



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113195535 A

(43) 申请公布日 2021.07.30

(21) 申请号 201980075175.X

(22) 申请日 2019.10.29

(30) 优先权数据

2018904117 2018.10.30 AU

2019903255 2019.09.04 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.05.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2019/051189 2019.10.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/087116 EN 2020.05.07

(71) 申请人 彼得麦克卡勒姆癌症研究所

地址 澳大利亚维多利亚

(72) 发明人 M·克肖 C·斯莱尼 B·冯谢德

(74) 专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理有限公司 11728

代理人 吕鹏云 尹吉伟

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书28页

序列表40页 附图21页

(54) 发明名称

用于连接表达CAR的免疫细胞与抗原呈递细胞的双特异性多肽及其用途

(57) 摘要

本申请针对双特异性多肽,其包含与抗原呈递细胞(APC)上的抗原结合的第一结合域和与表达嵌合抗原受体(CAR)的免疫细胞上的抗原结合的第二结合域。还公开了用于制备发明的多肽的核酸、载体和宿主细胞。还公开了包含所述双特异性多肽的组合物、治疗癌症的方法以及刺激免疫细胞在体内和体外活化和扩增的方法。

1. 一种双特异性多肽, 包含第一结合域和第二结合域, 其中所述第一结合域是与抗原呈递细胞 (APC) 上表达的抗原特异性结合的抗体或抗体片段, 并且其中所述第二结合域是与表达嵌合抗原受体 (CAR) 的免疫细胞上的抗原特异性结合的抗体或抗体片段。

2. 根据权利要求1所述的双特异性多肽, 其中所述第二结合域与由免疫细胞表达的CAR上的抗原特异性结合。

3. 根据权利要求1或2所述的双特异性多肽, 其中所述APC为专职性APC, 选自由树突状细胞、巨噬细胞和B细胞组成的组, 优选地其中所述APC为树突状细胞。

4. 根据权利要求1至3任一项所述的双特异性多肽, 其中所述第一结合域包含单链可变片段 (scFv)。

5. 根据权利要求1至4任一项所述的双特异性多肽, 其中所述第二结合域包含scFv。

6. 根据权利要求1至5任一项所述的双特异性多肽, 其中所述第一结合域特异性结合APC上表达的抗原, 所述APC上表达的抗原选自由MHCII、Clec9a、PD-L1、PD-L2、半乳糖凝集素、CD11c、CD19、CD40和CD83组成的组。

7. 根据权利要求6所述的双特异性多肽, 其中所述APC不是肿瘤细胞或癌细胞。

8. 根据权利要求6或7所述的双特异性多肽, 其中所述APC上表达的抗原不是肿瘤相关抗原。

9. 根据权利要求1至8任一项所述的双特异性多肽, 其中所述免疫细胞选自由T细胞、自然杀伤 (NK) 细胞、细胞毒性T淋巴细胞、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 和调节T细胞组成的组。

10. 根据权利要求9所述的双特异性多肽, 其中所述免疫细胞为T细胞。

11. 根据权利要求1至10任一项所述的双特异性多肽, 其中所述第二结合域与CAR上的亲和标签特异性结合。

12. 根据权利要求1至10任一项所述的双特异性多肽, 其中所述第二结合域与免疫细胞上的亲和标签特异性结合。

13. 根据权利要求1和3至10任一项所述的双特异性多肽, 其中所述第二结合域与CD3特异性结合。

14. 根据权利要求2至12任一项所述的双特异性多肽, 其中所述第二结合域与选自c-myc标签、FLAG标签、HA标签、His标签、S标签、SBP标签、Strep标签、eXACT标签、GST标签、MBP标签或GFP标签的亲和标签特异性结合。

15. 根据权利要求14所述的双特异性多肽, 其中所述亲和标签为c-myc标签。

16. 根据权利要求1至15任一项所述的双特异性多肽, 其中所述第一结合域包含选自由SEQ ID NO:2或4组成的组的氨基酸序列, 或与其具有至少70%同一性的氨基酸序列。

17. 根据权利要求13所述的双特异性多肽, 其中所述第二结合域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列, 或与其具有至少70%同一性的氨基酸序列。

18. 根据权利要求1至11、14和15任一项所述的双特异性多肽, 其中所述第二结合域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列, 或与其具有至少70%同一性的氨基酸序列。

19. 根据权利要求1至18任一项所述的双特异性多肽, 进一步包含连接所述第一和第二结合域的柔性连接体, 其中所述连接体包含选自由SEQ ID NO:10、12或14组成的组的氨基酸序列, 或与其具有至少70%同一性的氨基酸序列。

20. 根据权利要求1至18任一项所述的双特异性多肽, 其中所述第一和第二结合域是化

学偶联的。

21. 根据权利要求1至11、14和15任一项所述的双特异性多肽, 包含选自由SEQ ID NO: 16和18组成的组的氨基酸序列, 或与其具有至少70%同一性的氨基酸序列。

22. 根据权利要求1、3至10和13任一项所述的双特异性多肽, 包含选自由SEQ ID NO: 20和22组成的组的氨基酸序列, 或与其具有至少70%同一性的氨基酸序列。

23. 根据权利要求1至22任一项所述的双特异性多肽, 其特征在于, 血浆半衰期为约5小时至约15小时。

24. 根据权利要求23所述的双特异性多肽, 其中所述血浆半衰期为约10小时至约12小时。

25. 一种编码权利要求1至24任一项所述的双特异性多肽的核酸序列, 或与其具有至少70%同一性的多核苷酸序列。

26. 根据权利要求25所述的核酸序列, 其包含选自由SEQ ID NO: 15、17、19或21组成的组的多核苷酸序列, 或与其具有至少70%同一性的多核苷酸序列。

27. 一种载体, 其包含可操作地连接至调控序列的权利要求25或权利要求26所述的核酸序列。

28. 根据权利要求27所述的载体, 其包含选自由SEQ ID NO: 23-26组成的组的多核苷酸序列。

29. 一种细胞, 其包含权利要求27或28所述的载体。

30. 一种制备双特异性多肽的方法, 其包括: (i) 在培养基中并且在适合表达所述双特异性多肽的条件下培养权利要求29的细胞; 以及 (ii) 从所述细胞或从所述培养基中分离所述双特异性多肽。

31. 一种药物组合物, 其包含权利要求1至24任一项所述的双特异性多肽以及药学上可接受的载体。

32. 一种治疗癌症的方法, 其包括向有需要的受试者联合施用治疗有效量的: (i) 表达CAR的免疫细胞; 和 (ii) 权利要求1至24任一项所述的双特异性多肽, 或权利要求31所述的药物组合物, 并且其中所述双特异性多肽同时结合所述受试者的内源性APC上表达的抗原和所述免疫细胞表达的CAR上的抗原, 从而刺激免疫细胞在体内的活化和扩增用于治疗癌症。

33. 一种刺激免疫细胞在体内活化和扩增的方法, 其包括向受试者联合施用有效量的 (i) 表达CAR的免疫细胞; 和 (ii) 权利要求1至24任一项所述的双特异性多肽或权利要求31所述的药物组合物, 其中所述双特异性多肽同时结合所述受试者的内源性APC上表达的抗原和所述免疫细胞表达的CAR上的抗原, 从而刺激免疫细胞在体内的活化和扩增。

34. 一种刺激免疫细胞在体外活化和扩增的方法, 其包括在培养基中培养分离的表达CAR的免疫细胞, 所述培养基包含 (i) APC或APC模拟物, 和 (ii) 权利要求1至23任一项所述的双特异性多肽, 并且其中所述双特异性多肽同时结合所述APC或APC模拟物上表达的抗原和所述免疫细胞表达的CAR上的抗原, 从而刺激免疫细胞在体外的活化和扩增。

35. 根据权利要求32至34任一项所述的方法, 其中所述免疫细胞选自由T细胞、NK细胞、细胞毒性T淋巴细胞、TIL和调节T细胞组成的组。

36. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述免疫细胞为T细胞。

37. 根据权利要求32至36任一项所述的方法, 其中所述免疫细胞衍生自自体细胞。

38. 根据权利要求32至36任一项所述的方法, 其中所述免疫细胞衍生自同种异体细胞。

39. 根据权利要求32至38任一项所述的方法, 其中所述双特异性多肽以MHC单倍型独立的方式刺激所述免疫细胞的活化和扩增。

40. 根据权利要求32至39任一项所述的方法, 其中所述双特异性多肽与所述受试者的内源专职性APC特异性结合, 所述内源专职性APC任选地选自树突状细胞、巨噬细胞和B细胞组成的组。

41. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述双特异性多肽不与肿瘤细胞或癌细胞上的抗原结合。

42. 根据权利要求32至41任一项所述的方法, 其中所述双特异性多肽结合的所述抗原不是肿瘤相关抗原。

43. 权利要求1至24任一项所述的双特异性多肽或权利要求31所述的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

44. 权利要求1至24任一项所述的双特异性多肽或权利要求31所述的药物组合物, 用于治疗癌症。

用于连接表达CAR的免疫细胞与抗原呈递细胞的双特异性多肽及其用途

技术领域

[0001] 本公开主要涉及一种双特异性多肽,包括其组成和用途,包含能与抗原呈递细胞(APC)结合的第一结合域和能与T细胞结合的第二结合域。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求于2018年10月30日提交的澳大利亚临时专利申请No.2018904117和2019年9月4日提交的澳大利亚临时专利申请No.2019903255的优先权,其全部内容通过引用特此并入。

背景技术

[0004] 过继细胞转移(ACT)在癌症治疗中展现出令人兴奋的潜力。在ACT中,在再输注给患者之前,大量的自体肿瘤反应性T细胞在体外产生。肿瘤反应性T细胞可以从血液或肿瘤中分离出来,并在使用多肽和/或细胞因子的刺激下于体外扩增。迄今,最令人印象深刻的对ACT的反应是在特定的肿瘤类型中,例如其中T细胞转移连同施用IL-2以及涉及化学疗法和/或全身放射的预处理方案的黑色素瘤,使93位患者中有52位(56%)观察到客观缓解率,在93位患者中有20位患者达到完全缓解,该20位患者中有19位患者在治疗后5年以上持续完全缓解(Hinrichs等,2014,ImmunologyReviews,257(1):56-71)。骨髓移植后患有Epstein-Barr病毒(EBV)相关淋巴增殖性疾病的患者也可从ACT中获益,几乎所有患者在过继转移EBC特异性T细胞后都可以完全治愈疾病(Heslop等,2010,Blood,115(5):925-35)。但是,很少分离出对其它癌症类型具有反应性的自体T细胞。

[0005] 改善T细胞对ACT的反应性的方法包括对患者淋巴细胞进行基因修饰以产生针对大多数恶性肿瘤(包括实体癌和血液癌)的肿瘤反应性T细胞。基因修饰的两种主要方法涉及编码T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)的基因。CAR由一个融合了T细胞信号结构域的抗体衍生结构域组成,该结构域重新定向T细胞针对肿瘤细胞的效应功能。两种方法都可以使T细胞具有肿瘤反应性,但CAR方法不受MHC限制,更加广泛地适用于广大的患者。

[0006] CAR可以有多种形式(Kershaw等,2013,NatureReviews Cancer,13(8):525-41),但通常由肿瘤相关抗原(TAA)特异性抗体的单链可变区片段(scFv)组成的胞外域组成。该scFv通过铰链和跨膜结构域连接至由一个或多个信号部分组成的胞内区。已经开发出对一系列TAA(包括Her2、CEA、FBP、CD19和CD209)具有特异性的CAR。最先进的临床研究已经使用CD19特异性的CAR治疗B细胞白血病和淋巴瘤(Kershaw等,2013,同上)。2017年,美国FDA批准了其中两种CD19-CART细胞疗法用于B细胞恶性肿瘤的治疗(诺华公司的Kymriah以及Kite Pharma公司和吉利德公司的Yescarta)。尽管有这些结果,针对实体肿瘤客观缓解的报道较少,这可能是CAR T细胞的活化、扩增和持久性不足和/或免疫抑制的肿瘤微环境所致。

[0007] 优化这类疗法的尝试导致了CAR T细胞与其它旨在克服肿瘤诱导的免疫抑制治疗方法相结合,包括与 α -PD-1单克隆抗体的联合治疗(John等,2013,Clinical Cancer

Research, 19:5636-46), 信号传导和细胞因子途径的基因修饰 (Koneru等, 2015, Oncoimmunology, 4:e994446), 以及佐剂 (例如激动型 α -4-1BB单克隆抗体 (mAB) (Mardiana等, 2017, Cancer Research) 和双特异性T细胞衔接体 (BiTE)) 的应用。尽管已经证明这些方法中的某些成功实现了T细胞和癌细胞之间的直接相互作用, 从而导致造血癌细胞中的T细胞扩增, 但很少观察到实体癌环境中T细胞的显著扩增 (Huehls等, 2015, Immunological CellBiology, 93 (3):290-6)。

[0008] 由于淋巴细胞数量少并且重症患者的细胞状况差, 体外扩增和生产CAR T细胞面临的困难通常会恶化用于CAR T细胞递送的治疗方法的优化 (美国食品药品监督管理局: KYMRIAH (tisagenlecleucel), 2017年8月30日)。此外, 即使能够获得充足的供体细胞, 也需要制造大量的细胞以在这些疗法中向患者提供有效的剂量, 而来自健康供体的同种异体细胞被认为是该问题的解决方案, 但存在许多问题, 例如因供体和受体之间的人白细胞抗原 (HLA) 不匹配导致的移植物抗宿主病 (GvHD)。因此, 仍迫切需要开发新的试剂以改善用于ACT的CAR T细胞的体外和体内扩增。

发明内容

[0009] 在本文公开的一个方面, 提供了一种包含第一结合域和第二结合域的双特异性多肽, 其中所述第一结合域是与抗原呈递细胞 (APC) (优选专职性APC) 上表达的抗原特异性结合的抗体或抗体片段, 并且其中所述第二结合域是与表达嵌合抗原受体 (CAR) 的免疫细胞上的抗原特异性结合的抗体或抗体片段。

[0010] 在本文公开的一个方面, 提供了一种包含第一结合域和第二结合域的双特异性多肽, 其中所述第一结合域是与抗原呈递细胞 (APC) 上表达的抗原特异性结合的抗体或抗体片段, 并且其中所述第二结合域是与由免疫细胞表达的嵌合抗原受体 (CAR) 特异性结合的抗体或抗体片段。

[0011] 在本文公开的另一个方面, 提供了编码本文所述的双特异性多肽的核酸。

[0012] 在本文公开的另一个方面, 提供了一种载体, 其包含可操作地连接于调控序列的本文所述的核酸序列。

[0013] 在本文公开的另一个方面, 提供了一种细胞, 其包含本文所述的载体。

[0014] 在本文公开的另一个方面, 提供了一种制备双特异性多肽的方法, 包括: (i) 在培养基中并且在适合表达双特异性多肽的条件下培养本文所述的细胞; 以及 (i) 从所述细胞或从所述培养基中分离表达的双特异性多肽。

[0015] 在本文公开的另一个方面, 提供了一种药物组合物, 其包含本文所述的双特异性多肽以及药学上可接受的载体。

[0016] 在本文公开的另一个方面, 提供了一种治疗癌症的方法, 包括向有需要的受试者联合施用治疗有效量的: (i) 表达CAR的免疫细胞; 和 (ii) 本文所述的双特异性多肽或药物组合物, 并且其中所述双特异性多肽同时结合所述受试者的内源性APC上表达的抗原和所述免疫细胞上的抗原, 优选地其中所述免疫细胞上的抗原为所述CAR上的抗原, 从而刺激免疫细胞在体内的活化和扩增用于治疗癌症。

[0017] 在本文公开的另一个方面, 提供了一种刺激免疫细胞在体内活化和扩增的方法, 包括向受试者联合施用有效量的 (i) 表达CAR的免疫细胞; 和 (ii) 向所述受试者施用本文所

述的双特异性多肽或药物组合物,其中所述双特异性多肽同时结合所述受试者的内源性APC上表达的抗原和所述免疫细胞上的抗原,优选地其中所述免疫细胞上的抗原是所述CAR上的抗原,从而刺激免疫细胞在体内的活化和扩增。

[0018] 在本文公开的另一个方面,提供了一种刺激免疫细胞在体外活化和扩增的方法,包括在培养基中培养分离的表达CAR的免疫细胞,所述培养基包含(i) APC或APC模拟物,和(ii) 本文所述的双特异性多肽,其中所述双特异性多肽同时结合所述APC或APC模拟物上表达的抗原和所述免疫细胞上的抗原,优选地其中所述免疫细胞上的抗原为所述CAR上的抗原,从而刺激免疫细胞在体外的活化和扩增。

[0019] 在本文公开的另一个方面,提供了本文所述的双特异性多肽或药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的应用。

[0020] 在另一个方面,提供了本文所述的双特异性多肽或药物组合物,用于治疗癌症。

[0021] 在另一个方面,本发明提供一种试剂盒或制品,包括本发明的一种或多种双特异性多肽、编码所述双特异性多肽的核酸和/或如上所述的药物组合物。

[0022] 在其它方面,提供了用于上述治疗应用的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0023] (a) 容置有本发明的双特异性多肽、核酸、载体或药物组合物的容器;以及

[0024] (b) 带有使用说明的标签或包装说明书。

[0025] 在某些实施方案中,所述试剂盒还可以包括一种或多种用于治疗癌症的活性成分或原料。例如,所述试剂盒还可以包括表达CAR的免疫细胞。

附图说明

[0026] 图1显示使用Expi293细胞表达系统可以表达特异于CAR T细胞上的抗原的结合域。

[0027] 图2显示使用293T细胞系和阳离子脂质体系统可以表达全长双特异性多肽。(A-B) 针对来自表达BEAT1 (9E10-M5/114) 的293T细胞的蛋白裂解物的His标签的蛋白印迹图示。

[0028] 图3显示使用293T细胞系和jetPEI系统可以表达全长双特异性多肽。(A-B) 针对来自表达BEAT2 (MHCII/c-myc) 和BEAT3 (CD40/CD3) 的293T细胞的蛋白裂解物的His标签的蛋白印迹图示。

[0029] 图4显示全长双特异性多肽可被表达并在细胞均质化后从细胞释放。针对来自表达BEAT2 (MHCII/c-myc) 和BEAT3 (CD40/CD3) 的293T细胞的蛋白裂解物的His标签的蛋白印迹图示,(A) 6孔板中均质化的0.75% Supe+细胞,以及(B) 6孔板中未均质化的细胞团。

[0030] 图5显示双特异性多肽B型葡萄球菌肠毒素 (Staphylococcus Enterotoxin B, SEB) 介导T细胞扩增和IFN- γ 分泌。(A) 存在或不存在SEB(x轴)的情况下,针对来自B6小鼠或人PBMC的脾细胞的T细胞增殖(y轴)的图示。(B) 存在或不存在SEB(x轴)的情况下,针对来自B6小鼠或人PBMC的脾细胞的IFN- γ 分泌(y轴)的图示。(C) 存在或不存在SEB(x轴)的情况下,经过48小时后,已建立E0771-Her2乳腺肿瘤的荷瘤小鼠脾脏中TCR-V β 8⁺细胞百分比的图示。 $*p<0.05$, $***p<0.001$ (student t检验)。

[0031] 图6显示在体内通过联合施用SEB使CAR T细胞的抗肿瘤疗效增强。(A) 已建立E0771-Her2乳腺癌的荷瘤小鼠的肿瘤大小(mm²;y轴)与时间(治疗后天数;x轴)的图示。(B) 已建立24JK-Her2乳腺癌的荷瘤小鼠的肿瘤大小(mm²;y轴)与时间(治疗后天数;x轴)的图

示。(C) 已建立MC38-Her2乳腺癌的荷瘤小鼠的肿瘤大小 (mm^2 ; y轴) 与时间 (治疗后天数; x轴) 的图示。误差线: 标准误。 $*p<0.05$, $**p<0.01$ (student t检验)。(D) 已建立E0771-Her2乳腺癌的荷瘤小鼠中 (包括仅接受SEB或仅接受CAR T细胞的小鼠) 的肿瘤大小 (mm^2 ; y轴) 与时间 (治疗后天数; x轴) 的图示。除非另有说明, 否则在未治疗组与SEB+CAR组之间进行显著性比较。

[0032] 图7显示通过联合施用SEB增强了CAR T细胞对肿瘤的浸润。以CD8染色的细胞图示, (A) 不存在SEB, 或 (B) 存在SEB。在CAR+SEB中, 深色染色表示浸润的CAR T细胞 (即CD8⁺)。误差线=50 μm 。

[0033] 图8显示CAR特异性结合域的结合不干扰CAR介导的T细胞功能。(A) 与E0771-Her2细胞和对照或抗myc抗体 (y轴) 孵育的CAR T细胞的IFN- γ 分泌 (pg/mL; y轴) 的图示。(B) 存在或不存在抗myc抗体 (x轴) 的情况下, 与E0771-Her2细胞共培养的CAR T细胞的细胞毒性 (杀伤率%; y轴) 的图示。

[0034] 图9显示双特异性多肽 (即BEAT) 促进CAR T细胞的体外增殖。来自用CFSE标记并与BEAT (抗CD40/抗myc) 或抗CD40抗体和抗myc抗体的混合物孵育72小时的转基因CAR小鼠的脾细胞的细胞数量的图示。

[0035] 图10显示BEAT介导CAR T细胞的活化和增殖。BEAT的三个实例是通过将特异于myc标签 (存在于CAR中) 的抗体与特异于在APC的多种亚型上表达的CD40、PD-L2或Clec9a的抗体化学偶联产生的。存在或不存在BEAT的情况下, 孵育小鼠CAR T细胞与小鼠脾细胞 (作为APC的来源)。将不表达CAR的T细胞作为对照。未偶联抗体 (如所列) 存在的情况下, 将CAR T细胞与APC孵育也作为对照。(A) 在各BEAT存在的情况下, CAR T细胞 (右图) 而非对照T细胞 (左图) 分泌IFN- γ 。(B) 存在或不存在各可替换BEAT的情况下, CAR T细胞以荧光染料CFSE进行负载并与APC孵育。与对照非转导的T细胞 (左图) 相比, 转导的CAR T细胞 (右图) 的荧光强度降低, 说明增殖程度是明显的。

[0036] 图11显示CD40-myc BEAT能够根除小鼠中E0771-Her2乳腺癌。如所列, 使用CAR T细胞 (2×10^6 , 静脉注射) 和/或myc-CD40特异性的BEAT (第0天36 μg , 腹腔注射) 处理已建立皮下E0771-Her2肿瘤的Her2转基因荷瘤小鼠。其它小鼠组接受未偶联抗myc抗体和抗CD40抗体, 或未经处理 (对照)。(A) 肿瘤生长以及 (B) 小鼠存活。数据代表每组6只小鼠的3次独立实验。 $*p<0.05$, $***p<0.001$ 非配对student t检验。

[0037] 图12显示CD40-myc BEAT能使T细胞在肿瘤中聚集。皮下E0771-Her2肿瘤的荷瘤小鼠接受抗HER2 CAR T细胞 (2×10^6 , 静脉注射) 和CD40-myc BEAT (第0天36 μg , 腹腔注射)。其它小鼠仅接受CAR T细胞、BEAT或未经处理 (对照)。(A) 在开始处理后的第7天, 取出肿瘤, 分离、染色以检测CD8⁺T细胞, 并使用流式细胞仪进行分析。数据代表每组的3只小鼠。(B) 将肿瘤用福尔马林固定、切片, 并以DAPI (蓝色) 和抗CD8抗体 (棕色) 染色。显示了来自接受所列处理的小鼠的3个切片的图示。

[0038] 图13显示CART细胞在小鼠中长期存在。将脾脏从CART细胞+CD40-myc BEAT根除了E0771-Her2肿瘤的长期 (>200天) 存活小鼠 (左图) 或幼鼠 (naïve mice) (右图) 取出, 并且以抗myc抗体和CD8染色以检测CART细胞。数据代表3只小鼠。

[0039] 图14显示经CAR T细胞+BEAT疗法后, 对Her2阳性肿瘤产生排斥的小鼠完全耐受Her2阳性肿瘤的再挑战。皮下E0771-Her2肿瘤经Her2特异性CAR T细胞和CD40-myc BEAT介

导根除后的长期存活小鼠,以相同的Her2阳性肿瘤细胞(5×10^5)在对侧皮下再挑战。肿瘤生长(上图)和小鼠存活(下图)。幼鼠的肿瘤生长作为对照。(再挑战组8只小鼠,对照6只小鼠,*** $p < 0.001$,**** $p < 0.0001$)。

[0040] 图15显示CAR T细胞+BEAT疗法介导的对Her2阳性肿瘤产生排斥的小鼠中,Her2阴性肿瘤的生长被抑制。经Her2特异性CAR T细胞+CD40-myc BEAT使小鼠预先排斥E0771-Her2肿瘤,以不表达Her2的E0771在对侧进行再挑战(5×10^5 个细胞)。幼鼠的肿瘤生长作为对照。肿瘤生长(上图)和小鼠存活(下图)。(再挑战组15只小鼠,对照组5只小鼠。*** $p < 0.01$,**** $p < 0.001$,**** $p < 0.0001$)。

[0041] 图16显示抗Her2 CART细胞与CD40-myc偶联的BEAT抑制小鼠MC38-Her2结肠癌的生长。以抗Her2 CART细胞(2×10^6 ,静脉注射)和CD40-myc BEAT(第0天36 μg)处理皮下建立有MC38-Her2肿瘤的荷瘤小鼠。其它组的小鼠接受CART细胞处理、仅抗体(如所列)处理或未处理(对照)。除BEAT+CAR组7只小鼠之外,每组6只小鼠。*** $p < 0.01$)。

[0042] 图17显示PD-L2-myc与Clec9aBEAT的偶联物能使CART细胞抑制肿瘤生长。通过单克隆抗体与抗myc抗体的化学偶联来制备对APC表达的分子PD-L2或Clec9a具有特异性的BEAT。皮下建立有E0771-Her2肿瘤的荷瘤小鼠接受所列处理,或未经处理(对照)。(每组3-6只小鼠。* $p < 0.05$,** $p < 0.01$)。

[0043] 图18显示重组人CD40-myc BEAT介导人CAR T细胞的增殖。使用逆转录病毒转导Her2特异性CAR从人外周血产生CART细胞。存在或不存在化学偶联或重组CD40-myc BEAT(偶联3 $\mu\text{g}/\text{ml}$,重组0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的情况下,用CFSE标记CART细胞($2 \times 10^5/\text{ml}$)并孵育5天,5Gy辐照CTV标记的人血白细胞作为APC的来源(左图)。用空载体转导的T细胞作为对照(右图)。用流式细胞仪分析细胞。

[0044] 图19显示重组人CD40-myc BEAT增强来自CART细胞的IFN- γ 分泌。使用编码抗Her2CAR的逆转录病毒载体从外周血中产生人CART细胞。存在或不存在化学偶联或重组制备的CD40-myc BEAT的情况下,将CART细胞与作为APC来源的人血白细胞孵育5天。一些培养孔中加入了抗CD3抗体作为阳性对照。取上清液并使用ELISA分析IFN- γ 。

[0045] 图20显示人CAR T细胞与偶联的人BEAT结合抑制小鼠的肿瘤生长。皮下建立MDA-MB-231人乳腺癌的Nod-SCID-gamma (NSG) 荷瘤小鼠接受CAR T细胞,有或没有偶联的人CD40-myc BEAT(第0天36 μg ,腹腔注射)。还通过静脉递送人血来源的白细胞(1×10^6)作为APC的来源。一组未经处理的小鼠作为对照。(每组5只小鼠,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$,student t检验)。

[0046] 图21显示BEAT可以诱导来自以下的反应:表达一系列肿瘤抗原特异性的CAR的T细胞,以及表达CAR的T细胞,该CAR包括位于CAR不同位置的不同抗原。当带有用于与肿瘤抗原CEA结合的CAR并且具有myc标签(CEA-myc CAR)的T细胞,与小鼠脾细胞和具有用于与myc结合的第一结合域以及用于与CD40结合的第二结合域的BEAT孵育时,分泌更多的IFN- γ (pg/mL;y轴)。当带有用于与肿瘤抗原Her2结合的CAR并且具有位于CAR的N端的FLAG标签(Her2-FLAG CAR)的T细胞,与小鼠脾细胞和具有用于与FLAG结合的第一结合域以及用于与CD40结合的第二结合域的BEAT孵育时,也分泌更多的IFN- γ 。在表达CD40的脾细胞的存在下,FLAG和CD40特异性的BEAT也诱导Her2-FLAG CAR T细胞分泌IFN- γ 。

具体实施方式

[0047] 贯穿本说明书,除非上下文另外要求,否则将词语“包含(comprise)”或诸如“包含(comprises)”或“含有(comprising)”之类的变体理解为暗示包括所陈述的要素或整体或要素或整体的组,但不排除任何其它要素或整体或要素或整体的组。

[0048] 在本说明书中对任何在先出版物(或从其中衍生的信息)或任何已知事项的引用均不是、也不应该视为承认或接受或以任何形式的暗示在先出版物(或从其中衍生的信息)或已知事项构成本说明书所涉及领域的公知常识的一部分。

[0049] 除非另外特别定义,否则应认为本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0050] 除非另外指出,否则本说明书中使用的分子生物学、细胞培养和实验室技术是本领域技术人员公知的标准程序。这些技术在贯穿诸如以下来源的文献中被描述和解释: J.Perbal,《分子克隆实用指南》,约翰威立出版社(1984)、J.Sambrook等,《分子克隆:实验手册》冷泉港实验室出版社(1989)、T.A.Brown(编辑),《基本分子生物学:实用方法》,卷1和卷2,IRL出版社(1991)、D.M.Glover和B.D.Hames(编辑),《DNA克隆:实用方法》,卷1-4,IRL出版社(1995和1996)以及F.M.Ausubel等(编辑),《分子生物学最新方案》,格林出版社;所有这些通过引用并入。所描述的过程被认为是本领域公知的并且为了读者的方便而提供。本说明书中提到的所有其它出版物也通过引用以其整体并入。

[0051] 除非上下文另外明确指出,否则如在本说明书中所使用的,单数形式的“一个(a)”、“一种(an)”、“该(the)”包括其复数形式。因此,例如,提及“多肽”包括单个多肽以及两个或更多个多肽;提及“抗原呈递细胞”包括单个APC以及两个或更多个APC,等等。

[0052] 氨基酸和核酸序列通过序列识别号(SEQ ID NO)表示,如下表1所示。

[0053] 表1

SEQ ID NO	名称	序列类型
1	CD40 scFv	核酸
2	CD40 scFv	氨基酸
3	MHCII scFv	核酸
4	MHCII scFv	氨基酸
5	CD3 scFv	核酸
6	CD3 scFv	氨基酸
7	c-myc标签scFv	核酸
8	c-myc标签scFv	氨基酸
9	连接体1	核酸
10	连接体1	氨基酸
11	连接体2	核酸
12	连接体2	氨基酸
13	连接体3	核酸
14	连接体3	氨基酸
15	CD40/c-myc标签(BEAT1)	核酸
16	BEAT1	氨基酸

17	MHCII/c-myc标签 (BEAT2)	核酸
18	BEAT2	氨基酸
19	CD40/CD3 (BEAT3)	核酸
20	BEAT3	氨基酸
21	MHCII/CD3 (BEAT4)	核酸
22	BEAT4	氨基酸
23	BEAT1载体	核酸
24	BEAT2载体	核酸
25	BEAT3载体	核酸
26	BEAT4载体	核酸

[0055] 本公开至少部分基于发明人的意外发现断言,使用双特异性多肽使CAR T细胞与抗原呈递细胞(APC)连接增强了T细胞在体外和体内的扩增并对肿瘤有高度抑制且无毒性,同时降低达到治疗效果所需的CAR T细胞的有效剂量。重要的是,CAR T细胞是在远离免疫抑制肿瘤微环境的淋巴组织中接收活化和增殖信号。

[0056] 因此,在本文公开的一个方面,提供了一种包含第一结合域和第二结合域的双特异性多肽,其中,所述第一结合域是与在抗原APC上表达的抗原特异性结合的抗体或抗体片段,并且其中所述第二结合域是与由免疫细胞表达的嵌合抗原受体(CAR)上的抗原特异性结合的抗体或抗体片段。

[0057] 双特异性多肽

[0058] 如本文所用,术语“双特异性多肽”是指可以同时与两种不同的靶抗原特异性结合的多肽。本文描述的双特异性多肽包含两个结构上不同的结合域(即区),每个结合域与单个靶抗原特异性结合。双特异性多肽可以用于结合APC上的靶抗原和表达CAR的免疫细胞上的不同靶抗原。进一步地,双特异性多肽可以用于结合APC上的靶抗原和由免疫细胞表达的CAR上的不同靶抗原。双特异性多肽可以包括一个或多个抗体或抗体片段(例如一个或多个scFv)的多肽序列(即结构域)。在另一个实施方案中,所述双特异性多肽可以包括一个或多个配体的多肽序列。

[0059] 在一个实施方案中,所述双特异性多肽是具有第一scFv和第二scFv的串联单链可变片段抗体(taFv)。

[0060] 本文所述双特异性多肽可被不同地称为“APC和T细胞的双特异性衔接体”或“BEAT”。

[0061] 本文中可互换使用的“多肽”、“肽”、“蛋白质”和“蛋白质分子”是指包含氨基酸残基的聚合物或由氨基酸残基的聚合物组成的分子,以及它们的变体和合成类似物。因此,这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基为合成的非天然氨基酸(例如天然氨基酸相应的化学类似物)的氨基酸聚合物以及天然氨基酸聚合物。

[0062] 本文所用的术语“氨基酸”是指天然氨基酸和合成的氨基酸,以及与天然氨基酸具有相似功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然氨基酸相同的基本化学结构的化合物,例如与氢、羧基、氨基和R基团结合的碳。这些类似物可能具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽主链。氨基酸模拟物

是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构、但与天然氨基酸功能类似的化合物。

[0063] 本文中的氨基酸可以用它们的常用全称(例如半胱氨酸)、常见的三字母符号(例如Cys)或IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号(例如C)来指代。同样地,核苷酸可以用它们的常用单字母代码来指代。

[0064] 本文所用的术语“抗原”是指与“抗体”、“抗体片段”或“双特异性多肽”结合的分子。抗原可以是被免疫球蛋白识别的蛋白质,此时蛋白质上与免疫球蛋白结合的位点被称为“表位”。在一个实施方案中,抗原可以是细胞表面受体的配体(例如MHCII、Clec9a、PD-L1、PD-L2、半乳糖凝集素、CD11c、CD19、CD40和CD83)。在另一个实施方案中,抗原是由免疫细胞表达的CAR上的标签。

[0065] 本文所用的术语“抗原呈递细胞”或“APC”可以是专职性抗原呈递细胞(例如树突状细胞、巨噬细胞、B细胞、上皮细胞等),或非专职性抗原呈递细胞(例如成纤维细胞、胸腺上皮细胞、甲状腺上皮细胞、神经胶质细胞、胰岛β细胞、血管内皮细胞等)。在一个优选的实施方案中,APC是专职抗原结合细胞,而非肿瘤细胞。

[0066] 在一个实施方案中,第一结合域特异性结合APC上表达的抗原,抗原选自MHCII、Clec9a、PD-L1、PD-L2、半乳糖凝集素、CD11c、CD19、CD40和CD83组成的组。MHCII表达于树突状细胞(DC)、单核吞噬细胞、某些内皮细胞、胸腺上皮细胞和B细胞上;Clec9a表达于BDCA+树突状细胞和一小部分CD14+/CD16-单核细胞上;PD-L1和PD-L2表达于巨噬细胞、髓样树突状细胞、B细胞和血管内皮细胞上;半乳糖凝集素由辅助T细胞和B细胞表达;CD11c由树突状细胞高水平表达;CD19表达于所有专职B细胞到成熟B细胞以及滤泡树突状细胞上;CD40由树突状细胞、B细胞和巨噬细胞表达;CD83主要由成熟树突状细胞表达。在一个优选的实施方案中,与第一结合域特异性结合的抗原不是肿瘤相关抗原。

[0067] 在一个实施方案中,第二结合域与表达CAR或类似受体的免疫细胞上的抗原特异性结合。在进一步的实施方案中,本发明的双特异性多肽的第二结合域可以与免疫细胞上的抗原结合,其中,所述抗原并非CAR的一部分,而是存在于免疫细胞的细胞表面上的抗原。

[0068] 在一些实施方案中,免疫细胞是工程化T细胞或NK细胞,典型地,其中工程化T细胞或NK细胞上的抗原是CAR的一部分。根据这些实施方案,本发明的双特异性多肽的第二结合域可以结合CAR的胞外部分。第二结合域可以与CAR的抗原结合域结合,或其可以与CAR中不参与抗原结合的胞外区结合。

[0069] 在某些实施方案中,存在于免疫细胞上的CAR也可以包含用于与第二结合域结合的额外的氨基酸或分子。如本领域已知的,可以将CAR构建体设计成包含“标签”,该标签通常是被抗体特异性识别的短氨基酸序列。在一些实施方案中,免疫细胞是工程化以表达包含标签的CAR的T细胞或NK细胞。在这些实施方案的上下文中,双特异性多肽的第二结合域可以与标签结合,或其可以与CAR的标签以外的区域结合。在一些实施方案中,其中免疫细胞是工程化以表达包含标签的CAR的T细胞或NK细胞,双特异性多肽的第二结合域与CAR的标签以外的区域结合。

[0070] 存在于CAR上的标签的示例包括肽标签(例如FLAG标签、HA标签、His标签、Myc标签、S标签、SBP标签、Strep标签和eXact标签)以及蛋白标签(例如GST标签、MBP标签、GFP标签,用于与抗体或其它蛋白、核蛋白(如亮氨酸拉链)或任意其它蛋白结合形成结构域以修饰CAR的标签)。在一个实施方案中,CAR上的抗原或亲和标签为c-Myc标签。

[0071] 在一些实施方案中,免疫细胞是工程化以表达不含标签的CAR的T细胞或NK细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是工程化以表达CAR的T细胞或NK细胞,该CAR不含标签或任何异源肿瘤相关抗原或肿瘤相关抗原的片段。

[0072] 在一些实施方案中,免疫细胞是工程化以表达CAR的T细胞或NK细胞,并且双特异性多肽与CAR的胞外部分结合。如本领域已知的,CAR是包含胞外结构域、跨膜结构域和细胞质结构域的细胞表面受体,该结构域组合不存在于天然的单个蛋白质中。胞外结构域包含抗原结合域,抗原结合域可以是抗体或抗体片段。该抗体或抗体片段可以是人抗体或片段、人源化抗体或片段或非人抗体或片段。典型地,抗原结合域是抗体片段,例如Fab或scFv。最典型地,抗原结合域是scFv。胞外结构域通常也包含连接抗原结合域与跨膜结构域的间隔(或铰链)区。间隔区可以来自免疫球蛋白,例如IgG1或IgG4,或来自不同的细胞表面蛋白,包括但不限于CD4、CD8或CD28。

[0073] 在一些实施方案中,本发明的双特异性多肽包含来自抗独特型抗体或其抗原结合片段的第二结合域,其中所述抗独特型抗体是CAR的抗体部分的抗独特型抗体。换言之,第二结合域与CAR的抗原结合域结合。

[0074] 抗独特型抗体在本领域是已知的,并且本领域技术人员将能够在设计本发明的双特异性多肽中充分利用这些抗体的抗原结合域。相应地,在一些实施方案中,本发明的双特异性多肽的第二结合域包含衍生自对抗CD19抗体、抗Her2抗体或其它抗体具有特异性的抗独特型抗体的抗体或抗体片段,或包含衍生自抗独特型抗体的抗原结合片段的抗体或抗体片段,用于结合在CAR中发现的抗体。

[0075] 本领域已知多种抗独特型抗体。例如,公开号为W0 2014/190273的国际专利申请以及Jena等2013,PLoS One,8(3):e57838描述了识别抗CD19⁺scFv FMC63抗体的抗独特型抗体(mAb克隆号136.20.1),其用于许多CAR构建体的当前开发中。

[0076] 在一些实施方案中,本发明的双特异性多肽的第二结合域包含抗体或抗原结合域,抗体或抗原结合域衍生自抗CD19抗体特异性的抗独特型抗体或抗独特型抗体的抗原结合片段,其具有与克隆号136.20.1的mAb中的一个或多个相同的CDR(即VH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3中的一个、多个或全部,采用Kabat定义、Chothia定义或Kabat定义和Chothia定义的结合)。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含抗原结合多肽构建体,抗原结合多肽构建体衍生自抗CD19抗体特异性的抗独特型抗体或该抗独特型抗体的抗原结合片段,其可以具有来自克隆号136.20.1的mAb中的一个或多个(例如两个)可变区。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含抗原结合多肽构建体,抗原结合多肽构建体衍生自抗CD19抗体特异性的抗独特型抗体或该抗独特型抗体的抗原结合片段,其与克隆号136.20.1的mAb结合相同的表位。

[0077] 抗独特型抗体的其它实例包括从AbDSerotec®可商购的那些,,公开号为W02013/188864的国际专利中描述的抗CD22抗体特异性的抗独特型抗体,公开号为W097/34636的国际专利中描述的抗CEA抗体特异性的抗独特型抗体,专利号为5,935,821的美国专利中描述的抗GD-2抗体特异性的抗独特型抗体,以及Jakka等2013,Anticancer Research,33(10):4189-420中描述的抗NY-ESO-1抗体特异性的抗独特型抗体。还可以从AbDSerotec®获得定制的抗独特型抗体。

[0078] 或者,靶向CD19或其它肿瘤相关抗原的CAR的抗独特型抗体可以根据Jena等,同上

中描述的方法进行制备,并用于抗独特型抗原结合多肽构建体的构建。

[0079] 在一些实施方案中,双特异性多肽包含与不参与抗原结合的CAR的胞外区结合的第二结合域。本发明的双特异性多肽的第二结合域可以结合存在于免疫细胞上的CAR的胞外域上的任意抗原。例如,双特异性多肽的第二结合域可以结合CAR的铰链区(即CAR的跨膜结构域和scFv部分之间),或结合CAR中scFv部分的可变重链和可变轻链之间的间隔区,或结合CAR的任意其它区。

[0080] 在一些实施方案中,铰链区可以是scFv-CD28或scFv-CD8连接,其包含可以被第二结合域靶向的新表位。在一些实施方案中,铰链区可以包含可以被第二结合域靶向的突变(Fc结合无效)IgG CH2/3。在一些实施方案中,铰链区可以包含间隔区,例如Liu等(2016, Nature Biotechnology, 34:430-434)中描述的可以被第二结合域靶向的Strep-tag II。

[0081] 与CAR分子的铰链区结合的抗CAR抗体的一个实例是公开号为WO 2014/190273的国际专利申请中描述的2D3抗体,其与IgG4 CH2-CH3铰链区结合。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含与IgG4 CH2-CH3铰链区结合的抗原结合多肽构建体。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含抗原结合多肽构建体,其与IgG4 CH2-CH3铰链区结合并且具有如WO 2014/190273中描述的2D3中的一个或多个相同的CDR(即VH CDR1、VH CDR2、CH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3中的一个、多个或全部),或一个或多个(例如两个)2D3的可变区。在一些实施方案中,双特异性多肽的第二结合域结合如WO 2014/190273中描述的IgG4 CH2-CH3铰链区,并且结合与2D3相同的表位。

[0082] 本文所用术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指重组多肽,其包含与至少一个胞内信号结构域连接的抗原结合域。CAR的抗原结合域是CAR的功能部分,与肿瘤细胞上表达的抗原(即“肿瘤相关抗原”)特异性结合(即特异性靶向)。肿瘤相关抗原的实例是本领域技术人员已知的,其示例包括Her2、CEA、FBP、CD19和CD209。

[0083] 如本文所用“肿瘤相关抗原”是指癌细胞所表达的抗原。肿瘤相关抗原可以由非肿瘤细胞表达,或者可以由非肿瘤细胞表达。当肿瘤相关抗原不由非肿瘤细胞表达时(即肿瘤相关抗原为肿瘤细胞所特有时),其也可以称为“肿瘤特异性抗原”。当肿瘤相关抗原不是肿瘤细胞所特有时,其也可以在无法诱导对该抗原免疫耐受状态的情况下表达于非肿瘤细胞上。抗原在肿瘤上的表达可以在能使免疫系统应答该抗原的情况下发生。肿瘤相关抗原可以是当免疫系统不成熟且无法应答时,在胎儿发育过程中表达于非肿瘤细胞上的抗原,或者它们可以是通常在正常细胞上低水平存在但在肿瘤细胞上以高得多的水平表达的抗原。与相应的非肿瘤组织相比,那些最具临床意义的肿瘤相关抗原被差异化表达,并允许特异性T细胞或免疫球蛋白优先识别肿瘤细胞。

[0084] 完整且持续的T细胞活化和增殖需要初级启动信号(信号1)、次级协同刺激受体参与信号(信号2)以及细胞因子受体参与信号(信号3)。由于CAR T细胞不能以MHC限制性方式工作,其与APC之间的相互作用通常不足,导致信号2和信号3受到严重影响。因此,一个或多个信号结构域的参与可以影响T细胞对肿瘤相关抗原产生应答时的活化的水平和维持,这可能引起细胞因子产生的增加。

[0085] 在一个实施方案中,CAR包含至少一个胞内信号结构域。合适的信号结构域将是本领域技术人员熟知的,其示例包括CD3 ζ 、CD28、41BB、DAP10、OX40、ICOS、DAP12、KIR2DS2、4-1BB、CD3 ϵ 、CD35、CD3 ν 、CD25、CD27、CD79A、CD79B、CARD11、FcRa、Fc γ tp、Fc γ Ry、Fyn、HVEM、Lck、

LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slip76、pTa、TCRa、TCR β 、TRIM、Zap70、PTCH2和LIGHT。在一个实施方案中，CAR包含至少两个胞内信号结构域。在另一个实施方案中，CAR的胞内信号结构域包含CD28和CD3 ζ 信号结构域。

[0086] 在进一步的实施方案中，第二结合域与表达CAR的免疫细胞上的抗原结合，其中所述抗原不是CAR或者不在CAR上。换言之，表达CAR的免疫细胞也可以包含一个或多个抗原，该抗原可以被本发明的双特异性多肽的第二结合域结合。例如，抗原可以包括存在于免疫细胞表面上的天然蛋白（如CD3、CD4、CD8、CD25、CD127、CD196（CCR6）、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD197和HLA-DR）。或者，免疫细胞上的抗原可以是人工引入的抗原，例如亲和标签。可以存在于免疫细胞表面上的肽标签的实例包括肽标签（例如FLAG标签、HA标签、His标签、Myc标签、S标签、SBP标签、Strep标签、eXact标签）和蛋白标签（例如GST标签、MBP标签、GFP标签）。

[0087] 本发明的双特异性多肽的第一和第二结合域优选为抗体或抗体片段的形式。本文所用术语“抗体”泛指任何包含四条多肽链的免疫球蛋白（Ig）分子，四条多肽链为两条重（H）链和两条轻（L）链。本文还公开的是保留了抗体分子的基本表位结合特征的抗原结合片段、突变体、变体及其衍生物。这些突变体、变体和衍生物将是本领域技术人员已知的，其示例描述于本文其它位置。

[0088] 抗体重链将通常包含一个重链可变区（HCVR或VH）以及一个重链恒定区。所述重链恒定区通常包含三个区域，CH1、CH2和CH3。轻链将通常包含一个轻链可变区（LCVR或VL）以及一个轻链恒定区CL。VH区和VL区可以进一步分为高变区，也被称为互补决定区（CDR），散布于框架区（FR）。每个VH和VL通常由三个CD和四个FR组成，从氨基端到羧基端按照如下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。免疫球蛋白分子可以是任意种（如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY）、类（如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2）或亚类。

[0089] 如本文所用，术语“抗原结合片段”或“抗体片段”是指保留特异性结合靶抗原能力的抗体的一个或多个片段。抗原结合片段的示例包括（i）Fab片段，其是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段；（ii）F（ab'）₂片段，其是包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的双价片段；（iii）由VH和CH1结构域组成的Fd片段；（iv）由抗体的一个臂的VL和VH结构域组成的单链可变片段（scFv）；（v）dAb片段（Ward等1989，Nature，341：544-6），其包含单个的可变结构域；以及（vi）分离的CDR。

[0090] 在一个实施方案中，第一结合域包含scFv。在另一个实施方案中，第二结合域包含scFv。

[0091] 适合的免疫细胞将是本领域技术人员熟知的，其示例包括T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）和自然杀伤（NK）细胞。在一个实施方案中，细胞为T细胞、自然杀伤（NK）细胞或肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）。

[0092] 在一个优选的实施方案中，表达CAR的免疫细胞为T细胞。适合的T细胞的示例包括辅助性T细胞（HTL；CD4⁺T细胞）、细胞毒性T细胞（CTL；CD8⁺T细胞）、CD4⁺CD8⁺T细胞、CD4⁻CD8⁻T细胞或任意其它T细胞亚群。适合的T细胞的其它示例包括表达一个或多个如下标志物的T细胞：CD3、CD4、CD8、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD127、CD197以及HLA-DR。

[0093] 用于根据本发明用途的细胞的来源将是本领域技术人员已知的，其示例包括外周血、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。在一个实施方案中,细胞来自全血。

[0094] 本文所用术语“序列同一性”或“序列同源性”指两个聚合分子之间亚单元序列的同一性,例如两个核苷酸分子之间,如两个DNA分子或两个RNA分子,或两个多肽分子之间。当两个分子中的亚单元位点都被相同的单体亚单元占据时,例如,如果两个DNA分子中的一个位点都被腺嘌呤占据,那么它们在该位点是同源或相同的。两个序列之间的同源性是配对或同源位置的数量的直接函数,例如,如果两个序列中有一半的位点(如在一个长度为10个亚单位的聚合物中的五个位点)是同源的,该两序列50%同源;如果90%的位点(如10个中的9个)是配对或同源的,该两序列90%同源。

[0095] 在一个实施方案中,所述双特异性多肽包含第一结合域,所述第一结合域包含选自SEQ ID NO:2或4组成的组的氨基酸序列,或与选自SEQ ID NO:2或4组成的组的氨基酸序列具有至少70%,优选至少71%,优选至少72%,优选至少73%,优选至少74%,优选至少75%,优选至少76%,优选至少77%,优选至少78%,优选至少79%,优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%,优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,优选至少90%,优选至少91%,优选至少92%,优选至少93%,优选至少94%,优选至少95%,优选至少96%,优选至少97%,优选至少98%或更优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0096] 在一个实施方案中,所述双特异性多肽包含第二结合域,所述第二结合域包含氨基酸序列SEQ ID NO:6或8,或与SEQ ID NO:6或8具有至少70%,优选至少71%,优选至少72%,优选至少73%,优选至少74%,优选至少75%,优选至少76%,优选至少77%,优选至少78%,优选至少79%,优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%,优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,优选至少90%,优选至少91%,优选至少92%,优选至少93%,优选至少94%,优选至少95%,优选至少96%,优选至少97%,优选至少98%或更优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0097] 在一个实施方案中,所述双特异性多肽包含选自SEQ ID NO:16、18、20或22组成的组的氨基酸序列的氨基酸,或与选自SEQ ID NO:16、18、20或22组成的组的氨基酸序列具有至少70%,优选至少71%,优选至少72%,优选至少73%,优选至少74%,优选至少75%,优选至少76%,优选至少77%,优选至少78%,优选至少79%,优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%,优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,优选至少90%,优选至少91%,优选至少92%,优选至少93%,优选至少94%,优选至少95%,优选至少96%,优选至少97%,优选至少98%或更优选至少99%同一性的氨基酸序列的氨基酸。

[0098] 在一个实施方案中,所述双特异性多肽包含第一结合域,所述第一结合域包含SEQ ID NO:2的氨基酸,或与SEQ ID NO:2具有至少70%,优选至少71%,优选至少72%,优选至少73%,优选至少74%,优选至少75%,优选至少76%,优选至少77%,优选至少78%,优选至少79%,优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%,优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,优选至少90%,优选至少91%,优选至少92%,优选至少93%,优选至少94%,优选至少95%,优选至少96%,优选至少97%,优选至少98%或更优选至少99%序列同一性的氨基酸序列;并且所述双特异性多肽包含第二结合域,所述第二结合域包含SEQ ID NO:6的氨基酸,或与SEQ ID

N0:6具有至少70%，优选至少71%，优选至少72%，优选至少73%，优选至少74%，优选至少75%，优选至少76%，优选至少77%，优选至少78%，优选至少79%，优选至少80%，优选至少81%，优选至少82%，优选至少83%，优选至少84%，优选至少85%，优选至少86%，优选至少87%，优选至少88%，优选至少89%，优选至少90%，优选至少91%，优选至少92%，优选至少93%，优选至少94%，优选至少95%，优选至少96%，优选至少97%，优选至少98%或更优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0099] 在一个实施方案中,所述双特异性多肽包含第一结合域,所述第一结合域包含SEQ ID NO:2的氨基酸,或与SEQ ID NO:2具有至少70%,优选至少71%,优选至少72%,优选至少73%,优选至少74%,优选至少75%,优选至少76%,优选至少77%,优选至少78%,优选至少79%,优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%,优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,优选至少90%,优选至少91%,优选至少92%,优选至少93%,优选至少94%,优选至少95%,优选至少96%,优选至少97%,优选至少98%或更优选至少99%序列同一性的氨基酸序列;并且所述双特异性多肽包含第二结合域,所述第二结合域包含SEQ ID NO:8的氨基酸,或与SEQ ID NO:8具有至少70%,优选至少71%,优选至少72%,优选至少73%,优选至少74%,优选至少75%,优选至少76%,优选至少77%,优选至少78%,优选至少79%,优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%,优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,优选至少90%,优选至少91%,优选至少92%,优选至少93%,优选至少94%,优选至少95%,优选至少96%,优选至少97%,优选至少98%或更优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[10100] 在一个实施方案中,所述双特异性多肽包含第一结合域,所述第一结合域包含SEQ ID NO:4的氨基酸,或与SEQ ID NO:4具有至少70%,优选至少71%,优选至少72%,优选至少73%,优选至少74%,优选至少75%,优选至少76%,优选至少77%,优选至少78%,优选至少79%,优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%,优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,优选至少90%,优选至少91%,优选至少92%,优选至少93%,优选至少94%,优选至少95%,优选至少96%,优选至少97%,优选至少98%或更优选至少99%序列同一性的氨基酸序列;并且所述双特异性多肽包含第二结合域,所述第二结合域包含SEQ ID NO:6的氨基酸,或与SEQ ID NO:6具有至少70%,优选至少71%,优选至少72%,优选至少73%,优选至少74%,优选至少75%,优选至少76%,优选至少77%,优选至少78%,优选至少79%,优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%,优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,优选至少90%,优选至少91%,优选至少92%,优选至少93%,优选至少94%,优选至少95%,优选至少96%,优选至少97%,优选至少98%或更优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[1010] 在一个实施方案中,所述双特异性多肽包含第一结合域,所述第一结合域包含SEQ ID NO:4的氨基酸,或与SEQ ID NO:4具有至少70%,优选至少71%,优选至少72%,优选至少73%,优选至少74%,优选至少75%,优选至少76%,优选至少77%,优选至少78%,优选至少79%,优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%,优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,优选至少90%,

优选至少91%，优选至少92%，优选至少93%，优选至少94%，优选至少95%，优选至少96%，优选至少97%，优选至少98%或更优选至少99%序列同一性的氨基酸序列；并且所述双特异性多肽包含第二结合域，所述第二结合域包含SEQ ID NO:8的氨基酸，或与SEQ ID NO:8具有至少70%，优选至少71%，优选至少72%，优选至少73%，优选至少74%，优选至少75%，优选至少76%，优选至少77%，优选至少78%，优选至少79%，优选至少80%，优选至少81%，优选至少82%，优选至少83%，优选至少84%，优选至少85%，优选至少86%，优选至少87%，优选至少88%，优选至少89%，优选至少90%，优选至少91%，优选至少92%，优选至少93%，优选至少94%，优选至少95%，优选至少96%，优选至少97%，优选至少98%或更优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0102] 本发明的双特异性多肽可以包括连接第一结合域和第二结合域的连接体序列。所述连接体例如可以起到连接抗原结合多肽构建体的两个结构域的作用(如scFv或双价抗体的VH和VL)，或可以起到将两个抗原结合多肽构建体连接在一起的作用(如两个或更多个Fab或sdAb)，或可以起到将抗原结合多肽构建体连接至支架的作用。在一些实施方案中，所述双特异性多肽可以包含多个连接体(即两个或更多个)，例如，连接至支架的一个或多个scFv可以包含一个连接scFv中的VH和VL的连接体以及一个将该scFv连接至支架的连接体。适合连接体为本领域已知，并且可由熟练的技术人员根据连接体的预期用途容易地选择(例如，参见Müller&Kontermann, 治疗性抗体手册中的“双特异性抗体”，Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. 2014)。

[0103] 有用的连接体包括甘氨酸-丝氨酸(GlySer)连接体，其在本领域是众所周知的并且包含以各种顺序组合的甘氨酸和丝氨酸单元。实例包括但不限于(GS)、(GSGGS)_n、(GGGS)_n和(GGGGS)_n，其中n为至少为1的整数，通常为1至约10之间的整数，例如，1至约8之间、1至约6之间或1至约5之间。

[0104] 其它有用的连接体包括衍生自免疫球蛋白铰链序列的序列。该连接体可以包含四种IgG类型中任意一种的铰链序列的全部或部分，还可以任选地包括另外的序列。例如，连接体可以包括免疫球蛋白铰链序列的一部分以及甘氨酸-丝氨酸序列。一个非限制性的实例为一个连接体，其包括IgG1铰链的大约前15个残基，其后是GlySer连接体序列，诸如上述的那些，其长度约为10个氨基酸。

[0105] 连接体的长度将根据其应用而改变。技术人员可以容易地选择适合连接体长度。例如，当连接体用于连接scFv的VH和VL结构域时，该连接体的长度通常为约5至约20个氨基酸之间，例如，长度在约10至约20个氨基酸之间，或长度在约15至约20个氨基酸之间。当连接体用于连接双价抗体的VH和VL结构域时，该连接体应足够短以防止同一条链中的这两个结构域发生缔合。例如，连接体的长度可以为约2至约12个氨基酸之间，例如，长度在约3至约10个氨基酸之间，或长度约5个氨基酸。

[0106] 在一些实施方案中，当连接体连接两个Fab片段时，该连接体可以选择保持有F(ab')片段的对位的相对空间构象，并且能够形成与IgG核心铰链中的二硫键等同的共价键的连接体。在该上下文中，适合连接体包括IgG铰链区，例如，来自IgG1、IgG2或IgG4的那些。也可以使用这些典型连接体的修饰形式。例如，提高IgG4铰链的稳定性的修饰是本领域已知的(参见例如Labrijn等2009, Nature Biotechnology, 27:767-771)。

[0107] 连接体可以包含连接第一和第二结合域的氨基酸残基的序列。或者，第一和第二

结合域可以通过化学偶联(例如,在结构域之间形成一个双芳基偶联物)连接。用于化学偶联结合域的适合方法的实例为本领域已知。这些方法包括使用琥珀酰亚胺基化合物修饰赖氨酸残基上的伯胺,如TriLink科技公司的生物偶联试剂。在一个实施方案中,如果第一和/或第二结合域为scFv,所述双特异性多肽包含scFv的VH和VL结构域之间的连接体序列。适合的连接体序列会是本领域技术人员已知的,其示例包括相对柔性和亲水性的氨基酸残基。在一个实施方案中,连接体序列选自由SEQ ID NO:10、12或14组成的组,或选自与SEQ ID NO:10、12或14具有至少70%,优选至少71%,优选至少72%,优选至少73%,优选至少74%,优选至少75%,优选至少76%,优选至少77%,优选至少78%,优选至少79%,优选至少80%,优选至少81%,优选至少82%,优选至少83%,优选至少84%,优选至少85%,优选至少86%,优选至少87%,优选至少88%,优选至少89%,优选至少90%,优选至少91%,优选至少92%,优选至少93%,优选至少94%,优选至少95%,优选至少96%,优选至少97%,优选至少98%或更优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0108] 抗体或抗体片段可以含有用于纯化或鉴定的其它氨基酸或分子。例如,抗体可以含有表位或亲和标签。该表位或亲和标签的示例包括肽标签(例如FLAG标签、HA标签、His标签、Myc标签、S标签、SBP标签、Strep标签、eXact标签)以及蛋白标签(例如GST标签、MBP标签、GFP标签)。在一个实施方案中,表位或亲和标签为His标签。

[0109] 核酸和载体

[0110] 在本文公开的另一个一方面,提供了编码本文所述的双特异性多肽的核酸。在另一个一方面,提供了包含本文所述的载体的细胞。

[0111] 在本文中可互换使用的术语“多核苷酸”、“多核苷酸序列”、“核苷酸序列”、“核酸”或“核酸序列”指代mRNA、RNA、cRNA、cDNA或DNA。该术语通常指长度至少为10个碱基的核苷酸的聚合形式,或者是核糖核苷酸或者是脱氧核苷酸或修饰形式或任意类型的核苷酸。该术语包括RNA和DNA的单链及双链形式。

[0112] 如本文所用,术语“基因”包括能够用于形成mRNA的核酸分子,可任选地加入元件以辅助该过程。基因可能会或可能不会被用于产生功能性蛋白。基因可以同时包括编码区和非编码区(例如,内含子、调控元件、启动子、增强子、终止序列以及5'和3'非翻译区)。

[0113] 术语“转基因”在本文中用于描述已经或即将被人工引入宿主生物基因组并被传递至该宿主后代的遗传物质。在一些实施方案中,其赋予导入的T细胞期望的性质,或导致期望的治疗结果。

[0114] 如本文所用,术语“编码(encode)”、“编码(encoding)”等是指一种核酸提供给另一种核酸或多肽的能力。例如,如果核酸序列可以被转录和/或翻译以产生多肽或如果其可以被加工为可以被转录和/或翻译以产生该多肽的形式,则该核酸序列被称为“编码”该多肽。这类核酸序列可以包括编码序列或编码序列和非编码序列两者。因此,术语“编码(encode)”、“编码(encoding)”等包括由DNA分子转录产生的RNA产物、由RNA分子翻译产生的蛋白质、由DNA分子转录以形成RNA产物以及该RNA产物随后翻译产生的蛋白质、或DNA分子经转录以提供RNA产物,对该RNA产物进行加工以提供经过加工的RNA产物(例如mRNA),且该经过加工的RNA产物随后翻译产生的蛋白质。

[0115] 在一个实施方案中,编码所述双特异性多肽的核酸序列具有选自由SEQ ID NO:15、17、19、21、31或33组成的组的多核苷酸序列,或为与SEQ ID NO:15、17、19、21、31或33具

有至少70%，优选至少71%，优选至少72%，优选至少73%，优选至少74%，优选至少75%，优选至少76%，优选至少77%，优选至少78%，优选至少79%，优选至少80%，优选至少81%，优选至少82%，优选至少83%，优选至少84%，优选至少85%，优选至少86%，优选至少87%，优选至少88%，优选至少89%，优选至少90%，优选至少91%，优选至少92%，优选至少93%，优选至少94%，优选至少95%，优选至少96%，优选至少97%，优选至少98%或更优选至少99%序列同一性的核酸序列。

[0116] 在另一个方面，提供了一种载体，包含可操作地连接至调控序列的本文所述的核酸。

[0117] 术语“调控元件”或“调控序列”指在特定细胞中表达可操作地连接的编码序列所需的核酸序列（例如，DNA）。适用于真核细胞的调控序列包括启动子、多聚腺苷酸化信号、转录增强子、翻译增强子、调节mRNA稳定性的先导序列或尾随序列，以及靶向序列，其将转录的多核苷酸编码的产物靶向到细胞内的胞内区隔或胞外环境。

[0118] 通常，调控序列包括但不限于启动子序列，5' 非编码区，顺式调控区例如用于转录调控蛋白或翻译调控蛋白的功能结合位点，上游开放阅读框，核糖体结合序列，转录起始位点，翻译起始位点和/或编码先导序列、终止密码子、翻译终止位点以及3' 非翻译区的核苷酸序列。涵盖本领域已知的组成型或诱导型启动子。该启动子可以是天然存在的启动子，或是结合了一个以上启动子元件的杂合启动子。

[0119] 所涵盖的启动子序列可以是哺乳细胞固有的或衍生自其它来源，其中该区域在所选择的有机体中具有功能。启动子的选择将根据预期宿主细胞的不同而不同。例如，可以用于在哺乳细胞中表达的启动子包括可引导对镉等重金属响应的金属硫蛋白启动子、β-肌动蛋白启动子以及病毒启动子，如SV40大T抗原启动子等的、人巨细胞病毒（CMV）立早（IE）启动子、劳氏肉瘤病毒LTR启动子、小鼠乳腺癌病毒LTR启动子、腺病毒主要晚期启动子（AdMLP）、单纯疱疹病毒启动子以及HPV启动子，特别是HPV上游调控区（URR），等等。所有这些启动子在本领域中已被充分描述并容易获得。

[0120] 增强子元件也可以在本文中使用以提升载体构建体内核酸序列的表达水平。实例包括SV40早期基因增强子，例如Di jkema等（1985, EMBO Journal, 4:761）所述，衍生自劳氏肉瘤病毒的长末端重复序列（LTR）的增强子/启动子，例如Gorman等（1982, Proceedings of the National Academy of Science. 美国, 79:6777）所述，以及衍生自人CMV的元件，例如Boshart等（1985, Cell, 41:521）所述，如CMV内含子A序列包括的元件。

[0121] 载体构建体还可以包含3' 非翻译序列。3' 非翻译序列指基因的一部分，其包含的DNA片段含有多聚腺苷酸化信号和任何其它可以实现mRNA加工或基因表达的调控信号。多聚腺苷酸化信号的特征是实现添加多聚腺苷酸化域至mRNA前体的3' 端。多聚腺苷酸化信号通常通过与典型形式的5' AATAAA-3' 存在同源性而被识别，尽管变化并不罕见。3' 非翻译调控DNA序列优选地包括从约50至1,000个核苷酸，并且除了多聚腺苷酸化信号和任意其它可以实现mRNA加工或基因表达的调控信号之外，还可以含有转录和翻译终止序列。

[0122] 本文所用术语“可操作地连接（operably connected）”或“可操作地连接（operably linked）”指并置，其中所描述的组件处于使其以预期方式发挥作用的关系。例如，调控序列“可操作地连接”至编码序列是指该调控序列相对于该编码序列的位置和/或方向，以允许在与调控序列相容的条件下表达该编码序列。

[0123] 如本文所用术语“开放阅读框”和“ORF”可以在本文互换使用,是指在编码序列的翻译起始密码子和终止密码子之间编码的氨基酸序列。术语“起始密码子”(例如ATG)和“终止密码子”(例如TGA、TAA、TAG)是指编码序列中分别指定蛋白质合成(mRNA翻译)的起始和链终止的三个相邻核苷酸(“密码子”)的单元。

[0124] 如本文所用应用于“核酸分子”、“多核苷酸”等的术语“重组”应理解是指人工核酸结构(即,非复制型cDNA或RNA;或复制子,自我复制型cDNA或RNA),其在本文所述细胞中可以被转录和/或翻译。

[0125] 重组核酸分子或多核苷酸可以被插入载体。可以使用如质粒表达载体的非病毒载体或病毒载体。根据本发明的载体种类及核酸构建体的插入技术为本领域已知,其示例包括粘黏粒、质粒(例如裸的或包含在脂质体中)和病毒(例如慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0126] 在一个实施方案中,载体包含选自由SEQ ID NO:23-26组成的组的多核苷酸序列。

[0127] 本文所述的核酸序列、多核苷酸或载体构建体包含自然界不存在的异源序列。

[0128] 在另一个方面,提供了一种包含本文所述载体的宿主细胞。适合的宿主细胞会是本领域技术人员已知的,其示例包括细菌细胞(例如大肠杆菌(*E.coli*)、奇异变异杆菌(*P.mirabilis*))、真菌细胞(例如酿酒酵母(*S.cerevisiae*)、巴氏毕赤酵母(*P.pastoria*)、里氏木霉(*T.reesei*))、植物细胞、昆虫细胞(例如SF-9、SF21、Hi-5)或哺乳动物细胞。在一个实施方案中,宿主细胞为哺乳动物细胞。适合的哺乳动物细胞会是本领域技术人员已知的,其示例包括CHO细胞或293T细胞。这些细胞可通过商业供应商广泛获得。

[0129] 制备双特异性多肽的方法

[0130] 在另一个方面,提供了制备本文所述的双特异性多肽的方法,包括(i)在培养基中并且在适合表达双特异性多肽的条件下培养本文所述的细胞;以及(ii)从所述细胞或所述培养基中分离所述双特异性多肽。

[0131] 可以使用本领域技术人员已知的任何数量的表达系统来制备本文所述的双特异性多肽,其示例包括在细菌(例如大肠杆菌(*E.coli*)、奇异变异杆菌(*P.mirabilis*))、真菌(例如酿酒酵母(*S.cerevisiae*)、巴氏毕赤酵母(*P.pastoria*)、里氏木霉(*T.reesei*))、植物或植物细胞、昆虫或昆虫细胞(例如SF-9、SF21、Hi-5)或哺乳动物细胞中制备或通过它们制备。在一个实施方案中,表达系统为哺乳动物表达系统。适合的哺乳动物表达系统会是本领域技术人员已知的,其示例包括CHO或293表达系统。这些表达系统可通过商业供应商广泛获得。在一个实施方案中,使用哺乳动物表达系统制备所述双特异性多肽。

[0132] 在另一个方面,提供了制备本文所述的双特异性多肽的方法,包括在适合形成包含第一结合域和第二结合域的化学偶联的双特异性多肽的条件下,将所述第一结合域与所述第二结合域结合。

[0133] 在一个优选的实施方案中,如本文其它位置所述,所述化学偶联的双特异性多肽形成于琥珀酰亚胺基化合物修饰赖氨酸残基上存在的伯胺之后。

[0134] 利用商业可得的抗体或其抗原结合域以产生本文所述的双特异性多肽会在技术人员的能力范围内。此外,基于具有所需特异性的抗体或抗原结合域相关的公开序列信息,复制抗体或其抗原结合域在技术人员的能力范围内,并因此根据本发明将这些抗体或其抗原结合域包括在双特异性多肽中。特别地,会理解,本发明涵盖任意双特异性抗体的产生,

该双特异性抗体被设计为具有本文所述的第一和第二结合域的特异结合亲和性(即,第一结合域用于与抗原呈递细胞上的抗原结合,抗原呈递细胞优选专职性抗原呈递细胞,如树突状细胞;以及第二结合域用于与表达CAR的免疫细胞上的抗原结合,包括其中所述抗原为CAR上的抗原)。技术人员会理解,具有所需结合特异性的抗原结合域的任意组合都可以用于获得本发明的双特异性多肽。

[0135] 药物组合物

[0136] 在另一个方面,提供了一种包含本文所述的双特异性多肽以及药学上可接受的载体的药物组合物。

[0137] 本文所述的组合物可以以本领域已知的方式制备,并且适用于肠胃外给药至哺乳动物,特别是人类的,包含治疗有效量的组合物和一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂。

[0138] 本文所用术语“药学上可接受的载体”是指任何适合的载体、稀释剂或赋形剂。这些包括所有水性和非水性的等渗无菌注射液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂和溶质,以使所述组合物与预期接受者的血液等渗;水性和非水性的无菌混悬液,其可以包括悬浮剂和增稠剂、分散介质、抗真菌剂和抗细菌剂、等渗剂和吸收剂等。会理解的是,本发明的组合物也可以包括其它补充生理活性剂。

[0139] 从与组合物中的其它成分相容并且对受试者无害的角度而言,载体通常为药学上“可接受的”。组合物包括适用于肠胃外给药的那些,包括皮下、肌肉内、静脉和皮内给药。所述组合物可以方便地以单位剂型存在,并且可以通过药学领域公知的任何方法制备。这些方法包括制备用于与分离的T细胞联合的载体。通常,通过将任意活性成分与液态载体均匀且紧密地联合来制备所述组合物。

[0140] 在一个实施方案中,所述组合物适用于肠胃外给药。在另一个实施方案中,所述组合物适用于静脉给药。

[0141] 适用于肠胃外给药的组合物包括水性和非水性的等渗无菌注射液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、杀菌剂和溶质,以使所述组合物与预期接受者的血液等渗;以及水性和非水性的无菌混悬液,其可以包括悬浮剂和增稠剂。

[0142] 本公开还考虑了本文所述的组合物与其它活性剂和/或诸如放射治疗或手术的其它治疗方案或形式之外的组合。当本文所述的组合物用于与已知活性剂联用时,该组合可以依照顺序(连续地或在不进行治疗的期间间断性地)或同时或作为混合物施用。适合的抗癌剂会是本领域技术人员已知的。联合治疗也可考虑包括在本发明的组合物治疗之后接着已知方法治疗,或在用已知药剂治疗之后接着以本发明的组合物治疗,例如作为维持治疗。例如,在癌症的治疗中,本发明的组合物可以考虑与以下药物联合施用:烷化剂(如二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺联合顺铂(ifosfamidecysplatin)或诸如顺铂、卡铂和奥沙利铂(oxaliplatin)等含铂的烷化剂),抗代谢药(如嘌呤或嘧啶类似物,或诸如硫唑嘌呤和巯嘌呤的抗叶酸剂),蒽环类药物(如柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、伊达比星、戊柔比星、米托蒽醌或蒽环型类似物),植物碱(如长春花生物碱类或紫杉类,如长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛、紫杉醇或doestaxel),拓扑异构酶抑制剂(如I型或II型拓扑异构酶抑制剂),鬼臼毒素(如依托泊苷或替尼泊苷),酪氨酸激酶抑制剂(如甲磺酸伊马替尼、尼洛替尼或达沙替尼),腺苷受体抑制剂(如A2aR抑制剂、SCH58261、CPI-444、SYN115、

ZM241385、FSPTP或诸如PSB-1115的A2_BR抑制剂),腺苷受体激动剂(如CCPA、IB-MECA和CI-IB-MECA),检查点抑制剂(包括PDL-1/PD-1轴,如纳武单抗、派姆单抗、阿特珠单抗、BMS-936559、MEDI4736、MPDL33280A或MSB0010718C),CTLA-4通路抑制剂(如伊匹单抗和曲美木单抗),TIM-3通路抑制剂或已知促进T细胞功能的单克隆抗体激动剂(包括诸如MEDI6469的抗OX-40抗体,以及诸如PF-05082566的抗4-1BB抗体)。

[0143] 在另一个方面,本发明提供了一种试剂盒或制品,其包括一种或多种本发明的双特异性多肽、编码所述双特异性多肽的核酸和/或如上所述的药物组合物。

[0144] 在另外方面,提供了一种用于上述治疗应用的试剂盒,所述试剂盒包含:

[0145] (a) 容置有本发明的双特异性多肽、核酸、载体或药物组合物的容器;以及

[0146] (b) 带有使用说明的标签或包装说明书。

[0147] 所述试剂盒还可以包括一种或多种用于治疗癌症的活性成分或原料。例如,所述试剂盒还可以包括表达CAR的免疫细胞。

[0148] 所述“试剂盒”或“制品”可以包含容器以及在容器上或与容器有关的标签或包装说明书。适合的容器包括如瓶、小瓶、注射器、吸塑包装等。所述容器可以由诸如玻璃或塑料的多种材料形成。所述容器容置有对治疗疾病有效的治疗组合物,并且可以具有无菌的进出口(例如,所述容器可以是静脉注射溶液袋或具有可被皮下注射针刺入的塞子的小瓶)。所述标签或包装说明书指明所述治疗组合物用于治疗选择的病症。在一个实施方案中,所述标签或包装说明书包括使用说明,并且指明所述治疗或预防组合物可以用于治疗本文所述的癌症或其它病症。

[0149] 所述试剂盒可以包含(a)治疗或预防组合物;以及(b)容置有第二活性成分或原料的第二容器。根据本发明的该实施方案的试剂盒可以进一步包含包装说明书,其指明所述组合物和其它活性成分可以用于治疗本文所述的癌症或病症。或者或另外地,所述试剂盒可以进一步包含第二(或第三)容器,该第二(或第三)容器包含药学上可接受的缓冲液,如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲液、林格氏溶液和葡萄糖溶液。其还可以进一步包含本领域技术人员会已知的、从商业和用户角度出发所需的其它材料,适合的实例包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0150] 治疗方法

[0151] 在另一个方面,提供了一种治疗癌症的方法,包括向有需要的受试者联合施用治疗有效量的:(i)表达CAR的免疫细胞;和(ii)本文所述的双特异性多肽或药物组合物,其中所述双特异性多肽在体内同时结合所述受试者的内源性APC上表达的抗原和所述免疫细胞表达的CAR上的抗原,从而刺激免疫细胞的活化和扩增用于治疗癌症。

[0152] 如本文所述,表达CAR的免疫细胞和双特异性多肽或药物组合物的联合施用可以通过将所述免疫细胞和所述双特异性多肽或药物组合物制成相同的组合物(例如用于同时联合施用),或将它们制成用于顺序施用的不同组合物来实现。“顺序”施用是指在所述免疫细胞和所述双特异性多肽或药物组合物的施用之间存在间隔。顺序施用之间的所述间隔可以是数秒、数分钟、数小时或数天。在一个实施方案中,可能需要定期重新施用所述免疫细胞和所述双特异性多肽和药物组合物,以达到所需的治疗效果。顺序施用可以以任何顺序进行。

[0153] 发明人令人惊讶地证明了本文所述的双特异性多肽在体内刺激免疫细胞的活化

和扩增,从而提高了诸如CAR T细胞疗法的免疫细胞疗法的疗效。相应地,所述双特异性多肽可被称为“佐剂”。本文所用术语“佐剂”是指双特异性多肽,其可以增加表达CAR的免疫细胞引起的免疫应答的强度,超过了仅表达CAR的免疫细胞所能引起的免疫应答的强度。

[0154] 免疫细胞活化可以通过例如T细胞TCR/CD3复合体或CD2表面蛋白的刺激提供初级刺激信号,以及通过例如CD28或4-1BBL的辅助分子提供次级协同刺激信号来实现。除了通过TCR/CD3复合体或CD2提供的初级刺激信号之外,诱导T细胞应答需要次级协同刺激信号。在特定的实施方案中,CD28结合剂可以用于提供协同刺激信号。适合的协同次级配体包括但不限于CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、4-1BBL、OX40L、诱导型协同刺激配体 (ICOS-L)、细胞间粘附分子 (ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素 β 受体、ILT3、ILT4、与Toll配体受体结合的激动剂或抗体,以及与B7-H3特异性结合的配体。

[0155] 本文可互换使用的术语“扩充(expanded)”、“扩增(expansion)”、“扩充(expanding)”、“增殖(propagation)”是指在向受试者施用细胞或施用制备的药物组合物之前或施用之后,免疫细胞数量的增加。免疫细胞可以使用本领域已知的任意细胞培养方法进行扩增。例如,免疫细胞可以在体外组织培养系统中扩增,包括液体培养、单层等。

[0156] 用于治疗癌症的治疗方案可以由本领域技术人员决定,并且将通常取决于以下因素,包括但不限于肿瘤的类型、大小、分期和受体状态,以及受试者的年龄、体重和总体健康状况。另一个决定性因素可以是出现疾病复发的风险。例如,对于被确定为处于高风险或较高风险或出现复发疾病的受试者,与被认为处于低风险或较低风险出现复发疾病的受试者相比,可以制定更加积极的治疗方案。类似地,对于被确定为患有相对晚期癌症的受试者,例如III期或IV期疾病,与患有相对早期癌症的受试者相比,可以制定更加积极的治疗方案。

[0157] 本文所用术语“癌症”指与异常细胞增殖相关的任何病症。这些病症会是本领域技术人员已知的。在一个实施方案中,所述癌症为实体癌。在另一个实施方案中,所述癌症为Her2阳性癌症。在另一个实施方案中,所述癌症选自由乳腺癌、胰腺癌和肝癌组成的组。

[0158] 本文所用术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”是指以任何方式补救疾病或症状、或预防、阻碍、延缓、消除或逆转癌症或其它不良症状的发生或发展的任意和所有用途。因此,术语“治疗(treating)”等应在尽可能宽泛的范围内加以考虑。例如,治疗并不必然意味着对受试者进行治疗直至完全康复或痊愈。在表现出多种症状或以多种症状为特征的病症中,所述治疗不一定需要补救、预防、阻碍、延缓、消除或逆转所有的所述症状,而是可以补救、预防、阻碍、延缓、消除或逆转一种或多种所述症状。

[0159] 将要治疗癌症的受试者可以是对人类具有经济重要性和/或社会重要性的人类或哺乳动物,例如,人类以外的食肉动物(例如猫和狗),猪类(例如猪、家猪和野猪),反刍动物(例如牛、公牛、绵羊、长颈鹿、鹿、山羊、野牛和骆驼),马和鸟类,鸟类包括濒临灭绝的鸟类、动物园的鸟类和禽类,尤其是驯养的禽类,例如诸如火鸡、鸡、鸭、鹅、珍珠鸡等的家禽,因为这些动物对人类具有经济重要性。术语“受试者”不表示特定的年龄。因此,意在涵盖成人、青少年和新生儿受试者。

[0160] 本文所用术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换使用,以指代本公开可适用的任何受试者。在一个实施方案中,所述受试者为哺乳动物。在另一个实施方案中,所述受试者为人类。

[0161] 本文所用术语“治疗有效量”是指当施用于需要该治疗的哺乳动物(特别是人)时,足以治疗癌症的细胞量。可以由医师考虑年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移的程度以及受试者病情的个体差异,来确定要施用的修饰的细胞的精确的量。

[0162] 通常,免疫细胞(例如CAR-T细胞)疗法的施用由每千克体重的细胞数来定义。然而,由于修饰的细胞将在转移后复制和扩增,因此所施用的细胞剂量将不会与最终的稳态细胞数量相似。在一个实施方案中,包含本发明的修饰的细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/千克体重的剂量施用。在另一个实施方案中,包含本发明的修饰的细胞的药物组合物可以以 10^5 至 10^6 个细胞/千克体重的剂量施用,包括该范围内的所有整数值。

[0163] 包含本文所述的双特异性多肽的组合物也可以以这些剂量进行多次施用。通过监测患者的疾病征兆并相应地调整治疗,本领域技术人员可以容易地确定针对特定受试者的最佳剂量和治疗方案。

[0164] 在一个实施方案中,所述免疫细胞衍生自自体细胞。在另一个实施方案中,所述免疫细胞衍生自同种异体细胞。

[0165] 术语“自体”是指衍生自同一个体的任何物质,该物质随后被重新引入该个体。

[0166] 术语“同种异体”是指衍生自不同个体的任何物质,该个体与引入该物质的个体的物种相同。当一个或多个位点的基因不同时,两个或更多个个体被称为彼此同种异体。在一些方面,来自相同物种的个体的同种异体物质可以在基因上具有足够的差异,从而产生抗原相互作用。

[0167] 细胞的制备

[0168] 为了获得充足治疗剂量的免疫细胞组合物,制备免疫细胞的方法通常涉及一轮或多轮刺激、活化和/或扩增。根据本文公开的方法,可以刺激免疫细胞以在体内和体外活化和扩增。

[0169] 因此,在本文公开的另一个方面,提供了一种刺激免疫细胞在体内活化和扩增的方法,包括向受试者联合施用有效量的(i)表达CAR的免疫细胞;和(ii)本文所述的双特异性多肽或所述药物组合物,其中所述双特异性多肽在体内同时结合所述受试者的内源性APC上表达的抗原和所述免疫细胞表达的CAR上的抗原。

[0170] 本文所述的免疫细胞在体内的活化和扩增有助于减少每种治疗剂量的免疫细胞所需的免疫细胞的数量。

[0171] 在另一个方面,提供了一种刺激免疫细胞在体外活化和扩增的方法,包括在培养基中培养分离的表达CAR的免疫细胞,所述培养基包含(i)APC或APC模拟物,和(ii)本文所述的双特异性多肽,其中所述双特异性多肽同时结合所述APC或APC模拟物上表达的抗原和所述免疫细胞表达的CAR上的抗原。

[0172] 本文所考虑的所述免疫细胞制备方法具有简单且稳健的培养起始和活化步骤,有助于生成作为优质治疗产品的免疫细胞组合物。在一个实施方案中,培养起始和活化包括将细胞群接种于细胞培养容器中,例如细胞培养袋、GREX生物反应器、WAVE生物反应器等,并通过初级和协同刺激免疫细胞信号通路活化免疫细胞。所述细胞组合物可以进一步在一种或多种外加生长因子或细胞因子(例如IL-2、IL7和/或IL-15或其任意适合的组合)的存在下进行培养。

[0173] 在另一个实施方案中,免疫细胞的活化和扩增包括用APC或APC模拟物培养分离的

免疫细胞。在一个实施方案中,所述APC或APC模拟物选自自由供体来源的APC、合成的人工APC(aAPC)、针对CD3和CD8的活化抗体功能化的微珠(Dynabead)、自体单核细胞衍生的树突状细胞(mo-DC)以及模拟APC的支架组成的组。

[0174] 在特定的实施方案中,培养起始包括将包含T细胞(例如PBMC)的细胞群以所需密度(如 $1-5 \times 10^6$ 个细胞/mL)接种于细胞培养容器中的适合细胞培养基中,该细胞培养基含有一种或多种细胞因子、初级刺激配体以及协同刺激配体。在另一个一实施方案中,所述细胞因子、刺激配体和协同刺激配体可以随后添加至细胞培养基中的PBMC。

[0175] 在一个实施方案中,所述细胞培养容器为细胞培养袋,包括但不限于MACS®GMP细胞扩增袋、MACS®GMP细胞分化袋、EXP-Pak™细胞扩增生物容器、VueLife™袋、KryoSure™袋、KryoVue™袋、Lifecell®袋、PermaLife™袋、X-Fold™袋、Si-Culture™袋以及VectraCell™袋,如本文其它位置所述。

[0176] 在特定的实施方案中,所述细胞接种于包含适合的细胞培养基的细胞培养容器中。适合的细胞培养基的示例包括但不限于TCGM、X-VIVO™(补充了2mM GlutaMAX™-I、10mM HEPES以及5%人AB血清)、CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM(Life Technologies)、CTS™ AIM V®培养基(Life Technologies)、RPMI 1640、Clicks、DMEM、MEM、a-MEM、F-12、X-Vivo 15(龙沙)、CellGro®无血清培养基(CellGenix)以及X-Vivo 20(龙沙),并添加了氨基酸、丙酮酸钠和维生素,无血清或添加了适量的血清(或血浆)或一组确定的激素,和/或足以使免疫细胞生长和扩增的一定量的细胞因子。

[0177] 本文考虑的细胞培养基可以进一步包含一种或多种因子,包括但不限于血清(例如胎牛血清或人血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、IL-21、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 和TNF- α 。

[0178] 在一个实施方案中,所述APC或APC模拟物选自自由供体衍生的APC、合成的人工APC(aAPC)、针对CD3和CD8的活化抗体功能化的微珠(Dynabead)、自体单核细胞衍生树突状细胞(mo-DC)以及模拟APC的支架组成的组。

[0179] 本领域技术人员将理解,本文描述的发明除了具体的描述的那些之外,可以进行变化和修改。应当理解的是,本发明包括落入本发明精神和范围之内的所有这种变化和修改。本发明还单独地或共同地包括在本说明书中提及或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及所述步骤或特征中的任意两个或更多个的任何和所有组合。

[0180] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0181] 通过以下非限制性实施例进一步描述本文实现的各种实施方案。

[0182] 实施例

[0183] A. 材料

[0184] 细胞培养

[0185] E0771为小鼠乳腺癌细胞系(Johnstone等,2015,Disease Models&Mechanisms,8:237-51),24JK为甲基胆蒽诱导的纤维肉瘤(Shiloni等,1993,Cancer Immunology and Immunotherapy,37:286-92),并且MC38为化学诱导的结肠腺癌(Corbett等,1975,Cancer Research,35:2434-9)。这些细胞系来源于C57BL/6小鼠,并且在小鼠干细胞病毒LTR启动子的控制下,逆转录病毒转导了亲本细胞系以表达人Her2抗原。这些Her2+细胞系被称为

24JK-Her2、MC38-Her2以及E0771-Her2。MDA-MB-231、PANC1和A549细胞系为Her2+。

[0186] 所有细胞系于37℃、5%CO₂下培养在RPMI培养基中,RPMI培养基添加有10%热灭活的胎牛血清(FBS)、1mmol/L丙酮酸钠、2mmol/L谷氨酰胺、0.1mmol/L非必需氨基酸、10mM 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素。E0771-Her2在补充DMEM中培养,可以增强对培养瓶的附着。

[0187] CAR T细胞

[0188] 从人或小鼠供体采取的全血的血沉棕黄层收集得到PBMC。根据Ritchie等(2013, *Molecular Therapy*, 21 (11):2122-29)中描述的方法,使用Her2特异性的CAR逆转录病毒载体或空白对照载体转导T细胞。根据Mardiana等(2017, *Cancer Research*)中描述的方法,使用Her2特异性的CAR逆转录病毒载体或空白对照载体转导小鼠T细胞。

[0189] 其它免疫细胞

[0190] 使用辐照的PBMC、从PBMC中以FACS分选的CD19+B细胞或单核细胞衍生的树突状细胞(Mo-DC)来生成APC。使用可商购的试剂盒(Miltenyi Biotec)在未成熟和成熟的mo-DC的混合物中生成mo-DC。

[0191] B.BEAT的设计

[0192] 通过使用柔性连接体将两个抗体scFv结构域连接到一条多肽链中以设计BEAT。第一个scFv结构域被设计为特异性结合CD40 (SEQ ID NO:2)或MHCII (SEQ ID NO:4)。从产生抗CD40 (FGK45)和抗MHCII (M5/114)的单克隆抗体的杂交瘤细胞系中分离cDNA。克隆编码这些单克隆抗体的可变H结构域和L结构域的基因,并通过(G4S)3-连接体序列基因融合以产生APC特异性scFv。第二个scFv结构域被设计为特异性结合上述Her2特异性的CAR中的CD3 (SEQ ID NO:6)或myc标签 (SEQ ID NO:8),并使用相同方法生成CAR特异性scFv。

[0193] APC特异性scFv和CAR特异性scFv重组连接以产生编码BEAT的基因 (SEQ ID NO:17和19)。

[0194] C.BEAT的制备

[0195] BEAT编码序列被克隆至含有巨细胞病毒(CMV)启动子的pCDNA3.4 TOPO载体中,用于在哺乳动物细胞培养中高水平表达天然蛋白。根据标准程序验证插入的编码序列。使用Expi293表达系统(Invitrogen)、jetPEI (Polyplus-transfection股份公司)和阳离子脂质体转染哺乳动物细胞,以用于BEAT的快速和超高产量蛋白制备。

[0196] 针对细菌制备BEAT,使用Gateway克隆系统(Invitrogen)。因此,将BEAT编码序列插入entry质粒中以创建pDONR221ZeoBEAT。然后转化感受态大肠杆菌,选择含有pDONR221ZeoBEAT的阳性克隆并测序。然后,将pDONR221ZeoBEAT与pDestination载体pET15bGW结合以创建pET15bBEAT。然后转化感受态大肠杆菌,选择含有pET15bBEAT的阳性克隆并测序。然后将pET15bBEAT转化至BL21DE3大肠杆菌中,并以IPTG诱导以产生BEAT多肽。

[0197] 使用His60 Ni Superflow树脂/镍珠收集含有His标签的BEAT多肽。使用6His检查试剂盒(Cisbio)电泳和蛋白质印迹法检测BEAT的纯度和浓度。

[0198] 为了确认重组BEAT多肽的结合性,将BEAT与荧光染料偶联。将使用流式细胞仪确认已标记的BEAT的结合性。此外,我们将使用竞争性结合试验确认BEAT和原始单克隆抗体与相同分子的结合。

[0199] 使用蛋白质-蛋白质偶联试剂盒 (Protein-Protein Conjugation kit, TriLink 生物技术公司) 制备化学偶联的 BEAT 多肽。简言之, 将 myc 标签 (存在于 CAR 中)、CD40、PD-L2 或 Clec9a 的特异性抗体脱盐, 并使用斑马 (zebra) 柱将其浓缩至修饰缓冲液中。

[0200] 当制备 BEAT 多肽时, 以 S-HyNic 修饰其中一种抗体, 以 S-4FB 修饰另一种抗体, 两者的摩尔取代率均为 5。将抗体与 S-HyNic 或 S-4FB 在室温下孵育 2.5 小时之后, 将修饰的抗体脱盐并使用斑马柱转移至偶联缓冲液中。随后, 将等摩尔量的 S-HyNic 修饰抗体和 S-4FB 修饰抗体混合在一起, 并向混合物中添加 1/10 体积的 10 x TurboLink 催化缓冲液。然后将蛋白混合物于 4℃ 孵育过夜。在偶联程序的第二天, 将样品以 5000g 离心 5 分钟以去除所有团聚体。

[0201] 通过电泳法 (NuPAGE 凝胶, Invitrogen) 确认抗体的偶联。然后, 使用 HiLoad 16/600 Superdex™ 200pg 柱 (GE 医疗生命科学部) 经快速蛋白液相色谱 (FPLC) 将偶联产物纯化至 PBS-/-。使用 FPLC 纯化后, 通过电泳法 (NuPAGE 凝胶, Invitrogen) 确认化学偶联 BEAT 的不同片段的分子量。在一些情况下, 使用 Vivaspins (Sartorius Stedim) 进一步浓缩纯化的化学偶联 BEAT。

[0202] E. SEB 功能分析

[0203] 将人或小鼠 T 细胞与 APC 和 SEB 共培养, 并在共培养 24-72 小时后评估细胞增殖、IFN- γ 分泌和 TCRV β 8⁺ T 细胞向脾脏的浸润。

[0204] 为了确定 SEB 是否可以通过促进 T 细胞扩增来增强 CAR T 细胞治疗的功效, 我们测试了三种不同的小鼠肿瘤模型, 分别为植入了 E0771-Her2 乳腺癌, 24JK-Her2 肉瘤和 MC38-Her2 癌的 Her2 转基因小鼠。在乳清酸性蛋白 (WAP) 启动子的控制下, 这些具有免疫活性的 Her2 转基因小鼠在正常乳腺和大脑中表达人 Her2, 因此它们可耐受 Her2+ 细胞系 (Piechocki 等, 2003, Journal of Immunology, 171:5787-94)。建立 Her2+ 肿瘤后, 将 CART 细胞过继转移, 并在同一天和 5 天后经腹腔注射两次 SEB。

[0205] F. BEAT 功能分析

[0206] 从抗 CD40/抗 myc 抗体产生化学偶联双特异性多肽, 以评估 BEAT 对细胞增殖的影响。以上文所述的已经在 Her2 特异性 CAR 上存在的 c-myc 标签作为 CAR 特异性抗原。

[0207] 将 T 细胞、BEAT 和 APC 共培养, 并使用多种测定法以确认 T 细胞和 APC 上的功能变化。在共培养 24-72 小时后, 检测细胞增殖 (氘化胸腺嘧啶掺入试验、CFSE 标记法和细胞计数法)、细胞因子分泌 (ELISA、细胞因子微球阵列法和细胞内染色) 以及细胞活化/分化状态 (包括 CD25、CD69、CD45RA、CD45RO、CD27、CD28、MHCII、CD80、CD86 以及 CCR7 的标志物)。

[0208] 将使用一系列测定法评估 BEAT 刺激 T 细胞的细胞毒性能力, 包括用于检测细胞裂解的铬释放测定法、T 细胞上的颗粒酶和 CD107a 染色、膜联蛋白 V/7AAD 以及实时凋亡/坏死分析 (RealTime-Glo AnnexinV apoptosis and necrosis assay kit, Promega)。将使用适当的 BEAT、T 细胞和肿瘤细胞对照以确定特异性。

[0209] 为了确定 BEAT 产生的 CAR T 细胞对多种实体瘤细胞系的应答能力, 我们将使用植入免疫缺陷小鼠中的 Her2 阳性人细胞系 MDA-MB-231 乳腺癌、PANC1 胰腺癌和 A549 肺癌细胞系 (或对照), 或 Her2 转基因小鼠中的 E0771-Her2、MC38-Her2、24JK-Her2 小鼠肿瘤细胞系作为靶点。建立 Her2+ 肿瘤后, 将 CAR T 细胞过继转移, 并在同一天和 5 天后经腹腔注射两次 BEAT。

[0210] 结果

[0211] 使用哺乳动物系统制备BEAT

[0212] 哺乳动物系统可以用于制备可溶形式的BEAT,并且具有适当的翻译后修饰的优点,但是产率相对较低(即,每 10^8 个细胞产生少于1nmol的scFv蛋白)。

[0213] 使用Expi293细胞表达系统,成功产生了CD3的scFv (CAR特异性;SEQ ID NO:6;图1)。使用阳离子脂质体(图2)和jetPEI(图3)系统产生了BEAT2(MHCII/c-myc;SEQ ID NO:18)和BEAT3(CD40/CD3;SEQ ID NO:20)的全长BEAT。但是,jetPEI系统在细胞匀浆后可以更有效地释放重组BEAT。

[0214] SEB在体外增强T细胞增殖和IFN- γ 分泌

[0215] SEB是一种双特异性多肽,其特异性结合APC上的肽结合槽外的MHCII分子以及T细胞上的TCR,该T细胞在小鼠中带有特有的TCRV β 链,特别是V β 3、7、8和17。SEB与MHCII和TCR同时结合刺激大量的T细胞,包括CD4⁺和CD8⁺,从而导致它们的活化和增殖。MHCII呈递的常规抗原活化0.0001-0.001%的T细胞,而双特异性多肽,例如SEB,刺激所有T细胞中的2-20%(Fraser和Proft,2008,ImmunologyReviews,225:226-43;Arcus等,2000,Journal ofMolecularBiology,299(1):157-68)。因此,SEB被用作观点验证分子,以开发在体内活化和扩增CAR T细胞的策略,但是,本文所述的方法和试剂以更加可控的方式和最小的毒性实现了该目的。

[0216] 当存在SEB时,与SEB孵育后,小鼠和人T细胞扩增到显著更大的程度(图5A),并且分泌更大量的IFN- γ 。当将SEB注射入带有已建立E0771-Her2乳腺癌的荷瘤小鼠中时,脾脏中TCR-V β 8⁺(SEB参与的TCR β 类型之一)的百分比显著高于未治疗组(图5C)。

[0217] 令人惊讶的是,在过继转移CAR T细胞和两剂SEB之后,所有三种鼠模型中的肿瘤生长都受到了显著的抑制,其中30-50%的小鼠肿瘤消失并且得以长期存活(图6)。与仅接受CAR T细胞或仅SEB的小鼠相比,接受CAR T细胞和SEB的组合的小鼠的肿瘤被抑制到显著更大的程度。

[0218] 肿瘤的抑制与CAR T细胞浸润肿瘤部位增加>10倍有关(图7)。据估计,每剂CAR T细胞中,能与SEB连接的正确V β 类型的CAR T细胞的数量约为 2×10^5 (所有转移的CAR T细胞的10%)。与其它已知有效剂量的CAR T细胞相比,在免疫活性模型中,以如此低的有效剂量的CAR T细胞观察到高度肿瘤抑制且无毒性,代表显著并且出乎意料的结果,并且表明如果在非MHC限制性或非V β 限制性的方式下,如果CAR T细胞与APC连接可能具有甚至更好的效果。

[0219] BEAT对CAR T细胞的活化和扩增

[0220] 重要的是,已经确认抗myc抗体与CART细胞的结合不会影响CAR介导的T细胞功能(图8)。此外,还证明了化学偶联双特异性多肽在体外大大增强了CAR T细胞的增殖(图9)。相反地,两种相同摩尔浓度的单一抗体的组合不介导CAR T细胞的增殖。这些数据表明双特异性多肽可以连接APC和CAR T细胞,且该连接导致了CAR T细胞生成的增加。

[0221] BEAT介导CAR T细胞的活化和增殖

[0222] BEAT的三个实例是通过将myc标签(存在于CAR中)特异性抗体与在APC的多种亚群上表达的CD40、PD-L2或Clec9a的特异性抗体化学偶联而得。存在或不存在BEAT的情况下,孵育小鼠CAR T细胞与小鼠脾细胞(作为APC的来源)。将不表达CAR的T细胞用作对照。未偶

联抗体存在的情况下,将CAR T细胞与APC孵育也用作对照。

[0223] 图10所示的结果表明,在各BEAT存在的情况下,CAR T细胞而非对照T细胞分泌IFN- γ (图10A)。

[0224] 存在或不存在各替代BEAT的情况下,CAR T细胞以荧光染料CFSE进行标记并与APC孵育。与对照非转导T细胞相比,转导CAR T细胞的荧光强度降低,说明增殖程度是明显的(图10B)。

[0225] 综上,这些结果表明BEAT可以激活CAR T细胞并诱导其增殖。此外,表明各种APC分子和APC亚群可以用作BEAT靶点。

[0226] CD40-myc BEAT能够根除小鼠的E0771-Her2乳腺癌

[0227] 以CAR T细胞 (2×10^6 , 静脉注射) 和/或myc-CD40特异性的BEAT (第0天36 μ g, 腹腔注射) 处理已建立皮下E0771-Her2肿瘤的Her2转基因荷瘤小鼠。其它小鼠组接受未偶联的抗myc抗体和抗CD40抗体,或未经处理(对照)。

[0228] 图11的结果显示了在施用BEAT结合CAR T细胞后的肿瘤生长和小鼠存活。数据表明,在正常乳腺和大脑中表达Her2的免疫活性小鼠中,CD40-myc BEAT能使CAR T细胞介导已建立的乳腺癌肿瘤的根除的能力。

[0229] CD40-myc BEAT能使T细胞在肿瘤中聚集

[0230] 皮下有E0771-Her2肿瘤的荷瘤小鼠接受抗HER2 CAR T细胞 (2×10^6 , 静脉注射) 和CD40-myc BEAT (第0天36 μ g, 腹腔注射) 处理。其它小鼠仅接受CAR T细胞或BEAT或未经处理(对照)。

[0231] 在开始处理后的第7天,取出肿瘤,分离、染色以检测CD8⁺T细胞,并使用流式细胞仪进行分析。数据代表每组的3只小鼠。将肿瘤用福尔马林固定、切片,并且以DAPI (蓝色) 和抗CD8抗体 (棕色) 染色。图像显示了接受所列处理的小鼠的3个代表性切片。

[0232] 如图12所示的结果表明,BEAT能使CAR T细胞在肿瘤中聚集到比没有BEAT时高得多的能力。

[0233] CART细胞在小鼠中长期存在

[0234] 将通过CAR T细胞+CD40-myc BEAT根除了E0771-Her2肿瘤后的长期(>200天)存活小鼠或幼鼠(naïve mouse)的脾脏取出,以抗myc抗体和CD8染色以检测CAR T细胞。数据代表3只小鼠。

[0235] 图13所示数据表明,BEAT能够使CART细胞在小鼠中长期存在的能力,说明小鼠将受到保护以免受肿瘤的再挑战。

[0236] 经CAR T细胞+BEAT疗法后,对Her2阳性肿瘤产生排斥的小鼠完全耐受HER2阳性肿瘤的再挑战

[0237] 皮下E0771-Her2肿瘤经Her2特异性CAR T细胞和CD40-myc BEAT介导根除后的长期存活小鼠,以相同的Her2阳性肿瘤细胞 (5×10^5) 在其对侧皮下再挑战。肿瘤生长(上图)和小鼠存活(下图)如图14所示。幼鼠的肿瘤生长情况作为对照。(再挑战组8只小鼠,对照组6只小鼠,*** $p < 0.001$,**** $p < 0.0001$)。

[0238] 这些数据支持以下结论:CAR T+BEAT疗法后,持续存在的(移植的)CAR T细胞能够对随后的Her2阳性肿瘤复发做出反应。

[0239] CAR T细胞+BEAT疗法介导的对Her2阳性肿瘤产生排斥的小鼠中,Her2阴性肿瘤的

生长受到抑制

[0240] 经Her2特异性CAR T细胞+CD40-myc BEAT使小鼠预先排斥E0771-Her2肿瘤后,以不表达Her2的E0771在小鼠对侧进行再挑战(5×10^5 个细胞)。幼鼠的肿瘤生长情况作为对照。肿瘤生长(上图)和小鼠存活(下图)如图15所示(再挑战组4只小鼠,对照组5只小鼠。 $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$)。

[0241] 这些数据表明,CAR T细胞+BEAT疗法诱导表位扩散,由此诱导了具有不同于Her2特异性的并且可以参与抗肿瘤作用的其他特异性T细胞。

[0242] 抗Her2 CART细胞与CD40-myc偶联的BEAT结合抑制小鼠MC38-Her2结肠癌的生长

[0243] 以抗Her2 CART细胞(2×10^6 ,静脉注射)和CD40-myc BEAT(第0天36 μ g)处理皮下建立有MC38-Her2肿瘤的荷瘤小鼠。其它组的小鼠接受CART细胞处理、仅抗体(如列表)处理或未处理(对照)。(除BEAT+CAR组有7只小鼠之外,每组6只小鼠。 $**p < 0.01$)。

[0244] 如图16所示的结果显示,使用CART细胞+BEAT可以控制乳腺癌以外的肿瘤类型。

[0245] PD-L2-myc与Clec9a BEAT偶联物能使CART细胞抑制肿瘤生长

[0246] 通过单克隆抗体与抗myc抗体的化学偶联来制备对APC表达的分子PD-L2或Clec9a特异性的BEAT。皮下建立有E0771-Her2肿瘤的荷瘤小鼠接受所列处理,或未经处理(对照)。(每组3-6只小鼠。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$)。

[0247] 如图17所示的结果表明,在各种APC亚群上发现的几种不同分子的特异性BEAT可以增强CART细胞对小鼠肿瘤的应答。

[0248] 重组人CD40-myc BEAT介导人CART细胞的增殖

[0249] 使用逆转录病毒转导Her2特异性CAR从人外周血生成CART细胞。存在或不存在化学偶联或重组CD40-myc BEAT(偶联3 μ g/ml,重组0.5 μ g/ml)的情况下,以CFSE标记CART细胞(2×10^5 /ml)并且孵育5天,存在5Gy辐照CTV标记的人血白细胞,作为APC的来源。空载体转导的T细胞作为对照。使用流式细胞仪分析细胞。

[0250] 如图18所示的结果表明,使用连接抗myc抗体的抗人CD40抗体的BEAT可以介导人CART细胞增殖。其进一步表明重组的BEAT与化学偶联的BEAT在介导CART细胞增殖方面同样有效。

[0251] 重组人CD40-myc BEAT增强来自CART细胞的IFN- γ 分泌

[0252] 使用编码抗Her2 CAR的逆转录病毒载体,从外周血中产生人CART细胞。存在或不存在化学偶联或重组制备的CD40-myc BEAT的情况下,CART细胞与作为APC来源的人血白细胞孵育5天。一些培养孔中加入了抗CD3抗体作为阳性对照组。取上清液并使用ELISA分析IFN- γ 。

[0253] 如图19所示,重组BEAT可以活化人CART细胞以分泌IFN- γ 。

[0254] 人CART细胞与偶联的人BEAT结合抑制小鼠的肿瘤生长

[0255] 皮下建立MDA-MB-231人乳腺癌的Nod-SCID-gamma(NSG)荷瘤小鼠,接受CART细胞,有或没有偶联的人CD40-myc BEAT(第0天36 μ g,腹腔注射)。还通过静脉递送人血来源的白细胞(1×10^6)作为APC的来源。一组未经处理的小鼠作为对照。(每组5只小鼠, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, student t检验)。

[0256] 如图20所示数据表明,BEAT增强人类CART细胞抵抗小鼠中建立的人类癌症的功效的能力。

[0257] 对一系列位于CAR中各种位点的抗原具有特异性的BEAT可以诱导来自CAR T细胞的应答

[0258] 通过产生具有在CAR中的不同位点加入的抗原(即,亲和标签)的CAR,以评估对CAR中一系列抗原具有特异性的BEAT的能力。特别地,制备了癌胚抗原(CEA)特异性CAR,位于该CAR的中心加入了myc抗原,并且制备了Her2-FLAG CAR,在CAR的氨基末端加入了FLAG抗原。

[0259] 存在或不存在对APC表达的分子CD40具有特异性的BEAT的情况下, 5×10^5 个带有CEA-myc CAR或Her2-FLAG CAR的小鼠CAR T细胞与 5×10^5 个CD40阳性小鼠脾细胞(作为APC的来源)共同孵育,对APC表达的分子CD40具有特异性的BEAT是通过单克隆抗体与抗myc抗体化学偶联得到(BEAT1,如本文其它位置所述),或是通过单克隆抗体与抗FLAG抗体化学偶联得到(BEAT5)。未经转导的脾细胞用作对照。在未偶联抗体的存在下,将CAR T细胞与APC孵育也用作对照。共培养72小时后,通过ELISA测定IFN- γ 的分泌。

[0260] 图21所示结果表明,与对照相比,CEA-myc CAR T细胞在BEAT1的存在下分泌IFN- γ 。同样地,与对照相比,Her2-FLAG CAR T细胞在BEAT5的存在下分泌IFN- γ 。

[0261] 这些结果表明,BEAT在提升CAR T细胞疗法的功效方面具有广泛的应用。首先,已经证明BEAT诱导来自CAR T细胞的应答,其中CAR T细胞针对不同的肿瘤相关抗原。

[0262] 其次,已经证明当在不同组织类型发生癌症的情况下使用CAR T细胞时,BEAT诱导来自T细胞的应答。

[0263] 通过调整BEAT的设计以在CAR T疗法中提高各种不同CAR结构的功效是可能的这一事实进一步证明了BEAT广泛的应用性。例如,本文所呈现的结果表明,可将BEAT设计为与CAR上的不同抗原结合,并保留诱导来自CAR T细胞应答的能力。因此,CAR中的各种抗原可以用作BEAT的靶点。

[0264] 重要的是,还证明了抗原在CAR上的位点可以改变而不会显著影响BEAT的功效。更具体地,已证明位于中心的myc标签(即,Her2-myc和CEA-myc CAR)以及位于N末端的FLAG表位(即,Her2-FLAG CAR)两者均为BEAT的可用结合靶点。这些数据进一步表明位于CAR中的各种位点的抗原在诱导CAR T细胞应答中是有效的。

[0265] 总结

[0266] 本文所呈结果表明,可以设计和定制BEAT以用于与各种不同的CAR结构偶联,从而提高CAR T疗法的功效。

[0267] 已经证明,本研究所获得的双特异性多肽(即BEAT)通过APC的连接有效活化和扩增CAR T细胞。此外,已经证明当靶向各种肿瘤抗原和/或在CAR中不同位点的各种不同抗原时,BEAT是有效的。由于对MHC单倍型无限制,所以该方法相对于其它支持T细胞的疗法更为有利。

[0268] BEAT的药代动力学可通过“按需”诱导活化和扩增,从而有利于对CAR T细胞进行更程度的控制,从而在控制对于正常组织的毒性的同时平衡抗肿瘤功效的需求,这是诸如疫苗的其它CAR T细胞支持方法中所无法实现的。

序列表

<110> 彼得麦克卡勒姆癌症研究所

<120> 用于连接表达CAR的免疫细胞与抗原呈递细胞的双特异性多肽及其用途

<130> FSP1V211093XN

<150> 2018904117

<151> 2018-10-30

<150> 2019903255

<151> 2019-09-04

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 747

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗CD40 scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (747)

<400> 1

atg gag gtg cag gtg gtg gag tct gat gga ggc tta gtg cag cct gga 48

Met Glu Val Gln Val Val Glu Ser Asp Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10 15

agg tcc cta aaa ctc ccc tgt gca gcc tca gga ttc act ttc agt gac 96

Arg Ser Leu Lys Leu Pro Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp

20 25 30

tat tac atg gcc tgg gtc cgc cag gct cca acg aag ggg ctg gag tgg 144

Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

gtc gca agc att agt tat gat ggt agt agc act tac tat cga gac tcc 192

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

50 55 60

gtg aag ggc cga ttc act atc tcc aga gat aat gca aaa agc acc cta 240

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu

65 70 75 80

tac ctg caa atg gac agt ctg agg tct gag gac acg gcc act tat tac 288

Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

tgc gga aga cac agt agc tac ttt gat tac tgg ggc caa gga gtc atg 336
 Cys Gly Arg His Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met
 100 105 110
 gtc aca gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc 384
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 ggt ggc gga tcg gac act gta ctg acc cag tct cct gct ttg gct gtg 432
 Gly Gly Gly Ser Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val
 130 135 140
 tct cca gga gag agg gtt acc atc tcc tgt agg gcc agt gac agt gtc 480
 Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Asp Ser Val
 145 150 155 160
 agt aca ctt atg cac tgg tac caa cag aaa cca gga cag caa ccc aaa 528
 Ser Thr Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro Lys
 165 170 175
 ctc ctc atc tat cta gca tca cac cta gaa tct ggg gtc cct gcc agg 576
 Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser His Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg
 180 185 190
 ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc acc att gat cct 624
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro
 195 200 205
 gtg gag gct gat gac act gca acc tat tac tgt cag cag agt tgg aat 672
 Val Glu Ala Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Asn
 210 215 220
 gat ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa ttg aaa aat ggg 720
 Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asn Gly
 225 230 235 240
 gcc gtc gag cac cac cac cac cac 747
 Ala Val Glu His His His His His His
 245

<210> 2

<211> 249

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

Met Glu Val Gln Val Val Glu Ser Asp Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1

5

10

15

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

<210> 3

<211> 621

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗MHCII scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (621)

<400> 3

```

gag gtg cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctt gtg aaa ccc tca cag 48
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1           5           10          15
tca ctc tcc ctc acc tgt tct gtc act gct tac ttc atc act agt aat 96
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Ala Tyr Phe Ile Thr Ser Asn
           20           25           30
tac tgg gcc tgg atc cgg aag ttc cca gga aat aaa atg gag tgg atg 144
Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp Met
           35           40           45
gga cac ata acc tac agt ggt tac act acc tac aat cca tct ctc aaa 192
Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
           50           55           60
agt cga atc tcc att act aga gac aca tcg agg aat cag ttc ttc ctc 240
Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Arg Asn Gln Phe Phe Leu
           65           70           75           80
cag ttg aac tct gta act act gag gac aca gcc act tat tac tgt gca 288
Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
           85           90           95
aga ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg 336
Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
           100          105          110
aac att gta atg acc caa tct ccc aaa tcc atg tcc atg tca gta gga 384
Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
           115          120          125
gag agg gtc acc ttg acc tgc aag gcc agt gag aat gtg gtt act tat 432
Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr
           130          135          140
gtt tcc tgg tat caa cag aaa cca gag cag tct cct aaa ctg ctg ata 480
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
           145          150          155          160
tac ggg gca tcc aac cgg tac act ggg gtc ccc gat cgc ttc aca ggc 528
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
           165          170          175
agt gga tct gca aca gat ttc act ctg acc atc agc agt gtg cag gct 576
Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
           180          185          190
gaa gac ctt gca gat tat cac tgt gga cag ggt tac agc tat ccg 621
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro

```

37

<223> 抗CD3 2C11 scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (777)

<400> 5

```

atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca 48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1           5           10           15
ggt tcc act ggt gac gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg 96
Gly Ser Thr Gly Asp Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
           20           25           30
gtg cag cct gga aag tcc ctg aaa ctc tcc tgt gag gcc tct gga ttc 144
Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe
           35           40           45
acc ttc agc ggc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggg agg 192
Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg
           50           55           60
ggg ctg gag tcg gtc gca tac att act agt agt agt att aat atc aaa 240
Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ile Asn Ile Lys
65           70           75           80
tat gct gac gct gtg aaa ggc cgg ttc acc gtc tcc aga gac aat gcc 288
Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala
           85           90           95
aag aac tta ctg ttt cta caa atg aac att ctc aag tct gag gac aca 336
Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu Lys Ser Glu Asp Thr
           100          105          110
gcc atg tac tac tgt gca aga ttc gac tgg gac aaa aat tac tgg ggc 384
Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr Trp Gly
           115          120          125
caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga 432
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
           130          135          140
ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gac atc cag atg acc cag tct cca 480
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
145          150          155          160
tca tca ctg cct gcc tcc ctg gga gac aga gtc act atc aat tgt cag 528
Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln
           165          170          175
gcc agt cag gac att agc aat tat tta aac tgg tac cag cag aaa cca 576

```

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 180 185 190
 ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc tat tat aca aat aaa ttg gca gat 624
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asn Lys Leu Ala Asp
 195 200 205
 gga gtc cca tca agg ttc agt ggc agt ggt tct ggg aga gat tct tct 672
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Ser Ser
 210 215 220
 ttc act atc agc agc ctg gaa tcc gaa gat att gga tct tat tac tgt 720
 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys
 225 230 235 240
 caa cag tat tat aac tat ccg tgg acg ttc gga cct ggc acc aag ctg 768
 Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu
 245 250 255
 gaa atc aaa 777
 Glu Ile Lys
 <210> 6
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 6
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp 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 Glu Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg
 50 55 60
 Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ile Asn Ile Lys
 65 70 75 80
 Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala
 85 90 95
 Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu Lys Ser Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
 145 150 155 160
 Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln
 165 170 175
 Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 180 185 190
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asn Lys Leu Ala Asp
 195 200 205
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Ser Ser
 210 215 220
 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys
 225 230 235 240
 Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu
 245 250 255

Glu Ile Lys

<210> 7

<211> 762

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗c-myc scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (762)

<400> 7

atg gag gtg cac ctg gtg gag tct ggg gga gac tta gtg aag cct gga 48
 Met Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt cac 96
 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His
 20 25 30
 tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg gag tgg 144
 Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp
 35 40 45
 gtc gca acc att ggt agt cgt ggt act tac acc cac tat cca gac agt 192
 Val Ala Thr Ile Gly Ser Arg Gly Thr Tyr Thr His Tyr Pro Asp Ser
 50 55 60

```

gtg aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gac aag aac gcc ctg 240
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Ala Leu
65          70          75          80
tac ctg caa atg aac agt ctg aag tct gaa gac aca gcc atg tat tac 288
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
85          90          95
tgt gca aga aga agt gaa ttt tat tac tac ggt aat acc tac tat tac 336
Cys Ala Arg Arg Ser Glu Phe Tyr Tyr Tyr Gly Asn Thr Tyr Tyr Tyr
100         105         110
tct gct atg gac tac tgg ggt caa gga gcc tca gtc acc gtc tcc tca 384
Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115         120         125
ggg gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tgc gac 432
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
130         135         140
att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gta tct cta gga cag 480
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
145         150         155         160
agg gcc acc atc tcc tgc aga gcc agc gaa agt gtt gat aat tat ggc 528
Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly
165         170         175
ttt agt ttt atg aac tgg ttc caa cag aaa cca gga cag cca ccc aaa 576
Phe Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
180         185         190
ctc ctc atc tat gct ata tcc aac cga gga tcc ggg gtc cct gcc agg 624
Leu Leu Ile Tyr Ala Ile Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg
195         200         205
ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc agc ctc aac atc cat cct 672
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro
210         215         220
gta gag gag gat gat cct gca atg tat ttc tgt cag caa act aag gag 720
Val Glu Glu Asp Asp Pro Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys Glu
225         230         235         240
gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa 762
Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245         250

```

<210> 8

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 连接体1

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (15)

<400> 9

ggt gga ggc ggt tca 15

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 11

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 连接体2

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (45)

<400> 11

ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg 45

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

1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 12

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 13
<211> 90
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接体3
<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (90)
<400> 13
ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg ggt 48
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg 90
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30
<210> 14
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 14
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30
<210> 15
<211> 1524
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> BEAT 1 CD40/c-myc标签
<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1524)
<400> 15

```

atg gag gtg cac ctg gtg gag tct ggg gga gac tta gtg aag cct gga 48
Met Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly
1           5           10           15
ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt cac 96
Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His
           20           25           30
tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg gag tgg 144
Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp
           35           40           45
gtc gca acc att ggt agt cgt ggt act tac acc cac tat cca gac agt 192
Val Ala Thr Ile Gly Ser Arg Gly Thr Tyr Thr His Tyr Pro Asp Ser
           50           55           60
gtg aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gac aag aac gcc ctg 240
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Ala Leu
65           70           75           80
tac ctg caa atg aac agt ctg aag tct gaa gac aca gcc atg tat tac 288
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
           85           90           95
tgt gca aga aga agt gaa ttt tat tac tac ggt aat acc tac tat tac 336
Cys Ala Arg Arg Ser Glu Phe Tyr Tyr Tyr Gly Asn Thr Tyr Tyr Tyr
           100          105          110
tct gct atg gac tac tgg ggt caa gga gcc tca gtc acc gtc tcc tca 384
Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
           115          120          125
ggg gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gac 432
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
           130          135          140
att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gta tct cta gga cag 480
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
145          150          155          160
agg gcc acc atc tcc tgc aga gcc agc gaa agt gtt gat aat tat ggc 528
Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly
           165          170          175
ttt agt ttt atg aac tgg ttc caa cag aaa cca gga cag cca ccc aaa 576
Phe Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
           180          185          190
ctc ctc atc tat gct ata tcc aac cga gga tcc ggg gtc cct gcc agg 624
Leu Leu Ile Tyr Ala Ile Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg
           195          200          205

```

```

ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc agc ctc aac atc cat cct 672
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro
210 215 220
gta gag gag gat gat cct gca atg tat ttc tgt cag caa act aag gag 720
Val Glu Glu Asp Asp Pro Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys Glu
225 230 235 240
gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa ggt gga 768
Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly
245 250 255
ggc ggt tca atg gag gtg cag gtg gtg gag tct gat gga ggc tta gtg 816
Gly Gly Ser Met Glu Val Gln Val Val Glu Ser Asp Gly Gly Leu Val
260 265 270
cag cct gga agg tcc cta aaa ctc ccc tgt gca gcc tca gga ttc act 864
Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Pro Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
275 280 285
ttc agt gac tat tac atg gcc tgg gtc cgc cag gct cca acg aag ggg 912
Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly
290 295 300
ctg gag tgg gtc gca agc att agt tat gat ggt agt agc act tac tat 960
Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr
305 310 315 320
cga gac tcc gtg aag ggc cga ttc act atc tcc aga gat aat gca aaa 1008
Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
325 330 335
agc acc cta tac ctg caa atg gac agt ctg agg tct gag gac acg gcc 1056
Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
340 345 350
act tat tac tgc gga aga cac agt agc tac ttt gat tac tgg ggc caa 1104
Thr Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
355 360 365
gga gtc atg gtc aca gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt 1152
Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
370 375 380
ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gac act gta ctg acc cag tct cct gct 1200
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
385 390 395 400
ttg gct gtg tct cca gga gag agg gtt acc atc tcc tgt agg gcc agt 1248
Leu Ala Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
405 410 415

```

gac agt gtc agt aca ctt atg cac tgg tac caa cag aaa cca gga cag 1296
 Asp Ser Val Ser Thr Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 420 425 430
 caa ccc aaa ctc ctc atc tat cta gca tca cac cta gaa tct ggg gtc 1344
 Gln Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser His Leu Glu Ser Gly Val
 435 440 445
 cct gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc acc 1392
 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 450 455 460
 att gat cct gtg gag gct gat gac act gca acc tat tac tgt cag cag 1440
 Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 465 470 475 480
 agt tgg aat gat ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa ttg 1488
 Ser Trp Asn Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 485 490 495
 aaa aat ggg gcc gtc gag cac cac cac cac cac cac 1524
 Lys Asn Gly Ala Val Glu His His His His His His
 500 505

<210> 16

<211> 508

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 16

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

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

420	425	430
Gln Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser His Leu Glu Ser Gly Val		
435	440	445
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
450	455	460
Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln		
465	470	475
Ser Trp Asn Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu		
485	490	495
Lys Asn Gly Ala Val Glu His His His His His His		
500	505	

<210> 17

<211> 1401

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> BEAT 2 MHCII-c-myc标签

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1398)

<400> 17

```

atg gag gtg cac ctg gtg gag tct ggg gga gac tta gtg aag cct gga 48
Met Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly
1           5           10          15
ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt cac 96
Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His
          20          25          30
tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg gag tgg 144
Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp
          35          40          45
gtc gca acc att ggt agt cgt ggt act tac acc cac tat cca gac agt 192
Val Ala Thr Ile Gly Ser Arg Gly Thr Tyr Thr His Tyr Pro Asp Ser
          50          55          60
gtg aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gac aag aac gcc ctg 240
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Ala Leu
65          70          75          80
tac ctg caa atg aac agt ctg aag tct gaa gac aca gcc atg tat tac 288
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
          85          90          95

```

```

tgt gca aga aga agt gaa ttt tat tac tac ggt aat acc tac tat tac 336
Cys Ala Arg Arg Ser Glu Phe Tyr Tyr Tyr Gly Asn Thr Tyr Tyr Tyr
      100                      105                      110

tct gct atg gac tac tgg ggt caa gga gcc tca gtc acc gtc tcc tca 384
Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
      115                      120                      125

ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gac 432
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
      130                      135                      140

att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gta tct cta gga cag 480
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
      145                      150                      155                      160

agg gcc acc atc tcc tgc aga gcc agc gaa agt gtt gat aat tat ggc 528
Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly
      165                      170                      175

ttt agt ttt atg aac tgg ttc caa cag aaa cca gga cag cca ccc aaa 576
Phe Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
      180                      185                      190

ctc ctc atc tat gct ata tcc aac cga gga tcc ggg gtc cct gcc agg 624
Leu Leu Ile Tyr Ala Ile Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg
      195                      200                      205

ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc agc ctc aac atc cat cct 672
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro
      210                      215                      220

gta gag gag gat gat cct gca atg tat ttc tgt cag caa act aag gag 720
Val Glu Glu Asp Asp Pro Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys Glu
      225                      230                      235                      240

gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa ggt gga 768
Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly
      245                      250                      255

ggc ggt tca gag gtg cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctt gtg aaa 816
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
      260                      265                      270

ccc tca cag tca ctc tcc ctc acc tgt tct gtc act gct tac ttc atc 864
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Ala Tyr Phe Ile
      275                      280                      285

act agt aat tac tgg gcc tgg atc cgg aag ttc cca gga aat aaa atg 912
Thr Ser Asn Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met
      290                      295                      300

```

gag tgg atg gga cac ata acc tac agt ggt tac act acc tac aat cca 960
 Glu Trp Met Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro
 305 310 315 320
 tct ctc aaa agt cga atc tcc att act aga gac aca tcg agg aat cag 1008
 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Arg Asn Gln
 325 330 335
 ttc ttc ctc cag ttg aac tct gta act act gag gac aca gcc act tat 1056
 Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 340 345 350
 tac tgt gca aga ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt 1104
 Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 355 360 365
 ggc gga tcg aac att gta atg acc caa tct ccc aaa tcc atg tcc atg 1152
 Gly Gly Ser Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met
 370 375 380
 tca gta gga gag agg gtc acc ttg acc tgc aag gcc agt gag aat gtg 1200
 Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val
 385 390 395 400
 gtt act tat gtt tcc tgg tat caa cag aaa cca gag cag tct cct aaa 1248
 Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys
 405 410 415
 ctg ctg ata tac ggg gca tcc aac cgg tac act ggg gtc ccc gat cgc 1296
 Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg
 420 425 430
 ttc aca ggc agt gga tct gca aca gat ttc act ctg acc atc agc agt 1344
 Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 435 440 445
 gtg cag gct gaa gac ctt gca gat tat cac tgt gga cag ggt tac agc 1392
 Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser
 450 455 460
 tat ccg taa 1401
 Tyr Pro
 465
 <210> 18
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成构建体

<400> 18

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

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

Tyr Pro

465

<210> 19

<211> 1542

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> BEAT 3 CD40-抗-CD3抗体

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1539)

<400> 19

atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca 48

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

ggg tcc act ggt gac gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg 96

Gly Ser Thr Gly Asp Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu

20 25 30

gtg cag cct gga aag tcc ctg aaa ctc tcc tgt gag gcc tct gga ttc 144

```

Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe
      35                      40                      45
acc ttc agc ggc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggg agg 192
Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg
      50                      55                      60
ggg ctg gag tcg gtc gca tac att act agt agt agt att aat atc aaa 240
Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ile Asn Ile Lys
      65                      70                      75                      80
tat gct gac gct gtg aaa ggc cgg ttc acc gtc tcc aga gac aat gcc 288
Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala
      85                      90                      95
aag aac tta ctg ttt cta caa atg aac att ctc aag tct gag gac aca 336
Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu Lys Ser Glu Asp Thr
      100                     105                     110
gcc atg tac tac tgt gca aga ttc gac tgg gac aaa aat tac tgg ggc 384
Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr Trp Gly
      115                     120                     125
caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga 432
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
      130                     135                     140
ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gac atc cag atg acc cag tct cca 480
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
      145                     150                     155                     160
tca tca ctg cct gcc tcc ctg gga gac aga gtc act atc aat tgt cag 528
Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln
      165                     170                     175
gcc agt cag gac att agc aat tat tta aac tgg tac cag cag aaa cca 576
Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
      180                     185                     190
ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc tat tat aca aat aaa ttg gca gat 624
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asn Lys Leu Ala Asp
      195                     200                     205
gga gtc cca tca agg ttc agt ggc agt ggt tct ggg aga gat tct tct 672
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Ser Ser
      210                     215                     220
ttc act atc agc agc ctg gaa tcc gaa gat att gga tct tat tac tgt 720
Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys
      225                     230                     235                     240
caa cag tat tat aac tat ccg tgg acg ttc gga cct ggc acc aag ctg 768

```

Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu	
245	250 255
gaa atc aaa ggt gga ggc ggt tca atg gag gtg cag gtg gtg gag tct	816
Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Met Glu Val Gln Val Val Glu Ser	
260	265 270
gat gga ggc tta gtg cag cct gga agg tcc cta aaa ctc ccc tgt gca	864
Asp Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Pro Cys Ala	
275	280 285
gcc tca gga ttc act ttc agt gac tat tac atg gcc tgg gtc cgc cag	912
Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln	
290	295 300
gct cca acg aag ggg ctg gag tgg gtc gca agc att agt tat gat ggt	960
Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly	
305	310 315 320
agt agc act tac tat cga gac tcc gtg aag ggc cga ttc act atc tcc	1008
Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser	
325	330 335
aga gat aat gca aaa agc acc cta tac ctg caa atg gac agt ctg agg	1056
Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg	
340	345 350
tct gag gac acg gcc act tat tac tgc gga aga cac agt agc tac ttt	1104
Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Ser Tyr Phe	
355	360 365
gat tac tgg ggc caa gga gtc atg gtc aca gtc tcc tca ggt gga ggc	1152
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly	
370	375 380
ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gac act gta ctg	1200
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Thr Val Leu	
385	390 395 400
acc cag tct cct gct ttg gct gtg tct cca gga gag agg gtt acc atc	1248
Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Ile	
405	410 415
tcc tgt agg gcc agt gac agt gtc agt aca ctt atg cac tgg tac caa	1296
Ser Cys Arg Ala Ser Asp Ser Val Ser Thr Leu Met His Trp Tyr Gln	
420	425 430
cag aaa cca gga cag caa ccc aaa ctc ctc atc tat cta gca tca cac	1344
Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser His	
435	440 445
cta gaa tct ggg gtc cct gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca	1392

Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 450 455 460
 gac ttc acc ctc acc att gat cct gtg gag gct gat gac act gca acc 1440
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Thr Ala Thr
 465 470 475 480
 tat tac tgt cag cag agt tgg aat gat ccg tgg acg ttc ggt gga ggc 1488
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Asn Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
 485 490 495
 acc aag ctg gaa ttg aaa aat ggg gcc gtc gag cac cac cac cac cac 1536
 Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asn Gly Ala Val Glu His His His His His
 500 505 510
 cac tga 1542
 His
 <210> 20
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 20
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp 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 Glu Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg
 50 55 60
 Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ile Asn Ile Lys
 65 70 75 80
 Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala
 85 90 95
 Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu Lys Ser Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro

145	150	155	160
Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln			
	165	170	175
Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro			
	180	185	190
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asn Lys Leu Ala Asp			
	195	200	205
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Ser Ser			
	210	215	220
Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys			
225	230	235	240
Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu			
	245	250	255
Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Met Glu Val Gln Val Val Glu Ser			
	260	265	270
Asp Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Pro Cys Ala			
	275	280	285
Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln			
	290	295	300
Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly			
305	310	315	320
Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser			
	325	330	335
Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg			
	340	345	350
Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Ser Tyr Phe			
	355	360	365
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly			
	370	375	380
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Thr Val Leu			
385	390	395	400
Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Ile			
	405	410	415
Ser Cys Arg Ala Ser Asp Ser Val Ser Thr Leu Met His Trp Tyr Gln			
	420	425	430
Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser His			
	435	440	445
Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr			
	450	455	460

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Thr Ala Thr
 465 470 475 480
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Asn Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
 485 490 495
 Thr Lys Leu Glu Leu Lys Asn Gly Ala Val Glu His His His His His
 500 505 510

His

<210> 21

<211> 1413

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> BEAT 4 MHCII-抗-CD3抗体

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1413)

<400> 21

atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca 48
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 ggt tcc act ggt gac gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg 96
 Gly Ser Thr Gly Asp Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 gtg cag cct gga aag tcc ctg aaa ctc tcc tgt gag gcc tct gga ttc 144
 Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 acc ttc agc ggc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggg agg 192
 Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg
 50 55 60
 ggg ctg gag tcg gtc gca tac att act agt agt agt att aat atc aaa 240
 Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ile Asn Ile Lys
 65 70 75 80
 tat gct gac gct gtg aaa ggc cgg ttc acc gtc tcc aga gac aat gcc 288
 Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala
 85 90 95
 aag aac tta ctg ttt cta caa atg aac att ctc aag tct gag gac aca 336
 Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Met Asn Ile Leu Lys Ser Glu Asp Thr
 100 105 110
 gcc atg tac tac tgt gca aga ttc gac tgg gac aaa aat tac tgg ggc 384

Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr Trp Gly	
115	120 125
caa gga acc atg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga	432
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
130	135 140
ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gac atc cag atg acc cag tct cca	480
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro	
145	150 155 160
tca tca ctg cct gcc tcc ctg gga gac aga gtc act atc aat tgt cag	528
Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln	
165	170 175
gcc agt cag gac att agc aat tat tta aac tgg tac cag cag aaa cca	576
Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
180	185 190
ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc tat tat aca aat aaa ttg gca gat	624
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asn Lys Leu Ala Asp	
195	200 205
gga gtc cca tca agg ttc agt ggc agt ggt tct ggg aga gat tct tct	672
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Ser Ser	
210	215 220
ttc act atc agc agc ctg gaa tcc gaa gat att gga tct tat tac tgt	720
Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys	
225	230 235 240
caa cag tat tat aac tat ccg tgg acg ttc gga cct ggc acc aag ctg	768
Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu	
245	250 255
gaa atc aaa ggt gga ggc ggt tca gag gtg cag ctt cag gag tca gga	816
Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly	
260	265 270
cct ggc ctt gtg aaa ccc tca cag tca ctc tcc ctc acc tgt tct gtc	864
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val	
275	280 285
act gct tac ttc atc act agt aat tac tgg gcc tgg atc cgg aag ttc	912
Thr Ala Tyr Phe Ile Thr Ser Asn Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Lys Phe	
290	295 300
cca gga aat aaa atg gag tgg atg gga cac ata acc tac agt ggt tac	960
Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp Met Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Tyr	
305	310 315 320
act acc tac aat cca tct ctc aaa agt cga atc tcc att act aga gac	1008

Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp
 325 330 335
 aca tcg agg aat cag ttc ttc ctc cag ttg aac tct gta act act gag 1056
 Thr Ser Arg Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu
 340 345 350
 gac aca gcc act tat tac tgt gca aga ggt gga ggc ggt tca ggc gga 1104
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 355 360 365
 ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg aac att gta atg acc caa tct ccc 1152
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro
 370 375 380
 aaa tcc atg tcc atg tca gta gga gag agg gtc acc ttg acc tgc aag 1200
 Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys
 385 390 395 400
 gcc agt gag aat gtg gtt act tat gtt tcc tgg tat caa cag aaa cca 1248
 Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 405 410 415
 gag cag tct cct aaa ctg ctg ata tac ggg gca tcc aac cgg tac act 1296
 Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 420 425 430
 ggg gtc ccc gat cgc ttc aca ggc agt gga tct gca aca gat ttc act 1344
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr
 435 440 445
 ctg acc atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctt gca gat tat cac tgt 1392
 Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys
 450 455 460
 gga cag ggt tac agc tat ccg 1413
 Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro
 465 470
 <210> 22
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 22
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp 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 Glu Ala	Ser Gly Phe
35	40	45
Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met	His Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Arg
50	55	60
Gly Leu Glu Ser Val Ala Tyr	Ile Thr Ser Ser Ser Ile	Asn Ile Lys
65	70	75
Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly	Arg Phe Thr Val Ser Arg	Asp Asn Ala
85	90	95
Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln	Met Asn Ile Leu Lys Ser	Glu Asp Thr
100	105	110
Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg	Phe Asp Trp Asp Lys Asn	Tyr Trp Gly
115	120	125
Gln Gly Thr Met Val Thr Val	Ser Ser Gly Gly Gly Gly	Ser Gly Gly
130	135	140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	Ser Asp Ile Gln Met Thr	Gln Ser Pro
145	150	155
Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu	Gly Asp Arg Val Thr Ile	Asn Cys Gln
165	170	175
Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn	Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln	Gln Lys Pro
180	185	190
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu	Ile Tyr Tyr Thr Asn Lys	Leu Ala Asp
195	200	205
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser	Gly Ser Gly Ser Gly Arg	Asp Ser Ser
210	215	220
Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu	Ser Glu Asp Ile Gly Ser	Tyr Tyr Cys
225	230	235
Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro	Trp Thr Phe Gly Pro Gly	Thr Lys Leu
245	250	255
Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly	Ser Glu Val Gln Leu Gln	Glu Ser Gly
260	265	270
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser	Gln Ser Leu Ser Leu Thr	Cys Ser Val
275	280	285
Thr Ala Tyr Phe Ile Thr Ser	Asn Tyr Trp Ala Trp Ile	Arg Lys Phe
290	295	300
Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp	Met Gly His Ile Thr Tyr	Ser Gly Tyr
305	310	315
Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu	Lys Ser Arg Ile Ser Ile	Thr Arg Asp
325	330	335

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

<210> 23

<211> 5497

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> BEAT 1载体

<400> 23

gaattaattc ataccagatc accgaaaact gtcttccaaa tgtgtccccc tcacactccc 60
 aaattcgcgg gcttctgctc ttagaccact ctacctatt cccacactc accggagcca 120
 aagccgcggc ccttccgttt ctttgccttt gaaagacccc acccgtaggt ggcaagctag 180
 cttaagtaac gccactttgc aaggcatgga aaaatacata actgagaata ggaaagtcca 240
 gatcaaggtc aggaacaaaag aaacagctga ataccaaaca ggatatctgt ggtaagcggc 300
 tcctgccccg gctcagggcc aagaacagat gagacagctg agtgatgggc caaacaggat 360
 atctgtggta agcagttcct gccccggctc ggggccaaga acagatggtc cccagatgcg 420
 gtccagccct cagcagtttc tagtgaatca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct 480
 gaaaatgacc ctgtacctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc 540
 gcgcttccgc tctccgagct caataaaaga gcccaaac cctcactcgg cgcgccagtc 600
 ttccgataga ctgcgtcgcc cgggtaccgc tattcccaat aaagcctctt gctgtttgca 660
 tccgaatcgt ggtctcgctg ttccttggga gggctctctc tgagtgattg actaccacg 720
 acgggggtct ttcatattggg ggctcgctcc ggatttggag acccctgccc agggaccacc 780
 gaccaccac cgggaggtaa gctggccagc aacctatctg tgtctgtccg attgtctagt 840

gtctatgttt gatgttatgc gcctgcgtct gtactagtta gctaactagc tctgtatctg 900
 gcggacccgt ggtggaactg acgagttctg aacacccggc cgcaaccag ggagacgtcc 960
 cagggacttt gggggccgtt tttgtggccc gacctgagga agggagtcga tgtggaatcc 1020
 gaccccgta gatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt tccgcctcc 1080
 gtctgaattt ttgctttcgg tttggaaccg aagccgcgcg tcttgtctgc tgcagcatcg 1140
 ttctgtgttg tctctgtctg actgtgtttc tgtatttgc tgaaaattag ggccagactg 1200
 ttaccactcc ctttaagttt accttaggtc actggaaaga tgtcgagcgg atcgctcaca 1260
 accagtcggt agatgtcaag aagagacgtt gggttacctt ctgctctgca gaatggccaa 1320
 cctttaacgt cggatggccg cgagacggca cctttaaccg agacctcatc acccaggtta 1380
 agatcaaggt cttttcacct ggcccgcatg gacaccaga ccaggtcccc tacatcgtga 1440
 cctgggaagc cttggctttt gacccccctc cctgggtcaa gccctttgta caccctaagc 1500
 ctccgcctcc tcttcctcca tccgccccgt ctctccccct tgaacctcct cgttcgacct 1560
 cgctcgatc ctccctttat ccagcctca ctcttctct aggcgcggga attccggccg 1620
 tgacaagagt tactaacagc ccctctctcc aagctcactt acaggtctc tacttagtcc 1680
 agcacgaagt ctggagacct ctggcggcag cctaccaaga acaactggac cgaccggtgg 1740
 tacctacccc ttaccgagtc ggcgacacag tgtgggtccg ccgacaccag actaagaacc 1800
 tagaacctcg ctggaaagga ccttacacag tcctgcagac cacccccacc gccctcaaag 1860
 tagacggcat cgcagcttgg atacacgccg cccacgtgaa ggctgccgac cccgggggtg 1920
 gaccatctct agactgacgc ggccgccac cgaggtgcac ctggtggagt ctgggggaga 1980
 cttagtgaag cctggagggt ccctgaaact ctctgtgca gcctctggat tcactttcag 2040
 tcactatggc atgtcttggg ttgccagac tccagacaag aggtctggagt gggctgcaac 2100
 cattggtagt cgtggtactt acaccacta tccagacagt gtgaaggac gattcaccat 2160
 ctccagagac aatgacaaga acgccctgta cctgcaaag aacagtctga agtctgaaga 2220
 cacagccatg tattactgtg caagaagaag tgaattttat tactacggtg atacctacta 2280
 ttactctgct atggactact ggggtcaagg agcctcagtc accgtctcct caggtggagg 2340
 cggttcaggc ggaggtggct ctggcgggtg cggtatcgac attgtgctga cccaatctcc 2400
 agcttctttg gctgtatctc taggacagag ggccaccatc tcctgcagag ccagcgaaag 2460
 tgttgataat tatggcttta gttttatgaa ctggttccaa cagaaaccag gacagccacc 2520
 caaactcctc atctatgcta tatccaaccg aggatccggg gtccctgcca ggttttagtg 2580
 cagtggtctt gggacagact tcagcctcaa catccatct gtagaggagg atgatcctgc 2640
 aatgtatttc tgtcagcaaa ctaaggaggt tccgtggacg ttcggtggag gcaccaagct 2700
 ggaaatcaaa ggtggaggcg gttcaatgga ggtgcagggt gtggagtctg atggaggctt 2760
 agtgcagcct ggaaggctcc taaaactccc ctgtgcagcc tcaggattca ctttcagtga 2820
 ctattacatg gcctgggtcc gccaggtccc aacgaagggg ctggagtggg tcgcaagcat 2880
 tagttatgat ggtagtagca ctactatcg agactccgtg aaggccgat tcaactatctc 2940
 cagagataat gcaaaaagca ccctatacct gcaaatggac agtctgaggt ctgaggacac 3000
 ggccacttat tactgcggaa gacacagtag ctactttgat tactggggcc aaggagtcac 3060
 ggtcacagtc tcctcagggt gaggcggttc aggcggaggt ggctctggcg gtggcggatc 3120
 ggacactgta ctgaccagct ctctgtcttt ggctgtgtct ccaggagaga gggttacat 3180

ctcctgtagg gccagtgaca gtgtcagtac acttatgcac tggtaccaac agaaaccagg 3240
acagcaaccc aaactcctca tctatctagc atcacaccta gaatctgggg tccctgccag 3300
gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt caccctcacc attgatcctg tggaggctga 3360
tgacactgca acctattact gtcagcagag ttggaatgat ccgtggacgt tcggtggagg 3420
caccaagctg gaattgaaaa atggggccgt cgagcaccac caccaccacc actgagtcga 3480
ggatcaattc cgcccccttc cctccccccc ccctaacgtt actggccgaa gccgcttgga 3540
ataaggccgg tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt cttttggcaa 3600
tgtgagggcc cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc 3660
tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc 3720
ttcttgaaga caaacaacgt ctgtagcgac cttttgcagg cagcggaacc cccacctgg 3780
cgacaggtgc ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca 3840
accccagtc cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag 3900
cgtattcaac aaggggctga aggatgcccc gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct 3960
ggggcctcgg tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaacg tctaggcccc 4020
ccgaaccacg gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat aataccatga ttgaacaaga 4080
tggtattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 4140
acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttcggc ctgtcagcgc aggggcgccc 4200
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 4260
gcggctatcg tggctggcca cgacgggctg tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac 4320
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc 4380
tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatc 4440
gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcgagcacg 4500
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 4560
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt 4620
cgtgacctat ggcatgcct gcttgccgaa tatcatgggt gaaaatggcc gcttttctgg 4680
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgtttgctac 4740
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg 4800
tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg 4860
agcgggactc tggggatccg ataaaataaa agattttatt tagtctccag aaaaaggggg 4920
gaatgaaaga cccacactgt aggtttggca agctagctta agtaacgcca ttttgcaagg 4980
catggaaaaa tacataactg agaatagaga agttcagatc aaggtcagga acagatggaa 5040
cagctgaata tgggcaaac aggatatctg tggtaaagcag ttcttgcccc ggctcagggc 5100
caagaacaga tggaacagct gaatatgggc caaacaggat atctgtggta agcagttcct 5160
gccccggctc agggccaaga acagatggtc ccagatgcg gtccagccct cagcagtttc 5220
tagagaacca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct gaaatgacct tgtgccttat 5280
ttgaactaac caatcagttc gtttctcgtc tctgttcgag cgcttctgct ccccgagctc 5340
aataaaagag cccacaaccc ctcaactcgg gcgccagtc tccgattgac tgagtcgccc 5400
gggtaccgt gtatccaata aaccctcttg cagttgcac cgacttggtg tctcgctgtt 5460
ccttgggagg gtctcctctg agtgattgac taccctg 5497

<210> 24

<211> 5368

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> BEAT 2载体

<400> 24

```

gaattaattc ataccagatc accgaaaact gtcttccaaa tgtgtccccc tcacactccc 60
aaattcgcgg gcttctgctc ttagaccact ctacctattt cccacactc accggagcca 120
aagccgcggc ccttccgttt ctttgccttt gaaagacccc acccgtaggt ggcaagctag 180
cttaagtaac gccactttgc aaggcatgga aaaatacata actgagaata ggaaagttca 240
gatcaaggtc aggaacaaaag aaacagctga ataccaaaca ggatatctgt ggtaagcggc 300
tcctgccccg gctcagggcc aagaacagat gagacagctg agtgatgggc caaacaggat 360
atctgtggta agcagttcct gccccggctc ggggccaaga acagatggtc cccagatgcg 420
gtccagccct cagcagtttc tagtgaatca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct 480
gaaaatgacc ctgtacctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc 540
gcgcttccgc tctccgagct caataaaaga gccacaacc cctcactcgg cgcgccagtc 600
ttccgataga ctgcgtcgcc cgggtacccg tattcccaat aaagcctctt gctgtttgca 660
tccgaatcgt ggtctcgctg ttccttggga gggctctctc tgagtgttg actaccacg 720
acgggggtct ttcatttggg ggctcgtccg ggatttggag acccctgccc agggaccacc 780
gacccaccac cgggaggtaa gctggccagc aacctatctg tgtctgtccg attgtctagt 840
gtctatgttt gatgttatgc gcctgcgtct gtactagtta gctaactagc tctgtatctg 900
gcggacccgt ggtggaactg acgagttctg aacacccggc cgcaaccag ggagacgtcc 960
cagggacttt gggggccgtt tttgtggccc gacctgagga agggagtcga tgtggaatcc 1020
gaccccgta ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt tccgcctcc 1080
gtctgaattt ttgctttcgg tttggaaccg aagccgcgcg tcttgtctgc tgcagcatcg 1140
ttctgtgttg tctctgtctg actgtgttct tgtatttgtc tgaatttag ggccagactg 1200
ttaccactcc cttaagtttg accttaggtc actggaaaga tgtcgagcgg atcgctcaca 1260
accagtcggg agatgtcaag aagagacgtt gggttacett ctgctctgca gaatggccaa 1320
cctttaacgt cgcatggccc cgagacggca cctttaaccg agacctcatc acccaggtta 1380
agatcaaggc cttttcacct ggcccgcgtg gacaccaga ccaggtcccc tacatcgtga 1440
cctgggaagc cttggctttt gacccccctc cctgggtcaa gccctttgta caccctaagc 1500
ctccgcctcc tcttcctcca tccgccccgt ctctccccct tgaacctcct cgttcgacct 1560
cgctcgatc ctccctttat ccagccctca ctctctctct aggcgccgga attccggccg 1620
tgacaagagt tactaacagc ccctctctcc aagctcactt acaggtctct tacttagtcc 1680
agcacgaagt ctggagacct ctggcggcag cctaccaaga acaactggac cgaccggtgg 1740
tacctacccc ttaccgagtc ggcgacacag tgtgggtccg ccgacaccag actaagaacc 1800
tagaacctcg ctggaaagga ccttacacag tcctgcagac cccccacc gccctcaaag 1860
tagacggcat cgcagcttgg atacacgccg cccacgtgaa ggctgccgac cccgggggtg 1920

```

gaccatctct agactgacgc ggccgcccac cgaggtgcac ctggtggagt ctgggggaga 1980
 cttagtgaag cctggagggt ccctgaaact ctctgtgca gcctctggat tcactttcag 2040
 tcactatggc atgtcttggg ttcgccagac tccagacaag aggctggagt gggtcgcaac 2100
 cattggtagt cgtggtactt acacccacta tccagacagt gtgaaggac gattcaccat 2160
 ctccagagac aatgacaaga acgccctgta cctgcaaata aacagtctga agtctgaaga 2220
 cacagccatg tattactgtg caagaagaag tgaattttat tactacggtg atacctacta 2280
 ttactctgct atggactact ggggtcaagg agcctcagtc accgtctcct caggtggagg 2340
 cggttcaggc ggaggtggct ctggcgggtg cggatcggac attgtgctga cccaatctcc 2400
 agcttctttg gctgtatctc taggacagag ggccaccatc tcctgcagag ccagcgaaag 2460
 tgttgataat tatggcttta gttttatgaa ctggttccaa cagaaaccag gacagccacc 2520
 caaactcctc atctatgcta tatccaaccg aggatccggg gtccctgcca ggttttagtgg 2580
 cagtgggtct gggacagact tcagcctcaa catccatcct gtagaggagg atgatcctgc 2640
 aatgtatttc tgtcagcaaa ctaaggaggt tccgtggacg ttcggtggag gcaccaagct 2700
 ggaaatcaaa ggtggaggcg gttcagaggt gcagcttcag gagtccaggc ctggccttgt 2760
 gaaaccctca cagtcactct ccctcacctg ttctgtcact gcttacttca tcactagtaa 2820
 ttactgggcc tggatccgga agttcccagg aaataaaatg gagtggatgg gacacataac 2880
 ctacagtggg tacactacct acaatccatc tctcaaaagt cgaatctcca ttactagaga 2940
 cacatcgagg aatcagttct tcctccagtt gaactctgta actactgagg acacagccac 3000
 ttattactgt gcaagagggt gaggcggttc aggcggaggt ggctctggcg gtggcggatc 3060
 gaacattgta atgaccaat ctcccaaata catgtccatg tcagtaggag agagggtcac 3120
 cttgacctgc aaggccagtg agaattgtgt tacttatgtt tcctggtatc aacagaaacc 3180
 agagcagtct cctaaactgc tgatatacgg ggcatccaac cggtagactg ggggtccccga 3240
 tcgcttcaca ggcagtggat ctgcaacaga ttctactctg accatcagca gtgtgcaggc 3300
 tgaagacctt gcagattatc actgtggaca gggttacagc tatccggtcg aggatcaatt 3360
 ccgccccctc ccctcccccc cccctaactg tactggccga agccgcttg aataaggccg 3420
 gtgtgcgttt gtctatatgt tattttccac catattgccg tcttttggca atgtgagggc 3480
 ccggaaacct ggccctgtct tcttgacgag cattcctagg ggtctttccc ctctcgccaa 3540
 aggaatgcaa ggtctgttga atgtcgtgaa ggaagcagtt cctctggaag cttcttgaag 3600
 acaacaacg tctgtagcga ccctttgcag gcagcggaac cccccacctg gcgacagggtg 3660
 cctctgcggc caaaagccac gtgtataaga tacacctgca aaggcggcac aacccagtg 3720
 ccacgttggt agttggatag ttgtggaaag agtcaaatag ctctcctcaa gcgtattcaa 3780
 caaggggctg aaggatgccc agaaggtacc ccattgtatg ggatctgatc tggggcctcg 3840
 gtgcacatgc tttacatgtg tttagtcgag gttaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac 3900
 ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga taataccatg attgaacaag atggattgca 3960
 cgcaggttct ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac 4020
 aatcggtgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt 4080
 tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc 4140
 gtggctggcc acgacgggcg ttccttgccg agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg 4200
 aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctcaccttgc 4260

tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc 4320
 ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcac gagcgagcac gtactcggat 4380
 ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc 4440
 cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcat gcccgcggc gaggatctcg tcgtgaccca 4500
 tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggg ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga 4560
 ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat 4620
 tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc 4680
 tcccgattcg cagcgcacgc ctttctatcg ctttcttgac gagttcttct gagcgggact 4740
 ctgggggatcc gataaaataa aagattttat ttagtctcca gaaaaagggg ggaatgaaag 4800
 accccacctg taggtttggc aagctagctt aagtaacgcc attttgcaag gcatggaaaa 4860
 atacataact gagaatagag aagttcagat caaggtcagg aacagatgga acagctgaat 4920
 atgggccaaa caggatatct gtggtaaagca gttcctgccc cggctcaggg ccaagaacag 4980
 atggaacagc tgaatatggg ccaaacagga tatctgtggt aagcagttcc tgccccggct 5040
 cagggccaaag aacagatggt ccccagatgc ggtccagccc tcagcagttt ctagagaacc 5100
 atcagatggt tccagggtgc cccaaggacc tgaaatgacc ctgtgcctta tttgaactaa 5160
 ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc tccccgagct caataaaaga 5220
 gccacaacc cctcactcgg ggcgccagtc ctccgattga ctgagtcgcc cgggtaccgc 5280
 tgtatccaat aaacctctt gcagttgcat ccgacttggt gtctcgctgt tccttgggag 5340
 ggtctctctt gagtgattga ctaccgct 5368

<210> 25

<211> 5515

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> BEAT 3载体

<400> 25

gaattaattc ataccagatc accgaaaact gtcttccaaa tgtgtccccc tcacactccc 60
 aaattcgcg gcttctgctc ttagaccact ctaccctatt cccacactc accggagcca 120
 aagccgcggc cttccggtt ctttgccttt gaaagacccc acccgtaggt ggcaagctag 180
 cttaagtaac gccactttgc aaggcatgga aaaatacata actgagaata ggaaagtcca 240
 gatcaaggtc aggaacaaaag aaacagctga ataccaaaca ggatatctgt ggtaagcggg 300
 tcctgccccg gctcagggcc aagaacagat gagacagctg agtgatgggc caaacaggat 360
 atctgtggta agcagttcct gccccggctc ggggccaaga acagatggtc cccagatgcg 420
 gtccagccct cagcagtttc tagtgaatca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct 480
 gaaaatgacc ctgtacctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc 540
 gcgcttcgc tctccgagct caataaaaga gccacaacc cctcactcgg cgcgccagtc 600
 ttccgataga ctgcgtcgcc cgggtaccgc tattcccaat aaagcctctt gctgtttgca 660
 tccgaatcgt ggtctcgctg ttcttggga ggtctcctc tgagtgttg actaccacg 720
 acgggggtct ttcatattgg ggctcgtccg ggatttggag acccctgccc aggaccacc 780

gacccaccac cgggaggtaa gctggccagc aacatatctg tgtctgtccg attgtctagt 840
gtctatgttt gatgttatgc gcctgcgtct gtactagtta gctaactagc tctgtatctg 900
gcggacccgt ggtggaactg acgagttctg aacacccggc cgcaaccagc ggagacgtcc 960
cagggacttt gggggccgtt tttgtggccc gacctgagga agggagtcca tgtggaatcc 1020
gaccccgctc ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt tcccgcctcc 1080
gtctgaattt ttgctttcgg tttggaaccg aagccgcgcg tcttgtctgc tgcagcatcg 1140
ttctgtgttg tctctgtctg actgtgtttc tgtatttgc tgaaaattag ggccagactg 1200
ttaccactcc cttaagtttg accttaggtc actggaaaga tgtcgagcgg atcgctcaca 1260
accagtcggt agatgtcaag aagagacgtt gggttacctt ctgctctgca gaatggccaa 1320
cctttaacgt cggatggccg cgagacggca cctttaaccg agacctcatc acccaggtta 1380
agatcaaggt cttttcacct ggcccgcatg gacaccaga ccaggtcccc tacatcgtga 1440
cctgggaagc cttggctttt gacccccctc cctgggtcaa gccctttgta caccctaagc 1500
ctccgcctcc tcttctcca tccgccccgt ctctccccct tgaacctcct cgttcgacct 1560
cgctcgatc ctccctttat ccagccctca ctcttctct aggcgcgga attccggccg 1620
tgacaagagt tactaacagc ccctctctcc aagctcactt acaggctctc tacttagtcc 1680
agcacgaagt ctggagacct ctggcggcag cctaccaaga acaactggac cgaccgttg 1740
tacctacccc ttaccgagtc ggcgacacag tgtgggtccg ccgacaccag actaagaacc 1800
tagaacctcg ctggaagga ccttacacag tctgcagac cccccacc gccctcaaag 1860
tagacggcat cgcagcttg atacacgccg ccacgtgaa ggctgccgac cccgggggtg 1920
gaccatctct agactgacgc ggccgccac catggagaca gacacactcc tgctatgggt 1980
actgctgctc tgggttccag gttccactgg tgacgaggtg cagctgggtg agtctggggg 2040
aggcttgggtg cagcctggaa agtccctgaa actctctgt gaggcctctg gattcacctt 2100
cagcggctat ggcatgcact gggtcgcca ggctccaggg agggggctgg agtcggctgc 2160
atacattact agtagtagta ttaatatcaa atatgctgac gctgtgaaag gccggttcac 2220
cgtctccaga gacaatgcca agaacttact gtttctacaa atgaacattc tcaagtctga 2280
ggacacagcc atgtactact gtgcaagatt cgactgggac aaaaattact ggggccaagg 2340
aaccatggtc accgtctcct caggtggagg cggttcaggc ggaggtggct ctggcggtg 2400
cggatcggac atccagatga ccagctctcc atcatcactg cctgcctccc tgggagacag 2460
agtcactatc aattgtcagg ccagtcagga cattagcaat tatttaact ggtaccagca 2520
gaaaccaggg aaagctccta agctcctgat ctattataca aataaattgg cagatggagt 2580
cccatcaagg ttcagtggca gtggttctgg gagagattct tctttcacta tcagcagcct 2640
ggaatccgaa gatattggat cttattactg tcaacagtat tataactatc cgtggacgtt 2700
cggacctggc accaagctgg aaatcaaagg tggaggcggg tcaatggagg tgcaggtgg 2760
ggagtctgat ggaggcttag tgcagcctgg aaggtcccta aaactccct gtgcagcctc 2820
aggattcact ttcagtgact attacatggc ctgggtccgc caggctccaa cgaaggggt 2880
ggagtgggtc gcaagcatta gttatgatgg tagtagcact tactatcgag actccgtgaa 2940
gggccgattc actatctcca gagataatgc aaaaagcacc ctatactgc aaatggacag 3000
tctgaggtct gaggacacgg ccacttatta ctgcggaaga cacagtagct actttgatta 3060
ctggggccaa ggagtcatgg tcacagtctc ctgaggtgga ggcggttcag gcggaggtg 3120

```

ctctggcggg ggcgatcgg acactgtact gaccagctct cctgctttgg ctgtgtctcc 3180
aggagagagg gttaccatct cctgtagggc cagtacagtg gtcagtacac ttatgcactg 3240
gtaccaacag aaaccaggac agcaacccaa actcctcatc tatctagcat cacacctaga 3300
atctgggggtc cctgccagggt tcagtggcag tgggtctggg acagacttca ccctcaccat 3360
tgatcctgtg gaggtgatg acactgcaac ctattactgt cagcagagtt ggaatgatcc 3420
gtggacgttc ggtggaggca ccaagctgga attgaaaaat ggggccgtcg agcaccacca 3480
ccaccaccac tgagtcgagg atcaattccg cccctctccc tcccccccc ctaacgttac 3540
tgccgaagc cgcttggaat aaggccgggtg tgcgtttgtc tatatgttat tttccaccat 3600
attgccgtct tttggcaatg tgaggggccg gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat 3660
tcctaggggt ctttcccctc tcgccaaagg aatgcaaggt ctgttgaatg tcgtgaagga 3720
agcagttcct ctggaagctt cttgaagaca aacaacgtct gtagcgacc tttgcaggca 3780
gcggaacccc ccacctggcg acaggtgcct ctgcggccaa aagccacgtg tataagatac 3840
acctgcaaag gcggcacaac cccagtgcc cgttgtgagt tggatagttg tggaaagagt 3900
caaatggctc tcctcaagcg tattcaacaa ggggctgaag gatgccaga aggtacccca 3960
ttgtatggga tctgatctgg ggctcgggtg cacatgcttt acatgtgttt agtcgaggtt 4020
aaaaaacgtc taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa aacacgataa 4080
taccatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct 4140
attcggtat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgcccgcc tgttccggct 4200
gtcagcgcag gggcgcccg tttcttttgt caagaccgac ctgtccgggt ccctgaatga 4260
actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc 4320
tgtgtcgcag gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg 4380
gcaggatctc ctgtcatctc acctgtctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc 4440
aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccc ttcgaccacc aagcgaacaa 4500
tcgcatcgag cgagcacgta ctcggtatga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga 4560
cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggtcaagg cgcgcatgcc 4620
cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga 4680
aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca 4740
ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggccggcaat gggctgaccg 4800
cttcctcgtg ctttacggta tcgccgtcc cgattcgcag cgcatgcct tctatgcct 4860
tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggatccgat aaaataaaag attttattta 4920
gtctccagaa aaagggggga atgaaagacc ccacctgtag gtttggcaag ctagcttaag 4980
taacgccatt ttgcaaggca tggaaaaata cataactgag aatagagaag ttcagatcaa 5040
ggtcaggaa agatggaaca gctgaatatg ggccaaacag gatattctgtg gtaagcagtt 5100
cctgccccgg ctcagggcc aagaacagatg gaacagctga atatgggcca aacaggatat 5160
ctgtggtaag cagttcctgc cccggctcag ggccaagaac agatggtccc cagatgcggt 5220
ccagccctca gcagtttcta gagaaccatc agatgtttcc aggggtgcccc aaggacctga 5280
aatgacctg tgccttattt gaactaacca atcagttcgc ttctcgcttc tgttcgcgcg 5340
cttctgctcc ccgagctcaa taaaagagcc cacaaccct cactcggggc gccagtcctc 5400
cgattgactg agtcgcccgg gtaccctgtg atccaataaa ccctcttgca gttgcatccg 5460

```

acttgtggtc tcgctgttcc ttgggagggt ctctctgag tgattgacta cccgt 5515

<210> 26

<211> 5386

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> BEAT 4载体

<400> 26

```

gaattaattc ataccagatc accgaaaact gtcttccaaa tgtgtccccc tcacactccc 60
aaattcgcgg gcttctgctc ttagaccact ctacctatt cccacactc accggagcca 120
aagccgcggc ctttccgttt ctttgccttt gaaagacccc acccgtaggt ggcaagctag 180
cttaagtaac gccactttgc aaggcatgga aaaatacata actgagaata ggaaagttca 240
gatcaaggtc aggaacaaaag aaacagctga ataccaaaca ggatatctgt ggtaagcggg 300
tcctgccccg gctcagggcc aagaacagat gagacagctg agtgatgggc caaacaggat 360
atctgtggta agcagttcct gccccggctc ggggccaaga acagatgggc cccagatgcg 420
gtccagccct cagcagtttc tagtgaatca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct 480
gaaaatgacc ctgtacctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc 540
gcgcttccgc tctccgagct caataaaaga gccacaacc cctcactcgg cgcgccagtc 600
ttccgataga ctgcgtcgcc cgggtacccg tattcccaat aaagcctctt gctgtttgca 660
tccgaatcgt ggtctcgctg ttccttggga gggctctctc tgagtgattg actaccacg 720
acgggggtct ttcatttggg ggctcgtccg ggatttggag acccctgccc agggaccacc 780
gacccaccac cgggaggtaa gctggccagc aacctatctg tgtctgtccg attgtctagt 840
gtctatgttt gatgttatgc gcctgcgtct gtactagtta gctaactagc tctgtatctg 900
gcggacccgt ggtggaactg acgagttctg aacacccggc cgcaaccag ggagacgtcc 960
cagggacttt gggggccgtt tttgtggccc gacctgagga agggagtcca tgtggaatcc 1020
gaccccgta ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt tcccgcctcc 1080
gtctgaattt ttgctttcgg tttggaaccg aagccgcgcg tcttgtctgc tgcagcatcg 1140
ttctgtgttg tctctgtctg actgtgtttc tgtatttgc tgaaaattag ggccagactg 1200
ttaccactcc cttaagtttg accttaggtc actggaaaga tgtcgagcgg atcgctcaca 1260
accagtcggt agatgtcaag aagagacgtt gggttacctt ctgctctgca gaatggccaa 1320
cctttaacgt cggatggccg cgagacggca cctttaaccg agacctcatc acccaggtta 1380
agatcaaggt cttttcacct ggcccgcatg gacaccaga ccaggtcccc tacatcgtga 1440
cctgggaagc cttggctttt gacccccctc cctgggtcaa gccctttgta caccctaagc 1500
ctccgcctcc tcttcctcca tccgccccgt ctctccccct tgaacctcct cgttcgacct 1560
cgctcgtatc ctccctttat ccagccctca ctcttctct aggcgccgga attccggccg 1620
tgacaagagt tactaacagc ccctctctcc aagctcactt acaggtctct tacttagtcc 1680
agcacgaagt ctggagacct ctggcggcag cctaccaaga acaactggac cgaccggtgg 1740
tacctaccc ttaccgagtc ggcgacacag tgtgggtccg ccgacaccag actaagaacc 1800
tagaacctcg ctggaaagga ccttacacag tcctgcagac cacccccacc gccctcaaag 1860

```

tagacggcat	cgcagcttgg	atacacgccg	cccacgtgaa	ggctgccgac	cccgggggtg	1920
gaccatctct	agactgacgc	ggccgcccac	catggagaca	gacacactcc	tgctatgggt	1980
actgctgctc	tgggttccag	gttccactgg	tgacgaggtg	cagctgggtg	agtctggggg	2040
aggcttgggtg	cagcctggaa	agtccctgaa	actctcctgt	gaggcctctg	gattcacctt	2100
cagcggctat	ggcatgcact	gggtccgcca	ggctccaggg	agggggctgg	agtcggtcgc	2160
atacattact	agtagtagta	ttaatatcaa	atatgctgac	gctgtgaaag	gccggttcac	2220
cgtctccaga	gacaatgcc	agaacttact	gtttctacaa	atgaacattc	tcaagtctga	2280
ggacacagcc	atgtactact	gtgcaagatt	cgactgggac	aaaaattact	ggggccaagg	2340
aaccatgggtc	accgtctcct	caggtggagg	cggttcaggc	ggaggtggct	ctggcgggtg	2400
cggatcggac	atccagatga	cccagtctcc	atcatcactg	cctgcctccc	tgggagacag	2460
agtcactatc	aattgtcagg	ccagtcagga	cattagcaat	tatttaaact	ggtaccagca	2520
gaaaccaggg	aaagctccta	agtcctgat	ctattataca	aataaattgg	cagatggagt	2580
cccatcaagg	ttcagtggca	gtggttctgg	gagagattct	tctttcacta	tcagcagcct	2640
ggaatccgaa	gataattgat	cttattactg	tcaacagtat	tataactatc	cgtggacgtt	2700
cggacctggc	accaagctgg	aaatcaaagg	tggaggcggt	tcagaggtgc	agcttcagga	2760
gtcaggacct	ggccttgtga	aaccctcaca	gtcactctcc	ctcacctgtt	ctgtcactgc	2820
ttacttcatc	actagtaatt	actgggcctg	gatccggaag	ttcccaggaa	ataaaatgga	2880
gtggatggga	cacataacct	acagtggtta	cactacctac	aatccatctc	tcaaaagtcg	2940
aatctccatt	actagagaca	catcgaggaa	tcagttcttc	ctccagttga	actctgtaac	3000
tactgaggac	acagccactt	attactgtgc	aagaggtgga	ggcggttcag	gcggaggtgg	3060
ctctggcggt	ggcggatcga	acattgtaat	gacccaatct	cccaaatcca	tgtccatgtc	3120
agtaggagag	agggtcacct	tgacctgcaa	ggccagttag	aatgtggtta	cttatgtttc	3180
ctggtatcaa	cagaaaccag	agcagtctcc	taaactgctg	atatacgggg	catccaaccg	3240
gtacactggg	gtccccgatc	gcttcacagg	cagtggatct	gcaacagatt	tactctgac	3300
catcagcagt	gtgcaggctg	aagaccttgc	agattatcac	tgtggacagg	gttacagcta	3360
tccggtcgag	gatcaattcc	gcccctctcc	ctccccccc	cctaacgtta	ctggccgaag	3420
ccgcttggaa	taaggccggt	gtgcgtttgt	ctatatgtta	ttttccacca	tattgccgtc	3480
ttttggcaat	gtgagggccc	ggaaacctgg	ccctgtcttc	ttgacgagca	ttcctagggg	3540
tctttcccct	ctcgccaaag	gaatgcaagg	tctgttgaat	gtcgtgaagg	aagcagttcc	3600
tctggaagct	tcttgaagac	aaacaacgtc	tgtagcgacc	ctttgcaggc	agcggaaacc	3660
cccacctggc	gacaggtgcc	tctgcggcca	aaagccacgt	gtataagata	cacctgcaaa	3720
ggcggcacia	ccccagtgcc	acgttgtgag	ttggatagtt	gtggaaagag	tcaaatggct	3780
ctcctcaagc	gtattcaaca	aggggctgaa	ggatgccag	aaggtacccc	attgtatggg	3840
atctgatctg	gggcctcggt	gcacatgctt	tacatgtgtt	tagtcgaggt	taaaaaacgt	3900
ctaggcccc	cgaaccacgg	ggacgtggtt	ttcctttgaa	aaacacgata	ataccatgat	3960
tgaacaagat	ggattgcacg	caggttctcc	ggccgcttgg	gtggagaggc	tattcggcta	4020
tgactgggca	caacagacaa	tcggctgctc	tgatgccgcc	gtgttcgggc	tgtcagcgca	4080
ggggcgcccc	gttctttttg	tcaagaccga	cctgtccggt	gccctgaatg	aactgcagga	4140
cgaggcagcg	cggctatcgt	ggctggccac	gacgggcgtt	ccttgcgcag	ctgtgctcga	4200

cgttgctact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct 4260
cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg 4320
gctgcatacg cttgatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga 4380
gcgagcacgt actcggatgg aagccgggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca 4440
tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc cgcacggcga 4500
ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg 4560
cttttctgga ttcatcgact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc 4620
gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt 4680
gctttacggg atcgccgctc ccgattcgca gcgcacgcc ttctatgcc ttcttgacga 4740
gttccttctga gcgggactct ggggatccga taaaataaaa gattttattt agtctccaga 4800
aaaagggggg aatgaaagac cccacctgta ggtttggcaa gctagcttaa gtaacgcat 4860
tttgcaaggc atggaaaaat acataactga gaatagagaa gttcagatca aggtcaggaa 4920
cagatggaac agctgaatat gggccaaaca ggatatctgt ggtaagcagt tcctgccccg 4980
gctcagggcc aagaacagat ggaacagctg aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa 5040
gcagttcctg ccccggtca gggccaagaa cagatggtcc ccagatgcgg tccagccctc 5100
agcagtttct agagaaccat cagatgtttc cagggtgccc caaggacctg aaatgaccct 5160
gtgccttatt tgaactaacc aatcagttcg cttctcgctt ctgttcgcgc gcttctgctc 5220
cccgagctca ataaaagagc ccacaacccc tctctcgggg cgccagtcct ccgattgact 5280
gagtcgcccc ggtacccgtg tatccaataa accctcttgc agttgcatcc gacttgtggt 5340
ctcgtgttc cttgggaggg tctcctctga gtgattgact acccgt 5386

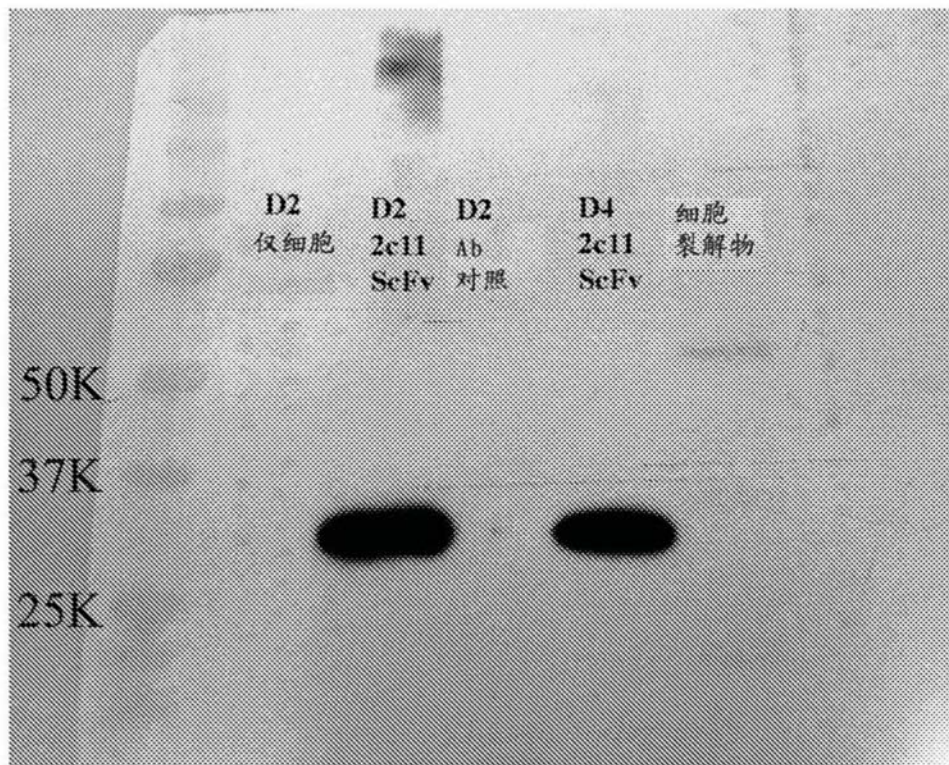


图1

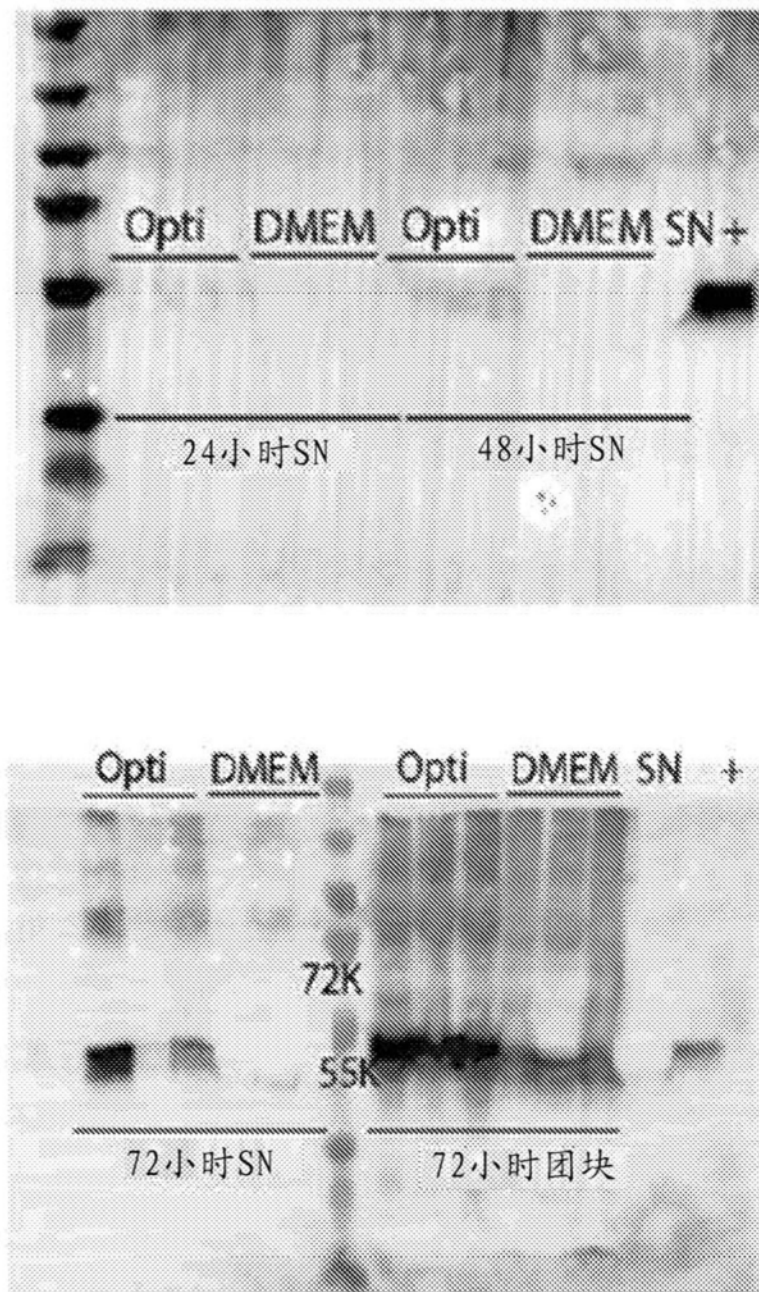
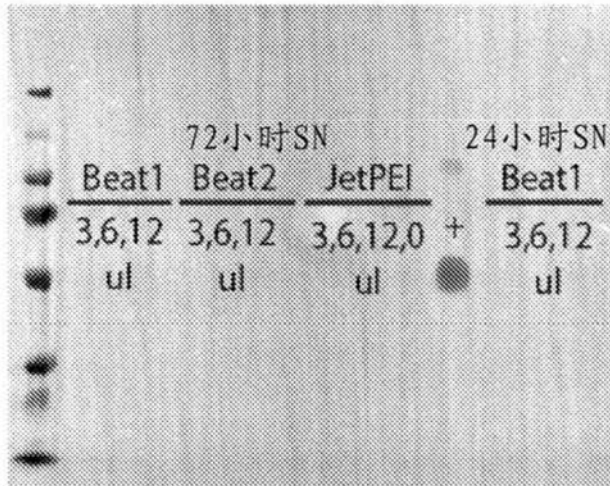


图2

凝胶1



凝胶2

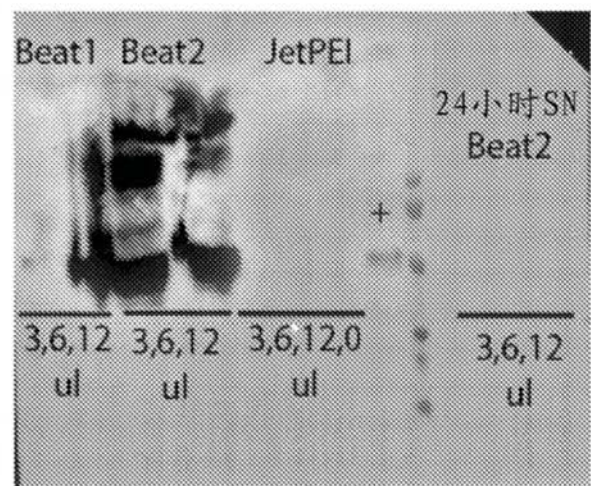
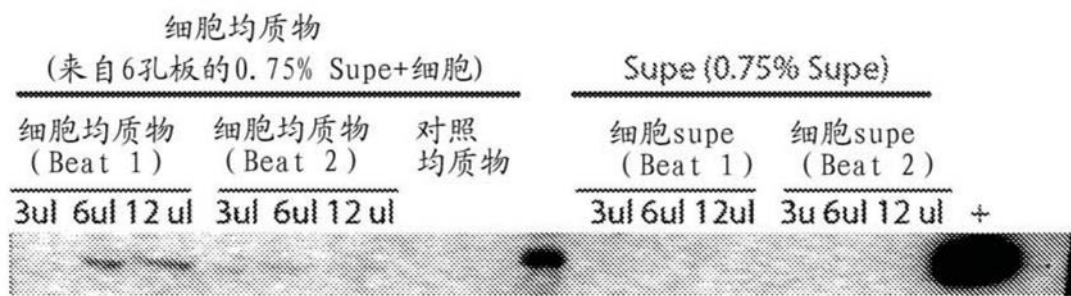


图3

凝胶1



梯度

凝胶2

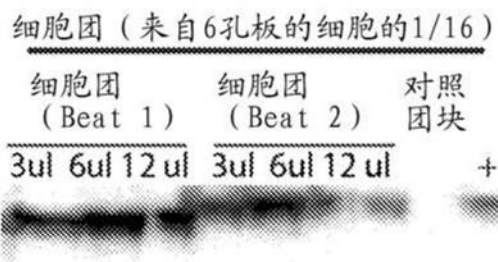


图4

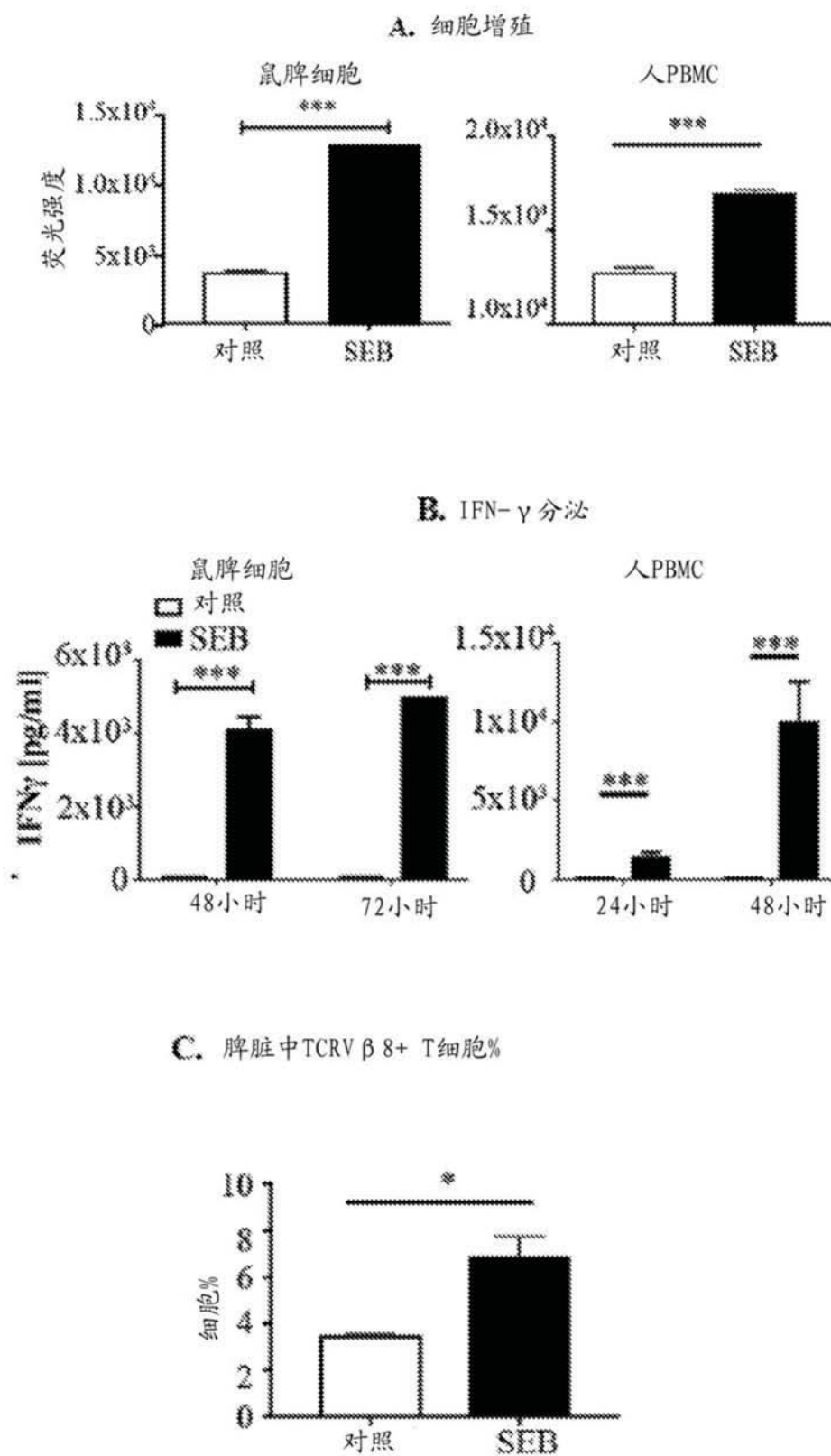
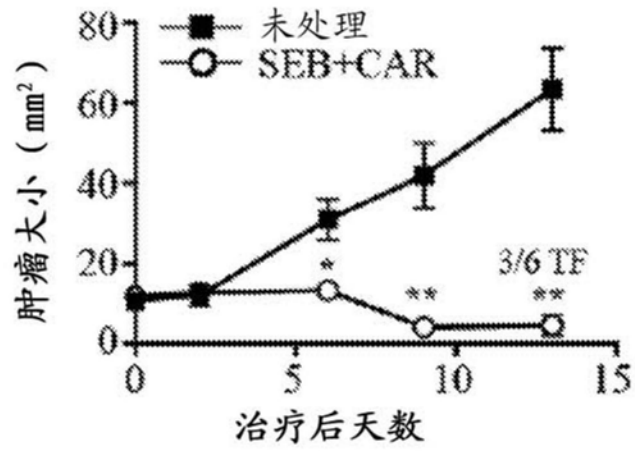


图5

A

E0771-Her2



B

24JK-Her2

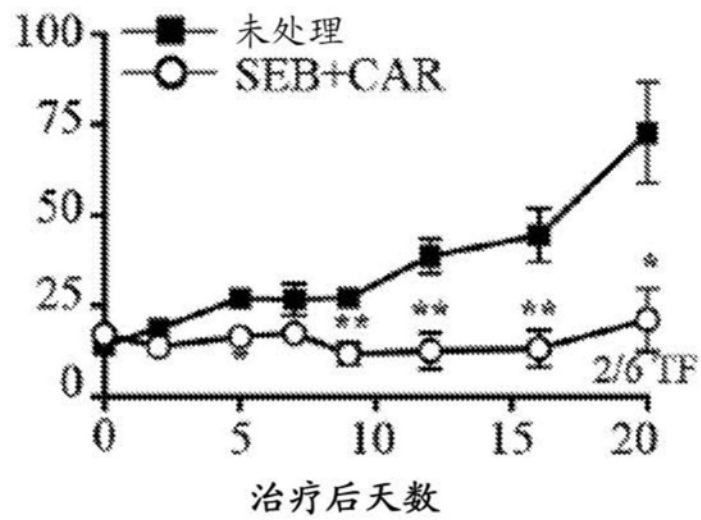
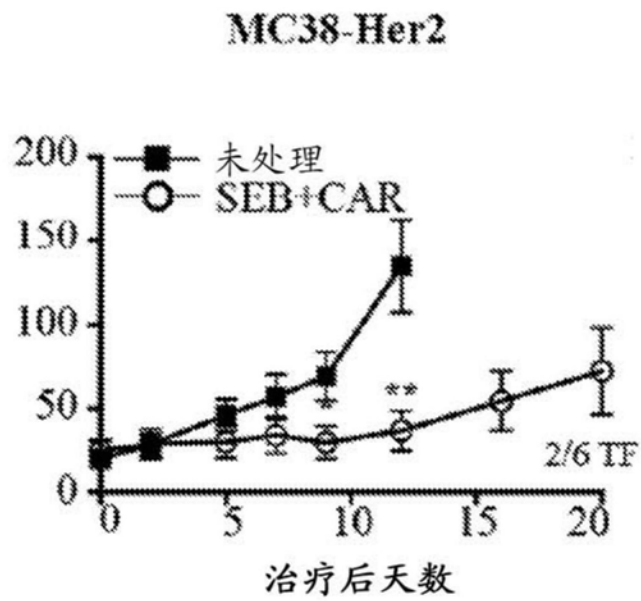


图6

C



D

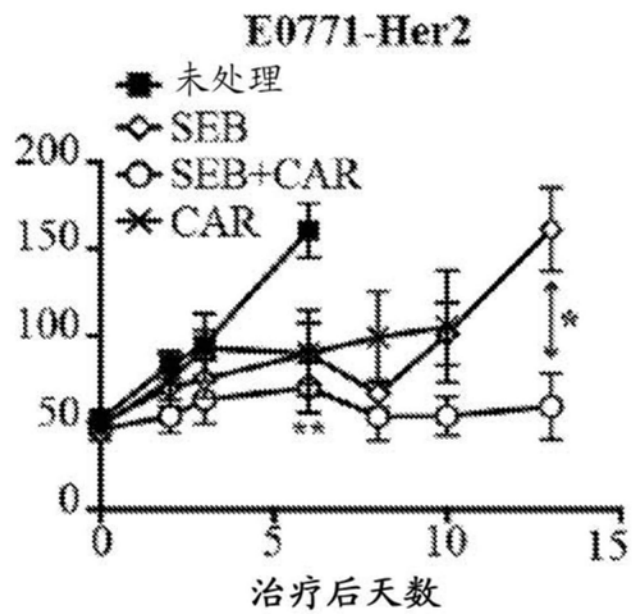


图6(续)

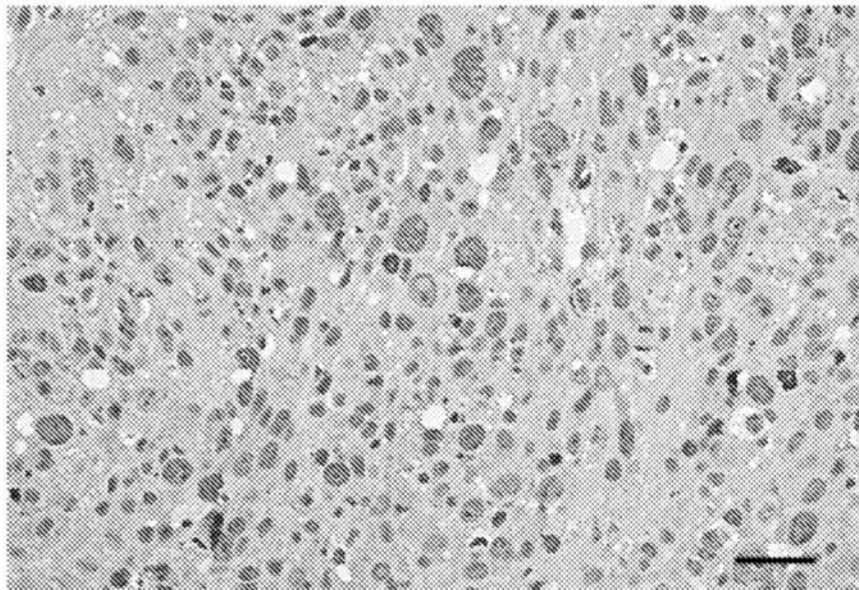
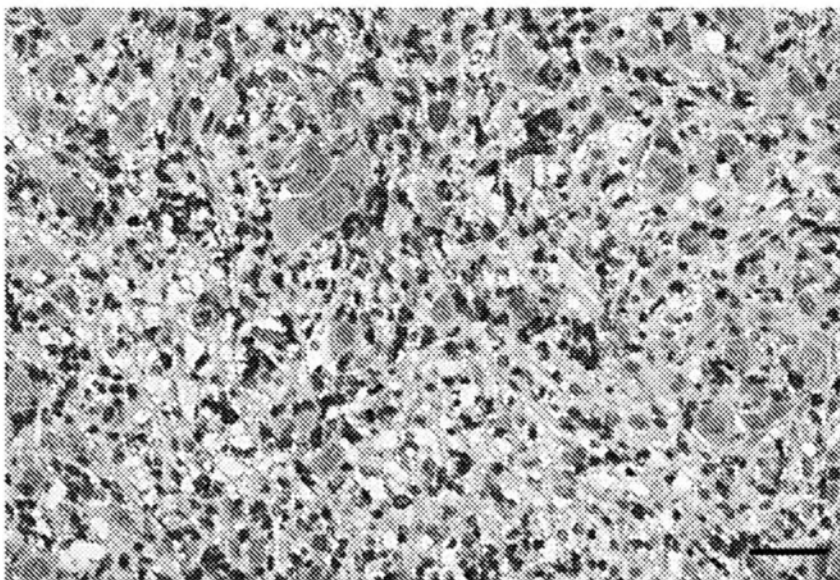
A**CAR****B****CAR+SEB**

图7

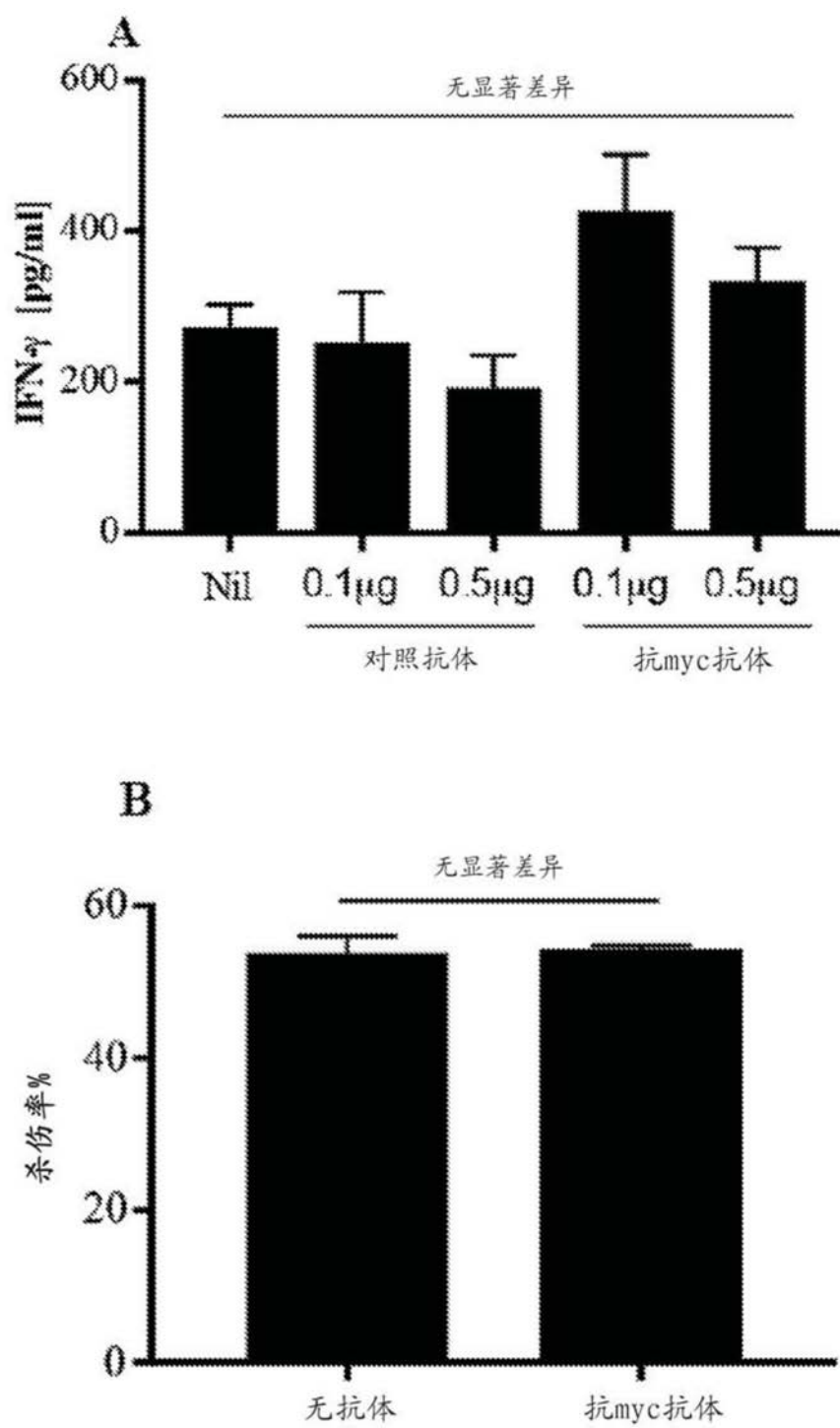


图8

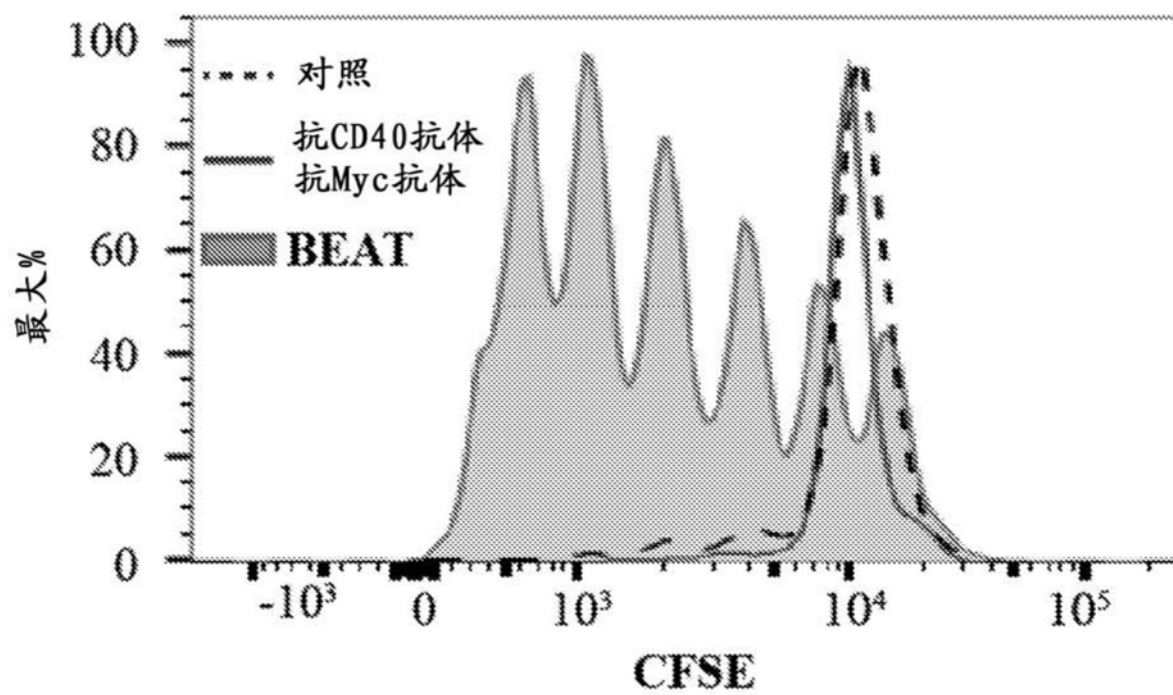


图9

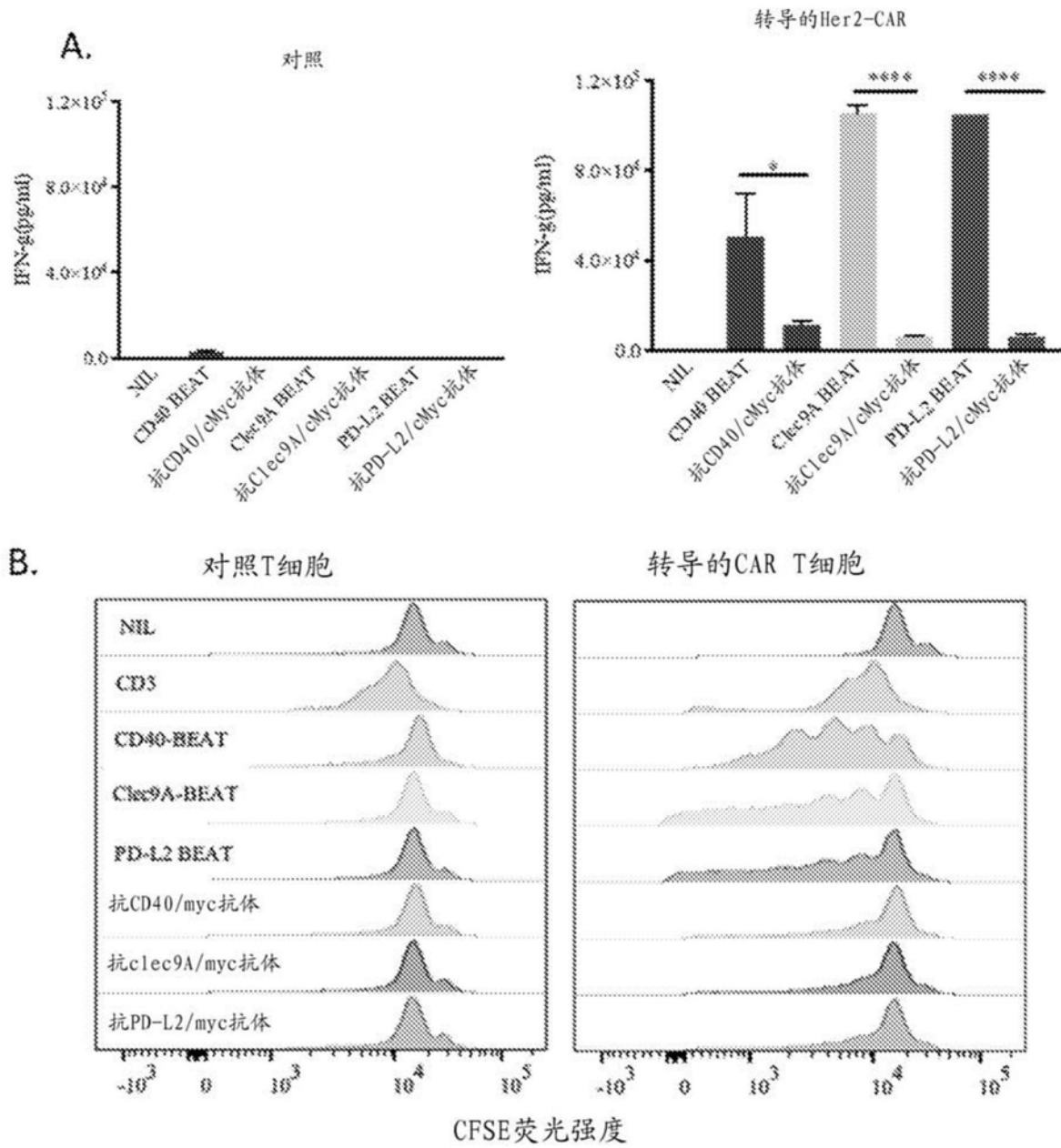


图10

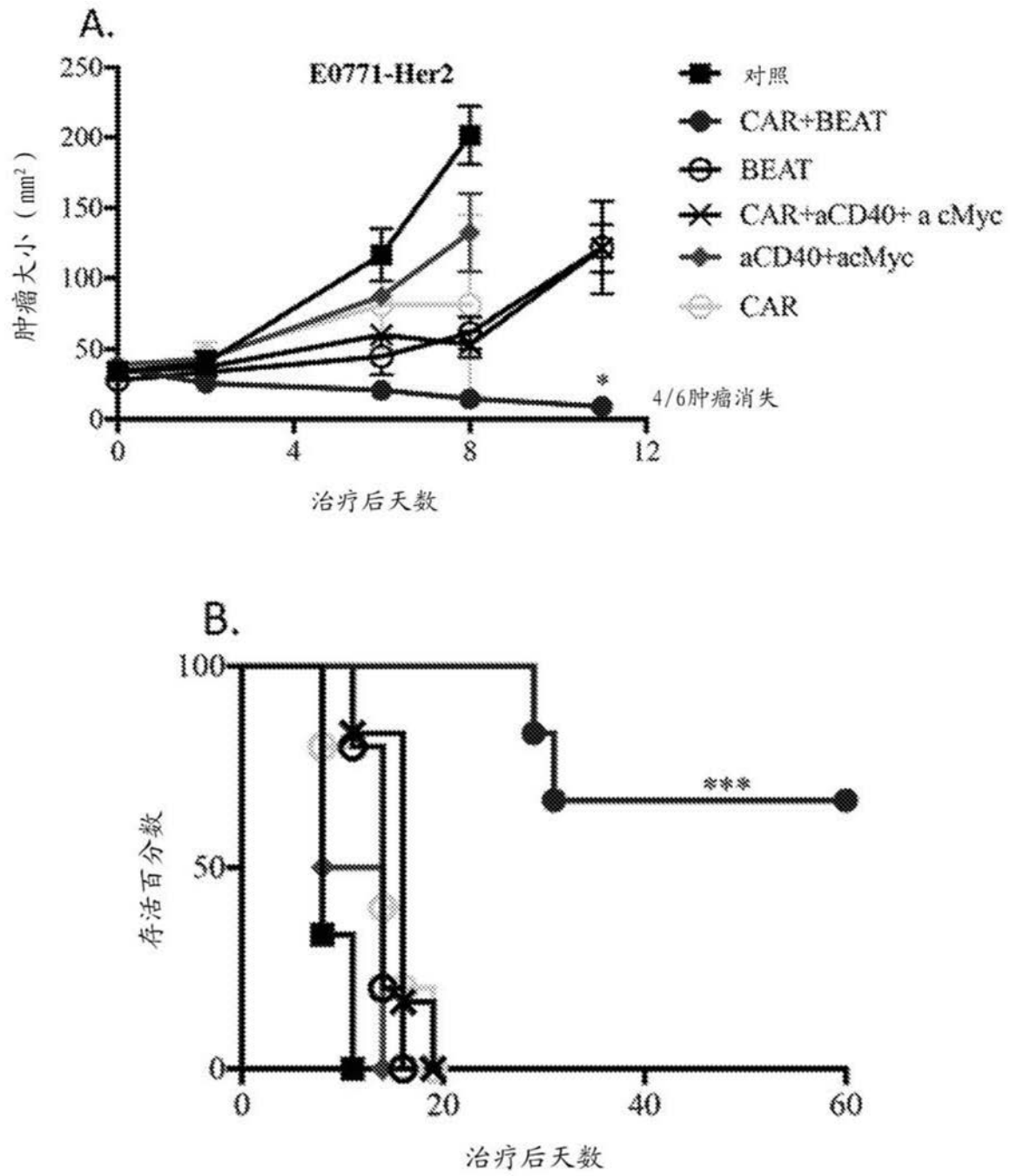


图11

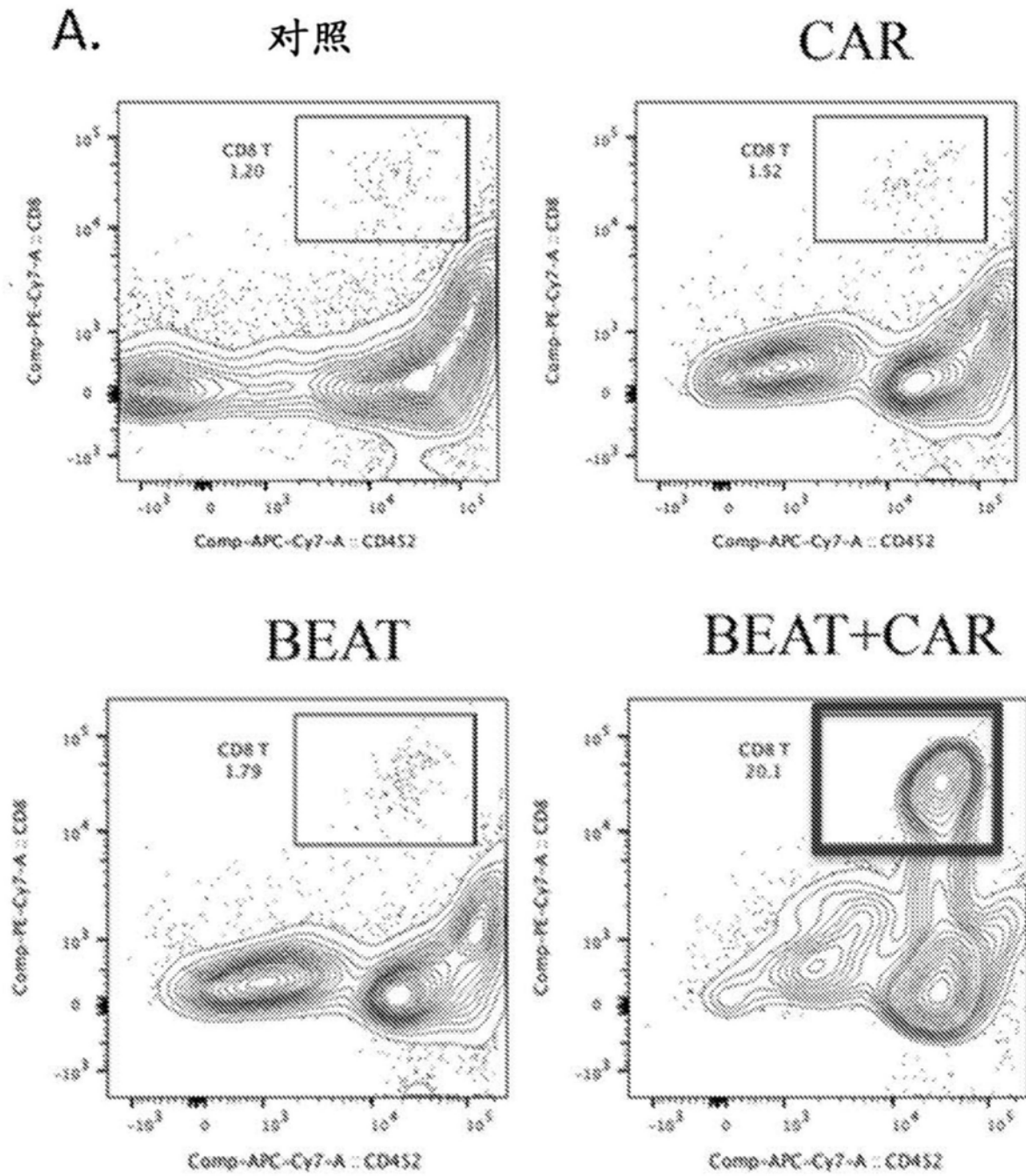


图12

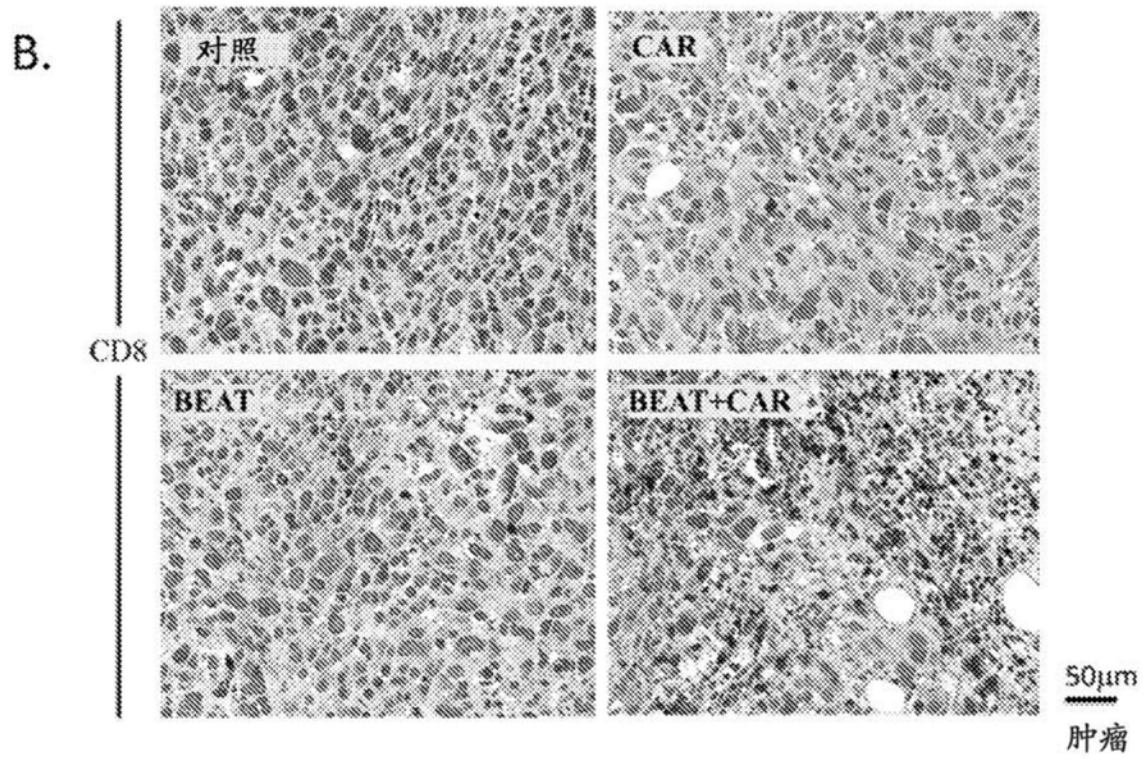


图12(续)

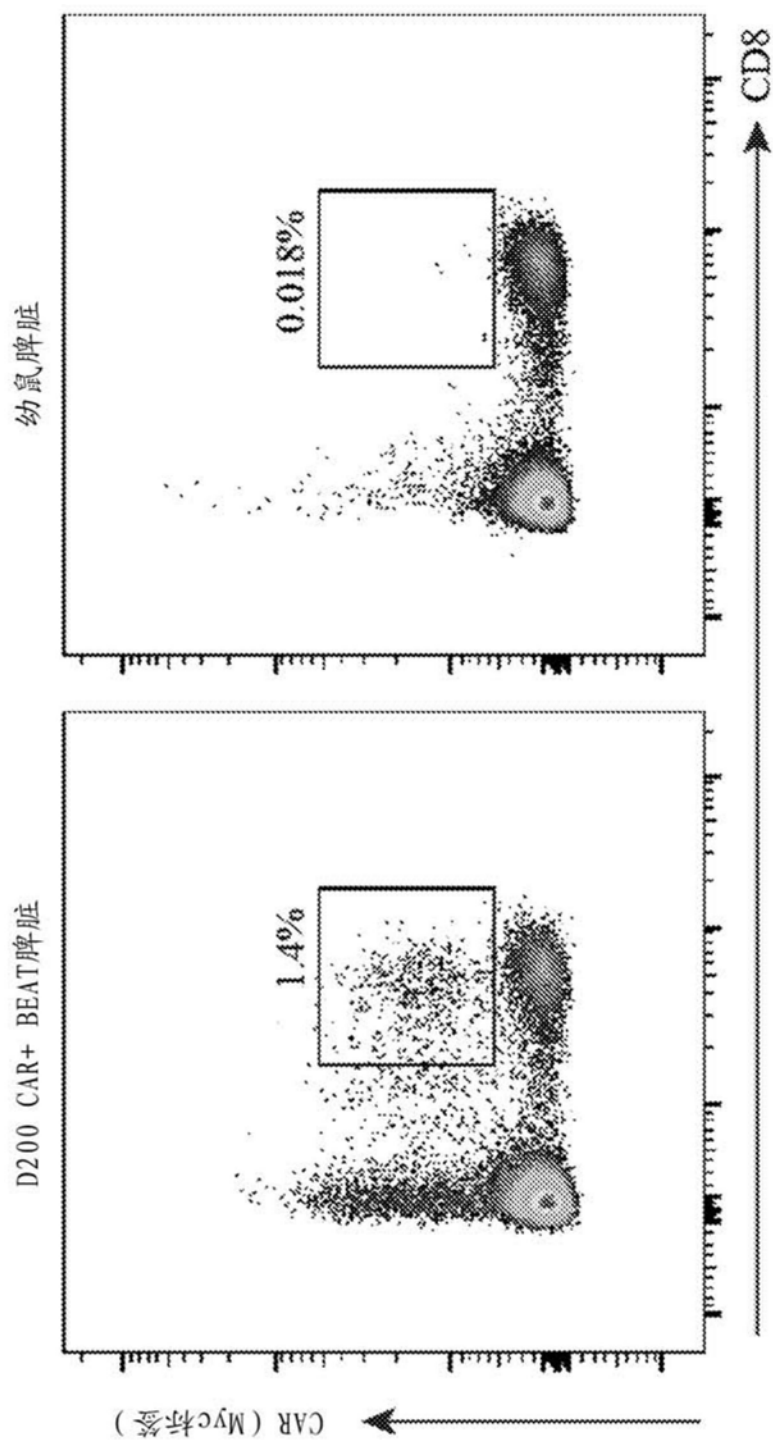


图13

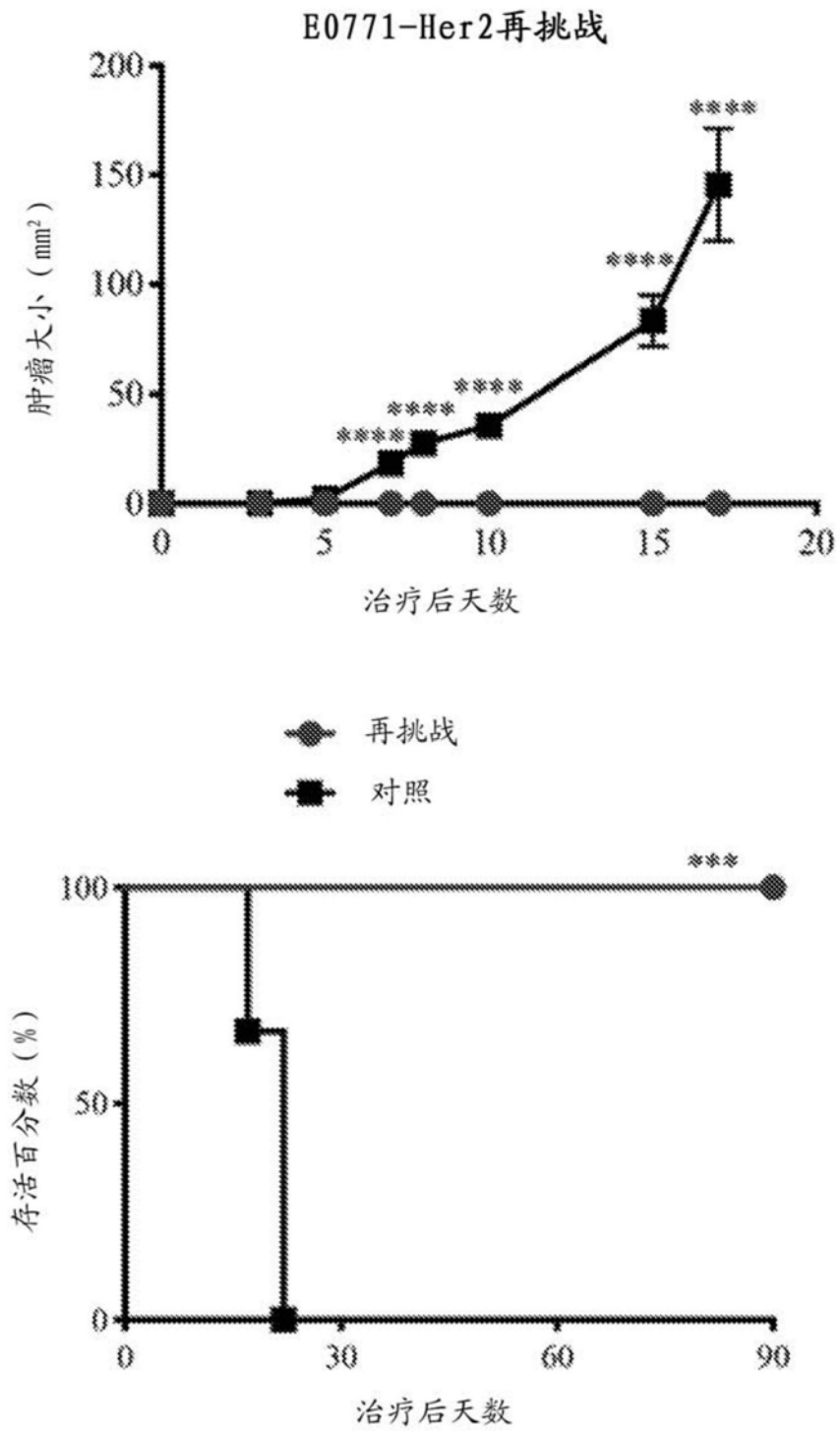


图14

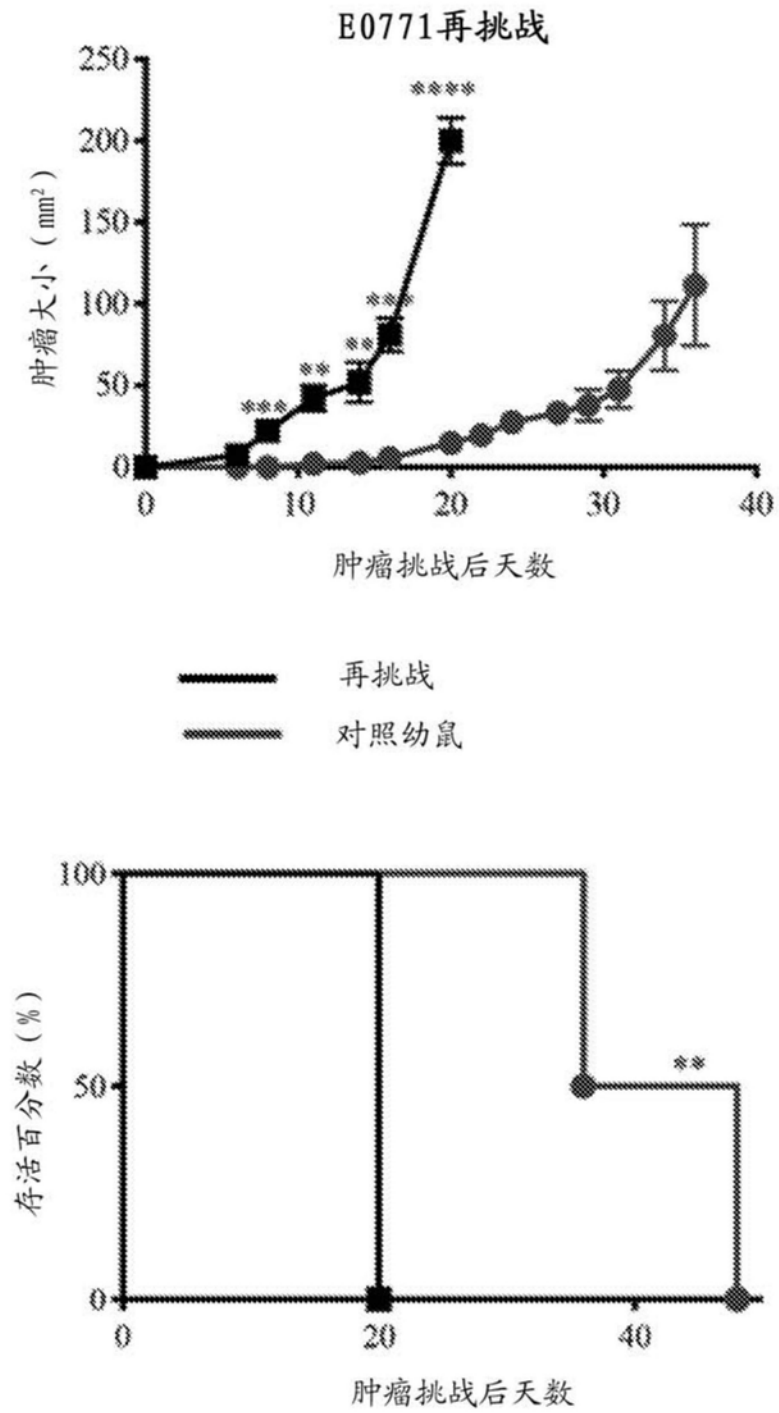


图15

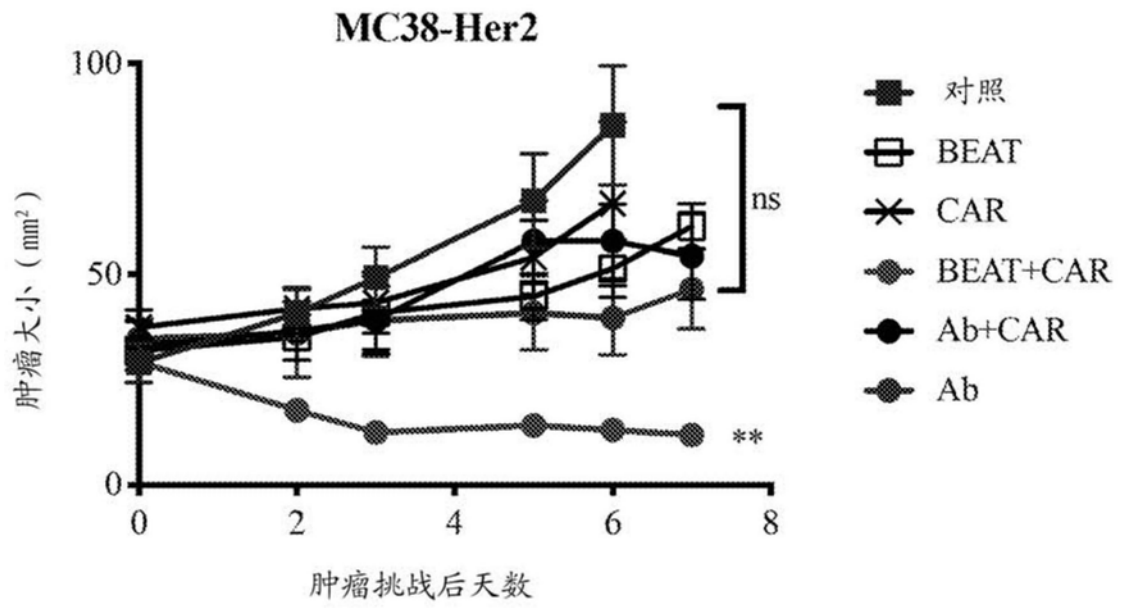


图16

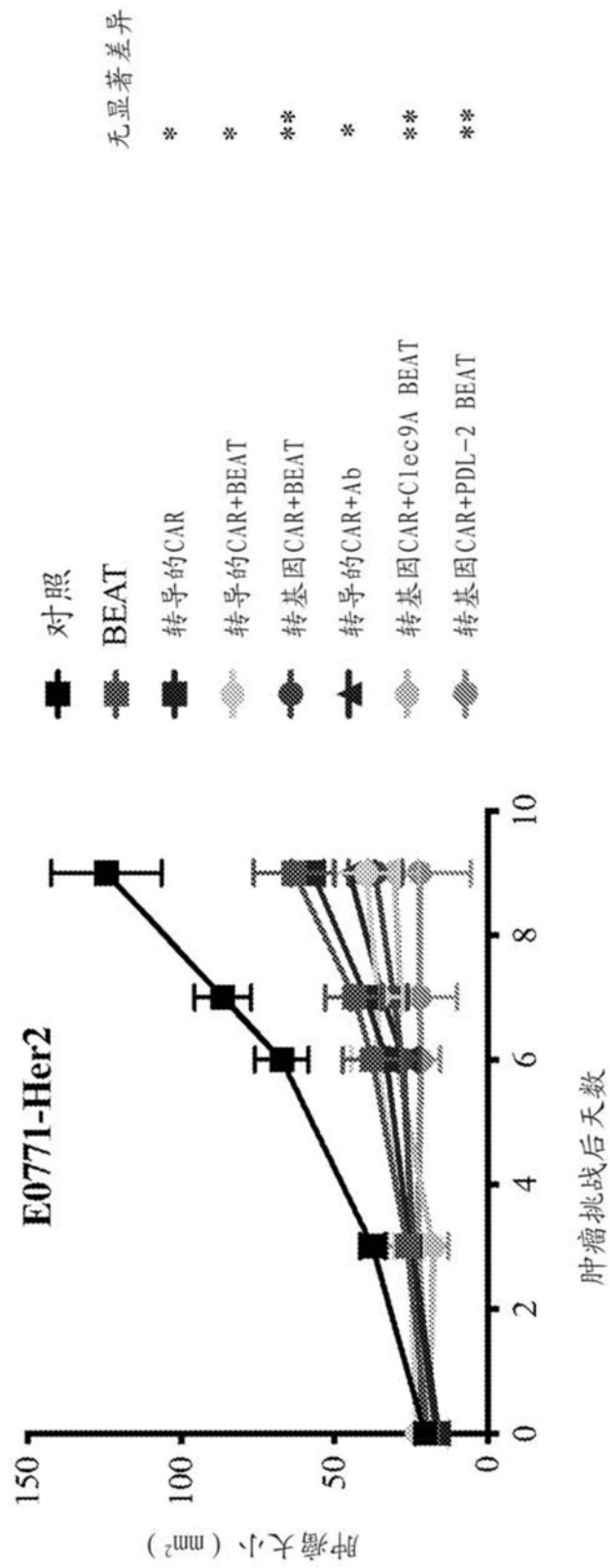


图17

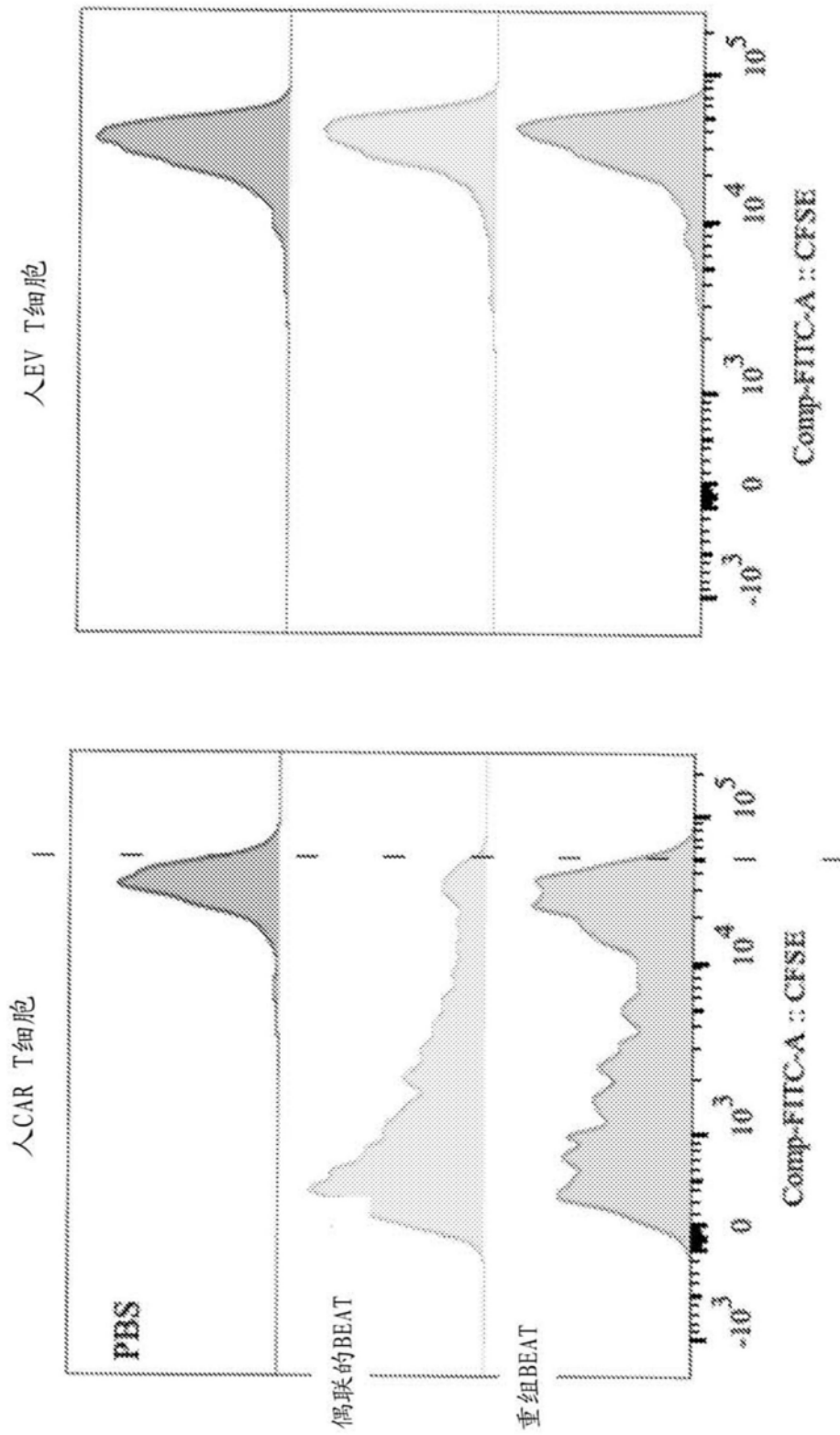


图18

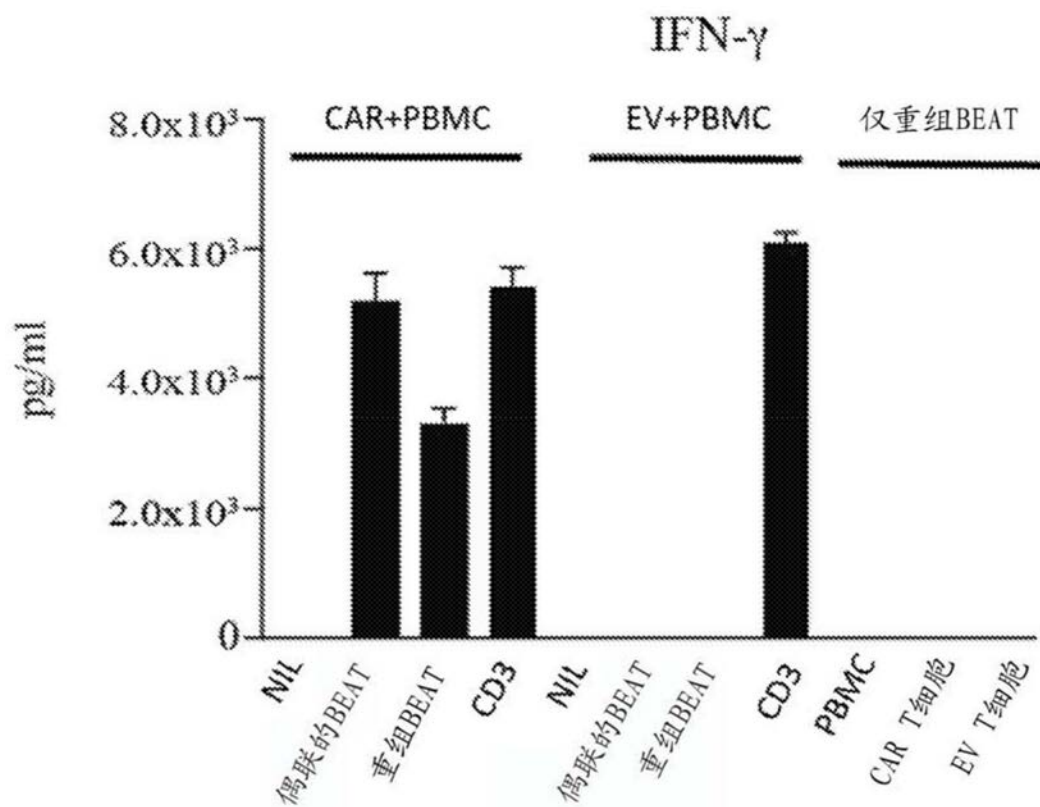


图19

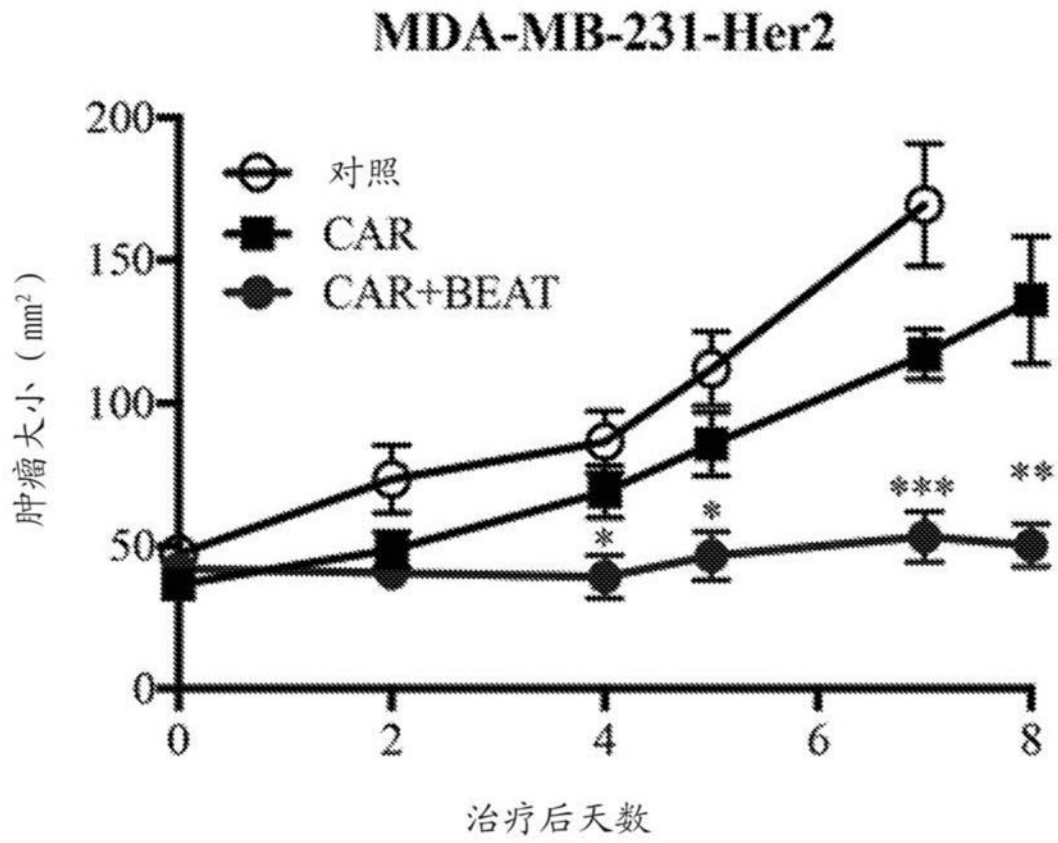


图20

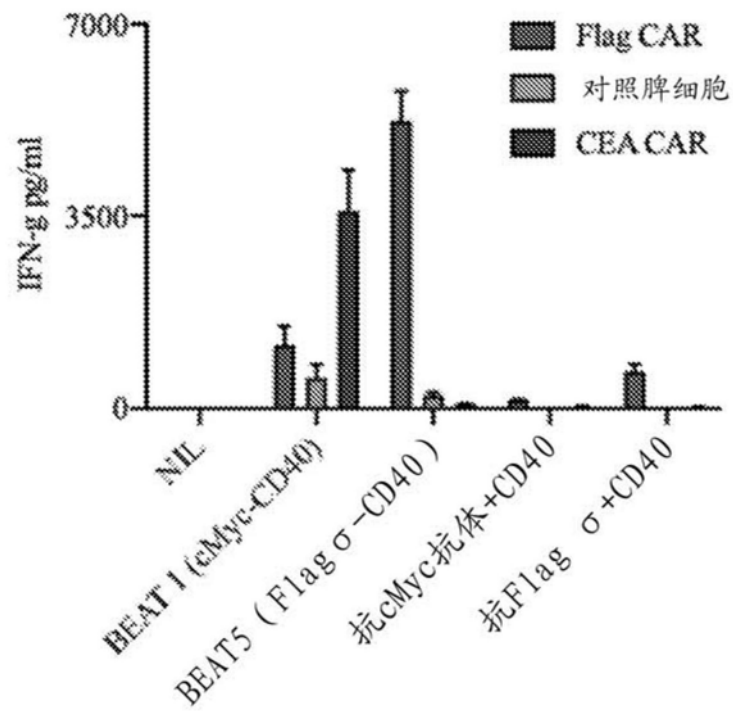


图21