



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110229834 B

(45) 授权公告日 2022. 11. 01

(21) 申请号 201910500128.7

(22) 申请日 2013.09.18

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110229834 A

(43) 申请公布日 2019.09.13

(30) 优先权数据  
61/717,960 2012.10.24 US

(62) 分案原申请数据  
201380061387.5 2013.09.18

(73) 专利权人 美国卫生和人力服务部  
地址 美国马里兰州

(72) 发明人 里马斯·J·奥兰塔斯  
艾拉·H·帕斯坦  
迪米特尔·S·蒂米特鲁夫  
克里斯特尔·L·麦考尔

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204  
专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.  
C12N 15/62 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

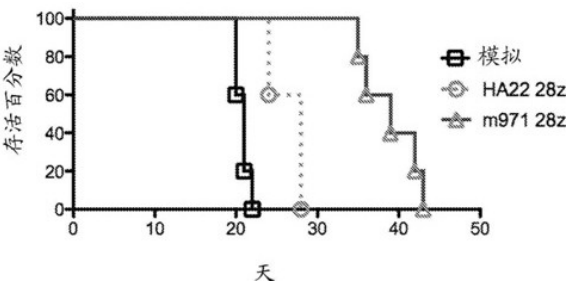
(56) 对比文件  
WO 2009124109 A1, 2009.10.08  
CN 1572800 A, 2005.02.02  
CN 1566155 A, 2005.01.19  
KR 20110068184 A, 2011.06.22  
WO 2012079000 A1, 2012.06.14

审查员 陈宏

权利要求书2页 说明书22页  
序列表19页 附图5页

(54) 发明名称  
M971嵌合抗原受体

(57) 摘要  
本发明提供包含含有SEQ ID NO:1-6的抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内T细胞信号传导结构域的嵌合抗原受体(CAR)。公开了涉及所述CAR的核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体、抗体或其抗原结合部分以及药物组合物。还公开了检测哺乳动物中存在癌症的方法以及治疗或预防哺乳动物中癌症的方法。





1. 嵌合抗原受体CAR在制备用于检测、治疗或预防血液恶性肿瘤的药物中的用途，其中所述CAR包含CD22特异性的抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内T细胞信号传导结构域，

其中所述抗原结合结构域包含重链可变区CDR1-CDR3序列以及轻链可变区CDR1-CDR3序列，并且其中所述重链可变区CDR1-CDR3序列分别如SEQ ID NOs: 1、2和3所示，以及所述轻链可变区CDR1-CDR3序列分别如SEQ ID NOs: 4、5和6所示。

2. 根据权利要求1所述的用途，其中所述血液恶性肿瘤为霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞癌、急性骨髓性白血病、B-慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴细胞白血病和伯基特淋巴瘤。

3. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述抗原结合结构域包含轻链可变区，所述轻链可变区包含含有SEQ ID NO: 7的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述抗原结合结构域包含重链可变区，所述重链可变区包含含有SEQ ID NO: 8的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO: 9的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO: 11的接头。

7. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述CAR还包含含有SEQ ID NO: 10的前导序列。

8. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述跨膜结构域包含i) CD8的一部分和/或ii) CD28的一部分。

9. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述跨膜结构域包含含有SEQ ID NO: 12或18的CD8氨基酸序列，和/或含有SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。

10. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述细胞内T细胞信号传导结构域包含i) CD28的细胞内信号传导部分，ii) CD137的细胞内信号传导部分，和iii) CD3 $\zeta$ 的细胞内信号传导部分中的一种或多种。

11. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述细胞内T细胞信号传导结构域包含含有SEQ ID NO: 16或19的氨基酸序列。

12. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述细胞内T细胞信号传导结构域包含含有SEQ ID NO: 13或20的氨基酸序列。

13. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述细胞内T细胞信号传导结构域包含含有SEQ ID NO: 14、17或21的CD3 $\zeta$ 氨基酸序列。

14. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述细胞内T细胞信号传导结构域包含CD28的细胞内部分或包含CD137的细胞内信号传导部分，并且其中所述CAR不包含CD28和CD137两者的细胞内信号传导结构域。

15. 根据权利要求14所述的用途，其中所述CAR不包含源自一种以上T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域。

16. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述CAR包含含有SEQ ID NO: 22-24中任一项的氨基酸序列。



17. 根据权利要求1或2所述的用途, 其中所述细胞内T细胞信号传导结构域包含CD137的细胞内信号传导部分和CD3 $\zeta$ 的细胞内信号传导部分。

18. 根据权利要求17所述的用途, 其中所述跨膜结构域包含CD8的一部分。

19. 根据权利要求17所述的用途, 其中所述跨膜结构域包含CD28的一部分。

20. 核酸在制备用于检测、治疗或预防血液恶性肿瘤的药物中的用途,

其中所述核酸包含编码嵌合抗原受体CAR的核苷酸序列,

其中所述CAR包含CD22特异性的抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内T细胞信号传导结构域,

其中所述抗原结合结构域包含重链可变区CDR1-CDR3序列以及轻链可变区CDR1-CDR3序列, 并且其中所述重链可变区CDR1-CDR3序列分别如SEQ ID NOs: 1、2和3所示, 以及所述轻链可变区CDR1-CDR3序列分别如SEQ ID NOs: 4、5和6所示。

21. 根据权利要求20所述的用途, 其中所述血液恶性肿瘤为霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞癌、急性骨髓性白血病、B-慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴细胞白血病和伯基特淋巴瘤。

22. 根据权利要求20或21所述的用途, 其中所述核酸包含含有SEQ ID NO: 25的核苷酸序列。

23. 根据权利要求22所述的用途, 其中所述核酸还包含选自SEQ ID NO: 26-28的核苷酸序列。



## M971嵌合抗原受体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2012年10月24日提交的美国临时申请第61/717,960 号的权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 以电子方式提交的材料通过引用并入

[0004] 通过引用整体并入本文的是随本文同时提交的并且如下确定的计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表:名称为“714144\_ST25.txt”,日期为2013 年8月30日的一份31,786字节ASCII(文本)文件。

[0005] 发明背景

[0006] 癌症为公共健康问题。虽然在治疗诸如化疗中有所进展,但对于许多癌症,包括血液恶性肿瘤的预后可能很差。例如,据估计,2000年在 美国预期超过45,000例死亡是由于非霍奇金氏淋巴瘤和白血病(Greenlee 等,CA Cancer J.Clin.,50:7-33(2000))。因此,存在对癌症,特别是血液 恶性肿瘤的其他治疗的未得到满足的需求。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明的实施方案提供包含含有SEQ ID NO:1-6的抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内T细胞信号传导结构域的嵌合抗原受体(CAR)。

[0009] 本发明的其它实施方案提供涉及本发明的CAR的相关的核酸、重组 表达载体、宿主细胞、细胞群体、抗体或其抗原结合部分以及药物组合 物。

[0010] 本发明的另外的实施方案提供检测哺乳动物中存在癌症的方法以及 治疗或预防哺乳动物中癌症的方法。

[0011] 附图中几个视图的简要说明

[0012] 图1A至图1G为示出在不同的效应物与靶标(E:T)比率下,靶标<sup>51</sup>Cr 标记的白血病细胞系REH(A)、SEM(B)、NALM6-GL(C)、KOPN8(D)、Daudi(E)、Raji(F)和K562(G)被未转导的(模拟,●;圆形)或用以下 CAR(HA22-SH-第二代第1版(▼),m971-第二代第1版(▲;空心三角形)或CD19-特异性CAR(■;正方形))转导的人T细胞效应物裂解%的图。

[0013] 图2A至图2C为示出在不同的E:T比率下,靶标白血病细胞系Raji(A)、NALM6-GL(B)或K562(C)被未转导的T细胞(模拟,●;圆形), m971-第二代第1版CAR(▲)或m971-第三代CAR(▼)效应物裂解百分比的图。

[0014] 图3A至图3C为示出在与白血病细胞系NALM6-GL(CD22<sup>低</sup>)(A)、Raji(CD22<sup>高</sup>)(B)或K562(CD22-阴性)(C)共培养后,由未转导的(模拟)或用以下CAR中的一种(抗-CD19,m971-第二代第1版(SEQ ID NO:23), m971-第三代(SEQ ID NO:24),HASH22-第二代第1版, HASH22-第二代 第2版或HASH22-第三代)转导qA分泌的干扰素(IFN)- $\gamma$  (pg/ml)的量的图。

[0015] 图3D至图3F为示出在与白血病细胞系NALM6-GL(CD22<sup>低</sup>)(A)、Raji(CD22<sup>高</sup>)(B)或K562(CD22-阴性)(C)共培养后,由未转导的(模拟)或用以下CAR中的一种(抗-CD19,m971-第二代第1版(SEQ ID NO:23), m971-第三代(SEQ ID NO:24),HASH22-第二代第1版, HASH22-第二代 第2版或HASH22-第三代)转导的T细胞分泌的白细胞介素(IL)-2 (pg/ml)



的量的图。

[0016] 图3G至图3I为示出在与白血病细胞系NALM6-GL (CD22<sup>低</sup>) (A)、Raji (CD22<sup>高</sup>) (B) 或 K562 (CD22-阴性) (C) 共培养后,由未转导的(模拟) 或用以下CAR中的一种(抗-CD19,m971-第二代第1版(SEQ ID NO:23), m971-第三代(SEQ ID NO:24),HASH22-第二代第1版, HASH22-第二代第2版或HASH22-第三代) 转导的T细胞分泌的肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  (pg/ml) 的量的图。

[0017] 图4A为示出在30天的时段内测量由荧光素酶(转染到白血病细胞内,所述白血病细胞被注射到小鼠)与注射至小鼠的荧光素反应生成的生物发光信号(光子/s/cm<sup>2</sup>/sr)的图。用对照T细胞(“模拟”,未转导的,●;圆形)或用HASH22 CAR-第二代第1版(■;正方形)或m971-第二代第1版(三角形,SEQ ID NO:23)转导的T细胞处理小鼠。光子/s/cm<sup>2</sup>/sr值越高指示肿瘤负荷越大。

[0018] 图4B为示出用对照T细胞(“模拟”,未转导的,正方形)或用HASH22 CAR-第二代第1版(圆形)或971 CAR-第二代第1版(三角形,SEQ ID NO:23)转导的T细胞处理的小鼠在30天的存活百分比的图。(模拟v.HA22,  $p=0.0019$ ;模拟v.m971,  $p=0.0019$ ;m971v.HA22,  $p=0.003$ )。

[0019] 图5为示出在用未转导的T细胞(模拟)或用编码m971-第二代第2版 CAR (SEQ ID NO:22)的核苷酸序列转导的 $15 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^6$ 或 $1 \times 10^5$ T细胞治疗患有白血病的小鼠之后三天、五天和八天的生物发光图像的表。从灰至白的阴影变化指示肿瘤负荷增加。

[0020] 图6为示出在44天的时段内,图5中显示的小鼠的生物发光发射的光子总数目的图。对光子总数目进行定量并且作图,并示出每个时间点的平均值和标准差。用未转导的T细胞(模拟)(加号符号)或用编码m971-第二代第2版CAR (SEQ ID NO:22)的核苷酸序列转导的 $15 \times 10^6$ (菱形)、 $5 \times 10^6$ (花)、 $1 \times 10^6$ (十字)或 $1 \times 10^5$ (星号)T细胞治疗小鼠。

[0021] 发明详述

[0022] 本发明的实施方案提供包含含有SEQ ID NO:1-6的抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内T细胞信号传导结构域的嵌合抗原受体(CAR)。

[0023] CAR为人工构建的杂合蛋白质或多肽,所述杂合蛋白质或多肽含有连接至T细胞信号传导结构域的抗体的抗原结合结构域(如,单链可变片段(scFv))。CAR的特性包括它们能够以非-MHC-限制的方式重定向T细胞对选定的靶标的特异性和反应性,从而利用单克隆抗体的抗原结合性质。非-MHC限制的抗原识别使表达CAR的T细胞能够识别不依赖抗原加工的抗原,从而绕过肿瘤逃逸的主要机制。此外,当在T细胞中表达时,有利的是,CAR不会与内源性T细胞受体(TCR) $\alpha$ 链和 $\beta$ 链二聚化。

[0024] 本文使用的短语“具有抗原特异性”和“引发抗原特异性应答”意指CAR可特异性结合于抗原并免疫识别抗原,使得CAR至抗原的结合引发免疫应答。

[0025] 本发明的CAR对CD22具有抗原特异性。CD22为属于免疫球蛋白(Ig)超家族的谱系限制的B细胞抗原。CD22在60-70%的B细胞淋巴瘤和白血病(如,B-慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)和伯基特(Burkitt's)淋巴瘤)中表达并且不存在于B细胞形成早期阶段的细胞表面上或干细胞上。Vaickus等,Crit.Rev.Oncol./Hematol., 11:267-297 (1991);Bang等,Clin.Cancer Res.,11:1545-50 (2005)。

[0026] 不受特定理论或机制的束缚,据信通过引发对CD22的抗原特异性应答,本发明的



CAR提供下述中的任何一种或多种:靶向并破坏表达 CD22的癌细胞、减少或消除癌细胞、促进免疫细胞浸润至肿瘤位点以及 增强/延伸抗癌应答。因为CD22不在B细胞形成早期阶段或干细胞上表达,所以预期本发明的CAR大体上有利地避免靶向/破坏干细胞和/或早期形成阶段的B细胞。

[0027] 本发明的实施方案提供包含m971抗体(“m971”)的抗原结合结构域的 CAR。m971的抗原结合结构域特异性地结合于CD22。在这方面,本发明的优选实施方案提供包含抗原结合结构域的CAR,所述抗原结合结构域包含m971的抗原结合结构域的单链可变片段(scFv),由m971的抗原结合结构域的单链可变片段(scFv)组成,或基本上由m971的抗原结合结构域的单链可变片段(scFv)组成。与HA22免疫毒素相比,m971抗体提供至CD22的改善结合并且还结合于不同的CD22表位。Xiao等,mAbs 1:3,297-303 (2009)。

[0028] 抗原结合结构域可包含轻链可变区和/或重链可变区。在本发明的实施方案中,重链可变区包含CDR1区、CDR2区和CDR3区。在这方面,抗原结合结构域可包含以下中的一种或多种:含有SEQ ID NO:1的重链CDR1区;含有SEQ ID NO:2的重链CDR2区;和含有SEQ ID NO:3的重链CDR3区。优选地,重链包含全部SEQ ID NO:1-3。

[0029] 在本发明的实施方案中,轻链可变区可包含轻链CDR1区、轻链 CDR2区和轻链CDR3区。在这方面,抗原结合结构域可包含以下中的一种或多种:含有SEQ ID NO:4的轻链CDR1区;包含SEQ ID NO:5的轻链CDR2区;和包含SEQ ID NO:6的轻链CDR3区。优选地,轻链包含全部SEQ ID NO:4-6。在特别优选的实施方案中,抗原结合结构域包含全部SEQ ID NO:1-6。

[0030] 抗原结合结构域的轻链可变区可包含SEQ ID NO:7,由SEQ ID NO:7组成,或基本上由SEQ ID NO:7组成。抗原结合结构域的重链可变区可包含SEQ ID NO:8,由SEQ ID NO:8组成或基本上由SEQ ID NO:8组成。因此,在本发明的实施方案中,抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO:7的轻链可变区和/或含有SEQ ID NO:8的重链可变区。优选地,抗原结合结构域包含SEQ ID NO:7和8两者。

[0031] 在本发明的实施方案中,轻链可变区和重链可变区可以通过接头连接。接头可包含任何合适的氨基酸序列。在本发明的实施方案中,接头可以包含SEQ ID NO:11,由SEQ ID NO:11组成或基本上由SEQ ID NO:11组成。

[0032] 在实施方案中,抗原结合结构域包含轻链可变区和重链可变区。在这方面,包含轻链可变区和重链可变区两者的抗原结合结构域的实施方案包含SEQ ID NO:9,由SEQ ID NO:9组成或基本上由SEQ ID NO:9组成。

[0033] 在实施方案中,抗原结合结构域包含前导序列。前导序列可以位于轻链可变区的氨基端。前导序列可以包含任何合适的前导序列。在实施方案中,前导序列为人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)受体序列。在这方面,抗原结合结构域包含的前导序列含有SEQ ID NO:10,由SEQ ID NO:10组成,或基本上由SEQ ID NO:10组成。在本发明的实施方案中,虽然前导序列可以促进CAR在细胞表面上的表达,但是在表达的CAR中存在前导序列不是CAR发挥功能所必需的。在本发明的实施方案中,CAR在细胞表面上表达后,前导序列可以从CAR上切除。因此,在本发明的实施方案中,CAR没有前导序列。

[0034] 在本发明的实施方案中,CAR包含跨膜结构域。在本发明的实施方案中,跨膜结构域包含i) CD8和/或ii) CD28。在优选的实施方案中,CD8和CD28为人。CD8或CD28可分别包含



不到整个的CD8或CD28。在这方面,CAR包含的CD8跨膜结构域含有SEQ ID NO:12或18,由SEQ ID NO:12或18组成,或基本上由SEQ ID NO:12或18组成,和/或包含的CD28跨膜结构域含有SEQ ID NO:15,由SEQ ID NO:15组成或基本上由SEQ ID NO:15组成。

[0035] 在本发明的实施方案中,CAR包含含有以下任何一种或多种的细胞内T细胞信号传导结构域:i) CD28,ii) CD137,和/或iii) CD3 $\zeta$  ( $\zeta$ )。在优选的实施方案中,CD28、CD137和CD3 $\zeta$ 为人。CD28为T细胞共刺激中重要的T细胞标志物。CD137,也被称为4-1BB,向T细胞传递有效的共刺激信号,从而促进T淋巴细胞的分化并增强其长期存活。CD3 $\zeta$ 与TCR联合以产生信号并含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。CD28、CD137或CD3 $\zeta$ 可分别包含不到整个的CD28、CD137或CD3 $\zeta$ 。在这方面,细胞内T细胞信号传导结构域包含的CD28氨基酸序列含有SEQ ID NO:16或19,由SEQ ID NO:16或19组成或基本上由SEQ ID NO:16或19组成,包含的CD137氨基酸序列含有SEQ ID NO:13或20,由SEQ ID NO:13或20组成或基本上由SEQ ID NO:13或20组成,和/或包含的CD3 $\zeta$ 氨基酸序列含有SEQ ID NO:14、17或21,由SEQ ID NO:14、17或21组成或基本上由SEQ ID NO:14、17或21组成。

[0036] 在本发明的实施方案中,CAR包含含有CD28的跨膜结构域和含有CD28和CD3 $\zeta$ 的细胞内T细胞信号传导结构域。在这方面,CAR可包含各个SEQ ID NO:15-17。优选地,CAR包含a) 各个SEQ ID NO:1-6和15-17;b) 7-8和15-17;c) 9和15-17;或d) 9-10和15-17。

[0037] 在本发明的实施方案中,CAR包含含有CD8的跨膜结构域和含有CD28、CD137和CD3 $\zeta$ 的细胞内T细胞信号传导结构域。在这方面,CAR可以包含各个SEQ ID NO:18-21。优选地,CAR包含a) 各个SEQ ID NO:1-6和18-21;b) 7-8和18-21;c) 9和18-21;或d) 9-10和18-21。

[0038] 在本发明的实施方案中,CAR包含含有CD8的跨膜结构域和含有CD137和CD3 $\zeta$ 的细胞内T细胞信号传导结构域。在这方面,CAR可包含各个SEQ ID NO:12-14。优选地,CAR包含a) 各个SEQ ID NO:1-6和12-14;b) 7-8和12-14;c) 9和12-14;或d) 9-10和12-14。

[0039] 本发明另外的实施方案提供包含表1中示出的任何氨基酸序列,由表1中示出的任何氨基酸序列组成,或基本上由表1中示出的任何氨基酸序列组成的CAR。

[0040] 表1

[0041]	SEQ ID NO:	抗原结合结构域	跨膜和信号传导结构域
	SEQ ID NO:22 (第二代, 第2版)	m971	-CD8 跨膜结构域 -CD137 和 CD3 $\zeta$ 细胞内 T 细胞信号传导结构域
	SEQ ID NO:23 (第二代, 第1版)	m971	-CD28 跨膜结构域 -CD28 和 CD3 $\zeta$ 细胞内 T 细胞信号传导结构域
	SEQ ID NO:24 (第三代)	m971	-CD8 跨膜结构域 -CD28、CD137 和 CD3 $\zeta$ 细胞内 T 细胞信号传导结构域

[0042] 包括在本发明范围内的是本文描述的本发明CAR的功能部分。当用于指CAR时,术



语“功能部分”是指本发明的CAR的任何部分或片段，该部分或片段保留了部分CAR(亲本CAR)的生物活性。功能部分涵盖，例如，保留了能够以与亲本CAR类似的程度、以与亲本CAR相同的程度或以比亲本CAR更高的程度识别靶细胞或者检测、治疗或预防疾病的CAR的那些部分。关于亲本CAR，功能部分可包含，例如，亲本CAR的约10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或更多。

[0043] 功能部分可在部分的氨基端或羧基端，或在两端处包含另外的氨基酸，所述另外的氨基酸不存在于亲本CAR的氨基酸序列。期望另外的氨基酸不会干扰功能部分的生物功能，如识别靶细胞、检测癌症、治疗或预防癌症等。更期望的是，与亲本CAR的生物活性相比，另外的氨基酸增强生物活性。

[0044] 包括在本发明范围内的是本文描述的本发明CAR的功能变体。本文使用的术语“功能变体”是指具有与亲本CAR大量的或显著的序列同一性或相似性的CAR、多肽或蛋白质，所述功能变体保留了CAR变体的生物活性。功能变体涵盖，例如，本文描述的CAR(亲本CAR)的那些变体，其保留了能够以与亲本CAR类似的程度、以与亲本CAR相同的程度或以比亲本CAR更高的程度识别靶细胞。关于亲本CAR，功能变体的氨基酸序列与亲本CAR的氨基酸序列可，例如，具有至少约30%、约50%、约75%、约80%、约90%、约98%、约99%或更高的同一性。

[0045] 功能变体可，例如，包含具有至少一个保守性氨基酸置换的亲本CAR的氨基酸序列。替代地或另外地，功能变体可包含具有至少一个非保守性氨基酸置换的亲本CAR的氨基酸序列。在这种情况下，优选的是不会干扰或抑制功能变体的生物活性的非保守性氨基酸置换。非保守性氨基酸置换可以增强功能变体的生物活性，使得功能变体的生物活性与亲本CAR相比有所增加。

[0046] 本发明CAR的氨基酸置换优选为保守性氨基酸置换。保守性氨基酸置换为本领域已知的，并且包括其中具有某些物理和/或化学性质的一个氨基酸被交换为具有相同或类似化学或物理性质的另一氨基酸的氨基酸置换。例如，保守性氨基酸置换可为将酸性/带负电荷的极性氨基酸置换为另一酸性/带负电荷的极性氨基酸(如，Asp或Glu)、具有非极性侧链的氨基酸置换为具有非极性侧链的另一氨基酸(如，Ala、Gly、Val、He、Leu、Met、Phe、Pro、Tip、Cys、Val等)、碱性/带正电荷的极性氨基酸置换为另一碱性/带正电荷的极性氨基酸(如Lys、His、Arg等)、具有极性侧链的不带电荷的氨基酸置换为具有极性侧链的另一不带电荷的氨基酸(如，Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr等)、具有 $\beta$ -分支侧链的氨基酸置换为具有 $\beta$ -分支侧链的另一氨基酸(如，Ile、Thr和Val)、具有芳族侧链的氨基酸置换为具有芳族侧链的另一氨基酸(如，His、Phe、Trp和Tyr)等。

[0047] CAR可基本上由指定的氨基酸序列或本文描述的序列组成，使得其它组分，如其它氨基酸，不会实质性改变功能变体的生物活性。

[0048] 本发明的实施方案的CAR(包括功能部分和功能变体)可为任何长度，即，可包含任何数目的氨基酸，前提是CAR(或其功能部分或功能变体)保留其生物活性，如，能够特异性地结合于抗原、检测哺乳动物中的患病细胞、或者治疗或预防哺乳动物中的疾病等。例如，CAR可为约50至约5000个氨基酸长，如长度为50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、1000或更多个氨基酸。

[0049] 本发明的实施方案的CAR(包括本发明的功能部分和功能变体)可包含代替一个



或多个天然存在的氨基酸的合成氨基酸。此类合成氨基酸为本领域已知的,并且包括例如,氨基环己烷羧酸、正亮氨酸、 $\alpha$ -氨基正 癸酸、高丝氨酸、S-乙酰氨基-半胱氨酸、反式-3-和反式-4-羟脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、 $\beta$ -苯基丝氨酸、 $\beta$ -羟基苯丙氨酸、苯甘氨酸、 $\alpha$ -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、吡啶-2-羧酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸单酰胺、N'-苄基-N'-甲基-赖氨酸、N',N'-二苄基-赖氨酸、6-羟赖氨酸、鸟氨酸、 $\alpha$ -氨基环戊烷羧酸、 $\alpha$ -氨基环己烷羧酸、 $\alpha$ -氨基 环庚烷羧酸、 $\alpha$ -(2-氨基-2-降莰烷)-羧酸、 $\alpha$ ,  $\gamma$ -二氨基丁酸、 $\alpha$ ,  $\beta$ -二氨基丙 酸、高苯丙氨酸、以及 $\alpha$ -叔丁基甘氨酸。

[0050] 本发明的实施方案的CAR(包括功能部分和功能变体)可经由如二硫 桥而被糖基化、酰胺化、羧化、磷酸化、酯化、N-酰化、环化,或被转 化成酸加成盐和/或任选地二聚化或聚合或缀合。

[0051] 本发明的实施方案的CAR(包括其功能部分和功能变体)可通过本领域已知的方法获得。CAR可以通过制备多肽或蛋白质的任何合适的方法 制备。从头合成多肽和蛋白质的合适的方法描述在参考文献,如Chan 等, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; *Peptide and Protein Drug Analysis*, Reid, R. 编辑, Marcel Dekker Inc., 2000; *Epitope Mapping*, Westwood 等编辑, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001; 和美国专利5,449,752 中。另外,多肽和蛋白质可利用标准的重组方法使用本文描述的核酸重 组产生。参见,例如, Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; 和 Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates 以及 John Wiley & Sons, NY, 1994。此外,本发明的一些CAR(包括其功 能部分和功能变体)可分离自和/或纯化自诸如植物,细菌,昆虫,哺乳动物如大鼠、人等的来源。分离和纯化方法为本领域熟知的。可选地,本 文描述的CAR(包括其功能部分和功能变体)可通过诸如Synpep(Dublin, CA)、Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) 和 Multiple Peptide Systems (San Diego, CA) 的公司商业合成。在这方面,可合成、重组、分 离和/或纯化本发明的CAR。

[0052] 本发明的实施方案还提供抗体或其抗原结合部分,其特异性地结合 于本发明的CAR的表位。抗体可为本领域已知的任何类型的免疫球蛋白。例如,抗体可为任何同种型,如,IgA、IgD、IgE、IgG、IgM等。抗体可为单克隆的或多克隆的。抗体可为天然存在的抗体,如分离自和/ 或纯化自哺乳动物如,小鼠、兔子、山羊、马、鸡、仓鼠、人等的抗体。可选地,抗体可为基因工程抗体,如人源化抗体或嵌合抗体。抗体可为 单体形式或聚合形式。另外,抗体可对本发明CAR的功能部分具有任何 水平的亲和力或亲合力。

[0053] 测试抗体结合至本发明CAR的任何功能部分的能力的方法为本领域 已知的并且包括任何抗体-抗原结合测定如,例如,放射性免疫测定(RIA)、ELISA、蛋白质印迹、免疫沉淀和竞争性抑制测定(参见,如Janeway等,下 文和美国专利申请第2002/0197266 A1号)。

[0054] 制备抗体的合适的方法为本领域已知的。例如,标准的杂交瘤方法 描述于,如, Köhler 和 Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 511-519 (1976), Harlow 和 Lane (编辑), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988) 以及 C. A. Janeway 等 (编辑), *Immunobiology*, 第5版, Garland Publishing, New York, NY (2001)。可选地,其它方法,如



EBV-杂交瘤方法(Haskard和 Archer,J.Immunol.Methods,74(2),361-67(1984)和Roder等,Methods Enzymol,121,140-67(1986))和噬菌体载体表达系统(参见如,Huse等,Science,246,1275-81(1989))为本领域熟知的。此外,在非人动物中产生抗体的方法描述于如,美国专利5,545,806、5,569,825和5,714,352,以及美国专利申请公布第2002/0197266 A1号。

[0055] 另外,噬菌体展示可用于生成抗体。在这方面,编码抗体的抗原结合可变(V)结构域的噬菌体文库可利用标准的分子生物学和重组DNA技术生成(参见如,Sambrook等(见上文)和Ausubel等(见上文))。选择编码具有期望特异性的可变区的噬菌体来特异性结合于期望抗原,并重建包含选定的可变结构域的完整或部分抗体。将编码重建抗体的核酸序列引入合适的细胞系,诸如用于杂交瘤产生的骨髓瘤细胞,使得细胞分泌具有单克隆抗体特性的抗体(参见如,Janeway等(见上文),Huse等(见上文)和美国专利6,265,150)。

[0056] 抗体可通过转基因特定的重链和轻链免疫球蛋白基因的转基因小鼠产生。此类方法为本领域已知的并且描述于例如,美国专利5,545,806和5,569,825以及Janeway等(见上文)。

[0057] 用于生成人源化抗体的方法为本领域熟知的并且详细描述于例如,Janeway等,见上文,美国专利5,225,539、5,585,089和5,693,761,欧洲专利第0239400 B1号以及英国专利第2188638号。人源化抗体也可使用在美国专利5,639,641和Pedersen等,J.Mol.Biol,235,959-973(1994)中描述的抗体表面重塑技术生成。

[0058] 本发明的实施方案还提供本文描述抗体的任何抗原结合部分。抗原结合部分可为具有至少一个抗原结合位点的任何部分,诸如Fab、F(ab')<sub>2</sub>、dsFv、sFv、双抗体和三链抗体。

[0059] 可使用常规的重组DNA技术方法(参见,如,Janeway等,见上文)生成单链可变区片段(sFv)抗体片段,其为截短的Fab片段,包括经由合成肽连接至抗体轻链的V结构域的抗体重链的可变(V)结构域。类似地,二硫化物稳定的可变区片段(dsFv)可通过重组DNA技术制备(参见如,Reiter等,Protein Engineering,7,697-704(1994))。然而,本发明的抗体片段不限于这些示例性类型的抗体片段。

[0060] 另外,抗体或其抗原结合部分可修饰为包含可检测标记如,例如放射性同位素、荧光团(如异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE))、酶(如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)和元素颗粒(如金颗粒)。

[0061] 本发明的实施方案还提供包含编码本文描述的任何CAR(包括其功能部分和功能变体)的核苷酸序列的核酸。本发明的核酸可包含编码本文描述的任何前导序列、抗原结合结构域、跨膜结构域和/或细胞内T细胞信号传导结构域的核苷酸序列。

[0062] 本发明的实施方案提供包含编码前导序列和抗原结合结构域(包括轻链可变区和重链可变区)的核苷酸序列的核酸。在这方面,核酸可包含SEQ ID NO:25,由SEQ ID NO:25组成,或基本上由SEQ ID NO:25组成。

[0063] 本发明的核酸可包含编码本文描述的任何跨膜结构域和/或细胞内T细胞信号传导结构域的核苷酸序列。本发明的实施方案提供包含核苷酸序列的核酸,所述核苷酸序列编码包含CD28的跨膜结构域、包含CD28的细胞内T细胞信号传导结构域和包含CD3 $\zeta$ 的细胞内T细胞信号传导结构域。在这方面,核酸可包含SEQ ID NO:27,由SEQ ID NO:27组成或



基本上由SEQ ID NO:27组成。本发明的另一实施方案提供包含核苷酸序列的核酸,所述核苷酸序列编码包含CD8的跨膜结构域、包含CD28的细胞内T细胞信号传导结构域、包含CD137的细胞内T细胞信号传导结构域和包含CD3 $\zeta$ 的细胞内T细胞信号传导结构域。在这方面,核酸可包含SEQ ID NO:28,由SEQ ID NO:28组成或基本上由SEQ ID NO:28组成。本发明的又一实施方案提供包含核苷酸序列的核酸,所述核苷酸序列编码包含CD8的跨膜结构域、包含CD137的细胞内T细胞信号传导结构域和包含CD3 $\zeta$ 的细胞内T细胞信号传导结构域。在这方面,核酸可包含SEQ ID NO:26,由SEQ ID NO:26组成,或基本上由SEQ ID NO:26组成。

[0064] 在本发明的实施方案中,核酸包含编码前导序列、抗原结合结构域(包括轻链可变区和重链可变区)、含有CD28的跨膜结构域、含有CD28的细胞内T细胞信号传导结构域和含有CD3 $\zeta$ 的细胞内T细胞信号传导结构域的核苷酸序列。在这方面,核酸可包含SEQ ID NO:25和27,由SEQ ID NO:25和27组成,或基本上由SEQ ID NO:25和27组成。

[0065] 在本发明的实施方案中,核酸包含编码前导序列、抗原结合结构域(包括轻链可变区和重链可变区)、含有CD8的跨膜结构域、含有CD28的细胞内T细胞信号传导结构域、含有CD137的细胞内T细胞信号传导结构域和包含CD3 $\zeta$ 的细胞内T细胞信号传导结构域的核苷酸序列。在这方面,核酸可包含SEQ ID NO:25和28,由SEQ ID NO:25和28组成,或基本上由SEQ ID NO:25和28组成。

[0066] 在实施方案中,核酸包含编码前导序列、抗原结合结构域(包括轻链可变区和重链可变区)、含有CD8的跨膜结构域、含有CD137的细胞内T细胞信号传导结构域和含有CD3 $\zeta$ 的细胞内T细胞信号传导结构域的核苷酸序列。在这方面,核酸可包含SEQ ID NO:25和26,由SEQ ID NO:25和26组成,或基本上由SEQ ID NO:25和26组成。

[0067] 本文使用的“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”,并且通常意指DNA或RNA的聚合物,其可为单链或双链的,由天然来源合成或获得(如分离和/或纯化)的,可含有天然的、非天然的或改变的核苷酸,以及可含有天然的、非天然的或改变的核苷酸间连接,如氨基磷酸酯键或硫代磷酸酯键替代未修饰的寡核苷酸的核苷酸之间存在的磷酸二酯。在一些实施方案中,核酸不包含任何插入、缺失、倒置和/或置换。然而,在一些情况下,如本文所讨论的,包含一个或多个插入、缺失、倒置和/或置换的核酸可能为合适的。在一些实施方案中,核酸可以编码不会影响CAR的功能并且在宿主细胞表达核酸之后可以被翻译或不被翻译的另外的氨基酸序列。

[0068] 本发明的实施方案的核酸可以为重组的。如本文所用,术语“重组体”是指(i)通过将天然或合成的核酸片段连接至可在活细胞中复制的核酸分子而在活细胞外构建的分子,或(ii)来自以上(i)中所述的那些复制的分子。为了本文的目的,复制可为体外复制或体内复制。

[0069] 重组核酸可以为这样的核酸,其具有并非天然存在的序列或具有通过人工组合两个另外分离的序列片段而制得的序列。该人工组合经常通过化学合成,或更常见的,通过人工处理分离的核酸片段,如通过基因工程技术,如在Sambrook等(见上文)中描述的那些来实现。可使用本领域已知的程序基于化学合成和/或酶连接反应构建核酸。参见,例如, Sambrook等(见上文)以及Ausubel等(见上文)。例如,核酸可使用天然存在的核苷酸或为增加分子的生物稳定性或增加杂交后形成的双链体的物理稳定性而设计的不同修饰



的核苷酸(如,硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸)化学合成。可用于生成核酸的修饰核苷酸的实例包括但不限于,5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 $\beta$ -D-半乳糖苷核苷、肌苷、 $N^6$ -异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、 $N^6$ -取代的腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 $\beta$ -D-甘葡聚糖核苷、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫基- $N^6$ -异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、怀丁苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、核苷(queosine)、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧基丙基)尿嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。可选地,本发明的一种或多种核酸可购自公司,如Macromolecular Resources(Fort Collins, CO)和Synthegen(Houston, TX)。

[0070] 核酸可包含任何分离或纯化的核苷酸序列,所述核苷酸序列编码任何CAR或其功能部分或功能变体。可选地,核苷酸序列可包含简并成任何序列或简并序列的组合物核苷酸序列。

[0071] 本发明的实施方案还提供分离或纯化的核酸,所述核酸包含与本文描述的任何核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列或在严格条件下与本文描述的任何核酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0072] 在严格条件下杂交的核苷酸序列可以在高严格条件下杂交。“高严格条件”意指核苷酸序列以强于非特异性杂交可检测的量与靶序列(本文描述的任何核酸的核苷酸序列)特异性杂交。高严格条件包括区分多核苷酸与精确的互补序列,或仅含有来自随机序列的一些分散的错配的互补序列的条件,所述随机序列碰巧具有匹配核苷酸序列的一些小区域(如,3-10个碱基)。此类互补性的小区域比14-17个或更多个碱基的全长互补更容易熔融,并且高严格杂交使得它们易于被区分。相对地高严格条件将包括,例如,低盐和/或高温条件,如在约50-70°C的温度下通过约0.02-0.1M NaCl或等价物提供。此类高严格条件容许如果有的话,核苷酸序列与模板或靶链之间很少的错配,并且特别适于检测任何本发明CAR的表达。通常应理解可通过加入增加量的甲酰胺使条件更严格。

[0073] 本发明还提供包含与本文描述的任何核酸具有至少约70%或更高,如约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性的核苷酸序列的核酸。

[0074] 在实施方案中,本发明的核酸可掺入至重组表达载体中。在这方面,本发明的实施方案提供包含本发明的任何核酸的重组表达载体。为了本发明的目的,术语“重组表达载体”意指基因修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,当构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列,并且在足以在细胞内表达mRNA、蛋白质、多肽或肽的条件下载体与细胞接触时,所述基因修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体允许宿主细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽。本发明的载体并非是整个天然存在的。然而,载体的一部分可为天然存在的。本发明的重组表达载体可包含任何类型的核苷酸,包括但不限于DNA和RNA,所述DNA和RNA可为单链或双链,部分由天然来源合成或获得,并且可含有天然的、非天然的或改变的核苷酸。重组表达载体可包含天然存在的或非天然存在的核苷酸间连键或者这两种类型的连键。



优选地,非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间连键不会阻碍载体的转录或复制。

[0075] 在实施方案中,本发明的重组表达载体可为任何合适的重组表达载体,并且可用于转化或转染任何合适的宿主细胞。合适的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达或这两者的那些载体,如质粒和病毒。载体可选自pUC系列(Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD)、pBluescript系列(Stratagene, La Jolla, CA)、pET系列(Novagen, Madison, WI)、pGEX系列(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)和pEX系列(Clontech, Palo Alto, CA)。也可使用噬菌体载体,如 $\lambda$ GT10、 $\lambda$ GT11、 $\lambda$ ZapII(Stratagene)、 $\lambda$ EMBL4和 $\lambda$ N M1149。植物表达载体的实例包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。重组表达载体可以为病毒载体,如逆转录病毒载体或慢病毒载体。在一些实施方案中,载体可为转座子。

[0076] 许多转染技术通常为本领域已知的(参见,如Graham等,Virology,52: 456-467(1973); Sambrook等,见上文; Davis等,Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier(1986); 和Chu等, Gene, 13:97(1981)。转染方法包括磷酸钙共沉淀(参见,如Graham等,见上文)、直接微注射入培养的细胞内(参见,如Capecchi, Cell, 22:479-488(1980))、电穿孔(参见,如Shigekawa等, BioTechniques, 6:742-751(1988))、脂质体介导的基因转移(参见,如Mannino等, BioTechniques, 6:682-690(1988))、脂质介导的转导(参见,如Feigner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7417(1987)), 以及使用高速微弹轰击的核酸递送(参见,如, Klein等, Nature, 327:70-73(1987))。

[0077] 在实施方案中,本发明的重组表达载体可使用在例如Sambrook等,(见上文)和Ausubel等(见上文)中描述的标准重组DNA技术来制备。可制备表达载体的构建体(其可为环状或线性的)来含有在原核或真核宿主细胞中有功能的复制系统。复制系统可来源于如ColE1、2 $\mu$ 质粒、 $\lambda$ 、SV40、牛乳头瘤病毒等。

[0078] 重组表达载体可包含调控序列,如转录和翻译起始密码子和终止密码子,其对待引入载体的宿主细胞类型(如细菌、真菌、植物或动物)为特定的(视情况),并且考虑载体是否基于DNA或RNA。包含终止密码子的序列的实例包括SEQ ID NO:32-33。重组表达载体可包含限制位点来促进克隆。包含限制位点的序列实例包括SEQ ID NO:29-31。

[0079] 重组表达载体可包含一个或多个标记基因,所述标记基因允许对转化或转染的宿主细胞进行选择。标记基因包括杀菌剂抗性,如对抗生素、重金属等的抗性,与营养缺陷型宿主互补以提供原养型等。本发明表达载体的合适标记基因包括,例如新霉素/G418抗性基因、潮霉素抗性基因、组氨醇抗性基因、四环素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因。

[0080] 重组表达载体可包含天然或非天然的启动子,其可操作地连接至编码CAR(包括其功能部分和功能变体)的核苷酸序列或至与编码CAR的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列。启动子的选择,如强、弱、可诱导的、组织特异的和发育特异的,在本领域技术人员的能力内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在本领域技术人员的普通技术内。启动子可为非病毒启动子或病毒启动子,如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子或在鼠科干细胞病毒的长末端重复序列中存在的启动子。

[0081] 本发明的重组表达载体可被设计用于瞬时表达、用于稳定表达或两者。另外,可制备用于组成型表达或用于诱导型表达的重组表达载体。

[0082] 此外,可制备包含自杀基因的重组表达载体。如本文所用,术语“自杀基因”是指



引起表达自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可为该基因在细胞中表达后赋予其对药剂如药物的敏感性,并且当细胞与药剂接触或暴露于药剂时引起细胞死亡的基因。自杀基因为领域中已知的(参见,例如Suicide Gene Therapy:Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004), 并且包括, 例如单纯性疱疹病毒 (HSV) 胸苷激酶 (TK) 基因、胞嘧啶脱氨酶基因、嘌呤核苷磷酸化酶基因和硝基还原酶基因。

[0083] 包括在本发明范围内的为包含任何本发明CAR (包括其任何功能部分或变体)、核酸、重组表达载体、宿主细胞、宿主细胞群体或者抗体或其抗原结合部分的缀合物, 如生物缀合物。缀合物以及合成缀合物的常规方法为本领域已知的(参见, 例如Hudecz, F., Methods Mol. Biol. 298: 209-223 (2005) 和Kirin等, Inorg Chem. 44 (15): 5405-5415 (2005))。

[0084] 本发明的实施方案还提供包含本文描述的任何重组表达载体的宿主细胞。如本文所用, 术语“宿主细胞”是指可含有本发明重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可为真核细胞, 如植物、动物、真菌或藻类, 或者可为原核细胞, 如细菌或原生动物。宿主细胞可为培养的细胞或原代细胞, 即直接分离自生物体, 如人。宿主细胞可为粘附细胞或悬浮细胞, 即在悬浮液中生长的细胞。合适的宿主细胞为本领域中已知的并且包括, 例如DH5 $\alpha$ 大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞等。为了扩增或复制重组表达载体的目的, 宿主细胞可以为原核细胞, 如DH5 $\alpha$ 细胞。为了产生重组CAR的目的, 宿主细胞可以为哺乳动物细胞。宿主细胞可以为人细胞。虽然宿主细胞可为任何细胞类型, 可来源于任何类型的组织并且可为任何发育阶段, 但宿主细胞可以为外周血淋巴细胞 (PBL) 或外周血单核细胞 (PBMC)。宿主细胞可以为T细胞。

[0085] 为了本文的目的, T细胞可为任何T细胞, 如培养的T细胞, 例如原代T细胞或来自培养的T细胞系的T细胞, 如Jurkat、SupT1等, 或从哺乳动物获得的T细胞。如果从哺乳动物获得, 则T细胞可从许多来源获得, 包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其它组织或液体。T细胞也可被富集或纯化。T细胞可以为人T细胞。T细胞可以为分离自人的T细胞。T细胞可为任何类型的T细胞并且可为任何发育阶段, 包括但不限于CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>双阳性T细胞、CD4<sup>+</sup>辅助T细胞如Th<sub>1</sub>和Th<sub>2</sub>细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞 (如细胞毒性T细胞)、肿瘤浸润细胞、记忆T细胞、初始T细胞等。T细胞可以为CD8<sup>+</sup>T细胞或CD4<sup>+</sup>T细胞。

[0086] 本发明的实施方案还提供包含至少一种本文描述的宿主细胞的细胞群体。细胞群体可为异源群体, 除了至少一种不包含任何重组表达载体的其它细胞, 如宿主细胞 (如T细胞), 或者除了T细胞之外的细胞, 如B细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌肉细胞、脑细胞等, 所述异源群体包含含有所述的任何重组表达载体的宿主细胞。可选地, 细胞群体可为大体上同源的群体, 其中所述群体主要包含含有重组表达载体的宿主细胞 (如, 基本上由其组成)。群体也可 为克隆细胞群体, 其中群体的所有细胞为包含重组表达载体的单个宿主细胞的克隆, 使得群体的所有细胞包含重组表达载体。在本发明的一个实施方案中, 细胞群体为克隆群体, 所述克隆群体包含含有如本文所述 的重组表达载体的宿主细胞。

[0087] 可分离和/或纯化CAR (包括其功能部分和变体)、核酸、重组表达载体、宿主细胞



(包括其群体)和抗体(包括其抗原结合部分),在下文中其全部被统称为“本发明的CAR物质”。本文使用的术语“分离的”意指已经脱离其天然环境。术语“纯化的”或“分离的”不要要求绝对纯度或分离;相反,其意为相对术语。因此,例如,纯化的(或分离的)宿主细胞制剂为其中宿主细胞比在体内其天然环境的细胞更纯的宿主细胞制剂。此类宿主细胞可以例如,通过标准的纯化技术产生。在一些实施方案中,纯化宿主细胞的制剂使得宿主细胞代表至少约50%,例如至少约70%的制剂的总细胞含量。例如,纯度可为至少约50%,可为大于约60%、约70%或约80%,或可为约100%。

[0088] 本发明的CAR物质可以配制成组合物,如药物组合物。在这方面,本发明的实施方案提供包含任何CAR、功能部分、功能变体、核酸、表达载体、宿主细胞(包括其群体)和抗体(包括其抗原结合部分)以及药学上可接受的载体的药物组合物。含有任何本发明的CAR物质的本发明药物组合物可包含多于一种的本发明CAR物质,如CAR和核酸,或两种或更多种不同的CAR。可选地,药物组合物可包含与其它药物活性剂或药物如化学治疗剂,如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、阿霉素、氟尿嘧啶、吉西他滨(gemcitabine)、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗(rituximab)、长春碱、长春新碱等组合的本发明的CAR物质。在优选的实施方案中,药物组合物包含本发明的宿主细胞或其群体。

[0089] 本发明的CAR物质可以盐的形式(如药学上可接受的盐)提供。合适的药学上可接受的酸加成盐包括来源于无机酸如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸和硫酸,以及有机酸如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、乙醇酸、葡糖酸、琥珀酸和芳基磺酸例如对甲苯磺酸的那些酸加成盐。

[0090] 关于药物组合物,药学上可接受的载体可为任何常规使用的那些载体并且仅受限于化学-物理考虑因素,如溶解性和与活性剂缺乏反应性以及给予途径。本文描述的药学上可接受的载体,例如媒介物、佐剂、赋形剂和稀释剂,为本领域技术人员熟知的并且公众容易获得。优选的是对活性剂为化学惰性的药学上可接受的载体和在使用条件下无有害的副作用或毒性的药学上可接受的载体。

[0091] 载体的选择将部分由特定的本发明CAR物质以及用于给予本发明CAR物质的具体方法来确定。因此,存在本发明的药物组合物的多种合适的制剂。可以使用防腐剂。合适的防腐剂可以包括,例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。可以任选地使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以总组合物的约0.0001重量%至约2重量%的量存在。

[0092] 合适的缓冲剂可以包括,例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾以及各种其它酸和盐。可以任选地使用两种或更多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物通常以总组合物的约0.001重量%至约4重量%的量存在。

[0093] 药物制剂中本发明CAR物质的浓度可从,如低于约1重量%,通常为约10重量%或至少约10重量%变化至多达约20重量%至约50重量%或更高,并且可根据选择的特定给予方式主要按液体体积和粘度选定。

[0094] 用于制备可给予的(如可胃肠外给予的)组合物的方法为已知的或对本领域技术人员为显而易见的,且更详细地描述于,例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott Williams&Wilkins;第21版。(2005年5月1日)。

[0095] 用于口服、气雾、胃肠外(如皮下、静脉内、动脉内、肌内、皮内、腹膜内和硬膜内)



和外用给予的以下制剂仅为示例性的而非限制。可使用多于一种途径来给予本发明的CAR物质,并且在某些情况下,特定的途径可提供比另一途径更直接且更有效的应答。

[0096] 适合于口服给予的制剂可包含以下或由以下组成:(a)液体溶液,如溶解于稀释剂中的有效量的本发明CAR物质,所述稀释剂如水、盐水或橙汁;(b)胶囊剂、囊剂、片剂、锭剂和糖锭,每种含有固体或颗粒状的预定量的活性成分;(c)粉末;(d)在适当液体中的悬浮液;以及(e)合适的乳剂。液体制剂可包含加入或未加入药学上可接受的表面活性剂的稀释剂,如水和醇,例如乙醇、苄醇和聚乙烯醇。胶囊形式可为含有例如表面活性剂,润滑剂和诸如乳糖、蔗糖、磷酸钙和玉米淀粉的惰性填料的普通硬壳或软壳明胶类型。片剂形式可包含以下一种或多种:乳糖、蔗糖、甘露醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸、微晶纤维素、阿拉伯胶、明胶、瓜尔胶、胶态二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酸和其它赋形剂,着色剂,稀释剂,缓冲剂,崩解剂,润湿剂,防腐剂,调味剂以及其它药理学相容的赋形剂。除了本领域内已知的这些赋形剂之外,锭剂形式可在调味剂(通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)中包含本发明的CAR物质,而糖锭在惰性基质(如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶、乳剂、凝胶等)中包含本发明的CAR物质。

[0097] 适用于胃肠外给予的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者血液等渗的溶质,以及水性和非水性无菌悬液,其可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。在加入或未加入药学上可接受的诸如皂或去污剂表面活性剂,诸如果胶、卡波姆、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素的悬浮剂,或乳化剂和其它药物佐剂时,本发明的CAR物质可以生理上可接受的稀释剂于药物载体中给予,所述药物载体如无菌液体或液体的混合物包括水、盐水、含水葡萄糖和相关的糖溶液、醇如乙醇或十六烷醇、乙二醇如丙二醇或聚乙二醇、二甲基亚砷、甘油、缩酮如2,2-二甲基-1,3-二噁茂烷-4-甲醇、醚、聚(乙二醇)400、油、脂肪酸、脂肪酸酯或甘油酯、或乙酰化的脂肪酸甘油酯。

[0098] 可在胃肠外制剂中使用的油包括石油、动物油、植物油或合成油。油的具体实例包括花生油、大豆油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油、矿脂和矿物油。胃肠外制剂中使用的合适脂肪酸包括油酸、硬脂酸和异硬脂酸。油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯为合适的脂肪酸酯实例。

[0099] 在胃肠外制剂中使用的合适脂肪酸盐包括脂肪碱金属、铵和三乙醇胺盐,而合适的去污剂包括(a)阳离子去污剂如,例如二甲基二烷基卤化铵和烷基吡啶鎓卤化物,(b)阴离子去污剂如,例如烷基、芳基和烯基磺酸盐,烷基、烯基、醚基和单甘油硫酸酯和磺基琥珀酸酯,(c)非离子去污剂如,例如脂肪胺氧化物、脂肪酸烷醇酰胺和聚环氧乙烷聚丙烯(polyoxyethylenepolypropylene)共聚物,(d)两性去污剂如,例如烷基-β-氨基丙酸盐和2-烷基-咪唑啉季铵盐,以及(e)其混合物。

[0100] 胃肠外制剂通常将在溶液中含有,例如约0.5重量%至约25重量%的本发明CAR物质。可以使用防腐剂和缓冲剂。为了使注射部位的刺激最小化或消除注射部位的刺激,此类组合物可含有一种或多种非离子表面活性剂,其具有例如亲水-亲脂平衡(HLB)为约12至约17。此类制剂中表面活性剂的量的范围通常为例如,约5重量%至约15重量%。合适的表面活性剂包括聚乙二醇山梨糖醇脂肪酸酯,如山梨糖醇单油酸酯以及环氧乙烷与通过环氧丙烷与丙二醇缩合形成的疏水性基质的高分子量加合物。胃肠外制剂可在单位剂



量或多剂量密封容器如安瓿和小瓶中提供,并且可储存于冻干(冷冻干燥的)条件下,仅需要在使用前即刻加入用于注射的无菌液体赋形剂,例如水。临时注射溶液和悬浮液可由前述种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0101] 可注射制剂与本发明的实施方案一致。对可注射组合物的有效药物载体的需求为本领域普通技术人员熟知的(参见,如,Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J.B.Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker和 Chalmers编辑,第238-250页(1982),以及ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 第4版,第622-630页(1986))。

[0102] 外用制剂,包括可用于经皮药物释放的那些制剂,为本领域技术人员熟知的并且在本发明实施方案的上下文中适合应用于皮肤。本发明的CAR物质,可单独或与其它合适的组分组合制备成待经由吸入给予的气雾剂制剂。这些气雾剂制剂可被置于可接受的加压推进剂如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等中。它们也可以被配制用于非加压制备如在喷雾器或雾化器中的药物。此类喷雾制剂也可以用于喷雾粘膜。

[0103] “有效量”或“治疗有效量”是指足以预防或治疗个体癌症的剂量。用于治疗或预防用途的有效量将取决于,例如被治疗的疾病或病症的阶段和严重程度,患者的年龄、体重和总的健康状态,以及处方医师的判断。剂量的大小也将通过选定的活性物、给予方法、给予的时间和频率、可能伴随给予特定活性物的任何不良副作用的存在、性质和程度,以及期望的生理效果来确定。本领域技术人员将理解的是,不同的疾病或病症可能需要涉及多次给予的延长治疗,可能在每次给予或不同轮次给予中使用本发明的CAR物质。通过举例而非旨在限制本发明,本发明CAR物质的剂量可为约0.001至约1000mg/kg被治疗的受试者体重/天,约0.01至约10mg/kg体重/天,约0.01mg至约1mg/kg体重/天。当本发明的CAR物质为宿主细胞时,宿主细胞的示例性剂量可为最少一百万个细胞(1mg细胞/剂量)。当本发明的CAR物质为包装在病毒内的核酸时,病毒的示例性剂量可为1ng/剂量。

[0104] 为了本发明的目的,给予的本发明CAR物质的量或剂量应足以在合理的时间范围内引起受试者或动物的治疗性或预防性响应。例如,本发明CAR物质的剂量应在从给予时间起约2小时或更久,如约12小时至约24小时或更久时间的时段内足以结合于抗原或检测、治疗或预防疾病。在某些实施方案中,时间段甚至可以更久。剂量将由特定的本发明CAR物质的功效和动物(如人)的状况以及待治疗的动物(如人)的体重来确定。

[0105] 为了本发明的目的,测定可用于确定待给予哺乳动物的起始剂量,所述测定包括,例如在分别被给予不同剂量的T细胞的一组哺乳动物中,将特定剂量的此类T细胞给予哺乳动物后,比较靶细胞裂解和/或由表达本发明CAR的T细胞分泌的IFN- $\gamma$ 所达到的程度。在给予某些剂量后,靶细胞裂解和/或IFN- $\gamma$ 分泌所达到的程度可通过本领域已知的方法测定。

[0106] 除了上述药物组合物之外,本发明的CAR物质可被配制成包合配合物,诸如环糊精包合配合物或脂质体。脂质体可用于将本发明的CAR物质靶向特定的组织。脂质体也可用于增加本发明CAR物质的半衰期。许多方法可用于制备脂质体如,在例如Szoka等, Ann.Rev.Biophys.Bioeng., 9,467(1980)以及美国专利4,235,871、4,501,728、4,837,028和5,019,369所述。

[0107] 可用于本发明的实施方案的上下文中的递送系统可以包括时释递送系统、延迟



释放递送系统和持续释放递送系统,使得本发明组合物的递送发生在待治疗的部位发生敏化之前,并且具有充足的时间引起待治疗的部位发生敏化。本发明的组合物可与其它治疗剂或疗法结合使用。此类系统可避免重复给予本发明的组合物,从而增加受试者和医师的便利性,并且可特别适合于本发明的某些组合物实施方案。

[0108] 许多类型的释放递送系统是可获得的并且对本领域普通技术人员为已知的。其包括聚合物基质系统诸如聚(丙交酯-乙交酯)、共聚草酸酯(copolyoxalates)、聚己内酯、聚酰胺酯、聚原酸酯、聚羟基丁酸和聚酐。含有药物的前述聚合物的微胶囊剂描述于,例如美国专利5,075,109。递送系统还包括非聚合物系统,其为包括诸如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸的甾醇或诸如单甘油酯、二甘油酯和三甘油酯的中性脂肪的脂类;水凝胶释放系统;硅橡胶(sylastic)系统;基于肽的系统;蜡涂层;使用常规粘合剂和赋形剂的压缩片剂;部分融合的植入物等。特定的实例包括但不限于:(a)侵蚀系统,其中活性组合物以某种形式包含在基质内,如在美国专利4,452,775、4,667,014、4,748,034和5,239,660中描述的那些系统;以及(b)扩散系统,其中活性组分以受控的速率从聚合物中渗透,如美国专利3,832,253和3,854,480中所描述。此外,可使用基于泵的硬件递送系统,其中的一些适合于植入。

[0109] 本领域普通技术人员将容易理解本发明的CAR物质可以任何多种方式修饰,使得本发明CAR物质的治疗或预防功效通过修饰而增加。例如,本发明的CAR物质可通过接头直接或间接地缀合于靶向部分。将化合物,如本发明的CAR物质缀合于靶向部分的实践为本领域已知的。参见,例如Wadwa等,J. Drug Targeting 3:111(1995)和美国专利5,087,616。

[0110] 可选地,本发明的CAR物质可被修饰成储库形式,使得本发明的CAR物质释放至给予其的体内的方式相对于体内的时间和位置得到控制(参见,例如,美国专利4,450,150)。本发明CAR物质的储库形式可为,例如包含本发明的CAR物质和多孔或无孔材料(如聚合物)的可植入的组合物,其中本发明的CAR物质被材料封装或扩散通过材料和/或无孔材料降解。然后将储库植入至体内的期望位置,并且本发明的CAR物质以预定速率从植入物释放。

[0111] 当本发明的CAR物质与一种或多种另外的治疗剂一起给予时,一种或多种另外的治疗剂可共给予哺乳动物。“共给予”意指在足够接近的时间给予一种或多种另外的治疗剂和本发明的CAR物质,使得本发明的CAR物质可增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。在这方面,可先给予本发明的CAR物质,接着给予一种或多种另外的治疗剂,或反之亦然。可选地,本发明的CAR物质和一种或多种另外的治疗剂可同时给予。可与CAR物质共给予的示例性治疗剂为IL-2。据信,IL-2增强本发明的CAR物质的治疗效果。为了本发明方法的目的,其中将宿主细胞或细胞群体给予哺乳动物,所述细胞可为与哺乳动物同种异体或哺乳动物自体的细胞。

[0112] 预期本发明药物组合物、CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞或细胞群体可用于治疗或预防哺乳动物疾病的方法中。不受特定理论或机制的束缚,本发明的CAR具有能够识别抗原如CD22的生物活性,使得当由细胞表达时,CAR能够介导对抗表达抗原如CD22的细胞的免疫应答,所述CAR为特异性的。在这方面,本发明的实施方案提供治疗或预防哺乳动物癌症的方法,所述方法包括以治疗或预防哺乳动物癌症的有效量给予哺乳动物本发明的CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体、抗体和/或其抗原结合部分和/或药



物组合物。

[0113] 本发明的实施方案还包括在给予本发明的CAR物质之前对哺乳动物进行淋巴清除。淋巴清除的实例包括但不限于，非骨髓性淋巴清除、化疗、骨髓性淋巴清除化疗、全身辐射等。

[0114] 为了本发明方法的目的，其中给予宿主细胞或细胞群体时，所述细胞可为与哺乳动物同种异体或哺乳动物自体的细胞。优选地，所述细胞为哺乳动物自体的。

[0115] 本文提及的哺乳动物可为任何哺乳动物。如本文所用，术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物，包括但不限于啮齿目的哺乳动物，如小鼠和仓鼠，以及兔形目的哺乳动物，如兔子。哺乳动物可以来自食肉目，包括猫科动物(猫)和犬科动物(犬)。哺乳动物可以来自偶蹄目，包括牛科动物(牛)和猪科动物(猪)或奇蹄目，包括马科动物(马)。哺乳动物可以为灵长目、猿(Ceboids)目或猴(Simoids)目(猴)或猿猴亚目(人和猿)。优选地，哺乳动物为人。

[0116] 关于本发明方法，癌症可为任何癌症，包括任何的急性淋巴细胞性癌症、急性骨髓性白血病、小泡型横纹肌肉瘤、膀胱癌(如膀胱癌)、骨癌、脑癌(如髓母细胞瘤)、乳腺癌、肛门癌、肛管癌或直肠肛门癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、外阴癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性癌症、结肠癌、食管癌、宫颈癌、纤维肉瘤、胃肠道类癌肿瘤、头颈癌(如头颈鳞状细胞癌)、霍奇金(Hodgkin)淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、白血病、液体瘤、肝癌、肺癌(如非小细胞肺癌)、淋巴瘤、恶性间皮瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金(non-Hodgkin)淋巴瘤、B-慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)和伯基特(Burkitt's)淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、实体瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌和输尿管癌。优选地，癌症为血液系统肿瘤(如白血病或淋巴瘤，包括但不限于霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞性癌症、急性髓样白血病、B-慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)和伯基特淋巴瘤)。优选地，癌症以表达CD22为特征。

[0117] 本文使用的术语“治疗”和“预防”以及源自于此的词不必暗示100%或完全治疗或预防。相反，存在不同程度的治疗或预防，本领域普通技术人员认为所述治疗或预防具有潜在的益处或治疗效果。在这方面，本发明方法可提供任何量的任何水平的治疗或预防哺乳动物的癌症。而且，本发明方法提供的治疗或预防可包括正在治疗或预防的疾病如癌症的一种或多种病患或症状的治疗或预防。另外，为了本文的目的，“预防”可涵盖延缓疾病或其症状或病患的发作。

[0118] 本发明的另一实施方案提供应用本发明的CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体、抗体或其抗原结合部分或药物组合物治疗或预防哺乳动物癌症。

[0119] 本发明的另一实施方案提供检测哺乳动物中存在癌症的方法，所述方法包括：(a)将包含一种或多种来自哺乳动物的细胞的样品与本发明的CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体、抗体和/或其抗原结合部分进行接触，从而形成复合物；以及(b)检测所述复合物，其中检测到所述复合物指示哺乳动物中存在癌症。

[0120] 样品可以通过任何合适的方法，如活组织检查或尸检获得。活组织检查为从个体中取得组织和/或细胞。此类取得可以从个体中收集组织和/或细胞，以便在取得的组织



和/或细胞上进行实验。该实验可以包括确定个体是否具有和/或患有某些病患或疾病状态的实验。所述病患或疾病可 以为如癌症。

[0121] 关于检测哺乳动物中存在癌症的本发明方法的实施方案,包含哺乳 动物细胞的样品可为包含全细胞、其裂解物或一部分全细胞裂解物如细 胞核或细胞质部分、全蛋白质部分、或核酸部分的样品。如果样品包含 全细胞,则细胞可为哺乳动物的任何细胞,如任何器官或组织的细胞, 包括血细胞或内皮细胞。

[0122] 为了本发明检测方法的目的是,所述接触可在相对于哺乳动物的体外 或体内发生。优选地,在体外进行接触。

[0123] 另外,复合物的检测可通过本领域已知的任何多种方法进行。例如, 本文描述的本发明TCR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细 胞、细胞群体或抗体或其抗原结合部分可用可检测的标记物如,例如放 射性同位素、荧光团(如异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE))、酶(如碱 性磷酸酶、辣根过氧化物酶)和元素颗粒(如,金颗粒)进行标记。

[0124] 检测CAR识别靶细胞的能力以及抗原特异性的方法为本领域已知 的。例如,Clay等(J.Immunol,163:507-513(1999))教导测量细胞因子(如 干扰素- $\gamma$ 、粒细胞/单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )或白细胞介素2(IL-2))释放的方法。此外, CAR功能可通过测量细胞 毒性来评估,如Zhao等(J.Immunol,174:4415-4423(2005))所述。

[0125] 以下实施例进一步阐明本发明,但当然不应理解为以任何方式限制 其范围。

[0126] 实施例1

[0127] 本实施例表明抗-CD22 CAR的合成,用抗-CD22 CAR转导PBMC并 在转导的PBMC上分析CAR表面表达。

[0128] 编码CAR的序列使用密码子优化算法(Mr.Gene GmbH,Regensburg, Germany)合成,并如Zhao等(J.Immunol,183(9):5563-74(2009))所述亚克 隆至“目标”载体,如表A中示出的编码第一版第二代CAR(CD28跨膜 和细胞内T细胞信号传导结构域以及CD3- $\zeta$ 链细胞内T细胞信号传导结 构域)、第二版第二代CAR(CD8跨膜结构域连接至CD137和CD3- $\zeta$ T细 胞信号传导结构域)或第三代CAR(CD8跨膜结构域连接至CD28、CD137 和CD3- $\zeta$ 细胞内T细胞信号传导结构域)的序列。

[0129] 表A

[0130]

SEQ ID NO:	抗原结合结 构域	其它组分
HA22CAR-第二代, 第 1 版	HA22	-CH2CH3 -CD28 跨膜结构域



[0131]

		-CD28 和 CD3 $\zeta$ 细胞内 T 细胞信号传导结构域
HA22CAR-第三代	HA22	-CH2CH3 -CD8 跨膜结构域 -CD28、CD137 和 CD3 $\zeta$ 细胞内 T 细胞信号传导结构域
HASH22 CAR-第二代, 第 1 版	HA22	-短的免疫球蛋白恒定结构域序列 -CD28 跨膜结构域 -CD28 和 CD3 $\zeta$ 细胞内 T 细胞信号传导结构域
HASH22 CAR-第三代	HA22	-短的免疫球蛋白恒定结构域序列 -CD8 跨膜结构域 -CD28、CD137 和 CD3 $\zeta$ 细胞内 T 细胞信号传导结构域
BL22 CAR-第二代	BL22	-CH2CH3 -CD28 跨膜结构域 -CD28 和 CD3 $\zeta$ 细胞内 T 细胞信号传导结构域
BL22 CAR-第三代	BL22	-CH2CH3 -CD8 跨膜结构域 -CD28、CD137 和 CD3 $\zeta$ 细胞内 T 细胞信号传导结构域
HASH22 CAR-第二代, 第 2 版	HA22	-短的免疫球蛋白恒定结构域序列 -CD8 跨膜结构域 -CD137 和 CD3 $\zeta$ 细胞内 T 细胞信号传导结构域
m971 CAR-第二代, 第 1 版 (SEQ ID NO:23)	m971	-CD28 跨膜结构域 -CD28 和 CD3 $\zeta$ 细胞内 T 细胞信号传导结构域
m971 CAR-第三代 (SEQ ID	m971	-CD8 跨膜结构域



[0132]	NO:24)		-CD28、CD137 和 CD3 $\zeta$ 细胞内 T 细胞信号传导结构域
	m971 CAR-第二代, 第 2 版 (SEQ ID NO:22)	m971	-CD8 跨膜结构域 - CD137 和 CD3 $\zeta$ 细胞内 T 细胞信号传导结构域

[0133] 通过用编码CAR逆转录病毒载体的质粒和RD114包膜糖蛋白转染 293GP细胞,在 48-72小时后收集培养物上清液 (s/n) 来产生逆转录病毒载体上清液。将培养物上清液冷冻或立即使用,如先前在Y.Zhao等 (J. Immunol,183:5563 (2009)) 中所述,使用“板上 (on plate)”方法 (用预先暴露于含有载体s/n的稀释液的RECTORNECTIN (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) 包被的平板上培养淋巴细胞) 连续2天来转导OKT3和IL-2活化的人PBMC。在本研究中还使用含有来自永生细胞系产生者 (permanent producer cell line) 的CD19-特异性CAR的逆转录病毒s/n (Kochenderfer等, Blood,1 16:4099 (2010))。

[0134] 在转导的T细胞上的CAR表达通过流式细胞术来测定。为了直接测量能够凭借CH2CH3结构域结合CD22的细胞数目,使用山羊抗-人 IgG (H&L) (Invitrogen,Grand Island,NY)。为了检测编码非-CH2CH3的 CAR,使用CD22-Fc (R&D Systems) 随后抗IgG-Fc PE (Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA)。HA22SH CAR表达短的免疫球蛋白恒定结构域序列替代CH2CH3。使用蛋白质L检测CD19-CAR。结合生物素化蛋白质L (50ng/ul, Thermo Scientific,Waltham,MA),洗涤细胞,然后用SA-PE (4ug/ml,BD Biosciences, Franklin Lakes,NJ) 检测。为了比较,还评估了CD19-CAR载体s/n。流式细胞术实验验证了转导的T细胞上CAR 表达。如通过平均荧光强度 (MFI) 测量,与第三代CAR相比,第二代CAR显示增加的表面表达水平。

[0135] 实施例2

[0136] 本实施例表明CD22和CD19抗原在白血病细胞系上的表达。

[0137] 使用QUANTI-BRITE PE柱粒 (BD Biosciences) 以及PE-标记的抗 -CD19和抗-CD22 抗体,评估人白血病细胞系 (REH、SEM、NALM6、KOPN8、Daudi、Raji和K562) 在细胞表面上CD19和CD22的表达水平 (表 2)。“每个细胞的受体数目”显示在每个指示的细胞系上每个细胞的分子 的大约绝对数目。根据制造商的说明书使用CELLQUEST软件 (BD) 数据分析工具通过测定每个细胞结合的抗体 (ABC) 计算数据。

[0138] 表2

[0139]	白血病细胞系	每个细胞的受体数目
	REH CD19	15,100
	SEM CD19	50,800
	NALM-6 CD19	50,500
	KOPN-8 CD19	60,800
	Daudi CD19	15,000
	Raji CD19	50,000
	K562 CD19	<100



REH CD22	7,000
SEM CD22	7,000
NALM-6 CD22	8,000
KOPN-8 CD22	15,300
Daudi CD22	8,000
Raji CD22	60,800
K562 CD22	<200

#### [0140] 实施例3

[0141] 本实施例表明表达第二代(第1版)m971 CAR的细胞的溶解活性。

[0142] 为了测定溶解活性,将白血病细胞系(REH、SEM、NALM6、KOPN8、Daudi、Raji和K562)进行<sup>51</sup>Cr标记并用作细胞毒性测定中的靶标。细胞为未转导的(模拟)或者用第二代(第1版)m971 CAR(SEQ ID NO:23),抗-CD 19 CAR,或第二代(第1版)HASH22 CAR转导,并且在细胞毒性测定中以不同的效应子与靶标比率用作效应细胞。测量靶细胞的裂解百分数并且示于图1A-1G中。

[0143] 如图1A-1G中所示,用第二代(第1版)m971 CAR(SEQ ID NO:23)转导的细胞裂解表达CD22的白血病细胞系REH、SEM、NALM6、OPN8、Daudi和Raji,并且不会裂解不表达CD22的细胞系K562。与用第二代(第1版)HASH22 CAR转导的细胞相比,用第二代(第1版)m971 CAR(SEQ ID NO:23)转导的细胞显示更优的溶解能力。

[0144] 将七名BCP-ALL患者样品用于CD22和CD19表达分析。观察到宽范围的抗原表达,如通过流式细胞术分析显示。一些患者对两种抗原都显示出强阳性,而其它患者的CD22染色减少。在每种情况下,CD22特异性CAR赋予第三方淋巴细胞抗-白血病溶解活性。

#### [0145] 实施例4

[0146] 本实施例表明表达m971 CAR的T细胞的溶解活性。

[0147] 为了确定提供的第二代或第三代CAR构建体是否增加溶解活性,将白血病细胞系Raji (CD22<sup>高</sup>)、NALM6-GL (CD22<sup>低</sup>)或K562 (CD22-阴性)进行<sup>51</sup>Cr标记并用作细胞毒性测定中的靶标。效应细胞为未转导的(模拟)或用m971-第二代第1版CAR (SEQ ID NO:23)或m971-第三代CAR (SEQ ID NO:24)转导的人T细胞。将效应细胞和靶细胞以不同的效应子与靶标(E:T)比率共培养。结果示于图2A至图2C中。

[0148] 如图2A至图2C所示,与第三代m971 CAR相比,第二代m971 CAR显示更优的溶解活性。

#### [0149] 实施例5

[0150] 本实施例表明表达m971 CAR的T细胞的反应性。

[0151] 将未转导的(模拟)或用以下CAR中的一种转导的T细胞与白血病细胞系Raji (CD22<sup>高</sup>)、NALM6-GL (CD22<sup>低</sup>)或562 (CD22-阴性)共培养并测量分泌的干扰素 (IFN) -  $\gamma$ 、肿瘤坏死因子 (TNF)  $\alpha$ 和白细胞介素 (IL) - 2的量:抗-CD 19,m971-第二代第1版 (SEQ ID NO:23),m971-第三代 (SEQ ID NO:24),HASH22-第二代第1版,HASH22-第二代第2版或HASH22-第三代。结果示于图3A至图3I中。

[0152] 如图3A至图3I中所示,与第三代m971 CAR相比,用m971-第二代第1版CAR转导的细胞响应于表达CD22的细胞系的共培养而分泌更高量的IFN- $\gamma$ 、IL-2和TNF $\alpha$ 。



[0153] 实施例6

[0154] 本实施例表明与HA22 CAR相比,用m971 CAR转导的细胞减缓疾病的进展并延长体内存活的持续时间。

[0155] 第0天,用 $0.5 \times 10^6$  NALM6-GL (用荧光素酶转染的NALM6) 注射 NOD重症联合免疫缺陷(scid)  $\gamma$  免疫缺陷(NSG) 小鼠。第3天,用 $1 \times 10^7$  未转导的(模拟) T细胞或者用HASH22-第二代第1版CAR或m971-第二代第1版CAR (SEQ ID NO:23) 转导的T细胞治疗小鼠。使用Xenogen IVIS 仪器用生物发光成像以光子/s/cm<sup>2</sup>/sr就每只小鼠的生物发光信号测量肿瘤负荷。小鼠腹膜内(i.p.) 注射3mg D-荧光素(Caliper Life Sciences, Inc., Hopkinton, MA) 并在注射后4分钟,将麻醉的小鼠用30秒的曝光时间成像。在第3天、第7天和第15天时,使用LIVING IMAGE软件以光子/s/cm<sup>2</sup>/sr分析每只小鼠的生物发光信号。将信号强度随着时间作图,且结果示于图4A中。

[0156] 如图4A中所示,所有的小鼠在第3天时具有等同的疾病。与用对照细胞或用HA22CAR转导的细胞治疗的小鼠相比,用m971-第二代第1版CAR (SEQ ID NO:23) 转导的T细胞治疗的小鼠减少小鼠的肿瘤负荷。

[0157] 测量小鼠存活50天,使用Log-rank (Mantel-Cox) 分析计算存活统计数据并且存活结果示于图4B中。如图4B中所示,与用HA22 CAR转导的对照细胞治疗的小鼠相比,用m971-第二代第1版CAR (SEQ ID NO:23) 转导的T细胞治疗的小鼠显示增加的存活。

[0158] 为了确定治疗失败是否是由于失去抗原性,根据惯例化方案,使由于疾病负荷的小鼠安乐死,并通过流式细胞术分析脾脏。在治疗前,在 HASH-28z和m971-28z转导的T细胞上观察到高水平的CAR表达,并且NALM6-GL细胞表达CD19和CD22两者。在处死后,首先分析脾脏人CD45和GFP表达。门控GFP阳性细胞代表肿瘤,在进一步分析之后,该门控群体持续表达GFP。然而,剩余的任何CD45阳性和GFP阴性细胞不再表达抗-CD22 CAR。这指示白血病持续表达CD22并且CAR T细胞不会在处死时存留。当重复实验,在12天处死小鼠时,治疗性T细胞仍具有效果时,其可容易地在血液、脾脏和骨髓中检测到。m971-28z (第二代第1版) CAR显示出更强的浸润骨髓的能力。

[0159] 实施例7

[0160] 本实施例表明继承性转移表达m971 CAR的细胞的剂量应答曲线。

[0161] 第0天,用 $0.5 \times 10^6$  NALM6-GL细胞注射NSG (免疫缺陷的) 小鼠。第3天,使用荧光素底物成像动物以验证白血病的存在。第3天,用未转导的(模拟) T细胞或用编码m971-第二代第2版CAR的核苷酸序列 (SEQ ID NO:22) 转导的 $15 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^6$ 或 $1 \times 10^5$  T细胞静脉内(i.v.) 注射具有白血病的小鼠。转导的T细胞的CAR转导效率为90%。将T细胞用抗-CD3/CD28珠粒(1:1) 刺激,在40单位/ml的白细胞介素-2中培养,并在初始刺激之后10天注射至小鼠中。在第5天和第8天对小鼠再次成像。结果示于图5和图6中。图5中从灰至白的阴影变化指示增加的肿瘤负荷。在图6中,光子的减少指示肿瘤负荷的减少。如图5和图6所示,到第8天观察到用最高的剂量水平完全消除白血病。

[0162] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利在此通过引用并入,其程度如同每份参考文献单独地和具体地表示为通过引用并入并且在本文以其整体示出。

[0163] 在描述本发明的上下文中使用的术语“一个/一种”和“所述”和“至少一种/一个”以及类似的指示物(特别是在以下权利要求的上下文中)应被解释为覆盖单数和复数两



者,除非本文另外指出或与上下文明显 矛盾。术语“至少一种/一个”之后一项或多项列表(例如,“A和B中的 至少一种/一个”)的使用应被解释为意指选自列出的项中的一项(A或B)或两个或更多个列出的项的组合(A和B),除非本文另外指出或与上下文 明显矛盾。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应被解释为 开放式的术语(即意指“包括,但不限于”),除非另外指明。本文数值的 范围的描述仅旨在用作分别提及属于范围内的每个单独数值的速记法,除非本文另外指出,并且将每个单独数值并入说明书,如同其在本文中 被独立引用一样。本文描述的所有方法可以任何合适的顺序进行,除非 本文另外指出或与上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有的实例或示 例性语言(如“例如”)的使用仅仅旨在更好地阐明本发明,并且不会对以 其它方式要求保护的本发明范围构成限制。不应将本说明书中的语言解 释为表明任何未要求保护的组分对实施本发明是必要的。

[0164] 本发明的优选实施方案在本文中描述,包括发明人已知的实施该发 明的最佳模式。对本领域的普通技术人员来说,阅读上述说明后这些优 选的实施方案中的改变可以是显而易见的。发明人期望熟练的技术人员 酌情利用这些改变,并且发明人意欲以不同于本文具体描述的方式实施 该发明。因此,在适用法律允许的情况下,本发明包括在所附的权利要 求中所引用主题的所有修改和等同物。此外,在其所有可能的改变中上 述要素的任何组合涵盖于本发明中,除非本文另外说明或上下文中明显 矛盾。



- [0001] 序列表
- [0002] <110> 美国卫生和人力服务部 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE
- [0003] SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES)
- [0004] <120> M971嵌合抗原受体
- [0005] <130> 714144
- [0006] <150> US 61/717,960
- [0007] <151> 2012-10-24
- [0008] <160> 33
- [0009] <170> PatentIn version 3.5
- [0010] <210> 1
- [0011] <211> 10
- [0012] <212> PRT
- [0013] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0014] <220>
- [0015] <221>
- [0016] <222>
- [0017] <223> 合成的
- [0018] <400> 1
- [0019] Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala
- [0020] 1 5 10
- [0021] <210> 2
- [0022] <211> 9
- [0023] <212> PRT
- [0024] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0025] <220>
- [0026] <221>
- [0027] <222>
- [0028] <223> 合成的
- [0029] <400> 2
- [0030] Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn
- [0031] 1 5
- [0032] <210> 3
- [0033] <211> 14
- [0034] <212> PRT
- [0035] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0036] <220>
- [0037] <221>



[0038]	<222>
[0039]	<223> 合成的
[0040]	<400> 3
[0041]	Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp Leu Glu Asp Ala Phe Asp Ile
[0042]	1 5 10
[0043]	<210> 4
[0044]	<211> 6
[0045]	<212> PRT
[0046]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0047]	<220>
[0048]	<221>
[0049]	<222>
[0050]	<223> 合成的
[0051]	<400> 4
[0052]	Gln Thr Ile Trp Ser Tyr
[0053]	1 5
[0054]	<210> 5
[0055]	<211> 3
[0056]	<212> PRT
[0057]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0058]	<220>
[0059]	<221>
[0060]	<222>
[0061]	<223> 合成的
[0062]	<400> 5
[0063]	Ala Ala Ser
[0064]	1
[0065]	<210> 6
[0066]	<211> 10
[0067]	<212> PRT
[0068]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0069]	<220>
[0070]	<221>
[0071]	<222>
[0072]	<223> 合成的
[0073]	<400> 6
[0074]	Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr Phe
[0075]	1 5 10
[0076]	<210> 7



[0077]	<211>	107
[0078]	<212>	PRT
[0079]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0080]	<220>	
[0081]	<221>	
[0082]	<222>	
[0083]	<223>	合成的
[0084]	<400>	7
[0085]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0086]	1	5 10 15
[0087]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr	
[0088]	20	25 30
[0089]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile	
[0090]	35	40 45
[0091]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0092]	50	55 60
[0093]	Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala	
[0094]	65	70 75 80
[0095]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln	
[0096]	85	90 95
[0097]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0098]	100	105
[0099]	<210>	8
[0100]	<211>	124
[0101]	<212>	PRT
[0102]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0103]	<220>	
[0104]	<221>	
[0105]	<222>	
[0106]	<223>	合成的
[0107]	<400>	8
[0108]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	
[0109]	1	5 10 15
[0110]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn	
[0111]	20	25 30
[0112]	Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu	
[0113]	35	40 45
[0114]	Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala	
[0115]	50	55 60



[0116]	Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
[0117]	65 70 75 80
[0118]	Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
[0119]	85 90 95
[0120]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp Leu Glu Asp Ala Phe Asp
[0121]	100 105 110
[0122]	Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[0123]	115 120
[0124]	<210> 9
[0125]	<211> 236
[0126]	<212> PRT
[0127]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0128]	<220>
[0129]	<221>
[0130]	<222>
[0131]	<223> 合成的
[0132]	<400> 9
[0133]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0134]	1 5 10 15
[0135]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
[0136]	20 25 30
[0137]	Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
[0138]	35 40 45
[0139]	Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
[0140]	50 55 60
[0141]	Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
[0142]	65 70 75 80
[0143]	Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
[0144]	85 90 95
[0145]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp Leu Glu Asp Ala Phe Asp
[0146]	100 105 110
[0147]	Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
[0148]	115 120 125
[0149]	Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
[0150]	130 135 140
[0151]	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Trp Ser
[0152]	145 150 155 160
[0153]	Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu
[0154]	165 170 175



[0155]	Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
[0156]	180 185 190
[0157]	Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
[0158]	195 200 205
[0159]	Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro
[0160]	210 215 220
[0161]	Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0162]	225 230 235
[0163]	<210> 10
[0164]	<211> 22
[0165]	<212> PRT
[0166]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0167]	<220>
[0168]	<221>
[0169]	<222>
[0170]	<223> 合成的
[0171]	<400> 10
[0172]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
[0173]	1 5 10 15
[0174]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro
[0175]	20
[0176]	<210> 11
[0177]	<211> 5
[0178]	<212> PRT
[0179]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0180]	<220>
[0181]	<221>
[0182]	<222>
[0183]	<223> 合成的
[0184]	<400> 11
[0185]	Gly Gly Gly Gly Ser
[0186]	1 5
[0187]	<210> 12
[0188]	<211> 69
[0189]	<212> PRT
[0190]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0191]	<220>
[0192]	<221>
[0193]	<222>



[0194]	<223>	合成的
[0195]	<400>	12
[0196]	Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala	
[0197]	1 5 10 15	
[0198]	Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly	
[0199]	20 25 30	
[0200]	Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile	
[0201]	35 40 45	
[0202]	Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val	
[0203]	50 55 60	
[0204]	Ile Thr Leu Tyr Cys	
[0205]	65	
[0206]	<210>	13
[0207]	<211>	42
[0208]	<212>	PRT
[0209]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0210]	<220>	
[0211]	<221>	
[0212]	<222>	
[0213]	<223>	合成的
[0214]	<400>	13
[0215]	Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met	
[0216]	1 5 10 15	
[0217]	Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe	
[0218]	20 25 30	
[0219]	Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu	
[0220]	35 40	
[0221]	<210>	14
[0222]	<211>	112
[0223]	<212>	PRT
[0224]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0225]	<220>	
[0226]	<221>	
[0227]	<222>	
[0228]	<223>	合成的
[0229]	<400>	14
[0230]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly	
[0231]	1 5 10 15	
[0232]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr	



[0233]	20	25	30
[0234]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
[0235]	35	40	45
[0236]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
[0237]	50	55	60
[0238]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
[0239]	65	70	75
[0240]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
[0241]	85	90	95
[0242]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0243]	100	105	110
[0244]	<210> 15		
[0245]	<211> 65		
[0246]	<212> PRT		
[0247]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0248]	<220>		
[0249]	<221>		
[0250]	<222>		
[0251]	<223> 合成的		
[0252]	<400> 15		
[0253]	Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr		
[0254]	1	5	10
[0255]	Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro		
[0256]	20	25	30
[0257]	Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu		
[0258]	35	40	45
[0259]	Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val		
[0260]	50	55	60
[0261]	Arg		
[0262]	65		
[0263]	<210> 16		
[0264]	<211> 40		
[0265]	<212> PRT		
[0266]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0267]	<220>		
[0268]	<221>		
[0269]	<222>		
[0270]	<223> 合成的		
[0271]	<400> 16		



[0272]	Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
[0273]	1 5 10 15
[0274]	Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
[0275]	20 25 30
[0276]	Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
[0277]	35 40
[0278]	<210> 17
[0279]	<211> 112
[0280]	<212> PRT
[0281]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0282]	<220>
[0283]	<221>
[0284]	<222>
[0285]	<223> 合成的
[0286]	<400> 17
[0287]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
[0288]	1 5 10 15
[0289]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
[0290]	20 25 30
[0291]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
[0292]	35 40 45
[0293]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
[0294]	50 55 60
[0295]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
[0296]	65 70 75 80
[0297]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
[0298]	85 90 95
[0299]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0300]	100 105 110
[0301]	<210> 18
[0302]	<211> 84
[0303]	<212> PRT
[0304]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0305]	<220>
[0306]	<221>
[0307]	<222>
[0308]	<223> 合成的
[0309]	<400> 18
[0310]	Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro



[0311]	1	5	10	15
[0312]	Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu			
[0313]	20	25	30	
[0314]	Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg			
[0315]	35	40	45	
[0316]	Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly			
[0317]	50	55	60	
[0318]	Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn			
[0319]	65	70	75	80
[0320]	His Arg Asn Arg			
[0321]	<210> 19			
[0322]	<211> 40			
[0323]	<212> PRT			
[0324]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0325]	<220>			
[0326]	<221>			
[0327]	<222>			
[0328]	<223> 合成的			
[0329]	<400> 19			
[0330]	Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro			
[0331]	1	5	10	15
[0332]	Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro			
[0333]	20	25	30	
[0334]	Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser			
[0335]	35	40		
[0336]	<210> 20			
[0337]	<211> 47			
[0338]	<212> PRT			
[0339]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0340]	<220>			
[0341]	<221>			
[0342]	<222>			
[0343]	<223> 合成的			
[0344]	<400> 20			
[0345]	Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe			
[0346]	1	5	10	15
[0347]	Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly			
[0348]	20	25	30	
[0349]	Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu			



[0350]	35	40	45
[0351]	<210> 21		
[0352]	<211> 112		
[0353]	<212> PRT		
[0354]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0355]	<220>		
[0356]	<221>		
[0357]	<222>		
[0358]	<223> 合成的		
[0359]	<400> 21		
[0360]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly		
[0361]	1 5 10 15		
[0362]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
[0363]	20 25 30		
[0364]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
[0365]	35 40 45		
[0366]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
[0367]	50 55 60		
[0368]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
[0369]	65 70 75 80		
[0370]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
[0371]	85 90 95		
[0372]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0373]	100 105 110		
[0374]	<210> 22		
[0375]	<211> 484		
[0376]	<212> PRT		
[0377]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0378]	<220>		
[0379]	<221>		
[0380]	<222>		
[0381]	<223> 合成的		
[0382]	<400> 22		
[0383]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro		
[0384]	1 5 10 15		
[0385]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly		
[0386]	20 25 30		
[0387]	Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly		
[0388]	35 40 45		



[0389]	Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser
[0390]	50 55 60
[0391]	Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys
[0392]	65 70 75 80
[0393]	Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn
[0394]	85 90 95
[0395]	Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr
[0396]	100 105 110
[0397]	Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp
[0398]	115 120 125
[0399]	Leu Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
[0400]	130 135 140
[0401]	Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
[0402]	145 150 155 160
[0403]	Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
[0404]	165 170 175
[0405]	Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly
[0406]	180 185 190
[0407]	Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly
[0408]	195 200 205
[0409]	Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
[0410]	210 215 220
[0411]	Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
[0412]	225 230 235 240
[0413]	Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
[0414]	245 250 255
[0415]	Ile Lys Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
[0416]	260 265 270
[0417]	Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
[0418]	275 280 285
[0419]	Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
[0420]	290 295 300
[0421]	Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
[0422]	305 310 315 320
[0423]	Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys
[0424]	325 330 335
[0425]	Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
[0426]	340 345 350
[0427]	Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly



[0428]	355	360	365
[0429]	Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala		
[0430]	370	375	380
[0431]	Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg		
[0432]	385	390	395
[0433]	Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu		
[0434]	405	410	415
[0435]	Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn		
[0436]	420	425	430
[0437]	Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met		
[0438]	435	440	445
[0439]	Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly		
[0440]	450	455	460
[0441]	Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala		
[0442]	465	470	475
[0443]	Leu Pro Pro Arg		
[0444]	<210> 23		
[0445]	<211> 480		
[0446]	<212> PRT		
[0447]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0448]	<220>		
[0449]	<221>		
[0450]	<222>		
[0451]	<223> 合成的		
[0452]	<400> 23		
[0453]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro		
[0454]	1	5	10
[0455]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly		
[0456]	20	25	30
[0457]	Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly		
[0458]	35	40	45
[0459]	Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser		
[0460]	50	55	60
[0461]	Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys		
[0462]	65	70	75
[0463]	Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn		
[0464]	85	90	95
[0465]	Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr		
[0466]	100	105	110



[0467]	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Val	Thr	Gly	Asp
[0468]			115						120						125	
[0469]	Leu	Glu	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val
[0470]			130						135						140	
[0471]	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser
[0472]	145								150				155			160
[0473]	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala
[0474]						165					170					175
[0475]	Ser	Gln	Thr	Ile	Trp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly
[0476]						180					185				190	
[0477]	Lys	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly
[0478]						195					200				205	
[0479]	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu
[0480]						210					215				220	
[0481]	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln
[0482]	225					230					235					240
[0483]	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ile	Pro	Gln	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
[0484]						245					250					255
[0485]	Ile	Lys	Ala	Ala	Ala	Ile	Glu	Val	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp
[0486]						260					265					270
[0487]	Asn	Glu	Lys	Ser	Asn	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val	Lys	Gly	Lys	His	Leu
[0488]						275					280					285
[0489]	Cys	Pro	Ser	Pro	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu
[0490]						290					295					300
[0491]	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val
[0492]	305						310					315				320
[0493]	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His
[0494]						325					330					335
[0495]	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys
[0496]						340					345					350
[0497]	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser
[0498]						355					360					365
[0499]	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly
[0500]						370					375					380
[0501]	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr
[0502]	385						390					395				400
[0503]	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys
[0504]						405					410					415
[0505]	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys



[0506]	420	425	430
[0507]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
[0508]	435	440	445
[0509]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
[0510]	450	455	460
[0511]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0512]	465	470	475
[0513]	<210> 24		
[0514]	<211> 544		
[0515]	<212> PRT		
[0516]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0517]	<220>		
[0518]	<221>		
[0519]	<222>		
[0520]	<223> 合成的		
[0521]	<400> 24		
[0522]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro		
[0523]	1	5	10
[0524]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly		
[0525]	20	25	30
[0526]	Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly		
[0527]	35	40	45
[0528]	Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser		
[0529]	50	55	60
[0530]	Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys		
[0531]	65	70	75
[0532]	Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn		
[0533]	85	90	95
[0534]	Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr		
[0535]	100	105	110
[0536]	Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp		
[0537]	115	120	125
[0538]	Leu Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val		
[0539]	130	135	140
[0540]	Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser		
[0541]	145	150	155
[0542]	Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala		
[0543]	165	170	175
[0544]	Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly		



[0545]	180							185					190						
[0546]	Lys	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly			
[0547]	195							200					205						
[0548]	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu			
[0549]	210							215					220						
[0550]	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln			
[0551]	225							230					235					240	
[0552]	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ile	Pro	Gln	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu			
[0553]	245							250					255						
[0554]	Ile	Lys	Ala	Ala	Ala	Phe	Val	Pro	Val	Phe	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr			
[0555]	260							265					270						
[0556]	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser			
[0557]	275							280					285						
[0558]	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly			
[0559]	290							295					300						
[0560]	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp			
[0561]	305							310					315					320	
[0562]	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile			
[0563]	325							330					335						
[0564]	Thr	Leu	Tyr	Cys	Asn	His	Arg	Asn	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu			
[0565]	340							345					350						
[0566]	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg			
[0567]	355							360					365						
[0568]	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg			
[0569]	370							375					380						
[0570]	Ser	Arg	Phe	Ser	Val	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile			
[0571]	385							390					395					400	
[0572]	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp			
[0573]	405							410					415						
[0574]	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu			
[0575]	420							425					430						
[0576]	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly			
[0577]	435							440					445						
[0578]	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr			
[0579]	450							455					460						
[0580]	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys			
[0581]	465							470					475					480	
[0582]	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys			
[0583]	485							490					495						



[0584]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg	
[0585]	500	505 510
[0586]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala	
[0587]	515	520 525
[0588]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
[0589]	530	535 540
[0590]	<210>	25
[0591]	<211>	774
[0592]	<212>	DNA
[0593]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0594]	<220>	
[0595]	<221>	
[0596]	<222>	
[0597]	<223>	合成的
[0598]	<400>	25
[0599]	atgcttctgc tcgtgacaag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccctgc ctttctgctg	60
[0600]	atccctcagg tgcagctgca gcagtctggc cctggcctcg tgaagcctag ccagaccctg	120
[0601]	agcctgacct gtgccatcag cggcgatagc gtgtccagca atagcgccgc ctggaactgg	180
[0602]	atcagacaga gccctagcag aggcctggaa tggctgggccc ggacctacta ccggtccaag	240
[0603]	tggtacaacg actacgccgt gtccgtgaag tcccggatca ccatcaaccc cgacaccagc	300
[0604]	aagaaccagt tctccctgca gctgaacagc gtgacccccg aggataccgc cgtgtactac	360
[0605]	tgcgccagag aagtgaccgg cgacctggaa gatgccttcg acatctgggg ccagggcaca	420
[0606]	atggtcaccg tgtctagcgg aggcggcgga agcgacatcc agatgacaca gagccccagc	480
[0607]	tccctgagcg ccagcgtggg agacagagtg accatcacct gtcgggccag ccagaccatc	540
[0608]	tggtcctacc tgaactggtg tcagcagcgg cctggcaagg cccccaacct gctgatctat	600
[0609]	gccgccagct cactgcagag cggcgtgccc agcagatttt ccggcagagg cagcggcacc	660
[0610]	gacttcaccc tgacaatcag ttccctgcag gccgaggact tcgccaccta ctactgccag	720
[0611]	cagagctaca gcatcccca gaccttcggc caggggacca agctggaaat caaa	774
[0612]	<210>	26
[0613]	<211>	672
[0614]	<212>	DNA
[0615]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0616]	<220>	
[0617]	<221>	
[0618]	<222>	
[0619]	<223>	合成的
[0620]	<400>	26
[0621]	accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccacgcgctc gcagcccctg	60
[0622]	tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg	120



[0623]	gacttcgcct gtgatatcta catctgggcg cccttggccg ggacttgtgg ggtccttctc	180
[0624]	ctgtcactgg ttatcacctt ttactgcaaa cggggcagaa agaaactcct gtatatattc	240
[0625]	aaacaacat ttatgagacc agtacaact actcaagagg aagatggctg tagctgccga	300
[0626]	tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac	360
[0627]	gccccgcgt acaagcagg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga	420
[0628]	gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	480
[0629]	agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag	540
[0630]	gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggagg gcaaggggca cgatggcctt	600
[0631]	taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg	660
[0632]	ccccctcgct aa	672
[0633]	<210>	27
[0634]	<211>	654
[0635]	<212>	DNA
[0636]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0637]	<220>	
[0638]	<221>	
[0639]	<222>	
[0640]	<223>	合成的
[0641]	<400>	27
[0642]	gttatgtatc ctctcctta cctagacaat gagaagagca atggaacat tatccatgtg	60
[0643]	aaagggaac acctttgtcc aagtccccta tttcccgac cttctaagcc cttttgggtg	120
[0644]	ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt	180
[0645]	attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctctgcaca gtgactacat gaacatgact	240
[0646]	ccccgccgc cggggccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc	300
[0647]	gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag	360
[0648]	ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg	420
[0649]	gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaacctcag	480
[0650]	gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg	540
[0651]	atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca	600
[0652]	gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg ctaa	654
[0653]	<210>	28
[0654]	<211>	852
[0655]	<212>	DNA
[0656]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0657]	<220>	
[0658]	<221>	
[0659]	<222>	
[0660]	<223>	合成的
[0661]	<400>	28



[0662]	ttcgtgccgg tcttcctgcc agcgaagccc accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca	60
[0663]	ccggcgccca ccatcgctc gcagcccctg tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg	120
[0664]	gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg gacttcgcct gtgatatcta catctgggcg	180
[0665]	cccttggccg ggacttgtgg ggtccttctc ctgtcactgg ttatcaccct ttactgcaac	240
[0666]	cacaggaaca ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa catgactccc	300
[0667]	cgccgccccg ggcccacccg caagcattac cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca	360
[0668]	gcctatcgct cccgtttctc tgttggttaa cggggcagaa agaagctcct gtatatattc	420
[0669]	aaacaacat ttatgagacc agtacaaact actcaagagg aagatggctg tagctgccga	480
[0670]	tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgagagtga agttcagcag gagcgagac	540
[0671]	gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga	600
[0672]	gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	660
[0673]	agaaggaaga accctcagga aggctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag	720
[0674]	gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt	780
[0675]	taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg	840
[0676]	ccccctcgct aa	852
[0677]	<210>	29
[0678]	<211>	6
[0679]	<212>	DNA
[0680]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0681]	<220>	
[0682]	<221>	
[0683]	<222>	
[0684]	<223>	合成的
[0685]	<400>	29
[0686]	ctcgag	6
[0687]	<210>	30
[0688]	<211>	8
[0689]	<212>	DNA
[0690]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0691]	<220>	
[0692]	<221>	
[0693]	<222>	
[0694]	<223>	合成的
[0695]	<400>	30
[0696]	gcggccgc	8
[0697]	<210>	31
[0698]	<211>	6
[0699]	<212>	DNA
[0700]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)



[0701]	<220>		
[0702]	<221>		
[0703]	<222>		
[0704]	<223>	合成的	
[0705]	<400>	31	
[0706]	ggatcc		6
[0707]	<210>	32	
[0708]	<211>	19	
[0709]	<212>	DNA	
[0710]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0711]	<220>		
[0712]	<221>		
[0713]	<222>		
[0714]	<223>	合成的	
[0715]	<400>	32	
[0716]	taaggatccg ataaaataa		19
[0717]	<210>	33	
[0718]	<211>	15	
[0719]	<212>	DNA	
[0720]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0721]	<220>		
[0722]	<221>		
[0723]	<222>		
[0724]	<223>	合成的	
[0725]	<400>	33	
[0726]	ctaaggatcc gataa		15



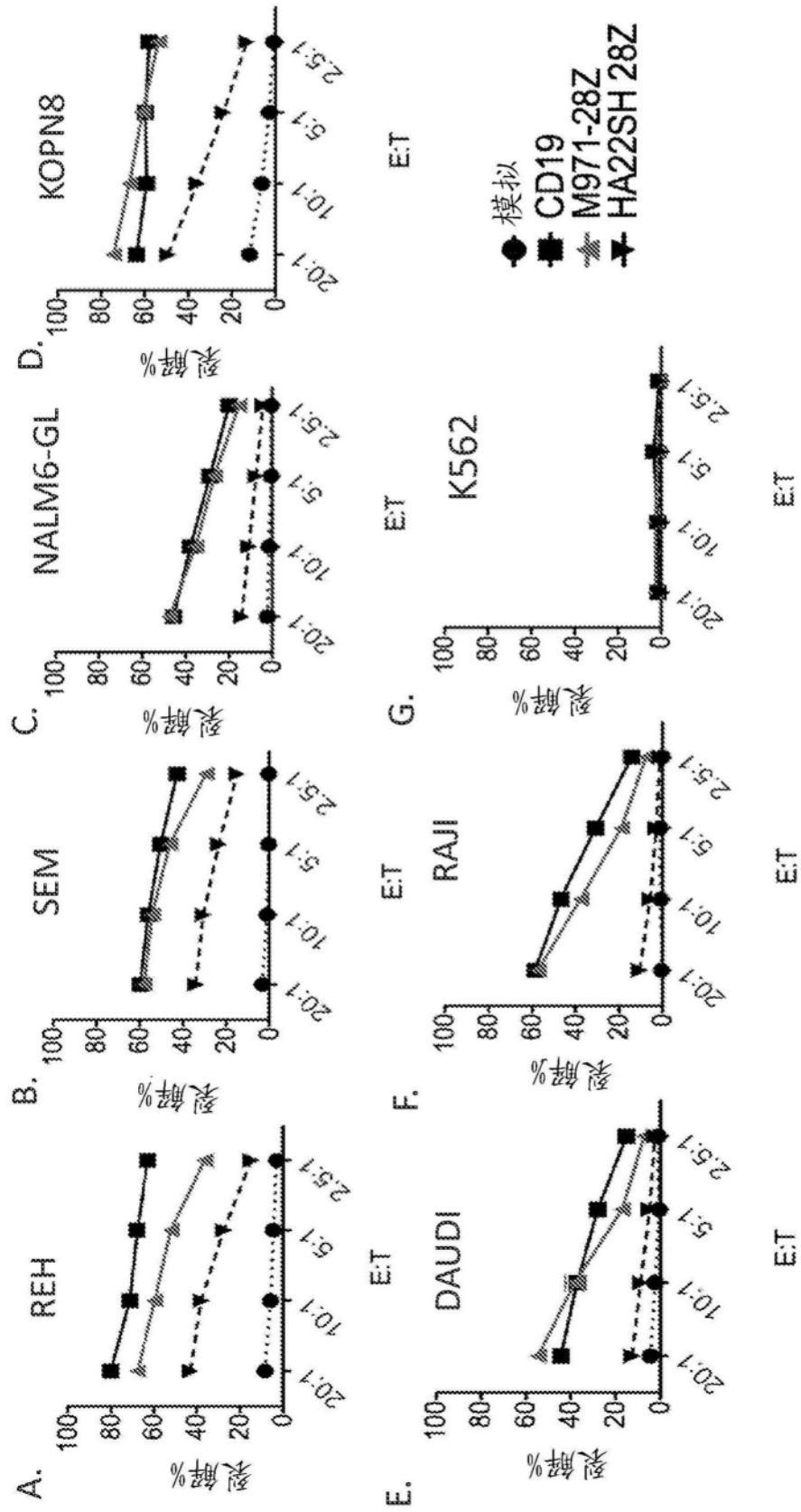


图1



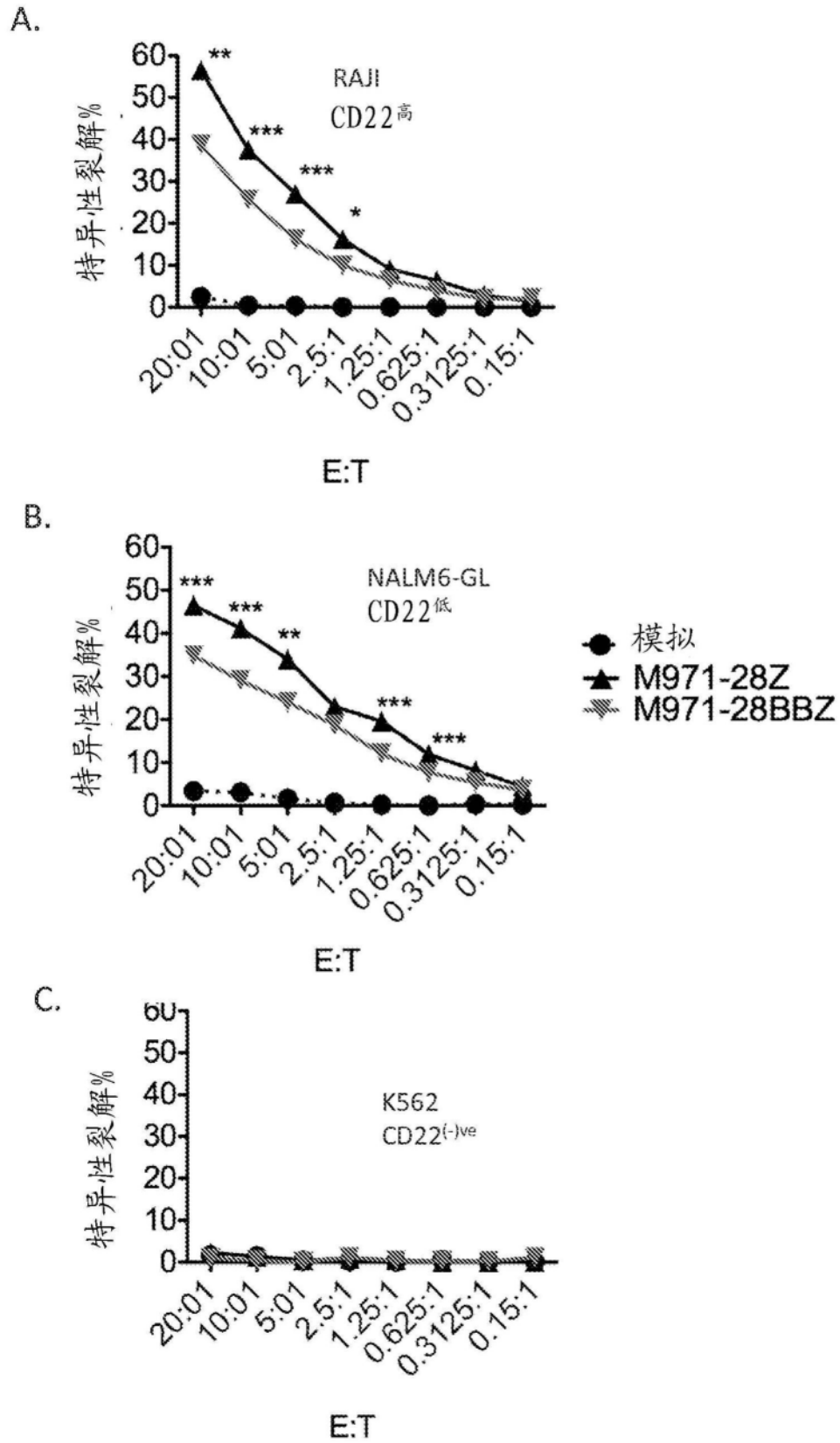


图2



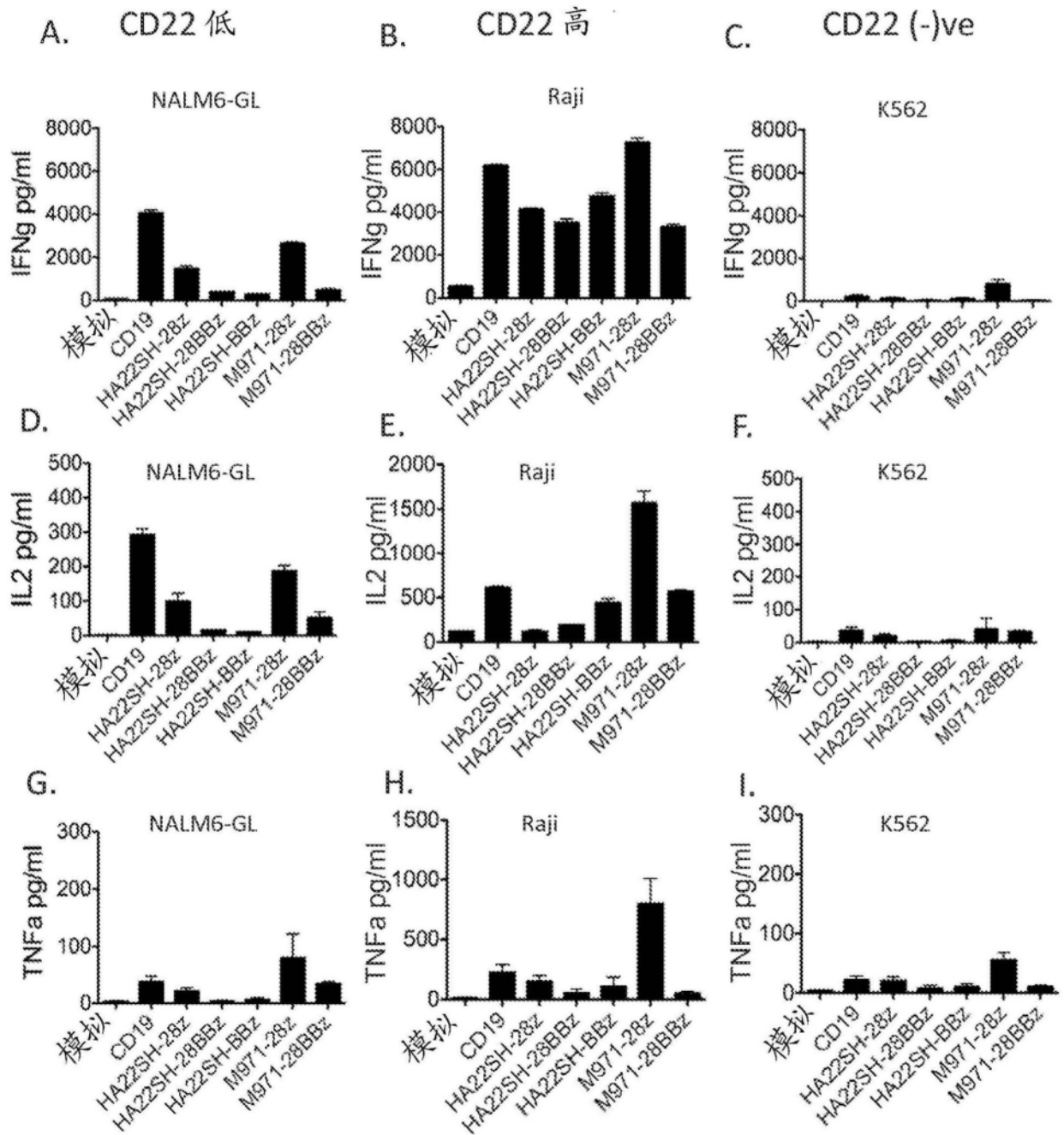


图3



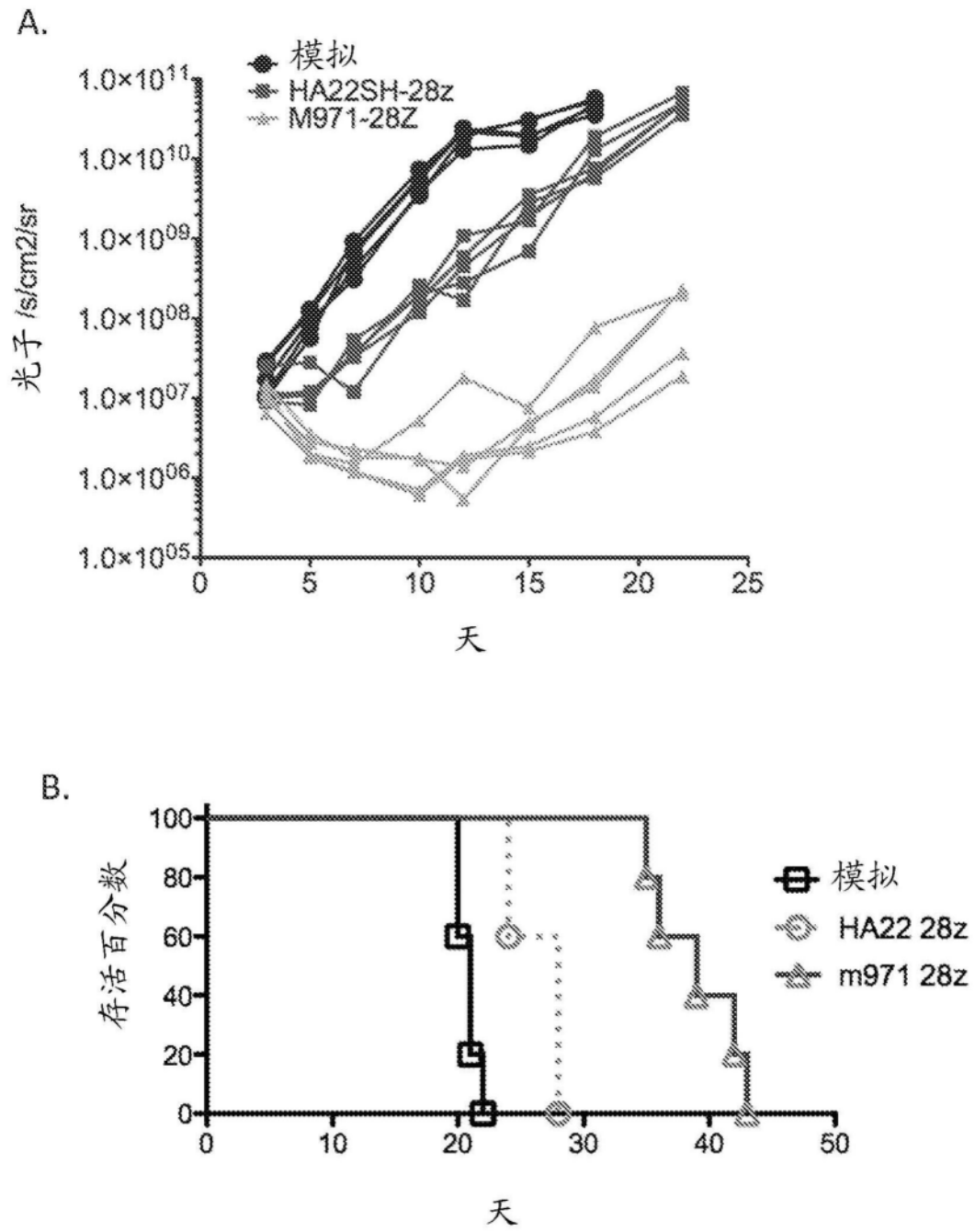


图4



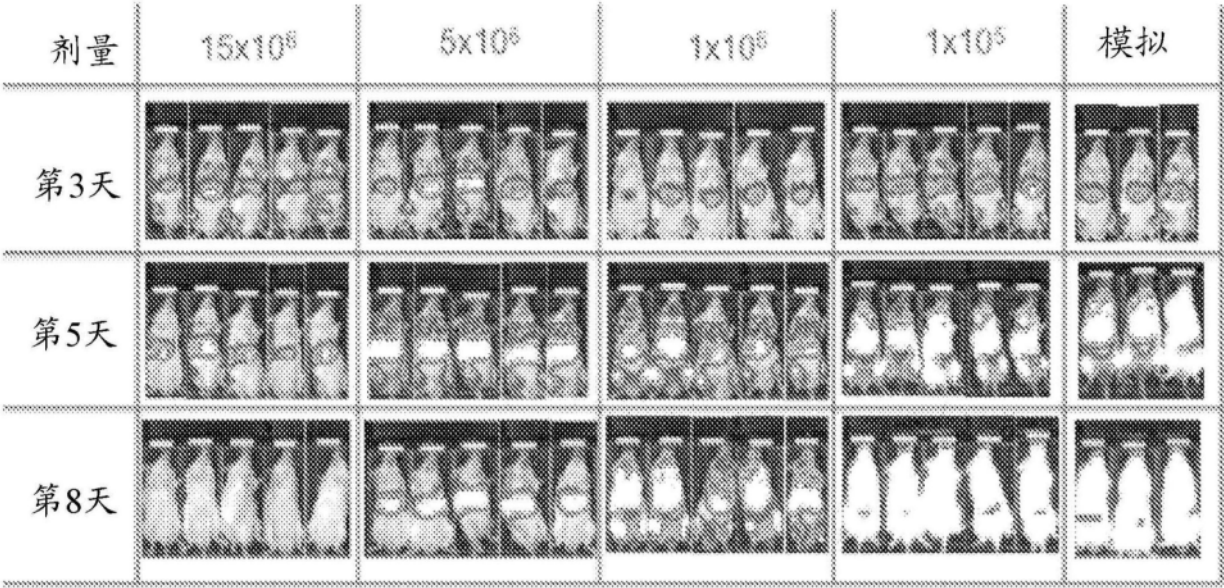


图5

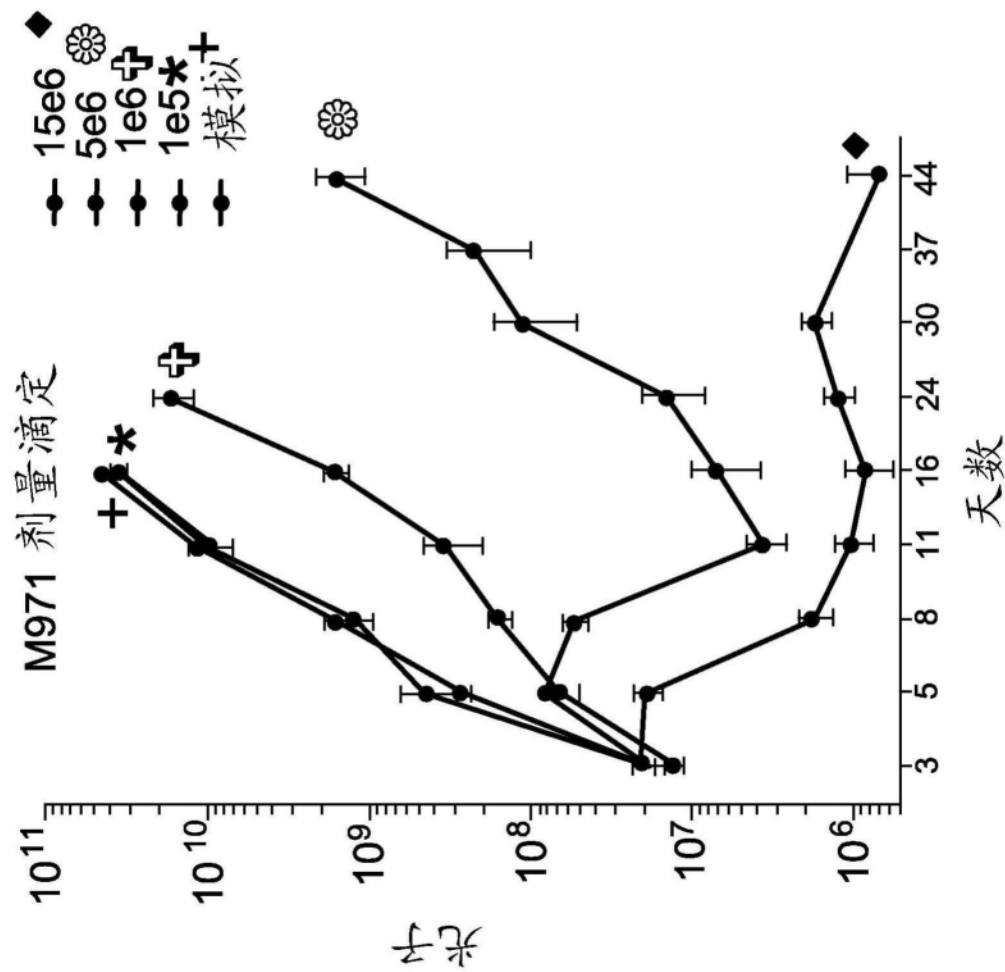


图6