



(10) 授权公告号 CN 111094349 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 07

(21) 申请号 201880056053.1

沃尔夫冈·乌克特

(22) 申请日 2018.08.23

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理师 钟海胜 宋琴芝

申请公布号 CN 111094349 A

(43) 申请公布日 2020.05.01

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C07K 16/28 (2006.01)

17187554.5 2017.08.23 EP

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2020.02.21

W0 2016090034 A2, 2016.06.09

(86) PCT国际申请的申请数据

Hossein Panjideh等. “Immunotherapy of B-cell non-Hodgkin lymphoma by targeting the chemokine receptor CXCR5 in a preclinical mouse model”. 《Tumor Immunology》. 第第135卷卷 (第第135卷期), 参见摘要.

PCT/EP2018/072750 2018.08.23

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 刘婷

W02019/038368 EN 2019.02.28

(73) 专利权人 马克思-德布鲁克-分子医学中心

亥姆霍兹联合会

地址 德国柏林

(72) 发明人 乌塔·霍普肯 阿明·雷姆

权利要求书3页 说明书44页

尤利娅·布卢姆

序列表46页 附图16页

(54) 发明名称

嵌合抗原受体和结合CXCR5的CAR-T细胞

(57) 摘要

本发明涉及分离的嵌合抗原受体多肽 (CAR), 其中CAR包含胞外抗原结合域, 该胞外抗原结合域包含结合人CXC趋化因子受体5型 (CXCR5) 蛋白的抗体或抗体片段。本发明进一步涉及编码本发明的CAR的核酸分子、表达本发明的CAR的遗传修饰的免疫细胞, 优选T细胞、以及所述细胞在治疗与表达CXCR5的致病性细胞的存在有关的医学病症中的用途, 所述表达CXCR5的致病性细胞优选为致病性成熟B细胞和/或记忆B细胞和/或致病性T细胞和/或滤泡辅助性T细胞, 特别是成熟B细胞非霍奇金淋巴瘤 (B-NHL), T细胞非霍奇金淋巴瘤、或自身抗体依赖性自身免疫疾病, 优选选自系统性红斑狼疮 (SLE) 或类风湿性关节炎。

1. 一种嵌合抗原受体 (CAR) 多肽, 包含:

i. 胞外抗原结合域, 所述胞外抗原结合域包含与CXC趋化因子受体5型 (CXCR5) 蛋白结合的抗体或抗体片段,

ii. 跨膜域, 和

iii. 胞内域,

其中, 所述抗原结合域包含可变重链 (VH) 以及可变轻链 (VL), 所述VH包含:

- 根据SEQ ID NO.1 (GFTFSTSG) 的重链互补决定区1 (H-CDR1),

- 根据SEQ ID NO.2 (ISSSSGFV) 的重链互补决定区2 (H-CDR2), 和

- 根据SEQ ID NO.3 (ARSEAAF) 的重链互补决定区3 (H-CDR3),

所述VL包括:

- 根据SEQ ID NO.4 (KSRLSRMGITP) 的轻链互补决定区1 (L-CDR1),

- 根据SEQ ID NO.5 (RMS) 的轻链互补决定区2 (L-CDR2), 和

- 根据SEQ ID NO.6 (AQFLEYPPT) 的轻链互补决定区3 (L-CDR3)。

2. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体 (CAR) 多肽, 其包含:

VH域, 所述VH域与如下的SEQ ID NO.7具有至少90%的序列同一性:

EVQLVESGGGLVQPGX1SLX2LSCX3ASGFTFSTSGMX4WFRQAPGKGLX5WVX6YISSSSGFVYADX7VKGRFTISRDNAX8LYLQX9NSLX10X11EDTAX12YYCARSEAAFVGQGTTLTVSS,

其中, X1:G或K; X2:R或K; X3:A或S; X4:N或H; X5:E或D; X6:S或A; X7:S或A; X8:S或T; X9:M或L; X10:R或K; X11:A或S; X12:V或I;

和VL域, 所述VL域与如下的SEQ ID NO.8具有至少90%的序列同一性:

DIVLTQX1PRSX2PVTPGEX3ASISCRSX4KSRLSRMGITPLNWYLQKPGX5SPQLLIYRMSNX6ASGVPDRFSGSGSX7TDFTLKISKVETEDVGVIYCAQFLEYPPTFGSGTKLEIK,

其中, X1:S或A; X2:L或V; X3:P或S; X4:S或N; X5:Q或K; X6:R或L; X7:G或E,

其中, 所述VH域包含根据SEQ ID NO.1的H-CDR1、根据SEQ ID NO.2的H-CDR2和根据SEQ ID NO.3的H-CDR3的CDR序列; 并且所述VL域包含根据SEQ ID NO.4的L-CDR1、根据SEQ ID NO.5的L-CDR2和根据SEQ ID NO.6的L-CDR3的CDR序列。

3. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体 (CAR) 多肽, 其包含:

根据如下SEQ ID NO.9的VH域:

EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSTSGMNWFRQAPGKGLEWVSYISSSSGFVYADSVKGRFTISRDNAXNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEAAFVGQGTTLTVSS, 或

根据如下SEQ ID NO.10的VH域:

EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCASGFTFSTSGMHWFRQAPGKGLDWVAYISSSSGFVYADAVKGRFTISRDNAXNTLYLQLNSLKSIEDTAIYYCARSEAAFVGQGTTLTVSS;

以及根据如下SEQ ID NO.11的VL域:

DIVLTQSPRSLPVTPGEPASISCRSSKSRSLRMGITPLNWYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISKVETEDVGVIYCAQFLEYPPTFGSGTKLEIK, 或

根据如下SEQ ID NO.12的VL域:

DIVLTQAPRSVSVTPGESASISCRSNKSRSLRMGITPLNWYLQKPGKSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISKVETEDVGVIYCAQFLEYPPTFGSGTKLEIK。

4. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体 (CAR) 多肽, 其中, 当所述CAR在遗传修饰的免疫细胞中表达时, 所述免疫细胞结合在表达CXCR5的细胞表面上的CXCR5并被活化, 从而诱导针对所述表达CXCR5的细胞的细胞毒活性。

5. 根据权利要求4所述的嵌合抗原受体 (CAR) 多肽, 其中, 所述表达CXCR5的细胞为DOHH-2、OCI-Ly7、SU-DHL4、JeKo-1、JVM-3、MEC-1和/或SC-1细胞系。

6. 根据权利要求4所述的嵌合抗原受体 (CAR) 多肽, 其中, 所述遗传修饰的免疫细胞为T淋巴细胞。

7. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体 (CAR) 多肽:

- 其中, 所述胞外抗原结合域包含位于VH域和VL域之间的接头多肽, 其中所述接头选自根据SEQ ID NO.13的惠特洛 (Whitlow), 或根据SEQ ID NO.14的Gly-Ser接头; 和/或

- 另外包含位于胞外抗原结合域和跨膜域之间的间隔区多肽, 其中所述间隔区选自:

a. 根据SEQ ID NO.15的IgG1间隔区,

b. 根据SEQ ID NO.16的IgG1 Δ 间隔区,

c. 根据SEQ ID NO.17的IgG4间隔区,

d. 根据SEQ ID NO.18的IgG4间隔区, 或

e. 根据SEQ ID NO.19的IgG4间隔区; 和/或

- 其中, 所述跨膜域选自根据SEQ ID NO.20的CD8 α 域或根据SEQ ID NO.21的CD28域; 和/或

- 其中, 所述胞内域包含共刺激域, 所述共刺激域选自根据SEQ ID NO.22的4-1BB共刺激域, 或根据SEQ ID NO.23的CD28共刺激域, 或包含相邻排列的根据SEQ ID NO.22的4-1BB和根据SEQ ID NO.23的CD28共刺激域两者的共刺激域; 和/或

- 另外包含信号传导域, 其中, 所述信号传导域是根据SEQ ID NO.24的CD3 ζ 信号传导域。

8. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体 (CAR) 多肽, 其包含SEQ ID NO.25、26、27、28或29中的任一个序列或由SEQ ID NO.25、26、27、28或29中的任一个序列组成。

9. 一种编码根据权利要求1所述的嵌合抗原受体 (CAR) 多肽的核酸分子。

10. 根据权利要求9所述的核酸分子, 包含胞外抗原结合域、跨膜域和胞内域, 其中, 所述胞外抗原结合域由SEQ ID NO.37、53或38中的至少一个序列和SEQ ID NO.39、54或40中的至少一个序列编码, 或所述核酸分子包含根据SEQ ID NO.31、32、33、34或35的序列。

11. 一种遗传修饰的免疫细胞, 包含根据权利要求9或10所述的核酸分子和/或表达根据权利要求1所述的CAR。

12. 根据权利要求11所述的遗传修饰的免疫细胞, 其中, 所述免疫细胞选自由T淋巴细胞和NK细胞组成的组。

13. 根据权利要求12所述的遗传修饰的免疫细胞, 其中, 所述T淋巴细胞为细胞毒性T淋巴细胞。

14. 根据权利要求11至13中任一项所述的遗传修饰的免疫细胞在制备用于治疗与表达CXCR5的致病性细胞的存在有关的医学病症中的用途, 其中, 所述医学病症为:

- B细胞非霍奇金淋巴瘤 (B-NHL);

- T细胞非霍奇金淋巴瘤;

-B细胞源性淋巴增生性疾病,其选自由急性成淋巴细胞白血病(B-ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)组成的组;

-T细胞源性淋巴增生性疾病,其选自由血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤和具有白血病播散的T细胞淋巴瘤组成的组;或

-自身抗体依赖性自身免疫疾病,其选自系统性红斑狼疮(SLE)或类风湿性关节炎。

嵌合抗原受体和结合CXCR5的CAR-T细胞

[0001] 描述

[0002] 本发明涉及分离的嵌合抗原受体多肽 (CAR), 其中CAR包含胞外抗原结合域, 该胞外抗原结合域包含结合CXC趋化因子受体5型 (CXC chemokine receptor type 5, CXCR5) 蛋白的抗体或抗体片段。本发明进一步涉及编码本发明的CAR的核酸分子, 表达本发明的CAR的遗传修饰的免疫细胞, 优选T细胞, 以及所述细胞在治疗与表达CXCR5的致病性细胞的存在有关的医学病症中的用途, 所述表达CXCR5的致病性细胞优选为致病性成熟B细胞和/或记忆B细胞和/或致病性T细胞和/或滤泡辅助性T细胞, 特别是成熟B细胞非霍奇金淋巴瘤 (B-NHL), T细胞非霍奇金淋巴瘤、或自身抗体依赖性自身免疫疾病, 所述自身抗体依赖性自身免疫疾病优选选自系统性红斑狼疮 (SLE) 或类风湿性关节炎。

背景技术

[0003] B-NHL是异质性的, 并且可以通过侵袭性和惰性过程来区分。护理标准通常是抗体/化学疗法的组合, 可以单独使用, 也可以与自体干细胞移植、免疫调节药物、放射线、蛋白酶体抑制剂、信号传导途径抑制剂结合使用, 并且对于极少数患者, 应用同种异体干细胞移植。因为在许多B-NHL实体中, 诊断时的中位年龄>66至72岁, 所以还存在合并症, 因而无法进行密集和长期的化学疗法, 甚至不能进行同种异体骨髓移植。

[0004] 在成熟B细胞淋巴瘤中, B细胞受体 (BCR) 信号传导抑制剂, 最重要的是依鲁替尼等, 在缓解率方面取得了巨大进步。尽管最初对这类激酶抑制剂具有高敏感性, 但尚不确定能否根除肿瘤; 其次, 几项研究表明, 克隆性淋巴瘤和白血病的演化导致对布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 抑制产生抗性。因此, 针对靶向疗法的继发性抗性的迅速出现表明迫切需要找到可耐受的挽救疗法的方案, 该方案尤其适用于已接受几种其他化学疗法治疗, 因而临床表现 (IPI评分) 降低的患者。

[0005] 靶向白血病和淋巴瘤B细胞上广泛表达的CD19抗原的过继性嵌合抗原受体 (CAR) - T细胞疗法带来了实质性的临床疗效, 目前, FDA已注册40多项CD19 CAR-T细胞研究用于治疗B-NHL和B-ALL (www.clinicaltrials.gov)。但是, 在直接针对B-NHL的抗CD19抗体或CAR-T细胞疗法中, 由于抗原丢失, 而产生抗性。最近的研究表明, 在抗CD19 CAR-T细胞治疗后, 出现了由于选择了替换剪接的CD19同种型而导致的逃逸变体, 因此丧失了相关的CD19 CAR表位。

[0006] 因此, 除了现有的治疗性单克隆抗体或CAR-T细胞疗法外, CXCR5成为B细胞淋巴瘤免疫疗法的替代靶标。

[0007] 具有明显淋巴结寄生 (nodal lodging) 的B细胞源性淋巴增生性疾病, 例如急性成淋巴细胞白血病 (B-ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、滤泡性淋巴瘤 (FL)、套细胞淋巴瘤 (MCL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 经常表达内稳态趋化因子受体CXCR5。CXCR5在成熟的循环B细胞和一小部分CD4⁺T细胞 (滤泡辅助性T细胞 (Tfh)) 上生理表达, 并调节其向次级淋巴器官内的B细胞滤泡的自我稳态贩运和归巢。重要的是, CXCR5不在骨髓 (BM) 内的B细胞前体上表达, 浆细胞也不表达该受体。

[0008] 就本发明人所知,先前没有描述可供选择的抗CXCR5 CAR构建体,并且目前没有与本发明的医学方法有关的抗CXCR5抗体研究。

[0009] Panjideh等人(国际癌症期刊(International Journal of Cancer),第135卷,第11期,2014年4月29日)描述了CXCR5双特异性抗体在治疗非霍奇金淋巴瘤中的用途。Sadelain等人(癌症发现(Cancer Discovery),第3卷,第4期,2013年4月1日)对各种CAR技术进行了综述,但未提到CXCR5。WO 2016/090034公开了CAR构建体的多个可能靶标。提及了CD185 (CXCR5),但没有有关CAR组件、医疗用途的任何细节或完全没有提到靶标相关性。WO 2016/164731描述了针对多种B细胞靶抗原的CAR-T细胞的用途。没有提及CXCR5作为CAR T靶标。

[0010] 诸如上述那些医学病症的替代疗法正在开发或目前已经建立,例如抗CD19 CAR构建体、标准疗法如细胞毒性化学疗法、皮质类固醇、免疫调节剂(如IMiD)、蛋白酶体抑制剂、自体干细胞移植、同种异体干细胞移植、信号传导抑制剂和针对CD20的抗体利妥昔单抗和抗CD19的欧来吐单抗(Oletuzumab)以及包括靶向CD19的Fab片段和抗CD3片段的双特异性抗体(BITE)(博纳吐单抗)。

[0011] 尽管针对致病性B细胞和T细胞的疾病,许多潜在的替代疗法正在开发中,但是仍然强烈需要提供解决这样的医学病症的有效手段。

发明内容

[0012] 鉴于现有技术,本发明所基于的技术问题是提供适合于治疗与致病性B细胞和/或T细胞相关的疾病,特别是非霍奇金淋巴瘤或自身抗体依赖性自身免疫疾病的药剂。

[0013] 该问题通过独立权利要求的特征解决。本发明的优选实施方式由从属权利要求提供。

[0014] 因此,本发明涉及一种嵌合抗原受体多肽(CAR),包括:

[0015] i. 胞外抗原结合域,包含与CXC趋化因子受体5型(CXCR5)蛋白结合的抗体或抗体片段,

[0016] ii. 跨膜域,和

[0017] iii. 胞内域。

[0018] 因此,本发明涉及抗CXCR5 CAR构建体和表达所述构建体的相应免疫细胞,优选在赋予人T细胞对确定的成熟B-NHL具有高细胞毒活性的同时保留正常的造血细胞例如T细胞(除本文所述的Tfh或其他T细胞淋巴瘤之外)、血浆B细胞及其骨髓前体的CAR-T细胞产物。在优选的实施方式中,所有髓样细胞和NK细胞同样被保留;因为本发明的CAR-T细胞产物对这些细胞没有活性。

[0019] 在本发明的免疫疗法的优选实施方式中,优选地用逆转录病毒(retrovirally)转导患者来源的T细胞以表达如本文所述的人工免疫受体,该人工免疫受体由以下组成:胞外抗体来源的抗原识别部分,其融合于跨膜部分;然后是胞内信号传导域。因此,本文所述的构建体赋予转导的T细胞抗肿瘤溶细胞能力。

[0020] 由于T细胞的优选的自体转移,因此在使用本发明的CAR-T治疗时不能发生移植物抗宿主疾病。可以发展记忆T细胞形成,这对预防复发很重要的。

[0021] 这样的成熟的B-NHL实体包括但不限于某些阶段的滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞

淋巴瘤、套细胞淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病。

[0022] 抗CXCR5 CAR-T细胞将首次能够在肿瘤微环境中靶向肿瘤细胞,因为促进淋巴瘤生长的Tfh细胞将会同时被根除。给定肿瘤实体内的肿瘤细胞对靶抗原CXCR5均是阳性的,因此排除了不需要的对低表达/不表达肿瘤细胞的阳性选择。

[0023] 在优选的实施方式中,本文所述的抗CXCR5 CAR-T细胞适用于治疗不适合其他疗法的成熟B-NHL患者。更具体地,本发明的实施方式涉及以下患者集的治疗:

[0024] i) 具有多药耐药性的患者,

[0025] ii) 不符合同种异体干细胞移植条件的患者,

[0026] iii) 具有无法进行进一步的化学疗法的合并症的患者,

[0027] iv) 不耐受化学疗法的老年患者,

[0028] v) 甚至在进行性疾病和多种其他标准护理疗法失败后,CAR也适用于抢救疗法,

[0029] vi) 甚至适用于抗体可能失效的在靶肿瘤细胞上的抗原密度低的情况,和/或

[0030] vii) 适用于作为对抗体来说并非如此的单一疗法。

[0031] 本文所述的抗CXCR5 CAR赋予T细胞抗肿瘤功效所必需的高亲和力。已经证明本发明的抗CXCR5 CAR不针对生理血浆B细胞、T细胞(除Tfh细胞和表达特定病理性CXCR5的T细胞之外)、NK细胞、所有髓样细胞谱系及其前体赋予T细胞反应性。因此,本发明对其他造血组织具有前所未有的低脱靶反应性。

[0032] 与抗CD19 CAR-T细胞相反,本发明的抗CXCR5 CAR对未成熟的B-NHL、前体B细胞瘤形成或生理良性B细胞前体没有不需要的反应性。

[0033] 如以下实施例所示,在体外共培养体系中,抗CXCR5 CAR-T细胞在暴露于表达CXCR5的人B-NHL肿瘤细胞系时活化。然后,这些T细胞形成高水平分泌IFN- γ 的效应表型,该表型预测细胞毒性活性。

[0034] 另外,针对所选靶细胞系,B-NHL、B和T细胞白血病、CXCR5阴性细胞和CXCR5转染子的细胞毒性测定(51Cr释放)表明,仅在对CXCR5呈阳性的细胞系中获得了选择性细胞毒性。

[0035] 其他临床前测试包括:i) 对来自患者的合适的B-NHL细胞系进行体外细胞毒性测试,以及ii) 对异种移植的B-NHL细胞系进行抗CXCR5 CAR活性的体内测试。

[0036] 因此,本发明的CAR代表了用于治疗本文所述医学病症的令人惊讶且有益的方法。抗CXCR5 CAR以前尚未被尝试使用或被描述为治疗NHL的有前途的方法。由于标志物的选择性,最小的(如果不是不存在的话)不希望的副作用也代表了本发明的有益和令人惊讶的方面。特别是在已经产生了对抗CD19治疗抗性的患者中,本发明代表了非常有希望的消除恶性肿瘤的方法。

[0037] 在一种实施方式中,本发明涉及如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)多肽,其中当所述CAR在遗传修饰的免疫细胞,优选T淋巴细胞中表达时,所述免疫细胞结合在表达CXCR5的细胞表面上的CXCR5并活化,从而诱导针对所述表达CXCR5的细胞的细胞毒活性。

[0038] 表达CXCR5的细胞的实例是技术人员已知的,并且可以通过进一步筛选癌症或其他致病性细胞来鉴定。表达CXCR5的细胞系优选是DOHH-2、OCI-Ly7、SU-DHL4、JeKo-1、JVM-3、MEC-1和/或SC-1。

[0039] 在一种实施方式中,本发明涉及嵌合抗原受体多肽(CAR),其包含:

[0040] -胞外抗原结合域,包含结合CXC趋化因子受体5型(CXCR5)蛋白的抗体或抗体片

段,其中所述抗体或抗体片段包含单链抗体片段的VH和VL域,其中优选地,接头多肽位于VH和VL域之间,其中所述接头优选被构造为不干扰抗体片段-CXCR5抗原相互作用;

[0041] -间隔区多肽(也称为铰链),位于胞外抗原结合域和跨膜域之间,其中所述间隔区多肽优选构造为当所述CAR在表达所述CAR的T细胞中表达时不干扰抗体片段-CXCR5抗原相互作用和/或T细胞活化;

[0042] -跨膜域,其中所述跨膜域优选被构造为当所述CAR在表达所述CAR的T细胞中表达时不干扰抗体片段-CXCR5抗原相互作用和/或T细胞活化;

[0043] -和胞内域,其中所述胞内域包含共刺激域和信号传导域,其中所述胞内域优选被构造为例如通过增加细胞因子产生和/或促进T细胞复制而与CXCR5靶标结合时提供信号以刺激T细胞活化,从而导致细胞毒性作用。

[0044] 因此,本发明的CAR可以采用各种形式,包括用于本文所述的每个功能域的可能不同的蛋白质序列。技术人员能够例如基于以下实施例中证明的实验方法来选择和测试CAR的期望功能。因此,本领域技术人员可以使用常规方法来评估在本文讨论的任何功能域中待用于本发明的CAR的任何给定的特定蛋白质序列的功能功效。例如,可以使用各种位于VH和VL域之间的接头多肽序列、各种位于胞外抗原结合域和跨膜域之间的间隔区多肽序列(也称为铰链)、各种跨膜域和优选包含共刺激域和信号传导域的各种胞内域。

[0045] 在本发明的实施方式中,CAR以及本文提及的每个元件或域被构造为,不有害地干扰抗体片段-CXCR5抗原相互作用,当所述CAR在表达所述CAR的T细胞中表达时不有害地干扰T细胞活化,并且在与CXCR5靶标结合时不有害地干扰CAR提供信号来刺激T细胞活化。

[0046] 本文描述了用于评估CXCR5 CAR的这些性质的实验方法,使得本发明被认为涵盖各种功能序列变体和本文描述的类型的域的组合,而限于通过以下实例公开的特定序列。例如,可以通过IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的释放来证明表达CXCR5的肿瘤细胞对本发明的CAR-T细胞的特异性活化,如下所示。

[0047] 就本发明人的知识,本发明涉及首次描述的CXCR5 CAR,以及CXCR5CAR在医学环境中所期望的治疗效果的第一功能性证据。与本文所述的各种功能域中采用的特定序列无关,CXCR5 CAR的单独提供代表了在治疗与致病性成熟B细胞和/或记忆B细胞和/或致病性T细胞和/或滤泡辅助性T细胞相关的许多疾病中的重大且有益的突破。

[0048] 与CAR的抗原结合域有关的实施方式:

[0049] 在一种实施方式中,本发明涉及如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)多肽,其中所述抗原结合域包含可变重链(VH),所述VH包含:

[0050] -与SEQ ID NO 1(GFTFSTSG)具有至少80%序列同一性的重链互补决定区1(H-CDR1),

[0051] -与SEQ ID NO 2(ISSSSGFV)具有至少80%序列同一性的重链互补决定区2(H-CDR2),和

[0052] -与SEQ ID NO 3(ARSEAAF)具有至少80%序列同一性的重链互补决定区3(H-CDR3),

[0053] 以及可变轻链(VL),所述VL包括:

[0054] -与SEQ ID NO 4(KSRLSRMGITP)具有至少80%序列同一性的轻链互补决定区1(L-CDR1),

[0055] -与SEQ ID NO 5(RMS)具有至少66%序列同一性的轻链互补决定区2(L-CDR2),和
[0056] -与SEQ ID NO 6(AQFLEYPT)具有至少80%序列同一性的轻链互补决定区3(L-CDR3)。

[0057] 在一种实施方式中,本发明涉及如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)多肽,其包含:VH域,所述VH域包含SEQ ID NO.1、SEQ ID No.2和SEQ ID NO.3的CDR序列;和VL域,所述VL域包含SEQ ID NO.4、SEQ ID No.5和SEQ ID NO.6的CDR序列。

[0058] 在优选的实施方式中,与SEQ ID NO 1至6的特定CDR序列具有80%或更高序列同一性的序列变体保持与CXCR5结合,并且与具有SEQ ID NO 1至6的特定CDR序列的VH和VL域的功能特性基本上相同或相似,即,在亲和力、特异性和表位结合方式方面,CXCR5结合基本上相同或相似。

[0059] scFV片段的氨基酸序列最初是从大鼠抗人CXCR5抗体获得的,并且在多种改进方面例如通过VL和VH链的人源化进行了修饰,以允许在跨膜受体结构的情况下折叠和表达。

[0060] 此外,轻链和重链片段的顺序可以根据抗原结合片段的期望构型而反转。

[0061] 另外,在一些实施方式中,重链和轻链之间的接头序列已经例如通过缩短而被修饰以增强CAR功能。

[0062] 另外,编码CAR的核酸序列已被密码子优化以改善CAR的表达。

[0063] 这些修饰使得能够在T细胞上进行充分的表面表达,并且仍然保持适当的抗原结合。高亲和力和高亲合力使CAR-T细胞能够i)识别具有高、中或低CXCR5表面表达的肿瘤靶细胞,ii)针对具有高、中或低CXCR5表面表达的肿瘤靶细胞而活化,以及iii)杀死具有高、中或低CXCR5表面表达的肿瘤靶细胞。

[0064] 就本发明人所知,抗CXCR5 CAR和人源化抗CXCR5抗体之前均未在本领域中被描述。

[0065] 由于本文所述的抗CXCR5 CAR-T细胞的抗原结合域的高亲和力(affinity)和亲合力(avidity),即使低表达CXCR5的成熟B-NHL也可以被识别,从而允许T细胞活化和肿瘤细胞杀伤。

[0066] 本文所述的抗CXCR5 CAR-T细胞产物的特征在于独特的性质。

[0067] 如本文所述的抗CXCR5 CAR具有高亲和力并且赋予T细胞高特异性和亲合力(avidity)。这些特性使CAR-T细胞能够i)识别具有高和低CXCR5表面表达的肿瘤靶细胞,ii)针对具有高和低CXCR5表面表达的肿瘤靶细胞而活化,以及iii)杀死具有高和低CXCR5表面表达的肿瘤靶细胞。

[0068] 可以通过使用与荧光染料偶联的抗CXCR5抗体,结合Quantibrite珠子(来自Becton Dickinson)来定量在肿瘤细胞表面表达的CXCR5抗原的数量。用于定量在肿瘤细胞表面表达的CXCR5抗原的优选方法是“荧光活化细胞分选/细胞分析”(FACS)。珠子的荧光强度与结合到细胞上的荧光抗体的数量精确相关,这是细胞上的CXCR5分子的数量度量。

[0069] 本文所述的VH和VL片段可以在CAR中以多种构型排列,并且仍保持对靶表位的高特异性和高亲和力。在一些实施方式中,CAR可以以VH-VL或VL-VH构型构造,在接头、铰链、跨膜域、共刺激域和/或活化域中变化,并且仍保持其功效。本发明的这一令人惊讶的特征使得直接针对CXCR5的CAR的设计具有更大的灵活性,从而如果有必须要或期望任何进一步的开发,则能够基于本文所述的VH和VL域进一步修饰和/或优化CAR结构。

[0070] 大鼠和人源化序列的序列比对在图4中示出。因此,以下序列还包括代表大鼠和人源化形式的抗原结合域的通用序列。在以下序列中,每个X代表潜在的氨基酸变化。优选的氨基酸取代是针对每个潜在改变的位置所描述的那些。

[0071] 本发明涵盖了本文提出的任何给定的潜在变异残基的潜在修饰的所有可能组合(如“通用序列”中的X所示的)。通过组合这些取代中的一种或多种,可以产生表现出本文所证明的大鼠抗原结合域的期望的结合特性的人源化变体。本文所述的CAR或其部分还包括与明确公开或通过序列式公开的人源化序列具有至少70%、80%、优选90%的序列同一性的序列。

[0072] 在一种实施方式中,本发明涉及如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)多肽,其包含:

[0073] VH域,所述VH域与如下的SEQ ID NO 7具有至少70%、80%的序列同一性,优选至少85%、90%、95%或100%的序列同一性:

[0074] EVQLVESGGGLVQPGX1SLX2LSCX3ASGFTFSTSGMX4WFRQAPGKGLX5WVX6YISSSSGFVYADX7VKGRFTISRDNAX8LYLQX9NSLX10X11EDTAX12YYCARSEAAFWGQGTTLVTVSS,

[0075] 其中X1至X12可以是任何氨基酸,优选X1:G或K,X2:R或K,X3:A或S,X4:N或H,X5:E或D,X6:S或A,X7:S或A,X8:S或T,X9:M或L,X10:R或K,X11:A或S,X12:V或I;

[0076] 和VL域,所述VL域与如下的SEQ ID NO 8具有至少80%的序列同一性,优选至少85%、90%、95%或100%的序列同一性:

[0077] DIVLTQX1PRSX2PVTPGEX3ASISCRSX4KSRLSRMGITPLNWYLQKPGX5SPQLLIYRMSN6ASGVPDRFSGSGSX7TDFTLKISKVETEDVGVYYCAQFLEYPPTFGSGTKLEIK,

[0078] 其中X1至X7可以是任何氨基酸,优选X1:S或A,X2:L或V,X3:P或S,X4:S或N,X5:Q或K,X6:R或L,X7:G或E。

[0079] 在优选的实施方式中,与本文列出的特定VH和VL序列具有80%或更高序列同一性的序列变体保持与CXCR5结合,并且与具有本文所列举的特定序列的VH和VL域的功能特性基本上相同或相似,即,在亲和力、特异性和表位结合方式方面,CXCR5结合基本上相同或相似。

[0080] 在一种实施方式中,本发明涉及如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)多肽,其包含:

[0081] -VH域,根据如下的SEQ ID NO 9

[0082] (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMNWFRQAPGKGLEWVSYISSSSGFVYADSVKGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEAAFWGQGTTLVTVSS)

[0083] -或根据如下的SEQ ID NO 10

[0084] (EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSASGFTFSTSGMHWFRQAPGKGLDWVAYISSSSGFVYADAVKGRFTISRDNALNTLYLQLNSLKSEDTAIYYCARSEAAFWGQGTTLVTVSS);

[0085] -以及VH域,根据如下的SEQ ID NO 11

[0086] (DIVLTQSPRSLPVTPGEPASISCRSSKSRLSRMGITPLNWYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVDRFSGSGSDTFTLKISKVETEDVGVYYCAQFLEYPPTFGSGTKLEIK)

[0087] -或根据如下的SEQ ID NO 12

[0088] (DIVLTQAPRSVSVTPGESASISCRSNKSRLSRMGITPLNWYLQKPGKSPQLLIYRMSNLASGVDRFSGSGSETDFTLKISKVETEDVGVYYCAQFLEYPPTFGSGTKLEIK)。

[0089] 在其他实施方式中,本发明涉及嵌合抗原受体(CAR)多肽,其包含一个或多个接

头、间隔区、跨膜域和信号传导域。在一种实施方式中, CAR包含胞内域, 该胞内域包含共刺激域和信号传导(活化)域。

[0090] 在一种实施方式中, 本发明涉及如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)多肽, 其中所述胞外抗原结合域包含位于VH和VL域之间的接头多肽, 其中所述接头优选选自:

[0091] -惠特洛(Whitlow)(SEQ ID NO 13; GSTSGSGKPGSGEGSTKG), 或

[0092] -Gly-Ser(SEQ ID NO 14; SSGGGSGGGSGGGGS)接头, 或

[0093] -与SEQ ID NO 13或14具有至少80%的序列同一性的接头。

[0094] 在一种实施方式中, 本发明涉及如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)多肽, 其还包含位于胞外抗原结合域和跨膜域之间的间隔区多肽, 其中所述间隔区选自:

[0095] -IgG1间隔区(SEQ ID NO 15:

[0096] PAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHN
HYTQKSLSLSPGKKDPK),

[0097] -IgG1 Δ 间隔区(SEQ ID NO 16:

[0098] PAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHN
HYTQKSLSSLSGK),

[0099] -IgG4(Hi-CH2-CH3)间隔区(SEQ ID NO 17:

[0100] ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSLGK),

[0101] -IgG4(Hi-CH3)间隔区(SEQ ID NO 18:

[0102] ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK),

[0103] -IgG4(Hi)间隔区(SEQ ID NO 19; ESKYGPPCPPCP) 或

[0104] -与SEQ ID NO 15至19中的任一个具有至少80%的序列同一性的间隔区。

[0105] 在一种实施方式中, 本发明涉及如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)多肽, 其中所述跨膜域选自:

[0106] -CD8 α 域(SEQ ID NO 20; IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC), 或

[0107] -CD28域(SEQ ID NO 21; FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV), 或

[0108] -与SEQ ID NO 20或21具有至少80%的序列同一性的跨膜域。

[0109] 在一种实施方式中, 本发明涉及如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)多肽, 其中所述胞内域包括:

[0110] -共刺激域, 其选自4-1BB共刺激域(SEQ ID NO 22:

[0111] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL), 和/或

[0112] -CD28共刺激域(SEQ ID NO 23:

[0113] RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSL), 或

[0114] -同时包含相邻排列的4-1BB(SEQ ID NO 22)和CD28共刺激域(SEQID NO 23)的共刺激域, 或

[0115] -与SEQ ID NO 22或23具有至少80%的序列同一性的共刺激域。

[0116] 在一种实施方式中, 本发明涉及如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)多肽, 其另外包含信号传导域(也称为活化域), 其中所述信号传导域是

[0117] -CD3 ζ (4-1BB或CD28)信号传导域(SEQ ID NO 24; LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRR EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR), 或

[0118] -与SEQ ID NO 24具有至少80%的序列同一性的信号传导域。

[0119] 在一种实施方式中, 本发明涉及如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)多肽, 其包含根据SEQ ID NO 25、26、27、28或29中任一个的序列。

[0120] 信号传导域的交换满足了对强而快速的效应阶段(CD28共刺激域)或由T细胞记忆群保证的长期复发控制(4-1BB信号域)的需求。如本文所证明的, 各种信号传导域可以以多种构型交换, 从而在其设计方面为CAR提供了灵活性, 而没有丧失有利的结合特性。

[0121] 在本发明的其他实施方式中, CAR可以包括以下构型:

[0122] -H28:MP71-hCXCR5-VH-惠特洛(Whitlow)-VL-IgG1-CD28-CD28-CD3 ζ

[0123] -R28:MP71-ratCXCR5-VH-惠特洛(Whitlow)-VL-IgG1-CD28-CD28-CD3 ζ

[0124] -HBB1:MP71-hCXCR5-VH-惠特洛(Whitlow)-VL-IgG1 Δ -CD8 α -4-1BB-CD3 ζ

[0125] -HBB2:MP71-hCXCR5-VH-惠特洛(Whitlow)-VL-IgG1-CD28-4-1BB-CD3 ζ

[0126] -H28BB:MP71-hCXCR5-VH-惠特洛(Whitlow)-VL-IgG1-CD28-CD28-4-1BB-CD3 ζ

[0127] 特定构型旨在作为优选但非限制性的实施方式。以上构型也不旨在被本文描述的那些实施方式的特定序列所限制。在这些构型的情况下, 序列变化是可能的, 并且被本发明的范围所涵盖。

[0128] 由于用作接头、间隔区、跨膜域和胞内域的变体(通过添加可供选择的组件), 显而易见的是, 本领域技术人员可以按需要交换各种组件, 并且可以保持CXCR5结合特性, 从而保持所期望的生物学效应。

[0129] 在优选的实施方式中, 与MP71-载体和 γ -逆转录病毒表达系统结合, 可以实现对人T细胞的异常高的转导率。转导系统由于CAR构建体的模块化设计而可变, 这意味着慢病毒以及转座子均可使用, 这取决于技术人员在实施本发明时的需要和偏好。用于CXCR5 CAR的遗传信息/核酸分子的转移还包括CrispR/Cas和TALEN介导的插入靶细胞系, 优选T淋巴细胞、自然杀伤细胞和诱导性多能干细胞iPS。本发明涵盖将CXCR5 CAR的遗传信息/核酸分子转移到表达所述CAR的细胞中的所有合适方法, 本领域技术人员在实施本发明时可以选择合适的方法。例如, 转化T细胞的多种方法是本领域已知的, 包括任何给定的基于病毒的基因转移方法(例如基于修饰的逆转录病毒科的方法)以及非病毒方法(例如基于DNA的转座子和通过电穿孔直接转移mRNA的方法)。

[0130] 另外, 已经以三步克隆程序交换了CAR构建体的信号传导组件, 该三步克隆程序允许临床上可应用的抗CXCR5 CAR的组件组合和由技术人员进行定制化构建。

[0131] 在本发明的另一方面, 本发明涉及分离的核酸分子, 其优选为载体的形式, 所述载

体例如病毒载体或转座子载体,优选为睡美人载体,所述分离的核酸分子选自由以下组成的组:

[0132] a) 核酸分子,包含如下的核苷酸序列

[0133] -该核苷酸序列编码根据本文所述的CAR的任何实施方式的嵌合抗原受体 (CAR) 多肽,

[0134] -该核苷酸序列编码胞外抗原结合域、跨膜域和胞内域,其中所述胞外抗原结合域由SEQ ID NO:37或38的至少一个序列和SEQ ID NO:39或40的至少一个序列编码,

[0135] -该核苷酸序列根据SEQ ID No.31、32、33、34或35,和/或

[0136] b) 与根据a)的核苷酸序列互补的核酸分子;

[0137] c) 核酸分子,包含具有足够序列同一性以与根据a)或b)的核苷酸序列在功能上类似/等价的核苷酸序列,优选地包含与根据a)或b)的核苷酸序列的序列同一性为至少80%的核苷酸序列;

[0138] d) 由于遗传密码而简并为根据a)至c)的核苷酸序列的核酸分子;和/或

[0139] e) 根据a)至d)的核苷酸序列的核酸分子,该核酸分子通过缺失、添加、取代、易位、倒位和/或插入而被修饰,并且在功能上与根据a)至d)的核苷酸序列相似/等价。

[0140] 在本发明的优选实施方式中,分离的核酸分子优选地为载体的形式,所述载体例如病毒载体或转座子载体,优选为睡美人载体,所述分离的核酸分子选自由以下组成的组:

[0141] a) 核酸分子,包含如下的核苷酸序列

[0142] -该核苷酸序列编码根据本文所述的CAR的任何实施方式的嵌合抗原受体 (CAR) 多肽,

[0143] -该核苷酸序列编码胞外抗原结合域、跨膜域和胞内域,其中所述胞外抗原结合域由SEQ ID NO:37、53或38的至少一个序列和SEQ ID NO:39、54或40的至少一个序列编码,

[0144] -该核苷酸序列根据SEQ ID No.31、32、33、34或35,和/或

[0145] b) 与根据a)的核苷酸序列互补的核酸分子;

[0146] c) 核酸分子,包含具有足够序列同一性以与根据a)或b)的核苷酸序列在功能上类似/等价的核苷酸序列,包含与根据a)或b)的核苷酸序列的序列同一性为至少80%、优选90%或95%的核苷酸序列,其中功能类似涉及结合CXCR5靶抗原,并且当相应的T细胞表达所述构建体时,CAR-T细胞产物赋予T细胞抗成熟B-NHL的细胞毒活性,同时保留正常的造血细胞,例如T细胞(除了Tfh或本文所述的其他T细胞淋巴瘤外)、血浆B细胞及其骨髓前体;和/或

[0147] d) 由于遗传密码而简并为根据a)至c)的核苷酸序列的核酸分子。

[0148] 术语简并为(或简并成)是指核酸分子的核苷酸序列的差异,但是根据遗传密码,翻译后不会导致核苷酸序列的氨基酸蛋白质产物的差异。在一种实施方式中,该核酸分子涉及符合a)和b),a)、b)和c),或a)、b)和d)的上述分子。

[0149] 本发明优选的氨基酸和核苷酸序列:

[0150]

SEQ ID No.	序列	描述
1	GFTFSTSG	H-CDR1
2	ISSSSGFV	H-CDR2
3	ARSEAAF	H-CDR3
4	KSRLSRMGITP	L-CDR1
5	RMS	L-CDR2
6	AQFLEYPPT	L-CDR3
7	EVQLVESGGGLVQPGX1SLX2LSCX3ASGFTFSTSGMX4WFRQAPG KGLX5WVX6YISSSSGFVYADX7VKGRFTISRDNAX8LYLQX9N SLX10X11EDTAX12YYCARSEAAFWGQGLTVTVSS 其中, X1: G 或 K; X2: R 或 K; X3: A 或 S; X4: N 或 H; X5: E 或 D; X6: S 或 A; X7: S 或 A; X8: S 或 T; X9: M 或 L; X10: R 或 K, X11: A 或 S; X12: V 或 I	“通用”VH 序列涵 盖大鼠和人源化 序列两者
7	EVQLVESGGGLVQPGXSLXLSCXASGFTFSTSGMXWFRQAPGKGL XWVXYISSSSGFVYADSVKGRFTISRDNAXLYLQXNSLXXEDT AXYYCARSEAAFWGQGLTVTVSS 其中, X 是任何氨基酸, 优选上述那些。	“通用”VH 序列涵 盖大鼠和人源化 序列两者
8	DIVLTQX1PRSX2PVTPGEX3ASISCRSX4KSRLSRMGITPLNWYLQ KPGX5SPQLLIYRMSNX6ASGVPDFRSGSGSX7TDFTLKISKVETED VGVIYYCAQFLEYPPTFGSGTKLEIK 其中, X1: S 或 A; X2: L 或 V; X3: P 或 S; X4: S 或 N; X5: Q 或 K; X6: R 或 L; X7: G 或 E	“通用”VL 序列涵 盖大鼠和人源化 序列两者
8	DIVLTQXPRSPVTPGEXASISCRSXKSRLSRMGITPLNWYLQKPG XSPQLLIYRMSNXASGVPDFRSGSGSXTDFTLKISKVETEDVGVIYY CAQFLEYPPTFGSGTKLEIK 其中, X 是任何氨基酸, 优选上述那些。	“通用”VL 序列涵 盖大鼠和人源化 序列两者
9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSTSGMNWFRQAPGKGL EWVSYISSSSGFVYADSVKGRFTISRDNAXSLYLQMNLSRAEDTA VYYCARSEAAFWGQGLTVTVSS	人源化 VH
10	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSASGFTFSTSGMHWFRQAPGKGL DWVAYISSSSGFVYADAVKGRFTISRDNAXNTLYLQLNSLKSEDTAI YYCARSEAAFWGQGLTVTVSS	大鼠 VH
11	DIVLTQSPRSLPVTPGEPASISCRSSKSRLSRMGITPLNWYLQKPGQS PQLLIYRMSNRASGVPDFRSGSGSGTDFTLKISKVETEDVGVIYYCA QFLEYPPTFGSGTKLEIK	人源化 VL
12	DIVLTQAPRSVSVTPGESASISCRSNKSRLSRMGITPLNWYLQKPGK SPQLLIYRMSNLASGVPDFRSGSGSETDFTLKISKVETEDVGVIYYC AQFLEYPPTFGSGTKLEIK	大鼠 VL
13	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	惠特洛 (Whitlow) 接头
14	SSGGGGSGGGGSGGGGS	Gly-Ser 接头
15	PAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGKKDPK	IgG1 间隔区
16	PAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS	IgG1Δ 间隔区

[0151]

	VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SSLSPGKK	
17	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK	IgG4 (HI-CH2-CH3) 间 隔区
18	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	IgG4 (HI-CH3) 间 隔区
19	ESKYGPPCPPCP	IgG4 (HI)间隔区
20	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	跨膜域 CD8 α
21	FWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV	跨膜域 CD28
22	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL	共刺激域 4-1BB
23	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSL	共刺激域 CD28
24	LRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	活化域 CD3 ζ (4-1BB) 或 (CD28)
25	MDFQVQIFSLLISASVIMSREVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSTSGMNWFRQAPGKGLEWVSYISSSGFVYADSVKGRFTISR NAQNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEAAFWGQGTLTVTSSGSTS GSGKPGSGEGSTKGDIVLTQSPRSLPVTGPGEASISCRSSKSRSLRM GITPLNWYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPRDFSGSGSGTDFTLK ISKVETEDVGVIYCAQFLEYPTFGSGTKLEIKPAEPKSPDKTHTCP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYPYAPPRDFAAYRSLRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	H28 MP71-hCXCR5-V H- 惠 特 洛 (Whitlow) -VL-IgG1-CD28- CD28-CD3z
26	MDFQVQIFSLLISASVIMSREVQLVESGGGLVQPGKSLKLSASG FTFSTSGMHWFRQAPGKGLDWVAYISSSGFVYADAVKGRFTISR NAQNTLYLQLNSLKSEDTAIYYCARSEAAFWGQGTLTVTSSGSTSG SGKPGSGEGSTKGDIVLTQAPRSVSVTPGESASISCRSNKSRSLRMG ITPLNWYLQKPGKSPQLLIYRMSNLASGVPRDFSGSGSETDFTLKIS KVETEDVGVIYCAQFLEYPTFGSGTKLEIKPAEPKSPDKTHTCPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYPYAPPRDFAAYRSLRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE	R28 MP71- 大 鼠 CXCR5-VH- 惠 特 洛 (Whitlow) -VL-IgG1-CD28- CD28-CD3z

[0152]

	AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
27	MDFQVQIFSFLISASVIMSREVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSTSGMNWFRQAPGKGLEWVSYISSSSGFVYADSVKGRFTISR NAQNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEAAFWGQGLTVTVSSGSTS GSGKPGSGEGSTKGDIVLTQSPRSLPVTGPGEASISCRSSKSRLSRM GITPLNWYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISKVETEDVGYYCAQFLEYPTFGSGTKLEIKPAEPKSPDKTHTCP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	HBB1 MP71-hCXCR5-V H- 惠 特 洛 (Whitlow) -VL-IgG1Δ-CD8α -4-1BB-CD3z
28	MDFQVQIFSFLISASVIMSREVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSTSGMNWFRQAPGKGLEWVSYISSSSGFVYADSVKGRFTISR NAQNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEAAFWGQGLTVTVSSGSTS GSGKPGSGEGSTKGDIVLTQSPRSLPVTGPGEASISCRSSKSRLSRM GITPLNWYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISKVETEDVGYYCAQFLEYPTFGSGTKLEIKPAEPKSPDKTHTCP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSRFPEEEEGGCELLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	HBB2 MP71-hCXCR5-V H- 惠 特 洛 (Whitlow) -VL-IgG1-CD28-4 -1BB-CD3z
29	MDFQVQIFSFLISASVIMSREVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSTSGMNWFRQAPGKGLEWVSYISSSSGFVYADSVKGRFTISR NAQNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSEAAFWGQGLTVTVSSGSTS GSGKPGSGEGSTKGDIVLTQSPRSLPVTGPGEASISCRSSKSRLSRM GITPLNWYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISKVETEDVGYYCAQFLEYPTFGSGTKLEIKPAEPKSPDKTHTCP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYQPYAPPRDFAAYRSLKGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	H28BB MP71-hCXCR5-V H- 惠 特 洛 (Whitlow) -VL-IgG1-CD28- CD28-4-1BB-CD3 z
30	MDFQVQIFSFLISASVIMSR	Lkappa 前导区
31	ATGGATTTCAGGTGCAGATCTTCAGCTTCCTGCTGATCTCCGCC AGCGTGATCATGAGCCGCGAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCG GAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTC GCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCAGCGGCATGAAGTGGTTTCA	H28 MP71-hCXCR5-V H- 惠 特 洛 (Whitlow)

[0153]

	ACAGGCCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCTACATCAGCA GCAGCTCCGGCTTCGTGTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTT CACCATCAGCAGAGACAACGCCAGAACAGCCTGTACCTGCAG ATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGAAGCGAGGCCGCCTTTTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACA GTGTCCAGCGGCAGCACAAGCGGCTCTGGCAAACCTGGATCTG GCGAGGGCAGCACCAGGGCGATATCGTGCTGACCCAGAGCCC CAGATCCCTGCCTGTGACACCTGGCGAGCCTGCCAGCATCAGCT GCAGAAGCAGCAAGAGCCGGCTGAGCCGGATGGGCATCACCCC CCTGAACTGGTATCTGCAGAAACCCGGCCAGTCCCCCAGCTGC TGATCTACCGGATGAGCAACAGAGCCAGCGGCGTGCCCGATAGA TTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAG CAAGGTGAAACCGAGGACGTGGGCGTGACTATTGCGCCAG TTCCTGGAATACCCCCCACCTTGGCAGCGGCACCAAGCTGGA AATCAAGCCCCGCCGAGCCCAAGAGCCCCGACAAGACCCATACC TGCCCTCCATGTCTGCCCTCCAGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTC CTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCGCCCGGAC CCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATC CCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCAG CTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCATCAGGACTGGC TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCT GCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGACAG CCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCAGGGACG AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGAGAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAAAAAGATCCCAAATTTGGGTGCTGGTGGTGGTTG GTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTA TTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT GACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAA GCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCG CTCCCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCG TACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGG ACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGG GACCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAG GAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAA GGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG ACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTGA	-VL-IgG1-CD28- CD28-CD3z
32	ATGGATTTCCAGGTGCAGATCTTCAGCTTCCTGCTGATCTCCGCC AGCGTGATCATGAGCCGCGAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGAG GAGGCTTAGTGACGCTGGAAAGTCCCTGAAACTCTCCTGTTCA GCCTCTGGATTACATTAGTACCTCTGGCATGCACTGGTTTCGC CAAGCTCCAGGAAAGGGGCTGGATTGGGTTGCATACATTAGTAG TAGCAGCGGTTTCGTCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATGCACAGAACACCCTGTACCTGCAACTC AACAGTCTGAAGTCTGAAGACACTGCCATCTATTACTGTGCAAG AAGCGAGGCTGCTTTCTGGGGCCAAAGGCACTCTGGTCACTGTCT CTTCAGGCAGCACCAGCGGCTCCGGCAAGCCTGGCTCTGGCGA GGGCAGCACAAAGGGAGATATTGTGTTGACTCAAGCTCCACGCT	R28 MP71- 大 鼠 CXCR5-VH-惠特 洛 (Whitlow) -VL-IgG1-CD28- CD28-CD3z

[0154]

	CTGTATCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGCTTCCATCTCCTGCAGGT CTAATAAGAGTCGACTGAGTAGGATGGGCATCACTCCCTTGAATT GGTACCTTCAGAAGCCAGGAAAGTCTCCTCAGCTCCTGATATATC GGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTTCCAGACAGGTTTAGTGGC AGTGGGTCAGAAACAGATTTTAACTGAAAATCAGTAAGGTGGA GACTGAGGATGTTGGCGTTTATTACTGTGCACAGTTTCTAGAATA TCCTCCTACGTTTCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAACCTG CCGAGCCTAAGAGCCCCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGT CCTGCCCTCCAGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCC AAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCGCCCGGACCCCCGAAGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCACA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAAAA GATCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGC TTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACA TGACTCCCCGCCGCCCGGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCC TATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCCTGAGAGT GAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGC CAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGG AGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGAT GGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTA CAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAG ATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATG GCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTGA	
33	ATGGATTTCCAGGTGCAGATCTTCAGCTTCCCTGCTGATCTCCGCC AGCGTGATCATGAGCCGCGAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCG GAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCC GCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACACGCGCATGAACTGGTTCAG ACAGGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCTACATCAGCA GCAGCTCCGGCTTCGTGTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTT CACCATCAGCAGAGACAACGCCCAGAACAGCCTGTACCTGCAG ATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGAAGCGAGGCCGCTTTTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACA GTGTCCAGCGGCAGCACAAAGCGGCTCTGGCAAACCTGGATCTG GCGAGGGCAGCACCAAGGGCGATATCGTGCTGACCCAGAGCCC CAGATCCCTGCCTGTGACACCTGGCGAGCCTGCCAGCATCAGCT GCAGAAAGCAGCAAGAGCCGGCTGAGCCGGATGGGCATCACCCC CCTGAACTGGTATCTGCAGAAACCCGGCCAGTCCCCCAGCTGC TGATCTACCGGATGAGCAACAGAGCCAGCGGCGTGCCCGATAGA TTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAG CAAGGTGGAACCCGAGGACGTGGGCGTGTAATTGCGCCAG TTCCTGGAATACCCCCCACCTTTGGCAGCGGCACCAAGCTGGA	HBB1 MP71-hCXCR5-V H- 惠 特 洛 (Whitlow) -VL-IgG1Δ-CD8α -4-1BB-CD3z

[0155]

	AATCAAGCCCGCCGAGCCCAAGAGCCCGACAAGACCCATACC TGCCCTCCATGTCTGCCCTCCAGTGGCTGGCCCTAGCGTGTC CTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCGCCCGGAC CCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATC CCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCAC CTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCATCAGGACTGGC TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCT GCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGACAG CCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCAGGGACG AGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGG CTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCC AGCCCGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAG CGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGA GCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCA CGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCAGC CTGAGCCCAGGCAAGAAGATCTACATCTGGGCCCTCTGGCCGG CACCTGTGGCGTGCTGCTGTCTCTCGTGATCACACTGTACTG CAAGCGGGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCC TTCATGCGGCCCGTGCAGACCACCCAGGAAGAGGACGGCTGCT CCTGCAGATTCCCCGAGGAAGAAGAAGGCGGCTGCGAGCTGCT GCGCGTGAAGTTTTCTAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGC AGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACG GGAAGAGTACGACGTGCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCT GAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAACCCCCAGGAAGGC CTGTATAACGAAGTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACA GCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGGAGAAGAGGCAAGGGCC ACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACAC CTATGACGCCCTGCACATGCAGGCTCTGCCCCCAGATAA	
34	ATGGATTTCCAGGTGCAGATCTTCAGCTTCCTGCTGATCTCCGCC AGCGTGATCATGAGCCGCGAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCG GAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTC GCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCAGCGGCATGAACTGGTTTCAG ACAGGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCTACATCAGCA GCAGCTCCGGCTTCGTGTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTT CACCATCAGCAGAGACAACGCCCAGAACAGCCTGTACCTGCAG ATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGAAGCGAGGCCGCCTTTTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACA GTGTCCAGCGGCAGCACAAAGCGGCTCTGGCAAACCTGGATCTG GCGAGGGCAGCACCAAGGGCGATATCGTGCTGACCCAGAGCCC CAGATCCCTGCCTGTGACACCTGGCGAGCCTGCCAGCATCAGCT GCAGAAGCAGCAAGAGCCGGCTGAGCCGGATGGGCATCACCCC CCTGAACTGGTATCTGCAGAAACCCGGCCAGTCCCCCAGCTGC TGATCTACCGGATGAGCAACAGAGCCAGCGGCGTGCCGATAGA TTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAG CAAGGTGGAACCGAGGACGTGGGCGTGACTATTGCGCCAG TTCCTGGAATAACCCCCACCTTTGGCAGCGGCACCAAGCTGGA AATCAAGCCCGCCGAGCCCAAGAGCCCGACAAGACCCATACC TGCCCTCCATGTCTGCCCTCCAGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTTC CTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCGCCCGGAC CCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATC CCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCAC CTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCATCAGGACTGGC	HBB2 MP71-hCXCR5-V H- 惠 特 洛 (Whitlow) -VL-IgG1-CD28-4 -1BB-CD3z

[0156]

	<p>TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCT GCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGACAG CCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCAGGGACG AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAAAAAGATCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTG GTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTA TTATTTCTGGGTGAAGCGGGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATC TTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGACAGACCACCCAGGAAG AGGACGGCTGCTCCTGCAGATTCCCCGAGGAAGAAGAAGGCGG CTGCGAGCTGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC CCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGT GGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG GGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCAC CAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTC GCTGA</p>	
35	<p>ATGGATTTCCAGGTGCAGATCTTCAGCTTCCTGCTGATCTCCGCC AGCGTGATCATGAGCCGCGAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCG GAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCC GCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCAGCGGCATGAACTGGTTTCAG ACAGGCCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCTACATCAGCA GCAGCTCCGGCTTCGTGTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTT CACCATCAGCAGAGACAACGCCCAGAACAGCCTGTACCTGCAG ATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC CAGAAGCGAGGCCGCCTTTTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACA GTGTCCAGCGGCAGCACAAGCGGCTCTGGCAAACCTGGATCTG GCGAGGGCAGCACCAAGGGCGATATCGTGCTGACCCAGAGCCC CAGATCCCTGCCTGTGACACCTGGCGAGCCTGCCAGCATCAGCT GCAGAAGCAGCAAGAGCCGGCTGAGCCGGATGGGCATCACCCC CCTGAACTGGTATCTGCAGAAACCCGGCCAGTCCCCCAGCTGC TGATCTACCGGATGAGCAACAGAGCCAGCGGCGTGCCCGATAGA TTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTTCACCTGAAGATCAG CAAGGTGGAACCGAGGACGTGGGCGTGTACTATTGCGCCAG TTCCTGGAATAACCCCCCACCTTTGGCAGCGGCACCAAGCTGGA AATCAAGCCCGCCGAGCCCAAGAGCCCCGACAAGACCCATACC TGCCCTCCATGTCTGCCCTCCAGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTC CTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCGCCCGGAC CCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATC CCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCAC CTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGCTGCATCAGGACTGGC TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCT GCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGACAG CCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCAGGGACG AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC</p>	<p>H28BB MP71-hCXCR5-V H- 惠 特 洛 (Whitlow) -VL-IgG1-CD28- CD28-4-1BB-CD3 z</p>

[0157]

	CGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAAAAAGATCCCAAATTTGGGTGCTGGTGGTGGTTG GTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTA TTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT GACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAA GCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCG CTCCCTGAAGCGGGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAG CAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACCACCCAGGAAGAGGACG GCTGCTCCTGCAGATTCCCCGAGGAAGAAGAAGGCGGCTGCGA GCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTAC CAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACG AAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGAC CCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAA GGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTA CAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGG GCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA CCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTGA	
36	ATGGATTTCCAGGTGCAGATCTTCAGCTTCTGCTGATCTCCGCC AGCGTGATCATGAGCCGC	Lkappa 前导区
37	GAGGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTG GCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTC AGCACCAGCGGCATGAACTGGTTCAGACAGGCCCTGGCAAGG GCCTGGAATGGGTGTCTACATCAGCAGCAGCTCCGGCTTCGTG TACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGAGACA ACGCCCAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGCGAGGCCGCCT TTTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACAGTGTCCAGC	密码子优化的人 源化 VH
53	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCG GCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CAGCACCAGCGGCATGAACTGGTTCAGGCAGGCCCCCGGCAAG GGCCTGGAGTGGGTGAGCTACATCAGCAGCAGCAGCGGCTTCG TGTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGA CAACGCCCAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGCGAGGCCG CCTTCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTG	未密码子优化的 人源化 VH
38	GAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTAGTGCAGCCTG GAAAGTCCCTGAAACTCTCCTGTTTCAGCCTCTGGATTCACATTC AGTACCTCTGGCATGCACTGGTTTCGCCAAGCTCCAGGAAAGGG GCTGGATTGGGTGGCATACATTAGTAGTAGCAGCGGTTTCGTCTA TGCAGACGCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATG CACAGAACACCCTGTACCTGCAACTCAACAGTCTGAAGTCTGA AGACACTGCCATCTATTACTGTGCAAGAAGCGAGGCTGCTTTCT GGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCTTCA	大鼠 VH
39	GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCCAGATCCCTGCCTGTGACACC TGGCGAGCCTGCCAGCATCAGCTGCAGAAGCAGCAAGAGCCGG CTGAGCCGGATGGGCATCACCCCCCTGAACTGGTATCTGCAGAA ACCCGGCCAGTCCCCCAGCTGCTGATCTACCGGATGAGCAACA GAGCCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTCCGGCTCTGGAAGCGGC ACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAAGGTGGAAACCGAGGACG TGGGCGTGTAATTGCGCCAGTTCCTGGAATACCCCCCACCT TTGGCAGCGGCACCAAGCTGGAAATCAAG	人源化 VL
54	GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCCGCAGCCTGCCCGTGACCCC	未密码子优化的

[0158]

	CGGCGAGCCCGCCAGCATCAGCTGCAGGTCCTCCAAGTCCAGGCTGAGCAGGATGGGCATCACCCCCCTGAACTGGTACCTGCAGAA GCCCCGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACAGGATGAGCAAC AGGGCCAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCG GCACCGACTTCACCCCTGAAGATCAGCAAGGTGGAGACCGAGGA CGTGGGCGTGTAATACTGCGCCCAAGTTCCTGGAGTACCCCCCA CCTTCGGCAGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG	人源化 VL
40	GATATTGTGTTGACTCAAGCTCCACGCTCTGTATCTGTCACTCCT GGAGAGTCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAATAAGAGTCGACT GAGTAGGATGGGCATCACTCCCTTGAATTGGTACCTTCAGAAAGC CAGGAAAGTCTCCTCAGCTCCTGATATATCGGATGTCCAACCTTG CCTCAGGAGTTCAGACAGGTTTAGTGGCAGTGGGTGAGAAAC AGATTTTACACTGAAAATCAGTAAGGTGGAGACTGAGGATGTTG GCGTTTATTACTGTGCACAGTTTCTAGAATATCCTCCTACGTTTCG TTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	大鼠 VL
41	GGCAGCACAAGCGGCTCTGGCAAACCTGGATCTGGCGAGGGCA GCACCAAGGGC	人源化惠特洛 (Whitlow)
42	GGCAGCACCAGCGGCTCCGGCAAGCCTGGCTCTGGCGAGGGCA GCACAAAGGGA	大鼠惠特洛 (Whitlow)
43	CCCGCCGAGCCCAAGAGCCCCGACAAGACCCATACCTGCCCTCC ATGTCCTGCCCCCTCCAGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCTGTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCGCCCGGACCCCTGAA GTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGT GAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGG TGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGC AAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGACAGCCCCGCGA GCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACC AAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AAAAAGATCCCCAA	人源化 IgG1 间隔 区
44	CCTGCCGAGCCTAAGAGCCCCGACAAGACCCACACCTGTCCCC CTTGTCCTGCCCCCTCCAGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCTGTTC CCCCAAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCGCCCGGACCCCCGAA GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AAAGATCCCCAA	大鼠 IgG1 间隔区
45	CCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCG	人源化 IgG1Δ 间

[0159]

	ATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCT TCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCA GGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCTCTGCAC AACCCTACACCCAGAAGTCCCTGAGCAGCCTGAGCCCAGGCA AGAAG	隔区
46	CCTGCCGAGCCTAAGAGCCCCGACAAGACCCACACCTGTCCCC CTTGTCTGCCCCTCCAGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCTGTTC CCCCAAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCGCCCGACCCCGAA GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAA	大鼠 IgG1Δ 间隔区
47	ATCTACATCTGGGCCCCCTCTGGCCGGCACCTGTGGCGTGCTGCT GCTGTCTCTCGTGATCACACTGTACTGC	跨膜域 CD8α
48	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGC TTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTG	跨膜域 CD28
49	AAGCGGGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCT TCATGCGGCCCCGTGCAGACCACCCAGGAAGAGGACGGCTGCTC CTGCAGATTCCCCGAGGAAGAAGAAGGCGGCTGCGAGCTG	共刺激域 4-1BB
50	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGACATGAACA TGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCC TATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCCTG	共刺激域 CD28
51	CTGCGCGTGAAGTTTTCTAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTACCA GCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGA CGGGAAGAGTACGACGTGCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACC CTGAGATGGGCGGCAAGCCTAGAAGAAAGAACCCCAAGGAAGG CCTGTATAACGAAGTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTAC AGCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGGAGAAGAGGCAAGGGC CACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACA CCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCTCTGCCCCCAGATAA	活化域 CD3 ζ (4-1BB)
52	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGC AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAG AGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCT GAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGC CTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG TGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCAC GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA CGACGCCCTTCATATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTGA	活化域 CD3 ζ (CD28)

[0160] 本发明的另一方面涉及包含本文所述的核酸分子的载体,所述载体优选为病毒载体,更优选为 γ 逆转录病毒载体。在本发明的另一方面,本发明涉及编码并且优选能够表达本发明的CAR的转座子载体,所述转座子载体优选为睡美人载体。

[0161] 本发明的另一方面涉及遗传修饰的免疫细胞,其包含如本文所述的核酸分子或载体,和/或表达如本文所述的CAR。

[0162] 在优选的实施方式中,使用“睡美人”转座子系统,特别是睡眠美人转座酶,用如本文所述的核酸对旨在施用以治疗本文提及的疾病的免疫细胞进行遗传修饰,所述核酸编码并表达如本文所述的抗CXCR5 CAR。在本发明的上下文中,睡美人转座子系统是设计用于将精确定义的DNA序列引入脊椎动物染色体中的合成DNA转座子,目的是修饰免疫细胞以表达本文所述的CAR。睡美人转座子结合了病毒和裸露DNA的优势。已根据病毒在新宿主细胞中感染和复制的能力对病毒进行了进化选择。同时,细胞已经进化出主要的分子防御机制来

保护自己免受病毒感染。出于社会和法规方面的原因,避免使用病毒也很重要。因此,使用非病毒载体,例如睡美人系统,可以避免细胞对抗载体的许多但不是全部防御。由于这个原因,睡美人系统能够对免疫细胞进行特别有效和安全的遗传修饰,以便施用于患者。

[0163] 在本发明的其他实施方式中,可以使用CrispR/Cas和TALEN介导的编码CXCR5 CAR的核酸的插入。技术人员已知的适应于细菌中天然存在的过程的CrispR/Cas可用于精确有效地编辑DNA,以将合适的编码序列插入感兴趣的免疫细胞,优选T细胞中。Cas9是充当分子对剪刀的一种蛋白质,可通过相关的RNA分子(引导RNA)引导至特定的DNA序列。当Cas9到达其在DNA上的靶标位置时,它有助于本地遗传密码的变化,从而影响该基因的功能。CRISPR/Cas9可以将CAR基因递送到T细胞基因组内的非常特定的位点,这可以降低基因插入在错误或期望的位置处的风险。

[0164] 在一种实施方式中,免疫细胞优选选自T淋巴细胞或NK细胞,更优选细胞毒性T淋巴细胞。

[0165] 在优选的实施方式中,包含如本文所述的核酸分子或载体和/或表达如本文所述的CAR的遗传修饰的免疫细胞的特征在于该免疫细胞为CD4+和/或CD8+T细胞,优选为CD4+和/或CD8+T细胞的混合物。这些T细胞群,以及优选地包含CD4+和CD8+转化的细胞的组合,针对各种恶性B细胞(例如B-NHL),优选针对本文所述的那些细胞和/或相关医学病症,表现出特别有效的细胞溶解活性。

[0166] 在优选的实施方式中,包含如本文所述的核酸分子或载体和/或表达如本文所述的CAR的遗传修饰的免疫细胞是CD4+和CD8+T细胞,优选地CD4+和CD8+T细胞的比率为1:10至10:1,更优选为5:1至1:5、2:1至1:2或1:1。以所提及的比率,优选以1:1CD4+/CD8+比率施用表达本文所述的CAR的CXCR5定向修饰的CAR-T细胞,在治疗本文所提及的疾病期间产生有益的特性,例如这些比例导致改善的治疗响应和降低的毒性。

[0167] 本发明的另一个令人惊讶的方面是本文公开的CAR的改进的稳定性。在适当的条件下,CAR多肽可以很容易地保存很长时间,而结合亲和力没有任何损失。

[0168] 本发明的另一方面涉及如本文所述的遗传修饰的免疫细胞,其用于治疗与表达CXCR5的致病性细胞的存在有关的医学病症。

[0169] 在一种实施方式中,要治疗的医学病症与致病性成熟B细胞和/或记忆B细胞的存在有关。

[0170] 在一种实施方式中,要治疗的医学病症是成熟B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)。

[0171] 在其他实施方式中,要治疗的医学病症是B细胞源性淋巴增生性疾病,优选选自急性成淋巴细胞白血病(B-ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)组成的组。

[0172] 在一种实施方式中,要治疗的医学病症与致病性T细胞和/或滤泡辅助性T细胞的存在有关。

[0173] 在一种实施方式中,要治疗的医学病症是具有或不具有白血病肿瘤细胞播散的T细胞非霍奇金淋巴瘤。

[0174] 在一种实施方式中,要治疗的医学病症是T细胞源性淋巴增生性疾病,优选选自血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤和具有白血病播散的T细胞淋巴瘤组成的组。

[0175] 本发明的另一方面涉及如本文所述的表达本发明的CAR的遗传修饰的免疫细胞,所述遗传修饰的免疫细胞用作治疗自身抗体依赖性自身免疫病的药物。

[0176] 在一种优选的实施方式中,自身免疫疾病选自系统性红斑狼疮(SLE)或类风湿性关节炎。

[0177] 仅最近,CAR-T细胞也已经被讨论作为治疗自身抗体介导的疾病的靶向方法(Ellebrecht等人.(2016)科学353:179-184)。靶向CXCR5的能力将抑制自身反应性B细胞和Tfh细胞的共定位,这对于治疗自身免疫疾病将大有裨益。

[0178] 轻度形式的自身免疫疾病通常最初会使用非甾体类抗炎药(NSAID)或缓解疾病抗风湿药(DMARD)进行治疗。类风湿性关节炎(RA)和系统性红斑狼疮(SLE)的更严重形式,包括由于活动性疾病引起的器官功能障碍,通常用类固醇结合强力免疫抑制剂(例如环磷酰胺,一种针对循环细胞的细胞毒性剂)进行治疗。仅最近,一种靶向在自身免疫疾病患者的血清中发现水平升高的细胞因子BAFF的抗体贝利单抗获得了美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于SLE。

[0179] 然而,只有新形成的B细胞才能依靠BAFF在人体内存活,而记忆B细胞和浆细胞则对选择性BAFF抑制作用较不敏感(Jacobi等人.(2010)关节炎与风湿病(Arthritis Rheum) 62:201-210)。对于类风湿性关节炎(RA),TNF抑制剂是最先获得许可的生物药剂,其次是阿巴西普、利妥昔单抗和托珠单抗等:它们抑制与关节发炎和破坏有关的关键炎性途径,但是,这是由于相对免疫抑制导致的感染风险升高为代价的(Chan等人.(2010)Nat Rev Immunol 10:301-316,Keyser(2011)Curr Rheumatol Rev 7:77-87)。

[0180] 利妥昔单抗是一种从循环中消耗B细胞的单克隆抗体,特别是越来越多地被处方用于RA的治疗以及也用于具有多血管炎和其他抗嗜中性粒细胞胞浆抗体相关血管炎的肉芽肿病的治疗。但是利妥昔单抗并非没有风险,并且具有与环磷酰胺相似的不良事件风险率(Shah等人(2015)ImmunoTargets andTherapy 4:173-183)。因此,确保针对自身反应性B细胞和自身抗体响应的更精细更持久的方法是必要的。

[0181] 本发明进一步涉及治疗本文所述的医学病症的方法,通常包括向需要所述治疗的患者施用治疗有效量的CAR或表达所述CAR的免疫细胞。

具体实施方式

[0182] 嵌合抗原受体:

[0183] 根据本发明,嵌合抗原受体多肽(CAR)包括胞外抗原结合域、跨膜域和胞内域,该胞外抗原结合域包含结合靶抗原的抗体或抗体片段。通常将CAR描述为包含衍生自抗体的胞外域(抗原结合域)和包含衍生自T细胞信号传导蛋白的信号传导组件的胞内域。

[0184] 在优选的实施方式中,胞外域优选包含来自免疫球蛋白的重链和轻链的被构造为单链可变片段(scFv)的可变区。scFv优选通过将跨膜部分锚定于胞内信号传导域连接于提供灵活性并转导信号的铰链区。该跨膜域优选来源自CD8 α 或CD28。在第一代CAR中,信号传导域由TCR复合体的 ζ 链组成。术语“代”是指胞内信号传导域的结构。第二代CAR配备有来源自CD28或4-1BB的单一共刺激域。第三代CAR已经包含两个共刺激域,例如CD28、4-1BB、ICOS或OX40、CD3 ζ 。优选地,本发明涉及第二代或第三代CAR。

[0185] 在各种实施方式中,提供了将免疫效应细胞的细胞毒性重定向至B细胞的遗传工

程化受体。这些遗传工程化受体在本文中称为嵌合抗原受体 (CAR)。CAR是将针对所期望抗原 (例如, CXCR5) 的基于抗体的特异性与激活T细胞受体的胞内域相结合以产生表现出特异性抗CXCR5细胞免疫活性的嵌合蛋白的分子。如本文所用, 术语“嵌合”描述了由来自不同来源的不同蛋白质或DNA的部分组成。

[0186] 本文考虑的CAR包含与CXCR5结合的胞外域 (也称为结合域或抗原结合域)、跨膜域以及胞内域或胞内信号传导域。CAR的抗CXCR5抗原结合域与CXCR5接合在靶细胞表面上导致CAR聚集, 并将活化刺激传递至含CAR的细胞。CAR的主要特征是CAR重定向免疫效应细胞特异性的能力, 从而以主要组织相容性复合物 (MHC) 非依赖性方式触发增殖、细胞因子产生、吞噬作用或产生介导靶抗原表达细胞的细胞死亡的分子, 从而利用单克隆抗体、可溶性配体或细胞特异性受体的细胞特异性靶向能力。

[0187] 在各种实施方式中, CAR包含: 胞外结合域, 其包含人源化CXCR5特异性结合域; 跨膜域; 一个或多个胞内信号传导域。在特别的实施方式中, CAR包含: 胞外结合域, 其包含其

[0188] “胞外抗原结合域”或“胞外结合域”可互换使用, 并为CAR提供与目标靶抗原CXCR5特异性结合的能力。结合域可以衍生自天然、合成、半合成或重组来源。优选的是scFv域。

[0189] “特异性结合”应被理解为是通过本领域技术人员来理解的, 由此技术人员清楚地知道可用于测试结合和结合特异性的各种实验程序。确定平衡缔合或平衡解离常数的方法是本领域已知的。在许多蛋白质-蛋白质相互作用中, 一些交叉反应或背景结合可能是不可避免的; 这不减损CAR和表位之间结合的“特异性”。“特异性结合”描述了抗CXCR5抗体或其抗原结合片段 (或包含其抗原结合片段的CAR) 以比背景结合更大的结合亲和力与CXCR5结合。当理解抗体和表位之间的相互作用中考虑术语“特异性”时, 术语“直接针对”也适用。

[0190] “抗原 (Ag)”是指可以刺激动物中抗体的产生或T细胞应答的化合物、组合物或物质。在特别的实施方式中, 靶抗原是CXCR5多肽的表位。“表位”是指结合剂结合的抗原区域。表位可以由通过蛋白质的三级折叠并列的连续氨基酸或不连续氨基酸形成。

[0191] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL域, 其中这些域以单一多肽链并以任一方向 (例如VL-VH或VH-VL) 存在。通常, scFv多肽在VH和VL域之间进一步包含使得scFv能够形成用于抗原结合的期望结构的多肽接头。在优选的实施方式中, 本文考虑的CAR包含抗原特异性结合域, 该抗原特异性结合域是scFv并且可以是鼠、人或人源化scFv。单链抗体可以从对所期望靶标特异的杂交瘤的V区基因克隆。在特别的实施方式中, 抗原特异性结合域是结合人CXCR5多肽的人源化scFv。适用于构建本文考虑的抗CXCR5 CAR的可变重链的说明性实例包括但不限于SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列。适用于构建本文考虑的抗CXCR5 CAR的可变轻链的说明性实例包括但不限于SEQ ID NO: 11所示的氨基酸序列。

[0192] 抗体和抗体片段:

[0193] CAR包含胞外抗原结合域, 所述胞外抗原结合域包含结合CXCR5多肽的抗体或抗体片段。因此, 本发明的抗体或抗体片段包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、双特异性抗体、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体、单链片段 (scFv)、单可变片段 (ssFv)、单域抗体 (例如来自纳米抗体的VHH片段)、Fab片段、F(ab')₂片段、由Fab表达文库产生的片段、抗独特型抗体和表位结合片段或以上任意的组合, 只要它们保留优选包含相应的CDR或如本文所述的VH和VL区的本文所述的CAR的相似结合特性。微型抗体和多价抗体 (例如双抗体、三抗体、四

价抗体和肽体)也可以用于本发明的方法。本发明的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白分子的任何类(即IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或亚类。因此,如本文所用的术语抗体还包括通过修饰完整抗体产生或使用重组DNA方法从头合成的本发明的CAR所包含的抗体和抗体片段。

[0194] 如本文所用,“抗体”通常是指由基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码的一种或多种多肽组成的蛋白质。当使用术语“抗体”时,也可以认为是指术语“抗体片段”。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,分别依次定义了免疫球蛋白的类IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。已知基本的免疫球蛋白(抗体)结构单元包含四聚体或二聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一条“轻”(L)链(约25kD)和一条“重”(H)链(约50至70kD)。每条链的N端定义了约100至110个或更多个氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。术语“可变轻链”和“可变重链”分别是指轻链和重链的这些可变区。任选地,抗体或抗体的免疫学部分可以与其他蛋白化学缀合或与其他蛋白表达为融合蛋白。

[0195] 本发明的CAR旨在结合哺乳动物,特别是人的蛋白质靶标。蛋白质名称的使用可能对应于小鼠或人形式的蛋白质。

[0196] 可以使用常规技术,例如通过竞争性ELISA(酶联免疫吸附测定)或通过结合缔合,或使用标记的配体的置换测定,或使用表面等离子体共振装置(例如Biacore),容易地确定结合域多肽和根据本公开的CAR蛋白的亲和力。

[0197] 可以使用本领域已知的任何方法来制备人源化抗体,所述人源化抗体包含本发明的抗体的一个或多个CDR或衍生自所述抗体的一个或多个CDR。例如,可以使用四个通用步骤来使单克隆抗体人源化。它们是:(1)确定起始抗体轻链和重链可变域的核苷酸和预测的氨基酸序列,(2)设计人源化抗体,即,决定在人源化过程中使用哪种抗体框架区,(3)实际人源化方法/技术,和(4)人源化抗体的转染和表达。参见,例如,美国专利号4,816,567;5,807,715;5,866,692;6,331,415;5,530,101;5,693,761;5,693,762;5,585,089;6,180,370;5,225,539;6,548,640。

[0198] 术语人源化抗体是指,免疫球蛋白的至少一部分框架区,以及任选地一部分CDR区或参与结合的其他区域衍生或被调节至人免疫球蛋白序列。人源化、嵌合或部分人源化形式的小鼠单克隆抗体可以例如通过重组DNA技术由编码H和L链的小鼠和/或人基因组DNA序列或由编码H和L链的cDNA克隆来制备。人源化形式的小鼠抗体可以通过重组DNA技术将非人抗体的CDR区与人恒定区连接而产生(Queen等人,1989;WO 90/07861)。可供选择地,用于本发明方法的单克隆抗体可以是人单克隆抗体。人抗体可以例如使用噬菌体展示方法(WO 91/17271;WO 92/01047)获得。

[0199] 如本文所用,人源化抗体还指作为包含衍生自非人免疫球蛋白的最小序列的特异性嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合亚序列)的非人(例如鼠、骆驼、美洲驼、鲨鱼)形式的抗体。

[0200] 如本文所用,人或人源化抗体或抗体片段是指,具有与由人产生的抗体的氨基酸序列和/或使用本领域已知或本文公开的制备人抗体的任何技术已经制备的氨基酸序列相对应的氨基酸序列的抗体。人抗体或其片段可以通过竞争性结合实验来选择,或者以其他方式选择为具有与特定小鼠抗体相同的表位特异性。令人惊奇地,本发明的人源化抗体在很大程度上共享了小鼠抗体的有用的功能特性。人多克隆抗体也可以以用免疫原性剂免疫

的人血清形式提供。任选地,这样的多克隆抗体可以通过使用淀粉样原纤维和/或非原纤维多肽或其片段作为亲和试剂通过亲和纯化来浓缩。可以根据W0 99/60846中描述的技术从血清中获得单克隆抗体。

[0201] 可变区和CDR

[0202] 抗体的可变区是指单独或组合的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区。重链和轻链的可变区均由三个互补决定区(CDR)(也称为高变区)连接的四个框架区(FR)组成。每条链中的CDR通过FR紧密保持在一起,并且与另一条链中的CDR一起有助于形成抗体的抗原结合位点。

[0203] 有许多可用于确定CDR的技术,例如基于跨物种序列变异性的方法(例如,Kabat等人,免疫学感兴趣的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest), (第5版,1991年,美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州));以及基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(Al-Lazikani等人(1997)J.Molec.Biol.273:927-948)。可供选择的方法包括IMGT国际ImMunoGeneTics信息系统(Marie-Paule Lefranc)。Kabat定义基于序列变异性,是最常用的方法。Chothia定义基于结构环区域的位置,其中AbM定义是牛津分子公司的AbM抗体建模软件使用的两者之间的折衷方案(请参阅www.bioinf.org.uk:Andrew CR Martin博士课题组)。如本文所用,CDR可指通过一种或多种方法或通过这些方法的组合定义的CDR。

[0204] 在一些实施方式中,本发明提供了并入CAR的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含至少一个CDR,与至少一个CDR基本相同的至少两个、至少三个或更多个CDR,本发明的抗体的至少两个、至少三个或更多个CDR。其他实施方式包括具有至少两个、三个、四个、五个或六个CDR的抗体,这些CDR与本发明的抗体或衍生自本发明的抗体的至少两个、三个、四个、五个或六个CDR基本相同。在一些实施方式中,至少一个,两个,三个,四个,五个或六个CDR与本发明的抗体的至少一个,两个,三个CDR的同一性为至少约70%、75%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。应当理解,出于本发明的目的,尽管活性程度与所述抗体相比可能有变化(更能更大或更小),但结合特异性和/或总体活性通常被保留。

[0205] CAR的其他组件

[0206] 在某些实施方式中,本文考虑的CAR可以在各个域之间包含接头残基,所述接头残基被添加以用于分子的适当间隔和构型,例如包含如下的氨基酸序列的接头,所述氨基酸序列连接VH和VL域,并提供与两个亚结合域的相互作用兼容的间隔区功能,从而使所得多肽对与包含相同轻链和重链可变区的抗体相同的靶分子保持特异性结合亲和力。本文考虑的CAR可包含一个、两个、三个、四个或五个或更多个接头。在特别的实施方式中,接头的长度为约1至约25个氨基酸,约5至约20个氨基酸或约10至约20个氨基酸,或任何中间长度的氨基酸。

[0207] 接头的说明性实例包括甘氨酸聚合物;甘氨酸-丝氨酸聚合物;甘氨酸-丙氨酸聚合物;丙氨酸-丝氨酸聚合物;以及本领域已知的其他柔性接头,例如惠特洛(Whitlow)接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,因此可能能够充当融合蛋白(例如本文所述的CAR)的结构域之间的中性系链。

[0208] 在特别的实施方式中,在CAR的结合域之后是一个或多个“间隔区”或“间隔区多

肽”,所述“间隔区”或“间隔区多肽”是指将抗原结合域移离效应细胞表面以实现适当的细胞/细胞接触、抗原结合和激活的区域。在某些实施方式中,间隔区域是免疫球蛋白的一部分,包括但不限于一个或多个重链恒定区,例如CH2和CH3。间隔区域可以包括天然存在的免疫球蛋白铰链区或改变的免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。在一种实施方式中,间隔区域包含IgG1或IgG4的CH2和CH3域。在一种实施方式中,以防止CAR与巨噬细胞和其他先天免疫细胞上表达的Fc受体结合的方式,使这种间隔区/铰链区的Fc结合域突变。

[0209] 在一些实施方式中,在CAR的结合域之后可以是一个或多个“铰链域”,所述“铰链域”在使抗原结合域远离效应细胞表面定位以实现适当的细胞/细胞接触、抗原结合和激活中起作用。CAR可以在结合域和跨膜域(TM)之间包含一个或多个铰链域。铰链域可以衍生自天然、合成、半合成或重组来源。铰链域可以包括天然存在的免疫球蛋白铰链区或改变的免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。适用于本文所述的CAR的说明性铰链域包括衍生自1型膜蛋白(例如CD8 α 、CD4、CD28、PD1、CD152和CD7)的胞外区的铰链区,所述铰链区可以是来自这些分子的野生型铰链区或可以被改变。在另一种实施方式中,铰链域包含PD1、CD152或CD8 α 铰链区。

[0210] “跨膜域”是CAR的一部分,该部分融合胞外结合部分和胞内信号传导域并将CAR锚定至免疫效应细胞的质膜。TM域可以衍生自天然、合成、半合成或重组来源。TM域可以衍生自T细胞受体、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154和PD1的 α 、 β 或 ζ 链。在一种实施方式中,本文考虑的CAR包含衍生自CD8 α 或CD28的TM域。

[0211] 在特别的实施方式中,本文考虑的CAR包含胞内信号传导域。“胞内信号传导域”是指CAR的一部分,该部分参与将与人CXCR5多肽结合的有效抗CXCR5 CAR的信息转导到免疫效应细胞内部以引发效应细胞功能,例如活化、产生细胞因子、增殖和细胞毒性活性,包括向CAR结合的靶细胞释放细胞毒性因子或抗原结合至胞外CAR域引起的其他细胞响应。术语“效应功能”是指免疫效应细胞的专门功能。T细胞的效应功能例如可以是溶细胞活性或帮助或包括细胞因子分泌的活性。因此,术语“胞内信号传导域”是指蛋白质的转导效应子功能信号并指导细胞执行专门的功能的一部分。本文考虑的CAR包含一个或多个共刺激信号传导域,以增强表达CAR受体的T细胞的功效、扩增和/或记忆形成。如本文所用,术语“共刺激信号传导域”是指共刺激分子的胞内信号传导域。共刺激分子是除抗原受体或Fc受体以外的细胞表面分子,共刺激分子在结合抗原后提供T淋巴细胞的有效活化和功能所需的第二信号。

[0212] 在一种实施方式中,CAR包含胞内域,该胞内域包含共刺激域和信号传导(活化)域。因此,CAR构建体可包括原生T细胞受体复合物的胞内信号传导域(CD3 ζ)和提供第二信号以刺激完全T细胞活化的一个或多个共刺激域。共刺激域被认为增加CAR T细胞细胞因子的产生并促进T细胞复制和T细胞持久性。共刺激域也已显示出潜在地防止CAR T细胞消耗,增加T细胞抗肿瘤活性并增强患者中CAR T细胞的存活。作为非限制性实例,在临床前研究中,具有4-1BB共刺激域的CAR构建体与逐步持续扩增和效应功能、持久性增强以及T细胞亚群组成中的中央记忆细胞(TCM)富集相关。4-1BB是肿瘤坏死因子(TNF)超家族的成员,并且是主要在抗原活化的CD4和CD8T细胞上表达的体内诱导型糖蛋白受体。作为非限制性实例,CD28是免疫球蛋白(Ig)超家族的成员。它在静止和活化的CD4和CD8 T细胞上组成型表达,

并通过刺激PI3K-AKT信号转导途径在T细胞活化中起关键作用。在一种实施方式中,胞内域同时包含4-1BB和CD28共刺激域。其他共刺激域包括可与CD3 ζ 信号传导(活化)域结合的ICOS和OX40。

[0213] 多肽

[0214] 除非有相反的说明,否则“肽”、“多肽”、“多肽片段”和“蛋白质”可以互换使用,并且按照常规含义,即作为氨基酸序列使用。多肽不限于特定长度,例如,它们可以包含全长蛋白质序列或全长蛋白质的片段,并且可以包括多肽的翻译后修饰(例如糖基化、乙酰化、磷酸化等),以及天然存在和非天然存在的已知的其他修饰形式。

[0215] 在各种实施方式中,本文考虑的CAR多肽在蛋白质的N端包含信号(或前导)序列,其以共翻译或翻译后方式指导蛋白质的转移。可以使用多种熟知的重组和/或合成技术中的任一种来制备多肽。本文考虑的多肽具体涵盖本公开的CAR,或缺失、添加和/或取代如本文公开的CAR的一个或多个氨基酸的序列。

[0216] 如本文所用,“分离的肽”或“分离的多肽”等是指从细胞环境以及与细胞的其他组件的缔合体分离和/或纯化肽或多肽分子,即,所述肽或多肽分子与体内物质没有显著关联。类似地,“分离的细胞”是指已经从体内组织或器官获得并且基本上不含胞外基质的细胞。

[0217] 核酸

[0218] 如本文所用,术语“多核苷酸”或“核酸分子”是指信使RNA(mRNA)、RNA、基因组RNA(gRNA)、正链RNA(RNA(+))、负链RNA(RNA(-))、基因组DNA(gDNA)、互补DNA(cDNA)或重组DNA。多核苷酸包括单链和双链多核苷酸。优选地,本发明的多核苷酸包括与本文所述的任何参考序列具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的多核苷酸或变体,通常其中变体维持参考序列的至少一种生物学活性。在各种说明性实施方式中,本发明部分地考虑了包括表达载体、病毒载体和转移质粒的多核苷酸,以及组合物以及包含它们的细胞。

[0219] 可以使用本领域已知和可获得的多种成熟技术中的任一种来制备、操纵和/或表达多核苷酸。为了表达所期望的多肽,可以将编码该多肽的核苷酸序列插入适当的载体中。载体的实例是质粒、自主复制序列和转座元件(transposable element)。另外的示例性载体包括但不限于质粒、噬菌粒、粘粒、人工染色体(例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1衍生的人工染色体(PAC))、噬菌体(例如 λ 噬菌体或M13噬菌体)和动物病毒。可用作载体的动物病毒类别的实例包括但不限于逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳多空病毒(例如SV40)。表达载体的实例是用于在哺乳动物细胞中表达的pCIneo载体(Promega)、用于慢病毒介导的基因转移和在哺乳动物细胞中表达的pLenti4/V5-DESTTM、pLenti6/V5-DESTTM和pLenti6.2/V5-GW/lacZ(Invitrogen)。在特别的实施方式中,可以将本文公开的嵌合蛋白的编码序列连接到这样的表达载体中,以在哺乳动物细胞中表达嵌合蛋白。表达载体中存在的“控制元件”或“调控序列”是载体的那些非翻译区-复制起点、选择盒、启动子、增强子、翻译起始信号(Shine Dalgarno序列或Kozak序列)内含子、聚腺苷酸化序列,5'和3'非翻译区-它们与宿主细胞蛋白相互作用以进行转录和翻译。这样的元件的强度和特异性可能有所不同。取决于所使用的载体系统和宿主,可以使用许多合适的转录和翻译元件,包括遍在

启动子和诱导型启动子。

[0220] 载体

[0221] 在特别的实施方式中,用编码CAR的逆转录病毒载体(例如慢病毒载体)转导细胞(例如免疫效应细胞,如T细胞)。例如,用编码CAR的载体转导免疫效应细胞,该CAR包含人源化抗CXCR5抗体或结合CXCR5多肽的抗原结合片段以及跨膜域和胞内信号传导域,使得这些转导的细胞可以引发CAR介导的细胞毒性响应。

[0222] 逆转录病毒是基因递送的常用工具。在特别的实施方式中,逆转录病毒用于将编码嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸递送至细胞。如本文所用,术语“逆转录病毒”是指将病毒的基因组RNA逆转录为线性双链DNA拷贝并随后将其基因组DNA共价整合到宿主基因组中的RNA病毒。一旦病毒整合到宿主基因组中,就被称为“前病毒”。前病毒充当RNA聚合酶II的模板,并指导RNA分子的表达,该RNA分子编码产生新的病毒颗粒所需的结构蛋白和酶。

[0223] 适用于特别的实施方式的说明性逆转录病毒包括但不限于:莫洛尼鼠白血病病毒(M-MuLV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猫白血病病毒(FLV)、泡沫病毒、弗林德鼠白血病病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)和慢病毒。

[0224] 如本文所用,术语“慢病毒”是指一组(或属)复杂的逆转录病毒。说明性慢病毒包括但不限于:HIV(人免疫缺陷病毒;包括1型HIV和2型HIV);维斯纳梅迪病毒(VMV)病毒;山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV);马传染性贫血病毒(EIAV);猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。在一种实施方式中,基于HIV的载体骨架(即HIV顺式作用序列元件)是优选的。在特别的实施方式中,慢病毒用于将包含CAR的多核苷酸递送至细胞。

[0225] 本文使用的术语“载体”是指能够转移或运输另一种核酸分子的核酸分子。转移的核酸通常与载体核酸分子连接,例如插入载体核酸分子。载体可以包括指导细胞中自主复制的序列,或者可以包括足以允许整合入宿主细胞DNA的序列。有用的载体包括,例如质粒(例如DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒、细菌人工染色体和病毒载体。有用的病毒载体包括,例如复制缺陷型逆转录病毒和慢病毒。在本发明的其他实施方式中,可以使用CrispR/Cas和TALEN介导的CXCR5 CAR编码核酸的插入。适合于CrispR/Cas和TALEN介导的插入的载体是技术人员已知的。

[0226] 对本领域技术人员显而易见的是,术语“病毒载体”被广泛地用于指包含通常有助于核酸分子转移或整合到细胞基因组中的病毒来源的核酸元件的核酸分子(例如转移质粒),或指介导核酸转移的病毒颗粒。病毒颗粒通常将包含各种病毒组件,有时除了核酸以外还包含宿主细胞组件。

[0227] 术语病毒载体可以指能够将核酸转移到细胞中的病毒或病毒颗粒,或者是指转移的核酸本身。病毒载体和转移质粒包含主要来自病毒的结构和/或功能遗传元件。术语“逆转录病毒载体”是指包含主要衍生自逆转录病毒的结构和功能遗传元件或其部分的病毒载体或质粒。

[0228] 因此,在优选的实施方式中,本发明涉及一种用编码CAR的表达载体转染细胞的方法。例如,在一些实施方式中,载体包含另外的序列,例如促进CAR表达的序列,例如启动子、增强子、poly-A信号和/或一个或多个内含子。在优选的实施方式中,编码CAR的序列的侧翼

是转座子序列,使得转座酶的存在允许编码序列整合到转染细胞的基因组中。

[0229] 在一些实施方式中,将遗传转化的细胞进一步用促进编码CAR的序列整合到转染细胞的基因组中的转座酶转染。在一些实施方式中,转座酶以DNA表达载体提供。然而,在优选的实施方式中,转座酶以可表达的RNA或蛋白质的形式提供,使得转座酶在转基因细胞中不会长期表达。例如,在一些实施方式中,转座酶以mRNA(例如,包含帽和poly-A尾的mRNA)的形式提供。根据本发明的实施方式,可以使用任何转座酶系统。然而,在一些实施方式中,转座酶是鲑科鱼型Tel样转座酶(SB)。例如,转座酶可以是所谓的“睡美人”转座酶,参见例如美国专利6,489,458,其通过引用并入本文。在一些实施方式中,转座酶是具有增加的酶活性的工程化酶。转座酶的一些具体实例包括但不限于SB 10、SB 11或SB 100X转座酶(参见,例如Mates等人,2009,Nat Genet.41(6):753-61或US9228180,其通过引用并入本文。例如,方法可以包括用编码SB 10、SB 11或SB 100X转座酶的mRNA对细胞电穿孔。

[0230] 序列变体:

[0231] 本发明的范围内还包括保持本发明的相似结合特性的要求保护的核酸、蛋白质、抗体、抗体片段和/或CAR的序列变体(例如由%序列同一性定义的序列变体)。这样的变体显示可供选择的序列,但是基本上保持相同的结合特性(例如靶标特异性),正如所提供的特定序列被称为功能类似物或功能类似的。序列同一性涉及进行序列比对时相同核苷酸或氨基酸的百分比。

[0232] 本文所用的“序列同一性”是指在比较窗口中,序列在核苷酸对核苷酸基础上或氨基酸对氨基酸基础上相同的程度。因此,“序列同一性百分比”可以通过比较比较窗口中两个最佳比对的序列,确定相同核酸碱基(例如A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、He、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gin、Cys和Met)在两个序列中同时存在的位置数以产生匹配位置数,将匹配位置数除以比较窗口中的总位置数(即窗口大小),然后将结果乘以100即可得出序列同一性百分比。包括与本文所述的任何参考序列具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸和多肽,通常其中多肽变体维持参考多肽的至少一种生物学活性。

[0233] 本领域普通技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,存在许多编码如本文所述的多肽的核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列具有最小的同源性或序列同一性。然而,由于密码子使用的差异而变化的多核苷酸是本发明特别考虑的。在本发明中还包括被归入所述序列同一性的序列的缺失、取代和其他变化。

[0234] 本发明的范围内还包括可以通过取代而发生的蛋白质序列修饰。如本文所定义的取代是对蛋白质的氨基酸序列进行的修饰,其中一个或多个氨基酸被相同数目的(不同)氨基酸取代,从而产生了包含与初级蛋白质不同的氨基酸序列的蛋白质。可以进行优选不显著改变蛋白质功能的取代。如添加一样,取代可以是自然的也可以是人工的。在本领域中熟知的是,可以进行氨基酸取代而不显著改变蛋白质的功能。当修饰涉及“保守”氨基酸取代时,尤其如此,“保守”氨基酸取代是一种氨基酸被另一种具有相似性质的氨基酸取代。这样的“保守”氨基酸可以是天然或合成氨基酸,它们由于大小、电荷、极性和构象可以被取代而不会显著影响蛋白质的结构和功能。通常,许多氨基酸可以被保守氨基酸取代,而不会有害地影响蛋白质的功能。

[0235] 通常,非极性氨基酸Gly、Ala、Val、Ile和Leu;非极性芳族氨基酸Phe、Trp和Tyr;中性极性氨基酸Ser、Thr、Cys、Gln、Asn和Met;带正电荷的氨基酸Lys、Arg和His;带负电荷的氨基酸Asp和Glu代表几组保守氨基酸。此列表并不详尽。例如,众所周知,即使Ala、Gly、Ser以及有时Cys可以彼此替代,即使它们属于不同的组。

[0236] 取代变体在抗体分子中去除了至少一个氨基酸残基,并在该位置处插入了不同的残基。取代诱变最感兴趣的位点包括高变区,但也考虑了FR改变。如果这样的取代导致生物活性的变化,则可以引入下表中被称作“示例性取代”或如以下参考氨基酸类别进一步描述的更实质性的变化,并筛选产物。

[0237] 潜在的氨基酸取代:

	原始残基	优选的保守取代	示例性取代的实例
[0238]	Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
	Asg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
	Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
	Asp (D)	Glu	Glu; Asn
	Cys (C)	Ser	Ser; Ala
	Gln (Q)	Asn	Asn, Glu
	Glu (E)	Asp	Asp; Gln
	Gly (G)	Ala	Ala
	His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
	Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸
	Leu (L)	Ile	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe
[0239]	Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
	Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
	Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
	Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
	Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸

[0240] 抗体生物学特性的实质性修饰是通过选择对保持以下的作用显著不同的取代而实现的:(a)在取代区域的多肽骨架结构,例如呈片状或螺旋状构型,(b)分子在靶位点的电荷或疏水性,或(c)侧链的多少。

[0241] 保守氨基酸取代不限于天然存在的氨基酸,还包括合成氨基酸。常用的合成氨基酸是:各种链长的 ω 氨基酸和环己基丙氨酸,它们是中性和非极性类似物;瓜氨酸和甲硫氨酸亚砷,它们是中性和非极性类似物;苯基甘氨酸,它是芳族中性类似物;磺基丙氨酸,它是带负电荷的类似物;鸟氨酸,它是带正电荷的氨基酸类似物。如天然存在的氨基酸一样,该列表不是穷举的,而仅仅是本领域熟知的取代的实例。

[0242] 遗传修饰的细胞和免疫细胞

[0243] 在特别的实施方式中,本发明考虑了经遗传修饰以表达本文考虑的CAR的细胞,用于治疗B细胞相关病症。如本文所用,术语“遗传工程化的”或“遗传修饰的”是指将DNA或RNA形式的另外的遗传物质添加到细胞中的总遗传物质中。术语“遗传修饰的细胞”、“修饰的细胞”和“重定向的细胞”可互换使用。如本文所用,术语“基因疗法”是指以永久性或暂时性地将DNA或RNA形式的另外的遗传物质引入细胞中的总遗传物质中,以恢复、校正或修饰基因的表达,或用于表达治疗性多肽(例如CAR)的目的。在特别的实施方式中,本文考虑的CAR被引入免疫效应细胞并在免疫效应细胞中表达,以便将免疫效应细胞的特异性重定向至感兴趣的靶抗原,例如CXCR5多肽。

[0244] “免疫细胞”或“免疫效应细胞”是具有一种或多种效应功能(例如,细胞毒性细胞杀伤活性、分泌细胞因子、诱导ADCC和/或CDC)的任何免疫系统细胞。免疫效应细胞也可以与iPSC(诱导性多能干细胞)区分开来。

[0245] 本发明的免疫效应细胞可以是自体的/同体的(autogeneic) (“自身”)或非自体的 (“非自身的”,例如同种异体的、同基因的或异种的)。如本文所用,“自体的”是指来自同一受试者的细胞,并且代表本发明的优选实施方式。如本文所用,“同种异体的”是指在遗传上与所比较的细胞不同的相同物种的细胞。

[0246] 如本文所用,“同基因的”是指在遗传上与所比较的细胞相同的不同受试者的细胞。如本文所用,“异种的”是指与所比较的细胞不同物种的细胞。在优选的实施方式中,本发明的细胞是自体的或同种异体的。

[0247] 与本文考虑的CAR一起使用的说明性免疫效应细胞包括T淋巴细胞。术语“T细胞”或“T淋巴细胞”是本领域公认的,并且旨在包括胸腺细胞、未成熟T淋巴细胞、成熟T淋巴细胞、静息T淋巴细胞,细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK细胞)或活化的T淋巴细胞。细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞通常是CD3和CD56阳性的非主要组织相容性复合物(MHC)限制的自然杀伤(NK)样T淋巴细胞。T细胞可以是辅助T细胞(Th;CD4+T细胞),例如辅助T细胞1(Th1)或辅助T细胞2(Th2)。T细胞可以是细胞毒性T细胞(CTL;CD8+T细胞),CD4+CD8+T细胞,CD4 CD8 T细胞或任何其他T细胞亚群。适用于特别的实施方式的T细胞的其他示例性群体包括幼稚T细胞和记忆T细胞以及干细胞样记忆细胞(TSCM)。

[0248] 例如,当自体细胞移植后重新引入患者时,如本文所述用本发明的CAR修饰的T细胞可以识别并杀伤肿瘤细胞。与其他T细胞相比,CIK细胞可以具有增强的细胞毒性活性,因此代表了本发明的免疫细胞的优选实施方式。

[0249] 如本领域技术人员将理解的,其他细胞也可以与本文所述的CAR一起用作免疫效应细胞。特别地,免疫效应细胞还包括NK细胞、NKT细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞。免疫效应细胞还包括效应细胞的祖细胞,其中可以诱导这样的祖细胞在体内或体外分化为免疫效应细胞。祖细胞可以是在限定的培养条件下成为免疫效应细胞的iPSC。

[0250] 本发明提供了制备表达本文考虑的CAR的免疫效应细胞的方法。在一种实施方式中,该方法包括转染或转导从个体分离的免疫效应细胞,使得免疫效应细胞表达一种或多种如本文所述的CAR。在某些实施方式中,免疫效应细胞是从个体中分离出来的,并且在没有进一步体外操作的情况下遗传修饰。然后可以将这样的细胞直接重新施用给个体。在进一步的实施方式中,在被遗传修饰以表达CAR之前,首先激活免疫效应细胞并刺激免疫效应细胞在体外增殖。在这方面,可以在遗传修饰(即,经转导或转染以表达本文考虑的CAR)之

前和/或之后培养免疫效应细胞。

[0251] 在特别的实施方式中,在本文所述的免疫效应细胞的体外操作或遗传修饰之前,细胞来源从受试者获得。在特别的实施方式中,CAR修饰的免疫效应细胞包括T细胞。T细胞可从多种来源获得,包括但不限于外周血单核细胞、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、脾脏组织和肿瘤。在某些实施方式中,T细胞可以使用本领域技术人员已知的多种技术从收集自受试者的单位血液中获得,如沉淀(例如FICOLL™分离)、基于抗体缀合的珠子(例如MACS™分离(Miltenyi))。在一种实施方式中,通过单采血液分离术获得来自个体循环血液的细胞。单血液分离术产物通常包含包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞的淋巴细胞,其他有核白细胞、红细胞和血小板。在一种实施方式中,可以洗涤通过单采血液分离术收集的细胞以除去血浆部分,并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中以用于后续处理。可以用PBS或缺少钙、镁和大多数(如果不是所有其他的)二价阳离子的其他合适溶液洗涤细胞。如本领域普通技术人员将理解的,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法来完成,例如通过使用半自动流过离心机。例如,Cobe 2991单元处理器,Baxter CytoMate等。洗涤后,可将细胞重悬于各种生物相容性缓冲液或其他含有或不含缓冲液的盐溶液中。在某些实施方式中,单采血液分离术样品的不希望的分组分可以在直接重悬浮的细胞培养基中去除。

[0252] 在某些实施方式中,通过裂解红细胞并消耗单核细胞,例如通过经PERCOLL™梯度离心,从外周血单核细胞(PBMC)分离T细胞。可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离T细胞的特定亚群。本文使用的一种方法是通过负磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,其使用针对存在于阴性选择的细胞上的细胞表面标志物的单克隆抗体混合物。

[0253] PBMC可以使用本文考虑的方法直接遗传修饰以表达CAR。在某些实施方式中,在分离PBMC之后,进一步分离T淋巴细胞,并且在某些实施方式中,可以在遗传修饰和/或扩增之前或之后将细胞毒性和辅助T淋巴细胞分选为幼稚、记忆和效应T细胞亚群。可以通过使用标准方法获得CD8⁺细胞。在一些实施方式中,通过鉴定与那些类型的CD8⁺细胞中的每种相关的细胞表面抗原,将CD8⁺细胞进一步分类为幼稚、中央记忆和效应细胞。

[0254] 在一些实施方式中,本发明的免疫细胞(例如本文所述的T细胞)可以使用技术人员已知的方法从诱导性多能干细胞(iPSC)获得。

[0255] 生产CAR T细胞的接受方法依赖于成熟的循环T细胞的遗传修饰和扩增。这样的过程利用自体T细胞,并通过内源TCR表达以及通过MHC不相容性排斥,降低了异体T细胞发生移植物抗宿主病(GvHD)的风险。作为可供选择的方案,从多能干细胞(例如诱导性多能干细胞)体外直接分化工程化的T细胞提供了基本上无限的可被遗传修饰以表达本发明的CAR的细胞来源。在一些实施方式中,可以维持所谓的主iPSC系,这代表可一致且重复地生产同质细胞产品的可再生来源。在一些实施方式中,在扩增和分化成所期望的免疫细胞,优选T细胞之前,考虑用编码CAR的核酸转化主iPSC细胞系。T淋巴细胞可以例如从iPSC产生,使得iPSC可以用编码CAR的核酸修饰,随后扩增并分化为T细胞以施用于患者。也可以从iPSC分化为合适的免疫细胞(例如T细胞),然后用编码CAR的核酸进行转化,然后在施用前扩增。在本发明中考虑了iPSC扩增、遗传修饰和扩增以提供用于施用的合适数目的细胞的所有可能组合。

[0256] 免疫效应细胞(例如T细胞)可以在使用已知方法分离后进行遗传修饰,或者免疫

效应细胞可以在进行遗传修饰之前在体外活化和扩增(或在祖细胞的情况下进行分化)。在特别的实施方式中,免疫效应细胞(例如T细胞)用本文考虑的嵌合抗原受体遗传修饰(例如用包含编码CAR的核酸的病毒载体转导),然后在体外活化和扩增。在各种实施方式中,T细胞可以使用例如美国专利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;以及美国专利申请公开第20060121005号中描述的方法。在遗传修饰以表达CAR之前或之后活化和扩增。

[0257] 在另一种实施方式中,可以使用例如一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同表达载体的混合物来遗传修饰免疫效应细胞的供体群,其中每种载体编码如本文考虑的不同的嵌合抗原受体蛋白。所得修饰的免疫效应细胞形成修饰细胞的混合群,其中修饰的细胞的一部分表达一种以上的不同CAR蛋白。

[0258] 在一种实施方式中,本发明提供了一种存储靶向CXCR5蛋白的表达遗传修饰的鼠、人或人源化CAR蛋白的免疫效应细胞的方法,该方法包括冷冻保存免疫效应细胞,使得细胞在解冻后保持活力。可以通过本领域已知的方法将表达CAR蛋白的免疫效应细胞的一部分冷冻保存,以提供这样的细胞的永久来源,用于将来治疗患有B细胞相关病症的患者。需要时,可以将冷冻保存的转化的免疫效应细胞解冻,生长和扩增为更多这样的细胞。

[0259] 组合物和制剂

[0260] 如本文考虑的,本文考虑的组合物可以包含一种或多种多肽、多核苷酸、包含它们的载体、遗传修饰的免疫效应细胞等。组合物包括但不限于药物组合物。“药物组合物”是指在药学上可接受的或生理学上可接受的溶液中配制的组合物,所述组合物用于单独地或与一种或多种其他治疗方式组合地施用于细胞或动物。还应理解,如果需要,本发明的组合物也可以与其他药剂(例如细胞因子、生长因子、激素、小分子、化学治疗剂、前药、药物、抗体或其他各种药物活性剂)组合施用。实际上,对于还可以包含在组合物中的其他组分没有限制,条件是另外的药剂不会不利地影响组合物递送预期疗法的能力。

[0261] 本文所用的短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内,适合于与人类和动物的组织接触而没有过多的毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,并且与合理的获益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0262] 如本文所用,“药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于已被美国食品和药物管理局批准可用于人类或家畜的任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、稳定剂、等渗剂、溶剂、表面活性剂或乳化剂。示例性的药学上可接受的载体包括但不限于糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;可可脂,蜡、动植物脂肪、石蜡、硅酮、膨润土、硅酸、氧化锌;油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类,例如丙二醇;多元醇类,例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;酯类,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;以及药物制剂中使用的任何其他兼容性物质。

[0263] 在特别的实施方式中,本发明的组合物包含本文考虑的一定量的表达CAR的免疫效应细胞。如本文所用,术语“量”是指遗传修饰的治疗细胞(例如T细胞)实现包括临床结果

的有益或期望的预防或治疗结果的“有效量(amount effective/effective amount)”。

[0264] “预防有效量”是指有效达到期望的预防结果的遗传修饰的治疗细胞的量。通常但不是必须的,因为预防剂量在疾病之前或疾病的早期阶段中用于受试者,所以预防有效量小于治疗有效量。术语预防性不一定指完全禁止或预防特定的医学疾病。术语预防性还指某一医学疾病在其症状发生或恶化方面的风险的降低。

[0265] 遗传修饰的治疗细胞的“治疗有效量”可以根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及干细胞和祖细胞在个体中引起期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量也是治疗有益作用超过病毒或转导的治疗细胞的任何毒性或有害作用的量。术语“治疗有效量”包括有效地“治疗”受试者(例如患者)的量。当指示治疗量时,医师可以考虑年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度以及患者(受试者)状况的个体差异来确定要施用的本发明组合物的精确剂量。

[0266] 通常可以规定,包含本文描述的T细胞的药物组合物可以以 10^2 至 10^{10} 个细胞/kg体重,优选 10^5 至 10^7 个细胞/kg体重的剂量施用,其中包括这些范围内的所有整数值。细胞的数量将取决于组合物的预期的最终用途,包含在组合物中的细胞类型也将取决于最终用途。对于本文提供的用途,细胞通常为1升或更少的体积,可以为500mL或更少,甚至250mL或100mL或更少。因此,所期望的细胞密度通常大于 10^6 个细胞/mL,通常大于 10^7 个细胞/mL,通常大于 10^8 个细胞/mL或更大。临床相关数量的免疫细胞可以分配成多次输注,该多次输注累积等于或超过 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、或 10^{12} 个细胞。在本发明的一些方面,特别是由于所有输注的细胞将被重定向至特定的靶抗原,因此可以施用较少数量的细胞。可以以这些范围内的剂量多次施用表达CAR的细胞组合物。细胞对于接受治疗的患者可以是同种异体的、同基因的、异种的或自体的。

[0267] 通常,包含如本文所述活化和扩增的细胞的组合物可用于治疗和预防免疫受损的个体中出现的疾病。特别地,包含本文考虑的CAR修饰的T细胞的组合物用于治疗B细胞恶性肿瘤。本发明的CAR修饰的T细胞可以单独施用,或者作为药物组合物与载体、稀释剂、赋形剂和/或与其他成分(例如IL-2或其他细胞因子)或细胞群组合施用。在特别的实施方式中,本文考虑的药物组合物包含与一种或多种药学或生理上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合的一定量的遗传修饰的T细胞。

[0268] 包含表达CAR的免疫效应细胞群(例如T细胞)的本发明的药物组合物,可以包含缓冲剂,例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,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。本发明的组合物优选配制用于肠胃外施用,例如血管内(静脉内或动脉内)、腹膜内或肌内施用。

[0269] 液体药物组合物,无论是溶液、悬浮液还是其他类似形式,都可以包括以下中的一种或多种:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液,优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠,固定油(例如作为可用作溶剂或悬浮介质的合成的聚甘油单酯或甘油二酯)、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶剂;抗菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲液,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张力的药剂,例如氯化钠或葡萄糖。肠胃外制剂可以装在用玻璃或塑料制成的安瓿瓶、一次性注射器或多剂量小瓶中。可注射药物组合物优选是无菌的。

[0270] 在具体的实施方式中,本文考虑的组合包含单独或与一种或多种治疗剂组合的有效量的表达CAR的免疫效应细胞。因此,表达CAR的免疫效应细胞组合可以单独施用或与其他已知的癌症治疗(例如放射疗法、化学疗法、移植、免疫疗法、激素疗法、光动力疗法等)组合施用。组合也可以与抗生素组合施用。这样的治疗剂在本领域中作为用于本文所述的特定疾病状态(例如特定癌症)的标准治疗可以被接受。考虑的示例性治疗剂包括细胞因子、生长因子、类固醇、NSAID、DMARD、抗炎药、化学疗法、放射疗法、治疗性抗体或其他活性剂和辅助剂。

[0271] 治疗方法

[0272] 本文考虑的遗传修饰的免疫效应细胞提供了过继免疫疗法的改进方法,该方法用于治疗与表达CXCR5的致病性细胞的存在有关的医学病症,包括但不限于免疫调节病症和血液系统恶性肿瘤。

[0273] 如本文所用,“与表达CXCR5的致病性细胞的存在有关的医学病症”是指例如癌症或自身免疫疾病等的医学病症,其中与疾病的病理生理学有关的细胞表现出CXCR5的表达,并且优选地表现出CXCR5在细胞表面上呈现。CXCR5的表达可以通过技术人员已知的多种方法来确定,例如,通过从患者体内分离细胞以及通过使用针对CXCR5转录物的引物进行PCR、用抗CXCR5抗体进行免疫染色或通过流式细胞术进行分析来评估这些细胞。这种致病性细胞通常可以是致病性成熟B细胞和/或记忆B细胞和/或致病性T细胞和/或滤泡辅助性T细胞。

[0274] 在特别的实施方式中,本文考虑的包含CAR修饰的T细胞的组合用于治疗血液系统恶性肿瘤,包括但不限于B细胞恶性肿瘤,例如具有或不具有白血病肿瘤细胞播散的非霍奇金淋巴瘤(NHL)(例如B细胞NHL或T细胞非霍奇金淋巴瘤)。

[0275] 非霍奇金淋巴瘤涵盖了一大组淋巴细胞(白细胞)癌症。非霍奇金淋巴瘤可发生在任何年龄,通常以大于正常的淋巴结、发烧和体重减轻为特征。非霍奇金淋巴瘤也可出现在结外部位,例如中枢神经系统和包括肺、肠、结肠和内脏的粘膜组织。非霍奇金淋巴瘤有许多不同类型。例如,非霍奇金淋巴瘤可分为侵袭性(快速增长)和惰性(缓慢增长)类型。

[0276] 非霍奇金淋巴瘤可源自B细胞和T细胞。如本文所用,术语“非霍奇金淋巴瘤”包括“B细胞”和“T细胞”非霍奇金淋巴瘤。B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)包括伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤(CLL/SLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤和套细胞淋巴瘤。骨髓或干细胞移植后发生的淋巴瘤通常是B细胞非霍奇金淋巴瘤。

[0277] T细胞淋巴瘤约占美国所有NHL的15%。T细胞淋巴瘤有许多不同的形式,例如血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AITL),它是血液或淋巴管免疫母细胞的成熟T细胞淋巴瘤。T细胞淋巴瘤的其他形式涉及皮肤T细胞淋巴瘤和具有白血病播散的T细胞淋巴瘤。

[0278] 慢性淋巴细胞白血病(CLL)也可以用本CAR进行治疗,是一种会导致未成熟白细胞(B淋巴细胞)缓慢增加的惰性(缓慢生长的)癌症。癌细胞通过血液和骨髓扩散,还会影响淋巴结或其他器官,例如肝脏和脾脏。CLL最终导致骨髓衰竭。该疾病的另一种表现形式称为小淋巴细胞淋巴瘤,主要分布在次要淋巴器官,例如淋巴结和脾脏。

[0279] 在本发明的一种实施方式中,CAR或表达所述CAR的免疫细胞旨在用于治疗自身免疫疾病,优选自身抗体依赖性自身免疫疾病,优选具有炎性组分的自身免疫疾病。

[0280] 反常的 (deregulated) 表达CXCR5的滤泡辅助性T细胞 (Tfh) 表现了重要的机制, 该机制在自身免疫疾病中有助于增加体液免疫反应和自身抗体的产生。因此, 在自身免疫的背景下, 表达CXCR5的Tfh细胞代表了可行的靶标。

[0281] 要治疗的自身免疫疾病优选选自高安氏动脉炎, 巨细胞动脉炎, 家族性地中海热, 川崎病, 结节性多动脉炎, 皮肤型结节性多动脉炎, 肝炎相关性动脉炎, 白塞氏综合征, 韦格氏肉芽肿, ANCA血管炎, 丘-施二氏综合征 (Churg-Strauss syndrome), 显微镜下多血管炎、结缔组织病血管炎、Hennoch-紫癜、冷球蛋白血管炎、皮肤白细胞破碎性脉管炎、热带性主动脉炎、结节病、柯根综合征 (Cogan's syndrome)、威斯科特-奥尔德里奇综合征 (Wiskott-Aldrich Syndrome)、麻风结节动脉炎、CNS原发性脉管炎、闭塞性血栓性血管炎、副肿瘤性动脉炎 (Paraneoplastic arteritis)、荨麻疹、德高病 (Dego's disease)、骨髓增生异常综合征、持久性隆起性红斑、高免疫球蛋白D、过敏性鼻炎、支气管哮喘、慢性阻塞性肺病、牙周炎、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、淀粉样变性、克隆病 (Morbus Chron)、溃疡性结肠炎、自身免疫性肌炎、糖尿病、格林-巴利综合征 (Guillain-Barre Syndrome)、组织细胞增生症、骨关节炎、特应性皮炎、牙周炎、慢性鼻窦炎、牛皮癣、牛皮癣关节炎、显微镜结肠炎、肺纤维化、肾小球肾炎、惠普耳氏病 (Whipple's disease)、斯提耳氏病 (Still's disease)、结节性红斑、耳炎、冷球蛋白血症、干燥综合征 (Sjogren's syndrome)、红斑狼疮 (优选系统性红斑狼疮 (SLE))、再生障碍性贫血、骨髓纤维化、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、木村氏病、系统性硬化症、慢性织脉周炎、慢性前列腺炎、特发性肺纤维化、慢性肉芽肿性疾病、特发性失弛缓症、博来霉素诱导的肺部炎症、阿糖胞苷诱导的肺部炎症、自身免疫性血小板减少、自身免疫性嗜中性粒细胞减少、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性淋巴细胞减少症、恰加斯氏病、慢性自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性肝炎、桥本氏甲状腺炎、萎缩性甲状腺炎、格雷夫斯病 (Graves disease)、自身免疫性多腺体综合征、自身免疫性阿狄森综合征、寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、疱疹样皮炎、自身免疫性秃头症、白癜风、抗磷脂综合征、重症肌无力、僵硬综合征 (Stiff-man syndrome)、古德帕斯彻氏综合征、交感性眼炎、毛囊炎、夏普综合征 (Sharpsyndrome) 和/或伊文综合征 (Evans syndrome), 特别是枯草热、牙周炎、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎, 最优选SLE。

[0282] 系统性红斑狼疮 (SLE) 也称为狼疮, 是一种身体的免疫系统攻击身体各部位的健康组织的自身免疫性疾病。症状因人而异, 可能从轻度到重度。常见症状包括关节疼痛和肿大、发热、胸痛、脱发、口腔溃疡、淋巴结肿大、感觉疲劳, 以及最常见于脸上的红色皮疹。

[0283] 滤泡辅助性T细胞 (Tfh) 细胞最近已被发现为CD4+辅助T细胞中的人免疫缺陷病毒 (HIV) 的主要细胞储库 (Leong等人, 2017, Frontiers in Immunology, 8:622), 表达本发明的CAR的CAR免疫细胞可以靶向产生HIV的辅助T细胞的滤泡储库。这样, 本发明的CAR可以用于消除或抑制在治疗HIV中产生HIV的辅助T细胞的储库。因此, 在一种实施方式中, 产生HIV的辅助T细胞的储库被认为是表达CXCR5的一组致病性细胞, 特别是致病性T细胞。

[0284] 如本文所用, 术语“个体”和“受试者”通常可互换使用, 并且是指表现出可以用本文别处公开的基因治疗载体、基于细胞的治疗剂和方法治疗的疾病、病症或病况的症状的任何动物。在优选的实施方式中, 受试者包括表现出可以用本文公开的基于细胞的治疗剂和方法治疗的造血系统的疾病、病症或病况 (例如B细胞恶性肿瘤) 的症状的任何动物。适合的受试者包括实验动物 (例如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)、农场动物和家畜或宠物 (例如猫或

狗)。包括非人灵长类动物,并且优选包括人类患者。典型的受试者包括具有B细胞恶性肿瘤,已被诊断患有B细胞恶性肿瘤或处在具有B细胞恶性肿瘤的风险中的人类患者。

[0285] 如本文所用,“治疗(treatment/treating)”包括对疾病或病理状况的症状或病理学的任何有益或期望的作用,并且可包括所治疗的疾病或病况的一种或多种可测量标记物的甚至最小的减少。治疗可任选地涉及疾病或病况的症状的减轻或改善,或疾病或病况的进展的延迟。“治疗”不一定表示完全根除或治愈疾病或病况或其相关症状。

[0286] 如本文所用,“防止(prevent)”和类似的词语,例如“防止(prevented/preventing)”或“预防(prophylactic)”等,表示防止、抑制或降低疾病或病况发生或复发的可能性的方法。它还指延迟疾病或病况的发作或复发,或延迟疾病或病况的症状的发生或复发。如本文所用,“防止”和类似词语还包括在疾病或病况发作或复发之前降低疾病或病况的强度、影响、症状和/或负担。

[0287] 在一种实施方式中,在有需要的受试者中治疗B细胞相关病症的方法包括施用有效量、例如治疗有效量的包含本文考虑的遗传修饰的免疫效应细胞的组合物。施用的数量和频率将由诸如患者的状况以及患者的疾病的类型和严重性等因素确定,尽管适当的剂量可以通过临床试验确定。

[0288] 本文考虑的组合物的施用可以以任何方便的方式进行,包括通过气溶胶吸入、注射、摄取、输血、植入或移植进行。在优选的实施方式中,肠胃外施用组合物。本文所用的短语“肠胃外施用(parenteral administration/administered parenterally)”是指除肠内和局部施用以外的施用方式,通常通过注射施用,包括但不限于血管内、静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、瘤内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、包膜下、蛛网膜下腔、脊柱内和胸骨内注射和输注。在一种实施方式中,通过直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位而将本文考虑的组合物施用于受试者。

附图说明

[0289] 本发明通过以下附图举例说明。这些附图应当被认为是对可能的和潜在优选的实施方式的进一步描述,这些实施方式增强了本发明的一个或多个非限制性实施方式的支持。

[0290] 附图的简要说明:

[0291] 图1:优选的CAR结构的示意图。

[0292] 图2:优选的CAR构建体H28、R28、HBB1、HBB2和H28BB的示意图。

[0293] 图3:如本文所述的CAR的各种结构元件的优选构建体和潜在组合的列表。

[0294] 图4:mAb结合区与本CAR中采用的优选人源化序列之间的序列比较。

[0295] 图5:编码mAb结合区hHC的DNA序列的序列描绘图。

[0296] 图6:编码mAb结合区hLC的DNA序列的序列描绘图。

[0297] 图7:具有人源化和大鼠CXCR5-CAR序列的GeneArt™质粒。

[0298] 图8:限制酶切后构建体和载体的凝胶电泳。

[0299] 图9:逆转录病毒转导后通过人T细胞上CXCR5 CAR表达进行的流式细胞术确认。

[0300] 图10:在功能测定中评估的细胞类型上的CXCR5表达。

[0301] 图11:CAR转导的人T细胞与不同靶细胞系的共培养物显示了通过不同的CXCR5+B-

NHL和对照细胞系活化特异性T细胞。

[0302] 图12:细胞毒性测定揭示了对CXCR5阳性细胞系的选择性杀伤。

[0303] 图13:在异种移植的NSG小鼠模型中,CXCR5重定向的CAR-T细胞针对B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)是有效的。

[0304] 图14:CAR转导的人T细胞与不同靶细胞系的共培养物显示了通过不同的CXCR5+B-NHL和对照细胞系活化特异性T细胞。

[0305] 图15:CAR转导的人T细胞与作为靶标的不同人组织的CXCR5阴性原代细胞的共培养物未显示脱靶T细胞活化,而表达CXCR5的B-NHL细胞系JeKo-1介导特异性T细胞活化并用作阳性对照。

[0306] 附图的详细说明:

[0307] 图1:优选的CAR结构的示意图。描绘了抗原结合域的VL和VH域,包括位于VH和VL域之间的接头。还描绘了位于抗原结合域和跨膜域之间的间隔区。还描绘了胞内域的变体,其包括例如共刺激和活化域。

[0308] 图2:优选的CAR构建体H28、R28、HBB1、HBB2和H28BB的示意图。本发明的优选构建体包含跨膜域、共刺激域和活化域的变体。本质上,本发明的优选实施方式能够交换这些各种域,优选交换本文公开的那些特别的实施方式,尽管还涵盖具有本领域技术人员已知的类似功能的其他域。

[0309] 图3:如本文所述的CAR的各种结构元件的优选构建体和潜在组合的列表。

[0310] 图4:mAb结合区与本CAR中采用的优选人源化序列之间的序列比较。描述了比对,显示了大鼠与人源化hHC和hLC序列之间的序列同一性。如所描绘的,在人源化和大鼠hHC序列之间有89%的序列同一性,在人源化和大鼠hLC序列之间有93%的序列同一性。

[0311] 图5:编码mAb结合区hHC的DNA序列的序列描绘图,特别显示了编码人源化hHC的原始和密码子优化(CO)的DNA序列之间的序列比较。

[0312] 图6:编码mAb结合区hLC的DNA序列的序列描绘图,特别显示了编码人源化hLC的原始和密码子优化(CO)的DNA序列之间的序列比较。

[0313] 图7:具有人源化和大鼠CXCR5-CAR序列的GeneArt™质粒。使用凝胶电泳证明了切割的scFV。

[0314] 图8:限制酶切后构建体和载体的凝胶电泳。还描绘了包含编码CAR的构建体的质粒MP71。

[0315] 图9:逆转录病毒转导后通过人T细胞上的CXCR5 CAR表达进行的流式细胞术确认:CAR表达、构建体H28、SP6、未转导。

[0316] 图10:(A)在功能测定中评估的某些细胞类型上的CXCR5表达。评估的是B-NHL细胞系DOHH-2、SU-DHL4、OCI-Ly7和JeKo-1,主要患者来源的MCL异种移植物,B-ALL细胞系NALM6、REH,MM细胞系NCI-H929和T-ALL细胞系Jurkat。从分析中可以看出,CXCR5在B-NHL DOHH-2、SU-DHL4、OCI-Ly7和JeKo-1细胞系中表达。(B)排除本发明的CXCR5 CAR-T细胞显示出与人健康组织的交叉反应性,在一组来自人健康组织的原代细胞中评估了CXCR5的表达。通过抗CXCR5免疫染色和流式细胞术分析,测试的原代人细胞(HUVEC,人脐静脉内皮细胞;HUAEC,人脐动脉内皮细胞;HA,人星形胶质细胞;HN,人神经元;HPNC,人周神经细胞;HCoEpiC,人结肠上皮细胞)均未显示CXCR5表面表达。(C)通过使用QuantiBRITE PE校准珠

和CXCR5特异性抗体,对所选B-NHL细胞系(SU-DHL4、OCI-Ly7、DOHH-2、SC-1、JeKo-1、MEC-1、JVM-3)上、MM细胞系(NCI-H929)上、B-ALL(REH、NALM-6)和T-ALL(Jurkat)细胞系上、结肠腺癌细胞系(SW-620)和未转染或CXCR5转染的胚胎肾细胞系(分别为HEK293,HEK-CXCR5)上每个细胞的CXCR5密度进行定量确定。

[0317] 图11:CAR转导的人T细胞与不同靶细胞系的共培养物显示了通过不同的CXCR5+B-NHL和对照细胞系活化特异性T细胞。进行功能性体外共培养和IFN- γ ELISA。释放的IFN- γ 的水平指示T细胞活化。将未转导的T细胞(UT;每个系列的左栏)、表达CXCR5-CAR的T细胞(CXCR5(H28);每个系列的中栏)和SP6 T细胞(SP6;每个系列的右栏)与靶细胞系DOHH-2、SU-DHL4、OCI-Ly7、JeKo-1、NALM6、REH、NCI-H929和Jurkat细胞共培养。DOHH-2、SU-DHL4、OCI-Ly7和JeKo-1靶细胞响应于本发明的CXCR5 CAR-T细胞治疗而显示特异性IFN- γ 释放。JVM-3还显示治疗后IFN- γ 释放。

[0318] 图12:细胞毒性测定揭示了对CXCR5阳性细胞系的选择性杀伤;在CXCR5阴性细胞系中基本上没有观察到杀伤。进行了两个独立的功能性体外共培养和⁵¹Cr释放测定。(A,B) DOHH-2、SU-DHL4、OCI-Ly7、SC-1(仅在(B)中),JeKo-1靶细胞系在用本发明的CAR-T处理后显示裂解,而不表达CXCR5的细胞(Nalm6和NCI-H929)则未显示裂解。

[0319] 图13:在异种移植的NSG小鼠模型中,CXCR5重定向的CAR-T细胞针对B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)有效。为了提供概念证明,将CXCR5 CAR修饰的T细胞的强大体外活性转化为体内有效的抗肿瘤活性,将NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1 Wjl}/SzJ(NSG)小鼠队列用 5×10^5 个套细胞淋巴瘤细胞(MCL)JeKo-1静脉内接种(图13中的A至C),并用荧光素酶基因与GFP一起转导。NSG小鼠不发育T、B和NK细胞,因此适合异种移植人细胞的耐受和生长。(A)在异种移植的NSG小鼠模型中植入MCL肿瘤。通过静脉移植MCL细胞攻击小鼠。肿瘤接种后第5天,通过IVIS成像观察肿瘤细胞的生长。为了测量肿瘤负荷的发作,将成像延长至120秒(第0天)。(B)为了跟踪治疗效果并缩小生物发光强度以得到更好的表现,(A)中的小鼠在第0天再次成像10秒钟。同一天,使用接受 3×10^6 个抗CXCR5 CAR-转导的T细胞的小鼠(n=4)以及作为阴性对照的SP6-CAR-转导的小鼠(n=3)(第0天)。在10秒时在完成CAR-T细胞转移后的随后IVIS暴露,以便在第0天和第19天之间进行更好的比较。(C)在每个时间点针对每组分别绘制了从覆盖每只小鼠全身的目标区域获得的生物发光信号的平均值(图13C)。基本上所有用SP6 CAR治疗的动物都患有以后肢、胸腔和腹部器官的骨髓上有较强的发光信号为表征的进行性淋巴瘤疾病,然而CXCR5 CAR治疗组显然不是这种情况。这提供了CXCR5 CAR-T细胞对B-NHL淋巴瘤实体具有抗肿瘤活性的首次临床前体内证明。

[0320] 图14:CAR转导的人T细胞与不同靶细胞系的共培养物显示了通过不同的CXCR5+B-NHL和对照细胞系活化特异性T细胞。进行功能性体外共培养和IFN- γ (上图)、IL-2(中图)和TNF- α (下图)ELISA。释放的IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的水平指示T细胞活化和T细胞功能。未转导(UT,空心柱)、表达CXCR5-CD28 CAR(H28,红色柱)、CXCR5-41BB(HBB1;蓝色柱)、CXCR5-CD28/41BB(H28BB,绿色柱)的T细胞和SP6 T细胞(SP6,灰色柱)与靶细胞系JeKo-1、DOHH-2、SU-DHL4、OCI-Ly7、REH和NCI-H929细胞共培养。DOHH-2、SU-DHL4、OCI-Ly7和JeKo-1靶细胞响应于用本发明的CXCR5 CAR-T细胞治疗而显示特异性IFN- γ 、IL-2和TNF- α 释放。

[0321] 图15:CAR转导的人T细胞与作为靶标的不同人组织的CXCR5阴性原代细胞的共培养物未显示脱靶T细胞活化,而表达CXCR5的B-NHL细胞系JeKo-1介导特异性T细胞活化并用

作阳性对照。进行功能性体外共培养和IFN- γ ELISA。将未转导的(UT,空心柱),表达CXCR5-CD28 CAR(H28,红色柱)的T细胞和SP6 CAR T细胞(SP6,灰色柱)与原代细胞HUVEC、HUAEC、HA、HN、HPNC、HCoEpiCs,与T-ALL细胞系Jurkat,以及B-NHL细胞系JeKo-1共培养。缺乏IFN- γ 释放指示在存在CXCR5阴性原代细胞和CXCR5阴性T-ALL细胞系Jurkat的情况下缺乏特异性T细胞活化。本发明的CXCR5-CD28 CAR-T细胞响应于与表达CXCR5的JeKo-1靶细胞的共培养而显示特异性IFN- γ 释放。

[0322] 实施例

[0323] 通过以下公开的实施例说明本发明。实施例提供了对本发明的潜在优选的非限制性实施方式的技术支持和更详细的描述。

[0324] 为了证明本文描述的CAR的功能性和有益特性,应考虑以下实施例:

[0325] -CAR转导的人T细胞与不同靶细胞系的共培养显示出不同的CXCR5+细胞系对T细胞的特异性活化;读出(readout)是从T细胞释放作为效应细胞因子的IFN- γ 。

[0326] -细胞毒性测定揭示了CXCR5+细胞系的选择性杀伤;在CXCR5阴性细胞系(例如Nalm6和NCI-H929)中基本上没有杀伤。

[0327] -体内实验涉及使用异种移植NSG小鼠模型生成关于i)功能性,ii)脱靶反应性,iii)T细胞记忆,和iv)过继转移的CAR-T细胞对B-NHL细胞系的生物安全性的数据。对于B-NHL,将抗CXCR5 CAR-T细胞的溶细胞能力与建立的抗CD19 CAR-T细胞产物进行比较。

[0328] 实施例1:克隆和质粒制备:

[0329] CAR scFv序列使用GeneArt™(基因合成服务)合成。使用NotI和CsiI(图7)进行了合成序列的限制性消化以便从GeneArt质粒释放scFv插入物。用NotI和CsiI消化包含另外的CAR序列的逆转录病毒载体MP71,以使得能够随后将分离的scFv插入物连接到载体中的CAR构建体中。随后将消化的载体去磷酸化。使用凝胶电泳分离片段(图8)并纯化。

[0330] 随后将如上所述产生的CAR scFv序列以3:1的比例连接到包含另外的CAR序列(50ng)的纯化载体中。将连接混合物转化到MACH-1中。进行对照消化,并对微量制备物进行测序。随后将构建体重新转化到MACH-1中。制备了MP71-CXCR5-CAR质粒的最大量制备物。

[0331] MP71是单(+)链RNA病毒。逆转录酶将逆转录病毒RNA-基因组转化为DNA拷贝。DNA作为原病毒在随机位置整合到靶基因组中。通过细胞分裂,病毒作为原病毒稳定再生。

[0332] MP71包含以下顺式调控元件:

[0333] LTR(=长末端重复序列)来源于含有启动子的鼠骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)。载体的前导序列衍生自鼠胚胎干细胞病毒。PRE(转录后调控元件)最初来自土拨鼠肝炎病毒。

[0334] MP71已经失活,因为逆转录病毒基因缺失,因此不再具有复制能力。先前将结构基因分别引入包装细胞系中的两个辅助质粒中。转染需要gag、pol和env基因产物。感染性病毒颗粒释放到细胞培养上清液中,并且可用于转导PBL。可以在人PBL中实现高转导率和高表达率。

[0335] 实施例2:转染和转导:

[0336] 第0天:在6孔板中接种HEK-T(293T)细胞或GalV细胞用于产生病毒

[0337] 第1天:用于产生逆转录病毒的瞬时3质粒转染(磷酸钙转染)。根据标准方案,在250mM CaCl₂和150 μ l H₂O中,每孔使用18 μ g DNA。将细胞在37℃下温育6小时,更换培养基,然后在37℃下进一步温育48小时。

[0338] 用抗huCD3和抗huCD28抗体包被24孔非组织培养板:

[0339] 制备抗CD3/抗CD28-抗体 (5 μ g/ml抗CD3、1 μ g/ml抗CD28) 的PBS溶液, 每孔0.5ml。将具有0.5ml抗体溶液的每个孔在37 $^{\circ}$ C下温育2小时, 用2% 无菌BSA溶液 (水溶液) 替换, 温育: 30分钟 (37 $^{\circ}$ C)。除去BSA溶液, 并用2ml PBS洗涤孔。

[0340] 从40ml血液中纯化PBMC (约 2.5×10^7 个PBMC):

[0341] 在2 \times 50ml Falcon管中制备12.5ml Ficoll梯度介质, 用RPMI (+100IU/ml的青霉素、链霉素) 稀释血液至45ml, 混合, 并用22.5ml血液-介质混合物包被, 离心 (20分钟, 20 $^{\circ}$ C, 1800rpm, RZB*648, G 17.9)。丢弃15ml上层相。将剩余的上层相与含乳白色PBMC的中间相转移至新的50ml Falcon管, 用RPMI (+100IU/ml青霉素、链霉素) 填充至45ml, 并离心。在45ml RPMI (+100IU/ml青霉素、链霉素) 中重悬沉淀物, 离心, 将沉淀物合并于10-20ml T细胞培养基中, 用台盼蓝染色一个样品, 计数细胞并添加浓度为1至 1.5×10^6 个细胞/ml的细胞 (T细胞培养基 (+100IU/ml IL-2) 对应于400U/ml临床IL2) 至抗CD3、抗CD28包被的孔。离心剩余的PBMC, 将其悬浮在冷冻培养基中, 并在-80 $^{\circ}$ C下储存在冷冻管中。

[0342] 第3天:PBL的转导

[0343] 从HEK-T-或GalV细胞中去除并过滤 (0.45 μ m过滤器) 病毒上清液。用1.0ml病毒上清液处理受刺激的PBMC。用1ml病毒上清液处理受刺激的PBL, 并在CD3/CD28包被的孔中离心 (90分钟, 32 $^{\circ}$ C, 800 \times g)。终浓度为100IU/ml IL2或10ng/ml IL7和10ng/ml IL15, 另外还有4 μ g/ml (8 μ l) 硫酸鱼精蛋白。

[0344] 第4天:PBL的转导

[0345] 从HEK-T细胞或GalV细胞中过滤 (0.45 μ m) 剩余的病毒上清液 (4 $^{\circ}$ C) 和第二上清液。从PBL收集1ml上清液。将细胞因子浓度调整为100IU/ml IL2或10ng/ml IL7和10ng/ml IL15, 以及4 μ g/ml (8 μ l) 的硫酸鱼精蛋白。在32 $^{\circ}$ C下以800 \times g离心90分钟。转导后4小时, 将PBL从24孔板中洗出至T25细胞培养瓶中。添加具有IL2或IL7/IL15的新鲜培养基。

[0346] 第7天到第13天: 培养PBL, 用新鲜的IL2或IL7/IL15处理T细胞培养基。

[0347] 第13天: 结束T细胞刺激。

[0348] 冲洗细胞培养瓶中的PBL培养物, 离心, 将沉淀物在T细胞培养基 (+10IU/ml IL2或1ng/ml IL7/IL15) 中重悬。

[0349] 从第15天开始: 功能测定

[0350] 实施例3: 抗CXCR5 CAR T细胞的体外功能测试

[0351] 逆转录病毒转导后人T细胞上CXCR5 CAR表达的确认:

[0352] 提供了在人T细胞的情况下折叠和运输CAR受体的证据。证明了逆转录病毒转导方案的功能性。

[0353] 1) 通过Ficoll梯度纯化人外周血白细胞。如上所述培养、刺激和用逆转录病毒转导细胞。

[0354] 转导后, 将细胞进一步在含有IL2或IL-7/IL15的培养基中培养, 然后分析CXCR5-CAR表达。

[0355] 2) 通过流式细胞术 (FACS) 分析来评估转导率和生活力。为了检测CXCR5-CAR的表达, 用抗人IgG抗体对细胞进行染色, 该抗体选择性识别CAR构建体间隔区中的人IgG1或IgG4部分。进行对CD3/CD8 T细胞的复合染色。

[0356] 结果如图9所示。

[0357] CAR转导的人T细胞与不同靶细胞系的共培养显示不同的CXCR5⁺B-NHL细胞系的特异性T细胞活化

[0358] 对于CAR-T细胞活化的读出是从T细胞释放作为效应细胞因子的IFN- γ 。

[0359] 1) 如上详细描述,产生了逆转录病毒转导的人T细胞。使用了以下T细胞: CXCR5-CD28 CAR受体变体 (H28)、CXCR5-4-1BB CAR受体变体 (HBB1)、CXCR5-CD28/4-1BB CAR受体变体 (H288BB)、SP6阴性对照CAR, UT=未转导的T细胞。

[0360] 2) 在列出的细胞系或原代细胞存在下,将逆转录病毒转导的T细胞共培养18至20小时,比例为1:1。

[0361]

细胞系	起源	CXCR5 阳性
DOHH-2	由滤泡性中心母细胞/中心细胞性淋巴瘤 (FL) 发展而来的免疫母细胞性 B 细胞淋巴瘤	是
OCI-Ly7	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL), 生发中心型	是
SU-DHL4	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL), 生发中心型	是
JeKo-1	套细胞淋巴瘤 (MCL), B-NHL	是
SC-1	B 滤泡性淋巴瘤 (B-NHL)	是
JVM-3	B 细胞慢性淋巴细胞白血病 (B-CLL)	是
NALM-6	B 急性成淋巴细胞白血病 (B-ALL)	否
REH	B 急性成淋巴细胞白血病 (B-ALL)	否
NCI-H929	多发性骨髓瘤 (MM)	否
Jurkat	T 细胞急性成淋巴细胞白血病 (T-ALL)	否
SW-620	结肠腺癌细胞	否
HEK293	胚肾细胞	否
HEK-CXCR5	CXCR5 转染的胚肾细胞	是
原代细胞	起源	CXCR5 阳性
MCL PDX	患者来源的套细胞淋巴瘤异种移植物	是
HUVEC	人脐静脉内皮细胞	否
HUAEC	人脐动脉内皮细胞	否
HA	人星形胶质细胞	否
HPNC	人周神经细胞	否
HCoEpiC	人结肠上皮细胞	否
HN	人神经元	否

[0362] 3) 共培养后,取样无细胞培养上清液并测定IFN- γ 的对照水平。最大释放值通过

PMA/离子霉素刺激效应T细胞诱导。最小释放值仅由T细胞诱导。

[0363] 4) 通过ELISA测定上清液中的IFN- γ 释放。

[0364] 结果如图11所示。

[0365] 细胞毒性测定揭示了对CXCR5阳性细胞系的选择性杀伤;在CXCR5阴性细胞系中基本上未见杀伤

[0366] 使用⁵¹Cr释放测定法定量细胞毒性T淋巴细胞的活性。该测定法能够测量靶细胞的细胞溶解。

[0367] 1) 如上所述,产生了逆转录病毒转导的人T细胞。除了SP6阴性对照CAR和UT=未转导的T细胞外,还使用了CXCR5 CAR受体变体(H28)。

[0368] 2) 用⁵¹Cr标记靶细胞

[0369] 3) 然后将CAR-T细胞和标记的靶细胞共培养4小时,并滴定法测量效应细胞与靶细胞的比例:

[0370] 效靶比:

[0371] 80:1

[0372] 0:1

[0373] 20:1

[0374] 10:1

[0375] 5:1

[0376] 2.5:1

[0377] 4) 收集无细胞的细胞培养上清液,

[0378] 5) 将上清液转移至LUMA-闪烁板,在 γ 闪烁计数器中测量释放的⁵¹Cr。最大释放值由通过施加至LUMA板而裂解的靶细胞来确定;最小释放值仅使用靶细胞来确定。

[0379] 结果如图12所示。

[0380] 实施例4:使用异种移植NSG小鼠模型的体内实验,以评估针对B-NHL细胞系的过继转移的CAR-T细胞

[0381] 为了证明配备有本文所述的多种抗CXCR5-CAR变体的CAR-T细胞具有效应活性,而且在原位条件下也具有效应活性,将CXCR5+B-NHL细胞系通过静脉内途径移植到NSG小鼠(NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1} Wjl/SzJ)中。

[0382] CXCR5+B-NHL细胞系为:

[0383] SU-DHL4 (DLBCL)、JEKO-1 (套细胞淋巴瘤)、JVM3 (CLL)、DOHH-2 (FL)、OCI-Ly7或SC-1。

[0384] 包括阴性对照细胞系,即REH (ALL),它在体外并未被抗CXCR5 CAR T细胞破坏,但是抗CD19 CAR的靶标。

[0385] 这些小鼠特别适合于异种移植,因为它们通过提供细胞因子来支持人细胞的生长,并且没有用于排斥移植的T、B和NK细胞。B-NHL细胞系也用萤火虫荧光素酶基因稳定转导,该基因允许通过应用荧光素进行体内肿瘤细胞检测。使用IVIS系统通过生物发光成像监测注射的肿瘤的进展和分布。

[0386] 接下来,当通过萤光素酶发光信号强度增强确认肿瘤细胞的生长时,在肿瘤细胞接种后约5至8天,在静脉内途径从每个接受者 5×10^5 至高达 5×10^6 个细胞,以滴定的方式施

用人CAR T细胞。将抗CXCR5 CAR T细胞与抗CD19 CAR和两种合适的阴性对照(例如无关的SP6对照和未转导的T细胞对照)进行了比较。

[0387] 每隔3至5天测量一次发光强度,并确定动物的肿瘤细胞相关信号的生长迟缓/进展和消失。观察间隔为28天。发光强度的降低和肿瘤细胞相关信号的消失表明CAR T细胞具有治疗作用。

[0388] 上述实验用NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1 Wjl}/SzJ(NSG)小鼠通过用 5×10^5 个用萤光素酶基因连同GFP转导的套细胞淋巴瘤细胞(MCL)静脉内接种小鼠来进行(图13)。小鼠随后接受 3×10^6 个抗CXCR5 CAR转导的T细胞(n=4),以及使用SP6-CAR转导的T细胞(n=3)(第0天)作为阴性对照。从覆盖每只小鼠全身的目标区域获得生物发光信号的平均值。在每个时间点针对每组绘制数据图(图13C)。基本上所有用SP6 CAR治疗的动物都患有以后肢、胸腔和腹部器官的骨髓上有较强的发光信号为特征的进行性淋巴瘤疾病,然而CXCR5 CAR治疗组明显不是这种情况。这提供了CXCR5 CAR-T细胞对B-NHL淋巴瘤实体具有抗肿瘤活性的首次临床前体内证明。

[0389] 图14显示了具有(1)4-1BB或CD28作为共刺激组件和(2)具有CD28和4-1BB作为共刺激组件的第三代CAR的可供选择的CAR组件,以及它们对使用CAR T细胞与肿瘤细胞系的共培养实验的功能效果。带有CXCR5的肿瘤细胞对CAR-T细胞的特异性活化通过释放IFN- γ 、IL-2和TNF- α 来证明。

[0390] 尽管CXCR5-CD28(H28)CAR似乎是最有效的,但两种可供选择的CAR CXCR5-4-1BB(HBB1)和CXCR5-CD28/4-1BB(H28BB)也显示出明显的特异性活性。图15显示来自不携带CXCR5的健康人组织的原代细胞(也参见图10B中的数据)不诱导CXCR5-CD28 CAR-T细胞的特异性活性。

[0391] 实施例5:特定患者群体的临床方法

[0392] 在人体内环境中,预期本发明在患有弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病和套细胞淋巴瘤的B-NHL患者中显示功效。具有以下特征的患者将被纳入I期临床研究:i)具有多药抗性的患者;ii)不符合同种异体干细胞移植条件的患者;iii)具有不能接受进一步化学疗法的合并症的患者;iv)不耐受化学疗法的老年患者;v)出现进行性疾病后采取抢救疗法,多线的其他标准护理疗法均无效的患者,vi)自体干细胞移植后患有快速进行性疾病的患者,vii)同种异体干细胞移植后具有进行性疾病的患者,viii)同种异体干细胞移植之前作为过渡疗法的患者,和/或ix)在肿瘤细胞上表现出CD19和/或CD20的逃逸变体或突变体,从而使当前的抗体疗法(抗CD20、利妥昔单抗、抗CD19、奥仑单抗、BITE CD19/CD3、博纳吐单抗)或抗CD19CAR疗法失去/下调其靶标结构并变得无效的患者。

[0393] 在人体内环境中,预期本发明在患有血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤和具有白血病播散、皮肤定位或任何其他器官播散的各种形式的T细胞淋巴瘤的T-NHL患者中显示功效。对于这些患者,除全身化疗方案外,不存在选择性治疗。因此,具有以下特征的患者将被纳入I期临床研究:i)具有多药抗性的患者;ii)不符合同种异体干细胞移植条件的患者;iii)具有不能接受进一步化学疗法的合并症的患者;iv)不耐受化学疗法的老年患者;v)出现进行性疾病后采取抢救疗法,一线或两线的其他标准护理疗法均无效的患者,vi)自体干细胞移植后患有快速进行性疾病的患者,vii)同种异体干细胞移植后具有进行性疾病的患者,viii)同种异体干细胞移植之前作为过渡疗法的患者,ix)针对进行一线标准化学疗法

的具有进行性疾病的患者作为第二线疗法。

序列表

<110> 马克思-德布鲁克-分子医学中心亥姆霍兹联合会

<120> 嵌合抗原受体和结合CXCR5的CAR-T细胞

<130> XII 2156/17W0

<150> EP17187554.5

<151> 2017-08-23

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser Gly
1 5

[0001]

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 2

Ile Ser Ser Ser Ser Gly Phe Val
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 3

Ala Arg Ser Glu Ala Ala Phe
1 5

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体序列

<400> 4

Lys Ser Arg Leu Ser Arg Met Gly Ile Thr Pro
 1 5 10

<210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0002]

<400> 5

Arg Met Ser Xaa
 1

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体序列

<400> 6

Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体序列

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16).. (16)	
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (19).. (19)	
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (23).. (23)	
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35).. (35)	
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (46).. (46)	
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸	
[0003]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (49).. (49)	
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (62).. (62)	
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (77).. (77)	
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (82).. (82)	
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (86).. (87)	
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (92).. (92)	
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸	
	<400> 7	

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

[0004] Ser

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (47)..(47)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (59)..(59)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Xaa Pro Arg Ser Xaa Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Xaa Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Xaa Lys Ser Arg Leu Ser Arg
 20 25 30

[0005]

Met Gly Ile Thr Pro Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Xaa Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Xaa Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Xaa Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 9
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体序列

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Gly Phe Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ser Glu Ala Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

[0006]

Ser

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met His Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Gly Phe Val Tyr Ala Asp Ala Val Lys

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ser Glu Ala Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体序列

[0007] <400> 11

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Arg Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Arg Leu Ser Arg
20 25 30

Met Gly Ile Thr Pro Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Ala 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 Lys Val Glu Thr Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗体序列

<400> 12

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ala Pro Arg Ser Val Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Lys Ser Arg Leu Ser Arg
 20 25 30

Met Gly Ile Thr Pro Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

[0008]

Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 接头

<400> 13

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 14

<211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 接头

<400> 14

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser

<210> 15
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IgG1间隔区

<400> 15

[0009] Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 1 5 10 15

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 100 105 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
130 135 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
195 200 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys
225 230 235

[0010]

<210> 16
<211> 235
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1 delta间隔区

<400> 16

Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

65	70	75	80
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	85	90	95
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	100	105	110
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	115	120	125
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu	130	135	140
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	145	150	155
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	165	170	175
[0011] Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	180	185	190
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val	195	200	205
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln	210	215	220
Lys Ser Leu Ser Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys	225	230	235
<210> 17			
<211> 229			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> IgG4 (HI-CH2-CH3)间隔区			
<400> 17			
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe	1	5	10
			15

	Glu	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				
[0012]	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	
		130					135					140					
	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
	145					150					155					160	
	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
					165					170					175		
	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	
				180					185					190			
	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	
			195					200					205				
	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	
		210					215					220					
	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys												
	225																
<210>	18																

<211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IgG4 (HI-CH3)间隔区

<400> 18

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg
 1 5 10 15

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 20 25 30

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 35 40 45

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 50 55 60

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 65 70 75 80

[0013]

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 85 90 95

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 100 105 110

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 115

<210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IgG4 (HI)间隔区

<400> 19

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 20
 <211> 24

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 跨膜域CD8 α

<400> 20

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> 21
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 跨膜域CD28

<400> 21

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

[0014]

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

<210> 22
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 共刺激域4-1BB

<400> 22

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> 23

<211> 42
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 共刺激域CD28

<400> 23

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu
 35 40

<210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 活化域CD3 ζ (4-1BB)或(CD28)

[0015]

<400> 24

Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 20 25 30

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 35 40 45

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 50 55 60

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 65 70 75 80

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 85 90 95

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 100 105 110

Arg

<210> 25
 <211> 682
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> H28

<400> 25

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

[0016] Thr Phe Ser Thr Ser Gly Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Gly Phe Val Tyr
65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln
85 90 95

Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Glu Ala Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly
130 135 140

Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
145 150 155 160

Arg Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg

	165	170	175
	Ser Ser Lys Ser Arg Leu Ser Arg Met Gly Ile Thr Pro Leu Asn Trp 180 185 190		
	Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met 195 200 205		
	Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser 210 215 220		
	Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val 225 230 235 240		
	Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Pro Thr Phe Gly 245 250 255		
	Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp 260 265 270		
[0017]	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro 275 280 285		
	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala 290 295 300		
	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp 305 310 315 320		
	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn 325 330 335		
	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val 340 345 350		
	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu 355 360 365		
	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys 370 375 380		
	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr 385 390 395 400		

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 420 425 430

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 450 455 460

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 485 490 495

Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
 500 505 510

[0018]

Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 515 520 525

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 530 535 540

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 545 550 555 560

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
 565 570 575

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 580 585 590

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 595 600 605

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 610 615 620

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
625 630 635 640

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
645 650 655

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
660 665 670

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
675 680

<210> 26
<211> 682
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> R28

<400> 26

[0019]

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Ser Thr Ser Gly Met His Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Asp Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Gly Phe Val Tyr
65 70 75 80

Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln
85 90 95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Glu Ala Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

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

[0020]

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
355 360 365

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
370 375 380

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
385 390 395 400

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
420 425 430

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
450 455 460

[0021]

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
485 490 495

Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
500 505 510

Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
515 520 525

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
530 535 540

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
545 550 555 560

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
565 570 575

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
580 585 590

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
595 600 605

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
610 615 620

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
625 630 635 640

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
645 650 655

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
660 665 670

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
675 680

[0022]

<210> 27
<211> 678
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HBB1

<400> 27

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Ser Thr Ser Gly Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Gly Phe Val Tyr
65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln
85 90 95

Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Glu Ala Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly
130 135 140

Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
145 150 155 160

Arg Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg
165 170 175

Ser Ser Lys Ser Arg Leu Ser Arg Met Gly Ile Thr Pro Leu Asn Trp
180 185 190

[0023]

Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
195 200 205

Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
210 215 220

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val
225 230 235 240

Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Pro Thr Phe Gly
245 250 255

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp
260 265 270

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
275 280 285

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala
290 295 300

	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
	305					310					315					320
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
					325					330					335	
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
				340					345					350		
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
			355					360					365			
	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
		370					375					380				
	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
	385					390					395					400
	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
					405					410					415	
[0024]	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
				420					425					430		
	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
			435					440					445			
	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
		450					455					460				
	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
	465				470						475					480
	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Pro
				485						490					495	
	Gly	Lys	Lys	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val
				500					505					510		
	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys
			515					520					525			
	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr

	530	535	540
	Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu 545 550 555 560		
	Gly Gly Cys Glu Leu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala 565 570 575		
	Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu 580 585 590		
	Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp 595 600 605		
	Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu 610 615 620		
	Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile 625 630 635 640		
[0025]	Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr 645 650 655		
	Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met 660 665 670		
	Gln Ala Leu Pro Pro Arg 675		
	<210> 28 <211> 683 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> HBB2		
	<400> 28		
	Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser 1 5 10 15		
	Val Ile Met Ser Arg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu 20 25 30		

	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
			35					40					45			
	Thr	Phe	Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Asn	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
		50					55					60				
	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Phe	Val	Tyr
	65					70					75					80
	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Gln
					85					90					95	
	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala
				100					105					110		
	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Glu	Ala	Ala	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			115					120					125			
	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly
		130					135					140				
[0026]	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro
	145					150					155					160
	Arg	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg
					165					170					175	
	Ser	Ser	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Arg	Met	Gly	Ile	Thr	Pro	Leu	Asn	Trp
				180					185					190		
	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met
		195						200					205			
	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser
		210					215					220				
	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Lys	Val	Glu	Thr	Glu	Asp	Val
	225					230					235				240	
	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Phe	Leu	Glu	Tyr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly
					245					250					255	
	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp

	260	265	270
	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro 275 280 285		
	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala 290 295 300		
	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp 305 310 315 320		
	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn 325 330 335		
	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val 340 345 350		
	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu 355 360 365		
[0027]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys 370 375 380		
	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr 385 390 395 400		
	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 405 410 415		
	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu 420 425 430		
	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu 435 440 445		
	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys 450 455 460		
	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu 465 470 475 480		
	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 485 490 495		

Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
500 505 510

Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
515 520 525

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
530 535 540

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
545 550 555 560

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Leu Arg Val Lys Phe Ser
565 570 575

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
580 585 590

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
595 600 605

[0028]

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
610 615 620

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
625 630 635 640

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
645 650 655

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
660 665 670

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
675 680

<210> 29
<211> 724
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> H28BB

<400> 29

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Ser Thr Ser Gly Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Gly Phe Val Tyr
65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln
85 90 95

[0029]

Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Glu Ala Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly
130 135 140

Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
145 150 155 160

Arg Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg
165 170 175

Ser Ser Lys Ser Arg Leu Ser Arg Met Gly Ile Thr Pro Leu Asn Trp
180 185 190

Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
195 200 205

Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
210 215 220

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val
225 230 235 240

Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Pro Thr Phe Gly
245 250 255

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp
260 265 270

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
275 280 285

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala
290 295 300

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
305 310 315 320

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
325 330 335

[0030]

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
340 345 350

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
355 360 365

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
370 375 380

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
385 390 395 400

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
420 425 430

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
450 455 460

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
485 490 495

Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
500 505 510

Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
515 520 525

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
530 535 540

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
545 550 555 560

[0031]

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Lys Arg Gly Arg Lys Lys
565 570 575

Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
580 585 590

Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly
595 600 605

Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
610 615 620

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
625 630 635 640

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
645 650 655

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
660 665 670

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
675 680 685

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
690 695 700

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
705 710 715 720

Leu Pro Pro Arg

<210> 30
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Lkappa前导区

<400> 30

[0032] Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg
20

<210> 31
<211> 2049
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> H28d

<400> 31
atggatttcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc 60
cgcgaggtgc agctggtgga atctggcgga ggactgggtgc agcctggcgg ctctctgaga 120
ctgtcttgtg ccgccagcgg cttcaccttc agcaccagcg gcatgaactg gttcagacag 180
gcccctggca agggcctgga atgggtgtcc tacatcagca gcagctccgg cttcgtgtac 240
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcagagaca acgcccagaa cagcctgtac 300
ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcgag 360
gccgcctttt ggggccaggg aacactcgtg acagtgtcca gcggcagcac aagcggctct 420

[0033]	ggcaaacctg gatctggcga gggcagcacc aagggcgata tcgtgctgac ccagagcccc	480
	agatccctgc ctgtgacacc tggcgagcct gccagcatca gctgcagaag cagcaagagc	540
	cggctgagcc ggatgggcat cccccctg aactggtatc tgcagaaacc cggccagtcc	600
	ccccagctgc tgatctaccg gatgagcaac agagccagcg gcgtgcccga tagattttcc	660
	ggctctggaa gcggcaccga cttcacctg aagatcagca aggtggaaac cgaggacgtg	720
	ggcgtgtact attgcgcca gttcctggaa tccccccca cctttggcag cggcaccaag	780
	ctggaaatca agcccgccga gcccaagagc cccgacaaga ccataacctg ccctccatgt	840
	cctgcccctc cagtggctgg ccctagcgtg ttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc	900
	ctgatgatcg cccggacccc tgaagtgacc tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat	960
	cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag	1020
	cccagagagg aacagtacaa cagcacctac cgggtggtgt ctgtgctgac cgtgctgcat	1080
	caggactggc tgaacggcaa agagtacaag tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc	1140
	cccatcgaga aaaccatctc caaggccaag ggacagcccc gcgagcccca ggtgtacaca	1200
	ctgcctcaa gcagggacga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa	1260
	ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	1320
	tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc	1380
	accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag	1440
	gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa aaaagatccc	1500
	aaatthtggg tgetggtggt ggttgggtga gtcctggctt gctatagctt gctagtaaca	1560
	gtggccttta ttatthtctg ggtgaggagt aagaggagca ggctcctgca cagtgaactac	1620
	atgaacatga ctccccgccg ccccgggccc acccgcaagc attaccagcc ctatgcccc	1680
	ccacgcgact tcgcagccta tcgtccctg agagtgaagt tcagcaggag cgagacgcc	1740
	cccgcgtacc agcagggccga gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag	1800
	gagtacgatg ttttgacaa gagacgtggc cgggacctg agatgggggg aaagccgaga	1860
	aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc	1920
	tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac	1980
	cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc	2040
	cctcgtga	2049

	<210>	32	
	<211>	2049	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	R28d	
	<400>	32	
	atggatttcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc		60
	cgcgaggtag agctgggtga gtctggagga ggcttagtgc agcctggaaa gtccctgaaa		120
	ctctcctgtt cagcctctgg attcacattc agtacctctg gcatgcactg gtttcgccaa		180
	gctccaggaa aggggctgga ttgggttgca tacattagta gtagcagcgg tttcgtctat		240
	gcagacgctg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca atgcacagaa caccctgtac		300
	ctgcaactca acagtctgaa gtctgaagac actgccatct attactgtgc aagaagcgag		360
	gctgctttct ggggccaaagg cactctggtc actgtctctt caggcagcac cagcggtcc		420
	ggcaagcctg gctctggcga gggcagcaca aaggagata ttgtgttgac tcaagctcca		480
	cgctctgtat ctgtcactcc tggagagtca gcttccatct cctgcaggtc taataagagt		540
[0034]	cgactgagta ggatgggcat cactcccttg aattggtacc ttcagaagcc aggaaagtct		600
	cctcagctcc tgatatatcg gatgtccaac cttgcctcag gagttccaga caggtttagt		660
	ggcagtgggt cagaaacaga ttttacctg aaaatcagta aggtggagac tgaggatgtt		720
	ggcgtttatt actgtgcaca gtttctagaa tatectcta cgttcggttc tgggaccaag		780
	ctggagatca aacctgccga gcctaagagc cccgacaaga cccacacctg tcccccttgt		840
	cctgcccctc cagtggctgg ccctagcgtg ttcctgttcc ccccaaagcc caaggatacc		900
	ctgatgatcg cccggacccc cgaagtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac		960
	cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag		1020
	ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac		1080
	caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc		1140
	cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc		1200
	ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa		1260
	ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac		1320
	tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc		1380
	accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag		1440

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa aaaagatccc	1500
aaattttggg tgctgggtgt ggttgggtgga gtcctggctt gctatagctt gctagtaaca	1560
gtggccttta ttattttctg ggtgaggagt aagaggagca ggctcctgca cagtgactac	1620
atgaacatga ctccccgccg ccccgggccc acccgcaagc attaccagcc ctatgcccc	1680
ccacgcgact tcgcagccta tcgctccctg agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc	1740
cccgcgtacc agcagggccga gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag	1800
gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga	1860
aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc	1920
tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac	1980
cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc	2040
cctcgctga	2049

<210> 33
 <211> 2037
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0035]

<220>
 <223> HBB1d

<400> 33	
atggatttcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc	60
cgcgaggtgc agctgggtgga atctggcgga ggactgggtgc agcctggcgg ctctctgaga	120
ctgtcttgtg ccgccagcgg cttcaccttc agcaccagcg gcatgaactg gttcagacag	180
gcccctggca agggcctgga atgggtgtcc tacatcagca gcagctccgg cttcgtgtac	240
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcagagaca acgcccagaa cagcctgtac	300
ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcgag	360
gccgcctttt ggggccaggg aacactcgtg acagtgtcca gcggcagcac aagcggctct	420
ggcaaacctg gatctggcga gggcagcacc aaggcgata tcgtgctgac ccagagcccc	480
agatccctgc ctgtgacacc tggcgagcct gccagcatca gctgcagaag cagcaagagc	540
cggctgagcc ggatgggcat cccccctg aactggtatc tgcagaaacc cggccagtcc	600
ccccagctgc tgatctaccg gatgagcaac agagccagcg gcgtgcccga tagattttcc	660
ggctctggaa gcggcaccga cttcaccctg aagatcagca aggtggaaac cgaggacgtg	720
ggcgtgtact attgcgccc gttcctggaa tccccccca cctttggcag cggcaccaag	780

[0036]	ctggaaatca agcccccgga gcccagagc cccgacaaga cccataacctg ccctccatgt	840
	cctgccccctc cagtggctgg ccctagcgtg ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc	900
	ctgatgatcg cccggacccc tgaagtgacc tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat	960
	cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac ggcggtggaag tgcacaacgc caagaccaag	1020
	cccagagagg aacagtacaa cagcacctac cgggtggtgt ctgtgctgac cgtgctgcat	1080
	caggactggc tgaacggcaa agagtacaag tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc	1140
	cccatcgaga aaaccatctc caaggccaag ggacagcccc gcgagcccca ggtgtacaca	1200
	ctgcctccaa gcagggacga gctgaccaag aaccaggtgt ccctgacctg cctcgtgaag	1260
	ggctttctacc cctccgatat cgccgtggaa tgggagagca atggccagcc cgagaacaac	1320
	tacaagacca cccccctgt gctggacagc gacggctcat tcttctgtga cagcaagctg	1380
	acagtggaca agagccggtg gcagcagggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag	1440
	gctctgcaca accactacac ccagaagtcc ctgagcagcc tgagcccagg caagaagatc	1500
	tacatctggg cccctctggc cggcacctgt ggcggtgctgc tgctgtctct cgtgatcaca	1560
	ctgtactgca agcggggcag aaagaagctg ctgtacatct tcaagcagcc cttcatgcgg	1620
	cccgtgcaga ccaccagga agaggacggc tgctcctgca gattccccga ggaagaagaa	1680
	ggcggctgcg agctgctgcg cgtgaagttt tctagaagcg ccgacgcccc tgcctaccag	1740
	cagggccaga accagctgta caacgagctg aacctgggca gacgggaaga gtacgacgtg	1800
	ctggataagc ggagaggccg ggacctgag atgggcggca agcctagaag aaagaacccc	1860
	caggaaggcc tgtataacga actgcagaaa gacaagatgg ccgaggccta cagcgagatc	1920
	ggaatgaagg gcgagcggag aagaggcaag ggccacgatg gactgtacca gggcctgagc	1980
	accgccacca aggacaccta tgacgccctg cacatgcagg ctctgcccc cagataa	2037
<210> 34 <211> 2052 <212> DNA <213> 人工序列		
<220> <223> HBB2d		
<400> 34 atggatttcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc		
	cgcgaggtgc agctggtgga atctggcgga ggactggtgc agcctggcgg ctctctgaga	120

	ctgtcttgtg ccgccagcgg cttcaccttc agcaccagcg gcatgaactg gttcagacag	180
	gcccctggca agggcctgga atgggtgtcc tacatcagca gcagctccgg cttcgtgtac	240
	gccgacagcg tgaaggcg gttcaccatc agcagagaca acgccagaa cagcctgtac	300
	ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcgag	360
	gccgcctttt ggggccaggg aacactcgtg acagtgtcca gcggcagcac aagcggctct	420
	ggcaaactg gatctggcga gggcagcacc aaggcgata tcgtgctgac ccagagcccc	480
	agatccctgc ctgtgacacc tggcgagcct gccagcatca gctgcagaag cagcaagagc	540
	cggctgagcc ggatgggcat cccccctg aactggtatc tgcagaaacc cggccagtcc	600
	ccccagctgc tgatctaccg gatgagcaac agagccagcg gcgtgccga tagattttcc	660
	ggctctggaa gcggcaccga cttaccctg aagatcagca aggtggaaac cgaggacgtg	720
	ggcgtgtact attgcceca gttcctggaa tccccccca cctttggcag cggcaccaag	780
	ctggaaatca agcccgcga gcccaagagc cccgacaaga ccataacctg ccctccatgt	840
	cctgcccctc cagtggctgg ccctagcgtg ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc	900
	ctgatgatcg cccggacccc tgaagtgacc tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat	960
[0037]	cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac ggctggaag tgcacaacgc caagaccaag	1020
	cccagagagg aacagtacaa cagcacctac cgggtggtgt ctgtgctgac cgtgctgcat	1080
	caggactggc tgaacggcaa agagtacaag tgcaagggtg ccaacaaggc cctgctgcc	1140
	cccatcgaga aaaccatctc caaggccaag ggacagcccc gcgagcccca ggtgtacaca	1200
	ctgcctcaa gcagggacga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa	1260
	ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	1320
	tacaagacca cgctcccggt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc	1380
	accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtttct catgctccgt gatgcatgag	1440
	gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa aaaagatccc	1500
	aaattttggg tgctggtggt ggttggtgga gtcctggctt gctatagctt gctagtaaca	1560
	gtggccttta ttattttctg ggtgaagcgg ggcagaaaga agctgctgta catcttcaag	1620
	cagcccttca tgcggcccggt gcagaccacc caggaagagg acggctgctc ctgcagattc	1680
	cccaggaag aagaaggcgg ctgcgagctg ctgagagtga agttcagcag gagcgagac	1740
	gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga	1800
	gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	1860

	agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag	1920
	gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt	1980
	taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg	2040
	ccccctcgct ga	2052
	<210> 35	
	<211> 2175	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> H28BBd	
	<400> 35	
	atggatttcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc	60
	cgcgaggtgc agctgggtgga atctggcgga ggactgggtgc agcctggcgg ctctctgaga	120
	ctgtcttgtg ccgccagcgg cttcaccttc agcaccagcg gcatgaactg gttcagacag	180
	gccccctggca agggcctgga atgggtgtcc tacatcagca gcagctccgg cttcgtgtac	240
	gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agcagagaca acgcccagaa cagcctgtac	300
[0038]	ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcgag	360
	gccgcctttt ggggccaggg aacctcgtg acagtgtcca gcggcagcac aagcggctct	420
	ggcaaacctg gatctggcga gggcagcacc aagggcgata tcgtgctgac ccagagcccc	480
	agatccctgc ctgtgacacc tggcagacct gccagcatca gctgcagaag cagcaagagc	540
	cggctgagcc ggatgggcat cccccctg aactggtatc tgcagaaacc cggccagtcc	600
	ccccagctgc tgatctaccg gatgagcaac agagccagcg gcgtgcccga tagattttcc	660
	ggctctggaa gcggcaccga cttcacctg aagatcagca aggtggaaac cgaggacgtg	720
	ggcgtgtact attgcgcca gttcctggaa tccccccca cctttggcag cggcaccaag	780
	ctggaaatca agcccgccga gcccagagc cccgacaaga ccataacctg ccctccatgt	840
	cctgcccctc cagtggctgg ccctagcgtg ttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc	900
	ctgatgatcg cccggacccc tgaagtgacc tgcgtgggtg tggtatgtgtc ccacaggat	960
	cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac ggctggaag tgcacaacgc caagaccaag	1020
	cccagagagg aacagtacaa cagcacctac cgggtgggtg ctgtgctgac cgtgctgcat	1080
	caggactggc tgaacggcaa agagtacaag tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc	1140

	cccatcgaga aaaccatctc caaggccaag ggacagcccc gcgagcccca ggtgtacaca	1200
	ctgcctccaa gcagggacga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtaaaa	1260
	ggctttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac	1320
	tacaagacca cgctccccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaagctc	1380
	accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag	1440
	gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa aaaagatccc	1500
	aaattttggg tgctgggtgg ggttggtgga gtcctggctt gctatagctt gctagtaaca	1560
	gtggccttta ttattttctg ggtgaggagt aagaggagca ggctcctgca cagtactac	1620
	atgaacatga ctccccgccg ccccgggccc acccgcaagc attaccagcc ctatgcccc	1680
	ccacgcgact tcgcagccta tcgctccctg aagcggggca gaaagaagct gctgtacatc	1740
	ttcaagcagc cttcatgcg gcccgtagcag accaccagc aagaggacgg ctgctcctgc	1800
	agattccccg aggaagaaga aggcggctgc gagctgagag tgaagttcag caggagcgca	1860
	gacgcccccg cgtaccagca gggccagaac cagctctata acgagctcaa tctaggacga	1920
	agagaggagt acgatgtttt ggacaagaga cgtggccggg accctgagat ggggggaaag	1980
[0039]	ccgagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg	2040
	gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc gagcgccgga ggggcaaggg gcacgatggc	2100
	ctttaccagg gtctcagtac agccaccaag gacacctacg acgcccctca catgcaggcc	2160
	ctgccccctc gctga	2175
	<210> 36	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Lkappa前导区 d	
	<400> 36	
	atggatttcc aggtgcagat cttcagcttc ctgctgatct ccgccagcgt gatcatgagc	60
	cgc	63
	<210> 37	
	<211> 339	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 人源化VHd	
	<400> 37	
	gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg	60
	tcttgtgccg ccagcggctt caccttcage accagcggca tgaactggtt cagacaggcc	120
	cctggcaagg gcctggaatg ggtgtcctac atcagcagca gctccggctt cgtgtacgcc	180
	gacagcgtga agggccgggtt caccatcage agagacaacg cccagaacag cctgtacctg	240
	cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag aagcgaggcc	300
	gccttttggg gccaggaac actcgtgaca gtgtccage	339
	<210> 38	
	<211> 339	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 大鼠VHd	
	<400> 38	
	gaggtacagc tgggtggagtc tggaggagge ttagtgcagc ctggaaagtc cctgaaactc	60
[0040]	tcctgttcag cctctggatt cacattcagt acctctggca tgcactggtt tcgccaagct	120
	ccaggaaagg ggctggattg ggttgcatac attagtagta gcagcggttt cgtctatgca	180
	gacgctgtga agggccgggtt caccatctcc agagacaatg cacagaacac cctgtacctg	240
	caactcaaca gtctgaagtc tgaagacact gccatctatt actgtgcaag aagcgaggct	300
	gctttctggg gccaaaggcac tctggtcact gtctcttca	339
	<210> 39	
	<211> 336	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人源化VLd	
	<400> 39	
	gatatcgtgc tgaccagag cccagatcc ctgcctgtga cacctggcga gcctgccagc	60
	atcagctgca gaagcagcaa gagccgctg agccgatgg gcatcacccc cctgaactgg	120
	tatctgcaga aaccggcca gtccccccag ctgctgatct accgatgag caacagagcc	180
	agcggcgtgc ccgatagatt ttccgctct ggaagcggca ccgacttcac cctgaagatc	240
	agcaaggtgg aaaccgagga cgtgggcgtg tactattgcg cccagttcct ggaatacccc	300

	cccacctttg gcagcggcac caagctggaa atcaag	336
	<210> 40	
	<211> 336	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 大鼠VLd	
	<400> 40	
	gatatttgtg tgactcaagc tccacgtct gtatctgtca ctcttgaga gtcagcttcc	60
	atctctgca ggtctaataa gagtcgactg agtaggatgg gcatcactcc cttgaattgg	120
	taccttcaga agccaggaaa gtctcctcag ctctgatat atcggaatgc caaccttgcc	180
	tcaggagttc cagacagggt tagtggcagt gggtcagaaa cagatcttac actgaaaatc	240
	agtaaggtgg agactgagga tggtagcggt tattactgtg cacagtttct agaatacct	300
	cctacgttcg gttctgggac caagctggag atcaaa	336
[0041]	<210> 41	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人源化惠特洛 (Whitlow) d	
	<400> 41	
	ggcagcacia gcggctctgg caaacctgga tctggcgagg gcagcaccaa gggc	54
	<210> 42	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 大鼠惠特洛 (Whitlow) d	
	<400> 42	
	ggcagcacca gcggctccgg caagcctggc tctggcgagg gcagcacaaa ggga	54
	<210> 43	
	<211> 711	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人源化IgG1间隔区 d	

	<400> 43	
	cccgccgagc ccaagagccc cgacaagacc catacctgcc ctccatgtcc tgccccctcca	60
	gtggctggcc ctagegtggt cctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gatgatcgcc	120
	cggacccctg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggatcc cgaagtgaag	180
	ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa	240
	cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtct gtgctgaccg tgctgcatca ggactggctg	300
	aacggcaaag agtacaagtg caaggtgtcc aacaaggccc tgccctgcccc catcgagaaa	360
	accatctcca aggccaaggg acagccccgc gagccccagg tgtacacact gcctccaagc	420
	agggacgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc	480
	agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg	540
	cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag	600
	agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac	660
	cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaaa aagatcccaa a	711
[0042]	<210> 44	
	<211> 711	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 大鼠IgG1间隔区 d	
	<400> 44	
	cctgccgagc ctaagagccc cgacaagacc cacacctgtc ccccttgtcc tgccccctcca	60
	gtggctggcc ctagegtggt cctgttcccc ccaaagccca aggataccct gatgatcgcc	120
	cggacccccg aagtacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag	180
	ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag	240
	cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg	300
	aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa	360
	accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc	420
	cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc	480
	agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg	540
	cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag	600
	agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac	660

	cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaaa aagatcccaa a	711
	<210> 45	
	<211> 265	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人源化IgG1 delta间隔区 d	
	<400> 45	
	ccaggtgtcc ctgacctgcc tcgtgaaggg cttctacccc tccgatatcg ccgtggaatg	60
	ggagagcaat ggccagcccg agaacaacta caagaccacc ccccctgtgc tggacagcga	120
	cggctcattc ttctgtaca gcaagctgac agtggacaag agccggtggc agcagggcaa	180
	cgtgttcage tgcagcgtga tgcacgaggc tctgcacaac cactacaccc agaagtcct	240
	gagcagcctg agcccaggca agaag	265
	<210> 46	
	<211> 440	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0043]	<220>	
	<223> 大鼠IgG1 delta间隔区 d	
	<400> 46	
	cctgccgagc ctaagagccc cgacaagacc cacacctgtc ccccttgtec tgcccccca	60
	gtggctggcc ctagcgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggataccct gatgatcgcc	120
	cggacccccg aagtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag	180
	ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag	240
	cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcage gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg	300
	aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa	360
	accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc	420
	cgggatgagc tgaccaagaa	440
	<210> 47	
	<211> 72	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 跨膜域CD8 α d	

	<400> 47	
	atctacatct gggcccctct ggccggcacc tgtggcgtgc tgetgctgtc tctcgtgate	60
	acactgtact gc	72
	<210> 48	
	<211> 81	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 跨膜域CD28 d	
	<400> 48	
	ttttgggtgc tgggtgggtg tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg	60
	gcctttatta ttttctgggt g	81
	<210> 49	
	<211> 126	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 共刺激域4-1BB d	
[0044]	<400> 49	
	aagcggggca gaaagaagct gctgtacatc ttcaagcagc ccttcatgcg gcccggtcag	60
	accacccagg aagaggacgg ctgctcctgc agattccccg aggaagaaga aggcggctgc	120
	gagctg	126
	<210> 50	
	<211> 126	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 共刺激域CD28 d	
	<400> 50	
	aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc	60
	gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatgc	120
	tccttg	126
	<210> 51	
	<211> 342	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	活化域CD3 ζ (4-1BB) d	
	<400>	51	
		ctgcgcgtga agttttctag aagcgccgac gcccctgcct accagcaggg ccagaaccag	60
		ctgtacaacg agctgaacct gggcagacgg gaagagtacg acgtgctgga taagcggaga	120
		ggccgggacc ctgagatggg cggcaagcct agaagaaaga acccccagga aggcctgtat	180
		aacgaactgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcggaat gaaggcgag	240
		cggagaagag gcaagggccg cgatggactg taccagggcc tgagcaccgc caccaaggac	300
		acctatgacg ccctgcacat gcaggctctg cccccagat aa	342
	<210>	52	
	<211>	339	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	活化域CD3 ζ (CD28) d	
	<400>	52	
		agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggccg gaaccagctc	60
[0045]		tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc	120
		cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat	180
		gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc	240
		cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc	300
		tacgagcccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgtga	339
	<210>	53	
	<211>	333	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	hHC	
	<400>	53	
		gaggtgcagc tgggtggagag cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggcag cctgaggctg	60
		agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc accagcggca tgaactgggt caggcaggcc	120
		cccggcaagg gcctggagtg ggtgagctac atcagcagca gcagcggctt cgtgtacgcc	180
		gacagcgtga agggcagggt caccatcagc agggacaacg ccagaaacag cctgtacctg	240
		cagatgaaca gcctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag gagcgaggcc	300

	gccttctggg gccagggcac cctggtgacc gtg	333
	<210> 54	
	<211> 336	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> hLC	
[0046]	<400> 54	
	gacatcgtgc tgaccagag cccccgcage ctgcccgtga cccccggcga gcccgccage	60
	atcagctgca ggtcctccaa gtccaggctg agcaggatgg gcatcacccc cctgaactgg	120
	tacctgcaga agccccggcca gagccccccag ctgctgatct acaggatgag caacagggcc	180
	agcggcgtgc ccgacaggtt cagcggcage ggcagcggca ccgacttcac cctgaagatc	240
	agcaagtggt agaccgagga cgtgggcgtg tactactgcg cccagttcct ggagtacccc	300
	cccaccttcg gcagcggcac caagctggag atcaag	336

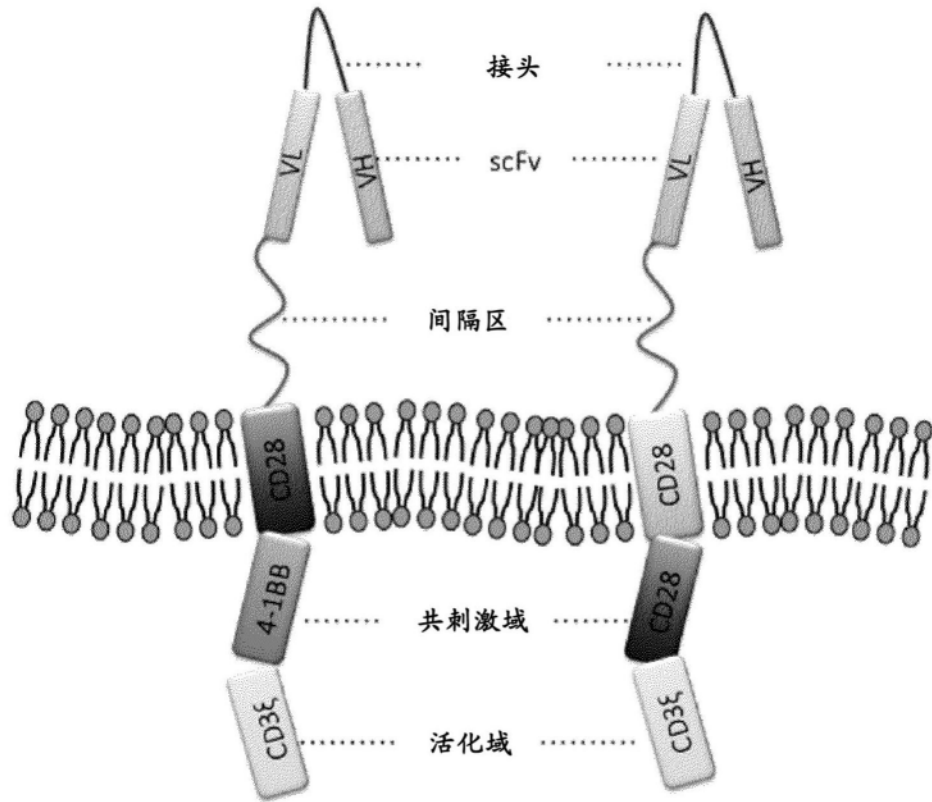


图1

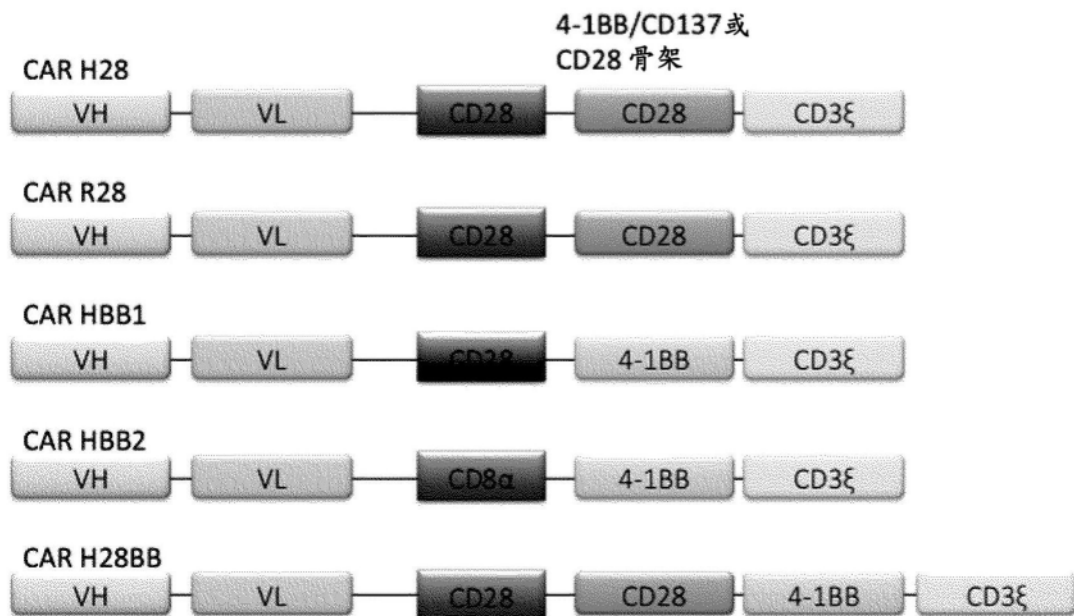


图2

前导区	scFv	顺序	接头	间隔区	跨膜域	共刺激域	活化域	
H28	Igk	人源化的	VH-VL	惠特洛	IgG1	CD28	CD28	CD3ξ
R28	Igk	大鼠	VH-VL	惠特洛	IgG1	CD28	CD28	CD3ξ
HBB1	Igk	人源化的	VH-VL	惠特洛	IgG1	CD28	4-1BB	CD3ξ
HBB2	Igk	人源化的	VH-VL	惠特洛	IgG1Δ	CD8α	4-1BB	CD3ξ
H28BB	Igk	人源化的	VH-VL	惠特洛	IgG1	CD28	CD28 4-1BB	CD3ξ

图3

hHC和hLC的蛋白比对

大鼠对比人

人源化和大鼠序列 (hHC) 之间有89%的同源性

人源化和大鼠序列 (hLC) 之间有93%的同源性

VH

序列ID: 查询_228957 长度: 113 匹配数: 1

范围1: 1至113 图形

▼下一个匹配 ▲ 上一个匹配

分数	期望	方法	同一性	相似性	空隙
214字节(546)	4e-79	组成矩阵调整	101/113(89%)	112/113(99%)	0/113(0%)
大鼠 1	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSASGFTFSTSGMHWFRQAPGKGLDWVAYISSSSGFVYA	60			
人 1	EVQLVESGGGLVQPG SL+LSC+ASGFTFSTSGM+WFRQAPGKGL+WV+YISSSSGFVYA	60			
大鼠 61	DAVKGRFTISRDNQNTLYLQLNSLKSEDTAIYYCARSEAAFWGQGLVTVSS	113			
人 61	D+VKGRFTISRDNQNTLYLQ+NSL++EDTA+YYCARSEAAFWGQGLVTVSS	113			

VL

序列ID: 查询_74585 长度: 112 匹配数: 1

范围1: 1至112 图形

▼下一个匹配 ▲ 上一个匹配

分数	期望	方法	同一性	相似性	空隙
213字节(542)	1e-78	组成矩阵调整	104/112(93%)	108/112(96%)	0/112(0%)
大鼠 1	DIVLTQAPRSVSVTPGESASISCRSNKSRSLRMGITPLNWLQKPGKSPQLLIYRMSNLA	60			
人 1	DIVLTQ+PRS+ VTPGE ASISCRS+KSRLSRMGITPLNWLQKPG+SPQLLIYRMSN A	60			
大鼠 61	SGVPDRFSGSGSETDFTLKISKVETEDVGVIYCAQFLEYPPTFGSGTKLEIK	112			
人 61	SGVPDRFSGSGS TDFTLKISKVETEDVGVIYCAQFLEYPPTFGSGTKLEIK	112			

图4

hHC改变

序列针对智人进行密码子优化

密码子优化(CO)后与原始序列有90%的同源性

VH

序列ID: 查询_122263 长度: 339

匹配数: 1

范围1: 1至333

图形

▼下一个匹配 ▲上一个匹配

分数	期望	同一性	空隙	链
433字节(234)	4e-126	301/334(90%)	2/334(0%)	正/正
原始 1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGC-GGCCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCT	59		
CO 1	GAGGTGCAGCTGGTGGGA-ATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACT	59		
原始 60	GAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCAGCGGCATGAACTGGTTCAGGCAGGC	119		
CO 60	GTCTTGTCGCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCAGCGGCATGAACTGGTTCAGACAGGC	119		
原始 120	CCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCTACATCAGCAGCAGCAGCGGCTTCGTGTACGC	179		
CO 120	CCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCTACATCAGCAGCAGCTCCGGCTTCGTGTACGC	179		
原始 180	CGACAGCGTGAAGGGCAGGTTCCACCATCAGCAGGGACAACGCCCAGAACAGCCTGTACCT	239		
CO 180	CGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGAGACAACGCCCAGAACAGCCTGTACCT	239		
原始 240	GCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGCGAGGC	299		
CO 240	GCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGCGAGGC	299		
原始 300	CGCCTTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTG	333		
CO 300	CGCCTTTTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACAGTG	333		

图5

hLC改变

序列针对智人进行密码子优化

密码子优化(CO)后与原始序列有89%的同源性

VL

序列ID: 查询_71369

长度 336

匹配数: 1

范围1: 1至336

图形

▼ 下一个匹配 ▲ 上一个匹配

分数	期望	同一性	空隙	链
411字节(222)	2e-119	298/336(89%)	0/336(0%)	正/正
原始 1	GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGCGAGCCTGCCCGTGACCCCGGCGAGCCCGCCAGC			60
CO 1	GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGATCCCTGCCGTGTGACACCTGGCGAGCCTGCCAGC			60
原始 61	ATCAGCTGCAGGTCTTCCAAGTCCAGGCTGAGCAGGATGGGCATCACCCCCCTGAAC TGG			120
CO 61	ATCAGCTGCAGAAGCAGCAAGAGCCGGCTGAGCCGGATGGGCATCACCCCCCTGAAC TGG			120
原始 121	TACCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACAGGATGAGCAACAGGGCC			180
CO 121	TATCTGCAGAAACCCGGCCAGTCCCCCAGCTGCTGATCTACCGGATGAGCAACAGAGCC			180
原始 181	AGCGGCGTGCCCGACAGGTTACGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATC			240
CO 181	AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATC			240
原始 241	AGCAAGGTGGAGACCGAGGACGTGGGCGTG TACTACTGCGCCAGTTCTTGGAGTAcccc			300
CO 241	AGCAAGGTGGAACCGAGGACGTGGGCGTG TACTATTGCGCCAGTTCTTGGAAATACCCC			300
原始 301	cccACCTTCGGCAGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG			336
CO 301	CCCACCTTTGGCAGCGGCACCAAGCTGGAAATCAAG			336

图6

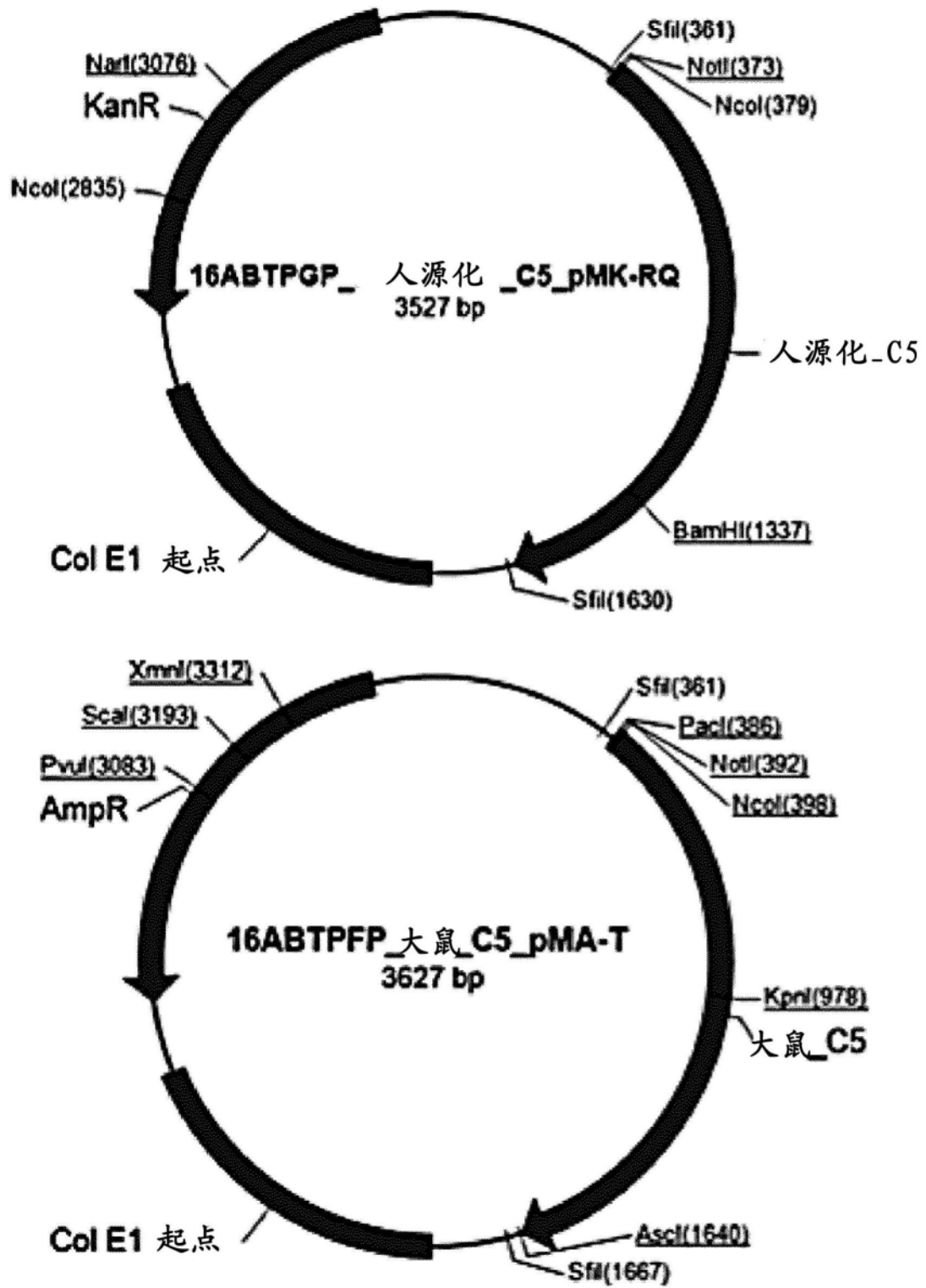


图7

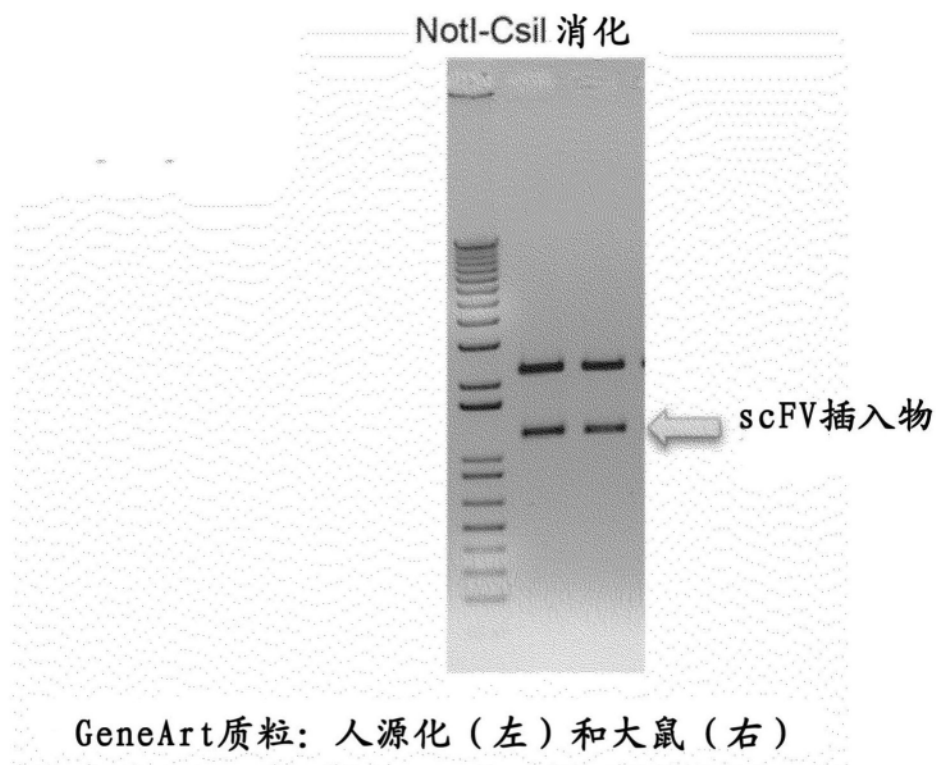


图7 (续)

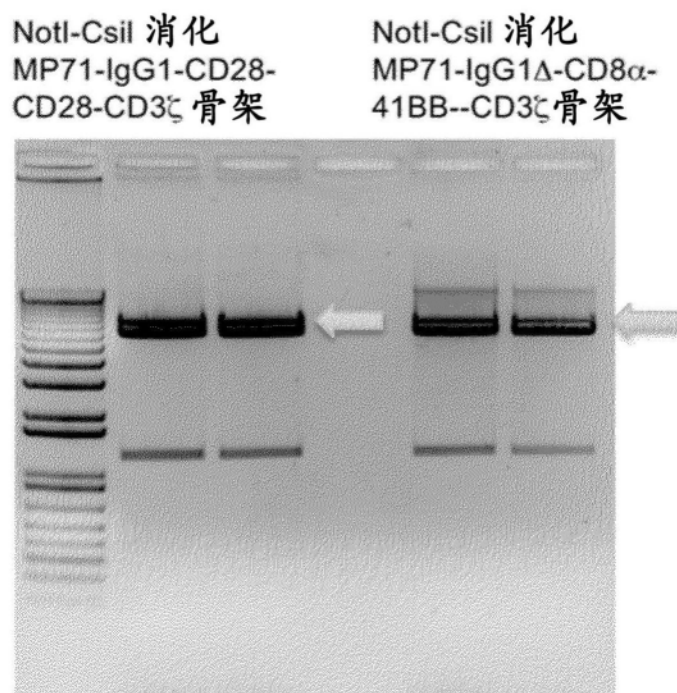


图8

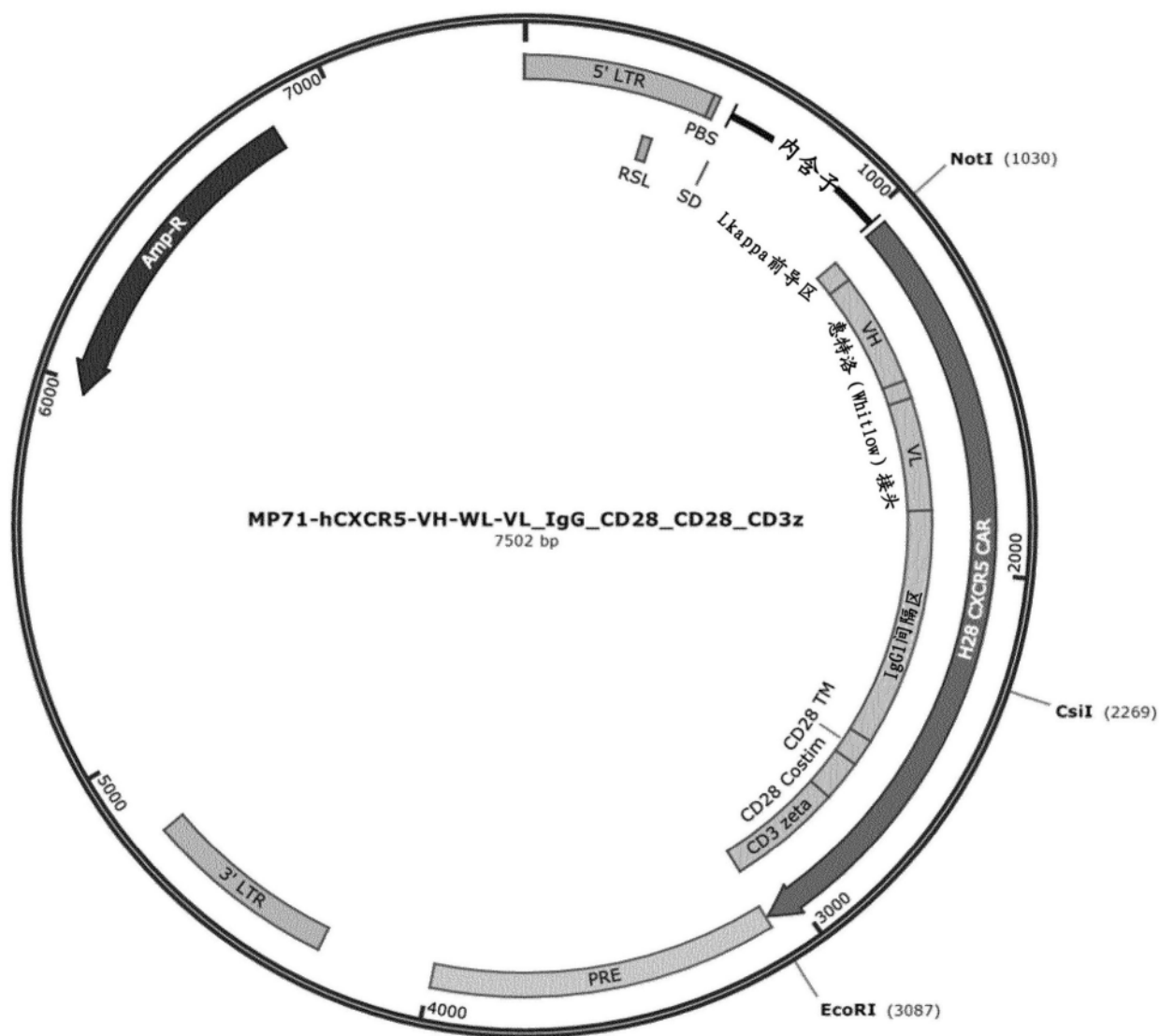


图8 (续)

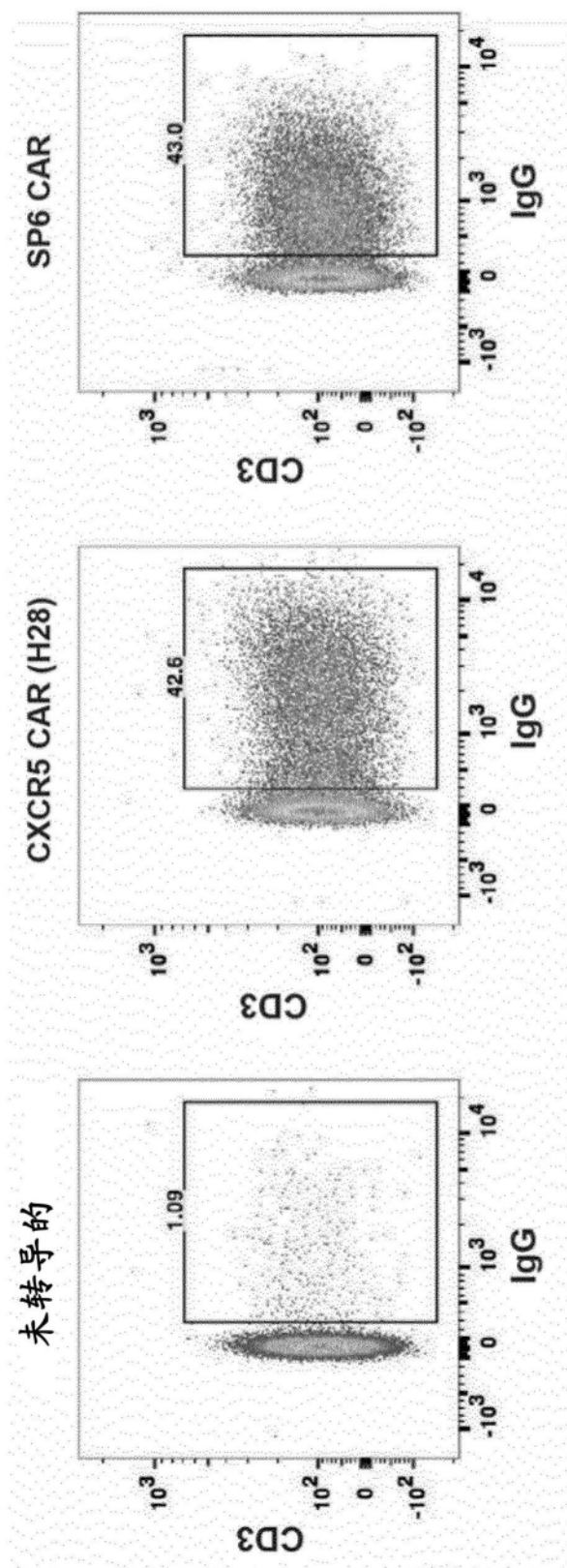


图9

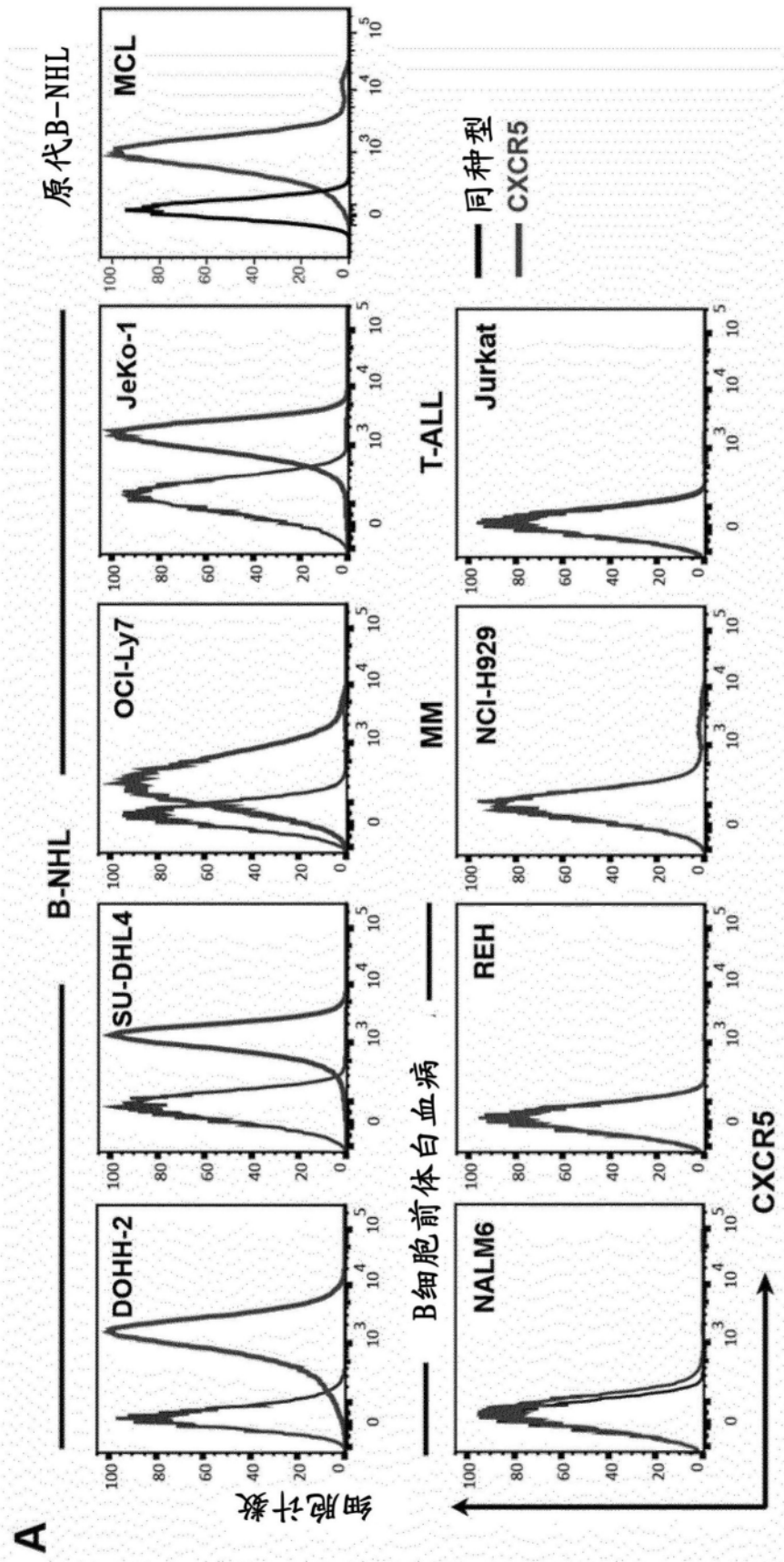


图10

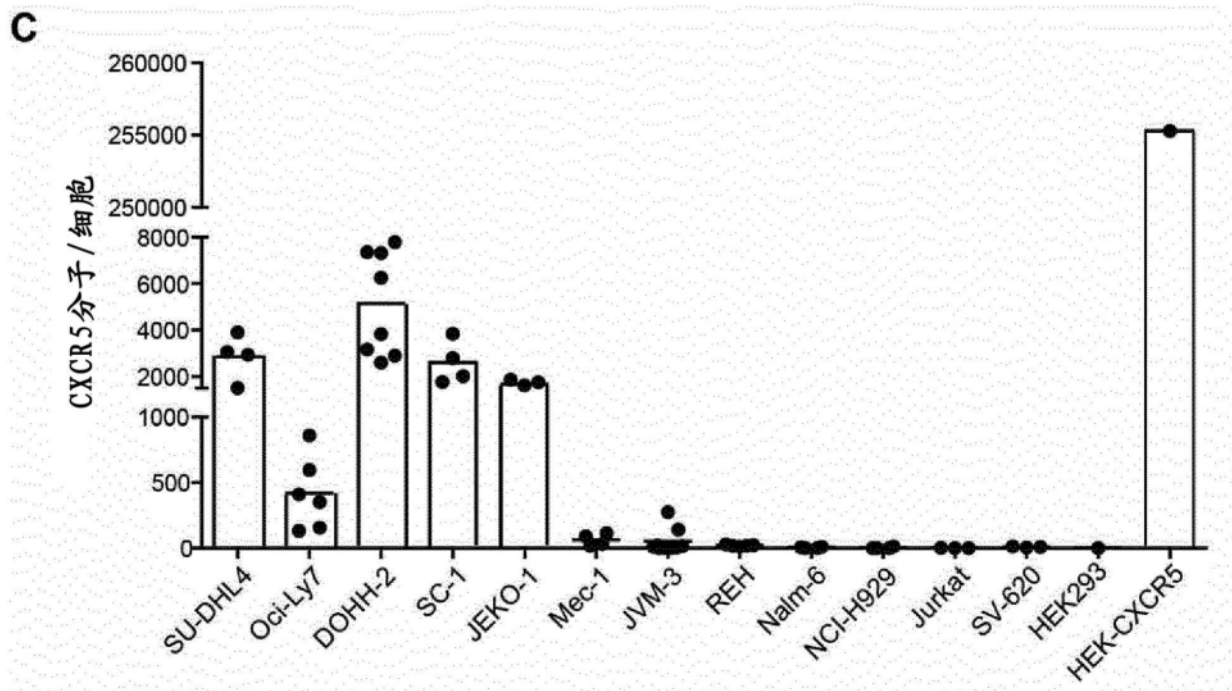
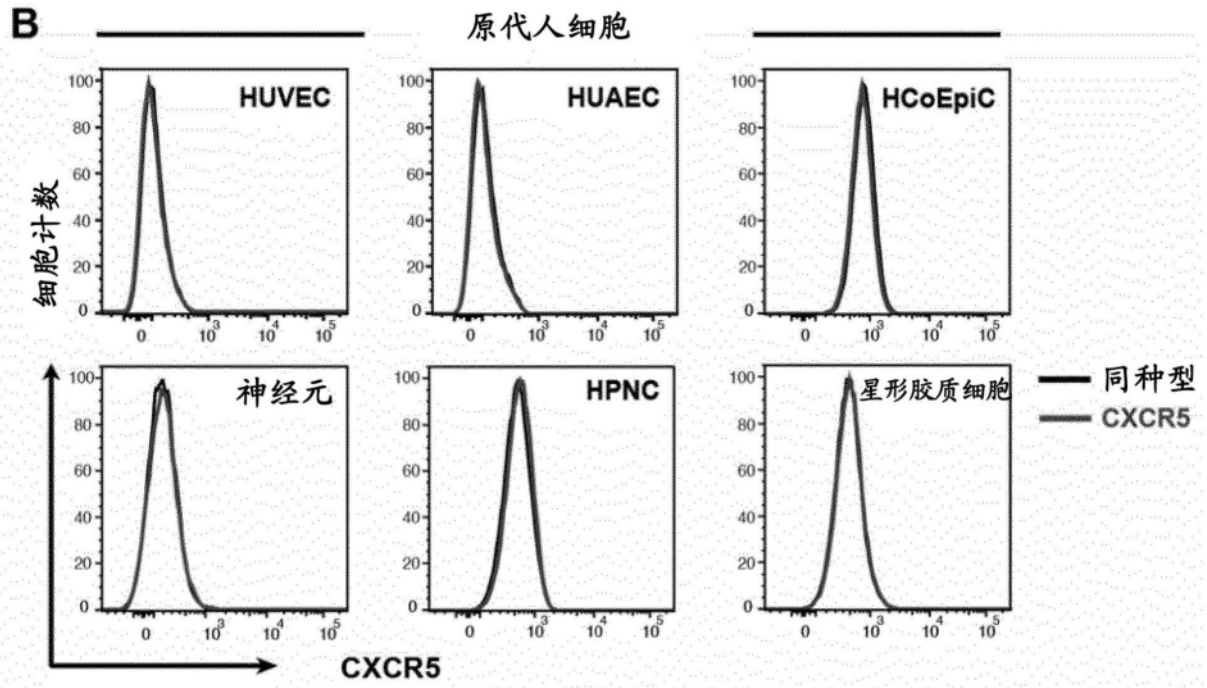


图10(续)

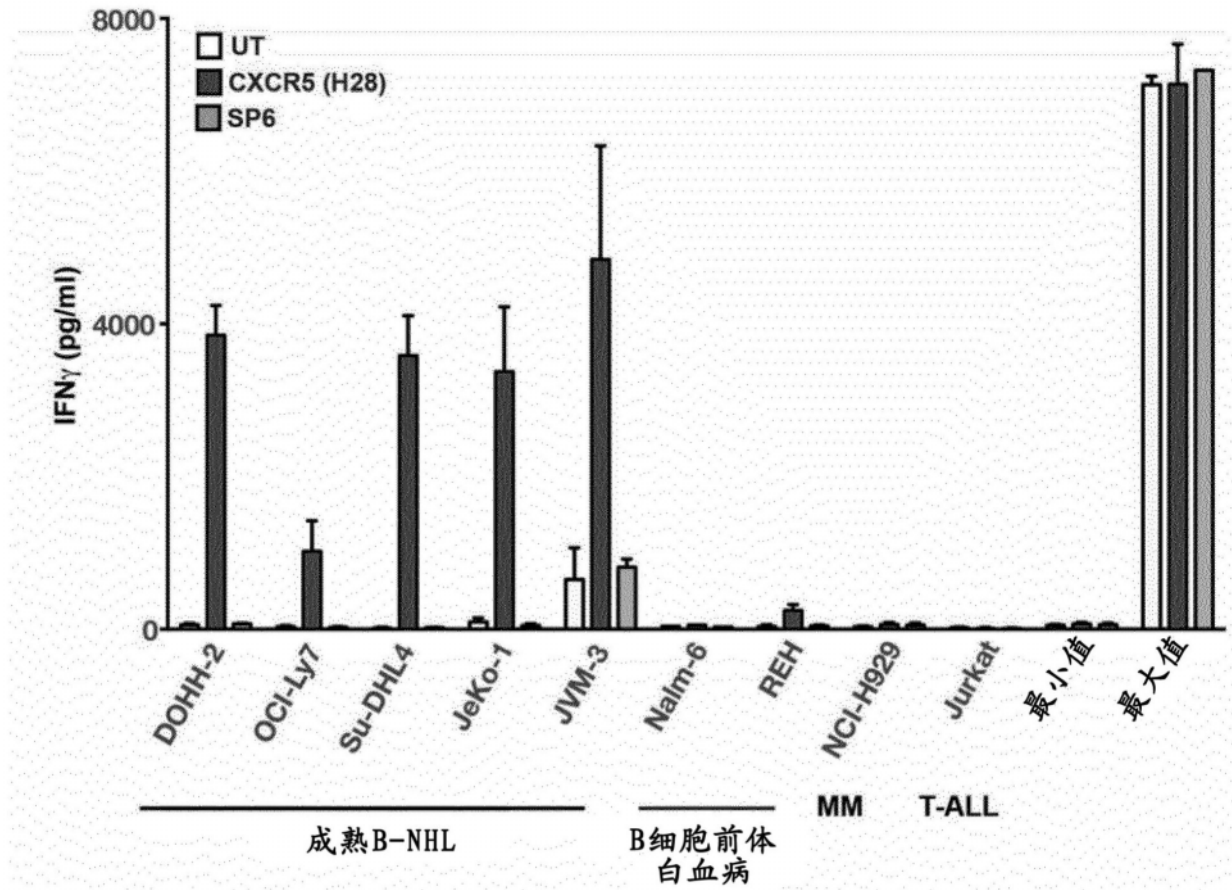


图11

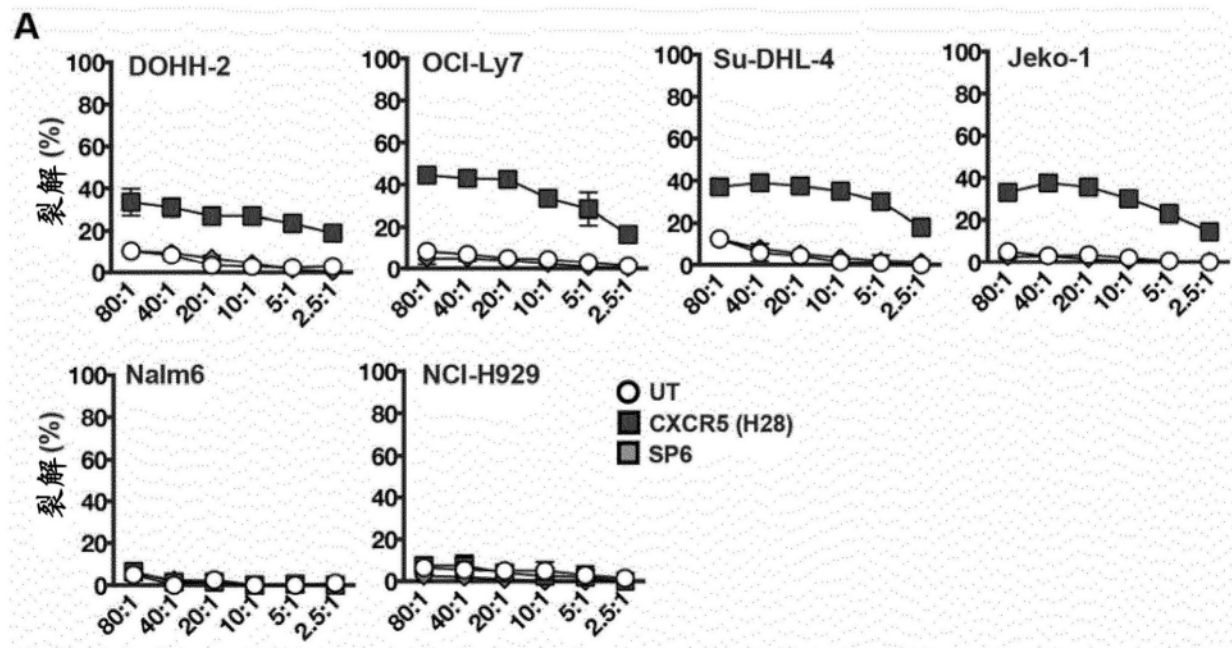


图12

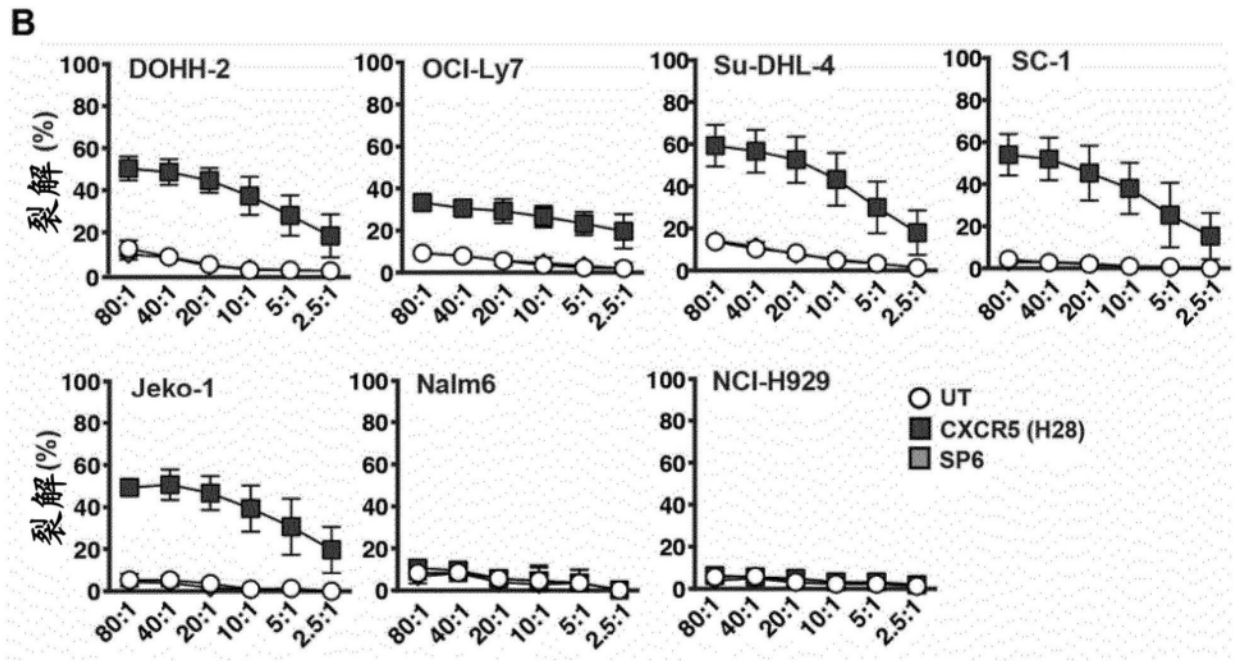


图12(续)

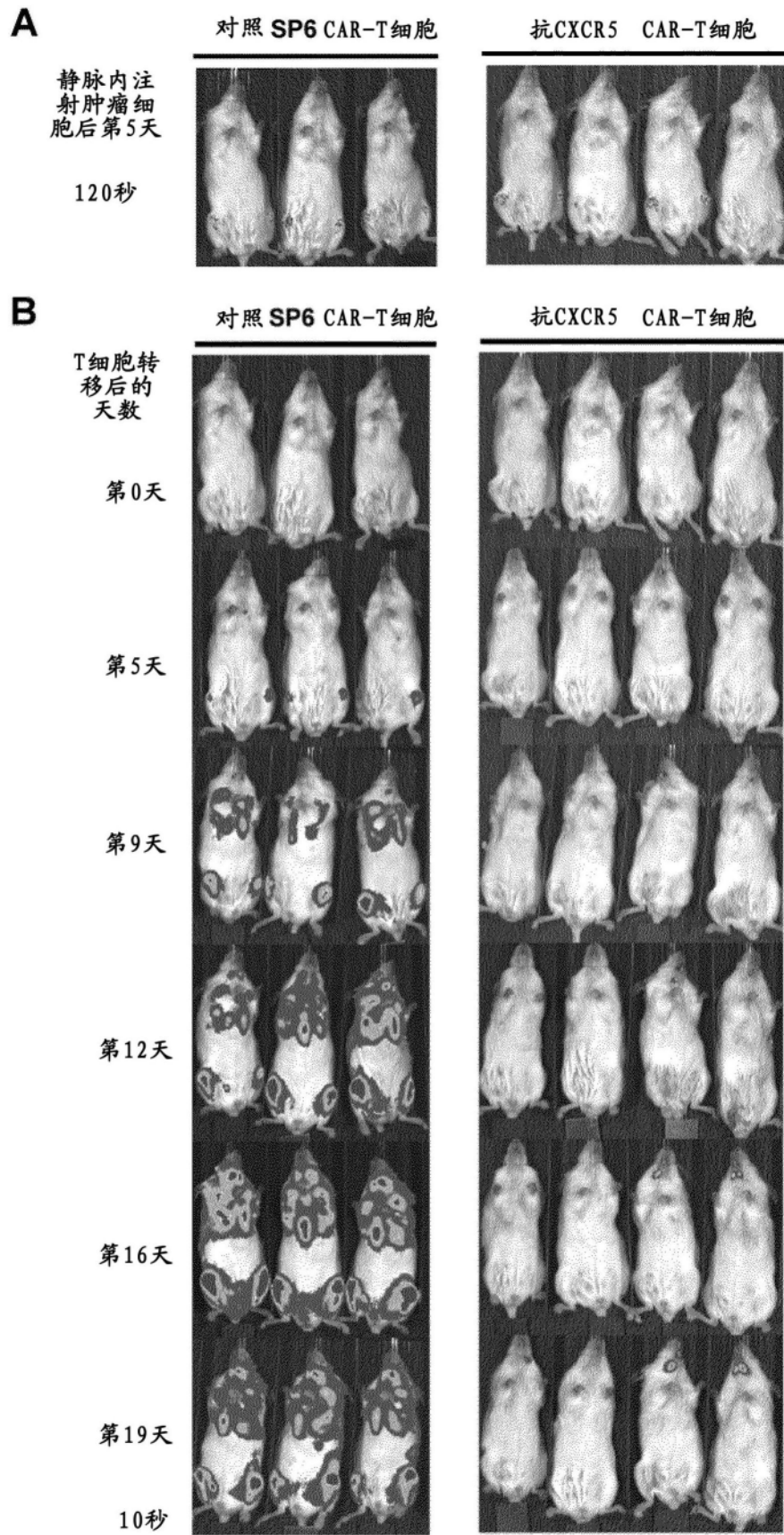


图13

C

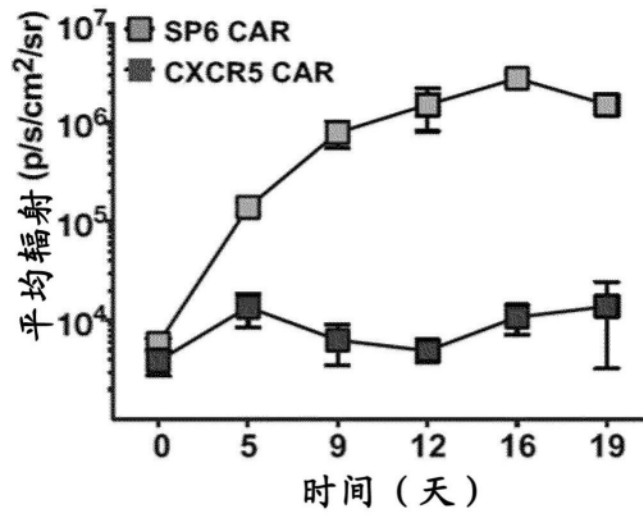


图13(续)

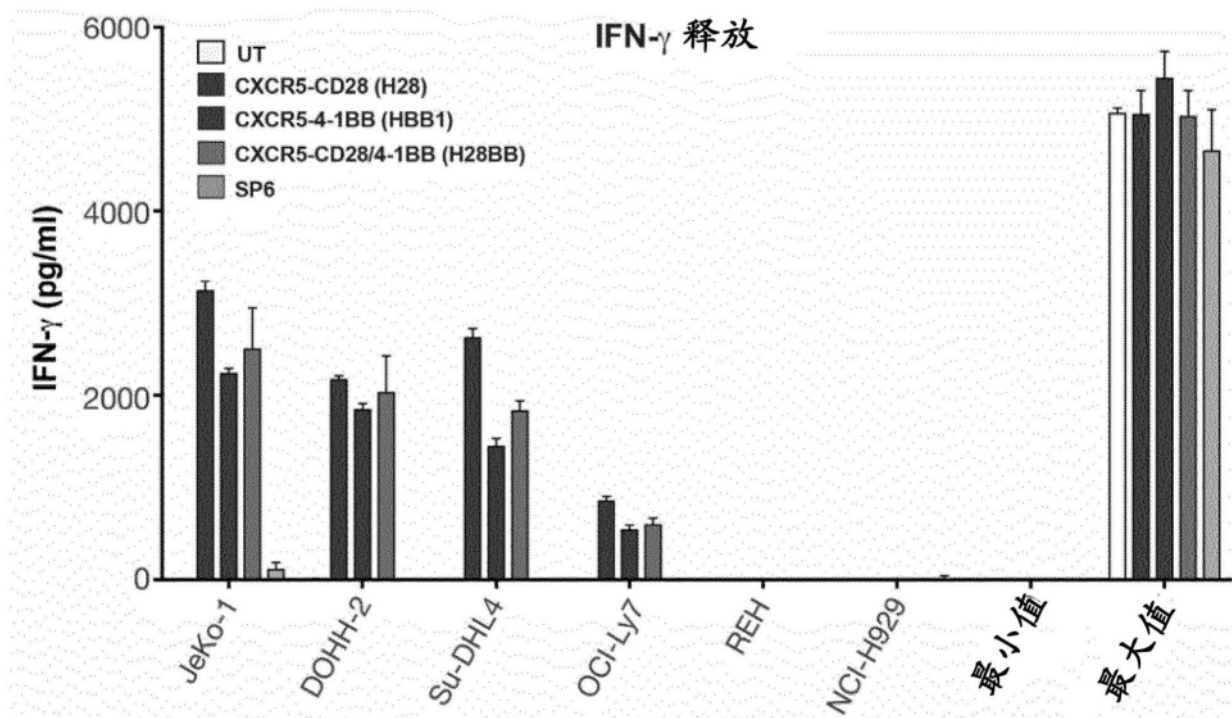


图14

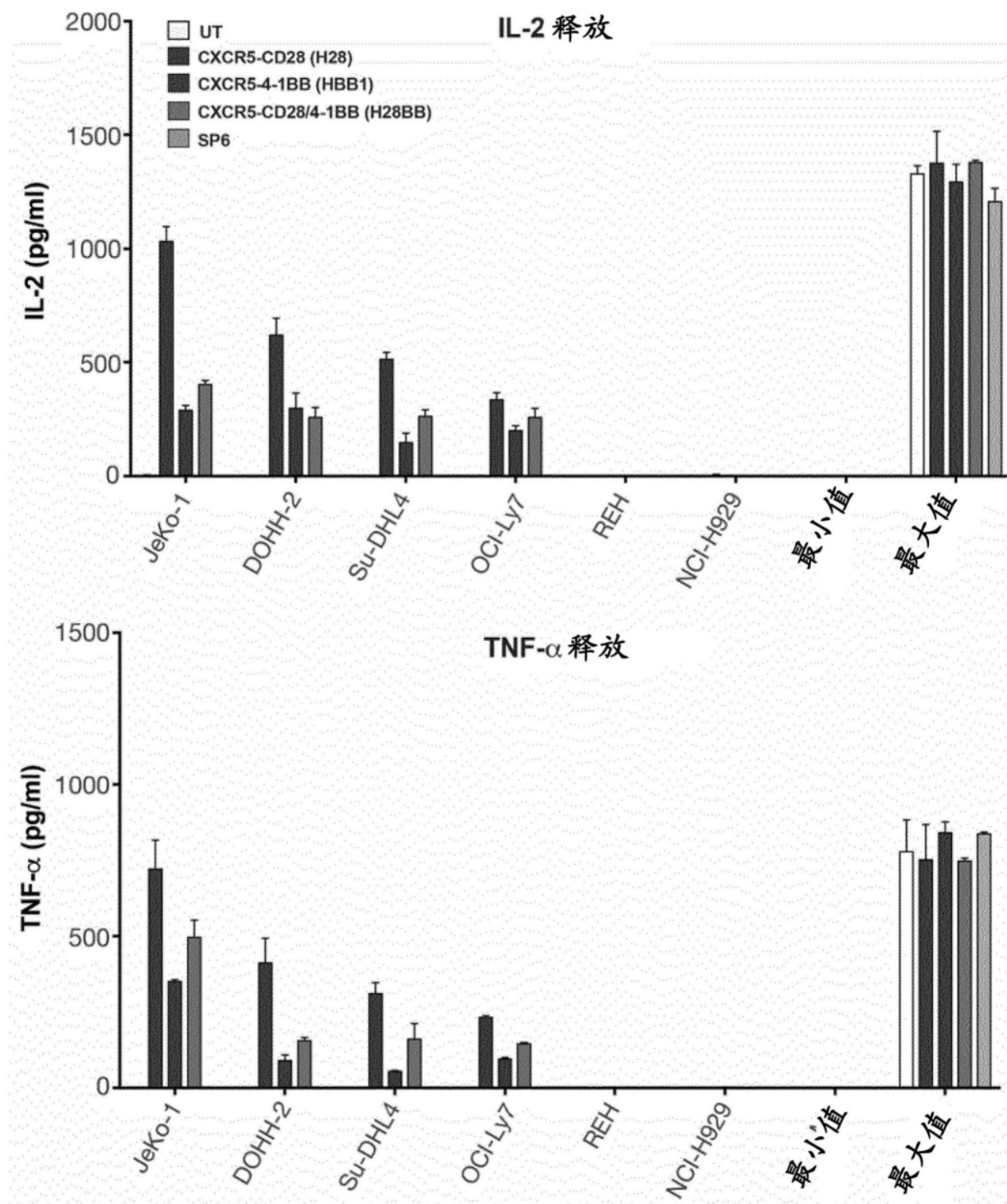


图14(续)

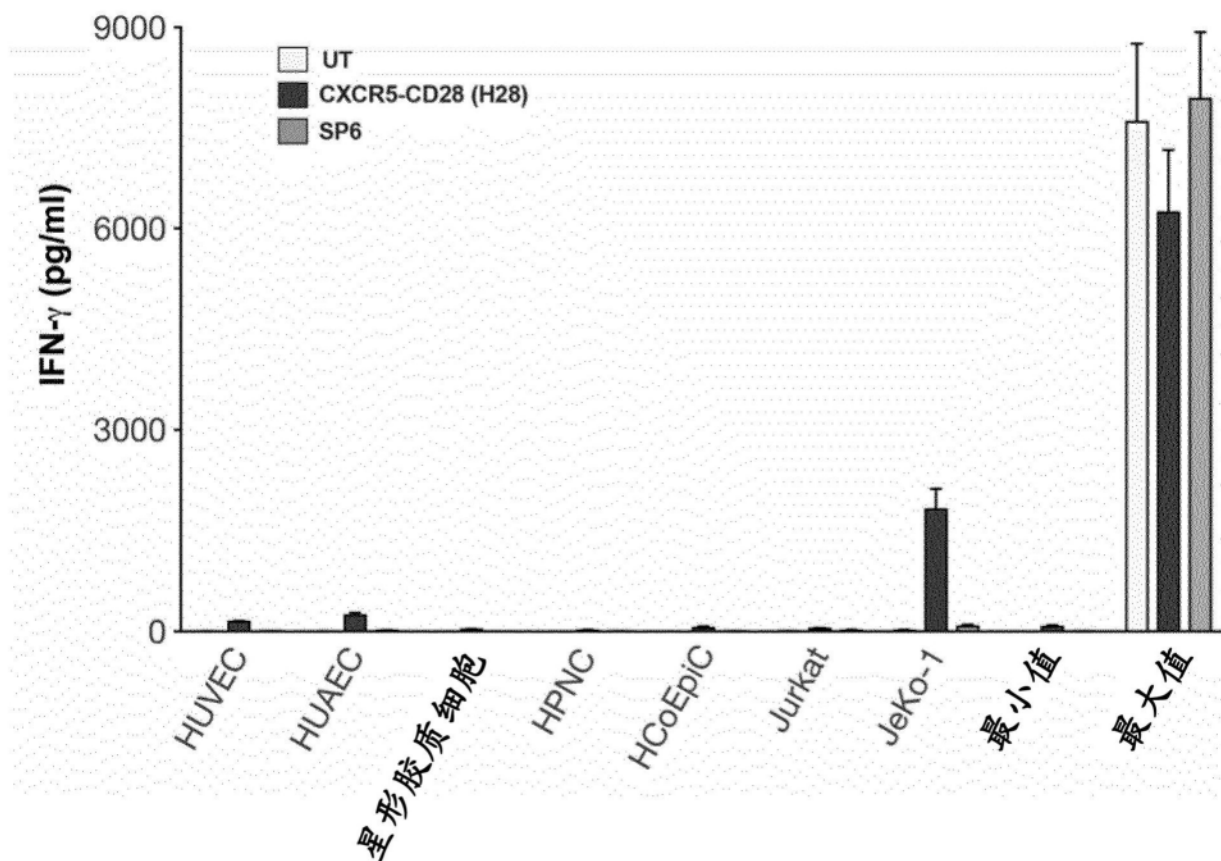


图15