



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115397461 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 25

(21) 申请号 202180025555.X

(22) 申请日 2021.02.05

(30) 优先权数据

62/970,401 2020.02.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/016713 2021.02.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/158850 EN 2021.08.12

(71) 申请人 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

地址 美国纽约州

(72) 发明人 A·丹尼安 R·J·布伦特延斯

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

专利代理师 龙淳 邹亮

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书4页 说明书40页

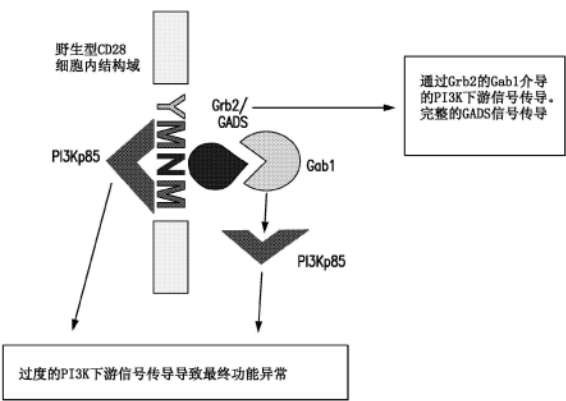
序列表42页 附图45页

(54) 发明名称

具有CD28突变的嵌合抗原受体及其用途

(57) 摘要

本公开提供用于增强对癌症和病原体的免疫应答的方法和组合物。本公开涉及包含突变的CD28细胞内基序的嵌合抗原受体 (CAR) 和包含此类CAR的细胞。本公开的主题还涉及所述细胞用于治疗疾病,例如用于治疗癌症的用途。



1. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 其包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域, 所述细胞内信号传导结构域包含至少一个共刺激信号传导结构域, 所述共刺激信号传导结构域包含 CD28 多肽, 所述 CD28 多肽包含突变的 YNM 基序。

2. 根据权利要求 1 所述的 CAR, 其中与包含天然 YNM 基序的 CD28 分子相比, 所述 CD28 多肽具有减少的磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K) 的 p85 亚基的募集。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的 CAR, 其中 PI3K 的 p85 亚基不与所述突变的 YNM 基序结合。

4. 根据权利要求 3 所述的 CAR, 其中所述突变的 YNM 基序由 YxNx (SEQ ID NO:21) 所示的氨基酸序列组成, 其中 x 不是蛋氨酸 (M)。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的 CAR, 其中所述突变的 YNM 基序由 YENV (SEQ ID NO:22)、YSNV (SEQ ID NO:23)、YKNL (SEQ ID NO:24)、YENQ (SEQ ID NO:25)、YKNI (SEQ ID NO:26)、YINQ (SEQ ID NO:27)、YHNK (SEQ ID NO:28)、YVNQ (SEQ ID NO:29)、YLNP (SEQ ID NO:30)、YLNT (SEQ ID NO:31)、YDND (SEQ ID NO:66)、YENI (SEQ ID NO:67)、YENL (SEQ ID NO:68)、YKNQ (SEQ ID NO:72)、YKNV (SEQ ID NO:73) 或 YANG (SEQ ID NO:87) 所示的氨基酸序列组成。

6. 根据权利要求 3-5 中任一项所述的 CAR, 其中所述突变的 YNM 基序由 YSNV (SEQ ID NO:23)、YENV (SEQ ID NO:22) 或 YKNI (SEQ ID NO:26) 所示的氨基酸序列组成。

7. 根据权利要求 3-6 中任一项所述的 CAR, 其中所述突变的 YNM 基序由 YSNV (SEQ ID NO:23) 所示的氨基酸序列组成。

8. 根据权利要求 3-7 中任一项所述的 CAR, 其中所述突变的 YNM 基序与生长因子受体结合受体 2 (Grb2) 和/或 Shc 下游的 Grb2 相关衔接体 (GADS) 结合。

9. 根据权利要求 1 或 2 所述的 CAR, 其中所述突变的 YNM 基序不与 Grb2 和/或 GADS 结合。

10. 根据权利要求 9 所述的 CAR, 其中所述突变的 YNM 基序由 YMxM (SEQ ID NO:20) 所示的氨基酸序列组成, 其中 x 不是天冬氨酸 (N)。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的 CAR, 其中所述突变的 YNM 基序由 YMDM (SEQ ID NO:32)、YMPM (SEQ ID NO:79)、YMRM (SEQ ID NO:37) 或 YMSM (SEQ ID NO:80) 所示的氨基酸序列组成。

12. 根据权利要求 9-11 中任一项所述的 CAR, 其中所述突变的 YNM 基序由 YMDM (SEQ ID NO:32) 所示的氨基酸序列组成。

13. 根据权利要求 9 所述的 CAR, 其中所述突变的 YNM 基序由 YbXM (SEQ ID NO:33) 所示的氨基酸序列组成, 其中 x 不是天冬氨酸 (N), 并且 b 不是蛋氨酸 (M)。

14. 根据权利要求 13 所述的 CAR, 其中所述突变的 YNM 基序由 YTHM (SEQ ID NO:34)、YVLM (SEQ ID NO:35)、YIAM (SEQ ID NO:36)、YVEM (SEQ ID NO:83)、YVKM (SEQ ID NO:85) 或 YVPM (SEQ ID NO:86) 所示的氨基酸序列组成。

15. 根据权利要求 9 所述的 CAR, 其中所述突变的 YNM 基序由 YMxb (SEQ ID NO:65) 所示的氨基酸序列组成, 其中 x 不是天冬氨酸 (N), 并且 b 不是蛋氨酸 (M)。

16. 根据权利要求 15 所述的 CAR, 其中所述突变的 YNM 基序由 YMAP (SEQ ID NO:77) 所示的氨基酸序列组成。

17. 根据权利要求 9-16 中任一项所述的 CAR, 其中 PI3K 的 p85 亚基信号传导与所述突变的 YNM 基序结合。

18. 根据权利要求1或2所述的CAR, 其中所述突变的YMN基序不与Grb2和/或GADS或PI3K的p85亚基结合。

19. 根据权利要求18所述的CAR, 其中所述突变的YMN基序由Ybxb (SEQ ID NO:43) 所示的氨基酸序列组成, 其中x不是天冬氨酸(N), 并且b不是蛋氨酸(M)。

20. 根据权利要求19所述的CAR, 其中所述突变的YMN基序由YGGG (SEQ ID NO:44)、YAAA (SEQ ID NO:45)、YFFF (SEQ ID NO:46)、YETV (SEQ ID NO:69)、YQQQ (SEQ ID NO:70)、YHAE (SEQ ID NO:71)、YLDL (SEQ ID NO:74)、YLIP (SEQ ID NO:75)、YLRV (SEQ ID NO:76)、YTAV (SEQ ID NO:82) 或YVHV (SEQ ID NO:84) 所示的氨基酸序列组成。

21. 根据权利要求18-20中任一项所述的CAR, 其中所述突变的YMN基序由YGGG (SEQ ID NO:44) 所示的氨基酸序列组成。

22. 根据权利要求1或2所述的CAR, 其中所述突变的YMN基序能够通过限制能够与PI3K的p85亚基结合的蛋氨酸残基的数量来调节PI3K信号传导。

23. 根据权利要求22所述的CAR, 其中所述突变的YMN基序由YMN<sub>x</sub> (SEQ ID NO:38) 或Y<sub>x</sub>NM (SEQ ID NO:39) 所示的氨基酸序列组成, 其中x不是蛋氨酸(M)。

24. 根据权利要求22或23所述的CAR, 其中所述突变的YMN基序由YMN<sub>V</sub> (SEQ ID NO:40)、YENM (SEQ ID NO:41) 和YMN<sub>Q</sub> (SEQ ID NO:42)、YMN<sub>L</sub> (SEQ ID NO:78) 或YSNM (SEQ ID NO:81) 所示的氨基酸序列组成。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的CAR, 其中所述细胞外抗原结合结构域与抗原结合。

26. 根据权利要求25所述的CAR, 其中所述抗原是肿瘤抗原或病原体抗原。

27. 根据权利要求25或26所述的CAR, 其中所述抗原是肿瘤抗原。

28. 根据权利要求27所述的CAR, 其中所述肿瘤抗原选自CD19、间皮素、AXL、TIM3、HVEM、MUC16、MUC1、CA1X、CEA、CD8、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CLL1、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、EGP-2、EGP-40、EpCAM、Erb-B、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、叶酸受体- $\alpha$ 、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R- $\alpha$ 2、 $\kappa$ -轻链、KDR、LeY、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、MAGEA3、CT83 (也称为KK-LC-1)、p53、MART1、GP100、蛋白酶3 (PR1)、酪氨酸酶、生存素、hTERT、EphA2、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD44V6、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME、HPV E6癌蛋白和HPV E7癌蛋白。

29. 根据权利要求28所述的CAR, 其中所述肿瘤抗原是CD19。

30. 根据权利要求1-29中任一项所述的CAR, 其中所述突变的YMN基序由YMDM (SEQ ID NO:32) 所示的氨基酸序列组成。

31. 根据权利要求30所述的CAR, 其中所述细胞外抗原结合结构域与CD19结合。

32. 根据权利要求31所述的CAR, 其中所述CAR包含SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列。

33. 根据权利要求1-29中任一项所述的CAR, 其中所述突变的YMN基序由YKNI (SEQ ID NO:26) 所示的氨基酸序列组成。

34. 根据权利要求33所述的CAR, 其中所述细胞外抗原结合结构域与CD19结合。

35. 根据权利要求34所述的CAR, 其中所述CAR包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列。

36. 根据权利要求1-29中任一项所述的CAR, 其中所述突变的YMN基序由YENV (SEQ ID

NO:22)所示的氨基酸序列组成。

37. 根据权利要求36所述的CAR,其中所述细胞外抗原结合结构域与CD19结合。

38. 根据权利要求37所述的CAR,其中所述CAR包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列。

39. 根据权利要求1-29中任一项所述的CAR,其中所述突变的YMN基序由YSNV (SEQ ID NO:64)所示的氨基酸序列组成。

40. 根据权利要求39所述的CAR,其中所述细胞外抗原结合结构域与CD19结合。

41. 根据权利要求40所述的CAR,其中所述CAR包含SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列。

42. 根据权利要求1-29中任一项所述的CAR,其中所述突变的YMN基序由YGGG (SEQ ID NO:63)所示的氨基酸序列组成。

43. 根据权利要求42所述的CAR,其中所述细胞外抗原结合结构域与CD19结合。

44. 根据权利要求43所述的CAR,其中所述CAR包含SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列。

45. 一种细胞,其包含权利要求1-44中任一项所述的CAR。

46. 根据权利要求45所述的细胞,其中所述细胞是免疫应答细胞。

47. 根据权利要求45或46所述的细胞,其中所述细胞是淋巴谱系的细胞或骨髓谱系的细胞。

48. 根据权利要求45-47中任一项所述的细胞,其中所述细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、可从中分化出淋巴样细胞的干细胞。

49. 根据权利要求45-48中任一项所述的细胞,其中所述细胞是T细胞。

50. 根据权利要求48或49所述的细胞,其中所述T细胞选自细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、 $\gamma$   $\delta$ T细胞、肿瘤反应性淋巴细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、调节性T细胞和自然杀伤T(NKT)细胞。

51. 一种组合物,其包含权利要求45-50中任一项所述的细胞。

52. 根据权利要求51所述的组合物,其是还包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

53. 根据权利要求51或52所述的组合物,其用于治疗 and/或预防赘生物或肿瘤和/或病原体感染。

54. 一种降低受试者肿瘤负荷的方法,所述方法包括向所述受试者施用权利要求45-50中任一项所述的细胞或权利要求51-53中任一项所述的组合物。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述方法减少所述受试者中的肿瘤细胞的数量、减小肿瘤大小和/或根除所述肿瘤。

56. 一种治疗和/或预防赘生物或肿瘤的方法,所述方法包括向所述受试者施用权利要求45-50中任一项所述的细胞或权利要求51-53中任一项所述的组合物。

57. 一种延长患有赘生物或肿瘤的受试者的生存期的方法,所述方法包括向所述受试者施用权利要求45-50中任一项所述的细胞或权利要求51-53中任一项所述的组合物。

58. 根据权利要求54-57中任一项所述的方法,其中所述赘生物和/或肿瘤选自B细胞白血病、B细胞淋巴瘤、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、非霍奇金氏淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、急性髓系白血病(AML)和混合表型急性白血病(MPAL)。

59. 一种用于产生抗原特异性细胞的方法,所述方法包括将编码权利要求1-44中任一项所述的CAR的核酸分子引入细胞。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述核酸分子存在于载体上。

61. 根据权利要求60所述的方法,其中所述载体是逆转录病毒载体。
62. 一种核酸分子,其编码权利要求1-44中任一项所述的CAR。
63. 根据权利要求62所述的核酸分子,其包含SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:58所示的核苷酸序列。
64. 一种载体,其包含权利要求62或63所述的核酸分子。
65. 根据权利要求64所述的载体,其中所述载体是 $\gamma$ -逆转录病毒载体。
66. 一种宿主细胞,其表达权利要求64或65所述的核酸分子。
67. 根据权利要求66所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是T细胞。
68. 一种试剂盒,其包含权利要求1-44中任一项所述的CAR、权利要求35-40中任一项所述的细胞、权利要求51-53中任一项所述的组合物、权利要求62或63所述的核酸分子,或权利要求64或65所述的载体。
69. 根据权利要求68所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含用于治疗 and/或预防赘生物、肿瘤和/或病原体感染的书面说明书。

## 具有CD28突变的嵌合抗原受体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年2月5日提交的美国临时专利申请第62/970,401号的优先权,其全部内容并入本文以供参考,并要求其优先权。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已通过EFS-Web以ASCII格式提交,其全部内容并入本文以供参考。所述ASCII副本创建于2021年2月4日,命名为072734.1189\_ST25.txt,大小为70,968字节。

### 技术领域

[0005] 本公开提供用于增强对癌症和病原体的免疫应答的方法和组合物。本公开涉及包含突变的CD28细胞内基序、即突变的YMN基序的嵌合抗原受体(CAR)。本公开的主题还提供包含该CAR的细胞和包含该细胞的组合物,以及该细胞和组合物用于治疗疾病,例如用于治疗癌症的用途。

### 背景技术

[0006] 基于细胞的免疫疗法是一种具有治愈潜力的癌症治疗方法。通过引入编码天然或修饰的T细胞受体(TCR)或对于所选抗原具有特异性的称为嵌合抗原受体(CAR)的抗原的合成受体的遗传物质,可以修饰T细胞和其它免疫细胞以靶向肿瘤抗原。患者工程化的CAR T细胞已显示出对一系列液体和固体恶性肿瘤疗效显著。

[0007] 正在临床上使用和临床前开发的CAR主要使用共刺激信号传导结构域,如CD28或4-1BB。CD28是一种跨膜蛋白,通过其作为共刺激分子的作用在T细胞活化中发挥关键作用,是基于CD28的CAR构建体的组成部分。持久性,特别是这些CAR的功能持久性已显示与更好的结果相关。存在对改进的CAR的未满足需求,该改进的CAR与现有CAR相比,具有增强的增殖和持久性和/或具有改进的效率和活动性。

### 发明内容

[0008] 本公开的主题提供包含突变的CD28细胞内基序,即突变的YMN基序的嵌合抗原受体(CAR)。

[0009] 本公开提供嵌合抗原受体(CAR),其包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,该细胞内信号传导结构域包含至少一个共刺激信号传导结构域,该共刺激信号传导结构域包含CD28多肽,该CD28多肽包含突变的YMN基序。

[0010] 在某些实施方式中,与包含天然YMN基序的CD28分子相比,该CD28多肽具有减少的磷酸肌醇3-激酶(PI3K)的p85亚基的募集。在某些实施方式中,PI3K的p85亚基不结合突变的YMN基序。在某些实施方式中,突变的YMN基序由Y<sub>x</sub>N<sub>x</sub>(SEQ ID NO:21)所示的氨基酸序列组成,其中x不是蛋氨酸(M)。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YENV(SEQ ID NO:22)、YSNV(SEQ ID NO:23)、YKNL(SEQ ID NO:24)、YENQ(SEQ ID NO:25)、YKNI(SEQ ID NO:

26)、YINQ (SEQ ID NO:27)、YHNK (SEQ ID NO:28)、YVNQ (SEQ ID NO:29)、YLNP (SEQ ID NO:30)、YLNT (SEQ ID NO:31)、YDND (SEQ ID NO:66)、YENI (SEQ ID NO:67)、YENL (SEQ ID NO:68)、YKNQ (SEQ ID NO:72)、YKNV (SEQ ID NO:73) 或 YANG (SEQ ID NO:87) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YSNV (SEQ ID NO:23)、YENV (SEQ ID NO:22) 或 YKNI (SEQ ID NO:26) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YSNV (SEQ ID NO:23) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,突变的YMN基序结合生长因子受体结合受体2 (Grb2) 和/或Shc下游的Grb2相关衔接体 (adaptor) (GADS)。

[0011] 在某些实施方式中,突变的YMN基序不结合Grb2和/或GADS。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMxM (SEQ ID NO:20) 所示的氨基酸序列组成,其中x不是天冬氨酸(N)。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMDM (SEQ ID NO:32)、YMPM (SEQ ID NO:79)、YMRM (SEQ ID NO:37) 或 YMSM (SEQ ID NO:80) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMDM (SEQ ID NO:32) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YbxM (SEQ ID NO:33) 所示的氨基酸序列组成,其中x不是天冬氨酸(N),并且b不是蛋氨酸(M)。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YTHM (SEQ ID NO:34)、YVLM (SEQ ID NO:35)、YIAM (SEQ ID NO:36)、YVEM (SEQ ID NO:83)、YVKM (SEQ ID NO:85) 或 YVPM (SEQ ID NO:86) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMxb (SEQ ID NO:65) 所示的氨基酸序列组成,其中x不是天冬氨酸(N),并且b不是蛋氨酸(M)。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMAP (SEQ ID NO:77) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,PI3K的p85亚基信号传导结合突变的YMN基序。

[0012] 在某些实施方式中,突变的YMN基序不结合Grb2和/或GADS或PI3K的p85亚基。在某些实施方式中,突变的YMN基序由Ybxb (SEQ ID NO:43) 所示的氨基酸序列组成,其中x不是天冬氨酸(N),并且b不是蛋氨酸(M)。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YGGG (SEQ ID NO:44)、YAAA (SEQ ID NO:45)、YFFF (SEQ ID NO:46)、YETV (SEQ ID NO:69)、YQQQ (SEQ ID NO:70)、YHAE (SEQ ID NO:71)、YLDL (SEQ ID NO:74)、YLIP (SEQ ID NO:75)、YLRV (SEQ ID NO:76)、YTAV (SEQ ID NO:82) 或 YVHV (SEQ ID NO:84) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YGGG (SEQ ID NO:44) 所示的氨基酸序列组成。

[0013] 在某些实施方式中,突变的YMN基序能够通过限制可结合PI3K的p85亚基的蛋氨酸残基的数量来调节PI3K信号传导。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMNx (SEQ ID NO:38) 或 YxNM (SEQ ID NO:39) 所示的氨基酸序列组成,其中x不是蛋氨酸(M)。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMNv (SEQ ID NO:40)、YENM (SEQ ID NO:41) 和 YMNQ (SEQ ID NO:42)、YMNl (SEQ ID NO:78) 或 YSNM (SEQ ID NO:81) 所示的氨基酸序列组成。

[0014] 在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域与抗原结合。在某些实施方式中,抗原是肿瘤抗原或病原体抗原。在某些实施方式中,抗原是肿瘤抗原。在某些实施方式中,肿瘤抗原选自CD19、间皮素、AXL、TIM3、HVEM、MUC16、MUC1、CAIX、CEA、CD8、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CLL1、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、EGP-2、EGP-40、EpCAM、Erb-B (例如,Eerb-B2、Erb-B3、Erb-B4)、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、叶酸受体- $\alpha$ 、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R- $\alpha$ 2、 $\kappa$ -轻链、KDR、LeY、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、ERBB2、MAGEA3、CT83 (也称为KK-LC-1)、p53、MART1、GP100、蛋白酶3 (PR1)、酪氨酸酶、生存素、hTERT、EphA2、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原 (h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-

72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD44V6、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME、HPV E6癌蛋白和HPV E7癌蛋白。在某些实施方式中，肿瘤抗原是CD19。

[0015] 在某些实施方式中，突变的YMN基序由YMDM (SEQ ID NO:32) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，细胞外抗原结合结构域与CD19结合。在某些实施方式中，CAR包含SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列。

[0016] 在某些实施方式中，突变的YMN基序由YKNI (SEQ ID NO:26) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，细胞外抗原结合结构域与CD19结合。在某些实施方式中，CAR包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列。

[0017] 在某些实施方式中，突变的YMN基序由YENV (SEQ ID NO:22) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，细胞外抗原结合结构域与CD19结合。在某些实施方式中，CAR包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列。

[0018] 在某些实施方式中，突变的YMN基序由YSNV (SEQ ID NO:64) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，细胞外抗原结合结构域与CD19结合。在某些实施方式中，CAR包含SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列。

[0019] 在某些实施方式中，突变的YMN基序由YGGG (SEQ ID NO:63) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，细胞外抗原结合结构域与CD19结合。在某些实施方式中，CAR包含SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列。

[0020] 本公开的主题还提供包含本文所述CAR的细胞。在某些实施方式中，该细胞是免疫应答细胞。在某些实施方式中，该细胞是淋巴谱系的细胞或骨髓谱系的细胞。在某些实施方式中，该细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞和可从中分化出淋巴样细胞的干细胞。在某些实施方式中，该细胞是T细胞。在某些实施方式中，T细胞选自细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、 $\gamma\delta$  T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、调节性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和肿瘤反应性淋巴细胞。

[0021] 此外，本公开的主题提供包含本文所述细胞的组合物。在某些实施方式中，该组合物是还包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在某些实施方式中，该组合物用于治疗/或预防赘生物和/或病原体感染。

[0022] 本公开的主题还提供减少受试者肿瘤负荷的方法。在某些实施方式中，该方法包括向受试者施用本文所述的细胞或本文所述的组合物。在某些实施方式中，该方法减少受试者中肿瘤细胞的数量、减小肿瘤大小和/或根除肿瘤。

[0023] 本公开的主题还提供治疗和/或预防赘生物的方法。在某些实施方式中，该方法包括向受试者施用本文所述的细胞或本文所述的组合物。

[0024] 本公开的主题还提供延长患有赘生物的受试者的生存期的方法。在某些实施方式中，该方法包括向受试者施用本文所述的细胞或本文所述的组合物。

[0025] 在某些实施方式中，赘生物和/或肿瘤选自B细胞白血病、B细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、非霍奇金氏淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、急性髓系白血病(AML)和混合表型急性白血病(MPAL)。

[0026] 本公开的主题还提供用于产生抗原特异性细胞的方法。在某些实施方式中，该方法包括将编码本文所述CAR的核酸序列引入细胞。在某些实施方式中，该核酸序列存在于载体上。在某些实施方式中，该载体是逆转录病毒载体。

[0027] 此外,本公开的主题提供编码本文所述CAR的核酸分子。在某些实施方式中,核酸分子包含SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:58所示的核苷酸序列。本公开的主题还提供包含本文所述核酸分子的载体。在某些实施方式中,该载体是 $\gamma$ -逆转录病毒载体。

[0028] 本公开的主题还提供表达本文所述核酸分子的宿主细胞。在某些实施方式中,宿主细胞是T细胞。

[0029] 此外,本公开的主题还提供包含本文所述CAR、本文所述细胞、本文所述组合物、本文所述核酸分子或本文所述载体的试剂盒。在某些实施方式中,试剂盒还包含用于治疗 and/或预防赘生物和/或病原体感染的书面说明书。

## 附图说明

[0030] 图1是生理性CD28信号传导的示意图。

[0031] 图2是调节PI3Kp85与CD28结合的CD28修饰的示意图。

[0032] 图3A-3D显示CD28-YKNI突变型CAR T细胞在体外具有强大的杀伤能力,这与某些CAR T细胞相当。将表达截短的EGFR结构域(Etah19)的人CD19-靶向CAR T细胞与表达GFP-萤火虫荧光素酶(ffLuciferase)的CD19+NALM6细胞(NALM6gL)以不同的效应物:肿瘤比共培养。24小时后通过生物发光测量肿瘤细胞裂解(相对于非信号传导的CAR T细胞)。h28Z:基于CD28的+CD3Z信号传导结构域;hBBZ:基于4-1BB的+CD3Z信号传导结构域;h28h1XX:基于CD28的+具有突变的ITAM 2和ITAM 3的CD3Z信号传导结构域;hYKNIZ:突变的基于CD28的(YNMN->YKNI)+CD3Z信号传导结构域。pStimx#指刺激后,其中数字表示先前刺激的数量。图3A显示制造后的肿瘤细胞裂解结果。图3B显示1次刺激后的肿瘤细胞裂解结果。图3C显示2次刺激后的肿瘤细胞裂解结果。图3D显示4次刺激后的肿瘤细胞裂解结果。

[0033] 图4A-4N显示突变型CD28 CAR T细胞表现出不同的促炎性细胞因子分泌谱。将人CD19-靶向CAR T细胞单独培养,与CD19+NALM6细胞以1:1的效应物:肿瘤比共培养。24小时后,收集上清液,并使用基于微珠的多重测定法测量细胞因子。图4A-4G显示来自供体V的细胞因子谱,图4H-4N显示来自供体IV的细胞因子谱。(图4A、4H) GM-CSF; (图4B、4I) IFN- $\gamma$ ; (图4C、4J) IL-13; (图4D-4K) IL-17; (图4E-4L) IL-9; (图4F-4M) IL-2; (图4G-4N) TNF- $\alpha$ 。

[0034] 图5显示CD28-YKNI突变型CAR T细胞对重复抗原暴露的应答在增殖方面没有定量差异。将人CD19-靶向CAR T细胞与NALM6以1:5的E:T比和50,000个CAR T细胞/mL的浓度共培养。大约每5天,对CAR T细胞进行计数并通过流式细胞术进行表征,并将起始数量的肿瘤细胞添加回培养物中(由箭头指示)。

[0035] 图6显示与CD28和CD28-1xx CAR T细胞相比,CD28-YKNI突变型CAR T细胞在重复抗原遭遇的情况下保持记忆表型。将人CD19-靶向CAR T细胞与NALM6以1:5的E:T比和50,000个CAR T细胞/mL的浓度共培养。大约每5天,对CAR T细胞进行计数,并通过流式细胞术对记忆表型(CD62L+)进行表征,并将起始数量的NALM6肿瘤细胞添加回培养物中(由箭头指示)。

[0036] 图7显示与CD28和CD28-1xx CAR T细胞相比,CD28-YKNI突变型CAR T细胞在重复抗原遭遇的情况下保持相对平衡的CD8:CD4比。将人CD19-靶向CAR T细胞与NALM6以1:5的E:T比和50,000个CAR T细胞/mL的浓度共培养。大约每5天,对CAR T细胞进行计数,并通过

流式细胞术对CD4/CD8分布进行表征,并将起始数量的NALM6肿瘤细胞添加回培养物中(由箭头指示)。

[0037] 图8显示CD28-YKNI突变型CAR T细胞在单次或多次激活后表现出较低的胚细胞样转变(blastogenesis)。CAR T细胞与NALM6gL以1:5的初始E:T(1次刺激,蓝色)共培养。同时,用相同量的肿瘤重复刺激CAR T细胞,共刺激5次(每12小时刺激1次;红色)。共培养开始后约10天,通过流式细胞术评估大小/胚细胞样转变(通过前向散射评估)。

[0038] 图9A-9B显示在供体A和B中单次或多次刺激9天后在CAR T细胞中测量的代谢谱。在所刺激的CAR T细胞中测量耗氧率(OCR)(图9A)和细胞外酸化率(ECAR)(图9B)。

[0039] 图10A-10B显示CD28-YKNI突变型CAR T细胞在单次或多次刺激的情况下表达较低水平的共抑制分子。在单次或多次刺激下,在CD28-YKNI突变型CAR T细胞(ah19hYKNIhZ)和野生型CAR T细胞(ah19h28hZ)中测量LAG3和PD1(图10A)以及TIM-3和PD1(图10B)的表达。

[0040] 图11显示CD28-YKNI突变型CD19-靶向CAR T细胞在体内优于标准的基于CD28的CAR T细胞。NCG小鼠接种 $10^6$ 个NALM6gfp<sup>+</sup>ffLUC<sup>+</sup>肿瘤细胞,4天后用CAR T细胞处理。绘制生存率图。CAR T细胞来自两个不同的健康供体。

[0041] 图12是具有修饰的PI3Kp85和Grb2/GADS与CD28结合能力的示例性CD28突变型的示意图。

[0042] 图13显示CD28-YKNI突变型CAR T细胞在24小时杀伤试验中表现出相当的杀伤能力。将表达截短的EGFR结构域(Etah19)的人CD19-靶向CAR T细胞与表达GFP-萤火虫荧光素酶的CD19+NALM6细胞(NALM6gL)以不同的效应物:肿瘤比共培养,24小时后通过生物发光测量肿瘤细胞裂解(相对于非信号传导的CAR T细胞)。

[0043] 图14显示CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞(YKNI、YENV和YMDM)在体外优于标准的基于CD28的CAR T细胞。将人CD19-靶向CAR T细胞与NALM6以1:5的E:T比以25,000个CAR T细胞/mL的初始浓度共培养。每天测量并绘制6天中CAR+和NALM6的浓度。

[0044] 图15显示CD28突变型表现出良好的衰竭(exhaustion)免疫表型。将CAR T细胞与NALM6gL以1:5的初始E:T(1次刺激)共培养。同时,用相同量的肿瘤重复刺激CAR T细胞共5次(每12小时1次刺激)。共培养开始后约10天,通过流式细胞术评估衰竭标志物(TIM3和PD1)。

[0045] 图16显示接种 $1 \times 10^6$ 个NALM6gfp<sup>+</sup>ffLUC<sup>+</sup>肿瘤细胞并用不同CAR T细胞处理的NCG小鼠的生存曲线。

[0046] 图17显示接种 $1 \times 10^6$ 个NALM6gfp<sup>+</sup>ffLUC<sup>+</sup>肿瘤细胞并用不同CAR T细胞处理的NCG小鼠的生存曲线。

[0047] 图18显示接种 $1 \times 10^6$ 个NALM6gfp<sup>+</sup>ffLUC<sup>+</sup>肿瘤细胞并用不同CAR T细胞处理的NCG小鼠的生物发光图像。每周测量生物发光。

[0048] 图19显示CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞在体外显示出有效的长期细胞毒性能力。将人CD19-靶向CAR T细胞(具有菱形标记的折线)与NALM6gL(具有圆形标记的折线)以1:15的E:T比共培养。每天测量并以细胞/mL绘制七天中CAR+T细胞和NALM6的浓度。

[0049] 图20显示CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞显示良好的衰竭免疫表型。将CAR T细胞与NALM6gL以1:15或1:30的E:T比共培养。五天后,通过流式细胞术评估包括LAG3、TIM3和PD1在内的衰竭标志物在CAR T细胞中的表达。

[0050] 图21显示接受CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞的NCG小鼠的生存曲线。NCG小鼠接种 $1 \times 10^6$ 个NALM6gfp<sup>+</sup>ffLUC<sup>+</sup>肿瘤细胞,4天后用500,000个CAR T细胞处理。CAR T细胞来自两个不同的健康供体。

[0051] 图22显示接受CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞的NCG小鼠的生存曲线。NCG小鼠接种 $1 \times 10^6$ 个NALM6gfp<sup>+</sup>ffLUC<sup>+</sup>肿瘤细胞,4天后用200,000个CAR T细胞处理。CAR T细胞来自单个健康供体。

[0052] 图23显示CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞在体外显示与抗原密度无关的增强的增殖。将人CD19-靶向CD28-Yxxx突变型CAR T细胞与具有高或低CD19抗原密度的NALM6gL以1:1的E:T比共培养。每6天,对CAR<sup>+</sup>T细胞进行计数并用NALM6gL重新刺激,共刺激三次。

[0053] 图24A-24C显示CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞在暴露于抗原时表现出独特的细胞因子分泌谱。将人CD19-靶向CD28-Yxxx突变型CAR T细胞与NALM6gL共培养。24小时后,收集上清液,并通过基于Luminex微珠的多重测定法测量细胞因子,包括白细胞介素-2(图24A)、TNF- $\alpha$ (图24A)、GM-CSF(图24B)、干扰素- $\gamma$ (图24B)、IL-9(图24C)和IL-17(图24C)。

## 具体实施方式

[0054] 本公开的主题提供包含至少一个共刺激信号传导结构域的嵌合抗原受体(CAR),该共刺激信号传导结构域包含CD28多肽,该CD28多肽包含突变的YMN基序。与包含天然YMN基序的CD28分子相比,该CD28多肽具有减少的磷酸肌醇3-激酶(PI3K)的p85亚基信号传导的募集。在某些实施方式中,PI3K的p85亚基信号传导不结合突变的YMN基序。在某些实施方式中,PI3K的p85亚基信号传导不结合突变的YMN基序,生长因子受体结合受体2(Grb2)和/或Shc下游的Grb2相关衔接体(GADS)结合突变的YMN基序。在某些实施方式中,Grb2和/或GADS不结合突变的YMN基序。在某些实施方式中,Grb2和/或GADS不结合突变的YMN基序,PI3K的p85亚基信号传导结合突变的YMN基序。

[0055] 本公开的主题还提供包含本公开的CAR的细胞(例如免疫应答细胞,例如T细胞或NK细胞)。本公开的主题还提供使用本公开的细胞用于诱导和/或增强对靶抗原的免疫应答,和/或用于治疗、和/或预防赘生物或肿瘤和/或病原体感染的方法。本公开的主题至少部分基于以下发现:与包含含有天然CD28细胞内基序(即天然YMN基序)的CAR的细胞相比,包含含有突变的CD28细胞内基序(即突变的YMN基序)的CAR的细胞表现出增强的抗肿瘤效果。

[0056] 本说明书和实施例描述了本公开的非限制性实施方式。

[0057] 为了明确披露而非限制,详细描述分为以下小节:

[0058] 5.1. 定义;

[0059] 5.2. 嵌合抗原受体(CAR);

[0060] 5.3. 细胞;

[0061] 5.4. 组合物和载体;

[0062] 5.5. 多肽;

[0063] 5.6. 制剂和给药;

[0064] 5.7. 治疗方法;和

[0065] 5.8. 试剂盒

[0066] 5.1. 定义

[0067] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有本领域技术人员通常理解的含义。以下参考文献为本领域技术人员提供本公开的主题中使用的许多术语的一般定义: Singleton等, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (第二版, 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker编, 1988); The Glossary of Genetics, 第五版, R. Rieger等(编), Springer Verlag (1991); 和 Hale&Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。

[0068] 本文使用的术语“约”或“大约”是指在由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,这将部分地取决于如何测量或确定该值,即测量系统的局限性。例如,根据本领域的惯例,“约”可以指在3个或多于3个标准偏差内。或者,“约”可以表示给定值的至多20%,例如至多10%、至多5%、或至多1%的范围。或者,特别是关于生物系统或过程,该术语可以表示在数值的一个数量级内,例如在5倍以内、或在2倍以内。

[0069] “免疫应答细胞”是指在免疫应答中起作用的细胞或其祖细胞或其后代。在某些实施方式中,免疫应答细胞是淋巴谱系的细胞。淋巴谱系的细胞的非限制性实例包括T细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞和从中可分化出淋巴样细胞的干细胞。在某些实施方式中,免疫应答细胞是骨髓谱系的细胞。

[0070] “激活免疫应答细胞”是指信号转导的诱导或细胞中蛋白质表达的变化,导致免疫应答的启动。例如,当CD3链响应于配体结合和基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITAM)聚集时,就会产生信号转导级联反应。在某些实施方式中,当内源性TCR或外源性CAR与抗原结合时,发生免疫突触的形成,其包括在结合受体(例如,CD4或CD8, CD3  $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ 等)附近的许多分子的聚集。膜结合信号传导分子的这种聚集使CD3链中包含的ITAM基序磷酸化。该磷酸化反过来启动了T细胞激活通路,最终激活转录因子,例如NF- $\kappa$ B和AP-1。这些转录因子诱导T细胞的整体基因表达,从而增加IL-2的产生,促进主调节T细胞蛋白的增殖和表达,进而启动T细胞介导的免疫应答。

[0071] “刺激免疫应答细胞”是指导致强烈和持续的免疫应答的信号。在各种实施方式中,这发生在免疫细胞(例如,T细胞)激活之后或通过包括但不限于CD28、CD137(4-1BB)、OX40、CD40和ICOS的受体同时介导。接收多种刺激信号对于建立强烈且长期的T细胞介导的免疫应答可能很重要。T细胞可以迅速被抑制并且对抗原无应答。尽管这些共刺激信号的作用可能有所不同,但它们通常会导致基因表达增加,从而产生长寿、增殖性和抗凋亡性T细胞,其对抗原应答强烈,可彻底和持续根除。

[0072] 本文使用的术语“抗原识别受体”是指能够响应于其与抗原的结合而激活免疫应答细胞(例如T细胞)的受体。

[0073] 如本文所用,“CDR”定义为抗体的互补决定区氨基酸序列,其是免疫球蛋白重链和轻链的高变区。参见,例如, Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)。通常,抗体在可变区中包含三个重链和三个轻链CDR或CDR区。CDR提供大多数接触残基,以使抗体与抗原或表位结合。在某些实施方式中,使用Kabat系统(Kabat等,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services (1991); NIH 公开第 91-3242 号) 标注 CDR 区域。在某些实施方式中, 根据 IMGT 编号系统标识 CDR。如本文所用, 术语“单链可变片段”或“scFv”是免疫球蛋白的重链 ( $V_H$ ) 和轻链 ( $V_L$ ) 的可变区的融合蛋白, 其共价连接形成  $V_H::V_L$  异源二聚体。 $V_H$  和  $V_L$  直接连接或通过肽编码接头 (例如, 10、15、20、25 个氨基酸) 连接, 其将  $V_H$  的 N 端与  $V_L$  的 C-端连接或将  $V_H$  的 C 端与  $V_L$  的 N 端连接。接头通常富含甘氨酸以提高灵活性, 以及丝氨酸或苏氨酸以提高溶解度。

[0074] 本文使用的“接头”应指共价连接两个或多个多肽或核酸以使它们彼此连接的官能团 (例如, 化学物质或多肽)。本文使用的“肽接头”是指用于将两种蛋白质偶联在一起 (例如, 偶联  $V_H$  和  $V_L$  结构域) 的一个或多个氨基酸。

[0075] 尽管去除了恒定区并引入了接头, scFv 蛋白仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。单链 Fv 多肽抗体可以由如 Huston 等, Proc Nat Acad Sci USA, (1988); 85:5879-5883; 美国专利第 5,091,513 号、第 5,132,405 号和第 4,956,778 号以及美国专利公开号 20050196754 和 20050196754 所述的包含  $V_H$  和  $V_L$  编码序列的核酸表达。已经描述具有抑制活性的拮抗性 scFv (Zhao 等, Hyrbidoma (Larchmt) 2008; 27 (6): 455-51; Peter 等, J Cachexia Sarcopenia Muscle (2013); 4 (1): 79-86; Shieh 等, J Immunol (2009); 183 (4): 2277-85; Giomarelli 等, Thromb Haemost (2007); 97 (6): 955-63; Fife 等, J C I (2006); 116 (8): 2252-61; Brocks 等, Immunotechnology (1997); 3 (3): 173-84; Moosmayer 等, Ther Immunol (1995); 2 (10): 31-40)。已经描述具有刺激活性的激动性 scFv (Peter 等, J Biol Chem (2003); 25278 (38): 36740-7; Xie 等, Nat Biotech (1997); 15 (8): 768-71; Ledbetter 等, Crit Rev Immunol (1997); 17 (5-6): 427-55; Ho 等, BioChem Biophys Acta (2003); 1638 (3): 257-66)。

[0076] 如本文所用, 术语“亲和力”是指结合强度的量度。亲和力可以取决于抗体结合位点和抗原决定簇之间立体化学拟合的紧密程度、它们之间的接触面积的大小和/或带电基团和疏水基团的分布。用于计算抗体对抗原的亲和力的方法是本领域已知的, 包括但不限于各种抗原结合实验, 例如功能性测定 (例如流式细胞术测定)。

[0077] 如本文所用, 术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指包含与能够激活免疫应答细胞的细胞内信号传导结构域融合的细胞外抗原结合结构域和跨膜结构域的分子。在某些实施方式中, CAR 的细胞外抗原结合结构域包含 scFv。scFv 可以源自融合抗体的可变重和轻区。替代地或另外, scFv 可以衍生自 Fab' s (而不是抗体, 例如获自 Fab 文库)。在某些实施方式中, 将 scFv 融合至跨膜结构域, 然后融合至细胞内信号传导结构域。

[0078] 如本文所用, 术语“核酸分子”包括编码目的多肽的任何核酸分子。这种核酸分子不需要与内源性核酸序列具有 100% 同源性或同一性, 但可以表现出基本同一性。

[0079] “基本同一性”或“基本同源性”是指与参考氨基酸序列 (例如, 本文描述的任何氨基酸序列) 或参考核酸序列 (例如本文描述的任意一个核酸序列) 具有至少约 50% 同一性或同源性的多肽或核酸分子。在某些实施方式中, 这样的序列与用于比较的氨基酸或核酸序列具有至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 81%、至少约 82%、至少约 83%、至少约 84%、至少约 85%、至少约 86%、至少约 87%、至少约 88%、至少约 89%、至少约 90%、至少约 91%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或至少约 100% 同源性或同一性。

[0080] 两个序列之间的同一性百分比是该序列共享的相同位置数的函数(即, %同源性 = 相同位置数#/位置总数# × 100), 其中考虑了空位数和每个空位的长度, 需要引入这些空位以实现两个序列的最佳比对。序列的比较和两个序列之间同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。

[0081] 序列同一性可以通过使用序列分析软件(例如, 威斯康星大学生物技术中心遗传学计算机组的序列分析软件包, 威斯康星州麦迪逊市53705大学大道1710号, BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)进行测量。这样的软件通过将同源性程度赋予各种取代、缺失和/或其它修饰来匹配相同或相似的序列。保守取代通常包括以下组内的取代: 甘氨酸、丙氨酸; 缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸; 天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺; 丝氨酸、苏氨酸; 赖氨酸、精氨酸; 和苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中, 可以使用BLAST程序, 其中e-3和e-100之间的概率得分指示密切相关的序列。

[0082] 可以使用E. Meyers和W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))的算法确定两个氨基酸序列之间的同源性百分比, 该算法已合并到ALIGN程序(2.0版)中), 使用PAM120重量残基表, 空位长度罚分为12, 空位罚分为4。此外, 两个氨基酸序列之间的同源性百分比可以使用Needleman和Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970))算法来确定, 该算法已被整合到GCG软件包(可从www.gcg.com获得)中的GAP程序中, 使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵, 并且空位权重为16、14、12、10、8、6或4, 长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0083] 另外或可替代地, 本公开的主题的氨基酸序列可以进一步用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索以例如识别相关序列。可以使用Altschul等(1990) J. Mol. Biol. 215:403-10的XBLAST程序(2.0版)执行此类搜索。可以使用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索, 得分=50, 字长=3, 以获得与本文公开的指定序列(例如, scFv m903, m904, m905, m906和m900的重链和轻链可变区序列)同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对, 可以如Altschul等, (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17):3389-3402中所述使用Gapped BLAST。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时, 可以使用各个程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0084] “有效量”是足以在治疗后产生有益或期望的临床结果的量。可以以一剂或多剂剂量将有效量施用于受试者。在某些实施方式中, 有效量是足以缓解、改善、稳定、逆转或减慢疾病进展或以其它方式减少疾病病理后果的量。有效量可由医师根据具体情况确定, 并且在本领域技术人员的能力范围内。当确定合适的剂量以达到有效量时, 通常要考虑几个因素。这些因素包括受试者的年龄、性别和体重、所治疗的疾病、疾病的严重程度以及所施用的细胞的形式和有效浓度。

[0085] “调节”是指正或负改变。示例性调节包括约1%、约2%、约5%、约10%、约25%、约50%、约75%或约100%的变化。

[0086] “增加”是指正改变至少约5%。改变可以为约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%、约100%或更多。

[0087] “减少”是指负改变至少约5%。改变可以为约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%或甚至约100%。

[0088] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物纯的”是指物质在不同程度上不含在其原始状态下通常与其伴随的组分。“分离”表示与原始来源或环境的分离度。“纯化”表示高于分离的

分离度。“纯化的”或“生物纯的”蛋白质基本不含其它物质,以使任何杂质均不会实质性地影响蛋白质的生物学特性或引起其它不利后果。也就是说,如果核酸或肽通过重组DNA技术产生而基本不含细胞材料、病毒材料或培养基,或者通过化学合成而基本不含化学前体或其它化学品,则其是纯化的。纯度和均质性通常使用分析化学技术确定,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法。术语“纯化的”可以表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中产生基本上一个条带。对于可以进行修饰(例如磷酸化或糖基化)的蛋白质,不同的修饰可以产生不同的分离的蛋白质,可以将其分别纯化。

[0089] “分离的细胞”是指与天然伴随细胞的分子和/或细胞组分分离的细胞。

[0090] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”是指能够特异性结合细胞上存在的特定抗原决定簇或抗原决定簇组的结构域。

[0091] “赘生物”是指以细胞或组织的病理性增生及其随后向其它组织或器官的迁移或侵袭为特征的疾病。赘生物的生长通常是不受控制的和进行性的,并且在不引起正常细胞增殖或者导致正常细胞增殖停止的条件下发生。赘生物可影响多种细胞类型、组织或器官,包括但不限于选自以下的器官:膀胱、骨骼、大脑、乳房、软骨、神经胶质、食道、输卵管、胆囊、心脏、肠、肾脏、肝脏、肺、淋巴结、神经组织、卵巢、胰腺、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾脏、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、泌尿生殖道、输尿管、尿道,子宫和阴道、或其组织或细胞类型。赘生物包括癌症,例如肉瘤、肿瘤或浆细胞瘤(浆细胞的恶性肿瘤)。

[0092] “信号序列”或“前导序列”是指存在于新合成的蛋白质的N-端,指导它们进入分泌通路的肽序列(例如5、10、15、20、25或30个氨基酸)。

[0093] 术语“包含”,“包括”旨在具有美国专利法中赋予它们的广义含义,并且可以表示“含有”,“包含”等。

[0094] 如本文所用,“治疗”是指试图改变所治疗的个体或细胞的疾病进程的临床干预,并且可以用于预防或在临床病理过程中进行。治疗的治疗作用包括但不限于预防疾病的发生或复发、缓解症状、减轻疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展的速度、改善或减轻疾病状态、和缓解或改善预后。通过预防疾病或病症的进展,治疗不仅可以预防在受影响或诊断的受试者或怀疑患有该病症的受试者中由于病症引起的恶化,而且治疗可以在有患病症或怀疑患有该病症风险的受试者中预防该病症的发作或该病症的症状。

[0095] 本文中的“个体”或“受试者”是脊椎动物,例如人或非人动物,例如哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人、灵长类动物、农场动物、运动动物、啮齿动物和宠物。非人动物受试者的非限制性实例包括啮齿动物,如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠;兔子;狗;猫;绵羊;猪;山羊;牛;马;和非人灵长类动物,例如猿和猴子。如本文所用,术语“免疫受损的”是指具有免疫缺陷的受试者。该受试者非常容易遭受机会性感染,这种感染是由通常不会在免疫系统健康的人中引起疾病的生物体引起的,但是会影响免疫系统功能差或免疫系统受抑制的人。

[0096] 本公开主题的其它方面在以下公开中描述,并且在本公开主题范围内。

[0097] 5.2. 嵌合抗原受体(CAR)

[0098] 在某些实施方式中,本公开提供一种嵌合抗原受体(CAR),其包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,该细胞内信号传导结构域包含至少一个共刺激信号传导结构域,该共刺激信号传导结构域包含CD28多肽,该CD28多肽包含突变的CD28细胞内基序,即突变的YMN基序。

[0099] CAR是工程受体,它将目的特异性移植或赋予免疫效应细胞。CAR可用于将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上;其编码序列的转移由逆转录病毒载体促进。

[0100] 共有三代CAR。“第一代”CAR通常由细胞外抗原结合结构域(例如scFv)组成,该结构域与跨膜结构域融合,而跨膜结构域与细胞质/细胞内信号传导结构域融合。“第一代”CAR可以提供从头抗原识别,并通过单个融合分子中的CD3 $\zeta$ 链信号传导结构域激活CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞,而不依赖HLA介导的抗原递呈。“第二代”CAR将来自各种共刺激分子(例如CD28、4-1BB、ICOS、OX40)的细胞内信号传导结构域添加到CAR的细胞质尾区,以向T细胞提供额外的信号。“第二代”CAR包括提供共刺激(例如CD28或4-1BB)和激活(CD3 $\zeta$ )的那些。“第三代”CAR包括提供多重共刺激(例如,CD28和4-1BB)和激活(CD3 $\zeta$ )的那些。在某些实施方式中,抗原识别受体是第二代CAR。在某些实施方式中,CAR包含结合抗原的细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在某些实施方式中,CAR还包含铰链/间隔区。在某些实施方式中,抗原识别受体是第三代CAR,其包含多个共刺激信号传导结构域。

[0101] 在某些实施方式中,CAR可包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中细胞外抗原结合结构域特异性结合抗原,该抗原可以是肿瘤抗原或病原体抗原。

#### [0102] 5.2.1. 抗原

[0103] 在某些实施方式中,CAR结合肿瘤抗原或病原体抗原。

[0104] 在某些实施方式中,CAR结合肿瘤抗原。任何肿瘤抗原(例如抗原肽)可用于本文所述的肿瘤相关实施方式。抗原来源包括但不限于癌蛋白。抗原可以表达为肽或完整蛋白或其部分。完整的蛋白质或其部分可以是天然的或诱变后的。在某些实施方式中,抗原在肿瘤组织中表达。肿瘤抗原的非限制性实例包括间皮素、AXL、TIM3、HVEM、CD19、MUC16、MUC1、CAIX、CEA、CD8、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CLL1、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、EGP-2、EGP-40、EpCAM、Erb-B(例如,Erb-B2、Erb-B3、Erb-B4)、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、叶酸受体- $\alpha$ 、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R- $\alpha$ 2、 $\kappa$ -轻链、KDR、LeY、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、MAGEA3、CT83(也称为KK-LC-1)、p53、MART1、GP100、蛋白酶3(PR1)、酪氨酸酶、生存素、hTERT、EphA2、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD44V6、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME、HPV E6癌蛋白和HPV E7癌蛋白。在某些实施方式中,肿瘤抗原

是CD19。

[0105] 在某些实施方式中,CAR与CD19多肽结合。在某些实施方式中,CAR结合人CD19多肽。在某些实施方式中,人CD19多肽包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或其部分。SEQ ID NO:1在下文提供。

```
PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQ  
MGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAK  
[0106] DRPEIWEGEPPCLPPRDSLNSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKD  
DRPARDMWVMTGLLLPRATAQDAGKYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWK [SEQ ID  
NO:1]
```

[0107] 在某些实施方式中,CAR与CD19(例如,人CD19)的细胞外结构域结合。

[0108] 在某些实施方式中, CAR结合病原体抗原, 例如用于治疗 and/或预防病原体感染或其它传染病。病原体的非限制性实例包括能够引起疾病的病毒、细菌、真菌、寄生虫和原生动物。

[0109] 病毒的非限制性实例包括逆转录病毒科 (Retroviridae) (例如人免疫缺陷病毒, 例如HIV-1 (也称为HDTV-III、LAVE或HTLV-III/LAV或HIV-III; 以及其他分离株, 例如HIV-LP); 小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae) (例如脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒; 肠道病毒、人类柯萨奇病毒、鼻病毒、埃可病毒); 杯状病毒科 (Caliciviridae) (例如引起胃肠炎的菌株); 披膜病毒科 (Togaviridae) (例如马脑炎病毒、风疹病毒); 黄病毒科 (Flaviridae) (例如登革热病毒、脑炎病毒、黄热病毒); 冠状病毒科 (Coronaviridae) (例如冠状病毒); 弹状病毒科 (Rhabdoviridae) (例如水疱性口炎病毒、狂犬病病毒); 丝状病毒科 (Filoviridae) (例如埃博拉病毒); 副粘病毒科 (Paramyxoviridae) (例如副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒); 正粘病毒科 (Orthomyxoviridae) (例如流感病毒); 布尼亚病毒科 (Bunyaviridae) (例如汉坦病毒、布尼亚病毒、白蛉病毒和Nairovirus); 沙粒病毒科 (Arenaviridae) (出血热病毒); 呼肠孤病毒科 (Reoviridae) (例如呼肠孤病毒、环状病毒和轮状病毒); 双核糖核酸病毒科 (Birnaviridae); 嗜肝DNA病毒科 (Hepadnaviridae) (乙型肝炎病毒); 细小病毒科 (Parvoviridae) (细小病毒); 乳多空病毒科 (Papovaviridae) (乳头状瘤病毒、多瘤病毒); 腺病毒科 (Adenoviridae) (大多数腺病毒); 疱疹病毒科 (Herpesviridae) (单纯疱疹病毒 (HSV) 1和2、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒 (CMV)、疱疹病毒); 痘病毒科 (Poxviridae) (天花病毒、痘苗病毒、痘病毒); 和虹彩病毒科 (Iridoviridae) (例如非洲猪瘟病毒); 和未分类病毒 (例如丁型肝炎的病原体 (被认为是乙型肝炎病毒的缺陷卫星)、非甲、非乙型肝炎的病原体 (第1类=肠道传播; 第2类=肠外传播 (即丙型肝炎); 诺沃克及相关病毒和星形病毒)、人乳头瘤病毒 (即HPV)、JC病毒、Epstein-Barr病毒、默克尔细胞多瘤病毒)。

[0110] 细菌的非限制性实例包括巴氏杆菌 (*Pasteurella*)、葡萄球菌 (*Staphylococci*)、链球菌 (*Streptococcus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*) 种和沙门氏菌 (*Salmonella*) 种。感染性细菌的具体实例包括但不限于幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、分枝杆菌 (*Mycobacteria* spp) (例如结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、鸟分枝杆菌 (*M. avium*)、胞内分枝杆菌 (*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansasii*)、戈登氏分枝杆菌 (*M. goodii*))、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A组链球菌)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B组链球菌)、链球菌 (草绿色组)、粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌 (*Streptococcus bovis*)、链球菌 (厌氧sps.)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、致病性弯曲杆菌 (pathogenic *Campylobacter* sp.)、肠球菌 (*Enterococcus* sp.)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、*Bacillus anthracis*、白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.)、红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter*

aerogenes)、肺炎克雷伯杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、多杀性巴氏杆菌 (*Pasturella multocida*)、类杆菌 (*Bacteroides* sp.)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*)、细弱密螺旋体 (*Treponema pertenuis*)、钩端螺旋体 (*Leptospira*)、立克次体 (*Rickettsia*)、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 和衣氏放线菌 (*Actinomyces israeli*)。

[0111] 在某些实施方式中,病原体抗原是存在于巨细胞病毒 (CMV) 中的病毒抗原、存在于 Epstein-Barr 病毒 (EBV) 中的病毒抗原、存在于人免疫缺陷病毒 (HIV) 中的病毒抗原或存在于流感病毒中的病毒抗原。

[0112] 5.2.2. CAR 的细胞外抗原结合结构域

[0113] 在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包含 scFv。在某些实施方式中,scFv 是人 scFv。在某些实施方式中,scFv 是人源化 scFv。在某些实施方式中,scFv 是鼠 scFv。在某些实施方式中,通过用抗原 Fc 融合蛋白筛选 scFv 噬菌体文库来鉴定 scFv。

[0114] 在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包含 Fab。在某些实施方式中,Fab 是交联的。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包含  $F(ab)_2$ 。任何前述分子可包含在具有异源序列的融合蛋白中以形成细胞外抗原结合结构域。

[0115] 在某些实施方式中,CAR 的细胞外抗原结合结构域 (例如,scFv) 以约  $1 \times 10^{-6} M$  或更小的解离常数 ( $K_d$ ) 结合抗原。在某些实施方式中, $K_d$  为约  $1 \times 10^{-6} M$  或更小,约  $1 \times 10^{-7} M$  或更小,大约  $1 \times 10^{-8} M$  或更小,或约  $1 \times 10^{-9} M$  或更小。在某些非限制性实施方式中, $K_d$  为约  $1 \times 10^{-8} M$  或更小。在某些非限制性实施方式中, $K_d$  为约  $1 \times 10^{-9} M$  或更小。

[0116] CAR 的细胞外抗原结合结构域的结合可以通过例如酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、放射免疫测定法 (RIA)、FACS 分析、生物测定法 (例如生长抑制) 或 Western 印迹测定法来确认。这些测定法中的每一种通常通过使用对目的复合物特异的标记试剂 (例如,抗体或 scFv) 来检测特定目的蛋白质-抗体复合物的存在。例如,scFv 可以被放射性标记并用于放射免疫测定法 (RIA) (例如,参见 Weintraub, B., 放射免疫测定的原理,放射配体测定技术的第七培训课程,内分泌学会,1986 年 3 月,并入本文以供参考以供参考)。放射性同位素可通过使用  $\gamma$  计数器或闪烁计数器或放射自显影等方法进行检测。在某些实施方式中,用荧光标记物标记细胞外抗原结合结构域。荧光标记物的非限制性实例包括绿色荧光蛋白 (GFP)、蓝色荧光蛋白 (例如,EBFP、EBFP2、Azurite 和 ImKalamal)、青色荧光蛋白 (如,ECFP、Cerulean 和 CyPet) 和黄色荧光蛋白 (比如,YFP、Citrine、Venus 和 YPet)。在一个实施方式中,人 scFv 用 GFP 标记。

[0117] 在某些实施方式中,根据 IMGT 编号系统标识 CDR。

[0118] 在某些实施方式中,CAR 的细胞外抗原结合结构域 (例如,scFv) 包含或由 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成,并特异性结合 CD19 多肽 (例如,人 CD19 多肽,例如,具有 SEQ ID NO:1 或其部分的人 CD19 肽)。

[0119] 在某些实施方式中,CAR 的细胞外抗原结合结构域 (例如 scFv) 包含  $V_H$ ,  $V_H$  包含与 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列具有至少约 80% (例如,至少约 81%、至少约 82%、至少约 83%、至少约 84%、至少约 85%、至少约 86%、至少约 87%、至少约 88%、至少约 89%、至少约 90%、至少约 91%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、或至少约 99%) 同源性或同一性的氨基酸序列。例如,CAR 的细胞外抗原结合结

构域(例如,scFv)包含 $V_H$ , $V_H$ 包含与SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列具有约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的 $V_H$ 。SEQ ID NO:3在下表1中提供。

[0120] 在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv)包含 $V_L$ ,其包含与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列具有至少约80%(例如,至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%)同源性或同一性的氨基酸序列。例如,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包含 $V_L$ , $V_L$ 包含与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列具有约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的 $V_H$ 。SEQ ID NO:4在下表1中提供。

[0121] 在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括:包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的 $V_H$ 和包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的 $V_L$ 。在某些实施方式中, $V_H$ 和 $V_L$ 通过接头连接。在某些实施方式中,接头包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。SEQ ID NO:5在下文提供。

[0122] GGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 5]

[0123] 在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括:包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列或其保守修饰的 $V_H$  CDR1、包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列或其保守修饰的 $V_H$  CDR2,和包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列或其保守修饰的 $V_H$  CDR3。表1中提供SEQ ID NO:6-8。

[0124] 在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括:包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列或其保守修饰的 $V_L$  CDR1、包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列或其保守修饰的 $V_L$  CDR2,和包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列或其保守修饰的 $V_L$  CDR3。表1中提供SEQ ID NO:9-11。

[0125] 在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括:包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列或其保守修饰的 $V_H$  CDR1、包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列或其保守修饰的 $V_H$  CDR2、包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列或其保守修饰的 $V_H$  CDR3、包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列或其保守修饰的 $V_L$  CDR1、包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列或其保守修饰的 $V_L$  CDR2,和包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列或其保守修饰的 $V_L$  CDR3。

[0126] 在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括:包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的 $V_H$  CDR1、包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的 $V_H$  CDR2、包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的 $V_H$  CDR3、包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的 $V_L$  CDR1、包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的 $V_L$  CDR2和包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的 $V_L$  CDR3。

[0127] 表1

|        |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                        |                         |
|--------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| [0128] | 抗原                | CD19                                                                                                                                                                                                                                                                               |                        |                         |
|        | CDR               | 1                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 2                      | 3                       |
|        | V <sub>H</sub>    | GYAFSS [SEQ ID NO: 6]                                                                                                                                                                                                                                                              | YPGDGD [SEQ ID NO: 7]  | KTISSVDF [SEQ ID NO: 8] |
|        | V <sub>L</sub>    | NVGTNVA [SEQ ID NO: 9]                                                                                                                                                                                                                                                             | SATYRN [SEQ ID NO: 10] | FCQQYNY [SEQ ID NO: 11] |
|        | 全长 V <sub>H</sub> | EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNY<br>NGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTDTV<br>SS [SEQ ID NO: 3]                                                                                                                                    |                        |                         |
|        | 全长 V <sub>L</sub> | DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPD<br>RFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNYRYPYTSGGGTKLEIKR [SEQ ID NO: 4]                                                                                                                                                   |                        |                         |
| [0129] | scFv              | EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNY<br>NGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTDTV<br>SSGGGGSGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQS<br>PKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNYRYPYTSGGGTK<br>LEIKR [SEQ ID NO: 2] |                        |                         |
|        |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                        |                         |

[0130] 如本文所用,术语“保守序列修饰”是指不显著影响或改变包含氨基酸序列的本公开的CAR(例如,CAR的细胞外抗原结合结构域)的结合特性的氨基酸修饰。保守修饰可以包括氨基酸取代、添加和删除。可以通过本领域已知的标准技术,如定点突变和PCR介导的突变,将修饰引入本公开的CAR的人scFv中。氨基酸可以根据其物理化学性质(如电荷和极性)分类。保守氨基酸取代是指氨基酸残基被同一基团内的氨基酸取代。例如,氨基酸可以按电荷分类:带正电的氨基酸包括赖氨酸、精氨酸、组氨酸,带负电的氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸,带中性电荷的氨基酸包括丙氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。此外,氨基酸可以按极性分类:极性氨基酸包括精氨酸(碱性极性)、天冬酰胺、天冬氨酸(酸性极性)、谷氨酸(酸性极性)、谷氨酰胺、组氨酸(碱性极性)、赖氨酸(碱性极性)、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸;非极性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸。因此,CDR区内的一个或多个氨基酸残基可以用来自同一组的其它氨基酸残基替换,并且可以使用本文所述的功能测定法来测试改变的抗体的保留功能(即,上文(c)至(1)中所示的功能)。在某些实施方式中,特定序列或CDR区内不多于一个、不多于两个、不多于三个、不多于四个、不多于五个残基被改变。

[0131] 与特定序列(例如,SEQ ID NO:3和4)具有至少约80%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%(例如,约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)同源性或同一性的V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>氨基酸序列可包含相对于特定序列的取代(例如,保守取代)、插入或删除,但保留结合靶抗原(例如CD19)的能力。在某些实施方式中,在特定序列(例如,SEQ ID NO:3和4)中取代、插入和/或删除总共1至10个氨基酸。在某些实施

方式中,取代、插入或删除发生在细胞外抗原结合结构域的CDR之外的区域(例如,在FR中)。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包含选自SEQ ID NO:3和4的V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>序列,包含该序列(SEQ ID NO:3和4)的翻译后修饰。

#### [0132] 5.2.3.CAR的跨膜结构域

[0133] 在某些非限制性实施方式中,CAR的跨膜结构域包含跨越膜的至少一部分的疏水性 $\alpha$ 螺旋。不同的跨膜结构域导致不同的受体稳定性。抗原识别后,受体聚集并且信号被传递给细胞。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包括CD8、CD28、CD3 $\zeta$ 、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、CD84、CD166、CD8a、CD8b、ICAM-1、CTLA-4、CD27、CD40、NKGD2、或其组合的天然或修饰的跨膜结构域。

[0134] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD28多肽(例如,CD28的跨膜域或其一部分)。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含人CD28的跨膜结构域或其一部分。在某些实施方式中,CD28多肽包含与具有NCBI参考号NP\_006130(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列或其片段具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%同源性或同一性的氨基酸序列或由其组成,和/或可任选包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些实施方式中,CD28多肽包含是SEQ ID NO:12的连续部分的氨基酸序列或由其组成,氨基酸序列长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多220个氨基酸。在某些实施方式中,CD28多肽包含SEQ ID NO:12的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、150至200、153至179或200至220的氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD28多肽,该CD28多肽包含SEQ ID NO:12的氨基酸153至179或由其组成。SEQ ID NO:12在下文提供。

[0135] 

```
1   MLRLLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD
61  SAVEVCVVYGY NYSQQLQVYS KTGFCNDGKL GNEVTFYLYQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP
121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR
181 SKRSRLLLHSD YNMNTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS [SEQ ID NO: 12]
```

[0136] 编码SEQ ID NO:12的氨基酸153至179的示例性核苷酸序列在下文提供的SEQ ID NO:13中示出。

[0137] 

```
TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT
TTTCTGGGTG[SEQ ID NO: 13]
```

[0138] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含小鼠CD28的跨膜结构域或其一部分。在某些实施方式中,CD28多肽包含与具有NCBI参考号NP\_031668.3(SEQ ID NO:14)的序列或其片段具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%同源性或同一性的氨基酸序列或由其组成,和/或可任选包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在非限制性的某些实施方式中,CD28多肽包含是SEQ ID NO:14的连续部分的氨基酸序列或由其组成,氨基酸序列长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多218个氨基酸。在某些实施方式中,CD28多肽包含SEQ ID NO:14的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、150至200、151至177或200至218的氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD28多肽,该CD28多肽包含SEQ ID NO:14的氨基酸151至177或由其组成。SEQ ID NO:14在下文提供:

1 MTLRLFLAL NFFSVQVTEN KILVKQSPLL VVDSNEVSLS CRYSYNLLAK EFRASLYKGV  
61 NSDVEVCVGN GNFTYQPQFR SNAEFNCDGD FDNETVTFRL WNLHVNHTDI YFCKIEFMYP  
[0139] 121 PPYLDNERSN GTIIHIKEKH LCHTQSSPKL FWALVVVAGV LFCYGLLVTV ALCVIWTSNR  
181 RNRLQLSDYM NMTPRRPGLT RKPYPYAPA RDEFAAYRP [SEQ ID NO: 14]

[0140] 在某些实施方式中, CAR的跨膜结构域包含CD8多肽(例如, CD8的跨膜结构域或其一部分)。在某些实施方式中, CAR的跨膜结构域包含人CD8的跨膜结构域或其一部分。在某些实施方式中, CD8多肽包含与具有NCBI参考号NP\_001139345.1 (SEQ ID NO:15)的序列或其片段具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列或由其组成, 和/或可任选包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些实施方式中, CD8多肽包含是SEQ ID NO:15的连续部分的氨基酸序列或由其组成, 氨基酸序列长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多235个氨基酸。在某些实施方式中, CD8多肽包含或具有SEQ ID NO:15的氨基酸1至235、1至50、50至100、100至150、150至200、137至209或200至235的氨基酸序列。在某些实施方式中, CAR的跨膜结构域包含CD8多肽, 其包含SEQ ID NO:15的氨基酸137至209或由其组成。SEQ ID NO:15在下文提供。

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLL  
YLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPA  
[0141] PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRR  
VCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV [SEQ ID NO: 15]

[0142] 在某些实施方式中, CAR的跨膜结构域包含小鼠CD8的跨膜结构域或其一部分。在某些实施方式中, CD8多肽包含与具有NCBI参考号AAA92533.1 (SEQ ID NO:16)的序列或其片段具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列或由其组成, 和/或可任选包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些实施方式中, CD8多肽包含是SEQ ID NO:16的连续部分的氨基酸序列或由其组成, 氨基酸序列长度为至少约20、至少约30、至少约40、至少约50、至少约60、至少约70、至少约100、至少约200且至多247个氨基酸。在某些实施方式中, CD8多肽包含或具有SEQ ID NO:16的氨基酸1至247、1至50、50至100、100至150、150至200、151至219或200至247的氨基酸序列。在某些实施方式中, CAR的跨膜结构域包含CD8多肽, 该CD8多肽包含SEQ ID NO:16的氨基酸151-219或由其组成。SEQ ID NO:16在下文提供。

1 MASPLTRFLS LNLILLMGESI ILGSGEAKPQ APELRIFPKK MDAELGQKVD LVCEVLGSVS  
61 QGCSWLFQNS SSKLPQPTFV VYMASSHNI TWDEKLNSSK LFSAVRDTNN KYVLTNLKFS  
[0143] 121 KENEGYYFCS VISNSVMYFS SVVPVLQKVN STTTKPVLR T PPSVHPTGTS QPQRPEDCRP  
181 RGSVKGTGLD FACDIYIWAP LAGICVAPLL SLIITLICYH RSRKRVCCKP RPLVRQEGKP  
241 RPSEKIV [SEQ ID NO: 16]

[0144] 在某些实施方式中, CAR进一步包括将细胞外抗原结合结构域连接到跨膜结构域的间隔区。间隔区可以足够灵活, 以允许抗原结合结构域在不同方向上定向, 从而促进抗原识别, 同时保持CAR的激活活性。

[0145] 在某些实施方式中, CAR的铰链/间隔区包括CD8、CD28、CD3 $\zeta$ 、CD40、4-1BB、OX40、CD84、CD166、CD8a、CD8b、ICOS、ICAM-1、CTLA-4、CD27、CD40和NKGD2、合成多肽(不基于与免疫应答相关的蛋白质)、或其组合的天然或修饰的铰链区。铰链/间隔区可以是来自IgG1的

铰链区,或者是免疫球蛋白的CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>区和CD3的部分、CD28多肽的一部分(例如,SEQ ID NO:12或14的一部分)、CD8多肽的一部分(例如SEQ ID NO:15或16的一部分)、前述任一项的变体,该变体与其具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约100%的同源性或同一性、或合成的间隔序列。

#### [0146] 5.2.4.CAR的细胞内信号传导结构域

[0147] 在某些实施方式中,CAR包含细胞内信号传导结构域。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3 $\zeta$ 多肽。CD3 $\zeta$ 可激活或刺激细胞(如淋巴谱系的细胞,如T细胞)。野生型(“天然”)CD3 $\zeta$ 包含三个功能性免疫受体酪氨酸基激活基序(ITAM)、三个功能性富碱性拉伸(BRS)区(BRS1、BRS2和BRS3)。CD3 $\zeta$ 在抗原结合后将激活信号传递至细胞(例如,淋巴谱系的细胞,例如T细胞)。CD3 $\zeta$ -链的细胞内信号传导结构域是来自内源性TCR的信号的主要传递者。

[0148] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含天然CD3 $\zeta$ 。在某些实施方式中,CD3 $\zeta$ 多肽包含与具有NCBI参考号NP\_932170(SEQ ID NO:17)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列或其片段,或由其组成,和/或可任选包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些实施方式中,CD3 $\zeta$ 多肽包含作为SEQ ID NO:17的连续部分的氨基酸序列或由其组成,该氨基酸序列长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多164个氨基酸。在某些实施方式中,CD3 $\zeta$ 多肽包含SEQ ID NO:17的氨基酸1至164、1至50、50至100、52至164、100至150或150至164的氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3 $\zeta$ 多肽,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸52至164或由其组成。SEQ ID NO:17在下文提供:

```
1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
[0149] 61 APAYQQGQNQ LYNELNLGRR EYDVLDKRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEG LYNELQKDKMA
121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [SEQ ID NO: 17]
```

[0150] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3 $\zeta$ 多肽,其包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列或由其组成。SEQ ID NO:18在下文提供:

```
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
[0151] SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [SEQ ID NO: 18]
```

[0152] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域还包含至少一个共刺激信号传导结构域。在某些实施方式中,该至少一个共刺激信号传导结构域包含至少一种共刺激分子或其一部分。在某些实施方式中,该至少一个共刺激信号传导结构域包含至少一个共刺激分子的细胞内结构域或其一部分。

[0153] 如本文所用,“共刺激分子”是指除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子,其可提供淋巴细胞对抗原的有效应答。在某些实施方式中,共刺激分子可以提供最佳的淋巴细胞活化。共刺激分子的非限制性实例包括CD28、4-1BB、OX40、ICOS、DAP-10、CD27、CD40、NKGD2、CD2、FN14、HVEM、LTBR、CD28H、TNFR1、TNFR2、BAFF-R、BCMA、TACI、TROY、RANK、CD40、CD27、CD30、EDAR、XEDAR、GITR、DR6和NGFR、及其组合。共刺激分子可以与共刺激配体结合,共刺激配体是在细胞表面表达的蛋白质,其在与其受体结合时产生共刺激应答,即,当CAR与其靶抗原结合时影响所提供刺激的细胞内应答。

[0154] 在某些实施方式中,该至少一个共刺激信号传导结构域包含CD28多肽,该CD28多肽包含突变的YMN基序。

[0155] CD28是一种跨膜蛋白,通过其作为共刺激分子的功能在T细胞活化中发挥关键作用。CD28也称为分化簇28、Tp44和CD28分子。CD28具有细胞内结构域,其包含对CD28的有效信号传导至关重要的细胞内基序。在某些实施方式中,CD28细胞内结构域包含调节TCR刺激后信号传导通路的细胞内亚结构域(也称为“细胞内基序”)。

[0156] CD28包含三个细胞内基序:一个YMN基序和两个富含(rick)脯氨酸的基序:PRRP基序和PYAP基序。CD28细胞内基序可以作为许多衔接分子的停泊位点,这些衔接分子通过其SH2或SH3结构域与这些基序相互作用。这种相互作用转导下游信号,终止于调节基因表达的转录因子。例如,天然YMN基序结合磷酸肌醇3-激酶(PI3K)的p85亚基。天然YMN基序还与生长因子受体结合蛋白2(Grb2)和/或Grb2相关衔接蛋白2(GADS)结合。Grb2与Gab1和Gab2结合,而Gab1和Gab2又可以招募PI3K的p85亚基。

[0157] 在某些实施方式中,天然YMN基序由YMN(SEQ ID NO:19)所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,天然YMN基序通过共有序列YMxM(SEQ ID NO:20)与PI3K的p85亚基结合,其中x不是天冬氨酸(N)。在某些实施方式中,天然YMN基序通过共有序列YxNx(SEQ ID NO:21)与Grb2和/或GADS结合,其中x不是蛋氨酸(M)。

[0158] 在某些实施方式中,与包含天然YMN基序的CD28分子相比,包含本公开的突变的YMN基序的CD28多肽具有减少的PI3K的p85亚基的募集。

[0159] 在某些实施方式中,PI3K的p85亚基不结合突变的YMN基序,从而减少PI3K的p85亚基至CD28多肽的募集。阻断PI3K的p85亚基结合的突变的YMN基序保留其与Grb2和/或GADS的结合。因此,Grb2/GADS的下游信号传导保持完整,例如,导致IL-2分泌的下游信号传导仍保持完整。这种突变的YMN基序称为“GADS/Grb2允许型突变型”。

[0160] 在某些实施方式中,突变的YMN结合PI3K的p85亚基,但不结合Grb2和/或GADS。由于PI3K p85的结合被保留,PI3K的下游信号传导保持完整。由于Grb2/GADS的结合被阻断,由Grb2与Gab1和Gab2的结合触发的PI3K p85亚基的募集被减少或阻断。此外,Grb2/GADS的下游信号传导被阻断。这种突变的YMN基序称为“PI3K允许型突变型”。

[0161] 在某些实施方式中,突变的YMN不结合PI3K的p85亚基,并且不结合Grb2和/或GADS。这种突变的YMN基序称为“无功能性突变型”。无功能性突变型不提供PI3K、Grb2或GADS与CD28在YMN基序处的结合,但不排除这些信号传导分子与CD28分子中的其它地方结合。

[0162] 在某些实施方式中,突变的YMN仅保留存在于YMN基序中的两个蛋氨酸残基中的一个蛋氨酸残基,即YMxx或YxxM。这些基序通过限制多少蛋氨酸残基可以结合PI3K的p85亚基,潜在地调节经由PI3K的信号传导。这种突变的YMN基序称为“杂交‘半(HEMI)’突变型”。

[0163] 5.2.4.1.GADS/Grb-2允许型突变型

[0164] 在某些实施方式中,突变的YMN基序是GADS/Grb-2允许型突变型。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YxNx(SEQ ID NO:21)所示的氨基酸序列组成,其中x不是蛋氨酸(M)。在某些实施方式中,x选自氨基酸A、R、N、D、C、E、Q、G、H、I、K、F、P、S、T、W、Y、V和L。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YENV(SEQ ID NO:22)、YSNV(SEQ ID NO:23)、YKNL(SEQ ID NO:24)、YENQ(SEQ ID NO:25)、YKNI(SEQ ID NO:26)、YINQ(SEQ ID NO:27)、YHNK(SEQ ID

NO:28)、YVNQ (SEQ ID NO:29)、YLNP (SEQ ID NO:30)、YLNT (SEQ ID NO:31)、YDND (SEQ ID NO:66)、YENI (SEQ ID NO:67)、YENL (SEQ ID NO:68)、YKNQ (SEQ ID NO:72)、YKNV (SEQ ID NO:73) 或YANG (SEQ ID NO:87) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YSNV (SEQ ID NO:23) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YKNI (SEQ ID NO:26) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YENV (SEQ ID NO:22) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YKNL (SEQ ID NO:24) 所示的氨基酸序列组成。

#### [0165] 5.2.4.2.PI3K允许型突变型

[0166] 在某些实施方式中,突变的YMN基序是PI3K允许型突变型。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMxM (SEQ ID NO:20) 所示的氨基酸序列组成,其中x不是天冬氨酸(N)。在某些实施方式中,x选自氨基酸A、R、D、C、E、Q、G、H、I、K、M、F、P、S、T、W、Y、V和L。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMDM (SEQ ID NO:32)、YMPM (SEQ ID NO:79)、YMRM (SEQ ID NO:37) 或YMSM (SEQ ID NO:80) 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMDM (SEQ ID NO:32) 所示的氨基酸序列组成。

[0167] 在某些实施方式中,突变的YMN基序由YbxM (SEQ ID NO:33) 所示的氨基酸序列组成,其中x不是天冬氨酸(N),并且b不是蛋氨酸(M)。在某些实施方式中,x选自氨基酸A、R、D、C、E、Q、G、H、I、K、M、F、P、S、T、W、Y、V和L。在某些实施方式中,b选自氨基酸A、R、N、C、E、Q、G、H、I、K、N、F、P、S、T、W、Y、V和L。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YTHM (SEQ ID NO:34)、YVLM (SEQ ID NO:35)、YIAM (SEQ ID NO:36)、YVEM (SEQ ID NO:83)、YVKM (SEQ ID NO:85) 或YVPM (SEQ ID NO:86) 所示的氨基酸序列组成。

[0168] 在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMxb (SEQ ID NO:65) 所示的氨基酸序列组成,其中x不是天冬氨酸(N),并且b不是蛋氨酸(M)。在某些实施方式中,x选自氨基酸A、R、D、C、E、Q、G、H、I、K、M、F、P、S、T、W、Y、V和L。在某些实施方式中,b选自氨基酸A、R、N、C、E、Q、G、H、I、K、N、F、P、S、T、W、Y、V和L。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMAP (SEQ ID NO:77) 所示的氨基酸序列组成。

[0169] 某些突变的YMN基序在Mol Cell Proteomics.2010Nov;9(11):2391-404; Virology.2015May;0:568-577中得到描述,两者全部内容均并入本文以供参考。

#### [0170] 5.2.4.3.“杂交‘半’突变型”

[0171] 在某些实施方式中,突变的YMN基序是“杂交‘半’突变型”。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMNx (SEQ ID NO:38) 或YxNM (SEQ ID NO:39) 所示的氨基酸序列组成,其中x不是蛋氨酸(M)。在某些实施方式中,x选自氨基酸A、R、N、C、E、Q、G、H、I、K、N、F、P、S、T、W、Y、V和L。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMNv (SEQ ID NO:40)、YENM (SEQ ID NO:41)、YMNQ (SEQ ID NO:42)、YMNl (SEQ ID NO:78) 或YSNM (SEQ ID NO:81) 所示的氨基酸序列组成。

#### [0172] 5.2.4.4.无功能性突变型

[0173] 在某些实施方式中,突变的YMN基序是无功能性突变型。在某些实施方式中,突变的YMN基序由氨基酸序列Ybxb (SEQ ID NO:43) 组成,其中x不是天冬氨酸(N),并且b不是蛋氨酸(M)。在某些实施方式中,x选自A、R、D、C、E、Q、G、H、I、K、M、F、P、S、T、W、Y、V和L。在某些实施方式中,b选自A、R、N、D、C、E、Q、G、H、I、K、F、P、S、T、W、Y、V和L。在某些实施方式中,突变的

YMN基序由YGGG (SEQ ID NO:44)、YAAA (SEQ ID NO:45)、YFFF (SEQ ID NO:46)、YETV (SEQ ID NO:69)、YQQQ (SEQ ID NO:70)、YHAE (SEQ ID NO:71)、YLDL (SEQ ID NO:74)、YLIP (SEQ ID NO:75)、YLRV (SEQ ID NO:76)、YTAV (SEQ ID NO:82)或YVHV (SEQ ID NO:84)所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YGGG (SEQ ID NO:44)所示的氨基酸序列组成。

[0174] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域,该共刺激信号传导结构域包含CD28多肽,该CD28多肽包含由YENV (SEQ ID NO:22)所示的氨基酸序列组成的突变的YMN基序,其中该CD28多肽由SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列组成。SEQ ID NO:47在下文提供。

[0175] RSKRSRLHSDYENVTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [SEQ ID NO: 47]

[0176] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域,该共刺激信号传导结构域包含CD28多肽,该CD28多肽包含由YKNI (SEQ ID NO:26)所示的氨基酸序列组成的突变的YMN基序,其中该CD28多肽由SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列组成。SEQ ID NO:48在下文提供。

[0177] RSKRSRLHSDYKKNITPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [SEQ ID NO: 48]

[0178] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域,该共刺激信号传导结构域包含CD28多肽,该CD28多肽包含由YMDM (SEQ ID NO:32)所示的氨基酸序列组成的突变YMN基序,其中该CD8多肽由SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列组成。SEQ ID NO:49在下文提供。

[0179] RSKRSRLHSDYMDMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [SEQ ID NO: 49]

[0180] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域,该共刺激信号传导结构域包含CD28多肽,该CD28多肽包含由YGGG (SEQ ID NO:44)所示的氨基酸序列组成的突变的YMN基序,其中该CD28多肽由SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列组成。SEQ ID NO:63在下文提供。

[0181] RSKRSRLHSDYGGGTTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [SEQ ID NO: 63]

[0182] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域,该共刺激信号传导结构域包含CD28多肽,该CD28多肽包含由YSNV (SEQ ID NO:23)所示的氨基酸序列组成的突变的YMN基序,其中该CD28多肽由SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列组成。SEQ ID NO:64在下文提供。

[0183] RSKRSRLHSDYSNVTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [SEQ ID NO: 64]

[0184] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含第一共刺激信号传导结构域和第二共刺激信号传导结构域,该第一共刺激性信号结构域包含CD28多肽,该CD28多肽包含突变的YMN基序(如本文所公开),该第二共刺激信号传导结构域包含共刺激分子的细胞内结构域。在某些实施方式中,该共刺激分子选自4-1BB、OX40、ICOS、DAP-10、CD30、CD271、BAFFR、BCMA、DR3、FN14、HVEM、LTBR、RANK、TACI、TNFR1、TNFR2、TROY、EPOR、IL1RAcP、IL18R1、IL18RAP、ST2、及其组合。

[0185] 在某些实施方式中,该第二共刺激信号传导结构域包含4-1BB多肽(例如,4-1BB的细胞内结构域或其一部分)。在某些实施方式中,4-1BB多肽包含与具有NCBI参考号NP\_001552 (SEQ ID NO:50)的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约

95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列或其片段,或由其组成,和/或可任选包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些实施方式中,4-1BB多肽包含作为SEQ ID NO:50的连续部分的氨基酸序列或由其组成,该氨基酸序列长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50、或至少100、或至少150或至少150、且至多255个氨基酸。在某些实施方式中,4-1BB多肽包含SEQ ID NO:50的氨基酸1至255、1至50、50至100、100至150、150至200、214至255或200至255的氨基酸序列或由其组成。SEQ ID NO:50在下文提供。

```
1  MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
61  TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC
[0186] 121  CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE
181  PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTlRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG
241  CSCRFPEEEE GGCEL [SEQ ID NO: 50]
```

#### [0187] 5.2.5. 示例性CAR

[0188] 在某些实施方式中,CAR是CD19-靶向CAR。在某些实施方式中,CAR包含(a)与人CD19结合的细胞外抗原结合结构域,其包含:包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2、包含SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3、包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2、以及包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;(b)跨膜结构域,其包含CD28的跨膜结构域或其一部分,和(c)细胞内信号传导结构域,其包含(i) CD3ζ多肽和(ii)共刺激信号传导结构域,其包含CD28多肽,该CD28多肽包含突变的YMN基序。在某些实施方式中,突变的YMN基序由YMDM(SEQ ID NO:32)、YKNI(SEQ ID NO:26)、YENV(SEQ ID NO:22)、YSNV(SEQ ID NO:23)、YKNL(SEQ ID NO:24)或YGGG(SEQ ID NO:44)所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>通过具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的接头连接。

[0189] 在某些实施方式中,示例性CD19-靶向CAR包含由YMDM(SEQ ID NO:32)所示的氨基酸序列组成的突变的YMN基序。在某些实施方式中,示例性CD19-靶向CAR由下文提供的SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列组成。

```
EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLT
ADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELT
QSPKFMSTSVGDRVSVTCASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIT
[0190] NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGP
SKPFWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIIFWVRSKRSLRLHSDYMDMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [SEQ ID NO: 51]
```

[0191] 编码SEQ ID NO:51的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在下文提供的SEQ ID NO:52中示出。

[0192]

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGC  
TTCTGGCTATGCATTAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGA  
TTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACT  
GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTT  
CTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA  
CCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACC  
CAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGT  
GGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCT  
ACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACT  
AACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGG  
GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG  
AGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCT  
TCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTTGCTTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC  
CTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGGATATGACTCCCC  
GCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC  
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCT  
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA  
AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC  
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTAC  
AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [SEQ ID NO: 52]

[0193] 在某些实施方式中, 示例性CD19-靶向CAR包含由YENV (SEQ ID NO:22) 所示的氨基酸序列组成的突变的YMN基序。在某些实施方式中, 示例性CD19-靶向CAR由下文提供的SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列组成。

[0194]

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLT  
ADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIELT  
QSPKFMSTSVGDRVSVTKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIT  
NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGP  
SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYENVTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS  
RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY  
SEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [SEQ ID NO: 53]

[0195] 编码SEQ ID NO:53的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在下文提供的SEQ ID NO:54中示出。

[0196]

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGC  
TTCTGGCTATGCATTAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGA  
TTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACT  
GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTT  
CTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA  
CCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACC  
CAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGT  
GGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCT  
ACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACT  
AACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGG  
GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG  
AGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCT  
TCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC  
CTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTATGAAAATGTGACTCCCC  
GCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC  
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCT  
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA  
AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC  
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTAC  
AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAG[SEQ ID NO: 54]

[0197] 在某些实施方式中, 示例性CD19-靶向CAR包含由氨基酸序列YKNI (SEQ ID NO:26) 组成的突变的YNM基序。在某些实施方式中, 示例性CD19-靶向CAR由下文提供的SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列组成。

[0198]

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLT  
ADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIELT  
QSPKFMSTSVGDRVSVTCASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIT  
NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP  
SKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYKNITPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS  
RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAY  
SEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [SEQ ID NO: 55]

[0199] 编码SEQ ID NO:55的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在下文提供的SEQ ID NO: 56中示出。

[0200]

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGC  
TTCTGGCTATGCATTAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGA  
TTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAATAACAATGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACT  
GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTT  
CTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA  
CCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACC  
CAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGT  
GGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCT  
ACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACT  
AACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGG  
GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG  
AGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCT  
TCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC  
CTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTATAAAAACATTACTCCCC  
GCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC  
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCT  
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA  
AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC  
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTAC  
AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [SEQ ID NO: 56]

[0201] 在某些实施方式中, 示例性CD19-靶向CAR包含由氨基酸序列YSNV (SEQ ID NO:23) 组成的突变的YMN基序。在某些实施方式中, 示例性CD19-靶向CAR由下文提供的SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列组成。

[0202]

EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLT  
ADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIELT  
QSPKFMSTSVGDRVSVTKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIT  
NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP  
SKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYSNVTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS  
RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAY  
SEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [SEQ ID NO: 57]

[0203] 编码SEQ ID NO:57的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在下文提供的SEQ ID NO: 58中示出。

[0204]

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGC  
TTCTGGCTATGCATTAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGA  
TTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACT  
GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTT  
CTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA  
CCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACC  
CAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGT  
GGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCT  
ACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACT  
AACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGG  
GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCCTTACCTAGACAATG  
AGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCT  
TCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC  
CTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACTCAAATGTTACTCCCC  
GCGGCCCCGGGCCCCACCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC  
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCT  
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA  
AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC  
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTAC  
AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [SEQ ID NO: 58]

[0205] 在某些实施方式中,示例性CD19-靶向CAR包含由氨基酸序列YKNL (SEQ ID NO:24)组成的突变的YNM基序。在某些实施方式中,示例性CD19-靶向CAR由下文提供的SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列组成。

[0206]

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLT  
ADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELT  
QSPKFMSTSVGDRVSVCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFLTIT  
NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGP  
SKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYKNLTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS  
RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAY  
SEIGMKGERRRGKGHDLGYQLSTATKDTYDALHMQALPPR [SEQ ID NO: 59]

[0207] 编码SEQ ID NO:59的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在下文提供的SEQ ID NO:60中示出。

[0208]

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGC  
TTCTGGCTATGCATTAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGA  
TTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACT  
GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTT

[0209]

CTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA  
CCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACC  
CAGTCTCCAAAATTTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGT  
GGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCT  
ACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACT  
AACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGG  
GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG  
AGAAGAGCAATGGAACCATTTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCT  
TCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC  
CTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACAAAACTTGACTCCCC  
GCCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC  
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCT  
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA  
AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC  
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTAC  
AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [SEQ ID NO: 60]

[0210] 在某些实施方式中,示例性CD19-靶向CAR包含由氨基酸序列YGGG (SEQ ID NO:44)组成的突变的YMN基序。在某些实施方式中,示例性CD19-靶向CAR由下文提供的SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列组成。

[0211]

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLT  
ADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIELT  
QSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFLTIT  
NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP  
SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYGGGTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS  
RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPFMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAY  
SEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [SEQ ID NO: 61]

[0212] 编码SEQ ID NO:61的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在下文提供的SEQ ID NO:62中示出。

[0213]

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGC  
TTCTGGCTATGCATTAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGA  
TTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACT  
GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTT  
CTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA  
CCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACC  
CAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGT  
GGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCT  
ACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACT  
AACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGG  
GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG  
AGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCT  
TCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC  
CTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAAGTACGGTGGAGGGACTCCCC  
GCCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC  
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCT  
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGAA  
AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC  
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTAC  
AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [SEQ ID NO: 62]

[0214] 5.3. 细胞

[0215] 本公开的主题提供包含本公开的CAR (例如第5.2节中公开的CAR) 的细胞。在某些实施方式中,细胞选自淋巴谱系的细胞和骨髓谱系的细胞。在某些实施方式中,细胞是免疫应答细胞。在某些实施方式中,免疫应答细胞是淋巴谱系的细胞。

[0216] 在某些实施方式中,细胞是淋巴谱系的细胞。淋巴谱系的细胞可以提供抗体的产生、细胞免疫系统的调节、血液中外来试剂的检测、宿主外来细胞的检测等。淋巴谱系的细胞的非限制性实例包括T细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、树突状细胞、从中可分化出淋巴细胞的干细胞。在某些实施方式中,干细胞是多能干细胞(例如,胚胎干细胞)。

[0217] 在某些实施方式中,细胞是T细胞。T细胞可以是胸腺中成熟的淋巴细胞,主要负责细胞介导的免疫。T细胞参与适应性免疫系统。本公开主题的T细胞可以是任何类型的T细胞,包括但不限于辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞(包括中枢记忆T细胞、干细胞样记忆T细胞(或干样记忆T细胞)和两种类型的效应记忆T细胞:例如TEM细胞和TEMRA细胞、调节性T细胞(也称为抑制性T细胞)、肿瘤反应性淋巴细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞、粘膜相关恒定T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。细胞毒性T细胞(CTL或杀伤性T细胞)是能够诱导受感染的体细胞或肿瘤细胞死亡的T淋巴细胞亚群。患者自身的T细胞可以通过引入CAR进行遗传修饰以靶向特异性抗原。在某些实施方式中,免疫应答细胞是T细胞。T细胞可以是CD4<sup>+</sup>T细胞或CD8<sup>+</sup>T细胞。在某些实施方式中,T细胞是CD4<sup>+</sup>T细胞。在某些实施方式中,T细胞是CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0218] 在某些实施方式中,细胞是NK细胞。自然杀伤(NK)细胞可以是淋巴细胞,其是细胞介导免疫的一部分,并在先天免疫应答期间起作用。NK细胞不需要预先激活以对靶细胞产生细胞毒性作用。

[0219] 本公开主题的人淋巴细胞类型包括但不限于外周供体淋巴细胞。例如在如下参考中所公开的那些, Sadelain等人Nat Rev Cancer (2003); 3:35-45 (公开了经遗传修饰以表达CAR的外周供体淋巴细胞)、Morgan, R.A.等人2006Science 314:126-129 (公开了经基因改造以表达包括 $\alpha$ 和 $\beta$ 异二聚体的全长肿瘤抗原识别T细胞受体复合物)、Panelli等人, J Immunol (2000); 164:495-504; Panelli等人, J Immunol (2000); 164:4382-4392 (公开了肿瘤活检中来源于肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的淋巴细胞培养物)、以及Dupont, J.等人, Cancer Res (2005); 65:5417-5427; Papanicolaou等人, Blood (2003); 102:2498-2505 (公开了使用人工抗原呈递细胞 (AAPC) 或脉冲树突状细胞的选择性体外扩增抗原特异性外周血白细胞)。

[0220] 细胞(例如, T细胞)可以是自体的、非自体的(例如, 同种异体的), 或者在体外衍生自工程化祖细胞或干细胞。

[0221] 本公开主题的细胞可以是骨髓谱系的细胞。骨髓谱系的细胞的非限制性实例包括单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性白细胞、嗜酸性粒细胞、巨核细胞、肥大细胞、红细胞、血小板和从中可分化出骨髓谱系的细胞的干细胞。在某些实施方式中, 干细胞是多能干细胞(例如, 胚胎干细胞或诱导的多能干细胞)。

[0222] 在某些实施方式中, 本公开的细胞能够调节肿瘤微环境。肿瘤具有对宿主免疫应答不利的微环境, 涉及恶性细胞保护自身免受免疫识别和消除的一系列机制。这种“恶性肿瘤微环境”包括多种免疫抑制因子, 包括浸润性调节性CD4<sup>+</sup> T细胞(Treg)、髓源性抑制细胞(MDSC)、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、包括TGF- $\beta$ 在内的免疫抑制细胞因子, 以及靶向激活的T细胞表达的免疫抑制受体(CTLA-4和PD-1)的配体的表达。这些免疫抑制机制在维持耐受和抑制不适当的免疫应答方面发挥作用, 然而在肿瘤微环境中, 这些机制阻止有效的抗肿瘤免疫应答。总的来说, 这些免疫抑制因子在与所靶向的肿瘤细胞接触时可诱导过继转移的CAR修饰的T细胞的显著无能或凋亡。

[0223] 在某些实施方式中, 可以用本公开的CAR转导细胞, 使得细胞表达CAR。

[0224] 在某些实施方式中, 细胞还包含可溶性单链可变片段(scFv), 其结合具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽。在某些实施方式中, 免疫抑制活性是指诱导细胞(例如, 激活的免疫应答细胞)中的信号转导或蛋白质表达的变化, 导致免疫应答的降低。已知通过其结合抑制或降低免疫应答的多肽包括CD47、PD-1、CTLA-4、及其相应配体, 包括SIRPa、PD-L1、PD-L2、B7-1和B7-2。这些多肽存在于肿瘤微环境中, 并抑制对赘生性细胞的免疫应答。在各种实施方式中, 抑制、阻断或拮抗免疫抑制多肽和/或其配体的相互作用增强了免疫应答细胞的免疫应答。

[0225] 在某些实施方式中, 免疫刺激活性是指诱导细胞(例如, 激活的免疫应答细胞)中的信号转导或蛋白质表达的变化, 导致免疫应答的增加。免疫刺激活性可包括促炎活性。已知通过其结合刺激或增加免疫应答的多肽包括CD28、OX-40、4-1BB、及其相应配体, 包括B7-1、B7-2、OX-40L和4-1BBL。这种多肽存在于肿瘤微环境中并激活对赘生性细胞的免疫应答。在各种实施方式中, 促进、刺激或激起促炎多肽和/或其配体增强免疫应答细胞的免疫应答。

[0226] 包含CAR和结合具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽的可溶性scFv的细胞公开于国际专利公开号WO 2014/134165中, 其全文通过引用并入。

[0227] 在某些实施方式中,细胞进一步包括外源性CD40L。包含CAR和外源性CD40L的细胞在国际专利公开号W0 2014/134165中公开。

[0228] 此外,在某些实施方式中,细胞被工程化表达IL-18。在某些实施方式中,细胞还包含外源性IL-18多肽或其片段。在某些实施方式中,细胞还包含IL-18基因位点处修饰的启动子/增强子,其可增加IL-18基因表达,例如,放置组成型或诱导型启动子以驱动IL-18基因表达。国际专利公开号W02018/027155中公开了包含CAR并被工程化表达IL-18的细胞,例如,在IL-18基因位点包含外源性IL-18多肽或其片段或修饰的启动子/增强子,该国际专利公开通过引用全文并入。

[0229] 另外或替代地,将细胞工程化表达IL-33。在某些实施方式中,细胞还包含外源性IL-33多肽或其片段。在某些实施方式中,细胞还包含IL-33基因位点处的修饰的启动子/增强子,其可以增加IL-33的基因表达,例如,被放置以驱动IL-33表达的组成型或诱导型启动子。国际专利公开号W02019/099479中公开了包含CAR并被工程化表达IL-33的细胞,例如,在IL-33基因位点包含外源性IL-33多肽或其片段或修饰的启动子/增强子,该国际专利公开通过引用全部并入。

[0230] 另外或替代地,将细胞工程化表达IL-36。在某些实施方式中,细胞进一步包含外源性IL-36多肽或其片段。在某些实施方式中,细胞还包含IL-36基因位点处的修饰的启动子/增强子,其可以增加IL-36的基因表达,例如,被放置以驱动IL-36表达的组成型或诱导型启动子。国际专利公开号W02019/099483中公开了包含CAR并被工程化表达IL-36的细胞,例如,在IL-36基因位点包含外源性IL-36多肽或其片段或修饰的启动子/增强子,该国际专利公开通过引用全文并入。

[0231] 5.4. 组合物和载体

[0232] 本公开的主题提供包含本公开的CAR (例如第5.2节中公开的CAR) 的组合物。还提供包含这种组合物的细胞。

[0233] 在某些实施方式中,本公开的CAR由可操作地连接到启动子的核酸分子编码。

[0234] 此外,本公开的主题提供核酸组合物,其包含编码本公开的CAR (例如,第5.2节中公开的一种) 的多核苷酸。还提供包含这种核酸组合物的细胞。

[0235] 在某些实施方式中,核酸组合物还包含启动子,其可操作地连接到编码本公开的CAR的多核苷酸。

[0236] 在某些实施方式中,启动子是内源性或外源性的。在某些实施方式中,外源性启动子选自延伸因子(EF) -1启动子、巨细胞病毒即早期启动子(CMV) 启动子、猿猴病毒40早期启动子(SV40) 启动子、磷酸甘油酸激酶(PGK) 启动子和金属硫蛋白启动子。在某些实施方式中,启动子是诱导型启动子。在某些实施方式中,诱导型启动子选自NFAT转录响应元件(TRE) 启动子、CD69启动子、CD25启动子和IL-2启动子。

[0237] 组合物和核酸组合物可通过现有技术已知的方法或如本文所述施用给受试者或/或递送到细胞中。细胞(例如T细胞或NK细胞) 的遗传修饰可以通过用重组DNA构建体转导基本上均匀的细胞组合物来实现。在某些实施方式中,使用逆转录病毒载体(例如, $\gamma$ -逆转录病毒载体或慢病毒载体) 将DNA构建体引入细胞。例如,编码抗原识别受体的多核苷酸可以被克隆到逆转录病毒载体中,并且表达可以从其内源性启动子、逆转录病毒长末端重复序列或目标细胞类型特异性启动子驱动。也可以使用非病毒载体。

[0238] 对于细胞的初始遗传修饰以包含本公开的CAR,可以使用逆转录病毒载体进行转导,然而可以使用任何其它合适的病毒载体或非病毒递送系统。抗原识别受体可以在单个多顺反子表达盒、单个载体的多个表达盒或多个载体中构建。产生多顺反子表达盒的元件的实例包括但不限于,各种病毒和非病毒内部核糖体进入位点(IRES,如FGF-1 IRES、FGF-2 IRES、VEGF IRES、IGF-II IRES、NF- $\kappa$ B IRES、RUNX1 IRES、p53 IRES、甲型肝炎IRES、丙型肝炎IRES、瘟疫病毒IRES、口蹄疫病毒IRES、小核糖核酸病毒IRES、脊髓灰质炎病毒和脑心肌炎病毒)和可切割接头(如2A肽,如P2A、T2A、E2A和F2A肽)。逆转录病毒载体和适当包装线的组合也是合适的,其中衣壳蛋白将具有感染人细胞的功能。已知多种产生两性病毒的细胞系,包括但不限于PA12 (Miller等, (1985) Mol Cell Biol (1985);5:431-437); PA317 (Miller等, Mol Cell Biol (1986);6:2895-2902); 和CRIP (Danos等, Proc Natl Acad Sci USA (1988);85:6460-6464)。非两性颗粒也是合适的,例如,用VSVG、RD114或GALV包络和本领域已知的任何其它假型化颗粒。

[0239] 可能的转导方法还包括将细胞与生产细胞直接共培养 (Bregni等人, Blood (1992);80:1418-1422),或单独用病毒上清液培养或用具有或不具有适当生长因子和多阳离子的浓缩载体原液培养 (Xu,等. Exp. Hemat. (1994);22:223-230); 和Hughes,等. J. Clin. Invest. (1992);89:1817)。

[0240] 其它转导病毒载体可用于修饰细胞。在某些实施方式中,所选择的载体表现出高效的感染和稳定的整合与表达(例如,见Cayouette等, Human Gene Therapy 8:423-430, 1997; Kido等, Current Eye Research 15:833-844, 1996; Bloomer等, Journal of Virology 71:6641-6649, 1997; Naldini等, Science 272:263-267, 1996; 和Miyoshi等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997)。可使用的其它病毒载体包括,例如腺病毒、慢病毒和与腺相关的病毒载体、牛痘病毒、牛乳头瘤病毒或疱疹病毒,例如Epstein-Barr病毒(也参见例如Miller, Human Gene Thera (1990) 15-14; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis等, BioTechniques (1988);6:608-614; Tolstoshev等, Cur Opin Biotechnol (1990) 1:55-61; Sharp, The Lancet (1991);337:1277-78; Cornetta等, Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-22, 1987; Anderson, Science (1984);226:401-409; Moen, Blood Cells 17:407-16, 1991; Miller等, Biotechnol (1989);7:980-90; LeGal La Salle等, Science (1993);259:988-90; 和Johnson, Chest (1995) 107:77S-83S的载体)。逆转录病毒载体发展地特别好,并已用于临床 (Rosenberg等, N. Engl. J. Med 323:370, 1990; Anderson等, 美国专利第5,399,346号)。

[0241] 非病毒方法也可用于细胞的遗传修饰。例如,可以通过在脂质转染 (Feigner等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1987);84:7413; Ono等, Neurosci Lett (1990);17:259; Brigham等, Am J Med Sci (1989);298:278; Staubinger等, Methods in Enzymol (1983);101:512; Wu等, J Biol Chem (1988);263:14621; Wu等, J Biol Chem (1989);264:16985) 的情况下施用核酸或手术条件下的微注射 (Wolff等, Science 247:1465, 1990) 将核酸分子引入免疫应答细胞中。基因转移的其它非病毒方法包括使用磷酸钙、DEAE-葡聚糖、电穿孔和原生质体融合进行体外转染。脂质体也可能有利于将DNA递送到细胞中。将正常基因移植到受试者的受影响组织中也可以通过将正常核酸离体转移到可培养的细胞类型(例如,自体或异源原代细胞或其后代)中来实现,之后将细胞(或其子代)注射到靶向组织中或全身注

射。还可以使用转座酶或靶向核酸酶(例如锌指核酸酶、巨核酸酶或TALE核酸酶、CRISPR)衍生或获得重组受体。瞬时表达可通过RNA电穿孔获得。

[0242] 任何靶向基因组编辑方法也可用于将本公开的抗原识别受体递送至细胞或受试者。在某些实施方式中,使用CRISPR系统递送本文公开的本公开的抗原识别受体。在某些实施方式中,使用锌指核酸酶递送抗原识别受体。在某些实施方式中,使用TALEN系统递送本公开的抗原识别受体。

[0243] 成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统是在原核细胞中发现的基因组编辑工具。当用于基因组编辑时,该系统包括Cas9(一种能够利用crRNA作为其引导物来修饰DNA的蛋白质)、CRISPR RNA(crRNA,包含Cas9用于将其引导到宿主DNA的正确部分的RNA,以及

[0244] 锌指核酸酶(ZFN)是一种人工限制性内切酶,通过将锌指DNA结合结构域与DNA切割结构域结合而产生。锌指结构域可被工程化以靶向特定DNA序列,其允许锌指核酸酶靶向基因组内的期望序列。单个ZFN的DNA结合结构域通常包含多个单独的锌指重复,并且每个锌指重复可以识别多个碱基对。生成新的锌指结构域的最常用方法是结合已知特异性的较小的锌指“模块”。ZFN中最常见的切割结构域是来自II型限制性内切酶FokI的非特异性切割结构域。利用内源性同源重组(HR)机器和携带CAR表达盒的同源DNA模板,ZFN可用于将CAR表达盒插入基因组中。当目标序列被ZFN切割时,HR机器搜索受损染色体和同源DNA模板之间的同源性,然后在染色体的两个断裂端之间复制模板序列,从而将同源DNA模板整合到基因组中。

[0245] 转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)是一种限制性内切酶,可被工程化以切割特定的DNA序列。TALEN系统的工作原理与ZFN几乎相同。它们通过将转录激活因子样效应物DNA结合结构域与DNA切割结构域结合而产生。转录激活因子样效应物(TALE)由33-34个氨基酸重复基序组成,具有两个可变位置,对特定核苷酸具有强识别作用。通过组装这些TALE的阵列,TALE DNA结合结构域可以被设计成结合期望的DNA序列,从而引导核酸酶在基因组中的特定位置切割。用于多核苷酸治疗方法的cDNA表达可以从任何合适的启动子(例如,人巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)或金属硫蛋白启动子)指导,并由任何合适的哺乳动物调节元件或内含子(例如延伸因子1a增强子/启动子/内含子结构)调节。例如,如果需要,已知优先指导特定细胞类型中基因表达的增强子可用于指导核酸的表达。所使用的增强子可以包括但不限于那些被表征为组织或细胞特异性增强子的增强子。或者,如果将基因组克隆用作治疗构建体,则可以通过同源调节序列或(如果需要的话)来自异源来源的调节序列(包括上述任何启动子或调节元件)介导调节。

[0246] 用于递送基因组编辑试剂/系统的方法可以根据需要而变化。在某些实施方式中,所选基因组编辑方法的组分作为一个或多个质粒中的DNA构建体递送。在某些实施方式中,

组分通过病毒载体递送。常见的递送方法包括但不限于电穿孔、微注射、基因枪、刺穿转染、液体静压力、连续输注、超声处理、磁感染、腺相关病毒、病毒载体的包膜蛋白假型、可复制的载体顺式和反式作用元件、单纯疱疹病毒，和化学载体（例如，寡核苷酸、脂复合物、聚合物囊泡、多聚物、树状大分子、无机纳米颗粒和细胞穿透肽）。

#### [0247] 5.5. 多肽

[0248] 本公开的主题提供通过在序列中产生改变来优化氨基酸序列或核酸序列的方法。这种改变可能包括某些突变、缺失、插入或翻译后修饰。本公开的主题还包括本文公开的任何天然存在的多肽的类似物（包括但不限于CD19、CD8、CD28、4-1BB和CD3 $\zeta$ ）。类似物可以通过氨基酸序列差异、翻译后修饰或两者而与本文公开的天然存在的多肽不同。类似物可以表现出与本公开主题的天然存在的氨基酸序列的全部或部分具有至少约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多的同源性。序列比较的长度为至少5个、10个、15个或20个氨基酸残基，例如至少25个、50个或75个氨基酸残基或100个以上氨基酸残基。同样，在确定同一性程度的示例性方法中，可以使用BLAST程序， $e^{-3}$ 和 $e^{-100}$ 之间的概率分数指示密切相关的序列。修饰包括多肽的体内和体外化学衍生，例如乙酰化、羧化、磷酸化或糖基化；这种修饰可以在多肽合成或加工期间或在用分离的修饰酶处理之后发生。类似物也可以通过改变一级序列而与天然存在的多肽不同。这些包括天然和诱导的遗传变异（例如，由于通过辐射或暴露于乙烷甲基硫酸盐的随机诱变或如Sambrook, Fritsch和Maniatis,《分子克隆：实验室手册》（第2版），CSH出版社，1989，或Ausubel等（同上）中所述通过位点特异性诱变而产生的）。还包括环化肽、分子和类似物，其含有L-氨基酸以外的残基，如D-氨基酸或非天然存在或合成的氨基酸，如 $\beta$ 或 $\gamma$ 氨基酸。

[0249] 除了全长多肽之外，本公开的主题还提供本文公开的任何多肽的片段。如本文所用，术语“片段”指至少5、10、13或15个氨基酸。在某些实施方式中，片段包含至少20个连续氨基酸、至少30个连续氨基酸或至少50个连续氨基酸。在某些实施方式中，片段包含至少60至80、100、200、300或更多个连续氨基酸。片段可以通过本领域技术人员已知的方法产生，或者可以由正常的蛋白质处理过程产生（例如，从新生多肽中去除生物活性不需要的氨基酸，或者通过可选的mRNA剪接或可选的蛋白质处理事件去除氨基酸）。

#### [0250] 5.6. 制剂和给药

[0251] 本公开的主题还提供包含本公开的细胞的组合物。包含本公开的细胞的组合物可以方便地作为无菌液体制剂提供，例如等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散液或粘性组合物，其可以缓冲到选定的pH值。液体制剂通常比凝胶、其它粘性组合物和固体组合物更容易制备。此外，液体组合物更易于施用，特别是通过注射施用。另一方面，粘性组合物可以在适当的粘度范围内配制，以提供与特定组织的较长接触时间。液体或粘性组合物可以包括载体，其可以是溶剂或分散介质，其包含例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇（例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等）及其合适的混合物。

[0252] 无菌可注射溶液可通过将遗传修饰细胞掺入所需量的适当溶剂中来制备，溶剂具有根据需要加入不同量的其它成分。这种组合物可以与合适的载体、稀释剂或赋形剂如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等混合。组合物也可以冻干。组合物可包含辅助物质，例如润湿剂、分散剂或乳化剂（例如甲基纤维素）、pH缓冲剂、胶凝剂或粘度增强添加剂、防腐剂、调味剂、色素等，这取决于给药途径和所需制剂。可参考标准文本，例如“REMINGTON'S

PHARMACEUTICAL SCIENCE”，1985年第17版，并入本文以供参考，以制备合适的制剂，而无需进行过多的实验。

[0253] 可以添加增强组合物稳定性和无菌性的各种添加剂，包括抗菌防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。通过各种抗菌和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等，可以确保防止微生物的作用。通过使用延迟吸收的试剂，例如单硬脂酸铝和明胶，可以延长可注射药物形式的吸收。然而，根据本公开的主题，所使用的任何载体、稀释剂或添加剂必须与遗传修饰细胞兼容。

[0254] 组合物可以是等渗的，即它们可以具有与血液和泪液相同的渗透压。可使用氯化钠或其它药学上可接受的试剂如右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或其它无机或有机溶质来实现组合物的所需等渗性。氯化钠可特别用于含有钠离子的缓冲液。

[0255] 如果需要，可以使用药学上可接受的增稠剂将组合物的粘度保持在所选水平。例如，甲基纤维素容易且经济地获得并且易于使用。其它合适的增稠剂包括例如黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆等。增稠剂的浓度可取决于所选的药剂。重要的一点是使用将达到所选粘度的量。显然，合适的载体和其它添加剂的选择将取决于给药的确切途径和特定剂型的性质，例如液体剂型（例如，组合物是要配制成溶液、悬浮液、凝胶还是另一种液体剂型，如时间释放剂型或液体填充剂型）。

[0256] 包含本公开的细胞的组合物可以系统地或直接地提供给受试者，用于诱导和/或增强对抗原的免疫应答和/或治疗和/或预防肿瘤形成。在某些实施方式中，将本公开的细胞或包含其的组合物直接注射到目的器官（例如，受瘤形成影响的器官）中。或者，本公开的细胞或包含其的组合物例如通过给药进入循环系统（例如，肿瘤脉管系统）间接提供给目的器官。可以在施用细胞或组合物之前、期间或之后提供扩增和分化剂，以在体外或体内增加细胞（例如，T细胞或NK细胞）的产生。

[0257] 本公开的细胞可以在任何生理学上可接受的载体中给药，通常是血管内给药，尽管它们也可以被引入骨或其它方便的部位，在那里细胞可以找到再生和分化的合适部位（例如胸腺）。

[0258] 待给药的细胞数量可因被治疗的受试者的不同而不同。在某些实施方式中，向受试者施用约 $10^4$ 至约 $10^{10}$ 、约 $10^4$ 至大约 $10^7$ 、约 $10^5$ 至约 $10^7$ 、约 $10^5$ 至约 $10^9$ 、约 $10^5$ 至约 $10^{10}$ 、或约 $10^6$ 至约 $10^8$ 个的本公开的细胞。可以以更小的数量施用更有效的细胞。通常，至少将施用约 $1 \times 10^5$ 个细胞，最终达到约 $1 \times 10^{10}$ 个或更多。在某些实施方式中，向受试者施用至少约 $1 \times 10^5$ 、约 $2 \times 10^5$ 、约 $5 \times 10^5$ 、约 $1 \times 10^6$ 、约 $5 \times 10^6$ 、约 $1 \times 10^7$ 、约 $5 \times 10^7$ 、约 $1 \times 10^8$ 、约 $5 \times 10^8$ 、约 $1 \times 10^9$ 或约 $5 \times 10^9$ 个的本公开的细胞。在某些实施方式中，向受试者施用约 $10^5$ 和约 $10^6$ 个本公开的细胞。在某些实施方式中，向受试者施用约 $1 \times 10^5$ 个的本公开的细胞。在某些实施方式中，向受试者施用约 $2 \times 10^5$ 个的本公开的细胞。在某些实施方式中，向受试者施用约 $5 \times 10^5$ 个的本公开的细胞。在某些实施方式中，向受试者施用约 $1 \times 10^6$ 个的本公开的细胞。有效剂量的精确确定可以基于每个受试者的个体因素，包括其大小、年龄、性别、体重和特定受试者状况。本领域技术人员可以根据本公开和本领域知识容易地确定剂量。

[0259] 本公开的细胞可以包括纯化的细胞群。本领域技术人员可以使用各种公知的方法，例如荧光活化细胞分选（FACS），容易地确定本公开的细胞在群体中的百分比。包含本公开的免疫应答细胞的群体中纯度的合适范围为约50%至约55%、约5%至约60%和约65%

至约70%。在某些实施方式中,纯度为约70%至约75%、约75%至约80%、或约80%至约85%。在某些实施方式中,纯度为约85%至约90%、约90%至约95%和约95%至约100%。本领域技术人员可以容易地调整剂量(例如,纯度降低可能需要增加剂量)。细胞可以通过注射、导管等引入。

[0260] 本领域技术人员可以容易地确定组合物中且要在方法中施用的细胞和任选添加剂、媒介物和/或载体的量。通常,任何添加剂(除活性细胞和/或试剂外)在磷酸盐缓冲盐水中以0.001至50%(重量)溶液的量存在,活性成分以微克至毫克的量级存在,例如约0.0001至约5wt%、约0.0001至约1wt%、约0.0001至约0.05wt%或约0.001至约20wt%,约0.01至约10wt%或约0.05至约5wt%。对于要向动物或人施用的任何组合物,可以确定以下内容:毒性,例如通过确定合适动物模型(如啮齿动物,如小鼠)中的致死剂量(LD)和LD50;引发适当反应的组合物的剂量、其中组分的浓度和施用组合物的时间。根据本领域技术人员、本公开和本文引用的文件的知识,这种确定不需要过度的实验。而且,连续给药的时间可以在没有过度实验的情况下确定。

[0261] 在某些实施方式中,组合物是包含本公开的细胞和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0262] 组合物的施用可以是自体的或异源的。例如,可以从一个受试者获得细胞,并给同一受试者或不同的相容受试者施用。可以施用外周血衍生细胞或其后代(例如,体内、离体或体外衍生)。当施用本公开的组合物(例如,包含本公开的细胞的药物组合物)时,其可以单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)配制。

[0263] 本公开的细胞和组合物可以通过本领域已知的任何方法进行给药,包括但不限于口服给药、静脉给药、皮下给药、节内给药、肿瘤内给药、鞘内给药、胸膜内给药、骨内给药、腹膜内给药、胸膜给药和直接给药。

[0264] 5.7. 治疗方法

[0265] 本公开的主题提供用于诱导和/或增加有需要的受试者的免疫应答的方法。本公开的细胞及包含其的组合物可用于治疗或药物治疗。本公开的主题提供使用细胞(例如T细胞,例如CD4<sup>+</sup>T细胞或CD8<sup>+</sup>T细胞)或包含其的组合物各种方法。例如,本公开的细胞及包含其的组合物可用于减少受试者的肿瘤负荷。本公开的细胞可以减少受试者的肿瘤细胞的数量、减小肿瘤大小和/或根除肿瘤。本公开的细胞及包含其的组合物可用于治疗和/或预防受试者的赘生物或肿瘤。本公开的细胞及包含其的组合物可用于延长患有赘生物或肿瘤的受试者的生存期。本公开的细胞及包含其的组合物可用于治疗和/或预防受试者的病原体感染。此类方法包括施用本公开的细胞或包含其的组合物(例如,药物组合物)实现期望的效果,例如缓解现有状况或预防复发。对于治疗,给药量是有效产生所需效果的量。有效量可在一次或一系列给药中提供。有效量可以以团注或通过连续灌注提供。

[0266] 本公开的主题提供使用细胞(例如T细胞)或包含其的组合物各种方法。例如,本公开的主题提供减少受试者肿瘤负荷的方法。在某些实施方式中,减少肿瘤负荷的方法包括向受试者施用本公开的细胞或包含其的组合物。本公开的细胞可以减少受试者的肿瘤细胞的数量、减小肿瘤大小和/或根除肿瘤。

[0267] 肿瘤可以是实体瘤。实体瘤的非限制性实例包括间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌、胸膜肿瘤、胶质母细胞瘤、食管癌、胃癌(gastric cancer)、滑膜肉瘤、胸腺

癌、子宫内膜癌、胃癌 (stomach cancer)、黑色素瘤、肝癌、肾细胞癌、软组织肉瘤和胆管癌。

[0268] 本公开的主题还提供增加或延长患有赘生物的受试者的生存期的方法。在某些实施方式中,增加或延长患有赘生物的受试者的生存期的方法包括向受试者施用本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物。该方法可以减少或消除受试者的肿瘤负荷。此外,本公开的主题提供增加受试者免疫应答的方法,其包括向受试者施用本公开的细胞或包含其的组合物。本公开的主题还提供治疗和/或预防受试者中赘生物的方法,其包括向受试者施用本公开的细胞或包含其的组合物。

[0269] 赘生物或肿瘤的非限制性实例包括B细胞白血病、B细胞淋巴瘤、急性淋巴母细胞性白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、急性髓细胞白血病 (AML)、多发性骨髓瘤、淋巴瘤 (霍奇金淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤)、胶质母细胞瘤、骨髓增生异常综合征 (MDS) 和慢性粒细胞白血病 (CML)、骨癌、肠癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、黑色素瘤 (皮肤或眼内恶性黑色素瘤)、肾癌 (如透明细胞癌)、喉癌、前列腺癌 (如激素难治性前列腺腺癌)、血癌 (如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、子宫癌、直肠癌、肛门区的癌症、膀胱癌、脑癌、胃癌 (stomach cancer)、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、白血病 (例如,急性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、急性髓细胞白血病、急性成髓细胞白血病、急性早幼粒细胞性白血病、急性单核细胞白血病、急红细胞白血病、慢性白血病、慢性粒细胞白血病)、真性红细胞增多症、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、淋巴细胞淋巴瘤、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱轴瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症包括由石棉诱发的癌症、包括瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (Waldenstrom's macroglobulinemia)、重链病和实体瘤比如肉瘤和癌 (carcinomas) (例如,纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴血管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维尔姆斯瘤 (Wilm's tumor)、子宫颈癌、唾液腺癌、子宫癌、睾丸癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。

[0270] 在某些实施方式中,肿瘤或赘生物选自B细胞白血病、B细胞淋巴瘤、急性淋巴母细胞性白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、非霍奇金氏淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、急性髓系白血病 (AML) 和混合表型急性白血病 (MPAL)。在某些实施方式中,CAR与CD19结合。

[0271] 本公开的主题还提供增加或延长患有病原体感染的受试者的生存期的方法。在某些实施方式中,该方法包括向受试者施用本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物。非限制性病原体感染包括HIV和真菌感染。

[0272] 受试者可能患有晚期疾病,在这种情况下,治疗目标可以包括缓解或逆转疾病进展和/或改善副作用。受试者可能有其已接受治疗的疾病史,在这种情况下,治疗目标通常包括降低或延迟复发风险。

[0273] 可以对本公开的细胞 (例如T细胞) 进行进一步修饰,以避免或最小化免疫并发症 (称为“恶性T细胞转化”) 的风险,例如移植物抗宿主病 (GvHD),或者当健康组织表达与肿瘤

细胞相同的靶抗原时,导致类似于GvHD的结果。这个问题的潜在解决方案是将自杀基因工程到本公开的细胞中。合适的自杀基因包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(hsv-tk)、诱导型半胱氨酸蛋白酶9自杀基因(iCasp-9)和截短的人表皮生长因子受体(EGFRt)多肽。在某些实施方式中,自杀基因是EGFRt多肽。EGFRt多肽可以通过施用抗EGFR单克隆抗体(例如西妥昔单抗)来消除T细胞。EGFRt可以共价连接到CAR的上游。自杀基因可以包含在包含编码本公开的CAR的核酸的载体内。以这种方式,在恶性T细胞转化(例如GVHD)期间施用设计用于激活自杀基因的前药(例如,可以激活iCasp-9的前药(例如,AP1903))触发自杀基因被激活的表达CAR的细胞中的凋亡。将自杀基因掺入本公开的例如CAR中提供额外的安全水平,具有在非常短的时间内消除大多数受体表达细胞的能力。本公开的掺入自杀基因的细胞(例如,T细胞)可以在细胞输注后的给定时间点被预先消除,或者在毒性的最早迹象时被根除。

#### [0274] 5.8. 试剂盒

[0275] 本公开的主题提供用于诱导和/或增强受试者的免疫应答、治疗和/或预防受试者体内的赘生物或肿瘤、减少受试者中的肿瘤负荷、增加或延长受试者内有赘生物的受试者的生存期和/或治疗和/或预防病原体感染的试剂盒。在某些实施方式中,试剂盒包括本公开的细胞或包含其的组合。在某些实施方式中,试剂盒包括无菌容器;这种容器可以是盒子、安瓿、瓶子、小瓶、管、袋、小袋、泡罩包装或本领域已知的其它合适的容器形式。这种容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或其它适合于容纳药物的材料制成。在某些非限制性实施方式中,试剂盒包括编码本公开的CAR的核酸分子。

[0276] 如果需要,将细胞和/或核酸分子与将细胞或核酸分子施用于患有瘤形成或有发展成瘤形成风险的受试者的说明书一起提供。说明书通常包括有关使用组合物用于治疗 and/或预防瘤形成的信息。在某些实施方式中,说明书包括以下至少一项:治疗剂的描述;用于治疗或预防瘤形成的剂量表和给药;注意事项;警告;适应症;不适应症;用药信息;不良反应;动物药理学;临床研究;和/或参考。这些说明书可以直接打印在容器上(如果有的话),或者作为用在容器上的标签,或者作为单独的纸页、小册子、卡片或文件夹提供在容器内或与容器一起。

#### [0277] 6. 实施例

[0278] 通过参考以下实施例将更好地理解本公开主题,该实施例作为本公开主题的示例而非通过限制的方式提供。

##### [0279] 实施例1:CD28突变型CAR T细胞的体外和体内表征

[0280] 似乎PI3K信号传导是冗余的,因为CD28不仅直接结合PI3K p85亚基(通过YMNM中存在YMxM共有序列),而且Grb2(结合YxNx共有基序)结合Gab1和Gab2,其转而又可以招募PI3K p85亚基,启动下游信号传导。

[0281] 考虑到可以结合在CD28分子上的衔接分子的不同数量,T细胞功能性结果(即效应细胞毒性、细胞因子分泌、激活、存活、记忆形成和衰竭)最有可能是由这些衔接分子与CD28结合产生的下游信号传导级联的总和。因此,对这些CD28基序的修饰可以允许或限制各种衔接分子的结合,其将改变信号传导,导致效应物功能的增强和/或功能失调的缓解。鉴于PI3K信号传导在T细胞终末分化中的含义,该信号传导通路的冗余可能对效应物功能有害,而调节它可能是有益的(图1)。

[0282] 鉴于CD28中的YMN基序具有决定结合伴侣(衔接分子)的能力,以及这些伴侣通过由PI3K、Grb2和GAD产生的多个信号传导级联来决定T细胞命运的能力,创建了多个CD28突变,这些突变允许或排斥这些衔接分子与CD28的结合(图2,图12)。

[0283] CD28-YKNI突变型CAR T细胞的表征

[0284] 创建CD28-YKNI突变型CAR T细胞。将表达截短的EGFR结构域(Etah19)的不同的人CD19-靶向CAR T细胞与表达GFP-萤火虫荧光素酶的CD19+NALM6细胞(NALM6gL)以不同的效应物:肿瘤比共培养。24小时后通过生物发光测量肿瘤细胞裂解(相对于非信号传导CAR T细胞)。发现CD28-YKNI突变型CAR T细胞在体外具有强大的杀伤能力(图3A-3D)。

[0285] 将人CD19-靶向CAR T细胞单独培养,与CD19+NALM6细胞以1:1的效应物:肿瘤比共培养。24小时后,收集上清液,并使用基于微珠的多重测定法测定细胞因子。CD28-YKNI突变型CAR T细胞具有独特的细胞因子分泌谱(图4A-4N)。

[0286] 将不同的人CD19-靶向CAR T细胞与NALM6以1:5的E:T比和50,000个CAR T细胞/mL的浓度共培养。大约每5天对CAR T细胞进行计数,并通过流式细胞术、记忆表型(CD62L+)和CD4/CD8分布进行表征。在不同的时间点将起始数量的肿瘤细胞添加回培养物中。CD28-YKNI突变型CAR T细胞在体外也具有强大的杀伤增殖能力(图5)。与CD28和CD28-1xx CAR T细胞相比,CD28-YKNI突变型CAR T细胞在重复抗原遭遇的情况下保持记忆表型(图6)。与CD28和CD28-1xx CAR T细胞相比,CD28-YKNI突变型CAR T细胞在重复抗原遭遇的情况下保持相对平衡的CD8:CD4比(图7)。

[0287] CD28-YKNI突变型CAR T细胞在单次和多次刺激后表现出受限的激活谱。CAR T细胞与NALM6gL以1:5的初始E:T(1次刺激)共培养。同时,用相同量的肿瘤重复刺激CAR T细胞共5次(每12小时1次刺激)。共培养开始后约10天,通过流式细胞术评估大小/胚细胞样转变(通过前向散射评估)。CD28-YKNI突变型CAR T细胞在单次或多次激活后表现出较低的胚细胞样转变(图8)。

[0288] 在单次或多次刺激后9天测量CD28-YKNI突变型CAR T细胞的代谢谱。CD28-YKNI突变型CAR T细胞在单次或多次刺激后表现出显著较低的基础呼吸(图9A)。在用白血病抗原进行5次刺激后,在Etah19h28Z和Etah19h28Zp33中测得显著更高的基础耗氧率(OCR),而在仅进行1次刺激后不存在这种差异。细胞基础耗氧量增加表明优先依赖氧化磷酸化作为主要的能量产生机制,以解释增强的CAR T细胞增殖所需的代谢需求。在用肿瘤抗原进行额外刺激(例如,与刺激1次相比,刺激5次)后,基础OCR的增加进一步证实了这一点。

[0289] CD28-YKNI突变型CAR T细胞在单次或多次刺激后也表现出显著更低的乳酸产生(图9B)。细胞外酸化率(ECAR)是糖酵解过程中乳酸产生的可测量替代物。所刺激的CAR T细胞中基础ECAR的增加表明糖酵解活性增加,这通常在用抗原激活的T细胞中测量。观察到Etah19hMUThZ中ECAR的增加,但最小,表明具有这种修饰的T细胞未经历显著刺激。

[0290] CAR T细胞与NALM6gL以1:5的初始E:T(1次刺激)共培养。同时,用相同量的肿瘤重复刺激CAR T细胞共5次(每12小时1次刺激)。共培养开始后约10天,通过流式细胞术评估衰竭标志物(LAG3和PD1)。CD28-YKNI突变型CAR T细胞在单次或多次刺激的情况下表达较低水平的共抑制分子(LAG3和PD1、TIM-3和PD1)(图10A-10B)。

[0291] 测量了基于突变的CAR T细胞的体内抗肿瘤作用。NCG小鼠接种 $10^6$ 个NALM6gfp<sup>+</sup>ffLUC<sup>+</sup>肿瘤细胞,4天后用CAR T细胞处理。CAR T细胞来自两个不同的健康供体。CD28-YKNI

突变型CD19-靶向CAR T细胞在体内优于标准的基于CD28的CAR T细胞(图11)。

**[0292] 其它CD28突变型CAR T细胞的表征**

**[0293]** 将表达截短的EGFR结构域(Etah19)的不同人CD19-靶向CD28突变型CAR T细胞(CD28-YKNI、CD28-YMDM、CD28-YGGG、CD28-YENV、CD28-YKNL和CD28-YSNV) CD28与表达GFP-萤火虫荧光素酶的CD19+NALM6细胞(NALM6gL)以不同的效应物:肿瘤比共培养,24小时后通过生物发光测量肿瘤细胞裂解(相对于非信号传导的CAR T细胞)。CD28-YKNI突变型CAR T细胞在24小时杀伤试验中显示出相当的杀伤能力(图13)。

**[0294]** 将不同的人CD19-靶向CAR T细胞与NALM6以1:5的E:T比以25,000个CAR T细胞/mL的初始浓度共培养。每天测量并绘制6天中CAR+和NALM6的浓度。CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞(YKNI、YENV和YMDM)在体外优于标准的基于CD28的CAR T细胞(图14)。CD28突变型在体外显示出强大的长期细胞毒性能力。

**[0295]** CAR T细胞与NALM6gL以1:5的初始E:T(1次刺激)共培养。同时,用相同量的肿瘤重复刺激CAR T细胞共5次(每12小时1次刺激)。共培养开始后约10天,通过流式细胞术评估衰竭标志物(TIM3和PD1)。CD28突变型表现出良好的衰竭免疫表型(图15)。

**[0296]** CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞(YKNI、YENV和YMDM)在体内优于标准的基于CD28的CAR T细胞(图16-18)。NCG小鼠接种 $1 \times 10^6$  NALM6gfp<sup>+</sup>ffLUC<sup>+</sup>肿瘤细胞,4天后用CAR T细胞处理。绘制存活率。每周测量生物发光。CAR T细胞来自单个健康供体。

**[0297] 实施例2:CD28突变型CAR T细胞的表征**

**[0298]** 创建CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞,包括YENV、YKNI、YGGG、YMDM和YSNV CD19-靶向CAR T细胞。对这些CD28突变型CAR T细胞的体外和体内特征进行表征。

**[0299]** 将CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞与NALM6gL以1:15的E:T比共培养。每天测量并以细胞/mL绘制7天中和NALM6的浓度。观察到CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞(CD28-YENV、CD28-YKNI、CD28-YGGG、CD28/YMDM和CD28-YSNV)优于标准的基于CD28的CAR T细胞,并在体外证明了强大的长期细胞毒性能力(图19)。

**[0300]** 将CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞与NALM6gL以1:15和1:30的E:T共培养。5天后,通过流式细胞术评估CAR T的衰竭标志物(LAG3、TIM3和PD1)表达。CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞具有良好的衰竭免疫表型(图20)。

**[0301]** 为了显示CD28突变型CAR T细胞的体内抗肿瘤作用,NCG小鼠接种 $1 \times 10^6$ 个NALM6gfp<sup>+</sup>ffLUC<sup>+</sup>肿瘤细胞,并在4天后用500,000个或200,000个CAR T细胞处理。CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞在体内表现出增强的肿瘤控制,并优于标准的基于CD28的CAR T细胞(图21和22)。

**[0302]** CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞在体外显示出增强的增殖,与抗原密度无关。将人CD19-靶向CD28-Yxxx突变型CAR T细胞与具有高或低CD19抗原密度的NALM6gL以1:1的E:T比共培养。每6天,对CAR+T细胞计数并用NALM6gL重新刺激,共刺激三次。在高抗原密度和低抗原密度CD19肿瘤细胞的情况下,CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞在体外显示出与标准的基于CD28的CAR T细胞相比增强的增殖(图23)。

**[0303]** 测量了CD28-Yxxx突变型CD19-靶向CAR T细胞的细胞因子分泌谱。将人CD19-靶向的CD28-Yxxx突变型CAR T细胞与NALM6gL共培养。24小时后,收集上清液,通过基于Luminex微珠的多重测定法测定细胞因子,包括白细胞介素-2、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF、干扰素- $\gamma$ 、IL-9和

IL-17。CD28-Y<sub>xxx</sub>突变型CD19-靶向CAR T细胞在暴露于抗原时表现出独特的细胞因子分泌谱(图24A-24C)。

[0304] 虽然已经详细描述了本公开的主题及其某些优点,但是应当理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下,可以在本文进行各种更改、替换和改变。此外,本申请的范围不限于本说明书中描述的工艺、机器、制造和物质组成以及方法的特定实施方式。如本领域普通技术人员从本公开的主题的公开中容易理解的,与本文所描述的相应实施方式执行基本相同的功能或实现基本相同的结果的当前存在的或稍后要开发的工艺、机器、制造、物质组成或方法可以根据本公开的主题加以利用。因此,所附权利要求旨在在其范围内包括这样的工艺、机器、制造、物质组成或方法。

[0305] 本申请中引用了各种专利、专利申请、出版物、产品描述、协议和序列登录号,出于所有目的,将其全部公开内容并入本文以供参考。

## 序列表

&lt;110&gt; 纪念斯隆-凯特琳癌症中心(MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER)

A·丹尼安(DANIYAN, Anthony)

R·J·布伦特延斯(BRENTJENS, Renier J.)

&lt;120&gt; 具有CD28突变的嵌合抗原受体及其用途(CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS WITH CD28 MUTATIONS AND USE THEREOF)

&lt;130&gt; 072734.1189

&lt;150&gt; US 62/970,401

&lt;151&gt; 2020-02-05

&lt;160&gt; 87

&lt;170&gt; PatentIn版本3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 272

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 1

```

Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val
1           5           10           15
Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr
           20           25           30
Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly
           35           40           45
Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe
           50           55           60
Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
65           70           75           80
Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val
           85           90           95
Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
           100          105          110
Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
           115          120          125
Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
           130          135          140
Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser
145          150          155          160
Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
           165          170          175

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Trp | Leu | Ser | Cys | Gly | Val | Pro | Pro | Asp | Ser | Val | Ser | Arg | Gly | Pro |
| 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Ser | Trp | Thr | His | Val | His | Pro | Lys | Gly | Pro | Lys | Ser | Leu | Leu | Ser |
| 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Glu | Leu | Lys | Asp | Asp | Arg | Pro | Ala | Arg | Asp | Met | Trp | Val | Met | Glu |
| 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Gly | Leu | Leu | Leu | Pro | Arg | Ala | Thr | Ala | Gln | Asp | Ala | Gly | Lys | Tyr |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |     |
| Tyr | Cys | His | Arg | Gly | Asn | Leu | Thr | Met | Ser | Phe | His | Leu | Glu | Ile | Thr |
| 245 |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Arg | Pro | Val | Leu | Trp | His | Trp | Leu | Leu | Arg | Thr | Gly | Gly | Trp | Lys |
| 260 |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 245

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Lys | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Arg | Pro | Gly | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |
| Ser | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Ala | Phe | Ser | Ser | Tyr |
| 20  |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |     |     |     |     |
| Trp | Met | Asn | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
| 35  |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Gln | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asp | Gly | Asp | Thr | Asn | Tyr | Asn | Gly | Lys | Phe |
| 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Gly | Gln | Ala | Thr | Leu | Thr | Ala | Asp | Lys | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |
| Met | Gln | Leu | Ser | Gly | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Phe | Cys |
| 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Arg | Lys | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Val | Asp | Phe | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp |
| 100 |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |
| 115 |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Glu | Leu | Thr | Gln | Ser |
| 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Lys | Phe | Met | Ser | Thr | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Ser | Val | Thr | Cys |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |     |

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 165 170 175  
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn  
 180 185 190  
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 195 200 205  
 Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe  
 210 215 220  
 Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Glu Ile Lys Arg  
 245

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 3

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 4

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Glu | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Lys | Phe | Met | Ser | Thr | Ser | Val | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Asp | Arg | Val | Ser | Val | Thr | Cys | Lys | Ala | Ser | Gln | Asn | Val | Gly | Thr | Asn |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Val | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Pro | Leu | Ile |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Tyr | Ser | Ala | Thr | Tyr | Arg | Asn | Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Thr | Gly |
|     |     |     | 50  |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Thr | Asn | Val | Gln | Ser |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Lys | Asp | Leu | Ala | Asp | Tyr | Phe | Cys | Gln | Gln | Tyr | Asn | Arg | Tyr | Pro | Tyr |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Ser | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Arg |     |     |     |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 5

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 6

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Tyr | Ala | Phe | Ser | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 7

Tyr Pro Gly Asp Gly Asp

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 8

Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 9

Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 10

Ser Ala Thr Tyr Arg Asn

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 11

Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr

1 5

<210> 12

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 12

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val

1 5 10 15

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr

20 25 30

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser

35 40 45

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu

50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser

65 70 75 80

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr

85 90 95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys

100 105 110

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser

115 120 125

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro

130 135 140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly

145 150 155 160

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile

165 170 175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met

180 185 190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro

195 200 205

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

210 215 220

<210> 13

<211> 81

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 13

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Thr | Thr | Thr | Gly | Gly | Gly | Thr | Gly | Cys | Thr | Gly | Gly | Thr | Gly | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| Thr | Gly | Gly | Thr | Thr | Gly | Gly | Thr | Gly | Gly | Ala | Gly | Thr | Cys | Cys | Thr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly | Gly | Cys | Thr | Thr | Gly | Cys | Thr | Ala | Thr | Ala | Gly | Cys | Thr | Thr | Gly |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Cys | Thr | Ala | Gly | Thr | Ala | Ala | Cys | Ala | Gly | Thr | Gly | Gly | Cys | Cys | Thr |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Thr | Thr | Ala | Thr | Thr | Ala | Thr | Thr | Thr | Thr | Cys | Thr | Gly | Gly | Gly | Thr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Gly |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 14

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Leu | Arg | Leu | Leu | Phe | Leu | Ala | Leu | Asn | Phe | Phe | Ser | Val | Gln |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| Val | Thr | Glu | Asn | Lys | Ile | Leu | Val | Lys | Gln | Ser | Pro | Leu | Leu | Val | Val |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Asp | Ser | Asn | Glu | Val | Ser | Leu | Ser | Cys | Arg | Tyr | Ser | Tyr | Asn | Leu | Leu |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ala | Lys | Glu | Phe | Arg | Ala | Ser | Leu | Tyr | Lys | Gly | Val | Asn | Ser | Asp | Val |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Glu | Val | Cys | Val | Gly | Asn | Gly | Asn | Phe | Thr | Tyr | Gln | Pro | Gln | Phe | Arg |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ser | Asn | Ala | Glu | Phe | Asn | Cys | Asp | Gly | Asp | Phe | Asp | Asn | Glu | Thr | Val |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| Thr | Phe | Arg | Leu | Trp | Asn | Leu | His | Val | Asn | His | Thr | Asp | Ile | Tyr | Phe |
|     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Cys | Lys | Ile | Glu | Phe | Met | Tyr | Pro | Pro | Pro | Tyr | Leu | Asp | Asn | Glu | Arg |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |

|                                                                 |     |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Ile Lys Glu Lys His Leu Cys His Thr |     |         |
| 130                                                             | 135 | 140     |
| Gln Ser Ser Pro Lys Leu Phe Trp Ala Leu Val Val Val Ala Gly Val |     |         |
| 145                                                             | 150 | 155 160 |
| Leu Phe Cys Tyr Gly Leu Leu Val Thr Val Ala Leu Cys Val Ile Trp |     |         |
|                                                                 | 165 | 170 175 |
| Thr Asn Ser Arg Arg Asn Arg Leu Leu Gln Ser Asp Tyr Met Asn Met |     |         |
|                                                                 | 180 | 185 190 |
| Thr Pro Arg Arg Pro Gly Leu Thr Arg Lys Pro Tyr Gln Pro Tyr Ala |     |         |
|                                                                 | 195 | 200 205 |
| Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Pro                         |     |         |
|                                                                 | 210 | 215     |
| <210> 15                                                        |     |         |
| <211> 235                                                       |     |         |
| <212> PRT                                                       |     |         |
| <213> 人工序列                                                      |     |         |
| <220>                                                           |     |         |
| <223> 合成的                                                       |     |         |
| <400> 15                                                        |     |         |
| Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu |     |         |
| 1                                                               | 5   | 10 15   |
| His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr |     |         |
|                                                                 | 20  | 25 30   |
| Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser |     |         |
|                                                                 | 35  | 40 45   |
| Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala |     |         |
|                                                                 | 50  | 55 60   |
| Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala |     |         |
| 65                                                              | 70  | 75 80   |
| Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp |     |         |
|                                                                 | 85  | 90 95   |
| Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr |     |         |
|                                                                 | 100 | 105 110 |
| Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe |     |         |
|                                                                 | 115 | 120 125 |
| Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg |     |         |
|                                                                 | 130 | 135 140 |
| Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg |     |         |
| 145                                                             | 150 | 155 160 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Ser | Pro | Leu | Thr | Arg | Phe | Leu | Ser | Leu | Asn | Leu | Leu | Leu | Met |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Gly | Glu | Ser | Ile | Ile | Leu | Gly | Ser | Gly | Glu | Ala | Lys | Pro | Gln | Ala | Pro |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Glu | Leu | Arg | Ile | Phe | Pro | Lys | Lys | Met | Asp | Ala | Glu | Leu | Gly | Gln | Lys |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Val | Asp | Leu | Val | Cys | Glu | Val | Leu | Gly | Ser | Val | Ser | Gln | Gly | Cys | Ser |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Trp | Leu | Phe | Gln | Asn | Ser | Ser | Ser | Lys | Leu | Pro | Gln | Pro | Thr | Phe | Val |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Val | Tyr | Met | Ala | Ser | Ser | His | Asn | Lys | Ile | Thr | Trp | Asp | Glu | Lys | Leu |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Asn | Ser | Ser | Lys | Leu | Phe | Ser | Ala | Val | Arg | Asp | Thr | Asn | Asn | Lys | Tyr |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Val | Leu | Thr | Leu | Asn | Lys | Phe | Ser | Lys | Glu | Asn | Glu | Gly | Tyr | Tyr | Phe |
|     |     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Cys | Ser | Val | Ile | Ser | Asn | Ser | Val | Met | Tyr | Phe | Ser | Ser | Val | Val | Pro |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
| Val | Leu | Gln | Lys | Val | Asn | Ser | Thr | Thr | Thr | Lys | Pro | Val | Leu | Arg | Thr |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Pro | Ser | Pro | Val | His | Pro | Thr | Gly | Thr | Ser | Gln | Pro | Gln | Arg | Pro | Glu |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |

Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala  
 180 185 190  
 Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Pro  
 195 200 205  
 Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys  
 210 215 220  
 Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro  
 225 230 235 240  
 Arg Pro Ser Glu Lys Ile Val  
 245

<210> 17

<211> 164

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 17

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys  
 20 25 30  
 Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala  
 35 40 45  
 Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr  
 50 55 60  
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg  
 65 70 75 80  
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met  
 85 90 95  
 Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn  
 100 105 110  
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met  
 115 120 125  
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly  
 130 135 140  
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Pro Arg

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 18

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Val | Lys | Phe | Ser | Arg | Ser | Ala | Asp | Ala | Pro | Ala | Tyr | Gln | Gln | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Gln | Asn | Gln | Leu | Tyr | Asn | Glu | Leu | Asn | Leu | Gly | Arg | Arg | Glu | Glu | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Asp | Val | Leu | Asp | Lys | Arg | Arg | Gly | Arg | Asp | Pro | Glu | Met | Gly | Gly | Lys |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Pro | Arg | Arg | Lys | Asn | Pro | Gln | Glu | Gly | Leu | Tyr | Asn | Glu | Leu | Gln | Lys |
|     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Asp | Lys | Met | Ala | Glu | Ala | Tyr | Ser | Glu | Ile | Gly | Met | Lys | Gly | Glu | Arg |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Arg | Arg | Gly | Lys | Gly | His | Asp | Gly | Leu | Tyr | Gln | Gly | Leu | Ser | Thr | Ala |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Lys | Asp | Thr | Tyr | Asp | Ala | Leu | His | Met | Gln | Ala | Leu | Pro | Pro | Arg |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 19

Tyr Met Asn Met  
1

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (3) . . (3)

<223> X是任何天然存在的氨基酸,但不是天冬氨酸

(N) ;在某些实施方式中,X选自

氨基酸A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V和L。

<400> 20

Tyr Met Xaa Met

1

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (2) .. (2)

<223> X是任何天然存在的氨基酸,但不是蛋氨酸

(M)。在某些实施方式中,X选自

氨基酸A, R, N, D, C, E, Q, G, H, I, K, F, P, S, T, W, Y, V和L。

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (4) .. (4)

<223> X是任何天然存在的氨基酸,但不是蛋氨酸

(M)。在某些实施方式中,X选自

氨基酸A, R, N, D, C, E, Q, G, H, I, K, F, P, S, T, W, Y, V和L。

<400> 21

Tyr Xaa Asn Xaa

1

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 22

Tyr Glu Asn Val

1

<210> 23

<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 23  
Tyr Ser Asn Val  
1  
<210> 24  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 24  
Tyr Lys Asn Leu  
1  
<210> 25  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 25  
Tyr Glu Asn Gln  
1  
<210> 26  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 26  
Tyr Lys Asn Ile  
1  
<210> 27  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 27

Tyr Ile Asn Gln

1

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 28

Tyr His Asn Lys

1

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 29

Tyr Val Asn Gln

1

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 30

Tyr Leu Asn Pro

1

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 31

Tyr Leu Asn Thr

1

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 32

Tyr Met Asp Met

1

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (2) .. (2)

<223> X是任何天然存在的氨基酸,但不是蛋氨酸

(M)。在某些实施方式中,X选自

氨基酸A, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, N, F, P, S, T, W, Y, V和L。

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (3) .. (3)

<223> X是任何天然存在的氨基酸,但不是天冬氨酸

(N)。在某些实施方式中,X选自

氨基酸A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V和L。

<400> 33

Tyr Xaa Xaa Met

1

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的  
<400> 34  
Tyr Thr His Met  
1  
<210> 35  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 35  
Tyr Val Leu Met  
1  
<210> 36  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 36  
Tyr Ile Ala Met  
1  
<210> 37  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 37  
Tyr Met Arg Met  
1  
<210> 38  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<220>  
<221> 尚未归类的特征

<222> (4) .. (4)

<223> X是任何天然存在的氨基酸,但不是蛋氨酸

(M);在某些实施方式中,X选自

氨基酸A, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, N, F, P, S, T, W, Y, V和L。

<400> 38

Tyr Met Asn Xaa

1

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (2) .. (2)

<223> X是任何天然存在的氨基酸,但不是蛋氨酸

(M);在某些实施方式中,X选自

氨基酸A, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, N, F, P, S, T, W, Y, V和L。

<400> 39

Tyr Xaa Asn Met

1

<210> 40

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 40

Tyr Met Asn Val

1

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 41

Tyr Glu Asn Met

1

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 42

Tyr Met Asn Gln

1

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (2) .. (2)

<223> X是任何天然存在的氨基酸,但不是蛋氨酸

(M)。在某些实施方式中,X选自

A, R, N, D, C, E, Q, G, H, I, K, F, P, S, T, W, Y,  
V和L。

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (3) .. (3)

<223> X是任何天然存在的氨基酸,但不是天冬氨酸

(N)。在某些实施方式中,X选自

A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y,  
V和L。

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (4) .. (4)

<223> X是任何天然存在的氨基酸,但不是蛋氨酸

(M)。在某些实施方式中,X选自

A, R, N, D, C, E, Q, G, H, I, K, F, P, S, T, W, Y,  
V和L。

<400> 43

Tyr Xaa Xaa Xaa

1

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 44

Tyr Gly Gly Gly

1

<210> 45

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 45

Tyr Ala Ala Ala

1

<210> 46

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 46

Tyr Phe Phe Phe

1

<210> 47

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 47

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Glu Asn Val Thr

1

5

10

15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
35 40

<210> 48

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 48

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Lys Asn Ile Thr  
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
35 40

<210> 49

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 49

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

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
35 40

<210> 50

<211> 255

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 50

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu  
1 5 10 15

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Phe | Glu | Arg | Thr | Arg | Ser | Leu | Gln | Asp | Pro | Cys | Ser | Asn | Cys | Pro |
| 20  |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Gly | Thr | Phe | Cys | Asp | Asn | Asn | Arg | Asn | Gln | Ile | Cys | Ser | Pro | Cys |
| 35  |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Pro | Asn | Ser | Phe | Ser | Ser | Ala | Gly | Gly | Gln | Arg | Thr | Cys | Asp | Ile |
| 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |     |
| Cys | Arg | Gln | Cys | Lys | Gly | Val | Phe | Arg | Thr | Arg | Lys | Glu | Cys | Ser | Ser |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |
| Thr | Ser | Asn | Ala | Glu | Cys | Asp | Cys | Thr | Pro | Gly | Phe | His | Cys | Leu | Gly |
| 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Gly | Cys | Ser | Met | Cys | Glu | Gln | Asp | Cys | Lys | Gln | Gly | Gln | Glu | Leu |
| 100 |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Lys | Lys | Gly | Cys | Lys | Asp | Cys | Cys | Phe | Gly | Thr | Phe | Asn | Asp | Gln |
| 115 |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Arg | Gly | Ile | Cys | Arg | Pro | Trp | Thr | Asn | Cys | Ser | Leu | Asp | Gly | Lys |
| 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Val | Leu | Val | Asn | Gly | Thr | Lys | Glu | Arg | Asp | Val | Val | Cys | Gly | Pro |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |     |
| Ser | Pro | Ala | Asp | Leu | Ser | Pro | Gly | Ala | Ser | Ser | Val | Thr | Pro | Pro | Ala |
| 165 |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Ala | Arg | Glu | Pro | Gly | His | Ser | Pro | Gln | Ile | Ile | Ser | Phe | Phe | Leu |
| 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Leu | Thr | Ser | Thr | Ala | Leu | Leu | Phe | Leu | Leu | Phe | Phe | Leu | Thr | Leu |
| 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg | Phe | Ser | Val | Val | Lys | Arg | Gly | Arg | Lys | Lys | Leu | Leu | Tyr | Ile | Phe |
| 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Gln | Pro | Phe | Met | Arg | Pro | Val | Gln | Thr | Thr | Gln | Glu | Glu | Asp | Gly |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |     |
| Cys | Ser | Cys | Arg | Phe | Pro | Glu | Glu | Glu | Glu | Gly | Gly | Cys | Glu | Leu |     |
| 245 |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 51  
 <211> 467  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <400> 51

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Ala | Phe | Ser | Ser | Tyr |
| 20  |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |     |     |     |     |
| Trp | Met | Asn | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
| 35  |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Gln | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asp | Gly | Asp | Thr | Asn | Tyr | Asn | Gly | Lys | Phe |
| 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Gly | Gln | Ala | Thr | Leu | Thr | Ala | Asp | Lys | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |
| Met | Gln | Leu | Ser | Gly | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Phe | Cys |
| 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Arg | Lys | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Val | Asp | Phe | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp |
| 100 |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |
| 115 |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Glu | Leu | Thr | Gln | Ser |
| 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Lys | Phe | Met | Ser | Thr | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Ser | Val | Thr | Cys |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |     |
| Lys | Ala | Ser | Gln | Asn | Val | Gly | Thr | Asn | Val | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys |
| 165 |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Pro | Leu | Ile | Tyr | Ser | Ala | Thr | Tyr | Arg | Asn |
| 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Thr | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe |
| 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Leu | Thr | Ile | Thr | Asn | Val | Gln | Ser | Lys | Asp | Leu | Ala | Asp | Tyr | Phe |
| 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |
| Cys | Gln | Gln | Tyr | Asn | Arg | Tyr | Pro | Tyr | Thr | Ser | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |     |
| Leu | Glu | Ile | Lys | Arg | Ala | Ala | Ala | Ile | Glu | Val | Met | Tyr | Pro | Pro | Pro |
| 245 |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |     |     |     |     |
| Tyr | Leu | Asp | Asn | Glu | Lys | Ser | Asn | Gly | Thr | Ile | Ile | His | Val | Lys | Gly |
| 260 |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | His | Leu | Cys | Pro | Ser | Pro | Leu | Phe | Pro | Gly | Pro | Ser | Lys | Pro | Phe |
| 275 |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |     |     |     |     |
| Trp | Val | Leu | Val | Val | Val | Gly | Gly | Val | Leu | Ala | Cys | Tyr | Ser | Leu | Leu |
| 290 |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Thr | Val | Ala | Phe | Ile | Ile | Phe | Trp | Val | Arg | Ser | Lys | Arg | Ser | Arg |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |     |     |     |
| Leu | Leu | His | Ser | Asp | Tyr | Met | Asp | Met | Thr | Pro | Arg | Arg | Pro | Gly | Pro |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |

Pro Pro Arg

465

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 1401

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 52

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60  
tcctgcaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120  
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatgggtga tactaactac 180  
aatggaaaagt tcaagggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300  
attagttcgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcacctgc 360  
tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctgggt gaggtggatc tgacattgag 420  
ctcaccacgt ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480  
aaggccagtc agaattgtggg tactaatgta gcctgggtatc aacagaaacc aggacaatct 540  
cctaaaccac tgatttactc ggcaacctac cggaacagtg gagtccctga tcgtttcaca 600  
ggcagtggtat ctgggacaga ttctactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660  
gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720  
ctggagatca aacgggcggc cgcaattgaa gttatgtatc ctctcctta cctagacaat 780

gagaagagca atggaacat tatccatgtg aaagggaac acctttgtcc aagtccccta 840  
 tttcccgac cttctaagcc cttttgggtg ctgggtggtg ttggtggagt cctggcttgc 900  
 tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 960  
 ctctgcaca gtgactacat ggatatgact ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat 1020  
 taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 1080  
 aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140  
 ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200  
 gggggaaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260  
 aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1320  
 cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380  
 atgcaggccc tgccccctcg c 1401

<210> 53

<211> 467

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 53

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Lys | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Arg | Pro | Gly | Ser |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Ala | Phe | Ser | Ser | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Trp | Met | Asn | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gly | Gln | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asp | Gly | Asp | Thr | Asn | Tyr | Asn | Gly | Lys | Phe |
|     |     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |
| Lys | Gly | Gln | Ala | Thr | Leu | Thr | Ala | Asp | Lys | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Met | Gln | Leu | Ser | Gly | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Phe | Cys |
|     |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |
| Ala | Arg | Lys | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Val | Asp | Phe | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp |
|     |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |
|     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Glu | Leu | Thr | Gln | Ser |
|     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |
| Pro | Lys | Phe | Met | Ser | Thr | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Ser | Val | Thr | Cys |
| 145 |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Lys | Ala | Ser | Gln | Asn | Val | Gly | Thr | Asn | Val | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |
| Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Pro | Leu | Ile | Tyr | Ser | Ala | Thr | Tyr | Arg | Asn |  |  |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |  |  |
| Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Thr | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe |  |  |
|     |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |  |  |
| Thr | Leu | Thr | Ile | Thr | Asn | Val | Gln | Ser | Lys | Asp | Leu | Ala | Asp | Tyr | Phe |  |  |
|     |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |  |  |
| Cys | Gln | Gln | Tyr | Asn | Arg | Tyr | Pro | Tyr | Thr | Ser | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |
| Leu | Glu | Ile | Lys | Arg | Ala | Ala | Ala | Ile | Glu | Val | Met | Tyr | Pro | Pro | Pro |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |
| Tyr | Leu | Asp | Asn | Glu | Lys | Ser | Asn | Gly | Thr | Ile | Ile | His | Val | Lys | Gly |  |  |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |  |  |
| Lys | His | Leu | Cys | Pro | Ser | Pro | Leu | Phe | Pro | Gly | Pro | Ser | Lys | Pro | Phe |  |  |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |  |  |
| Trp | Val | Leu | Val | Val | Val | Gly | Gly | Val | Leu | Ala | Cys | Tyr | Ser | Leu | Leu |  |  |
|     |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |  |  |
| Val | Thr | Val | Ala | Phe | Ile | Ile | Phe | Trp | Val | Arg | Ser | Lys | Arg | Ser | Arg |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |
| Leu | Leu | His | Ser | Asp | Tyr | Glu | Asn | Val | Thr | Pro | Arg | Arg | Pro | Gly | Pro |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |  |  |
| Thr | Arg | Lys | His | Tyr | Gln | Pro | Tyr | Ala | Pro | Pro | Arg | Asp | Phe | Ala | Ala |  |  |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |  |  |
| Tyr | Arg | Ser | Arg | Val | Lys | Phe | Ser | Arg | Ser | Ala | Asp | Ala | Pro | Ala | Tyr |  |  |
|     |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     | 365 |     |     |  |  |
| Gln | Gln | Gly | Gln | Asn | Gln | Leu | Tyr | Asn | Glu | Leu | Asn | Leu | Gly | Arg | Arg |  |  |
|     |     |     |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     | 380 |     |     |  |  |
| Glu | Glu | Tyr | Asp | Val | Leu | Asp | Lys | Arg | Arg | Gly | Arg | Asp | Pro | Glu | Met |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |  |
| Gly | Gly | Lys | Pro | Arg | Arg | Lys | Asn | Pro | Gln | Glu | Gly | Leu | Tyr | Asn | Glu |  |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |  |
| Leu | Gln | Lys | Asp | Lys | Met | Ala | Glu | Ala | Tyr | Ser | Glu | Ile | Gly | Met | Lys |  |  |
|     |     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |  |  |
| Gly | Glu | Arg | Arg | Arg | Gly | Lys | Gly | His | Asp | Gly | Leu | Tyr | Gln | Gly | Leu |  |  |
|     |     |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |  |  |
| Ser | Thr | Ala | Thr | Lys | Asp | Thr | Tyr | Asp | Ala | Leu | His | Met | Gln | Ala | Leu |  |  |
|     |     |     |     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     | 460 |     |     |  |  |
| Pro | Pro | Arg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| 465 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 1404

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 54

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60  
 tcctgcaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120  
 cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatggtga tactaactac 180  
 aatggaaagt tcaagggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300  
 attagttcgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360  
 tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420  
 ctcaccagtc ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480  
 aaggccagtc agaattgtggg tactaatgta gcctggtatc aacagaaacc aggacaatct 540  
 cctaaaccac tgatttactc ggcaacctac cggaacagtg gagtccctga tcgcttcaca 600  
 ggcagtggat ctgggacaga ttctactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660  
 gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720  
 ctggagatca aacgggcggc cgcaattgaa gttatgtatc ctctcctta cctagacaat 780  
 gagaagagca atggaaccat tatccatgtg aaagggaaac acctttgtcc aagtccccta 840  
 tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc 900  
 tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 960  
 ctcttcgaca gtgactatga aaatgtgact ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat 1020  
 taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 1080  
 aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140  
 ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200  
 gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260  
 aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1320  
 cacgatggcc ttaccagggt tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380  
 atgcaggccc tgccccctcg ctag 1404

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 467

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 55

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr |     |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |     |
| Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile |     |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |     |
| Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe |     |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys |     |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |     |
| Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp |     |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |
| Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Leu | His | Ser | Asp | Tyr | Lys | Asn | Ile | Thr | Pro | Arg | Arg | Pro | Gly | Pro |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Thr | Arg | Lys | His | Tyr | Gln | Pro | Tyr | Ala | Pro | Pro | Arg | Asp | Phe | Ala | Ala |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Tyr | Arg | Ser | Arg | Val | Lys | Phe | Ser | Arg | Ser | Ala | Asp | Ala | Pro | Ala | Tyr |
|     |     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |
| Gln | Gln | Gly | Gln | Asn | Gln | Leu | Tyr | Asn | Glu | Leu | Asn | Leu | Gly | Arg | Arg |
|     |     |     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |
| Glu | Glu | Tyr | Asp | Val | Leu | Asp | Lys | Arg | Arg | Gly | Arg | Asp | Pro | Glu | Met |
| 385 |     |     |     |     |     |     | 390 |     |     |     | 395 |     |     |     | 400 |
| Gly | Gly | Lys | Pro | Arg | Arg | Lys | Asn | Pro | Gln | Glu | Gly | Leu | Tyr | Asn | Glu |
|     |     |     |     |     |     |     | 405 |     |     |     | 410 |     |     |     | 415 |
| Leu | Gln | Lys | Asp | Lys | Met | Ala | Glu | Ala | Tyr | Ser | Glu | Ile | Gly | Met | Lys |
|     |     |     |     |     |     |     | 420 |     |     |     | 425 |     |     |     | 430 |
| Gly | Glu | Arg | Arg | Arg | Gly | Lys | Gly | His | Asp | Gly | Leu | Tyr | Gln | Gly | Leu |
|     |     |     |     |     |     |     | 435 |     |     |     |     |     | 440 |     | 445 |
| Ser | Thr | Ala | Thr | Lys | Asp | Thr | Tyr | Asp | Ala | Leu | His | Met | Gln | Ala | Leu |
|     |     |     |     |     |     |     | 450 |     |     |     | 455 |     |     |     | 460 |

Pro Pro Arg

465

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 1401

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 56

```

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatgggtga tactaactac 180
aatggaaaagt tcaagggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300
attagttcgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcacctgc 360
tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420
ctcaccagct ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480
aaggccagtc agaatgtggg tactaatgta gcctggtatc aacagaaacc aggacaatct 540
cctaaaccac tgatttactc ggcaacctac cggaacagtg gagtcctga tcgcttcaca 600
ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660
gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720

```

ctggagatca aacgggcggc cgcaattgaa gttatgtatc ctctcctta cctagacaat 780  
 gagaagagca atggaaccat tatccatgtg aaagggaac acctttgtcc aagtccccta 840  
 tttcccgac cttctaagcc cttttgggtg ctgggtggtg ttggtggagt cctggcttgc 900  
 tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 960  
 ctctgcaca gtgactataa aaacattact ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat 1020  
 taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 1080  
 aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140  
 ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200  
 gggggaaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260  
 aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1320  
 cacgatggcc ttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380  
 atgcaggccc tgccccctcg c 1401

<210> 57

<211> 467

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 57

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Lys | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Arg | Pro | Gly | Ser |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Ala | Phe | Ser | Ser | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |
| Trp | Met | Asn | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     |     | 45  |     |
| Gly | Gln | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asp | Gly | Asp | Thr | Asn | Tyr | Asn | Gly | Lys | Phe |
|     |     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     |     | 60  |     |
| Lys | Gly | Gln | Ala | Thr | Leu | Thr | Ala | Asp | Lys | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Met | Gln | Leu | Ser | Gly | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Phe | Cys |
|     |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |
| Ala | Arg | Lys | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Val | Asp | Phe | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp |
|     |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |
|     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Glu | Leu | Thr | Gln | Ser |
|     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |
| Pro | Lys | Phe | Met | Ser | Thr | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Ser | Val | Thr | Cys |
| 145 |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Ala | Ser | Gln | Asn | Val | Gly | Thr | Asn | Val | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Pro | Leu | Ile | Tyr | Ser | Ala | Thr | Tyr | Arg | Asn |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |
| Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Thr | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe |
|     |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |
| Thr | Leu | Thr | Ile | Thr | Asn | Val | Gln | Ser | Lys | Asp | Leu | Ala | Asp | Tyr | Phe |
|     |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |
| Cys | Gln | Gln | Tyr | Asn | Arg | Tyr | Pro | Tyr | Thr | Ser | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Leu | Glu | Ile | Lys | Arg | Ala | Ala | Ala | Ile | Glu | Val | Met | Tyr | Pro | Pro | Pro |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |
| Tyr | Leu | Asp | Asn | Glu | Lys | Ser | Asn | Gly | Thr | Ile | Ile | His | Val | Lys | Gly |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |
| Lys | His | Leu | Cys | Pro | Ser | Pro | Leu | Phe | Pro | Gly | Pro | Ser | Lys | Pro | Phe |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |
| Trp | Val | Leu | Val | Val | Val | Gly | Gly | Val | Leu | Ala | Cys | Tyr | Ser | Leu | Leu |
|     |     |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     |     |     | 300 |     |
| Val | Thr | Val | Ala | Phe | Ile | Ile | Phe | Trp | Val | Arg | Ser | Lys | Arg | Ser | Arg |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Leu | Leu | His | Ser | Asp | Tyr | Ser | Asn | Val | Thr | Pro | Arg | Arg | Pro | Gly | Pro |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |
| Thr | Arg | Lys | His | Tyr | Gln | Pro | Tyr | Ala | Pro | Pro | Arg | Asp | Phe | Ala | Ala |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |
| Tyr | Arg | Ser | Arg | Val | Lys | Phe | Ser | Arg | Ser | Ala | Asp | Ala | Pro | Ala | Tyr |
|     |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |
| Gln | Gln | Gly | Gln | Asn | Gln | Leu | Tyr | Asn | Glu | Leu | Asn | Leu | Gly | Arg | Arg |
|     |     |     |     | 370 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 380 |     |
| Glu | Glu | Tyr | Asp | Val | Leu | Asp | Lys | Arg | Arg | Gly | Arg | Asp | Pro | Glu | Met |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Gly | Gly | Lys | Pro | Arg | Arg | Lys | Asn | Pro | Gln | Glu | Gly | Leu | Tyr | Asn | Glu |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |
| Leu | Gln | Lys | Asp | Lys | Met | Ala | Glu | Ala | Tyr | Ser | Glu | Ile | Gly | Met | Lys |
|     |     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |
| Gly | Glu | Arg | Arg | Arg | Gly | Lys | Gly | His | Asp | Gly | Leu | Tyr | Gln | Gly | Leu |
|     |     |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |
| Ser | Thr | Ala | Thr | Lys | Asp | Thr | Tyr | Asp | Ala | Leu | His | Met | Gln | Ala | Leu |
|     |     |     |     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |
| Pro | Pro | Arg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

465

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 1401

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 58

```
gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatgggtga tactaactac 180
aatggaaagt tcaagggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300
attagttcgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcacctgc 360
tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420
ctcaccaggt ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480
aaggccagtc agaatgtggg tactaatgta gcctggtatc aacagaaacc aggacaatct 540
cctaaaccac tgatttactc ggcaacctac cggaacagtg gagtccctga tcgcttcaca 600
ggcagtggtg ctgggacaga tttcactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660
gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720
ctggagatca aacgggcggc cgcaattgaa gttatgtatc ctctcctta cctagacaat 780
gagaagagca atggaacat tatccatgtg aaagggaac acctttgtcc aagtccccta 840
tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc 900
tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 960
ctcctgcaca gtgactactc aaatgttact ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat 1020
taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 1080
aggagcgcag acgccccgcg gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140
ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200
gggggaaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260
aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1320
cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380
atgcaggccc tgccccctcg c 1401
```

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 467

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 59

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Lys | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Arg | Pro | Gly | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Ala | Phe | Ser | Ser | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Trp | Met | Asn | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gly | Gln | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asp | Gly | Asp | Thr | Asn | Tyr | Asn | Gly | Lys | Phe |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Lys | Gly | Gln | Ala | Thr | Leu | Thr | Ala | Asp | Lys | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Met | Gln | Leu | Ser | Gly | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Phe | Cys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ala | Arg | Lys | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Val | Asp | Phe | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Glu | Leu | Thr | Gln | Ser |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Pro | Lys | Phe | Met | Ser | Thr | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Ser | Val | Thr | Cys |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Lys | Ala | Ser | Gln | Asn | Val | Gly | Thr | Asn | Val | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Pro | Leu | Ile | Tyr | Ser | Ala | Thr | Tyr | Arg | Asn |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Thr | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Thr | Leu | Thr | Ile | Thr | Asn | Val | Gln | Ser | Lys | Asp | Leu | Ala | Asp | Tyr | Phe |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Cys | Gln | Gln | Tyr | Asn | Arg | Tyr | Pro | Tyr | Thr | Ser | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Leu | Glu | Ile | Lys | Arg | Ala | Ala | Ala | Ile | Glu | Val | Met | Tyr | Pro | Pro | Pro |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Tyr | Leu | Asp | Asn | Glu | Lys | Ser | Asn | Gly | Thr | Ile | Ile | His | Val | Lys | Gly |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Lys | His | Leu | Cys | Pro | Ser | Pro | Leu | Phe | Pro | Gly | Pro | Ser | Lys | Pro | Phe |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Trp | Val | Leu | Val | Val | Val | Gly | Gly | Val | Leu | Ala | Cys | Tyr | Ser | Leu | Leu |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |
| Val | Thr | Val | Ala | Phe | Ile | Ile | Phe | Trp | Val | Arg | Ser | Lys | Arg | Ser | Arg |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Leu Leu His Ser Asp Tyr Lys Asn Leu Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro |     |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |
| Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu |     |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 | 415 |
| Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys |     |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 | 430 |
| Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu |     |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 | 445 |
| Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu |     |     |     |
|                                                                 | 450 | 455 | 460 |

Pro Pro Arg

465

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 1401

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 60

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60  
tcctgcaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120  
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatgggtga tactaactac 180  
aatggaaaagt tcaaggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300  
attagttcgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360  
tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420  
ctcaccacgt ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480  
aaggccagtc agaattgtggg tactaatgta gcctggtatc aacagaaacc aggacaatct 540  
cctaaaccac tgattttactc ggcaacctac cggaacagtg gagtccctga tcgcttcaca 600  
ggcagtggtat ctgggacaga tttcactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660

gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720  
 ctggagatca aacgggcggc cgcaattgaa gttatgtatc ctcttcctta cctagacaat 780  
 gagaagagca atggaaccat tatccatgtg aaagggaac acctttgtcc aagtccccta 840  
 tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg ctgggtggtg ttggtggagt cctggcttgc 900  
 tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 960  
 ctcttcgaca gtgactacaa aaacttgact ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat 1020  
 taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 1080  
 aggagcgcag acgccccgcg gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140  
 ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200  
 gggggaaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260  
 aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1320  
 cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380  
 atgcaggccc tgccccctcg c 1401

<210> 61

<211> 467

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 61

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Lys | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Arg | Pro | Gly | Ser |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Ala | Phe | Ser | Ser | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |
| Trp | Met | Asn | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gly | Gln | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asp | Gly | Asp | Thr | Asn | Tyr | Asn | Gly | Lys | Phe |
|     |     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |
| Lys | Gly | Gln | Ala | Thr | Leu | Thr | Ala | Asp | Lys | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Met | Gln | Leu | Ser | Gly | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Phe | Cys |
|     |     |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ala | Arg | Lys | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Val | Asp | Phe | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp |
|     |     |     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |
|     |     |     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Glu | Leu | Thr | Gln | Ser |
|     |     |     |     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |
| Pro | Lys | Phe | Met | Ser | Thr | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Ser | Val | Thr | Cys |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 | 255 |
| Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly |     |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 | 270 |
| Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe |     |     |     |
|                                                                 | 275 | 280 | 285 |
| Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu |     |     |     |
|                                                                 | 290 | 295 | 300 |
| Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Leu Leu His Ser Asp Tyr Gly Gly Gly Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro |     |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |
| Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu |     |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 | 415 |
| Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys |     |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 | 430 |
| Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu |     |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 | 445 |
| Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu |     |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |     |

Pro Pro Arg

465

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 1401

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 62

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60  
 tcctgcaagg cttctggeta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120  
 cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatgggtga tactaactac 180  
 aatggaaagt tcaagggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300  
 attagtctcg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360  
 tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420  
 ctcaccagtc ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480  
 aaggccagtc agaatgtggg tactaatgta gcctggtatc aacagaaacc aggacaatct 540  
 cctaaaccac tgattttactc ggcaacctac cggaacagtg gagtccctga tcgcttcaca 600  
 ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660  
 gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720  
 ctggagatca aacgggcggc cgcaattgaa gttatgtatc ctctcctta cctagacaat 780  
 gagaagagca atggaaccat tatccatgtg aaagggaac acctttgtcc aagtccccta 840  
 tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc 900  
 tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 960  
 ctcttcgaca gtgactacgg tggagggact ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat 1020  
 taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 1080  
 aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140  
 ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200  
 gggggaaaagc cgagaaggaa gaacctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260  
 aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1320  
 cacgatggcc ttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380  
 atgcaggccc tgccccctcg c 1401

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

<400> 63

Tyr Gly Gly Gly

1

<210> 64

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 64

Tyr Ser Asn Val

1

<210> 65

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (3) .. (3)

<223> X是任何天然存在的氨基酸,但不是天冬氨酸(N)。在某些实施方式中,X选自

氨基酸A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V和L。

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (4) .. (4)

<223> X是任何天然存在的氨基酸,但不是蛋氨酸(M)。在某些实施方式中,X选自

氨基酸A, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, N, F, P, S, T, W, Y, V和L。

<400> 65

Tyr Met Xaa Xaa

1

<210> 66

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的  
<400> 66  
Tyr Asp Asn Asp  
1  
<210> 67  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 67  
Tyr Glu Asn Ile  
1  
<210> 68  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 68  
Tyr Glu Asn Leu  
1  
<210> 69  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 69  
Tyr Glu Thr Val  
1  
<210> 70  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 70

Tyr Gln Gln Gln

1

<210> 71

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 71

Tyr His Ala Glu

1

<210> 72

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 72

Tyr Lys Asn Gln

1

<210> 73

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 73

Tyr Lys Asn Val

1

<210> 74

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 74

Tyr Leu Asp Leu

1

<210> 75

<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 75  
Tyr Leu Ile Pro  
1  
<210> 76  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 76  
Tyr Leu Arg Val  
1  
<210> 77  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 77  
Tyr Met Ala Pro  
1  
<210> 78  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 78  
Tyr Met Asn Leu  
1  
<210> 79  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的  
<400> 79  
Tyr Met Pro Met  
1  
<210> 80  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 80  
Tyr Met Ser Met  
1  
<210> 81  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 81  
Tyr Ser Asn Met  
1  
<210> 82  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 82  
Tyr Thr Ala Val  
1  
<210> 83  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 83

Tyr Val Glu Met

1

<210> 84

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 84

Tyr Val His Val

1

<210> 85

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 85

Tyr Val Lys Met

1

<210> 86

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 86

Tyr Val Pro Met

1

<210> 87

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 87

Tyr Ala Asn Gly

1

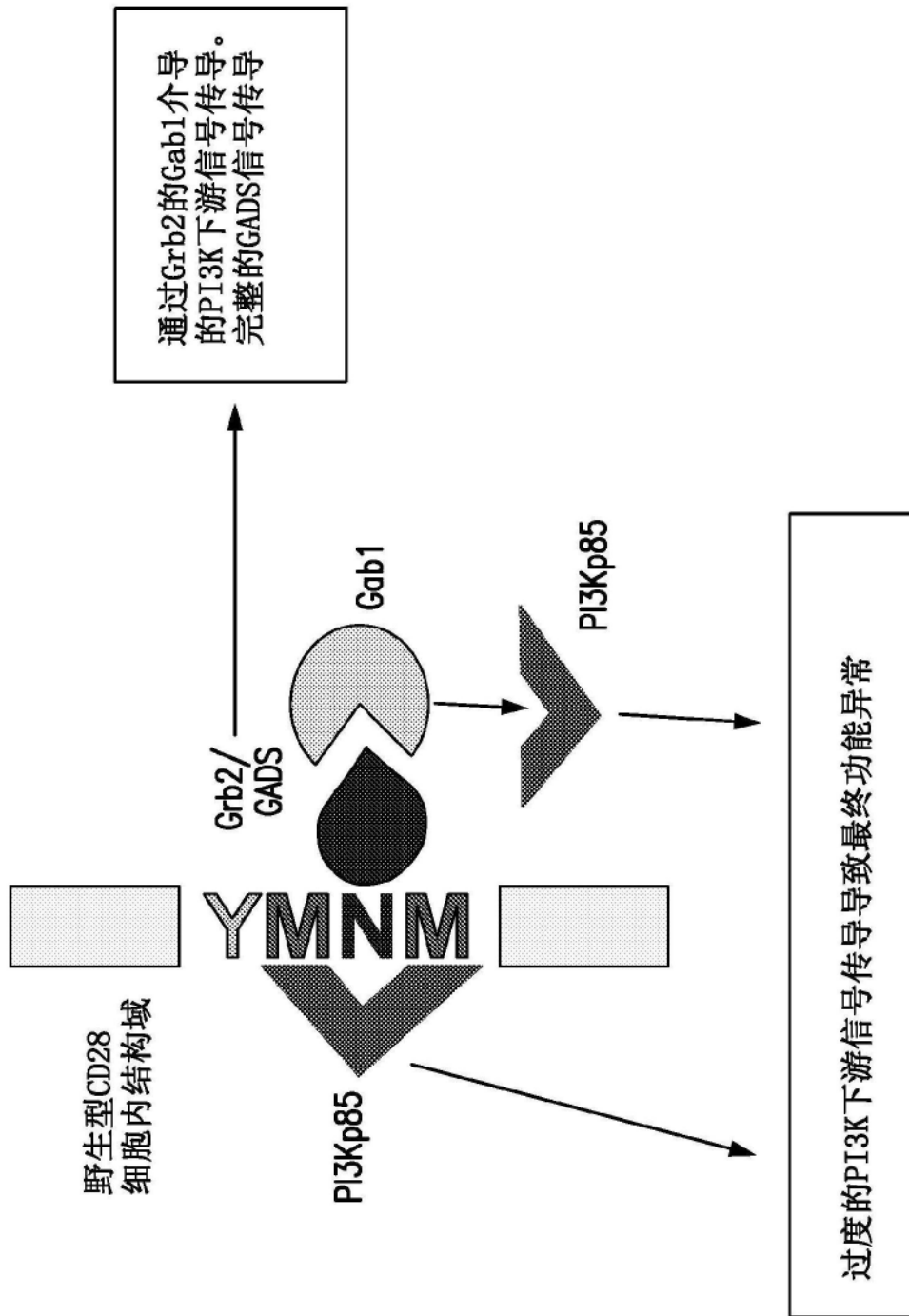


图1

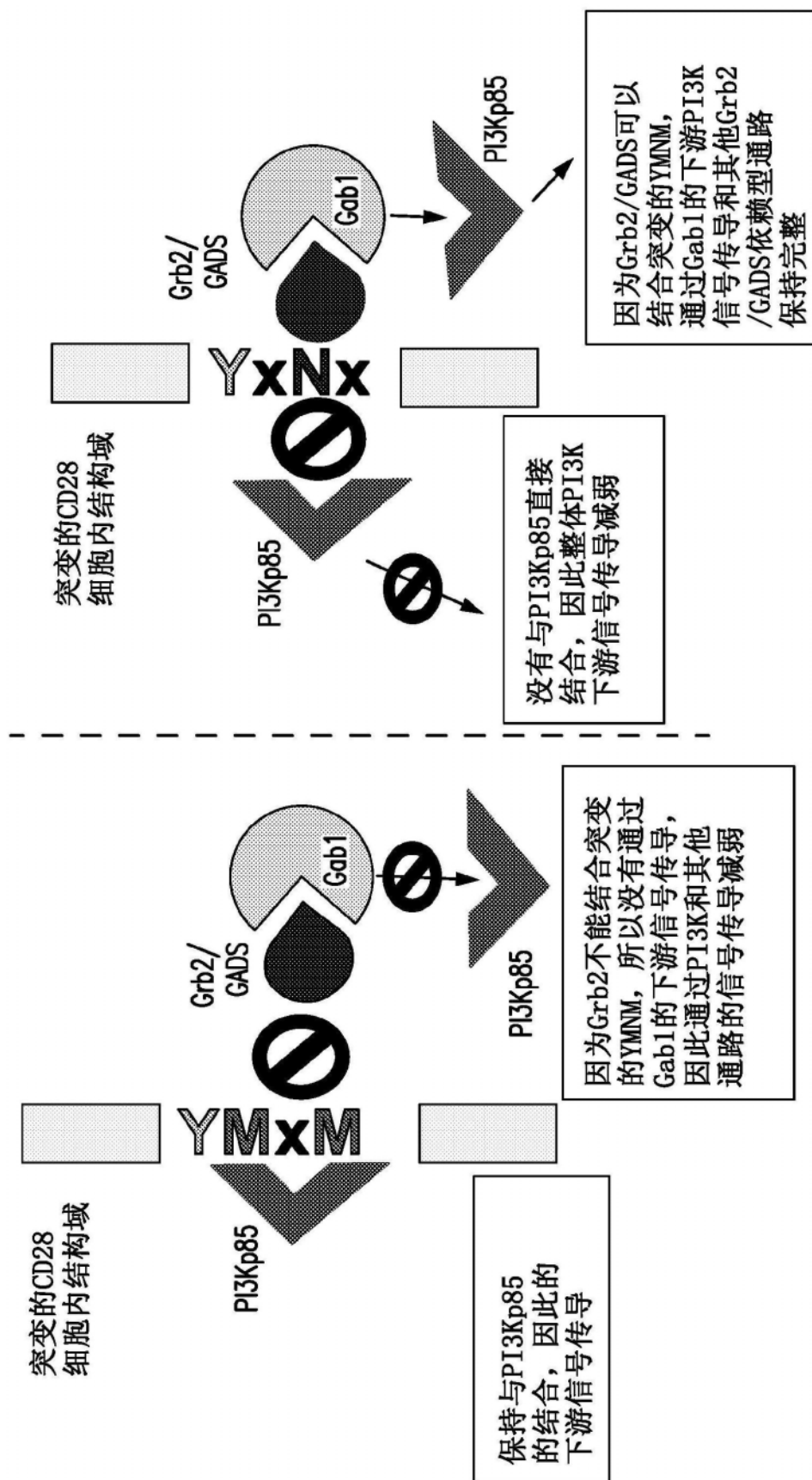


图2

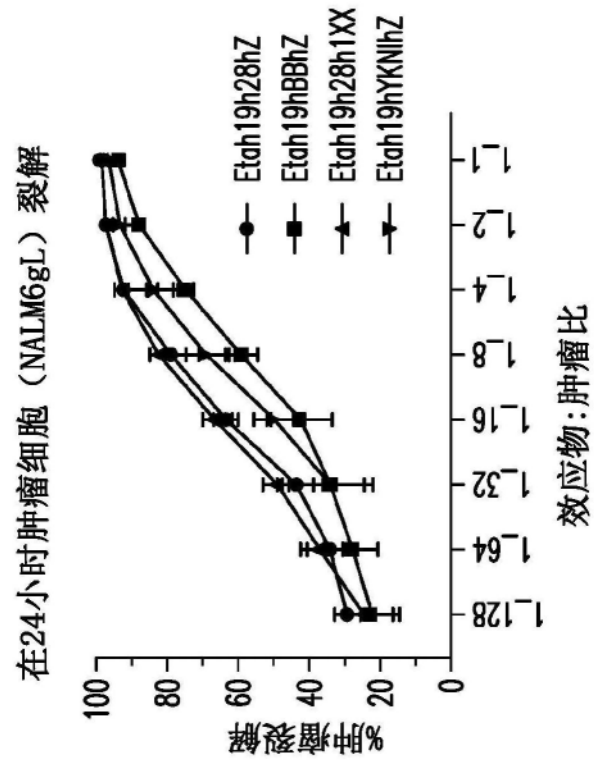


图3A

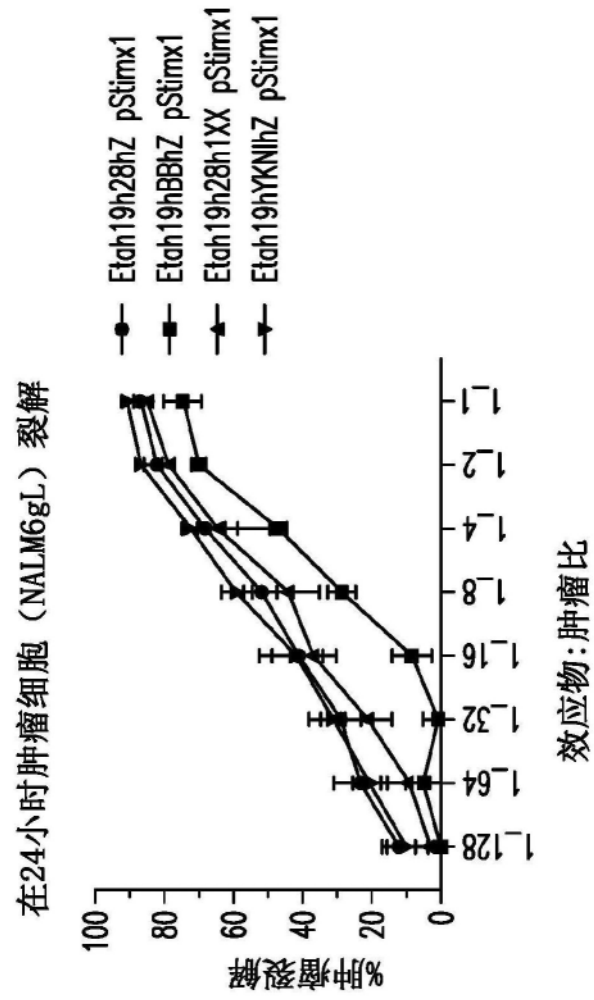


图3B

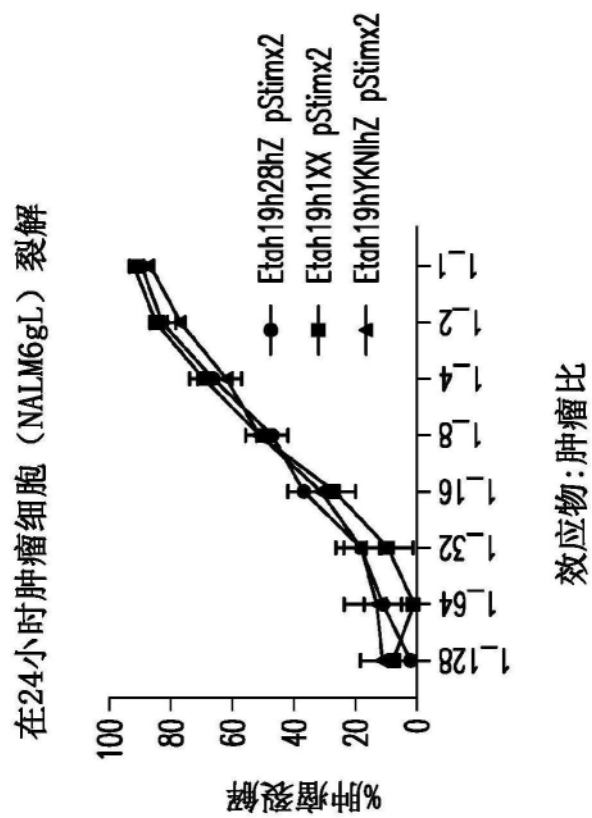


图3C

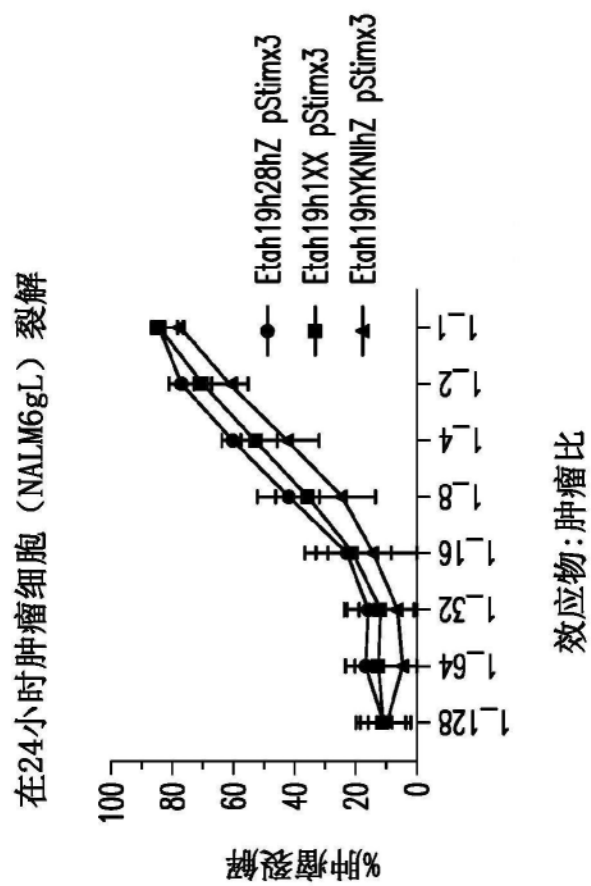


图3D

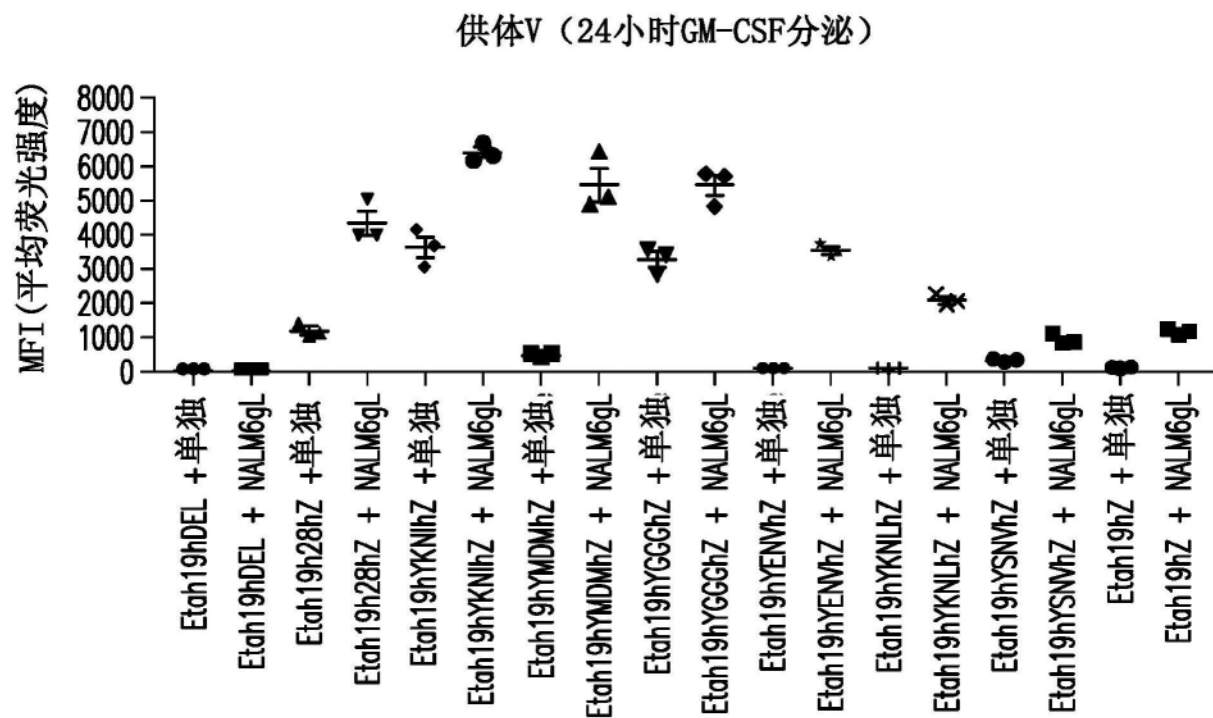


图4A

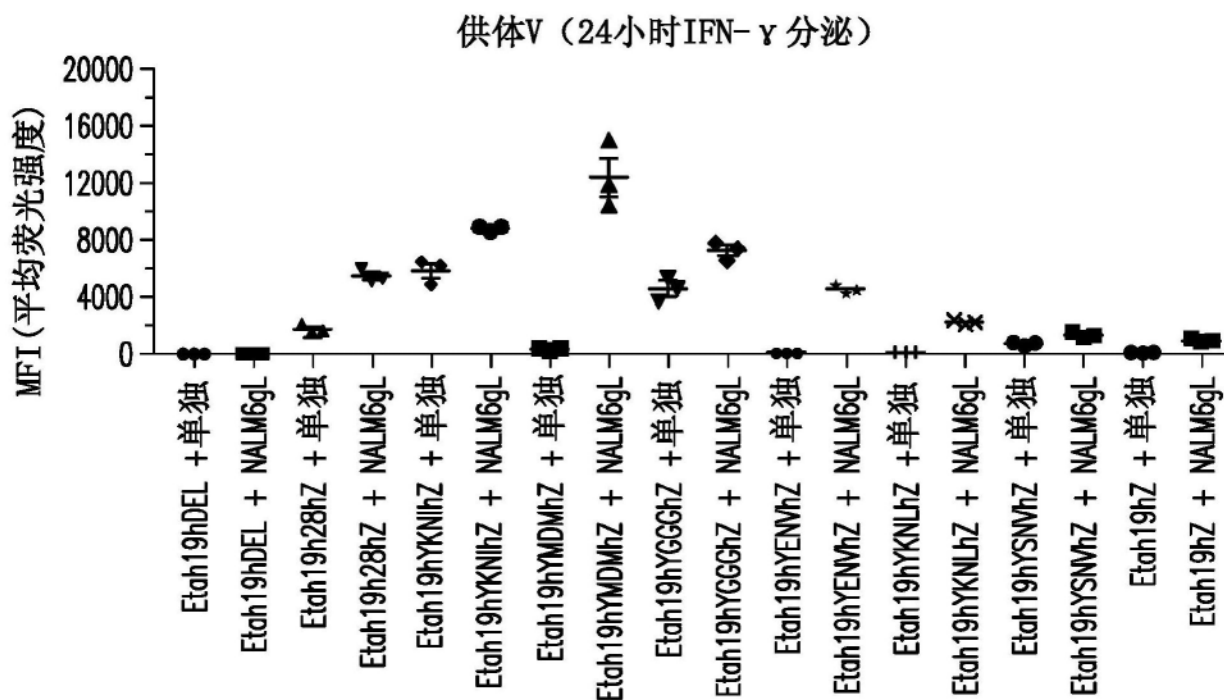


图4B

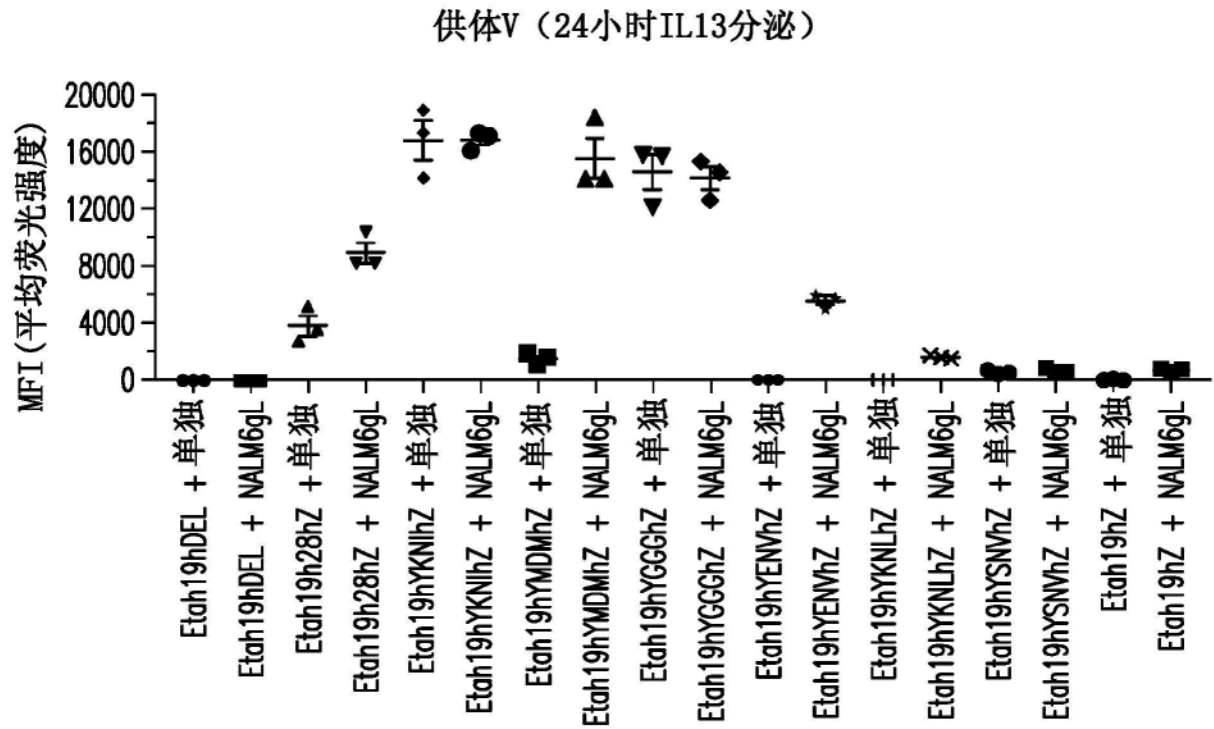


图4C

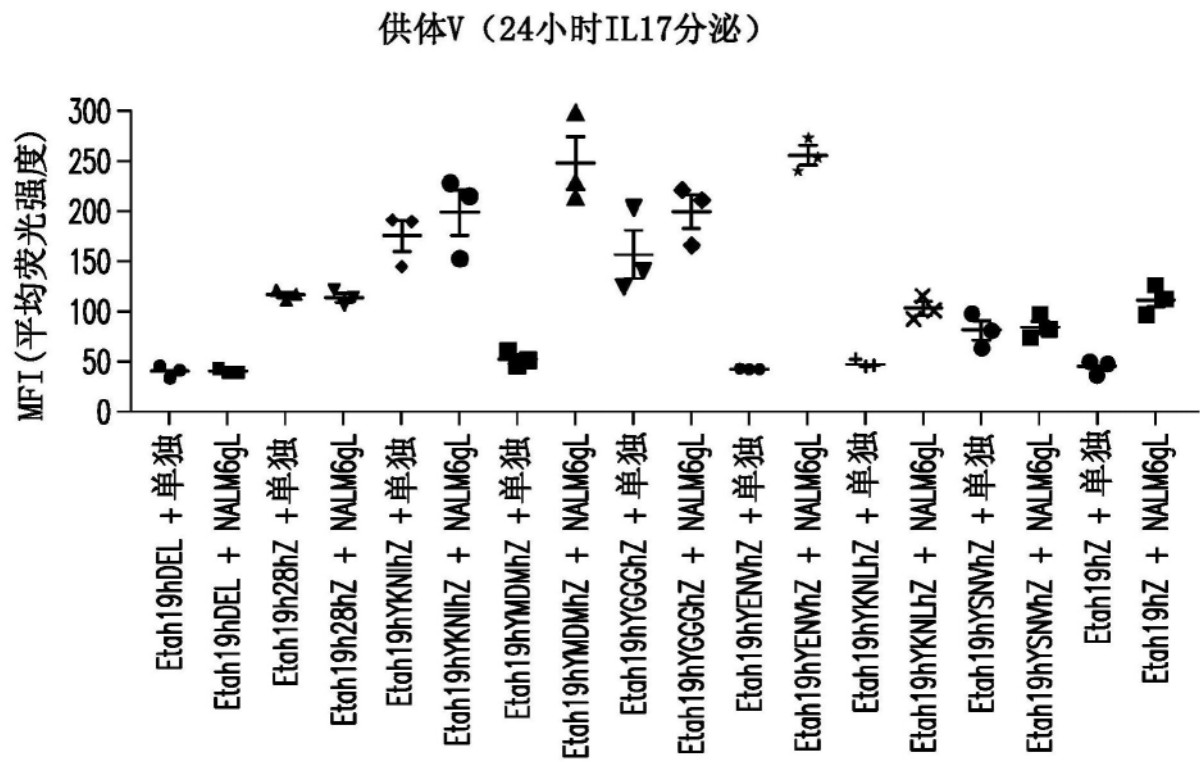


图4D

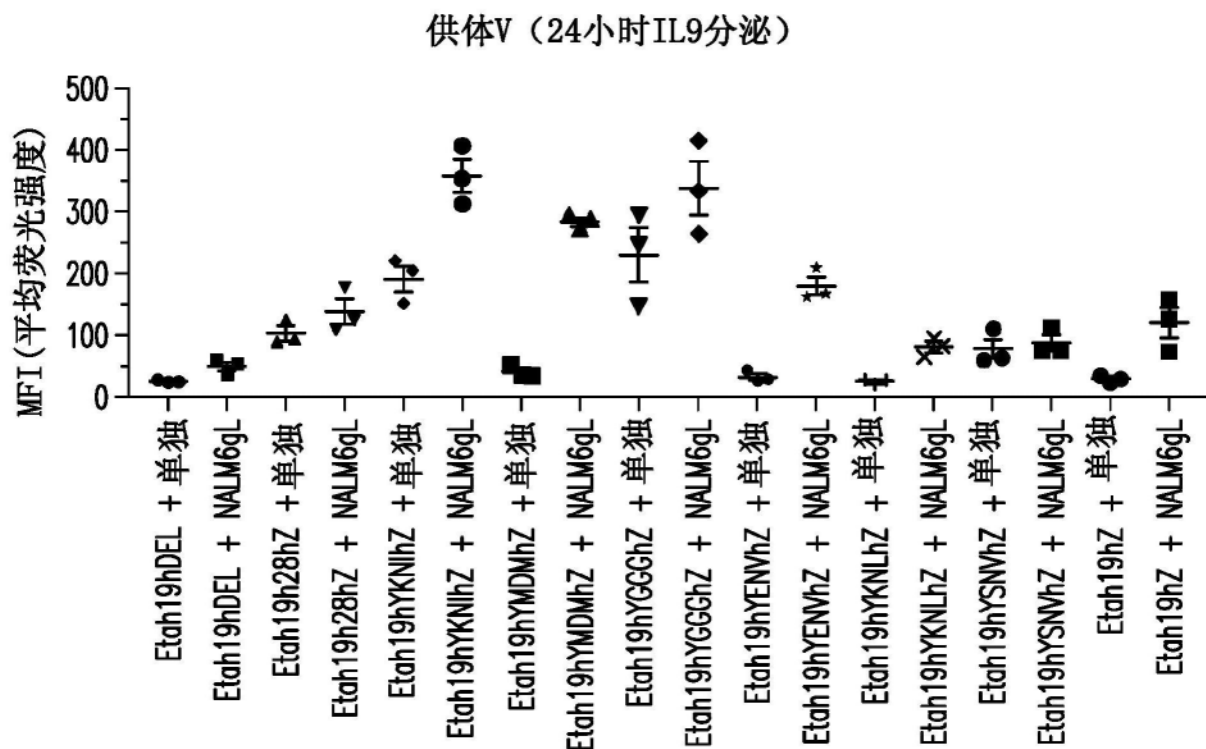


图4E

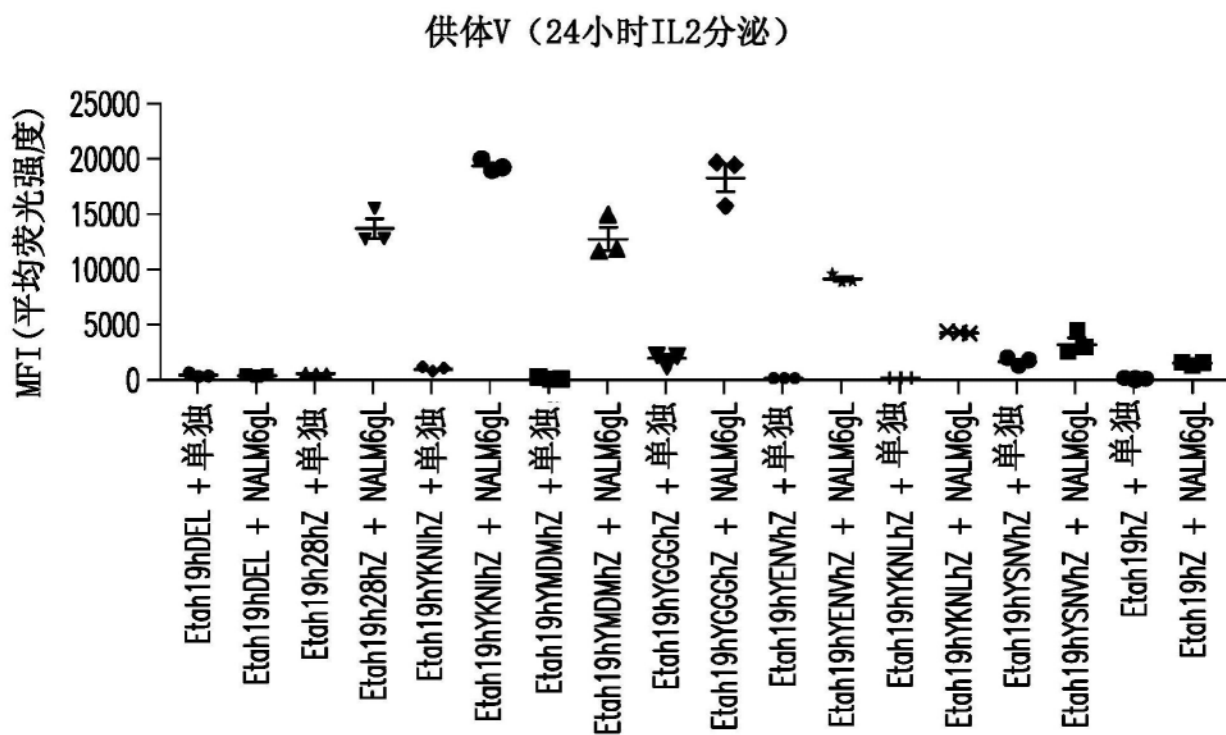


图4F

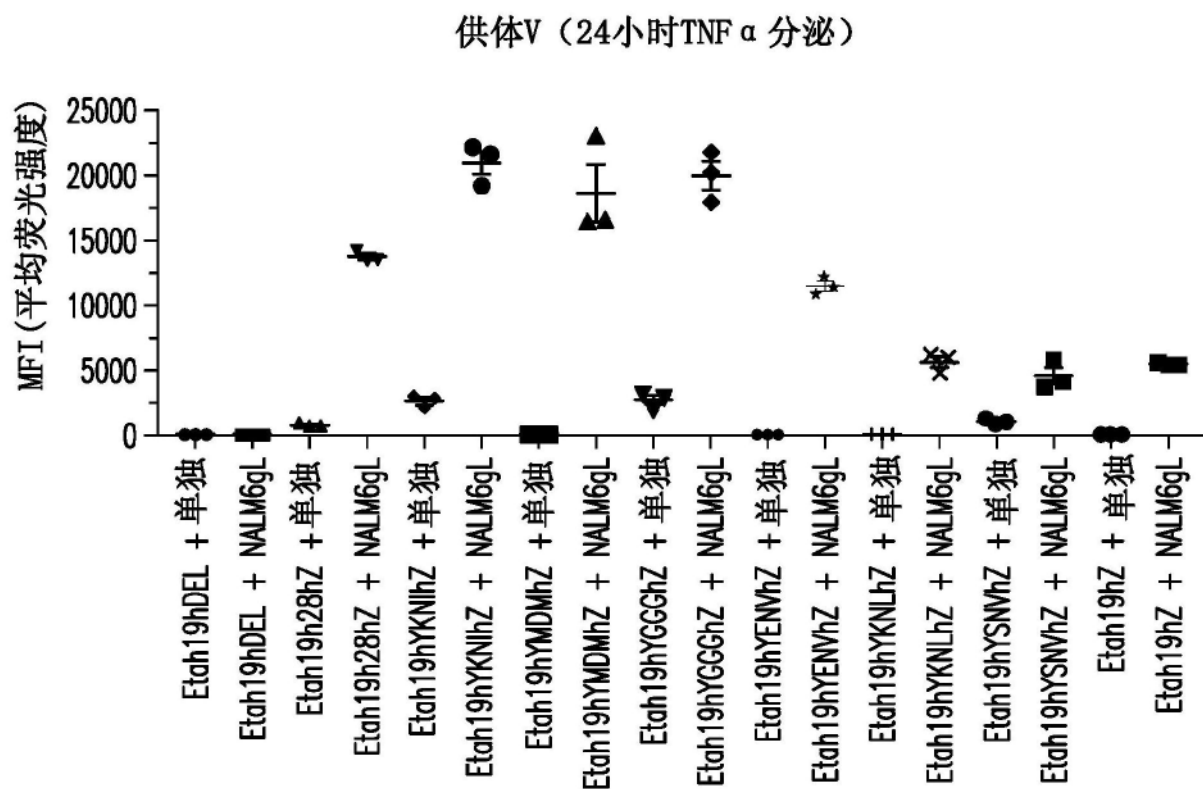


图4G

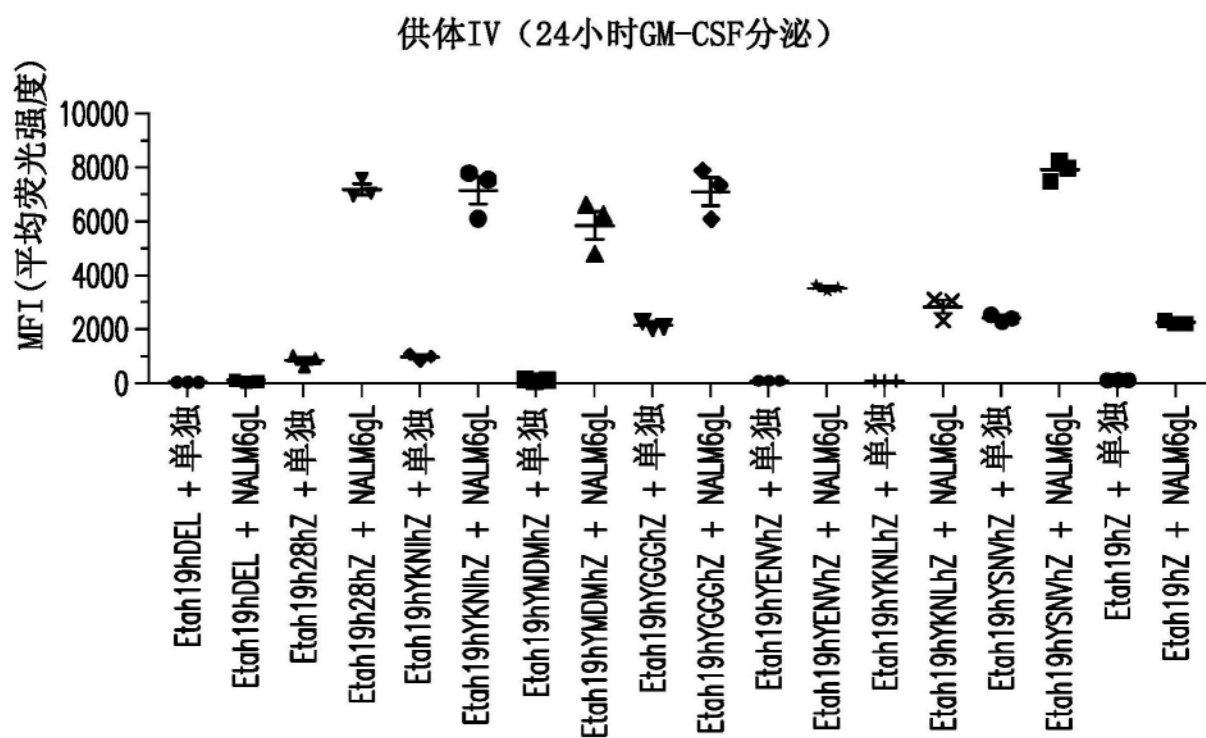


图4H

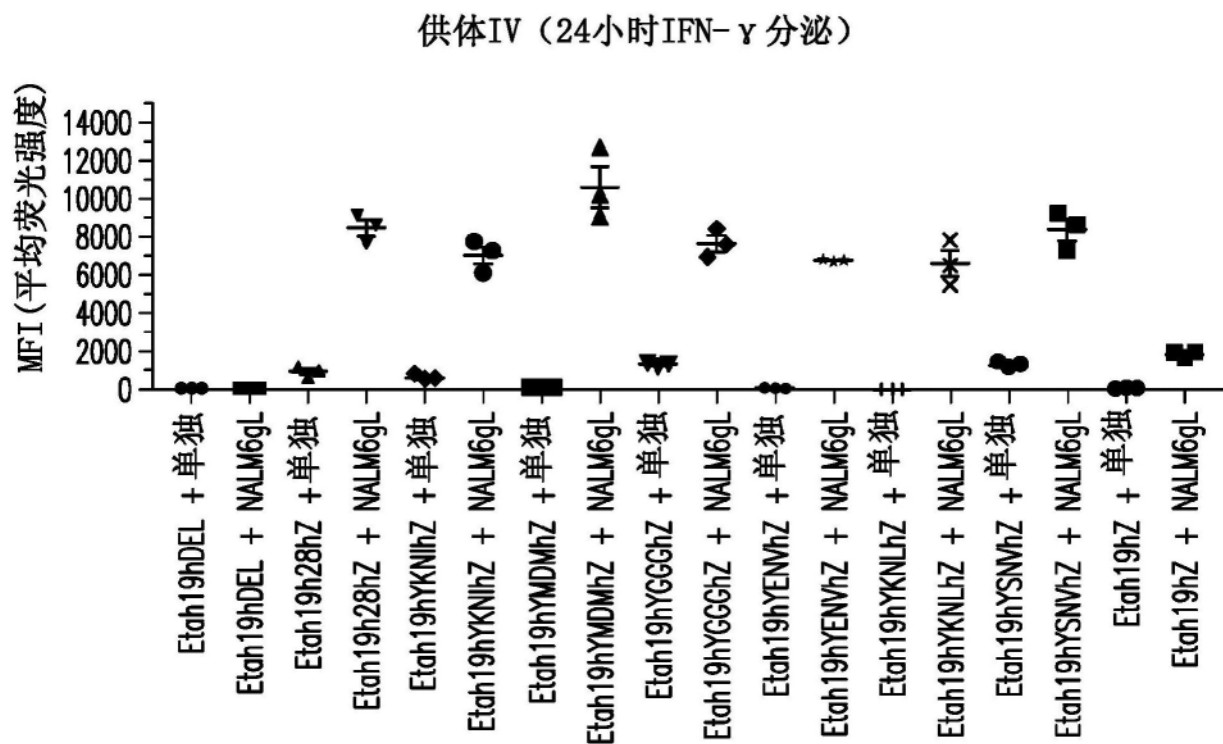


图4I

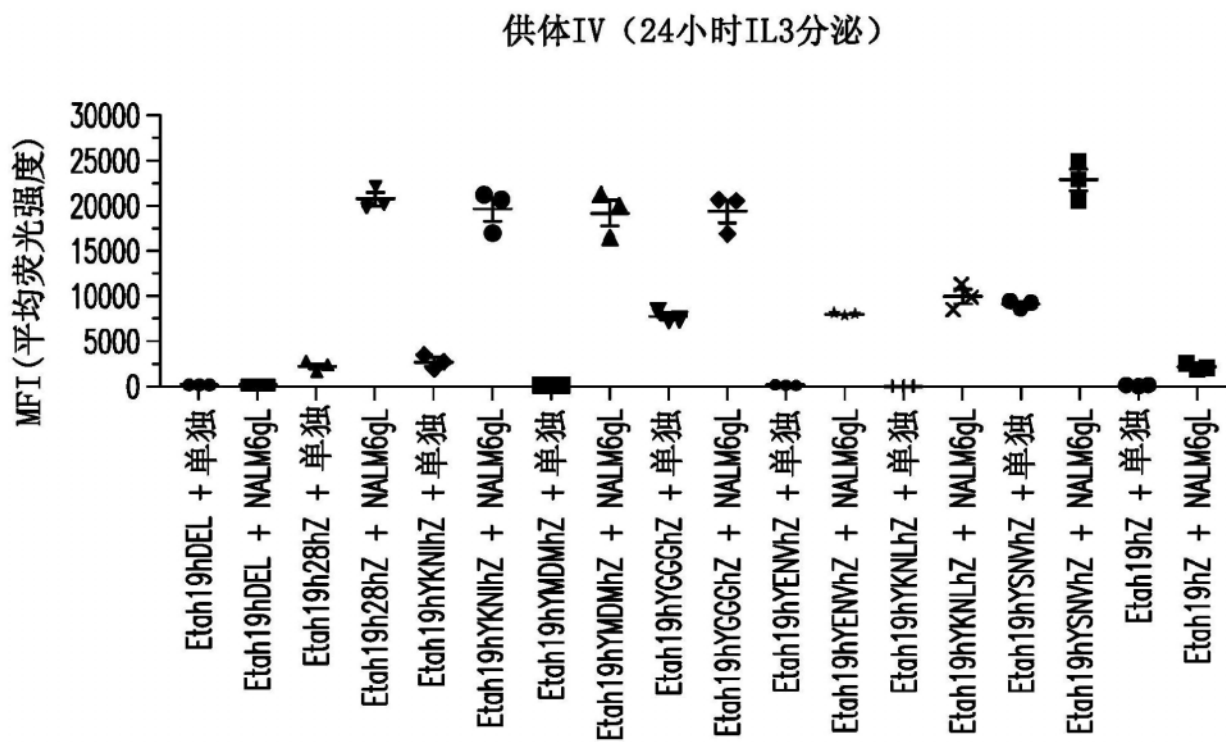


图4J

供体IV (24小时IL17分泌)

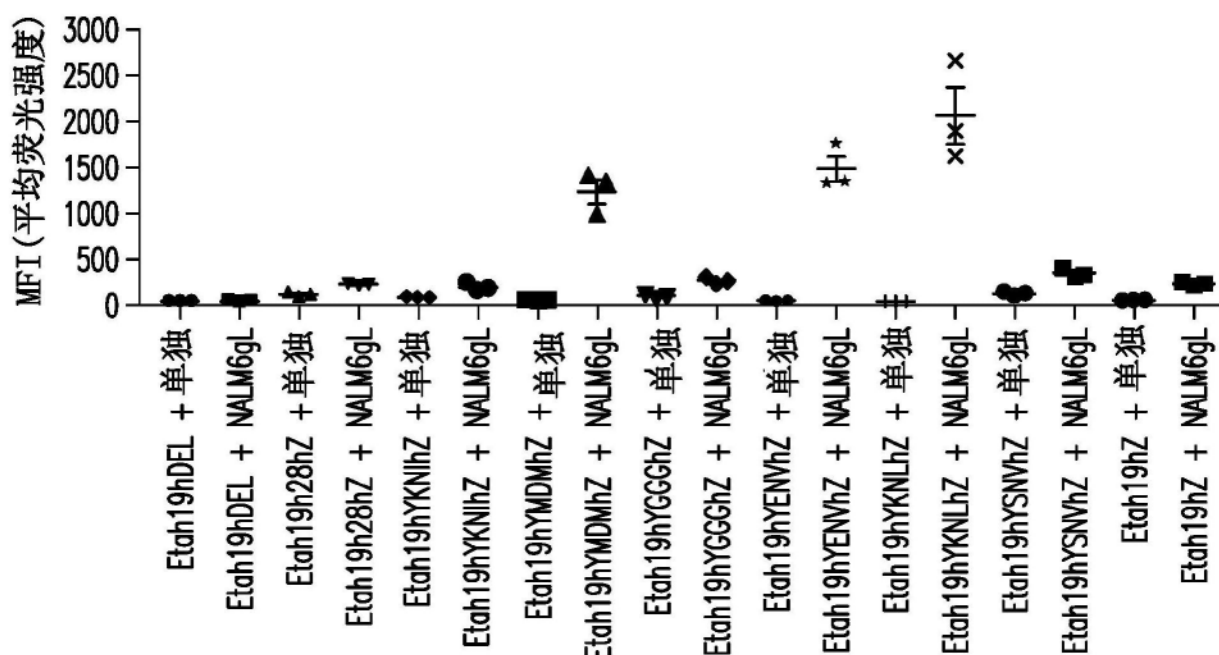


图4K

供体IV (24小时IL9分泌)

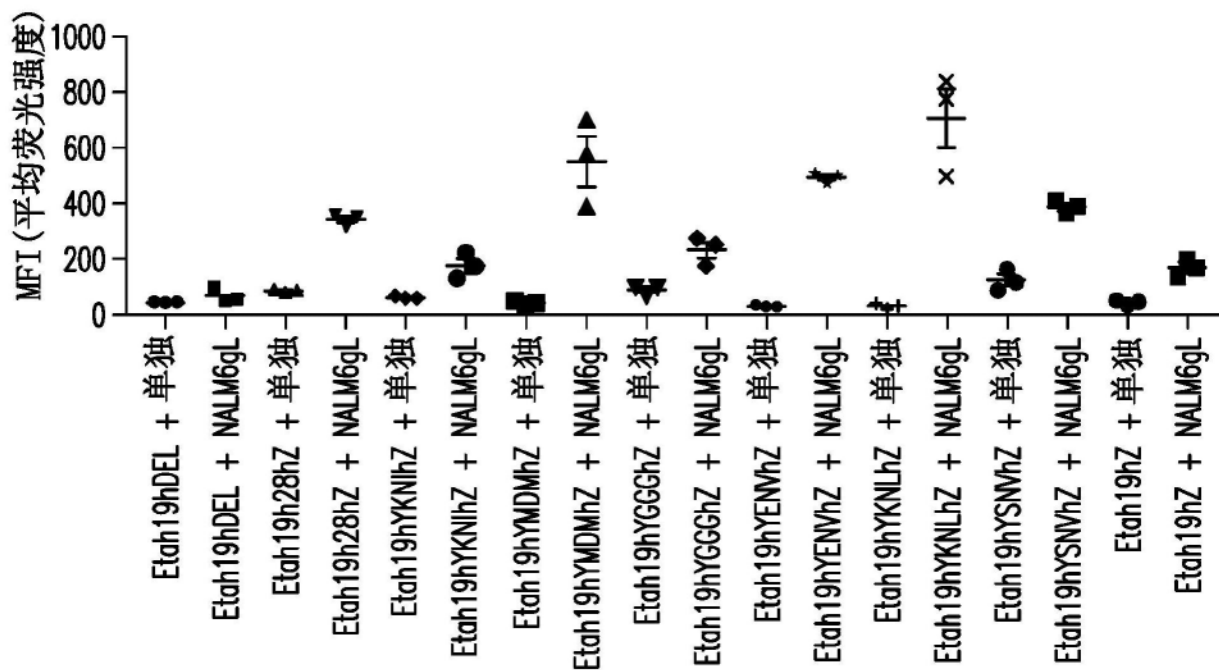


图4L

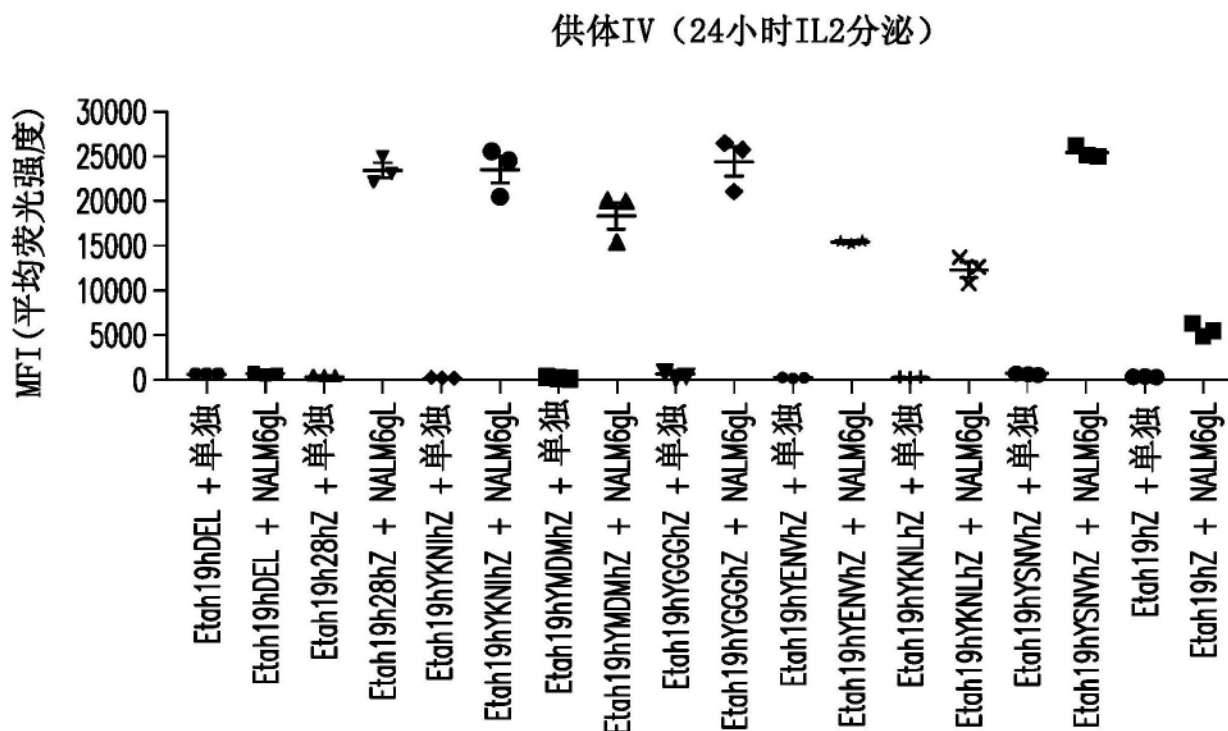


图4M

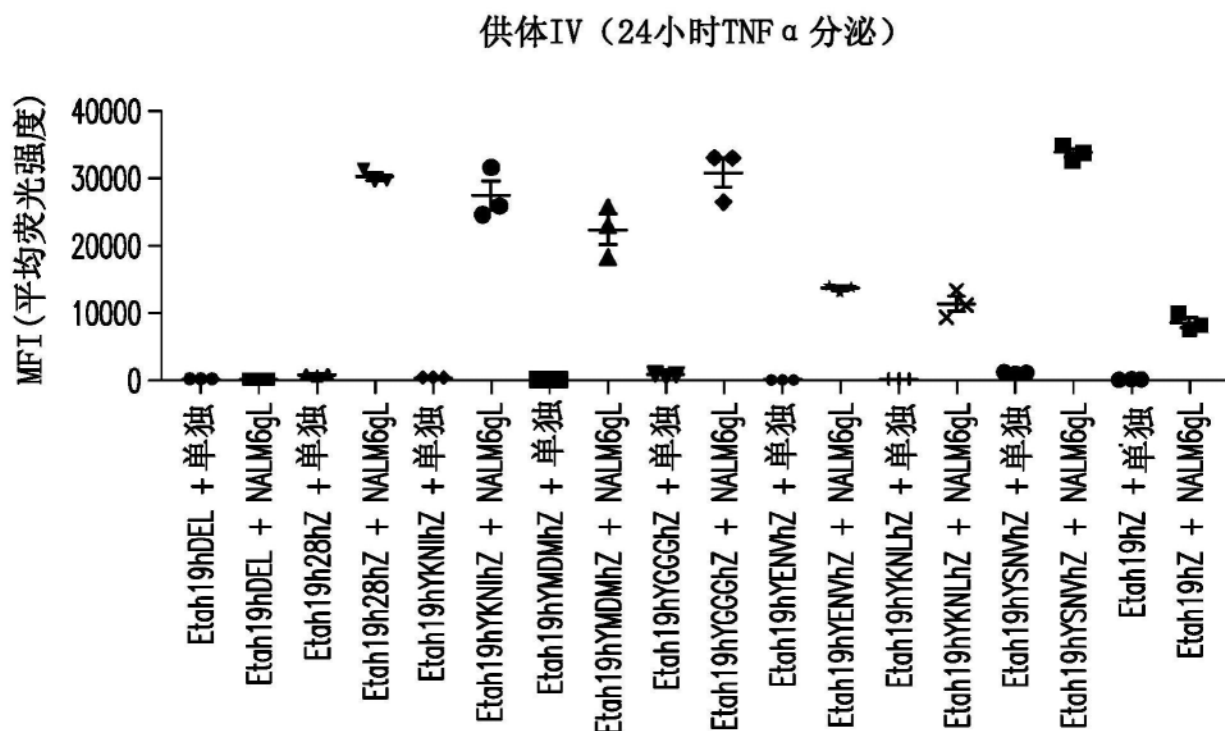


图4N

递归刺激下的CAR T细胞增殖

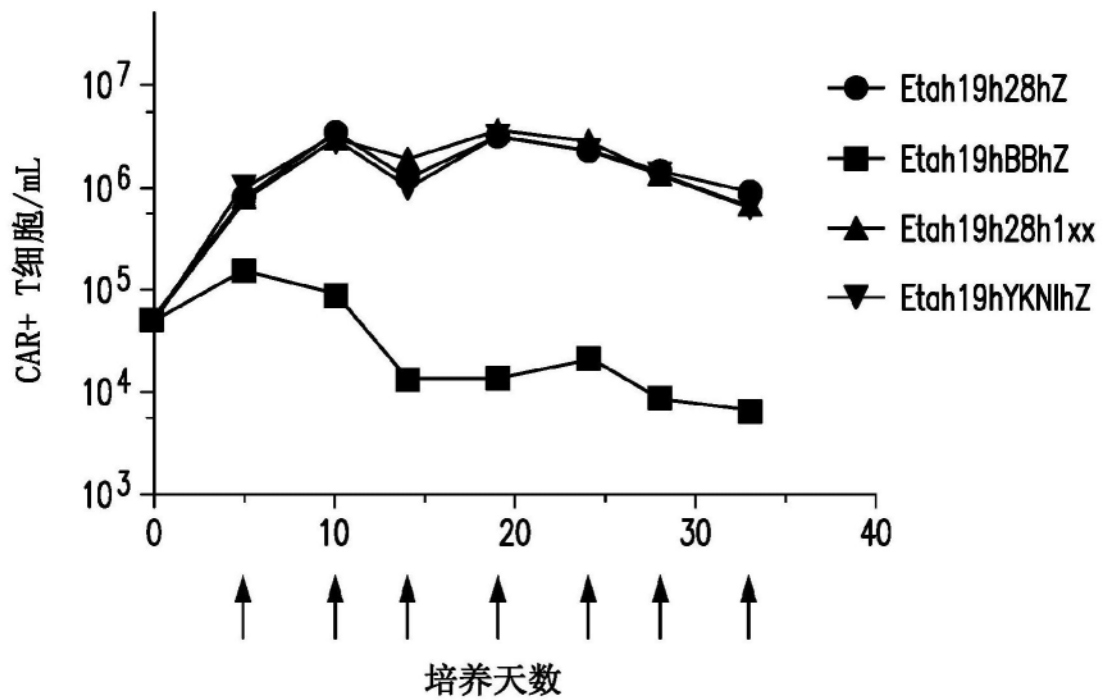


图5

递归刺激下的CD62L+记忆CAR T细胞的比例

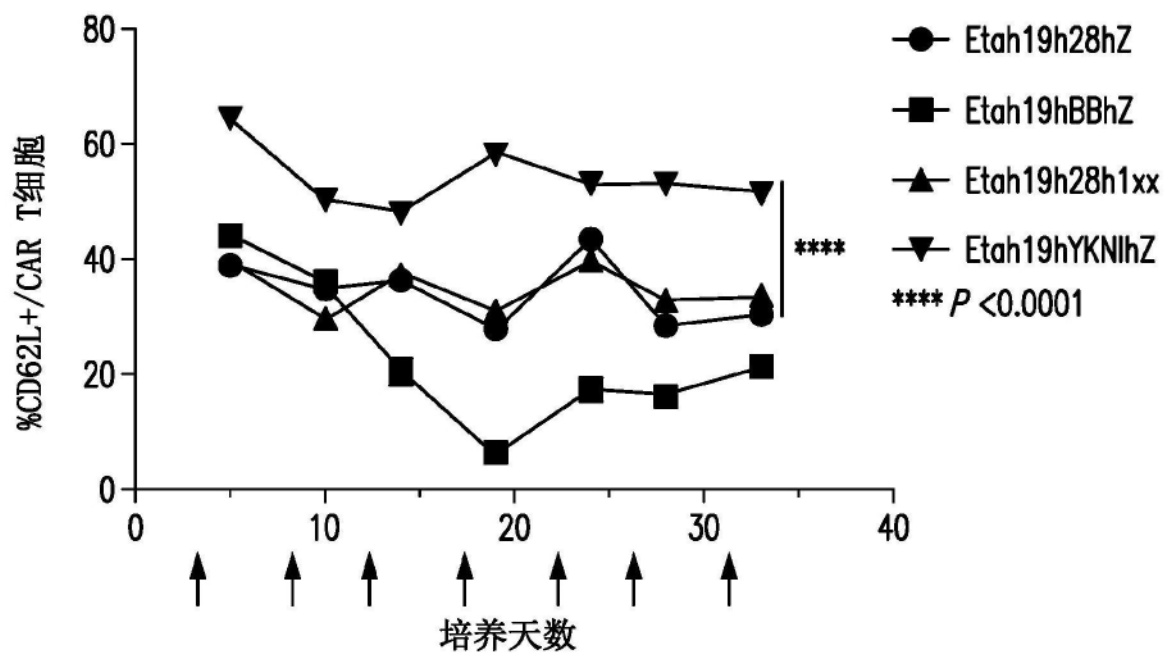


图6

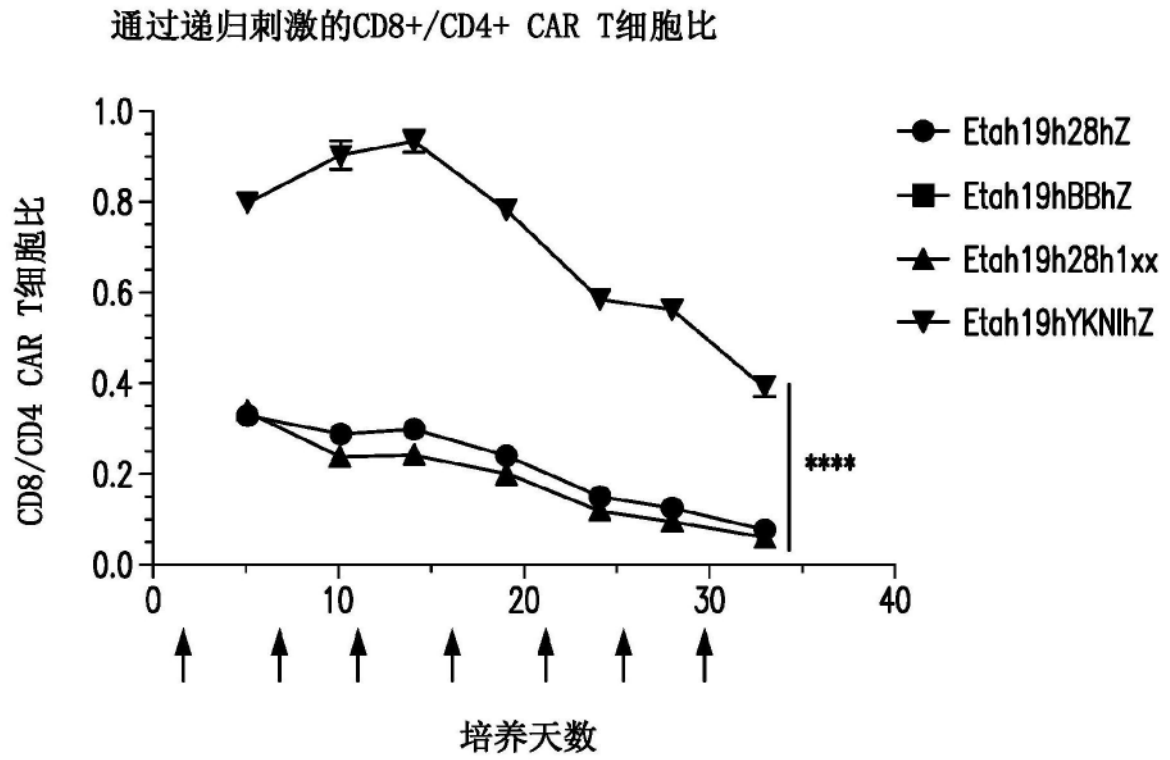


图7

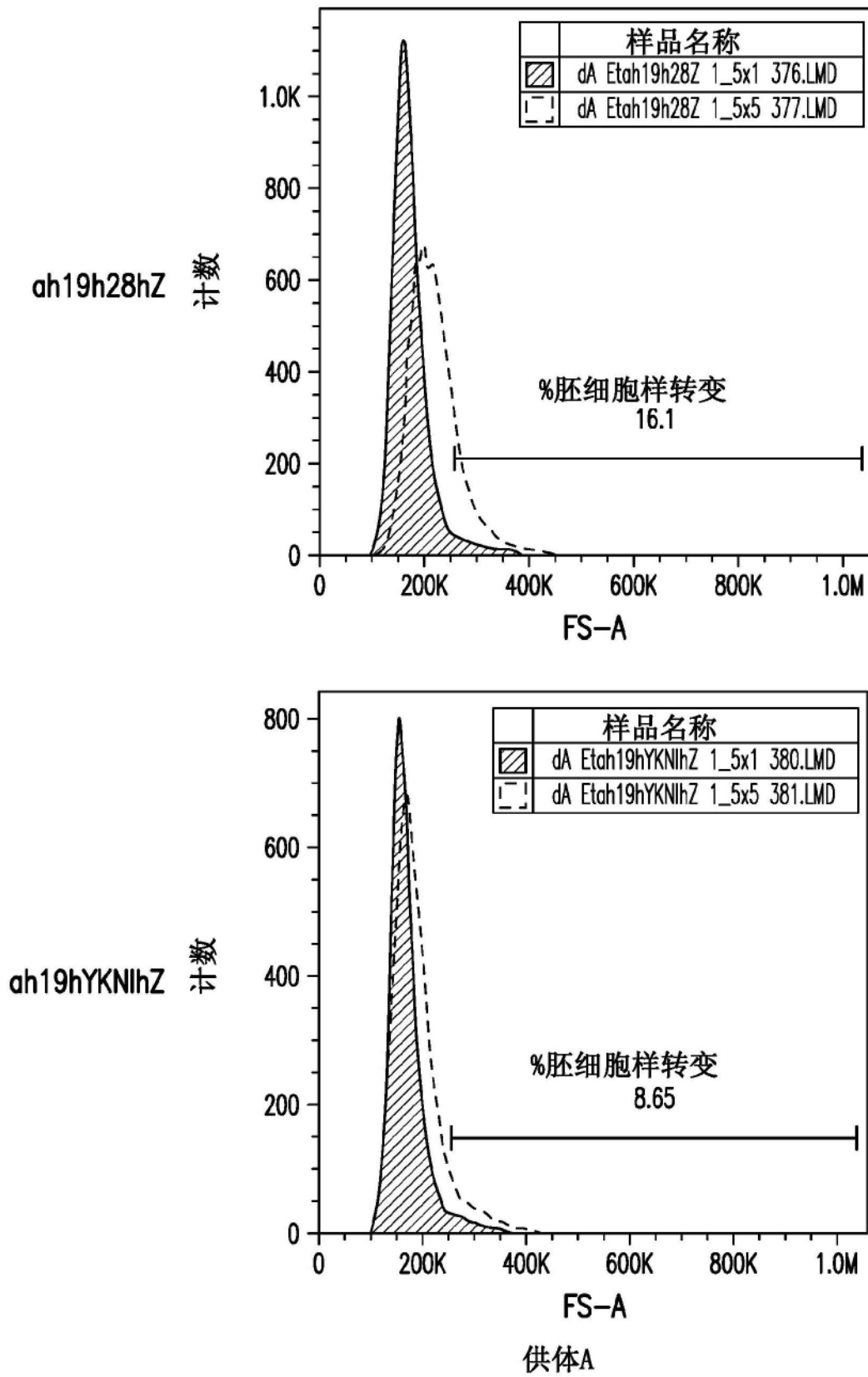


图8

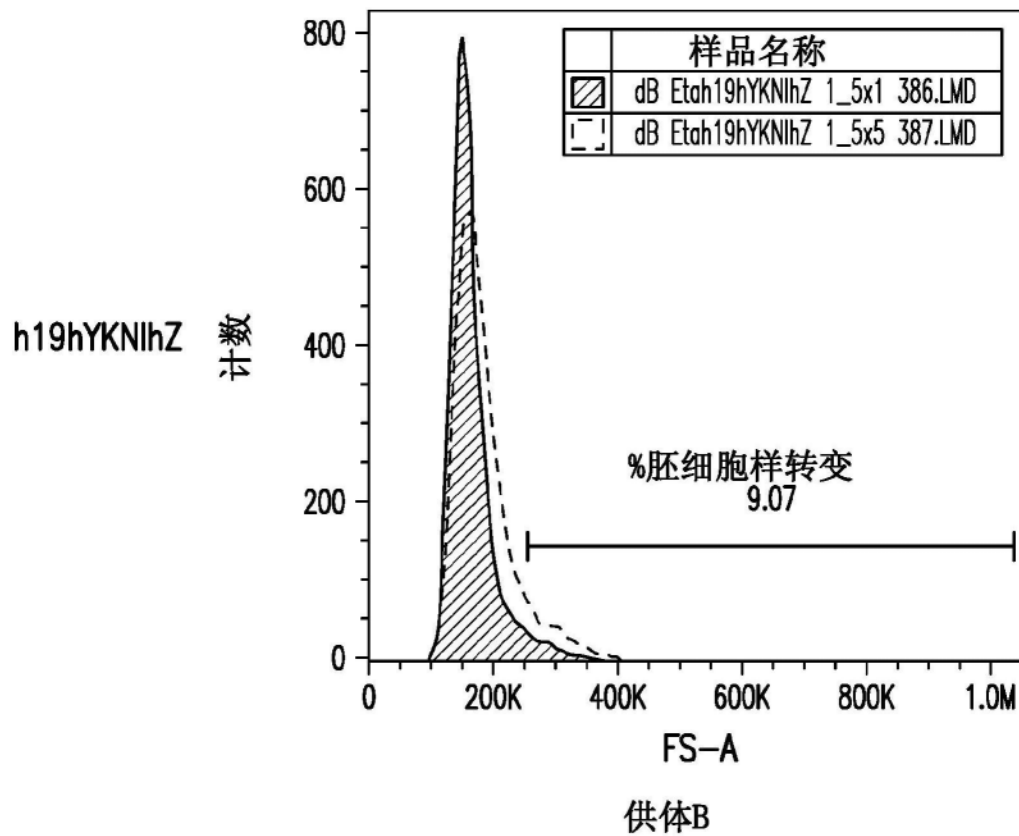
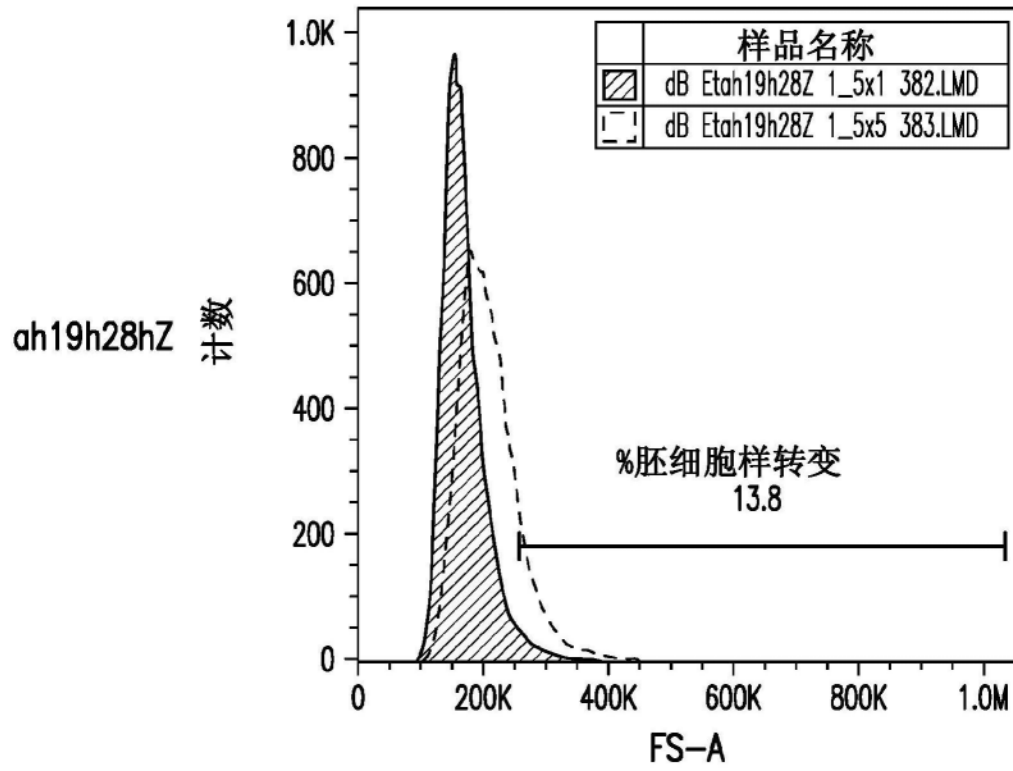


图8续

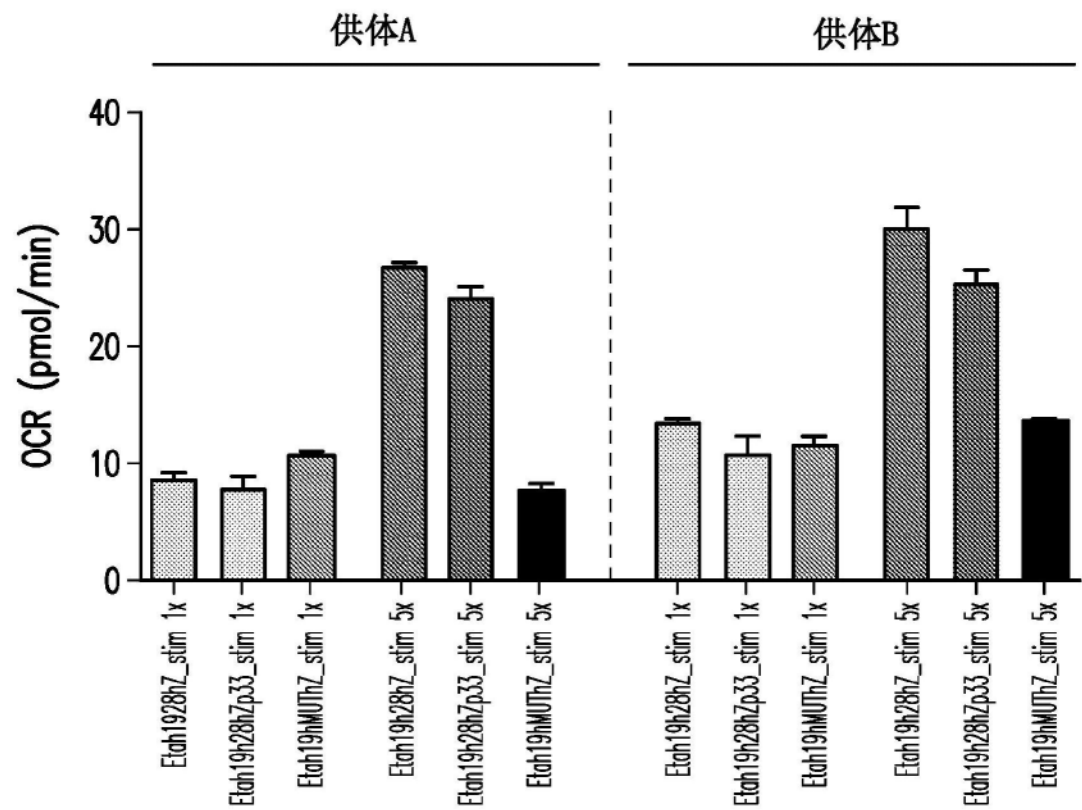


图9A

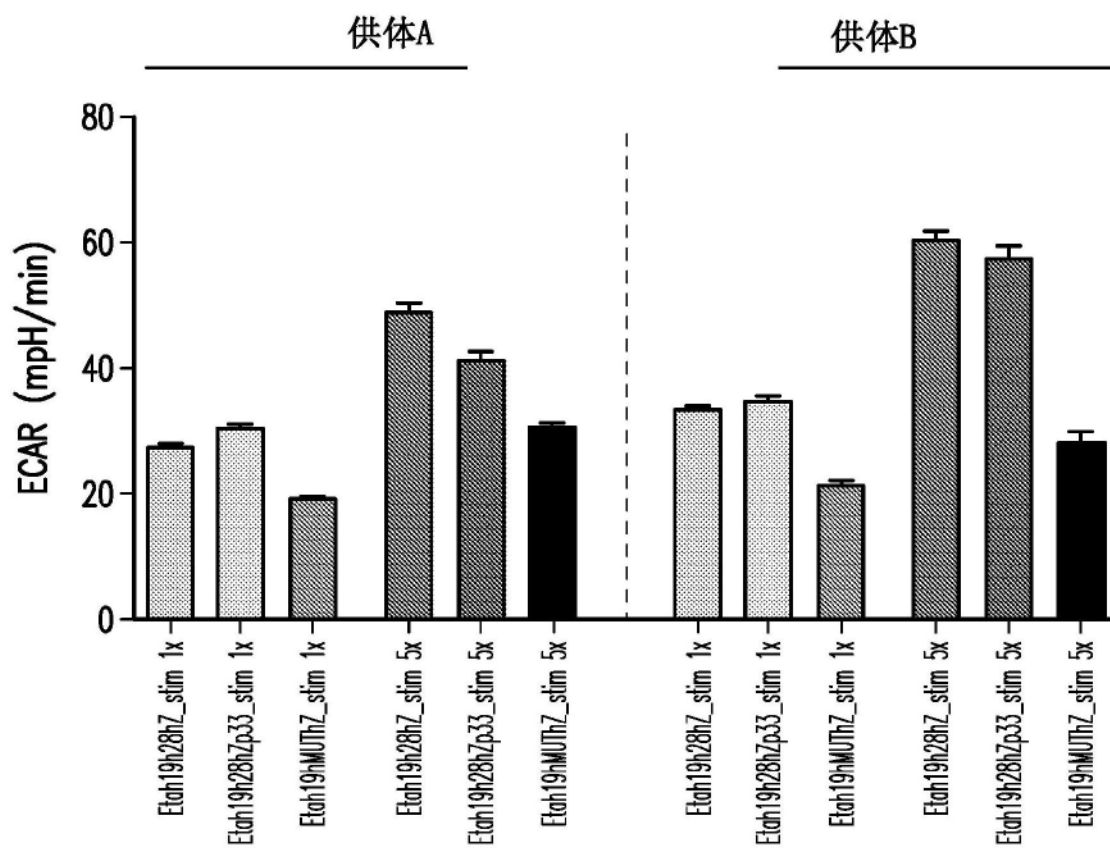


图9B

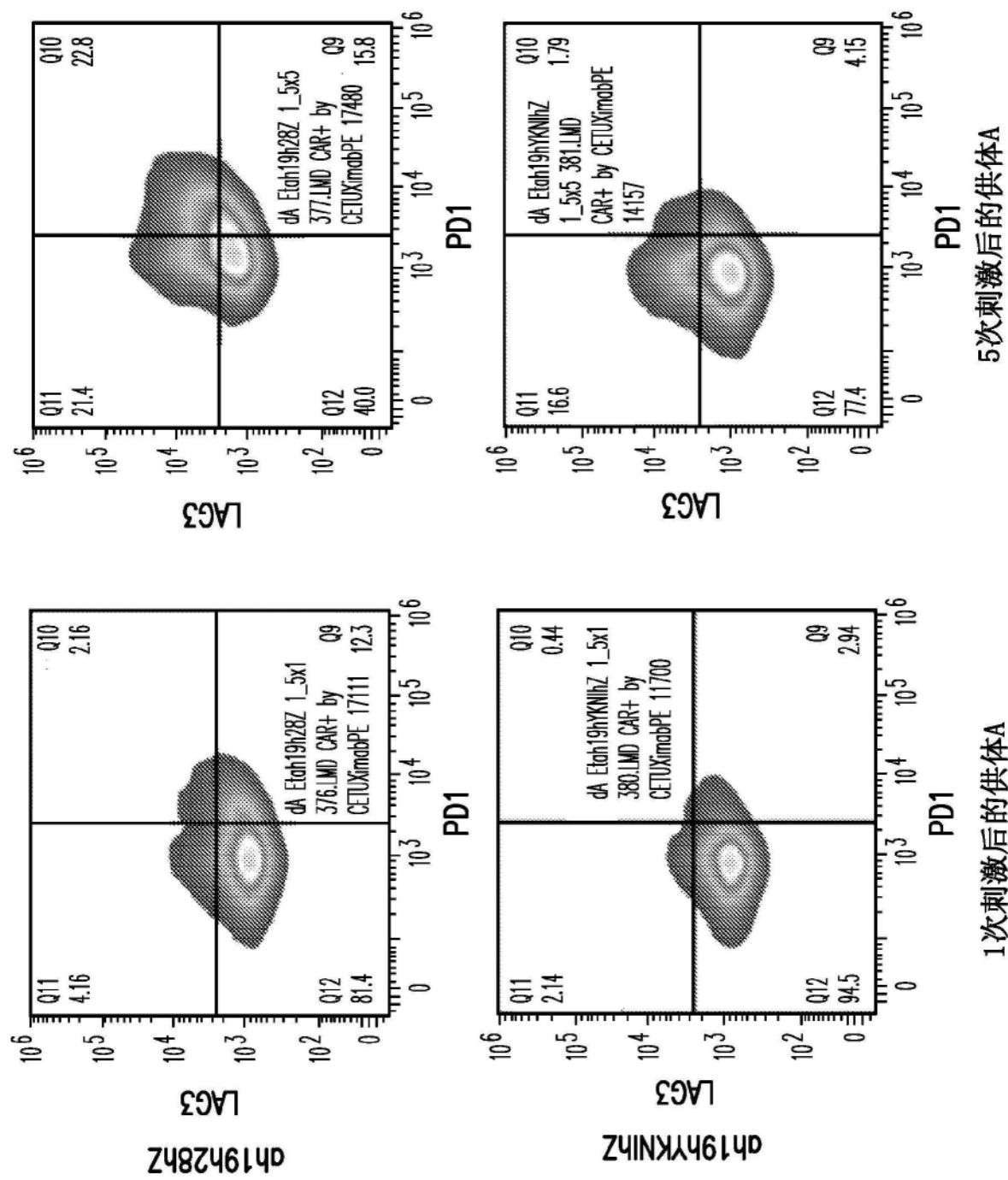


图10A

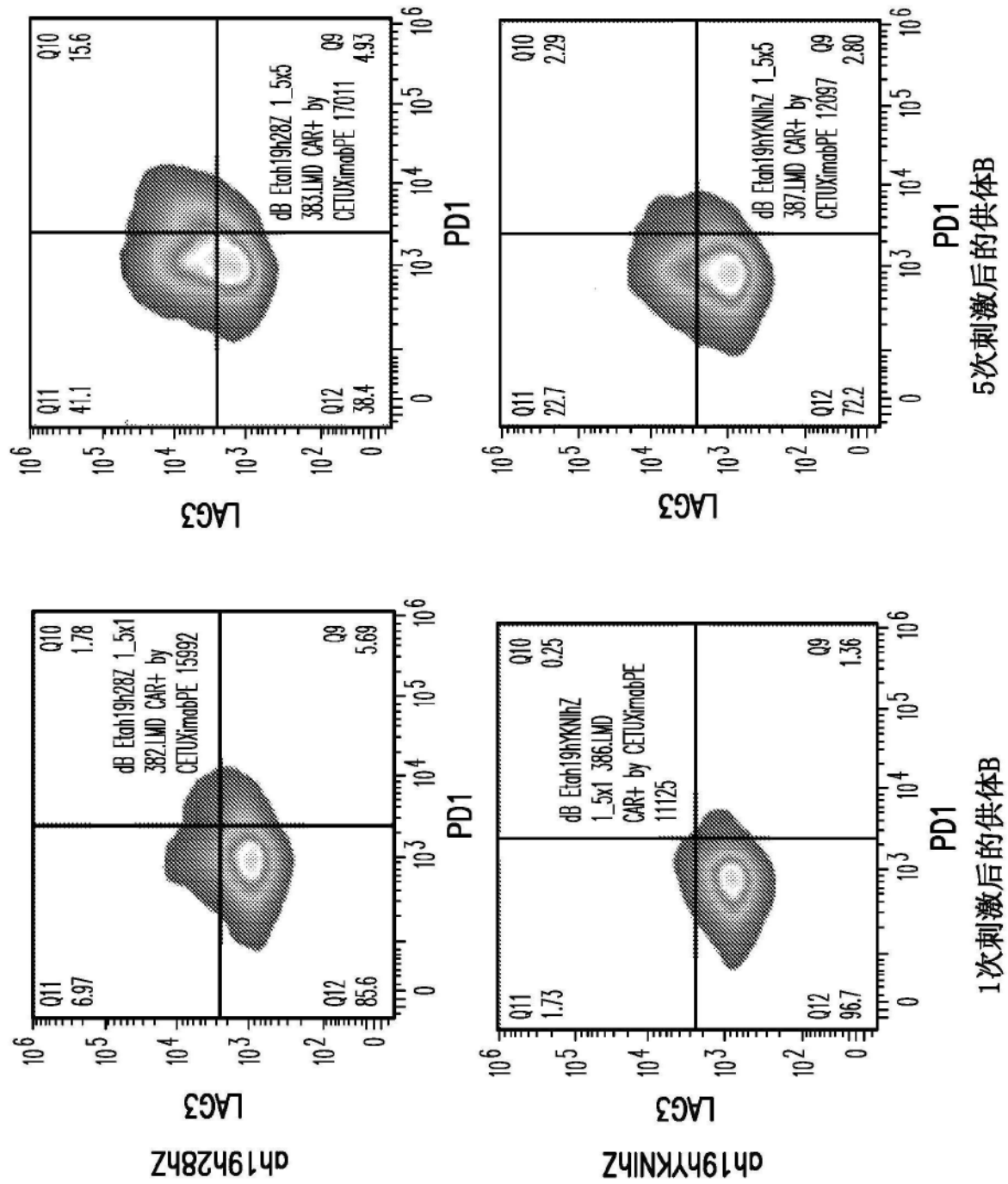


图10A续

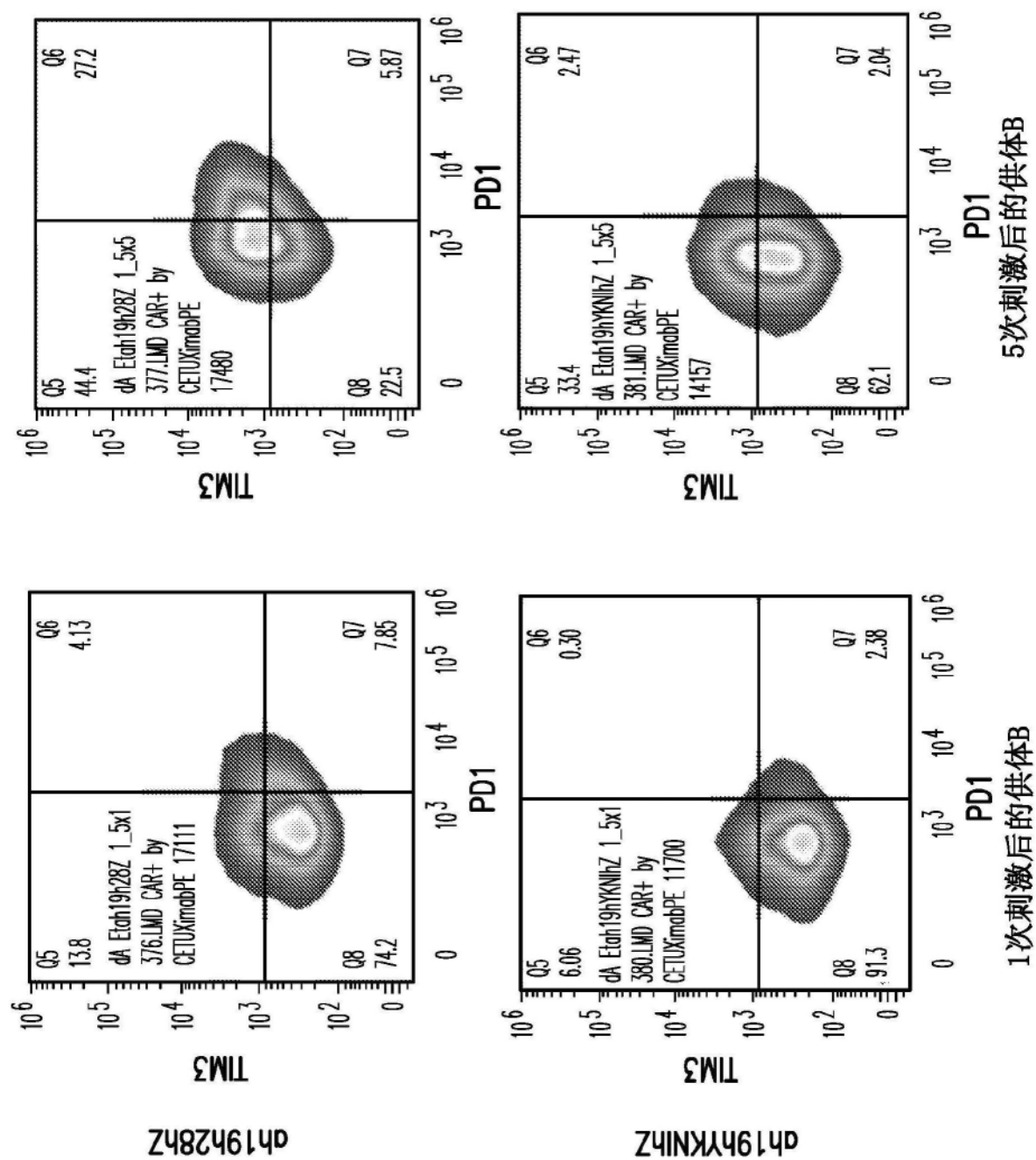


图10B

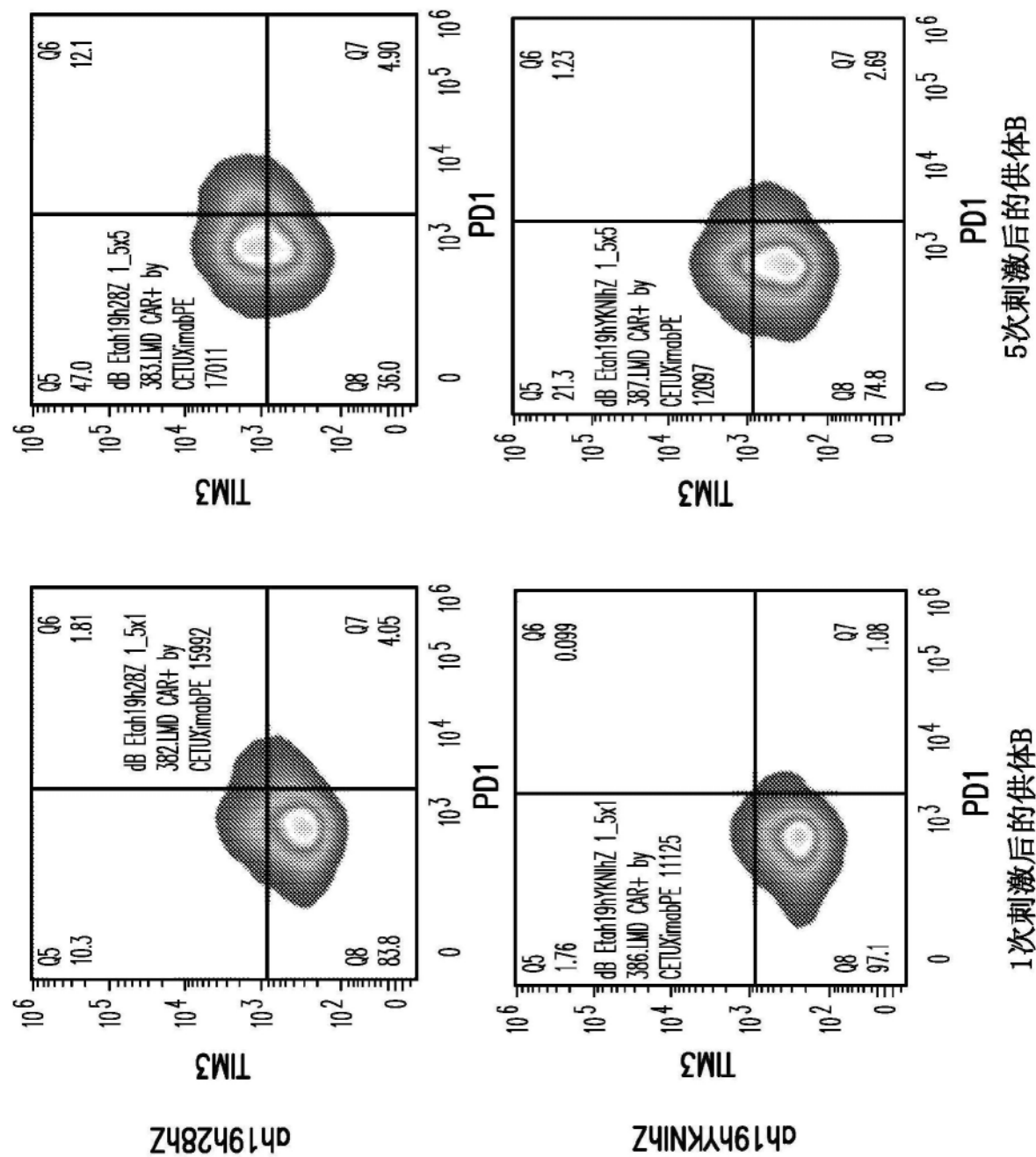
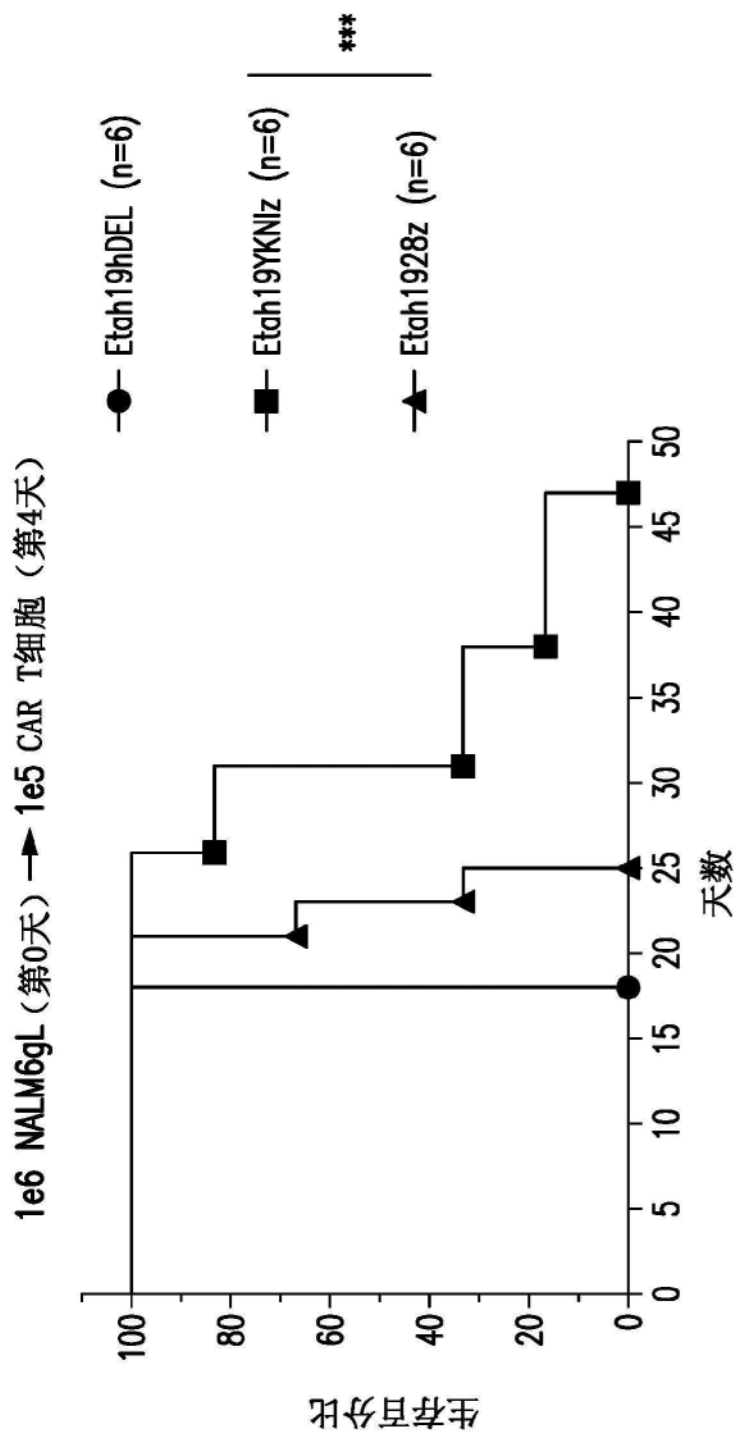


图10B续



|       |                   |                 |                  |
|-------|-------------------|-----------------|------------------|
|       | Etah19YKN1z (n=6) | Etah1928z (n=6) | Etah19hDEL (n=6) |
| 中位生存期 | 31                | 23              | 18               |

|              |         |
|--------------|---------|
| P值           | <0.0001 |
| P值总结         | ****    |
| 生存曲线有显著性差异吗? | 是       |

图11

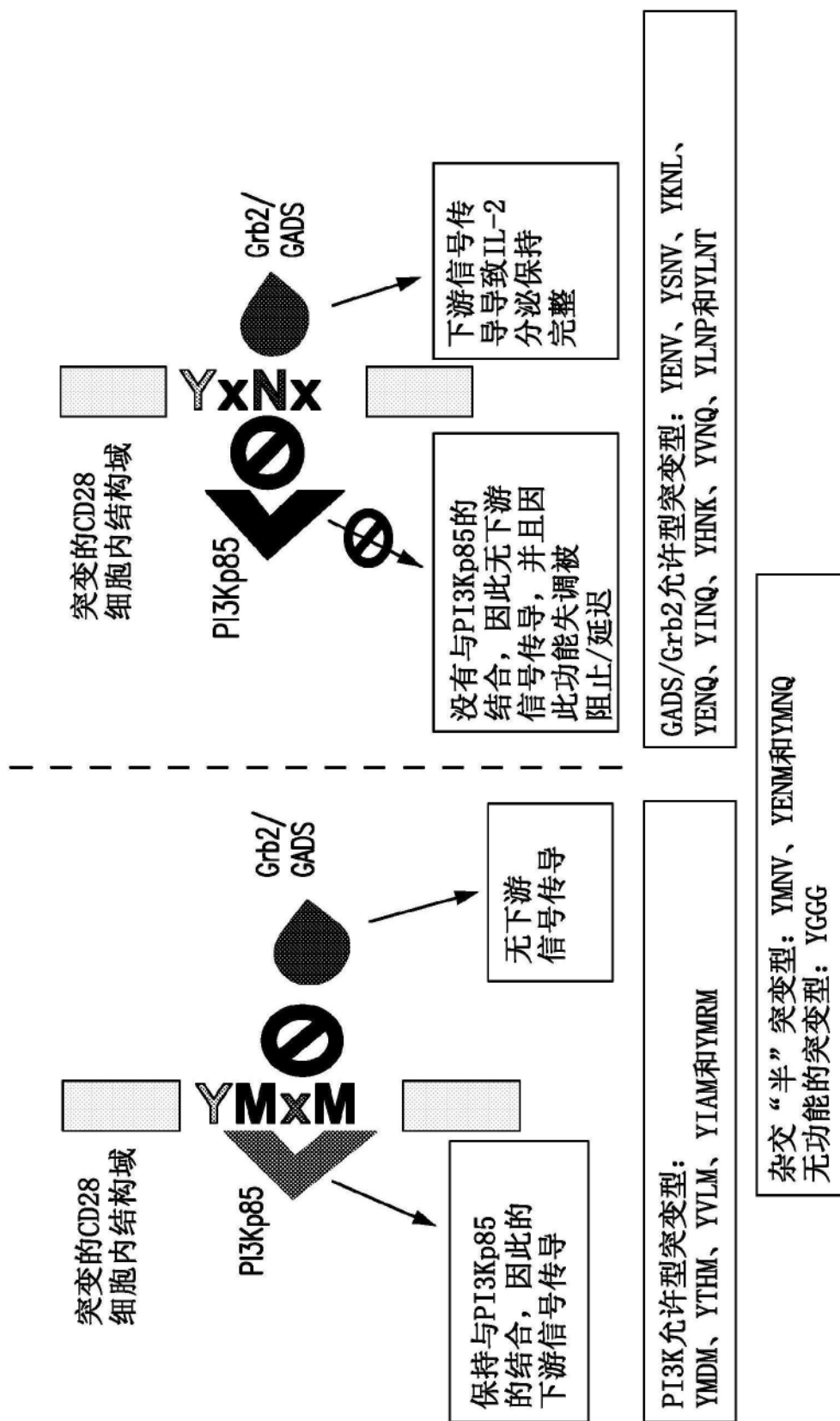


图12

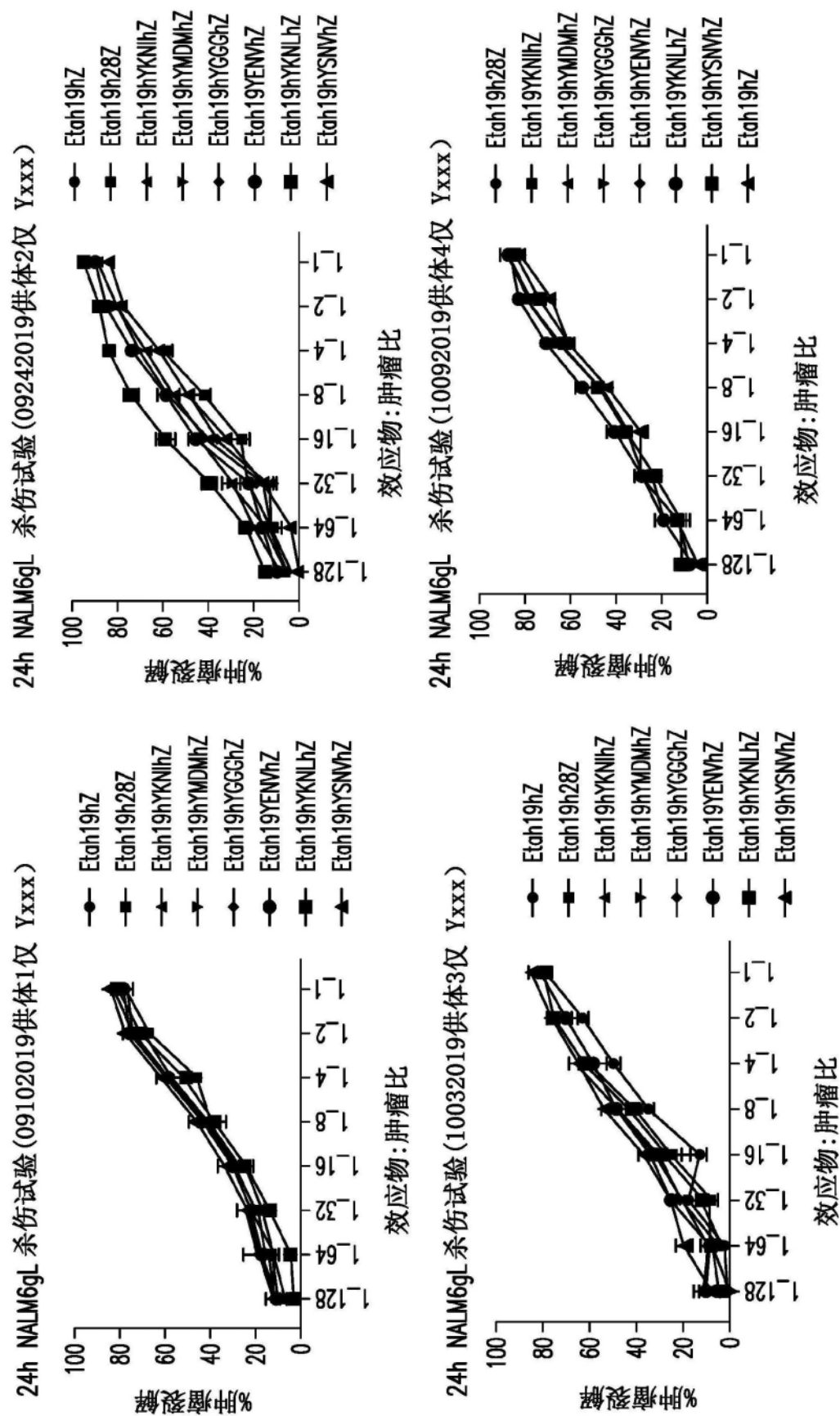


图13

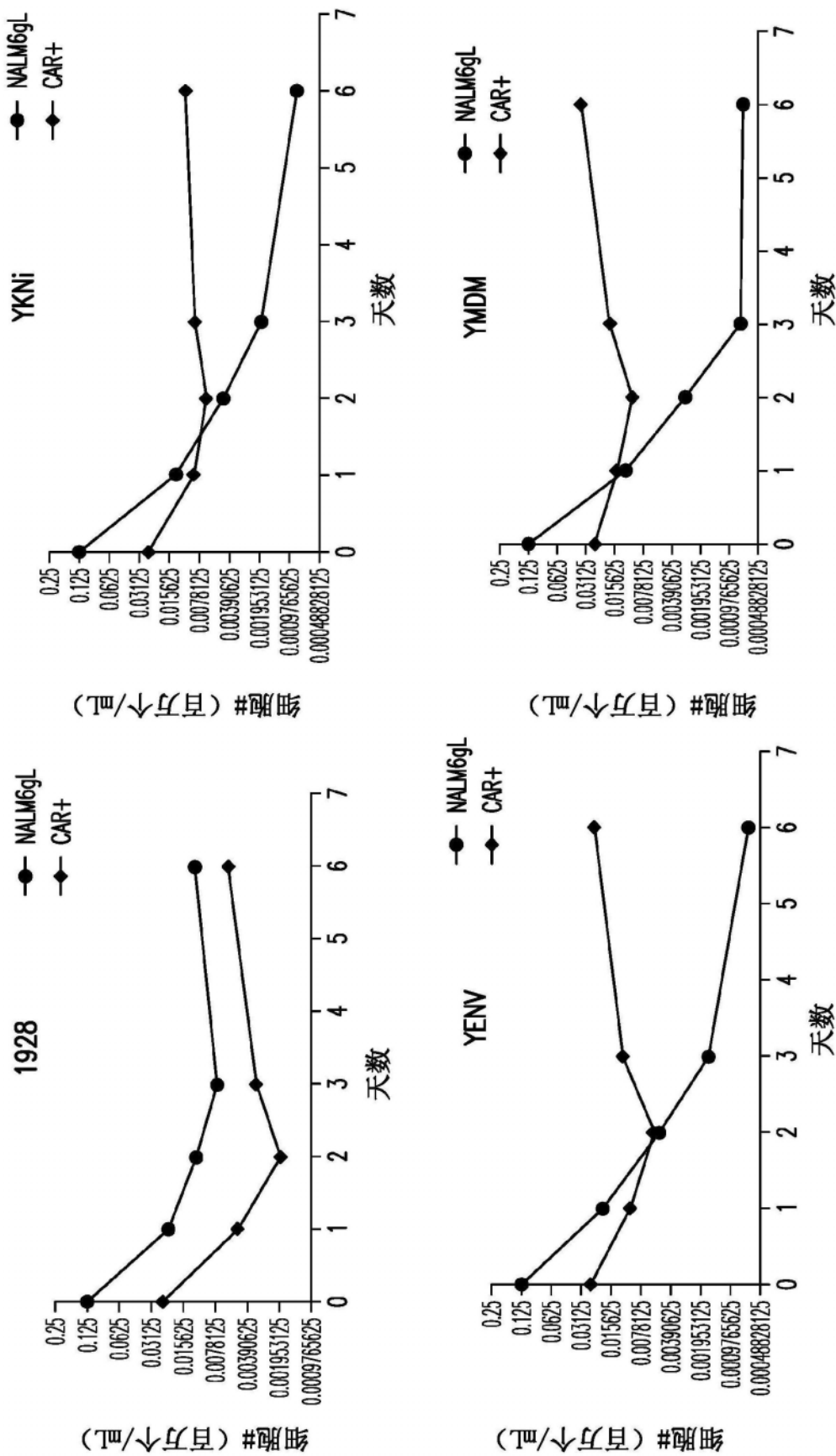


图14

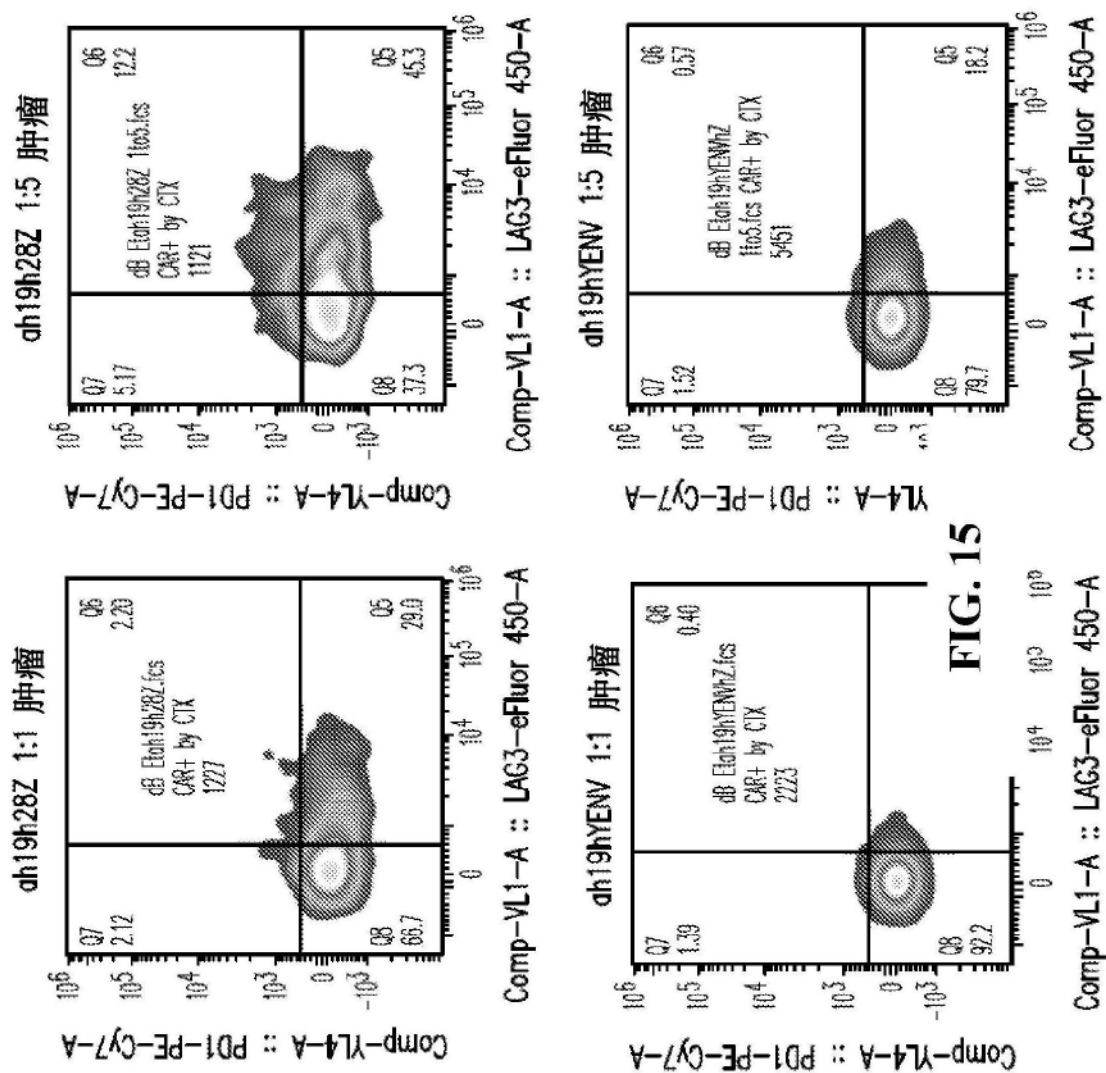


图15

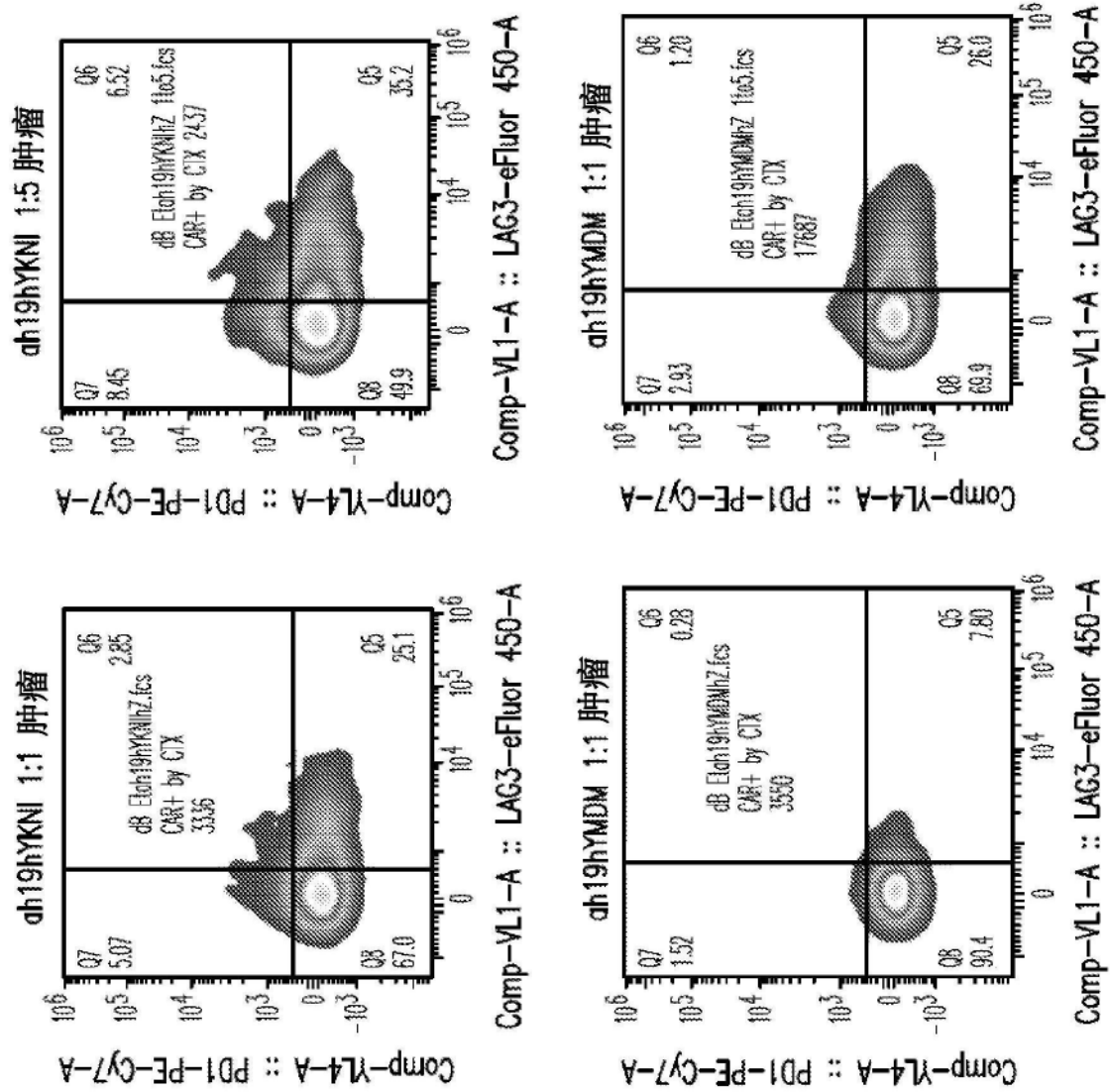


图15续

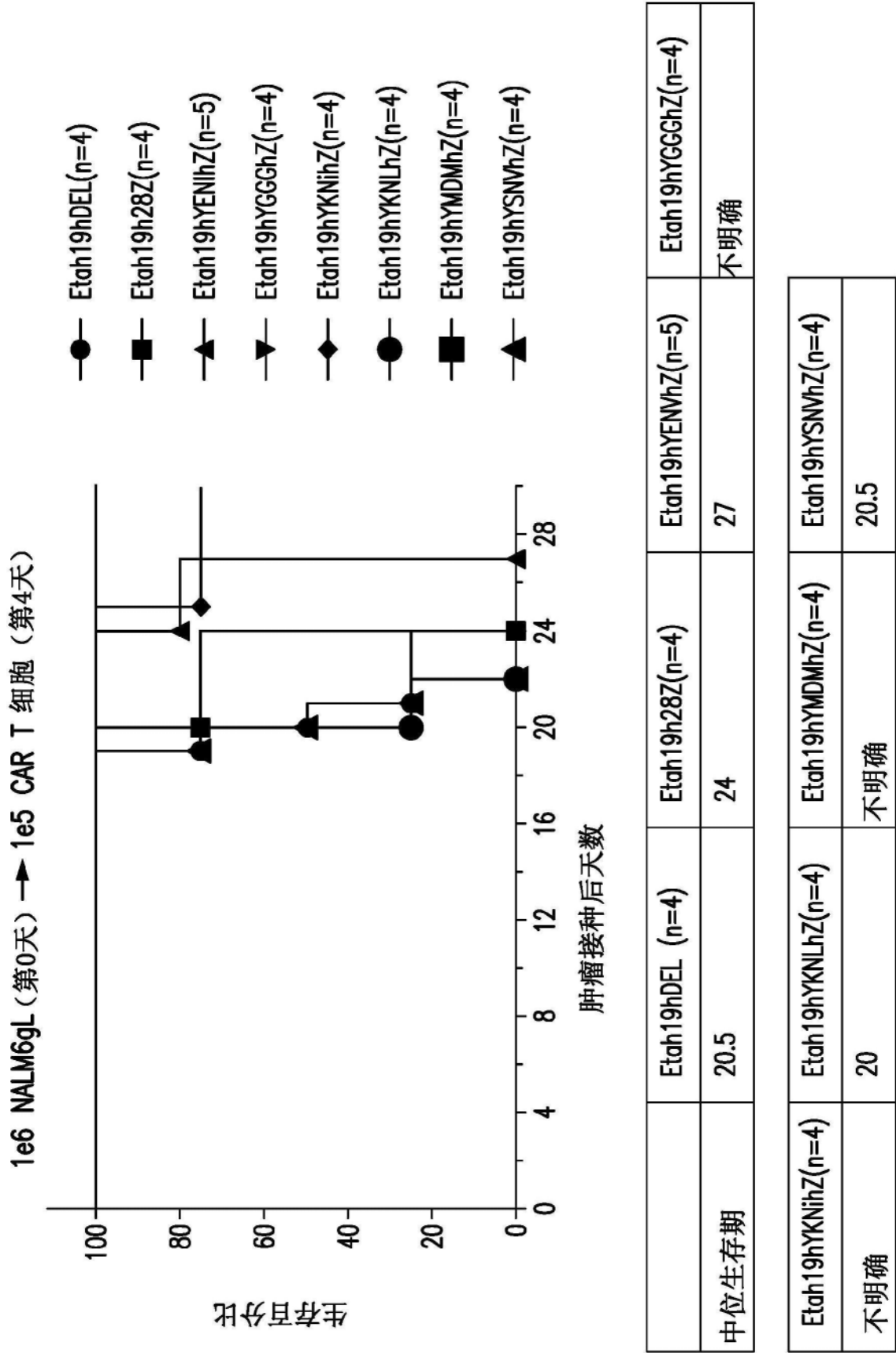
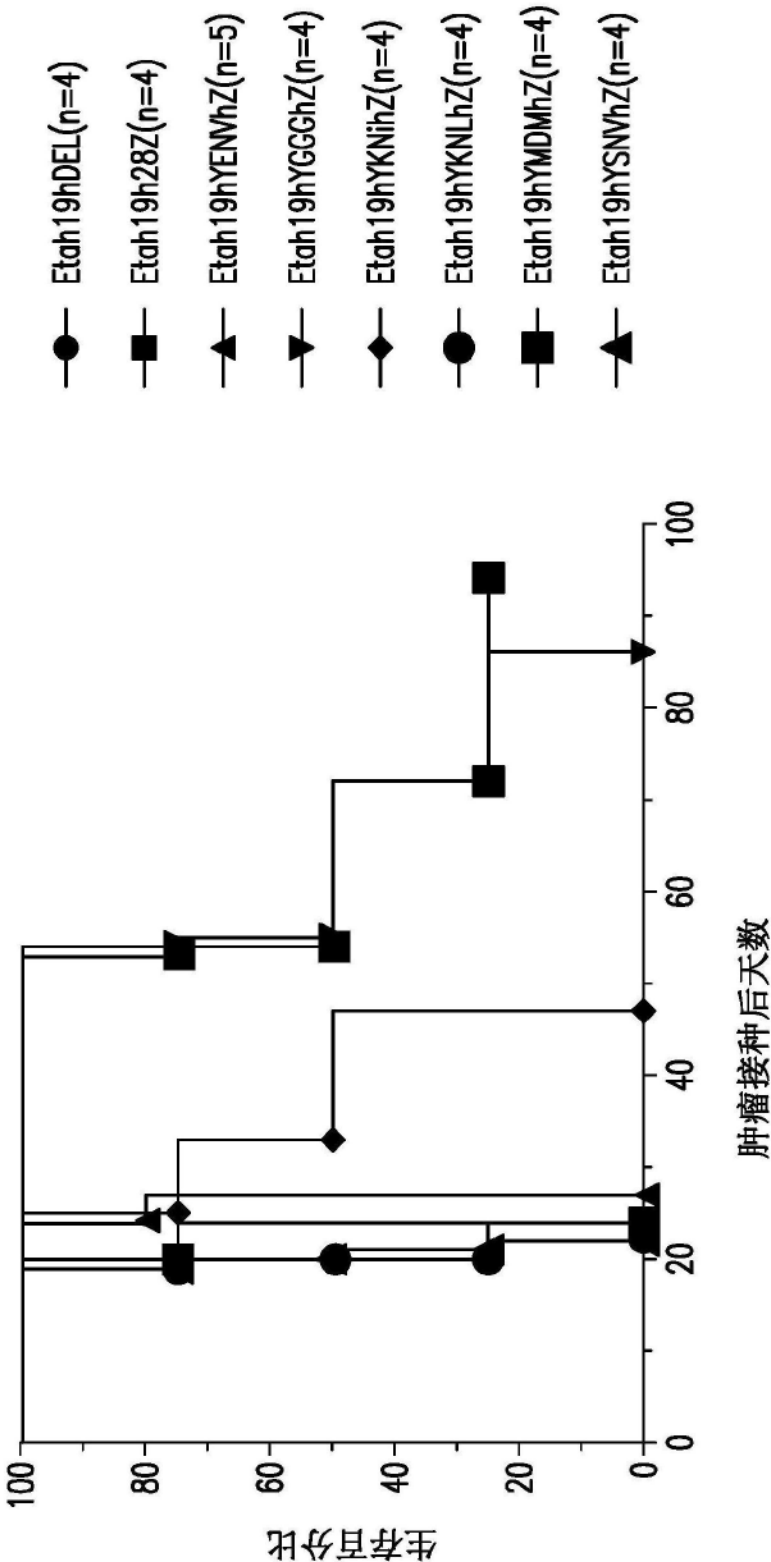


图16

生存比例: 20191018 NALM6gL Yxxx仅UTD的生存



|       |                  |                  |                     |                     |
|-------|------------------|------------------|---------------------|---------------------|
|       | Etah19hDEL (n=4) | Etah19h28Z (n=4) | Etah19hYENVhZ (n=5) | Etah19hYGGGhZ (n=4) |
| 中位生存期 | 20.5             | 24               | 27                  | 63.5                |

|                     |                     |                     |                     |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Etah19hYKNihZ (n=4) | Etah19hYKNLhZ (n=4) | Etah19hYMDMhZ (n=4) | Etah19hYSNVhZ (n=4) |
| 40                  | 20                  | 63                  | 20.5                |

图17

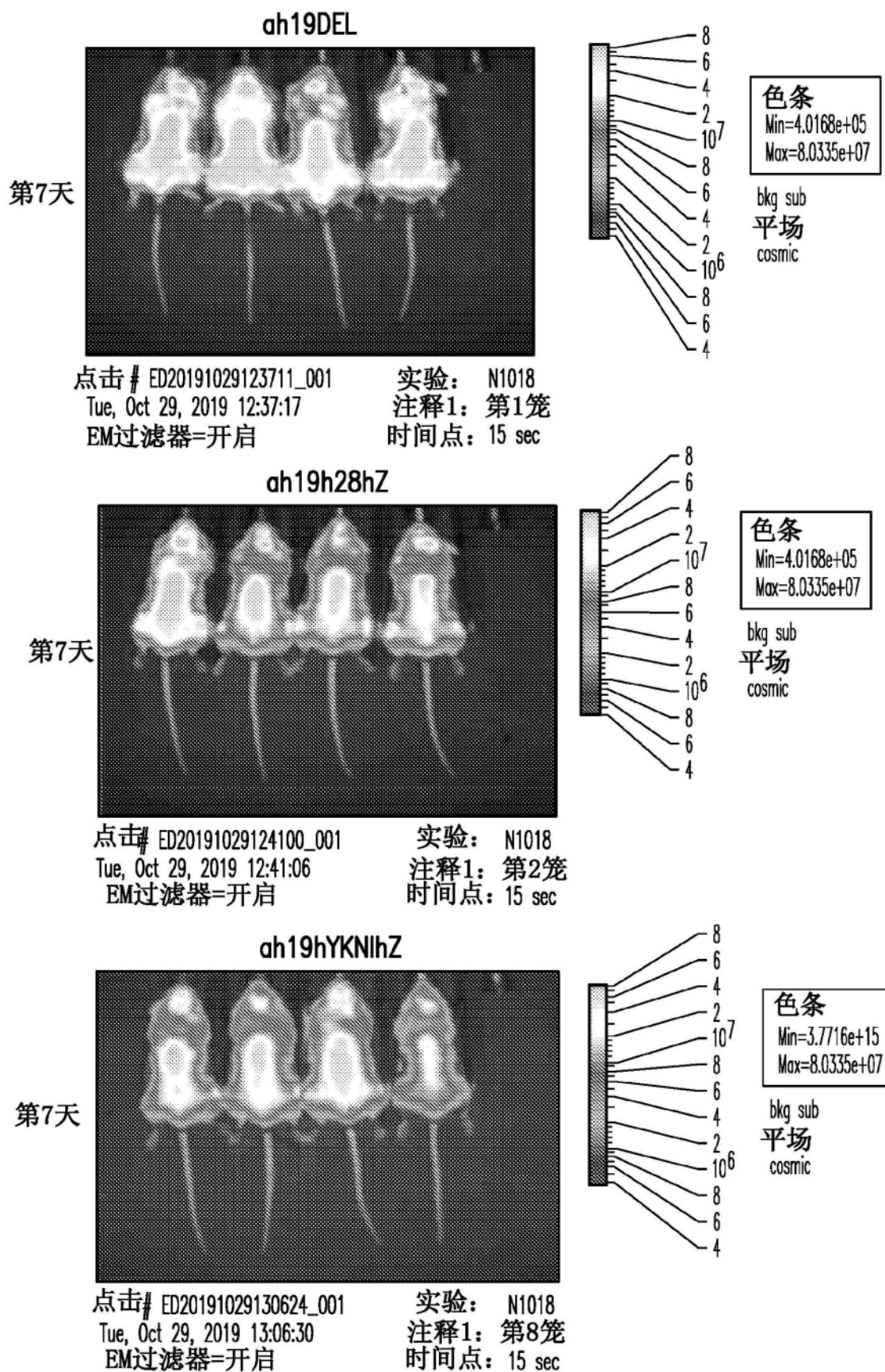
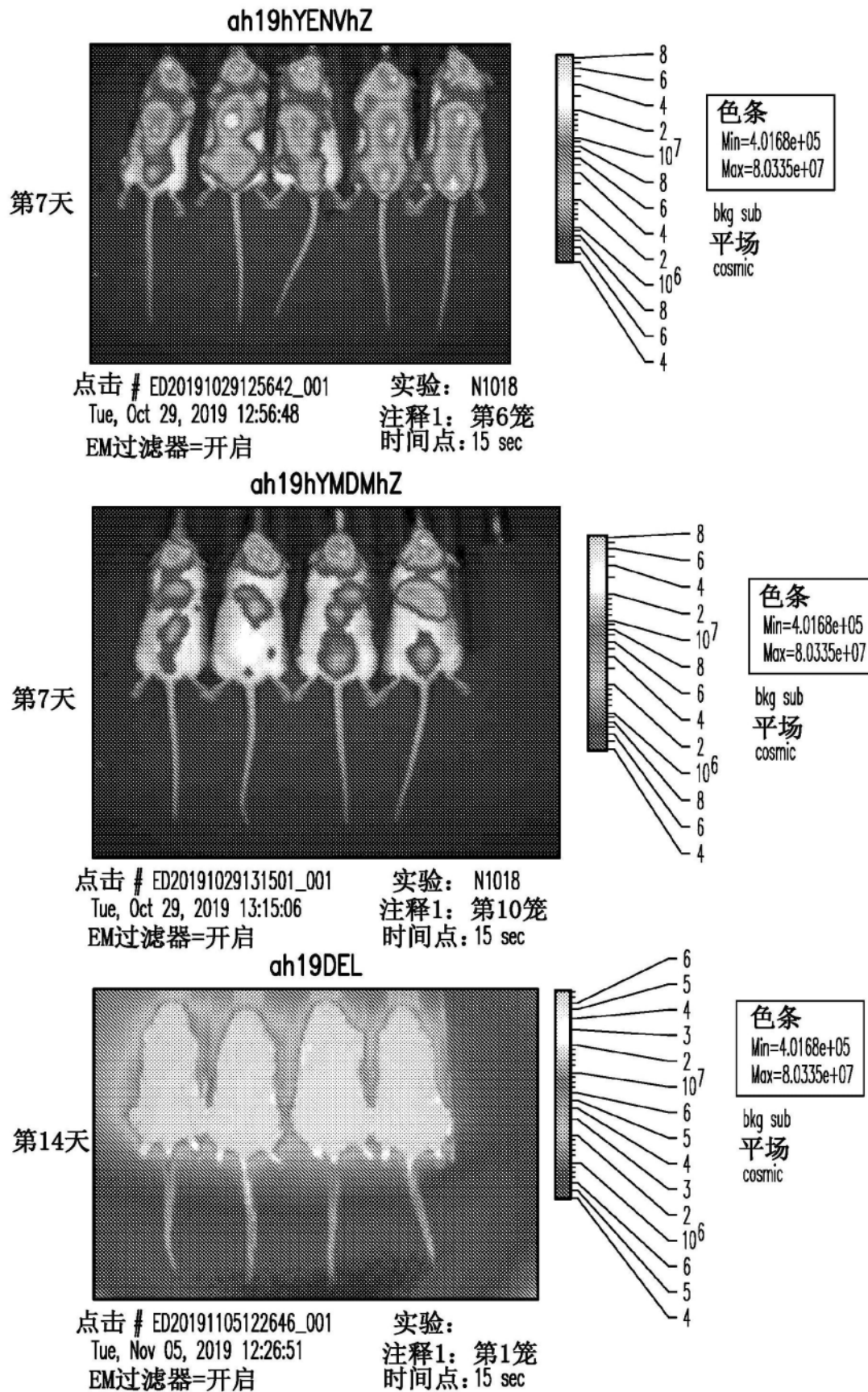


图18



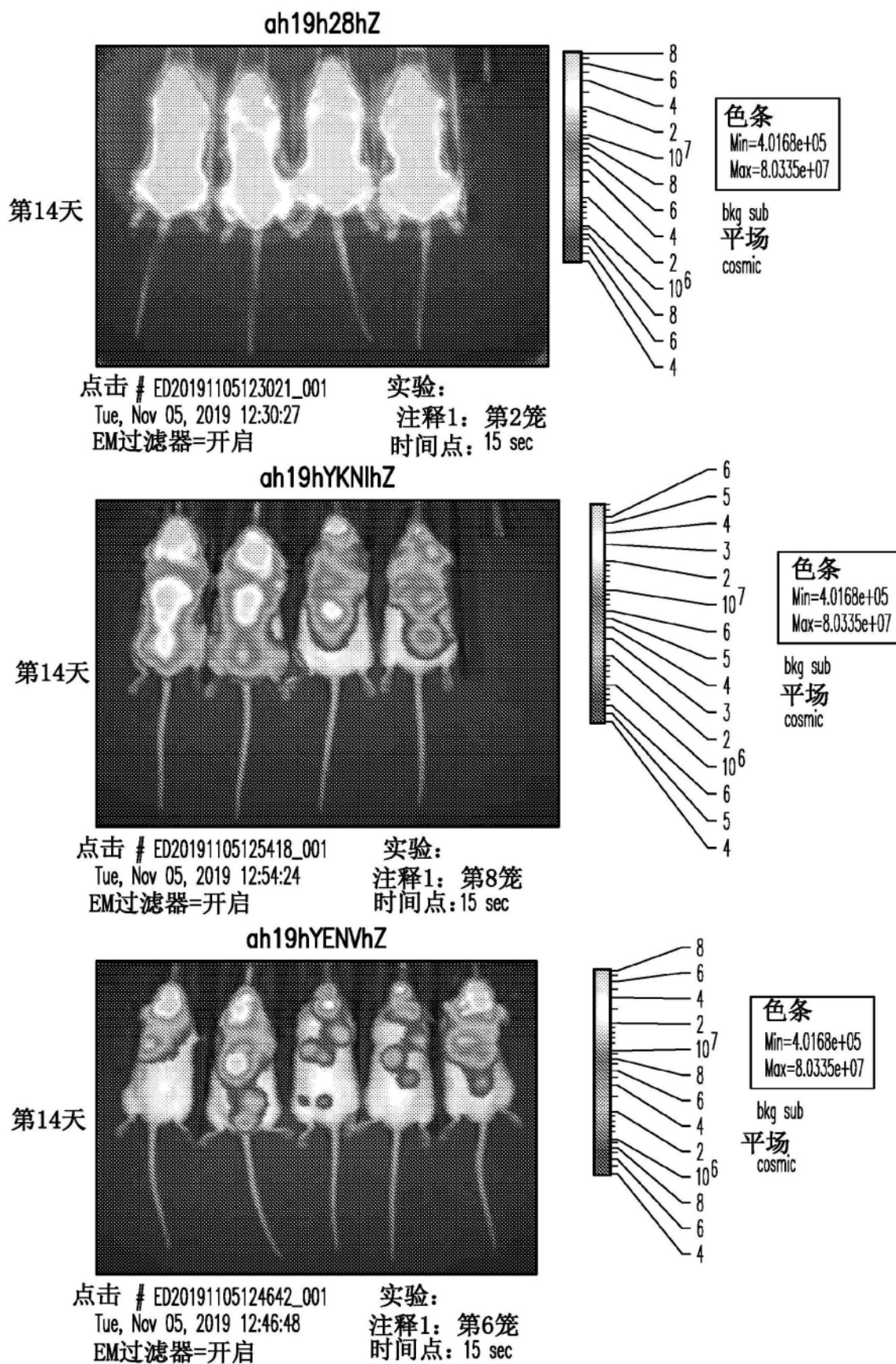


图18续

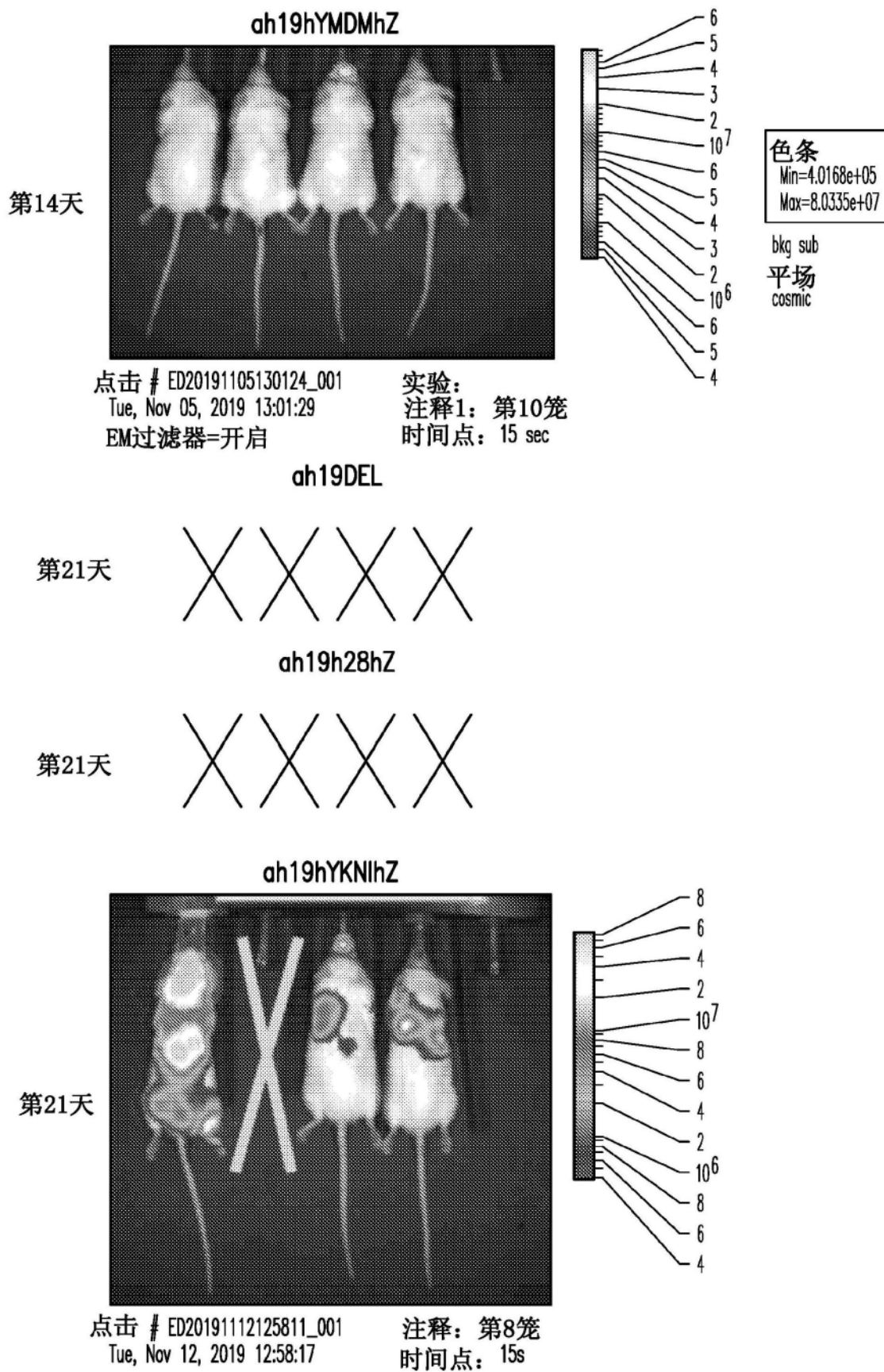


图18续

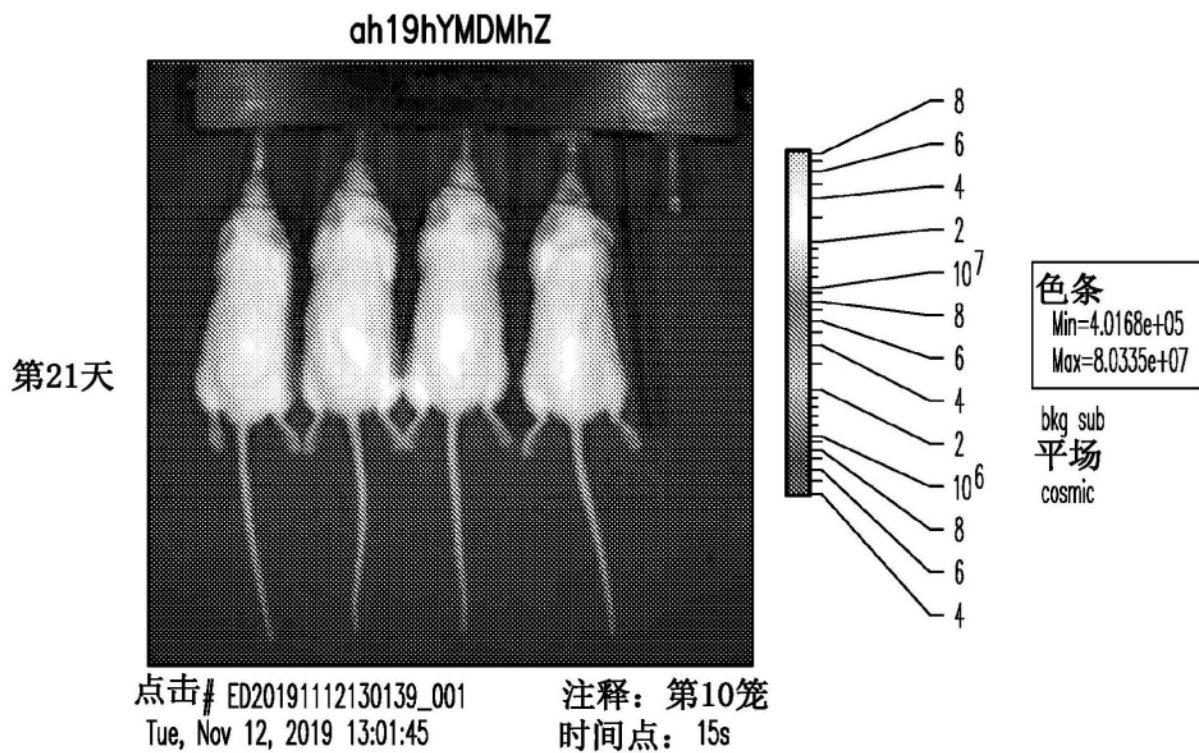
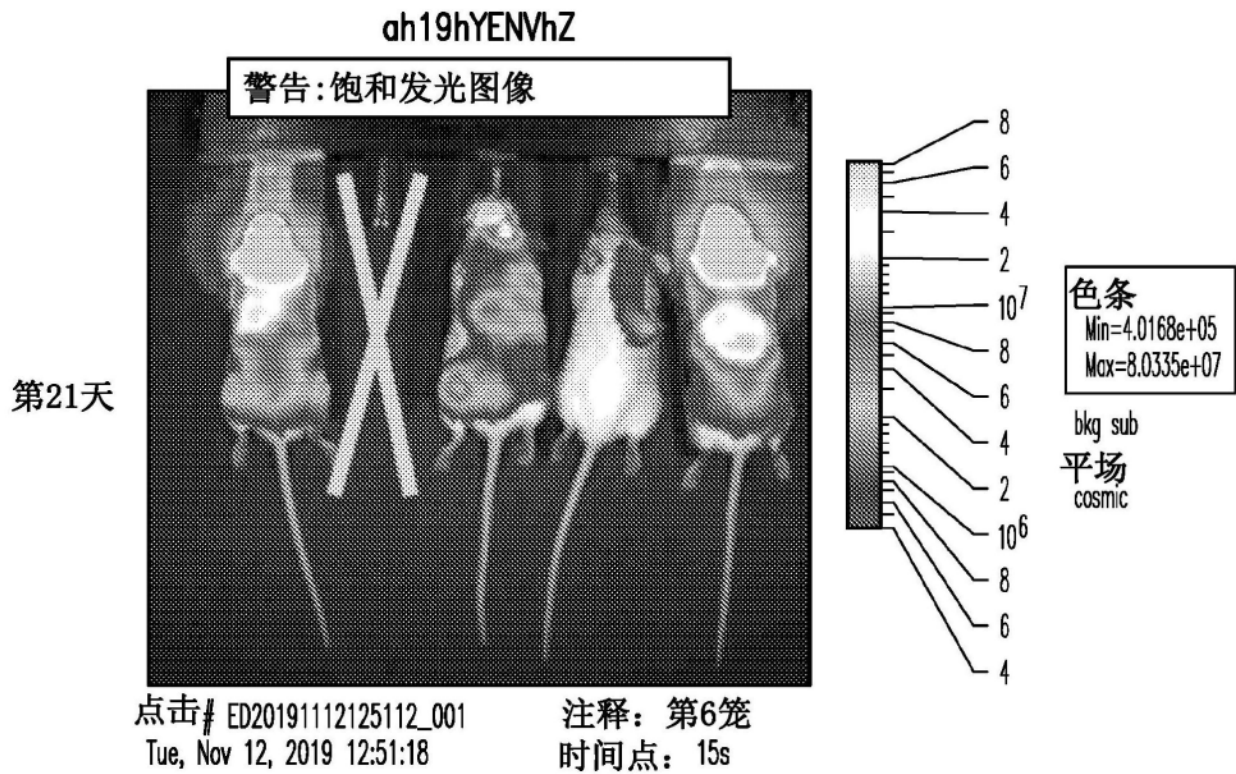


图18续

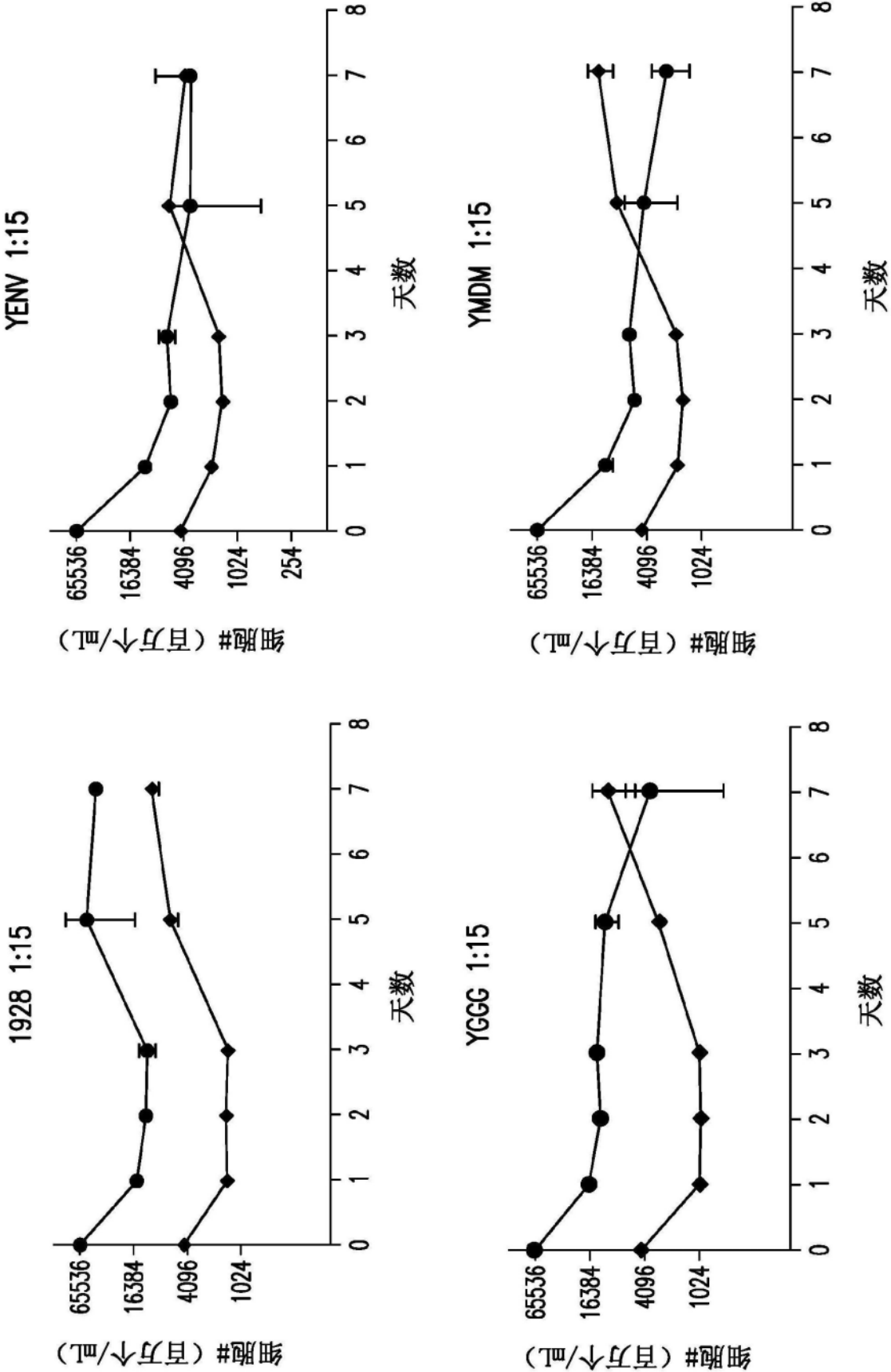


图19

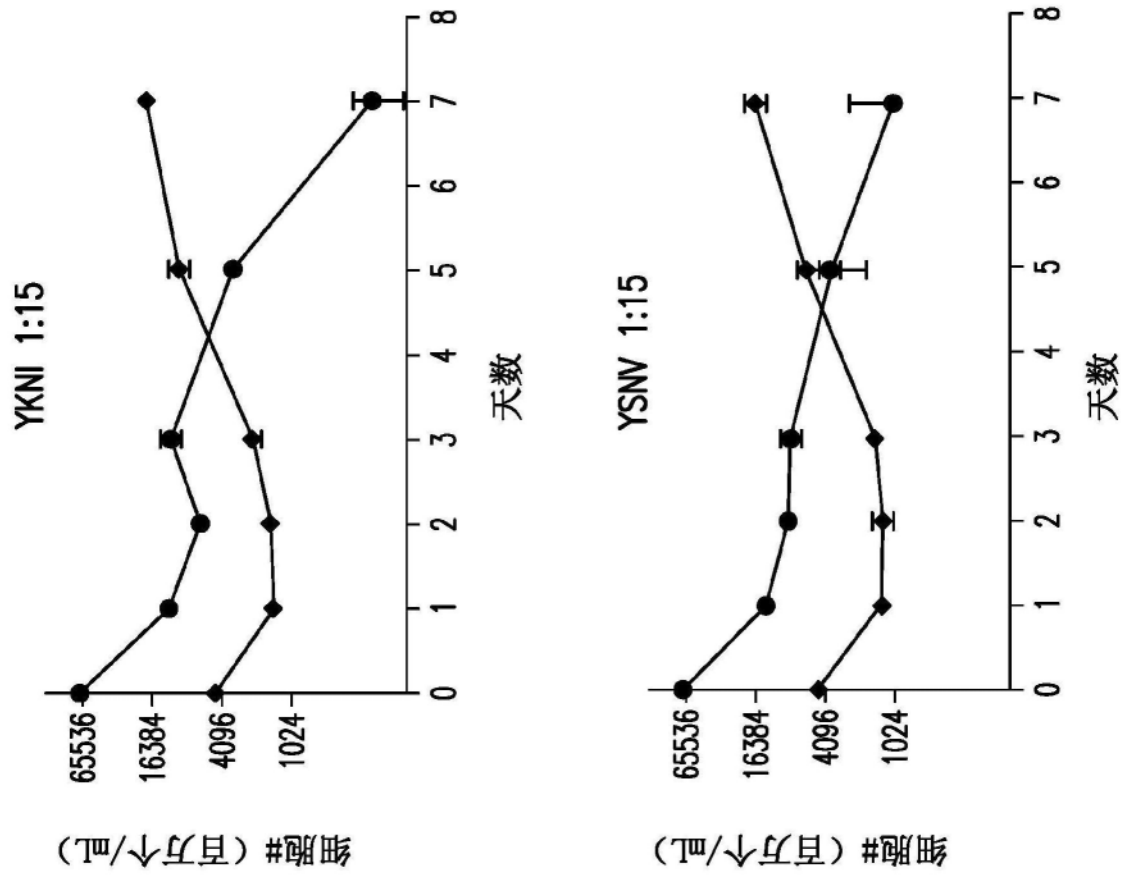


图19续

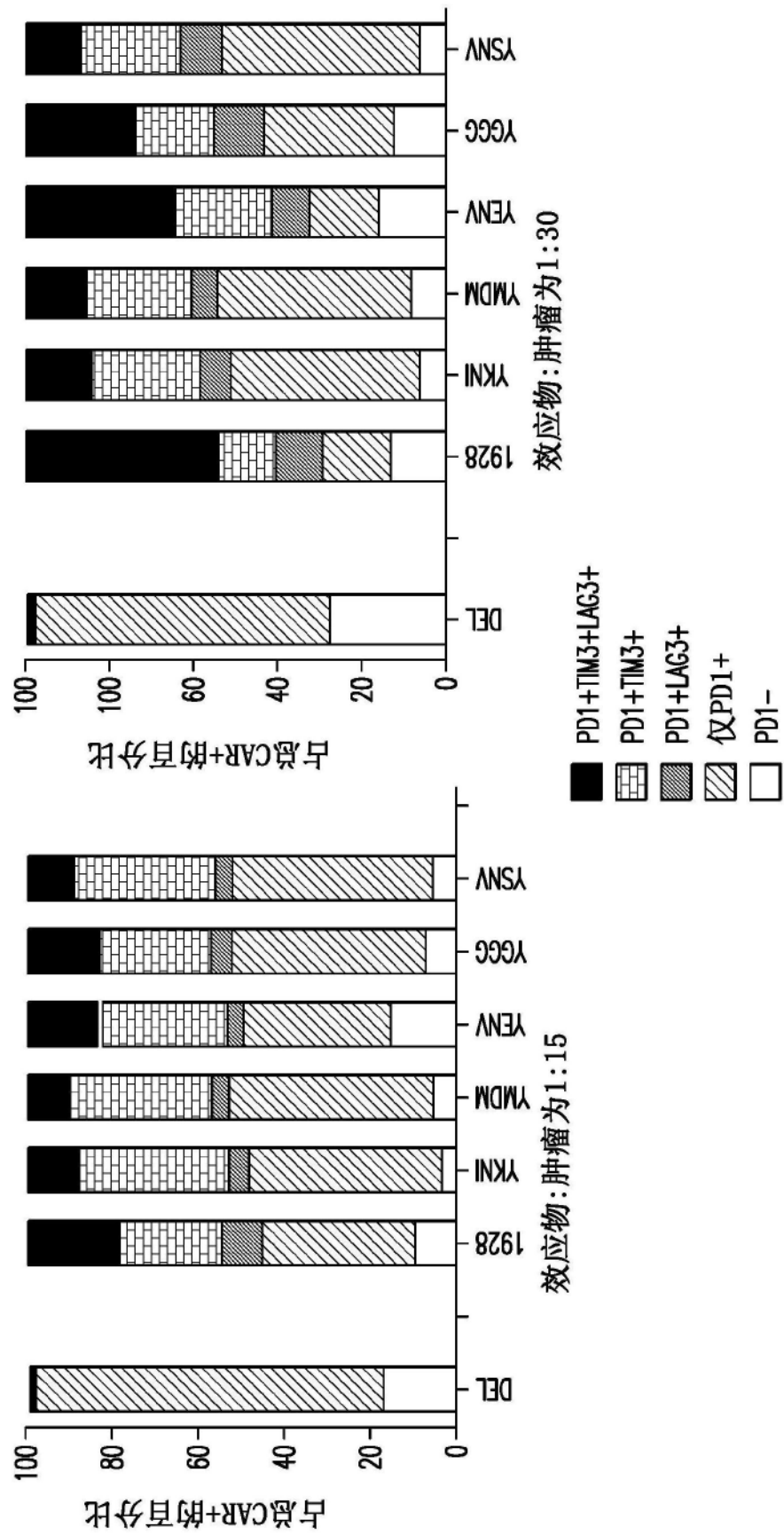


图20

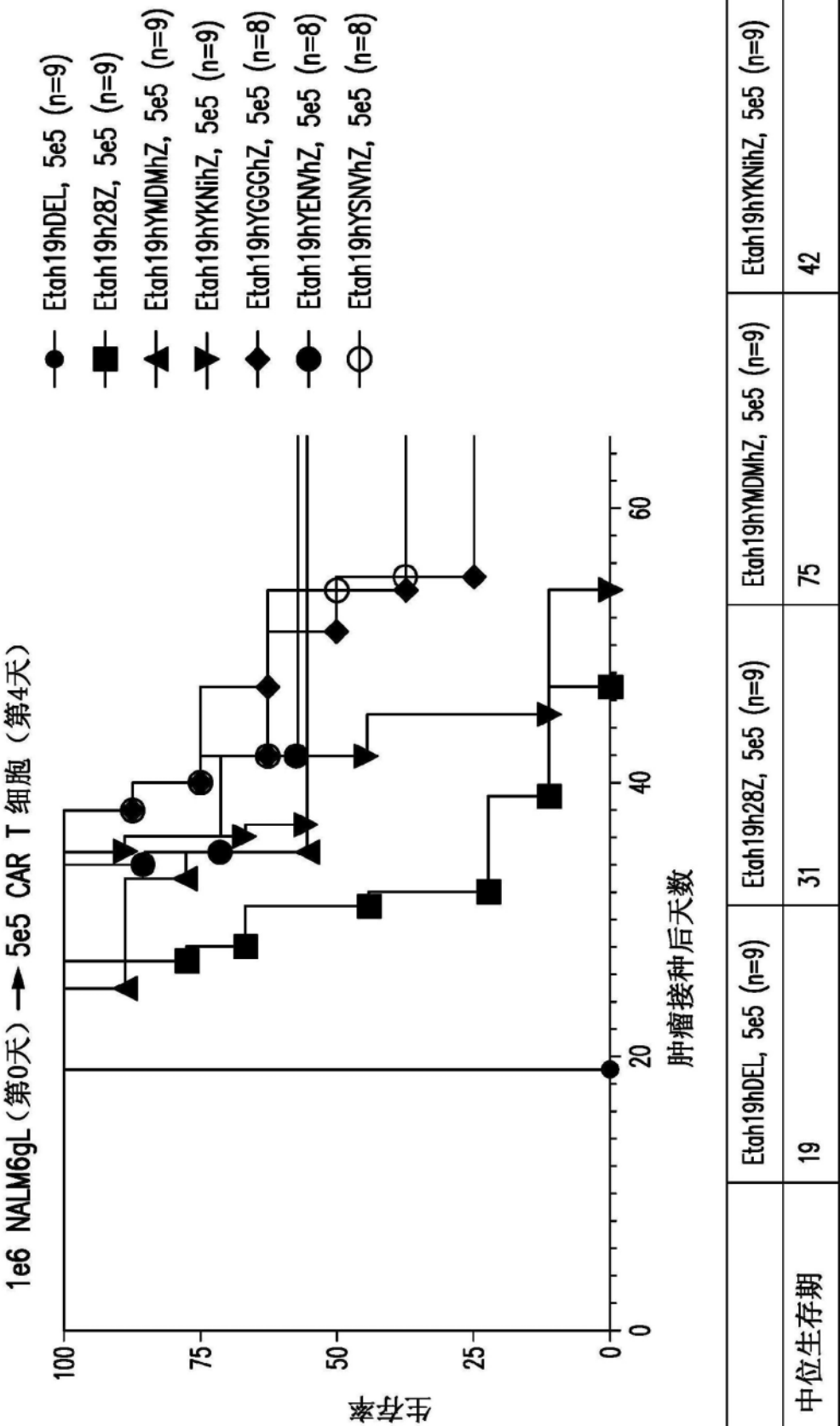


图21

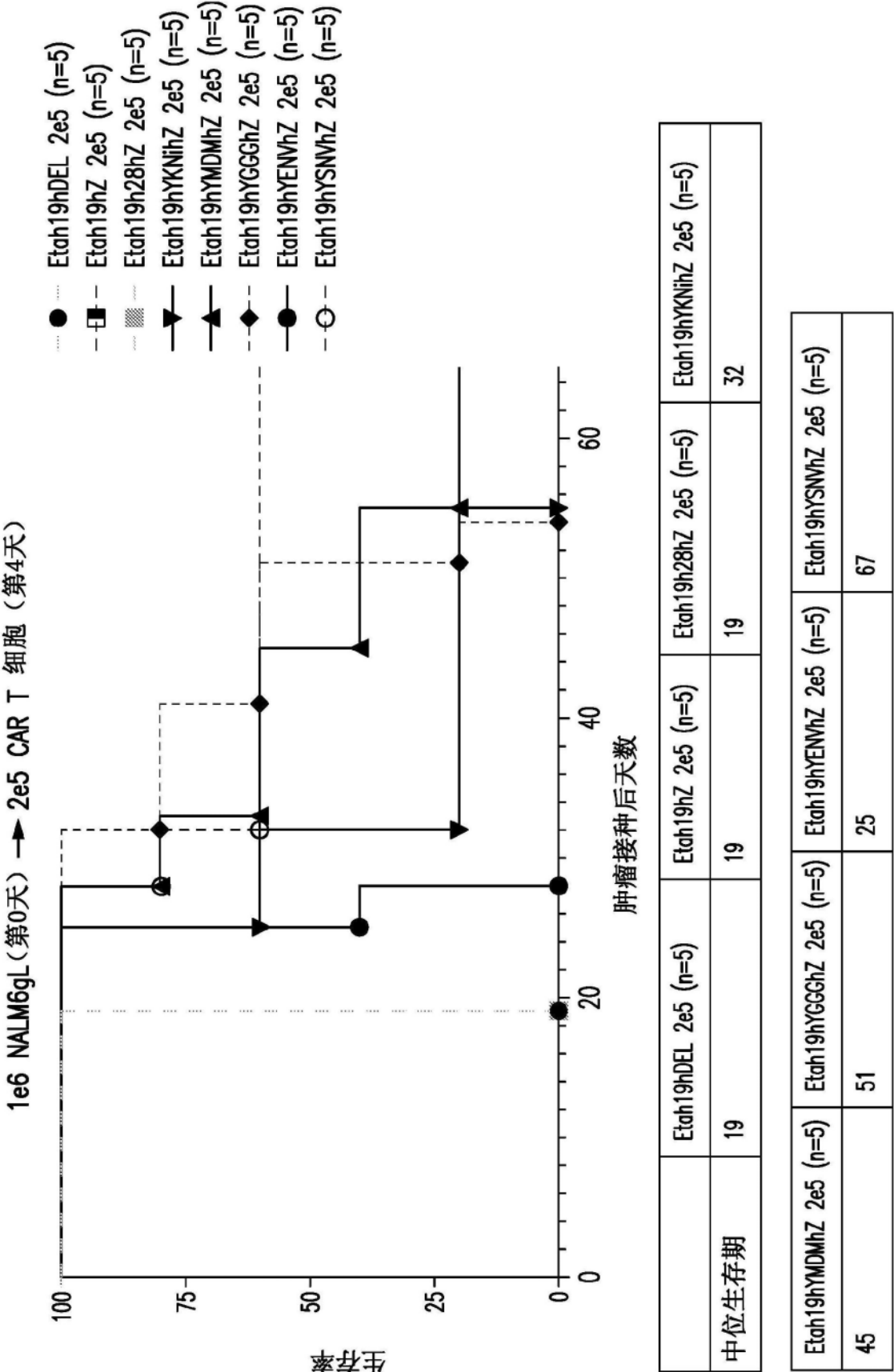


图22

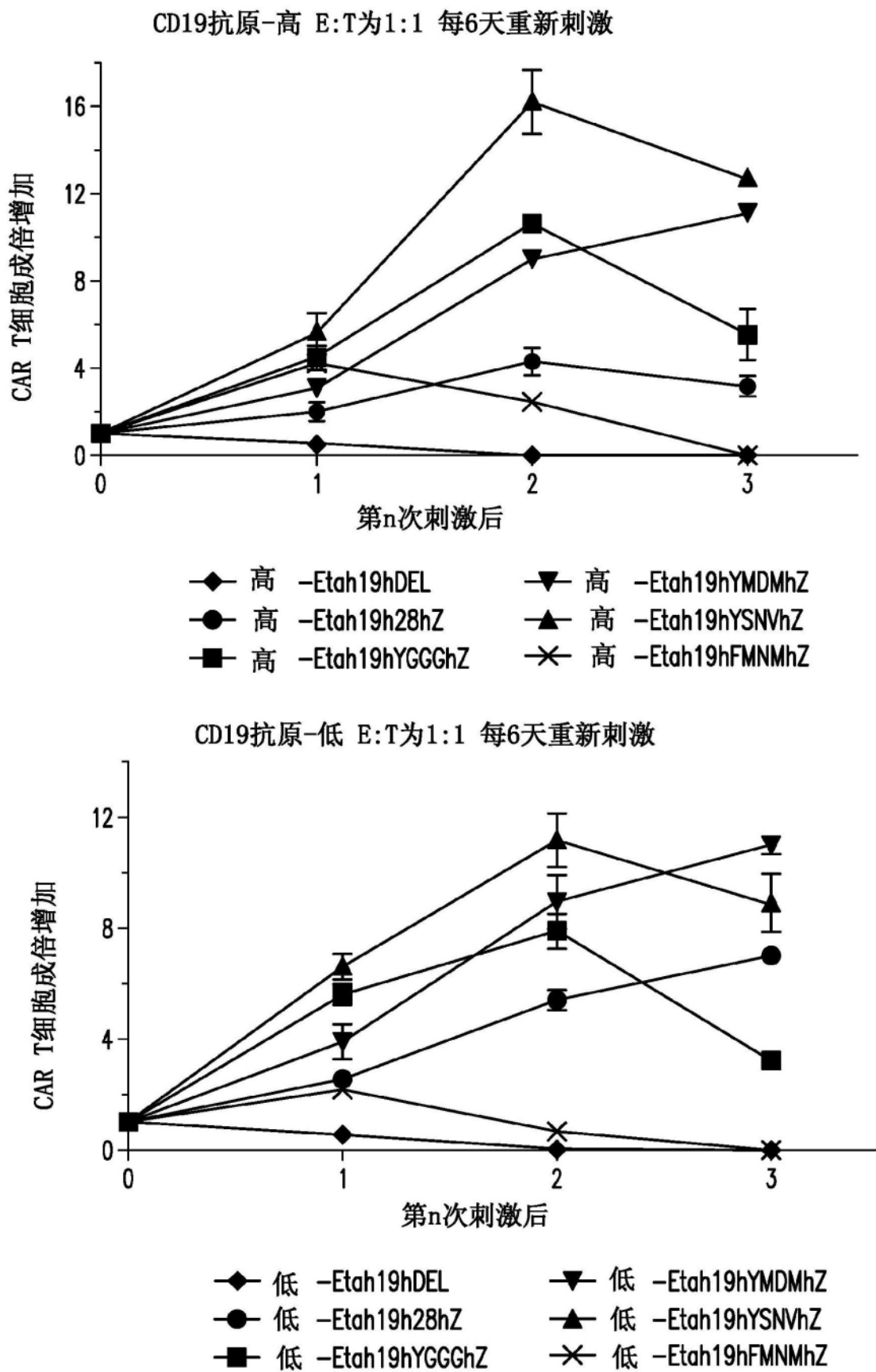


图23

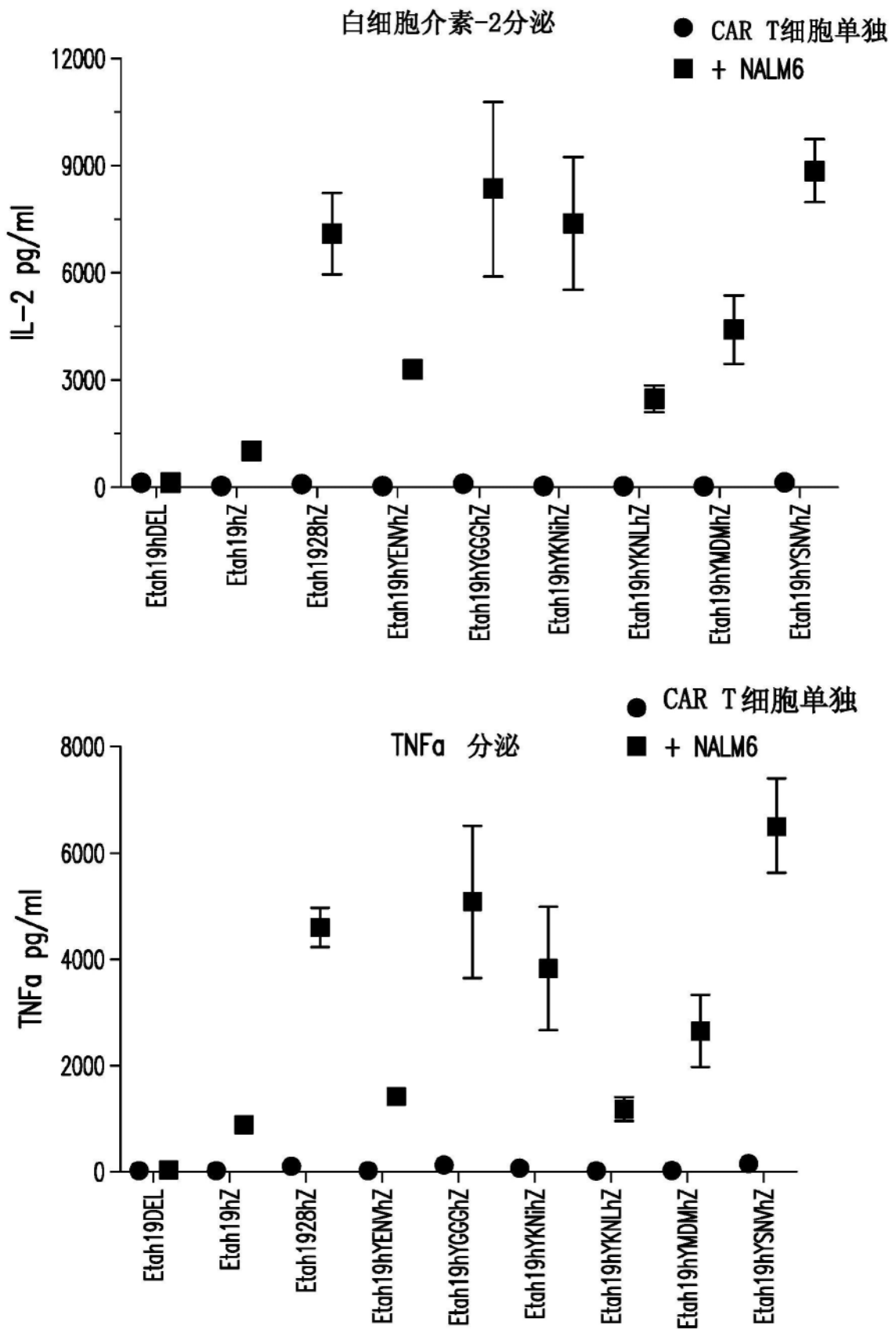


图24A

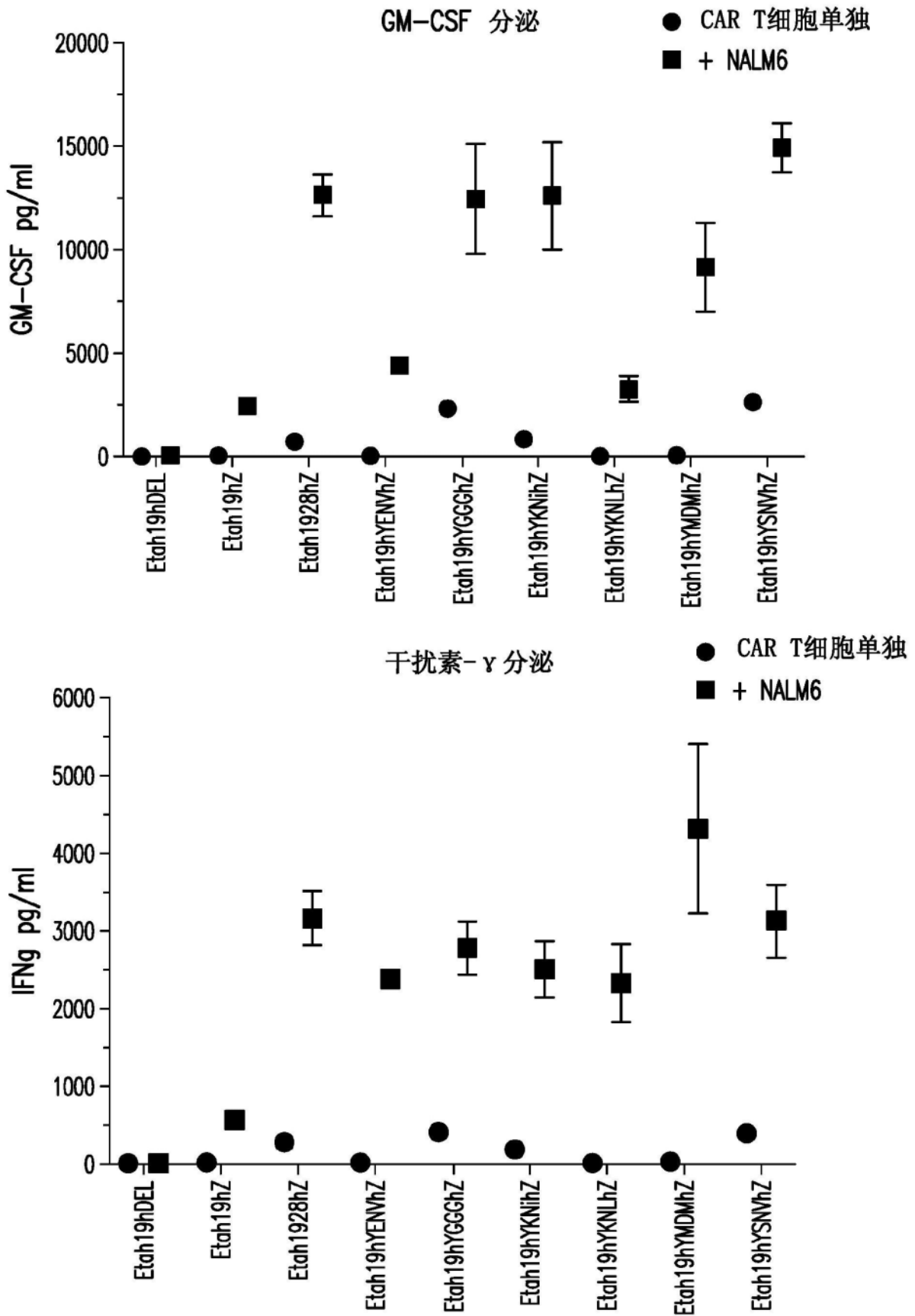


图24B

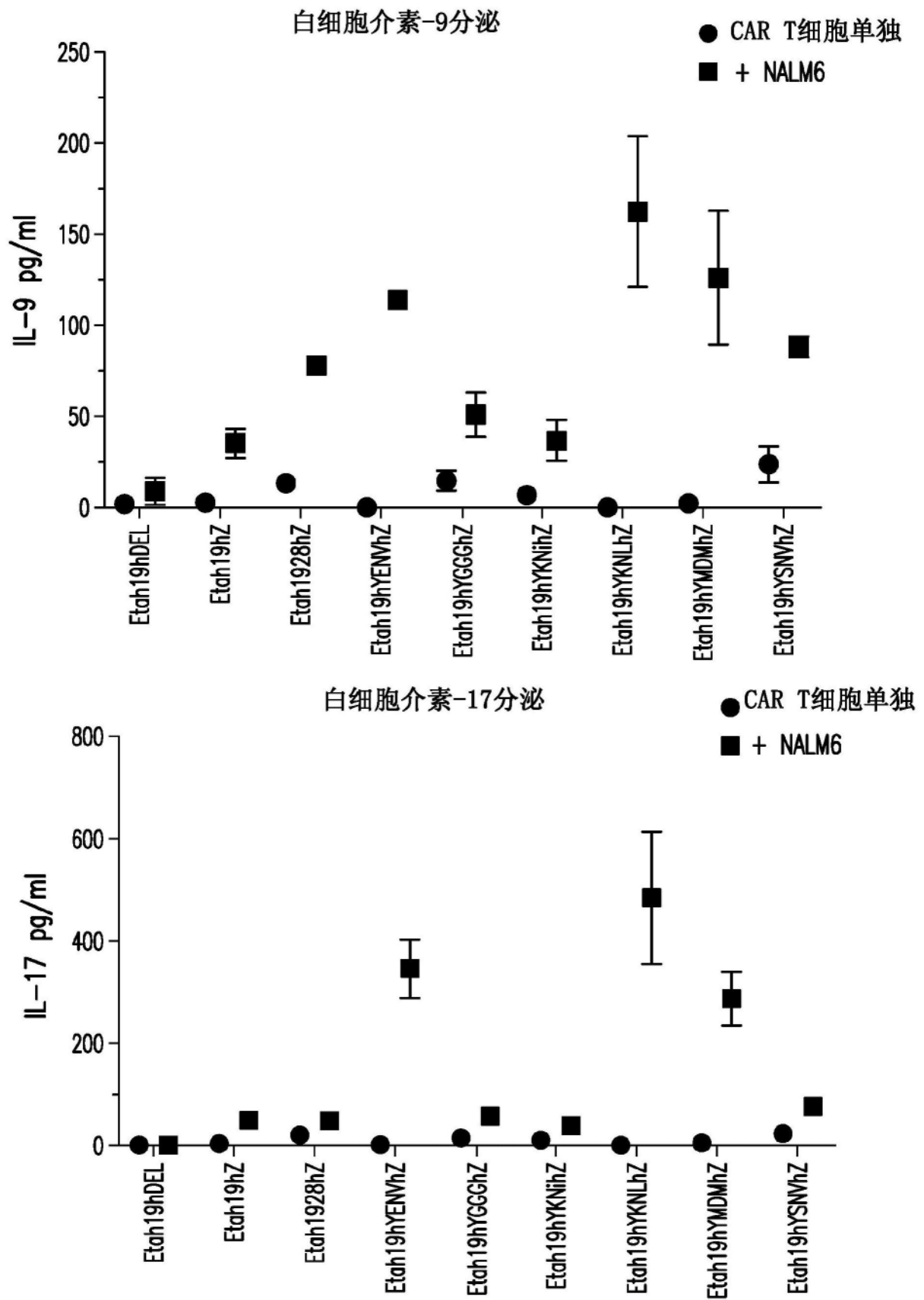


图24C