(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114765980 A
(43)申请公布日 2022.07.19

(21)申请号 202080077466.5

(22)申请日 2020.09.04

(30)优先权数据
62/897,062 2019.09.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.06

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/049521 2020.09.04

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/046432 EN 2021.03.11

(71)申请人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 克里斯蒂娜·普伊赫-绍斯
安东尼·里瓦斯 伊冯娜·陈

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 刘振佳

(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/867(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

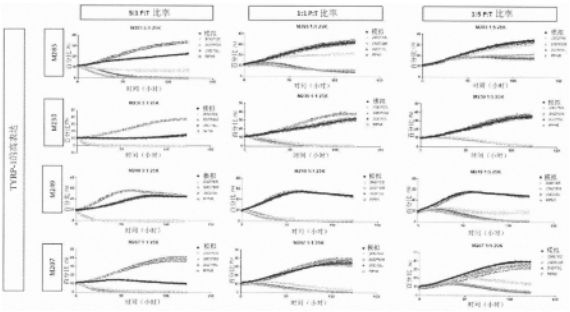
权利要求书5页 说明书48页
序列表54页 附图20页

(54)发明名称

用于治疗癌症的嵌合抗原受体及相关方法和组合物

(57)摘要

提供了与能够特异性结合TYRP-1的治疗性受体(包括嵌合抗原受体(CAR))相关的方法和组合物。所公开的组合物包括例如表达TYRP-1特异性CAR的细胞(例如免疫细胞)、编码TYRP-1特异性CAR的核酸和TYRP-1特异性CAR多肽。某些方面涉及使用包含TYRP-1特异性CAR的组合物(例如表达TYRP-1特异性CAR的细胞)治疗癌症(包括黑素瘤)的方法。在一些实施方案中,本文提供了包含TYRP-1结合结构域、铰链区、跨膜结构域和胞内信号传导结构域的嵌合多肽。



CN 114765980 A

1.嵌合多肽,其包含:

(a)抗原结合结构域,其包含:

(i)与SEQ ID NO:10具有至少90%序列同一性的重可变(VH)区;和

(ii)与SEQ ID NO:5具有至少90%序列同一性的轻可变(VL)区;

(b)跨膜结构域;和

(c)胞内信号传导结构域。

2.嵌合多肽,其包含:

(a)抗原结合结构域,其包含:

(i)包含SEQ ID NO:11(HCDR1)、SEQ ID NO:12(HCDR2)和SEQ ID NO:13(HCDR3)的重可变(VH)区;和

(ii)包含SEQ ID NO:6(LCDR1)、SEQ ID NO:7(LCDR2)和SEQ ID NO:8(LCDR3)的轻可变(VL)区;

(b)跨膜结构域;和

(c)胞内信号传导结构域。

3.权利要求1或2所述的嵌合多肽,其中所述VH区和所述VL区由接头隔开。

4.权利要求1至3中任一项所述的嵌合多肽,其中所述接头的长度为4至40个氨基酸。

5.权利要求4所述的嵌合多肽,其中所述接头包含$(G_4S)_n$序列,其中n为1、2、3、4、5或6。

6.权利要求4所述的嵌合多肽,其中所述接头包含$(EAAAK)_n$序列,其中n为1、2、3、4、5或6。

7.权利要求4所述的嵌合多肽,其中所述接头包含SEQ ID NO:9。

8.权利要求1至7中任一项所述的嵌合多肽,其还包含信号肽。

9.权利要求8所述的嵌合多肽,其中所述信号肽是小鼠κ链信号肽。

10.权利要求9所述的嵌合多肽,其中所述信号肽包含SEQ ID NO:4。

11.权利要求1至10中任一项所述的嵌合多肽,其中所述跨膜结构域是T细胞受体的α或β链或者来自CD28、CD3ε(epsilon)、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD123、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。

12.权利要求11所述的嵌合多肽,其中所述跨膜结构域是CD28跨膜结构域。

13.权利要求11或12所述的嵌合多肽,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:17。

14.权利要求1至13中任一项所述的嵌合多肽,其中所述胞内信号传导结构域包含初级信号传导结构域。

15.权利要求14所述的嵌合多肽,其中所述初级信号传导结构域是CD3ζ(zeta)信号传导结构域。

16.权利要求14或15所述的嵌合多肽,其中所述初级信号传导结构域包含SEQ ID NO:19。

17.权利要求14至16中任一项所述的嵌合多肽,其中所述胞内信号传导结构域还包含共刺激结构域。

18.权利要求17所述的嵌合多肽,其中所述共刺激结构域包含来自4-1BB(CD137)、CD28、IL-15Rα、OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)或ICOS(CD278)的信号传导结构域。

19.权利要求18所述的嵌合多肽,其中所述共刺激结构域包含CD28信号传导结构域。

20.权利要求17至19中任一项所述的嵌合多肽,其中所述共刺激结构域包含SEQ ID NO:18。

21.权利要求18所述的嵌合多肽,其中所述共刺激结构域包含4-1BB信号传导结构域。

22.权利要求21所述的嵌合多肽,其中所述共刺激结构域包含SEQ ID NO:70。

23.权利要求1至22中任一项所述的嵌合多肽,其中所述VH区相对于所述VL区更靠近所述嵌合多肽的氨基末端。

24.权利要求1至22中任一项所述的嵌合多肽,其中所述VL区相对于所述VH区更靠近所述嵌合多肽的氨基末端。

25.权利要求1至24中任一项所述的嵌合多肽,其中所述抗原结合结构域和所述跨膜结构域由铰链区隔开。

26.权利要求25所述的嵌合多肽,其中所述铰链区包含IgG4铰链、CD8α铰链、IgG1铰链或CD34铰链。

27.权利要求25或26所述的嵌合多肽,其中所述铰链区的长度为8至50个氨基酸。

28.权利要求27所述的嵌合多肽,其中所述铰链区的长度为10至15个氨基酸。

29.权利要求28所述的嵌合多肽,其中所述铰链区包含SEQ ID NO:14。

30.权利要求25或26所述的嵌合多肽,其中所述铰链区的长度为50至150个氨基酸。

31.权利要求30所述的嵌合多肽,其中所述铰链区的长度为110至125个氨基酸。

32.权利要求31所述的嵌合多肽,其中所述铰链区包含SEQ ID NO:15。

33.权利要求25或26所述的嵌合多肽,其中所述铰链区的长度为150至300个氨基酸。

34.权利要求33所述的嵌合多肽,其中所述铰链区的长度为215至250个氨基酸。

35.权利要求34所述的嵌合多肽,其中所述铰链区包含SEQ ID NO:16。

36.嵌合多肽,其包含:

(a)信号肽;

(b)抗原结合结构域,其包含:

(i)包含SEQ ID NO:10的重可变(VH)区;和

(ii)包含SEQ ID NO:5的轻可变(VL)区;

(c)长度为8至300个氨基酸的铰链区;

(d)CD28跨膜结构域;和

(e)包含CD28信号传导结构域和CD3ζ(zeta)信号传导结构域的胞内信号传导结构域。

37.权利要求36所述的嵌合多肽,其中所述VH区和所述VL区由接头隔开。

38.权利要求36或37所述的嵌合多肽,其中所述接头的长度为4至40个氨基酸。

39.权利要求38所述的嵌合多肽,其中所述接头包含$(G_4S)_n$序列,其中n为1、2、3、4、5或6。

40.权利要求38所述的嵌合多肽,其中所述接头包含$(EAAAK)_n$序列,其中n为1、2、3、4、5或6。

41.权利要求38所述的嵌合多肽,其中所述接头包含SEQ ID NO:9。

42.权利要求36至41中任一项所述的嵌合多肽,其中所述铰链区包含SEQ ID NO:14。

43.权利要求42所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:1。

44.权利要求36至41中任一项所述的嵌合多肽,其中所述铰链区包含SEQ ID NO:15。

45.权利要求44所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:2。

46.权利要求36至41中任一项所述的嵌合多肽,其中所述铰链区包含SEQ ID NO:16。

47.权利要求46所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:3。

48.权利要求1至47中任一项所述的嵌合多肽,其中所述抗原结合结构域与TYRP-1蛋白特异性结合。

49.核酸,其包含编码权利要求1至48中任一项所述的嵌合多肽的序列。

50.权利要求49所述的核酸,其中所述核酸是表达构建体。

51.权利要求49所述的核酸,其中所述表达构建体是质粒。

52.权利要求49所述的核酸,其中所述表达构建体是病毒载体。

53.权利要求52所述的核酸,其中所述病毒载体是来源于逆转录病毒的载体或来源于慢病毒的载体。

54.细胞,其包含权利要求49至53中任一项所述的核酸。

55.权利要求54所述的细胞,其中所述核酸被整合到所述细胞的基因组中。

56.细胞,其包含权利要求1至48中任一项所述的嵌合多肽。

57.权利要求54至56中任一项所述的细胞,其中所述细胞是免疫细胞。

58.权利要求54至57中任一项所述的细胞,其中所述细胞是T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T细胞(NKT)、恒定自然杀伤T细胞(iNKT)、干细胞、淋巴样祖细胞、外周血单个核细胞(PBMC)、外周血干细胞(PBSC)、骨髓细胞、胎儿肝细胞、胚胎干细胞、脐带血细胞、诱导多能干细胞(iPS细胞)。

59.权利要求58所述的细胞,其中所述细胞是T细胞或NK细胞。

60.权利要求59所述的细胞,其中所述细胞是记忆T细胞。

61.权利要求60所述的细胞,其中所述记忆T细胞是CD4+T细胞或CD8+T细胞。

62.细胞群,其包含权利要求54至61中任一项所述的细胞。

63.药物组合物,其包含(a)权利要求54至61中任一项所述的细胞或权利要求62所述的细胞群和(b)可药用赋形剂。

64.制造工程化细胞的方法,其包括将权利要求49至53中任一项所述的核酸引入到细胞中。

65.权利要求64所述的方法,其中所述细胞是免疫细胞。

66.权利要求64或65所述的方法,其中所述细胞是T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T细胞(NKT)、恒定自然杀伤T细胞(iNKT)、干细胞、淋巴样祖细胞、外周血单个核细胞(PBMC)、外周血干细胞(PBSC)、骨髓细胞、胎儿肝细胞、胚胎干细胞、脐带血细胞、诱导多能干细胞(iPS细胞)。

67.权利要求66所述的方法,其中所述细胞是T细胞或NK细胞。

68.权利要求67所述的方法,其中所述细胞是记忆T细胞。

69.权利要求68所述的方法,其中所述记忆T细胞是CD4+T细胞或CD8+T细胞。

70.权利要求64所述的方法,其中所述细胞不是免疫细胞,其中所述方法还包括使所述细胞经历足以将所述细胞分化成免疫细胞的条件。

71.权利要求64至70中任一项所述的方法,其还包括在足以扩增所述工程化细胞以产

生工程化细胞群的条件下培养所述工程化细胞。

72.治疗患有癌症的对象的方法,其包括向所述对象施用(a)有效量的权利要求62所述的细胞群或(b)权利要求63所述的药物组合物。

73.权利要求72所述的方法,其中所述癌症是黑素瘤。

74.权利要求72或73所述的方法,其还包括向所述对象提供另外的治疗。

75.权利要求74所述的方法,其中所述另外的治疗是化学治疗、放射治疗或免疫治疗。

76.权利要求75所述的方法,其中所述另外的治疗是免疫治疗。

77.权利要求76所述的方法,其中所述免疫治疗包括免疫检查点抑制剂治疗。

78.权利要求77所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂治疗包含PD-1抑制剂或CTLA-4抑制剂。

79.治疗对象的黑素瘤的方法,所述方法包括向所述对象施用包含能够与TYRP-1蛋白结合的嵌合多肽的细胞,所述嵌合多肽包含:

(a)信号肽;

(b)抗原结合结构域,其包含:

(i)包含SEQ ID NO:10的重可变(VH)区;和

(ii)包含SEQ ID NO:5的轻可变(VL)区;

(c)长度为8至300个氨基酸的铰链区;

(d)跨膜结构域;和

(e)胞内信号传导结构域。

80.权利要求79所述的方法,其中所述跨膜结构域是T细胞受体的α或β链或者来自CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD123、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。

81.权利要求79或80所述的方法,其中所述跨膜结构域是CD28跨膜结构域。

82.权利要求81所述的方法,其中所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:17。

83.权利要求79至82中任一项所述的方法,其中所述胞内信号传导结构域包含初级信号传导结构域。

84.权利要求83所述的方法,其中所述初级信号传导结构域是CD3ζ信号传导结构域。

85.权利要求84所述的方法,其中所述初级信号传导结构域包含SEQ ID NO:19。

86.权利要求83至85中任一项所述的方法,其中所述胞内信号传导结构域还包含共刺激结构域。

87.权利要求86所述的方法,其中所述共刺激结构域包含来自4-1BB(CD137)、CD28、IL-15Rα、OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)或ICOS(CD278)的信号传导结构域。

88.权利要求87所述的方法,其中所述共刺激结构域包含CD28信号传导结构域。

89.权利要求88所述的方法,其中所述共刺激结构域包含SEQ ID NO:18。

90.权利要求87所述的方法,其中所述共刺激结构域包含4-1BB信号传导结构域。

91.权利要求90所述的方法,其中所述共刺激结构域包含SEQ ID NO:70。

92.权利要求79至91中任一项所述的方法,其中所述VH区和所述VL区由接头隔开。

93.权利要求79至92中任一项所述的方法,其中所述接头的长度为4至40个氨基酸。

94.权利要求93所述的方法,其中所述接头包含$(G_4S)_n$序列,其中n为1、2、3、4、5或6。

95.权利要求93所述的方法,其中所述接头包含$(EAAAK)_n$序列,其中n为1、2、3、4、5或6。

96.权利要求93所述的方法,其中所述接头包含SEQ ID NO:9。

97.权利要求79至96中任一项所述的方法,其中所述铰链区包含SEQ ID NO:14。

98.权利要求97所述的方法,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:1。

99.权利要求79至96中任一项所述的方法,其中所述铰链区包含SEQ ID NO:15。

100.权利要求99所述的方法,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:2。

101.权利要求79至96中任一项所述的方法,其中所述铰链区包含SEQ ID NO:16。

102.权利要求101所述的方法,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:3。

103.权利要求79所述的方法,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:88。

用于治疗癌症的嵌合抗原受体及相关方法和组合物

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2019年9月6日提交的美国临时专利申请No.62/897,062的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 背景

[0004] 本发明是在由国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的基金号CA197633下的政府支持下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

发明领域

[0005] 本发明总体上涉及分子生物学和免疫治疗的领域。

技术背景

[0006] 黑素瘤是一种皮肤癌,并且每年导致超过96,000例新的癌症确诊。免疫检查点阻断(Immune checkpoint blockade,ICB)已被批准作为晚期转移性黑素瘤的一线治疗。尽管ICB取得了临床响应(抗CTLA-4和抗PD-1组合治疗的响应率约为60%),但大部分患者对治疗没有响应,并且一些响应者复发。因此,需要适合于针对ICB无响应或难治的黑素瘤患者的治疗。

[0007] 酪氨酸酶相关蛋白-1(Tyrosinase-related protein-1,TYRP-1)是在黑素细胞和黑素瘤细胞中特异性表达的跨膜糖蛋白。TYRP-1在黑素瘤肿瘤中广泛表达,并且其高水平表达与不利结局相关。本文认识到需要用于有效靶向TYRP-1以治疗黑素瘤的组合物和方法。

[0008] 本公开内容概述

[0009] 本公开内容满足了本领域对靶向TYRP-1用于治疗癌症的治疗性受体(包括嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR))的需要。因此,本公开内容的某些方面涉及治疗黑素瘤。另一些实施方案涉及靶向TYRP-1的抗原结合结构域,其包含与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:10具有至少90%序列同一性的序列。提供了涉及作为结合TYRP-1的治疗性受体的多肽的组合物和方法,作为用于治疗癌症(例如黑素瘤)的解决方法。一些实施方案包括TYRP-1靶向多肽、编码TYRP-1靶向多肽的核酸、包含编码TYRP-1靶向多肽的核酸的载体、包含编码TYRP-1靶向多肽的核酸或载体的细胞、在其表面上表达TYRP-1靶向多肽的细胞、包含TYRP-1靶向多肽的药物组合物、包含表达TYRP-1靶向多肽的细胞的药物组合物、制备TYRP-1靶向多肽的方法、制备表达TYRP-1靶向多肽的T细胞的方法、用包含TYRP-1靶向多肽的组合物治疗对象的方法、包含TYRP-1靶向多肽的细胞群以及包含TYRP-1靶向抗原结合结构域的多肽。特别考虑到这些要素中的一个或更多个可以从本公开内容的某些实施方案中排除。

[0010] 在一些实施方案中,本文讨论的CAR分子具有CAR分子的三个主要区域,其是:与一个或更多个靶标分子结合的胞外结构域,包含初级胞内信号传导结构域的胞质区以及在胞外结构域和胞质结构域之间的跨膜区域。一些CAR分子具有在胞外结构域和跨膜结构域之

间的间隔区。此外，一个或更多个接头可以在一个或更多个区域之间或之内包含在CAR分子中，例如在胞外结构域内的不同结合区之间或在结合区之内，例如在轻链(VH)的可变区和重链(VL)的可变区之间。一个或更多个标签可以包含在本公开内容的CAR分子中。标签可以在一个或更多个区域之间或之内。例如，CAR分子可以包含VH区和VL区之间的标签。在另一个实例中，CAR分子可以包含两个不同抗原结合区之间的标签。在另一个实例中，CAR分子可以在分子的N末端包含标签。关于特定区域的任何实施方案均可以相对于本文公开的任何其他特定区域来实施。可以与任何其他特定区域一起实施的区域的一些实例包括但不限于以下：胞外结构域、TYRP-1靶向结构域、与SEQ ID NO:10具有至少90％序列同一性的VH结构域、包含SEQ ID NO:10的Vh结构域、与SEQ ID NO:5具有至少90％序列同一性的VL结构域、包含SEQ ID NO:5的VL结构域、接头、铰链、胞外间隔区、跨膜结构域、胞质结构域、胞内信号传导结构域、初级胞内信号传导结构域、共刺激结构域、标签、检测肽和前导肽。这些区域中的一个或更多个可以从本公开内容的某些实施方案中排除。根据其功能，这些区域中的任何一个都可以在另一区域的N-末端侧或C-末端侧紧邻，但是还考虑了在连续区域之间存在插入氨基酸，其长度为至少或至多

[0011] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,或99

[0012] 个氨基酸(或其中可推导出的任何范围)。

[0013] 其他方面涉及嵌合多肽，其包含(a)抗原结合结构域，所述抗原结合结构域包含(i)重可变(VH)区；和(ii)轻可变(VL)区；跨膜结构域和胞内信号传导结构域。在一些实施方案中，VH区与SEQ ID NO:10具有至少90％的序列同一性。在一些实施方案中，VH区包含SEQ ID NO:11(HCDR1)、SEQ ID NO:12(HCDR2)和SEQ ID NO:13(HCDR3)。在一些实施方案中，VL区与SEQ ID NO:5具有至少90％的序列同一性。在一些实施方案中，VL区包含SEQ ID NO:6(LCDR1)、SEQ ID NO:7(LCDR2)和SEQ ID NO:8(LCDR3)。

[0014] 本公开内容的方法方面涉及本公开内容的CAR分子、组合物和细胞用于治疗癌症的用途。在一些实施方案中，癌症是皮肤癌。在一些实施方案中，癌症包括TYRP-1+癌症，其中TYRP-1+癌症是包含TYRP-1+细胞的癌症或在肿瘤细胞群中包含至少0.5％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％或90％(或其中可推导出的任何范围)的TYRP-1+癌细胞的癌症。在一些实施方案中，癌症包括黑素瘤。本公开内容的CAR多肽可以具有包含这样的氨基酸序列或由这样的氨基酸序列组成的区域、结构域、接头、间隔区或其其他部分：所述氨基酸序列与本文所述的氨基酸序列的全部或一部分具有至少、至多或恰好50％、51％、52％、53％、54％、55％、56％、57％、58％、59％、60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性(或其中可推导出的任何范围)。在某些实施方案中，CAR多肽包含这样的氨基酸序列或由这样的氨基酸序列组成：所述氨基酸序列与SEQ ID NO:1至89中的任一个具有至少、至多或恰好

50％、51％、52％、53％、54％、55％、56％、57％、58％、59％、60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、100％同一性(或其中可推导出的任何范围)。

[0015] 在一些实施方案中,本公开内容的多肽包含VH结构域和VL结构域。在一些实施方案中,VH结构域和VL结构域由接头隔开。在一个实施方案中,可变区的顺序是VH-VL。在另一个实施方案中,可变区的顺序是VL-VH。预期多肽可包含多个接头,例如1、2、3、4、5或更多个接头。接头的长度为、为至少、或为至多

[0016] 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,或99

[0017] 个氨基酸(或其中可推导出的任何范围)。在某些实施方案中,接头长度为4至40个氨基酸。预期接头可隔开本文所述的CAR多肽中的任何结构域/区域。在一些实施方案中,接头仅由甘氨酸和丝氨酸残基构成(甘氨酸-丝氨酸接头)。在一些实施方案中,接头是具有序列GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:9)的接头。

[0018] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH结构域和VL结构域的至少一部分,例如每个的CDR,其中这些结构域存在于单个多肽链中。在一些实施方案中,预期scFv包含重链可变区的CDR1、CDR2和/或CDR3和轻链可变区的CDR1、CDR2和/或CDR3。还预期CDR1、CDR2或CDR3可以分别包含本文作为CDR1、CDR2或CDR3提供的SEQ ID NO中列出的序列或由其组成。CDR还可以包含在特定CDR序列的一侧或两侧侧翼的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个连续氨基酸残基(或其中可推导出的任何范围);因此,特定CDR序列(例如表1至3中所示的那些)的N末端或C末端可以存在一个或更多个另外的氨基酸。

[0019] 还预期scFv可包含多于轻链可变区和/或重链区的CDR。在一些实施方案中,轻链可变区的全部或一部分和/或者重链可变区的全部或一部分包含在作为结合结构域的一部分的scFv中。在一些实施方案中,顺序是VH-VL,而在另一些实施方案中,顺序是VL-VH。此外,本文提供的VH、VL、VH-VL或VL-VH序列可以具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个的添加、缺失和/或替换,特别是如果这样的变化不改变轻链和重链可变区的CDR的话。

[0020] 在一些实施方案中,本公开内容的CAR分子包含胞外结构域和胞质区(也称为胞内结构域)之间的跨膜结构域。实施方案包括作为以下的跨膜结构域:T细胞受体的α或β链、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD123、CD134、CD137或CD154跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域是CD28跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:17。

[0021] 在一些实施方案中,本公开内容的CAR分子具有介导内部细胞信号传导的胞质区。在一些实施方案中,这是通过来自CD3ζ(zeta)(其充当初级或主要胞内)的信号传导结构域实现的。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域包含含有SEQ ID NO:19的初级信号传导结构域。在另一些实施方案中,胞质区包含1、2或3个共刺激结构域。在一些实施方案中,胞质区包含两个共刺激结构域。在某些实施方案中,共刺激结构域来自4-1BB(CD137)、CD28、IL-15Rα、OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)或ICOS(CD278),但是也可以包

括其他共刺激结构域。在某些实施方案中，共刺激结构域是4-1BB共刺激结构域。在一些实施方案中，共刺激结构域包含SEQ ID NO:70。在一些实施方案中，共刺激结构域是CD28共刺激结构域。在一些实施方案中，共刺激结构域包含SEQ ID NO:18。

[0022] 在某些实施方案中，贯穿本公开内容描述的多肽是分离的，意味着其不存在于细胞环境中。在一些情况下，它们是纯化的，这意味着其在很大程度上(如果没有完全的话)与具有不同氨基酸序列和/或化学式的多肽分离。

[0023] 在一些实施方案中提供了核酸，其包含编码本文公开的嵌合抗原受体及其一部分的序列。核酸可包含RNA或DNA。在某些实施方案中，核酸是表达构建体。在一些实施方案中，表达构建体是载体。在某些实施方案中，载体是病毒载体。在一些具体实施方案中，病毒载体是逆转录病毒载体或来源于逆转录病毒。在一些实施方案中，逆转录病毒载体包含慢病毒载体或来源于慢病毒。注意，在某些实施方案中，病毒载体是整合核酸。另外，核酸可以是参与基因编辑的分子，使得编码CAR的核酸(例如DNA、RNA)用于将CAR编码序列并入基因组(例如TRAC基因座)的特定基因座中。在一些实施方案中，这涉及基因编辑系统，例如CRISPR/Cas9。核酸、多核苷酸或多核苷酸区域(或者多肽或多肽区域)相对于另一序列具有一定百分比(例如60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、98％或99％或其中可推导出的任何范围)的“序列同一性”或“同源性”，意味着在比对时，比较两个序列时该百分比的碱基(或氨基酸)是相同的。可以使用本领域已知的软件程序确定该比对和百分比同源性或序列同一性，例如在Ausubelet al eds.(2007)Current Protocols in Molecular Biology中描述的那些。预期核酸可以与本文提供的任何核酸SEQ ID NO具有这样的序列同一性或同源性。

[0024] 在另一些实施方案中，存在包含编码本文讨论的任何CAR的全部或一部分的核酸的细胞或细胞群。在某些实施方案中，细胞或细胞群在其基因组中包含编码本文所述的任何CAR多肽的序列。这包括但不限于已整合到细胞基因组中的慢病毒或逆转录病毒。在一些实施方案中，细胞或细胞群表达本文讨论的任何CAR的全部或一部分，包括但不限于具有SEQ ID NO:1至89中任一个的氨基酸序列的那些。其中引入了编码CAR多肽的核酸的细胞后代(F1、F2及以后)包括在本文公开的细胞或细胞群中。在一些实施方案中，细胞或细胞群是T细胞、自然杀伤(natural killer,NK)细胞、自然杀伤T细胞(natural killer T,NKT)、恒定自然杀伤T细胞(invariant natural killer T,iNKT)、干细胞、淋巴样祖细胞、外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)、外周血干细胞(peripheral blood stem cell,PBSC)、骨髓细胞、胎儿肝细胞、胚胎干细胞、脐带血细胞、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPS细胞)。一些具体实施方案涉及作为T细胞或NK细胞的细胞。在一些实施方案中，T细胞包括初始记忆T细胞(naïvememory T cell)。在一些实施方案中，初始记忆T细胞包含CD4+或CD8+T细胞。在一些实施方案中，细胞是包含CD4+和CD8+T细胞二者的细胞群。在一些实施方案中，细胞是包含初始记忆T细胞的细胞群，所述初始记忆T细胞包含CD4+和CD8+T细胞。在一些实施方案中，T细胞包含来自CD14耗竭、CD25耗竭和/或CD62L富集的PBMC的群的T细胞。在涉及细胞群的一些实施方案中，所述群为约、为至少约、或为至多约10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}个细胞(或其中可推导出的任何范围)。在某些实施方案中，存在约10^3至10^8个细胞。在某些实施方案中，细胞对于将接受其的患者而言是自体的。在另一些实施方案中，细胞不是自体的，并且可以是同种异

体的。

[0025] 在一些方面中，本公开内容涉及包含一种或更多种本文所述的多肽的细胞。在一些实施方案中，细胞是免疫细胞。在一些实施方案中，细胞是祖细胞或干细胞。在一些实施方案中，祖细胞或干细胞在体外分化为免疫细胞。在一些实施方案中，细胞是T细胞。在一些实施方案中，细胞是CD4+或CD8+T细胞。在一些实施方案中，细胞是自然杀伤细胞。在一些实施方案中，细胞是离体的。术语“免疫细胞”包括免疫系统的细胞，其参与机体针对感染性疾病和外来物质二者的防御。免疫细胞可包括例如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、自然杀伤细胞、淋巴细胞如B细胞和T细胞、和单核细胞。T细胞可包括，例如CD4+、CD8+、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、γδT细胞、调节性T细胞、抑制性T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th17细胞和自然杀伤T细胞。在一个具体实施方案中，T细胞是调节性T细胞。

[0026] 作为一个实施方案，还包括包含细胞群的组合物，其中所述组合物是可药用制剂。

[0027] 还提供了制备和使用嵌合抗原受体、编码这样的CAR的核酸以及包含这些CAR的细胞和组合物的方法。方法包括用于以下的方法：制备表达CAR的细胞，治疗患有癌症的患者，治疗患有黑素瘤的患者，开发表达CAR的T细胞或NK细胞，表达TYRP-1靶向CAR分子。

[0028] 方法的步骤包括以下步骤中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个：克隆TYRP-1特异性CAR的区域；将编码TYRP-1特异性CAR的核酸引入到细胞中；编辑细胞基因组以表达TYRP-1特异性CAR；用编码TYRP-1特异性CAR的病毒载体感染细胞；将指导RNA(gRNA)和/或模板引入到细胞中以编辑基因组以表达TYRP-1特异性CAR；培养细胞或细胞群；扩增细胞或细胞群；将细胞或细胞群分化为具有一种或更多种T细胞或NK细胞特性的细胞；用无血清培养基培养细胞；在产生T细胞或NK细胞的条件下培养细胞；纯化表达TYRP-1特异性CAR的细胞；向患者施用表达TYRP-1特异性CAR的细胞；从患者获得细胞；从患者分离细胞；选择表达TYRP-1特异性CAR的细胞；使用可分类标签分离细胞；检测与TYRP-1特异性CAR相关的标签；测量与TYRP-1特异性CAR相关的标签；或者除了施用表达TYRP-1特异性CAR分子的细胞之外，还向患者施用其他癌症治疗。

[0029] 在某些实施方案中，存在制备表达嵌合抗原受体的细胞的方法，其包括将编码本文讨论的CAR分子之一的核酸或允许细胞基因组的基因编辑以表达本文讨论的CAR分子之一的核酸引入到细胞中。在某些实施方案中，用编码CAR的慢病毒转导细胞。在一些实施方案中，用编码CAR的逆转录病毒转导细胞。在一些实施方案中，细胞是T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T细胞(NKT)、恒定自然杀伤T细胞(iNKT)、干细胞、淋巴样祖细胞、外周血单个核细胞(PBMC)、外周血干细胞(PBSC)、骨髓细胞、胎儿肝细胞、胚胎干细胞、脐带血细胞、诱导多能干细胞(iPS细胞)。在细胞还不是T细胞或NK细胞的情况下，方法还可以包括在促进细胞分化为T细胞或NK细胞的条件下培养细胞。在另一些实施方案中，方法包括在将核酸引入到细胞中之前和/或之后在使细胞扩增的条件下培养细胞。在一些实施方案中，用无血清培养基培养细胞。

[0030] 关于治疗患有癌症的患者的另外方法包括向患者施用有效量的包含表达TYRP-1靶向CAR的细胞群的组合物。在一些实施方案中，患者患有皮肤癌。在一些具体实施方案中，患者患有黑素瘤。在另外的一些实施方案中，患者患有复发的黑素瘤。另外的一些实施方案包括向患者施用另外的治疗的步骤。另外的一些实施方案包括向患者施用化学治疗和/或放射的步骤。在一些实施方案中，另外的治疗包括免疫治疗。在一些实施方案中，另外的治

疗包括本文所述的另外的治疗。在一些实施方案中，免疫治疗包括免疫检查点抑制剂治疗。在一些实施方案中，免疫治疗包括本文所述的免疫治疗。在一些实施方案中，免疫检查点抑制剂治疗包含PD-1抑制剂和/或CTLA-4抑制剂。在一些实施方案中，免疫检查点抑制剂治疗包含本文所述的一种或更多种免疫检查点蛋白的一种或更多种抑制剂。

[0031] 在一些实施方案中，本文公开了嵌合多肽，其包含(a)抗原结合结构域，所述抗原结合结构域包含(i)与SEQ ID NO:10具有至少90％序列同一性的重可变(VH)区和(ii)与SEQ ID NO:5具有至少90％序列同一性的轻可变(VL)区，(b)跨膜结构域，和(c)胞内结构域。在一些实施方案中，VH区包含SEQ ID NO:10。在一些实施方案中，VL区包含SEQ ID NO:5。在一些实施方案中，嵌合多肽还包含信号肽。在一些实施方案中，嵌合多肽还包含铰链区。在一些实施方案中，VH区和VL区由接头隔开，例如长度为4至40个氨基酸的接头。在一些实施方案中，接头包含SEQ ID NO:9。在一些实施方案中，接头包含SEQ ID NO:89。在一些实施方案中，跨膜结构域是T细胞受体的α或β链或者来自CD28、CD3ε(epsilon)、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD123、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。在一些实施方案中，跨膜结构域包含SEQ ID NO:17。在一些实施方案中，胞内信号传导结构域包含CD3ζ(zeta)信号传导结构域。在一些实施方案中，胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:19。在一些实施方案中，胞内信号传导结构域包含来自细胞因子受体的信号传导结构域。在一些实施方案中，胞内信号传导结构域包含来自4-1BB(CD137)、CD28、IL-15Rα、OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)或ICOS(CD278)的信号传导结构域。在一些实施方案中，胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:18。在一些实施方案中，胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:70。在一些实施方案中，抗原结合结构域和跨膜结构域由铰链区隔开。在一些实施方案中，铰链区包含IgG4铰链、CD8α铰链、IgG1铰链或CD34铰链。在一些实施方案中，铰链区包含SEQ ID NO:14。在一些实施方案中，铰链区包含SEQ ID NO:15。在一些实施方案中，铰链区包含SEQ ID NO:16。

[0032] 在一些方面中，本文公开了嵌合多肽，其包含(a)信号肽，(b)抗原结合结构域，所述抗原结合结构域包含(i)包含SEQ ID NO:10的重可变区和(ii)包含SEQ ID NO:5的轻可变区；(c)长度为8至300个氨基酸的铰链区；(d)跨膜结构域；和(e)胞内结构域。在一些实施方案中，跨膜结构域是CD28跨膜结构域。在一些实施方案中，胞内信号传导结构域包含CD28信号传导结构域和CD3ζ(zeta)信号传导结构域。在一些实施方案中，VH区和VL区由接头隔开。在一些实施方案中，接头包含SEQ ID NO:9。在一些实施方案中，铰链区包含SEQ ID NO:14。在一些实施方案中，铰链区包含SEQ ID NO:15。在一些实施方案中，铰链区包含SEQ ID NO:16。在一些实施方案中，嵌合多肽包含SEQ ID NO:1。在一些实施方案中，嵌合多肽包含SEQ ID NO:2。在一些实施方案中，嵌合多肽包含SEQ ID NO:3。在一些实施方案中，嵌合多肽包含SEQ ID NO:88。在一些实施方案中，抗原结合结构域与TYRP-1蛋白特异性结合。

[0033] 在一些实施方案中，本文公开了编码本文所述的任何嵌合多肽(例如，CAR)的核酸。在一些实施方案中，核酸是表达构建体。在一些实施方案中，表达构建体是质粒。在一些实施方案中，表达构建体是病毒载体。在一些实施方案中，病毒载体是来源于逆转录病毒的载体或来源于慢病毒的载体。在一些方面，本文公开了包含本文所述的任何核酸的细胞。在一些实施方案中，核酸被整合到细胞的基因组中。在一些方面中，本文公开了包含本文所述的任何嵌合多肽(例如，CAR)的细胞。

[0034] 在一些实施方案中，细胞是免疫细胞。在一些实施方案中，细胞是T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T细胞(NKT)、恒定自然杀伤T细胞(iNKT)、干细胞、淋巴样祖细胞、外周血单个核细胞(PBMC)、外周血干细胞(PBSC)、骨髓细胞、胎儿肝细胞、胚胎干细胞、脐带血细胞或诱导多能干细胞(iPS细胞)。在一些实施方案中，细胞是记忆T细胞。在一些实施方案中，本文公开了包含本文公开的细胞的细胞群。另一些实施方案涉及包含细胞群的药物组合物。

[0035] 在一些实施方案中，本公开内容提供了用于治疗患有癌症的对象的方法，其包括向对象施用有效量的细胞群或药物组合物，所述细胞群或药物组合物包含嵌合多肽或编码嵌合多肽的核酸。

[0036] 一种或更多种序列或组合物的用途可以基于本文所述的任何方法使用。在整个本申请中讨论了另一些实施方案。关于本公开内容的一个方面讨论的任何实施方案也适用于本公开内容的其他方面，并且反之亦然。例如，本文所述的方法中的任何步骤都可以应用于任何其他方法。此外，本文所述的任何方法可以排除任何步骤或步骤的组合。实施例部分中的实施方案应理解为是适用于本文所述技术的所有方面的实施方案。

[0037] 通过以下详细描述，本发明的其他目的、特征和优点将变得明显。然而，应该理解，尽管详细描述和具体实例指示了本发明的一些优选实施方案，但是它们仅以示例的方式给出，因为根据该详细描述，本发明的精神和范围内的多种改变和修改对本领域技术人员将变得明显。

[0038] 附图简述

[0039] 以下附图构成了本说明书的一部分，并且被包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过结合本文给出的具体实施方案的详细描述来参考这些附图中的一幅或更多幅，可以更好地理解本发明。

[0040] 图1A和1B示出了表达所示CAR构建体的T细胞对具有TYRP-1的高表达的人黑素瘤细胞系(图1A)和具有TYRP-1的低表达的人黑素瘤细胞系(图1B)的体外细胞毒性。

[0041] 图2示出了表达所示CAR构建体的人PBMC在与具有TYRP-1的高表达(上图)、TYRP-1的低表达(左下图)或TYRP-1的阴性表达(右下图)的人黑素瘤细胞系共培养时的体外细胞因子分泌。

[0042] 图3A和3B示出了表达所示CAR构建体的小鼠CD3+T细胞对鼠黑素瘤细胞系B16-F10的体外细胞毒性(图3A)和细胞因子分泌(图3B)。

[0043] 图4示出了表达20D7SS、20D7SM或20D7SL CAR构建体的T细胞在荷B16-F10黑素瘤肿瘤的C57/B6免疫活性小鼠中的体内抗肿瘤活性。

[0044] 图5示出了不同剂量的表达20D7SL CAR构建体的鼠T细胞在荷B16-F10黑素瘤肿瘤的C56/B6免疫活性小鼠中的体内抗肿瘤活性。

[0045] 图6示出了单独的或与标准IL-2处理组合的用表达20D7SL CAR之鼠T细胞进行的处理在荷B16-F10黑素瘤肿瘤的C57/B6免疫活性小鼠中的体内抗肿瘤活性。

[0046] 图7A和7B示出了表达20D7SL CAR的人T细胞在免疫缺陷小鼠模型中在患者来源的黑素瘤模型中的体内抗肿瘤活性。

[0047] 图8A至8C示出了表达20D7SL CAR的T细胞在具有TYRP-1的阴性表达的一组人非黑素瘤细胞系中随时间的体外细胞毒性。

[0048] 图9A和9B显示了在与TYRP-1敲除细胞系共培养时体外细胞因子分泌和细胞毒性的丧失。

[0049] 图10A和10B示出了表达包含不同共刺激结构域的CAR的T细胞的体外抗肿瘤活性。

[0050] 图11A和11B示出了表达包含不同的共刺激信号传导结构域的CAR的T细胞在免疫缺陷小鼠模型中在患者来源的黑素瘤模型中的体内抗肿瘤活性。

[0051] 图12A至12C示出了结合TCGA数据集、BMS-CA029和MK3475-001临床试验数据集的所有患者中的TYRP-1表达。

[0052] 举例说明性实施方案的描述

[0053] 本文公开了能够靶向TYRP-1的用于治疗癌症的治疗性受体，包括嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中，本公开内容的CAR用于治疗黑素瘤。使用模块化DNA组装和高通量表征方法，发明人开发了响应于TYRP-1具有不同靶向效率的一组CAR，从而允许选择实现治疗效力同时避免对健康组织的潜在毒性的理想构建体。本公开内容的一些实施方案涉及命名为20D7SS(SEQ ID NO:1)、20D7SM(SEQ ID NO:2)和20D7SL(SEQ ID NO:3)的CAR，其不同之处在于铰链区长度。TYRP-1靶向的CAR能够有效靶向多种患者来源的黑素瘤细胞系，并根据靶细胞表面上TYRP-1的表达水平而具有不同程度的靶向效力。TYRP-1 CAR对TYRP-1具有选择性，并且在具有TYRP-1的阴性表达的细胞中不显示出细胞毒性或细胞因子释放。TYRP-1靶向的CAR还能够在有和没有IL-2的免疫活性小鼠中以及在免疫受损小鼠的不同患者来源的黑素瘤模型中控制已建立的黑素瘤。另外，具有不同胞内信号传导结构域的TYRP-1 CAR在体外和体内具有相似的抗肿瘤活性。

[0054] I.定义

[0055] 本公开内容的肽涉及包含嵌合抗原受体或CAR的肽。CAR是工程化受体，其能够将任意特异性植入到免疫效应细胞上。在一些情况下，这些受体用于将单克隆抗体的特异性植入到T细胞上。受体被称为嵌合的，因为其由来自不同来源的部分构成。

[0056] 当涉及基因产物时，术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文可互换使用。

[0057] “同源性”或“同一性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。可以通过比较每个序列中的位置来确定同一性，所述序列可出于比较目的而对齐。当比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时，则分子在该位置共有序列同一性。序列之间的同一性程度是序列共有的匹配或同源位置数目的函数。“无关”或“非同源”序列与本公开内容的序列之一共有小于60％的同一性，小于50％的同一性，小于40％的同一性，小于30％的同一性或小于25％的同一性。

[0058] 如本文所用，术语“氨基部分”、“N末端”、“氨基末端”等用于指多肽区域的顺序。此外，当某物在区域的N末端时，其不一定在整个多肽的末端(或端部)，而仅在该区域或结构域的N末端。类似地，本文所用的术语“羧基部分”、“C末端”、“羧基末端”等用于指多肽区域的顺序，并且当某物在区域的C末端时，其不一定在整个多肽的末端(或端部)，而是仅在该区域或结构域的C末端。

[0059] 术语“多核苷酸”、“核酸”和“寡核苷酸”可互换使用，并且是指任何长度的核苷酸的聚合形式，即脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构，并且可以执行任何已知或未知的功能。以下是多核苷酸的非限制性实例：基因或基因片段(例如探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体

RNA、核酶、cDNA、dsRNA、siRNA、miRNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包含经修饰的核苷酸，例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在的话，可以在多核苷酸组装之前或之后赋予核苷酸结构修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可在聚合之后进一步修饰，例如通过与标记组分缀合。该术语也指双链和单链分子二者。除非另有说明或要求，否则本发明的作为多核苷酸的任何实施方案既涵盖双链形式，也涵盖已知或预测构成双链形式的两个互补单链形式中的每一个。

[0060] “编码”特定蛋白质的“基因”、“多核苷酸”、“编码区”、“序列”、“区段”、“片段”或“转基因”是当在适当调节序列的控制下时在体外或体内被转录并任选地还翻译成基因产物(例如多肽)的核酸分子。编码区可以以cDNA、基因组DNA或RNA形式存在。当以DNA形式存在时，核酸分子可以是单链(即有义链)或双链。编码区的边界由5′(氨基)端的起始密码子和3′(羧基)端的翻译终止密码子确定。基因可以包括但不限于来自原核或真核mRNA的cDNA，来自原核或真核DNA的基因组DNA序列，和合成DNA序列。转录终止序列通常位于基因序列的3′。

[0061] 术语“抗体”包括单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体和抗体片段，其可以是人的、小鼠的、人源化的、嵌合的或来源于其他物种。“单克隆抗体”是从针对特定抗原位点的基本上均质的抗体群中获得的抗体。

[0062] “抗体或其功能片段”意指与特定抗原或表位特异性结合或者与其进行免疫反应的免疫球蛋白分子，并且包括多克隆抗体和单克隆抗体二者。术语抗体包括免疫球蛋白的经遗传改造或以其他方式修饰的形式，例如胞内抗体(intrabody)、肽抗体(peptibody)、嵌合抗体、完全人抗体、人源化抗体和杂缀合抗体(heteroconjugate antibody)(例如双特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体)。术语功能性抗体片段包括抗体的抗原结合片段，包括例如Fab′、F(ab′)2、Fab、Fv、rlgG和scFv片段。术语scFv是指单链Fv抗体，其中传统双链抗体的重链和轻链的可变结构域已连接形成一条链。

[0063] 如本文所用，术语“结合亲和力”是指两种试剂的可逆结合的平衡常数，并表示为解离常数(Kd)。结合亲和力可以比抗体对不相关氨基酸序列的结合亲和力大至少25％、大至少50％、大至少75％、大至少1倍、大至少2倍、大至少3倍、大至少4倍、大至少5倍、大至少6倍、大至少7倍、大至少8倍、大至少9倍、大至少10倍、大至少20倍、大至少30倍、大至少40倍、大至少50倍、大至少60倍、大至少70倍、大至少80倍、大至少90倍、大至少100倍、或者大至少1000倍或更多(或其中可推导出的任何范围)。如本文所用，术语“亲合力”是指两种或更多种试剂的复合物在稀释后对解离的抗性。术语“免疫反应性”和“优先结合”在本文中关于抗体和/或抗原结合片段可互换使用。

[0064] 术语“结合”是指由于例如共价的、静电的、疏水的和离子的和/或氢键的相互作用，包括例如盐桥和水桥的相互作用，在两个分子之间的直接缔合。

[0065] “个体”、“对象”和“患者”可互换使用并且可以指人或非人。

[0066] 术语“降低/减少(lower)”、“降低的/减少的(reduced)”、“降低/减少(reduction)”、“减少/降低(decrease)”或“抑制”在本文中均一般用于意指统计学上显著量的减少。然而，为了避免疑问，“降低/减少”、“降低的/减少的”、“降低/减少”、“减少/降低”或“抑制”意指与参照水平相比至少10％的减少/降低，例如与参照水平相比至少约

20％、或至少约30％、或至少约40％、或至少约50％、或至少约60％、或至少约70％、或至少约80％、或至少约90％或者多至并且包括100％(即，与参照样品相比不存在的水平)的减少/降低、或者10％至100％的任意减少/降低。

[0067] 在整个本申请中，术语“约”用于表明值包括用于确定该值的装置和/或方法的误差的标准差。

[0068] 术语“增加的/提高的(increased)”、“增加/提高(increase)”、“增强(enhance)”或“激活/活化(activate)”在本文中均一般用于意指统计学上显著量的增加；为了避免疑问，术语“增加的/提高的”、“增加/提高”、“增强”或“激活/活化”意指与参照水平相比至少10％的增加/提高，例如与参照水平相比至少约20％、或至少约30％、或至少约40％、或至少约50％、或至少约60％、或至少约70％、或至少约80％、或至少约90％或者多至并且包括100％的增加/提高或者10％至100％的任意增加/提高，或者与参照水平相比，至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍或至少约10倍的增加/提高，或者2倍至10倍或更高的任意增加/提高。

[0069] 本文中使用的术语“包括”或“包含”用于提及对于本发明而言必需的组合物、方法及其相应组分，但对包含未指定的要素而言是开放的，无论其是否必需。

[0070] 本文中使用的术语“基本上由.....组成”是指给定实施方案所需的那些要素。所述术语允许存在不实质上影响本发明的该实施方案的基本和新的或功能性的特征的另外要素。关于药物组合物，术语“基本上由.....组成”包括所列举活性成分，不包括任何其他活性成分，但不排除任何药物赋形剂或非治疗活性的其他组分。

[0071] 术语“由.....组成”是指如本文所述的组合物、方法及其各自的组分，它们不包括在实施方案的描述中未列举的任何要素。

[0072] 预期在术语“包含/包括”的情况下描述的一些实施方案也可在术语“由.....组成”或“基本上由.....组成”的情况下实施。

[0073] 如在本说明书和所附权利要求书中所使用的，未用数量词限定的名词意指“一个/种或更多个/种”，除非上下文另外明确指出。因此，例如，提及“方法”包括一种或更多种方法，和/或本文中所述类型的步骤，和/或其在本领域技术人员阅读本公开内容等之后对他们将变得明显。

[0074] 特别预期了关于本发明一个实施方案所讨论的任何限制均可适用于本发明的任何其他实施方案。此外，本发明的任何组合物可用于本发明的任何方法中，并且可使用本发明的任何方法以产生或利用本发明的任何组合物。在实施例中阐述的实施方案的一些方面也是可在不同实施例中的其他地方或在本申请中的其他地方(例如在发明内容、具体实施方式、权利要求书和附图说明中)讨论的一些实施方案的背景下实施的实施方案。

[0075] 在治疗、诊断或生理目的或作用的背景下的任何方法也可以用“用途”权利要求语言描述，例如本文讨论的任何化合物、组合物或试剂用于实现或实施所述治疗、诊断或生理目的或作用“的用途”。

[0076] II.多肽

[0077] A.信号肽

[0078] 本公开内容的多肽可以包含信号肽。“信号肽”是指引导蛋白质在细胞内转运和定位(例如至某个细胞器(如内质网)和/或细胞表面)的肽序列。在一些实施方案中，信号肽引

导新生蛋白到内质网中。如果受体要被糖基化并锚定在细胞膜中，则这是必不可少的。通常，使用天然连接到最氨基末端组分的信号肽(例如，在具有轻链-接头-重链取向的scFv中，使用轻链的天然信号)。在一些实施方案中，信号肽包含SEQ ID NO:4。

[0079] 在一些实施方案中，信号肽在通过内质网(endoplasmic reticulum，ER)之后被切割，即是可切割的信号肽。在一些实施方案中，限制位点位于信号肽的羧基端以促进切割。

[0080] B.抗原结合结构域

[0081] 本公开内容的多肽可以包含一个或更多个抗原结合结构域。在一些实施方案中，多肽包含TYRP-1结合结构域。在一些实施方案中，多肽包含TYRP-1结合结构域和一个或更多个另外的结合结构域。“抗原结合结构域”描述了在适当条件下能够与抗原结合的多肽区域。在一些实施方案中，抗原结合结构域是基于一种或更多种抗体的单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中，本公开内容的多肽的抗原结合结构域是基于TYRP-1抗体的scFv，例如IMC-20D7S或任何其他TYRP-1抗体。在一些实施方案中，抗原结合结构域包含重可变(VH)区和轻可变(VL)区，其中VH和VL区位于同一多肽上。在一些实施方案中，抗原结合结构域包含VH和VL区之间的接头。接头可以使抗原结合结构域形成用于抗原结合的所期望结构。

[0082] 本公开内容多肽的抗原结合结构域的可变区可以通过使VH和/或VL CDR 1、CDR 2和/或CDR 3区内的氨基酸残基突变来进行修饰，以改善抗体的一种或更多种结合特性(例如亲和力)。术语“CDR”指互补决定区，其基于分别由B细胞和T细胞产生的免疫球蛋白(抗体)和T细胞受体中的可变链的一部分，其中这些分子与其特异性抗原结合。由于与免疫球蛋白和T细胞受体相关的大多数序列变异存在于CDR中，因此有时将这些区域称为高变区。突变可以通过多种技术(例如，定点诱变或PCR介导的诱变)引入，并且对抗体结合或其他感兴趣的功能特性的影响可以在适当的体外或体内测定中进行评价。优选地，引入保守的修饰，并且通常改变CDR区域内不超过1、2、3、4或5个残基。突变可以是氨基酸替换、添加或缺失。

[0083] 可以对抗体进行框架修饰以降低免疫原性，例如，通过将一个或更多个框架残基“回复突变”为相应的种系序列。

[0084] 还预期了通过使抗原结合结构域与结合相同抗原(多价)或不同抗原(多特异性)的VH和VL区对多聚，抗原结合结构域可以是多特异性或多价的。

[0085] 抗原结合区例如可变区(重链和/或轻链可变区)或CDR的结合亲和力可以为至少10^{-5}M、10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M、10^{-12}M或10^{-13}M。在一些实施方案中，抗原结合区例如可变区(重链和/或轻链可变区)或CDR的K_D可以为至少10^{-5}M、10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M、10^{-12}M或10^{-13}M(或其中可推导出的任何范围)。

[0086] 结合亲和力、K_A或K_D可以通过本领域已知的方法来确定，例如通过基于表面等离振子共振(SRP)的生物传感器，通过动力学排斥测定(KinExA)，通过基于偏振调制斜入射反射差(OI-RD)用于微阵列检测的光学扫描仪，或通过ELISA。

[0087] 在一些实施方案中，将TYRP-1-结合区人源化。在一些实施方案中，与包含非人源化的结合区(例如来自小鼠的结合区)的多肽相比，包含人源化结合区的多肽在宿主细胞中具有相等、更好或至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、100％、101％、102％、103％、104％、104％、106％、106％、108％、109％、110％、115％或120％(或其中可推导出的任何范围)的

结合亲和力和/或表达水平。

[0088] 在一些实施方案中，相对于小鼠框架，人框架的框架区(例如FR1、FR2、FR3和/或FR4)可以各自或共同具有至少、至多或恰好

[0089] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,1o1,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,或200

[0090] 个(或其中可推导出的任何范围)氨基酸替换、连续氨基酸添加或连续氨基酸缺失。

[0091] 在一些实施方案中，相对于人框架，小鼠框架的框架区(例如FR1、FR2、FR3和/或FR4)可以各自或共同具有至少、至多或恰好

[0092] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,或200

[0093] 个(或其中可推导出的任何范围)氨基酸替换、连续氨基酸添加或连续氨基酸缺失。

[0094] 替换可以在重链或轻链可变区的FR1、FR2、FR3或FR4的第

[0095] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100位。

[0096] C.胞外间隔区

[0097] 胞外间隔区可以将抗原结合结构域连接至跨膜结构域。在一些实施方案中，铰链具有足够的柔性以允许抗原结合结构域以不同方向取向以促进抗原结合。在一个实施方案中，间隔区是来自IgG的铰链区。替代方案包括免疫球蛋白的CH2CH3区和CD3的一部分。在一些实施方案中，CH2CH3区可具有L235E/N297Q或L235D/N297Q修饰，或与CH2CH3区具有至少

75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,间隔区来自IgG4。胞外间隔区可以包含铰链区。

[0098] 如本文所用,术语“铰链”是指提供结构柔性和分隔侧翼多肽区域的柔性多肽连接区(本文也称为“铰链区”),并且可以由天然或合成多肽组成。来源于免疫球蛋白(例如,IgG1)的“铰链”通常被定义为从人IgG1的Glu216延伸至Pro230(Burton(1985)Molec.Immunol.,22:161-206)。通过将形成重链间二硫键(S-S)的第一个和最后一个半胱氨酸残基置于相同位置,可以将其他IgG同种型的铰链区与IgG1序列进行比对。铰链区可以是天然存在的或非天然存在的,包括但不限于如美国专利No.5,677,425(通过引用并入本文)中描述的改变的铰链区。铰链区可包含来源于与CH1结构域的抗体不同类别或亚类的抗体的完整铰链区。术语“铰链”还可以包含来源于CD8以及在提供柔性和分隔侧翼区域方面提供类似功能的其他受体。

[0099] 胞外间隔区的长度可以为至少、至多或恰好

[0100] 4,5,6,7,8,9,10,12,15,16,17,18,19,20,20,25,30,35,40,45,50,75,100,110,119,120,130,140,150,160,170,180,190,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,260,270,280,290,300,325,350,或400

[0101] 个氨基酸(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,胞外间隔区由来自免疫球蛋白(例如IgG)的铰链区组成或包含来自免疫球蛋白(例如IgG)的铰链区。免疫球蛋白铰链区氨基酸序列是本领域已知的;参见例如Tan et al.(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:162;和Huck et al.(1986)Nucl.Acids Res。

[0102] 胞外间隔区的长度可影响CAR的信号传导活性和/或响应于抗原刺激的CAR信号传导的CAR-T细胞的扩增特性。在一些实施方案中,使用了较短的间隔区,例如少于50、45、40、30、35、30、25、20、15、14、13、12、11或10个氨基酸。在一些实施方案中,较长的间隔区,例如至少50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、260、270、280或290个氨基酸的那些可具有提高体内或体外扩增的优势。

[0103] 作为非限制性实例,免疫球蛋白铰链区可以包括以下氨基酸序列之一:DKTHT(SEQ ID NO:20);CPPC(SEQ ID NO:21);CPEPKSCDTPPPCPR(SEQ ID NO:22);ELKTPLGDTTHT(SEQ ID NO:23);KSCDKTHTCP(SEQ ID NO:24);KCCVDCP(SEQ ID NO:25);KYGPPCP(SEQ ID NO:26);EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:27-人IgG1铰链);ERKCCVECPPCP(SEQ ID NO:28-人IgG2铰链);ELKTPLGDTTHTCPRCP(SEQ ID NO:29-人IgG3铰链);SPNMVPHAHHAQ(SEQ ID NO:30);ESKYGPPCPPCP(SEQ ID NO:14)或ESKYGPPCPSCP(SEQ ID NO:32)(基于人IgG4铰链的)等。在一些实施方案中,铰链区包含SEQ ID NO:15。在一些实施方案中,铰链区包含SEQ ID NO:16。

[0104] 胞外间隔区可包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4、铰链区的氨基酸序列。与野生型(天然存在的)铰链区相比,胞外间隔区还可包含一个或更多个氨基酸替换和/或插入和/或缺失。例如,人IgG1铰链的His229可以被Tyr替换,从而铰链区包含序列EPKSCDKTYTCPPCP(SEQ

ID NO:33)。

[0105] 胞外间隔区可包含来源于人CD8的氨基酸序列;例如,铰链区可包含氨基酸序列:TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(SEQ ID NO:34),或其变体。

[0106] 胞外间隔区可包含或进一步包含CH2区。示例性的CH2区是

[0107] APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK (SEQ ID NO:35).

[0108] 胞外间隔区可包含或进一步包含CH3区。示例性的CH3区是

[0109] GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:36).

[0110] 当胞外间隔区包含多个部分时,在多个部分之间任何地方可能存在0至50个氨基酸。例如,在铰链和CH2或CH3区之间或在CH2和CH3区之间(当两者都存在时),可具有至少、至多或恰好0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45或50个氨基酸(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,胞外间隔区基本上由铰链、CH2和/或CH3区组成,这意味着铰链、CH2和/或CH3区是存在的仅有的可鉴别区域,并且排除了所有其他结构域或区域,但是还可能存在不是可鉴别区域一部分的氨基酸。

[0111] D.跨膜结构域

[0112] 本公开内容的多肽可以包含跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域是跨越膜的疏水性α螺旋。不同的跨膜结构域可能导致不同的受体稳定性。

[0113] 在一些实施方案中,跨膜结构域插入在胞外间隔区和胞质区之间。在一些实施方案中,跨膜结构域插入在胞外间隔区和一个或更多个共刺激区之间。在一些实施方案中,接头位于跨膜结构域和一个或更多个共刺激区之间。

[0114] 提供将多肽插入真核(例如哺乳动物)细胞的细胞膜中的任何跨膜结构域都可以适合于使用。作为一个非限制性实例,可以使用CD28来源的跨膜序列FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV(SEQ ID NO:17)。在一些实施方案中,跨膜结构域是CD8β来源的:LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC(SEQ ID NO:37);CD4来源的:ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC(SEQ ID NO:38);CD3ζ来源的:LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV(SEQ ID NO:39);CD28来源的:WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV(SEQ ID NO:40);CD134(OX40)来源的:VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL(SEQ ID NO:41);或CD7来源的:ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA(SEQ ID NO:42)。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于CD28、CD8、CD4、CD3-ζ、CD134或CD7。

[0115] E.胞质区

[0116] 在抗原识别之后,本公开内容的受体可以聚集并且信号通过胞质区传递到细胞。在一些实施方案中,本文所述的共刺激结构域是胞质区的一部分。在一些实施方案中,胞质区包含胞内信号传导结构域。胞内信号传导结构域可以包含初级信号传导结构域和一个或更多个共刺激结构域。

[0117] 适用于本公开内容的多肽的胞质区和/或共刺激区包括任何所期望的信号传导结构域,其响应于通过抗原与抗原结合结构域结合的激活而提供不同且可检测的信号(例如,

通过细胞一种或更多种细胞因子的产生提高;靶基因转录的变化;蛋白质活性的变化;细胞行为的变化,例如细胞死亡;细胞增殖;细胞分化;细胞存活;细胞信号传导应答的调节等)。在一些实施方案中,胞质区包含至少一个(例如一个、两个、三个、四个、五个、六个等)如本文中所述的ITAM基序。在一些实施方案中,胞质区包含DAP10/CD28型信号传导链。

[0118] 适用于本公开内容的多肽的胞质区包括含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的胞内信号传导多肽。ITAM基序是YX1X2(L/I),其中X1和X2独立地为任何氨基酸。在一些情况下,胞质区包含1、2、3、4或5个ITAM基序。在一些情况下,ITAM基序在胞内结构域中重复两次,其中ITAM基序的第一和第二个实例彼此由6至8个氨基酸隔开,例如(YX1X2(L/I))(X3)n(YX1X2(L/I)),其中n是6至8的整数,并且6至8个X3各自可以是任何氨基酸。

[0119] 合适的胞质区可以是来源于含ITAM基序多肽的含ITAM基序部分。例如,合适的胞质区可以是来自任何含ITAM基序蛋白质的含ITAM基序结构域。因此,合适的胞内结构域无需包含其所来源的整个蛋白质的整个序列。合适的含ITAM基序多肽的实例包括但不限于:DAP12、DAP10、FCER1G(Fcε受体Iγ链);CD3D(CD3δ);CD3E(CD3ε);CD3G(CD3γ);CD3-ζ;和CD79A(抗原受体复合物相关蛋白α链)。

[0120] 在一些情况下,胞质区来源于DAP12(也被称为TYROBP;TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白;KARAP;PLOSL;DN AX-激活蛋白12;KAR相关蛋白;TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白;杀伤激活受体相关蛋白;杀伤激活受体相关蛋白等)。例如,合适的胞内结构域多肽可包含与以下具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0121] MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO:43);

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO:44);

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO:45); 或

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO:46).

[0122] 在一些实施方案中,合适的胞质区可包含全长DAP12氨基酸序列的含ITAM基序部分。因此,合适的胞内结构域多肽可包含与ESPYQELQGQRSDVYSDLNTQ(SEQ ID NO:47)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0123] 在一些实施方案中,胞质区来源于FCER1G(也被称为FCRG;Fcε受体Iγ链;Fc受体γ链;fc-εR1-γ;fcRγ;fceRIγ;高亲和力免疫球蛋白ε受体亚基γ;免疫球蛋白E受体,高亲和力,γ链;等)。例如,合适的胞内结构域多肽可包含与

[0124] MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ (SEQ ID NO:48)

[0125] 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基

酸序列同一性的氨基酸序列。

[0126] 在一些实施方案中，合适的胞质区可包含全长FCER1G氨基酸序列的含ITAM基序部分。因此，合适的胞内结构域多肽可包含与DGVYTGLSTRNQETYETLKHE(SEQ ID NO:49)具有至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％或100％氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0127] 在一些实施方案中，胞质区来源于T细胞表面糖蛋白CD3δ链(也称为CD3D;CD3-δ;T3D;CD3抗原，δ亚基;CD3δ;CD3δ;CD3d抗原，δ多肽(TiT3复合物);OKT3，δ链;T细胞受体T3δ链;T细胞表面糖蛋白CD3δ链;等)。例如，合适的胞内结构域多肽可包含与以下氨基酸序列(2种同种型)中任一种的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110个aa至约115个aa、约115个aa至约120个aa、约120个aa至约130个aa、约130个aa至约140个aa、约140个aa至约150个aa、或约150个aa至约170个aa的连续段(stretch)具有至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％或100％氨基酸序列同一性的氨基酸序列：

[0128] MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLG KRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALG VFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO:50)或

MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLG KRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRTADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHL GGNWARNK (SEQ ID NO:51).

[0129] 在一些实施方案中，合适的胞质区可包含全长CD3δ氨基酸序列的含ITAM基序部分。因此，合适的胞内结构域多肽可包含与DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN(SEQ ID NO:52)具有至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％或100％氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0130] 在一些实施方案中，胞质区来源于T细胞表面糖蛋白CD3ε链(也被称为CD3e、CD3ε;T细胞表面抗原T3/Leu-4ε链、T细胞表面糖蛋白CD3ε链、AI504783、CD3、CD3ε、T3e等)。例如，合适的胞内结构域多肽可包含与以下氨基酸序列的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110个aa至约115个aa、约115个aa至约120个aa、约120个aa至约130个aa、约130个aa至约140个aa、约140个aa至约150个aa、或约150个aa至约205个aa的连续段具有至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％或100％氨基酸序列同一性的氨基酸序列：

[0131] MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILW QHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARV CENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQ NKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI (SEQ ID NO:53).

[0132] 在一些实施方案中，合适的胞质区可包含全长CD3ε氨基酸序列的含ITAM基序部分。因此，合适的胞内结构域多肽可包含与NPDYEPIRKGQRDLYSGLNQR(SEQ ID NO:54)具有至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％或100％氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0133] 在一些实施方案中，胞质区来源于T细胞表面糖蛋白CD3γ链(也被称为CD3G、CD3γ、T细胞受体T3γ链、CD3-γ、T3G、γ多肽(TiT3复合物)等)。例如，合适的胞质区可包含与

以下氨基酸序列的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110个aa至约115个aa、约115个aa至约120个aa、约120个aa至约130个aa、约130个aa至约140个aa、约140个aa至约150个aa、或约150个aa至约180个aa的连续段具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列：

[0134] MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDG KMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATIS GFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQ GNQLRRN (SEQ ID NO:55).

[0135] 在一些实施方案中，合适的胞质区可包含全长CD3γ氨基酸序列的含ITAM基序部分。因此，合适的胞质区可包含与DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN(SEQ ID NO:56)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0136] 在一些实施方案中，胞质区来源于T细胞表面糖蛋白CD3ζ链(也被称为CD3Z、CD3ζ、T细胞受体T3ζ链、CD247、CD3-ζ、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZ等)。例如，合适的胞质区可包含与以下氨基酸序列(2种同种型)中任一种的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110个aa至约115个aa、约115个aa至约120个aa、约120个aa至约130个aa、约130个aa至约140个aa、约140个aa至约150个aa、或约150个aa至约160个aa的连续段具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列：

[0137] MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:57) 或 MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:58).

[0138] 在一些实施方案中，胞质区包含

[0139] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:19).

[0140] 在一些实施方案中，合适的胞质区可包含全长CD3ζ氨基酸序列的含ITAM基序部分。因此，合适的胞质区可包含与以下氨基酸序列中任一种具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列：

[0141] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:19); NQLYNELNLGRREEYDVLDKR (SEQ ID NO:61); EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK (SEQ ID NO:62); 或 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ (SEQ ID NO:63).

[0142] 在一些实施方案中，胞质区来源于CD79A(也被称为B细胞抗原受体复合物相关蛋

白α链;CD79a抗原(免疫球蛋白相关α);MB-1膜糖蛋白;ig-α;膜结合免疫球蛋白相关蛋白;表面IgM相关蛋白;等)。例如,合适的胞质区可包含与以下氨基酸序列(2种同种型)中任一种的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110个aa至约115个aa、约115个aa至约120个aa、约120个aa至约130个aa、约130个aa至约150个aa、约150个aa至约200个aa、或约200个aa至约220个aa的连续段具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0143] MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKSHGGIYVCRVQEGNESYQQSCGTYLRVRQPPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP (SEQ ID NO:64); 或

MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNEPPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP (SEQ ID NO:65).

[0144] 在一些实施方案中,合适的胞质区可包含全长CD79A氨基酸序列的含ITAM基序部分。因此,合适的胞质区可包含与以下氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG(SEQ ID NO:66).

[0145] 在一些实施方案中,合适的胞质区可包含DAP10/CD28型信号传导链。CD28信号传导链的一个实例是氨基酸序列

[0146] FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:67).

[0147] 在一些实施方案中,合适的胞内结构域包含与氨基酸序列

[0148] FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:67)

[0149] 的整个长度具有至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0150] 适用于本公开内容的多肽的其他胞质区包括ZAP70多肽,例如包含与以下氨基酸序列的约300个氨基酸至约400个氨基酸、约400个氨基酸至约500个氨基酸,或约500个氨基酸至619个氨基酸的连续段具有至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的多肽:

MPDPAAHLPFFYGSISRAEAEEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLGGYVLSLVHDVRFHHF
PIERQLNGTYAIAGGKAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLRKPCNRPSGLEPQPGVFDCLR
DAMVRDYVRQTWKLEGEALEQAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKL
YSGAQTDGKFLLRPRKEQGTYALSLIYGKTVYHYLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLV
EYLKLKADGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAHPSTLTHPQRRIDTLNSDGYTPEP

[0151] ARITSPDKPRPMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKLFLKRDNLLIADIELGCGNFGSVRQGV
YRMRKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLV
MEMAGGGPLHKFLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLV
NRHYAKISDFGLSKALGADDSYYTARSAGKWPLKWYAPECINFRKFSSRSDVWSYGVT
MWEALSYGQKPYKKMKGPEVMAFIEQGKRMECPPECPPELYALMSDCWIYKWEDRPD
FLTVEQRMRACYYSLASKVEGPPGSTQKAEAACA (SEQ ID NO:69).

[0152] 1.共刺激区

[0153] 合适的共刺激区(例如包括在胞质区中的那些)的一些非限制性实例包括但不限于来自4-1BB(CD137)、CD28、ICOS、OX-40、BTLA、CD27、CD30、GITR和HVEM的多肽。

[0154] 共刺激区可具有至少、至多、或者正好20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200或300个氨基酸或可从其中推导出的任何范围的长度。在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白4-1BB(也被称为TNFRSF9;CD137;CDw137;ILA;等)的胞内部分。例如,合适的共刺激区可包含与

[0155] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:70)

[0156] 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0157] 在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白CD28(也被称为Tp44)的胞内部分。例如,合适的共刺激区可包含与FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS(SEQ ID NO:71)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0158] 在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白ICOS(也被称为AILIM、CD278和CVID1)的胞内部分。例如,合适的共刺激区可包含与TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL(SEQ ID NO:72)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0159] 在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白OX-40(也被称为TNFRSF4、RP5-902P8.3、ACT35、CD134、OX40、TXGP1L)的胞内部分。例如,合适的共刺激区可包含与RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI(SEQ ID NO:73)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0160] 在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白BTLA(也被称为BTLA1和CD272)的胞内部分。例如,合适的共刺激区可包含与

CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCF

[0161] RMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:74)

[0162] 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基

酸序列同一性的氨基酸序列。

[0163] 在一些实施方案中，共刺激区来源于跨膜蛋白CD27(也被称为S 152、T14、TNFRSF7和Tp55)的胞内部分。例如，合适的共刺激区可包含与HQRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP(SEQ ID NO:75)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0164] 在一些实施方案中，共刺激区来源于跨膜蛋白CD30(也被称为TNFRSF8、D1S166E和Ki-1)的胞内部分。例如，合适的共刺激区可包含与

[0165] RRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESLPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK (SEQ ID NO:76)

[0166] 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0167] 在一些实施方案中，共刺激区来源于跨膜蛋白GITR(也被称为TNFRSF18、RP5-902P8.2、AITR、CD357和GITR-D)的胞内部分。例如，合适的共刺激区可包含与

[0168] HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLWV (SEQ ID NO:77)

[0169] 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0170] 在一些实施方案中，共刺激区来源于跨膜蛋白HVEM(也被称为TNFRSF14、RP3-395M20.6、ATAR、CD270、HVEA、HVEM、LIGHTR和TR2)的胞内部分。例如，合适的共刺激区可包含与

[0171] CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH (SEQ ID NO:78)

[0172] 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0173] 在一些实施方案中，共刺激结构域包含与RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS(SEQ ID NO:18)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0174] 在一些实施方案中，共刺激结构域氨基酸序列与来自细胞因子受体的信号传导结构域具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性。

[0175] F.检测肽

[0176] 在一些实施方案中，本文所述的多肽还可以包含检测肽(也称为“标签”)。合适的检测肽包括血细胞凝聚素(HA;例如，YPYDVPDYA(SEQ ID NO:79))；FLAG(例如，DYKDDDDK(SEQ ID NO:80))；c-myc(例如，EQKLISEEDL;SEQ ID NO:81)等。在一些实施方案中，本文所述的多肽还包含CD-20模拟表位肽(例如，CPYSNPSLC(SEQ ID NO:89))。在一些实施方案中，本文所述的多肽包含与SEQ ID NO:89具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的标签序列。其他合适的检测肽是本领域已知

的。

[0177] G.肽接头

[0178] 在一些实施方案中，本公开内容的多肽包括肽接头(有时称为接头)。可使用肽接头来隔开任何本文中所述的肽结构域/区。例如，接头可在信号肽与抗原结合结构域之间、抗原结合结构域的VH与VL之间、抗原结合结构域与肽间隔区之间、肽间隔区与跨膜结构域之间、侧接共刺激区或在共刺激区的N-或C-区上、和/或在跨膜结构域与胞内结构域之间。肽接头可具有多种氨基酸序列中的任一种。结构域和区可通过一般具有柔性性质的肽接头连接，但是不排除其他化学键联。接头可以是长度为约6至约40个氨基酸、或长度为约6至约25个氨基酸的肽。这些接头可通过使用合成的编码接头的寡核苷酸来偶联蛋白质而产生。

[0179] 可使用具有一定程度柔性的肽接头。肽接头实际上可具有任何氨基酸序列，应记住合适的肽接头将具有导致一般柔性肽的序列。使用小氨基酸(例如甘氨酸和丙氨酸)可用于产生柔性肽。这样的序列的产生对于本领域技术人员是常规的。

[0180] 合适的接头可容易地选择并且可具有任何合适的长度，例如1个氨基酸(例如Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸，包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸，并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0181] 合适的接头可容易地选择并且可具有任何合适的不同长度，例如1个氨基酸(例如Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸，包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸，并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0182] 示例性的柔性接头包括甘氨酸聚合物$(G)_n$、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(G4S)_n$和$(GGGS)_n$，其中n是至少1的整数。在一些实施方案中，n是至少、至多、或者恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(或可从其中推导出的任何范围)。甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。可使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物；Gly和Ser二者均是相对未结构化的，并且因此可充当组分之间的中性链(tether)。可使用甘氨酸聚合物；甘氨酸比甚至丙氨酸获得显著更多的phi-psi空间，并且比具有更长侧链的残基的限制少得多。示例性的间隔区可包含氨基酸序列，其包括但不限于

GGSG (SEQ ID NO:82), GGSGG (SEQ ID NO:83),

[0183] GSGSG (SEQ ID NO:84), GSGGG (SEQ ID NO:85), GGGSG (SEQ ID NO:86), GSSSG (SEQ ID NO:87), 等。

[0184] 在另一些实施方案中，接头包含$(EAAAK)_n$，其中n是至少1的整数。在一些实施方案中，n是至少、至多、或恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(或可从其中推导出的任何范围)。

[0185] 在一些实施方案中，接头是Whitlow接头。在一些实施方案中，接头包含与GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:9)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0186] H.另外的修饰和多肽增强

[0187] 另外，本公开内容的多肽可以是经化学修饰的。可改变多肽的糖基化，例如，通过修饰多肽序列内的一个或更多个糖基化位点以提高多肽对抗原的亲和力(美国专利No.5,

714,350和6,350,861)。

[0188] 预期本公开内容的多肽的区域或片段可相对于SEQ ID NO:1至89中任一个具有、至少具有或至多具有

[0189] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200

[0190] 个或更多个氨基酸替换、连续氨基酸添加、或连续氨基酸缺失。或者,本公开内容的多肽的区域或片段可具有包含以下的氨基酸序列或由以下的氨基酸序列组成的氨基酸序列:与SEQ ID NO:1至89中任一个具有、至少具有、或至多具有50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%(或可从其中推导出的任何范围)同一性。此外,在一些实施方案中,区域或片段包含在SEQ ID NO:1至89中任一个中起始于第

[0191] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,

368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,或500

[0192] 位(其中第1位处于SEQ ID NO的N末端)的具有

[0193] 4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500

[0194] 个或更多个连续氨基酸的氨基酸区域。本公开内容的多肽可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50个或更多个变体氨基酸,或者本公开内容的多肽可与SEQ ID NO:1至89中任一个的至少、或至多

[0195] 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,

53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247、248,249,250,300,400,500,550,600,

[0196] 个或更多个、或可从其中推导出的任何范围的连续氨基酸具有至少60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％(或可从其中推导出的任何范围)相似性、同一性或同源性。

[0197] 本公开内容的多肽可包含至少、至多、或正好

[0198] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,1,39,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,

444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,或615

[0199] (或可从其中推导出的任何范围)个替换。

[0200] 替换可在SEQ ID NO:1至89中任一个的第

[0201] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,

539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,或650

[0202] (或可从其中推导出的任何范围)位氨基酸处。

[0203] 本文中所述的多肽的固定长度可为至少、至多或正好

[0204] 5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,300,400,500,550,1000

[0205] (或可从其中推导出的任何范围)个或更多个氨基酸。

[0206] 替换变体通常包含在蛋白质内的一个或更多个位点处一个氨基酸与另一个氨基酸的交换,并且可设计成在丧失或不丧失其他功能或特性的情况下调节多肽的一种或更多种性质。替换可以是保守的,也就是说,一个氨基酸被一个相似形状和电荷的氨基酸替代。保守替换是本领域公知的并且包括,例如,以下改变:丙氨酸到丝氨酸;精氨酸到赖氨酸;天冬酰胺到谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸到谷氨酸;半胱氨酸到丝氨酸;谷氨酰胺到天冬酰胺;谷氨酸到天冬氨酸;甘氨酸到脯氨酸;组氨酸到天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸到亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸到缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸到精氨酸;甲硫氨酸到亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸到酪氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸;丝氨酸到苏氨酸;苏氨酸到丝氨酸;色氨酸到酪氨酸;酪氨酸到色氨酸或苯丙氨酸;以及缬氨酸到异亮氨酸或亮氨酸。或者,替换可以是非保守的,使得多肽的功能或活性受到影响。非保守的改变通常包括将残基用化学上相异的残基替换,例如用极性或带电荷的氨基酸替换非极性或不带电荷的氨基酸,反之亦然。

[0207] 蛋白质可以是重组的或体外合成的。或者,非重组或重组蛋白质可从细菌分离。还预期包含这样变体的细菌可应用于组合物和方法中。因此,不需要分离蛋白质。

[0208] 本文中使用的术语“功能等同的密码子”是指编码相同氨基酸的密码子,例如精氨酸或丝氨酸的六个密码子,并且也指编码生物学等同的氨基酸的密码子。

[0209] 还将理解的是,氨基酸和核酸序列可分别包含另外的残基,例如另外的N-或C-端氨基酸,或者5’或3’序列,并且仍然基本上如本文中所公开的一个序列所示,只要序列符合以上提出的标准即可,所述标准包括在涉及蛋白质表达的情况下,维持生物学蛋白质活性。

末端序列的添加特别适用于这样的核酸序列,其可例如包括位于编码区的5'或3'部分侧翼的多个非编码序列。

[0210] 在另一些实施方案中,通过引入一个或更多个替换来实现多肽功能的改变。例如,某些氨基酸可替换蛋白质结构中的其他氨基酸,以改变相互作用组分的相互作用结合能力。例如如蛋白质相互作用结构域、核酸相互作用结构域和催化位点的结构可具有被替换以改变这样的功能的氨基酸。由于决定蛋白质的生物学功能活性的是该蛋白质的相互作用能力和性质,因此可在蛋白质序列及其基础DNA编码序列中进行某些氨基酸替换,并且尽管如此却产生具有不同特性的蛋白质。因此,本发明人预期,可在基因的DNA序列中做出多种改变使其生物学效用或活性发生显著改变。

[0211] 在进行这样的变化时,可考虑氨基酸的亲水指数(hydropathic index)。氨基酸亲水指数在赋予蛋白质以相互作用生物学功能中的重要性是本领域中通常了解的(Kyte and Doolittle,1982)。公认的是,氨基酸的相对亲水特性有助于所得蛋白质的二级结构,其转而限定了蛋白质与其他分子(例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等)的相互作用。

[0212] 本领域中还应理解的是,可基于亲水性有效地进行类似氨基酸的替换。美国专利4,554,101(通过引用并入本文)声称:蛋白质的最大局部平均亲水性(如受其邻近氨基酸的亲水性控制)与蛋白质的生物学特性相关。应理解的是,氨基酸可替换具有相似亲水性值的另一氨基酸,并且仍产生生物学上等同和免疫上等同的蛋白质。

[0213] 如以上所概括的,氨基酸替换通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,其疏水性、亲水性、电荷、尺寸等。将多个前述特征考虑在内的示例性替换是公知的,并且包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0214] 在一些具体的实施方案中,全部或部分本文中所述蛋白质也可根据常规技术在溶液中或在固体支持物上合成。多种自动合成仪可商购获得并且可根据已知的方案使用。参见,例如,Stewart and Young(1984);Tam等(1983);Merrifield,(1986);和Barany and Merrifield(1979),其各自通过引用并入本文。或者,可使用重组DNA技术,其中将编码肽或多肽的核苷酸序列插入表达载体中,转化或转染到适当的宿主细胞中,并在适合表达的条件下培养。

[0215] 一个实施方案包括将基因转移至细胞(包括微生物)用于产生和/或呈递蛋白质的用途。可将目的蛋白的基因转移到适当的宿主细胞中,随后在适当的条件下培养细胞。可使用编码几乎任何多肽的核酸。本文中讨论了重组表达载体的产生以及其中包含的元件。或者,待产生的蛋白质可以是通常由用于蛋白质产生的细胞合成的内源性蛋白质。

[0216] III.细胞

[0217] 某些实施方案涉及包含本公开内容的多肽或核酸的细胞。在一些实施方案中,细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,细胞是T细胞。"T细胞"(也称为"T-细胞")包括所有类型的表达CD3的免疫细胞,包括但不限于T辅助细胞、恒定自然杀伤T(iNKT)细胞、细胞毒性T细胞和T调节细胞(Treg)γ-δT细胞。T细胞可以指CD4+或CD8+T细胞。T细胞可以指富含CD62L的T细胞。免疫细胞可以是自然杀伤(NK)细胞、B细胞或免疫系统的任何其他细胞。

[0218] 合适的哺乳动物细胞包括原代细胞和永生化细胞系。合适的哺乳动物细胞系包括人细胞系、非人灵长类细胞系、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠)细胞系等。合适的哺乳动物细胞

系包括但不限于HeLa细胞(例如美国典型培养物保藏中心(ATCC)No.CCL-2)、CHO细胞(例如ATCC No.CRL9618、CCL61、CRL9096)、人胚肾(HEK)293细胞(例如ATCC No.CRL-1573)、Vero细胞、NIH 3T3细胞(例如ATCC No.CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如ATCC No.CCL10)、PC12细胞(ATCC No.CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞(ATCC No.CRL1651)、RATI细胞、小鼠L细胞(ATCC No.CCLI.3)、HLHepG2细胞、Hut-78、Jurkat、HL-60、NK细胞系(例如,NKL、NK92和YTS)等。

[0219] 在一些情况下,细胞不是永生化细胞系,而是从个体获得的细胞(例如,原代细胞)。例如,在一些情况下,细胞是从个体获得的免疫细胞。作为一个实例,细胞是从个体获得的T淋巴细胞。作为另一个实例,细胞是从个体获得的细胞毒性细胞。作为另一个实例,细胞是从个体获得的干细胞(例如,外周血干细胞)或祖细胞。

[0220] 本公开内容的细胞可以包含一种或更多种治疗性多肽或多核苷酸。在一些实施方案中,公开了包含一种或更多种CAR多肽的细胞。在一些实施方案中,细胞包含含有肿瘤抗原结合结构域的CAR多肽。在一些实施方案中,细胞包含含有TYRP-1结合结构域的CAR多肽。在某些实施方案中,包含CAR多肽的细胞还可以包含一种或更多种另外的治疗性多肽和/或多核苷酸。包含本公开内容的治疗性多肽或多核苷酸的细胞还可以包含一种或更多种另外的遗传修饰(例如,基因突变、基因缺失、基因添加等),在一些实施方案中,其提高治疗性细胞的效力或安全性。这样的遗传修饰的某些非限制性实例描述于:Puig-Saus and Ribas.Gene editing:towards the third generation of adoptive T cell transfer therapies.Immuno-Oncology Technology.2019 June 13;1:19-26,通过引用整体并入本文。

[0221] IV.用于修饰基因组DNA的方法

[0222] 在某些实施方案中,对基因组DNA进行修饰以包括另外的突变、插入或缺失,或者以整合本公开内容的某些分子构建体,使得该构建体从基因组DNA表达。在一些实施方案中,将编码本公开内容的多肽的核酸整合到细胞的基因组DNA中。在一些实施方案中,核酸通过病毒转导整合到细胞中,例如通过慢病毒或逆转录病毒转导进行的基因转移。在一些实施方案中,通过逆转录病毒载体、慢病毒载体或腺相关病毒载体将编码本公开内容的多肽(例如,CAR)的核酸整合到宿主细胞的基因组中来修饰基因组DNA。

[0223] 在一些实施方案中,整合是靶向整合。在一些实施方案中,靶向整合通过使用DNA消化剂/多核苷酸修饰酶例如位点特异性重组酶和/或靶向内切核酸酶来实现。术语“DNA消化剂”是指能够切割核酸的核苷酸亚基之间的键(即磷酸二酯键)的试剂。一个特异性靶标是TRAC(T细胞受体α恒定(T cell receptor alpha constant))基因座。例如,首先,将用由与靶向TRAC(T细胞受体α恒定)基因座的单指导RNA(single-guide RNA,sgRNA)复合的Cas9蛋白组成的核糖核蛋白(RNP)复合物对细胞进行电穿孔。电穿孔之后十五分钟,将用携带有编码CAR的同源定向修复(homology directed repair,HDR)模板的AAV6处理细胞。在另一个实例中,双链或单链DNA包含HDR模板并通过电穿孔与RNP复合物一起被引入到细胞中。

[0224] 因此,一方面,本公开内容包括靶向整合。实现此的一种方式是通过使用外源性核酸序列(即,着陆垫(landing pad)),其包含至少一种多核苷酸修饰酶,例如位点特异性重组酶和/或靶向内切核酸酶的至少一种识别序列。位点特异性重组酶是本领域公知的,并且通常可被称为转化酶、解离酶或整合酶。位点特异性重组酶的一些非限制性实例可包括λ整

合酶、Cre重组酶、FLP重组酶、γ-δ解离酶、Tn3解离酶、ΦC31整合酶、Bxb1整合酶和R4整合酶。位点特异性重组酶识别特异性识别序列(或识别位点)或其变体,所有这些都是本领域公知的。例如,Cre重组酶识别LoxP位点,而FLP重组酶识别FRT位点。

[0225] 预期的靶向内切核酸酶包括锌指核酸酶(zinc finger nuclease,ZFN)、兆核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease,TALEN)、CRISPR/Cas样内切核酸酶、I-Tevl核酸酶或相关单体杂合体、或人工靶向DNA双链断裂诱导剂。示例性的靶向内切核酸酶在下面进一步描述。例如,通常来说,锌指核酸酶包含DNA结合结构域(即,锌指)和切割结构域(即,核酸酶),其二者均在下面描述。多核苷酸修饰酶的定义中还包括本领域技术人员已知的任何其他有用的融合蛋白,例如可包含DNA结合结构域和核酸酶。

[0226] 着陆垫序列是包含至少一个被特定的多核苷酸修饰酶(例如位点特异性重组酶和/或靶向内切核酸酶)选择性地结合并修饰的识别序列的核苷酸序列。通常,着陆垫序列中的识别序列不以内源性存在于待修饰细胞的基因组中。例如,在待修饰的细胞是CHO细胞的情况下,着陆垫序列中的识别序列不存在于内源性CHO基因组中。可通过选择不以内源性存在于靶细胞的基因组内的对于高效核苷酸修饰酶的识别序列,来提高靶向整合的速率。选择不以内源性存在的识别序列还降低了潜在的脱靶整合。在另一些方面中,可期望使用在待修饰细胞中为天然的识别序列。例如,在着陆垫序列中使用多个识别序列的情况下,一个或更多个可以是外源性的,并且一个或更多个可以是天然的。

[0227] 本领域普通技术人员可容易地确定被位点特异性重组酶和/或靶向内切核酸酶结合和切割的序列。

[0228] 多个识别序列可存在于单个着陆垫中,从而使着陆垫被两种或更多种多核苷酸修饰酶依次靶向,使得可插入两种或更多种独特的核酸(尤其包含受体基因和/或诱导型报道子)。或者,着陆垫中多个识别序列的存在允许相同核酸的多个拷贝插入到着陆垫中。当两个核酸靶向单个着陆垫时,着陆垫包括对于第一多核苷酸修饰酶(例如第一ZFN对)的第一识别序列和对于第二多核苷酸修饰酶(例如第二ZFN对)的第二识别序列。作为替代或补充,包含一个或更多个识别序列的单独的着陆垫可整合在多个位置。在用载荷的多个拷贝转化的细胞中可观察到蛋白质表达提高。或者,当在相同或不同的着陆垫中插入了包含不同表达盒的多个独特核酸序列时,可同时表达多个基因产物。无论核酸的数量和类型如何,当靶向内切核酸酶是ZFN时,示例性ZFN对包括hSIRT、hRSK4和hAAVS1,以及随附的识别序列。

[0229] 一般而言,用于促进靶向整合的着陆垫可包含至少一个识别序列。例如,着陆垫可包括至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个或更多个识别序列。在包含多于一个识别序列的一些实施方案中,识别序列可以是彼此独特的(即,被不同的多核苷酸修饰酶识别)、相同的重复序列或重复和独特序列的组合。

[0230] 本领域普通技术人员将容易理解,用作着陆垫的外源性核酸还可包含除识别序列之外的其他序列。例如,包含编码如本文中所述的可选择的或可筛选的基因的一个或更多个序列可能是得当的,例如抗生素抗性基因、代谢选择标志物或荧光蛋白。也可存在使用其他补充序列,例如转录调节和控制元件(即启动子、部分启动子、启动子陷阱、起始密码子、增强子、内含子、绝缘子和其他表达元件)。

[0231] 除选择适当的识别序列之外,选择具有高切割效率的靶向内切核酸酶也提高着陆垫的靶向整合速率。靶向内切核酸酶的切割效率可使用本领域公知的方法包括例如使用例如CEL-1测定的测定或对PCR扩增子中插入/缺失(Indel)进行直接测序来确定。

[0232] 在本文中公开的方法和细胞中使用的靶向内切核酸酶的类型可以并且将变化。靶向内切核酸酶可以是天然存在的蛋白质或经改造的蛋白质。靶向内切核酸酶的一个实例是锌指核酸酶,下面将对其进行进一步详细讨论。

[0233] 可使用的靶向内切核酸酶的另一个实例是包含至少一个核定位信号的RNA指导的内切核酸酶,其允许内切核酸酶进入真核细胞的细胞核内。RNA指导的内切核酸酶还包含至少一个核酸酶结构域和至少一个与指导RNA相互作用的结构域。通过指导RNA将RNA指导的内切核酸酶引导至特定的染色体序列,使得RNA指导的内切核酸酶切割特定的染色体序列。由于指导RNA提供了靶向切割的特异性,因此RNA指导的内切核酸酶的内切核酸酶是通用的,并且可与不同的指导RNA一起使用以切割不同的靶染色体序列。以下进一步详细讨论了示例性的RNA指导的内切核酸酶蛋白。例如,RNA指导的内切核酸酶可以是CRISPR/Cas蛋白或CRISPR/Cas样融合蛋白、来源于成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspersed short palindromic repeat,CRISPR)/CRISPR相关(Cas)系统的RNA指导的内切核酸酶。

[0234] 靶向内切核酸酶也可以是兆核酸酶。兆核酸酶是特征在于大的识别位点(即,识别位点通常为约12个碱基对至约40个碱基对)的内切脱氧核糖核酸酶。作为该要求的结果,识别位点通常在任何给定的基因组中仅出现一次。在兆核酸酶中,称为“LAGLIDADG”的归巢内切核酸酶(homing endonuclease)家族已成为研究基因组和基因组工程的有价值的工具。兆核酸酶可通过使用本领域技术人员公知的技术修饰其识别序列来靶向特定的染色体序列。参见,例如,Epinat et al,2003,Nuc.Acid Res.,31(11):2952-62和Stoddard,2005,Quarterly Review of Biophysics,pp.1-47。

[0235] 可使用的靶向内切核酸酶的另一个实例是转录激活子样效应物(TALE)核酸酶。TALE是来自植物病原体黄单胞菌属(Xanthomonas)的转录因子,其可容易地被改造成结合新的DNA靶标。TALE或其截短形式可与内切核酸酶(例如FokI)的催化结构域连接,以产生被称为TALE核酸酶或TALEN的靶向内切核酸酶。参见,例如,Sanjana et al,2012,Nature Protocols 7(1):171-192;Bogdanove A J,Voytas D F,2011,Science,333(6051):1843-6;Bradley P,Bogdanove A J,Stoddard B L.,2013,Curr Opin Struct Biol.,23(1):93-9。

[0236] 另一个示例性的靶向内切核酸酶是位点特异性核酸酶。特别地,位点特异性核酸酶可以是其识别序列在基因组中很少出现的“罕见切割剂(rare-cutter)”内切核酸酶。优选地,位点特异性核酸酶的识别序列在基因组中仅出现一次。或者,靶向核酸酶可以是人工靶向DNA双链断裂诱导剂。

[0237] 在一些实施方案中,靶向整合可通过使用整合酶实现。例如,phiC31整合酶是编码于噬菌体phiC31的基因组内的序列特异性重组酶。phiC31整合酶介导被称为附着位点(att)的两个34碱基对序列之间的重组,一个见于噬菌体中并且另一个在细菌宿主中。已显示该丝氨酸整合酶在许多不同的细胞类型(包括哺乳动物细胞)中高效地发挥作用。在phiC31整合酶的存在下,通过在具有与天然attP位点类似的序列的位点(被称为假attP位

点)处重组可将含attB的供体质粒单向整合到靶基因组中。phiC31整合酶作为单一拷贝可整合任何尺寸的质粒,并且不需要辅因子。经整合的转基因稳定表达并且是可遗传的。

[0238] 在一个实施方案中,通过使用转座酶实现了本公开内容的多核苷酸的基因组整合。例如,可使用设计成将所精确限定的DNA序列引入脊椎动物染色体中的合成DNA转座子(例如"睡美人(Sleeping Beauty)"转座子系统)。睡美人转座子系统由睡美人(Sleeping Beauty,SB)转座酶和设计成将特定的DNA序列插入脊椎动物的基因组中的转座子构成。DNA转座子以简单的剪切粘贴方式从一个DNA位点易位到另一个DNA位点。转座是一个精确的过程,其中将所限定的DNA片段从一个DNA分子中切除并移动到同一或不同DNA分子或基因组中的另一个位点。

[0239] 与所有其他Tcl/mariner型转座酶一样,SB转座酶将转座子插入受体DNA序列中的TA二核苷酸碱基对中。插入位点可在同一DNA分子的其他位置,或在另一DNA分子(或染色体)中。在哺乳动物(包括人)基因组中,存在约2亿个TA位点。在转座子整合过程中TA插入位点进行复制。该TA序列的复制是转座的标志,并且在一些实验中用于确定机制。转座酶可编码于转座子内,或者转座酶可由另外的来源提供,在这种情况下转座子成为非自主元件。非自主转座子是最有用的遗传工具,因为在插入之后它们无法独立地继续切除和再次插入。人基因组和其他哺乳动物基因组中鉴定的所有DNA转座子都是非自主的,因为尽管它们包含转座酶基因,但是这些基因是非功能性的并且不能产生可移动转座子的转座酶。

[0240] V.方法

[0241] 本公开内容的一些方面涉及用于治疗癌症(例如皮肤癌)的方法。在一些实施方案中,公开了用于治疗患有黑素瘤的对象的方法。在一些实施方案中,公开了用于治疗TYRP-1^{+}癌症的方法。在另一些实施方案中,本文所述的治疗性受体(例如,CAR)可用于刺激免疫应答。免疫应答刺激可以在体外、体内或离体进行。在一些实施方案中,本文所述的治疗性受体用于预防复发。所述方法通常涉及用包含编码本公开内容的多肽的核苷酸序列的表达载体或DNA、RNA(例如体外经转录的RNA)或腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)对哺乳动物细胞进行遗传修饰,或将多肽直接转移到细胞中。细胞可以是免疫细胞(例如,T淋巴细胞或NK细胞)、干细胞、祖细胞等。在一些实施方案中,细胞是本文所述的细胞。

[0242] 在一些实施方案中,遗传修饰是离体进行的。例如,从个体获得T淋巴细胞、干细胞或NK细胞(或本文中所述的细胞);以及从个体获得的细胞被遗传修饰以表达本公开内容的多肽。在一些情况下,经遗传修饰的细胞离体被激活。在另一些情况下,将经遗传修饰的细胞引入个体(例如,从其获得细胞的个体);并且经遗传修饰的细胞在体内被激活。

[0243] 在一些实施方案中,所述方法涉及施用本文所述的细胞或肽以治疗癌症或向患有癌症的人施用。在一些实施方案中,癌症是TYRP-1+癌症。在一些实施方案中,癌症是皮肤癌。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤。在一些实施方案中,黑素瘤是浅表扩散性黑素瘤、模块化黑素瘤、肢端雀斑样痣黑素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、无黑素性黑素瘤、结缔组织增生性黑素瘤、眼黑素瘤、黏膜黑素瘤或转移性黑素瘤。在另一些实施方案中,本文讨论的关于癌症的治疗可以应用于前期癌,例如光线性角化病(actinic keratosis,AK)。在另一些实施方案中,癌症可以是皮肤鳞状细胞癌。在另外的实施方案中,患者先前患有黑素瘤或癌前黑素瘤和/或处于患黑素瘤的风险之中。

[0244] VI.另外的治疗

[0245] A.免疫治疗

[0246] 在一些实施方案中,该方法包括施用癌症免疫治疗。癌症免疫治疗(有时称为免疫肿瘤学,缩写IO)是利用免疫系统来治疗癌症。可将免疫治疗分类为主动治疗、被动治疗或混合治疗(主动治疗和被动治疗)。这些方法运用了以下事实:癌细胞通常在其表面具有可被免疫系统检测到的分子,称为肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen,TAA);它们通常是蛋白质或其他大分子(例如碳水化合物)。主动免疫治疗通过靶向TAA引导免疫系统攻击肿瘤细胞。被动免疫治疗增强现有的抗肿瘤应答,并包括使用单克隆抗体、淋巴细胞和细胞因子。下面描述可用于本公开内容方法中的免疫治疗。

[0247] 1.检查点抑制剂和组合治疗

[0248] 本公开内容的一些实施方案可包括施用免疫检查点抑制剂(也称为检查点抑制剂治疗),下面对其进行进一步描述。检查点抑制剂治疗可以是仅靶向一种细胞检查点蛋白的单一治疗,或者可以是靶向至少两种细胞检查点蛋白的组合治疗。例如,检查点抑制剂单一治疗可包含以下之一:PD-1、PD-L1或PD-L2抑制剂,或者可包含CTLA-4、B7-1或B7-2抑制剂之一。检查点抑制剂组合治疗可包含以下之一:PD-1、PD-L1或PD-L2抑制剂,并且还可组合包含CTLA-4、B7-1或B7-2抑制剂之一。组合治疗中的抑制剂组合不需要在同一组合物中,而是可同时、基本同时或以包括定期施用两种抑制剂的给药方案来施用,其中周期可以是本文中所述的时间段。

[0249] a.PD-1、PD-L1和PD-L2抑制剂

[0250] PD-1可在其中T细胞遇到感染或肿瘤的肿瘤微环境中发挥作用。活化的T细胞上调PD-1并继续在外周组织中表达它。细胞因子(例如IFN-γ)诱导上皮细胞和肿瘤细胞上PD-L1的表达。PD-L2在巨噬细胞和树突细胞上表达。PD-1的主要作用是在免疫应答过程中限制外周中效应T细胞的活性并防止对组织的过度损害。本公开内容的抑制剂可阻断PD-1和/或PD-L1活性的一种或更多种功能。

[0251] “PD-1”的替代名称包括CD279和SLEB2。“PD-L1”的替代名称包括B7-H1、B7-4、CD274和B7-H。“PD-L2”的替代名称包括B7-DC、Btdc和CD273。在一些实施方案中,PD-1、PD-L1和PD-L2是人PD-1、PD-L1和PD-L2。

[0252] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂是抑制PD-1与其配体结合配偶体结合的分子。在一个具体方面中,PD-1配体结合配偶体是PD-L1和/或PD-L2。在另一个实施方案中,PD-L1抑制剂是抑制PD-L1与其结合配偶体结合的分子。在一个具体方面中,PD-L1结合配偶体是PD-1和/或B7-1。在另一个实施方案中,PD-L2抑制剂是抑制PD-L2与其结合配偶体结合的分子。在一个具体方面中,PD-L2结合配偶体是PD-1。抑制剂可以是抗体、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白或寡肽。示例性抗体描述于美国专利No.8,735,553、8,354,509和8,008,449,其全部通过引用并入本文。用于本文中提供的方法和组合物中的其他PD-1抑制剂是本领域已知的,例如描述于美国专利申请No.US2014/0294898、US2014/022021和US2011/0008369中,其全部通过引用并入本文。

[0253] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂是抗PD-1抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)。在一些实施方案中,抗PD-1抗体选自:纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)和皮地利珠单抗(pidilizumab)。在一些实施方案中,PD-1抑制剂是免疫黏附素(例如,包含与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PD-L1或PD-L2的胞外部

分或PD-1结合部分的免疫黏附素)。在一些实施方案中,PD-L1抑制剂包含AMP-224。纳武单抗(也称为MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558和OPDIVO®)是描述于WO2006/121168中的抗PD-1抗体。派姆单抗(也称为MK-3475、Merck 3475、兰洛利珠单抗(lambrolizumab)、KEYTRUDA®和SCH-900475)是描述于WO2009/114335中的抗PD-1抗体。皮地利珠单抗(也称为CT-011、hBAT或hBAT-1)是描述于WO2009/101611中的抗PD-1抗体。AMP-224(也称为B7-DCIg)是描述于WO2010/027827和WO2011/066342中的PD-L2-Fc融合可溶性受体。另外的PD-1抑制剂包括MEDI0680,也称为AMP-514和REGN2810。

[0254] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是PD-L1抑制剂,例如度伐单抗(Durvalumab),也被称为MEDI4736;阿特珠单抗(atezolizumab),也被称为MPDL3280A;阿维单抗(avelumab),也被称为MSB00010118C、MDX-1105、BMS-936559;或其组合。在某些方面中,免疫检查点抑制剂是PD-L2抑制剂,例如rHIgM12B7。

[0255] 在一些实施方案中,抑制剂包含纳武单抗、派姆单抗或皮地利珠单抗的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施方案中,抑制剂包含纳武单抗、派姆单抗或皮地利珠单抗的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及纳武单抗、派姆单抗或皮地利珠单抗的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,抗体与上述抗体竞争PD-1、PD-L1或PD-L2上相同表位的结合和/或与之结合。在另一个实施方案中,抗体与上述抗体具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或99%(或可从其中推导出的任何范围)的可变区氨基酸序列同一性。

[0256] b.CTLA-4、B7-1和B7-2抑制剂

[0257] 在本文中提供的方法中可靶向的另一免疫检查点是细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4),也称为CD152。人CTLA-4的完整cDNA序列具有Genbank登录号L15006。CTLA-4见于T细胞表面,并且当与抗原呈递细胞表面上的B7-1(CD80)或B7-2(CD86)结合时充当"关闭"开关。CTLA-4是免疫球蛋白超家族的成员,其在辅助性T细胞的表面上表达并向T细胞传递抑制信号。CTLA-4与T细胞共刺激蛋白CD28类似,并且两个分子均与抗原呈递细胞上的B7-1和B7-2结合。CTLA-4向T细胞传递抑制信号,而CD28传递刺激信号。胞内CTLA-4也见于调节性T细胞中并且对其功能可能是重要的。通过T细胞受体和CD28的T细胞活化导致CTLA-4(B7分子的抑制性受体)的表达提高。本公开内容的抑制剂可阻断CTLA-4、B7-1和/或B7-2活性的一种或更多种功能。在一些实施方案中,抑制剂阻断CTLA-4和B7-1的相互作用。在一些实施方案中,抑制剂阻断CTLA-4和B7-2的相互作用。

[0258] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白或寡肽。

[0259] 适用于本发明方法中的抗人CTLA-4抗体(或来源于其的VH和/或VL结构域)可使用本领域公知的方法来产生。或者,可使用本领域公认的抗CTLA-4抗体。例如,公开于以下中的抗CTLA-4抗体可用于本文中公开的方法中:US 8,119,129、WO 01/14424、WO 98/42752;WO 00/37504(CP675,206,也称为曲美木单抗(tremelimumab);原名替西木单抗(ticilimumab))、美国专利No.6,207,156;Hurwitz et al.,1998..每个上述出版物的教导在此通过引用并入。也可使用与这些本领域公认的抗体中任一者竞争与CTLA-4结合的抗体。例如,人源化CTLA-4抗体描述于国际专利申请No.WO2001/014424、WO2000/037504和美国专利No.8,017,114中;所有均通过引用并入本文。

[0260] 在本公开内容的方法和组合物中可用作检查点抑制剂的另外的抗CTLA-4抗体是伊匹单抗(ipilimumab)(也称为10D1、MDX-010、MDX-101和Yervoy®)或者其抗原结合片段和变体(参见,例如WO01/14424)。

[0261] 在一些实施方案中,抑制剂包含曲美木单抗或伊匹单抗的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施方案中,抑制剂包含曲美木单抗或伊匹单抗的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及曲美木单抗或伊匹单抗的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,抗体与上述抗体竞争PD-1、B7-1或B7-2上相同表位的结合和/或与之结合。在另一个实施方案中,抗体与上述抗体具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或99%(或可从其中推导出的任何范围)的可变区氨基酸序列同一性。

[0262] 2.共刺激分子的抑制

[0263] 在一些实施方案中,免疫治疗包含共刺激分子的抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂包括B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD28、ICOS、OX40(TNFRSF4)、4-1BB(CD137;TNFRSF9)、CD40L(CD40LG)、GITR(TNFRSF18)及其组合。抑制剂包括抑制性抗体、多肽、化合物和核酸。

[0264] 3.树突细胞治疗

[0265] 树突细胞治疗通过使树突细胞将肿瘤抗原呈递给淋巴细胞来引发抗肿瘤应答,这活化它们,引发它们杀伤呈递抗原的其他细胞。树突细胞是哺乳动物免疫系统中的抗原呈递细胞(APC)。在癌症治疗中,它们有助于靶向癌症抗原。基于树突细胞的细胞癌治疗的一个实例是sipuleucel-T。

[0266] 诱导树突细胞呈递肿瘤抗原的一种方法是通过用自体肿瘤裂解物或短肽(对应于癌细胞上蛋白质抗原的小部分蛋白质)进行疫苗接种。这些肽通常以与佐剂(高免疫原性物质)组合来提供,以提高免疫和抗肿瘤应答。其他佐剂包括吸引或活化树突细胞的蛋白质或其他化学物质,例如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony-stimulating factor,GM-CSF)。

[0267] 树突细胞也可通过使肿瘤细胞表达GM-CSF在体内被活化。这可通过对肿瘤细胞进行遗传改造以产生GM-CSF来实现,或通过用表达GM-CSF的溶瘤病毒感染肿瘤细胞来实现。

[0268] 另一策略是从患者的血液中去除树突细胞并在身体外部活化它们。树突细胞在存在肿瘤抗原的情况下被活化,肿瘤抗原可以是单个肿瘤特异性肽/蛋白质或肿瘤细胞裂解物(分解肿瘤细胞的溶液)。这些细胞(与可选的佐剂)被输注并引发免疫应答。

[0269] 树突细胞治疗包括使用与树突细胞表面上的受体结合的抗体。抗原可添加至抗体并可诱导树突细胞成熟并提供对肿瘤的免疫。

[0270] 4.细胞因子治疗

[0271] 细胞因子是由在肿瘤内存在的许多类型的细胞产生的蛋白质。它们可调节免疫应答。肿瘤经常运用它们来使其生长并降低免疫应答。这些免疫调节作用使得它们被用作引发免疫应答的药物。两种常用的细胞因子是干扰素和白介素。

[0272] 干扰素由免疫系统产生。它们通常参与抗病毒反应,但对于癌症也有用途。它们分为三组:I型(IFNα和IFNβ)、II型(IFNγ)和III型(IFNλ)。

[0273] 白介素具有一系列免疫系统作用。IL-2是示例性的白介素细胞因子治疗。

[0274] 5.过继性T细胞治疗

[0275] 过继性T细胞治疗是通过输注T细胞(过继性细胞转移)的被动免疫接种的一种形

式。它们见于血液和组织中，并且通常当它们发现外来病原体时会活化。具体地，当T细胞的表面受体遇到在其表面抗原上显示出部分外来蛋白质的细胞时，它们就会活化。这些可以是感染的细胞，或是抗原呈递细胞(APC)。它们见于正常组织中和肿瘤组织中，在那里它们被称为肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte，TIL)。它们在存在APC(例如呈递肿瘤抗原的树突细胞)的情况下被活化。尽管这些细胞可攻击肿瘤，但肿瘤内的环境具有高度免疫抑制作用，这阻止免疫介导的肿瘤死亡。

[0276] 已经开发了产生和获得靶向肿瘤的T细胞的多种方式。对肿瘤抗原具有特异性的T细胞可从肿瘤样品(TIL)中除去，或从血液过滤。随后的活化和培养离体进行，并将所得物进行再输注。肿瘤靶向T细胞可通过基因治疗产生。肿瘤靶向T细胞可以通过将T细胞暴露于肿瘤抗原来扩增。

[0277] 预期癌症治疗可排除本文中所述的任何癌症治疗。此外，本公开内容的一些实施方案包括先前已经接受过本文中所述的治疗、当前正在接受本文中所述的治疗、或尚未接受本文中所述的治疗的患者。在一些实施方案中，患者是已经确定对本文中所述治疗具有抗性的患者。在一些实施方案中，患者是已经确定对本文中所述治疗敏感的患者。

[0278] B.溶瘤病毒

[0279] 在一些实施方案中，另外的治疗包含溶瘤病毒。溶瘤病毒是优先感染并杀伤癌细胞的病毒。当感染的癌细胞被溶瘤作用破坏时，它们释放出新的感染性病毒颗粒或病毒粒子来帮助破坏剩余的肿瘤。认为溶瘤病毒不仅造成肿瘤细胞的直接破坏，而且还刺激宿主的抗肿瘤免疫应答以进行长期的免疫治疗。

[0280] C.多糖

[0281] 在一些实施方案中，另外的治疗包含多糖。见于蘑菇中的某些化合物(主要是多糖)可上调免疫系统并可具有抗癌特性。例如，β-葡聚糖(例如香菇多糖)在实验室研究中已显示出刺激巨噬细胞、NK细胞、T细胞和免疫系统细胞因子，并在临床试验中已经作为免疫佐剂进行了研究。

[0282] D.新生抗原

[0283] 在一些实施方案中，另外的治疗包括新生抗原突变的靶向。许多肿瘤表达突变。这些突变潜在地产生新的可靶向抗原(新生抗原)以用于T细胞免疫治疗。如使用RNA测序数据所确定的，在具有高突变负荷的肿瘤中，癌症病变中CD8+T细胞的存在更高。与自然杀伤细胞和T细胞的细胞溶解活性相关的转录水平与许多人肿瘤中的突变负荷呈正相关。

[0284] E.化学治疗

[0285] 在一些实施方案中，另外的治疗包括化学治疗。合适的化学治疗剂类别包括：(a)烷化剂，例如氮芥类(例如，二氯甲基二乙胺、环磷酰胺(cylophosphamide)、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺类(例如，六甲基三聚氰胺、噻替派)、烷基磺酸酯类(例如白消安)、亚硝基脲类(例如，卡莫司汀、洛莫司汀、氯脲菌素(chlorozoticin)、链脲菌素)和三嗪类(例如，达卡巴嗪(dicarbazine))；(b)抗代谢物，例如叶酸类似物(例如，甲氨蝶呤)、嘧啶类似物(例如，5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、氮尿苷)以及嘌呤类似物和相关物质(例如，6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、喷司他丁)；(c)天然产物，例如长春花生物碱(例如，长春花碱、长春新碱)、表鬼臼毒素(epipodophylotoxin)(例如，依托泊苷、替尼泊苷)、抗生素(例如，放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、博来霉素、普卡霉素(plicamycin)和米

托蒽醌(mitoxanthrone))、酶(例如,L-天冬酰胺酶),和生物反应调节剂(例如,干扰素-α);以及(d)其他药剂,例如铂配位复合物(例如,顺铂、卡铂)、经取代脲(例如,羟基脲)、甲基肼(methylhydiazine)衍生物(例如,丙卡巴肼(procarbazine),和肾上腺皮质抑制剂(adreocortical suppressant)(例如,泰素和米托坦)。在一些实施方案中,顺铂是特别合适的化学治疗剂。

[0286] 顺铂已经被广泛用于治疗癌症,例如转移性睾丸或卵巢癌、晚期膀胱癌、头颈癌、宫颈癌、肺癌或其他肿瘤。顺铂不经口吸收并因此必须通过其他途径例如静脉内、皮下、瘤内或腹膜内注射来递送。顺铂可单独使用或与其他药剂组合使用,在某些实施方案中,预期在临床应用中使用的有效剂量包括:约15mg/m^2至约20mg/m^2持续每三周5天,总共三个疗程。在一些实施方案中,与包含与编码治疗性多肽的多核苷酸有效连接的Egr-1启动子的构建体联合递送至细胞和/或对象的顺铂的量少于单独使用顺铂时将递送的量。

[0287] 其他合适的化学治疗剂包括抗微管剂,例如紫杉醇(“泰素”)和盐酸多柔比星(“多柔比星”)。确定通过腺病毒载体递送的Egr-1启动子/TNFα构建体与多柔比星的组合在克服对化学治疗和/或TNF-α的抗性方面是有效的,这表明构建体与多柔比星的组合治疗克服了对多柔比星和TNF-α二者的抗性。

[0288] 多柔比星吸收差,并且优选静脉内施用。在某些实施方案中,对于成人,合适的静脉内剂量包括:约60mg/m2至约75mg/m2,以约21天的间隔;或者约25mg/m2至约30mg/m2,以约3周至约4周的间隔,以连续2或3天中的每一者重复;或者约20mg/m2,每周一次。在年长患者中,当存在先前化学治疗或肿瘤性骨髓浸润(neoplastic marrow invasion)导致的先前骨髓抑制或当药物与其他骨髓生成抑制药物组合时,应使用最低剂量。

[0289] 氮芥类是可用于本公开内容方法中的另一合适的化学治疗剂。氮芥类可包括但不限于二氯甲基二乙胺(HN2)、环磷酰胺和/或异环磷酰胺、美法仑(L-溶肉瘤素)和苯丁酸氮芥。环磷酰胺((CYTOXAN®)可从Mead Johnson获得,而NEOSTAR®可从Adria获得)是另一合适的化学治疗剂。对于成人,合适的经口剂量包括:例如约1mg/kg/天至约5mg/kg/天,静脉内剂量包括:例如,最初在约2天至约5天的时间内约40mg/kg至约50mg/kg的分剂量,或者约每7天至约10天约10mg/kg至约15mg/kg,或者每周两次约3mg/kg至约5mg/kg,或者约1.5mg/kg/天至约3mg/kg/天。由于不利的胃肠道作用,因此优选静脉内途径。药物有时也通过渗透或进入体腔内肌内施用。

[0290] 另外的合适的化学治疗剂包括嘧啶类似物,例如阿糖胞苷(胞嘧啶阿拉伯糖苷(cytosine arabinoside))、5-氟尿嘧啶(氟尿嘧啶;5-FU)和氟尿苷(氟脱氧尿苷;FudR)。5-FU可以约7.5至约1000mg/m2之间的任何剂量施用于对象。此外,5-FU给药方案可以是多种时间段,例如长至六周,或由本公开内容所属领域的普通技术人员确定。

[0291] 另一种合适的化学治疗剂吉西他滨二磷酸(GEMZAR®,Eli Lilly&Co.,“吉西他滨”)被推荐用于治疗晚期和转移性胰腺癌,并且因此也将可用于本公开内容以用于这些癌症。

[0292] 递送至患者的化学治疗剂的量可以是可变的。在一个合适的实施方案中,当化学治疗与构建体一起施用时,化学治疗剂可以以有效地在宿主中引起癌症的停止或消退的量来施用。在另一些实施方案中,化学治疗剂可以以比化学治疗剂的化学治疗有效剂量少2至10,000倍之间的任何量来施用。例如,化学治疗剂可以以比化学治疗剂的化学治疗有效剂

量少约20倍、少约500倍或甚至少约5000倍的量来施用。本公开内容的化学治疗剂可在体内与构建体组合测试用于期望的治疗活性，以及用于确定有效剂量。例如，这样的化合物在人中进行测试之前可在合适的动物模型系统中测试，包括但不限于大鼠、小鼠、鸡、牛、猴、兔等。如实施例中所述，还可使用体外测试来确定合适的组合和剂量。

[0293] F.放射治疗

[0294] 在一些实施方案中，另外的治疗或先前的治疗包括辐射，例如电离辐射。本文中使用的“电离辐射”意指包括通过核相互作用具有足够能量或可产生足够能量以产生电离(电子的获得或损失)的粒子或光子的辐射。一个示例性和优选的电离辐射是x辐射。用于将x辐射递送至靶组织或细胞的手段是本领域公知的。

[0295] 在一些实施方案中，电离辐射的量大于20Gy并且以一剂施用。在一些实施方案中，电离辐射的量为18Gy并且以三剂施用。在一些实施方案中，电离辐射的量至少、至多或正好是2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、18、19、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或40Gy(或可从其中推导出的任何范围)。在一些实施方案中，电离辐射以至少、至多或正好1、2、3、4、5、6、7、8、9或10剂(或可从其中推导出的任何范围)施用。当施用多于一剂时，剂量可相隔约1、4、8、12或24小时，或者1、2、3、4、5、6、7或8天，或者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14或16周，或可从其中推导出的任何范围。

[0296] 在一些实施方案中，IR的量可表示为IR的总剂量，其然后以分次剂量施用。例如，在一些实施方案中，总剂量是50Gy，以每次5Gy的10次分次剂量施用。在一些实施方案中，总剂量为50至90Gy，以每次2至3Gy的20至60次分次剂量施用。在一些实施方案中，IR的总剂量至少、至多或约为

[0297] 20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,125,130,135,140,或150

[0298] (或可从其中推导出的任何范围)。在一些实施方案中，总剂量以至少、至多或正好1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、15、20、25、30、35、40、45或50Gy(或可从其中推导出的任何范围)的分次剂量施用。在一些实施方案中，施用至少、至多或正好

[0299] 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100

[0300] (或可从其中推导出的任何范围)次分次剂量。在一些实施方案中，每天施用至少、至多或正好1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12(或可从其中推导出的任何范围)次分次剂量。在一些实施方案中，每周施用至少、至多或正好1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30(或可从其中推导出的任何范围)次分次剂量。

[0301] G.手术

[0302] 约60％患有癌症的人将经历一些类型的手术，其包括预防性、诊断性或阶段性、治疗性和姑息性手术。治疗性手术包括切除术，其中将所有或部分的癌组织物理地去除、切除和/或破坏，并且可与其他治疗，例如本发明实施方案的治疗、化学治疗、放射治疗、激素治疗、基因治疗、免疫治疗和/或替代治疗联合使用。肿瘤切除是指物理去除至少部分的肿瘤。除肿瘤切除术之外，通过手术的治疗包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微控制的手术(莫氏手术(Mohs'surgery))。

[0303] 在切除部分或全部癌性细胞、组织或肿瘤之后，可在体内形成腔。治疗可通过灌注、直接注射或在该区域局部施加另外的抗癌治疗来完成。这样的治疗可例如每1、2、3、4、5、6或7天，或者每1、2、3、4和5周，或者每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月重复进行。这些治疗也可具有多种剂量。

[0304] H.其他药剂

[0305] 考虑可将其他药剂与本发明实施方案的某些方面组合使用以提高治疗的治疗效力。这些另外的药剂包括影响细胞表面受体和GAP连接的上调的药剂、细胞抑制剂和分化剂、细胞黏附抑制剂、提高过度增殖细胞对凋亡诱导剂的敏感性的药剂，或其他生物药剂。通过提高GAP连接数而提高胞间信号传导将提高对邻近过度增殖细胞群的抗过度增殖作用。在另一些实施方案中，细胞抑制剂或分化剂可与本发明实施方案的某些方面组合使用以提高治疗的抗过度增殖效力。考虑了细胞黏附抑制剂以提高本发明实施方案的效力。细胞黏附抑制剂的一些实例是黏着斑激酶(focal adhesion kinase，FAK)抑制剂和洛伐他汀。还考虑了可将提高过度增殖细胞对凋亡的敏感性的其他药剂(例如抗体c225)与本发明实施方案的某些方面组合使用以提高治疗效力。

[0306] VII.药物组合物

[0307] 本公开内容包括用于在有此需要的对象中治疗疾病和调节免疫应答的方法。本公开内容包括可以为药物组合物形式的细胞，所述药物组合物可用于诱导或修饰免疫应答。

[0308] 根据本公开内容的组合物的施用将通常经由任何常见途径进行。这包括但不限于肠胃外、原位、皮内、皮下、经口、经皮、肌内、腹膜内、腹膜内、眼内、通过植入、通过吸入、脑室内、鼻内或静脉内注射。在一些实施方案中，本公开内容的组合物(例如，包含表达治疗性受体的细胞的组合物)通过静脉内注射施用。

[0309] 通常，本公开内容的组合物和治疗以与剂量制剂相容的方式并且以将是治疗有效和免疫修饰的这样的量施用。待施用的数量取决于待治疗的对象。需要施用的活性成分的确切量取决于从业者的判断。

[0310] 施加的方式可广泛地变化。用于施用包含细胞组分的药物组合物的任何常规方法都是适用的。药物组合物的剂量将取决于施用途径，并且将根据对象的身材大小和健康而变化。

[0311] 在许多情况下，将期望具有至多约或至少约3、4、5、6、7、8、9、10或更多次的多次施用。施用可以为2天至12周间隔，更通常为一至两周间隔。施用过程之后可进行对于同种异体反应性免疫应答和T细胞活性的测定。

[0312] 短语“可药用”或“药理学上可接受的”是指当施用于动物或人时不产生不良反应、变应性反应或其他不良反应的分子实体和组合物。本文中使用的“可药用载体”包含任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。这样的介质和试

剂用于药物活性物质的用途是本领域公知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容，否则考虑其在免疫原性和治疗性组合物中的使用。本公开内容的药物组合物是可药用组合物。

[0313] 本公开内容的组合物可配制成用于肠胃外施用，例如，配制成用于经由静脉内、肌内、皮下或甚至腹膜内途径注射。通常，这样的组合物可制备成作为液体溶液剂或混悬剂的可注射剂，并且制剂还可被乳化。

[0314] 适合于可注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体；包括芝麻油、花生油或水性丙二醇的制剂。其在制造和储存条件下也应该是稳定的，并且必须被保存以免受微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。

[0315] 通过将活性成分(即，本公开内容的细胞)以需要的量与以上列举的多种其他成分(根据需要)一起并入适当溶剂中随后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。通常来说，通过将多种经灭菌的活性成分并入无菌载剂中来制备分散体，所述无菌载剂包含基础分散介质和所需要的来自以上列举的那些的其他成分。

[0316] 基于预期目标确定组合物的有效量。术语“单位剂量”或“剂量”是指适合用于对象中的物理离散单位，每个单位包含经计算产生与其施用(即适当的途径和方案)相关的本文中讨论的所期望响应的预定量的组合物。根据治疗次数和单位剂量二者，待施用的量取决于所期望的结果和/或保护。组合物的确切量还取决于从业者的判断，并且对于每个个体是特有的。影响剂量的因素包括对象的身体和临床状态、施用途径、预期的治疗目标(症状的减轻与治愈)，以及特定组合物的效力、稳定性和毒性。在配制之后，溶液以与剂量制剂相容的方式并且以治疗或预防有效的量来施用。制剂易于以多种剂型施用，例如上述可注射溶液的类型。

[0317] 本公开内容的组合物和相关方法，特别是本公开内容的组合物的施用，也可与另外的治疗例如本文中所述的另外的治疗的施用组合使用，或者与本领域已知的其他传统治疗组合使用。

[0318] 本文中公开的治疗性组合物和治疗可在另一治疗或药剂之前、与之同时和/或之后进行，间隔为数分钟至数周。在将药剂分开施加于细胞、组织或生物体的实施方案中，通常将确保在每次递送的时间之间重要的时间段没有到期，使得治疗剂仍将能够对细胞、组织或生物体发挥有利的组合作用。例如，在这样的情况下，预期可使细胞、组织或生物体与两种、三种、四种或更多种药剂或治疗基本同时(即，在小于约一分钟内)接触。在另一些方面中，一种或更多种治疗剂或治疗可在施用另一治疗剂或治疗之前和/或之后在以下时间内施用或提供：1分钟、5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、45分钟、60分钟、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、22小时、23小时、24小时、25小时、26小时、27小时、28小时、29小时、30小时、31小时、32小时、33小时、34小时、35小时、36小时、37小时、38小时、39小时、40小时、41小时、42小时、43小时、44小时、45小时、46小时、47小时、48小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周或更长时间，以及可从其中推导出的任何范围。

[0319] 治疗可包括多种“单位剂量”。单位剂量被定义为包含预定量的治疗性组合物。待

施用的量以及特定途径和制剂在临床领域技术人员的技能决定范围内。单位剂量不需要作为单次注射施用，但可包括在设定时间段内连续输注。在一些实施方案中，单位剂量包括单一可施用剂量。

[0320] 根据治疗次数和单位剂量二者，待施用的量取决于所期望的治疗效果。有效剂量被理解为是指达到特定效果所需的量。在某些实施方案中的实践中，预期在10mg/kg至200mg/kg范围内的剂量可影响这些药剂的保护能力。因此，预期剂量包括以下剂量：约0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、和200、300、400、500、1000μg/kg、mg/kg、μg/天、或mg/天、或可从其中推导出的任何范围。此外，这样的剂量可在一天内、和/或在数天、数周或数月内多次施用。

[0321] 在一些实施方案中，无论通过一次施用或是更多次施用，施用于人的免疫检查点抑制剂(例如抗体和/或微生物调节剂)的治疗有效量或足够量将在约0.01至约50mg/kg患者体重的范围内。在一些实施方案中，使用的治疗为例如每天施用约0.01至约45mg/kg、约0.01至约40mg/kg、约0.01至约35mg/kg、约0.01至约30mg/kg、约0.01至约25mg/kg、约0.01至约20mg/kg、约0.01至约15mg/kg、约0.01至约10mg/kg、约0.01至约5mg/kg、或约0.01至约1mg/kg。在一个实施方案中，本文中所述的治疗在21天周期的第1天以约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、约1000mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg或约1400mg的剂量施用于对象。剂量可作为单剂量或作为多剂量(例如，2或3次剂量)施用，例如输注。这种治疗的进展容易通过常规技术进行监测。

[0322] 在某些实施方案中，药物组合物的有效剂量是可提供约1μM至150μM的血液水平的剂量。在另一个实施方案中，有效剂量提供约4μM至100μM；或约1μM至100μM；或约1μM至50μM；或约1μM至40μM；或约1μM至30μM；或约1μM至20μM；或约1μM至10μM；或约10μM至150μM；或约10μM至100μM；或约10μM至50μM；或约25μM至150μM；或约25μM至100μM；或约25μM至50μM；或约50μM至150μM；或约50μM至100μM(或可从其中推导出的任何范围)的血液水平。在另一些实施方案中，剂量可提供药剂的以下血液水平(其是由向对象施用的治疗剂产生的)：约、至少约或至多约

[0323] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100

[0324] μM或可从其中推导出的任何范围。在某些实施方案中，施用于对象的治疗剂在体内被代谢为经代谢的治疗剂，在这种情况下，血液水平可指该治疗剂的量。或者，到了治疗剂不被对象代谢的程度，本文中讨论的血液水平可指未经代谢的治疗剂。

[0325] 治疗性组合物的确切量还取决于从业者的判断并且对每个个体是特有的。影响剂量的因素包括患者的身体和临床状态、施用途径、预期的治疗目标(症状的减轻与治愈)，以及对象可能正在经历的特定治疗性物质或其他治疗的效力、稳定性和毒性。

[0326] 本领域技术人员将理解并意识到，可将μg/kg或mg/kg体重的剂量单位转换并以μg/ml或mM(血液水平)的相当浓度单位(例如4μM至100μM)来表示。还应理解，摄取依赖于物种和器官/组织。待进行的与摄取和浓度测量有关的适用的转换因素和生理假设是公知的，

并且将允许本领域技术人员将一种浓度测量转换为另一种浓度测量，并且对本文中所述的剂量、效力和结果做出合理的比较和结论。

[0327] VIII.序列

[0328] 可用于本公开内容的方法和组合物的示例性嵌合多肽和CAR分子的氨基酸序列在下表1中提供。

[0329] 表1:CAR

[0330]

名称	SEQ ID NO:	序列
20D7SS	1	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWLMYTFGQGTKLEIKG STSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASG YTFTSYAMNWVRQAPGQGLESMGWINTNTGNPTYAQGFTGR FVFSMDTSVSTAYLQISSLKAEDTAIYYCAPRYSSSWYLDYWG QGTLVTVSSESKYGPPCPPCPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAF

[0331]

		IIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
20D7SM	2	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWLMYTFGQGTKLEIKG STSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASG YTFTSYAMNWVRQAPGQGLESMGWINTNTGNPTYAQGFTGR FVFSMDTSVSTAYLQISSLKAEDTAIYYCAPRYSSSWYLDYWG QGTLVTVSSESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMN MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR
20D7SL (也称为 "20D7SL-28z")	3	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWLMYTFGQGTKLEIKG STSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASG YTFTSYAMNWVRQAPGQGLESMGWINTNTGNPTYAQGFTGR FVFSMDTSVSTAYLQISSLKAEDTAIYYCAPRYSSSWYLDYWG QGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKFWVLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAP PRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
20D7SL-BBZ	88	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWLMYTFGQGTKLEIKG STSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASG YTFTSYAMNWVRQAPGQGLESMGWINTNTGNPTYAQGFTGR FVFSMDTSVSTAYLQISSLKAEDTAIYYCAPRYSSSWYLDYWG QGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV

[0332]

		FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKFWVLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0333] 本公开内容的TYRP-1结合区的示例性CDR实施方案包括下表2中提供的那些。

[0334] 表2:TYRP-1结合区的CDR

[0335]

名称	SEQ ID NO:	序列
LCDR1	6	RASQSVSSYLA
LCDR2	7	DASNRAT
LCDR3	8	QQRSNWLMYT
HCDR1	11	GYTFTSYAMN
HCDR2	12	WINTNTGNPTYAQGFTG
HCDR3	13	RYSSSWYLDY

[0336] 可用于本公开内容的方法和组合物的另外的多肽、结构域和区在下表3中提供。

[0337] 表3:可用于本公开内容的实施方案的多肽结构域

[0338]

名称	SEQ ID NO:	序列
鼠κ链信号肽	4	METDTLLLWVLLLWVPGSTG
VL	5	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWLMYTFGQGTKLEIK
Whitlow 接头	9	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
VH	10	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTSYAMNW VRQAPGQGLESMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFS MDTSVSTAYLQISSLKAEDTAIYYCAPRYSSSWYLDY WGQGTLVTVSS
铰链-短	14	ESKYGPPCPPCP

[0339]

铰链-中	15	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK
铰链-长	16	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK
CD28 跨膜结构域	17	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
CD28 共刺激结构域	18	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF AAYRS
CD3ζ 初级信号传导结构域	19	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR

[0340] IX.实施例

[0341] 包括以下实施例以说明本公开内容的一些优选实施方案。本领域技术人员应理解,在以下实施例中公开的技术代表本发明人发现在本公开内容的实践中发挥良好作用的技术,并因此可被认为构成了用于本公开内容实践的优选模式。然而,本领域技术人员根据本公开内容应理解,可在不脱离本公开内容的精神和范围的情况下,对所公开的具体实施方案作出许多变化而仍然获得相同或相似的结果。实施例不应以任何方式解释为限制。所有引用的参考文献(包括参考文献、已授权的专利、已公布的专利申请和本申请通篇引用的GenBank登录号)的内容通过引用明确并入本文。当通过引用并入本文的文件中的术语定义与本文使用的术语定义冲突时,以本文使用的定义为准。

[0342] 实施例1:在具有不同的TYRP-1表达水平的一组人黑素瘤细胞系中的体外细胞毒性

[0343] 将人PBMC用编码20D7SS(SEQ ID NO:1)、20D7SM(SEQ ID NO:2)或20D7SL(SEQ ID NO:3)CAR构建体的逆转录病毒载体活化和转导。将T细胞扩增5天,并随后使用5:1、1:1或1:5的T细胞产物与黑素瘤细胞(P:T)的比率与黑素瘤细胞单层进行共培养。将在仅培养基中培养的黑素瘤细胞(RPMI)或未经转导的T细胞(模拟)用作对照。使用的黑素瘤细胞系稳定表达核RFP(nRFP)。为了测量细胞毒性,随时间追踪nRFP的百分比。具有高TYRP-1表达的黑素瘤细胞M285、M230、M249和M207的结果示出在图1A中。在每个测量的比率(5:1、1:1和1:5)下,至少一种测试的CAR构建体在所有四种细胞系中有效降低黑素瘤细胞的生存力。具有低TYRP-1表达的黑素瘤细胞M202和M229的结果示出在图1B中。平均值±SD示出在图中。

[0344] 实施例2:在与具有不同的TYRP-1表达水平的一组人黑素瘤细胞系共培养之后T细胞的体外细胞因子分泌

[0345] 将人PBMC用编码20D7SS(SEQ ID NO:1)、20D7SM(SEQ ID NO:2)或20D7SL(SEQ ID NO:3)CAR构建体的逆转录病毒载体活化和转导。将T细胞扩增5天,并随后使用5:1、1:1或1:5的T细胞产物与黑素瘤细胞(P:T)的比率与黑素瘤细胞单层进行共培养。将未经转导的T细胞(模拟)用作对照。在共培养之后24小时,收集上清液并通过ELISA量化IFNγ分泌。作为另外的对照,还在不存在靶黑素瘤细胞(RPMI,仅T细胞对照)的情况下测量了IFNγ的分泌。所有细胞的结果示出在图2中。平均值±SD示出在图中。*表示p<0.05vs.模拟T细胞,使用t检验和Holm-Sidak校正进行多重比较。对于每个测试的比率(5:1、1:1和1:5),图2从左到右示出了来自用模拟细胞、20D7SS、20D7SM、20D7SL和RPMI进行的处理的IFNγ分泌。

[0346] 实施例3:鼠黑素瘤细胞系中的体外细胞毒性和细胞因子分泌

[0347] 使C57/B6小鼠安乐死,收集它们的脾脏,并用CD3/28珠和白介素-2(IL2)纯化和活化CD3+T细胞。在活化之后24小时,用编码20D7SS(SEQ ID NO:1)、20D7SM(SEQ ID NO:2)或20D7SL(SEQ ID NO:3)CAR构建体的逆转录病毒载体转导T细胞。将T细胞扩增6天,并随后使用5:1、1:1或1:5的T细胞产物与黑素瘤细胞(P:T)的比率与B16-F10黑素瘤单层进行共培养。将未经转导的T细胞(模拟)或仅细胞培养基(RPMI)用作对照。将T细胞的细胞毒性通过随时间的nRFP汇合百分比来测量;这些结果示于图3A中。相对于模拟或RPMI处理,用所有三种CAR构建体进行的处理在所有三种比率(5:1、1:1和1:5)下均导致细胞生存力降低。B16-F10细胞系先前被修饰以组成型地表达nRFP。在共培养之后24小时,通过ELISA量化IFNγ的存在。作为另外的对照,还在不存在靶黑素瘤细胞(RPMI,仅T细胞对照)的情况下测量了IFNγ的分泌。这些结果示出在图3B中。用所有三种CAR构建体进行的处理在所有三种比率(5:1、1:1和1:5)下均刺激了IFNγ,而对照处理没有。平均值±SD示出在图中。

[0348] 实施例4:20D7SS、20D7SM和20D7SL CAR构建体在免疫活性鼠模型中的体内抗肿瘤活性

[0349] 如实施例3所述纯化、转导和扩增来自C57/B6小鼠的鼠T细胞。在转导之后四天,将用编码20D7SS(SEQ ID NO:1)、20D7SM(SEQ ID NO:2)或20D7SL(SEQ ID NO:3)CAR构建体的逆转录病毒载体转导的500万个T细胞静脉内施用到荷B16-F10黑素瘤肿瘤的C57/B6小鼠中。将未经转导的T细胞(模拟)或PBS用作对照。将小鼠在T细胞施用之前一天用淋巴细胞清除全身辐照(500cGy)进行预处理。在T细胞转移之后的第0、1和2天,施用三剂50,000IU/小鼠的人IL2。使用卡尺随时间追踪肿瘤体积。结果示出在图4中。平均值±SD示出在图中。***p<0.001,****p<0.0001,与20D7SL CAR处理组相比,使用双因素ANOVA和Tukey校正进行多重比较。相对于对照处理,用表达20D7SL的细胞进行的处理显著延迟了该模型中的肿瘤生长。

[0350] 实施例5:20D7SL CAR构建体在免疫活性鼠模型中的体内抗肿瘤活性

[0351] 如实施例3所述纯化、转导和扩增来自C57/B6小鼠的鼠T细胞。在转导之后4天,将用编码20D7SL(SEQ ID NO:3)CAR构建体的逆转录病毒载体转导的500万(5M)或1000万(10M)T细胞静脉内施用到荷B16-F10黑素瘤肿瘤的C57/B6小鼠中。将未经转导的T细胞(模拟)或PBS用作对照。将小鼠在T细胞施用之前一天用淋巴细胞清除全身辐照(500cGy)进行预处理。在T细胞转移之后的第0、1和2天,施用三剂50,000IU/小鼠的人IL2。使用卡尺随时间追踪肿瘤体积。结果示出在图5中。平均值±SD示出在图中。****p<0.0001,与模拟5M处理组相比,####p<0.0001,与模拟10M处理组相比,使用双因素ANOVA和Tukey校正进行多重

比较。相对于对照处理，用表达20D7SL的5M和10M细胞进行的处理均显著延迟了该模型中的肿瘤生长。

[0352] 实施例6：单独的20D7SL CAR构建体或与标准IL-2处理组合的20D7SL CAR构建体在免疫活性鼠模型中的体内抗肿瘤活性

[0353] 将来自C57/B6小鼠的鼠T细胞纯化、活化、转导和扩增五天。转导之后4天，将用编码20D7SL CAR构建体的逆转录病毒载体转导的1000万个T细胞静脉内施用到荷B16-F10黑素瘤肿瘤的C57/B6小鼠中。将未经转导的T细胞(模拟)或PBS用作对照。将小鼠在T细胞施用之前一天用淋巴细胞清除全身辐照(500cGy)进行预处理。在指定组中，在T细胞转移之后的第0、1和2天，施用三剂50,000IU/小鼠的人IL-2。使用卡尺随时间追踪肿瘤体积(平均值±SD示出在图中)。结果示出在图6中。*p＜0.05vs模拟;#p＜0.05vs模拟+IL2，未配对t检验和Holm-Sidak校正进行多重比较。相对于对照处理，在有和没有Il-2的情况下，用表达20D7SL的细胞进行的处理显著延迟了该模型中的肿瘤生长。

[0354] 实施例7：20D7SL CAR T在免疫缺陷小鼠模型中在患者来源的黑素瘤模型中的体内抗肿瘤活性

[0355] 将人PBMC活化，用表达20D7SL CAR的逆转录病毒载体转导，并扩增9天。将用编码20D7SL CAR构建体的逆转录病毒载体转导的1000万个T细胞静脉内施用到荷M207(图7A)和M249(图7B)皮下肿瘤的NSG小鼠中。将CD19CAR-T细胞或仅载剂用作阴性对照。使用卡尺随时间追踪肿瘤体积(平均值±SD示出在图中)。结果示出在图7A(M207细胞)和图7B(M249细胞)中。*p＜0.05vs PBS;#p＜0.05vs CD19CAR-T细胞，未配对t检验和Holm-Sidak校正进行多重比较。

[0356] 实施例8：20D7SL CAR构建体在具有TYRP-1的阴性表达的一组人非黑素瘤细胞系中随时间的体外细胞毒性

[0357] 将人PBMC活化，用编码20D7SL-28z CAR构建体(包含CD28共刺激信号传导结构域)或20D7SL-BBZ构建体(包含4-1BB共刺激信号传导结构域)的慢病毒载体转导。将这些细胞扩增9天。将CAR-T细胞和对照使用1∶1的T细胞产物与肿瘤细胞的比率与A549(图8A，肺腺癌)、UPS-03(图8B，肉瘤)和UPS-04(图8C，肉瘤)细胞进行共培养。将未经转导的T细胞(模拟)或仅细胞培养基(RPMI)用作对照。这些非黑素瘤肿瘤细胞系稳定表达核RFP(nRFP)。为了测量细胞毒性，随时间追踪nRFP的百分比。结果示出在图8A至8C中。平均值±SD示出在图中。具有TYRP-1的阴性表达的细胞系的生存力没有降低。

[0358] 实施例9：与TYRP-1敲除细胞系共培养之后体外细胞因子分泌和细胞毒性的丧失

[0359] 将人PBMC活化，用编码具有CD28共刺激信号传导结构域的20D7SL CAR构建体的慢病毒载体转导，并扩增9天。将CAR-T细胞和对照与M285人黑素瘤细胞系野生型(具有TYRP-1的高表达)或M285-TYRP-1敲除细胞系使用5∶1的T细胞产物与黑素瘤细胞比率进行共培养。将未经转导的T细胞(模拟)用作对照。在共培养之后24小时，收集上清液并通过ELISA量化IFNγ分泌(图9A)。随时间测量细胞毒性(图9B)。这些黑素瘤肿瘤细胞系稳定地表达核RFP(nRFP)。为了测量细胞毒性，随时间追踪nRFP的百分比。结果示出在图9A至9B中。平均值±SD示出在图中。用CAR-T细胞进行的处理刺激了IFNγ表达并抑制了TYPR-1表达细胞中的肿瘤细胞生长。

[0360] 实施例10：具有不同共刺激信号传导结构域的20D7SL CAR-T细胞的体外抗肿瘤活

性

[0361] 将人PBMC活化，用编码具有4-1BB共刺激信号传导结构域(20D7SL-BBZ)或CD28共刺激信号传导结构域(20D7SL-28z)的20D7SL CAR构建体的慢病毒载体转导，并扩增9天。将CAR-T细胞和对照与一组具有TYRP-1的高表达的黑素瘤细胞系使用5:1的T细胞产物与黑素瘤细胞比率进行共培养。将未经转导的T细胞(模拟)用作对照。在共培养之后24小时，收集上清液并通过ELISA量化IFNγ分泌(图10A)。作为另外的对照，还在没有靶黑素瘤细胞(RPMI，仅T细胞对照)的情况下测量了干扰素-γ的分泌。在共培养之后48小时测量生长抑制百分比(图10B)。这些黑素瘤肿瘤细胞系稳定地表达核RFP(nRFP)。为了测量细胞毒性，随时间追踪nRFP的百分比。将用CAR-T细胞处理的肿瘤细胞单层中的nRFP百分比相对于用未经转导的T细胞处理的肿瘤细胞单层中的nRFP百分比归一化以计算肿瘤生长抑制的百分比。结果示出在图10A和10B中。平均值±SD和单个值示出在图中。20D7SL-BBZ和20D7SL-28z均刺激了IFNγ分泌并抑制了肿瘤细胞生长。

[0362] 实施例11:具有不同共刺激信号传导结构域的20D7SL CAR T在免疫缺陷小鼠模型中在患者来源的黑素瘤模型中的体内抗肿瘤活性。

[0363] 将人PBMC活化，用编码具有4-1BB共刺激信号传导结构域(20D7SL-BBZ)或CD28共刺激信号传导结构域(20D7SL-28z)的20D7SL CAR构建体的慢病毒载体转导，并扩增9天。将用慢病毒载体转导的1000万个T细胞静脉内施用于荷M230(图11A)和M249(图11B)皮下肿瘤的NSG小鼠。使用卡尺随时间追踪肿瘤体积(平均值±SD示出在图中)。将未经转导的T细胞或载剂用作阴性对照。结果示出在图11A和11B中。*p＜0.05vs PBS;#p＜0.05vs未经转导的T细胞，未配对t检验和Holm-Sidak校正进行多重比较。20D7SL-BBZ和20D7SL-28z均抑制了肿瘤生长。

[0364] 实施例12:结合TCGA数据集和BMS-CA029和MK3475-001临床试验数据集的所有患者中的TYRP-1表达。

[0365] 分析了来自多个数据库的TYRP-1表达数据。图12A示出了所有黑素瘤患者的TYRP-1表达。图12B示出了肢端黑素瘤患者的TYRP-1表达。图12C示出了黏膜黑素瘤患者的TYRP-1表达。图12D示出了葡萄膜黑素瘤患者的TYRP-1表达。灰色虚线表示阳性TYRP-1表达(≥1 Log2 FPKM)和高TYRP表达(≥7 Log2 FPKM)。

[0366] * * *

[0367] 根据本公开内容，本文中公开和要求保护的所有方法均可在不进行过度实验的情况下做出和执行。虽然已经根据一些优选实施方案描述了本公开内容的组合物和方法，但是对于本领域技术人员来说显而易见的是，在不脱离本公开内容的概念、精神和范围的情况下，可以对本文所述方法以及本文所述方法的步骤或步骤序列施加变化。更具体地，将明显的是，在化学和生理学两方面均相关的某些试剂可替代本文中所述的试剂而将实现相同或类似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有这样的类似替代和修改被视为在所附权利要求书限定的本公开内容的精神、范围和概念内。

[0368] 在本申请中列举的参考文献就其提供了补充本文中阐述的那些的示例性操作或其他细节而言特别地通过引用并入本文。

[0369] 参考文献

[0370] 在整个说明书中引用的以下参考文献和出版物，就其提供了补充本文中阐述的那

些的示例性操作或其他细节而言特别地通过引用并入本文。

[0371] Patel D,Balderes P,Lahiji A,Melchior M,Ng S,Bassi R,et al.Generation and characterization of a therapeutic human antibody to melanoma antigen TYRP1.Hum Antibodies.2007;16(3-4):127-36.

[0372] Zhu EF,Gai SA,Opel CF,Kwan BH,Surana R,Mihm MC,et al.Synergistic innate and adaptive immune response to combination immunotherapy with anti-tumor antigen antibodies and extended serum half-life IL-2.Cancer Cell.2015;27(4):489-501.

[0373] Moynihan KD,Opel CF.Szeto GL,Tzeng A,Zhu EF,Engrcitz JM,et al.Eradication of largc established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses.Nature medicine.2016;22(12):1402-10

[0374] Khalil DN,Postow MA,Ibrahim N,Ludwig DL,Cosaert J,Kambhampati SR,et al.An Open-Label,Dose-Escalation Phase I Study of Anti-TYRP1 Monoclonal Antibody IMC-20D7S for Patients with Relapsed or Refractory Melanoma.Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research.2016;22(21):5204-10.

序列表

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> 用于治疗癌症的嵌合抗原受体及相关方法和组合物

<130> UCLA.P0096WO / 1001133230

<150> US 62/897,062
<151> 2019-09-06

<160> 89

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 1

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

[0001]

Gly Ser Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Leu Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
130 135 140

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

Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
165 170 175

Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
180 185 190

Ser Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln
195 200 205

Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Val Ser Thr
210 215 220

Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
225 230 235 240

[0002]

Tyr Cys Ala Pro Arg Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
260 265 270

Cys Pro Pro Cys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
275 280 285

Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
290 295 300

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
305 310 315 320

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
325 330 335

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
340 345 350

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
355 360 365

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
370 375 380

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
385 390 395 400

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
405 410 415

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
420 425 430

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
435 440 445

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
450 455

[0003]

<210> 2
<211> 564
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 2

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Leu Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
130 135 140

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

Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
165 170 175

[0004] Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
180 185 190

Ser Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln
195 200 205

Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Val Ser Thr
210 215 220

Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Pro Arg Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
260 265 270

Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
275 280 285

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

290 295 300

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
305 310 315 320

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
325 330 335

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
340 345 350

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
355 360 365

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
370 375 380

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
385 390 395 400

[0005] Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
405 410 415

Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
420 425 430

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
435 440 445

Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
450 455 460

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
465 470 475 480

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
485 490 495

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
500 505 510

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met

515 520 525

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
530 535 540

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
545 550 555 560

Leu Pro Pro Arg

<210> 3
<211> 674
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

[0006]

Gly Ser Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Leu Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
130 135 140

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

Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
165 170 175

Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
180 185 190

Ser Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln
195 200 205

Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Val Ser Thr
210 215 220

Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
225 230 235 240

[0007]

Tyr Cys Ala Pro Arg Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
260 265 270

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe
275 280 285

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

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
305 310 315 320

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
325 330 335

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

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

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
370 375 380

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

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
405 410 415

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

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

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

[0008]

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
465 470 475 480

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Phe Trp
485 490 495

Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
500 505 510

Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly
515 520 525

Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr
530 535 540

Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr
545 550 555 560

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

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
580 585 590

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
595 600 605

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
610 615 620

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
625 630 635 640

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
645 650 655

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
660 665 670

Pro Arg

[0009]

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 4

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 5
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 5

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

[0010]

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 6

```
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1               5                   10
```

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 7

```
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1               5
```

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 8

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 9
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 9

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

[0011]
Lys Gly

<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 10

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Pro Arg Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0012] <400> 11

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ala Met Asn
1 5 10

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 12

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr
1 5 10 15

Gly

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 13

Arg Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 14

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

<210> 15
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

[0013]

<220>
<223> 合成肽

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
115

<210> 16
<211> 229
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 16

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
[0014] 35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

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

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 17
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

[0015] <220>
<223> 合成肽

<400> 17

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

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

<210> 18
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 18

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

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 19

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

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

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

[0016]

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

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

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

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

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 20

Asp Lys Thr His Thr

1 5

<210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 21

Cys Pro Pro Cys
1

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 22

[0017]
Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
1 5 10 15

<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 23

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 24

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1 5 10

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 25

Lys Cys Cys Val Asp Cys Pro
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 26

[0018] Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 27

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

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 28

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 29

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0019]

<400> 30

Ser Pro Asn Met Val Pro His Ala His His Ala Gln
1 5 10

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 31

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

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 32

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

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 33

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Tyr Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 34
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0020]

<400> 34

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

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

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

<210> 35
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 35

Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
[0021] <213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 36

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
100 105

<210> 37
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 37

Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Val Ala Ile His Leu Cys Cys
20

<210> 38
<211> 25
[0022] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 38

Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly
1 5 10 15

Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys
20 25

<210> 39
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 39

Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu
1 5 10 15

Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val
20

<210> 40
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 40

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

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

<210> 41
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

[0023] <220>
<223> 合成肽

<400> 41

Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro
1 5 10 15

Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
20 25

<210> 42
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 42

Ala Leu Pro Ala Ala Leu Ala Val Ile Ser Phe Leu Leu Gly Leu Gly
1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Cys Val Leu Ala

20

<210> 43
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 43

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp
20 25 30

Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met
35 40 45

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
50 55 60

[0024]

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg
65 70 75 80

Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
85 90 95

Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr
100 105 110

Lys

<210> 44
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 44

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp
20 25 30

Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met
35 40 45

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
50 55 60

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Thr Arg Lys
65 70 75 80

Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln
85 90 95

Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys
100 105 110

[0025] <210> 45
<211> 102
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 45

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Asp Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu
20 25 30

Ala Gly Ile Val Met Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu
35 40 45

Ala Val Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala
50 55 60

Glu Ala Ala Thr Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr
65 70 75 80

Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr
85 90 95

Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys
100

<210> 46
<211> 101
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 46

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Asp Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu
20 25 30

Ala Gly Ile Val Met Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu
[0026] 35 40 45

Ala Val Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala
50 55 60

Glu Ala Thr Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln
65 70 75 80

Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln
85 90 95

Arg Pro Tyr Tyr Lys
100

<210> 47
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 47

Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser
1 5 10 15

Asp Leu Asn Thr Gln
20

<210> 48
<211> 86
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 48

Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala
1 5 10 15

Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu
20 25 30

[0027]

Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile
35 40 45

Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val
50 55 60

Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys
65 70 75 80

His Glu Lys Pro Pro Gln
85

<210> 49
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 49

Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu
1 5 10 15

Thr Leu Lys His Glu
20

<210> 50
<211> 171
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 50

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
[0028] 50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
130 135 140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr
145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys

165 170

<210> 51
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 51

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
50 55 60

[0029]

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Thr Ala Asp Thr Gln
85 90 95

Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp
100 105 110

Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
115 120 125

<210> 52
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 52

Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser

1 5 10 15

His Leu Gly Gly Asn
20

<210> 53
<211> 207
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 53

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

[0030]

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 54
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 54

Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser
1 5 10 15

[0031] Gly Leu Asn Gln Arg
20

<210> 55
<211> 182
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 55

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
1 5 10 15

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
20 25 30

Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe
50 55 60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
100 105 110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
145 150 155 160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
165 170 175

[0032]

Asn Gln Leu Arg Arg Asn
180

<210> 56
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 56

Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser
1 5 10 15

His Leu Gln Gly Asn
20

<210> 57
<211> 163
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 57

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

[0033]

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
100 105 110

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
115 120 125

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
130 135 140

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
145 150 155 160

Pro Pro Arg

<210> 58
<211> 164
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 58

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

[0034] Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
100 105 110

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
115 120 125

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
130 135 140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

<210> 59
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 59

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

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

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

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

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

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

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

[0035]

<210> 60
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 60

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

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

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

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

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

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

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

<210> 61
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 61

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
1 5 10 15

Val Leu Asp Lys Arg
20

[0036]

<210> 62
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 62

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
1 5 10 15

Ser Glu Ile Gly Met Lys
20

<210> 63
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 63

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
1 5 10 15

Ala Leu His Met Gln
20

<210> 64
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 64

Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe
1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala
20 25 30

[0037]

Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu
35 40 45

Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val
50 55 60

Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe
65 70 75 80

Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile Gln Asn Val
85 90 95

Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn
100 105 110

Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro
115 120 125

Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile
130 135 140

Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly

145 150 155 160

Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu
165 170 175

Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn
180 185 190

Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly
195 200 205

Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu
210 215 220

Lys Pro
225

<210> 65
<211> 188
<212> PRT
<213> 人工序列

[0038]

<220>
<223> 合成肽

<400> 65

Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe
1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala
20 25 30

Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu
35 40 45

Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val
50 55 60

Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe
65 70 75 80

Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Glu Pro Pro Pro Arg Pro Phe Leu
85 90 95

Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile Ile Thr Ala Glu Gly Ile
100 105 110

Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly Thr Leu Leu Leu Phe Arg
115 120 125

Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu Asp Ala Gly Asp Glu Tyr
130 135 140

Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met
145 150 155 160

Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly Thr Tyr Gln Asp Val Gly
165 170 175

Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu Lys Pro
180 185

[0039]

<210> 66
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 66

Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu
1 5 10 15

Asp Ile Ser Arg Gly
20

<210> 67
<211> 68
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 67

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

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
20 25 30

Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
35 40 45

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
50 55 60

Ala Tyr Arg Ser
65

<210> 68
<211> 68
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 68

[0040]
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
20 25 30

Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
35 40 45

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
50 55 60

Ala Tyr Arg Ser
65

<210> 69
<211> 619
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 69

Met Pro Asp Pro Ala Ala His Leu Pro Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser
1 5 10 15

Arg Ala Glu Ala Glu Glu His Leu Lys Leu Ala Gly Met Ala Asp Gly
20 25 30

Leu Phe Leu Leu Arg Gln Cys Leu Arg Ser Leu Gly Gly Tyr Val Leu
35 40 45

Ser Leu Val His Asp Val Arg Phe His His Phe Pro Ile Glu Arg Gln
50 55 60

Leu Asn Gly Thr Tyr Ala Ile Ala Gly Gly Lys Ala His Cys Gly Pro
65 70 75 80

Ala Glu Leu Cys Glu Phe Tyr Ser Arg Asp Pro Asp Gly Leu Pro Cys
85 90 95

Asn Leu Arg Lys Pro Cys Asn Arg Pro Ser Gly Leu Glu Pro Gln Pro
100 105 110

[0041]

Gly Val Phe Asp Cys Leu Arg Asp Ala Met Val Arg Asp Tyr Val Arg
115 120 125

Gln Thr Trp Lys Leu Glu Gly Glu Ala Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser
130 135 140

Gln Ala Pro Gln Val Glu Lys Leu Ile Ala Thr Thr Ala His Glu Arg
145 150 155 160

Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys
165 170 175

Leu Tyr Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg
180 185 190

Lys Glu Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val
195 200 205

Tyr His Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro
210 215 220

Glu Gly Thr Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys
225 230 235 240

Leu Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn
245 250 255

Ser Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala
260 265 270

His Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Gln Arg Arg Ile Asp Thr Leu Asn
275 280 285

Ser Asp Gly Tyr Thr Pro Glu Pro Ala Arg Ile Thr Ser Pro Asp Lys
290 295 300

Pro Arg Pro Met Pro Met Asp Thr Ser Val Tyr Glu Ser Pro Tyr Ser
305 310 315 320

Asp Pro Glu Glu Leu Lys Asp Lys Lys Leu Phe Leu Lys Arg Asp Asn
325 330 335

[0042]

Leu Leu Ile Ala Asp Ile Glu Leu Gly Cys Gly Asn Phe Gly Ser Val
340 345 350

Arg Gln Gly Val Tyr Arg Met Arg Lys Lys Gln Ile Asp Val Ala Ile
355 360 365

Lys Val Leu Lys Gln Gly Thr Glu Lys Ala Asp Thr Glu Glu Met Met
370 375 380

Arg Glu Ala Gln Ile Met His Gln Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Val Arg
385 390 395 400

Leu Ile Gly Val Cys Gln Ala Glu Ala Leu Met Leu Val Met Glu Met
405 410 415

Ala Gly Gly Gly Pro Leu His Lys Phe Leu Val Gly Lys Arg Glu Glu
420 425 430

Ile Pro Val Ser Asn Val Ala Glu Leu Leu His Gln Val Ser Met Gly
435 440 445

Met Lys Tyr Leu Glu Glu Lys Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala
450 455 460

Arg Asn Val Leu Leu Val Asn Arg His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe
465 470 475 480

Gly Leu Ser Lys Ala Leu Gly Ala Asp Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg
485 490 495

Ser Ala Gly Lys Trp Pro Leu Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn
500 505 510

Phe Arg Lys Phe Ser Ser Arg Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr
515 520 525

Met Trp Glu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys
530 535 540

Gly Pro Glu Val Met Ala Phe Ile Glu Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys
545 550 555 560

[0043]

Pro Pro Glu Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp
565 570 575

Ile Tyr Lys Trp Glu Asp Arg Pro Asp Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg
580 585 590

Met Arg Ala Cys Tyr Tyr Ser Leu Ala Ser Lys Val Glu Gly Pro Pro
595 600 605

Gly Ser Thr Gln Lys Ala Glu Ala Ala Cys Ala
610 615

<210> 70
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 70

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

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

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

<210> 71
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 71

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
1 5 10 15

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
20 25 30

[0044]

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

<210> 72
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 72

Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr
1 5 10 15

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp
20 25 30

Val Thr Leu
35

<210> 73

<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 73

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
20 25 30

Thr Leu Ala Lys Ile
35

<210> 74
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0045]

<400> 74

Cys Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr
1 5 10 15

Ala Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln
20 25 30

Thr Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr
35 40 45

Gly Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly
50 55 60

Ser Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile
65 70 75 80

Val Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu
85 90 95

Ala Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val

100 105 110

Arg Ser

<210> 75
<211> 49
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 75

His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu
1 5 10 15

Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser
20 25 30

Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser
35 40 45

[0046]

Pro

<210> 76
<211> 187
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 76

Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys Tyr
1 5 10 15

Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg Pro
20 25 30

Arg Arg Ser Ser Thr Gln Leu Arg Ser Gly Ala Ser Val Thr Glu Pro
35 40 45

Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met Ser Gln Pro Leu Met Glu Thr Cys

50 55 60

His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Ala
65 70 75 80

Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg
85 90 95

Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met
100 105 110

Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu
115 120 125

Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu
130 135 140

Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro
145 150 155 160

[0047] Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys
165 170 175

Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys
180 185

<210> 77
<211> 54
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 77

His Ile Trp Gln Leu Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln
1 5 10 15

Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln
20 25 30

Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg
35 40 45

Leu Gly Asp Leu Trp Val
50

<210> 78
<211> 60
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 78

Cys Val Lys Arg Arg Lys Pro Arg Gly Asp Val Val Lys Val Ile Val
1 5 10 15

Ser Val Gln Arg Lys Arg Gln Glu Ala Glu Gly Glu Ala Thr Val Ile
20 25 30

Glu Ala Leu Gln Ala Pro Pro Asp Val Thr Thr Val Ala Val Glu Glu
35 40 45

Thr Ile Pro Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His
[0048] 50 55 60

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 79

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 80
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 80

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 81

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 82
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 82

[0049] Gly Gly Ser Gly
1

<210> 83
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 83

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 84
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 84

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 85
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 85

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 86
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 86

[0050] Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 87
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 87

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 88
<211> 675
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 88

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

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

[0051] Asn Trp Leu Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
130 135 140

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

Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
165 170 175

Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
180 185 190

Ser Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln
195 200 205

Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Val Ser Thr
210 215 220

Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr

225 230 235 240

Tyr Cys Ala Pro Arg Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
260 265 270

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe
275 280 285

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

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
305 310 315 320

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
325 330 335

[0052] Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
340 345 350

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

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
370 375 380

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

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
405 410 415

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

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

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

450 455 460

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
465 470 475 480

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Phe Trp
485 490 495

Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
500 505 510

Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
515 520 525

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

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

[0053] Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
565 570 575

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
580 585 590

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
595 600 605

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
610 615 620

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

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
645 650 655

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

Pro Pro Arg

675

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0054]

<220>
<223> 合成多肽

<400> 89

Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys
1 5

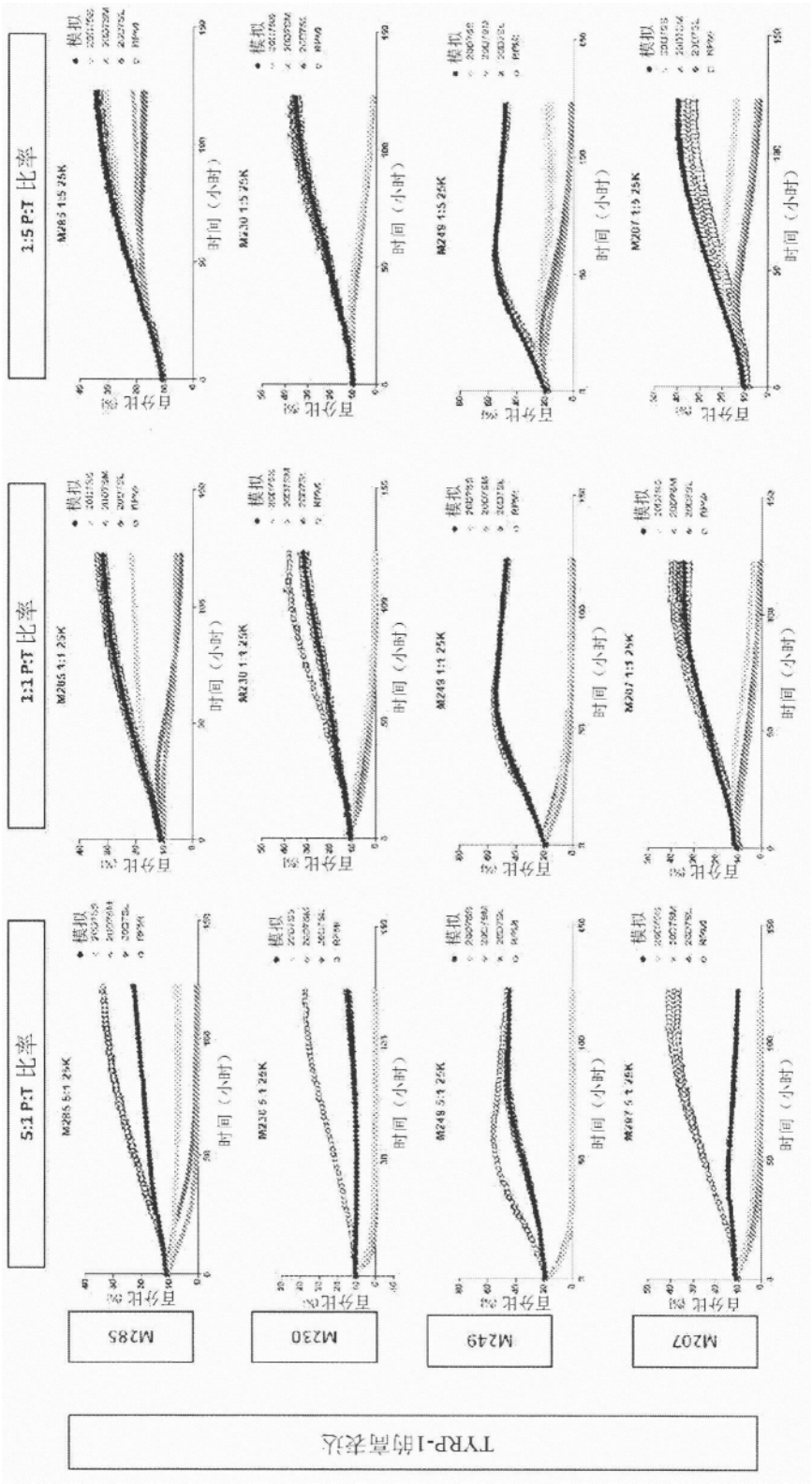

TYRP-1的高表达
M285
M230
M249
M207
5:1 P:T 比率
1:1 P:T 比率
1:5 P:T 比率
模拟
百分比 (%)
时间 (小时)

图1A

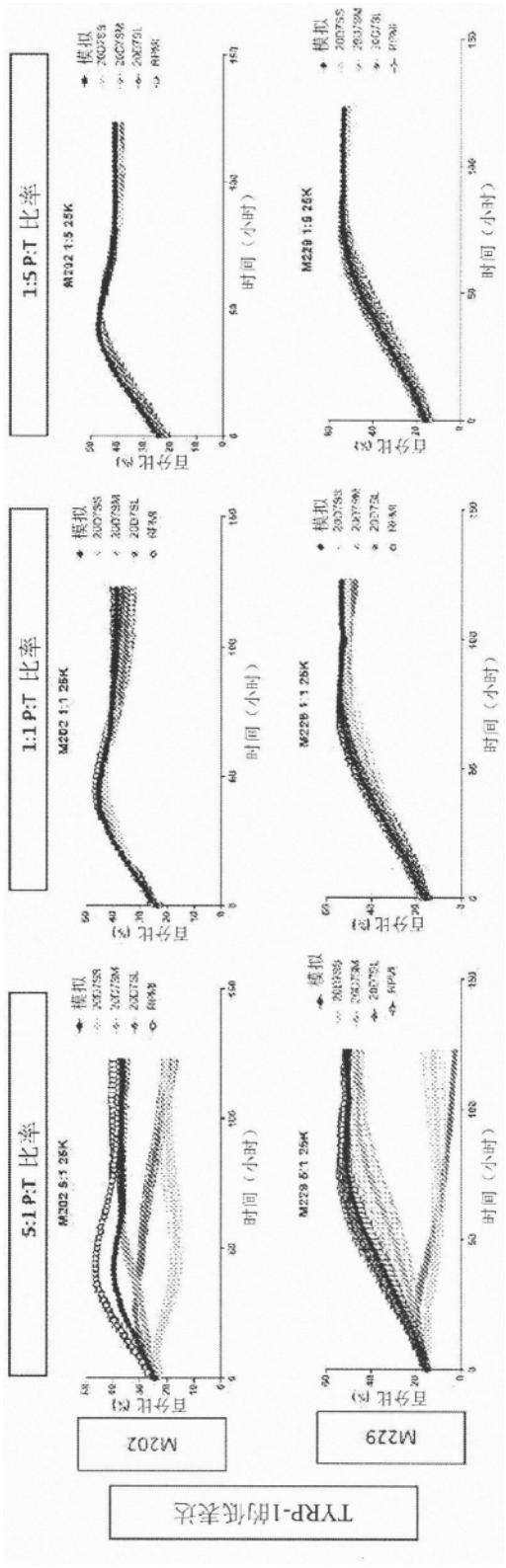


图1B

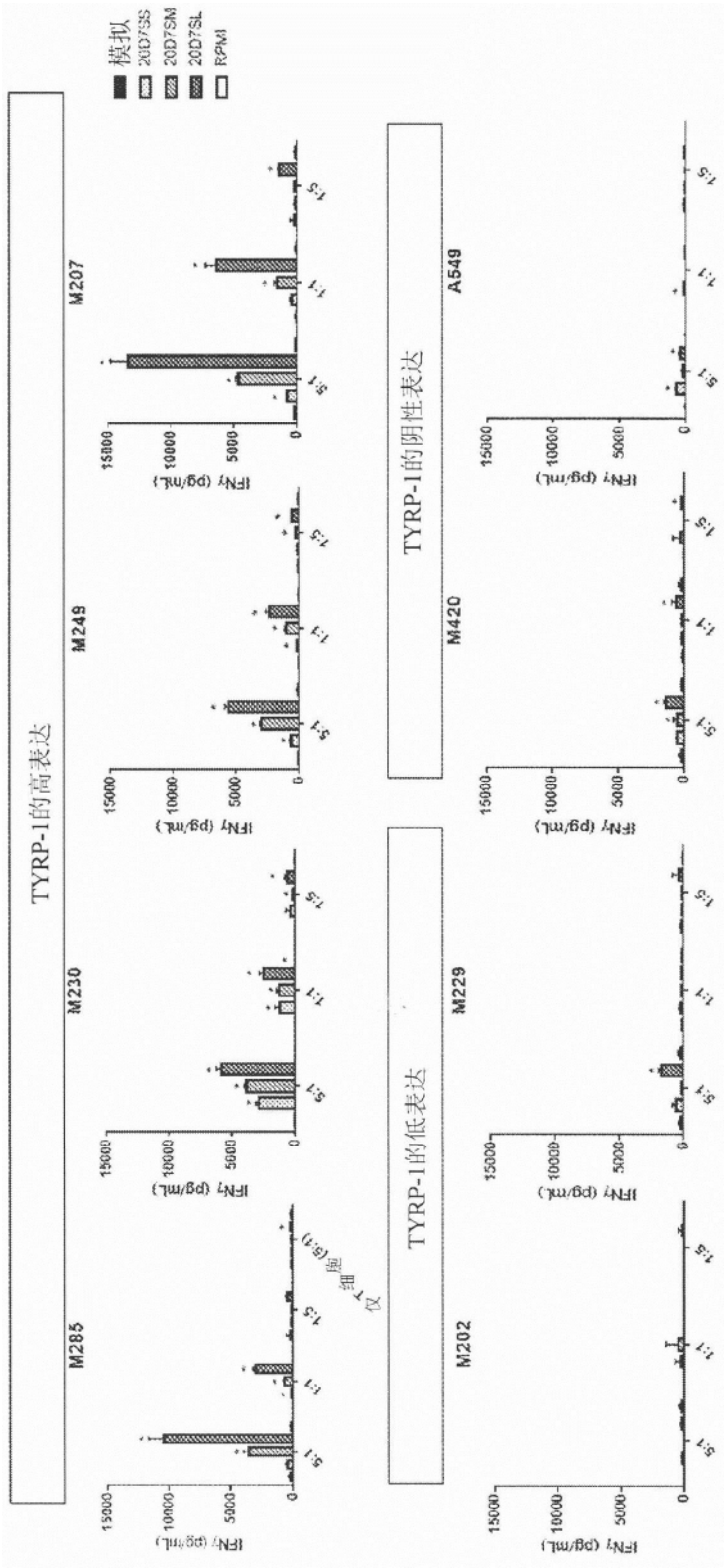

模拟
20D7SS
20D7SM
20D7SL
RPMI
TYRP-1的高表达
TYRP-1的阴性表达
TYRP-1的低表达
M285
M230
M249
M207
M202
M229
M420
A549
IFNγ (pg/mL)
15000
10000
5000
0
5:1
1:1
1:5
效靶比(E:T)

图2

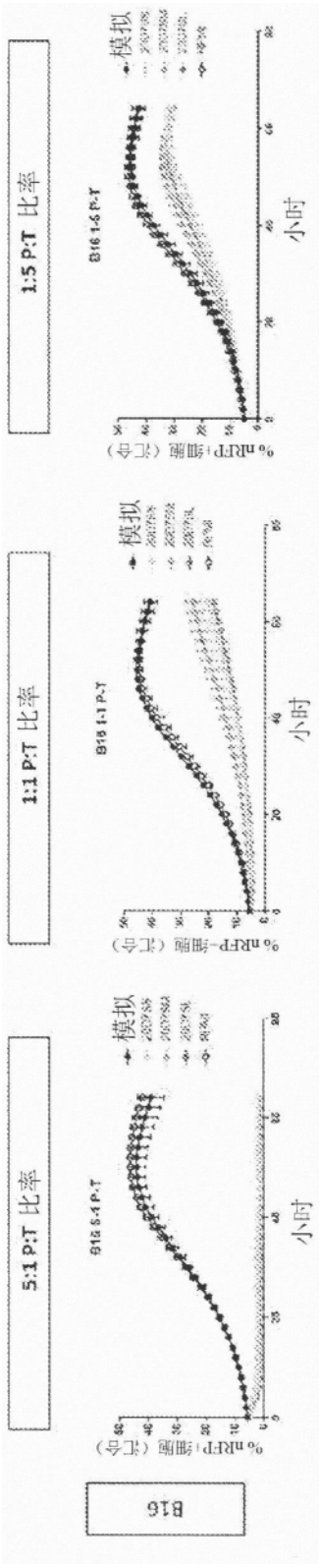


图3A

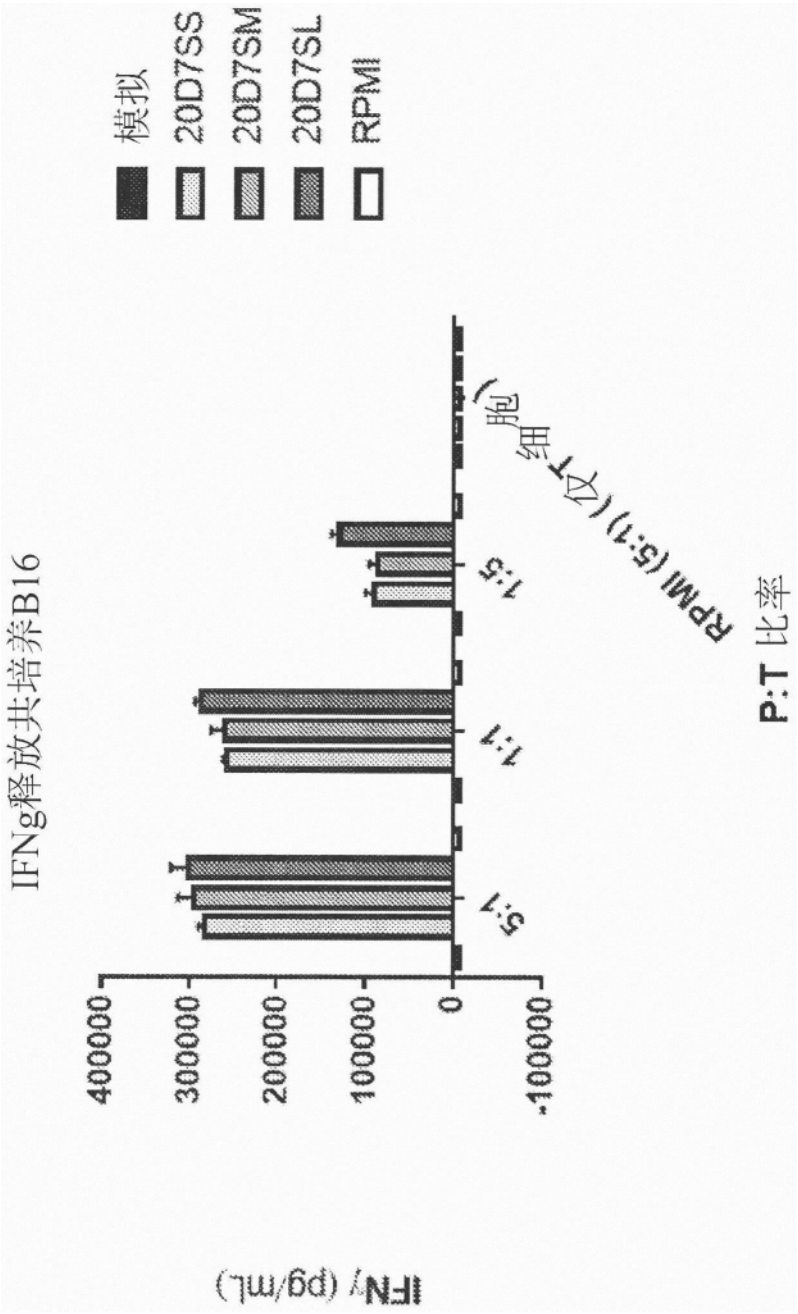

模拟
20D7SS
20D7SM
20D7SL
RPMI
IFNg释放共培养B16
IFNγ (pg/mL)
400000
300000
200000
100000
0
-100000
5:1
1:1
1:5
RPMI (5:1) (交叉细胞)
P:T 比率

图3B

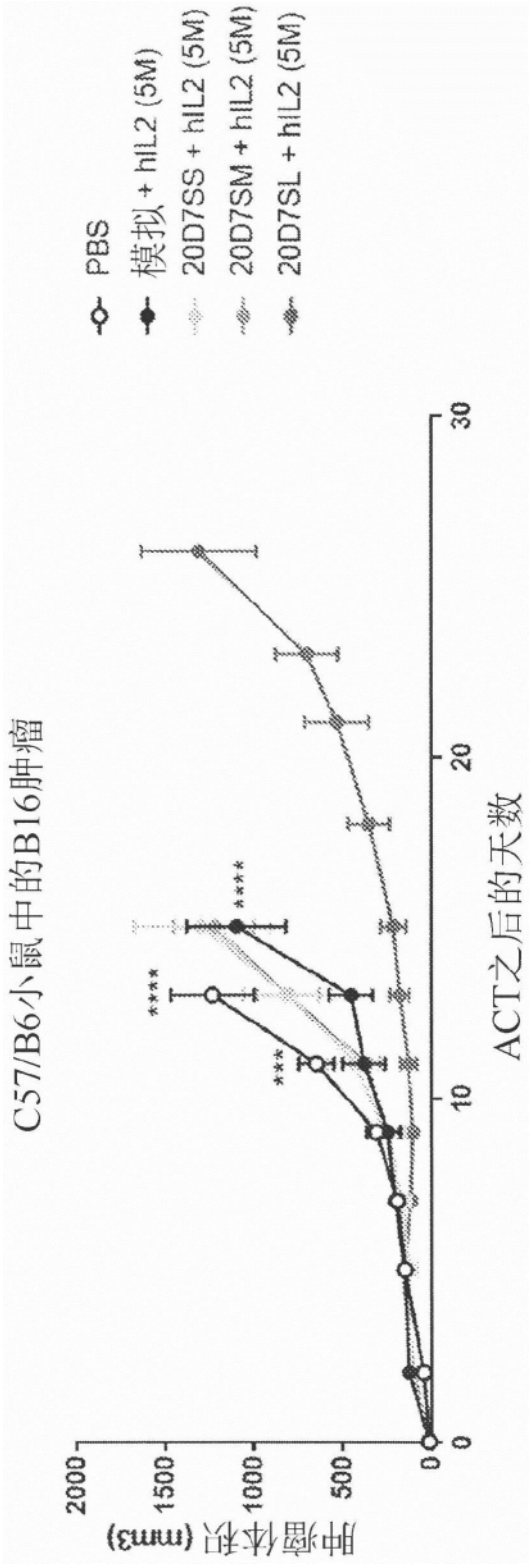

C57/B6小鼠中的B16肿瘤
肿瘤体积 (mm3)
ACT之后的天数
PBS
模拟 + hIL2 (5M)
20D7SS + hIL2 (5M)
20D7SM + hIL2 (5M)
20D7SL + hIL2 (5M)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
***
****
****

图4

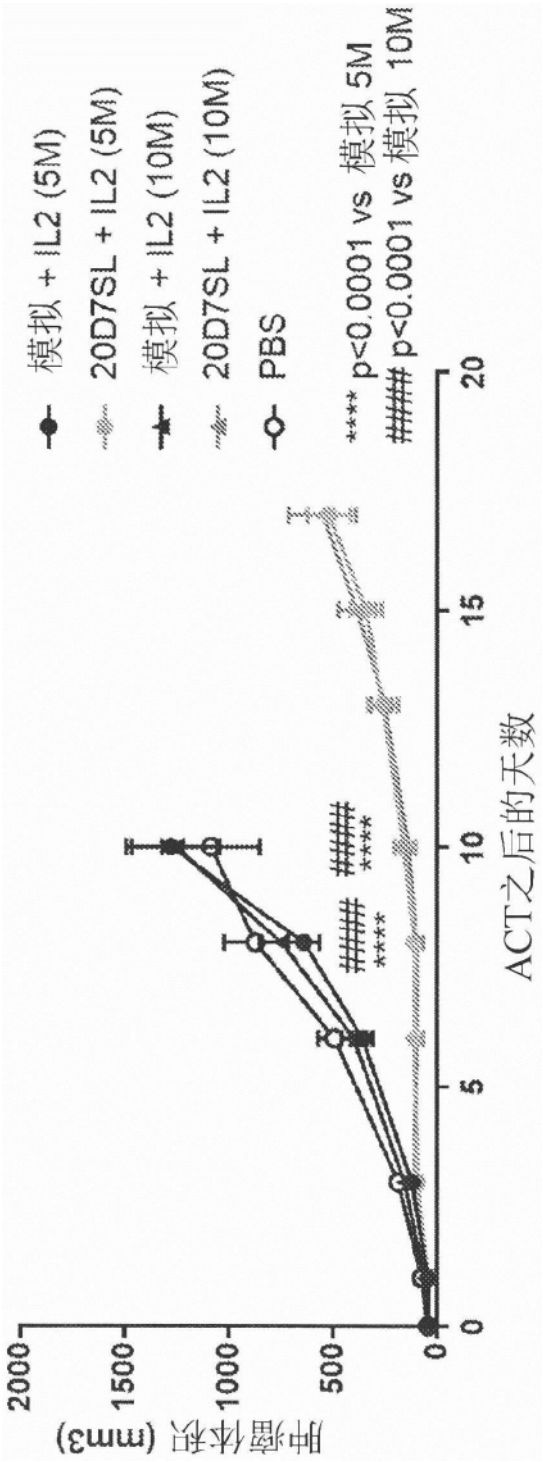

模拟 + IL2 (5M)
20D7SL + IL2 (5M)
模拟 + IL2 (10M)
20D7SL + IL2 (10M)
PBS
**** p<0.0001 vs 模拟 5M
p<0.0001 vs 模拟 10M
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
ACT之后的天数

图5

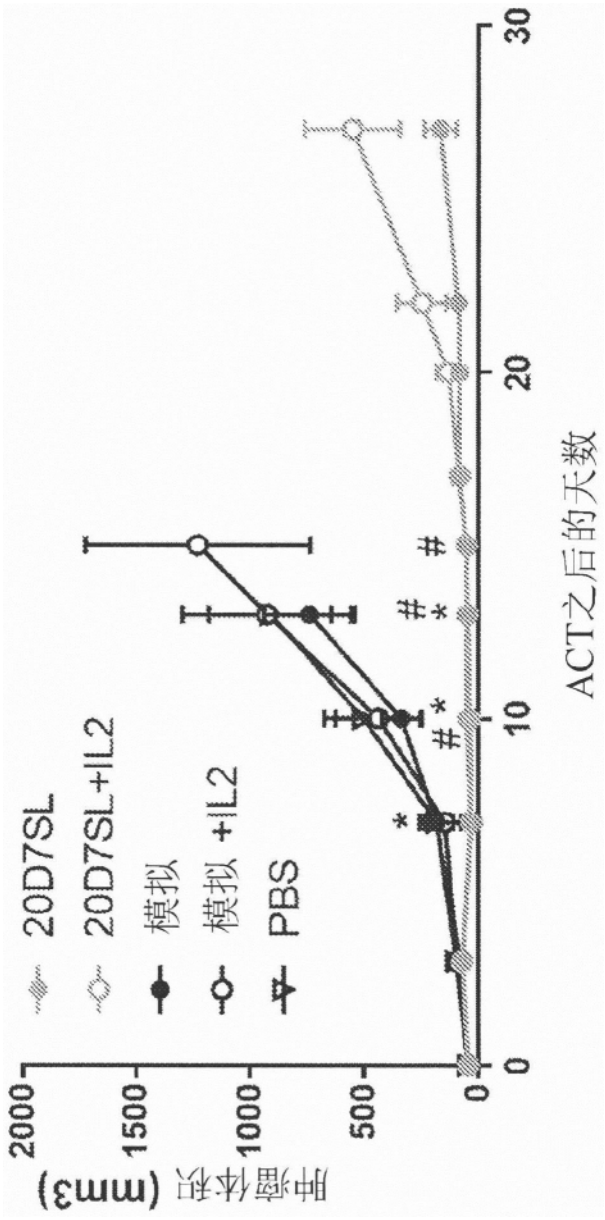

20D7SL
20D7SL+IL2
模拟
模拟 +IL2
PBS
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
ACT之后的天数
*
#
*
#
*
#

图6

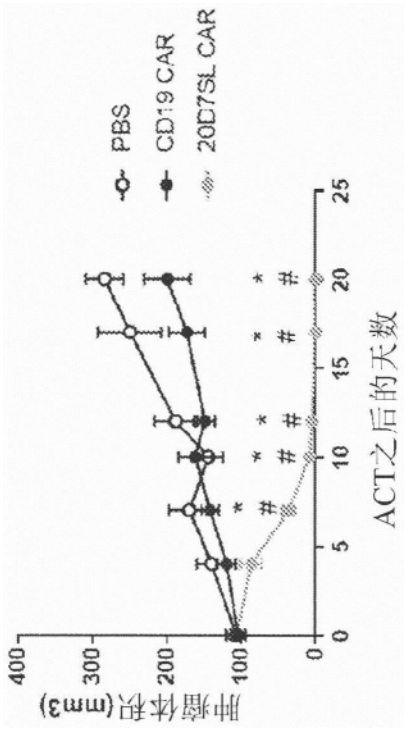

PBS
CD19 CAR
20D7SL CAR
肿瘤体积(mm3)
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
ACT之后的天数

图7A

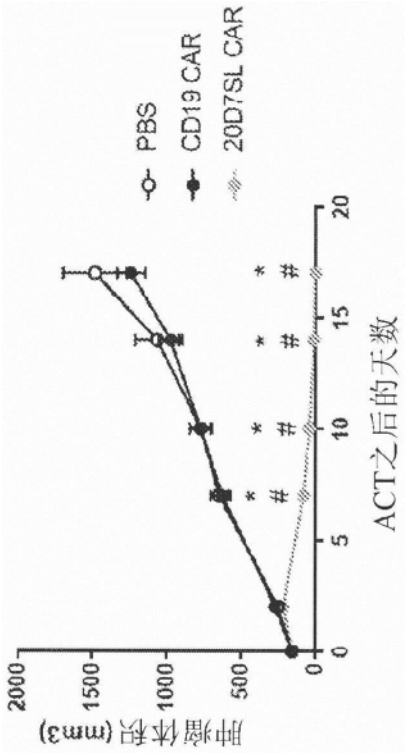

PBS
CD19 CAR
20D7SL CAR
肿瘤体积(mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
ACT之后的天数

图7B

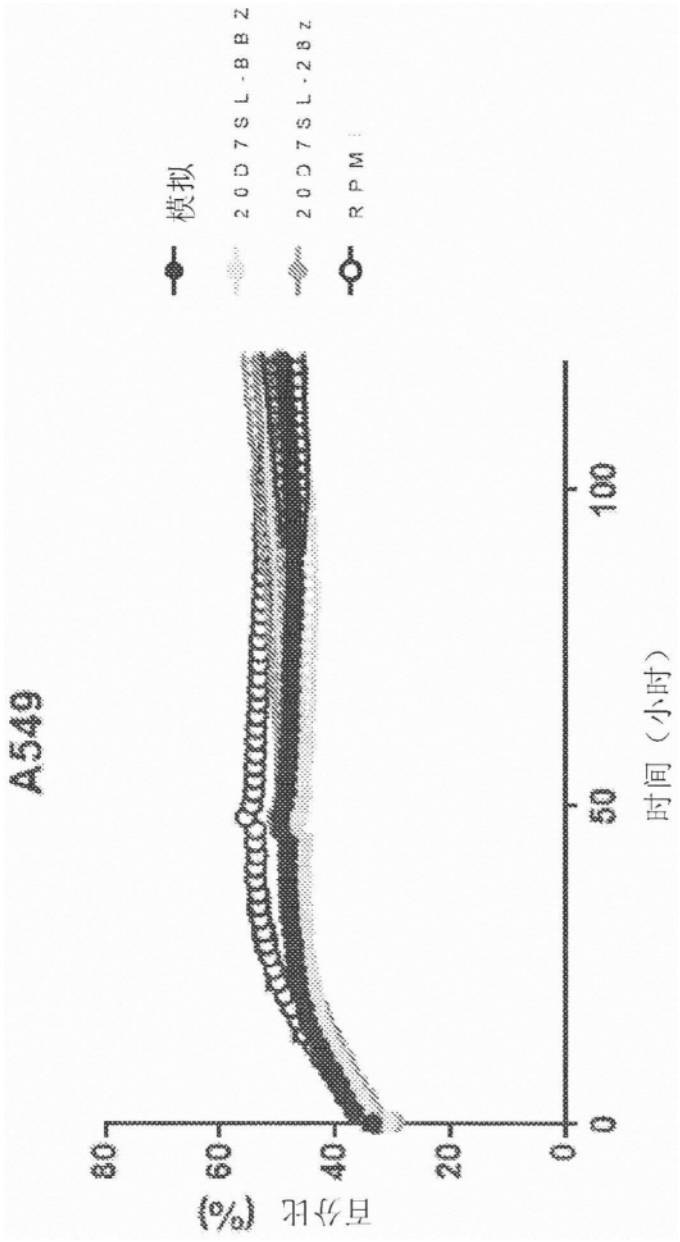

A549
模拟
20D7SL-BBZ
20D7SL-28z
RPMI
百分比（%）
0
20
40
60
80
0
50
100
时间（小时）

图8A

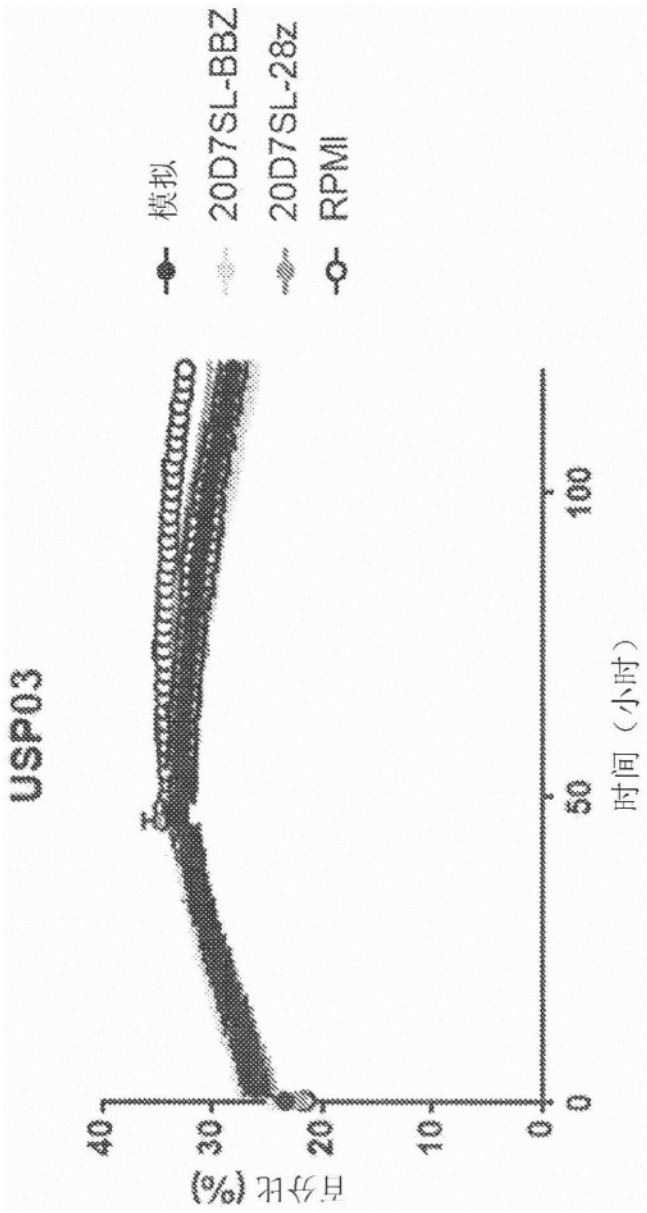

USP03
模拟
20D7SL-BBZ
20D7SL-28z
RPMI
百分比 (%)
40
30
20
10
0
0
50
100
时间（小时）

图8B

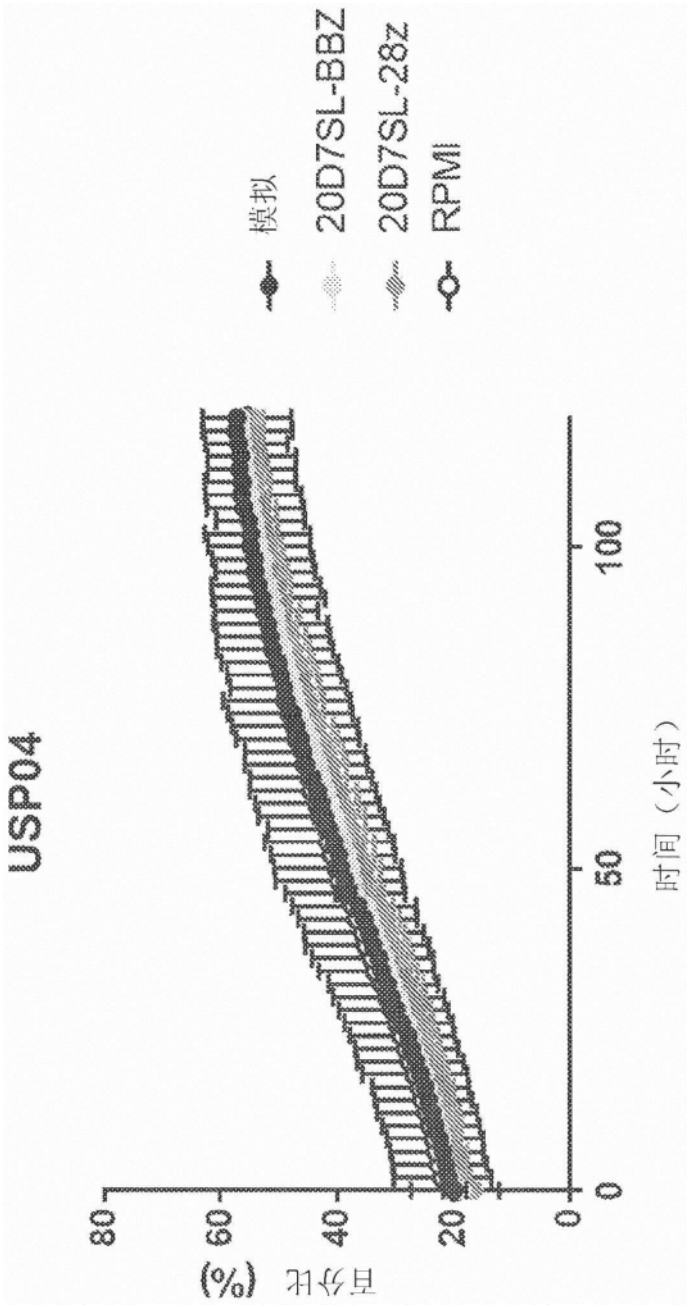

USP04
模拟
20D7SL-BBZ
20D7SL-28z
RPMI
百分比 (%)
80
60
40
20
0
0
50
100
时间（小时）

图8C

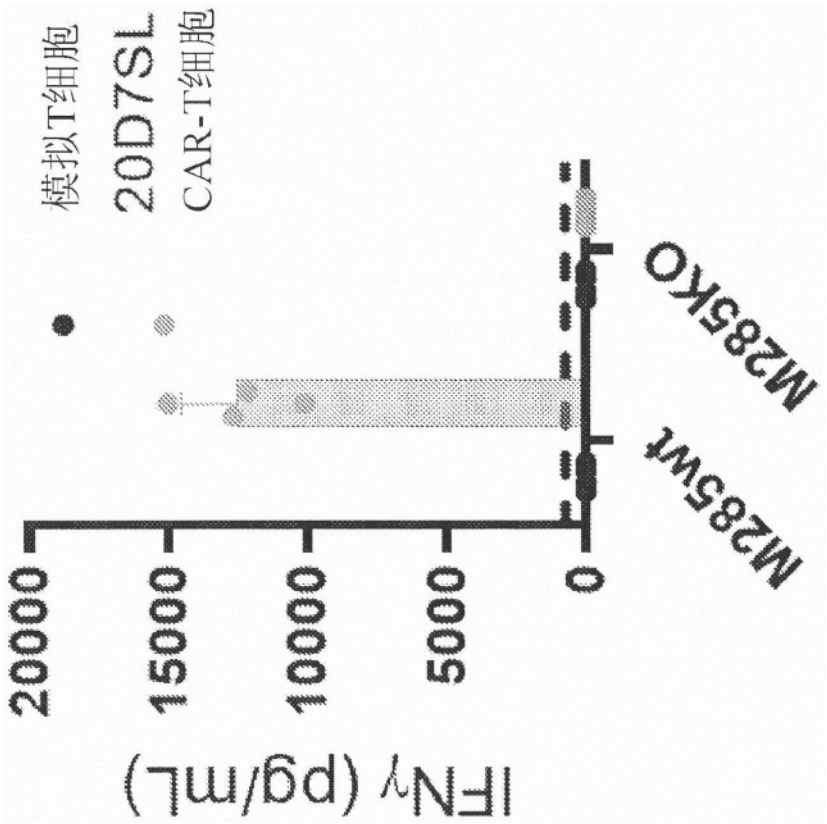

模拟T细胞
20D7SL
CAR-T细胞
M285KO
M285wt
0
5000
10000
15000
20000
IFNγ (pg/mL)

图9A

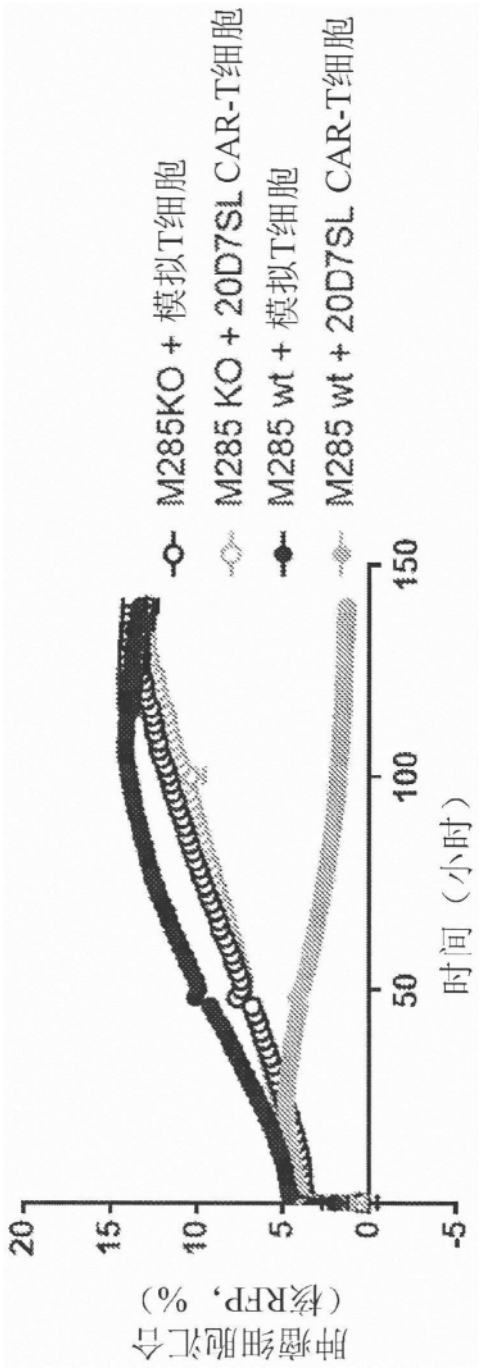

M285KO + 模拟T细胞
M285 KO + 20D7SL CAR-T细胞
M285 wt + 模拟T细胞
M285 wt + 20D7SL CAR-T细胞
肿瘤细胞汇合
（核RFP，%）
20
15
10
5
0
-5
50
100
150
时间（小时）

图9B

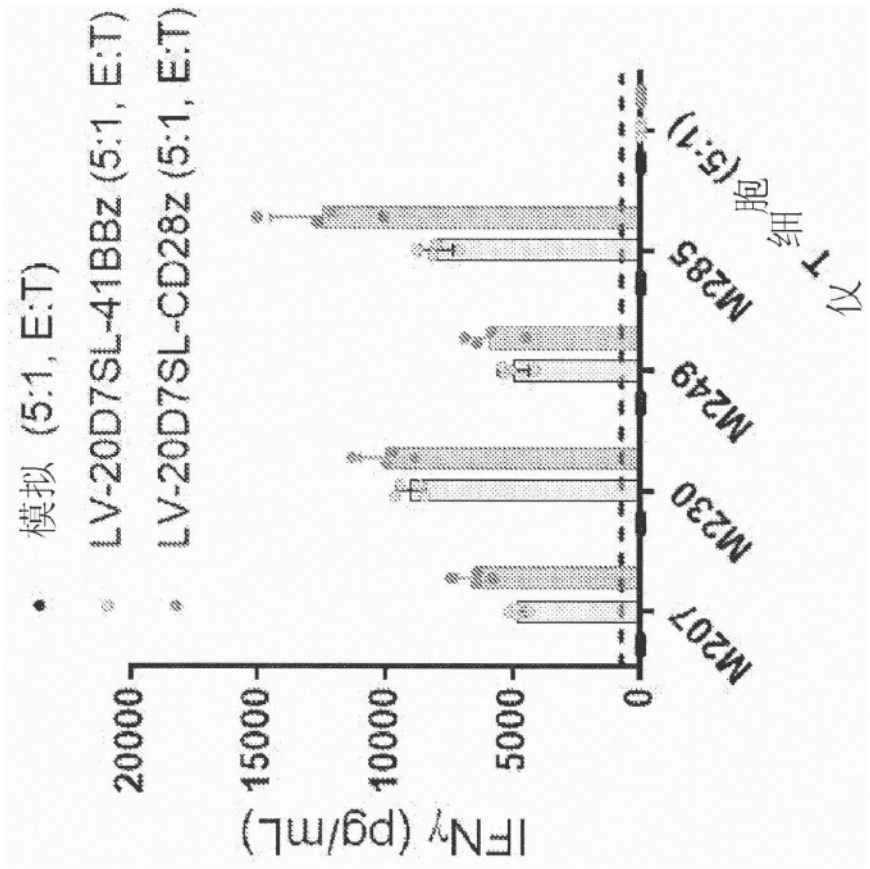

模拟 (5:1, E:T)
LV-20D7SL-41BBz (5:1, E:T)
LV-20D7SL-CD28z (5:1, E:T)
IFNγ (pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
M207
M230
M249
M285
T细胞仪 (5:1)

图10A

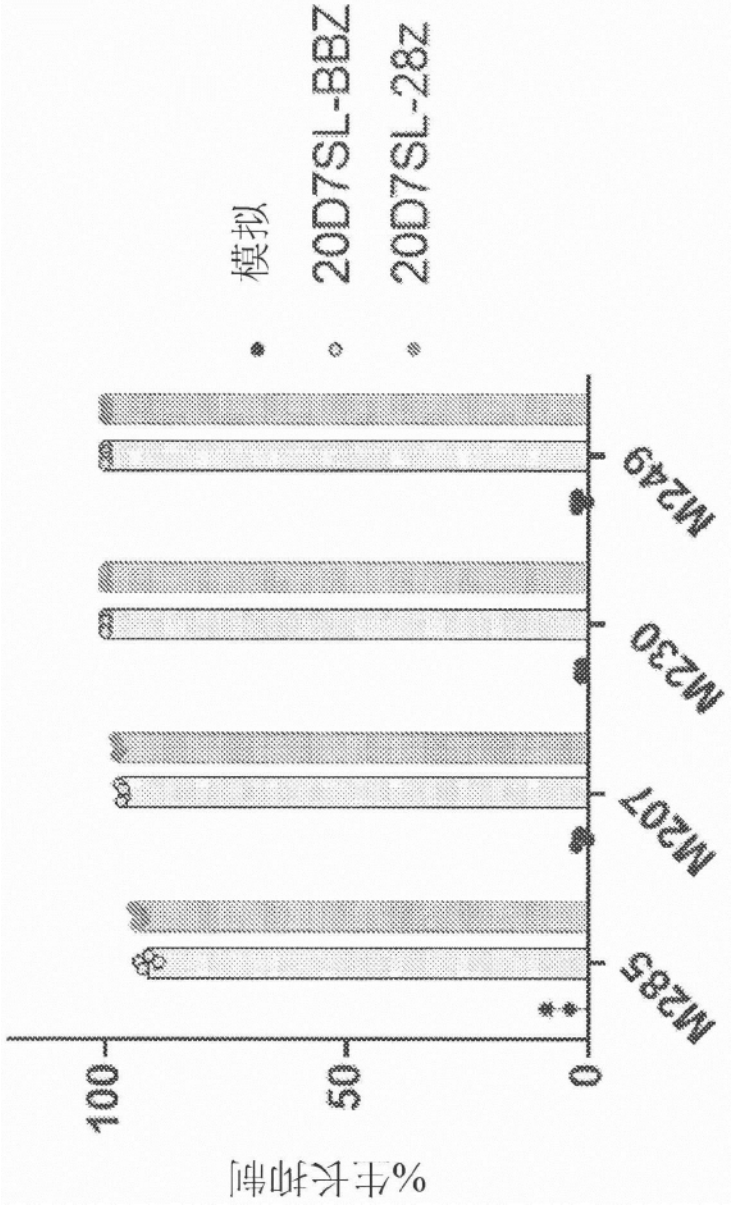


图10B

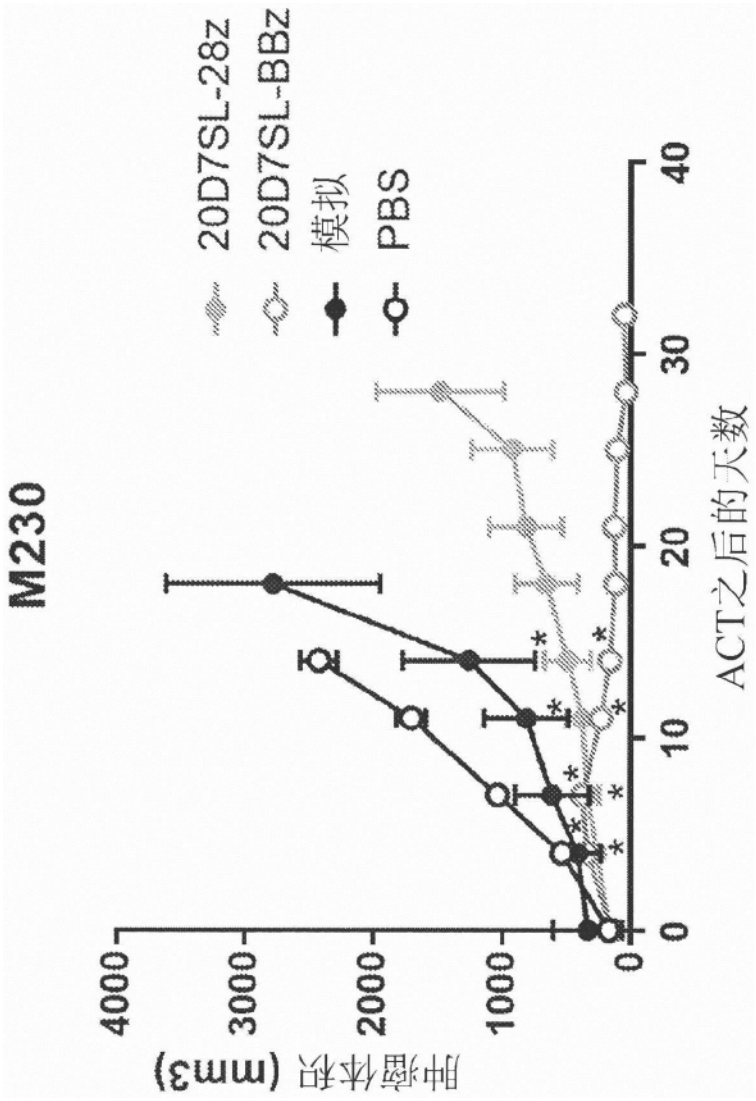

M230
20D7SL-28z
20D7SL-BBz
模拟
PBS
肿瘤体积 (mm3)
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
ACT之后的天数
*

图11A

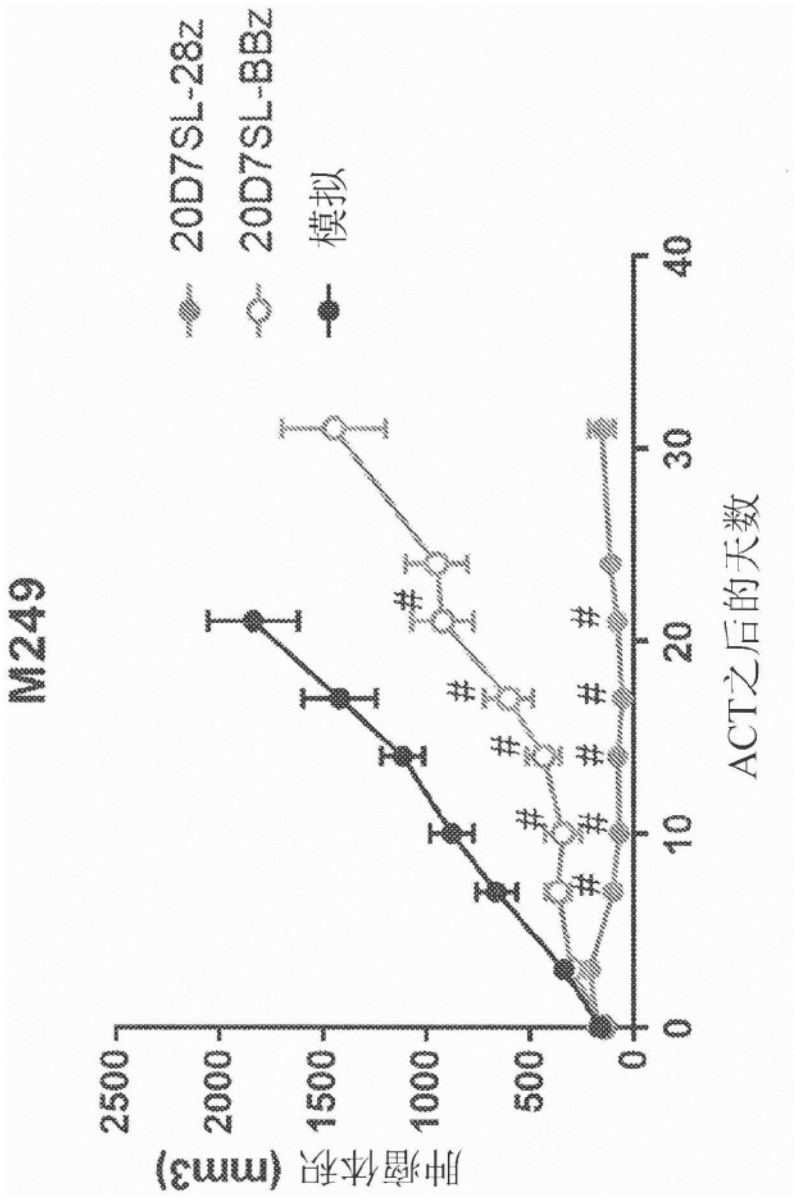

M249
20D7SL-28z
20D7SL-BBz
模拟
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
ACT之后的天数

图11B

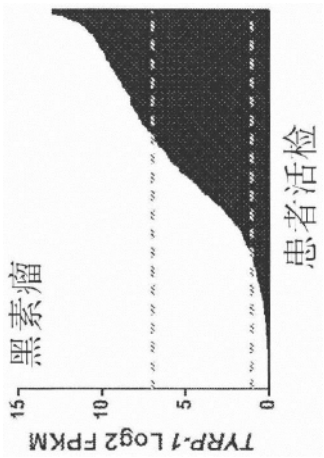


图12A

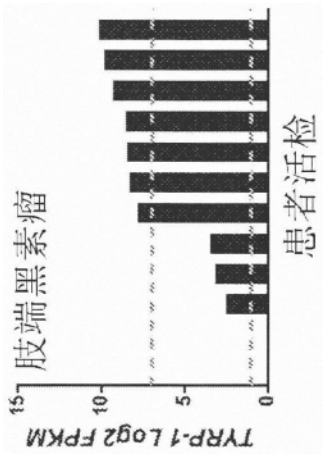


图12B

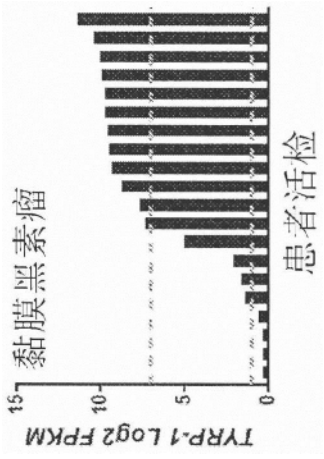


图12C

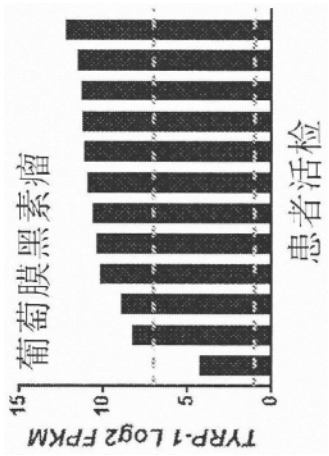


图12D