



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108350462 B

(45) 授权公告日 2022.05.27

(21) 申请号 201680064592.0

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(22) 申请日 2016.09.10

专利代理人 张晓飞 张文辉

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108350462 A

(51) Int.CI.

C12N 15/62 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.07.31

C12N 5/0781 (2006.01)

(30) 优先权数据

2015903719 2015.09.11 AU

C12N 5/0783 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 19/00 (2006.01)

2018.05.04

A61K 35/17 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 35/00 (2006.01)

PCT/AU2016/050851 2016.09.10

(56) 对比文件

WO 2012079000 A1, 2012.06.14

(87) PCT国际申请的公布数据

WO 2011075789 A1, 2011.06.30

W02017/041143 EN 2017.03.16

WO 2014055657 A1, 2014.04.10

(73) 专利权人 生物权威(英国)有限公司

WO 2011020155 A1, 2011.02.24

地址 英国剑桥

审查员 李有朝

(72) 发明人 J.T.库姆斯 S.C.巴里

权利要求书2页 说明书37页

T.J.萨德隆

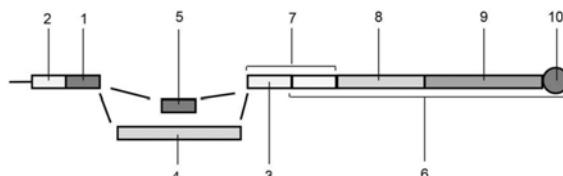
序列表34页 附图15页

(54) 发明名称

嵌合抗原受体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及针对表达功能失调或非功能性P2X嘌呤受体7受体的细胞的嵌合抗原受体(CAR)。进一步提供了靶向表达功能失调或非功能性P2X嘌呤受体7受体的赘生性细胞和肿瘤的方法,以及治疗和预防受试者中的癌症的方法。



1. 嵌合抗原受体,其包括:

抗原识别域,其识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体;

跨膜域;和

信号传导域,其包括活化受体的细胞内信号传导部分和共刺激受体的细胞内信号传导部分。

2. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域包括与以下具有序列同一性的部分:抗体的抗原结合位点,或抗体片段的抗原结合位点。

3. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域包括与以下具有序列同一性的部分:来自抗体重链或抗体轻链的至少互补决定区1(CDR1)、CDR2和CDR3。

4. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域识别与所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的三磷酸腺苷(ATP)结合位点相关的表位。

5. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中与野生型(功能性)P2X<sub>7</sub>受体的ATP结合能力相比,所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体具有降低的结合ATP的能力。

6. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体具有使所述受体功能失调的构象变化。

7. 根据权利要求6所述的嵌合抗原受体,其中所述构象变化是氨基酸从反式构象改变为顺式构象,所述氨基酸是在所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的氨基酸位置210处的脯氨酸。

8. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域识别包括在所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的氨基酸位置210处的脯氨酸的表位。

9. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域识别包括功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的氨基酸残基200至216的表位。

10. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域识别包括功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的氨基酸残基297至306的表位。

11. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域包含SEQ ID NO:10、32、33或34中所示氨基酸序列的三个CDR。

12. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域是抗原结合片段(Fab)、scFv、sdAb或肽。

13. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域是多价的。

14. 根据权利要求1的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域是二价或三价的。

15. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域包含:

- CDR1,其由SEQ ID NO:10的第30至35位残基的氨基酸序列组成;
- CDR2,其由SEQ ID NO:10的第50至67位残基的氨基酸序列组成;和
- CDR3,其由SEQ ID NO:10的第98至108位残基的氨基酸序列组成。

16. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域包含:

- CDR1,其由SEQ ID NO:32的第30至35位残基的氨基酸序列组成;
- CDR2,其由SEQ ID NO:32的第50至67位残基的氨基酸序列组成;和
- CDR3,其由SEQ ID NO:32的第98至108位残基的氨基酸序列组成。

17. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域包含:

- CDR1,其由SEQ ID NO:33的第30至35位残基的氨基酸序列组成;

- CDR2, 其由SEQ ID NO:33的第50至67位残基的氨基酸序列组成; 和
- CDR3, 其由SEQ ID NO:33的第98至108位残基的氨基酸序列组成。

18. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体, 其中所述抗原识别域包含:

- CDR1, 其由SEQ ID NO:34的第30至35位残基的氨基酸序列组成;
- CDR2, 其由SEQ ID NO:34的第50至67位残基的氨基酸序列组成; 和
- CDR3, 其由SEQ ID NO:34的第98至108位残基的氨基酸序列组成。

19. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体, 其包含SEQ ID NO:26、27、52、53和54中任一项的氨基酸序列。

20. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体, 其中所述活化受体是CD3共受体复合物的成员和/或Fc受体, 和/或其中所述共刺激受体选自由CD27、CD28、CD30、CD40、DAP10、OX40、4-1BB (CD137) 和ICOS组成的组。

21. 核酸分子, 其包括编码根据权利要求1至20中任一项所述的嵌合抗原受体的核苷酸序列。

22. 核酸构建体或载体, 其包括编码根据权利要求1至20中任一项所述的嵌合抗原受体的核酸分子。

23. 病毒载体, 其包含编码权利要求1至20中任一项的嵌合抗原受体的核酸, 用于宿主细胞的病毒转导。

24. 经遗传修饰的细胞, 所述细胞包括权利要求1至20任一项所述的嵌合抗原受体, 或包含编码权利要求1至20任一项所述的嵌合抗原受体的核酸或病毒载体。

25. 经遗传修饰的细胞, 其包含根据权利要求1至20中任一项所述的嵌合抗原受体, 其中所述细胞选自: 白细胞、外周血单个核细胞 (PBMC)、淋巴细胞、T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞、天然杀伤细胞或天然杀伤T细胞。

26. 经遗传修饰的细胞在制备药物中的用途, 所述药物用于杀伤表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞, 所述经遗传修饰的细胞包括权利要求1至20中任一项所述的嵌合抗原受体。

27. 经遗传修饰的细胞在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗癌症或用于杀死癌细胞, 所述经遗传修饰的细胞包括权利要求1至20中任一项所述的嵌合抗原受体。

28. 根据权利要27所述的用途, 其中所述癌细胞选自以下的一种或多种: 脑癌 (brain cancer)、食道癌 (oesophageal cancer)、口腔癌 (mouth cancer)、舌癌 (tongue cancer)、甲状腺癌 (thyroid cancer)、肺癌 (lung cancer)、胃癌 (stomach cancer)、胰腺癌 (pancreatic cancer)、肾癌 (kidney cancer)、结肠癌 (colon cancer)、直肠癌 (rectal cancer)、前列腺癌 (prostate cancer)、膀胱癌 (bladder cancer)、宫颈癌 (cervical cancer)、上皮细胞癌 (epithelial cell cancer)、皮肤癌 (skin cancer)、白血病 (leukaemia)、淋巴瘤 (lymphoma)、骨髓瘤 (myeloma)、乳腺癌 (breast cancer)、卵巢癌 (ovarian cancer)、子宫内膜癌 (endometrial cancer) 和睾丸癌 (testicular cancer)。

29. 药物组合物, 其包括经遗传修饰的细胞和药学上可接受的载体, 所述经遗传修饰的细胞包含权利要求1至20中任一项的嵌合抗原受体。

## 嵌合抗原受体及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2015年9月11日提交的澳大利亚临时专利申请号2015903719 的优先权,将其内容通过引用并入本文。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及嵌合抗原受体,表达嵌合抗原受体的T细胞以及使用嵌合抗原受体来预防和/或治疗癌症的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 免疫系统具有高度进化的和特定的机制来保护我们免受一系列病理学的影响。在这些病理学中,检测和消除不需要的病原体,如细菌感染,病毒感染的细胞,并且重要地,可能导致恶性肿瘤(癌症)的突变细胞。免疫系统预防癌症形成和生长的能力取决于免疫系统细胞区分“健康”细胞和“患病”(例如,赘生性或前赘生性)细胞的能力。这是通过识别指示细胞从健康状态向患病状态转变的细胞标志物(抗原)而实现的。

[0006] 已经有通过操纵或指导免疫系统靶向表达癌细胞抗原的细胞来开发用于治疗癌症的免疫治疗方法的许多尝试。免疫治疗方法主要集中在利用分离的或工程化的抗体采用体液免疫系统,或者最近采用免疫系统的细胞臂 (cellular arm)。

[0007] 利用细胞免疫疗法来治疗癌症的早期尝试利用从肿瘤分离并在体外扩增的T淋巴细胞。尽管在早期研究中这种方法提供了一些初步前景,但是该方法存在相关的许多技术挑战。分离T细胞群并扩增至临床相关的数目在技术上是具有挑战性的,并且扩增的不良受控性质导致最终的T细胞群是明显异质性的,并且可能仅包含少量的癌症抗原特异性T细胞。结果,这种方法的效力是不可预测和可变的。

[0008] 为了解决与使用离体扩增的肿瘤分离的T细胞相关的一些缺陷,在20世纪80年代后期开始开发嵌合抗原受体(CAR或人工T细胞受体)。嵌合抗原受体通过以下产生:将对所需抗原特异的细胞外区域与信号传导区域连接,导致可诱导T细胞功能的抗原特异性受体。

[0009] 用CAR转化分离的T细胞导致对给定抗原特异的T细胞群。结果,可产生较大的抗原特异性T细胞群并用于免疫治疗。

[0010] 对肿瘤相关抗原具有特异性的CAR转化的T细胞的初步临床试验是有希望的。然而,CAR转化的T细胞的效力导致显著的高细胞因子血症 (hypercytokinemia),并且最终导致一些患者的死亡。据信这些不利影响主要是由CAR转化的T细胞的中靶但脱瘤活性诱导的,所述中靶但脱瘤活性是由 CAR的相关抗原在健康的非癌性细胞群上的内源性表达的结果诱导的。

[0011] 因此显然需要开发靶向肿瘤相关抗原的CAR,该肿瘤相关抗原由癌性细胞选择性表达但不在非癌性细胞上内源地表达。

[0012] 在本说明书中的文件,行为,材料,设备,文章等的讨论仅仅是用于提供本发明的上下文的目的。没有提示或表示因为其在本申请的每个权利要求的优先权日之前存在,所以这些事项中的任一种或全部形成现有技术基础或者是与本发明相关的领域中的公知常

识。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明部分基于以下认识预测:由于表达CAR的免疫细胞显著的“中靶”但“脱瘤”活性,因此需要开发CAR和表达该CAR的经遗传修饰的细胞,所述 CAR靶向与一系列赘生性(癌性)细胞或前赘生性(癌前)细胞特异地相关的标志物。发明人已认识到功能失调性P2X<sub>7</sub>受体是用CAR靶向的合适标志物。

[0015] 因此,第一方面,本发明提供了包括抗原识别域和信号传导域的嵌合抗原受体,其中所述抗原识别域识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体。

[0016] 在一些实施方案中,所述抗原识别域识别与所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的三磷酸腺苷(ATP)结合位点相关的表位。在一些实施方案中,与野生型(功能性)P2X<sub>7</sub>受体的ATP结合能力相比,所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体在ATP结合位点处具有降低的结合ATP的能力。在一些实施方案中,功能失调性P2X<sub>7</sub>受体不能在ATP结合位点处结合ATP。

[0017] 在一些实施方案中,功能失调性P2X<sub>7</sub>受体具有使所述受体功能失调的构象变化。在一些实施方案中,所述构象变化是氨基酸从反式构象改变为顺式构象。一些实施方案中,从反式构象改变为顺式构象的所述氨基酸是在所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的氨基酸位置210处的脯氨酸。

[0018] 在一些实施方案中,所述抗原识别域识别包括在所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的氨基酸位置210处的脯氨酸的表位。在一些实施方案中,所述抗原识别域识别包括一个或多个氨基酸残基的表位,所述氨基酸残基跨越所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的氨基酸位置200处的甘氨酸至氨基酸位置216处的半胱氨酸(包括端点在内)。

[0019] CAR的抗原识别域可以是能够与功能失调性P2X<sub>7</sub>受体相互作用并特异性识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的任何合适的分子。然而,在一些实施方案中,抗原识别域包含与结合所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的抗体或其片段的氨基酸序列的氨基酸序列同源性。在一些实施方案中,所述抗原识别域包含与结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的抗体的片段-抗原结合(Fab)部分的氨基酸序列的氨基酸序列同源性。在一些实施方案中,抗体是人源化抗体。

[0020] 在一些实施方案中,所述抗原识别域包含与结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的单链可变片段(scFv)或多价scFv的氨基酸序列的氨基酸序列同源性。在一些实施方案中,多价scFv是二价scFv或三价scFv。

[0021] 在一些实施方案中,所述抗原识别域包括与结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的单抗体域(single-antibody domain) (sdAb)的氨基酸序列同源性。

[0022] 在一些实施方案中,抗原识别域包括结合肽,其包括与结合功能失调性 P2X<sub>7</sub>受体的抗体的一个或多个CDR区的氨基酸序列同源性。在一些实施方案中,结合肽包括与结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的抗体的V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>链的CDR1、2和3域的氨基酸序列同源性。在一些实施方案中,抗原识别域包括与跨越在 SEQ ID NO:10,32,33或34中所示序列的位置30至35,50至67或98至108的区域中的任一个至少50%,60%,70%,80%,90%或94%相同的一个或多个氨基酸序列。在一些实施方案中,抗原识别域包括跨越在SEQ ID NO:10, 32,33或34中所示序列的位置30至35,50至67或98至108的序列中的一个或多个序列。在一些实施方案中,抗原识别域包括SEQ ID NO:10,32,33或 34中所示的一个或多个序列。

[0023] 在一些实施方案中,所述信号传导域包含源自活化受体的部分。在一些实施方案

中,活化受体是CD3共受体复合物的成员或者是Fc受体。在一些实施方案中,所述源自CD3共受体复合物的部分是CD3- $\zeta$ 。在一些实施方案中,源自所述Fc受体的部分是Fc $\epsilon$ RI或Fc $\gamma$ RI。  
[0024] 在一些实施方案中,所述信号传导域包括源自共刺激受体的部分。在一些实施方案中,所述信号传导域包括源自活化受体的部分和源自共刺激受体的部分。在一些实施方案中,所述共刺激受体选自由CD27、CD28、CD30、CD40、DAP10、OX40、4-1BB (CD137) 和ICOS组成的组。

[0025] 在第二方面,本发明提供了核酸分子,其包括编码根据本发明第一方面的嵌合抗原受体的核苷酸序列。

[0026] 在第三方面,本发明提供了包含根据本发明第二方面的核酸分子的核酸构建体。在一些实施方案中,所述核酸分子的表达是在转录调控序列的控制下。在一些实施方案中,转录调控序列可以是组成型启动子或诱导型启动子。

[0027] 在本发明第三方面的一些实施方案中,核酸构建体进一步包括内部核糖体进入位点 (IRES),其允许在从核酸构建体表达后mRNA内的翻译起始。

[0028] 在本发明第三方面的一些实施方案中,核酸构建体是载体,例如病毒载体,其可用于转化T细胞以诱导CAR的表达。

[0029] 在第四方面,本发明提供了包含根据本发明第一方面的CAR的经遗传修饰的细胞。在一些实施方案中,细胞包含两种或更多种不同的CAR。

[0030] 在第五方面,本发明提供了经遗传修饰的细胞,其包含根据本发明第二方面的核酸分子或根据本发明第三方面的核酸构建体或该构建体的基因组整合形式。在一些实施方案中,核酸分子或核酸构建体编码两种或更多种不同的CAR。

[0031] 在本发明的第四和第五方面的一些实施方案中,两种或更多种不同的 CAR具有不同的信号传导域。

[0032] 在本发明第四和第五方面的一些实施方案中,所述细胞包括第一CAR和第二CAR,所述第一CAR具有包括源自活化受体的部分的信号传导域,所述第二CAR包括源自共刺激受体的部分的信号传导域。在一些实施方案中,所述活化受体是CD3共受体复合物的成员或者是Fc受体。在一些实施方案中,所述共刺激受体选自由CD27、CD28、CD30、CD40、DAP10、OX40、4-1BB (CD137) 和ICOS组成的组。

[0033] 在本发明第四个和第五方面的一些实施方案中,细胞被进一步修饰以组成性表达共刺激受体。在一些实施方案中,细胞被进一步修饰以表达共刺激受体的配体,从而促进细胞的自体刺激。

[0034] 在本发明第四和第五方面的一些实施方案中,细胞被进一步修饰以分泌细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子选自由IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-17和IL-21或其组合组成的组。

[0035] 在本发明第四和第五方面的一些实施方案中,细胞是白细胞。在一些实施方案中,细胞是外周血单个核细胞 (PBMC),淋巴细胞,T细胞(包括CD4+ T细胞或CD8+T细胞),天然杀伤细胞或天然杀伤T细胞。

[0036] 第六方面,本发明提供杀伤表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞的方法,所述方法包括将表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的所述细胞暴露于具有嵌合抗原受体的经遗传修饰的细胞,其中所述嵌合抗原受体针对所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体。

[0037] 在本发明第六方面的一些实施方案中,CAR直接识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体,或通过中间体识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体。在一些实施方案中,中间体是结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的探针,并且CAR识别该探针。在一些实施方案中,探针是抗体或适体。在一些实施方案中,探针包含标签并且CAR识别该标签。

[0038] 第七方面,本发明提供杀伤表达功能失调性P2X<sub>7</sub>的细胞的方法,所述方法包括使表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的所述细胞暴露于根据本发明的第四个或第五方面所述的经遗传修饰的细胞。

[0039] 在本发明第六和第七方面的一些实施方案中,将表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞与外源细胞因子一起暴露于经遗传修饰的细胞。在一些实施方案中,经遗传修饰的细胞是与表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的所述细胞自体的经遗传修饰的细胞。

[0040] 在本发明第六和第七方面的一些实施方案中,表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞是癌细胞。在一些实施方案中,癌症选自下组:脑癌(brain cancer)、食道癌(oesophageal cancer)、口腔癌(mouth cancer)、舌癌(tongue cancer)、甲状腺癌(thyroid cancer)、肺癌(lung cancer)、胃癌(stomach cancer)、胰腺癌(pancreatic cancer)、肾癌(kidney cancer)、结肠癌(colon cancer)、直肠癌(rectal cancer)、前列腺癌(prostate cancer)、膀胱癌(bladder cancer)、宫颈癌(cervical cancer)、上皮细胞癌(epithelial cell cancer)、皮肤癌(skin cancer)、白血病(leukaemia)、淋巴瘤(lymphoma)、骨髓瘤(myeloma)、乳腺癌(breast cancer)、卵巢癌(ovarian cancer)、子宫内膜癌(endometrial cancer)和睾丸癌(testicular cancer)。在一些实施方案中,癌症选自下组:肺癌(lung cancer)、食道癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌(prostate cancer)、膀胱癌、宫颈癌、阴道癌(vaginal cancer)、上皮细胞癌、皮肤癌、血液相关癌症(blood-related cancer)、乳腺癌、子宫内膜癌、子宫癌(uterine cancer)和睾丸癌。

[0041] 在本发明第六和第七方面的一些实施方案中,癌症是转移性的。在一些实施方案中,癌症是III期癌症或IV期癌症。

[0042] 在第八方面,本发明提供了体外扩增根据本发明第四或第五方面的经遗传修饰的细胞的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于CAR的抗原的步骤。在一些实施方案中,该方法包括将细胞暴露于细胞因子的另外步骤。

[0043] 在第九方面,本发明提供了体外扩增根据本发明第四或第五方面的经遗传修饰的细胞的方法,该方法包括将所述细胞暴露于CAR的抗原并同时将所述细胞暴露于细胞因子的步骤。

[0044] 在本发明第八和第九方面的一些实施方案中,细胞因子是IL-2亚族(subfamily)、干扰素亚族、IL-10亚族、IL-1亚族、IL-17亚族或TGF-β亚族的成员。

[0045] 在本发明第八个和第九方面的一些实施方案中,细胞因子选自下组:IFN-γ、IL-2、IL-5、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、TNF-α、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3和GM-CSF或其组合。

[0046] 在第十方面,本发明提供了体外扩增根据本发明第四或第五方面的经遗传修饰的细胞的方法,所述方法包括使所述细胞暴露于固定化的抗CD3和抗CD28抗体。在本发明的第十方面中的一些实施方案中,将抗体固定化在珠状基质上(例如在“人类活化剂(Activator)”Dynabeads<sup>TM</sup>上)。在本发明第十方面的一些实施方案中,将抗体固定化在组织

培养容器的表面上,诸如培养瓶,平板或生物反应器的表面上。

[0047] 在第十一方面,本发明提供了药物组合物,其包含根据本发明第四或第五方面的经遗传修饰的细胞和药学上可接受的载体。在一些实施方案中,药物组合物包含可由细胞因子组成的合适佐剂。在一些实施方案中,药物组合物还可以包含如本文所述的中间体。

[0048] 附图简述

[0049] 为了进一步理解本发明的方面和优点,应结合附图来参考以下详细描述。

[0050] 图1-显示根据本发明的一个实施方案的抗非功能性(nf)P2X<sub>7</sub>受体的嵌合抗原受体(CAR)的排列的示意图。

[0051] 图2-显示用于表达图1中抗nf P2X<sub>7</sub>受体CAR的BLIV质粒的示意图。

[0052] 图3-电泳凝胶,显示来自用BLIV质粒转化的大肠杆菌(E.coli)克隆分离的BamHI限制性DNA的限制性片段。

[0053] 图4-电泳凝胶,显示来自用BLIV质粒转化的经选择的大肠杆菌克隆中分离的EcoRI,BamHI和PstI限制性DNA的限制性片段。

[0054] 图5-显示了用构建慢病毒载体所需的质粒转染的293T细胞和用含有慢病毒载体的上清液转导的293T细胞的显微术图像,所述慢病毒载体含有BLIV-CAR-短铰链构建体。

[0055] 图6-显示了用构建慢病毒载体所需的质粒转染的293T细胞和用含有慢病毒载体的上清液转导的293T细胞的显微术图像,所述慢病毒载体含有BLIV-CAR-长铰链构建体。

[0056] 图7-用RosetteSep人CD8+T细胞富集试剂盒(RosetteSep human CD8+T cell enrichment kit)纯化的T细胞的细胞纯度的FACS分析。

[0057] 图8-包含CD8+T细胞和BT549细胞共培养的杀伤测定的FACS分析。

[0058] 图9-图显示了与未转导的CD8+T细胞和用空BLIV质粒转导的CD8+T细胞相比,与用含有BLIV-CAR-长铰链的慢病毒载体和BLIV-CAR-短铰链质粒转导的CD8+T细胞共培养48小时后删除的染料标记的靶细胞的百分比。

[0059] 图10-PEP2-2-1-1,PEP2-472-2和PEP2-2-12结合肽与针对nf-P2X<sub>7</sub>受体的抗体的比对。

[0060] 图11-显示根据本发明另一个实施方案的抗nf P2X<sub>7</sub>受体CAR的排列的示意图。

[0061] 图12-显示用于表达图11的抗-nf P2X<sub>7</sub>受体CAR的pCDH质粒的示意图。

[0062] 图13-电泳凝胶,显示了来自EcoRI和NotI限制性DNA的限制性片段,所述DNA从用pCDH质粒转化的选择的Sure2克隆分离。

[0063] 图14-HEK293T细胞转染效率的FACS分析。

[0064] 图15-慢病毒转导效率的FACS分析的代表性直方图。

[0065] 图16-表达GFP的经转导的CD8细胞的百分比的FACS分析。

[0066] 图17-用于产生非功能性和功能性P2X<sub>7</sub>受体的融合蛋白主链的图解。

[0067] 图18-电泳凝胶,显示来自Bam HI和PmeI限制性DNA的限制性片段,所述DNA从用含有EXD2\_K193A或EXD2\_WT的pDONR-107载体转化的选择的E.cloni®10G克隆分离。

[0068] 图19-电泳凝胶,显示了来自Bam HI限制性DNA的限制性片段,所述DNA从用含有EXD2\_K193A或EXD2\_WT的pLV-416载体转化的选择的E.cloni®10G克隆分离。

[0069] 图20-用pLV-416-EXD2\_K193A和pLV-416-EXD2\_WT对HEK293细胞的慢病毒包装的转导的FACS分析。

[0070] 图21-用含有pLV-416-EXD2\_K193A或pLV-416-EXD2\_WT构建体的慢病毒转导HEK293的FACS分析。

[0071] 图22-显示通过表达PEP2-2-1-1, PEP2-472-2CAR的T细胞杀伤表达 nfP2X<sub>7</sub>的HEK靶细胞和231乳腺癌细胞的图

[0072] 发明详述

[0073] 本文所指的核苷酸和多肽序列由序列标识号 (SEQ ID NO:) 表示。表1中提供了序列标识符的概述。在说明书末尾还提供了序列表。

[0074] 表1

[0075] 序列标识符概述

序列标识符	序列
SEQ ID NO: 1	人类P2X <sub>7</sub> 受体mRNA序列
SEQ ID NO: 2	人类P2X <sub>7</sub> 受体编码(cDNA)序列
SEQ ID NO: 3	
SEQ ID NO: 4	
SEQID 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	
SEQ ID NO: 13	
SEQ ID NO: 14	
SEQ ID NO: 15	

[0076]

序列标识符	序列
SEQ ID NO: 16	短铰链氨基酸序列
SEQ ID NO: 17	短的核苷酸序列
SEQ ID NO: 18	CD28共刺激受体的部分的氨基酸序列
SEQ ID NO: 19	编码SEQ ID NO: 18的核苷酸序列
SEQ ID NO: 20	OX40共刺激受体的部分的氨基酸序列
SEQ ID NO: 21	编码SEQ ID NO: 20的核苷酸序列
SEQ ID NO: 22	CD3 zeta共受体复合物的部分的氨基酸序列
SEQ ID NO: 23	编码SEQ ID NO: 22的核苷酸序列
SEQ ID NO: 24	P2A氨基酸序列
SEQ ID NO: 25	P2A核苷酸序列
SEQ ID NO: 26	PEP2-2-3结合肽CAR氨基酸序列-长铰链
SEQ ID NO: 27	PEP2-2-3结合肽CAR氨基酸序列-短铰链
SEQ ID NO: 28	PEP2-2-3结合肽CARR核苷酸序列-长铰链
SEQ ID NO: 29	PEP2-2-3结合肽CAR核苷酸序列-短铰链
SEQ ID NO: 30	人类CD8前导氨基酸序列
SEQ ID NO: 31	人类CD8核苷酸序列
SEQ ID NO: 32	PEP2-2-1-1结合肽的氨基酸序列
SEQ ID NO: 33	PEP2-472-2结合肽的氨基酸序列
SEQ ID NO: 34	PEP2-2-12结合肽的氨基酸序列
SEQ ID NO: 35	PEP2-2-1-1 CAR的核苷酸序列
SEQ ID NO: 36	PEP2-472-2 CAR的核苷酸序列
SEQ ID NO: 37	PEP2-2-12 CAR的核苷酸序列
SEQ ID NO: 38	pCHD-CMV-正向引物
SEQ ID NO: 39	PCHD-co GFP-反向引物
SEQ ID NO: 40	2-2-1-1-反向引物
SEQ ID NO: 41	2-2-1-1-正向引物
SEQ ID NO: 42	2-472-2-反向引物
SEQ ID NO: 43	2-472-2-正向引物
SEQ ID NO: 44	2-12-2-反向引物
SEQ ID NO: 45	COM-FOR-1引物
SEQ ID NO: 46	COM-FOR-2引物
SEQ ID NO: 47	EXD2_K193A基因区段
SEQ ID NO: 48	EXD2_WT基因区段
SEQ ID NO: 49	EXD-F1引物
SEQ ID NO: 50	EXD2-R1引物
SEQ ID NO: 51	EXD2-F1引物
SEQ ID NO: 52	PEP2-2-1-1 CAR的氨基酸序列

[0077]

序列标识符	序列
SEQ ID NO: 53	PEP2-472-2 CAR的氨基酸序列
SEQ ID NO: 54	PEP2-2-12 CAR的氨基酸序列

[0079] 发明人已经认识到,由于表达嵌合抗原受体(CAR)的免疫细胞的显著的“中靶”但“脱瘤”活性,因此需要开发CAR和表达CAR的经遗传修饰的细胞,所述CAR靶向与赘生性(癌性)或前赘生性(癌前)细胞特异性相关的标志物。本发明人已经认识到功能失调性P2X<sub>7</sub>受体是用于在一系列癌症中用表达 CAR的免疫细胞靶向的合适标志物。

[0080] 因此,第一方面,本发明提供了包含抗原识别域和信号传导域的嵌合抗原受体(CAR),其中所述抗原识别域识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体。

[0081] 嵌合抗原受体是人工构建的蛋白质,其在细胞表面上表达时可诱导抗原特异性细胞应答。CAR包含至少两个域;第一域是特异性识别抗原,或者更具体地是识别抗原的一个或多个表位部分的抗原识别域;并且第二域是能够诱导或参与诱导细胞内信号传导途径的信号传导域。

[0082] 这两个域的组合决定了CAR的抗原特异性和CAR诱导所需的细胞应答的能力,后者也依赖于CAR的宿主细胞。例如,在T辅助细胞中表达并且具有包含CD3活化域的信号传导域的CAR的活化可以在通过遇到其关联抗原而被活化后诱导CD4+T辅助细胞分泌一系列细胞因子。在另一个实例中,在CD8+细胞毒性T细胞中表达时的相同CAR在由表达关联抗原的细胞活化后可诱导细胞毒素的释放,所述细胞毒素最终导致诱导抗原表达细胞的凋亡。

[0083] 除了抗原识别域和信号传导域之外,CAR可以进一步包含另外的组分或部分。例如,CAR可以包括跨膜域,所述跨膜域可以包含CAR信号传导域的一部分或可以与信号传导域相关。跨膜域通常是跨越细胞的脂质双层并将 CAR嵌入细胞膜中的一个或多个疏水性螺旋。CAR的跨膜域可以是当与细胞关联时CAR的表达模式中的一个决定簇。例如,使用与CD3共受体相关的跨膜域可允许CAR在幼稚T细胞中表达,而来自CD4共受体的跨膜域的使用可指导CAR在T辅助细胞中而不是在细胞毒性T细胞中的表达。

[0084] CAR的另一个组分或部分可以是接头域。接头域(也称为间隔区或铰链域)可以从跨膜域的胞外侧跨越到抗原识别域,从而将抗原识别域与跨膜域连接。虽然在某些情况下,功能性CAR不需要接头域(即,抗原识别域可以直接与跨膜域连接),但在某些情况下,使用接头域允许CAR的最大效力。接头域可以具有多种功能,所述功能包括允许CAR的柔性以允许对于结合抗原必需的CAR的抗原识别域的取向。因此,接头域可以是执行该功能的任何氨基酸序列。接头域的一个非限制性实例是与IgG抗体的铰链区,诸如IgG1 铰链区具有氨基酸序列同源性的域。替代实例包括与抗体的CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>区或 CD3共受体复合物,CD4共受体或CD8共受体的部分具有序列同源性的氨基酸序列。

[0085] P2X<sub>7</sub>受体(嘌呤能受体P2X,配体门控离子通道7)是在包括人类在内的多种物种中表达的ATP-门控离子通道。该受体由基因编码,所述基因的正式标志表示为P2RX7。该基因也称为P2X嘌呤受体7,ATP受体,P2Z受体,P2X7 受体和嘌呤能受体P2X7变体A。对于本公开的目的,该基因和编码的受体在本文中分别称为P2X7和P2X<sub>7</sub>。

[0086] 人P2X7基因的mRNA,编码(cDNA)和氨基酸序列分别列于SEQ ID NO: 1至3。人P2X7基因的mRNA和氨基酸序列也分别表示为GenBank登录号 NM\_002562.5和NP\_002553.3。P2X7基因在黑猩猩,恒河猴,狗,牛,小鼠,大鼠,猪,鸡,斑马鱼和蛙中是保守的。人和其他物种中

的P2X<sub>7</sub>基因的更多详情可以从国家生物技术信息中心(National Centre for Biotechnology Information) (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 的GenBank数据库获得。例如,基因ID号对于人P2X7是5027,对于黑猩猩是452318,对于猴是699455,对于狗是448778,对于牛是286814,对于小鼠是18439,对于斑马鱼是387298,对于蛙是398286。此外,至少73种生物体与人类P2X7基因具有直向同源物。

[0087] 关于人和其他物种中的P2X7基因的进一步详情也可以在NCBI的 UniGene入口处找到(例如对于人P2X7参见UniGene Hs.729169 -<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?UGID=4540770&TAXID=9606 &SEARCH>)。或者,可以从UniProt数据库([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) 获得P2X7基因的核苷酸和氨基酸序列的详情,其中人P2X7基因的UniProt ID是Q99572。将 GenBank和UniProt记录的内容通过引用并入本文。

[0088] P2X<sub>7</sub>受体由三个蛋白质亚基(单体)形成,其中在人的天然受体中,至少一个单体具有SEQ ID N0:3所示的氨基酸序列。应当理解,如本文所提及的“P2X<sub>7</sub>受体”,还包括受体的天然存在的变异,包括受体的剪接变体,天然存在的截短形式和等位变体。P2X<sub>7</sub>受体还可以包括具有经修饰的氨基酸序列的亚基,例如包括在SEQ ID N0:3所示的氨基酸的截短,氨基酸缺失或修饰的那些。

[0089] 例如,P2X7基因或编码蛋白质的“变体”可分别展示出与天然P2X<sub>7</sub>受体至少80%相同,至少90%相同,至少95%相同,至少98%相同,至少99%相同或至少99.9%相同的核酸或氨基酸序列。

[0090] P2X<sub>7</sub>受体通过ATP与该受体的ATP结合位点结合而激活。这导致通道的快速打开(毫秒内),所述通道选择性允许小阳离子移过膜。短时间段(几秒钟内)后,在细胞膜上形成了大孔,其允许多达900Da大小的分子渗透过细胞膜。这种孔形成最终导致细胞去极化,并且在许多情况下导致细胞毒性和细胞死亡。这种作用导致了以下信条(belief):P2X<sub>7</sub>受体参与多种细胞类型的凋亡。

[0091] 像参与凋亡的其他分子,如Bc12和Bax一样,P2X<sub>7</sub>受体功能的降低或丧失可导致相比而言对诱导的凋亡有抗性的细胞。在许多情况下,这种对凋亡的抗性在正常“健康”细胞向突变的癌前或癌性细胞转变中是至关重要的。因此,靶向具有P2X<sub>7</sub>受体的功能降低或功能丧失的细胞的能力为癌症治疗提供了有希望的靶标。

[0092] 因此,在本发明的第一方面中,CAR识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体。如整个说明书中使用,关于P2X<sub>7</sub>受体的术语“功能失调”包括相对于其在正常非肿瘤细胞中的比较功能,受体的功能降低。在一些实施方案中,P2X<sub>7</sub>受体的功能可以降低至少1%,5%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%或大于99%。在一些实施方案中,术语“功能失调”可以包括非功能性P2X<sub>7</sub>受体。也就是说,P2X<sub>7</sub>受体不能被诱导以允许阳离子和其他分子穿过细胞膜的渗透性。

[0093] 本文包括了导致功能失调性受体的P2X<sub>7</sub>受体的野生型或天然形式中的任何改变。例如,功能失调性受体可以是受体的一个或多个氨基酸突变或改变的结果,所述氨基酸与ATP与受体结合相关。实际上,P2X<sub>7</sub>受体是功能失调性的,因为它具有在ATP结合位点处结合ATP的降低的能力,或不能在ATP结合位点处结合ATP。在这种情况下,嵌合抗原受体的抗原识别域将识别与ATP结合位点相关的功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的表位。因此,在本发明第一方面的一些实施方案中,嵌合抗原受体的抗原识别域识别与ATP结合位点相关的功能失调性

P2X<sub>7</sub>受体的表位。在一些实施方案中,与野生型(功能性)P2X<sub>7</sub>受体的ATP结合能力相比,功能失调性P2X<sub>7</sub>受体具有降低的结合ATP的能力。在一些实施方案中,功能失调性P2X<sub>7</sub>受体不能结合ATP。

[0094] P2X<sub>7</sub>受体的一个或多个氨基酸的改变可以包括受体的一个或多个氨基酸的构象改变。因此,在本发明第一方面的一些实施方案中,嵌合抗原受体与功能失调性P2X<sub>7</sub>受体结合,所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体具有使受体功能失调的构象变化。具体而言,该构象变化可以是P2X<sub>7</sub>受体的一个或多个氨基酸从反式构象改变为顺式构象。在一些实施方案中,P2X<sub>7</sub>受体的位置210处的脯氨酸从反式构象改变为顺式构象。在这种情况下,CAR的抗原识别域可识别包含在P2X<sub>7</sub>受体的氨基酸位置210处脯氨酸的表位。在本发明第一方面的一些实施方案中,抗原识别域识别包括一个或多个氨基酸残基的表位,所述氨基酸残基跨越所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的氨基酸位置200处的甘氨酸至氨基酸位置216处的半胱氨酸(包括端点)。在本发明第一方面的一些实施方案中,抗原识别域识别表位,所述表位包括功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的位置210处的脯氨酸,和跨越所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的氨基酸位置200处的甘氨酸至氨基酸位置216处的半胱氨酸(包括端点)的氨基酸残基中的一个或多个。

[0095] 虽然不希望受理论束缚,但由于P2X<sub>7</sub>受体第210位的脯氨酸构象改变,可以改变受体的三维结构。三维结构的这种改变可允许CAR的抗原识别域结合先前在P2X<sub>7</sub>受体的天然三维结构中不可接近的氨基酸或表位。因此,在一些实施方案中,CAR识别由于SEQ ID NO:3的位置210处的脯氨酸的反式至顺式构象变化而暴露于抗原识别域的P2X<sub>7</sub>受体的一个或多个表位。这些表位可包括P2X<sub>7</sub>受体的200-210位或297-306位(包括端点)处的氨基酸中的一个或多个。因此,在本发明第一方面的一些实施方案中,抗原识别域识别表位,所述表位包括P2X<sub>7</sub>受体的200-210位和/或297-306位氨基酸中的一个或多个。

[0096] 如整个说明书中使用的,术语“识别”指抗原识别域与功能失调性P2X<sub>7</sub>受体,其部分或其表位结合的能力。在一些实施方案中,抗原识别域可以直接结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体或其表位。在其他实施方案中,抗原识别域可以与功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的加工形式结合。如本上下文中使用的,术语“加工形式”指由于细胞内加工而已经截短或消化的P2X<sub>7</sub>受体形式。因此,功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的“加工形式”的识别可以是由于与主要组织相容性复合体(MHC)结合而呈现的结果。

[0097] 抗原识别域可以是能够识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体或其表位的任何合适的域。如整个说明书中使用,术语“抗原识别域”是指提供针对功能失调性 P2X<sub>7</sub>受体的CAR特异性的CAR部分。抗原识别域可以是CAR的胞外区的全部或仅可以是其一部分。合适的抗原识别域包括但不限于与结合功能失调性 P2X<sub>7</sub>受体的抗体或其片段的抗原结合位点具有序列同源性的多肽。因此,在本发明第一方面的一些实施方案中,抗原识别域包括与结合功能失调性 P2X<sub>7</sub>受体的抗体或其片段具有同源性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗原识别域的部分包括与结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的抗体或其片段具有同源性的氨基酸序列。来源同源抗体序列可以是对P2X<sub>7</sub>受体具有亲和力的任何合适的抗体序列。例如,该序列可以与源自以下物种中的一种或多种的抗体共享序列同源性;人,非人灵长类,小鼠,大鼠,兔,绵羊,山羊,雪貂(ferret),犬,鸡,猫,豚鼠,仓鼠,马,牛或猪。抗原识别域可以与从杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体的序列共享序列同源性。当同源抗体序列的起源物种不是人时,抗体优选是人源化抗体。同源抗体序列也可以来自非哺乳动物物种,诸如软骨鱼(例如鲨鱼IgNAR抗

体-参见W02012/073048)。或者,抗原结合域可以包括提供与鲨鱼抗体相似功能性的经修饰的蛋白支架,诸如具有基于鲨鱼IgNAR抗体的结合部分的i-体(i-bodies)(参见W02005/118629)。另外,抗原识别域可以是,可以源自任何其他合适的结合分子或肽,或可以与任何其他合适的结合分子或肽共享序列同源性,所述结合分子或肽可以以足以激活CAR信号传导域的亲和力选择性与功能失调性P2X<sub>7</sub>受体相互作用。本领域已知用于鉴定抗原结合蛋白的方法,诸如尤其是淘选噬菌体展示文库,蛋白质亲和层析,共免疫沉淀和酵母双杂交系统(参见Srinivasa Rao, V. et al. Int J Proteomics, 2014; 文章ID 147648)。

[0098] 在一些实施方案中,CAR的抗原识别域包括与结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的抗体的片段-抗原结合(Fab)部分的氨基酸序列的氨基酸序列同源性。如本领域中理解的,抗体的Fab部分由抗体的重链和轻链中每条的一个恒定区和一个可变区构成。Fab是抗体的抗原决定簇区,并且可以通过从抗体中酶促切割Fc区来产生。

[0099] 在本发明第一方面的一些实施方案中,抗原识别域包含与结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的单链可变片段(scFv)的氨基酸序列的氨基酸序列同源性。如本领域中理解的,scFv是包含与抗体的可变重链(VH)和可变轻链(VL)共享同源性或可以与抗体的可变重链(VH)和可变轻链(VL)相同的两个部分的融合蛋白,其中两部分通过接头肽连接在一起。例如,scFv可以包括源自识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的抗体的VH和VL氨基酸序列。在本上下文中,应当理解,术语“源自”不是指多肽本身的来源,而是指构成抗原结合区的一部分的氨基酸序列的衍生。因此,术语“源自”包括合成,人工或以其他方式产生的多肽,所述多肽与结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的抗体共享序列同一性。

[0100] 在本发明第一方面的一些实施方案中,抗原识别域包含与结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的多价scFv的氨基酸序列的氨基酸序列同源性。在一些实施方案中,多价scFv是二价或三价scFv。

[0101] 在本发明第一方面的一些实施方案中,抗原识别域具有结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的单抗体域(sdAb)的氨基酸序列。

[0102] 在一些实施方案中,抗原识别域包括SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列或其功能性变体。

[0103] 在一些实施方案中,抗原识别域包括结合肽,其包括与结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的抗体的一个或多个CDR区的氨基酸序列同源性。在一些实施方案中,结合肽包括一个或多个区域,其与结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的抗体的VH和/或VL链的CDR1、2和3域具有序列同源性。在一些实施方案中,抗原识别域包括与跨越在SEQ ID NO:10, 32, 33或34中所示序列的位置30至35, 50至67或98至108的区域中的任一个至少50%, 60%, 70%, 80%, 90%或94%相同的一个或多个序列。在一些实施方案中,抗原识别域包括跨越在SEQ ID NO:10, 32, 33或34中所示序列的位置30至35, 50至67或98至108的序列中的一个或多个序列。间隔SEQ ID NO:10、32、33或34中所示的抗原结合肽的CDR区的序列可以是允许CDR区的合适形成和构象的任何适合的序列。在一些实施方案中,抗原识别域包括与SEQ ID NO:10、32、33或34中列出的序列之一至少50%, 60%, 70%, 80%或90%, 95%或99%相同的序列。

[0104] 已经在本领域中描述了针对功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的抗体(可以从其衍生合适的氨基酸序列)以及用于生产这种抗体的方法(例如W02001/020155, W02003/020762, W02008/043145, W02008/043146, W02009/033233, W02011/020155和W02011/075789)。用于产生针

对特定表位的多克隆和单克隆抗体的方法(诸如之前给出的那些)将是本领域技术人员已知的。总之,在合适的免疫原性载体蛋白和佐剂存在下将期望的表位(诸如包括位置210处的脯氨酸的功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的区段)注射入合适的宿主动物中。然后从经免疫的动物中收集血清,并且可以基于抗体类别或其抗原特异性分离抗体。在评估纯化的抗体的适合性和特异性之后,可以进一步处理抗体以分离抗原结合片段,或测序以鉴定相关VH和VL域。用于产生针对功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的抗体的合适表位是本领域已知的(参见WO2008/043146, WO2010/000041和WO2009/033233作为实例)。

[0105] CAR的信号域可以是在CAR活化后能够诱导细胞内信号传递级联或参与细胞内信号传递级联的诱导的任何合适的域,所述CAR活化是由CAR的抗原识别域识别抗原导致的。CAR的信号传导域将根据CAR活化后期望的细胞结果而具体选择。尽管存在许多可能的信号传导域,但是当用于免疫治疗和癌症治疗时,信号传导域可以基于它们来源的受体,即活化受体和共刺激受体(参见下面的进一步详情)而分为两大类。因此,在本发明第一方面的一些实施方案中,信号传导域包括源自活化受体的部分。在一些实施方案中,信号传导域包括源自共刺激受体的部分。

[0106] 如整个说明书中使用,术语“部分”当就活化受体或共刺激受体而言使用时指受体中包括负责或参与受体与其关联抗原或配体相互作用后细胞内信号传导级联的起始/诱导的序列的任何区段。下文概述了通过CD3起始/诱导T细胞受体(TCR)的细胞内信号级联的实例。

[0107] 虽然不希望受理论束缚,但TCR的细胞外部分主要包含克隆型TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 链(TCR $\alpha/\beta$ 受体)或TCR $\gamma$ 和TCR $\delta$ 链(TCR $\gamma/\delta$ 受体)的异二聚体。这些TCR异二聚体通常缺乏固有的信号传导能力,并且因此它们与CD3的多个信号传导亚基(主要是CD3-zeta, -gamma, -delta和-epsilon)非共价结合。CD3的gamma、delta、和epsilon链中的每个具有细胞内(细胞质)部分,其包括单一基于免疫受体-酪氨酸的活化基序(Immune-receptor-Tyrosine-based-Activation-Motif, ITAM),而CD3-zeta链包含三个串联ITAM。在MHC存在下TCR由其关联抗原接合以及必需的共受体例如CD4或CD8结合后,起始信号传导,这导致酪氨酸激酶(即Lck)磷酸化CD3链的细胞内ITAM内的两个酪氨酸残基。随后,募集第二个酪氨酸激酶(ZAP-70-本身由Lck磷酸化激活)以使ITAM双磷酸化。结果,几个下游靶蛋白被活化,其最终导致细胞内构象改变,钙动员和肌动蛋白细胞骨架重排,当它们结合在一起时最终导致转录因子激活和T细胞免疫应答的诱导。

[0108] 如整个说明书中使用的,术语“活化受体”指形成T细胞受体(TCR)复合物的组分或参与T细胞受体(TCR)复合物的形成的受体或共受体,或参与由识别抗原性或其他免疫原性刺激物导致的免疫细胞的特异性活化的受体。

[0109] 这种活化受体的非限制性实例包括T细胞受体-CD3复合物的组分(CD3-zeta, -gamma, -delta, 和-epsilon),CD4共受体,CD8共受体,FC受体或天然杀伤(NK)细胞相关活化受体诸如LY-49(KLRA1),天然细胞毒性受体(NCR, 优选NKP46, NKP44, NKP30或NKG2或CD94/NKG2异二聚体)。因此,在本发明的第一方面的一些实施方案中,信号传导域包括源自以下成员中的任一种或多种的部分:CD3共受体复合物(优选CD3- $\zeta$ 链或其部分),CD4共受体,CD8共受体,FC受体(FcR)(优选Fc $\epsilon$ RI或Fc $\gamma$ RI)或NK相关受体诸如LY-49。

[0110] 每个CD3链的特定细胞内信号传导部分是本领域已知的。举例来说,CD3 $\zeta$ 链的细

胞内胞质区域从SEQ ID NO:4所示序列的氨基酸52跨越至氨基酸164,其中三个ITAM区跨越SEQ ID NO:4的氨基酸61至89,100至128和131至159。此外,CD3 $\epsilon$ 链的细胞内部分跨越SEQ ID NO:5所示序列的氨基酸153至207,其中单个ITAM区域跨越SEQ ID NO:5的氨基酸178至205的氨基酸。CD3 $\gamma$ 链的细胞内部分跨越SEQ ID NO:6所示序列的氨基酸138至182,其中单个ITAM区域跨越SEQ ID NO:6的氨基酸149至177。CD38的细胞内部分跨越氨基酸SEQ ID NO:7中所示序列的氨基酸127至171,其中单个ITAM区域跨越SEQ ID NO:7的氨基酸138至166。

[0111] 在本发明第一方面的一些实施方案中,信号传导域包括源自CD3(优选CD3- $\zeta$ 链或其部分)或FC受体(优选Fc $\epsilon$ RI或Fc $\gamma$ RI)中的任一个的部分。在一些实施方案中,CD3- $\zeta$ 共受体复合物的部分包括SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列或其功能变体。

[0112] FC受体的细胞内部分是本领域已知的。例如,Fc $\epsilon$ RI的细胞内部分跨越SEQ ID NO:8所示序列的氨基酸1至59、118至130和201至244。此外,Fc $\gamma$ RI的细胞内部分跨越SEQ ID NO:9所示序列的氨基酸314至374。

[0113] 活化受体部分的各种组合可用于形成CAR的跨膜(TM)和细胞内(IC)部分,例如CD3 $\zeta$ TM和CD3 $\zeta$ IC(Landmeier S. et al. Cancer Res. 2007; 67: 8335-43; Guest RD. et al., J Immunother. 2005, 28: 203-11; Hombach AA. et al. J Immunol. 2007; 178: 4650-7),CD4 TM和CD3 $\zeta$ IC(James SE. et al. J Immunol. 2008; 180: 7028-38),CD8 TM和CD3 $\zeta$ IC(Patel SD. et al. Gene Ther. 1999; 6: 412-9),以及Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ TM和Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ IC(Haynes NM. et al. J Immunol. 2001; 166: 182-7; Annenkov AE. et al. J Immunol. 1998; 161: 6604-13)。

[0114] 如整个说明书中使用的,术语“共刺激受体”指在活化受体的抗原特异性诱导后辅助激活免疫细胞的受体或共受体。应当理解,共刺激受体不需要抗原的存在并且不是抗原特异性的,但通常是两种信号之一,另一种信号是诱导免疫细胞应答所需的激活信号。在免疫应答的情况下,共刺激受体通常通过在抗原呈递细胞(APC)诸如树突细胞或巨噬细胞表面上表达的其配体的存在而被激活。具体对于T细胞,共刺激对于导致细胞活化,增殖,分化和存活(所有这些通常称为在T细胞活化的保护下)是必需的,而在共刺激的缺乏下将抗原递呈给T细胞可导致无反应性,克隆删除和/或抗原特异性耐受性的发展。重要的是,共刺激分子可通知T细胞对同时遇到的抗原的应答。一般而言,“阳性”共刺激分子背景下遇到的抗原将导致T细胞的活化和旨在消除表达该抗原的细胞的细胞免疫应答。然而,在“阴性”共受体背景下遇到的抗原将导致对共同遇到的抗原的耐受性的诱导状态。

[0115] T细胞共刺激受体的非限制性实例包括CD27,CD28,CD30,CD40, DAP10, OX40, 4-1BB(CD137), ICOS。具体而言,CD27,CD28,CD30, CD40,DAP10,OX40,4-1BB(CD137)和ICOS均代表增强T细胞应答活化的“阳性”共刺激分子。因此,在本发明第一方面的一些实施方案中,信号传导域包括衍生于CD27,CD28,CD30,CD40,DAP10,OX40,4-1BB(CD137)和ICOS中的任一种或多种的部分。

[0116] 在本发明第一方面的一些实施方案中,信号传导域包括源自CD28, OX40或4-1BB共刺激受体的部分。在一些实施方案中,信号传导域包含CD28共刺激受体的一部分。在一些实施方案中,信号传导域包括OX40共刺激受体的一部分。在一些实施方案中,OX40共刺激受体的部分包括SEQ ID NO: 20所示的氨基酸序列或其功能变体。

[0117] 可以利用共刺激受体部分的各种组合以形成CAR的跨膜(TM)和细胞内(IC)部分。

例如CD8 TM和DAP10 IC或CD8 TM和4-1BB IC (Marin V. et al. Exp Hematol. 2007;35: 1388-97) ,CD28 TM和CD28 IC (Wilkie S. et al. J Immunol. 2008;180:4901-9; Maher J. et al. Nat Biotechnol. 2002;20:70-5) ,以及CD8 TM 和CD28 IC (Marin V. et al. Exp Hematol. 2007;35:1388-97)。

[0118] 以上提到的活化和共刺激受体的序列信息容易在多种数据库中获得。例如,表2中提供了这些受体的人氨基酸,基因和mRNA序列的实施方案。

[0119] 表2

[0120] 活化和共刺激受体序列信息的概述

受体名称	Uniprot编号	NCBI基因ID号	GeneBank mRNA编号
CD3-zeta	P20963	919	GI:166362721
CD3-gamma	P09693	917	GI:166362738
CD3-delta	P04234	915	GI:98985799
CD3-epsilon	P07766	916	GI:166362733
CD4	P0173	920	GI:303522473
CD8 alpha	P01732	925	GI:225007534
CD8 beta	P01966	926	GI:296010927
Fc $\gamma$ RI	P12314	2209	GI:31331
Fc $\epsilon$ R1	Q01362	2206	GI:219881
Ly-49 (KLRA1)	Q7Z556	10748	GI:33114184
NKp46	O76036	9437	GI:3647268
NKp44	O95944	9436	GI:4493701
NKp30	O14931	259197	GI:5823969
CD94	Q13241	3824	GI:1098616
CD27	P26842	939	GI:180084
CD28	P10747	940	GI:338444
CD30	P28908	943	GI:180095
CD40	P25942	958	GI:29850
DAP10	Q9UBK5	10870	GI:5738198
OX40	P43489	7293	GI:472957
4-1BB (CD137)	Q07011	3604	GI:571320
ICOS	Q9Y6W8	29851	GI:9968295
CTLA-4	P16410	1493	GI:291928
PD-1	Q15116	5133	GI:2149002

[0121]

[0122] 虽然参考人活化和共刺激受体提供了表2,但本领域技术人员应当理解,每个受体的同源和直向同源 (orthologous) 形式存在于大多数哺乳动物和脊椎动物物种中。因此,以上提及的序列仅提供为可包含在本发明第一方面的 CAR中的受体序列的非限制性实例,并且可使用来自任何所需物种的同源和直向同源序列来产生适合于给定的物种的CAR。

[0123] 在本发明第一方面的一些实施方案中,信号传导域包括源自活化受体的部分和源自共刺激受体的部分。虽然不希望受到理论的限制,但在本上下文中,通过CAR的抗原识别域识别抗原将同时诱导细胞内激活信号和细胞内共刺激信号两者。因此,这将模拟表达共刺激配体的APC呈递抗原。或者,CAR 可以具有信号传导域,其包含源自活化受体或共刺激

受体的部分。在这种替代形式中,CAR将仅诱导激活细胞内信号传导级联或共刺激细胞内信号传导级联。

[0124] 在本发明第一方面的一些实施方案中,CAR将具有包含源自单个活化受体的部分和源自多个共刺激受体的部分的信号传导域。在一些实施方案中, CAR将具有包含源自多个活化受体的部分和源自单个共刺激受体的部分的信号传导域。在一些实施方案中,CAR将具有包含源自多个活化受体的部分和源自多个共刺激受体的部分的信号传导域。在一些实施方案中,CAR将具有包含源自单个活化受体的部分和源自两个共刺激受体的部分的信号传导域。在一些实施方案中,CAR将具有包含源自单个活化受体的部分和源自三个共刺激受体的部分的信号传导域。在一些实施方案中,CAR将具有包含源自两个活化受体的部分和源自一个共刺激受体的部分的信号传导域。在一些实施方案中,CAR将具有包含源自两个活化受体的部分和源自两个共刺激受体的部分的信号传导域。如应当理解,存在可以衍生信号传导域的活化受体和共刺激受体的数目的其他变化,并且认为上述实例不是对本文包括的可能组合的限制。

[0125] 在本发明第一方面的一些实施方案中,嵌合抗原受体包括在SEQ ID NO: 26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53,或SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列,或SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54的功能变体。在一些实施方案中,所述功能变体包括与SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或 SEQ ID NO:54至少80%相同的氨基酸序列。

[0126] 如上文指示,本发明包括以下中任一个的功能变体:SEQ ID NO:10, SEQ ID NO: 18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO: 27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54。在本发明的上下文中,“功能性变体”可以包括任何氨基酸序列,只要它维持以下中任一个的功能:SEQ ID NO: 10,SEQ ID NO: 18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或 SEQ ID NO:54。

[0127] 如此,功能变体可以例如相对于以下中的一个具有一个或多个氨基酸的插入,缺失或取代:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或 SEQ ID NO:54;以下中的一个的突变形式或等位变体:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54;以下中的一个的直向同源物:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO: 33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54;以下中的一个的部分同源物(homeologue):SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54;以下中的一个的类似物:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO: 54;等,条件是功能变体维持以下中的任一个的功能:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO: 27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ

ID NO:34,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54。

[0128] 例如关于SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO: 53或SEQ ID NO:54,包括SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54的嵌合抗原受体的功能是在不显著识别功能性的P2X<sub>7</sub>受体的情况下识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体,并诱导导致表达CAR 的T细胞活化的细胞内信号。如本领域技术人员将理解的,可以在不显著改变功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的识别和/或表达CAR的T细胞的活化的情况下做出对SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54中所列出的嵌合抗原受体的氨基酸序列的部分的变化。此类变化可以包括但不限于嵌合抗原受体的铰链区的变化,跨膜域的变化以及包含嵌合抗原受体的细胞内域的活化受体和/或共刺激受体部分的变化。

[0129] 如上所示,功能变体可包含相对于以下之一的单独的氨基酸取代,缺失或插入: SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26,SEQ ID NO: 27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO: 34,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54。例如,本领域将认识到任何氨基酸都可以用化学(功能上)相似的氨基酸取代并保留多肽的功能。此类保守氨基酸取代在本领域中是公知的。表3中的以下各组含有对于彼此是保守取代的氨基酸。

[0130] 表3

[0131] 示例性氨基酸保守取代

原始残基	示例性的取代	原始残基	示例性的取代
Ala (A)	Val (V), Leu (L), Ile (I), Gly (G)	Leu (L)	Ile (I), Val (V), Met (M), Ala (A), Phe (F)
Arg (R)	Lys (K)	Lys (K)	Arg (R)
Asn (N)	Gln (Q), His (H)	Met (M)	Leu (L), Phe (F)
Asp (D)	Glu (E)	Phe (F)	Leu (L), Val (V), Ala (A)
Cys (C)	Ser (S)	Pro (P)	Gly (G)
Gln (Q)	Asn (N), His (H)	Ser (S)	Thr (T)
Glu (E)	Asp (D)	Thr (T)	Ser (S)
Gly (G)	Pro (P), Ala (A)	Trp (W)	Tyr (Y)
His (H)	Asn (N), Gln (Q)	Tyr (Y)	Trp (W), Phe (F)
Ile (I)	Leu (L), Val (V), Ala (A)	Val (V)	Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Ala (A)

[0132]

[0133] 此外,根据需要,非天然氨基酸或化学氨基酸类似物可以作为取代或添加而引入到本文所涵盖的多肽中。这些氨基酸包括但不限于常见氨基酸的D- 异构体,2,4-二氨基丁酸, $\alpha$ -氨基异丁酸,4-氨基丁酸,2-氨基丁酸,6-氨基己酸,2-氨基异丁酸,3-氨基丙酸,鸟氨

酸,正亮氨酸,正缬氨酸,羟脯氨酸,肌氨酸,瓜氨酸,高瓜氨酸,碘基丙氨酸,叔丁基甘氨酸,叔丁基丙氨酸,苯基甘氨酸,环己基丙氨酸,β-丙氨酸,氟代氨基酸,设计的氨基酸诸如β-甲基氨基酸,Cα-甲基氨基酸,Na-甲基氨基酸和通常的氨基酸类似物。

[0134] 如上所述,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO: 22,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54中任一种的功能变体可以包含与SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO: 22,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54中的任一种至少 80% 相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,功能变体可包含与以下中的任一种至少85%的氨基酸序列同一性,至少90%的氨基酸序列同一性,至少91%的氨基酸序列同一性,至少92%的氨基酸序列同一性,至少93%的氨基酸序列同一性,至少94%的氨基酸序列同一性,至少95%的氨基酸序列同一性,至少96%的氨基酸序列同一性,至少97%的氨基酸序列同一性,至少98%的氨基酸序列同一性,至少99%的氨基酸序列同一性,或至少99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%或99.9%的氨基酸序列同一性: SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO: 26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54.

[0135] 当比较氨基酸序列时,应当在由多肽长度确定的比较窗口上比较序列。例如,设想在SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO: 34,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54中的任一种的至少20 个氨基酸残基,至少50个氨基酸残基,至少75个氨基酸残基,至少100个氨基酸残基,至少200个氨基酸残基,至少300个氨基酸残基,至少400个氨基酸残基,至少500个氨基酸残基,至少600个氨基酸残基或全长内的比较窗口。比较窗口可以包含与参考序列(其不包含添加或缺失)相比,约20%或更少的添加或缺失(即缺口)以用于两个序列的最佳比对。用于比对比较窗口的序列的最佳比对可以通过算法的计算机化实施来进行,诸如BLAST家族的程序,如例如由Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402公开的。全局比对程序也可用于比对大小大致相同的相似序列。全局比对程序的实例包括 NEEDLE(可从www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\_needle/获得),它是EMBOSS 包的一部分(Rice P et al., 2000, Trends Genet., 16:276-277) 和GGSEARCH程序(可从fasta.bioch.virginia.edu/fasta-www2/fasta-www.cgi? rm=compare&pgm=gnw获得),它是FASTA包的一部分(Pearson W and Lipman D, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-2448)。这两个程序都是基于 Needleman-Wunsch算法,该算法用于寻找两个序列沿着其整个长度的最佳比对(包括缺口)。序列分析的详细讨论也可以在Ausubel et al的Unit 19.3 ("Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley&Sons Inc, 1994-1998, 第15章, 1998) 中找到。

[0136] 在第二方面,本发明提供了核酸分子,其包含编码根据本发明第一方面的嵌合抗原受体的核苷酸序列。在一些实施方案中,核酸分子是非天然存在的核酸分子。

[0137] 在本发明第二方面的一些实施方案中,核酸分子包括编码在SEQ ID NO: 26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列,或编码SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54的功能性变体的核苷

酸序列。在一些实施方案中,功能变体包括与SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:52,SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54至少80%相同的氨基酸序列。

[0138] 核酸分子可以包含任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸,其可以是未经修饰的或经修饰的RNA或DNA。例如,核酸分子可以包括单链和/或双链 DNA,作为单链和双链区域的混合物的DNA,单链和双链RNA,以及作为单链和双链区域的混合物的RNA,包含可以是单链或更典型地是双链或单链和双链区域的混合物的DNA和RNA的杂合分子。另外,核酸分子可以包含三重链区域,其包含RNA或DNA或者RNA和DNA两者。核酸分子还可以包含一个或多个经修饰的碱基或为了稳定性或其他原因而修饰的DNA或RNA主链。可以对DNA和RNA进行各种修饰;因此术语“核酸分子”包含化学,酶促或代谢修饰的形式。

[0139] 在本发明第二方面的一些实施方案中,核酸分子包括在SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37所示的核苷酸序列。

[0140] 本领域技术人员将理解,本发明考虑编码嵌合抗原受体的任何核苷酸序列,所述嵌合抗原受体具有SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列,或是SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37的功能变体。例如,考虑SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:35, SEQ ID NO: 36或SEQ ID NO:37的变体,所述变体包含与SEQ ID NO:28,SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37的一种或多种不同的核酸,但仍编码相同的氨基酸序列。由于遗传密码的简并性,大量的核酸可以编码任何给定的蛋白质。例如,密码子GCA,GCC,GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37中由密码子规定丙氨酸的每个位置处,可以将密码子改变为描述的任何相应密码子而不改变所编码的多肽。因此,编码嵌合抗原受体的本文中每个核苷酸序列还描述了核苷酸序列的每种可能的沉默变异,所述嵌合抗原受体具有SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列,或SEQ ID NO: 26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37的功能变体。本领域技术人员将认识到,可以修饰核酸中的每个密码子(除了通常为甲硫氨酸的唯一密码子的AUG,和通常为色氨酸的唯一密码子的TGG 外)以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核苷酸序列的每个沉默变异隐含在每个描述的序列中。

[0141] 在第三方面,本发明提供了包含根据本发明第二方面的核酸分子的核酸构建体。核酸构建体可进一步包含以下一种或多种:一种或多种宿主的复制起点;在一种或多种宿主中有活性的选择标志物基因;和/或一个或多个转录调控序列。

[0142] 如本文所用,术语“选择标志物基因”包括对有其表达的细胞赋予表型,以便于鉴定和/或选择用构建体转染或转化的细胞的任何基因。

[0143] “选择标志物基因”包括以下的任何核苷酸序列,其当由用构建体转化的细胞表达时对细胞赋予便于这些经转化的细胞的鉴定和/或选择的表型。编码合适的选择性标志物的一系列核苷酸序列是本领域已知的(例如Mortesen, RM. and Kingston RE. Curr Protoc Mol Biol, 2009;Unit 9.5)。编码选择性标志物的示例性核苷酸序列包括:腺苷脱氨酶(ADA)基因;胞嘧啶脱氨酶(CDA) 基因;二氢叶酸还原酶(DHFR) 基因;组氨醇脱氢酶(hisD) 基因;嘌呤霉素-N- 乙酰转移酶(PAC) 基因;胸苷激酶(TK) 基因;黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (XGPRT) 基因或抗生素抗性基因,诸如氨苄青霉素抗性基因,嘌呤霉素抗性基因,博来

霉素抗性基因,潮霉素抗性基因,卡那霉素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因;荧光报告基因,诸如绿色,红色,黄色或蓝色荧光蛋白编码基因;和基于发光的报告基因,诸如萤光素酶基因等等,它们允许使用诸如荧光激活细胞分选(FACS)的技术对细胞进行光学选择。

[0144] 此外,应当注意的是,选择标志物基因可以是构建体中不同的读码框,或者可以表达为与另一种多肽(例如CAR)的融合蛋白。

[0145] 如上所述,核酸构建体还可以包含一个或多个转录控制序列。术语“转录调控序列”应理解为包括实现可操作连接的核酸的转录的任何核酸序列。转录控制序列可以包括例如前导序列,聚腺苷酸化序列,启动子,增强子或上游激活序列和转录终止子。通常,转录控制序列至少包括启动子。如本文所用的,术语“启动子”描述赋予,激活或增强核酸在细胞中的表达的任何核酸。

[0146] 在一些实施方案中,至少一个转录控制序列可操作地连接至本发明第二方面的核酸分子。对于本说明书的目的,当转录控制序列能够促进,抑制或以其他方式调节核酸分子的转录时,认为转录控制序列与给定核酸分子是“可操作地连接”的。因此,在一些实施方案中,核酸分子处于转录控制序列,诸如组成型启动子或诱导型启动子的控制下。

[0147] “核酸构建体”可以是处于任何合适的形式,诸如以质粒,噬菌体,转座子,粘粒,染色体,载体等形式,其当与适当的控制元件结合时能够复制,并且可以使包含在所述构建体内的基因序列在细胞之间转移。因此,该术语包括克隆和表达媒介物以及病毒载体。在一些实施方案中,核酸构建体是载体。在一些实施方案中,载体是病毒载体。

[0148] 对于发生表达的细胞,组织或器官,启动子可组成性地或不同地调节可操作地连接的核酸分子的表达。因此,启动子可包括例如组成型启动子或诱导型启动子。“组成型启动子”是在大多数环境和生理条件下有活性的启动子。“诱导型启动子”是在特定环境或生理条件下有活性的启动子。本发明考虑使用在感兴趣的细胞中有活性的任何启动子。如此,本领域普通技术人员将容易地确定各种各样的启动子。

[0149] 哺乳动物组成型启动子可以包括但不限于猿病毒40(SV40),巨细胞病毒(CMV),P-肌动蛋白,遍在蛋白C(UBC),延伸因子-1 $\alpha$ (EF1A),磷酸甘油酸激酶(PGK)和CMV早期增强子/鸡 $\beta$ 肌动蛋白(CAGG)。

[0150] 诱导型启动子可以包括但不限于化学诱导型启动子和物理诱导型启动子。化学诱导型启动子包括具有由化合物诸如醇,抗生素,类固醇,金属离子或其他化合物调节的活性的启动子。化学诱导型启动子的实例包括:四环素调控的启动子(例如参见美国专利5,851,796和美国专利5,464,758);类固醇响应性启动子诸如糖皮质激素受体启动子(例如,参见美国专利5,512,483),蜕皮激素受体启动子(例如参见美国专利6,379,945)等;和金属响应性启动子,诸如金属硫蛋白启动子(例如参见美国专利4,940,661,美国专利4,579,821和美国专利4,601,978)等。

[0151] 如上所提及,控制序列还可以包括终止子。术语“终止子”是指发出转录终止信号的转录单元末端的DNA序列。终止子是通常含有聚腺苷酸化信号的3'非翻译DNA序列,其有利于将聚腺苷酸序列添加到初级转录物的3'末端。如启动子序列一样,终止子可以是任何终止子序列,其在预期使用其的细胞,组织或器官中是可运行的。合适的终止子对于本领域技术人员而言是已知的。

[0152] 如将理解的,本发明第三方面的核酸构建体可以进一步包括其他序列,例如允许

增强的表达,细胞质或膜运输和位置信号的序列。具体的非限制性实例包括内部核糖体进入位点(IRES)。

[0153] 本发明延伸至基本上如本文所述的所有遗传构建体。这些构建体可以进一步包括用于在真核生物中维持和/或复制遗传构建体和/或将遗传构建体或其部分整合到真核细胞的基因组中的核苷酸序列。

[0154] 本领域中已知用于将外源遗传物质,诸如本发明第三方面的核酸构建体有意引入(转染/转导)真核细胞的方法。如将理解的,最适于将核酸构建物引入到所期望的宿主细胞的方法取决于许多因素,诸如核酸构建体的大小,宿主细胞的类型,期望的转染/转导效率的比率和最终期望的或需要的转染/转导的细胞的存活力。这种方法的非限制性实例包括:用化学品诸如阳离子聚合物,磷酸钙或结构体诸如脂质体和树枝状聚合物(dendrimer)进行的化学转染;非化学方法诸如电穿孔,声孔作用(sonoporation),热休克或光学转染;基于颗粒的方法,诸如“基因枪”递送,磁转染(magnetofection),或impalefection或病毒转导。

[0155] 核酸构建体将根据期望的转染/转导方法进行选择。在本发明第三方面的一些实施方案中,核酸构建体是病毒载体,并且用于将核酸构建体引入宿主细胞的方法是病毒转导。本领域中已知利用病毒转导来引发CAR在PBMC中表达的方法(Parker, LL. et al. *Hum Gene Ther.* 2000; 11:2377-87),并且更一般地利用逆转录病毒系统转导哺乳动物细胞的方法(Cepko, C. and Pear, W. *Curr Protoc Mol Biol.* 2001, unit 9.9)。在其他实施方案中,核酸构建体是质粒,粘粒,人工染色体等,并且可以通过本领域已知的任何合适的方法转染到细胞中。

[0156] 在第四方面,本发明提供了经遗传修饰的细胞,其包含根据本发明第一方面的嵌合抗原受体。

[0157] 在本发明第四方面的一些实施方案中,经遗传修饰的细胞包含两种或更多种不同的CAR。

[0158] 在第五方面,本发明提供了经遗传修饰的细胞,其包含根据本发明第二方面的核酸分子,或者包括根据本发明第三方面的核酸构建体或该核酸构建体的基因组整合形式。

[0159] 在本发明第五方面的一些实施方案中,经遗传修饰的细胞包含编码两种或更多种不同CAR的核酸分子或核酸构建体。在本发明第五方面的一些实施方案中,经遗传修饰的细胞包括两种或更多种核酸分子,或两种或更多种核酸构建体,每种核酸分子或核酸构建体编码不同的CAR。

[0160] 如本文所提及的,“经遗传修饰的细胞”包括含有本发明所涵盖的非天然存在和/或引入的核酸分子或核酸构建体的任何细胞。引入的核酸分子或核酸构建体可作为离散(discreet)的DNA分子维持在细胞中,或者它可被整合到细胞的基因组DNA中。

[0161] 细胞的基因组DNA应当在其最广泛的语境中理解,包括构成细胞的遗传互补物的任何和所有内源DNA。因此,应当将细胞的基因组DNA理解为包括染色体,线粒体DNA等。如此,术语“基因组整合”考虑染色体整合,线粒体DNA整合等。构建体的“基因组整合形式”可以是构建体的全部或部分。然而,在一些实施方案中,构建体的基因组整合形式至少包括本发明第二方面的核酸分子。

[0162] 如本文所用,术语“不同的CAR”或“不同的嵌合抗原受体”是指具有不同的抗原识

别域和/或不同的信号传导域的任何两种或更多种CAR。在一个实例中，“不同的CAR”包括具有相同抗原识别域(例如两个CAR都可识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体),但具有不同的信号传导域的两个CAR,诸如一个CAR具有的信号传导域具有活化受体的部分,而另一个CAR具有的信号传导域具有共刺激受体的部分。如将理解的,该实施方案中的两种或更多种CAR中的至少一种将具有识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的抗原识别域,并且其他CAR可以采取任何合适的形式,并且可针对任何合适的抗原。

[0163] 因此,在本发明的第四和第五方面的一些实施方案中,两种或更多种不同的CAR具有不同的信号传导域,并且可以具有相同的或不同的抗原识别域。特别地,根据本发明的第四个或第五方面的经遗传修饰的细胞可以包括第一嵌合抗原受体和第二嵌合抗原受体,所述第一嵌合抗原受体具有包括源自活化受体的部分的信号传导域,所述第二嵌合抗原受体具有包括源自共刺激受体的部分的信号传导域。

[0164] 在本发明的第四或第五方面的一些实施方案中,活化受体(从其衍生信号传导域的部分)是CD3共受体复合物或是Fc受体。

[0165] 在本发明第四或第五方面的一些实施方案中,共刺激受体(从其衍生信号传导域的部分)选自CD27,CD28,CD-30,CD40,DAP10,OX40,4-1BB(CD137)和ICOS。

[0166] 在本发明的第四或第五方面的一些实施方案中,共刺激受体(从其衍生信号传导域的部分)选自CD28,OX40或4-1BB。

[0167] 在本发明第四和第五方面的一些实施方案中,经遗传修饰的细胞被进一步修饰以组成性表达共刺激受体。

[0168] 如上所述,通常仅当同时经历激活信号(通常响应于抗原)和共刺激信号时才诱导细胞免疫应答。因此,通过具有根据上述实施方案中的一些的经遗传修饰的细胞(其包括组合提供细胞内激活信号和细胞内共刺激信号的两种或更多种CAR),来确保响应于一种或多种CAR对其关联抗原的识别而诱导足够的免疫应答。或者,经遗传修饰的细胞可以仅包含一个CAR,其具有识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的抗原识别域,并且可以组成性地表达共刺激受体,从而增加当CAR被活化时同时提供的共刺激的可能性。或者,可以对经遗传修饰的细胞进行进一步修饰以组成性表达共刺激受体及其配体两者。以这种方式,细胞不断经历共刺激并且仅需要具有包含来自活化受体的部分的信号传导域的CAR的活化,以用于细胞的免疫激活。

[0169] 因此,在本发明的第四或第五方面的一些实施方案中,经遗传修饰的细胞被进一步修饰以组成性地表达共刺激受体。在进一步的实施方案中,经遗传修饰的细胞被进一步修饰以便表达共刺激受体的配体,从而促进细胞的自身刺激。还表达共刺激受体及其同源配体(以诱导自身刺激)两者的CAR表达性T细胞的实例是本领域已知的,并且特别包括Stephen MT.et al.Nat Med, 2007;13:1440-9中所公开的那些。

[0170] 可以通过进一步修饰细胞以分泌细胞因子,优选促炎或促增殖细胞因子来增强包含CAR的经遗传修饰的细胞的效力。细胞因子的这种分泌为表达CAR的细胞提供自分泌支持,并改变围绕CAR表达性细胞的局部环境,使得募集并活化免疫系统的其他细胞。因此,在本发明的第四或第五方面的一些实施方案中,经遗传修饰的细胞被进一步修饰以分泌细胞因子。这种分泌可以是组成性的,或者可以在CAR识别其关联抗原或配体时是可诱导的。

[0171] 尽管可根据所需的免疫应答来选择任一种或多种细胞因子,但优选的细胞因子包

括IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17和IL-21或其组合。

[0172] 本发明第四或第五方面的经遗传修饰的细胞可以是任何合适的免疫细胞,或者可以是均质或异质性的细胞群。在一些实施方案中,细胞是白细胞,外周血单个核细胞(PBMC),淋巴细胞,T细胞,CD4+T细胞,CD8+T细胞,天然杀伤细胞或天然杀伤T细胞。

[0173] 在第六方面,本发明提供杀伤表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞的方法,所述方法包括将表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞暴露于具有嵌合抗原受体的经遗传修饰的细胞,其中所述嵌合抗原受体针对所述功能失调性P2X<sub>7</sub>受体。

[0174] 因此,在本发明第六方面的一些实施方案中,CAR直接识别功能失调性 P2X<sub>7</sub>受体。在其他实施方案中,CAR间接识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体。

[0175] 如本文所用,术语“直接识别”包括当受体以其天然形式存在时,CAR的抗原识别域与功能失调性P2X<sub>7</sub>受体或其表位的直接结合。在另一个非限制性实例中,抗原识别域可以直接结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的加工形式,其可以由抗原呈递分子诸如主要组织相容性复合物(MHC)呈递。

[0176] 作为直接识别具有功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞的CAR的备选,CAR可以通过间接手段针对具有功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞。

[0177] 因此,在本发明第六方面的一些实施方案中,嵌合抗原受体经由中间体识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体。中间体可以是与功能失调性P2X<sub>7</sub>受体直接结合或相互作用的分子诸如探针。此类探针的非限制性实例包括抗体,抗体的Fab, scFv, 可溶性工程化的TCR或适体。CAR可以能够直接识别探针,或者探针可以具有CAR所识别的标签。在任一方面,探针提供针对靶细胞(即具有功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞)的特异性,而具有CAR的经遗传修饰的细胞针对靶细胞提供效力并指导免疫应答。或者,中间体可以是细胞内源性标志物,所述细胞内源性标志物与功能失调性P2X<sub>7</sub>受体相关,或其表达与细胞内源性标志物相关。标志物的功能失调可以是P2X<sub>7</sub>受体功能失调的原因或结果。

[0178] 在本发明第六方面的一些实施方案中,杀伤具有功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞的方法还包括将具有功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞暴露于中间体的步骤。

[0179] 在本发明第六方面的一些实施方案中,中间体是与功能失调性P2X<sub>7</sub>受体结合的探针并且嵌合抗原受体识别探针。优选地,探针是抗体或适体。

[0180] 如贯穿整个说明书中使用的,术语“适体”是指与靶标(特别是功能失调性 P2X<sub>7</sub>受体)特异性结合或优先形成复合物的任何寡核酸,多核酸,肽或多肽。

[0181] 在本发明第六方面的一些实施方案中,探针包括标签并且嵌合抗原受体识别该标签。通过中间体识别细胞的CAR的实例在本领域中是已知的,例如欧洲专利申请EP 2651442。

[0182] 在本发明第六方面的一些实施方案中,具有功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞在受试者体内。在一些实施方案中,所述受试者是人。在一些实施方案中,所述方法还包括与外源细胞因子一起将表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞暴露于经遗传修饰的细胞。

[0183] 在本发明第六方面的一些实施方案中,经遗传修饰的细胞与来自受试者的表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞自体的经遗传修饰的细胞。

[0184] 在本发明第六方面的一些实施方案中,表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞在受试者体内。在本发明第六方面的一些实施方案中,表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞是癌细胞。

[0185] 在本发明第六方面的一些实施方案中,本发明提供了治疗或预防受试者中的癌症的方法,所述方法包括向受试者提供具有嵌合抗原受体的经遗传修饰的细胞,其中所述嵌合抗原受体针对具有功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的靶细胞。

[0186] 如本文所用的,术语“治疗”或“处理”应当理解为在其范围内包括以下结果中的一个或多个:(i)在一定程度上抑制受试者中原发性肿瘤的生长,包括减缓和完全生长停滞,并且包括降低切除后原发性肿瘤的生长;(ii)在一定程度上抑制受试者中一种或多种继发性肿瘤的生长和形成;(iii)减少受试者中的肿瘤细胞的数量;(iv)减小受试者中肿瘤的大小;(v)抑制(即,即减少,减缓或完全停止)肿瘤细胞浸润到周围器官中;(vi)抑制(即减少,减缓或完全停止)转移;(vii)与未治疗的状态相比,提高受试者的预期寿命;(viii)与未治疗的状态相比,提高受试者的生活质量;(ix)缓解,消融或改善受试者中的至少一种癌症症状;(x)导致受试者癌症消退或缓解;(xi)缓解由癌症引起的受试者中的状况;和(xii)停止受试者中与癌症相关的症状。

[0187] 如本文所用,术语“预防”应当理解为在其范围内包括抑制受试者中原发性肿瘤的形成,抑制受试者中一种或多种继发性肿瘤的形成,或减少或消除缓解中的受试者中的癌症复发。

[0188] 如本文所用,术语“抑制”理解为指与对照,诸如未处理的细胞或受试者中的生长相比,癌症、癌性细胞或肿瘤生长的减少或降低。在一些实施方案中,相对于未处理的对照,生长可以减少或降低至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%或100%。

[0189] 可以通过本领域已知的一系列方法来评估癌症,肿瘤或癌性细胞生长的抑制。例如,对于体外癌性细胞,细胞的生长可以通过合适的增殖测定法或通过评估氚化胸苷在给定时间段内掺入细胞DNA的程度的方法来确定。对于体内存在的肿瘤或癌性细胞,肿瘤或细胞的生长可以通过例如本领域已知的合适成像方法来确定。

[0190] 如本文所用,术语“受试者”是指任何能够患有癌症的动物。感兴趣的特定受试者是人和科学上相关的物种诸如小鼠,大鼠,白鼬,豚鼠,仓鼠,非人灵长类,狗,猪和绵羊,或经济相关动物诸如马,狗,猫和牛。在本发明第六方面的优选实施方案中,所述受试者是人。

[0191] 提及“给受试者提供”指对受试者施用经遗传修饰的细胞。或者,可以在受试者体内产生经遗传修饰的细胞。例如,可以在体内产生经遗传修饰的细胞,使得受试者具有经遗传修饰的细胞的内源性群体。用于此类体内生成的合适手段是本领域已知的,并且包括受试者的基因治疗。

[0192] 如贯穿整个说明书中所用,提及“针对”具有功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的靶细胞的CAR涵盖基于具有功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞针对细胞的免疫应答的选择性靶向。重要的是,此类靶向不限于CAR直接识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体。也就是说,CAR本身不必直接识别或结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体,而仅仅必须能够选择性识别表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞并由该细胞活化。

[0193] 因此,在本发明第六方面的一些实施方案中,CAR直接识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体。在其他实施方案中,CAR间接识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体。

[0194] 如本文所用,术语“直接识别”包括当受体以其天然形式存在时,CAR的抗原识别域与功能失调性P2X<sub>7</sub>受体或其表位的直接结合。在另一个非限制性实例中,抗原识别域可以直接结合功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的加工形式,其可以由抗原呈递分子诸如主要组织相容性复

合物 (MHC) 呈递。

[0195] 作为直接识别具有功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞的CAR的备选,CAR可以通过间接手段针对具有功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的靶细胞。

[0196] 因此,在本发明第六方面的一些实施方案中,嵌合抗原受体经由中间体识别功能失调性P2X<sub>7</sub>受体。中间体可以是与功能失调性P2X<sub>7</sub>受体直接结合或相互作用的分子诸如探针。此类探针的非限制性实例包括抗体,抗体的Fab, scFv, 可溶性工程化的TCR或适体。CAR可以能够直接识别探针,或者探针可以具有CAR所识别的标签。在任一方面,探针提供针对靶细胞(即具有功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞)的特异性,而具有CAR的经遗传修饰的细胞针对靶细胞提供效力并指导免疫应答。或者,中间体可以是细胞内源性标志物,所述细胞内源性标志物与功能失调性P2X<sub>7</sub>受体相关,或其表达与功能失调性 P2X<sub>7</sub>受体相关。标志物的功能失调可以是P2X<sub>7</sub>受体功能失调的原因或结果。

[0197] 在本发明第六方面的一些实施方案中,治疗或预防受试者中的癌症的方法还包括给受试者提供中间体的步骤。

[0198] 在本发明第六方面的一些实施方案中,中间体是与功能失调性P2X<sub>7</sub>受体结合的探针并且嵌合抗原受体识别探针。优选地,探针是抗体或适体。

[0199] 如贯穿整个说明书中使用,术语“适体”是指与靶标(特别是功能失调性 P2X<sub>7</sub>受体)特异性结合或优先形成复合物的任何寡核酸,多核酸,肽或多肽。

[0200] 在本发明第六方面的一些实施方案中,探针包括标签并且嵌合抗原受体识别标签。通过中间体识别细胞的CAR的实例在本领域中是已知的,例如欧洲专利申请EP 2651442。

[0201] 在第七方面,本发明提供了治疗或预防受试者中癌症的方法,所述方法包括向受试者施用根据本发明第四或第五方面的经遗传修饰的细胞。

[0202] 虽然提供表达针对具有功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的靶细胞的CAR的经遗传修饰的细胞可以提供针对癌前或癌性细胞的有效免疫治疗,但与经遗传修饰的细胞一起提供佐剂可进一步增强免疫反应的诱导并可以增加免疫治疗。细胞因子,优选促炎性细胞因子是与具有CAR的经遗传修饰的细胞一起提供给受试者的特别合适的佐剂。

[0203] 因此,在本发明的第六和第七方面的一些实施方案中,将经遗传修饰的细胞与细胞因子一起施用于受试者。应当理解,如在整个说明书中使用,术语“与……一起”包括将经遗传修饰的细胞与细胞因子同时施用或与细胞因子组合施用。因此,当与细胞因子组合施用时,可以认为这包括联合疗法,由此受试者的免疫治疗包括用细胞因子治疗和用具有针对表达功能失调性 P2X<sub>7</sub>受体的靶细胞CAR的经遗传修饰的细胞治疗两者。在一些形式中,细胞因子在与施用经遗传修饰的细胞不同的日期(>24小时)施用。在其它形式中,细胞因子与经遗传修饰的细胞在同一天(在24小时内)施用。在其他形式中,细胞因子和经遗传修饰的细胞在彼此18小时,12小时,6小时,4小时,2小时,1小时,45分钟,30分钟,15分钟,10分钟,5分钟,2分钟或1分钟内施用。

[0204] 与经遗传修饰的细胞一起施用的合适的细胞因子包括IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、IL-23、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$ 、GM-CSF、TGF $\beta$ 和TNF $\alpha$ 。优选的细胞因子包括IL-2和IFN $\alpha$ 。此外,细胞因子可以以重组形式,天然形式或通过递送系统施用,诸如与蛋白质的融合物,作为在经遗传修饰的细胞中表达的核酸序列递送或与聚

合物诸如聚乙二醇 (PEG) 缀合递送。

[0205] 要遗传修饰的细胞可以从任何合适的来源获得。在本发明第六或第七方面的一些实施方案中,要遗传修饰的细胞是自体细胞,其是与表达功能失调性P2X<sub>7</sub>受体的细胞自体的细胞。有利的是,自体细胞不会被受试者的免疫系统识别为“非自身”,并因此会被受试者所耐受。然而,在一些形式的癌症中,合适的自体细胞可以不容易获得。因此,在本发明的一些实施方案中,要遗传修饰的细胞是同种异体细胞或异源细胞。

[0206] P2X<sub>7</sub>功能失调是各种癌症中常见的分子变化。因此,本发明第六或第七方面的方法可用于预防和治疗各种癌症。

[0207] 在本发明第六或第七方面的一些实施方案中,所述方法用于预防或治疗选自以下癌症中的一种或多种:脑癌、食道癌、口腔癌、舌癌、甲状腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、肾癌、结肠癌、直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、宫颈癌、上皮细胞癌、皮肤癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、睾丸癌。优选地,癌症是选自以下癌症中的一种或多种:肺癌、食道癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌、膀胱癌、宫颈癌、阴道癌、上皮细胞癌、皮肤癌、血液相关癌症、乳腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、睾丸癌。

[0208] 在本发明第六或第七方面的一些实施方案中,癌症是转移性癌症,诸如 III期或 IV期癌症。

[0209] 在产生根据本发明的第四或第五方面的经遗传修饰的细胞时,可以期望体外扩增细胞群以增加可用于治疗的总细胞数量。这可以使用将该细胞暴露于CAR用的抗原的步骤来进行。因此,本发明的第八方面提供了体外扩增根据本发明第四或第五方面的经遗传修饰的细胞的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于CAR用的抗原的步骤。在一些实施方案中,该方法包括将细胞暴露于细胞因子的另外步骤。

[0210] 在第九方面,本发明提供了体外扩增根据本发明第四或第五方面的经遗传修饰的细胞的方法,该方法包括将细胞暴露于CAR用的抗原并同时将细胞暴露于细胞因子的步骤。

[0211] 用于本发明第八或第九方面的优选的细胞因子包括IL-2亚族,干扰素亚族,IL-10亚族,IL-1亚族,IL-17亚族或TGF-β亚族的成员。在本发明第八或第九方面的一些实施方案中,细胞因子选自由FN-γ、IL-2、IL-5、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、TNF-α、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3 和GM-CSF或其组合组成的组。

[0212] 在第十方面,本发明提供了体外扩增根据本发明第四或第五方面的经遗传修饰的细胞的方法,所述方法包括使所述细胞暴露于固定化的抗CD3和抗 CD28抗体。在本发明的第十方面的一些实施方案中,将抗体固定化在珠状基质上(例如“人活化剂”Dynabeads<sup>TM</sup>)。在本发明第十方面的一些实施方案中,将抗体固定化在可选择的表面上,诸如组织培养容器,培养瓶,平板或生物反应器的表面上。

[0213] 如本领域技术人员将理解的,取决于CAR的信号传导域,CAR对其关联抗原的识别将导致细胞内信号传导,这最终导致细胞增殖。因此,可以扩增少量细胞或单独的细胞(或者在单细胞的情况下,克隆性扩增)以形成治疗有意义的数目。通过提供细胞因子可以进一步增强这一过程。

[0214] 根据本发明的第四或第五方面的经遗传修饰的细胞的递送或施用可以是单独递送或施用细胞,或递送或施用配制到合适药物组合物中的细胞。因此,在第十一方面中,本发明提供药物组合物,其包含根据本发明的第四或第五方面的经遗传修饰的细胞和药学上

可接受的载体。

[0215] 本领域已知用于提供用于免疫治疗的含CAR细胞的方法(参见例如Kershaw, MH. et al. Clin Cancer Res. 2006; 12 (20) : 6106-15; Parker LL. et al. Hum Gene Ther 2000; 11: 2337-87)。此外,本领域已知用于制备,扩增和评估哺乳动物CAR表达细胞的方案和方法(参见例如Cheadle, EJ. et al. Antibody Engineering: Methods and Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology, vol. 907: 645-66),并概述于下面的实施例中。

[0216] 考虑待施用的细胞的特定物理和化学特性,药物组合物还可以包括一种或多种药学上可接受的添加剂,包括药学上可接受的盐,氨基酸,多肽,聚合物,溶剂,缓冲剂,赋形剂和填充剂。在一些实施方案中,药物组合物包含根据本发明的第四或第五方面的经遗传修饰的细胞在合适的介质,诸如等张盐水溶液中的悬浮液。在一些实施方案中,药物组合物可以包含合适的佐剂,诸如如上所述的一种或多种细胞因子。在一些实施方案中,药物组合物还可以包含如上所述的中间体。

[0217] 药物组合物的施用也可以通过肠胃外手段进行,所述肠胃外手段包括静脉内,心室内,腹膜内,肌内或颅内注射,或局部注射到肿瘤部位或癌性肿块。

[0218] 在整个说明书中,除非上下文另有要求,词语“包含”或变型会理解为暗示包含所陈述的要素或整数或者要素或整数的组,但不排除任何其他元素或整数或者元素或整数的组。

[0219] 最后,参考分子生物学的标准教科书,其包含用于执行本发明所涵盖的基本技术的方法。参见例如Green MR and Sambrook J, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第4版), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012。

[0220] 对于本领域技术人员而言显而易见的是,尽管为了清楚和理解的目的已经对本发明进行了一些详细描述,但是可以对本文描述的实施方案和方法进行各种修改和改变而不脱离本说明书中公开的发明性构思的范围。

[0221] 以下实施例进一步说明本发明。这些实施例仅用于描述特定实施方案的目的,而不旨在限制上述的描述。

[0222] 实施例1

[0223] PEP2-2-3结合肽嵌合抗原受体(CAR)设计和表达的方案

[0224] 详述了设计和表达根据本发明的一个实施方案的抗非功能性(nf)P2X<sub>7</sub>受体CAR的过程的示例性方案在以下详述。

[0225] PEP2-2-3(抗-nfP2X<sub>7</sub>)嵌合抗原受体的设计

[0226] 根据图1所示的示意图设计抗nfP2X<sub>7</sub>嵌合抗原受体(CAR)。

[0227] 产生CAR的抗原识别域1,其包含PEP2-2-3结合肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:11所示的核苷酸序列)。显示PEP2-2-3序列对在癌细胞,诸如前列腺LNCap细胞上表达的功能失调性P2X<sub>7</sub>受体具有特异性亲和力,对单核细胞或淋巴细胞没有显著亲和力。

[0228] 将CD8a信号传导肽2(具有SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:13所示的核苷酸序列)连接到PEP2-2-3抗原识别域1的N端。CD8a信号传导肽2包括在SEQ ID NO:13的位置1至13处的Kozak共有序列。包括Kozak序列的CD8a信号传导肽2作用于促进核糖体识

别经转录的RNA，并提供翻译起始位点，从而促进CAR的经转录的RNA序列翻译成蛋白质。

[0229] 将CAR的抗原识别域1通过两个铰链区中(称为长铰链4和短铰链5)的一个连接到跨膜域3。提供长铰链4以允许抗原识别域的柔性，这对于抗原识别域与其关联配体(功能失调性P2X<sub>7</sub>)相互作用可以是需要的。长铰链4的氨基酸和核苷酸序列分别在SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15中列出。短铰链5的氨基酸和核苷酸序列分别在SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中列出。

[0230] CAR的跨膜域3和细胞内域6的部分由CD28共刺激受体7的部分提供(SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:19所示的核苷酸序列)。细胞内域进一步包括共刺激受体OX408的部分(SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:21所示的核苷酸序列)和活化受体CD3zeta 9的部分(SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:23所示的核苷酸序列)。

[0231] 将P2A序列10(SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:25所示的核苷酸序列)添加到CAR的C-末端，允许与CAR的C末端附接的任何肽序列的翻译后切除。构建的抗nfP2X<sub>7</sub>CAR-长铰链和抗-nfP2X<sub>7</sub>CAR-短铰链的氨基酸序列分别在SEQ ID NO:26和27中给出。

[0232] 慢病毒载体设计和装配

[0233] 将设计的CAR整合到图2所示的BLIV慢病毒质粒(System Biosciences, California, USA)中，所述质粒包括荧光和生物发光报告蛋白，绿色荧光蛋白(GFP)和萤火虫萤光素酶(FLuc)。BLIV质粒还包括在GFP和FLuc报道蛋白编码序列之间的T2A编码序列，其允许FLuc和GFP蛋白的翻译后分离。

[0234] 将与BLIV载体的NheI限制性位点的上游和下游序列具有同源性的序列添加到设计的CAR的5'和3'末端以产生SEQ ID NO 28(CAR-长铰链)和SEQ ID NO:29(CAR-短铰链)所示的最终核苷酸序列。包含5'和3'序列允许使用Gibson克隆将抗nf P2X<sub>7</sub>CAR掺入BLIV载体中。

[0235] 使用基因块(gene block)技术(gBlock<sup>TM</sup>基因片段-Integrated DNA Technologies, Iowa, USA)构建抗nf P2X<sub>7</sub>CAR长铰链和抗nf P2X<sub>7</sub>CAR短铰链的核苷酸序列，并按照制造商的说明书使用Gibson装配克隆试剂盒(Assembly Cloning Kit)(New England Biolabs inc. Ipswich MA, USA-cat# E5510S)进行装配。

[0236] 在NheI克隆位点处限制性处理BLIV质粒，并且使用Gibson装配掺入抗nf P2X<sub>7</sub>CAR编码序列。

[0237] BLIV-CAR载体的克隆和评估

[0238] 根据制造商的说明书，用生成的BLIV-CAR载体转化New England Biolabs 5-alpha感受态大肠杆菌细胞(Gibson装配克隆试剂盒中提供)。简单来说：

[0239] -将一管NEB 5-alpha感受态大肠杆菌细胞在冰上解冻10分钟；

[0240] -将含有1pg-100ng BLIV-CAR质粒DNA的1-5μl添加到细胞混合物中并通过轻敲管4到5次混合；

[0241] -将大肠杆菌和质粒混合物置于冰上30分钟而不混合；

[0242] -将细胞和质粒混合物在42℃下热激30秒，然后在冰上放置5分钟而不混合；

[0243] -向混合物中加入950μl SOC，之后加热到37℃保持60分钟并剧烈振荡；

[0244] -制备选择板并加热到37℃；

[0245] -在SOC溶液中制备10倍连续稀释的细胞;和

[0246] -将50至100 $\mu$ l的每种稀释液涂布于选择平板上,随后在37℃下温育过夜。

[0247] 在温育经转化的(大肠杆菌)细胞后,分离出用BLIV-CAR-短铰链质粒转化的10个细菌菌落和用BLIV-CAR-长铰链质粒转化的10个细菌菌落,纯化质粒DNA,并用BamHI限制性酶限制性处理。针对合适大小的限制性片段,通过凝胶电泳分析限制性DNA。如图3所示,用BLIV-CAR-长铰链质粒转化的细菌克隆的菌落2至9含有适当大小的限制性片段(7.8kb和2.8kb),而用BLIV-CAR-短铰链质粒转化的细菌克隆的仅仅菌落4提供了合适大小的限制性片段(7.4kb和2.8kb)。

[0248] 选择含有BLIV-CAR-长铰链质粒(L2至L4)的细菌的克隆2至4以及含有BLIV-CAR-短铰链质粒(S4)的细菌的克隆4,以使用EcoRI, BamHI和PstI限制酶进一步确认质粒身份。如表4和图4中所示,所有的菌落都显示出期望长度的限制性片段。

[0249] 表4

[0250] BLIV-CAR质粒的预期的限制性片段长度

[0251]	限制性酶和质粒	预期长度
	未修饰的BLIV质粒	8.9kb
	Bam HI限制性BLIV-CAR长铰链	7.8kb和2.8kb
	Bam HI限制性BLIV-CAR-短铰链	7.4kb和2.8kb
	Eco RI限制性BLIV-CAR-长铰链	6.8kb, 2.6kb和1.5kb
	Eco RI限制性BLIV-CAR-短铰链	7.7kb和2.6kb
	Pst I限制性BLIV-CAR长铰链	8.6kb, 2.0kb和0.22kb
	Pst I限制性BLIV-CAR-短铰链	9.3kb, 0.8kb和0.22kb

[0252] 慢病毒载体的构建与验证

[0253] 按照以下方法使用293T细胞从3质粒方案中包装慢病毒。

[0254] 第1天:在T-225烧瓶中将293T细胞接种于含有10%血清的35ml DMEM培养基中,使得细胞在次日是90-95%汇合的。

[0255] 第2天:将30ug生成的BLIV-CAR质粒之一(或未修饰的BLIV质粒), 30ug gag-pol质粒delta8.2和15ug VSV-G质粒(pMD2.G)加入到OptiMEM培养基中,最终体积为750 $\mu$ l,并且混合。加入300 $\mu$ l的PEI溶液并在室温下温育至少20分钟。然后将混合物加入到汇合的293T细胞中,然后在37℃下温育。

[0256] 第3天:加入质粒混合物后24小时,从293T细胞中倾析上清液并在4℃下储存。用35ml新鲜培养基替换倾析的混合物,然后在37℃进一步温育。

[0257] 第4天:加入质粒混合物后48小时,除去培养基并与24小时收获的上清液合并。将合并的上清液在1500g旋转15分钟以除去任何剩余的细胞碎片。上清液通过0.45 $\mu$ m过滤器过滤,并且然后在WX超速离心机中以 17,000rpm旋转1小时。离心后,用手倾析上清液,管中保留50-200 $\mu$ l。将离心管置于50ml有螺旋盖的管中以防止污染和蒸发,并使病毒在4℃下重悬过夜。

[0258] 第5天:将病毒从离心管底部重悬浮并转移到新的1.5ml管中。将重悬浮的病毒在离心管中以5000rpm旋转5分钟以除去任何剩余的碎片。

[0259] 温育24小时后,通过GFP荧光的存在评估用BLIV-CAR-短铰链和 BLIV-CAR-长铰链

载体转染293T细胞(参见图5A和图6A)。将第5天收集的含有短铰链BLIV-CAR和长铰链BLIV-CAR病毒载体的上清液(如上所述)与新鲜的293T细胞一起温育,并对GFP荧光可视化以测试转导能力(参见图 5B和图6B)。

[0260] 筛选CAR T细胞功能

[0261] 根据制造商的说明使用RosetteSep<sup>TM</sup>人CD8+T细胞分离试剂盒 (Stemcell technologies, Vancouver, Canada) 从50ml人血液中分离10<sup>8</sup>个CD8T 细胞。如图7所示,纯度分析表明76.6%的经纯化的细胞是CD8+。

[0262] 以每孔10<sup>5</sup>个细胞将CD8+T细胞与1:1比例的dynal T细胞扩增剂 (expander) (CD3/CD28) 珠温育。然后将CD8细胞与慢病毒制备物以5或更高的感染复数 (MOI) 一起温育过夜,所述慢病毒制备物含有未修饰的BLIV质粒, BLIV-CAR-短铰链质粒或BLIV-CAR-长铰链质粒。在温育后,洗涤CD8 +T细胞,之后与靶细胞共培养。

[0263] 表达非功能性P2X<sub>7</sub>受体的靶细胞由乳腺癌细胞系BT549 (ATCC HTB-122) 提供。按照制造商的说明书,使用荧光膜计算间染料eFluor<sup>TM</sup> 670 (fluorescent membrane intercalculating dye eFluor<sup>TM</sup>670) (affymetrix eBioscience) 对这些细胞进行染料标记。简单来说:

[0264] -将BT549细胞制备成单细胞悬液并用PBS洗涤两次以除去任何残留的血清;

[0265] -将细胞重悬于室温PBS中;

[0266] -在室温的PBS中制备10μM细胞增殖染料eFluor®670的溶液;

[0267] -将等体积的10μM染料溶液加入到制备的BT549细胞中以得到最终浓度为5μM的染料溶液;

[0268] -将染料溶液中的BT549细胞在黑暗中在37°C温育10分钟,然后通过加入4倍体积的含有10%血清的冷培养基来终止标记,然后在黑暗中在冰上温育5分钟;

[0269] -最后细胞在培养基中洗涤3次,然后以所需浓度重悬于培养基中。

[0270] 在染料标记之后,将靶细胞与制备的CD8+T细胞以10:1,5:1,1:1和0:1 (T细胞:靶标) 的比例共培养。

[0271] 共培养24小时后,收集细胞并使用荧光激活细胞分选术 (FACS) 分析。定量含有膜计算间染料的靶细胞的数量以评估共培养的T细胞是否导致靶细胞死亡或细胞增殖的停滞。用于定量CD8+T细胞杀伤靶细胞的效力的门控和分析策略在图8中显示,并且在图9中定量。图8A显示经标记的CD8 +T细胞的门控和直方图分析。图8B显示了经标记的BT549靶细胞的门控和直方图分析。图8C显示了对照CD8+T细胞和BT549靶标共培养24小时后的门控和直方图分析。图8D显示了用BLIV-CAR长铰链转导的CD8+ T细胞和BT549靶细胞共培养24小时后的门控和直方图分析。图8E显示了用BLIC-CAR-短铰链转导的CD8+T细胞和BT549靶细胞共培养24小时的门控和直方图分析。

[0272] 如图9中可以看到,相比于靶细胞与未转导或对照转导的(未修饰的 BLIV载体) CD8T细胞的共培养,当靶细胞与用含有BLIV-CAR长铰链或 BLIV-CAR短铰链的慢病毒转导的CD8T细胞共培养时,删除(杀死)的 BT549靶细胞的数目增加。

[0273] 鉴于图9中呈现的结果,显然用抗-nf P2X<sub>7</sub>CAR受体(具有短铰链或长铰链)转导的CD8+T细胞显示对表达非功能性P2X<sub>7</sub>的靶细胞的升高的细胞毒活性水平,证明CAR-T细胞杀伤癌细胞靶标的能力。

[0274] 实施例2

[0275] 备选的抗nf P2X7嵌合抗原受体的设计

[0276] 下文详述了进一步示例性方案,其详述了设计和在T细胞上表达根据本发明的一个实施方案的抗非功能性(nf)P2X<sub>7</sub>受体CAR的方法。

[0277] 使用三种抗非功能性P2X<sub>7</sub>结合肽设计抗-nf P2X<sub>7</sub>CAR。具体而言,CAR设计成包括与肽PEP2-2-1-1,PEP2-472-2或PEP2-2-12(分别具有SEQ ID NOS:32,33和34中所示的氨基酸序列)具有序列同源性的抗原识别域。这些结合肽已显示与非功能性P2X<sub>7</sub>受体结合(Barden,J.A.,Sluyter,R.,Gu,B.J. &Wiley,J.S.2003.Specific detection of non-functional human P2X(7) receptors in HEK293cells and B-lymphocytes.FEBS Lett 538,159-162)。

[0278] 上述结合肽与识别非功能性P2X<sub>7</sub>受体的抗体的重链可变区的比对显示在图10中。互补决定区(CDR1至3)序列的比对通过方框指示。

[0279] 具有PEP2-2-1-1序列的CAR构建的具体实例在下面详述。将相同的CAR结构和序列用于具有PEP2-472-2或PEP2-2-12序列作为结合肽的CAR,其中用备选的结合肽替换PEP2-2-1-1。

[0280] 编码PEP2-2-1-1结合肽的DNA序列与其他DNA序列以符合读码框的方式合成以产生具有下述构造的CAR。

[0281] 参照图11,通过将人类的CD8 $\alpha$ 分子(CD8A)转录物变体1的前导序列(具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:31所示的核苷酸序列)11连接至PEP2-2-1-1结合肽12(具有SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:35所示的核苷酸序列)的N末端来制备成抗原识别域。

[0282] 然后通过经修饰的IgG4铰链-CH2-CH4 13将抗原识别域连接至跨膜域,所述经修饰的IgG4铰链-CH2-CH4 13具有如以上实施例1中所述的长铰链序列(即SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列和在SEQ ID NO:15中列出的核苷酸序列)。

[0283] 将包含CD8前导序列11和PEP2-2-1结合肽12的胞外域与由人CD28 15的一部分(具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:19所示的核苷酸序列)提供的跨膜域14连接,所述跨膜域14也包括CD28胞质域16的一部分。

[0284] CAR 17的细胞内部分由以下提供:上文提到的人CD28分子的一部分 14和人类肿瘤坏死因子受体超家族成员4的细胞质域(TNFRSF4/OX40-具有 SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:21中所示的核苷酸序列) 18,所述细胞质域18连接至人类CD247分子的细胞质域19(T细胞表面糖蛋白CD3zeta链,具有SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列和在SEQ ID NO: 23中所示的核苷酸序列)。

[0285] 慢病毒载体设计和装配

[0286] 使用基因块(gene block)技术(gBlock<sup>TM</sup>基因片段-Integrated DNA Technologies,Iowa,USA)构建经设计的PEP2-2-1-1,PEP2-472-2和PEP2-2-12 CAR的核苷酸序列,并按照制造商的说明书使用Gibson装配克隆试剂盒(Assembly Cloning Kit)(New England Biolabs inc.Ipswich MA,USA -cat#E5510S)进行装配。用于整合到克隆载体(包括限制性位点)中的PEP2-2-1-1,PEP2-472-2或PEP2-2-12 CAR的核苷酸构建体的序列分别显示于SEQ ID NO:35,36和37中。

[0287] 将CAR核苷酸构建体整合到图11所示的pCDH-CMV-MCS-T2A (pCDH) 载体 (System Biosciences, California, Cat#CD524A-1) 中, 所述载体包括荧光报告蛋白, 绿色荧光蛋白 (GFP)。pCDH载体进一步包括在克隆位点和 GFP之间的T2A编码序列, 其允许克隆的CAR和 GFP蛋白的翻译后分离。

[0288] 为了将PEP2-2-12和PEP2-472-2CAR核苷酸构建体整合到pCDG载体中, 用EcoR1和 NotI限制性处理pCDH载体并凝胶纯化 (QIAquick凝胶提取试剂盒, QIAGEN)。还用EcoRI和 NotI消化酶消化PEP2-2-12和 PEP2-472-2CAR核苷酸gBlock构建体。然后根据制造商的说明书用 QIAquick PCR纯化试剂盒纯化限制性gBlock片段。将限制性载体与限制性 CAR构建体以插入物与载体3:1的摩尔比连接。将连接混合物转化化学感受态SURE2细胞 (Agilent)。

[0289] PEP2-2-1-1 CAR构建体含有内部EcoR1限制性位点, 因此将其以不同于PEP2-2-12 和PEP2-472-2 CAR核苷酸构建体的方式整合到pCDH载体中。用EcoR1限制性处理PCDH载体, 并且在100uM dNTPs存在下由T4 DNA 聚合酶填充所得到的5'突出端 (12°C, 15分钟)。终止反应 (在10mM EDTA的存在下, 在75°C保持20分钟), 并且对限制性载体进行柱纯化 (QIAquick PCR 纯化试剂盒, QIAGEN)。然后用NotI进一步限制性处理纯化的载体并进行凝胶纯化 (QIAquick凝胶提取试剂盒, QIAGEN)。PEP2-2-1-1 CAR构建体片段首先用SmaI进行限制性处理, 然后通过NotI消化 (均在25°C)。根据制造商的说明书, 用QIAquick PCR纯化试剂盒纯化限制性的gBlock片段。将限制性载体与CAR构建体以插入物与载体的3:1摩尔比连接。

[0290] 克隆和评估pCDH-CAR载体

[0291] 根据制造商的说明书将上述三种CAR构建体中的每一种的连接混合物转化到化学感受态SURE2细胞 (Agilent) 中。简单来说:

[0292] - 将SURE2细胞在冰上解冻。一旦解冻, 将细胞轻轻混合, 并将100μl 等分的细胞置于预先冷却的14ml圆底管中;

[0293] - 将2μl的β-巯基乙醇加入到细胞的每个等分试样中;

[0294] - 将管混合并在冰上温育10分钟, 每2分钟轻轻旋转一次;

[0295] - 将0.1-50ng的每种pCDH-CAR载体加入到等分的细胞中;

[0296] - 轻轻混合等分试样, 并且然后在冰上温育30分钟;

[0297] - 将管在42°C的水浴中加热30秒, 并且然后在冰上温育2分钟;

[0298] - 将0.9ml预热的 (42°C) NZY+肉汤加入每个管中, 然后在25-250rpm的搅拌下于37°C温育1小时;

[0299] - 将多达200μl的转化混合物涂布在含有抗生素的LB琼脂平板上, 然后在37°C温育过夜;

[0300] - 挑取菌落并进一步培养过夜;

[0301] - 用Quicklyse微量制备试剂盒 (QIAGEN) 从培养的克隆中分离质粒 DNA, 并用 EcoRI/NotI消化来进行消化以鉴定具有正确大小的CAR-pCDH 载体的克隆

[0302] 在温育转化的 (SURE2) 细胞后, 分离出5至6个用pCDH-CAR转化的细胞菌落, 并进一步培养过夜, 所述pCDH-CAR针对PEP2-2-1-1, PEP2-472-2 或PEP2-2-12结合肽中的每种。用Quicklyse微量制备试剂盒 (QIAGEN) 从每个培养的菌落分离质粒DNA, 并用EcoRI/NotI限制

性酶进行限制性处理。通过凝胶电泳对限制性DNA分析合适大小的限制性片段。

[0303] 如图13所示,PEP2-2-1-1 pCDH-CAR构建体的菌落3,PEP2-472-2 pCDH-CAR构建体的菌落1和3以及PEP2-2-12 pCDH-CAR构建体的菌落 1,3和5含有合适大小的限制性片段。

[0304] 使用选自表5的适当的引物对每个所选择的克隆进行测序以确认CAR 的整合。

[0305] 表5

[0306] 用于确认选定的菌落中正确的CAR构建体的引物

引物名称	序列	SEQ ID NO	
pCHD-CMV-正向	GGTGGGAGGTCTATATAAGC	SEQ ID NO: 38	
[0307]	pCHD-coGFP-反向	TGATGCGGCACTCGATCTC	SEQ ID NO: 39
	2-2-1-1-反向	CTTCACGGAGTCTGCGTAG	SEQ ID NO: 40
	2-2-1-1-正向	TCTTGTCACTGTATCCAGTG	SEQ ID NO: 41
	2-472-2-反向	CGTATCTTCAGCTCTCAAGC	SEQ ID NO: 42
	2-472-2-正向	TGGTCCTTCAGTTTCCTGT	SEQ ID NO: 43
[0308]	2-12-2-反向	CAGCTGTATCTTCTGCTC	SEQ ID NO: 44
	Com-正向-1	AGTGGGAGAGTAACGGACAG	SEQ ID NO: 45
	Com-正向-2	AGGGCCAGAATCAATTGTAC	SEQ ID NO: 46

[0309] 将每个所选择的菌落的测序数据与PEP2-2-1-1,PEP2-472-2或 PEP2-2-12CAR构建体中每个的计算机得出的重组克隆比对,并针对每个选定的菌落中的至少一个验证合适的构建体。根据制造商的说明书,用NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi EF试剂盒Macherey-Nagel进行所验证的克隆的大规模无内毒素质粒分离。

[0310] 病毒载体的构建与验证

[0311] 使用Lipofectamine2000试剂(Invitrogen)按照标准实验室方案(Brown, C.Y. et al. 2010. Robust, reversible gene knockdown using a single lentiviral short hairpin RNA vector. Hum Gene Ther 21, 1005-1017)在瞬时转染的Hek293T细胞中进行慢病毒包装。简单来说:

[0312] -按照制造商的方案,每次转染中在T75cm<sup>2</sup>烧瓶中使用75ul Lipofectin 将12.5ug 慢病毒载体DNA与3.75ug pMD2.g (VSV-G包膜表达载体),6.25ug pRSV-Rev和7.5ug pCMVdelta8.2混合,并培养过夜;

[0313] -次日早晨更换培养基,并且48小时后收获含有病毒的上清液;

[0314] -收集的上清液以300xg离心5分钟,然后通过0.45um过滤器过滤;

[0315] -通过超速离心(68,000×g,90分钟和4°C,Beckman SW32转子)浓缩来自过滤上清液的病毒颗粒。除去上清液并将病毒沉淀物轻轻地重悬于冰上的 DMEM中;

[0316] -将100ul病毒等分试样储存在-70°C直至需要。

[0317] 为了评估病毒转染的比率,收获经转染的Hek293T细胞并通过流式细胞术测定GFP阳性细胞(含有pCDH载体的细胞)的百分比。图14显示了用 LV-PEP2-472-2包装混合物转染

的Hek293T的代表性结果。

[0318] 通过用浓缩的LV原种的连续稀释液(1:50和1:100)转导已知数量的 Hek293T细胞来计算病毒滴度。转导在8ug/ml聚凝胺(海美溴铵 (Hexadimethrine bromide))的存在下过夜进行。次日,用新鲜培养基替换含有病毒和聚凝胺的培养基,24小时后收获细胞,并且通过流式细胞术测定GFP 阳性细胞的百分比。使用下式计算病毒滴度:转导单位/ml (TU) = (FxC/V) xD, 其中F=GFP+细胞的频率 (%GFP+/100) ,C=加入病毒时的细胞数,V=以 mL计的转导体积,并且D=稀释因子。LV-PEP2-472-2转导的代表性流数据在图15中所示。PEP2-2-1-1, PEP2-12-2和PEP2-472-2CAR病毒载体中的每个的TU在下表6提供。

[0319] 表6

[0320] 病毒载体转导单位

慢病毒构建	稀释因子	平均%GFP <sup>+</sup> 细胞	TU/ml
PEP2-2-1-1	50	31.15	4.14e6
	100	21.25	5.62e6
PEP2-12-2	50	54.6	7.26e6
	100	33.15	8.82e6
PEP2-472-2	50	62	8.25e6
	100	39.55	10.52e6

[0322] 筛选nf-P2X<sub>7</sub>CAR T细胞功能

[0323] 表达抗-nf-P2X<sub>7</sub>CAR的CD8T细胞的产生

[0324] 根据以下方法纯化人CD8细胞并转导:

[0325] 从匿名捐献者(Australia Red Cross blood service)的血沉棕黄层分离的单个核细胞(MNC)中纯化人CD8T细胞。使用Ficoll-Paque<sup>TM</sup>密度梯度培养基分离MNC。根据制造商的说明书从MNC Dynabeads<sup>®</sup> Untouched<sup>TM</sup>人CD8 T细胞试剂盒(Invitrogen)纯化CD8T细胞。如通过流式细胞术所评估的,分离的细胞的纯度≥85%。

[0326] 将 $2 \times 10^6$ 个纯化的细胞与CD3/CD28珠(珠与细胞比率为3:1)和 IL2(500U/ml)一起预温育30分钟,然后加入1至2个感染复数(MOI)单位的病毒以及8ug/ml聚凝胺,所述病毒含有LV-PEP2-2-1-1,LV-PEP2-472-2或空的LV载体(GFP对照病毒)。将细胞与病毒一起温育16小时,然后除去含病毒的培养基。将剩余的细胞和珠在包括IL2的新鲜培养基中温育40小时,然后分析GFP荧光水平。

[0327] 如图16所示,8%至43%之间的GFP+CD8细胞指示成功转导。

[0328] 产生表达nf-P2X<sub>7</sub>或野生型(WT)P2X<sub>7</sub>受体的靶细胞

[0329] 为了评估表达抗-nf-P2X<sub>7</sub>-CAR的CD8细胞的效力,制备在其细胞表面上过表达非功能性P2X<sub>7</sub>受体(具有K193A突变)或P2X<sub>7</sub>受体的野生型细胞外域的Hek293T细胞。

[0330] 从Integrated DNA technologies (IDT) 订购EXD2\_K193A(nf-P2X<sub>7</sub>) 和 EXD2\_WT(功能性P2X<sub>7</sub>) gBlock基因片段(分别为SEQ ID NO:47和48)。将 EXD2域设计成与编码融合蛋白的DNA序列以符合读码框的方式表达,所述融合蛋白由来自pDisplay的IgK-前导-HA-MYC-PDGFR-跨膜域 (Invitrogen-图17)组成。这些融合蛋白设计用于表面表达。将EXD2\_K193A 和EXD2\_WT基因片段克隆到HA和MYC-表位标签之间以形成融合基因块。将Gateway

attB1和attB2序列包含在融合基因块的5'和3'端以克隆到 LV-416-IRES-puro载体(Clontech)中。

[0331] 使用Gateway® (ThermoFisher) 进行克隆,并且所有步骤都按照制造商的方案进行。简单来说:

[0332] -在侧翼有attB的DNA片段 (EXD2\_K193A, SEQ ID NO:47和 EXD2\_WT, SEQ ID NO: 48) 和含有attP的pDONR-107载体之间进行第一次 BP重组反应以产生进入克隆 (entry clone)。根据制造商的方案将BP重组反应用于转化化学感受态 E.cloni® 10G细胞 (Lucigen®);

[0333] -将经转化的细胞铺板在含有50ug/ml卡那霉素 (Sigma) 的LB琼脂平板上并在37℃下温育过夜;

[0334] -挑取来自每个平板的两个克隆以在含有卡那霉素 (SIGMA) (50ug/ml) 的 LB肉汤中制备微量培养物 (2mL)。随后在搅拌下于37℃温育过夜;

[0335] -使用QIAGEN QuickLyse微量制备试剂盒在次日从微量培养物中提取质粒DNA;

[0336] -进行诊断性Bam H1-HF (NEB) 和Pme1 (NEB) 消化以鉴定重组克隆。通过 Bam H1和 Bam H1/PmeI消化,然后进行凝胶电泳,证实EXD2\_K193A和 EXD2\_WT克隆两者是正确消化的(图18)。

[0337] 选择来自每个构建体 (EXD2\_K193A和EXD2\_WT) 的一个克隆用于LR 重组反应(如下所述)以将EXD2\_K193A和EXD2\_WT构建体插入到pLV-416 目的载体中。

[0338] 选择来自每个构建体 (EXD2\_K193A和EXD2\_WT) 的一个克隆来用于 LR重组反应(如下所述),以便将EXD2\_K193A和EXD2\_WT构建体插入到pLV-416目的载体中。

[0339] 选择克隆后,然后进行LR重组反应以将来自pDONR-107进入克隆的每个EXD2插入物转移至pLV-416目的载体中以产生表达载体。根据制造商的方案使用最终的LR重组反应来转化化学感受态 E.cloni® 10G细胞 (Lucigen®)。简单来说:

[0340] -将经转化的细胞铺板在含有100ug/ml的氨苄青霉素 (SIGMA) 的LB琼脂平板上并在37℃下温育过夜;

[0341] -挑取来自每个平板的六个克隆以在含有氨苄青霉素 (SIGMA) (50ug/ml) 的LB肉汤中制备微量培养物 (2mL),将其在搅拌下于37℃温育过夜;

[0342] -次日分离质粒DNA并进行Bam H1消化以鉴定重组克隆。通过存在三条合适大小 (3431, 1056和5844bp-见图19) 的条带鉴定出重组克隆。如从图 19中可以看出,来自每个平板的全部六个所选择的克隆提供了合适大小的限制性片段;

[0343] -用表7中列出的引物对用含有EXD2\_K193A或EXD2\_WT的pLV-416 构建体转导的两个克隆测序,以确认构建体是正确的。

[0344] 表7

[0345] 用于确认选定的菌落中正确的EXD2\_K193A和EXD2\_WT构建体的引物

引物名称	序列	SEQ ID NO
EXD-F1引物	ACAAGCTGTACCAGCGGAAA	SEQ ID NO:49
EXD2-R1引物	CACCACCACCTTAAAGGGCA	SEQ ID NO:50
EXD2-F1引物	ACAAGCTGTACCAGCGGAAA	SEQ ID NO:51

[0347] 为了产生用于转导HEK293细胞的病毒颗粒,并生成表达功能性或非功能性P2X<sub>7</sub>受体的稳定HEK293细胞系,使用以下方案:

[0348] -在转染前一天将HEK293细胞铺板(每个烧瓶 $7 \times 10^6$ 个细胞)。

[0349] -用慢病毒包装载体以及pLV-416-EXD2或pLV416-EXD2\_WT转染 HEK293T细胞。为了监测转染效率,还包括了GFP表达质粒(1ug)。

[0350] -过夜培养后,除去含有转染试剂的培养基并替换为10ml新鲜培养基(含 10%FCS 的DMEM)。24小时后收获10ml培养基并在-80°C下储存在2ml等分试样中直至需要。将另外10ml新鲜培养基(具有10%FCS的DMEM)加入烧瓶中,其在再过24小时后收获。

[0351] -通过以1200rpm离心培养基然后通过0.45um过滤器过滤从收获的培养基中分离病毒颗粒。将具有病毒颗粒的经过滤的培养基用于转染HEK293细胞。

[0352] 为了评估转染效率,在除去第二个10ml培养基后收获细胞,并且通过流式细胞术测定GFP阳性细胞的百分比。图20显示用 pLV-416-EXD2\_K193A和pLV-416-EXD2\_WT以97%和85%的效率转染 HEK293细胞。

[0353] 为了产生在其细胞表面上表达功能性和非功能性P2X<sub>7</sub>的细胞外域的稳定HEK293细胞。使用以下方案:

[0354] -在转导前一天将HEK293细胞接种于T25烧瓶中(每烧瓶 $7 \times 10^5$ )。

[0355] -次日从每个烧瓶中除去培养基,并根据表8中列出的比例加入根据上述方案产生的含有病毒颗粒的新鲜培养基;

[0356] -将聚凝胺加入到每个烧瓶中至最终浓度为8ug/mL。

[0357] 表8

[0358] 转导方案

病毒颗粒	培养基	具有病毒的培养基	培养基	具有病毒的培养基	培养基	具有病毒的培养基
pLV-416-EXD2	2.5 mL	2.5 mL	4 mL	1 mL	4.5 mL	0.5 mL
pLV-416-EXD2_WT	2.5 mL	2.5 mL	4 mL	1 mL	4.5 mL	0.5 mL
对照 LV-411-GFP	4 mL	1 mL (0.5 MOI)				
聚凝胺 20 mg/mL 储液	2 uL		2 uL		2 uL	
未转导的	5 mL					

[0359] [0360] -转导24小时后,从每个烧瓶中取出培养基,并向除了含有表达GFP的对照慢病毒(LV-411-GFP)的烧瓶外的所有烧瓶中添加补充有1600ug/mL G418的新鲜培养基(含10%FCS的DMEM)。

[0361] -在转导后72小时监测用对照pLV-411-GFP病毒转导的HEK293T细胞的GFP表达(参

见图21)；

[0362] - 在用G418补充培养基培养后4天所有未转导的细胞死亡。经转导的细胞系在培养基中具有G418的情况下继续正常生长。

[0363] 转染的P2X<sub>7</sub>受体的细胞外域含有HA和MYC-表位标签。因此,可以用针对HA-和MYC-的单克隆抗体染色这些细胞以通过流式细胞术确认细胞外域的表面表达。

[0364] 筛选CAR T细胞功能

[0365] 为了评估nf-P2X<sub>7</sub>-CAR的功能性,将用PEP2-2-1-1或PEP2-472-2 CAR 构建体(如上制备)中的每一种转导的CD8细胞以1:1的比例在96孔圆底培养板中与1X10<sup>4</sup>个表达nf-P2X<sub>7</sub>受体的靶细胞(如上制备)和表达非功能性 P2X<sub>7</sub>受体的MDA-MB-231乳腺癌细胞(231 P2X<sub>7</sub>细胞)共温育4小时。

[0366] 根据制造商的说明书,通过在CytoTox96®非放射性细胞毒性测定法 (Promega, Madison, Wisconsin, USA) 中测定细胞毒性的百分比。简单来说:

[0367] - 4小时之前的45分钟,对于每100μl靶细胞,将10μl裂解液(10X)加入至每个孔中;

[0368] - 再过45分钟后,将平板以250xg离心4分钟;

[0369] - 从每个孔中取50μl等分试样并转移到96孔平底板上;

[0370] - 向含有转移的等分试样的平板的每个孔中加入50μl的CytoTox96®试剂,并在室温下用箔覆盖该平板30分钟;

[0371] - 30分钟后,向每个孔中加入50μl终止液,并从每个孔中读取490nm处的吸光度。

[0372] 根据制造商的说明校正每个孔的吸光度值,并使用下式计算细胞毒性百分比,相对于空载体转导的T细胞标准化,以给出细胞杀伤的倍数变化。

实验的-效应器自发的-靶标自发的 \*100

[0373] 
$$\% \text{ 细胞毒性} = \frac{\text{靶标最大值} - \text{靶标自发的}}{\text{靶标最大值}} * 100$$

[0374] 如图22A所示,表达PEP2-2-1-1和PEP2-472-2 CAR两者的CD8T细胞比用空载体转导的CD8细胞杀死多约15和11倍(分别)的表达非功能性P2X<sub>7</sub>受体的HEK细胞。此外,如图22B所示,与用空载体转导的CD8细胞相比,表达PEP2-2-1-1和PEP2-472-2 CAR的CD8T细胞(分别)杀死多约2.5和2.25 倍的231 P2X<sub>7</sub>细胞。

[0375] 可以以任何合适的顺序执行本文所述的所有方法,除非本文另有指示或与上下文明显矛盾。除非另外声明,否则本文提供的任何实例或所有示例性语言(例如“诸如”)的使用仅旨在更好地说明示例性实施方案,并不限制要求保护的本发明的范围。说明书中的任何语言都不应解释为将任何未要求保护的元素表示为必需的。

[0376] 这里提供的描述涉及可以共享共同特性和特征的几个实施方案。应当理解,一个实施方案的一个或多个特征可以与其他实施方案的一个或多个特征组合。另外,实施方案的单个特征或特征的组合可构成另外的实施方案。

[0377] 这里使用的主题标题仅仅是为了方便读者的参考,并且不应当用于限制整个公开内容或权利要求中发现的主题。主题标题不应用于解释权利要求或权利要求限制的范围。

[0378] 本领域技术人员将会理解,除了具体描述的那些以外,本文所述的发明易于进行变化和修改。应当理解,本发明包括所有这些变化和修改。本发明还包括本说明书中单独或共同地提及或指出的所有步骤,特征,组合物和化合物,以及步骤或特征中任何两种或更多

种的任一种和所有组合。

[0379] 而且,要注意的是,除非上下文已另外指出,否则如本文所使用的,单数形式“一”,“一个”和“该”包括复数形式。

[0380] 未来的专利申请可以基于本申请提交,例如通过要求本申请的优先权,通过要求分案状态和/或要求继续状态。应当理解的是,所附权利要求书并不意图限制可能在任何这样的未来申请中要求保护的范围。

- [0001] 序列表  
[0002] <110> CTM@CRC Ltd.  
[0003] <120> 嵌合抗原受体及其用途  
[0004] <130> 1068243  
[0005] <150> 2015903719  
[0006] <151> 2015-09-11  
[0007] <160> 54  
[0008] <170> PatentIn版本 3.5  
[0009] <210> 1  
[0010] <211> 3680  
[0011] <212> DNA  
[0012] <213> 人类  
[0013] <400> 1  
[0014] gtcattggag gagcttgaag ttaaagactc ctgctaaaaa ccagtagctt tcattttgca 60  
[0015] gttactggga gggggcttgc tgtggccctg tcaggaagag tagagctctg gtccagctcc 120  
[0016] ggcgcaggggag ggaggctgtc accatgccgg cctgctgcag ctgcagtgtat gttttccagtt 180  
[0017] atgagacgaa caaagtcaact cggatccaga gcatgaattt tggcaccatt aagtggttct 240  
[0018] tccacgtgtat catctttcc tacgtttgct ttgctctgggt gagtgacaag ctgttaccagc 300  
[0019] gggaaagagcc tgtcatcagt tctgtgcaca ccaaggtgaa ggggatagca gaggtgaaag 360  
[0020] aggagatcgt ggagaatgga gtgaagaagt tgggcacag tgcgttgcacc accgcagact 420  
[0021] acacccccc tttcaggggg aactcttct tcgtgtatgac aaacttctc aaaacagaag 480  
[0022] gccaagagca gcgggttgtt cccgagtatc ccacccgcag gacgctctgt tcctctgacc 540  
[0023] gaggtttaaa aaggatgg atggacccgc agagcaaaagg aattcagacc ggaagggtgt 600  
[0024] tagtgtatga agggaccatc aagacctgtg aagtctctgc ctgggtcccc atcgaggcag 660  
[0025] tggaaaggcc ccccccggcct gctctttga acagtgcgcgaa aacttcaact gtgctcatca 720  
[0026] agaacaatat cgactcccc ggcacacaact acaccacgag aaacatcctg ccaggttaa 780  
[0027] acatcaacttac taccttccac aagactcaga atccacagtgc tcccatatcc cgactaggag 840  
[0028] acatctccg agaaacacaggc gataatttt cagatgtggc aattcaggc ggaataatgg 900  
[0029] gcattgagat ctactggac tgcaaccttag accgttgggtt ccatcactgc cgtcccaaatt 960  
[0030] acagttccg tcgccttgac gacaagacca ccaacgtgtc ctttaccctt ggctacaact 1020  
[0031] tcagatacgc caagtactac aaggaaaaca atgttgagaa acggactctg ataaaagtct 1080  
[0032] tcgggatccg ttttgacatc ctggttttg gcacccggagg aaaatttgcattatccagc 1140  
[0033] tggttgtta catcggtctca accctctcct acttcgggtt ggccgctgtt ttcatcgact 1200  
[0034] tcctcatcga cacttactcc agtaactgct gtcgtccca tattttatccc tggtgcaagt 1260  
[0035] gctgtcagcc ctgtgtggtc aacgaataact actacaggaa gaagtgcgag tccattgtgg 1320  
[0036] agccaaagcc gacattaaag tatgtgtcct ttgtggatga atcccacatt aggtggatgaa 1380  
[0037] accagcagct actaggaga agtctgcaag atgtcaagg ccaagaagtc ccaagacctg 1440  
[0038] cgatggactt cacagatttgc tccaggctgc ccctggccct ccatgacaca ccccccgttcc 1500  
[0039] ctggacaacc agaggagata cagctgttta gaaaggaggc gactcctaga tccaggatgaa 1560  
[0040] gccccgtctg gtgccagtgtt ggaagctgccc tcccatctca actccctgag agccacaggat 1620  
[0041] gcctggagga gctgtgtc cggaaaaagc cggggccctg catcaccacc tcagagctgt 1680

[0042] tcaggaagct ggtcctgtcc agacacgtcc tgcagttcct cctgctctac caggagccct 1740  
[0043] tgctggcgct ggatgtggat tccaccaaca gccggctgct gcactgtgcc tacaggtgct 1800  
[0044] acgccacactg gcgcctcgcc tcccaggaca tggctgactt tgccatcctg cccagctgct 1860  
[0045] gccgctggag gatccggaaa gagttccga agagtgaagg gcagtcacgt ggcttcaaga 1920  
[0046] gtccttactg aagccaggca ccgtggctca cgtctgtaat cccagcgctt tgggaggccg 1980  
[0047] aggcaggcag atcacctgag gtcgggagtt ggagacccgc ctggcttaaca aggcgaaatc 2040  
[0048] ctgtctgtac taaaaataca aaaatcagcc agacatggc gcatgcaccc gcaatcccag 2100  
[0049] ctactcggga ggctgaggca caagaatcac ttgaacccgg gaggcagagg ttgttagtgag 2160  
[0050] cccagattgt gccactgctc tccagcctgg gaggcacagc aaactgtccc ccaaaaaaaaa 2220  
[0051] aaaagagtc ttaaccaatag caggggctgc agtagccatg ttaacatgac atttaccagc 2280  
[0052] aacttgaact tcacctgcaa agctctgtgg ccacatttc agccaaaggaa aatatgctt 2340  
[0053] tcatcttctg ttgctctctg tgtctgagag caaagtgacc tggtaaaaca aaccagaatc 2400  
[0054] cctctacatg gactcagaga aaagagattt agatgttaatg ctcaactctg tccccaggaa 2460  
[0055] gttgtgtgac cctaggcctc tcacccctgt gcctctgtct ccttggcccaactactat 2520  
[0056] ctcagagata ttgtgaggac aaattgagac agtgcacatg aactgtcttt taatgtgtaa 2580  
[0057] agatctacat gaatgcaaaaa catttcattt tgaggcaga cttagataat gtccaaactaa 2640  
[0058] aaacaaaccc ttttcatctt ggctggagaa tgtggagaac taaagggtggc cacaaattct 2700  
[0059] ttgacactca agtccccaa gacctaaggg ttttatctcc tccccttggaa tatgggtggc 2760  
[0060] tctgattgct ttatccaaaa gtggaaagtga cattgtgtca gtttcagatc ctgatcttaa 2820  
[0061] gaggctgaca gcttctactt gctgtccctt ggaactcttgc ctatcgggaa agccagacgc 2880  
[0062] catttaaaag tctgcctatc ctggccaggt gtggggctc acacctgtaa tcccagcaact 2940  
[0063] ttgggagacc aaggcggcgc gatcaactaa agtcaggagt ccaagaccag actcgccaaac 3000  
[0064] atgggtgaaac cgtatctcta ataaaaatcac aaaaatttgc tggcatggt gcccccacct 3060  
[0065] gtagtcctag ctatcaagag gctgagacag gagaaacact tgaacctggg aggtggaggt 3120  
[0066] tgcattgagc tgagatcgtt ccactgcact ccaggctggg tgacagagcgc agactccatc 3180  
[0067] tcaaaaaaaaaaaaaaaaatgt ctgcctatcc tgagactgccc ctgctgtgag 3240  
[0068] gaagcccaag cagtcacgtt gacagtgcctt gaccagcccc agctttcaag ccatccaaagc 3300  
[0069] ccagtcacca aacatgagag agaagaagcc ttcaaggat tctggactcc actaacatata 3360  
[0070] gactgatacc gcatgataca tcccaagtga gaactgcccc ataaatccag aaaaccacat 3420  
[0071] tgcttatctta agtccctaaatggggctt atttggccatc cagcaacagg taactggaaac 3480  
[0072] agaggcaag cctgtatgaat gggcacacag actcagcccc tacctccctt gttctaatg 3540  
[0073] ttctcaggga gcccggacca accctgggag cctcaggaaat ttaggtttcc actggacagt 3600  
[0074] tctagaaggg ctatagacca aatcaggtaa ctcaccagac cagccttggaa atctatcaaa 3660  
[0075] tctaactgct gagctaccca 3680  
[0076] <210> 2  
[0077] <211> 1788  
[0078] <212> DNA  
[0079] <213> 人类  
[0080] <400> 2  
[0081] atgcccggct gctgcagctg cagtgtatgtt ttccagtttgc agacgaacaa agtcactcg 60  
[0082] atccagagca tgaattatgg caccattaag tggttttcc acgtgtatcat cttttctac 120  
[0083] gtttgcttttgc ctctgggtgag tgacaagctg taccagcgga aagggcctgt catcaggat 180

[0084] gtgcacacca aggtgaaggg gatagcagag gtgaaagagg agatcggtga gaatggagtg 240  
 [0085] aagaagttgg tgcacagtgt cttgacacc gcagactaca cttccctt gcagggaaac 300  
 [0086] tcttcctcg tcatgacaaa cttctcaaa acagaaggcc aagagcagcg gttgtgtccc 360  
 [0087] gagtatccca cccgcaggac gctctgtcc tctgaccgag gtttaaaaa gggatggatg 420  
 [0088] gacccgcaga gcaaaggaat tcagaccgga aggtgtgtag tgtatgaagg gaaccagaag 480  
 [0089] acctgtgaag tctctgcctg gtgc(ccatc gaggcagtgg aagaggcccc ccggcctgct 540  
 [0090] ctcttgaaca gtgccgaaaaa cttcactgtg ctcataaga acaatatcga cttccccggc 600  
 [0091] cacaactaca ccacgagaaa catcctgcca gtttaaaca tcacttgcac cttccacaag 660  
 [0092] actcagaatc cacagtgtcc catttccga ctaggagaca tcttccgaga aacaggcgat 720  
 [0093] aatttttcag atgtggcaat tcagggcgga ataatggca ttgagatcta ctgggactgc 780  
 [0094] aaccttagacc gttggttcca tcactgcgt cccaaataca gtttccgtcg ctttgacgac 840  
 [0095] aagaccacca acgtgtcctt gtaccctggc tacaacttca gatacgccaa gtactacaag 900  
 [0096] gaaaacaatg ttgagaaacg gactctgata aaagtctcg ggatccgtt tgacatcctg 960  
 [0097] gttttggca ccggagggaaa atttgcattt atccagctgg ttgtgtacat cggctcaacc 1020  
 [0098] ctctcctact tcggctcgcc cgctgtgttc atcgacttcc tcatcgacac ttactccagt 1080  
 [0099] aactgctgtc gctccatata ttatccctgg tgcaagtgt gtcagccctg tgtggtaac 1140  
 [0100] gaataactact acaggaagaa gtgcgagtcc attgtggagc caaagccgac attaaagtat 1200  
 [0101] gtgtcctttg tggatgaatc ccacattagg atggtaacc agcagctact agggagaagt 1260  
 [0102] ctgcaagatg tcaaggccca agaagtccca agacctgcga tggacttcac agatttgtcc 1320  
 [0103] aggctgcccc tggccctcca tgacacaccc ccgattccctg gacaaccaga ggagatacag 1380  
 [0104] ctgcttagaa aggaggcgac tcctagatcc agggatagcc ccgtctggc ccagtgtgg 1440  
 [0105] agctgcctcc catctcaact ccctgagagc cacaggtgcc tggaggagct gtgctgccgg 1500  
 [0106] aaaaagccgg gggcctgcat caccaccta gagctttca ggaagctgg cctgtccaga 1560  
 [0107] cacgtcctgc agttcctcct gcttaccag gagcccttgc tggcgttgg tggattcc 1620  
 [0108] accaacagcc ggctcgccca ctgtgcctac aggtgctacg ccacccggc cttccgttcc 1680  
 [0109] caggacatgg ctgactttgc catcctgccc agctgctgcc gctggaggat ccggaaagag 1740  
 [0110] tttccgaaga gtgaaggcga gtacagtggc ttcaagagtc cttaactga 1788  
 [0111] <210> 3  
 [0112] <211> 595  
 [0113] <212> PRT  
 [0114] <213> 人类  
 [0115] <400> 3  
 [0116] Met Pro Ala Cys Cys Ser Cys Ser Asp Val Phe Gln Tyr Glu Thr Asn  
 [0117] 1 5 10 15  
 [0118] Lys Val Thr Arg Ile Gln Ser Met Asn Tyr Gly Thr Ile Lys Trp Phe  
 [0119] 20 25 30  
 [0120] Phe His Val Ile Ile Phe Ser Tyr Val Cys Phe Ala Leu Val Ser Asp  
 [0121] 35 40 45  
 [0122] Lys Leu Tyr Gln Arg Lys Glu Pro Val Ile Ser Ser Val His Thr Lys  
 [0123] 50 55 60  
 [0124] Val Lys Gly Ile Ala Glu Val Lys Glu Glu Ile Val Glu Asn Gly Val  
 [0125] 65 70 75 80

[0126]	Lys Lys Leu Val His Ser Val Phe Asp Thr Ala Asp Tyr Thr Phe Pro		
[0127]	85	90	95
[0128]	Leu Gln Gly Asn Ser Phe Phe Val Met Thr Asn Phe Leu Lys Thr Glu		
[0129]	100	105	110
[0130]	Gly Gln Glu Gln Arg Leu Cys Pro Glu Tyr Pro Thr Arg Arg Thr Leu		
[0131]	115	120	125
[0132]	Cys Ser Ser Asp Arg Gly Cys Lys Lys Gly Trp Met Asp Pro Gln Ser		
[0133]	130	135	140
[0134]	Lys Gly Ile Gln Thr Gly Arg Cys Val Val Tyr Glu Gly Asn Gln Lys		
[0135]	145	150	155
[0136]	Thr Cys Glu Val Ser Ala Trp Cys Pro Ile Glu Ala Val Glu Glu Ala		
[0137]	165	170	175
[0138]	Pro Arg Pro Ala Leu Leu Asn Ser Ala Glu Asn Phe Thr Val Leu Ile		
[0139]	180	185	190
[0140]	Lys Asn Asn Ile Asp Phe Pro Gly His Asn Tyr Thr Arg Asn Ile		
[0141]	195	200	205
[0142]	Leu Pro Gly Leu Asn Ile Thr Cys Thr Phe His Lys Thr Gln Asn Pro		
[0143]	210	215	220
[0144]	Gln Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Asp Ile Phe Arg Glu Thr Gly Asp		
[0145]	225	230	235
[0146]	Asn Phe Ser Asp Val Ala Ile Gln Gly Gly Ile Met Gly Ile Glu Ile		
[0147]	245	250	255
[0148]	Tyr Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Trp Phe His His Cys Arg Pro Lys		
[0149]	260	265	270
[0150]	Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Asp Lys Thr Thr Asn Val Ser Leu Tyr		
[0151]	275	280	285
[0152]	Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Tyr Ala Lys Tyr Tyr Lys Glu Asn Asn Val		
[0153]	290	295	300
[0154]	Glu Lys Arg Thr Leu Ile Lys Val Phe Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu		
[0155]	305	310	315
[0156]	Val Phe Gly Thr Gly Gly Lys Phe Asp Ile Ile Gln Leu Val Val Tyr		
[0157]	325	330	335
[0158]	Ile Gly Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Ala Ala Val Phe Ile Asp		
[0159]	340	345	350
[0160]	Phe Leu Ile Asp Thr Tyr Ser Ser Asn Cys Cys Arg Ser His Ile Tyr		
[0161]	355	360	365
[0162]	Pro Trp Cys Lys Cys Cys Gln Pro Cys Val Val Asn Glu Tyr Tyr Tyr		
[0163]	370	375	380
[0164]	Arg Lys Lys Cys Glu Ser Ile Val Glu Pro Lys Pro Thr Leu Lys Tyr		
[0165]	385	390	395
[0166]	Val Ser Phe Val Asp Glu Ser His Ile Arg Met Val Asn Gln Gln Leu		
[0167]	405	410	415

[0168]	Leu Gly Arg Ser Leu Gln Asp Val Lys Gly Gln Glu Val Pro Arg Pro		
[0169]	420	425	430
[0170]	Ala Met Asp Phe Thr Asp Leu Ser Arg Leu Pro Leu Ala Leu His Asp		
[0171]	435	440	445
[0172]	Thr Pro Pro Ile Pro Gly Gln Pro Glu Glu Ile Gln Leu Leu Arg Lys		
[0173]	450	455	460
[0174]	Glu Ala Thr Pro Arg Ser Arg Asp Ser Pro Val Trp Cys Gln Cys Gly		
[0175]	465	470	475
[0176]	Ser Cys Leu Pro Ser Gln Leu Pro Glu Ser His Arg Cys Leu Glu Glu		
[0177]	485	490	495
[0178]	Leu Cys Cys Arg Lys Lys Pro Gly Ala Cys Ile Thr Thr Ser Glu Leu		
[0179]	500	505	510
[0180]	Phe Arg Lys Leu Val Leu Ser Arg His Val Leu Gln Phe Leu Leu Leu		
[0181]	515	520	525
[0182]	Tyr Gln Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asp Val Asp Ser Thr Asn Ser Arg		
[0183]	530	535	540
[0184]	Leu Arg His Cys Ala Tyr Arg Cys Tyr Ala Thr Trp Arg Phe Gly Ser		
[0185]	545	550	555
[0186]	Gln Asp Met Ala Asp Phe Ala Ile Leu Pro Ser Cys Cys Arg Trp Arg		
[0187]	565	570	575
[0188]	Ile Arg Lys Glu Phe Pro Lys Ser Glu Gly Gln Tyr Ser Gly Phe Lys		
[0189]	580	585	590
[0190]	Ser Pro Tyr		
[0191]	595		
[0192]	<210> 4		
[0193]	<211> 164		
[0194]	<212> PRT		
[0195]	<213> 人类		
[0196]	<400> 4		
[0197]	Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu		
[0198]	1	5	10
			15
[0199]	Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys		
[0200]	20	25	30
[0201]	Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala		
[0202]	35	40	45
[0203]	Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		
[0204]	50	55	60
[0205]	Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
[0206]	65	70	75
[0207]	Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		
[0208]	85	90	95
[0209]	Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn		

[0210]	100	105	110
[0211]	Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met		
[0212]	115	120	125
[0213]	Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly		
[0214]	130	135	140
[0215]	Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala		
[0216]	145	150	155
[0217]	Leu Pro Pro Arg		
[0218]	<210> 5		
[0219]	<211> 207		
[0220]	<212> PRT		
[0221]	<213> 人类		
[0222]	<400> 5		
[0223]	Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser		
[0224]	1 5 10 15		
[0225]	Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr		
[0226]	20 25 30		
[0227]	Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr		
[0228]	35 40 45		
[0229]	Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys		
[0230]	50 55 60		
[0231]	Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp		
[0232]	65 70 75 80		
[0233]	His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr		
[0234]	85 90 95		
[0235]	Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu		
[0236]	100 105 110		
[0237]	Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met		
[0238]	115 120 125		
[0239]	Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu		
[0240]	130 135 140		
[0241]	Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys		
[0242]	145 150 155 160		
[0243]	Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn		
[0244]	165 170 175		
[0245]	Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg		
[0246]	180 185 190		
[0247]	Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile		
[0248]	195 200 205		
[0249]	<210> 6		
[0250]	<211> 180		
[0251]	<212> PRT		

- [0252] <213> 人类
- [0253] <400> 6
- [0254] Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
- [0255] 1 5 10 15
- [0256] Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
- [0257] 20 25 30
- [0258] Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
- [0259] 35 40 45
- [0260] Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe
- [0261] 50 55 60
- [0262] Leu Thr Glu Asp Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
- [0263] 65 70 75 80
- [0264] Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
- [0265] 85 90 95
- [0266] Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
- [0267] 100 105 110
- [0268] Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
- [0269] 115 120 125
- [0270] Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
- [0271] 130 135 140
- [0272] Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
- [0273] 145 150 155 160
- [0274] Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
- [0275] 165 170 175
- [0276] Asn Gln Leu Arg
- [0277] 180
- [0278] <210> 7
- [0279] <211> 171
- [0280] <212> PRT
- [0281] <213> 人类
- [0282] <400> 7
- [0283] Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
- [0284] 1 5 10 15
- [0285] Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
- [0286] 20 25 30
- [0287] Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
- [0288] 35 40 45
- [0289] Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
- [0290] 50 55 60
- [0291] Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
- [0292] 65 70 75 80
- [0293] Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys

[0294]	85	90	95
[0295]	Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val		
[0296]	100	105	110
[0297]	Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His		
[0298]	115	120	125
[0299]	Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg		
[0300]	130	135	140
[0301]	Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr		
[0302]	145	150	155
[0303]	Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys		
[0304]	165	170	
[0305]	<210> 8		
[0306]	<211> 244		
[0307]	<212> PRT		
[0308]	<213> 人类		
[0309]	<400> 8		
[0310]	Met Asp Thr Glu Ser Asn Arg Arg Ala Asn Leu Ala Leu Pro Gln Glu		
[0311]	1 5 10 15		
[0312]	Pro Ser Ser Val Pro Ala Phe Glu Val Leu Glu Ile Ser Pro Gln Glu		
[0313]	20 25 30		
[0314]	Val Ser Ser Gly Arg Leu Leu Lys Ser Ala Ser Ser Pro Pro Leu His		
[0315]	35 40 45		
[0316]	Thr Trp Leu Thr Val Leu Lys Lys Glu Gln Glu Phe Leu Gly Val Thr		
[0317]	50 55 60		
[0318]	Gln Ile Leu Thr Ala Met Ile Cys Leu Cys Phe Gly Thr Val Val Cys		
[0319]	65 70 75 80		
[0320]	Ser Val Leu Asp Ile Ser His Ile Glu Gly Asp Ile Phe Ser Ser Phe		
[0321]	85 90 95		
[0322]	Lys Ala Gly Tyr Pro Phe Trp Gly Ala Ile Phe Phe Ser Ile Ser Gly		
[0323]	100 105 110		
[0324]	Met Leu Ser Ile Ile Ser Glu Arg Arg Asn Ala Thr Tyr Leu Val Arg		
[0325]	115 120 125		
[0326]	Gly Ser Leu Gly Ala Asn Thr Ala Ser Ser Ile Ala Gly Gly Thr Gly		
[0327]	130 135 140		
[0328]	Ile Thr Ile Leu Ile Ile Asn Leu Lys Lys Ser Leu Ala Tyr Ile His		
[0329]	145 150 155 160		
[0330]	Ile His Ser Cys Gln Lys Phe Phe Glu Thr Lys Cys Phe Met Ala Ser		
[0331]	165 170 175		
[0332]	Phe Ser Thr Glu Ile Val Val Met Met Leu Phe Leu Thr Ile Leu Gly		
[0333]	180 185 190		
[0334]	Leu Gly Ser Ala Val Ser Leu Thr Ile Cys Gly Ala Gly Glu Glu Leu		
[0335]	195 200 205		

[0336]	Lys Gly Asn Lys Val Pro Glu Asp Arg Val Tyr Glu Glu Leu Asn Ile			
[0337]	210	215	220	
[0338]	Tyr Ser Ala Thr Tyr Ser Glu Leu Glu Asp Pro Gly Glu Met Ser Pro			
[0339]	225	230	235	240
[0340]	Pro Ile Asp Leu			
[0341]	<210> 9			
[0342]	<211> 374			
[0343]	<212> PRT			
[0344]	<213> 人类			
[0345]	<400> 9			
[0346]	Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln			
[0347]	1	5	10	15
[0348]	Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser			
[0349]	20	25	30	
[0350]	Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu			
[0351]	35	40	45	
[0352]	Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln			
[0353]	50	55	60	
[0354]	Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser			
[0355]	65	70	75	80
[0356]	Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile			
[0357]	85	90	95	
[0358]	Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg			
[0359]	100	105	110	
[0360]	Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys			
[0361]	115	120	125	
[0362]	Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe			
[0363]	130	135	140	
[0364]	Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile			
[0365]	145	150	155	160
[0366]	Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr			
[0367]	165	170	175	
[0368]	Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro			
[0369]	180	185	190	
[0370]	Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val			
[0371]	195	200	205	
[0372]	Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln			
[0373]	210	215	220	
[0374]	Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn			
[0375]	225	230	235	240
[0376]	Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly			
[0377]	245	250	255	

[0378]	Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg		
[0379]	260	265	270
[0380]	Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr Pro		
[0381]	275	280	285
[0382]	Val Trp Phe His Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu		
[0383]	290	295	300
[0384]	Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys		
[0385]	305	310	315
[0386]	Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys		
[0387]	325	330	335
[0388]	Val Ile Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys		
[0389]	340	345	350
[0390]	Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys		
[0391]	355	360	365
[0392]	Glu Pro Gln Gly Ala Thr		
[0393]	370		
[0394]	<210> 10		
[0395]	<211> 119		
[0396]	<212> PRT		
[0397]	<213> 人工序列		
[0398]	<220>		
[0399]	<223> PEP2-2-3		
[0400]	<400> 10		
[0401]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0402]	1 5 10 15		
[0403]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His		
[0404]	20 25 30		
[0405]	Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0406]	35 40 45		
[0407]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0408]	50 55 60		
[0409]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0410]	65 70 75 80		
[0411]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0412]	85 90 95		
[0413]	Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Ser Pro Gly		
[0414]	100 105 110		
[0415]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0416]	115		
[0417]	<210> 11		
[0418]	<211> 357		
[0419]	<212> DNA		

- [0420] <213> 人工序列
- [0421] <220>
- [0422] <223> PEP2-2-3 编码序列
- [0423] <400> 11
- [0424] gaagttcaac tgctggagag tggagggggc ctcgtcagc cggcggcag cttgcgcctg 60
- [0425] tcatgtcag caagcggtt cacccttagg aaccacgata tgggtgggt gaggcaggct 120
- [0426] ccgggaaagg gtctggaatg ggtgagtgcc atatcaggga gcggaggctc cacctactac 180
- [0427] gcagactccg tgaagggtcg gtttacgatt tccagagaca attccaagaa taccctgtac 240
- [0428] ctgcagatga actccctccg cgccgaagat acagcagtct actactgtgc agaaccaaaa 300
- [0429] ccaatggata cagaattcga ctattggagt cctggaactc ttgtcactgt atccagt 357
- [0430] <210> 12
- [0431] <211> 21
- [0432] <212> PRT
- [0433] <213> 人类
- [0434] <400> 12
- [0435] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
- [0436] 1 5 10 15
- [0437] His Ala Ala Arg Pro
- [0438] 20
- [0439] <210> 13
- [0440] <211> 72
- [0441] <212> DNA
- [0442] <213> 人类
- [0443] <400> 13
- [0444] gagcgcgtca tggctcttcc tgtgaccgca ttgctgctgc cgctggcctt gctgctgcat 60
- [0445] gcagctcggc ca 72
- [0446] <210> 14
- [0447] <211> 228
- [0448] <212> PRT
- [0449] <213> 人工序列
- [0450] <220>
- [0451] <223> 长铰链
- [0452] <400> 14
- [0453] Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Pro Val
- [0454] 1 5 10 15
- [0455] Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
- [0456] 20 25 30
- [0457] Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
- [0458] 35 40 45
- [0459] Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
- [0460] 50 55 60
- [0461] Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

[0462]	65	70	75	80
[0463]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
[0464]		85	90	95
[0465]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser			
[0466]		100	105	110
[0467]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
[0468]		115	120	125
[0469]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
[0470]		130	135	140
[0471]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
[0472]		145	150	155
[0473]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
[0474]		165	170	175
[0475]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr			
[0476]		180	185	190
[0477]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
[0478]		195	200	205
[0479]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
[0480]		210	215	220
[0481]	Ser Leu Gly Lys			
[0482]	225			
[0483]	<210> 15			
[0484]	<211> 684			
[0485]	<212> DNA			
[0486]	<213> 人工序列			
[0487]	<220>			
[0488]	<223> 长铰链			
[0489]	<400> 15			
[0490]	gagagtaaat atggacctcc gtgtccgagt tgtcccgcc ctcctgtggc cggccctct 60			
[0491]	gtatttctgt ttccaccta a gccgaaagat acattgtatga tttagccgaac accagagggt 120			
[0492]	acttgtgtgg ttgttgacgt gagtcaagag gaccctgagg tgcagttaa ttggtatgtc 180			
[0493]	gacggagttg aggtgcataa cgccaagacg aagccgcgag aggagcagtt taattccacc 240			
[0494]	tacagggtcg tatccgttct cactgtcctt caccaggact ggctgaatgg gaaggagttac 300			
[0495]	aaatgcaaag tgagcaataa aggctgccg agctccatcg aaaaaaccat ttccaaggca 360			
[0496]	aaaggccaaac cccgagagacc acaggtctat accctgccac caagccagga ggaaatgacc 420			
[0497]	aagaatcagg tgagcctcac ctgtctggc aaggccttct acccgccga catgcgggt 480			
[0498]	gagtgggaga gtaacggaca gcctgaaaac aattacaaga caacccgcc tgtttggac 540			
[0499]	tctgacggct cctttttct gtactctcg cttaccgtgg ataagagtag atggcaagaa 600			
[0500]	ggcaacgtct tcagctgttc cgtgatgcat gaggcgctgc ataaccatta tacacaaaaaa 660			
[0501]	agtctgtcct tgagcctggg caaa 684			
[0502]	<210> 16			
[0503]	<211> 30			

- [0504] <212> PRT
- [0505] <213> 人工序列
- [0506] <220>
- [0507] <223> 短铰链
- [0508] <400> 16
- [0509] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
- [0510] 1 5 10 15
- [0511] Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Asp Pro Lys
- [0512] 20 25 30
- [0513] <210> 17
- [0514] <211> 90
- [0515] <212> DNA
- [0516] <213> 人工序列
- [0517] <220>
- [0518] <223> 短铰链
- [0519] <400> 17
- [0520] ggcggcggcg gctctggcgg tggggtagc ggaggcggcg gaagcgaatc caaatatggc 60
- [0521] ctccttgc caccgtgcc cgtatccaaag 90
- [0522] <210> 18
- [0523] <211> 68
- [0524] <212> PRT
- [0525] <213> 人类
- [0526] <400> 18
- [0527] Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
- [0528] 1 5 10 15
- [0529] Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
- [0530] 20 25 30
- [0531] Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
- [0532] 35 40 45
- [0533] Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
- [0534] 50 55 60
- [0535] Ala Tyr Arg Ser
- [0536] 65
- [0537] <210> 19
- [0538] <211> 204
- [0539] <212> DNA
- [0540] <213> 人工序列
- [0541] <220>
- [0542] <223> CD28 编码序列
- [0543] <400> 19
- [0544] tttgggtgc tgggggtgg tgggggtgtc ctcgttgc acagttgtt ggtgacagtt 60
- [0545] gccttattt tttttgggt ggcgcgttgcg cggagtcgc tccttcattt cgactatatg 120

[0546] aacatgacac ctcggccccc aggcccaacg aggaaacatt atcagccata tgcaccacct 180  
 [0547] agagactttg ccgcttaccg gtcc 204  
 [0548] <210> 20  
 [0549] <211> 36  
 [0550] <212> PRT  
 [0551] <213> 人类  
 [0552] <400> 20  
 [0553] Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly  
 [0554] 1 5 10 15  
 [0555] Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr  
 [0556] 20 25 30  
 [0557] Leu Ala Lys Ile  
 [0558] 35  
 [0559] <210> 21  
 [0560] <211> 108  
 [0561] <212> DNA  
 [0562] <213> 人工序列  
 [0563] <220>  
 [0564] <223> 0X40 编码序列  
 [0565] <400> 21  
 [0566] cgagatcaa ggcttccccc cgatgcacac aaaccacccg gcggtggctc atttcgaaca 60  
 [0567] ccaattcagg aagagcaggc agacgcccac agcaccctgg ccaagatc 108  
 [0568] <210> 22  
 [0569] <211> 112  
 [0570] <212> PRT  
 [0571] <213> 人类  
 [0572] <400> 22  
 [0573] Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 [0574] 1 5 10 15  
 [0575] Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
 [0576] 20 25 30  
 [0577] Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
 [0578] 35 40 45  
 [0579] Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
 [0580] 50 55 60  
 [0581] Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 [0582] 65 70 75 80  
 [0583] Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
 [0584] 85 90 95  
 [0585] Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 [0586] 100 105 110  
 [0587] <210> 23

- [0588] <211> 336
- [0589] <212> DNA
- [0590] <213> 人工序列
- [0591] <220>
- [0592] <223> CD3zeta的编码序列
- [0593] <400> 23
- [0594] cggttaaagt tcagccgaag tgcagatgct cggcataacc agcagggcca gaatcaattt 60
- [0595] tacaatgagc ttaacctcggt cccagagag gatgtatgt tactggataa gcggcgccg 120
- [0596] cggatcctg agatggagg aaagcctcggt agaaaaatc cccaggaagg actttacaat 180
- [0597] gagttgcaga aggataagat ggccgaagca tattctgaaa tcggatgaa aggtgagcgg 240
- [0598] cggagaggaa aaggccacga cggctctac cagggctga gcacagctac taaagataaca 300
- [0599] tacgacgcac ttcatatgca agccctgcct ccccg 336
- [0600] <210> 24
- [0601] <211> 22
- [0602] <212> PRT
- [0603] <213> 人工序列
- [0604] <220>
- [0605] <223> P2A
- [0606] <400> 24
- [0607] Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
- |          |   |    |    |
|----------|---|----|----|
| [0608] 1 | 5 | 10 | 15 |
|----------|---|----|----|
- [0609] Glu Glu Asn Pro Gly Pro
- |           |
|-----------|
| [0610] 20 |
|-----------|
- [0611] <210> 25
- [0612] <211> 66
- [0613] <212> DNA
- [0614] <213> 人工序列
- [0615] <220>
- [0616] <223> 编码序列 for P2A
- [0617] <400> 25
- [0618] ggaagcgggtg ccacgaacctt ttctctcctc aaacaggctg gggacgtcga ggaaaaatcca 60
- [0619] ggtccc 66
- [0620] <210> 26
- [0621] <211> 611
- [0622] <212> PRT
- [0623] <213> 人工序列
- [0624] <220>
- [0625] <223> CAR-长铰链
- [0626] <400> 26
- [0627] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
- |          |   |    |    |
|----------|---|----|----|
| [0628] 1 | 5 | 10 | 15 |
|----------|---|----|----|
- [0629] His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu

[0630]	20	25	30
[0631]	Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe		
[0632]	35	40	45
[0633]	Thr Phe Arg Asn His Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
[0634]	50	55	60
[0635]	Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr		
[0636]	65	70	75
[0637]	Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser		
[0638]	85	90	95
[0639]	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr		
[0640]	100	105	110
[0641]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp		
[0642]	115	120	125
[0643]	Tyr Trp Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Glu		
[0644]	130	135	140
[0645]	Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala		
[0646]	145	150	155
[0647]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
[0648]	165	170	175
[0649]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln		
[0650]	180	185	190
[0651]	Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
[0652]	195	200	205
[0653]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr		
[0654]	210	215	220
[0655]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
[0656]	225	230	235
[0657]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile		
[0658]	245	250	255
[0659]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[0660]	260	265	270
[0661]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
[0662]	275	280	285
[0663]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0664]	290	295	300
[0665]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0666]	305	310	315
[0667]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val		
[0668]	325	330	335
[0669]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[0670]	340	345	350
[0671]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		

[0672]	355	360	365
[0673]	Leu Gly Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys		
[0674]	370	375	380
[0675]	Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser		
[0676]	385	390	395
[0677]	Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg		
[0678]	405	410	415
[0679]	Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg		
[0680]	420	425	430
[0681]	Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala		
[0682]	435	440	445
[0683]	His Lys Pro Pro Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu		
[0684]	450	455	460
[0685]	Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser		
[0686]	465	470	475
[0687]	Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
[0688]	485	490	495
[0689]	Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
[0690]	500	505	510
[0691]	Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
[0692]	515	520	525
[0693]	Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
[0694]	530	535	540
[0695]	Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly		
[0696]	545	550	555
[0697]	His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		
[0698]	565	570	575
[0699]	Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr		
[0700]	580	585	590
[0701]	Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly		
[0702]	595	600	605
[0703]	Pro Gly Glu		
[0704]	610		
[0705]	<210> 27		
[0706]	<211> 408		
[0707]	<212> PRT		
[0708]	<213> 人工序列		
[0709]	<220>		
[0710]	<223> CAR-短铰链		
[0711]	<400> 27		
[0712]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
[0713]	1	5	10
			15

[0714]	His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu		
[0715]	20	25	30
[0716]	Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe		
[0717]	35	40	45
[0718]	Thr Phe Arg Asn His Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
[0719]	50	55	60
[0720]	Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr		
[0721]	65	70	75
[0722]	Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser		
[0723]	85	90	95
[0724]	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr		
[0725]	100	105	110
[0726]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp		
[0727]	115	120	125
[0728]	Tyr Trp Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly		
[0729]	130	135	140
[0730]	Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly		
[0731]	145	150	155
[0732]	160		
[0733]	Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val		
[0734]	165	170	175
[0735]	Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe		
[0736]	180	185	190
[0737]	Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp		
[0738]	195	200	205
[0739]	Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr		
[0740]	210	215	220
[0741]	225	230	235
[0742]	240		
[0743]	Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp		
[0744]	245	250	255
[0745]	Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala		
[0746]	260	265	270
[0747]	Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln		
[0748]	275	280	285
[0749]	Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu		
[0750]	290	295	300
[0751]	Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly		
[0752]	305	310	315
[0753]	Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu		
[0754]	325	330	335
[0755]	Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly		
	340	345	350

[0756]	Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser		
[0757]	355	360	365
[0758]	Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro		
[0759]	370	375	380
[0760]	Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly		
[0761]	385	390	395 400
[0762]	Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro		
[0763]	405		
[0764]	<210> 28		
[0765]	<211> 1875		
[0766]	<212> DNA		
[0767]	<213> 人工序列		
[0768]	<220>		
[0769]	<223> 编码CAR-长铰链		
[0770]	<400> 28		
[0771]	gaccggcgcc tactctagag gagcgcgtca tggctttcc tgtgaccgca ttgctgctgc 60		
[0772]	cgtggcctt gctgctgcat gcagctcgcc cagaagttca actgctggag agtggagggg 120		
[0773]	gcctcgtgca gccggcgcc agcttgcgcc tgtcatgtgc agcaagcggg ttcacctta 180		
[0774]	ggaaccacga tatgggttgg gtgaggcagg ctccggaaa gggcttgaa tgggtgagtg 240		
[0775]	ccatatcagg gagcggaggc tccacctact acgcagactc cgttaagggt cggttacga 300		
[0776]	tttccagaga caattccaag aataccctgt acctgcagat gaactccctc cgccggaaag 360		
[0777]	atacagcagt ctactactgt gcagaaccaa aaccaatggc tacagaattc gactatttgg 420		
[0778]	gtccttggaaac tcttgtcact gtatccagtg gaggaggcga gagtaaatat ggacctccgt 480		
[0779]	gtccgagttg tcccgccct cctgtggccg gcccctctgt atttctgtt ccacctaagc 540		
[0780]	cgaaagatac attgatgatt agccgaacac cagaggttac ttgtgtggtt gttgacgtga 600		
[0781]	gtcaagagga ccctgaggtg cagtttaatt ggtatgtcga cggagtttag gtgcataacg 660		
[0782]	ccaagacgaa gccgcgagag gagcagtttta attccaccata cagggtcgta tccgttctca 720		
[0783]	ctgtccttca ccaggacttgg ctgaatggcaggagttacaa atgcaaagtg agcaataaag 780		
[0784]	gcctgcccggcag ctccatcgaa aaaaccattt ccaaggcaaa aggccaaaccc cgagagccac 840		
[0785]	aggctatac cctgccacca agccaggagg aaatgaccaaa gaatcagggtg agcctcacct 900		
[0786]	gtctggtcaa gggcttctac ccgtccgaca tcgcgggtgg gtggagagt aacggacagc 960		
[0787]	ctgaaaacaa ttacaagaca accccgcctt ttttggactc tgacggctcc tttttctgt 1020		
[0788]	actctcggttaccgttggat aagagtagat ggcaagaagg caacgtcttc agctgttccg 1080		
[0789]	tgtatgcata ggcgcgtcat aaccattata cacaaaaaaaat tctgtccttgc agcctggca 1140		
[0790]	aattttgggt gctgggtggt gtgggggggtg tcctcgcttgc ctacagtttgc ttgggtacag 1200		
[0791]	ttgcctttat tattttttgg gtgcgcagta agcggagtcg ctccttcat tccgactata 1260		
[0792]	tgaacatgac acctcgccgc ccaggcccaa cgaggaaaca ttatcagcca tatgcaccac 1320		
[0793]	ctagagactt tgccgcttac cggtcccggag atcaaaggct tccccccgat gcacacaaac 1380		
[0794]	cacccggcgg tggctcattt cgaacaccaa ttcaggaaga gcaggcagac gcccacagca 1440		
[0795]	ccctggccaa gatccgggtt aagttcagcc gaagtgcaga tgcggccggca taccagcagg 1500		
[0796]	gccagaatca attgtacaat gagcttaacc tcggccgcag agaggagttt gatgtactgg 1560		
[0797]	ataagcggcg cggacggatgg cctgagatgg gaggaaagcc tcggagaaaa aatccccagg 1620		

[0798] aaggactta caatgagttc cagaaggata agatggccga agcatattct gaaatcgaaa 1680  
 [0799] tgaaaaggta gcggcggaga ggaaaaggcc acgacggct ctaccagggg ctgagcacag 1740  
 [0800] ctactaaaga tacatacgcac gcacttcata tgcaagccct gcctccccc ggaagcgggt 1800  
 [0801] ccacgaactt ttctctcctc aaacaggctg gggacgtcga ggaaaatcca ggtcccgccg 1860  
 [0802] aattcgccac catgc 1875  
 [0803] <210> 29  
 [0804] <211> 1272  
 [0805] <212> DNA  
 [0806] <213> 人工序列  
 [0807] <220>  
 [0808] <223> 编码CAR-短铰链  
 [0809] <400> 29  
 [0810] gaccggcgcc tactctagag gagcgcgtca tggccctgcc tgtgacagcc ctgctgctgc 60  
 [0811] cactcgctct tctccttcac gccgcaagac ccgaagtgc gcttctggag tctggaggtg 120  
 [0812] gtttggtgca gcctggcggt tctctagat tgtcatgcgc cgcatccggc ttcacccccc 180  
 [0813] ggaaccatga tatgggttgg gtccgcccagg ccccaggcaa gggtctttag tgggtctccg 240  
 [0814] ccatcagcgg cagtggcggt tccacatact acgcagactc cgtcaaaggc agatttacaa 300  
 [0815] tttcacggga taatagtaag aacactctgt acctccagat gaatagtctc cgggcccggagg 360  
 [0816] acacagctgt gtactattgc gcggagccaa agccaatggc tactgagttt gattattggc 420  
 [0817] gcccggaaac cctggtagaca gtatccagcg gcggcggcggt ctctggcggt ggggttagcg 480  
 [0818] gaggcggcggt aagcgaatcc aaatatggcc ctccttgccc accgtgcccc gatccaaagt 540  
 [0819] tctgggtgct ggtggtagtg ggtggcgtcc tggcctgtta ttctctgctt gtgacagtcg 600  
 [0820] cgtttatcat cttttgggtc cggctaaac gctctagggtt gttgcactcc gattacatga 660  
 [0821] acatgacccc acgcggccct ggcctacgc ggaagcacta ccaacccctac gctccccc 720  
 [0822] gggatttcgc cgcttacagg agccgagatc agagactgcc acccgatgcaca 780  
 [0823] ccgggtgggtt gtccttcagg accccaaatcc aggaggagca agctgacgcg cattccaccc 840  
 [0824] ttgccaagat aagggtcaaa tttagtaggt cagctgacgc gcccgttat caacaggac 900  
 [0825] agaaccagtt gtataatgaa ctcaatctcg gacgacgcga ggagtacgc gtactggata 960  
 [0826] agaggcgcgg cagggatct gaaatggcg gcaagcccg gcgaaaaaac ccccaggagg 1020  
 [0827] gactctacaa tgagctgcag aaggacaaaaa tggcagaagc ttactccgaa attggaatga 1080  
 [0828] agggcgaaag aaggagaggg aaagggcacg atggcctgta tcagggcctg agtaccgcca 1140  
 [0829] ccaaggacac gtatgatgcc ctgcataatgc aggcaactgcc ccctagagga agcggggcta 1200  
 [0830] cgaatttcag ctcctgaaa caggctggcg acgtggagga aaatccgggg ccaggcgaat 1260  
 [0831] tcgccaccat gc 1272  
 [0832] <210> 30  
 [0833] <211> 21  
 [0834] <212> PRT  
 [0835] <213> 人类  
 [0836] <400> 30  
 [0837] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 [0838] 1 5 10 15  
 [0839] His Ala Ala Arg Pro

[0840]	20																	
[0841]	<210>	31																
[0842]	<211>	63																
[0843]	<212>	DNA																
[0844]	<213>	人类																
[0845]	<400>	31																
[0846]	atggctttc	ctgtgaccgc	attgctgctg	ccgctggcct	tgctgctgca	tgcagctcgg	60											
[0847]	cca	63																
[0848]	<210>	32																
[0849]	<211>	119																
[0850]	<212>	PRT																
[0851]	<213>	人工序列																
[0852]	<220>																	
[0853]	<223>	PEP2-2-1-1 结合肽																
[0854]	<400>	32																
[0855]	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
[0856]	1		5			10						15						
[0857]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Asn	His		
[0858]			20			25						30						
[0859]	Asp	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
[0860]			35			40						45						
[0861]	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val			
[0862]			50			55						60						
[0863]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr		
[0864]			65			70						75				80		
[0865]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
[0866]				85			90						95					
[0867]	Ala	Glu	Pro	Lys	Pro	Met	Asp	Thr	Glu	Phe	Asp	Tyr	Arg	Ser	Pro	Gly		
[0868]				100			105						110					
[0869]	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
[0870]			115															
[0871]	<210>	33																
[0872]	<211>	119																
[0873]	<212>	PRT																
[0874]	<213>	人工序列																
[0875]	<220>																	
[0876]	<223>	PEP2-472-2 结合肽																
[0877]	<400>	33																
[0878]	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
[0879]	1		5			10						15						
[0880]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Pro	Met	Lys		
[0881]			20			25						30						

[0882]	Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0883]	35	40	45	
[0884]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
[0885]	50	55	60	
[0886]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[0887]	65	70	75	80
[0888]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0889]	85	90	95	
[0890]	Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Arg Ser Pro Gly			
[0891]	100	105	110	
[0892]	Thr Leu Val Thr Val Leu Glu			
[0893]	115			
[0894]	<210> 34			
[0895]	<211> 119			
[0896]	<212> PRT			
[0897]	<213> 人工序列			
[0898]	<220>			
[0899]	<223> PEP2-2-12 结合肽			
[0900]	<400> 34			
[0901]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0902]	1 5 10 15			
[0903]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn His			
[0904]	20 25 30			
[0905]	Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0906]	35 40 45			
[0907]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val			
[0908]	50 55 60			
[0909]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[0910]	65 70 75 80			
[0911]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0912]	85 90 95			
[0913]	Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Pro Gly			
[0914]	100 105 110			
[0915]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0916]	115			
[0917]	<210> 35			
[0918]	<211> 1864			
[0919]	<212> DNA			
[0920]	<213> 人工序列			
[0921]	<220>			
[0922]	<223> PEP2-2-1-1 嵌合抗原受体			
[0923]	<400> 35			

[0924] cctccataga agattctaga gctagcgaat tctgcagtcg acggtaccgc gggcccgaaa 60  
 [0925] tccaccgggt cccgcgcatt ggcttccct gtgaccgcatt tgctgctgcc gctggcctt 120  
 [0926] ctgctgcatt cagctcgcc agaagttcaa ctgctggaga gtggaggggg cctcgtgcag 180  
 [0927] cccggcggca gcttgcgcct gtcatgtgca gcaagcgggt tcacccttag gaaccacgat 240  
 [0928] atgggggtggg tgaggcaggc tccggaaag ggtctggaat gggtgagtgc catatcagg 300  
 [0929] acggggggct ccacctacta cgcagactcc gtgaagggtc ggtttacgat ttccagagac 360  
 [0930] aattccaaga ataccctgta cctgcagatg aactccctcc ggcgcgaaga tacagcagtc 420  
 [0931] tactactgtg cagaacccaaa accaatggat acagaattcg actataggag tcctggaact 480  
 [0932] ctgtcaactg tatccagtgg aggaggcgag agtaaatatg gacccctgtc tccgagttgt 540  
 [0933] cccgcgcctc ctgtggccgg cccctctgta tttctgttc cacctaagcc gaaagataca 600  
 [0934] ttgatgatta gccgaacacc agaggtact tgtgtggttt ttgacgtgag tcaagaggac 660  
 [0935] cctgaggtgc agtttaattt gtatgtcgcg ggagttgagg tgcataacgc caagacgaag 720  
 [0936] cccgcgaggagg agcagttaa ttccacactt acgggtcgat ccgttctcac tgccttcac 780  
 [0937] caggactggc tgaatggaa ggagtacaaa tgcaaagtga gcaataaagg cctgccgagc 840  
 [0938] tccatcgaaa aaaccatttc caaggcaaaa ggccaaacccc gagagccaca ggtctatacc 900  
 [0939] ctgccaccaa gccaggagga aatgaccaag aatcaggtga gcctcacctg tctggtaag 960  
 [0940] ggtttctacc cgtccgacat cgcgggtggag tgggagagta acggacagcc tgaaaacaat 1020  
 [0941] tacaagacaa cccgcctgt tttggactct gacggctcct ttttctgta ctctcggtt 1080  
 [0942] accgtggata agagtagatg gcaagaaggc aacgtctca gctgtccgt gatgcattgag 1140  
 [0943] gcgcgtcata accattatac acaaaaaagt ctgtccttga gcctggcaaa accttttgg 1200  
 [0944] gtgcgtgggg tgggggggg tgcctcgct tgctacagtt tggtgggtac agttgcctt 1260  
 [0945] attattttt gggtgcccg taagcggagt cgcctccctt attccgacta tatgaacatg 1320  
 [0946] acacctcgcc gcccaggccc aacgaggaaa cattatcgc catatgcacc accttagagac 1380  
 [0947] ttggccgctt accggccccg agatcaaagg ctccccccg atgcacacaa accacccggc 1440  
 [0948] ggtggctcat ttgcacacc aattcaggaa gagcaggcag acgcccacag caccctggcc 1500  
 [0949] aagatccggg taaagttcag ccgaagtgc gatgcgcggg cataccagca gggccagaat 1560  
 [0950] caattgtaca atgagctta cctcgccgc agagaggagt atgatgtact ggataagcgg 1620  
 [0951] cgcggacggg atcctgagat gggaggaaag cctcgagaa aaaatcccc ggaaggactt 1680  
 [0952] tacaatgagt tgcagaagga taagatggcc gaagcatatt ctgaaatcg gatgaaaggt 1740  
 [0953] gagcggcgga gaggaaaagg ccacgacggg ctctaccagg ggctgagcac agctactaaa 1800  
 [0954] gatacatacg acgcacttca tatgcaagcc ctgcctcccc ggcggccgc agcatcgata 1860  
 [0955] agta 1864  
 [0956] <210> 36  
 [0957] <211> 1863  
 [0958] <212> DNA  
 [0959] <213> 人工序列  
 [0960] <220>  
 [0961] <223> PEP2-472-2 嵌合抗原受体  
 [0962] <400> 36  
 [0963] cctccataga agattctaga gctagcgaat tctgcagtcg acggtaccgc gggcccgaaa 60  
 [0964] tccaccgggt cccgcgcatt gcattgccat ttacggcgat cctcgtgcctt ctcgcactcc 120  
 [0965] tcttcacgc agctcgaccc gaggtccagc ttctcgagtc cgggtggtaa cttgtcaac 180

[0966] cgggcggctc cttgcgactt tcctgtgccg cctccggta cacttcccc atgaaagaca 240  
 [0967] tggatgggt gcgcaggcg ccagggagg gtcttgagt ggtcagcgct ataagtggga 300  
 [0968] gtgggtgggg aacatattat gcagattcag taaaaggccg cttcaactatc agtcgcgata 360  
 [0969] acagcaaaaa cacactgtat cttcagatga atagcttgag agctgaagat acggcggtgt 420  
 [0970] attactgtgc ggagccgaaa ccaatggata ccgagttcga ctaccgctcc cctggcacct 480  
 [0971] tggttactgt ccttgaaggc ggccggagaga gcaagttacgg gccggcgtgc ccaagttgcc 540  
 [0972] ctgccccgcc tgtggctggt cttcagttt tcctgtttcc gcctaaacca aaagacactc 600  
 [0973] ttatgatttc tcgcacgcct gaagtcactt gtgttgcgt agatgtcagt caggaggacc 660  
 [0974] cggaaagtcca atttaattgg tacgtggatg gagttgaggt gcataacgcc aagacgaagc 720  
 [0975] cgcgagagga gcagtttaat tccacctaca gggtcgtatc cggtctact gtccttcacc 780  
 [0976] aggactggct gaatgggaag gagtacaaat gcaaagttagt caataaaggc ctggcgagct 840  
 [0977] ccatcgaaaa aaccatttc aaggcaaaag gccaaccccg agagccacag gtctatacc 900  
 [0978] tgccaccaag ccaggaggaa atgaccaaga atcaggttagt cttcacctgt ctggtcaagg 960  
 [0979] gttctaccc gtccgacatc gcgggtggagt gggagagtaa cggacagcct gaaaacaatt 1020  
 [0980] acaagacaac cccgcctgtt ttggactctg acggctcctt ttttctgtac tctcggttta 1080  
 [0981] ccgtggataa gagtagatgg caagaaggca acgtcttcag ctgttccgtg atgcatgagg 1140  
 [0982] cgctgcataa ccattataca caaaaaagtc tgtcctttagt cctggcaaa ctttttggg 1200  
 [0983] tgctgggtgt ggtgggggt gtcctcgctt gctacagttt gttggtaga gttgcctta 1260  
 [0984] ttattttttgggtgt ggtgcgcagt aagcggagtc gcctccttca ttccgactat atgaacatga 1320  
 [0985] cacctcgccg cccaggccca acgaggaaac attatcagcc atatgcacca cctagagact 1380  
 [0986] ttggccctta ccggtcccga gatcaaaggc ttccccccga tgcacacaaa ccacccggcg 1440  
 [0987] gtggctcatt tcgaacacca attcaggaag agcaggcaga cgcccacagc accctggcca 1500  
 [0988] agatccgggt aaagttcagc cgaagtgcag atgcgcggc ataccagcag ggccagaatc 1560  
 [0989] aattgtacaa tgagcttaac ctggccgca gagaggagta tggatgtactg gataagcggc 1620  
 [0990] gcccgggaa tcctgagatg ggaggaaagc ctggagaaaa aaatccccag gaaggacttt 1680  
 [0991] acaatgagtt gcagaaggat aagatggccg aagcatattc tggaaatcggtg atgaaagggt 1740  
 [0992] agcggcggag agggaaaggc cacacgggc tctaccaggg gctgagcaca gctactaaag 1800  
 [0993] atacatacga cgcacttcat atgcaagccc tgcctccccg cgcggccgca gcatcgataa 1860  
 [0994] gta 1863  
 [0995] <210> 37  
 [0996] <211> 1863  
 [0997] <212> DNA  
 [0998] <213> 人工序列  
 [0999] <220>  
 [1000] <223> PEP2-2-12 嵌合抗原受体  
 [1001] <400> 37  
 [1002] cctccataga agattctaga gctagcgaat tctgcagtcg acggtaccgc gggccggga 60  
 [1003] tccaccggtc cgccgcctatg gctctggccg taactgctct ctttcttcca cttgcactgc 120  
 [1004] ttctccacgc ggctaggccg gaagtccaaac ttctggaaatc tggaggtggt ctcgtgcagc 180  
 [1005] ctggcggatc cctccgggtt tctgcgcgc cttcaggatt cacattcgg aaccacgaca 240  
 [1006] tgggggtgggt taggcaagcg ccgggcaagg gcctcgaatg ggtttcagcc atatctggtt 300  
 [1007] cggaggttc tacctactat gctaactcag tcaagggcag attacgatc tcaagagaca 360

- [1008] atagtaagaa cacgctgtac cttcagatga actctcttag agcagaagat acagctgtgt 420  
 [1009] actattgtgc tgaaccgaag cctatggata ctgagttga ctaccctagt ccggggacgc 480  
 [1010] tggttaaccgt ctccagtgaa ggcggagaaa gcaaatacgg tccccctgc ccctcttgcc 540  
 [1011] ctgccccgcc tggctgtgt cctcagttt tcctgtttcc gcctaaacca aaagacactc 600  
 [1012] ttatgatttc tcgcacgcct gaagtcactt gtgttgtcgt agatgtcagt caggaggacc 660  
 [1013] cggaaatcca atttaattgg tacgtggatg gagttgaggt gcataacgcc aagacgaagc 720  
 [1014] cgcgagagga gcagttaat tccacctaca gggtcgtatc cggttctact gtccttcacc 780  
 [1015] aggactggct gaatgggaag gagttacaaat gcaaagttag caataaaggc ctgcccggct 840  
 [1016] ccatcgaaaaa aaccattcc aaggcaaaag gccaaccccg agagccacag gtctatacc 900  
 [1017] tgccaccaag ccaggaggaa atgaccaaga atcaggttag cctcacctgt ctggtaagg 960  
 [1018] gcttctaccc gtccgacatc gcgggtggagt gggagagtaa cggacagcct gaaaacaatt 1020  
 [1019] acaagacaac cccgcctgtt ttggactctg acggctcctt ttttctgtac tctggctta 1080  
 [1020] ccgtggataa gagtagatgg caagaaggca acgttccag ctgttccgtg atgcatgagg 1140  
 [1021] cgctgcataa ccattataca caaaaaagtc tgtccttgag cctggcaaa ctttttggg 1200  
 [1022] tgctggtggt ggtgggggt gtcctcgctt gctacagttt gttggtgaca gttgccttt 1260  
 [1023] ttatTTTTTg ggtgcgcagt aagcggagtc gcctccttca ttccgactat atgaacatga 1320  
 [1024] cacctcgccg cccaggccca acgaggaaac attatcagcc atatgcacca cctagagact 1380  
 [1025] ttgcccctta cccggccca gatcaaaggc ttcccccga tgcacacaaa ccacccggcg 1440  
 [1026] gtggctcatt tcgaacacca attcaggaag agcaggcaga cgcccacagc accctggcca 1500  
 [1027] agatccgggt aaagttcagc cgaagtgcag atgcgccgc ataccagcag ggccagaatc 1560  
 [1028] aattgtacaa tgagcttaac ctggccgca gagaggagta tgatgtactg gataagcggc 1620  
 [1029] gccggacggga tcctgagatg ggaggaaagc ctcggagaaa aaatccccag gaaggactt 1680  
 [1030] acaatgagtt gcagaaggat aagatggccg aagcatattc tgaatcggg atgaaagggt 1740  
 [1031] agcggcggag aggaaaaggc cacgacggc tctaccaggg gctgagcaca gctactaaag 1800  
 [1032] atacatacga cgcacttcat atgcaagccc tgcctcccg cgcggccgca gcatcgataa 1860  
 [1033] gta 1863  
 [1034] <210> 38  
 [1035] <211> 20  
 [1036] <212> DNA  
 [1037] <213> 人工序列  
 [1038] <220>  
 [1039] <223> pCHD-CMV-前向引物  
 [1040] <400> 38  
 [1041] ggtgggaggt ctatataaggc 20  
 [1042] <210> 39  
 [1043] <211> 19  
 [1044] <212> DNA  
 [1045] <213> 人工序列  
 [1046] <220>  
 [1047] <223> pCHD-coGFP-反向引物  
 [1048] <400> 39  
 [1049] tgatgcggca ctcgatctc 19

- [1050] <210> 40
- [1051] <211> 19
- [1052] <212> DNA
- [1053] <213> 人工序列
- [1054] <220>
- [1055] <223> 2-2-1-1-反向引物
- [1056] <400> 40
- [1057] cttcacggag tctgcgtag 19
- [1058] <210> 41
- [1059] <211> 20
- [1060] <212> DNA
- [1061] <213> 人工序列
- [1062] <220>
- [1063] <223> 2-2-1-1-前向引物
- [1064] <400> 41
- [1065] tcttgtcact gtatccagtg 20
- [1066] <210> 42
- [1067] <211> 20
- [1068] <212> DNA
- [1069] <213> 人工序列
- [1070] <220>
- [1071] <223> 2-472-2-反向引物
- [1072] <400> 42
- [1073] cgtatcttca gctctcaagg 20
- [1074] <210> 43
- [1075] <211> 20
- [1076] <212> DNA
- [1077] <213> 人工序列
- [1078] <220>
- [1079] <223> 2-472-2-前向引物
- [1080] <400> 43
- [1081] tggtccttca gttttccctgt 20
- [1082] <210> 44
- [1083] <211> 18
- [1084] <212> DNA
- [1085] <213> 人工序列
- [1086] <220>
- [1087] <223> 2-12-2-反向引物
- [1088] <400> 44
- [1089] cagctgtatc ttctgctc 18
- [1090] <210> 45
- [1091] <211> 20

- [1092] <212> DNA  
[1093] <213> 人工序列  
[1094] <220>  
[1095] <223> Com-For-1 引物  
[1096] <400> 45  
[1097] agtgggagag taacggacag 20  
[1098] <210> 46  
[1099] <211> 20  
[1100] <212> DNA  
[1101] <213> 人工序列  
[1102] <220>  
[1103] <223> Com-For-2 引物  
[1104] <400> 46  
[1105] agggccagaa tcaattgtac 20  
[1106] <210> 47  
[1107] <211> 1117  
[1108] <212> DNA  
[1109] <213> 人工序列  
[1110] <220>  
[1111] <223> EXD2\_K193A 融合基因块  
[1112] <400> 47  
[1113] ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcta tggagacaga cacactcctg ctatgggtac 60  
[1114] tgctgctctg ggttccaggt tccactggtg actatccata tggatgttcca gattatgctg 120  
[1115] gggccagtga caagctgtac cagcggaaag agcctgtcat cagttctgtg cacaccaagg 180  
[1116] tgaaggggat agcagaggtg aaagaggaga tcgtggagaa tggagtgaag aagttggtgc 240  
[1117] acagtgtctt tgacaccgca gactacacct tcccttgca ggggaactct ttcttcgtga 300  
[1118] tgacaaaactt tctcaaaaaca gaaggccaag agcagcggtt gtgtcccgag tatcccaccc 360  
[1119] gcaggacgct ctgttcctct gaccgaggtt gtaaaaaggg atggatggac ccgcagagca 420  
[1120] aaggaattca gaccggaagg tgtgttagtgt atgaaggaa ccagaagacc tgtgaagtct 480  
[1121] ctgcctggtg ccccatcgag gcagtggaaag aggccccccg gcctgctctc ttgaacagtg 540  
[1122] ccgaaaactt cactgtgctc atcgcaaca atatcgactt cccggccac aactacacca 600  
[1123] cgagaaacat cctgccaggt ttaaacatca cttgtacctt ccacaagact cagaatccac 660  
[1124] agtgtcccat tttccgacta ggagacatct tccgagaaac aggcgataat ttttcagatg 720  
[1125] tggcaattca gggcggaaata atggcattt agatctactg ggactgcaac ctagaccgtt 780  
[1126] gttccatca ctggcgcccc aaatacagtt tccgtcgct tgacgacaag accaccaacg 840  
[1127] tgtccttgta ccctggctac aacttcagat acgccaagta ctacaaggaa aacaatgttg 900  
[1128] agaaagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgaatgc tgtggccag gacacgcagg 960  
[1129] aggtcatcgt ggtgccacac tccttgcctt ttaaggtggt ggtgatctca gccatcctgg 1020  
[1130] ccctggtggt gctcaccatc atccctta tcattcctcat catgcttgg cagaagaagc 1080  
[1131] cacgttagac ccagcttct tgtacaaagt ggtcccc 1117  
[1132] <210> 48  
[1133] <211> 1117

- [1134] <212> DNA
- [1135] <213> 人工序列
- [1136] <220>
- [1137] <223> EXD2\_WT 融合基因块
- [1138] <400> 48
- [1139] ggggacaagt ttgtacaaaa aaggcaggcta tggagacaga cacactcctg ctagggta 60
- [1140] tgctgctctg gttccaggt tccactggtg actatccata ttagttcca gattatgctg 120
- [1141] gggccagtga caagctgtac cagcggaaag agcctgtcat cagttctgtc cacaccaagg 180
- [1142] tgaagggat agcagaggtg aaagaggaga tcgtggagaa tggagtgaag aagttggtgc 240
- [1143] acagtgtctt tgacaccgca gactacaccc tcccttgca ggggaactct ttcttcgtga 300
- [1144] tgacaaaactt tctcaaaaaca gaaggccaag agcagcggtt gtgtcccgag tatcccaccc 360
- [1145] gcaggacgct ctgttccctt gaccgagggtt gtaaaaagggtt atggatggac ccgcagagca 420
- [1146] aaggaattca gaccggaagg tttgtgtgt atgaaggaa ccagaagacc tgtgaagtct 480
- [1147] ctgcctggtg ccccatcgag gcagtggaaag aggccccccg gcctgctctc ttgaacagtg 540
- [1148] ccgaaaactt cactgtgctc atcaagaaca atatcgactt ccccgccac aactacacca 600
- [1149] cgagaaacat cctgccaggt ttaaacatca cttgtaccc ttccatccatc cagaatccac 660
- [1150] agtgtcccat tttccgacta ggagacatct tccgagaaac aggcgataat tttcagatg 720
- [1151] tggcaattca gggcggaata atggcatttgc agatctactg ggactgcaac ctagaccgtt 780
- [1152] ggttccatca ctgccgtccc aaatacagtt tccgtcgccct tgacgacaag accaccaacg 840
- [1153] tgccttgta ccctggctac aacttcagat acgccaagta ctacaaggaa aacaatgtt 900
- [1154] agaaagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgaatgc tgtggccag gacacgcagg 960
- [1155] aggtcatcggt ggtgccacac tccttgcctt ttaaggtggt ggtgatctca gccatcctgg 1020
- [1156] ccctggtggt gctcaccatc atctccctta tcatacctcat catgcttgg cagaagaacg 1080
- [1157] cacgttagac ccagcttct tgtacaaagt ggtcccc 1117
- [1158] <210> 49
- [1159] <211> 20
- [1160] <212> DNA
- [1161] <213> 人工序列
- [1162] <220>
- [1163] <223> EXD-F1 引物
- [1164] <400> 49
- [1165] acaagctgtta ccagcgaaaa 20
- [1166] <210> 50
- [1167] <211> 20
- [1168] <212> DNA
- [1169] <213> 人工序列
- [1170] <220>
- [1171] <223> EXD2-R1 引物
- [1172] <400> 50
- [1173] caccaccacc tttaaaggca 20
- [1174] <210> 51
- [1175] <211> 20

- [1176] <212> DNA
- [1177] <213> 人工序列
- [1178] <220>
- [1179] <223> EXD2-F1 引物
- [1180] <400> 51
- [1181] acaagctgta ccagcgaaa 20
- [1182] <210> 52
- [1183] <211> 588
- [1184] <212> PRT
- [1185] <213> 人工序列
- [1186] <220>
- [1187] <223> PEP2-2-1-1 CAR 氨基酸序列
- [1188] <400> 52
- [1189] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
- [1190] 1 5 10 15
- [1191] His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
- [1192] 20 25 30
- [1193] Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
- [1194] 35 40 45
- [1195] Thr Phe Arg Asn His Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
- [1196] 50 55 60
- [1197] Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr
- [1198] 65 70 75 80
- [1199] Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
- [1200] 85 90 95
- [1201] Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
- [1202] 100 105 110
- [1203] Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp
- [1204] 115 120 125
- [1205] Tyr Arg Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Glu
- [1206] 130 135 140
- [1207] Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
- [1208] 145 150 155 160
- [1209] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
- [1210] 165 170 175
- [1211] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
- [1212] 180 185 190
- [1213] Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
- [1214] 195 200 205
- [1215] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
- [1216] 210 215 220
- [1217] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

[1218]	225	230	235	240
[1219]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile			
[1220]	245	250	255	
[1221]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
[1222]	260	265	270	
[1223]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser			
[1224]	275	280	285	
[1225]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
[1226]	290	295	300	
[1227]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
[1228]	305	310	315	320
[1229]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val			
[1230]	325	330	335	
[1231]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
[1232]	340	345	350	
[1233]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
[1234]	355	360	365	
[1235]	Leu Gly Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala			
[1236]	370	375	380	
[1237]	Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg			
[1238]	385	390	395	400
[1239]	Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro			
[1240]	405	410	415	
[1241]	Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro			
[1242]	420	425	430	
[1243]	Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp			
[1244]	435	440	445	
[1245]	Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu			
[1246]	450	455	460	
[1247]	Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe			
[1248]	465	470	475	480
[1249]	Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu			
[1250]	485	490	495	
[1251]	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp			
[1252]	500	505	510	
[1253]	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys			
[1254]	515	520	525	
[1255]	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala			
[1256]	530	535	540	
[1257]	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys			
[1258]	545	550	555	560
[1259]	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr			

[1260]	565	570	575
[1261]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[1262]	580	585	
[1263]	<210> 53		
[1264]	<211> 588		
[1265]	<212> PRT		
[1266]	<213> 人工序列		
[1267]	<220>		
[1268]	<223> PEP2-472-2 CAR 氨基酸序列		
[1269]	<400> 53		
[1270]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu		
[1271]	1 5 10 15		
[1272]	His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu		
[1273]	20 25 30		
[1274]	Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr		
[1275]	35 40 45		
[1276]	Thr Phe Pro Met Lys Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
[1277]	50 55 60		
[1278]	Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Tyr		
[1279]	65 70 75 80		
[1280]	Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser		
[1281]	85 90 95		
[1282]	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr		
[1283]	100 105 110		
[1284]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp		
[1285]	115 120 125		
[1286]	Tyr Arg Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Leu Glu Gly Gly Glu		
[1287]	130 135 140		
[1288]	Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala		
[1289]	145 150 155 160		
[1290]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
[1291]	165 170 175		
[1292]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln		
[1293]	180 185 190		
[1294]	Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
[1295]	195 200 205		
[1296]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr		
[1297]	210 215 220		
[1298]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
[1299]	225 230 235 240		
[1300]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile		
[1301]	245 250 255		

[1302]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[1303]	260	265	270
[1304]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
[1305]	275	280	285
[1306]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[1307]	290	295	300
[1308]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[1309]	305	310	315
[1310]	320		
[1311]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val		
[1312]	325	330	335
[1313]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[1314]	340	345	350
[1315]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[1316]	355	360	365
[1317]	Leu Gly Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala		
[1318]	370	375	380
[1319]	Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg		
[1320]	385	390	395
[1321]	400	405	415
[1322]	410		
[1323]	Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro		
[1324]	420	425	430
[1325]	Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp		
[1326]	435	440	445
[1327]	Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu		
[1328]	450	455	460
[1329]	Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe		
[1330]	465	470	475
[1331]	480	485	490
[1332]	495		
[1333]	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		
[1334]	500	505	510
[1335]	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys		
[1336]	515	520	525
[1337]	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala		
[1338]	530	535	540
[1339]	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys		
[1340]	545	550	555
[1341]	560	570	575
[1342]	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr		
[1343]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
	580	585	

[1344]	<210> 54			
[1345]	<211> 588			
[1346]	<212> PRT			
[1347]	<213> 人工序列			
[1348]	<220>			
[1349]	<223> PEP2-2-12 CAR 氨基酸序列			
[1350]	<400> 54			
[1351]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu			
[1352]	1	5	10	15
[1353]	His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu			
[1354]	20	25	30	
[1355]	Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe			
[1356]	35	40	45	
[1357]	Thr Phe Arg Asn His Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys			
[1358]	50	55	60	
[1359]	Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr			
[1360]	65	70	75	80
[1361]	Tyr Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser			
[1362]	85	90	95	
[1363]	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr			
[1364]	100	105	110	
[1365]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Glu Pro Lys Pro Met Asp Thr Glu Phe Asp			
[1366]	115	120	125	
[1367]	Tyr Pro Ser Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Glu			
[1368]	130	135	140	
[1369]	Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala			
[1370]	145	150	155	160
[1371]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
[1372]	165	170	175	
[1373]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln			
[1374]	180	185	190	
[1375]	Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
[1376]	195	200	205	
[1377]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr			
[1378]	210	215	220	
[1379]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
[1380]	225	230	235	240
[1381]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile			
[1382]	245	250	255	
[1383]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
[1384]	260	265	270	
[1385]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser			

[1386]	275	280	285
[1387]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[1388]	290	295	300
[1389]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[1390]	305	310	315
[1391]	320	325	330
[1392]	335		
[1393]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[1394]	340	345	350
[1395]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[1396]	355	360	365
[1397]	Leu Gly Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala		
[1398]	370	375	380
[1399]	Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg		
[1400]	385	390	395
[1401]	Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro		
[1402]	405	410	415
[1403]	Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro		
[1404]	420	425	430
[1405]	Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp		
[1406]	435	440	445
[1407]	Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu		
[1408]	450	455	460
[1409]	Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe		
[1410]	465	470	475
[1411]	480		
[1412]	Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu		
[1413]	485	490	495
[1414]	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		
[1415]	500	505	510
[1416]	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys		
[1417]	515	520	525
[1418]	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala		
[1419]	530	535	540
[1420]	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys		
[1421]	545	550	555
[1422]	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr		
[1423]	565	570	575
[1424]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
	580	585	

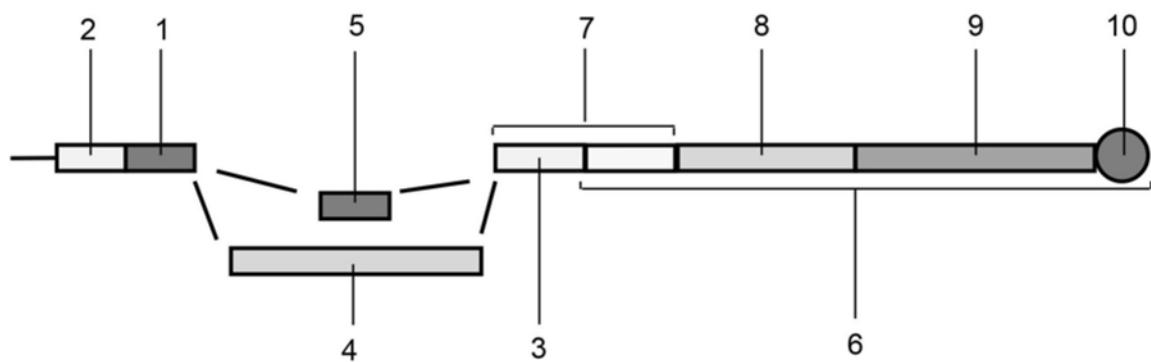


图1

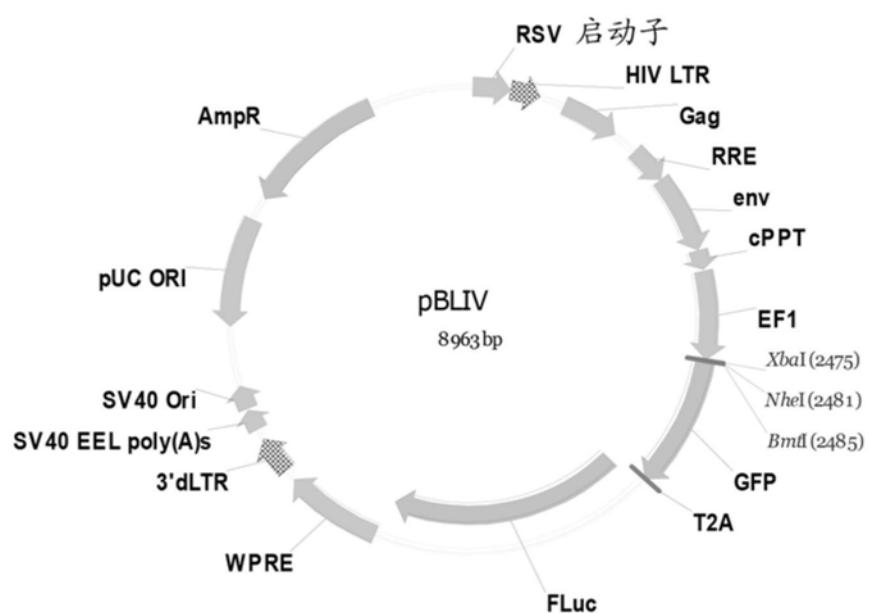


图2

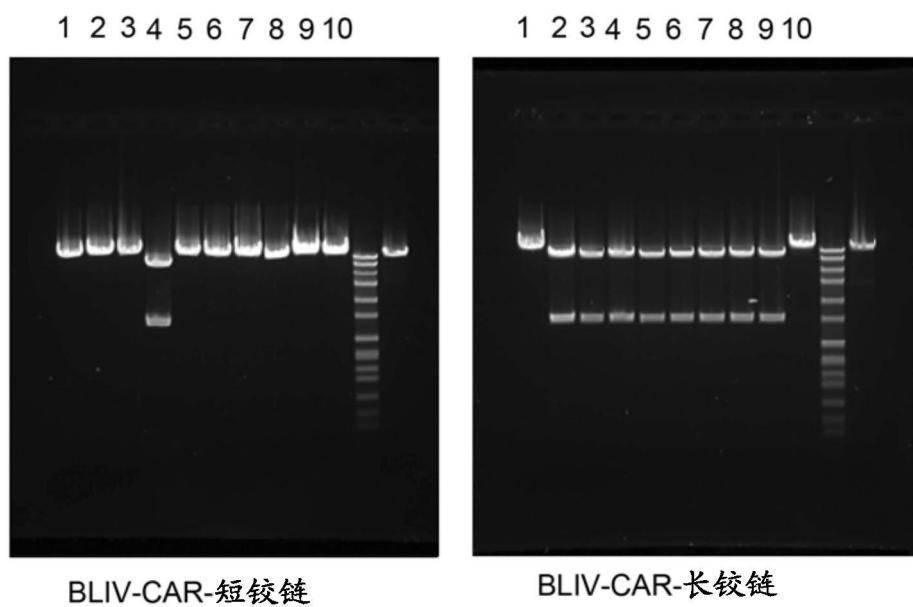


图3

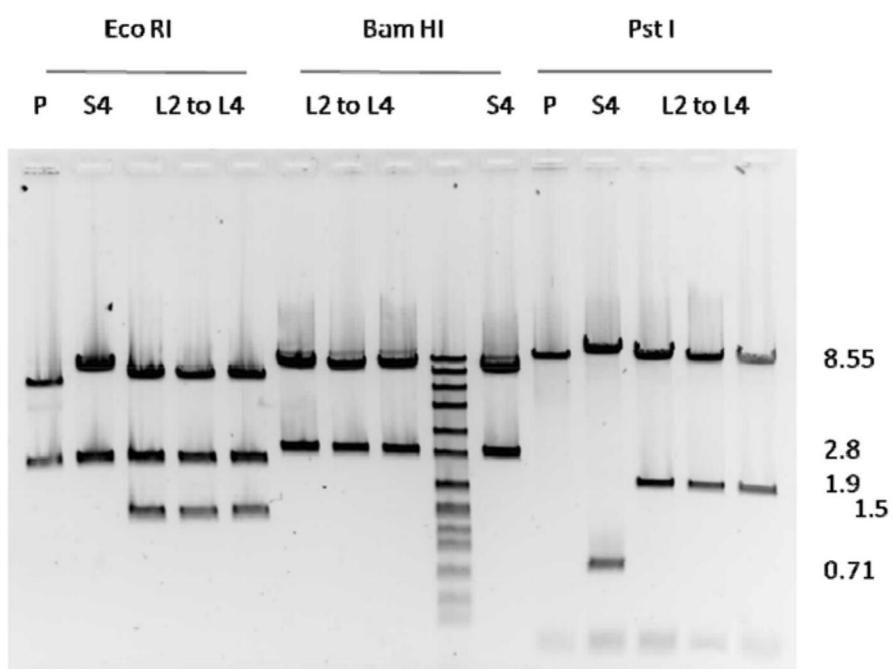
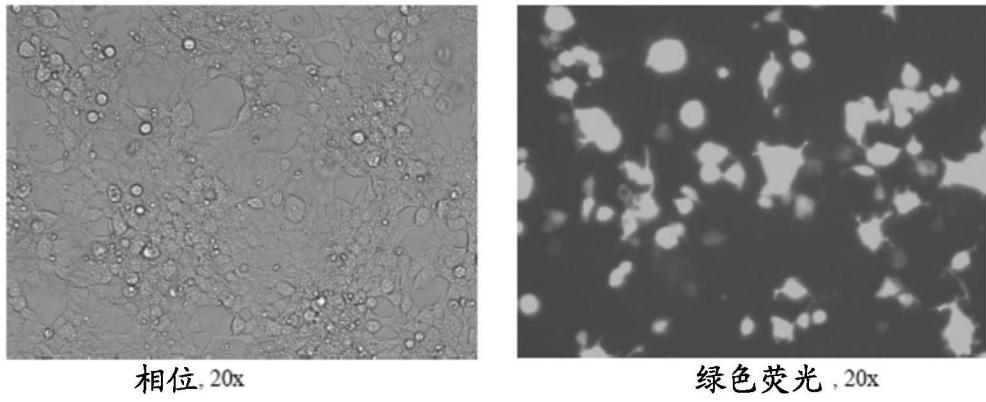


图4

**A**

用BLIV-CAR-短铰链转染293T细胞

**B**

用BLIV-CAR-短铰链转染293T细胞

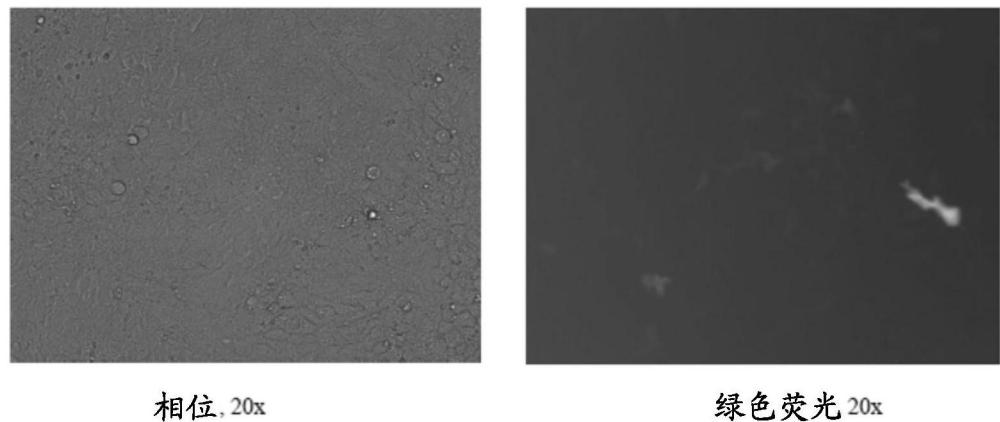
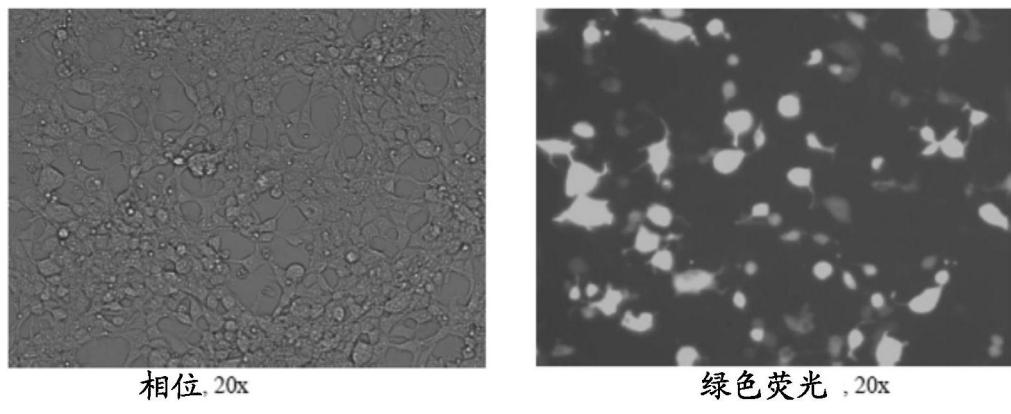


图5

**A**

用BLIV-CAR-长铰链转染293T细胞

**B**

用BLIV-CAR-长铰链转染293T细胞

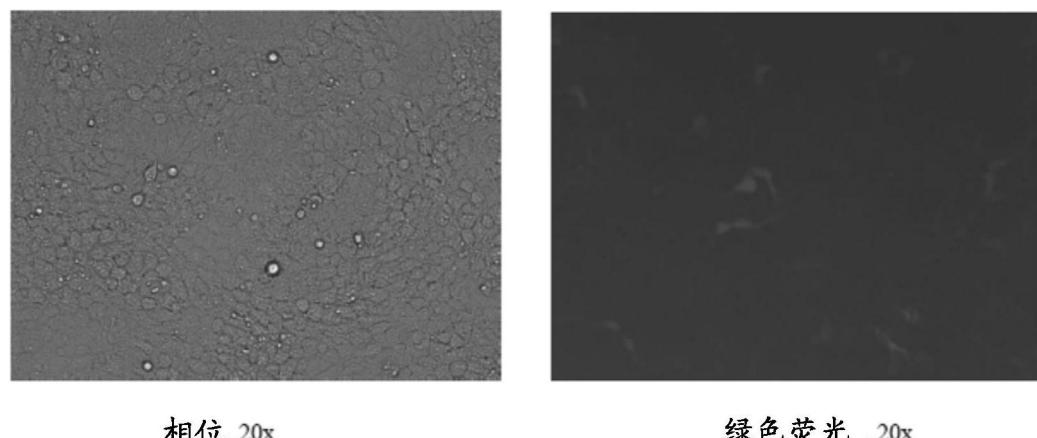


图6

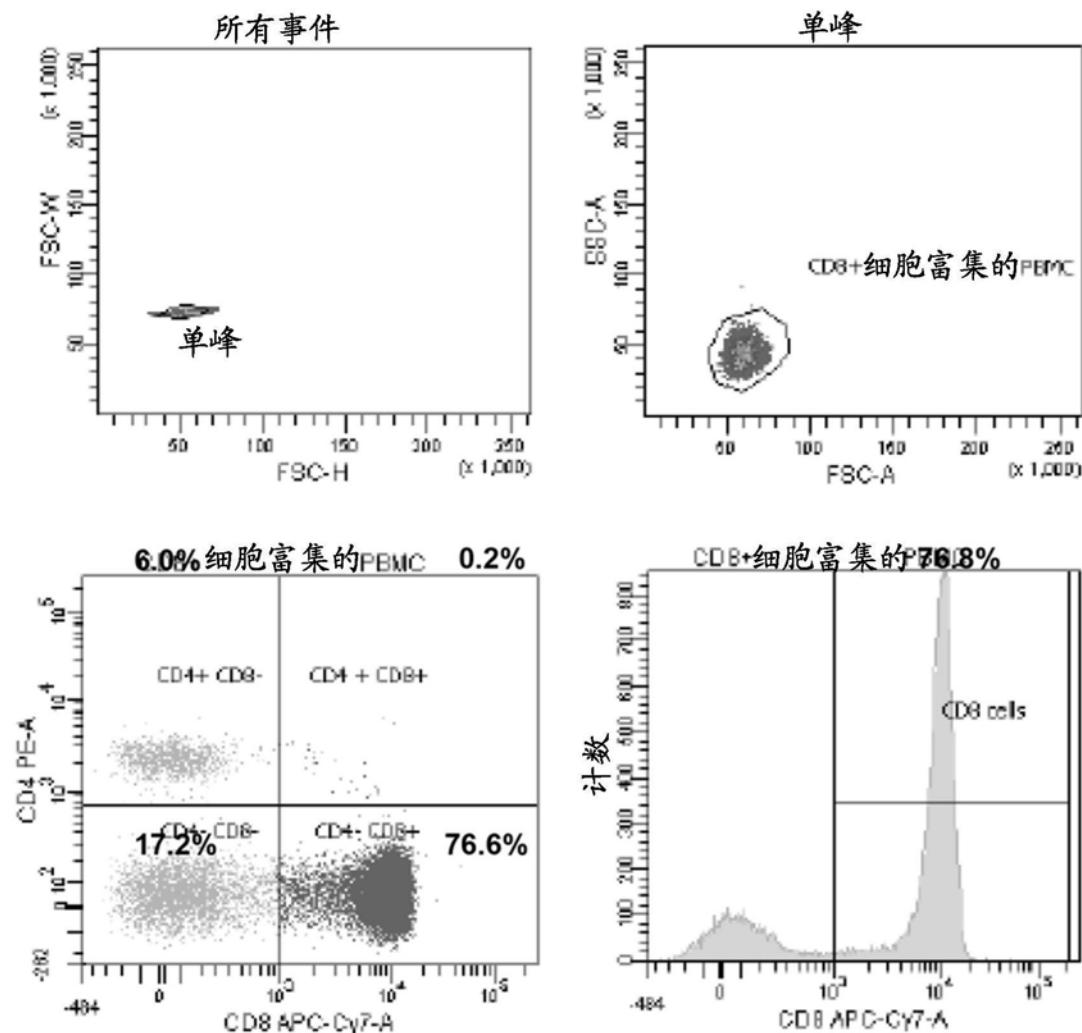


图7

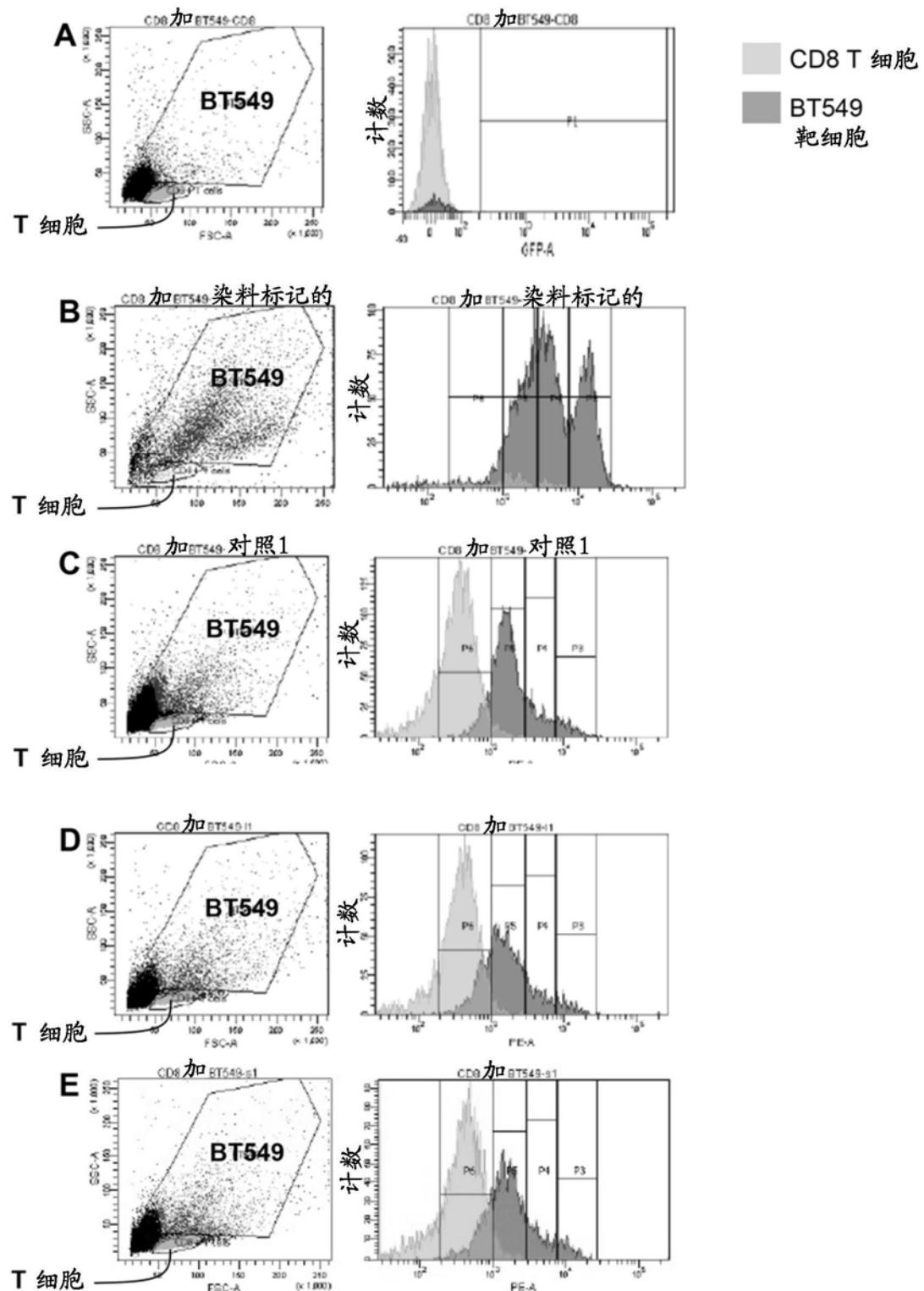


图8

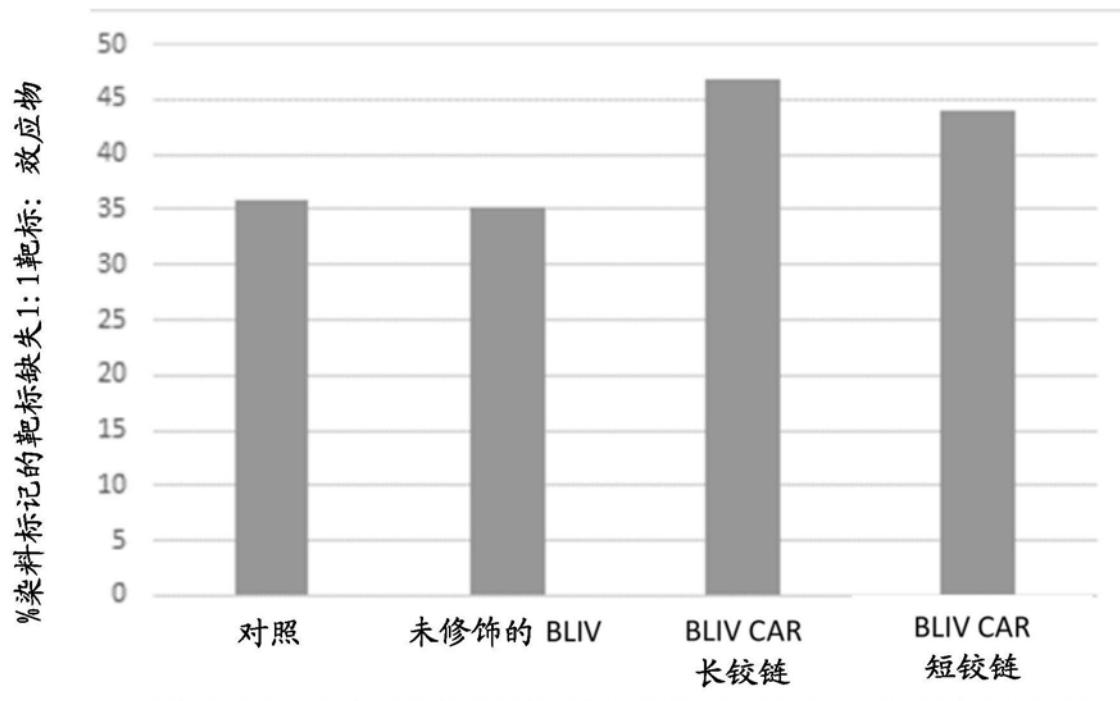


图9

## CLUSTAL O(1.2.2) 多序列比对

AB242HC	-MMVLSLLYLLTALPGILSEVQPQQSGPSLVKPSQTLSSLCSVTGDSITSGYWNWIRIFP	59
AB256HC	-MMVLSLLYLLTALPGIDSEVQLQESGSPSLVKPSQTLSSLCSVTGDSITSGYWNWIRKFP	59
AB265HC	-MMVLSLLYLLTALPGILSEVQLQESGSPSLVKPSQTLSSLCSVTGDSITSGYWNWIRKFP	59
ab260HC	MDLRLSCAFIIVLLKGVQSEVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAVASGFTFSSYMSWVRQSP	60
PEP2-472-2	-----EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFPMKDMGWVRQAP	41
PEP2-2-1-1	-----EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTERNHDMGWVRQAP	41
PEP2-2-12	-----EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTERNHDMGWVRQAP	41
AB213HC	MTFGLSLIFLVLTGVRPGGSLKLSCTAGFTFSGYAMSWVRQTP	60
AB214HC	MNFGFSLIPLVVLKGVQCEVVLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTPSSYMSWVRQIP	60
AB258HC	MGWSWIFLFLSGTAGVLVQLQSGPELVKPGASVKISCKTSGHTFEYALHWVRQSH	60
AB212HC	-----QVQLVQSGPELKKGEITVKISCKKASGYIFTYYGMNWVRQAP	41
AB253HC	MAWWTLLFLMMAAQSAQAIHLVQSGPELKPKGETVEISCKASCYFTFTNHGMNWVKQTP	60
	::  :  **  *  :  *  .  :  :  *  ::  *  ::	
AB242HC	ENKIDYMGYINY---SGTTYYNPSLKS---VSITRDTSNQYDRLNSVTAEDITATYYCAK	115
AB256HC	GNKLEYMGYINK---SGNTYYNPSLNSR-LSITRDTSKNQYNLQLSSVTAEDITATYYCAR	115
AB265HC	GNKLEYMGYINY---SGSTYYNPSLNSR-LSITRDTSKNQYSLQLSSVTAEDITATYYCAR	115
ab260HC	EKGLEWVAEIRLKSNDYATHYAEVKGK-FTISRDDSksRLYLMQNSLRAEDITGIYYCRL	119
PEP2-472-2	GKGLEWVAIS--GSGGGTYYADSVKGR-FTISRDNsknLTYLMQNSLRAEDITAVYYCAE	98
PEP2-2-1-1	GKGLEWVAIS--GSGGTYYADSVKGR-FTISRDNsknLTYLMQNSLRAEDITAVYYCAE	98
PEP2-2-12	GKGLEWVAIS--GSGGTYYANQVKGR-FTISRDNsknLTYLMQNSLRAEDITAVYYCAE	98
AB213HC	EKRLEWVATID--SGGYNTYYFDSTVKGR-FTISRDNsRNnLTYLMQNSLRAEDITAVYYCST	118
AB214HC	ERRLEWVATIG--YSG-RTYPFDSTVKGR-FTISRDNsRNnLTYLMQNSLRAEDITAVYYCST	116
AB258HC	GKSFEWIGGIN--PNNGGATYNQFKGK-ATLTVDKSSSTPFMELHSLTFEDSAVYFCAR	117
AB212HC	GKGLKWLWGIN--TYTGEPTYADDFKGR-FAFSLETSARTAFLQINNLKNEDITATYFCAR	98
AB253HC	GKGLKWMWGIN--TYTGQSIYSDDFKGR-FAFSMETSATTAYLQINNLKDDEDITATYFCAG	117
	.  :  .  *  *  .  .  .  :  :  .  .  .  *  *  .  *  *	
AB242HC	GRNTY---SGFAFWGPGTILTVSAAKITPPSVYPLAPGCGDTTGSS	158
AB256HC	GRAIYYYKSGFAYWGQGTILTVSAAKITPPSVYPLAPGCGDTTG--	159
AB265HC	GRAIYYYKSGFVYWGQGTILTVSAAKITPPSVYPLAPGCGDTTG--	159
ab260HC	--VYYGNYDAMDYWGQGTISVITVSSRSQSFPNVFFLVSCESPLYDKN	163
PEP2-472-2	PKPM---DTEFDYRSPGTILTVLE-----	119
PEP2-2-1-1	PKPM---DTEFDYRSPGTILTVVSS-----	119
PEP2-2-12	PKPM---DTEFDYRSPGTILTVSS-----	119
AB213HC	SLV-----EFFDYWGPGTALTIVSSAKITPPSVY-----	147
AB214HC	GIFHYTTSYFDYWGQGTILTVSSAKITPPSVYPLAPGCGDTTG--	160
AB258HC	AYY-----AMDYWGQGTISVIVSSAKITPPSVY-----	145
AB212HC	SRYL-----GVLSYWGQGTILTVVS-----	117
AB253HC	GK-----GHFDSWGQGTILTVSSAKITPPSVYPLAPGCGDTTG--	155
	:  .  *  *  :  *	

图10

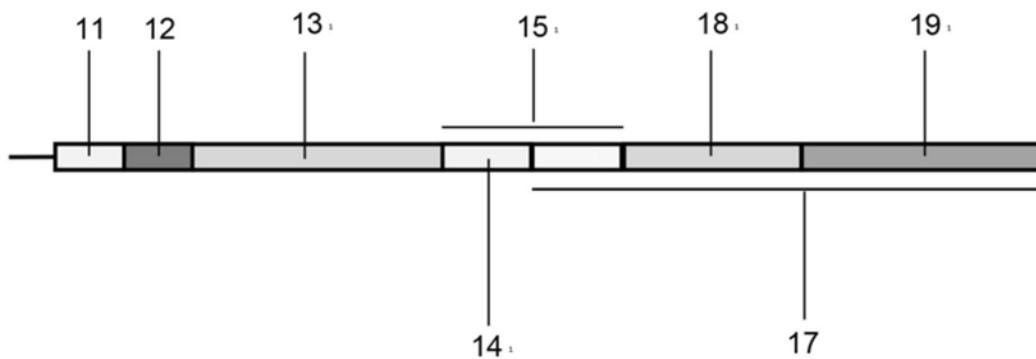


图11

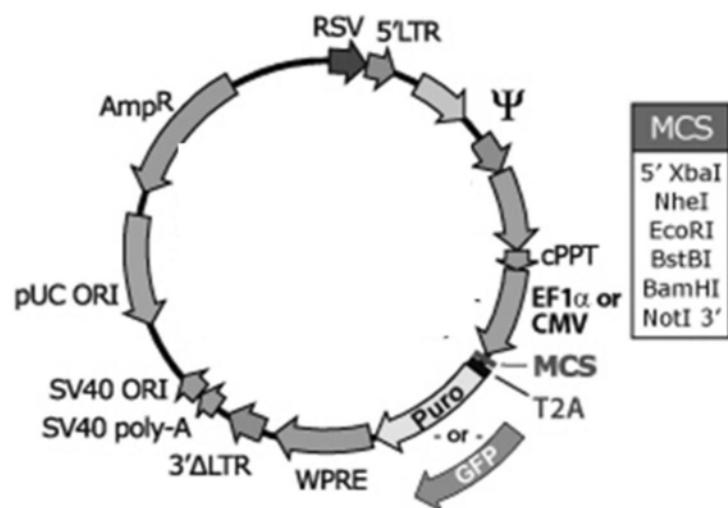


图12

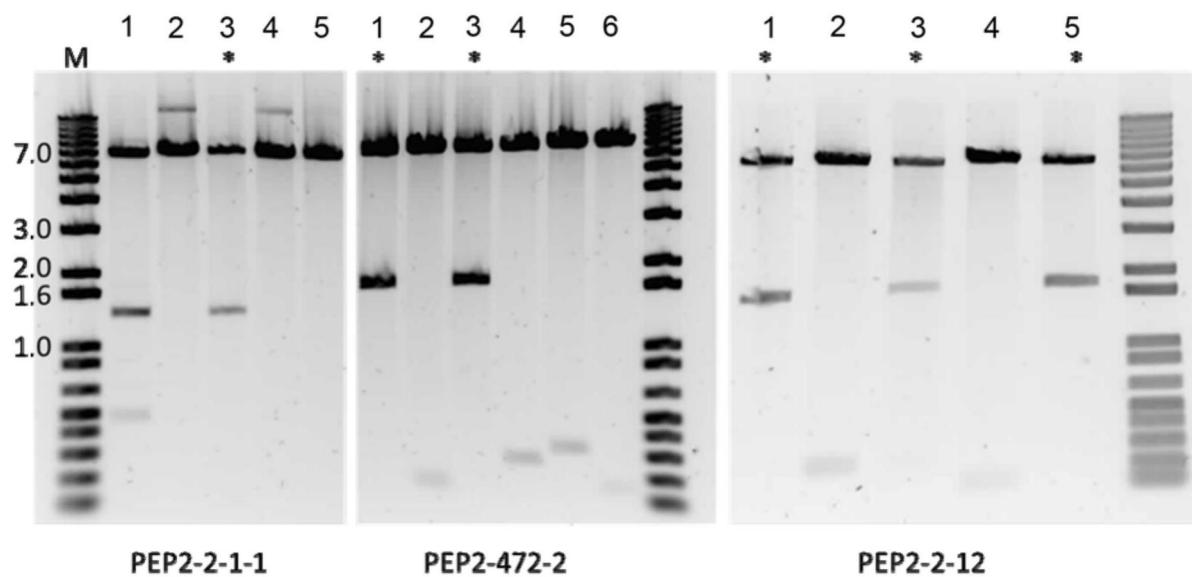


图13

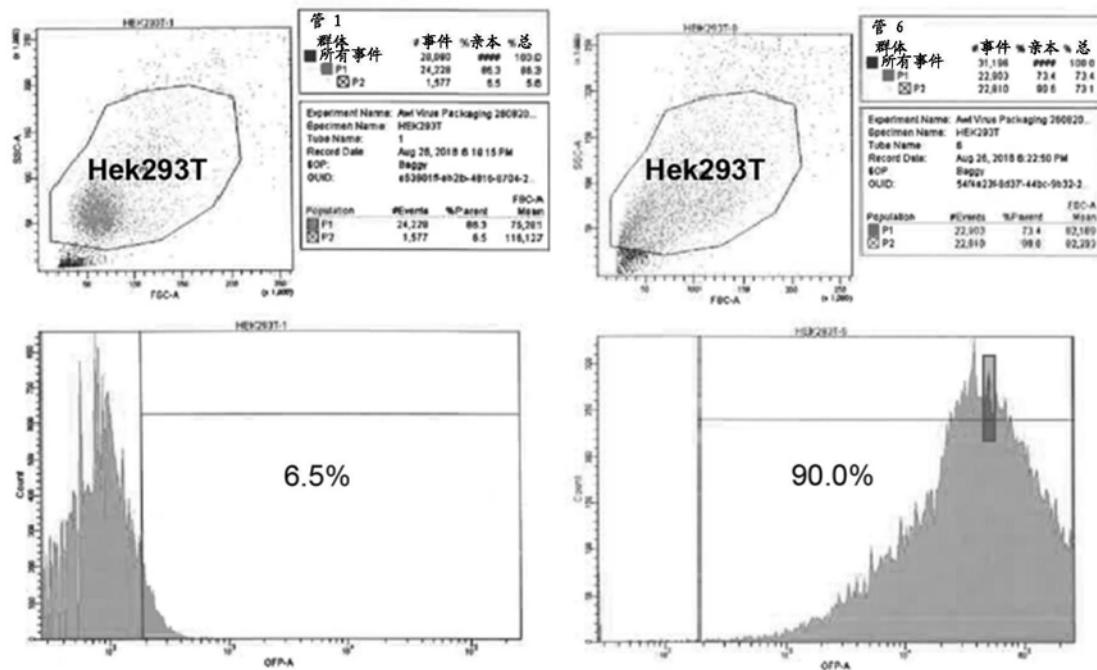


图14

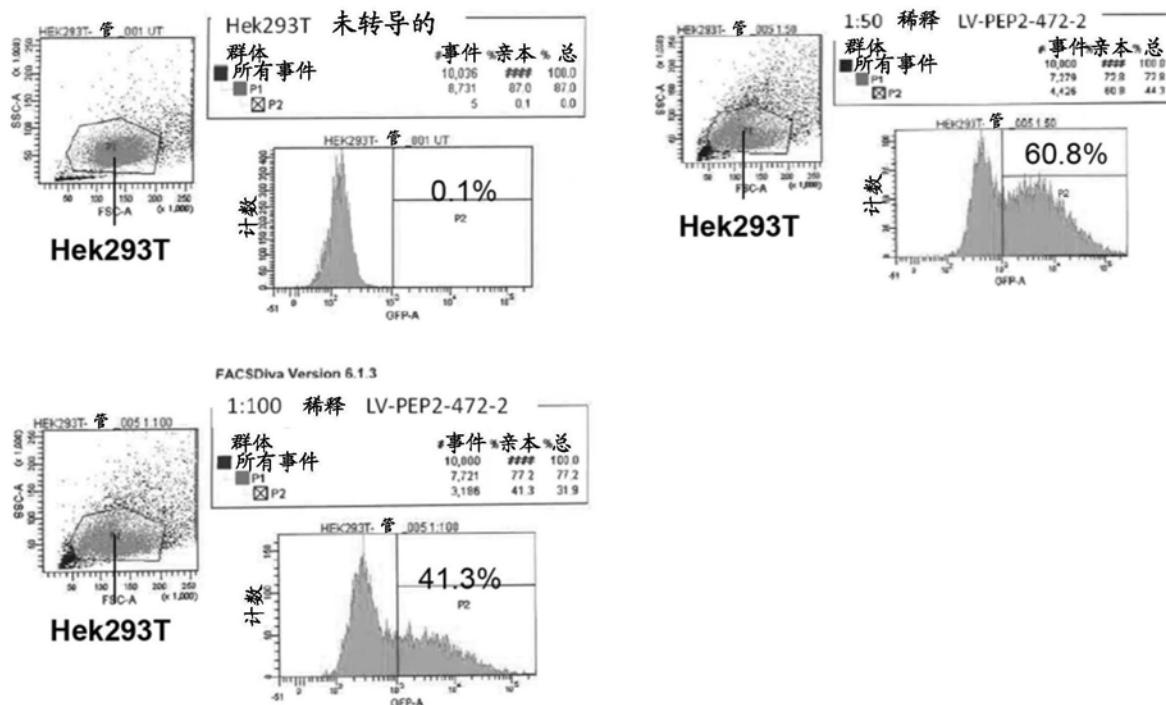


图15

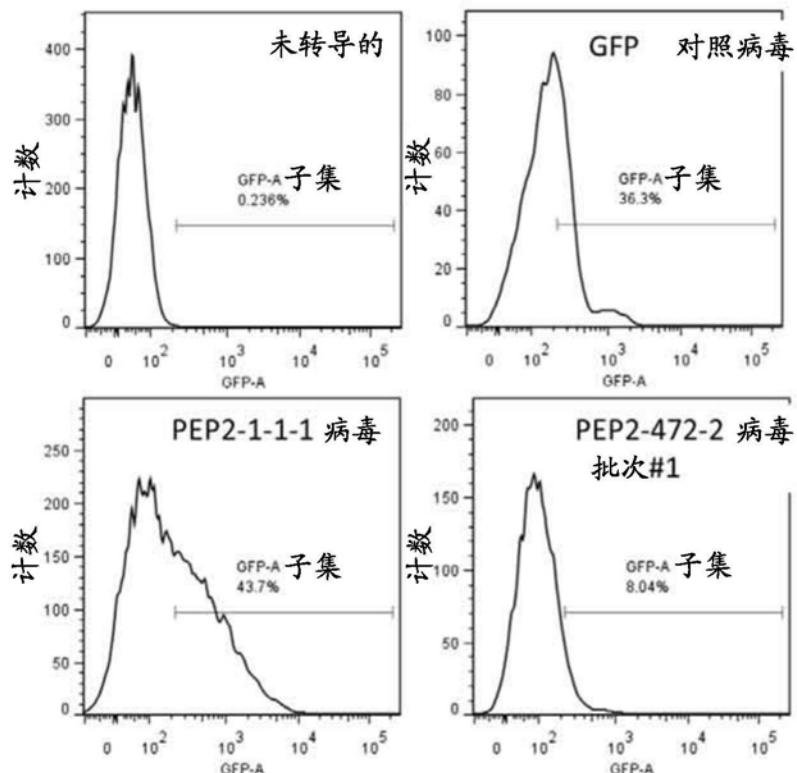


图16

Ig k-链前导序列

721	CTTGGGGATA TCCACC <b>ATG</b> GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Trp Val Leu Leu
hemagglutinin A 表位	
773	CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC TAT CCA TAT GAT GTT CCA GAT Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Val Pro Asp
<i>Sfi</i> I <i>Bgl</i> II <i>Xma</i> I <i>Sma</i> I <i>Sac</i> II <i>Pst</i> I <i>Sal</i> I <i>Acc</i> I	
821	TAT GCT GGG GCC CAGCCGGCCA GATCTCCCGG GATCCGGCTG CTGCAGGTC GAC Tyr Ala
<i>myc</i> 表位	
874	GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AATGCTGTGG GCCAGGACAC Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu ...
<b>PDGFR 跨膜结构域 (5'端)</b>	
924	GCAGGAGGTC ATCGTGGTGC CACACTCCTT GCCCTTTAAG GTGGTGGTGA TCTCAGGCCAT
984	CCTGGCCCTG GTGGTGCTCA CCATCATCTC CCTTATCATC CTCATCATGC TTTGGCAGAA <b>PDGFR (3'端)</b>
1044	GAAGCCACGT TAGGCGGCCG CTCGAGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA

图17

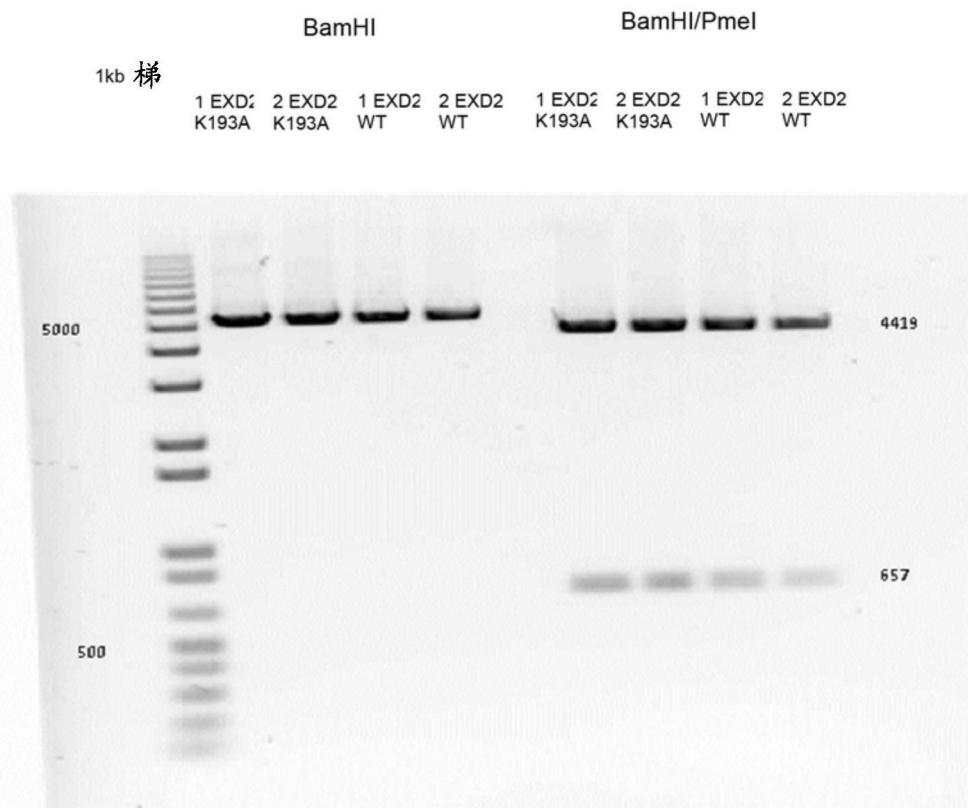


图18

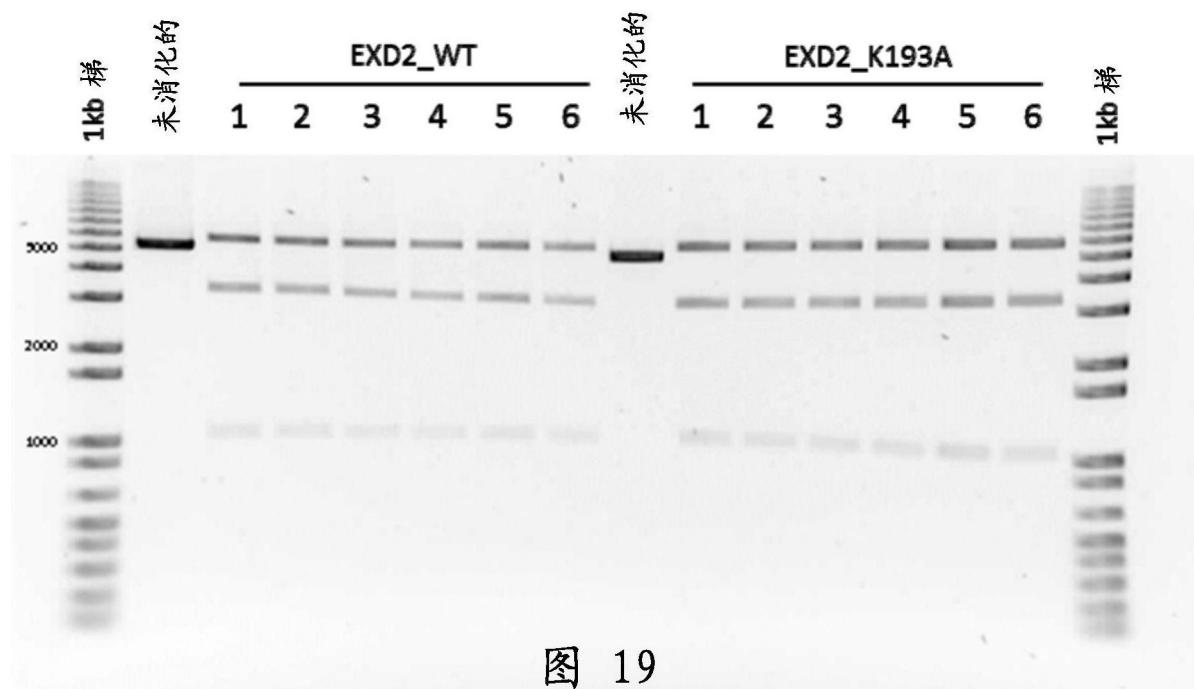


图 19

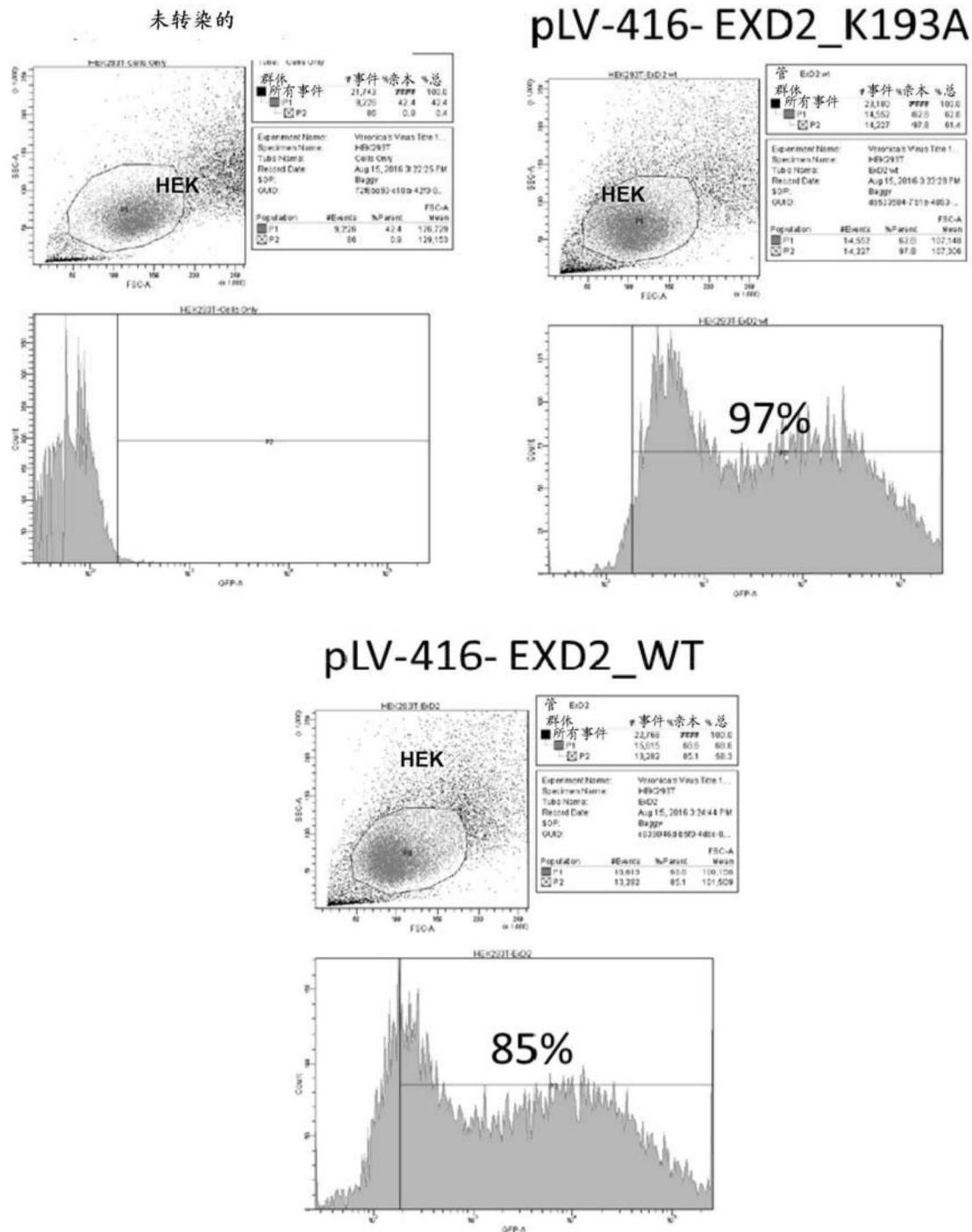


图20

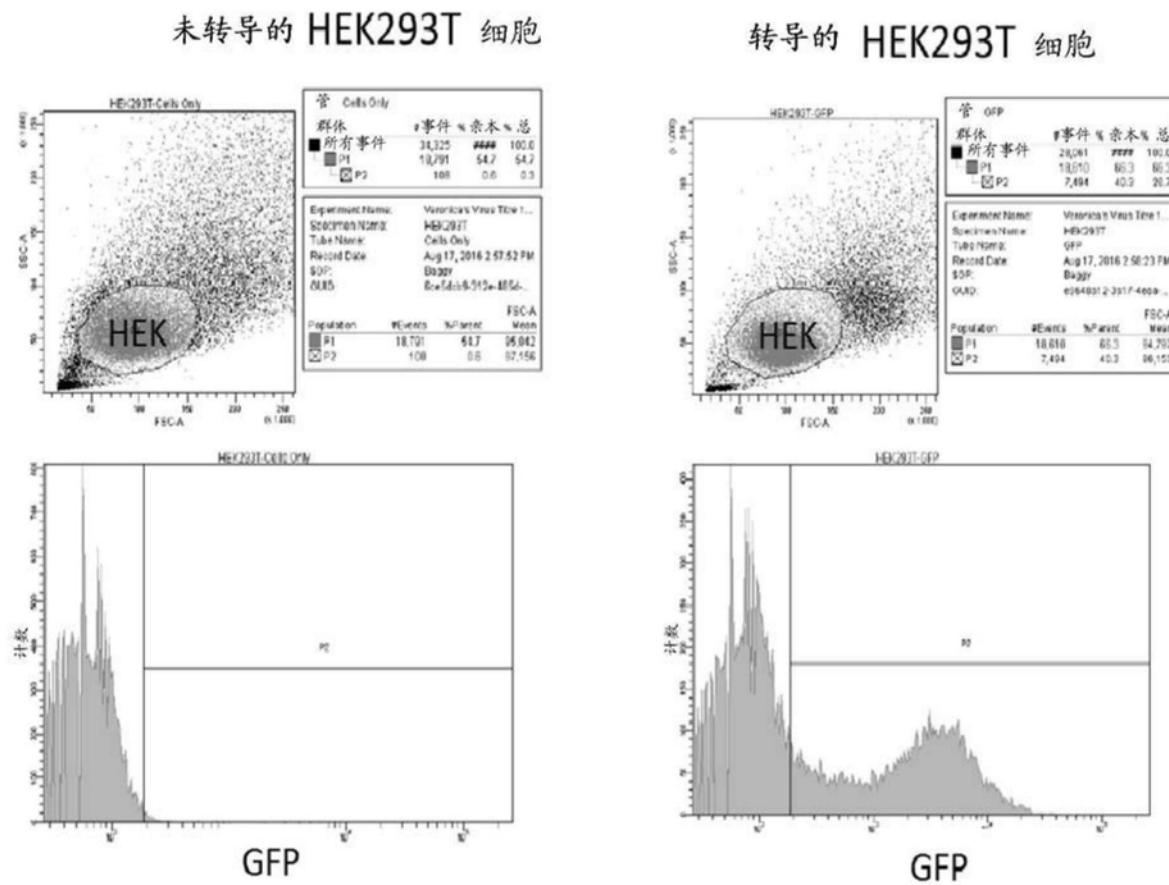
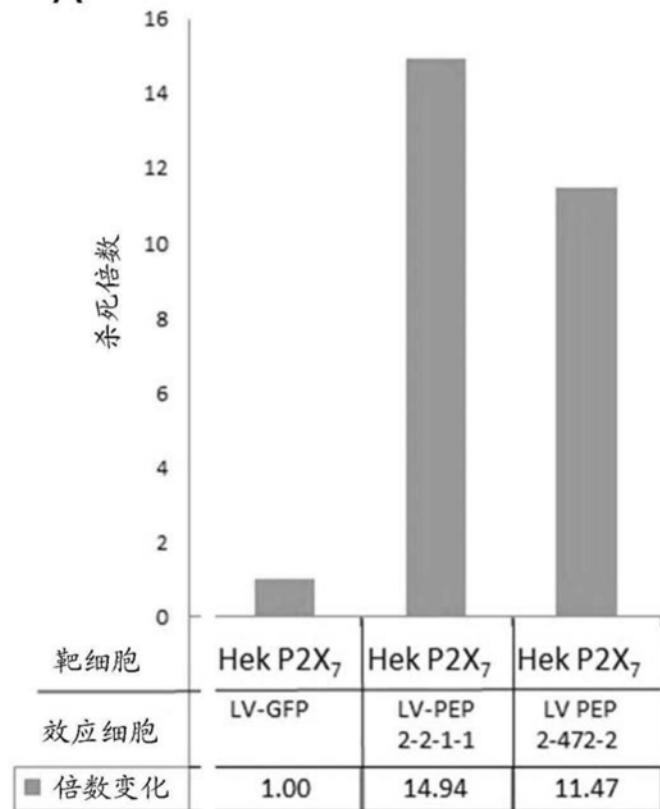


图21

A



B

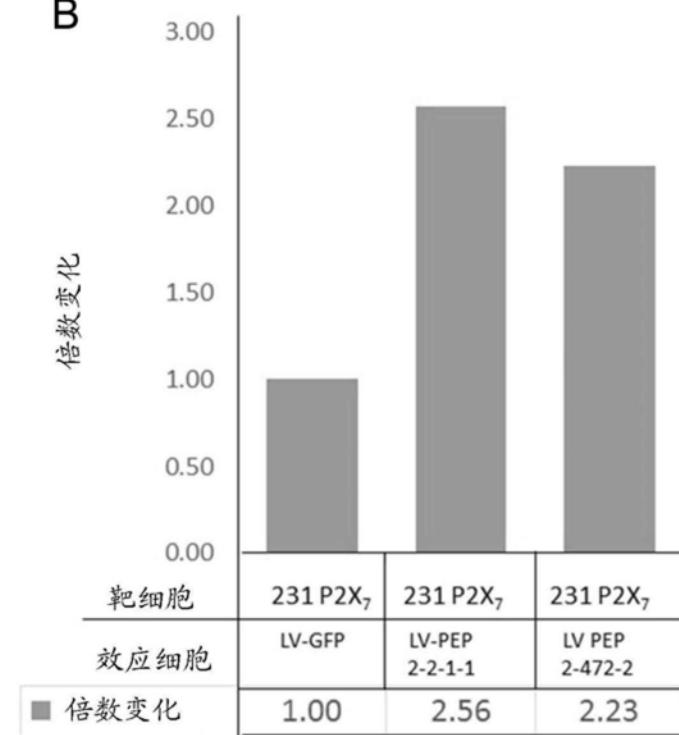


图22