+造血干细胞和祖先细胞;和(2) 离体扩增该细胞。除了美国专利号5,199,942描述的细胞生长因子外,还可以使用其它因子例如flt3 L,IL-1,IL-3和c-kit配体用于培养和扩增细胞。

[0336] 除了在离体免疫的情况下使用基于细胞的疫苗外,本发明还提供用于体内免疫的组合物和方法以在患者中引发针对抗原的免疫反应。

[0337] 一般地,可以将本文所述活化和扩增的细胞用于治疗 and 预防免疫受损个体中的疾病。尤其是,本发明的CAR修饰T细胞可以用于治疗与EGFRvIII表达相关的疾病、病症和病况。一些方面,本发明细胞用于治疗有罹患EGFRvIII表达相关疾病、病症和病况的患者。因此,本发明提供治疗或预防与EGFRvIII表达相关的疾病、病症和病况的方法,包括向有需要的个体施用治疗有效量的本发明CAR修饰T细胞。

[0338] 本发明CAR修饰T细胞可以单独地施用,或者与稀释剂和/或与其它成分例如IL-2或其它细胞因子或细胞群或其它药物治疗(如本文所述)组合以药物组合物的形式施用。

[0339] 本发明还提供用于抑制EGFRvIII表达细胞群增殖或减少该细胞群的方法,该方法包括使包含EGFRvIII表达细胞的细胞群与结合该EGFRvIII表达细胞的本文所述EGFRvIII CART细胞接触。一个特定方面,本发明提供抑制EGFRvIII表达癌细胞群的增殖或减少该癌细胞群的方法,该方法包括使EGFRvIII表达癌细胞群与结合该EGFRvIII表达细胞的本文所述EGFRvIII CART细胞接触。一方面,本发明提供抑制EGFRvIII表达癌细胞群的增殖或减少该癌细胞群的方法,该方法包括使EGFRvIII表达癌细胞群与结合该EGFRvIII表达细胞的本文所述EGFRvIII CART细胞接触。在一些方面,在胶质细胞瘤或与EGFRvIII表达细胞相关的其它癌症的患者个体或动物模型中,与阴性对照相比,本发明EGFRvIII CART细胞使个体

或动物模型中细胞和/或癌细胞的数量、数目、量或百分比减少至少25%，至少30%，至少40%，至少50%，至少65%，至少75%，至少85%，至少95%，或至少99%。一方面，个体是人。

[0340] 本发明还提供用于预防、治疗和/或管理与EGFRvIII表达细胞相关的疾病(例如成胶质细胞瘤)的方法，该方法包括向有需要的个体施用与该EGFRvIII表达细胞结合的本文所述EGFRvIII CART细胞。一方面，个体是人。

[0341] 本发明提供防止与EGFRvIII表达细胞相关的癌症复发的方法，该方法包括向有需要的个体施用与该EGFRvIII表达细胞结合的本文所述EGFRvIII CART细胞。一方面，该方法包括向有需要的个体组合施用有效量的结合该EGFRvIII表达细胞的EGFRvIII CART细胞以及有效量的其它治疗。

[0342] 组合治疗

[0343] 本文所述CAR表达细胞可以与其它已知活性剂和治疗组合使用。“组合”施用在本文中意指，两种(或两种以上)不同治疗在个体罹患病症的过程中被递送给个体，例如，在个体被诊断出患有病症之后并在该病症被治愈或消除或由于其它原因而停止治疗之前，向个体递送该两种或两种以上治疗。一些实施方案中，一种治疗在第二治疗递送开始时仍然在继续，由此在施用上存在重叠。有时这被称作“同时”或“并行递送”。在其它实施方案中，一种治疗递送结束后，开始其它治疗递送。在任一情况的一些实施方案中，由于组合施用，治疗更为有效。例如，与在无第一治疗的情况下施用第二治疗相比，第二治疗更有效，例如，施用更少的第二治疗观察到相同效果，或第二治疗更大程度地减少了症状，或者在第一治疗上观察到相似的情况。一些实施方案中，递送导致症状或病症的其它相关参数的减少大于递送一种治疗而缺少另一种治疗时所观察到的减少。两种治疗的效果可以是部分相加的、完全相加的、或大于加合的。可以进行递送，使递送的第一治疗的效果在递送第二治疗时仍能够检测到。

[0344] 本文所述CAR表达细胞和至少一种其它的治疗剂可以同时地、在相同的组合物或分开的组合物中施用，或顺序地施用。对于顺序施用，可以首先施用本文所述CAR表达细胞，第二活性剂可以第二施用，或可以将施用顺序颠倒。

[0345] 在其它方面，可以在治疗方案中将本文所述CAR表达细胞与如下治疗组合使用：手术、化疗、放射、免疫抑制剂，例如环孢素(cyclosporin)、硫唑嘌呤(azathioprine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、霉酚酸酯(mycophenolate)和FK506、抗体或其它免疫清除剂(immunoablative agents) 例如CAMPATH、抗CD3抗体或其它抗体治疗、环磷酰胺(cytoxan)、氟达拉滨(fludarabine)、环孢素(cyclosporin)、FK506、雷帕霉素(rapamycin)、霉酚酸(mycophenolic acid)、类固醇(steroids)、FR901228、细胞因子和辐射。用于恶性胶质细胞瘤的示例性免疫治疗方法公开在Johnson et al.2010 Curr Neurol Neurosci Rep 10:259-266中。一些实施方案中，可以在治疗方案中组合使用本文所述CAR表达细胞和靶向细胞外基质蛋白例如生腱蛋白(tenscin)的活性剂，例如抗生腱蛋白抗体，例如<sup>211</sup>At标记的抗生腱蛋白抗体。一些实施方案中，可以在治疗方案中组合使用本文所述CAR表达细胞和免疫调节剂，例如干扰素α、干扰素β、TGF-β2肽抑制剂、或poly-ICLC。一些实施方案中，可以在治疗方案中组合使用本文所述CAR表达细胞和WT1转录因子肽疫苗，例如Izumoto et al.2008J Neurosurg 108:963-971中描述的。

[0346] 一个实施方案中,本文所述CAR表达细胞可以与化疗剂组合使用。示例性化疗剂包括烷化剂、基于铂的药剂、血管发生抑制剂(例如VEGF 途径抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂(例如EGF途径抑制剂)、mTOR抑制剂)。

[0347] 可以考虑用于组合治疗中的一般化疗剂包括:阿那曲唑(anastrozole, **Arimidex®**),比卡鲁胺(bicalutamide, **Casodex®**),硫酸博来霉素(bleomycin sulfate, **Blenoxane®**),白消安(busulfan, **Myleran®**), **白消安注射剂**(busulfan injection, **Busulfex®**),卡培他滨(capecitabine, **Xeloda®**),N4-戊氧基羰基-5-脱氧基-5-氟胞嘧啶,卡铂(carboplatin, **Paraplatin®**),卡莫司汀(carmustine, **BiCNU®**),苯丁酸氮芥(chlorambucil, **Leukeran®**),顺铂(cisplatin, **Platinol®**),克拉屈滨(cladribine, **Leustatin®**),环磷酰胺(cyclophosphamide, **Cytoxan®**或**Neosar®**),阿糖胞苷(cytarabine, cytosine arabinoside, **Cytosar-U®**),阿糖胞苷脂质体注射剂(cytarabine liposome injection, **DepoCyt®**),达卡巴嗪(dacarbazine, **DTIC-Dome®**),更生霉素(dactinomycin)(放线菌素D(Actinomycin D), Cosmegen),柔红霉素盐酸盐(daunorubicin hydrochloride, **Cerubidine®**),柔红霉素柠檬酸盐脂质体注射剂(**DaunoXome®**),地塞米松(dexamethasone),多西他赛(docetaxel, **Taxotere®**),盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride, **Adriamycin®**, **Rubex®**),依托泊甙(etoposide, **Vepesid®**),磷酸氟达拉滨(fludarabine phosphate, **Fludara®**),5-氟尿嘧啶(**Adrucil®**, **Efudex®**),氟他胺(flutamide, **Eulexin®**),tezacitibine,吉西他滨(Gemcitabine)(二氟脱氧胞嘧啶),羟基脲(hydroxyurea, **Hydrea®**),依达比星(Idarubicin, **Idamycin®**),异环磷酰胺(ifosfamide, **IFEX®**),依立替康(irinotecan, **Camptosar®**),L-天冬酰胺酶(**ELSPAR®**),甲酰四氢叶酸钙(leucovorin calcium),美法仑(melphalan, **Alkeran®**),6-巯基嘌呤(**Purinethol®**),甲氨蝶呤(methotrexate, **Folex®**),米托蒽醌(mitoxantrone, **Novantrone®**),mylotarg,紫杉醇(paclitaxel, **Taxol®**),phoenix(钇90/MX-DTPA),喷司他丁(pentostatin),聚苯丙生20加卡莫司汀植入剂(polifeprosan 20with carmustine implant, **Gliadel®**),枸橼酸他莫昔芬(tamoxifen citrate, **Nolvadex®**),替尼泊甙(teniposide, **Vumon®**),6-硫鸟嘌呤(6-thioguanine),塞替派(thiotepa),替拉扎明(tirapazamine, **Tirazone®**),注射用盐酸拓扑替康(**Hycamptin®**),长春花碱(vinblastine, **Velban®**),长春花新碱(vincristine, **Oncovin®**),和脱水长春花碱(vinorelbine, **Navelbine®**)。

[0348] 示例性烷化剂包括,但不限于,氮芥类(nitrogen mustards),乙烯亚胺衍生物

(ethylenimine derivatives), 烷基磺酸盐类(alkyl sulfonates), 亚硝基脲(nitrosoureas) 和三氮烯类(triazenes): 尿嘧啶氮芥(uracil mustard) (**Aminouracil Mustard®**, **Chlorethaminacil®**, **Demethyldopan®**, **Desmethyldopan®**, **Haemanthamine®**, **Nordopan®**, **Uracil nitrogen mustard®**, **Uracillost®**, **Uracilmostaza®**, **Uramustin®**, **Uramustine®**), 氮芥(chlormethine) (**Mustargen®**), 环磷酰胺(cyclophosphamide) (**Cytoxan®**, **Neosar®**, **Clafen®**, **Endoxan®**, **Procytox®**, **Revimmune™**), 异环磷酰胺(ifosfamide) (**Mitoxana®**), 美法仑(melphalan) (**Alkeran®**), 苯丁酸氮芥(Chlorambucil) (**Leukeran®**), 溴丙哌嗪(pipobroman) (**Amedel®**, **Vercyte®**), 三亚胺嗪(triethylenemelamine) (**Hemel®**, **Hexalen®**, **Hexastat®**), 三亚乙基硫代磷胺(triethylenethiophosphoramine), 替莫唑胺(Temozolomide) (**Temodar®**), 塞替派(thiotepa) (**Thioplex®**), 白消安(**Busilvex®**, **Myleran®**), 卡莫司汀(**BiCNU®**), 洛莫司汀(lomustine) (**CeeNU®**), 链脲霉素(streptozocin) (**Zanosar®**), 和达卡巴嗪(Dacarbazine) (**DTIC-Dome®**)。其它的示例性烷化剂包括,但不限于,奥沙利铂(Oxaliplatin) (**Eloxatin®**); 替莫唑胺(**Temodar®** 和 **Temodal®**); 更生霉素(也称作放线菌素-D, **Cosmegen®**); 美法仑(也称作L-PAM, L-沙可来新(sarcolysin), 和苯丙氨酸氮芥(phenylalanine mustard), **Alkeran®**); 六甲蜜胺(Altretamine) (也称作六甲氰胺(hexamethylmelamine) (HMM), **Hexalen®**); 卡莫司汀(**BiCNU®**); 苯达莫司汀(Bendamustine) (**Treanda®**); 白消安(**Busulfex®** 和 **Myleran®**); 卡铂(**Paraplatin®**); 洛莫司汀(也称作CCNU, **CeeNU®**); 顺铂(也称作CDDP, **Platinol®** 和 **Platinol®-AQ**); 苯丁酸氮芥(Chlorambucil) (**Leukeran®**); 环磷酰胺(**Cytoxan®** 和 **Neosar®**); 达卡巴嗪(也称作DTIC, DIC和甲噻咪唑胺(imidazole carboxamide), **DTIC-Dome®**); 六甲蜜胺(也称作六甲氰胺(hexamethylmelamine) (HMM), **Hexalen®**); 异环磷酰胺(Ifosfamide) (**Ifex®**); Prednumustine; 丙卡巴肼(Procarbazine) (**Matulane®**); 氮芥(Mechlorethamine) (也称作nitrogen mustard, mustine和 mechloroethamine hydrochloride, **Mustargen®**); 链脲霉素(**Zanosar®**); 塞替派(Thiotepa) (也称作三乙烯硫代磷酰胺(thiophosphoamide), TESP 和 TSPA, **Thioplex®**); 环磷酰胺(**Endoxan®**, **Cytoxan®**, **Neosar®**, **Procytox®**, **Revimmune®**); 和盐酸苯达莫司汀(**Treanda®**)。

[0349] 示例性基于铂的活性剂包括但不限于, 卡铂、顺铂、和奥沙利铂。

[0350] 示例性血管发生抑制剂包括但不限于A6 (Angstrom Pharmaceuticals), ABT-510

(Abbott Laboratories), ABT-627 (Atrasentan) (Abbott Laboratories/Xinlay), ABT-869 (Abbott Laboratories), Actimid (CC4047, 泊马度胺 (Pomalidomide)) (Celgene Corporation), AdGVPEDF.11D (GenVec), ADH-1 (Exherin) (Adherex Technologies), AEE788 (Novartis), AG-013736 (阿西替尼 (Axitinib)) (Pfizer), AG3340 (Prinomastat) (Agouron Pharmaceuticals), AGX1053 (AngioGenex), AGX51 (AngioGenex), ALN-VSP (ALN-VSP 02) (Alnylam Pharmaceuticals), AMG 386 (Amgen), AMG706 (Amgen), 阿帕替尼 (apatinib) (YN968D1) (Jiangsu Hengrui Medicine), AP23573 (Ridaforolimus/MK8669) (Ariad Pharmaceuticals), AQ4N (Novavea), ARQ 197 (ArQule), ASA404 (Novartis/Antisoma), 阿替莫德 (Atiprimod) (Callisto Pharmaceuticals), ATN-161 (Attenuon), AV-412 (Aveo Pharmaceuticals), AV-951 (Aveo Pharmaceuticals), 安维汀 (Avastin) (贝伐单抗 (Bevacizumab)) (Genentech), AZD2171 (西地尼布 (Cediranib)/Recentin) (AstraZeneca), BAY 57-9352 (特拉替尼 (Telatinib)) (Bayer), BEZ235 (Novartis), BIBF1120 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb), BMS-582664 (布立尼布 (Brivanib)) (Bristol-Myers Squibb), BMS-690514 (Bristol-Myers Squibb), 骨化三醇 (Calcitriol), CCI-779 (馱瑞塞尔 (Torisel)) (Wyeth), CDP-791 (ImClone Systems), 高三尖杉酯碱 (Ceflatonin) (Homoharringtonine/HHT) (ChemGenex Therapeutics), 西乐葆 (Celebrex) (塞来昔布 (Celecoxib)) (Pfizer), CEP-7055 (Cephalon/Sanofi), CHIR-265 (Chiron Corporation), NGR-TNF, COL-3 (Metastat) (Collagenex Pharmaceuticals), Combretastatin (Oxigene), CP-751,871 (Figitumumab) (Pfizer), CP-547,632 (Pfizer), CS-7017 (Daiichi Sankyo Pharma), CT-322 (Angiocept) (Adnexus), 姜黄素 (Curcumin), 达肝素钠 (dalteparin) (法安明 (Fragmin)) (Pfizer), 双硫仑 (Disulfiram) (安塔布司 (Antabuse)), E7820 (Eisai Limited), E7080 (Eisai Limited), EMD 121974 (西仑吉肽 (Cilengitide)) (EMD Pharmaceuticals), ENMD-1198 (EntreMed), ENMD-2076 (EntreMed), 恩度 (ENDOSTAR) (Simcere), 爱必妥 (Erbix) (ImClone/Bristol-Myers Squibb), EZN-2208 (Enzon Pharmaceuticals), EZN-2968 (Enzon Pharmaceuticals), GC1008 (Genzyme), 金雀异黄素 (Genistein), GSK1363089 (Foretinib) (GlaxoSmithKline), GW786034 (帕唑帕尼 (Pazopanib)) (GlaxoSmithKline), GT-111 (Vascular Biogenics Ltd.), IMC--1121B (雷莫芦单抗 (Ramucirumab)) (ImClone Systems), IMC-18F1 (ImClone Systems), IMC-3G3 (ImClone LLC), INCB007839 (Incyte Corporation), INGN 241 (Introgen Therapeutics), 易瑞沙 (Iressa) (ZD1839/吉非替尼 (Gefitinib)), LBH589 (Faridak/Panobinostat) (Novartis), 诺适得 (Lucentis) (雷珠单抗 (Ranibizumab)) (Genentech/Novartis), LY317615 (Ezastaurin) (Eli Lilly and Company), Macugen (哌加他尼 (Pegaptanib)) (Pfizer), MEDI522 (Abeigrin) (MedImmune), MLN518 (坦度替尼 Tandutinib) (Millennium), Neovastat (AE941/Benefin) (Aeterna Zentaris), 多吉美 (Nexavar) (Bayer/Onyx), NM-3 (Genzyme Corporation), 那可丁 (Noscipine) (Cougar Biotechnology), NPI-2358 (Nereus Pharmaceuticals), OSI-930 (OSI), Palomid 529 (Paloma Pharmaceuticals, Inc.), Panzem 胶囊 (2ME2) (EntreMed), Panzem NCD (2ME2) (EntreMed), PF-02341066 (Pfizer), PF-04554878 (Pfizer), PI-88 (Progen Industries/

Medigen Biotechnology), PKC412 (Novartis), Polyphenon E (绿茶提取物) (Polypheno E International, Inc), PPI-2458 (Praecis Pharmaceuticals), PTC299 (PTC Therapeutics), PTK787 (瓦他拉尼 Vatalanib) (Novartis), PXD101 (贝利司他 Belinostat) (CuraGen Corporation), RAD001 (依维莫司 Everolimus) (Novartis), RAF265 (Novartis), 瑞戈非尼 (Regorafenib) (BAY73-4506) (Bayer), 雷利米得 (Revlimid) (Celgene), 乙酸阿奈可他 (Retaane) (Alcon Research), SN38 (脂质体) (Neopharm), SNS-032 (BMS-387032) (Sunesis), SOM230 (帕瑞肽 Pasireotide) (Novartis), 角鲨胺 (Squalamine) (Genaera), 苏拉明 (suramin), 索坦 (Sutent) (Pfizer), 特罗凯 (Tarceva) (Genentech), TB-403 (Thrombogenics), Tempostatin (Collard Biopharmaceuticals), 四硫钼酸盐 (tetrathiomolybdate) (Sigma-Aldrich), TG100801 (TargeGen), 沙利度胺 (Thalidomide) (Celgene Corporation), 亭扎肝素钠 (Tinzaparin sodium), TKI258 (Novartis), TRC093 (Tracoon Pharmaceuticals Inc.), VEGF Trap (Aflibercept) (Regeneron Pharmaceuticals), VEGF Trap-Eye (Regeneron Pharmaceuticals), Veglin (VasGene Therapeutics), 硼替佐米 (Bortezomib) (Millennium), XL184 (Exelixis), XL647 (Exelixis), XL784 (Exelixis), XL820 (Exelixis), XL999 (Exelixis), ZD6474 (AstraZeneca), 伏立诺他 (Vorinostat) (Merck), 和 ZSTK474。

[0351] 示例性血管内皮生长因子 (VEGF) 受体抑制剂包括但不限于, 贝伐单抗 (Bevacizumab) (阿瓦斯汀 **Avastin®**), 阿西替尼 (Axitinib) (**Inlyta®**); 丙氨酸布立尼布 (brivanib alaninate) (BMS-582664, (S)-(R)-1-(4-(4-氟-2-甲基-1H-吡啶-5-基氧基)-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基氧基)丙-2-基)2-氨基丙酸酯); 索拉非尼 (多吉美) (**Nexavar®**); 帕唑帕尼 (Pazopanib) (**Votrient®**); 苹果酸舒尼替尼 (Sunitinib malate) (**Sutent®**); 西地尼布 (Cediranib) (AZD2171, CAS 288383-20-1); Vargatef (BIBF1120, CAS 928326-83-4); Foretinib (GSK1363089); 特拉替尼 (Telatinib) (BAY57-9352, CAS 332012-40-5); 阿帕替尼 (apatinib) (YN968D1, CAS 811803-05-1); 伊马替尼 (Imatinib) (**Gleevec®**); 普纳替尼 (ponatinib) (AP24534, CAS 943319-70-8); Tivozanib (AV951, CAS 475108-18-0); 瑞戈非尼 (Regorafenib) (BAY73-4506, CAS 755037-03-7); 瓦他拉尼 (Vatalanib) 二盐酸盐 (PTK787, CAS 212141-51-0); 布立尼布 (Brivanib) (BMS-540215, CAS 649735-46-6); 凡德他尼 (vandetanib) (**Caprelsa®** 或 AZD6474); 二磷酸莫替沙尼 (Motesanib Diphosphate) (AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-二氢-3,3-二甲基-1H-吡啶-6-基)-2-[(4-吡啶基甲基)氨基]-3-吡啶甲酰胺, 描述于 PCT 公布号 W0 02/066470); 多韦替尼二乳酸 (Dovitinib Dilactic acid) (TKI258, CAS 852433-84-2); Linfanib (ABT869, CAS 796967-16-3); 卡博替尼 (Cabozantinib) (XL184, CAS 849217-68-1); 来他替尼 (Lestaurtinib) (CAS 111358-88-4); N-[5-[[[5-(1,1-二甲基乙基)-2-噻唑基]甲基]硫]-2-噻唑基]-4-吡啶甲酰胺 (BMS38703, CAS 345627-80-7); (3R,4R)-4-氨基-1-((4-((3-甲氧基苯基)氨基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)吡啶-3-醇 (BMS690514); N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[ (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6 $\alpha$ )-八氢-2-甲基环戊烷[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺 (XL647, CAS 781613-23-8); 4-甲基-3-[[1-甲基-6-

(3-吡啶基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]-N-[3-(三氟甲基)苯基]-苯甲酰胺(BHG712, CAS 940310-85-0);和Aflibercept (**Eylea®**)。

[0352] 示例性EGF途径抑制剂包括但不限于:酪氨酸磷酸化抑制剂(tyrphostin) 46, EKB-569,厄洛替尼(erlotinib) (**Tarceva®**),吉非替尼(Gefitinib) (**Iressa®**),爱必妥(Erbitux),尼妥珠单抗(nimotuzumab),拉帕替尼(lapatinib) (**Tykerb®**),西妥昔单抗(cetuximab) (抗EGFR mAb),<sup>188</sup>Re-标记的尼妥珠单抗(抗EGFR mAb),和一般地和具体地公开在WO 97/02266,EP 0 564 409,WO 99/03854,EP 0 520 722,EP 0 566 226,EP 0 787 722,EP 0 837 063,US 5,747,498,WO 98/10767,WO 97/30034,WO 97/49688,WO 97/38983和WO 96/33980中的那些。示例性EGFR抗体包括但不限于,西妥昔单抗(爱必妥(**Erbitux®**);帕尼单抗(Panitumumab) (**Vectibix®**);马妥珠单抗(Matuzumab) (EMD-72000);曲妥珠单抗(Trastuzumab) (**Herceptin®**);尼妥珠单抗(hR3);扎鲁木单抗(Zalutumumab);TheraCIM h-R3;MDX0447 (CAS 339151-96-1);和 ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1)。示例性表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂包括但不限于,厄洛替尼盐酸盐(**Tarceva®**),吉非替尼(Gefitinib) (**Iressa®**);N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[[ (3"S)-四氢-3-咪唑基]氧基]-6-噻唑啉基]-4(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺, **Tovok®**);凡德他尼(vandetanib) (**Caprelsa®**);拉帕替尼(**Tykerb®**);(3R,4R)-4-氨基-1-((4-((3-甲氧基苯基)氨基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS690514);卡奈替尼(Canertinib)二盐酸盐(CI-1033);6-[4-[(4-乙基-1-哌嗪基)甲基]苯基]-N-[(1R)-1-苯基乙基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-胺(AEE788, CAS 497839-62-0);莫立替尼(Mubritinib) (TAK165);培利替尼(Pelitinib) (EKB569);阿法替尼(Afatinib) (BIBW2992);来那替尼(Neratinib) (HKI-272);N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吡唑-5-基]氨基]-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-氨基甲酸,(3S)-3-吗啉基甲基酯(BMS599626);N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[ (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6 $\alpha$ )-八氢-2-甲基环戊烷并[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-噻唑啉胺(XL647, CAS 781613-23-8);和4-[4-[[ (1R)-1-苯基乙基]氨基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-酚(PKI166, CAS 187724-61-4)。

[0353] 示例性mTor抑制剂包括但不限于,雷帕霉素(rapamycin) (**Rapamune®**),及其类似物和衍生物;SDZ-RAD;坦西莫司(Temsirolimus) (**Torisel®**;也称作CCI-779);地磷莫司(ridaforolimus) (以前称作 deferolimus, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-二羟基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-五氧代-11,36-二氧杂-4-氮杂三环[30.3.1.0<sup>4,9</sup>]三十六碳-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基环己基二甲基磷酸酯,也称作AP23573和MK8669,描述在PCT公布号WO 03/064383);依维莫司(Everolimus) (**Afinitor®**或RAD001);雷帕霉素(rapamycin) (AY22989, **Sirolimus®**);Simapimod (CAS 164301-51-3);(5-{2,4-二[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧基

苯基) 甲醇(AZD8055); 2-氨基-8-[反式-4-(2-羟基乙氧基) 环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(PF04691502, CAS 1013101-36-4); 和N<sup>2</sup>-[1,4-二氧代-4-[[4-(4-氧代-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2-基) 吗啉-4-基] 甲氧基] 丁基]-L-精氨酸甘氨酸-L-α-天冬氨酸-L-丝氨酸-, 内盐(SF1126, CAS 936487-67-1)。

[0354] 示例性磷酸肌醇-3-激酶(PI3K) 抑制剂包括但不限于, 4-[2-(1H-吡唑-4-基)-6-[[4-(甲基磺酰基) 哌嗪-1-基] 甲基] 噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基] 吗啉(也称作GDC 0941, 描述在PCT公布号W0 09/036082和W0 09/055730); 2-甲基-2-[4-[3-甲基-2-氧代-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氢咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基] 苯基] 丙腈(也称作BEZ 235或NVP-BEZ 235, 描述在PCT公布号W0 06/122806); 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉并嘧啶-4-基) 吡啶-2-胺(也称作 BKM120或NVP-BKM120, 描述在PCT公布号W02007/084786); 陶扎色替(Tozasertib)(VX680或MK-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-吡啶基)-6-喹啉基] 亚甲基]-2,4-噻唑烷二酮(GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(乙酰基氧基)-1-[(二-2-丙烯基氨基) 亚甲基]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-八氢-11-羟基-4-甲氧基甲基)-4a,6a-二甲基-环戊烷并[5,6]萘并[1,2-c]吡喃-2,7,10(1H)-三酮(PX866, CAS 502632-66-8); 和8-苯基-2-(吗啉-4-基)-苯并吡喃-4-酮(LY294002, CAS 154447-36-6)。示例性蛋白激酶B(PKB) 或AKT抑制剂包括但不限于, 8-[4-(1-氨基环丁基) 苯基]-9-苯基-1,2,4-三唑并[3,4-f][1,6]二氮杂萘-3(2H)-酮(MK-2206, CAS 1032349-93-1); 哌立福辛(perifosine)(KRX0401); 4-十二烷基-N-1,3,4-噻二唑-2-基-苯磺酰胺(PHT-427, CAS 1191951-57-1); 4-[2-(4-氨基-1,2,5-噻二唑-3-基)-1-乙基-7-[(3S)-3-哌啶基甲氧基]-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-4-基]-2-甲基-3-丁炔-2-醇(GSK690693, CAS 937174-76-0); 8-(1-羟基乙基)-2-甲氧基-3-[(4-甲氧基苯基) 甲氧基]-6H-二苯并[b,d]吡喃-6-酮(palomid 529, P529, 或SG-00529); Tricirbine(6-氨基-4-甲基-8-(β-D-呋喃核糖基)-4H,8H-吡咯并[4,3,2-de]嘧啶并[4,5-c]哒嗪); (αS)-α-[[[5-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-3-吡啶基] 氧基] 甲基]-苯乙胺(A674563, CAS 552325-73-2); 4-[(4-氯苯基) 甲基]-1-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-4-哌啶胺(CCT128930, CAS 885499-61-6); 4-(4-氯苯基)-4-[4-(1H-吡唑-4-基) 苯基]-哌啶(AT7867, CAS 857531-00-1); 和Archexin(RX-0201, CAS 663232-27-7)。

[0355] 也可以使用抑制钙依赖性磷酸酶calcineurin(环孢素和FK506) 或抑制对生长因子诱导的信号传导重要的p70S6激酶(雷帕霉素) 的药物(Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun.73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr.Opin.Immun.5:763-773, 1993)。再一方面, 本发明细胞组合物可以与以下治疗联合(例如, 在之前、同时或之后) 施用给患者: 骨髓移植、使用化疗剂的T细胞清除治疗(T cell ablative therapy) 例如氟达拉滨(fludarabine)、外射线放疗(XRT), 环磷酰胺, 和/或抗体例如OKT3或CAMPATH。一方面, 在B细胞清除治疗, 例如与CD20反应的药物, 例如Rituxan之后, 施用本发明细胞组合物。例如, 一个实施方案中, 个体可以经历标准治疗, 在高剂量化疗之后接受外周血干细胞移植。一些实施方案中, 在移植后, 个体接受输注本发明扩增的免疫细胞。在再一实施方案中, 扩增的细胞在手术之前或之后施用。

[0356] 一个实施方案中, 可以向个体施用减少或改善与CAR表达细胞施用相关的副反应

的活性剂。与CAR表达细胞施用相关的副反应包括,但不限于,CRS,和噬血细胞性淋巴组织细胞增多症(hemophagocytic lymphohistiocytosis,HLH),又称巨噬细胞活化综合征(macrophage activation syndrome,MAS)。CRS的症状包括高热、恶心、短暂性低血压(transient hypotension)、缺氧等等。因此,本文所述方法可以包括向患者施用本发明CAR表达细胞并进一步施用活性剂以管理由CAR表达细胞治疗引起的可溶性因子的升高水平。一个实施方案中,在个体中升高的可溶性因子是IFN- $\gamma$ ,TNF $\alpha$ ,IL-2和IL-6中的一种或多种。因此,施用以处理该副作用的活性剂可以是中和这些可溶性因子之一或多个的活性剂。此类活性剂包括但不限于,类固醇、TNF $\alpha$ 抑制剂、和IL-6抑制剂。TNF $\alpha$ 抑制剂的一个例子是用依那西普(Etanercept)。IL-6抑制剂的一个例子是托珠单抗(Tocilizumab)(toc)。

[0357] 一个实施方案中,向个体施用增强CAR表达细胞活性的活性剂。例如,一个实施方案中,所述活性剂可以是抑制抑制性分子的活性剂。抑制性分子例如程序化死亡分子1(PD1)在一些实施方案中可以减少CAR表达细胞引发免疫效应子反应的功能。抑制性分子的例子包括PD1,PD-L1,CTLA4,TIM3,LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160,2B4和TGFR $\beta$ 。抑制抑制性分子(例如通过在DNA、RNA或蛋白水平的抑制作用)可以优化CAR表达细胞性能。在实施方案中,抑制性核酸例如dsRNA,例如siRNA或shRNA,可以用于抑制抑制性分子在CAR表达细胞中的表达。在一个实施方案中,抑制剂是shRNA。在一个实施方案中,CAR表达细胞中抑制性分子被抑制。在这些实施方案中,抑制抑制性分子表达的dsRNA分子可以与编码CAR的成分(例如所有成分)的核酸连接。一个实施方案中,抑制性信号的抑制剂可以是例如与抑制性分子结合的抗体或抗体片段。例如,该活性剂可以是与PD1,PD-L1,PD-L2或CTLA4结合的抗体或抗体片段(例如伊匹单抗(ipilimumab)(也称作MDX-010和MDX-101,商品名**Yervoy®**;Bristol-Myers Squibb;Tremelimumab(可从Pfizer获得的IgG2单克隆抗体,以前称作ticilimumab,CP-675,206) ) )。

[0358] PD1是CD28受体家族的抑制性成员,该受体家族还包括CD28,CTLA-4,ICOS,和BTLA。PD-1在活化的B细胞、T细胞和髓样细胞上表达(Agata et al.1996Int.Immunol 8:765-75)。PD1的两个配体,PD-L1和PD-L2,已经被证实在与PD1结合后下调T细胞活化(Freeman et al.2000 J Exp Med 192:1027-34;Latchman et al.2001Nat Immunol 2:261-8;Carter et al.2002Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1大量存在于人癌症中(Dong et al.2003J Mol Med 81:281-7;Blank et al.2005Cancer Immunol. Immunother 54:307-314;Konishi et al.2004Clin Cancer Res 10:5094)。可以通过抑制PD1与PD-L1的局部相互作用,逆转免疫抑制。PD1,PD-L1和PD-L2的抗体、抗体片段和其它抑制剂是本领域可得的,并可以与本文所述CD123 CAR组合使用。例如,纳武单抗(nivolumab)(也称作BMS-936558或MDX1106;Bristol-Myers Squibb)是特异性阻断PD-1的全人IgG4单克隆抗体。纳武单抗(克隆5C4)和其它特异性结合PD-1的人单克隆抗体公开在US 8,008,449和W02006/121168。Pidilizumab(CT-011;Cure Tech)是与PD-1结合的人源化IgG1k单克隆抗体。Pidilizumab和其它人源化抗PD1单克隆抗体公开在W02009/101611。Lambrolizumab(也称作MK03475;Merck)是与PD1结合的人源化IgG4单克隆抗体。Lambrolizumab和其它人源化抗PD1抗体公开在US 8,354,509和W02009/114335。MDPL3280A(Genentech/Roche)是结合PD-L1的人Fc优化的IgG1单克隆抗体。MDPL3280A和其它抗PD-L1人单克隆抗体公开在美国专利号7,943,743和美国公布号20120039906。其它抗PD-L1结合剂包括YW243.55.S70

(重和轻链可变区示于W02010/077634的SEQ ID NOs 20和21)和MDX-1 105(也称作BMS-936559,以及例如公开在 W02007/005874中的抗-PD-L1结合剂)。AMP-224(B7-DCIg; Amplimmune;例如公开在W02010/027827和W02011/066342),是 PD-L2 Fc融合可溶性受体,阻断PD1与B7-H1的相互作用。其它抗-PD1 抗体包括AMP 514(Amplimmune),等等,例如公开在US 8,609,089,US 2010028330,和/或US 20120114649中的抗PD1抗体。增强CAR表达细胞活性的活性剂可以是,例如包含第一结构域和第二结构域的融合蛋白,其中第一结构域是抑制性分子或其片段,而第二结构域是与阳性信号相关的多肽,例如,与阳性信号相关的多肽是CD28,ICOS及其片段,例如CD28 和/或ICOS的胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,在表达CAR的相同细胞中表达该融合蛋白。在另一实施方案中,通过不表达抗EGFRvIII CAR的细胞,例如T细胞表达该融合蛋白。

[0359] 在一个实施方案中,增强本文所述CAR表达细胞活性的活性剂是 miR-17-92。

[0360] 药物组合物和治疗

[0361] 本发明药物组合物可以包含本文所述CAR表达细胞,例如多个CAR 表达细胞,以及一种或多种制药学或生理学可接受的载体、稀释剂或赋形剂。该组合物可以包含缓冲剂例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;糖,例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露糖醇;蛋白质;多肽或氨基酸例如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂例如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明组合物可以在一方面配制用于静脉内施用。

[0362] 本发明药物组合物可以以合适待治疗(或预防)的疾病的方式施用。尽管施用的量和频率将取决于多种因素例如患者状况、患者疾病的类型和严重程度,但合适剂量可以通过临床试验确定。

[0363] 一个实施方案中,药物组合物基本上不含杂质,例如存在不可检测水平的杂质,例如选自下述的杂质:内毒素、支原体、具有复制能力的慢病毒(RCL)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残留的抗CD3/抗CD28包被的珠、小鼠抗体、合并的人血清、牛血清白蛋白、牛血清、培养基组分、载体包装细胞或质粒组分、细菌和真菌。一个实施方案中,细菌是选自以下的至少之一:粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*),白假丝酵母(*Candida albicans*),大肠杆菌(*Escherichia coli*),流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*),脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitides*),铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*),化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)A组。

[0364] 当提及“免疫学有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”、或“治疗有效量”时,待施用的本发明组合物的准确量可以由医师考虑患者(个体)在年龄、体重、肿瘤大小、感染程度或转移程度、以及状况方面的个体差异而确定。一般而言,包含本文所述T细胞的药物组合物可以以  $10^4$ 到 $10^9$ 细胞/kg体重的剂量、一些情况下 $10^5$ 到 $10^6$ 细胞/kg体重的剂量(包括其间所有整数值)施用。也可以以这些剂量多次使用T细胞组合物。可以通过免疫治疗领域一般已知的输注技术,施用这些细胞(参见,例如 Rosenberg et al.,*New Eng.J.of Med.*319:1676,1988)。

[0365] 一些方面,可能期望向个体施用活化的T细胞,并随后重新抽血(或进行单采血液成分术),根据本发明活化由此获得的T细胞,将这些活化的扩增的T细胞重新输入患者体内。该过程可以每隔几周进行多次。一些方面,可以从10cc至400cc的血液抽取物活化T细

胞。一些方面,可以从20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc, 或100cc的血液抽取物活化T细胞。

[0366] 可以以任何方便的方式,包括通过气溶胶吸入、注射、吞咽、转输、移植或植入,施用本发明组合物。本文所述组合物可以经动脉、皮下、皮内、肿瘤内、结节内、髓内、肌肉内、静脉内(i.v.)注射、或腹膜内,施用给患者。一方面,本发明T细胞组合物通过皮内或皮下注射施用给患者。一个方面,通过静脉内注射施用本发明T细胞组合物。可以将T细胞组合物直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位中。

[0367] 在一个特别的示例性方面,可以对个体实施白细胞单采术,其中收集、富集或离体耗竭白细胞以选择和/或分离目的细胞,例如T细胞。可以通过本领域已知方法,扩增这些T细胞分离物,并处理以便可以引入一个或多个本发明CAR构建体,由此产生本发明CAR T细胞。随后可以对有需要的个体施用标准治疗——高剂量化疗之后外周血干细胞移植。一些方面,在移植之后或并行地,个体接受扩增的本发明CAR T细胞输注。再一方面,在手术之前或之后施用扩增的细胞。

[0368] 施用给患者的上述治疗的剂量将随着所治疗的病况的准确性质和所治疗的受体而变。可以根据本领域公认的实践,进行剂量扩大以用于人施用。

## 实施例

[0369] 本发明通过参考以下实验实施例进一步详细描述。除非具体说明,否则这些实施例仅为了举例说明目的而提供,不旨在构成限制。因此,本发明不应以任何方式理解为限于下述实施例,相反地应理解为涵盖了根据本文教导而明显的任何和所有变形方案。

[0370] 不进一步描述,可以认为本领域普通技术人员能够使用前述描述和下述举例说明性实施例而制备和利用本发明的组合物并实施本发明的方法。下述实施例具体指向本发明的多个方面,不应理解为以任何方式对本发明的其余部分构成限制。

[0371] 实施例1:在诊断患有EGFRvIII+成胶质细胞瘤的患者中经工程化以表达EGFRvIII-靶向嵌合抗原受体的重定向自体T细胞

[0372] 以下实验设计以解决,通过基于抗体的嵌合抗原受体(CAR)重定向于表面蛋白EGFRvIII的人T细胞是否可以有效地在NSG小鼠中消除EGFRvIII+多形性成胶质细胞瘤模型。此外,设计实验,以评价这些细胞的植入和持久性。测试三种不同形式的CAR,涵盖两种不同的单链可变片段(结合EGFRvIII抗原的CAR部分)和胞内信号传导结构域(4-1BB和CD3 $\zeta$ ,带和不带CD28)。

[0373] 免疫缺陷NOD/scid/ $\gamma$ cnull(NSG)小鼠是植入人肿瘤细胞系(脑肿瘤系U87,其为EGFR+并具有EGFRvIII+的工程化版本)和人T细胞的优良异种移植模型。在植入后,人T细胞可以在NSG小鼠中维持大约2个月或直到致命的异种GVHD(xGVHD)形成,这取决于输注的人T细胞的剂量和供体。

[0374] 简言之,使用慢病毒平台构建了新CAR(3C10 CAR),该CAR并入来源于抗EGFRvIII单克隆抗体3C10的scFv。该CAR已经在体外和在异种小鼠模型中进行了测试。NOD/scid/ $\gamma$ c(-/-)(NSG)小鼠模型已经广泛地用于CAR治疗的临床前评价,包括评价输注的人T细胞的长期持久性。在脑中携带7日U87-EGFRvIII肿瘤的NSG小鼠在第7-11日接受每日i.p.注射替莫唑胺(Temozolomide)(1mg/剂),并在第7日和第17日静脉内输注: $2 \times 10^6$ 人T-细胞,所述

人T细胞离体转导了3C10 CAR或模拟物增强型绿色荧光蛋白(EGFP)-载体。在第21日,在所有接受了CAR转导的T细胞的小鼠中均未检测到BLI信号,而对于使用模拟物转导的T细胞处理的小鼠,5只小鼠中4只显示出在替莫唑胺导致的短暂抗肿瘤效应后肿瘤的重新生长。在一个分开的实验中,在第21日处死用CAR-T-细胞处理的小鼠,使用生物素-缀合的抗F(ab')<sub>2</sub>mAb(特异于3C10CAR)和链霉亲和素-藻红素(PE),通过免疫组织化学评价CAR转达的T-细胞的浸润。基于强PE信号,i.v.输注的CAR-T-细胞表现出对肿瘤的强浸润,而用链霉亲和素-PE染色但未使用抗F(ab')<sub>2</sub>mAb的对照组织仅显示出背景信号。

[0375] 以下是用于这些实验的材料和方法。

[0376] 材料和方法

[0377] NSG小鼠模型

[0378] 最近建立了免疫缺陷性NOD/scid/ $\gamma$  cnull(NSG)小鼠群体。NSG小鼠缺少T和B细胞、自然杀伤细胞,也具有受损的树突细胞功能。已经证实,植入活化的T细胞在NSG小鼠中比在以前的NOD/scid/ $\beta$ 2Mnull小鼠模型中更优。因此,使用NSG模型用于人异种移植实验。

[0379] 该生物学系统的结构和特征

[0380] 尽管针对EGFRvIII的许多单克隆和多克隆抗体与野生型EGFR或其它非特异蛋白具有交叉反应性,但单克隆抗体(mAb)3C10(最初通过以包括EGFRvIII特异性融合连接处的14个氨基酸肽免疫小鼠而开发)显示出对EGFRvIII的高度特异性识别,而对野生型EGFR具有可忽略的可检测结合(Okamoto et al.,1996Br J Cancer 73:1366-1372)。研究级慢病毒载体用于该T细胞转导。

[0381] 用于小鼠输注的细胞制备物

[0382] 输注给小鼠的细胞是人T细胞。通过在健康自愿者供体上实施白细胞单采术,由宾夕法尼亚大学人类免疫学中心获得富集人单个核细胞的单采血液成分术产品。所有样本根据大学机构评审委员会批准的程序收集,并从每个供体获得书面知情同意书。使用RosetteSep人T细胞富集混合物(Stemcell Technologies,Vancouver,Canada),对T细胞实施负选择。将T细胞转移到TRP实验室,在此用研究级CD3/28珠激活并在含谷氨酰胺、10%FBS、20mM Hepes、100U/ml青霉素和100ug/ml链霉素的RPMI中扩增。24小时后进行载体转导,其中将包装的慢病毒载体直接加至活化的培养物中。在第5日使细胞脱离珠子,用Coulter Multisizer 3(Beckman Coulter,Fullerton,CA)就大小(f1)和总细胞计数的改变而监测扩增,维持0.7E6至2E6细胞/ml的浓度。以山羊抗小鼠抗体(GAM,针对3C10基CARs)或山羊抗人抗体(GAH,针对139基CAR)染色,通过流式细胞术,检测CAR转导的T细胞的转导效率。在研究的第0日,通过尾静脉,每只小鼠输注1百万CAR<sup>+</sup>T细胞。

[0383] 替莫唑胺(TMZ)处理

[0384] 携带i.c.U87-EGFRvIII肿瘤并在第0日接受CAR<sup>+</sup>T细胞的小鼠,随后在第0-4日(5日每日)接受腹膜内(i.p.)注射TMZ:TMZ以6.67mg/ml溶解在DMEM中。每只小鼠通过i.p.注射接受50uL TMZ溶液(333微克/剂;大约17mg/kg/剂)。

[0385] 临床级CART

[0386] 在临床细胞和疫苗生产设施(CVPF)中制备CART-EGFRvIII T细胞,该细胞产品是自体T淋巴细胞。从白细胞单采术产品,通过对流离心淘洗,除去单核细胞,从而富集CD3<sup>+</sup>T细胞。在第0日,使用抗CD3/CD28 mAb 包被的磁珠活化富集的T细胞,以开始该生产工艺。使

T细胞培养物接触 EGFRvIII CAR慢病毒载体,并扩增。该T细胞生产工艺始于静态组织培养(第0日至第5日),之后转移到Wave生物反应器中(如需要的话)以在灌流条件下进一步扩增。培养结束后,从细胞中除去磁珠、洗涤、浓缩并冷藏。使用控制速度的冷冻仪,以基于细胞数量的体积(最终浓度为最大  $10^8/\text{ml}$ ),将修饰的T细胞产品冷藏于冷藏袋中。将冷藏的EGFRvIII CAR T细胞产品在 $\leq -130^\circ\text{C}$ 贮存在监控的冷冻机中。现描述实验结果如下。

[0387] 通过CAR-T细胞根除颅内表达EGFRvIII的成胶质细胞瘤

[0388] 成胶质细胞瘤 (GBM) 是最常见且最为恶性的原发性脑肿瘤,GBM在美国每年引起大约12,000例癌症相关死亡。在以化疗(替莫唑胺)和放疗(RT)组合治疗后,GBM患者的平均存活时间短于15个月。以自体T-细胞,尤其是转导了嵌合抗原受体的T-细胞进行的过继性细胞转移(ACT)治疗,已经在近来的血液学癌症试验中展示出希望。以CART细胞进行的ACT可能尤其适用于GBM患者,这是因为相比于通过体内免疫诱导的天然T细胞,可以更好地操作和控制离体制备的细胞的特异性、数量和功能型表型。

[0389] 表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII) 是在人类肿瘤中最常见的 EGFR变体,但在正常组织中罕见。该蛋白由外显子2-7的读框内缺失引起,在EGFR的细胞外结构域中在外显子1和8的连接处产生新的甘氨酸残基,由此形成肿瘤特异性表位。EGFRvIII在24%至67%的GBM中表达,但不在正常组织中表达。

[0390] 为了开发用于GBM的有效CAR治疗,产生了三种靶向EGFRvIII 的新慢病毒CAR构建体。这些构建体各编码来源于EGFRvIII特异性鼠单克隆抗体(mAbs) 3C10、或命名为“139”的EGFRvIII特异性人源化单克隆抗体(mAbs)的单链可变片段(scFv) (图6)。3C10 scFv偶联CD8a铰链、4-1BB和CD3 $\zeta$ 结构域,并带有或不带有CD28跨膜和胞内结构域(分别为3C10BBz28-CAR和3C10BBz-CAR)。139scFv偶联CD8a铰链、4-1BB 和CD3 $\zeta$ 结构域(139BBz-CAR)。转导了这些CAR的人T细胞展示出对表达EGFRvIII的U87人GBM细胞(U87-EGFRvIII) 特异的、有力的裂解;见图7。在脑中携带7日U87-EGFRvIII肿瘤的免疫受损NOD/scid/ $\gamma c$  (-/-) (NSG) 小鼠接受 $1 \times 10^6$ 人T-细胞静脉内输注,其中所述人T细胞离体转导了:1) 139BBz-CAR;2) 3C10BBz-CAR;3) 3C10BBz28-CAR;4) 靶向人 CD19的对照CD19BBz-CAR。这些小鼠在第7日-第11日每日还接受腹膜内注射替莫唑胺(330mcg/剂)。由于U87-EGFRvIII细胞也表达萤光素酶,通过生物萤光成像(BLI),监测肿瘤生长。到第21日,所有仅用盐水处理的小鼠均因快速肿瘤生长而死亡,而无ACT的替莫唑胺治疗抑制但未根除U87-EGFRvIII肿瘤。接受CD19BBz-CAR-T-细胞和替莫唑胺的小鼠表现出对U87-EGFRvIII的一些同种异体反应,但肿瘤在这些小鼠中继续生长。另一方面,在接受139BBz-CAR-, 3C10BBz-CAR-, 或3C10BBz28-CAR-转导的T-细胞的所有小鼠中,到第21日BLI信号减小到基线水平以下,说明全部肿瘤根除(图8)。重要的是,与3C10BBz28或 139BBz CART细胞相比,接受3C10BBz-CART细胞的小鼠更快地清除肿瘤,说明3C10与BBz的组合可能在患者中提供更好的反应。监测肿瘤生长和外周免疫反应,以确定三种EGFRvIII-CAR载体中任一种是否比其它具有更好的长期抗肿瘤效果。

[0391] 本文给出的结果强烈支持,在并行接受替莫唑胺标准护理化疗的GBM 患者中开发使用EGFRvIII靶向性CAR-T-细胞的ACT的I期临床试验。

[0392] 临床设计

[0393] 设计了单臂开放标签探索性研究,以确定CART-EGFRvIII T细胞在 EGFRvIII+新

诊断GBM的患者中的安全性、耐受性和植入可能性。一般,所有个体被给予自体CART-EGFRvIII T细胞。对符合条件的个体实施白细胞单采术,以获得大量外周血单个核细胞(PBMC)用于 CART-EGFRvIII生产。从PBMC纯化T细胞,用人源化3C10-CAR慢病毒转导,体外扩增并以合适剂量的等分试样冷藏。在第0日临在输注前将待输注的细胞在床边融化。

[0394] 规律间隔地对个体进行血液检查至第4周(第28日),以评估CART EGFRvIII细胞的安全性、植入和持久性。在输注后在多个时间评价含有 3C10-CAR载体的循环T细胞亚组,与基线样品比较。在第28日后,通过医疗史、身体检查、脑MRI和血液检查或按照护理标准,每月评价个体直至6个月。

[0395] 在这些就诊的同时实施研究血液检查。在6个月后,每2个月随访患者,持续两年。按照与基因转移研究相关的FDA管理条例所要求的,在2 年时间点后,个体进入滚动式研究,每年通过电话和问卷随访,再持续13 年,以对长期健康问题的诊断,例如新恶性病的出现,进行评价。

[0396] 不受特定理论的限制,据认为,由于EGFRvIII蛋白的高度受限表达,预期不会存在任何类型的脱离肿瘤的在靶T细胞激活。优选地,仅施用一次CART-EGFRvIII输注,并因此预期不会出现过敏型反应。然而,可能遭遇的一种毒性是在肿瘤部位由T细胞活化引起的局外炎症(bystander inflammation)。可以密切监控和管理脑水肿的症状和体征。一些实施方案中,可以通过使用抗炎药,例如类固醇药,治疗由T细胞活化引起的局外炎症。

[0397] 实施例2:共转导miR-17-92增强转导了抗EGFRvIII嵌合抗原受体的T- 细胞在携带人胶质细胞瘤异种移植物的小鼠中的抗肿瘤活性

[0398] miR-17-92表达赋予I型表型,增强T细胞存活。已经报道,miR-17-92 在源自成胶质细胞瘤(GBM)患者的T-细胞中被下调。为了改善使用嵌合抗原受体转导的T-细胞(CAR-T-细胞)过继性转移治疗GBM的功效,构建了一种新的编码miR-17-92和CAR的慢病毒载体(pELNS-3C10-CAR),所述CAR由表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)特异性单链可变片段(scFv)串联地偶联T-细胞受体CD3 $\zeta$ 链信号传导模块和CD137(4-1BB)及CD28 的共刺激基序组成。除了针对稳定表达EGFRvIII的U87 GBM细胞(U87-EGFRvIII)的抗原特异性强细胞毒性活性外,共转导了miR-17-92的 CAR-T-细胞,与无miR-17-92共转导的CAR-T-细胞相比,表现出对转化生长因子(TGF)- $\beta$ 和替莫唑胺的T细胞抑制效应的提高抵抗性。在携带颅内U87-EGFRvIII异种移植物的小鼠中,具有或不具有转基因来源的 miR-17-92表达的CAR-T-细胞表现出了相似水平的强治疗效果,没有显示出任何不受控的CAR-T-细胞生长。然而,当使用U87-EGFRvIII细胞在脑中再次攻击这些小鼠时,接受共转导的CAR-T-细胞的小鼠,与无 miR-17-92共转导的CAR-T-细胞处理的小鼠相比,显示出了改善的保护作用。这些数据支持,miR-17-92可以整合在CAR中以提高在GBM患者中的功效。

[0399] 现描述实验结果如下:

[0400] 构建编码EGFRvIII-特异性CAR和miR-17-92的慢病毒载体

[0401] 产生了编码CAR的慢病毒载体(pELNS-3C10-CAR),所述CAR通过源自人EGFRvIII-特异性单克隆抗体(mAb) 3C10的单链可变片段(scFv)识别EGFRvIII(见图1A)。在该构建体中,EF-1 $\alpha$ 启动子驱动CAR融合蛋白,所述融合蛋白整合了3C10来源的scFv、CD28跨膜结构域(TM)及 CD28和4-1BB胞内结构域(ICD)和CD3 $\zeta$ 结构域。也使用基于FG12的自失活(SIN)载体构建了慢病毒miR-17-92构建体(FG12-EF1 $\alpha$ -miR-17/92)(见图1B)。在该载体中,EF-1 $\alpha$ 启

动子驱动miR-17-92,人UbiC启动子驱动增强型绿色荧光蛋白(EGFP)标记基因(用于跟踪转导的细胞)。用于方案中的缩写:RSV/HIV-1 5' LTR:杂合RSV启动子-R/U5长末端重复,EF-1 $\alpha$ :人延伸因子1 $\alpha$ -亚基启动子,VH:3C10免疫球蛋白的重链可变区,VL:3C10免疫球蛋白的轻链可变区,HIV-1  $\Delta$ -3' LTR:U3区中具有缺失的自失活3'长末端重复;CMV/HIV-1 5' LTR:杂合CMV启动子-R/U5长末端重复,UbiC:泛素C启动子。

[0402] 体外表征转导了CAR和miR-17-92的人T-细胞

[0403] 用pELNS-3C10-CAR转导健康供体来源的CD3<sup>+</sup> T-细胞,并且针对3C10-CAR和miR-17-92的表达,利用流式细胞术,分别通过抗小鼠(Fab')<sub>2</sub>抗体和EGFP,评价这些细胞的转基因表达水平(图2A,左)。使用特异于人T细胞上的3C10来源的scFv的抗小鼠F(ab')<sub>2</sub>Ab,检测到了近一半(48.9%)的T细胞在其表面表达3C10来源的scFv。

[0404] 为了获得表达CAR和转基因来源的miR-17-92两者的人T细胞,通过顺序感染pELNS-3C10-CAR和FG12-EF1 $\alpha$ -miR-17/92,以这两种慢病毒载体共转导CD3<sup>+</sup> T-细胞。用pELNS-3C10-CAR最初转导后24小时,用FG12-EF1 $\alpha$ -miR-17-92转导T-细胞。观察到,总T细胞中大约四分之一(23.6%)表达CAR和EGFP两者(图2A,右)。对于随后的体外研究,使用生物素化的抗小鼠F(ab')<sub>2</sub>Ab和抗生物素MACS,富集了CAR转导的T-细胞(CAR-T-细胞)。基于共转导效率(图2A,右),至少50%的该CAR-T-细胞也表达EGFR(由此转基因来源的miR-17-92)。通过实时PCR,与转导单独CAR的T细胞相比,在F(ab')<sub>2</sub>Ab富集的、miR-17-92共转导的CAR-T-细胞中检测到了高3-4倍的miR-17-92表达(图2B)。图2B显示了通过qRT-PCR测量到的、该miR-17-92簇成员(miR-17-3p, miR-17-5p和miR-92a-1)在转导的T细胞中的表达水平。描述来自具有相似结果的三个实验之一的3个重复测量的平均值 $\pm$ SD值。\*指示使用t检验在两组之间p<0.05。图2C描述转导的T细胞的EGFRvIII特异性细胞毒性活性,其中针对<sup>51</sup>Cr标记的U87-EGFRvIII或对照U87细胞,以各种E:T比例,通过12-h <sup>51</sup>Cr释放试验评价了该细胞毒性活性。对照细胞是模拟物(EGFP)转导的T-细胞。值指示在三个重复孔中的平均值 $\pm$ SD。

[0405] 尽管模拟物转导的T-细胞仅显示了对亲本U87(EGFRvIII阴性)和U87-EGFRvIII细胞两者的背景水平裂解,但是用CAR转导的T细胞表现出了对EGFRvIII表达性U87人GBM细胞(U87-EGFRvIII)的强特异性裂解,以及对亲本U87细胞的仅背景水平细胞毒性效应(图2C)。在这些12h <sup>51</sup>Cr-释放试验中,miR-17-92共转导CAR-T-细胞不显著增强其对U87-EGFRvIII靶细胞的特异性细胞毒性活性。

[0406] miR-17-92共转导赋予增强的IFN- $\gamma$ 释放和对TGF- $\beta$ 和替莫唑胺(TMZ-标准护理治疗)引起的抑制效应的增强抗性

[0407] 在以前的研究(Sasaki et al.,2010,J.Transl Med 8:17)中,与来源于野生型小鼠的对应物相比,来自miR-17-92转基因小鼠的CD4<sup>+</sup> T细胞表现出了增强的IFN- $\gamma$ 产生;并且用miR-17-92转染人Jurkat T细胞导致对活化诱导的细胞死亡(AICD)的增强抗性。

[0408] 进行实验,以评价在细胞暴露于化疗剂TMZ或免疫抑制性细胞因子TGF- $\beta$ 时,用miR-17-92共转导CAR-T-细胞是否可以赋予增强的IFN- $\gamma$ 产生、细胞增殖、和较低程度的细胞凋亡性死亡。

[0409] 当用EGFRvIII转导的人工抗原呈递细胞(aAPCs)在无TGF- $\beta$ 或TMZ的情况下刺激CAR-T-细胞时,细胞在有或无共转导的情况下表达相似水平的IFN- $\gamma$ 。然而,当细胞暴露于

渐增剂量的TGF- $\beta$ 或TMZ时,无 miR-17-92共转导的CAR-T-细胞产生了显著降低水平的IFN- $\gamma$ ,而共转导的CAR-T-细胞维持了高水平的IFN- $\gamma$ 产生(图3A)。空心柱和实心柱分别代表来自CAR-T-细胞(无miR-17-92)和miR-17-92共转染的CAR-T细胞的结果。图3A显示在96h共培养的最后24小时期间由转导的T细胞产生的IFN- $\gamma$ 。图3B显示,在该3天共培养过程之后通过WST1试验评价了两组之间的相对增殖水平。图3C和3D显示通过膜联蛋白-V和PI评价的CAR-T-细胞的细胞凋亡性死亡。图3C显示暴露于TMZ的CAR-T-细胞上膜联蛋白-V的平均荧光强度。值表示三个重复孔中的平均值 $\pm$ SD(\*表示 $P<0.05$ )。图3D显示在具有相似结果的三个实验之一中膜联蛋白-V+和/或PI+的流式细胞术图。

[0410] 进行实验,评价miR-17-92共转导在培养物中存在TMZ时对CAR-T-细胞增殖的影响。设计实验,用表达EGFRvIII的aAPC诱导CAR-T-细胞增殖,通过WST-1试验评价增殖(图3B)。无TMZ时,与对照CAR-T-细胞相比,miR-17-92-共转导的CAR-T-细胞表现出了更快增殖速率的趋势,但差异不显著。为了具体评价TMZ对CAR-T-细胞增殖的影响,在图3B中,相对于无TMZ时相同细胞的增殖,描述了每个组中细胞的增殖速率。当培养物中加入递增浓度的TMZ时,与对照CAR-T细胞相比,miR-17-92共转导的CAR-T-细胞中生长抑制程度显著更小。

[0411] 进行实验,评价miR-17-92共转导是否使得CAR-T-细胞更抵抗TMZ诱导的细胞凋亡。为此,在递增浓度TMZ中对膜联蛋白V<sup>+</sup>和碘化丙啶(PI)<sup>+</sup>CAR-T细胞进行流式细胞术评价(图3C和3D)。观察到早期细胞凋亡的细胞(膜联蛋白V<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>)、细胞凋亡/坏死的细胞(膜联蛋白V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>)和坏死的细胞(膜联蛋白V<sup>-</sup>PI<sup>+</sup>)的剂量依赖性增加,miR-17-92-共转导的CAR-T-细胞显示出比对照CAR-T-细胞较低程度的细胞凋亡改变。

[0412] 静脉内注射CAR-T-细胞组合TMZ在NSG小鼠中导致完全消除建立的U87-EGFRvIII肿瘤

[0413] 进行实验,评价在携带有建立的(7日)颅内U87-EGFRvIII肿瘤的免疫受损NOD/scid/ $\gamma$ c(-/-)(NSG)小鼠中CAR-T-细胞的功效。小鼠通过尾静脉接受单次静脉内(i.v.)输注miR-17-92共转导的CAR-T-细胞、未共转导miR-17-92的CAR-T-细胞、或模拟物转导的T-细胞( $2 \times 10^6$ /小鼠)。由于新诊断的GBM患者常规接受TMZ治疗,故设计实验,自T细胞输注之日起5天每天腹膜内注射TMZ(图4A)。图4B显示Kaplan-Meier分析。与使用模拟物转导的T细胞相比,用CAR-T细胞(有或无miR-17-92共转导)处理的小鼠的平均存活显著更高( $p<0.05$ )。TMZ治疗本身没有效果,所有接受TMZ和模拟物转导的T-细胞的对照小鼠均在T细胞输注后3周(第21天)内死亡(图4B)。尽管用CAR-T-细胞的5只小鼠中一只小鼠以及用miR-17-92共转导的CAR-T-细胞的5只小鼠中两只小鼠到22日死于肿瘤进展,但是这些组中所有其它小鼠均存活超过40天。结果来自具有相似结果的两个独立实验之一。接受miR-17-92-共转导的CAR-T-细胞的小鼠与接受无miR-17-92共转导的CAR-T-细胞的小鼠在存活上没有统计学显著差异(对数秩检验(Log-rank test): $p=0.5485$ )。

[0414] miR-17-92共转导的CAR-T-细胞在小鼠中赋予对抗U87-EGFRvIII肿瘤的持久保护作用

[0415] 为了确定图4所示实验中输注给小鼠的CAR-T-细胞是否可以向宿主提供抵抗U87-EGFRvIII肿瘤的长期保护作用,在第49天对存活者在脑的对侧半球中接种U87-EGFRvIII细胞以实施再次攻击(图5)。尽管在CAR-T-细胞处理的所有三只小鼠中再次攻击的肿瘤细胞

均生长,但是以 miR-17-92-共转导的CAR-T-细胞处理的小鼠无一显示出超过背景水平的 BLI信号。这些结果强烈地提示,miR-17-92簇的共转导赋予CAR-T-细胞长期持久性,由此向宿主提供对抗肿瘤生长的延长保护作用。自2个小鼠组纵向测量的肿瘤来源的平均光子通量 $\pm$ SD。基于在未携带肿瘤的小鼠中观察到的水平确定背景荧光水平(不超过 $10^3$ p/s),其中平行地对所述小鼠与处理组中携带肿瘤的小鼠获取图像。

[0416] miR-17-92可以整合在CAR中以改善功效

[0417] 在此给出的结果说明,在转导了新抗EGFRvIII-CAR (3C10-CAR) 的 T-细胞中共表达miR-17-92的效果,其中所述3C10-CAR整合了3C10 scFv 和CD3 $\zeta$ 链、CD137 (4-1BB) 及CD28。本结果显示,miR-17-92的共表达赋予T细胞对TGF- $\beta$ 和替莫唑胺的生长抑制效应的增强抗性。在体内,与 3C10-CAR单独转导的T细胞相比,共转导3C10-CAR和miR-17-92的 T-细胞表现出了更持久的治疗效果。

[0418] 在本研究中miR-17-92的慢病毒转导赋予miR簇在转导的T-细胞中异位过表达。然而,在生理学条件下,T细胞中内源miR-17-92的表达水平表现出受到严密调节。在人CD8<sup>+</sup> T细胞中,在幼稚细胞中检测到高水平miR-17-92表达,但随着细胞分化,miR-17-92表达减少(Salaun et al., 2011, J Transl Med 9:44)。在淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒感染的小鼠模型中,miR-17-92在T细胞活化后被强上调,然而在克隆性扩增后被下调,并进一步在记忆发展过程中被沉默(Wu et al., 2012, Proc Natl Acad Sci USA 109:9965-9970)。在该文献研究中,miR-17-92是快速T细胞扩增及其IFN- $\gamma$  表达所需的。然而,miR-17-92过表达会造成朝向短寿终末效应细胞的分化。miR-17-92下调失败可以导致记忆细胞的逐渐丧失和缺陷性中央记忆细胞(central memory cell)发育(Wu et al., 2012, Proc Natl Acad Sci USA 109:9965-9970)。这些观察结果不一定与本文给出的结果相符,因为观察到miR-17-92-共转导的CAR-T-细胞的持久性及其有效保护宿主抵抗再攻击的U87-EGFRvIII细胞的能力。不受任何特定理论的约束,据认为该观察结果可归因于在CAR中提供的共刺激分子和miR-17-92的组合效应。

[0419] 尽管miR-17-92已经被描述为致癌miR(van Haaften and Agami, 2010, Genes & Development 24:1-4),但已知miR-17-92过表达本身在淋巴细胞中不具有致癌性(Xiao et al., 2008, Nat Immunol 9:405-414)。事实上,在目前的研究中没有观察到miR-17-92-转导的T-细胞的不受控增殖。然而,作为获得更好安全性保证的备选方案,用miR-17-92本身瞬时转导T细胞(而非慢病毒稳定转移)和多次注射这些T细胞,可能是一种不涉及整合病毒载体相关安全问题的合理方案。

[0420] 就EGFRvIII靶向性CAR治疗GBM而言,近来Morgan等人评价了在 $\gamma$ -逆转录病毒CAR中来源于七种不同抗EGFRvIII mAbs (包括3C10和人139)的scFv序列(Morgan et al., 2012, Hum Gene Ther 23:1043-1053)。对这些CAR的体外表征显示,3C10和139是响应EGFRvIII表达性靶细胞(而非表达野生型EGFR基因的细胞)造成特异性IFN- $\gamma$  产生的三个克隆中的两个。

[0421] 此外,重要的是,认识到甚至在“EGFRvIII阳性”病例中EGFRvIII 仅在GBM患者群体和部分GBM细胞中表达(Heimberger et al., 2005, Clin. Cancer Res. 11:1462-1466)。将EGFRvIII作为唯一靶标的靶向性免疫治疗可能导致已经下调了该免疫治疗所靶向的抗原的GBM细胞的过度生长(Sampson et al., 2010, J Clin Oncol 28:4722-4729)。许多先前

的研究已经开发了针对GBM相关抗原的CAR,所述GBM抗原为例如IL-13R $\alpha$ 2 (Kong et al., 2012, Clin Cancer Res 18:5949-5960; Kahlon et al., 2004, Cancer Res. 64:9160-9166), HER-2 (Ahmed et al., 2010, Clinical Cancer Research 16:474-485) 和 EphA2 (Chow, K.K. et al. 重定向于EphA2的T 细胞用于成胶质细胞瘤的免疫治疗. Mol Ther (2012)。不希望受任何特定理论的约束,据认为,有效CAR治疗应当最终使用能够抵抗GBM诱导的抑制机制并靶向多重抗原的T细胞,由此输注的T细胞可以针对具有异质性抗原表达谱的GBM表现出有效且持久的治疗效果。

[0422] 本文给出的结果说明,使用pELNS-3C10-CAR和 FG12-EF1a-miR-17/92共转导的T-细胞的益处。作为实现CAR和 miR-17-92转基因共表达的一个备选方案,构建了将3C10-CAR基因和 miR-17-92基因两者表达为单个转录物的基于pELNS的慢病毒载体。相比基于双载体的方案,使用该单“串联”载体,可以在相对简单的转导程序和直接的调节过程方面具有优势。此外,表达CAR的所有T细胞应也表达 miR-17-92。然而,发现,该“串联”载体的转导效率低于双载体方法的效率,这可能是因为:慢病毒滴度随着插入片段大小的增加而降低。如本文其它地方讨论的,3C10-CAR基因的慢病毒转导和miR-17-92的电穿孔相组合可能是可行策略。

[0423] 在本研究中,还发现,40%至60%的CD3<sup>+</sup>CAR-T-细胞是CD4<sup>+</sup>,并且CD4<sup>+</sup>CAR-T-细胞以EGFRvIII特异性方式有效裂解U87-EGFRvIII 细胞。已经报道,穿孔蛋白<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T-细胞通过穿孔蛋白/粒酶B途径,而非Fas/FasL途径,介导细胞毒性活性 (Porakishvili et al., 2004, Haematologica 89:435-443)。因此,据信,在本研究中CD4<sup>+</sup>CAR-T-细胞表达穿孔蛋白和粒酶B以介导观察到的针对U87-EGFRvIII细胞的裂解活性。

[0424] 总之,目前的研究为评价整合miR-17-92的CAR治疗提供了坚实的基础。

[0425] 实施例3:CAR序列

[0426] 鼠单克隆抗体 (mAb) 3C10最初通过用包括EGFRvIII特异性融合连接处的14个氨基酸肽 (PEP3) 免疫小鼠而产生,该抗体显示出高度特异性地识别EGFRvIII,而对野生型EGFR无任何可检测的结合 (Okamoto et al, British J.Cancer 1996, 73:1366-1372)。随后,产生mAb 3C10的单链可变片段 (scFv), 获得3C10 scFv的cDNA。尽管原始mAb的亲合性和/或抗原特异性在scFv形式中可能常常丧失,但3C10 scFv保持了其与EGFRvIII 特异性表位的选择性反应性 (Nakayashiki et al., Jpn.J.Cancer Res. 2000, 91:1035-1043)。

[0427] 通过将3C10scFv (小鼠) 与CD28、4-1BB和CD3 $\zeta$ 克隆到pELNS慢病毒主链质粒中,构建了EGFRvIII CAR (EF1启动子)。通过将3C10scFv 克隆到CD8a铰链/CD8TM/4-1BB/CD3 $\zeta$  pELNS慢病毒主链中,构建了另一EGFRvIII CAR (通过EF1a启动子表达)。

[0428] 3C10scFv-CD28BBzeta CAR (氨基酸) (SEQ ID NO:1)

- MALPVTALLPLALLLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDY  
YIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPENDETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTS  
EDTAVYYCAFRGGVYWGP GTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSHMDVVMQTQSPL  
TLSVAIGQSASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDSGVPDRFTG  
[0429] SGGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGT HFPGT FGGG TKLEIKASTTTPAPR  
PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVGGVLACYSL  
LVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKR  
GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ  
GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA  
YSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0430] 3C10scFv-BBz CAR (氨基酸) (SEQ ID NO:2)  
MALPVTALLPLALLLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIE  
DYIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPENDETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSE  
DTAVYYCAFRGGVYWGP GTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSHMDVVMQTQSPL  
TLSVAIGQSASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDSGVPD  
[0431] RFTGSGGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGT HFPGT FGGG TKLEIKASTTTPAPR  
PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL  
VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP  
AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK  
MAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0432] 3C10scFv-CD28BBzeta CAR (核酸) (SEQ ID NO:18)

[0433]

atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccgggatccgagattcagctgcag  
caatctggggcagaacttgtgaagccaggggcctcagtcagctgctcctgcacagggtctggcttcaacattgaagactactatat  
tactgggtgaagcagaggactgaacaggcctggaatggattggaaggattgatcctgagaatgatgaactaaatatggccc  
aatattccagggcagggccactataacagcagacacatcctccaacacagtctacctgcaactcagcagcctgacatctgagga  
cactgccgtctattactgtgccttgcgggtggagtctactgggggccaggaaccactctcacagtctcctcaggagggtggtggtccggt  
ggtggtggtccggagggtggtggttcacatatggatggtgatgacccagtcctcactcactctatcggttgccattggac  
aatcagcctccatctcttgaagtcaagtcagagcctcttagatgtagtgaaagacatattgaattggtgttacagaggccagccagt  
ctccaaagcgcctaattctctgtgtctaaactggactctggagtcctgacagggtcactggcagtggatcagggac  
agatttcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggattgggaattattattgctggcaagggtacacatttctgggacgtt  
cggtggaggggaccaagctggagataaaagctagcaccacgacgccagcggcgaccaccaacaccggcgcccaccatcg  
cgtcgcaagccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcggggggcgcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgt  
gattttgggtgctggtggtggtggtggagtcctggcttgcctatagcttgcctagtaacagtggcctttattatttctgggtg  
aggagtaagaggagcaggctcctgcacagtactacatgaacatgactccccggcccccggggccaccgcaagcattacc  
agccctatgccccaccacgcgacttcgacgcctatcgtccaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatt  
tatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaaggaggatgtgaactga  
gagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagag  
aggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaacctt  
caggaaaggcctgtacaatgaactgcagaaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcggcg  
aggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacgccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccc  
tgccccctcgc

[0434] 3C10scFv-BBz CAR (核酸) (SEQ ID NO:19)

Atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccgggatccgagattcagctgca  
gcaatctggggcagaacttgtgaagccaggggcctcagtcagctgctcgcacaggttctggcttaacattgaagactactat  
attcactgggtgaagcagaggactgaacagggcctggatggattggaaggattgatcctgagaatgatgaaactaaatatggc  
ccaatattccagggcagggccactataacagcagacacatctccaacacagtctacctgcaactcagcagcctgacatctgaggacact  
gccgtctattactgtgcctttcgcggtggagtctactgggggccagggaaccactctcacagtctcctcaggaggtggtg  
gttcgggtggtggtggtccggaggtggtggttcacatatggatgttgatgacccagtctccactactctatcggttgccattg  
gacaatcagcctccatctcttgaagtaagtcagagcctcttagatagtgatgaaagacatattgaattggtgttacagaggc  
caggccagtctccaagcgcctaattctcttggtgtctaaactggactctggagtcctgacaggttactggcagtggtacagg  
gacagattcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggattgggaattattattgctggcaaggtacacatttctgggacgttcg  
gtggaggggaccaagctggagataaaagctagcaccacgacgccagcggcgaccaccaacaccggcgccccc  
atcgcgtcgcagcccctgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcggcgggggcgagtgacacagagggggctgg  
acttcgctgtgatatctacatctgggcgcccttgccgggacttgggggtccttctcctgtcactggttatcaccctttactgaa  
acggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagagggaagatggctgtagc  
tgccgatttccagaagaagaagaaggaggtgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcaggg  
ccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccggg  
accctgagatggggggaaagccgagaagggaagaaccctcagggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcc  
tacagtgagattgggatgaaggcgagcggcgaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaagga  
cacctacgacgcccttcacatgcagggcctgccccctcgc

[0436] 称作“139”的scFv片段是抗EGFRvIII人抗体(Morgan et al., 2012 Hum Gene Ther 23 (10):1043-53)。包含139scFv的EGFRvIII CAR通过如下产生:最先合成139scFv。将139scFv的序列和前导序列、CD8铰链、跨膜(TM)结构域、及期望的信号传导结构域克隆在一起。例如,将139scFv的序列和4-1BB及CD3ζ的信号传导结构域克隆在一起。从pELNS载体表达该CAR构建体(139scFv-BBZ)用于慢病毒生产。

[0437] 139scFv-BBz CAR(氨基酸)(SEQ ID NO:3)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNNL  
AWYQQKPGKAPKRLIYAASNLSGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLQPEDFATYYC  
LQHHSYPLTSGGGTKVEIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQVLES GGGLVQPGGSLR  
LSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTNYADSVKGRFTISR  
D  
[0438] NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSSGWSEYWGQGLTVTVSSASTTTPAPRP  
PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLV  
ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA  
YKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM  
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0439] 139scFv-BBz CAR(核酸)(SEQ ID NO:20)

[0440] Atggccttaccagtgaccgccttgctcctgcccgtggtgctgctccacgccgccaaggccgggatccgacatccagatgaccaga  
gccttagcagcctgagcgccagcgtgggagacagagtaccatcacctgtcgggccaaggccatcagaaca  
acctggcctggtatcagcagaagcccggcaaggccccaagagactgatctacgctgccagcaatctgcagagcggcgtgcc  
cagcagattcaccggagcggctccggcaccgagttcacctgatcgtgtccagcctgcagcccaggacttcgccactact  
actgcctgcagcaccacagctacctctgaccagcggcggaggcaccgaaggtggagatcaagcggaccggcagcaccagc  
ggcagcggcaagcctggcagcggcgagggaagcgaggtccaggtgctggaatctggcggcgactggtgcagcctggcggcagc  
ctgagactgagctgtgccgccagcggcttcaccttcagcagctacgccatgtcttgggtccggcaggtcctggaag  
ggcctggaatgggtgtccgccatcagcggctctggcggtccaccaactacgccgacagcgtgaaggccgggttcacatcagccgg  
gacaacagcaagaacacctgtatctgcagatgaacagcctgagagccgaggacaccgccgtgtactactgtccgg  
cagcagcgggtggagcgagtactggggccagggcacactggtcacagtgtctagcgtagcaccacgacgccagcggc  
gaccaccaacaccggcggccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcggcggggg  
cgcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtgggtccttctctgtactg  
gttatccctttactgcaaacggggcagaaagaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaaggaga  
agatggctgtagctgccgatttcagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgc  
gtacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgg  
gacctgagatggggggaaagccgagaaggaaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaaataagatggcggagg  
cctacagtgagattgggatgaaaggcagcggcggaggggcaaggggcacgatggcctttaccaggggtctcagtacagccaccaag  
gacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgt

[0441] CAR组分

[0442] 核酸序列:

[0443] .3C10 scFv核苷酸序列(小鼠)(SEQ ID NO:4)

[0444] GAGATT CAGCTGCAGCAATCTGGGGCAGAACTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCA  
AGCTGTCCTGCACAGGTTCTGGCTTCAACATTGAAGACTACTATATTCCTGAGGTTG  
AAGCAGAGGACTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGAAGGATTGATCCTGAGAATG  
ATGAAACTAAATATGGCCCAATATTCCAGGGCAGGGCCACTATAACAGCAGACAC  
ATCCTCCAACACAGTCTACCTGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCG  
TCTATTACTGTGCCTTTCGCGGTGGAGTCTACTGGGGGCCAGGAACCACTCTCACA  
GTCTCCTCAGGAGGTGGTGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCGGAGGTGGTGGTTCACA  
TATGGATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCACTCTATCGGTTGCCATTGGACAATC  
AGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACAT  
ATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTCTCTG  
GTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGAC  
AGATTTCACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAATTTATTATT  
GCTGGCAAGGTACACATTTTCTGGGACGTTCCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGAT  
AAAA

[0445] .139scFv核苷酸序列(人源化)(SEQ ID NO:5)

- GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG  
TGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGAAACAACCTGGCCTGGTATCA  
GCAGAAGCCCCGCAAGGCCCCCAAGAGACTGATCTACGCTGCCAGCAATCTGCAG  
AGCGGCGTGCCAGCAGATTACCGGAAGCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGA  
TCGTGTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGCACCAC  
AGCTACCCTCTGACCAGCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGGCA  
[0446] GCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGAAGCGAGGTCCAGGTGCT  
GGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCC  
GCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGTCTTGGGTCCGGCAGGCTCCTGG  
AAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCGGCTCTGGCGGCTCCACCAACTAC  
GCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCC  
TGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC  
GGCAGCAGCGGTGGAGCGAGTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTA  
GC
- [0447] .前导序列(核酸序列):(SEQ ID NO:6)  
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
- [0448] CGCCAGGCCG
- [0449] .铰链(核酸序列):(SEQ ID NO:7)  
ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGC
- [0450] AGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT  
GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT
- [0451] .跨膜(核酸序列):(SEQ ID NO:8)  
ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACT
- [0452] GGTTATCACCCCTTTACTGC
- [0453] .4-1BB胞内结构域(核酸序列):(SEQ ID NO:9)  
AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC
- [0454] CAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAGAAGA  
AGAAGGAGGATGTGAACTG
- [0455] .CD3 $\zeta$ (核酸序列):(SEQ ID NO:10)  
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAG  
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT  
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
- [0456] AGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG  
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGC  
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC  
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

- [0457] .CD3 $\zeta$  (核酸序列;NCBI参考序列NM\_000734.3) : (SEQ ID NO:100)  
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAG  
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT  
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
- [0458] AGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG  
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC  
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC  
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
- [0459] 氨基酸序列:
- [0460] .3C10 scFv氨基酸序列(小鼠) (SEQ ID NO:11)  
EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHVVVKQRTEQGLEWIGRIDPEN  
DETKYGPFIQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDYAVYYCAFRGGVYWGPGTTL
- [0461] TVSSGGGGSGGGSGGGSGHMDVVMQTSPLTSLVAIGQSASISCKSSQSLDSDG  
KTYLNWLLQRPQSPKRLISLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGI  
YYCWQGFTHFPQTFGGGTKLEIK
- [0462] .139scFv氨基酸序列(人) (SEQ ID NO:12)  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNNLAWYQQKPGKAPKRLIYAASNQ  
SGVPSRFTGSGSGTEFTLVSSLQPEDFATYYCLQHHSYPLTSGGGTKVEIKRTGS
- [0463] TSGSGKPGSGEGSEVQVLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP  
GKGLEWVSAISGSGGSTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY  
CAGSSGWSEYWGQGTLVTVSS
- [0464] .前导序列(氨基酸序列) : (SEQ ID NO:13)
- [0465] MALPVTALLPLALLHAARP
- [0466] .铰链(氨基酸序列) : (SEQ ID NO:14)
- [0467] TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
- [0468] .跨膜(氨基酸序列) : (SEQ ID NO:15)
- [0469] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
- [0470] .4-1BB胞内结构域(氨基酸序列) : (SEQ ID NO:16)
- [0471] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
- [0472] .CD3 $\zeta$ 结构域(氨基酸序列) : (SEQ ID NO:17)  
RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
- [0473] GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
- [0474] .CD3 $\zeta$ 结构域(氨基酸序列;NCBI参考序列NM\_000734.3) : (SEQ ID NO:99)  
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
- [0475] GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
- [0476] 编码多肽SEQ ID NO:11的核苷酸提供为SEQ ID NO:4。编码多肽SEQ ID NO:12的

核苷酸提供为SEQ ID NO:5。编码多肽SEQ ID NO:13 的核苷酸提供为SEQ ID NO:6。编码多肽SEQ ID NO:14的核苷酸提供为 SEQ ID NO:7。编码多肽SEQ ID NO:15的核苷酸提供为SEQ ID NO:8。编码多肽SEQ ID NO:16的核苷酸提供为SEQ ID NO:9。编码多肽SEQ ID NO:17提的核苷酸供为SEQ ID NO:10。编码多肽SEQ ID NO:1的核苷酸提供为SEQ ID NO:18。编码多肽SEQ ID NO:2的核苷酸提供为SEQ ID NO:19。编码多肽SEQ ID NO:3的核苷酸提供为SEQ ID NO:20。编码多肽SEQ ID NO:99的核苷酸提供为SEQ ID NO:100。

[0477] 实施例4:EGFRvIII CAR的预测CDR确定

[0478] 根据Kabat,EGFRvIII CAR的预测CDR确定如下:

• VH:

[0479] **EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPEN  
DETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSED TAVYYCAFRGGVYWGP GTT  
LTVSS; (SEQ ID NO: 21);**

[0480] 其中CDR1是DYYIH (SEQ ID NO:22) ,CDR2是RIDPENDETKYGPI FQG (SEQ ID NO:23) ,  
CDR3是RGGVY (SEQ ID NO:24) 。

• VL:

[0481] **DVVM TQSPLTLSVAIGQSASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLISL  
VSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGTHFP GTTFGGG TKLEIK;  
(SEQ ID NO: 25);**

[0482] 其中CDR1是KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:26) ,CDR2是 LVSKLDS (SEQ ID NO:  
27) ,CDR3是WQGTHFP GT (SEQ ID NO:28) 。

[0483] 根据Chothia,EGFRvIII CAR的预测CDR确定如下:

• VH:

[0484] **EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPEN  
DETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSED TAVYYCAFRGGVYWGP GTT  
LTVSS; (SEQ ID NO: 29);**

[0485] 其中CDR1是GFNIEDY (SEQ ID NO:30) ,CDR2是DPENDE (SEQ ID NO:31) ,CDR3是  
RGGVY (SEQ ID NO:32) 。

• VL:

[0486] **DVVM TQSPLTLSVAIGQSASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLISL  
VSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGTHFP GTTFGGG TKLEIK;  
(SEQ ID NO: 33);**

[0487] 其中CDR1是SQSLLDSDGKTY (SEQ ID NO:34) ,CDR2是LVS (SEQ ID NO:35) ,CDR3是  
GTHFP G (SEQ ID NO:36) 。

[0488] 实施例5:鼠抗EGFRvIII抗体的人源化

[0489] 鼠EGFRvIII抗体的人源化对于临床环境是期望的,在此小鼠特异性残基可能在接  
受鼠CAR构建体转导的T细胞治疗的患者中诱导人抗小鼠抗原 (HAMA) 反应。自公开的文献  
(Morgan et al.(2012) Human Gene Therapy,23:1043-1953,Supra) 提取杂交瘤来源的鼠

EGFRvIII抗体的 VH和VL序列。通过将来自鼠EGFRvIII抗体的CDR区嫁接到人种系受体构架VH1\_1-f或VH5\_5a以及VK2\_A17或VK4\_B3 (vBASE数据库) 上,进行人源化。除了CDR区外,保留了来自鼠序列的几个构架残基,即VK2#36,#49,VK4#2,#36,#46,#49,VH1#2,#24,#76,#94和VH5#2,#24,#73,#76,#94,这些残基被认为支持CDR区的结构完整性。此外,人 J元件JH6和JK4分别用于重链和轻链。所得的人源化抗体的氨基酸序列命名为:对于轻链,VK2\_A17/Hz1和VK4\_B3/Hz1;对于重链,VH1\_1-f/Hz1,VH5\_5-a/Hz1,见图9中所示。残基编号根据Kabat (Kabat E.A.et al,1991,同上引文)。对于CDR定义,使用了Kabat以及Chothia (1987引文同上)。自小鼠EGFRvIII保留的构架残基以加框粗体/斜体显示,而CDR残基加下划线。

[0490] 基于图9中所示人源化轻链和重链序列,使用了总共8种构架组合,以产生可溶性scFv用于进一步验证。VL和VH结构域出现在scFv中的顺序是可变的(即,VL-VH,或VH-VL取向),使用了4个拷贝的“G<sub>4</sub>S”亚单位(SEQ ID NO:37)连接这些构架,其中每个亚单位包含序列GGGGS (SEQ ID NO:37)。图9公开了根据Kabat等和Chothia等(同上引文)计算的VH和VL序列中的CDR。

[0491] 克隆:

[0492] 获得编码小鼠和人源化VL和VH结构域的DNA序列,对构建体的密码子进行优化以用于在来自智人(Homo sapiens)的细胞中表达。

[0493] 将编码VL和VH结构域的序列亚克隆到适于在哺乳动物细胞中分泌的表达载体中。表达载体的元件包括启动子(巨细胞病毒(CMV)增强子-启动子)、利于分泌的信号序列、多腺苷酸化信号和转录终止子(牛生长激素(BGH)基因)、允许附加型复制和在原核细胞中复制的元件(例如,SV40起点和ColE1或本领域已知的其它元件)、以及允许实施选择的元件(氨苄青霉素抗性基因和zeocin标记)。

[0494] 实施例6:表征人源化抗EGFRvIII可溶性scFv片段

[0495] 使用标准分子生物学技术,如上所述产生了可溶性scFv片段。在表征研究中使用这些可溶性scFv,以检查其稳定性、细胞表面表达和结合性质。

[0496] scFv表达和纯化

[0497] 对于每个scFv构建体的转染,用100μg质粒,使用PEI作为转染试剂,以3:1 (PEI:DNA) 比例,转染了大约3e8 293F细胞。在100ml EXPi293 表达培养基(Invitrogen)中,在摇瓶中以37℃、125rpm、8%CO<sub>2</sub>,培养细胞。6天后收获培养物,用于蛋白纯化。

[0498] 3500g离心20分钟,收获293F细胞。收集上清液,通过VacuCap90 PF Filter Unit (w/0.8/0.2μm Super Membrane,PALL) 过滤。将大约400ul Ni-NTA琼脂糖珠(Qiagen)加入上清液。转动混合物并4℃孵育4小时。上样纯化柱,用具有20mM组氨酸的洗涤缓冲液洗涤。用具有300mM组氨酸的500μl洗脱缓冲液,洗脱蛋白。在4℃用PBS缓冲液透析样品过夜。使用nanodrop 2000c,定量蛋白样品。

[0499] 通过FACS测量纯化的scFv与表达人EGFR野生型或EGFRvIII的细胞结合的EC<sub>50</sub>

[0500] 进行以下实验,以证实所有人源化EGFRvIII scFv变体与EGFRvIII 具有相当的结合,但不结合野生型EGFR。

[0501] HEK293F悬浮细胞用野生型hEGFR或hEGFRvIII瞬时转染,转染后2天收获细胞。将大约5e5细胞/孔转移到BD Falcon 96孔板。900rpm (Sorval Legend XT离心机) 离心细胞3分钟。移出上清液。将抗EGFRvIII scFv蛋白样品稀释在具有5%FBS的DPBS中。将样品加入

孔中,混合并孵育1小时。在具有5%FBS的DPBS中洗涤细胞两次。细胞与抗poly His PE (R&D) 一起孵育1小时,洗涤两次,之后进行FACS分析 (LSRII,来自BD Biosciences)。

[0502] 小鼠scFv (m3C10) 对hEGFRvIII的EC<sub>50</sub>被确定为~5nM,见图10 所示。所有人源化EGFRvIII scFv变体均显示出在一位数到小二位数nM EC<sub>50</sub>范围 (5-50nM) 中的EC<sub>50</sub>值。此外,没有检测到构建体2173和2174 与表达野生型EGFR的细胞系存在明显结合,说明与小鼠3C10相比改善的安全性质,见图11所示。基于这些研究,克隆2173被选择用于进一步临床表征,见实施例8所示。

[0503] 实施例7:人源化EGFRvIII CAR构建体

[0504] 用于最终CAR构建体中的ScFv来源于实施例1中所描述的人源化构架序列。VL和VH结构域在scFv中出现的顺序是可变的(即,VL-VH,或 VH-VL取向)。使用(G4S)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 113) 接头连接可变结构域,以产生表1中所示scFvs。

[0505] 表1:人源化EGFRvIII scFv构建体,其中显示VH和VL取向和接头长度(表公开“G4S”为SEQ ID NO:37)

| 构建体 ID         | 长度 aa | 注释             |
|----------------|-------|----------------|
| 108358         | 277   | VH1-VK4, 4G4S  |
| 108359         | 277   | VK4-VH1, 4G4S  |
| 108360         | 277   | VH5-VK2, 4G4S  |
| 108361         | 277   | VK2-VH5, 4G4S  |
| [0506] 107276  | 277   | VH1-VK2, 4G4S  |
| 111046         | 278   | VH5-VK4, 4G4S  |
| 111048         | 278   | VK4-VH5, 4G4S  |
| 107277         | 277   | VK2-VH1, 4G4S  |
| 107275         |       |                |
| mEGFRvIII 3C10 | 274   | VH-VL, 3G4S+HM |
| EGFRvIII 139   | 269   | VL-VH,         |

[0507] 以下表2中提供人源化scFv片段的序列 (SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:50,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:80)。这些scFv片段与其它序列SEQ ID NOs: 13-17一起用于产生完全CAR构建体(具有SEQ ID NOs:SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:67,SEQ ID NO:73,SEQ ID NO:79和SEQ ID NO:85)。

[0508] 这些克隆均在来源CD3ζ链的共刺激结构域的信号结构域中含有Q/K 残基改变。

[0509] 表2:人源化EGFRvIII CAR构建体

[0510]

| 名称                       | SEQ ID NO: | 序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CAR 1</b>             |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| CAR1<br>scFv<br>结构域      | 38         | eiqlvqsgaevkpgatvkiscksgsfniiedyyihwvqqapgkglewmgridpendet<br>kygpifqgrvtitadtstntvymelsslrstedavyycafrggvywgqgtvtvssgggsg<br>ggsgggsgggsgsdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpg<br>qppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkv<br>eik                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| CAR1<br>scFv<br>结构域 nt   | 39         | gaaatccagctggtccaatcgggagctgaggtcaagaagccgggagccaccgtcaagatct<br>catgcaaggggtcgggattcaacatcgaggactactacattcactgggtgcagcaagctccg<br>ggaaaaggcctggaatggatggcgagaatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacgga<br>ccgattttccaagggaagtgactatcaccgccgatacttcaaccaataccgtctacatggaac<br>tgagctcgtccgggtccgaagatactgcagtgtattactgtgcctttcgggagggggtgactg<br>gggccaaggaaactactgtcactgtctcgtcaggaggcggagggtcgggaggaggcgggag<br>cggaggcgggtggctcgggtggcggagggaagcgacgtggtgatgaccagtcctccggactc<br>cctcggcgtgagcctcggagagaggcgactatcaattgcaagtcgtccagtcacttctgga<br>ttccgatggtaaacgtacctcaactggctgcagcaaaaggcaggcagccacccaaacgggt<br>tgatctcccttggtccaaactggatagcggagtgctgaccgcttctcgggtccggtagcgg<br>gaccgacttcaccctgacgatcagctcactgcaggcggaggacgtggcagtgactactgct<br>ggcagggaacccacttcctggcacctttggagggtggcaccaaggtggagatcaag |
| CAR1<br>可溶性<br>scFv - nt | 40         | atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgtcggccc<br>aaatccagctggtccaatcgggagctgaggtcaagaagccgggagccaccgtcaagatctc<br>atgcaagggtcgggattcaacatcgaggactactacattcactgggtgcagcaagctccgg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

[0511]

|                          |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                          |    | gaaaaggcctgggaatggatgggcagaatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacggac<br>cgattttccaagggaagagtactatcaccgccgatacttcaaccaataccgtctacatggaact<br>gagctcgtccgggtccgaagatactgcagtgattactgtgcctttcgcggagggtgtactgg<br>ggccaaggaaactactgtactgtctcgcagaggcggagggtcgggaggaggcgggagc<br>ggaggcgggtggtcgggtggcggagggaagcgacgtggtgatgaccagtcctccggactcc<br>ctcgccgtgagccctggagagaggcgactatcaattgcaagtcgtccagtcacttctggatt<br>ccgatggtaaaacgtacctcaactggctgcagcaaaagccaggggcagccacccaaacggtt<br>gatctccctgtgtccaaactggatagcggagtgctgaccgcttctcgggtccggtagcggg<br>accgacttcaccctgacgatcagctcactgcaggcggaggacgtggcagtgactactgctg<br>gcagggaaccacttccctggcactttggaggtggcaccaaggtggagatcaagggatcg<br>caccaccatcaccatcatcatcac                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| CAR1<br>可溶性<br>scFv - aa | 41 | <u>Malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkgpatvkisksgsfniedyihwvqqap</u><br>gkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrstedavyycafrggvy<br>wgqgttvsvsgggsgggsgggsgggsgdsvmtqspdslavslgeratinckssqsl<br>ldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvsldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyy<br>cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| CAR 1 –<br>全长- nt<br>慢病毒 | 42 | atggccctcctgtcaccgcctgtgcttccgctgctcttctgctccacgccgctcggcccg<br>agatccagctgggtcagtcgggagctgaagtcaaaagcctggcgcaaccgtcaagatctcg<br>tgcaaaagatcagggttaacatcgaggactactacatccattgggtgcaacaggcaccggg<br>aaaaggcctggagtggtgaggaggattgaccagaaaatgacgaaaccaagtacggacc<br>gatcttcaaggacgggtgaccatcacgggtgacacttccactaacaccgtctacatggaact<br>ctcgagccttcgctcggagataccgcgggtgactactgcgccttagagggtgagtgactactgg<br>ggacaagggactaccgtcaccgtgtcgtcaggtggcggaggatcaggcggaggcggctcc<br>ggtggaggagggaagcggaggagggtgctccgacgtggtgatgacgcagtcaccggactcc<br>ttggcgggtgagcctgggtgaacgcgccactatcaactgcaagagctccagagcttctgga<br>ctccgatggaagacttatctcaattgggtgcaacagaagcctggccagccgccaagagac<br>tcactcactggtgagcaagctggatagcggagtgccagatcggttttcgggatcgggctcag<br>gcaccgacttcaccctgactatttctccctccaagccgaggatgtggcgtctactactgttgg<br>caggggactcacttccggggaccttcggtggaggcactaaggtggagatcaaaaccactac<br>cccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatgcctccagcctctgtccctgcgtc<br>cggaggcatgtagaccgcagctggtggggcgtgcataccggggtcttgacttcgcctgc |

[0512]

|                        |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                        |    | gatatctacatttggccccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttactcgtgatcact<br>ctttactgtaagcgcggctcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgt<br>gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggtcccagaggaggaggagggcgg<br>ctgcgaactcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag<br>aaccagctctacaacgaactcaatcttggctggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg<br>gagaggacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaaagaatccccagagggc<br>ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg<br>ggaaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca<br>aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg          |
| CAR 1 –<br>全长- aa      | 43 | malpytalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkgpavtkiskgsgfnied <u>dyvih</u> wvqqap<br>gkglewmg <u>ridpendetkvgpifqgr</u> vtitadtstntvymelsslrsedavyycafr <u>gg</u><br><u>vyw</u> gqgtvtvssggggsgggsgggsgggsgsdvmtqspdslavslgeratin <u>kss</u><br><u>qslldsdgktyln</u> wlqqkpgqppkrlis <u>lvsklds</u> gvprdfsgsgsgtdftltisslqaedva<br>vyyc <u>wqgthfpgt</u> fgggtkveikttpprptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtrg<br>ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklliyfkqpfmrpvqttqeedgcsrfpe<br>eeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprk<br>npqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp<br>r |
| <b>CAR 2</b>           |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| CAR2<br>scFv<br>结构域    | 44 | dvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvsldsg<br>vpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikggggsgggsg<br>ggsggggseiqlvqsgaevkkgpavtkiskgsgfniedyyihwvqqapgkglewm<br>gridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedavyycafrggyvwgqgtvt<br>vss                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| CAR2<br>scFv<br>结构域-nt | 45 | gatgtcgtgatgacctgccccagactccctcgcagtgtccttgggagaacgggccaccatc<br>aactgcaaatcgagccagtcactgctggactcagacggaaaagacctcaactgctgca<br>gcagaagcctggccagccaccgaagcgctgatctccctggtgtccaagctggactcgggc<br>gtccgggacaggtttagcggtagcggctcgggaaccgacttactctgaccattagctcgtc<br>caagctgaagatgtggcggtctactactgctggcaggggaccacttccccgggacctttggc<br>ggagggaactaaagtcgaaatcaaaggaggagcgatcaggtggaggaggcagcggagg<br>aggaggggagcggcggtggcggtccgaaattcaactgtgcaatccggtgccgaggtgaag                                                                                                                                    |

[0513]

|                            |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                            |    | aaacctggtgccactgtcaagatctcgtgtaaggatcgggattcaatatcaggactactaca<br>tccactgggtgcaacaggcggcaggaaaggattggagtgatgggtcgcacgacccgga<br>aaacgatgagactaagtacggaccgatctccaagccgggtcacgatcactgcggatacct<br>ccactaataccgtgtatatggagctctcgtcactgagaagcgaagatacggccgtgtactactg<br>cgcattcagaggaggtgtgtactggggccagggaactactgtgaccgtgtcgtcg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| CAR2 -<br>可溶性<br>scFv - nt | 46 | atggccctccctgtaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg<br>atgtcgtgatgaccagtcgccagactccctcgcagtgtccttgggagaacgggccaccatca<br>actgcaaatcagccagtcactgctggactcagacggaaagacctacctaactggctgcag<br>cagaagcctggccagccaccgaagcgcctgatctccctgggttccaagctggactcgggcgt<br>cccggaacaggttttagcggtagcggctcgggaaccgacttactctgaccattagctcgtcca<br>agctgaagatgtggcgggtctactactgctggcaggggacccacttccccgggacctttggcg<br>gaggaaactaaagtcgaaatcaaaggaggaggcggatcaggtggaggaggcagcggaggga<br>ggaggggagcggcgggtggcggctccgaaattcaacttgtgcaatccgggtgccagggtgaaga<br>aacctggtgccactgtcaagatctcgtgtaaggatcgggattcaatatcaggactactacat<br>ccactgggtgcaacaggcggcaggaaaggattggagtgatgggtcgcacgacccgga<br>aaacgatgagactaagtacggaccgatctccaagccgggtcacgatcactgcggatacct<br>ccactaataccgtgtatatggagctctcgtcactgagaagcgaagatacggccgtgtactactg<br>cgcattcagaggaggtgtgtactggggccagggaactactgtgaccgtgtcgtcggggtcac<br>atcaccaccatcatcatcaccac |
| CAR2 -<br>可溶性<br>scFv - aa | 47 | malpvtalllplalllhaarpdvvmqtspdsavlgeratinckssqslldsdgktylnwlqq<br>kpgqppkrlislvsksldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfggg<br>tkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkpkp gatvkiscksgsfniedyyi<br>hwwvqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvitadtstntvymelsslrstedtavy<br>ycafrggvywgqgtvtvssgshhhhhhhh                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| CAR 2 -<br>全长-nt           | 48 | atggccctccctgtaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg<br>acgtggtcatgactcaaagcccagattccttgctgtctcccttgagaaagagcaacgatcaa<br>ttgcaaaagctcgcagtcctgttgactccgatggaaaaacctacctaactggctgcagca<br>gaagccgggacaaccaccaaaagcggctgattccctcgtgtccaagctggacagcggcgtg<br>ccggatcgttctcgggcagcggctcgggaaccgattttacttacttctacttctgactgcaagc<br>ggaggacgtggcgggtgtattactgctggcagggcactcacttccgggtacttttggaggagg<br>taccaaagtcgaaatcaagggtggaggcgggagcggaggaggcgggtcgggaggagga                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

[0514]

|                     |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |    | <p>ggatcgggtggcggaggctcagaaatccagctggtgcagtcaggtgccgaagtgaagaag<br/> cctggggccacggtgaagatctcgtgcaaggggagcggattcaacatcaggattactacat<br/> ccattgggtgcaacaggcccctggcaaagggtggaatggatgggaaggatcgaccccga<br/> gaatgacgagactaagtacggccgatctccaaggacgggtgaccatcactgcagacactt<br/> caaccaacaccgtctacatggaactctcctcgtcgcctccgaggacaccgccgtgtactact<br/> gtgctttcagaggaggagtctactggggacagggaacgaccgtgaccgtcagctcaaccact<br/> accccagcaccgaggccaccaccccgctcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcg<br/> tccggaggcatgtagaccgcagctggtggggcgtgcataccggggtcttgacttcgcct<br/> gcgatatctacatttggcccctctgctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatca<br/> ctctttactgtaagcgcggctggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcct<br/> gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcacggtccgagaggaggagggaaggcg<br/> gctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggca<br/> gaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtagacgtgctggacaagc<br/> ggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaaagggg<br/> cctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaag<br/> gggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccaggactcagcaccgccacc<br/> aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p> |
| CAR 2 -<br>全长-aa    | 49 | <p>malpvtalllplalllhaarpdvmtqspdslavslgeratinc<u>kssqslldsdgktyln</u>wlq<br/> qkpgqppkrlis<u>lvsklds</u>gvpdfrfsgsgtdftltisslqaedvavyyc<u>wqgthfpgt</u>fg<br/> ggtkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfnied<br/> <u>yvih</u>wvqqapgkglewmgridpendetk<u>vgpifqgr</u>vtitadtstntvymelsslrse<br/> tavyyca<u>frggvy</u>wgqgtvtvsssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrg<br/> ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyfkqpfmrpvqtteedgcscrpe<br/> eeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgreeydvldkrrgrdpemggkprrk<br/> npqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp<br/> r</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>CAR 3</b>        |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| CAR3<br>scFv<br>结构域 | 50 | <p>eiqlvqsgaevkkpgeslrisccksgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetk<br/> ygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrggvywgqgtvtvssggggsg<br/> ggsgggsgggsgsdvmtqspslpvtlgqpasiscckssqslldsdgktylnwlqqrpg<br/> qsprrlislvsldsgvpdrfsgsgtdftlkisrveadvgyycwqgthfpgtfgggtkv</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

[0515]

|                             |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                             |    | eik                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| CAR3<br>scFv<br>结构域 nt      | 51 | gagattcagctgggtccaaagcggcgagaaagtgaagccaggggaatcgttgcgcacatca<br>gctgtaaagggttcggcttaacatcgaggactattacatccattgggtgcggcagatgccag<br>gaaaggggctggaatggatgggacggattgacccggagaacgacgaaaccaagtacggac<br>cgatctttcaaggacacgtgactatctccgccgacaccagcatcaatacgggtgtacctcaatg<br>gtcctcactcaaggcctcggataccgcatgtactactgcgcgttcagaggaggcgtctactg<br>gggacaagggactactgtgactgtctcatcaggagggtggaggaaagcggaggagggtgctcg<br>ggcggagggtgatcggaggaggagggtccgatgtggtgatgaccagtcctccactgtcgc<br>tcccgggtgacctcggacagcctgctagcatctcgtgcaaatcctcgcaatccctgctggactc<br>ggacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcgcctggccagagcccagaaaggctt<br>atctcgctggtgtcaaaagtggatagcgggtgtgcccaccgggttcagcgggtcagggtcagg<br>aaccgatttcaccttgaagatctcccgcgtggaagccgaagatgtcggagtctactactgctgg<br>cagggtactcacttcccggggaccttgggtggcggcactaagggtcagagattaag                                                                                                  |
| CAR 3 -<br>可溶性<br>scFv - nt | 52 | atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg<br>agattcagctgggtccaaagcggcgagaaagtgaagccaggggaatcgttgcgcacatcag<br>ctgtaaagggttcggcttaacatcgaggactattacatccattgggtgcggcagatgccagga<br>aaggggctggaatggatgggacggattgacccggagaacgacgaaaccaagtacggaccg<br>atctttcaaggacacgtgactatctccgccgacaccagcatcaatacgggtgtacctcaatggt<br>cctcactcaaggcctcggataccgcatgtactactgcgcgttcagaggaggcgtctactggg<br>gacaagggactactgtgactgtctcatcaggagggtggaggaaagcggaggagggtgctcggg<br>cggagggtgatcggaggaggagggtccgatgtggtgatgaccagtcctccactgtcgtc<br>ccgggtgacctcggacagcctgctagcatctcgtgcaaatcctcgcaatccctgctggactcg<br>gacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcgcctggccagagcccagaaaggctta<br>tctcgtggtgtcaaaagtggatagcgggtgtgcccaccgggttcagcgggtcagggtcagga<br>accgatttcaccttgaagatctcccgcgtggaagccgaagatgtcggagtctactactgctggc<br>agggtactcacttcccggggaccttgggtggcggcactaagggtcagagattaagggtcacacc<br>atcatcaccatcaccaccac |
| CAR 3 -<br>可溶性<br>scFv - aa | 53 | malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslriskgsgfniedyyihwvrqmp<br>gkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrgg<br>vywgqgttvtvssgggsgggsgggsgggsgsdvmtqspslpvtlgqpasisckss<br>qslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgv                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

[0516]

|                  |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |    | yycwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| CAR 3 –<br>全长-nt | 54 | atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg<br>aatccagctggtgcaaaaggagccgaggtgaagaagcccggagaatccctgcgcattctc<br>gtgtaagggttccggctttaacatcgaggattactacatccactgggtgagacagatgccggg<br>caaagggtctggaatggatgggccgcatcgacccggagaacgacgaaccaatacggacc<br>aatcttccaaggacatgtgactatttccgggatactccatcaacactgtctacttgagtgga<br>gctcgtcaaggcgtcggataccgccatgtactactgcgcattcagaggaggtgtgtactggg<br>gccagggcactacgggtcaccgtgtcctcgggaggtggagggtcaggaggcggaggctcgg<br>gcgggtggaggatcaggcggaggaggaaagcgtgtgtcatgactcaatccccactgtcact<br>gcctgtcactctggggcaaccggcttccatctcatgcaagtcaagccaatcgtgctcactcc<br>gacggaaaaacctacctaattggcttcagcagcggccaggccagtcgcctcggagggtgat<br>ctcactcgtgtcgaagcttgactccggggtgccggatcggtttagcgaagcggatcgggga<br>ccgacttcacgttgaagattagccgggtggaagccgaggacgtgggagtctattactgctggc<br>aggggacccacttccggggactttcggaggaggcacaaagtcgagattaagaccactac<br>cccagcaccgaggccaccacccgggtcctaccatcgctccacgctctgtccctgcgtc<br>cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgc<br>gatactacatttggcccctctggtggtacttgcggggctcgtgctttcactcgtgatcact<br>ctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaacccttcatgaggcctgt<br>gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggtcccagaggaggaggaaagcggg<br>ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcag<br>aaccagcttacaacgaactcaatcttggcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg<br>gagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgagaaagaatcccaagagggc<br>ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg<br>ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca<br>aggacacatatgacgtcttcatatgcaggccctgccgcctcgg |
| CAR 3 –<br>全长-aa | 55 | malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslriskgsgfniedyvihwvrqmp<br>gkglewmg <del>ridpendetkvgpifqgh</del> hvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrg<br><del>gvv</del> wgqgttvvtvssgggsgggsgggsgggsgsdvmtqspslpvtlgqpasisck <del>s</del><br><del>sqslldsdgktvln</del> wlqqrpgqsprrlis <del>lvsklds</del> gvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadv<br>gvyyyc <del>wqgthfpgt</del> fgggtkveiktttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr<br>gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtqeedgcscrfp                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

|                            |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                            |    | <p>eeeeggcelrvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrrreydvldkrrgrdpemggkpr<br/> knpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp<br/> pr</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>CAR 4</b>               |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| CAR4<br>scFv<br>结构域        | 56 | <p>dvvmtqspislplvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvskldsgv<br/> pdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgyycwqgthfpgtfgggtkveikgggsgggsgsg<br/> ggsggggseiqlvqsgaevkpkgeslrisksgsfniedyihwvrqmpgkglewmg<br/> ridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggywggqgttv<br/> tvss</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| CAR4<br>scFv<br>结构域 nt     | 57 | <p>gacgtcgtcatgaccagagcccgtgtcactgcctgtgacctgggccagccggcgtccat<br/> tagctgcaaatcctcgcaatccctgctcgactcagacggaaaaacgtacttgaactggctcaa<br/> cagcgccctgggcaatccccaaggcggcttatctcactcgtcagcaagctcgatagcgggtgc<br/> ccagacagatttctgggctcgggatcgggcactgattcactctgaagatctcgcggttgaa<br/> gccgaggatgtgggagtgtactattgctggcagggcactcacttccccgggacgtttggcgg<br/> aggaaactaaggctcgagatcaaaaggaggagggtgatcaggcgagggtggagcgaggagg<br/> gagggaagcgggtggtggaggtccgaaatccagctggtgcaatcaggagccgaggtgaaga<br/> agccgggagaatccctgcgcattcgtgcaagggtcgggcttaacatcgaggattactac<br/> atccactgggtgcggcagatgccgggaaagggttggaatggatgggacgcattgacctgg<br/> aaaatgatgaaccaaatacgggccaatcttccaaggccactgaccattagcgtgacactt<br/> ccatcaacaccgtgtaccttcagtggctcctcactgaaggcgtcggacactgccatgtactactg<br/> tgcattcagaggagggtctactggggacagggcaccaccgtgaccgtgagctcc</p> |
| CAR4 –<br>可溶性<br>scFv - nt | 58 | <p>atggccctccctgtaccgccctgctgcttccgtggtcttctgctccacgccgctcggccc<br/> acgtcgtcatgaccagagcccgtgtcactgcctgtgacctgggccagccggcgtccatta<br/> gctgcaaatcctcgcaatccctgctcgactcagacggaaaaacgtacttgaactggctccaac<br/> agcgccctgggcaatccccaaggcggcttatctcactcgtcagcaagctcgatagcgggtgcc<br/> cagacagatttctgggctcgggatcgggcactgattcactctgaagatctcgcggttggaag<br/> ccgaggatgtgggagtgtactattgctggcagggcactcacttccccgggacgtttggcggg<br/> ggaaactaaggctcgagatcaaaaggaggagggtgatcaggcgagggtggagcgaggagg<br/> agggaagcgggtggtggaggtccgaaatccagctggtgcaatcaggagccgaggtgaagaa<br/> gccgggagaatccctgcgcattcgtgcaagggtcgggcttaacatcgaggattactacat<br/> ccactgggtgcggcagatgccgggaaagggttggaatggatgggacgcattgacctggga</p>                                                                                                                                  |

[0517]

[0518]

|                           |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                           |    | aaatgatgaaaccaaatacgggccaatcttccaagggcacgtgaccattagcgtgacacttc<br>catcaacaccgtgtaccttcaagtgtcctcactgaaggcgtcggacactgcatgtactactgt<br>gcattcagaggaggggtctactggggacagggcaccaccgtgaccgtgagctccggctcgc<br>atcaccatcatcaccaccatcac                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| CAR4 –<br>可溶性<br>scFv -aa | 59 | <u>malpytalllplalllhaar</u> pdvmtqspislpvtlgqpasisckssqslldsdktylnwlqq<br>rpgqsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqgthfpgtfggg<br>tkveikggggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeslrisksgsfniedyyi<br>hwvvrmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtam<br><u>yycfrggvywgqgtvtvssgshhhhhhhh</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| CAR 4 –<br>全长-nt          | 60 | atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg<br>acgtcgtcatgaccaatccccctctcctgccggtcaccctgggtcagccggcgtcgtatc<br>atgcaaaagctcacagtccctgctggattcggacggaaaaacctactgaactggctccaaca<br>gagggccgggtcagtcacctcgcagactgatctcgctggtagcaagctcgactcgggtgtgc<br>cggatcggttctccgggtcaggatcgggcaccgactttacgctcaagatttcgagagtggagg<br>ccgaggatgtgggagtgtactattgctggcagggcacgcatttccccgggacctttggaggc<br>gggactaagggtgaaatcaaggagggtggcggatcaggcggaggaggcagcggcggag<br>gtggatcaggaggcggagggtcagagatccagctggtccaaagcggagcagagggtgaaga<br>agccaggcgagtccttcgatttcgtgcaaaggagcggcttaacattgaagattactacat<br>ccactgggtgcggcaaatgccaggaaagggtctggaatggatgggacggatcaccaga<br>aaatgatgaaactaagtacggaccgatcttccaaggacacgtcactatctccggacacttc<br>gatcaacaccgtgtacctccagtgaggcagcttgaaagcctccgacaccgctatgtactactt<br>gccttccgcggaggagtctactggggacaggggactactgtgaccgtgtcgtccaccactac<br>cccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatgcctccagcctctgtccctgcgtc<br>cggaggcatgtagaccgcagctgggtgggcccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgc<br>gatatctacatttggcccctctggctggtacttgcggggctcgtgctttcactcgtgatcact<br>ctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaacccttcatgaggcctgt<br>gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggtcccagaggaggaggaaaggcgg<br>ctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag<br>aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg<br>gagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgagaaagaatccccaagagggc<br>ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg |

[0519]

|                         |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                         |    | ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca<br>aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| CAR 4 –<br>全长-aa        | 61 | malpvtalllplalllhaarpdvmtqspislpvtlgqpasisckssqslldsdgktvlnwlq<br>qrpqqsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqgthfpgtf<br>ggtkveikggggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeslrisksgsfniedy<br>yihwvrqmpgkglewmgridpendetkvgpifqghvtisadtsintvylqwsslkasd<br>tamyycafrggvvywgqgtvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr<br>gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtteedgcscrfp<br>eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedyldkrrdpemggkpr<br>knpqeglynelqkdmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp<br>pr                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>CAR 5</b>            |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| CAR5<br>scFv<br>结构域     | 62 | eiqlvqsgaevkkpgatvkisksgsfniiedyyihwvqqapgkglewmgridpendet<br>kygpifqgrvitadtsntvymelsslrseidavyycafrggvywgqgtvtvssgggsg<br>ggsgsgggsgggsgsdvmtqspislpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqrpq<br>qsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqgthfpgtfgggk<br>eik                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| CAR5<br>scFv<br>结构域 nt: | 63 | gaaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgctaccgtgaagattt<br>catgcaagggtacgggcttaacatcaggattactacatccactgggtgcagcaggcacca<br>ggaaaaggacttgaatggtggccggatcgaccggaaaatgacgagactaagtagggcc<br>ctatctccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagaccaaacaccgtctatatgaac<br>tctcgtccctgaggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgttgcggaggtgtgtactgg<br>ggacagggtaccaccgtcaccgtgtcatcgggcggtggaggctccggtggaggagggtca<br>ggaggcggtggaagcggaggaggcggcagcgacgtggtcatgactcaatcgccgtgtcg<br>ctgcccgtcactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaactctgcagtcactgcttgact<br>ccgatggaaagacctcaactggctgcagcaacggccaggccaatcccaagacgcct<br>gatctcgttggtgtcaaagctggactcagggtgccggaccggttctccggagcggtcg<br>gcacggatttcactctcaagatctccagagtgaagccgaggatgtgggagtctactactgct<br>ggcagggaaccatttccctggaacttttggcggagggaactaagggtcagattaaa |
| CAR5 -<br>可溶性           | 64 | atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgctggcttctgctccacgccgctcggccg<br>aaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgctaccgtgaagattca                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

[0520]

|                           |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| scFv - nt                 |    | <p>tgcaaggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg<br/> aaaaggacttgaatggatgggccggtacgacccggaaaatgacgagactaagtacggccct<br/> atctccaaggacgggtgacgacaccgcagacactagcaccaacaccgtctatatggaactc<br/> tcgtccctgagggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgtttcgcggagggtgtgtactggg<br/> gacagggtaccaccgtcaccgtgtcatcggcggtggagggtccggtggaggagggtcag<br/> gaggcggtggaagcggaggaggcgagcgacgtggtcatgactcaatgccgtgtcgc<br/> tgccgtcactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaatcctgcagtcactgcttgactc<br/> cgatggaaagacctacctcaactggctgcagcaacgccaggccaatcccaagacgcctg<br/> atctcgttggtgtcaaaactggactcaggggtgccggaccggttccgggagcgggtcggg<br/> cacggatttactctcaagatctccagagtggagccgaggatgtgggagtctactactgtg<br/> gcagggaacccatttccctggaacttttggcgagggaactaaggtcgagattaaaggagcc<br/> accatcatcatcaccaccaccac</p>                                                                                                                                                                             |
| CAR5 -<br>可溶性<br>scFv -aa | 65 | <p><u>malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgatvkiskgsgfniedyyihwvqqap</u><br/> gkglewmgridpendetkygpifqgrvitadtstntvymelsslrsetavycafrggvy<br/> wgqgttvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvmtqspislplvtlqqpasickssqsl<br/> ldsdgktylnwlqrrpqsprrlislvsldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgyy<br/> cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| CAR 5 –<br>全长-nt          | 66 | <p>atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg<br/> aaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgctaccgtgaagatttca<br/> tgcaaggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg<br/> aaaaggacttgaatggatgggccggtacgacccggaaaatgacgagactaagtacggccct<br/> atctccaaggacgggtgacgacaccgcagacactagcaccaacaccgtctatatggaactc<br/> tcgtccctgagggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgtttcgcggagggtgtgtactggg<br/> gacagggtaccaccgtcaccgtgtcatcggcggtggagggtccggtggaggagggtcag<br/> gaggcggtggaagcggaggaggcgagcgacgtggtcatgactcaatgccgtgtcgc<br/> tgccgtcactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaatcctgcagtcactgcttgactc<br/> cgatggaaagacctacctcaactggctgcagcaacgccaggccaatcccaagacgcctg<br/> atctcgttggtgtcaaaactggactcaggggtgccggaccggttccgggagcgggtcggg<br/> cacggatttactctcaagatctccagagtggagccgaggatgtgggagtctactactgtg<br/> gcagggaacccatttccctggaacttttggcgagggaactaaggtcgagattaaaaccactac<br/> cccagaccgaggccaccaccggctcctaccatgcctcccagcctctgtccctgcgtc</p> |

[0521]

|                        |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                        |    | cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgc<br>gatatctacatttggccctctggtggtacttgcggggtcctgctgctttactcgtgactact<br>ctttactgtaagcgcggcgggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgt<br>gcagactactcaagaggaggacggctgttcattgccggtcccagaggaggaggaaaggcgg<br>ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag<br>aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg<br>gagaggacgggacccagaaatggcggggaagccgcgagaaagaatccccaaaggaggc<br>ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg<br>ggaaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca<br>aggacacatgacgtcttcacatgcaggccctgccgcctcgg |
| CAR 5 –<br>全长-aa       | 67 | malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgatvkisksgsfnie <u>dyvih</u> wvqqap<br>gkglewm <u>gridpendetkvgpifqgr</u> vtitadtstntvymelssrsedtavyyc <u>frgg</u><br><u>vyw</u> gqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgdvmtqspslpvtlgqpasisc <u>kss</u><br><u>qslldsdgktvln</u> wlqqrpgqsprrlis <u>lvsklds</u> gvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadv<br>vyyc <u>wqgthfpgt</u> fgggtkveikttpprptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtrg<br>ldfacdiyiwaplgtcgvlslvitlyckrgrklliyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfe<br>eeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgreeydvldkrrgrdpemggkprrk<br>npqeglynelqkdmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp<br>r                                                               |
| <b>CAR 6</b>           |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| CAR6<br>scFv<br>结构域    | 68 | eiqlvqsgaevkkpgeslrisksgsfnieyihwvrqmpgkglewmgridpendetk<br>ygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyyc <u>frgg</u> vywqgtvtvssgggsg<br>ggsgggsgggsgsdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpg<br>qppkrlislvsksldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkv<br>eik                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| CAR6<br>scFv<br>结构域 nt | 69 | gaaatccagctggtgcagtcaggcggcagggtcaagaagccgggagagtcgctgagaatct<br>cgtgcaagggctcggggttaacatcgaggactactacattactgggtcaggcagatgccg<br>ggaaagggactggaatggatggccggatcgaccagaaaatgacgaaaccaatacggg<br>ccgattttcaaggccagctgactatcagcgacacgagcatcaaacactgtctacctcagt<br>ggtcctcgcttaaggccagcgataccgctatgtactactgcgattcagaggcggggtgtact<br>ggggacaagggaaccactgtgaccgtgagcagcggaggtggcggtcgggaggaggtggg                                                                                                                                                                                                                                                           |

[0522]

|                            |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                            |    | <p>agcggaggaggaggtccggcggtggaggatcagatgtcgtgatgaccagtcctccggact<br/> ccctcgtgtctcactggcgagcgcgcgaccatcaactgcaaactgagccagtcgctgttg<br/> gactccgatggaaagacttatctgaattggctgcaacagaaaccaggacaacctcccaagcg<br/> gctcatctcgttgtgcaaaactcgattcgggagtgccagaccgttctcgggtccgggag<br/> cggaaactgactttactttgaccatttctcactgcaagcggaggatgtggccgtgtattactgttg<br/> gcagggcacgcatttccctggaaccttcggtggcggaactaagggtgaaatcaag</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| CAR6 -<br>可溶性<br>scFv - nt | 70 | <p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg<br/> aaatccagctggtgcagtcaggcgccgaggtcaagaagccgggagagtcgctgagaatctc<br/> gtgcaagggtcgggggttaacatcaggactactacattcactgggtcaggcagatgccgg<br/> gaaagggtggaatggatggcgccggtcgaaccagaaaatgacgaaaccaaatagggc<br/> cgatttttaaggccacgtgactatcagcgcagacacgagcatcaactgtctacctccagt<br/> gtcctcgttaaggccagcgataccgctatgtactactgcgcattcagaggcggggtgactg<br/> gggacaaggaaacctgtgaccgtgagcagcggaggtggcggtcgggagggaggtggga<br/> gcggaggaggaggttccggcggtggaggatcagatgtcgtgatgaccagtcctccggactc<br/> cctcgtgtctcactggcgagcgcgcgaccatcaactgcaaactgagccagtcgctgttg<br/> actccgatggaaagacttatctgaattggctgcaacagaaaccaggacaacctcccaagcgg<br/> ctcatctcgttgtgcaaaactcgattcgggagtgccagaccgttctcgggtccgggagc<br/> ggaactgactttactttgaccatttctcactgcaagcggaggatgtggccgtgtattactgttg<br/> cagggcacgcatttccctggaaccttcggtggcggaactaagggtgaaatcaagggtacaca<br/> ccaccatcaccatcaccatcaccat</p> |
| CAR6 -<br>可溶性<br>scFv - aa | 71 | <p><u>malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslriscksgsfniedyyihwvrqmp</u><br/> gkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrgg<br/> vywgqgttvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvmtqspdslavslgeratinckss<br/> qslldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvsldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvav<br/> yycwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhhh</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| CAR6 -<br>全长-nt            | 72 | <p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg<br/> agattcagctcgtgcaatcgggagcggaaagtaagaagccaggagagtccttgcggatctca<br/> tgcaagggtagcggctttaacatcaggattactacatccactgggtgaggcagatgccggg<br/> gaagggtactgaaatggatgggacggatcgaaccagaaaacgacgaaactaagtacgggtcc<br/> gatcttccaaggccatgtgactattagcggcgatacttcaatcaataccgtgtatctgcaatggtc<br/> ctcattgaaagcctcagataccgcgatgtactactgtgctttcagaggagggtctactgggga</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

[0523]

|                     |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |    | cagggaactaccgtgactgtctcgtccggcggagggcgggtcaggaggtggcggcagcggaggaggggtccggcggaggtgggtccgacgtcgtgatgaccagagccctgacagcctggcagtgagcctgggcgaaagagctaccattaactgcaaatcgtcgcagagcctgctggactggacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcaaaagcctggccagccaccgaagcgcttatctcactggtgtcgaagctggattcgggagtgcccgatcgttctccggctcgggacgggtactgacttcaccctcactatctcctcgttcaagcagaggacgtggcgtctactactgctggcagggaacccactttccgggaaccttcggcggaggggacgaaagtggagatcaagaccactaccagcaccgaggccaccacccggctcctaccatgcctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggcgtgcataccggggtcttgacttcgctgcgatatctacatttgggccctctggctggtacttgcggggtcctgctgttctactgtgatcactttactgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatctttaagaacccctcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccggttccagaggaggaggaaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatttggctggagagaggagtacgactgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg |
| CAR6 –<br>全长-aa     | 73 | malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedvvi <h1>wvrqmpgkglewmgridpendetkvgpifqghv</h1> tisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggyvwgqgttvssggggsgggsgggsgggsgdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveiktttpprptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgreeydvldkrrgrdpemggkprknnpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| CAR 7               |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| CAR7<br>scFv<br>结构域 | 74 | dvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikggggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyvi <h1>wvrqmpgkglewmgridpendetkvgpifqghv</h1> tisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggyvwgqgttvss                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                     |    | ridpendetkvgpifqghv                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

[0524]

[0525]

|                            |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CAR7<br>scFv<br>结构域 nt     | 75 | gacgtggtgatgaccaatgccagattccctggcagtgccctggcggaacgcgccactatt<br>aactgcaaatgacacagtccttgcttgattccgacggaagacctacatcaattggtccagc<br>agaagccaggacaaccgccaagagactgatccctggtgtcaaaactggactcgggagt<br>gcctgatcgggtctcgggtagcgggagcggcaccgacttactctgaccatctgtactcca<br>ggctgaggacgtggccgtgtattactgttggcaggggtactcactttccgggcactttcggaggc<br>ggcaccaaggtggagattaaaggaggaggcgggaagcggaggtggaggatcgggaggtgg<br>tgggagcggcggaggaggagcggagatccagctcgtccaatcgggagcgggaagtgaaga<br>agcccggagagtcacttagaatctcatgcaaggggtcgggcttcaacatcaggattactaca<br>tccattgggtccgccagatgcctggtaaaggactggaatggatggggaggattgacccggaa<br>aacgacgaaactaagtacggaccgatcttcaagggcacgtgactatctccgtgatactca<br>atcaatactgtctacctccagtggctctcgtgaaagcaagcgacaccgcgatgtactactgcg<br>ccttccggggaggagtgtactggggccaaggcaccacggtcacggtcagctcc                                                                                                      |
| CAR7 -<br>可溶性<br>scFv - nt | 76 | atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg<br>acgtggtgatgaccaatgccagattccctggcagtgccctggcggaacgcgccactatta<br>actgcaaatgacacagtccttgcttgattccgacggaagacctacatcaattggtccagca<br>gaagccaggacaaccgccaagagactgatccctggtgtcaaaactggactcgggagtg<br>cctgatcgggtctcgggtagcgggagcggcaccgacttactctgaccatctgtactccag<br>gctgaggacgtggccgtgtattactgttggcaggggtactcactttccgggcactttcggaggcg<br>gcaccaaggtggagattaaaggaggaggcgggaagcggaggtggaggatcgggaggtggt<br>gggagcggcggaggaggagcggagatccagctcgtccaatcgggagcgggaagtgaagaa<br>gcccggagagtcacttagaatctcatgcaaggggtcgggcttcaacatcaggattactacat<br>ccattgggtccgccagatgcctggtaaaggactggatggatggggaggattgacccggaa<br>aacgacgaaactaagtacggaccgatcttcaagggcacgtgactatctccgtgatactca<br>atcaatactgtctacctccagtggctctcgtgaaagcaagcgacaccgcgatgtactactgcg<br>ccttccggggaggagtgtactggggccaaggcaccacggtcacggtcagctccggctcca<br>tcaccaccaccatcaccatcatcac |
| CAR7 -<br>可溶性              | 77 | <u>malpvtalllplalllhaar</u> pdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqq<br>kpgqppkrlislvsldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfggg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

[0526]

|           |  |                                                                                                                                                                |
|-----------|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| scFv - aa |  | tkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkpkgeslriscgsgfniedyyi<br>hwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtam<br>yycafrggvywgqgtvtvssgshhhhhhhhhh |
|-----------|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

[0527]

|                |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CAR 7<br>全长-nt | 78 | atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg<br>acgtggatgatgactcagtcgcctgactcgtggctgtgtcccttgagagcgggccactatca<br>attgcaagtcacccagtcgctgctggattccgacgggaaaacctcaattggctgcagca<br>aaaaccgggacagcctccaaagcggctcatcagcctggtgtccaagtggacagcggcgtg<br>ccagaccgcttctccggtcgggaagcgggtactgatttcacgctgacctatcatccctccaag<br>cggaggatgtggcagctactactgttggcagggcacgcattttccgggcacttttgaggag<br>ggaccaaggtcgaatcaaggaggagggtggctcgggcggaggaggctcgggaggagg<br>aggatcaggagcgggtggaagcgaattcaactggtccagagcggcgagaagtcaagaa<br>gccgggtgaatcgctcagaatctgtgcaaaggatcgggattcaacatcaggactactacat<br>tactgggtcagacaaatgccgggcaaagggtggaatggatggggaggatcagccccga<br>aacgatgaaaccaagtacggaccaatctccaagggcacgtgaccatttcggcgacacct<br>caatcaacactgtgtacctccagtggagctacttaaggccagcgataccgccatgtactattg<br>cgctttccggagggggtgtactggggacagggcactactgtgacctgtcatccaccactac<br>cccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtc<br>cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgc<br>gatatctacatttggcccctctggctggtacttgcggggctctgctgctttcactcgtgact<br>ctttactgtaagcgcgggtcgggaagactgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggcctgt<br>gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggtcccagaggaggagggaagcggg<br>ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgagcgcagatgctccagcctacaagcagggggcag<br>aaccagctctacaacgaactcaatcttggcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg<br>gagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgagaaagaatccccagaggggc<br>ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg<br>ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca<br>aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg |
| CAR 7<br>全长-aa | 79 | malpvtalllplalllhaarpdvvtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlq<br>qkpgqppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfg<br>ggtkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeslriscgsgfniedy                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

[0528]

|                            |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                            |    | <p><u>vihwvrqmpgkglewmgridpendetkvgpifqgh</u>htisadtsintvylqwsslkasd<br/> tamyyc<u>afrggvv</u>wgqgtvtvssttpaprpptpaptiasqplsrlpeacrpaaggavhtr<br/> gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtteedgcscrfp<br/> eeeeggcelrvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrrreydvldkrrdpemggkpr<br/> knpqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp<br/> pr</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>CAR 8</b>               |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| CAR8<br>scFv<br>结构域        | 80 | <p>dvvmqtspislplvtlgqpasickssqslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvsldsgv<br/> pdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgyycwqgthfpgtgfgggtkveikgggsgggsgsg<br/> ggsggggseiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgfniedyyihwvqqapgkglewm<br/> gridpendetkvgpifqgrvitadtstntvymelssrsedtavyyc<u>afrggvv</u>wgqgtvt<br/> vss</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| CAR8<br>scFv<br>结构域 nt     | 81 | <p>gatgtggtcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttgacagccagcgtcgatt<br/> agctgcaagtcatcccaatccctgctcgattcgatggaaagacctatctcaactggctgcagc<br/> aaagaccgggtcagagccctaggagactcatctcgttggtgtcaaaactggacagcggagtgc<br/> ccggaccgggtttccggttcgggatcggggacggacttactctgaagattcacgggtgga<br/> gctgaggatgtgggagtgtactactgctggcagggaaacccatttccctggcacttttgccgga<br/> ggaactaaggctgaaatcaaggaggaggtgctcgggaggagcgcgatcggcgaggagg<br/> cgggagcgcgaggagggtccgaaatcaactgtccagtcaggagccgaagtgaagaa<br/> accgggagccaccgtcaaatcagctgtaaggatcgggattcaatcagaggactactacat<br/> ccactgggtgcagcaagctccgggcaaggactggagtggatggggcgcatcgaccaga<br/> gaacgacgaaacaaatagcggccgatcttccaaggcggggtgaccatcaccgcggacac<br/> ctcaactaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactgcagtctactact<br/> gcgccttccgcggtggtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcg</p> |
| CAR8 -<br>可溶性<br>scFv - nt | 82 | <p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc<br/> atgtggtcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttgacagccagcgtcgatta<br/> gctgcaagtcatcccaatccctgctcgattcgatggaaagacctatctcaactggctgcagca<br/> aagaccgggtcagagccctaggagactcatctcgttggtgtcaaaactggacagcggagtgc<br/> cggaccgggtttccggttcgggatcggggacggacttactctgaagattcacgggtggaag<br/> ctgaggatgtgggagtgtactactgctggcagggaaacccatttccctggcacttttgccggag<br/> gaactaaggctgaaatcaaggaggaggtggctcgggaggagcgcgatcggcgaggaggc</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

[0529]

|                            |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                            |    | <p>gggagcggcggaggagggtccgaaatccaactgtccagtcaggagccgaagtgaagaaa<br/> ccgggagccaccgtcaaaatcagctgtaaggatcgggattcaatcagaggactactacac<br/> cactgggtgcagcaagctccgggcaaaaggactggagtggatggggcgatcgaccagag<br/> aacgacgaaaccaatacggcccgatcttcaaggcggtgaccatcaccgggacacct<br/> caactaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactgcagtctactactg<br/> cgcttccgcgggtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcgggggtccc<br/> accatcatcaccaccaccatcac</p> |
| CAR8 -<br>可溶性<br>scFv - aa | 83 | <p><u>malpytalllplalllhaar</u>pdvmtqspislpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqq<br/> rpgqsprrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgyycwqgthfpgtfggg<br/> tkveikggggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgfniedyyi<br/> hwwqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrstedavy<br/> ycafrggvywqggtvtvssgshhhhhhhh</p>                                                                                                                   |

[0530]

|                  |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CAR 8 –<br>全长-nt | 84 | <p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg<br/> atgtgtcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttgacagccagcgtcgatta<br/> gctgcaagtcatccaatccctgctcgattcggatgaaagacatatcaactgctgcagca<br/> aagacccgggtcagagccctaggagactcatctcgttggtgtcaaaagtggacagcggagtgc<br/> cggaccgggtttccgggttcgggatcggggacggacttactctgaagattcacgggtggaag<br/> ctgaggatgtgggagtgtactactgctggcagggaacccatttccctggcacttttggcggag<br/> gaactaagggtcgaaatcaaggaggagggtgctcgggaggaggcggatcgggcggaggc<br/> gggagcggcgaggagggtccgaaatccaactgtccagtcaggagccgaagtgaagaaa<br/> ccgggagccaccgtcaaaatcagctgtaaggatcgggattcaatcagaggactactacac<br/> cactgggtgcagcaagctccgggcaaaaggactggagtggatggggcgatcgaccagag<br/> aacgacgaaaccaatacggcccgatcttcaaggcggtgaccatcaccgggacacct<br/> caactaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactgcagtctactactg<br/> cgcttccgcgggtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcgaccactac<br/> cccagcaccgaggccaccacccggctcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtc<br/> cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctgc<br/> gatctacatttggcccctctggctggtacttgcgggtcctgctgctttactcgtgatcact<br/> ctttactgtaagcgcgggtcgaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgt<br/> gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagggaaggcgg</p> |
|------------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

[0531]

|                        |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                        |    | ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag<br>aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtagacgtgctggacaagcg<br>gagaggacgggacccagaaatggcggggaagccgcagaaaatcccaagagggc<br>ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg<br>ggaaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca<br>aggacacctatgacgtcttcacatgcaggccctgccgcctcgg                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| CAR 8 –<br>全长-aa       | 85 | malpvtalllplalllhaarpdvmtqspislpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlq<br>qrpqgsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqgthfpgtfg<br>ggtkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgatvkiskgsgfnied<br>vvihwvqqapkgglewmgridpendetkvgpifqgrvtitadtstntvymelsslr sed<br>tavyycafrggvwywgqgtvtvsssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrg<br>ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklliyfkqpfmrvpqtteedgcsrfpe<br>eeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqllynelnlgrreeydvldkrrdpemggkprrk<br>npqeglynelqkdmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp<br>r                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>CAR 9</b>           |    | Mouse anti-EGFRvIII clone 3C10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| CAR9<br>scFv<br>结构域    | 86 | eiqlqqsgaelvkpgasvklstgsgfniedyyihwvkqrteqglewigrdpendetkyg<br>pifqgratitadtssntvylqlssltstetavyycafrggvwywgpgttlvssgggsgggsgg<br>gggshmdvmtqspitlsvaigqsasisckssqslldsdgktylnwlqrpqgsprkrlislv<br>skldsgvpdrftgsgsgtdftlrisrveadlgiyycwqgthfpgtfggggkileik                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| CAR9<br>scFv<br>结构域 nt | 98 | gagatccagctccaacagagcggagccgaactggtcaaaccgggagcgtcgggtgaagtgt<br>catgcactggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccg<br>agcaggggctggaatggatcggagcggatcgaacccgaaaacgatgaaccaagtacgggc<br>ctatcttccaaggacgggccaccattacggctgacacgtcaagcaataccgtctacctcagct<br>ttccagcctgacctccgaggacactgccgtgtactactgcgccttcagaggagcgtgtactg<br>gggaccaggaaccactttgaccgtgtccagcggagggcggatcaggaggaggaggctc<br>aggcgggtggcggctgcacatggacgtggtcatgactcagtcctccgctgacctgtcgggtg<br>caattggacagagcgcacatccatctcgtgcaagagctcacagtcgctgctggattccgacggaa<br>agacttatctgaactggctgctccaaagaccagggcaatcaccgaaacgccttatctccctggt<br>gtcgaaactcgactcgggtgtgccggtcgggttaccggtagcgggtccggcagcgacttca<br>ctctccgcatttcgaggggtggaagcggaggtatctcgggatctactactgttggcagggaaaccc |

[0532]

|                            |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                            |    | acttcctgggacttttggaggcggaactaagctggaaatcaag                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| CAR9 -<br>可溶性<br>scFv - nt | 87 | atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggcttctgctccacgccgctcggcccg<br>agatccagctccaacagagcggagccgaactgggtcaaaccgggagcgtcggtaggtgtc<br>atgcactggatcgggcttaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccga<br>gcaggggctggaatggatcggacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtacggggcc<br>tatcttccaaggacgggccaccattacggctgacacgtcaagcaataccgtctacctccagctt<br>tccagcctgacctccgaggacactgccgtgtactactgcgccttcagaggaggcgtgtactgg<br>ggaccagggaaccactttgaccgtgtccagcggaggcgggtggatcaggaggaggaggtca<br>ggcgggtggcggctgcacatggacgtggtcatgactcagtcctccgctgacctgtcgggtgc<br>aattggacagagcgcacatctcgtgcaagagctcacagtcgctgctggattccgacggaaa<br>gacttatctgaactggctgctcaaagaccaggggcaatcaccgaaacgccttatctccctgggtg<br>tcgaaactcgactcgggtgtgccggatcggtttaccggtagcgggtccggcacggacttact<br>ctccgcatttcgagggtggaagcggaggatctcgggactactactgttggcagggaacca<br>cttccctgggacttttggaggcggaactaagctggaaatcaagggtagccatcaccatcacca<br>ccaccatcat |
| CAR9 -<br>可溶性<br>scFv - aa | 88 | <u>malpytalllplalllhaarpeiqqlqsgaelvkpgasvklscetgsfniedyyihwvkqrte</u><br>qglewigridpendetkygpifqgratitadtssntvylqlssltsetdavyycfrggywg<br>pgttltvssgggsgggsgggsgggshmdvmtqspltsvaigqsasisckssqllsdsgkt<br>ylnwllqrpqspkrlislvskldsgvpdrftgsdgtftrlsrveadlgiyycwqgthfp<br><u>gtfgggkcleikgshhhhhhhh</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| CAR9 -<br>全长-nt            | 89 | atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggcttctgctccacgccgctcggcccg<br>agatccagctccaacagagcggagccgaactgggtcaaaccgggagcgtcggtaggtgtc<br>atgcactggatcgggcttaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccga<br>gcaggggctggaatggatcggacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtacggggcc<br>tatcttccaaggacgggccaccattacggctgacacgtcaagcaataccgtctacctccagctt<br>tccagcctgacctccgaggacactgccgtgtactactgcgccttcagaggaggcgtgtactgg<br>ggaccagggaaccactttgaccgtgtccagcggaggcgggtggatcaggaggaggaggtca<br>ggcgggtggcggctgcacatggacgtggtcatgactcagtcctccgctgacctgtcgggtgc<br>aattggacagagcgcacatctcgtgcaagagctcacagtcgctgctggattccgacggaaa<br>gacttatctgaactggctgctcaaagaccaggggcaatcaccgaaacgccttatctccctgggtg<br>tcgaaactcgactcgggtgtgccggatcggtttaccggtagcgggtccggcacggacttact                                                                                                                                                  |

[0533]

|                        |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                        |    | ctccgcatttcgaggggtgaagcggaggatctcgggatctactactgttgaggggaacca<br>cttccctgggacttttggaggggaactaagctggaatcaagaccactacccagcaccga<br>ggccacccacccggctcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccggagcatgta<br>gacccgcagctgggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctgcgatatctacattg<br>ggccctctggctgggtacttcgggggtctgtgctttcactcgtgatcactcttactgtaagcg<br>cggtcgggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgcagactactcaa<br>gaggaggacggctgttcacgccgggtcccagaggaggaggaaggcggtgcgaactgcgc<br>gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctaca<br>acgaactcaatcttggcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacggg<br>accagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaacgag<br>ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggaacgcagaa<br>gaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg<br>acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg |
| CAR 9 –<br>全长-aa       | 90 | malpvtalllplalllhaarpeiqqqsgaelvkpgasvklscgtsgfniedvvi <h1>wvkqrte</h1><br>qglewigr <b><u>ridpendetkvgpifggr</u></b> ratitadtssntvylqlssltstetavyyca <b><u>frggv</u></b> w<br>gpgttlvtssgggsgggsgggsgggshmdvmtqspitlsvaigqsasis <b><u>ckssqslldsdg</u></b><br><b><u>ktvln</u></b> wllqrpqgspkrlis <b><u>lvsklds</u></b> gvpdrtfgsgsgtdftlrisrveadlgiyy <b><u>cwggt</u></b><br><b><u>hfpgt</u></b> fgggtkleikttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyw<br>aplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrffeeeggcelrv<br>kfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynel<br>qkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr                                                                                                                                                                                     |
| <b>CAR10</b>           |    | Anti-EGFRvIII clone 139                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| CAR10<br>scFv<br>结构域   | 91 | diqmtqspsslsasvdrvitcrasqgirnnlawyqqkpgkapkrliyaasnlqsgvpsrft<br>gsgsgteftlivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggtkveikrtgstsgsgkpgsggegsev<br>qvlesggglvqpqgslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstnyads<br>vkgrftisrdnskntlylqmnsraedtavyyagssgwseywgqgtlvtvss                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| CAR9<br>scFv<br>结构域 nt | 92 | gatatccaaatgactcagagccctcatccctgagcggcagcgtcggagacagggtgacat<br>cacgtgccgggcatccaaggcattagaataacttggcgtggtatcagcaaaaaccaggaa<br>aggccccgaagcgcctgatctacggcgcctccaaccttcagtcaggagtccctcgcgcttc<br>accgggagcggtagcggaactgagttacccttatcgtgctgctcctgcagccagaggacttc<br>gcgacctactactgcctccagcatcactcgtacccgttgacttcgggagggcggaaccaaggtc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

[0534]

|                             |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                             |    | <p>gaaatcaaacgcactggctcgacgtcagggtccggtaaacgggatcgggagaaggatcg<br/> gaagtccaagtgtgagagcggaggcggactcgtgcaacctggcgggtcgtcgggctc<br/> agctgtgccgcgtcgggttttactttcagctcgtacgtatgtcatgggtgcggcagggtccgg<br/> gaaaggggctggaatgggtgtccgctatttccggctcgggtggaagcaccaattacgccgac<br/> tccgtgaaggacgcttcaccatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatga<br/> actcgtgagagccgaggacaccgcagtgtactactgcgcagggtcaagcggctggtccga<br/> atactggggacagggcaccctcgtcactgtcagctcc</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| CAR10 -<br>可溶性<br>scFv - nt | 93 | <p>atggccctccctgtcaccgcccgtgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg<br/> atatccaaatgactcagagcccttcacccctgagcggcagcgtcggagacagggtgaccatc<br/> acgtgccgggcatcccaaggcattagaaataacttggcgtggtatcagcaaaaaccaggaaa<br/> ggccccgaagcgcctgatctacgcggcctccaaccttcagtcaggagtgcctcgcgcttca<br/> ccgggagcggtagcgggaactgagttacccttatcgtgtcgtccctgcagccagaggacttcg<br/> cgacctactactgcctccagcatcactcgtacccgttgacttcgggagcgggaaccaaggtcg<br/> aaatcaaacgcactggctcgacgtcagggtccggtaaacgggatcgggagaaggatcggga<br/> agtccaagtgtgagagcggaggcggactcgtgcaacctggcgggtcgtcgcggctcag<br/> ctgtgccgcgtcgggttttactttcagctcgtacgtatgtcatgggtgcggcagggtccggga<br/> aaggggctggaatgggtgtccgctatttccggctcgggtggaagcaccaattacgccgactc<br/> cgtgaaggacgcttcaccatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatgaa<br/> ctcgtgagagccgaggacaccgcagtgtactactgcgcagggtcaagcggctggtccgaa<br/> tactggggacagggcaccctcgtcactgtcagctcccatcaccatcaccaccaccatcac</p> |
| CAR10 -<br>可溶性<br>scFv - aa | 94 | <p><u>malpvtalllplalllhaar</u>pdqmtqspsslsasvgrvritcrasqgimnlawyqqkpgk<br/> apkrliyaasnlqsgvpsrftgsgsgteftlivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggtkveik<br/> rtgstsgsgkpgsggegseqvlesggglvqpqgsrlscaasgftfssyamswvrqapgkg<br/> lewvsaisgsggstnyadsvkgrftisrdnskntlylqmnsraedtavyycagssgwsey<br/> wgqgtlvtvss<u>shhhhhhhh</u></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| CAR 10<br>全长-nt             | 95 | <p>atggccctccctgtcaccgcccgtgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg<br/> atatccaaatgactcagagcccttcacccctgagcggcagcgtcggagacagggtgaccatc<br/> acgtgccgggcatcccaaggcattagaaataacttggcgtggtatcagcaaaaaccaggaaa<br/> ggccccgaagcgcctgatctacgcggcctccaaccttcagtcaggagtgcctcgcgcttca<br/> ccgggagcggtagcgggaactgagttacccttatcgtgtcgtccctgcagccagaggacttcg<br/> cgacctactactgcctccagcatcactcgtacccgttgacttcgggagcgggaaccaaggtcg</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

[0535]

|                 |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                 |    | aaatcaaacgcactggctcgacgtcagggtccggtaaaccgggatcgggagaaggatcggga<br>agtccaagtgtctggagagcggagggcggactcgtgcaacctggcgggtcgtcgggtcag<br>ctgtgccgcgtcgggttttactttcagctcgtacgtatgtcatgggtgcggcaggctccggga<br>aaggggctggaatgggtgtccgtatttccggctcgggtggaagcaccaattacgccgactc<br>cgtgaaggagcgttcacatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatgaa<br>ctgctgagagccgaggacaccgcagtgtactactgcgcagggtcaagcggctggtccgaa<br>tactggggacagggcaccctcgtcactgtcagctccaccactacccagcaccgaggccac<br>ccacccggctcctaccatgcctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccg<br>cagctggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgcccc<br>tctggctggtacttgcggggctcgtgctttcactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcg<br>gaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtgcagactactcaagagga<br>ggacggctgttcatgccgggtcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaa<br>attcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa<br>ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccca<br>gaaatggcggggaagccgcgcagaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaa<br>aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggaacgcagaagaggc<br>aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctc<br>ttcacatgcaggccctgccgcctcgg |
| CAR 10<br>全长-aa | 96 | malpvtalllplalllhaarpdqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgirnlnlawyqqkpgk<br>apkrliyaasnlqsgvpsrftgsgsgteftlivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggtkveik<br>rtgstsgsgkpgsggsevqvlesggglvqppgslrlscaasgftfssyamswvrqapgkg<br>lewvsaisgsggstnyadsvkgrftisrdnsntlylqmnsraedtavyycagssgwsey<br>wgqgtlvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfdacdiyiwapla<br>gtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfeeeeggcelrvkfsrs<br>adapaykqgqnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdk<br>maeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

[0536] 然后将CAR scFv片段克隆在慢病毒载体中以产生在单个编码框中的全长CAR构建体,其中使用EF1 $\alpha$ 启动子用于表达 (SEQ ID NO:97)。

[0537] EF1 $\alpha$ 启动子

GTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAG  
AAGTTGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGG  
TAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGA  
GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGC  
CGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGG  
GTTATGGCCCTTGCCTGTCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTG  
ATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGG  
AGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCG  
TGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCA  
TTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA  
[0538] ATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCCGGCGCGAC  
GGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGC  
CACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGC  
CTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACC  
AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA  
TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAA  
AGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCC  
GTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGG  
GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTA  
GGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGAT  
CTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTACAG  
TGTCGTGA (SEQ ID NO: 97).

[0539] CAR9, CAR10和选择的人源化EGFRvIII CAR构建体的表面表达和 FACS染色

[0540] 以下实验显示,对于在Jurkat细胞和原代T细胞两者上基于 EGFRvIII的体外结合研究,看起来存在亲合力差异。

[0541] 用Amaya Cell Line Nucleofector试剂盒V (Lonza, Colgne AG, Germany) 和 program X-001,用CAR9载体或CAR10载体电穿孔Jurkat E6细胞。转染后一天,将 $0.5 \times 10^6$ 细胞接种在V形96孔板 (Greiner Bio-One, Germany) 各孔的0.2ml FACS缓冲液 (含有5%FBS的DPBS缓冲液) 中,室温孵育10分钟。然后离心沉淀细胞,在具有不同浓度的 EGFRvIII-Fc或EGFRwt-Fc的0.2ml FACS缓冲液中重悬细胞,4℃温育 30分钟。然后用FACS缓冲液洗涤细胞三次,与具有2μl PE抗人IgG Fc (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 的0.2ml FACS 缓冲液在暗处4℃孵育30分钟。在用0.2ml FACS缓冲液洗涤3次后,在LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA) 机器上使用FACSDiva软件 (BD Biosciences, San Jose, CA) 分析细胞。以活细胞的相对log荧光,分析免疫荧光染色,并测量PE阳性细胞的百分比。

[0542] 如图12所示, Jurkat细胞中表达的CAR9与EGFRvIII-Fc融合蛋白的结合,比与野生型EGFR-Fc的结合,强大约1000倍。此外,与CAR9 相比,表达CAR10的CART构建体表现出显著较低的 (~40倍) EGFRvIII 结合。这说明,尽管鼠CAR9结合EGFRvIII,但其仍保留了与野生

型EGFR 的一些结合。此外,这强烈表明,与CAR10构建体相比,CAR9对EGFRvIII 具有更高的结合亲合力。

[0543] 在原代T细胞中的其它实验产生了相似的结果。简言之,原代人CD3<sup>+</sup> T细胞用抗CD3/CD28珠刺激24小时,然后用编码CAR9,CAR10,CAR6 或对照CAR的慢病毒载体以3:1的MOI转导细胞。在实验中还包括模拟物转导的T细胞群。将这些细胞在培养中扩增大约8-9天,直到它们开始静息下来。在该点,将 $0.5 \times 10^6$ 细胞接种到V形96孔板各孔中。用PBS 洗涤细胞一次,用Live/Dead试剂(在PBS中1:1000)冰上染色30分钟。然后用FACS缓冲液洗涤细胞两次,与1 $\mu$ g/ml生物素化的EGFRvIII或 EGFR wt蛋白在冰上孵育30min。然后洗涤细胞两次,与具有1:1000 稀释的链霉亲和素-PE的0.2ml FACS缓冲液在冰上孵育15min。用 FACS缓冲液洗涤两次后,在LSRII上分析细胞。以活细胞的相对log荧光,分析免疫荧光染色,测量PE阳性细胞的百分比和阳性群体的几何平均值。

[0544] 如图13所示,当饱和量的EGFRvIII蛋白用于检测时,即使所有构建体等同地转导(所有构建体为~50%转导效率),CAR9和CAR6 CARs显示出比CAR10(仅2K)高10倍的EGFRvIII结合几何平均值(CAR9为21K, CAR6为27K)。类似地,如EGFR wt蛋白染色的log值向下迁移所显示的,对EGFR wt蛋白的特异性低大约10倍。这进一步支持了在Jurkat细胞中的以上发现,该发现说明,当在原代T细胞中表达时,与CAR10相比,CAR9和CAR6具有更强的EGFRvIII蛋白亲合力;提示它们将在临床上更有效。

[0545] 该组人源化CAR构建体的功能性分析如实施例8中所述进行。

[0546] 实施例8:分析T细胞中人源化EGFRvIII特异性CAR构建体

[0547] 为了评价通过CAR技术靶向EGFRvIII的可行性,将人源化 EGFRvIII scFv片段以两种不同构型与CD3 $\zeta$ 链和4-1BB共刺激分子一起克隆到慢病毒CAR表达载体中。基于EGFRvIII CAR转导的T细胞响应于EGFRvIII<sup>+</sup>和EGFR wt靶产生的效应T细胞反应的数量和质量,选择最佳的构建体。效应T细胞反应包括但不限于,细胞扩增、增殖、倍增、细胞因子产生、和靶细胞杀伤或细胞裂解活性(脱粒)。

[0548] 材料和方法

[0549] 产生Jurkat报道细胞系用于CAR功能的最初表征

[0550] 作为原代T细胞转导和活化的替代方案,可以使用Jurkat-NFAT报道细胞系以评价CAR构建体的功能活性。用NFAT-萤光素酶报道分子构建体转染了Jurkat T细胞系(E6-1),基于PMA和离子霉素刺激后NFAT 报道分子的强诱导,选择稳定的克隆细胞系(JNL)用于进一步表征。用慢病毒载体以5:1的MOI转染JNL细胞,然后扩增5-7天。在用于试验之前,在LSRII上通过流式细胞术分析,确定转导的细胞(在细胞表面上表达 EGFRvIII CAR)的百分比和其表达的相对荧光强度。从直方图,可以通过比较转导的百分比与其相对荧光强度,检查CAR的相对表达水平。

[0551] 评价人源化EGFRvIII特异性CAR JNL细胞的T细胞活化

[0552] 为了在JNL报道细胞系中评价T细胞活化,将JNL或CAR-转导的 JNL细胞以每孔50,000细胞接种在具有透明底的96孔黑色板中。将靶细胞(BHK亲本细胞或经工程化以表达EGFRvIII或EGFR wt的BHK细胞)加入孔中,以产生1:2,1:1,1:0.3,1:0.1,1:0.03,1:0.01,1:0.003的效应细胞:靶细胞比例(E:T)。使用PMA和离子霉素作为活化的阳性对照。将细胞在37℃孵育16-24hrs。在孵育结束后,向每孔加入等体积的Bright-Glo 萤光素酶试验试

剂。室温孵育板子10分钟,然后使用荧光仪测量荧光。

[0553] 产生重定向的人源化EGFRvIII特异性CAR T细胞

[0554] 使用人源化EGFRvIII特异性CAR慢病毒转移载体,产生包装在 VSVg假型慢病毒颗粒中的基因组物质。慢病毒转移载体DNA与VSVg的三个包装成分gag/pol和rev以及lipofectamine试剂混合,将它们一起转移到293T细胞中。24和48hr后,收集培养基,过滤,通过超离心或色谱进行浓缩。所得病毒制备物储存在-80℃。通过在SupT1细胞上滴定,确定转导单位数。

[0555] 通过与CD3x28珠结合24小时以活化新鲜T细胞,然后加入合适数量的转导单位以获得期望的转导T细胞百分比,从而产生重定向的 EGFRvIII特异性CART细胞。允许这些修饰的T细胞扩增,直到其达到静息并且大小减少(~300f1),在此点冷藏细胞用于后期分析。使用Coulter multisizer III测量细胞数量和大小。在冷藏之前,在LSRII上通过流式细胞术分析,确定转导的细胞(在细胞表面上表达EGFRvIII特异性CAR) 的百分比和其表达的相对荧光强度。从直方图,可以通过比较转导的百分比与其相对荧光强度,检查CAR的相对表达水平。

[0556] 评价人源化EGFRvIII重定向的CAR T细胞的细胞裂解活性、增殖能力和细胞因子分泌

[0557] 为了评价人源化EGFRvIII特异性CAR T细胞的杀伤、增殖和分泌细胞因子的功能能力,融化细胞,使其过夜恢复。除了人源化构建体外,使用鼠CAR9用于比较目的,而SS1-BBz作为非靶向表达的CAR用于背景CAR/T细胞效应。对于该流式细胞毒性试验(flow based cytotoxicity assay),用CSFE染色靶细胞以定量其存在。还对靶细胞进行EGFRvIII 表达染色以证实相似的靶抗原水平。以10:1,3:1,1:1,0.3:1和0:1效应细胞:靶细胞比例的滴度,测量EGFRvIII CAR T细胞的细胞裂解活性,在此效应细胞被限定为表达抗EGFRvIII CAR的T细胞。通过将合适数量的T 细胞与恒定数量的靶细胞混合,开始试验。在4或16小时后,移出每个混合物的总体积,洗涤各孔。对T细胞进行CD3染色,并用live/dead标记物7AAD染色所有细胞。在最终洗涤后,将沉淀的细胞与预先确定数目的计数珠重悬在特定体积中。通过LSRII流式细胞术收集细胞染色数据,用FlowJo软件分析数据,使用珠子以量化结果。

[0558] 为了测量人源化CAR-EGFRvIII T细胞的细胞增殖和细胞因子产生,融合细胞,使其过夜恢复。除了人源化CAR-EGFRvIII外,使用鼠CAR9 用于比较目的,而SS1-BBz作为非靶向表达的CAR用于背景CAR/T细胞效应。这些T细胞针对表达或不表达EGFRvIII的U87(星形细胞瘤来源的成胶质细胞瘤细胞系)。此外,使用CD3x28珠评价T细胞对第二轮内源性免疫学信号产生反应的潜力。为了分析增殖,用CSFE染色T细胞。增殖为CSFE染色的稀释,反映亲本标记现分离到两个子代细胞中。该试验仅测试了1:1和1:0的效应细胞:靶细胞比例,在此效应细胞被确定为经标化以常见百分比表达抗EGFRvIII嵌合受体的总T细胞(CD4和8)。该试验一式两份重复,在混合细胞后24小时进行。移出上清液用于测定细胞因子的产生。5天后,用Live/Dead Violet (Invitrogen) 染色T细胞以确定活/死,然后染色CAR表达,并分型为CD4或CD8细胞。在最终的洗涤后,将沉淀的细胞与预定数量的BD计数珠一起重悬在特定体积中。通过LSRII流式细胞术收集细胞染色数据,用FlowJo软件分析,使用珠子以量化结果。将相对于特定数量的珠子计数到的细胞数乘以计数的珠子的分数,确定总细胞计数。

[0559] 结果

[0560] Jurkat报道分子试验检查人源化CAR-EGFRvIII细胞识别 EGFRvIII靶细胞的能力

[0561] 使用JNL报道细胞系,测量了CAR构建体在与靶结合后诱导活化的能力。用NFAT-萤光素酶报道分子构建体,工程化改造JNL细胞系,该构建体在CAR的靶结合后可以被诱导。用各种CAR-EGFRvIII构建体 (CAR9,CAR3,CAR6,CAR8和CAR10) 转导JNL细胞。通过流式细胞术评价转导效率,证实对于所有构建体为大约45-52%。然后用7种不同E:T 比例,使用三种不同靶细胞(BHK亲本,BHK-EGFRvIII或BHK-EGFR wt),刺激JNL-CAR-EGFRvIII细胞。JNL亲本细胞和表达对照CAR的 JNL细胞被包括作为其它对照。图14的结果显示,对于所有测试的构建体,以低至1:0.01的比例均可以发生显著的靶诱导的活化,并且CAR6和 CAR10在较高的E:T比例可以诱导最大活化。使用表达EGFR wt的细胞或表达对照CAR的JNL细胞,未观察到显著活化。这些数据说明CAR 构建体对于EGFRvIII靶的特异性和对EGFRwt靶缺乏交叉反应性。

[0562] 用人源化EGFRvIII CAR构建体转导和扩增原代人T细胞

[0563] 从健康供体的单采血液成分术产品或全血获得CD3+ T细胞。如上所述,用CD3xCD28珠刺激T细胞24小时,然后用浓缩的慢病毒上清液以 3的MOI转导。细胞在培养中扩增8-10天。

[0564] 人源化EGFRvIII CAR的细胞表面表达与鼠CAR9相当,并且其表达水平非常类似于鼠CAR9。将绘制每个人源化EGFRvIII特异性CAR转导的T细胞的细胞表面表达染色模式的直方图重叠,从这些图计算的平均荧光强度(MFI) 与转导的细胞的百分比良好相关。

[0565] 增殖试验检查EGFRvIII靶细胞刺激人源化EGFRvIII CART细胞的能力

[0566] 在增殖试验中,评价了EGFRvIII特异性CAR T细胞响应靶结合而增殖的能力。通过流式细胞术,计数亚群。用人源化CARs、鼠CAR9或 SS1(靶向mesothelin),转导供体T细胞。CAR与靶细胞以1:1或1:0混合,共培养5天。图15显示ND407 EGFRvIII CAR T细胞以抗原特异性方式增殖的能力。破折线指示接种的T细胞数量,相比较地没有检测到靶向U87的T细胞数量增加,而与U87-EGFRvIII结合诱导了特异于 EGFRvIII CAR T细胞群的增殖。ND407的相对反应说明,CAR6和CAR8 比CAR9或CAR3更强有力。CD3x28珠的结果说明,其刺激不足以驱动基于第二轮活化的增殖,类似于根本无刺激。

[0567] 使用ND407 T细胞,对不同huEGFRvIII CARs,基于其优先扩增 CAR+ T细胞的能力进行筛选。图16显示CAR5和CAR6在每个供体中一致地具有最强的CAR+扩增。CAR+增加是与靶成功结合、增殖、和自抗原识别引起的活化诱导的细胞死亡中存活的结果。

[0568] 杀伤试验检查人源化EGFRvIII CART细胞杀伤EGFRvIII靶细胞的能力

[0569] 在铬释放试验中,检测了EGFRvIII特异性CART细胞杀伤靶的能力。人成胶质细胞瘤细胞系U-87MG经工程化以表达EGFR野生型受体或 EGFRvIII突变体。这些工程化细胞系在该杀伤试验中用作靶标。使用三种效应CART细胞,以测定杀伤靶细胞的特异性:1) 转导以表达鼠3C10 (CAR9) 的人T细胞,2) 转导以表达鼠3C10的人源化形式(也称作CAR6) 的人T细胞,和3) 转导了对mesothelin特异的CAR(SS1) 的人T细胞。将所有效应细胞标化至表达30% CAR+转导。用铬51标记靶细胞,并在共培养后立即洗涤。将效应细胞和靶细胞以所示比例(E:T) 混合在一起,温育4小时。

[0570] 图17(A) 结果显示,在高达50:1的E:T比例,与表达野生型EGFR 受体的U-87细胞混

合的CAR T细胞没有显示出高于背景的细胞杀伤。然而,图17(B)中的结果显示,相反地,与表达EGFRvIII的U-87细胞混合的EGFRvIII特异性CAR T细胞,CAR9或CAR6,在E:T比例6.25:1至50:1显示出特异性杀伤。当mesothelin特异性CAR T细胞用作效应细胞时,没有观察到显著杀伤。这些数据说明,CAR9和CAR6 T细胞对表达EGFRvIII的靶细胞具有特异性的靶向杀伤,但表达野生型EGFR的细胞不被CAR9和CAR6 T细胞杀伤,或不被非特异CAR T细胞(SS1)杀伤。

[0571] 细胞因子试验检查人源化EGFRvIII CART细胞促进抗肿瘤反应和显示特异性的能力

[0572] 在共培养试验中评价EGFRvIII特异性CAR T细胞响应靶结合而诱导细胞因子的能力。将CAR T细胞与靶表达细胞以各种靶:效应比例(0.3:1, 1:1, 3:1和10:1)共培养18-24hrs。靶细胞包括表达EGFR wt内源性蛋白的U87细胞(U87 wt),过表达EGFRvIII的U87细胞(U87-vIII),BHK(幼仓鼠肾细胞)亲本细胞,过表达人EGFR wt蛋白的BHK细胞(BHK wt),或过表达人EGFRvIII蛋白的BHK细胞(BHK-vIII)。18-24hrs后,从培养物移出上清液,使用Cytometric Bead试验(CBA)分析细胞因子。结果清楚地表明:1) CAR6和CAR9 T细胞响应于EGFRvIII表达细胞诱导了相似水平的IFN $\gamma$ ;和2)没有CAR T细胞群响应EGFR wt表达细胞诱导IFN $\gamma$ 。重要的是,这些数据与杀伤和增殖数据一起表明,CAR6和CAR9表现出对EGFRvIII的功能性特异性,具有促进抗肿瘤免疫反应的能力。

[0573] 实施例9:人源化抗EGFRvIII CART细胞在小鼠中减少肿瘤负荷

[0574] 在小鼠中体内证实了人源化抗EGFRvIII CAR T细胞可以减小肿瘤负荷。例如,将#2173(CAR6)人源化抗EGFRvIII嵌合抗原受体(CAR)经慢病毒转导人T淋巴细胞,将该转导的细胞静脉内递送给异种免疫受损的NOD/SCID/common- $\gamma$ 链-/-小鼠,其中所述小鼠已经以建立的U87vIII胶质细胞瘤体内进行过处理。带有5日建立的U87vIII皮下腰窝肿瘤的对照小鼠接受供体匹配的非CAR转导的T细胞,通过使用卡尺直接测量皮下肿瘤(最大长度x最大宽度),并通过光谱体内成像系统(IVIS)测量光子发射,该对照小鼠的肿瘤生长迅速。在接受甚至低数量( $0.5-1 \times 10^6$ )的CAR6转导细胞的处理小鼠中,小鼠中的肿瘤生长以剂量依赖性方式显著地降低。

[0575] 在此实施例中,洗涤表达EGFRvIII,GFP+Luc+的 $1 \times 10^6$  U87vIII人胶质细胞瘤,在100 $\mu$ L盐水中皮下注射到30只NSG免疫受损小鼠的腰窝中(N=10/组)。用抗CD3/28包被的珠刺激人T细胞,用人源化EGFRvIII CAR scFv#2173(CAR6)经慢病毒转导这些细胞。在转导后,离体扩增和除去珠子,洗涤CAR转导的T细胞(通过流式细胞术~50%CAR+),在肿瘤植入后5天经尾静脉注射在100 $\mu$ L盐水中的所述细胞。通过卡尺测量(左上)、萤光素诱导的光子发射(右上),评价肿瘤生长。在T细胞转移后7天和肿瘤注射后12天,开始所述测量。图18中显示SEM(N=10小鼠/组)。图18中通过Kaplan Meier曲线绘制每组的存活(下方)。所有接受对照T细胞的小鼠到第26日均死亡,接受 $0.5 \times 10^6$ 和 $1.0 \times 10^6$  CAR6 T-细胞的组截止到第30实验日分别为30%和90%存活。

[0576] 等同方案

[0577] 本文引用的每一份和所有专利、专利申请和出版物的内容均特此完整地并入此处作为参考。尽管本发明已经就特定方面进行了公开,但明显地,本领域技术人员可以想到本发明的其它方面和变形,而不偏离本发明的真实精神和范围。后附权利要求书应理解为包

括所有这些方面和等同变形方案。

[0578] 本发明的一些实施方案如下：

[0579] 1. 编码嵌合抗原受体 (CAR) 的分离的核酸分子, 其中所述CAR包含抗EGFRvIII结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域, 所述胞内信号传导结构域包含刺激结构域, 其中所述抗EGFRvIII结合结构域包含表2或SEQ ID NO: 11中所列的任何抗EGFRvIII轻链结合结构域氨基酸序列的轻链互补决定区1 (LC CDR1)、轻链互补决定区2 (LC CDR2) 和轻链互补决定区3 (LC CDR3) 之一或多个, 以及表2或SEQ ID NO: 11中所列的任何抗EGFRvIII重链结合结构域氨基酸序列的重链互补决定区1 (HC CDR1)、重链互补决定区2 (HC CDR2)、和重链互补决定区3 (HC CDR3) 之一或多个。

[0580] 2. 实施方案1的分离的核酸分子, 包含表2或SEQ ID NO: 11中所列的任何抗EGFRvIII轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。

[0581] 3. 实施方案1的分离的核酸分子, 包含表2或SEQ ID NO: 11中所列的任何抗EGFRvIII重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。

[0582] 4. 实施方案1的分离的核酸分子, 包含表2或SEQ ID NO: 11中所列的任何抗EGFRvIII轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3, 以及表2或SEQ ID NO: 11中所列的任何抗EGFRvIII重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。

[0583] 5. 实施方案1的分离的核酸分子, 包含表2或SEQ ID NO: 11中所列的任何轻链可变区。

[0584] 6. 实施方案1的分离的核酸分子, 包含表2或SEQ ID NO: 11中所列的任何重链可变区。

[0585] 7. 实施方案1的分离的核酸分子, 包含表2或SEQ ID NO: 11中所列的任何轻链可变区和表2或SEQ ID NO: 11中所列的任何重链可变区。

[0586] 8. 任何前述实施方案的分离的核酸分子, 其中EGFRvIII结合结构域是scFv。

[0587] 9. 任何前述实施方案的分离的核酸分子, 其中轻链可变区包含在表2或SEQ ID NO: 11中提供的轻链可变区氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰但不超过30、20或10个修饰的氨基酸序列、或与表2或SEQ ID NO: 11中提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0588] 10. 任何前述实施方案的分离的核酸分子, 其中重链可变区包含在表2或SEQ ID NO: 11中提供的重链可变区氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰但不超过30、20或10个修饰的氨基酸序列、或与表2或SEQ ID NO: 11中提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0589] 11. 任何前述实施方案的分离的核酸分子, 其中抗EGFRvIII结合结构域包含选自SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 80和SEQ ID NO: 86的序列, 或与其具有95-99%同一性的序列。

[0590] 12. 任何前述实施方案的分离的核酸分子, 其中编码抗EGFRvIII结合结构域的核酸序列包含选自SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 81和SEQ ID NO: 98的序列、或与其具有95-

99%同一性的序列。

[0591] 13.任何前述实施方案的分离的核酸分子,其中编码的CAR包括跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自以下蛋白的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ , $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154。

[0592] 14.任何前述实施方案的分离的核酸分子,其中编码的跨膜结构域包含SEQ ID NO:15 的序列。

[0593] 15.任何前述实施方案的分离的核酸分子,其中编码的跨膜结构域包含在SEQ ID NO:15 的氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0594] 16.任何前述实施方案的分离的核酸分子,其中编码跨膜结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:8的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0595] 17.任何前述实施方案的分离的核酸分子,其中编码的抗EGFRvIII结合结构域通过铰链区与跨膜结构域连接。

[0596] 18.实施方案17的分离的核酸分子,其中编码的铰链区包含SEQ ID NO:14、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0597] 19.实施方案17的分离的核酸分子,其中编码铰链区的核酸序列包含SEQ ID NO:7 的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0598] 20.任何前述实施方案的分离的核酸分子,还包含编码共刺激结构域的序列。

[0599] 21.实施方案20的分离的核酸分子,其中编码的共刺激结构域包含选自以下蛋白的功能性信号传导结构域:OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137)。

[0600] 22.实施方案20或21的分离的核酸分子,其中编码的共刺激结构域包含SEQ ID NO:16 的序列。

[0601] 23.实施方案20或21的分离的核酸分子,其中编码的共刺激结构域包含在SEQ ID NO:16 的氨基酸序列中包含至少一个、两个或三个修饰(例如替代)但不超过20、10或5个修饰(例如替代)的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0602] 24.实施方案20或21的分离的核酸分子,其中编码共刺激结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:9的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0603] 25.任何前述实施方案的分离的核酸分子,还包含编码胞内信号传导结构域的序列。

[0604] 26.任何前述实施方案的分离的核酸分子,其中编码的胞内信号传导结构域包含4-1BB 的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域。

[0605] 27.任何前述实施方案的分离的核酸分子,其中编码的胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16的序列和/或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的序列。

[0606] 28.任何前述实施方案的分离的核酸分子,其中胞内信号传导结构域包含在SEQ ID NO:16的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的氨基酸序列中具有至少一个、两个或三个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0607] 29.任何前述实施方案的分离的核酸分子,其中编码的胞内信号传导结构域包含

SEQ ID NO:16的序列和SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的序列,其中包含胞内信号传导结构域的这些序列在相同读框中作为单个多肽链表达。

[0608] 30.任何前述实施方案的分离的核酸分子,其中编码胞内信号传导结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:9的序列或与其具有95-99%同一性的序列、和/或SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:100的序列或与其具有95-99%同一性的序列。

[0609] 31.任何前述实施方案的分离的核酸分子,还包含前导序列。

[0610] 32.实施方案31的分离的核酸分子,其中前导序列包含SEQ ID NO:13。

[0611] 33.由实施方案1-32之任一项的核酸分子编码的分离的多肽分子。

[0612] 34.实施方案33的分离的多肽分子,包含选自SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:90的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0613] 35.实施方案34的分离的多肽分子,包含SEQ ID NO:73的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0614] 36.实施方案34的分离的多肽分子,包含SEQ ID NO:79的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0615] 37.分离的嵌合抗原受体(CAR)分子,包含抗EGFRvIII结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域。

[0616] 38.实施方案37的分离的CAR分子,其中胞内信号传导结构域包含共刺激结构域和/或一级信号传导结构域。

[0617] 39.实施方案37或38的分离的CAR分子,其中抗EGFRvIII结合结构域包含包括抗EGFRvIII结合结构域的抗体或抗体片段。

[0618] 40.实施方案37-39之任一项的分离的CAR分子,其中抗EGFRvIII结合结构域包含表2或SEQ ID NO:11中所列的任何抗EGFRvIII结合结构域的轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)之一或多个,以及表2或SEQ ID NO:11中所列的任何抗EGFRvIII结合结构域的重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)之一或多个。

[0619] 41.实施方案37-40之任一项的分离的CAR分子,包含表2或SEQ ID NO:11中所列的任何抗EGFRvIII轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。

[0620] 42.实施方案37-41之任一项的分离的CAR分子,包含表2或SEQ ID NO:11中所列的任何抗EGFRvIII重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。

[0621] 43.实施方案37-42之任一项的分离的CAR分子,包含表2或SEQ ID NO:11中所列的任何抗EGFRvIII轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3,和表2或SEQ ID NO:11中所列的任何抗EGFRvIII重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。

[0622] 44.实施方案37-43之任一项的分离的CAR分子,其中抗EGFRvIII结合结构域是scFv。

[0623] 45.实施方案37-44之任一项的分离的CAR分子,其中抗EGFRvIII结合结构域包含表2或SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列的轻链和重链。

[0624] 46.实施方案37-45之任一项的分离的CAR分子,其中抗EGFRvIII结合结构域包含:

轻链可变区,所述轻链可变区包含在表2或SEQ ID NO:11中提供的轻链可变区氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰但不超过30、20或10个修饰的氨基酸序列、或与表2或SEQ ID NO:11中提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0625] 47.实施方案37-46之任一项的分离的CAR分子,其中抗EGFRvIII结合结构域包含重链可变区,所述重链可变区包含在表2或SEQ ID NO:11中提供的重链可变区氨基酸序列上具有至少一个、两个或三个修饰但不超过30、20或10个修饰的氨基酸序列、或与表2或SEQ ID NO:11中提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0626] 48.实施方案37-47之任一项的分离的CAR分子,其中抗EGFRvIII结合结构域包含选自SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:86的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0627] 49.实施方案37-48之任一项的分离的CAR分子,还包含选自以下蛋白的跨膜结构域: T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154。

[0628] 50.实施方案49的分离的CAR分子,其中跨膜结构域包含SEQ ID NO:15的序列。

[0629] 51.实施方案49或50的分离的CAR分子,其中跨膜结构域包含在SEQ ID NO:15的氨基酸序列中具有至少一个、两个或三个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0630] 52.实施方案37-51之任一项的分离的CAR分子,其中抗EGFRvIII结合结构域通过铰链区与跨膜结构域连接。

[0631] 53.实施方案52的分离的CAR分子,其中编码的铰链区包含SEQ ID NO:14、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0632] 54.实施方案37-53之任一项的分离的CAR分子,还包含编码共刺激结构域的序列。

[0633] 55.实施方案54的分离的CAR分子,其中共刺激结构域包含选自以下的蛋白的功能性信号传导结构域:OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18) 和4-1BB (CD137)。

[0634] 56.实施方案54或55的分离的CAR分子,其中共刺激结构域包含SEQ ID NO:16的序列。

[0635] 57.实施方案54或55的分离的CAR分子,其中共刺激结构域包含在SEQ ID NO:16的氨基酸序列中具有至少一个、两个或三个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0636] 58.实施方案37-57之任一项的分离的CAR分子,还包含编码胞内信号传导结构域的序列。

[0637] 59.实施方案58的分离的CAR分子,其中胞内信号传导结构域包含4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域。

[0638] 60.实施方案58或59的分离的CAR分子,其中胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16 的序列和/或SEQ ID NO:17的序列。

[0639] 61.实施方案58或59的分离的CAR分子,其中胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16 的序列和/或SEQ ID NO:99的序列。

[0640] 62.实施方案58-61之任一项的分离的CAR分子,其中胞内信号传导结构域包含在

SEQ ID NO:16的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的氨基酸序列中具有至少一个、两个或三个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0641] 63.实施方案58-61之任一项的分离的CAR分子,其中胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16的序列和SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:99的序列,其中包含胞内信号传导结构域的这些序列在相同读框中作为单一多肽链表达。

[0642] 64.实施方案37-63之任一项的分离的CAR分子,还包含前导序列。

[0643] 65.实施方案64的分离的CAR分子,其中前导序列包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0644] 66.抗EGFRvIII结合结构域,其包含SEQ ID NO:38、44、50、56、62、68、74或80 中的抗EGFRvIII结合结构域的轻链互补决定区1 (LC CDR1)、轻链互补决定区2 (LC CDR2) 和轻链互补决定区3 (LC CDR3) 的一个或多个,和SEQ ID NO:38、44、50、56、62、68、74或80中的抗EGFRvIII结合结构域的重链互补决定区1 (HC CDR1)、重链互补决定区2 (HC CDR2) 和重链互补决定区3 (HC CDR3) 的一个或多个。

[0645] 67.实施方案66的抗EGFRvIII结合结构域,包含SEQ ID NO:38、44、50、56、62、68、74或80中抗EGFRvIII轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。

[0646] 68.实施方案66或67的抗EGFRvIII结合结构域,包含SEQ ID NO:38、44、50、56、62、68、74或80中抗EGFRvIII重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。

[0647] 69.实施方案66-68之任一项的抗EGFRvIII结合结构域,包含SEQ ID NO:38、44、50、56、62、68、74或80中抗EGFRvIII轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1、LC CDR2 和LC CDR3,以及SEQ ID NO:38、44、50、56、62、68、74或80中抗EGFRvIII重链结合结构域氨基酸序列的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。

[0648] 70.实施方案66-69之任一项的抗EGFRvIII结合结构域,包含表2中轻链可变区和SEQ ID NO:38、44、50、56、62、68、74或80中重链可变区。

[0649] 71.实施方案66-70之任一项的抗EGFRvIII结合结构域,包含在SEQ ID NO:38、44、50、56、62、68、74或80提供的轻链可变区氨基酸序列中具有至少一个、两个或三个修饰但不超过30、20或10个修饰的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:38、44、50、56、62、68、74或80中氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,所述重链可变区包含在SEQ ID NO:38、44、50、56、62、68、74或80提供的重链可变区氨基酸序列中具有至少一个、两个或三个修饰但不超过30、20或10个修饰的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:38、44、50、56、62、68、74或80中序列具有95-99%同一性的序列。

[0650] 72.实施方案66-71之任一项的抗EGFRvIII结合结构域,包含选自SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:86的序列、或与其具有95-99%同一性的序列。

[0651] 73.包含任何前述实施方案的编码CAR的核酸分子的载体。

[0652] 74.实施方案73的载体,其中该载体选自DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、或逆转录病毒载体。

[0653] 75.实施方案73或74的载体,还包含启动子。

[0654] 76.实施方案75的载体,其中启动子是EF-1启动子。

- [0655] 77. 实施方案76的载体, 其中EF-1启动子包含SEQ ID NO:97的序列。
- [0656] 78. 实施方案73-77之任一载体, 其中载体是体外转录载体。
- [0657] 79. 实施方案73-78之任一载体, 其中载体中所述核酸序列还包含poly (A) 尾。
- [0658] 80. 实施方案73-79之任一载体, 其中载体中所述核酸序列还包含3' UTR。
- [0659] 81. 包含实施方案73-80之任一载体的细胞。
- [0660] 82. 实施方案81的细胞, 其中细胞是T细胞。
- [0661] 83. 实施方案82的细胞, 其中T细胞是CD8<sup>+</sup> T细胞。
- [0662] 84. 实施方案81或82的细胞, 其中细胞是人细胞。
- [0663] 85. 制备细胞的方法, 包括用实施方案73-80的载体转导T细胞。
- [0664] 86. 产生RNA工程化细胞群的方法, 包括将体外转录的RNA或合成的RNA引入细胞中, 其中所述RNA包含编码本文所述CAR分子的核酸。
- [0665] 87. 提供抗肿瘤免疫的方法, 包括向哺乳动物施用有效量的表达实施方案37-65的CAR 分子的细胞。
- [0666] 88. 实施方案87的方法, 其中细胞是自体T细胞。
- [0667] 89. 实施方案87或88的方法, 其中细胞是同种异体T细胞。
- [0668] 90. 实施方案87-89之任一的方法, 其中哺乳动物是人。
- [0669] 91. 治疗罹患EGFRvIII表达相关疾病的哺乳动物的方法, 包括向哺乳动物施用有效量的表达实施方案37-65之任一CAR分子的细胞。
- [0670] 92. 实施方案91的方法, 其中EGFRvIII表达相关疾病是成胶质细胞瘤。
- [0671] 93. 实施方案91或92的方法, 其中EGFRvIII表达相关疾病选自: 多形性成胶质细胞瘤 (GBM)、间变型星形细胞瘤、巨细胞型成胶质细胞瘤、胶质肉瘤、间变型少突胶质细胞瘤、间变型室管膜细胞瘤、脉络丛瘤、间变性神经节胶质细胞瘤(anaplastic ganglioglioma)、成松果体细胞瘤、髓上皮瘤、成室管膜细胞瘤、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤 (supratentorial primitive neuroectodermal tumor)、非典型畸胎样/横纹肌样瘤 (atypical teratoid/rhabdoid tumor)、肺癌 (例如非小细胞肺癌)、胸、前列腺、卵巢、结直肠和膀胱癌、以及其任何组合, 和任何所述癌症的转移。
- [0672] 94. 实施方案91-93之任一的方法, 其中表达CAR分子的细胞与增强CAR分子表达细胞的功效的活性剂组合施用。
- [0673] 95. 实施方案91-94之任一的方法, 其中表达CAR分子的细胞与改善和CAR分子表达细胞施用相关的一种或多种副反应的活性剂组合使用。
- [0674] 96. 实施方案91-95之任一的方法, 其中表达CAR分子的细胞与治疗EGFRvIII相关疾病的活性剂组合施用。
- [0675] 97. 实施方案1-32之任一分离的核酸分子、实施方案33-36之任一分离的多肽分子、实施方案37-65之任一分离的CAR、实施方案66-72之任一抗EGFRvIII结合结构域、实施方案73-80之任一载体或实施方案81-84之任一细胞, 用作药物。
- [0676] 98. 实施方案1-32之任一分离的核酸分子、实施方案33-36之任一分离的多肽分子、实施方案37-65之任一分离的CAR、实施方案66-72之任一抗EGFRvIII结合结构域、实施方案73-80之任一载体或实施方案81-84之任一细胞, 用于治疗表达EGFRvIII的疾病的用途。

## 序列表

&lt;110&gt; 诺华股份有限公司 (NOVARTIS AG )

宾夕法尼亚大学托管会 ( TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA)

高等教育联邦体系匹兹堡大学 ( UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE  
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION)

&lt;120&gt; 使用人源化抗EGFRvIII嵌合抗原受体治疗癌症

&lt;130&gt; N2067-7000W0

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; 61/888,255

&lt;151&gt; 2013-10-08

&lt;150&gt; 61/767,071

&lt;151&gt; 2013-02-20

&lt;160&gt; 127

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 535

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

&lt;400&gt; 1

```

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

```

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Met Asp Val Val Met Thr Gln |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Ala Ile Gly Gln Ser Ala Ser Ile Ser |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Ser |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ser Thr Thr Thr Pro |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |

Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn  
 435 440 445  
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg  
 450 455 460  
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly  
 465 470 475 480  
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu  
 485 490 495  
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu  
 500 505 510  
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His  
 515 520 525  
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 530 535  
 <210> 2  
 <211> 491  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成的  
 多肽"  
 <400> 2  
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala  
 20 25 30  
 Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser  
 35 40 45  
 Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr  
 50 55 60  
 Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu  
 65 70 75 80  
 Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp  
 85 90 95  
 Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu  
 100 105 110  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly  
 115 120 125

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Met Asp Val Val Met Thr Gln |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Ala Ile Gly Gln Ser Ala Ser Ile Ser |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Ser |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 | 255 |
| Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ser Thr Thr Thr Pro |     |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 | 270 |
| Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu |     |     |     |
|                                                                 | 275 | 280 | 285 |
| Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His |     |     |     |
|                                                                 | 290 | 295 | 300 |
| Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |
| Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys |     |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 | 415 |
| Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn |     |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 | 430 |
| Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu |     |     |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 |
| Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg                     |     | 480 |
| 485                                                             | 490 |     |
| <210> 3                                                         |     |     |
| <211> 488                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <221> 来源                                                        |     |     |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"                                       |     |     |
| <400> 3                                                         |     |     |
| Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Ile Val Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Gln His His Ser Tyr Pro Leu Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Glu Gly Ser Glu Val Gln Val Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu |     |     |

|                                                                 |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                                                 | 180 |     | 185 |     | 190 |
| Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala |     |     |     |     |     |
| 195                                                             |     | 200 |     | 205 |     |
| Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn |     |     |     |     |     |
| 210                                                             |     | 215 |     | 220 |     |
| Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val |     |     |     |     |     |
| 225                                                             |     | 230 |     | 235 | 240 |
| Tyr Tyr Cys Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly |     |     |     |     |     |
| 245                                                             |     | 250 |     | 255 |     |
| Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg |     |     |     |     |     |
| 260                                                             |     | 265 |     | 270 |     |
| Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg |     |     |     |     |     |
| 275                                                             |     | 280 |     | 285 |     |
| Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly |     |     |     |     |     |
| 290                                                             |     | 295 |     | 300 |     |
| Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr |     |     |     |     |     |
| 305                                                             |     | 310 |     | 315 | 320 |
| Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg |     |     |     |     |     |
| 325                                                             |     | 330 |     | 335 |     |
| Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro |     |     |     |     |     |
| 340                                                             |     | 345 |     | 350 |     |
| Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu |     |     |     |     |     |
| 355                                                             |     | 360 |     | 365 |     |
| Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala |     |     |     |     |     |
| 370                                                             |     | 375 |     | 380 |     |
| Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu |     |     |     |     |     |
| 385                                                             |     | 390 |     | 395 | 400 |
| Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly |     |     |     |     |     |
| 405                                                             |     | 410 |     | 415 |     |
| Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu |     |     |     |     |     |
| 420                                                             |     | 425 |     | 430 |     |
| Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser |     |     |     |     |     |
| 435                                                             |     | 440 |     | 445 |     |
| Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly |     |     |     |     |     |
| 450                                                             |     | 455 |     | 460 |     |
| Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu |     |     |     |     |     |
| 465                                                             |     | 470 |     | 475 | 480 |
| His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg                                 |     |     |     |     |     |
| 485                                                             |     |     |     |     |     |

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| <210> 4                                                           |     |
| <211> 729                                                         |     |
| <212> DNA                                                         |     |
| <213> 小鼠 (Mus sp.)                                                |     |
| <400> 4                                                           |     |
| gagattcagc tgcagcaatc tggggcagaa cttgtgaagc caggggcctc agtcaagctg | 60  |
| tcctgcacag gttctggctt caacattgaa gactactata ttcactgggt gaagcagagg | 120 |
| actgaacagg gcctggaatg gattggaagg attgatcctg agaatgatga aactaaatat | 180 |
| ggcccaatat tccagggcag ggccactata acagcagaca catcctccaa cacagtctac | 240 |
| ctgcaactca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc ctttcgcggt | 300 |
| ggagtctact gggggccagg aaccactctc acagtctcct caggagggtg tggttcggt  | 360 |
| ggtggtggtt ccggagggtg tggttcacat atggatgttg tgatgacca gtctccactc  | 420 |
| actctatcgg ttgccattgg acaatcagcc tccatctctt gcaagtcaag tcagagcctc | 480 |
| ttagatagtg atggaaagac atatttgaat tggttgttac agaggccagg ccagtctcca | 540 |
| aagcgctaa tctctctggt gtctaaactg gactctggag tccctgacag gttcactggc  | 600 |
| agtggatcag ggacagattt cacactgaga atcagcagag tggaggctga ggatttgga  | 660 |
| atttattatt gctggcaagg tacacatttt cctgggacgt tcggtggagg gaccaagctg | 720 |
| gagataaaa                                                         | 729 |
| <210> 5                                                           |     |
| <211> 720                                                         |     |
| <212> DNA                                                         |     |
| <213> 人工序列                                                        |     |
| <220>                                                             |     |
| <221> 来源                                                          |     |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的<br>多核苷酸"                                   |     |
| <400> 5                                                           |     |
| gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc | 60  |
| atcacctgtc gggccagcca gggcatcaga aacaacctgg cctggtatca gcagaagccc | 120 |
| ggcaaggccc ccaagagact gatctacgct gccagcaatc tgcagagcgg cgtgcccagc | 180 |
| agattcaccg gaagcggtc cggcaccgag ttcacctga tcgtgtccag cctgcagccc   | 240 |
| gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag caccacagct accctctgac cagcggcgga | 300 |
| ggcaccaagg tggagatcaa gcggaccggc agcaccagcg gcagcggcaa gcctggcagc | 360 |
| ggcgagggaa gcgaggtcca ggtgctggaa tctggcggcg gactggtgca gcctggcggc | 420 |
| agcctgagac tgagctgtgc cgccagcggc ttcaccttca gcagctacgc catgtcttgg | 480 |
| gtccggcagg ctcttgaaa gggcctggaa tgggtgtccg ccatcagcgg ctctggcggc  | 540 |
| tccaccaact acgccgacag cgtgaagggc cggttacca tcagccggga caacagcaag  | 600 |
| aacacctgt atctgcagat gaacagcctg agagccgagg acaccgccgt gtactactgt  | 660 |
| gccggcagca gcgggtggag cgagtactgg ggccagggca cactggtcac agtgtctagc | 720 |

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| <210> 6                                                           |     |
| <211> 63                                                          |     |
| <212> DNA                                                         |     |
| <213> 人工序列                                                        |     |
| <220>                                                             |     |
| <221> 来源                                                          |     |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"                                       |     |
| <400> 6                                                           |     |
| atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg | 60  |
| cgg                                                               | 63  |
| <210> 7                                                           |     |
| <211> 135                                                         |     |
| <212> DNA                                                         |     |
| <213> 人工序列                                                        |     |
| <220>                                                             |     |
| <221> 来源                                                          |     |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"                                       |     |
| <400> 7                                                           |     |
| accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg | 60  |
| tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg | 120 |
| gacttcgcct gtgat                                                  | 135 |
| <210> 8                                                           |     |
| <211> 72                                                          |     |
| <212> DNA                                                         |     |
| <213> 人工序列                                                        |     |
| <220>                                                             |     |
| <221> 来源                                                          |     |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的寡核苷酸"                                       |     |
| <400> 8                                                           |     |
| atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtec ttctcctgtc actggttata | 60  |
| accctttact gc                                                     | 72  |
| <210> 9                                                           |     |
| <211> 126                                                         |     |
| <212> DNA                                                         |     |
| <213> 人工序列                                                        |     |
| <220>                                                             |     |



|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly         |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Ser His Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Ala Ile Gly Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Glu Ile Lys                                                     |     |     |
| <210> 12                                                        |     |     |
| <211> 240                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 智人(Homo sapiens)                                          |     |     |
| <400> 12                                                        |     |     |
| Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asn |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile Val Ser Ser Leu Gln Pro |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His His Ser Tyr Pro Leu |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln Val |     |     |

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala  
1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly  
20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp  
35 40 45

<210> 15

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 15

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys  
20

<210> 16

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 16

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
35 40

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的

多肽”

&lt;400&gt; 17

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

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 1605

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成的  
 多核苷酸”

&lt;400&gt; 18

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60  
 ccgggatccg agattcagct gcagcaatct ggggcagaac ttgtgaagcc aggggcctca 120  
 gtcaagctgt cctgcacagg ttctggcttc aacattgaag actactatat tcaactgggtg 180  
 aagcagagga ctgaacaggg cctggaatgg attggaagga ttgatcctga gaatgatgaa 240  
 actaaatatg gcccataatt ccagggcagg gccactataa cagcagacac atcctccaac 300  
 acagtctacc tgcaactcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgcc 360  
 tttcgcggtg gagtctactg ggggccagga accactctca cagtctcttc aggaggtggt 420  
 ggttccggtg gtggtggttc cggaggtggt ggttcacata tggatgttgt gatgaccag 480  
 tctccactca ctctatcggt tgccattgga caatcagcct ccatctcttg caagtcaagt 540  
 cagagcctct tagatagtga tggaaagaca tatttgaatt ggttggtaca gaggccaggc 600  
 cagtctccaa agcgccctaat ctctctggtg tctaaactgg actctggagt ccctgacagg 660  
 ttcactggca gtggatcagg gacagatttc aactgagaa tcagcagagt ggaggctgag 720  
 gatttgggaa tttattattg ctggcaaggt acacattttc ctgggacgtt cggtggaggg 780  
 accaagctgg agataaaaagc tagcaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg 840

```

cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg    900
ggcgcagtg acacgagggg gctggacttc gcctgtgatt tttgggtgct ggtggtggtt    960
ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg    1020
aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc    1080
gggccccacc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc    1140
tccaaacggg gcagaaagaa actcctgtat atattcaaac aaccatttat gagaccagta    1200
caaactactc aagaggaaga tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga    1260
tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc ccggtacaa gcagggccag    1320
aaccagctct ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag    1380
agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa ggaagaacct tcaggaaggc    1440
ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa    1500
ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat ggcttttacc agggctctcag tacagccacc    1560
aaggacacct acgacgccct tcacatgcag gcctgcccc ctcgc                    1605

```

<210> 19

<211> 1473

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

<400> 19

```

atggccttac cagtgaccgc cttgtccttg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg    60
ccgggatccg agattcagct gcagcaatct ggggcagaac ttgtgaagcc aggggcctca    120
gtcaagctgt cctgcacagg ttctggcttc aacattgaag actactatat tctactgggtg    180
aagcagagga ctgaacaggg cctggaatgg attggaagga ttgacctga gaatgatgaa    240
actaaatatg gcccataatt ccagggcagg gccactataa cagcagacac atcctccaac    300
acagtctacc tgcaactcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgcc    360
tttcgcggtg gagtctactg ggggccagga accactctca cagtctcttc aggaggtggt    420
ggttccggtg gtggtggttc cggaggtggt ggttcacata tggatgttgt gatgaccag    480
tctccactca ctctatcggt tgccattgga caatcagcct ccattctctg caagtcaagt    540
cagagcctct tagatagtga tggaaagaca tatttgaatt ggttggttaca gaggccaggc    600
cagtctccaa agcgcctaatt ctctctggtg tctaaactgg actctggagt ccctgacagg    660
ttacttgga gtgatcagg gacagatttc aactgagaa tcagcagagt ggaggctgag    720
gatttgggaa tttattattg ctggcaaggt acacattttc ctgggacgtt cgggtggaggg    780
accaagctgg agataaaaagc tagcaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg    840
cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg    900
ggcgcagtg acacgagggg gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgcccttg    960
gccgggactt gtggggtcct tctcctgtca ctggttatca ccctttactg caaacggggc    1020

```

```

agaaagaaac tcctgtatat attcaaaca ccatattatga gaccagtaca aactactcaa 1080
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga 1140
gtgaagttca gcaggagcgc agacgcccc gcgtacaagc agggccagaa ccagctctat 1200
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg 1260
gaccttgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 1320
ctgcagaaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg 1380
aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1440
gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct cgc 1473

```

<210> 20

<211> 1465

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

<400> 20

```

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
ccgggatccg acatccagat gaccagagc ctagcagcc tgagcgccag cgtgggcgac 120
agagtacca tcacctgtcg ggccagccag ggcatcagaa acaacctggc ctggtatcag 180
cagaagcccc gcaaggcccc caagagactg atctacgctg ccagcaatct gcagagcggc 240
gtgcccagca gattcaccgg aagcggctcc ggcaccgagt tcacctgat cgtgtccagc 300
ctgcagcccc aggacttcgc cacctactac tgctgcagc accacagcta ccctctgacc 360
agcggcggag gcaccaaggt ggagatcaag cggaccggca gcaccagcg cagcggcaag 420
cctggcagcg gcgagggaag cgaggtccag gtgctggaat ctggcggcgg actggtgcag 480
cctggcggca gcctgagact gagctgtgcc gccagcggct tcaccttcag cagctacgcc 540
atgtcttggg tccggcaggc tcctggaaag ggctggaat ggggtgtccgc catcagcggc 600
tctggcggct ccaccaacta cgccgacagc gtgaagggcc ggttcacat cagccgggac 660
aacagcaaga acacctgta tctgcagatg aacagcctga gagccgagga caccgccgtg 720
tactactgtg ccggcagcag cgggtggagc gactactggg gccagggcac actggtcaca 780
gtgtctagcg ctagcaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gcccaccatc 840
gcgtcgagc ccctgtccct gcgcccagag gcgtgccggc cagcggcggg gggcgagtg 900
cacacgaggg ggctggactt cgctgtgat atctacatct gggcgccctt ggccgggact 960
tgtgggtcc ttctcctgtc actggttact accctttact gcaaacgggg cagaaagaaa 1020
ctcctgtata tattcaaaca accatttatg agaccagtac aaactactca agaggaagat 1080
ggctgtagct gccgatttcc agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagttc 1140
agcaggagcg cagacgcccc cgctacaag cagggccaga accagctcta taacgagctc 1200
aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggacctgag 1260
atgggggggaa agccgagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa 1320

```

gataagatgg cggaggccta cagttagatt gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag 1380  
 gggcacgatg gcctttacca gggctctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt 1440  
 cacatgcagg ccctgcccc tcgct 1465

<210> 21

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 21

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

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 22

Asp Tyr Tyr Ile His  
 1 5

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 23

Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 24

Arg Gly Gly Val Tyr

1 5

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 25

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

1 5 10 15

Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr  
1 5

<210> 29

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 29

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

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 30

Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr  
1                  5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 31

Asp Pro Glu Asn Asp Glu

1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 32

Arg Gly Gly Val Tyr

1 5

<210> 33

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 33

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

1 5 10 15

Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 34

Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr  
1 5 10

<210> 35

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 35

Leu Val Ser  
1

<210> 36

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 36

Gly Thr His Phe Pro Gly  
1 5

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列的描述：合成的肽"

&lt;400&gt; 37

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 246

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

&lt;400&gt; 38

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

100 105 110

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

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln

165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Thr Lys Val Glu Ile Lys                                         |     | 240 |
| 245                                                             |     |     |

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 39

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gaaatccagc tggccaatc gggagctgag gtcaagaagc cgggagccac cgtcaagatc  | 60  |
| tcatgcaagg ggtcgggatt caacatcgag gactactaca ttactgggt gcagcaagct  | 120 |
| ccgggaaaag gcctggaatg gatgggcaga atcgaccag aaaacgacga aactaagtac  | 180 |
| ggaccgattt tccaaggaag agtgactatc accgccgata cttcaaccaa taccgtctac | 240 |
| atggaactga gctcgtctcg gtccgaagat actgcagtgt attactgtgc ctttcgcgga | 300 |
| ggggtgtact ggggccaagg aactactgtc actgtctcgt caggaggcgg agggtcggga | 360 |
| ggaggcggga gcgaggcg tggctcgggt ggcgaggaa gcgacgtggt gatgaccag     | 420 |
| tccccggact ccctcgccgt gagcctcgga gagaggcgga ctatcaattg caagtcgtcc | 480 |
| cagtcacttc tggattccga tggtaaaacg tacctcaact ggctgcagca aaagccagg  | 540 |
| cagccacca aacggttgat ctcccttggt tccaaactgg atagcggagt gcctgaccgc  | 600 |
| ttctcgggtt ccggtagcgg gaccgacttc accctgacga tcagctcact gcaggcggag | 660 |
| gacgtggcag tgtactactg ctggcaggga acccacttcc ctggcacctt tggaggtggc | 720 |
| accaaggtgg agatcaag                                               | 738 |

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 831

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 40

```

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg      60
cccgaaatcc agctgggtcca atcgggagct gaggtcaaga agccgggagc caccgtcaag      120
atctcatgca aggggtcggg attcaacatc gaggactact acattcactg ggtgcagcaa      180
gctccgggaa aaggcctgga atggatgggc agaatcgacc cagaaaacga cgaaactaag      240
tacggaccga ttttccaagg aagagtgact atcaccgccg atacttcaac caataccgtc      300
tacaatggaac tgagctcgct ccggtccgaa gatactgcag tgtattactg tgcctttcgc      360
ggaggggtgt actggggcca aggaactact gtcactgtct cgtcaggagg cggagggtcg      420
ggaggaggcg ggagcggagg cgggtggctcg ggtggcggag gaagcgacgt ggtgatgacc      480
cagtccccgg actccctcgc cgtgagcctc ggagagaggg cgactatcaa ttgcaagtgc      540
tcccagtcac ttctggattc cgatggtaaa acgtacctca actggctgca gcaaaagcca      600
gggcagccac ccaaacggtt gatctccctt gtgtccaaac tggatagcgg agtgcctgac      660
cgctttctcg gttccggtag cgggaccgac ttcacctga cgatcagctc actgcaggcg      720
gaggacgtgg cagtgtacta ctgctggcag ggaaccact tccctggcac ctttggaggt      780
ggcaccaagg tggagatcaa gggatcgcac caccatcacc atcatcatca c      831

```

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 277

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

&lt;400&gt; 41

```

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

```

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser His His His |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| His His His His His                                             |     |     |

275

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 1470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 42

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| atggccctcc ctgtcaccgc cctgtctgctt ccgttggtctc ttctgctcca cgccgctcgg | 60  |
| cccgagatcc agctgggtgca gtcgggagct gaagtcaaaa agcctggcgc aaccgtcaag  | 120 |
| atctcgtgca aaggatcagg gttcaacatc gaggactact acatccattg ggtgcaacag   | 180 |
| gcacccggaa aaggcctgga gtggatgggg aggattgacc cagaaaatga cgaaaccaag   | 240 |
| tacggaccga tcttccaagg acgggtgacc atcacggctg acacttccac taacaccgtc   | 300 |
| tacatggaac tctcgagcct tcgctcggaa gataccgcgg tgtactactg cgcctttaga   | 360 |
| ggtggagtct actggggaca agggactacc gtcaccgtgt cgtcaggtgg cggaggatca   | 420 |
| ggcggaggcg gctccggtgg aggaggaagc ggaggaggtg gctccgacgt ggtgatgacg   | 480 |
| cagtcaccgg actccttggc ggtgagcctg ggtgaacgcg ccactatcaa ctgcaagagc   | 540 |

```

tcccagagct tgctggactc cgatggaaag acttatctca attggctgca acagaagcct      600
ggccagccgc caaagagact catctactg gtgagcaagc tggatagcgg agtgccagat      660
cggttttcgg gatcgggctc aggcaccgac ttcacctga ctatttcctc cctccaagcc      720
gaggatgtgg ccgtctacta ctgttggcag gggactcact tcccggggac cttcggtgga      780
ggcactaagg tggagatcaa aaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct      840
accatcgctt cccagcctct gtccctgctt ccggaggcat gtagaccgc agctggtggg      900
gccgtgcata cccggggtct tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct      960
ggtacttgcg gggctctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggtcgg     1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaaccc ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag     1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg     1140
aaattcagcc gcagcgcaga tgetccagcc tacaagcagg ggcaaacca gctctacaac     1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac     1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc     1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggta tgaaagggga acgcagaaga     1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctacgaccg ccaccaagga cacctatgac     1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg                                     1470

```

<210> 43

<211> 490

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 43

```

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

```

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro |     |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 |
| Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg                         |     | 480 |
| 485                                                             | 490 |     |

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 246

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

&lt;400&gt; 44

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|-----|--|
| 165 |     |     |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |  |     |  |
| Leu | Glu | Trp | Met | Gly | Arg | Ile | Asp | Pro | Glu | Asn | Asp | Glu | Thr | Lys | Tyr |  |     |  |
| 180 |     |     |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |     |  |
| Gly | Pro | Ile | Phe | Gln | Gly | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Ala | Asp | Thr | Ser | Thr |  |     |  |
| 195 |     |     |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |  |     |  |
| Asn | Thr | Val | Tyr | Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala |  |     |  |
| 210 |     |     |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |  |     |  |
| Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Phe | Arg | Gly | Gly | Val | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr |  |     |  |
| 225 |     |     |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |  | 240 |  |
| Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |  |
| 245 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |     |  |

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 45

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gatgtcgtga | tgaccagtc  | cccagactcc | ctcgcagtgt | ccttgggaga | acgggccacc | 60  |
| atcaactgca | aatcgagcca | gtcactgctg | gactcagacg | gaaagaccta | cctcaactgg | 120 |
| ctgcagcaga | agcctggcca | gccaccgaag | cgctgatct  | ccctggtgtc | caagctggac | 180 |
| tcgggcgtcc | cggacagggt | tagcggtagc | ggctcgggaa | ccgacttcac | tctgaccatt | 240 |
| agctcgtccc | aagctgaaga | tgtggcggtc | tactactgct | ggcaggggac | ccacttcccc | 300 |
| gggacctttg | gcgagggaac | taaagtcgaa | atcaaaggag | gaggcggatc | aggtggagga | 360 |
| ggcagcggag | gaggagggag | cggcgggtgg | ggctccgaaa | ttcaacttgt | gcaatccggt | 420 |
| gccgaggtga | agaaacctgg | tgccactgtc | aagatctcgt | gtaagggatc | gggattcaat | 480 |
| atcgaggact | actacatcca | ctgggtgcaa | caggcgccag | gaaagggatt | ggagtggatg | 540 |
| ggtcgcatcg | acccggaaaa | cgatgagact | aagtacggac | cgatcttcca | aggccgggtc | 600 |
| acgatcactg | cggatacctc | cactaatacc | gtgtatatgg | agctctcgtc | actgagaagc | 660 |
| gaagatacgg | ccgtgtacta | ctgcgcattc | agaggaggtg | tgtactgggg | ccagggaact | 720 |
| actgtgaccg | tgtcgtcg   |            |            |            |            | 738 |

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 831

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

<400> 46

```

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg      60
cccgatgtcg tgatgaccca gtccccagac tccctcgcag tgtccttggg agaacggggc      120
accatcaact gcaaatcgag ccagtcactg ctggactcag acggaaagac ctacctcaac      180
tggtcgcagc agaagcctgg ccagccaccg aagcgctga tctccctggg gtccaagctg      240
gactcggggcgt tcccggacag gtttagcggg agcggctcgg gaaccgactt cactctgacc      300
attagctcgc tccaagctga agatgtggcg gtctactact gctggcaggg gaccacttc      360
cccgggacct ttggcggagg aactaaagtc gaaatcaaag gaggaggcgg atcaggtgga      420
ggaggcagcg gaggaggagg gagcggcggt ggcggtccg aaattcaact tgtgcaatcc      480
ggtgccgagg tgaagaaacc tggtgccact gtcaagatct cgtgtaaggg atcgggattc      540
aatatcgagg actactacat ccactgggtg caacaggcgc caggaaaggg attggagtgg      600
atgggtcgca tcgaccgga aaacgatgag actaagtacg gaccgatctt ccaaggccgg      660
gtcacgatca ctgcggatac ctccactaat accgtgtata tggagctctc gtcactgaga      720
agcgaagata cggccgtgta ctactgcgca ttcagaggag gtgtgtactg gggccaggga      780
actactgtga ccgtgtcgtc ggggtcacat caccaccatc atcatcacca c      831

```

<210> 47

<211> 277

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 47

```

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

```

|                                 |                                 |     |
|---------------------------------|---------------------------------|-----|
| 100                             | 105                             | 110 |
| Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe | Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr |     |
| 115                             | 120                             | 125 |
| Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly | Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly |     |
| 130                             | 135                             | 140 |
| Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly | Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser |     |
| 145                             | 150                             | 155 |
| Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly | Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys |     |
| 165                             | 170                             | 175 |
| Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp | Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln |     |
| 180                             | 185                             | 190 |
| Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp | Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn |     |
| 195                             | 200                             | 205 |
| Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile | Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr |     |
| 210                             | 215                             | 220 |
| Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val | Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg |     |
| 225                             | 230                             | 235 |
| Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr | Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr |     |
| 245                             | 250                             | 255 |
| Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr | Val Ser Ser Gly Ser His His His |     |
| 260                             | 265                             | 270 |
| His His His His His             |                                 |     |

275

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 1470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 48

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atggccctcc ctgtcaccgc cctgetgett ccgetggetc ttctgctcca cgccgctcgg  | 60  |
| cccgacgtgg tcatgactca aagcccagat tccttggttg tctcccttg agaaagagca   | 120 |
| acgatcaatt gcaaaaagctc gcagtccttg ttggactccg atggaaaaac ctacctcaac | 180 |
| tggtgcagc agaagccggg acaaccacca aagcggtga tttccctcgt gtccaagctg    | 240 |
| gacagcggcg tgccggatcg cttctcgggc agcggctcgg gaaccgattt tactctcact  | 300 |
| atttcgtcac tgcaagcgga ggacgtggcg gtgtattact gctggcaggg cactcacttc  | 360 |
| ccgggtactt ttggtggagg taccaaagtc gaaatcaagg gtggaggcgg gagcggagga  | 420 |

```

ggcgggtcgg gaggaggagg atcgggtggc ggaggctcag aaatccagct ggtgcagtca      480
ggtgccgaag tgaagaagcc tggggccacg gtgaagatct cgtgcaaggg gagcggttc      540
aacatcgagg attactacat ccattgggtg caacaggccc ctggcaaagg gctggaatgg      600
atgggaagga tcgaccccga gaatgacgag actaagtacg gcccgatctt ccaaggacgg      660
gtgaccatca ctgcagacac ttcaaccaac accgtctaca tggaactctc ctcgctgcgc      720
tccgaggaca ccgccgtgta ctactgtgct ttcagaggag gagtctactg gggacaggga      780
acgaccgtga ccgtcagctc aaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct      840
accatcgctt cccagcctct gtccctgctt ccggaggcat gtagaccgc agctgggtgg      900
gccgtgcata cccgggggtct tgacttcgcc tgcgatctct acatttgggc ccctctggct      960
ggtacttgcg gggtcctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggtcgg     1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaacct ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag     1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg     1140
aaattcagcc gcagcgcaga tgetccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac     1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac     1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc     1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagatttgta tgaaagggga acgcagaaga     1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctacgaccg ccaccaagga cacctatgac     1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg                                     1470

```

<210> 49

<211> 490

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 49

```

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

```

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly         |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg |     |     |

|                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
|                           |     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |  |  |  |  |
| Arg                       | Gly | Arg | Asp | Pro | Glu | Met | Gly | Gly | Lys | Pro | Arg | Arg | Lys | Asn | Pro |  |  |  |  |
|                           |     |     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |  |  |  |  |
| Gln                       | Glu | Gly | Leu | Tyr | Asn | Glu | Leu | Gln | Lys | Asp | Lys | Met | Ala | Glu | Ala |  |  |  |  |
|                           |     |     |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |  |  |  |  |
| Tyr                       | Ser | Glu | Ile | Gly | Met | Lys | Gly | Glu | Arg | Arg | Arg | Gly | Lys | Gly | His |  |  |  |  |
|                           |     |     |     |     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |  |  |  |  |
| Asp                       | Gly | Leu | Tyr | Gln | Gly | Leu | Ser | Thr | Ala | Thr | Lys | Asp | Thr | Tyr | Asp |  |  |  |  |
| 465                       |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |  |  |  |
| Ala                       | Leu | His | Met | Gln | Ala | Leu | Pro | Pro | Arg |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|                           |     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <210> 50                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <211> 246                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <212> PRT                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <213> 人工序列                |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <220>                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <221> 来源                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽" |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <400> 50                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Glu                       | Ile | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Glu |  |  |  |  |
| 1                         | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ser                       | Leu | Arg | Ile | Ser | Cys | Lys | Gly | Ser | Gly | Phe | Asn | Ile | Glu | Asp | Tyr |  |  |  |  |
| 20                        |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Tyr                       | Ile | His | Trp | Val | Arg | Gln | Met | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Met |  |  |  |  |
| 35                        |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Gly                       | Arg | Ile | Asp | Pro | Glu | Asn | Asp | Glu | Thr | Lys | Tyr | Gly | Pro | Ile | Phe |  |  |  |  |
| 50                        |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Gln                       | Gly | His | Val | Thr | Ile | Ser | Ala | Asp | Thr | Ser | Ile | Asn | Thr | Val | Tyr |  |  |  |  |
| 65                        |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |  |  |  |  |
| Leu                       | Gln | Trp | Ser | Ser | Leu | Lys | Ala | Ser | Asp | Thr | Ala | Met | Tyr | Tyr | Cys |  |  |  |  |
| 85                        |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ala                       | Phe | Arg | Gly | Gly | Val | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val |  |  |  |  |
| 100                       |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ser                       | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly |  |  |  |  |
| 115                       |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ser                       | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Val | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Leu | Ser |  |  |  |  |
| 130                       |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Leu                       | Pro | Val | Thr | Leu | Gly | Gln | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Lys | Ser | Ser |  |  |  |  |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Thr Lys Val Glu Ile Lys                                         |     |     |     |
|                                                                 | 245 |     |     |

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

&lt;400&gt; 51

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| gagattcagc tgggtccaaag cggcgcagaa gtgaaaaagc cagggggaatc gttgcgcattc | 60  |
| agctgtaaaag gttccggctt caacatcgag gactattaca tccattgggt gcggcagatg   | 120 |
| ccaggaaagg ggctggaatg gatgggacgg attgaccgga agaacgacga aaccaagtac    | 180 |
| ggaccgatct ttcaaggaca cgtgactatc tccgccgaca ccagcatcaa tacggtgtac    | 240 |
| ctccaatgggt cctcactcaa ggcctcggat accgcgatgt actactgcgc gttcagagga   | 300 |
| ggcgtctact ggggacaagg gactactgtg actgtctcat caggaggtgg aggaagcgga    | 360 |
| ggaggtggct cgggcggagg tggatcgga ggaggagggt ccgatgtggt gatgaccag      | 420 |
| tccccactgt cgctcccgtt gaccctcgga cagcctgcta gcatctctg caaatcctcg     | 480 |
| caatccctgc tggactcgga cggaaaaacg tacctcaatt ggctgcagca gcgccctggc    | 540 |
| cagagcccga gaaggttat ctcgctggtg tcaaagctgg atagcgggtg gcccgaccgg     | 600 |
| ttcagcggct cagggtcagg aaccgatttc acctgaaga tctcccgcgt ggaagccgaa     | 660 |
| gatgtcggag tctactactg ctggcagggt actcattcc cggggacctt tggtggcggc     | 720 |
| actaaggtcg agattaag                                                  | 738 |

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 831

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列



|                                                                 |    |     |    |     |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|-----|----|-----|----|
|                                                                 | 85 |     | 90 |     | 95 |
| Ile Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr |    |     |    |     |    |
| 100                                                             |    | 105 |    | 110 |    |
| Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly |    |     |    |     |    |
| 115                                                             |    | 120 |    | 125 |    |
| Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly |    |     |    |     |    |
| 130                                                             |    | 135 |    | 140 |    |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr |    |     |    |     |    |
| 145                                                             |    | 150 |    | 155 |    |
| Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile |    |     |    |     |    |
| 165                                                             |    | 170 |    | 175 |    |
| Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr |    |     |    |     |    |
| 180                                                             |    | 185 |    | 190 |    |
| Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile |    |     |    |     |    |
| 195                                                             |    | 200 |    | 205 |    |
| Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly |    |     |    |     |    |
| 210                                                             |    | 215 |    | 220 |    |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala |    |     |    |     |    |
| 225                                                             |    | 230 |    | 235 |    |
| Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly |    |     |    |     |    |
| 245                                                             |    | 250 |    | 255 |    |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser His His His |    |     |    |     |    |
| 260                                                             |    | 265 |    | 270 |    |
| His His His His His                                             |    |     |    |     |    |
| 275                                                             |    |     |    |     |    |

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 1470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 54

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atggccctcc ctgtcaccgc cctgtgtgctt ccgttggtc ttctgtctcca cgccgctcgg | 60  |
| cccgaatcc agctggtgca aagcggagcc gaggtgaaga agcccgaga atccctgcgc    | 120 |
| atctcgtgta agggttccgg cttaacatc gaggattact acatccactg ggtgagacag   | 180 |
| atgccgggca aaggtctgga atggatgggc cgcacgacc cggagaacga cgaaaccaa    | 240 |
| tacggaccaa tcttccaagg acatgtgact atttccgcgg atacctccat caacactgtc  | 300 |

<400> 55

155

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  |
| Ile Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 |
| Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 |
| Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr |     |     |
|                                                                 | 145 | 150 |
| Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 |
| Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 |
| Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 |
| Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala |     |     |
|                                                                 | 225 | 230 |
| Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 |
| Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser |     |     |
|                                                                 | 275 | 280 |
| Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr |     |     |
|                                                                 | 290 | 295 |
| Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala |     |     |
|                                                                 | 305 | 310 |
| Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 |
| Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 |
| Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 |
| Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 |
| Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn |     |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg |     |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 | 415 |
| Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro |     |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 | 430 |
| Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala |     |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 | 445 |
| Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His |     |     |     |
|                                                                 | 450 | 455 | 460 |
| Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp |     |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 | 480 |
| Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg                         |     |     |     |
|                                                                 | 485 | 490 |     |
| <210> 56                                                        |     |     |     |
| <211> 246                                                       |     |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |     |
| <220>                                                           |     |     |     |
| <221> 来源                                                        |     |     |     |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"                                       |     |     |     |
| <400> 56                                                        |     |     |     |
| Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly |     |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser |     |     |     |
|                                                                 | 20  | 25  | 30  |
| Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser |     |     |     |
|                                                                 | 35  | 40  | 45  |
| Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro |     |     |     |
|                                                                 | 50  | 55  | 60  |
| Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 | 125 |
| Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys |     |     |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Ile |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Thr Val Thr Val Ser Ser                                         |     | 240 |
| 245                                                             |     |     |

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 57

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gacgtcgtca tgaccagag cccgctgtca ctgcctgtga ccctgggccca gccggcgtcc  | 60  |
| attagctgca aatcctcgca atccctgctc gactcagacg gaaaaacgta cttgaactgg  | 120 |
| ctccaacagc gccctgggca atccccaagg cggettattct cactcgtcag caagctcgat | 180 |
| agcgggtgtcc cagacagatt ttcgggctcg ggatcgggca ctgatttcac tctgaagatc | 240 |
| tcgcgggtgg aagccgagga tgtgggagtg tactattgct ggcagggcac tcaattcccc  | 300 |
| gggacgtttg gcggaggaac taaggtcgag atcaaaggag gaggtggatc aggcggaggt  | 360 |
| gggagcggag gaggaggaag cggtggtgga ggttccgaaa tccagctggt gcaatcagga  | 420 |
| gccgaggtga agaagccggg agaatccctg cgcattctgt gcaagggctc gggcttcaac  | 480 |
| atcgaggatt actacatcca ctgggtgcgg cagatgccgg gaaaggggtt ggaatggatg  | 540 |
| ggacgcattg acccggaata tgatgaaacc aaatacgggc caatcttcca aggccacgtg  | 600 |
| accattagcg ctgacacttc catcaacacc gtgtaccttc agtggctctc actgaaggcg  | 660 |
| tggacactg ccatgtacta ctgtgcattc agaggagggg tctactgggg acagggcacc   | 720 |
| accgtgaccg tgagctcc                                                | 738 |

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 831

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

<400> 58

```

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggttc ttctgctcca cgccgctcgg      60
cccgacgtcg tcatgaccca gagcccgtg tcaactgctg tgaccctggg ccagccggcg      120
tccattagct gcaaatcctc gcaatccctg ctgactcag acggaaaaac gtacttgaac      180
tggtccaac agcgccctgg gcaatcccca aggcggtta tctactcgt cagcaagctc      240
gatagcggtg tcccagacag attttcgggc tcgggatcgg gcaactgatt cactctgaag      300
atctcgcggg tggaagccga ggatgtggga gtgtactatt gctggcaggg cactcacttc      360
cccgggacgt ttggcggagg aactaaggtc gagatcaaag gaggaggtgg atcaggcgga      420
gggtgggagcg gaggaggagg aagcgggtgg ggaggttcgg aaatccagct ggtgcaatca      480
ggagccgagg tgaagaagcc gggagaatcc ctgcgcattc cgtgcaaggg ctcgggcttc      540
aacatcgagg attactacat ccactgggtg cggcagatgc cgggaaaggg gttggaatgg      600
atgggacgca ttgaccgga aaatgatgaa accaaatagc ggccaatctt ccaaggccac      660
gtgaccatta gcgtgacac ttccatcaac accgtgtacc ttcagtggtc ctactgaag      720
gcgtcggaca ctgccatgta ctactgtgca ttcagaggag ggttctactg gggacagggc      780
accaccgtga ccgtgagctc cggctcgcat caccatcatc accaccatca c      831

```

<210> 59

<211> 277

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 59

```

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

```

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp         |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 | 125 |
| Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 | 140 |
| Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Ala Asp Thr Ser Ile Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 | 255 |
| Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser His His His |     |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 | 270 |
| His His His His His                                             |     |     |     |
|                                                                 | 275 |     |     |

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 1470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 60

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg  | 60  |
| cccgcagtcg tcatgaccca atccccctctc tccctgccgg tcaccctggg tcagccggcg | 120 |
| tcgatctcat gcaaaagctc acagtccttg ctggattcgg acggaaaaac ctacttgaac  | 180 |

```

tggctccaac agaggccggg tcagtcccct cgcagactga tctcgctggg gagcaagctc 240
gactcgggtg tgccggatcg gttctccggg tcaggatcgg gcaccgactt tacgctcaag 300
atttcgagag tggaggccga ggatgtggga gtgtactatt gctggcaggg cacgcatttc 360
cccgggacct ttggaggcgg gactaagggtg gaaatcaagg gaggtggcgg atcaggcgga 420
ggaggcagcg gcggagggtg atcaggaggc ggagggtcag agatccagct ggtccaaagc 480
ggagcagagg tgaagaagcc aggcgagtcc cttcgcatth cgtgcaaagg gagcggcttc 540
aacattgaag attactacat ccactgggtg cggcaaatgc caggaaaggg tctggaatgg 600
atgggacgga tcgaccaga aaatgatgaa actaagtacg gaccgatctt ccaaggacac 660
gtcactatct ccgcggacac ttcgatcaac accgtgtacc tccagtggag cagcttgaaa 720
gcctccgaca ccgctatgta ctactgtgcc ttccgcggag gagtctactg gggacagggg 780
actactgtga ccgtgtcgtc caccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct 840
accatgcct cccagcctct gtccctgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctgggtgg 900
gccgtgcata cccgggggtct tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct 960
gggtacttgcg gggctcctgct gctttcactc gtgatcactc tttactgtaa gcgcggtcgg 1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaaccc ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag 1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg 1140
aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcaaacca gctctacaac 1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac 1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc 1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagatttgta tgaaagggga acgcagaaga 1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctacgaccg ccaccaagga cacctatgac 1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg 1470

```

<210> 61

<211> 490

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 61

```

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

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Arg | Arg | Leu | Ile | Ser | Leu | Val | Ser | Lys | Leu |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Asp | Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Phe | Thr | Leu | Lys | Ile | Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Tyr | Cys | Trp | Gln | Gly | Thr | His | Phe | Pro | Gly | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Lys | Val | Glu | Ile | Lys | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |
|     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Glu | Ile | Gln | Leu | Val | Gln | Ser |
| 145 |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |
| Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Glu | Ser | Leu | Arg | Ile | Ser | Cys | Lys |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Gly | Ser | Gly | Phe | Asn | Ile | Glu | Asp | Tyr | Tyr | Ile | His | Trp | Val | Arg | Gln |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Met | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Met | Gly | Arg | Ile | Asp | Pro | Glu | Asn |
|     |     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Asp | Glu | Thr | Lys | Tyr | Gly | Pro | Ile | Phe | Gln | Gly | His | Val | Thr | Ile | Ser |
|     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Ala | Asp | Thr | Ser | Ile | Asn | Thr | Val | Tyr | Leu | Gln | Trp | Ser | Ser | Leu | Lys |
| 225 |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Ala | Ser | Asp | Thr | Ala | Met | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Phe | Arg | Gly | Gly | Val | Tyr |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Thr | Thr | Thr | Pro | Ala |
|     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Pro | Arg | Pro | Pro | Thr | Pro | Ala | Pro | Thr | Ile | Ala | Ser | Gln | Pro | Leu | Ser |
|     |     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Leu | Arg | Pro | Glu | Ala | Cys | Arg | Pro | Ala | Ala | Gly | Gly | Ala | Val | His | Thr |
|     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |
| Arg | Gly | Leu | Asp | Phe | Ala | Cys | Asp | Ile | Tyr | Ile | Trp | Ala | Pro | Leu | Ala |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     |     |     | 320 |
| Gly | Thr | Cys | Gly | Val | Leu | Leu | Leu | Ser | Leu | Val | Ile | Thr | Leu | Tyr | Cys |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |     |
| Lys | Arg | Gly | Arg | Lys | Lys | Leu | Leu | Tyr | Ile | Phe | Lys | Gln | Pro | Phe | Met |
|     |     | 340 |     |     |     |     |     | 345 |     |     |     | 350 |     |     |     |
| Arg | Pro | Val | Gln | Thr | Thr | Gln | Glu | Glu | Asp | Gly | Cys | Ser | Cys | Arg | Phe |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Pro | Glu | Glu | Glu | Glu | Gly | Gly | Cys | Glu | Leu | Arg | Val | Lys | Phe | Ser | Arg |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg |     | 400 |
|                                                                 | 405 | 410 |
| Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro |     | 415 |
|                                                                 | 420 | 425 |
| Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala |     | 430 |
|                                                                 | 435 | 440 |
| Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His |     | 445 |
|                                                                 | 450 | 455 |
| Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp |     | 460 |
| 465                                                             | 470 | 475 |
| Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg                         |     | 480 |
|                                                                 | 485 | 490 |
| <210> 62                                                        |     |     |
| <211> 246                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <221> 来源                                                        |     |     |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"                                       |     |     |
| <400> 62                                                        |     |     |
| Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr |     | 15  |
|                                                                 | 20  | 25  |
| Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met |     | 30  |
|                                                                 | 35  | 40  |
| Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe |     | 45  |
|                                                                 | 50  | 55  |
| Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr |     | 60  |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     | 80  |
|                                                                 | 85  | 90  |
| Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val |     | 95  |
|                                                                 | 100 | 105 |
| Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly |     | 110 |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Thr Lys Val Glu Ile Lys                                         |     | 240 |
| 245                                                             |     |     |

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 63

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gaaatccagc tcgtgcagag cggagccgag gtcaagaaac cgggtgctac cgtgaagatt  | 60  |
| tcatgcaagg gatcgggctt caacatcgag gattactaca tccactgggt gcagcaggca  | 120 |
| ccaggaaaag gacttgaatg gatgggccgg atcgaccggg aaaatgacga gactaagtac  | 180 |
| ggccctatct tccaaggacg ggtgacgatc accgcagaca ctagcaccaa caccgtctat  | 240 |
| atggaactct cgtccctgag gtccgaagat actgccgtgt actactgtgc gtttcgcgga  | 300 |
| ggtgtgtact ggggacaggg taccaccgtc accgtgtcat cgggcggtgg aggctccgtt  | 360 |
| ggaggagggt caggaggcgg tggaagcgga ggaggcgga gcgacgtggt catgactcaa   | 420 |
| tcgccgtgt cgctgccgt cactctggga caaccgcgt ccatcagctg caaatcctcg     | 480 |
| cagtcaactgc ttgactccga tggaaagacc tacctcaact ggctgcagca acgcccaggc | 540 |
| caatcccaaa gacgcctgat ctcggttggtg tcaaagctgg actcagggtt gccggaccgg | 600 |
| ttctccggga gcgggtcggg cacggatttc actctcaaga tctccagagt ggaagccgag  | 660 |
| gatgtgggag tctactactg ctggcaggga acccatttcc ctggaacttt tggcggagga  | 720 |
| actaaggtcg agattaaa                                                | 738 |

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 831

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 64

```

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg      60
cccgaaatcc agctcgtgca gagcggagcc gaggtcaaga aaccgggtgc taccgtgaag      120
atttcatgca agggatcggg cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtgcagcag      180
gcaccaggaa aaggacttga atggatgggc cggatcgacc cggaaaatga cgagactaag      240
tacggcccta tcttccaagg acgggtgacg atcaccgcag aactagcac caacaccgtc      300
tatatggaac tctcgtccct gaggtccgaa gatactgccg tgtactactg tgcgtttcgc      360
ggaggtgtgt actggggaca ggggtaccacc gtcaccgtgt catcgggcgg tggaggctcc      420
gggtggaggag ggtcaggagg cgggtggaagc ggaggaggcg gcagcgacgt ggtcatgact      480
caatcgccgc tgcgctgcc cgtcactctg ggacaacccg cgtccatcag ctgcaaatcc      540
tcgcagtcac tgcttgactc cgatggaaag acctacctca actggctgca gcaacgcccc      600
ggccaatccc caagacgcct gatctcgttg gtgtcaaagc tggactcagg ggtgccggac      660
cggttctccg ggagcgggtc gggcacggat ttcactctca agatctccag agtggagcc      720
gaggatgtgg gagtctacta ctgctggcag ggaaccatt tccctggaac ttttggcgga      780
ggaactaagg tcgagattaa agggagccac catcatcatc accaccacca c      831

```

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 277

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

&lt;400&gt; 65

```

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

```

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Thr Asn Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser His His His |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| His His His His His                                             |     |     |
| 275                                                             |     |     |

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 1470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 66

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg

60

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| cccgaatcc agctcgtgca gagcggagcc gaggtcaaga aaccgggtgc taccgtgaag   | 120  |
| atttcatgca agggatcggg cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtgcagcag  | 180  |
| gcaccaggaa aaggacttga atggatgggc cggatcgacc cggaaaatga cgagactaag  | 240  |
| tacggcccta tcttccaagg acgggtgacg atcacgcgag aactagcac caacaccgtc   | 300  |
| tatatggaac tctcgtccct gaggtccgaa gatactgccg tgtactactg tgcgtttcgc  | 360  |
| ggaggtgtgt actggggaca ggggtaccacc gtcaccgtgt catcggggcg tggaggctcc | 420  |
| ggtggaggag ggtcaggagg cgggtggaagc ggaggaggcg gcagcgacgt ggtcatgact | 480  |
| caatcgccgc tgcgctgcc cgtcactctg ggacaacccg cgtccatcag ctgcaaatcc   | 540  |
| tcgcagtcac tgcttgactc cgatggaaag acctacctca actggctgca gcaacgcccc  | 600  |
| ggccaatccc caagacgcct gatctcgttg gtgtcaaagc tggactcagg ggtgccggac  | 660  |
| cggttctccg ggagcgggtc gggcacggat ttcactctca agatctccag agtggaaagc  | 720  |
| gaggatgtgg gagtctacta ctgctggcag ggaaccatt tccctggaac ttttggcgga   | 780  |
| ggaactaagg tcgagattaa aaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct   | 840  |
| accatgcct cccagcctct gtccctgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctggtggg    | 900  |
| gccgtgcata cccgggggtct tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct | 960  |
| ggtacttgcg gggtcctgct gctttcactc gtgatcactc ttactgtaa gcgcggtcgg   | 1020 |
| aagaagctgc tgtacatctt taagcaacct ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag  | 1080 |
| gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg  | 1140 |
| aaattcagcc gcagcgaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac   | 1200 |
| gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac  | 1260 |
| ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc  | 1320 |
| caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagatttgta tgaaagggga acgcagaaga  | 1380 |
| ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctacgaccg ccaccaagga cacctatgac   | 1440 |
| gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg                                   | 1470 |

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 490

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

&lt;400&gt; 67

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Asn Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Tyr Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  |
| Thr Asn Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 |
| Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 |
| Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 |
| Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 |
| Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 |
| Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 |
| Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser |     |     |
|                                                                 | 275 | 280 |
| Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 |
| Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 |
| Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe |     |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 |
| Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg                         |     |     |
| 485                                                             | 490 |     |

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 246

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

&lt;400&gt; 68

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Thr Lys Val Glu Ile Lys                                         |     | 240 |
| 245                                                             |     |     |

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

&lt;400&gt; 69

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gaaatccagc tgggtgcagtc aggcgccgag gtcaagaagc cgggagagtc gctgagaatc | 60  |
| tcgtgcaagg gctcgggggtt caacatcgag gactactaca ttactgggt caggcagatg  | 120 |
| ccgggaaaagg gactggaatg gatgggcccg atcgaccag aaaatgacga aaccaatac   | 180 |
| gggccgat ttttcaaggcca cgtgactatc agcgcagaca cgagcatcaa cactgtctac  | 240 |
| ctccagtgggt cctcgcttaa ggccagcgat accgctatgt actactgcgc attcagaggc | 300 |
| gggggtgtact ggggacaagg aaccactgtg accgtgagca gcggaggtgg cggctcggga | 360 |
| ggaggtggga gcggaggagg aggttccggc ggtggaggat cagatgtcgt gatgaccag   | 420 |
| tccccgact ccctcgctgt ctactgggc gagcgcgcga ccatcaactg caaatcgagc    | 480 |
| cagtcgctgt tggactccga tggaaagact tatctgaatt ggctgcaaca gaaaccagga  | 540 |
| caacctcca agcggctcat ctcgcttggt tcaaaactcg attcgggagt gccagaccgc   | 600 |
| ttctcgggggt ccgggagcgg aactgacttt actttgacca tttcctcact gcaagcggag | 660 |

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gatgtggccg tgtattactg ttggcagggc acgcatttcc ctggaacctt cggtggcgga  | 720 |
| actaaggtgg aaatcaag                                                | 738 |
| <210> 70                                                           |     |
| <211> 834                                                          |     |
| <212> DNA                                                          |     |
| <213> 人工序列                                                         |     |
| <220>                                                              |     |
| <221> 来源                                                           |     |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的<br>多核苷酸"                                    |     |
| <400> 70                                                           |     |
| atggccctcc ctgtcaccgc cctgetgett ccgetggetc ttctgtctcca cgccgctcgg | 60  |
| cccgaatcc agctggtgca gtcaggcgcc gaggtcaaga agccgggaga gtcgtgaga    | 120 |
| atctcgtgca agggctcggg gttcaacatc gaggactact acattcactg ggtcaggcag  | 180 |
| atgccgggaa agggactgga atggatgggc cggatcgacc cagaaaatga cgaaaccaa   | 240 |
| tacgggccga tttttcaagg ccacgtgact atcagcgag acacgagcat caacactgtc   | 300 |
| tacctccagt ggtcctcgct taaggccagc gataccgcta tgtactactg cgcattcaga  | 360 |
| ggcgggggtgt actggggaca aggaaccact gtgaccgtga gcagcggagg tggcggctcg | 420 |
| ggaggaggtg ggagcggagg aggaggttcc ggcggtggag gatcagatgt cgtgatgacc  | 480 |
| cagtccccgg actccctcgc tgtctcactg ggcgagcgcg cgaccatcaa ctgcaaatcg  | 540 |
| agccagtcgc tgttggactc cgatggaaag acttatctga attggctgca acagaaacca  | 600 |
| ggacaacctc ccaagcggct catctcgctt gtgtcaaaac tcgattcggg agtgccagac  | 660 |
| cgcttctcgg ggtccgggag cggaactgac ttactttga ccatttcctc actgcaagcg   | 720 |
| gaggatgtgg ccgtgtatta ctgttggcag ggcacgcatt tccctggaac cttcgggtggc | 780 |
| ggaactaagg tggaaatcaa gggatcacac caccatcatc accatcacca ccat        | 834 |
| <210> 71                                                           |     |
| <211> 278                                                          |     |
| <212> PRT                                                          |     |
| <213> 人工序列                                                         |     |
| <220>                                                              |     |
| <221> 来源                                                           |     |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的<br>多肽"                                      |     |
| <400> 71                                                           |     |
| Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu    |     |
| 1 5 10 15                                                          |     |
| His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val    |     |
| 20 25 30                                                           |     |
| Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe    |     |

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

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 1470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 72

|            |             |            |            |            |            |      |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| atggccctcc | ctgtcaccgc  | cctgctgctt | ccgctggctc | ttctgctcca | cgccgctcgg | 60   |
| cccgagattc | agctcgtgca  | atcgggagcg | gaagtcaaga | agccaggaga | gtccttgctg | 120  |
| atctcatgca | agggtagcgg  | ctttaacatc | gaggattact | acatccactg | ggtgaggcag | 180  |
| atgccgggga | agggactcga  | atggatggga | cggatcgacc | cagaaaacga | cgaaactaag | 240  |
| tacggtccga | tcttccaagg  | ccatgtgact | attagcgccg | atacttcaat | caataccgtg | 300  |
| tatctgcaat | ggtcctcatt  | gaaagcctca | gataccgcga | tgtactactg | tgctttcaga | 360  |
| ggaggggtct | actggggaca  | gggaactacc | gtgactgtct | cgtccggcgg | aggcgggtca | 420  |
| ggaggtggcg | gcagcggagg  | aggagggtcc | ggcggaggtg | ggtccgacgt | cgtgatgacc | 480  |
| cagagccctg | acagcctggc  | agtgagcctg | ggcgaaagag | ctaccattaa | ctgcaaatcg | 540  |
| tcgcagagcc | tgctggactc  | ggacggaaaa | acgtacctca | attggctgca | gcaaaagcct | 600  |
| ggccagccac | cgaagcgctt  | tatctcactg | gtgtcgaagc | tggattcggg | agtgcccgat | 660  |
| cgtttctccg | gctcgggac   | gggtactgac | ttcacctca  | ctatctctc  | gcttcaagca | 720  |
| gaggacgtgg | ccgtctacta  | ctgctggcag | ggaacccact | ttccgggaac | cttcggcgga | 780  |
| gggacgaaag | tggagatcaa  | gaccactacc | ccagcaccga | ggccaccac  | cccggctcct | 840  |
| accatcgctt | cccagcctct  | gtccctgcgt | ccggaggcat | gtagaccgc  | agctggtggg | 900  |
| gccgtgcata | cccgggggtct | tgacttcgcc | tgcgatatct | acatttgggc | ccctctggct | 960  |
| ggtacttgct | gggtcctgct  | gctttcactc | gtgatcactc | tttactgtaa | gcgcggtcgg | 1020 |
| aagaagctgc | tgtacatctt  | taagcaacct | ttcatgaggc | ctgtgcagac | tactcaagag | 1080 |
| gaggacggct | gttcatgccg  | gttcccagag | gaggaggaag | gcggctgcga | actgcgcgtg | 1140 |
| aaattcagcc | gcagcgcaga  | tgctccagcc | tacaagcagg | ggcagaacca | gctctacaac | 1200 |
| gaactcaatc | ttggtcggag  | agaggagtac | gacgtgctgg | acaagcggag | aggacgggac | 1260 |
| ccagaaatgg | gcgggaagcc  | gcgcagaaag | aatccccaag | agggcctgta | caacgagctc | 1320 |
| caaaaggata | agatggcaga  | agcctatagc | gagattggta | tgaaagggga | acgcagaaga | 1380 |
| ggcaaaggcc | acgacggact  | gtaccaggga | ctcagcaccg | ccaccaagga | cacctatgac | 1440 |
| gctcttcaca | tgcaggccct  | gccgcctcgg |            |            |            | 1470 |

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 490

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

&lt;400&gt; 73

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Leu | Pro | Val | Thr | Ala | Leu | Leu | Leu | Pro | Leu | Ala | Leu | Leu | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| His | Ala | Ala | Arg | Pro | Glu | Ile | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 |
| Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg                         |     |     |
| 485                                                             | 490 |     |

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 246

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

&lt;400&gt; 74

|                                                                 |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|
| Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly |    |    |
| 1                                                               | 5  | 10 |
| Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser |    |    |
| 20                                                              | 25 | 30 |
| Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro |    |    |
| 35                                                              | 40 | 45 |
| Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro |    |    |
| 50                                                              | 55 | 60 |
| Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile |    |    |
| 65                                                              | 70 | 75 |
| Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly |    |    |

| 85                                                              | 90  | 95  |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Gly Pro Ile Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Ile |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Asn Thr Val Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Met Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Thr Val Thr Val Ser Ser                                         |     | 240 |
| 245                                                             |     |     |

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 75

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gacgtggtga tgacccaatc gccagattcc ctggcagtgt ccctgggcga acgcgccact  | 60  |
| attaactgca aatcgtcaca gtccttgctt gattccgacg gaaagaccta cctcaattgg  | 120 |
| ctccagcaga agccaggaca accgccaaag agactgatct ccctggtgtc aaagctggac  | 180 |
| tcgggagtgct ctgatcggtt ctcgggtagc gggagcggca ccgacttcac tctgaccatc | 240 |
| tcgtcactcc aggctgagga cgtggccgtg tattactgtt ggcagggtac tcaatttccg  | 300 |
| ggcacttttcg gaggcggcac caaggtggag attaaaggag gaggcggaag cggaggtgga | 360 |
| ggatcgggag gtggtgggag cggcggagga gggagcgaga tccagctcgt ccaatcgga   | 420 |
| gcggaagtga agaagcccgg agagtcactt agaatctcat gcaaggggtc gggcttcaac  | 480 |
| atcgaggatt actacatcca ttgggtccgc cagatgcctg gtaaaggact ggaatggatg  | 540 |

gggaggattg acccgga aaa cgacgaaact aagtacggac cgatctttca agggcacgtg 600  
 actatctccg ctgatactc aatcaatact gtctacctcc agtggtcctc gctgaaagca 660  
 agcgacaccg cgatgtacta ctgcgcttc cggggaggag tgtactgggg ccaaggcacc 720  
 acggtcacgg tcagctcc 738

<210> 76

<211> 834

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

<400> 76

atggccctcc ctgtcaccgc cctgtctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60  
 cccgacgtgg tgatgaccca atcgccagat tccctggcag tgtccctggg cgaacgcgcc 120  
 actattaact gcaaactcgtc acagtccttg cttgattccg acggaagac ctacctcaat 180  
 tggctccagc agaagccagg acaaccgcca aagagactga tctccctggt gtcaaagctg 240  
 gactcgggag tgcctgatcg gttctcgggt agcgggagcg gcaccgactt cactctgacc 300  
 atctcgtcac tccaggctga ggacgtggcc gtgtattact gttggcaggg tactcacttt 360  
 ccgggcactt tcggaggcgg caccaagggt gagattaaag gaggagcgcg aagcggaggt 420  
 ggaggatcgg gaggtgggtgg gagcggcgga ggaggagcg agatccagct cgtccaatcg 480  
 ggagcgggaag tgaagaagcc cggagagtca cttagaatct catgcaaggg gtcgggcttc 540  
 aacatcgagg attactacat ccattgggtc cgccagatgc ctggtaaagg actggaatgg 600  
 atggggagga ttgacccgga aaacgacgaa actaagtacg gaccgatctt tcaagggcac 660  
 gtgactatct ccgctgatac ctcaatcaat actgtctacc tccagtggtc ctcgctgaaa 720  
 gcaagcgaca ccgcatgta ctactgcgcc ttccggggag gagtgtactg gggccaaggc 780  
 accacggtca cggtcagctc cggtcccat caccaccacc atccatca tcac 834

<210> 77

<211> 278

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 77

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu

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

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 1470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

<400> 78

```

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg      60
cccgcagtgg tgatgactca gtcgcctgac tcgctggctg tgtcccttgg agagcggggc      120
actatcaatt gcaagtcata ccagtcgctg ctggattccg acgggaaaac ctacctcaat      180
tggctgcagc aaaaaccggg acagcctcca aagcggtcca tcagcctggg gtccaagttg      240
gacagcggcg tgccagaccg cttctccggg tcgggaagcg gtactgattt cacgctgacc      300
atctcatccc tccaagcgga ggatgtggca gtctactact gttggcaggg cacgcatttt      360
ccgggcactt ttggaggagg gaccaaggtc gaaatcaagg gaggaggtgg ctcgggcgga      420
ggaggctcgg gaggaggagg atcaggaggc ggtggaagcg agattcaact ggtccagagc      480
ggcgcagaag tcaagaagcc gggatgaatc ctcagaatct cgtgcaaagg atcgggattc      540
aacatcgagg actactacat tcaactgggtc agacaaatgc cgggcaaagg gctggaatgg      600
atggggagga tcgaccccga aaacgatgaa accaagtacg gaccaatctt ccaagggcac      660
gtgaccattt cggcggacac ctcaatcaac actgtgtacc tccagtggag ctactttaag      720
gccagcgata ccgcatgta ctattgcgct ttccgcggag ggggtgtactg gggacagggc      780
actactgtga ccgtgtcatc caccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct      840
accatcgctt cccagcctct gtccctgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctggtggg      900
gccgtgcata cccgggggtct tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct      960
gggtacttgcg gggctcctgct gctttcactc gtgatcactc ttactgtaa gcgcggtcgg     1020
aagaagctgc tgtacatctt taagcaacct ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag     1080
gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg     1140
aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac     1200
gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac     1260
ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc     1320
caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggta tgaaagggga acgcagaaga     1380
ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctacgaccg ccaccaagga cacctatgac     1440
gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg                                     1470

```

<210> 79

<211> 490

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 79

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1

5

10

15

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Ala | Ala | Arg | Pro | Asp | Val | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Asp | Ser | Leu |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Val | Ser | Leu | Gly | Glu | Arg | Ala | Thr | Ile | Asn | Cys | Lys | Ser | Ser | Gln |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Leu | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Lys | Thr | Tyr | Leu | Asn | Trp | Leu | Gln | Gln |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Pro | Gly | Gln | Pro | Pro | Lys | Arg | Leu | Ile | Ser | Leu | Val | Ser | Lys | Leu |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp | Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Ala | Glu | Asp | Val | Ala | Val | Tyr |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Tyr | Cys | Trp | Gln | Gly | Thr | His | Phe | Pro | Gly | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Val | Glu | Ile | Lys | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Glu | Ile | Gln | Leu | Val | Gln | Ser |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Glu | Ser | Leu | Arg | Ile | Ser | Cys | Lys |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Ser | Gly | Phe | Asn | Ile | Glu | Asp | Tyr | Tyr | Ile | His | Trp | Val | Arg | Gln |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Met | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Met | Gly | Arg | Ile | Asp | Pro | Glu | Asn |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp | Glu | Thr | Lys | Tyr | Gly | Pro | Ile | Phe | Gln | Gly | His | Val | Thr | Ile | Ser |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Asp | Thr | Ser | Ile | Asn | Thr | Val | Tyr | Leu | Gln | Trp | Ser | Ser | Leu | Lys |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Ser | Asp | Thr | Ala | Met | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Phe | Arg | Gly | Gly | Val | Tyr |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Thr | Thr | Thr | Pro | Ala |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Arg | Pro | Pro | Thr | Pro | Ala | Pro | Thr | Ile | Ala | Ser | Gln | Pro | Leu | Ser |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Arg | Pro | Glu | Ala | Cys | Arg | Pro | Ala | Ala | Gly | Gly | Ala | Val | His | Thr |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg | Gly | Leu | Asp | Phe | Ala | Cys | Asp | Ile | Tyr | Ile | Trp | Ala | Pro | Leu | Ala |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Thr | Cys | Gly | Val | Leu | Leu | Leu | Ser | Leu | Val | Ile | Thr | Leu | Tyr | Cys |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 325 |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |     |     |
| Lys | Arg | Gly | Arg | Lys | Lys | Leu | Leu | Tyr | Ile | Phe | Lys | Gln | Pro | Phe | Met |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     | 345 |     |     |     | 350 |     |     |     |
| Arg | Pro | Val | Gln | Thr | Thr | Gln | Glu | Glu | Asp | Gly | Cys | Ser | Cys | Arg | Phe |
|     |     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Pro | Glu | Glu | Glu | Glu | Gly | Gly | Cys | Glu | Leu | Arg | Val | Lys | Phe | Ser | Arg |
|     |     |     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     | 380 |     |     |     |
| Ser | Ala | Asp | Ala | Pro | Ala | Tyr | Lys | Gln | Gly | Gln | Asn | Gln | Leu | Tyr | Asn |
| 385 |     |     |     | 390 |     |     |     | 395 |     |     |     | 400 |     |     |     |
| Glu | Leu | Asn | Leu | Gly | Arg | Arg | Glu | Glu | Tyr | Asp | Val | Leu | Asp | Lys | Arg |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     | 410 |     |     |     | 415 |     |     |     |
| Arg | Gly | Arg | Asp | Pro | Glu | Met | Gly | Gly | Lys | Pro | Arg | Arg | Lys | Asn | Pro |
|     |     |     |     | 420 |     |     |     | 425 |     |     |     | 430 |     |     |     |
| Gln | Glu | Gly | Leu | Tyr | Asn | Glu | Leu | Gln | Lys | Asp | Lys | Met | Ala | Glu | Ala |
|     |     |     |     | 435 |     |     |     | 440 |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Tyr | Ser | Glu | Ile | Gly | Met | Lys | Gly | Glu | Arg | Arg | Arg | Gly | Lys | Gly | His |
| 450 |     |     |     | 455 |     |     |     | 460 |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp | Gly | Leu | Tyr | Gln | Gly | Leu | Ser | Thr | Ala | Thr | Lys | Asp | Thr | Tyr | Asp |
| 465 |     |     |     | 470 |     |     |     | 475 |     |     |     | 480 |     |     |     |
| Ala | Leu | His | Met | Gln | Ala | Leu | Pro | Pro | Arg |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     | 490 |     |     |     |     |     |     |     |

 $\langle 210 \rangle$  80

246

&lt;212&gt; PRT

### 〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$ 

## 〈221〉 来源

〈223〉 /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

 $\langle 400 \rangle$  80

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

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 | 125 |
| Gly Gly Gly Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 | 140 |
| Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Ile Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Gly Pro Ile Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Asn Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Thr Val Thr Val Ser Ser                                         |     |     |     |
|                                                                 | 245 |     |     |

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 81

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| gatgtggtca tgacgcagtc accactgtcc ctccccgtga cccttggaca gccagcgtcg   | 60  |
| attagctgca agtcatccca atccctgtc gattcggatg gaaagacctt tctcaactgg    | 120 |
| ctgcagcaaaa gacccgggtca gagccctagg agactcatct cgttggtgtc aaagctggac | 180 |
| agcggagtg cggaccggtt ttccggttcg ggatcgggga cggacttcac tctgaagatt    | 240 |
| tcacgggtgg aagctgagga tgtgggagtg tactactgct ggcagggaac ccatttcct    | 300 |
| ggcacttttg gcggagggaac taaggtcgaa atcaaggag gaggtggctc gggaggaggc   | 360 |
| ggatcgggcg gaggcgggag cggcggagga ggtccgaaa tccaacttgt ccagtcagga    | 420 |

gccgaagtga agaaaccggg agccaccgtc aaaatcagct gtaagggatc gggattcaat 480  
 atcgaggact actacatcca ctgggtgcag caagctccgg gcaaaggact ggagtggatg 540  
 gggcgcatcg acccagagaa cgacgaaacc aaatacggcc cgatcttcca agggcgggtg 600  
 accatcaccg cggacacctc aactaacact gtgtacatgg agctgagctc cctgcgctcc 660  
 gaagatactg cagtctacta ctgcgccttc cgcggtgggtg tgtactgggg acagggcacc 720  
 actgtgactg tcagctcg 738

<210> 82

<211> 831

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

<400> 82

atggccctcc ctgtcaccgc cctgtctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60  
 cccgatgtgg tcatgacgca gtcaccactg tccctccccg tgacccttgg acagccagcg 120  
 tcgattagct gcaagtcac ccaatccctg ctcgattcgg atggaaagac ctatctcaac 180  
 tggctgcagc aaagaccggg tcagagccct aggagactca tctcgttggt gtcaaagctg 240  
 gacagcggag tgccggaccg gttttccggt tcgggatcgg ggacggactt cactctgaag 300  
 atttcacggg tggaagctga ggatgtggga gtgtactact gctggcaggg aacccatttc 360  
 cctggcactt ttggcggagg aactaaggct gaaatcaagg gaggaggtgg ctcgggagga 420  
 ggcggatcgg gcggaggcgg gagcggcgga ggagggtccg aaatccaact tgtccagtca 480  
 ggagccgaag tgaagaaacc gggagccacc gtcaaaatca gctgtaaggg atcgggattc 540  
 aatatcgagg actactacat ccactgggtg cagcaagctc cgggcaaagg actggagtgg 600  
 atggggcgca tcgaccaga gaacgacgaa accaaatacg gcccgatctt ccaagggcgg 660  
 gtgaccatca ccgcggacac ctcaactaac actgtgtaca tggagctgag ctccctgcgc 720  
 tccgaagata ctgcagtcta ctactgcgcc ttccgcgggtg gtgtgtactg gggacagggc 780  
 accactgtga ctgtcagctc ggggtccac catcatcacc accaccatca c 831

<210> 83

<211> 277

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 83

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

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

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 1470

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 84

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg | 60   |
| cccgatgtgg tcatgacgca gtcaccactg tccctccccg tgacccttgg acagccagcg | 120  |
| tcgattagct gcaagtcac ccaatccctg ctcgattcgg atggaaagac ctatctcaac  | 180  |
| tggctgcagc aaagacccgg tcagagccct aggagactca tctcgttggg gtcaaagctg | 240  |
| gacagcggag tgccggaccg gttttccggg tcgggatcgg ggacggactt cactctgaag | 300  |
| atttcacggg tggaagctga ggatgtggga gtgtactact gctggcaggg aacccatttc | 360  |
| cctggcactt ttggcggagg aactaaggte gaaatcaagg gaggaggtgg ctcgggagga | 420  |
| ggcggatcgg gcgaggcgcg gagcggcgga ggagggtccg aatccaact tgtccagtca  | 480  |
| ggagccgaag tgaagaaacc gggagccacc gtcaaaatca gctgtaaggg atcgggattc | 540  |
| aatatcgagg actactacat ccactgggtg cagcaagctc cgggcaaagg actggagtgg | 600  |
| atggggcgca tcgaccaga gaacgacgaa accaaatacg gcccgatctt ccaagggcgg  | 660  |
| gtgaccatca ccgcggacac ctcaactaac actgtgtaca tggagctgag ctccctgcgc | 720  |
| tccgaagata ctgcagtcta ctactgcgc ttccgcggtg gtgtgtactg gggacagggc  | 780  |
| accactgtga ctgtcagctc gaccactacc ccagcaccga ggccaccac cccggctcct  | 840  |
| accatgcct cccagcctct gtccctgcgt ccggaggcat gtagaccgc agctggtggg   | 900  |
| gccgtgcata cccgggtct tgacttcgcc tgcgatatct acatttgggc ccctctggct  | 960  |
| ggtacttgcg gggctcctgct gctttcactc gtgatcactc ttactgtaa gcgcggtcgg | 1020 |
| aagaagctgc tgtacatctt taagcaacc ttcatgaggc ctgtgcagac tactcaagag  | 1080 |
| gaggacggct gttcatgccg gttcccagag gaggaggaag gcggctgcga actgcgcgtg | 1140 |
| aaattcagcc gcagcgcaga tgctccagcc tacaagcagg ggcagaacca gctctacaac | 1200 |
| gaactcaatc ttggtcggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcggag aggacgggac | 1260 |
| ccagaaatgg gcgggaagcc gcgcagaaag aatccccaag agggcctgta caacgagctc | 1320 |
| caaaaggata agatggcaga agcctatagc gagattggta tgaaagggga acgcagaaga | 1380 |
| ggcaaaggcc acgacggact gtaccaggga ctacgaccg ccaccaagga cacctatgac  | 1440 |
| gctcttcaca tgcaggccct gccgcctcgg                                  | 1470 |

&lt;210&gt; 85

&lt;211&gt; 490

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

&lt;400&gt; 85

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

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys |     |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |
| Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg |     |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 | 415 |
| Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro |     |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 | 430 |
| Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala |     |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 | 445 |
| Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His |     |     |     |
|                                                                 | 450 | 455 | 460 |
| Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp |     |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 | 480 |
| Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg                         |     |     |     |
|                                                                 | 485 | 490 |     |

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 243

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

&lt;400&gt; 86

|                                                                 |    |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|----|
| Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala |    |    |    |
| 1                                                               | 5  | 10 | 15 |
| Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Tyr |    |    |    |
|                                                                 | 20 | 25 | 30 |
| Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile |    |    |    |
|                                                                 | 35 | 40 | 45 |
| Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Asp Glu Thr Lys Tyr Gly Pro Ile Phe |    |    |    |

|                                                                   |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 50                                                                | 55  | 60  |     |
| Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr   |     |     |     |
| 65                                                                | 70  | 75  | 80  |
| Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys   |     |     |     |
|                                                                   | 85  | 90  | 95  |
| Ala Phe Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val   |     |     |     |
|                                                                   | 100 | 105 | 110 |
| Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly   |     |     |     |
|                                                                   | 115 | 120 | 125 |
| Ser His Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val   |     |     |     |
|                                                                   | 130 | 135 | 140 |
| Ala Ile Gly Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu   |     |     |     |
| 145                                                               | 150 | 155 | 160 |
| Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro   |     |     |     |
|                                                                   | 165 | 170 | 175 |
| Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser   |     |     |     |
|                                                                   | 180 | 185 | 190 |
| Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr   |     |     |     |
|                                                                   | 195 | 200 | 205 |
| Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys   |     |     |     |
|                                                                   | 210 | 215 | 220 |
| Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu   |     |     |     |
| 225                                                               | 230 | 235 | 240 |
| Glu Ile Lys                                                       |     |     |     |
| <210> 87                                                          |     |     |     |
| <211> 822                                                         |     |     |     |
| <212> DNA                                                         |     |     |     |
| <213> 人工序列                                                        |     |     |     |
| <220>                                                             |     |     |     |
| <221> 来源                                                          |     |     |     |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的<br>多核苷酸"                                   |     |     |     |
| <400> 87                                                          |     |     |     |
| atggccctcc ctgtcaccgc cctgetgett ccgetggetc ttctgctcca cgccgctcgg |     |     | 60  |
| cccgagatcc agctccaaca gagcggagcc gaactggtca aaccgggagc gtcggtgaag |     |     | 120 |
| ttgtcatgca ctggatcggg cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtcaagcaa |     |     | 180 |
| cgcaccgagc aggggctgga atggatcgga cggatcgacc ccgaaaacga tgaaaccaag |     |     | 240 |
| tacgggccta tcttccaagg acgggccacc attacggctg acacgtcaag caataccgtc |     |     | 300 |
| tacctccagc tttccagcct gacctccgag gacactgccg tgtactactg cgccttcaga |     |     | 360 |

```

ggaggcgtgt actggggacc aggaaccact ttgaccgtgt ccagcggagg cggtggatca      420
ggaggaggag gctcaggcgg tggcggctcg cacatggacg tggtcatgac tcagtccccg      480
ctgaccctgt cgggtggcaat tggacagagc gcatccatct cgtgcaagag ctcacagtcg      540
ctgctggatt cgcacggaaa gacttatctg aactggctgc tccaaagacc agggcaatca      600
ccgaaacgcc ttatctccct ggtgtcgaaa ctcgactcgg gtgtgccgga tcggtttacc      660
ggtagcgggt ccggcacgga cttcactctc cgcatttcga gggtggaagc ggaggatctc      720
gggatctact actgttggca gggaaccacac ttccctggga cttttggagg cggaactaag      780
ctggaaatca agggtagcca tcaccatcac caccaccatc at                          822

```

<210> 88

<211> 274

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 88

```

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

```

|                                                                 |             |
|-----------------------------------------------------------------|-------------|
| Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp |             |
| 180                                                             | 185 190     |
| Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val |             |
| 195                                                             | 200 205     |
| Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser |             |
| 210                                                             | 215 220     |
| Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu |             |
| 225                                                             | 230 235 240 |
| Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly |             |
| 245                                                             | 250 255     |
| Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser His His His His His His |             |
| 260                                                             | 265 270     |

His His

&lt;210&gt; 89

&lt;211&gt; 1461

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 89

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atggccctcc ctgtcaccgc cctgtctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg | 60   |
| cccgagatcc agctccaaca gagcggagcc gaactgggtca aaccgggagc gtcggtgaag | 120  |
| ttgtcatgca ctggatcggg cttcaacatc gaggattact acatccactg ggtcaagcaa  | 180  |
| cgcaccgagc aggggctgga atggatcgga cggatcgacc ccgaaaacga tgaaaccaag  | 240  |
| tacgggccta tcttccaagg acgggccacc attacggctg acacgtcaag caataccgtc  | 300  |
| tacctccagc tttccagcct gacctccgag gacactgccg tgtactactg cgccttcaga  | 360  |
| ggaggcgtgt actggggacc aggaaccact ttgaccgtgt ccagcggagg cgggtgatca  | 420  |
| ggaggaggag gctcaggcgg tggcggctcg cacatggacg tggatcatgac tcagtccccg | 480  |
| ctgaccctgt cgggtggcaat tggacagagc gcatccatct cgtgcaagag ctcacagtgc | 540  |
| ctgctggatt ccgacggaaa gacttatctg aactggctgc tccaaagacc agggcaatca  | 600  |
| ccgaaacgcc ttatctccct ggtgtcgaaa ctcgactcgg gtgtgccgga tcggtttacc  | 660  |
| ggtagcgggt ccggcacgga cttcactctc cgcatttcga ggggtggaagc ggaggatctc | 720  |
| gggatctact actgttggca gggaaccac ttccctggga cttttggagg cggaactaag   | 780  |
| ctggaaatca agaccactac ccagcaccg aggccacca ccccggtcc taccatgcc      | 840  |
| tcccagcctc tgtccctgcg tccggaggca tgtagaccg cagctggtgg ggccgtgcat   | 900  |
| acccggggtc ttgacttcgc ctgcgatatc tacatttggg cccctctggc tggtacttgc  | 960  |
| ggggctcctgc tgctttcact cgtgatcact ctttactgta agcgcggtcg gaagaagctg | 1020 |

ctgtacatct ttaagcaacc cttcatgagg cctgtgcaga ctactcaaga ggaggacggc 1080  
 tgtttcatgcc gggtcccaga ggaggaggaa ggcggtgcg aactgcgcgt gaaattcagc 1140  
 cgcagcgcag atgctccagc ctacaagcag gggcagaacc agctctacaa cgaactcaat 1200  
 cttgggtcgga gagaggagta cgacgtgctg gacaagcgga gaggacggga cccagaaatg 1260  
 ggcggggaagc cgcgcagaaa gaatcccca gagggcctgt acaacgagct ccaaaaggat 1320  
 aagatggcag aagcctatag cgagattggt atgaaagggg aacgcagaag aggcaaaggc 1380  
 cacgacggac tgtaccaggg actcagcacc gccaccaagg acacctatga cgctcttcac 1440  
 atgcaggccc tgccgcctcg g 1461

<210> 90

<211> 487

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 90

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 |
| Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg                                     |     |     |

485

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 240

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

&lt;400&gt; 91

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

| 225                                                               | 230 | 235 | 240 |
|-------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| <210> 92                                                          |     |     |     |
| <211> 720                                                         |     |     |     |
| <212> DNA                                                         |     |     |     |
| <213> 人工序列                                                        |     |     |     |
| <220>                                                             |     |     |     |
| <221> 来源                                                          |     |     |     |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的<br>多核苷酸"                                   |     |     |     |
| <400> 92                                                          |     |     |     |
| gatatccaaa tgactcagag cccttcattc ctgagcgcca gcgtcggaga cagggtgacc |     |     | 60  |
| atcacgtgcc gggcatccca aggcattaga aataacttgg cgtggtatca gcaaaaacca |     |     | 120 |
| ggaaaggccc cgaagcgctt gatctacgag gcctccaacc ttcagtcagg agtgccctcg |     |     | 180 |
| cgtttcaccg ggagcggtag cggaactgag tttaccctta tcgtgtcgtc cctgcagcca |     |     | 240 |
| gaggacttcg cgacctacta ctgcctccag catcactcgt acccgttgac ttcgggaggc |     |     | 300 |
| ggaaccaagg tcgaaatcaa acgcactggc tcgacgtcag ggtccggtaa accgggatcg |     |     | 360 |
| ggagaaggat cggaagtcca agtgctggag agcggaggcg gactcgtgca acctggcggg |     |     | 420 |
| tcgtctcggc tcagctgtgc cgcgtcgggt tttactttca gctcgtacgc tatgtcatgg |     |     | 480 |
| gtgcggcagg ctccgggaaa ggggctggaa tgggtgtccg ctatttcagg ctcggttgga |     |     | 540 |
| agcaccaatt acgccgactc cgtgaaggga cgcttcacca tctcacggga taactccaag |     |     | 600 |
| aatactctgt acctccagat gaactcgtg agagccgagg acaccgcagt gtactactgc  |     |     | 660 |
| gcagggtcaa gcggctggtc cgaatactgg ggacagggca ccctcgtcac tgtcagctcc |     |     | 720 |
| <210> 93                                                          |     |     |     |
| <211> 807                                                         |     |     |     |
| <212> DNA                                                         |     |     |     |
| <213> 人工序列                                                        |     |     |     |
| <220>                                                             |     |     |     |
| <221> 来源                                                          |     |     |     |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的<br>多核苷酸"                                   |     |     |     |
| <400> 93                                                          |     |     |     |
| atggccctcc ctgtcaccgc cctgtgtgtt ccgttggttc ttctgttcca cgccgctcgg |     |     | 60  |
| cccgatatcc aaatgactca gagcccttca tccttgagcg ccagcgtcgg agacagggtg |     |     | 120 |
| accatcacgt gccgggcatc ccaaggcatt agaaataact tggcgttgta tcagcaaaaa |     |     | 180 |
| ccaggaaagg ccccgaaagc cctgatctac gcggcctcca accttcagtc aggagtgcgc |     |     | 240 |
| tcgcgcttca ccgggagcgg tagcggaact gagtttacc ttatcgtgtc gtccctgcag  |     |     | 300 |
| ccagaggact tcgcgacctt ctactgcctc cagcatcact cgtaccggtt gacttcggga |     |     | 360 |
| ggcggaacca aggtcgaaat caaacgcact ggctcgacgt cagggtccgg taaaccggga |     |     | 420 |
| tcgggagaag gatcggaagt ccaagtgtg gagagcggag gcggactcgt gcaacctggc  |     |     | 480 |

```

gggtcgctgc ggctcagctg tgccgcgtcg ggttttactt tcagctcgta cgctatgtca      540
tgggtgcggc aggcctccggg aaaggggctg gaatgggtgt cgcctatttc cggctcgggt      600
ggaagcacca attacgccga ctccgtgaag ggacgcttca ccatctcacg ggataactcc      660
aagaatactc tgtacctcca gatgaactcg ctgagagccg aggacaccgc agtgtactac      720
tgcgcagggt caagcggctg gtccgaatac tggggacagg gcaccctcgt cactgtcagc      780
tcccatcacc atcaccacca ccatcac                                          807

```

<210> 94

<211> 269

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 94

```

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

```

Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser  
 195 200 205  
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu  
 210 215 220  
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 245 250 255  
 Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His  
 260 265

<210> 95

<211> 1452

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
 多核苷酸"

<400> 95

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg  | 60   |
| cccgatatcc aaatgactca gagcccttca tccctgagcg ccagcgctcg agacagggtg  | 120  |
| accatcacgt gccgggcatc ccaaggcatt agaaataact tggcgtggta tcagcaaaaa  | 180  |
| ccaggaaagg ccccgaagcg cctgatctac gcggcctcca accttcagtc aggagtcccc  | 240  |
| tcgcgcttca ccgggagcgg tagcggaaact gagtttacct ttatcgtgtc gtccctgcag | 300  |
| ccagaggact tcgcgacctt ctactgcctc cagcatcact cgtacctcgt gacttcggga  | 360  |
| ggcggaaacca aggtcgaaat caaacgcact ggctcgacgt cagggtccgg taaaccggga | 420  |
| tcgggagaag gatcggaagt ccaagtgtg gagagcggag gcggactcgt gcaacctggc   | 480  |
| gggtcgctgc ggctcagctg tgccgcgtcg ggttttactt tcagctcgta cgctatgtca  | 540  |
| tgggtgcggc aggtccggg aaaggggctg gaatgggtgt ccgctatttc cggctcgggt   | 600  |
| ggaagcacca attacgccga ctccgtgaag ggacgcttca ccatctcag ggataactcc   | 660  |
| aagaatactc tgtacctcca gatgaactcg ctgagagccg aggacaccgc agtgtactac  | 720  |
| tgcgagggt caagcggtg gtccgaatac tggggacagg gcacctcgt cactgtcagc     | 780  |
| tccaccacta ccccgacc gaggccacc acccggtc ctaccatcgc ctcccagcct       | 840  |
| ctgtccctgc gtccggaggc atgtagacc gcagctgggt gggccgtgca taccggggt    | 900  |
| cttgacttcg cctgcgatat ctacatttg gccctcttg ctggtacttg cggggtcctg    | 960  |
| ctgctttcac tcgtgatcac tctttactgt aagcgcggtc ggaagaagct gctgtacatc  | 1020 |
| tttaagcaac ccttcatgag gcctgtgcag actactcaag aggaggacgg ctgttcatgc  | 1080 |
| cggttcccag aggaggagga aggcggctgc gaactgcgc tgaaattcag ccgcagcgca   | 1140 |
| gatgctccag cctacaagca ggggcagaac cagctctaca acgaactcaa tcttggtcgg  | 1200 |

agagaggagt acgacgtgct ggacaagcgg agaggacggg acccagaaat gggcgggaag 1260  
 ccgcgcagaa agaatcccca agagggcctg tacaacgagc tccaaaagga taagatggca 1320  
 gaagcctata gcgagattgg tatgaaaggg gaacgcagaa gaggcaaagg ccacgacgga 1380  
 ctgtaccagg gactcagcac cgccaccaag gacacctatg acgctcttca catgcaggcc 1440  
 ctgccgcctc gg 1452

<210> 96

<211> 484

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

<400> 96

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Cys Ala Gly Ser Ser Gly Trp Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly     |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 |
| Leu Pro Pro Arg                                                 |     | 480 |
| <210> 97                                                        |     |     |
| <211> 1183                                                      |     |     |
| <212> DNA                                                       |     |     |

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

<400> 97

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gtgaggctcc ggtgcccgtc agtgggcaga ggcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt   | 60   |
| ggggggagg gtcggcaatt gaaccggtgc ctagagaagg tggcgcgagg taaactggga   | 120  |
| aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt tcccagggtt gggggagaac cgtatataag  | 180  |
| tgcagtagtc gccgtgaacg ttcttttttcg caacgggttt gccgccagaa cacaggtaag | 240  |
| tgccgtgtgt ggttcccgcg ggcttggcct ctttacgggt tatggccctt gcgtgccttg  | 300  |
| aattacttcc acctggctgc agtacgtgat tcttgatccc gagcttcggg ttggaagtgg  | 360  |
| gtgggagagt tcgaggcctt gcgttaagg agcccttcg cctcgtgctt gagttgagge    | 420  |
| ctggcctggg cgctggggcc gccgcgtgcg aatctggtgg caccttcgcg cctgtctcgc  | 480  |
| tgttttcgat aagtctctag ccatttaaaa tttttgatga cctgctgcga cgcttttttt  | 540  |
| ctggcaagat agtcttgtaa atgcgggcca agatctgcac actggtattt cggttttttg  | 600  |
| ggccgcgggc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgcaca tggtcggcga ggcggggcct  | 660  |
| gcgagcgcgg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa gctggccggc ctgctctggt  | 720  |
| gcctggcctc gcgccgccgt gtatcgcccc gccctgggcg gcaaggctgg cccggtcggc  | 780  |
| accagttgcg tgagcggaaa gatggccgct tcccggccct gctgcaggga gctcaaatg   | 840  |
| gaggacgcgg cgctcgggag agcgggcggg tgagtcaccc acacaaagga aaaggcctt   | 900  |
| tccgtcctca gccgtcgtt catgtgactc cacggagtac cgggcgccgt ccaggcacct   | 960  |
| cgattagttc tcgagctttt ggagtacgtc gtcttttaggt tggggggagg ggttttatgc | 1020 |
| gatggagttt cccacactg agtgggtgga gactgaagtt aggccagctt ggcacttgat   | 1080 |
| gtaattctcc ttggaatttg ccctttttga gtttgatct tggttcattc tcaagcctca   | 1140 |
| gacagtgggt caaagttttt ttcttcatt tcaggtgtcg tga                     | 1183 |

<210> 98

<211> 729

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

<400> 98

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gagatccagc tccaacagag cggagccgaa ctggtcaaac cgggagcgtc ggtgaagttg | 60  |
| tcatgactg gatcgggctt caacatcgag gattactaca tccactgggt caagcaacgc  | 120 |
| accgagcagg ggctggaatg gatcggacgg atcgaccccc aaaacgatga aaccaagtac | 180 |
| gggcctatct tccaaggacg ggccaccatt acggctgaca cgtcaagcaa taccgtctac | 240 |

```

ctccagcttt ccagcctgac ctccgaggac actgccgtgt actactgcgc cttcagagga      300
ggcgtgtact ggggaccagg aaccactttg accgtgtcca gcggaggcgg tggatcagga      360
ggaggaggct caggcgggtg cggtctgcac atggacgtgg tcatgactca gtccccgctg      420
accctgtcgg tggcaattgg acagagcgca tccatctcgt gcaagagctc acagtcgctg      480
ctggattccg acggaaagac ttatctgaac tggctgctcc aaagaccagg gcaatcacccg      540
aaacgcctta tctccctggt gtcgaaactc gactcgggtg tgccggatcg gtttaccggt      600
agcgggtccg gcacggactt cactctccgc atttcgaggg tggaagcgga ggatctcggg      660
atctactact gttggcaggg aaccacttc cctgggactt ttggaggcgg aactaagctg      720
gaaatcaag                                         729

```

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 99

```

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

```

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 100

```

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggccga gaaccagctc      60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc      120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat      180
gaactgcaga aagataagat ggcgaggagg tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc      240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc      300
tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc                                         336

```

<210> 101

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 101

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Cys

1 5 10

<210> 102

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 102

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro

1 5 10 15

Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr

20 25 30

Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro

35 40 45

<210> 103

<211> 123

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 103

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60

gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc 123

<210> 104

&lt;211&gt; 230

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多肽"

&lt;400&gt; 104

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Phe |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |
| Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |
| Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val |
|     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     | 60  |     |
| Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |
| Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro | Ser |
|     |     |     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |
| Ser | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro |
|     |     |     |     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |
| Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Gln | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln |
|     |     |     |     | 130 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 140 |
| Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |
| Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr |
|     |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 175 |
| Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Arg | Leu |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 190 |
| Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Glu | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser |
|     |     |     |     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |
| Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser |
|     |     |     |     | 210 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 220 |
| Leu | Ser | Leu | Gly | Lys | Met |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 225 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 230 |

&lt;210&gt; 105



|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly |     |
| 85                                                              | 90  |
| Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val |     |
| 100                                                             | 105 |
| Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly |     |
| 115                                                             | 120 |
| Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn |     |
| 130                                                             | 135 |
| Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro |     |
| 145                                                             | 150 |
| Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys |     |
| 165                                                             | 170 |
| Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser |     |
| 180                                                             | 185 |
| Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu |     |
| 195                                                             | 200 |
| Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro |     |
| 210                                                             | 215 |
| Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser |     |
| 225                                                             | 230 |
| Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr |     |
| 245                                                             | 250 |
| Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg |     |
| 260                                                             | 265 |
| Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His                         |     |
| 275                                                             | 280 |

&lt;210&gt; 107

&lt;211&gt; 847

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

&lt;400&gt; 107

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| aggtggccccg aaagtcccaa ggcccaggca tctagtgttc ctactgcaca gccccaggca | 60  |
| gaaggcagcc tagccaaagc tactactgca cctgccacta cgcgcaatac tggccgtggc  | 120 |
| ggggaggaga agaaaaagga gaaagagaaa gaagaacagg aagagaggga gaccaagacc  | 180 |
| cctgaatgtc catcccatat ccagccgctg ggcgtctatc tcttgactcc cgcagtagac  | 240 |

gacttgtggc ttagagataa ggccaccttt acatgtttcg tcgtgggctc tgacctgaag 300  
gatgcccatt tgacttggga ggttgccgga aaggtaccca cagggggggt tgaggaaggg 360  
ttgctggagc gccattccaa tggctctcag agccagcact caagactcac ctttccgaga 420  
tccttgtgga acgccgggac ctctgtcaca tgtactctaa atcatcctag cctgccccca 480  
cagcgtctga tggcccttag agagccagcc gccagggcac cagttaagct tagcctgaat 540  
ctgctcgcca gtagtgatcc cccagaggcc gccagctggc tcttatgcga agtgtccggc 600  
ttagcccgcc ccaacatctt gctcatgtgg ctggaggacc agcgagaagt gaacaccagc 660  
ggcttcgctc cagcccggcc cccaccccag ccgggttcta ccacattctg ggcctggagt 720  
gtcttaaggg tcccagcacc acctagcccc cagccagcca catacacctg tgttgtgtcc 780  
catgaagata gcaggaccct gctaaatgct tctaggagtc tggaggtttc ctacgtgact 840  
gaccatt 847

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 108

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 109

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
寡核苷酸"

<400> 109

ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc

30

<210> 110

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的

多肽”

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (30)

<223> /注释=“该序列可以包含 1, 2, 3, 4, 5, 或6个  
‘Gly Gly Gly Gly Ser’ 重复单位”

<220>

<221> 变体

<222> (6) .. (30)

<223> /置换=“ ”

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (30)

<223> /注释=“序列中给出的变体残基相对于注释中在变体位置给出的残基无优先”

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (30)

<223> /注释=“参见提交的说明书中有关替代和优选实施方案的详细描述”

<400> 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
1                    5                    10                    15  
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
                  20                    25                    30

<210> 111

<211> 150

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成的  
多核苷酸”

<400> 111

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 60  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 120 |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa                                  | 150 |

<210> 112

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 112

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 113

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 113

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

1

5

10

15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 114

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
肽"

<400> 114

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

1

5

10

15

<210> 115

<211> 5000

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1) .. (5000)  
<223> /注释="该序列可以包含50至5,000个核苷酸 "  
<220>  
<221> 变异  
<222> (51) .. (5000)  
<223> /置换=" "  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1) .. (5000)  
<223> /注释="序列中给出的变体残基相对于注释中在变体位置给出的残基无优先"  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1) .. (5000)  
<223> /注释="参见提交的说明书中有关替代和优选实施方案的详细描述"  
<400> 115  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 420  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 480  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 540  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 600  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 720  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 780  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 900  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 960  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1020  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1320

209

|           |           |           |           |           |           |      |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 3720 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 3780 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 3840 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 3900 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 3960 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4020 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4080 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4140 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4200 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4260 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4320 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4380 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4440 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4500 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4560 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4620 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4680 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4740 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4800 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4860 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4920 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4980 |
| aaaaaaaaa | aaaaaaaaa |           |           |           |           | 5000 |

<210> 116

<211> 2000

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的  
多核苷酸"

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (2000)

<223> /注释="该序列可以包含50至2,000 个核苷酸"

<220>

<221> 变异

<222> (51) .. (2000)

<223> /置换=" "

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1) .. (2000)

&lt;223&gt; /注释="序列中给出的变体残基相对于注释中在变体位置给出的残基无优先"

&lt;400&gt; 116

|            |            |            |            |            |            |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 60   |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 120  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 180  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 240  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 300  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 360  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 420  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 480  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 540  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 600  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 660  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 720  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 780  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 840  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 900  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 960  |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1020 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1080 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1140 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1200 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1260 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1320 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1380 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1440 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1500 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1560 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1620 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1680 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1740 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1800 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1860 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1920 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 1980 |
| aaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa |            |            |            |            | 2000 |

|             |                                     |     |
|-------------|-------------------------------------|-----|
| <210>       | 117                                 |     |
| <211>       | 100                                 |     |
| <212>       | DNA                                 |     |
| <213>       | 人工序列                                |     |
| <220>       |                                     |     |
| <221>       | 来源                                  |     |
| <223>       | /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"               |     |
| <400>       | 117                                 |     |
| ttttttttttt | ttttttttttt                         | 60  |
| ttttttttttt | ttttttttttt                         | 100 |
| <210>       | 118                                 |     |
| <211>       | 5000                                |     |
| <212>       | DNA                                 |     |
| <213>       | 人工序列                                |     |
| <220>       |                                     |     |
| <221>       | 来源                                  |     |
| <223>       | /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"               |     |
| <220>       |                                     |     |
| <221>       | misc_feature                        |     |
| <222>       | (1) .. (5000)                       |     |
| <223>       | /注释="该序列可以包含50至 5,000 个核苷酸"         |     |
| <220>       |                                     |     |
| <221>       | 变异                                  |     |
| <222>       | (51) .. (5000)                      |     |
| <223>       | /置换=" "                             |     |
| <220>       |                                     |     |
| <221>       | misc_feature                        |     |
| <222>       | (1) .. (5000)                       |     |
| <223>       | /注释="序列中给出的变体残基相对于注释中在变体位置给出的残基无优先" |     |
| <400>       | 118                                 |     |
| ttttttttttt | ttttttttttt                         | 60  |
| ttttttttttt | ttttttttttt                         | 120 |
| ttttttttttt | ttttttttttt                         | 180 |
| ttttttttttt | ttttttttttt                         | 240 |
| ttttttttttt | ttttttttttt                         | 300 |
| ttttttttttt | ttttttttttt                         | 360 |
| ttttttttttt | ttttttttttt                         | 420 |



⟨210⟩ 119

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| <211> 5000                                                        |      |
| <212> DNA                                                         |      |
| <213> 人工序列                                                        |      |
| <220>                                                             |      |
| <221> 来源                                                          |      |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的<br>多核苷酸"                                   |      |
| <220>                                                             |      |
| <221> misc_feature                                                |      |
| <222> (1) .. (5000)                                               |      |
| <223> /注释="该序列可以包含100至5,000个核苷酸"                                  |      |
| <220>                                                             |      |
| <221> 变异                                                          |      |
| <222> (101) .. (5000)                                             |      |
| <223> /置换=" "                                                     |      |
| <220>                                                             |      |
| <221> misc_feature                                                |      |
| <222> (1) .. (5000)                                               |      |
| <223> /注释="序列中给出的变体碱基相对于注释中就变体位置给出的碱基无优先"                         |      |
| <400> 119                                                         |      |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 60   |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 120  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 180  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 240  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 300  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 360  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 420  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 480  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 540  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 600  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 660  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 720  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 780  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 840  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 900  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 960  |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 1020 |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 1080 |
| aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 1140 |

[illegible]

|                                |           |           |           |           |           |      |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 3540 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 3600 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 3660 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 3720 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 3780 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 3840 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 3900 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 3960 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4020 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4080 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4140 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4200 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4260 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4320 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4380 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4440 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4500 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4560 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4620 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4680 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4740 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4800 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4860 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4920 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 4980 |
| aaaaaaaaa                      | aaaaaaaaa |           |           |           |           | 5000 |
| <210> 120                      |           |           |           |           |           |      |
| <211> 400                      |           |           |           |           |           |      |
| <212> DNA                      |           |           |           |           |           |      |
| <213> 人工序列                     |           |           |           |           |           |      |
| <220>                          |           |           |           |           |           |      |
| <221> 来源                       |           |           |           |           |           |      |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"    |           |           |           |           |           |      |
| <220>                          |           |           |           |           |           |      |
| <221> misc_feature             |           |           |           |           |           |      |
| <222> (1) .. (400)             |           |           |           |           |           |      |
| <223> /注释="该序列可以包含100至400个核苷酸" |           |           |           |           |           |      |
| <220>                          |           |           |           |           |           |      |

|                                                                                         |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|--|----|--|----|-----|----|--|----|--|
| <221> 变异                                                                                |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <222> (101) .. (400)                                                                    |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <223> /置换=" "                                                                           |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <220>                                                                                   |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <221> misc_feature                                                                      |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <222> (1) .. (400)                                                                      |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <223> /注释="序列中给出的变体碱基相对于注释中就变异位置给出的碱基无优先"                                               |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <220>                                                                                   |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <221> misc_feature                                                                      |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <222> (1) .. (400)                                                                      |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <223> /注释="参见递交的说明书中关于替代和优选实施方案的详细描述"                                                   |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <400> 120                                                                               |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa |  |    |  |    | 60  |    |  |    |  |
| aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa |  |    |  |    | 120 |    |  |    |  |
| aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa |  |    |  |    | 180 |    |  |    |  |
| aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa |  |    |  |    | 240 |    |  |    |  |
| aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa |  |    |  |    | 300 |    |  |    |  |
| aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa |  |    |  |    | 360 |    |  |    |  |
| aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa                               |  |    |  |    | 400 |    |  |    |  |
| <210> 121                                                                               |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <211> 487                                                                               |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <212> PRT                                                                               |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <213> 人工序列                                                                              |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <220>                                                                                   |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <221> 来源                                                                                |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"                                                               |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| <400> 121                                                                               |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro                         |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| 1                                                                                       |  | 5  |  | 10 |     | 15 |  |    |  |
| Ala Phe Leu Ile Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser                         |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
|                                                                                         |  | 20 |  | 25 |     | 30 |  |    |  |
| Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ile Ile Ile Cys Arg Ala Ser                         |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
|                                                                                         |  | 35 |  | 40 |     | 45 |  |    |  |
| Gln Gly Ile Arg Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys                         |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| 50                                                                                      |  |    |  | 55 |     | 60 |  |    |  |
| Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val                         |  |    |  |    |     |    |  |    |  |
| 65                                                                                      |  | 70 |  |    |     | 75 |  | 80 |  |
| Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile                         |  |    |  |    |     |    |  |    |  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Val | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro | Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Leu | Gln |  |
|     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |  |
| His | His | Ser | Tyr | Pro | Leu | Thr | Ser | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile |  |
|     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |  |
| Lys | Phe | Thr | Gly | Ser | Thr | Ser | Gly | Ser | Gly | Lys | Pro | Gly | Ser | Gly | Glu |  |
|     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |  |
| Gly | Ser | Glu | Val | Gln | Val | Leu | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro |  |
| 145 |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |  |
| Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Ser | Tyr | Ala | Met | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu |  |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |  |
| Trp | Val | Ser | Ala | Ile | Ser | Gly | Ser | Gly | Gly | Ser | Thr | Asn | Tyr | Ala | Asp |  |
|     |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |  |
| Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ser | Lys | Asn | Thr |  |
|     |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |  |
| Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr |  |
| 225 |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |  |
| Tyr | Cys | Ala | Gly | Ser | Ser | Gly | Trp | Ser | Glu | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |  |
| Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Thr | Thr | Pro | Ala | Pro | Arg | Pro |  |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |  |
| Pro | Thr | Pro | Ala | Pro | Thr | Ile | Ala | Ser | Gln | Pro | Leu | Ser | Leu | Arg | Pro |  |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |  |
| Glu | Ala | Cys | Arg | Pro | Ala | Ala | Gly | Gly | Ala | Val | His | Thr | Arg | Gly | Leu |  |
|     |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |  |
| Asp | Phe | Ala | Cys | Asp | Ile | Tyr | Ile | Trp | Ala | Pro | Leu | Ala | Gly | Thr | Cys |  |
| 305 |     |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |  |
| Gly | Val | Leu | Leu | Leu | Ser | Leu | Val | Ile | Thr | Leu | Tyr | Cys | Lys | Arg | Gly |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |  |
| Arg | Lys | Lys | Leu | Leu | Tyr | Ile | Phe | Lys | Gln | Pro | Phe | Met | Arg | Pro | Val |  |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |  |
| Gln | Thr | Thr | Gln | Glu | Glu | Asp | Gly | Cys | Ser | Cys | Arg | Phe | Pro | Glu | Glu |  |
|     |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |  |
| Glu | Glu | Gly | Gly | Cys | Glu | Leu | Arg | Val | Lys | Phe | Ser | Arg | Ser | Ala | Asp |  |
|     |     |     |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |  |
| Ala | Pro | Ala | Tyr | Lys | Gln | Gly | Gln | Asn | Gln | Leu | Tyr | Asn | Glu | Leu | Asn |  |
| 385 |     |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     | 400 |  |

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg  
 405 410 415  
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly  
 420 425 430  
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu  
 435 440 445  
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu  
 450 455 460  
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His  
 465 470 475 480  
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 485

<210> 122

<211> 114

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 122

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

Ser Ser

<210> 123

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的

多肽”

&lt;400&gt; 123

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

Ser Ser

&lt;210&gt; 124

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释=“人工序列的描述：合成的

多肽”

&lt;400&gt; 124

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

| 100                                                             | 105 | 110 |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Ser Ser                                                         |     |     |
| <210> 125                                                       |     |     |
| <211> 112                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 小家鼠                                                       |     |     |
| <400> 125                                                       |     |     |
| Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Ala Ile Gly |     |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |     |
| Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser |     |     |
| 20 25 30                                                        |     |     |
| Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser |     |     |
| 35 40 45                                                        |     |     |
| Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro |     |     |
| 50 55 60                                                        |     |     |
| Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile |     |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |     |
| Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly |     |     |
| 85 90 95                                                        |     |     |
| Thr His Phe Pro Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys |     |     |
| 100 105 110                                                     |     |     |
| <210> 126                                                       |     |     |
| <211> 112                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <221> 来源                                                        |     |     |
| <223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"                                       |     |     |
| <400> 126                                                       |     |     |
| Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly |     |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |     |
| Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser |     |     |
| 20 25 30                                                        |     |     |
| Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser |     |     |
| 35 40 45                                                        |     |     |
| Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro |     |     |
| 50 55 60                                                        |     |     |
| Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile |     |     |

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

&lt;210&gt; 127

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

&lt;400&gt; 127

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

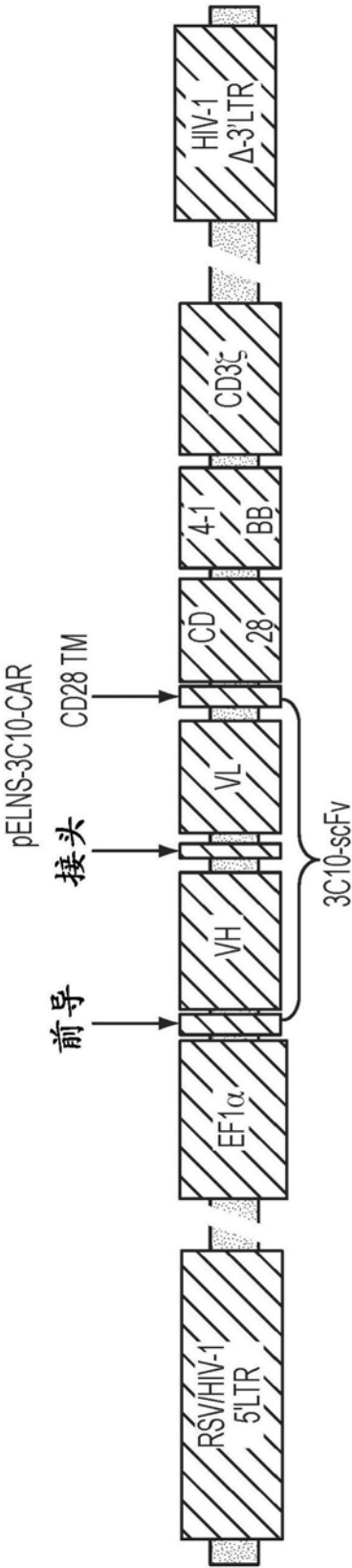


图1A

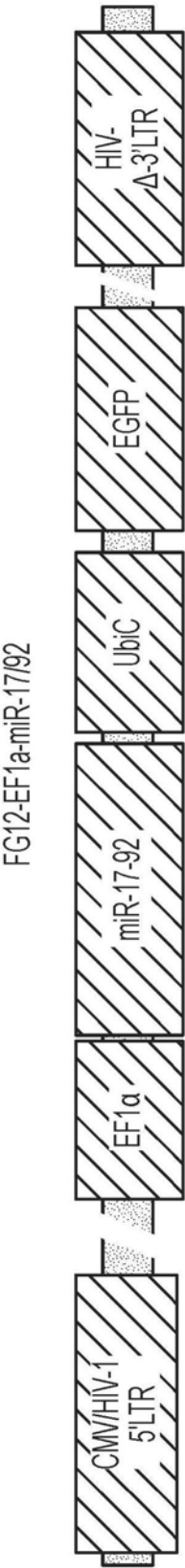


图1B

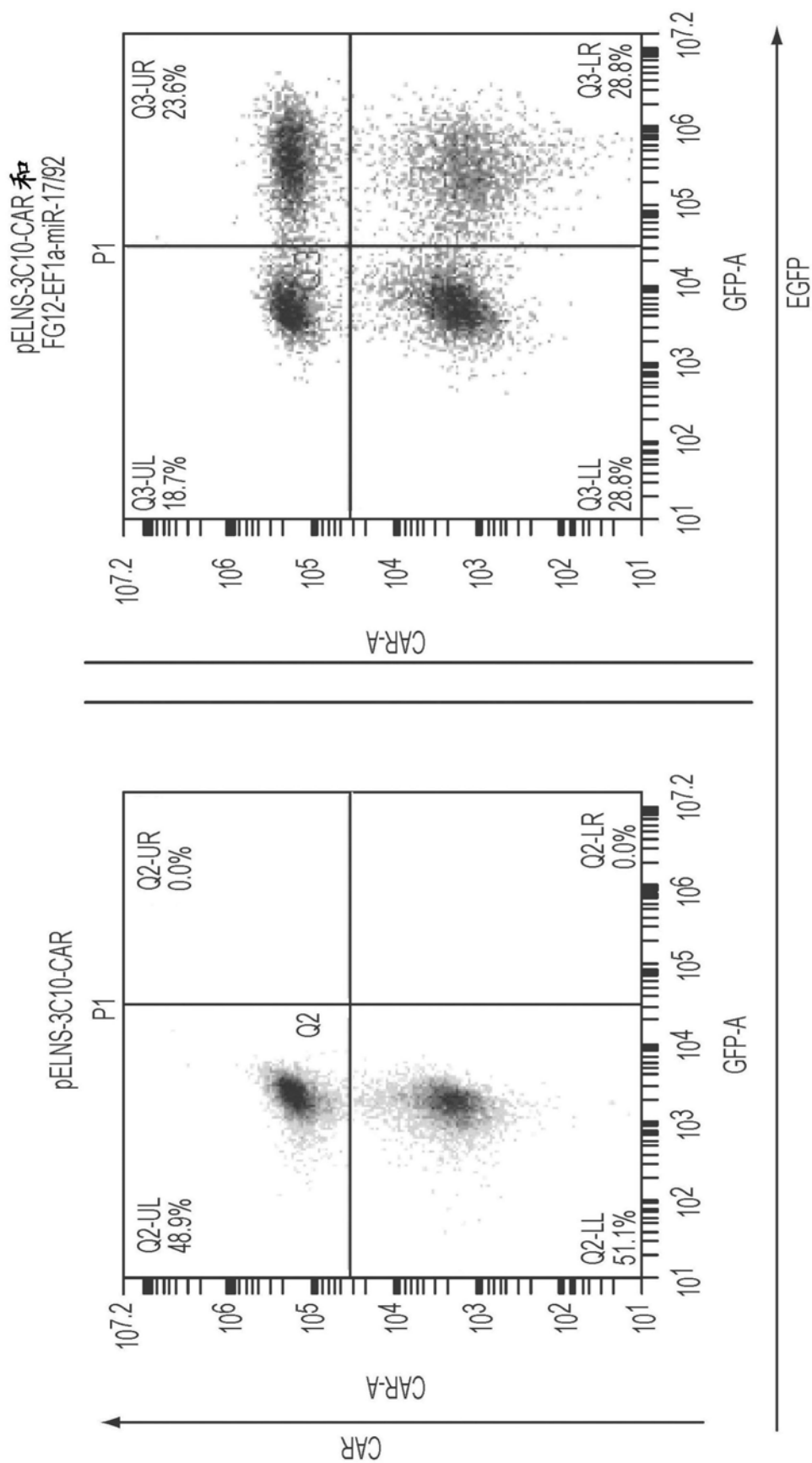


图2A

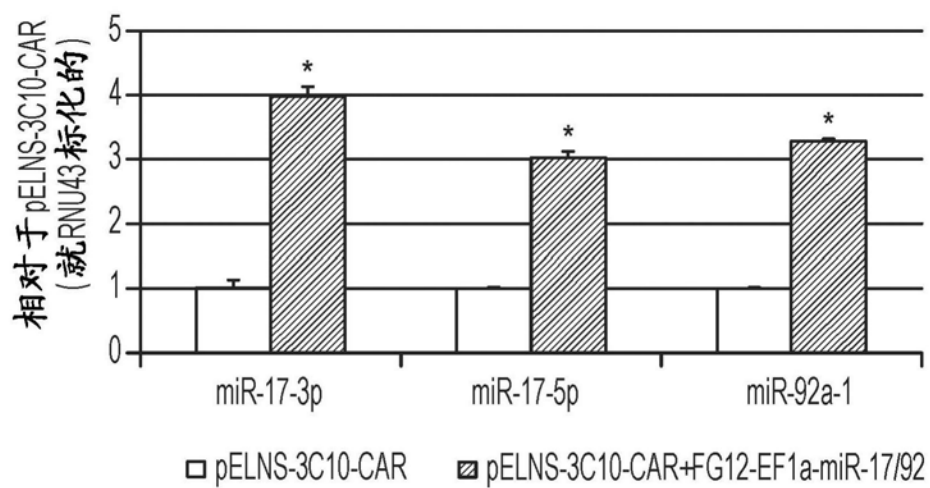


图2B

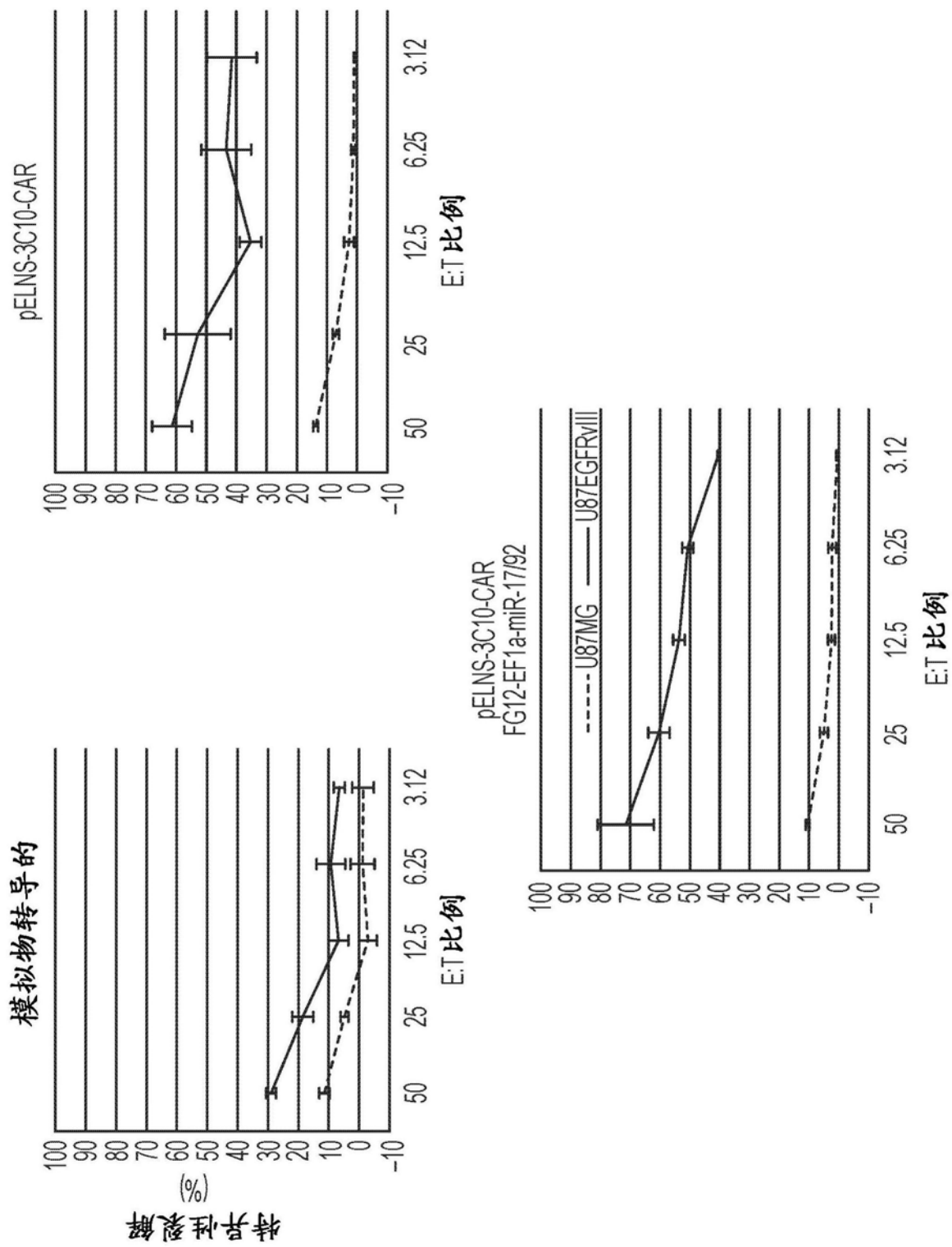


图2C

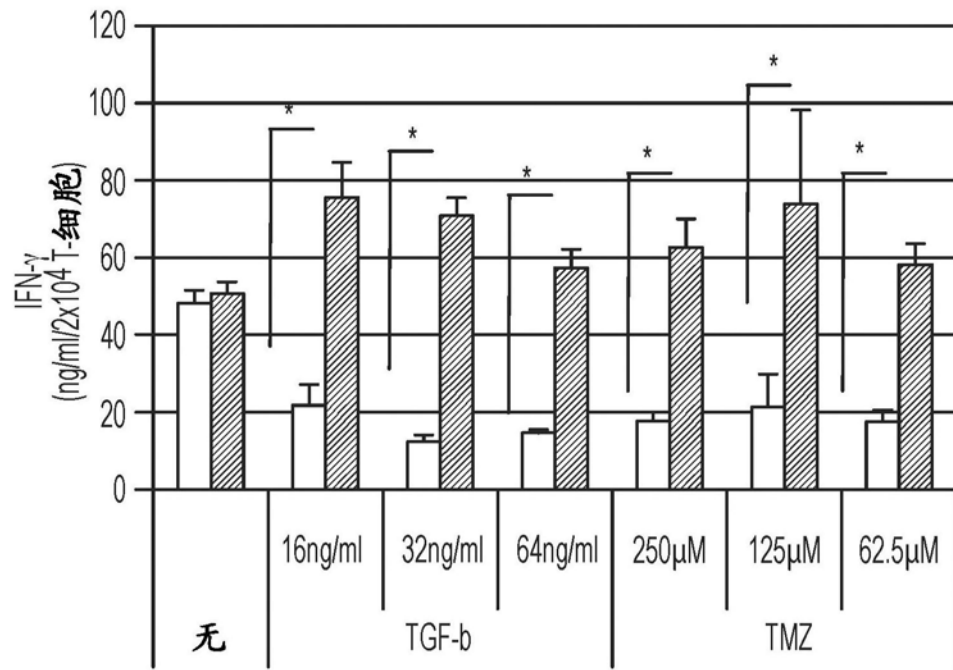


图3A

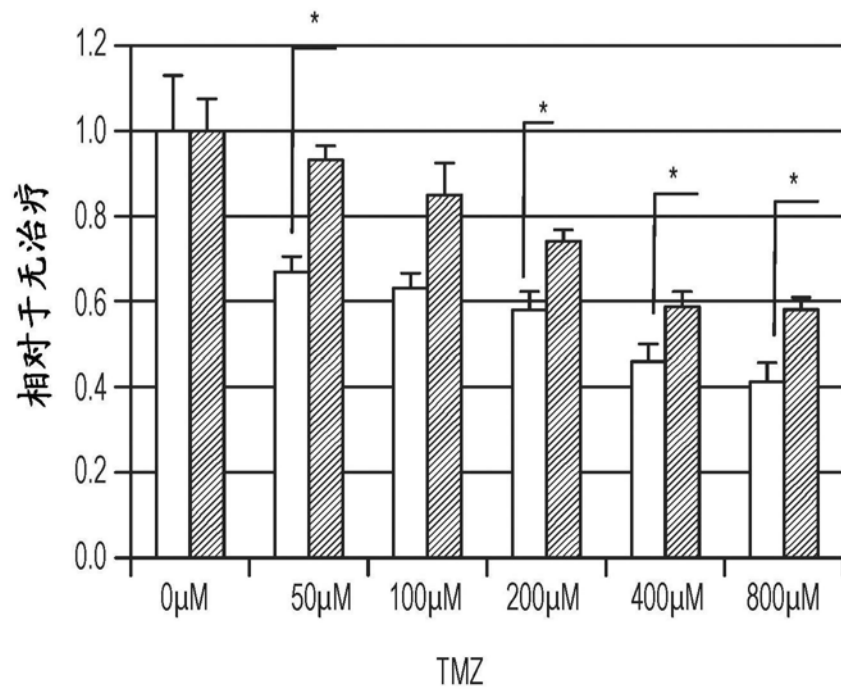


图3B

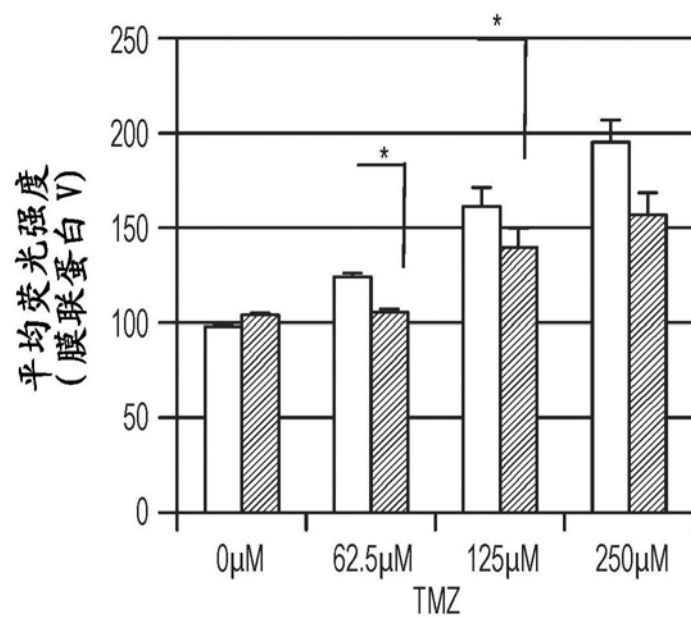


图3C

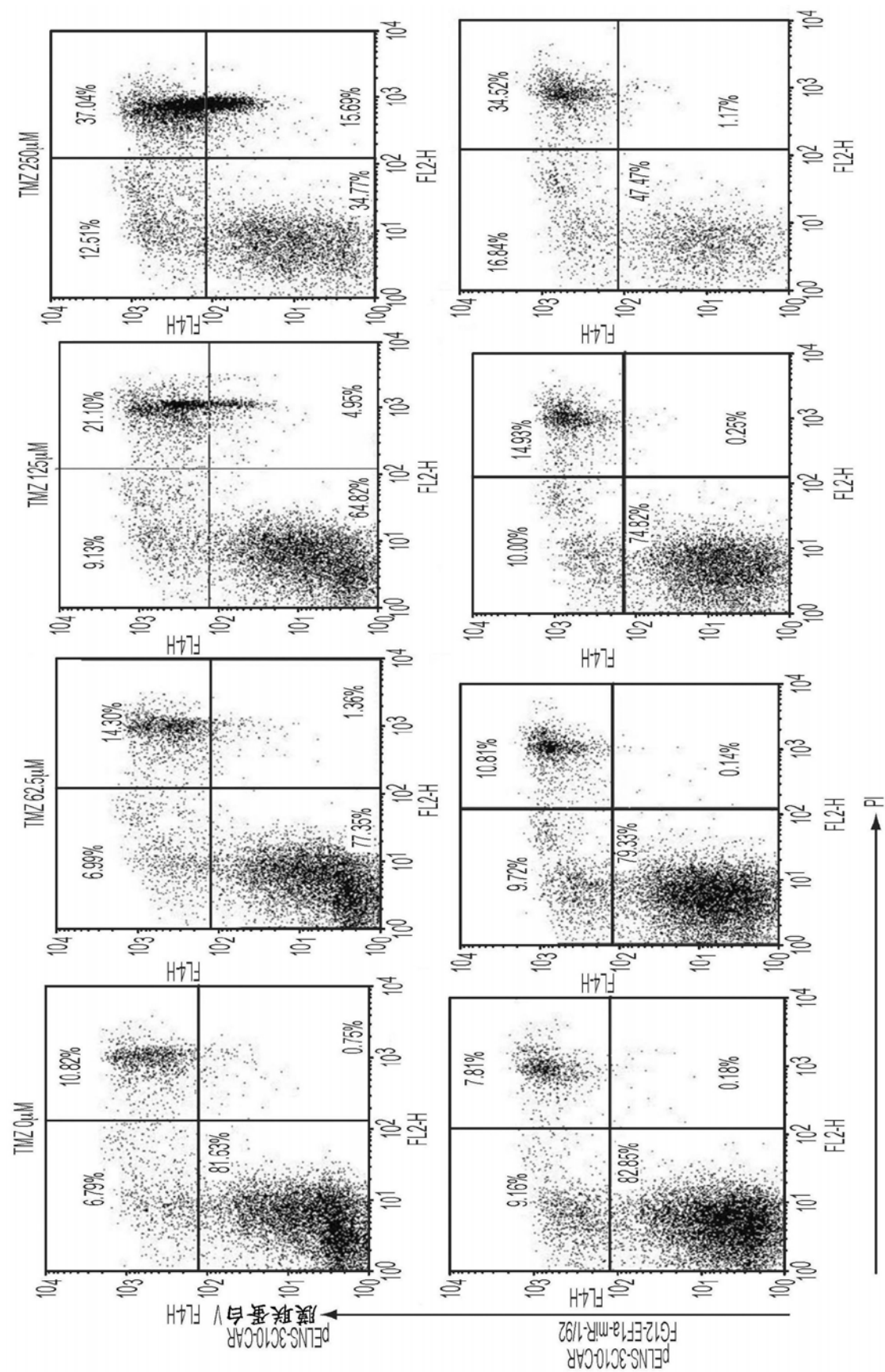


图3D

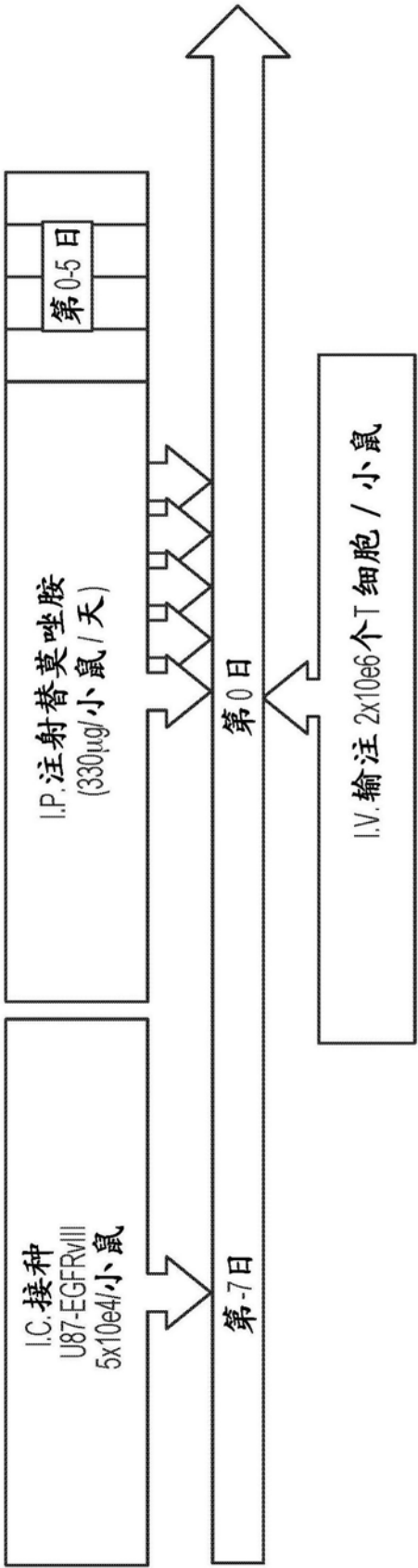


图4A

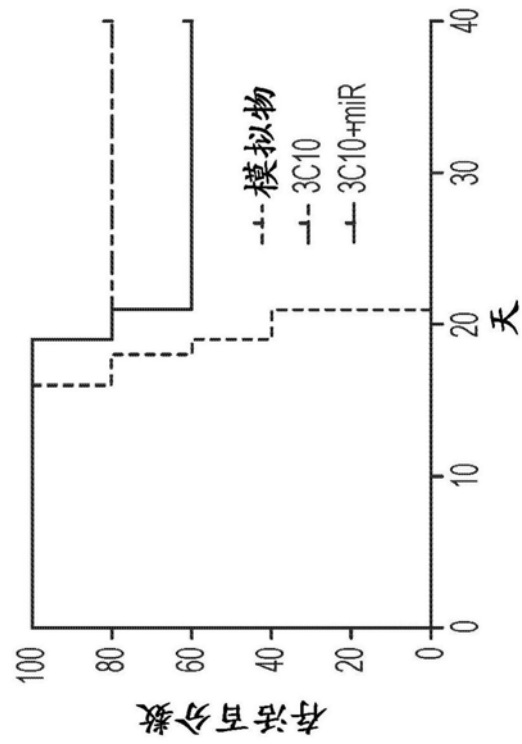


图4B

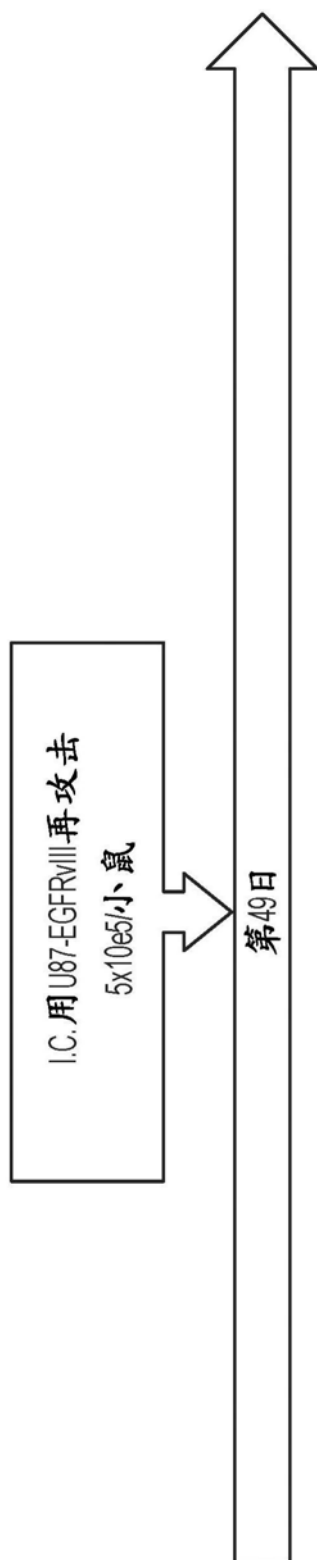


图5A

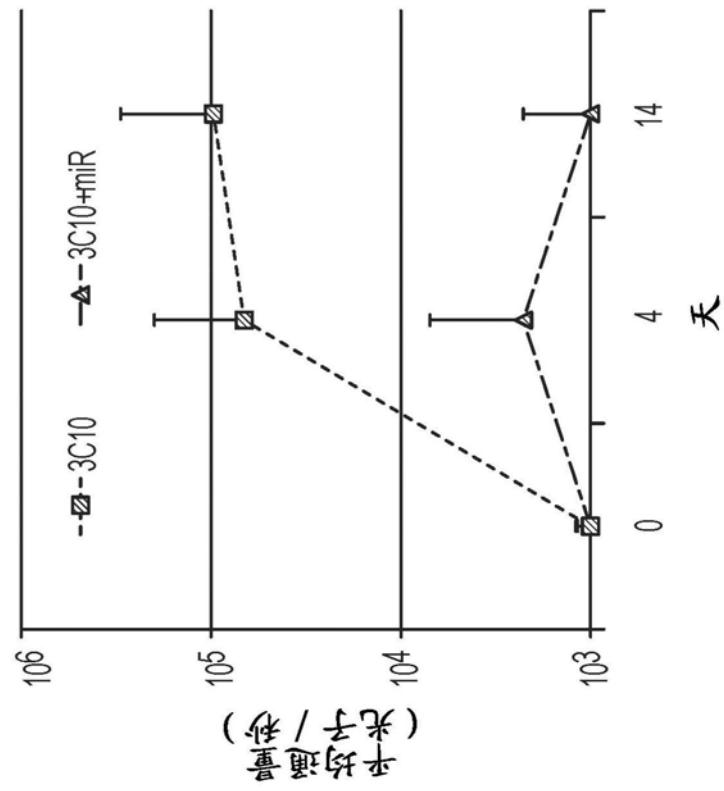


图5B

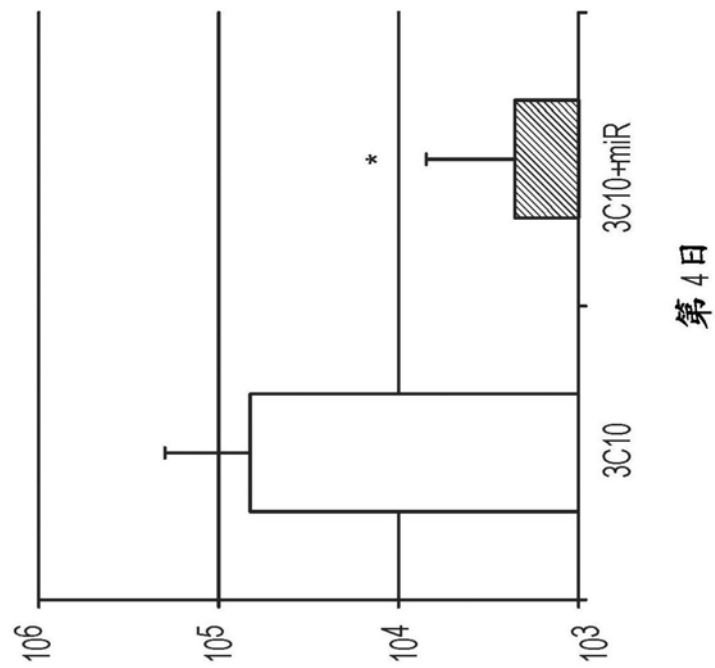


图5C

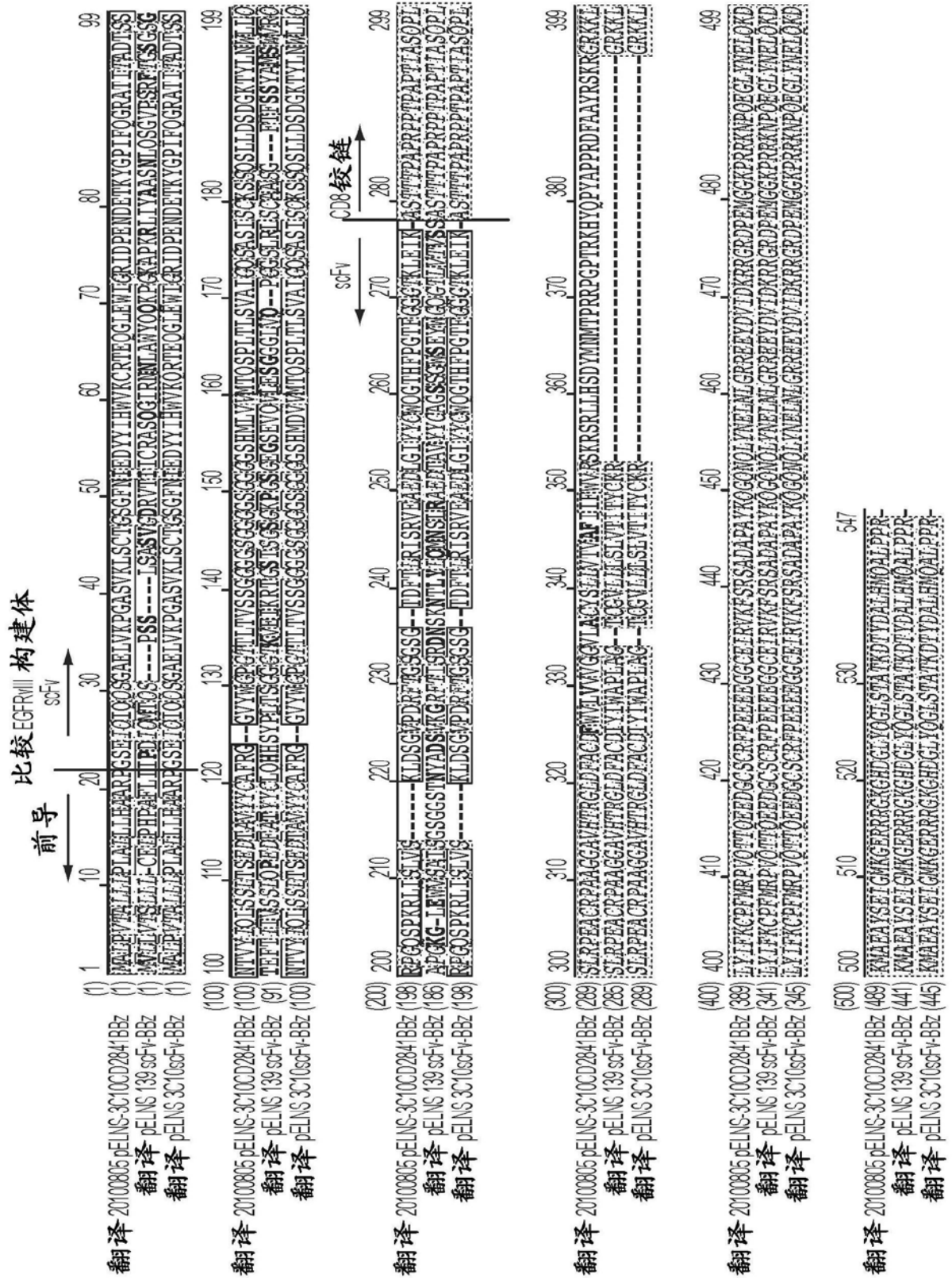


图6

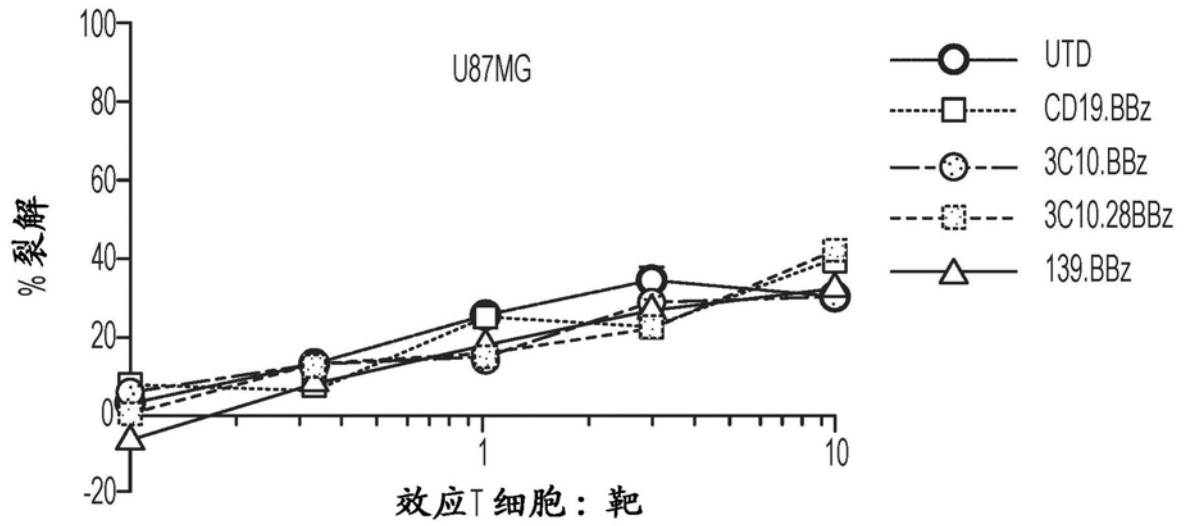


图7A

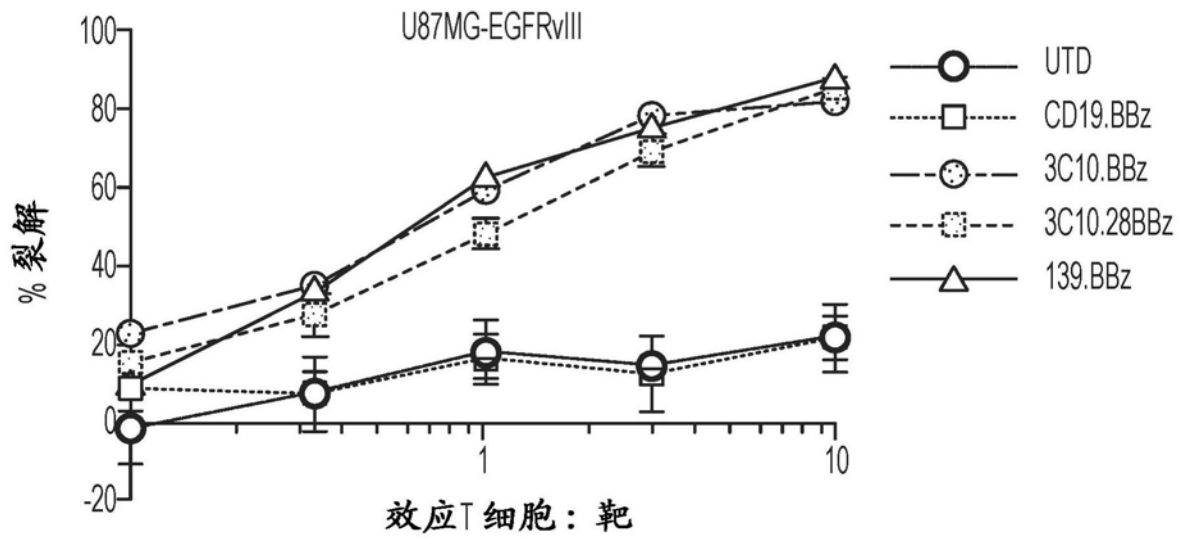


图7B

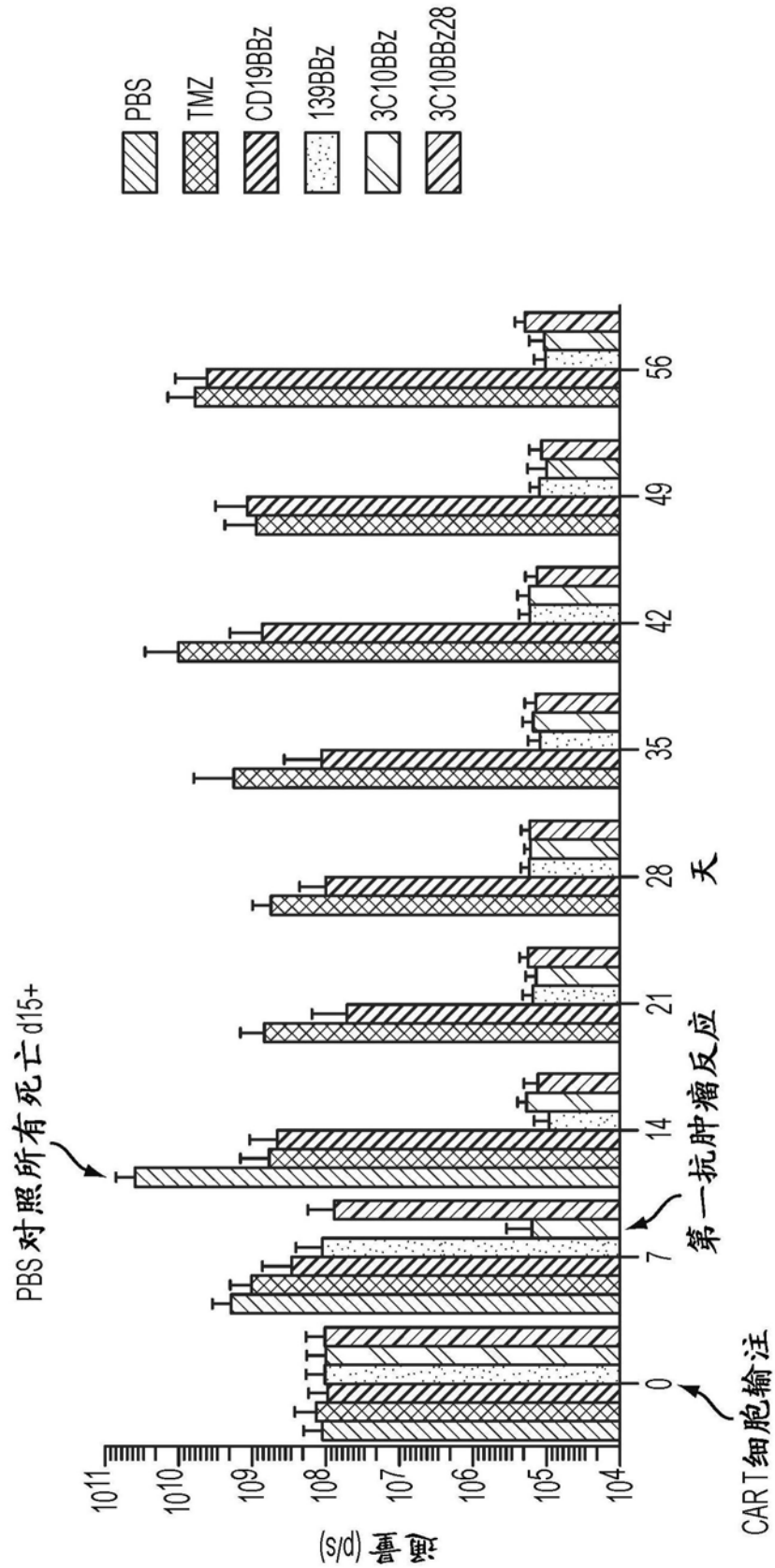


图8

|              |              |  |                     |  |
|--------------|--------------|--|---------------------|--|
| CDR定义CHOTIA  | CDR H1       |  | CDR H2              |  |
| CDR定义KABAT   | CDR H1       |  | CDR H2              |  |
| KABAT 编号     | CDR H1       |  | CDR H2              |  |
| 鼠3C10Vh      | GSGFNIEDYVIH |  | WVKQRTEQGLEWIGRIDP  |  |
| VH1_1fH21    | GSGFNIEDYVIH |  | WVQQAPEGKGLEWMGRIDP |  |
| VH5_5aH21    | GSGFNIEDYVIH |  | WVRQMPGKGLEWMGRIDP  |  |
| CDR定义CHOTIA  | CDR H3       |  | CDR H3              |  |
| CDR定义KABAT   | CDR H3       |  | CDR H3              |  |
| KABAT 编号     | CDR H3       |  | CDR H3              |  |
| 鼠3C10Vh      | RATITADTSS   |  | VYWGPGTTLTVSS       |  |
| VH1_1fH21    | RVITITADTST  |  | VYWGQGTTLTVSS       |  |
| VH5_5aH21    | HVTISADT     |  | VYWGQGTTLTVSS       |  |
| CDR定义CHOTIA  | CDR L1       |  | CDR L2              |  |
| CDR定义KABAT   | CDR L1       |  | CDR L2              |  |
| KABAT 编号     | CDR L1       |  | CDR L2              |  |
| 鼠3C10VI      | DVVMTQSP     |  | VSKLDSGVPPDRF       |  |
| VK2_A17-fH21 | DVVMTQSP     |  | VSKLDSGVPPDRF       |  |
| VK4_B3H21    | DVVMTQSP     |  | VSKLDSGVPPDRF       |  |
| CDR定义CHOTIA  | CDR L3       |  | CDR L3              |  |
| CDR定义KABAT   | CDR L3       |  | CDR L3              |  |
| KABAT 编号     | CDR L3       |  | CDR L3              |  |
| 鼠3C10VL      | TGSGSGTDF    |  | GTFGGGTTKLEIK       |  |
| VH2_A17H21   | TGSGSGTDF    |  | GTFGGGTTKVEIK       |  |
| VH4_B3H21    | TGSGSGTDF    |  | GTFGGGTTKVEIK       |  |

图9

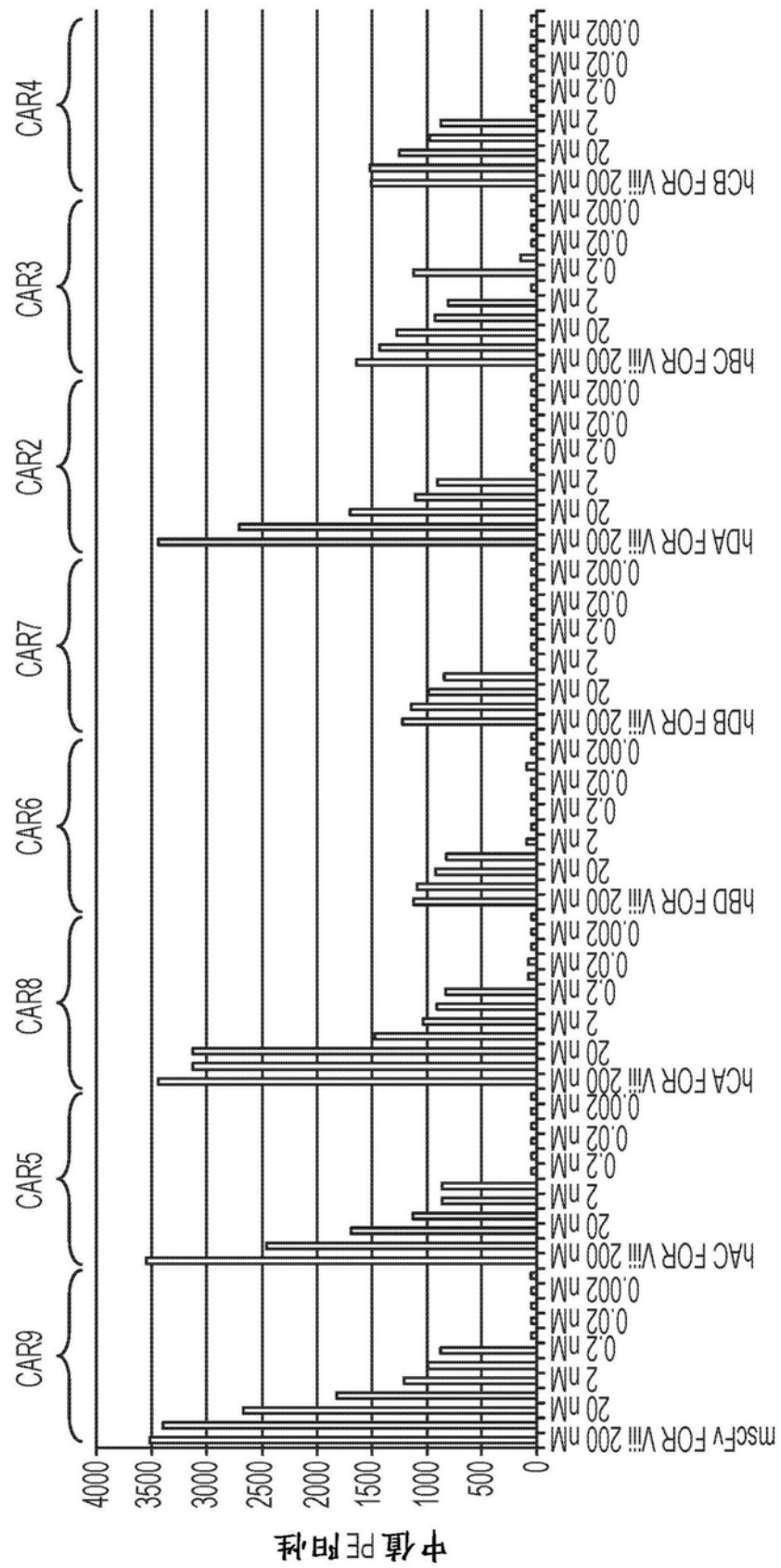


图10

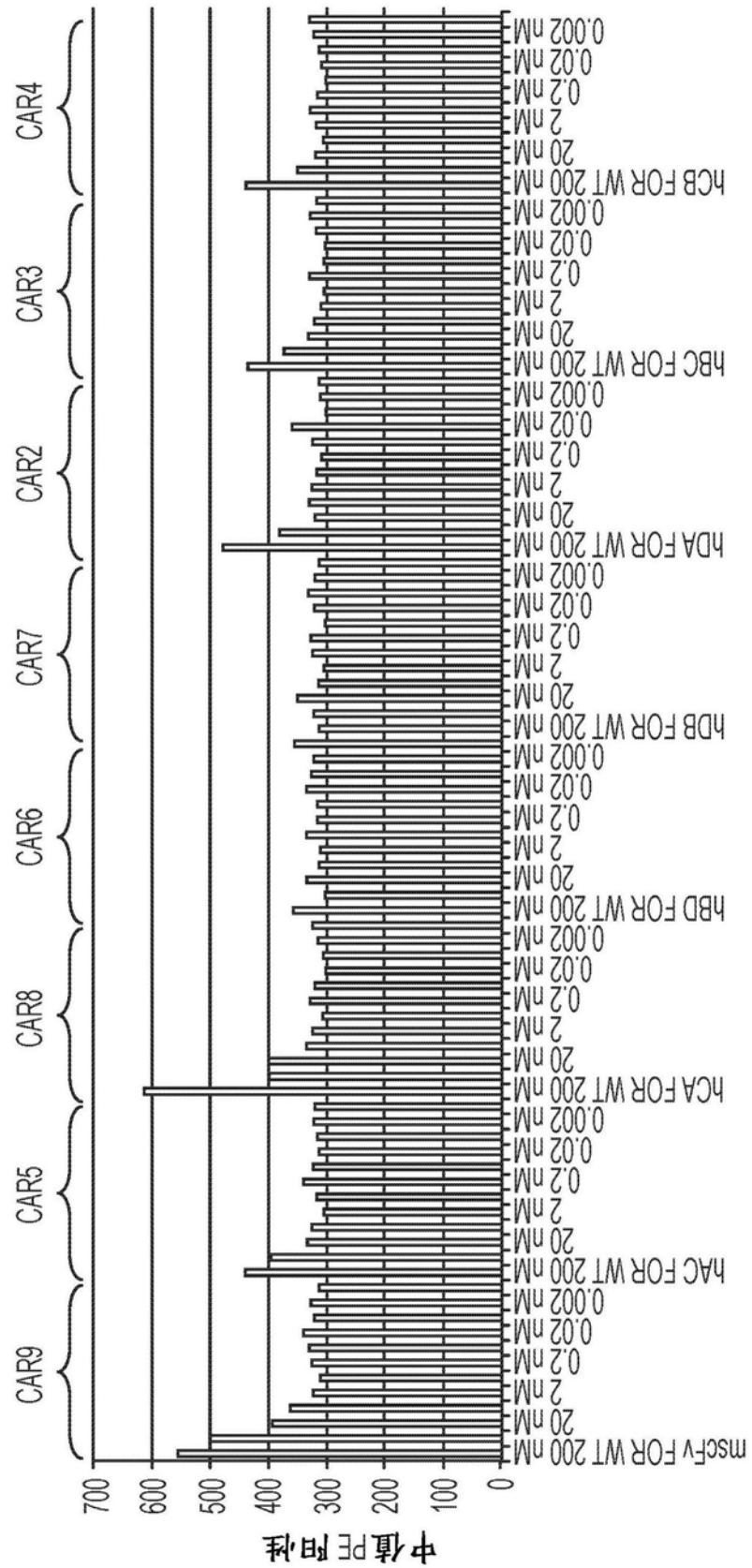


图11

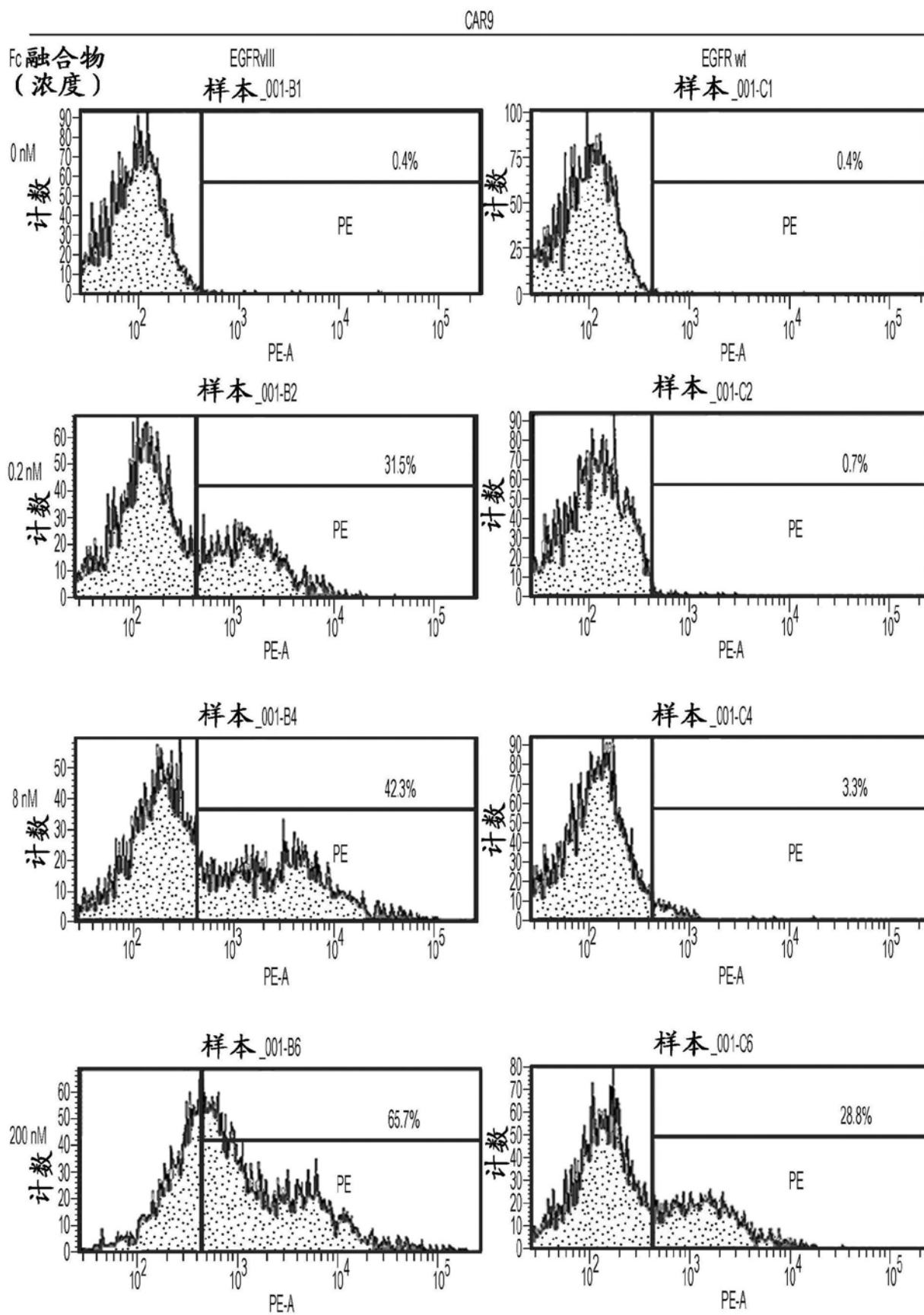


图12A

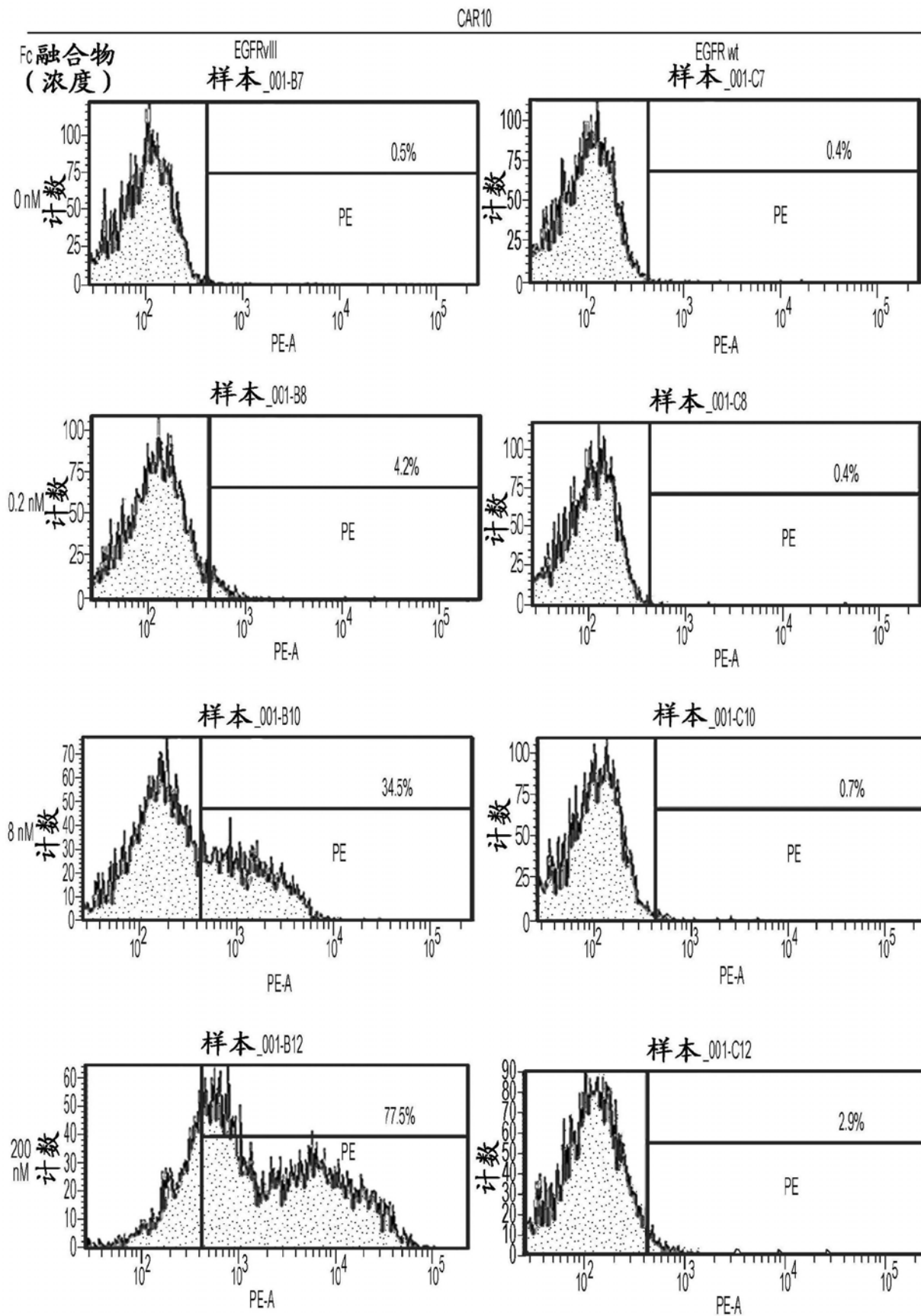


图12B

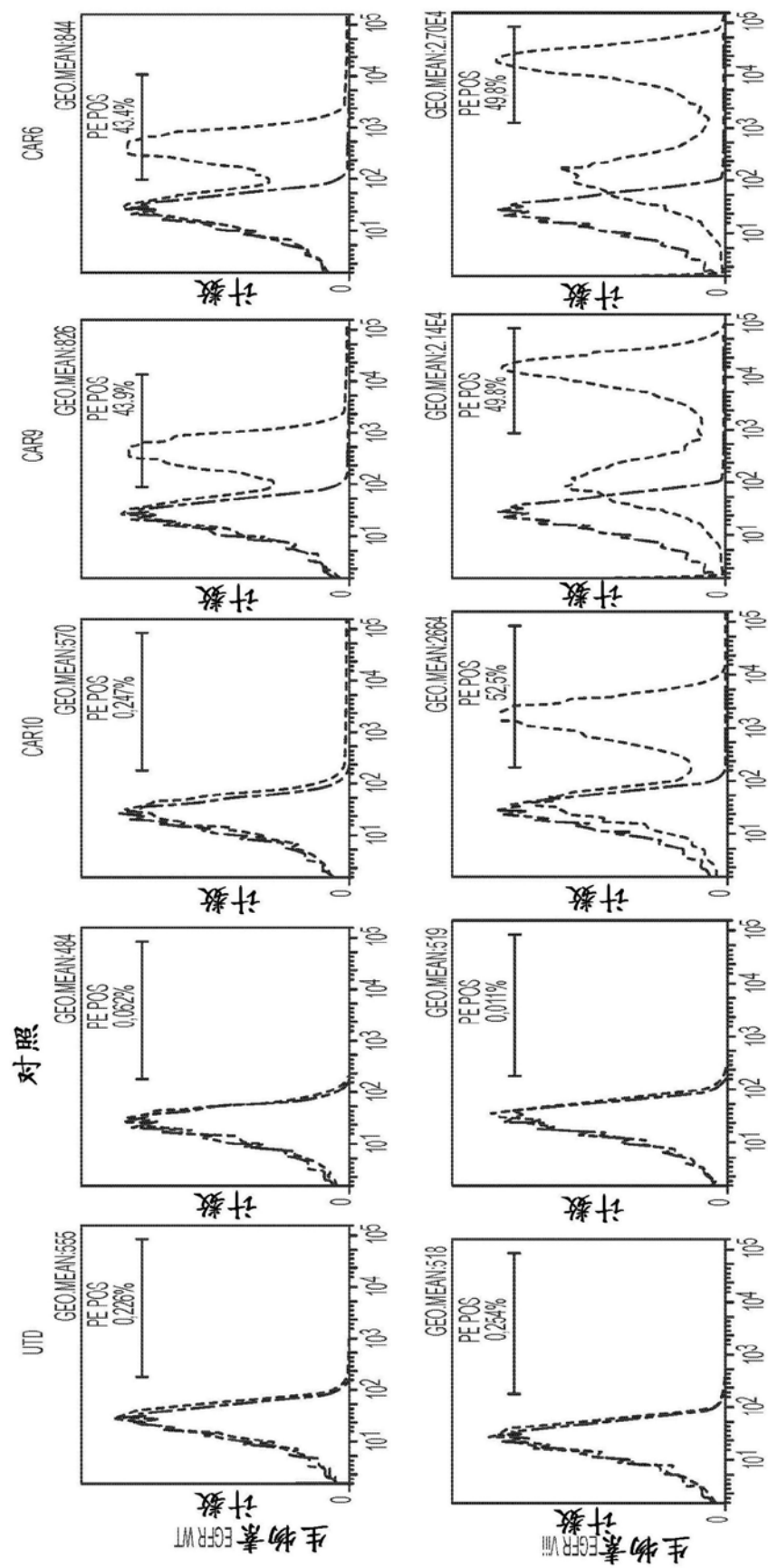


图13

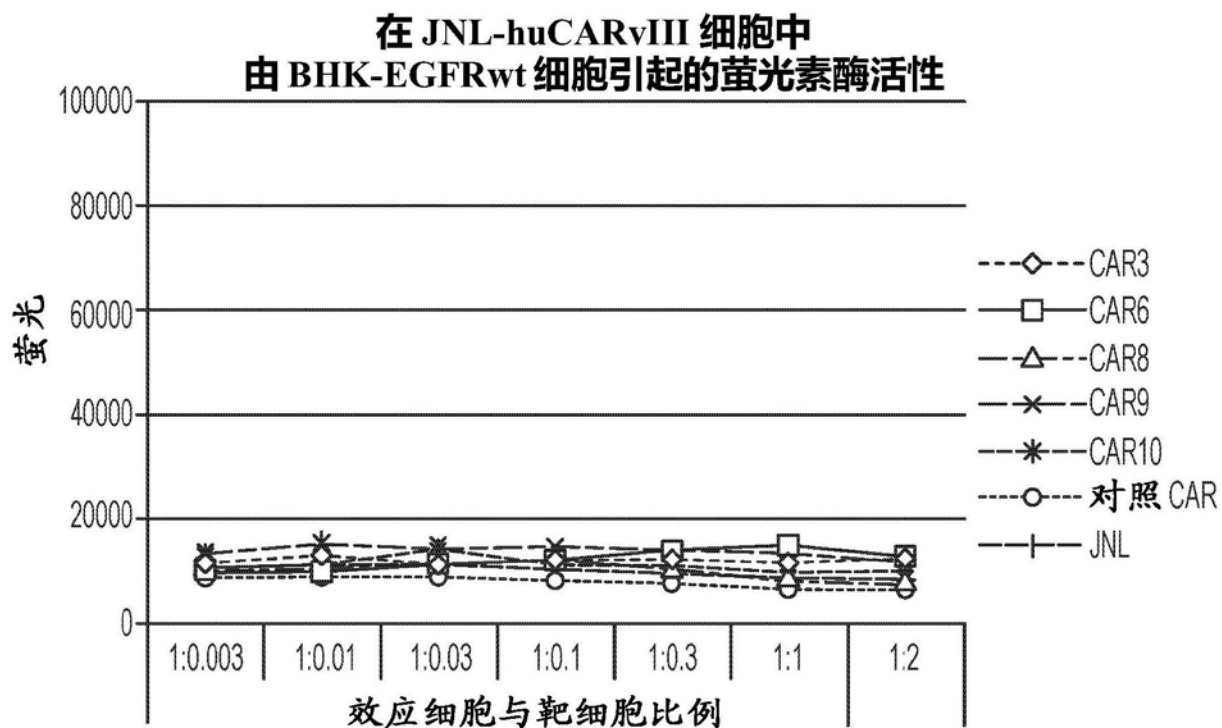
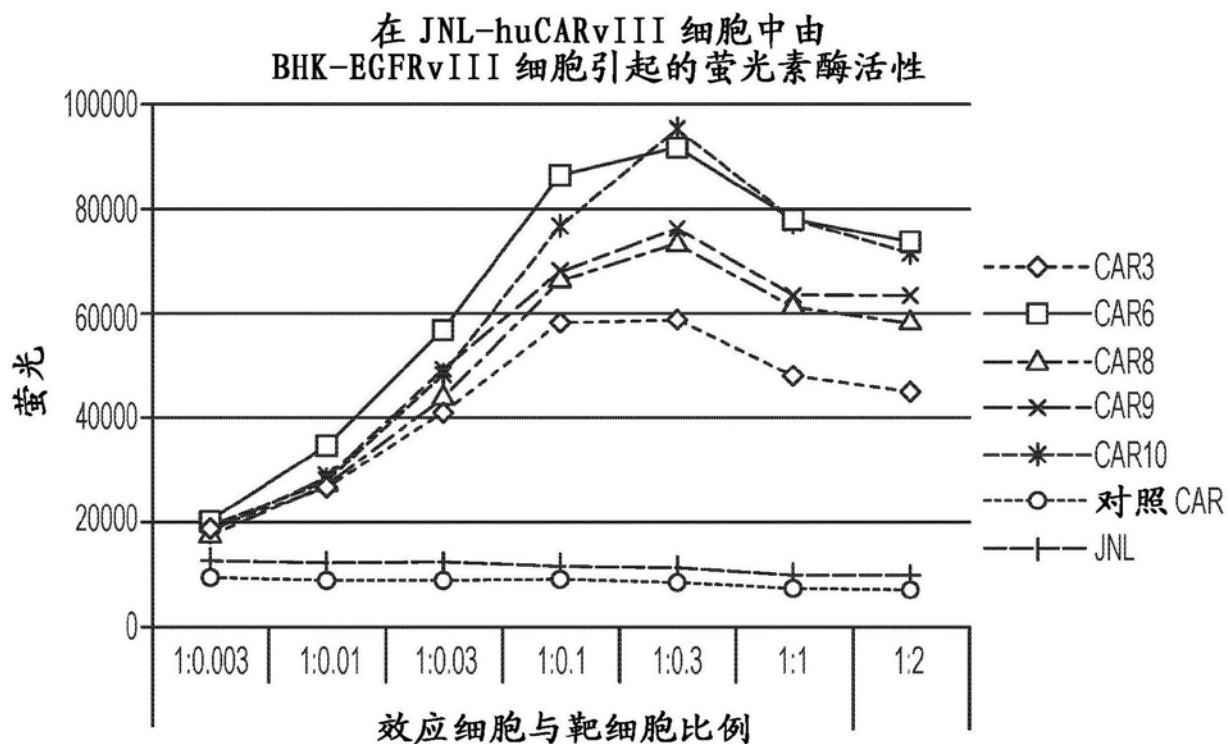


图14

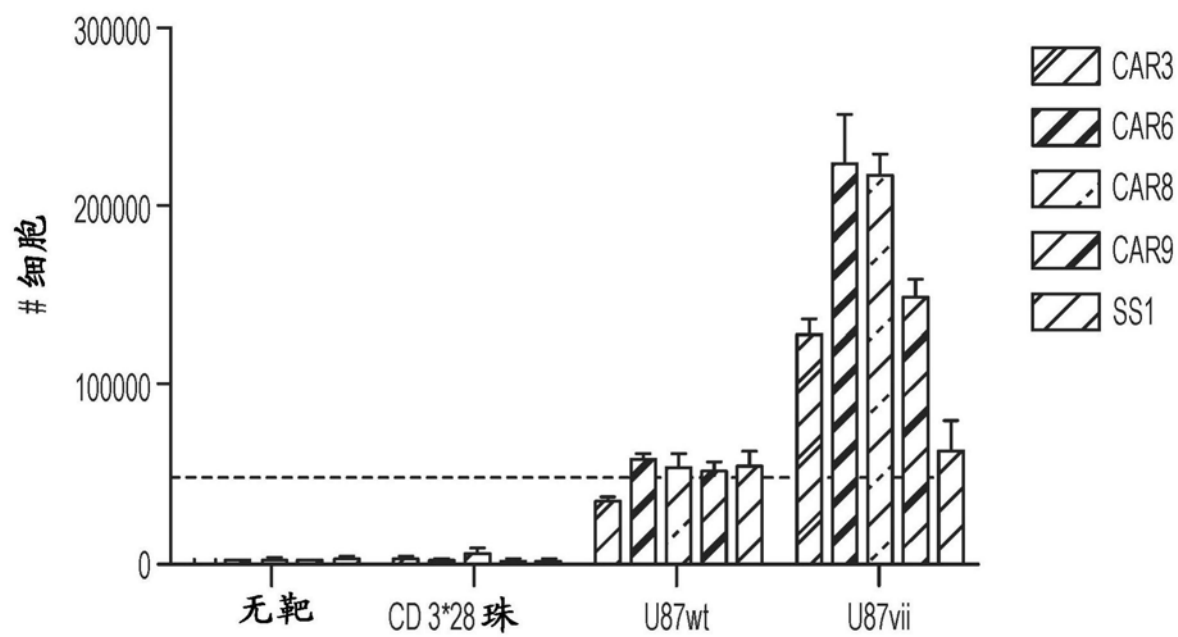


图15

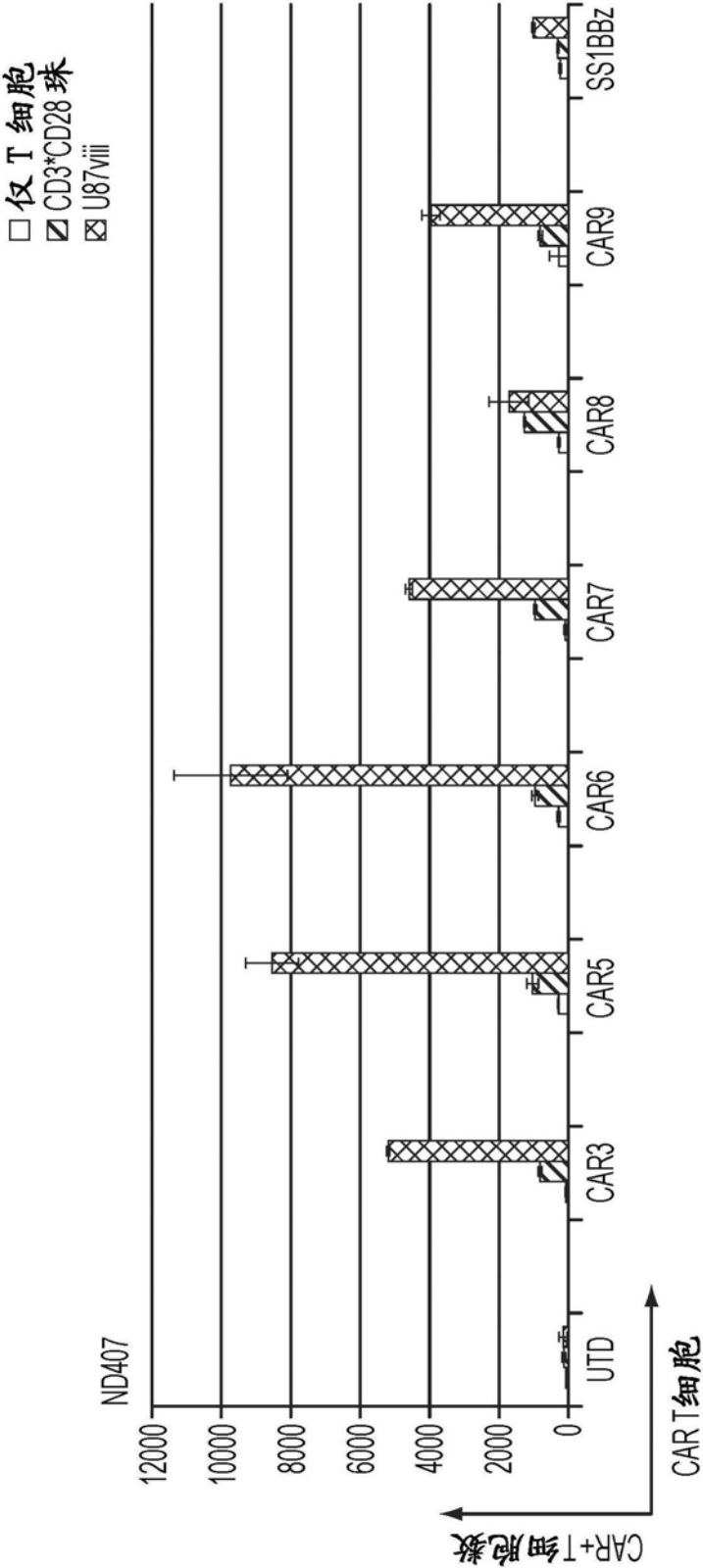


图16

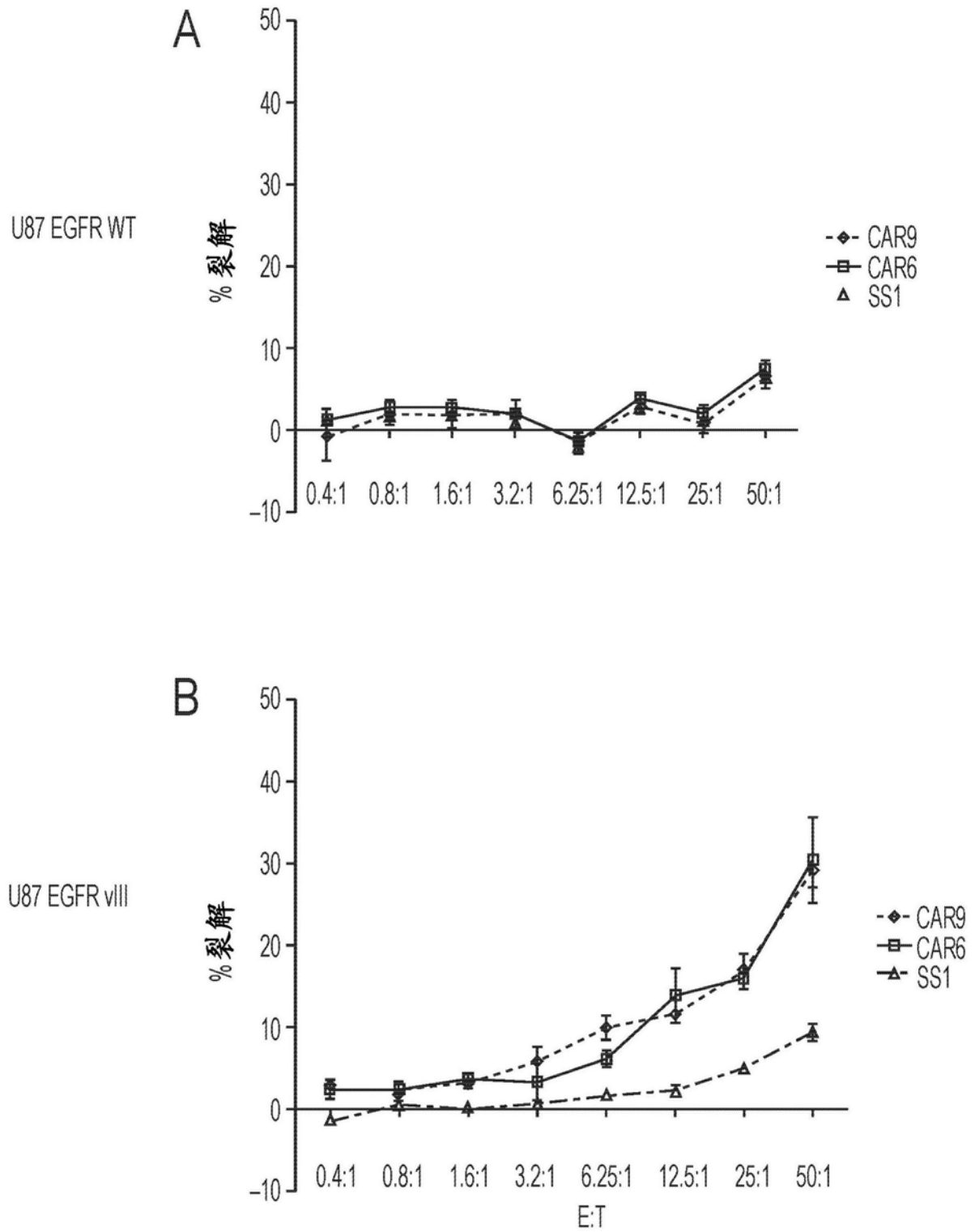


图17

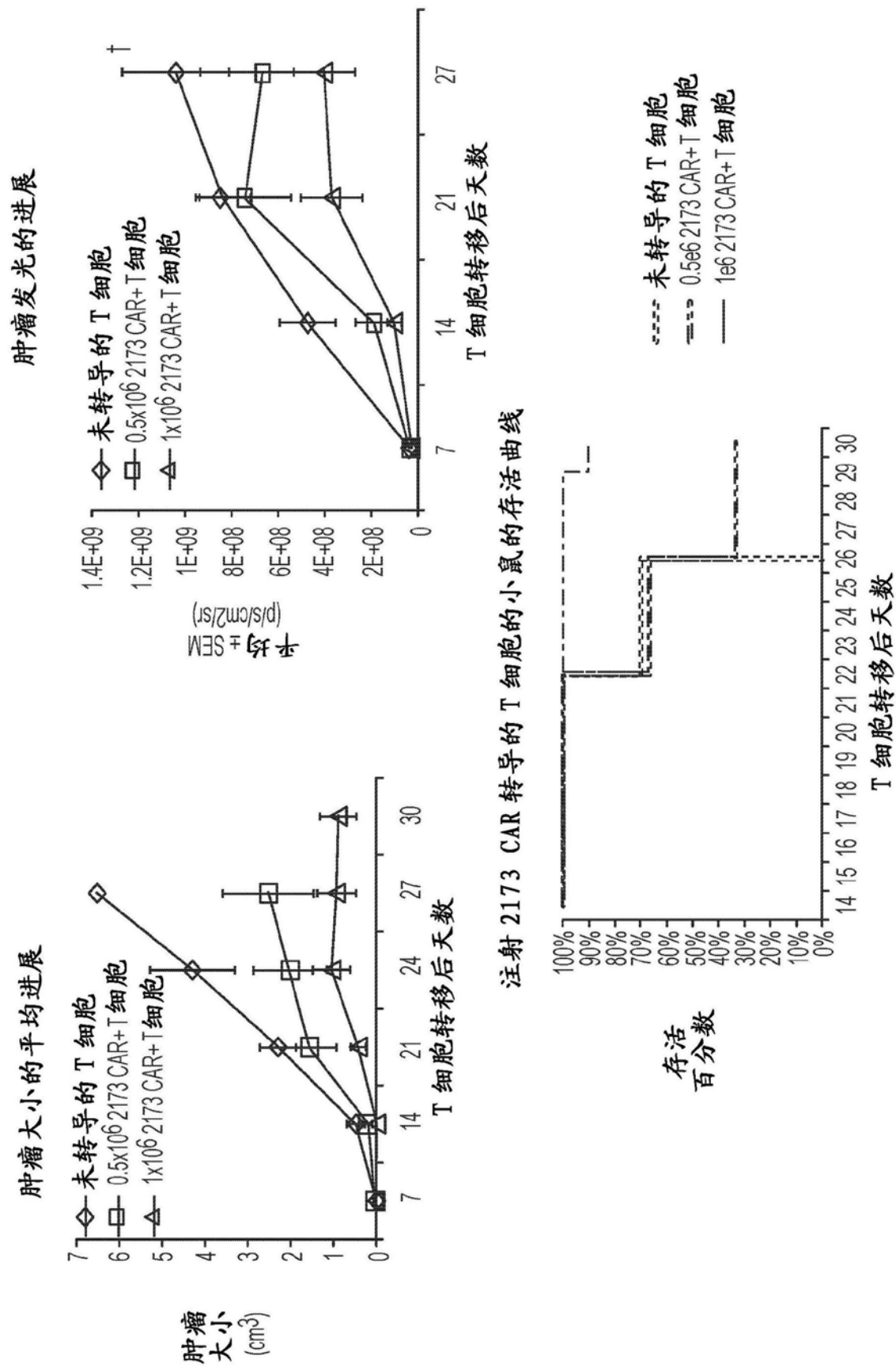


图18