



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119013396 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 22

(21) 申请号 202280088910.2

(22) 申请日 2022.11.14

(30) 优先权数据

63/279,398 2021.11.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/081841 2022.11.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/084095 EN 2023.05.19

(71) 申请人 汉莎生物制药股份有限公司

地址 瑞典隆德市

(72) 发明人 拉古韦尔·兰加纳坦

罗伯特·博克曼

安娜·卡琳·罗伯逊

克里斯蒂安·凯尔曼

詹彼得罗·多蒂

(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224

专利代理师 郑元博

(51) Int.Cl.

C12N 9/52 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书92页 附图25页

(54) 发明名称

增强过继性细胞转移免疫疗法的方法

(57) 摘要

本发明涉及通过施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质来增强靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的方法。

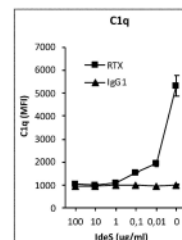


图1a

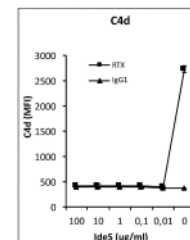


图1b

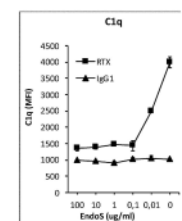


图1c

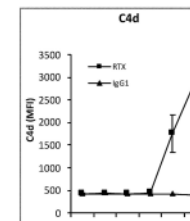


图1d

1. 一种提高靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法对患者益处的方法,包括将具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与过继性细胞转移免疫疗法联合施用。

2. 一种治疗癌症的方法,包括将具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法联合施用。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,在施用所述过继性细胞转移免疫疗法之前施用所述具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,或者其中在施用所述过继性细胞转移免疫疗法之后施用所述具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。

4. 一种治疗癌症的方法,包括向先前接受过和/或计划接受过靶向免疫球蛋白轻链的继性细胞转移免疫疗法的患者施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。

5. 一种治疗癌症的方法,包括向先前接受过和/或计划接受具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质的患者施用靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法。

6. 一种治疗抗体介导的自身免疫疾病的方法,其中治疗包括向先前接受过和/或计划接受具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质的患者施用靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法;

可选地,其中所述抗体介导的自身免疫疾病选自以下组成的组:幼年型关节炎(特别是幼年特发性关节炎)、类风湿性关节炎、全身性苔藓粘液性水肿(硬化性粘液性水肿)、格雷夫斯病、IgA驱动的大疱性皮肤病、IgG4驱动的大疱性类天疱疮、舍格伦综合征和狼疮性乳腺炎。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法包括施用表达嵌合抗原受体或T细胞受体的T细胞、自然杀伤细胞或树突细胞。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述嵌合抗原受体或T细胞受体包含结合结构域,例如scFv,所述结合结构域特异性结合免疫球蛋白轻链,例如人 κ 免疫球蛋白轻链或人 λ 免疫球蛋白轻链。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述方法增加在所述过继性细胞转移免疫疗法中施用的细胞的活性、存活和/或增殖。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述方法减少所述过继性细胞转移免疫疗法中施用的细胞的抗体介导的补体沉积、补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、衰竭、受体激活的细胞死亡、受体阻断和/或免疫球蛋白交联。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述疾病是癌症,并且所述癌症是B细胞肿瘤,例如B细胞淋巴瘤或B细胞白血病。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,

(i) 具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的蛋白质是来自链球菌属细菌如酿脓链球菌的IgG半胱氨酸蛋白酶,可选地其中所述蛋白质是IdeS或IdeZ;或者

(ii) 具有IgG内切糖苷酶活性的蛋白质是来自链球菌属细菌如酿脓链球菌、马链球菌或兽疫链球菌的IgG内切糖苷酶,或来自假结核棒状杆菌、粪肠球菌或脑膜败血伊丽莎白菌的IgG内切糖苷酶,可选地其中所述蛋白质是EndoS、CP40、EndoE或EndoF₂。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中,

(i) 具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的蛋白质是包含以下或由以下组成的多肽:SEQ ID NO:2、4、5或91的氨基酸序列或其具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的片段或变体;或者

(ii) 具有IgG内切糖苷酶活性的蛋白质是包含以下或由以下组成的多肽:SEQ ID NO:90的氨基酸序列或其具有IgG内切糖苷酶活性的片段或变体。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中,

(i) 具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的蛋白质是具有与SEQ ID NO:2、4、5或91至少80%相同、例如至少85%、90%、95%或99%相同的序列的多肽,或者其中所述IgG半胱氨酸蛋白酶包含SEQ ID NO:6-25和55-69中任一个的序列或由SEQ ID NO:6-25和55-69中任一个的序列组成,可选地其中所述序列包括在N端的额外的甲硫氨酸和/或在C端的组氨酸标签;或者

(ii) 具有IgG内切糖苷酶活性的蛋白质是具有与SEQ ID NO:90至少80%相同、例如至少85%、90%、95%或99%相同的序列的多肽。

15. 具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,所述蛋白质用于为患者进行靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法而进行调节或做准备,用于提高靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法对患者的益处,或用于在经受或计划经受靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的患者中降低血浆IgG水平或降低补体或Fc受体与血浆IgG分子的结合。

增强过继性细胞转移免疫疗法的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及对靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的改进。

背景技术

[0002] 过继性细胞转移免疫疗法是一类新建立的疗法,用于治疗包括癌症在内的各种疾病。对于实体瘤或造血源性肿瘤的治疗,在体外扩增了患者的T细胞,这种T细胞在理想情况下对肿瘤相关抗原具有特异性,然后进行回输。T细胞数量、特异性、活性和功效一直是这些治疗的限制因素。肿瘤逃逸的一个典型因素是呈递肿瘤抗原所需的HLA下调。

[0003] 嵌合抗原受体(CAR)转染细胞是基于细胞的免疫疗法的一个新兴领域,它利用了患者自身NK细胞和T细胞的固有的细胞溶解潜能。这些经修饰的自体细胞可以通过导入细胞表面表达的嵌合抗原受体(CAR)来对抗B细胞恶性肿瘤或实体瘤,如结肠癌或乳腺癌,这些嵌合抗原受体从肿瘤特异性scFv结构域中获得其特异性。表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞将细胞毒性T细胞的抗肿瘤活性与源自肿瘤相关抗原特异性抗体的scFv元件的特异性和亲和力相结合。可以从患者身上收获足够数量的自体T细胞,然后用所选CAR进行体外转染。进一步扩增提供了大量不依赖于HLA的肿瘤特异性细胞毒性T细胞。

[0004] 靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法正在开发以用于治疗淋巴恶性肿瘤(Ranganathan et al., Clin Cancer Res, 2021 and Vera et al., Blood 2006;108)。B淋巴细胞表达具有 κ 或 λ 轻链的表面单克隆免疫球蛋白,许多淋巴恶性肿瘤也是如此。因此,靶向由淋巴恶性肿瘤表达的免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法有望具有抗癌活性。这种过继性细胞转移免疫疗法还有望对患者免疫产生最小的不良影响,因为表达其他免疫球蛋白轻链谱系的非癌细胞不会受到过继性细胞转移免疫疗法的影响。

[0005] CAR T细胞(CAR-T)疗法的功效可能受到注射后CAR T细胞在患者体内的存活和持续活性的限制。然而,限制CAR T细胞存活和功效的因素仍然缺乏研究并且有争议。尽管针对CAR T细胞的体液反应在理论上可以引发抗体介导的效应机制,但几乎没有直接证据表明限制CAR T细胞成功的因素是由抗体引起的。相反,由于CD19等靶抗原的丢失导致的肿瘤逃逸(Majzner and Mackall, 2018, Cancer Discov., 8(10):1219-26)、缺乏多功能性的CAR T细胞(Rossi et al., 2018, Blood, 132(8):804-814)、或缺乏肿瘤浸润(Newick et al., 2017, Annu. Rev. Med. 68:139-152)是CAR T细胞成功的关注点。重复输注失败通常归因于小鼠肽呈递(例如由CAR T细胞的HLA上的scFv)引起的T细胞介导的细胞毒性(Turtle et al., -2016, J. Clin. Invest., 126(6):2123-2138)。与此相一致,据说FDA批准的CAR T细胞司利弗明(tisagenlecleucel) (Kymriah)不受先前存在的和诱导的体液免疫的影响(Thudium-Muller, J. Clin. Oncology, 36(15), 2018)。

[0006] 免疫球蛋白G降解型半胱氨酸蛋白酶imlifidase (IdeS) 是一种IgG肽链内切酶,其目前正在开发中以作为肾移植中的快速脱敏治疗。Imlifidase具有高度特异性,可切割IgG的所有亚类。Imlifidase可用于减少在施用抗体药物产品时对Fc受体的竞争(WO 2016/012285)。

[0007] 需要治疗癌症的改进的方法。

发明内容

[0008] 本发明提供了提高靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法对患者益处的方法,该方法包括将具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与过继性细胞转移免疫疗法联合施用。发明人已经确定,靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的功效可能会因血浆中的免疫球蛋白对细胞的刺激而降低,从而导致细胞衰竭和功能减退。此外,转移细胞(例如CAR-T细胞)的有限存活和持续活性可能限制靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的功效。发明人已经在实施例展示了具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可以去除可溶性免疫球蛋白和/或使可溶性免疫球蛋白失活,减少肿瘤外细胞刺激,并因此提高抗癌活性。此外,靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的疗效可能因细胞表面受体与可溶性免疫球蛋白结合而降低,从而阻断过继性细胞转移免疫疗法与靶肿瘤细胞之间的相互作用。具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可能有效消化可溶性抗体并增加受体与其在肿瘤上的靶标的结合。发明人还在实施例中表明,具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可以保护转移细胞。特别是,发明人已经确认了细胞表面受体特异性抗体(包括先前存在的抗体和在给药转移细胞后产生的抗体)可以缩减转移细胞的潜力,并且转移细胞的治疗效果将受益于通过对接受者的调节来去除抗体效应功能。靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法所结合的可溶性抗体也可能对转移细胞产生类似的有害作用。因此,施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可以提高转移细胞的存活和活性,并提供改进的过继性细胞转移免疫疗法治疗。发明人还确认了细胞表面受体特异性抗体(例如针对CAR-T细胞和其他基于细胞的治疗剂的受体构建体的细胞表面受体特异性抗体)可干扰受体与其靶蛋白之间的相互作用,而具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质对于消化抗体和增加受体与其靶标的结合是有效的。

[0009] 如实施例中所示,用IgG半胱氨酸蛋白酶imlifidase (IdeS) 治疗可以减少或阻止在可溶性免疫球蛋白存在下靶向免疫球蛋白轻链的CAR-T细胞产生细胞因子。如实施例中进一步证实的,用IgG半胱氨酸蛋白酶imlifidase (IdeS) 和IgG内切糖苷酶EndoS进行治疗减轻了针对CAR-T细胞和其他基于细胞的治疗剂的抗体的一些限制性效应功能。因此,本发明提供了提高靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法对患者益处的方法,该方法包括将具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与过继性细胞转移免疫疗法联合施用。在优选实施方式中,本发明提供了治疗癌症特别是B细胞肿瘤的方法,包括将具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法联合施用。

[0010] CAR-T疗法和其他靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的一个限制因素可能是抗 κ 和抗 λ CAR构建体与血浆中的免疫球蛋白结合。这可能会导致肿瘤外CAR-T细胞受到刺激,从而导致细胞衰竭和功能减退。因此,在患者体内存在可溶性免疫球蛋白的情况下,CAR-T可能会更快衰竭,并且无法达到最大的肿瘤细胞毒性。此外,可溶性免疫球蛋白可以阻断CAR-T疗法与其在肿瘤细胞上的靶标之间的相互作用。根据本发明,IgG半胱氨酸蛋白酶和IgG内切糖苷酶可用于减少血浆免疫球蛋白对CAR-T细胞的肿瘤外刺激和结合。即使

血浆免疫球蛋白没有被完全破坏(例如留下抗体片段),血浆免疫球蛋白的任何切割都会降低其稳定性和半衰期,从而减少其对CAR-T细胞的有害影响。此外,免疫球蛋白的切割可能会阻止CAR和FcγR之间的交联,否则该交联可能会导致肿瘤外激活和衰竭。

[0011] CAR-T疗法和其他过继性细胞转移免疫疗法的另一个限制因素可能是天然存在的针对CAR构建体的先前存在的抗体通过不同的抗体介导的效应机制影响它们的功效,这些效应机制如补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、强直刺激导致的衰竭、或受体激活诱导的细胞死亡。在注射后,此类抗体可降低患者体内CAR T细胞的存活和持续活性。输注的CAR-T细胞甚至可能诱导针对嵌合受体的抗体水平升高,从而防止CAR在第一次治疗过程中与其靶细胞的相互作用,并限制它们的扩增和持久性。由于抗药物抗体(ADA)水平增加且亲和力可能更高,因此第二轮治疗的成功可能更具挑战性。尽管CAR T细胞是自体来源的,但嵌合受体引入的变化和T细胞转染过程中病毒抗原的表达使CAR T细胞容易受到宿主免疫反应的攻击。一些免疫原性部分可以是受体组件之间的连接区域,但最突出的是scFv部分,例如,在CAR-T开发的早期阶段,scFv部分取自肿瘤特异性小鼠IgG。尽管随后的CAR构建体通常使用人源化IgG来减少外源表位的数量,但这些scFv仍然在抗原结合结构域中包含新表位(neo-epitope)。已经表明,这些外源表位可以是细胞宿主T细胞反应的抗原,从而限制CAR T细胞的存活(Harding et al., 2010, MAbs, 2(3):256-65, Meunier et al., 2019, Cell.&Mol.Immunology)。相反,实施例中的数据表明,具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可以增加转移细胞的存活和活性,并通过细胞表面受体特异性抗体的失活提供改进的治疗。靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法所结合的可溶性抗体也可以激活针对转移细胞的类似的抗体介导的效应机制,可以使用根据本发明的具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质来减少这些负面影响。

[0012] 转移细胞(如CAR T细胞)的活性、扩增和存活可能受抗体影响的可能的机制是不同的。例如,CAR特异性抗体可以借助补体沉积CDC和/或ADCP促进CAR T细胞的破坏。此外,与细胞表面受体结合的可溶性抗体也可以通过相同机制促进CAR-T细胞的破坏。这些例子表明,具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可有效缓解这些过程,从而改进过继性细胞转移免疫疗法。抗体本身与受体的结合也可能导致ADCC、衰竭或受体激活诱导的细胞死亡。具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质也将可用于减轻这些过程。

[0013] 鉴于这些发展,本发明提供了提高靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法对患者益处的方法,该方法包括将具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法联合施用。优选地,免疫疗法是癌症疗法,更优选地是B细胞肿瘤疗法。在其他实施方式中,免疫疗法是抗体介导的自身免疫疾病疗法。可选地,疾病选自以下组成的组:幼年型关节炎(特别是幼年特发性关节炎)、类风湿性关节炎、全身性苔藓粘液性水肿(硬化性粘液性水肿)、格雷夫斯病、IgA驱动的大疱性皮肤病、IgG4驱动的大疱性类天疱疮、舍格伦综合征和狼疮性乳腺炎。

[0014] 在某些实施方式中,在过继性细胞转移免疫疗法之前施用蛋白质。在先施用蛋白质可从血浆中去除免疫球蛋白和/或使免疫球蛋白失活,并在施用时使细胞的抗癌活性最大化。实施例表明IdeS和EndoS有效地使先前存在的抗体失活,例如,在添加补体来源或效

应细胞之前使用IdeS和EndoS是有效的。实施例还表明,健康个体和未施用过继性细胞转移免疫疗法的HLA致敏患者的血清中存在的抗体能够结合受体构建体和例如CAR T细胞的细胞并介导有害作用(例如ADCP、ADCC和干扰靶标结合(例如,此类同种异体抗体可由怀孕或输血引起)),所有这些都可以通过IdeS治疗来减少。在某些实施方式中,在施用过继性细胞转移免疫疗法之后施用蛋白质。实施例表明IdeS和EndoS可有效使诱导抗体失活,因为当在抗血小板特异性抗体后施用IdeS和EndoS时免疫性血小板减少症减少。实施例还表明,人血清中存在的同种异体抗体会对过继性细胞转移免疫疗法细胞(例如CAR-T细胞)产生负面影响,并且本发明的蛋白质可以减少或防止此类负面影响。过继性细胞转移免疫疗法可以诱导此类同种异体抗体,因此当本发明的蛋白质在施用过继性细胞转移免疫疗法后施用时可能有用。

[0015] 本发明还提供了提高过继性细胞转移免疫疗法对患者益处、延长作为过继性细胞转移的一部分施用的细胞的存活和/或增强其增殖、为患者进行过继性细胞转移免疫疗法而进行调节或做准备、在经受或计划经受过继性细胞转移免疫疗法的患者中降低血浆IgG水平或降低补体和/或Fc受体与血浆IgG分子的结合的方法,其中该方法包括施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。本发明多肽的实施例中显示的效果将在此类方法中提供显著益处。优选地,免疫疗法是癌症疗法,更优选地是B细胞肿瘤疗法。

[0016] 本发明还提供了用于增加过继性细胞转移疗法的效力或增加过继性细胞转移疗法的细胞表面受体与其靶标之间的结合的方法,该方法包括在靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法之前、之后或同时施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。实施例证明本发明的多肽有效增加这种效力和结合。在优选的此类实施方式中,靶标是 κ 轻链或 λ 轻链,并且优选地细胞表面受体是抗 κ 或抗 λ CAR。

[0017] 在本发明的任何方法的某些实施方式中,具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质通过去除血浆中被过继性细胞转移免疫疗法结合并导致细胞衰竭的免疫球蛋白和/或使其失活,而提高了过继性细胞转移免疫疗法对患者的益处或改善了癌症的治疗。此外,在本发明的任何方法的某些实施方式中,具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质通过去除抑制过继性细胞转移疗法的细胞表面受体与其靶标的结合的IgG抗体提高了过继性细胞转移免疫疗法对患者的益处或改善了癌症的治疗。所述抗体可以与细胞表面受体、特别是CAR结合,或者可以与CAR衔接子分子结合,或者可以与靶标本身结合,并且可以在空间上阻碍受体与其靶标之间的结合。

[0018] 在优选的实施方式中,本发明的方法使用IgG半胱氨酸蛋白酶。在尤其优选的实施方式中,IgG半胱氨酸蛋白酶是IdeS或IdeZ多肽,最优选是IdeS多肽,例如具有与SEQ ID NO:2、4、5或91至少80%相同、例如至少85%、90%、95%或99%相同的序列的多肽。实施例表明此类多肽有效保护细胞并去除循环免疫球蛋白和/或使循环免疫球蛋白失活。

[0019] 在其他实施方式中,IgG内切糖苷酶是EndoS多肽,例如具有与SEQ ID NO:90至少80%相同、例如至少85%、90%、95%或99%相同的序列的多肽。实施例表明此类多肽有效保护细胞并去除循环免疫球蛋白和/或使循环免疫球蛋白失活。

[0020] 在本发明尤其优选的实施方式中,该方法包括将IdeS多肽与靶向免疫球蛋白轻链的CAR-T疗法联合施用,优选地用于治疗B细胞肿瘤。

[0021] 在尤其优选的实施方式中,本发明的方法包括在过继性细胞免疫疗法之前施用

IdeS多肽,例如向计划接受靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞免疫疗法的患者施用IdeS多肽。此类方法将减少血浆中的免疫球蛋白,否则免疫球蛋白可能会耗尽并降低细胞疗法的效果,或者可能阻断细胞疗法与其在肿瘤细胞上的靶标之间的相互作用。

[0022] 本发明还提供用于本发明的方法的组合物,特别是药物组合物,其包含具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。

[0023] 在本发明的任何方面的优选实施方式中,过继性细胞免疫疗法不表达具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。在本发明的任何方面的优选实施方式中,具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质将以分离的蛋白质或包含分离的蛋白质的组合物的形式施用于患者。这种安排是有利的,因为具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与转移细胞不直接相关联,因此不太可能切割肿瘤细胞表达的免疫球蛋白轻链。过继性细胞免疫疗法和具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质即使同时施用,也可以分别地以分开的组合物形式施用。这种方法预计特别有效,例如因为它们可以提供血浆免疫球蛋白的全身去除或失活,以使施用的过继性细胞免疫疗法的活性最大化。

[0024] 在本发明的某些实施方式中,具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质用于使过继性细胞免疫疗法所针对的可溶性免疫球蛋白失活,而不适用于使针对过继性细胞免疫疗法的抗药物抗体失活。在某些实施方式中,根据本发明治疗的患者不具有针对过继性细胞免疫疗法的抗药物抗体,或者不预期或怀疑具有此类抗体。

[0025] 在下面编号的段落中提供了本发明的其他实施方式。

[0026] 1、一种提高靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法对患者益处的方法,包括将具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与过继性细胞转移免疫疗法联合施用。

[0027] 2、一种治疗癌症的方法,包括将具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法联合施用。

[0028] 3、根据前述任意实施方式的方法,其中,在施用所述过继性细胞转移免疫疗法之前施用所述具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,或者其中在施用所述过继性细胞转移免疫疗法之后施用所述具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,或者其中在施用第二或后续过继性细胞转移免疫疗法之前施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。

[0029] 4、一种治疗癌症的方法,包括向先前接受过和/或计划接受靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的患者施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。

[0030] 5、一种治疗癌症的方法,包括向先前接受过和/或计划接受具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质的患者施用靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法。

[0031] 6、一种治疗抗体介导的自身免疫疾病的方法,其中治疗包括向先前接受过和/或计划接受具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质的患者施用靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法;

[0032] 可选地,其中所述抗体介导的自身免疫疾病选自以下组成的组:幼年型关节炎

(特别是幼年特发性关节炎)、类风湿性关节炎、全身性苔藓粘液性水肿(硬化性粘液性水肿)、格雷夫斯病、IgA驱动的大疱性皮肤病、IgG4驱动的大疱性类天疱疮、舍格伦综合征和狼疮性乳腺炎。

[0033] 7、根据前述任意实施方式的方法,其中,所述过继性细胞转移免疫疗法包括施用表达嵌合抗原受体或T细胞受体的T细胞、自然杀伤细胞或树突细胞。

[0034] 8、根据实施方式7的方法,其中,所述嵌合抗原受体或T细胞受体包含结合结构域,例如scFv,所述结合结构域特异性结合免疫球蛋白轻链,例如人 κ 免疫球蛋白轻链或人 λ 免疫球蛋白轻链。

[0035] 9、根据前述任意实施方式的方法,其是治疗癌症的方法,其中癌症是B细胞肿瘤,例如B细胞淋巴瘤或B细胞白血病。

[0036] 10、根据实施方式9的方法,其中癌症选自以下组成的组:前体B急性淋巴细胞白血病/淋巴母细胞淋巴瘤(LBL)、B细胞急性淋巴细胞白血病;B细胞慢性淋巴细胞白血病(CLL);小淋巴细胞淋巴瘤;B细胞幼淋巴细胞白血病;淋巴浆细胞淋巴瘤/免疫细胞瘤;套细胞淋巴瘤;滤泡性淋巴瘤;粘膜相关淋巴组织(MALT)型结外边缘区B细胞淋巴瘤;结节边缘区B细胞淋巴瘤;脾边缘区淋巴瘤;毛细胞白血病;浆细胞瘤/浆细胞骨髓瘤;弥漫性大B细胞淋巴瘤(如原发性纵隔B细胞淋巴瘤)、伯基特淋巴瘤、伯基特样淋巴瘤;原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤和原发性眼内淋巴瘤。

[0037] 11、根据前述任意实施方式的方法,其中,所述方法增加了在过继性细胞转移免疫疗法中施用的细胞的活性。

[0038] 12、根据前述任意实施方式的方法,其中,所述方法增加在所述过继性细胞转移免疫疗法中施用的细胞的存活和/或增殖。

[0039] 13、根据前述任意实施方式的方法,其中,所述方法减少在过继性细胞转移免疫疗法中施用的细胞的抗体介导的补体结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、衰竭和/或受体激活的细胞死亡。

[0040] 14、根据前述任意实施方式的方法,其中:

[0041] (i) 具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的蛋白质是来自链球菌属细菌如酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的IgG半胱氨酸蛋白酶,可选地其中所述蛋白质是IdeS或IdeZ;或者

[0042] (ii) 具有IgG内切糖苷酶活性的蛋白质是来自链球菌属细菌如酿脓链球菌、马链球菌(*Streptococcus equi*)或兽疫链球菌(*Streptococcus zooepidemicus*)的IgG内切糖苷酶,或来自假结核棒状杆菌(*Corynebacterium pseudotuberculosis*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)或脑膜败血伊丽莎白菌(*Elizabethkingia meningoseptica*)的IgG内切糖苷酶,可选地其中所述蛋白质是EndoS、CP40、EndoE或EndoF₂。

[0043] 15、根据实施方式14的方法,其中,

[0044] (i) 具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的蛋白质是包含以下或由以下组成的多肽:SEQ ID NO:2、4、5或91的氨基酸序列或其具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的片段或变体;或者

[0045] (ii) 具有IgG内切糖苷酶活性的蛋白质是包含以下或由以下组成的多肽:SEQ ID NO:90的氨基酸序列或其具有IgG内切糖苷酶活性的片段或变体。

[0046] 16、根据实施方式14的方法,其中,

[0047] (i) 具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的蛋白质是具有与SEQ ID NO:2、4、5或91至少80%相同、例如至少85%、90%、95%或99%相同的序列的多肽,或者其中所述IgG半胱氨酸蛋白酶包含SEQ ID NO:6-25和55-69中任一个的序列或由SEQ ID NO:6-25和55-69中任一个的序列组成,可选地其中所述序列包括在N端的额外的甲硫氨酸和/或在C端的组氨酸标签;或者

[0048] (ii) 具有IgG内切糖苷酶活性的蛋白质是具有与SEQ ID NO:90至少80%相同、例如至少85%、90%、95%或99%相同的序列的多肽。

[0049] 17、一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于为患者进行靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法而进行调节或做准备。

[0050] 18、一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于提高靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法对患者的益处。

[0051] 19、一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于在经受或计划经受靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的患者中降低血浆IgG水平或降低补体或Fc受体与血浆IgG分子的结合。

附图说明

[0052] 图1:IdeS或EndoS治疗可以避免抗体靶向Daudi细胞的C1q和C4d沉积。Daudi细胞与RTX(或IgG1同种型对照)以及滴定量的IdeS(A+B)或EndoS(C+D)一起孵育约2小时,然后添加人血清补体再孵育2小时。将细胞等分并用抗人C1q(A+C)或C4d(B+D)染色,然后用SA-PE进行最后的检测步骤。使用Accuri C6流式细胞仪在FL2中分析细胞。描绘了MFI值。

[0053] 图2:可以用IdeS或EndoS防止或改善ADCC。CD20阳性Daudi细胞与RTX(从0.2至50 μ g/ml进行滴定)以及50 μ g/ml IdeS(正方形)、EndoS(三角形)或培养基(菱形)一起孵育。通过添加幼兔血清作为补体来源来诱导CDC。孵育90分钟后,将结果标准化为不含RTX的细胞存活百分比(设置为100%)。使用细胞计数试剂盒8(CCK8)来评估细胞毒性。正常阳性对照组不接受酶处理,仅滴定RTX,这代表RTX在指定浓度下的最大毒性。

[0054] 图3:对经调理(opsonized)的靶细胞进行IdeS处理防止ADCP。钙黄绿素染色的Daudi细胞用滴定的RTX(7.5 μ g/ml降至0.01 μ g/ml)进行调理,并与40 μ g/ml的IdeS(正方形)、EndoS(三角形)或无酶(仅培养基,菱形)一起孵育,然后添加FarRed染色的THP1效应细胞。孵育2小时后固定细胞,并在FL2和FL4中通过流式细胞仪进行分析。门控的FL2阳性细胞设置为100%。该群体进一步分为FL2单阳性和FL2-FL4双阳性细胞,这是THP1吞噬的Daudi细胞的读出。

[0055] 图4:体外IdeS切割的抗PLT抗体不会诱导ITP。单次注射(正方形)后,血小板减少性抗PLT IgG(250 μ g/每只小鼠)在BALB/c小鼠中诱导ITP。单切割的抗PLT IgG(三角形)在相同剂量下仅部分诱导ITP,而完全切割成F(ab')₂和Fc的抗PLT IgG不影响正常血小板水平。小鼠腹膜内接受0.25mg/每只小鼠的纯化的IgG的200 μ l PBS的溶液。第1天使用自动细胞计数器VetScan HM5测定血小板计数。

[0056] 图5:体内IdeS治疗可以防止抗体诱导的ITP。通过单次i.p.注射纯化的完整兔抗小鼠血小板IgG(0.25mg/每只小鼠)使BALB/c小鼠引发ITP。诱导ITP后一小时,以三种不同剂量(0.2、2和20 μ g/每只小鼠)i.v.施用IdeS治疗。“仅PBS”(圆圈)治疗组未接受IdeS,仅接

受抗PLT-IgG作为ITP诱导的阳性对照。仅接受载体溶液的幼稚小鼠(菱形)代表健康对照组。第1天使用自动细胞计数器VetScan HM5测定血小板计数。

[0057] 图6:即使在抗PLT抗体注射后EndoS也能防止小鼠发生ITP。BALB/c小鼠(每组n=6)注射50 μ g抗PLT IgG以引发ITP,或仅注射PBS(圆圈)作为正常血小板水平的对照。30分钟后,进行EndoS治疗性i.p.注射(10、30或90 μ g/每只小鼠)。ITP诱导对照注射PBS(菱形)。24小时后抽血并使用自动细胞计数器VetScan HM5分析血小板计数。

[0058] 图7:鉴定抗CAR特异性抗体——F(ab')₂特异性多克隆抗体与CAR T细胞受体特异性结合。评估多克隆兔抗小鼠F(ab')₂抗体(10 μ g/mL、1 μ g/mL)与原代CAR T细胞的结合,包括:(A)抗CD19 CAR T细胞;和(B)抗BCMA4 CAR T细胞;和(C)模拟转染的T细胞;和(D)表达BCR的Daudi细胞,它们分别作为阴性和阳性对照。使用生物素化抗兔Fc和SA-AF647通过流式细胞术分析检测结合的抗F(ab')₂抗体。类似地,还使用抗CD19 CAR-Jurkat T细胞系(E)(CARJ-ZP005,Creative biolabs)通过FACS分析评估了对多克隆兔抗小鼠F(ab')₂以及抗人F(ab')₂(10 μ g/mL)的结合,以MFI表示。

[0059] 图8:HAMA和抗CD19 CAR Jurkat T细胞同种异体特异性血清的鉴定。(A)使用经过验证的夹心ELISA试剂盒(Biolegend)筛选正常人血清样本(BioIVT)中的人抗小鼠IgG抗体(HAMA)。HAMA阳性血清的阈值设置为>10ng/mL。(B)ELISA筛选的HAMA血清与抗CD19-CAR-Jurkat T细胞一起孵育。Jurkat wt细胞用作CAR阴性染色对照。在与PE缀合的山羊抗人Fc检测抗体孵育后,通过流式细胞术分析细胞。(C)选择HAMA阳性和阴性血清,并通过流式细胞术分析进一步测试HAMA阳性和阴性血清中与抗CD19 CAR-Jurkat T细胞的特异性结合。这些血清与抗CD19 CAR-Jurkat T细胞一起进一步用于检测IgG效应机制。(D)筛选来自HLA致敏患者的血清对抗CD19 CAR-Jurkat T细胞的同种异体反应性。来自OneLambda的血清用作HLAI类阳性对照和阴性对照。

[0060] 图9:Imlifidase处理可防止CAR特异性抗体诱导的ADCP——imlifidase处理防止多克隆抗F(ab')₂抗体对抗CD19 CAR-Jurkat T细胞的ADCP调理作用。对于基于流式细胞术的ADCP分析,靶细胞(包括(A、B)抗CD19 CAR-Jurkat、(D、E) Jurkat wt细胞,以及(C、F)表达CD20和BCR的Daudi细胞)用钙黄绿素-AM染色,然后与指定浓度的经imlifidase处理的兔(A、C、D)抗小鼠F(ab')₂或(B、E、F)抗人F(ab')₂一起孵育。单核吞噬效应细胞系THP-1用CellTrace FarRed染色,然后添加到靶细胞中90分钟。通过流式细胞术评估吞噬作用。双阳性细胞(其反映了被吞噬的靶细胞)的量以占靶细胞的百分比表示。

[0061] 图10:Imlifidase防止同种异体血清调理的抗CD19 CAR-Jurkat T细胞诱导ADCP。在有或没有imlifidase(10 μ g/mL)处理的情况下,将靶细胞抗CD19-CAR-Jurkat细胞用来自(A)健康供者和(B)高度致敏抗HLA患者的血清进行调理。洗涤后,将靶细胞与表达Fc γ RI的报告细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育6小时,以诱导ADCP。作为激活的报告细胞的结果的荧光素酶活性使用发光读取仪进行测量,其中发光信号(RLU)以诱导值的平均倍数变化 $\pm$ SD表示。

[0062] 图11:imlifidase处理防止抗CD19 CAR特异性抗体诱导的ADCC(V158)。在有或没有imlifidase(20 μ g/mL)的情况下,将抗CD19 CAR-Jurkat T细胞用指定浓度的多克隆兔(A)抗小鼠和(B)抗人F(ab')₂特异性抗体来调理。使用高亲和力Fc γ RIIIa(V158)转染的报告细胞(Promega,#G7015)的荧光素酶报告生物测定来量化ADCC的诱导。(C)CAR阴性Jurkat wt细胞在存在/不存在imlifidase的情况下用兔抗人IgG F(ab')₂处理。BCR和CD20阳性

Daudi细胞,代表(D)利妥昔单抗和(E)抗人F(ab')₂特异性抗体对ADCC诱导的阳性靶细胞对照。衍生自激活效应细胞的发光信号(RLU)以诱导值(重复)的平均倍数变化±SD表示。

[0063] 图12:imlifidase处理防止抗CD19 CAR特异性抗体诱导的ADCC(F158)。在有或没有Imlifidase(20μg/mL)的情况下,将抗CD19 CAR-Jurkat T细胞用指定浓度的(A)多克隆兔抗小鼠和(B)抗人F(ab')₂特异性抗体来调理。使用低亲和力Fc γ RIIIa(F158)转染的报告细胞(Promega, #G979A)的荧光素酶报告生物测定来量化ADCC的诱导。(C)CAR阴性Jurkat wt细胞在存在/不存在Imlifidase的情况下用兔抗小鼠IgG F(ab')₂处理。BCR和CD20阳性的Daudi细胞,代表(D)利妥昔单抗和(E)抗人F(ab')₂特异性抗体对ADCC诱导的阳性靶细胞对照。衍生自激活效应细胞的发光信号(RLU)以诱导值(重复)的平均倍数变化±SD表示。

[0064] 图13:通过imlifidase处理可防止HAMA调理的抗CD19 CAR-Jurkat T细胞对ADCC的诱导。使用表达CD16 Fc γ RIIIa高亲和力(V158)等位基因的报告细胞系来测定ADCC诱导。在存在/不存在imlifidase的情况下,将基于鼠mAb FMC63的scFv-CD19-CAR Jurkat细胞系与正常人血清样本(之前通过ELISA测试了针对鼠IgG的HAMA水平)一起孵育,ADCC测定中包括HAMA阳性(184、187、208、250)和HAMA阴性(164)人血清。衍生自激活效应细胞的发光信号(RLU)表示为平均值(重复)±SD。

[0065] 图14:血清的Imlifidase处理改善了靶CD19蛋白与抗CD19 CAR T细胞的结合——可以通过imlifidase处理增加CD19蛋白与暴露于血清的抗CD19 CAR T细胞的结合。在有或没有imlifidase(10μg/mL)的情况下,将抗CD19 CAR-Jurkat T细胞与HAMA阳性和阴性血清样本一起孵育。在接下来的步骤中,将IHAc(1mM)添加到所有样本中以使imlifidase失活。将血清样本与抗CD19 CAR-Jurkat T细胞一起孵育,以使得可能的各IgG F(ab')₂与抗CD19 CAR结合。洗涤后,将重组atto-647N标记的人CD19-Fc蛋白(ATM9269,R&D systems)添加到细胞中,并通过流式细胞术评估抗CD19 CAR和CD19-靶蛋白相互作用。结果以中值荧光强度(FI)表示。

[0066] 图15:靶向免疫球蛋白轻链的CAR-T细胞与可溶性免疫球蛋白体外共培养可见IFN γ 产生的消除。来自两个健康人供者(BC170909和BC170803)的T细胞被转导CD19.CAR、κ.CD28或未转导(NTD)。NTD和CD19.CAR作为阴性对照,当接种可溶性免疫球蛋白时,两种细胞类型预期均不会产生IFN γ。然后将它们接种在血清中,血清中可溶性免疫球蛋白浓度各不相同,范围从无可溶性免疫球蛋白(标记为TCM)到血清中可溶性免疫球蛋白含量为10%、50%或90%,同时存在或不存在IdeS。接种后24小时收集共培养物的上清液,并通过ELISA测量IFN γ 浓度。正如预期的那样,NTD和CD19.CAR在任何接种条件下均未产生IFN γ。在存在可溶性免疫球蛋白存在的情况下,κ.CD28(图中标记为K28)确实产生了越来越多的IFN γ。然而,当IdeS被添加到共培养物中时,κ.CD28产生IFN γ 的能力被消除,如图右侧所示。在每组条形中,从左到右的条形显示NTD、CD19、K28。

[0067] 图16:κ.CAR内发现IFN γ 产生受到抑制。用CD19.CAR、κ.CD28、靶向λ轻链的CAR构建体(λ.CD28)转导来自另一位健康供者T细胞,以及NTD。当用可溶性免疫球蛋白浓度增加的条件接种时,κ.CD28继续显示IFN γ 产生,而在存在IdeS的情况下,IFN γ 产生减少。λ.CD28 CAR构建体在有或没有IdeS分子的情况下没有显示出显著差异。这可能是由于共培养中使用的可溶性免疫球蛋白血清的多克隆性质,并且λ轻链的比例可能低于激活λ.CD28 CAR T细胞所需的阈值。在图16A中,在每组条形中,从左到右的条形显示NTD 1E6、NTD 2E6、

NTD 3E6。在图16B中,在每组条形中,从左到右的条形显示CD19.CD28z 1E6、CD19.CD28z 2E6、CD19.CD28z 3E6。在图16C中,在每组条形中,从左到右的条形显示κ.CD28 1E6、κ.CD28 2E6、κ.CD28 3E6。在图16D中,在每组条形中,从左到右的条形显示λ.CD28 1E6、λ.CD28 2E6、λ.CD28 3E6。

[0068] 序列的简要说明

[0069] SEQ ID NO:1是IdeS的完整序列,包括N端甲硫氨酸和信号序列。它也可以NCBI参考序列号WP_010922160.1获得。

[0070] SEQ ID NO:2是IdeS的成熟序列,缺少N端甲硫氨酸和信号序列。它也可以Genbank登录号ADF13949.1获得。

[0071] SEQ ID NO:3是IdeZ的完整序列,包括N端甲硫氨酸和信号序列。它也可以NCBI参考序列号WP_014622780.1获得。

[0072] SEQ ID NO:4是IdeZ的成熟序列,缺少N端甲硫氨酸和信号序列。

[0073] SEQ ID NO:5是杂合IdeS/Z的序列。N端基于缺少N端甲硫氨酸和信号序列的IdeZ。

[0074] SEQ ID NO:6-25是本发明方法中使用的示例性蛋白酶的序列。

[0075] SEQ ID NO:26是IdeS多肽的序列。包含SEQ ID NO:2的序列,带有额外的N端甲硫氨酸和组氨酸标签(内部参考pCAR T124)。

[0076] SEQ ID NO:27是IdeZ多肽的序列。包含SEQ ID NO:4的序列,带有额外的N端甲硫氨酸和组氨酸标签(内部参考pCAR T144)。

[0077] SEQ ID NO:28是IdeS/Z多肽的序列。包含SEQ ID NO:5的序列,带有额外的N端甲硫氨酸和组氨酸标签(内部参考pCAR T145)。

[0078] SEQ ID NO:29是连续序列PLTPEQFRYNN,其对应于SEQ ID NO:3的第63-73位。

[0079] SEQ ID NO:30是连续序列PPANFTQG,其对应于SEQ ID NO:1的第58-65位。

[0080] SEQ ID NO:31是连续序列DDYQRNATEAYAKEVPHQIT,其对应于SEQ ID NO:3的第35-54位。

[0081] SEQ ID NO:32是连续序列DSFSANQEIRYSEVTPYHVT,其对应于SEQ ID NO:1的第30-49位。

[0082] SEQ ID NO:33-55是编码上述蛋白酶的核苷酸序列。

[0083] SEQ ID NO:56-69是用于本发明方法的示例性蛋白酶的序列。

[0084] SEQ ID NO:70是连续序列NQTN,其对应于SEQ ID NO:1的第336-339位。

[0085] SEQ ID NO:71是连续序列DSFSANQEIR YSEVTPYHVT,其对应于SEQ ID NO:1的第30-49位。

[0086] SEQ ID NO:72-86是编码本文公开的多肽的核苷酸序列。

[0087] SEQ ID NO:87是序列SFSANQEIRY SEVTPYHVT,其对应于SEQ ID NO:1的第31-49位。

[0088] SEQ ID NO:88是序列DYQRNATEAY AKEVPHQIT,其对应于IdeZ多肽(NCBI参考序列号WP_014622780.1)的第36-54位。

[0089] SEQ ID NO:89是序列DDYQRNATEAYAKEVPHQIT,其可存在于本发明多肽的N端处。

[0090] SEQ ID NO:90示出了成熟内切糖苷酶S(EndoS)的氨基酸序列。包括分泌信号在内的完整序列可在Genbank登录号AAK00850.1获得。

[0091] SEQ ID NO:91表示具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的多肽,其中所述多肽比IdeZ更有效地切割人IgG。

[0092] SEQ ID NO:92与SEQ ID NO:91相关,除了在SEQ ID NO:91的N端缺失前20个氨基酸外,与SEQ ID NO:91相同。

具体实施方式

[0093] 提高过继性细胞转移免疫疗法对患者的益处的方法

[0094] 本发明提供了提高靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法对患者益处的方法,该方法包括将具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与过继性细胞转移免疫疗法联合施用。发明人已经确定,血浆中的免疫球蛋白可能被靶向免疫球蛋白轻链的转移细胞结合,从而导致衰竭并可能阻断转移细胞与肿瘤上其靶标之间的相互作用。发明人已证明,具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可切割血浆中的免疫球蛋白,有助于维持转移治疗细胞的抗癌活性。因此,施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可增加或维持靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的活性。

[0095] 发明人还已经确定,过继性细胞转移免疫疗法的功效可能会因转移细胞(例如CAR-T细胞)有限的存活和有限的持续活性而降低,并且发明人已经在实施例中展示了具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可以保护转移细胞。特别是,发明人已经确认了细胞表面受体特异性抗体可以缩减转移细胞的潜力,并且转移细胞的治疗效果将受益于通过对接受者的调节来去除抗体效应功能。类似地,靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法所结合的可溶性抗体也可能缩减转移细胞的潜力。因此,施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可以提高转移细胞的存活和活性,并提供改进的治疗。发明人还证明了细胞表面受体特异性抗体可以干扰过继性细胞转移免疫疗法受体与其靶标的结合。因此,施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可以增加过继性细胞转移免疫疗法的效力和效果。

[0096] 在某些实施方式中,本发明提供了一种维持或增加作为靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移的一部分而施用的细胞的活性的方法,该方法包括在过继性细胞转移免疫疗法之前、之后或同时施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。在某些实施方式中,本发明提供延长作为过继性细胞转移的一部分施用的细胞的存活和/或增强其增殖的方法,该方法包括在过继性细胞转移免疫疗法之前、之后或同时施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。

[0097] 在某些实施方式中,本发明提供了一种为患者进行靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法而进行调节或做准备的方法,该方法包括施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。

[0098] 在某些实施方式中,本发明提供了一种在经受或计划经受靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的患者中降低血浆IgG水平或降低补体或Fc受体与血浆IgG分子的结合的方法。

[0099] 在某些实施方式中,本发明提供了一种用于增加靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移疗法的效力的方法,该方法包括在过继性细胞转移免疫疗法之前、之后或同时施用

具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。在某些实施方式中,本发明提供了一种用于增加过继性细胞转移疗法的细胞表面受体与其靶标之间的结合的方法,该方法包括在过继性细胞转移免疫疗法之前、之后或同时施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。

[0100] 在某些实施方式中,提高靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法对患者益处的方法包括施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质和随后施用过继性细胞转移免疫疗法。此类方法将使得血浆中存在的免疫球蛋白被去除和/或失活,以及使得先前存在的抗药物抗体(ADA)在施用细胞之前被蛋白质失活,这将使得细胞具有更好的活性、扩增和存活。ADA可以结合任何细胞疗法的任何部分,包括表达的CAR或TCR或HLA抗原(特别是在同种异体疗法中)。这些实施例表明,诸如IdeS之类的蛋白质对于去除刺激或阻断靶向免疫球蛋白轻链的CAR-T细胞的抗体是有效的。实施例还表明IdeS和EndoS可有效地使先前存在的抗体失活,例如,在添加补体来源或效应细胞之前使用IdeS和EndoS是有效的。实施例还表明,健康个体和未施用过继性细胞转移免疫疗法的HLA致敏患者的血清中存在的抗体能够结合受体构建体和例如CAR T细胞的细胞并介导有害作用(例如ADCP、ADCC和干扰靶标结合),所有这些都可以通过用本发明的蛋白质处理来减少。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于为患者通过靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法治疗而进行调节。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于降低计划接受靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法治疗的患者的血浆IgG水平。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于降低先前为靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的开发提供血液但尚未接受靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的患者的血浆IgG水平。本发明还提供了一种靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法组合物,用于治疗先前接受过具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质施用的患者。

[0101] 在优选实施方式中,提高过继性细胞转移免疫疗法对患者的益处的方法包括在施用过继性细胞转移免疫疗法之前施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。此类方法将允许可溶性血浆免疫球蛋白被切割,使得它们不能刺激和衰竭或阻断免疫球蛋白轻链特异性细胞。因此,转移细胞的活性将得到提高。本发明还提供了具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于改善患者计划接受的过继性细胞转移免疫疗法对患者的益处。本发明还提供了具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于治疗计划接受过继性细胞转移免疫疗法的患者。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于降低计划接受过继性细胞转移免疫疗法治疗的患者的血浆IgG水平。本发明还提供了一种过继性细胞转移免疫疗法组合物,用于治疗先前接受过具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质施用的患者。

[0102] 在某些实施方式中,提高过继性细胞转移免疫疗法对患者益处的方法包括在施用过继性细胞转移免疫疗法之后施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。此类方法将使得先前存在的抗药物抗体(ADA)和过继性细胞转移免疫疗法引起的抗体失活。此类方法还可以使原本可能被转移细胞结合的可溶性抗体失活。转移细胞的扩增和存活将因此得到改善。实施例表明IdeS和EndoS可有效使有害的多克隆抗体和诱导抗体失

活,因为当在抗血小板特异性抗体后施用Ides和EndoS时免疫性血小板减少症减少。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于提高先前施用的过继性细胞转移免疫疗法对患者的益处。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于治疗先前接受过过继性细胞转移免疫疗法的患者。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于降低先前接受过过继性细胞转移免疫疗法治疗的患者的血浆IgG水平。本发明还提供了一种过继性细胞转移免疫疗法组合物,用于治疗计划接受具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质施用的患者。

[0103] 在进一步实施方式中,提高过继性细胞转移免疫疗法对患者益处的方法包括在施用过继性细胞转移免疫疗法剂量之前和之后都施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。此类方法将使得先前存在的抗药物抗体(ADA)和过继性细胞转移免疫疗法引起的抗体失活。此类方法还可以使原本可能被转移细胞结合的可溶性抗体失活。转移细胞的扩增和存活将因此得到改善。

[0104] 在进一步实施方式中,提高过继性细胞转移免疫疗法对患者益处的方法包括在施用第一过继性细胞转移免疫疗法之后和在施用第二过继性细胞转移免疫疗法之前施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。因此,在两剂或更多剂的过继性细胞转移免疫疗法之间施用蛋白质。这种方法将使得转移细胞更好地扩增和存活,因为来自先前注射的任何ADA都将失活。此类方法还可以使原本可能被转移细胞结合的可溶性抗体失活。此外,可能衰竭或阻断转移细胞的可溶性抗体被去除或失活。优选地,在此类实施方式中,第一和第二以及任何随后的过继性细胞转移免疫疗法使用相同或相似的构建体和细胞。在此类实施方式中,相似的构建体或细胞可具有ADA交叉反应性表位。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于治疗先前接受过第一剂过继性细胞转移免疫疗法并且计划接受第二剂过继性细胞转移免疫疗法的患者。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于降低经受过继性细胞转移免疫疗法的多剂量方案的患者的IgG水平。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于提高多剂量方案过继性细胞转移免疫疗法治疗对患者的益处。本发明还提供了一种过继性细胞转移免疫疗法组合物,用于治疗先前已接受过过继性细胞转移免疫疗法组合物的剂量并且先前接受过具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质的施用的患者。

[0105] 在进一步实施方式中,提高过继性细胞转移免疫疗法对患者益处的方法包括在施用两剂或更多剂过继性细胞转移免疫疗法之后施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。此类方法将使得过继性细胞转移免疫疗法引起的抗体失活。此类方法还可以使原本可能被转移细胞结合的可溶性抗体失活。此外,可能衰竭或阻断转移细胞的可溶性抗体被去除或失活。转移细胞的扩增和存活将因此得到改善。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于提高先前以两剂或更多剂施用的过继性细胞转移免疫疗法对患者的益处。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于治疗先前接受过两剂或更多剂过继性细胞转移免疫疗法的患者。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于降低先前接受过两剂或更多剂过继性细胞转移免疫疗法治疗的患者的血浆IgG水

平。

[0106] 在本发明的某些实施方式中,提高过继性细胞转移免疫疗法对患者益处的方法包括多次施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质和多次施用过继性细胞转移免疫疗法。在某些实施方式中,多次施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质包括施用相同的酶。具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质的重复剂量可以间隔任何合适的时间段,例如1-7天、5-7天或6-8天。在某些实施方式中,多次施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质包括施用不同的酶。

[0107] 在本发明的某些实施方式中,提高过继性细胞转移免疫疗法对患者益处的方法包括同时施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质和过继性细胞转移免疫疗法。实施例表明,细胞表面受体特异性抗体可以干扰过继性细胞转移免疫疗法受体与其靶标的结合,但结合可通过本发明蛋白质的治疗而增加,因此同时施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可以提高过继性细胞转移免疫疗法的效力和效果。

[0108] 施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质将降低血浆IgG免疫球蛋白的稳定性、半衰期和Fc效应功能,从而降低其对免疫治疗细胞的有害影响。此外,IgG免疫球蛋白的切割可以防止免疫治疗细胞与FcγR之间的交联,否则该交联可能导致肿瘤外激活和衰竭。在本发明方法的优选实施方式中,施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质会切割患者血浆中存在的所有或几乎所有IgG分子。

[0109] 在本发明方法的优选实施方式中,施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质使存在于患者血浆中的所有或基本上所有IgG分子失活。在某些实施方式中,蛋白质以足以消除Fc受体或补体与存在于患者血浆中的所有或基本上所有IgG分子结合的量施用。

[0110] 在本发明的方法的某些实施方式中,施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可去除血液中的抗体或使其失活。在某些实施方式中,淋巴中的抗体也失活。在某些实施方式中,间质液中的抗体也失活。因此,根据本发明从血浆中去除抗体或使抗体失活可以包括从淋巴和/或间质液中去除抗体或使抗体失活。去除淋巴和/或间质液中的抗体或使其失活将延迟血浆抗体的补充,从而更长时间地减少血浆抗体对转移细胞的负面影响。

[0111] 在本发明的其中具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质在过继性细胞转移免疫疗法剂量之前施用的方法中,两次施用间隔了优选足以切割对象血浆中的所有或基本上所有IgG分子的时间间隔。所述间隔通常可以是至少30分钟并且通常可以最多21天。具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质的施用可以与淋巴细胞清除同时(例如在同一天)发生,或者在淋巴细胞清除之前或之后的1-7天发生。在某些实施方式中,蛋白质的施用发生在淋巴细胞清除和施用细胞疗法之间。“基本上所有”通常是指Fc受体和补体与血浆IgG的结合降低至低于施用前存在的水平的30%、20%、15%、10%或5%。例如,如果蛋白质是蛋白酶(如IdeS),则间隔将是试剂切割对象中至少70%、80%、85%、90%或95%的血浆IgG所需的时间,如在对象中通过任何合适的测定法测量的,如通过任何合适的测定法测量的。

[0112] 在本发明的其中具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质在过继性细胞转移免疫疗法剂量之后施用的方法中,该蛋白质优选在转移细胞增殖期间施用,例

如在施用过继性细胞转移免疫疗法的2周内、1周内、2天内、1天内或5小时内。

[0113] 在优选的实施方式中,本发明的方法用于减少先前在过继性细胞转移免疫疗法中施用于患者的细胞的抗体介导的补体沉积、CDC、ADCC、ADCP、衰竭或受体激活的细胞死亡。在优选的实施方式中,本发明的方法用于减少随后在过继性细胞转移免疫疗法中施用于患者的细胞的抗体介导的补体沉积、CDC、ADCC、ADCP、衰竭或受体激活的细胞死亡。在优选的实施方式中,本发明提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于减少先前在过继性细胞转移免疫疗法中施用于患者的细胞的抗体介导的补体沉积、CDC、ADCC、ADCP、衰竭或受体激活的细胞死亡。在其他优选的实施方式中,本发明提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于减少随后在过继性细胞转移免疫疗法中施用于患者的细胞的抗体介导的补体沉积、CDC、ADCC、ADCP、衰竭或受体激活的细胞死亡。在优选实施方式中,ADCC由Fc γ RIIIa (V158) 效应细胞或Fc γ RIIIa (F158) 效应细胞介导。

[0114] 在某些实施方式中,本发明的方法包括向具有可检测水平的人抗小鼠抗体 (HAMA) 的患者施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,HAMA是对小鼠免疫球蛋白具有特异性的免疫球蛋白。所述施用可以在过继性细胞转移免疫疗法施用之前、之后或同时进行。实施例表明,患者血清中的HAMA会对过继性细胞转移免疫疗法细胞产生有害影响,但这些影响可以通过用本发明的蛋白质进行治疗来降低或防止。HAMA可在正常个体中因接触鼠抗原而诱发。HAMA的频率和浓度在接受基于鼠mAb的生物制剂的患者中预计会更高,在某些情况下甚至会导致这些治疗剂的部分中和。

[0115] 在本发明的方法中,IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶可以与免疫抑制剂共同施用。在本发明的方法中,蛋白酶优选通过静脉内输注施用,但也可以通过任何合适的途径施用,包括例如皮内、皮下、经皮、肌肉内、动脉内、腹膜内、关节内、骨内、鞘内、心室内或其他适当的施用途径。施用的蛋白酶或内切糖苷酶的量可以为0.01mg/kg BW至2mg/kg BW、0.05至1.5mg/kg BW、0.1mg/kg BW至1mg/kg BW,优选0.15mg/kg BW至0.7mg/kg BW,最优选0.2mg/kg BW至0.3mg/kg BW,特别是0.25mg/kg BW。蛋白质可多次施用于同一对象,前提是对对象的血浆中能够与蛋白质结合的抗药物抗体 (ADA) 的量不超过临床医生确定的阈值。对象的血浆中能够与蛋白酶结合的ADA的量可以通过任何合适的方法确定,例如试剂特异性CAP EIA (ImmunoCAP) 测试或滴度测定。

[0116] 治疗癌症的方法

[0117] 本发明提供了治疗癌症的方法,该方法包括将具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法联合施用。实施例所示的在可溶性免疫球蛋白存在下细胞因子产生和刺激的减少表明,施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可以减少衰竭并增加转移细胞的活性并提供改善的癌症治疗。此外,实施例所示的对细胞的保护表明,施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质可以提高转移细胞的存活和活性,并提供改善的癌症治疗。

[0118] 在优选实施方式中,治疗癌症的方法包括施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质并随后施用靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于为患者通过靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法进行癌症治疗而进行调节。本发明还提供了

一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于降低计划接受过继性细胞转移免疫疗法癌症治疗的患者的血浆IgG水平。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于降低先前为靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的开发提供血液但尚未接受靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法的患者的血浆IgG水平。本发明还提供了一种靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法组合物,用于治疗先前接受过具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质施用的患者的癌症。

[0119] 在某些实施方式中,治疗癌症的方法包括在施用过继性细胞转移免疫疗法之后施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于提高先前施用的过继性细胞转移免疫疗法对患者的益处。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于治疗先前接受过过继性细胞转移免疫疗法的患者的癌症。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于降低先前接受过过继性细胞转移免疫疗法癌症治疗的患者的血浆IgG水平。本发明还提供了一种过继性细胞转移免疫疗法组合物,用于治疗计划接受具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质施用的患者的癌症。

[0120] 在进一步的实施方式中,治疗癌症的方法包括在施用过继性细胞转移免疫疗法剂量之前和之后都施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。

[0121] 在进一步的实施方式中,治疗癌症的方法包括在施用第一过继性细胞转移免疫疗法之后和在施用第二过继性细胞转移免疫疗法之前施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。优选地,在此类实施方式中,第一和第二以及任何随后的过继性细胞转移免疫疗法使用相同或相似的构建体和细胞。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于治疗先前接受过第一剂过继性细胞转移免疫疗法并且计划接受第二剂过继性细胞转移免疫疗法的患者的癌症。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于降低经受过继性细胞转移免疫疗法的多剂量方案的患者的IgG水平。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于提高多剂量方案过继性细胞转移免疫癌症疗法治疗对患者的益处。本发明还提供了一种过继性细胞转移免疫疗法组合物,用于治疗先前已接受过过继性细胞转移免疫疗法组合物的剂量并且先前接受过具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质的施用的患者的癌症。

[0122] 在进一步的实施方式中,治疗癌症的方法包括在施用两剂或更多剂过继性细胞转移免疫疗法之后施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于提高先前以两剂或更多剂施用的过继性细胞转移免疫疗法对患者的益处。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于治疗先前接受过两剂或更多剂过继性细胞转移免疫疗法的患者的癌症。本发明还提供了一种具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,用于降低先前接受过两剂或更多剂过继性细胞转移免疫疗法癌症治疗的患者的血浆IgG水平。

[0123] 在本发明的某些实施方式中,治疗癌症的方法包括多次施用具有IgG半胱氨酸蛋

白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质和多次施用过继性细胞转移免疫疗法。

[0124] 在本发明的某些实施方式中,治疗癌症的方法包括同时施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质和过继性细胞转移免疫疗法。

[0125] 在本发明的治疗方法中,以足以治愈、缓和或部分阻止癌症或其一种或多种症状的量向已经患有癌症的对象施用蛋白质和过继性细胞转移免疫疗法。这种治疗性治疗可导致癌症的缓解、稳定、转移减少或消除。足以实现这一点的量被定义为“治疗有效量”。对象可以已经被鉴定为患有癌症并且适合通过任何合适的手段进行过继性细胞转移免疫疗法。

[0126] 过继性细胞转移免疫疗法

[0127] 本发明的方法提供来自过继性细胞转移 (ACT) 免疫疗法的增加的益处,并由此提供改进的治疗癌症和其他疾病例如抗体介导的自身免疫疾病的方法。ACT免疫疗法是一种已确立且有效的专门治疗癌症的方法。ACT是将离体生长的细胞 (最常见的是免疫衍生细胞) 被动转移到宿主体内,目的是转移移植物的免疫功能和特征。

[0128] 根据本发明使用的ACT免疫疗法靶向免疫球蛋白轻链。免疫球蛋白轻链可以是 κ 轻链或 λ 轻链。优选地,免疫球蛋白轻链是人免疫球蛋白轻链。ACT免疫疗法通过表达受体构建体 (例如嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR)) 来结合免疫球蛋白轻链,所述受体构建体包含特异性结合免疫球蛋白轻链的结合结构域 (例如scFv)。靶向人免疫球蛋白 κ 轻链的示例性抗体由CRL-1758 (ATCC) 杂交瘤产生。靶向人免疫球蛋白 λ 轻链的示例性抗体由HP6054 (ATCC) 杂交瘤产生。靶向 κ 轻链和 λ 轻链的其他抗体也很容易获得。可以利用这些抗体的可变区容易地生成与人免疫球蛋白的 κ 轻链或 λ 轻链结合的scFv或替代构建体。

[0129] ACT可以是自体的 (例如,通过白细胞去除术分离,在施用前大约4周进行转导和选择),这在过继性T细胞疗法中很常见,或者ACT可以是同种异体的,在这种情况下,本发明的方法可以通过去除识别同种异体细胞上表达的受体和/或其他抗原的抗体来改善ACT。此外,ACT可以是异种的。在优选的实施方式中,ACT是自体的。

[0130] ACT还可以包括自体肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的转移,其可用于治疗患有晚期实体瘤 (例如黑色素瘤) 和血液恶性肿瘤的患者。

[0131] ACT还可以包括从健康供者“现成 (off-the-shelf)”分离、制备和储存 (例如,冷冻) 的同种异体淋巴细胞的转移,该同种异体淋巴细胞可用于治疗患有晚期实体瘤 (例如黑色素瘤) 和血液恶性肿瘤的患者。

[0132] 本发明的过继性细胞免疫疗法可以包括施用表达嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR) 的细胞,或者可以包括肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)。表达识别抗原的CAR/TCR的细胞群可以包括活化的T细胞群或自然杀伤 (NK) 细胞群或树突细胞群。树突细胞能够呈递抗原,以及直接杀死肿瘤。树突细胞可以表达,例如,抗 κ CAR或抗 λ CAR。表达CAR/TCR的细胞群可以包括基因编辑的细胞群。

[0133] ACT可以使用例如T细胞、自然杀伤 (NK) 细胞、 δ - γ T细胞、调节性T细胞、树突细胞和外周血单个核细胞的细胞类型。ACT可以使用单核细胞,目的是在接触肿瘤抗原后诱导分化为树突细胞和/或巨噬细胞。

[0134] 根据本发明的优选实施方式,过继性细胞疗法可以是CAR T细胞疗法。可以通过工程改造与癌细胞上表达的 κ 或 λ 轻链特异性结合的所需抗原结合结构域来工程改造CAR T细胞以靶向 κ 或 λ 轻链。在优选的实施方式中,细胞疗法使用造血来源的细胞。实施例证明本发

明的方法对造血来源的细胞特别有效。

[0135] 在优选实施方式中,过继性细胞疗法(优选CAR T细胞疗法)采用靶向 κ 轻链或 λ 轻链的细胞。示例性CAR-T细胞在Ranganathan et al., Clin Cancer Res, 2021和Vera et al., Blood 2006;108中描述。靶向人免疫球蛋白 κ 轻链的示例性抗体由CRL-1758 (ATCC) 杂交瘤产生。靶向人免疫球蛋白 λ 轻链的示例性抗体由HP6054 (ATCC) 杂交瘤产生。靶向 κ 轻链和 λ 轻链的其他抗体也很容易获得。可以使用此类抗体的可变区容易地生成与人免疫球蛋白 κ 轻链或 λ 轻链结合的scFv或替代构建体,例如如Ranganathan et al., Clin Cancer Res, 2021and Vera et al., Blood 2006;108中所描述的。用于本发明的CAR-T构建体可以包括人IgG1CH₂-CH₃区和铰链以及TCR/CD3复合物的 ζ 链,以及可选的CD28结构域。用于本发明的CAR-T构建体可以包括人CD8a铰链和跨膜结构域以及CD28共刺激内结构域和TCR/CD3复合物的胞质内CD3 ζ 链。优选的过继性细胞转移免疫疗法是CAR T细胞疗法(例如,自体细胞疗法和同种异体细胞疗法)。优选的是用于治疗血液恶性肿瘤如ALL、AML、NHL、DLBCL和CLL的CAR T细胞疗法。批准的CAR T细胞疗法的例子包括但不限于用于治疗NHL和DLBCL的 KYMRIA[®] (tisagenlecleucel) 和用于治疗NHL的 YESCARTA[®] (axicabtagene ciloleucel)。

[0136] 根据本发明的某些方面,表达CAR/TCR或TIL的细胞群可以是自体细胞、源自另一人供者的同种异体细胞或源自不同物种的动物的异种细胞。

[0137] 根据本发明的某些方面,表达CAR/TCR或TIL的细胞群可通过白细胞去除术分离、在施用前大约4周进行转导和选择,如在自体干细胞的情况下,或者可以从健康供者中分离出来并预先制备然后储存,例如冷冻制剂,以用于一名或多名患者,就像所谓的“现成”同种异体CAR-T干细胞疗法一样。

[0138] 根据本发明的某些方面,表达CAR/TCR的细胞群可以包括活化的T细胞群或自然杀伤(NK)细胞群或表达识别抗原的CAR/TCR的树突细胞群。树突细胞能够呈递抗原,以及直接杀死肿瘤。

[0139] CAR T细胞可包含能够靶向两种或更多种不同抗原(即,双特异性或二价、三特异性或三价、四特异性等)的抗原结合结构域。因此,CAR T细胞可以包含与第一抗原结合的第一抗原结合结构域和与第二抗原结合的第二抗原结合结构域(例如,串联CAR)。例如,CAR T细胞可包含免疫球蛋白轻链结合结构域和CD19或CD22结合结构域,因此可识别并结合免疫球蛋白轻链和CD19或CD22。或者进一步地,CAR T细胞可以包含免疫球蛋白轻链结合结构域和CD20结合结构域并且因此可以识别并结合免疫球蛋白轻链和CD20。

[0140] 或者,细胞群中的每个细胞或整个细胞群可包含多于一个不同的CAR T细胞(例如,构建体),其中每个CAR T细胞构建体可识别不同的抗原。例如,CAR T细胞群可以靶向三种抗原。

[0141] 根据本发明的某些方面,细胞群,无论是自体的还是同种异体的,都可以使用基因编辑技术进行工程改造,例如通过CRISPR/cas9(成簇的规则间隔的短回文重复序列/CRISPR相关蛋白9)、锌指核酸酶(ZFN)或转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)。这些在基因工程领域得到认可和实践的技术能够选择性地编辑、破坏或插入靶序列,以修改感兴趣的细胞的基因组。因此,可以编辑本发明中实施的用于过继转移的分离的自体或同种异体细胞,以缺失或替换已知基因或序列。例如,同种异体T细胞群中的T细胞受体(TCR)可以在

CAR-T转导之前或之后被缺失或替换,作为消除受者患者的移植物抗宿主病的一种手段。

[0142] 根据本发明的某些方面,作为过继性细胞转移免疫疗法施用的细胞群可以包含表达CAR的T细胞、NK细胞或树突细胞群,其中CAR包含细胞外抗体或抗体片段,该细胞外抗体或抗体片段包括人源化抗 κ 或 λ 轻链结合结构域、跨膜结构域和一个或多个细胞质共刺激信号传导结构域。

[0143] 在本发明的某些实施方式中,作为过继性细胞转移免疫疗法施用的细胞群表达T细胞受体(TCR)。TCR是抗原特异性分子,负责识别抗原呈递细胞或任何有核细胞(例如,人体所有细胞,红细胞除外)表面的主要组织相容性复合体(MHC)产物中呈递的抗原肽。相反,抗体通常识别可溶性抗原或细胞表面抗原,并且不需要通过MHC呈递抗原。该系统通过T细胞的TCR赋予T细胞识别细胞表达的全部细胞内抗原阵列(包括病毒蛋白)的潜在能力,这些细胞内抗原在细胞内加工成短肽,与细胞内MHC分子结合,并递送至表面作为肽-MHC复合物。该系统几乎允许任何外源蛋白质(例如,突变的癌症抗原或病毒蛋白质)或异常表达的蛋白质作为T细胞的靶标。

[0144] 根据本发明的某些方面,工程改造的CAR细胞可以是来自健康供者的同种异体的细胞,并且可以通过基因编辑技术例如CRISPR/cas9、ZFN或TALEN被进一步工程改造以消融或替换内源性TCR,其中缺失内源性TCR以消除CAR驱动的移植物抗宿主病。

[0145] 根据本发明的某些方面,可以从对象收集自体细胞(例如,T细胞或NK细胞或树突细胞)。这些细胞可以从许多来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。根据本发明的某些方面,可以使用通常从健康供者分离的同种异体或异种细胞。当T细胞、NK细胞、树突细胞或多能干细胞是同种异体或异种细胞时,可以使用本领域可用的许多细胞系。

[0146] 可以使用本领域技术人员已知的许多技术,例如Ficoll™分离,以从收集自对象的血液单位中获得细胞。根据本发明的某些方面,来自个体循环血的细胞可通过单采术获得。单采术产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、B细胞、单核细胞、粒细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。

[0147] 可以使用针对阴性选择细胞特有的表面标志物的抗体的组合来实现通过阴性选择富集细胞群。一种方法是通过负磁免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,所述负磁免疫粘附或流式细胞术使用针对阴性选择的细胞上存在的细胞表面标志物的单克隆抗体混合物。例如,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。根据本发明的某些方面,可能需要富集或阳性选择细胞群。例如,调节性T细胞的阳性富集可以使用CD4⁺、CD25⁺、CD62Lhi、GITR⁺和FoxP3⁺的阳性选择。

[0148] 收集的细胞可以通过本领域已知的多种方法中的任何一种进行工程改造以表达CAR或TCR。此外,可以通过本领域已知的多种方法中的任何一种来扩增工程化细胞。如上所述,CAR或TCR可以是双特异性的、三特异性的或四特异性的;CAR或TCR可包括诸如goCAR或goTCR之类的开关,或安全开关CAR或TCR;CAR或TCR可以表达免疫调节蛋白,例如装甲(armored)CAR或TCR。

[0149] 根据本发明的某些方面,从对象采集血液样本或血液成分单采(apheresis)产物可以在可能需要本文所述的扩增的细胞之前的任何时间段进行。因此,可以在任何必要的

时间点收集要工程改造和扩增(或在TIL的情况下简单扩增)的细胞来源,所需的细胞(例如T细胞、NK细胞、树突细胞或TIL)可以被分离和冷冻以供以后用于ACT,例如本文所述的那些ACT。

[0150] 根据本发明的某些方面,表达CAR/TCR的细胞群可以通过剂量分割施用于对象,其中总剂量的第一百分比在治疗的第一天施用,总剂量的第二百分比在随后的治疗日施用,并且可选地,总剂量的第三百分比在再随后的治疗日施用。

[0151] 示例性总剂量包含 10^3 - 10^{11} 个细胞/kg对象体重,例如 10^3 - 10^{10} 个细胞/kg对象体重,或 10^3 - 10^9 个细胞/kg对象体重,或 10^3 - 10^8 个细胞/kg对象体重,或 10^3 - 10^7 个细胞/kg对象体重,或 10^3 - 10^6 个细胞/kg对象体重,或 10^3 - 10^5 个细胞/kg对象体重。此外,示例性总剂量包含 10^4 - 10^{11} 个细胞/kg对象体重,例如 10^5 - 10^{11} 个细胞/kg对象体重,或 10^6 - 10^{11} 个细胞/kg对象体重,或 10^7 - 10^{11} 个细胞/kg对象体重。

[0152] 示例性总剂量可以基于患者体表面积而不是体重来施用。因此,总剂量可包括 10^3 - 10^{13} 个细胞/ m^2 。

[0153] 示例性剂量可以基于硬性或固定的施用方案而不是基于体重或体表面积。硬性剂量可以避免潜在的剂量计算错误。此外,可以使用基因分型和表型分析策略以及治疗药物监测来计算适当的剂量。也就是说,施用可以基于患者的免疫抑制细胞(例如,调节性T细胞、髓源性抑制细胞)的免疫库和/或疾病负担。因此,总剂量可包括 10^3 - 10^{13} 个总细胞。

[0154] 根据本发明的某些方面,细胞可以在治疗后直接从对象获得。在这方面,已经观察到在某些癌症治疗、特别是用破坏免疫系统的药物治疗之后,在治疗后不久的对象通常从治疗中恢复的时期内,获得的某些细胞(例如,T-细胞)的质量可能是最佳的或在其离体扩增的能力上有所改善的。同样,在使用本文所述方法进行离体操作后,这些细胞可能处于增强移植和体内扩增的优选状态。因此,在本发明的上下文中预期在该恢复阶段期间收集血细胞,包括T细胞、NK细胞、树突细胞或造血谱系的其他细胞。

[0155] 根据本发明的某些方面,第二剂量可以是表达相同或不同CAR/TCR的不同细胞群的不同或不同有效量。CAR/TCR的差异可以在CAR/TCR的任何方面,例如不同的结合或抗原识别结构域或共刺激结构域。第二剂量可以额外地或替代地包括IL-12分泌细胞,或者甚至可以包括与细胞疗法输注同时或依次进行的使用小分子抑制剂如BTK、P13K、IDO抑制剂的辅助免疫疗法。

[0156] 根据本发明的某些方面,除了过继性细胞转移免疫疗法和IgG半胱氨酸蛋白酶或内切糖苷酶之外,该方法还可以包括施用一种或多种额外的治疗剂。示例性治疗剂包括化疗剂、抗炎剂、免疫抑制剂、免疫调节剂或其组合。

[0157] 可以根据本领域已知的任何标准剂量方案施用治疗剂。示例性化疗剂包括抗有丝分裂剂,例如紫杉烷类,例如多西紫杉醇和紫杉醇,以及长春花生物碱,例如长春地辛、长春新碱、长春花碱和长春瑞滨。示例性化疗剂包括拓扑异构酶抑制剂,例如拓扑替康。

[0158] 示例性化疗剂包括生长因子抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、P38a MAP激酶抑制剂、血管生成、新血管形成和/或其他血管形成抑制剂、集落刺激因子、促红细胞生成剂、抗无变应性药剂、免疫抑制剂和/或免疫调节剂、病毒、病毒蛋白、免疫检查点抑制剂、BCR抑制剂(例如,BTK、P13K等)、免疫代谢剂(例如,IDO、精氨酸酶、谷氨酰胺酶抑制剂等),等等。根据本发明的某些方面,一种或多种治疗剂可以包括抗骨髓瘤剂。示例性的

抗骨髓瘤剂包括地塞米松、美法仑、多柔比星、硼替佐米、来那度胺、强的松、卡莫司汀、依托泊苷、顺铂、长春新碱、环磷酰胺和沙利度胺,其中的几种在上文中被指示为化疗剂、抗炎剂或免疫抑制剂。

[0159] 要治疗的癌症

[0160] 本发明的方法可以改善可使用靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法治疗的任何癌症的治疗。本发明的方法在治疗B细胞肿瘤的方法中特别有用。B淋巴细胞表达具有 κ 或 λ 轻链的表面单克隆免疫球蛋白,因此预计B细胞肿瘤通常适合靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法。可使用靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法治疗且在本发明的优选实施方式中治疗的B细胞肿瘤的例子是:前体B急性淋巴细胞白血病/淋巴母细胞淋巴瘤(LBL)、B细胞急性淋巴细胞白血病;B细胞慢性淋巴细胞白血病(CLL);小淋巴细胞淋巴瘤;B细胞幼淋巴细胞白血病;淋巴浆细胞淋巴瘤/免疫细胞瘤;套细胞淋巴瘤;滤泡性淋巴瘤;粘膜相关淋巴组织(MALT)型结外边缘区B细胞淋巴瘤;结节边缘区B细胞淋巴瘤;脾边缘区淋巴瘤;毛细胞白血病;浆细胞瘤/浆细胞骨髓瘤;弥漫性大B细胞淋巴瘤(如原发性纵隔B细胞淋巴瘤)、伯基特淋巴瘤、伯基特样淋巴瘤;原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤和原发性眼内淋巴瘤。在某些实施方式中,要治疗的癌症是B细胞淋巴瘤。在某些实施方式中,要治疗的癌症是B细胞白血病。在优选实施方式中,要治疗的癌症是B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL),特别是弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)或晚期滤泡性淋巴瘤(FL),它们被确定表达克隆限制于 κ 或 λ 轻链的表面免疫球蛋白。。

[0161] 在某些实施方式中,要治疗的癌症是B细胞淋巴瘤。在某些实施方式中,本发明的方法包括多次施用IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶并且要治疗的癌症是B细胞淋巴瘤。在某些这样的实施方式中,治疗癌症的方法包括在施用两剂或更多剂过继性细胞转移免疫疗法剂量之后施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,所述过继性细胞转移免疫疗法包括施用靶向免疫球蛋白轻链、特别是 κ 轻链或 λ 轻链的CAR-T细胞。在某些这样的实施方式中,该方法还包括免疫抑制。本发明的方法可以特别有效地治疗需要免疫抑制的肿瘤。

[0162] 在某些实施方式中,要治疗的癌症在其表面表达 κ 轻链或 λ 轻链。在某些实施方式中,要治疗的患者已被确定患有在其表面表达 κ 轻链或 λ 轻链的B细胞肿瘤。

[0163] 患者对实体瘤的抗癌反应不仅由癌细胞驱动,还由肿瘤微环境驱动。这种微环境由如成纤维细胞、T细胞和B淋巴细胞等非恶性细胞产生,可能具有耐受性。特别是T细胞不仅具有肿瘤溶解功能,而且其亚群还可以发展出调节性抑制表型,从而降低免疫系统的天然抗肿瘤反应。B细胞也观察到了同样的双重作用。例如,Breg细胞(例如在肿瘤块中产生IL10的细胞)可以抑制内源性抗肿瘤反应。

[0164] 使用轻链特异性CAR T细胞从肿瘤环境中去除Breg细胞可能有利于治疗癌症(Leong and Bryant, Transl Lung Cancer Res. 2021 Jun; 10(6): 2830-2841)。但是,使用例如利妥昔单抗去除大多数B细胞可能会导致已经虚弱的癌症患者更容易感染。在这种情况下,使用本发明的方法用CAR T细胞(例如 κ 或 λ 轻链特异性CAR T细胞)治疗患者,以去除肿瘤中的大部分B细胞块,同时保留相应的轻链B细胞群,以保护患者免于体液反应被完全消去,这是特别有利的。优选地,本发明的方法用于治疗人患者。在对象是人的情况下,对象可以具有任何年龄。例如,对象可以是60岁或更大、65岁或更大、70岁或以更大、75岁或更大、

80岁或更大、85岁或更大或90岁或更大。或者,对象可以是60岁或更年轻、55岁或更年轻、50岁或更年轻、45岁或更年轻、40岁或更年轻、35岁或更年轻、30岁或更年轻、25岁或更年轻、或20岁或更年轻。对于患有癌症的人对象,对象可以是新近确诊的,或复发的和/或难治性的,或处于缓解期。

[0165] 要治疗的其他疾病

[0166] 本发明的方法适用于改善可使用靶向免疫球蛋白轻链的过继性细胞转移免疫疗法治疗的任何疾病的治疗。多种自身免疫疾病的特征是存在携带 κ 或 λ 轻链的单克隆或寡克隆免疫球蛋白。靶向消除产生 κ 或 λ Ig的B细胞可能对这些患者有益,而不会完全抑制其体液免疫系统分支。

[0167] 合适的疾病的例子包括免疫球蛋白轻链偏斜的自身免疫疾病(Ig light chain skewed autoimmune diseases),例如幼年型关节炎(特别是幼年特发性关节炎)、类风湿性关节炎、全身性苔藓粘液性水肿(硬化性粘液性水肿)、格雷夫斯病、IgA驱动的大疱性皮肤病、IgG4驱动的大疱性类天疱疮、舍格伦综合征和狼疮性乳腺炎。

[0168] 可以使用本发明的方法治疗幼年型关节炎,因为这些患者的 λ 轻链水平显著升高(Low et al.; Scand J Immunol. 2007 Jan; 65(1): 76-83)。此外,在类风湿性关节炎中观察到瓜氨酸化蛋白抗体(ACPA)的 κ : λ 轻链偏斜(Slot et al., PLoS One. 2021 Mar 30; 16(3): e0247847.)。

[0169] 一般的硬化性粘液性水肿的典型特征是单克隆丙种球蛋白病(通常为IgG λ)和全身症状,包括神经系统、类风湿性、心脏、肺、胃肠道、血液系统症状和眼部表现。除了主要的患者组表达IgG λ 外,还有患者亚组表达克隆性 κ 或 λ IgA或IgM κ 。

[0170] 格雷夫斯病是由刺激甲状腺的自身抗体激活促甲状腺激素受体引起的,这激活了靶器官。信号传导增强会导致甲状腺增生、甲状腺激素分泌增加,并可能导致临床甲状腺毒症,从而可能导致危及生命的甲状腺风暴。许多患者都具有 κ 或 λ 寡克隆IgG1抗体(Chazenbalk et al.; J Clin Invest. 2002 Jul; 110(2): 209-17)。

[0171] 大疱性皮肤病和大疱性类天疱疮是自身免疫性大疱性皮肤病的亚型。皮肤起水疱被认为是由针对皮肤基质成分的抗体所驱动的。抗基底膜区抗体在大疱性类天疱疮中占主导地位,并且倾向于朝向IgG4上的 κ 轻链偏斜。表现为线性IgA大疱性皮肤病的患者可能主要是具有 κ 或 λ 轻链IgA(Flotte and Baird; J Immunol. 1986 Jan; 136(2): 491-6.)。

[0172] 在舍格伦综合征中也观察到了IgA λ 偏好(Jasani; J Pathol. 1988 Jan; 154(1): 1-5.)。

[0173] 在一些狼疮性乳腺炎病例中,观察到患者的浸润性浆细胞受 κ 轻链限制,但未显示浆细胞肿瘤的免疫表型(Yan et al. Surgical and Experimental Pathology volume 3, Article number: 24(2020))。此类患者可受益于使用本发明的方法进行治疗。

[0174] IgG半胱氨酸蛋白酶

[0175] 发明人已经证明,使用IgG半胱氨酸蛋白酶可保护细胞并提高它们的存活,因此可以与过继性细胞转移免疫疗法联合用于治疗癌症。用于本发明的IgG半胱氨酸蛋白酶对IgG具有特异性,IgG是哺乳动物血浆中的主要抗体类别。

[0176] 在优选的实施方式中,用于本发明方法的蛋白酶是imlifidase(IdeS)(酿脓链球菌(*S. pyogenes*)的免疫球蛋白G降解酶)。IdeS是由人病原体酿脓链球菌产生的细胞外半胱

氨酸蛋白酶。IdeS最初是从血清型M1的A组链球菌菌株中分离出来的,但是现在已经所有测试的A组链球菌菌株中鉴定出ides基因。IdeS具有极高的底物特异性,其唯一可识别的底物是IgG。IdeS催化人IgG所有亚类的重链的下部铰链区的单一蛋白水解切割。IdeS还催化各种动物中一些IgG亚类的重链的等效切割。IdeS通过两阶段机制有效地将IgG切割成Fc和F(ab')₂片段。在第一阶段,IgG的一条(第一)重链被切割以产生具有非共价结合的Fc分子的单切割的IgG(scIgG)分子。scIgG分子实际上是一种中间产物,它保留了原始IgG分子的剩余(第二)重链。在该机制的第二阶段,该第二重链被IdeS切割以释放F(ab')₂片段和同源二聚体Fc片段。这些是通常在生理条件下观察到的产物。在还原条件下,F(ab')₂片段可解离成两个Fab片段,同源二聚体Fc可解离成其组成单体。SEQ ID NO:1是IdeS的完整序列,包括N端甲硫氨酸和信号序列。它也可以NCBI参考序列号WP_010922160.1获得。SEQ ID NO:2是IdeS的成熟序列,缺少N端甲硫氨酸和信号序列。它也可以Genbank登录号ADF13949.1获得。

[0177] 在替代实施方式中,用于本发明方法的蛋白酶是IdeZ,它是由马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* ssp. *Zooepidemicus*,一种主要在马身上发现的细菌)产生的IgG半胱氨酸蛋白酶。SEQ ID NO:3是IdeZ的完整序列,包括N端甲硫氨酸和信号序列。它也可以NCBI参考序列号WP_014622780.1获得。SEQ ID NO:4是IdeZ的成熟序列,缺少N端甲硫氨酸和信号序列。

[0178] 在替代实施方式中,用于本发明方法的蛋白酶是杂合IdeS/Z,例如SEQ ID NO:5的蛋白酶。N端基于缺少N端甲硫氨酸和信号序列的IdeZ。

[0179] 在优选的实施方式中,用于本发明的蛋白酶可包含SEQ ID NO:2、4或5由SEQ ID NO:2、4或5组成。用于本发明的蛋白酶可在N端包含额外的甲硫氨酸(M)残基和/或在C端包含标签以协助在标准细菌表达系统中表达和从标准细菌表达系统中分离。合适的标签包括组氨酸标签,其可以与多肽的C端直接连接或通过任何合适的接头序列(例如3、4或5个甘氨酸残基)间接连接。组氨酸标签通常由六个组氨酸残基组成,尽管它可以比这更长,通常多达7、8、9、10或20个氨基酸,或者更短,例如5、4、3、2或1个氨基酸。

[0180] 在进一步优选的实施方式中,用于本发明的蛋白酶可以包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:6-25中任一个的序列。这些序列代表具有增加的蛋白酶活性和/或降低的免疫原性的IdeS和IdeZ多肽。SEQ ID NO:6-25中的每一个都可以可选地在N端包含额外的甲硫氨酸和/或在C端包含组氨酸标签。组氨酸标签优选由六个组氨酸残基组成。组氨酸标签优选通过3x甘氨酸或5x甘氨酸残基的接头与C端连接。

[0181] 在进一步优选的实施方式中,用于本发明的蛋白酶可以包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:56-69中任一个的序列。这些序列代表具有增加的蛋白酶活性和/或降低的免疫原性的IdeS多肽。SEQ ID NO:56-69中的每一个都可以可选地在N端包含额外的甲硫氨酸和/或在C端包含组氨酸标签。组氨酸标签优选由六个组氨酸残基组成。组氨酸标签优选通过3x甘氨酸或5x甘氨酸残基的接头与C端连接。

[0182] 在进一步优选的实施方式中,用于本发明的蛋白酶可以包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:6-25中任一个的序列,可选地具有多达3个(例如1、2或3个)氨基酸取代。SEQ ID NO:6-25中的每一个及其变体都可以可选地在N端包含额外的甲硫氨酸和/或在C端包含组氨酸标签。

[0183] 在进一步优选的实施方式中,用于本发明的蛋白酶可以包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:56-69中任一个的序列,可选地具有多达3个(例如1、2或3个)氨基酸取代。SEQ ID NO:56-69中的每一个及其变体都可以可选地在N端包含额外的甲硫氨酸和/或在C端包含组氨酸标签。

[0184] 在进一步优选的实施方式中,用于本发明的蛋白酶可以包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、或SEQ ID NO:91或SEQ ID NO:92的变体的序列,所述变体相对于SEQ ID NO:91或SEQ ID NO:92分别具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸修饰,前提是所述序列保留:(a)对应于SEQ ID NO:3的第95位的位置处的天冬酰胺(N), (b)对应于SEQ ID NO:3的第99位的位置处的天冬氨酸(D),以及(c)对应于SEQ ID NO:3的第226位的位置处的天冬酰胺(N),并且前提是当在相同测定中测量时,所述多肽在切割人IgG方面至少与分别由SEQ ID NO:91或92的氨基酸序列组成的多肽同样有效。优选地,至少一个修饰或所有修饰不产生与SEQ ID NO:4的多肽序列中相应位置上存在的氨基酸相同的氨基酸。

[0185] 本发明多肽的长度通常为至少100、150、200、250、260、270、280、290、300或310个氨基酸。本发明的多肽的长度通常不超过400、350、340、330、320或315个氨基酸。应当理解,以上列出的下限中的任一个可以与以上列出的上限中的任一个组合以提供本发明的多肽的长度范围。例如,多肽的长度可以为100至400个氨基酸,或250至350个氨基酸。多肽的长度优选为290至320个氨基酸,最优选为300至315个氨基酸。

[0186] 本发明的蛋白酶的一级结构(氨基酸序列)基于IdeS、IdeZ或IdeS/Z的一级结构,具体地分别基于SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列。本发明的蛋白酶的序列可以包含SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列的变体,该变体与SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列至少80%相同。变体序列可以与SEQ ID NO:2、4或5的序列至少80%、至少85%、优选至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同。变体可以与SEQ ID NO:2、4或5的序列相同,除了包含在W02016/128558或W02016/128559中指定的一种或多种特定修饰之外。可以在SEQ ID NO:2、4或5所示序列的至少50、至少100、至少200、至少300或更多个连续氨基酸的区域上,或更优选在SEQ ID NO:4或5的全长上测量相对于SEQ ID NO:2、4或5的序列的同源性。

[0187] 用于本发明的蛋白酶可以是包含SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列的变体的IdeS、IdeZ或IdeS/Z多肽,其中修饰(例如氨基酸添加、缺失或取代)相对于SEQ ID NO:2、4或5的序列进行。此类修饰优选是保守氨基酸取代。保守取代将氨基酸替换为具有相似化学结构、相似化学性质或相似侧链体积的其他氨基酸。引入的氨基酸可以具有与它们所替换的氨基酸相似的极性、亲水性、疏水性、碱性、酸性、中性或电荷。或者,保守取代可以引入另一个芳香族或脂肪族氨基酸来代替先前存在的芳香族或脂肪族氨基酸。保守氨基酸改变是本领域众所周知的。

[0188] IgG半胱氨酸蛋白酶活性可以通过任何合适的方法来评估,例如通过将多肽与含有IgG的样本一起孵育并测定IgG切割产物的存在。W02016/128559中描述了合适的方法。合适的测定包括基于ELISA的测定,例如W02016/128559中描述的那些。在这样的测定中,测定板的孔通常包被有抗体靶标,例如牛血清白蛋白(BSA)。然后将待测的多肽样本添加到孔中,随后加入靶标特异性抗体的样本,在该实施例中为BSA特异性抗体。使多肽和抗体在适合IgG半胱氨酸蛋白酶活性的条件下相互作用。在合适的时间间隔后,将洗涤测定板,并在

适合与靶标特异性抗体结合的条件下添加与靶标特异性抗体特异性结合的检测抗体。检测抗体将与每个孔中的任何已与靶标结合的完整靶标特异性抗体结合。洗涤后,孔中存在的检测抗体的量将与结合到该孔的靶标特异性抗体的量成比例。检测抗体可以直接或间接与标记或另一种报告系统(例如酶)缀合,从而可以确定每个孔中剩余的检测抗体的量。孔中受试多肽的效力越高,保留的完整的靶特异性抗体就越少,因此检测抗体就越少。通常,给定的测定板上的至少一个孔将包含IdeS而不是待测的多肽,以便可以将受试多肽的效力直接与IdeS的效力进行比较。也可以包括IdeZ和IdeS/Z用于比较。

[0189] 其他测定法可以通过直接观察和/或量化由受试多肽切割IgG产生的IgG片段来确定受试多肽的效力。这种类型的测定也在W02016/128559中描述。这种测定通常将IgG样本与滴定系列下不同浓度的测试多肽(或与作为对照的IdeS、IdeZ和IdeS/Z中的一种或多种)孵育。然后使用凝胶电泳(例如通过SDS-PAGE)分离在每个浓度下孵育所产生的产物。然后完整的IgG和由IgG切割产生的片段可以通过大小来识别,并通过用合适的染料染色的强度来量化。切割片段的数量越多,在给定浓度下受试多肽的效力就越大。本发明的多肽通常会在比IdeZ和/或IdeS更低的浓度(滴定系列中的较低点)下产生可检测量的切割片段。这种类型的测定还可以鉴定在切割IgG分子的第一重链或第二重链方面更有效的测试多肽,因为还可以确定由每个切割事件产生的不同片段的量。本发明的多肽在切割IgG分子的第一条链上比切割第二条链更有效,特别是在IgG是IgG2同种型时。本发明的多肽可以在切割IgG1方面上比切割IgG2更有效。

[0190] IgG内切糖苷酶

[0191] 发明人已经证明,使用IgG内切糖苷酶可保护细胞并提高它们的存活,因此可以与过继性细胞转移免疫疗法联合用于治疗癌症。用于本发明的IgG内切糖苷酶对IgG具有特异性,IgG是哺乳动物血浆中的主要抗体类别。

[0192] 该试剂可以是具有IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,优选地在IgG的Fc区的Asn-297(Kabat编号)处切割聚糖部分。这种蛋白质的优选实例是EndoS(酿脓链球菌的内切糖苷酶),其在实施例中被证明是有效的。EndoS水解正常糖基化IgG的天冬酰胺连接聚糖的 β -1,4-二-N-乙酰壳二糖核心(参见图18)。EndoS的成熟序列作为SEQ ID NO:90提供。该蛋白质可以包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列或由SEQ ID NO:90的氨基酸序列组成,或者可以是其来自替代细菌的同源物,替代细菌例如马链球菌或兽疫链球菌,或假结核棒状杆菌、粪肠球菌或脑膜败血伊丽莎白菌。试剂可以是CP40、EndoE或EndoF₂。

[0193] 或者,蛋白质可以是EndoS蛋白的变体,其包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:90具有至少80%、85%、90%或95%同一性且具有IgG内切糖苷酶活性的任何氨基酸序列。EndoS蛋白的变体可以包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:在氨基酸序列中相对于SEQ ID NO:90的氨基酸序列进行了多达1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90或更多个氨基酸取代、插入或缺失,前提是变体具有IgG内切糖苷酶活性。所述氨基酸取代优选是保守的。

[0194] 或者,试剂可以是这样的蛋白质,该蛋白质包含SEQ ID NO:90的片段或由SEQ ID NO:90的片段组成并具有IgG内切糖苷酶活性,优选地其中所述片段的长度为400至950、500至950、600至950、700至950、或800至950个氨基酸。优选的片段由SEQ ID NO:90的氨基酸1-409组成,其对应于链球菌半胱氨酸蛋白酶SpeB切割产生的EndoS的酶促活性 α -结构域。该

片段可以通过缺失SEQ ID NO:90的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基来产生。可以缺失多达1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、200、300、400、500或550个残基,或更多。缺失的残基可与其他缺失的残基相邻。

[0195] SEQ ID NO:2的任何片段或变体优选包括SEQ ID NO:90的残基191-199,即SEQ ID NO:1的Leu-191、Asp-192、Gly-193、Leu-194、Asp-195、Val-196、Asp-197、Val-198和Glu-199。这些氨基酸构成了完美的几丁质酶家族18活性位点,以谷氨酸结尾。几丁质酶活性位点中的谷氨酸对酶活性至关重要。因此,最优选地,SEQ ID NO:90的变体包含SEQ ID NO:90的Glu-199。SEQ ID NO:2的变体可以包含SEQ ID NO:90的具有一个或多个保守取代的残基191-199,前提是该变体包含SEQ ID NO:90的Glu-199。

[0196] 评估IgG水平和施用时间

[0197] 在本发明的方法中施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质和过继性细胞转移免疫疗法的适当时间可以使用例如用于评估血浆或血清IgG水平的测定来确定。例如,可以测量蛋白质使Fc受体和/或补体与基本上所有存在于对象血清或血浆中的IgG分子结合失活或消除所花费的时间量。这可以可选地通过测试取自个体的血清或血浆样本并应用任何合适的测定来确定。实施例描述了—些示例性的合适的测定。

[0198] 这样的测定可以直接测试血清或血浆样本中能够与一种或多种Fc受体结合的IgG分子的存在,例如在ELISA中测试。或者,这样的测定可以是间接的,因为它可以测试一种或多种预期由具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质处理IgG产生的反应产物的存在。例如,当试剂是切割IgG蛋白的酶时,可以分析血清或血浆样本中是否存在完整的IgG分子或切割产生的片段。这可以通过任何合适的方法实现,如通过基于分子量分离分子和片段(例如通过质谱法或SDS-PAGE),或通过分子或片段的特异性检测(例如通过ELISA)。或者,可以通过将对象的血清或血浆与表达FcγR的细胞混合并使用荧光染料缀合的抗人IgG通过流式细胞术监测IgG结合来检测IgG。

[0199] 因为散射比浊法(nephelometry)和浊度法(turbidimetry)的速度、易于使用和精度,因此在临床环境中评估样本(例如血清或血浆样本)中IgG数量的常规方法依赖浊度法和比浊法。在散射比浊法和浊度法中,光源通过透明容器内的液体样本投射。浊度法测量光强度的降低,散射比浊法测量光通过样本时的散射,其与溶液中免疫球蛋白的浓度成比例。这两个原理都是基于添加的抗IgG抗体与样本中的抗原反应形成抗原/抗体复合物(凝集)。添加PEG使反应快速进行到终点,提高灵敏度,并降低含有过量抗原的样本产生假阴性结果的风险。在IgG分析的情况下,IgG的F(ab')₂部分与抗IgG抗体交联并引起凝集反应。然而,当存在的部分或全部IgG可能不完整时,此类方法可能不合适。例如,如果IgG半胱氨酸蛋白酶(如IdeS)已被施用于样本所采自的对象(例如在本发明的方法中),或者如果此类蛋白酶已被施用于样本,将存在切割片段如F(ab')₂片段和Fc片段。这不会影响常规散射比浊法和浊度法的凝集反应,只要F(ab')₂片段仍存在于样本中。由于与完整的IgG相比,F(ab')₂片段的半衰期更短,因此凝集会随时间减少,尽管它与样本中存在的完整的IgG的量不成比例。因此,受存在IgG半胱氨酸蛋白酶(如IdeS)的影响的样本不能通过常规方法进行评估。本发明人开发了一种新的IgG浓度测定法,它与受存在IgG半胱氨酸蛋白酶(如IdeS)的影响的样本兼容,可用于任何临床环境,包括(但不限于)与本发明的其他方法联合使用。

[0200] 所述方法能够区分完整的IgG和IdeS生成的F(ab')₂片段。这是通过使用检测不同

片段的抗体(即抗Fab抗体和抗Fc抗体)来实现的。测定中使用的抗体一定不能是影响样本的IgG半胱氨酸蛋白酶(通常是IdeS)的底物。这避免了测定试剂受到样本中可能存在的任何活性蛋白酶的影响。这可以通过测试来自不同物种的IgG或通过使用抗体片段(即Fab片段或F(ab')₂片段)代替全抗体来实现。通常,抗F(ab')₂试剂作为捕获试剂与样本一起孵育。捕获试剂通常固定在例如测定板的孔中。然后通过与作为检测试剂的抗Fc试剂一起孵育来检测结合的IgG。因此,与散射比浊法和浊度法相反,只有同时具有Fab和Fc部分的IgG才会被检测到。检测试剂通常可以直接或间接缀合至有助于检测的部分,例如荧光染料或与显色底物反应的酶。捕获试剂和检测试剂可以是特异性识别IgG的Fab部分或Fc部分的任何其他分子,并且可以以相反的顺序使用,即使用抗Fc捕获和使用抗Fab检测。该测定可以任何合适的形式进行,例如常规ELISA或Meso Scale Discovery形式。

[0201] 在某些情况下,例如当IgG半胱氨酸蛋白酶是IdeS时,样本可包含中间片段,例如scIgG,在scIgG中,只有一条重链被切割,而F(ab')₂仍然连接到另一条完整的重链。在这种情况下,scIgG片段可能会被测定错误地识别为完整的IgG。因此,该方法可以包括评估样本中存在的片段大小的补充步骤。由于铰链区下方的重链之间没有二硫桥,所以scIgG片段中重链的Fc部分在变性条件下会与完整的重链分离,成为大约为20-25kDa的蛋白质。可以使用任何合适的方法(例如SDS-PAGE)检测和量化不同的片段大小。该方法的具体实施方式(包括可选的补充步骤)在实施例1中进行了描述(参见功效评估)。该方法对于评估IdeS在临床环境中的功效特别有用。

[0202] 当具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质是切割IgG上的聚糖部分的酶时,可以测定血清或血浆样本中是否存在具有正常或截短的聚糖的IgG分子、或由切割产生的聚糖片段。这可以通过任何合适的方法实现,例如通过基于分子量分离分子和/或片段(例如通过质谱法或SDS-PAGE),或通过分子或片段的特异性检测(例如通过ELISA)。

[0203] 在过继性细胞转移免疫疗法之前施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质的方法中,施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与过继性细胞转移免疫疗法之间的时间间隔的下限可以选自:至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少5小时或至少6小时。如果确定对象血清或血浆中存在的基本上所有IgG分子与Fc受体的结合在较早的时间点已被充分减少或消除,则下限可以比上述下限中的任何一个都短。优选地,下限为2小时。

[0204] 在过继性细胞转移免疫疗法之前施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质的方法中,施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与过继性细胞转移免疫疗法之间的时间间隔的上限可以独立于下限进行选择,并且可以通过内源性产生IgG开始替换或完全替换掉在执行该方法之前存在于对象血清或血浆中的IgG分子所花费的时间来确定。这可以通过测试取自个体的血清或血浆样本并应用任何合适的测定来确定,例如上文关于下限所述的那些测定。新合成的IgG通常会在3-4天内开始重新出现在血浆中,并在大约3周(21天)时完成完全替换。因此,上限可以选自:至多21天、至多18天、至多14天、至多13天、至多12天、至多11天、至多10天、至多9天、至多8天、至多7天、至多6天、至多5天、至多4天、至多3天、至多2天、至多24小时、至多18小时、至多12小时、至多10小时、至多8小时、至多7小时、至多6小时、至多5小时、至多4小时、至多3小时、至多2小时或至多1小时。优选地,上限为48小时。

[0205] 施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质与过继性细胞转移免疫疗法之间的时间间隔可为至多24小时、至多12小时或至多6小时,使得施用步骤(a)和(b)可以在同一天或同一治疗中心就诊期间进行。这是非常有利的,特别是在进入治疗中心可能受限的情况下。

[0206] 在过继性细胞转移免疫疗法之后施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶活性的蛋白质以增加免疫疗法的功效的方法中,施用时间取决于IgG ADA的升高。在某些实施方式中,在过继性细胞转移免疫疗法后4-8天、例如5-7或6天施用蛋白质。如果抗体反应是回忆反应,那么这个时间可能是合适的。如果抗体反应是初次反应,则可以在过继性细胞转移免疫疗法后超过一周施用蛋白质,例如10天、2周、3周或4周,或10天至2周之间、10天至3周之间、2周至4周之间。

[0207] 安全开关

[0208] 施用任何类型的过继性细胞转移免疫疗法时,一个令人担忧的问题是可能发生严重的细胞因子释放综合征(CSR)或其他并发症。因此,为了安全起见,最好能够暂时停止过继性细胞转移免疫疗法对靶细胞的裂解。本领域已知实现它的合适手段。例如,可以通过设计也表达自杀基因的CAR构建体来实现CAR T细胞的衰竭,例如可诱导型Caspase 9(iCasp9)、单纯疱疹病毒酪氨酸激酶(HSV-TK)或人胸苷酸激酶(TMPK)。

[0209] 对于B细胞受体(BCR)特异性CAR T细胞,BCR是 κ 或轻链CAR T细胞的触发靶标。暂时从细胞表面去除BCR将降低效应CAR T细胞的活性。

[0210] 去除CAR可以通过多种方式实现。例如,可以对细胞进行工程改造,使其包含连接细胞外配体结合结构域和细胞内信号传导结构域的CAR间隔物。有利的是,这些间隔物可容易被蛋白酶切割。这很有用,因为含有这些间隔物的具有任何给定scFv特异性的CAR T细胞在暴露于蛋白酶时可能会暂时致盲,从而可能消除患者体内的所有CAR T细胞。

[0211] 优选地,间隔物可包含IgG(例如IgG1或IgG4)的恒定区。在这些实施方式中,间隔物可被IgG切割酶如imlifidase切割。这些CAR间隔物可包含CH2或CH2-CH3结构域。IgG可具有野生型序列,或者可发生突变。例如,间隔物可发生突变以便与不包含具有突变的间隔物的CAR T细胞相比降低体内FcR介导的细胞识别。

[0212] 合适的间隔物是本领域已知的。例如Jonnalagadda等人(Mol Ther.2015Apr;23(4):757-768)描述了一种含有IgG4 Fc间隔物的CAR T,该间隔物包含降低FcR结合的突变。同样,Savoldo等人(J Clin Invest.2011May;121(5):1822-6)描述了一种CAR T,该CAR T包含衍生自人IgG1-CH2CH3结构域的间隔物,该间隔物在scFv和信号传导结构域之间的框内克隆(另见Hudecek等人(Cancer Immunol Res.2015Feb;3(2):125-35))。

[0213] 这些也可以使用其他IgG切割酶来进行,例如半胱氨酸蛋白酶如克隆自噬菌蛭弧菌(Bdellovibrio bacteriovorus)的半胱氨酸蛋白酶、或牙龈蛋白酶。

[0214] 可替代地,在施用过继性细胞转移免疫疗法之前施用IgG半胱氨酸蛋白酶。在这些实施方式中,优选在施用IgG半胱氨酸蛋白酶和开始过继性细胞转移免疫疗法之间留出足够的时间(优选多于3天,例如多于4天、多于5天、多于6天、多于7天、多于8天、多于9天或多于10天),以使至少部分或全部蛋白酶从患者血液中清除。技术人员将知道合适的时间范围。

[0215] 多肽的产生

[0216] 如本文所公开的多肽可以通过任何合适的方式产生。例如,可以使用本领域已知的标准技术直接合成多肽,例如Fmoc固相化学、Boc固相化学或通过液相肽合成。或者,可以通过用编码所述多肽的核酸分子或载体(vector)转化细胞(通常是细菌细胞)来产生多肽。在W02016/128559中描述和举例说明了通过在细菌宿主细胞中表达来产生多肽。

[0217] 包含多肽的组合物和制剂

[0218] 本发明还提供包含IgG半胱氨酸蛋白酶或IgG内切糖苷酶的组合物,用于本发明的治疗方法。例如,本发明提供了包含一种或多种本发明的多肽和至少一种药学上可接受的载体(carrier)或稀释剂的组合物。载体需要在与组合物的其他成分相容且对被施用组合物的对象无害的意义上是“可接受的”。通常,载体和最终组合物是无菌且无热原的。

[0219] 合适的组合物的配制可以使用标准的药物配制化学和方法来进行,所有这些对于相当熟练的技术人员来说都是容易获得的。例如,试剂可以与一种或多种药学上可接受的赋形剂或溶媒组合。辅助物质(例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质、还原剂等)可以存在于赋形剂或溶媒中。合适的还原剂包括半胱氨酸、硫代甘油、硫氧还原素(thioreducin)、谷胱甘肽等。赋形剂、溶媒和辅助物质通常是不会在接受组合物的个体中诱导免疫反应并且可施用其而没有异常毒性的药物制剂。药学上可接受的赋形剂包括但不限于:液体,例如水、盐水、聚乙二醇、透明质酸、甘油、硫代甘油和乙醇。其中还可以包括药学上可接受的盐,例如无机酸盐,比如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;和有机酸的盐,例如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。可在雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences; Mack Pub.Co., N.J. 1991)中获得药学上可接受的赋形剂、溶媒和辅助物质的详尽讨论。

[0220] 这种组合物可以以适于单次施用(bolus administration)或连续施用的形式制备、包装或销售。可注射组合物可以以单位剂型(例如在含有防腐剂的安瓿或多剂量容器中)制备、包装或销售。组合物包括但不限于:混悬液、溶液、油性或水性溶媒中的乳液、糊剂,和可植入的缓释或可生物降解的制剂。这种组合物还可以包含一种或多种另外的成分,包括但不限于:悬浮剂、稳定剂或分散剂。在用于肠胃外施用的组合物的一个实施方式中,活性成分以干燥(例如粉末或颗粒)形式提供,用于用合适的溶媒(例如,无菌无热原水)重构然后在肠胃外施用重构的组合物。组合物可以以无菌可注射水性或油性混悬液或溶液的形式制备、包装或销售。该混悬液或溶液可以根据已知的技术进行配制,并且除了活性成分之外,还可以包含其他成分,例如本文所述的分散剂、润湿剂或悬浮剂。此类无菌可注射制剂可以使用肠胃外可接受的无毒稀释剂或溶剂(例如水或1,3-丁二醇)来制备。其他可接受的稀释剂和溶剂包括但不限于:林格氏溶液,等渗氯化钠溶液和不会发油(例如合成的甘油单酯或甘油二酯)。

[0221] 其他有用的肠胃外施用的组合物包括包含微晶形式的、在脂质体制剂中的、或作为可生物降解的聚合物系统的组分的活性成分的那些组合物。用于持续释放或植入的组合物可以包含药学上可接受的聚合物或疏水性材料,例如乳液、离子交换树脂、微溶聚合物或微溶盐。组合物可适合于通过任何合适的途径施用,包括例如皮内、皮下、经皮、肌肉内、动脉内、腹膜内、关节内、骨内或其他合适的施途径。优选的组合物适合于通过静脉内输注来施用。

[0222] 通用

[0223] 应当理解,所公开的产品和方法的不同应用可以针对本领域的特定需要来定制。

还应当理解,本文使用的术语仅是为了描述本发明的具体实施方式的目的,而不是意在限制。

[0224] 此外,除非内容另有明确规定,否则如本说明书和所附权利要求中所使用的单数形式“一”、“一个”和“该”均包括复数指代对象。因此,例如,提及“多肽(a polypeptide)”包括“多个多肽(polypeptides)”等。

[0225] 除非特别禁止,否则本文公开的方法的步骤可以以任何适当的顺序执行并且列出步骤的顺序不应被认为是限制性的。

[0226] “多肽”在本文中以其最广泛的意义使用,是指具有两个或更多个亚基氨基酸、氨基酸类似物或其他拟肽的化合物。因此,术语“多肽”包括短的肽序列以及更长的多肽和蛋白质。如本文所用,术语“氨基酸”是指天然氨基酸和/或非天然氨基酸或合成氨基酸,包括D或L旋光异构体,以及氨基酸类似物和拟肽。

[0227] 术语“患者”和“对象”可互换使用,通常指人。除非另有说明,否则提及IgG通常是指人IgG。

[0228] 如上所述的氨基酸同一性可以使用任何合适的算法来计算。例如,PILEUP和BLAST算法可用于计算同一性或排列序列(例如识别等效序列或相应序列(通常以其默认设置)),例如Altschul S.F. (1993) J Mol Evol 36:290-300;Altschul,S,F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10中所述。用于执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>))公开获得。这种算法涉及首先通过识别查询序列中长度为W的短字段(word)来识别高评分序列对(High scoring sequence pair,HSP),该短字段在与数据库序列中的相同长度的字段对齐时匹配或满足一些正值阈值得分T。T被称为邻域字段得分阈值(如上所述,Altschul et al,同上)。这种初始邻域字段命中(word hit)充当种子启动搜索,以查找包含它们的HSP。只要可增加累积比对得分,字段命中就沿着每个序列在两个方向上延伸。在以下情况下,停止字段命中在每个方向上的延伸:由于一个或多个负得分残基比对的累积,累积比对评分为零或低于零;或到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X确定比对的灵敏度和速度。BLAST程序默认使用字长(W) 11,BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff and Henikoff (1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915-10919)比对(B) 50,期望(E) 10,M=5,N=4,以及两条链的比较。

[0229] BLAST算法对两个序列之间的相似性进行统计分析;参见,例如Karlin and Altschul (1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877。BLAST算法提供的相似性的一种度量是最小和概率(P(N)),其提供两个多核苷酸或氨基酸序列之间的匹配是偶然发生的概率的指示。例如,在如下的情况下,序列被认为与另一序列相似:在第一序列与第二序列的比较中,最小和概率小于约1,优选地小于约0.1,更优选地小于约0.01,并且最优选地小于约0.001,则认为。或者,UWGCG包提供BESTFIT程序,该程序可用于计算同一性(例如,在其默认设置下使用)(Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12,387-395)。

[0230] 本申请在上文或下文中引用的所有出版物、专利和专利申请,均通过引用方式整体并入本申请。

[0231] 实施例

[0232] 进行了实施例1至5中的实验以研究先前存在的或治疗诱导的抗体是否对CAR T细

胞有负面影响,以及这些影响是否可以通过用imlifidase或EndoS治疗来减轻。通过采用IgG与细胞表面受体结合的体外和体内模型,开发了模拟抗药物抗体与CAR T细胞的结合的系统。这些模型模拟嵌合抗原受体上表面结合抗体的抗体介导的效应机制。研究了在模型系统中用imlifidase或EndoS处理的效果。

[0233] 除非另有说明,否则所用的方法是标准的生物化学和分子生物学技术。合适的方法教科书的例子包括Sambrook et al.,Molecular Cloning,A Laboratory Manual(1989)和Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology(1995),John Wiley and Sons,Inc。

[0234] 材料和方法——实施例1-实施例4

[0235] 动物和细胞系

[0236] Balb/c JBomTac,6周龄雌性购自Taconic,并在9周龄时使用前适应环境。根据伦理批准M72-13(Lund)对小鼠进行圈养和处理。

[0237] 在完全D-MEM 10培养基(谷氨酰胺D-MEM、5%FCS和PEST)中培养Daudi细胞(ACC78)和THP1单核细胞系(AML;TIB-202)。

[0238] 抗体和补体

[0239] 兔抗小鼠血小板IgG(血清)(代码#CLA31440,批号6327,Cederland)用蛋白G纯化。纯化的IgG用IdeS处理以产生scIgG和完全切割的Fc/F(ab')₂级分,用于免疫性血小板减少症(ITP)实验。通过SDS-page凝胶分析确认切割产物的纯度。

[0240] 抗CD20 IgG(利妥昔单抗,N7022,10mg/mL)购自Mabthera,人IgG1同种型阴性对照(#I5154)购自Sigma。

[0241] CCK-8是日本同仁研究所(Dojindo Laboratories)的细胞计数试剂盒,按说明书使用。

[0242] 幼兔血清补体(CL3441;批号6374;Cedarlane)在使用前用无菌水重构,并以1:10的最终稀释度在培养基中稀释。

[0243] 将人血收集在BD CAT管(#368815;喷雾干燥促凝剂(二氧化硅,PVP,L-720))中用于血清并在-20℃下冷冻。血清在用作补体来源之前,经过了对Daudi细胞的低毒性测试。

[0244] 小鼠抗人C4d(A213,Quidel)在内部进行生物素化,并以1μg/ml用于细胞染色。

[0245] 多克隆绵羊抗人C1q(MD-14-0162,Raybiotech)被分割成F(ab')₂并使用FragIT试剂盒(A2-FR2-025,Genovis)纯化(最终染色浓度75μg/ml)。驴抗绵羊IgG(H+L)-bio(Jackson,713-065-003)与荧光染料SA-PE(BD-Pharmingen,#554061)一起用作检测抗体(2.5μg/ml)。

[0246] 7-AAD(Sigma,A9400)在CDC测定中用作死细胞标志物。

[0247] 对于ADCP测定,THP1细胞用FarRed DDA0-SE(Molecular Probes,C34553,批号:33C1-1)的DMSO(约2mM)溶液(1mg/ml)染色,Daudi细胞用钙黄绿素AM(Invitrogen,C3099,批号25257W)(1mg/ml的在DMSO中的储备溶液)染色。

[0248] 酶

[0249] 来自酿脓链球菌的His-tagged-EndoS在大肠杆菌(E.coli)中表达并纯化。使用Endo Trap蓝基质去除脂多糖(LPS)。在SDS-page凝胶上控制纯度。His-tag纯化后超过预期的100kD条带的其他蛋白质条带已通过质谱法显示出不是宿主细胞蛋白,而是EndoS来源蛋

白。

[0250] IdeS(酿脓链球菌的IgG降解酶)是一种来自人病原体酿脓链球菌的分泌型半胱氨酸内肽酶,它以高度特异性催化人免疫球蛋白G(IgG)抗体下部铰链处的蛋白水解单切割。

[0251] 实施例1-抗体介导的补体在靶细胞上的结合

[0252] 使用经利妥昔单抗(RTX)调理的CD20阳性Daudi细胞研究了先前存在的或治疗诱导的抗体对细胞疗法的影响以及IdeS和EndoS对此类抗体的影响,经利妥昔单抗(RTX)调理的CD20阳性Daudi细胞是CAR-T疗法中ADA相互作用的模型系统,在这种意义上,受体特异性抗体(RTX)与细胞表面受体(CD20)结合,类似于ADA与CAR的结合。

[0253] Daudi细胞上的补体沉积

[0254] Daudi细胞(50 μ l, 3x10E7/ml)用终浓度为2 μ g/ml的抗CD20抗体RTX或人IgG1阴性对照抗体以及1:10梯度滴定量的IdeS或EndoS处理,IdeS或EndoS以100 μ g/ml开始降至0.01 μ g/ml酶的终浓度。将总体积为150 μ l/孔的96V孔母板在37 $^{\circ}$ C下孵育110分钟。将板离心并去除50 μ l体积的上清液。添加1:5稀释度的100 μ l人血清形式的补体,从而最终血清稀释度为1:10。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育120分钟。所有稀释和洗涤步骤均在补充有0.5%BSA的D-MEM中进行。

[0255] 细胞上补体沉积的流式细胞术染色

[0256] C1q补体结合是通过与由多克隆IgG(#MD-14-0162;RayBiotech)生成的羊抗C1q F(ab')₂孵育来评估的,该多克隆IgG先前使用树脂结合的IdeS(FragIT试剂盒,#A0-FR6;Genovis)被切割成Fc和F(ab')₂片段。Fc片段用蛋白A柱去除。使用终浓度为75 μ g/ml的多克隆F(ab')₂。生物素化的驴抗绵羊IgG(H+L)(#713-065-003,Jackson ImmunoResearch)用于检测绵羊抗人C1q F(ab')₂。SA-PE在D-MEM(+0.5%BSA)中稀释并用作检测荧光染料。

[0257] 通过与生物素化小鼠抗人C4d抗体(#A213;Quidel)孵育来评估C4d补体结合。SA-PE在D-MEM(+0.5%BSA)中稀释并用作检测荧光染料。最后,将细胞转移到FACS管中,并使用Accuri C6细胞荧光计来分析细胞在FL2中的平均荧光强度(MFI)。

[0258] 结果

[0259] 基于靶细胞结合IgG的补体沉积可启动经典补体途径,这可导致膜攻击复合物(MAC)的形成,从而导致细胞死亡。通过抗体结合促进的补体级联反应的早期阶段还可以通过补体受体对细胞标记以进行补体介导的吞噬作用。因此,针对CAR T细胞的先前存在和诱导的抗体可以限制CAR-T在患者体内的持久性。

[0260] 使用经RTX调理的CD20阳性Daudi细胞研究IgG包被细胞的补体沉积,然后用指定浓度的IdeS或EndoS孵育。两小时后添加人血清作为补体来源,再进行两小时。对细胞进行等分,并使用抗人C1q或C4d特异性检测抗体和作为荧光染料的SA-PE对细胞染色。通过单细胞流式细胞术分析细胞的MFI。

[0261] IdeS和EndoS可防止IgG的C1q和C4d沉积(见图1)。这表明IgG致敏的CAR T细胞也将通过IdeS或EndoS处理而避免补体沉积,预计这也适用于轻链特异性CAR-T细胞。

[0262] 实施例2:补体依赖性细胞毒性(CDC)

[0263] 抗体与受体分子(包括先前存在或诱导的CAR特异性抗体)的结合可导致完全补体激活,从而导致细胞毒性MAC的形成。为了模拟这一点,将Daudi细胞与CD20受体特异性抗体RTX一起孵育,并研究是否可以通过用IdeS或EndoS处理来防止CDC。

[0264] Daudi细胞 (3×10^6) 与IdeS或EndoS ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) 以及滴定浓度的利妥昔单抗 (RTX) (孔中浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, 1:2 梯度稀释至 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$) 在母板中于 37°C 一起孵育60分钟。

[0265] 将 $50 \mu\text{l}$ 细胞混合物与作为补体来源的 $50 \mu\text{l}$ 幼兔血清 (1:5 稀释) 一起转移到ELISA板上, 并在 37°C 下孵育45分钟以进行CDC裂解。将 $10 \mu\text{l}$ CCK8 添加到各 $100 \mu\text{l}$ 混合物中, 并在 37°C 下在 CO_2 培养箱中再培养60分钟。HCl ($50 \mu\text{l}$, 0.1M) 用作终止溶液。在 450nm 处获取OD值。不含RTX的孔的OD值设置为100%存活。

[0266] 结果

[0267] 在RTX浓度为 $0.78 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 培养基组中70%的细胞死亡, 而在存在IdeS或EndoS的情况下, 在该浓度下, 所有Daudi细胞都存活 (见图2)。EndoS的保护作用随着RTX浓度的增加而降低, 在 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时降至30%存活, 尽管如此, 这个浓度是 $0.78 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的RTX浓度的60倍, 其存活与没有EndoS的情况下浓度为 $0.78 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时相同。因此, 即使在高抗体浓度 ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) 下, IdeS也可以防止CDC, 而EndoS也表现出强大的保护活性。预计这也适用于轻链特异性CAR-T细胞。

[0268] 实施例3-THP1效应细胞对经RTX调理的Daudi细胞的ADPC

[0269] 这些实验着手于IdeS和EndoS是否减少Fc γ R介导的吞噬作用 (ADCP) 的问题, 这是一种可能在存在先前存在或诱导的CAR特异性抗体的情况下限制CAR T细胞持久性的机制。

[0270] 细胞培养

[0271] THP1 (单核细胞效应细胞) 和Daudi靶细胞在完全谷氨酰胺D-MEM (5% FCS和PEST) 中扩增, 洗涤, 并在D-MEM10培养基中稀释, 然后进行实验。

[0272] 靶细胞标记

[0273] 在标记之前, Daudi细胞在PBS中洗涤两次以去除蛋白质。将细胞重新悬浮在PBS中, 并使用钙黄绿素 ($1 \text{mg}/\text{mL}$ 的钙黄绿素 $4 \mu\text{l}$ 添加到 6mL 细胞中) 染色, 并在RT下避光孵育。15分钟后, 细胞在培养基 (0.5% BSA) 中洗涤两次, 并以 2×10^6 个细胞/ mL 重悬于 3mL D-MEM 10培养基中。

[0274] 效应细胞标记

[0275] THP1细胞在PBS中洗涤两次以去除蛋白质并重悬于 5mL PBS中。添加FarRed ($5 \mu\text{L}$ FarRed添加到 5mL 细胞中) 并在RT下避光孵育。20分钟后, 将细胞在培养基中洗涤两次, 并以 3.6×10^6 个细胞/ mL 重悬于D-MEM 10中。

[0276] 靶效应细胞孵育

[0277] 滴定的RTX和酶 (IdeS或EndoS) 在 37°C 下孵育60分钟。Daudi靶细胞 ($50 \mu\text{l}$, $2 \times 10^6/\text{mL}$) 孵育30分钟以进行调理作用, 然后添加THP1效应细胞 ($50 \mu\text{l}$, $3.6 \times 10^6/\text{mL}$) 并孵育大约2小时, 以允许Daudi细胞的ADCP。细胞用5% PFA固定3分钟, 洗涤并转移以用于FACS分析。使用Accuri C6流式细胞仪分析细胞在FL2 (钙黄绿素) 和FL4 (FarRed) 中的MFI。双阳性细胞被认为是ADCP阳性。

[0278] 结果

[0279] 通过流式细胞术分析了IdeS和EndoS保护经RTX调理的CD20阳性Daudi细胞免受单核细胞THP1效应细胞Fc γ R介导的吞噬作用的有效性。简而言之, 在添加固定浓度的IdeS或EndoS之前, 用增加浓度的经RTX调理的钙黄绿素标记的Daudi细胞。在 37°C 下孵育30分钟后, 添加FarRed标记的THP1效应细胞进行约两小时。然后通过流式细胞术分析洗涤和固定

的细胞。FL2中钙黄绿素阳性的所有细胞都被门控并定义为100% Daudi细胞。然后将所有FL2阳性细胞在FL4中门控以获得RarRed阳性。这些钙黄绿素/FarRed双阳性细胞是THP1吞噬的Daudi细胞。IdeS去除Fc部分完全消除了THP1细胞吞噬调理的Daudi细胞的能力。EndoS对RTX的N297位置的去糖基化也导致该模型中吞噬作用的减少(参见图3)。

[0280] 因此,在ADCP方面,单核细胞系THP1被抗体调理的细胞吞入被IdeS处理完全防止,以及被EndoS处理减少。预计这也适用于轻链特异性CAR-T细胞。

[0281] 实施例4-免疫性血小板减少症 (ITP) 模型中的血小板保护

[0282] 正如上文使用RTX和Daudi细胞所证明的, IdeS和EndoS减轻了细胞表面受体-特异性抗体的效应功能。以下实验利用血小板减少症 (ITP) 模型对这些酶是否也能保护抗体致敏的内源性细胞免于消除进行体内研究。这表明通过用imlifidase或EndoS处理可以使针对细胞表面受体的有害多克隆抗体失活,从而模拟这些酶在抗CAR抗体的背景下对CAR T细胞持久性的影响。

[0283] ITP体内EndoS处理

[0284] 九周龄大的雌性Balb/c^{JBomTac}小鼠通过单次200μl i.p.注射通过蛋白G从兔抗小鼠血小板血清 (Cederland#CLA31440) 中纯化的抗血小板特异性抗体 (抗PLT IgG) (50μg IgG/每只小鼠) 来引发免疫性血小板减少症 (ITP)。30分钟后分别i.p.注射指定量的EndoS (10、30、90μg/每只小鼠),以PBS作为阴性对照。在两种情况下均注射载体溶液 (PBS) 的小鼠用作正常对照。注射后4小时评估小鼠的血肿或异常行为。24小时后,从尾静脉采集血液样本到Microvette CB300 (Sarstedt, Potassium-EDTA#16.444.100) 中。使用血液学分析仪VetScan HM5对血液样本中的血小板进行计数。

[0285] 用体外IdeS切割的抗PLT抗体诱导ITP

[0286] 通过蛋白G从小鼠血小板免疫兔的血清 (代码#CLA31440, Cederlane) 中纯化抗小鼠PLT IgG。处理IgG以产生IdeS切割产物scIgG和完全切割的Fc/F(ab')₂片段用于体内实验。

[0287] 九周龄大的雌性Balb/c^{JBomTac}小鼠通过单次200μl i.p.注射250μg/每只小鼠的抗PLT IgG、scIgG或Fc/F(ab')₂片段来引发ITP。一些小鼠注射了PBS以建立正常的血小板对照水平。24小时后,从尾静脉采集血液样本到Microvette CB300 (Sarstedt, Potassium-EDTA#16.444.100) 中。使用血液学分析仪VetScan HM5对血液样本中的血小板进行计数。

[0288] ITP体内IdeS处理

[0289] 九周龄大的雌性Balb/c^{JBomTac}小鼠通过单次200μl i.p.注射通过蛋白G从兔抗小鼠血小板血清 (Cederland#CLA31440) 中纯化的抗PLT IgG (250μg IgG/每只小鼠) 来引发ITP。在i.p.注射抗PLT IgG后一小时,i.v.施用IdeS (0、0.2、2、20μg/每只小鼠)。正常血小板水平的对照小鼠仅注射PBS。24小时后,从尾静脉采集血液样本到Microvette CB300 (Sarstedt, Potassium-EDTA#16.444.100) 中。使用血液学分析仪VetScan HM5对血液样本中的血小板进行计数。

[0290] 结果

[0291] 本研究的目的是评估IdeS切割产物scIgG或F(ab')₂IgG片段作为效应功能调节物与体内完整抗PLT IgG相比的体内效果。

[0292] 通过以0.25mg/每只小鼠的剂量单次i.p.注射兔抗小鼠血小板纯化的完整IgG、兔

scIgG或F(ab')₂片段,在BALB/c小鼠中诱导免疫性血小板减少症(ITP)。在诱导ITP后一天使小鼠流血,并通过尾静脉采集血液。血小板在VetScan HM5中自动计数。两只仅接受PBS的幼稚小鼠被用作对照小鼠。它们的正常血小板水平为 657×10^9 个血小板/L,相比而言,注射了兔抗小鼠血小板纯化的IgG的小鼠的血小板数量下降至 86×10^9 个血小板/L(参见图4)。然而,在注射了抗PLT scIgG的小鼠中可以看到血小板的少量减少。在用纯化的兔抗小鼠血小板F(ab')₂IgG片段处理的小鼠中,未观察到诱导了血小板减少症。

[0293] 从这个实验中,我们可以得出结论,通过IdeS在体外产生scIgG或F(ab')₂,可以实现对血小板减少症的防护作用。可以预期其他靶向嵌合抗原受体T细胞(包括轻链特异性CAR-T细胞)上新表位的先前存在或从头合成的抗体具有类似的防护作用。

[0294] 当注射了scIgG制剂时,可以部分防止血小板减少症,在IgG被IdeS切割成Fc和F(ab')₂片段后,完全地消除了血小板减少症(参见图4)。

[0295] 为了研究IdeS是否具有体内治疗效果,首先给小鼠引发注射血小板减少症的剂量的抗PLT兔IgG。一小时后,注射了不同剂量的IdeS。24小时后收集血液以建立不同组的小血小板计数。每只小鼠2 μ g IdeS足以挽救小鼠血小板的正常水平(参见图5)。因此,已经使用ITP小鼠模型在体内测试了IdeS对有害的抗血小板抗体(抗PLT)的治疗效果。将完整的多克隆抗PLT兔抗体(250 μ g)注射到小鼠中会导致强烈的ITP表型伴随血小板衰竭。

[0296] 当将EndoS注射到抗PLT IgG致敏小鼠体内时,可以看到类似的结果。50 μ g抗PLT抗体足以在24小时内将血小板计数从大约 600×10^9 /L降低到 200×10^9 /L。每只小鼠10 μ g EndoS足以保护小鼠免受血小板减少症(参见图6)。

[0297] 这些实验表明,使用IdeS或EndoS可以防止或改善经调理细胞的致病性的抗体介导的效应功能。基于这些数据,预计这些酶还将通过使先前存在的和治疗诱导的ADA来提高CAR T/-NK细胞的存活和功效。

[0298] 总之,已经表明,可以通过使用IdeS和EndoS来防止模拟ADA对CAR-T细胞反应的受试抗体介导的效应功能(C1q和C4d沉积、CDC、ADCP),。

[0299] 实施例5

[0300] 进行实验以确认针对单链可变片段(scFv)嵌合抗原受体或针对CAR-T细胞上同种异体表位的抗体是否具有有害作用。因此,对来自不同来源的CAR特异性抗体和同种异体特异性抗体测试了结合以及Fc介导的抗体效应功能,即CAR-T细胞的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。此外,经证实,imlifidase处理可以保护CAR-T细胞免受那些有害的IgG效应机制的影响。

[0301] 材料与方法

[0302] 细胞

[0303] CAR-T细胞系,抗CD19scFv(FMC63)-h(28 ζ)CAR-Jurkat T-细胞(CARJ-ZP005, Creative biolabs, Shirley, NY, 美国)基于克隆E6-1; Jurkat野生型(wt)(克隆E6-1)(#EP-CL-0129, ElabScience, Houston, TX, 美国); 原代人CAR T细胞,抗BCMA4 CAR T-细胞(BCMA-4-TM8-4-1BB-CD3 ζ CAR-T细胞)(PM-CAR1037, ProMab Biotechnologies, Richmond, CA, 美国); 抗CD19 CAR T-细胞(CD19-scFv-Flag-TM--CD28-CD3 ζ CAR-T细胞)(PM-CAR1007, ProMab Biotechnologies); 空白scFv对照T细胞(PM-CAR1000, ProMab Biotechnologies)。抗CD19-scFv来源于鼠CD19特异性单克隆抗体FMC63。

[0304] THP-1单核细胞系 (ACC16, DSMZ, Braunschweig, 德国)。IgM BCR和CD20阳性的 Daudi细胞 (ACC78, DSMZ)。所有细胞均在完全RPMI 10培养基 (RPMI, 10%FCS和PEST) 中培养。在嘌呤霉素 (1mg/ml) 选择下培养抗CD19 CAR-Jurkat T细胞。

[0305] 抗体和人血清

[0306] CAR scFv交叉反应性抗F(ab')₂特异性抗体包括: 亲和纯化的兔抗人IgG, F(ab')₂片段特异性 (#309-005-006, JacksonImmunoResearch, WestGrove, PA, 美国); 亲和纯化的兔抗鼠IgG, F(ab')₂片段特异性 (#315-005-006, JacksonImmunoResearch); 山羊抗人-IgG-Fc-PE (LS-AB2, OneLambda); 和生物素化山羊抗兔Fc (#111-066-046, JacksonImmunoResearch)。使用链霉亲和素-Alexa Fluor 647 (SA-AF647) (#016-600-084, JacksonImmunoResearch) 检测生物素化山羊抗兔Fc。

[0307] 人男性和女性血清样本 (n=119) 均购自BioIVT (BioIVT, Westbury, NY, 美国) 并用于人抗小鼠抗体 (HAMA) 的定量和同种异体特异性抗体筛选。对于来自高度HLA致敏患者 (n=8) 和1期健康志愿者 (n=11) 的匿名临床研究样本, 针对抗CD19 CAR-Jurkat T细胞的HAMA和HLA同种异体反应性进行了筛选。用于HLA同种异体反应性的对照血清购自OneLambda, 包括FlowPRA HLA I类阳性对照血清 (FL1-PC, OneLambda, WestHills, CA, 美国)、FlowPRAHLA II类阳性对照血清 (FL1-PC, OneLambda) 和HLA阴性对照血清 (LS-NC, LABScreen, OneLambda) 或健康供者捐赠的研究样本。

[0308] 基于ELISA的HAMA检测

[0309] 桥式ELISA试剂盒“LEGEND MAX人抗小鼠Ig (HAMA)” (目录号438307, 批号B329842, BioLegend, SanDiego, CA, 美国) 用于检测人血清中的HAMA。简而言之, 洗涤预先包被小鼠IgG的板, 并与未稀释的人血清样本 (BioIVT)、HAMA质控品、标准曲线样本和小鼠IgG缀合物一起孵育。丢弃内容物, 并用洗涤缓冲液洗涤板。添加底物溶液, 并将板在室温 (RT) 下避光孵育15分钟。添加终止溶液来终止反应。使用SpectraMax i3x分光光度计 (SpectraMax i3x, MolecularDevices, SanJose, CA, 美国) 在30分钟内测量450nm和570nm处的吸光度。在Graph Pad Prism 9 (GraphPad Software, SanDiego, CA, 美国) 中使用4-参数逻辑曲线拟合算法分析OD结果。高于10ng/ml HAMA的血清样本被认为是HAMA阳性。

[0310] CAR特异性人血清的流式细胞术筛选

[0311] 抗CD19 CAR-Jurkat或Jurkat野生型T细胞 (1x10E5/孔) 在PBS中洗涤并以300g离心5分钟。将细胞沉淀重悬于50μl从基于ELISA的HAMA检测中选择的人血清样本中。然后洗涤血清孵育的细胞并用山羊抗人Fc-PE抗体 (OneLambda) 染色, 然后通过流式细胞术 (CytoFLEX流式细胞仪, #C02945, Beckman Coulter) 在FL2中分析平均荧光强度 (MFI) 水平。

[0312] CAR-T Jurkat同种异体反应性人血清的流式细胞术筛选

[0313] 抗CD19 CAR-Jurkat T细胞 (1x10E5) 在PBS中洗涤并以300g离心5分钟。将细胞沉淀重悬于50μl指定的人血清样本中。使用FlowPRA I类阳性对照血清 (OneLambda)、FlowPRA II类阳性对照血清 (OneLambda) 和HLA阴性对照血清 (OneLambda) 作为对照。使用PE缀合的山羊抗人IgG (LS-AB2, OneLambda) 来检测结合的同种异体抗体。洗涤步骤后, 将细胞重悬于PBS中, 并使用流式细胞仪 (CytoFLEX) 分析MFI值。

[0314] 与原代CAR-T结合的多克隆IgG

[0315] 将原代人CAR T细胞 (包括抗BCMA4 CAR T细胞 (PM-CAR1037, ProMab

Biotechnologies)、抗CD19CAR T细胞(PM-CAR1007, ProMab Biotechnologies))和空白scFv对照细胞(PM-CAR1000, ProMab Biotechnologies)解冻、洗涤,并与兔抗小鼠IgG(F(ab')₂特异性)(#315-005-006, JacksonImmunoResearch)一起孵育30分钟。表达BCR的Daudi细胞作为F(ab')₂阳性对照染色。然后洗涤细胞并相继与生物素化山羊抗兔Fc抗体和SA-AF647(#016-600-084, JacksonImmunoResearch)孵育。使用类似的方法评估多克隆抗小鼠和抗人IgG抗体与抗CD19 CAR-Jurkat T细胞的结合。

[0316] 使用表达Fc γ RI的效应细胞的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)

[0317] 将抗CD19 CAR-Jurkat T细胞与血清一起孵育,并使用Fc γ RI报告生物测定试剂盒(#CS1781C01, Promega, Madison, WI, 美国)测试ADCP诱导。简而言之,将人血清样本(BioIVT和来自06研究的匿名血清)、HLA I类阳性对照血清(FL1-PC, OneLambda)和HLA阴性对照血清(#LS-NC, OneLambda)在有或没有10 μ g/mL imlifidase的情况下在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。将抗CD19 CAR-Jurkat靶T细胞(CARJ-ZP005, Creative Biolabs)(7500个/孔)离心,在D-PBS中洗涤一次,重悬于提供的测定缓冲液(RPMI-1640中的4%低IgG血清)中。靶细胞与Imlifidase处理/未处理的抗体和血清在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。随后,将表达Fc γ RI的效应细胞(75000个/孔)(Promega)添加到经调理的靶细胞中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育6小时。最后,将细胞与Bio-GloTM荧光素酶测定试剂(Promega)在环境温度下孵育10分钟,然后使用发光读取仪(SpectraMax i3x)测量荧光素酶活性,其中积分时间设置为0.5秒/孔。使用GraphPad Prism 9.0(GraphPad Software, San Diego, CA, 美国)分析数据。板背景计算为包括测定缓冲液的三个重复的平均值,而无抗体对照计算为在存在/不存在imlifidase的情况下仅包含细胞的重复的平均值。诱导倍数(FoI)计算如下, FoI = RLU(诱导-背景)/RLU(无抗体对照-背景)。

[0318] 使用表达高亲和力Fc γ RIIIa(V158)和低亲和力Fc γ RIIIa(F158)的效应细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)

[0319] 抗体(利妥昔单抗, MabThera, Roche, Basel, 瑞士)、兔抗人IgG(F(ab')₂特异性)(JacksonImmuno Research)、兔抗小鼠IgG(F(ab')₂特异性)(JacksonImmunoResearch)和人血清(BioIVT和来自高度HLA致敏患者的匿名血清)在有或没有20 μ g/mL imlifidase的情况下在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,然后在4 $^{\circ}$ C下储存过夜。将靶细胞(7500个细胞/孔)(包括抗CD19 CAR-Jurkat(CARJ-ZP005, Creative Biolabs)、Jurkat wt细胞(EP-CL-0129, Elabscience, Houston, TX, 美国)和Daudi细胞(ACC78, DSMZ, Braunschweig, 德国))离心,在D-PBS(GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY, 美国)中洗涤一次,重悬于测定缓冲液(RPMI-1640(Promega, Madison, WI, 美国)中的4%低IgG血清),并与imlifidase处理/未处理的抗体和血清在37 $^{\circ}$ C下一起孵育1小时。之后,将表达低亲和力(#G979A, Promega)或高亲和力(#G701A, Promega)Fc γ RIIIa的75000个效应细胞添加到经调理的靶细胞中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育6小时。最后,将细胞与Bio-GloTM荧光素酶测定试剂(Promega)在环境温度下孵育10分钟,然后使用发光读取仪(SpectraMax i3x)测量荧光素酶活性,其中积分时间设置为0.5秒/孔。导出原始数据并使用GraphPad Prism 9.0(GraphPad Software)进行分析。板背景计算为包括测定缓冲液的三次重复的平均值,而无抗体对照计算为在存在/不存在imlifidase的情况下仅包含细胞的重复的平均值。还包括HLA阴性对照,代表来自健康供者的血清样本,其中不含可定量的抗HLA I类和II类抗体。诱导倍数(FoI)计算如下, FoI = RLU(诱导-背景)/

RLU(无抗体对照-背景)。

[0320] 基于流式细胞术的ADCP测定

[0321] ADCP靶细胞(抗CD19 CAR-Jurkat T细胞、Jurkat wt T细胞和Daudi细胞)先用钙黄绿素-AM(C3099, Invitrogen, Carlsbad, CA, 美国)染色, 然后与imlifidase处理的(+/-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 兔抗人IgG(F(ab')₂特异性)抗体(#309-005-006, JacksonImmunoResearch)或抗小鼠IgG(F(ab')₂特异性)抗体(#315-005-006, JacksonImmunoResearch)按指定浓度孵育。或者, 将靶细胞沉淀整齐地(in neat)重悬于用imlifidase(+/-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理的人血清样本(25 μl)中, 用于用HAMA或同种异体IgG调理。单核细胞效应细胞系THP-1用CellTrace FarRed DDA0-SE(C34553, Molecular Probes, Eugene, OR, 美国)染色, 然后添加到靶细胞中并在37°C下孵育90分钟。通过流式细胞术(CytoFLEX流式细胞仪, #C02945, Beckman Coulter)评估吞噬作用。FL1和FL4双阳性细胞的数量, 反映了THP1细胞吞噬的靶细胞, 以占靶细胞的百分比表示。

[0322] CD19-蛋白结合阻断实验

[0323] 将兔抗小鼠IgG(F(ab')₂特异性抗体)(JacksonImmunoResearch Laboratories)与人血清(BioIVT)在有或没有10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ imlifidase的情况下在37°C下孵育60分钟。在接下来的孵育步骤中, 将IHAc(1mM)(I4386, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 美国)添加到所有样本中30分钟以使imlifidase失活。将抗CD19CAR-Jurkat和Jurkat wt T细胞与制备的血清和IgG样本在RT下孵育60分钟。将重组人CD19-Fc嵌合蛋白(atto 647N缀合的)(ATM9269, R&D systems, Minneapolis, MN, 美国)添加到细胞中并孵育45分钟, 然后通过流式细胞术(CytoFLEX流式细胞仪, #C02945, Beckman Coulter)进行分析。

[0324] 结果

[0325] F(ab')₂特异性多克隆抗体与CAR T细胞受体特异性结合

[0326] 用抗CD19或BCMA特异性嵌合抗原受体转染原代人T细胞以产生自体CAR T细胞, 用于鉴定CAR特异性抗体。当CAR的抗原特异性scFv结构域源自例如鼠单克隆抗体时, 它们包含对其受体而言是外源的表位, 即便是在自体CAR T细胞治疗的情况下。为了研究CAR特异性抗体对CAR T细胞的影响, 测试了不同来源的CAR特异性抗体的结合。多克隆兔抗小鼠F(ab')₂特异性抗体显示出与抗CD19 CAR T细胞(图7A)和抗BCMA-CAR T细胞(图7B)的交叉反应性, 而空白转染的T细胞(图7C)仍是未染色的。早先已证明对多克隆兔抗小鼠F(ab')₂检测试剂具有交叉反应性的表达B细胞受体的Daudi细胞(图7D)用于F(ab')₂阳性对照染色。用抗人CD19 CAR(其中受体的scFv基于鼠mAb FMC63)转导的人T细胞系Jurkat的染色证明了兔抗小鼠F(ab')₂抗体的强结合。使用兔抗人F(ab')₂甚至观察到一些交叉反应。这些数据证实针对不同靶标的各种不同的受体构建体可以与抗体结合。这种结合可能对诸如CAR T细胞治疗的过继性细胞转移免疫疗法产生负面影响, 因此这些抗体被进一步用于研究抗CAR T细胞抗体介导的效应功能, 以及用imlifidase处理可以在多大程度上防止这些效应功能。

[0327] HAMA和CD19-CAR Jurkat T细胞同种异体特异性血清的鉴定

[0328] 一组可能具有CAR特异性的抗体是人抗小鼠抗体(HAMA)。可以在夹心ELISA中用鼠IgG包被的测定板量化人血清样本中的HAMA水平。经过验证的HAMAELISA试剂盒用于筛选人血清中的HAMA(图8A)。测试了所选择的已鉴定的HAMA阳性和HAMA阴性样本与抗CD19 CAR-

Jurkat T细胞的结合。包括Jurkat wt T细胞以区分HAMA特异性IgG的结合与HLA同种异体反应。可以证明ELISA HAMA阳性血清也与抗CD19 CAR T细胞受体特异性结合(图8B)。描绘了针对HAMA通过ELISA筛选的血清(图8C)。然后通过流式细胞术进一步筛选这些样本的IgG结合。这使得选择出HAMA或抗CD19 CAR T细胞同种异体反应性血清,以进一步剖析这些不同的IgG组对抗CD19 CAR-Jurkat T细胞的影响。据信HAMA是在正常个体中因接触鼠抗原而诱发的。可预期HAMA的频率和浓度在接受基于鼠mAb的生物制剂的患者中更高,在某些情况下甚至会导致这些治疗剂的部分中和。与健康个体相比,在HLA致敏移植患者的血清中可以检测到更高水平的针对抗CD19 CAR-Jurkat T细胞的同种异体抗体(图8D)。八名筛选的高度抗HLA致敏患者中有五名呈阳性,一名患者对于抗CD19 CAR-Jurkat T细胞是高度抗HLA致敏的。两名筛选的个体没有针对抗CD19 CAR Jurkat细胞的同种异体抗体。

[0329] 这些数据表明,能够结合受体构建体的抗体在人患者(包括健康个体)中是可检测到的,并且在经历过可增加HLA致敏性的治疗(例如移植)的患者中有所增加。

[0330] 同种异体抗体不仅可以在器官移植中被诱导,也可以由于妊娠和输血而被诱导。将同种异体细胞疗法输注到患者体内可能是同种异体抗体的额外的诱导剂,可能会给同种异体CAR T细胞治疗带来问题。

[0331] imlifidase处理防止多克隆抗F(ab')₂抗体对抗CD19CAR-T细胞的ADCP调理作用,并且imlifidase防止同种异体血清调理的CD19-CAR Jurkat T细胞诱导ADCP

[0332] 对于多克隆抗F(ab')₂抗体(对CD19 scFv CAR结构域具有特异性)和HLA特异性抗体(针对同种异体抗CD19 CAR-Jurkat T细胞),测试了抗体介导的细胞吞噬作用(ADCP)的诱导以及对其通过用IgG切割酶imlifidase处理来防止(参见图9和图10)。基于流式细胞术的ADCP模型与钙黄绿素染色的靶细胞和CellTrace FarRed标记的单核细胞THP1效应细胞一起使用。通过流式细胞术采集细胞使得能区分单阳性细胞和双阳性细胞,即被吞噬的细胞。用兔抗小鼠F(ab')₂(图9A)或交叉反应性抗人F(ab')₂抗体(图9B)调理抗CD19 CAR-Jurkat靶细胞。在这两种情况下,添加imlifidase(10μg/mL)都防止了靶细胞的ADCP。没有摄取Jurkat wt细胞,表明吞噬作用是抗CD19 CAR依赖性的(图9D、E)。BCR阳性Daudi靶细胞用作F(ab')₂抗体介导的ADCP的阳性对照(图9C、F)。这些数据表明,受体特异性抗体可诱导针对T细胞的ADCP,ADCP预期会对细胞疗法产生负面影响。数据还表明,用imlifidase处理可有效防止ADCP。此外,使用生物发光Fc γ RI报告测定(#CS1781C01, Promega, #CS1781C01)测试了对同种异体Jurkat CAR T细胞致敏的人血清对ADCP的调理作用和诱导。来自正常个体(图10A)和高度抗HLA致敏患者(图10B)的血清能够调理抗CD19 CAR-Jurkat T细胞并诱导ADCP。血清IgG对同种异体细胞的ADCP诱导可以通过用imlifidase处理来降低。因此,这些数据证实了来自正常个体和致敏患者的血清中的抗体诱导针对过继性细胞转移免疫疗法细胞的ADCP,但这可以通过imlifidase处理来减少。

[0333] imlifidase处理防止Fc γ RIIIIa等位基因(V158)和等位基因(F158)抗CD19CAR特异性抗体诱导的ADCC(V158)。

[0334] 抗体依赖性细胞毒性(ADCC)是通过效应细胞上Fc γ RIIIIa(CD16a)与IgG调理的靶细胞接合而触发的。一般人群中存在两个主要的CD16a等位基因,一个是在第158位具有缬氨酸的高亲和力变体(V158),另一个是在第158位具有苯丙氨酸的低亲和力变体(F158)。这些等位基因被引入ADCC生物发光测定(Promega)的效应细胞中。在有和没有imlifidase

(20g/mL)处理的情况下,将抗CD19 CAR-Jurkat T细胞与兔抗小鼠(图11A)或抗人(图11B)F(ab')₂抗体一起孵育。将经调理的靶细胞与高亲和力Fc γ RIIIa (V158)效应细胞一起孵育。抗小鼠F(ab')₂抗体调理的靶细胞强烈地诱导ADCC。在经imlifidase处理的样本中ADCC的诱导被完全消除(图11A)。多克隆抗人F(ab')₂诱导的刺激作用较弱,但可以在100μg/mL时触发ADCC(图11B),这种作用在阴性对照Jurkat wt细胞中未发现(图11C)。用利妥昔单抗(图11D)或抗人F(ab')₂(图11E)调理的Daudi细胞用作阳性对照。此外,imlifidase处理经调理的Daudi靶细胞防止了ADCC的诱导(图11D、E)。

[0335] 使用低亲和力Fc γ RIIIa ADCC生物发光报告测定可以看到类似的结果(图12)。抗小鼠F(ab')₂处理的抗CD19 CAR-Jurkat T细胞诱导ADCC信号传导,这可以通过用imlifidase处理来防止(图12A)。另一方面,即使在最高(100μg/mL)抗体浓度下,多克隆抗人F(ab')₂抗体也无法触发ADCC信号传导(图12B)。与利妥昔单抗(图12D)或抗人F(ab')₂(图12E)一起孵育的Daudi细胞诱导低亲和力Fc γ RIIIa ADCC,而imlifidase处理防止了这种作用。

[0336] 这些数据进一步表明,受体特异性抗体可以介导对过继性细胞转移免疫疗法细胞的有害影响,特别是预期对细胞疗法产生负面影响的ADCC。数据还表明,用imlifidase处理可有效防止ADCC。

[0337] 通过imlifidase处理可防止HAMA调理的抗CD19 CAR-Jurkat T细胞对ADCC的诱导

[0338] 将用或不用20μg/mL imlifidase处理的ELISA-HAMA阴性(164)和阳性血清(184、187、208、250)与抗CD19 CAR-Jurkat T细胞一起孵育,然后将经调理的靶细胞添加到Fc γ RIIIa高亲和力等位基因转染的效应细胞(Promega)中。来自两份HAMA阳性血清(184、250)的生物发光信号在imlifidase的存在下减少(图13)。这表明人血清中的一部分小鼠IgG结合HAMA抗体与抗CD19 CAR结合,从而使得效应细胞的CD16 Fc γ RIIIa被触发。因此,这些数据进一步表明,人血清中的抗体介导了对过继性细胞转移免疫疗法细胞的有害作用,但这可以通过imlifidase处理来减少。

[0339] 可以通过imlifidase处理改善CD19蛋白与暴露于血清的抗CD19 CAR T细胞的结合

[0340] 对于成功的CAR T细胞疗法,它们的嵌合抗原受体与其靶蛋白的特异性相互作用是必需的步骤。血清IgG与抗CD19 CAR的结合可能会干扰其与靶细胞上的例如CD19的同源接合。对通过ELISA鉴定的HAMA阳性和阴性血清样本(图14)测试了对重组atto-647N标记的人CD19蛋白与抗CD19 CAR-Jurkat T细胞结合的干扰。在大多数样本中,imlifidase对血清IgG的消化导致来自抗CD19 CAR-Jurkat T细胞的中值FI信号增加,表明atto-647N标记的CD19蛋白的结合增加。这表明过继性细胞免疫疗法(例如抗CD19 CAR T细胞)与其靶蛋白的相互作用可以通过用imlifidase处理而仅去除IgG-Fc部分(这可以减少空间位阻)来增加。imlifidase的体外作用在体内可能更强,因为阻断F(ab')₂片段的半衰期将比其完整的IgG等效物更短。

[0341] 实施例6-在IdeS存在下与可溶性免疫球蛋白一起培养的CAR-T细胞中消除细胞因子的产生

[0342] 介绍

[0343] 本研究调查了针对免疫球蛋白轻链的CAR-T细胞构建体(例如Ranganathan et

al., Clin Cancer Res, 2021 and Vera et al., Blood 2006; 108 中公开的构建体) 在免疫球蛋白存在下是否表现出细胞因子 IFN γ 和 IL-2 的基线产生。还研究了将 IdeS 添加到该混悬液中是否会导致可溶性免疫球蛋白切割并减少或消除细胞因子产生。

[0344] 方法

[0345] 在第一个实验中, 从两名健康人供者获得的外周血单个核细胞中分离出 T 细胞。T 细胞被转导 CD19 靶向 CAR 构建体 (CD19.CAR) 或 κ 轻链靶向 CAR 构建体 (κ .28)。一群未转导细胞 (NTD) 用作阴性对照。然后将细胞置于四种不同的培养条件下, 每种条件下的可溶性免疫球蛋白浓度逐渐升高。然后将 IdeS 添加到各组类似接种的 CAR-T 细胞中, 以观察细胞因子产生的变化。

[0346] 在第二个实验中, 将第一个实验用第二轻链靶向构建体即 λ 轻链靶向 CAR (λ .28) 重复进行。使用从健康人供者获得的 T 细胞, 并用 CD19.CAR、 κ .28、 λ .28 进行转导或不进行转导 (NTD)。将细胞接种在与前面相同的可溶性免疫球蛋白浓度中, 并再次添加 IdeS 或不添加。

[0347] 结果

[0348] 如图 1 所示, 无论血清中可溶性免疫球蛋白的浓度如何, NTD 细胞和 CD19.CAR 均不会产生任何干扰素 γ (IFN γ)。这证实该检测有效, 因为 NTD 细胞和 CD19.CAR 不识别可溶性免疫球蛋白。

[0349] κ .28 T 细胞在可溶性免疫球蛋白存在下产生 IFN γ , 表现出基线细胞因子产生。此外, 血清中可溶性免疫球蛋白浓度越高, 产生的 IFN γ 就越多。然而, 当将 IdeS 添加到类似接种的 κ .28 细胞中时, IFN γ 产生被消除。这些结果在两个供者中都是可复制的。这些数据表明, 轻链特异性 CAR-T 细胞可以在肿瘤外被可溶性免疫球蛋白刺激, 并且这种刺激可以被 IdeS 消除。因此, 预计 IdeS 施用将有助于维持 CAR-T 细胞活性并减少衰竭。

[0350] 在第二个实验中, 观察到了类似的结果, 如图 2 所示。这些数据证实, 轻链特异性 CAR-T 细胞可以在肿瘤外被可溶性免疫球蛋白刺激, 并且这种刺激可以被 IdeS 消除。因此, 预计 IdeS 施用将有助于维持 CAR-T 细胞活性并减少衰竭。 λ .28 构建体产生的 IFN γ 最少, 这可能是由于所用的可溶性人免疫球蛋白血清是多克隆的, 并且 κ : λ 比率为 2:1, 这与人体内自然发生的情况一样。因此, 所用的可溶性免疫球蛋白血清中的 λ 轻链的量可能不足以引发细胞因子的产生。

序列表信息:

DTD 版本: V1_3

文件名: Sequence Listing N422948WO.xml

软件名称: WIPO Sequence

软件版本: 2.1.2

生成日期: 2022-11-08

基本信息:

[0351]

当前申请 / 知识产权局: WO

当前申请 / 申请人档案名: N422948WO

最早优先权申请 / 知识产权局: US

最早优先权申请 / 申请号: 63/279,398

最早优先权申请 / 申请日: 2021-11-15

申请人姓名或名称: HANSA BIOPHARMA AB

申请人姓名或名称 / 语言: en

发明名称: 增强过继性细胞转移免疫疗法的方法 (en)

序列总量: 92

序列:

序列号 (ID): 1

长度: 339

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..339

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌 (Streptococcus pyogenes)

残基:

MRKRCYSTSA AVLAAVTLFV LSVDRGVIAD SFSANQEIRY SEVTPYHVTS VWTGKVTPPA
60
NFTQGEDVFH APYVANQGWY DITKTFNGKD DLLCGAATAG NMLHWWFDQN
KDQIKRYLEE 120
HPEKQKINFN GEQMFDVKEA IDTKNHQLDS KLFYFKEKA FPYLSTKHLG
VFPDHVIDMF 180
INGYRLSLTN HGTPVKEGS KDPRGGIFDA VFTRGDQSKL LTSRHDFKEK NLKEISDLIK
240
KELTEGKALG LSHTYANVRI NHVINLWGAD FDSNGNLKAI YVTDSDSNAS
IGMKKYFVG 300
[0352] NSAGKVAISA KEIKEDNIGA QVLGLFTLST GQDSWNQTN 339

序列号 (ID): 2

长度: 310

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..310

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DSFSANQEIR YSEVTPYHVT SVWTGKVTPP ANFTQGEDVF HAPYVANQGW
YDITKTFNGK 60
DDLLCGAATA GNMLHWWFDQ NKDQIKRYLE EHPEKQKINF NGEQMFDVKE
AIDTKNHQLD 120
SKLFYFKEK AFPYLSTKHL GVFPDHVIDM FINGYRLSLT NHGTPVKEG SKDPRGGIFD
180
AVFTRGDQSK LLTSRHDFKE KNLKEISDLI KKELTEGKAL GLSHTYANVR INHVINLWGA
240
DFDSNGNLKA IYVTDSDSNA SIGMKKYFVG VNSAGKVAIS AKEIKEDNIG AQVLGLFTLS
300

TGQDSWNQTN

310

序列号 (ID): 3

长度: 349

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..349

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

MKTIAYPNKP HSLSAGLLTA IAIFSLASSN ITYADDYQRN ATEAYAKEVP HQITSVWTKG
60
VTPLTPEQFR YNNEDVIHAP YLAHQGWYDI TKAFDGKDNL LCGAATAGNM
LHWWFQDNKT 120
EIEAYLSKHP EKQKIIFNNQ ELFDLKAAID TKDSQTNSQL FNYFRDKAFP NLSARQLGVM
180
PDLVLDMFIN GYYLNVFKTQ STDVNRPYQD KDKRGGIFDA VFTRGDQTTL
LTARHDLKNK 240
GLNDISTIIK QELTEGRALA LSHTYANVSI SHVINLWGAD FNAEGNLEAI YVTDSDANAS
300
IGMKKYFVGI NAHGHVAISA KKIEGENIGA QVLGLFTLSS GKDIWQKLS
349

[0353]

序列号 (ID): 4

长度: 315

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..315

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT SVWTKGVTPL TPEQFRYNNE DVIHAPYLAH
QGWDITKAF 60
DGKDNLLCGA ATAGNMLHWW FDQNKTEIEA YLSKHPEKQK IIFNNQELFD
LKAAIDTKDS 120
QTNSQLFNYF RDKAFPNSA RQLGVMPDLV LDMFINGYYL NVFKTQSTDV
NRPYQDKDKR 180
GGIFDAVFTR GDQTLLTAR HDLKNKGLND ISTIIKQELT EGRALALSHT YANVSISHVI
240
NLWGADFNAE GNLEAIYVTD SDANASIGMK KYFVGINAHG HVAISAKKIE

GENIGAQVLG 300

LFTLSSGKDI WQKLS

315

序列号 (ID): 5

长度: 313

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..313

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT SVWTKGVTPPL TPEQFRYNNE DVFHAPYVAN
 QGWYDITKAF 60
 DGKDNLLCGA ATAGNMLHWW FDQNKDQIKR YLEEHPEKQK INFNGDNMFD
 VKKAIDTKNH 120
 QLDSKLFNYF KEKAFPGLSA RRIGVFPDHV IDMFINGYRL SLTNHGPTPV KEGSKDPRGG
 180
 IFDAVFTRGN QSKLLTSRHD FKNKNLNDIS TIHKQELTKG KALGLSHTYA NVSINHVINL
 240
 WGADFNAEGN LEAIYVTDSD SNASIGMKKY FVGVNAHGHV AISAKKIEGE
 [0354] NIGAQVLGLF 300
 TLSTGQDSWQ KLS 313

序列号 (ID): 6

长度: 315

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..315

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT SVWTKGVTPPL TPEQFRYNNE DVIHAPYLAN
 QGWYDITKAF 60
 DGKDNLLCGA ATAGNMLHWW FDQNKTEIEA YLSKHPEKQK IIFRNQELFD
 LKEAIRTKDS 120
 QTNSQLFEYF RDKAFPYLSA RQLGVMPDLV LDMFINGYYL NVFKTQSTDV
 KRPYQDKDKR 180
 GGIFDAVFTR GNQTLLTAR HDLKNKGLND ISTIIKEELT KGRALALSHT YANVSISHVI
 240
 NLWGADFNAE GNLEAIYVTD SDANASIGMK KYFVGINKHG HVAISAKKIE

GENIGAQVLG 300

LFTLSSGKDI WQKLN

315

序列号 (ID): 7

长度: 315

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..315

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA	YAKEVPHQIT	SVWTKGVTP	TPEQFRYNNE	DVIHAPYLAH
QGWYDITKTF 60				
NGKDNLLCGA	ATAGNMLHWW	FDQNKTEIEA	YLSKHPEKQK	IIFNNEELFD
LKAAIDTKDS 120				
QTNSQLFNYP	KEKAFPNLST	RQLGVMPDLV	LDMFINGYYL	NVFKTQSTDV
NRPYQDKDKR 180				
GGIFDAVFTR	GNQTTLLTAR	HDFKEKGLKD	ISTIHKQELT	EGRALALSHT
240				

[0355]

NLWGADFDAE	GNLKAIYVTD	SDANASIGMK	KYFVGINAHG	KVAISAKKIE
GENIGAQVLG 300				
LFTLSSGKDI WQQLS				315

序列号 (ID): 8

长度: 315

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..315

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DSFSANQEIR	YSEVTPYHVT	SVWTKGVTP	TPEQFRYNNE	DVIHAPYLAH
QGWYDITKAF 60				
DGKDNLLCGA	ATAGNMLHWW	FDQNKTEIEA	YLSKHPEKQK	IIFNNQELFD
LKAAIDTKDS 120				
QTNSQLFNYP	RDKAFPNLSA	RQLGVMPDLV	LDMFINGYYL	NVFKTQSTDV
NRPYQDKDKR 180				
GGIFDAVFTR	GDQTTLLTAR	HDLKNKGLND	ISTIHKQELT	EGRALALSHT
240				
NLWGADFNAE	GNLEAIYVTD	SDANASIGMK	KYFVGINAHG	HVAISAKKIE

GENIGAQVLG 300

LFTLSSGKDI WQKLS

315

序列号 (ID): 9

长度: 295

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..295

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

SVWTKGVTPPL TPEQFRYNNE DVIHAPYLAH QGWYDITKAF DGKDNLLCGA

ATAGNMLHWW 60

FDQNKTEIEA YLSKHPEKQK IIFNNQELFD LKAAIDTKDS QTNSQLFNYYF RDKAFPNLSA

120

RQLGVMPDLV LDMFINGYYL NVFKTQSTDV NRPYQDKDKR GGIFDAVFTR

GDQTTLLTAR 180

HDLKNKGLND ISTIHKQELT EGRALALSHT YANVSISHVI NLWGADFNAE GNLEAIYVTD

240

[0356] SDANASIGMK KYFVGINAHG HVAISAKKIE GENIGAQVLG LFTLSSGKDI WQKLS
295

序列号 (ID): 10

长度: 314

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..314

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT SVWTKGVTPPL TPEQFTQGED VIHAPYLAHQ

GWYDITKAFF 60

GKDNLLCGAA TAGNMLHWWF DQNKTEIEAY LSKHPEKQKI IFNNQELFDL

KAAIDTKDSQ 120

TNSQLFNYYFR DKAFPNLSAR QLGVMPDLVL DMFINGYYLN VFKTQSTDVN

RPYQDKDKRG 180

GIFDAVFTRG DQTTLLTARH DLKNKGLNDI STIHKQELTE GRALALSHTY ANVSISHVIN

240

LWGADFNAEG NLEAIYVTDSDANASIGMKK YFVGINAHGH VAISAKKIEG

ENIGAQVLGL 300

FTLSSGKDIW QKLS

314

序列号 (ID): 11

长度: 312

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..312

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT SVWTKGVTPP EQFTQGEDVI HAPYLAHQGW
YDITKAFDGK 60
DNLLCGAATA GNMLHWWFDQ NKTEIEAYLS KHPEKQKIIF NNQELFDLKA
AIDTKDSQTN 120
SQLFNYFRDK AFPNLSARQL GVMPDLVLDM FINGYYLNVF KTQSTDVNRP
YQDKDKRGGI 180
FDAVFTRGDQ TTLLTARHDL KKNKGLNDIST IIKQELTEGR ALALSHTYAN VSISHVINLW
240
GADFNAEGNL EAIYVTSDA NASIGMKKYF VGINAHGHVA ISAKKIEGEN IGAQVLGLFT
300
[0357] LSSGKDIWQK LS 312

序列号 (ID): 12

长度: 313

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..313

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT SVWTKGVTPP EQFRYNNEDV IHAPYLAHQG
WYDITKAFDG 60
KDNLLCGAAT AGNMLHWWFD QNKTEIEAYL SKHPEKQKII FNNQELFDLK
AAIDTKDSQT 120
NSQLFNYFRD KAFPNSARQ LGVMPDLVLD MFINGYYLNV FKTQSTDVNR
PYQDKDKRGG 180
IFDAVFTRGD QTLLTARHD LKNKGLNDIS TIIKQELTEG RALALSHTYA NVSISHVINL
240
WGADFNAEGN LEAIYVTSD ANASIGMKKY FVGINAHGHV AISAKKIEGE
NIGAQVLGLF 300

TLSSGKDIWQ KLS

313

序列号 (ID): 13

长度: 312

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..312

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT SVWTKGVTPP EQFTQGEDVI HAPYLAHQGW
YDITKAFDGK 60
DNLLCGAATA GNMLHWWFDQ NKTEIEAYLS KHPEKQKIII NNQELFDLKA
AIDTKDSQTN 120
SQLFNYFRDK AFPNLSARQL GVMPDLVLDM FINGYYLNVF KTQSTDVNRP
YQDKDKRGGI 180
FDAVFTRGDQ TTLTARHDL KNKGLNDIST IIKQELTEGR ALALSHTYAN VSISHVINLW
240
GADFNAEGNL EAIYVTSDA NASIGMKKYF VGINAHGHVA ISAKKIEGEN IGAQVLGLFT
300
[0358] LSSGKDIWQK LS 312

序列号 (ID): 14

长度: 312

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..312

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT SVWTKGVTPP EQFTQGEDVI HAPYLAHQGW
YDITKAFDGK 60
DNLLCGAATA GNMLHWWFDQ NKTEIEAYLS KHPEKQKIIIF RNQELFDLKA
AIDTKDSQTN 120
SQLFNYFRDK AFPNLSARQL GVMPDLVLDM FINGYYLNVF KTQSTDVNRP
YQDKDKRGGI 180
FDAVFTRGDQ TTLTARHDL KNKGLNDIST IIKQELTEGR ALALSHTYAN VSISHVINLW
240
GADFNAEGNL EAIYVTSDA NASIGMKKYF VGINAHGHVA ISAKKIEGEN IGAQVLGLFT
300

LSSGKDIWQK LS

312

序列号 (ID): 15

长度: 312

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..312

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT SVWTKGVTPP EQFTQGEDVI HAPYLAHQGW
YDITKAFDGK 60
DNLLCGAATA GNMLHWWFDQ NKTEIEAYLS KHPEKQKIII RNQELFDLKA
AIDTKDSQTN 120
SQLFNYFRDK AFPNLSARQL GVMPDLVLDM FINGYYLNVF KTQSTDVNRP
YQDKDKRGGI 180
FDAVFTRGDQ TTLTARHDL KNKGLNDIST IIKQELTEGR ALALSHTYAN VSISHVINLW
240
GADFNAEGNL EAIYVTSDA NASIGMKKYF VGINAHGHVA ISAKKIEGEN IGAQVLGLFT
300
[0359] LSSGKDIWQK LS 312

序列号 (ID): 16

长度: 312

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..312

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT SVWTKGVTPP EQFTQGEDVI HAPYLANQGW
YDITKAFDGK 60
DNLLCGAATA GNMLHWWFDQ NKTEIEAYLS KHPEKQKIIF RNQELFDLKE
AIRTKDSQTN 120
SQLFEYFRDK AFPYLSARQL GVMPDLVLDM FINGYYLNVF KTQSTDVKRP
YQDKDKRGGI 180
FDAVFTRGNQ TTLTARHDL KNKGLNDIST IIKEELTKGR ALALSHTYAN VSISHVINLW
240
GADFNAEGNL EAIYVTSDA NASIGMKKYF VGINKHGHVA ISAKKIEGEN IGAQVLGLFT
300

LSSGKDIWQK LN

312

序列号 (ID): 17

长度: 292

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..292

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

SVWTKGVTPP EQFTQGEDVI HAPYLAHQGW YDITKAFDGK DNLLCGAATA
GNMLHWWFDQ 60
NKTEIEAYLS KHPEKQKIIF RNQELFDLKA AIDTKDSQTN SQLFNYFRDK AFPNLSARQL
120
GVMPDLVLDM FINGYYLNVF KTQSTDVNRP YQDKDKRGGI FDAVFTRGNQ
TLLTARHDL 180
KNKGLNDIST IIKQELTEGR ALALSHTYAN VSISHVINLW GADFNAEGNL EAIYVTSDA
240
NASIGMKKYF VGINAHGHVA ISAKKIEGEN IGAQVLGLFT LSSGKDIWQK LS
292

[0360]

序列号 (ID): 18

长度: 312

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..312

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT SVWTKGVTPP EQFTQGEDVI HAPYLAHQGW
YDITKAFDGA 60
DNLLCGAATA GNMLHWWFDQ NKTEIEAYLS KHPEKQKIIF RNQELFDLKA
AIDTKDSQTN 120
SQLFNYFRDK AFPNLSARQL GVMPDLVLDM FINGYYLNVF KTQSTDVNRP
YQDKDKRGGI 180
FDAVFTRGNQ TLLTARHDL KNKGLNDIST IIKQELTEGR ALALSHTYAN VSISHVINLW
240
GADFNAEGNL EAIYVTSDA NASIGMKKYF VGINAHGHVA ISAKKIEGEN IGAQVLGLFT
300
LSSGKDIWQK LS 312

序列号 (ID): 19

长度: 292

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..292

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
SVWTKGVTPP    EQFTQGEDVI    HAPYLAHQGW    YDITKAFDGA    DNLLCGAATA
GNMLHWWFDQ    60
NKTEIEAYLS    KHPEKQKIIF    RNQELFDLKA    AIDTKDSQTN    SQLFNYFRDK    AFPNLSARQL
120
GVMPDLVLDM    FINGYYLNVF    KTQSTDVNRP    YQDKDKRGGI    FDAVFTRGNQ
TLLTARHDL    180
KNKGLNDIST    IIKQELTEGR    ALALSHTYAN    VSISHVINLW    GADFNAEGNL    EAIYVTDSDA
240
NASIGMKKYF    VGINAHGHVA    ISAKKIEGEN    IGAQVLGLFT    LSSGKDIWQK    LS
292
```

[0361]

序列号 (ID): 20

长度: 312

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..312

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
DDYQRNATEA    YAKEVPHQIT    SVWTKGVTPP    EQFTQGEDVI    HAPYLAHQGW
YDITKAFDGK    60
DNLLCGAATA    GNMLHWWFDQ    NKTEIEAYLS    KHPEKQKIIF    RNQELFDLKA
AIDTKDSQTN    120
SQLFNYFRDK    AFPNLSARQL    GVMPDLVLDM    FINGYYLNVF    KTQSTDVNRP
YQDKDKRGGI    180
FDAVFTRGNQ    TLLTARHDL    KNKGLNDIST    IIKQELTEGR    ALALSHTYAN    VSISHVINLW
240
GADFNAEGNL    EAIYVTDSDA    NASIGMKKYF    VGINAHGHVA    ISAKKIEGEN    IGAQVLGLFT
300
LSSGKDIWQK    LS                                     312
```

序列号 (ID): 21

长度: 312

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..312

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
DDYQRNATEA   YAKEVPHQIT   SVWTKGVTPPL   TPEQFTQGED   VFHAPYVANQ
GWYDITKAFFD  60
GKDNLLCGAA   TAGNMLHWWF   DQNKDQIKRY   LEEHPEKQKI   NFNGENMFDV
KKAIDTKNHQ   120
LDSKLFNYFK   EKAFFPYLSAK   HLGVPDPHVI   DMFINGYRLS   LTNHGPTPVK   EGSKDPRGGI
180
FDAVFTRGNQ   SKLLTSRHDF   KNKNLNDIST   IIKQELTKGK   ALGLSHTYAN   VRINHVINLW
240
GADFNAEGNL   EAIYVTDSDS   NASIGMKKYF   VGVNAHGHVA   ISAKKIEGEN
IGAQVLGLFT   300
LSTGQDSWQK   LS                                     312
```

[0362]

序列号 (ID): 22

长度: 312

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..312

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
DDYQRNATEA   YAKEVPHQIT   SVWTKGVTPPL   TPEQFTQGED   VFHAPYVANQ
GWYDITKAFFD  60
GKDNLLCGAA   TAGNMLHWWF   DQNKDQIKRY   LEEHPEKQKI   NFRGENMFDV
KEAIRTKNHQ   120
LDSKLFYFK    EKAFFPYLSAK   HLGVPDPHVI   DMFINGYRLS   LTNHGPTPVK   KGSKDPRGGI
180
FDAVFTRGNQ   SKLLTSRHDF   KNKNLNDIST   IIKSELTNGK   ALGLSHTYAN   VRINHVINLW
240
GADFNAEGNL   EAIYVTDSDS   NASIGMKKYF   VGVNKHGHVA   ISAKKIEGEN
IGAQVLGLFT   300
LSTGQDSWQK   LN                                     312
```

序列号 (ID): 23

长度: 312

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..312

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA	YAKEVPHQIT	SVWTKGVTPPL	TPEQFTQGED	VFHAPYVANQ
GWYDITKTFN	60			
GKDDLCLCGAA	TAGNMLHWWF	DQNKDQIKRY	LEEHPKQKI	NFNGEQMFDV
KEAIDTKNHQ	120			
LDSKLFYFK	EKAFPYLSTK	HLGVFPDHVI	DMFINGYRLS	LTNHGPTPVK
EGSKDPRGGI	180			
FDAVFTRGNQ	SKLLTSRHDF	KEKNLKEISD	LIKQELTEGK	ALGLSHTYAN
VRINHVINLW	240			
GADFDAEGNL	KAIYVTDSDS	NASIGMKKYF	VGUNAAGKVA	ISAKKIEGEN
IGAQVLGLFT	300			
LSTGQDSWNQ	TS			312

[0363]

序列号 (ID): 24

长度: 312

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..312

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA	YAKEVPHQIT	SVWTKGVTPPL	TPEQFTQGED	VFHAPYVANQ
GWYDITKTFN	60			
GKDDLCLCGAA	TAGNMLHWWF	DQNKDQIKRY	LEEHPKQKI	NFRGEQMFDV
KEAIRTKNHQ	120			
LDSKLFYFK	EKAFPYLSTK	HLGVFPDHVI	DMFINGYRLS	LTNHGPTPVK
KGSKDPRGGI	180			
FDAVFTRGNQ	SKLLTSRHDF	KEKNLKEISD	LIKEELTKGK	ALGLSHTYAN
VRINHVINLW	240			
GADFDAEGNL	KAIYVTDSDS	NASIGMKKYF	VGUNKAGKVA	ISAKKIEGEN
IGAQVLGLFT	300			
LSTGQDSWNQ	TN			312

序列号 (ID): 25

长度: 310

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..310

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
DDYQRNATEA    YAKEVPHQIT    SVWTKGVTPP    EQFTQGEDVI    HAPYVANQGW
YDITKAFDGK   60
DNLLCGAATA    GNMLHWWFDQ    NKDQIKRYLE    EHPEKQKINF    RGEQMFVKK
AIDTKNHQLD   120
SKLFNYFKEK    AFPGLSARRI    GVFPDHVIDM    FINGYRLSLT    NHGPTPVKEG    SKDPRGGIFD
180
AVFTRGNQSK    LLTSRHDFKN    KNLNDISTII    KQELTKGKAL    GLSHTYANVS    INHVINLWGA
240
DFNAEGNLEA    IYVTSDSNA    SIGMKKYFVG    VNAHGHVAIS    AKKIEGENIG    AQVLGLFTLS
300
TGQDSWQKLS                                     310
```

[0364]

序列号 (ID): 26

长度: 320

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..320

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
MDSFSANQEI    RYSEVTPYHV    TSVWTKGVTP    PANFTQGEDV    FHAPYVANQG
WYDITKTFNG   60
KDDLCCGAAT    AGNMLHWWFD    QNKDQIKRYL    EEHPEKQKIN    FNGEQMFVVK
EAIDTKNHQL   120
DSKLFYEFKE    KAFPYLSTKH    LGVFPDHVID    MFINGYRLSL    TNHPTPVKE    GSKDPRGGIF
180
DAVFTRGDQS    KLLTSRHDFK    EKNLKEISDL    IKKELTEGKA    LGLSHTYANV    RINHVINLWG
240
ADFDNNGNLK    AIYVTSDSN    ASIGMKKYFV    GVNSAGKVAI    SAKEIKEDNI
GAQVLGLFTL  300
STGQDSWNQT    NGGGHHHHHHH                                     320
```

序列号 (ID): 27

长度: 325

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..325

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
MDDYQRNATE    AYAKEVPHQI    TSVWTKGVTP    LTPEQFRYNN    EDVIHAPYLA
HQGWDYDITKA   60
FDGKDNLLCG    AATAGNMLHW    WFDQNKTEIE    AYLSKHPEKQ    KIIFNNQELF
DLKAAIDTKD   120
SQTNSQLFNY    FRDKAFPNLS    ARQLGVMPDL    VLDMFINGYY    LNVFKTQSTD
VNRPYQDKDK   180
RGGIFDAVFT    RGDQTTLLTA    RHDLKNKGLN    DISTIHKQEL    TEGRALALSH    TYANVSISHV
240
INLWGADFNA    EGNLEAIYVT    DSDANASIGM    KKYFVGINAH    GHVAISAKKI
EGENIGAQVL   300
GLFTLSSGKD    IWQKLSGGGH    HHHHHH                                     325
```

[0365]

序列号 (ID): 28

长度: 323

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..323

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
MDDYQRNATE    AYAKEVPHQI    TSVWTKGVTP    LTPEQFRYNN    EDVFHAPYVA
NQGWDYDITKA   60
FDGKDNLLCG    AATAGNMLHW    WFDQNKDQIK    RYLEEHPEKQ    KINFNGDNMF
DVKKAIDTKN   120
HQLDSKLFNY    FKEKAFPGLS    ARRIGVFPDH    VIDMFINGYR    LSLTNHGPTP    VKEGSKDPRG
180
GIFDAVFTRG    NQSKLLTSRH    DFKNKNLNDI    STIHKQELTK    GKALGLSHTY    ANVSINHVIN
240
LWGADFNAEG    NLEAIYVTDS    DSNASIGMKK    YFVGVAHGH    VAISAKKIEG
ENIGAQVLGL   300
FTLSTGQDSW    QKLSGGGHHH    HHHH                                     323
```

序列号 (ID): 29

长度: 11

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..11

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

PLTPEQFRYN N

11

序列号 (ID): 30

长度: 8

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..8

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

PPANFTQG

8

[0366]

序列号 (ID): 31

长度: 20

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..20

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT

20

序列号 (ID): 32

长度: 20

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..20

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DSFSANQEIR YSEVTPYHVT

20

序列号 (ID): 33

长度: 963

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..963

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacgtt 60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcactcaagg tgaagatgtt 120
tttccgctc cttatgttgc taaccaagga tggtagata ttacaaaac attcaatgga 180
aaagacgac ttcttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtggttcgat 240
caaaacaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttcaatggcg aacagatgtt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tatttgaata ttttaaagaa aaagcttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaa atccccgagg tggattttt 540
gacgccgtat ttacaagagg tgatcaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaa 600
gaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatcaacc atgttataa cctgtgggga 720
gctgactttg attctaacgg gaacctaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt 900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcgggtg gccatcatca ccatcaccac 960
taa

[0367]

963

序列号 (ID): 34

长度: 978

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..978

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc 60
acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca ctaacaccgg agcagtttcg atataataac 120
gaagatgtga tccatgcgcc atatcttgcct catcaaggct ggtacgatat caccaaggcc 180
ttcgatggga aggataatct cttgtgtggc gcagcaacgg caggtaatat gctgcattgg 240
tggtttgatc aaaataaac agagattgaa gcctatttaa gtaaacacc tgaaaagcaa 300
aaaatcattt ttaacaacca agagctattt gatttgaaag ctgctatcga taccaaggac 360

```

agtcaaacca atagtcagct ttttaattat tttagagata aagcctttcc aaatctatca 420
gcacgtcaac tcgggggttat gcctgatctt gttctagata tgtttatcaa tgggtactac 480
ttaaattgtt ttaaaacaca gtctactgat gtcaatcgac cttatcagga caaggacaaa 540
cgaggttgta ttttcgatgc tgtttcacc agaggagatc agacaacgct cttgacagct 600
cgtcatgatt taaaaataa aggactaaat gacatcagca ccattatcaa gcaagaactg 660
actgaaggaa gagcccttgc tttatcacat acctacgcca atgttagcat tagccatgtg 720
attaacttgt ggggagctga ttttaatgct gaaggaaacc ttgaggccat ctatgtcaca 780
gactcagatg ctaatgcgtc tattggtatg aaaaaatatt ttgtcgccat taatgctcat 840
ggacatgtcg ccatttctgc caagaaaata gaaggagaaa acattggcgc tcaagtatta 900
ggctatttta cgctttccag tggcaaggac atttggcaga aactgagcgg cgggtggccat 960
catcaccatc accactaa

```

978

序列号 (ID): 35

长度: 972

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..972

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

[0368]

```

atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt 60
accacggtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttcg ctataacaac 120
gaagatgtgt ttcattgcgc gtatgtggcg aaccaggcgt ggtatgatat taccaaagcg 180
tttgatggca aagataacct gctgtgcggc gcggcgaccg cgggcaacat gctgcattgg 240
tggtttgatc agaacaaga tcagattaaa cgctatctgg aagaacatcc ggaaaaacag 300
aaaattaact ttaacggcga taacatgtt gatgtgaaaa aagcattga taccaaaaac 360
catcagctgg atagcaaac gttaactat tttaaagaaa aagcgtttcc gggcctgagc 420
gcgcgcgcga ttggcgtgtt tccgatcat gtgattgata tgtttattaa cggctatcgc 480
ctgagcctga ccaacctgg cccgaccccg gtgaaagaag gcagcaaaga tccgcgcggc 540
ggcattttg atcggtgtt taccgcggc aaccagagca aactgctgac cagccgcat 600
gattttaaaa acaaaacct gaacgatatt agcaccatta ttaacagga actgacaaa 660
ggcaaagcgc tgggcctgag ccatacctat gcgaacgtga gcattaacca tgtgattaac 720
ctgtggggcg cggattttaa cgcggaaggc aacctggaag cgatttatgt gaccgatagc 780
gatagcaacg cgagcattgg catgaaaaa tttttgtgg gcgtgaacgc gcatggccat 840
gtggcgatta gcgcgaaaaa aattgaaggc gaaaacattg gcgcgcaggt gctgggcctg 900
tttaccctga gcaccggcca ggatagctgg cagaaactga gcggcggtgg ccatcatcac 960
catcaccact aa

```

972

序列号 (ID): 36

长度: 978

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..978

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt 60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttcg ctataacaac 120
gaagatgtga ttcatgcgcc gtatctggcg catcagggtt ggtatgatat taccaaaacc 180
tttaacggca aagataacct gctgtgcggc gcggcgaccg cgggcaacat gctgcattgg 240
tggtttgatc agaacaaaac cgaaattgaa gcgtatctga gcaaacatcc ggaaaaacag 300
aaaattattt ttaacaacga agaactgttt gatctgaaag cggcgattga taccaaat 360
agccagacca acagccagct gtttaactat tttaagaaa aagcgtttcc gaacctgagc 420
acccgccagc tgggcgtgat gccggatctg gtgctggata tgtttattaa cggctattat 480
gaagatgtga ttcatgcgcc gtatctggcg catcagggtt ggtatgatat taccaaaacc 180
tttaacggca aagataacct gctgtgcggc gcggcgaccg cgggcaacat gctgcattgg 240
tggtttgatc agaacaaaac cgaaattgaa gcgtatctga gcaaacatcc ggaaaaacag 300
aaaattattt ttaacaacga agaactgttt gatctgaaag cggcgattga taccaaat 360
agccagacca acagccagct gtttaactat tttaagaaa aagcgtttcc gaacctgagc 420
acccgccagc tgggcgtgat gccggatctg gtgctggata tgtttattaa cggctattat 480
catcaccatc accactaa
```

[0369]

978

序列号 (ID): 37

长度: 978

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..978

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt 60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttcg ctataacaac 120
gaagatgtga ttcatgcgcc gtatctggcg catcagggtt ggtatgatat taccaaaacc 180
tttaacggca aagataacct gctgtgcggc gcggcgaccg cgggcaacat gctgcattgg 240
tggtttgatc agaacaaaac cgaaattgaa gcgtatctga gcaaacatcc ggaaaaacag 300
aaaattattt ttaacaacga agaactgttt gatctgaaag cggcgattga taccaaat 360
agccagacca acagccagct gtttaactat tttaagaaa aagcgtttcc gaacctgagc 420
acccgccagc tgggcgtgat gccggatctg gtgctggata tgtttattaa cggctattat 480
```

```

ctgaacgtgt ttaaaaccca gagcaccgat gtgaaccgcc cgtatcagga taaagataaa 540
cgcgggcgga tttttagtc ggtgtttacc cgcgggcaacc agaccaccct gctgaccgcg 600
cgccatgatt taaagaaaa aggccgaaa gatattagca ccattattaa acaggaactg 660
accgaaggcc gcgcgctggc gctgagccat acctatgcga acgtgagcat tagccatgtg 720
attaacctgt ggggcgcgga tttttagtcg gaaggcaacc tgaaagcgat ttatgtgacc 780
gatagcgatg cgaacgcgag cattggcatg aaaaaatatt ttgtggcat taacgcgcat 840
ggcaaagtgg cgattagcgc gaaaaaatt gaaggcgaaa acattggcgc gcaggtgctg 900
ggcctgttta ccctagcag cggcaaagat atttggcagc agctgagcgg cgggtggccat 960
catcaccatc accactaa

```

978

序列号 (ID): 38

长度: 978

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..978

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

[0370]

```

atggatagct ttagcgcaa ccaggaaatt cgctatagcg aagtgacccc gtatcatgtg 60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttcg ctataacaac 120
gaagatgtga ttatcgccc gtatctggcg catcagggct ggtatgatat taccaaagcg 180
ttttagtgca aagataacct gctgtcggc gcggcgaccg cgggcaacat gctgcattgg 240
tggtttgac agaacaaaac cgaaattgaa gcgtatctga gcaaacatcc ggaaaaacag 300
aaaattttt ttaacaacca ggaactgtt gatctgaaag cggcgattga taccaaagat 360
agccagacca acagccagct gttaactat ttgcgcgata aagcgtttcc gaacctgagc 420
gcgcgccagc tgggcgtgat gccgatctg gtgctggata tgtttattaa cggctattat 480
ctgaacgtgt ttaaaaccca gagcaccgat gtgaaccgcc cgtatcagga taaagataaa 540
cgcgggcgga tttttagtc ggtgtttacc cgcgggcgatc agaccaccct gctgaccgcg 600
cgccatgac tgaaaaaaa aggccgaaac gatattagca ccattattaa acaggaactg 660
accgaaggcc gcgcgctggc gctgagccat acctatgcga acgtgagcat tagccatgtg 720
attaacctgt ggggcgcgga tttaacgcg gaaggcaacc tggaagcgat ttatgtgacc 780
gatagcgatg cgaacgcgag cattggcatg aaaaaatatt ttgtggcat taacgcgcat 840
ggccatgtgg cgattagcgc gaaaaaatt gaaggcgaaa acattggcgc gcaggtgctg 900
ggcctgttta ccctagcag cggcaaagat atttggcaga aactgagcgg cgggtggccat 960
catcaccatc accactaa

```

978

序列号 (ID): 39

长度: 918

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..918

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
atgagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttcg ctataacaac 60
gaagatgtga ttcatcgccc gtatctggcg catcagggct ggtatgatat taccaaagcg 120
tttcatggca aagataacct gctgtgcggc gcggcgaccg cgggcaacat gctgcattgg 180
tggtttgatc agaacaaaac cgaaattgaa gcgtatctga gcaaacatcc ggaaaaacag 240
aaaattattt ttaacaacca ggaactgttt gatctgaaag cggcgattga taccaaagat 300
agccagacca acagccagct gttaactat ttcgcgata aagcgttcc gaacctgagc 360
gcgcgccagc tgggcgtgat gccggatctg gtgctggata tgtttattaa cggctattat 420
ctgaacgtgt taaaaccca gagcaccgat gtgaaccgcc cgtatcagga taaagataaa 480
cgcgcgcgga ttttcatgac ggtgtttacc cgcgcgcatc agaccaccct gctgaccgcg 540
cgccatgac tgaaaaacaa aggcctgaac gatattagca ccattattaa acaggaactg 600
accgaaggcc gcgcgctggc gctgagccat acctatgcga acgtgagcat tagccatgtg 660
attaacctgt ggggcgcgga ttttaacgcg gaaggcaacc tggaagcgat ttatgtgacc 720
gatagcgatg cgaacgcgag cattggcatg aaaaaatatt ttgtggcat taacgcgcat 780
ggccatgttg cgattagcgc gaaaaaaatt gaaggcgaaa acattggcgc gcaggtgctg 840
ggcctgttta ccctgagcag cggcaaatgat atttgcgaga aactgagcgg cggtggccat 900
catcaccatc accactaa
```

918

[0371]

序列号 (ID): 40

长度: 975

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..975

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc 60
acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca ctaacacccg agcagtttac tcaagtgtaa 120
gatgtgatcc atgcgccata tcttgctcat caaggctggt acgatatcac caaggccttc 180
gatgggaagg ataatctctt gtgtggcgca gcaacggcag gtaatatgct gcattggtgg 240
tttcatcaaa ataaacaga gattgaagcc tatttaagta aacaccctga aaagcaaaaa 300
atcattttta acaaccaaga gctatttgat ttgaaagctg ctatcgatac caaggacagt 360
caaaccaata gtcagctttt taattatttt agagataaag cctttccaaa tctatcagca 420
cgteaactcg gggttatgcc tgatctgtt ctagatatgt ttatcaatgg ttactactta 480
aatgtgttta aaacacagtc tactgatgac aatcgacctt atcaggacaa ggacaaacga 540
gggtgttatt tcgatgctgt ttcaccaga ggagatcaga caacgctctt gacagctcgt 600
catgatttaa aaaataaagg actaaatgac atcagcacca ttatcaagca agaactgact 660
```

```
gaaggaagag cccttgcttt atcacatacc tacgccaatg ttagcattag ccatgtgatt 720
aactgtggg gagctgatt taatgctgaa ggaaacctg aggccatcta tgtcacagac 780
tcagatgcta atgcgtctat tggatgaaa aaatatattg tcggcattaa tgctcatgga 840
catgtcgcca ttctgcca gaaaatagaa ggagaaaaca ttggcgctca agtattaggc 900
ttattacgc ttccagtgg caaggacatt tggcagaaac tgagcggcgg tggccatcat 960
caccatcacc actaa
```

975

序列号 (ID): 41

长度: 969

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..969
 - > mol_type, 其他 DNA
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

[0372]

```
atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc 60
acttctgtat ggaccaaagg tggtacacca cccgagcagt ttactcaagg tgaagatgtg 120
atccatgcgc catatcttgc tcatcaaggc tggtagata tcaccaaggc cttcgtggg 180
aaggataatc tcttgtgtgg cgcagcaacg gcaggtataa tgctgcattg gtggtttgat 240
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaacacc ctgaaaagca aaaaatcatt 300
ttaacaacc aagagctatt tgattgaaa gctgctatcg ataccaagga cagtcaaacc 360
aatagtcagc ttttaatta ttttagagat aaagccttc caaatctatc agcacgtcaa 420
ctcgggggta tgcctgatct tgttctagat atgtttatca atggttacta cttaaattgt 480
ttaaaacac agtctactga tgtaatcga cttatcagg acaaggacaa acgagggtgt 540
atthtcgatg ctgttttcac cagaggagat cagacaacgc tcttgacagc tgcgtcatg 600
ttaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca agcaagaact gactgaagga 660
agagcccttg cttatcaca tacctacgcc aatgttagca ttagccatgt gattaacttg 720
tggggagctg attttaatgc tgaaggaaac cttgaggcca tctatgtcac agactcagat 780
gctaattcgt ctattggtat gaaaaaatat ttgtcggca ttaatgtca tggacatgtc 840
gccatttctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg ctcaagtatt aggcttatt 900
acgcttcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg gcggtggcca tcaccatcat 960
caccactaa
```

969

序列号 (ID): 42

长度: 972

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..972
 - > mol_type, 其他 DNA
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```

atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc 60
acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca cccgagcagt ttcatataa taacgaagat 120
gtgatccatg cgccatatct tgctcatcaa ggctggtagc atatcaccaa ggccttcgat 180
gggaaggata atctcttgtg tggcgagca acggcaggta atatgctgca ttggtgggtt 240
gatcaaaata aaacagagat tgaagcctat ttaagtaaac accctgaaaa gcaaaaaaat 300
attttaaca accaagagct atttgattg aaagctgcta tcgatacaca ggacagtcaa 360
accaatagtc agcttttaaa ttattttaga gataaagcct ttccaaatct atcagcacgt 420
caactcgggg ttatgcctga tctgttcta gatatgttta tcaatggta ctactaaat 480
gtgttataaa cacagtctac tgatgtcaat cgacctatc aggacaagga caaacgaggt 540
gggtatttcg atgctgtttt caccagagga gatcagacaa cgctcttgac agctcgtcat 600
gatttaaaaa ataaaggact aaatgacatc agcaccatta tcaagcaaga actgactgaa 660
ggaagagccc ttgctttatc acatacctac gccaatgta gcattagcca tgtgattaac 720
ttgtggggag ctgattttaa tgcgaagga aacctgagg ccatctatgt cacagactca 780
gatgctaatt cgctatttgg tatgaaaaaa tattttgtcg gcattaatgc tcatggacat 840
gtcgccattt ctgcaagaa aatagaagga gaaaacattg gcgctcaagt attaggctta 900
tttacgcttt ccagtgga gacatttgg cagaaactga gcggcggtgg ccatcatcac 960
catcaccact aa

```

972

[0373]

序列号 (ID): 43

长度: 969

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..969

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```

atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc 60
acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca cccgagcagt ttactcaagg tgaagatgtg 120
atccatgcgc catatcttgc tcatcaaggc tggtagata tcaccaaggc cttcgatggg 180
aaggataatc tcttgtgtgg cgcagcaacg gcaggtaata tgctgcattg gtggtttgat 240
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaacacc ctgaaaagca aaaaatcatt 300
attaacaacc aagagctatt tgattgaaa gctgctatcg ataccaagga cagtcaaac 360
aatagtcagc ttttaatta tttagagat aaagccttc caaatctatc agcacgtcaa 420
ctcgggggta tgcctgatct tgttctagat atgtttatca atggttacta cttaaatgtg 480
tttaaacac agtctactga tgtaaatcga cttatcagg acaaggacaa acgaggtggg 540
atttcgatg ctgtttcac cagaggagat cagacaacgc tcttgacagc tcgtcatgat 600
ttaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca agcaagaact gactgaagga 660
agagcccttg cttatcaca tacctacgcc aatgttagca ttagccatgt gattaacttg 720
tggggagctg attttaatgc tgaaggaaac cttgaggcca tctatgtcac agactcagat 780

```

```

gctaattgctg ctattggtat gaaaaaatat ttgtcggca ttaatgctca tggacatgct 840
gccatttctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg ctcaagtatt aggcttattt 900
acgctttcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg gcggtggcca tcatcaccat 960
caccactaa

```

969

序列号 (ID): 44

长度: 969

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..969
 - > mol_type, 其他 DNA
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```

atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc 60
acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca cccgagcagt ttactcaagg tgaagatgtg 120
atccatgcgc catatcttgc tcatcaaggc tggtagata tcaccaaggc cttcgatggg 180
aaggataatc tcttgtgtgg cgcagcaacg gcaggtataa tgctgcattg gtggtttgat 240
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaacacc ctgaaaagca aaaaatcatt 300
tttcgtaacc aagagctatt tgattgaaa gctgctatcg ataccaagga cagtcaaacc 360
aatatgcagc ttttaatta ttttagagat aaagccttc caaatctatc agcacgtcaa 420
[0374] ctcgggggta tgcctgatct tgtttagat atgtttatca atggttacta cttaaatgtg 480
tttaaacac agtctactga tgcaatcga cttatcagg acaaggacaa acgaggtggt 540
attttcgatg ctgtttcac cagaggagat cagacaacgc tctgacagc tcgtcatgat 600
ttaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca agcaagaact gactgaagga 660
agagcccttg ctttatcaca tacctacgcc aatgttagca ttagccatgt gattaacttg 720
tggggagctg attttaatgc tgaaggaaac cttgaggcca tctatgtcac agactcagat 780
gctaattgctg ctattggtat gaaaaaatat ttgtcggca ttaatgctca tggacatgct 840
gccatttctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg ctcaagtatt aggcttattt 900
acgctttcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg gcggtggcca tcatcaccat 960
caccactaa

```

969

序列号 (ID): 45

长度: 969

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..969
 - > mol_type, 其他 DNA
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```

atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc 60

```

```

acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca cccgagcagt ttactcaagg tgaagatgtg 120
atccatgcgc catatcttgc tcatcaaggc tggtagata tcaccaaggc cttcgatggg 180
aaggataatc tcttgttgg cgcagcaacg gcaggtataa tgctgcattg gtggtttgat 240
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaacacc ctgaaaagca aaaaatcatt 300
attcgtaac aagagctatt tgattgaaa gctgctatcg ataccaagga cagtcaaacc 360
aatagtcagc ttttaatta ttttagagat aaagccttc caaatctatc agcacgtcaa 420
ctcgggggta tgcctgatct tgttctagat atgtttatca atggttacta cttaaatgtg 480
ttaaaacac agtctactga tgtcaatcga cttatcagg acaaggacaa acgaggtggt 540
atttcgatg ctgtttcac cagaggagat cagacaacgc tctgacagc tcgtcatgat 600
ttaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca agcaagaact gactgaagga 660
agagcccttg cttatcaca tacctacgcc aatgttagca ttagccatgt gattaacttg 720
tggggagctg atttaatgc tgaaggaaac cttgaggcca tctatgtcac agactcagat 780
gctaattgct ctattggtat gaaaaaatat tttgcggca ttaatgctca tggacatgtc 840
gccatttctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg ctcaagtatt aggettattt 900
acgcttcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg gcggtggcca tcatccat 960
caccactaa

```

969

序列号 (ID): 46

长度: 969

分子类型: DNA

[0375]

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..969

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```

atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgca aagaagtgcc gcatcagatt 60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ccggaacagt ttactcaagg tgaagatgtg 120
attcatgcgc cgtatctggc gaaccagggc tggtagata ttaccaaagc gtttgatggc 180
aaagataacc tgctgtcggg cgcggcgacc gcgggcaaca tgctgcattg gtggtttgat 240
cagaacaaaa ccgaaattga agcgtatctg agcaaacatc cggaataaca gaaaattatt 300
tttcgaacc aggaactgtt tgatctgaaa gaagcgattc gcaccaaaga tagccagacc 360
aacagccagc tgtttgaata tttcgcgat aaagcgttc cgtatctgag cgcgcgccag 420
ctggcgctga tgccgatct ggtgctggat atgtttatta acggctatta tctgaactgt 480
ttaaaacc agagcaccga tgtgaaacgc ccgtatcagg ataaagataa acgcggcggc 540
attttgatg cgggtgttac ccgcggaac cagaccacc tgctgaccgc gcgccatgat 600
ctgaaaaaca aaggcctgaa cgatattagc accattatta aagaagaact gaccaaaggc 660
cgcgcgctgg cgtgagcca tacctatgag aacgtgagca ttagccatgt gattaacctg 720
tggggcgagg atttaacgc ggaaggcaac ctggaagcga tttatgtgac cgatagcgat 780
gcgaacgca gcatggcat gaaaaaatat tttgtgggca ttaacaaca tggccatgtg 840
gcgattagcg cgaaaaaat tgaaggcgaa aacattggcg cgcaggtgct gggcctgttt 900

```

accctgagca ggggcaaaga tatttggcag aaactgaacg gcggtggcca tcaccacat 960
caccactaa

969

序列号 (ID): 47

长度: 909

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..909

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

atgtctgtat ggaccaaagg ttttacacca cccgagcagt ttactcaagg tgaagatgtg 60
atccatgcgc catatcttgc tcacaaaggc tggtagata tcaccaaggc cttcgatggg 120
aaggataatc tcttgtgtgg cgcagcaacg gcaggtataa tgctgcattg gtggtttgat 180
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaacacc ctgaaaagca aaaaatcatt 240
tttcgtaacc aagagctatt tgattgaaa gctgctatcg ataccaagga cagtcaaacc 300
aatagtcagc ttttaatta ttttagagat aaagccttc caaatctatc agcacgtcaa 360
ctcgggggta tgcctgatct tgtctagat atgtttatca atggttacta cttaaatgtg 420
tttaaacac agtctactga tgcacatcga cttatcagg acaaggacaa acgaggtggt 480
[0376] atttcgatg ctgtttcac cagaggaaac cagacaacgc tcttgacagc tcgtcatgat 540
ttaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca agcaagaact gactgaagga 600
agagcccttg ctttatcaca tacctacgcc aatgttagca ttagccatgt gattaacttg 660
tggggagctg attttaatgc tgaaggaaac cttgaggcca tctatgtcac agactcagat 720
gctaattcgt ctatttgtat gaaaaatat ttttcggcca ttaatgtcga tggacatgtc 780
gccattctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg ctcaagtatt aggcctattt 840
acgcttcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg gcggtggcca tcaccacat 900
caccactaa

909

序列号 (ID): 48

长度: 969

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..969

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc 60
acttctgtat ggaccaaagg ttttacacca cccgagcagt ttactcaagg tgaagatgtg 120
atccatgcgc catatcttgc tcacaaaggc tggtagata tcaccaaggc cttcgatggg 180
gcggataatc tcttgtgtgg cgcagcaacg gcaggtataa tgctgcattg gtggtttgat 240

```
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaacacc ctgaaaagca aaaaatcatt 300
tttcgtaacc aagagctatt tgattgaaa gctgctatcg ataccaagga cagtcaaacc 360
aatagtcagc ttttaatta ttttagagat aaagccttc caaatctatc agcacgtcaa 420
ctcgggggta tgcctgatct tgttctagat atgtttatca atggttacta cttaaatgtg 480
tttaaaacac agtctactga tgtcaatcga ccttatcagg acaaggacaa acgaggtggt 540
attttcgatg ctgttttcac cagaggaaat cagacaacgc tcttgacagc tcgtcatgat 600
ttaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca agcaagaact gactgaagga 660
agagcccttg ctttatcaca tacctacgcc aatgtagca ttagccatgt gattaacttg 720
tggggagctg attttaatgc tgaaggaaac cttgaggcca tctatgtcac agactcagat 780
gctaattcgt ctattggtat gaaaaaata tttgtcggca ttaatgctca tggacatgtc 840
gccatttctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg ctcaagtatt aggcttattt 900
acgctttcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg gcggtggcca tcatccat 960
caccactaa
```

969

序列号 (ID): 49

长度: 909

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..909

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

[0377]

残基:

```
atgtctgtat ggaccaaagg tgttacacca cccgagcagt ttactcaagg tgaagatgtg 60
atccatgcgc catatcttgc tcatcaaggc tggtagata tcaccaaggc cttcgatggg 120
gcggataatc tcttgtgtgg cgcagcaacg gcaggtaata tgctgcattg gtggtttgat 180
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaacacc ctgaaaagca aaaaatcatt 240
tttcgtaacc aagagctatt tgattgaaa gctgctatcg ataccaagga cagtcaaacc 300
aatagtcagc ttttaatta ttttagagat aaagccttc caaatctatc agcacgtcaa 360
ctcgggggta tgcctgatct tgttctagat atgtttatca atggttacta cttaaatgtg 420
tttaaaacac agtctactga tgtcaatcga ccttatcagg acaaggacaa acgaggtggt 480
attttcgatg ctgttttcac cagaggaaat cagacaacgc tcttgacagc tcgtcatgat 540
ttaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca agcaagaact gactgaagga 600
agagcccttg ctttatcaca tacctacgcc aatgtagca ttagccatgt gattaacttg 660
tggggagctg attttaatgc tgaaggaaac cttgaggcca tctatgtcac agactcagat 720
gctaattcgt ctattggtat gaaaaaata tttgtcggca ttaatgctca tggacatgtc 780
gccatttctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg ctcaagtatt aggcttattt 840
acgctttcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg gcggtggcca tcatccat 900
caccactaa
```

909

序列号 (ID): 50

长度: 969

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..969

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc 60
acttctgtat ggaccaaagg tggtacacca cccgagcagt ttactcaagg tgaagatgtg 120
atccatgcgc catatcttgc tcatcaaggc tggtagata tcaccaaggc cttcgatggg 180
aaggataatc tctgtgtgg cgcagcaacg gcaggaata tgctgcattg gtggtttgat 240
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaacacc ctgaaaagca aaaaatcatt 300
tttcgtaacc aagagctatt tgattgaaa gctgctatcg ataccaagga cagtcaaacc 360
aatagtcagc ttttaatta ttttagagat aaagccttc caaatctatc agcacgtcaa 420
ctcgggggta tgcctgatct tgttctagat atgtttatca atggttacta cttaaatgtg 480
tttaaacac agtctactga tgcaatcga cctatcagg acaaggacaa acgagggtgt 540
attttcgatg ctgtttcac cagaggaaac cagacaacgc tctgacagc tcgtcatgat 600
ttaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca agcaagaact gactgaagga 660
agagcccttg cttatcaca tacctacgcc aatgtagca ttagccatgt gattaacttg 720
[0378] tggggagctg attttaatgc tgaaggaaac ctgaggcca tctatgtcac agactcagat 780
gctaatacgt ctattggtat gaaaaaatat tttgtcggca ttaatgtcga tggacatgtc 840
gccattctg ccaagaaat agaaggagaa aacattggcg ctcaagtatt aggttattt 900
acgcttcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg gcggtggcca tcaccacat 960
caccactaa
```

969

序列号 (ID): 51

长度: 969

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..969

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatcga aagaagtgcc gcatcagatt 60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttac ccagggcgaa 120
gatgtgtttc atgcgccgta tgtggcgaac cagggtgtgt atgatattac caaagcgttt 180
gatggcaaag ataactgct gtgcggcgcg gcgaccgagg gcaacatgct gcattggtgg 240
tttgatcaga acaagatca gattaaacgc tatctggaag aacatccgga aaaacagaaa 300
attaacttta acggcgaaaa catgtttgat gtgaaaaaag cgattgatac caaaaacat 360
cagctggata gcaaacgttt taactatttt aaagaaaaag cgtttccgta tctgagcgcg 420
```

```

aaacatctgg gcgtgtttcc ggatcatgtg attgatatgt ttattaacgg ctatgcctg 480
agcctgacca accatggccc gaccccggtg aaagaaggca gcaaagatcc gcgcggcggc 540
atthttgatg cgggtgttac ccgcggcaac cagagcaaac tgctgaccag ccgcatgat 600
tttaaaaca aaaacctgaa cgatattagc accattatta aacaggaact gaccaaaggc 660
aaagcgctgg gcctgagcca tacctatgcg aacgtgcgca ttaacctgt gattaacctg 720
tggggcgcgg attttaacgc ggaaggcaac ctggaagcga ttatgtgac cgatagcgat 780
agcaacgcga gcattggcat gaaaaaatat ttgtgggcg tgaacgcgca tggccatgtg 840
gcgattagcg cgaaaaaat tgaaggcgaa aacattggcg cgcaggtgct gggcctgttt 900
accctgagca ccggccagga tagctggcag aaactgagcg gcggtggcca tcaccacat 960
caccactaa

```

969

序列号 (ID): 52

长度: 969

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..969
 - > mol_type, 其他 DNA
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

[0379]

```

atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt 60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttac ccaggcgcaa 120
gatgtgtttc atgcgccgta tctggcgaac cagggctggt atgatattac caaagcgttt 180
gatggcaaag ataactgct gtgcggcgcg gcgaccgcgg gcaacatgct gcattggtgg 240
tttgatcaga acaagatca gattaaacgc tatctggaag aacatccgga aaaacagaaa 300
attaactttc gcggcgaaaa catgtttgat gtgaaagaag cgattcgac caaaaacat 360
cagctggata gcaaaactgt tgaatatttt aaagaaaaag cgtttccgta tctgagcgcg 420
aaacatctgg gcgtgtttcc ggatcatgtg attgatatgt ttattaacgg ctatgcctg 480
agcctgacca accatggccc gaccccggtg aaaaaaggca gcaaagatcc gcgcggcggc 540
atthttgatg cgggtgttac ccgcggcaac cagagcaaac tgctgaccag ccgcatgat 600
tttaaaaca aaaacctgaa cgatattagc accattatta aaagcgaact gaccaacggc 660
aaagcgctgg gcctgagcca tacctatgcg aacgtgcgca ttaacctgt gattaacctg 720
tggggcgcgg attttaacgc ggaaggcaac ctggaagcga ttatgtgac cgatagcgat 780
agcaacgcga gcattggcat gaaaaaatat ttgtgggcg tgaacaaaca tggccatgtg 840
gcgattagcg cgaaaaaat tgaaggcgaa aacattggcg cgcaggtgct gggcctgttt 900
accctgagca ccggccagga tagctggcag aaactgaacg gcggtggcca tcaccacat 960
caccactaa

```

969

序列号 (ID): 53

长度: 969

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..969

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt 60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttac ccagggcgaa 120
gatgtgttc atgcgccgta tgtggcgaac cagggtgtgt atgatattac caaaccttt 180
aacggcaaag atgatctgct gtgcggcgcg gcgaccgcgg gcaacatgct gcattggtgg 240
tttgatcaga acaaagatca gattaaacgc tatctggaag aacatccgga aaaacagaaa 300
attaacttta acggcgaaaca gatgtttgat gtgaaagaag cgattgatac caaaaacat 360
cagctggata gcaaacgttt tgaatatttt aaagaaaaag cgtttccgta tctgagcacc 420
aaacatctgg gcgtgtttcc ggatcatgtg attgatattt ttattaacgg ctatgcctg 480
agcctgacca accatggccc gaccccggtg aaagaaggca gcaaatgacc gcgcggcggc 540
attttgatg cgtgttttac ccgcggcaac cagagcaaac tgctgaccag ccgccatgat 600
tttaagaaa aaaacctgaa agaaattagc gatctgatta aacaggaact gaccgaaggc 660
aaagcgtctg gcctgagcca tacctatgcg aacgtgcgca ttaacctgt gattaaacctg 720
tggggcggcg attttgatgc ggaaggcaac ctgaaagcga tttatgtgac cgatagcgat 780
agcaacgcga gcattggcat gaaaaaatat tttgtggcg tgaacgcggc gggcaaagtg 840
gcgattagcg cgaaaaaat tgaaggcgaa aacattggcg cgcagggtgct gggcctgttt 900
accctgagca ccggccagga tagctggaac cagaccagcg gcggtggcca tcatccat 960
caccactaa
```

969

[0380]

序列号 (ID): 54

长度: 969

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..969

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt 60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttac ccagggcgaa 120
gatgtgttc atgcgccgta tgtggcgaac cagggtgtgt atgatattac caaaccttt 180
aacggcaaag atgatctgct gtgcggcgcg gcgaccgcgg gcaacatgct gcattggtgg 240
tttgatcaga acaaagatca gattaaacgc tatctggaag aacatccgga aaaacagaaa 300
attaacttta gcggcgaaaca gatgtttgat gtgaaagaag cgattcgac caaaaacat 360
cagctggata gcaaacgttt tgaatatttt aaagaaaaag cgtttccgta tctgagcacc 420
aaacatctgg gcgtgtttcc ggatcatgtg attgatattt ttattaacgg ctatgcctg 480
agcctgacca accatggccc gaccccggtg aaaaaaggca gcaaatgacc gcgcggcggc 540
```

```
atTTTtGatG cGgtGttAc cGcgGgCaac cagagcaaac tGctgaccag cGccatgat 600
tTtaaGaaa aaacCtGaa agaaattagc gatctgatta aagaagaact gaccaaaggc 660
aaagcgctgg gcctgagcca tacctatgcg aacgtgcgca ttaacctgt gattaacctg 720
tggggcgcgG atttGatGc ggaaggcaac ctgaaagcga tttatgtgac cgatagcgat 780
agcaacgcga gcattggcat gaaaaaatat tttgtggcg tgaacaaagc gggcaaagtG 840
gcgattagcg cgaaaaaat tgaaggcgaa aacattggcg cgCaggtGct gggcctgttT 900
accctgagca ccggccagga tagctggaac cagaccaacg gcggtggcca tcatcaccat 960
caccactaa
```

969

序列号 (ID): 55

长度: 963

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..963

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

[0381]

```
atggatgatt atcagcgcaa cGcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtGcc gcatcagatt 60
accagcggtGt ggaccaaagg cgtgaccccg ccggaacagt ttactcaagg tgaagatgtG 120
attcatgcgc cgtatgtggc gaaccaggGc tggatgata ttaccaaagc gtttGatGc 180
aaagataacc tGctgtcgGg cGcgGcgacc gCggGcaaca tGctgcattG gtggtttgat 240
cagaacaaag atcagattaa acGctatctg gaagaacatc cgGaaaaaca gaaaattaac 300
tttcGcgGcg aacagatgtt tGatgtgaaa aaagcgattG atacaaaaa ccatcagctG 360
gatagcaaac tGtttaacta tttaaagaa aaagcgttTc cggGcctgag cGcgGcgGc 420
attggcgtGt ttccggatca tGtgattgat atgtttatta acgGctatcg cctgagcctG 480
accaaccatG gcccGacccc ggtgaaagaa gGcagcaaag atccGcgGg cggcattttT 540
gatGcggtGt ttacccGcgG caaccagagc aaactGctga ccagccGcca tGattttaaa 600
aacaaaaacc tgaacgatat tagcaccatt attaaacagg aactgacca aggcaaagcg 660
ctggGcctga gccataccta tGcgaacgtG agcattaacc atgtgattaa cctgtggGg 720
gcgatttta acGcggaagg caacctggaa gcgatttatG tgaccgatag cgatagcaac 780
gcgagcattG gcatgaaaaa atattttgtG gGcgtgaacG cgcatggcca tGtgGcgatt 840
agcGcgaaaa aaattgaagg cgaaaacatt gGcgGcgagg tGctggGcct gtttacctG 900
agcaccggcc aggatagctG gcagaaactG agcggcggtG gccatcatca ccatcaccac 960
taa
```

963

序列号 (ID): 56

长度: 310

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..310

> mol_type, 蛋白质
> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
DSFSANQEIR    YSEVTPYHVT    SVWTKGVTPP    ANFTQGEDVF    HAPYVANQGW
YDITKTFNGK  60
DDLLCGAATA    GNMLHWWFDQ    NKDQIKRYLE    EHPEKQKINF    RGEQMFDVKE
AIDTKNHQLD  120
SKLFEYFKEK    AFPYLSTKHL    GVFPDHVIDM    FINGYRLSLT    NHGPTPVKEG    SKDPRGGIFD
180
AVFTRGDQSK    LLTSRHDFKE    KNLKEISDLI    KKELTEGKAL    GLSHTYANVR    INHVINLWGA
240
DFDSNGNLKA    IYVTDSDSNA    SIGMKKYFVG    VNSAGKVAIS    AKEIKEDNIG    AQVLGLFTLS
300
TGQDSWNQTN                                     310
```

序列号 (ID): 57

长度: 310

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..310

[0382]

> mol_type, 蛋白质
> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
DSFSANQEIR    YSEVTPYHVT    SVWTKGVTPP    ANFTQGEDVF    HAPYVANQGW
YDITKTFNGK  60
DDLLCGAATA    GNMLHWWFDQ    NKDQIKRYLE    EHPEKQKINF    KGEQMFDVKE
AIDTKNHQLD  120
SKLFEYFKEK    AFPYLSTKHL    GVFPDHVIDM    FINGYRLSLT    NHGPTPVKRG    SKDPRGGIFD
180
AVFTRGNQSK    LLTSRHDFKE    KNLKEISDLI    KKELTEGKAL    GLSHTYANVR    INHVINLWGA
240
DFDSNGNLKA    IYVTDSDSNA    SIGMKKYFVG    VNSAGKVAIS    AKEIKEDNIG    AQVLGLFTLS
300
TGQDSWNQTN                                     310
```

序列号 (ID): 58

长度: 310

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..310

> mol_type, 蛋白质
> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
DSFSANQEIR    YSEVTPYHVT    SVWTKGVTPP    ANFTQGEDVF    HAPYVANQGW
YDITKTFNGK   60
DDLLCGAATA    GNMLHWWFDQ    NKDQIKRYLE    EHPEKQKINF    RGEQMFDVKE
AIDTKNHQLD   120
SKLFEYFKEK    AFPYLSTKHL    GVFPDHVIDM    FINGYRLSLT    NHGPTPVKKG    SKDPRGGIFD
180
AVFTRGNQSK    LLTSRHDFKE    KNLKEISDLI    KKELTEGKAL    GLSHTYANVR    INHVINLWGA
240
DFDSNGNLKA    IYVTDSDSNA    SIGMKKYFVG    VNKAGKVAIS    AKEIKEDNIG
AQVLGLFTLS   300
TGQDSWNQTN                                     310
```

序列号 (ID): 59

长度: 310

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..310

[0383]

> mol_type, 蛋白质
> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
DSFSANQEIR    YSEVTPYHVT    SVWTKGVTPP    ANFTQGEDVF    HAPYVANQGW
YDITKTFNGK   60
DDLLCGAATA    GNMLHWWFDQ    NKDQIKRYLR    EHPEKQKINF    NGEQMFDVKE
AIDTKNHQLD   120
SKLFEYFKEK    AFPYLSTKHL    GVFPDHVIDM    FINGYRLSLT    NHGPTPVKEG    SKDPRGGIFD
180
AVFTRGNQSK    LLTSRHDFKE    KNLKEISDLI    KKELDEGKAL    GLSHTYANVR    INHVINLWGA
240
DFDSNGNLKA    IYVTDSDSNA    SIGMKKYFVG    VNSAGKVAIS    AKEIKEDNIG    AQVLGLFTLS
300
TGQDSWNQTN                                     310
```

序列号 (ID): 60

长度: 310

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..310

> mol_type, 蛋白质
> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
DSFSANQEIR    YSEVTPYHVT    SVWTKGVTPP    ANFTQGEDVF    HAPYVANQGW
YDITKTFNGK   60
DDLLCGAATA    GNMLHWWFDQ    NKDQIKRYLK    EHPEKQKINF    NGEQMFDVKE
AIRTKNHQLD   120
SKLFEYFKEK    AFPYLSTKHL    GVFPDHVIDM    FINGYRLSLT    NHGPTPVKEG    SKDPRGGIFD
180
AVFTRGNQSK    LLTSRHDFKE    KNLKEISDLI    KKELEEGKAL    GLSHTYANVR    INHVINLWGA
240
DFDSNGNLKA    IYVTDSDSNA    SIGMKKYFVG    VNKAGKVAIS    AKEIKEDNIG
AQVLGLFTLS   300
TGQDSWNQTN                                     310
```

序列号 (ID): 61

长度: 310

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..310

> mol_type, 蛋白质
> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
DSFSANQEIR    YSEVTPYHVT    SVWTKGVTPP    ANFTQGEDVF    HAPYVANQGW
YDITKTFNGK   60
DDLLCGAATA    GNMLHWWFDQ    NKDQIERYLE    EHPEKQKINF    NGEQMFDVKE
AIDTKNHQLD   120
SKLFEYFKEK    AFPYLSTKHL    GVFPDHVIDM    FINGYRLSLT    NHGPTPVKEG    SKDPRGGIFD
180
AVFTRGNQSK    LLTSRHDFKE    KNLKEISDLI    KEELTKGKAL    GLSHTYANVR    INHVINLWGA
240
DFDSNGNLKA    IYVTDSDSNA    SIGMKKYFVG    VNSAGKVAIS    AKEIKEKNIG    AQVLGLFTLS
300
TGQKSWNQTN                                     310
```

序列号 (ID): 62

长度: 310

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..310

[0384]

> mol_type, 蛋白质
> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
DSFSANQEIR    YSEVTPYHVT    SVWTKGVTPP    ANFTQGEDVF    HAPYVANQGW
YDITKTFNGK   60
DDLLCGAATA    GNMLHWWFDQ    NKDQIKRYLK    EHPEKQKINF    RGEQMFDVKE
AIRTKNHQLD   120
SKLFEYFKEK    AFPYLSTKHL    GVFPDHVIDM    FINGYRLSLT    NHGPTPVKEG    SKDPRGGIFD
180
AVFTRGNQSK    LLTSRHDFKE    KNLKEISDLI    KSELENGKAL    GLSHTYANVR    INHVINLWGA
240
DFDSNGNLKA    IYVTDSDSNA    SIGMKKYFVG    VNKAGKVAIS    AKEIKEDNIG
AQVLGLFTLS   300
TGQDSWNQTN                                     310
```

序列号 (ID): 63

长度: 310

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..310

[0385]

> mol_type, 蛋白质
> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
DSFSANQEIR    YSEVTPYHVT    SVWTKGVTPP    ANFTQGEDVF    HAPYVANQGW
YDITKTFNGK   60
DDLLCGAATA    GNMLHWWFDQ    NKDQIKRYLK    EHPEKQKINF    RGEQMFDVKE
AIRTKNHQLD   120
SKLFEYFKEK    AFPYLSTKHL    GVFPDHVIDM    FINGYRLSLT    NHGPTPVKKG    SKDPRGGIFD
180
AVFTRGNQSK    LLTSRHDFKE    KNLKEISDLI    KKELEEGKAL    GLSHTYANVR    INHVINLWGA
240
DFDSNGNLKA    IYVTDSDSNA    SIGMKKYFVG    VNSAGKVAIS    AKEIKEDNIG    AQVLGLFTLS
300
TGQDSWNQTN                                     310
```

序列号 (ID): 64

长度: 310

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..310

> mol_type, 蛋白质
> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DSFSANQEIR YSEVTPYHVT SVWTKGVTPP ANFTQGEDVF HAPYVANQGW
YDITKTFNGK 60
DDLLCGAATA GNMLHWWFDQ NKDQIERYLE EHPEKQKINF RGEQMFDVKE
AIDTKNHQLD 120
SKLFEYFKEK AFPYLSTKHL GVFPDHVIDM FINGYRLSLT NHGPTPVKKG SKDPRGGIFD
180
AVFTRGNQSK LLTSRHDFKE KNLKEISDLI KEELTKGKAL GLSHTYANVR INHVINLWGA
240
DFDSNGNLKA IYVTDSDSNA SIGMKKYFVG VNSAGKVAIS AKEIKEDNIG AQVLGLFTLS
300
TGQKSWNQTN 310

序列号 (ID): 65

长度: 306

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..306

[0386]

> mol_type, 蛋白质
> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DSFSANQEIR YSEVTPYHVT SVWTKGVTPP ANFTQGEDVF HAPYVANQGW
YDITKTFNGK 60
DDLLCGAATA GNMLHWWFDQ NKDQIKRYLE EHPEKQKINF NGEQMFDVKE
AIDTKNHQLD 120
SKLFEYFKEK AFPYLSTKHL GVFPDHVIDM FINGYRLSLT NHGPTPVKEG SKDPRGGIFD
180
AVFTRGDQSK LLTSRHDFKE KNLKEISDLI KKELTEGKAL GLSHTYANVR INHVINLWGA
240
DFDSNGNLKA IYVTDSDSNA SIGMKKYFVG VNSAGKVAIS AKEIKEDNIG AQVLGLFTLS
300
TGQDSW 306

序列号 (ID): 66

长度: 290

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..290

> mol_type, 蛋白质
> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

SVWTKGVTPP ANFTQGEDVF HAPYVANQGW YDITKTFNGK DDLLCGAATA
GNMLHWWFDQ 60
NKDQIKRYLE EHPEKQKINF NGEQMFVDVKE AIDTKNHQLD SKLFEYFKEK
AFPYLSTKHL 120
GVFPDHVIDM FINGYRLSLT NHGPTPVKEG SKDPRGGIFD AVFTRGDQSK LLTSRHDFKE
180
KNLKEISDLI KKELTEGKAL GLSHTYANVR INHVINLWGA DFDSNGNLKA IYVTDSDSNA
240
SIGMKKYFVG VNSAGKVAIS AKEIKEDNIG AQVLGLFTLS TGQDSWNQTN
290

序列号 (ID): 67

长度: 290

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..290

[0387]

> mol_type, 蛋白质
> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

SVWTKGVTPP ANFTQGEDVF HAPYVANQGW YDITKTFNGK DDLLCGAATA
GNMLHWWFDQ 60
NKDQIKRYLE EHPEKQKINF KGEQMFVDVKE AIDTKNHQLD SKLFEYFKEK
AFPYLSTKHL 120
GVFPDHVIDM FINGYRLSLT NHGPTPVKEG SKDPRGGIFD AVFTRGNQSK LLTSRHDFKE
180
KNLKEISDLI KKELTEGKAL GLSHTYANVR INHVINLWGA DFDSNGNLKA IYVTDSDSNA
240
SIGMKKYFVG VNSAGKVAIS AKEIKEDNIG AQVLGLFTLS TGQDSWNQTN
290

序列号 (ID): 68

长度: 290

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..290

> mol_type, 蛋白质
> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

SVWTKGVTPP ANFTQGEDVF HAPYVANQGW YDITKTFNGK DDLLCGAATA
GNMLHWWFDQ 60
NKDQIERYLE EHPEKQKINF KGEQMFDVKK AIDTKNHQLD SKLFEYFKEK
AFPYLSTKHL 120
GVFPDHVIDM FINGYRLSLT NHGPTPVKEG SKDPRGGIFD AVFTRGNQSK LLTSRHDFKE
180
KNLKEISDLI KEELTKGKAL GLSHTYANVR INHVINLWGA DFDSNGNLKA IYVTDSDSNA
240
SIGMKKYFVG VNSAGKVAIS AKEIKEDNIG AQVLGLFTLS TGQKSWNQTN
290

序列号 (ID): 69

长度: 319

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..319
 - > mol_type, 蛋白质
 - > 生物体, 酿脓链球菌

[0388]

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT SVWTKGVTPP ANFTQGEDVF HAPYVANQGW
YDITKTFNGK 60
DDLLCGAATA GNMLHWWFDQ NKDQIERYLE EHPEKQKINF KGEQMFDVKK
AIDTKNHQLD 120
SKLFEYFKEK AFPYLSTKHL GVFPDHVIDM FINGYRLSLT NHGPTPVKEG SKDPRGGIFD
180
AVFTRGNQSK LLTSRHDFKE KNLKEISDLI KEELTKGKAL GLSHTYANVR INHVINLWGA
240
DFDSNGNLKA IYVTDSDSNA SIGMKKYFVG VNSAGKVAIS AKEIKEDNIG AQVLGLFTLS
300
TGQKSWNQTN GGGHHHHHH 319

序列号 (ID): 70

长度: 4

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..4
 - > mol_type, 蛋白质
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

NQTN

4

序列号 (ID): 71

长度: 20

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..20
 - > mol_type, 蛋白质
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DSFSANQEIR YSEVTPYHVT

20

序列号 (ID): 72

长度: 963

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..963
 - > mol_type, 其他 DNA
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

[0389]

```
atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacgtt 60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactaagg tgaagatgtt 120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatatgata ttacaaaac attcaatgga 180
aaagacgata ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttcactg gtggttcgat 240
caaaacaaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttcaatggcg aacagatgtt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tatttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt 540
gacgccgtat ttacaagagg tgatcaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 600
gaaaaaaatc tcaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacaacc atgttataaa cctgtgggga 720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaag agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt 900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcgggtg gccatcatca ccatcaccac 960
taa
```

963

序列号 (ID): 73

长度: 963

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..963

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

atggatagtt ttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacgtt 60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactaagg tgaagatgtt 120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga 180
aaagacgac ttctttgcgg ggctgccaca gcaggggaata tgcttactg gtggttcgat 240
caaaacaaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttccgtggcg aacagatgtt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tatttgaata ttttaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggattttt 540
gacgccgtat ttacaagagg tgatcaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaa 600
gaaaaaaatc tcaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcataacc atgttataaa cctgtgggga 720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctgaaa agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactaggggt atttacactt 900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcgggt gccatcatca ccatcaccac 960
taa

963

[0390]

序列号 (ID): 74

长度: 963

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..963

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

atggatagtt ttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacgtt 60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactaagg tgaagatgtt 120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga 180
aaagacgac ttctttgcgg ggctgccaca gcaggggaata tgcttactg gtggttcgat 240
caaaacaaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttcaaggcg aacagatgtt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tatttgaata ttttaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480

```
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaacgt ggtagtaaag atccccgagg tggattttt 540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 600
gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacacc atgttataaa cctgtgggga 720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt 900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcgggtg gccatcatca ccatcaccac 960
taa
```

963

序列号 (ID): 75

长度: 963

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..963

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

[0391]

```
atggatagtt ttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacgtt 60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tactcaagg tgaagatgtt 120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga 180
aaagacgata ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtggttcgat 240
caaaacaaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttccgtggcg aacagatgtt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tattgaata ttttaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg cctagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaaaaa ggtagtaaag atccccgagg tggattttt 540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 600
gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacacc atgttataaa cctgtgggga 720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaata aagctggaaa agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt 900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcgggtg gccatcatca ccatcaccac 960
taa
```

963

序列号 (ID): 76

长度: 963

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..963

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacgtt 60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcactcaagg tgaagatgtt 120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga 180
aaagacgacg ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtggttcgat 240
caaaacaaag accaaattaa acgttatttg cgtgagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttcaatggcg aacagatgtt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tatttgaata ttttaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt 540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 600
gaaaaaaatc tcaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttagatga aggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacacc atgttataaa cctgtgggga 720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacctt 900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcgggtg gccatcatca ccatcaccac 960
taa
```

[0392]

963

序列号 (ID): 77

长度: 963

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..963

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacgtt 60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcactcaagg tgaagatgtt 120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga 180
aaagacgacg ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtggttcgat 240
caaaacaaag accaaattaa acgttatttg aaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttcaatggcg aacagatgtt tgacgtaaaa gaagctatcc gtactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tatttgaata ttttaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt 540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 600
```

```
gaaaaaaatc tcaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttagaaga aggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacaacc atgttataaa cctgtgggga 720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaata aagctggaaa agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacctt 900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac 960
taa
```

963

序列号 (ID): 78

长度: 963

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..963

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

[0393]

```
atggatagtt ttctgctaa tcaagagatt agatatcgg aagtaacacc ttatcacgtt 60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaact tcactcaagg tgaagatgtt 120
ttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggtatgata ttacaaaac attcaatgga 180
aaagacgata ttcttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtggttcgat 240
caaaacaag accaaattga acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttcaatggcg aacagatgtt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tatttgaata tttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaa atccccgagg tggatTTTT 540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 600
gaaaaaaatc tcaagaaat cagtgatctc attaaggaag agttaacaa aggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacaacc atgttataaa cctgtgggga 720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaaga aaaaaatata ggtgctcaag tactagggtt atttacctt 900
tcaacagggc aaaaaagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac 960
taa
```

963

序列号 (ID): 79

长度: 963

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..963

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
atggatagtt ttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacgtt 60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcactcaagg tgaagatgtt 120
ttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga 180
aaagacgac ttcttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtggttcgat 240
caaaacaag accaaattaa acgttatttg aaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttcgtggcg aacagatgtt tgacgtaaaa gaagctatcc gtactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tatttgaata ttttaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggattttt 540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaa 600
gaaaaaatc tcaagaaat cagtgatctc attaagagtg agttagaaaa cggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacc atgttataaa cctgtgggga 720
gctgacttgg attctaacgg gaacctaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaata aagctggaaa agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacctt 900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac 960
taa
```

963

[0394]

序列号 (ID): 80

长度: 963

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..963

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
atggatagtt ttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacgtt 60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcactcaagg tgaagatgtt 120
ttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga 180
aaagacgac ttcttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtggttcgat 240
caaaacaag accaaattaa acgttatttg aaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttcgtggcg aacagatgtt tgacgtaaaa gaagctatcc gtactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tatttgaata ttttaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaaaaa ggtagtaaag atccccgagg tggattttt 540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaa 600
gaaaaaatc tcaagaaat cagtgatctc attaagaag agttagaaga aggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacc atgttataaa cctgtgggga 720
```

```
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttggt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt 900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcgggtg gccatcatca ccatcaccac 960
taa
```

963

序列号 (ID): 81

长度: 963

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..963
 - > mol_type, 其他 DNA
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```
atggatagtt ttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacgtt 60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactaagg tgaagatgtt 120
tttccgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga 180
aaagacgac ttctttcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtggttcgat 240
caaaacaag accaaattga acgttattg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttccgtggcg aacagatgtt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tatttgaata ttttaagaa aaagcttcc cttatctat tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaaaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt 540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 600
gaaaaaaatc tcaaaagaaat cagtgatctc attaaggaag agttaacca aggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcataacc atgttataaa cctgtgggga 720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttggt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt 900
tcaacagggc aaaaaagttg gaatcagacc aatggcgggtg gccatcatca ccatcaccac 960
taa
```

963

序列号 (ID): 82

长度: 957

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..957
 - > mol_type, 其他 DNA
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

[0395]

```

atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatatcgg aagtaacacc ttatcacgtt 60
acttcggtt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactaagg tgaagatgtt 120
ttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga 180
aaagacgac ttcttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtggttcgat 240
caaaacaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttcaatggcg aacagatgtt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tatttgaata tttaaagaa aaagcttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaag atccccgagg tggatTTTT 540
gacgccgtat ttacaagagg tgatcaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 600
gaaaaaatc tcaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcataacc atgttataaa cctgtgggga 720
gctgactttg attctaacgg gaacctaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt attacactt 900
tcaacagggc aagatagttg ggggtggcggc ggtggccatc atcaccatca ccactaa 957

```

序列号 (ID): 83

长度: 903

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..903

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

```

atgtccgtt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactaagg tgaagatgtt 60
ttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga 120
aaagacgac ttcttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtggttcgat 180
caaaacaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 240
ttcaatggcg aacagatgtt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 300
gatagtaaat tatttgaata tttaaagaa aaagcttcc cttatctatc tactaaacac 360
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 420
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaag atccccgagg tggatTTTT 480
gacgccgtat ttacaagagg tgatcaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 540
gaaaaaatc tcaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct 600
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcataacc atgttataaa cctgtgggga 660
gctgactttg attctaacgg gaacctaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 720
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt 780
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt attacactt 840
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcgggt gccatcatca ccatcaccac 900

```

taa

903

序列号 (ID): 84

长度: 903

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..903

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

atgtccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt 60
ttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga 120
aaagacgac ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtggttcgat 180
caaaacaaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 240
ttcaaaggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcg acactaaaa ccaccagcta 300
gatagtaaat tatttgaata ttttaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 360
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 420
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt 480
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 540
gaaaaaaatc tcaagaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct 600
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcataacc atgttataaa cctgtgggga 660
gctgactttg attctaacgg gaacctaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 720
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt 780
tctgctaaag aaataaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacatt 840
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac 900
taa

[0397]

903

序列号 (ID): 85

长度: 903

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..903

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

atgtccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt 60
ttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga 120
aaagacgac ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtggttcgat 180
caaaacaaag accaaattga acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 240
ttcaaaggcg aacagatggt tgacgtaaaa aaagctatcg acactaaaa ccaccagcta 300

```

gatatgaaat tatttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 360
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 420
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt 480
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 540
gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaaggaag agttaaccaaggcaaggct 600
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacaacc atgttataaa cctgtgggga 660
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 720
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt 780
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt 840
tcaacagggc aaaaaagtgt gaatcagacc aatggcgggt gccatcatca ccatcaccac 900
taa

```

903

序列号 (ID): 86

长度: 963

分子类型: DNA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..963

> mol_type, 其他 DNA

> 生物体, 酿脓链球菌

残基:

[0398]

```

atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc 60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactaagg tgaagatgtt 120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggtagtata ttacaaaac attcaatgga 180
aaagacgata ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttcactg gtggttcgat 240
caaaacaaag accaaattga acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttcaaaggcg aacagatgtt tgacgtaaaa aaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
gatatgaaat tatttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt 540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 600
gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaaggaag agttaaccaaggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacaacc atgttataaa cctgtgggga 720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt 900
tcaacagggc aaaaaagtgt gaatcagacc aatggcgggt gccatcatca ccatcaccac 960
taa

```

963

序列号 (ID): 87

长度: 19

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..19
 - > mol_type, 蛋白质
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

SFSANQEIRY SEVTPYHVT

19

序列号 (ID): 88

长度: 19

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..19
 - > mol_type, 蛋白质
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DYQRNATEAY AKEVPHQIT

19

[0399]

序列号 (ID): 89

长度: 20

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..20
 - > mol_type, 蛋白质
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

DDYQRNATEA YAKEVPHQIT

20

序列号 (ID): 90

长度: 959

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..959
 - > mol_type, 蛋白质
 - > 生物体, 酿脓链球菌

残基:

EEKTVQVQKG	LPSIDSLHYL	SENSKKEFKE	ELSKAGQESQ	KVKEILAKAQ
QADKQAQELA 60				
KMKIPEKIPM	KPLHGPLYGG	YFRTWHDKTS	DPTEKDKVNS	MGELPKEVDL
AFIFHDWTKD 120				

[0400]

```

        YSLFWKELAT      KHVPKLNKQG      TRVIRTIPWR      FLAGGDNSGI      AEDTSKYPNT
PEGNKALAKA  180
        IVDEYVYKYN  LDGLDVDVEH  DSIPKVDKKE  DTAGVERSIQ  VFEEIGKLIQ  PKGVDKSRLF
240
        IMDSTYMADK      NPLIERGAPY      INLLLVQVYG      SQGEKGGWEP      VSNRPEKTME
ERWQGYISKYI  300
        RPEQYMIGFS      FYEENAEQEGN      LWYDINSRDK      EDKANGINTD      ITGTRAERYA
RWQPKTGGVK  360
        GGIFSYAIDR      DGVAHQPKKY      AKQKEFKDAT      DNIFHSDYSV      SKALKTVMLK
DKSYDLIDEK  420
        DFPDKALREA      VMAQVGTRKG      DLERFNGTLR      LDNPAIQSLE      GLNKFKKLAQ
LDLIGLSRIT  480
        KLDRSVLPAN  MKPGKDTLET  VLETYKKDNK  EEPATIPPVS  LKVSGLTGLK  ELDLSGFDRE
540
        TLAGLDAATL  TSLEKVDISG  NKLDLAPGTE  NRQIFDTMLS  TISNHVGSNE  QTVKFDKQKP
600
        TGHYPDTYGK      TSLRLPVANE      KVDLQSQLLF      GTVTNQGTLI      NSEADYKAYQ
NHKIAGRSFV  660
        DSNYHYNNFK      VSYENYTVKV      TDSTLGTTTD      KTLATDKEET      YKVDFFSPAD
KTKAVHTAKV  720
        IVGDEKTMV      NLAEGATVIG      GSADPVNARK      VFDGQLGSET      DNISLGWDSK
QSIIFKLKED  780
        GLIKHWRFFN  DSARNPETTN  KPIQEASLQI  FNIKDYNDN  LLENPNKFDD  EKYWITVDTY
840
        SAQGERATAF  SNTLNNITSK  YWRVVFDTKG  DRYSSPVVPE  LQILGYPLPN  ADTIMKTVTT
900
        AKELSQQKDK  FSQKMLDELK  IKEMALETSL  NSKIFDVTAI  NANAGVLKDC  IEKRQLLKK
959

```

序列号 (ID): 91

长度: 312

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..312

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* ssp. *Zooepidemicus*)

残基:

```

        DDYQRNATEA      YAKEVPHQIT      SVWTKGVTPP      EQFTQGEDVI      HAPYLAHQGW
YDITKAFNGK  60
        DLLCGAATA      GNMLHWWFDQ      NKTEIEAYLS      KHPEKQKIIF      RNQELFDLKA

```

AIDTKDSQTN 120
SQLFNYFRDK AFPNLSARQL GVMPDLVLDM FINGYYLNVF KTQSTDVNRP
YQDKDKRGGI 180
FDAVFTRGNQ TTLTARHDL KNKGLNDIST IIKQELTEGR ALALSHTYAN VSISHVINLW
240
GADFNAEGNL EAIYVTSDA NASIGMKKYF VGINAHGHVA ISAKKIEGEN IGAQVLGLFT
300
LSSGKDIWQK LS 312

序列号 (ID): 92

长度: 292

分子类型: AA

特征 位置/限定符:

- 来源, 1..292

> mol_type, 蛋白质

> 生物体, 马链球菌兽疫亚种

残基:

SVWTKGVTPP EQFTQGEDVI HAPYLAHQGW YDITKAFNGK DLLCGAATA
GNMLHWWFDQ 60
NKTEIEAYLS KHPEKQKIIF RNQELFDLKA AIDTKDSQTN SQLFNYFRDK AFPNLSARQL
120
GVMPDLVLDM FINGYYLNVF KTQSTDVNRP YQDKDKRGGI FDAVFTRGNQ
TTLTARHDL 180
KNKGLNDIST IIKQELTEGR ALALSHTYAN VSISHVINLW GADFNAEGNL EAIYVTSDA
240
NASIGMKKYF VGINAHGHVA ISAKKIEGEN IGAQVLGLFT LSSGKDIWQK LS
292
结束

[0401]

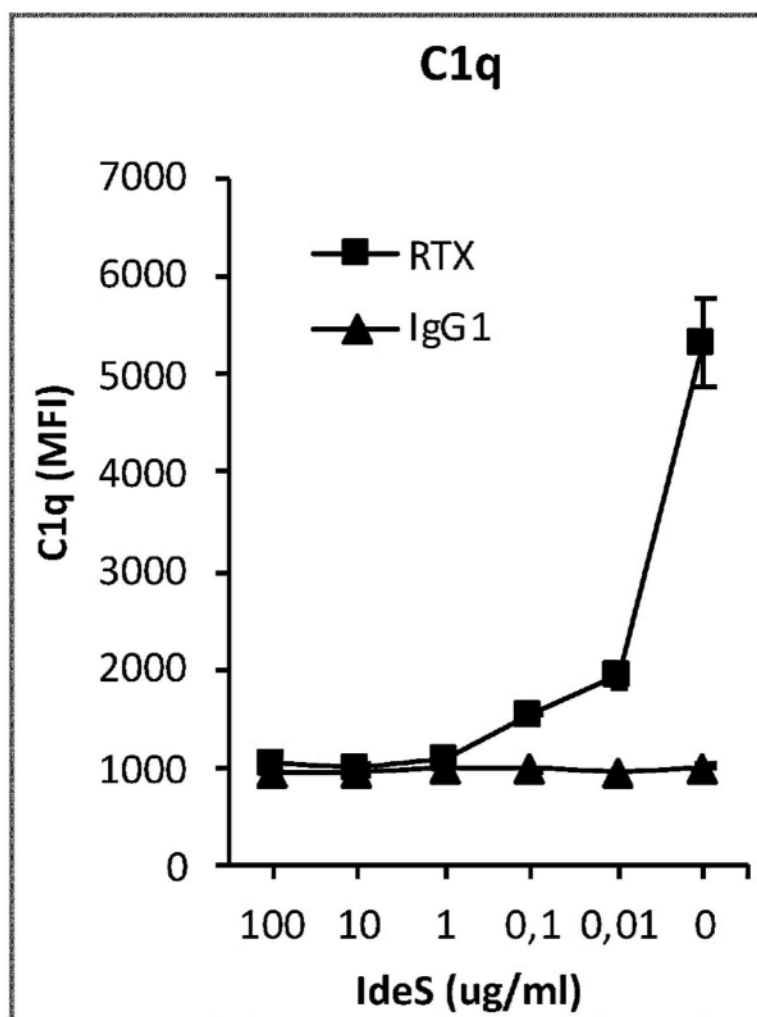


图1(A)

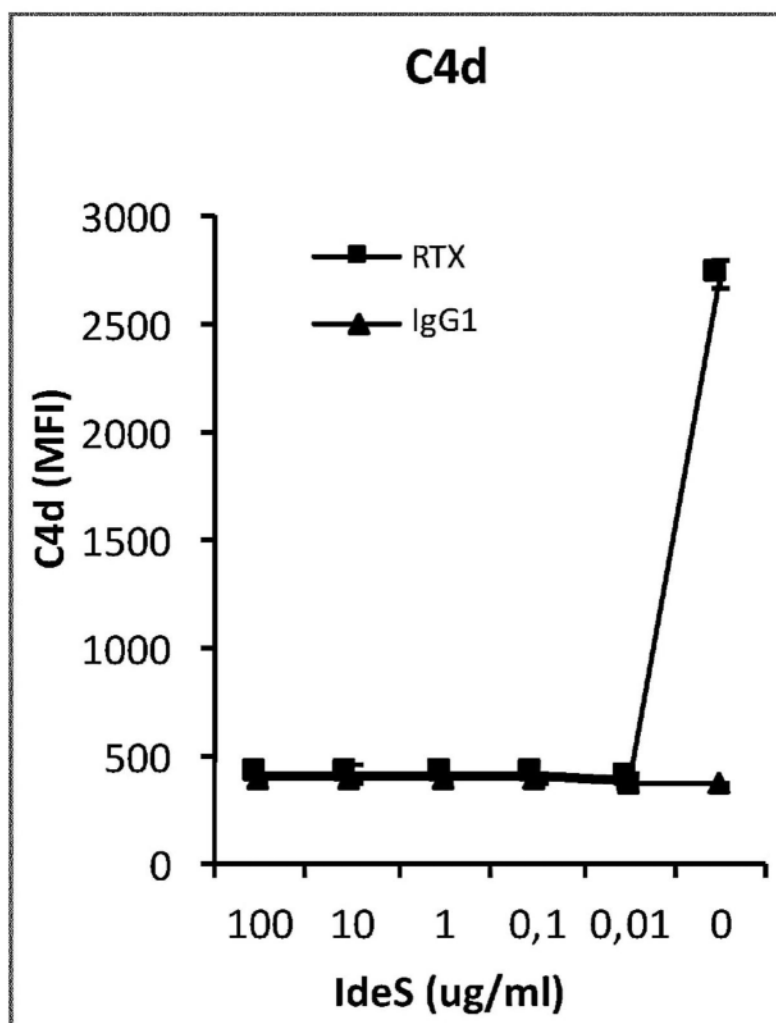


图1 (B)

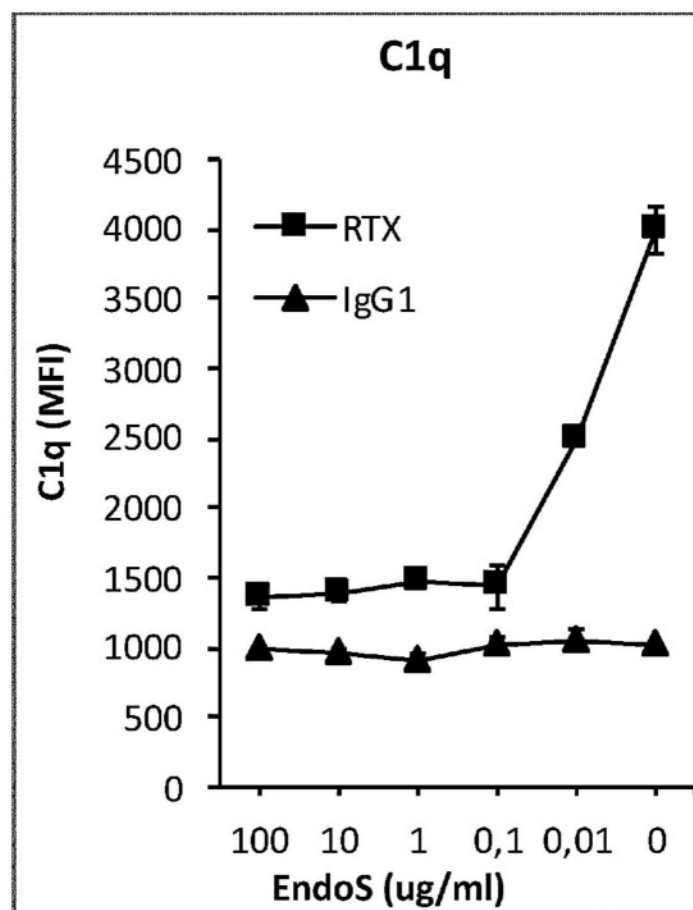


图1(C)

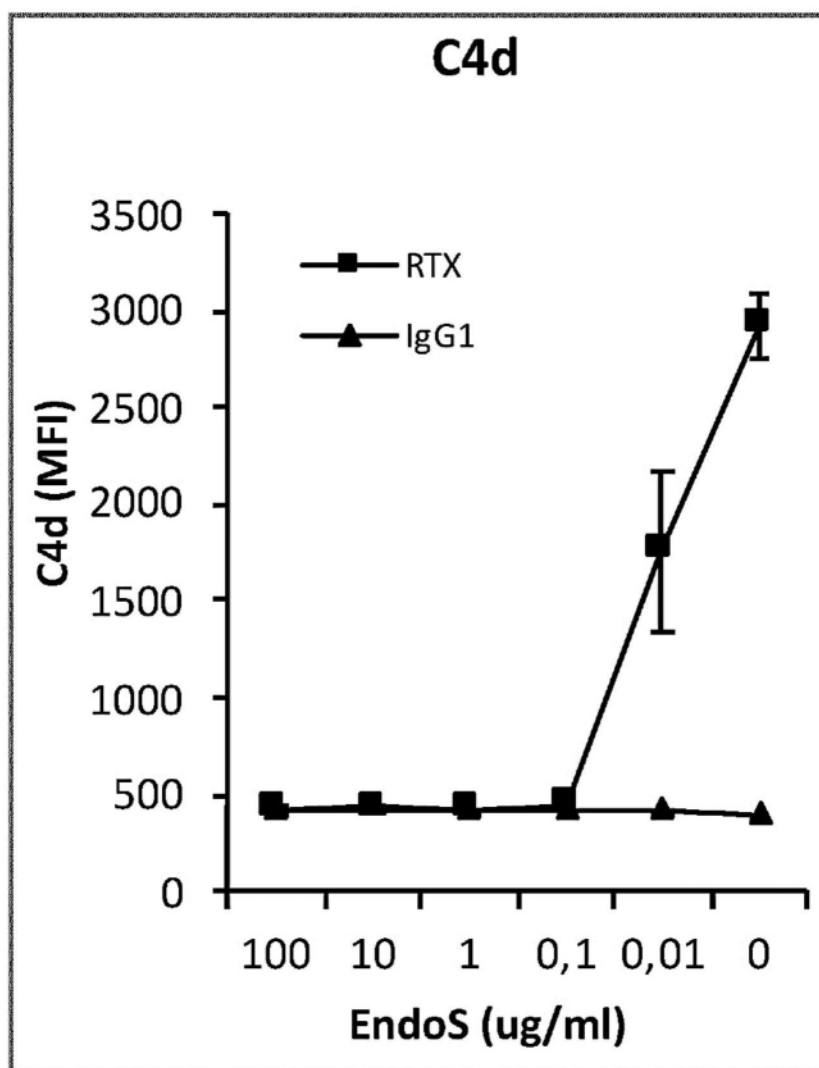


图1(D)

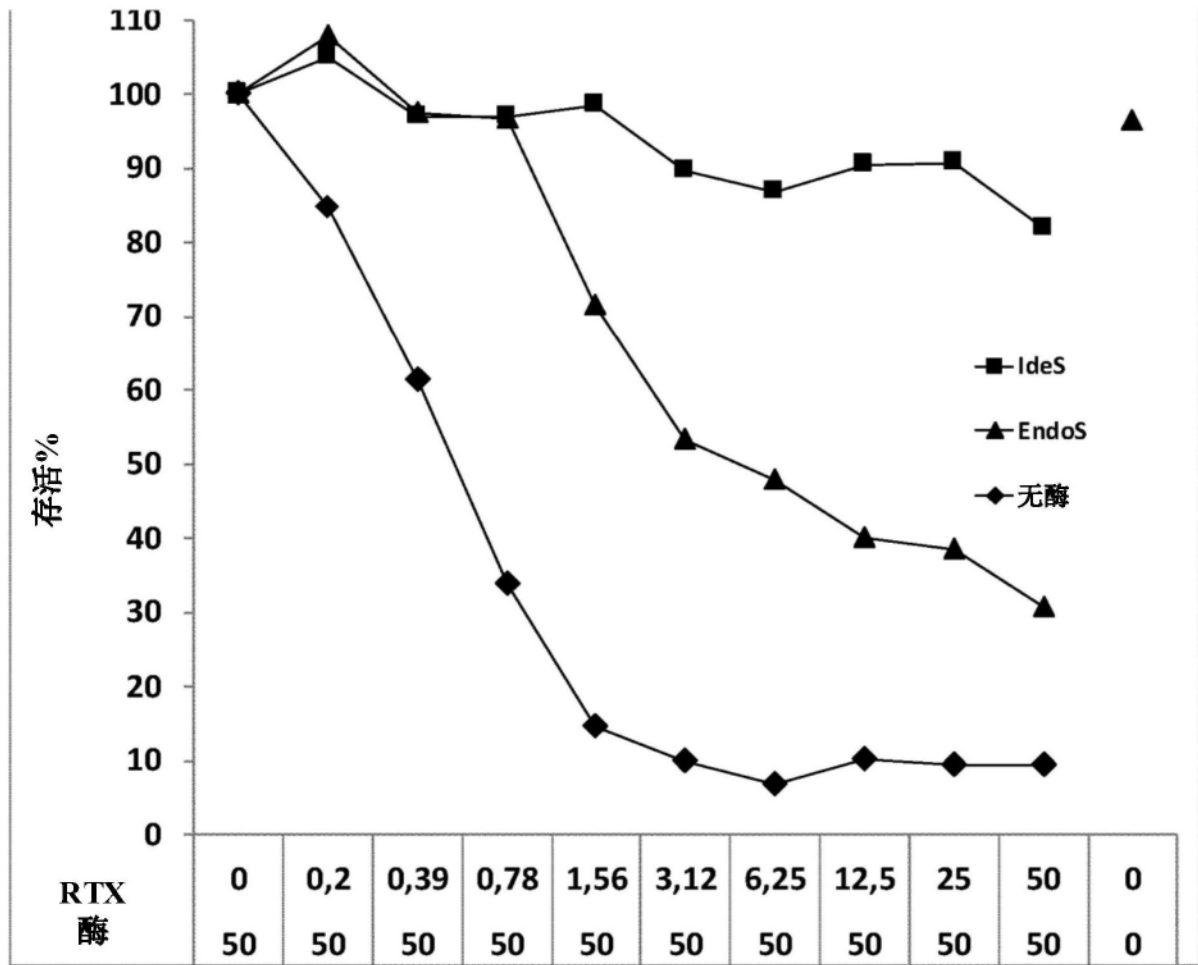


图2

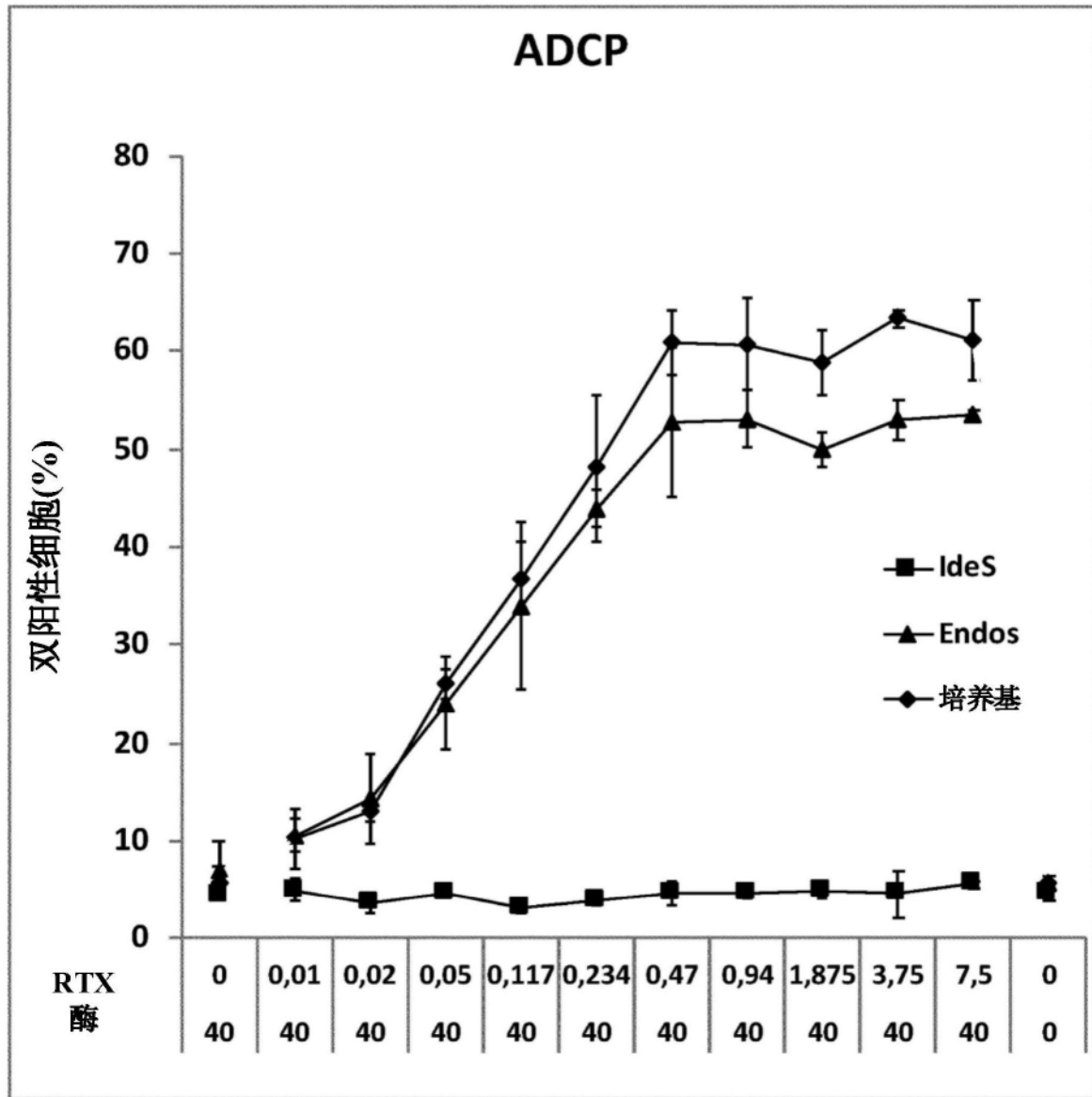


图3

(体外IdeS切割的抗PLT IgG)

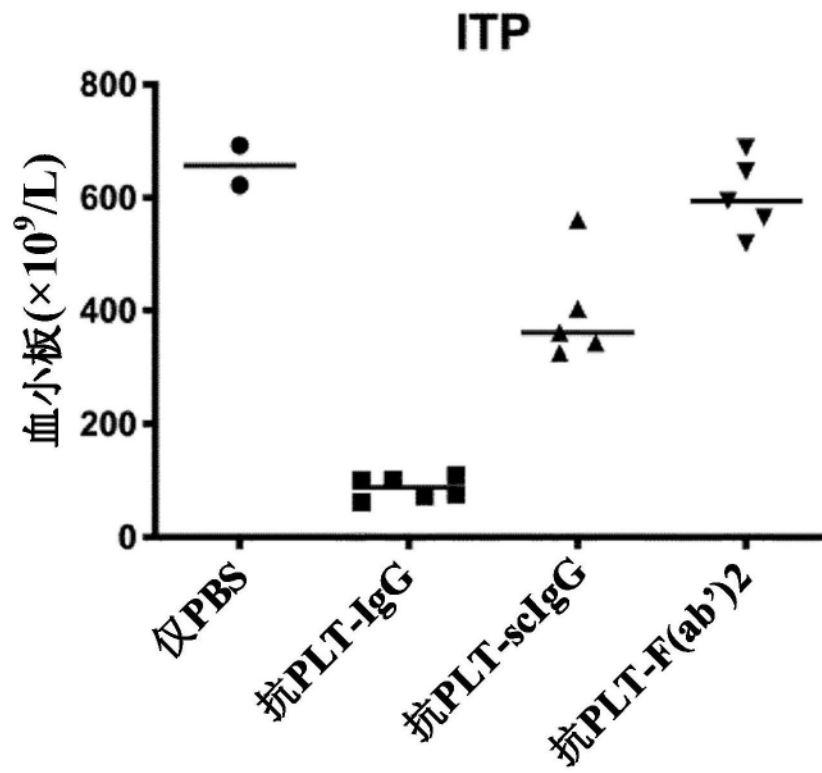


图4

IdeS体内治疗（24h）

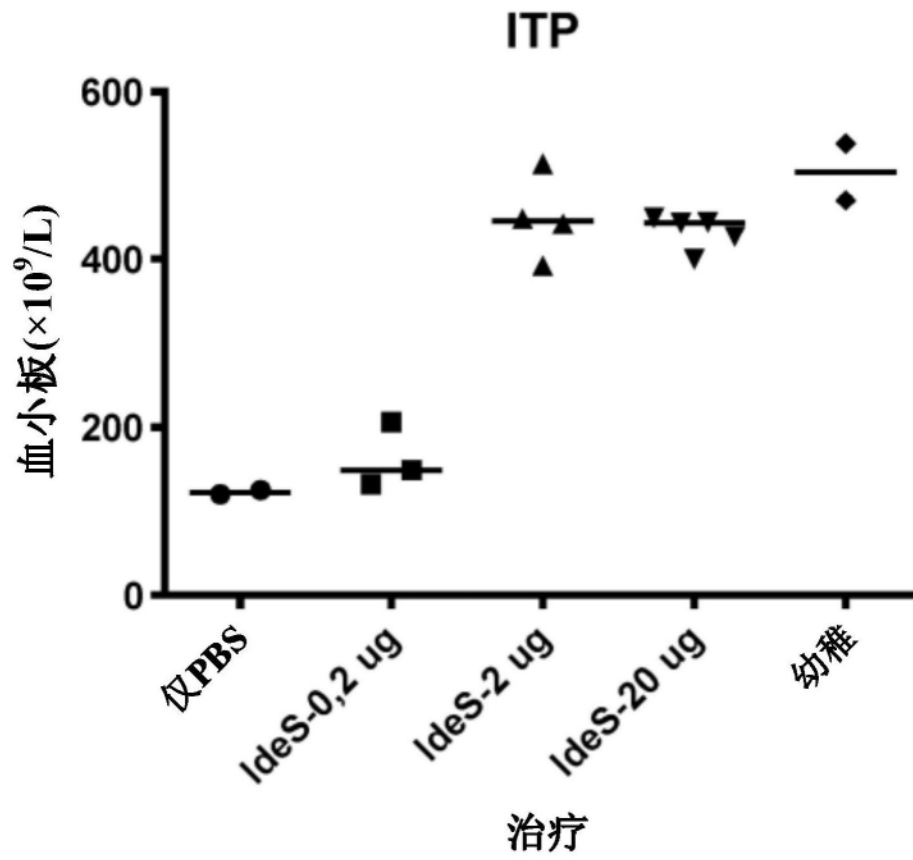


图5

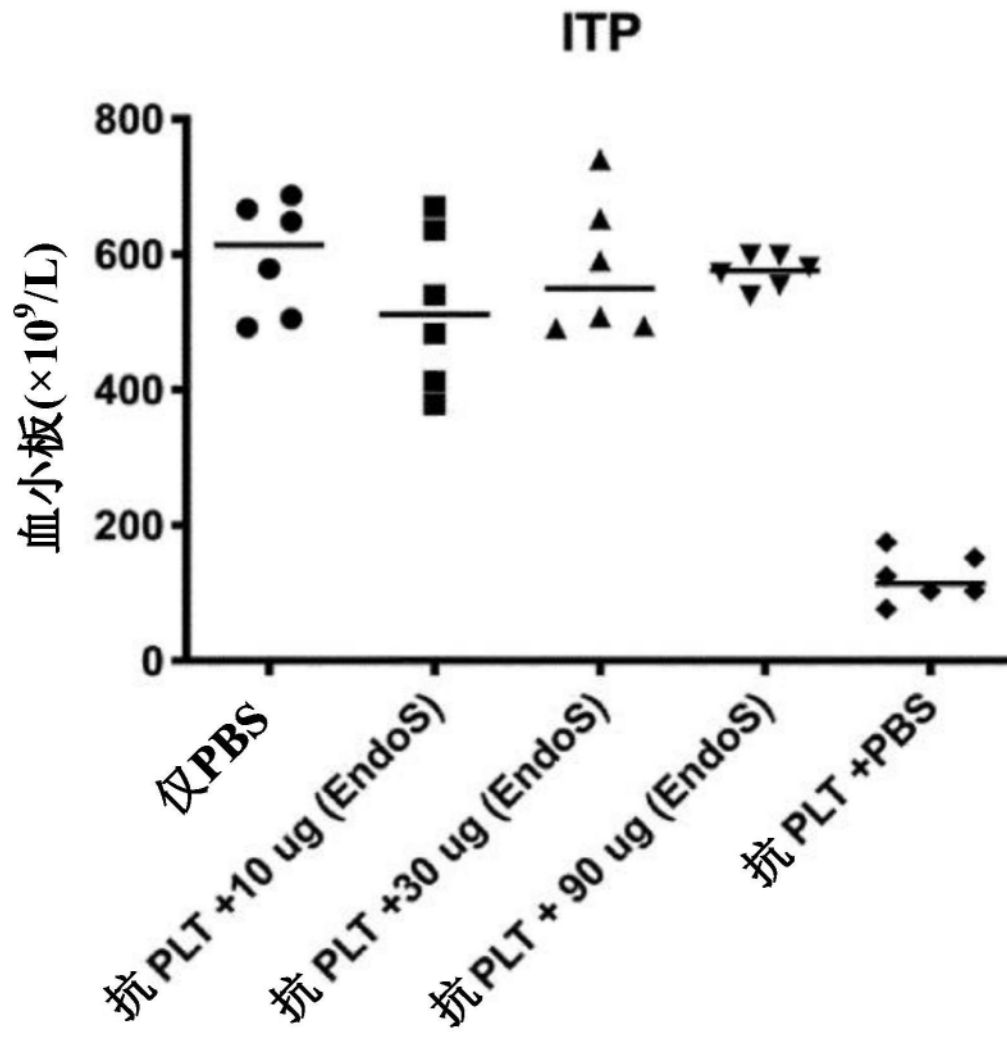


图6

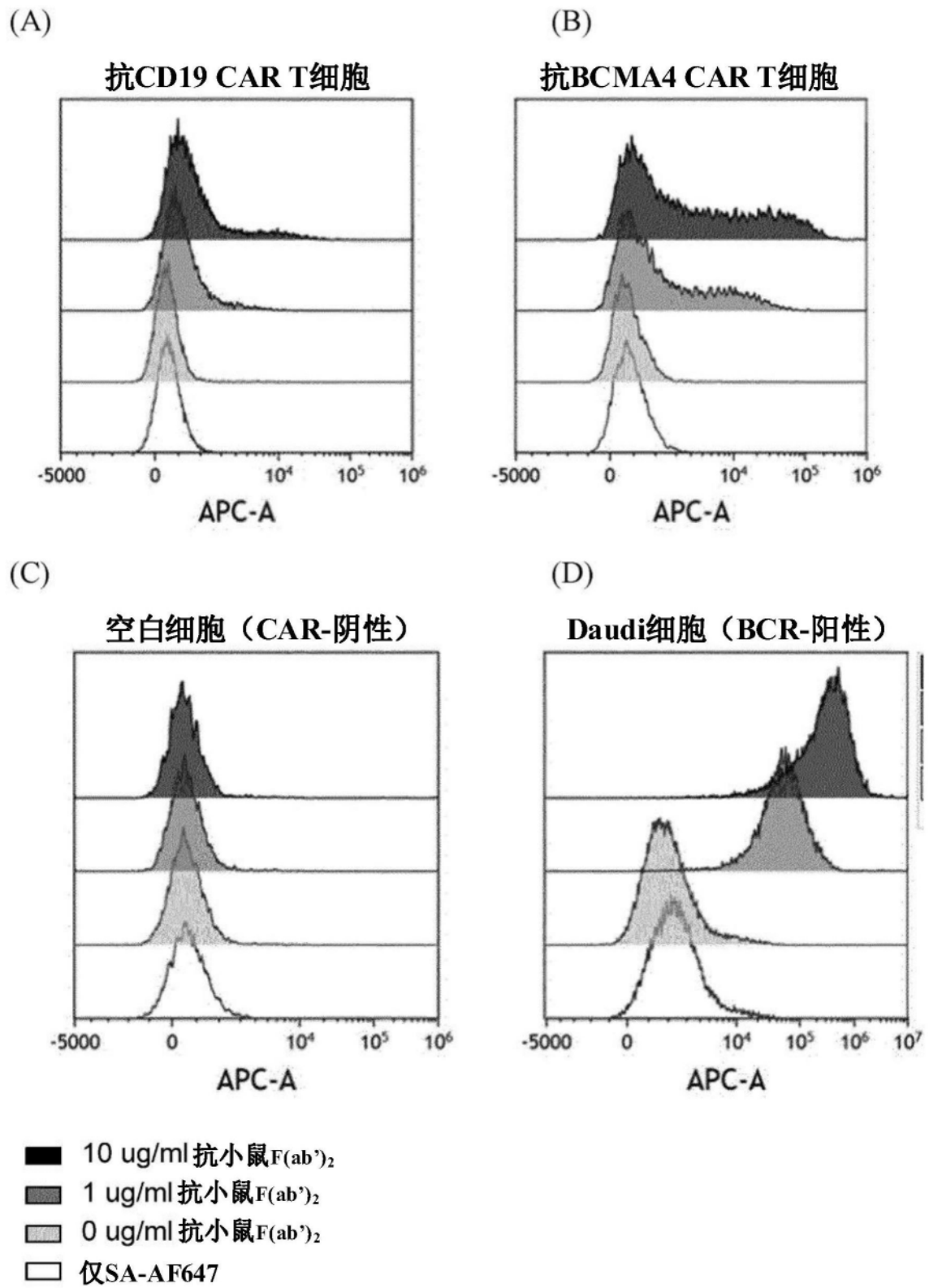


图7

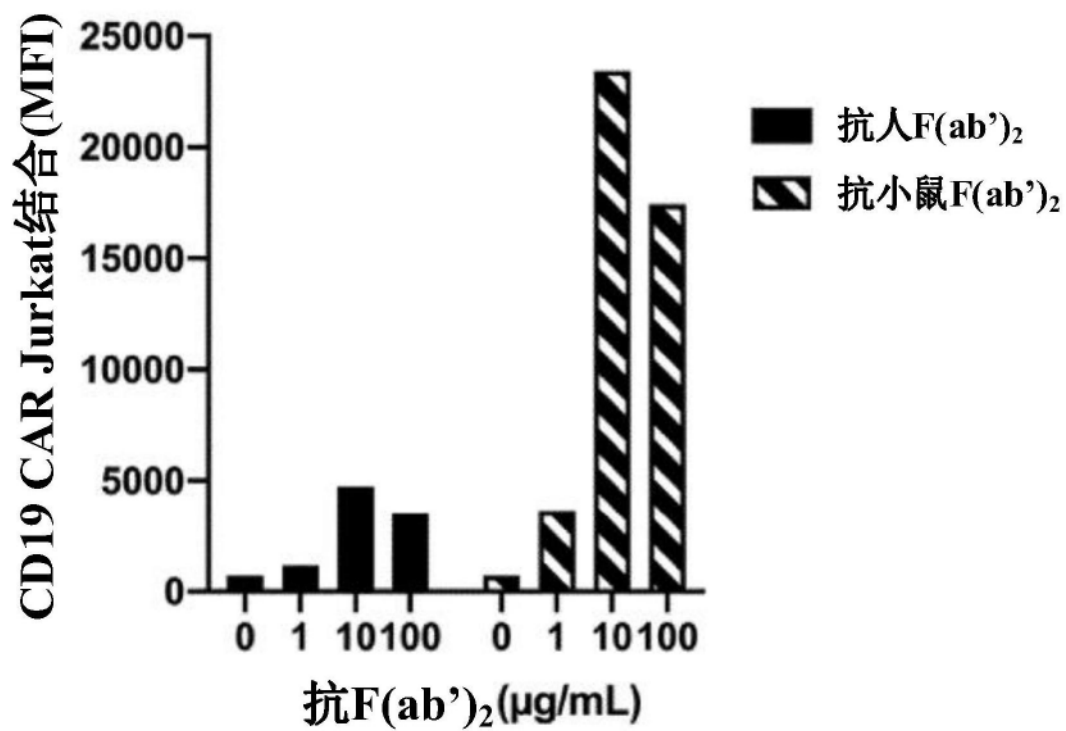


图7(E)

正常人血清中的HAMA

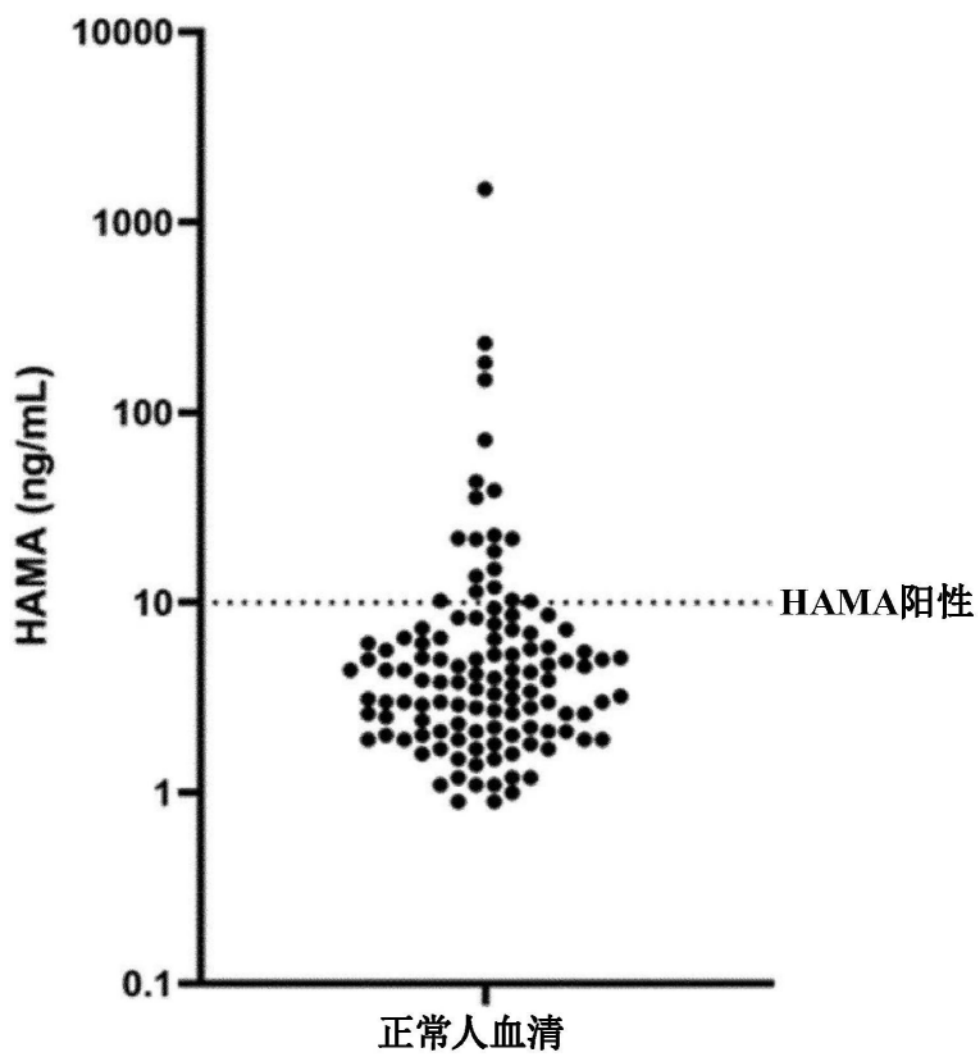
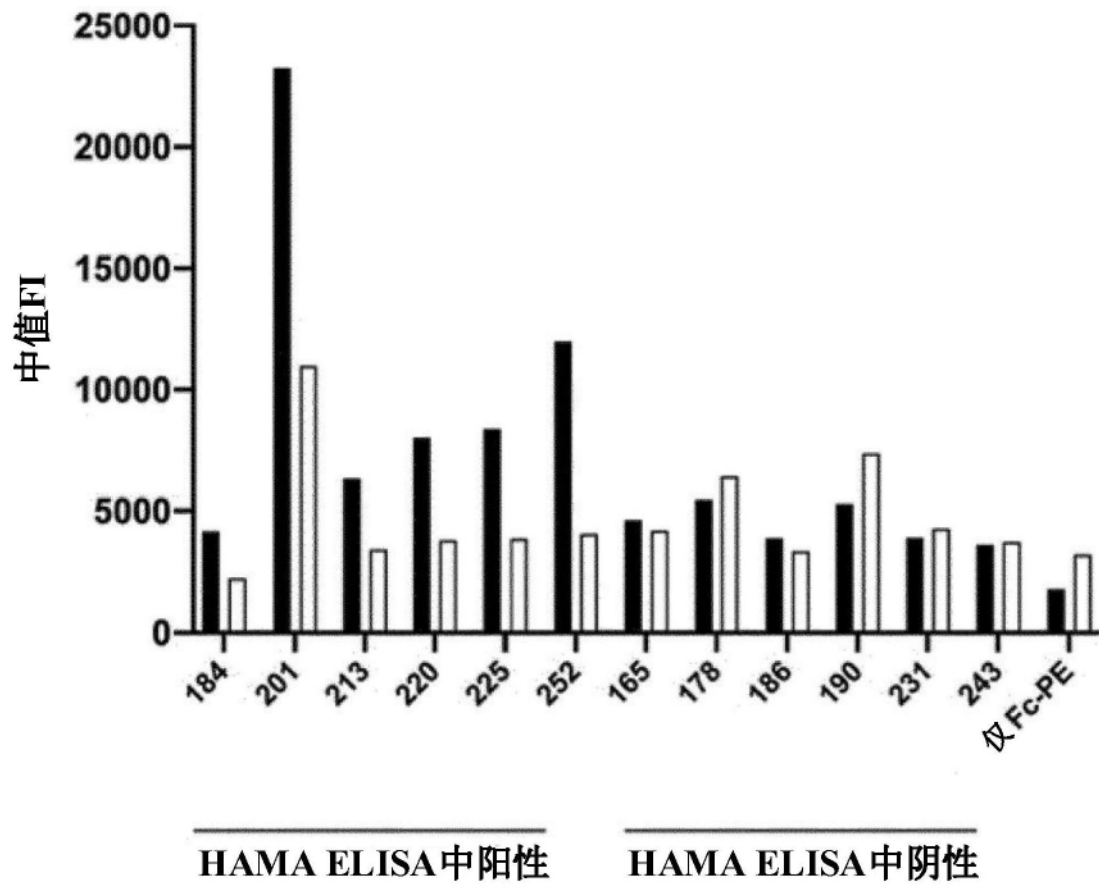


图8(A)



■ 抗CD19 CAR Jurkat
□ wt Jurkat

图8(B)

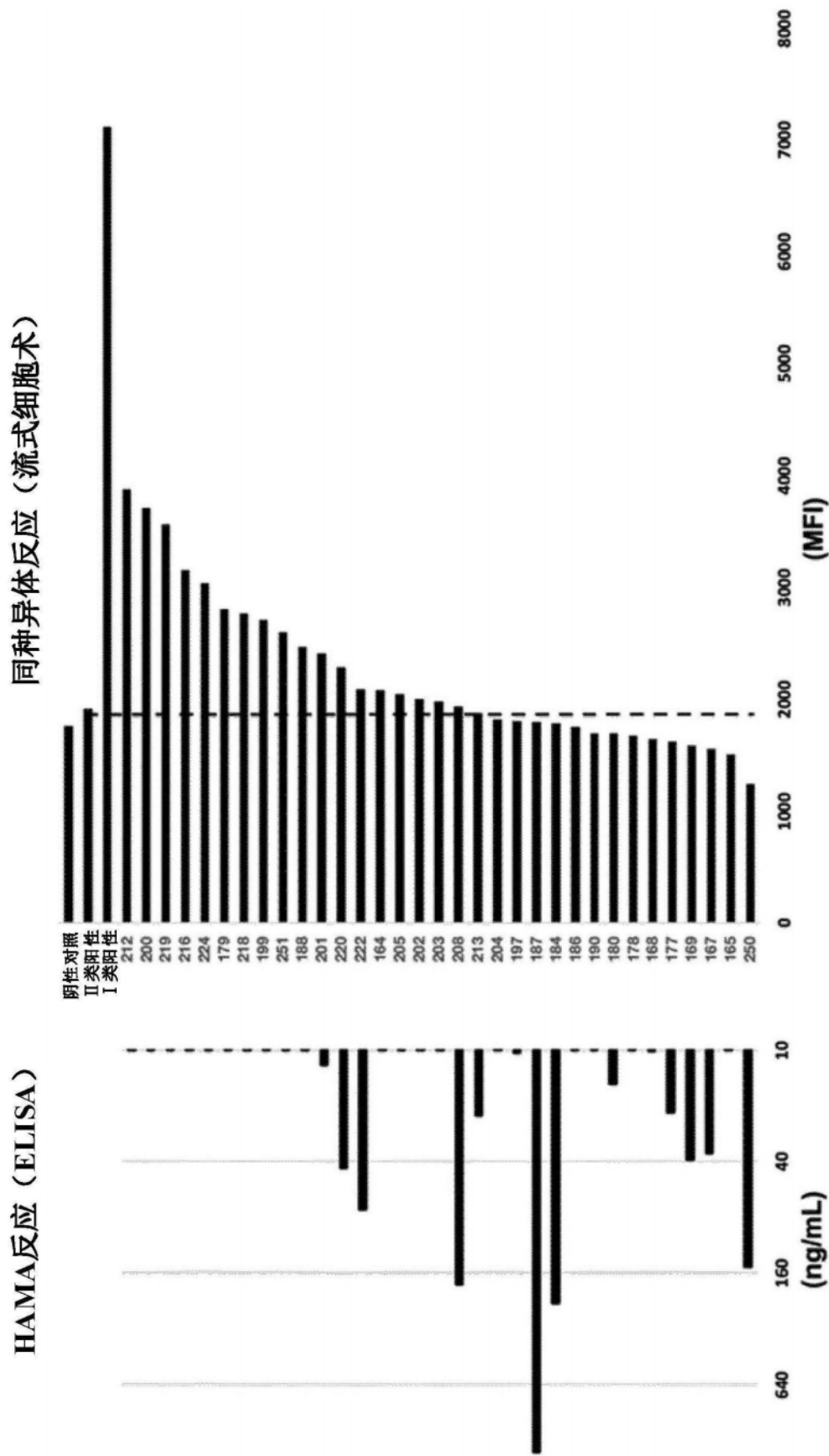


图8(C)

Jurkat CD19 CAR T细胞的血清同种异体反应

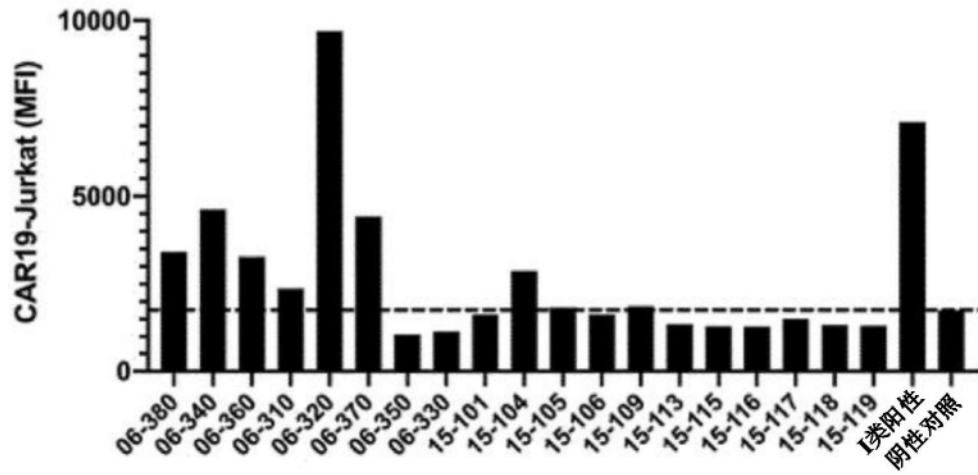


图8(D)

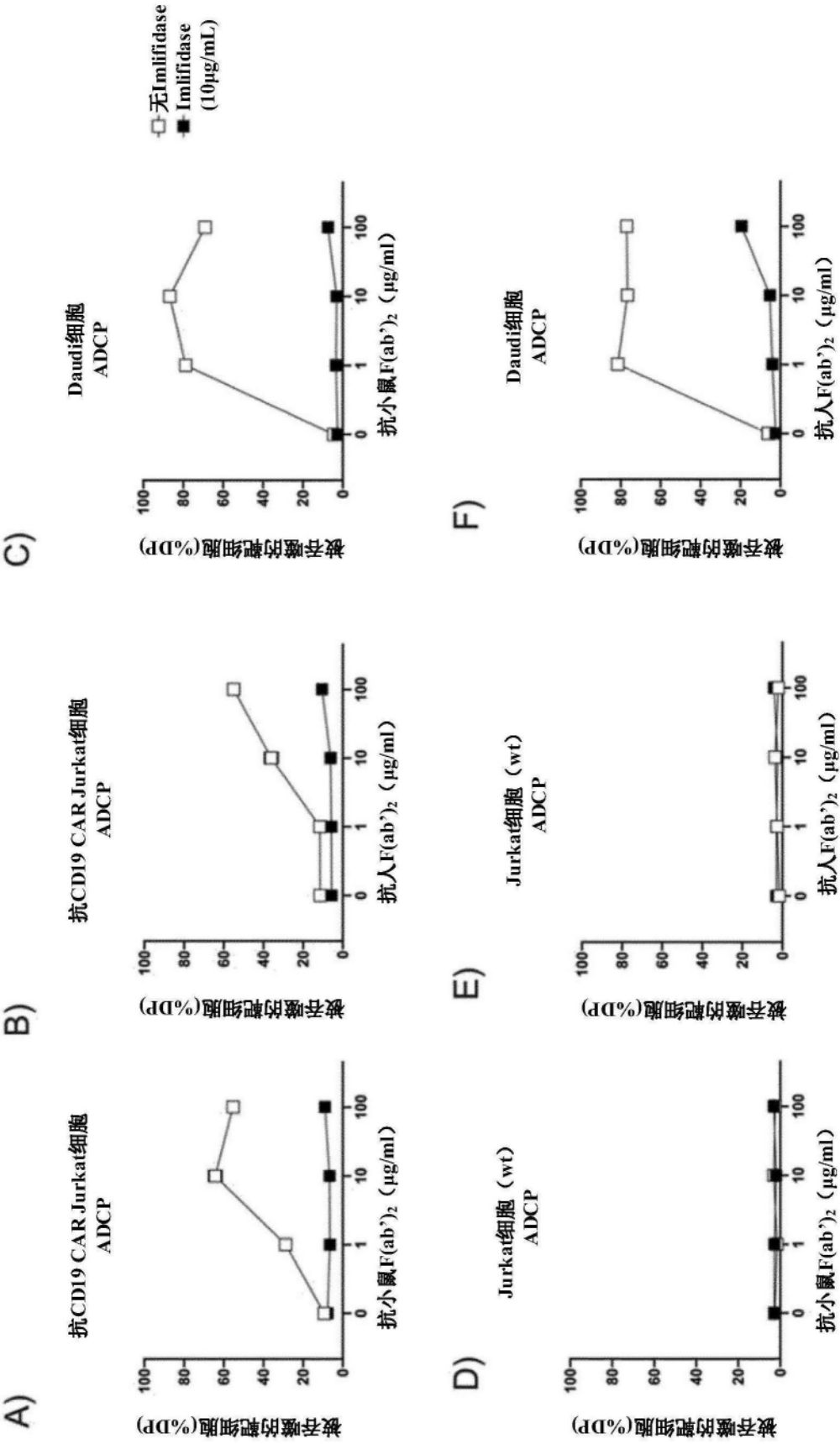
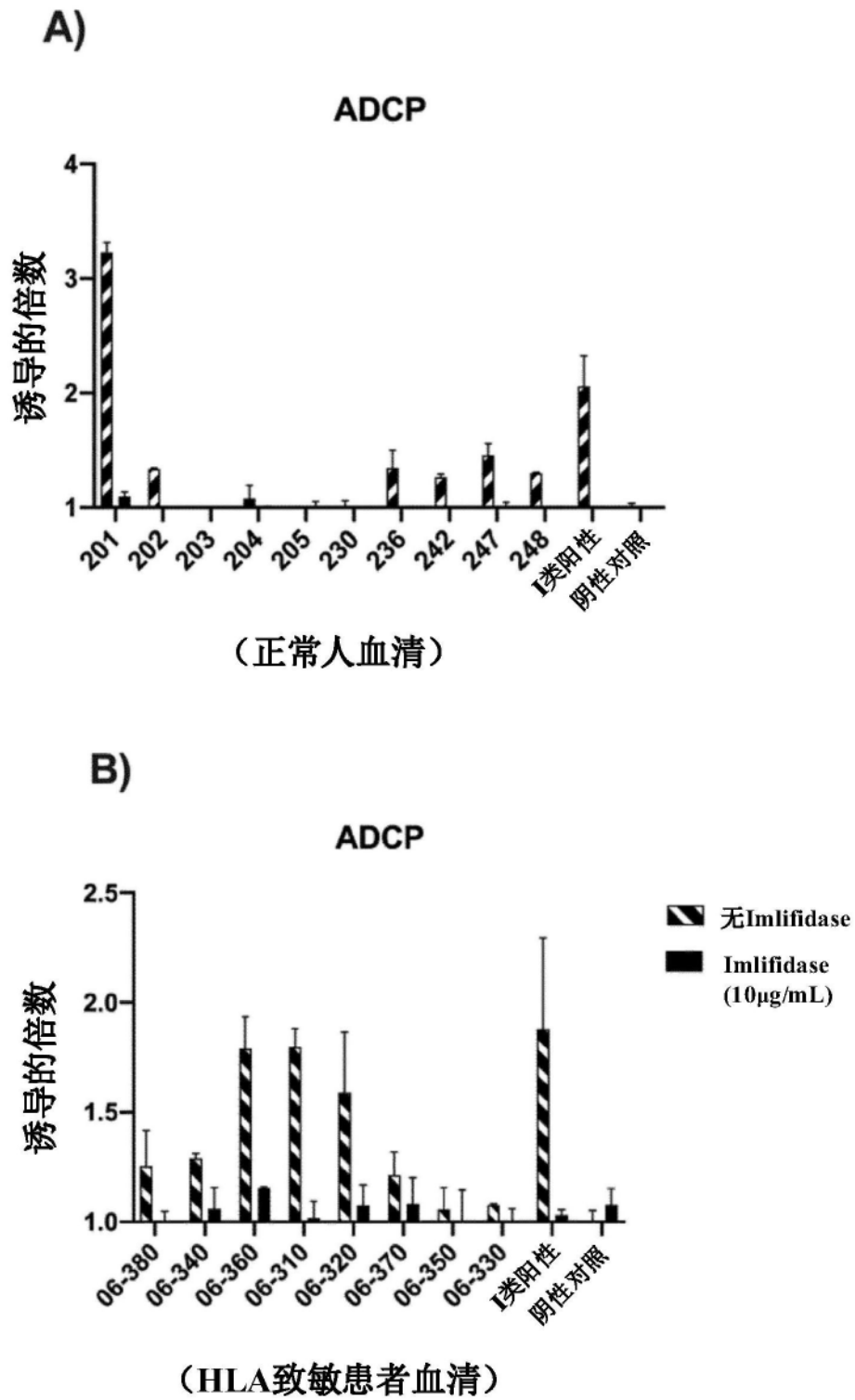


图9



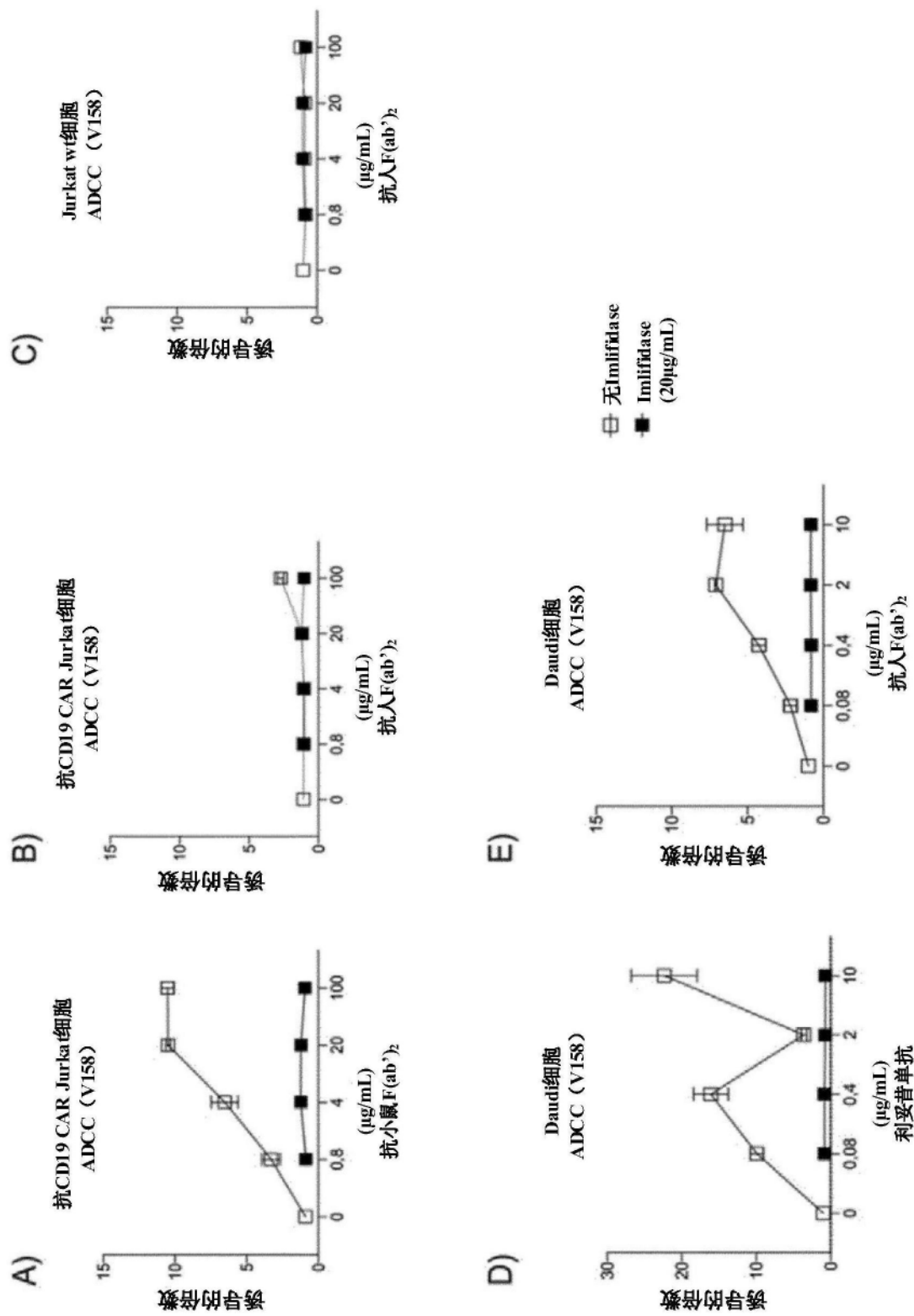


图11

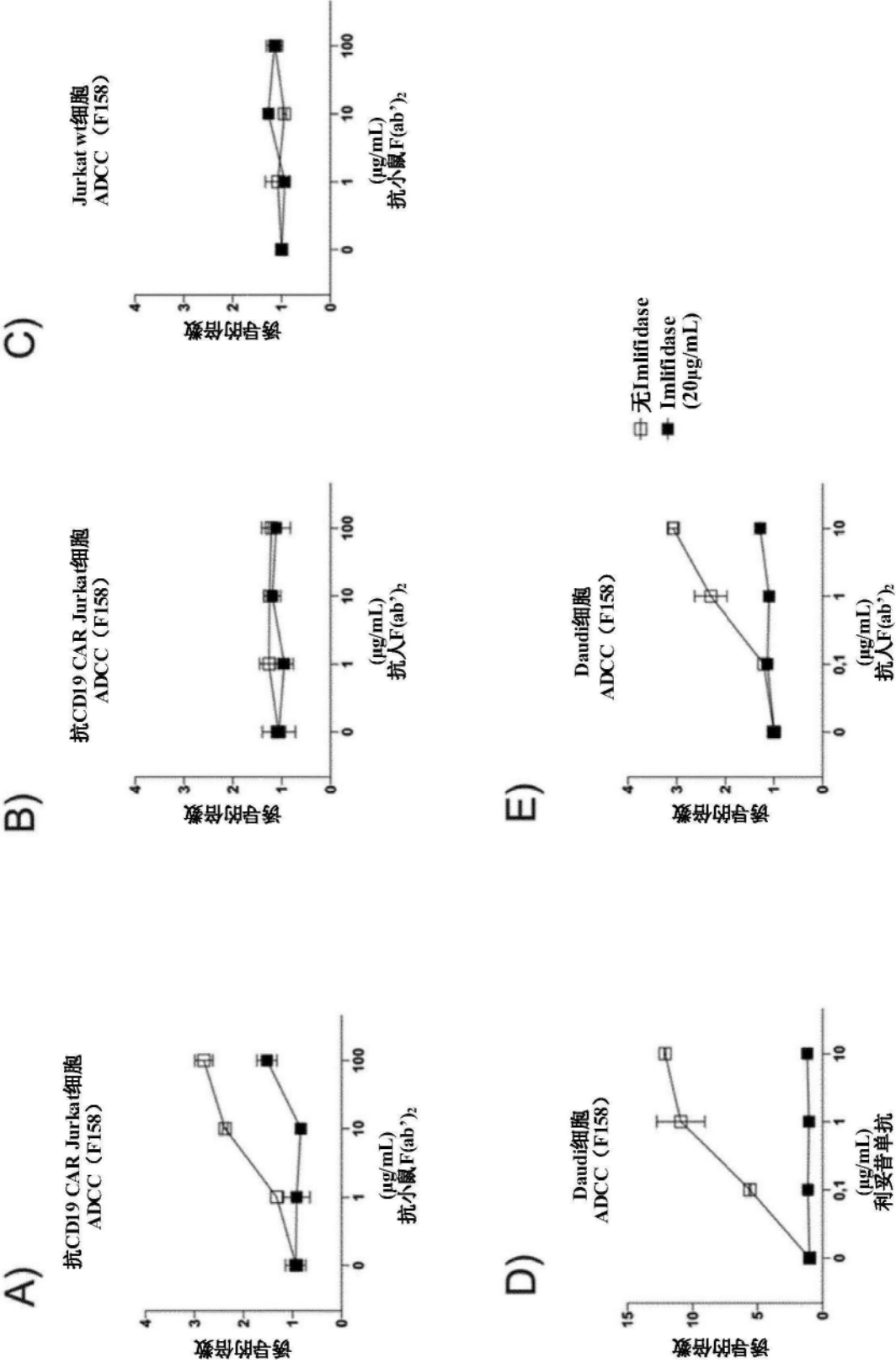


图12

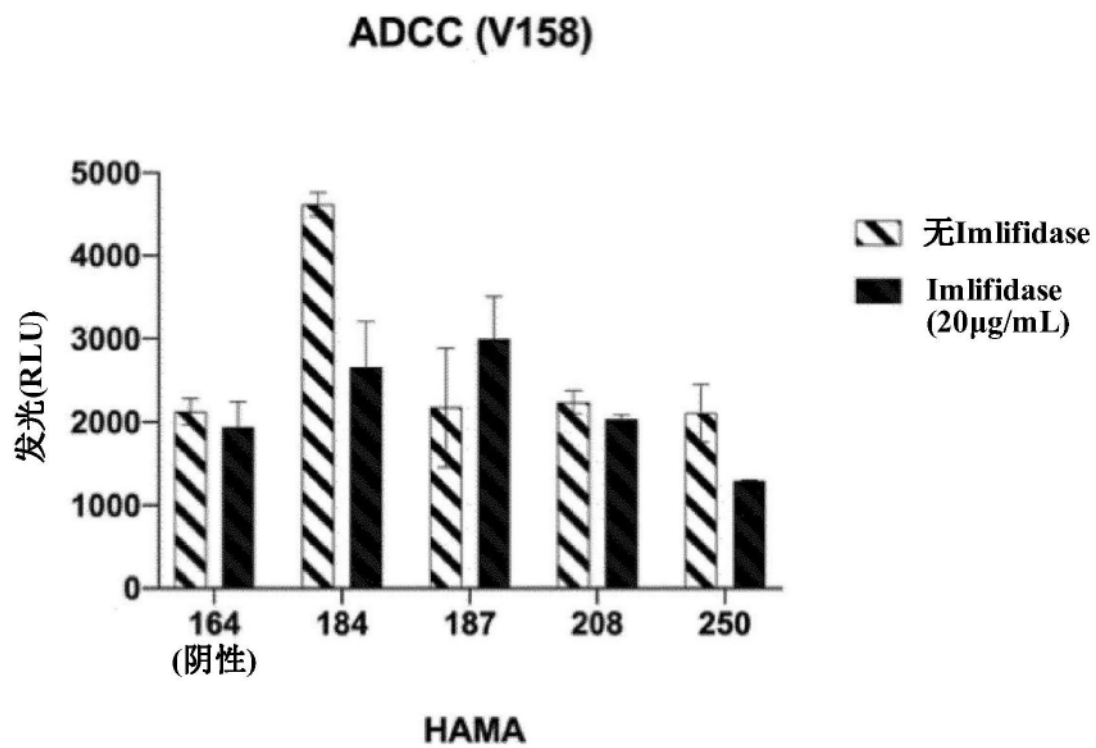


图13

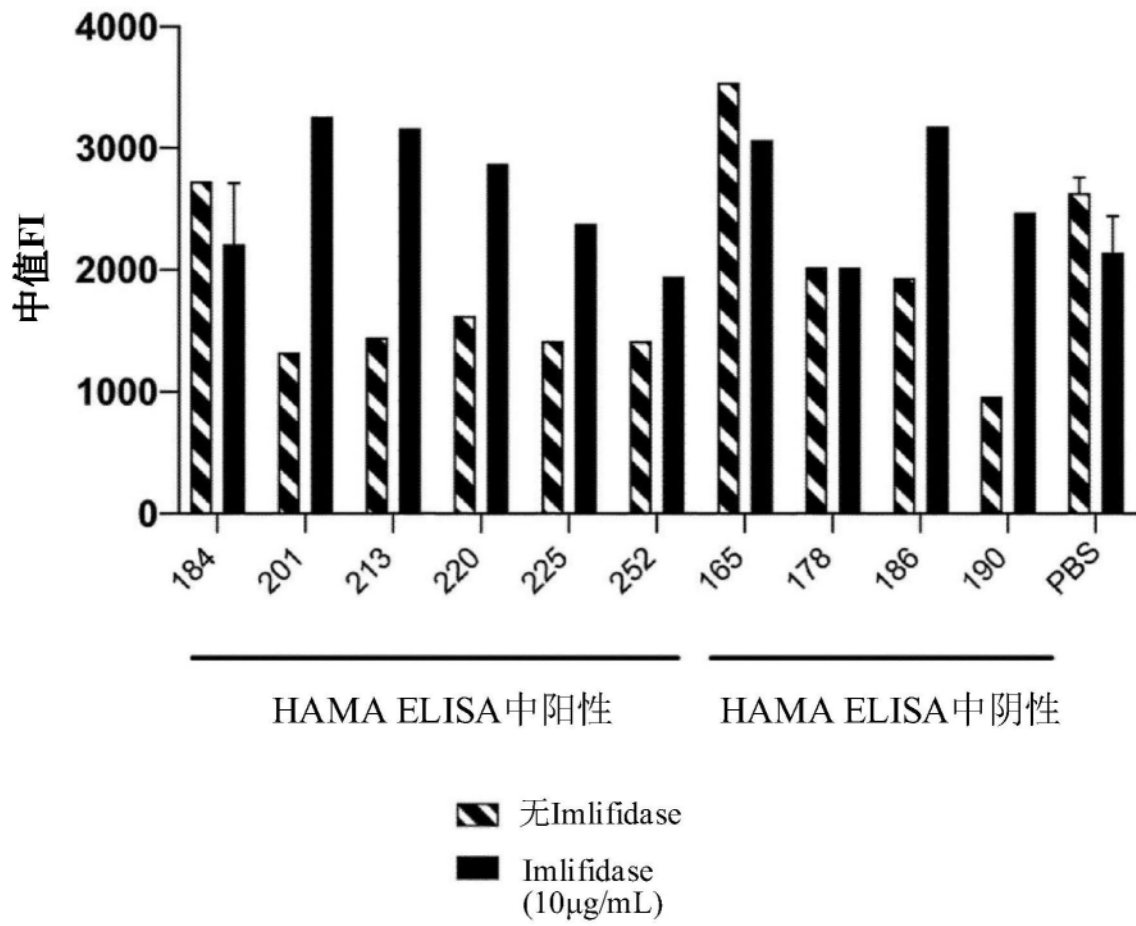


图14

BC170909

培养基中具有IdeS Ig切割酶

培养基中不具有IdeS Ig切割酶

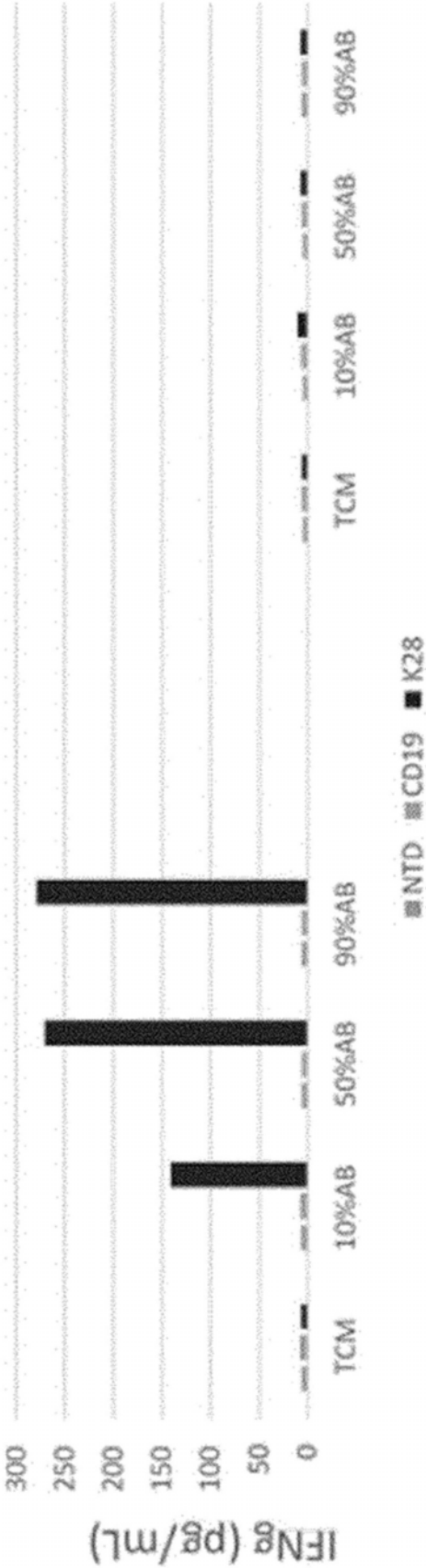


图15

BC170803

培养基中不具有IdeS Ig切割酶 培养基中具有IdeS Ig切割酶

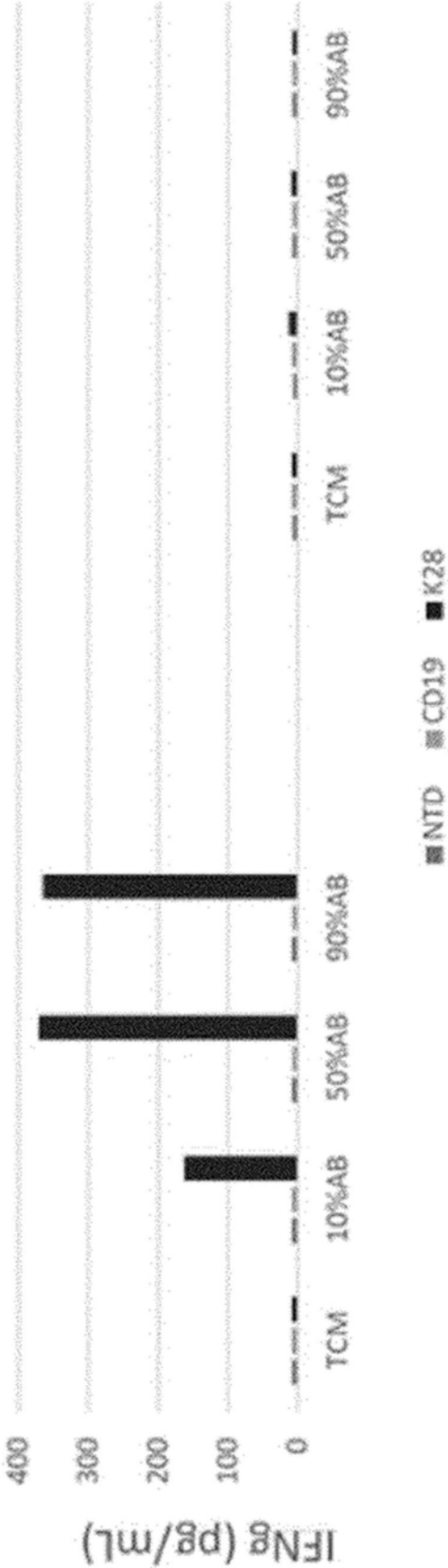


图15续

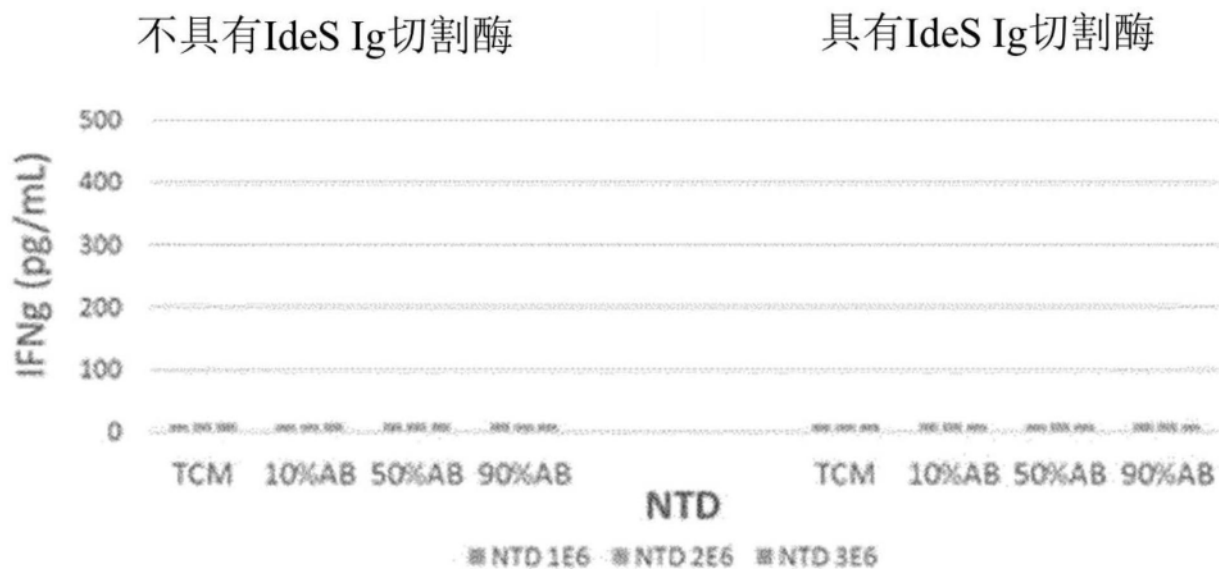


图16A

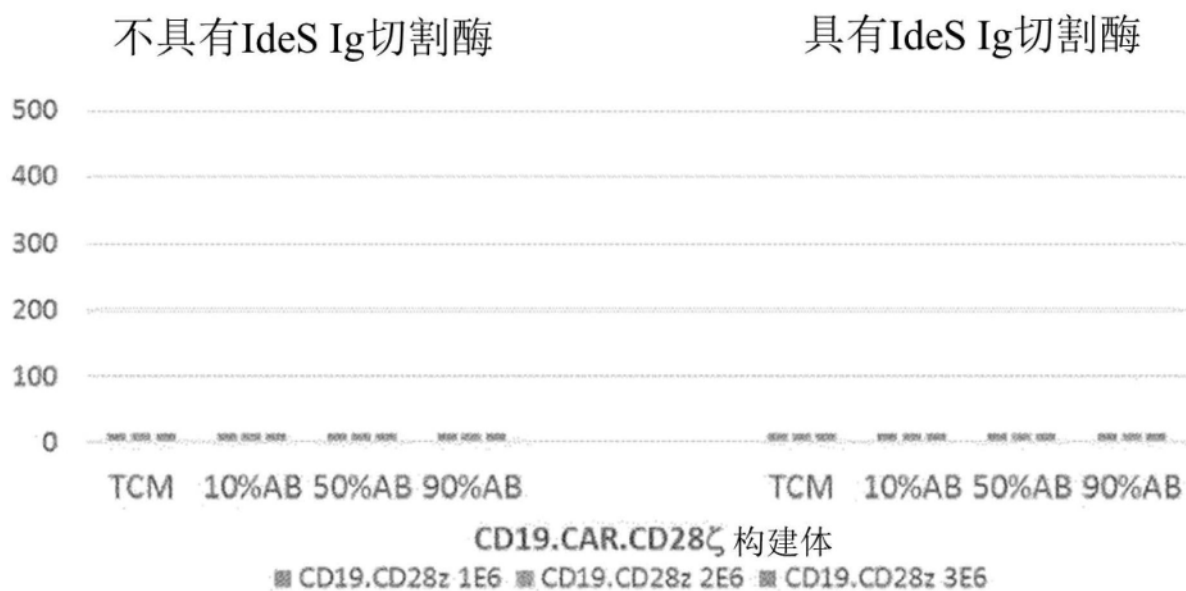


图16B

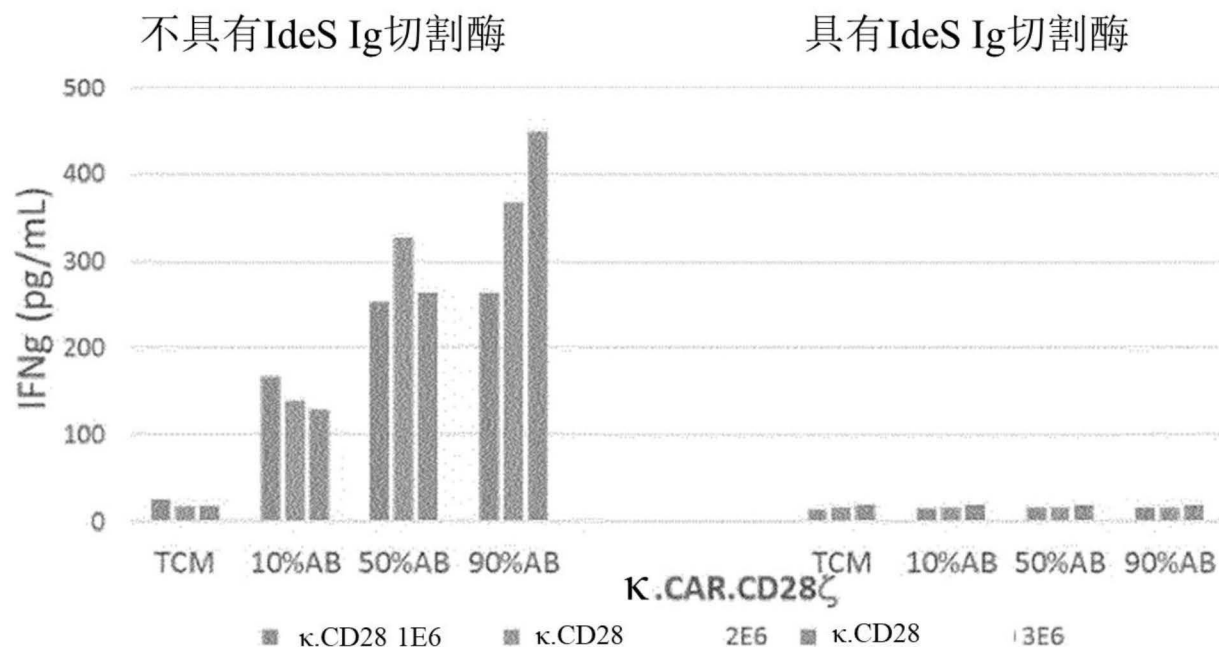


图16C

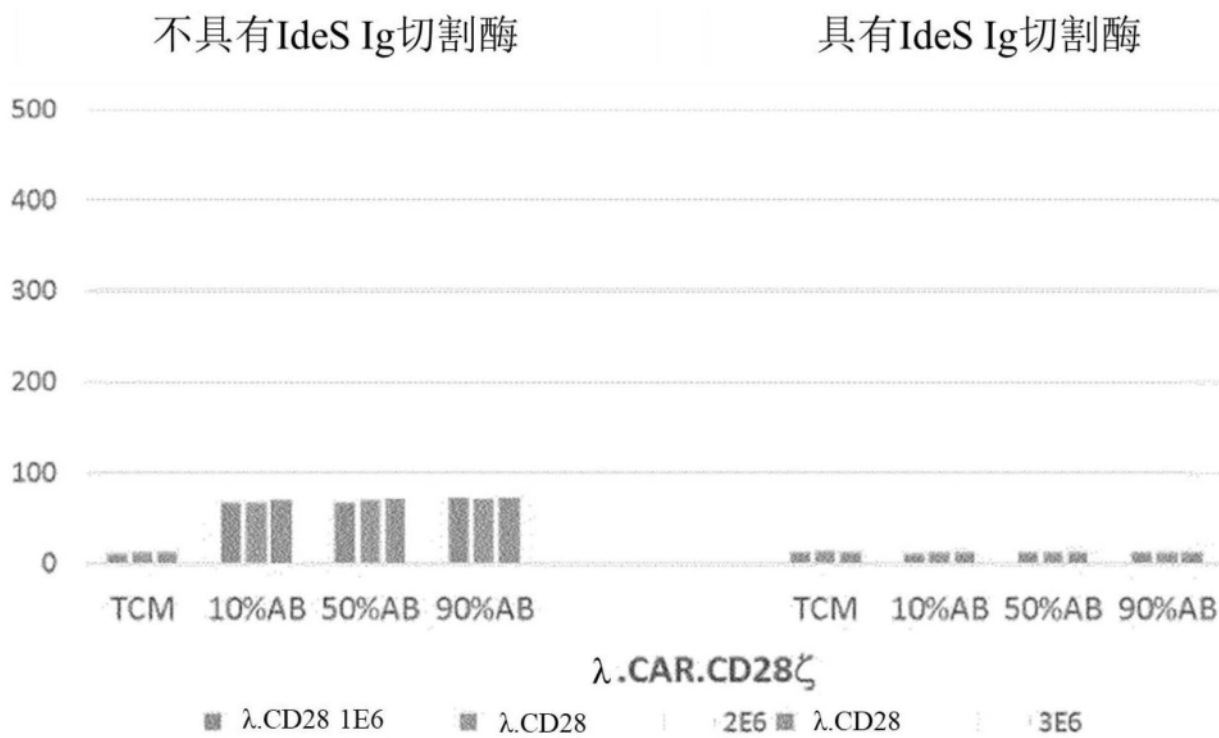


图16D