



(10) 授权公告号 CN 113234757 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 29

(21) 申请号 202110505479.4

(22) 申请日 2015.02.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113234757 A

(43) 申请公布日 2021.08.10

(30) 优先权数据
61/940,339 2014.02.14 US

(62) 分案原申请数据
201580017207.2 2015.02.16

(73) 专利权人 得克萨斯州大学系统董事会
地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 L·J·N·库珀 A·B·科恩戈德
B·A·拉比诺维奇 H·辛格
S·奥利瓦雷斯

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

专利代理师 余颖 杨昀

(51) Int.Cl.
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C40B 40/02 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 110462040 A, 2019.11.15

审查员 张珍珍

权利要求书1页 说明书30页
序列表29页 附图49页

(54) 发明名称

嵌合抗原受体及制备方法

(57) 摘要

提供了产生嵌合抗原受体 (CAR) 的方法。在一些实施方案中,通过从来自编码抗原结合结构域 (例如, scFv 区)、铰链区和膜内结构域的载体文库的载体的随机连接产生编码所述 CAR 的载体进行 CAR 的文库筛选。在一些实施方案中,所述载体含有转座子。

1. 一种T细胞, 包含a) 以下核酸编码的多肽, 所述核酸由核苷酸序列SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:5第1-1485位核苷酸所示核苷酸序列或SEQ ID NO:5第67-1485位核苷酸所示核苷酸序列构成; 和b) 膜结合细胞因子, 所述膜结合细胞因子是膜结合IL-15。
2. 如权利要求1所述的T细胞, 其中, 所述核酸由SEQ ID NO:5第67-1485位核苷酸所示的核苷酸序列构成。
3. 如权利要求1所述的T细胞, 其中, 所述多肽特异性结合CD19。
4. 如权利要求1所述的T细胞, 其中, 所述多肽包含嵌合抗原受体。
5. 如权利要求1所述的T细胞, 其中, 所述多肽引起或促进包含所述多肽的免疫细胞的至少一种正常效应子功能的活化。
6. 如权利要求1所述的T细胞, 其中, 所述T细胞 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或NKT细胞。
7. 一种药物组合物, 包含权利要求1至6中任一项所述的T细胞。
8. 权利要求1至6中任一项所述的T细胞在制造用于治疗哺乳动物癌症的药物中的用途, 所述癌症是B细胞恶性肿瘤。
9. 如权利要求8所述的用途, 其中, 所述B细胞恶性肿瘤是淋巴瘤或白血病。
10. 转座子, 所述转座子包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:5第1-1485位核苷酸或SEQ ID NO:5第67-1485位核苷酸所示的核苷酸序列。
11. 包含权利要求10所述转座子的T细胞。
12. 如权利要求11所述的T细胞, 其中, 所述T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或NKT细胞。
13. 如权利要求11所述的T细胞, 其还包含膜结合细胞因子, 所述膜结合细胞因子是膜结合IL-15。
14. 一种药物组合物, 包含权利要求11至13中任一项所述的T细胞。
15. 权利要求11至13中任一项所述的T细胞在制造用于治疗哺乳动物癌症的药物中的用途, 所述癌症是B细胞恶性肿瘤。
16. 如权利要求15所述的用途, 其中, 所述B细胞恶性肿瘤是淋巴瘤或白血病。

嵌合抗原受体及制备方法

发明背景

[0001] 本申请要求2014年2月14日提交的美国临时专利申请No.61/940,339的权益,所述申请通过引用方式将其全文并入本文。

发明领域

[0002] 本发明一般涉及分子生物学和医学领域。更具体地,它涉及产生嵌合抗原受体(CAR)的方法。

[0003] 相关领域的描述

[0004] 过继性T细胞转移是一种可以用于治疗癌症的有希望的治疗方法。过继性T细胞转移牵涉分离并扩增能选择性杀伤肿瘤细胞的抗原特异性T细胞。一般地,从受试者取出T细胞,并且在体外培养。可以将嵌合抗原受体(CAR)在体外引入T细胞中以指导T细胞在再引入受试者中后基于抗原的表达而选择性杀伤肿瘤细胞(例如Wieczorek等2013;Berry等,2013)。

[0005] 一个与过继性T细胞转移有关的问题是哪种CAR可以在某些患者群体中更有效起作用(例如用于治疗特定癌症)之间存在显著的可变性。由于可以潜在产生的可以展现出针对癌症的治疗活性的潜在不同CAR的数目非常大,目前临床医生非常难以预期哪种CAR可以展示针对给定癌症或癌症亚型的治疗活性。由于过继性T细胞转移的重大的治疗潜力,明显需要用于鉴定和产生新CAR的改善的方法。

发明内容

[0006] 在一些方面,本发明提供了用于产生CAR的方法,并且提供了特定的CAR。在一些方面,提供了用于产生大量CAR的方法,所述CAR可以针对特定癌症或癌症亚型的活性被筛选;这样,可以产生并鉴定可以展现出改善的针对特定癌症或癌症亚型的治疗潜力的CAR。可以向受试者或人患者治疗性施用本文中提供的CAR,例如以治疗癌症。

[0007] 临床数据证明了使T细胞靶向给定的肿瘤相关抗原(TAA)的特定的嵌合抗原受体(CAR)设计在不同患者中可以具有不同的治疗潜力。例如,当向具有急性的而不是慢性的B谱系白血病的患者施用自体遗传修饰的T细胞时,经由嵌合CD28/CD3 ζ 或CD137/CD3- ζ 活化的第二代CD19特异性CAR可以展现出优越的临床响应。为了解决此问题,本文中提供了用于产生可以展现出改善的针对给定肿瘤的抗肿瘤效果的CAR种类的方法。

[0008] 例如,本文中提供了可以用于产生大量CAR并且筛选它们治疗来自给定患者的癌症的能力的方法;这样,可以使用所述方法使用于患者的疗法个体化,并且选择展示针对具有特定癌症的特定患者或患者亚组的改善的治疗潜力的特定CAR。用于基因疗法的临床方法可以利用来自睡美人(Sleeping Beauty)(SB)转座子系统的DNA质粒的电转移,例如以降低制造用于小患者亚组的单独CAR设计的成本和复杂性。用于使CAR+T细胞个体化的这些方法可以利用大量CAR分子的产生,可以筛选所述CAR分子和评估其有益于给定患者的能力。

[0009] 在一些方面,提供了使用三重位点特异性重组系统(又称为“EZ-CAR”平台)高通量

装配CAR分子的方法。在一些实施方案中,这些方法可以允许从(i)限定特异性的单链可变片段(scFv), (ii)从细胞表面附加scFv的支架/铰链,和(iii)一个或多个胞内信号传导结构域快速组合原型CAR的3种组分。例如,如下文实施例中显示,使用EZ CAR平台连同临床级CD19RCD28 ζ CAR+T细胞(CG CAR),产生经由嵌合CD28/CD3- ζ 活化的CD19特异性CAR。

[0010] 在一些实施方案中,本文中提供或通过根据本发明的方法产生的CAR可以在T细胞中与膜结合IL-15共表达。这样,T细胞可以在体外或体内在不显著增殖的情况下以静止状态存活或存在。比较而言,如先前描述,表达CAR的T细胞当在体外去除细胞因子时通常会死亡,并且此细胞死亡可以在某些情况中临床施用T细胞时充当安全性特征。通常使用自发细胞测定来测量T细胞增殖。因此,与某些先前鉴定的CAR(其中T细胞在没有抗原性刺激的情况下在体外不能存活)形成对比,本文中提供了可以在体外在没有自发生长的情况下诱导细胞毒性的CAR。根据期望的具体的实施方案,通过本发明的方法产生或本文中提供的CAR可以在T细胞中具有或没有膜结合IL-15在T细胞中共表达的情况下表达。

[0011] 本发明的一个方面涉及一种组合物,所述组合物包含(a)编码一个或多个独特的抗原结合结构域的多个第一载体;(b)编码一个或多个独特的铰链结构域的多个第二载体;和(c)编码一个或多个独特的膜内结构域的多个第三载体;其中所述第一、第二和第三载体中的至少两种包括多个分别编码独特的抗原结合结构域、铰链结构域和/或膜内结构域的两种或更多种载体,并且进一步其中所述载体包含用于同源重组的位点以允许编码嵌合抗原受体(CAR)的第四载体的产生。

[0012] 在本发明中,如提到蛋白质结构域和多肽,如抗原结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、和膜内结构域(endodomain)使用,术语“独特的”意味着具有不同的多肽(氨基酸)序列、包含不同的多肽(氨基酸)序列或由不同的多肽(氨基酸)序列组成的结构域。例如,两个“独特的”抗原结合结构域可以结合相同抗原(实际上,甚至所述抗原上的相同表位);然而,抗原结合结构域在它们的连续氨基酸组成彼此不同的情况下是“独特的”。同样地,在连续的氨基酸组成方面不同的两种“独特的”抗原结合结构域也可以特异性结合不同抗原和表位。相反,如本文中使用的,相同氨基酸序列的两个分子(多肽)不是“独特的”多肽。

[0013] 在一些实施方案中,多个第一载体编码多个独特的抗原结合结构域,多个第二载体编码一个铰链结构域,并且多个第三载体编码多个独特的膜内结构域。在一些实施方案中,多个第一载体编码多个独特的抗原结合结构域,多个第二载体编码多个独特的铰链结构域,并且多个第三载体编码多个独特的膜内结构域。在一些实施方案中,多个第一载体编码多个独特的抗原结合结构域,多个第二载体编码多个独特的铰链结构域,并且多个第三载体编码一个膜内结构域。在一些实施方案中,多个第一载体编码一个抗原结合结构域,多个第二载体编码多个独特的铰链结构域,并且多个第三载体编码多个独特的膜内结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含scFv或由scF v组成。第三载体可以编码跨膜结构域。第二载体可以编码跨膜结构域。在一些实施方案中,组合物进一步包含编码一个或多个跨膜结构域的多个第五载体;其中第一载体、第二载体、第三载体和第五载体包含用于同源重组的位点以产生编码嵌合抗原受体(CAR)的第四载体。第一载体可以包含同源重组的第一序列和第二位点。第二载体可以包含同源重组的第二序列和同源重组的第三序列。第三载体可以包含同源重组的第三序列和同源重组的第四序列。第三载体可以包含同源重组的所述第三序列和同源重组的第四序列。第四载体包含同源重组的第一序列和同源重组的第

四序列。第一载体、第二载体、和/或第三载体可以编码转座酶。转座酶可以是鲑鱼型Tc1样转座酶(SB)。在一些实施方案中,第一载体、第二载体、第三载体、第四载体和/或第五载体中的1种、2种、3种、4种或全部是睡美人(SB)或piggyBac转座子载体。或者,在一些实施方案中,第一载体、第二载体、第三载体、第四载体、和/或第五载体不是睡美人(SB)或piggyBac转座子载体;例如,在一些实施方案中,可以在不使用睡美人(SB)或piggyBac载体的情况下产生CAR,然后可以随后将CAR插入在适合于转染T细胞的载体中(例如,插入睡美人(SB)载体,如例如Singh等,2015中所述)。不过,在一些实施方案中,产生已经存在于适合于转染T细胞的载体中的CAR可以简化过程或者减少产生CAR和转染T细胞两者所需的步骤的数目。独特的抗原结合结构域可以选择性结合不同的抗原。在一些实施方案中,独特的抗原结合结构域选择性结合相同的抗原。抗原结合结构域可以选择性结合CD19、通用抗原(小鼠)、HER-3、GD2、Gp75、CS1蛋白、间皮素、磷脂酰丝氨酸、cMyc、CD22、CD4、CD44v6、CD45、CD28、CD3、CD3e、CD123、CD138、CD52、CD56、CD74、CD30、Gp75、CD38、CD33、CD20、Her1/HER3融合物、GD2、碳水化合物、曲霉、ROR1、c-MET、EGFR、Dectin、埃博拉、真菌、GP、HE RV-K (HERVK)、NY-ESO-1、VEGF-R2、TGF- β 2R、IgG4、生物素或O-Ac GD2。独特的抗原结合结构域可以由scFv组成或者包含scFv。铰链区可以由下列各项组成或包含下列各项:12AA肽(GAGAGCAAGTACGGCCCTCC CTGCCCCCTTGCCCT,SEQ ID NO:1)、t-20AA肽、IgG4 Fc Δ EQ、IgG4 Fc Δ Q、(t-12AA+t-20AA)、mKate、phiLov、dsRed、Venus、eGFP、CH3 HA、(CD8 α +t-20AA)、双重t-20AA、(t-20AA+CD8 α)、(CD8 α +亮氨酸拉链Basep1)、(CD8 α +亮氨酸拉链Acid1)、2D3、CD8 α 或IgG4Fc。膜内结构域中的至少一个可以包含CD3 ζ 。膜内结构域中的至少一个可以包含一个或多个ITAM结构域。在一些实施方案中,膜内结构域中的至少一个包含(CD28+CD3 ζ)、(CD28+CD27+CD3 ζ)、(CD28+OX40+CD3 ζ)、(CD28+4-1BB+CD3 ζ)、(CD28+CD27+OX40+CD3 ζ)、(CD28+4-1BB+CD27+CD3 ζ)、(CD28+4-1BB+OX40+CD3 ζ)、(4-1BB+CD3 ζ)、(4-1BB+OX40+CD3 ζ)、(4-1BB+CD27+CD3 ζ)、(CD27+CD3 ζ)、(CD27+OX40+CD3 ζ)、(CD28 Δ +CD3 ζ)、(CD28 Δ +CD27+CD3 ζ)、(CD28 Δ +OX40+CD3 ζ)、(CD28 Δ +4-1BB+CD3 ζ)、(CD28 Δ +4-1BB+OX40+CD3 ζ)、(CD28 Δ +CD27+OX40+CD3 ζ)、(CD28 Δ +4-1BB+CD27+CD3 ζ)、(4-1BB+ICOS+CD3 ζ)、(CD28+ICOS+CD3 ζ)、(ICOS+CD3 ζ)、CD3 ζ 、或仅CD28。在一些实施方案中,可以测试CAR的活性,例如,使用iQue™筛选器(iQue™ Screener)(IntelliCyt,Albuquerque,NM)。在一些实施方案中,当在细胞如T细胞中表达时,使用诸如例如流式细胞术等技术,可以评估CAR的一种或多种特征(例如,活力、活化信号的上调、CD25的上调、细胞因子释放、和/或细胞杀伤)。

[0014] 本发明的另一个方面涉及一种组合物,所述组合物包含编码嵌合抗原受体的载体集合,所述载体集合编码多个独特的抗原结合结构域、铰链结构域和膜内结构域,所述集合的所述载体就所述结构域而言是随机化的。

[0015] 本发明的又一个方面涉及产生多个各自编码嵌合抗原受体(CAR)的载体的方法,所述方法包括:(i)获得包含本发明的多个载体(例如,如上文描述)的组合物;并且(ii)使所述组合物经受足以允许在所述载体中包含或由所述载体编码的所述独特的抗原结合结构域、铰链结构域和/或膜内结构域经由同源重组而重组的条件以产生多个第四载体,其中所述第四载体中的每个编码CAR。所述方法可以进一步包括在细胞中表达CAR。所述方法可以进一步包括测试CAR的活性。在一些实施方案中,第一载体中的一个或多个编码scFv区。在一些实施方案中,第三载体中的一个或多个编码跨膜结构域。在一些实施方案中,第二载

体中的一个或多个编码跨膜结构域。所述方法可以进一步包括通过重组随机合并编码跨膜结构域的第五载体与所述第一载体、第二载体、和第三载体以形成所述第四载体。在一些实施方案中,从编码多个独特的scFv区和多个独特的铰链区的多个载体随机连接所述第一载体和所述第二载体。在一些实施方案中,从编码多个独特的scFv区和多个独特的膜内结构域的多个载体随机连接所述第一载体和所述第三载体。在一些实施方案中,从编码多个独特的铰链区和多个独特的膜内结构域的多个载体随机连接所述第二载体和所述第三载体。在一些实施方案中,从编码多个独特的sc Fv区、多个独特的铰链区和多个独特的膜内结构域的多个载体随机连接所述第一载体、所述第二载体和所述第三载体。所述方法可以进一步包括通过随机连接来自编码多个scFv区的载体的第一文库的所述第一载体,随机连接来自编码多个scFv区的载体的第二文库的所述第二载体,并且随机连接来自编码多个膜内结构域的载体的第三文库的所述第三载体产生所述第四载体,以形成编码所述CAR的所述第四载体。第一载体可以包含同源重组的第一序列和第二位点。第二载体可以包含同源重组的第二序列和同源重组的第三序列。第三载体可以包含同源重组的所述第三序列和同源重组的第四序列。第三载体可以包含同源重组的所述第三序列和同源重组的第四序列。第四载体可以包含同源重组的所述第一序列和同源重组的所述第四序列。第一载体、第二载体、和/或第三载体可以编码转座酶。在一些实施方案中,第六载体编码转座酶,并且其中所述方法包括将所述第四载体和所述第六载体中的一种或多种引入、电穿孔、或转染到细胞中。转座酶可以是鲑鱼型Tc1样转座酶(SB)。所述方法可以进一步包括在存在人工抗原呈递细胞(aAPC)的情况下培养或提供用所述CAR转染的细胞,所述人工抗原呈递细胞(aAPC)能刺激表达CAR的T细胞的扩增。在一些实施方案中,所述scFv区、所述铰链区和所述膜内结构域中的每种各自在睡美人(SB)或piggyBac转座子载体中编码。在一些实施方案中,从编码多个独特的scFv区、铰链区和膜内结构域的多个载体通过所述重组随机连接所述第一载体、所述第二载体和/或所述第三载体中的每种。在一些实施方案中,所述第一载体、所述第二载体、和所述第三载体各自含有转座子;并且其中经由同源重组的所述连接包括位点特异性重组。在一些实施方案中,所述第一载体和所述第二载体各自具有第一同源重组位点;并且其中所述第二载体和所述第三载体各自具有第二同源重组位点。在一些实施方案中,所述第一载体具有第三重组位点,并且其中所述第四载体具有第四重组位点,其中所述第三重组位点和第四重组位点可以允许对细胞的同源重组。细胞可以是T细胞,如例如 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、或NK细胞、或NKT细胞。在一些实施方案中,细胞是多能细胞,如例如干细胞或诱导的多能干细胞。在一些实施方案中,细胞从干细胞、诱导的多能干细胞或干细胞衍生。细胞可以从诱导的多能干细胞衍生的T细胞或NK细胞。在一些实施方案中,所述独特的抗原结合结构域包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或更多个选择性识别不同抗原的scFv。在一些实施方案中,所述独特的抗原结合结构域包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或更多个选择性识别(即特异性结合)相同抗原的scFv。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域选择性(特异性)结合CD19、通用抗原(小鼠)、HER-3、GD2、Gp75、CS1蛋白、间皮素、磷脂酰丝氨酸、cMyc、CD22、CD4、CD44v6、CD45、CD28、CD 3、CD3e、CD123、CD138、CD52、CD56、CD74、CD30、Gp75、CD38、C D33、CD20、Her1/HER3融合物、GD2、碳水化合物、曲霉、ROR1、c-MET、EGFR、Dectin、埃博拉、真菌、GP、HERV-K、NY-ESO-1、VEGF-R2、TGF-b2R、IgG4、生物素或O-AcGD2。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域包含scFv或由scFv组成。所述铰链区可以编码12AA肽(GAGAGCAAGT

ACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCT, SEQ ID NO:1)、t-20AA肽、IgG4Fc ΔEQ、IgG4 Fc ΔQ、(t-12AA+t-20AA)、mKate、phiLov、dsRed、Venus、eGFP、CH3 HA、(CD8α+t-20AA)、双重t-20AA、(t-20AA+C D8α)、(CD8α+亮氨酸拉链Basep1)、(CD8α+亮氨酸拉链Acid1)、2D3、C D8α或IgG4 Fc。膜内结构域可以编码CD3ζ。膜内结构域可以编码一个或多个ITAM结构域。在一些实施方案中,所述膜内结构域编码(CD28+CD3ζ)、(CD28+CD27+CD3ζ)、(CD28+OX40+CD3ζ)、(CD28+4-1BB+CD3ζ)、(CD28+CD27+OX40+CD3ζ)、(CD28+4-1BB+CD27+CD3ζ)、(CD28+4-1BB+OX40+CD3ζ)、(4-1BB+CD3ζ)、(4-1BB+OX40+CD3ζ)、(4-1BB+CD27+CD3ζ)、(CD27+CD3ζ)、(CD27+OX40+CD3ζ)、(CD28 Δ+CD3ζ)、(CD28 Δ+CD27+CD3ζ)、(CD28 Δ+OX40+CD3ζ)、(CD28 Δ+4-1BB+CD3ζ)、(CD28 Δ+4-1BB+OX40+CD3ζ)、(CD28 Δ+CD27+OX40+CD3ζ)、(CD28 Δ+4-1BB+CD27+CD3ζ)、(4-1BB+ICOS+CD3ζ)、(CD28+ICOS+CD3ζ)、(ICOS+CD3ζ)、CD3ζ、或仅CD28。在一些实施方案中,可以测试CAR的活性,例如,使用iQue™筛选器(IntelliCyt, Albuquerque, NM)。在一些实施方案中,当在细胞如T细胞中表达时,使用诸如例如流式细胞术等技术,可以评估CAR的一种或多种特征(例如,活力、活化信号的上调、CD25的上调、细胞因子释放、和/或细胞杀伤)。在一些实施方案中,所述活性包括所述CAR选择性结合癌细胞,选择性结合病原体,选择性结合涉及自身免疫性疾病的细胞或者促进T细胞的活化、T细胞的破坏、T细胞的分化、T细胞的增殖、T细胞的去分化、T细胞的移动、T细胞的细胞因子生成、或T细胞的杀伤的能力。

[0016] 在一些实施方案中,所述癌细胞是卵巢癌、淋巴瘤、肾细胞癌、B细胞恶性肿瘤、CLL、B-ALL、ALL、白血病、B细胞恶性肿瘤或淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、无痛性B细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、AML、宫颈癌、乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌、成神经细胞瘤、皮肤癌、黑素瘤、肺癌、骨肉瘤、胶质瘤、上皮衍生的肿瘤、前列腺癌或儿科癌症。所述病原体可以是病毒、真菌或细菌。在一些实施方案中,所述测试包括单细胞成像、单细胞遗传学、单个T细胞或T细胞群体的评估;测量特异性杀伤或连续杀伤、基因表达、蛋白质表达、朝向或远离靶标的移动、增殖、活化诱导的细胞死亡、细胞因子的分泌或趋化因子的分泌。所述方法可以进一步包括基于单个CAR的特性,从所述多个载体选择所述单个CAR。所述方法可以进一步包括向受试者治疗性施用所述单个CAR。所述受试者可以是哺乳动物,如例如人。

[0017] 本发明的另一个方面涉及多肽,其包含下列各项或者由下列各项组成:CAR 217 (SEQ ID NO:2)、CAR 194 (SEQ ID NO:3)、CAR 212 (SEQ ID NO:4)、CAR 213 (SEQ ID NO:5)、CAR 265 (SEQ ID NO:6)、CAR 214 (SEQ ID NO:56)、CAR 215 (SEQ ID NO:57)、CAR 216 (SEQ ID NO:58)、CAR 218 (SEQ ID NO:59)、CAR 193 (SEQ ID NO:55)或CAR 268 (SEQ ID NO:7)。

[0018] 本发明的又一个方面涉及表达多肽的经转化的T细胞,所述多肽包含下列各项或者由下列各项组成:CAR 217 (SEQ ID NO:2)、CAR 194 (SEQ ID NO:3)、CAR 212 (SEQ ID NO:4)、CAR 213 (SEQ ID NO:5)、CAR 265 (SEQ ID NO:6)、CAR 214 (SEQ ID NO:56)、CAR 215 (SEQ ID NO:57)、CAR 216 (SEQ ID NO:58)、CAR 218 (SEQ ID NO:59)、CAR 193 (SEQ ID NO:55)或CAR 268 (SEQ ID NO:7)。细胞可以是永生化细胞。T细胞可以是αβT细胞、γδT细胞、NK细胞、NKT细胞、干细胞、或从干细胞衍生的细胞,包括免疫系统的细胞。

[0019] 本发明的另一个方面涉及药物制剂,所述药物制剂包含本发明的经转化的T细胞。

[0020] 本发明的又一个方面涉及核酸,所述核酸编码包含下列各项或由下列各项组成的嵌合抗原受体:CAR 217 (SEQ ID NO:2)、CAR 194 (SEQ ID NO:3)、CAR 212 (SEQ ID NO:4)、CAR 213 (SEQ ID NO:5)、CAR 265 (SEQ ID NO:6)、CAR 214 (SEQ ID NO:56)、CAR 215 (SEQ

ID NO:57)、CAR 216(SEQ ID NO:58)、CAR 218(SEQ ID NO:59)、CAR 193(SEQ ID NO:55)或CAR 268(SEQ ID NO:7)。所述核酸可以被包含在T细胞中,如例如 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NK细胞、NKT细胞、干细胞、或从多能细胞衍生的T细胞。T细胞可以被包含在药学上可接受的载体或赋形剂中。

[0021] 本发明的另一个方面涉及组合物,所述组合物包含不同CAR编码载体的文库,所述文库的载体就独特的抗原结合结构域、铰链结构域和/或膜内结构域而言是随机化的。在一些实施方案中,所述文库就独特的抗原结合结构域、铰链结构域和膜内结构域而言随机化。在一些实施方案中,所述文库就独特的抗原结合结构域和膜内结构域而言随机化。在一些实施方案中,所述文库就独特的抗原结合结构域和铰链结构域而言随机化。在一些实施方案中,所述文库就独特的抗原铰链结构域和膜内结构域而言随机化。

[0022] 下文在表1中显示了在本发明的方法中用于产生CAR的抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域和膜内结构域的实例。抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域、和膜内结构域在表1中仅作为非限制性实例提供,并且预期如对于具体临床应用所期望的,可以选择实际上任何抗原结合结构域(例如,靶向癌性细胞、细菌、真菌、病毒或病毒感染的细胞)。在表1中,提供了抗原结合结构域的靶标(例如,“CD19”可以指选择性结合CD19的scFv区)。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含选择性结合抗原的scFv或由选择性结合抗原的scFv组成。若期望的话,可以在期望时使scFv的部分随机化(例如,scFv的可变区的部分)。在一些实施方案中,抗原结合结构域选择性结合蛋白质。或者,抗原结合结构域可以选择性结合在靶标,如例如真菌、病毒、细菌或癌性细胞上表达的碳水化合物。例如,在一些实施方案中,抗原结合结构域包含Dectin-1或由Dectin-1组成,所述Dectin-1可以选择性结合存在于真菌细胞壁中的 β -葡聚糖和碳水化合物。在一些实施方案中,CAR可以选择性结合病毒,例如,CAR可以结合病毒蛋白,如肝炎包膜蛋白(例如,Krebs等,2013)。在一些实施方案中,抗原结合结构域是细胞因子。抗原结合结构域可以选择性结合蛋白质、碳水化合物、或糖。在一些实施方案中,从选择性结合单一靶标,抗原的多个抗原结合结构域产生CAR,或者抗原结合结构域可以具有重叠的抗原。在一些实施方案中,从选择性结合不同靶标或抗原的多个抗原结合结构域产生CAR。CAR中的膜内结构域可以在表达CAR的细胞,如例如T细胞或自然杀伤(NK)细胞中产生抑制信号(例如,PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、BTLA、ITIM、SHP-1、LAIR-1、TIGIT、Siglecs)或刺激信号(例如,CD27、CD28、ICOS、CD134、CD137、LCK、DAP10、ITAM、ZAP-70、LAT、SLP-76、细胞因子以及细胞因子受体;以及组合和突变)。当抗原结合区选择性识别抗原时,膜内结构域可以引起或促进包含CAR的细胞(例如T细胞或NK细胞)活化细胞杀伤、迁移、分化、去分化、或者导致诱导细胞中的凋亡信号。凋亡信号可以包含CTLA4凋亡信号和/或PD1(蛋白质死亡1)凋亡信号或由CTLA4凋亡信号和/或PD1(蛋白质死亡1)凋亡信号组成。在一些实施方案中,可以在细胞,如例如T细胞或NK细胞中表达超过一种独特的CAR。例如,可以在细胞中表达第一CAR和第二CAR,其中第一CAR选择性结合健康细胞上的抗原,并且经由第一膜内结构域诱导抑制信号(例如,降低T细胞或NK细胞将损伤健康细胞的概率),并且第二CAR选择性结合靶细胞(例如,癌性细胞、真菌、病毒感染的细胞、细菌)上的抗原,并且经由第二膜内结构域诱导刺激信号(例如,促进或引起T细胞或NK细胞对靶细胞的杀伤)。经由本发明的方法产生的CAR可以插入靶细胞,如例如T细胞或NK细胞,作为整合的DNA(例如,使用电穿孔和经由转座酶/转座子载体或系统的同源重组)或作为非整合的DNA或

RNA (例如,使用病毒载体,如例如慢病毒或逆转录病毒的mRNA的病毒递送)。在一些实施方案中,根据本发明的编码CAR的T细胞是永生化细胞;此类永生化细胞可以发挥功能,可以用于评估或测量CAR的治疗潜力或毒性。这样,可以筛选许多CAR的期望的药理学谱、针对患病细胞或病原体的毒性、在健康细胞中的毒性缺乏、和/或治疗效力。

[0023] 表1:可以组合为抗原结合结构域-铰链-信号传导结构域以产生CAR的DNA分子。

[0024]	抗原结合结构域 (例如, 选择性结合以下列出的靶标的 ScFv)
	CD19 (小鼠) (例如, SEQ ID NO:8)
	CD19 (人) (例如, SEQ ID NO:9)
	CD19 (人源化)
	通用抗原 (小鼠) (Rushworth 等, 2014)
	CD22 (例如, 来自 Jabbour 等, 2014 或 Kong 等, 2014 的 scFv)
	CD4 (例如, 来自 Humblet-Baron 等, 2015 的 scFv)
	CD44v6 (例如, 来自 Leung 2010 或 Verel 2002 的 scFv)
	CD45 (例如, 来自 Shin 等, 2011 的 scFv)
	CD28 (例如, 来自 Czerwiński 等, 2015 的 scFv)
	CD3 (例如, SEQ ID NO:10)
	CD3e (例如, 来自单克隆抗体 SPV-T3b 的 scFv, Life Technologies, Carlsbad, CA)
	CD123 (例如, SEQ ID NO:11)
	CD138 (例如, 来自 Sun 等, 2007 的 scFv)
	CD52 (例如, 来自 Wang 等, 2015 的 scFv)
	CD56 (例如, 来自 Kaufmann 等, 1997 的 scFv)
	CD74 (例如, 来自 Kaufman 等, 2013 的 scFv)
	CD30 (例如, SEQ ID NO:12)
	Gp75 (例如, 来自 Patel 等, 2008 的 scFv)
	CD38 (例如, 来自 de Weers 等, 2011 的 scFv)
	CD33 (例如, 来自 Manero 等, 2013 的 scFv)
	CD20 (例如, 来自 Le Garff-Tavernier 等, 2014 或 Winiarska 等, 2014 的 scFv)
	Her1/HER3 融合物 (例如, 来自 Sarup 等, 2008 的 scFv)
	HER-3 (例如, SEQ ID NO:13)
	GD2 (例如, SEQ ID NO:14)
	碳水化合物 (如曲霉碳水化合物), 例如来自 Stynen 等, 1991 的 scfv)

[0025]

ROR1 (例如, SEQ ID NO:15)
c-MET (例如, 来自 Zhuang 等, 2014 的 scFv)
cMyc (例如, SEQ ID NO:16)
EGFR (例如, 来自 Funakoshi 等, 2014 的 scFv)
Dectin (例如, Dectin 1 胞外结构域(ectodomain), SEQ ID NO:17)
Dectin-1 结合位点
埃博拉病毒 (例如, 来自 Audet 等, 2014 或 Qiu 等, 2012 的 scFv)
真菌抗原 (例如, 来自 Guimarães 等, 2011 的 scFv)
GP (Qiu 等, 2012)
Gp75 (例如, TA99, SEQ ID NO:18)
HERV-K (HERVK) (例如, SEQ ID NO:19)
NY-ESO-1 (例如, 来自 Schultz-Thater 等, 2000 的 scFv)
VEGF-R2 (例如, 来自 Zhang 等, 2002 的 scFv)
TGF- β 2R (例如, 来自 Leung, 2011 的 scFv)
IgG4 (例如, 来自 Curtin 等, 2015 的 scFv)
生物素 (例如, 来自 Vincent 等, 1993 的 scFv)
O-AcGD2 (例如, 来自 Goldberg 等, 2014 或 Ahmed 等, 2014 的 scFv)
CS1 蛋白 (例如, 埃罗妥珠单抗 (Elotuzumab) 或 huLuc63, SEQ ID NO:20)
间皮素 (例如, 使用, SS-1 scFv, SEQ ID NO:21)
磷脂酰丝氨酸 (例如, 来自 Gerber 等, 2011 的 scFv)

铰链/支架
12 AA (肽) (例如, SEQ ID NO:1)
t-20 AA (肽) (例如, SEQ ID NO:22)
CD8 α (例如, SEQ ID NO:23)
IgG4 Fc (例如, SEQ ID NO:24)
2D3 (例如, SEQ ID NO:25)
IgG4 Fc Δ EQ (IgG4Fc N40Q) (例如, SEQ ID NO:26)
IgG4 Fc Δ Q (IgG4Fc L18E N40Q) (例如 SEQ ID NO:27)
t-12AA + t-20AA
mKate (例如, SEQ ID NO:28)
phiLov (例如, SEQ ID NO:29)
dsRed (例如, SEQ ID NO:30)
Venus (例如, SEQ ID NO:31)

[0026]	eGFP (例如, SEQ ID NO:32)
	CH3 HA (例如, SEQ ID NO:33)
	mTFP-1 (例如, SEQ ID NO:34)
	CD8 α + t-20AA
	双重 t-20 AA
	t-20AA + CD8 α
	CD8 α +亮氨酸拉链 Basep1 (例如, SEQ ID NO:35)
	CD8 α +亮氨酸拉链 Acid1 (例如, SEQ ID NO:36)
[0027]	跨膜结构域
	CD28 (例如, SEQ ID NO:37)
	CD137 (4-1BB) (例如, SEQ ID NO:38)
	CD8 α (例如, SEQ ID NO:39)
	CD3 ζ (例如, SEQ ID NO:40)
[0028]	膜内结构域 (信号传导结构域)
	CD28 + CD3 ζ
	CD28 + CD27 + CD3 ζ
	CD28 + OX40 + CD3 ζ
	CD28 + 4-1BB + CD3 ζ
	CD28 + CD27 + OX40 + CD3 ζ
	CD28 + 4-1BB + CD27 + CD3 ζ
	CD28 + 4-1BB + OX40 + CD3 ζ
	4-1BB + CD3 ζ
	4-1BB + OX40 + CD3 ζ
	4-1BB + CD27 + CD3 ζ
	CD27 + CD3 ζ
	CD27 + OX 40 + CD3 ζ
	CD28 Δ + CD3 ζ
	CD28 Δ + CD27 + CD3 ζ
	CD28 Δ + OX40 + CD3 ζ
	CD28 Δ + 4-1BB + CD3 ζ
	CD28 Δ + 4-1BB + OX40 + CD3 ζ
	CD28 Δ + CD27 + OX40 + CD3 ζ
	CD28 Δ + 4-1BB + CD27 + CD3 ζ
	4-1BB + ICOS + CD3 ζ
	CD28 + ICOS + CD3 ζ
	ICOS + CD3 ζ
	CD3 ζ
	仅 CD28

[0029] ζ -zeta; Δ -突变体;注意=4-1BB又称为CD137;“+”指不同区域的融合。

[0030] 例如,在一些实施方案中,可以使用以下抗原结合结构域、铰链/支架、跨膜结构域、和膜内结构域,如表2中显示。信号传导结构域中,例如表1或表2中包含的序列的实例包

括CD27 (SEQ ID NO:41)、CD28 (SEQ ID NO:42)、CD28 Δ (SEQ ID NO:43)、CD134 (OX40) (SEQ ID NO:44)、CD137 (41BB) (SEQ ID NO:45)、ICOS (SEQ ID NO:46) 和CD3 ζ (SEQ ID NO:47)。如表2中列出的scFv抗EGFR结构域的实例包括Nimotuximab (SEQ ID NO:48) 和西妥昔单抗 (Cetuximab) (SEQ ID NO:49)。如表2中列出的scFv抗磷脂酰丝氨酸的实例是巴维昔单抗 (Bavituximab) (SEQ ID NO:50)。

[0031] 表2:用于产生CAR的文库的实例

[0032]

<i>ScFv</i>	
抗 CS1 蛋白	
抗间皮素 (SS-1)	
抗 CD123	
抗 CD19 人	
抗 CD19 小鼠	
抗 CD3	
抗 CD30	
抗 Dectin	
抗 G2D	
抗 Gp75	
抗 HERVK	
抗 CD22	
抗 ROR-1	
抗 EGFR	
抗 HER-3	
抗磷脂酰丝氨酸	

铰链/支架	
t-12 AA (肽)	
t-20 AA (肽)	
CD8 α	
IgG4 Fc	

IgG4Fc Δ EQ
 IgG4Fc Δ Q
 t-12AA+ t-20AA
 mKate
 phiLov
 dsRed
 Venus
 eGFP
 CH3 HA
 CD8α+ t-20AA
 双重 t-20AA
 t-20AA+ CD8α
 CD8α+亮氨酸拉链 Basepl
 CD8α+亮氨酸拉链 Acid1

跨膜结构域

CD28
 4-1BB
 CD3ζ

信号传导结构域

[0033]

CD28 + CD3ζ
 CD28 + CD27 + CD3ζ
 CD28 + OX40 + CD3ζ
 CD28 + 4-1BB + CD3ζ
 CD28 + CD27 + OX40 + CD3ζ
 CD28 + 4-1BB + CD27 + CD3ζ
 CD28 + 4-1BB + OX40 + CD3ζ
 4-1BB + CD3ζ
 4-1BB + OX40 + CD3ζ
 4-1BB + CD27 + CD3ζ
 CD28Δ + CD3ζ
 CD28Δ + CD27 + CD3ζ
 CD28Δ + OX40 + CD3ζ
 CD28Δ + 4-1BB + CD3ζ
 CD28Δ + 4-1BB + OX40 + CD3ζ
 CD28Δ + CD27 + OX40 + CD3ζ
 CD28Δ + 4-1BB + CD27 + CD3ζ
 4-1BB + ICOS + CD3ζ
 CD28 + ICOS + CD3ζ
 ICOS + CD3ζ
 CD3ζ
 仅 CD28

[0034] 如本文中使用时,术语“嵌合抗原受体 (CAR)”或“CAR”包括人工T细胞受体、嵌合T细胞受体、或嵌合免疫受体。CAR一般是工程化受体,其可以将人工特异性植入到特定的免疫

效应细胞上。可以采用CAR来将单克隆抗体的特异性赋予给T细胞,从而允许产生大量特异性T细胞,例如用于过继性细胞疗法。在一些实施方案中,CAR将细胞的特异性针对肿瘤相关抗原。在优选的实施方案中,CAR包含膜内结构域(包含胞内活化结构域)、跨膜结构域、铰链或支架区、和包含靶向结构域的胞外结构域(例如,从单克隆抗体衍生的scFv)。在一些实施方案中,胞外靶向结构域可以是受体的配体(例如,选择性结合蛋白质受体的肽)。在一些实施方案中,可以通过使用对恶性细胞特异的CAR重定向T细胞的特异性(例如,通过使用抗CD19 scFv靶向癌性B谱系细胞)来靶向恶性细胞。

[0035] 表1中显示了scFv区、铰链/支架区、跨膜结构域、和膜内结构域的实例,并且本文中还提供了相关序列的实例。在表1中注意到scFv区可以指用于特定靶标的多个scFv区(例如,表1中的“CD19”可以指单一单克隆抗体序列,或者在一些优选的实施方案中,它可以指从选择性靶向CD19的单克隆抗体衍生的多个scFv区)。预期可以使用本发明的方法产生CAR,所述CAR包含例如表1的scFv区、铰链/支架、跨膜结构域、和膜内结构域的任何组合的融合物。例如,在一些实施方案中,CAR可以包含与IgG4 Fc铰链/支架区、CD28跨膜结构域、和包含CD28和CD3 ζ 的膜内结构域融合的选择性靶向CD19的scFv区(例如,从小鼠、人或人源化单克隆抗体衍生)。在一些实施方案中,CAR可以包含与IgG4 Fc铰链/支架区、CD28跨膜结构域、和包含CD28和CD3 ζ 的膜内结构域融合的选择性靶向ROR1的scFv区。在一些实施方案中,CAR可以包含与IgG4 Fc铰链/支架区、CD28跨膜结构域、和包含4-1BB和CD3 ζ 的膜内结构域融合的选择性靶向ROR1的scFv区。在一些实施方案中,CAR可以包含与IgG4 Fc铰链/支架区、CD28跨膜结构域、和包含CD28和CD3 ζ 的膜内结构域融合的选择性靶向CD19的scFv区(例如,从小鼠、人或人源化单克隆抗体衍生)。

[0036] 如本文中使用时,术语“抗原”是能够由抗体或T细胞受体结合的分子。抗原一般可以用于诱导体液免疫应答和/或细胞免疫应答,导致B和/或T淋巴细胞的产生。

[0037] 如本文中说明书使用,“一个”或“一种”可以意指一个/种或多个/种。如本文中在权利要求中使用,当结合词语“包含”使用时,词语“一个”或“一种”可以意指一个/种或超过一个/种。

[0038] 在权利要求书中使用术语“或”用于指“和/或”,除非明确指明仅指备选或者备选是互相排斥的,尽管公开内容支持仅指备选和“和/或”的定义。如本文中使用时,“另一”可以意指至少第二或更多。

[0039] 贯穿本申请,术语“约”用于指数值包括装置、用于测定数值的方法的固有误差变化,或者研究受试者间存在的变化。

[0040] 通过以下详细描述,本发明的其它目的、特征和优点将变得明显。然而,应当理解,虽然详细描述和具体的实例指示本发明的优选的实施方式,但是它们仅作为例示给出,因为通过此详细描述,在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员将变得明显。

附图简述

[0041] 以下附图形成本说明书的一部分,并且为了进一步证明本发明的某些方面而包括在内。可以通过与本文中呈现的具体实施方案的详细描述组合参考这些中的一张或多张图更好理解本发明。

[0042] 图1:用于使用表达(i)特异性scFv,(ii)胞外铰链和(iii)膜内结构域的三种供体质粒再装配CAR的克隆载体。此方法将适合于产生各组在铰链、跨膜和胞内区上不同的CAR。使用三重重组位点系统从组分scFv,IgG4 Fc(长铰链);或CD8a(中等铰链)或仅肽(小铰链)和CD3 ζ 与不同信号传导结构域的组合工程化改造CAR分子。将三种供体质粒(进入克隆)中编码的scFv的文库和独特的支架和信号传导结构域重组入表达DNA载体中。此方法产生形式scFv-B-支架-C-信号传导结构域的多个CAR种类。

[0043] 图2A-B:(图2A)通过流式细胞术得到的电穿孔后66天T细胞中的CAR(Fc)和CD8⁺表达。在加载有CD19抗原的aAPC(克隆4)中扩增细胞。(图2B)使用4-h铬释放测定法通过CD19CAR+T细胞临床级(CG),通过三重重组位点得到的CD19CAR+T细胞(EZ CAR)和CAR⁻T细胞将CD19+EL-4的裂解与CD19⁻EL-4的背景裂解比较。与经照射的且加载有抗CD3(OKT3)的K562衍生的aAPC克隆#4一起扩增CAR⁻T。

[0044] 图3:CAR设计。CAR 212=SEQ ID NO:4;CAR 213=SEQ ID NO:5;CAR 214=SEQ ID NO:56;CAR 215=SEQ ID NO:57;CAR 216=SEQ ID NO:58;CAR 217=SEQ ID NO:2;CAR 218=SEQ ID NO:59;CAR 193=SEQ ID NO:55。

[0045] 图4:睡美人追踪质粒。

[0046] 图5-1和5-2:CAR表达。

[0047] 图6:CAR表达动力学。

[0048] 图7:表型。

[0049] 图8A-B:图8A-1、8A-2、8B-1和8B-2中显示了延长的表型。

[0050] 图9:蛋白质印迹分析。

[0051] 图10:扩增动力学。

[0052] 图11:倍数扩增:总细胞。

[0053] 图12:倍数扩增:CAR+T细胞。

[0054] 图13:细胞毒性。

[0055] 图14:4-1BB CAR:细胞毒性。

[0056] 图15:TM结构域:细胞毒性。

[0057] 图16:间隔区(IgG4对CD8):细胞毒性。

[0058] 图17:IFN- γ 产生。

[0059] 图18:4-1BB CAR:IFN- γ 产生。

[0060] 图19:TM结构域:IFN- γ 产生。

[0061] 图20:间隔区(IgG4对CD8):IFN- γ 产生。

[0062] 图21:安全性:针对SB11转座酶的PCR。

[0063] 图22:安全性:CAR拷贝数(qPCR)。

[0064] 图23:安全性:自主生长。如图中显示,观察到自主生长的缺乏。

[0065] 图24:CAR设计。在图的右边提供了CAR的实例。

[0066] 图25:CD3- ζ 。询问=SEQ ID NO:51;对象-顶部=SEQ ID NO:52;对象-中间=SEQ ID NO:53;对象-底部=SEQ ID NO:54。

[0067] 图26:CAR设计。

[0068] 图27:CAR。

- [0069] 图28:CAR表达。
- [0070] 图29:扩增动力学。
- [0071] 图30:扩增动力学。
- [0072] 图31:细胞毒性。
- [0073] 图32:细胞毒性。
- [0074] 图33:记忆标志物。显示了CAR⁺T细胞上的CD27、CD62L、CD28和CCR7的百分比表达(图26中显示了表达构建体)。
- [0075] 图34:IFN- γ 产生。
- [0076] 图35:IFN- γ 产生(PMA-Ion)
- [0077] 图36:自主生长。
- [0078] 图37:CAR拷贝数。
- [0079] 图38:CAR拷贝数。
- [0080] 图39:CAR拷贝数。
- [0081] 图40A-E:实施通过Lipofectamine用携带CAR DNA的质粒(pSBS0 EZ CAR)转染293-HEK细胞。在用抗Fc或抗独特型(抗CD19svFv)抗体染色后通过流式细胞术分析经转染的细胞。
- [0082] 图41A-B:图41A-1和41A-2,Nalm-6;EL-4CD19⁺细胞;具有MCL和CLL的患者肿瘤细胞(靶标),先前修饰为表达GFP。将 5×10^3 个靶细胞与增加浓度的CD19RIgG4CD28CAR T细胞、CD19RCD8 α CD28 CAR T细胞和CAR⁻T细胞(用作对照)一起温育4小时。在4小时后,通过IntelliCyt's iQue获得细胞,并且数据分析在其专有的软件中进行。图41B,图代表针对肿瘤细胞的CAR T细胞的杀伤百分比。效应细胞和靶细胞之前的比率范围为0至40个细胞。
- [0083] 图42:将 5×10^3 个靶细胞(EL-4CD19⁺粒酶B细胞报告物)与增加浓度的临床级CD19RIgG4CD28CAR T细胞、EZ CD19RCD8 α CD28 CAR T细胞和CAR⁻T细胞(用作对照)一起温育4小时和10小时。在温育时间后,通过IntelliCyt's iQue获得细胞,并且数据分析在其专有的软件中进行。图代表针对肿瘤细胞的CAR T细胞的杀伤百分比。效应细胞和靶细胞之前的比率范围为0至20个细胞。

具体实施方式

[0084] 本文中提供了用于产生嵌合抗原受体(CAR)的方法。所述方法利用多个载体,每个编码抗原结合结构域(例如,scFv区)、铰链区、跨膜区、和/或膜内结构域。例如,在一些实施方案中,第一载体编码抗原结合结构域,第二载体编码铰链区,并且第三区编码膜内结构域。在一些实施方案中,跨膜区在第二载体中,在第三载体中,或在第四载体中编码。在一些优选的实施方案中,载体可以同源重组以形成编码CAR的核酸,所述CAR包含抗原结合结构域、铰链区、跨膜区、和膜内结构域。这样,可以产生许多CAR,并且筛选期望的活性,如例如,选择性识别和杀伤表达由CAR选择性结合的抗原的癌性细胞。然后,CAR可以在细胞,如T细胞或自然杀伤(NK)细胞中以整合核酸(例如,使用转座酶/转座子整合到宿主基因组中的DNA)或以非整合核酸(例如,经由病毒载体,如慢病毒或逆转录病毒递送的mRNA)表达。然后,表达CAR的T细胞或NK细胞可以在药物制剂或赋形剂中向受试者,如人患者施用以治疗或预防疾病(例如,癌症、真菌感染、细菌感染、或病毒感染)。

[0085] I.文库产生

[0086] 可以通过本领域技术人员已知的方法产生编码多个scFv区、铰链/支架区、跨膜结构域、和膜内结构域(信号传导结构域)的文库。在一些实施方案中,对于scFv区、铰链/支架区、和膜内结构域(信号传导结构域)中的两个或三个,可得到多种可能性。在一些实施方案中,对于scFv区、铰链/支架区、跨膜结构域、和膜内结构域(信号传导结构域)中的两个、三个或全部,可得到多种可能性。例如,在表1中提供了scFv区、铰链/支架区、跨膜结构域、和膜内结构域(信号传导结构域)的实例。在一些实施方案中,文库可以编码多个靶向不同抗原,如多个抗癌抗原或肿瘤靶向抗原的scFv;在其它实施方案中,文库可以编码选择性结合单一靶标(例如,单一抗癌抗原,如CD19等)的多个不同scFv。这样,可以使用所述方法鉴定哪个肿瘤靶向构建体可以对给定细胞样品更有效起(例如以在个体化药物中使用)或可以使用所述方法鉴定在靶向给定抗原中更有效发挥功能的新CAR。scFv区一般包含从抗体衍生的可变轻(VL)和可变重(VH)链。在一些实施方案中,若想要的话,可以随机化VL和VH区的部分。用于产生文库的通用方法包括例如产生酵母文库、细菌、噬菌体文库、浸润性B细胞、杂交瘤(包括来自人和啮齿类),或来自羊驼(llamas)的文库、骆驼、马文库、和计算机方法(参见例如Lennard, 2002)。

[0087] 在一些实施方案中,融合编码scFv、铰链/支架区、跨膜结构域、和膜内结构域的不同载体以形成编码CAR的单一载体。可以经由转座子介导的同源重组发生融合。

[0088] 例如,在一些实施方案中,编码scFv、铰链/支架区、跨膜结构域、和/或膜内结构域的载体可以是睡美人(SB)或piggyBac DNA质粒。睡美人(SB)和piggyBac DNA质粒描述于例如Maiti等(2013), Singh等(2008), 和Huls等(2013)。在一些实施方案中,转座子由鲑鱼型Tc1样转座酶(SB)介导。在一些优选的实施方案中,经由如Singh等, 2014或Huls等中描述的方法,将编码CAR的载体转染或掺入来自受试者,如患有癌症的人患者的T细胞中。例如,可以使用从睡美人(SB)系统衍生的DNA载体避免与用重组病毒载体转导T细胞有关的费用和制造困难。在电穿孔后,转座子/转座酶可以改善用于在T细胞中表达CAR和其它转基因的质粒的整合效率。与人工抗原呈递细胞(aAPC)组合的SB系统可以选择性增殖,并且产生适合于人应用的CAR(+) T细胞。在一些实施方案中,两种DNA质粒、SB转座子(编码感兴趣的CAR)和SB转座酶(例如, SB11)的同步电转移可以继之以通过在存在可溶性重组人IL-2和IL-21的情况下每7天添加(刺激循环)经 γ -照射的aAPC回收稳定整合体。例如,可以进行4个循环(28天的连续培养)以产生临床上有吸引力的数目的稳定表达感兴趣CAR的T细胞。可以利用转座子/转座酶系统的使用递送表达CAR的T细胞,如例如Hackett等中描述。

[0089] II. 嵌合抗原受体

[0090] 本发明的实施方案牵涉产生并鉴定编码抗原特异性嵌合抗原受体(CAR)多肽的核酸。在一些实施方案中,将CAR进行人源化以降低免疫原性(hCAR)。

[0091] 在一些实施方案中,CAR可以识别由一种或多种抗原之间共享的空间构成的表位。模式识别受体,如Dectin-1可以用于驱动针对碳水化合物抗原的特异性。在某些实施方案中,结合区可以包含单克隆抗体的互补决定区、单克隆抗体的可变区、和/或其抗原结合片段。在一些实施方案中,结合区是scFv。在另一个实施方案中,结合受体或细胞靶标的肽(例如,细胞因子)可以作为可能性包括在内或者替换CAR的结合区中的scFv区。因此,在一些实施方案中,可以从编码多个scFv区和/或其它靶向蛋白的多个载体产生CAR。互补决定区

(CDR)是在抗原受体(例如,免疫球蛋白和T细胞受体)蛋白的可变域中找到的互补抗原并且因此向受体提供其针对所述特定抗原的特异性的短氨基酸序列。抗原受体的每条多肽链含有三个CDR(CDR1、CDR2和CDR3)。由于抗原受体通常由两条多肽链构成,每个抗原受体有可以与抗原接触的6个CDR:每条重链和轻链含有3个CDR。由于通常在CDR中找到与免疫球蛋白和T细胞受体选择性有关的大多数序列变异,这些区域有时称为超变结构域。在这些之中,CDR3显示最大的变异性,因为它由VJ(在重链和TCR $\alpha\beta$ 链的情况下为VDJ)区的重组编码。

[0092] 经由本发明产生的CAR编码核酸可以包含一个或多个个人基因或基因片段以增强用于人患者的细胞免疫疗法。在一些实施方案中,可以经由本文中描述的方法产生全长CAR cDNA或编码区。抗原结合区或结构域可以包含从特定的人单克隆抗体衍生的单链可变片段(scFv)的V_H和V_L链的片段,如那些描述于美国专利7,109,304(通过引用方式并入本文)的片段。在一些实施方案中,scFv包含人抗原特异性抗体的抗原结合结构域。在一些实施方案中,scFv区是由针对人密码子使用优化以在人细胞中表达的序列编码的抗原特异性scFv。

[0093] CAR的抗原结合结构域的排列可以是多聚体的,如双抗体(diabody)或多聚体。多聚体可以通过将轻链和重链的可变部分交叉配对成可以称为双抗体的事物而形成。在一些实施方案中,可以缩短或排除CAR的铰链部分(即,产生仅包含抗原结合结构域、跨膜区和胞内信号传导结构域的CAR)。大量铰链可以在本发明的情况下使用,例如如表1中显示。在一些实施方案中,可以使铰链区的第一个半胱氨酸得到维持,或者通过脯氨酸或丝氨酸取代突变,或者截短直至第一个半胱氨酸。从用作抗原结合区的scFv缺失Fc部分以产生根据本发明的CAR。在一些实施方案中,抗原结合区可以编码仅Fc结构域之一,例如来自人免疫球蛋白的CH2或CH3结构域。还可以包括已经被修饰以改善二聚化和寡聚化的人免疫球蛋白的铰链、CH2、和CH3区。在一些实施方案中,铰链部分可以包含8-14个氨基酸的肽(例如12AA肽)、CD8 α 的部分、或IgG4 Fc或者由其组成。在一些实施方案中,可以使用促进寡聚化的结构域,如CD8 α ,从细胞表面附加抗原结合结构域。在一些实施方案中,可以使用被单克隆抗体(mAb)克隆2D3(描述于例如Singh等,2008中的mAb克隆2D3)识别的结构域从细胞表面附加抗原结合结构域。

[0094] CAR的膜内结构域或胞内信号传导结构域一般可以引起或促进包含CAR的免疫细胞的至少一种正常效应子功能的活化。例如,膜内结构域可以促进T细胞的效应子功能,如例如细胞裂解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。初始、记忆的或记忆类型的T细胞中的效应子功能可以包括抗原依赖性增殖。术语“胞内信号传导结构域”或“膜内结构域”指可以转导效应子功能信号和/或指导细胞实施特化功能的CAR部分。虽然通常整个胞内信号传导结构域可以被包含在CAR中,但是在一些情况中可以包含膜内结构域的截短部分。一般地,膜内结构域包括截短的膜内结构域,其中截短的膜内结构域保留在细胞中转导效应子功能信号的能力。

[0095] 在一些实施方案中,膜内结构域包含T细胞受体的 ζ 链或任何其同源物(例如, η 、 δ 、 γ 、或 ϵ)、MB1链、B29、Fc RIII、Fc RI和信号传导分子的组合,如CD3 ζ 和CD28,CD27、4-1BB、DAP-10、OX40及其组合,以及其它类似的分子和片段。可以使用活化蛋白家族的其它成员的胞内信号传导部分,如Fc γ RIII和Fc ϵ RI。这些备选的跨膜和胞内结构域的实例可以参见例如Gross等(1992),Stancovski等(1993),Moritz等(1994),Hwu等(1995),Weijtens等(1996),和Hekele等(1996),通过引用方式以其整体并入本文。在一些实施方案中,膜内结

构域可以包括人CD3 ζ 胞内域。

[0096] 优选地,通过跨膜结构域连接抗原特异性胞外结构域和胞内信号传导结构域。可以在CAR中包含的跨膜结构域包括例如人IgG4Fc铰链和Fc区、人CD4跨膜结构域、人CD28跨膜结构域、跨膜人CD3 ζ 结构域、或半胱氨酸突变人CD3 ζ 结构域、或来自人跨膜信号传导蛋白例如CD16和CD8和红细胞生成素受体的跨膜结构域。例如,在表1中提供了跨膜结构域的实例。

[0097] 在一些实施方案中,膜内结构域包含编码共刺激受体,如例如经修饰的CD28胞内信号传导结构域、或CD28、CD27、OX-40 (CD134)、DAP10、或4-1BB (CD137) 共刺激受体的序列。在一些实施方案中,由CD3 ζ 启动的初始信号,由人共刺激受体提供的别的信号两者可以被包含在CAR中以更有效活化经转化的T细胞,这可以有助于改善过继性免疫疗法的体内持久性和治疗成功。如表1中记录,膜内结构域或胞内受体信号传导结构域可以包含单独或与Fc γ RIII共刺激信号传导结构域,如例如CD28、CD27、DAP10、CD137、OX40、CD2、4-1BB组合的CD3的 ζ 链。在一些实施方案中,膜内结构域包含TCR ζ 链、CD28、CD27、OX40/CD134、4-1BB/CD137、Fc ϵ RI γ 、ICOS/CD278、IL-2Rbeta/CD122、IL-2Ralpha/CD132、DAP10、DAP12、和CD40中的一种或多种的部分或全部。在一些实施方案中,膜内结构域中可以包含1、2、3、4或更多个胞质结构域。例如,在一些CAR中,已经观察到融合在一起的至少两个或三个信号传导结构域可以导致叠加或协同效应。

[0098] 在一些方面,可以产生包含编码CAR的DNA序列的分离的核酸区段和表达盒。可以使用多种载体。在一些优选的实施方案中,载体可以允许将编码CAR的DNA递送到免疫,如T细胞。CAR表达可以在调控的真核启动子,如例如MNDU3启动子、CMV启动子、EF1 α 启动子、或泛素启动子的控制下。此外,载体可以含有选择标记,若不是出于其它原因,以促进其体外操作。在一些实施方案中,可以从自DNA模板体外转录的mRNA表达CAR。

[0099] 嵌合抗原受体分子是重组的,并且以其既结合抗原又经由存在于其胞质尾部中的免疫受体活化基序 (ITAM) 而转导活化信号的能力区分。利用抗原结合部分 (例如,从单链抗体 (scFv) 产生) 的受体构建体提供“通用”的额外优点,因为它们可以以不依赖于HLA的方式结合靶细胞上的天然抗原。例如,可以将scFv构建体与编码CD3复合物的 ζ 链 (ζ) 的胞内部分、Fc受体 γ 链、和sky酪氨酸激酶的序列融合 (Eshhar等,1993;Fitzner-Attas等,1998)。已经在几种鼠和人抗原-scFv: ζ 系统中证明重定向的T细胞效应子机制,包括CTL的肿瘤识别和裂解 (Eshhar等,1997;Altenschmidt等,1997;Brocker等,1998)。

[0100] 例如,抗原结合区可以来自人或非人scFv。使用非人抗原结合区,如鼠单克隆抗体的一个可能的问题是降低的人效应子功能性和降低的穿透肿瘤块的能力。此外,非人单克隆抗体可以被宿主识别为外来蛋白质,并且因此重复注射此类外来抗体可以导致免疫应答的诱导,从而导致有害的超敏感性反应。对于基于鼠的单克隆抗体,此效应已经称为人抗小鼠抗体 (HAMA) 应答。在一些实施方案中,与一些鼠抗体相比,在CAR中包含人抗体或scFv序列可以导致很少或无HAMA应答。类似地,在CAR中包含人序列可以用于降低或避免免疫介导的内源T细胞的识别或消除的风险,所述内源T细胞存在于接受者中,并且可以基于HLA识别加工过的抗原。

[0101] 在一些实施方案中,CAR包含:a) 胞内信号传导结构域,b) 跨膜结构域,c) 铰链区,和d) 包含抗原结合区的胞外结构域。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域和跨膜结构

域与膜内结构域一起由单一载体编码,所述单一载体可以与编码铰链区的载体和编码抗原结合区的载体融合(例如,经由转座子指导的同源重组)。在其它实施方案中,胞内信号传导区和跨膜区可以由融合(例如,经由转座子指导的同源重组)的两个不同载体编码。

[0102] 在一些实施方案中,CAR的抗原特异性部分,又称为包含抗原结合区的胞外结构域,选择性靶向肿瘤相关抗原。肿瘤相关抗原可以是任何种类的,只要它在肿瘤细胞的细胞表面上表达。可以用经由本发明产生的CAR靶向的肿瘤相关抗原的实例包括例如CD19、CD20、癌胚抗原、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、CD56、EGFR、c-Met、AKT、Her2、Her3、上皮肿瘤抗原、黑素瘤相关抗原、突变p53、突变ras、Dectin-1等。在一些实施方案中,CAR的抗原特异性部分是scFv。表1中提供了肿瘤靶向性scFv的实例。在一些实施方案中,CAR可以与膜结合细胞因子共表达,例如以改善在存在有少量肿瘤相关抗原时的持久性。例如,CAR可以与膜结合IL-15共表达。

[0103] 在一些实施方案中,可以用CAR靶向胞内肿瘤相关抗原,如例如HA-1、存活蛋白、WT1和p53。这可以通过通用T细胞上表达的CAR实现,所述通用T细胞在HLA的背景中识别从胞内肿瘤相关抗原描述的加工过的肽。另外,通用T细胞可以遗传修饰为表达T细胞受体配对,其在HLA的情形中识别胞内加工过的肿瘤相关抗原。

[0104] 由CAR识别的病原体可以基本上是何种类型的病原体,但是在一些实施方案中,病原体是真菌、细菌或病毒。示例性的病毒病原体包括腺病毒科(Adenoviridae)、埃巴病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、JC病毒、BK病毒、HSV、HHV病毒科、细小RNA病毒科(Picornaviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)、嗜肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)、黄病毒科(Flaviviridae)、逆转录病毒科(Retroviridae)、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)、副粘液病毒科(Paramyxoviridae)、乳多空病毒科(Papovaviridae)、多瘤病毒(Polyomavirus)、弹状病毒科(Rhabdoviridae)、和披膜病毒科(Togaviridae)的病毒。示例性的病原性病毒引起天花、流感、流行性腮腺炎、麻疹、水痘、埃博拉和风疹。示例性的病原性真菌包括念珠菌属(*Candida*)、曲霉属(*Aspergillus*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、组织胞浆菌属(*Histoplasma*)、肺囊虫属(*Pneumocystis*)和葡萄状穗霉属(*Stachybotrys*)。示例性的病原性细菌包括链球菌属(*Streptococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、志贺菌属(*Shigella*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、大肠杆菌(*E.coli*)、立克次体属(*Rickettsia*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、博德特菌属(*Bordetella*)、衣原体属(*Chlamydia*)、螺旋体属(*Spirochetes*)、和沙门氏菌属(*Salmonella*)。在一些实施方案中,病原体受体Dectin-1可以用于产生CAR,所述CAR识别真菌,如曲霉属的细胞壁上的碳水化合物结构。在另一个实施方案中,可以基于识别病毒决定簇(例如,来自CMV和埃博拉的糖蛋白)的抗体制备CAR以中断病毒感染和病理学。

[0105] 在一些实施方案中,可以将编码CAR的裸DNA或合适的载体引入受试者的T细胞(例如,从患有癌症或其它疾病的人患者获得的T细胞)中。通过使用裸DNA的电穿孔稳定转染T细胞的方法是本领域中已知的。参见例如美国专利No.6,410,319。裸DNA一般指以对于表达正确的方向在质粒表达载体中含有的编码本发明的嵌合受体的DNA。在一些实施方案中,裸DNA的使用可以减少产生表达经由本发明的方法产生的CAR的T细胞需要的时间。

[0106] 或者,病毒载体(例如,逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、或慢病毒

载体)可以用于将嵌合构建体引入T细胞中。一般地,用于转染来自受试者的T细胞的编码CAR的载体在受试者的T细胞中一般应当是非复制的。基于病毒的大量载体是已知的,其中在细胞中维持的病毒的拷贝数足够低以维持细胞的活力。说明性的载体包括pFB-neo载体(STRATAGENE®)以及基于HIV、SV40、EBV、HSV或BPV的载体。

[0107] 一旦确定经转染或转导的T细胞能够以期望的调节和在期望水平以表面膜蛋白表达CAR,可以确定嵌合受体在宿主细胞中是否有功能以提供期望的信号诱导。随后,可以向受试者再引入或施用经转导的T细胞以活化受试者中的抗肿瘤应答。为了促进施用,可以用合适的载体或稀释剂(其优选是药学上可接受的)将经转导的T细胞制备成药物组合物或者制备成适合于体内施用的植入物。本领域中已经描述了制备此类组合物或植入物的手段(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Mack编(1980))。在适当时,可以将表达CAR的经转导的T细胞配制成半固体或液体形式的制剂,如胶囊、溶液、注射液、吸入剂、或气雾剂,以用于其各自的施用途径的常见方式进行。可以利用本领域中已知的手段防止或最小化组合物的释放和吸收,直至它达到靶组织或器官,或者确保组合物的定时释放。一般地,优选地,采用不使表达嵌合受体的细胞失效(ineffectuate)的药学可接受形式。因此,期望地,可以将经转导的T细胞制备成含有平衡盐溶液,如汉克(Hanks)氏平衡盐溶液、或生理盐水的药物组合物。

[0108] IV. 人工抗原呈递细胞

[0109] 在一些情况中,aAPC可用于制备基于CAR的治疗组合物和细胞疗法产品。对于关于抗原呈递系统的制备和用途的一般指导,参见例如美国专利No.6,225,042、6,355,479、6,362,001和6,790,662;美国专利申请公开No.2009/0017000和2009/0004142;和国际公开No.WO2007/103009)。

[0110] 可以使用aAPC扩增表达CAR的T细胞。在遇到肿瘤抗原期间,通过抗原呈递细胞对T细胞递送的信号可以影响T细胞编程及其随后的治疗效力。这已经刺激开发人工抗原呈递细胞的努力,所述人工抗原呈递细胞允许最佳控制对T细胞提供的信号(Turtle等,2010)。除了感兴趣的抗体或抗原外,aAPC系统还可以包含至少一种外源辅助分子。可以采用辅助分子的任何合适的数目和组合。辅助分子可以选自诸如共刺激分子和粘附分子等辅助分子。示例性的共刺激分子包括CD70和B7.1(又称作B7或CD80),其可以结合T细胞表面上的CD28和/或CTLA-4分子,从而影响例如T细胞扩增、Th1分化、短期T细胞存活、和细胞因子分泌,如白介素(IL)-2(参见Kim等,2004)。粘附分子可以包括碳水化合物结合糖蛋白,如选择蛋白、跨膜结合糖蛋白,如整联蛋白、钙依赖性蛋白,如钙粘蛋白和单次跨膜免疫球蛋白(Ig)超家族蛋白质,如胞间粘附分子(ICAM),其促进例如细胞与细胞或细胞与基质接触。示例性的粘附分子包括LFA-3和ICAM,如ICAM-1。例如,在美国专利No.6,225,042、6,355,479和6,362,001中例示了可用于选择、克隆、制备和表达示例性的辅助分子,包括共刺激分子和粘附分子的技术、方法和试剂。

[0111] 优选地,为了变为aAPC而选择的细胞具有胞内抗原呈递、胞内肽运输、和/或胞内MHC I类或II类分子-肽加载的缺陷,或者是变温的(即,比哺乳动物细胞系对温度攻击的敏感性更小),或者拥有缺陷和变温特性两者。优选地,为了变为aAPC而选择的细胞还缺乏表达引入细胞中的外源MHC I类或II类分子和辅助分子组分的至少一种内源对应物(例如,如上文描述的内源MHC I类或II类分子和/或内源辅助分子)的能力。此外,aAPC优选地保留细

胞在其修饰为产生aAPC前拥有的缺陷和变温特性。示例性的aAPC构成或衍生自与抗原加工(TAP)缺陷细胞系,如昆虫细胞系有关的转运蛋白。示例性的变温昆虫细胞系是果蝇细胞系,如Schneider 2细胞系(例如Schneider, J.m 1972)。美国专利No.6,225,042、6,355,479和6,362,001中提供了用于Schneider 2细胞的制备、生长和培养的说明性方法。

[0112] aAPC可以进行冷冻-融化循环。例如,可以通过将含有aAPC的合适容器与适量的液氮、固体二氧化碳(干冰)、或类似的低温材料接触,从而快速发生冷冻来冷冻aAPC。然后,通过从低温材料取出aAPC并且暴露于周围室温条件,或者通过其中采用微温水浴或温手促进较短的融化时间的促进融化过程融化冷冻的aAPC。另外,可以冷冻aAPC,并且在融化前贮存延长的时间段。也可以融化冷冻的aAPC,然后在进一步使用前冻干。有利地,可以不利影响冷冻-融化程序的防腐剂,如二甲亚砜(DMSO)、聚乙二醇(PEG)和其它防腐剂可以从进行冷冻-融化循环的含有aAPC的培养基中缺乏,或者基本上被除去,如通过将aAPC转移到基本上缺乏此类防腐剂的培养基。

[0113] 在其它优选的实施方案中,可以通过交联使异体核酸和aAPC的内源核酸失活,从而在失活后基本上不发生细胞生长、核酸的复制或表达。例如,可以在表达外源MHC和辅助分子,在aAPC表面上呈递此类分子,并且给呈递的MHC分子加载一种或多种选择的肽后的点时使aAPC失活。因而,虽然此类加载有失活的且选择的肽的aAPC使得基本上不能增殖或复制,但是它们可以保留选择的肽呈递功能。交联也可以导致基本上没有污染性微生物,如细菌和病毒的aAPC,而基本上不降低aAPC的抗原呈递细胞功能。因此,交联可以用于维持aAPC的重要APC功能,同时帮助减轻关于使用aAPC开发的细胞疗法产品的安全性的忧虑。关于与交联和aAPC相关的方法,参见例如美国专利申请公开No.20090017000,其通过引用方式并入本文。

[0114] IV. 实施例

[0115] 包括以下实施例以证明本发明的优选的实施方案。本领域技术人员应当理解,以下实施例中公开的技术代表由发明人发现的在本发明的实施中良好发挥功能的技术,并且因此可以认为构成其优选的实施模式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应当理解可以在不偏离本发明的精神和范围的前提下对公开的具体的实施方案进行许多改变,而仍然获得相同或相似的结果。

[0116] 实施例1

[0117] 材料和方法

[0118] 临床级DNA质粒的产生

[0119] SB转座子CoOpCD19RCD28 ζ /pSBS0在EF-1/HTLV杂合复合启动子(InvivoGen)下表达入密码子优化的(CoOp)第二代CoOpCD19RCD28 ζ CAR,所述EF-1/HTLV杂合复合启动子(InvivoGen)由延长因子-1a(EF-1a[Kim等,1990]和人T细胞白血病病毒(HTLV)的59非翻译区[Singh等,2011;Davies等,2010]构成。此DNA质粒的衍生描述于图1中。从DNA质粒pCMV-SB11以顺式表达在巨细胞病毒(CMV)启动子下的SB转座酶SB11(Singh等,2011;Singh等,2008)。对这两种质粒完整测序,并且由Waisman Clinical Biomanufacturing Facility(Madison,WI)使用用于选择细菌菌株大肠杆菌DH5a的卡那霉素制备。

[0120] 产生三重位点特异性重组DNA质粒:EZ-Build-CAR

[0121] 使用来自上文描述的CAR(CoOpCD19RCD28z/pSBS0)的DNA序列,各部分CD19 ScFv、

铰链IgG4 Fc和与CD3 ζ 信号传导结构域偶联的域结构域CD28跨膜和胞质溶胶部分侧翼有 λ 重组位点,由Geneart (Life Technologies)以PCR产物合成。将这三个部分单独插入pDonors221质粒中(通过酶BP clonase(两者都来自Invitrogen)。将三个质粒与三重位点特异性重组睡美人质粒通过酶LR PLUS clonase(Invitrogen)重组,以scFv-B-支架-C-信号传导结构域形式产生EZ-Build CD19CD28 ζ CAR(图1)。

[0122] 细胞计数

[0123] 使用台盼蓝排除法(Trypan-blue exclusion)区分活细胞与死亡细胞,并且使用Cellometer(Nexcelom Bioscience)计数(Singh等,2011)。

[0124] PBMC的分离

[0125] 来自两名男性志愿者健康供体的白细胞去除术(Leukapheresis)产品购自Key Biologics LLC(Memphis,TN)。通过我们修改Biosafe Sepax系统(Eysins,Switzerland)根据cGMP工作分离外周血单个核细胞(PBMC)。简言之,在闭合CS-900试剂盒上的所有夹子后,经由60mL注射器通过鲁尔锁紧连接器(Luer-lock connector)将100mL Ficoll(GE Healthcare)无菌转移到密度梯度介质袋(“ficoll袋”),并且加热使用手持式密封器(Sebra,型号#2380)密封的管道。将试剂盒用钉连接到1,000mL含有具有20mL 25%人血清清蛋白(HSA)(Baxter)的CliniMACS缓冲液(PBS/EDTA,Miltenyi,Cat#70026)(2%v/v,清洗缓冲液)以用于清洗的袋、最终产品袋[300mL具有偶联器的转移包(Baxter/Fenwal 4R2014)]和试剂/血液袋。使用基于密度梯度的分离方案(v126),将注射器活塞加载到离心机室中,并且将Sepax盖加载到aAPC(克隆#4)中以选择性增殖CAR+T细胞。使用经 γ -照射的aAPC在数字上扩增经遗传修饰的T细胞。在VueLife细胞培养袋中在CM中使来自WCB的融化的aAPC增殖长达60天,并且使用Biosafe Sepax II收获程序收获。简言之,经由鲁尔锁定连接将CS-490.1试剂盒连接到300mL输出袋(转移包)。在坑中安装分离室,并且将管道插入光学传感器中,并且旋塞阀对准成T位置。在连接压力传感器线后,在支持架上吊起产品袋和上清液/血浆袋。修改的方案PBSCv302选自Sepax手册,并且有待处理的输入产品的体积(初始体积)设置为#840mL。在确认和试剂盒测试后,开始程序。在完成后,除去袋,闭合夹子,并且除去试剂盒。无菌取出来自最终产品袋的细胞,用清洗介质(Plasmalyte中的10%HSA)清洗两次,并且计数。使用CIS BIO国际放射器(IBL-437C#09433)照射(100Gy)aAPC,并且使用控制速率冷冻器(Planer Kryo 750)在冷冻保存介质中冷冻保存备用。使用加载有抗CD3(OKT3)的K562衍生的aAPC克隆#4来增殖尚未进行遗传修饰的对照(CAR-)自体对照T细胞。在称作加载培养基(LM)的含有0.2%乙酰半胱氨酸(Acetadote,Cumberland Pharmaceuticals)的无血清X-Vivo 15(目录号04-744Q,Lonza)中将获自培养物的aAPC温育过夜。次日,洗涤细胞,使用 γ Cell11000Elite Cs-137放射器(MDS Nordion)照射(100Gy),与1mg/10⁶细胞功能级纯化的抗人CD3(克隆-OKT3,16-0037-85,eBioscience)一起以10⁶个细胞/mL的浓度重悬于LM中,并且在3-D旋转器(Lab-Line)上在温和搅拌的情况下于4℃温育30分钟。在用LM洗涤三次后,细胞用于实验或者在气体层中在液氮中以等分试样冷冻以备用。

[0126] CAR+T细胞的制备

[0127] 将融化的PBMC重悬于(i)人T细胞试剂盒(目录号VPA-1002,Lonza;对于2 $\times$ 10⁷个细胞,一个小杯中100 μ L)中,与(ii)编码CD19RCD28 CAR转座子的DNA质粒(CoOpCD19RCD28/

pSBS0) (每个小杯每 2×10^7 个PBMC的 $15 \mu\text{g}$ 超螺旋DNA), 和 (iii) 编码SB11转座酶的DNA质粒 (pCMVSB11) (每个小杯每 2×10^7 个PBMC的 $5 \mu\text{g}$ 超螺旋DNA)。将此混合物立即转移到小杯 (Lonza), 使用Nucleofector II (程序U-14, Amaxa/Lonza) 电穿孔 (限定培养第0天), 在10% RPMI完全培养基中静止2至3小时, 并且在半培养基更换后, 在 37°C , 5% CO_2 温育过夜。次日, 收获细胞, 计数, 通过流式细胞术测定表型, 并且以比率1:2 (CAR+T细胞:aAPC) 与经c-照射的aAPC共培养, 其标记为培养第1天和7天刺激周期的开始。分别从第1天和第7天起按星期一-星期三-星期五日程表添加IL-21 (目录号AF-200-21, PeproTech) 和IL-2 (目录号NDC 65483-116-07, Novartis)。NK细胞可以防止CAR+T细胞的数字扩增, 尤其在它们的过度生长在组织培养过程中早期出现的情况下。因此, 若CD3-CD56+细胞 $\leq 10\%$, 则在含有25% HAS的CliniMACS缓冲液 (80mL/107个细胞) 中在LS柱 (目录号130-042-401, Miltenyi Biotech) 上使用CD56珠粒 (目录号70206, Miltenyi Biotech, 20mL珠/107个细胞) 实施CD56消减。

[0128] CAR⁻对照T细胞的产生

[0129] 作为对照, 在7天刺激循环中以1:1的比率将 5×10^6 个mock转染的PBMC与经照射的并且加载有抗CD3 (OKT3) 的K562衍生的aAPC克隆#4共培养。从培养第1天起给所有培养物补充IL-21 (30ng/mL), 并且在开始培养后7天开始补充IL-2 (50U/mL)。随后, 每隔一天添加所有细胞因子。

[0130] 细胞的免疫表型

[0131] 在 4°C 使用100mL FACS缓冲液 (2% FBS, 0.1% 叠氮化钠) 中的抗体使染色细胞30分钟。使用FACSCalibur (BD Bioscience) 进行采集, 并且使用FCS Express 3.00.0612分析。

[0132] 铬释放测定

[0133] 使用经 ^{51}Cr 标记的靶细胞, 在标准的4小时铬释放测定中对T细胞评估其细胞毒性。一式三份在 1×10^5 、 0.5×10^5 、 0.25×10^5 、 0.125×10^5 底部板 (Costar) 上铺板T细胞。在温育后, 将50 μL 上清液收获到LumaPlate (Perkin Elmer) 上, 在TopCount NXT (Perkin Elmer) 上读数, 并且如下计算特异性裂解百分比:

[0134] $\frac{\text{实验}^{51}\text{Cr释放} - \text{自发}^{51}\text{Cr释放}}{\text{最大}^{51}\text{Cr释放} - \text{自发}^{51}\text{Cr释放}} \times 100$

[0135] 最大 ^{51}Cr 释放-自发 ^{51}Cr 释放

[0136] 通过在96孔V (Manufacturee Novo Software, Thornhill, Ontario, Canada) 中在来自分别与CM或0.1% Triton X-100 (Sigma) 温育的靶细胞和 0.0625×10^5 个细胞/孔与 5×10^3 个靶细胞的条件化上清液中测量铬来测定自发和最大释放。

[0137] 实施例2

[0138] CD19⁺CAR的产生

[0139] 使用上文在实施例1中描述的方法 (称为“EZ”法) 产生CD19+CAR。比较这些CD19⁺CAR (CD19CAR) 与经由先前的方法产生的临床级 (“CG”) CD19CAR。

[0140] 数据显示了三重位点重组系统产生与临床级CD19CAR (CG) 相似的CD19CAR (EZ)。质粒中由重组位点留下的足迹不干扰CAR的表达和功能 (图2A-B)。

[0141] 实施例3

[0142] 含有 (CD8, CD28) 跨膜结构域和 (CD28, 4-1BB) 信号传导结构域的CAR的产生

[0143] 测试的各个CAR已经显示相似的扩增、细胞毒性和Th1细胞毒性。CD19-BB-z已经显示了较低的Th2细胞因子产生; 在体内, 它在控制小鼠中的疾病方面是有效的 (Molecular

Therapy 17(8):1453-1464,2009)。不过,由于细胞在没有抗原性刺激的情况下在体外存活的事实而存在忧虑。

[0144] 下文在表2中显示了临床中的CAR。在一些实施方案中,本发明的CAR没有如下文表2中显示的特定构建体。或者,在一些实施方案中,可以使用本发明的方法产生具有下文表2中提到的CAR特征,不过与目前在临床中使用的CAR截然不同的CAR的另一种变化。

[0145] 表2:临床中的CAR

[0146]	临床试验	UPenn	Cooper (MDACC)
	基因转移方法	慢病毒	电穿孔/睡美人
	从中衍生的 scfv	FMC63	FMC63
	支架	CD8 α	IgG4
	间隔区	69 aa	230 aa
	跨膜	CD8 α	CD28
	CAR 信号传导膜	CD137 和 CD3- ζ	CD28 和 CD3- ζ
[0147]	内结构域		
	培养方法	CD3/CD28 珠粒	K562 aAPC
	细胞因子	IL-2	IL-2 和 IL-21
	培养时间	14 天	28 天
	输注产品中的转基因表达	4-23%	>80%

[0148] 图3中说明了具体的CAR构建体设计。如图3中显示,产生使用CD19scfv、CD8a铰链或IgG4 Fc茎部、CD8跨膜(TM)或CD28 TM或CD137 TM和经CD28或CD137膜内结构域连同CD3 ζ 膜内结构域信号传导的组合的各个CAR的示意图。

[0149] 然后,将图3中显示的CAR构建体克隆到含有SIM和FRA标签的睡美人质粒中以允许在使用常见的CVseq7引物扩增时在竞争再增殖研究中追踪。图4中显示了睡美人追踪质粒。

[0150] 使用Amaya Nucleofector II将图3中显示的CAR构建体电穿孔到T细胞中,并且在存在细胞因子(IL2, IL-21)的情况下与aAPC共培养28天。显示了电穿孔后1天(第1天)和与aAPC共培养28天(第28天)后的CAR表达。显示了CD3和CAR的点图,其中使用CD3和抗CD19scfv特异性Ab区分T细胞和CAR。图5-1和5-2中显示了CAR表达结果。

[0151] 随时间对图3中显示的CAR构建体评估CAR表达持续28天,并且显示。在21天后,大多数培养物具有>80% CAR表达。图6中显示了CAR表达动力学。

[0152] 在与aAPC共培养28天后显示了用来自图3的CAR核转染的培养物中的CD4和CD8 T细胞的表达百分比。图7中显示了这些表型结果。

[0153] 在共培养28天后,对CAR⁺T细胞(表达图3中描述的CAR)评估属于记忆(CD45RA、CCR7、CD27)、活化(CD69、HLA-DR)、细胞毒性(穿孔蛋白、粒酶B)、耗竭/衰老(CD57、KLRG1、

PD1)、和粘附(CD39、CD150)的标志物表达。图8A-B中显示了此延伸表型的结果。

[0154] 使用蛋白质印迹对CAR⁺T细胞(表达图3中描述的CAR)评估CD3 ζ 的表达。在变性条件下运行细胞裂解物,转移,并且使用一级小鼠抗人CD3 ζ mAb和偶联有HRP的山羊抗小鼠IgG使用SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity底物测量嵌合CD3 ζ 的表达。相对于CAR构建体的大小,观察到52、71和78kD的嵌合CD3 ζ 条带。图9中显示了这些蛋白质印迹结果。

[0155] 在第1天和此后每7天持续28天,用K562 aAPC刺激用CAR构建体(图3中描述)电穿孔的T细胞。在每个刺激循环结束时,使用台盼蓝排除方法计数细胞,并且在CD3和CAR表达方面进行表型分析。图10中显示的图描绘了随时间总共、CD3、和CAR⁺T细胞的推断的细胞计数。

[0156] 测量细胞的扩增。通过与(电穿孔后)第1天比较计数在共培养的第14天、第21天和第28天计算总细胞(图11)和CAR⁺(图12)T细胞的倍数扩增。图11和图12中显示了结果。

[0157] 对CAR表达T细胞(CAR⁺T细胞)测量细胞毒性。在标准的4小时铬释放测定法中,与CD19⁻EL-4相比,对CAR⁺T细胞(表达图3中描述的CAR)评估其针对CD19⁺肿瘤靶标(Daudi β_2 m、NALM-6和CD19⁺EL-4)的细胞毒性。在图13、图14、图15和图16中显示了结果。

[0158] 胞内IFN- γ 产生。在存在蛋白质转运抑制剂的情况下将CAR⁺T细胞(表达图3中描述的构建体)与(CD19⁺和CD19⁻)刺激细胞一起温育4-6小时,固定,透化,并且用IFN- γ 特异性mAb染色。PMA-离子霉素用作阳性对照。图17、图18、图19和图20中显示了胞内IFN- γ 产生的结果。

[0159] 针对SB11转座酶的PCR。在热循环仪中使用SB11特异性引物扩增从CAR⁺T细胞分离的DNA(图3)。GAPDH用作持家基因,并且线性化pCMV-SB11质粒,来自表达SB11的Jurkat细胞的基因组DNA用作阳性对照。CAR⁻细胞(无DNA)用作阴性对照。图21中显示了这些PCR结果。

[0160] 使用定量PCR(qPCR)测量CAR拷贝数。通过使用对IgG4 Fc茎部和反向/同向重复序列(IR/DR)特异性的引物和探针扩增基因组DNA来评估细胞中的CAR转基因(图3中显示的CAR构建体)的整合数目。RNA酶P基因用作内部对照,并且表达单拷贝CAR的Jurkat细胞系用于产生标准曲线。图22中显示了结果。

[0161] 接着,测量CAR⁺T细胞的自主生长的存在或缺乏。通过在缺乏细胞因子和aAPC的情况下培养T细胞来监测并测量CAR⁺T细胞(表达图3中显示的CAR构建体)的异常生长。每7天计数细胞,并且计算并绘图活细胞/死亡细胞百分比(从第1天起)。如图23中显示,观察到超过80%的T细胞到第14天是死亡的,显示缺乏自主生长。

[0162] 各个CAR可以进行表达(>80%),扩增(约1010),并且在相似程度上有细胞毒性(约60%,Daudi)。支架结构域(IgG4或CD8 α)用于建立CAR,并且不影响表达或效力。跨膜结构域(CD8,CD28)不影响效力。4-1BB跨膜结构域(216)影响表达(抗scFv Ab),但是不影响细胞毒性和细胞因子产生。信号传导结构域、CD28和4-1BB的组合没有叠加效应。CAR⁺T细胞展现出记忆/效应子表型。与其它CAR相比,仅含有4-1BB结构域(212、214、217)的CAR具有更高的CCR7表达。细胞表达记忆(CD27hi、CD45RAhi、CCR7lo)、活化(CD69med、HLA-DRhi)、细胞溶解(粒酶hi,穿孔蛋白lo),和粘附(CD39hi,CD150lo)的标志物,但是观察到可忽略不计量的抑制性标志物(CD57、PD1、KLRG1)。所有CAR,包括含有4-1BB结构域域的CAR,缺乏SB11转座酶,并且不自身增殖。

[0163] 实施例4

[0164] 含有CD3- ζ 的CAR的产生

[0165] 在本实施例中提供了含有CD3 ζ 的CAR。图24中显示了CAR设计的总图。如图24中显示,显示了CAR设计(图24,右)与抗体分子(图24,左)的比较。

[0166] 图25中显示了CD3 ζ 序列。图25中显示了CD3 ζ 及其同等型的序列。CAR设计包括CD3 ζ (同等型1),其形成膜内结构域信号传导部分之一并且具有三个ITAM。

[0167] 图26和图27中显示了具体的CAR构建体。图26显示了具有长(IgG4)、中等(CD8a铰链)和小(IgG 12aa)茎部,经由CD28或CD137膜内结构域进行信号传导的CD19特异性CAR的示意图。图27中显示了具有不同茎部和信号传导的CAR分子的命名。

[0168] 测量CAR表达。在电穿孔后1天(第1天)和在aAPC上共培养28天(第28天)后测量CAR(如图26中描述)的表达。图28中显示了CD3和CAR(如通过CD19scfv特异性mAb测量)的点图。

[0169] 对CAR测量扩增动力学。在7天刺激循环中在aAPC上共培养用CAR构建体(图26中显示)电穿孔的T细胞。对细胞计数,并且评估CD3和CAR的表达。图29和图30中显示了结果。

[0170] 测量CAR⁺T细胞的细胞毒性。在28天共培养结束时,在铬释放测定法中评估CAR⁺T细胞(表达图26中显示的构建体)的针对肿瘤靶标的细胞毒性。如图31中显示,对针对CD19⁺和CD19-肿瘤靶标的CD19RCD28(CAR 194)和CD19RCD137(CAR 217)CAR以各个效应物与靶标比率测量细胞毒性百分比。如图32中显示,获得在20:1的E:T比率时CAR⁺T细胞(表达图26中显示的CAR构建体)对CD19⁺EL-4的裂解百分比的数据。测量CAR⁺T细胞(表达图26中显示的构建体)上的CD27、CD62L、CD28和CCR7的表达百分比,并且在图33中显示了结果。

[0171] 对CAR⁺T细胞测量胞内细胞因子产生。在存在蛋白质转运抑制剂的情况下将刺激细胞(CD19⁺和CD19⁻)与CAR⁺T细胞(表达图26中显示的CAR)一起温育4小时,并且用IFN- γ 和IL-2mAb染色。PMA-离子霉素充当阳性对照,并且单独的T细胞充当阴性对照。图34显示了刺激后的IFN- γ 生成细胞的百分比。图35显示了与细胞刺激混合物(PMA-离子霉素)一起温育后IFN- γ 和或IL-2生成细胞的分解。

[0172] 对CAR⁺T细胞测量自主生长的存在或缺乏。对CAR⁺T细胞(表达图26中描述的CAR)评估其在缺乏外部刺激(细胞因子和aAPC)的情况下缺乏异常生长持续18天。在18天结束时,超过80%的细胞是死亡的,显示了缺乏不想要的生长。如图36中显示,观察到自主生长的缺乏。

[0173] 在CAR⁺T细胞中测量CAR拷贝数。通过qPCR使用对IgG4-Fc和IR/DR区特异性的引物/探针评估整合的CAR分子的拷贝数。如图37中显示,使用IR/DR探针观察到整合的CAR拷贝数(图26中显示的CAR)。如图38和图39中显示,在CAR构建体(图3中显示的两种CAR构建体和图26中显示的CAR构建体)的表和图形形式中提供了CAR拷贝数数据的汇编,如在两个不同实验中测试(P491;C714和GCR357861)。

[0174] 这些数据显示了可以在如本文中描述的培养系统中体外表达并培养具有各种间隔区的CAR。观察到所有CAR具有相似的CAR表达。在具有CD8铰链区的CAR中观察到CD19+EL-4s的最大细胞毒性。对测试的所有CAR观察到相似的CD62L和CD28表达。除了含有IgG4-Fc茎部的CAR外,在所有CAR中观察到如通过CAR拷贝数测量的高整合频率。通过PCR观察到自主生长和SB11的缺乏。与先前的报告形成对比,在CAR中包含12aa间隔区在这些研究中没有赋予改善的功能性。

[0175] 实施例5

[0176] 从主要组分快速装配CAR

[0177] 与临床级CD19RCD28 ζ CAR+T细胞(CG CAR)平行,发明人使用EZ CAR平台产生经由嵌合CD28/CD3- ζ 活化的CD19特异性CAR。将临床级CD28/CD3- ζ 和EZ CAR CD19RCD28 ζ CAR序列两者插入睡美人转座子载体中,并且电穿孔到T细胞中。在电穿孔后,在存在CD19+人工抗原呈递细胞(又称作活化和增殖细胞,或AaPC)的情况下培养T细胞,用于T细胞的抗原特异性扩增。通过流式细胞术(Fc+表达)每周测量T细胞表面中的CAR表达,显示了临床级CD19 CAR T细胞和EZ CD19 CAR T细胞中的相似CAR表达。还实施铬释放测定(CRA)以评估通过EZ CAR平台产生的T细胞CD19 CAR+针对肿瘤细胞的杀伤功能。在温育4小时后,通过EZ CAR T细胞观察到特异性细胞裂解的百分比为52%,并且通过CG CAR T细胞为49%。

[0178] 这些结果证明了使用这些方法产生功能性CAR⁺T细胞。然后,发明人使用与含有CAR分子的以下三种组分的质粒文库组合的如上文描述的方法进行CAR的快速产生:(i)抗CD19 scFv,(ii)具有不同尺寸的5种铰链(长-IgG4a和IgG4 Δ EQ,中等-CD8 α ,短-t-20AA和t-12AA)和(iii)具有CD3 ζ 结构域的7种信号传导结构域(CD27、CD28、CD28 Δ Y¹⁷³→F¹⁷³、CD134、CD137、CD278)的不同组合。用含有CAR转基因的质粒转染HEK 293细胞用于筛选27种不同CAR构建体以确保细胞表面中的CAR蛋白的表达。使用iQueTM筛选器(Intellicyt, Albuquerque, NM)(一种高通量流式细胞仪)进行个别CAR分子的高通量测试,其中使用表达荧光粒酶B报告物或GFP的工程化靶细胞进行细胞毒性测定。图40A-E中显示了结果。

[0179] 使用IntelliCyt's iQueTM,进行额外的实验以筛选CAR分子。iQueTM使用高通量流式细胞术,一种通过使用复用(multiplexing)性能和逐个细胞分析(cell-by-cell analysis)研究大群体产生信息的补充技术。发明人采用此技术来告知用CAR组修饰的T细胞的治疗潜力。可以针对活力,及活化信号(例如,CD25的上调)、细胞因子释放、和杀伤方面对来自孔的T细胞染色。因此,发明人调适iQue筛选器,并且利用其进行复用的基于珠粒的细胞因子检测和基于细胞的测定的能力。获得的结果指示此技术可以用于测试通过EZ CAR平台产生的大量不同CAR T细胞。使用IntelliCyt's iQueTM产生数据,其中对CAR T细胞的2个群体评估其杀伤靶细胞的能力。图41A-B和图42中显示了结果。这些结果证明了CAR分子有活性,并且iQueTM方法可以有效用于评估CAR活性。

[0180] ***

[0181] 本文中公开和要求保护的所有方法可以根据本公开内容进行和执行而无需过度实验。虽然本发明的组合物和方法已经按照优选的实施方案描述,但是对于本领域技术人员将明显的是,可以在不偏离本发明的构思、精神和范围的前提下对方法和在本文中描述的方法的步骤中或步骤的顺序中应用变化。更具体地,将明显的是,可以用化学和生理学相关的某些药剂替代本文中的描述的药剂,同时将实现相同或相似的结果。认为对于本领域技术人员明显的所有此类类似的替代和修饰在本发明的精神、范围和构思内,如所附权利要求书限定。

[0182] 参考文献

[0183] 通过引用方式将以下参考文献明确并入本文,其程度为它们提供对本文中列出的那些补充性的示例性程序或其它详情。

[0184] 美国公开No.2009/0017000

- [0185] 美国公开No.2009/0004142
- [0186] 美国专利No.6,225,042
- [0187] 美国专利No.6,355,479
- [0188] 美国专利No.6,362,001
- [0189] 美国专利No.6,410,319
- [0190] 美国专利No.6,790,662
- [0191] 美国专利No.7,109,304
- [0192] WO2007/103009
- [0193] Ahmed and Cheung,FEBS Lett.2014 Jan 21;588(2):288-97.
- [0194] Altenschmidt et al.,Adoptive transfer of in vitro-targeted,activated T lymphocytes results in total tumor regression,J Immunol.1997Dec 1;159(11):5509-15.
- [0195] Audet et al.,Sci Rep.2014 Nov 6;4:6881.
- [0196] Berry et al.Adoptive immunotherapy for cancer:the next generation of gene-engineered immune cells.Tissue Antigens.2009 Oct;74(4):277-89.
- [0197] Brocker et al.,Adv.Immunol.,68:257,1998.
- [0198] Curtin et al.,MAbs.2015 Jan 2;7(1):265-75.
- [0199] Czerwiński et al.,Drug Metab Dispos.2015 Jan;43(1):42-52.
- [0200] Davies JK,Singh H,Huls H,Yuk D,Lee DA,et al. (2010)Combining CD19 redirection and alloanergization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies.Cancer Res 70:3915-3924.
- [0201] de Weers et al.,J Immunol.2011 Feb 1;186(3):1840-8.
- [0202] Duong et al.,(2013)Engineering T Cell Function Using Chimeric Antigen Receptors Identified Using a DNA Library Approach.PLOS ONE 8(5):e63037.
- [0203] Eshhar et al.,Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors.Proc Natl Acad Sci U S A.;90(2):720-4,1993.
- [0204] Eshhar,Tumor-specific T-bodies:towards clinical application.Cancer Immunol Immunother.1997 Nov-Dec;45(3-4):131-6.1997
- [0205] Fitzer-Attaks et al.,Harnessing Syk family tyrosine kinases as signaling domains for chimeric single chain of the variable domain receptors: optimal design for T cell activation.J Immunol.1998Jan 1;160(1):145-54.1998
- [0206] Funakoshi et al.,Cancer Treat Rev.2014 Dec;40(10):1221-9.
- [0207] Gerber et al.,Clin Cancer Res.2011 Nov 1;17(21):6888-96.
- [0208] Goldberg et al.,J Clin Oncol.2014 May 10;32(14):1445-52.
- [0209] Gross et al.,Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity.Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:10024-10028,1989.

- [0210] Gross et al.(1992)Endowing T cells with antibody specificity using chimeric T cell receptors.FASEB J.1992 Dec;6(15):3370-8.
- [0211] Hackett et al.,A transposon and transposase system for human application,Mol Ther.2010 Apr;18(4):674-83).
- [0212] Hekele et al.Growth retardation of tumors by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes reprogrammed by CD44v6-specific scFv:zeta-chimera.Int J Cancer.1996 Oct 9;68(2):232-8,1996.
- [0213] Huls et al.,Clinical Application of Sleeping Beauty and Artificial Antigen presenting Cells to Genetically Modify T Cells from Peripheral and Umbilical Cord Blood.J.Vis.Exp.,doi:10.3791/50070,2013.
- [0214] Huls et al.“Clinical application of Sleeping Beauty and artificial antigen presenting cells to genetically modify T cells from peripheral and umbilical cord blood”J Vis Exp.2013 Feb 1;(72):e50070.
- [0215] Humblet-Baron and Baron,Immunol Cell Biol.2015 Feb 10.doi:10.1038/icb.2014.120.
- [0216] Hwu et al.(1995)In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes.Cancer Res.1995 Aug 1;55(15):3369-73.
- [0217] Ikeda et al.,Clin Cancer Res.2009 Jun 15;15(12):4028-37.
- [0218] Jabbour et al.,Am J Hematol.2014 Nov 18.
- [0219] Kaufmann et al.,Hum pathol.1997 Dec;28(12):1373-8.
- [0220] Kaufman et al.,Br J Haematol.2013 Nov;163(4):478-86.
- [0221] Kim DW,Uetsuki T,Kaziro Y,Yamaguchi N,Sugano S(1990)Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system.Gene 91:217-223.
- [0222] Kim et al.,2004,Nature,Vol.22(4),pp.403-410.
- [0223] Kim et al.,Immunology.2010 Aug;130(4):545-55.
- [0224] Kong et al.,Leuk Res.2014 Nov;38(11):1320-6.
- [0225] Krebs et al.,T cells expressing a chimeric antigen receptor that binds hepatitis B virus envelope proteins control virus replication in mice.Gastroenterology.2013 Aug;145(2):456-65.
- [0226] Le Garff-Tavernier et al.,Haematologica.2014 Dec 31.
- [0227] Lennard S.,Standard protocols for the construction of scFv libraries.Methods Mol Biol.2002;178:59-71.
- [0228] Leung,Molecular Imaging and Contrast Agent Database(MICAD),Bethesda (MD):National Center for Biotechnology Information(US);2004-2013.2010 Mar 25
- [0229] Leung 2011,IRDye800CW-anti-CD105 TRC105 chimeric monoclonal antibody.Molecular Imaging and Contrast Agent Database(MICAD).Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information(US);2004-2013.2011 Dec 01
- [0230] Maiti et al.,Sleeping beauty system to redirect T-cell specificity

for human applications. *J Immunother.* 36(2):112-23, 2013.

[0231] Manero et al., *Haematologica*. 2013 Feb; 98(2):217-21.

[0232] *Molecular Therapy* 17(8):1453-1464, 2009.

[0233] Moritz et al. (1994) Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 10; 91(10):4318-22.

[0234] Patel et al., *Anticancer Res.* 2008 Sep-Oct; 28(5A):2679-86.

[0235] Qiu et al., *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(3):e1575.

[0236] Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th Ed., Mack, ed. (1980)

[0237] Rushworth et al., (2014) "Universal Artificial Antigen Presenting Cells to Selectively Propagate T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptor Independent of Specificity" *J Immunother.* May; 37(4):204-13.

[0238] Sarup et al., *Mol Cancer Ther.* 2008 Oct; 7(10):3223-36.

[0239] Schneider, J. *Embryol. Exp. Morph.* 1972 Vol 27, pp. 353-365

[0240] Schultz-Thater et al., *Br J Cancer*. 2000 Jul; 83(2):204-8.

[0241] Shin et al., *Immune Netw.* 2011 Apr; 11(2):114-22.

[0242] Singh et al., Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res.*, 68:2961-2971, 2008.

[0243] Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Huls H, Olivares S, et al. (2011) Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies. *Cancer Res* 71:3516-3527.

[0244] Singh et al. "A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify clinical-grade T cells to target CD19." *Immunol Rev.* 2014 Jan; 257(1):181-90.

[0245] Singh et al., "Manufacture of T cells using the Sleeping Beauty system to enforce expression of a CD19-specific chimeric antigen receptor." *Cancer Gene Ther.* 2015 Jan 16.

[0246] Stancovski et al. (1993)

[0247] Stylen et al., *Fungal Cell Wall and Immune Response*, NATO ASI Series Volume 53, 1991, pp 181-193.

[0248] Sun et al., *Cell Mol Immunol.* 2007 Jun; 4(3):209-14.

[0249] Turtle et al., "Artificial antigen-presenting cells for use in adoptive immunotherapy" *Cancer J.* 2010 Jul-Aug; 16(4):374-81.

[0250] Verel, *Int J Cancer*. 2002 May 20; 99(3):396-402.

[0251] Vincent and Samuel, *Journal of Immunological Methods*, Volume 165, Issue 2, 15 October 1993, Pages 177-182.

[0252] Wang et al., *Immunology*. 2015 Feb; 144(2):254-62.

[0253] Weijtens et al. (1996) single chain Ig/gamma gene-redjrected human T lymphocytes produce cytokines, specifically lyse tumor cells, and recycle lytic

capacity.J Immunol.1996 Jul 15;157(2):836-43.

[0254] Wieczorek et al.,Genetically Modified T Cells for the Treatment of Malignant Disease.Transfus Med Hemother.2013 Dec;40(6):388-402.

[0255] Winiarska et al.,MAbs.2014;6(5):1300-13.

[0256] Zhuang et al.,Cancer Cell Int.2014 Nov 30;14(1):109.

[0257] Zhang et al.,Angiogenesis.2002;5(1-2):35-44.

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 得克萨斯州大学系统董事会 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM)
- [0003] <120> 嵌合抗原受体及制备方法
- [0004] <130> UTFC.P1231W0
- [0005] <140> 未知
- [0006] <141> 2015-02-16
- [0007] <150> 61/940,339
- [0008] <151> 2014-02-14
- [0009] <160> 59
- [0010] <170> PatentIn 3.5版
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 36
- [0013] <212> DNA
- [0014] <213> 人工序列
- [0015] <220>
- [0016] <223> 合成寡核苷酸
- [0017] <400> 1
- [0018] gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgccct 36
- [0019] <210> 2
- [0020] <211> 2037
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列
- [0023] <220>
- [0024] <223> 合成寡核苷酸
- [0025] <400> 2
- [0026] atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccacccgc ctttctgctg 60
- [0027] atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120
- [0028] gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180
- [0029] aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgacg taccacacca gccggtgca cagcggcgtg 240
- [0030] cccagccggt ttagcggcag cggtccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg 300
- [0031] gagcaggagg acatgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacacctt 360
- [0032] ggcgaggcaa caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420
- [0033] ggcgagggca gcaccaaggc cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc 480
- [0034] cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgccctgcc cgactacggc 540
- [0035] gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctgggcgt gatctggggc 600
- [0036] agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 660
- [0037] agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720
- [0038] tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780
- [0039] accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgccctgcc 840
- [0040] cccgagttcc tggcgggacc cagcgtgttc ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg 900

[0041]	atgatcagcc ggacccccga ggtgacctgt gtggtggtgg acgtgtccca ggaggacccc	960
[0042]	gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc	1020
[0043]	cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtggtgtccg tgetgaccgt gctgcaccag	1080
[0044]	gactggctga acggcaagga atacaagtgt aaggtgtcca acaaggcct gccagcagc	1140
[0045]	atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagcctcggg agccccaggt gtacaccctg	1200
[0046]	ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc	1260
[0047]	ttctacccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagcccga gaacaactac	1320
[0048]	aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggcagcttct tcctgtacag caggctgacc	1380
[0049]	gtggacaaga gccggtggca ggagggaac gtcttttagct gctccgtgat gcacgaggcc	1440
[0050]	ctgcacaacc actacacca gaagagcctg tccctgagcc tgggcaagat gttctgggtg	1500
[0051]	ctggtcgtgg tgggtggcgt gctggcctgc tacagcctgc tggtgacagt ggccttcac	1560
[0052]	atcttttggg tgaagagagg ccggaagaaa ctgctgtaca tcttcaagca gcccttcac	1620
[0053]	cggcccgctg agaccacca ggaagaggac ggctgcagct gccggttccc cgaggaagag	1680
[0054]	gaaggcggct gcgaactgc ggtgaagtgc agccggagcg ccgacgcccc tgcctaccag	1740
[0055]	caggccaga accagctgta caacgagctg aacctgggcc ggaggaggga gtacgacgtg	1800
[0056]	ctggacaagc ggagaggccg ggacctgag atgggcggca agccccggag aaagaacct	1860
[0057]	caggagggcc tgtataacga actgcagaaa gacaagatgg ccgaggccta cagcgagatc	1920
[0058]	ggcatgaagg gcgagcggcg gaggggcaag ggccacgacg gcctgtacca gggcctgagc	1980
[0059]	accgccacca aggataccta cgacgccctg cacatgcagg ccctgcccc cagatga	2037
[0060]	<210> 3	
[0061]	<211> 2034	
[0062]	<212> DNA	
[0063]	<213> 人工序列	
[0064]	<220>	
[0065]	<223> 合成寡核苷酸	
[0066]	<400> 3	
[0067]	atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccacccgc ctttctgctg	60
[0068]	atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg	120
[0069]	gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
[0070]	aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgac taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
[0071]	cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300
[0072]	gagcaggagg acatgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt	360
[0073]	ggcggcgga caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
[0074]	ggcgagggca gcaccaagg cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc	480
[0075]	cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc	540
[0076]	gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctgggcgt gatctggggc	600
[0077]	agcgagacca ctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
[0078]	agcaagagcc aggtgttct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720
[0079]	tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
[0080]	accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgccctgcc	840
[0081]	cccagttcc tggcgggacc cagcgtgttc ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg	900
[0082]	atgatcagcc ggacccccga ggtgacctgt gtggtggtgg acgtgtccca ggaggacccc	960

[0083]	gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc	1020
[0084]	cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag	1080
[0085]	gactggctga acggcaagga atacaagtgt aaggtgtcca acaaggcct gccagcagc	1140
[0086]	atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagcctcggg agccccaggt gtacaccctg	1200
[0087]	ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc	1260
[0088]	ttctacccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaac gccagcccga gaacaactac	1320
[0089]	aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggcagcttct tcctgtacag caggctgacc	1380
[0090]	gtggacaaga gccggtggca ggagggaac gtcttttagct gctccgtgat gcacgaggcc	1440
[0091]	ctgcacaacc actacacca gaagagcctg tccctgagcc tgggcaagat gttctgggtg	1500
[0092]	ctggctcgtg tgggtggcgt gctggcctgc tacagcctgc tggtgacagt ggccttcac	1560
[0093]	atcttttggg tgaggagcaa gcggagcaga ggccggccaca gcgactacat gaacatgacc	1620
[0094]	ccccggaggc ctggccccac ccggaagcac taccagccct acgcccctcc cagggaattc	1680
[0095]	gccgcctacc ggagccgggt gaagttcagc cggagcgccg acgcccctgc ctaccagcag	1740
[0096]	ggccagaacc agctgtacaa cgagctgaac ctgggcccga gggaggagta cgacgtgctg	1800
[0097]	gacaagcgga gaggccggga ccctgagatg ggccggcaac cccggagaaa gaaccctcag	1860
[0098]	gagggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatcggc	1920
[0099]	atgaagggcg agcggcggag gggcaagggc cagcagggcc tgtaccaggg cctgagcacc	1980
[0100]	gccaccaagg atacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgccccccag atga	2034
[0101]	<210> 4	
[0102]	<211> 1491	
[0103]	<212> DNA	
[0104]	<213> 人工序列	
[0105]	<220>	
[0106]	<223> 合成寡核苷酸	
[0107]	<400> 4	
[0108]	atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg	60
[0109]	atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg	120
[0110]	gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
[0111]	aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgac taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
[0112]	cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300
[0113]	gagcaggagg acatgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt	360
[0114]	ggcggcggaa caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
[0115]	ggcgagggca gcaccaaggc cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc	480
[0116]	cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc	540
[0117]	gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctgggcgt gatctggggc	600
[0118]	agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
[0119]	agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720
[0120]	tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
[0121]	accagcgtga ccgtgtccag caagcccacc accaccctg ccccagacc tccaacccca	840
[0122]	gccctacaa tcgccagcca gccctgagc ctgaggcccg aagcctgtag acctgccgct	900
[0123]	ggcggagccg tgcacaccag aggcctggat ttgcctgcg acatctacat ctggggccct	960
[0124]	ctggccggca cctgtggcgt gctgctgctg agcctgtgta tcacctgta ctgcaaccac	1020

[0125]	cggaacaaga gaggccggaa gaaactgctg tacatcttca agcagccctt catgcggccc	1080
[0126]	gtgcagacca cccaggaaga ggacggctgc agctgccggt tccccgagga agaggaaggc	1140
[0127]	ggctgcgaac tgcgggtgaa gttcagccgg agcgcgcacg cccctgccta ccagcagggc	1200
[0128]	cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg ggccggaggg aggagtacga cgtgctggac	1260
[0129]	aagcggagag gccgggaccc tgagatgggc ggcaagcccc ggagaaagaa ccctcaggag	1320
[0130]	ggcctgtata acgaactgca gaaagacaag atggccgagg cctacagcga gatcggcatg	1380
[0131]	aaggcgagc ggcgagggg caagggccac gacggcctgt accagggcct gacgaccgcc	1440
[0132]	accaaggata cctacgacgc cctgcacatg caggccctgc cccccagatg a	1491
[0133]	<210> 5	
[0134]	<211> 1488	
[0135]	<212> DNA	
[0136]	<213> 人工序列	
[0137]	<220>	
[0138]	<223> 合成寡核苷酸	
[0139]	<400> 5	
[0140]	atgtctctgc tggtagaccag cctgtctctg tgtgagctgc cccaccccg ctttctctctg	60
[0141]	atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg	120
[0142]	gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
[0143]	aagcccgacg gcaccgtcaa gctgtctgac taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
[0144]	cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300
[0145]	gagcaggagg acatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt	360
[0146]	ggcggcggaa caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
[0147]	ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc	480
[0148]	cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc	540
[0149]	gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggctgggagt ggctgggagt gatctggggc	600
[0150]	agcgagacca cctactacaa cagcgccttg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
[0151]	agcaagagcc aggtgttctt gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720
[0152]	tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
[0153]	accagcgtga ccgtgtccag caagcccacc accaccctg cccctagacc tccaacccca	840
[0154]	gcccctacaa tcgccagcca gcccctgagc ctgaggcccg aagcctgtag acctgccgt	900
[0155]	ggcggagccg tgcacaccag aggcctggat ttgcctgcg acatctacat ctggggccct	960
[0156]	ctggccggca cctgtggcgt gctgtctctg agcctgggtc taccctgta ctgcaaccac	1020
[0157]	cggaatagga gcaagcggag cagaggcggc cacagcgact acatgaacat gacccccgg	1080
[0158]	aggcctggcc ccacccggaa gcactaccag ccctacgccc ctcccaggga cttegccgcc	1140
[0159]	taccggagcc ggggtgaagt cagccggagc gccgacgccc ctgcctacca gcagggccag	1200
[0160]	aaccagctgt acaacgagct gaacctgggc cggaggagg agtacgacgt gctggacaag	1260
[0161]	cggagaggcc gggacctga gatgggcggc aagccccgga gaaagaacct tcaggagggc	1320
[0162]	ctgtataacg aactgcagaa agacaagatg gccgaggcct acagcgagat cggcatgaag	1380
[0163]	ggcgagcggc ggaggggcaa gggccacgac ggctgtacc agggcctgag caccgccacc	1440
[0164]	aaggatacct acgacgccct gcacatgcag gccctgcccc ccagatga	1488
[0165]	<210> 6	
[0166]	<211> 1380	

[0167]	<212> DNA
[0168]	<213> 人工序列
[0169]	<220>
[0170]	<223> 合成寡核苷酸
[0171]	<400> 6
[0172]	atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60
[0173]	atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120
[0174]	gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180
[0175]	aagccccgacg gcaccgtcaa gctgctgatac taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240
[0176]	cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg 300
[0177]	gagcaggagg acatgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt 360
[0178]	ggcggcggaa caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420
[0179]	ggcaggggca gcaccaaggc cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc 480
[0180]	cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc 540
[0181]	gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctggcgt gatctggggc 600
[0182]	agcgagacca cctactacaa cagcgcctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 660
[0183]	agcaagagcc aggtgttct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720
[0184]	tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780
[0185]	accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgccctttc 840
[0186]	tgggtgctgg tcgtggtggg tggcgtgctg gcctgtaca gcctgctggt gacagtggcc 900
[0187]	ttcatcatct tttgggtgag gagcaagcgg agcagaggcg gccacagcga ctacatgaac 960
[0188]	atgaccccc ggaggcctgg cccaccccg aagcactacc agccctacgc ccctcccagg 1020
[0189]	gacttcgccg cctaccggag ccgggtgaag ttccagccga gcgccgacgc ccctgcctac 1080
[0190]	cagcagggcc agaaccagct gtacaacgag ctgaacctgg gccggaggga ggagtacgac 1140
[0191]	gtgctggaca agcggagagg ccgggacct gagatggcg gcaagcccc gagaaagaac 1200
[0192]	cctcaggagg gcctgtataa cgaactgcag aaagacaaga tggccgagc ctacagcgag 1260
[0193]	atcgcatga agggcgagcg gcggaggggc aagggccacg acggcctgta ccagggcctg 1320
[0194]	agcaccgcca ccaaggatac ctacgacgcc ctgcacatgc aggccctgcc cccagatga 1380
[0195]	<210> 7
[0196]	<211> 1383
[0197]	<212> DNA
[0198]	<213> 人工序列
[0199]	<220>
[0200]	<223> 合成寡核苷酸
[0201]	<400> 7
[0202]	atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60
[0203]	atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120
[0204]	gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180
[0205]	aagccccgacg gcaccgtcaa gctgctgatac taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240
[0206]	cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg 300
[0207]	gagcaggagg acatgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt 360
[0208]	ggcggcggaa caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420

[0209]	ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc 480
[0210]	cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc 540
[0211]	gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggctgggagt ggctgggcgt gatctggggc 600
[0212]	agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 660
[0213]	agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720
[0214]	tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780
[0215]	accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgccctttc 840
[0216]	tgggtgctgg tcgtggtggg tggcgtgctg gcctgtctaca gcctgtctgt gacagtggcc 900
[0217]	ttcatcatct tttgggtgaa gagaggccgg aagaaactgc tgtacatctt caagcagccc 960
[0218]	ttcatgcggc ccgtgcagac caccaggaa gaggacggct gcagctgccg gttccccgag 1020
[0219]	gaagaggaag gcggctgcga actgcgggtg aagttcagcc ggagcgccga cgcccctgcc 1080
[0220]	taccagcagg gccagaacca gctgtacaac gagctgaacc tgggccggag ggaggagtac 1140
[0221]	gacgtgctgg acaagcggag aggccgggac cctgagatgg gcggcaagcc ccggagaaag 1200
[0222]	aaccctcagg agggcctgta taacgaactg cagaaagaca agatggccga ggcctacagc 1260
[0223]	gagatcggca tgaaggcgga gcggcggagg ggcaagggcc acgacggcct gtaccagggc 1320
[0224]	ctgagcaccg ccaccaagga tacctacgac gcctgcaca tgcaggccct gccccccaga 1380
[0225]	tga 1383
[0226]	<210> 8
[0227]	<211> 720
[0228]	<212> DNA
[0229]	<213> 人工序列
[0230]	<220>
[0231]	<223> 合成寡核苷酸
[0232]	<400> 8
[0233]	atctgcgaca tccagatgac ccagagccct gccagcctgt ctaccagcct gggcgagaca 60
[0234]	gtgaccatcc agtgtcaggc cagcgaggac atctactctg gcctggcttg gtatcagcag 120
[0235]	aagcccgga agagccctca gctgctgac tacggcgcca gcgacctgca ggacggcgtg 180
[0236]	ccaagcagat tcagcggcag cggctccgga acccagtaca gcctgaagat caccagcatg 240
[0237]	cagaccgagg acgaggcgt gtacttctgc cagcaaggcc tgacctacc tagaaccttc 300
[0238]	ggaggaggca ccaagctgga actgaaggcc ggaggcgga gtggaggcgg aggatctggc 360
[0239]	ggcggaggct ctgaagtgca gctgcagcag tctggcgctg aactggtccg gcctggcact 420
[0240]	agcgtgaagc tgtcctgcaa ggtgtccggc gacaccatca ctttctacta catgcacttc 480
[0241]	gtgaagcaga ggccaggaca gggcctggaa tggatcggca gaatcgacc tgaggacgag 540
[0242]	agcaccaagt acagcgagaa gttcaagaac aaggccaccc tgaccgccga caccagcagc 600
[0243]	aacaccgcct acctgaagct gtctagcctg acctccgagg acaccgccac ctacttttgc 660
[0244]	atctacggcg gctactactt cgactactgg ggccagggcg tgatggtcac cgtgtccagc 720
[0245]	<210> 9
[0246]	<211> 741
[0247]	<212> DNA
[0248]	<213> 人工序列
[0249]	<220>
[0250]	<223> 合成寡核苷酸

[0251]	<400> 9	
[0252]	ctgatccccg acatccagat gacccagacc acctccagcc tgagcgccag cctgggcgac	60
[0253]	cgggtgacca tcagctgccg ggccagccag gacatcagca agtacctgaa ctggtatcag	120
[0254]	cagaagcccc acggcaccgt caagctgctg atctaccaca ccagccggct gcacagcggc	180
[0255]	gtgcccagcc ggttttagcgg cagcggctcc ggcaccgact acagcctgac catctccaac	240
[0256]	ctggagcagg aggacatcgc cacctacttt tgccagcagg gcaacacact gccctacacc	300
[0257]	tttggcgggc gaacaaagct ggagatcacc ggcagcacct ccggcagcgg caagcctggc	360
[0258]	agcggcgagg gcagcaccaa gggcgaggtg aagctgcagg agagcggccc tggcctgggtg	420
[0259]	gccccagcc agagcctgag cgtgacctgt accgtgtccg gcgtgtccct gcccgactac	480
[0260]	ggcgtgtcct ggatccggca gccccctagg aagggcctgg agtggctggg cgtgatctgg	540
[0261]	ggcagcgaga ccactacta caacagcgcc ctgaagagcc ggctgaccat catcaaggac	600
[0262]	aacagcaaga gccaggtgtt cctgaagatg aacagcctgc agaccgacga caccgccatc	660
[0263]	tactactgtg ccaagcacta ctactacggc ggcagctacg ccatggacta ctggggccag	720
[0264]	ggcaccagcg tgaccgtgtc c	741
[0265]	<210> 10	
[0266]	<211> 723	
[0267]	<212> DNA	
[0268]	<213> 人工序列	
[0269]	<220>	
[0270]	<223> 合成寡核苷酸	
[0271]	<400> 10	
[0272]	cagatcgtgc tgaccagag ccccgccatc atgagcgcca gccctggcga gaaggtgacc	60
[0273]	atgacctgca gcgccagcag cagcgtgagc tacatgaact ggtatcagca gaagagcggc	120
[0274]	accagcccca agcgggtgat ctacgacacc agcaagctgg ccagcggcgt gcccggccac	180
[0275]	ttcaggggca gcggatctgg gacttcctac tctctgacca tcagcggcat ggaagccgag	240
[0276]	gatgccgcta cttactactg ccagcagtgg agcagcaacc ctttcacctt cggctccggc	300
[0277]	accaagctgg aaatcaaccg gggaggcggc ggttcggcg gaggtggctc tggcgggtggc	360
[0278]	ggaagtcagg tgcagctgca gcagagcgga gccgagctgg ccagacctgg cgcctccgtg	420
[0279]	aagatgagct gcaaggccag cggctacacc ttcacccggt acaccatgca ctgggtgaag	480
[0280]	cagagacccg gccaggcct ggaatggatc ggctacatca accccagccg gggctacacc	540
[0281]	aactacaacc agaagttaa ggacaaggcc accctgacca ccgacaagag cagcagcacc	600
[0282]	gcctacatgc agctgtccag cctgacctcc gaggacagcg ccgtgtacta ctgcgcccgg	660
[0283]	tactacgacg accactactg cctggactac tggggccagg gcaccacact gaccgtgagc	720
[0284]	agc	723
[0285]	<210> 11	
[0286]	<211> 735	
[0287]	<212> DNA	
[0288]	<213> 人工序列	
[0289]	<220>	
[0290]	<223> 合成寡核苷酸	
[0291]	<400> 11	
[0292]	ctgatccccg acgtgcagat caccagagc cccagctacc tggccgccag ccctggcgag	60

[0293]	acaatcacca tcaactgccg ggccagcaag agcatcagca aggacctggc ctggtatcag 120
[0294]	gaaaagcccg gcaagaccaa caagctgctg atctacagcg gcagcaccct gcagagcggc 180
[0295]	atccccagca gattcagcgg cagcggtcc ggaaccgact tcacctgac catcagcagc 240
[0296]	ctggaacccg aggacttcgc catgtactac tgccagcagc acaacaagta cccctacacc 300
[0297]	ttcggcggag gcaccaagct ggaaatcaag ggcagcacct ccggcagcgg caagcctggc 360
[0298]	agcggcgagg gcagcaccaa gggccaggtg cagctgcagc agccaggcgc cgagctgggtg 420
[0299]	aaacctggcg cccctgtgaa gctgagctgc aaggccagcg gctacacctt caccaactac 480
[0300]	tggatgaact ggatcaagca gaggcccgcc agaggcctgg aatggatcgg cagaatcgac 540
[0301]	cccagcgaca gcgagagcca ctacaaccag aagttcaagg acaaggccac actgaccgtg 600
[0302]	gacaagagca gcaacaccgc ctacatccag ctgtcttctc tgaccagcga ggacagcgcc 660
[0303]	gtgtactatt gcgccagata cgactacgac gacacatgg actactgggg ccagggcacc 720
[0304]	agcgtgaccg tgtct 735
[0305]	<210> 12
[0306]	<211> 810
[0307]	<212> DNA
[0308]	<213> 人工序列
[0309]	<220>
[0310]	<223> 合成寡核苷酸
[0311]	<400> 12
[0312]	atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaata gtgcctcagt cataatgtct 60
[0313]	agaatggccc aggtgcaact gcagcagtc ggggctgagc tggctagacc tggggcttca 120
[0314]	gtgaagatgt cctgcaaggc ttctggctac acctttacta cctacacaat aacttgggtg 180
[0315]	agacggaggc ctggacacga tctggaatgg attggataca ttaatcctag cagtggatgt 240
[0316]	tctgactaca atcaaaactt caagggaag accacattga ctgcagacaa gtctctcaac 300
[0317]	acagcctaca tgcaactgaa cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtgca 360
[0318]	agaagagcgg actatggtaa ctacgaatat acctggtttg cttactgggg ccaagggacc 420
[0319]	acggtcaccg tctcctcaag tggaggcggc tcaggaggag gtggctctgg cgggtggcga 480
[0320]	tcggtcacg agctcactca gtctccaaaa ttcatgtcca catcagtagg agacagggtc 540
[0321]	aacgtcacct acaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctggtt tcaacaaaaa 600
[0322]	ccagggaat ctctaaagt tctgatttac tcggcatctt accgatacag tggagtccct 660
[0323]	gatcgcttca caggcagtg atctggaaca gatttcactc tcaccatcag caatgtgcag 720
[0324]	tctgaagact tggcagagta tttctgtcag caatatcaca cctatcctct cacgttcgga 780
[0325]	gggggcacca agctggaaat caaacggtcg 810
[0326]	<210> 13
[0327]	<211> 735
[0328]	<212> DNA
[0329]	<213> 人工序列
[0330]	<220>
[0331]	<223> 合成寡核苷酸
[0332]	<400> 13
[0333]	caggtgcagc tgggtcagag cggcggcggc ctggtgcagc atggcggcag cctgcgcctg 60
[0334]	agctgcgcgg cgagcggtt tacctttagc agctatgaaa tgaactgggt gcgccaggcg 120

[0335]	ccgggcaaag gcctggaatg ggtgagcggc attagcggca gcggcggcag cacctattat	180
[0336]	gcggatagcg tgaaaggccg ctttaccccc attagccgcg ataacagcaa aaacaccctg	240
[0337]	tatctgcaga tgaaccgcct gcgcgcggaa gataccgcgg tgtattattg cgcgcgcgat	300
[0338]	aacggctggg aactgaccga ttggtatitt gatctgtggg gccgcggcac catggtgacc	360
[0339]	gtgagcagcg gcggcggcgg cagcggcggc ggccgcagcg gcggcggcgg cagcgatatt	420
[0340]	cagatgaccc agagcccag caccctgagc gcgagcattg gcgatcgcgt gaccattacc	480
[0341]	tgccgcgcga gcgaaggcat ttatcattgg ctggcgtggg atcagcagaa accgggcaaa	540
[0342]	gcgccgaaac tgctgattta taaagcagc agcctggcga gcggcgcgcc gagccgcttt	600
[0343]	agcggcagcg gcagcggcac cgattttacc ctgaccatta gcagcctgca gccggatgat	660
[0344]	tttgcgacct attattgcca gcagtatagc aactatccgc tgacctttgg cggcggcacc	720
[0345]	aaactggaaa ttaaa	735
[0346]	<210>	14
[0347]	<211>	747
[0348]	<212>	DNA
[0349]	<213>	人工序列
[0350]	<220>	
[0351]	<223>	合成寡核苷酸
[0352]	<400>	14
[0353]	gacgttgtga tgaccagac ccctctgagc ctgccttgtt ccctgggaga tcaggccagc	60
[0354]	atcagctgca gaagcagcca gagcctgctg aagaacaacg gcaacacctt cctgcaactg	120
[0355]	tatctgcaga agtccggcca gtccccaag ctgctgatct acaaggtgtc caaccggctg	180
[0356]	agcggcgtgc ccgatagatt ttctggctct ggcagcggca cctacttcac cctgaagatc	240
[0357]	agccgggtgg aagccgagga cctgggctgt tactttctgta gccagagcac ccacatccct	300
[0358]	tacaccttcg gcggaggcac caagctggaa ctgaagcggg gcagcacctc cggcagcggc	360
[0359]	aagcctggca gcggcaggg cagcaccaag ggcgaaagtga agctggtgga aagcggcgga	420
[0360]	ggcctggtgc tgccctggcga ttctctgaga ctgagctgcg ccaccagcga gttcaccttc	480
[0361]	accgactact acatgacctg ggtgcgccag cccccagaa aggctctgga atggctgggc	540
[0362]	ttcatccgga accgggcaaa cggctacacc accgagtaca accctagcgt gaagggccg	600
[0363]	ttcaccatca gccgggacaa cagccagagc atcctgtacc tgcagatgaa caccctgcgg	660
[0364]	accgaggaca gcgccacct ctactgtgct cgggtgtcca actgggcctt cgactatttg	720
[0365]	ggccagggca ccacctgac cgtgtct	747
[0366]	<210>	15
[0367]	<211>	759
[0368]	<212>	DNA
[0369]	<213>	人工序列
[0370]	<220>	
[0371]	<223>	合成寡核苷酸
[0372]	<400>	15
[0373]	gacatcaaga tgaccagag cccagctct atgtacgcca gcctgggcga gcgcgtgacc	60
[0374]	atcacctgta aagccagccc cgacatcaac agctacctga gctggttcca gcagaagccc	120
[0375]	ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaacagac tggtggatgg cgtgcccagc	180
[0376]	agattcagcg gcggaggctc tggccaggac tacagcctga ccatcaactc cctggaatac	240

[0377]	gaggacatgg gcatctacta ctgcctgcag tacgacgagt tcccctacac cttcggaggc	300
[0378]	ggcaccaagc tggaaatgaa gggcagcaca agcggcagcg gcaagcctgg atctggcgag	360
[0379]	ggaagcacca agggcgaagt gaagctggtg gaatctggcg gcggactcgt gaagcctggc	420
[0380]	ggctctctga agctgtcttg tgccgccagc ggcttcacct tcagcagcta cgccatgagc	480
[0381]	tgggtgcggc agatccccga gaagcggctg gaatgggtgg ccagcatcag cagaggcgga	540
[0382]	accacctact accccgactc tgtgaagggc cggttcacca tcagccggga caacgtgcgg	600
[0383]	aacatcctgt acctgcagat gacgagcctg cggagcgagg acaccgcat gtactactgt	660
[0384]	ggcagatacg actacgacgg ctactatgcc atggattact ggggccaggg caccagcgtg	720
[0385]	accgtgtcta gccagggaac ctccgtgaca gtgtccagc	759
[0386]	<210> 16	
[0387]	<211> 759	
[0388]	<212> DNA	
[0389]	<213> 人工序列	
[0390]	<220>	
[0391]	<223> 合成寡核苷酸	
[0392]	<400> 16	
[0393]	gaagtacatc tggttgagtc tgggtggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
[0394]	tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt cactatggca tgtcttgggt tcgccagact	120
[0395]	ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attggtagtc gtggtactta caccactat	180
[0396]	ccagacagtg tgaaggagc attcaccatc tccagagaca atgacaagaa cgccctgtac	240
[0397]	ctgcaaatga acagtctgaa gtctgaagac acagccatgt attactgtgc aagaagaagt	300
[0398]	gaattttatt actacggtaa tacctactat tactctgcta tggactactg gggccaaggc	360
[0399]	accacggctc ccgtctcctc aggtggcggg ggcagcggcg gtggtgggtc cggtggcggc	420
[0400]	ggatctgaca tcgtactcac acagtctcca gctagcctgg ctgtatctct aggacagagg	480
[0401]	gccaccatct cctgcagagc cagcgaaggt gttgataatt atggctttag ttttatgaac	540
[0402]	tggttccaac agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tctatgctat atccaaccga	600
[0403]	ggatccgggg tccctgccag gtttagtggc agtgggtctg ggacagactt cagcctcaac	660
[0404]	atccatcctg tagaggagga tgatcctgca atgtatttct gtcagcaaac taaggaggtt	720
[0405]	ccgtggacgt tcggagctgg caccaagctc gagatcaaa	759
[0406]	<210> 17	
[0407]	<211> 543	
[0408]	<212> DNA	
[0409]	<213> 人工序列	
[0410]	<220>	
[0411]	<223> 合成寡核苷酸	
[0412]	<400> 17	
[0413]	atggccatct ggcgagcaa cagcggcagc aacaccctgg aaaacggcta cttcctgagc	60
[0414]	cggaacaaag agaaccacag ccagcccacc cagagcagcc tggaagatag cgtgaccccc	120
[0415]	accaaggccg tgaaaaccac cggcgtgctg tccagcccct gccctcccaa ctggatcatc	180
[0416]	tacgagaaga gctgctacct gttcagcatg agcctgaaca gctgggacgg cagcaagcgg	240
[0417]	cagtgtggc agctgggcag caacctgctg aagatcgaca gcagcaacga gctgggcttc	300
[0418]	atcgtgaagc aggtgtccag ccagcccagc aactccttct ggatcggcct gagcaggccc	360

[0419] cagaccgagg tgccctggct gtgggaggac ggctccacct tcagctccaa cctgttccag 420
 [0420] atccggacca ccgccacaca ggaaaacccc agccccaact gcgtgtggat ccacgtgagc 480
 [0421] gtgatctacg accagctgtg cagcgtgccc agctacagca tctgcgagaa gaaattcagc 540
 [0422] atg 543
 [0423] <210> 18
 [0424] <211> 987
 [0425] <212> DNA
 [0426] <213> 人工序列
 [0427] <220>
 [0428] <223> 合成寡核苷酸
 [0429] <400> 18
 [0430] atggattttc aggtgcagat ttccagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtct 60
 [0431] agacaattcc aagtgaagct ggaggagtct ggggctgagc ttgtgaggcc aggggccttg 120
 [0432] gtcaagttgt cctgcaaaac ttctggcttc aacattaaag actacttttt acactgggtg 180
 [0433] agacagaggc ctgaccaggc cctggagtgg attggatgga ttaatcctga taatggtaat 240
 [0434] actgtttatg acccgaagct tcagggcacg gccagtttaa cagcagacac atcctccaac 300
 [0435] acagtctact tgcagctcag cggcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta tttctgtact 360
 [0436] cggagggact atacttatga aaaggctgct ctggactact ggggtcaggc agcctcagtc 420
 [0437] atcgtctcct cagccaaaac aacagcccca tcggtctatc cactggcccc tgtgtgtgga 480
 [0438] gatacaactg gctcctcggg gactctagga tgccctggta agagatctgg cgggtggcgg 540
 [0439] tctggtggcg gtggctcggc cgggtggcgg tctggagctc gacattgtgc tcacacagac 600
 [0440] tccaaatcca tgtccatgtc agtaggagag agggtcacct tgacctgcaa ggccagttag 660
 [0441] aatgtgggta cttatgtttc ctggatatca cagaaaccag agcagtctcc taaactgctg 720
 [0442] atatacgggg catccaaccg gtacactggg gtccccgac gcttcacagg cagtggatct 780
 [0443] gcaacagatt tcaactctgac catcagcagt gtgcaggctg aagaccttgc agattatcac 840
 [0444] tgtggacagg gttacagta tccgtacacg ttcggagggg ggaccaagct ggaaataaaa 900
 [0445] cgggctgatg ctgcaccaac ttatccgat caccatcatc atcatcatct gcagatatcc 960
 [0446] agcacagtgg cggccgctcg agtctag 987
 [0447] <210> 19
 [0448] <211> 753
 [0449] <212> DNA
 [0450] <213> 人工序列
 [0451] <220>
 [0452] <223> 合成寡核苷酸
 [0453] <400> 19
 [0454] ctgatcccca tggcccaggc gaagctgcag cagagcggcc ctgatctggt gaagcctggc 60
 [0455] gccagcgtga agatcagctg caaggccagc ggctacagct tcaccggcta ctacatgcac 120
 [0456] tgggtgaaac agagccacgg caagagcctg gaatggatcg gcagagtga ccccaatagc 180
 [0457] ggcggcacca gctacaacca gaattcaag gacaaggcca tcctgaccgt ggacaagagc 240
 [0458] agcagcaccg cctacatgga actgcggagc ctgaccagcg aggacagcgc cgtgtactac 300
 [0459] tgcgcccggc ccaagggcaa ctacttctac gccatggact actggggcca gggcaccacc 360
 [0460] gtgaccgtgt ctagcagcgg cggagggaag ggagggggag gatctggcgg aggcggcagc 420

[0461] gatatcgagc tgaccagag ccctagcagc ctggccgtgt cactgggcca gagagccacc 480
 [0462] atcagctgca gaggctccga gaggctggat agccacggca ccagcctgat gcactggtat 540
 [0463] cagcagaagc ccggccagcc cccaagtgc ctgatctacc gggccagcaa cctggaaagc 600
 [0464] ggcatccccg ccagattttc cggcagcggc agcagaaccg acttcaccct gaccatcaac 660
 [0465] cccgtggaga cagacgacgt ggccatctac tactgccagc agagcaacga ggaccctccc 720
 [0466] acctttggcg gaggcaccaa gctggaactg aag 753
 [0467] <210> 20
 [0468] <211> 732
 [0469] <212> DNA
 [0470] <213> 人工序列
 [0471] <220>
 [0472] <223> 合成寡核苷酸
 [0473] <400> 20
 [0474] gaagtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0475] agctgtgccg ccagcggctt cgacttcagc cggctactgga tgagctgggt gcgccaggcc 120
 [0476] cctggcaaag gcctggaatg gatcggcgag atcaaccccg acagcagcac catcaactac 180
 [0477] gccccagcc tgaaggacaa gttcatcatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
 [0478] ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actattgcgc cagaccgcac 300
 [0479] ggcaactact ggtacttcga cgtgtggggc cagggcaccc tcgtgacagt gtctggcagc 360
 [0480] acaagcggt ctggcaagcc tggatctggc gagggctcta ccaagggcga catccagatg 420
 [0481] acccagagcc ccagcagcct gtctgccagc gtgggcgaca gaggtagcat cacatgcaag 480
 [0482] gccagccagg acgtgggaat cgccgtggcc tggatcagc agaaacccgg caaggtgccc 540
 [0483] aagctgctga tctactgggc cagcaccaga cacaccggcg tgcccgatag attttccggc 600
 [0484] agcggctccg gcaccgactt caccctgaca atcagctccc tgcagcctga ggacgtggcc 660
 [0485] acctactact gccagcagta cagcagctac ccctacacct tcggacaggg caccaaggtg 720
 [0486] gaaatcaagc gg 732
 [0487] <210> 21
 [0488] <211> 720
 [0489] <212> DNA
 [0490] <213> 人工序列
 [0491] <220>
 [0492] <223> 合成寡核苷酸
 [0493] <400> 21
 [0494] caggtgcagc tgcagcagtc tggccccgag ctggaaaaac ctggcgcctc cgtgaagatc 60
 [0495] agctgcaagg ccagcggcta cagcttcacc ggctacacca tgaactgggt caagcagagc 120
 [0496] cacggcaaga gcctggaatg gatcggcctg atcaccacct acaacggcgc cagcagctac 180
 [0497] aaccagaagt tccggggcaa ggccaccctg accgtggaca agtctagcag caccgcctac 240
 [0498] atggacctgc tgagcctgac cagcaggagc agcggcgtgt acttctgtgc cagaggcggc 300
 [0499] tacgacggca gaggttcga ttattggggc cagggcacca ccgtgacagt gtctagcgga 360
 [0500] gtgggaggat ctggcggagg cggaagtggc ggagggggat ctgatatcga gctgaccag 420
 [0501] agccccgcca tcatgtctgc tagccctggc gagaaagtga ccatgacctg cagcggcagc 480
 [0502] tccagcgtgt cctacatgca ctggtatcag cagaagtccg gcaccagccc caagcgggtg 540

[0503]	atctacgaca caagcaagct ggcctctggc gtgcccggca gattttctgg cagcggctcc 600
[0504]	ggcaacagct actccctgac aatcagcagc gtggaagccg aggacgacgc cacctactac 660
[0505]	tgccagcagt ggagcggcta cccctgact ttggagccg gcaccaagct ggaaatcaag 720
[0506]	<210> 22
[0507]	<211> 60
[0508]	<212> DNA
[0509]	<213> 人工序列
[0510]	<220>
[0511]	<223> 合成寡核苷酸
[0512]	<400> 22
[0513]	agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg tccctgacct gcctcgtgaa gggctttctac 60
[0514]	<210> 23
[0515]	<211> 141
[0516]	<212> DNA
[0517]	<213> 人工序列
[0518]	<220>
[0519]	<223> 合成寡核苷酸
[0520]	<400> 23
[0521]	aagcctacca caaccctgc cccagacct cctacaccgc cccctacaat tgccagccag 60
[0522]	cctctgtctc tgaggccga ggctttaga cctgctgtg gcggagccgt gcacaccaga 120
[0523]	ggactggatt tcgcctgcga c 141
[0524]	<210> 24
[0525]	<211> 696
[0526]	<212> DNA
[0527]	<213> 人工序列
[0528]	<220>
[0529]	<223> 合成寡核苷酸
[0530]	<400> 24
[0531]	agcgagagca agtacggccc tcctgcccc ccttgccctg cccccagtt cctgggcgga 60
[0532]	cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag ccggaccccc 120
[0533]	gagtgacct gtgtgggtgt ggacgtgtcc caggaggacc ccgaggtcca gttcaactgg 180
[0534]	tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc cccgggagga gcagttcaat 240
[0535]	agcacctacc ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 300
[0536]	gaatacaagt gtaaggtgtc caacaagggc ctgccagca gcacgagaa aaccatcagc 360
[0537]	aaggccaagg gccagcctcg ggagccccag gtgtacacc tgccccctag ccaagaggag 420
[0538]	atgaccaaga atcaggtgtc cctgacctgc ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc 480
[0539]	gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 540
[0540]	ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac agcaggctga ccgtggacaa gagccggtgg 600
[0541]	caggagggca acgtctttag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 660
[0542]	cagaagagcc tgtccctgag cctgggcaag atgttc 696
[0543]	<210> 25
[0544]	<211> 60

[0545]	<212> DNA
[0546]	<213> 人工序列
[0547]	<220>
[0548]	<223> 合成寡核苷酸
[0549]	<400> 25
[0550]	agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg tccctgacct gcctcgtgaa gggctttctac 60
[0551]	<210> 26
[0552]	<211> 696
[0553]	<212> DNA
[0554]	<213> 人工序列
[0555]	<220>
[0556]	<223> 合成寡核苷酸
[0557]	<400> 26
[0558]	agcgagagca agtacggccc tccctgcccc ccttgccctg cccccgagtt cctgggcgga 60
[0559]	cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccgaccccc 120
[0560]	gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc caggaggacc ccgaggtcca gttcaactgg 180
[0561]	tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc cccgggagga gcagttccag 240
[0562]	agcacctacc ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 300
[0563]	gaatacaagt gtaaggtgtc caacaagggc ctgcccagca gcatcgagaa aaccatcagc 360
[0564]	aaggccaagg gccagcctcg ggagccccag gtgtacaccc tgccccctag ccaagaggag 420
[0565]	atgaccaaga atcaggtgtc cctgacctgc ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc 480
[0566]	gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 540
[0567]	ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaggtga ccgtggacaa gagccggtgg 600
[0568]	caggagggca acgtcttttag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 660
[0569]	cagaagagcc tgtccctgag cctgggcaag atgttc 696
[0570]	<210> 27
[0571]	<211> 696
[0572]	<212> DNA
[0573]	<213> 人工序列
[0574]	<220>
[0575]	<223> 合成寡核苷酸
[0576]	<400> 27
[0577]	agcgagagca agtacggccc tccctgcccc ccttgccctg cccccgagtt cgaaggcgga 60
[0578]	cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccgaccccc 120
[0579]	gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc caggaggacc ccgaggtcca gttcaactgg 180
[0580]	tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc cccgggagga gcagttccag 240
[0581]	agcacctacc ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 300
[0582]	gaatacaagt gtaaggtgtc caacaagggc ctgcccagca gcatcgagaa aaccatcagc 360
[0583]	aaggccaagg gccagcctcg ggagccccag gtgtacaccc tgccccctag ccaagaggag 420
[0584]	atgaccaaga atcaggtgtc cctgacctgc ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc 480
[0585]	gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 540
[0586]	ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaggtga ccgtggacaa gagccggtgg 600

[0587] caggagggca acgtctttag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 660
 [0588] cagaagagcc tgtccctgag cctgggcaag atgttc 696
 [0589] <210> 28
 [0590] <211> 711
 [0591] <212> DNA
 [0592] <213> 人工序列
 [0593] <220>
 [0594] <223> 合成寡核苷酸
 [0595] <400> 28
 [0596] atggtgtcca agggcgagga actgatcaaa gaaaacatgc acatgaagct gtacatggaa 60
 [0597] ggcaccgtga acaaccacca cttcaagtgc accagcgagg gagagggcaa gccctacgag 120
 [0598] ggcaccacga ccatgcggat caaggtggtc gagggcggac ctctgccctt cgccttcgac 180
 [0599] atcttgcca caagcttcat gtacggcagc aagaccttca tcaaccacac ccagggcac 240
 [0600] cccgatttct tcaagcagag cttccccgag ggcttcacct gggagagagt gaccacctac 300
 [0601] gaggacggcg gcgtgctgac cgccaccag gacaccagcc tgcaggacgg ctgcctgac 360
 [0602] tacaacgtga agatccgggg cgtgaacttc ccagcaacg gcccgtgat gcagaagaaa 420
 [0603] accctgggct gggaggccag caccgagatg ctgtaccctg ccgatggcgg cctggaaggc 480
 [0604] agagccgaca tggccctgaa actggtcggc ggagggcacc tgatctgcaa cctgaaaacc 540
 [0605] acctacagaa gcaagaagcc cgccaagaac ctgaagatgc ccggcgtgta ctacgtggac 600
 [0606] cggcggctgg aaaggatcaa agaggccgac aaagaaacct acgtggagca gcacgaggtg 660
 [0607] gccgtggccc ggtactgca cctgccctcc aagctgggcc acaaactgaa c 711
 [0608] <210> 29
 [0609] <211> 333
 [0610] <212> DNA
 [0611] <213> 人工序列
 [0612] <220>
 [0613] <223> 合成寡核苷酸
 [0614] <400> 29
 [0615] atgatcgaga agtccttctg gatcaccgac ccccggtgc ccgactaccc tateatcttt 60
 [0616] gccagcgacg gcttcctgga actgaccgag tacagccggg aagagatcat gggccggaac 120
 [0617] gccagattcc tgcaggcccc cgaaaccgat caggccaccg tgcagaagat ccgggacgcc 180
 [0618] atcagggacc agcgggaaac cacagtgcag ctgatcaact acaccaagag cggcaagaag 240
 [0619] ttctggaacc tgctgcatct gcagcccgat cgggatatagaa agggcggcct gcagtacttc 300
 [0620] atcggcgtgc agctcgtggg cagcgaccac gtg 333
 [0621] <210> 30
 [0622] <211> 675
 [0623] <212> DNA
 [0624] <213> 人工序列
 [0625] <220>
 [0626] <223> 合成寡核苷酸
 [0627] <400> 30
 [0628] atggccagca gcgaggacgt gatcaaagaa ttcattcggt tcaaagtgcg gatggaaggc 60

[0629]	agcgtgaacg gccacgagtt cgagattgag ggcgagggcg aaggcagacc ctacgaggga	120
[0630]	acacagaccg ccaagctgaa agtgaccaag ggcggacccc tgcccttcgc ctgggatata	180
[0631]	ctgagcccc agttccagta cggcagcaag gtgtacgtga agcaccgccg cgacatcccc	240
[0632]	gactacaaga agctgagctt ccccgagggc ttcaagtggg agagagtgat gaacttcgag	300
[0633]	gacggcggcg tcgtgaccgt gaccagagat agctctctgc aggacggcag cttcatctac	360
[0634]	aaagtgaagt ttatcggcgt gaacttcccc agcgacggcc ccgtgatgca gaaaaagacc	420
[0635]	atgggctggg aggccagcac cgagagactg taccctagag atggcgtgct gaaggcgag	480
[0636]	atccacaagg ccctgaagct gaaggatggc ggccactacc tgggtggaatt caagagcatc	540
[0637]	tacatggcca agaaaccgt gcagctgccc ggctactact acgtggacag caagctggac	600
[0638]	atcaccagcc acaacgagga ctacaccatc gtggaacagt acgagcgggc cgagggccgg	660
[0639]	caccatctgt ttctg	675
[0640]	<210>	31
[0641]	<211>	717
[0642]	<212>	DNA
[0643]	<213>	人工序列
[0644]	<220>	
[0645]	<223>	合成寡核苷酸
[0646]	<400>	31
[0647]	atggtgtcca agggcgagga actgttcacc ggcgtggtgc ccatcctggt ggaactggat	60
[0648]	ggcgacgtga acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgaaggcga cgccacatat	120
[0649]	ggcaagctga ccctgaagct gatctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ttggcctacc	180
[0650]	ctcgtgacca cactgggcta cggcctgcag tgcttcgcca gataccccga ccatatgaag	240
[0651]	cagcacgact tcttcaagag cgccatgccc gagggctacg tgcaggaacg gaccatcttc	300
[0652]	tttaaggacg acggcaacta caagaccagg gccgaagtga agttcgaggg cgacaccctc	360
[0653]	gtgaaccgga tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaaggagg acggcaacat cctgggccac	420
[0654]	aagctggagt acaactacaa cagccacaaac gtgtacatca ccgccgacaa gcagaagaac	480
[0655]	ggcatcaagg ccaacttcaa gatccggcac aacatcgagg acggcggcgt gcagctggcc	540
[0656]	gatcactacc agcagaacac ccctatcggc gacggccctg tgctgctgcc cgacaatcac	600
[0657]	tacctgagct accagagcgc cctgagcaag gaccccaacg agaagcggga ccacatggtg	660
[0658]	ctgctggaat tcgtgaccgc cgctggcatc accctgggca tggacgagct gtacaag	717
[0659]	<210>	32
[0660]	<211>	717
[0661]	<212>	DNA
[0662]	<213>	人工序列
[0663]	<220>	
[0664]	<223>	合成寡核苷酸
[0665]	<400>	32
[0666]	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
[0667]	ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgaggcgga tgccacctac	120
[0668]	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
[0669]	ctcgtgacca ccctgacctc cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
[0670]	cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggtctacg tccaggagcg caccatcttc	300

[0671]	ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
[0672]	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
[0673]	aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
[0674]	ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
[0675]	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
[0676]	tacctgagca ccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcg tcatatggtc 660
[0677]	ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggac actctcggca tggacgagct gtacaag 717
[0678]	<210> 33
[0679]	<211> 363
[0680]	<212> DNA
[0681]	<213> 人工序列
[0682]	<220>
[0683]	<223> 合成寡核苷酸
[0684]	<400> 33
[0685]	gccaaaggcc agcctcgga gccccaggtg tacaccctgc cccctagcca agaggagatg 60
[0686]	accaagaatc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggt tctaccccag cgacatcgcc 120
[0687]	gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc cctgtgctg 180
[0688]	gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc aggtgaccg tggacaagag ccggtggcag 240
[0689]	gagggcaacg tctttagctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcacaacca ctacaccag 300
[0690]	aagagcctgt ccctgagcct gggcaagatg ttctacccat acgatgttcc agattacgt 360
[0691]	tac 363
[0692]	<210> 34
[0693]	<211> 708
[0694]	<212> DNA
[0695]	<213> 人工序列
[0696]	<220>
[0697]	<223> 合成寡核苷酸
[0698]	<400> 34
[0699]	atggtgagca agggcgagga gaccacaatg ggcgtaatca agcccgacat gaagatcaag 60
[0700]	ctgaagatgg agggcaacgt gaatggccac gccttcgtga tcgagggcga gggcgagggc 120
[0701]	aagccctacg acggcaccaa caccatcaac ctggaggtga aggagggagc cccctgccc 180
[0702]	ttctctacg acattctgac caccgcgttc gcctacggca acagggcctt caccaagtac 240
[0703]	cccgcagaca tcccacta cttcaagcag tccttccccg agggctactc ttgggagcgc 300
[0704]	accatgacct tcgaggacaa gggcatcgtg aaggtgaagt ccgacatctc catggaggag 360
[0705]	gactccttca tctacgagat acacctcaag ggcgagaact tccccccaa cggccccgtg 420
[0706]	atgcagaaga agaccaccgg ctgggacgcc tccaccgaga ggatgtacgt gcgcgacggc 480
[0707]	gtgctgaagg gcgacgtcaa gcacaagctg ctgctggagg gcggcgccca ccaccgctt 540
[0708]	gacttcaaga ccatctacag ggccaagaag gcggtgaagc tgcccacta tcactttgtg 600
[0709]	gaccaccgca tcgagatcct gaaccacgac aaggactaca acaaggtgac cgtttacgag 660
[0710]	agcgcctggg cccgcaactc caccgacggc atggacgagc tgtacaag 708
[0711]	<210> 35
[0712]	<211> 423

[0713]	<212> DNA
[0714]	<213> 人工序列
[0715]	<220>
[0716]	<223> 合成寡核苷酸
[0717]	<400> 35
[0718]	aagcctacca caaccctgc cccagacct cctacaccg cccctacaat tgccagccag 60
[0719]	cctctgtctc tgaggccga ggctttaga cctgctgctg gcggagccgt gcacaccaga 120
[0720]	ggactggatt tcgcctgcga caagcctacc acaaccctg cccagacc tcctacacc 180
[0721]	gccctacaa ttgccagcca gcctctgtct ctgaggccg aggctttag acctgctgct 240
[0722]	ggcggagccg tgcacaccag aggactgat ttgcctgcg acagcagcg cggcgccgc 300
[0723]	agcggcgcg gcggcagcg cggcgccgc agcgcgcagc tgaaaaaaaa actgcaggcg 360
[0724]	ctgaaaaaaaa aaaacgcga gctgaaatgg aaactgcagg cgctgaaaaa aaaactggcg 420
[0725]	cag 423
[0726]	<210> 36
[0727]	<211> 423
[0728]	<212> DNA
[0729]	<213> 人工序列
[0730]	<220>
[0731]	<223> 合成寡核苷酸
[0732]	<400> 36
[0733]	aagcctacca caaccctgc cccagacct cctacaccg cccctacaat tgccagccag 60
[0734]	cctctgtctc tgaggccga ggctttaga cctgctgctg gcggagccgt gcacaccaga 120
[0735]	ggactggatt tcgcctgcga caagcctacc acaaccctg cccagacc tcctacacc 180
[0736]	gccctacaa ttgccagcca gcctctgtct ctgaggccg aggctttag acctgctgct 240
[0737]	ggcggagccg tgcacaccag aggactgat ttgcctgcg acagcagcg cggcgccgc 300
[0738]	agcggcgcg gcggcagcg cggcgccgc agcgcgcagc tggaaaaaga gctgcaggcc 360
[0739]	ctggaaaaag aaaacgctca gctggaatgg gaactgcagg ctctgaaaaa agagctggcc 420
[0740]	cag 423
[0741]	<210> 37
[0742]	<211> 69
[0743]	<212> DNA
[0744]	<213> 人工序列
[0745]	<220>
[0746]	<223> 合成寡核苷酸
[0747]	<400> 37
[0748]	tgggtgctgg tcgtggtggg tggcgtgctg gcctgctaca gcctgctggt gacagtggcc 60
[0749]	ttcatcatc 69
[0750]	<210> 38
[0751]	<211> 81
[0752]	<212> DNA
[0753]	<213> 人工序列
[0754]	<220>

[0755] <223> 合成寡核苷酸
[0756] <400> 38
[0757] attatctcat tcttcctggc cctgacctct accgccctgc tgtttctgct gttctttctg 60
[0758] accctgcggt tcagcgtggt g 81
[0759] <210> 39
[0760] <211> 84
[0761] <212> DNA
[0762] <213> 人工序列
[0763] <220>
[0764] <223> 合成寡核苷酸
[0765] <400> 39
[0766] atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgct actggttatc 60
[0767] accctttact gcaaccacag gaac 84
[0768] <210> 40
[0769] <211> 63
[0770] <212> DNA
[0771] <213> 人工序列
[0772] <220>
[0773] <223> 合成寡核苷酸
[0774] <400> 40
[0775] ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc atctatggtg tcattctcac tgccttggtc 60
[0776] ctg 63
[0777] <210> 41
[0778] <211> 144
[0779] <212> DNA
[0780] <213> 人工序列
[0781] <220>
[0782] <223> 合成寡核苷酸
[0783] <400> 41
[0784] cagcggcgga agtacagaag caacaagggc gagagccccg tggaacctgc cgagccttgc 60
[0785] agatacagct gccccagaga ggaagagggc agcaccatcc caatccagga agattaccgg 120
[0786] aagccccgagc ccgcctgtag ccct 144
[0787] <210> 42
[0788] <211> 132
[0789] <212> DNA
[0790] <213> 人工序列
[0791] <220>
[0792] <223> 合成寡核苷酸
[0793] <400> 42
[0794] ttttgggtga ggagcaagcg gagcagaggc ggccacagcg actacatgaa catgaccccc 60
[0795] cggaggcctg gccccaccgc gaagcactac cagccctacg cccctcccag ggacttcgcc 120
[0796] gcctaccgga gc 132

[0797] <210> 43
[0798] <211> 132
[0799] <212> DNA
[0800] <213> 人工序列
[0801] <220>
[0802] <223> 合成寡核苷酸
[0803] <400> 43
[0804] ttttgggtga ggagcaagcg gagcagagcg ggccacagcg acttcatgaa catgaccccc 60
[0805] cggaggcctg gccccaccg gaagcactac cagccctacg cccctcccag ggacttcgcc 120
[0806] gcctaccgga gc 132
[0807] <210> 44
[0808] <211> 108
[0809] <212> DNA
[0810] <213> 人工序列
[0811] <220>
[0812] <223> 合成寡核苷酸
[0813] <400> 44
[0814] agggaccaga gactgcctcc cgatgcccac aaacctccag gcggcggaag cttcagaacc 60
[0815] cccatccagg aagaacagcg cgacgcccac agcaccttg ccaagatt 108
[0816] <210> 45
[0817] <211> 126
[0818] <212> DNA
[0819] <213> 人工序列
[0820] <220>
[0821] <223> 合成寡核苷酸
[0822] <400> 45
[0823] aagcggggca gaaagaagct gctgtacatc ttcaagcagc ctttcatgcg gcccgtagcag 60
[0824] accaccagg aagaggacgg ctgctcctgc agattccccg aggaagaaga aggcggctgc 120
[0825] gagctg 126
[0826] <210> 46
[0827] <211> 102
[0828] <212> DNA
[0829] <213> 人工序列
[0830] <220>
[0831] <223> 合成寡核苷酸
[0832] <400> 46
[0833] aagaaaaagt acagcagcag cgtgcacgac cccaacggcg agtacatgtt catgcgggcc 60
[0834] gtgaacaccg ccaagaagtc cagactgacc gacgtgaccc tg 102
[0835] <210> 47
[0836] <211> 336
[0837] <212> DNA
[0838] <213> 人工序列

[0839]	<220>	
[0840]	<223>	合成寡核苷酸
[0841]	<400>	47
[0842]	cgggtgaagt tcagccggag cgccgacgcc cctgcctacc agcagggcca gaaccagctg	60
[0843]	tacaacgagc tgaacctggg ccggagggag gactacgacg tgctggacaa gcggagaggc	120
[0844]	cgggaccctg agatgggcgg caagccccgg agaaagaacc ctcaggaggg cctgtataac	180
[0845]	gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg	240
[0846]	cggaggggca agggccacga cggcctgtac cagggcctga gcaccgccac caaggatacc	300
[0847]	tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc cccaga	336
[0848]	<210>	48
[0849]	<211>	759
[0850]	<212>	DNA
[0851]	<213>	人工序列
[0852]	<220>	
[0853]	<223>	合成寡核苷酸
[0854]	<400>	48
[0855]	gatattcaga tgaccagag cccgagcagc ctgagcgca gcgtgggcga tcgcgtgacc	60
[0856]	attacctgcc gcagcagcca gaacattgtg catagcaacg gcaacaccta tctggattgg	120
[0857]	tatcagcaga ccccgggcaa agcgccgaaa ctgctgattt ataaagttag caaccgcttt	180
[0858]	agcggcgtgc cgagccgctt tagcggcagc ggcagcggca ccgattttac ctttaccatt	240
[0859]	agcagcctgc agccggaaga tattgcgacc tattattgct ttcagtatag ccatgtgccg	300
[0860]	tggacctttg gccagggcac caaactgcag attaccggca gcacctccgg cagcggcaag	360
[0861]	cctggcagcg gcgagggcag caccaagggc agccaggtgc agctgcagca gagcggcgcg	420
[0862]	gaagtgaaaa aaccgggcag cagcgtgaaa gtgagctgca aagcgagcgg ctataccttt	480
[0863]	accaactatt atatttattg ggtgcgccag gcgccgggcc agggcctgga atggattggc	540
[0864]	ggcattaacc cgaccagcgg cggcagcaac tttaacgaaa aattttaaacc ccgcgtgacc	600
[0865]	attaccgcgg atgaaagcag caccaccgcg tatatggaac tgagcagcct gcgcagcgaa	660
[0866]	gataccgcgt tttatttttg caccgccagc ggcctgtggt ttgatagcga tggccgcggc	720
[0867]	tttgattttt ggggccaggg caccaccgtg accgtgagc	759
[0868]	<210>	49
[0869]	<211>	732
[0870]	<212>	DNA
[0871]	<213>	人工序列
[0872]	<220>	
[0873]	<223>	合成寡核苷酸
[0874]	<400>	49
[0875]	gatattctgc tgaccagag cccggtgatt ctgagcgtga gcccgggcga acgcgtgagc	60
[0876]	tttagctgcc gcgcgagcca gagcattggc accaacattc attggtatca gcagcgcacc	120
[0877]	aacggcagcc cgcgctgct gattaaatat gcgagcgaaa gcattagcgg cattccgagc	180
[0878]	cgctttagcg gcagcggcag cggcaccgat ttaccctga gcattaacag cgtggaaagc	240
[0879]	gaagatattg cggattatta ttgccagcag aacaacaact ggccgaccac ctttggcgcg	300
[0880]	ggcaccaaac tggaactgaa aggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag	360

[0881]	ggcagcacca agggcagcca ggtgcagctg aaacagagcg gcccggcct ggtgcagccg	420
[0882]	agccagagcc tgagcattac ctgcaccgtg agcggcttta gcctgaccaa ctatggcgtg	480
[0883]	cattgggtgc gccagagccc gggcaaagcg ctggaatggc tgggcgtgat ttggagcggc	540
[0884]	ggcaacaccg attataacac cccgtttacc agccgcctga gcattaacaa agataacagc	600
[0885]	aaaagccagg tgttttttaa aatgaacagc ctgcagagca acgataccgc gatttattat	660
[0886]	tgcgcgcgcg cgctgacctt ttatgattat gaatttgcgt attggggcca gggcaccctg	720
[0887]	gtgaccgtga gc	732
[0888]	<210>	50
[0889]	<211>	726
[0890]	<212>	DNA
[0891]	<213>	人工序列
[0892]	<220>	
[0893]	<223>	合成寡核苷酸
[0894]	<400>	50
[0895]	gaagtgcagc tgcagcagag cggcccgaa ctggaaaaac cggcgcgag cgtgaaactg	60
[0896]	agctgcaaag cgagcgcta tagctttacc ggctataaca tgaactgggt gaaacagagc	120
[0897]	catggcaaaa gcctggaatg gattggccat attgatccgt attatggcga taccagctat	180
[0898]	aaccagaaat ttcgcgcaa agcgacctg accgtggata aaagcagcag caccgcgtat	240
[0899]	atgcagctga aaagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt attattgcgt gaaaggcggc	300
[0900]	tattatggcc attggtatit tgatgtgtgg ggcgcgggca ccaccgtgac cgtgagcagc	360
[0901]	ggcgaggcg gctctggcg cggaggatca ggtggcgag gatccgatat tcagatgacc	420
[0902]	cagagcccga gcagcctgag cgcgagcctg ggcaacgcg tgagcctgac ctgccgcgcg	480
[0903]	agccaggata ttggcagcag cctgaactgg ctgcagcagg gcccgatgg caccattaaa	540
[0904]	cgctgattt atgcgaccag cagcctggat agcggcgtgc cgaaacgctt tagcggcagc	600
[0905]	cgcagcgga gcgattatag cctgaccatt agcagcctgg aaagcgaaga ttttgtggat	660
[0906]	tattattgcc tgcagtatgt gagcagcccg ccgaccttg gcgcgggcac caaactggaa	720
[0907]	ctgaaa	726
[0908]	<210>	51
[0909]	<211>	111
[0910]	<212>	PRT
[0911]	<213>	人工序列
[0912]	<220>	
[0913]	<223>	合成多肽
[0914]	<400>	51
[0915]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly	
[0916]	1 5 10 15	
[0917]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr	
[0918]	20 25 30	
[0919]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys	
[0920]	35 40 45	
[0921]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys	
[0922]	50 55 60	

[0923]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
[0924]	65	70	75 80
[0925]	Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr		
[0926]	85	90	95
[0927]	Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0928]	100	105	110
[0929]	<210> 52		
[0930]	<211> 108		
[0931]	<212> PRT		
[0932]	<213> 人工序列		
[0933]	<220>		
[0934]	<223> 合成多肽		
[0935]	<400> 52		
[0936]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly		
[0937]	1	5	10 15
[0938]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
[0939]	20	25	30
[0940]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
[0941]	35	40	45
[0942]	Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln		
[0943]	50	55	60
[0944]	Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu		
[0945]	65	70	75 80
[0946]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
[0947]	85	90	95
[0948]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala		
[0949]	100	105	
[0950]	<210> 53		
[0951]	<211> 112		
[0952]	<212> PRT		
[0953]	<213> 人工序列		
[0954]	<220>		
[0955]	<223> 合成多肽		
[0956]	<400> 53		
[0957]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly		
[0958]	1	5	10 15
[0959]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
[0960]	20	25	30
[0961]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
[0962]	35	40	45
[0963]	Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln		
[0964]	50	55	60

56

[1007]	cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc	540
[1008]	gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctgggcgt gatctggggc	600
[1009]	agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
[1010]	agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720
[1011]	tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
[1012]	accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgcctgcc	840
[1013]	cccagttcc tgggcggacc cagcgtgttc ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg	900
[1014]	atgatcagcc ggacccccga ggtgacctgt gtggtggtgg acgtgtccca ggaggacccc	960
[1015]	gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc	1020
[1016]	cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag	1080
[1017]	gactggctga acggcaagga atacaagtgt aaggtgtcca acaaggccct gccagcagc	1140
[1018]	atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagcctcggg agccccaggt gtacacctg	1200
[1019]	ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc	1260
[1020]	ttctacccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagcccga gaacaactac	1320
[1021]	aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggcagcttct tcctgtacag caggctgacc	1380
[1022]	gtggacaaga gccggtggca ggagggaac gtcttttagct gctccgtgat gcacgaggcc	1440
[1023]	ctgcacaacc actacacca gaagagcctg tccctgagcc tgggcaagat gttctgggtg	1500
[1024]	ctggtcgtgg tgggtggcgt gctggcctgc tacagcctgc tggtgacagt ggccttcac	1560
[1025]	atcttttggg tgaggagcaa gcggagcaga ggccggccaca gcgactacat gaacatgacc	1620
[1026]	ccccggaggc ctggccccac ccggaagcac taccagccct acgccccctc cagggacttc	1680
[1027]	gccgcctacc ggagccgggt gaagttcagc cggagcgccg acgccccctgc ctaccagcag	1740
[1028]	ggccagaacc agctgtacaa cgagctgaac ctgggccgga gggaggagta cgacgtgctg	1800
[1029]	gacaagcgga gaggccggga ccctgagatg ggccggcaagc cccggagaaa gaaccctcag	1860
[1030]	gagggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatcggc	1920
[1031]	atgaaggcg agcggcggag gggcaagggc cagcagggc tgtaccaggg cctgagcacc	1980
[1032]	gccaccaagg atacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgccccccag atga	2034
[1033]	<210> 56	
[1034]	<211> 2040	
[1035]	<212> DNA	
[1036]	<213> 人工序列	
[1037]	<220>	
[1038]	<223> 合成寡核苷酸	
[1039]	<400> 56	
[1040]	atgtctctgc tggtgaccag cctgtctctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg	60
[1041]	atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg	120
[1042]	gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
[1043]	aagcccgacg gcaccgtcaa gctgtctgac taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
[1044]	cccagccggt ttagcggcag cggtccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300
[1045]	gagcaggagg acatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt	360
[1046]	ggcggcggaa caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
[1047]	ggcgagggca gcaccaaggc cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc	480
[1048]	cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc	540

[1049]	gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctgggct gatctggggc	600
[1050]	agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
[1051]	agcaagagcc aggtgttct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720
[1052]	tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
[1053]	accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgccctgcc	840
[1054]	cccagttcc tgggcggacc cagcgtgttc ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg	900
[1055]	atgatcagcc ggacccccga ggtgacctgt gtgggtggtg acgtgtccca ggaggacccc	960
[1056]	gaggtccagt tcaactggtg cgtggacggc gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc	1020
[1057]	cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag	1080
[1058]	gactggctga acggcaagga atacaagtgt aaggtgtcca acaaggcct gccagcagc	1140
[1059]	atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagcctcggg agccccaggt gtacaccctg	1200
[1060]	ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc	1260
[1061]	ttctaccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaac gccagcccga gaacaactac	1320
[1062]	aagaccacc cccctgtgct ggacagcgac ggcagcttct tcctgtacag caggctgacc	1380
[1063]	gtggacaaga gccggtggca ggagggaac gtcttttagct gctccgtgat gcacaggcc	1440
[1064]	ctgcacaacc actacacca gaagagcctg tccttagcc tgggcaagat gatctacatc	1500
[1065]	tgggccccctc tggccggcac ctgtggcgtg ctgctgctga gcctggatcat caccctgtac	1560
[1066]	tgcaaccacc ggaacaagag aggcgggaag aaactgctgt acatcttcaa gcagcccttc	1620
[1067]	atgcggcccg tgcagaccac ccaggaagag gacggctgca gctgccggtt ccccgaggaa	1680
[1068]	gaggaaggcg gctgcgaact gcgggtgaag ttcagccgga gcgccagc ccctgcctac	1740
[1069]	cagcagggcc agaaccagct gtacaacgag ctgaacctgg gccggaggga ggagtacgac	1800
[1070]	gtgctggaca agcgagagg ccgggaccct gagatggcg gcaagcccc gagaaagaac	1860
[1071]	cctcaggagg gcctgtataa cgaactgcag aaagacaaga tggccgaggc ctacagcgag	1920
[1072]	atcgcatga agggcgagcg gcggaggggc aagggccacg acggcctgta ccagggcctg	1980
[1073]	agcaccgcca ccaaggatac ctacgacgcc ctgcacatgc aggcctgcc cccagatga	2040
[1074]	<210> 57	
[1075]	<211> 2037	
[1076]	<212> DNA	
[1077]	<213> 人工序列	
[1078]	<220>	
[1079]	<223> 合成寡核苷酸	
[1080]	<400> 57	
[1081]	atgtgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccacccgc ctttctgctg	60
[1082]	atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg	120
[1083]	gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
[1084]	aagcccgcag gcacctcaa gctgctgatac taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
[1085]	cccagccggt ttagcggcag cggtccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300
[1086]	gagcaggagg acatgccac ctacttttgc cagcaggga acacactgcc ctacaccttt	360
[1087]	ggcgccgga caaagtggg gatcacggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
[1088]	ggcgagggca gcaccaagg cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc	480
[1089]	cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc	540
[1090]	gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctgggct gatctggggc	600

[1091]	agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
[1092]	agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720
[1093]	tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
[1094]	accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgccctgcc	840
[1095]	cccagattcc tgggcggacc cagcgtgttc ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg	900
[1096]	atgatcagcc ggacccccga ggtgacctgt gtggtggtgg acgtgtccca ggaggacccc	960
[1097]	gaggtccagt tcaactggta cgtggcggc gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc	1020
[1098]	cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag	1080
[1099]	gactggctga acggcaagga atacaagtgt aaggtgtcca acaaggcct gccagcagc	1140
[1100]	atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaaggc cagcctcggg agccccaggt gtacaccctg	1200
[1101]	ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc	1260
[1102]	ttctacccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagcccg gaacaactac	1320
[1103]	aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggcagcttct tcctgtacag caggctgacc	1380
[1104]	gtggacaaga gccggtggca ggagggaac gtcttttagct gctccgtgat gcacgaggcc	1440
[1105]	ctgcacaacc actacacca gaagagcctg tccctgagcc tgggcaagat gatctacatc	1500
[1106]	tgggccccctc tggccggcac ctgtggcgtg ctgctgctga gcctgggtcat caccctgtac	1560
[1107]	tgcaaccacc ggaataggag caagcggagc agaggcggcc acagcgacta catgaacatg	1620
[1108]	accccccgga ggcctggccc caccgggaag cactaccagc cctacgcccc tcccagggac	1680
[1109]	ttcgccgcct accggagccg ggtgaagtgc agccggagcg ccgacgcccc tgcctaccag	1740
[1110]	cagggccaga accagctgta caacgagctg aacctgggcc ggaggaggga gtacgacgtg	1800
[1111]	ctggacaagc ggagaggccg ggaccctgag atgggcggca agccccggag aaagaacctt	1860
[1112]	caggagggcc tgtataacga actgcagaaa gacaagatgg ccgaggccta cagcgagatc	1920
[1113]	ggcatgaagg gcgagcggcg gaggggcaag ggccacgacg gcctgtacca gggcctgagc	1980
[1114]	accgccacca aggataccta cgacgcctg cacatgcagg ccctgcccc cagatga	2037
[1115]	<210>	58
[1116]	<211>	2037
[1117]	<212>	DNA
[1118]	<213>	人工序列
[1119]	<220>	
[1120]	<223>	合成寡核苷酸
[1121]	<400>	58
[1122]	atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccg ctttctgctg	60
[1123]	atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg	120
[1124]	gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
[1125]	aagccccgacg gcaccgtcaa gctgctgata taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
[1126]	cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300
[1127]	gagcaggagg acatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt	360
[1128]	ggcggcgga caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
[1129]	ggcgagggca gcaccaaggc cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc	480
[1130]	cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc	540
[1131]	gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctgggcgt gatctggggc	600
[1132]	agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660

[1133]	agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720
[1134]	tactgtgcc a g c a c t a c t a c t a c t a c g g c g g c a g c t a c g c c a t g g a c t a c t g g g c c a g g g c	780
[1135]	accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgccctgcc	840
[1136]	cccagattcc tgggcggacc cagcgtgttc ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg	900
[1137]	atgatcagcc ggacccccga ggtgacctgt gtgggtggtgg acgtgtccca ggaggacccc	960
[1138]	gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc acaacgccaa gaccaagccc	1020
[1139]	cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtgggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag	1080
[1140]	gactggctga acggcaagga atacaagtgt aaggtgtcca acaagggcct gccagcagc	1140
[1141]	atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagcctcggg agccccaggt gtacaccctg	1200
[1142]	ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc	1260
[1143]	ttctacccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaac gccagcccga gaacaactac	1320
[1144]	aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggcagcttct tcctgtacag caggctgacc	1380
[1145]	gtggacaaga gccggtggca ggagggaac gtcttttagct gctccgtgat gcacgaggcc	1440
[1146]	ctgcacaacc actacacca gaagagcctg tccctgagcc tgggcaagat gattatctca	1500
[1147]	ttcttcctgg ccctgacctc taccgccctg ctgtttctgc tgtttttct gaccctgcgg	1560
[1148]	ttcagcgtgg tcaagagagg ccggaagaaa ctgctgtaca ttttcaagca gcccttcatg	1620
[1149]	cggcccgtgc agaccacca ggaagaggac ggctgcagct gccggttccc cgaggaagag	1680
[1150]	gaaggcggct gcgaactgcg ggtgaagtgc agccggagcg ccgacgcccc tgcctaccag	1740
[1151]	cagggccaga accagctgta caacgagctg aacctgggcc ggaggaggga gtacgacgtg	1800
[1152]	ctggacaagc ggagaggccg ggacctgag atgggcggca agccccggag aaagaacct	1860
[1153]	caggagggcc tgtataacga actgcagaaa gacaagatgg ccgaggccta cagcgagatc	1920
[1154]	ggcatgaagg gcgagcggcg gaggggcaag ggccacgacg gcctgtacca gggcctgagc	1980
[1155]	accgccacca aggataccta cgacgccctg cacatgcagg ccctgcccc cagatga	2037
[1156]	<210>	59
[1157]	<211>	2160
[1158]	<212>	DNA
[1159]	<213>	人工序列
[1160]	<220>	
[1161]	<223>	合成寡核苷酸
[1162]	<400>	59
[1163]	atgtctctgc tggtagaccag cctgtctctg tgtgagctgc cccacccgc ctttctgctg	60
[1164]	atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg	120
[1165]	gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
[1166]	aagcccgacg gcacctcaa gctgtctgac taccacacca gccggtgca cagcggcgtg	240
[1167]	cccagccggt ttagcggcag cggtccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300
[1168]	gagcaggagg acatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt	360
[1169]	ggcggcgga caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
[1170]	ggcaggggca gcaccaagg cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc	480
[1171]	cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc	540
[1172]	gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctgggctg gatctggggc	600
[1173]	agcgagacca cctactacaa cagcgccttg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
[1174]	agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720

[1175]	tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
[1176]	accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgccctgcc	840
[1177]	cccagattcc tgggcggacc cagcgtgttc ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg	900
[1178]	atgatcagcc ggacccccga ggtgacctgt gtggtgtgtg acgtgtccca ggaggacccc	960
[1179]	gaggtcagct tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc	1020
[1180]	cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag	1080
[1181]	gactggctga acggcaagga atacaagtgt aaggtgtcca acaagggcct gccagcagc	1140
[1182]	atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagcctcggg agccccaggt gtacaccctg	1200
[1183]	ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc	1260
[1184]	ttctacccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagcccga gaacaactac	1320
[1185]	aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggcagcttct tcctgtacag caggtgacc	1380
[1186]	gtggacaaga gccgttgca ggagggcaac gtcttttagct gctccgtgat gcacgaggcc	1440
[1187]	ctgcacaacc actacacca gaagagcctg tccttagacc tgggcaagat gttctgggtg	1500
[1188]	ctggtcgtgg tgggtggcgt gctggcctgc tacagcctgc tggtgacagt ggccttcac	1560
[1189]	atcttttggg tgaggagcaa gcggagcaga ggcgccaca gcgactacat gaacatgacc	1620
[1190]	ccccggaggc ctggccccac ccggaagcac taccagccct acgccccctc cagggaactc	1680
[1191]	gccgcctacc ggagcaagag aggccggaag aaactgctgt acatcttcaa gcagcccttc	1740
[1192]	atgcggcccg tgacagaccac ccaggaagag gacggctgca gctgccggtt ccccgaggaa	1800
[1193]	gaggaaggcg gctgcgaact gcgggtgaag ttcagccgga gcgccgacgc ccctgcctac	1860
[1194]	cagcagggcc agaaccagct gtacaacgag ctgaacctgg gccggaggga ggagtacgac	1920
[1195]	gtgctggaca agcggagagg ccgggacct gagatgggcg gcaagcccc gagaaagaac	1980
[1196]	cctcaggagg gcctgtataa cgaactgcag aaagacaaga tggccgaggc ctacagcgag	2040
[1197]	atcgcatga agggcgagcg gcggaggggc aagggccacg acggcctgta ccagggcctg	2100
[1198]	agcaccgcca ccaaggatac ctacgacgcc ctgcacatgc aggcctgcc cccagatga	2160

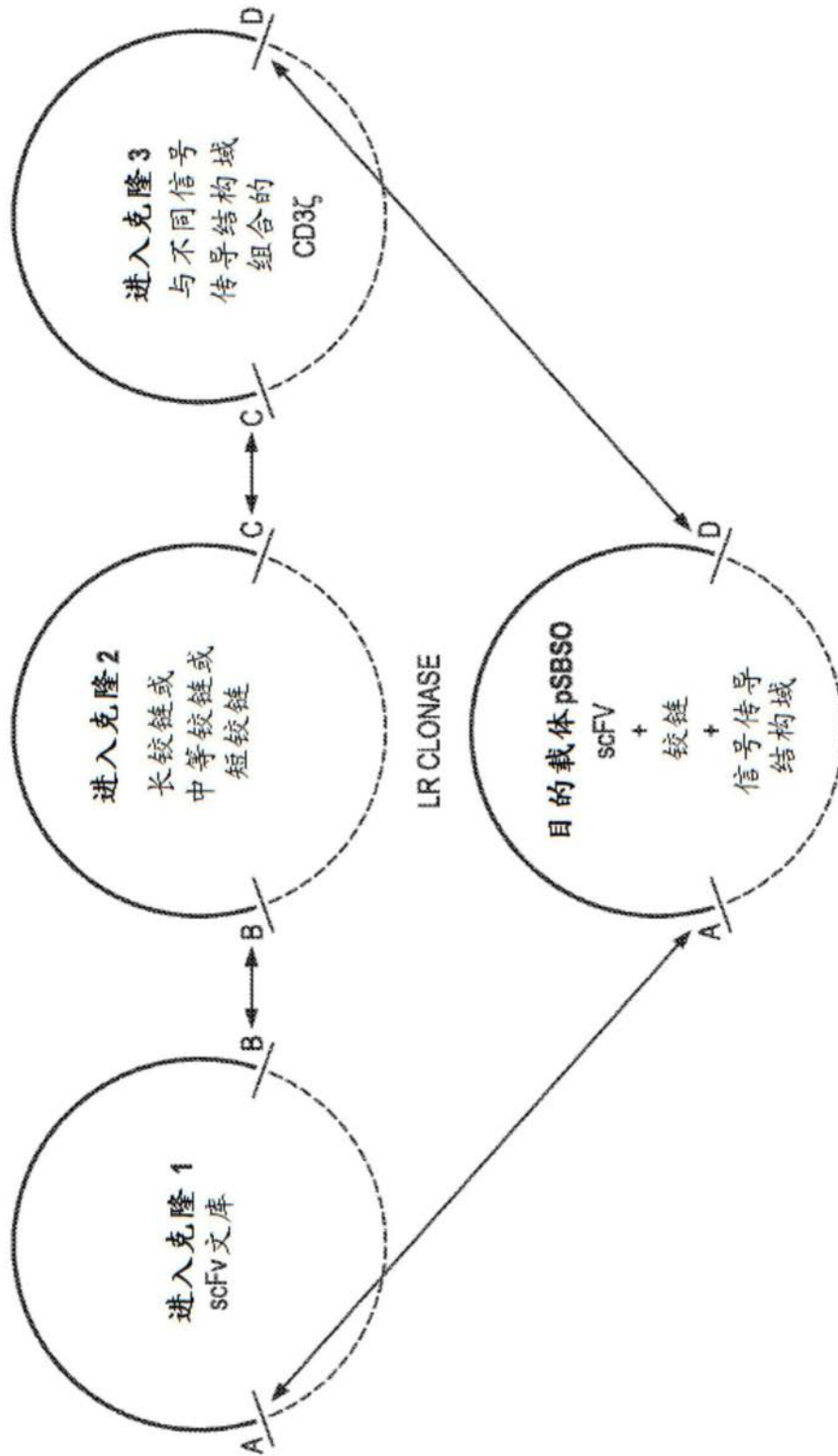


图1

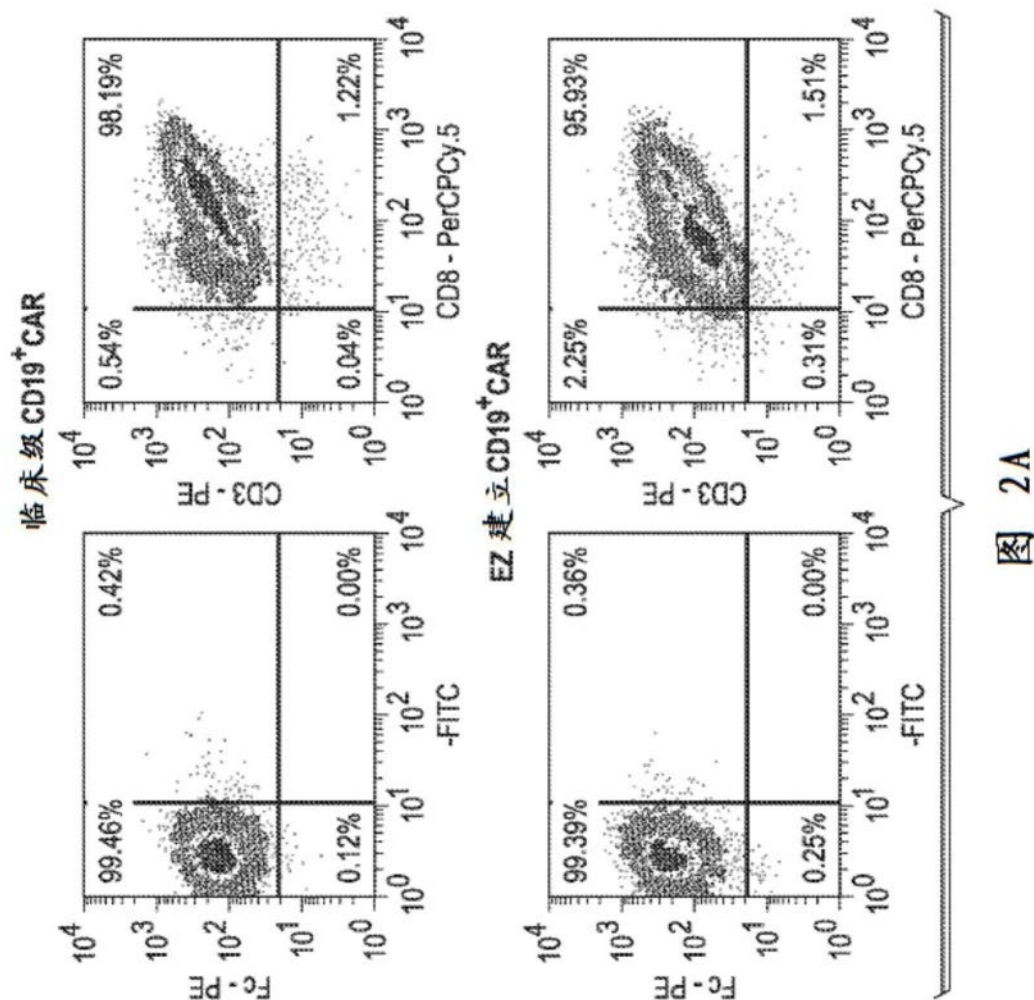


图 2A

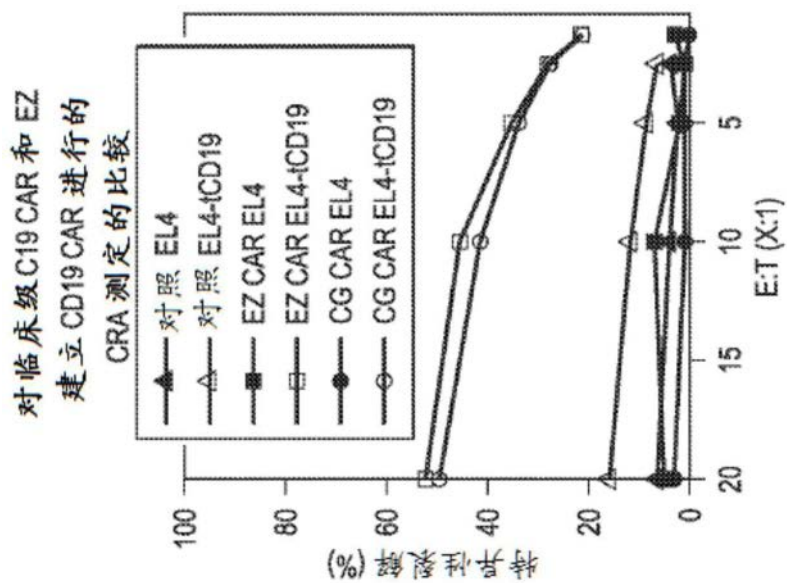


图2B

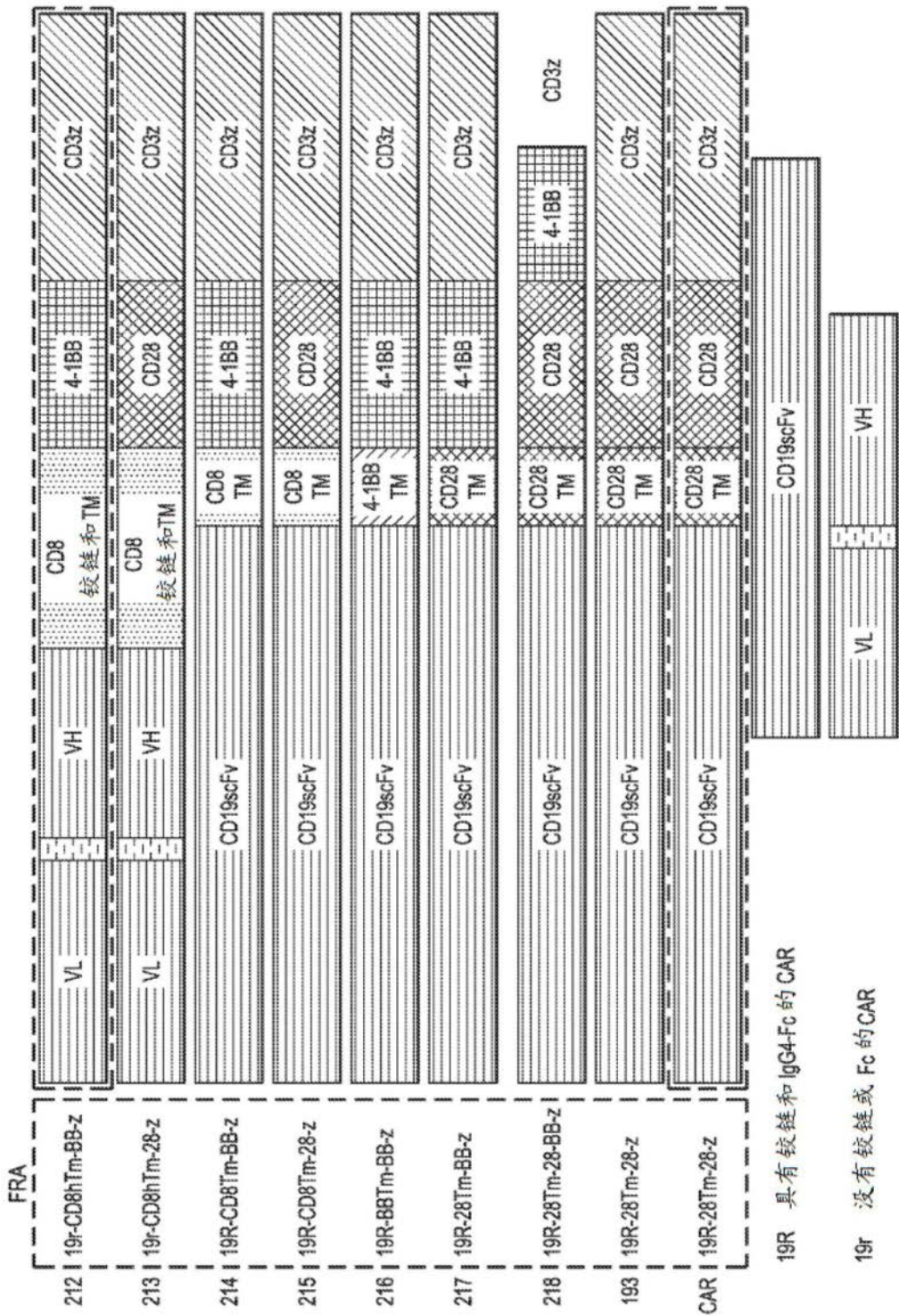


图3

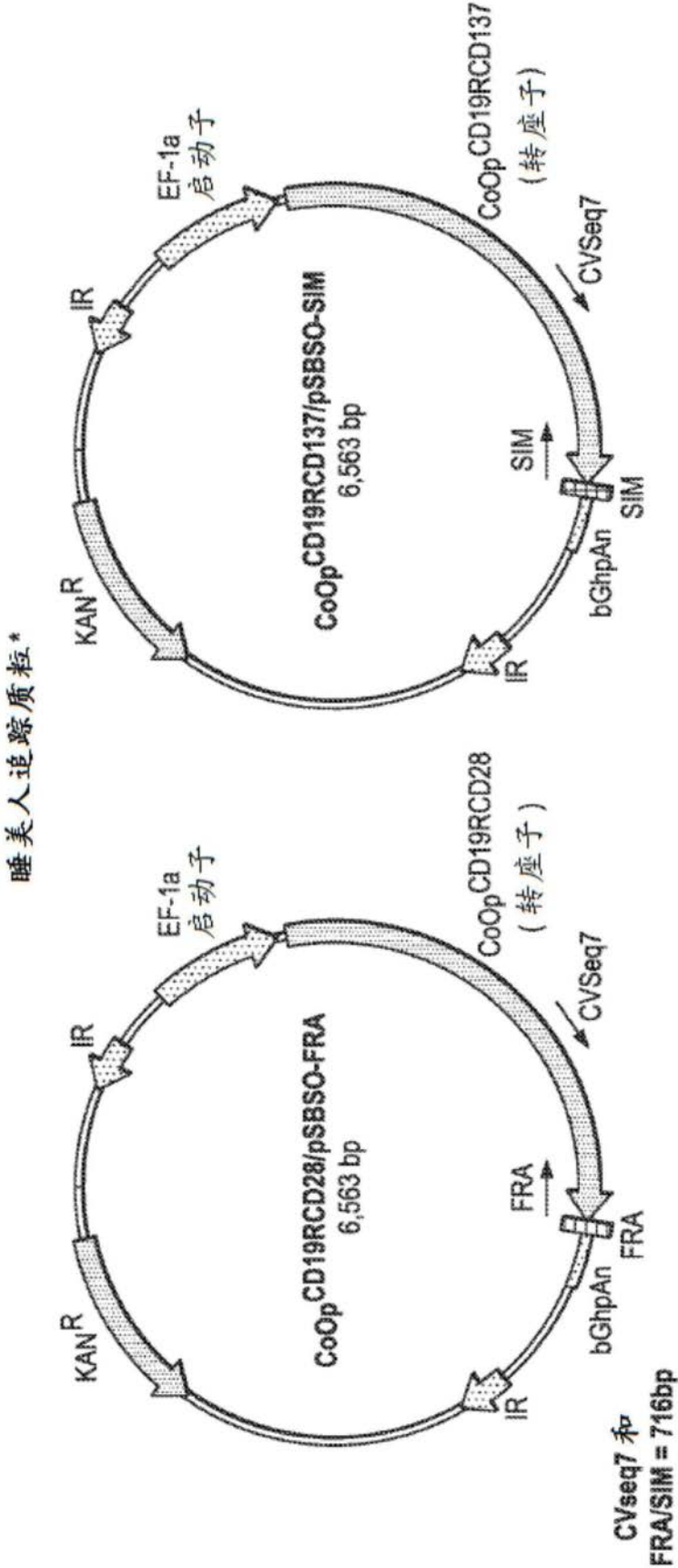


图4

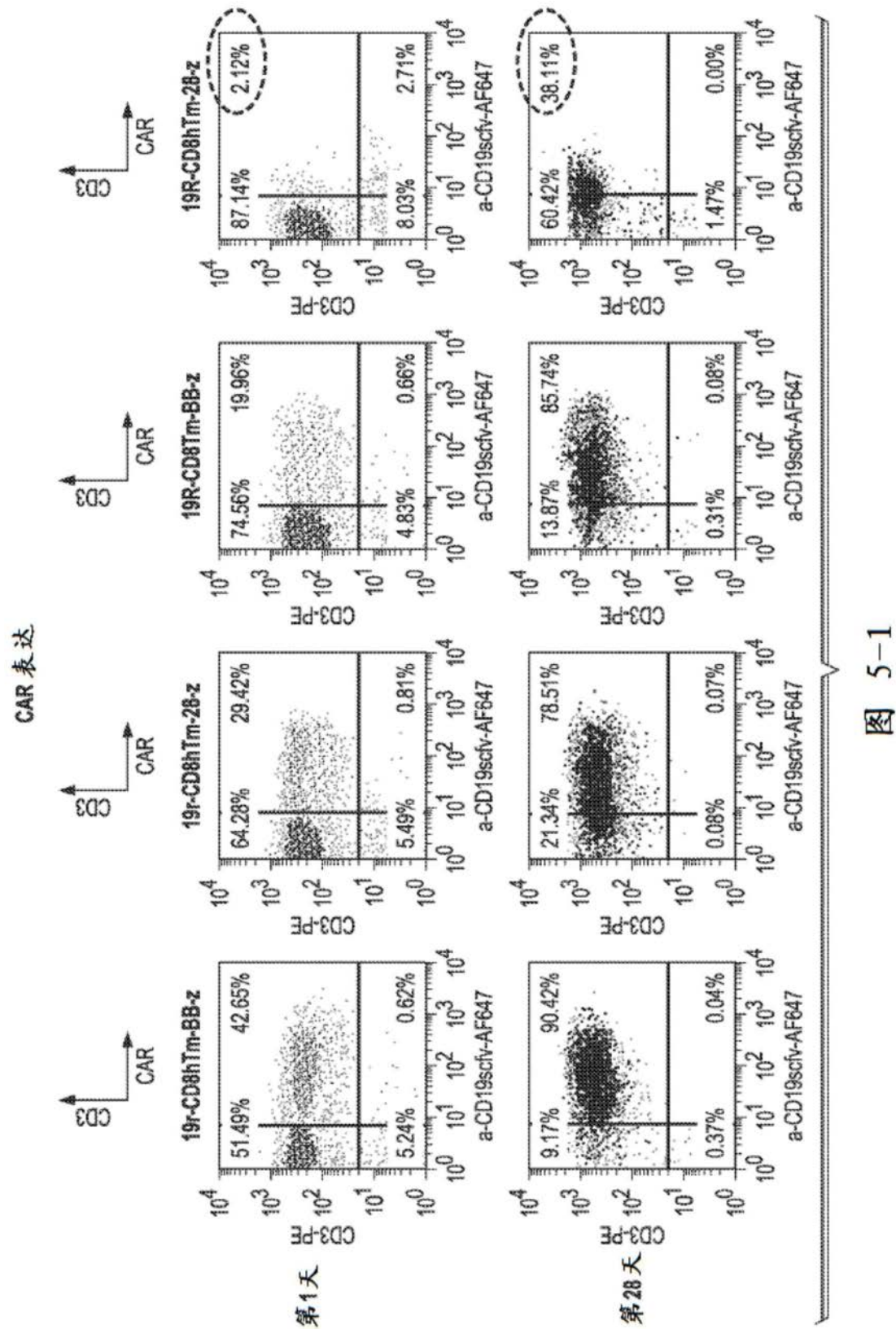


图5-1

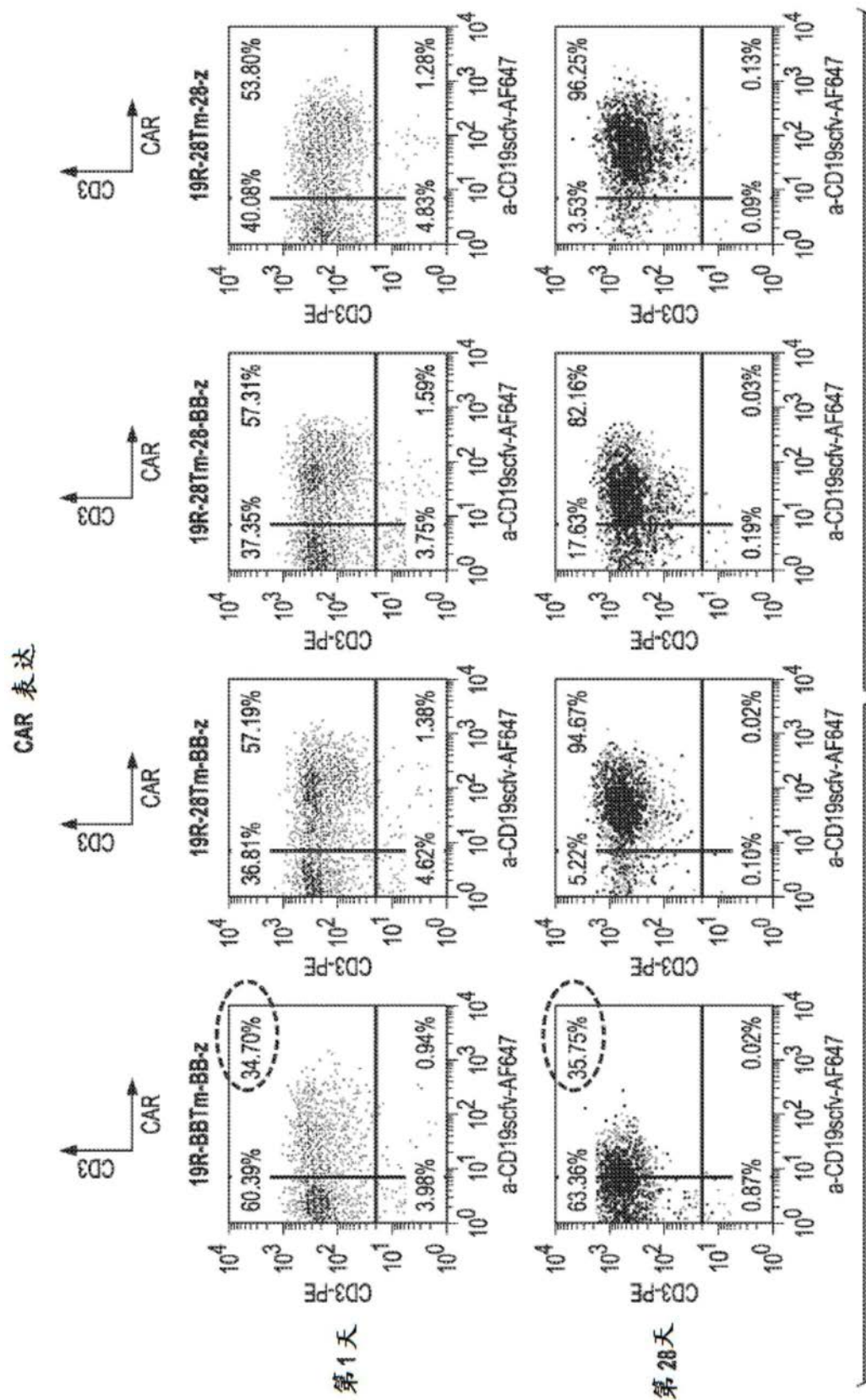


图 5-2

图5-2

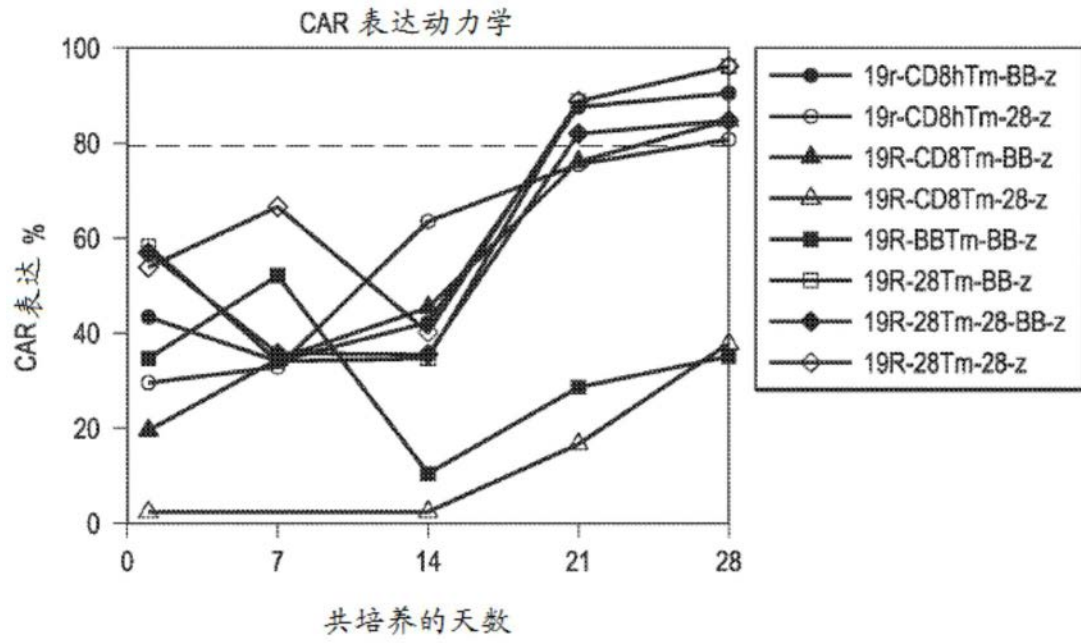


图6

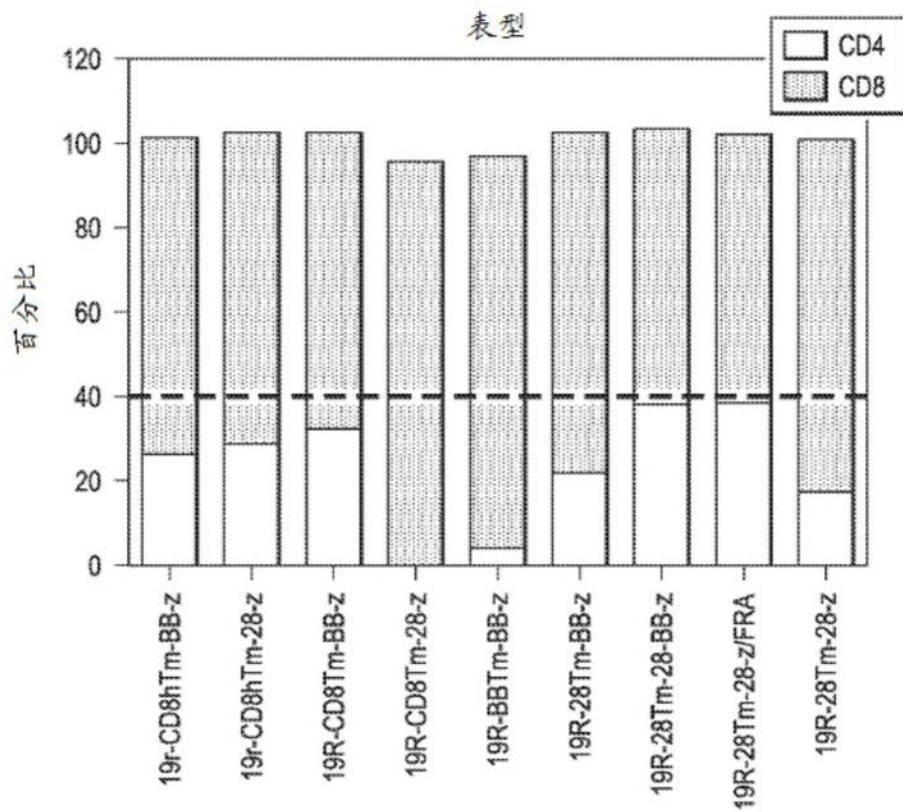


图7

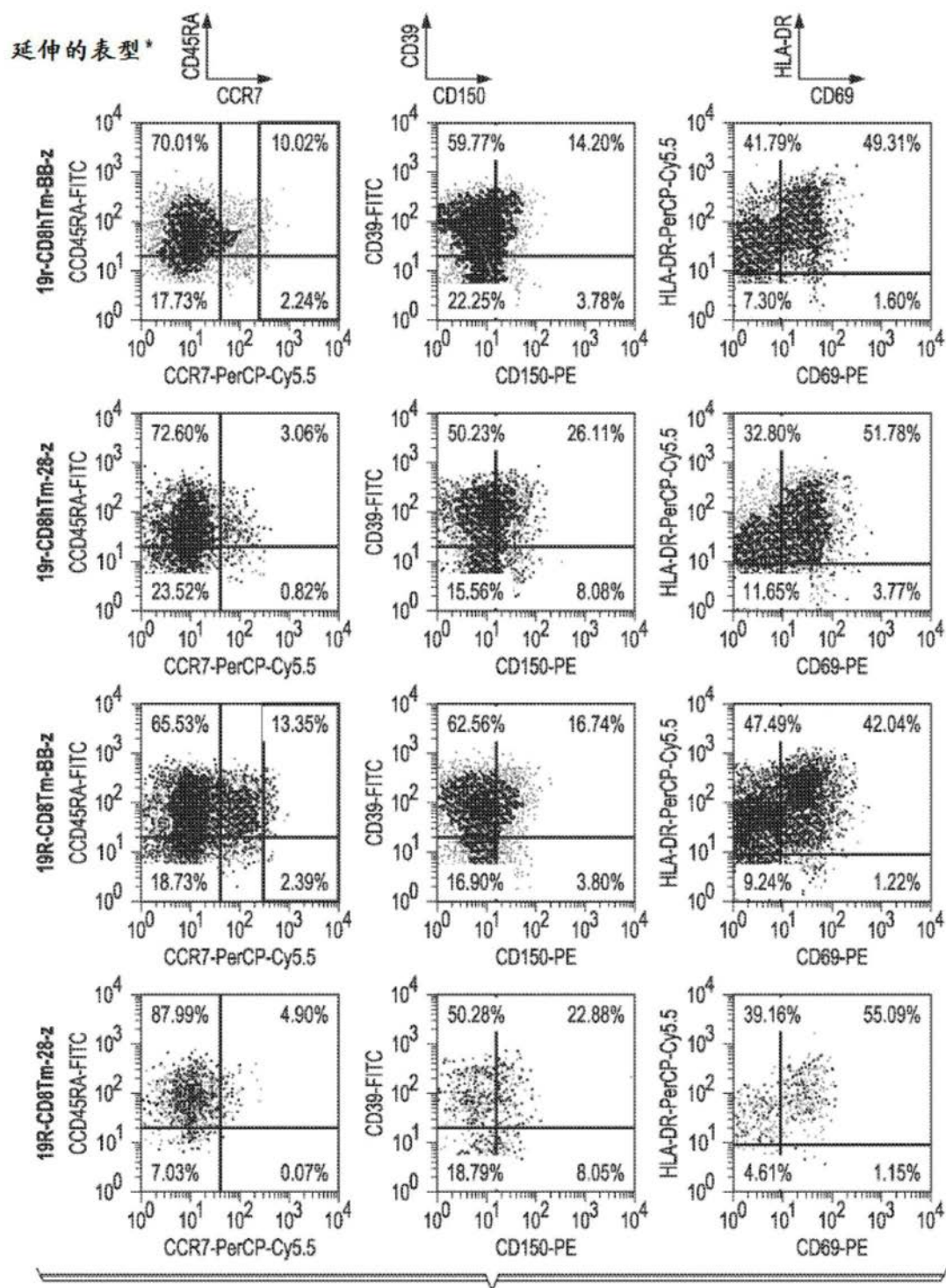


图 8A-1

图8A-1

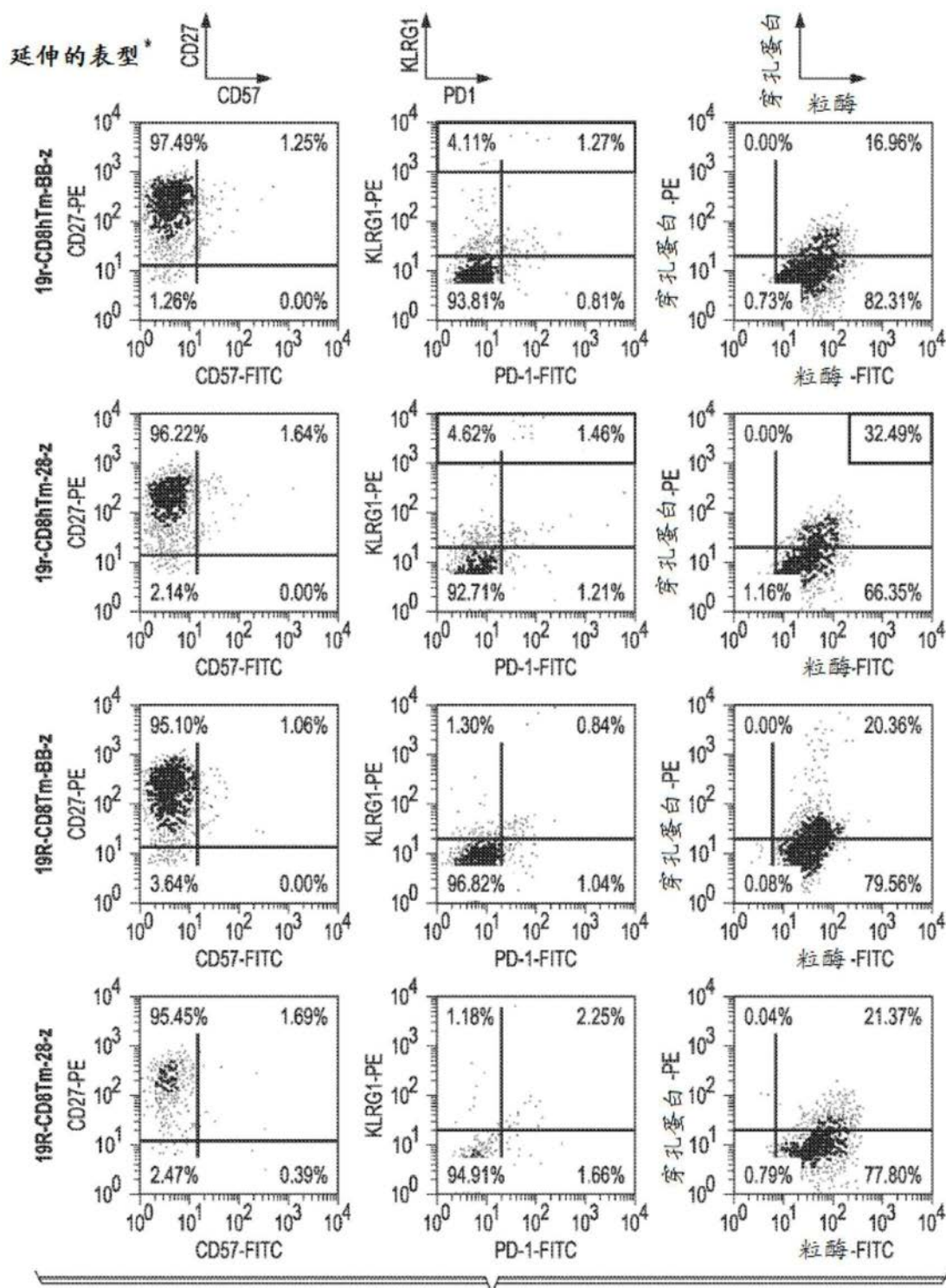


图 8A-2

图8A-2

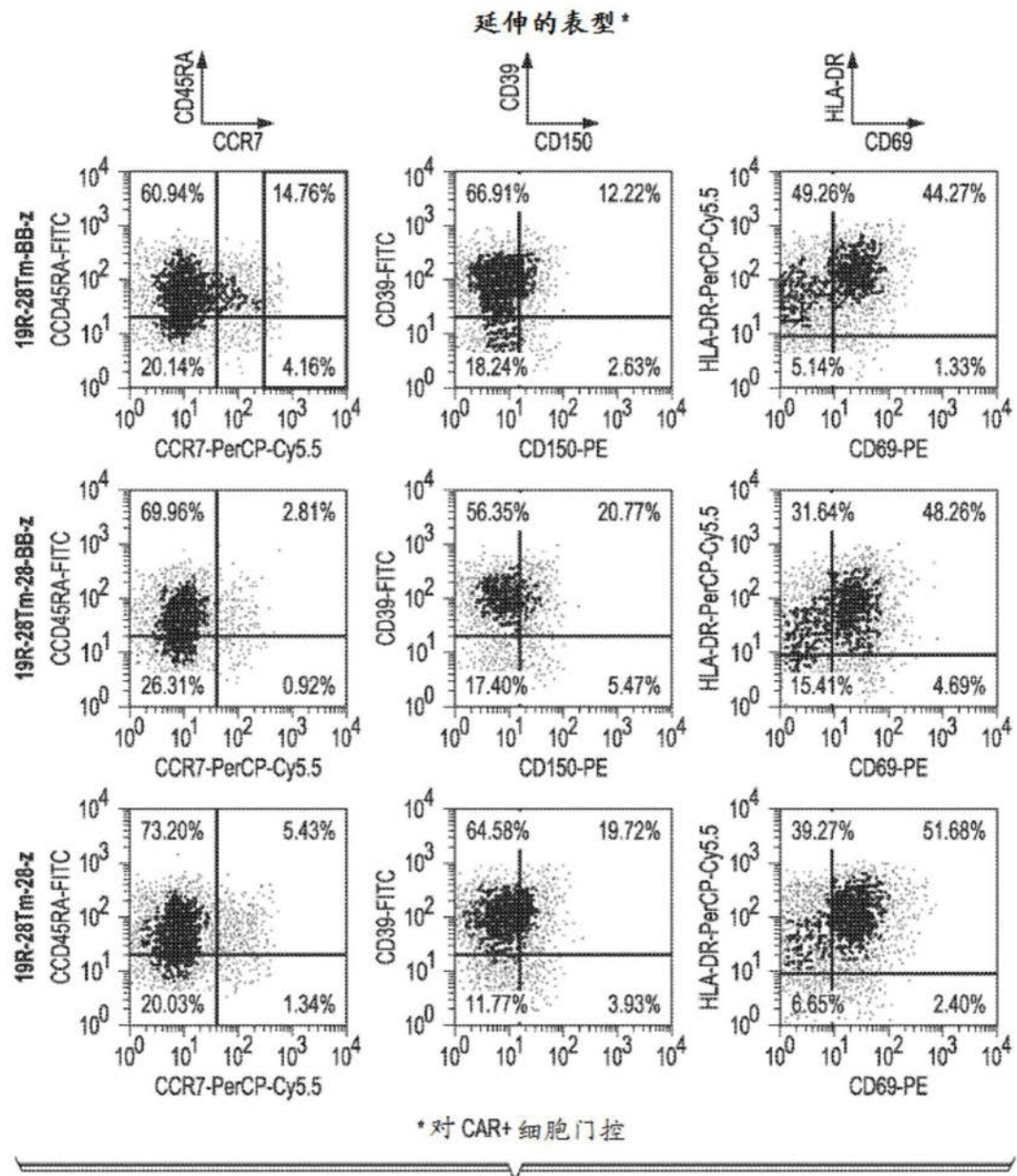


图 8B-1

图8B-1

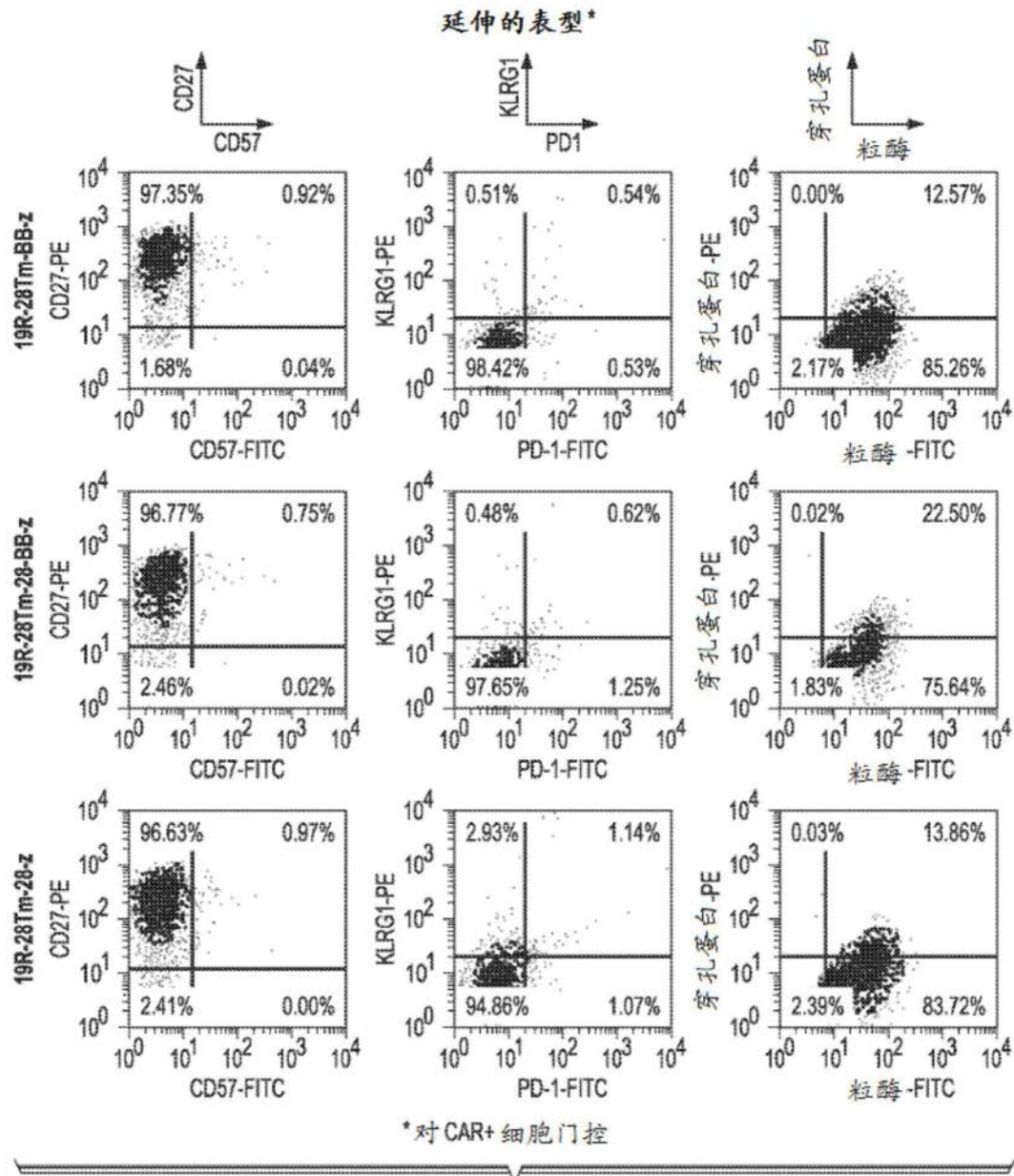


图 8B-2

图8B-2

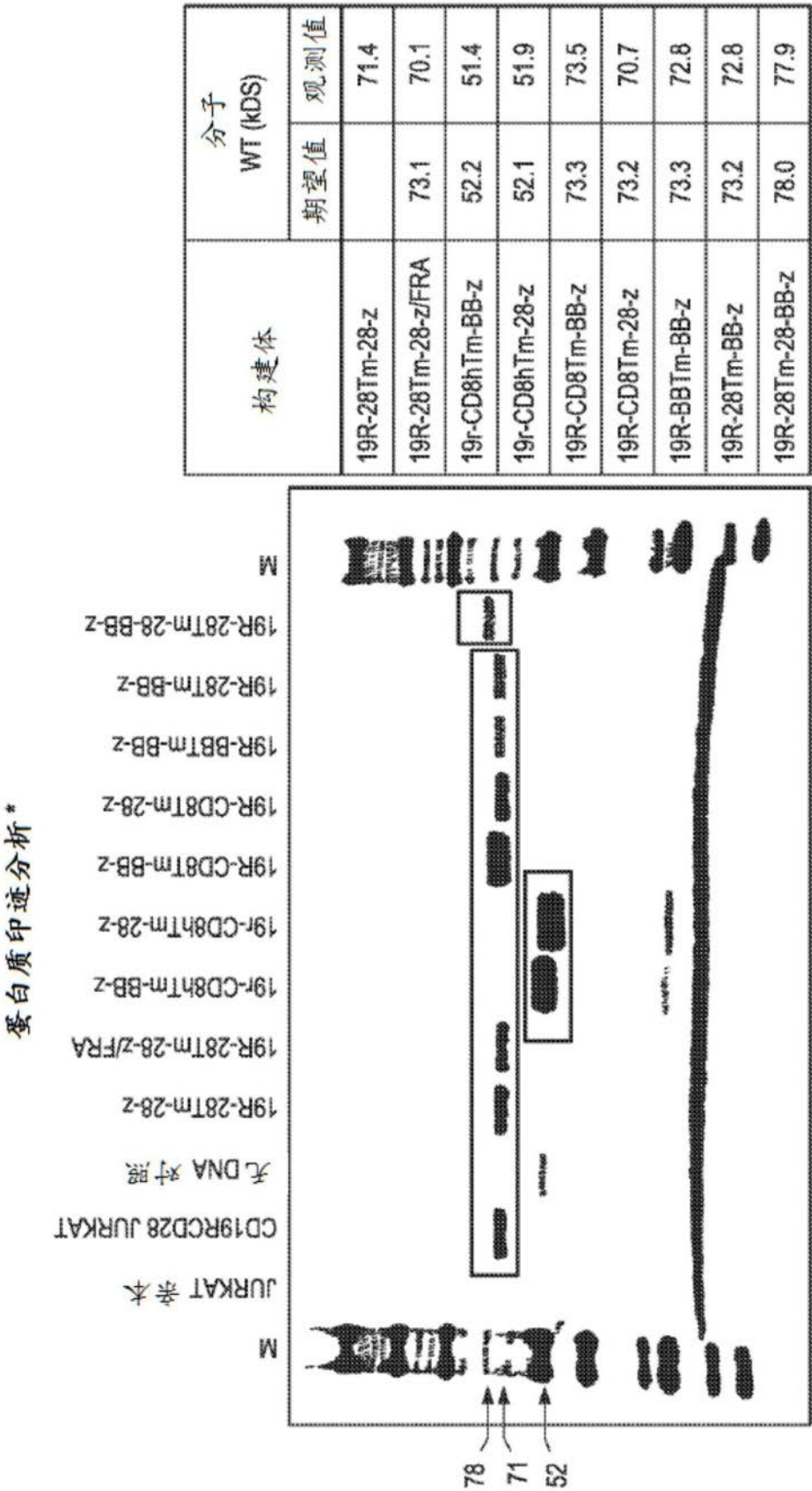


图9

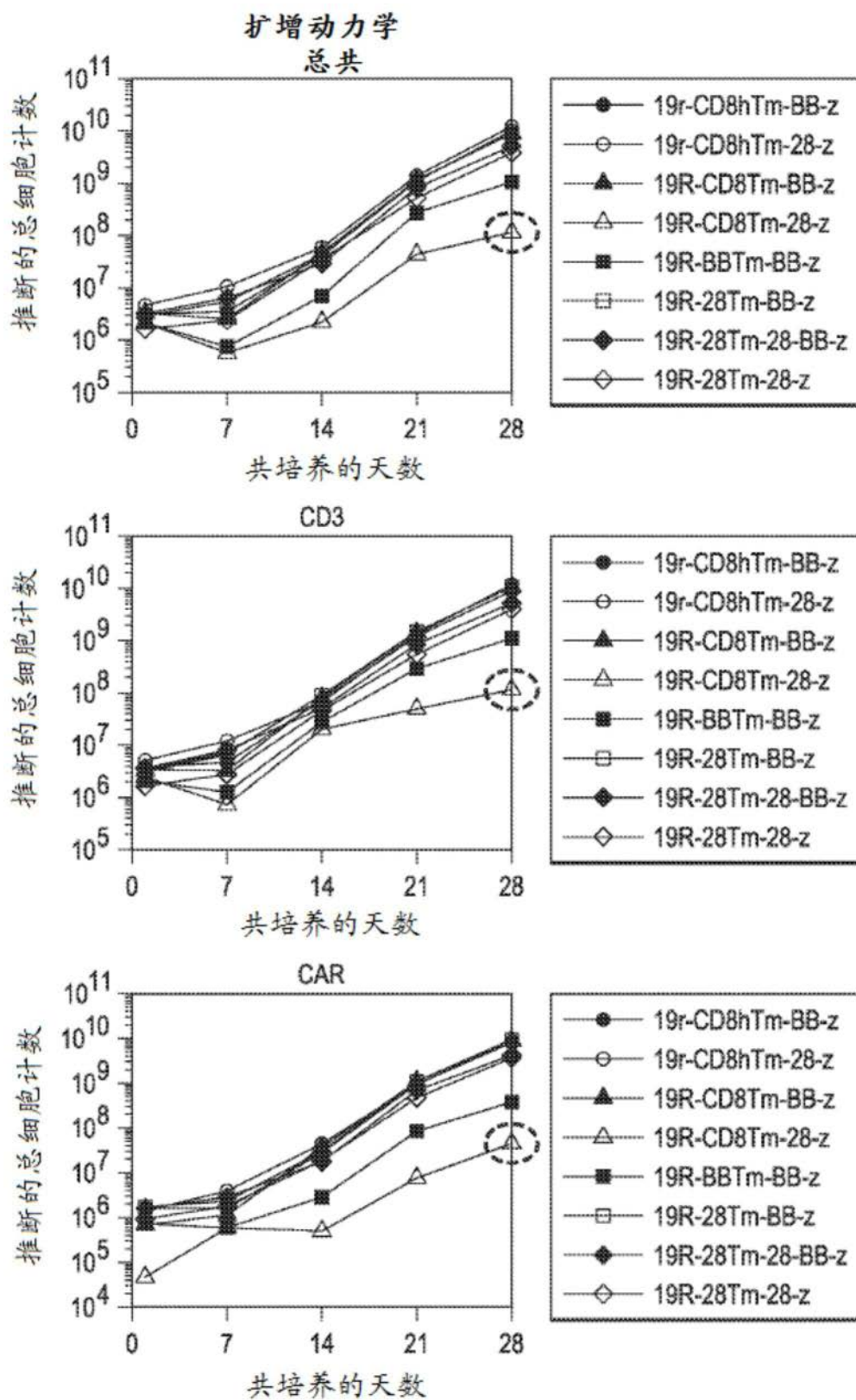


图10

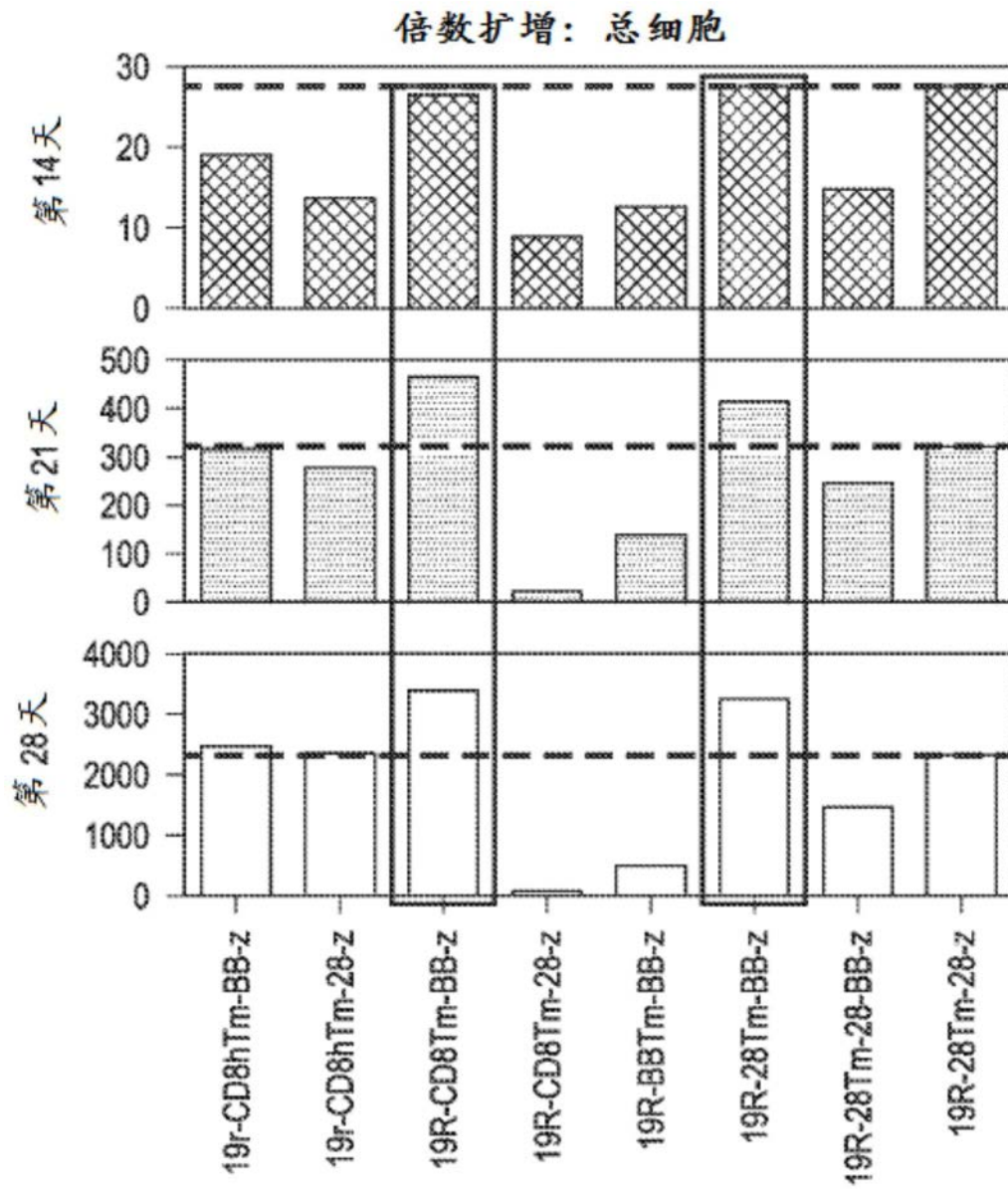


图11

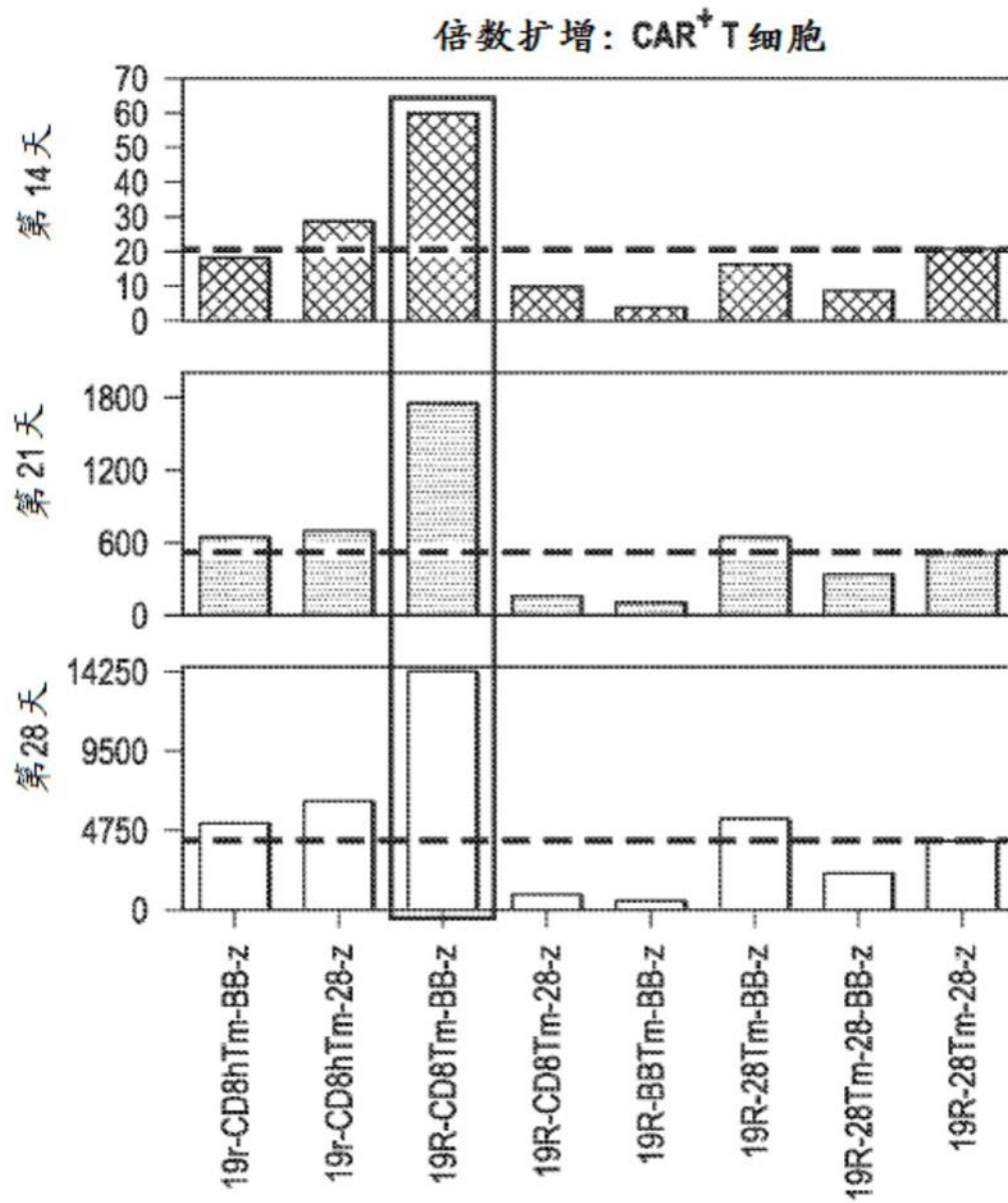


图12

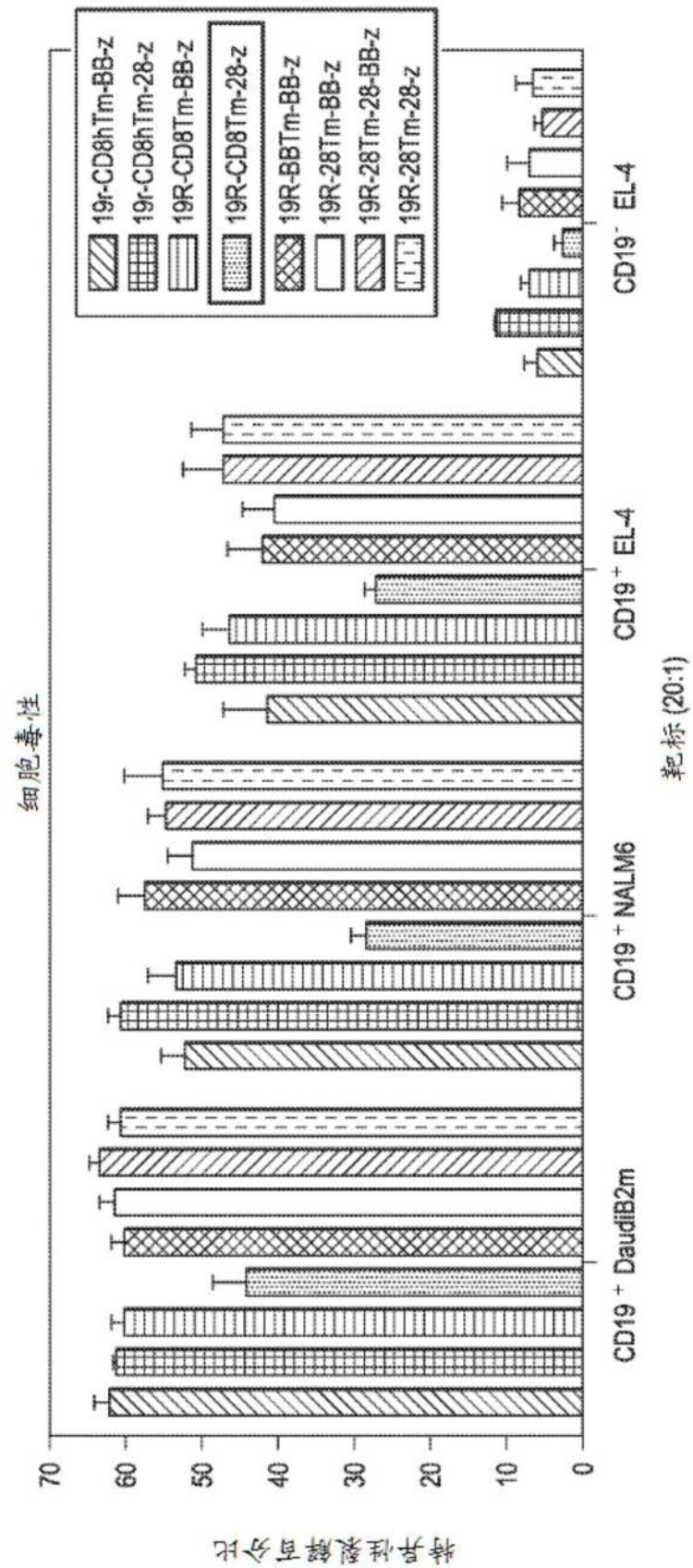


图13

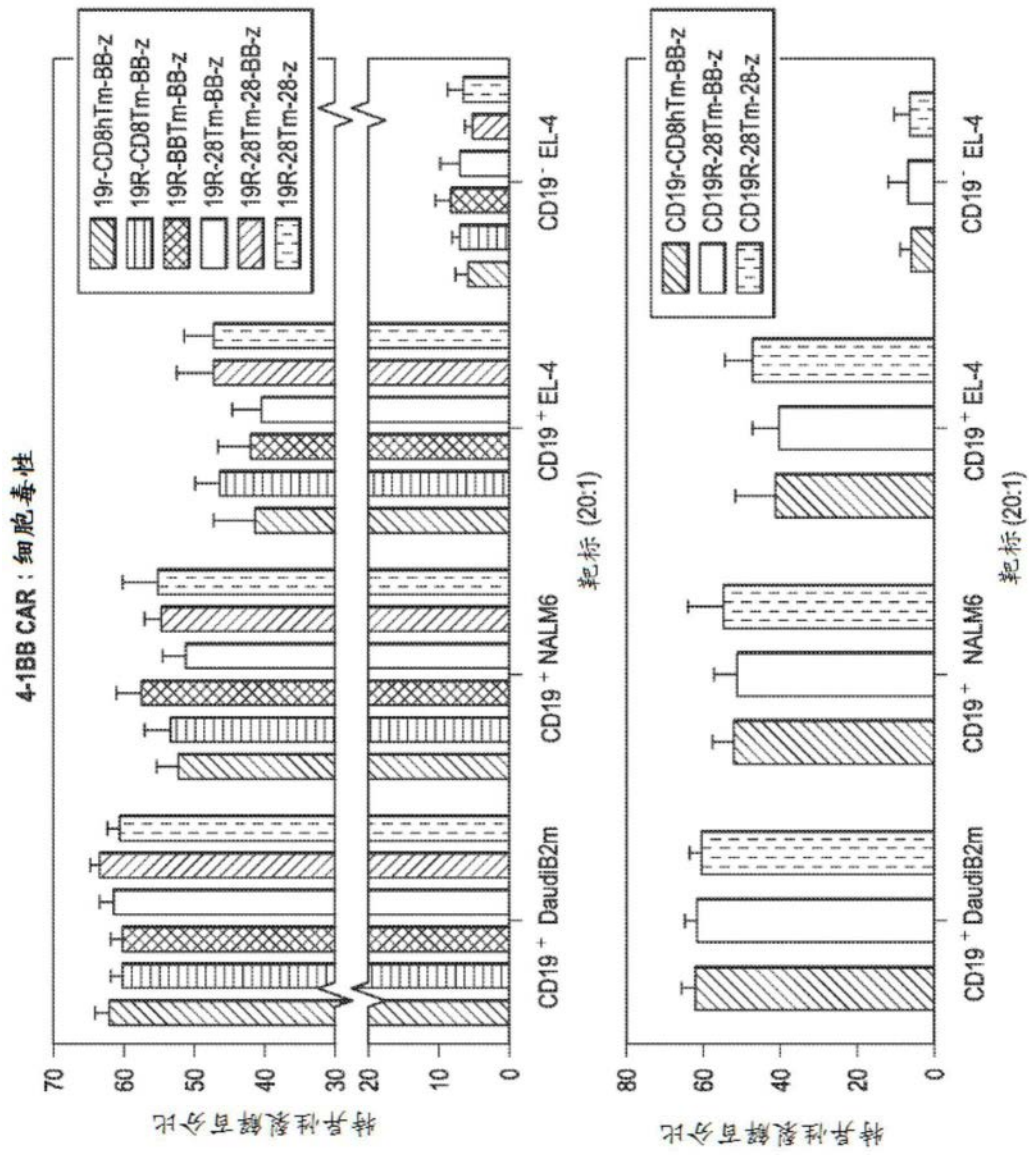


图14

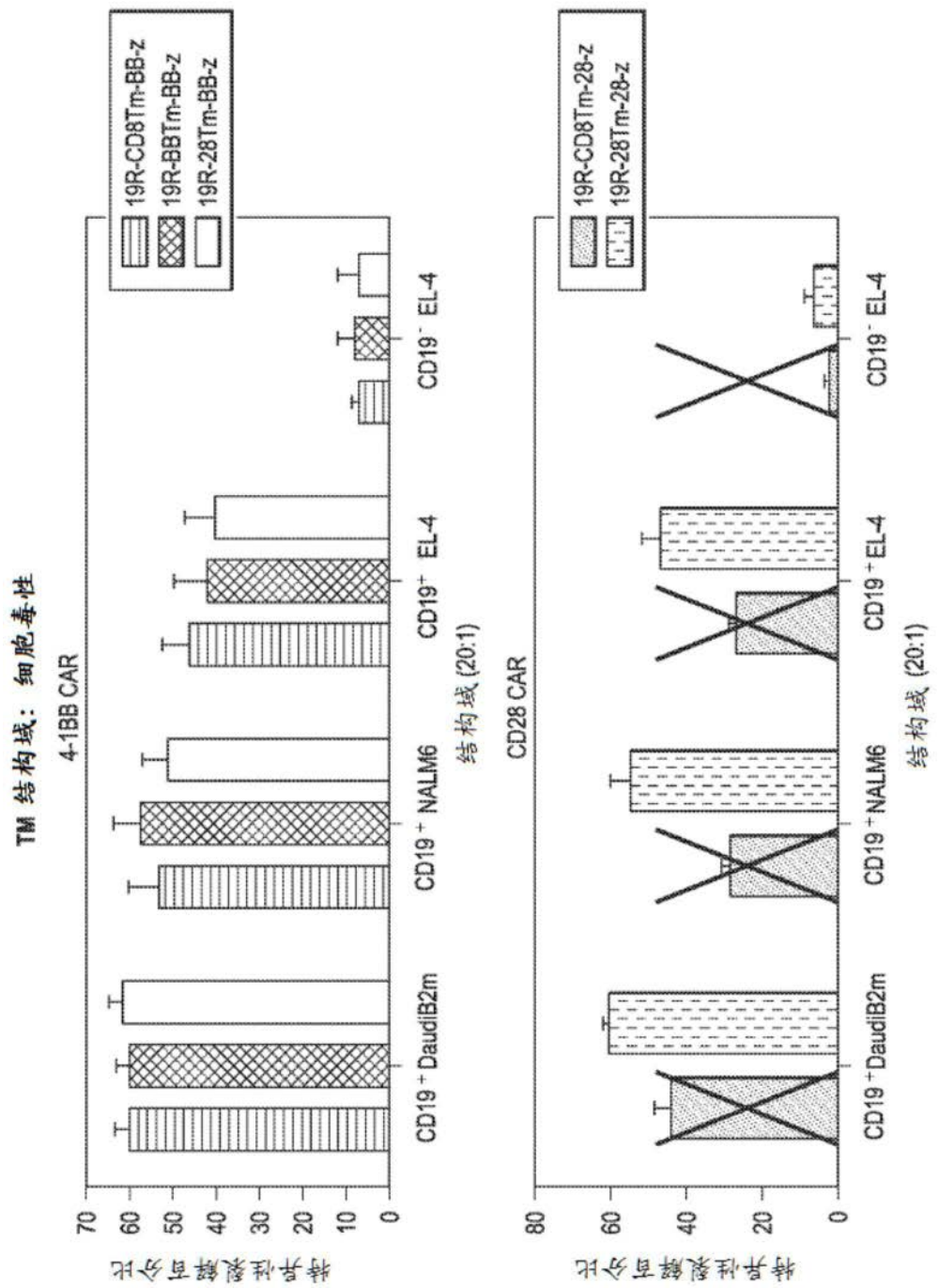


图15

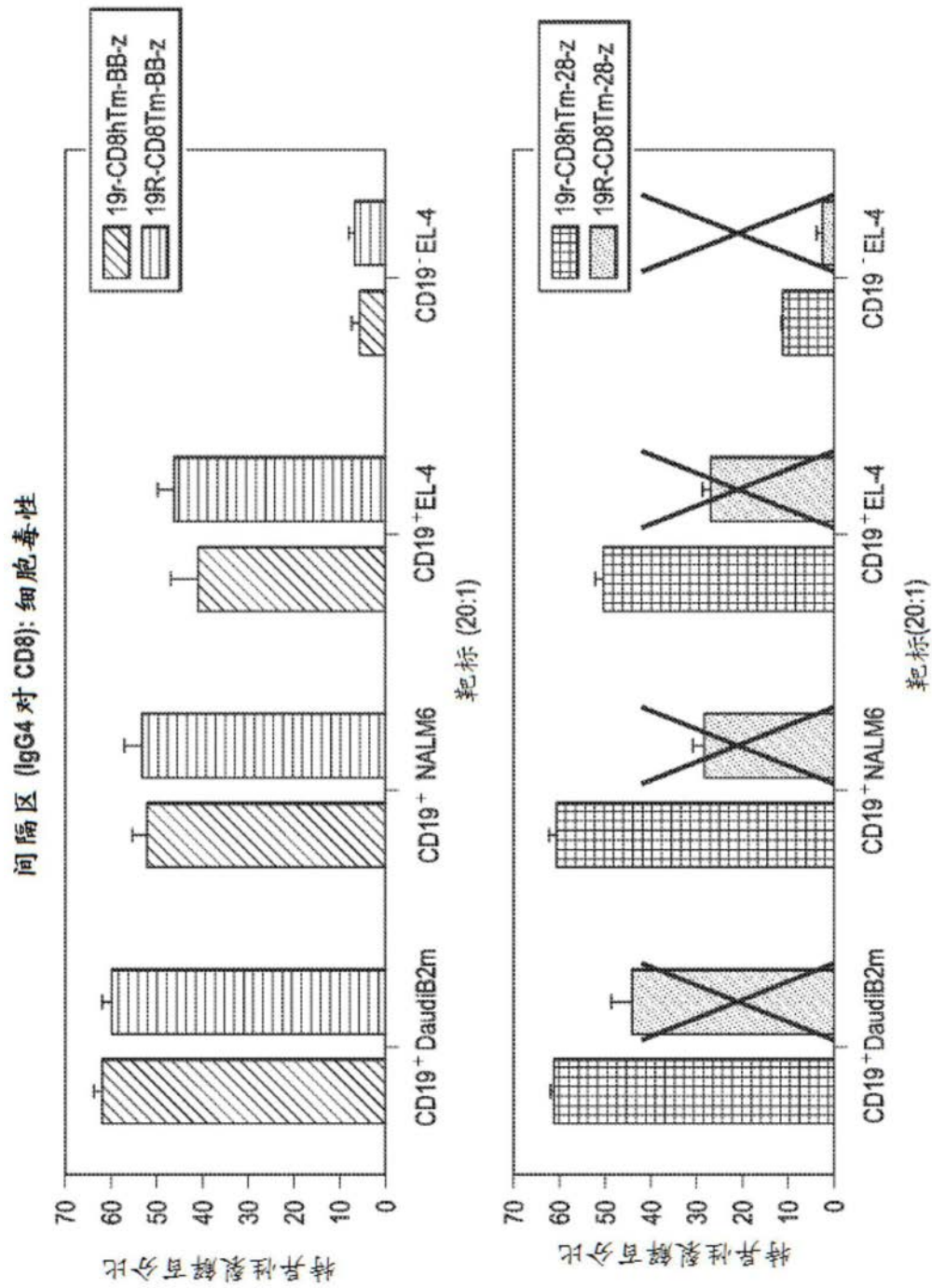


图16

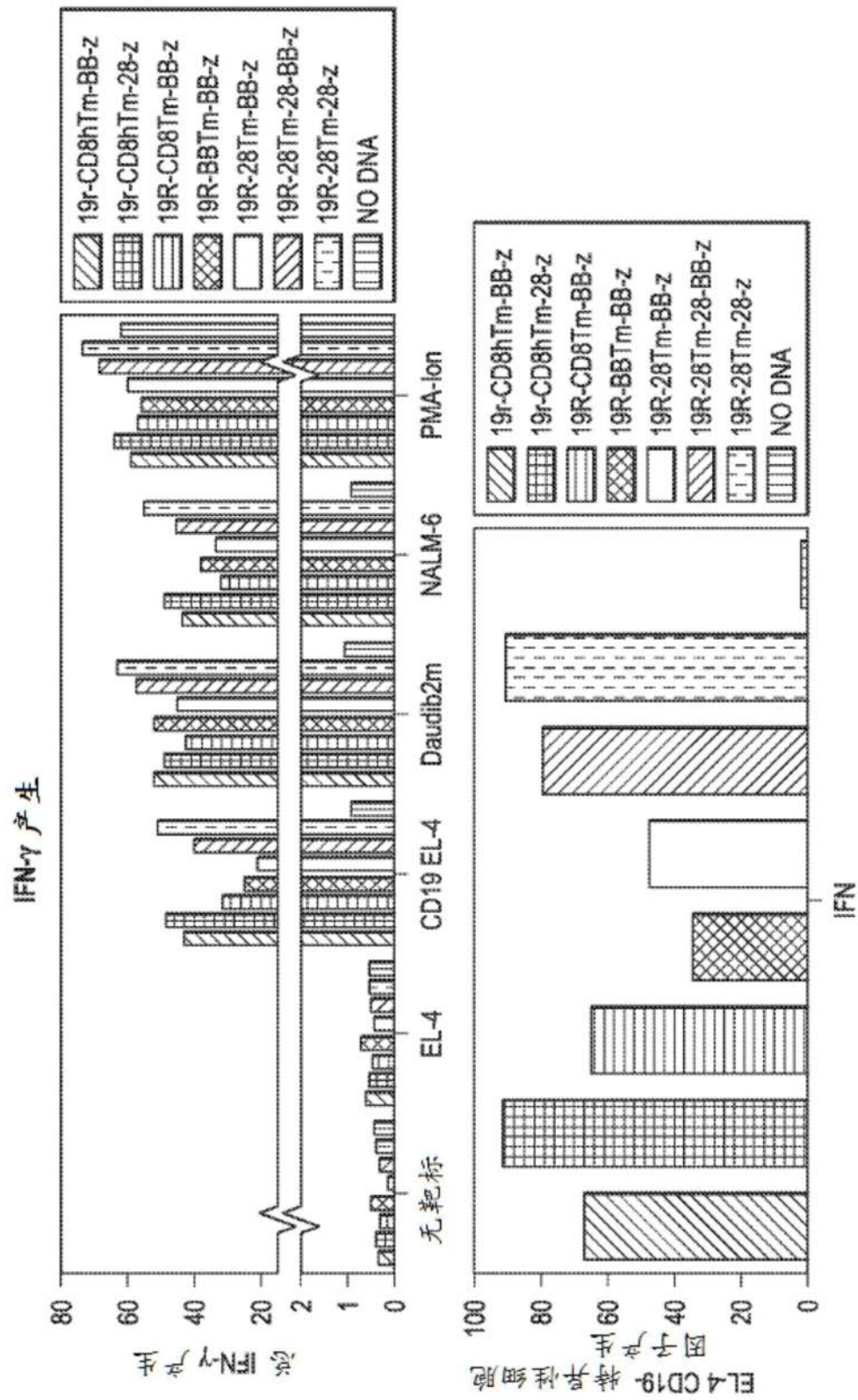


图17

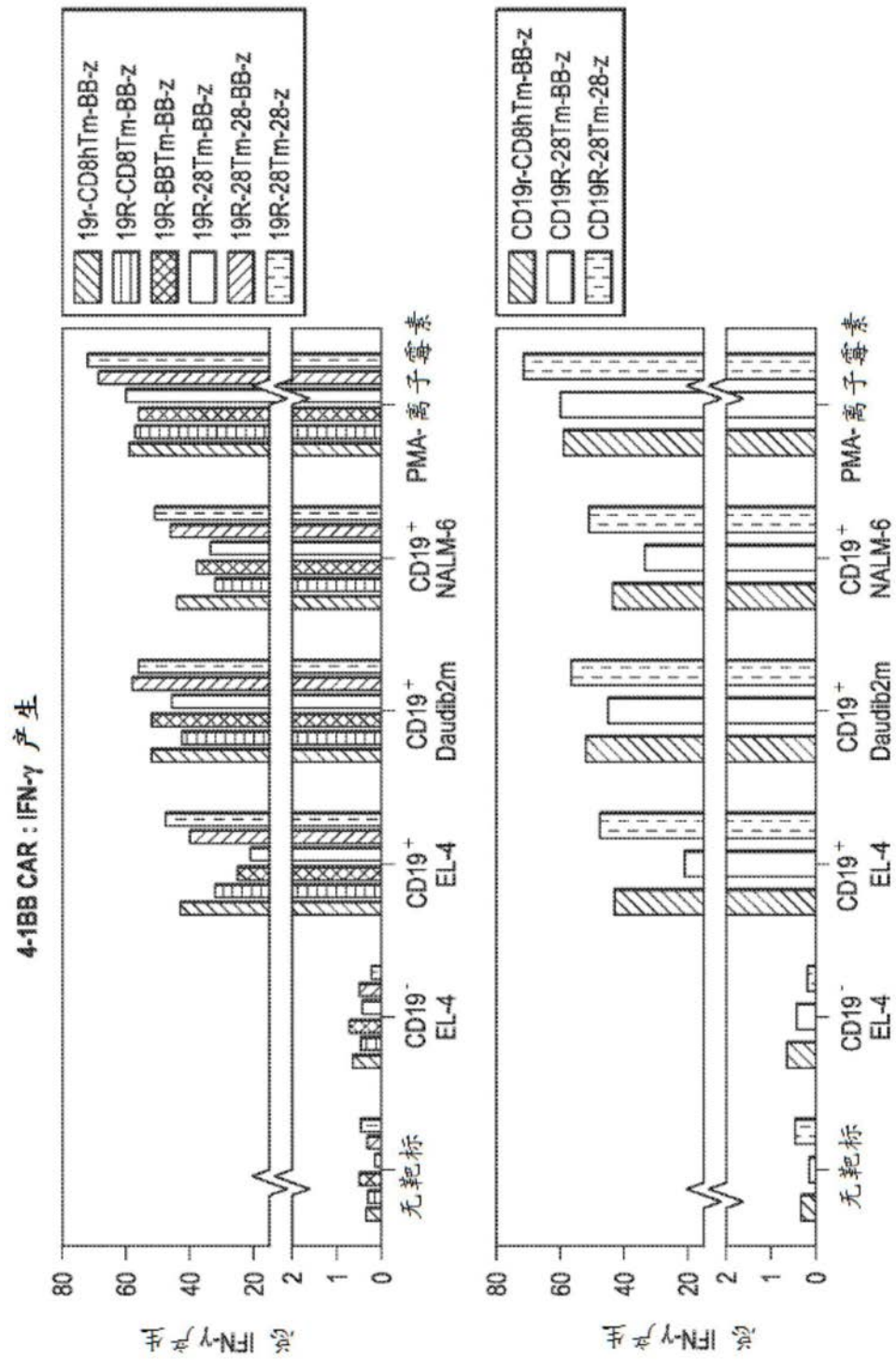


图18

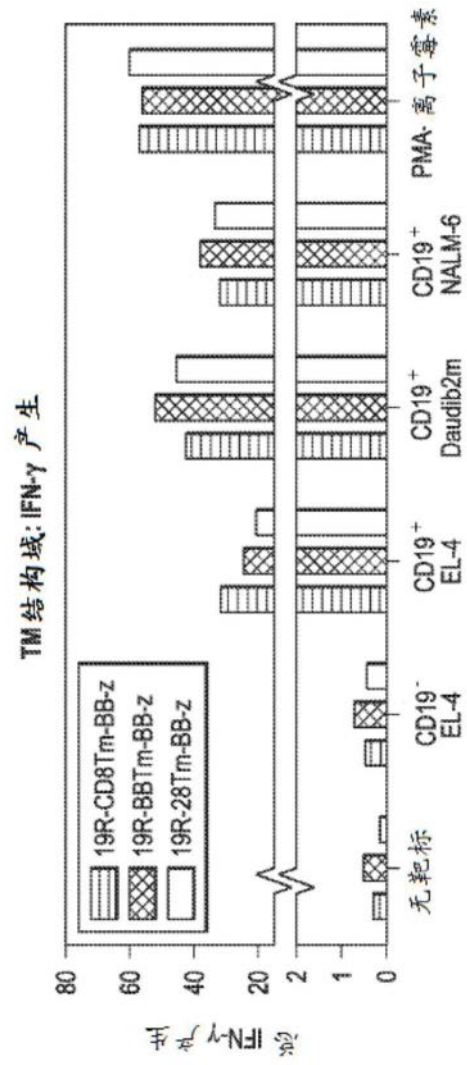


图19

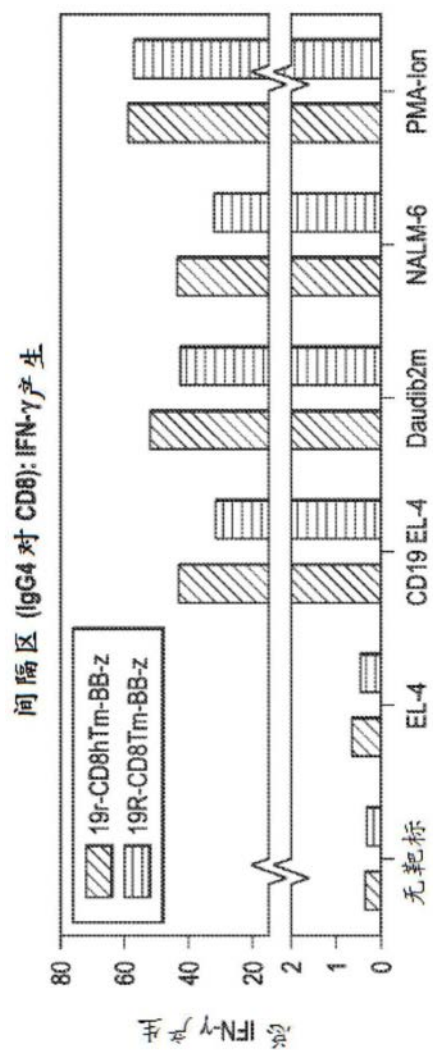


图20

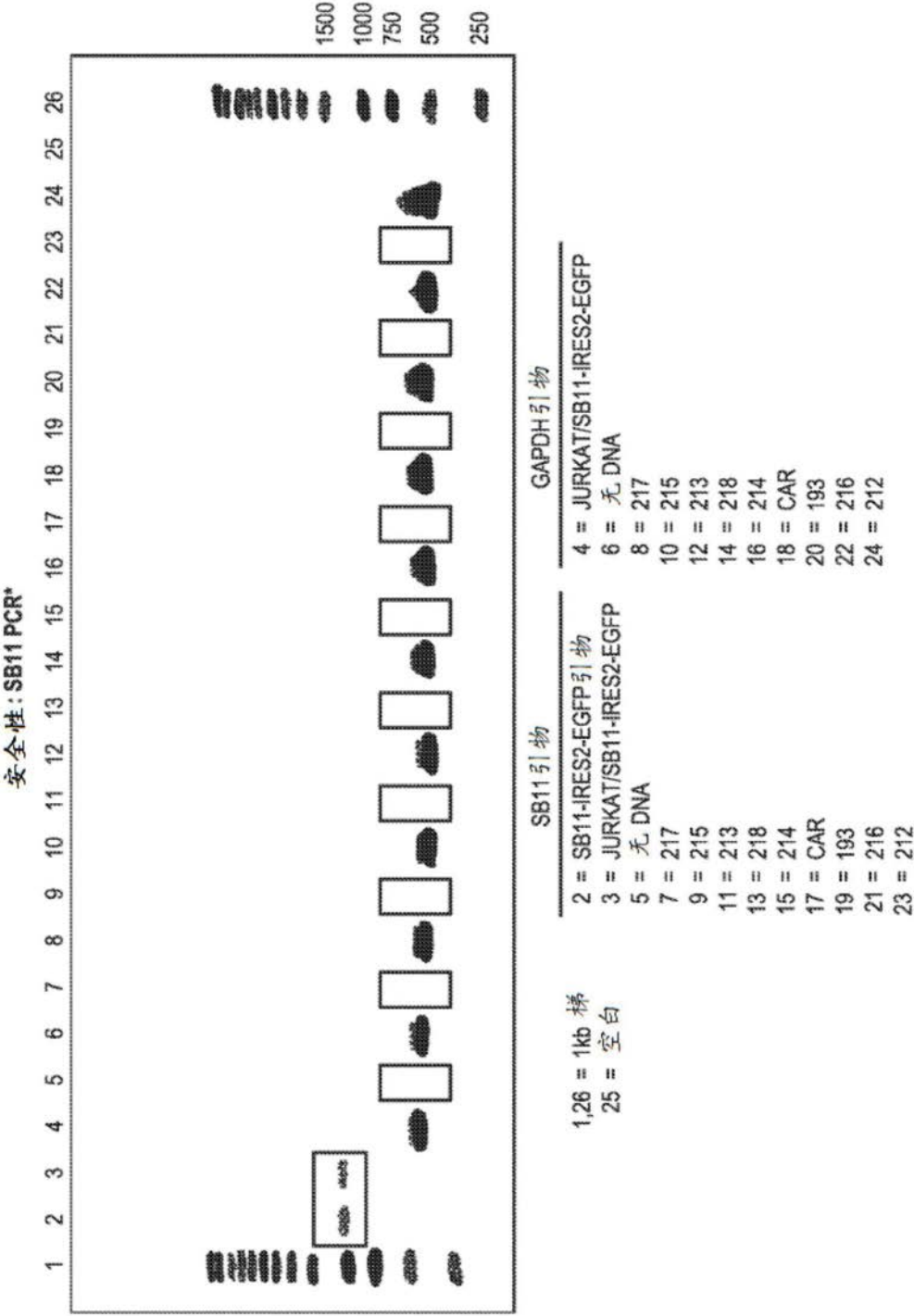


图21

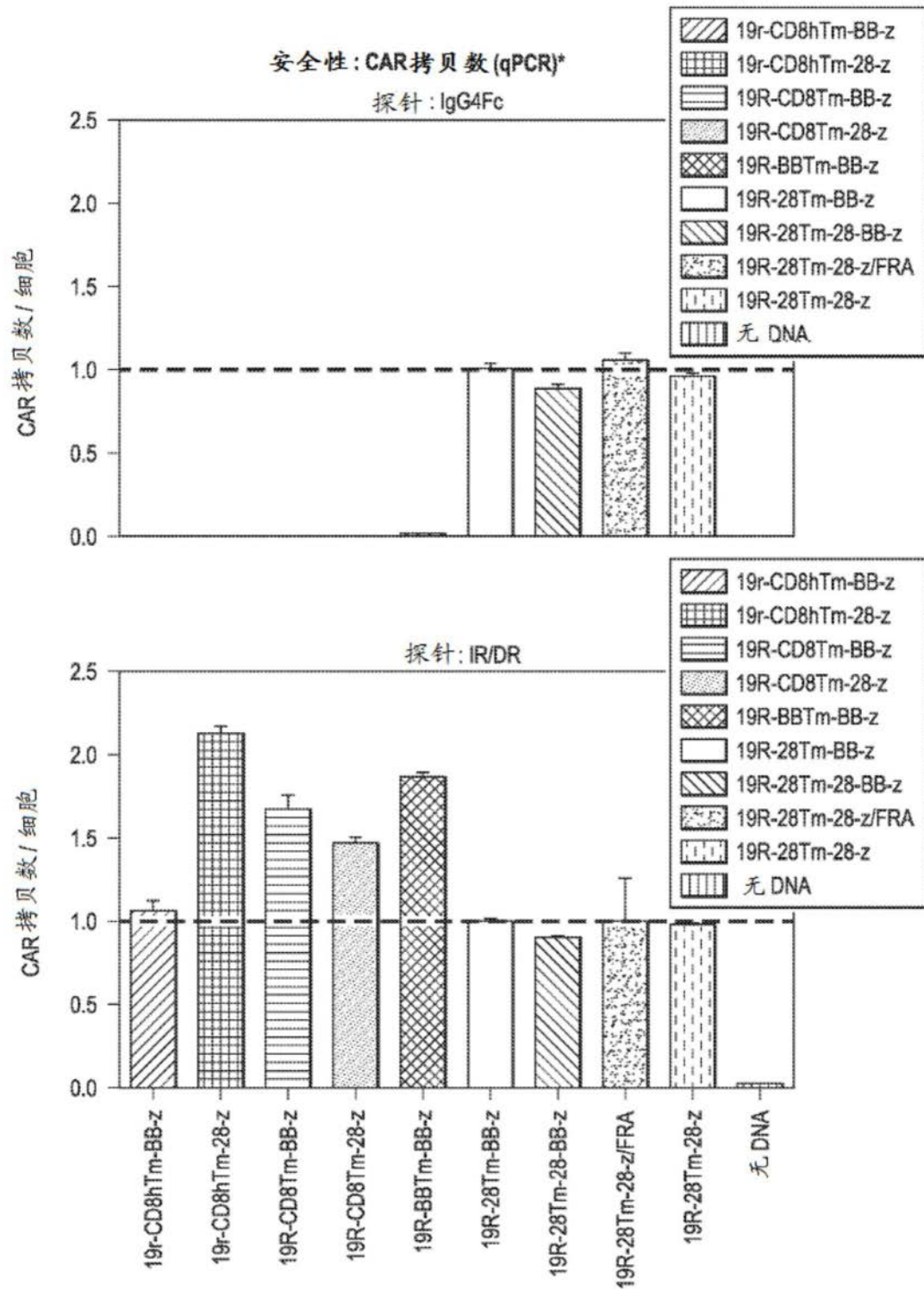


图22

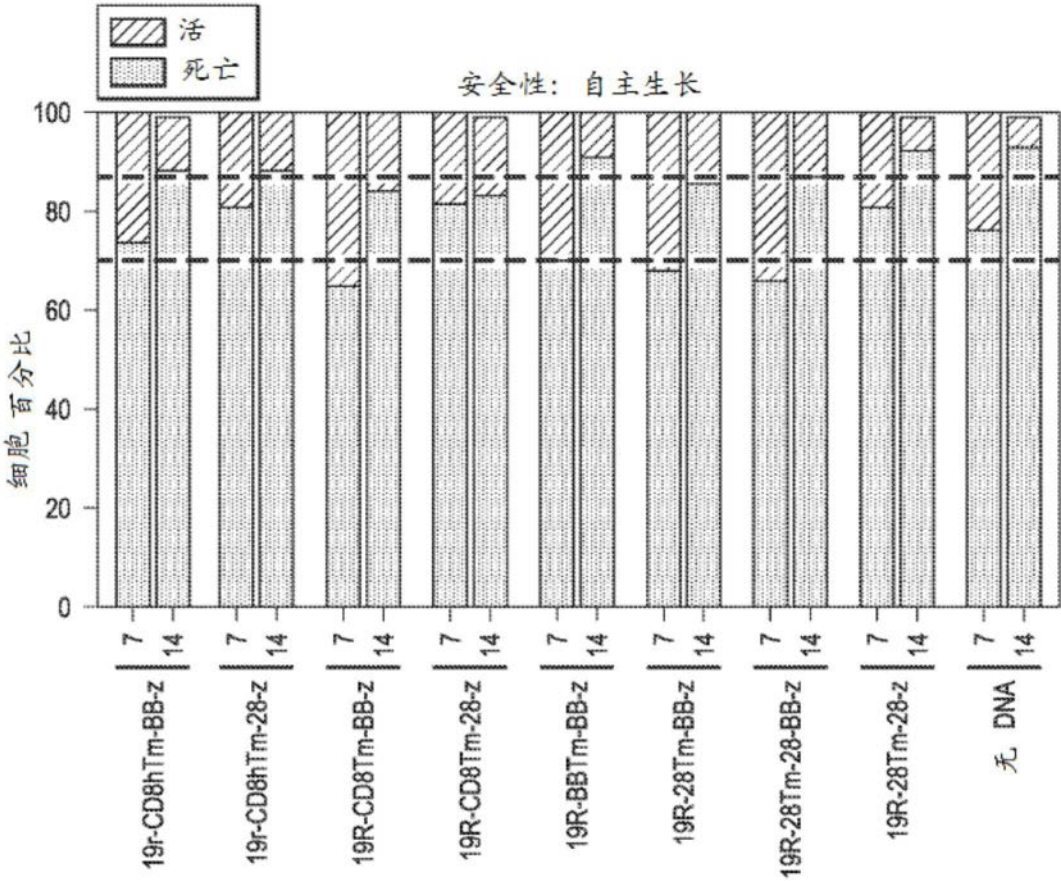


图23

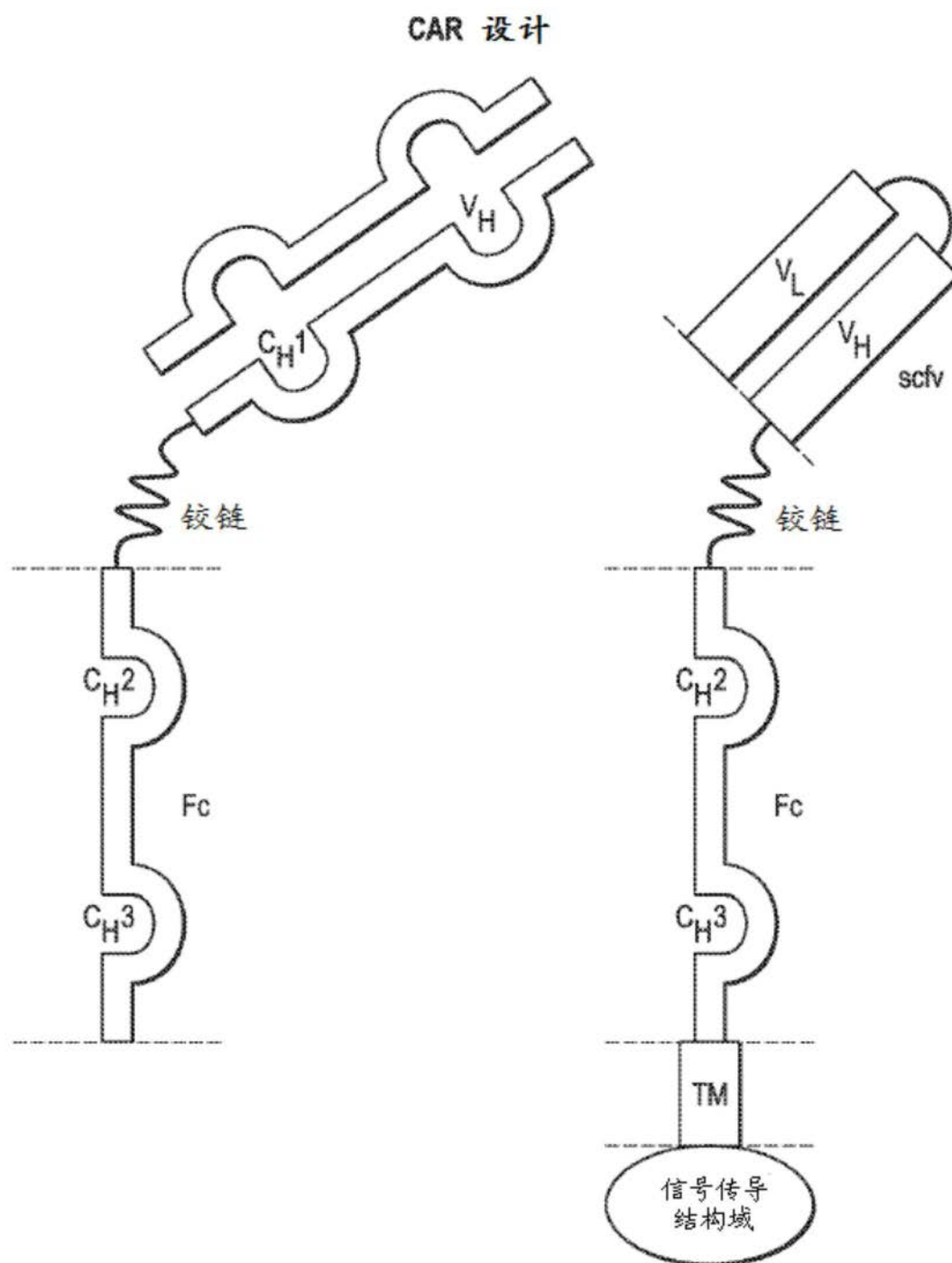


图24

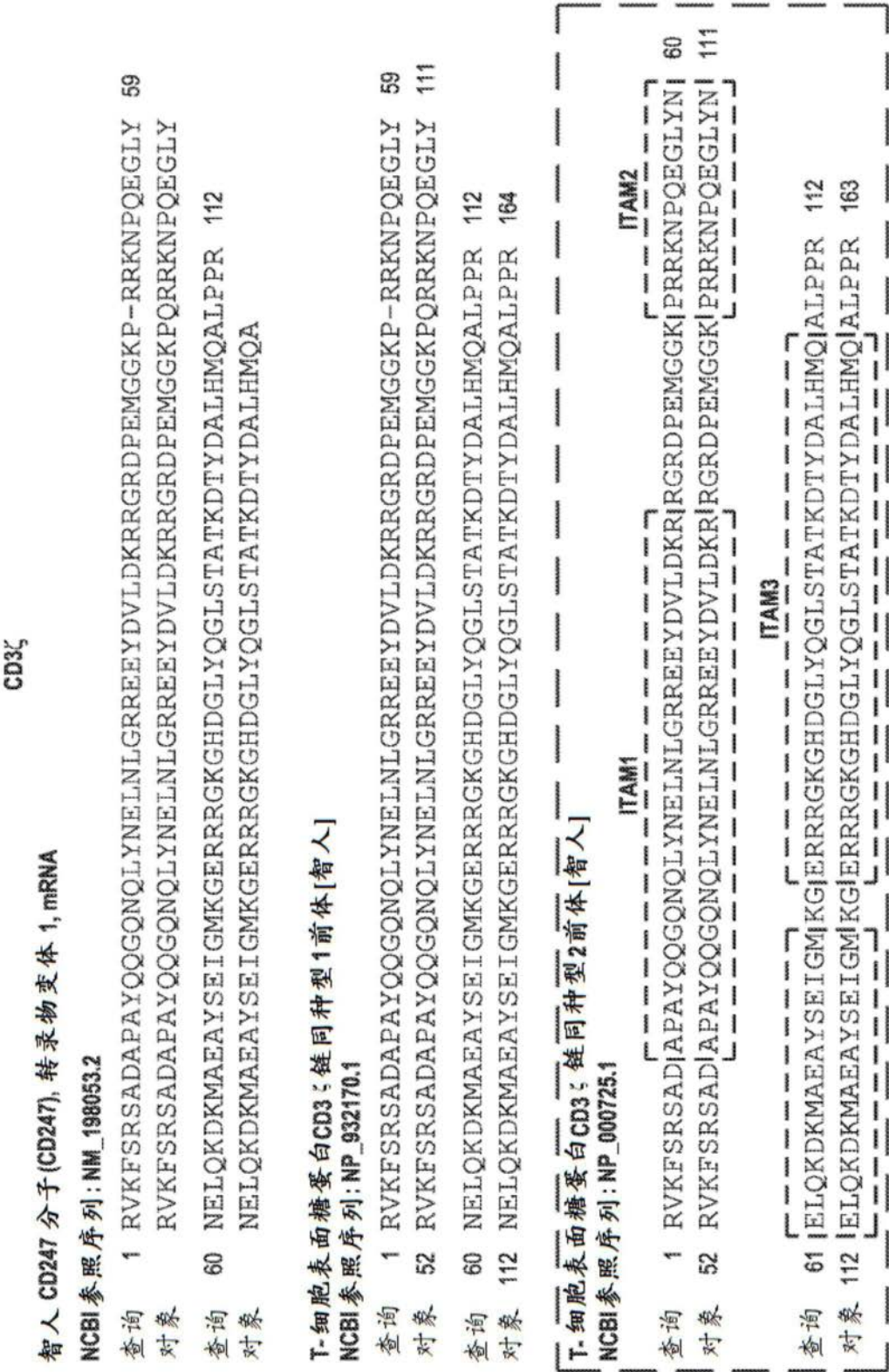


图25

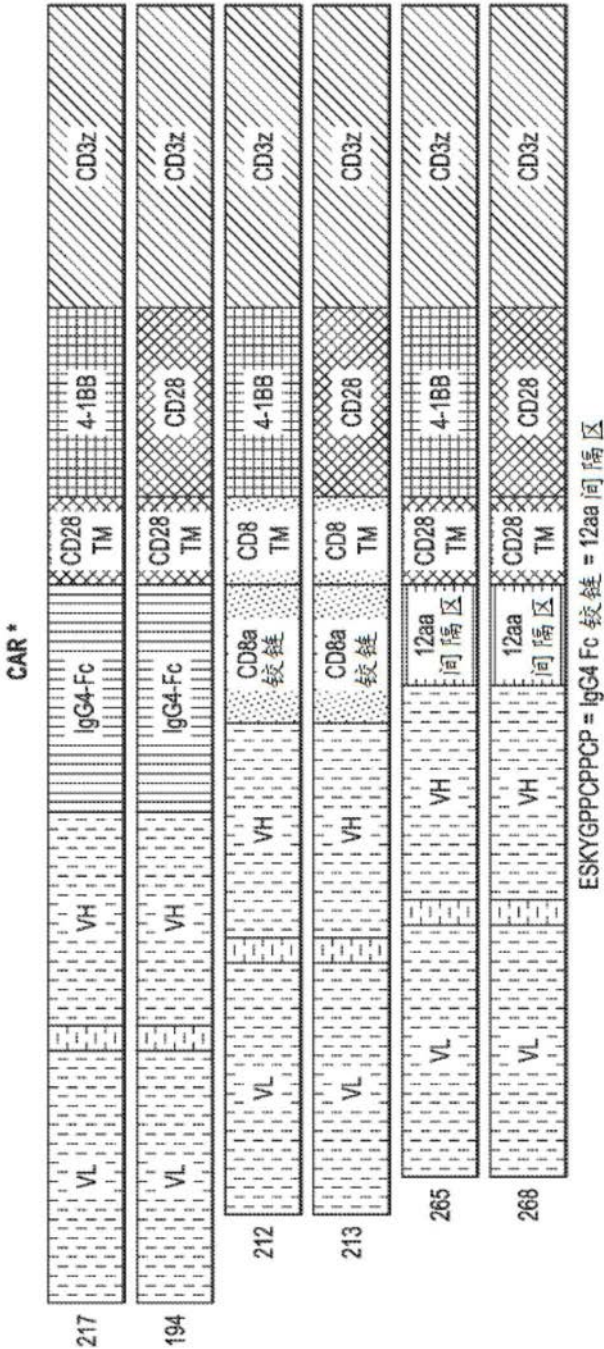


图26

CAR → 间隔区	COOPER	
	CD28	CD137
Fc (230aa)	194	217
CD8 (47aa)	213	212
短 (12aa)	265	268
CD3 ζ	WT	WT

图27

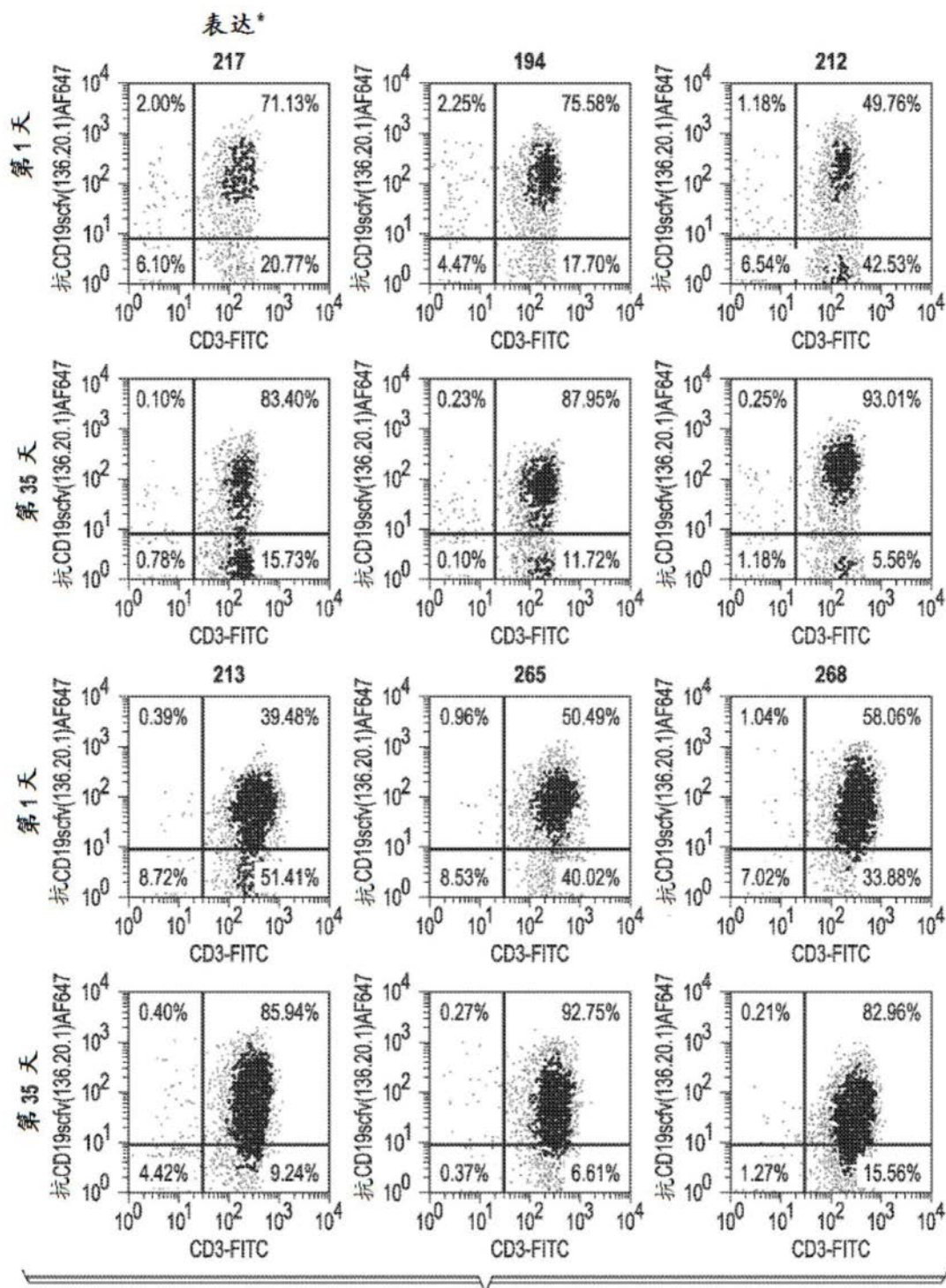


图 28

图28

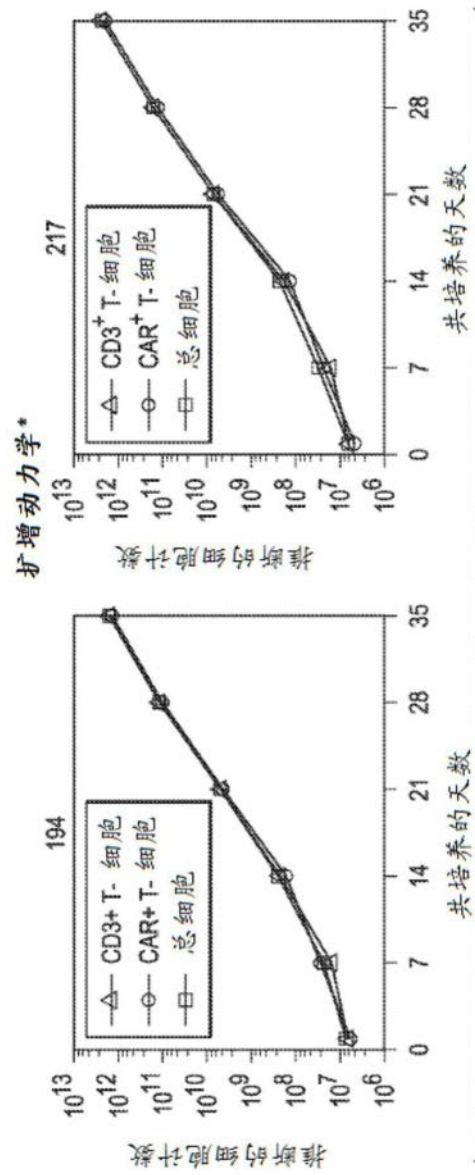


图 29

图29

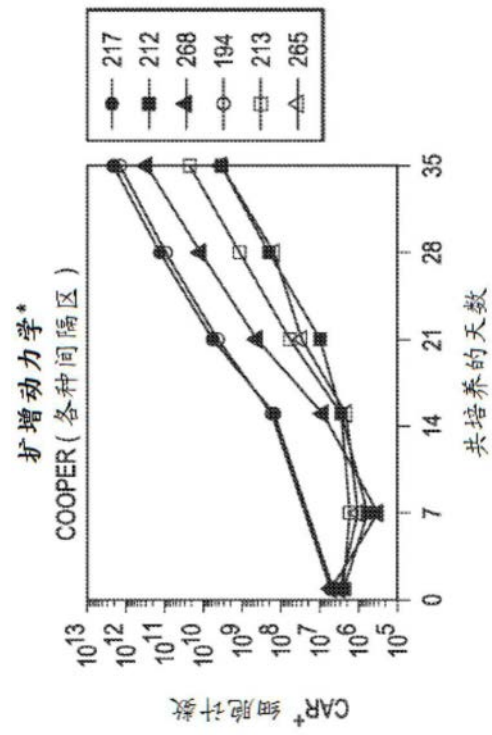


图30

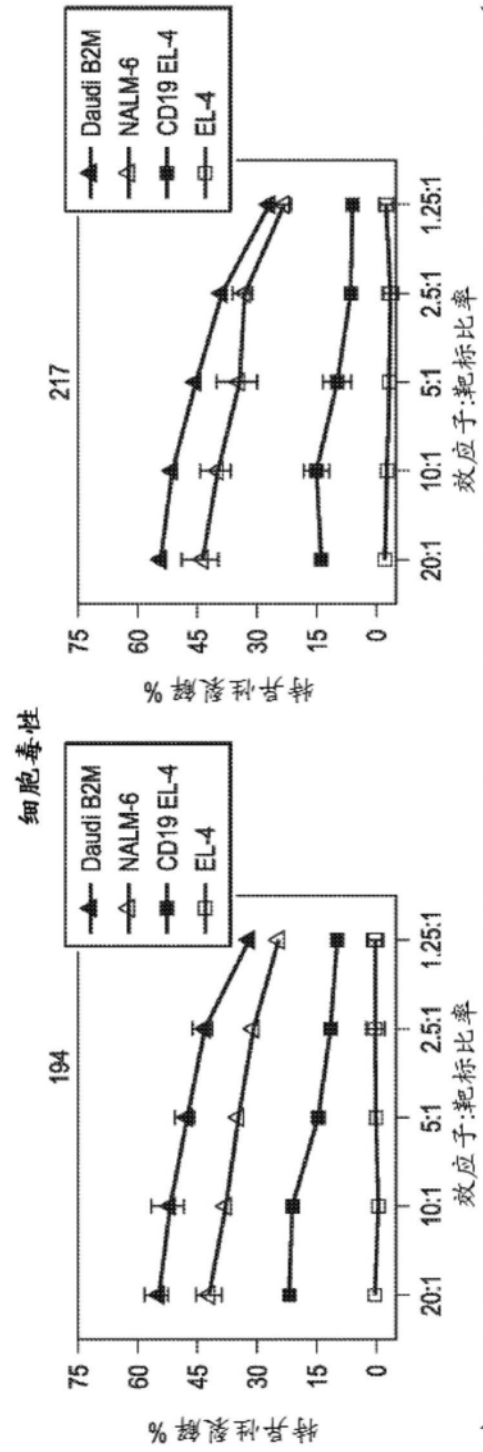


图 31

图31

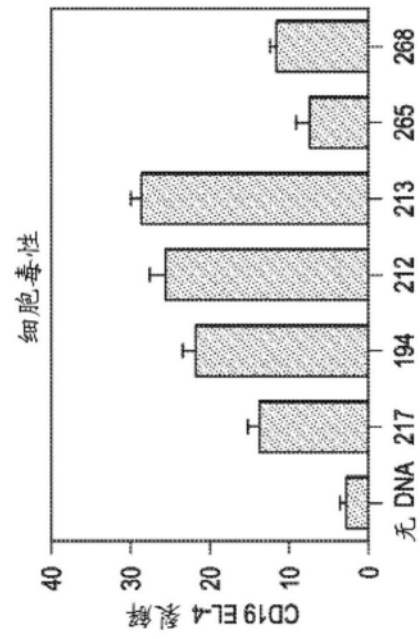


图32

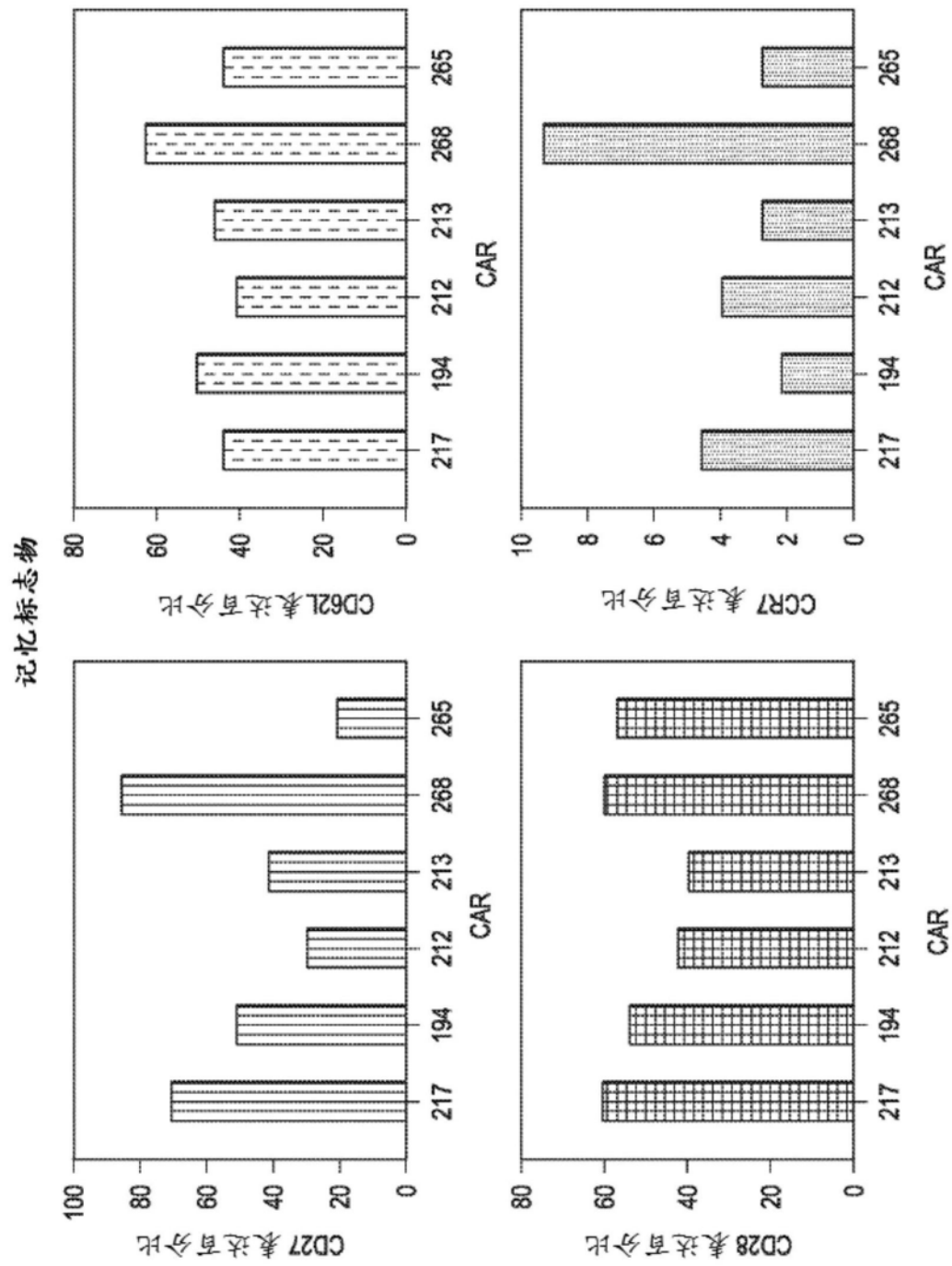


图33

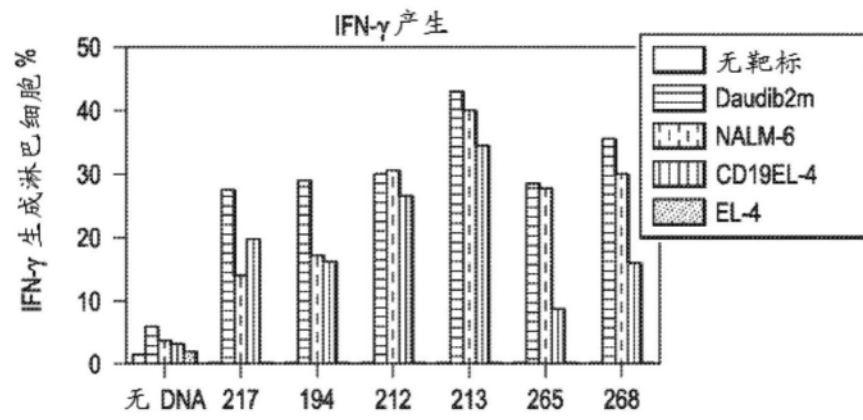


图34

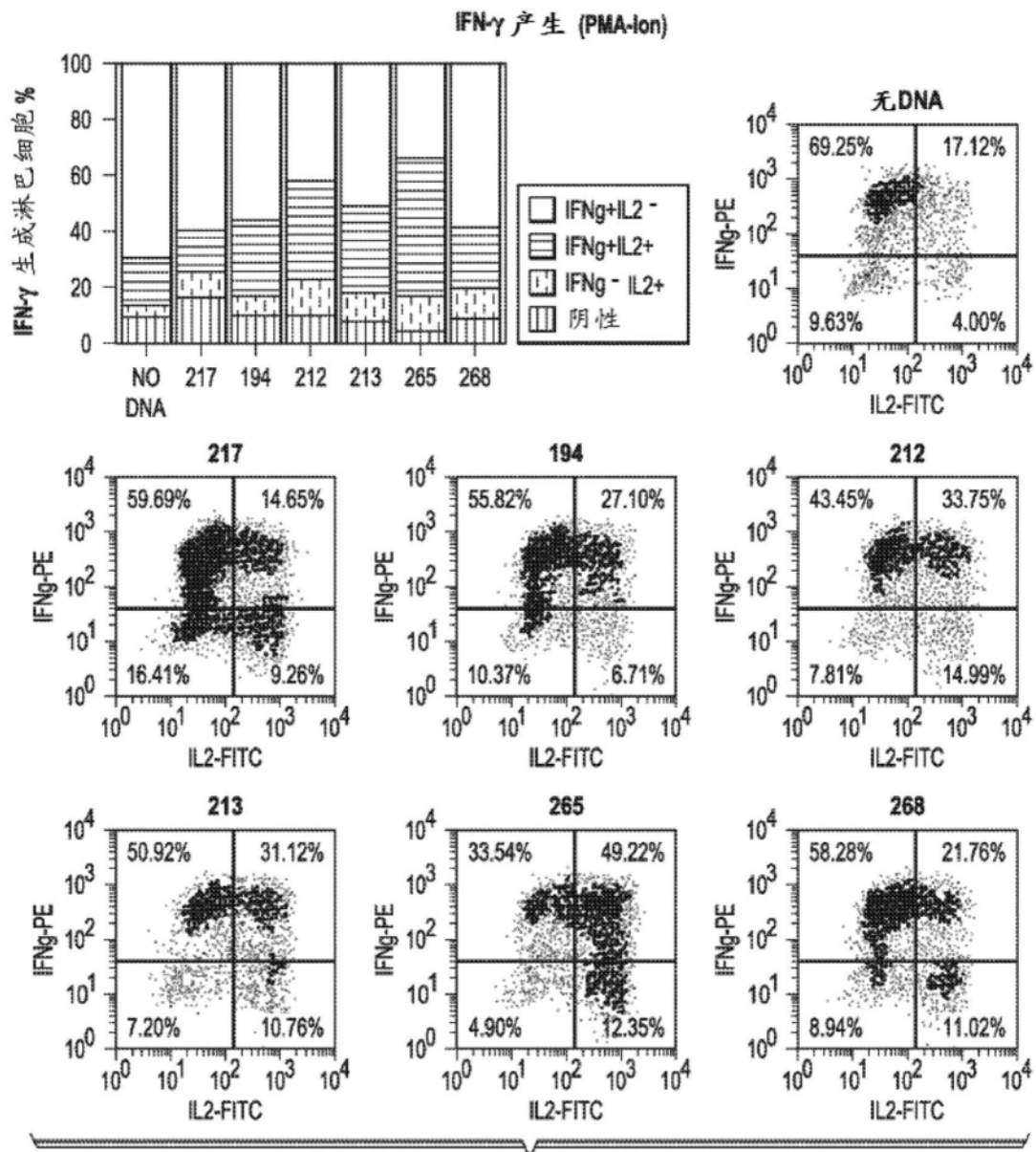


图 35

图35

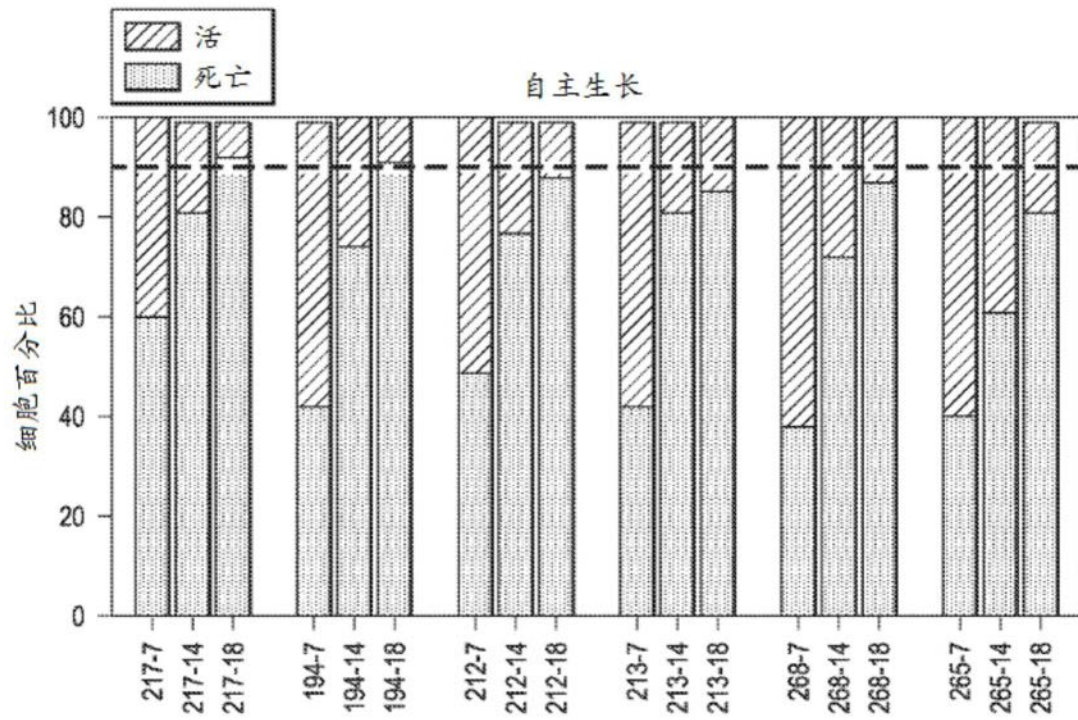


图36

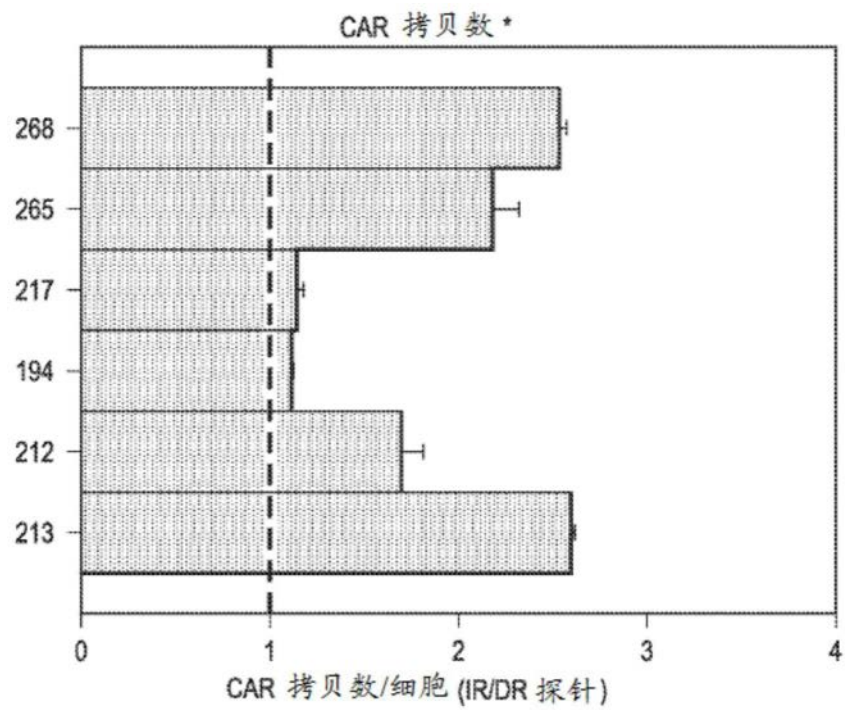


图37

CAR 拷贝数							
供体 P491C714 供体 GCR357861		COOPER					
结构域	CD28			CD137			CD28+ CD137
胞内信号传导	CD28			CD137			CD28+ CD137
TM/间隔区	CD8	CD28	CD137	CD8	CD28	CD137	CD28
Fc (230aa)	215 (1.48)	194 (1.12) 193 (1.01) 118 (0.98)		214 (1.67)	217 (1.01, 1.14)	216 (1.87)	218 (0.90)
CD8 (47aa)	213 (2.13, 2.6)			212 (1.06, 1.7)			
短 (12aa)		265 (2.18)			268 (2.53)		
CD3 ζ	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

图38

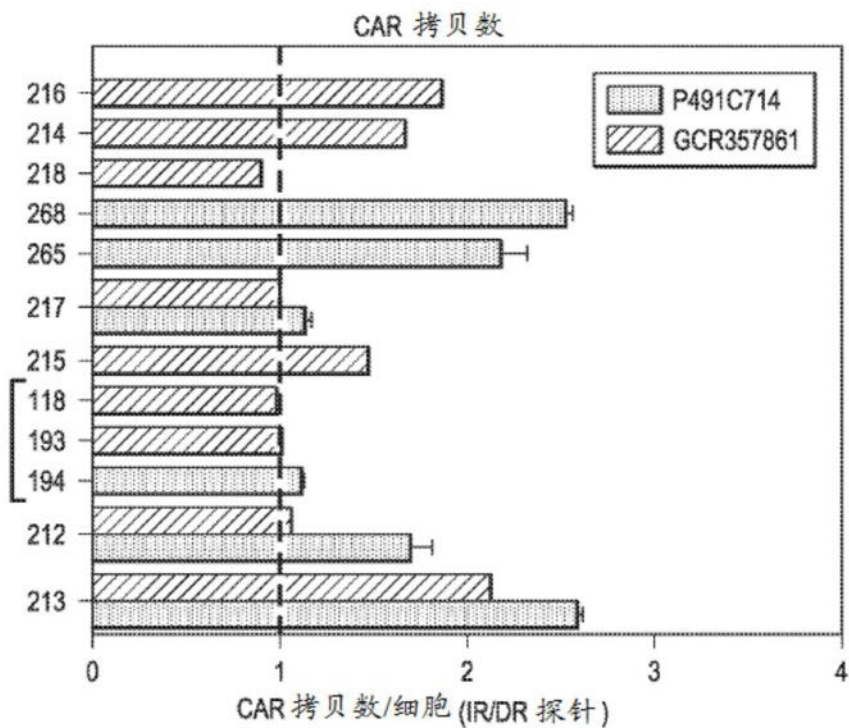


图39

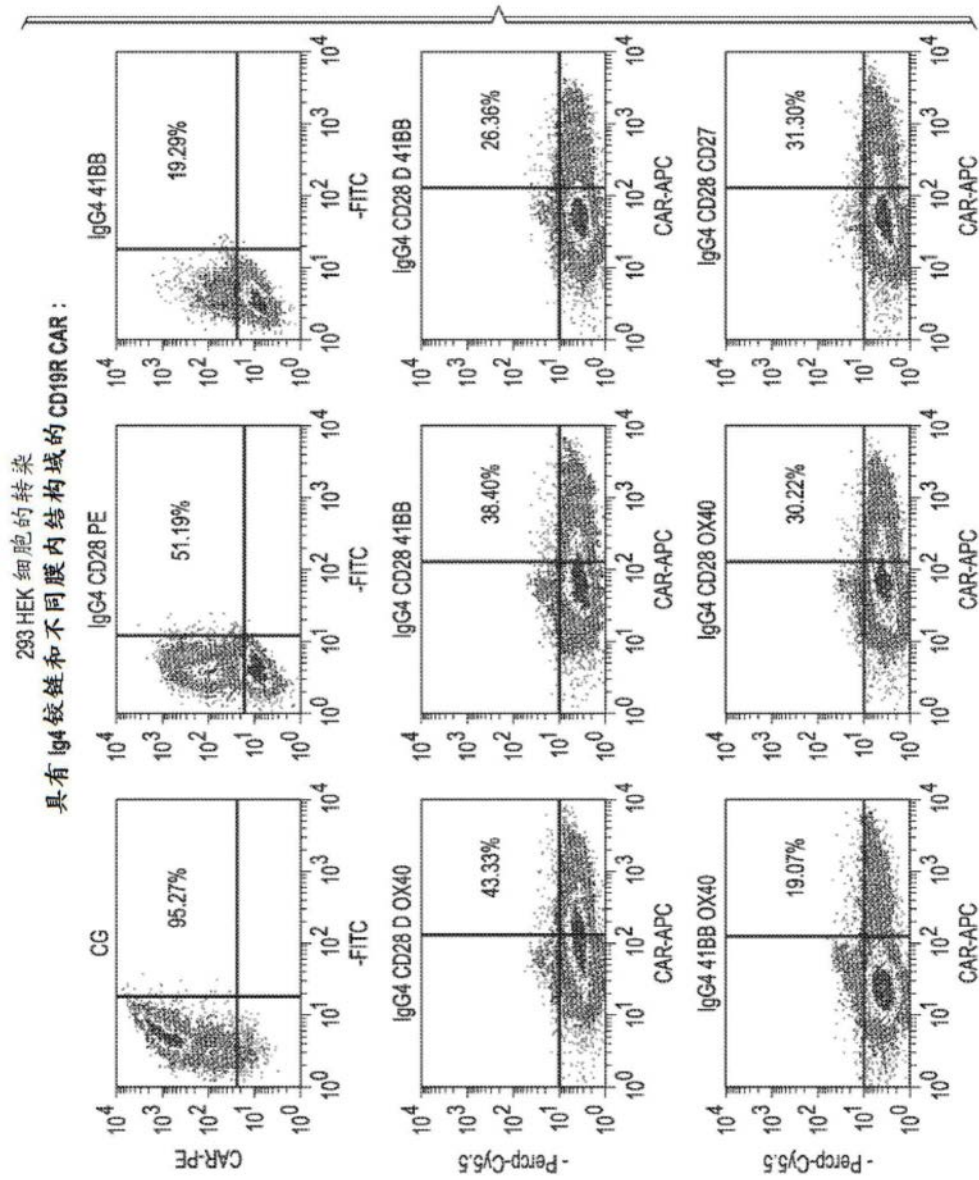


图40A

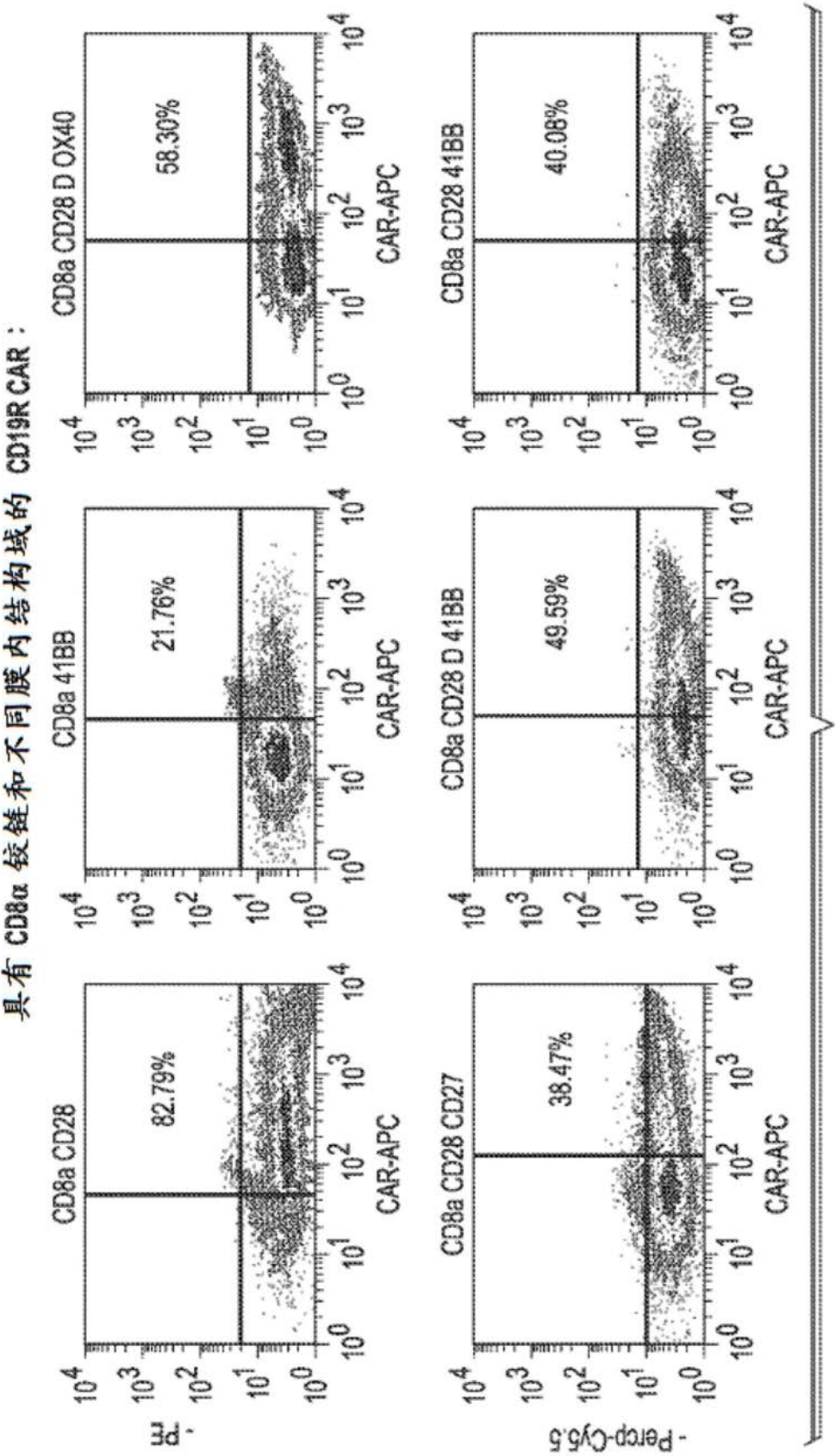


图 40B

图40B

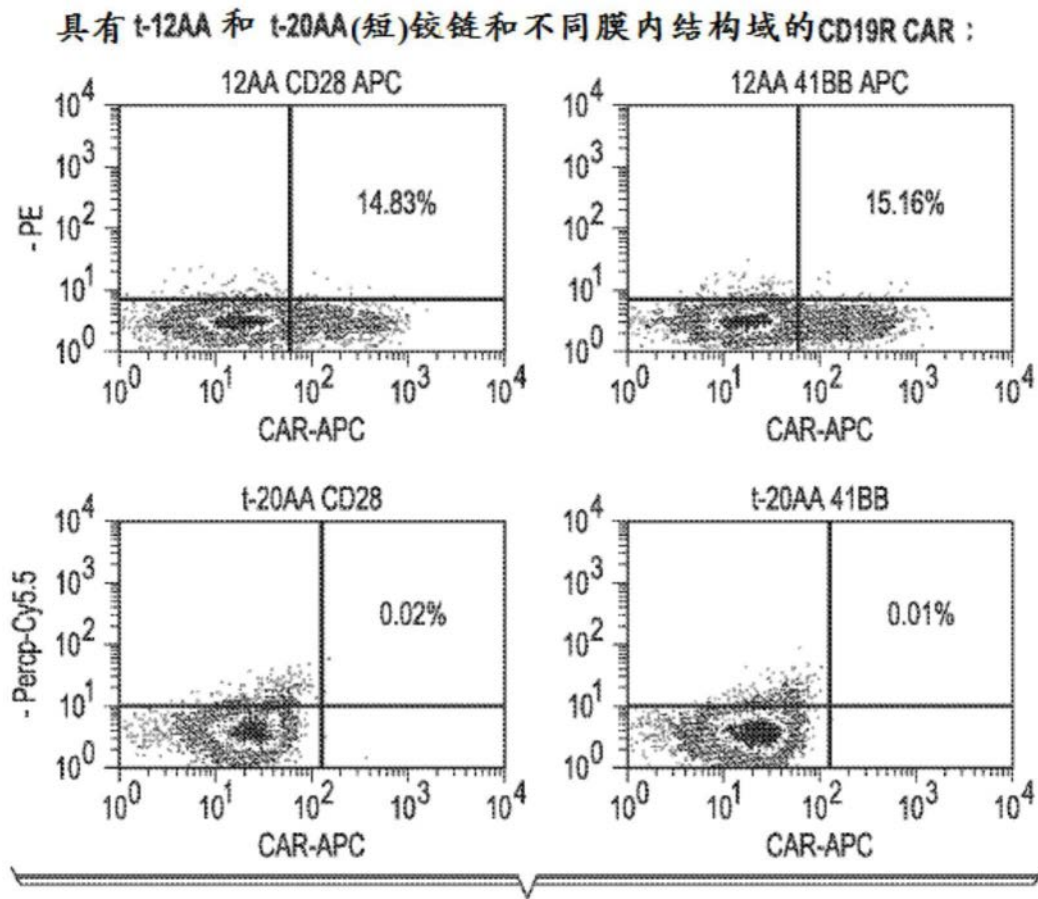


图 40C

图40C

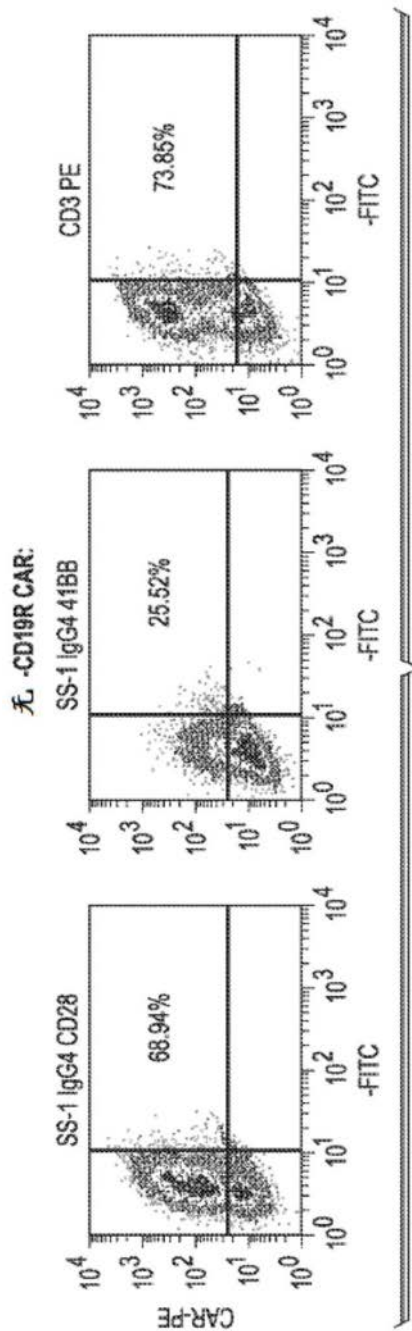


图40D

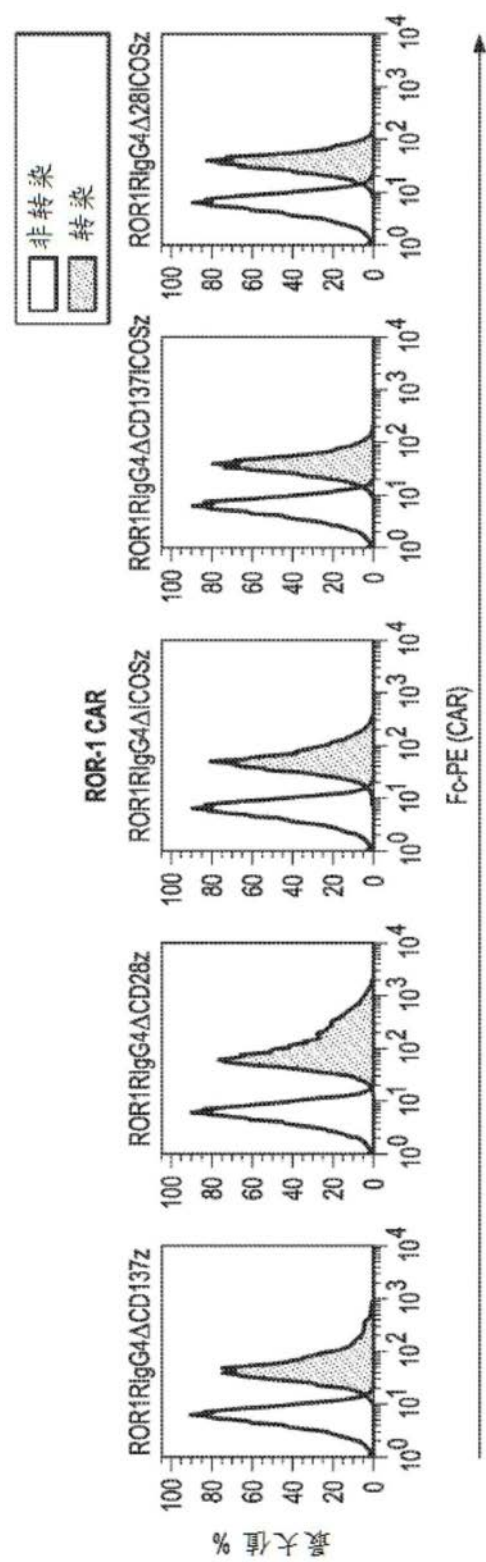


图40E

用于鉴定表达 GFP 的靶标和效应细胞的门控策略：

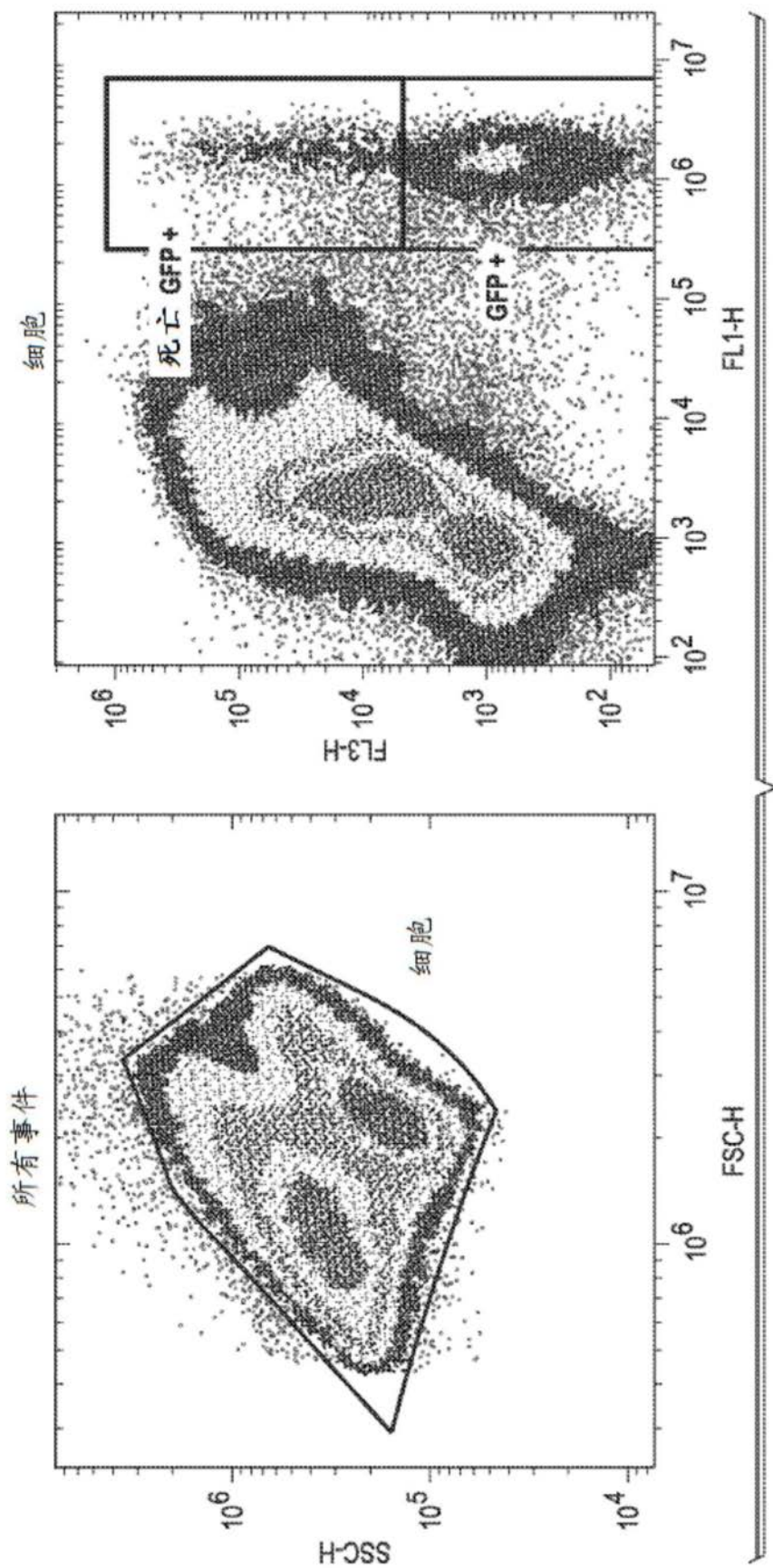


图 41A-1

图41A-1

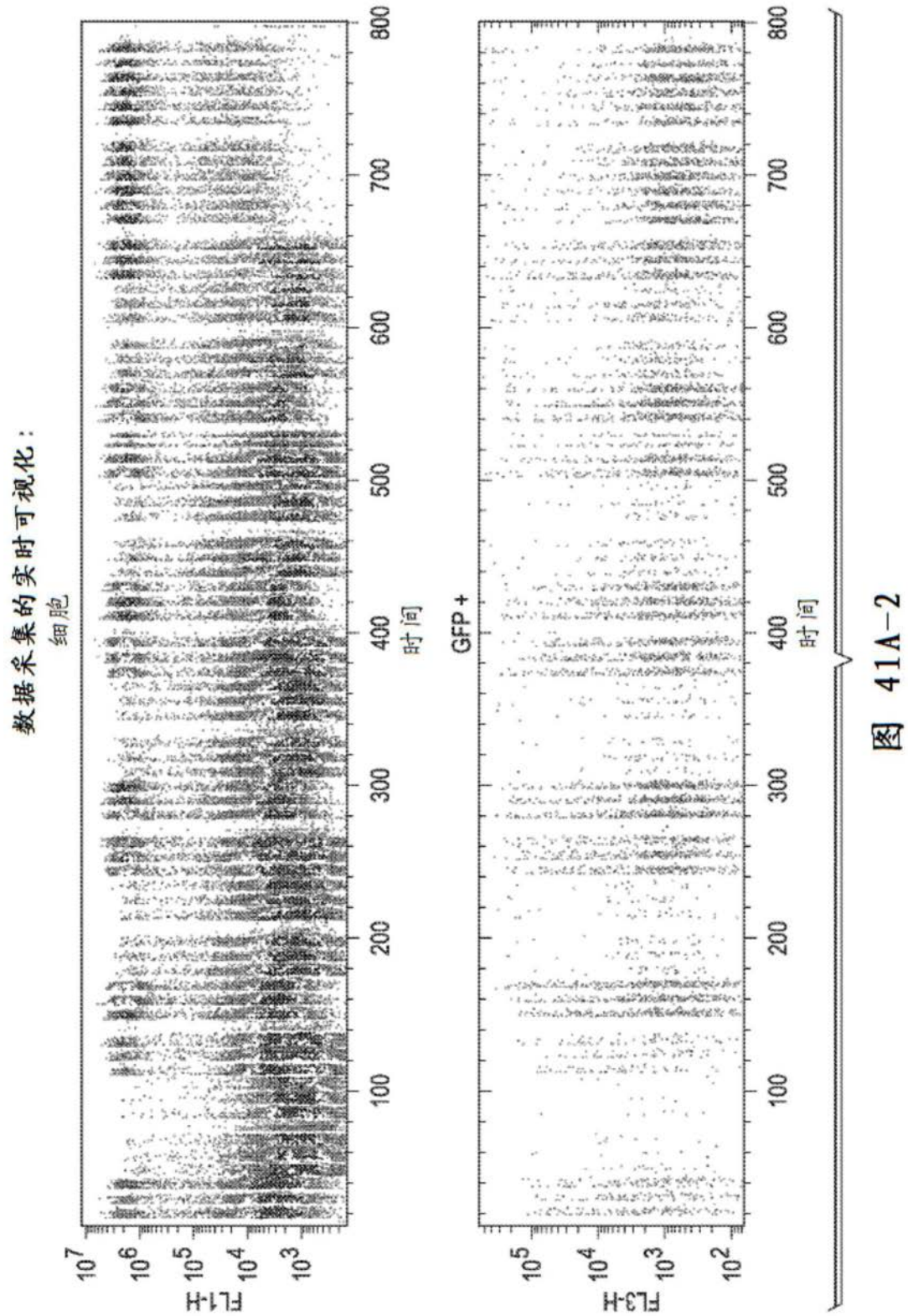


图41A-2

在 IntelliCyt's iQue™ 上对具有不同铰链的 EZ CAR 进行的杀伤测定的比较

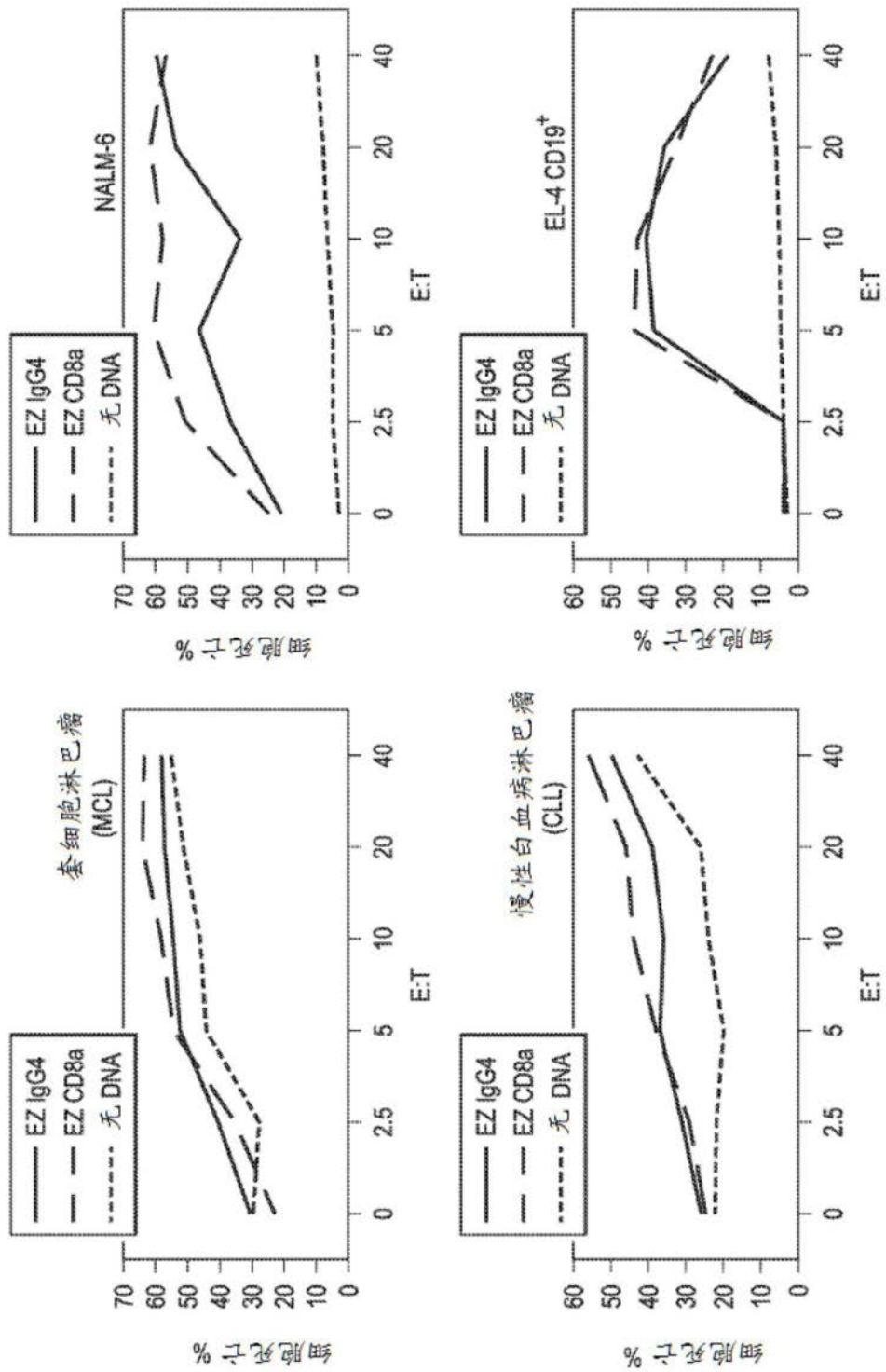


图41B

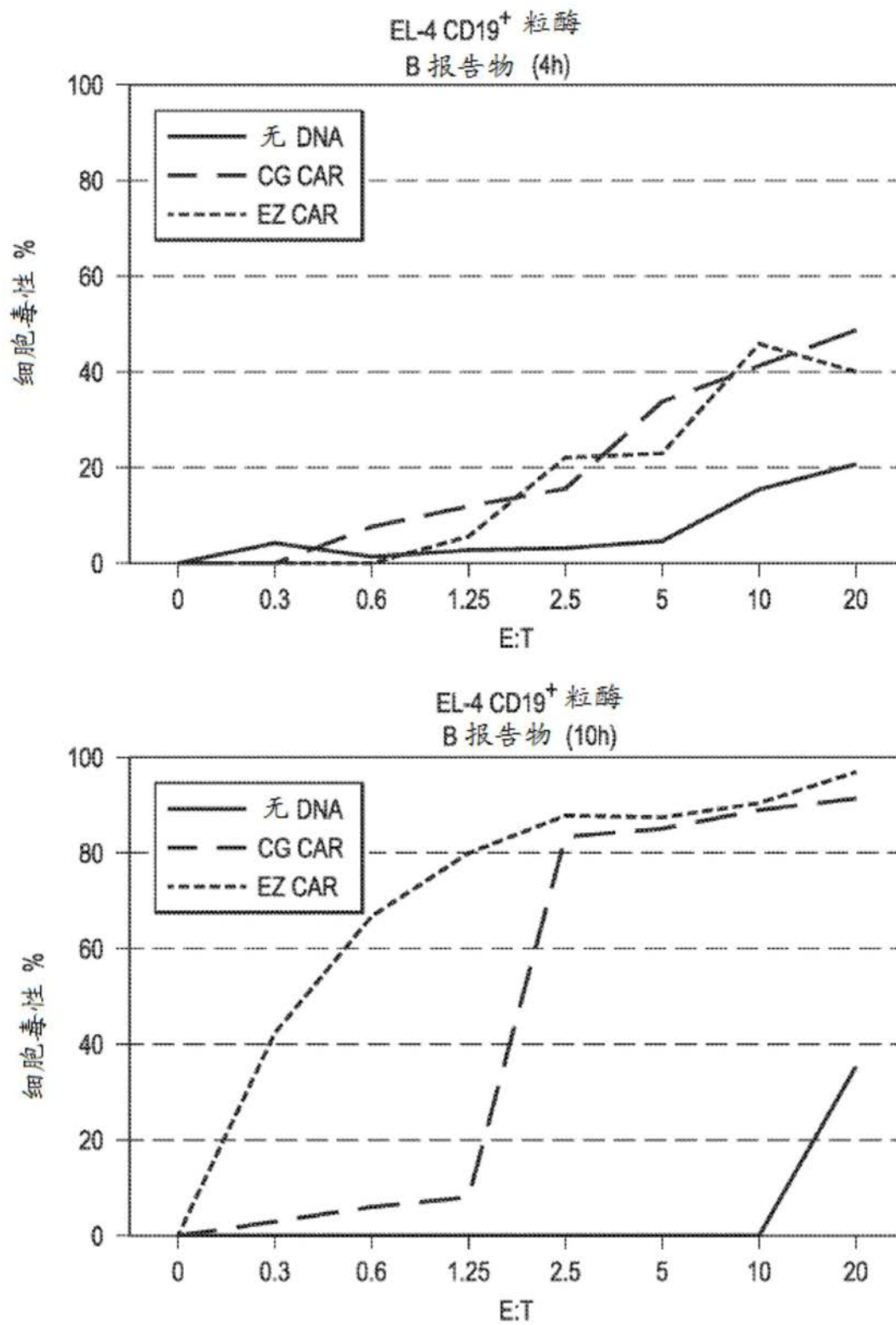


图42