



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106536564 B

(45) 授权公告日 2021.08.31

(21) 申请号 201580033802.5
 (22) 申请日 2015.06.01
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 106536564 A
 (43) 申请公布日 2017.03.22
 (30) 优先权数据
 62/006,313 2014.06.02 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2016.12.22
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2015/033473 2015.06.01
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02015/187528 EN 2015.12.10
 (73) 专利权人 美国卫生和人力服务部
 地址 美国马里兰州
 (72) 发明人 詹姆斯·N·科亨德费尔
 (74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
 有限责任公司 11204
 代理人 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 35/14 (2015.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
 (56) 对比文件
 US 2014271635 A1, 2014.09.18
 WO 2009091826 A9, 2009.09.24
 WO 2005044996 A2, 2005.05.19
 CN 104379179 A, 2015.02.25
 CN 101636502 A, 2010.01.27
 Kochenderfer, J.N..FMC63-28Z receptor protein [synthetic construct].《GenBank》.2012,第1页.
 李玲.基于嵌合抗原受体的肿瘤免疫治疗的研究进展.《转化医学杂志》.2015,第4卷(第2期),第97-103页.
 审查员 刘帅

权利要求书1页 说明书20页
 序列表25页 附图10页

(54) 发明名称
 靶向CD-19的嵌合抗原受体

(57) 摘要
 本发明涉及针对CD19的嵌合抗原受体(CAR),其包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:13中任一项的氨基酸序列。本发明还提供表达所述CAR的T细胞和破坏恶性B细胞的方法。

1. 针对CD19的嵌合抗原受体 (CAR), 其包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的CAR, 其中所述CAR包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

3. 嵌合抗原受体 (CAR), 其包含 (a) 针对CD19的单链可变片段 (scFv) 和 (b) 存在于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:9中的以下每一个的氨基酸序列: (i) CD8 α 胞外间隔子, (ii) 来源于人CD8 α 分子的跨膜结构域, 以及 (iii) 来源于 (a) 人CD28分子和人CD27分子以及 (b) 人CD3 ζ 分子的胞内T细胞信号转导结构域。

4. 嵌合抗原受体 (CAR), 其包含 (a) 针对CD19的单链可变片段 (scFv) 和 (b) 存在于SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中的以下每一个的氨基酸序列: (i) CD8 α 胞外间隔子, (ii) 来源于人CD8 α 分子的跨膜结构域, 以及 (iii) 来源于 (a) 人CD28分子和人CD27分子中的一种或两种以及 (b) Fc ϵ RI的 γ 链的胞内T细胞信号转导结构域。

5. 嵌合抗原受体 (CAR), 其包含 (a) 针对CD19的单链可变片段 (scFv) 和 (b) 存在于SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13中的以下每一个的氨基酸序列: (i) CD8 α 胞外间隔子, (ii) 来源于人CD8 α 分子的跨膜结构域, 以及 (iii) 来源于人CD28分子和Fc ϵ RI的 γ 链的胞内T细胞信号转导结构域。

6. 核酸, 其编码权利要求1至5中任一项所述的CAR。

7. 载体, 其包含权利要求6所述的核酸。

8. T细胞或NK细胞, 其包含权利要求7所述的载体。

9. 一种或多种权利要求8所述的T细胞或NK细胞在制备用于预防或治疗对象的B细胞恶性肿瘤的药物中的用途。

10. 破坏体外恶性B细胞的方法, 所述方法包括使一种或多种权利要求8所述的的T细胞或NK细胞与表达CD19的恶性B细胞群接触, 由此所述CAR与所述恶性B细胞上的CD19结合, 并且所述恶性B细胞被破坏。

11. 如权利要求10所述的方法, 其中所述恶性B细胞是淋巴瘤细胞。

12. 如权利要求10所述的方法, 其中所述恶性B细胞是白血病细胞。

13. 制备表达嵌合抗原受体 (CAR) 的细胞的方法, 所述方法包括将编码权利要求1至5中任一项所述的CAR的载体引入T细胞或NK细胞。

靶向CD-19的嵌合抗原受体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2014年6月2日提交的美国临时专利申请第62/006,313号的权益,将其通过引用并入。

[0003] 关于政府资助的研究和开发的声明

[0004] 本申请是由国立卫生研究院国家癌症研究所在项目号Z01 BC001415的政府资助下完成的。政府享有本申请的某些权利。

[0005] 以电子方式提交的材料通过引用并入

[0006] 通过引用整体并入本文的是随本文同时提交的并且如下确定的计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表:创建于2015年6月1日的一份名称为“720755_ST25.TXT”的58,356个字节的ASCII (Text) 文件。

[0007] 发明背景

[0008] B细胞恶性肿瘤(如淋巴瘤和白血病)发生于B细胞分化和活化的调节被破坏时。成熟B细胞的恶性肿瘤包括滤泡型淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、多发性骨髓瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤以及慢性淋巴细胞白血病(Shaffer等,Nature Reviews Immunology,2:920-933(2002))。诸如化疗、治疗性单克隆抗体(例如利妥昔单抗(RITUXANTM))和同种异体干细胞移植(alloHSCT)的标准疗法无法治愈恶性肿瘤(参见,例如Dreger等,Leukemia,21(1):12-17(2007);Gribben,J.G.,Blood,109(11):4617-4626(2007);和Armitage,J.O.,Blood,110(1):29-36(2007))。具体地,单克隆抗体作为单一药剂不是治愈性的,并且alloHSCT与高水平的死亡率和发病率相关(参见,例如Dreger等,见上文;Armitage等,见上文;以及McLaughlin等Journal of Clinical Oncology,16(8):2825-2833(1998))。

[0009] 可对T细胞进行遗传修饰以表达嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体是由抗原识别部分和T细胞活化结构域组成的融合蛋白(参见,例如Kershaw等,见上文;Eshhar等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90(2):720-724(1993);以及Sadelain等Curr.Opin.Immunol.,21(2):215-223(2009))。对于B细胞谱系恶性肿瘤,已经开发出利用靶向CD19的CAR的过继性T细胞方法(参见,例如Jensen等,Biology of Blood and Marrow Transplantation,16:1245-1256(2010);Kochenderfer等,Blood,116(20):4099-4102(2010);Porter等,The New England Journal of Medicine,365(8):725-733(2011);Savoldo等,Journal of Clinical Investigation,121(5):1822-1826(2011);Cooper等,Blood,101(4):1637-1644(2003);Brentjens等,Nature Medicine,9(3):279-286(2003);Kalos等,Science Translational Medicine,3(95):95ra73(2011);Cheadle等,Journal of Immunology,184(4):1885-1896(2010);Brentjens等,Clinical Cancer Research,13(18Pt 1):5426-5435(2007);Kochenderfer等,Blood,116(19):3875-3886(2010);Brentjens等,Blood,118(18):4817-4828(2011);以及Kochenderfer等,Blood,2011年12月8日(印刷前的电子出版物(2012))。B细胞抗原CD19已被选作CAR的靶标,因为其表达限于正常的和恶性B细胞(参见,例如Nadler等,Journal of Immunology,131(1):244-250(1983))。

[0010] 迄今为止报道的与抗CD19 CAR疗法相关的一个缺点是它们能够诱导与升高水平的血清细胞因子相关的显著毒性。人抗小鼠免疫应答的产生也是与当前的抗CD19 CAR相关的潜在风险,所述抗CD19 CAR包含鼠序列(参见,例如Jensen等,见上文;Lamers等,Blood, 117(1):72-82(2011);和Maus等,Cancer Immunol Res,2:112-120(2014))。

[0011] 因此,仍需要在人体中具有降低的毒性和免疫原性的可用于治疗B细胞恶性肿瘤的方法中的组合物。本发明提供了此类组合物和方法。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供针对CD19的分离的或纯化的嵌合抗原受体(CAR),其包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0014] 此外,本发明提供编码前述CAR的分离的或纯化的核酸序列、包含此类核酸序列的载体、包含此类载体的分离的T细胞,以及通过在体内或离体使此类分离的T细胞与表达CD19的恶性B细胞群接触而破坏恶性B细胞的方法。

[0015] 本发明还提供分离的或纯化的CAR,其包含存在于SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:9中的下述元件分离的或:(i)胞外间隔子,(i)来源于人CD8 α 分子的跨膜结构域,以及(iii)来源于人CD28分子、人CD27分子和人CD3 ζ 分子的胞内T细胞信号转导结构域。

[0016] 本发明提供包含存在于SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中的下述元件的分离的或纯化的CAR:(i)胞外间隔子,(i)来源于人CD8 α 分子的跨膜结构域,以及(iii)来源于人CD28分子、人CD27分子和Fc ϵ RI的 γ 链的胞内T细胞信号转导结构域。

[0017] 附图几个视图的简要描述

[0018] 图1为描述如实施例2所述的说明表达指定的CAR的T细胞的体外存活的实验结果的图。在培养第7天表达指定CAR的T细胞的百分比如下:FMC63-28Z,71%;FMC63-CD828Z,88%;以及FMC63-CD8BBZ,87%。

[0019] 图2A-2D为说明包含CD27胞内信号转导结构域的指定的全人CAR在T细胞表面的表达的FAC图的图像。该图对活的CD3+淋巴细胞进行门控。

[0020] 图3A和3B为说明与未转导的对照(图3B)相比,47G4-CD828Z CAR(图3A)在T细胞表面的表达的FAC图的图像。该图对活的CD3+淋巴细胞进行门控。

[0021] 图4A和4B为描述说明在CD19+T细胞系CD19-K562(图3A)和NALM6(图3B)中,表达FMC63-28Z、FMC63-CD828Z或FMC63-CD8BBZ CAR的T细胞产生TNF的实验结果的图。进行标准TNF ELISA以测量培养上清液中TNF的量(pg/mL)。将TNF水平相对于各培养物中表达各CAR的T细胞的分数标准化。结果显示了来自两个不同供体的标准化的TNF水平的平均值和平均值的标准误差。

[0022] 图5为描述说明在CD19+T细胞系CD19-K562和NALM6中,表达47G4-CD828Z CAR的T细胞产生IFN γ 的实验结果的图。A549、TC71和CCRF-CEM是CD19阴性细胞系。

[0023] 图6A-6D是如通过CD107a上调所测量的,说明用指定的CAR转导的T细胞以CD19特异性的方式脱粒的FAC图。

[0024] 图7A-7C是如通过羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)荧光所测量的,说明表达指定的CAR的T细胞能够在针对CD19的应答中增殖的FAC图。将表达指定CAR的T细胞与

CD19+细胞系CD19-K562(黑色填充的曲线)或CD19阴性细胞系NGFR-K562(空的曲线)在不含IL-2的培养基中一起培养4天。所有图均对活的CD3+CAR+淋巴细胞进行门控。

[0025] 图8为描述说明用MSGV-FMC63-CD828Z质粒转导的T细胞对原代慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞具有细胞毒性的实验结果的图,所述质粒编码FMC63-CD828Z CAR。

[0026] 图9为描述说明表达FMC63-28Z CAR或47G4-CD8CD28Z CAR的T细胞减小了NSG免疫受损小鼠中NALM6肿瘤的大小的实验结果的图。

[0027] 发明详述

[0028] 本发明提供分离的或纯化的嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR包含抗原识别部分和T细胞活化部分。嵌合抗原受体(CAR)是人工构建的杂合蛋白或多肽,其包含与T细胞信号转导结构域或T细胞活化结构域相连的抗体的抗原结合结构域(例如单链可变片段(scFv))。利用单克隆抗体的抗原结合特性,CAR具有以非MHC限制性的方式使T细胞的特异性和反应性重定向至选择的靶标的的能力。非MHC限制性的抗原识别给予表达CAR的T细胞不依赖于抗原加工而识别抗原的能力,从而绕过了肿瘤逃逸的主要机制。此外,当在T细胞中表达时,CAR有利地不与内源T细胞受体(TCR) α 和 β 链二聚化。

[0029] “分离的”意为物质(例如蛋白或核酸)从其自然环境中的移出。“纯化的”意为给定的物质(例如蛋白或核酸)的纯度增加,所述物质不论是从自然界移出的(例如基因组DNA和mRNA)还是合成的(例如cDNA)和/或在实验室条件下扩增的,其中“纯度”是相对术语,不是“绝对纯度”。然而,应当理解,核酸和蛋白可以用稀释剂或佐剂配制,并且出于实用目的仍是分离的。例如,当用于引入细胞时,通常将蛋白与可接受的载体或稀释剂混合。

[0030] 本发明的CAR包含针对CD19(也被称为B淋巴细胞抗原CD19、B4和CVID3)的抗原识别部分。CD19是仅由造血系统的B淋巴细胞和滤泡树突状细胞表达的细胞表面分子。它是最早待表达的B谱系限制性抗原,并且存在于大部分前-B细胞和大部分非T细胞急性淋巴细胞白血病细胞和B细胞型慢性淋巴细胞白血病细胞上(Tedder和Isaacs, *J. Immunol.*, 143:712-717 (1989))。CD19主要联合CD21和CD81作为B细胞共受体(Bradbury等, *J. Immunol.*, 149(9):2841-2850 (1992); Horvath等, *J. Biol. Chem.*, 273(46):30537-30543 (1998); 以及Imai等, *J. Immunol.*, 155(3):1229-1239 (1995))。活化时,CD19的胞质尾区变为磷酸化的,其导致通过Src家族激酶的结合和PI-3激酶的募集。CD19还被证实与其它细胞信号转导蛋白相互作用,如Lyn酪氨酸蛋白激酶(其为B细胞中的主要Src激酶)(Fujimoto等, *Immunity*, 13:47-57 (2000))、CD82(Imai等,见上文)、补体受体2(Bradbury等,见上文;和Horvath等,见上文)和VAV2(Doody等, *EMBO J.*, 19(22):6173-6184 (2000))。

[0031] 本发明的CAR包含抗原识别部分,所述抗原识别部分含有针对CD19的单克隆抗体或其抗原结合部分。本文使用的术语“单克隆抗体”指由B细胞的单克隆产生并结合相同表位的抗体。相对而言,“多克隆抗体”指由不同的B细胞产生并与同一抗原的不同表位结合的抗体群。本发明的CAR的抗原识别部分可以是全抗体或抗体片段。全抗体通常由四条多肽组成:两条相同的重(H)链多肽拷贝和两条相同的轻(L)链多肽拷贝。每条重链包含一个N-端可变(VH)区和三个C端恒定(CH1、CH2和CH3)区,并且每条轻链包含一个N端可变(VL)区和一个C端恒定(CL)区。各对轻链和重链的可变区形成抗体的抗原结合位点。VH和VL区具有相同的一般结构,其中各区包含序列相对保守的四个框架区。框架区通过三个互补决定区(CDR)相连。被称为CDR1、CDR2和CDR3的三个CDR形成抗体的“高变区”,其负责抗原结合。

[0032] 术语“抗体的片段”、“抗体片段”、“抗体的功能性片段”和“抗原结合部分”在本文可互换使用,意为抗体的保留特异性结合抗原的能力的一个或多个片段或部分(通常参见,Holliger等,Nat.Biotech.,23(9):1126-1129(2005))。本发明的CAR的抗原识别部分可以包含任何CD19结合的抗体片段。抗体片段可取地包含,例如一个或多个CDR、可变区(或其部分)、恒定区(或其部分)或者它们的组合。抗体片段的实例包括但不限于:(i) Fab片段,其为由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,其为包含由位于铰链区的二硫桥相连的两个Fab片段的二价片段;(iii) Fv片段,其由抗体单臂的VL和VH结构域组成;(iv) 单链Fv(scFv),其为由Fv片段的两个结构域(即VL和VH)组成的单价分子,所述两个结构域通过使两个结构域可作为单一多肽链合成的合成的接头连接(参见,例如Bird等,Science,242:423-426(1988);Huston等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85:5879-5883(1988);以及Osborn等,Nat.Biotechnol.,16:778(1998)),以及(v) 双链抗体(diabody),其为多肽链二聚物,其中每条多肽链包含通过肽接头连接至VL的VH,所述肽接头太短不允许同一多肽链上的VH与VL之间配对,从而驱动不同VH-VL多肽链上的互补结构域之间配对,以产生具有两个功能性抗原结合位点的二聚分子。抗体片段在本领域是已知的,并且在例如美国专利申请公开2009/0093024A1中进行了更详细地描述。在优选实施方案中,本发明的CAR的抗原识别部分包含抗CD19单链Fv(scFv)。

[0033] 单克隆抗体的抗原结合部分或片段可以是任何大小,只要所述部分与CD19结合。在这方面,针对CD19的单克隆抗体(本文也称作“抗CD19单克隆抗体”)的抗原结合部分或片段可取地包含一个或多个CDR,所述CDR包含约5至18个氨基酸(例如,约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18个或者任何两个前述数值之间限定的范围)。

[0034] 在一个实施方案中,本发明的CAR包含含有抗CD19单克隆抗体的可变区的抗原识别部分。抗CD19单克隆抗体可以获自或源自哺乳动物,包括但不限于:小鼠、大鼠或人。优选地,抗原识别部分包含小鼠或人抗CD19单克隆抗体的可变区。在该方面,抗原识别部分包含小鼠或人抗CD19单克隆抗体的轻链可变区、重链可变区,或者轻链可变区和重链可变区两者。优选地,本发明的CAR的抗原识别部分包含小鼠或人抗CD19单克隆抗体的轻链可变区和重链可变区。FMC63抗体(描述于Nicholson等,Molecular Immunology,34(16-17):1157-1165(1997)中)是可用于本发明的鼠抗CD19单克隆抗体的一个实例。FMC63单克隆抗体的可变区已被用于在临床试验中进行了测试的CAR中(参见,例如Kochenderfer等,Nature Review Clinical Oncol.,10(5):267-276(2013);Porter等,New Eng.J.Med.,365(8):725-733(2011);Kalos等,Science Translational Medicine,3(95):95ra73(2011);Kochenderfer等,Blood,116(20):4099-4102(2010);以及Kochenderfer等,Blood,119(12):2709-2720(2012))。47G4抗体(描述于美国专利申请公开号2010/0104509中)是可用于本发明的人抗CD19单克隆抗体的一个实例。

[0035] 在另一实施方案中,本发明的CAR包含信号序列。信号序列可以位于抗原识别部分(例如抗CD19抗体的可变区)的氨基端。信号序列可以包括任何合适的信号序列。在一个实施方案中,信号序列是人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)受体信号序列或者CD8 α 信号序列。例如,包含鼠抗CD19 scFv的本发明的CAR可以包含GM-CSF信号序列,而包含人抗CD19 scFv的本发明的CAR可以包含CD8 α 信号序列。

[0036] 在另一实施方案中,本发明的CAR包含胞外间隔子序列。胞外间隔子序列是短的氨

氨基酸序列,其有助于抗体的柔性(参见,例如Woof等,Nat.Rev.Immunol.,4(2):89-99(2004)),并且可以位于抗原识别部分(例如抗CD19 scFv)与T细胞活化部分之间。胞外间隔子序列可以包含任何跨膜蛋白的胞外区的所有或者一部分。例如,在一个实施方案中,胞外间隔子序列来源于人CD8 α 分子或者人CD28分子。

[0037] 本发明的CAR还包含跨膜结构域。跨膜结构域可以是获自或源自本领域已知的任何分子的任何跨膜结构域。例如,跨膜结构域可以获自或源自CD8 α 分子或CD28分子。CD8是作为T细胞受体(TCR)的共受体的跨膜糖蛋白,并且主要表达于细胞毒性T细胞表面。CD8的最常见形式作为由CD8 α 链和CD8 β 链组成的二聚体存在。CD28表达于T细胞上并且提供T细胞活化所需的共刺激信号。CD28是CD80(B7.1)和CD86(B7.2)的受体。在优选实施方案中,CD8 α 和CD28是人的。

[0038] 本发明的CAR包含T细胞活化部分。T细胞活化部分包含至少一个胞内(即,细胞质的)T细胞信号转导结构域(也被称作“共刺激结构域”)。CAR中采用的最常见的胞内T细胞信号转导结构域是CD3 ζ 分子,其与TCR关联以产生信号,并且其包含基于酪氨酸的免疫受体活化基序(ITAM)。优选地,T细胞活化部分包含多个(即,两个或更多个)胞内T细胞信号转导结构域。胞内T细胞信号转导结构域可以获自或源自CD28分子、CD3 ζ 分子或其修饰版本,人高亲和力IgE受体(Fc ϵ RI)的 γ 链,CD27分子,OX40分子,4-1BB分子,或者本领域已知的其它胞内信号转导分子。如以上所讨论的,CD28是在T细胞的共刺激中重要的T细胞标志物。4-1BB也被称作CD137,其向T细胞传输强共刺激信号,促进T淋巴细胞的分化并增强其长期存活。CD27是TNF受体超家族的成员,并且是产生并长期维持T细胞免疫所需的。人高亲和力IgE受体(Fc ϵ RI)是由1条 α 链、1条 β 链和两条二硫桥连接的 γ 链组成的四聚受体复合物。Fc ϵ RI组成型表达于肥大细胞和嗜碱粒细胞上,并且在嗜酸性粒细胞中是可诱导的。在优选实施方案中,胞内T细胞信号转导结构域是人的。

[0039] 本发明的CAR可以包含任何组合的前述跨膜结构域中的任何一种以及前述胞内T细胞信号转导结构域中的任何一种或多种(例如1、2、3或4种)。例如,本发明的CAR可以包含CD28跨膜结构域以及CD28和CD3 ζ 的胞内T细胞信号转导结构域。例如,可选地,本发明的CAR可以包含CD8 α 跨膜结构域以及CD28、CD3 ζ 、Fc ϵ RI的 γ 链和/或4-1BB的胞内T细胞信号转导结构域。在另一实施方案中,本发明的CAR可以包含CD8 α 跨膜结构域以及CD28、CD3 ζ 和CD27的胞内T细胞信号转导结构域。在另一实施方案中,本发明的CAR可以包含CD28跨膜结构域以及CD27、4-1BB和Fc ϵ RI的 γ 链的胞内T细胞信号转导结构域。

[0040] 本发明还提供编码本发明的嵌合抗原受体(CAR)的分离的或纯化的核酸序列。“核酸序列”意图涵盖DNA或RNA聚合物,即多核苷酸,其可以是单链或双链,并且其可以包含非天然的或者改变的核苷酸。本文使用的术语“核酸”和“多核苷酸”指任何长度的聚合形式的核苷酸,可以是核糖核苷酸(RNA)或者脱氧核糖核苷酸(DNA)。这些术语指分子的一级结构,因此包括双链和单链DNA以及双链和单链RNA。作为等同物,术语包括由核苷酸类似物构成的RNA或DNA的类似物以及修饰的多核苷酸,例如但不限于甲基化的和/或带帽的多核苷酸。

[0041] 本发明的CAR可以包含任何数目的氨基酸,条件是CAR保留其生物学活性,例如特异性结合抗原、检测哺乳动物中的患病细胞或者治疗或预防哺乳动物中的疾病等的的能力。例如,CAR可以包含50个或更多个(例如60个或更多个、100个或更多个、或者500个或更多个)氨基酸,但少于1,000个(例如,900个或更少个、800个或更少个、700个或更少个、或者

600个或更少)氨基酸。优选地,CAR为约50个至约700个氨基酸(例如,约70个、约80个、约90个、约150个、约200个、约300个、约400个、约550个或者约650个氨基酸),约100个至约500个氨基酸(例如,约125个、约175个、约225个、约250个、约275个、约325个、约350个、约375个、约425个、约450个或者约475个氨基酸),或者由任意两个前述数值所限定的范围。

[0042] 本发明的范围包括本文所述的本发明的CAR的功能部分。当提及CAR使用时,术语“功能部分”指本发明的CAR的任何部分或片段,所述部分或片段保留了其中产生部分的CAR(亲本CAR)的生物活性。功能部分涵盖,例如保留与亲本CAR类似程度、相同程度或者比其更高层次的识别靶细胞或者检测、治疗或预防疾病的能力的那些CAR部分。关于编码亲本CAR的核酸序列,编码CAR的功能部分的核酸序列可以编码包含亲本CAR的例如约10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或者更多的蛋白。

[0043] CAR的功能部分在所述部分的氨基端或羧基端或者在这两端可以包含额外的氨基酸,所述额外的氨基酸在亲本CAR的氨基酸序列中未发现。可取地,额外的氨基酸不干扰功能部分的生物功能,例如识别靶细胞、检测癌症、治疗或预防癌症等。更可取地,与亲本CAR的生物活性相比,额外的氨基酸增强CAR的生物活性。

[0044] 本发明还提供本发明的CAR的功能变体。本文使用的术语“功能变体”指与本发明的CAR具有明显的或显著的序列同一性或相似性的CAR、多肽或蛋白,所述功能变体保留了其中产生变体的CAR的生物活性。功能变体涵盖,例如保留与亲本CAR类似程度、相同程度或者更高层次的识别靶细胞的能力的本文所述的CAR(亲本CAR)的那些变体。关于编码亲本CAR的核酸序列,编码CAR的功能变体的核酸序列可以与编码所述亲本CAR的核酸序列例如,约10%相同,约25%相同,约30%相同,约50%相同,约65%相同,约80%相同,约90%相同,约95%相同或者约99%相同。

[0045] 功能变体可以,例如包含具有至少一个保守氨基酸置换的本发明的CAR的氨基酸序列。短语“保守氨基酸置换”或者“保守突变”指一个氨基酸被具有共同特性的另一氨基酸取代。明确各氨基酸之间的共同特性的功能方法是分析同源有机体的相应蛋白之间氨基酸变化的归一化频率(Schulz,G.E.和Schirmer,R.H.,Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979))。根据此类分析,可以限定这样的氨基酸组:组内的氨基酸优先互相交换,并从而在其对整体蛋白结构的影响上大部分彼此相似(Schulz,G.E.和Schirmer,R.H.,见上文)。保守突变的实例包括同一氨基酸亚组内的氨基酸的氨基酸置换,例如,赖氨酸置换精氨酸,并且反之亦然,以使得可以维持正电荷;谷氨酸置换天冬氨酸,并且反之亦然,以使得可以维持负电荷;丝氨酸置换苏氨酸以使得能够维持游离的-OH;以及谷氨酰胺置换天冬酰胺,以使得能够维持游离的-NH₂。

[0046] 可选地或者另外,功能变体可以包含具有至少一个非保守氨基酸置换的亲本CAR的氨基酸序列。“非保守突变”涉及不同组之间的氨基酸置换,例如,赖氨酸置换色氨酸或者苯丙氨酸置换丝氨酸等。在这种情况下,非保守氨基酸置换优选不干扰或抑制功能变体的生物活性。非保守氨基酸置换可以增强功能变体的生物活性,以使与亲本CAR相比,所述功能变体的生物活性增加。

[0047] 本发明的CAR(包括其功能部分和功能变体)可以包含代替一个或多个天然存在的氨基酸的合成的氨基酸。此类合成的氨基酸在本领域是已知的,并且包括,例如氨基环己烷羧酸、正亮氨酸、 α -氨基正癸酸、高丝氨酸、S-乙酰基氨甲基-半胱氨酸、反式-3-和反式-4-

羟脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、 β -苯基丝氨酸、 β -羟基苯丙氨酸、苯甘氨酸、 α -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、二氢吡啶-2-羧酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸单酰胺、 N' -苄基- N' -甲基-赖氨酸、 N' , N' -二苄基-赖氨酸、6-羟赖氨酸、鸟氨酸、 α -氨基环戊烷羧酸、 α -氨基环己烷羧酸、 α -氨基环庚烷羧酸、 α -(2-氨基-2-降莰烷)-羧酸、 α , γ -二氨基丁酸、 α , β -二氨基丙酸、高苯丙氨酸和 α -叔丁基甘氨酸。

[0048] 本发明的CAR(包括其功能部分和功能变体)可以被糖基化、酰胺化、羧化、磷酸化、酯化、 N -酰化、经由例如二硫桥而环化,或被转化成酸加成盐和/或任选地二聚化或聚合或缀合。

[0049] 本发明还提供针对任何目标靶分子(即,包含任何抗原识别部分)的CAR,所述CAR包含前述胞外间隔子、跨膜结构域和胞内T细胞信号转导结构域的任何组合的任何一种。例如,本发明的CAR可以包含(i)胞外间隔子,(i)跨膜结构域,其来源于人CD8 α 分子,以及(iii)胞内T细胞信号转导结构域,其来源于人CD3 ζ 分子和人CD28分子(如SEQ ID NO:1的CAR中所使用的)。在另一实施方案中,本发明的CAR可以包含(i)胞外间隔子,(i)跨膜结构域,其来源于人CD8 α 分子,以及(iii)胞内T细胞信号转导结构域,其来源于人CD28分子、人CD27分子和人CD3 ζ 分子(如SEQ ID NO:4的CAR中所使用的)。在另一实施方案中,本发明的CAR可以包含(i)胞外间隔子,(i)跨膜结构域,其来源于CD8 α 分子,以及(iii)胞内T细胞信号转导结构域,其来源于人CD28分子、人CD27分子和Fc ϵ RI的 γ 链(如SEQ ID NO:10的CAR中所使用的)。在另一实施方案中,本发明的CAR可以包含(i)胞外间隔子,(i)跨膜结构域,其来源于人CD8 α 分子,以及(iii)胞内T细胞信号转导结构域,其来源于人CD28分子和Fc ϵ RI的 γ 链(如SEQ ID NO:12的CAR中所使用的)。

[0050] 在优选实施方案中,本发明的CAR包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13的氨基酸序列,或者由其组成。

[0051] 可以利用本领域已知的方法产生本发明的CAR。例如,可以利用标准重组DNA方法来重组产生核酸序列、多肽和蛋白(参见,例如Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,,第三版.,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY,2001;和Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates和John Wiley&Sons,NY,1994)。此外,可以从来源分离和/或纯化合成产生的编码CAR的核酸序列,所述来源如植物、细菌、昆虫或哺乳动物(例如大鼠、人)等。分离和纯化的方法在本领域众所周知。可选地,可以商业合成本文所述的核酸序列。在该方面,核酸序列可以是合成的、重组的、分离的和/或纯化的。

[0052] 本发明还提供包含编码本发明的CAR的核酸序列的载体。载体可以是,例如质粒、粘粒、病毒载体(例如逆转录病毒载体或腺病毒载体)或噬菌体。合适的载体和载体制备的方法在本领域众所周知(参见,例如Sambrook等,见上文,以及Ausubel等,见上文)。

[0053] 除编码本发明的CAR的核酸序列之外,载体优选包含提供核酸序列在宿主细胞中的表达的表达控制序列,如启动子、增强子、多腺苷酸化信号、转录终止子、内部核糖体进入位点(IRES)等。示例性的表达控制序列在本领域是已知的,并且描述于例如,Goeddel, Gene Expression Technology:Methods in Enzymology,185卷,Academic Press,San Diego,

Calif. (1990) 中。

[0054] 来自多种不同来源的大量启动子,包括组成型启动子、诱导型启动子和阻抑启动子,在本领域众所周知。启动子的代表性来源包括,例如病毒、哺乳动物、昆虫、植物、酵母和细菌,并且来自这些来源的合适的启动子可以容易地获得或者可以基于可公开获得(例如来自贮藏所(如ATCC)以及其它商业或个人来源)的序列合成制备。启动子可以是单向(即在一个方向起始转录)或双向的(即在3' 或5' 方向起始转录)。启动子的非限制性实例包括,例如,T7细菌表达系统、pBAD(araA)细菌表达系统、巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子和RSV启动子。诱导型启动子包括,例如Tet系统(美国专利5,464,758和5,814,618)、蜕皮激素诱导系统(No等,Proc.Natl.Acad.Sci.,93:3346-3351(1996))、T-REXTM系统(Invitrogen, Carlsbad,CA)、LACSWITCHTM系统(Stratagene, San Diego,CA)以及Cre-ERT他莫昔芬诱导重组酶系统(Indra等,Nuc.Acid.Res.,27:4324-4327(1999);Nuc.Acid.Res.,28:e99(2000);美国专利7,112,715;以及Kramer&Fussenegger,Methods Mol.Biol.,308:123-144(2005))。

[0055] 本文使用的术语“增强子”指增加例如与之可操作地连接的核酸序列的转录的DNA序列。增强子可以位于离核酸序列的编码区数千碱基处,并且能够介导调控因子的结合、DNA甲基化模式或者DNA结构的变化。来自多种不同来源的大量增强子在本领域众所周知,并且可以作为克隆的多核苷酸或者位于克隆的多核苷酸内获得(来自例如贮藏所(如ATCC)以及其它商业或个人来源)。包含启动子(如常用的CMV启动子)的多种多核苷酸还包含增强子序列。增强子可以位于编码序列的上游、编码序列内或者编码序列的下游。术语“Ig增强子”指来源于定位于免疫球蛋白(Ig)基因座中的增强子区的增强子元件(此类增强子包括,例如重链(μ)5'增强子、轻链(κ)5'增强子、 κ 和 μ 内含子增强子以及3'增强子(通常参见Paul W.E.(ed),Fundamental Immunology,第三版,Raven Press,New York(1993),第353-363页,和美国专利5,885,827)。

[0056] 载体还可以包含“选择标记基因”。本文使用的术语“选择标记基因”指这样的核酸序列,在相应的选择试剂存在的情况下,允许特异性选择或针对表达所述核酸序列的细胞。合适的选择标记基因在本领域是已知的,并且描述于,例如国际专利申请公开WO 1992/08796和WO1994/28143;Wigler等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:3567(1980);O'Hare等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,78:1527(1981);Mulligan&Berg,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,78:2072(1981);Colberre-Garapin等,J.Mol.Biol.,150:1(1981);Santerre等,Gene,30:147(1984);Kent等,Science,237:901-903(1987);Wigler等,Cell,11:223(1977);Szybalska&Szybalski,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,48:2026(1962);Lowy等,Cell,22:817(1980);以及美国专利5,122,464和5,770,359中。

[0057] 在一些实施方案中,载体是“附加型表达载体”或“附加体”,其能够在宿主细胞中复制,并且在合适的选择压力存在的情况下,作为宿主胞内的染色体外DNA区段持久存在(参见,例如Conese等,Gene Therapy,11:1735-1742(2004))。代表性的可商购获得的附加型表达载体包括但不限于利用爱泼斯坦巴尔病毒核抗原1(EBNA1)和爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)复制起点(oriP)的附加型质粒。来自Invitrogen(Carlsbad,CA)的载体pREP4、pCEP4、pREP7和pcDNA3.1以及来自Stratagene(La Jolla,CA)的pBK-CMV代表利用T抗原和SV40复制起点代替EBNA1和oriP的附加型载体的非限制性实例。

[0058] 其它合适的载体包括整合表达载体,其可以随机整合进宿主细胞的DNA,或者可以包含重组位点,使得能够在表达载体和宿主细胞的染色体之间进行特异性重组。此类整合表达载体可以利用宿主细胞染色体的内源表达控制序列,以实现期望的蛋白的表达。以位点特异的方式整合的载体的实例包括,例如,来自Invitrogen (Carlsbad,CA)的flp-in系统的元件(例如pcDNATM5/FRT),或者如可见于来自Stratagene (La Jolla,CA)的pExchange-6核心载体的cre-lox系统。随机整合进宿主细胞染色体的载体的实例包括,例如来自Invitrogen (Carlsbad,CA)的pcDNA3.1(当在T抗原不存在的情况下引入时)和来自Promega (Madison,WI)的pCI或pFN10A (ACT) FLEXITM。

[0059] 也可以使用病毒载体。代表性的病毒表达载体包括但不限于:基于腺病毒的载体(例如可获自Crucell, Inc. (Leiden, The Netherlands)的基于腺病毒的Per.C6系统)、基于慢病毒的载体(例如来自Life Technologies (Carlsbad,CA)的基于慢病毒的pLP1)和逆转录病毒载体(例如来自Stratagene (La Jolla,CA)的pFB-ERV加pCFB-EGSH)。在优选实施方案中,病毒载体为慢病毒载体。

[0060] 可将包含编码本发明的CAR的核酸的载体引入能够表达CAR的宿主细胞,包括任何合适的原核细胞或真核细胞。优选的宿主细胞是这样的细胞:其能够容易且可靠地生长,具有合理的快速生长速率,具有表征良好的表达系统,并且能够容易且有效地转化或转染。

[0061] 本文使用的术语“宿主细胞”指能够包含表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞,例如植物、动物、真菌或藻类,或者可以是原核细胞,例如细菌或原生动物。宿主细胞可以是培养的细胞或原代细胞,即从有机体(例如人)直接分离的细胞。宿主细胞可以是贴壁细胞或悬浮细胞,即悬浮生长的细胞。合适的宿主细胞在本领域是已知的,并且包括,例如DH5 α 大肠杆菌(E. coli)细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞等。出于扩增或复制重组表达载体的目的,宿主细胞可以是原核细胞,例如DH5 α 细胞。出于产生重组CAR的目的,宿主细胞可以是哺乳动物细胞。宿主细胞优选为人细胞。宿主细胞可以是任何细胞类型的细胞,可以来源于任何类型的组织,并且可以是处于任何发育阶段的细胞。在一个实施方案中,宿主细胞可以是外周血淋巴细胞(PBL)、外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤细胞(NK)或T细胞。优选地,宿主细胞是T细胞。选择合适的哺乳动物宿主细胞的方法以及细胞的转化、培养、扩增、筛选和纯化方法在本领域是已知的。

[0062] 本发明提供分离的T细胞,其表达编码本文所述的本发明的CAR的核酸序列。本发明的T细胞可以是任何T细胞,如培养的T细胞,例如原代T细胞或者来自培养的T细胞系的T细胞,或者获自哺乳动物的T细胞。如果获自哺乳动物,则T细胞可以获自多种来源,包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其它组织或液体。也可以富集或纯化T细胞。T细胞优选为人T细胞(例如分离自人)。T细胞可以为处于任何发育阶段的细胞,包括但不限于CD4⁺/CD8⁺双阳性T细胞、CD4⁺辅助T细胞(例如Th₁和Th₂细胞)、CD8⁺T细胞(例如细胞毒性T细胞)、肿瘤浸润细胞、记忆性T细胞、初始T细胞等。在一个实施方案中,T细胞是CD8⁺T细胞或CD4⁺T细胞。T细胞系可获自例如美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA)和德国微生物和细胞保藏中心(DSMZ),并且其包括,例如Jurkat细胞(ATCC TIB-152)、Sup-T1细胞(ATCC CRL-1942)、RPMI 8402细胞(DSMZ ACC-290)、Karpas 45细胞(DSMZ ACC-545)及以上的衍生物。

[0063] 可以通过“转染”、“转化”或“转导”将编码本发明的CAR的核酸序列引入细胞。本文使用的术语“转染”、“转化”或“转导”指通过利用物理或化学方法将一种或多种外源多核苷

酸引入宿主细胞。许多转染技术在本领域是已知的,并且其包括,例如磷酸钙DNA共沉淀(参见,例如Murray E.J. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, 第7卷, *Gene Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1991)); DEAE-葡聚糖;电穿孔;阳离子脂质体介导的转染;钨颗粒促进的微粒轰击(Johnston, *Nature*, 346:776-777 (1990));以及磷酸锶DNA共沉淀(Brash等, *Mol. Cell Biol.*, 7:2031-2034 (1987))。在感染性颗粒于合适的包装细胞(它们中的许多可商购获得)中生长之后,噬菌体或病毒载体可被引入宿主细胞。

[0064] 在不受具体理论或机制束缚的情况下,认为通过引发针对CD19的抗原特异性应答,本发明的CAR提供下述中的一项或多项:靶向并破坏表达CD19的癌细胞,减少或消除癌细胞,促进免疫细胞至肿瘤部位的浸润,以及增强/延伸抗癌应答。因此,本发明提供破坏恶性B细胞的方法,其包括使前述分离的T细胞中的一种或多种与表达CD19的恶性B细胞群接触,从而CAR产生并与恶性B细胞上的CD19结合,并且所述恶性B细胞被破坏。如以上所讨论的,B细胞恶性肿瘤的治疗通常包括化疗、治疗性单克隆抗体和同种异体干细胞移植;然而,高复发率在经受此类治疗的患者中是常见的。如以上所讨论的,恶性B细胞高表达CD19(参见,例如Nadler等,见上文),并且可将本发明的方法用于治疗本领域已知的任何B细胞恶性肿瘤。成熟B细胞的恶性肿瘤包括但不限于:滤泡型淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、多发性骨髓瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤以及慢性淋巴细胞白血病(Shaffer等,见上文)。

[0065] 可使表达编码本文所述的本发明的抗CD19 CAR的核酸序列的一种或多种分离的T细胞与表达CD19的恶性B细胞群离体、在体内或者在体外接触。“离体”指在具有天然条件的最小改变的有机体外部人工环境中的细胞或组织中或者细胞或组织上实施的方法。相对而言,术语“在体内”指在正常、完整状态下的活的有机体中实施的方法,而“在体外”的方法是利用已从其通常的生物背景中分离的有机体组分实施的方法。本发明的方法优选涉及离体和体内组分。就这点而言,例如以上描述的分体的T细胞可以在表达编码本发明的抗CD19的CAR的核酸序列的条件下离体培养,然后直接转移进受B细胞恶性肿瘤影响的哺乳动物(优选人)中。此类细胞转移方法在本领域被称作“过继性细胞转移(ACT)”,其中将免疫来源的细胞被动转移进新的接受者宿主中,以将供体免疫来源的细胞的功能转移至新宿主。治疗多种类型的癌症(包括血液癌症,如B细胞恶性肿瘤)的过继性细胞转移方法在本领域是已知的,并且公开于例如Gattinoni等, *Nat. Rev. Immunol.*, 6 (5) :383-393 (2006); June, CH, *J. Clin. Invest.*, 117 (6) :1466-76 (2007); Rapoport等, *Blood*, 117 (3) :788-797 (2011);以及Barber等, *Gene Therapy*, 18:509-516 (2011)中。

[0066] 当向哺乳动物施用T细胞时,所述细胞可以是所述哺乳动物同种异体的或者自体的。在“自体”施用方法中,将细胞(例如血液形成干细胞或淋巴细胞)从哺乳动物中移出,保存(并且任选地,被修饰),并返回至同一哺乳动物。在“同种异体”施用方法中,哺乳动物接收来自遗传上相似但是不相同的供体的细胞(例如血液形成干细胞或淋巴细胞)。优选地,细胞是哺乳动物自体的。

[0067] 可取地,以组合物(如药物组合物)的形式向人施用T细胞。可选地,可将编码本发明的CAR的核酸序列或者包含编码CAR的核酸序列的载体配制为组合物,如药物组合物,并施用于人。本发明的药物组合物可以包含表达本发明的CAR的T细胞群。除编码本发明的CAR的核酸序列或者表达本发明的CAR的宿主细胞之外,药物组合物可以包含其它药学活性剂

或药物,如化疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、阿霉素、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱、长春新碱等。在优选实施方案中,药物组合物包含表达本发明的CAR的分离的T细胞,更优选包含表达本发明的CAR的T细胞群。

[0068] 本发明的T细胞可以以盐(例如,药学可接受的盐)的形式提供。合适的药学可接受的酸加成盐包括来源于无机酸和有机酸的那些酸加成盐,所述无机酸如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸和硫酸,以及所述有机酸如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、延胡索酸、苯甲酸、乙醇酸、葡糖酸、琥珀酸和芳基磺酸(例如对甲苯磺酸)。

[0069] 运载体的选择将部分取决于具体的本发明的CAR、编码CAR的核酸序列、载体或表达CAR的宿主细胞,以及取决于用于施用本发明的CAR、编码CAR的核酸序列、载体或表达CAR的宿主细胞的具体方法。因此,存在多种合适的本发明的药物组合物制剂。例如,药物组合物可以包含防腐剂。合适的防腐剂可以包括,例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。任选地,可以使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以全部组合物的重量计约0.0001%至约2%的量存在。

[0070] 此外,可在组合物中使用缓冲剂。合适的缓冲剂包括,例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾以及多种其它酸和盐。任选地,可以使用两种或更多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物通常以全部组合物的重量计约0.001%至约4%的量存在。

[0071] 制备可施用的(例如可肠胃外施用的)组合物的方法对于本领域技术人员而言是已知的,并且更加详细地描述于,例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott Williams&Wilkins,第21版(2005)。

[0072] 可将包含本发明的CAR、编码CAR的核酸序列、表达CAR的载体或宿主细胞的组合物配制为包含复合物(inclusion complex),如环糊精包含复合物或者配制为脂质体。脂质体可以用于将宿主细胞(例如T细胞或NK细胞)或者本发明的核酸序列靶向具体组织。还可将脂质体用于增加本发明的核酸序列的半衰期。许多方法可用于制备脂质体,如描述于例如Szoka等,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.,9:467(1980)以及美国专利4,235,871、4,501,728、4,837,028和5,019,369中的那些方法。

[0073] 组合物可以采用限时释放、延迟释放和持续释放递送系统,以使本发明的组合物的递送发生在待治疗部位敏化之前,并且具有充足的时间引起待治疗部位的敏化。许多类型的释放递送系统均是可获得的,并且对于本领域普通技术人员而言是已知的。此类系统可以避免组合物的重复施用,从而增加对象和医师的便利,并且可以特别适于本发明的实施方案的某些组合物实施方案。

[0074] 可取地,组合物包含有效治疗或预防B细胞恶性肿瘤的量的表达编码本发明的CAR的核酸序列的宿主细胞或者包含此类核酸序列的载体。本文使用的术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等指获得期望的药理学和/或生理学效果。优选地,效果是治疗性的,即所述效果部分或者完全治愈了疾病和/或可归因于所述疾病的不良症状。为此,本发明的方法包括施用“治疗有效量”的组合物,所述组合物包含表达本发明的CAR的宿主细胞或者包含含有编码CAR的核酸序列的载体。“治疗有效量”指在给药时并持续必要的时间段,有效实现期望的治疗结果的量。治疗有效量可以根据诸如下述因素而改变:个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及CAR在所述个体中引发期望的应答的能力。例如,本发明的CAR的治疗有效量是与多发性骨髓瘤细胞上的CD19结合并将其破坏的量。

[0075] 可选地,药理学和/或生理学效果可以是预防性的,即所述效果完全或部分预防疾病或其症状。在该方面,本发明的方法包括向易发B细胞恶性肿瘤的哺乳动物施用“预防有效量”的组合物,所述组合物包含表达本发明的CAR的宿主细胞或者包含含有编码CAR的核酸序列的载体。“预防有效量”指在给药时并持续必要的时段,有效实现期望的预防结果(例如疾病发作的预防)的量。

[0076] 向哺乳动物(例如人)施用的宿主细胞的典型的量可以是,例如在100万至1000亿个细胞的范围内;然而,在该示例性范围以下或以上的量位于本发明的范围内。例如,本发明的宿主细胞的每日剂量可以是约100万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞、或者由任意两个前述数值所限定的范围),优选约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞、或者由任意两个前述数值所限定的范围),更优选约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞、或者由任意两个前述数值所限定的范围)。

[0077] 可以通过对治疗的患者的定期评估来监测治疗或预防效力。对于根据病况在数天或更长时间内的重复施用,重复治疗直至发生期望的疾病症状的阻抑。然而,也可使用其它给药方案,并且其位于本发明的范围内。可以通过组合物的单次推注施用,通过组合物的多次推注施用,或者通过组合物的连续输注施用来递送期望的剂量。

[0078] 可以利用标准施用技术向哺乳动物施用组合物,所述组合物包含表达本发明的CAR的宿主细胞或者包含含有编码CAR的核酸序列的载体,所述标准施用技术包括:口服施用、静脉内施用、腹膜内施用、皮下施用、肺部施用、经皮施用、肌肉内施用、鼻内施用、颊部施用、舌下施用或者栓剂施用。组合物优选适于肠胃外施用。本文使用的术语“肠胃外”包括静脉内施用、肌肉内施用、皮下施用、直肠施用、阴道施用以及腹膜内施用。更优选地,通过静脉注射、腹膜内注射或者皮下注射,利用外周系统递送向哺乳动物施用组合物。

[0079] 可将组合物与一种或多种其它治疗剂一起施用,它们可以共施用于哺乳动物,该组合物包含表达本发明的CAR的宿主细胞或者包含含有编码CAR的核酸序列的载体。“共施用”意为施用一种或多种其它治疗剂以及包含本发明的宿主细胞或者本发明的载体的组合物在时间上足够接近,以使本发明的CAR能够增强一种或多种其它治疗剂的效果,或者反之亦然。就这点而言,可以首先施用包含本发明的宿主细胞或者本发明的载体的组合物,并且然后可以施用一种或多种其它治疗剂,或者反之亦然。可选地,可以同时施用包含本发明的宿主细胞或者本发明的载体的组合物和一种或多种其它治疗剂。可与包含本发明的宿主细胞或者本发明的载体的组合物共同施用的治疗剂的实例是IL-2。

[0080] 一旦向哺乳动物(例如人)施用包含表达本发明的CAR的宿主细胞或者包含含有编码CAR的核酸序列的载体的组合物,可以通过本领域已知的任何合适方法测量所述CAR的生物活性。根据本发明方法,CAR与恶性B细胞上的CD19结合,并且所述恶性B细胞被破坏。可以利用本领域已知的任何合适方法分析CAR与恶性B细胞表面上的CD19的结合,所述方法包括,例如ELISA和流式细胞术。可以利用本领域已知的任何合适方法测量CAR破坏恶性B细胞

的能力,如例如Kochenderfer等, *J. Immunotherapy*, 32 (7) : 689-702 (2009) 以及Herman等, *J. Immunological Methods*, 285 (1) : 25-40 (2004) 中所述的细胞毒性分析。也可以通过分析某些细胞因子(如CD107a、IFN γ 、IL-2和TNF)的表达来测量CAR的生物活性。

[0081] 本领域技术人员将容易地理解,可以以任何数量的方法对本发明的CAR进行修饰,以通过所述修饰增加CAR的治疗或预防效力。例如,可以通过接头将CAR直接或间接缀合至靶向部分。将化合物(例如CAR)缀合至靶向部分的实践在本领域是已知的。参见,例如Wadwa等, *J. Drug Targeting* 3:111 (1995) 和美国专利5,087,616。

[0082] 下述实施例进一步阐明本发明,但是当然不应被解释为以任何方式限制其范围。

[0083] 实施例1

[0084] 该实施例阐述了产生本发明的抗CD19嵌合抗原受体(CAR)的方法。

[0085] 设计并合成一系列抗CD19 CAR。所有CAR均包含由来源于鼠单克隆抗体FMC63的单链可变片段(scFv) (Nicholson等, *Molecular Immunology*, 34 (16-17) : 1157-1165 (1997)) 或全人单克隆抗体47G4 (美国专利申请公开号2010/0104509) 组成的抗原识别结构域。CAR包含来源于人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)受体的信号序列或者来源于人CD8分子的信号序列。CAR包含两个或更多个胞内T细胞信号转导结构域(或者“共刺激结构域”)的组合,该胞内T细胞信号转导结构域来源于人CD3 ζ 分子、人CD28分子、人4-1BB分子、人CD27分子和/或Fc ϵ RI的 γ 链。

[0086] 更具体地,利用质粒MSGV-FMC63-28Z (描述于Kochenderfer等, *Journal of Immunotherapy*, 32 (7) : 689-702 (2009) 中) 作为起始材料,构建表示为FMC63-CD828Z的质粒,该质粒编码包含来源于FMC63的scFv、GM-CSF受体信号序列、CD8胞外组分和跨膜组分以及人CD3 ζ 和CD28分子的胞内T细胞信号转导结构域的CAR。首先用限制酶NotI和BmgBI (New England Biolabs, Ipswich, MA) 切割MSGV-FMC63-28Z质粒,所述酶去除了该质粒的整个CD28部分。接下来,将编码人CD8分子胞外区的一部分和全部跨膜区、CD28分子的细胞质部分以及CD3 ζ 分子的细胞质部分的DNA片段(由Invitrogen, Carlsbad, CA合成) 连接进切割的MSGV-FMC63-28Z质粒中。人CD8、CD28和CD3 ζ 的序列获自美国国家生物技术信息中心网站。关于CAR中包含的各分子部分的指导获自Kochenderfer等, *Journal of Immunotherapy*, 32 (7) : 689-702 (2009)。

[0087] 通过利用全人47G4单克隆抗体的序列(描述于美国专利申请公开号2010/0104509中) 产生全人抗CD19 CAR。通过用KM株接种小鼠产生47G4抗体,其携带人 κ 轻链转基因和人重链转染色体(transchromosome)。47G4抗体轻链和重链可变区的序列获自美国专利申请公开号2010/0104509。设计从5'至3'包含下述元件的47G4 scFv: CD8信号序列、47G4抗体轻链可变区、包含氨基酸序列GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:14) 的接头肽(参见Cooper等, *Blood*, 101 (4) : 1637-1644 (2003)) 以及47G4抗体重链可变区。然后设计编码CAR的DNA序列,其从5'至3'包含下述元件: 以上描述的47G4 scFv、人CD8分子的胞外区的一部分和全部跨膜区,以及人CD28分子和人CD3 ζ 分子的细胞质部分。该CAR被命名为47G4-CD828Z,并且序列由Invitrogen (Carlsbad, CA) 合成。

[0088] 使用标准方法,对pRRLSIN.cPPT.MSCV.coDMF5.oPRE慢病毒质粒(描述于Yang等, *Journal of Immunotherapy*, 33 (6) : 648-658 (2010) 中) 进行修饰,以用以上描述的47G4-CD828Z CAR序列替代所述质粒的coDMF5部分。将得到的质粒表示为LSIN-47G4-CD8CD28Z。

[0089] 通过利用标准方法对以上描述的MSGV-FMC63-CD828Z质粒进行修饰来构建命名为MSGV-47G4-CD8BBZ的质粒。MSGV-47G4-CD8BBZ质粒编码命名为47G4-CD8BBZ的CAR,所述CAR从5'至3'包含:以上描述的47G4 scFv、人CD8分子胞外区的一部分和全部跨膜区、人4-1B B (CD137)分子的包含氨基酸序列RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:15)的一部分,以及CD3 ζ 分子的细胞质部分。

[0090] 通过用MSGV-47G4-CD8BBZ中包含的相同4-1BB序列替代质粒MSGV-FMC63-CD828Z的CD28序列来构建命名为MSGV-FMC63-CD8BBZ的质粒,所述质粒编码命名为FMC63-CD8BBZ CAR的CAR。

[0091] 将编码SP6 scFv的DNA (Ochi等,Proc.Nat1.Acad.Sci.USA,80(20):6351-6355(1983))连接进切除编码FMC63 scFv的DNA之后的MSGV-FMC63-CD828Z逆转录病毒载体,以形成MSGV-SP6-CD828Z,其识别半抗原2,4,6-三硝基苯磺酸,并且在一些实验中用作阴性对照。

[0092] 利用以上所述的方法产生的所有抗CD19 CAR均描述于表1中。

[0093] 表1

[0094]

抗 CD19CAR	氨基酸 SEQ ID NO	信号序列	胞外区和跨 膜区	胞内 T 细胞信号转 导结构域
47G4-CD828Z	1	人 CD8 α	人 CD8 α	CD28 CD3 ζ
47G4-CD8BBZ	2	人 CD8 α	人 CD8 α	4-1BB CD3 ζ
47G4-CD827Z	3	人 CD8 α	人 CD8 α	CD27 CD3 ζ
47G4-CD82827Z	4	人 CD8 α	人 CD8 α	CD28 CD27 CD3 ζ
47G4-CD827BBZ	5	人 CD8 α	人 CD8 α	4-1BB CD27 CD3 ζ
FMC63-CD828Z	6	GM-CSF 受体	人 CD8 α	CD28 CD3 ζ
FMC63-CD827BBZ	7	GM-CSF 受体	人 CD8 α	CD27 4-1BB CD3 ζ
FMC63-CD827Z	8	GM-CSF 受体	人 CD8 α	CD27 CD3 ζ
FMC63-CD82827Z	9	GM-CSF 受体	人 CD8 α	CD28 CD27 CD3 ζ
47G4-CD82827GAMMA	10	人 CD8 α	人 CD8 α	CD28 CD27 Fc ϵ RI γ 链
FMC63-CD82827GAMMA	11	人 CD8 α	人 CD8 α	CD28 CD27 Fc ϵ RI γ 链
47G4-CD828GAMMA	12	人 CD8 α	人 CD8 α	CD28 Fc ϵ RI γ 链
FMC63-CD828GAMMA	13	GM-CSF 受体	人 CD8 α	CD28 Fc ϵ RI γ 链

[0095] 该实施例的结果证实了基于全人单克隆抗CD19抗体和鼠单克隆抗CD19抗体的抗

CD19 CAR的产生。

[0096] 实施例2

[0097] 该实施例阐述了产生表达编码本发明的CAR的核酸序列的T细胞的方法。

[0098] 产生编码以上所述的CAR但不能复制的 γ 逆转录病毒或慢病毒,并将其用于转导T细胞。为了瞬时产生不能复制的 γ 逆转录病毒,利用LIPOFECTAMINETM2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA),用编码实施例1中所述的CAR的质粒以及编码RD114包膜蛋白的质粒(Porter等, Human Gene Therapy, 7 (8) : 913-919 (1996))转染293GP包装细胞(Burns等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90 (17) : 8033-8037 (1993))。将转染的细胞在37°C,于不含抗生素的D10培养基中孵育6-8小时。然后用新鲜的D10培养基替代用于转染的培养基,并将细胞再孵育36-48小时。在转染期间和转染之后,在聚-D-赖氨酸包被的平皿(BD Biosciences, San Jose, CA)上培养293GP细胞。从平皿中移出包含逆转录病毒的上清液,并离心,以移除细胞碎片。将上清液于-80°C储存。

[0099] 利用Yang等, Journal of Immunotherapy, 33 (6) : 648-658 (2010)中所述的方案,产生包含编码实施例1中所述的各CAR的慢病毒的上清液。

[0100] 将外周血单核细胞(PBMC)解冻,并在T细胞培养基中洗涤一次。以 1×10^6 个/mL的浓度,在包含50ng/mL抗CD3单克隆抗体OKT3 (Ortho, Bridgewater, NJ)和300IU/mL IL-2的T细胞培养基中悬浮PBMC。向75cm²培养瓶(Corning, Corning, NY)中添加20mL该悬液。将瓶在37°C和5%CO₂下竖直培养(参见,例如Kochenderfer等, Journal of Immunotherapy, 32 (7) : 689-702 (2009))。

[0101] 通过下述实施T细胞的 γ 逆转录病毒转导:首先将RETRONECTINTM (Takara/Clontech Laboratories, Mountain View, CA)以10g/mL的浓度溶解于PBS中,然后将2mL该RetroNectinTM的PBS溶液添加至非组织培养包被的6孔板(BD Biosciences)的各孔中。将板室温(RT)孵育2小时。孵育之后,吸去RETRONECTINTM溶液,并向各RETRONECTINTM包被的孔中添加2mL由汉克斯平衡盐溶液(HBSS)加2%的牛血清白蛋白(BSA)组成的封闭液。将板室温孵育30分钟。吸去封闭液,并用HBSS+2.5%HEPES的溶液清洗孔。将 γ 逆转录病毒上清液快速解冻,并在T细胞培养基中以1:1释稀。然后向各RETRONECTINTM包被的孔中添加2mL稀释的上清液。

[0102] 添加上清液之后,将板在32°C下,以2000xg离心2小时。然后从孔中吸去上清液,并向各孔中添加 2×10^6 个用OKT3和IL-2培养了2天的T细胞。当向逆转录病毒包被的板中添加T细胞时,将其以 0.5×10^6 个细胞/mL的浓度在添加300IU/mL IL-2的T细胞培养基中悬浮。向各孔添加T细胞之后,将板以1000xg离心10分钟,并在37°C孵育过夜。孵育24-30小时之后,将T细胞从板中移出,以 0.5×10^6 个细胞/mL的浓度在含300IU/mL IL-2的新鲜T细胞培养基中悬浮,并在37°C和5%CO₂下培养。

[0103] 对于T细胞的慢病毒转导,将活化的PBMC在含有硫酸鱼精蛋白和300IU/mL IL-2的慢病毒上清液中悬浮。将细胞以1200xg离心1小时。然后将细胞在37°C培养3小时。接下来,用+10%胎牛血清(Invitrogen, Carlsbad, CA)和IL-2的RPMI (Mediatech, Inc., Manassas, VA)以1:1稀释上清液。将细胞在稀释的上清液中培养过夜,然后将其返回至添加5%人AB血清和IL-2的AIM V培养基中培养。

[0104] 评估基于FMC63的CAR在转导的T细胞上的表达。具体地,将转导的T细胞洗涤,并在

FAC缓冲液(添加0.1%叠氮化钠和0.4%BSA的磷酸盐缓冲盐水(PBS))中悬浮。添加生物素标记的多克隆山羊抗小鼠F(ab)2抗体(抗Fab, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)以检测FMC63 scFv。将细胞在4℃孵育25分钟,并洗涤一次。将细胞在FAC缓冲液中悬浮,并用正常的小鼠IgG(Invitrogen, Carlsbad, CA)封闭。然后将细胞用藻红蛋白(PE)标记的链霉亲和素(BD Pharmingen, San Diego, CA)、抗CD4、抗CD8和抗CD3染色。用LSR II流式细胞仪(BD Biosciences)进行流式细胞术捕获,并用FlowJo软件(Treestar, Inc. Ashland, OR)进行分析。利用除了使用生物素标记的蛋白L(GenScript, Piscataway, NJ)代替生物素标记的多克隆山羊抗小鼠F(ab)2抗体之外几乎相同的方法,对基于47G4的CAR在转导的T细胞上的表达进行评估。

[0105] 将表达CAR(CAR+)的T细胞的百分比计算为:各实验中转导CAR的培养物中用抗Fab抗体或蛋白L染色的T细胞的百分比减去来自同一供体,用抗Fab或蛋白L染色的同样培养的未转导的T细胞的百分比。

[0106] 在培养第7天,表达包含来源于鼠FMC63抗体的scFv的CAR的T细胞的百分比如下:FMC63-28Z, 71%; FMC63-CD828Z, 88%; 以及FMC63-CD8BBZ, 87%。如图1所示,与包含IL-2的培养物中表达FMC63-CD828Z CAR或FMC63-CD8BB CAR的T细胞相比,表达FMC63-28Z CAR的T细胞显示出较短的体外存活。也在用编码FMC63-CD828Z、FMC63-CD8BBZ和FMC63-CD827Z的 γ 逆转录病毒转导的T细胞上检测到了高水平的CAR表达。

[0107] 包含来源于47G4抗体的scFv的CAR在人T细胞表面高水平表达。具体地,图2A-2D显示了包含CD27胞内信号转导结构域的基于47G4的CAR的表达,而图3A和3B显示了47G4-CD828Z CAR的表达。

[0108] 该实施例的结果证实可将T细胞工程化,以表达本发明的抗CD19CAR。

[0109] 实施例3

[0110] 该实施例描述了用于测定本发明的CAR对CD19的特异性的一系列实验。

[0111] 患者样本和细胞系

[0112] 非白血病PBMC样本获自在美国国家癌症研究所(NCI)外科分部的机构审查委员会批准的方案中登记的黑素瘤患者、慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者或者淋巴瘤患者。使用来自5名不同患者的细胞。供体1患有CLL,供体2为正常供体,供体3和供体5均患有淋巴瘤,以及供体4患有黑素瘤。将PBMC在添加10%DMSO的90%FBS(Sigma, St. Louis, MO)中冷冻保藏。在使用原代CLL细胞作为靶细胞的实验中,使用来自患有CLL的患者的未处理的PBMC。使用下述表达CD19的永生化细胞系:NALM-6(来自DSMZ的急性淋巴细胞白血病, Braunschweig, Germany)和CD19-K562。使用下述CD19阴性细胞系:A549(肺癌,来自ATCC)、CCRF-CEM(T细胞白血病,来自ATCC)、MDA231(乳腺癌,来自ATCC)和TC71(尤文氏肉瘤,由M. Tsokos博士, National Cancer Institute, Bethesda, MD惠赠)。所有细胞系均在R10培养基中维持。当在分析中将CLL PBMC用作靶标时,在分析之前,将细胞在R10培养基中培养12-18小时。

[0113] 干扰素和TNF酶联免疫吸附分析(ELISA)

[0114] 临床试验中,接受表达CAR FMC63-28Z的T细胞输注的患者中低血压和其它毒性的发生促进,表达FMC63-28Z的T细胞的TNF产生与表达本发明的CAR的T细胞的TNF产生的比较。

[0115] 将靶细胞洗涤,并以 1×10^6 个细胞/mL在不含IL-2的T细胞培养基中悬浮。向96孔

圆底板 (Corning, Tewksbury, MA) 的每两个孔中添加100,000个各靶细胞类型的靶细胞。也准备仅包含T细胞的孔。将板在37°C孵育18-20小时。孵育之后,利用标准方法进行IFN γ 或TNF ELISA分析 (Pierce, Rockford, IL)。在一些实验中,通过将TNF水平除以过夜培养物中表达给定CAR的T细胞的百分比而将TNF ELISA结果标准化。如实施例2中所述测定CAR的表达。

[0116] 如图4A和4B所示,当针对细胞表面CAR表达标准化时,表达FMC63-28Z的T细胞一致地比表达FMC-CD828Z CAR和FMC63-CD8BBZ CAR的T细胞产生更多TNF。FMC63-28Z CAR和FMC63-CD828Z CAR的唯一区别是用FMC63-CD828Z中来自人CD8蛋白的胞外组分和跨膜组分替代FMC63-28Z的人CD28的胞外组分和跨膜组分。FMC63-28Z与FMC63-CD828Z之间T细胞持久性和炎性细胞因子产生的明显区别导致在随后的CAR设计中使用CD8胞外间隔子和跨膜组分。

[0117] 如表2和3中所示(所有单位均为pg/mL IFN γ),当将用抗CD19 CAR转导的T细胞与表达CD19的细胞系CD19-K562过夜培养时,它们产生大量IFN γ ,但是当将转导CAR的T细胞与阴性对照细胞系培养时,它们仅产生背景水平的IFN γ 。47G4-CD828Z CAR的IFN γ ELISA结果显示于图5中。

[0118] 表2

[0119]	CD19 阳性靶标			CD19 阴性靶标				
	效应细胞	CD19-K562	CLL	NGFR-K562	CEM	A549	单独的 T 细胞	CAR+ T 细胞的%
[0120]	47G4-CD8BBZ	33926	10498	5885	6342	8188	5300	90
	FMC63-CD8BBZ	44327	13919	4211	4405	5407	4003	86
	未转导的	<12	1060	16	<12	<12		0

[0121] 表3

[0122]	效应细胞	CD19 阳性靶标		CD19 阴性靶标		单独的 T 细胞
		CD19-K562	CLL	NGFR-K562	MDA231	
	47G4-CD827Z	7435	1833	39	87	37
	47G4-CD828Z	13819	1300	22	45	16
	47G4-CD828GAMMA	9963	866	19	30	<12
	47G4-CD82827Z	11874	2436	32	68	27
	47G4-CD82827GAMMA	8351	870	23	46	18
	47G4-CD8BBZ	13381	2394	87	175	82
	未转导的	18	16	16	32	<12

[0123] 高背景IFN γ 分泌是用包含4-1BB部分的CAR的一致观察结果。用FMC63-CD827Z CAR转导的T细胞以CD19特异性的方式产生IFN γ 。当将FMC63-CD827Z细胞与CA19阴性的NGFR-K562和CCRF-CEM细胞一起培养时,引发低得多的IFN γ 水平。FMC63-CD827Z转导的T细胞也以抗原特异性的方式产生TNF。

[0124] CD107a分析

[0125] 对于测试的各T细胞培养物,准备两个或三个单独的管。一个管包含CD19-K562细胞,一个管包含未处理的原代CLL细胞,以及另一个管包含NGFR-K562细胞。在一些实验中,省略CD19-K562管。所有管均包含用以上所述的抗CD19 CAR转导的T细胞、1mL AIM VTM培养基 (Life Technologies, Carlsbad, CA) +5% 人血清、滴定浓度的抗CD107a抗体

(eBioscience, Inc., San Diego, CA; 克隆 eBioH4A3) 以及 1 μ L Golgi Stop (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)。将所有管在 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 小时, 然后针对 CD3、CD4 和 CD8 的表达进行染色。

[0126] 在针对用表达 CD19 的靶细胞进行刺激的应答中, 来自不同对象的表达 CAR FMC63-CD828Z、FMC63-CD827Z、FMC63-CD8BBZ、47G4-CD827Z、47G4-CD82827Z、47G4-CD827BBZ 或 47G4-CD8BBZ 的 T 细胞特异性上调 CD107a, 并且 47G4-CD827Z、47G4-CD82827Z、47G4-CD827BBZ CAR 的 CD107a 分析的结果显示于图 6A-6D 中。这指示 T 细胞 CD19 特异性脱粒的发生, 其为穿孔素介导的细胞毒性的先决条件 (参见, 例如 Rubio 等, Nature Medicine, 9 (11): 1377-1382 (2003))。

[0127] 增殖分析

[0128] 对当用表达 CD19 的靶细胞刺激时, 用抗 CD19 CAR 转导的 T 细胞的增殖能力进行评估。具体地, 将 0.5×10^6 个受辐射的 CD19-K562 细胞或者 0.5×10^6 个受辐射的 NGFR-K562 细胞与 0.75×10^6 个用抗 CD19 CAR 转导的全部 T 细胞共培养。如 Mannering 等, J. Immunological Methods, 283 (1-2): 173-183 (2003) 中所述, 用羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯 (CFSE) (Life Technologies, Carlsbad, CA) 标记 T 细胞。用于共培养的培养基是 AIM VTM 培养基 (Life Technologies, Carlsbad, CA) + 5% 人 AB 血清。未向培养基中添加 IL-2。开始 4 天之后, 用排除死细胞的台盼蓝对各共培养物中的活细胞进行计数, 并且如实施例 2 中所述进行流式细胞术。

[0129] 如图 7A-7C 所示, 表达 CAR FMC63-CD8BBZ、FMC63-CD828Z 和 47G4-CD8BBZ 的 T 细胞, 当与 CD19-K562 细胞一起培养时, 均显示出比当与阴性对照 NGFR-K562 细胞一起培养时更高的 CFSE 稀释度。这些结果指示, 当用表达 CD19 的靶细胞刺激时, 用抗 CD19 CAR 转导的 T 细胞特异性增殖。

[0130] 该实施例的结果证实表达本发明的 CAR 的 T 细胞显示出 CD19 特异性的细胞因子产生、脱粒和增殖。

[0131] 实施例 4

[0132] 该实施例阐述了表达本发明的抗 CD19 CAR 的 T 细胞能够破坏慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 细胞。

[0133] 进行细胞毒性分析以确定用本发明的 FMC63-CD828Z CAR 转导的 T 细胞是否能够破坏来自患有 CLL 的患者的表达 CD19 的未处理的 PBMC。具体地, 利用例如 Kochenderfer 等, J. Immunotherapy, 32 (7): 689-702 (2009) 和 Hermans 等, J. Immunological Methods, 285 (1): 25-40 (2004) 中所述的分析, 通过比较表达 CD19 的靶细胞 (即 CLL PBMC) 的存活相对于阴性对照 CCRF-CEM 细胞的存活来测量靶细胞的细胞毒性。

[0134] 将 CCRF-CEM 细胞以 1.5×10^6 个细胞/mL 的浓度在 R10 培养基中悬浮, 并以 5M 的浓度添加荧光染料 5-(和-6)-((4-氯甲基) 苯甲酰基) 氨基) 四甲基罗丹明 (CMTMR) (Life Technologies, Carlsbad, CA)。将细胞混合, 然后在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。然后将细胞洗涤, 在细胞毒性培养基中悬浮, 并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。然后将细胞洗涤两次, 并在细胞毒性培养基中悬浮。以 1×10^6 个细胞/mL 在 PBS+0.1% BSA 中悬浮 CLL PBMC。以 1M 的浓度向该细胞悬液中添加荧光染料羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯 (CFSE) (Life Technologies, Carlsbad, CA)。将细胞在 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟。孵育之后, 通过添加与细胞悬液的体积相等体积的 FBS 来终止标

记反应,并将细胞室温孵育2分钟。然后将细胞洗涤,并在细胞毒性培养基中悬浮。

[0135] 在相同的管中,将大约50,000个表达CD19的CLL PBMC和50,000个CCRF-CEM细胞与不同数量的转导CAR的T细胞组合。在所有实验中,将用FMC63-CD828Z CAR转导的效应T细胞的细胞毒性与来自同一对象的用SP6-28Z对照CAR转导的或者未转导的阴性对照效应T细胞的细胞毒性进行比较。以下述T细胞:靶细胞比率,在无菌的5mL试管(BD Biosciences, Franklin Lakes,NJ)中建立共培养物:20:1、6.7:1、2.2和0.7:1,一式两份。将培养物在37℃孵育4小时。如厂商所推荐的,在孵育之后立即添加7-氨基-放线菌素D(7AAD;BD Biosciences, Franklin Lakes,NJ),并用BD FACS Canto II (BD Biosciences)进行流式细胞术捕获。用FlowJo软件(Treestar, Inc. Ashland, OR)进行分析。对7AAD阴性(活的)细胞的分析进行门控,并测定各T细胞和靶细胞培养物的活的CLL靶细胞和活的CCRF-CEM阴性对照细胞的百分比。

[0136] 对于各培养物,通过将活的CLL PBMC的百分数除以活的CCRF-CEM阴性对照细胞的百分数,确定CLL PBMC的存活百分数。通过将各T细胞和靶细胞培养物中的CLL PBMC存活百分数除以在仅包含CLL靶细胞和CCRF-CEM阴性对照细胞而不包含任何效应T细胞的管中CLL靶细胞的百分数:CCRF-CEM阴性对照细胞的百分数的比率来计算校正的CLL PBMC存活百分数。该校正对于解释起始细胞数目的变化和自发的靶细胞死亡是必要的。将细胞毒性计算为CLL PBMC的细胞毒性百分数=100-校正的CLL PBMC存活百分数。对于所有效应细胞:靶标比率,一式两份测定细胞毒性,并且对结果进行平均。

[0137] 细胞毒性分析的结果显示于图8中,并且证实本发明的抗CD19 CAR可以用于破坏恶性B细胞的方法中。

[0138] 实施例5

[0139] 该实施例阐述了表达本发明的抗CD19 CAR的T细胞能够降低动物模型中恶性B细胞肿瘤的生长。

[0140] 使免疫受损的NSG小鼠皮下注射400万个CD19+NALM6肿瘤细胞。6天后,在形成可触知的肿瘤之后,对小鼠进行单一静脉注射已用MSGV-FMC63-28Z CAR载体(描述于Kochenderfer等,Journal of Immunotherapy,32(7):689-702(2009)等)或者LSIN-47G4-CD8CD28Z CAR载体(描述于实施例1中)转导的人T细胞的处理。每三天对肿瘤进行测量,并与未处理小鼠中的肿瘤进行比较。

[0141] 显示于图9中的该实验的结果指示,表达FMC63-28Z CAR或47G4-CD8CD28Z CAR的T细胞显著降低了处理的小鼠中肿瘤的大小。

[0142] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利在此通过引用并入,其程度如同每份参考文献单独地和具体地表示为通过引用并入并且在本文以其整体示出。

[0143] 在描述本发明的上下文中(特别是在以下权利要求的上下文中)使用的术语“一个/一种”和“所述”和“至少一种/一个”以及类似的指示物应被解释为覆盖单数和复数两者,除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。术语“至少一种/一个”之后一项或多项列表(例如,“A和B中的至少一种/一个”)的使用应被解释为意指选自列出的项中的一项(A或B)或两个或更多个列出的项的组合(A和B),除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应被解释为开放式的术语(即意指“包括,但不限于”),除非另外指明。本文数值的范围的描述仅旨在用作分别提及属于范围内的每个单独数值的速记

法,除非本文另外指出,并且每个单独的数值均并入说明书中如同其被单独的列举出一样。本文所述的所有方法可以以任何合适的顺序进行,除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有的实例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅仅意图更好地阐明本发明,并且不会对以其它方式要求保护的本发明范围构成限制。不应将本说明书中的语言解释为表明任何未要求保护的组分对实施本发明是必要的。

[0144] 本发明的优选实施方案在本文中描述,包括发明人已知的实施该发明的最佳模式。对本领域的普通技术人员来说,阅读上述说明书后这些优选的实施方案中的改变可以是显而易见的。发明人期望熟练的技术人员酌情利用这些改变,并且发明人意欲以不同于本文具体描述的方式实施该发明。因此,在适用法律允许的情况下,本发明包括在所附的权利要求中所引用主题的所有修改和等同物。此外,在其所有可能的改变中上述要素的任何组合涵盖于本发明中,除非本文另外说明或上下文中明显矛盾。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 美国卫生和人力服务部
 [0003] <120> 靶向CD-19的嵌合抗原受体
 [0004] <130> 720755
 [0005] <150> US 62/006,313
 [0006] <151> 2014-06-02
 [0007] <160> 15
 [0008] <170> PatentIn version 3.5
 [0009] <210> 1
 [0010] <211> 502
 [0011] <212> PRT
 [0012] <213> 人工序列
 [0013] <220>
 [0014] <223> 合成的
 [0015] <400> 1
 [0016] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 [0017] 1 5 10 15
 [0018] His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
 [0019] 20 25 30
 [0020] Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 [0021] 35 40 45
 [0022] Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 [0023] 50 55 60
 [0024] Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
 [0025] 65 70 75 80
 [0026] Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 [0027] 85 90 95
 [0028] Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 [0029] 100 105 110
 [0030] Tyr Gly Ser Ser Arg Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 [0031] 115 120 125
 [0032] Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 [0033] 130 135 140
 [0034] Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 [0035] 145 150 155 160
 [0036] Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe
 [0037] 165 170 175
 [0038] Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

[0039]		180		185		190										
[0040]	Glu	Trp	Met	Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Ala
[0041]		195		200		205										
[0042]	Gln	Gln	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser
[0043]		210		215		220										
[0044]	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
[0045]		225		230		235										
[0046]	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Ala	Val	Ala	Ala	Asp	Trp	Leu	Asp	Pro	Trp
[0047]		245		250		255										
[0048]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Phe	Val	Pro	Val	Phe	Leu
[0049]		260		265		270										
[0050]	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala
[0051]		275		280		285										
[0052]	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg
[0053]		290		295		300										
[0054]	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys
[0055]		305		310		315										
[0056]	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu
[0057]		325		330		335										
[0058]	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Asn	His	Arg	Asn	Arg	Ser	Lys
[0059]		340		345		350										
[0060]	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg
[0061]		355		360		365										
[0062]	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp
[0063]		370		375		380										
[0064]	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala
[0065]		385		390		395										
[0066]	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu
[0067]		405		410		415										
[0068]	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp
[0069]		420		425		430										
[0070]	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu
[0071]		435		440		445										
[0072]	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile
[0073]		450		455		460										
[0074]	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr
[0075]		465		470		475										
[0076]	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met
[0077]		485		490		495										

[0078]	Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0079]	500
[0080]	<210> 2
[0081]	<211> 508
[0082]	<212> PRT
[0083]	<213> 人工序列
[0084]	<220>
[0085]	<223> 合成的
[0086]	<400> 2
[0087]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0088]	1 5 10 15
[0089]	His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
[0090]	20 25 30
[0091]	Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
[0092]	35 40 45
[0093]	Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0094]	50 55 60
[0095]	Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
[0096]	65 70 75 80
[0097]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0098]	85 90 95
[0099]	Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
[0100]	100 105 110
[0101]	Tyr Gly Ser Ser Arg Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
[0102]	115 120 125
[0103]	Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
[0104]	130 135 140
[0105]	Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
[0106]	145 150 155 160
[0107]	Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe
[0108]	165 170 175
[0109]	Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
[0110]	180 185 190
[0111]	Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala
[0112]	195 200 205
[0113]	Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
[0114]	210 215 220
[0115]	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
[0116]	225 230 235 240

[0117]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp
[0118]	245 250 255
[0119]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu
[0120]	260 265 270
[0121]	Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
[0122]	275 280 285
[0123]	Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
[0124]	290 295 300
[0125]	Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
[0126]	305 310 315 320
[0127]	Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
[0128]	325 330 335
[0129]	Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Phe Ser
[0130]	340 345 350
[0131]	Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro
[0132]	355 360 365
[0133]	Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys
[0134]	370 375 380
[0135]	Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe
[0136]	385 390 395 400
[0137]	Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
[0138]	405 410 415
[0139]	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
[0140]	420 425 430
[0141]	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
[0142]	435 440 445
[0143]	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
[0144]	450 455 460
[0145]	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
[0146]	465 470 475 480
[0147]	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
[0148]	485 490 495
[0149]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0150]	500 505
[0151]	<210> 3
[0152]	<211> 509
[0153]	<212> PRT
[0154]	<213> 人工序列
[0155]	<220>

[0156] <223> 合成的
 [0157] <400> 3
 [0158] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 [0159] 1 5 10 15
 [0160] His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
 [0161] 20 25 30
 [0162] Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 [0163] 35 40 45
 [0164] Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 [0165] 50 55 60
 [0166] Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
 [0167] 65 70 75 80
 [0168] Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 [0169] 85 90 95
 [0170] Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 [0171] 100 105 110
 [0172] Tyr Gly Ser Ser Arg Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 [0173] 115 120 125
 [0174] Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 [0175] 130 135 140
 [0176] Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 [0177] 145 150 155 160
 [0178] Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe
 [0179] 165 170 175
 [0180] Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 [0181] 180 185 190
 [0182] Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala
 [0183] 195 200 205
 [0184] Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 [0185] 210 215 220
 [0186] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 [0187] 225 230 235 240
 [0188] Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp
 [0189] 245 250 255
 [0190] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu
 [0191] 260 265 270
 [0192] Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 [0193] 275 280 285
 [0194] Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg

[0195]	290	295	300
[0196]	Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys		
[0197]	305	310	315 320
[0198]	Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu		
[0199]		325	330 335
[0200]	Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Gln Arg Arg		
[0201]		340	345 350
[0202]	Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro		
[0203]		355	360 365
[0204]	Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile		
[0205]		370	375 380
[0206]	Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro Arg Val Lys		
[0207]		385	390 395 400
[0208]	Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln		
[0209]		405	410 415
[0210]	Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu		
[0211]		420	425 430
[0212]	Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg		
[0213]		435	440 445
[0214]	Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met		
[0215]		450	455 460
[0216]	Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly		
[0217]		465	470 475 480
[0218]	Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp		
[0219]		485	490 495
[0220]	Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0221]		500	505
[0222]	<210> 4		
[0223]	<211> 550		
[0224]	<212> PRT		
[0225]	<213> 人工序列		
[0226]	<220>		
[0227]	<223> 合成的		
[0228]	<400> 4		
[0229]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
[0230]	1	5	10 15
[0231]	His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu		
[0232]		20	25 30
[0233]	Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln		

[0234]	35	40	45
[0235]	Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
[0236]	50	55	60
[0237]	Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile		
[0238]	65	70	75
[0239]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[0240]	85	90	95
[0241]	Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln		
[0242]	100	105	110
[0243]	Tyr Gly Ser Ser Arg Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile		
[0244]	115	120	125
[0245]	Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser		
[0246]	130	135	140
[0247]	Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys		
[0248]	145	150	155
[0249]	Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe		
[0250]	165	170	175
[0251]	Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu		
[0252]	180	185	190
[0253]	Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala		
[0254]	195	200	205
[0255]	Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser		
[0256]	210	215	220
[0257]	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val		
[0258]	225	230	235
[0259]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp		
[0260]	245	250	255
[0261]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu		
[0262]	260	265	270
[0263]	Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala		
[0264]	275	280	285
[0265]	Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg		
[0266]	290	295	300
[0267]	Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys		
[0268]	305	310	315
[0269]	Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu		
[0270]	325	330	335
[0271]	Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser Lys		
[0272]	340	345	350

[0273]	Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg
[0274]	355 360 365
[0275]	Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp
[0276]	370 375 380
[0277]	Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly
[0278]	385 390 395 400
[0279]	Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg
[0280]	405 410 415
[0281]	Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro
[0282]	420 425 430
[0283]	Glu Pro Ala Cys Ser Pro Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
[0284]	435 440 445
[0285]	Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
[0286]	450 455 460
[0287]	Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
[0288]	465 470 475 480
[0289]	Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
[0290]	485 490 495
[0291]	Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
[0292]	500 505 510
[0293]	Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
[0294]	515 520 525
[0295]	Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
[0296]	530 535 540
[0297]	Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0298]	545 550
[0299]	<210> 5
[0300]	<211> 556
[0301]	<212> PRT
[0302]	<213> 人工序列
[0303]	<220>
[0304]	<223> 合成的
[0305]	<400> 5
[0306]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0307]	1 5 10 15
[0308]	His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
[0309]	20 25 30
[0310]	Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
[0311]	35 40 45

[0312]	Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0313]	50 55 60
[0314]	Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
[0315]	65 70 75 80
[0316]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0317]	85 90 95
[0318]	Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
[0319]	100 105 110
[0320]	Tyr Gly Ser Ser Arg Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
[0321]	115 120 125
[0322]	Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
[0323]	130 135 140
[0324]	Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
[0325]	145 150 155 160
[0326]	Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe
[0327]	165 170 175
[0328]	Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
[0329]	180 185 190
[0330]	Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala
[0331]	195 200 205
[0332]	Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
[0333]	210 215 220
[0334]	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
[0335]	225 230 235 240
[0336]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp
[0337]	245 250 255
[0338]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu
[0339]	260 265 270
[0340]	Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
[0341]	275 280 285
[0342]	Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
[0343]	290 295 300
[0344]	Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
[0345]	305 310 315 320
[0346]	Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
[0347]	325 330 335
[0348]	Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Gln Arg Arg
[0349]	340 345 350
[0350]	Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro

[0351]	355	360	365
[0352]	Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile		
[0353]	370	375	380
[0354]	Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro Arg Phe Ser		
[0355]	385	390	395
[0356]	Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro		
[0357]	405	410	415
[0358]	Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys		
[0359]	420	425	430
[0360]	Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe		
[0361]	435	440	445
[0362]	Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu		
[0363]	450	455	460
[0364]	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		
[0365]	465	470	475
[0366]	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys		
[0367]	485	490	495
[0368]	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala		
[0369]	500	505	510
[0370]	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys		
[0371]	515	520	525
[0372]	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr		
[0373]	530	535	540
[0374]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0375]	545	550	555
[0376]	<210> 6		
[0377]	<211> 506		
[0378]	<212> PRT		
[0379]	<213> 人工序列		
[0380]	<220>		
[0381]	<223> 合成的		
[0382]	<400> 6		
[0383]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro		
[0384]	1	5	10
[0385]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser		
[0386]	20	25	30
[0387]	Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser		
[0388]	35	40	45
[0389]	Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly		

[0390]	50	55	60
[0391]	Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val		
[0392]	65	70	75
[0393]	Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr		
[0394]	85	90	95
[0395]	Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln		
[0396]	100	105	110
[0397]	Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
[0398]	115	120	125
[0399]	Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser		
[0400]	130	135	140
[0401]	Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala		
[0402]	145	150	155
[0403]	Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu		
[0404]	165	170	175
[0405]	Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu		
[0406]	180	185	190
[0407]	Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser		
[0408]	195	200	205
[0409]	Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln		
[0410]	210	215	220
[0411]	Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr		
[0412]	225	230	235
[0413]	Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr		
[0414]	245	250	255
[0415]	Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val		
[0416]	260	265	270
[0417]	Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro		
[0418]	275	280	285
[0419]	Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro		
[0420]	290	295	300
[0421]	Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu		
[0422]	305	310	315
[0423]	Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys		
[0424]	325	330	335
[0425]	Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg		
[0426]	340	345	350
[0427]	Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met		
[0428]	355	360	365

[0429]	Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala
[0430]	370 375 380
[0431]	Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg
[0432]	385 390 395 400
[0433]	Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
[0434]	405 410 415
[0435]	Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
[0436]	420 425 430
[0437]	Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
[0438]	435 440 445
[0439]	Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
[0440]	450 455 460
[0441]	Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
[0442]	465 470 475 480
[0443]	Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
[0444]	485 490 495
[0445]	Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0446]	500 505
[0447]	<210> 7
[0448]	<211> 560
[0449]	<212> PRT
[0450]	<213> 人工序列
[0451]	<220>
[0452]	<223> 合成的
[0453]	<400> 7
[0454]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
[0455]	1 5 10 15
[0456]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
[0457]	20 25 30
[0458]	Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
[0459]	35 40 45
[0460]	Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
[0461]	50 55 60
[0462]	Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
[0463]	65 70 75 80
[0464]	Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
[0465]	85 90 95
[0466]	Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
[0467]	100 105 110

[0468]	Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0469]	115 120 125
[0470]	Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
[0471]	130 135 140
[0472]	Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
[0473]	145 150 155 160
[0474]	Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
[0475]	165 170 175
[0476]	Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
[0477]	180 185 190
[0478]	Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
[0479]	195 200 205
[0480]	Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
[0481]	210 215 220
[0482]	Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
[0483]	225 230 235 240
[0484]	Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
[0485]	245 250 255
[0486]	Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val
[0487]	260 265 270
[0488]	Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
[0489]	275 280 285
[0490]	Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
[0491]	290 295 300
[0492]	Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
[0493]	305 310 315 320
[0494]	Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
[0495]	325 330 335
[0496]	Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg
[0497]	340 345 350
[0498]	Asn Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu
[0499]	355 360 365
[0500]	Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser
[0501]	370 375 380
[0502]	Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser
[0503]	385 390 395 400
[0504]	Pro Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile
[0505]	405 410 415
[0506]	Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp

[0546]	115	120	125
[0547]	Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser		
[0548]	130	135	140
[0549]	Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala		
[0550]	145	150	155
[0551]	Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu		
[0552]	165	170	175
[0553]	Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu		
[0554]	180	185	190
[0555]	Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser		
[0556]	195	200	205
[0557]	Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln		
[0558]	210	215	220
[0559]	Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr		
[0560]	225	230	235
[0561]	Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr		
[0562]	245	250	255
[0563]	Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val		
[0564]	260	265	270
[0565]	Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro		
[0566]	275	280	285
[0567]	Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro		
[0568]	290	295	300
[0569]	Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu		
[0570]	305	310	315
[0571]	Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys		
[0572]	325	330	335
[0573]	Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg		
[0574]	340	345	350
[0575]	Asn Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu		
[0576]	355	360	365
[0577]	Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser		
[0578]	370	375	380
[0579]	Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser		
[0580]	385	390	395
[0581]	Pro Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln		
[0582]	405	410	415
[0583]	Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu		
[0584]	420	425	430

[0585]	Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
[0586]	435 440 445
[0587]	Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
[0588]	450 455 460
[0589]	Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
[0590]	465 470 475 480
[0591]	Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
[0592]	485 490 495
[0593]	Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
[0594]	500 505 510
[0595]	Arg
[0596]	<210> 9
[0597]	<211> 554
[0598]	<212> PRT
[0599]	<213> 人工序列
[0600]	<220>
[0601]	<223> 合成的
[0602]	<400> 9
[0603]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
[0604]	1 5 10 15
[0605]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
[0606]	20 25 30
[0607]	Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
[0608]	35 40 45
[0609]	Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
[0610]	50 55 60
[0611]	Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
[0612]	65 70 75 80
[0613]	Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
[0614]	85 90 95
[0615]	Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
[0616]	100 105 110
[0617]	Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0618]	115 120 125
[0619]	Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
[0620]	130 135 140
[0621]	Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
[0622]	145 150 155 160
[0623]	Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu

[0624]		165		170		175
[0625]	Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu					
[0626]		180		185		190
[0627]	Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser					
[0628]		195		200		205
[0629]	Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln					
[0630]		210		215		220
[0631]	Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr					
[0632]		225		230		235
[0633]	Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr					
[0634]		245		250		255
[0635]	Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val					
[0636]		260		265		270
[0637]	Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro					
[0638]		275		280		285
[0639]	Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro					
[0640]		290		295		300
[0641]	Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu					
[0642]		305		310		315
[0643]	Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys					
[0644]		325		330		335
[0645]	Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg					
[0646]		340		345		350
[0647]	Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met					
[0648]		355		360		365
[0649]	Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala					
[0650]		370		375		380
[0651]	Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Arg Arg Lys Tyr Arg					
[0652]		385		390		395
[0653]	Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr					
[0654]		405		410		415
[0655]	Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp					
[0656]		420		425		430
[0657]	Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro Arg Val Lys Phe Ser Arg					
[0658]		435		440		445
[0659]	Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn					
[0660]		450		455		460
[0661]	Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg					
[0662]		465		470		475
						480

[0663]	Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
[0664]	485 490 495
[0665]	Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
[0666]	500 505 510
[0667]	Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
[0668]	515 520 525
[0669]	Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
[0670]	530 535 540
[0671]	Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0672]	545 550
[0673]	<210> 10
[0674]	<211> 476
[0675]	<212> PRT
[0676]	<213> 人工序列
[0677]	<220>
[0678]	<223> 合成的
[0679]	<400> 10
[0680]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0681]	1 5 10 15
[0682]	His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
[0683]	20 25 30
[0684]	Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
[0685]	35 40 45
[0686]	Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0687]	50 55 60
[0688]	Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
[0689]	65 70 75 80
[0690]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0691]	85 90 95
[0692]	Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
[0693]	100 105 110
[0694]	Tyr Gly Ser Ser Arg Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
[0695]	115 120 125
[0696]	Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
[0697]	130 135 140
[0698]	Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
[0699]	145 150 155 160
[0700]	Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe
[0701]	165 170 175

[0702]	Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
[0703]	180 185 190
[0704]	Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala
[0705]	195 200 205
[0706]	Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
[0707]	210 215 220
[0708]	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
[0709]	225 230 235 240
[0710]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp
[0711]	245 250 255
[0712]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu
[0713]	260 265 270
[0714]	Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
[0715]	275 280 285
[0716]	Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
[0717]	290 295 300
[0718]	Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
[0719]	305 310 315 320
[0720]	Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
[0721]	325 330 335
[0722]	Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser Lys
[0723]	340 345 350
[0724]	Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg
[0725]	355 360 365
[0726]	Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp
[0727]	370 375 380
[0728]	Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly
[0729]	385 390 395 400
[0730]	Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg
[0731]	405 410 415
[0732]	Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro
[0733]	420 425 430
[0734]	Glu Pro Ala Cys Ser Pro Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr
[0735]	435 440 445
[0736]	Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu
[0737]	450 455 460
[0738]	Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln
[0739]	465 470 475
[0740]	<210> 11

[0741] <211> 480
 [0742] <212> PRT
 [0743] <213> 人工序列
 [0744] <220>
 [0745] <223> 合成的
 [0746] <400> 11
 [0747] Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 [0748] 1 5 10 15
 [0749] Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
 [0750] 20 25 30
 [0751] Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
 [0752] 35 40 45
 [0753] Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
 [0754] 50 55 60
 [0755] Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
 [0756] 65 70 75 80
 [0757] Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
 [0758] 85 90 95
 [0759] Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
 [0760] 100 105 110
 [0761] Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 [0762] 115 120 125
 [0763] Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 [0764] 130 135 140
 [0765] Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
 [0766] 145 150 155 160
 [0767] Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
 [0768] 165 170 175
 [0769] Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
 [0770] 180 185 190
 [0771] Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
 [0772] 195 200 205
 [0773] Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
 [0774] 210 215 220
 [0775] Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
 [0776] 225 230 235 240
 [0777] Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 [0778] 245 250 255
 [0779] Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val

[0780]		260		265		270										
[0781]	Pro	Val	Phe	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro
[0782]			275					280						285		
[0783]	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro
[0784]		290					295							300		
[0785]	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu
[0786]	305					310						315				320
[0787]	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys
[0788]				325						330					335	
[0789]	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Asn	His	Arg
[0790]			340						345						350	
[0791]	Asn	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met
[0792]			355					360						365		
[0793]	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala
[0794]		370						375						380		
[0795]	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Gln	Arg	Arg	Lys	Tyr	Arg
[0796]	385					390					395					400
[0797]	Ser	Asn	Lys	Gly	Glu	Ser	Pro	Val	Glu	Pro	Ala	Glu	Pro	Cys	Arg	Tyr
[0798]				405						410					415	
[0799]	Ser	Cys	Pro	Arg	Glu	Glu	Glu	Gly	Ser	Thr	Ile	Pro	Ile	Gln	Glu	Asp
[0800]			420							425					430	
[0801]	Tyr	Arg	Lys	Pro	Glu	Pro	Ala	Cys	Ser	Pro	Gln	Val	Arg	Lys	Ala	Ala
[0802]			435							440					445	
[0803]	Ile	Thr	Ser	Tyr	Glu	Lys	Ser	Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ser	Thr
[0804]		450								455					460	
[0805]	Arg	Asn	Gln	Glu	Thr	Tyr	Glu	Thr	Leu	Lys	His	Glu	Lys	Pro	Pro	Gln
[0806]	465					470						475				480
[0807]	<210>	12														
[0808]	<211>	428														
[0809]	<212>	PRT														
[0810]	<213>	人工序列														
[0811]	<220>															
[0812]	<223>	合成的														
[0813]	<400>	12														
[0814]	Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
[0815]	1			5						10					15	
[0816]	His	Ala	Ala	Arg	Pro	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu
[0817]				20						25					30	
[0818]	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln

[0858]	Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg
[0859]	355 360 365
[0860]	Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp
[0861]	370 375 380
[0862]	Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr
[0863]	385 390 395 400
[0864]	Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu
[0865]	405 410 415
[0866]	Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln
[0867]	420 425
[0868]	<210> 13
[0869]	<211> 432
[0870]	<212> PRT
[0871]	<213> 人工序列
[0872]	<220>
[0873]	<223> 合成的
[0874]	<400> 13
[0875]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
[0876]	1 5 10 15
[0877]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
[0878]	20 25 30
[0879]	Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
[0880]	35 40 45
[0881]	Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
[0882]	50 55 60
[0883]	Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
[0884]	65 70 75 80
[0885]	Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
[0886]	85 90 95
[0887]	Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
[0888]	100 105 110
[0889]	Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0890]	115 120 125
[0891]	Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
[0892]	130 135 140
[0893]	Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
[0894]	145 150 155 160
[0895]	Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
[0896]	165 170 175

[0897]	Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
[0898]	180 185 190
[0899]	Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
[0900]	195 200 205
[0901]	Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
[0902]	210 215 220
[0903]	Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
[0904]	225 230 235 240
[0905]	Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
[0906]	245 250 255
[0907]	Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val
[0908]	260 265 270
[0909]	Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
[0910]	275 280 285
[0911]	Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
[0912]	290 295 300
[0913]	Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
[0914]	305 310 315 320
[0915]	Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
[0916]	325 330 335
[0917]	Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg
[0918]	340 345 350
[0919]	Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met
[0920]	355 360 365
[0921]	Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala
[0922]	370 375 380
[0923]	Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Val Arg Lys Ala Ala
[0924]	385 390 395 400
[0925]	Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr
[0926]	405 410 415
[0927]	Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln
[0928]	420 425 430
[0929]	<210> 14
[0930]	<211> 18
[0931]	<212> PRT
[0932]	<213> 人工序列
[0933]	<220>
[0934]	<223> 合成的
[0935]	<400> 14

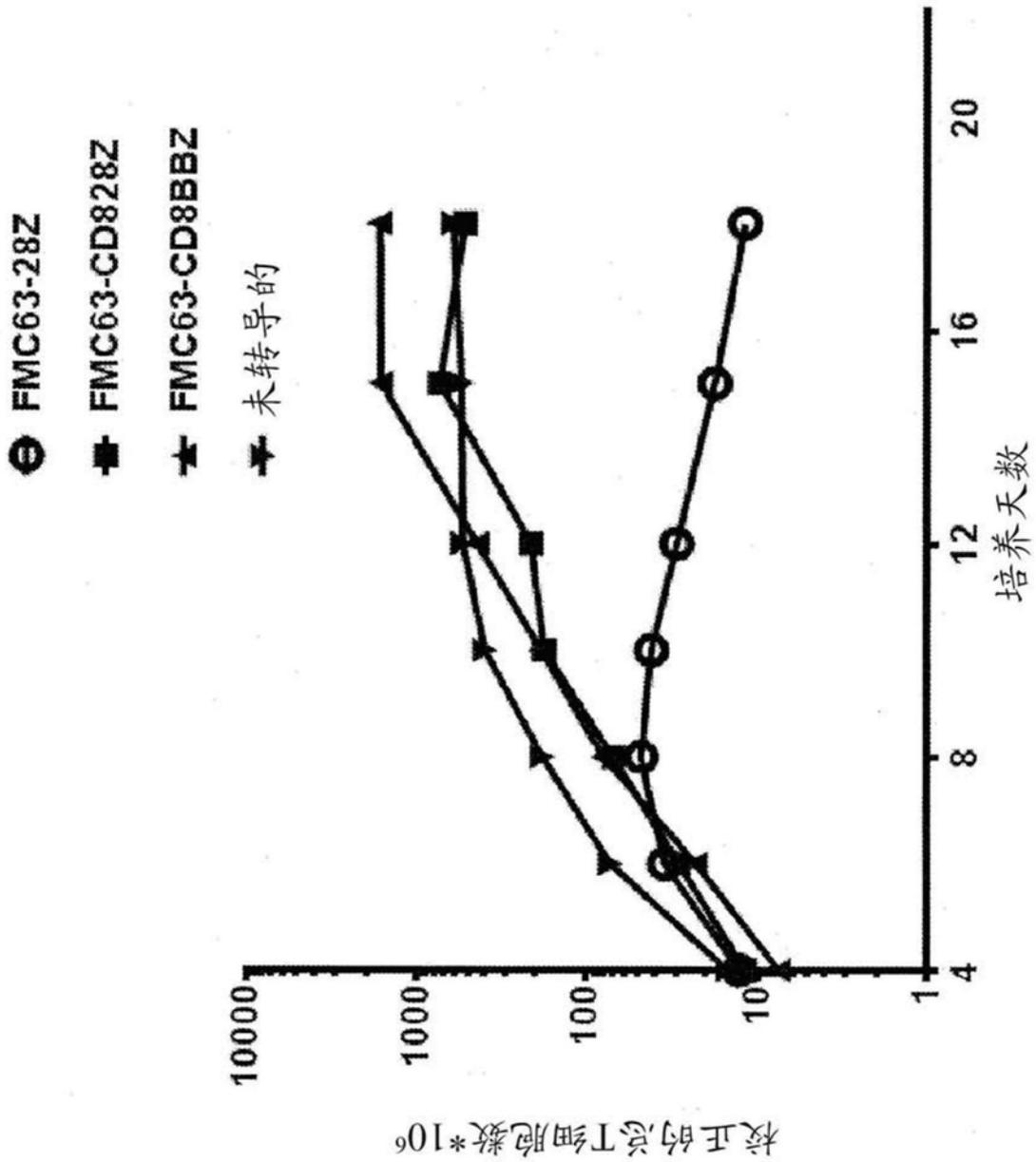


图1

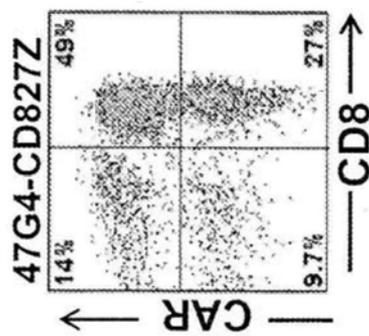


图2A

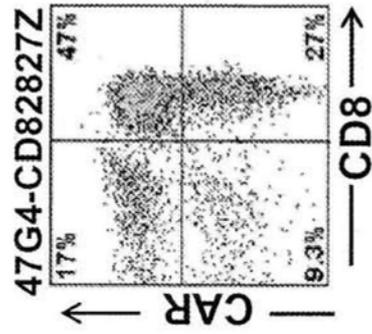


图2B

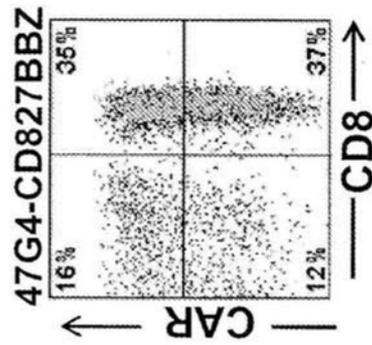


图2C

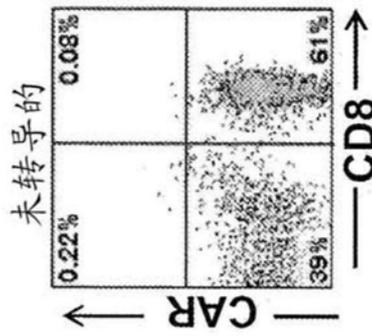


图2D

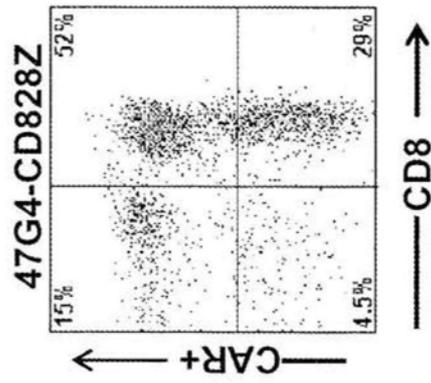


图3A

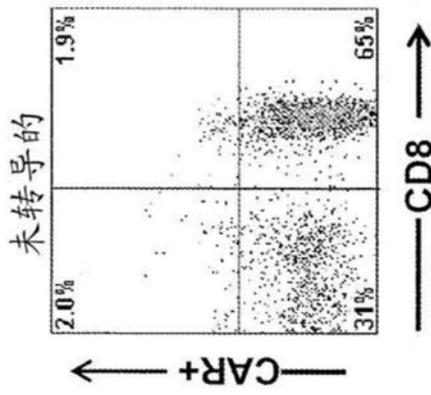


图3B

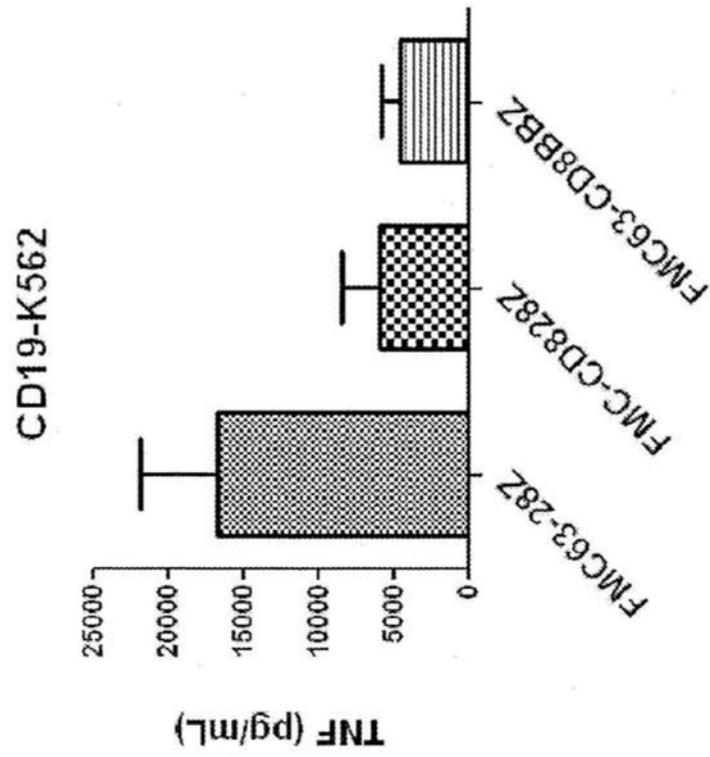


图4A

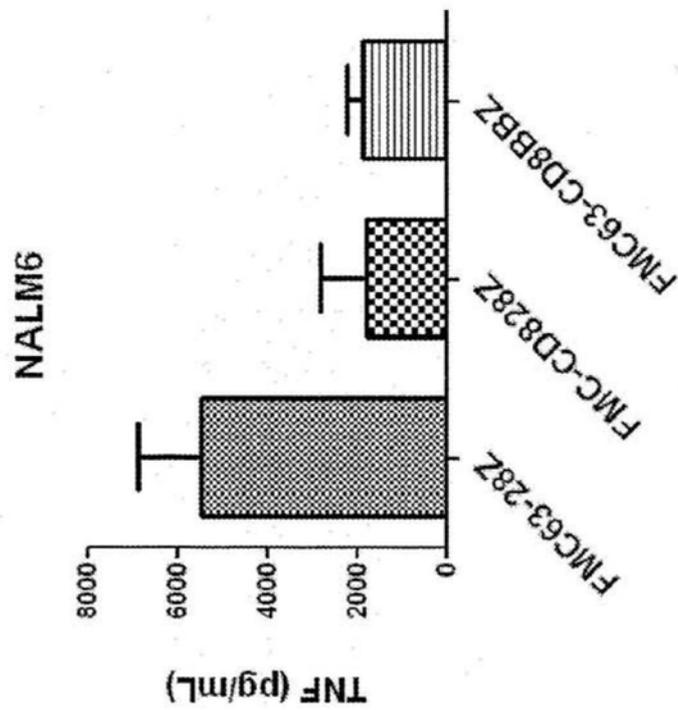


图4B

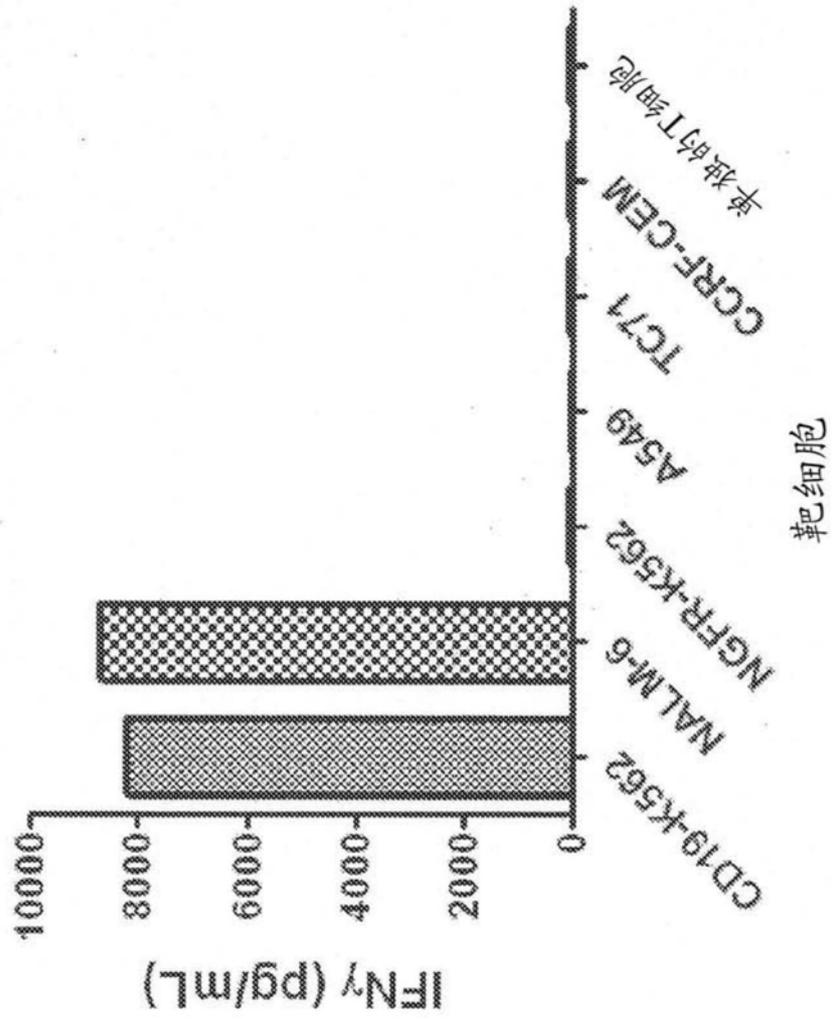


图5

47G4-CD827Z

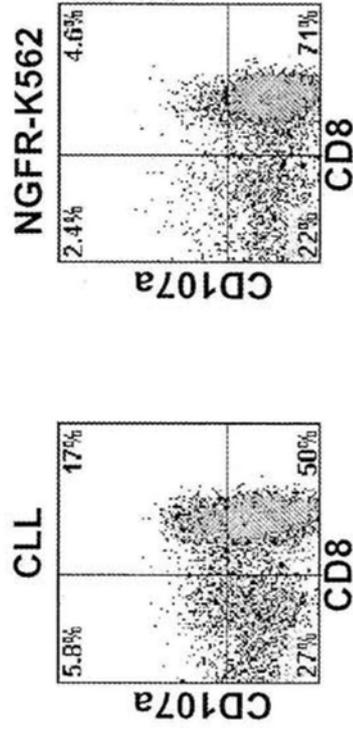


图6A

47G4-CD82827Z

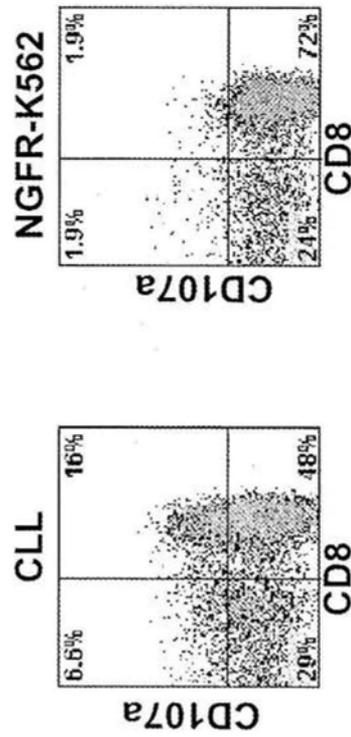


图6B

47G4-CD827BBZ

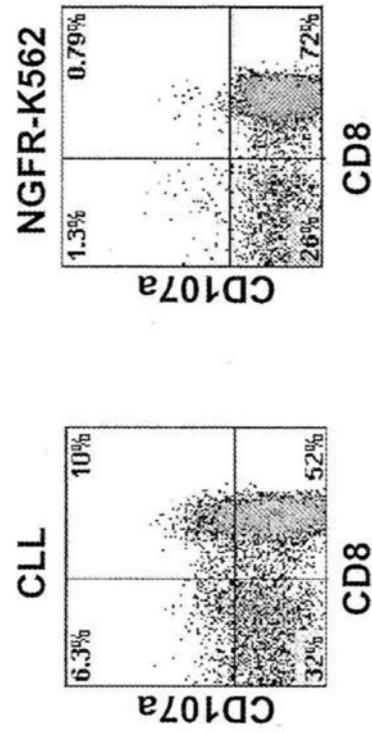


图6C

未转导的

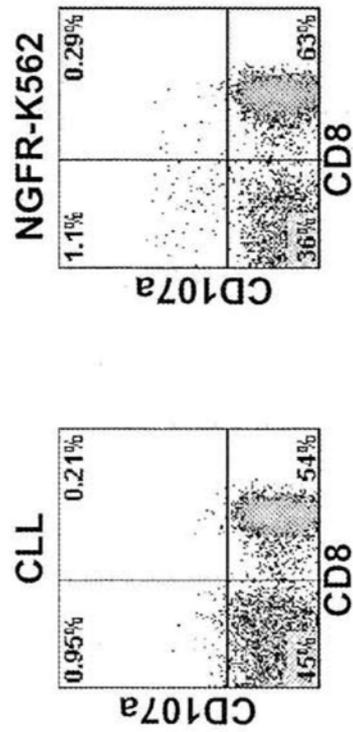


图6D

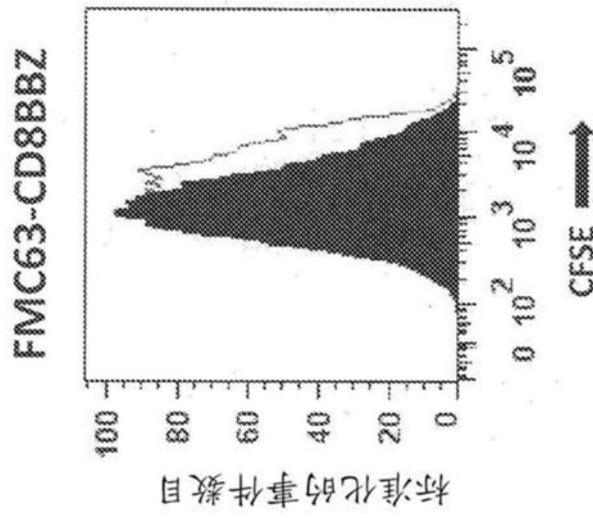


图7A

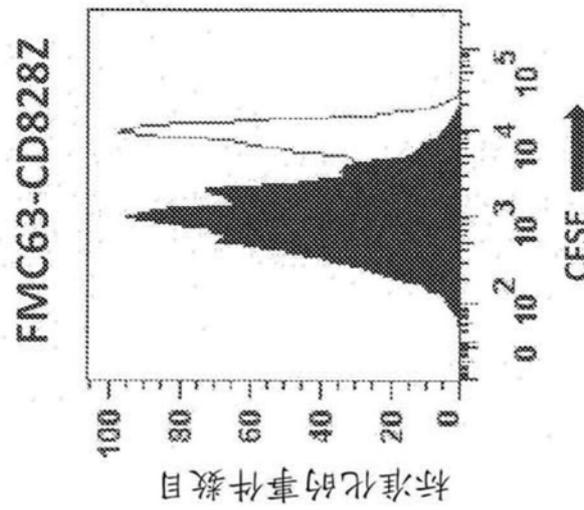


图7B

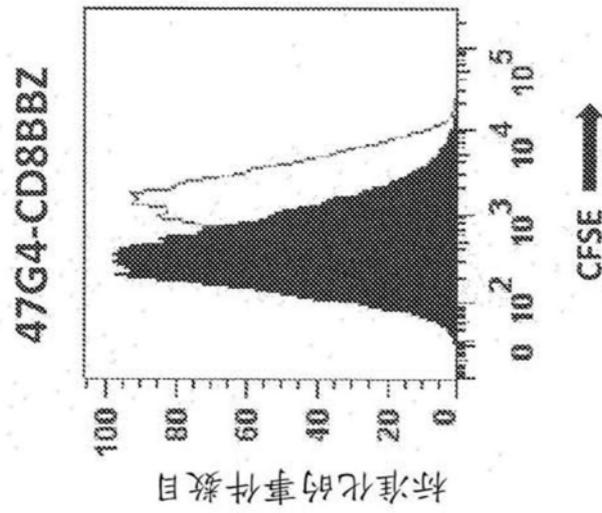


图7C

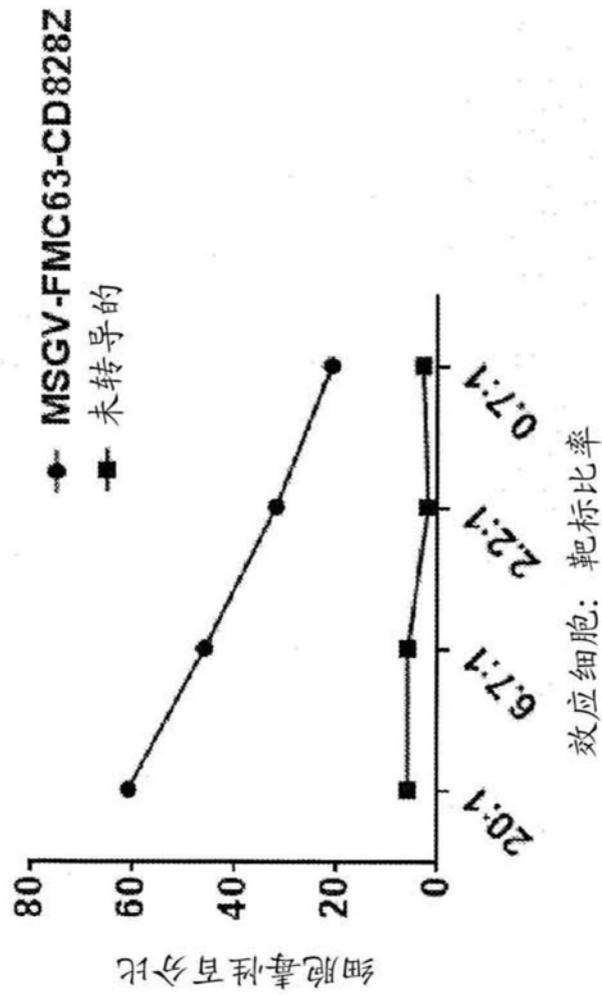


图8

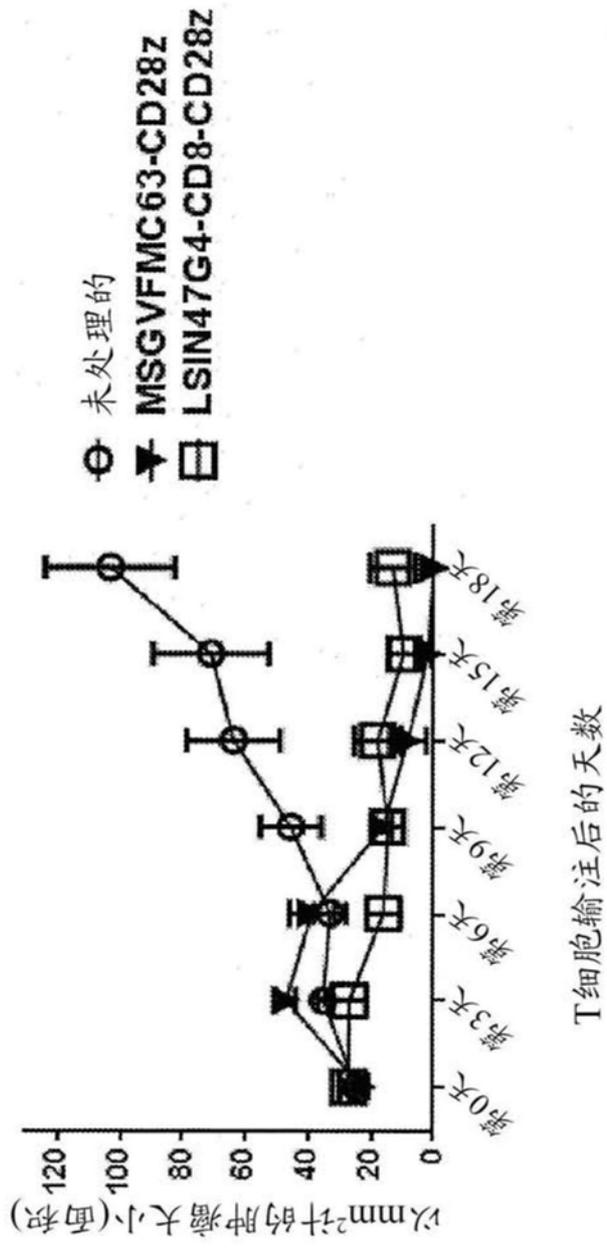


图9